

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

BIOSYNTÉZA POLYHYDROXYALKANOÁTŮ U NESIRNÝCH PURPUROVÝCH BAKTERIÍ

BIOSYNTHESIS OF POLYHYDROXYALKANOATES IN NON-SULFUR PURPLE BACTERIA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Tomáš Fiala

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1909/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Tomáš Fiala**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biochemická technologie
Vedoucí práce: **prof. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Biosyntéza polyhydroxyalkanoátů u nesírných purpurových bakterií

Zadání bakalářské práce:

- Literární rešerše na téma metabolismus purpurových nesírných bakterií a charakterizace purpurových bakterií
- Optimalizace kultivačních podmínek u vybraných nesírných purpurových bakterií
- Analýza mikrobiálních kultur na úrovni genotypu s využitím PCR
- Analýza mikrobiálních kultur v kontextu obsahu PHA granulí

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2024:

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

Tomáš Fiala
student

prof. Ing. Stanislav Obruča,
Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřena na polyhydroxyalkanoáty (PHA) a jejich produkci pomocí nesírných purpurových bakterií, konkrétně *Rhodospirillum rubrum*. Proběhla optimalizace kultivačních podmínek pomocí a především stanovení vhodné koncentrace NaCl pro následující evoluční experimenty. U těchto vzorků byl zkoumán růst a produkce PHA pomocí plynové chromatografie s FID detektorem. Poté byl tento mikroorganismus dlouhodobě pasážován o vysoké koncentraci NaCl (40 g/L). Kultivace probíhala v systému pasáží s 48 h intervalem mezi přeočkováním za aerobních podmínek ve tmě. U takto kultivovaných vzorků byla stanovena produkce biomasy a PHA pomocí plynové chromatografie s FID detektorem. Jako poslední experiment byla provedena PCR analýza pro test genů *16S rRNA* a *phaC*. Závěrem práce je provedení úspěšné adaptace *R. rubrum* na koncentraci 40 g/l NaCl. Dále byl prokázán pozitivní vliv stresového podnětu na zvýšenou produkci PHA u bakterie *Rhodospirillum rubrum*.

Klíčová slova

Nesírné purpurové bakterie, *Rhodospirillum rubrum*, polyhydroxyalkanoáty, evoluční inženýrství, osmotický stres, plynová chromatografie, PCR

ABSTRACT

This bachelor thesis focuses on polyhydroxyalkanoates (PHA) and their production using non-sulfur purple bacteria, specifically *Rhodospirillum rubrum*. The cultivation conditions were optimized especially with respect to the determination of NaCl concentrations for the following evolution experiments. Then this microorganism was repeatedly cultured at a high concentration of NaCl (40 g/L). Passage system was used in this cultivation with 48 h between inoculations under aerobic conditions in the dark. In the samples cultivated in this way, the growth rate was investigated using optical density and the amount of biomass and PHA using gas chromatography with an FID detector. As the last experiment PCR analysis was performed to test the *16S rRNA* and *phaC* genes. The conclusion of the work is the successful adaptation of *R. rubrum* to a concentration of 40 g/l NaCl. Furthermore, the positive effect of stress stimulus on the increased PHA production was proven.

Key words

Non-sulfur purple bacteria, *Rhodospirillum rubrum*, polyhydroxyalkanoates, evolutionary engineering, osmotic stress, gas chromatography, PCR

Bibliografická citace

FIALA, Tomáš. *Biosyntéza polyhydroxyalkanoátů u nesírných purpurových bakterií*. Brno, 2024. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156623>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Stanislav Obruča.

Prohlášení

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

.....

podpis studenta

Poděkování

Rád bych poděkoval mému vedoucímu, prof. Ing. Stanislavovi Obručovi Ph.D. za vedení celé bakalářské práce, tipy rady a pomoc v celém procesu. Dále bych chtěl také poděkovat své konzultantce, Ing. Viktorii-Alexandře Pacasové za trpělivost, veškerou pomoc při měření a zhotovení práce. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat rodině a přátelům za podporu během mého dosavadního studia.

Obsah

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Polyhydroxyalkanoáty	9
2.1.1	Charakteristika	9
2.1.2	Struktura PHA	9
2.1.3	Biosyntéza PHA	10
2.1.4	Biodegradace PHA	11
2.1.5	Praktické využití	12
2.2	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	13
2.2.1	Struktura a vlastnosti	13
2.2.2	Metabolismus	14
2.2.3	Polyhydroxyalkanoáty a odpověď na stresové podněty	18
2.3	Evoluční inženýrství a adaptace	24
2.3.1	Mutagenese	24
2.3.2	Genová evoluce	25
2.3.3	Adaptivní laboratorní evoluce	26
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
3.1	Mikroorganismy, chemikálie, přístroje	28
3.1.1	Mikroorganismy	28
3.1.2	Použité chemikálie	28
3.1.3	Použité přístroje.....	31
3.2	Kultivace <i>R. rubrum</i>	31
3.2.1	Optimalizace kultivace	31
3.2.2	Evoluční inženýrství.....	32

3.2.3	Finální kultivace	32
3.3	Stanovení biomasy	32
3.3.1	Spektrofotometrické stanovení biomasy	32
3.3.2	Gravimetrické stanovení biomasy	33
3.4	Stanovení obsahu PHA pomocí plynové chromatografie s FID detektorem	33
3.4.1	Příprava vzorků	33
3.5	PCR	33
3.5.1	Izolace DNA	33
3.5.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	34
3.5.3	Agarózová gelová elektroforéza	34
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	36
4.1	Optimalizace podmínek pro kultivaci <i>R. rubrum</i>	36
4.1.1	Stanovení množství biomasy a PHA	37
4.2	Evoluční inženýrství <i>R. rubrum</i>	38
4.2.1	Stanovení množství biomasy a PHA	40
4.3	Kultivace adaptovaného kmene v rozdílných koncentracích soli	41
4.4	Polymerázová řetězová reakce	43
5	Závěr	45
	CITACE	47
	Použité zkratky	55

1 ÚVOD

Plasty jsou důležitou součástí dnešní společnosti, a proto stejnou mírou dnešní společnost ovlivňuje i jimi zapříčiněné znečištění životního prostředí. V dnešní době jsou klasické konvenční plasty z velké části vyráběny petrochemickým způsobem z ropy a nejsou v přírodě degradovatelné. Pouze erodují na mikroplasty, které se následně nacházejí v přírodě, rostlinách a živočiších. Z toho důvodu jsou momentálně jedním z největších polutantů životního prostředí na světě, s produkcí 353 milionů tun odpadu každý rok.

Jedním z možných řešení pro tuto krizi je využití biodegradabilních plastů, které jsou mikroorganismy daného prostředí rozkládány na látky přírodě neškodlivé. V dnešní době se již využívají varianty bioplastů například polymer kyseliny mléčné PLA, z kterého se vyrábí jednorázové nádoby, lékařské potřeby, zemědělské fólie atd. Dalším možným kandidátem z této kategorie biologicky rozložitelných plastů jsou polyhydroxyalkanoáty (PHA). Polyhydroxyalkanoáty jsou momentálně zkoumaná skupina polymerů, kdy dle dosavadního výzkumu vykazují skvělé vlastnosti poukazující na jejich potenciální využití v mnoha průmyslových odvětvích. Největší problém PHA je jejich výrobní cena. Z důvodu jejich biotechnologické produkce, což obnáší rizika ve formě cenově náročných substrátů, nároků na sterilaci a následně i šance nižších výtěžků jsou náklady na průmyslovou produkci PHA vysoké. Z toho důvodu se hledají způsoby, jak zlevnit tento proces a jedním z těchto způsobů je zkoumání možných nových mikrobiálních producentů a jejich schopnost přežití a produkce za určitých podmínek.

Právě jednou skupinou producentů jsou nesírné purpurové bakterie, do které patří i bakterie *Rhodospirillum rubrum*, která je zajímavá schopností produkce různých polymerů a svým univerzálním metabolickým aparátem umožňující různé kultivační podmínky. Právě tato práce je zaměřena na zkoumání schopnosti *R. rubrum* růst a produkovat PHA v podmínkách mimo její optimum. Extrémní podmínky by mohly být cestou ke snížení nároků a nákladů na sterilitu prostředí a tím pádem i celého kultivačního procesu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Polyhydroxyalkanoáty

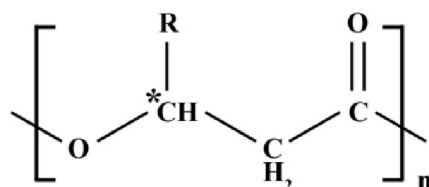
2.1.1 Charakteristika

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) se řadí mezi polyestery, které jsou v přírodě produkovány řadou mikroorganismů. Zatím bylo potvrzeno okolo 300 druhů mikroorganismů, které jsou schopné produkce a akumulace PHA v cytoplazmě ve formě granulí PHA a mají pro mikroorganismy primárně funkci jako zásobárny uhlíku a energie. Syntéza PHA je katalyzována hlavně v případě nadbytku uhlíku a nedostatku ostatních živin, jako např. dusíku nebo fosforu. U mnohých producentů byla také prokázána protektivní funkce PHA vůči vystavení stresorům vnějšího prostředí (např. osmotickému tlaku nebo nepříznivým teplotám), z toho důvodu lze vystavením těmto stresorům zvýšit produkci PHA.

PHA začalo být zkoumáno z důvodu jejich mechanických vlastností, které jsou v mnoha případech obdobné petrochemickým plastům. Hlavním rozdílem je jejich biodegradabilita v přírodě na oxid uhličitý s vodou a biokompatibilita, díky které je možné PHA využít např. i v medicíně či kosmetice. Doba rozkladu PHA se pohybuje v rozmezí 3 až 18 měsíců v závislosti na podmínkách prostředí, ve kterém dochází k rozkladu a typu monomeru, ze kterého je dané PHA složeno [1, 2].

2.1.2 Struktura PHA

PHA jsou lineární polymery hydroxyalkanových kyselin spojených esterovou vazbou. Existuje více než 150 možných monomerů s lineární, větvenou, nasycenou, nenasycenou nebo aromatickou strukturou, kde rozdílné struktury a monomery poskytují rozdílné mechanické vlastnosti výslednému polymeru.



Obrázek 1 – Obecný vzorek PHA, převzato a upraveno [3]

PHA dělíme do 3 skupin podle délky bočního řetězce, který je na obrázku 1 značen písmenem R. Dělíme je na PHA s krátkým řetězcem (tzv. „short-chain length PHA“, *scl*-PHA), do kterých můžeme zařadit např. poly-3-hydroxybutyrát P(3HB), poly-3-

hydroxyvalerát P(3HV), které mají v řetězci méně než 6 atomů uhlíku. Dále jsou PHA se středně dlouhým řetězcem (tzv. „medium-chain length PHA“, *mcl*-PHA), které disponují 6–14 atomy uhlíku v řetězci a jako poslední jsou PHA s dlouhým řetězcem (tzv. „long-chain length PHA“, *lcl*-PHA) s více než 14 atomy uhlíku v řetězci. *Scl*-PHA jsou krystalické, tuhé a křehké s nízkou mechanickou pevností a vysokou teplotou tání, což je limituje v možné aplikaci pro průmyslové využití. S *mcl*-PHA můžeme najít větší diversitu vlastností a využití, kvůli elastickým vlastnostem, nízké teplotě tání a méně krystalické struktuře. Při produkci kopolymerů s různými monomerními jednotkami záleží na typu mikroorganismu, prostředí, metabolické dráze, kterou je PHA syntetizováno, uhlíkovém zdroji a dalších faktorech [4, 5].

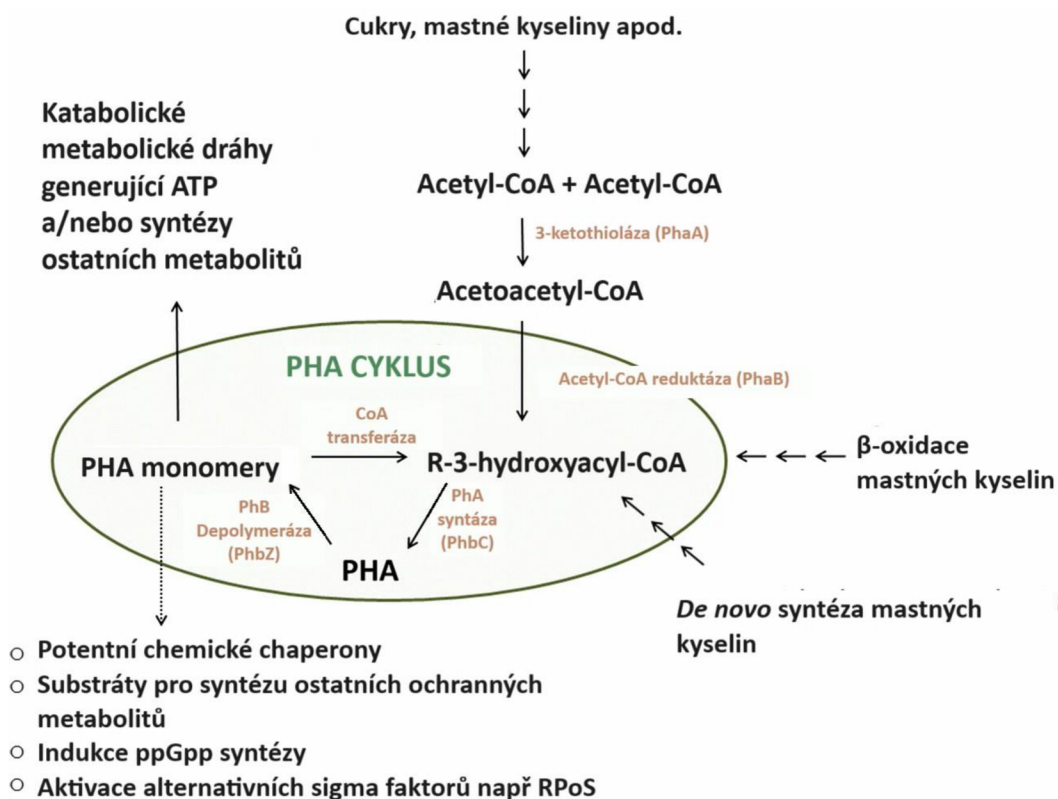
Mezi nejvíce prozkoumané PHA patří polyhydroxybutyrát P(3HB) z důvodu jeho objevení jakožto prvního PHA v bakterii, když je objevil francouzský vědec Lemoigne v roce 1926 během studie bakterie *Bacillus megaterium* [6]. P(3HB) je avšak velmi tuhý a křehký materiál, z toho důvodu se zkoumají nejrůznější možnosti jak tyto vlastnosti optimalizovat. Jako druhý vhodný kandidát k průmyslovému využití je zkoumán kopolymer z P(3HB) a polyhydroxyvalerátu (P(3HB-co-3HV)), nebo kopolymer z P(3HB) a 4-hydroxybutyrátu (P(3HB-co-4HB)), které jsou více elastické než samotný P(3HB). Kombinace *scl*-PHA s *mcl*-PHA dává vzniklým polymerům více elastické vlastnosti, které zvyšují možnosti jejich průmyslové využití [2].

2.1.3 Biosyntéza PHA

PHA jsou syntetizovány v případě dostatečného množství uhlíkatého substrátu, a nedostatku primárně dusíku, nebo fosforu, kdy následně slouží jako zdroj uhlíku a energie pro své producenty. Granule PHA s velikostí 0,2-0,5 μm jsou skladovány uvnitř mikroorganismu. Granule jsou tvořeny z více vrstev, kdy každá z nich má rozdílné vlastnosti. Vnitřní vrstva se skládá z hydrofobního jádra polyesteru PHA. Původní představa o struktuře byla tvořena převážně pomocí fosfolipidů, které tvořily vnější hydrofilní vrstvu. Později bylo zjištěno, že obal se skládá z amfifilního proteinu, který tvoří ochrannou vrstvu před hydrofilním prostředím cytoplasmy a zaručuje granulím lepší kompatibilizaci [7].

Metabolická dráha biosyntézy *scl*-PHA se skládá ze tří enzymaticky katalyzovaných reakcí. Mezi dané enzymatické katalyzátory patří 3-ketothioláza, acetyl-CoA reduktáza a jako poslední P(3HB) syntáza [7]. Acetyl-CoA bakterie získávají zpracováním substrátu, kde záleží na jeho druhu (tzn. sacharidy, lipidy, aj.) pro následnou volbu metabolické dráhy. β -oxidace

mastných kyselin je prvním z možných metabolických drah, kde po navázání CoA do řetězce získá po odštěpení acetyl-CoA. Dalším způsobem může být oxidativní dekarboxylace pyruvátu z glykolýzy v dýchacím řetězci v mitochondriálním matrixu [8]. Jako první reakce v syntéze je kondenzace dvou acetyl-CoA za pomoci 3-ketothiolázy a výsledným produktem této reakce je acetoacetyl-CoA. Tento produkt je v další reakci redukován díky acetyl-CoA reduktázou na R-3-hydroxybutyryl-CoA. V poslední fázi je R-3-hydroxybutyryl-CoA polymerizován pomocí P(3HB) syntázy za vzniku P(3HB) a jako vedlejší produkt vznikne koenzym A, který je během toho procesu odštěpen od R-3-hydroxybutyryl-CoA. V buňce však neprobíhá pouze biosyntéza PHA, ale zároveň probíhá také jejich biodegradace pomocí P(3HB) depolymeráz, jakožto součást takzvaného „PHA cyklu“ během kterého jsou v neustálém procesu polymerovány a obnovovány PHA monomery [7].



