



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

VLIV ELEKTROCHEMICKY GENEROVANÉHO PEROXIDU VODÍKU NA STRESOVOU ODPOVĚĚ MIKROORGANISMŮ ZA ÚČELEM ZVÝŠENÉ PRODUKCE PHA

THE INFLUENCE OF ELECTROCHEMICALLY GENERATED HYDROGEN PEROXIDE ON THE STRESS
RESPONSE OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF INCREASED PHA PRODUCTION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Johana

Najbrtová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Ehlich, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1959/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Johana Najbrtová**
Studijní program: Chemie přírodních látek
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Ehlich, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Vliv elektrochemicky generovaného peroxidu vodíku na stresovou odpověď mikroorganismů za účelem zvýšené produkce PHA

Zadání diplomové práce:

- 1) Vypracovat literární rešerši na aplikace elektrochemie v biotechnologiích.
- 2) Konstrukce a optimalizace platformy pro generaci peroxidu vodíku zaměřené na biotechnologické aplikace.
- 3) Studium vlivu elektrochemicky generovaného peroxidu vodíku na množství produkovaného PHA u vybraných modelových mikroorganismů stresovaných tímto způsobem.

Termín odevzdání diplomové práce: 29.4.2024:

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

Bc. Johana Najbrtová
studentka

Ing. Jiří Ehlich, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

Abstrakt

Předmětem předložené diplomové práce je vliv elektrochemicky tvořeného peroxidu vodíku na produkci polyhydroxyalkanoátů. Peroxid vodíku byl v této práci generován přímo v kultivačním médiu s bakteriemi, a to dvouelektronovou redukcí kyslíku. Tato práce je dělena na teoretickou část, která se věnuje přiblížení tematiky polyhydroxyalkanoátů, oxidativního stresu, elektrochemické produkce H_2O_2 a propojení elektrochemie s biotechnologií. Experimentální část je zaměřena na aplikaci těchto poznatků. Peroxid vodíku byl generován aplikací elektrického potenciálu na elektrodový systém složený konkrétně z nerezové ocelové pracovní elektrody, titanové protelektrody a pseudoreferenční Ag/AgCl elektrody vložených do polypropylenového držáku. Po počáteční elektrochemické charakterizaci připraveného systému byl vybrán potenciál $-0,8$ V a -1 V pro aplikaci v kultivačních experimentech. Zde byl zkoumán vliv H_2O_2 na stresovou odpověď bakterie *Cupriavidus necator* H16 z České sbírky mikroorganismů. Z výsledků kultivačních experimentů bylo patrné, že elektrochemicky produkovaný H_2O_2 nemá výrazný vliv na vývoj bakteriální kultury. Avšak samotný elektrodový systém pozitivně ovlivňuje bakteriální růst. Vliv H_2O_2 nebyl patrný z důvodu nízké produkce v médiu. Ta byla způsobena nízkou koncentrací kyslíku v objemu kultivačního média. V průběhu práce byl navrhnout nový elektrodový systém s vyšší tvorbou H_2O_2 , který mohl využívat vzdušného kyslíku pro redukcí na H_2O_2 . Avšak ani s tímto systémem nebylo dosaženo chtěné stresové odpovědi bakterie, jelikož zvýšené tvorbě H_2O_2 bránil biofilm vzniklý na elektrodách. Dále bylo v práci zjištěno, že materiály použité na elektrodový systém podporují tvorbu biofilmu, a to hlavně titan, nerezová ocelová mřížka a polypropylen.

Klíčová slova

Polyhydroxyalkanoáty, peroxid vodíku, oxidativní stres, *Cupriavidus necator* H16, elektrochemická redukce kyslíku

Abstract

The subject of the presented thesis is the effect of electrochemically formed hydrogen peroxide on the production of polyhydroxyalkanoate. In this work, hydrogen peroxide was generated directly in the medium with bacteria by two-electron reduction of oxygen. This thesis is divided into a theoretical part, which is devoted to approaching the topic of polyhydroxyalkanoate, oxidative stress, electrochemical production of H_2O_2 and the connection of electrochemistry with biotechnology. The experimental part is focused on the application of these findings. Hydrogen peroxide was generated by applying an electrical potential to an electrode system composed of a stainless-steel working electrode, a titanium counter electrode, and a pseudo-reference Ag/AgCl electrode embedded in a polypropylene holder. After initial electrochemical characterization of the prepared system, a potential of -0,8 V and -1 V was selected for application in cultivation experiments. Here, the effect of H_2O_2 on the stress response of the bacterium *Cupriavidus necator* H16 from the Czech collection of microorganisms was investigated. From the results of the cultivation experiments, it was evident that the electrochemically produced H_2O_2 does not have a significant effect on the development of the bacterial culture. However, the electrode system itself positively affects bacterial growth. The influence of H_2O_2 was not noticeable due to the low production in medium. This was caused by a low concentration of oxygen in the medium. During this work, a new electrode system with higher H_2O_2 production was designed, which could use atmospheric oxygen for reduction to H_2O_2 . However, even with this system, a desired stress response was not achieved, because increased production of H_2O_2 was prevented by the formation of biofilm on the electrodes. Furthermore, it was found that the materials used for the electrode system support the formation of biofilm, mainly titanium, stainless-steel mesh and polypropylene.

Keywords

Polyhydroxyalkanoates, hydrogen peroxide, oxidative stress, *Cupriavidus necator* H16, electrochemical reduction of oxygen

NAJBRTOVÁ, Johana. *Vliv elektrochemicky generovaného peroxidu vodíku na stresovou odpověď mikroorganismů za účelem zvýšené produkce PHA* [online]. Brno, 2024 [cit. 2024-04-27]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156615>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Jiří Ehlich.

Prohlášení

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

.....

podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Jiřímu Ehlichovi Ph.D. a také své konzultantce paní Ing. Evě Slaninové Ph.D. za odborné vedení a pomoc při vypracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Xenii Kouřilové za ochotu a pomoc při práci v laboratoři. Poděkování patří také Ing. Anně Tvrdoňové za pořízení SEM snímků. V neposlední řadě patří poděkování mé rodině a přátelům za podporu během studia. Část práce byla provedena za podpory výzkumné infrastruktury CzechNanoLab (ID LM2023051, MŠMT, 2023-2026), CEITEC Vysoké učení technické v Brně.

Obsah

1.	Úvod	8
2.	Teoretická část	9
2.1	Polyhydroxyalkanoáty	9
2.1.1	Charakteristika.....	9
2.1.2	Produkce polyhydroxyalkanoátů	10
2.1.3	Využití.....	11
2.2	Oxidativní stres a jeho vliv na bakterie	12
2.2.1	Oxidativní stres.....	12
2.2.2	Vliv oxidativního stresu na syntézu polyhydroxyalkanoátů	14
2.3	Elektrochemická tvorba peroxidu vodíku.....	15
2.3.1	Princip elektrochemické tvorby peroxidu vodíku	15
2.3.2	Redukční reakce kyslíku (ORR).....	15
2.3.3	Využití elektrochemicky tvořeného H ₂ O ₂	16
2.3.4	Tvorba peroxidu vodíku v mikrobiální cele	17
2.4	Spojení elektrochemie s biotechnologií.....	17
2.4.1	Elektro-fermentace.....	17
2.4.2	Elektricky aktivní mikroorganismy	18
2.4.3	Význam elektro-fermentace	18
2.5	Mikrobiální palivové články	19
2.5.1	Aplikace mikrobiálního palivového článku	20
2.6	Elektrochemické analytické metody	20
2.6.1	Chronoamperometrie	20
3.	Experimentální část.....	22
3.1.1	Chemikálie.....	22
3.1.2	Přístroje	22
3.1.3	Mikroorganismy	23
3.2	Metody.....	23
3.2.1	Sestavení elektrodových systémů	23
3.2.2	Použité elektrochemické metody	24
3.2.3	Charakterizace elektrodového systému.....	25
3.2.4	Stanovení koncentrace peroxidu vodíku	26
3.2.5	Kultivace	27
3.2.6	Stanovení biomasy	28
3.2.7	Stanovení obsahu PHB.....	29

3.2.8	Stanovení obsahu kyslíku.....	29
3.2.9	Příprava vzorků pro skenovací elektronovou mikroskopii	29
4.	Výsledky a diskuse.....	31
4.1	Charakterizace elektrodového systému	31
4.1.1	Dlouhodobá produkce peroxidu vodíku.....	32
4.2	Vliv elektrochemicky produkovaného peroxidu vodíku na bakteriální růst	34
4.2.1	Kultivace s aplikovaným potenciálem -0,8 V	34
4.2.2	Kultivace s vyšší produkcí peroxidu vodíku	35
4.2.3	Růst bakteriální kultury za stresových podmínek.....	38
4.3	Stanovení obsahu kyslíku	41
4.4	Nový typ pracovní elektrody	44
4.5	Kultivace s novým typem elektrodového systému.....	46
4.5.1	Porovnání kultivace se starým a novým elektrodovým systémem	49
4.6	Vliv stáří kultury na stresovou odpověď bakterií.....	51
4.7	Vliv nečistot na elektrodovém systému na produkci peroxidu vodíku	53
4.8	Vliv použitých materiálů na bakteriální růst.....	55
4.9	Vznik biofilmu na vybraných materiálech	59
4.9.1	Pokrytí biofilmem po ukončení kultivace	60
5.	Závěr.....	63
6.	Citace.....	65
7.	Seznam použitých zkratk	76

1. Úvod

Biotechnologie mají v lidské historii dlouhodobou tradici. Již od starověku využívali lidé mikroorganismy pro získání různých látek především pro potravinářské účely. V průběhu času byly objeveny další mikroorganismy, schopné produkovat zajímavé látky jako jsou antibiotika, organické kyseliny, enzymy či polymery. Biotechnologie však není pouze o mikroorganismech, ale zapojuje i jiné živé organismy či jejich části pro získání požadovaného produktu. Právě využitím živých organismů můžeme získat látky, které by byly velmi těžké připravit chemickou cestou. V dnešní době biotechnologie zahrnují a propojují řadu odvětví jako je například genetika, bioinformatika či elektrochemie. Propojení biotechnologie s elektrochemií je poměrně nové. Jedním z možných propojení je elektro-fermentace. Hlavní výhodou této technologie je, že lze ovlivňovat počty redoxních reakcí a tím i výsledné množství produktu [1]. Dále se mohou v biotechnologiích používat elektrochemické biosenzory.

V polední době byla řada studií zaměřena na nalezení vhodné náhrady petrochemických plastů. Jak je známo, plast je díky svým vlastnostem jeden z nejvyužívanějších materiálů na světě. Problémem však je jeho následné zpracování, protože tento materiál nelze biologicky rozložit. Jednou z možností je recyklace, avšak čím více je plastový materiál recyklován tím více se zhoršují jeho vlastnosti. Jednou z možných náhrad petrochemických plastů jsou takzvané bioplasty polyhydroxyalkanoáty (PHA). Vlastnostmi se tyto PHA podobají petrochemickým plastům, avšak jsou biologicky rozložitelné a biokompatibilní. Tyto biopolymery jsou tedy vhodnou alternativou ke klasickým plastům. Jedná se o polymery produkované řadou bakterií, jakožto úložiště energie a uhlíku [2]. Avšak velkoobjemová produkce tohoto biopolymeru brání vysoká výrobní cena. Nicméně pro snížení ceny výsledného produktu existuje několik možností například využití odpadních materiálů jako uhlíkového substrátu, nové bakteriální druhy zejména ze skupiny extrémofilních mikroorganismů či zvýšení syntézy PHA pomocí aplikace stresových podmínek. V mnoha studiích byl popsán vliv různých druhů stresu na produkci PHA. Když je bakteriální kultura vystavena vhodnému množství stresoru dochází k navýšení produkce PHA. Jedním z typů tohoto stresu je oxidativní stres, který vyvolávají ROS což jsou reaktivní sloučeniny kyslíku jako jsou například hydroxylový radikál či peroxid vodíku. Samotný vliv H_2O_2 na syntézu PHA byl již dříve popsán, konkrétně bylo přidáno 5 mM H_2O_2 díky čemuž došlo k navýšení obsahu PHA v buňce o necelých 6 % [3]. Nicméně jako druhá možnost využití peroxidu vodíku během kultivačního procesu je příprava této sloučeniny elektrochemickou cestou, a to oxidací vody či redukcí kyslíku.

Pokud bychom tedy chtěli navýšit produkci PHA mohly bychom propojit biotechnologický proces syntézy tohoto polymeru s elektrochemickou generací H_2O_2 . Použitím systému, který by produkoval H_2O_2 přímo v kultivačním médiu, by mohl vzniknout nový kontinuální proces výroby PHA. A právě tímto se zabývá tato diplomová práce.

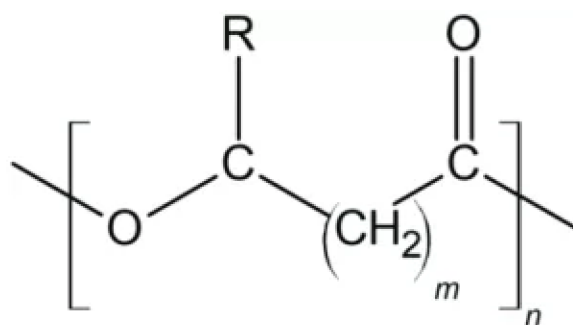
2. Teoretická část

2.1 Polyhydroxyalkanoáty

Jak již bylo krátce zmíněno v úvodu, polyhydroxyalkanoáty jsou biopolymery s podobnými vlastnostmi jako petrochemické plasty. Tyto polymery jsou syntetizovány celou řadou bakterií v nadbytku uhlíkového substrátu při nedostatku ostatních živin jako je dusík, fosfor či kyslík. Jejich velkou výhodou je biologická rozložitelnost a také biokompatibilita, díky čemuž je o tyto biopolymery velký zájem [2].

2.1.1 Charakteristika

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou polyestery (R)-hydroxyalkanových kyselin produkované řadou bakterií například *Cupriavidus necator* H16 či *Bacillus megaterium*. Díky jejich vlastnostem jako je biokompatibilita a biologická degradabilita, jsou tyto polymery jednou z možností, jak nahradit běžné petrochemické plasty [2, 4]. Bakterie je tvoří jako zdroj energie a uhlíku, či jako ochranu před možným stresem, jako je například osmotický či oxidativní stres. PHA jsou syntetizovány v době, kdy mají dostatek zdroje uhlíku a nedostatek jiných živin jako je fosfor, kyslík či dusík [5, 6]. Tyto biopolymery jsou syntetizovány intracelulárně ve formě granulí o průměru 0,2-0,5 μm [7, 8]. Složení a struktura PHA se liší podle producenta, uhlíkového substrátu či podmínek při tvorbě, ale vždy se jedná o R-izomer, a to z důvodu stereospecifity enzymu PHA syntázy [7, 9]. Základní struktura PHA je zobrazena na obrázku 1 [5]. Polyhydroxyalkanoáty mohou být děleny do tří skupin podle délky jejich řetězce, a to na PHA s krátkým řetězcem (scl-PHA) 3-5 atomů uhlíku, PHA se středně dlouhým řetězcem (mcl-PHA) 6-14 atomů uhlíku a poslední skupinou je PHA s dlouhým řetězcem (lcl-PHA), jehož řetězec obsahuje více než 14 atomů uhlíku, tento typ PHA je neobvyklý [10, 11]. Molekulová hmotnost PHA se pohybuje v rozmezí od 2×10^5 - 3×10^6 Da [12]. Podle svých vlastností můžeme PHA řadit mezi termoplasty. Zatímco mcl-PHA jsou pevné a tuhé a jejich teplota tání je průměrně 40 °C, scl-PHA jsou elastomerní a flexibilní s průměrnou teplotou tání 180 °C [13, 14]. Jedná se o velmi prostudovanou skupinu, u které je známo až 150 různých monomerů, které můžeme klasifikovat podle počtu uhlíků, polohy hydroxylové skupiny či funkčních skupin v postranních řetězcích [15]. Dále můžeme dělit PHA podle zastoupení monomerů. Pokud jsou všechny monomery stejné, jedná se o homopolymer, pokud je přítomno více typů monomeru, jedná se o heteropolymer či kopolymer. Zástupci PHA jsou například poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát), poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát), poly(4-hydroxybutyrát) nebo poly(3-hydroxybutyrát) (PHB) [2].



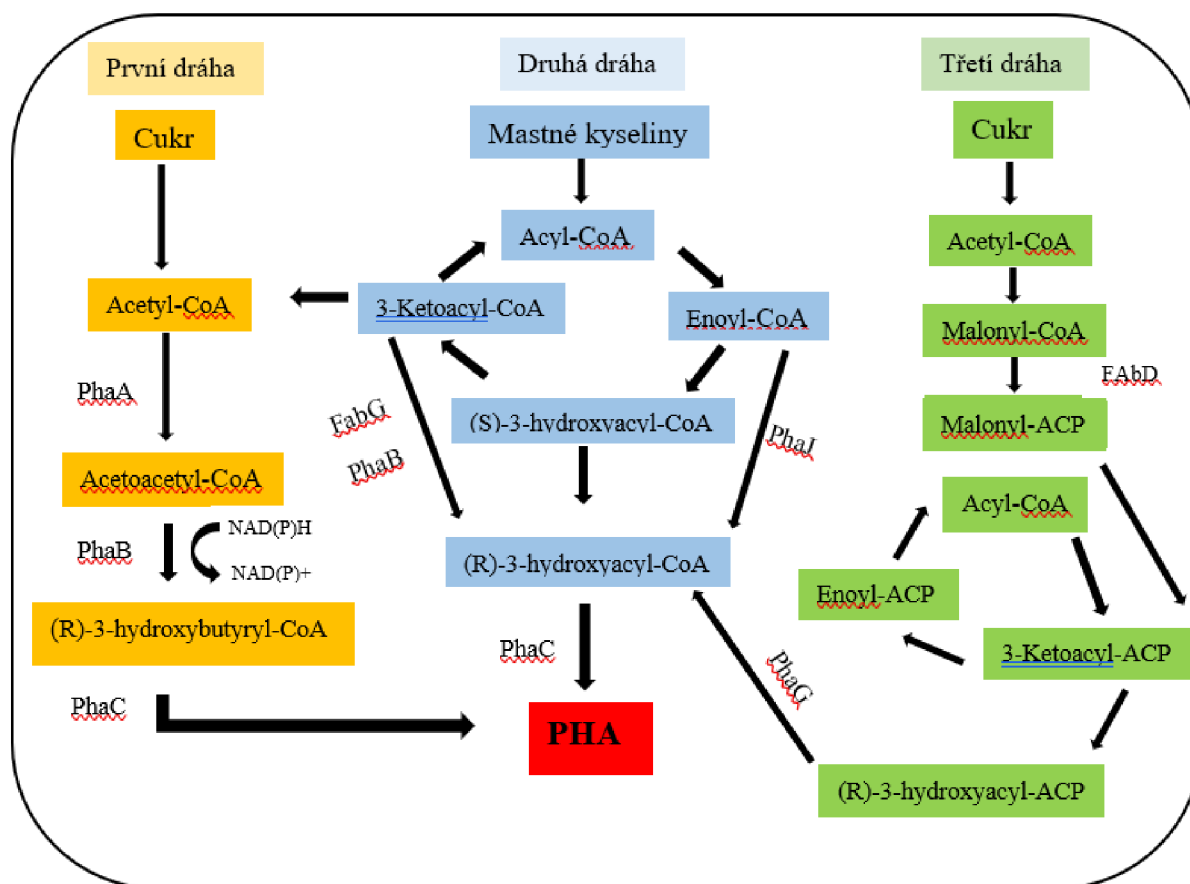
Obrázek 1, základní stavební jednotka PHA [5]

2.1.2 Produkce polyhydroxyalkanoátů

Produkce polyhydroxyalkanoátů se liší podle toho, jaký je požadovaný výsledný polymer a v jakém množství má být vyprodukován. Na to má vliv použitý uhlíkový substrát, kultivační podmínky, vybraná bakteriální kultura a její metabolické dráhy pro syntézu PHA. V této kapitole jsou popsány biosyntetické dráhy využívané bakteriemi pro produkci polyhydroxyalkanoátů a také obecné podmínky pro jejich kultivaci [16].

2.1.2.1 Biosyntéza

Bakterie potřebují dostatek uhlíkového zdroje pro produkci PHA, a to zejména cukry, mastné kyseliny či aminokyseliny. Jak již bylo zmíněno v předcházející kapitole 2.1.1., množství vyprodukováného polymeru a typ polymeru závisí na druhu substrátu [16]. Pro produkci polyhydroxyalkanoátů nejprve musí vzniknout monomery ve formě hydroxyacyl-CoA, které následně podléhají polymerizaci [17]. Pro syntézu monomerů PHA se využívají nejčastěji tři dráhy a to glykolýza, β -oxidace a biosyntéza mastných kyselin [18]. Na obrázku 2 jsou popsány jednotlivé metabolické cesty, které vedou k produkci PHA.



Obrázek 2, metabolické dráhy pro syntézu PHA upraveno z [10]

První dráha vychází z glykolýzy a je typická pro syntézu scl-PHA jako je například PHB. V bakteriální buňce dojde k rozkladu cukru až na acetyl-CoA. Následně za pomoci enzymu ketothiolázy (Pha A) kondenzují dvě molekuly acetyl-CoA a vzniká acetoacetyl-CoA. Ten je dále redukován na 3-hydroxybutyryl-CoA za využití acetoacetyl-CoA reduktázy (Pha B) a NADPH. Posledním krokem je polymerizace pomocí enzymu syntázy (Pha C)

za vzniku PHB [17, 19]. Další dráha využívá syntézy mastných kyselin pro produkci PHA. Při této syntéze vzniká R-3-hydroxyacyl-ACP, který lze převést na R-3-hydroxyacyl-CoA za pomoci acyl-ACP-CoA transacylázy (PhaG). Dále následuje polymerizace na výsledný polymer PHA [14, 18]. Poslední cesta je založena na β -oxidaci. Výchozí látkou pro tuto dráhu jsou mastné kyseliny. U β -oxidace dochází k rozkladu mastných kyselin na řadu produktů, které mohou být převedeny na R-3-hydroxyacyl-CoA působením reduktáz, epimeráz a hydratáz. Jedním z těchto produktů je enoyl-CoA, který může být převeden na R-3-hydroxyacyl-CoA pomocí R-3-hydroxyacyl-CoA hydratázy (PhaJ). Finálním krokem je polymerizace R-3-hydroxyacyl-CoA na mcl-PHA díky enzymu syntáze (PhaC) [16, 21]. Produkce PHA je možná ovlivnit různými stresory, regulátory enzymů či nedostatkem živin. Bakterie syntetizují PHA převážně ve stacionární fázi růstu [17].

2.1.2.2 Podmínky kultivace

Existuje řada podmínek a faktorů, které ovlivňují produkci PHA. Nejdůležitějšími z nich jsou použitý bakteriální kmen, pH, poměr C/N a obsah rozpuštěného kyslíku. Až 300 různých bakterií je schopných produkovat PHA a každá z nich má specifické podmínky růstu, které musí být dodrženy např. teplota, přístup kyslíku, pH, dostatek živin [22]. Jak již bylo zmíněno poměr C/N má významný vliv na akumulaci PHA v buňce, kdy vysoký poměr C/N podporuje PHA akumulaci a nízký zase růst kultury [23, 24]. Mírnou úpravou poměru C/N lze také měnit složení polymeru [23]. Také hodnota pH ovlivňuje mikrobiální aktivitu a metabolismus buňky, a tak i nepřímo tvorbu PHA. Při neutrálním pH je produkce polymeru nejvyšší. To však neznamená, že nejlepší podmínky pro produkci jsou při konstantním pH. Bylo prokázáno, že pro dobrou akumulaci PHA je důležité, aby hodnota pH kolísala. Na začátku kultivace je přidán substrát a pH vzroste, avšak postupem času se vrátí na původní hodnotu [22, 23, 24]. Rovněž přístup kyslíku je důležitý v rámci mikrobiální kultivace, například aerobní organismy potřebují kyslík pro růst. Kyslík je u těchto organismů finálním akceptor elektronů v dýchacím řetězci, a tím přispívá i k tvorbě energie ve formě ATP. Pokud je obsah kyslíku nízký dochází ke snížení růstu kultury. Výsledný výtěžek PHA je stejný, ale obsah rozpuštěného kyslíku v médiu může ovlivnit složení biopolymeru, a to na úrovni monomerů [22, 23].

2.1.3 Využití

V dnešní době se začíná zvyšovat poptávka po náhradách petrochemických plastů, za účelem snížení produkovaného odpadu. Polyhydroxyalkanoáty by díky svým vlastnostem, hlavně pak kvůli jejich biodegradabilitě, mohly být vhodným materiálem. Avšak jejich produkce je stále velmi nákladná. Doposud se využívají jen v malé míře, a to hlavně v zemědělství, medicíně a v potravinářství [26, 27, 28]. V lékařství se PHA používají zvláště kvůli jejich biokompatibilitě a netoxické povaze [27]. V tomto oboru nalézají uplatnění například jako nosiče léku, implantáty či stehy [28]. Dalším možným využitím je při tvorbě scaffoldů pro regeneraci kůže, kde se využívá poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) [29]. Jednou ze zajímavých vlastností PHB je jeho schopnost vázat se na rakovinné buňky pomocí specifických proteinů, které zdravé buňky nemají. Této schopnosti by mohlo být využito pro léčbu rakovinových onemocnění. [27, 30]. V rámci zemědělství se PHA využívají jako mulčovací folie, ochranné folie proti přírodním podmínkám, enkapsulované hnojiva,

pesticidy či semena a mnohé další. Přičemž mulčovací folie z PHA jsou vhodnou náhradou klasických polyethylenových folií, které znečišťují půdu. Navíc má PHA dobrý vliv na půdní strukturu, zabraňuje její kontaminaci a zadržuje vodu. Díky své nízké propustnosti pro kyslík nachází PHA využití i jako ochranné filmy [27, 28]. Dalším z využití polyhydroxyalkanoátů je v potravinářském průmyslu, kde se používají jako obaly. Díky svým hydrofobním vlastnostem, termoplastické povaze a nepropustnosti pro plyny jsou pro toto využití vhodné. PHA se také používá pro výrobu jednorázových příborů, brček, kelímků, víček atd [28, 31].

2.2 Oxidativní stres a jeho vliv na bakterie

Bakterie jsou neustále vystavovány různým stresovým faktorům jako je například osmotický tlak, teplota či reaktivní formy kyslíku. Aby byly bakterie schopné přežít v takových nepříznivých podmínkách vyvinuli se u nich různé ochranné mechanismy. Bylo zjištěno, že polyhydroxyalkanoáty nemají pouze zásobní funkci, ale i ochranou [5, 6]. Tato kapitola je věnována oxidativnímu stresu, bakteriální odpovědi na tento stres a vlivu oxidativního stresu na syntézu PHA.

