

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2018

PETRA MAJEROVÁ

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ
KATEDRA CHEMIE



Monitorování znečištění vody aromatickými uhlovodíky
pomocí bioluminiscenčních bioreportérů

Monitoring of aromatic hydrocarbons in contaminated water
with bioluminescent bioreporters

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí práce: doc. Ing. Alena Hejtmánková, CSc.
Bakalant: Petra Majerová

2018

Práce byla prováděna v Oddělení vícefázových reaktorů, v laboratoři imobilizovaných biokatalyzátorů a optických senzorů Ústavu chemických procesů AV ČR, v.v. i., v Praze 6 Suchbale.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Ing. Aleny Hejtmánkové, CSc. Další potřebné informace s experimentální prací mi poskytla Ing. Gabriela Kuncová CSc., a že jsem uvedla všechny literární prameny, ze kterých jsem čerpala.

Prohlašuji, že tištěná verze se shoduje s verzí odevzdanou přes Univerzitní informační systém.

V Praze 25. 04. 2018

.....

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat všem, kteří se podíleli na dokončení mé bakalářské práce. Za vytvoření kvalitních podmínek pro měření a příjemného prostředí konzultantce Ing. Gabriele Kuncové CSc. Také za její pomoc při měření, cenné rady a získání mnoha zkušeností. Dále si velmi cením trpělivosti, pomoci a odborného vedení při práci doc. Ing. Aleně Hejtmánkové, CSc. Dále moje poděkování patří Doc. Ing. Josefu Tröglovi Ph.D. za poskytnutí cenných rad, chemikálií a reálné vody k mému měření. V neposlední řadě děkuji mé rodině, příteli, přátelům a všem blízkým za trpělivost a podporu během celého mého studia.

Abstrakt

Cílem práce bylo porovnat indukci bioluminiscence volných a imobilizovaných buněk bioluminiscenčních bioreportérů *Pseudomonas fluorescens* HK44 a *Pseudomonas putida* TVA8. *Ps. fluorescens* HK44 je geneticky upravený mikroorganismus, emitující bioluminiscenci v přítomnosti salicylové kyseliny naftalenu, a skupiny dalších polyaromatických uhlovodíků. *Ps. putida* TVA8 je geneticky upravený mikroorganismus, produkující bioluminiscenci v přítomnosti toluenu a dalších aromatických látek (BTEX). V rámci práce byla proměřena závislost intenzity bioluminiscence *Ps. fluorescens* HK44 na koncentraci salicylové kyseliny v rozsahu 0 až 500 mg.ml⁻¹ a *Ps. putida* TVA8 na koncentraci toluenu v rozsahu 0 až 0,88 µg.ml⁻¹. Bioluminiscenční bioreportéry byly imobilizovány do polyvinylalkoholového gelu technologii Lentikats[®]. Intenzity indukované bioluminiscence *Ps. putida* TVA8 volných i buněk imobilizovaných do čoček Lentikats[®] byly prakticky stejné, kdežto v případě *Ps. fluorescens* HK44 imobilizací došlo k tomu, že maxima bioluminiscence bylo dosaženo za více než dvojnásobně delší dobu. Dále byla sledována opakovatelnost a skladovatelnost. Čočky Lentikats[®] byly skladovány po dobu jednoho měsíce. Během této doby bylo možné indukovat bioluminiscenci. Intenzita bioluminiscence byla závislá na podmínkách skladování a způsobu „oživení“. Možnost použití imobilizovaných bioluminiscenčních bioreportérů k detekci znečištění v reálném vzorku byla ověřena detekcí vodou znečištěnou BTEX odebranou v kontaminované lokalitě v severních Čechách. Intenzita bioluminiscence reálného vzorku byla úměrná intenzitě indukované standardním roztokem toluenu, pokud byl vzorek příslušně naředěn. Intenzita bioluminiscence koncentrovaného vzorku byla nižší v důsledku toxického působení vysoké koncentrace dalších znečišťujících látek na mikroorganismy biosenzoru.

Klíčová slova:

Bioluminiscenční bioreportéry, detekce znečištění aromatickými látkami, biosenzory, imobilizované mikroorganismy, Lentikats[®].

Abstract

The aim of this work was to compare induction of bioluminescence of free and immobilized bioluminescent bioreporters. *Pseudomonas fluorescens* HK44 and *Pseudomonas putida* TVA8. *Ps. fluorescens* HK44 is genetically engineered microorganisms producing bioluminescence in presence of salicylic acid, naphthalene, and other polyaromatic hydrocarbons. *Ps. putida* TVA8 is genetically engineered microorganisms producing bioluminescence in presence of toluene and other aromatic hydrocarbons (BTEX). In this study the dependencies of intensities of bioluminescence of *Ps. fluorescens* HK44 on concentration of salicylic acid in the range from 0 to 500 mg.ml⁻¹ and *Ps. putida* TVA8 on concentration of toluene in the range from 0 to 0.88 µg.ml⁻¹ were measured. Bioluminescent bioreporters were immobilized in polyvinylalcohol matrix via Lentikats[®] technology. Intensities of induced bioluminescence of *Ps. putida* TVA8, free and cells in Lentikats[®], were similar, whereas in case of *Ps. fluorescens* HK44 immobilization caused that the bioluminescence maxima were appeared after twice longtime. Further reproducibility and shelf life were followed. Lentils of Lentikats[®] were stored for one month and during that time, it was possible to induce the bioluminescence. Intensities of induced bioluminescence were dependent on storages conditions and mode of recovery. A potential of application of Lentakits[®] immobilized bioreporters was checked with real water sampled in contaminated area in north Bohemia. Intensity of bioluminescence of real sample was proportional to intensity induced with toluene solution only in case that sample was correspondingly diluted. Intensity of bioluminescence of concentrated sample was lower due to toxicity of high concentration of pollutants to the organisms of .biosensor.

Key words:

Bioluminescent bioreporters, detection of contamination with aromatic compounds, immobilized microorganisms, Lentikats[®].

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíl práce.....	2
3	Literární rešerše	2
3.1	Aromatické sloučeniny jako polutanty	2
3.1.1	Toluen	2
3.1.2	Naftalen	3
3.1.3	Salicylová kyselina.....	5
3.2	Bioluminiscence	5
3.2.1	Bioluminiscence <i>Aequorea victoria</i>	7
3.2.2	Bioluminiscence <i>Vibrio fischeri</i>	8
3.3	Biosenzory.....	9
3.3.1	Dělení biosenzorů.....	10
3.3.2	Využití biosenzorů	11
3.4	Imobilizace biologického materiálu	13
3.4.1	Metody imobilizace biologického materiálu.....	13
3.5	Bioreportéry.....	14
3.6	Geneticky modifikované organismy (GMO).....	15
3.7	<i>Pseudomonas putida</i> TVA8	16
3.8	<i>Pseudomonas fluorescens</i> HK44	16
4	Metodika	17
4.1	Použité chemikálie	17
4.2	Použité přístroje.....	18
4.3	Použité roztoky a média	18
4.4	Použitý organismus	21
4.5	Měření bioluminiscence	22
4.6	Použité metody	23
4.6.1	Konzervace mikroorganismů	23
4.6.2	Kultivace mikroorganismů.....	23
4.6.3	Indukce volných buněk	24
4.6.4	Imobilizace buněk	25
4.6.5	Indukce imobilizovaných buněk	27
4.7	Experimenty s <i>Pseudomonas putida</i> TVA8	27
4.7.1	Růstová křivka	27

4.7.2	Závislost optické hustoty na log počtu buněk v 1 ml.....	27
4.7.3	Vliv koncentrace toluenu na bioluminiscenci volných buněk	28
4.7.4	Vliv buněčné koncentrace v jamce na bioluminiscenci	28
4.7.5	Srovnání bioluminiscence volných a imobilizovaných buněk.....	28
4.7.6	Vliv skladovacího média na bioluminiscenci	28
4.8	Experimenty s <i>Pseudomonas fluorescens</i> HK44.....	29
4.9	Reálný vzorek vody	29
5	Výsledky	30
5.1	<i>Pseudomonas putida</i> TVA8	30
5.2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> HK44	35
6	Diskuze	41
7	Závěr a přínos práce.....	43
8	Přehled literatury a použitých zdrojů.....	44

1 Úvod

Kvalita životního prostředí značně ovlivňuje zdraví člověka, zvířat, rostlin a okolí. Člověk je s přírodou úzce svázán – tvoří dynamicky fungující systém. Jak se lidská populace vyvíjí, tak se mění i kvalita životního prostředí. Člověk působí na životní prostředí v lokálním, ale i globálním měřítku. S rozvojem techniky a průmyslu, bohužel člověk přírodě čím dál více škodil. K nejhorším změnám došlo v době průmyslové revoluce v důsledku industrializace, rozvoje dopravy a nadměrného využívání přírodních zdrojů (uhlí, ropy). Do prostředí začaly být vnášeny chemické látky, které v přírodě byly původně přítomny jen v minimálních koncentracích nebo se vůbec nevyskytovaly. Chemické látky, které jsou ve velkém množství škodlivé a znečišťují životní prostředí, se nazývají polutanty. (Loučka, 2014).

Mezi nejzávažnější polutanty se řadí například kovy (především toxické kovy jako rtuť, olovo, kadmium aj.), azbest, kyanidy, monocyklické aromatické uhlovodíky, polycyklické aromatické uhlovodíky, pesticidy a produkty jejich rozkladu a další. (Loučka, 2014). V životním prostředí se nachází těchto znečišťujících látek mnoho, a proto je důležitý jejich monitoring. Monitorováním znečištění životního prostředí za použití moderních chemických analýz, lze docílit přesného stanovení celkové koncentrace škodlivých chemických látek. Chemická analýza však neposkytuje informace o biologické dostupnosti a celkové toxicitě kontaminantů. Alternativní metodu představují bioreportéry jako senzory pro měření kontaminace vody a půdy (Close & kol., 2009). Tato metoda poskytuje informace o celkové toxicitě, biologické dostupnosti a o celkovém reálném dopadu na organismy. Bakteriální biosenzory jsou schopné citlivě reagovat na chemické látky nebo fyzikální činitele v jejich okolí produkcí viditelného světla. Měřitelný signál je přímo úměrný koncentraci analytu ve vzorku. (Saylor & kol., 1998, Kuncová & kol., 2011). Hlavními výhodami biosenzorů je jejich jednoduchost, rychlá odezva a vlastní specifická. V životním prostředí se biosenzory používají zejména pro sledování biologického degradačního procesu různých organických polutantů, luminiscenční stanovení znečišťujících látek, nebo vizualizaci znečištění.

Metoda monitorování znečištění není tak přesná, jako chemická analýza pomocí plynové chromatografie (GC), ale poskytuje semikvantitativní údaje o biologické dostupnosti skupiny polutantů a při zpracování většího počtu vzorků z jedné lokality je i levnější.

2 Cíl práce

Detekce kontaminantů pomocí bioluminiscenčních bioreportérů, geneticky upravených mikroorganismů, produkujících bioluminiscenci v přítomnosti určitých znečišťujících látek. Cílem práce je vypracovat postup detekce polyaromatických uhlovodíků (PAHs) pomocí imobilizovaných bioluminiscenčních bioreportérů v mikrotitrační destičce a porovnat s výsledky chemické analýzy reálného vzorku.

3 Literární rešerše

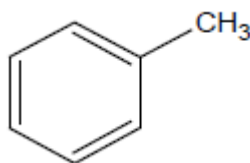
3.1 Aromatické sloučeniny jako polutanty

Aromatické uhlovodíky (arény, aromáty) jsou sloučeniny uhlíku a vodíku uspořádané do jednoho či více aromatických jader. Strukturu aromatického jádra tvoří šestice uhlíků uzavřených do kruhu, ve kterém se střídají jednoduché a dvojně vazby. Arény jsou kapaliny (např. benzen, toluen, xyleny) nebo pevné látky (např. naftalen, fenanthren). Jsou to těžké, jedovaté sloučeniny většinou s typickým zápachem a vyznačují se dobrou rozpustností v organických rozpouštědlech. Tato skupina látek patří mezi významné polutanty znečišťující životní prostředí. Ropné látky a uhlí jsou hlavní surovinou pro jejich výrobu. Aromáty se dělí do dvou základních skupin podle počtu benzenových jader na monocyklické a polycyklické. Mezi monocyklické patří benzen, toluen, etylbenzen, xylen (BTEX), styren a kumen. Do skupiny polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU) patří naftalen, fenantren, antracen, fluoren, fluoranten, pyren a další (Arnika ©2014, Tloučka, 2014).

3.1.1 Toluén

Toluén (obr.1) je monocyklická aromatická sloučenina s charakteristickým nasládlým zápachem. Je to bezbarvá těžká kapalina, jejíž páry jsou na vzduchu výbušné. Této látce se využívá jako průmyslového rozpouštědla, k barvení kůží, výrobě benzenu a dalších chemických látek. Uvolňuje se do prostředí z benzínu, unikáním ze skládek odpadu anebo cigaretového kouře, což má za následek negativní dopady na okolí a živé organismy včetně člověka. Škodí lidskému organismu, dráždí oči, dýchací cesty a má narkotické účinky. Chronická expozice se projevuje neurotoxicky, např. encefalopatií, při níž dochází k poškození mozku a zraku, které mohou způsobit až oslepnutí (©IRZ, Loučka, 2014).

Obr. 1: Toluén (Loučka, 2014)



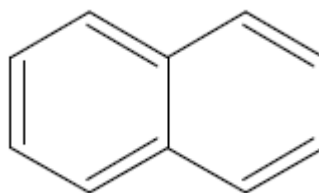
Ke stanovení koncentrace toluenu v prostředí se využívá mnoha laboratorních technik. Od chemické či fyzikální analýzy, přes plynovou chromatografii nebo plynové chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií a dalších. Alternativní metodou stanovení toluenu ve vodě či půdě je stanovení koncentrace analytu ve vzorku pomocí bioluminiscenčního bioreportéru *Pseudomonas putida* TVA8. Geneticky upravený bakteriální kmen, který v přítomnosti benzenu, toluenu, etylbenzenu a xylenu (BTEX) produkuje snadno měřitelný světelný signál – bioluminiscenci. Tento gen byl použit v mnoha studiích pro stanovení koncentrace toluenu ve vodě i v půdě. V publikaci (Kuncová & kol., 2016) byl použit buněčný bioreportér imobilizovaný v hydrogelu oxidu křemičitého za použití optického vlákna ve vzorcích vody. Bioluminiscence takto imobilizovaných buněk byla indukována toluenem při nejvyšší koncentraci ($26,5 \text{ mg.l}^{-1}$) a při nejnižší ($5,3 \text{ mg.l}^{-1}$) z koncentrační řady. K dosažení maxima došlo do 12 hodin měření po indukci. Další článek (Zajíc & kol., 2016) se věnuje adsorpci buněk *Pseudomonas putida* TVA8 na povrchu optického vlákna z křemene po ošetření 3-aminopropyltriethoxysilanem (APTES). Kde byly porovnány výsledky měření bioluminiscence z obou stran vrstvy adsorbovaných buněk. V diplomové práci (Hlavatá, 2009) byl použit luminiscenční bioreportér k detekci ropných látek a jejich derivátů.

3.1.2 Naftalen

Naftalen patří do skupiny polyaromatických sloučenin. Jedná se o uhlovodíky tvořené nejméně dvěma benzenovými jádry (obr. 2). PAU se běžně vyskytují v životním prostředí. Jsou důsledkem z vulkanické činnosti či požárů, nicméně k největším emisím dochází antropogenní činností z dopravy, průmyslu, topenišť, nebo při grilování. Tyto škodliviny se nejčastěji naváží na pevné částice v atmosféře a dochází k jejich bioakumulaci. Proto patří mezi nejzávažnější polutanty životního prostředí. PAU se v životním prostředí přeměňují velmi pomalu. Produkty jejich přeměn mohou být ještě toxičtější než původní uhlovodíky (Arnika ©2014, Tloučka, 2014).

Nejjednodušším polycyklickým uhlovodíkem se dvěma aromatickými jádry je naftalen. Má pevnou krystalickou strukturu bílé barvy. Patří mezi hořlavé a explozivní látky. Běžně se nachází v ropě a černouhelném dehtu, odkud se také získává. Přirozeně vzniká při hoření organického materiálu. Je důležitou surovinou při výrobě barviv (indigo), farmak, pryskyřic a rozpouštědel. Využití nachází také v domácnosti jako dezinfekce, nebo insekticid. Naftalen má toxické účinky na organismus, konkrétně nefrotoxické (poškozuje ledviny), hepatotoxické (může způsobit poškození jater), anemické (může za rozpad červeného krevního barviva - hemoglobinu) a dermatologické. Má dráždivé účinky na oči (může dojít k poškození rohovky či sítnice), na trávicí trakt po požití a na sliznice dýchacích cest. Je silně toxický pro vodní prostředí (Tloučka, 2014).

Obr. 2: Naftalen (Pavlovský & kol., 2013)



Stanovení naftalenu a dalších PAU v ovzduší je velmi komplikované kvůli vysokém bodu varu látek a desorpci z pevných částic během vzorkování. Ke stanovení se využívá několika chromatografických metod. Mezi nejrozšířenější metody patří plynová chromatografie s hmotnostní nebo plamenovou ionizační detekcí. Dále metoda izotopového zředování anebo kapalinová chromatografie za použití spektrometrického detektoru, snímajícího fluorescenční záření. Vysokou účinnou kapalinová chromatografie (HPLC) s fluorescenční detekcí je metoda, která se používá pro měření naftalenu ve vodě. Vhodné je využít i jiných detektorů, jakými jsou například hmotnostní spektrometry. Zjištění koncentrace naftalenu v půdě se provádí buď extrakčními metodami. Veškeré analýzy však potřebují specializovanou laboratoř a jsou nákladné. Navíc je potřeba klást vyšší nároky na zjišťování biodostupnosti toxicity těchto polutantů včetně jejich vlivu na živý organismus. K tomuto účelu se stále více využívá mikroorganismů, hlavně bakterií, které je možné napěstovat v laboratorních podmínkách, které pak odpovídají na konkrétní podnět snadno měřitelnou odezvou pomocí světla (Arnika, ©2014, © IRZ).