Obrázek 2 - Metabolická dráha biosyntézy PHA s náznakem PHA cyklu, převzato a upraveno [7]

2.1.4 Biodegradace PHA

PHA jsou molekuly, které jsou degradovány svými producenty, případně ostatními mikroorganismy, které disponují enzymatickým aparátem pro jejich rozklad. Tato vlastnost je jedním z důvodů, proč se o PHA uvažuje jako o náhradě petrochemických plastů. Schopnost degradace PHA se nevyskytuje pouze u mikroorganismů, které jsou schopny PHA

produkovat. Degradaci PHA využívají houby, bakterie a mnoho dalších mikroorganismů napříč mnoha místy a ekosystémy. PHA degradující mikroorganismy byly nalezeny v půdě, kompostu, v kalu z čističek, ve sladké i slané vodě [9].

Mikroorganismy mohou PHA degradovat za intracelulárních i extracelulárních podmínek, taktéž za podmínek aerobních i anaerobních pomocí depolymeráz. Za anaerobních podmínek se rozkládá na metan a vodu, zatímco za aerobních podmínek se rozkládá na oxid uhličitý a vodu. Tyto depolymerázy enzymaticky hydrolyticky rozkládají esterovou vazbu polymeru na monomery a oligomery. Pomocí depolymeráz lze hydrolyzovat pouze esterové vazby v (R)-konfiguraci [9, 10].

Degradace PHA probíhá také jako součást PHA cyklu, který lze vidět na obrázku 2. V prvotním kroku je PHA hydrolyzováno pomocí PHA depolymerázy. Touto reakcí vzniká R-3-hydroxybutyrát, který je R-3-hydroxybutyrát dehydrogenázou přeměněn na acetoacetát [7, 9]. Acetoacetát je dále rozkládán β -ketothiolázou na acetyl-CoA. Za přítomnosti kyslíku je v citrátovém cyklu dále rozkládán až na CO_2 a H_2O [11]. Za anaerobních podmínek je dráhou β -oxidace rozkládán na CH_4 , CO_2 a H_2O [12].

2.1.5 Praktické využití

PHA je díky svým vlastnostem, které jsou podobné petrochemickým plastům, jedna z možností na nahrazení klasických plastů. Možná úprava jejich fyzikálně-chemických vlastností v závislosti na složení jednotlivých monomerů v polymeru z PHA tvoří extrémně variabilní alternativu. Tímto jsou využitelné ve většině průmyslových odvětví. Využití by mohly mít např. jako obalové materiály, v kosmetice, zdroj biopaliva, nanovláknna nebo ve tkáňovém inženýrství. Hlavní nevýhodou ohledně využití PHA je jejich cena, která je podstatně vyšší oproti petrochemickým plastům a jím podobným výrobkům [13].

Díky svým netoxickým vlastnostem jsou PHA zkoumány jako možné náhrady a výztuž v medicínských aplikacích. Za vlastnost biokompatibility vděčí PHA kyselině β -hydroxymáselné, také nazývané 3-hydroxybutyrát, která se přirozeně vyskytuje v lidské krvi v koncentracích 0,3-1,3 mM [14]. *Mcl*-PHA s vyšší měkkostí, jako například kopolymer P(3HB-co-3HV), jsou využívány jako scaffoldy pro regeneraci pokožky. Kopolymer P(3HB-co-4HB) je možné využít při operacích cév a srdečních komor díky jeho amorfním a elastickým vlastnostem [12]. Další možné využití je při regeneraci buněk kostní dřene

a kostní tkáň. V tomto využití byl při testování nejvíce kompatibilní kopolymer P(3HB) a 3-hydroxyhexanoátu P(3HB-co-HHX). Pak díky hydrofobním vlastnostem je možno využít jako přenašeče léčiv na místo potřeby v těle [15]. Nejvíc pozornosti však budí schopnost PHA nacházet rakovinné buňky pomocí specifických proteinů. Z tohoto hlediska je tedy možné využití pro detekci rakoviny [12].

Možnost biodegradability pomocí mikroorganismů je největší rozdíl oproti petrochemickým plastům, které by mohli být bioplasty, jako je PHA, nahrazeny. P(3HB), P(3HB-co-3HV) a směsi PHA/P(3HB) s kyselinou polymléčnou (PLA), termoplastickým škrobem mají vysokou odolnost vůči vodě, viditelnému světlu, UV záření a oxidativním procesům, kterým jsou obalové materiály ve velké míře vystavované. Díky lamelární sktruktuře P(3HB) jsou také dostatečně odolné vůči plynům s paropermeabilitou okolo 560 g/m²/den. Díky tomu byly PHA využity jako obalové materiály pro suroviny s kratší dobou skladovatelnosti. Největší nevýhoda využití jako obalové materiály je opět cena výroby [14, 15]. Další možnost zakomponování potravinářského průmyslu do produkce PHA je využití potravinářských odpadů, jejichž každoročně vzniká obrovské množství, například slupky, odpadní rostlinný olej apod. Mikroorganismy produkující PHA využívají takové látky jako substrát nebo zdroj energie. Tímto způsobem je možné snížení množství potravinářského odpadu a zlevnit výrobní cenu PHA jakožto obalových materiálů [15].

2.2 *Rhodospirillum rubrum*

2.2.1 Struktura a vlastnosti

Rhodospirillum rubrum je mezofilní G⁻ nesírná bakterie s teplotním optimem mezi 25–30 °C. Bakterie *Rhodospirillum rubrum* je fakultativně anaerobní bakterie spirochetního tvaru s mnohovrstvými vnějšími obaly. Je schopna růst fotoautotrofně, fotoheterotrofně i fotomixotrofně. Uvnitř buněk lze pozorovat přítomnost chromatoforů, což jsou zploštělé disky obsahující barviva jako např. bakteriochlorofyl umožňující fotosyntézu absorpcí světelného záření a karotenoidy [16, 17, 18]. V chromatoforech se také vyskytuje elektron transportní řetězec pro tvorbu ATP [19]. V aerobním prostředí je *Rhodospirillum rubrum* bezbarvá, díky inhibici fotosyntézy kyslíkem. V anaerobním prostředí získává díky probíhající fotosyntéze červenou barvu způsobenou produkcí a akumulací karotenoidů, bakteriochlorofylu *a* a ostatních barviv v chromatoforech [20].

Rhodospirillum rubrum je fakultativně anaerobní mikroorganismus, což znamená, že je schopna změny metabolických drah v závislosti přístupu ke kyslíku. V aerobních podmínkách využívá řetězec buněčného dýchání k obnově kofaktoru NAD^+/NADH přenosem elektronů [21]. Při anaerobní respiraci jsou alternativními akceptory elektronů dimethylsulfoxid, nebo trimethylaminoxid. Tato změna elektronových akceptorů umožní využití malátu, acetátu a sukcinátu jako růstových substrátů a zdrojů uhlíku. Z hlediska přeměny energie vykazovaly dimethylsulfoxid a trimethylaminoxid pouze 33-41% účinnost oproti kyslíku [22].



Obrázek 3 - *Rhodospirillum rubrum* [23]

Purpurové bakterie se dělí na sirmé a nesirmé, kde je jejich hlavní rozdíl v schopnosti metabolizovat síru. *Rhodospirillum rubrum* patří mezi nesirmé bakterie, v tom případě nevyužívá síru a sirmé sloučeniny jako donory elektronů pro jejich oxidaci při fotosyntéze. Purpurové nesirmé bakterie jsou schopné do určité míry síru využívat, ale vždy pouze z okolí a neuchovávají si sirmé sloučeniny uvnitř buňky. Místo sirmých sloučenin využívají organické sloučeniny jako malát nebo sukcinát [24].

2.2.2 Metabolismus

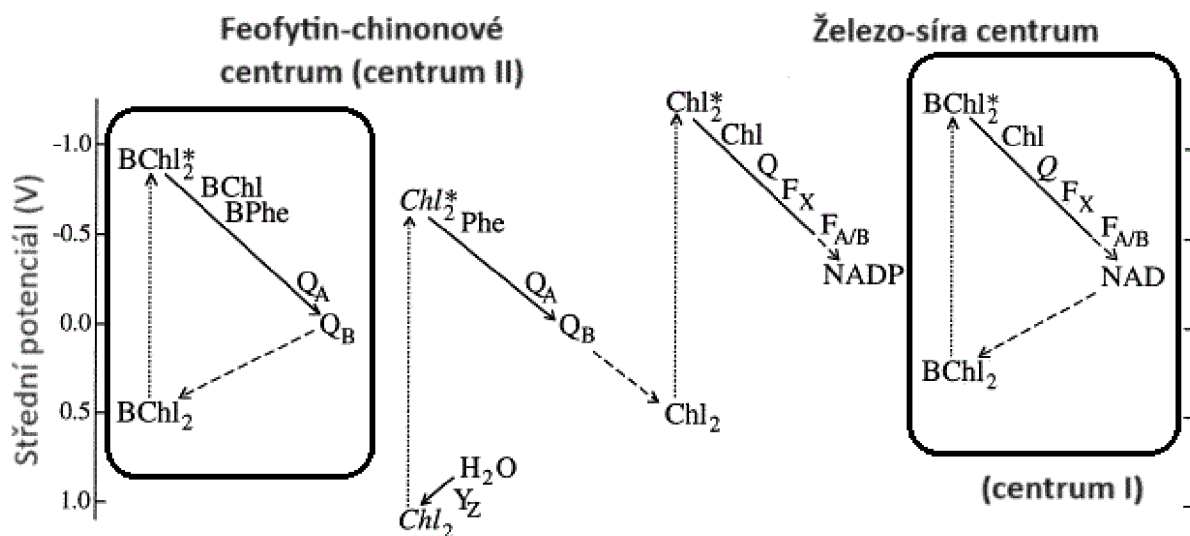
2.2.2.1 Anoxygenní fotosyntéza

Anoxygenní fotosyntéza je druh fotosyntézy, při které není využíván kyslík jako finální akceptor elektronů, tzn. probíhá bez přítomnosti kyslíku. U *Rhodospirillum rubrum* bývají tímto akceptorem organické sloučeniny [25].

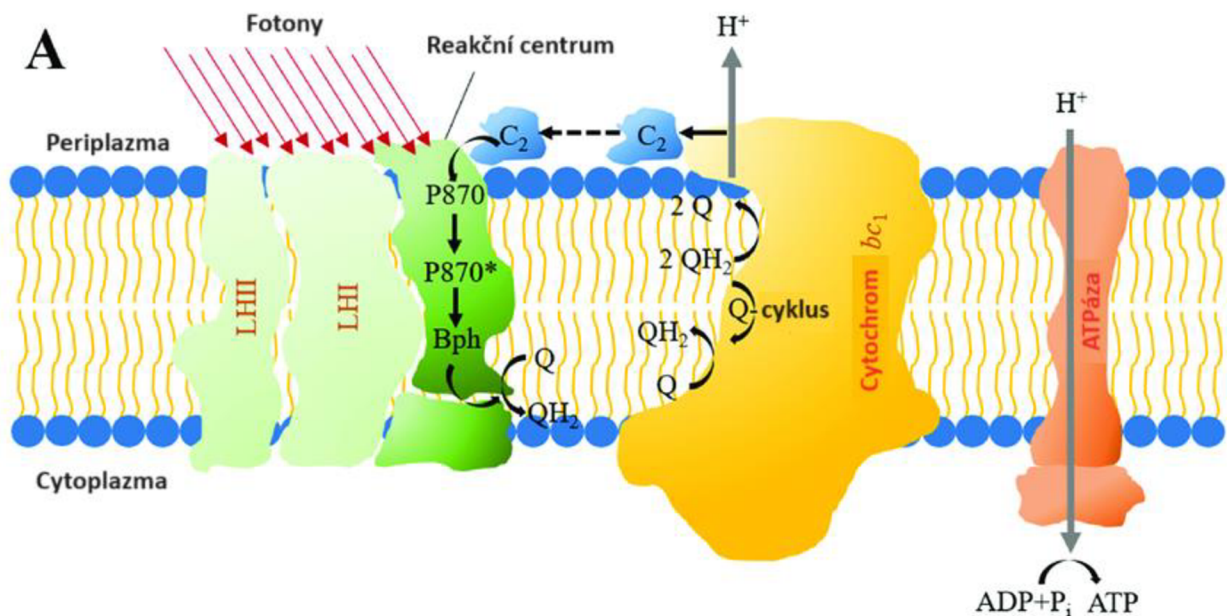
Organismy schopné fotosyntézy bez přítomnosti kyslíku využívají jiných redukčních činidel namísto vody, která je využívána u fotosyntézy s přístupem kyslíku, například vodík, síru, organické sloučeniny nebo jiné donory elektronů. Tato změna je způsobena odlišným fotopigmentem, kde místo chlorofylu využívají bakteriochlorofyl. Rozdílnost může způsobit přítomnost různých typů karotenoidů pro každý organismus [26].

Bakterie s tímto typem fotosyntézy disponují dvěma reakčními centry. První typ reakčního centra absorbující světlo o vlnové délce 840 nm využívá zelené sírné bakterie a druhý typ reakčního centra využívá purpurové bakterie, mezi které se řadí i *Rhodospirillum rubrum*. V každém centru je světlo absorbováno o jiné vlnové délce. Reakční centrum II absorbuje světlo o délce 870 nm, kdežto reakční centrum I absorbuje světlo o vlnové délce 840 nm. Dalším rozdílem je využití odlišných primárních akceptorů elektronů. Zelené sírné bakterie využívají chlorofyl a fylochinon s návazností na řadu Fe-S proteinů k přenašečům elektronů ferredoxinem a ferredoxin-NADP⁺ reduktázou na finální NAD [26, 27]

Pro purpurové bakterie včetně *Rhodospirillum rubrum* je absorbováno světlo o vlnové délce 870 nm, které je absorbováno pomocí světlosběrných komplexů. Poté je přeneseno do dimeru molekul bakteriochlorofylu 870 (BChl₂). Jakmile dosáhne dimer excitačního stavu, jsou elektrony přeneseny na bakteriochlorofyl (BChl), který slouží jako primární akceptor elektronů. Elektron je dále zachycen na bakteriofytin (BPhe) a následně předán na primární ubichinonový akceptor (Q_A). Z něhož jde elektron na sekundární ubichinonový akceptor (Q_B), který přijme dva takovéto elektrony a protony z cytoplasmy a přesune se do ubichinonového poolu (Q-cyklu). Sekundární akceptor Q_B je poté reoxidován komplexem cytochromu (bc₁), z kterého se elektron přesune do cytochromového komplexu (c₂) na obrázku 5, který jako finální krok tohoto cyklu reoxiduje dříve využitý dimer bakteriochlorofylu 870. Po absorpci dvou fotonů reakčním centrem jsou přesunuty čtyři protony do extracelulárního prostoru, které jsou následně využity pro syntézu ATP. ATP je tvořeno pomocí protonového gradientu, který vzniká v periplazmě díky danému cyklu a přesunu čtyř protonů H⁺ do periplazmatického prostoru. Tento gradient následně spouští protonovou hybnou sílu do cytoplasmy, která způsobí konformační změnu ATPázy a otevření kanálu zpět do cytoplasmy. Proud protonů následně roztočí hlavu ATPázy a díky tomu dochází k fosforylaci adenosindifosfátu (ADP) na adenosintrifosfát (ATP) [27].