2.2.1 Oxidativní stres

Oxidativní stres je způsoben vysoce reaktivními formami kyslíku neboli ROS. Ty mohou oxidovat různé důležité složky buněk jako jsou lipidy, proteiny či nukleové kyseliny na sloučeniny toxické pro buňku. ROS mohou vznikat aerobními pochody v buňce (dýchání), nebo exogenně při vystavení oxidačním činidlům [32]. Bakterie se umí bránit proti oxidativnímu stresu, a někdy ho mohou využívat i jako signální molekulu pro řízení některých procesů jako je například tvorba biofilmu. Avšak pouze pokud se jedná o nízké koncentrace ROS [33, 34]. Dojde-li, ale k navýšení ROS buňka není nadále schopná eliminovat stres a nastává u ní stresový stav. Mezi ROS patří řada látek, avšak ty nejdůležitější z nich jsou superoxidový aniont O_2^- , peroxid vodíku H_2O_2 a hydroxylový radikál $\cdot OH$. Superoxidový aniont vzniká z kyslíku, který přijme elektron od donoru. V buňce vzniká tento aniont autooxidací enzymů jako je např. dehydrogenáza, kdežto exogenně může vznikat ze sloučenin podobných chinonům. Dalším zástupcem je hydroxylový radikál. Jedná se o velice reaktivní látku, která oxiduje všechny složky buňky jako jsou proteiny, nukleové kyseliny, lipidy a další [34]. V biologickém systému vzniká hlavně Fentonovou reakcí, kdy dochází k reakci peroxidu vodíku s kovovými kofaktory za vzniku OH^- [35]. Tento zástupce ROS nejde rozložit pomocí enzymů a jeho tvorba může být pro buňku fatální. Peroxid vodíku také způsobuje oxidativní stres. Intracelulárně dochází k tvorbě peroxidu převážně z dismutace O_2 a autooxidace flavoenzymů. Peroxid vodíku může přecházet přes buněčnou membránu a je stabilnější než superoxidový aniont, konkrétně se rozkládá za pomoci enzymu peroxidázy [34, 36].

Je známo, že bakterie mohou žít i za těch nejextrémnějších podmínek, jelikož disponují celou škálou protektivních mechanismů. Hlavní složkou těchto mechanismů jsou geny pro regulování stresové odpovědi organismu. Tyto geny nastartují expresi nových proteinů, díky nimž se buňka přizpůsobí novým extrémním podmínkám. Proti oxidativnímu stresu mají mikroorganismy rozdílné typy ochrany. Například využívají sekundární metabolity, systémy pro obnovu poškozených částí a v neposlední řadě také enzymatické, redoxní a transkripční regulační systémy [37, 38]. Bakteriální antioxidační systém využívá látky jako je kataláza,

superoxiddismutáza, glutathionperoxidáza, reduktáza a některé neenzymatické látky jako je například thioredoxin, peroxiredoxin pro vypořádání se se stresem. Další možností buňky je zapojení redoxních regulátorů kupříkladu OxyR, MosR, OhrR, SaZ atd. [37].

Pro správnou funkci těchto obranných mechanismů jsou důležité kofaktory NADH a NADPH a jejich oxidované formy, které ovlivňují celkový redoxní stav buňky u aerobních organismů. NADH zprostředkovává funkci nosiče elektronů při tvorbě ATP, která je spřažena s dýchacím řetězcem, kde vznikají ROS. NADPH je také nosičem elektronů, ale jeho redukční povahy je využíváno při buněčné syntéze. Tento kofaktor také chrání buňku před oxidačním stresem, neboť reaguje s reakčními formami kyslíku, a to přímou či nepřímou cestou. NADP vzniká v pentózofosfátové dráze u reakcích katalyzovaných glukózo-6-fosfatdehydrogenázou a glukonátdehydrogenázou. Pomocí transhydrogenáz lze tyto kofaktory převádět mezi sebou. Důležitou roli mají tyto kofaktory při změnách centrálního uhlíkového metabolismu, jelikož se jedná o koenzymy oxidačně-redukčních reakcí [32].

2.2.1.1 Reakce bakterií na peroxid vodíku

Jak již bylo naznačeno výše, mikroorganismy disponují celou řadou obranných mechanismů s ohledem na stresový faktor. V případě zvýšené koncentrace peroxidu vodíku v okolí mikroorganismu, nedokáží již enzymy na povrchu buňky zadržet H_2O_2 a proniká do buňky. Většina mikroorganismů má mechanismus, který je brání před účinky H_2O_2 . Modelovým systémem je OxyR bakterie *Escherichia coli*, což je peroxidem aktivovaný transkripční faktor [39]. K jeho aktivaci dochází, když se koncentrace H_2O_2 v cytoplazmě zvýší na průměrně 0,2 μM [40]. Zbytek cysteinu na OxyR proteinu podléhá přímé oxidaci H_2O_2 a vzniká kyselina sulfenová a systém je aktivován [41]. U jiných bakterií redukovaný OxyR plní funkci represoru, který se uvolní po oxidaci. V obou případech dochází k expresi řady genů, hlavně pro proteiny, které snižují koncentraci peroxidu v buňce, zmenšují zásobu železa a reagují na poškození způsobené peroxidem [39].

Zásadní protektivní roli při styku mikroorganismů s peroxidem vodíku hrají enzymy, konkrétně peroxidáza (AhpCF) a kataláza (katG), které mají za úkol snížit množství peroxidu. Peroxidáza ke svému působení potřebuje dostatek NADH jinak se snižuje její aktivita. Tudiž za podmínek s omezeným příjmem živin buňka potřebuje využít další enzym a to katalázu. Pro snížení zásob železa využívá buňka Dps (dodekamerický mini-feritin), který inkorporuje železo do svého jádra. Aby mohla tato reakce proběhnout musí být přítomen H_2O_2 a také musí dojít k oxidaci železa z Fe^{2+} na Fe^{3+} . Dále dochází k indukci represoru Fur. Jakmile pominou stresové podmínky, signalizuje tento represor, jestli je dostatek železa, a tím ukončuje expresi genu pro transportní systémy. Peroxid tento systém Fur blokuje, a tak dochází k nekontrolovanému transportu železa do buňky. Posledním z této skupiny je protein YaaA, který snižuje množství železa, ale doposud není známo, jakým způsobem. Snížením obsahu železa v buňce však může nastat problém, a to z důvodu potřeby syntézy enzymů s Fe kofaktorem. Proto potřebuje buňka udržovat takovou hladinu železa, aby mohly být produkovány enzymy a zároveň nedocházelo k poškození nukleových kyselin. *E. Coli* k tomuto účelu využívá Clp proteázu, která udržuje rovnováhu [39, 42].

Takto popsaný mechanismus OxyR se může lišit pro jiné druhy mikroorganismů, anebo může být využíván odlišný systém. Tím může být například mechanismus Per R na bázi Fe, který využívá reakce Fe^{2+} a H_2O_2 [39, 43]. Per R patří do skupiny regulátorů vychytávající molekuly železa neboli metaloregulačních transkripčních faktorů. Struktura Per R je dimerní, jedna podjednotka má strukturní místo, kde se nevratně váže Zn^{2+} a druhá regulační vazebné místo pro kov, kdy preferovaným kovem je Fe^{2+} . Pokud je nedostatek Fe^{2+} , tak mohou některé bakterie využívat Mn^{2+} . Regulace tímto způsobem je založena na oxidaci Fe^{2+} na Fe^{3+} v regulačním místě. Za vhodných podmínek, jinými slovy bez přítomnosti stresoru je dimer stabilní, díky vazbě regulačního kovu, a tím dokáže lépe interagovat s DNA, což vede k represí regulonu Per R. Při vystavení buňky vyšším koncentracím peroxidu vodíku dochází k oxidaci železa v regulačním místě Fentonovou reakcí a dojde k derepresi regulovaných genů. Tyto geny se především účastní metabolismu a ochrany proti H_2O_2 stresu, dále na udržení homeostáze kovů či tvorbě surfaktantů [34].

2.2.2 Vliv oxidativního stresu na syntézu polyhydroxyalkanoátů

Bakterie se vyrovnávají s oxidativním stresem řadou mechanismů, které byly popsány výše. Pro jejich řádnou funkci se v bakteriální buňce akumuluje NADPH a dochází k inhibici citrátového cyklu. Tím vznikne přebytek acetyl-CoA, který je využíván k syntéze PHA. Z toho vyplývá, že oxidativní stres by se mohl využívat k zvýšení produkce tohoto biopolymeru. Avšak nejprve musí být zjištěna vhodná míra oxidativního stresu, která bude stimulovat tvorbu PHA a zároveň nepoškodí buňku. Aplikace stresu také snižuje bakteriální růst, proto by bylo vhodné ho aplikovat až v stacionární fázi růstu. Další propojení PHA a oxidativního stresu je přes jeho ochrannou funkci [44]. Bylo zjištěno, že na povrchu PHA granulí jsou přítomny proteiny tzv. phasiny, které chrání bakterie před stresovými faktory jako jsou ROS [44, 45]. V předchozích studiích byla také popsána antioxidační aktivita 3-hydroxybutyrátu, monomeru PHB. To však není jediná sloučenina chránící buňky před stresovými faktory. Dalšími takovými látkami jsou degradační produkty PHB. Bylo zjištěno, že methylesterifikované 3-hydroxybutyrátové oligomery jsou antioxidačně aktivní proti hydroxylovému radikálu [46].

Samotný vliv peroxidu vodíku na produkci PHA byl již zkoumán ve studii od Obruči et al. z roku 2010. Zaměřili se na to, jak H_2O_2 ovlivňuje biosyntetickou dráhu PHA a na enzymatickou regulaci tohoto procesu, a také jestli dochází ke změnám molekulární hmotnosti takto produkovaného PHA. V této práci byl zkoumán i vliv etanolu, ale zde bude přiblíženo pouze působení peroxidu vodíku. Použitým mikroorganismem byla bakterie *Cupriavidus necator* H16 (CCM 3726). Kultivace probíhala na třepačce při otáčkách 150 rpm a teplotě 30 °C, jako uhlíkový substrát byla použita fruktóza o finální koncentraci 20 g/l v médiu. Peroxid vodíku (3 %) byl přidán v 60 h kultivace o takovém objemu, aby bylo dosaženo potřebné koncentrace. Bylo prokázáno, že aplikace stresu zvyšuje akumulaci PHA, nejlepších výsledků oproti kontrole bylo dosaženo při koncentraci 5 mM H_2O_2 na začátku stacionární fáze. Dále byla zkoumána bakteriální odpověď na použitý stres, a to poměr NADPH/NADP. Bylo zjištěno, že buňky pod oxidačním stresem zvyšují aktivitu glukóza-6-fosfátdehydrogenázy, a proto byla v této práci měřena aktivita tohoto enzymu. Bylo zjištěno, že aktivita se po použití H_2O_2 výrazně zvýšila. To mohlo být způsobeno vyšším

poměrem NADPH/NADP což zvýšilo obsah acetyl-CoA v buňce. Díky čemuž nižší obsah volného CoA podporoval aktivitu β -ketothiolázy. Vyšší poměr NADPH/NADP také podporuje aktivitu acetoacetyl-CoA reduktázy. Všechny tyto faktory pravděpodobně způsobily zvýšenou produkci PHA oproti kontrole. Molekulární hmotnost PHA byla při mírných stresových podmínkách vyšší, avšak se zvyšující se koncentrací peroxidu vodíku se snižovala. Na základě výsledků vyplývá, že koncentrace 5 mM H_2O_2 navýšila obsah PHA na 79,3 % oproti kontrole z 73,34 %, a zároveň i zvýšila molekulární hmotnost na $9,054 \times 10^5$ Da oproti kontrole z $1,870 \times 10^5$ Da [3].

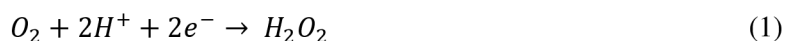
2.3 Elektrochemická tvorba peroxidu vodíku

Elektrochemická produkce peroxidu vodíku je možná dvěma cestami, a to redukcí kyslíku nebo oxidací vody. V této práci bude přiblížen vznik H_2O_2 redukčními reakcemi kyslíku.

2.3.1 Princip elektrochemické tvorby peroxidu vodíku

Elektrochemická tvorba peroxidu vodíku je ekologičtější alternativa k běžné výrobě H_2O_2 antrachinovou cestou. A zároveň bezpečnější oproti přímé syntéze z O_2 a H_2 , protože tyto plyny mají výbušnou povahu. Elektrochemická generace peroxidu vodíku byla poprvé navržena roku 1887 Trauberem, který navrhl dvouelektronovou redukci kyslíku na katodě (ORR) [47]. Další možností pro elektrochemickou tvorbu peroxidu vodíku je přes oxidaci vody na anodě (WOR). Obě cesty mají konkurenční mechanismy. Zatímco u ORR dochází k redukci kyslíku až na vodu přes čtyřelektronovou cestu, tak u WOR proběhne oxidace vody na kyslík přes multielektronový, čtyřelektronový či jedoelektronový přenos. Během těchto reakcí vznikají kyslíkové meziprodukty jako jsou $*OOH$, $*O$, $*OH$. Reakce redukce kyslíku jsou zobrazeny na rovnici 1 a 2[48].

Reakce dvouelektronové cesty u ORR:



Reakce čtyřelektronové cesty u ORR:



2.3.2 Redukční reakce kyslíku (ORR)

ORR je vícestupňový proces uskutečněný disociativním či asociativním mechanismem. U disociativního procesu dojde k rozbití vazby O-O za vzniku dvou kyslíkových radikálů $*O$ k čemuž dojde po adsorbci kyslíku, který je redukován na OH_{ads} a H_2O_{ads} . Při asociativní cestě zůstává vazba O-O zachována za vzniku H_2O nebo H_2O_2 . Nejprve se O_2 naváže na aktivní místo a dojde k přenosu elektronů a vznikne $*OOH$, který je dále redukován na peroxid vodíku. H_2O vznikne redukcí $*OOH$ na $*O$, pokud je rozštěpena vazba mezi kyslíky. Typ produktu závisí na účinnosti katalyzátoru disociovat O-O vazbu na $*OOH$. Tento mechanismus je pro tvorbu peroxidu důležitější. Podstatným aspektem je také pH elektrolytu. Výše popsané reakce probíhají při kyselém pH. V alkalickém pH (vyšší než 11,6) vzniká u $2e^-$ cesty HO_2^- , a při $4e^-$ procesu je tvořen OH^- . Jednotlivé reakce jsou znázorněny na rovnicích 3-7[47, 49].

Reakce s kyslíkovými intermediány:



U dvouelektronové cesty:



U čtyřelektronové cesty:



Pro průmyslovou výrobu peroxidu vodíku procesem ORR je důležité použít katalyzátory s vysokou selektivitou dvouelektronové cesty, tento proces je termodynamicky výhodnější než čtyřelektronová cesta. Dalším problémem je, že může dojít k následné redukci nebo rozkladu H_2O_2 na H_2O . Vybraný katalyzátor tedy musí být selektivní pro dvouelektronovou cestu, a zároveň potlačit tvorbu H_2O z peroxidu vodíku. Bylo navrženo mnoho potenciálně vhodných katalyzátorů jako jsou ušlechtilé kovy a jejich slitiny, materiály na bázi uhlíku, organické molekuly atd. Ušlechtilé kovy, jako je Au, Pd, Pt a jejich slitiny mají dobrou aktivitu a selektivitu, avšak jejich většímu použití brání vysoká cena. Neušlechtilé přechodné kovy jsou levnou alternativou, které však musí být upraveny například propojením s uhlíkovými materiály, jinak dochází k disproportionaci H_2O_2 a disociaci O_2 . Tyto uhlíkové materiály jsou levné, vodivé a mají dobré mechanické vlastnosti. Samy o sobě však nejsou vhodné pro katalýzu ORR reakce. Jednou z možností zlepšení jejich vlastností je obohacení materiálu o heteroatomy O, N, S, P atd. Nicméně jsou neustále zkoumány další materiály pro katalýzu ORR, které by byly levné, nemusely se upravovat a zároveň měly vysokou účinnost [50].

2.3.3 Využití elektrochemicky tvořeného H_2O_2

Elektrochemická výroba chemických sloučenin je zajímavou alternativou k běžné chemické cestě, a to z důvodu šetrnosti k životnímu prostředí. Takto tvořený H_2O_2 také nepotřebuje další přečištění, které je u chemicky vyrobeného H_2O_2 nutné pro aplikace např. v medicíně [51, 52]. Peroxid vodíku má mnohé využití jako ekologický oxidant, nejčastěji při bělení papírové buničiny, chemické syntéze, dezinfekce. Další možnost jeho využití je při čištění vody i odpadních vod a plynů [52]. K čištění odpadních vod se využívá elektro-Fentonův proces. Tento systém propojuje elektrochemickou tvorbu H_2O_2 a elektroregeneraci Fe^{2+} , kde reakcí H_2O_2 s Fe^{2+} vzniká $*OH$ používaný pro degradaci organických kontaminantů např. barviv, pesticidů, herbicidů, fenolových sloučenin atd. Kromě elektro-fentonova procesu se začali v poslední době objevovat nové metody na bázi elektrochemické tvorby peroxidu, jako například elektrochemicky řízené UV/ H_2O_2 procesy [53].

2.3.4 Tvorba peroxidu vodíku v mikrobiální cele

Jednou z možností syntézy peroxidu vodíku, je elektrochemická syntéza v mikrobiální elektrochemické cele. K produkci H_2O_2 v tomto uspořádání dochází následovně. Elektroaktivní bakterie obsažené v anodovém biofilmu oxidují organický substrát, a tak produkují elektrony a protony. Elektrony jsou přeneseny vnějším obvodem na katodu, kde dojde k redukci kyslíku za vzniku H_2O_2 nebo H_2O . Protony přecházejí přes proton-selektivní membránu, aby byla zachována nábojová neutralita. Tento proces musí probíhat ve dvoukomorové cele, aby nedošlo k poškození anodických bakterií peroxidem vodíku. Kdyby byl použit acetát jako organický substrát, fungoval by tento systém bez potřeby externího zdroje energie [54].

2.4 Spojení elektrochemie s biotechnologií

Propojení elektrochemie s biotechnologií je relativně nové a může zahrnovat například mikrobiální elektrochemické systémy anebo využití elektrochemických senzorů v biotechnologických procesech. Mikrobiální elektrodové systémy využívají interakci mikroorganismů s povrchem elektrod, při kterých dochází k přeměnám mezi elektrickou a chemickou energií. Výhodou této technologie je to, že elektrody mohou zastávat funkci akceptoru či donoru elektronů v metabolismu mikroorganismů, toho je využíváno například u elektro-fermentace či mikrobiálních palivových článků [55].

2.4.1 Elektro-fermentace

Procesem fermentace získáváme mnohé zajímavé produkty už po staletí např. kyselinu octovou, kyselinu citrónovou, probiotika, enzymy, biopolymery, biopaliva atd. Při průmyslové produkci však může docházet k několika problémům jako je vysoká produkční cena, způsobená použitím drahého substrátu, náročným up-streamem či následné přečišťování produktu. Další nevýhodou může být redoxní nerovnováha fermentace, což může vést k vzniku více produktů. Jedním z možných způsobů, jak tomuto předejít je probubláváním plynem, přidáním dalšího substrátu či kontrolou pH. Elektro-fermentace tyto problémy může vyřešit. Přidáním elektrod lze fermentaci řídit tak, aby se zvýšila čistota produktu nebo podpořil růst buněk. Základním principem elektro-fermentace je, že elektrický proud zastává funkci donoru či akceptoru elektronů. Jedná se o nový obor spojující klasickou fermentaci se základy elektrochemie, a to tak, že k řízení a kontrole fermentace slouží elektrochemické prostředky [1, 56, 57].

Je známo, že mikroorganismy potřebují akceptor a donor elektronů k správné funkci metabolismu. Redoxní reakce probíhající při fermentaci jsou často cyklické, kdy NAD^+ je redukováno na NADH po oxidaci substrátu a k regeneraci NAD^+ dochází při redukci oxidovaného substrátu na konečný produkt. Množství získaného produktu lze změnit, a to úpravou toku elektronů např. změnou pH či tlaku. Poměr $NAD^+/NADH$ lze také měnit pomocí elektrod. Elektro-fermentace tedy může ovládat tvorbu oxidovaných nebo redukovaných produktů. Přenos elektronů mezi elektrodami a mikroorganismy probíhá pomocí elektron transportních systémů, anebo pomocí rozpustných redoxních mediátorů, které mohou difundovat do buňky. Základní systém pro elektro-fermentaci se skládá ze dvou elektrod (anoda, katoda), elektrolytu (kultivačního média) a externího zdroje [56, 58]. Při anodové elektro-fermentaci elektroda přijímá elektrony a tím snižuje obsah NADH,

tudíž nemůže docházet k redukci oxidovaného substrátu. Tohoto procesu se dá využít, pokud je požadovaný produkt získán jen po oxidaci substrátu. Anoda by také mohla nahradit kyslík jakožto finální akceptor elektronů a tím změnit aerobní proces na anaerobní [57, 59]. Pokud anoda odebírá elektrony přímo z mikroorganismů, současně za vzniku elektrické energie je tento systém nazýván mikrobiálním palivovým článkem [58]. U katodové elektro-fermentace dochází ke zvýšení obsahu NADH, protože funguje jako donor elektronů. Navýšený obsah NADH tak může vést k vyšší produkci konečného redukováného produktu [57, 59]. Zařízení využívající katodickou elektro-fermentaci se nazývá elektro-fermentační článek nebo bioelektro-syntetický článek. Rozdíl mezi těmito označeními je v tom, jaký substrát je využíván. Když je substrátem CO₂ jedná se o bioelektro-syntetický článek, pokud organická látka tak jde o článek elektro-fermentační [58]. Další možností tohoto typu fermentace je pasivní úprava redoxních podmínek, bez zásahu do metabolismu organismů, nejedná se tedy o elektricky aktivní organismy [56].

2.4.2 Elektricky aktivní mikroorganismy

Mikroorganismy používané pro klasickou fermentaci by měly splňovat jisté požadavky. A to schopnost využívat široký sortiment levných substrátů, mírné kultivační podmínky a syntetizovat požadovaný produkt v dostatečné míře. Pro elektro-fermentaci musí být použitý organismus tzv. elektricky aktivní. To znamená, že daný organismus je schopný transportovat přebytečné elektrony přes buněčné membrány k elektrodě. A to přímou cestou anebo transportem zprostředkovaným mezi vnějším a vnitřním prostředím. [60] Toho lze dosáhnout použitím povrchových proteinů jako jsou cytochromy, anebo endogenních buněčných mediátorů. Mikroorganismy pro běžnou fermentaci často tuto vlastnost postrádají. Avšak za použití vnějších elektronových nosičů jako je neutrální červeň či methylenová modř by se elektroneutrální bakterie mohly účastnit elektro-fermentace [58]. Naopak vysoce elektroaktivní mikroorganismy neprodukují dostatečné množství rozličných produktů. Nicméně tento problém lze vyřešit pomocí genového inženýrství. Kupříkladu *E. Coli* se stala modelovým mikroorganismem pro navýšení elektrické aktivity pomocí genů z elektroaktivní bakterie *Shewanella oneidensis*. Takto upravená bakterie byla využita pro anodickou fermentaci glycerolu. Výsledkem bylo, že došlo k produkci více oxidovaného produktu, a to acetátu. Druhou možností je začlenit žádané metabolické dráhy do již elektroaktivního mikroorganismu. Kupříkladu do bakterie *S. oneidensis* byly vloženy geny z *B. subtilis* pro syntézu acetoinu, díky čemuž došlo k nevyvážené anaerobní kultivaci a přeměně laktátu na acetoin [61, 62, 63]. Jedním z organismů, který je elektroaktivní a zároveň dokáže syntetizovat zajímavé produkty je *Clostridium saccharoperbutylaceticum* N1-4. Tento mikroorganismus produkuje rozpouštědla a to aceton, butanol a ethanol z glukózy přes Emden-Meyerhof-Parnas metabolickou cestu. Výsledkem elektrické fermentace byla vyšší produkce butanolu [58].

2.4.3 Význam elektro-fermentace

Využití mikrobiální elektro-fermentace by mohlo mít velký přínos pro syntézu biopaliv a jiných cenných fermentačních produktů. Zatím však nízká účinnost a produktivita těchto systémů brání jejich průmyslovému využití. Hlavní důvod nízké účinnosti a produktivity je nedostatek extracelulárních elektronových transportů a nedostatek nástrojů pro genové

inženýrství. Dalším problémem v použití těchto procesů ve větším měřítku jsou elektrodové materiály či stavba a provoz bioreaktoru. Elektrodový materiál by měl být biokompatibilní, chemicky stabilní, mít dostatečný povrch, vysokou vodivost, mechanickou pevnost a nízkou cenu. Také musí dojít k optimalizaci bioreaktoru, kde se musí brát v potaz vnitřní odpor reaktoru a kultivační podmínky (teplota, pH, salinita) [60].

Elektro-fermentace by mohla být užitečnou technikou pro získání látek, jejichž běžná produkce je velmi obtížná. Katodická elektro-fermentace představuje obrovský potenciál s ohledem na produkci redukovaných sloučenin. Ta využívá elektřiny jakožto levné redukční síly. Toho může být využito pro syntézu diolů a jim podobných sloučenin, které patří do skupiny obtížně produkovaných látek. Tyto látky se využívají jako základní prvky polymerů např. uretanu. Kupříkladu 1,4-butandiol lze získat elektro-fermentací ze sukcinátu. Pro přeměnu sukcinátu na 1,4-butandiol je nutná vysoká redukční energie. Pokud by energie byla získávána z organického materiálu, znamenalo by to nárůst ceny celého procesu, což je nežádoucí. Využitím elektrické energie je tak možné snížit cenu výroby 1,4-butandiolu [64].

2.5 Mikrobiální palivové články

Mikrobiální palivové články jsou jednou z nových možností získání obnovitelné energie. Fungují na principu přeměny chemické energie vazeb na elektrickou energii za pomoci určitých mikroorganismů a jejich metabolických drah [65]. Mikrobiální palivový článek se skládá z anodové a katodové komory, které jsou od sebe odděleny membránou propustnou pro protony. V anodové komoře dochází k rozkladu substrátu mikroorganismy za vzniku CO₂, protonů a elektronů. Poté jsou elektrony transportovány externí cestou a využity pro redukci kyslíku v katodové oblasti společně s protony, které projdou přes polopropustnou membránu [65, 66]. Kontinuální tvorba elektrické energie je možná díky odebrání finálního akceptoru elektronů při rozkladu substrátu např. kyslíku, a jediným akceptorem elektronu je tedy anoda [67].

Velmi důležitý aspekt u mikrobiálních palivových článků je výběr elektrod, kde se musí brát v potaz jak povrch elektrod, tak i velikost póru elektrodového materiálu, a to z důvodu tvorby bakteriálního biofilmu na povrchu elektrody. Používanými materiály jsou například uhlík, uhlíkové kompozity a směsi ve formě tyčí, bloků či kartáčů. Dalším důležitým hlediskem pro výběr elektrodového materiálu je objem článku. Zatím co v mikroměřítku se používá kovový či uhlíkový vodič, tak v makroměřítku se používají uhlíkové závoje, a to z důvodu vhodného počtu mikrokanáleků, které zvyšují permeabilitu a tím zlepšují přenos živin. Další výhodou tohoto materiálu je nízký odpor, díky jeho celistvosti [68].

Mezi další důležité části mikrobiálního palivového článku rozhodně patří i mikroorganismy, které se nacházejí v anodické komoře. Jedná se o anaerobní chemoheterotrofy, které mají schopnost přenášet elektrony z buňky ven. Tyto bakterie se rovněž nazývají elektrogenní a řadíme mezi ně např. *Geobacter sulfurreducens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shewanella oneidensis*. Některé druhy elektroaktivních organismů například zmíněná *Shewanella oneidensis* využívají procesu, který se nazývá přímý přenos elektronů. Ten využívá redoxně aktivních proteinů např. cytochrom c pro přenos elektronů na elektrodu. Proto je důležitý kontakt bakterii s materiálem elektrody, protože pouze tyto organismy,

kteře jsou imobilizovány mohou přenášet elektrony na elektrodu, a tím zvýšit produkci energie. Další možný transport elektronů je pomocí sekundárních metabolitů tzv. nepřímý a zprostředkovaný přenos [69]. Pro správný růst mikroorganismů a také vyšší produkci energie je velmi důležitý druh substrátu. Vybraný substrát by měl být levný a neměl by potřebovat velkou předúpravu. Jednou z možností je využití odpadních vod s vysokým obsahem kyslíku např. z pivovarství, textilního či papírenského průmyslu, které mohou být náhradou používaných čistých látek jako je glukóza a acetát. Navíc komplexní složení odpadů by mohlo vést k obohacení mikrobiální kultury, a tudíž k zvýšení produkce elektrické energie [66].