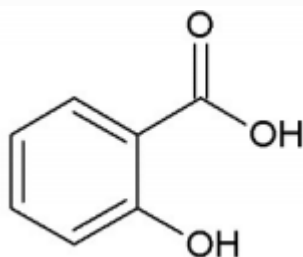
Alternativní metodou pro stanovení naftalenu v životním prostředí, je použití luminiscenčního bioreportéru *Pseudomonas fluorescens* HK44, produkujícího bioluminiscenci v přítomnosti některých polyaromatických uhlovodíků (naftalenu resp. salicylátu). Tato metoda byla různě modifikována. Například v článku (Trögl & kol., 2004) byly použity buňky bakteriálního bioreportéru, které byly imobilizovány do předpolymerizovaného tetramethoxysilanu. Bioluminiscence byla zaznamenána po 50 minut po indukci a maxima odezvy bylo dosaženo po 4,5 hodiny. Byla zde zaznamenána lineární závislost mezi koncentrací buněk a luminiscenční odezvou biosenzoru. Čím vyšší koncentrace buněk byla použita při experimentu, tím vyšší odezvy bylo dosaženo. Bohužel se zvyšující koncentrací buněk se snižovala mechanická odolnost biosenzoru. Byly připraveny kalibrační řady, jak pro toluen, tak pro salicylát. Minimální koncentrace indukující detekovatelnou bioluminiscenci byla u koncentrace naftalenu $1,2 \text{ mg.l}^{-1}$ a salicylátu $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$. Bioreportérová účinnost *Ps. fluorescens* HK44 imobilizovaného alginátu, síťovaného ionty stroncia, byla zkoumána v simulovaných podzemních vodách s různými režimy pH. Tato studie naznačila, že HK44 je užitečný pro dlouhodobé aplikace biosenzoru v podmínkách mírně kyselých až neutrálních podzemních vod. S úmyslem vytvořit mikrobiální senzor pro biodegradaci kyseliny salicylové pomocí *Ps. fluorescens* HK44 přišel roku 2007 tým vědeckých pracovníků z Brazílie. Ve své studii (Tatyane & kol., 2007)

popisují schopnost HK44 reagovat na degradaci kyseliny salicylové v jednoduché formě ve vodních systémech. Tento kmen má slibnou budoucnost ve využití ve formě luminiscenčního mikrobiálního snímače. V disertační práci (Trögl, 2005) je popsána studie o imobilizaci buněk *Ps. fluorescens* HK44 metodou sol-gel do křemičitých vrstev, se kterými byly provedeny série měření. Experimenty byly založeny na stanovení vlastností a životaschopnosti imobilizovaných buněk, jejich následné použití pro konstrukci optického biosenzoru, a pro detekci naftalenu či salicylátu. Rozdíl v bioluminiscenci volných a imobilizovaných buněk nebyl prakticky žádný, za to se imobilizované buňky daly opakovaně použít pro další měření experimentů (řádově měsíce). Maxima bioluminiscence bylo dosaženo po 4 – 12 hodinách indukce podle toho, který induktor (naftalen či salicylát) byl použit-

3.1.3 Salicylová kyselina

Jako alternativa naftalenu se může použít salicylát, sůl salicylové kyseliny. Salicylová kyselina patří mezi organické kyseliny. Je to krystalická bezbarvá látka bez zápachu. Řadí se mezi málo hořlavé chemické látky. Vyznačuje se špatnou rozpustností ve vodě (při 20 °C). Při intenzivním zahřívání vytváří se vzduchem výbušné směsi. Salicylová kyselina se průmyslově syntetizuje metodou Kolbe-Schmitt ze suchého fenoxidu sodného, v proudu oxidu uhličitého při 150 – 160 °C a tlaku 500 kPa. Salicylová kyselina slouží jako hlavní surovina pro výrobu acetylsalicylové kyseliny (aspirinu). V malých koncentracích se používá v kožním lékařství k podpoře růstu epitelu kůže. Při zvýšení koncentrace se kyselina používá k léčbě lupénky nebo bradavic na nohách. Při kontaktu s kůží má mírné dráždivé účinky a může způsobit vážné poškození očí. V případě vdechnutí může způsobit kašel a dušnost. Nejpoužívanější soli salicylové kyseliny je salicylát sodný. Tato sůl má podobné účinky na zdraví člověka, jako samotná kyselina (Lysáková, 2017).

Obr. 3: Salicylová kyselina (Lysáková, 2017).



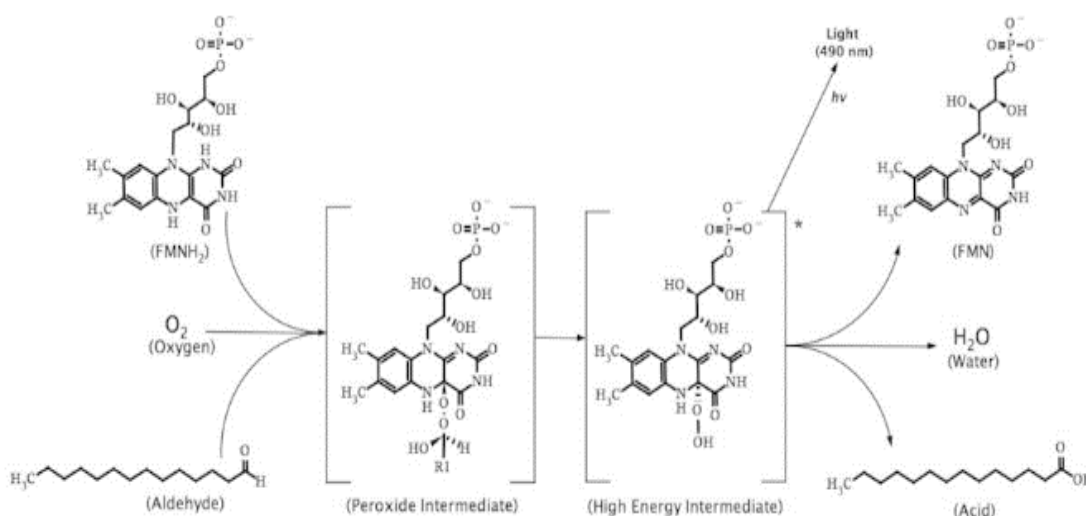
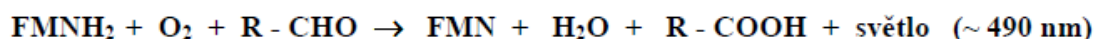
3.2 Bioluminiscence

Bioluminiscence je specifickým případem chemiluminiscence. Je produkována živými organismy, jedná se o tzv. „světélkování organismů“. Existuje celá řada organismů v přírodě, které jsou schopny bioluminiscence jako např. mořští živočichové, chobotnice, medúzy, ryby, řasy, bakterie na hnilým substrátu, modře světélkující prvoci, členovci, světlušky aj. Ryby patří mezi jediné obratlovce, kteří jsou schopni bioluminiscence. Jen na dně oceánů žije tisíce druhů světélkujících

organismů. Více než polovina všech druhů medúz produkuje světlo k obraně proti predátorům. Zajímavý je případ světélkování světlušek, protože schopnost bioluminiscence mají jen všechny larvy světlušek. Larvy pravděpodobně využívají světélkování k odrazení predátora, zatímco někteří dospělci světlušek pro lákání samečků. Dravé druhy členovců napodobují světlo světlušek pro lákání kořisti. Živočichové jsou schopni produkovat světlo sami, pomocí buněk zvané photocyty. Tyto buňky jsou různě rozmístěné ve tkáních živočichů, nebo se seskupují ve specializovaných orgánech, zvané photophory. Někteří živočichové potřebují k produkci světla symbioticky žijící druhy bakterií, které se usídlily v orgánech ryb a hlavonožců (Meighen, 1991, James & kol., 2000).

Bioluminiscence je výsledkem složitých chemických reakcí v těle organismů. Při kterých dochází k vyzáření až 96 % světla, zbytek je teplo. Bioluminiscenční světlo je světlem tzv. „studeným“. Chemické reakce se účastní luciferin (nízkomolekulární substrát tukovité povahy) a enzym luciferáza (který štěpí substrát luciferin), přičemž se emituje světlo. Luciferin je v organismech syntetizován, nebo je dodáván potravou. Luciferinů existuje více druhů, podle toho, ze kterých organismů byly izolovány. Luciferáza je enzym katalyzující luminiscenční reakci za přítomnosti kyslíku. Luciferin se oxiduje molekulárním kyslíkem za přítomnosti enzymu luciferázy, vznikne oxyluciferin v excitovaném stavu a přebytečná energie se vyzáří ve formě modrozeleného světla o vlnové délce 490 nm. Reakce se často účastní navíc flavinové a nikotinové kofaktory, energie ve formě Adenosintrifosfátu (ATP), a někdy i ionty kovů (obr. 4). Luciferin, získaný z mořských bakterií *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri* je dvoukomponentní systém sestávající se z flavin mononukleotidu a dlouhého alifatického aldehydu (Hakkila & kol., 2002, Close & kol., 2009).

Obr. 4: Obecné schéma bakteriální bioluminiscence (Close & kol., 2009).

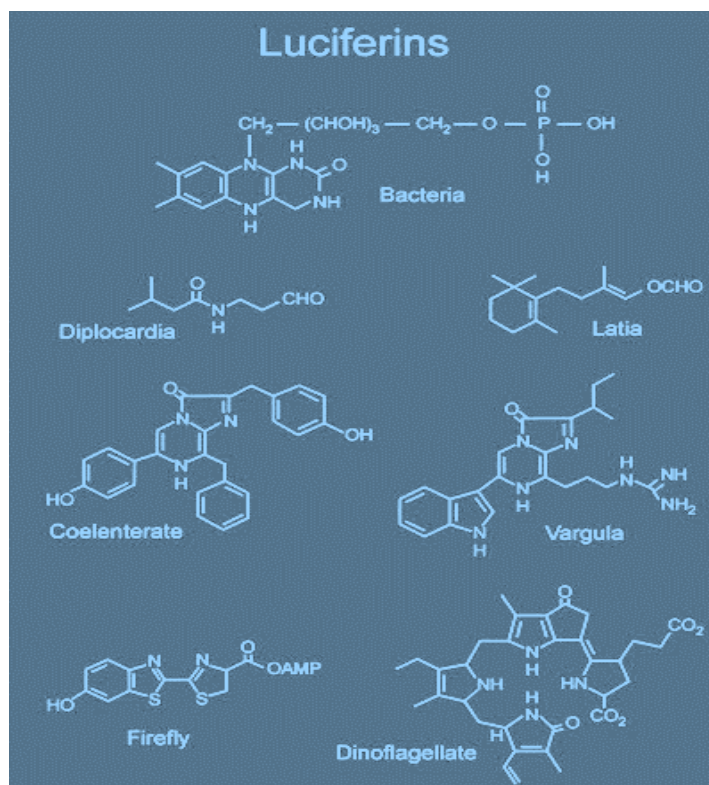


Luciferin (alifatický aldehyd s dlouhým řetězcem) reaguje s redukováným flavin mononukleotidem za vzniku flavin mononukleotidu, vody a odpovídajícího mastné

kyseliny. Světlo vzniká jako vedlejší produkt luciferázou katalyzované reakce. Této reakce je využíváno ke sledování exprese genů exprimujících enzym luciferázu a to nejen v genovém inženýrství (Meighen, 1991, Close & kol., 2009).

Nejvýznamnější skupinou bioluminiscenčních jednobuněčných organismů jsou bakterie mořské, sladkovodní či půdní. Nejznámější jsou rody bakterií *Vibrio*, *Photobacterium* a *Xenorhabdus*. Mezi nejvíce prozkoumané druhy se řadí např. *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri*, *Photobacterium phosphoreum*, *Photobacterium leiognathi* a *Xenorhabdus luminescence* (Hakkila & kol., 2002). Bakterie mohou žít samostatně nebo symbioticky v orgánech živočichů. Luminiscenční bakterie mohou být i patogenní (*Photorhabdus asymbiotica*). Různé typy luciferinů, podle toho z jakých živočichů byla látka izolována, jsou znázorněny na obr. 5.

Obr. 5: Různé typy Luciferinu (URL 5)

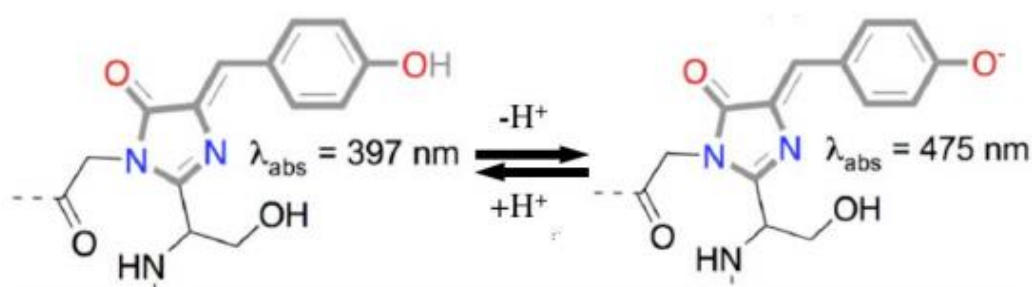


3.2.1 Bioluminiscence *Aequorea victoria*

Medúza *Aequorea victoria*, obývající zvláště teplá moře, vytváří zelenou záři kolem okraje svého těla (zvonu) průchodem svého původně modrého světla skrz sloučeninu známou jako zelený fluorescenční protein (GFP - Green Fluorescent Protein). GFP je schopný absorbovat světlo dvou různých vlnových délek (obr. 6). Tento protein byl syntetizován v laboratoři a uměle vložen do sekvencí DNA jiných druhů. Protein se vyznačuje jedinečnou vlastností a to takovou, že pod ultrafialovým světlem (395

nm) vydává zelené fluorescenční záření (o vlnové délce 508 nm). Díky tomu lze přítomnost GFP snadno detekovat s použitím fluorescenčního spektrofotometru. Protein má specifickou strukturu, která chrání jeho chromofor, takže dochází k zachování fluorescence v přítomnosti vysokých teplot, denaturujících látek a detergentů. U tohoto proteinu nejsou nutné žádné substráty nebo kofaktorů, kterých je třeba u bakteriálních bioluminiscenčních systémů. GFP protein vědcům umožňuje lepší sledování genové exprese v bakteriálních a eukaryotních buňkách, a prozkoumání těl živočichů (Kendall & Badminton, 1998, Hakkila & kol., 2002). V roce 2008 obdrželi za objev a výzkum tohoto proteinu vědci Osamu Šimomura, Martin Chalfie, Roger Y. Tsien Nobelovu cenu za chemii. Osamu Shimomura izoloval látku z medúzy a objevil její fluorescenční schopnosti, Martin Chalfie zjistil, jakým způsobem lze GFP navázat na jiné proteiny a Roger Y. Tsien vysvětlil detaily fluorescenčního působení a objevil další varianty tohoto proteinu.

Obr. 6: Zelený fluorescenční protein (GFP – *Green Fluorescent Protein*), (Close & kol., 2009).



Protein GFP je schopný absorbovat světlo dvou různých vlnových délek. Dvojitě absorpční píky v spektrech GFP jsou výsledkem různých stavů v chromoforu GFP. Neutrální stav (vlevo) je zodpovědný za hlavní pík při vlnové délce 397 nm, zatímco aniontová forma (vpravo) je odpovědná za menší pík při vlnové délce 475 nm. Bez ohledu na stav nabití chromoforu dochází k emisi při vlnové délce 504 nm (zelená barva), (Close & kol., 2009).

3.2.2 Bioluminiscence *Vibrio fischeri*

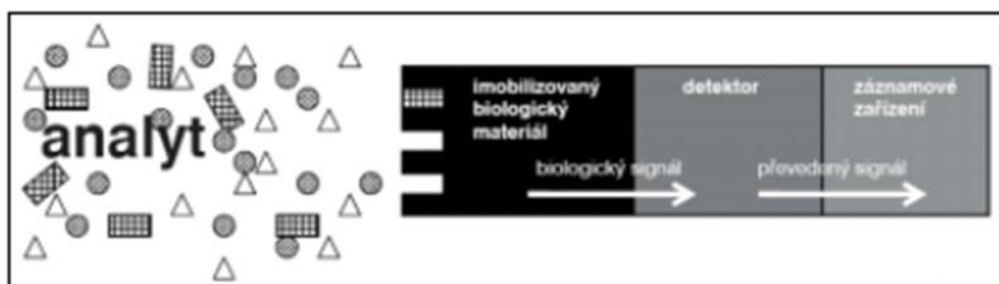
Mořská bakterie *Vibrio fischeri* patří k nejprozkoumanějším luminiscenčním bakteriím. Žije hlavně v teplých a subtropických oblastech. Patří mezi aerobní, heterotrofní, gramnegativní bakterie. Pro svůj život potřebuje asi 2% roztok NaCl. *Vibrio fischeri* žije buď volně, nebo v symbióze s různými druhy dalších mořských živočichů, kterým umožňuje proces bioluminiscence v jejich světelných orgánech. Produkce světla u *Vibrio fischeri* je energeticky náročná. K tomu je potřeba dostatek kyslíku a pro volnou bakterii nemá prakticky žádný význam. Zde se právě využívá symbiózy bakterií, které se usídlily v orgánech živočichů. Živočichové poskytují

energii a živiny bakteriím a bioluminiscenční bakterie na oplátku živočichům zdroj světla. Bioluminiscence se projevuje až při vyšších buněčných koncentracích (James & kol., 2000). *Vibrio fischeri* kóduje 10 genů, označovaných jako *lux C, D, A, B, E, F, I, R, G, Y*. Geny *luxG* a *luxF* mají neznámou funkci. Geny *luxA* a *luxB* kódují dvě podjednotky enzymu luciferázy. Podjednotky tzv. reduktázového komplexu jsou kódovány pomocí genů *luxC, luxD* a *luxF*. *LuxY* kóduje tzv. žlutý fluorescenční protein a *LuxR* a *luxI* kódují regulační proteiny odpovědné za quorum sensing (Quorum sensing je mechanismus mezibuněčné komunikace, který umožňuje bakterii vnímat a reagovat na změny v hustotě bakterie v daném okolí což ovlivňuje širokou řadu biologických funkcí, jako je například bioluminiscence nebo virulence (Anand Pai, Duke's Pratt School of Engineerin). Všechny 10 *lux* genů je uspořádaných do operonu (segmentu DNA, který obsahuje geny strukturní, operační a regulační) genu *LuxICDABEG* se společným promotorem (sekvence DNA, která obsahuje informace o začátku transkripce DNA) (Meighen, 1991, James & kol., 2000).

3.3 Biosenzory

Biosenzor je citlivý analytický aparát, jehož hlavní částí je biologický materiál. Každý biosenzor je tvořen bioreceptorem, který citlivě reaguje na daný analyt a převodníkem, který zprostředkovává snadno měřitelný fyzikální nebo chemický signál. Měřitelný signál je přímo úměrný koncentraci analytu ve vzorku. Bioreceptorem může být enzym, buňka, živá organela, tkáň (zvířecí nebo rostlinná), nukleová kyselina, protilátka a v neposlední řadě mikroorganismus (Kizek & kol., 2003). Konstrukce biosenzoru je vidět na obrázku 7.