Obrázek 4 - Reakční centra pro anoxygenní fotosyntézu, převzato a upraveno [27]



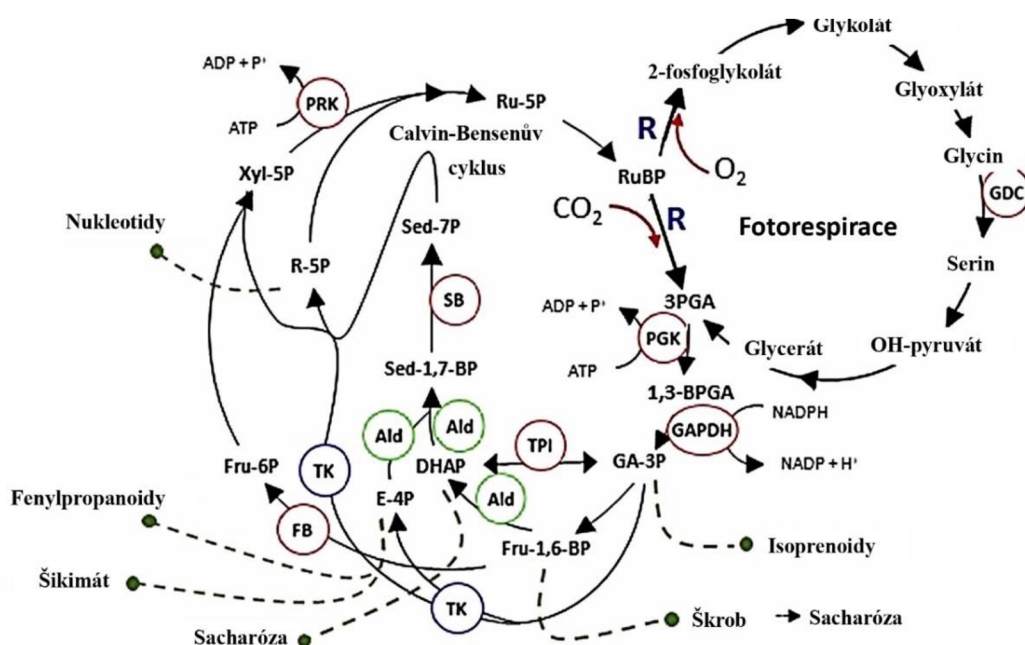
Obrázek 5- Schéma anoxygenní fotosyntézy a jejího spřažení v tvorbou ATP, převzato a upraveno [28]

2.2.2.2 Calvin-Benson-Basshamův cyklus (CBB)

Z důvodu schopnosti fotoautotrofního i fotoheterotrofního způsobu růstu využívá *Rhodospirillum rubrum* Calvin-Benson-Basshamův cyklus k fixaci CO₂ během růstu [29].

Celý cyklus se skládá ze 13 reakcí celkově katalyzovaných pomocí 11 enzymů a může být rozdělen na 3 katalytické fáze: karboxylaci, redukci a regeneraci. Celý cyklus začíná přijmutím 3 molekul CO₂ na ribulózu-1,5-bisfosfát (RuBP) pomocí enzymu Rubisco a ATP. Dochází ke vzniku 6 molekul 3-fosfoglycerátu (3PGA), který je následně fosforylován na 1,3-

bisfosfátglycerát (1,3-BPGA). Tato molekula redukována na glyceraldehyd-3-fosfát (GA-3P) za souběžné oxidace NADPH na NADP+H⁺. V tento moment se 1 z 6 molekul oddělí z cyklu a zbylých 5 pokračuje v regeneraci na původní RuBP. Z GA-3P se pomocí triózafosfát izomerázy dá izomerovat dihydroxyaceton-fosfát (DHAP). Tento krok je reverzibilní z důvodu závislosti na dalším využití v daném cyklu. Z tohoto bodu se dá pokračovat pomocí fruktóza-1,6-bisfosfát aldolázy na šestiuhlíkatou fruktózu-1,6-bisfosfát (Fru-1,6-BP) nebo na sedmiuhlíkovou sedoheptulózu-1,7-bisfosfát (Sed-1,7-BP). Fru-1,6-BP je pomocí fruktóza-1,6-bisfosfatázy přeměněna na fruktózy-6-fosfát (Fru-6P), která se redukuje na xylulózu-5-fosfát (Xyl-5P). V dalším kroku je pomocí fosforibulokinázy přeměněna na ribulózu-5-fosfát (Ru-5P). Sed-1,7-BP je v průběhu cyklu pomocí sledu reakcí přeměněna na ribulózu-5-fosfát (Ru-5P). Spotřebouáním jedné molekuly ATP je Ru-5P fosforylována na původní ribulózu-1,5-bisfosfát [29].



Obrázek 6 - Schéma CBB cyklu [29] RuBP – ribulóza-1,5- bisfosfát; 3PGA – 3-fosfoglycerát; 1,3-BPGA – 1,3-bisfosfoglycerát; GA-3P – glyceraldehyd-3-fosfát; DHAP – dihydroxyacetonfosfát; Sed-1,7-BP – sedoheptulóza-1,7-bisfosfát; Sed-7P – sedoheptulóza-7-fosfát; R-5P – ribóza-5-fosfát; E-4P – erytróza-4-fosfát; Fru-1,6-BP – fruktóza-1,6-bisfosfát; Fru-6P – fruktóza-6-fosfát; Xyl-5P – xylulóza-5-fosfát; Ru-5P – ribulóza-5-fosfát; PGK – fosfoglycerát kináza; GAPDH – glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza; TPI – triózafosfát izomeráza; Ald – fruktóza-1,6-bisfosfát aldóza; FB – fruktóza-1,6-bisfosfatáza; TK – transketoláza; SB – sedoheptulóza-1,7-bisfosfátáza; PRK – fosforibulokináza

2.2.2.3 Fixace dusíku

Rhodospirillum rubrum je svým metabolismem velmi všestranná bakterie, díky čemuž je schopná i fixace vzdušného dusíku. Tento proces je katalyzovaný enzymatickým komplexem nitrogenázou, která redukuje dusík ve formě N_2 na dusík ve formě amoniaku NH_3 . Tento proces je energeticky náročný a vyžaduje vysokou spotřebu ATP. Zároveň zde dochází k tvorbě vodíku, u kterého se spekuluje jeho využití jako novodobé palivo z obnovitelného zdroje. U purpurových nesírných bakterií se mohou vyskytovat tři druhy nitrogenázy, Mo-nitrogenáza, Fe-nitrogenáza a V-nitrogenáza. *Rhodospirillum rubrum* disponuje pouze prvními dvěma druhy nitrogenáz [30, 31].

Na regulaci fixace dusíku se podílí mnoho faktorů např. obsah molybdenu, železa, amoniaku. Dále se na regulaci podílí takzvaný Ntr systém. V tomto systému se nachází velká řada genů ovlivňující tento proces např. *nifA* (transkripční aktivátor), *glnK* (signalizační protein pro transdukcii P_{II}) a *amtB* (kódující domnělý transportér amoniaku). Dále se zde nachází mnoho proteinů například *GlnD*, *NtrB*, *NtrC* a P_{II} . *NtrB* je histidinová kináza, která fosforyluje *NtrC* v limitních podmínkách dusíku a jako fosfatáza defosforyluje *NtrC* při dostatku dusíku. Při nedostatku dusíku se proteiny P_{II} urydilují, což zamezí jejich interakci s *NtrB*, která následně převládá v kinázové aktivitě. Fosforylovaná forma *NtrC* funguje jako aktivátor pro transkripci *nifA* a dalších genů, které následně regulují aktivity Mo-nitrogenázy a Fe-nitrogenázy [32].

2.2.3 Polyhydroxyalkanoáty a odpověď na stresové podněty

2.2.3.1 Osmotický stres

Osmotický tlak je na buňku vyvíjen v různých prostředích, čímž se řadí mezi nejčastější vnější stresové podněty pro buňku. Změna osmolarity může nastat velmi rychle v různých prostředích, z toho důvodu je pro buňky životně důležitá schopnost dostatečně rychlé reakce na tuto změnu. V hypotonickém prostředí dochází k transportu vody do buňky ve snaze vyrovnání iontové koncentrace obou prostředí, vně i mimo buňku, kde v kritickém případě dochází k prasknutí buňky z náporu množství vody. Opačný případ je hypertonické prostředí, kdy je voda exportována z buňky. V extrémních případech může dojít k úplné dehydrataci vnitřní cytoplazmy [33].

Princip ochrany spočívá ve vlastnostech PHA granulí. Jejich téměř bezvodá struktura umožňuje jejich funkci jakožto hydrofobního lešení pro oporu buňky při zmenšení objemu cytoplazmy v důsledku dehydratace, případně plazmolýzy v případě vystavení buňky hypertonickému prostředí. U hypotonického prostředí vykazují buňky s obsahem PHA vyšší odolnost nejspíše díky mnohem menším poškozením membrány a možnému udržení funkce membránových pump a kanálků pro udržování stability prostředí buňky [34].

Tato vlastnost byla zkoumána u mikroorganismu *Cupriavidus necator* H16 vystavenému hypotonickému prostředí. Porovnávány byly divoký kmen schopný akumulace PHA a mutantní kmen zbavený této schopnosti. Nejvyšší procento úmrtnosti bylo pozorováno u kultury mutantního kmene *C. necator* PHB-4, kde pouze 2 % původního množství dokázalo přežít vystavení osmotickému šoku zvýšením a následným snížením koncentrace NaCl. Zatímco u kmenu *C. necator* H16, kultivovaného v médiu s limitujícím faktorem dusíku, byla konečná koncentrace PHA v buňce 74 % suché buněčné hmoty a byla pozorována úmrtnost pouze 30 %. Avšak v tomto případě nebyl pozorován úbytek buněk následkem poškozením buněk vystavením osmotickému tlaku [34].

V případě *Cupriavidus necator* H16 vystavovanému hypertonickému prostředí byl pozorován ochranný účinek PHA díky stabilizaci buněčné membrány poškozené plazmolýzou. V tomto případě byly PHA granule využívány k zaplnění prasklin buněčné stěny a minimalizaci úniků cytoplazmy. Tento efekt byl možný díky jejich amorfnímu charakteru a struktuře PHA granulí, které v tomto případě vykazovaly překvapivě tekutinám podobné vlastnosti. Tento efekt byl sledován při porovnávání divokého a mutantního kmene. Při kultivaci ve 4 různých koncentracích NaCl. Ve všech případech byla pozorována vyšší schopnost přežití osmotického tlaku u divokého kmene, kde v nejvyšší koncentraci 200 g/l soli přežilo okolo 60 % buněk oproti 35 % mutantního kmene bez PHA [33].

Další výzkum na podložení protektivních vlastností PHA vůči osmotickému tlaku byl prováděn u modifikované *E. coli* schopné produkce P(3HB) a divokého kmene. Tyto dva kmény byly vystaveny prostředí s 25 % glukózy. Při těchto podmínkách byl pozorován radikální pokles procent živých buněk u divokého kmene, kde po 40 minutách zůstala pouze 2 % původního množství buněk. K porovnání u modifikovaného organismu přežilo 40 minutové vystavení okolo 10 % původního množství. Tento rozdíl byl znát i u kratšího

intervalu 20 minut, kde u divokého kmene přežilo okolo 12 % a u PHA produkujícího kmene přežilo okolo 35 % původních buněk [35].

2.2.3.2 UV Záření

UV záření je jeden z nejčastějších stresových podnětů pro živé organismy z důvodu jeho přítomnosti ve slunečním světle. UV záření se dělí na 3 typy v závislosti na vlnové délce a každý typ má trochu jiné vlastnosti. UVA záření je ve vlnové délce od 315 nm do 400 nm. Zhruba 99 % UV záření dopadajícího na povrch země je právě UVA. Druhý typ je UVB ve vlnových délkách od 280 nm do 315 nm. Toto záření je značně škodlivé pro organismy z důvodu možného poškození struktur sloučenin v organismu. UVB záření je převážně pohlcováno ozónovou vrstvou v atmosféře země. Třetí typ je UVC, do kterého patří záření s vlnovými délkami menšími než 280 nm. Toto záření je nejnebezpečnější z důvodu nejvyšší schopnosti průniku do organismů. Dopadem UVC je atmosférický kyslík O_2 štěpen a následně vzniká ozón O_3 . Nebezpečí UV záření spočívá převážně v možnosti navození změny struktury DNA, RNA, lipidů a proteinů, což jsou všechno esenciální molekuly pro život organismů. UV záření při absorpci organismy začne tvořit reaktivní formy kyslíku (ROS), které svou reaktivitou zapříčiňují již zmíněné strukturní změny. Mnoho organismů si jako obranný mechanismus vůči UV záření produkuje různé pigmenty např. melanin, scytonemin, sphaerophorin. PHA granule vykazují schopnost částečně odrážet UV záření, a tím minimalizovat celkovou absorpci do organismu a následnou tvorbu ROS [36].

PHA granule, které jsou v buňce obsaženy, hrají také u některých mikroorganismů svou roli v ochraně proti UV záření a jeho následkům na organismus. Vliv v ochraně byl pozorován u *Azospirillum brasilense*, kde se porovnávaly dva typy buněk. Typ s vyšším obsahem PHA, okolo 40 % suché hmotnosti biomasy, vykazoval mnohem vyšší odolnost a životaschopnost oproti typu s nízkým obsahem PHA, okolo 5 % suché hmotnosti biomasy. V dalším případě byla tato schopnost PHA potvrzena u geneticky modifikované *Escherichia coli* s geny na produkci a hydrolýzu PHA v porovnání s normálním typem bez těchto genů. U mikroorganismu *C. necator* H16 a jeho mutantního kmene PHB-4, který je neschopný produkce PHA, došlo při vystavení UV záření po dobu 45 s k poklesu u divokého kmene na zhruba 60 % a u mutantního kmene k poklesu až na zhruba 20 % původního množství živých buněk [36].

Další důkaz vykazující PHA protektivní vlastnosti u *A. brasilense* vykazoval, že při využití divokého kmene schopného PHA produkce a mutantního kmene této schopnosti zbavené byl divoký kmen výrazně odolnější. Při vystavení UV záření po dobu až 60 s šlo pozorovat výrazný pokles živých buněk mutantního kmene až na 2 % původního množství. U divokého kmene bylo po stejnou dobu vystavení živých stále 19,7 % původních buněk [37].

2.2.3.3 Teplota

Při odezvě na teplotní výkyvy má produkce a akumulace PHA také svou úlohu. U teplotních rozdílů se odděleně zkoumá vliv PHA na teplotní extrém v hodnotách nad, či pod teplotním optimem. V prvním případě byl pozorován vliv při kultivaci v teplotách pod hranicí teplotního optima. Nízké teploty inhibují růst mikroorganismů zpomalením syntézy proteinů, tuhnutím cytoplazmatické membrány, denaturací proteinů chladem, tvorba ledových krystalů. V prováděné studii na bakteriích rodu *Pseudomonas* při kultivaci při 10 °C byl pozorován zásadní rozdíl v růstu. U mutantního typu této bakterie, který nebyl schopen produkovat PHA, nedošlo během 3 dnů kultivace k žádnému nárůstu množství buněk. Divoký typ *Pseudomonas* vykazoval růst a do stacionární fáze růstu se dostal po době dvou dnů. Další potvrzení hypotézy bylo provedeno experimentem, při kterém byly oba kmeny kultivovány při optimálních 28 °C a následně přeočkovány do média o teplotě 10 °C. Zde opět divoký kmen vykazoval slabý početní úbytek buněk, kdežto u mutantního kmene byl pokles buněk drastický [38, 39].

Pro teploty pod bodem mraznutí vody byly také pozorovány kryoprotektivní účinky. U bakterie typu *Sphingopyxis chilensis* S37 při nedostatku uhlíkového substrátu a kryogenních podmínkách byla snaha prostudovat kryoprotektivní účinky PHA. Tato bakterie byla kultivována společně s *Sphingopyxis alaskensis* pro porovnávání životaschopnosti těchto dvou typů. Při kultivaci v R₂A médiu po dobu 48 h byly bakterie následně suspendovány v minerálních solných roztocích bez zdroje uhlíku. Tato suspenze byla inkubována v rozmezí 48-120 h při 30 °C a následně zmrazena při teplotě -20 °C po dobu 48 h. U obou bakterií byla po 48 h pozorována životaschopnost, kde u *Sphingopyxis chilensis* došlo k úbytku na 10 % živých buněk. Jako kontrolní organismus byla použita *E. coli* K-12, která byla zmrazením usmrcena. U obou dvou kmenů byla pozorována akumulace PHA naznačující ochranné účinky vůči extrémně nízkým teplotám [40]. Dále tyto účinky potvrzuje test kryogenních účinků 3-hydroxybutyrátu (3HB) v buňkách. Byl testován tento efekt při cyklu zmrazení a

rozmrazování zvoleného typu enzymatické lipázy *Rhizopus oryzae*. Při přidání 3HB v koncentraci 100 mM bylo pozorováno nulové poškození enzymu při 5 mrazících cyklech, kde pro porovnání u enzymu bez 3HB byl pozorován pokles aktivity na 59 % původní hodnoty [41]

Posledním razantním rizikem, co se týče teplotních výkyvů prostředí organismů, je vysoká teplota. Vysoké teploty představují riziko ohledně denaturace proteinů a jejich následnou ztrátu vlastností esenciálních pro metabolismus buňky. Pro potvrzení ochranných efektů PHA při dlouhodobém vystavení vysokých teplot byl teplotně namáhán typ bakterie *Bacillus thuringiensis* YBT-1520. Kultivace probíhala při dvou teplotách, a to 30 a 42 °C. Při 30 °C probíhala kultivace kontrolní kultury a při 42 °C, což je u tohoto typu maximální testovaná hodnota vykazující možný růst. Z těchto kultur byly odebrány vzorky po 8, 12 a 16 h kultivace. V průběhu celé kultivace šlo pozorovat produkci PHA v obou kulturách. Množství bylo porovnáváno, kde při 8 h bylo pozorováno větší množství u kultury při 30 °C. Po 12 h bylo množství PHA srovnatelné u obou kultur a od 16 h probíhala produkce PHA ve větším množství v kultuře při 42 °C. Maximum obou kultur nastalo po 48 h, kde u teplotně stresované kultury došlo k produkci 17krát většímu množství PHA než u kontrolní kultury. Tato metabolická změna potvrzuje ochranné vlastnosti PHA na dlouhodobé vystavení vysokým teplotám [42]. Při vystavení teplotnímu šoku lze pozorovat stejné vlastnosti PHA. U divokého kmenu a mutantu, neschopného produkce PHA, bakterie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 a FRD1 byl po vystavení teplotě 50 °C pozorován pokles živých buněk. Po vystavení teplotnímu šoku po dobu 5 minut byl pozorován počet buněk na 1 ml. Pro divoké kmény byly hodnoty okolo 2300, pro mutantní kmen PAO1 byly hodnoty okolo 1900 a pro mutantní kmen FRD1 byly hodnoty okolo 1000. Kmen PAO1 i jeho mutant vykazovaly vyšší tepelnou toleranci než divoký a mutantní kmen FRD1, kde po 10 minutách bylo nalezeno skoro nulové množství živých buněk, zatímco pro PAO1 byly stále nalezeny živé buňky [43].