2.5.1 Aplikace mikrobiálního palivového článku

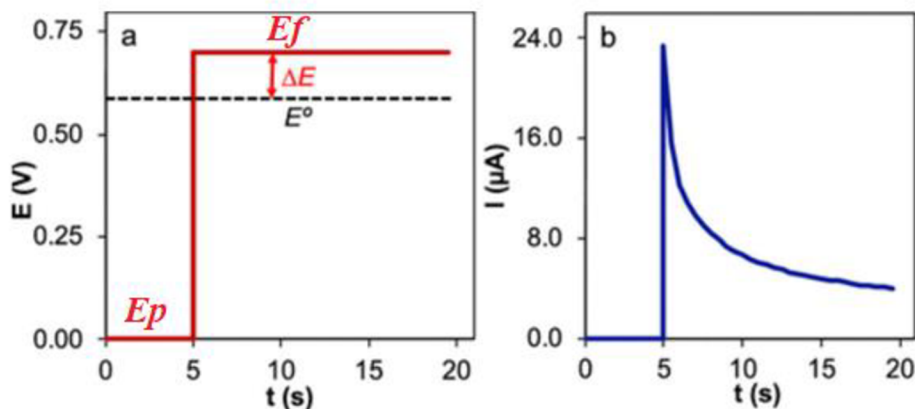
Kromě zřejmé aplikace jako nová možnost zisku elektrické energie má mikrobiální palivový článek i jiná využití. Jednou z těchto možností je technologie zpracování odpadních vod a odpadů. Jedná se o vhodné spojení, kde dojde jak k odstranění organických látek z odpadních vod, tak i k zisku energie. Mohlo by se jednat o vhodnou náhradu aerobního zpracování odpadů a odpadních vod z hlediska nižších nákladů. A to zejména z důvodu provzdušňování a zpracování kalů, které je u aerobních technologií nutné. Využití článku jako biosenzoru je také jednou z možností, jelikož by mohl sloužit k měření znečištění vod například pomocí měření biologické koncentrace a spotřeby kyslíku. Další možností aplikace mikrobiálního palivového článku je výroba vodíku. Změnami v článku lze docílit toho, že bude vyráběn vodík, a ne elektrická energie [70, 71].

2.6 Elektrochemické analytické metody

Elektrochemické analytické metody mají širokou škálu využití například pro analýzu léku, potravinářských aditiv či látek znečišťujících životní prostředí. Výhodou těchto metod je jejich cenová dostupnost, vysoká citlivost a přesnost. Mezi elektrochemické metody se řadí například voltametrie, amperometrie, potenciometrie, elektrochemická impedanční spektroskopie atd [72]. V této práci je přiblížena chronoamperometrická metoda, která je hlavní elektrochemickou metodou použitou v experimentální části práce.

2.6.1 Chronoamperometrie

Chronoamperometrie je jednou z nejjednodušších a nejvyužívanějších voltametrických metod. Zjednodušeně se jedná o metodu, která spočívá v aplikaci konstantního potenciálu na pracovní elektrodu vůči referenční elektrodě a následném měření proudu protékajícím mezi pracovní elektrodou a protielektrodou. [73]. V chronoamperometrickém experimentu dojde ke změně počátečního elektrodového potenciálu (E_p), při kterém nedochází k výměně elektronů na potenciál (E_f), u kterého dochází k faradaickému procesu. Výsledný proud je závislý na čase viz. obrázek 3 graf b. Jak lze vidět, na obrázku 3 je graf a znázorňující závislosti potenciálu na čase pro elektrochemickou oxidační reakci. Hodnota potenciálu E_f je pro takovou reakci vyšší než hodnota potenciálu E^0 , kde rychlost přenosu elektronu již neovlivňuje proud. Výsledný proud je ovlivněn tokem látek, které mohou podléhat redoxním reakcím, anebo kinetikou reakcí pro regeneraci těchto látek. Pokud je tok těchto látek řízen difúzí, je možné získat difúzní koeficient elektroaktivních látek z Cottrellovy rovnice [74, 75].



Obrázek 3, graf a: průběh aplikovaného potenciálu, graf b: výsledná závislost proudu na čase. Oba grafy jsou pro elektrochemickou oxidativní reakci. Upraveno z [74]

Chronoamperometrické měření může být provedeno jednou ze dvou metod. A to aplikací jednoho počátečního potenciálu (E_p), a měření výsledného proudu. Anebo použitím dvojitého potenciálového kroku, kde je aplikován počáteční potenciál (E_p) a po uplynutí určité doby je potenciál (E_f) vrácen na původní hodnotu [75].

Ačkoli je chronoamperometrie velice užitečná metoda má i řadu nevýhod. Je to poměrně časově náročná metoda a také se nejedná o velmi selektivní metodu. Výsledný proud je součtem faradaických proudů produkovaných všemi ionty v roztoku, které podléhají redoxním reakcím [73].

3. Experimentální část

3.1.1 Chemikálie

- 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (Sigma-Aldrich, DEU)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, CZE)
- Ethanol 99,8 % (Lach-Ner, CZE)
- Fruktóza (Lach-Ner, CZE)
- Glutaraldehyd 50 % vodný roztok (Sigma-Aldrich, DEU)
- Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Lach-Ner, CZE)
- Hexamethyldisilazan (Sigma-Aldrich, DEU)
- Hydroxid sodný (Lach-Ner, CZE)
- Chloroform, stabilizovaný v 2-methyl-2-butene (VWR Chemicals, USA)
- Izopropylalkohol (PENTA, CZE)
- Nutrien broth (HiMedia, IND)
- Roti@fair PBS 7,4 (Carl Roth, DEU)
- Peroxidáza (Sigma-Aldrich, DEU)
- Síran amonný (Lachema, CZE)
- Síran hořečnatý heptahydrát (Lach-Ner, CZE)

3.1.2 Přístroje

- 3D tiskárna, Raise3D E2
- Analytické váhy, OHAUS Pioneer model PA224C
- Centrifuga, Hettich EBA 200
- Centrifuga, Hettich ROTINA 420R
- ELISA reader, Biotek, SYNERGY H1
- Laboratorní zdroj, Keysight E36313A
- Laminární box Aura mini, BioAir – Euroclone
- Magnetická míchačka, Biosan MMS-3000
- Plynový chromatograf s FID, Thermo Scientific Trace 1300
- Potenciostat, Ivium Octostat
- PocketSTAT2, IVIUM TECHNOLOGIES
- Skenovací elektronový mikroskop FEI Verios 460L
- Termoblok, Bibby Scientific Stuart SBH 200D
- Termostat, LTE IP100U
- Třepačka, Witeg, SHO-2D
- Temperovaná třepačka, IKA KS4000 i control
- Unisense μ Sensor Instruments, Opto-F1 UniAmp
- Vortex, Benchmark BenchMixer
- Laboratorní vybavení

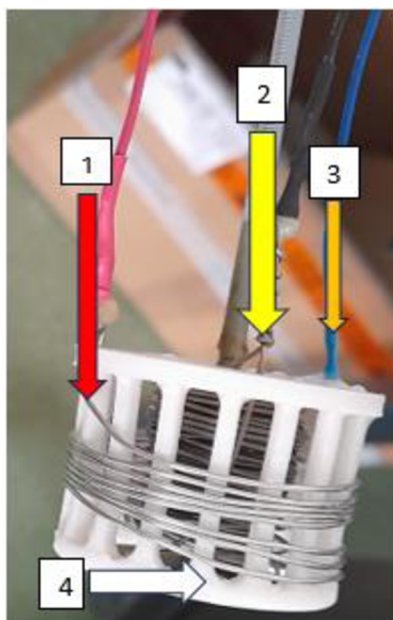
3.1.3 Mikroorganismy

V této práci byla použita bakterie *Cupravidus necator* H16 CCM 3726, získaná z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

3.2 Metody

3.2.1 Sestavení elektrodových systémů

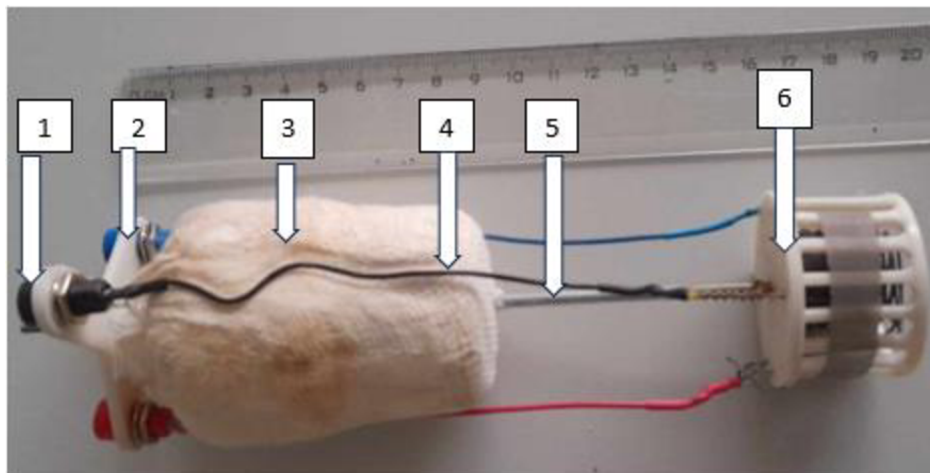
Materiál pro výrobu elektrodových systémů byl vybrán podle poznatků z diplomové práce Ing. Runštukové [76]. Elektrodový systém (viz obrázek 4 a 5) se skládá z pracovní elektrody (katoda), referenční elektrody a protielektrody (anoda). Aby nedocházelo ke zkratu elektrod byl navržen polypropylenový (PP) držák, který dává systému potřebnou oporu. Tento držák byl vytisknut pomocí 3D tiskárny. Pro upevnění systému v Erlenmeyerové baňce byla k polypropylenovému držáku přidána závitová tyč zakončena špuntem. Tyč byla opatřena bužírkou, aby nezkorodovala a byla našroubována do PP držáku a přilepena epoxidovým lepidlem. Dále byl pro udržení konektorů jednotlivých elektrod nad špunt připevněn polypropylenový nástavec. Jako pracovní elektroda byla použita nerezová ocel 316L o celkovém povrchu 27,6 cm². Protielektroda byla vyrobena z titanového drátu o celkovém povrchu 3,5krát větším než u pracovní elektrody. Jako referenční elektroda byla použita pseudoreferenční elektroda Ag/AgCl, vyrobená dle postupu z práce Bc. Floriana [77]. Takto připravené elektrody byly poté upevněny do držáku a připájeny k drátům zakončených konektory, které umožnily zapojení elektrod k potenciostatu. Pokud elektrody nešly napájet, v případě ocelové elektrody, bylo kontaktu dosaženo obtočením elektrody drátkem. Zda je mezi elektrodou a konektorem kontakt bylo ověřeno změřením elektrického odporu.



Obrázek 4, elektrodový systém. 1- pracovní elektroda, 2- protielektroda, 3- pseudoreferenční elektroda, 4- polypropylenový držák

V průběhu experimentů byla vyměněna pracovní elektroda, kdy byl původní ocelový drát nahrazen ocelovou mřížkou o přibližně stejném povrchu (viz obrázek 5). Tato mřížka nebyla připájena, ale pouze omotána a přidráťována k napájecímu drátu, z důvodu špatného pájení

oceli. U nově zhotovené pracovní elektrody byl změřen odpor, aby bylo zjištěno, zda je toto upevnění vhodné. Mřížka byla umístěna na polypropylenový držák, tak aby když bude systém ponořen do vody, byla mřížka z poloviny v médiu a z poloviny nad hladinou. Toto uspořádání zajistilo, že při míchání baňky docházelo k omývání celé pracovní elektrody (mřížky), a pro redukci kyslíku tak mohl být využit vzdušný kyslík.



Obrázek 5, elektroodový systém s vyměňenou pracovní elektrodou (mřížka): 1- konektor, 2- držák konektorů, 3- špunt, 4- spojovací dráty, 5- tyč, 6- polypropylenový držák

3.2.1.1 Očištění elektroodových systému pomocí vývoje vodíku

Před každým měřením bylo provedeno očištění elektroodového systému. Systém byl ponořen do 0,1 M roztoku NaOH. Pracovní elektroda byla připojena k zápornému zdroji napětí a protielektroda ke kladnému. Poté byl navyšován potenciál, dokud se nezačal vyvíjet vodík na pracovní elektrodě. Potenciál byl přiváděn po dobu 4 min od začátku tvorby bublin.

3.2.2 Použité elektrochemické metody

3.2.2.1 Elektrochemická impedanční spektroskopie

Před každým měřením s elektroodovým systémem, jeho charakterizací či kultivačním experimentem, byla vždy změřena elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS). Měření bylo provedeno z důvodu zjištění odporu systému, a zda se něco nezměnilo či nedošlo k chybě při přípravě experimentu. Samotný experiment probíhal poté tak, že elektroodový systém byl vložen do média a zapojen do potenciostatu, který byl ovládán pomocí IviumSoft programu. Takto připravené měření probíhalo od 1 MHz do 1 Hz s amplitudou 10 mV a krokem 10 frekvencí na dekádu.

3.2.2.2 Chronoamperometrie

Tato metoda sloužila k měření elektrického proudu, který vznikne faradayickými procesy, po přiložení vybraného potenciálu na pracovní elektrodu viz 2.6.1. Výstup tohoto měření je poté graf závislosti proudu na čase. Přičemž potenciál byl na elektroodový systém přiváděn pomocí potenciostatu. Také tato metoda byla nastavena v softwaru IviumSoft i s potřebnými parametry, které byly pro všechna měření stejné skrz čtyřelektroodové zapojení. Doba měření a interval snímání se lišily pro jednotlivé experimenty. Metoda byla spuštěna vždy až po zapnutí míchání třepačky a změření EIS.

3.2.3 Charakterizace elektrodového systému

Elektrodový systém byl charakterizován v 100 ml kultivačního média o složení viz tabulka 1. Po celou dobu měření byl celý systém ponořen v médiu a míchán na třepačce domácí výroby. Měření probíhalo od potenciálu -0,2 V do -1 V s krokem -0,1 V. Pro aplikaci potenciálu na elektrodový systém byla použita chronoamperometrická metoda popsaná výše. Každé měření trvalo po dobu 1 h. Po uplynutí této doby byl odebrán vzorek pro stanovení vzniklého H₂O₂ dle postupu níže.

Tabulka 1, složení kultivačního produkčního média pro bakterii *Cupriavidus necator* H16

látko	koncentrace [g/l]
KH ₂ PO ₄	1,02
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	11,1
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2
Fruktóza	20
MES	1 ml/l

Tabulka 2, složení roztoku stopových prvků MES

látko	koncentrace [g/l]
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	9,7
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	7,8
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,156
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,119
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	0,118
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1
0,1 M HCl	1000 ml

3.2.3.1 Měření dlouhodobé produkce peroxidu vodíku

Z výsledků charakterizace elektrod byl vybrán potenciál -0,8 V a -1 V, při jejichž aplikaci byla změřena vysoká koncentrace H₂O₂. Pokus probíhal ve 100 ml kultivačního média v 250 ml Erlenmeyerově baňce. Médium bylo sterilizované v tlakovém hrnci po dobu 30 minut s již vloženým elektrodovým systémem a hadičkou pro odběr. Roztok fruktózy a stopových prvků MES byl přidán pomocí hadičky a v laminárním boxu. Následně byla baňka umístěna na třepačku (viz obrázek 6), bylo změřeno elektrochemické impedanční spektrum (EIS) a poté byl aplikován daný potenciál. Vzorky byly následně odebírány pomocí hadičky v nepravidelných intervalech a byl stanoven obsah H₂O₂. Délka experimentu se lišila pro jednotlivá měření.



Obrázek 6, standardizace elektrodového systému v médiu na domácky vyrobené třepačce

3.2.4 Stanovení koncentrace peroxidu vodíku

Pro stanovení obsahu H_2O_2 ve vzorcích byla použita metoda využívající barvivo tetramethylbenzidín (TMB) a enzym peroxidáza (HRP). Tato metoda je založena na reakci, při níž dojde k oxidaci TMB barviva pomocí H_2O_2 a vznikne modrý komplex jehož absorbance lze změřit při 653 nm. Enzym peroxidáza je přidán pro urychlení reakce. Pro toto stanovení je nutné připravit roztok složený ze tří složek, a to roztoku barviva TMB, enzymu HRP a McIlvaineho pufru. Roztok barviva byl připraven o koncentraci 10 mg/ml v dimethylsulfoxidu (DMSO). Enzymová složka byla připravena o koncentraci 2 mg/ml v deionizované vodě, kdy aktivita enzymu byla 89,63 U/mg. Nakonec byl připraven pufr smícháním 435 ml 0,2 M roztoku Na_2HPO_4 a 315 ml 0,1 M kyseliny citronové s výsledných pH okolo 5,7. Roztoky barviva a enzymu byly uchovány v mrazáku, roztok pufru při laboratorní teplotě. Výsledný roztok pro stanovení H_2O_2 byl připraven o objemu 1 ml, kde 993 μl tvořil pufr, 2 μl enzym HRP a 5 μl TMB barvivo. Takto namíchaný roztok bylo možné uchovat v lednici po dobu maximálně 5 h, poté musel být připraven nový roztok pro stanovení H_2O_2 .

Za účelem stanovení H_2O_2 byla použita mikrotitrační destička, kde byl napipetován nejprve vzorek a poté připravený roztok v celkovém objemu 200 μl , poměr vzorku a roztoku byl takový, aby absorbance dosahovala hodnot menších než 1 a v rozsahu kalibrační křivky. Následně byla destička vložena do ELISA readeru Biotek Synergy H1 a byla změřena absorbance při 653 nm. Ze získaných hodnot byla vypočítána koncentrace H_2O_2 , za využití kalibrační křivky. Ta byla připravena a změřena, vždy po připravení nového roztoku pufru v rozsahu koncentrace 0-30 μM .

3.2.5 Kultivace

3.2.5.1 Příprava inokula

Do 100 ml Erlenmayerových baňek bylo nalito 50 ml živného média nutrient broth (složení v tabulce 3) o koncentraci 25 g/l. Takto připravené baňky byly sterilovány v tlakovém hrnci po dobu 30 minut. Dále byla média ochlazená na laboratorní teplotu a následně zaočkována bakteriální kulturou *Cupriavidus necator* H16 v laminárním boxu. Takto připravená inokula byla umístěna na třepačku vyhřátou na 30 °C s otáčkami 180 rpm po dobu 24 h.

Tabulka 3, složení roztoku nutrient broth pro přípravu inokula

Složení NB	[g/l]
Pepton	10
Hovězí extrakt	10
Chlorid sodný	5

3.2.5.2 Kultivace s elektrodoými systémy

Produkční médium bylo připraveno v potřebném objemu o složení viz tabulka 1. Připravený roztok byl rozlit po 100 ml do 300 ml Erlenmayerových baňek. Poté byly kontrolní baňky a baňky s vloženým elektrodoým systémem a hadičkou sterilovány v autoklávu. Následně byl v laminárním boxu pomocí hadičky přidán roztok fruktózy (finální koncentrace v médiu 20 g/l) a roztok stopových prvků o složení viz tabulka 2. Nakonec bylo přidáno 10 ml inokula a baňky byly umístěny na otevřenou třepačku s otáčkami 95 rpm. Doba kultivace se lišila podle jednotlivých kultivací. Po 24 h či 48 h byl aplikován stresový faktor následujícím způsobem. Třepání bylo pozastaveno a elektrodové systémy byly připojeny k potenciostatu a bylo změřeno jejich impedanční spektrum. Dvě Erlenmayerovy baňky s vloženými elektrodoými systémy nebyly připojeny k potenciostatu a byly ponechány jako kontroly. Poté byla nastavena chronoamperometrická metoda s potenciálem -0,8 V či -1 V, obnoveno třepání a spuštěna metoda. Jak tento typ kultivace probíhal je znázorněné na obrázku 7. V průběhu kultivace byly odebírány vzorky pro stanovení optické hustoty, obsahu biomasy a PHB. Při odebírání vzorků bylo pozastaveno třepání a pomocí sterilní injekční stříkačky byl odebrán dostatečný objem média. Aby byla co nejvíce omezena možnost kontaminace, byly hadičky sloužící k odběru obaleny alobalem a před i po každém odběru otřeny ethanolem.

3.2.5.3 Očištění elektrodového systému po ukončení kultivace

Po ukončení kultivace byly elektrodové systémy vyjmuty a opláchnuty pod tekoucí vodou. Následně byl systém zcela ponořen do 0,1 M roztoku NaOH a umístěn do ultrazvuku, kde byl sonifikován po dobu 10 min. Poté byly elektrody opláchnuty deionizovanou vodou a byl zkontrolován jejich stav. Následně byly ještě očištěny dle postupu v kapitole 3.2.1.1.



Obrázek 7, kultivace s elektrodovým systémem

3.2.5.4 Kultivace s částmi elektrodového systému

Produkční médium bylo namícháno o složení viz tabulka 1. Jednotlivé složky byly naváženy a rozpuštěny v potřebném objemu destilované vody. Po úplném rozpuštění byl roztok produkčního média rozlit po 100 ml do 250 ml Erlenmeyerových baněk. Následně byly do baněk přidány jednotlivé části elektrodového systému a také část hadičky pro odběr vzorku. Kultivace probíhala v paralelním provedení a s kontrolními vzorky bez přítomnosti daných částí. Poté byly baňky sterilovány v tlakovém hrnci po dobu 30 minut. Dále byl do média přidán roztok stopových prvků MES, roztok fruktózy (finální koncentrace 20 g/l) a 10 ml inokula. Kultivace trvala 72 h na otevřené třepačce pod lampou při otáčkách 95 rpm. Každých 24 h byl v laminárním boxu odebrán vzorek pro určení optické hustoty a množství biomasy a PHB.

3.2.6 Stanovení biomasy

Obsah biomasy byl stanoven u vzorků odebíraných z produkčního média. Stáří buněčné suspenze se lišilo, protože vzorky byly odebírány po celou dobu kultivace. Pro stanovení byly použity dvě metody, a to spektrofotometrická a gravimetrická.

3.2.6.1 Spektrofotometrické stanovení růstu bakteriální kultury

Optická hustota média byla stanovena každý den kultivace. Nejprve bylo nutné zjistit správný poměr pro ředění vzorku. Vzorek byl ředěn roztokem PBS v takovém poměru, aby absorbance nepřesáhla hodnotu 1. Připravený vzorek byl proměřen v spektrofotometru při vlnové délce 600 nm.

3.2.6.2 Gravimetrické stanovení biomasy

V průběhu kultivace byly také odebírány vzorky, u kterých byl obsah biomasy stanoven následujícím způsobem. Daný objem vzorku v rozmezí 4-10 ml byl stočen po dobu 5 min při 6000 rpm a poté byl oddělen supernatant. Dále byl do centrifugační zkumavky přidán roztok PBS, ve kterém byla usazená biomasa rozsuspendována pomocí vortexu. Následně byl vzorek opět stočen, za již zmíněných podmínek a supernatant opět slit. Takto připravené vzorky byly sušeny při 70 °C do konstantní hmotnosti a poté zváženy, díky čemuž byly stanoveny koncentrace biomasy v původních vzorcích.

3.2.7 Stanovení obsahu PHB

Obsah PHB byl stanoven ve vysušené biomase získané z jednotlivých odběrů (viz podkapitola 3.2.6.2), ze které bylo naváženo 8-11 mg biomasy do 2 ml vialek. Následně byl do vialek přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml esterifikační směsi s vnitřním standardem. Jako esterifikační směs byla použita 15 % kyselina sírová v methanolu a jako vnitřní standard kyselina benzoová o koncentraci 5 mg/ml. Po přidání roztoků byly vialky zakrimpovány a vloženy do termobloku po dobu 3 h při teplotě 94 °C za účelem esterifikace. Po uplynutí dané doby byly vzorky vyjmuty z termobloku a nechány vychladnout. Následně byl celý objem přelit do 4 ml vialky, která obsahovala 0,5 ml 0,05 M NaOH, který byl použit pro neutralizaci vzorku. Takto připravená vialka byla důkladně protřepána, aby došlo k oddělení fází. Byly nachystány 2 ml šroubovací vialky, do kterých bylo přidáno 0,9 ml isopropylalkoholu a napipetováno 50 µl spodní fáze vzorků. Takto připravený vzorek byl dále charakterizován na plynovém chromatografu s FID detekcí.

3.2.8 Stanovení obsahu kyslíku

Obsah kyslíku byl měřen v produkčním médiu v průběhu celé kultivace pomocí kyslíkového senzoru Unisense µsensor Instruments, Opto-F1 UniAmp. Tento senzor funguje na principu zhášení luminiscence pomocí O₂ molekul, čím více přítomných O₂ molekul tím nižší luminiscence. Produkční médium i inokulum bylo připraveno dle postupu výše (viz kapitola 3.2.5). Kalibrace elektrody byla provedena následovně. Bylo připraveno dostatečné množství produkčního média obsahujícího všechny složky kromě bakteriální kultury do dvou nádob. V první nádobě bylo médium 20 min probubláváno plyným dusíkem a ve druhé vzduchem. Po uplynulé době byl senzor nejprve ponořen do média nasyceného dusíkem a následně do média probublávaného vzduchem. Při tomto stanovení byl měřen parciální tlak O₂ v médiu, v kalibračním médiu probublávaném vzduchem byl normální parciální tlak O₂ a to 21 %. Kalibrace byla provedena před každým měřením. Po kalibraci byla měřicí elektroda opatrně očištěna ethanolem a vložena v laminárním boxu do média, které obsahovalo již všechny složky. Následně byla Erlenmeyerova baňka s vloženým senzorem a zaočkovaným médiem umístěna na třepačku pod lampu, kde kultivace probíhala po dobu 72 h při otáčkách 95 rpm.

3.2.9 Příprava vzorků pro skenovací elektronovou mikroskopii

Pro pozorování pod skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM) byly vybrány tři materiály, a to nerezová ocelová mřížka, titanový drát a polypropylenový disk. Tyto vzorky byly upraveny na takovou velikost, aby je bylo možné pozorovat

pod elektronovým mikroskopem. Následně byly tyto materiály vloženy do produkčního média o složení viz tabulka 1. Poté bylo toto médium sterilováno po dobu 30 min v tlakovém hrnci. Druhý den bylo médium zaočkováno inokulem, připraveným podle postupu v kapitole 3.2.5.1. Celkově bylo připraveno pět kultivačních baněk jedna baňka pro polypropylen, dvě pro mřížku a dvě pro titan (jedna s odběrem po 24 h a druhá po 168 h). Kultivace probíhala po dobu 168 h při otáčkách 95 rpm na otevřené třepačce a pod lampou.