Obr. 7: Biosenzor (Skládal, 1990).



3.3.1 Dělení biosenzorů

Biosenzory se dělí podle toho jaký je jejich biorozpoznávací materiál na molekulové, tkáňové a buněčné (Skládal, 2002). Hlavní složkou molekulových biosenzorů je biomolekula nebo subcelulární struktura. Biomolekulou mohou být protilátky, nukleové kyseliny nebo enzymy. Subcelulární strukturou, tedy drobnými mikroskopickými útvary uvnitř buněk, bývají buněčná organela nebo enzymový komplex. Výhodou molekulových senzorů je jejich vysoká selektivita a reakční rychlost. Nevýhodou je vysoká cena, v důsledku náročné izolaci biomolekul, které jsou pak více náchylné na podmínky prostředí (Trögl, 2005).

Tkáňové biosenzory jsou tvořené izolovanými tkáněmi vyšších eukaryotických organismů. V praxi se moc nepoužívají, s výjimkou některých medicínských aplikací. Hlavní nevýhodou je opět náročná izolace tkáňových kultur a také jejich kultivace, obdobně jako u molekulových biosenzorů (Vo-dint & Cullum, 2009, Mišo, 2012).

Součástí buněčných senzorů, jak vyplývá z názvu, jsou celé izolované buňky, jednoho či více typů mikrobiálních bakterií či kvasinek. Buněčné biosenzory využívají ke konstrukci hlavně mořských světélkujících bakterií *Vibrio fischeri* a *Vibrio Harveyi* nebo chemiluminiscenčních látek. Výhodou je selektivita, jednodušší izolace a následná kultivace buněk. Nevýhodou je těžší odhad chování složitěho systému bakteriálních buněk (Mello & Kubota, 2002, Kizek & kol., 2003).

Biosenzory se dělí podle typu převodníku, což je zařízení, které převádí změny fyzikální veličiny (tlak, jas) na elektrický signál, který je pak zaznamenáván záznamovým zařízením. Převodník specificky reaguje na daný typ chemické reakce, která probíhá mezi analytem a reakční složkou. Do této skupiny patří biosenzory ampérometrické, potenciometrické, konduktometrické a optické. Optické biosenzory jsou založeny na měření bioluminiscence. V současné době jsou moderní hlavně díky pokroku v laserové technologii a technologii optických vláken. Interakce biokatalyzátoru s cílovým analytem těchto senzorů je založena na metodách využívajících absorpci v UV-VIS oblasti, bioluminiscenci, fluorescenci a měření indexu lomu. Optické luminiscenční senzory mají uplatnění ve fermentačních a alkoholových procesech nebo při stanovování sacharidů. Mezi hlavní výhody optických biosenzorů patří možnosti jejich použití na dálkové snímání a nízké pořizovací náklady. Jejich miniaturní velikost může být výhodou, ale i zároveň nevýhodou, jelikož může dojít k ovlivnění odezvy. Mezi nevýhody patří složitý mechanismus mikroorganismů, který ne vždy lze předem odhadnout (Mello & Kubota, 2002).

3.3.2 Využití biosenzorů

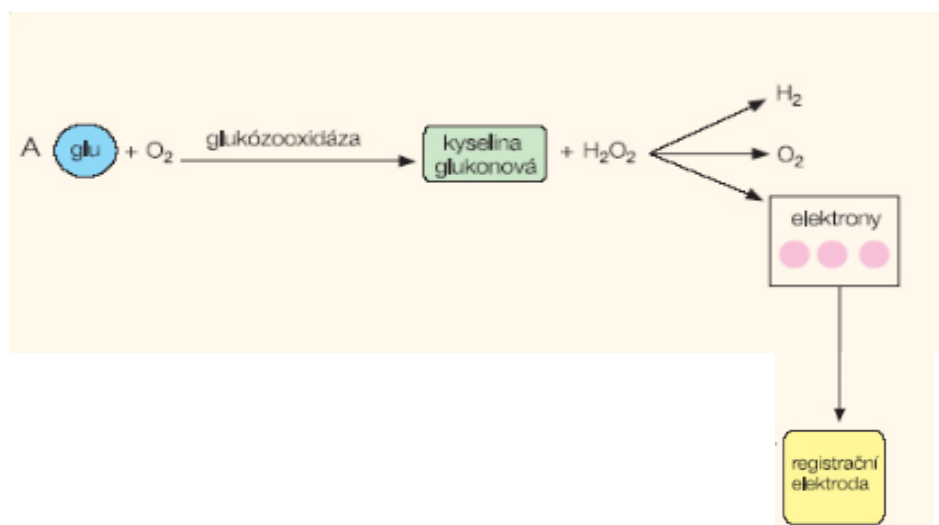
Biosenzory mají v současné době velmi širokou škálu využití. První optické snímače byly založené zejména na měření kyslíku, oxidu uhličitého, pH nebo koncentrace glukózy v krvi. Mezi průkopníky komerčních biosenzorů patří glukometry a enzymová elektroda. První glukometr vyvinutý A. H. Clemensem (Ames Reflectance Meter, obr. 8) byl patentován v roce 1971. Ke stanovení se použila fotometrická metoda. Tento glukometr měřil glykémie v rozpětí 0,6–22 mmol/l, byl napájen ze sítě a před použitím bylo třeba 30 minutové „zahřátí“. Princip glukometru je založený na stanovení glukózy pomocí fotometrické metody či elektrochemické (obr. 9). Fotometrická metoda je založená na změně absorbance vhodné vlnové délky elektromagnetického záření, způsobené některým produktem či meziproduktem chemické reakce, jejíž součástí je samotná glukóza. Tato metoda využívá stejné reakce, jen vzniklý peroxid vodíku se stanovuje oxidační kopulací se substituovaným fenolem a 4 - aminoantipyrinem za katalýzy enzymem peroxidázou. Vzniká barevný produkt, který absorbuje světelné záření při 498 nm. Množství vzniklého barevného produktu (chromogen červené barvy) je úměrné koncentraci glukózy ve vzorku (Skládal, 2002, Brož, 2006, Štěchová, 2016).

Elektrochemické glukometry pracují na principu přítomnosti enzymu a přímého měření elektrických veličin. Pro přímou detekci krevním metabolitů se využívá enzymu glukózaoxidazy, který katalyzuje oxidaci glukózy kyslíkem. Vzniká glukonová kyselina a peroxid vodíku, který je elektrochemicky redukován na vodu a vzniklý elektrický proud, který je úměrný koncentraci glukózy (Wiener, 1995, Kizek & kol., 2003, Brož, 2006). Elektroodový systém je v přímém kontaktu se vzorkem, který se před vlastním měřením neředí ani jinak neupravuje krev, plasma či sérum). Při stanovení dochází k současnému spotřebování glukózy a rozpuštěného kyslíku ve vzorku. Protože se měří elektrický proud, jedná se o ampérometrické stanovení. Ampérometrie měří okamžitou velikost elektrického proudu uvolňovaného při reakci. Lze také změřit elektrický náboj (coulometrické stanovení). Přímé coulometrické stanovení se provádí do úplného spotřebování analytu (Kizek & kol., 2003, Brož, 2006).

Obr. 8: Glukometr Ames Reflectance Meter (Brož, 2006).



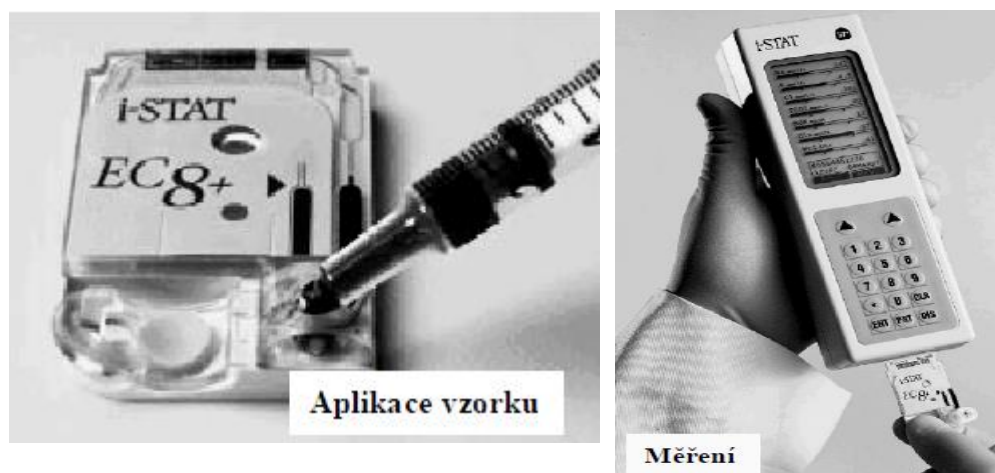
Obr. 9 :Princip stanovení glukózy v glukometrech (Brož, 2006).



Senzory mají velký význam v oblasti medicíny, kde slouží pacientům trpící *Diabetes mellitus* (cukrovka). Nemoc se projevuje zvýšenou koncentrací glukózy v krvi, vznikající v důsledku nedostatku inzulínu. Zdravý člověk má standardní hladinu glukózy v krvi mezi 3,5 a 5,5 mmol.l⁻¹. Zvýšení koncentrace glukózy po jídle stimuluje rychlé uvolnění inzulínu, který zároveň umožní vstup glukózy dovnitř buněk a současně zabrání její tvorbě v játrech. U diabetiků je tato regulace narušena a inzulín se pacientům musí podávat. Hlavním cílem klinické diagnostiky je vývoj glukózového biosenzoru pro detekci *in vivo*, který by pacientovi průběžně dávkoval dle potřeby inzulín řízeným pumpou (Skládal, 2002, Vo-dint & Cullum, 2009).

Na bázi biosenzorů se využívá malých laboratorních zařízení, které jsou citlivé kromě glukózy například na sacharózu, močovinu, laktát či alkohol. Za zmínku stojí ruční multikanálový elektrochemický přístroj i-STAT (obr. 10), který poskytuje rychlé informace o stavu pacienta. Základní modul obsahuje mimo měřících senzorů také zásobní roztok standardu a prostor, kam se nanese krev pacienta. Modul s krví se zasune do přístroje, který dále změří i minerální látky jako sodík, draslík, chloridy, oxid uhličitý, dále pH, močovinu a hematokrit. Kalibrační roztok je součástí výměnné kártridže, který zaručuje vysoké kvality výsledků. S i-STATem je možné se setkat v ordinaci praktických lékařů, veterinářů a dokonce i ve vojenství (Mello & Kubota, 2002, Kizek & kol., 2003).

Obr. 10: i-STAT (Skládal, 2002)



V potravinářském průmyslu se biosenzorů využívá při kontrole čerstvosti potravin nebo při fermentačních procesech. Slouží hlavně pro detekci kontaminace pomocí bakterií, stanovení sacharidů a vitamínů. Největší přínos v současné době má použití biosenzorů v životním prostředí v chemických laboratořích. Ve vodohospodářství při monitoringu znečištění pitné vody a vodní toků (Skládal, 2002).

3.4 Imobilizace biologického materiálu

Imobilizace představuje zachycení biologického materiálu na povrch nebo dovnitř inertní matrice. Tímto procesem lze docílit vylepšení vlastností biologického materiálu biosenzoru. Imobilizované organismy pak mají vyšší odolnost vůči toxickým látkám a mikroorganismům, které by mohli biologický materiál nějakým způsobem kontaminovat. Prodlouží se jejich životaschopnost, a tím i možnost opakovaného použití. Imobilizovaných buněk se využívá v oblastech biotechnologie, průmyslu, při biodegradacích organických polutantů a v medicíně. Dále slouží ke konstrukci biosenzorů a k monitorování životního prostředí (Woodward, 1988, Mello & Kubota, 2002).

3.4.1 Metody imobilizace biologického materiálu

Metod pro imobilizaci živého materiálu biosenzorů je velký počet a stále se vyvíjejí další nové metody. Způsob imobilizace závisí na povaze vazby mezi maticí a imobilizovaným materiálem. Imobilizace může být realizována nejrůznějšími metodami, jako například mechanickým zachycením biokomponent na povrch převodníku, v gelu či polymeru (enkapsulace). Dalším způsobem je zesíťování biomolekul, pomocí elektropolymerace apod (Mikulicová, 2009).

Jednoduchou a nenáročnou metodou je mechanické zachycení biomolekul na povrchu převodníku. Roztok biologického materiálu (celulózy, acetylcelulózy nebo polykarbonátů) se nanese na povrch převodníku a překryje se dialyzační membránou tak, aby byla umožněna difúze analytu, ale zároveň aby byly dostatečně zachyceny biokomponenty na svém místě. Ukotvený materiál se uchovává ve vhodném roztoku pufru. Takto zkonstruovaný biosenzor už nelze rozebrat. Zmíněná technika je žádoucí pro tkáňové řezy. Další způsob imobilizace představuje ukotvení biomateriálu v gelu či polymeru. Mezi nejpoužívanější látky patří polyakrylamid, želatina, polyvinylalkohol (PVA) a Hema. Želatina (5% roztok) se používá tak, že nejprve nabobtná, rozpustí se při zvýšené teplotě (okolo 40 °C), smíchá s enzymem a nakonec se nalije na vodorovnou podložku. Po 12 ti hodinovém vysychání (při 4 °C) se vzniklé membrány aplikují na aktivní plochu senzoru a zachytí dialyzační membránou (Skládal, 2002).

Imobilizace zesíťováním molekul praxi znamená vytvoření membrány přímo z molekul enzymů či jakýkoliv jiných molekul jejich zesíťováním vhodným bifunkčním činidlem. Nejvhodnějším činidlem je glutaraldehyd. Glutaraldehyd se smíchá s roztokem bílkoviny, v závislosti na koncentraci složek vytváří spontánně

retikulum buď přímo na povrchu senzoru, nebo na vhodném podkladovém materiálu. Takto vytvořené enzymové membrány mají velmi dobrou stabilitu v důsledku značného podílu latentní enzymové aktivity.

3.4.1.1 Imobilizace v PVA matrici do čoček Lentikats®

Mezi nejšetrnější imobilizační postupy, patří vnesení biokomponentu do neutrálního, hydrofilního a ve vodě silně bobtnajícího polymeru PVA. Prepolymer se připravuje hydrolytickou reakcí polyvinylacetátu. Po následném zesíťování vznikne konečný polymer. Pro chemické zesíťování PVA se využívá triisokyanátů (TIC), které jsou schopné pospojovat jednotlivé postranní hydroxyly PVA (Skládal, 2002, Polyak & kol., 2001).

V této práci byly bakterie imobilizované v polyvinylalkoholové matrici (tzv. Biokatalyzátor Lentikats®). Tato metoda imobilizace využívá mikroorganismy enkapsulovaných (zapouzdřených) do PVA čoček patentovaným postupem dle Vorlopa (tzv. Biokatalyzátor Lentikats = BL). Tato technologie se používá v průmyslovém měřítku firmou LentiKat's a.s. Imobilizace technologií Lentikats je vysoce biokompatibilní. Čočky Lentikats® mají specifický čočkovitý tvar, který nebrání difúzi látek v matrici. PVA matrice umožňuje rozmnožování imobilizovaných mikroorganismů a při dostatku živin, je možné udržet dlouhodobou aktivitu BL (Jahnz & kol. 2001, Sievers & kol. 2002). Díky imobilizaci v PVA matrici, získávají bakterie ochrannou vrstvu, která zvyšuje jejich životaschopnost.

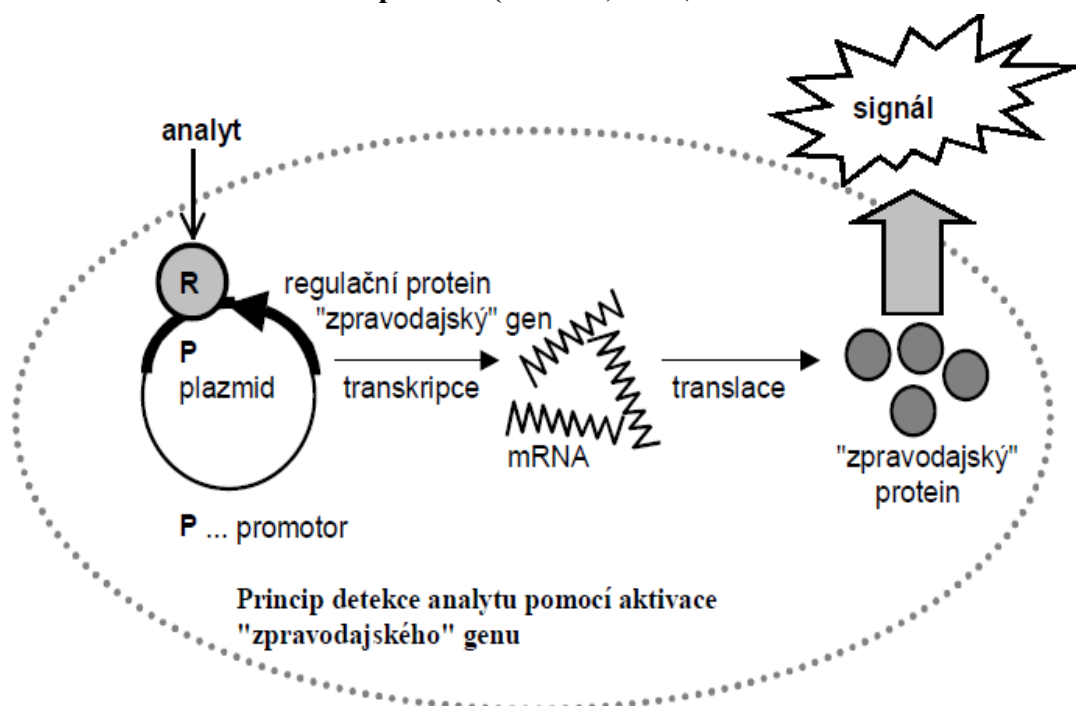
3.5 Bioreportéry

Bioreportéry jsou geneticky upravené živé buňky mikrobiálního původu. Jsou upravené tak, aby produkovaly měřitelný signál jako odpověď na přítomnost specifického podnětu. Často to bývají podněty např. chemické (např. přítomností nějaké látky), fyzikální (teplota, UV záření), biologické povahy nebo metabolické (stresem). (Leveau & Lindow, 2002). Bioreportér se skládá ze dvou základních genů – promotorový a reportérový. Promotorový gen aktivuje reportérové geny ve chvíli, kdy je rozpoznána konkrétní látka v okolí bakteriální buňky. Za promotor se označuje oblast DNA v buňce, která má na starost transkripci (přepis) genů. Jedná se o fyziologickou odpověď na přítomnost nějaké látky ve svém okolí. Tento způsob reakce mikrobiálním buňkám umožní obranu proti toxickému působení cizorodých látek nebo komunikaci s dalšími mikroorganismy produkcí chemických signálů (Trögl, 2005).