2.2.3.4 Oxidační stres

Oxidační stres je do určité míry všudypřítomný a to z důvodu vyššího zastoupení kyslíku na zemi. Oxidační stres je často způsoben tzv. reaktivními formami kyslíku (ROS). Mezi různé formy ROS patří např. peroxid vodíku H₂O₂. Důsledkem vystavení ROS může být změna struktury DNA, RNA, proteinů, lipidů i volně se vyskytujících aminokyselin. Celkovou koncentraci ROS v buňce mohou ovlivnit i vnější vlivy jako třeba UV záření [44].

Proti oxidačním stresu pomáhají mezi produkty při tvorbě a celého metabolismu PHA. Mezi tyto sloučeniny patří převážně methylesterifikované dimery a trimery 3-hydroxybutyrátu (ME-3HB). Tyto sloučeniny mají vysokou schopnost vychytávání hydroxylových radikálů, které jsou tvořeny např. štěpením H_2O_2 . Vychytávají tyto radikály 3krát více než glutathion a až 11krát více než vitamín C nebo kyselina β -hydroxymáselná. Díky této schopnosti posilují odolnost organismů vůči oxidačnímu stresu [45, 46].

Protektivní vlastnosti PHA vůči oxidačnímu stresu byli prokázány u *E. coli* pGEM-T::*phbCAB* *Cn*, kde při vystavení TiO_2 ve třech různých koncentracích byla pozorována vyšší schopnost přežití takového stresu u bakterií s PHA granulemi oproti těm bez granulí. Už po 60 minutách vystavení byla koncentrace živých buněk 25krát nižší u *E. coli*, které neobsahovaly PHA. Při následném vystavení UV záření byl rozdíl odolnosti oxidačnímu stresu více znatelný [44].

Další důkaz ochranných vlastností PHA byl zkoumán u *Herbaspirillum seropedicae*. U tohoto typu mikroorganismu byla zkoumána genová exprese a aktivita genu Fnr, gen, který funguje jako regulátor pro změnu metabolismu z aerobního na anaerobní. Byly posuzovány divoký kmen schopný produkce P(3HB) a *phaC1* mutant, kterému chyběl gen pro PHA syntázu. Během exponenciální fáze růstu bylo u mutantního kmene pozorováno o 50 % větší množství ROS uvnitř buňky a na konci dané růstové fáze až o 75 % větší množství. Dále byly tyto kmeny testovány na jejich schopnost neutralizovat ROS po vystavení chemickému antioxidantu Nac. U divokého kmene bylo v exponenciální fázi pozorováno zmírnění počtu ROS o 60% a u mutantního kmene nebyla pozorována žádná změna oxidačního stresu [47].

2.2.3.5 Těžké kovy

Kontaminace přírodního prostředí těžkými kovy je celosvětový problém z důvodu jejich toxické povahy. Mezi hlavních pět kontaminantů se řadí arsen (As), kadmium (Cd), chrom (Cr), rtuť (Hg) a olovo (Pb), dále pak do této skupiny patří kovy jako měď (Cu), nikl (Ni), stříbro (Ag) a zinek (Zn). Tyto kovy se v přírodě vyskytují vlivem lidské aktivity ve stále větším množství a v mnoha případech je jejich koncentrace vyšší než udávaná kritická hodnota v prostředí. Na mikrobiální úrovni jsou těžké kovy nebezpečné převážně kvůli jejich podobnosti buněčně důležitých elementům. Způsobují inhibici biologických funkcí, zvyšují množství ROS, destabilizují strukturu molekul DNA, RNA a proteinů [48, 49].

Mnoho mikroorganismů je schopno vlastní ochrany vůči těžkým kovům. Mohou se chránit před efekty těžkých kovů anebo aktivně snižovat vliv a přítomnost toxických kovů v prostředí pomocí detoxikací, precipitací nebo odstraněním [48].

U mikroorganismu *A. brasilense* byly porovnávány kmeny Sp7 a Sp245 pod vlivem těžkých kovů. Přesněji v koncentraci 0,2 mM Cu^{2+} a Zn^{2+} . V tomto experimentu byla pozorována zvýšená produkce PHA jako odezva vystavení prostředí s těžkými kovy oproti kontrolnímu vzorku v malátovém médiu [49].

Další výzkum poukazuje na zvýšení akumulace PHA při vystavení prostředí s těžkými kovy. Při zkoumání mikroorganismu *C. necator* H16 byla kultura vystavena koncentraci 0,02 mmol/l CoCl_2 a NiCl_2 . V obou případech byla pozorována zvýšená produkce PHA až o 6 %, oproti kontrole v dusík limitujícím médiu. Při zvýšení koncentrací sloučenin kovů docházelo ke snížení produkce biomasy a tím i poklesu produkce PHA [50].

2.3 Evoluční inženýrství a adaptace

Evoluční inženýrství patří k jednomu z přístupů, které mohou být využity ke zvýšení produkce metabolitů. V dnešní době patří k často využívané metodě v biologickém výzkumu k vylepšení vlastností daných mikroorganismů. Nejčastěji se jedná o zvýšení odolnosti vůči různým stresovým podnětům nebo ke zvýšení produkce požadované látky. Jedná se o metodu, ve které je snaha o podněcování určitého fenotypu nebo fyziologických charakteristik určitého kmene, během které nebudou ovlivněny přirozené dobré vlastnosti buňky. Zahrnuje nepřetržitý vývoj mikrobiální populace pod selektivně zvoleným stresem. Mezi nejčastější způsoby evolučního inženýrství patří techniky mutagenese, evoluce genomu a adaptivní laboratorní evoluce. Z hlediska fenotypové evoluce genů může být využito inverzní metabolické inženýrství [51].

2.3.1 Mutagenese

Z hlediska mutagenese se převážně využívají chemické a fyzikální mutageny. Mezi chemické mutageny se řadí analogy bází nukleových kyselin, modifikátory nukleových bází v jejich struktuře a mutagen posunu v rámci nukleotidů. Mezi fyzikální řadíme UV záření, α , β a γ radioaktivní záření. Tyto mutageny mohou zvýšit šanci mutace a jejich četnost více než tisíckrát. Konvenční metody mutagenese mohou zvýšit četnost mutací po určitou mez.

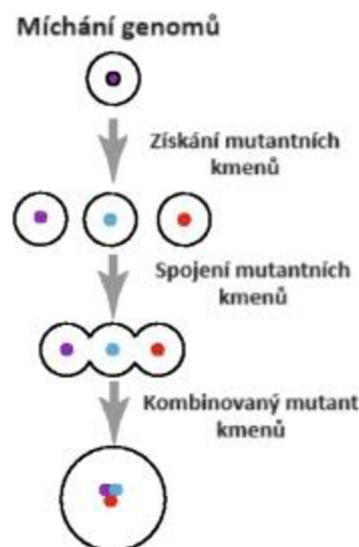
Frekvence prospěšných mutací je velmi nízká a směr mutací a vlastností získaných mutantních kmenů je složité kontrolovat [51].

Způsob, kterým se může cílené mutagenéze dosáhnout, je aplikace plazmy. Vysokou pozornost má metoda využití plazmatu o pokojové teplotě a atmosférickém tlaku, což zvyšuje četnost mutací. Použití vykazuje vysokou odlišnost v mutacích a žádné znečištění prostředí [51, 52].

Metodou vystavení plazmatu byl získán mutant mikroorganismu *Enterobacter cloacae*. Tento nový mutantní kmen vykazoval toleranci na NaCl, kdy dosahoval standardního růstu i v médiu s 7,5 % NaCl. Při porovnávání s divokým kmenem stejného mikroorganismu vykazoval mnohonásobně zvýšenou koncentraci draselných iontů K^+ uvnitř buňky. Předpokládá se, že právě tento mechanismus zvyšuje schopnost mutantního kmene přežít vyšší osmotický tlak způsobený vysokou koncentrací soli v médiu [52].

2.3.2 Genová evoluce

U genomové evoluce se využívá techniky zvané míchání genomů, při které dojde k přesunu více DNA genů a k jejich následné rekombinaci pro žádaný výsledek. Může se tímto tvořit kombinace různých fenotypů od různých rodičovských kmenů z různých druhů, například spojení vysoké odolnosti v daném prostředí s vysokou výtěžností produktu. Tento způsob se prokázal být rychlou a efektivní strategií a byl proveden na prokaryotních i eukaryotních buňkách [51].



Obrázek 7 – Schéma míchání genomů, převzato a upraveno, [51]

Globální transkripční inženýrství (gTME) se soustředí na hlavní faktory ovlivňující exprese genů, jako jsou například transkripční faktory. Může se pak regulovat exprese genů pro dosažení ideálního a požadovaného fenotypu. Dalším způsobem, jak ovlivnit exprese genů, je ovlivnění ribozomální RNA, a změnit tak proces translace. Tato metoda se nazývá ribozomální inženýrství, avšak vedlejší efekt použití této metody je možnost inhibice růstu buňky [51].

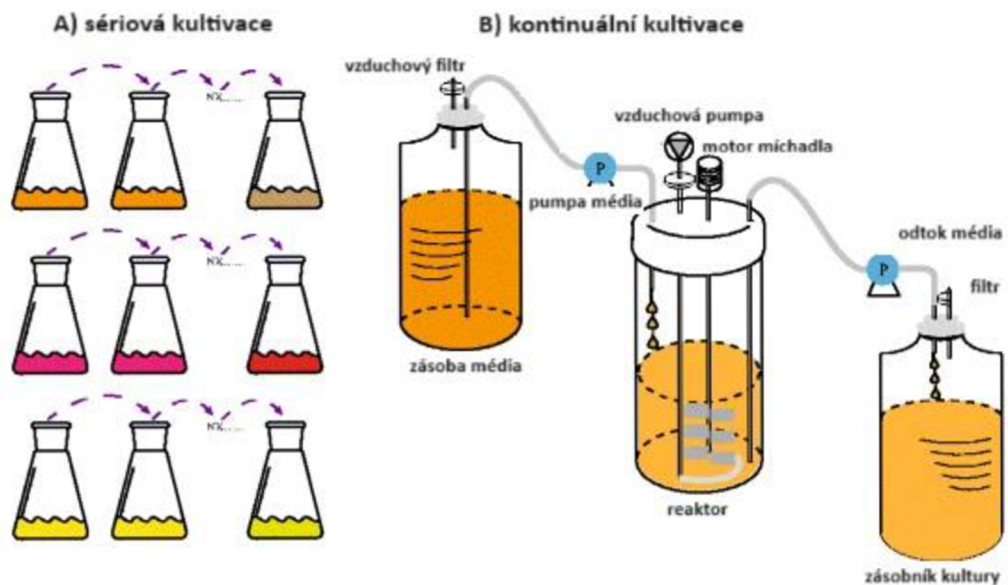
2.3.3 Adaptivní laboratorní evoluce

V případě adaptivní laboratorní evoluce (ALE) se využívá prodloužené kultivace pro akumulaci postupných mutací. Využívá se dlouhodobého vystavení mikroorganismu médiu s určitými podmínkami, které by měly zapříčinit žádanou adaptaci [51].

ALE se dá provozovat vícero způsoby. Jeden z těchto způsobů je sériová kultivace v baňkách. Vždy se po stejném časovém intervalu, který je zvolen v závislosti na rychlosti růstu mikroorganismu, se kultura mikroorganismu přesune do nové sady baněk s čerstvým médiem obsahujícím zvolený stresor pro udržení kultury v exponenciální fázi růstu a zajištění dostatečného množství živin a substrátu. Doba této kultivace může být velice dlouhá od týdnů až po roky s přesně definovanými podmínkami, které podpoří vznik chtěného fenotypu. Hlavní výhodou tohoto postupu je možnost vysokého množství paralelních kultur kvůli nízké náročnosti na prostor a náklady. Lehce se dají kontrolovat určité podmínky, jako okolní teplota a homogenita kultury, pomocí konstantního míchání. Tento způsob má i své nevýhody v dlouhé potřebné době kultivování, nemožnosti ovlivňovat podmínky v médiu jako pH, množství rozpuštěného kyslíku, aj. Také je u této metody variace v množství hustoty kultury a měnící se rychlost růstu. Tuto metodu popisuje obrázek 8A [51, 53].

Druhý způsob kultivace je kontinuální. Při této kultivaci se do reaktoru vpouští nové médium a také se stále odčerpává médium s metabolity. Výhodou oproti předchozímu způsobu je konstantní rychlost růstu a hustota kultury. Tohoto je dosaženo kontrolou podmínek uvnitř reaktoru nejčastěji například pH, rozpuštěného kyslíku nebo koncentrace substrátu či metabolitu. V závislosti na podmínkách je následně automatizován přítok nového média s živinami a substrátem, právě pro dosažení ideálních podmínek po celou dobu kultivace. Stejným systémem se reguluje odtok stávající kultury a média z reaktoru pro udržení stále konstantního objemu a podmínek. Hlavní nevýhodou této metody jsou náklady na údržbu

z důvodu vysoké spotřeby média. V posledních letech se zlepšily možnosti mikro bioreaktorů a následného snížení nákladů. Tuto metodu popisuje obrázek 8B [51, 53, 54].



Obrázek 8 – Schéma ALE kultivací, převzato a upraveno [51]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Mikroorganismy, chemikálie, přístroje

3.1.1 Mikroorganismy

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

3.1.2 Použité chemikálie

- LB Broth (Sigma-Aldrich)
- Kvasničný extrakt (HiMedia)
- Chlorid sodný (Lach-Ner)
- Chlorid draselný (Lach-Ner)
- Chlorid amonný (Lach-Ner)
- Biotin (Sigma-Aldrich)
- Hydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner)
- D-fruktóza (Lach-Ner)
- Octan sodný (Penta)
- Heptahydrát síranu hořečnatého (Lach-Ner)
- MOPS (Sigma-Aldrich)
- Dihydrát chloridu vápenatého (Lach-Ner)
- Chlorid nikelnatý (Lach-Ner)
- Kyselina trihydrogenboritá (Penta)
- Síran železitý (Lach-Ner)
- Sodná sůl kyseliny etylendiamintetraoctové (Lach-Ner)
- Molybdenan sodný (Lach-Ner)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného (Lach-Ner)
- Hydroxid sodný (Lach-Ner)
- Chloroform (Sigma-Aldrich)
- Kyselina sírová (Sigma-Aldrich)
- Methanol (Sigma-Aldrich)

- Isopropylalkohol (Lach-Ner)
- Kyselina benzoová (Sigma-Aldrich)
- PCR loading Yellow load (Top-Bio)
- Master Mix Hot Start (New England BioLabs)
- Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe)
- PCR agaróza (Top-Bio)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Lach-Ner)

3.1.2.1 Média a roztoky

V tomto experimentu bylo *R. rubrum* kultivováno v komplexním médiu LB Broth a následně v produkčním médiu SYN FAY.