Po ukončení kultivace byly kousky materiálu opatrně vyjmuty a opláchnuty v PBS. Pro fixaci bakteriálních buněk na daný materiál byl použit 2,5% roztok glutaraldehydu připravený z 50 % vodného roztoku glutaraldehydu a 0,1 M PBS. V tomto roztoku byly vzorky ponechány 20 h při 4° C. Poté byly vzorky opatrně vyjmuty a vloženy do roztoku PBS, kde byly ponechány 10 min při 4 °C. V roztoku PBS byly opláchnuty celkově třikrát. Pro dehydrataci vzorků byly použity roztoky ethanolu o koncentraci 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % a 99,8 %. Vzorky byly v jednotlivých roztocích ponechány po dobu 10 min a v 99,8 % roztoku byly dehydratovány celkem třikrát. Poté byly vzorky vloženy do roztoku hexamethyldisilazanu a sušeny po dobu 2 h při 35° C.

Před samotným pozorováním na elektronovém mikroskopu byly vzorky nalepeny na uhlíkovou pásku a pozlaceny. A to z toho důvodu zajištění jejich vodivosti. Poté již proběhlo snímání na skenovacím elektronovém mikroskopu FEI Verios 460L s vysokým rozlišením za použití urychlovacího napětí 5 kV.

4. Výsledky a diskuse

Cílem této diplomové práce bylo použití elektrochemicky tvořeného peroxidu vodíku, generovaného přímo v kultivačním médiu, za účelem zvýšení produkce polyhydroxyalkanoátů. Jak již bylo zmíněno výše, studie od Obruča et. al. z roku 2010 popisuje vliv H_2O_2 na produkci PHA, kdy při vhodné koncentraci H_2O_2 , 5 mM dojde k navýšení obsahu PHA z 73,34 % na 79,30 % [3]. Výsledky této studie jsou jedním z podnětů pro tuto práci. Pokud by bylo možné navýšit produkci PHA v bakteriální buňce pomocí H_2O_2 generovaného přímo v kultivačním médiu, mohlo by se jednat o nový kontinuální způsob produkce PHA, tzv. nemuselo by se do média nic přidávat v průběhu kultivace. Tato práce se skládá ze dvou částí, a to z elektrochemické a biotechnologické. Elektrochemická část je zaměřena na sestavení elektrodového systému, který je schopen produkovat peroxid vodíku v dostatečné míře. Větší část práce je poté věnována kultivačním experimentům s aplikací elektrodového systému a optimalizaci těchto kultivací.

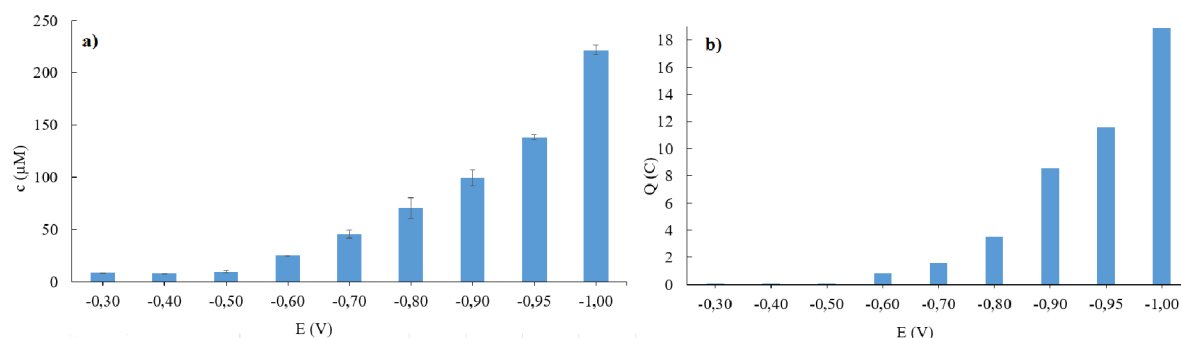
4.1 Charakterizace elektrodového systému

Nejprve byl sestaven elektrodový systém dle postupu v kapitole 3.2.1. Materiály pro výrobu byly vybrány podle výsledků práce Ing. Runštukové [76]. Jako pracovní elektroda byla použita nerezová ocel 316L, je to levný materiál, který je selektivní pro dvouelektronovou cestu redukce kyslíku. Protože všechna měření probíhala v jednokomorovém uspořádání byl vybrán titan jako protielektroda, jelikož tento materiál nepodporuje zpětnou oxidaci H_2O_2 . Jako referenční elektroda byla použita Ag/AgCl elektroda.

Po sestavení elektrodového systému byla nutná jeho charakterizace z důvodu nalezení optimálního potenciálu, při jehož aplikaci vznikne dostatečné množství H_2O_2 . Neboť peroxid vodíku vzniká v médiu dvouelektronovou redukcí kyslíku, ke které dochází na katodě, tedy pracovní elektrodě. Elektrodový systém byl před každým měřením očištěn, aby mohl být využit celý povrch pro adsorpci O_2 . Charakterizace probíhala v produkčním médiu o složení viz tabulka 1, po dobu jedné hodiny a poté byl změřen obsah H_2O_2 dle postupu v kapitole 3.2.4. Výsledky tohoto měření jsou zaznamenány na obrázku 8a. Zde je znázorněn graf závislost koncentrace vyprodukovaného peroxidu vodíku na použitém potenciálu. Z grafu je patrné, že pro potenciál -0,3 V, -0,4 V a -0,5 V je koncentrace peroxidu vodíku velmi podobná a nízká v průměru $8,96 \pm 0,69 \mu\text{M}$. Avšak od potenciálu -0,6 V dochází k navyšování produkce peroxidu vodíku. A to tak, že čím vyšší aplikovaný potenciál tím vyšší koncentrace H_2O_2 .

Pro jednotlivé potenciály byla také stanovena hodnota vyměněného náboje, který prošel elektrochemickým systémem za dobu měření. Náboj byl vypočítán integrací proudu podle času. Závislost náboje na jednotlivých potenciálech je znázorněna na obrázku 8b. V tomto grafu je patrný stejný trend jako u předchozího grafu, se zvyšujícím se potenciálem narůstá i velikost vyměněného náboje. Což znamená, že při vyšším potenciálu dochází k větší míře redoxních reakcí. Je nutné se zamyslet i nad tím, jaké reakce probíhají na anodě, tedy protielektrodě. Zde musí docházet k oxidačním reakcím, aby byla zachována rovnováha systému. Jak již bylo zmíněno materiálem protielektrody je titan, tedy je velmi nepravděpodobné, že by docházelo k zpětné oxidaci H_2O_2 . Dle složení média by mohlo

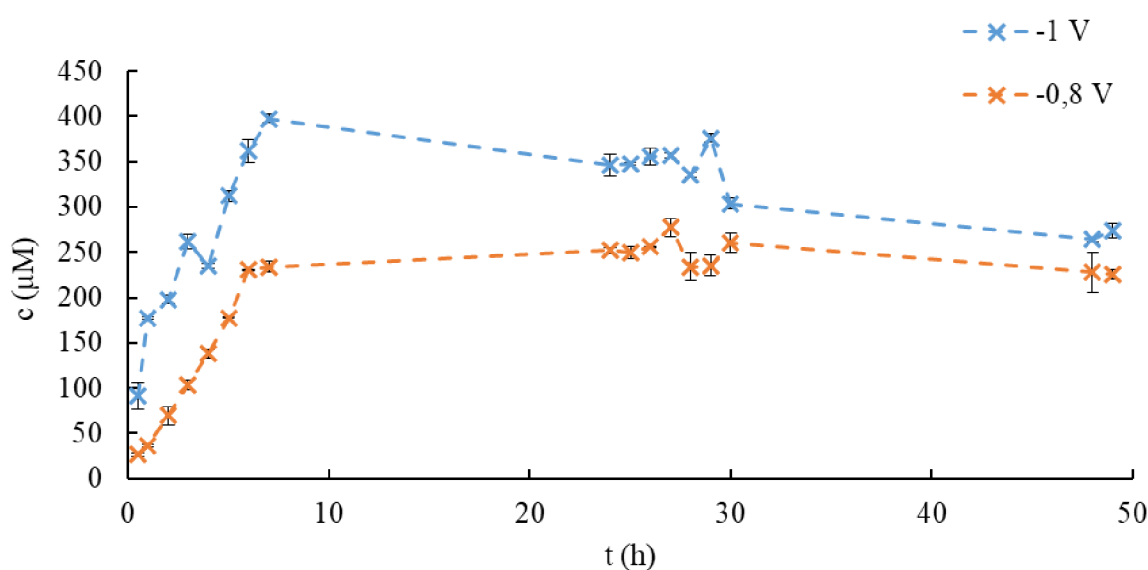
docházet k oxidaci fruktózy, která je v médiu o koncentraci 20 g/l. Samotný povrch titanové elektrody může podléhat oxidaci, a to na TiO_2 . V průběhu experimentů byla pozorována změna barvy protielektrody, která je důkazem oxidace titanu na TiO_2 .



Obrázek 8, a) graf závislosti koncentrace peroxidu vodíku na použitém potenciálu, b) graf závislosti náboje na použitém potenciálu

4.1.1 Dlouhodobá produkce peroxidu vodíku

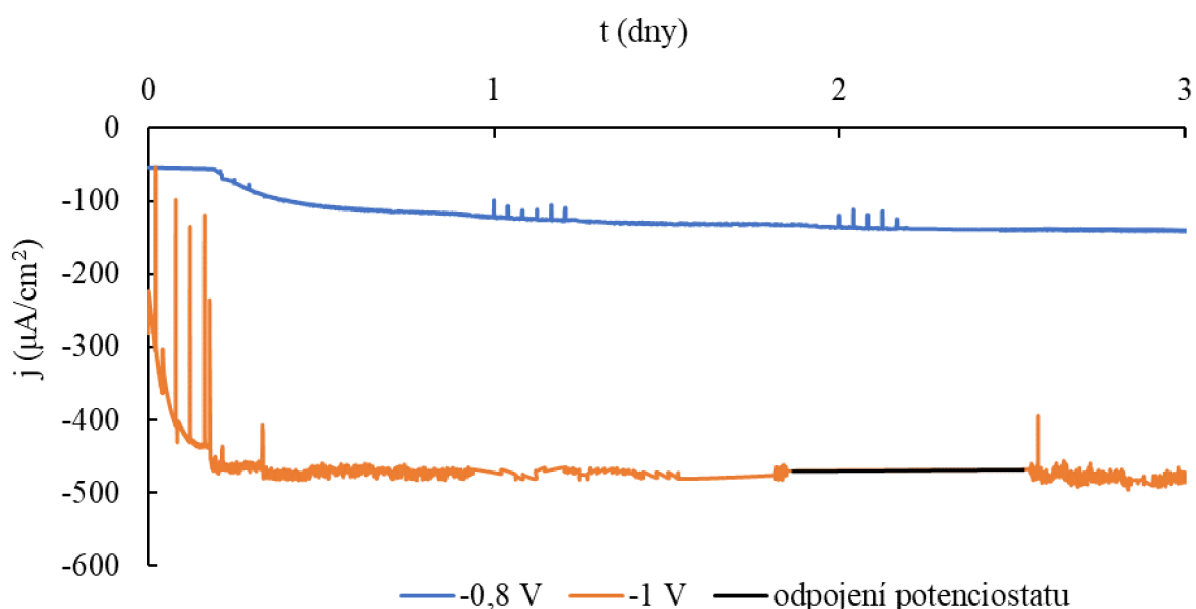
Na základě výsledků z kapitoly 4.1 byl pro účely této práce vybrán potenciál $-0,8$ V, kde koncentrace peroxidu dosáhla $70,80$ μM po jedné hodině. Pro tento potenciál byla změřena i dlouhodobá produkce peroxidu vodíku, kde byla průběžně stanovována koncentrace H_2O_2 po dobu 120 h. Použitelné výsledky byly do 50 h, jelikož poté došlo ke kontaminaci média a nebylo možné obsah stanovit. Jelikož vzorky pro stanovení koncentrace H_2O_2 nebyly odebírány po celou dobu měření, ale pouze v určitých intervalech, nelze přesně říci v jakém čase bylo dosaženo maximální koncentrace. Je však pravděpodobné, že k tomu došlo někdy mezi 7-27 h experimentu. Pokud tento fakt opomeneme, je z průběhu grafu na obrázku 9 zřejmé, že koncentrace H_2O_2 je v čase relativně konstantní, a to okolo 250 μM .



Obrázek 9, dlouhodobá produkce peroxidu vodíku pro potenciál $-0,8$ V a -1 V

Po provedení prvního kultivačního experimentu s potenciálem $-0,8\text{ V}$, bylo na základě výsledků rozhodnuto použít potenciál s vyšší produkcí H_2O_2 , a to přesně potenciál o hodnotě -1 V . U tohoto potenciálu byla koncentrace H_2O_2 po hodinové charakterizaci v produkčním médiu $221,72\ \mu\text{M}$. Dlouhodobé produkce peroxidu vodíku v čase pro vybrané potenciály byly porovnány (viz obrázek 9) na základě čehož bylo zjištěno, že koncentrace H_2O_2 je pro potenciál -1 V vyšší, jak bylo předpokládáno. Avšak průběh závislostí se liší. Zatím co u potenciálu $-0,8\text{ V}$ je od 7 h koncentrace H_2O_2 relativně konstantní, u potenciálu -1 V , dochází k poklesu koncentrace v čase. To může být způsobeno tím, že u potenciálu -1 V je rychleji spotřebováván kyslík v médiu. Neboť vyšší potenciál podporuje rychlejší výměnu elektronů mezi pracovní elektrodou a kyslíkem v médiu. Dalším možným vysvětlením je, že může docházet k redukci H_2O_2 na vodu. Když porovnáme plochu pod oběma křivkami zjistíme, že při aplikaci potenciálu -1 V získáme pouze o 28,28 % více H_2O_2 v čase oproti použití potenciálu $-0,8\text{ V}$. To platí, ale pouze pro změřené hodnoty, je možné že v čase od 7 h do 24 h vystoupala koncentrace peroxidu výše než $400\ \mu\text{M}$.

Dále byla stanovena závislost proudových hustot v čase pro oba použité potenciály (obrázek 10). Píky viditelné na obou křivkách byly způsobeny odebráním vzorků, kdy bylo nutné zastavit míchání médií. Nicméně je z grafu zřejmé, že průběh křivky pro -1 V je z části úplně konstantní, a to okolo druhého dne pokusu. V této době došlo ke ztrátě dat z důvodu odpojení potenciostatu. Dále byla pozorována i proudová hustota, která u obou potenciálů narůstá do 7 h měření a poté je již relativně konstantní. To odpovídá i změřené koncentraci H_2O_2 pro tento pokus viz obrázek 9. Jak bylo předpokládáno je zde poměrně velký rozdíl mezi hodnotami proudové hustoty u použitých potenciálů, a to až o $400\ \mu\text{A}/\text{cm}^2$.



Obrázek 10, graf závislosti proudové hustoty na čase pro potenciál $-0,8\text{ V}$ a -1 V

4.2 Vliv elektrochemicky produkovaného peroxidu vodíku na bakteriální růst

Po charakterizaci elektrodového systému byly vybrány potenciály -0,8 V a -1 V pro aplikaci v kultivačních experimentech. Tato kapitola se zabývá průběhem těchto kultivací.

4.2.1 Kultivace s aplikovaným potenciálem -0,8 V

Na základě získaných dat z předcházející kapitoly byl pro první kultivační experiment použit potenciál -0,8 V, kdy postup přípravy a průběhu všech kultivačních pokusů je popsán v kapitole 3.2.5. Jako produkční mikroorganismus byla vybrána bakterie *Cupriavidus necator* H16, jelikož se jedná o modelovou produkci PHB. Samotný experiment probíhal v šesti opakováních s aplikovaným stresem (dále označováno jako skupina potenciál -0,8 V), dvou kontrolách s elektrodovým systémem (žádná produkce H₂O₂) a dvou kontrolách bakteriálních kultivací bez přítomnosti elektrodového systému. Stresor, v tomto případě produkce peroxidu vodíku, byl aplikován ve 24 h kultivace. A to z důvodu potřebného nárůstu bakteriální kultury, protože aplikace H₂O₂ by mohla zpomalit růst nebo i zabít kulturu, což není v zájmu této práce. V průběhu experimentu byly každých 24 h odebírány vzorky pro stanovení optické hustoty (OD) kultury a také pro zjištění obsahu PHB a biomasy v g/l. Výsledky těchto stanovení jsou uvedeny v tabulce 4. Kultivace byla ukončena po 96 h. V průběhu experimentu byla také měřena závislost proudu na čase, avšak tato data byla po ukončení pokusu ztracena. Tento experiment se liší od všech dalších, protože produkční médium nebylo zaočkováno 10 % inokula, ale pouze 5 %. Jednalo se o pilotní experiment, podle kterého byly následně upraveny jak kultivační parametry, tak i postupy odebírání vzorků především z kultivací z elektrodovými systémem.

Tabulka 4, průměrné hodnoty parametrů OD, koncentrace PHB a biomasy v g/l pro jednotlivé skupiny

parametr	t [h]	Potenciál -0,8 V	Kontrola s elektrodami	Kontrola
OD [-]	24	4,80 ± 0,14	6,68 ± 0,59	5,68 ± 0,81
	48	20,25 ± 1,45	19,95 ± 2,76	22,05 ± 3,18
	72	30,98 ± 3,01	27,65 ± 3,18	31,95 ± 0,21
	96	42,50 ± 5,31	41,60 ± 10,32	47,15 ± 4,60
Biomasa [g/l]	t [h]	Potenciál -0,8 V	Kontrola s elektrodami	Kontrola
	24	1,69 ± 0,30	1,98 ± 0,06	1,45 ± 0,00
	48	3,61 ± 0,21	4,00 ± 0,23	3,85 ± 0,18
	72	5,06 ± 0,17	5,29 ± 0,27	5,98 ± 0,17
	96	5,99 ± 0,17	5,90 ± 0,30	7,09 ± 0,45
PHB [g/l]	t [h]	Potenciál -0,8 V	Kontrola s elektrodami	Kontrola
	24	0,44 ± 0,21	0,52 ± 0,15	0,42 ± 0,00
	48	2,52 ± 0,10	2,83 ± 0,07	2,58 ± 0,15
	72	3,59 ± 0,22	3,79 ± 0,21	4,17 ± 0,08
	96	4,13 ± 0,21	4,16 ± 0,01	5,22 ± 0,50

Optická hustota bakteriální kultury je parametr, z kterého lze určit růst daného kmene v čase. Z hodnot zapsaných v tabulce 4 je zřejmé, že všechny skupiny v čase stále narůstaly a nedocházelo k odumírání buněk. Je však patrné, že z rostoucím časem roste i chyba měření, která je nejvyšší v 96 h kultivace pro kontrolní skupinu s elektrodami. K této chybě mohlo dojít při přípravě vzorku pro stanovení optické hustoty. Další možností pro vznik této chyby by mohla být tvorba biofilmu na elektrodovém systému bez produkce H_2O_2 . Tvrzení, že u všech skupin nedocházelo k odumírání buněk podporuje i další ze stanovených parametrů, a to koncentrace biomasy. Z tabulky je patrné, že koncentrace biomasy rostla v čase opět pro všechny skupiny a od 72 h byl vyšší nárůst biomasy u skupiny kontrola, kde nebyl aplikován stres ani nebyl vložen elektrodový systém. Posledním ze změřených parametrů byla koncentrace PHB. Jelikož jedním z cílů této práce je navýšit produkci tohoto polymeru je koncentrace PHB velmi podstatný faktor. Avšak z výsledků zaznamenaných výše vyplývá, že nejlepšími výsledky s nejvyšším obsahem PHB dosáhla kontrolní skupina, a to od 72 h kultivace. Vzorky, na které byl aplikován stres vykazují nižší koncentraci PHB i biomasy. Je tedy možné, že produkce H_2O_2 v kultivačním médiu měla negativní vliv na růst buněk a produkci PHB a to po 48 h kultivace. Když se zaměříme na výsledky kontrolní skupiny s elektrodovým systémem, lze tento předpoklad vyvrátit. Koncentrace PHB a biomasy je porovnatelná pro stresovanou skupinu a kontrolní skupinu s elektrodovým systémem. Závěrem prvního kultivačního experimentu s elektrodovým systémem je tedy to, že byl významný rozdíl mezi kontrolní skupinou a dalšími dvěma skupinami. Avšak skupina potenciál -0,8 V a skupina kontrola s elektrodovými systémy mají velmi podobné výsledky. To by mohlo znamenat, že vyvíjený H_2O_2 nemá výrazný vliv na růst bakteriální kultury ani na produkci PHB, a že přítomnost elektrodového systému ovlivňuje bakteriální růst. Bohužel kvůli ztrátě dat zaznamenané závislosti proudu na čase nelze porovnat produkci H_2O_2 v tomto experimentu s výsledky měření dlouhodobé tvorby H_2O_2 . V průběhu experimentu byl také odebrán vzorek pro stanovení H_2O_2 metodou z kapitoly 3.2.4. Tímto způsobem nebyl zjištěn žádný obsah H_2O_2 . Je tedy možné, že vyprodukovaný H_2O_2 okamžitě zreagoval s organickou hmotou a nemohlo dojít k jeho stanovení.

4.2.2 Kultivace s vyšší produkcí peroxidu vodíku

Výsledky prvního pokusu naznačují, že aplikovaný stresor neměl žádný významný vliv na produkci PHB či růst bakteriální kultury. Je možné, že produkce H_2O_2 byla nedostatečná a buňky se s touto koncentrací vypořádaly bez spuštění stresové odpovědi, která zahrnuje zvýšení produkce PHB. Proto byl pro další pokus vybrán potenciál -1 V, jelikož při tomto potenciálu vzniká větší množství H_2O_2 viz obrázek 9. Kultivace probíhala po dobu 144 h tedy šest dní, a stresování bylo aplikováno po 24 h kultivace. Počet vzorků ve skupinách byl stejný jako v předchozím pokusu.

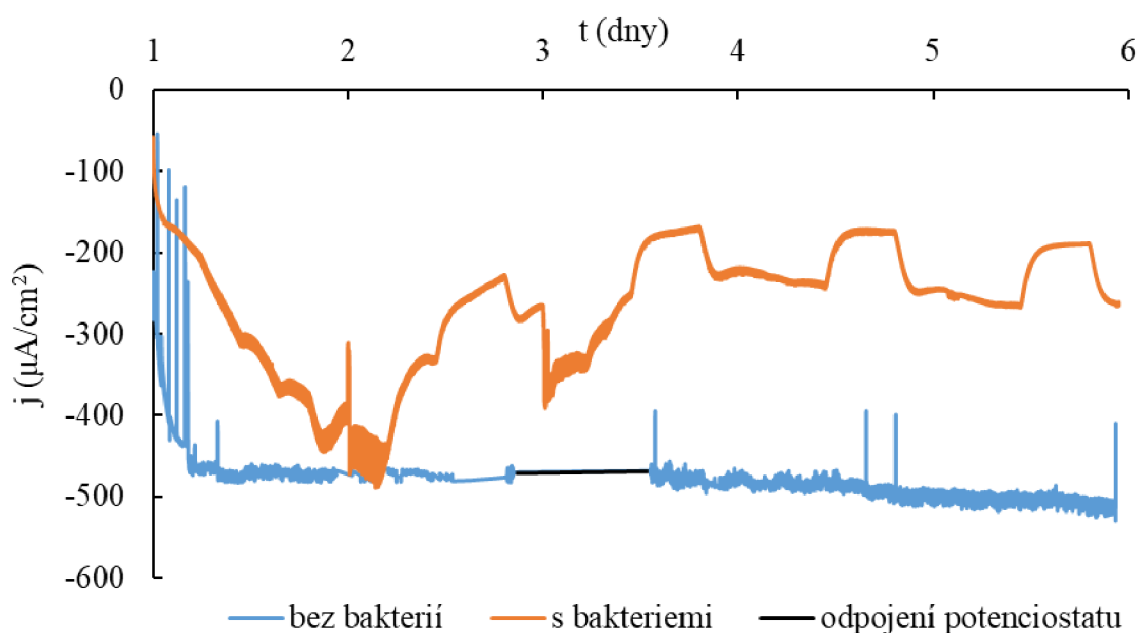
Tabulka 5, průměrné hodnoty parametrů OD, koncentrace PHB a biomasy v g/l pro jednotlivé skupiny

parametr	t [dny]	Potenciál -1 V	Kontrola s elektrodami	Kontrola
OD [-]	1	8,16 ± 0,25	6,79 ± 0,63	4,36 ± 0,80
	2	24,24 ± 0,03	23,52 ± 0,01	16,26 ± 0,02
	3	37,12 ± 0,60	40,32 ± 0,76	31,2 ± 0,43
	6	48,06 ± 4,80	45,13 ± 4,35	52,2 ± 1,56
Biomasa [g/l]	t [dny]	Potenciál -1 V	Kontrola s elektrodami	Kontrola
	1	4,00 ± 0,22	3,56 ± 0,06	2,49 ± 0,01
	2	8,29 ± 0,58	7,40 ± 0,57	5,29 ± 0,10
	3	8,94 ± 0,53	8,77 ± 0,27	7,49 ± 0,33
	6	8,12 ± 0,56	8,43 ± 0,60	8,58 ± 0,13
PHB [g/l]	t [dny]	Potenciál -1 V	Kontrola s elektrodami	Kontrola
	1	1,87 ± 0,07	1,76 ± 0,02	1,01 ± 0,12
	2	4,81 ± 0,18	4,01 ± 0,28	2,69 ± 0,07
	3	5,29 ± 0,57	5,54 ± 0,00	4,14 ± 0,39
	6	4,32 ± 0,49	4,72 ± 0,61	4,98 ± 0,89

V tabulce 5 jsou uvedeny výsledky měření jednotlivých parametrů. U hodnot optické hustoty je opět zřejmá chyba měření, a to hlavně pro šestý den kultivace. Proto bude průběh experimentu popsán podle parametru koncentrace biomasy. Podle získaných hodnot koncentrace biomasy je patrný rozdíl mezi skupinami už od počátku kultivace. Již v prvním dni, tedy před aplikací stresu, je koncentrace biomasy pro skupinu potenciál -1 V vyšší než pro dvě zbylé skupiny. Výrazný rozdíl je hlavně mezi touto skupinou a skupinou kontrola. Tento poznatek by mohlo podpořit domněnku, že již pouze přítomnost elektrodového systému má vliv na růst bakteriální kultury. Po aplikaci stresu byla koncentrace biomasy pro stresovanou skupinu opět nejvyšší a stejně tak koncentrace PHB. Ze vzorků odebraných třetího dne kultivace je zřejmé, že vzorky ze skupiny kontrola s elektrodovým systémem a skupina potenciál -1 V dosáhly svého maxima jak v koncentraci biomasy, tak i PHB. Šestý den došlo u obou skupin k poklesu, hlavně pak v koncentraci PHB.