Reportérové geny začnou produkovat reportérové proteiny, které následně generují detekovatelný signál (obr. 11). Jako reportérový gen lze použít prakticky jakýkoliv gen, pro bioluminiscenci, fluorescenci i pro extracelulární enzymy, jejichž aktivita se snadno měří. Z luminiscenčních genů se nejčastěji používají bakteriální geny z *Vibrio fischeri*, geny světlušek a geny z medúzy *Aequorea victoria*. Z fluorescenčních genů se nejvíce využívá GFP, jehož výhodou je snadná detekce bez nutnosti přidání substrátů, vysoká citlivost stanovení a jednoduché provedení. Výsledný signál nesmí být rušen matricí měřeného vzorku. Musí být snadno odlišitelný (v komplexních

směsích) na základě aktivity enzymu, fluorescence nebo bioluminiscence s dostatečně rychlou a citlivou odezvou (Leveau & Lindow, 2002, Skládal, 2002). Pomocí této metody lze stanovovat široké spektrum analytů od těžkých kovů a toxických organických chemických látek, přes protilátky až po stanovení virů. Smyslem konstrukce bakteriálních bioreportérů je v první řadě analytické použití mikroorganismů k detekci toxických a rozmanité pozorování chování mikroorganismů (Polyak & kol., 2001).

Obr. 11: Princip detekce analytu pomocí aktivace promotorového genu bioreportéru (Skládal, 2002).



3.6 Geneticky modifikované organismy (GMO)

Geneticky modifikovaný organismus, je veškerý organismus kromě člověka, jehož původní dědičný materiál byl upraven metodou genového inženýrství, stanovený zákonem č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty, ve znění pozdějších předpisů a vyhláškou 209/2004, o bližších podmínkách nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty, ve znění pozdějších předpisů (MŽP, ©2008 – 2018). Tyto změny lze provést deaktivací konkrétního genu či začleněním genu jiného organismu. První genetické modifikace byly prováděny s jednoduššími organismy, jako jsou bakterie a kvasinky. S rozvojem genového inženýrství se postupně začalo s úpravami dědičného materiálu buněk vyšších organismů, hlavně savců a krytosemenných rostlin (Saylor & Ripp, 2000). Nakládání s GMO a genetickými produkty je dovoleno pouze na základě oprávnění podle těchto právních předpisů. Důležité je zajištění ochrany zdraví člověka a zvířat, životního prostředí a biologické rozmanitosti (MŽP, ©2008 – 2018). GMO se

ponejvíce využívají ve výzkumu, jehož výsledky vedou k lepšímu poznání podstaty některých nemocí. Mají vysokou rezistenci vůči infekčním chorobám, parazitům, herbicidům aj. Použití geneticky upravených organismů v potravinách a zemědělských plodinách je všeobecně velmi kritizováno. Konzumace takovýchto plodin člověkem může způsobit alergickou reakci.

3.7 *Pseudomonas putida* TVA8

Rod *Pseudomonas*, poprvé popsáný v roce 1895 Walterem Migulou, patří mezi ekologicky významné bakterie žijící v půdě, vodě i mořském prostředí. *Pseudomonas putida* TVA8 je geneticky upravená bakterie, která je schopna použít toluen a strukturně podobné látky jako zdroj uhlíku pro svůj růst. Roste velmi rychle a může využívat celou řadu substrátů včetně alifatických nebo aromatických uhlovodíků, tak i dalších toxických organických látek. Při jejich degradaci využívá degradační dráhu toluendioxygenázy (TOD). Teplotní optimum bakterie je 28 °C. Tato bakterie byla vytvořena vložením inzertu mini-*Tn5Kmtod-lux* pomocí systému transpozonu na chromozom bakterie *Pseudomonas putida* F1.

3.8 *Pseudomonas fluorescens* HK44

Bakterie druhu *Pseudomonas fluorescens* patří mezi nepatogenní bičíkaté bakterie, které se vyskytují jak v půdě, vodě, tak na povrchu rostlin (Trögl, 2005). U této bakterie byla zjištěna produkce fluoreskujícího pigmentu dobře rozpustného ve vodě. K produkci pigmentu dochází při nedostatku železa v okolním prostředí. *Ps. fluorescens* HK44 je geneticky modifikovaná bakterie, která je odvozená od bakterie *Pseudomonas fluorescens* HK9 (dříve označována jako 18H). Smyslem genetické modifikace bylo vpravení umělého plazmidu pUTK21 do bakteriální DNA. *Ps. fluorescens* HK44 v přítomnosti salicylátu, naftalenu a některých dalších aromatických uhlovodíků (anthracen, fenanthren atd.) vykazuje měřitelnou luminiscenci díky vloženým genům *luxCDABE* (King, 1990, Heitzer & kol., 1992). *Ps. fluorescens* HK44 má rezistenci k ampicilinu, chloramfenikolu a tetracyklinu. Bakterie má teplotní optimum růstu v rozmezí 20 – 30 °C. Rozsah pH vhodný pro dělení tohoto kmenu je cca 5 - 8 (Trögl, 2005).

4 Metodika

Veškerá experimentální práce byla prováděná v oddělení Vícefázových reaktorů, v laboratoři imobilizovaných biokatalyzátorů a optických senzorů, na Ústavu chemických procesů AV ČR, v. v. i., v Praze 6 – Suchbátka.

Práce je zaměřena na detekci kontaminantů pomocí bioluminiscenčních bioreportérů. *Pseudomonas putida* TVA8 je geneticky upravený mikroorganismus, produkující bioluminiscenci v přítomnosti monocyklických aromatických uhlovodíků (toluenu). *Pseudomonas fluorescens* HK44 produkuje měřitelnou bioluminiscenci v přítomnosti polyaromatických uhlovodíků (naftalenu resp. salicylátu). Oba bakteriální kmeny byly použity ve volné i imobilizované formě v PVA (polyvinylalkohol) gelu.

4.1 Použité chemikálie

Agar, A7002	Sigma - Aldrich, Německo
Bakteriální pepton, LP0037,	Oxoid, VB
Dihydrofosforečnan sodný, p. a.,	Lach-ner, ČR
Dusičnan amonný, p. a.,	Lach-ner, ČR
Ethanol, p. a.,	Lach-ner, ČR
Glycerol p. a.	Sigma – Aldrich, Německo
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, p. a.	Penta ČR
Hydroxid sodný, p. a.	Lach-ner, ČR
Chlorid sodný p. a.	Lach-ner, ČR
Chlorid vápenatý, p. a.	AppliChem, Německo
Chlorid železitý hexahydrát, p. a.	Lach-ner, ČR
Kanamycin	Sigma – Aldrich, Německo
Kvasnicový extrakt, 70161	Fluka, SRN
Kyselina boritá, p. a.	Reanal, Maďarsko
Kyselina chlorovodíková, p. a.	Lach-ner, ČR
Kyselina salicylová p. a.	Penta, ČR
Molybdenan sodný, čistý	Lach-ner, ČR
Oxid hořečnatý, p. a.	Lach-ner, ČR
Síran hořečnatý heptahydrát, p. a.	Lach-ner, ČR
Síran měďnatý pentahydrát, p. a.	Lach-ner, ČR
Síran sodný, čistý	Lach-ner, ČR

Síran zinečnatý heptahydrát, p. a.	Lach-ner, ČR
Sukcinát sodný hexahydrát, p. a.	Fluka, SRN
Tetracyklin	Sigma – Aldrich, Německo
Toluen, p. a.	Lach-ner, ČR
Trypton, LP0042	Oxoid, VB

4.2 Použité přístroje

Analytické váhy AA-200DS, Denver Instrument Companies, USA

Autokláv Chirana – PS 121V/I, ČR

Biohazard box Trigon plus, Thermo Scientific, Německo

Centrifuga Universal 32R, Hettich, Německo

Chladicí inkubátor, FTC 901, Anglie

Elektronový mikroskop Jeol JEM 1010, Jeol, Japonsko

Lednice, Liebherr, Německo

Hlubokomrazicí box, Arctiko, USA

Magnetická míchačka, Variomag Poly15, Roth, Německo

pH metr MiniTrode, Hamilton, Německo

Předvážky APX-602, Instrument Companies, USA

Spektrofotometr SPECTROstar Omega, BMG Labtech, USA

Termostat Memmert, ČR

Třepačka rotační Unimax 1010DT, Heidolph, Německo

UV-VIS Spektrofotometr HP8452A, Hewlett-Packard, USA

Vortex Velp, Itálie

4.3 Použité roztoky a média

K přípravě roztoků a médií byla použita destilovaná voda. Sterilizace roztoků a médií bylo prováděno autoklávováním. Byly též filtrovány přes filtr (Whatman, s velikostí pórů 0,22 μm), roztoky antibiotik. Filtry Whatman jsou jednorázové sterilní filtry, které jsou tvořeny plastovým filtračním nástavcem se zabudovanou membránou. Podmínky sterilizace – doba 20 minut, 120 °C a tlak 0,1 - 0,15 MPa. Hodnota pH roztoků a médií, bylo upraveno na pH $7,2 \pm 0,2$, pomocí 1M hydroxidu sodného nebo 1M kyseliny chlorovodíkové.

Příprava roztoku antibiotik

0,1 g tetracyklinu (TC) byl rozpuštěn v 10 ml destilované vody. Stejným postupem byl připraven i roztok kanamycinu (KN). Připravené zásobní roztoky o koncentraci 10 g.l⁻¹ antibiotik byly sterilizovány. Ze zásobního roztoku se připravil roztok pracovní o koncentraci 50 µg.ml⁻¹.Roztoky byly uchovávány v lednici (4 °C) maximálně po dobu 14 dnů, neboť antibiotikum se rozkládá.

Příprava roztoku toluenu (R)

Nasycený roztok toluenu byl připraven 24hodinovým mícháním destilované vody a toluenu v Erlenmeyerově baňce při 25 °C. Po hodině stání při teplotě 25 °C se bylo skleněnou pipetou odebráno z vodní vrstvy 0,28 ml nasyceného roztoku toluenu do 100ml odměrné baňky se zábrusem a obsah baňky byl doplněn minerálním médiem MSM po rysku. Výsledný roztok (R) má koncentraci 1,325 mg.l⁻¹. Takto připravený roztok toluenu byl používán po dobu dvou týdnů.

Příprava roztoku salicylové kyseliny

Odvážené množství 0,5 g na analytických vahách salicylové kyseliny se rozpustilo v destilované vodě tak, aby její finální objem byl 100 ml. Výsledná koncentrace zásobního roztoku (označen jako S) je 500 mg.ml⁻¹, pak se roztok sterilizoval. Roztok se poté naředil (viz tab. 1). Takto připravený roztoky kys. salicylové byl používán po dobu dvou týdnů.

Tab. 1: Kalibrační roztoky salicylové kyseliny

označení	odměr.baňka (ml)	Odebráno ze zásob. roztoku (ml)	Výsledná koncentrace (mg.ml ⁻¹)
S1	10	1	50
S2	50	0,5	5
S3	100	0,1	0,5

Pozn. Barevné značení jednotlivých roztoků bylo dále použito v grafech.

Příprava fosfátového pufru (c=0,5 mol.l⁻¹, pH = 7)

33 g dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného a 103 g fosforečnanu sodného bylo rozpuštěno v destilované vodě tak, aby finální objem byl 100 ml. Po kontrole pH následovala sterilizace roztoku.

Příprava roztoku síranu sodného

1,44 g síranu sodného bylo rozpuštěno tak, aby finální objem byl 100 ml. Poté byl roztok sterilizován. Stabilizační roztok byl používán pro stabilizaci imobilizovaných buněk v PVA gelu, podle certifikované metody Lentakits[®] (viz kapitola 4. 6. 4.).

Příprava stopových prvků

látka	navážka (g.l ⁻¹)
MgO	10
CaCl ₂	2,94
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	1,44
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,39
H ₃ BO ₃	0,062
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,53
FeCl ₃ . 6 H ₂ O	5,4

Roztok hexahydrátu chloridu železitého byl připraven zvlášť (z důvodu usazování červeného zákalu). Poté byl připraven roztok stopových prvků. Oxid manganatý a boritá kyselina byly rozpuštěny jako první s 96 ml destilované vody a 4 ml chlorovodíkové kyseliny (c = 0,1 mol.l⁻¹). Z důvodu špatné rozpustnosti oxidu manganatého ve vodě – který tvoří bílou sraženinu). Po rozpuštění sraženiny byly do roztoku přidány ostatní sloučeniny. Oba vzniklé roztoky byly sterilizovány každý zvlášť sterilizací přestříknutím přes filtr (Whatman, 0,22 μm) Takto připravené roztoky byly uchovávány v ledničce (4 °C) obalené parafilmem v ledničce

Příprava (minerálního) MSM média

látka	množství
FeCl ₃ . 6 H ₂ O	0,1 ml
Fosfátový pufr (c=0,5 mol.l ⁻¹ , pH = 7)	100 ml
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,1 g.l ⁻¹
NH ₄ NO ₃	0,2 g.l ⁻¹
Stopové prvky	0,1 ml
Destilovaná voda	900 ml

Nejdříve bylo v 900 ml destilované vody rozpuštěny látky heptahydrát síranu hořečnatého a dusičnan amonný. Takto vzniklý roztok byl sterilován po dobu 30

minut. Po vychladnutí roztoku bylo přidáno 100 ml sterilního roztoku fosfátového pufru (viz výše, str. 19), poté 0,1 ml roztoku hexahydrátu chloridu železitého a nakonec 0,1 ml roztoku stopových prvků (viz výše, str. 20). Příprava indukčního MSM média byla prováděna v Biohazard boxu. Vzniklé médium bylo uchováváno ledniče (4 °C) maximálně po dobu 14 dnů.

LB (Luria – Bertani) médium

Tekuté LB médium bylo připraveno odvážením a smícháním 1 g chloridu sodného, 0,5 g kvasnicového extraktu a 1 g tryptonu. Odvážené množství látek bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. Poté bylo pH média upraveno na hodnotu $\text{pH } 7,2 \pm 0,2$, pomocí 1M hydroxidu sodného nebo 1M kyseliny chlorovodíkové a následně sterilizováno.

Tuhé LB médium bylo připraveno stejně jako LB tekuté, avšak dále byly přidány 2 g agaru. Vše bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. Po kontrole pH opět následovala sterilizace. Po vychladnutí sterilizovaného média (30 – 40 °C) bylo přidáno antibiotikum pro daný bakteriální kmen (kanamycin pro TVA8, tetracyklin pro HK44), tak aby jeho výsledná koncentrace byla $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Následovalo aseptické rozlévání do Petriho misek tak, aby vznikla vrstva přibližně 0,5 cm silná. Po ztuhnutí vzniklé vrstvy agaru byly misky uchovávány v lednici (4 °C) po dobu 2 týdnů.

YEPS (yeast extract-pepton-succinate) médium

Na analytických vahách bylo postupně naváženo 0,02 g dusičnanu amonného, 0,02 g kvasničného extraktu, 0,1 g peptonu a 0,27 g sukcinátu sodného. Odvážené množství látek bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. Bylo upraveno pH média a poté sterilováno.

Vzorek reálné vody

Vzorek reálné vody byl odebrán z kontaminované lokality v severních Čechách. Obsah aromatických látek ve vzorku (viz tabulka) byl stanoven v laboratořích Aquatest podle platných norem. Benzen a styren nebyl ve vzorku prokázán.

látky	koncentrace ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)
benzen	<MD
ethylbenzen	6,2
styren	<MD
toluen	10,45
xylén	16,96

4.4 Použitý organismus

Pseudomonas fluorescens HK44, který je rezistentní k tetracyklinu (TC) a *Pseudomonas putida* TVA8 s rezistencí ke kanamycinu (KN) byly poskytnuty ze

sbírky Center for Environmental Biotechnology, University of Tennessee Knoxville, v USA.

Bakterie byly pěstovány v Petriho miskách na tuhém LB médiu (agaru) s antibiotikem TC v případě *Pseudomonas fluorescens* HK44 a KN (*Pseudomonas putida* TVA8). Pro zaočkování inokula byly používány bakterie napěstované v Petriho miskách na agaru s antibiotikem (**a**) nebo bakterie přímo ze zamražené kultury z hlubokomrazicího boxu (**b**). Petriho misky byly uchovávány v ledničce (4 °C) po dobu 2 – 3 týdnů. Mikroorganismy byly přeočkovány čárkováním na čerstvě přichystané LB agary s příslušným antibiotikem (TC u HK44, KN u TVA8) a kultivovány v inkubátoru a to bakterie TVA8 při 25 °C po dobu 24 hodin a HK 44 při 28 °C po dobu 48 hodin. Misky s narostlou kulturou byly obaleny parafilmem, popsány a uloženy do lednice. Každé 3 týdny byly bakterie přeočkovány na čerstvý agar.

Křížový roztěr bakterií:

- 1) Byla připravena agarová miska s antibiotikem (200 ml tuhého LB média vystačilo na cca 6 misek).
- 2) (**a**) byly použity bakterie napěstované v Petriho miskách na agaru s antibiotikem (TC u HK44, KN u TVA8), uchovávané v ledničce (4 °C)
(**b**) zkumavka eppendorf s buněčnou suspenzí byla vyjmuta z hlubokomrazicího boxu ve směsi se sterilním 50% glycerolem v poměru 1:1 (0,5 ml kultury a 0,5 ml glycerolu) a obsah zkumavky se nechal roztát v Biohazard boxu.
- 3) Kličkou (která byla vyžihána a ochlazená o agar) byla suspenze rozetřena na misku rovnoměrně, pomocí několika rovnými tahy.
- 4) Klička byla opět vyžihána, zchlazena o agar a udělány 3 - 4 čáry přes hustý nátěr, čímž se docílilo zředění buněk z původního nátěru.
- 5) Po vyžihání kličky, se miska dala do inkubátoru (viz postup kultivace v termostatu výše).
- 6) Pro napěstování buněk se bralo z takto připravených misek.

Celý postup byl prováděn přísně sterilně, miska byla otevírána co nejméně a klička byla před odložením znovu žihána v plameni (očko i drátek kličky byly vyžihány v oranžové části plamene). Klička byla ochlazená před odběrem vzorku, aby nedošlo k usmrcení bakterií.