Složení LB Broth:

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

Při kultivaci na Petriho miskách bylo přidáno 1,5–2% agaru

Složení SYN FAY:

- | | |
|--------------------------------------------------------------------|---------|
| • SYN salts (5x) | 200 ml |
| • K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ | 0,5 ml |
| • Biotin 2 mg/ml | 0,1 ml |
| • 1,5M roztok fruktózy | 10 ml |
| • 1M roztok acetátu | 10 ml |
| • Kvasniční extrakt 50 g/l | 20 ml |
| • Destilovaná voda | 1000 ml |

Složení SYN salts (5x):

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

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

Složení FeMo chelátovaného roztoku:

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

Složení fosfátového pufru PBS:

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

Složení TBE 10x:

- Tris(hydroxymethyl)aminomethan 108 g
- H₃BO₃ 55 g
- EDTA 9,3 g
- Destilovaná voda 1000 ml

3.1.2.2 Příprava médií

Při přípravě komplexního média LB Broth byly výše uvedené složky po navážení rozpuštěné v požadovaném množství destilované vody na magnetické míchačce. Dále bylo médium rozlito do 500ml Erlenmeyerových baněk po 100ml a následně sterilováno za zvýšené teploty okolo 121 °C a zvýšeného tlaku po dobu 35 minut.

Při přípravě kultivačního média SYN FAY byl nejprve připraven roztok SYN salts (5x), kde byly navážené složky rozpuštěny v odměrné baňce obsahující požadované roztoky a doplněny na daný objem destilovanou vodou. Následně bylo pH SYN salts roztoku upraveno na 7,1 pomocí NaOH. Poté bylo připraveno médium SYN FAY přidáním všech roztoků zmíněných výše do odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou na daný objem. V pozdější fázi

experimentu bylo v destilované vodě rozpuštěno dané množství NaCl pro požadovanou výslednou koncentraci v médiu o hodnotách 10, 20, 30, 40 a 60 g/l. Sterilní roztok biotinu byl do média přidán ve sterilním boxu před zaočkováním kultury.

3.1.3 Použité přístroje

- Analytické váhy ew620-3NM, KERN
- Centrifuga Hettich EVA20, MANEKO
- Centrifuga Sartorius Weender Landestrasse, Sigma Santorius
- Magnetická míchačka technoKartell, MERCI s.r.o
- Vortex BENCHMIXER, Benchmark Scientific Inc.
- Termocyklér My Cycler™, BIO-RAD
- Plynový chromatograf s plamenoionizačním detektorem FID, Thermo Scientific, Trace 1300 (kolona DB-WAX 30m by 0,25mm)
- pH metr pH 50+ DHS, XS Instruments
- Termoblok Block heater SBH130D, Stuart
- Temperovaná třepačka, Heidoplh, Icubator 1000
- UV-VIS Spektrofotometr Hitachi U-3900H s integračním nastavcem 60mmDIA
- Běžné laboratorní sklo a vybavení

3.2 Kultivace *R. rubrum*

R. rubrum bylo původně kultivováno na Petriho miskách na LB Broth médiu. Petriho misky byly zaočkovány z kryozkumavek. Z misek byly zaočkovány 2–3 kličky do inokulačního LB média. Dané kultury byly kultivovány v temperované třepačce při 160 rpm a 28 °C po dobu 2–3 dnů. Poté byly kultury zaočkovány do 500 ml Erlenmeyerových baněk s 100 ml SYN FAY média. Byl zaočkován přesný objem inokula, aby počáteční optická hustota média byla 0,1 měřeno na vlnové délce 660 nm.

3.2.1 Optimalizace kultivace

Pro optimalizaci kultivace bylo připraveno 10 Erlenmeyerových baněk s 100 ml SYN FAY média s koncentracemi NaCl o hodnotách 0, 10, 20, 30, 40 g/l. Do médií byl zaočkován objem inokula tak, aby počáteční optická hustota byla 0,1 měřeno na vlnové délce 660 nm. Přeočkování probíhalo v sterilním boxu. Kultivace probíhala v temperované třepačce při 160 rpm a 28 °C po dobu 3 dnů. Byly odebrány vzorky biomasy po 48 h a po 72 h.

3.2.2 Evoluční inženýrství

Při pasážování *R. rubrum* byly vždy připraveny 2 Erlenmeyerovy baňky s 100 ml SYN FAY média s koncentrací 40 g/l NaCl. Do těchto baněk bylo zaočkováno inokulum, v průběhu experimentu bylo inokulum nahrazeno předchozí pasáží, v daném objemu, aby počáteční hodnota optické hustoty byla 0,1 měřeno při vlnové délce 660 nm. Přeočkování probíhalo v sterilním boxu. Kultivace probíhala na temperované třepačce při 160 rpm a 28 °C. Doba kultivace jedné pasáže byla 48 h. Po této době byla kultura přeočkována do nového média a odebrány vzorky biomasy pro následné analýzy.

K uchování vybraných pasáží (každá třetí) byly použity kryozkumavky obsahující 0,5 ml roztoku s 30 obj. % glycerolu. Do těchto kryozkumavek bylo v sterilním boxu přidáno 0,5 ml kultury dané pasáže. Výsledná koncentrace glycerolu v kryozkumavkách byla 15 obj. %. Takto zakonzervované pasáže byly následně skladovány při -80 °C.

3.2.3 Finální kultivace

Při finální kultivaci *R. rubrum* byly z kryozkumavek na Petriho misky zaočkovány vzorky do LB média. Z misek byly následně očkovány 2–3 kličky do 100 ml inokulačního LB média v 500 ml Erlenmeyerových baňkách. Byly kultivovány vzorky divokého kmene *R. rubrum* a třinácté pasáže z předchozího experimentu. Baňky byly kultivovány na třepačce při 160 rpm při 28 °C po dobu 2–3 dnů. Následně byly z inokulačních médií s divokým kmenem zaočkovány dvě 500 ml Erlenmeyerovy baňky s 100 ml SYN FAY média s koncentrací NaCl 0 g/l. Z inokula s třináctou pasáží bylo zaočkováno šest Erlenmeyerových baněk s 100 ml SYN FAY média s koncentracemi NaCl o hodnotách 0, 40 a 60 g/l. Očkovaný objem byl naměřen tak, aby počáteční optická hustota v produkčním médiu byla 0,1 měřeno na spektrofotometru na vlnovou délku 660 nm. Kultury v produkčních médiích byly kultivovány na třepačce při 160 rpm při 28 °C po dobu 2 dnů. Po této době byly odebrány vzorky biomasy na následné analýzy.

3.3 Stanovení biomasy

3.3.1 Spektrofotometrické stanovení biomasy

Optická hustota kultury byla měřena spektrofotometricky při vlnové délce 660 nm. Jako blank byl využit PBS pufr/LB Broth médium. Do plastové kyvety byl odebrán 1 ml kultury a následně byla změřena optická hustota.

3.3.2 Gravimetrické stanovení biomasy

Z Erlenmeyerových baněk bylo odebráno 10 ml kultury do centrifugačních zkumavek. Dané zkumavky byly centrifugované při 6000 rpm po dobu 5 minut. Po centrifugaci byl slit supernatant a následně byly vzorky promyty 5 ml PBS. Obsah byl zhomogenizován na vortexu a následně znovu stočen při stejných podmínkách. Po druhé centrifugaci byl opět slit supernatant a vzorky byly umístěny do sušárny pro vysušení do konstantní hmotnosti. Po vysušení byly vzorky zváženy.

3.4 Stanovení obsahu PHA pomocí plynové chromatografie s FID detektorem

Množství PHA bylo stanoveno pomocí plynové chromatografie s plamenoionizačním detektorem (FID). Stanovovaly se methylestery získané kyselou hydrolyzou a následnou esterifikací vzniklého monomeru.

3.4.1 Příprava vzorků

Do krimpovacích vialek bylo naváženo 10-15 mg usušené biomasy. Do každé vialky byl následně napipetován 1 ml chloroformu a 0,8 ml kyseliny sírové v methanolu s vnitřním standardem kyselinou benzoovou o koncentraci 5 mg/ml. Vzorky byly následně esterifikovány v termobloku po dobu 3 hodin při 94 °C. Po esterifikaci byly vzorky převrhnuty do 5 ml vialek obsahujících 0,5 ml 50 mM roztoku NaOH, následně byly vialky důkladně protřepány. Po oddělení fází, vrchní vodné fáze a spodní organické fáze, bylo z organické fáze odpipetováno 50 µl vzorku do 2 ml šroubovací vialky obsahující 0,9 ml isopropylalkoholu. Vialky byly uzavřeny a následně analyzovány na plynovém chromatografu s FID.

3.5 PCR

3.5.1 Izolace DNA

Pro izolaci DNA byly odebrány vzorky kultur divokého kmene *R. rubrum* a třinácté pasáže z finální kultivace. Bylo sterilně odebráno 800 µl do 1,5 ml Eppendorfových zkumavek, které byly následně centrifugovány po dobu 3 minut na 4000 rpm. Po zcentrifugování vzorků byl odpipetován supernatant a přidáno 100 µl lyzačního pufru. Zkumavky byly následně zhomogenizovány na vortexu a vloženy do termobloku na 10 min při 90 °C. Následně byly vzorky stočeny na centrifuze na 10 minut při 10 000 rpm a následně byl sterilně odpipetován supernatant pro PCR.

3.5.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

V případě tohoto experimentu byla prováděna multiplex PCR, přesněji duplex PCR s dvěma druhy primerů pro dva geny. Byly použity primery 16S-f a 16S-R pro detekci genů *16S rRNA*, pro potvrzení bakteriálního původu dané kultury. Druhá sada primerů G-D a G-1R byla použita pro detekci genů pro *phaC*. Tento gen je důležitý pro tvorbu PHA syntázy první třídy.

Bylo připraveno 6 vzorků o objemu 25 µl do 100 µl Eppendorfových zkumavek. Dva vzorky s DNA divokého kmene *R. rubrum*, dva vzorky s DNA z třinácté pasáže *R. rubrum*, jeden vzorek jako pozitivní kontrolu s DNA *Cupravidus necator* a jeden vzorek jako negativní kontrolu bez DNA. Takto připravené vzorky byly následně vloženy do termocykléru na program v tabulce 1.

Složení vzorku pro PCR

- Master mix 12,5 µl
- Mg²⁺ 2,6 µl
- Primer 4 · 1 µl
- PCR H₂O 4,9 µl
- DNA 1 µl

Tabulka 1 Teplotní profil pro duplexní PCR (pro *16S rRNA* a *phaC*)

Krok	Podmínky		
	Počet cyklů	Teplota [°C]	Doba trvání [s]
Iničiační denaturace	1	94	30
Denaturace	30	94	30
Annealing		55	30
Extension		68	90
Elongace	1	68	300
Chlazení		4	60

3.5.3 Agarózová gelová elektroforéza

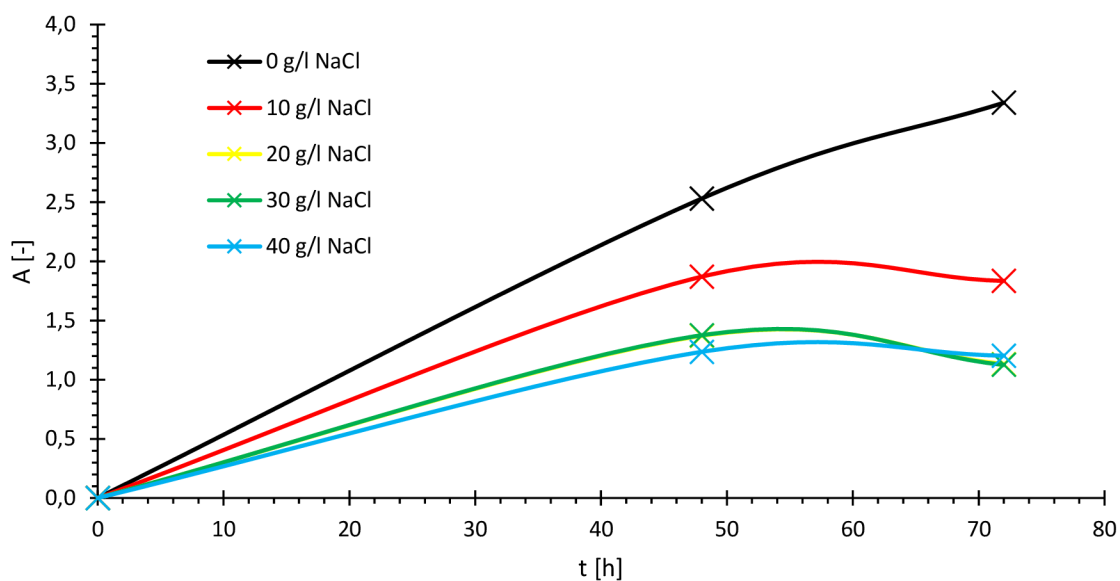
Pro elektroforézu na agarózovém gelu byl nejprve připraven gel. Gel byl připraven pomocí PCR agarózy a následně zalit TBE pufrem 1x koncentrovaným. V našem případě byl použit 1,2 % agarózový gel. Bylo naváženo 1,8 g agarózy a ta byla zalita 150 ml TBE 1x pufru, který byl zředěný destilovanou vodou z TBE 10x pufru v poměru 9:1. Po uschnutí gelu byl vložen do vany na elektroforézu a byly do jamek napipetovány vzorky. K 10 µl vzorku DNA

z PCR byly přidány 3 μ l barevného roztoku a z obarveného vzorku DNA bylo na gel napipetováno 10 μ l. Žebříčku byly na gel pipetovány 4 μ l. Po napipetování vzorků byla vana naplněna TBE 1x pufrem. Elektroforéza byla spuštěna na 30 minut na 90 V.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

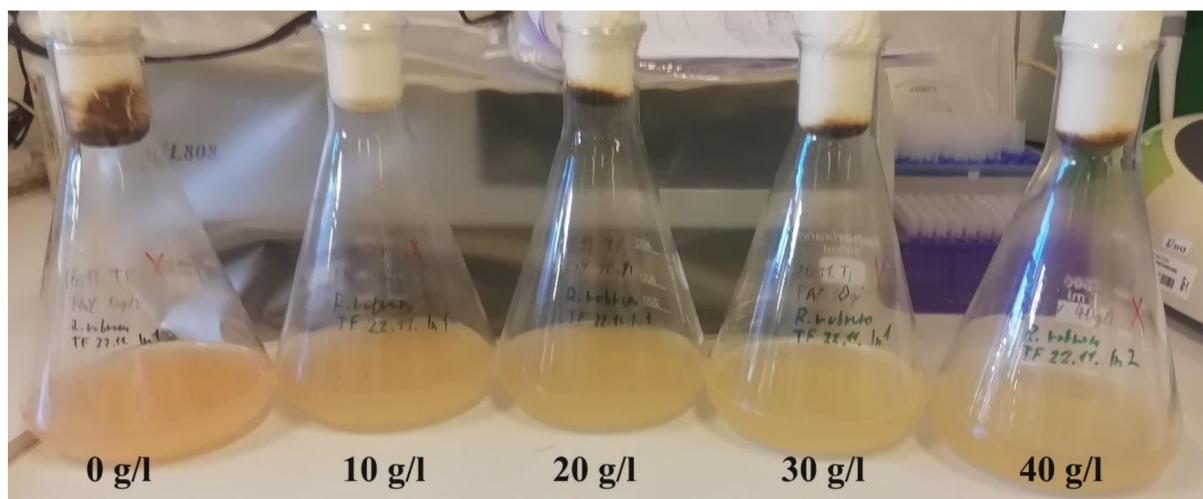
4.1 Optimalizace podmínek pro kultivaci *R. rubrum*

Prvotní část experimentu byla optimalizace podmínek pro kultivaci bakterie *R. rubrum*. V tomto případě se prováděla optimalizace koncentrace NaCl v médiu, aby byla zjištěna maximální koncentrace NaCl, u které by byl možný růst bakterie spolu s produkcí PHA.. V tomto experimentu byla použita média SYN FAY s koncentracemi NaCl od 0 do 40 g/l. Výsledné naměřené absorbance lze pozorovat na obrázku 9 ve formě růstové křivky.



Obrázek 9 – Růstová křivka *R. rubrum* při různých koncentracích NaCl

Na obrázku 9 lze pozorovat téměř lineární křivku růstu pro médium bez NaCl. U ostatních koncentrací je vidět zásadní pokles v rychlosti růstu i množství narostlé biomasy. Inhibiční efekt soli je pozorovatelný u koncentrace 10 g/l a při vyšší koncentraci 20 g/l lze vidět větší efekt inhibice, ale růst při koncentracích 20 g/l a 30 g/l NaCl je takřka identický bez pozorovatelných rozdílů. U koncentrace 40 g/l je viditelné největší snížení růstu oproti kontrole (0 g/l), avšak překvapivě bylo *R. rubrum* stále schopno růst i v té nejvyšší testované koncentraci NaCl.