To by mohlo znamenat, že bakterie začaly rozkládat PHB a využívat ho jako zdroj uhlíku. Druhou možností je, že by koncentrace H₂O₂ byla tak vysoká, že by bakterie aktivovaly jednu ze svých možných stresových odpovědí. A začaly rozkládat PHB na methylesterifikované oligomery, které buňce pomáhají vyrovnat se se stresovými podmínkami [46]. Tato možnost je však nepravděpodobná, jelikož k poklesu obsahu PHB došlo i u kontrolní skupiny s elektrodovým systémem, kde nebyl aplikován žádný stresor. Pravděpodobnější je první tvrzení, že bakterie začaly rozkládat PHB a využívat ho pro svůj růst. To by naznačovalo, že došlo k vyčerpání primárního zdroje uhlíku, fruktózy. Rychlý nárůst bakteriální kultury by tuto myšlenku mohl potvrdit. Skupina kontrola měla pomalejší růst, jak je zjevné z výsledků v tabulce 5, a maxima koncentrace biomasy i PHB dosáhla šestého dne na rozdíl

od dvou zbylých skupin. Závěrem lze říci, že přítomnost elektrodového systému v médiu má pozitivní vliv na růst bakteriální kultury. Pokud bychom se zaměřili na to, zda byl v tomto pokusu patrný vliv H_2O_2 bylo by to pouze druhý dne kultivace, poté co byl stres aplikován den předtím. Nejvyšší obsah PHB $4,81 \pm 0,18$ g/l je u vzorků stresované skupiny, a to s největším rozdílem oproti jiným dnům kultivace. I z grafu závislosti proudové hustoty na čase (obrázek 11), je zřejmé, že produkce H_2O_2 byla nejvyšší do druhého dne kultivace. Na obrázku 11 lze vidět, že do druhého dne kultivace jsou hodnoty proudové hustoty nejvyšší. Je tedy pravděpodobné, že v tomto čase docházelo k nejvyššímu počtu redukčních reakcí, tudíž bylo vyprodukováno nejvíce H_2O_2 . Ten mohl spustit stresovou odpověď buněk, která ve výsledku způsobila přebytek acetyl-CoA, výchozí sloučeniny potřebné pro PHA syntézu [44].



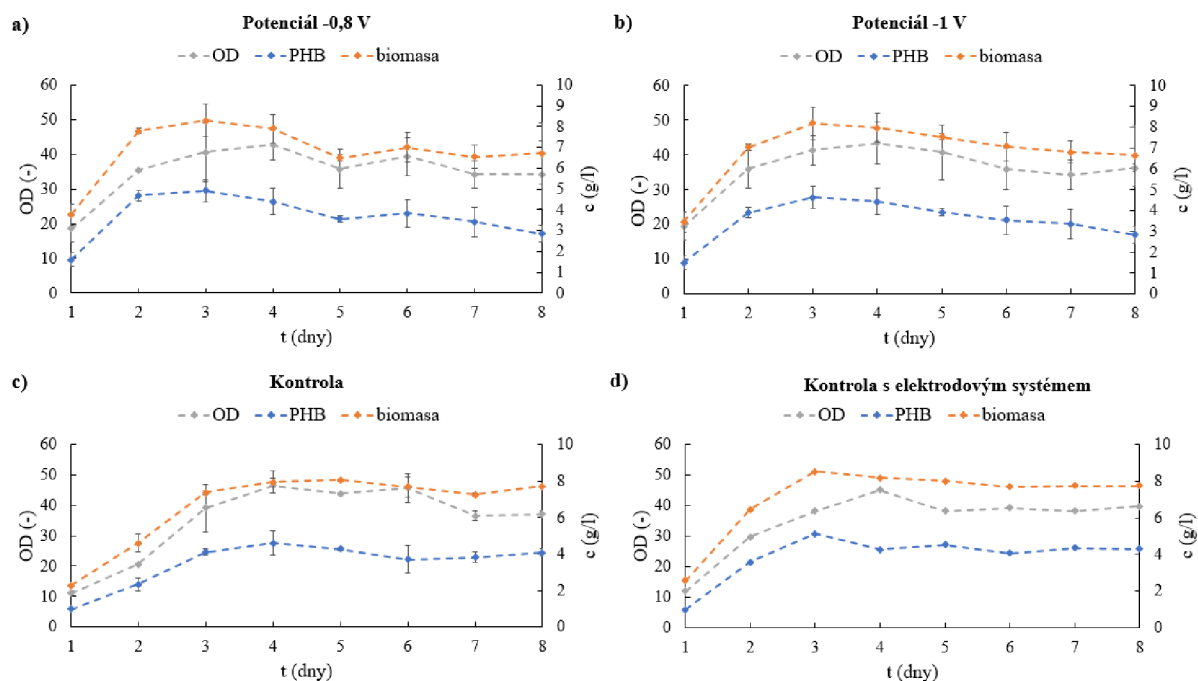
Obrázek 11, graf závislosti proudové hustoty na čase pro médium bez bakterií a s bakteriemi

V rámci experimentu byla rovněž stanovena závislost proudové hustoty na čase pro tento pokus (s bakteriemi) a stejná závislost získaná při měření dlouhodobé produkce H_2O_2 v produkčním médiu bez bakterií (viz obrázek 11). Osa času je uvedena ve dnech od aplikace stresu, což znamená od prvního dne kultivace, kdy zaočkování produkčního média je nulový den. Stres byl tedy aplikován po dobu pěti dní a celková doba kultivace byla šest dní. Jak můžete vidět na obrázku 11 pro médium s bakteriální kulturou, roste proudová hustota do prvního dne po spuštění a poté klesá. Při porovnání křivek média s bakteriemi a bez, je patrné, že médium bez bakterií má výrazně vyšší hodnotu proudové hustoty než médium s bakteriemi. To naznačuje, že u kultivačního pokusu dochází k nižšímu počtu redukčních reakcí. Jedním z možných vysvětlení tohoto poklesu je to, že podmínky kultivace použité bakterie *Cupriavidus necator* H16 jsou aerobní. To znamená, že bakterie ke svému růstu využívají kyslík, jako finální akceptor elektronů v elektron-transportním řetězci. Kyslík v médiu je tedy spotřebováván bakteriálními buňkami, a nemůže být zcela použit

pro produkci H_2O_2 . Tato bakterie může být kultivována i za anaerobních podmínek, ale v tomto experimentu se zaměřujeme pouze na aerobní způsob kultivace [78].

4.2.3 Růst bakteriální kultury za stresových podmínek

Pro zjištění průběhu bakteriálního růstu a ověření již získaných dat při kultivačních experimentech s elektrodovými systémy byl proveden třetí experiment, který probíhal po dobu osmi dní. Pro tento pokus byl použit jak potenciál $-0,8$ V, tak i -1 V. Počet vzorků byl čtyři opakování pro každý potenciál, dvě kultivace pro skupinu kontrola s elektrodami a kontrola bez elektrodového systému. Na následujících grafech (viz obrázek 12a-d) je znázorněn vývoj kultivačního experimentu z hlediska koncentrace biomasy, PHB a optické hustoty pro jednotlivé dny. V průběhu tohoto pokusu bylo zjištěno, že jeden ze systému, na který byl přiváděn potenciál $-0,8$ V má velmi odlišný průběh od ostatních. Po bližším pozorování bylo objeveno, že dochází k aplikaci jiného potenciálu než $-0,8$ V z důvodu poničené referenční elektrody. Tento vzorek byl proto vyřazen a není zahrnut do výsledků. Dalším z vyřazených vzorků byl vzorek ze skupiny kontrola s elektrodovým systémem, a to z důvodu velmi odlišného růstu kultury. Optická hustota tohoto vzorku byla výrazně nižší než u ostatních, stejně tak obsah biomasy. Průběh experimentu pro jednotlivé skupiny je znázorněn na obrázku 12.



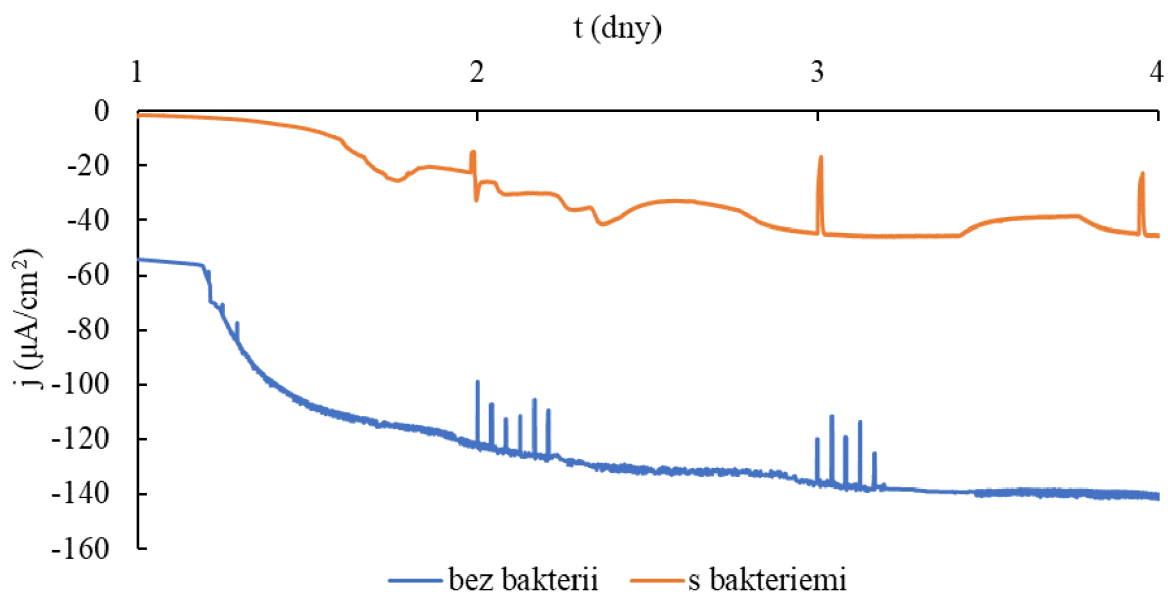
Obrázek 12, graf závislosti optické hustoty, koncentrace PHB a biomasy na čase pro jednotlivé skupiny vzorků.

Růst bakteriální kultury jde nejlépe popsat růstovou křivkou, závislostí počtu buněk na čase, která je rozdělena na několik fází. První z nich je lag fáze, buňky se uzpůsobují novým podmínkám. Poté nastává fáze exponenciální, pro tuto fázi je typický rychlý růst kultury. Následuje fáze stacionární, kdy je počet vznikajících a odumírajících buněk vyrovnán. V této fázi také dochází k syntéze sekundárních metabolitů. Poslední fází je takzvaná fáze odumírání [79]. V rámci této práce je růstová křivka v tomto experimentu závislostí

koncentrace biomasy na čase. Výsledky této kultivace jsou uvedeny na obrázku 12a-d. Pro skupinu -0,8 V je vidět rychlý růst kultury do druhého dne kultivace (viz obrázek 12a). V tento den tedy končí exponenciální fáze růstu a dále nastává stacionární. V této fázi by měla být produkce PHB nejvyšší což také odpovídá, tato fáze trvá od druhého do čtvrtého dne kultivace. Čtvrtého dne je již patrný úbytek koncentrace biomasy i PHB a je zřejmé, že dále dochází již k odumírání buněk takzvaná fáze odumírání. Průběh růstové křivky pro vzorky skupiny potenciál -1 V je odlišný od předchozí skupiny. Exponenciální fáze končí až třetí den a poté se již snižuje koncentrace biomasy v čase, dochází k postupnému odumírání. V důsledku toho stacionární fáze není zjevná pro tuto skupinu. Obsah PHB je nejvyšší též třetí den. Kontrolní skupina by měla mít typický průběh růstové křivky (viz obrázek 12c), exponenciální fáze trvá do třetího dne, a tu následuje stacionární, která trvá až do šestého dne pokusu. Poté je na průběhu křivky patrný pokles koncentrace biomasy odpovídající fázi odumírání. Nejvyšší koncentrace PHB bylo dosaženo čtvrtého dne, tedy ve stacionární fázi. Poslední skupinou je kontrolní skupina s elektrodovým systémem. Jako u předchozí skupiny končí růstová fáze třetího dne. Následuje lehký pokles v koncentraci biomasy a od čtvrtého dne je možné říci, že je koncentrace konstantní. Obě kontrolní skupiny mají od čtvrtého dne relativně konstantní koncentraci biomasy i PHB. U stresovaných skupin je patrný pokles jak v koncentraci biomasy, tak i PHB. Tyto výsledky by mohly potvrdit výše zmíněnou domněnku, že po třetím dni kultivace začínají bakterie rozkládat PHB a vzniklé sloučeniny využívají k ochraně buňky před oxidačním stresem viz kapitola 2.2.2 [46]. Bakteriální buňky tak začínají reagovat na vyšší hladinu stresoru, v tomto případě H_2O_2 . Je možné, že koncentrace H_2O_2 je příliš vysoká a nepodporuje tvorbu PHB, ale spíše jeho rozklad či odumírání buněk.

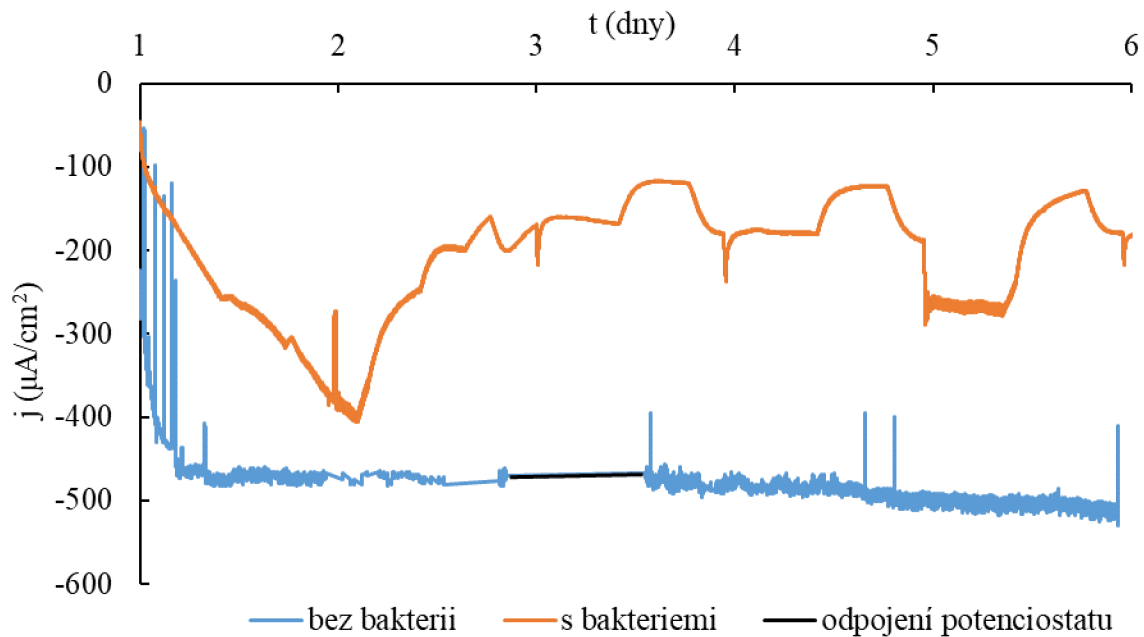
4.2.3.1 Porovnání proudových hustot pro médium s bakteriemi a bez bakterií

V rámci charakterizace kultivací s elektrodovým systémem byly i v tomto případě stanoveny proudové hustoty naměřené pro skupiny potenciál -0,8 V a potenciál -1 V. Obrázek 13 znázorňuje proudovou hustotu získanou pro potenciál -0,8 V v médiu s bakteriemi a bez bakterií. Z průběhu závislosti pro médium s bakteriemi je zřejmé, že proudová hustota roste v čase a okolo druhého dne od aplikace stresu je relativně konstantní. Píky, které se objevují v průběhu křivky jsou přesně v časech, kdy došlo k odběru vzorku a bylo pozastaveno třepání. V porovnání s médiem bez bakterií je jasné, že došlo k poklesu proudové hustoty, a tudíž nedocházelo k takové produkci H_2O_2 jak bylo předpokládáno (okolo $210 \mu M$). Nicméně podle výsledků je možné říci, že koncentrace H_2O_2 se s rostoucím časem zvyšuje. Rovněž lze pomocí proudové hustoty konstatovat, že se počet redukčních reakcí nesnižuje (v průběhu křivky od 3. dne kultivace), tudíž je pravděpodobné, že obsah H_2O_2 je stále stejný. Tato skutečnost by mohla být vysvětlením pro odumírání stresovaných buněk začínající po třetím dni kultivace (viz obrázek 12a-b). Je možné, že bakterie se od třetího dne nedokáží vyrovnat s permanentní přítomností H_2O_2 a začínají umírat.



Obrázek 13, graf závislosti proudové hustoty na čase pro skupinu potenciál $-0,8$ V v porovnání s médiem bez bakterií

Oproti potenciálu $-0,8$ V byl stanoven pro potenciál -1 V úplně jiný průběh této závislosti (viz obrázek 14) Do prvního dne po spuštění stresu proudová hustota prudce narůstá a poté dochází k poklesu. Lze tedy říci, že u vzorků, kde byl aplikován potenciál -1 V dochází rychleji ke spotřebování kyslíku a k vyšší produkci H_2O_2 než u potenciálu $-0,8$ V. Výsledky skupiny potenciál -1 V by měly být nejvíce ovlivněny vznikajícím H_2O_2 . Avšak podobný průběh růstu lze vidět i u skupiny $-0,8$ V, jak bylo popsáno výše. Zde byla také vyjádřena myšlenka, že koncentrace H_2O_2 je v pozdější fázi kultivace příliš vysoká a dochází k odumírání buněk z této příčiny. Ale to, že výsledky stresovaných skupin u obou potenciálů jsou tak podobné této teorii nenasvědčuje. Na základě naměřených proudových hustot je zřejmé (obrázek 13 a 14), že elektroodový systém, na který byl aplikován potenciál -1 V by měl tvořit mnohem více H_2O_2 než ten, kde byl použit potenciál $-0,8$ V. Proudová hustota pro potenciál -1 V se pohybuje v rozmezí -100 až -400 $\mu A/cm^2$, zatímco u potenciálu $-0,8$ V okolo -40 $\mu A/cm^2$. Pravděpodobné tedy je, že na odumírání buněk po třetím dni kultivace nemá vliv koncentrace H_2O_2 , ale spíše vyčerpání fruktózy jakožto zdroje uhlíku pro růst bakterií. Kdyby byl v tomto experimentu více zřejmý vliv H_2O_2 muselo by dojít k nadprodukci PHB, anebo k rychlejšímu odumírání či zpomalení růstu bakteriálních buněk.



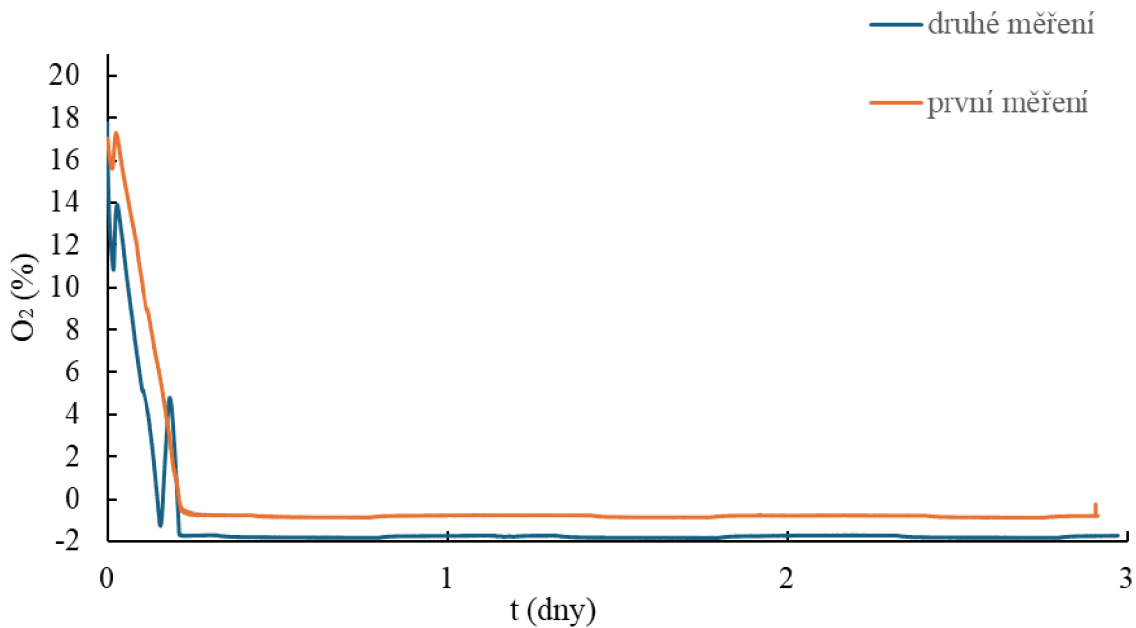
Obrázek 14, graf závislosti proudové hustoty na čase pro skupinu potenciál -1 V s porovnáním s médiem bez bakterií

4.3 Stanovení obsahu kyslíku

Z důvodu výsledků předchozích kultivačních experimentů, bylo rozhodnuto stanovit obsah kyslíku v kultivačním médiu, jelikož je to důležitý faktor pro tvorbu H_2O_2 . Jak již bylo zmíněno v kapitole 4.1 peroxid vodíku je tvořen redukcí kyslíku na pracovní elektrodě, která je zcela ponořena do kultivačního média. Stanovením obsahu kyslíku je tedy možné zjistit kolik H_2O_2 lze maximálně produkovat v kultivačním médiu společně s bakteriemi. Postup, který byl použit pro tento úkol je popsán v kapitole 3.2.8. V médiu je stanoven parciální tlak rozpuštěného kyslíku při atmosférickém tlaku a laboratorní teplotě.

Měření bylo provedeno dvakrát a výsledky jsou znázorněny na obrázku 15. Z grafu je patrné, že na začátku kultivace je obsah kyslíku mezi 14-16 % a postupně klesá až do šesté hodiny kultivace. Poté klesne koncentrace kyslíku na 0 % a zůstane na této hodnotě až do konce kultivace. Přičemž rozdíl mezi jednotlivými měřeními mohl být způsoben kalibrací senzoru, kdy před každým stanovením bylo nutné senzor zkalibrovat. Díky čemuž mohla vzniknout odchylka, jelikož podmínky kalibrace se mohly lišit, zejména laboratorní teplota. Z výsledků je tedy zřejmé, že po šesté hodině kultivace již není žádný kyslík v médiu. Senzor byl umístěn uprostřed média, jak je zobrazeno na obrázku 16. Jak už bylo výše zmíněno, použitý mikroorganismus *Cupriavidus necator* H16 může růst v aerobních i anaerobních podmínkách. Pro anaerobní podmínky je typická dlouhá lag fáze a nízká produkce biomasy [78]. Avšak v průběhu pokusu byl viditelný nárůst kultury toto zakalení média je dobře viditelné na obrázku 16. Na konci obou měření byl také odebrán vzorek pro stanovení koncentrace biomasy. Pro první měření byla koncentrace $7,88 \pm 0,13$ g/l a pro druhé $8,01 \pm 0,28$ g/l. Jelikož kultivační podmínky byly stejné pro tento pokus i pokusy s elektrodovými systémy můžeme porovnat průběh růstu bakteriální kultury pro tento pokus s výsledky

z kapitoly 4.2.3. Zde můžeme vidět růstovou křivku pro kontrolní skupinu na obrázku 12c. Na této křivce není zřejmá dlouhá lag fáze ani nízká koncentrace biomasy. Je tedy možné říci, že se stále jedná o aerobní podmínky. Stanovený nulový obsah kyslíku v médiu by mohl znamenat, že dochází k malé difúzi vzdušného kyslíku do média anebo, že rozpuštěný kyslík je převážně u hladiny či ihned spotřebováván bakteriemi, a proto nelze stanovit. V obou případech nemůže vznikat H_2O_2 redukcí kyslíku, v takovém měřítku, jak bylo očekáváno, jestli vůbec k nějaké produkci peroxidu vodíku v médiu dochází.



Obrázek 15, závislost koncentrace kyslíku na čase



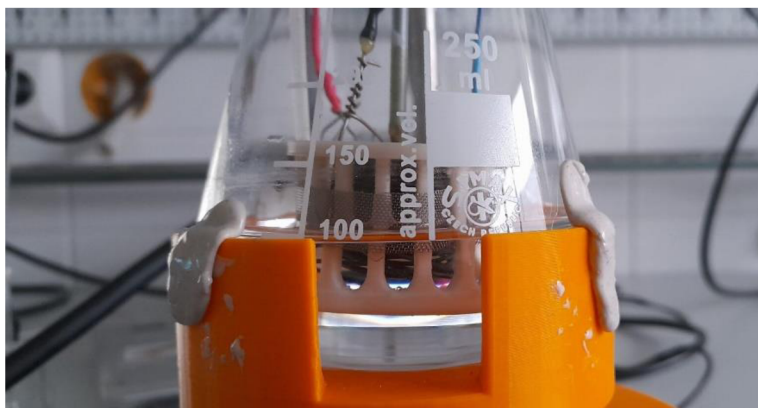
Obrázek 16, měření koncentrace O_2 v průběhu kultivace, černý křížek označuje umístění snímací části senzor

Je tedy otázkou, k jakým reakcím tedy může docházet v kultivačním médiu s bakteriemi, když zde není přítomný kyslík. Podle hodnot proudové hustoty získaných z předchozích experimentů, dochází v kultivačním médiu k redukčním reakcím. Těchto reakcí je však méně než v médiu bez bakterií viz obrázek 13 a 14. Dřívější předpoklad byl ten, že je to z důvodu využívání kyslíku bakteriemi. Tudíž k produkci H_2O_2 není použit veškerý obsah kyslíku, ale pouze ten, který bakterie nespotebují. Nový poznatek o tom, že v médiu pravděpodobně není žádný kyslík tuto myšlenku vyvrací. Jaké další látky by tedy mohly být redukovány v médiu kromě zmíněného kyslíku. Při použití potenciálu -1 V by mohlo docházet k elektrolýze vody, kdy dochází k redukci vody a vývoji vodíku na katodě a oxidaci vody a vývoji kyslíku na anodě. Pokud by v médiu vznikal kyslík a vodík mohlo by docházet k zvýšení koncentrace biomasy v médiu. Neboť kyslík zastává roli finálního akceptoru elektronů a vodík má funkci donoru elektronů u chemolithotrofního metabolismu. Námí zvolená bakterie *Cupriavidus necator* H16 je schopná využívat jak chemolithotrofní, tak i heterotrofní metabolismus. V rámci této práce by to mohlo znamenat, že v případě vyčerpání fruktózy, jakožto organického substrátu pro heterotrofní metabolismus, začne bakterie využívat chemolithotrofní cestu, ve které je zdrojem uhlíku CO_2 [78]. Avšak při porovnání koncentrací biomasy pro stresovanou skupinu a kontrolní skupinu s elektrodovým systémem je zřejmé, že koncentrace biomasy je relativně stejná viz kapitola 4.2.3. Pokud tedy docházelo k elektrolýze vody nebylo to v takovém měřítku, aby to ovlivnilo bakteriální kulturu.

Další možnou reakcí je redukce fruktózy na sorbitol a manitol. Poté jsou v médiu přítomny jen soli a bakteriální buňky, případně odpadní látky vzniklé během bakteriální kultivace. *Cupriavidus necator* H16 není elektro-aktivní organismus, takže je velmi nepravděpodobné, že by docházelo k výměně elektronů s bakteriálními buňkami. Pravděpodobnější je tedy redukce fruktózy na sorbitol a manitol. Ve studii od Creus et. al. z roku 2023 je popsána elektrochemická redukce fruktózy za vzniku sorbitolu a manitolu. V práci byla použita měděná katoda a jednalo se o dvoukomorový článek. Výsledkem této práce bylo navýšení konverze fruktózy na své redukované formy, a to až na 77 %. Použitý roztok měl 0,1 M koncentraci fruktózy v 0,12 M PHB při pH 11,3. Podmínky produkce byly následující proud -20 mA , proudová hustota $-5,3\text{ mA/cm}^2$ a aplikace $1,37\text{ V vs. RHE}$ oxidační pulz po dobu 5 s každých 5 min, ten byl aplikován pro zajištění stability měděné elektrody. V této studii byl použit galvanostatický mód. Výsledkem této studie je, že lze získat sorbitol a manitol elektrochemickou redukcí fruktózy v poměrně vysoké koncentraci [80]. V této práci je použit zcela jiný elektrochemický systém i podmínky. Pro použité materiály nebyl nalezen článek popisující redukční reakce fruktózy, ale je možné že k nim v médiu dochází. Porovnáním proudových hustot v médiu s a bez bakterií je zřejmé, že hodnoty této veličiny narůstají do určitého bodu a poté je proudová hustota relativně konstantní až do konce experimentu. Fruktóza je však využívána bakteriemi pro svůj růst. Takže pokud bychom předpokládali, že hlavní redukční reakce je reakce fruktózy muselo by docházet k poklesu proudové hustoty v čase, z důvodu spotřebování fruktózy pro růst buněk.