4.5 Měření bioluminiscence

Bioluminiscence byla měřena pomocí spektrofotometru SPECTROstar Omega s možností proměřovat vzorky přímo z destičky. Je to speciální spektrofotometr schopný změřit absorbanci i luminiscenci. Všechny připravené vzorky byly proměřovány v mikrotitrační destičce (až 96 vzorků najednou). Každá jamka destičky je schopná pojmout maximální množství roztoku 200 µl. Software „Reader Control“ slouží pro ovládání přístroje a „MARS Data Analysis“ Software pro analýzu dat.

Podmínky nastavení byly stejné pro oba bakteriální kmeny. Před vložení byla destička překrytá speciální folií (Breathe-Easy®), aby nedošlo k vypaření měřených vzorků z jamek destičky, a tím k poškození přístroje.

Tab 3: Podmínky nastavení měřicího programu

měřená veličina	luminescence	absorbance
název destičky	COSTAR 96	COSTAR 96
nastavení pro měření destičky		
počet cyklů	76	76
časový interval jednoho cyklu (s)	0,26	
vlnová délka (nm)	max. 500	600
snímací modul	orbitální průměrování	
průměr snímání (mm)	3	
optické nastavení	čočka	
nastavení třepání		
frekvence (rpm)	300	300
modul	dvojitě orbitální	dvojitě orbitální
druh třepání	10 s před každým cyklem	10 s před každým cyklem
obecné nastavení		
optika	snímání ze spodu	snímání ze shora
polohovací zpoždění	0,1	0,2
nastavená teplota (° C)	28	28

4.6 Použité metody

4.6.1 Konzervace mikroorganismů

Do Erlenmeyerovy baňky se 100 ml tekutého LB média s antibiotikem (KN pro TVA8, TC pro HK44), byla zaočkována bakteriální kultura pomocí očkovací kličky, dále kultivována při 28 °C a 120 rpm na třepačce přes noc. Druhý den napěstovaná kultura byla smíchána s 50% glycerolem (sterilizovaným) v poměru 1:1. Směs byla dávkována do sterilních zkumavek Eppendorf (2 ml) vždy po 1 ml (0,5 ml kultury + 0,5 ml glycerolu). Takto připravené zkumavky byly umístěny do mrazicího boxu nastaveného na teplotu -70 °C. Oba bakteriální kmeny konzervovány stejným způsobem.

4.6.2 Kultivace mikroorganismů

Kultivace buněk probíhala v Erlenmeyerově baňce se 100 ml tekutého LB média s antibiotikem (viz kapitola 4. 4.). Pro zaočkování inokula byly použity bakterie *Ps. putida* TVA8 a *Ps. fluorescens* HK44, které byly napěstovány v Petriho miskách na LB agaru s antibiotikem (viz kapitola 4. 4.) nebo bakterie zamražené v glycerolu. V případě použití zamražených bakterií v glycerolu byl do Erlenmeyerovy baňky se 100 ml tekutého LB média s antibiotikem přidán celý obsah suspenze ze zkumavky Eppendorf . Buňky byly kultivovány při 28 °C a 120 rpm na třepačce přes noc. Druhý

den bylo odebráno inokulum a přeočkováno do čerstvého média (viz tab. 5). Pak se buněčná suspenze nechala narůst do logaritmické fáze (fáze intenzivní množení bakterií, aktivní metabolismus), přičemž se nárůst kontroloval měřním absorbance přístrojem HP8452A (kyveta s délkou optické dráhy 1 cm), při vlnové délce $\lambda = 600$ nm pro TVA8 a $\lambda = 546$ nm pro HK44), dále označováno OD (Optická hustota, anglicky Optical density resp. O. D., jednotky dále označovány jako ODU = Optical density units). Měření optické hustoty se často používá v mikrobiologii jako jednoduché metody k určení koncentrace počtu buněk v suspensi, protože v jistém rozsahu platí přibližně lineární vztah mezi koncentrací buněk a O. D. OD bylo měřeno proti slepému vzorku (čisté médium, destilovaná). Narostlá buněčná suspenze (viz tab 4.) byla odstředěna a promyta médiem. Nakonec byla peleta naředěna (resuspendována) tak, aby výsledná koncentrace buněk v roztoku byla $1 \cdot 10^9$ V případě TVA8 byla koncentrace buněk zředěna minerálním MSM médiem a buňky HK44 médiem YEPS. Postup kultivace byl stejný. Buněčná suspenze byla napipetována do Erlenmeyerovy baňky na třepačku, při 28 °C a 120 rpm přes noc („vyhladovění“) a druhý den byla použita k měření.

Tab. 4: Parametry kultivaci buněk

Bakteriální kmen	<i>Ps. p</i> TVA8	<i>Ps. f.</i> HK44
Množství odebraného inokula (ml)	1	5
OD (nm)	600	546
Logaritmická fáze	0,5 – 0,6	0,8 - 1
Podmínky odstředění		
Teplota (°C)	25	5
Čas (min)	10	10
RCF (x g)	1882	2381
Resuspendováno (ml)	50	5
2. odstředění		
Teplota (°C)	25	5
Čas (min)	10	10
RCF (x g)	1882	2381

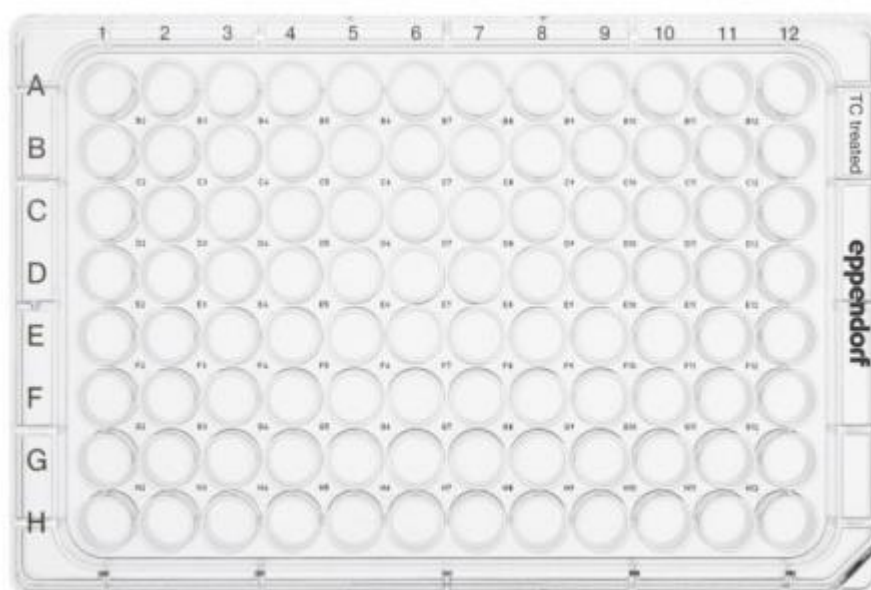
Pozn. RCF (relative centrifugal force, česky relativní odstředivá síla) se měří v síle x gravitace nebo síla g. Toto je síla vyvíjená na obsahu rotoru, vyplývající z otáček rotoru odstředivky.

4.6.3 Indukce volných buněk

Pro indukci byla použita „vyhladovělá“ (bez přístupu živin) buněčná suspenze buněk *Ps. putida* TVA8. Dále bylo použito minerální MSM médium (viz podkapitola 3. 4. 1. 1), kalibrační roztoky toluenu (viz podkapitola 3. 4. 1. 1), připravené ve 100ml odměrných baňkách a buněčná suspenze. Indukce buněk proběhla v 96jamkové mikrotitrační destičce (glass coated microplate na obr. 12), která byla vždy sterilní.

Nejprve byl napipetován roztok toluenu, poté minerální médium a nakonec buněčná suspenze. Vzorky byly měřeny ve třech paralelních opakování. Indukce volných buněk *Ps. fluorescens* HK44 proběhla úplně stejně, jen bylo použito živné YEPS médium (příprava viz 4. 3.) a roztoky salicylové kyseliny. Hotová mikrotitrační destička byla přikryta folií a ihned vložena do SPECTROstar Omega kde proběhlo měření indukované bioluminiscence, které je uváděno v L.U. (luminescent units česky luminiscenční jednotky).

Obr. 12: Mikrotitrační destička (foto)



4.6.4 Imobilizace buněk

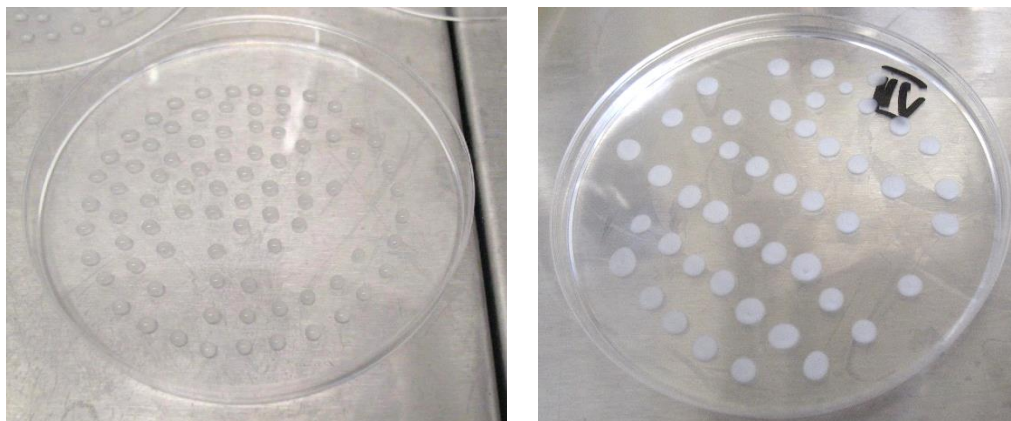
K imobilizaci byla použita nakultivována noční kultura (podkapitola viz 4.6.2.) Buněčná suspenze se nechala narůst do logaritmické fáze délce pro daný bakteriální mikroorganismus, která byla přeočkována do čerstvého živného LB média s antibiotikem (viz tab. 5). Imobilizace proběhla v PVA matrici (technologie Lentikats®). PVA gel se rozehřál na vodní lázni při teplotě 90 °C. Ke zchlazenému PVA gelu (32 ml) byla přidána narostlá buněčná suspenze (7,5 ml). Suspenze PVA gelu a buněk byla řádně promíchána na vortexu a nalita na skleněnou Petriho misku. Do Petriho misky byla umístěna speciální hlava (dále jen hlava) na přípravu čoček Lentikats® (obr. 9). PVA gel s mikroroganismy zachycený na hrotech hlavy byl přenesen na víčko sterilní skleněné Petriho misky. Poté byly ponechány misky s připravenými imobilizovanými čočkami v Biohazard boxu. Po dosažení 30 % váhy čerstvých čoček, byly stabilizovány v roztoku síranu sodného (mícháním na magnetické míchačce) po dobu 2 hodin. Po stabilizaci byly čočky promyty minerálním médiem MSM, rozděleny do dvou Erlenmeyerových baněk s živným LB médiem a

antibiotikem a ponechány kultivovat přes noc na třepačce (28°C, 120 rpm). Druhý den byly čočky přendány do sterilních plastových Petriho misek a zality uchovávacím roztokem s přidaným antibiotikem. Petriho misky s imobilizovanými buňkami ve formě čoček Lentikats[®] se uchovávaly v ledničce. Imobilizace buněk proběhla stejným postupem u obou bakteriálních kmenů.

Obr. 13: Hlava pro tvoření čoček Lentikats[®]



Obr. 14: Čočky Lentikats®



Čočky (vlevo) byly čerstvě připraveny, čočky na obrázku (vpravo) jsou po dosažení 30 % váhy čerstvých čoček.

4.6.5 Indukce imobilizovaných buněk

Indukce imobilizovaných buněk *Ps. putida* TVA8 a *Ps. fluorescens* HK44 proběhla stejně jako v případě volných buněk (podkapitola 4.6.3), pouze s tím rozdílem, že nejprve byla do mikrotitrační destičky vložena, čočka Lentikats®, s imobilizovanými TVA8 nebo HK44 a poté byl přidán roztok induktoru (toluenu nebo salicylové kyseliny) a média. Vzorky byly prováděny ve třech paralelních opakováním (jako v předešlých pokusech). Naplněná mikrotitrační destička byla přikryta speciální folií a ihned vložena do SPECTROstar Omega, kde proběhlo měření indukované bioluminiscence.

4.7 Experimenty s *Pseudomonas putida* TVA8

4.7.1 Růstová křivka

Do Erlenmayerovy baňky se 100 ml tekutého LB média s kanamycinem, byla zaočkována bakteriální kultura. Směs byla kultivována při 28 °C a 120 rpm na třepačce přes noc. Druhý den se odebrala narostlá kultura (1 ml u TVA8, 5 ml u HK44) a přeočkována do čerstvého LB média s KM. Poté bylo měřeno každých 30 minut OD narostlé kultury, při dané vlnové délce 600 nm.

4.7.2 Závislost optické hustoty na log počtu buněk v 1 ml

Do Erlenmayerovy baňky se 100 ml LB média s KN, byla zaočkována kultura TVA8 a přes noc kultivována na třepačce při 28 °C a 120 rpm. Následující den se odebral 1 ml narostlé kultury, přeočkoval do čerstvého LB média s KN a kultura se dále nechala kultivovat na třepačce při laboratorní teplotě. Suspenze narostlých buněk byla postupně odebírána a po změření OD při 600 nm bylo 0,1 ml rozetřeno na agarovou misku s LB s KN. Při vyšších OD byla suspenze ředěna tak, aby počet

narostlých kolonií byl počítatelný, tj. nižší než cca 600. Výsledky (viz kapitola 5.2.1 str. 28) byly vyneseny do grafu a proloženy rovníci přímkou.

4.7.3 Vliv koncentrace toluenu na bioluminiscenci volných buněk

Nakultivované bakterie TVA8 (viz 4.6.2.) byly indukovány v minerálním MSM médiu s přídavkem toluenu jak je uvedeno v tabulce 5. Slepým vzorkem bylo čisté minerální médium MSM. Roztok toluenu R (viz kapitola 4. 3) byl pipetován jako první přímo do každé jamky destičky zvlášť (viz tab. 5), pak bylo přidáno minerální médium MSM a nakonec buněčná suspenze. Každý vzorek vždy testován ve třech paralelních opakováních..

Tab 5: Koncentrační řada toluenu

Objem roztolu (μl)	Výsledná koncentrace v jamce ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
20	0,15
40	0,30
60	0,44
120	0,88

4.7.4 Vliv buněčné koncentrace v jamce na bioluminiscenci

Nakultivované bakterie byly rozděleny na polovinu. První půlka suspenze buněk byla dále zředěna (100 x) minerálním médiem MSM. Připravené dvě sady buněčných suspenzí byly použity pro měření v jedné mikrotitrační destičce, každá suspenze byla napipetována do jedné poloviny destičky. V první polovině se uchovávala koncentrovaná buněčná suspenze a v druhé polovině 100x zředěná suspenze v minerálním MSM médiu. Nakultivované bakterie (viz kap. 4. 6. 2.) se indukovaly v minerálním MSM médiu s přídavkem toluenu (pokus v kapitole 4.7.4).

4.7.5 Srovnání bioluminiscence volných a imobilizovaných buněk

V jedné polovině mikrotitrační destičky byly indukovány volné TVA8 a ve druhé TVA8 imobilizované v PVA matici ve formě čoček Lentikats[®].

4.7.6 Vliv skladovacího média na bioluminiscenci

Polovina imobilizovaných buněk ve formě čoček Lentikats[®] byla skladována v ledničce v MSM a druhá polovina v živném tekutém médiu LB s KN. Před indukcí byly všechny čochky kultivovány ve 100 ml živného LB média na třepačce při 28°C a 120 rpm přes noc. Druhý den byly čochky promyty MSM médiem. Do každé jamky

mikrotitrační destičky byla vložena jedna čočka. Čočky byly indukované toluenem. Jedna polovina čoček, byla indukovaná v MSM médiu a druhá v tekutém LB médiu s KN.

4.8 Experimenty s *Pseudomonas fluorescens* HK44

S bioluminiscenčním bioreportérem *Ps. fluorescens* HK44 byly provedeny pokusy stejnými postupy, tak jak je popsáno pro *Ps. putida* TVA8. Byly použity media a indukční roztoky specifické pro kmen HK44 jak je uvedeno v kapitole 4.3.

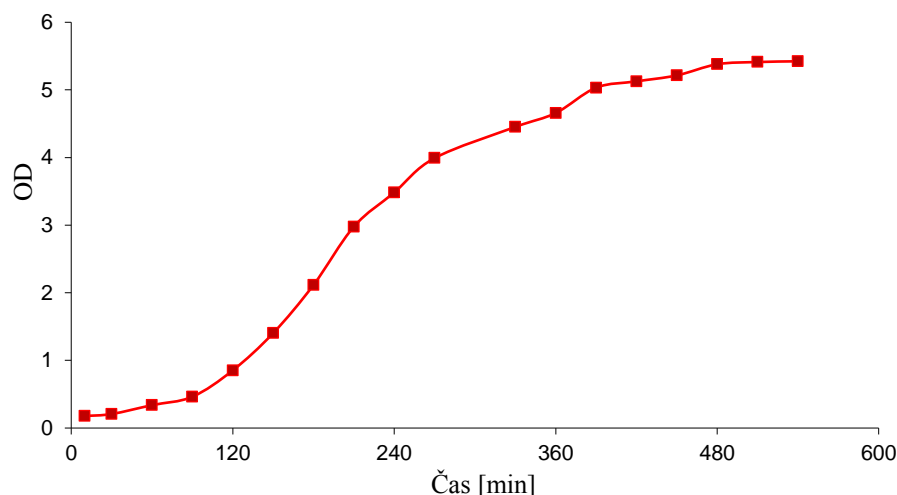
4.9 Reálný vzorek vody

Pro indukci byly použity čočky Lentikats[®] s *Ps. Putida* TVA 8 (koncentrace buněk $1,3 \cdot 10^{-1}$ B.ml⁻¹) a HK44 (koncentrace buněk ...). Čočky byly den před indukcí kultivovány v tekutém živném médiu LB s antibiotikem, na třepačce při 28 °C a 120 rpm přes noc. Druhý den byly čočky indukované v jedné destičce. Pro indukci byl použit koncentrovaný reálný vzorek i zředěný a roztok toluenu R. Obsah jednotlivých jamek je uveden na obr. V jamkách v řadě D (viz obr ..) byl ke koncentrovanému a zředěnému vzorku přidán roztok toluenu R (koncentrace v jamce 0.44 μg.ml⁻¹). Toto složení v jamce bylo použito pro kontrolu vlivu dalších látek, přítomných v reálném vzorku ale neurčených, na intenzitu indukované bioluminiscence.