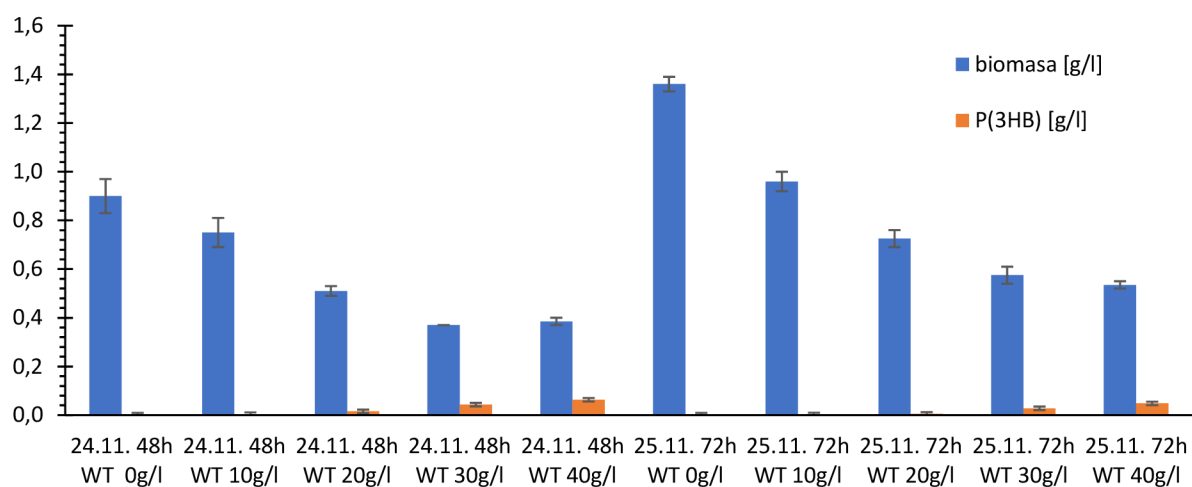


Obrázek 10 – Kultury *R. rubrum* staré 48 h kultivované v rozdílných koncentracích NaCl

Také lze pozorovat trend snížení produkce pigmentů se zvyšující koncentrací soli dle obrázku 10. Snížení množství pigmentu může být způsobeno metabolickou odpovědí na osmotický stres způsobený vyššími koncentracemi soli v médiu. Metabolickou odpovědí by měla být větší preference metabolické cesty pro tvorbu PHA jakožto možného obraného mechanismu vůči osmotickému tlaku oproti fotosyntéze, ke které je potřeba barevných pigmentů schopných pohlcovat sluneční záření.

4.1.1 Stanovení množství biomasy a PHA

Součástí optimalizace bylo také stanovení množství biomasy a PHA u odebraných vzorků po 48 a 72 h. Množství byla určována pomocí plynové chromatografie s FID detektorem podle postupu uvedeného v kapitole 3.4. Výsledné hodnoty lze pozorovat v grafu na obrázku 11.

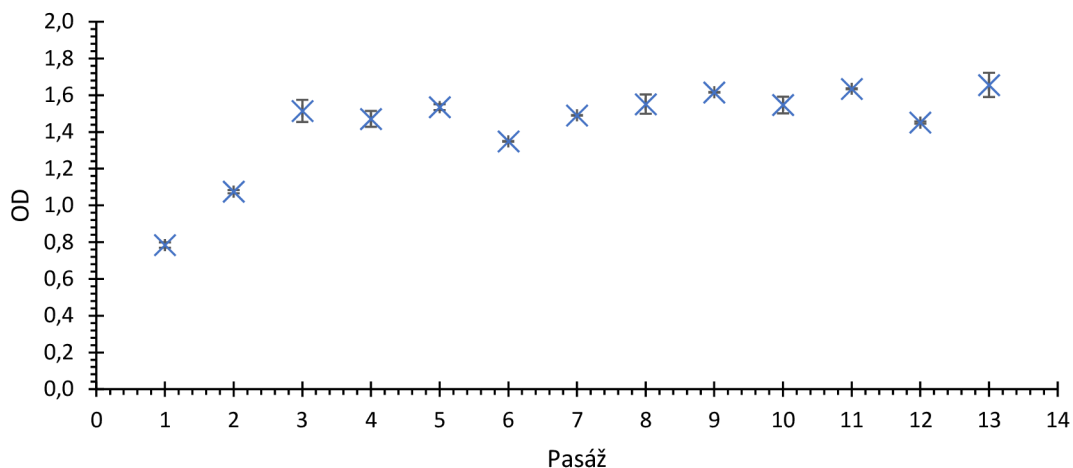


Obrázek 11 – Graf koncentrací biomasy a P(3HB) při 48 h a 72 h při různých koncentracích NaCl

Na obrázku 11 je patrné snížení výtěžku se zvyšující se koncentrací NaCl. U nulové koncentrace NaCl byl pozorován nejvyšší nárůst v množství biomasy mezi 48 a 72 h s zvýšením z $0,9 \pm 0,07$ g/l na $1,360 \pm 0,03$ g/l biomasy. Nejnižší nárůst biomasy byl u koncentrace 40 g/l s $0,385 \pm 0,015$ g/l na $0,535 \pm 0,015$ g/l. Produkce PHA měla opačný trend, je totiž viditelný zvyšující se obsah PHA se zvýšením koncentrace NaCl. Procentuální zvýšení produkce PHA je v koncentracích zásadní. U koncentrací 0 a 10 g/l bylo obsaženo méně než 1 % PHA v biomase. Při 20 g/l obsahovala biomasa 3,1 % PHA. U koncentrace 30 g/l byl procentuální obsah PHA na 11,62 %. Nejvyšší procentuální obsah byl u koncentrace 40 g/l s 16,38 % PHA v biomase. Nejvyšší obsah PHA byl pro danou koncentraci vždy naměřen po 48 h. Z důvodu schopnosti bakterie stále růst a nejvyšší produkce PHA byla vybrána koncentrace 40 g/l pro další experiment s kultivační dobou 48 h. Zvyšující se koncentrace soli se dá předpokládat jako odpověď bakterie na zvyšující se osmotický stres. Ochranný účinek PHA vůči stresovým podnětům, konkrétně osmotickému šoku, je známý a vyvolává u bakterie produkci. Jsou experimenty dokazující tuto metabolickou odpověď mikroorganismů jako například u *Haloferax mediterranei*, kde byla pozorována zvýšená produkce PHA jako odezva na zvyšující se osmotický tlak [55]. Podobný efekt byl využit i v druhém experimentu, kde pomocí vystavení osmotickému tlaku byla vyvolána produkce PHA, podle které pak byli producenti izolováni z aktivovaného kalu [56].

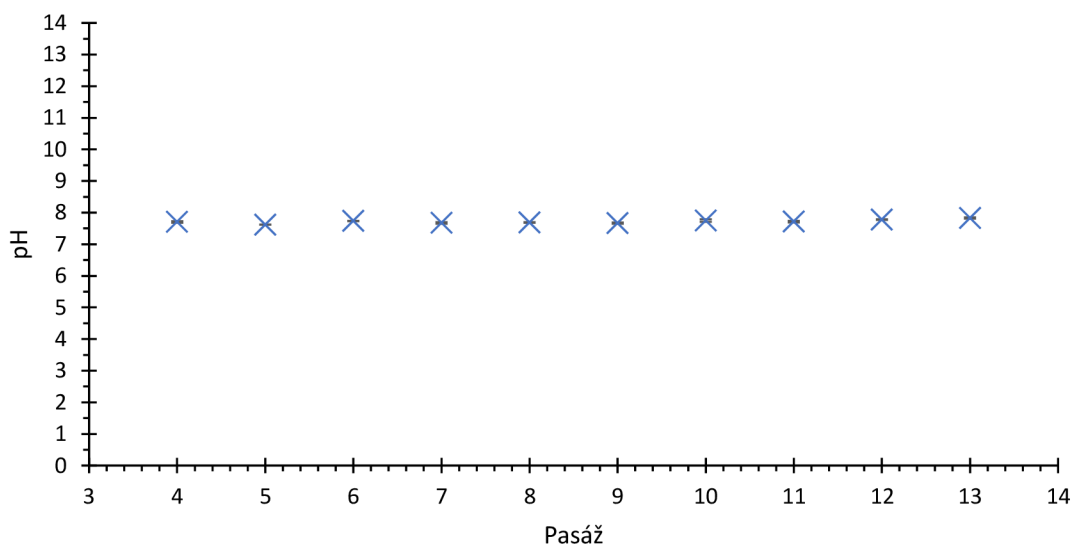
4.2 Evoluční inženýrství *R. rubrum*

V následující části práce bylo metodami evolučního inženýrství dosaženo adaptace *R. rubrum* na zvýšenou koncentraci soli (40 g/l). Hlavním cílem tohoto experimentu byla snaha zvýšení tolerance této bakterie na koncentrace NaCl v prostředí a s tím spojená zvýšená produkce PHA. Pasáže byly vždy přeočkovány po 48 h do nového média s celkovým počtem 13 pasáží (viz. Kapitola v experimentální části). Na obrázku 12 lze pozorovat adaptaci kultury na vysokou koncentraci NaCl během prvních tří pasáží díky zvýšení OD660 a následné ustálení hodnot v rozmezí $1,529 \pm 0,067$ od 4. pasáže.



Obrázek 12 – Graf hodnot optické hustoty při 660 nm jednotlivých pasáží

Jako další měřítko života schopnosti kultury bylo měřeno pH od čtvrté pasáže. Každá bakterie má své optimální pH pro růst. Hodnota pH může být dobrým identifikátorem dostatku živin a substrátu a případným změnám stavu média [57]. Metabolická aktivita může být také ovlivněna změnou pH a kvůli tomu následně produkce metabolitů, v našem případě by to mohlo mít za následek změnu v množství produkce PHA [58]. Na obrázku 13 lze pozorovat konstantní hodnoty pH v průběhu celého experimentu s hodnotami $7,717 \pm 0,045$. Tyto hodnoty naznačovaly stálý stav kultury bez větších výkyvů, kterou potvrdily i hodnoty optické hustoty z grafu na obrázku 12.

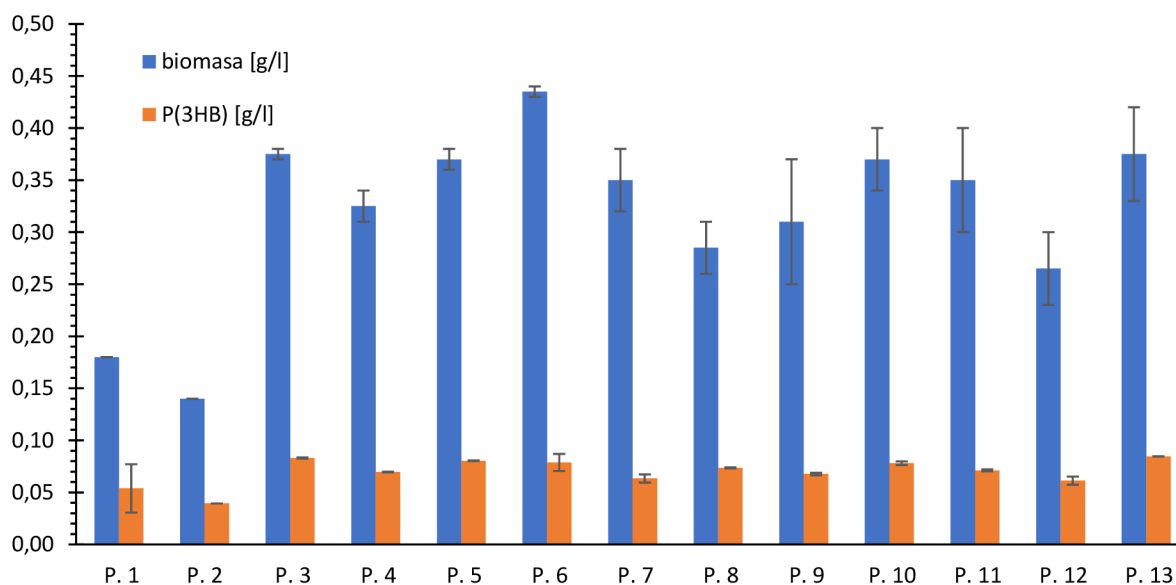


Obrázek 13 – Graf hodnot pH v pasážích

Dále lze v grafech 12 a 13 pozorovat životaschopnost bakterie *R. rubrum* v prostředí s poměrně vysokou salinitou, vzhledem k ustálení trendu růstu kultury v průběhu experimentu. Tyto výsledky poukazují na možnost využití mořské vody pro kultivace *R. rubrum* z důvodu průměrné salinity mořské vody odpovídající 35 g/l solí [59]. V tomto experimentu byla kultivace prováděna v médiu s vyšší salinitou při koncentraci 40 g/l NaCl. Tato skutečnost by mohla mít zásadní vliv na ekonomické nároky při případném využití této bakterie jakožto průmyslového producenta PHA. Ekonomické rozdíly by mohly být způsobeny vyšší přístupností k zdroji mořské vody oproti sladkovodním zdrojům a nižším cenovým zatížením při využití mořské vody oproti vodě sladké. Podobné využití mořské vody a mikroorganismů v ní schopných přežít bylo zmíněno například pro využití v těžářském průmyslu v odlehlejších oblastech s nižším přístupem k sladké vodě, zvláště při obdobích sucha [60]. Avšak co se týče tohoto využití *R. rubrum*, by byly potřeba další experimenty, při kterých by byla součástí média mořská voda, jelikož mořská voda neobsahuje pouze NaCl, ale i řadu dalších mikroelementů, na rozdíl od klasické sladké vody obohacené o určitou koncentraci NaCl. Mořská voda má komplexní složení z mnohým minerálních látek a může se lišit v závislosti na geologické poloze [61].

4.2.1 Stanovení množství biomasy a PHA

V průběhu evolučních experimentů byly odebrány vzorky biomasy pro stanovení množství PHA. Hodnoty stanovené biomasy i PHA jsou uvedené v obrázku 14.

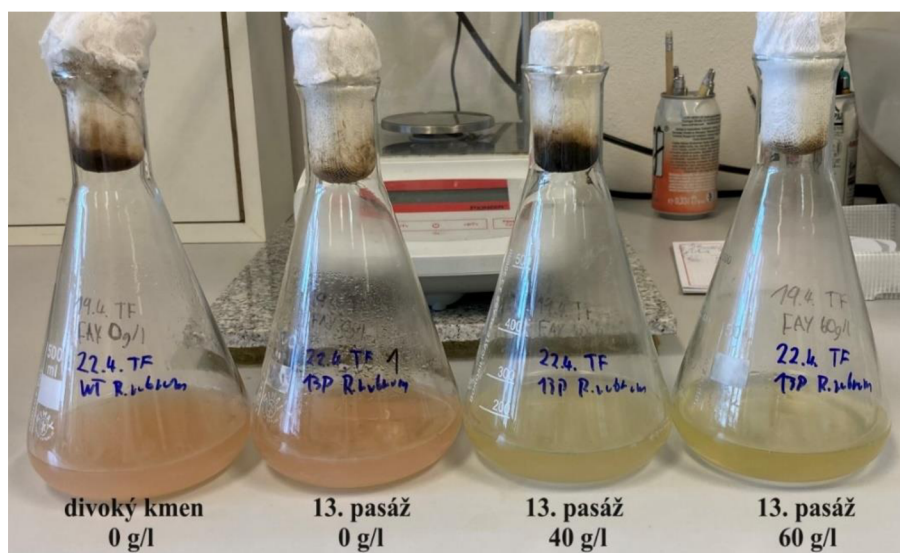


Obrázek 14 – Graf koncentrace obsahu biomasy a PHA v jednotlivých pasážích

Lze pozorovat shodující se koncentrace biomasy jako při optimalizačních kultivacích. Množství biomasy dosahovalo hodnot $0,346 \pm 0,036$ g/l pro pasáže 3 až 13, u prvních dvou pasáží byla koncentrace biomasy $0,160 \pm 0,02$ g/l. V průběhu pasážování však došlo ke zvýšení množství PHA až hodnoty $22,14 \pm 2,83$ %. Zvýšení produkce PHA oproti optimalizaci bylo nejspíše způsobeno kontinuálním vystavením osmotickému stresu v podobě NaCl jako jeden z následků výsledné adaptace. Ochranné vlastnosti PHA vůči stresovým podnětům už byly popsány v předchozí kapitole 2.2.3. Při kontinuálním vystavení stresu je na buňku nátlak vyšší oproti nárazovému vystavení a tento nátlak vyvolá v bakterii adekvátní obrannou odezvu, v našem případě zvýšení produkce PHA jakožto ochranného prvku. Podobnou adaptaci bakterií se zvýšením produkce PHA při osmotickém stresu byla dokázána při experimentu s bakterií *C. necator* [62].