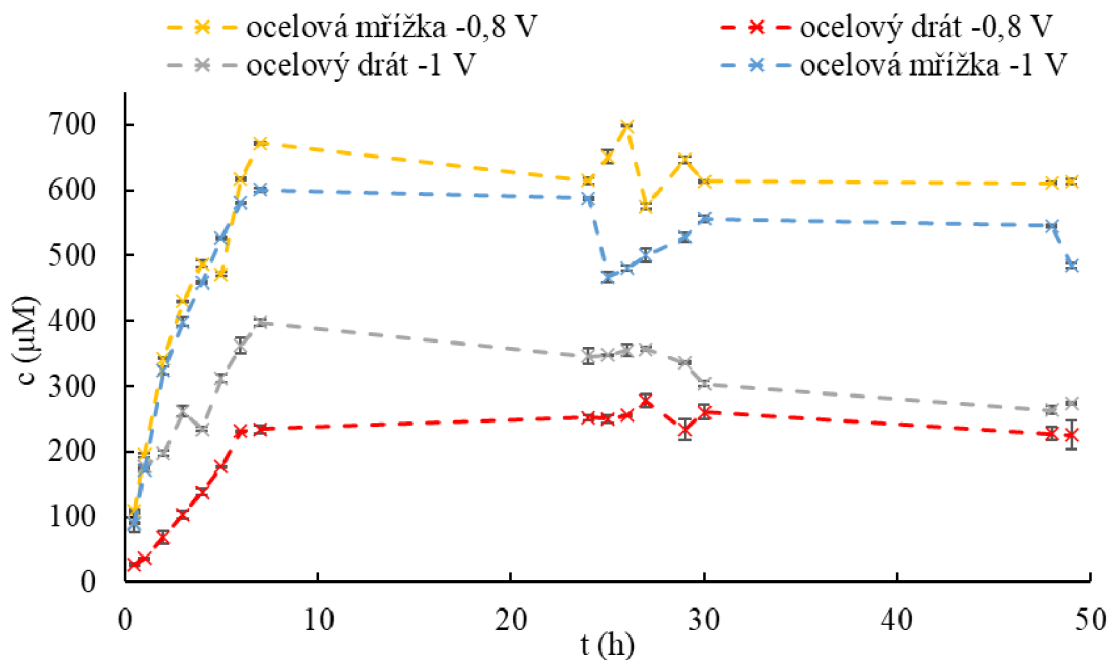
4.4 Nový typ pracovní elektrody

Nový typ pracovní elektrody byl navrhnout díky doposud získaným poznatkům (viz obrázek 17). Bylo zjištěno, že obsah kyslíku je v kultivačním médiu nulový od 6 h kultivace. Nemůže tedy docházet k redukci kyslíku na peroxid vodíku. Proto bylo navrženo vyměnit ocelový drát, jež zastává funkci pracovní elektrody za ocelovou mřížku. Tato mřížka byla v Erlenmeyerově baňce umístěna tak, aby byla z poloviny ponořena v médiu a z poloviny nad hladinou média. Plocha mřížky byla přibližně stejná jako plocha ocelového drátu ve starém systému. Díky míchání na třepačce docházelo k omývání celkového povrchu mřížky, a pro tvorbu H_2O_2 tak mohl být využit i vzdušný kyslík.



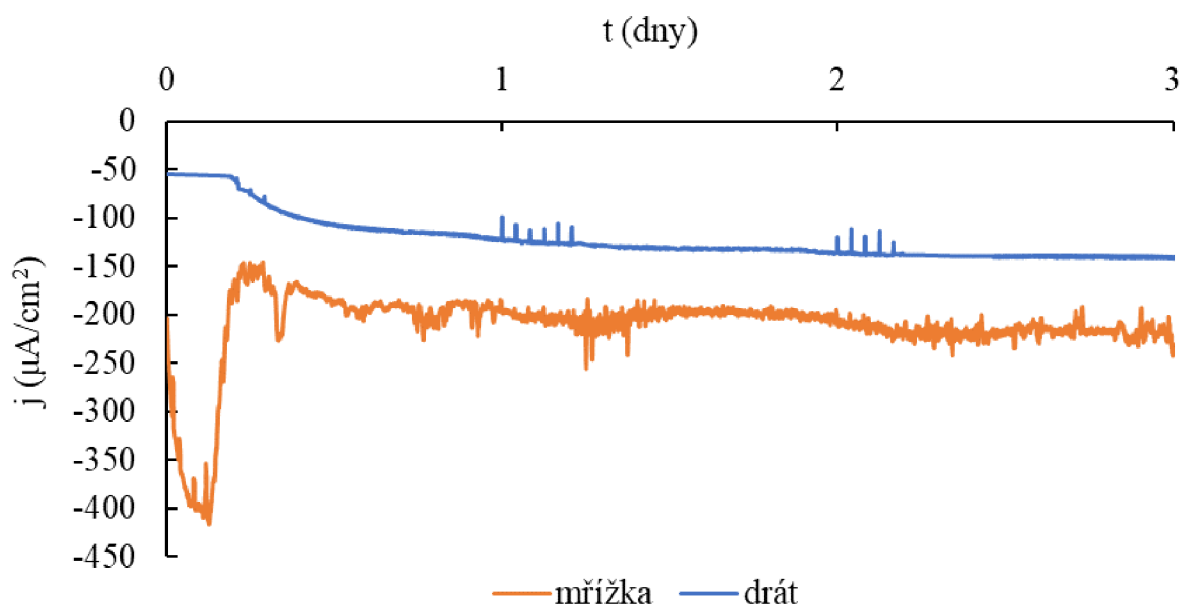
Obrázek 17, nový typ elektrodevého systému s mřížkou ponořenou z poloviny do kultivačního média

U takto obměněného elektrodevého systému byla změřena dlouhodobá produkce H_2O_2 pro potenciál $-0,8\text{ V}$ a -1 V . Výsledky tohoto měření jsou znázorněny na obrázku 18, kde jsou porovnány se starším typem elektrodevého systému. Z grafu závislosti koncentrace na čase je zřejmé, že při použití nového typu elektrodevého systému se zvýší produkce peroxidu vodíku. Konkrétně pro potenciál $-0,8\text{ V}$ se zvýší tvorba H_2O_2 o 61,92 % a pro potenciál -1 V o 41,07 %. Lze tedy konstatovat, že nový typ elektrodevého systému má výrazně vyšší produkci H_2O_2 než předchozí typ. Což znamená, že dokáže využívat vzdušný kyslík pro redukční reakce, jelikož pro potenciál $-0,8\text{ V}$ se koncentrace H_2O_2 pohybuje okolo $650\text{ }\mu\text{M}$ a pro -1 V okolo $600\text{ }\mu\text{M}$. Zajímavé je, že pro starý elektrodevé systém byla koncentrace H_2O_2 v čase vyšší pro potenciál -1 V . Pro nový elektrodevé systém je vyšší při použití potenciálu $-0,8\text{ V}$. Vysvětlením tohoto úkazu je nejspíše to, že potenciál $-0,8\text{ V}$ je lepší pro tento typ redukce kyslíku, kde se využívá i vzdušný kyslík. Proto byl tento potenciál vybrán i pro následující kultivační experiment.



Obrázek 18, závislost koncentrace H_2O_2 na čase pro elektrodový systém s mřížkou a elektrodový systém s drátem pro potenciál $-0,8 V$ a $-1 V$

Rovněž byla pro nový elektrodový systém stanovena závislost proudové hustoty na čase pro potenciál $-0,8 V$ (viz obrázek 19). Roztřepení křivky pro proudovou hustotu u elektrodového systému s mřížkou je způsobeno nedokonalým kontaktem mezi mřížkou a konektorem, jelikož nebylo možné k němu mřížku připájet. Na grafu je zřetelně vidět, že nový typ elektrodového systému má vyšší proudovou hustotu po celou dobu měření, a to až o $100 \mu A/cm^2$. Na začátku měření můžeme vidět rychlý nárůst proudové hustoty, který se poté vrací a zůstává relativně konstantní až do konce měření. Tento nárůst mohl být způsoben tím, že v médiu je na začátku více O_2 a jeho koncentrace se v čase snižuje při produkci H_2O_2 . Další možné vysvětlení by mohlo být, že došlo k úpravě elektrodového systému, a tudíž k posunutí mřížky. Plocha mřížky již nemusela být z poloviny v médiu, ale více než z poloviny. Což by znamenalo, že vzdušný kyslík byl méně využíván pro tvorbu H_2O_2 .



Obrázek 19, graf závislost proudové hustoty na čase pro potenciál $-0,8$ V pro starý (drát) a nový (mřížka) typ elektrodového systému

4.5 Kultivace s novým typem elektrodového systému

Po charakterizaci nového elektrodového systému, na který byl aplikován potenciál $-0,8$ V (viz kapitola 4.4), byl tento systém využit v rámci bakteriálních kultivací za účelem navýšení produkce PHB. A jak již bylo zmíněno výše, tento potenciál byl vybrán z důvodu vyšší produkce H_2O_2 než u potenciál -1 V. V tomto experimentu bylo očekáváno, že bakteriální buňky budou vystaveny vyšší koncentraci H_2O_2 , a tudíž by mohla být pozorována větší stresová odpověď buněk než v předchozích kultivačních experimentech. Pro tento pokus byl postup opět stejný jako v kapitole 3.2.5. Ale bylo dbáno na to, aby se při každém odběru upravil elektrodový systém tak, aby byla mřížka vždy z poloviny v kultivačním médiu. Stresování bylo zapnuto po prvním dni kultivace, jako u předchozích pokusů, aby tyto pokusy mohly být porovnány. Samotný experiment trval sedm dní. Ve skupině s aplikovaným potenciálem bylo šest vzorků, skupina kontrola s elektrodovým systémem měla dva vzorky a kontrola bez elektrodového systému také dva. I v tomto experimentu byly kultivace zkoumány z hlediska OD, koncentrace biomasy a množství naprodukováného PHB (viz tabulka 6).

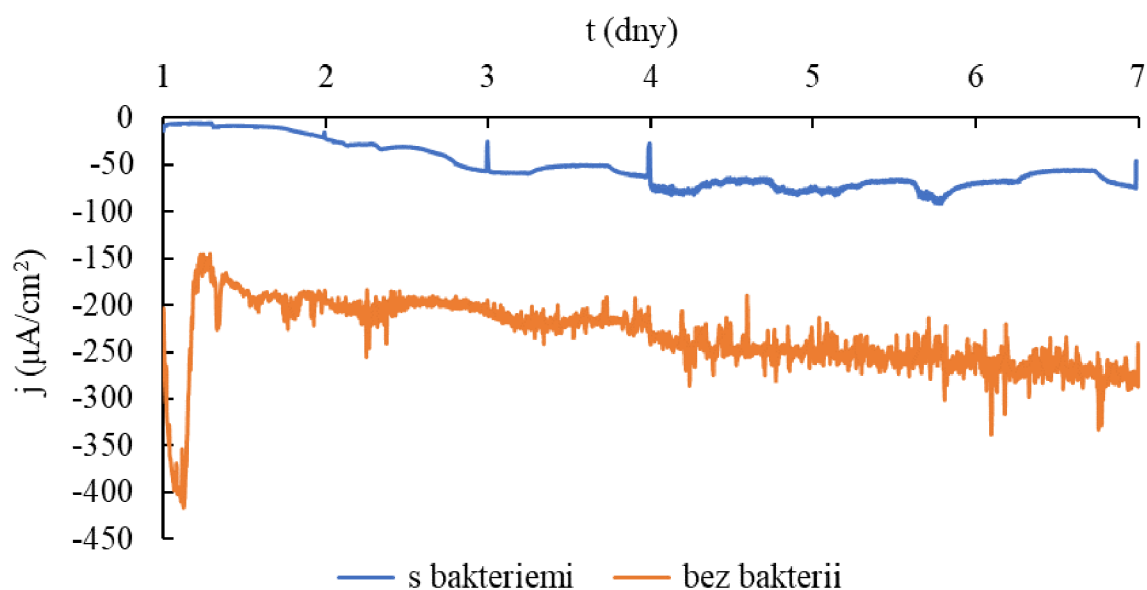
Tabulka 6, výsledné hodnoty optické hustoty, koncentrace biomasy a PHB pro všechny skupiny

parametr	t [dny]	Potenciál $-0,8$ V	Kontrola s elektrodami	Kontrola
OD [-]	1	$20,75 \pm 2,24$	$22,72 \pm 2,40$	$13,78 \pm 0,04$
	2	$37,54 \pm 3,47$	$34,17 \pm 1,31$	$24,78 \pm 2,44$
	3	$47,83 \pm 7,35$	$36,70 \pm 5,83$	$35,20 \pm 2,48$
	4	$43,24 \pm 4,01$	$34,40 \pm 5,01$	$44,53 \pm 5,76$
	7	$46,61 \pm 2,41$	$38,15 \pm 3,83$	$42,88 \pm 2,23$

parametr	t [dny]	Potenciál -0,8 V	Kontrola s elektrodami	Kontrola
Biomasa [g/l]	1	3,57 ± 0,23	3,57 ± 0,25	2,45 ± 0,04
	2	7,44 ± 0,38	7,70 ± 0,25	5,05 ± 0,11
	3	8,50 ± 0,74	6,26 ± 0,48	7,09 ± 0,61
	4	8,07 ± 0,28	6,19 ± 0,51	7,81 ± 1,29
	7	7,24 ± 0,66	5,92 ± 0,57	7,50 ± 0,55
PHB [g/l]	t [dny]	Potenciál -0,8 V	Kontrola s elektrodami	Kontrola
	1	1,43 ± 0,11	1,41 ± 0,05	0,90 ± 0,05
	2	3,67 ± 0,17	3,68 ± 0,07	2,48 ± 0,33
	3	4,34 ± 0,55	2,69 ± 0,39	3,84 ± 0,43
	4	4,03 ± 0,49	2,59 ± 0,46	4,46 ± 0,89
	7	3,63 ± 0,39	2,27 ± 0,76	3,86 ± 0,37

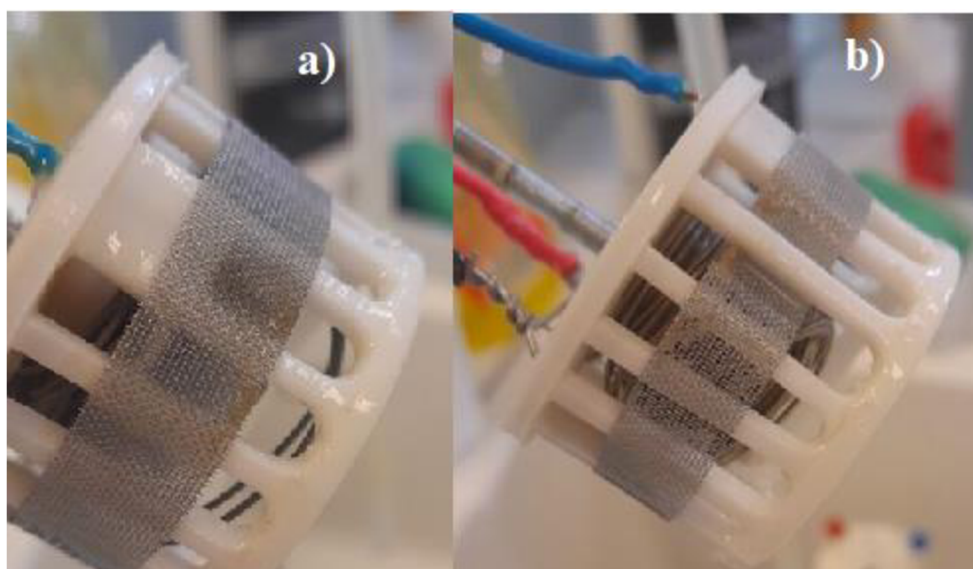
Před aplikací stresu byla koncentrace biomasy stejná pro skupinu potenciál -0,8 V a kontrolu s elektrodovým systémem stejně tak optická hustota a koncentrace PHB. U skupiny kontrola jsou všechny parametry nižší než u dvou ostatních. Opět bylo potvrzeno, že pouhá přítomnost elektrodového systému podporuje růst bakteriální kultury. Nejvyšší koncentrace biomasy a PHB byla stanovena ve třetím dni kultivace pro skupinu potenciál -0,8 V. Poté dochází k poklesu obou koncentrací. Pro skupinu kontrola s elektrodami koncentrace PHB a biomasy dosáhne maxima v druhém dni, a poté dochází k poklesu. Kontrolní skupina má opět pomalejší nárůst a nejvyšší koncentrace PHB dosáhne ve čtvrtém dni kultivace. V tomto pokusu je poprvé patrný vliv H₂O₂. Stresovaná skupina dosáhne ve třetím dni koncentrace 4,34 ± 0,55 g/l PHB. U kontrolní skupiny byl obsah PHB 4,46 ± 0,89 g/l, a to čtvrtý den kultivace. Když porovnáme obě hodnoty PHB je zřejmé, že obsah PHB u kontrolní skupiny je sice vyšší, ale také má vyšší odchylku. Můžeme tedy konstatovat, že použitím nového elektrodového systému dosáhneme vysoké koncentrace biomasy i PHB, a to již třetí den kultivace.

V průběhu experimentu byla měřena i závislost proudové hustoty na čase (viz obrázek 20), kdy médium s bakteriemi má opět nižší proudovou hustotu oproti médiu bez bakterií. Nárůst proudové hustoty je zpočátku pomalý a od čtvrtého dne je již prakticky konstantní. Rozdíl mezi křivkami pro médium s a bez bakterií je skoro o 150 μA/cm². To znamená, že produkce H₂O₂ je opět výrazně nižší než u měření dlouhodobé produkce peroxidu vodíku pro médium bez přítomnosti bakterií.



Obrázek 20, graf závislosti proudové hustoty na čase pro médium s a bez bakterií, použitý potenciál $-0,8\text{ V}$

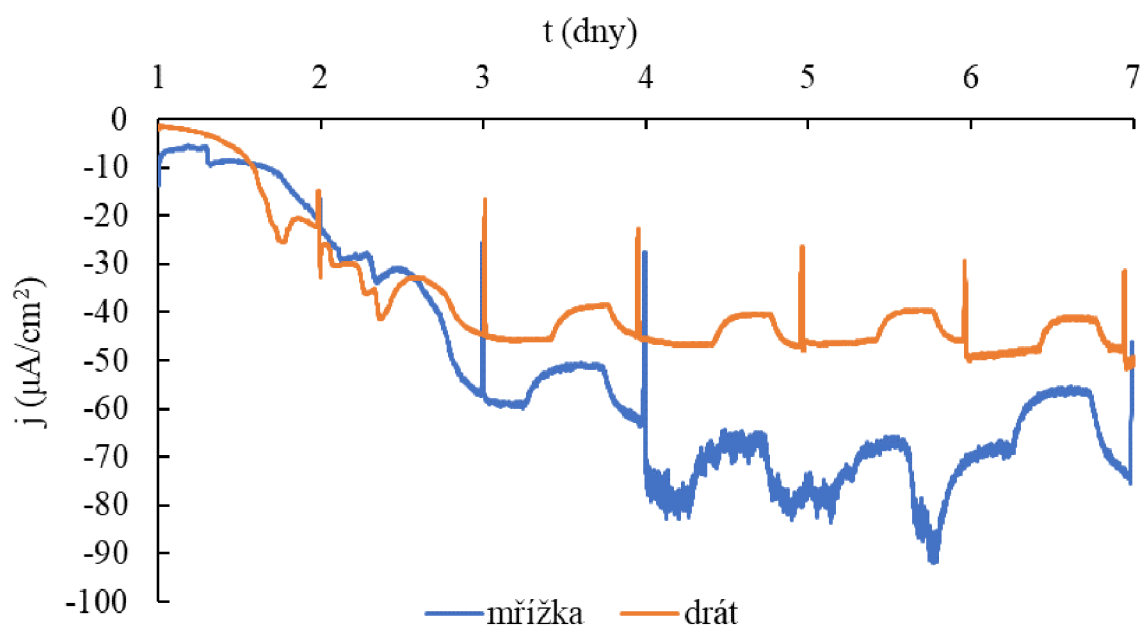
Po ukončení experimentu bylo u některých elektrodo­vých systému objeveno pokrytí mřížky pracovní elektrody bakteriemi. Na obrázku 21 je porovnání elektrodo­vého systému, který produkoval H_2O_2 (obrázek 21a) a dalšího, který sloužil jako kontrola (obrázek 21b). Je zřejmé, že u kontrolní skupiny je pokrytí elektrody bakteriemi hustší. Produkce H_2O_2 tedy elektrodo­vý systém brání proti vzniku biofilmu, ale nedostatečně. I na tomto systému je zřetelné pokrytí biofilmem. U použité bakterie *Cupriavidus necator* H16 není vznik biofilmu typický pro tento typ kultivace [81, 82]. Mohlo tedy dojít k shlukování buněk v mezerách mřížky. Nicméně vznik tohoto pokrytí ať už biofilmu nebo jen shluku buněk, může být zodpovědné za rozdíly ve vzorcích skupiny kontrola s elektrodo­vými systémy.



Obrázek 21, elektrodo­vý systém po ukončení kultivace, a) elektrodo­vý systém na kterém probíhala produkce H_2O_2 b) elektrodo­vý systém kontrolní skupiny

4.5.1 Porovnání kultivace se starým a novým elektrodovým systémem

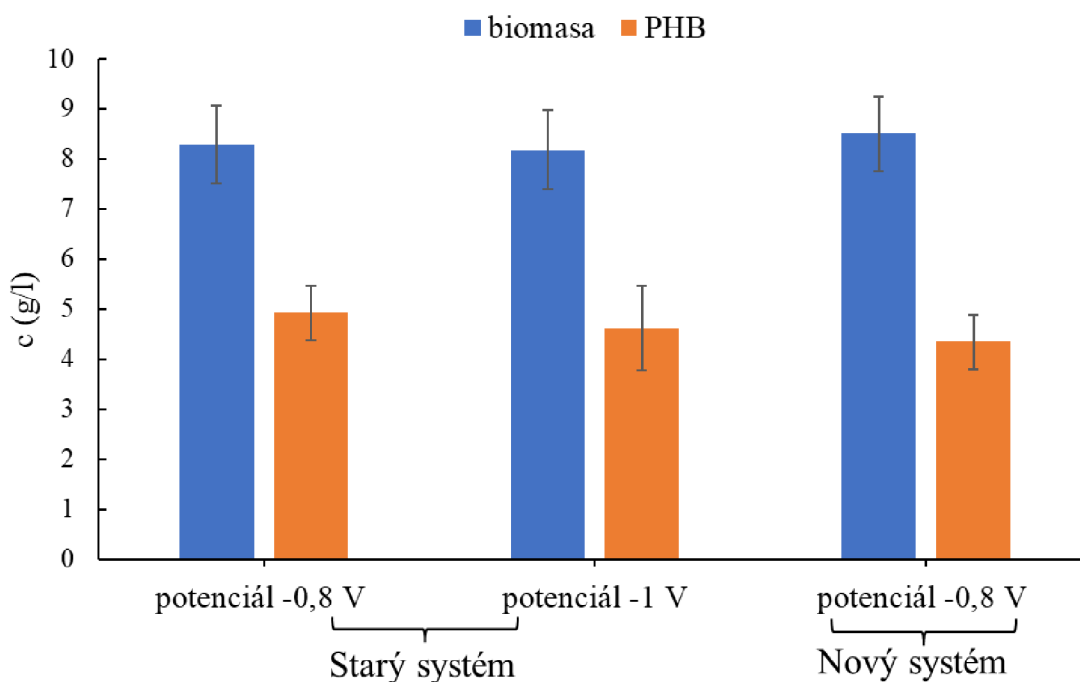
Díky naměřeným datům jsme porovnali proudové hustoty pro experiment s novým a starým typem elektrodových systému (viz obrázek 22). Zajímavé je, že začátek křivky proudové hustoty je pro oba typy systému ve stejném rozsahu. K rozdělení křivek dochází až před druhým dnem od aplikace stresu. Poté je již proudová hustota pro nový systém s mřížkou stále vyšší cca o $20 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. To že od aplikace potenciálu docházelo skoro ke stejnému počtu redukčních reakcí u obou systému by mohlo být vysvětleno následovně. Na obrázku 21 je viditelné pokrytí elektrody bakteriemi. Tím mohlo dojít ke snížení plochy elektrody, a to by vedlo k nižšímu počtu redukčních reakcí. Avšak v průběhu kultivace mohl být biofilm částečně odstraněn vznikajícím H_2O_2 a využitelná plocha pro redukci by se opět zvýšila.



Obrázek 22, závislost proudové hustoty na čase pro pokus s novým typem elektrodového systému a starým typem systému z kapitoly 4.2.3

Z hlediska porovnání produkce biomasy a PHB u vzorků z pokusu se starým a novým systémem, byl vybrán třetí den kultivace, jelikož pro oba pokusy bylo v tuto dobu dosaženo nejvyšší koncentrace PHB a biomasy (viz obrázek 23). Hodnoty pro starý systém jsou z kapitoly 4.2.3. Koncentrace biomasy je nejvyšší pro nový systém ($8,50 \pm 0,74 \text{ g/l}$), poté pro starý s použitým potenciálem $-0,8 \text{ V}$ ($8,30 \pm 0,78 \text{ g/l}$) a nejnižší pro potenciál -1 V u starého systému ($8,19 \pm 0,78 \text{ g/l}$). Avšak tyto rozdíly nejsou nijak významné. To platí i pro obsah PHB. U tohoto parametru je vyšší koncentrace u skupiny potenciál $-0,8 \text{ V}$ pro starý systém ($4,92 \pm 0,54 \text{ g/l}$), poté pro stejný systém potenciál -1 V ($4,62 \pm 0,85 \text{ g/l}$) a nejnižší koncentraci PHB má nový systém s potenciálem $-0,8 \text{ V}$ ($4,34 \pm 0,55 \text{ g/l}$). Tyto výsledky jsou překvapivé zvláště proto, že podle proudových hustot (viz obrázek 22) má docházet k více redukčním reakcím při použití nového systému. Dále bylo při stanovení obsahu O_2 zjištěno, že v médiu žádný kyslík není od 6 h kultivace a potenciál je aplikován až v 24 h. Proto byl navrhnut nový systém, který využívá i vzdušný kyslík k redukci na H_2O_2 . Předpoklad pro tento pokus byl takový, že zde bude vliv H_2O_2 výraznější. Ale výsledky ukazují, že obsah PHB je pro tento

pokus nižší než u předchozích se starým elektrodovým systémem. Je tedy možné, že koncentrace peroxidu vodíku je stále nízká pro spuštění chtěné stresové odpovědi. Která spočívá v tom, že je produkován nadbytek NADPH a dojde tak k zablokování citrátového cyklu. To znamená, že se hromadí acetylCoA, který může buňka využít pro syntézu PHB [44]. Při porovnání výsledku je zjevné, že elektrodový systém musí mít nějaký vliv na bakteriální kulturu i bez produkce H₂O₂. A to hlavně z důvodu rychlejšího růstu kultury.