5 Výsledky

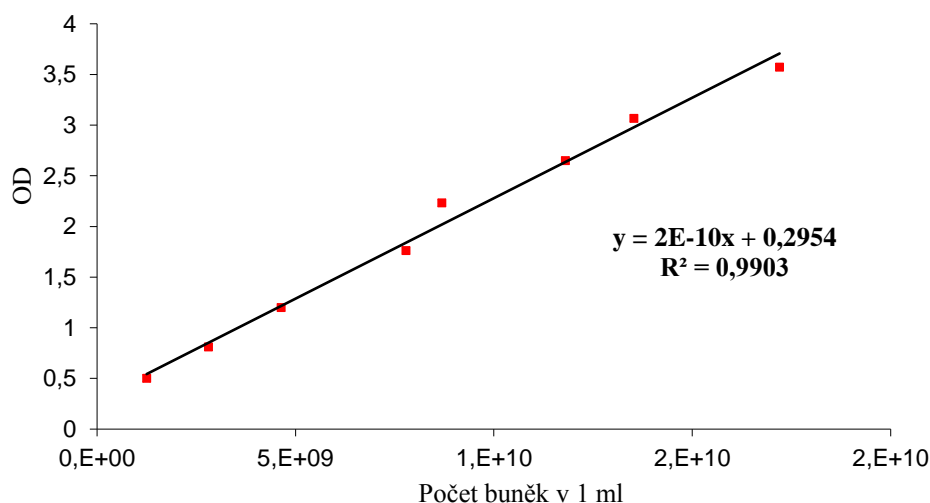
5.1 *Pseudomonas putida* TVA8

Závislost optické hustoty buněk (OD) na době kultivace mikroorganismů je znázorněna na obr 15. Obrázek popisuje růst mikroorganismů v uzavřeném prostoru. Buňky byly kultivovány v živném LB médiu. V rozmezí od 0 – 120 minut probíhala lag fáze (buňky se přizpůsobovaly prostředí), v časovém intervalu 120 – 330 minut nastala log fáze (buňky se začaly množit) a mezi 330 – 600 minutou došlo k ustanovení stacionární fáze.



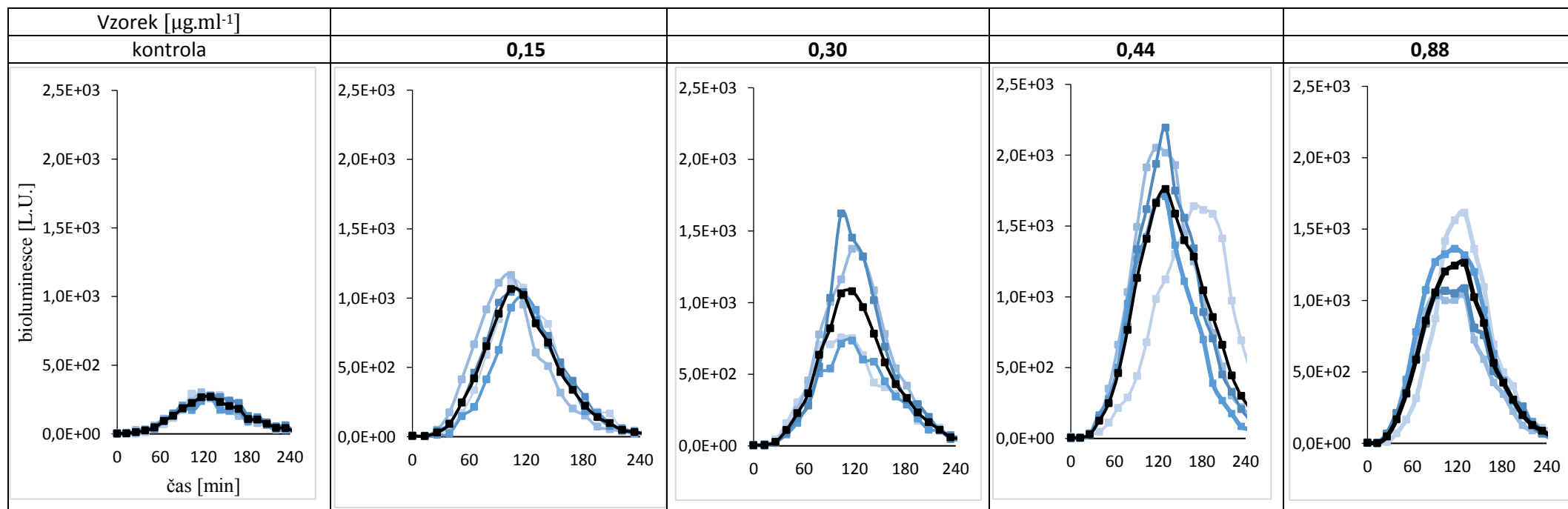
Obr. 15: Růstová křivka mikroorganismu TVA8

Na obr. 16 je možné vidět závislost optické hustoty na log počtu buněk v 1 ml. Suspenze narostlých buněk byla postupně odebírána a po změření OD (optické hustoty) při 600 nm byla vždy 1 ml rozetřena na agarovou misku LB s KN. Výsledky byly vyneseny do grafu a proloženy rovnicí přímky.



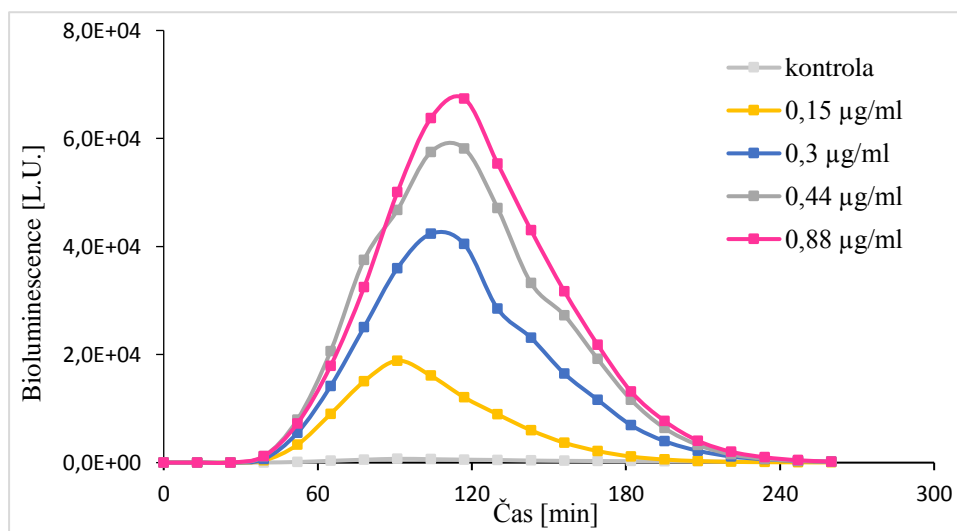
Obr. 16: Závislost optické hustoty buněk na buněčné koncentraci

Změřená časová závislost luminiscence volných buněk v MSM médiu po indukci toluenem (koncentrační rozmezí 0 – 0,88 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) je znázorněná na obr- 18. Měření bylo provedeno v jedné mikrotitrační destičce ve čtyřech paralelních opakování (pozice A-D, viz obr. 12). Do grafu byl zanesen průměr každého paralelního opakování (černá barva). Nejvyššího rozdílu bylo dosaženo u koncentrací 0,30 a 0,44 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ toluenu v jamce. Závislost bioluminiscence volných buněk na koncentraci indukovaného toluenu byla proměřena v rozmezí koncentrací (0 – 0,88 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) v čase. Maxima bioluminiscenční odezvy bylo dosaženo po 90 – 120 min indukce. Závislost bioluminiscence je přímo úměrná koncentraci toluenu v jamce.



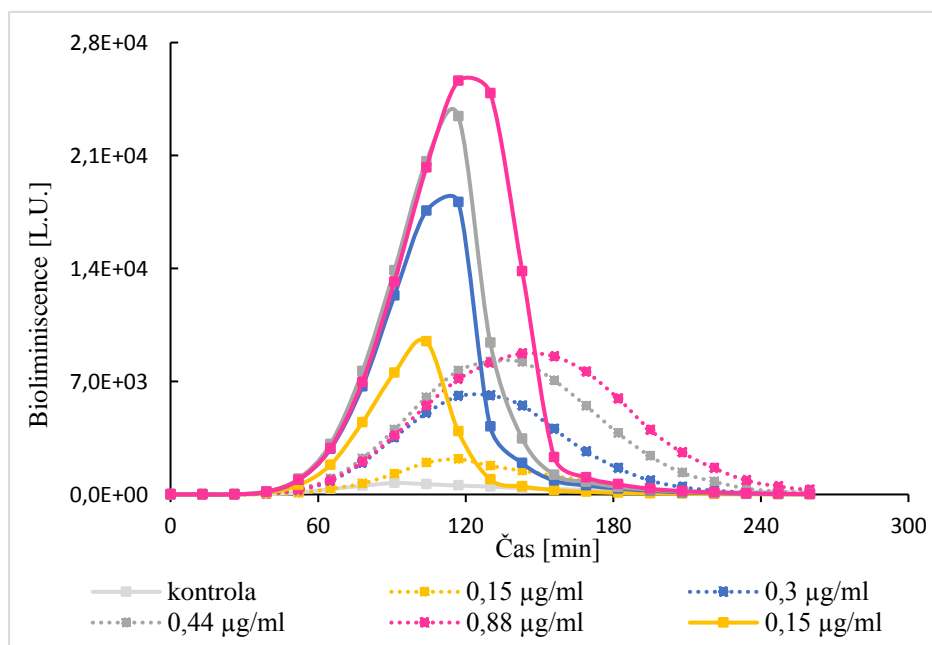
Obr. 17: Opakovatelnost luminiscenční odezvy volných buněk TVA8

Obr 18 ukazuje závislost bioluminiscence na koncentraci toluenu v minerálním MSM médiu v čase. Intenzita bioluminiscence stoupala se vzrůstající koncentrací toluenu od 0 do $0,88 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v jamce. Menší rozdíl v intenzitě bioluminiscence byl mezi koncentracemi $0,44 \mu\text{g}/\text{ml}$ a $0,88 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.



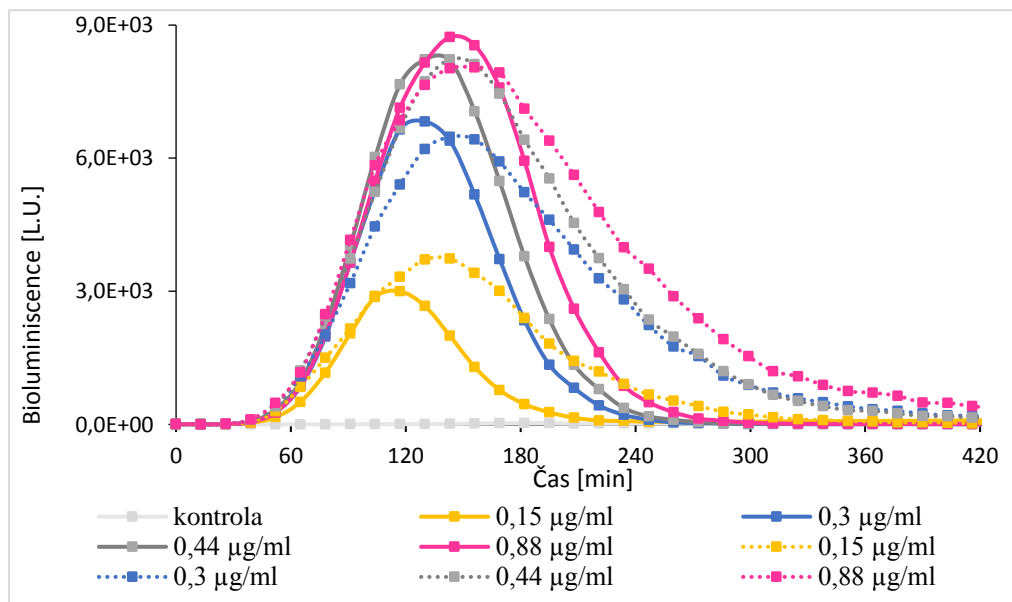
Obr. 18: Vliv koncentrace toluenu na bioluminiscenci volných buněk

Závislost bioluminiscenční odezvy na koncentraci volných buněk TVA8 je znázorněná na obr. 19. Byly proměřeny dvě buněčné suspenze, jedna s koncentrací 1.10^9 B.ml⁻¹ (plná čára) a druhá s koncentrací 1.10^7 (tečkovaná čára). Po naředění volných buněk došlo k poklesu bioluminiscenční odezvy přibližně 3x. Obě buněčné suspenze byly indukovány toluenem v minerálním MSM médiu.



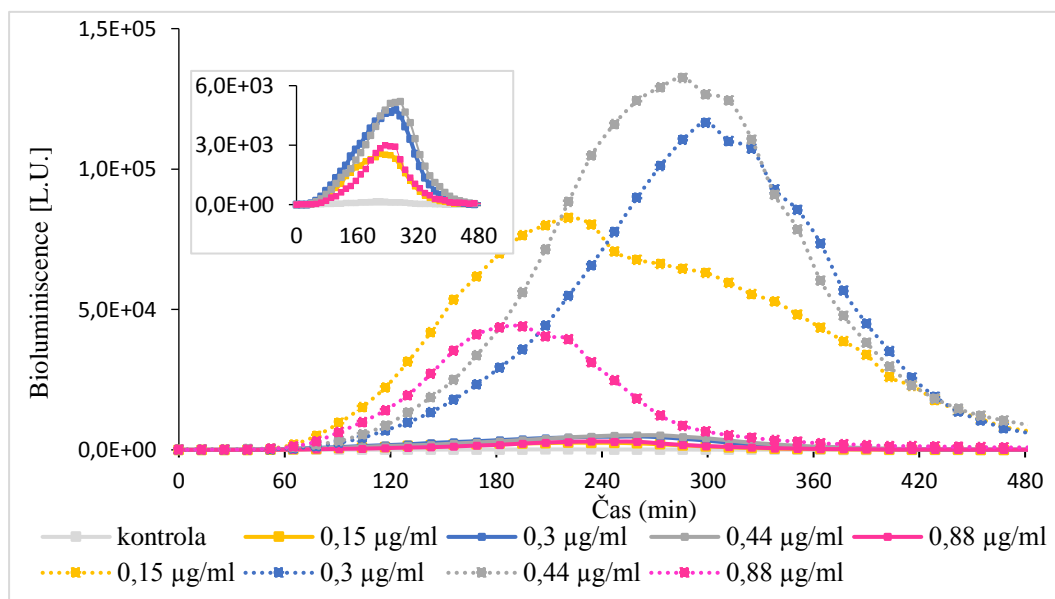
Obr. 19 : Vliv buněčné koncentrace v jamce na bioluminiscence

Časový průběh bioluminiscence volných (plná čára) a imobilizovaných buněk TVA8 v PVA matrici (tečkovaná čára) o stejné koncentraci $1,3 \cdot 10^{10}$ B.ml⁻¹. Buňky TVA8 byly indukovány kalibrační řadou toluenu 0 - 0,88 µg.ml⁻¹ v MSM médiu v čase. Intenzita bioluminiscence volných i imobilizovaných mikroorganismů byla skoro stejná, což naznačuje obr. 21.

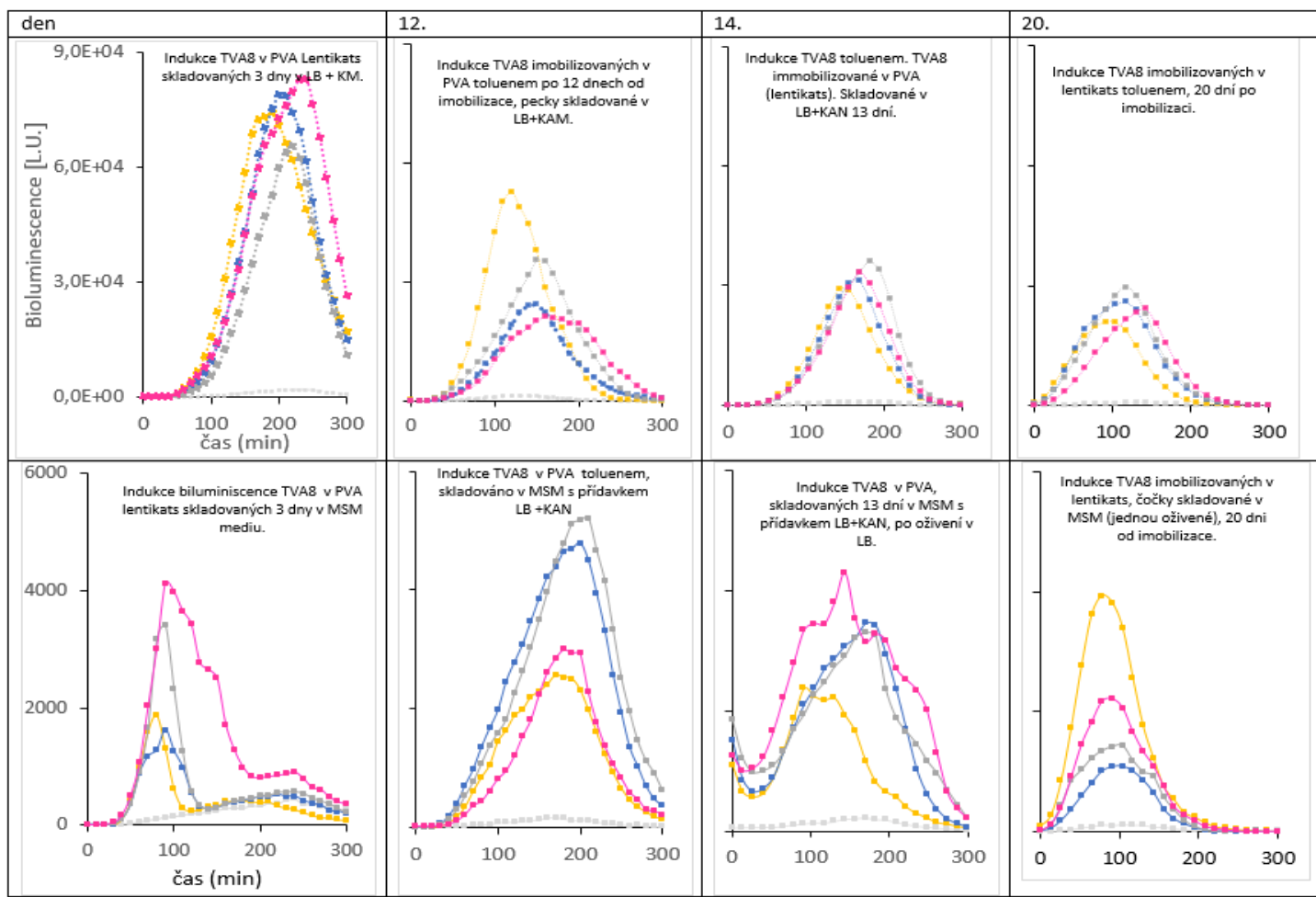


Obr. 21: Srovnání bioluminiscence volných a imobilizovaných buněk TVA8 v Lentikats®

Na obrázku č. 22 je znázorněn vliv média na intenzitu bioluminiscence imobilizovaných buněk TVA8 v PVA matrici ve formě čoček. Čočky byly skladovány v minerálním MSM médiu (plná čára) a živném LB médiu (tečkovaná čára) indukované toluenem. Vyšší odezva bioluminiscence byla v případě imobilizovaných buněk. V grafu vložen výřez.