4.3 Kultivace adaptovaného kmene v rozdílných koncentracích soli

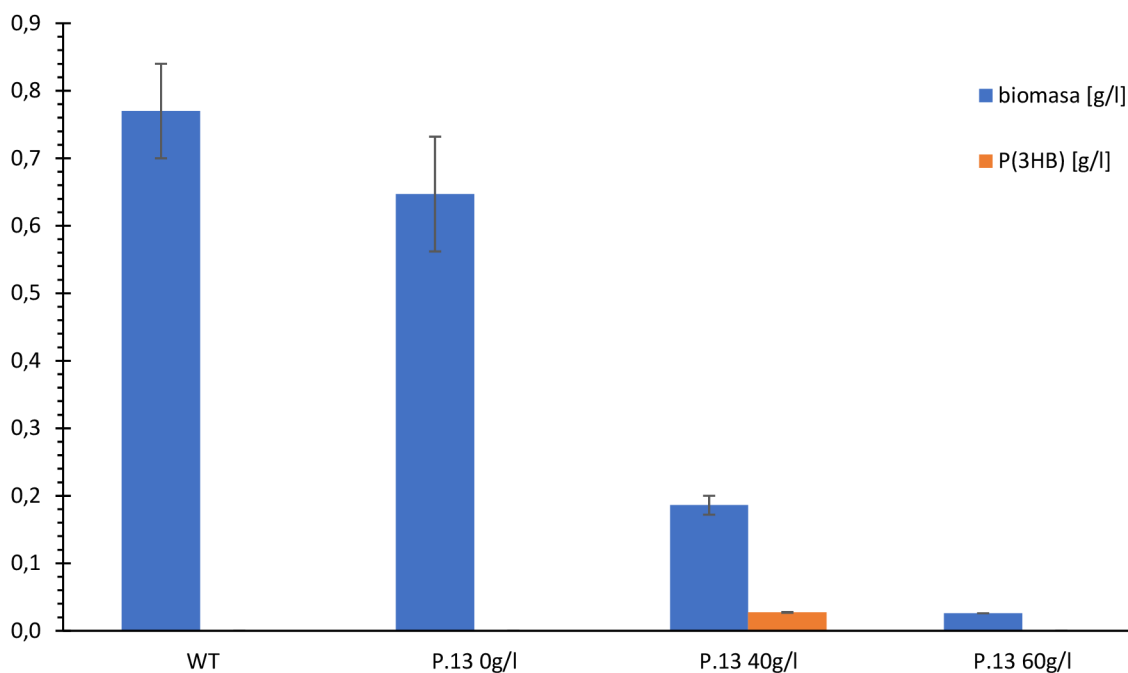
U finální kultivace byla porovnána kultura poslední 13. pasáže s původním divokým kmenem *R. rubrum*. Tato kultivace byla prováděna pro porovnání schopnosti růstu adaptované kultury v různých koncentracích. Kultura divokého kmene sloužila v tomto případě jako kontrola při nulové koncentraci soli. Při této kultivaci šlo opět pozorovat stejný trend v tvorbě pigmentů jako při optimalizaci koncentrace NaCl v médiu v kapitole 4.1. U nulových koncentrací NaCl lze na obrázku 15 vidět narůžovělé zbarvení způsobené tvorbou pigmentů pro fotosyntézu. Zbarvení není příliš výrazné, pouze lehce narůžovělé z důvodu přítomnosti kyslíku, která inhibuje syntézu pigmentů u *R. rubrum*. U zvýšených koncentrací 40 g/l a 60 g/l NaCl lze vidět čistě žluté zbarvení způsobené barvou SYN FAY média a zákalem z růstu kultur, které produkovaly podstatně méně pigmentů, než kultury rostoucí v médiu bez NaCl.



Obrázek 15 – Kultury finální kultivace

Na obrázku 16 lze pozorovat produkci biomasy při daných koncentracích soli. Nejvyšší množství biomasy lze pozorovat u kontrolního divokého kmene (WT) s hodnotou $0,770 \pm 0,07$ g/l. U kultivace adaptované pasáže v nulové koncentraci NaCl lze vidět lehce nižší koncentraci biomasy s hodnotou $0,647 \pm 0,085$ g/l z důvodu adaptace na obsah soli v médiu a změny optimálního složení pro růst, které se liší od optima pro divoký kmen. Stejně snížená koncentrace biomasy se projevila i v koncentraci 40 g/l. Při nejvyšší koncentraci 60 g/l lze pozorovat velmi nízkou koncentraci s hodnotou 0,026 g/l, jelikož kultura projevovala spíše známky vymírání než růstu. Tento projev značí polohu horní hranice koncentrace NaCl, při které je *R. rubrum* schopno přežít, tedy mezi 40 – 60 g/l.

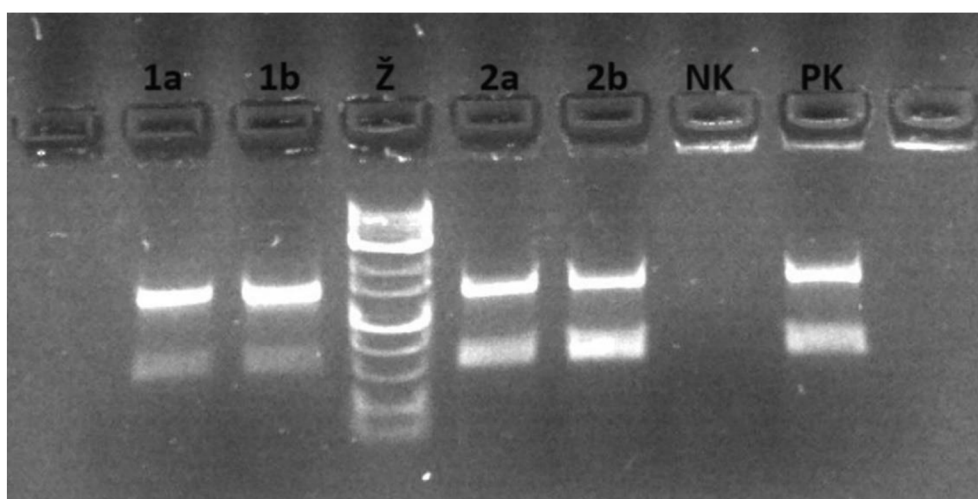
Je zajímavé, že adaptovaný kmen *R. rubrum* produkoval PHA pouze v médiu s koncentrací soli 40 g/l. Tato skutečnost společně s výsledky z optimalizačních kultivací poukazuje na teorii, že *R. rubrum* potřebuje stresový podnět pro produkci PHA. Obsah PHA byl v tomto případě $14,64 \pm 0,33$ %. V koncentraci 60 g/l nedošlo k tvorbě PHA z už zmíněného důvodu nepříznivých podmínek pro růst a vymírání kultury. Podobný efekt stresu na produkci PHA byl pozorován při adaptaci *C. necator* na NaCl a Cu^{2+} . V tomto experimentu došli k podobným výsledkům, kde aktivita enzymů stojících za produkcí PHA byla u adaptace na měďnaté ionty dvojnásobná a při adaptaci na NaCl trojnásobná oproti divokému kmeni. Výsledné množství PHA v divokém kmeni bylo ve výsledku větší, to ale přisuzovali i zvýšení degradace PHA u adaptovaným kmenů [62].



Obrázek 16 – Graf množství biomasy a PHA při finální kultivaci

4.4 Polymerázová řetězová reakce

Při duplexové PCR byly použity dva sady primerů, které mohly být využity díky rozdílné velikosti genů a stejné annealingové teplotě. První využitý pár primerů byl 16S-f a 16S-R pro detekci a multiplikaci genů *16S rRNA*. Tento gen o velikosti okolo 1500 bp vypovídá o bakteriálním původu zkoumaného vzorku [63]. Druhým využitým párem primerů byl G-D a G-1R. Pomocí těchto primerů byl při PCR multiplikován gen pro *phaC* o velikosti 551 bp, který kóduje PHA syntázu první třídy. Přítomnost PHA syntázy první třídy u bakterie *R. rubrum* již byla potvrzena [64].



Obrázek 17 – Agarózová elektroforéza duplexové PCR pro geny *16S rRNA* a *phaC*

Tabulka 2 Vysvětlivky k obrázku 17

1a, 1b	Divoký kmen
Ž	Žebříček
2a, 2b	Třináctá pasáž
NK	Negativní kontrola
PK	Pozitivní kontrola (<i>Cupravidus necator</i>)

Na obrázku 17 lze pozorovat kladnou detekci genu *16S rRNA* u obou zkoumaných vzorků. Pro *16S rRNA* gen odpovídá první viditelný bend a pro gen *phaC* odpovídá druhý viditelný bend. Pozitivní detekce je pozorovatelná i pro gen *phaC* a toto nám potvrzuje, že nedošlo k žádným nežádoucím změnám ve schopnosti produkce PHA v důsledku vysoké koncentrace NaCl.

5 Závěr

Tato práce byla zaměřena na ověření schopnosti produkce PHA u nesírných purpurových bakterií, konkrétně u bakterie *Rhodospirillum rubrum*. Nadále byla zkoumána její schopnost přežít v podmínkách mimo její optimum za stálé produkce PHA. Hlavním cílem byla adaptace na zvýšenou koncentraci NaCl v médiu a identifikace změn vyvolaných danou adaptací.

Nejprve byla provedena optimalizace počáteční koncentrace NaCl v médiu a doby kultivace. Pro tento experiment byla využita média o koncentracích 0, 10, 20, 30, 40 g/l NaCl, ve kterých byla bakterie *R. rubrum* kultivována po dobu 48 a 72 h. Vzorky byly odebrány po 48 a 72 h pro určení optimální kultivační doby. Ze získaných výsledků byla zjištěna schopnost růstu při 40 g/l NaCl s nejvyšším procentuálním výtěžkem PHA během kultivační doby 48 h.

Následně bylo prováděno evoluční inženýrství pasážováním kultury *R. rubrum* ve zvoleném intervalu 48 h v koncentraci 40 g/l NaCl při aerobních podmínkách za tmy. V průběhu celého procesu byla u každé pasáže měřena hodnota pH, optická hustota a odebrán vzorek biomasy pro následné stanovení množství biomasy a PHA pomocí plynové chromatografie s FID detektorem. Z výsledků získaných během tohoto experimentu byla potvrzena adaptace kultury na koncentraci NaCl díky ustálení optické hustoty a množství biomasy od 3. pasáže na hodnotě $0,346 \pm 0,036$ g/l. Stabilní hodnoty pH také poukazyvaly na úspěšnou adaptaci na zvolené podmínky. Dále bylo během tohoto experimentu zjištěno zvýšení produkce PHA, které se od optimalizačních kultivací zvýšilo z 16,38 % na $22,14 \pm 2,83$ %. Toto zvýšení poukazuje na reakci zvýšení produkce PHA jako ochranný mechanismus na stresový podnět, v tomto případě osmotický tlak způsobený NaCl. Toto pozorování je v souladu s výsledky několika jiných studií s jinými mikroorganismy, kde kontinuální vystavení stresu taktéž vyvolalo zvýšení produkce PHA oproti krátkodobému a nárazovému vystavení stresovému stimulu.

Poté byl prováděn experiment kultivace adaptované kultury *R. rubrum* v třech rozdílných koncentracích NaCl 0, 40 a 60 g/l. Také byl kultivován divoký kmen jako kontrolní výsledek pro hodnoty v nulové koncentraci NaCl. Tato kultivace byla prováděna po dobu 48 h za tmy při aerobních podmínkách. Z výsledků tohoto experimentu byl poukázán vliv adaptace na optimální podmínky média při kultivaci. Při porovnávání množství biomasy v nulových

koncentracích NaCl dosáhl divoký kmen vyšších hodnot oproti adaptované kultuře. Divoký kmen dosáhl hodnoty $0,770 \pm 0,07$ g/l a adaptovaná kultura $0,647 \pm 0,085$ g/l. Koncentrace 60 g/l NaCl byla pro bakterii *R. rubrum* příliš vysoká, jelikož kultivace prokazovala známky spíše vymírání než růstu. Z tohoto usuzujeme, že horní hranice koncentrace NaCl, při které je *R. rubrum* schopno růst, leží mezi hodnotami 40 – 60 g/l. Dalším zajímavým poznatkem tohoto experimentu byla produkce PHA pouze u adaptované kultury při koncentraci NaCl 40 g/l. Tento výsledek poukazuje na teorii, že *R. rubrum* potřebuje pro vyšší produkci PHA stresový podnět.

Jako poslední experiment byla provedena gelová elektroforéza divokého kmene a adaptované kultury na geny *16S rRNA* a *phaC*. Pro gen *16S rRNA* potvrzující bakteriální původ byly použity primery 16S-f a 16S-R. Pro gen *phaC*, který stojí za tvorbou PHA syntázy první třídy, byly použity primery G-D a G-1R. V tomto testu byl pozitivně potvrzen výskyt obou genů v obou testovaných vzorcích poukazujících na žádnou změnu na genové úrovni jako následek adaptace.

Výsledky této práce prokázaly na možnou adaptaci *R. rubrum* na vyšší koncentrace NaCl bez ztráty růstu a produkce PHA. Také poukazují na možnost využití mořské vody pro budoucí kultivace a její možné pozitivní vlivy na ekonomickou stránku kultivačního procesu. Tuto teorii bude třeba potvrdit dalšími rozšiřujícími experimenty, při kterých by byla součástí média mořská voda, jelikož mořská voda neobsahuje pouze NaCl, ale i řadu dalších mikroelementů, na rozdíl od klasické sladké vody obohacené o určitou koncentraci NaCl.

CITACE

- [1] Z. A. Raza, S. Abid, a I. M. Banat, „Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications", *Int Biodeterior Biodegradation*, roč. 126, s. 45–56, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001>.
- [2] L. D. Allegue, M. Ventura, J. A. Melero, a D. Puyol, „Unraveling PHA production from urban organic waste with purple phototrophic bacteria via organic overload", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, roč. 166, s. 112687, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112687>.
- [3] G.-Y. A. Tan *et al.*, „Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review", *Polymers (Basel)*, roč. 6, č. 3, s. 706–754, 2014, doi: [10.3390/polym6030706](https://doi.org/10.3390/polym6030706).
- [4] S. Sali a H. R. Mackey, „The application of purple non-sulfur bacteria for microbial mixed culture polyhydroxyalkanoates production", *Rev Environ Sci Biotechnol*, roč. 20, č. 4, s. 959–983, 2021, doi: [10.1007/s11157-021-09597-7](https://doi.org/10.1007/s11157-021-09597-7).
- [5] V. Montiel-Corona a G. Buitrón, „Polyhydroxyalkanoates from organic waste streams using purple non-sulfur bacteria", *Bioresour Technol*, roč. 323, s. 124610, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124610>.
- [6] T. Tsuge, M. Hyakutake, a K. Mizuno, „Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases and PHA-producing *Bacillus*", *Appl Microbiol Biotechnol*, roč. 99, č. 15, s. 6231–6240, 2015, doi: [10.1007/s00253-015-6777-9](https://doi.org/10.1007/s00253-015-6777-9).
- [7] S. Obruca *et al.*, „Novel unexpected functions of PHA granules", *Appl Microbiol Biotechnol*, roč. 104, č. 11, s. 4795–4810, 2020, doi: [10.1007/s00253-020-10568-1](https://doi.org/10.1007/s00253-020-10568-1).
- [8] M. Kohlmeier, „Acetate", in *Nutrient Metabolism*, M. Kohlmeier, Ed., London: Academic Press, 2003, s. 147–153. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-012417762-8.50029-6>.
- [9] D. Jendrossek a R. Handrick, „Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates", *Annu Rev Microbiol*, roč. 56, s. 403–432, 2002, doi: [10.1146/annurev.micro.56.012302.160838](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160838).