Obrázek 23, porovnání koncentrace biomasy a PHB pro nový a starý systém

V tomto experimentu bylo zjištěno, že kontrolní skupina s elektrodovým systémem má odlišný průběh růstu od předchozích pokusů. Pro experiment s novým systémem je růst podobný se stresovanou skupinou jen do druhého dne kultivace a poté se zpomaluje. Nejvyšší koncentrace biomasy pro kontrolní skupinu s novým elektrodovým systémem je $7,70 \pm 0,25$ g/l a PHB $3,68 \pm 0,07$ g/l. U kontrolní skupiny se starým systémem byla nejvyšší koncentrace biomasy $8,64 \pm 0,13$ g/l a PHB $5,33 \pm 0,30$ g/l (hodnoty jsou zprůměrované z výsledků kapitoly 4.2.2 a 4.2.3). Možným vysvětlením je použití mřížky jako pracovní elektrody. Je možné, že tvorbou biofilmu či shluků na mřížce se snižuje obsah biomasy v médiu. Tudiž z odebraného vzorku určíme nižší koncentraci, než je opravdová, protože část buněk je zachycená na elektrodovém systému. To také vysvětluje závěr předchozí kapitoly 4.5, kde je uvedeno, že v experimentu s novým elektrodovým systémem byl patrný vliv H₂O₂. Ve zmíněné kapitole je řečeno, že vzorek stresované skupiny má nejvyšší koncentraci biomasy a PHB v porovnání s kontrolní skupinou. Pokud však tyto výsledky porovnáme s kontrolní skupinou se starým elektrodovým systémem je zřejmé, že ani pro nový elektrodový systém není patrný vliv H₂O₂.

4.6 Vliv stáří kultury na stresovou odpověď bakterií

Nový elektroodový systém byl vyzkoušen i s ohledem na stáří kultury a aplikaci vybraného stresu. V tomto případě byl použit stejný potenciál $-0,8\text{ V}$, ale byl aplikován až po 48 h kultivace. Z předchozích výsledků je zřejmé, že kultura má nejrychlejší růst do 48 h a poté se růst zpomalí a nastane stacionární fáze. Aplikací stresu až v stacionární fázi by mohlo dojít k vyšší produkci PHB, pokud bude koncentrace H_2O_2 dostatečná. Jestliže bude generováno malé množství H_2O_2 nebude na průběhu kultivace znatelný žádný rozdíl. Teoreticky by měl nový elektroodový systém produkovat poměrně vysoké množství H_2O_2 a to okolo $650\ \mu\text{M}$ a tuto koncentraci by si měl i udržet. Nicméně v kultivačních experimentech bude koncentrace nižší, protože médium neobsahuje žádný kyslík nebo pouze minimální množství. Je pravděpodobné, že H_2O_2 bude vznikat hlavně z O_2 nad médiem. Počet vzorků v jednotlivých skupinách je šest pro potenciál $-0,8\text{ V}$ a po dvou pro obě kontrolní skupiny.

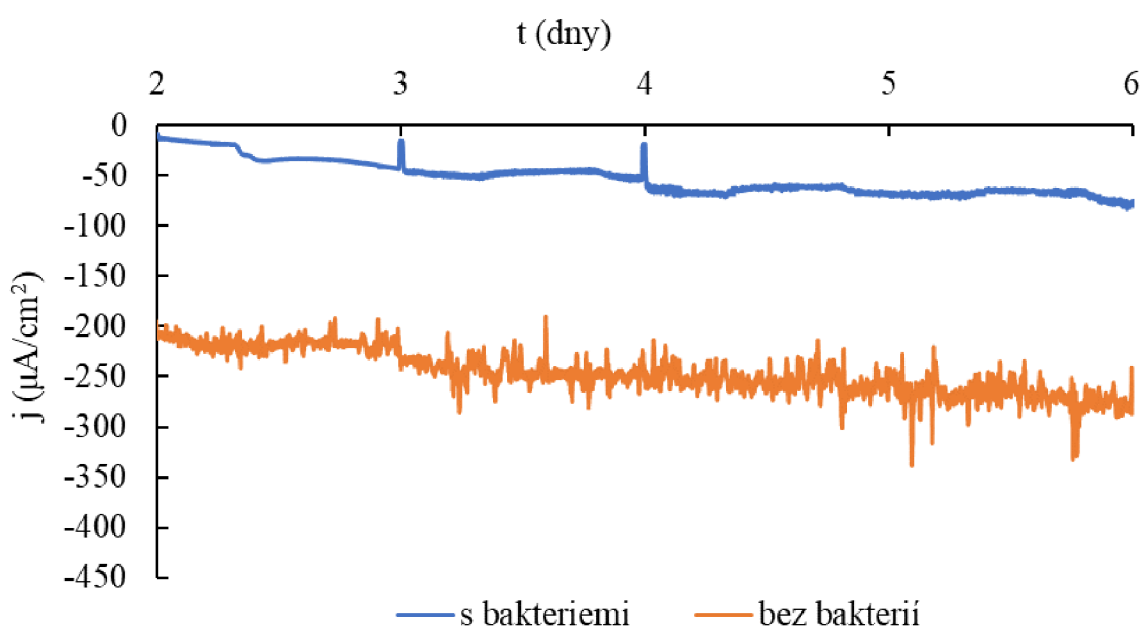
Tabulka 7, hodnoty parametrů pro jednotlivé skupiny vzorků při aplikaci stresu na 48 h starou kulturu

parametr	t [dny]	Potenciál $-0,8\text{ V}$	Kontrola s elektrodami	Kontrola
OD [-]	1	$17,50 \pm 3,53$	$13,38 \pm 0,85$	$9,55 \pm 0,07$
	2	$37,73 \pm 3,07$	$35,68 \pm 4,71$	$28,30 \pm 0,07$
	3	$46,78 \pm 10,01$	$47,13 \pm 0,53$	$48,23 \pm 1,24$
	4	$43,98 \pm 9,35$	$37,98 \pm 5,65$	$41,08 \pm 2,16$
	7	$44,89 \pm 8,90$	$43,93 \pm 12,65$	$38,00 \pm 2,05$
Biomasa [g/l]	t [dny]	Potenciál $-0,8\text{ V}$	Kontrola s elektrodami	Kontrola
	1	$3,71 \pm 0,28$	$3,65 \pm 0,20$	$2,58 \pm 0,17$
	2	$7,29 \pm 0,50$	$6,93 \pm 0,49$	$4,87 \pm 0,28$
	3	$8,24 \pm 0,93$	$7,00 \pm 0,88$	$7,46 \pm 0,05$
	4	$7,73 \pm 0,89$	$7,72 \pm 0,21$	$8,06 \pm 0,61$
	7	$6,92 \pm 0,99$	$6,80 \pm 0,70$	$7,07 \pm 0,44$
PHB [g/l]	t [dny]	Potenciál $-0,8\text{ V}$	Kontrola s elektrodami	Kontrola
	1	$1,44 \pm 0,15$	$1,35 \pm 0,08$	$1,02 \pm 0,20$
	2	$3,69 \pm 0,39$	$3,34 \pm 0,41$	$2,91 \pm 0,41$
	3	$4,19 \pm 0,89$	$3,27 \pm 0,35$	$3,86 \pm 0,08$
	4	$3,59 \pm 0,97$	$3,44 \pm 0,45$	$3,65 \pm 0,45$
	7	$3,20 \pm 0,39$	$1,87 \pm 0,28$	$3,22 \pm 0,30$

Výsledky pro tento pokus pro stresovanou skupinu jsou velmi podobné s předchozím pokusem s novým elektroodovým systémem (viz tabulka 7). Rozdíl je však v kontrolní skupině s elektroodovým systémem, průběh růstu je odlišný od předchozí skupiny. U minulého pokusu se koncentrace biomasy a PHB snižovala od třetího dne, zde dochází k poklesu až sedmého dne. V těchto skupinách by neměl být žádný rozdíl, jelikož byly nachystány úplně stejně. Po ukončení pokusu byly elektroodové systémy prohlédnuty a opět bylo nalezeno pokrytí

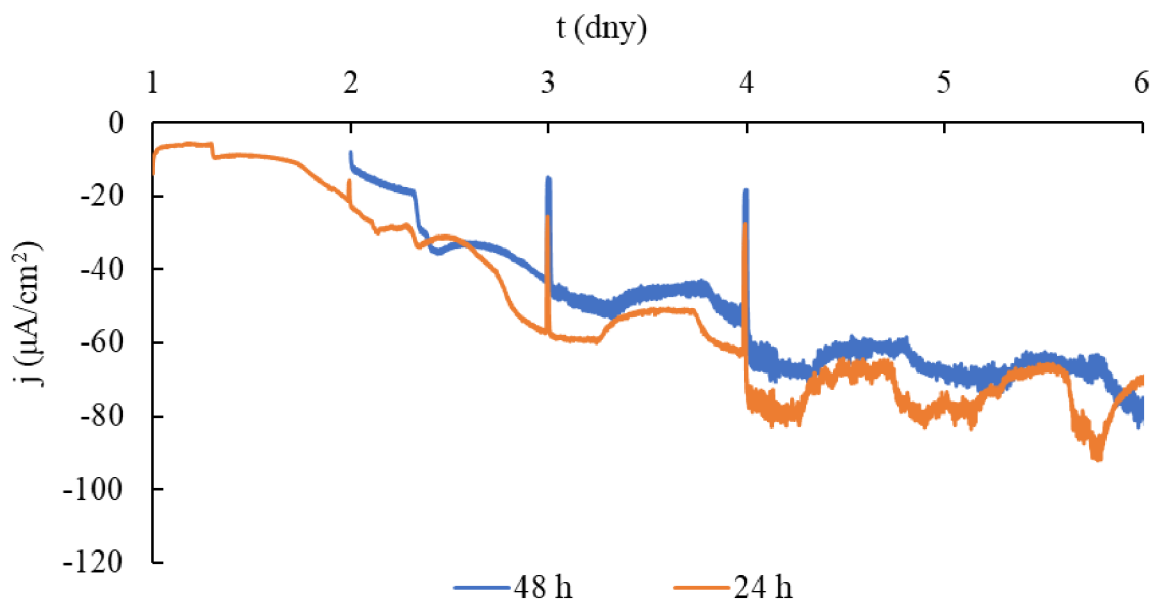
bakteriemi na mřížce pracovní elektrody. To může být jeden z důvodů pro vysokou odchylku u parametru OD, a proto tento parametr není až tak směrodatný.

Při porovnání průměru proudové hustoty tohoto měření a proudové hustoty při stanovení dlouhodobé produkce H_2O_2 , je patrné že hustota u pokusu je znatelně nižší (obrázek 24). Avšak není tak roztřepená což znamená, že zde byl lepší kontakt elektrod. Nižší proudová hustota také znamená, že nedochází k takové redukci jako u pokusu bez bakterií. Možným vysvětlením je, že otáčky na po domácku vyrobené třepačce jsou vyšší než 95 rpm na třepačce použité pro kulturační experimenty, a tudíž dochází k rychlejšímu omývání elektrody a tím k vyšší možnosti redukce vzdušného kyslíku. Druhé možné vysvětlení již bylo popsáno u experimentu výše a to takové, že médium s bakteriemi obsahuje méně O_2 .



Obrázek 24, závislost proudové hustoty na čase pro médium s bakteriemi a bez bakterií

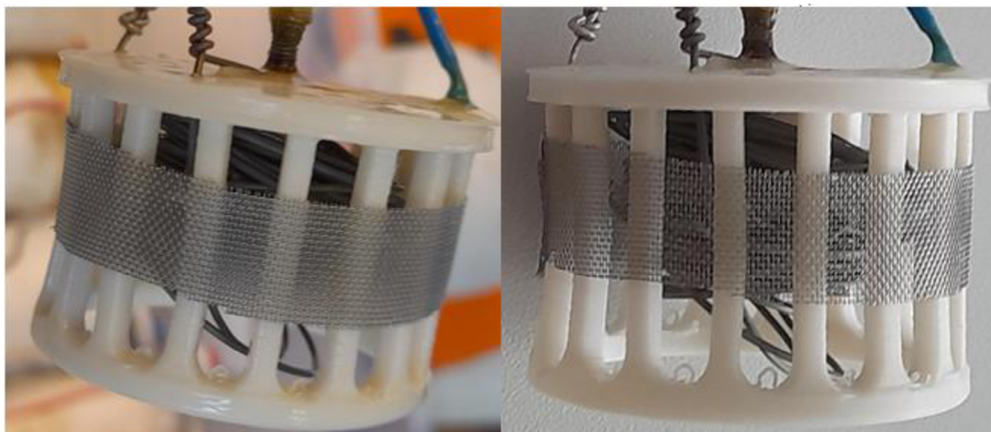
Na obrázku 25 je porovnání proudových hustot pro pokus s novým elektrodoým systémem, kdy byl stres aplikován ve 24 h a 48 h kultivace. Jelikož v jednom z pokusů byl stres aplikován až ve druhém dni kultivace začíná záznam proudové hustoty až od této hodnoty. Doba kdy byl proveden odběr vzorku je opět zřetelná díky píkům vzniklých vypnutím třepačky. Proudová hustota pro obě křivky narůstá až do čtvrtého dne a poté je relativně konstatní. Mezi křivkami je patrný rozdíl v hodnotách proudové hustoty. Pro kultivaci s aplikovaným potenciálem v 24 h je proudová hustota vyšší. V obou měřeních byl použit stejný potenciál a to $-0,8$ V, tudíž tento rozdíl mohl vzniknout jinými podmínkami kultivace. Při aplikaci stresu v 48 h kultivace byla nejvyšší koncentrace biomasy $8,24 \pm 0,93$ g/l a koncentrace PHB $4,19 \pm 0,89$ g/l. V kapitole 4.5 byl stres aplikován v 24 h a nejvyšší koncentrace biomasy byla $8,50 \pm 0,74$ g/l a PHB $4,34 \pm 0,55$ g/l. Aplikací stresu v 48 h získáme nižší koncentraci biomasy i PHB, avšak u těchto vzorků je poměrně vysoká odchylka. Lze tedy říci, že stáří bakteriální kultury nemá vliv na stresovou odpověď bakterií v tomto pokuse.



Obrázek 25, graf závislosti proudové hustoty na čase pro nový systém s aplikací stresu ve 24 h a 48 h

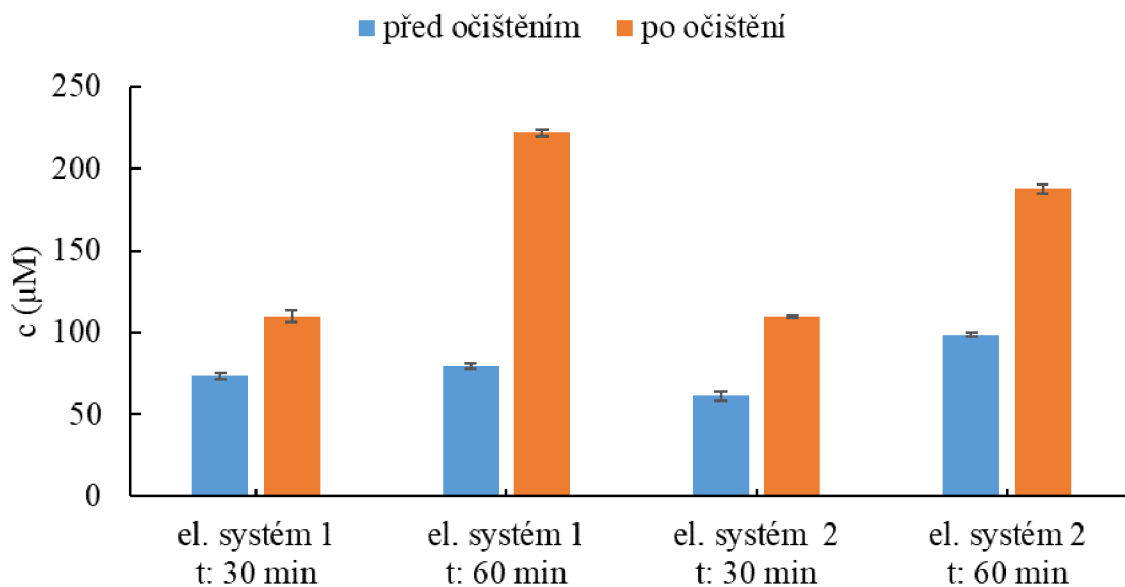
4.7 Vliv nečistot na elektrodoovém systému na produkci peroxidu vodíku

Po ukončení předchozího kultivačního pokusu byla zkoumána čistota elektrodoového systému. Za tímto účelem byly vybrány dva elektrodové systémy a byl proveden pokus generace H_2O_2 v čistém produkčním médiu bez bakterií. Elektrodový systém byl před měřením ponořen do deionizované vody a poté ponechán 24 h při laboratorní teplotě. Následně byl na systém po dobu 1 h aplikován potenciál $-0,8 \text{ V}$ a vzorky pro stanovení koncentrace H_2O_2 byly odebrány po 30 a 60 minutách. Poté byl systém očištěn podle postupu v kapitole 3.2.1 a experiment proběhl znovu nyní již s čistým elektrodoovým systémem. Obrázek 26 ukazuje elektrodový systém před a po očištění. Před očištěním je mřížka viditelně pokrytá bakteriemi (obrázek 26 vlevo), mřížka vypadá rozmazaně. Oproti tomu u čistého systému jsou mezery mřížky dobře rozpoznatelné (obrázek 26 vpravo). Lze tedy říci, že před očištěním byl systém pokryt bakteriemi. Jaký měl tento fakt vliv na produkci H_2O_2 v čistém médiu je znázorněno na obrázku 27.



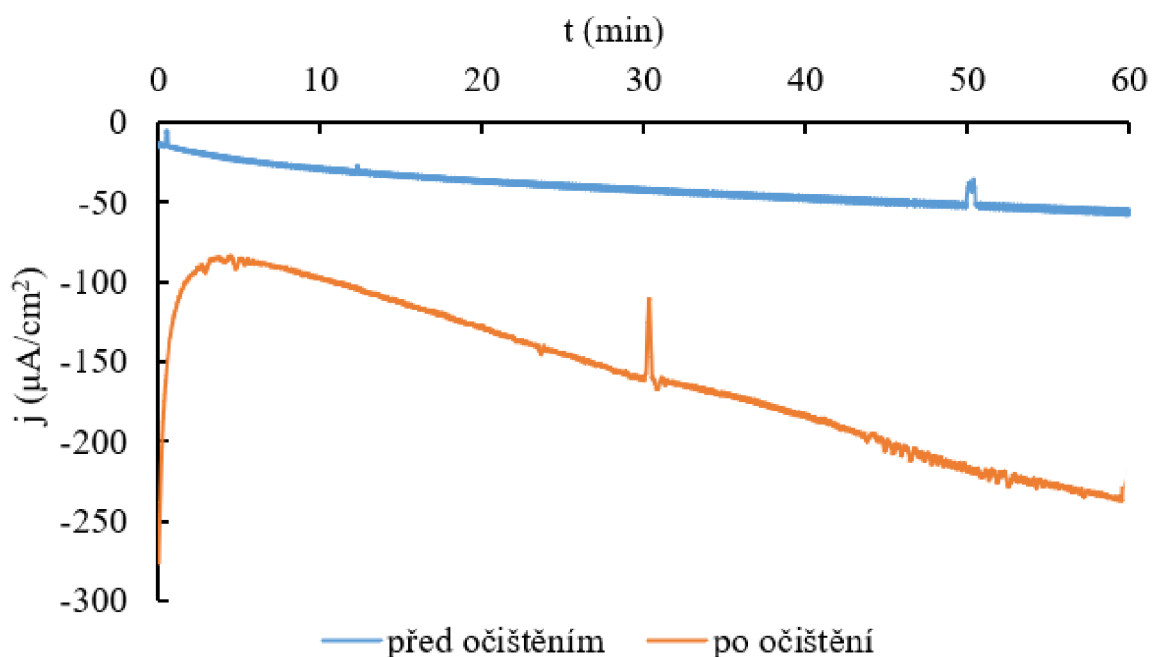
Obrázek 26, elektrodový systém 1 před očištěním a po očištění

Z grafu na obrázku 27 je zřejmé, že tvorba peroxidu vodíku je nižší pro neočištěné elektrody. V případě prvního elektrodového systému nedochází ani k výraznému nárůstu koncentrace H_2O_2 v čase pro neočištěný systém. Po očištění systémů dojde k zvýšení koncentrace H_2O_2 o 64,12 %, u prvního elektrodového systému a o 47,59 % u druhého. Tento rozdíl může být způsobem tím, že i přesto že byly oba elektrodové systémy očištěny stejným postupem, druhý elektrodový systém mohl být hůře očištěn. To by znamenalo, že využitelný povrch elektrody je nižší, a dochází k méně redukčním reakcím. Jelikož se jedná o ruční výrobu každý systém může mít trochu jiné parametry, a to by také mohlo být důvodem tohoto rozdílu.



Obrázek 27, graf koncentrace vyprodukovaného H_2O_2 elektrodovým systémem před a po očištění

S ohledem na čistotu systému byla také stanovena závislost proudové hustoty na čase pro elektrodový systém 1 před a po očištění (viz obrázek 28). Z grafu je patrné, že očištěný systém má mnohem vyšší proudovou hustotu než neočištěný. Pro očištěný systém proudová hustota strmě narůstá, kdežto u neočištěného je také patrný růst, ale mnohem pomalejší. Jedním z možných vysvětlení je, že zbylé kultury se zachytili na elektrodě, uschly na ní, a tím se snížila pracovní plocha. To by mohlo naznačovat vznik biofilmu, avšak u tohoto typu kultivace s touto bakterií to není typické. Druhá možnost je ta, že se nejedná o biofilm, ale pouze o zachycené buňky na mřížce.

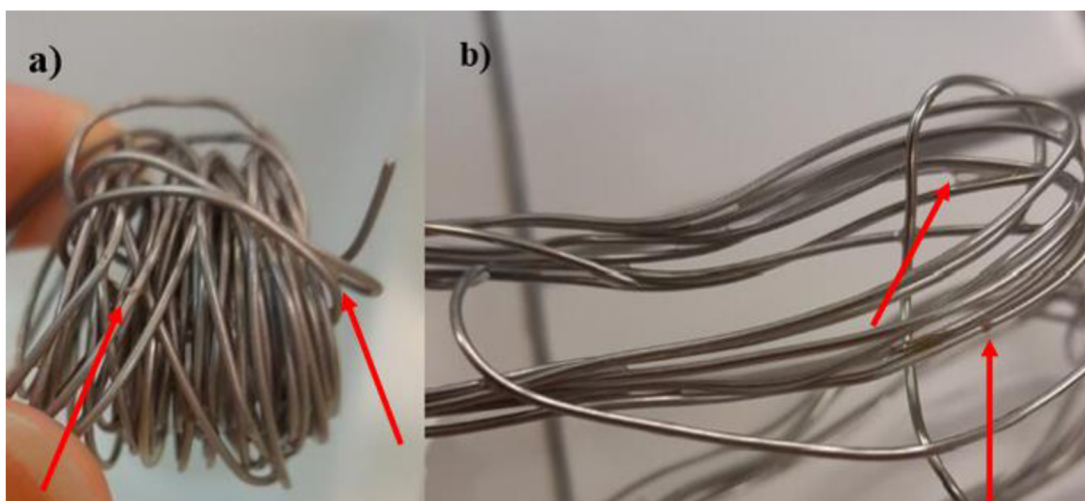


Obrázek 28, závislost proudové hustoty na čase pro elektrodový systém 1 před a po očištění systému

4.8 Vliv použitých materiálů na bakteriální růst

Kultivace s částmi elektrodového systému byla provedena za účelem zjistit, zda materiály použité pro sestavení elektrodového systému neovlivňují nějakým způsobem vývoj bakteriální kultury. Pokus byl proveden dle postupu v kapitole 3.2.5. Tato kultivace proběhla dvakrát a počet vzorků byl dva pro každý materiál a vzorek kontroly. Použité materiály byly titanový drát, drát a mřížka z nerezové oceli 316L, polypropylenový disk, stříbrný drátek a silikonová hadička. Jednotlivé části systému měly stejný povrch jako v elektrodovém systému. Po ukončení pokusu byl z každé Erlenmeyerovy baňky odebrán vzorek pro určení koncentrace PHB a biomasy. Následně byly z baňky vyjmuty jednotlivé součástky a zkontrolovány. Na obrázcích 29-32 jsou části systému, na kterých byla pozorována přítomnost bakteriální kultury.

Na obrázku 29a je titanová elektroda, kde v zákrutech elektrody byly nalezeny shluky bakterií. Je pravděpodobné, že při kultivaci se za pomoci míchaní začaly v zákrutech elektrody zachytávat buňky, a tak vznikly tyto shluky. Stejným způsobem došlo i k uchycení bakterií na elektrodě z nerezové oceli, buňky jsou zde patrné pouze v záhybech drátu či v místech, kde je drát blízko u sebe viz obrázek 29b.



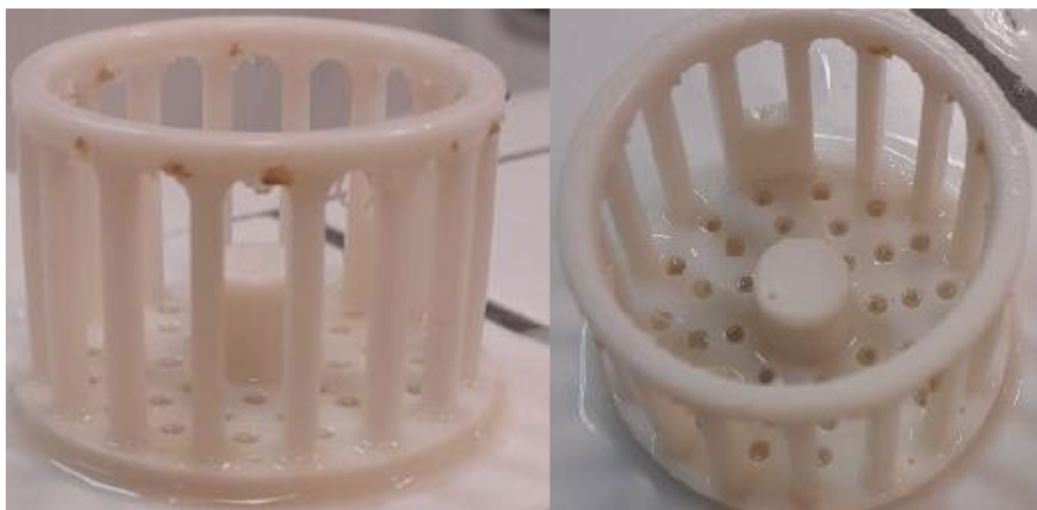
Obrázek 29, a) titanový drát, protielektroda, b) drát z nerezové oceli, pracovní elektroda ve starém elektrodevém systému

Ocelová mřížka použitá pro nový elektrodevý systém jako pracovní elektroda je vidět na obrázku 30. Po ukončení kultivace bylo na mřížce nalezeno velké množství shluků bakteriálních buněk. To bylo očekáváno po výsledcích předchozích experimentů s novým systémem. Z obrázku můžeme říci, že většina shluků je v mezerách mřížky a jsou zde ve větším množství než u předchozích elektrod. Jelikož velikost ok mřížky je ve stovkách μm , může mřížka fungovat jako síto a zachytávat bakterie.