Obr. 22: Vliv podmínek skladování na bioluminiscenci imobilizovaných buněk TVA8 ve formě čoček Lentikats®

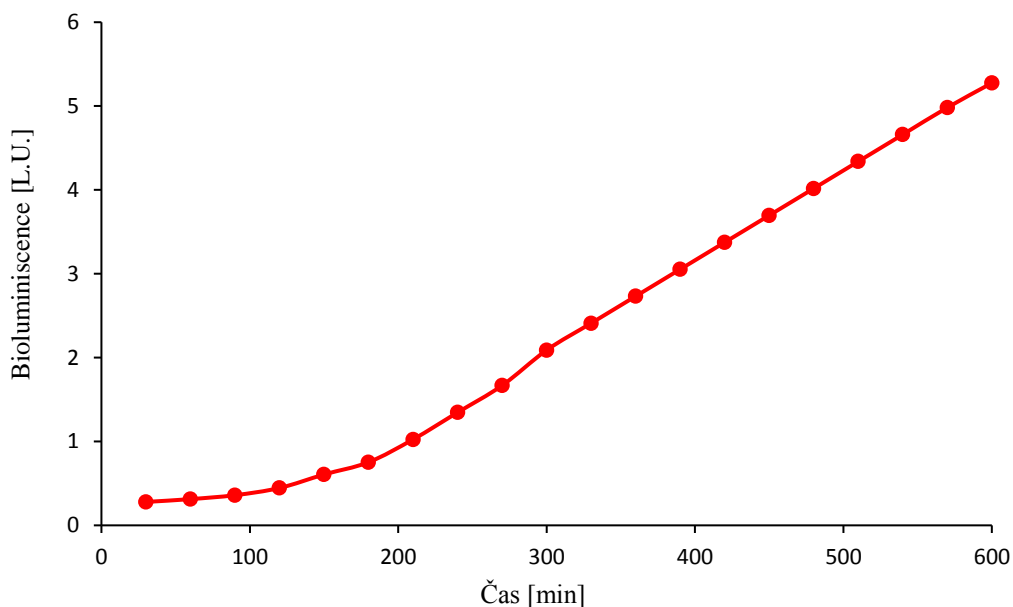


Obr. 23: Vliv skladování buněk TVA8 imobilizovaných v Lentikats[®], na indukovanou bioluminiscenci v minerálním MSM (plná čára) a živném LB (tečkovaná čára) médiu

Na obr. 23 je znázorněno skladování imobilizovaných čoček Lentikats® po dobu jednoho měsíce. V první polovině grafu jsou čočky skladovány v živném LB médiu. Imobilizované buňky TVA8 byly změřeny po 3, 12, 13 a 20 dnech skladování v ledničce v uchovávacím živném LB médiu. Dosažení maxima se pohybovalo v rozmezí 150 – 200 minutami po indukci toluenem. V druhé polovině grafu byly buňky uchovávány v minerálním MSM médiu. Měření probíhalo shodně s buňkami v LB médiu. Dosažení nejvyšší intenzity bioluminiscence bylo dosaženo po 100 – 150 minutách indukce toluenem. Z obrázku je zřejmé, že použití živného LB média je pro imobilizované čočky výhodnější.

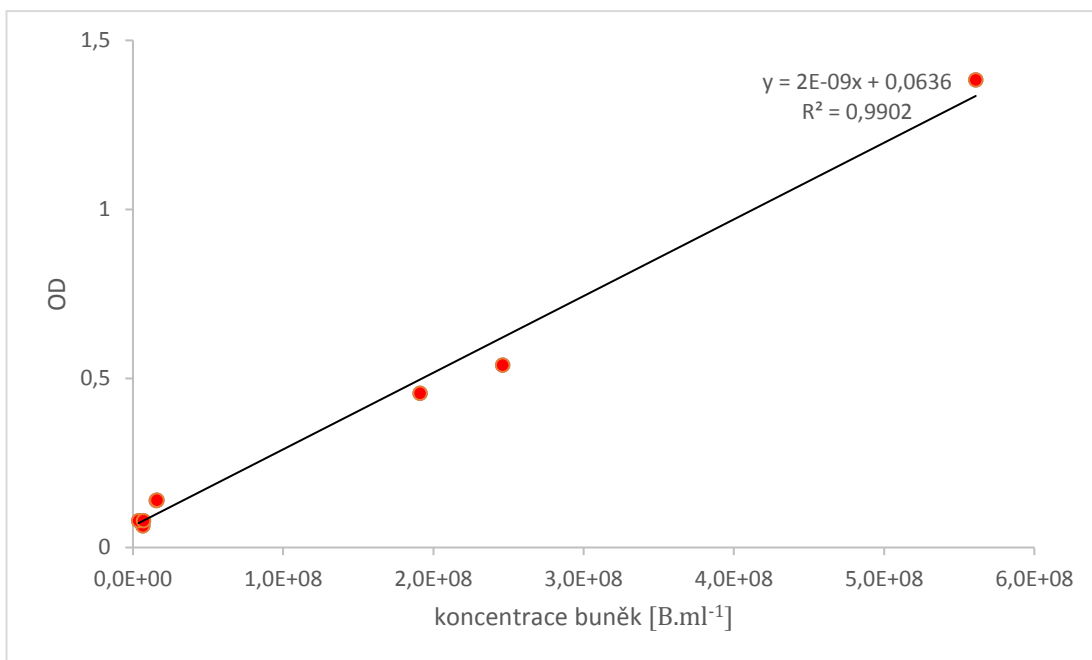
5.2 *Pseudomonas fluorescens* HK44

Závislost optické hustoty buněk (OD) na době kultivace mikroorganismů je znázorněna na obr. 24. Obrázek popisuje růst mikroorganismů v uzavřeném prostoru. Buňky byly kultivovány v živném YEPS médiu. V rozmezí od 0 – 100 minut probíhala lag fáze (buňky se přizpůsobovaly prostředí), v časovém intervalu 100 – 180 minut nastala log fáze (buňky se začaly množit). Obrázek je analogický obrázku 16.



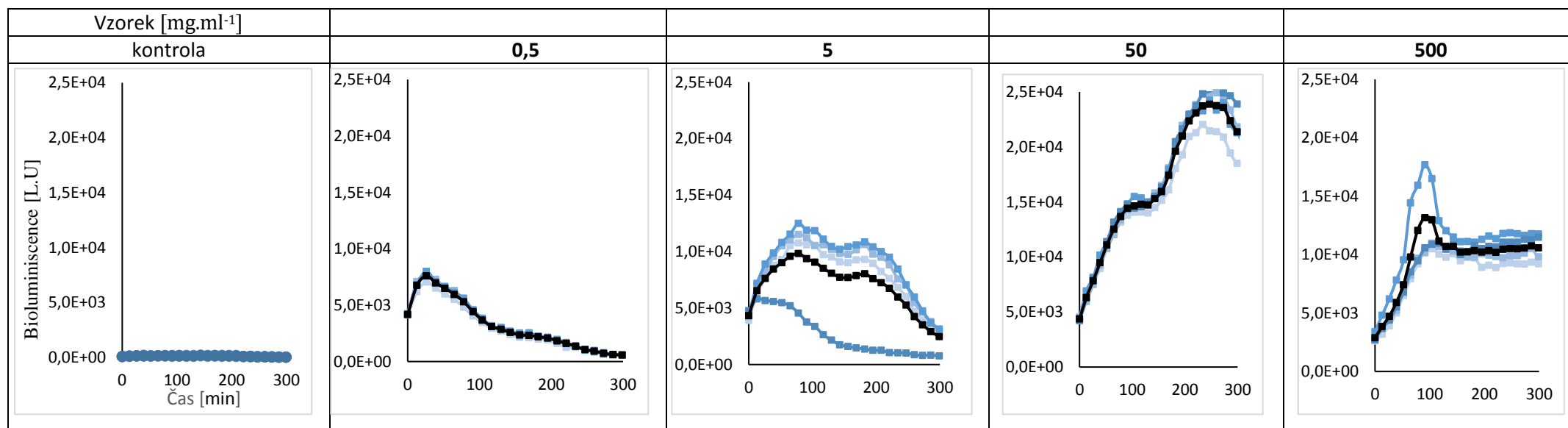
Obr. 24: Růstová křivka mikroorganismu

Na obr. 25 je lze vidět závislost optické hustoty na log počtu buněk v 1 ml. Suspenze narostlých buněk byla postupně odebírána a po změření OD (optické hustoty) při 600 nm byla vždy 1 ml rozetřena na agarovou misku LB s TC. Výsledky byly vyneseny do grafu a proloženy rovnicí přímky.



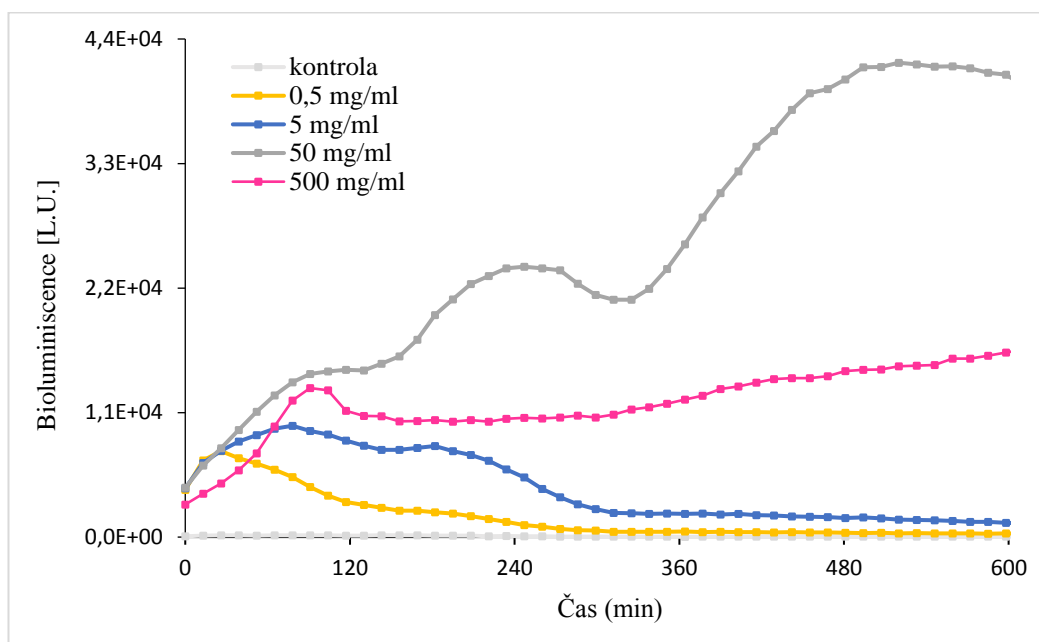
Obr. 25 Závislost optické hustoty buněk na buněčné koncentraci

Změřená časová závislost luminiscence volných buněk v YEPS médiu po indukci salicylovou kyselinou (koncentrační rozmezí 0 – 0,500 mg.ml⁻¹ v jamce) je znázorněná na obr- 26. Měření bylo provedeno v jedné mikrotitrační destičce ve čtyřech paralelních opakování (pozice A-D, viz obr. 12). Do grafu byl zanesen průměr každého paralelního opakování (černá barva). Nejvyššího rozdílu bylo dosaženo u koncentrací 5 mg.ml⁻¹ salicylové kyseliny v jamce. Prvního maxima bioluminiscenční odezvy bylo dosaženo po 100 minutách indukce. Druhé maximum bylo dosaženo po cca 200 minutách.



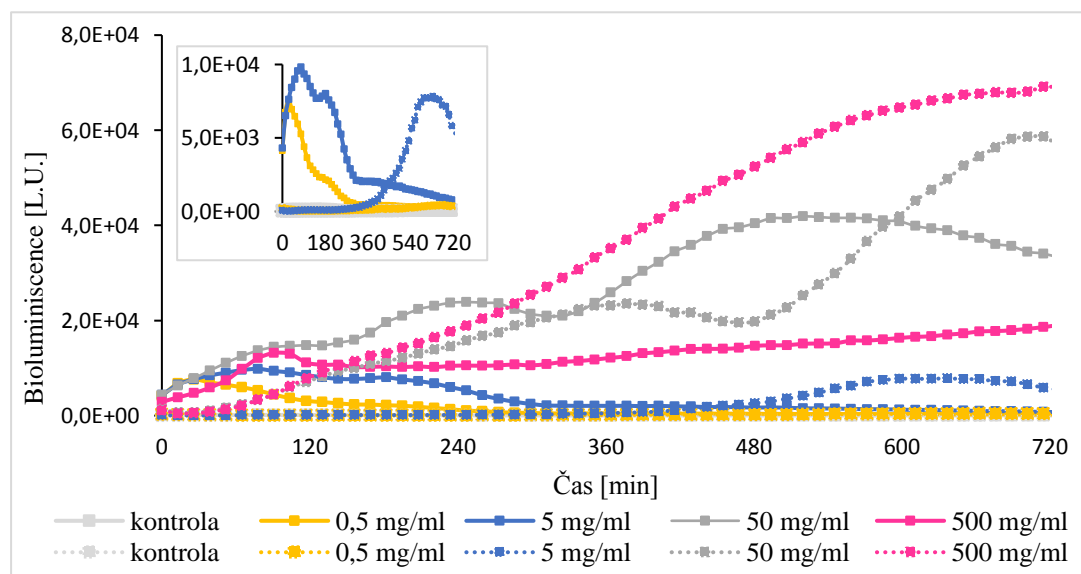
Obr. 26 Opakovatelnost luminiscenční odezvy volných buněk HK44

Závislost bioluminiscence na koncentraci salicylové kyseliny v médiu YEPS v čase ukazuje obr. 27. Intenzita bioluminiscence stoupala se vzrůstající koncentrací od 0 do 50 mg.ml⁻¹ v jamce. Menší rozdíl v intenzitě bioluminiscence byl zaznamenán u koncentracemi 500 mg.ml⁻¹.



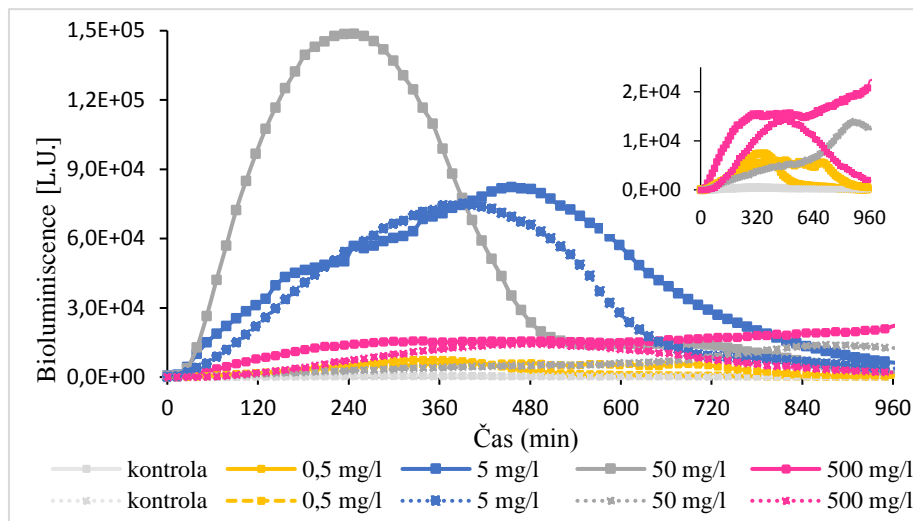
Obr.27: Vliv koncentrace salicylátu na bioluminiscence volných buněk *P. fluorescens*

Obr. 28 : Časový průběh bioluminiscence stejného množství volných (plná čára) a imobilizovaných (tečkovaná čára) buněk *P. Fluorescens* HK44 v PVA matrici ve formě čoček Lentikats®, indukované salicylátém. Bioluminiscence imobilizovaných buněk byla rozdílná. Do grafu vložen výřez.



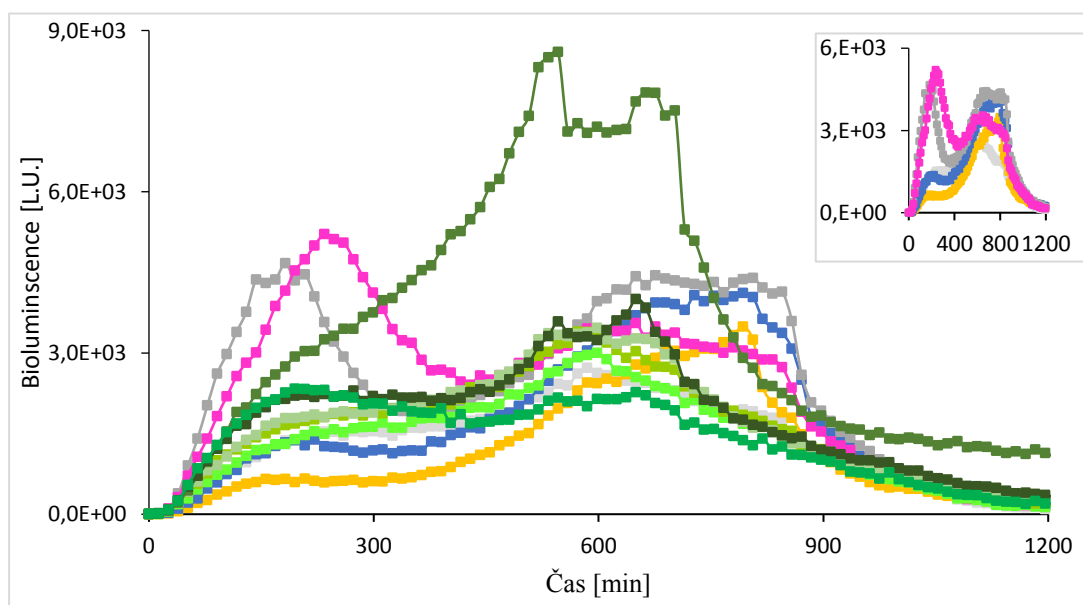
Obr. 28: Srovnání bioluminiscence volných a imobilizovaných buněk

Na obrázku č. 29 je znázorněn vliv média na intenzitu bioluminiscence imobilizovaných buněk HK44 v PVA matrici ve formě čoček. Čočky byly skladovány v minerálním YEPS médiu (plná čára) a živném LB médiu (tečkovaná čára) indukované salicylovou kyselinou. Vyšší odezva bioluminiscence byla v případě imobilizovaných buněk. V grafu vložen výřez.