- [10] S. Ray a V. Kalia, „Polyhydroxyalkanoate Production and Degradation Patterns in Bacillus Species", *Indian J Microbiol*, roč. 57, zář. 2017, doi: 10.1007/s12088-017-0676-y.
- [11] S. Philip, T. Keshavarz, a I. Roy, „Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications", *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, roč. 82, č. 3, s. 233–247, bře. 2007, doi: <https://doi.org/10.1002/jctb.1667>.
- [12] W. Zhou, S. Bergsma, D. I. Colpa, G.-J. W. Euverink, a J. Krooneman, „Polyhydroxyalkanoates (PHAs) synthesis and degradation by microbes and applications towards a circular economy", *J Environ Manage*, roč. 341, s. 118033, 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118033>.
- [13] S. C. Wang, W. Chen, H. X. Xiang, J. J. Yang, Z. Zhou, a M. F. Zhu, „Modification and Potential Application of Short-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate (SCL-PHA)", *Polymers (Basel)*, roč. 8, č. 8, 2016, doi: 10.3390/polym8080273.
- [14] S. Ladhari, N.-N. Vu, C. Boisvert, A. Saidi, a P. Nguyen-Tri, „Recent Development of Polyhydroxyalkanoates (PHA)-Based Materials for Antibacterial Applications: A Review", *ACS Appl Bio Mater*, roč. 6, č. 4, s. 1398–1430, dub. 2023, doi: 10.1021/acsabm.3c00078.
- [15] K. Prajapati, R. Nayak, A. Shukla, P. Parmar, D. Goswami, a M. Saraf, „Polyhydroxyalkanoates: An Exotic Gleam in the Gloomy Tale of Plastics", *J Polym Environ*, roč. 29, č. 7, s. 2013–2032, 2021, doi: 10.1007/s10924-020-02025-x.
- [16] A. B. PARDEE, H. K. SCHACHMAN, a R. Y. STANIER, „Chromatophores of Rhodospirillum rubrum", *Nature*, roč. 169, č. 4294, s. 282–283, 1952, doi: 10.1038/169282a0.
- [17] D. D. Hickman a A. W. Frenkel, „The Structure of Rhodospirillum rubrum", *J Biophys Biochem Cytol*, roč. 6, č. 2, s. 277–284, říj. 1959, doi: 10.1083/jcb.6.2.277.
- [18] D. D. Hickman a A. W. Frenkel, „OBSERVATIONS ON THE STRUCTURE OF RHODOSPIRILLUM RUBRUM", *Journal of Cell Biology*, roč. 25, č. 2, s. 279–291, kvě. 1965, doi: 10.1083/jcb.25.2.279.

- [19] A.-L. Smeds a S.-O. Enfors, „Extraction of chromatophores from *Rhodospirillum rubrum* in aqueous two-phase systems: A method for large-scale isolation of membrane particles", *Enzyme Microb Technol*, roč. 7, č. 12, s. 601–606, 1985, doi: [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(85\)90028-6](https://doi.org/10.1016/0141-0229(85)90028-6).
- [20] R. U. Schwerzmann a R. Bachofen, „Carotenoid Profiles in Pigment-Protein Complexes of *Rhodospirillum rubrum*", *Plant Cell Physiol*, roč. 30, č. 4, s. 497–504, čer. 1989, doi: [10.1093/oxfordjournals.pcp.a077768](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077768).
- [21] A. Thore, D. L. Keister, a A. S. Pietro, „Studies on the respiratory system of aerobically (Dark) and anaerobically (Light) grown *Rhodospirillum rubrum*", *Arch Mikrobiol*, roč. 67, č. 4, s. 378–396, 1969, doi: [10.1007/BF00412584](https://doi.org/10.1007/BF00412584).
- [22] J. E. Schultz a P. F. Weaver, „Fermentation and Anaerobic Respiration by *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodopseudomonas capsulata*", *J Bacteriol*, roč. 149, č. 1, s. 181–190, led. 1982, doi: [10.1128/jb.149.1.181-190.1982](https://doi.org/10.1128/jb.149.1.181-190.1982).
- [23] A. C. Munk *et al.*, „Complete genome sequence of *Rhodospirillum rubrum* type strain (S1T)", *Stand Genomic Sci*, roč. 4, č. 3, s. 293–302, 2011, doi: [10.4056/sigs.1804360](https://doi.org/10.4056/sigs.1804360).
- [24] M. Madigan a D. Jung, „An Overview of Purple Bacteria: Systematics, Physiology, and Habitats", in *Volume 28*, 2008, s. 1–15. doi: [10.1007/978-1-4020-8815-5_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8815-5_1).
- [25] M. Higuchi-Takeuchi a K. Numata, „Marine Purple Photosynthetic Bacteria as Sustainable Microbial Production Hosts", *Front Bioeng Biotechnol*, roč. 7, 2019, doi: [10.3389/fbioe.2019.00258](https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00258).
- [26] D. M. George, A. S. Vincent, a H. R. Mackey, „An overview of anoxygenic phototrophic bacteria and their applications in environmental biotechnology for sustainable Resource recovery", *Biotechnology Reports*, roč. 28, s. e00563, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00563>.
- [27] J. P. Allen a J. C. Williams, „Photosynthetic reaction centers", *FEBS Lett*, roč. 438, č. 1, s. 5–9, 1998, doi: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01245-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01245-9).

- [28] C. Sepúlveda-Muñoz, I. de Godos Crespo, a R. Muñoz, „Wastewater Treatment Using Photosynthetic Microorganisms", *Symmetry (Basel)*, roč. 15, s. 525, úno. 2023, doi: 10.3390/sym15020525.
- [29] M. Ludwig, J. Hartwell, C. A. Raines, a A. J. Simkin, „The Calvin-Benson-Bassham cycle in C4 and Crassulacean acid metabolism species", *Semin Cell Dev Biol*, roč. 155, s. 10–22, 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2023.07.013>.
- [30] H. Wang a A. Norén, „Metabolic regulation of nitrogen fixation in *Rhodospirillum rubrum*", *Biochem Soc Trans*, roč. 34, č. 11th Nitrogen Cycle Meeting, s. 160–161, 2006, doi: 10.1042/BST0340160.
- [31] I. Maeda, „Potential of Phototrophic Purple Nonsulfur Bacteria to Fix Nitrogen in Rice Fields", *Microorganisms*, roč. 10, č. 1, 2022, doi: 10.3390/microorganisms10010028.
- [32] Z. Yaoping, P. E. L, a R. G. P, „GlnD Is Essential for NifA Activation, NtrB/NtrC-Regulated Gene Expression, and Posttranslational Regulation of Nitrogenase Activity in the Photosynthetic, Nitrogen-Fixing Bacterium *Rhodospirillum rubrum*", *J Bacteriol*, roč. 187, č. 4, s. 1254–1265, úno. 2005, doi: 10.1128/jb.187.4.1254-1265.2005.
- [33] S. Obruca *et al.*, „The presence of PHB granules in cytoplasm protects non-halophilic bacterial cells against the harmful impact of hypertonic environments", *N Biotechnol*, roč. 39, s. 68–80, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.008>.
- [34] P. Sedlacek *et al.*, „PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances", *N Biotechnol*, roč. 49, s. 129–136, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.10.005>.
- [35] Q. Wang, H. Yu, Y. Xia, Z. Kang, a Q. Qi, „Complete PHB mobilization in *Escherichia coli* enhances the stress tolerance: a potential biotechnological application", *Microb Cell Fact*, roč. 8, č. 1, s. 47, 2009, doi: 10.1186/1475-2859-8-47.
- [36] E. Slaninova *et al.*, „Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation", *Appl Microbiol Biotechnol*, roč. 102, č. 4, s. 1923–1931, 2018, doi: 10.1007/s00253-018-8760-8.

- [37] K. Daniel, J. Edouard, a O. Yaacov, „Involvement of the Reserve Material Poly- β -Hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* Stress Endurance and Root Colonization", *Appl Environ Microbiol*, roč. 69, č. 6, s. 3244–3250, čer. 2003, doi: 10.1128/AEM.69.6.3244-3250.2003.
- [38] P. M. Tribelli a N. I. López, „Poly(3-hydroxybutyrate) influences biofilm formation and motility in the novel Antarctic species *Pseudomonas extremaustralis* under cold conditions", *Extremophiles*, roč. 15, č. 5, s. 541, 2011, doi: 10.1007/s00792-011-0384-1.
- [39] N. D. Ayub, P. M. Tribelli, a N. I. López, „Polyhydroxyalkanoates are essential for maintenance of redox state in the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. 14-3 during low temperature adaptation", *Extremophiles*, roč. 13, č. 1, s. 59–66, 2009, doi: 10.1007/s00792-008-0197-z.
- [40] P. Pavez, J. L. Castillo, C. González, a M. Martínez, „Poly- β -Hydroxyalkanoate Exert a Protective Effect Against Carbon Starvation and Frozen Conditions in *Sphingopyxis chilensis*", *Curr Microbiol*, roč. 59, č. 6, s. 636–640, 2009, doi: 10.1007/s00284-009-9485-9.
- [41] S. Obruca *et al.*, „Accumulation of Poly(3-hydroxybutyrate) Helps Bacterial Cells to Survive Freezing", *PLoS One*, roč. 11, č. 6, s. e0157778-, čer. 2016, [Online]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157778>
- [42] D. Wu *et al.*, „Proteomic analysis reveals the strategies of *Bacillus thuringiensis* YBT-1520 for survival under long-term heat stress", *Proteomics*, roč. 11, č. 13, s. 2580–2591, čvc. 2011, doi: <https://doi.org/10.1002/pmic.201000392>.
- [43] T. H. Pham, J. S. Webb, a B. H. A. Rehm, „The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation", *Microbiology (N Y)*, roč. 150, č. 10, s. 3405–3413, 2004, doi: <https://doi.org/10.1099/mic.0.27357-0>.
- [44] L.-K. Goh, R. K. Purama, a K. Sudesh, „Enhancement of Stress Tolerance in the Polyhydroxyalkanoate Producers without Mobilization of the Accumulated Granules",

- Appl Biochem Biotechnol*, roč. 172, č. 3, s. 1585–1598, 2014, doi: 10.1007/s12010-013-0634-z.
- [45] J. J. Koskimäki *et al.*, „Methyl-esterified 3-hydroxybutyrate oligomers protect bacteria from hydroxyl radicals“, *Nat Chem Biol*, roč. 12, č. 5, s. 332–338, 2016, doi: 10.1038/nchembio.2043.
- [46] M. Müller-Santos, J. J. Koskimäki, L. P. S. Alves, E. M. de Souza, D. Jendrossek, a A. M. Pirttilä, „The protective role of PHB and its degradation products against stress situations in bacteria“, *FEMS Microbiol Rev*, roč. 45, č. 3, s. fuaa058, kvě. 2021, doi: 10.1093/femsre/fuaa058.
- [47] M. B. Batista *et al.*, „PHB Biosynthesis Counteracts Redox Stress in *Herbaspirillum seropedicae*“, *Front Microbiol*, roč. 9, 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.00472.
- [48] Z. Rahman a V. P. Singh, „Bioremediation of toxic heavy metals (THMs) contaminated sites: concepts, applications and challenges“, *Environmental Science and Pollution Research*, roč. 27, č. 22, s. 27563–27581, 2020, doi: 10.1007/s11356-020-08903-0.
- [49] A. A. Kamnev, A. V Tugarova, a L. P. Antonyuk, „Endophytic and epiphytic strains of *Azospirillum brasilense* respond differently to heavy metal stress“, *Microbiology (N Y)*, roč. 76, č. 6, s. 809–811, 2007, doi: 10.1134/S0026261707060239.
- [50] S. Obruca, I. Marova, Z. Svoboda, a R. Mikulikova, „Use of controlled exogenous stress for improvement of poly(3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator*“, *Folia Microbiol (Praha)*, roč. 55, č. 1, s. 17–22, 2010, doi: 10.1007/s12223-010-0003-z.
- [51] Z. Zhu *et al.*, „Evolutionary engineering of industrial microorganisms-strategies and applications“, *Appl Microbiol Biotechnol*, roč. 102, č. 11, s. 4615–4627, 2018, doi: 10.1007/s00253-018-8937-1.
- [52] X. Hua *et al.*, „A salt tolerant *Enterobacter cloacae* mutant for bioaugmentation of petroleum- and salt-contaminated soil“, *Biochem Eng J*, roč. 49, č. 2, s. 201–206, 2010, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.12.014>.

- [53] M. Dragosits a D. Mattanovich, „Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology", *Microb Cell Fact*, roč. 12, č. 1, s. 64, 2013, doi: 10.1186/1475-2859-12-64.
- [54] A. Buchenauer, M. C. Hofmann, M. Funke, J. Büchs, W. Mokwa, a U. Schnakenberg, „Micro-bioreactors for fed-batch fermentations with integrated online monitoring and microfluidic devices", *Biosens Bioelectron*, roč. 24, č. 5, s. 1411–1416, 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.08.043>.
- [55] Y.-W. Cui, X.-Y. Gong, Y.-P. Shi, a Z. (Drew) Wang, „Salinity effect on production of PHA and EPS by *Haloferax mediterranei*", *RSC Adv*, roč. 7, č. 84, s. 53587–53595, 2017, doi: 10.1039/C7RA09652F.
- [56] I. Pernicova, I. Novackova, P. Sedlacek, X. Kourilova, M. Koller, a S. Obruca, „Application of osmotic challenge for enrichment of microbial consortia in polyhydroxyalkanoates producing thermophilic and thermotolerant bacteria and their subsequent isolation", *Int J Biol Macromol*, roč. 144, s. 698–704, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.128>.
- [57] Q. Jin a M. F. Kirk, „pH as a Primary Control in Environmental Microbiology: 1. Thermodynamic Perspective", *Front Environ Sci*, roč. 6, 2018, doi: 10.3389/fenvs.2018.00021.
- [58] R. Ye, Q. Jin, B. Bohannan, J. K. Keller, S. A. McAllister, a S. D. Bridgham, „pH controls over anaerobic carbon mineralization, the efficiency of methane production, and methanogenic pathways in peatlands across an ombrotrophic–minerotrophic gradient", *Soil Biol Biochem*, roč. 54, s. 36–47, 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.05.015>.
- [59] H. Swenson a U. S. G. Survey, „Why is the ocean salty?", 1994. doi: 10.3133/70159082.
- [60] S. M. Rea, N. J. McSweeney, B. P. Degens, C. Morris, H. M. Siebert, a A. H. Kaksonen, „Salt-tolerant microorganisms potentially useful for bioleaching operations where fresh water is scarce", *Miner Eng*, roč. 75, s. 126–132, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2014.09.011>.

- [61] H. M. W, P. D. M, W. J. Lee, L. V Celeste, W. A. T, a T. J. Cameron, „Artificial Seawater Media Facilitate Cultivating Members of the Microbial Majority from the Gulf of Mexico", *mSphere*, roč. 1, č. 2, s. 10.1128/msphere.00028-16, dub. 2016, doi: 10.1128/msphere.00028-16.
- [62] I. Novackova *et al.*, „The role of polyhydroxyalkanoates in adaptation of *Cupriavidus necator* to osmotic pressure and high concentration of copper ions", *Int J Biol Macromol*, roč. 206, s. 977–989, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.102>.
- [63] C. J. E, „Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases", *Clin Microbiol Rev*, roč. 17, č. 4, s. 840–862, říj. 2004, doi: 10.1128/cmr.17.4.840-862.2004.
- [64] D. M. Revelo Romo, M. V. Grosso, N. C. Moreno Solano, a D. Montoya Castaño, „A most effective method for selecting a broad range of short and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate producing microorganisms", *Electronic Journal of Biotechnology*, roč. 10, č. 3, s. 348–357, 2007, doi: 10.4067/s0717-34582007000300002.

Použité zkratky

PHA – Polyhydroxyalkanoáty

scl-PHA – Polyhydroxyalkanoáty s krátkým postranním řetězcem

P(3HB) – Poly-3-hydroxybutyrát

P(3HV) – Poly-3-hydroxyvalerát

mcl-PHA – Polyhydroxyalkanoáty se středně dlouhým postranním řetězcem

lcl-PHA – Polyhydroxyalkanoáty s dlouhým postranním řetězcem

(P(3HB-co-3HV)) – Kopolymer poly-3-hydroxybutyrátu a poly-3-hydroxyvalerátu

(P(3HB-co-4HB)) – Kopolymer poly-3-hydroxybutyrátu a poly-4-hydroxybutyrátu

CoA– koenzym A

P(3HB-co-HHX) – Kopolymer poly-3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyhexanoátu

PLA – Polymer kyseliny mléčné

NAD⁺ – oxidovaná forma nikotinamidadenindinukleotidu

NADH – redukována forma nikotinamidadenindinukleotidu

NADP⁺ – Nikotinamidadenindinukleotidfosfát

NAD – Nikotinamidadenindinukleotid

BChl – Bakteriochlorofyl

BPhe – Bakteriofytin

Q_A – Ubichinonový akceptor

Q_B – Ubichinonový akceptor

bc₁ – Cytochromový komplex

c₂ – Cytochromový komplex

ATP – Adenosintrifosfát

ADP – Adenosindifosfát

CO₂ – Oxid uhličitý

CH₄ – Methan

H₂O – Voda

gTME – globální transkripční inženýrství (Global transcription machinery engineering)

NADPH – Nikotinamidadenindinukleotidfosfát

NADPH+H⁺ – Nikotinamidadenindinukleotidfosfát

NH₃ – Amoniak

NaCl – Chlorid sodný

ROS – Reaktivní forma kyslíku

O₂ – Kyslík

O₃ – Ozón

H₂O₂ – Peroxid vodíku

ALE – Adaptivní laboratorní evoluce

MOPS – kyselina 4-morfolinopropansulfonová

FID – plamenoionizační detektor

PCR – polymerázová řetězová reakce

WT – „wild type“, divoký kmen