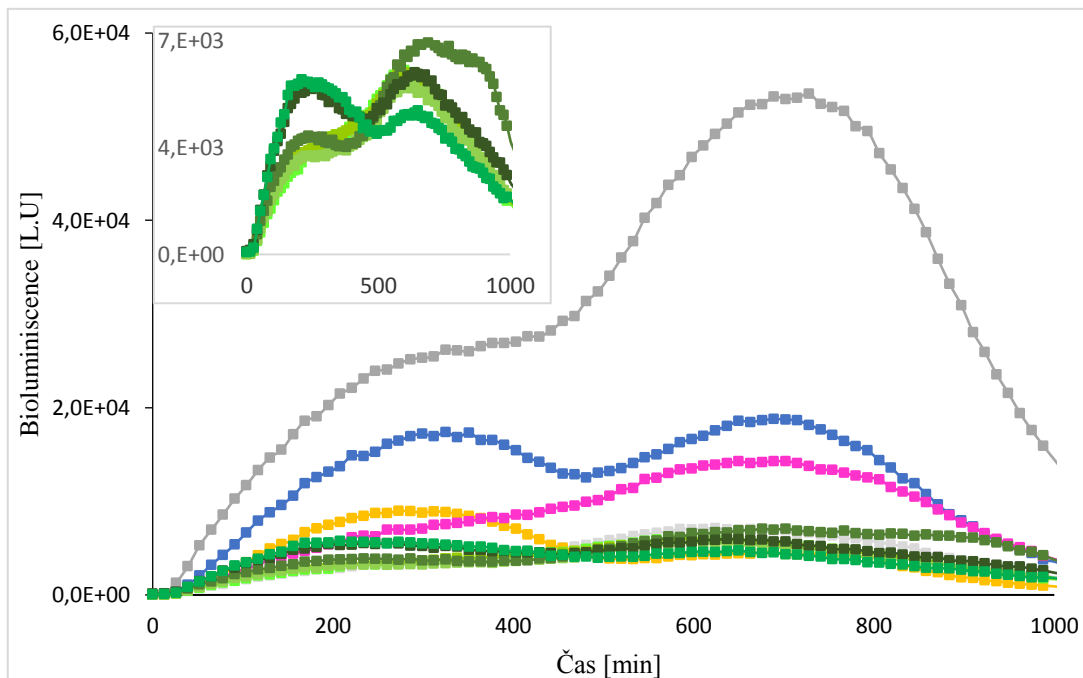
Obr. 29: Vliv podmínek skladování na bioluminiscenci imobilizovaných buněk HK44 ve formě čoček Lentikats®

Imobilizované buňky byly indukovány reálným vzorkem, koncentrovaným i zředěným a standartními roztoky toluenu (odstíny zelené barvy), koncentrace 0 do 0,88 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v jamce (barevné). Nejvyšší bioluminiscenční odezvy bylo dosaženo u zředěného vzorku (1:10) reálné kontaminované vody jak lze vidět na obr. 30. Vložen výřez.



Obr. 30: Průběh bioluminiscence imobilizovaných buněk TVA8 v čočkách Lentikats® indukovaných reálným vzorkem

Imobilizované buňky byly indukovány reálným vzorkem, koncentrovaným i zředěným a standardními roztoky salicylové kyseliny (odstíny zelené barvy), koncentrace 0 do 0,500 mg.ml⁻¹ v jamce (barevné) je znázorněna obr. 30.. Nejvyšší bioluminiscenční odezvy bylo dosaženo u zředěného vzorku (1:10) reálné kontaminované vody. Vložen výřez.



Obr. 30: Průběh bioluminiscence imobilizovaných buněk TVA8 v čočkách Lentikats® indukovaných reálným vzorkem

6 Diskuze

Experimenty provedené s *Pseudomonas putida* TVA8

Opakovatelnost ukazuje, že jsou rozdíly v intenzitě bioluminiscence buněk i v čase dosažení maxima. Vyrůstaly se vzrůstem koncentrace toluenu v jamce. To zřejmě souvisí s rozdílnou difuzí toluenu do čočky a tím i rozdílnou dosažitelností toluenu pro mikroorganismy. Bioluminiscence stoupá se vzrůstající koncentrací toluenu od 0 do $0,88 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Menší rozdíl v intenzitě bioluminiscence byl mezi koncentracemi $0,44 \mu\text{g}/\text{ml}$ a $0,88 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, což souvisí s toxickým působením vyšší koncentrace toluenu na buňky. Maximální bioluminiscence buněk byla dosažena zhruba po 1,5 – 2 hodinách po indukci toluenem. Bioluminiscence je závislá na buněčné koncentraci.

Použitá metoda Lentikats[®] je vhodná pro imobilizaci bakterií. Bioluminiscence imobilizovaných buněk *Pseudomonas putida* TVA8 byla srovnatelná s volnými buňkami, což naznačuje zachování životaschopnosti většiny buněk. Narozdíl u buněk *Pseudomonas fluorescens* HK44, kde se odezva lišila. Čas k dosažení maxima bioluminiscence buněk TVA8 byl delší pro imobilizované buňky a to zejména při nižších koncentracích toluenu. Pro koncentraci toluenu $0,15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byl rozdíl 20 minut, kdežto pro koncentraci $0,88 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byl rozdíl pouze 5 minut. To souvisí s difuzí toluenu k buňkám, imobilizovaným v Lentikats[®]. Vliv na skladování má druh média. Lepší je skladování v LB médiu, protože představuje zdroj živin pro mikroorganismus buněk. Při skladování imobilizovaných buněk v živném médiu, byla bioluminiscence zhruba 10 x vyšší než při skladování v MSM médiu. Skladováním, ať už v LB nebo MSM médiu docházelo postupně k poklesu bioluminiscence. K udržení měřitelné bioluminiscence bylo přidáno několik ml živného média s antibiotikem do minerálního media, ve kterém byly buňky skladovány. Zvýšení bioluminiscence imobilizovaných buněk skladovaných v minerálním médiu, bylo dosaženo i jejich oživením, kultivací přes noc v živném médiu.

Experimenty provedené s *Pseudomonas fluorescens* HK44

Experimenty ukazují, že při indukci buněk HK44 salicylovou kyselinou došlo k prvnímu maximu intenzity bioluminiscence po 80 minutách indukce. Při koncentracích $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $50 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ je zřetelné i druhé bioluminiscenční maximum v čase kolem 200 minut. Při koncentraci $500 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ se zřejmě již projevuje toxický účinek vysoké koncentrace kyseliny salicylové. Časový průběh intenzity bioluminiscence byl ve všech jamkách indukovaných stejnou koncentrací kyseliny salicylové prakticky stejný. Rozdíly v intenzitě byly do 20 % s jedinou výjimkou ($5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Bioluminiscence stoupala se vzrůstající koncentrací salicylové kyseliny od $0,5$ do $50 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. U nejvyšší koncentrace $500 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ došlo k poklesu intenzity bioluminiscence: Tato vysoká koncentrace salicylátu působí již toxicky na volné buňky HK44. Maximální intenzity bioluminiscence buněk bylo dosaženo v rozmezí

90 – 240 minutami po indukci salicylátém. V průběhu měření došlo minimálně ke dvěma zvýšením bioluminiscence. Tento rozdílný průběh indukce od TVA8 je způsoben tím, že genetický konstrukt odpovědný za produkci bioluminiscence byl vložen na plasmidu.

Bioluminiscence volných i imobilizovaných buněk HK44, indukovaných stejnou koncentrací salicylátu byla rozdílná. Maximum bioluminiscence imobilizovaných buněk se zvýšilo oproti volným ~ 6x. Kromě koncentrace 5 a 50 mg.ml⁻¹ salicylové kyseliny. Čas k dosažení maxima bioluminiscence byl asi 2x delší pro imobilizované buňky, zejména při vyšších koncentracích salicylátu. Prodloužení času k dosažení maxima bioluminiscence může souviset s difuzí salicylátu k buňkám imobilizovaným v Lentikats[®].

Vliv na skladování má druh média. Při skladování imobilizovaných buněk v živném YEPS médiu, byla bioluminiscence jen o něco vyšší než při skladování v LB médiu s TC. Ke zvýšení bioluminiscence imobilizovaných buněk skladovaných v minerálním mediu, bylo dosaženo jejich kultivací oživením, kultivací přes noc v živném LB médiu s TC.

Reálný vzorek

Průběh bioluminiscence TVA8 v čočkách Lentikats[®] indukovaných reálným vzorkem, koncentrovaným i zředěným a standartními roztoky. Nejvyšší bioluminiscence dosáhl reálný vzorek zředěný 1:10 ale až po více než 6 hodinách indukce. Koncentrovaný vzorek i vzorky zředěné 1:1, 1:50 a 1:100 měly bioluminiscenci nižší, což souvisí s vysokou koncentrací BTEX, která už je toxická u koncentrovaného vzorku a vzorku 1:1 a na druhou stranu s nízkou koncentrací BTEX u vzorků zředěných 1:50 a 1:100. V čase odpovídajícímu dosažení maxima v jamkách se standartními roztoky (konc. 0,44 a 0,88 µg. ml⁻¹) byla bioluminiscence vzorku zředěného 1:10 přibližně odpovídající koncentrací toluenu (ve srovnání se standartními roztoky). Vysoká bioluminiscence v jamkách s přidavkem standartu u reálného vzorku, koncentrovaného i zředěného, (neuveďeno v grafu č. 9) souvisí s přítomností dalších, neidentifikovaných, látek v reálném vzorku ať už zdrojů uhlíku nebo látek narušujících buněčnou membránu, které zvyšují indukovanou bioluminiscenci.

Bioluminiscence HK44 indukovaná reálným vzorkem ve všech zředěních byla na úrovni slepého pokusu (tzn. bioluminiscence HK44 v YEPS mediu bez induktoru). To je v souladu s chemickým rozbohem, kdy nebyly ve vzorku nalezeny žádné polyaromatické uhlovodíky.

7 Závěr a přínos práce

Experimenty provedené v této práci prokázaly podobný průběh indukce u volných i imobilizovaných buněk bioreportérů *Ps. fluorescens* HK44 a *Ps. putida* TVA8. Bylo prokázáno, že imobilizované bioreportéry v čočkách Lentikats® je možné skladovat po dobu 1 měsíce. Skladování je nutné provádět v živném mediu, jinak dochází k prudkému poklesu indukované bioluminiscence. Pokud jsou skladovány v minerálním mediu, je nutné provést oživení kultivací přes noc v živném mediu.

Bioreportéry imobilizované do Lentikats® mohou sloužit jako nástroj pro rychlou a levnou detekci kontaminace vody. Vzhledem k přítomnosti dalších látek v reálných vzorcích, které mohou zvyšovat ale i snižovat bioluminiscenci, bude využití detekce pomocí imobilizovaných bioreportérů zejména při sledování kontaminace v určité lokalitě. Nízká cena jedné analýzy pomocí bioreportérů imobilizovaných do Lentikats®, umožní časté odbírání vzorků. V případě hledání nejvíce kontaminovaného místa lze detekovat semikvantitativně kontaminaci ve velkém počtu vzorků a tím přesněji určit nejvíce zasažené místo.

8 Přehled literatury a použitých zdrojů

Close, M. D., Ripp, S., Sayler, G. S., 2009: Reporter proteins in whole-cell optical bioreporter detection system, biosensor integrations, and biosensing applications. *Sensors*, 9 (11), 9147-9174.

Hakkila K., Maksimow M., Karp M., Virta M., 2002: Reporter genes *lucFF*, *luxCDABE*, *gfp*, and *dsred* have different characteristics in whole-cell bacterial sensors. *Anal Biochem*, 301(2), 235-42.

Heitzer A., Webb O. F., Thonnard J. E., Sayler G. S., 1992: Specific and quantitative assesment of naphthalene and salicylate bioavailability by using a bioluminiscent catabolic reporter bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (6), 1839-1846.

James S., Nilsson P., James G., Kjelleberg S., Fagerström T., 2000: Luminescence control in the marine bacterium *Vibrio fischeri*: An analysis of the dynamics of lux regulation. *Journal of Molecular Biology*, 296 (4), 1127-1137.

Kendall J. M., Badminton M. N., 1998: *Aequorea victoria* bioluminescence moves into an exciting new era. *Trends Biotechnol.*, 16 (5), 216-224.

King J. M. H., DiGrazia P. M., Applegate B., Burlage R., Sanseverino J., Dunbar P., Larimer F., Sayler G. S., 1990: Rapid, sensitive bioluminescent reporter technology for naphthalene exposure and biodegradation. *Science*, 249 (4970), 778-781.

Kizek R., Vacek J., Trnková L., Klejdus B., Kubáň. V., 2003: Elektrochemické biosenzory v analýze zemědělských produktů a vzorků životního prostředí. *Chem. Listy*, 97, 1003 -1006.

Kuncová, G.; Pazlarová, J.; Hlavatá, A.; Steven, R.; Sayler, G. S., 2011: Bioluminescent bioreporter *Pseudomonas putida* TVA8 as a detector of water pollution. Operational conditions and selectivity of free cells sensor. *Ecological Indicators*, 11 (3), 882–887.

Lacal J., Busch A., Guazzaroni M.E., Krell T., Ramos J. L., (2006): The TodS-TodT two-component regulatory system recognizes a wide range of effectors and works with DNA-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 103(21), 8191-8196.

Leveau J.H.J., Lindow S. E., 2002: Bioreporters in microbial ecology. *Current Opinion Microbiology*, 5 (1), 259-265.

Matrubutham U., Thonnard J. E., Sayler G. S., 1997: Bioluminescence induction response and survival of the bioreporter bacterium *Pseudomonas fluorescens* HK44 in nutrient-deprived conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47 (5), 604–609.

Meighen E. A., 1991: Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 55 (1), 123-142.

Mello, L. D.; Kubota, L. T. 2000: Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry*, 77 (2), 237–256.

Polyak B., Bassis E., Novodvoretz A., Belkin S., Marks R. S., 2001: Bioluminescent wholecell optical fiber sensor to genotoxicants: system optimization. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 74 (1-3), 18-26.

Rychtáriková, R., Kuncová G., 2009: Immobilized Singlet Oxygen Photosensitizers and Their Antimicrobial Effect, *Chem. Listy*, 103, 800–813.

Sayler G., S., Ripp S. 2000: Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes. *Current Opinion in Biotechnology*, 11 (3), 286-289.

Silva T. R., Valdman E., Valdman B., Leite S. G. F., 2007: Salicylic acid degradation from aqueous solutions using *Pseudomonas fluorescens* HK44. Parameters studies and application tools. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38 (1), ISSN 1678-4405.

Trögl J., Ripp S., Kuncová G., Sayler S., Churavá A., Pařík P., Demnerová K., Hálová J., Kubicová L., 2004: Selectivity of whole cell optical biosensor with immobilized bioreporter *Pseudomonas fluorescens* HK44. *Sensors and Actuators B: Chemical.*, 107 (1), 98-103.

Trögl J., Chauhan A., Ripp S., Layton C., A., Kuncová. G., Sayler G. S., 2012: *Pseudomonas fluorescens* HK44: Lessons Learned from a Model Whole-Cell Bioreporter with a Broad Application History. *Sensors*, 12 (2), 1544-1571.

Vo-dinh T., Cullum B., 2000: Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 366 (6-7), 540-551.

Wiener, K., 1995: Whole blood glucose, what are we actually measuring? *Ann. Clin. Biochem.*, vol. 32, (1-8)

Woodward, J., 1988: Methods of immobilization of microbial cells. *Journal of Microbiological Methods*, 8 (1-2), 91–102.

Zajíc J., Bittner M., Brányik T., Solovyev A., Šabata S., Kuncová G., 2016: Repetitive inductions of bioluminescence of *Pseudomonas putida* TVA8 immobilised by adsorption on optical fibre. *Chemical papers*, 70 (7), 877–887.

Loučka T., 2014: *Chemie životního prostředí*, Ústí nad Labem, 164 s.

Pavlovský J., Vontorová J., Praus P., 2013: *Metody monitorování životního prostředí*. Ostrava, 247 s.

Skládal P., 2002: *Biosensory*, Brno, 149 s.

Arnika, ©2014: Naftalen - Arnika (online) [cit.2018.02.14], dostupné z <<http://arnika.org/naftalen>>.

Arnika, ©2014: Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs) - Arnika (online) [cit.2018.02.14], dostupné z <<http://arnika.org/polycyklicke-aromaticke-uhlovodiky-pahs>>.

Arnika, ©2014: Toluen - Arnika (online) [cit.2018.02.14], dostupné z <<http://arnika.org/toluen>>.

Brož J., Současné možnosti monitorování glykémie, Remedia (online), dostupné z: <www.remédia.cz>.

CENIA a MŽP, ©IRZ - Naftalen|irz.cenia.cz (online) [cit.2018.04.14], dostupné z <<https://www.irz.cz/node/164>>.

MŽP, © 2008–2018: Geneticky modifikované organismy (GMO) – Ministerstvo životního prostředí (online) [cit.2018.04.14], dostupné z <https://www.mzp.cz/cz/geneticky_modifikovane_organismy>.

Štěchová K., Technologie v diabetologii. Co je to senzor - Medical tribune cz – (online) [cit.2018.04.14], dostupné z <<https://www.tribune.cz/clanek/40861-technologie-v-diabetologii-co-je-to-senzor>>.

Gavlasová P., 2007: Využití optické diagnostiky pro monitorování biologické degradace organických polutantů. Vysoká škola chemicko - technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, 140 s. (disertační práce). „nepublikováno“. Dep. VŠCHT v Praze.

Lysáková, 20017

Trögl, J., 2005: Vývoj biosenzoru pro stanovení polutantů v životním prostředí. Vysoká škola chemicko - technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Praha. 113 s. (disertační práce). „nepublikováno“. Dep. VŠCHT v Praze.