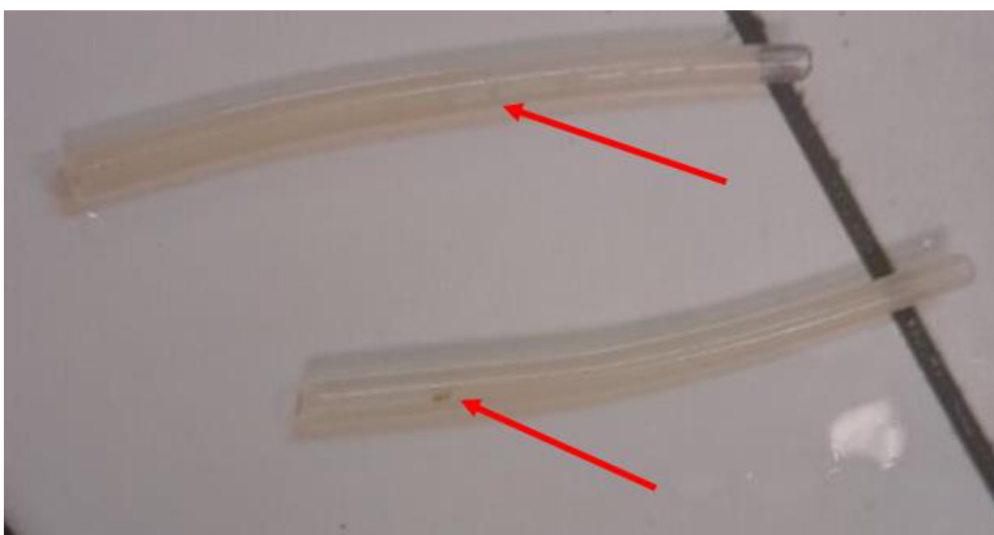
Obrázek 30, ocelová mřížka, pracovní elektroda v novém elektrodevém systému

I na polypropylenovém disku zobrazeného na obrázku 31 jsou velmi dobře viditelná místa, kde jsou uchyceny bakterie. Shluky bakterií jsou pro tento materiál největší v porovnání s ostatními. K přichycení docházelo převážně v hrubých částech polypropylenového disku, které vznikli při 3D tisku.



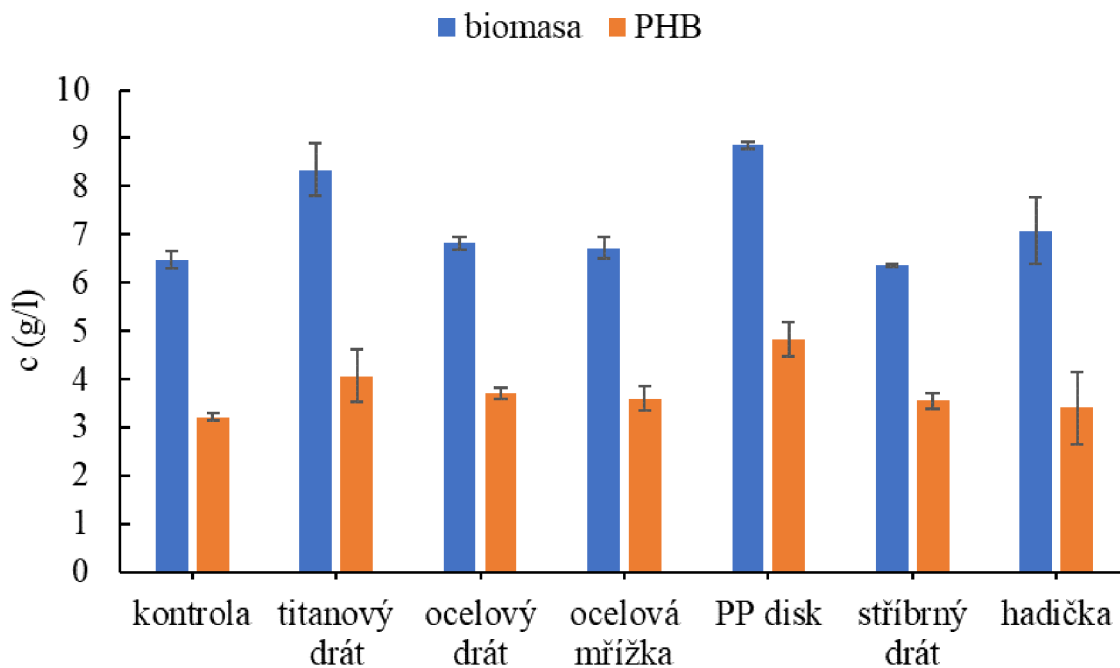
Obrázek 31, polypropylenový disk

Posledním materiálem, na kterém bylo viditelné zachycení buněk byla silikonová hadička, která v pokusech s produkcí H_2O_2 sloužila k odběru vzorku. Shluky bakterií byly nalezeny uvnitř hadičky a pravděpodobně vznikly průtokem média skrz hadičku (viz obrázek 32).



Obrázek 32, silikonová hadička pro odběru vzorku z média

Výsledky koncentrace biomasy a PHB pro vzorky odebrané na konci bakteriální kultivace jsou zaznamenány na obrázku 33. Tyto hodnoty jsou zprůměrované ze dvou kultivací a celkový počet vzorků byl čtyři. Z grafu je patrné, že výrazný nárůst biomasy oproti ostatním vzorkům mají vzorky, kde byl umístěn polypropylenový disk a titanový drát. Pro ocelovou mřížku a drát je koncentrace biomasy nepatrně vyšší než u kontroly. Zatímco při přidání stříbrného drátu je koncentrace biomasy stejná jako u kontroly. Velikost použitého drátu je velmi malá, a proto nikterak neovlivňuje bakteriální kulturu. Kromě částí elektrodového systému byla vložena do kultivačního média i hadička pro odběr a pro ni byla koncentrace biomasy třetí nejvyšší. Tento vzorek má však také nejvyšší odchylku, protože výsledky první a druhé kultivace nebyly velmi podobné. Obsah PHB ve vzorcích je opět nejvyšší u polypropylenového disku, poté u titanového drátu. U ostatních použitých materiálu je obsah PHB velice podobný kontrole.



Obrázek 33, graf zobrazující koncentraci PHB a biomasy v g/l pro 72 h kultivace

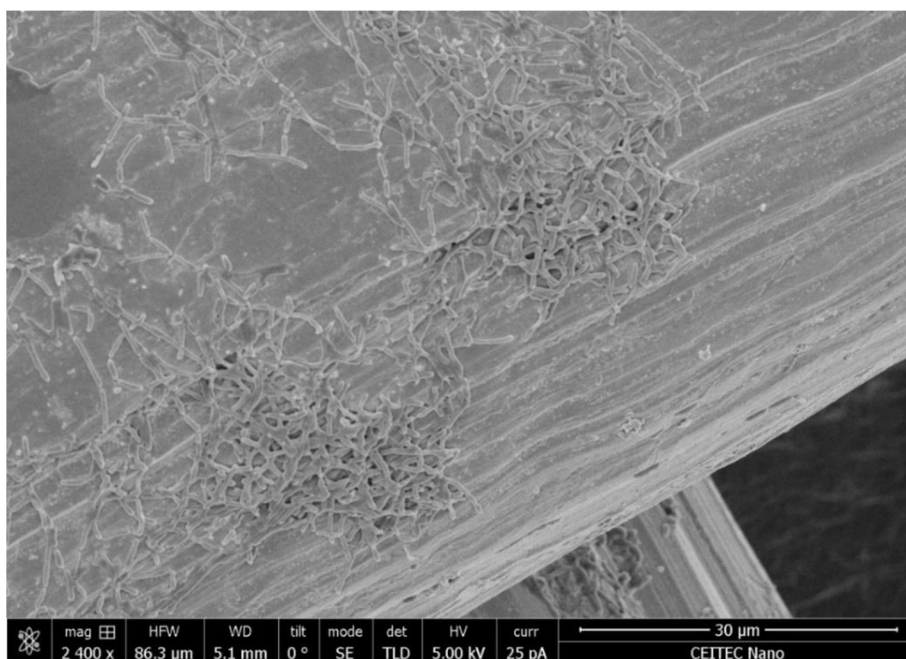
Z obrázku výše (viz obrázek 31) je zřejmé, že polypropylenový disk je nejvíce pokryt bakteriemi a z výsledků (viz obrázek 33) je patrné, že přítomnost PP disku podporuje bakteriální růst. Koncentrace biomasy byla pro PP disk $8,85 \pm 0,06$ g/l a obsah PHB $4,83 \pm 0,35$ g/l. Na titanovém drátu nebylo spatřeno velké množství bakteriálních shluků, avšak i pro tento materiál byl stanoven vysoký obsah biomasy $8,35 \pm 0,55$ g/l i PHB $4,06 \pm 0,55$ g/l. Oba zmíněné vzorky těchto materiálů mají poměrně velký povrch, což by mohl být jeden z důvodů proč je zde vyšší nárůst biomasy, neboť se zde bakterie mohou lépe shlukovat a růst. PP disk má povrch $35,07$ cm² a titanový drát $96,47$ cm². Povrch ocelového drátu i mřížky je roven $27,6$ cm². Není tedy tak velký rozdíl ve velikosti povrchu ocelových elektrod a PP disku. A proto velikost povrchu použité části elektrodového systému není hlavní důvod vyšší koncentrace biomasy a PHB. Dále byl také zohledněn typ materiálu. V předchozí studii od Johnston et. al. z roku 2019 bylo zjištěno, že polypropylen může být použit pro produkci PHA. V této studii byl polypropylenový vzorek upraven termooxidací a následně byl vložen do kultivačního média. Použitý bakteriální kmen pro tuto práci byl *Cupriavidus necator* H16 NCIMB 10442, ATCC 17699. Výsledkem této práce bylo, že upravený PP může sloužit jako další zdroj uhlíku pro růst bakterie [83]. Výsledky kultivací s částmi elektrodového systému ukazují, že nejvyšší koncentrace biomasy i PHB je u PP disku. Jedním z možných vysvětlení je využití PP disku jako dalšího zdroje uhlíku. Jak bylo zmíněno výše lze tohoto dosáhnout jen při úpravě polypropylenového materiálu. V této práci byl polypropylen vystaven pouze sterilizaci v tlakovém hrnci po dobu 30 min. Je tedy nepravděpodobné, že by došlo k narušení jeho struktury. Polypropylenové disky byly také zváženy před a po kultivaci. A jejich hmotnost se nikterak nelišila. Konkrétně byly vzorky zváženy po 72 h sušení. Před prvním vážením PP disku po kultivaci byla jeho hmotnost až o 0,5 g vyšší než u disku před kultivací. Po prohlídce disku byla objevena zaschlá biomasa. Proto byl disk znovu a lépe vyčištěn a usušen, a poté již nebyl rozdíl v hmotnosti disku před

a po kultivaci. Je známo, že polypropylen i titan mají hydrofobní povrch [84, 85]. A bakterie by tak mohly povrch těchto materiálů využít pro tvorbu shluků či biofilmu. To je možné vysvětlit pro vyšší koncentrace biomasy u média s vloženým PP diskem a titanovým drátem. Výše byl zmíněn i vliv velikosti povrchu na růst bakteriální kultury. Pro ocelové materiály je koncentrace biomasy i PHB porovnatelná s kontrolou, avšak jejich povrch je jen o 7,47 cm² menší než povrch PP disku. Aby byla teorie o vlivu velikosti povrchu pravdivá, musel by být větší rozdíl v koncentraci biomasy pro kontrolní vzorek a vzorek s vloženou ocelovou elektrodou. Pravděpodobnější je teorie o povaze povrchu materiálu, protože povrch oceli je hydrofilní na rozdíl od dalších dvou materiálů [86].

4.9 Vznik biofilmu na vybraných materiálech

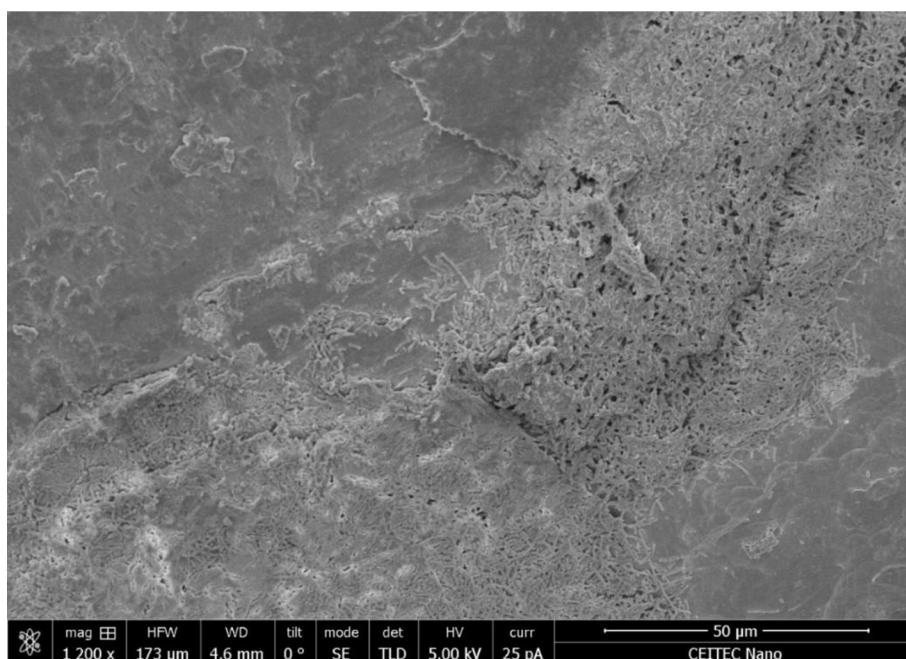
Z předchozích výsledků je zřejmé, že v průběhu kultivace dochází k pokrytí elektrodového systému bakteriemi. Pro potvrzení tohoto tvrzení byly části elektrodového systému pozorovány pod skenovacím elektronovým mikroskopem. Vybrané materiály pro toto měření byly nerezová ocelová mřížka 316L (pracovní elektroda), titanový drát (protielektróda) a polypropylenový disk. Příprava těchto vzorků je popsána v kapitole 3.2.9. Jednotlivé části byly vloženy do produkčního média a kultivace trvala sedm dní. Vzorky byly připravené druhý a sedmý den kultivace.

Druhý den kultivace byly odebrány vzorky elektrodových materiálů, tedy ocelová mřížka a titanový drát. V kultivačních experimentech byl aplikován potenciál až druhý den kultivace. Kdyby byly elektrody pokryty bakteriemi již v této době, vedlo by to ke snížení produkce H₂O₂. Povrch elektrod by byl menší a kyslík by měl méně prostoru pro adsorpci, která je nutná pro jeho úspěšnou redukci na H₂O₂. Na obrázku 34 je SEM snímek ocelové mřížky, na kterém je patrné pokrytí bakteriálním biofilmem. Buňky *Cupriavidus necator* H16 jsou zde dobře rozpoznatelné. Z obrázku je patrné, že se bakterie drží spíše ve skupinách.



Obrázek 34, SEM snímek ocelové mřížky pro druhý den kultivace

Pokrytí biofilmem je zřetelné i na vzorku titanové elektrody na obrázku 35. Na tomto snímku je vrstva bakteriálních buněk poměrně celistvá a pokrývá relativně velkou část elektrody. Můžeme tedy konstatovat, že bakteriální biofilm vzniká již od počátku kultivace, a to jak na pracovní elektrodě (ocelová mřížce) tak i na protielektrodě (titanový drát). Je tedy pravděpodobné, že tento fakt zhoršil produkci H_2O_2 . Také by tím mohl být vysvětlen rozdíl v proudových hustotách pro médium s a bez bakterií viz. kapitola 4.5 a 4.6. Jelikož přítomnost biofilmu způsobila zmenšení povrchu obou elektrod, a tak docházelo k nižšímu počtu redoxních reakcí.

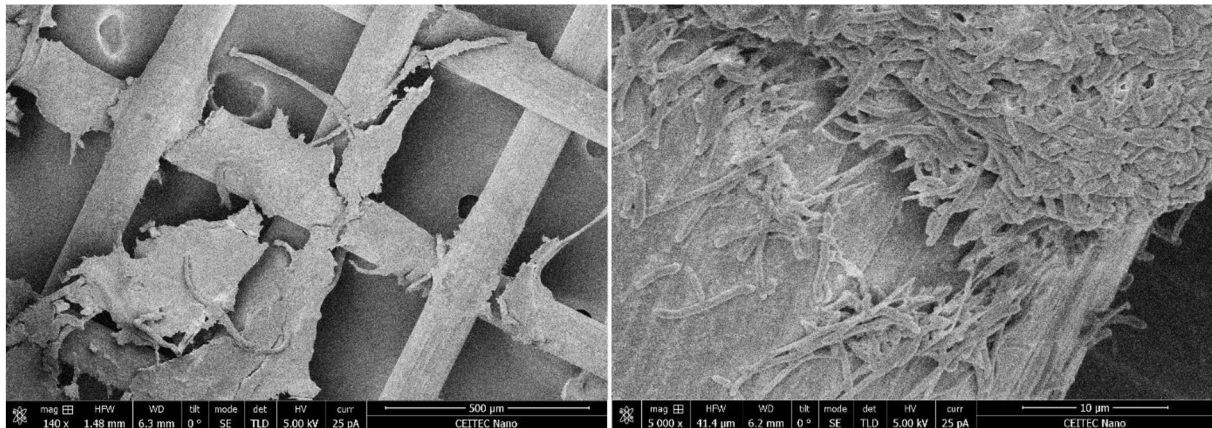


Obrázek 35, SEM snímek titanového drátu pro druhý den kultivace

4.9.1 Pokrytí biofilmem po ukončení kultivace

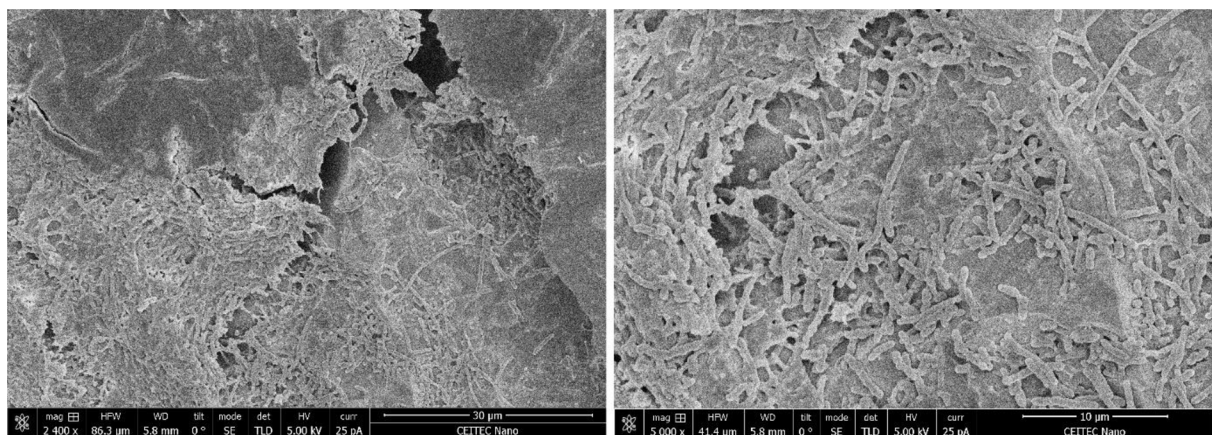
Dále byly charakterizovány vzorky po ukončení kultivace, která trvala sedm dní, a to proto aby byl zjištěn stav biofilmu. Dalším důvodem bylo zjistit, zda dochází k tvorbě biofilmu na polypropylenovém materiálu. V kapitole 4.8. je zkoumán vliv jednotlivých částí elektrodového systému na růst bakteriální kultury. Z výsledků tohoto experimentu je patrné, že nejvyšší koncentrace biomasy i PHB byla u PP disku a poté u titanového drátu. Jedním z možných vysvětlení je vznik bakteriálního biofilmu na povrchu těchto materiálů.

Na prvním snímku ocelové mřížky (viz obrázek 36 nalevo) jsou patrné poměrně velké shluky bakterií na mřížce, tyto shluky byly viditelné pouhým okem na připraveném vzorku. Kromě těchto shluků se zdá povrch mřížky bez pokrytí bakteriemi. Na druhém snímku (viz obrázek 36 napravo) je přiblížený jeden ze shluků bakterií. Z obrázku je patrné, že bakteriální buňky narůstají ve vrstvách na sebe. Na snímku je také zřejmé, že se buňky drží hlavně okolo velkého shluku bakterií a dále je již pouze volná mřížka. Lze tedy říci, že v průběhu času se zvětšuje plocha, kterou bakteriální biofilm pokrývá a také tloušťka tohoto biofilmu.



Obrázek 36, SEM snímek pro nerezovou ocelovou mřížku měřítko 500 µm a 10 µm

Jako druhý materiál byl charakterizován pomocí techniky SEM titanový drát, který byl odebrán z kultivace po sedmi dnech (viz obrázek 37). U přiblížení 30 µm je na povrchu drátu patrné pokrytí bakteriemi, a to zejména ve spodní části obrázku. Bakterie se nacházejí převážně v mnohočetných skupinách, ale jsou zde viditelné i samostatné buňky (viz obrázek 37 nalevo). Na horní části obrázku je viditelná část povrchu titanového drátu bez bakteriálních buněk. Ze snímku lze říci, že titanový drát je pokryt bakteriálním biofilmem, avšak ne zcela. Při přiblížení této části vzorku (měřítko 10 µm) jsou pěkně viditelné jednotlivé buňky (viz obrázek 37 napravo). V porovnání se vzorkem ocelové mřížky je zřejmé, že bakterie zde netvoří takovou vrstvu biofilmu, jinými slovy bakteriální buňky nejsou ve vrstvách. Při pozorování pomocí SEM bylo zřejmé, že pokrytí biofilmem je vyšší u vzorku po ukončení kultivace než u vzorků z druhého dne kultivace.

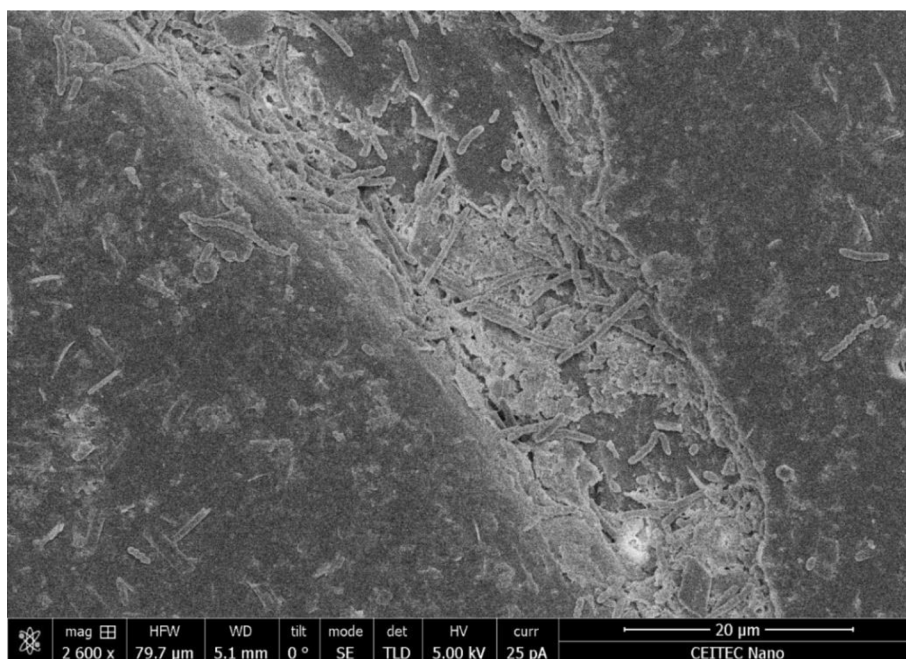


Obrázek 37, SEM snímek pro titanový drát měřítko 30 µm a 10 µm

Posledním z materiálů sledovaným pod skenovacím elektronovým mikroskopem byl polypropylen. Kousky polypropylenu byly pozorovány z důvodu výsledků kultivačních experimentů s částmi elektrodových systémů (obrázek 38). V tomto měření bylo zjištěno, že přítomnost PP disku má pozitivní vliv na růst bakteriální kultury. Jedním z důvodů, proč tomu tak mohlo být je právě tvorba biofilmu.

SEM snímek zobrazuje povrch vzorku polypropylenu (obrázek 38), kde je viditelná přítomnost bakteriálních buněk. Pokrytí je oproti ostatním materiálům nižší a bakterie jsou zde spíše osamocené než ve skupinách. Největší koncentrace bakterií je uprostřed snímku,

kde je viditelná rýha, kterou vyplňují buňky. Na dalších místech jsou již bakterie pouze osamocené a v malém počtu. Je tedy možné, že se bakterie pouze zachytili v této rýze a jinak biofilm na PP netvoří.



Obrázek 38, SEM snímek pro polypropylenový materiál

Závěrem tedy je, že povrch všech vybraných materiálů je pokryt bakteriálními buňkami. To by mohlo znamenat tvorbu biofilmu. Bakteriální biofilm vzniká dvoustupňovým procesem. V prvním kroku dochází k reverzibilnímu připojení buněk pomocí hydrodynamických a elektrostatických interakcí. Druhý krok je již ireverzibilní a buňky jsou k povrchu připojeny van der Waalsovými vazbami. Tvorbu biofilmu usnadňují také buněčné extracelulární orgány (bičíky, pili) a extracelulární polymerní látky. Dalším z faktorů ovlivňující vznik biofilmu je charakter a velikost povrchu. Biofilmy dobře vznikají na hydrofobním materiálu, který má velký povrch [87]. Jak již bylo zmíněno u bakterie *Cupriavidus necator* H16 je tvorba biofilmu při chemoorganotrofních podmínkách nepravděpodobná. Avšak na všech vzorcích bylo pozorováno částečné pokrytí bakteriemi. Lze tedy říci, že došlo k tvorbě biofilmu na těchto materiálech. Dalším vysvětlením by mohla být nesprávná příprava vzorku pro SEM pozorování, a to hlavně nedokonalým opláchnutím vzorků před fixací glutaraldehydem. Avšak části povrchu bez bakterií nasvědčují tomu, že vzorky byly správně připraveny. Kdyby bylo na povrchu vzorků stále přítomné kultivační médium byl by povrch zcela pokryt bakteriemi. Pro titanový drát a ocelovou mřížku je pokrytí bakteriemi výraznější. Na povrchu ocelové mřížky je přítomno nejvíce velkých shluků buněk. K jejich tvorbě zřejmě došlo kvůli vlnitému povrchu mřížky, díky čemuž je zde více částí, kde se mohou bakterie zachytit. V kapitole 4.8 je popsán vliv částí elektrodového systému na růst kultury. Nejlepších výsledků koncentrace biomasy i PHB dosáhl vzorek s vloženým PP diskem a poté titanovým drátem. Oba vzorky měly poměrně velký povrch. Bakterie měly více místa pro interakce s povrchem daných vzorků. Bylo prokázáno, že na titanovém drátu vzniká biofilm což by mohl být důvod zvýšené koncentrace biomasy a PHB. U polypropylenového disku bylo zjištěno, že bakterie také tvoří biofilm, ale pouze na nerovném povrchu způsobeném 3D tiskem.

5. Závěr

Cílem této diplomové bylo navýšit produkci PHA aplikací oxidativního stresu. Zvýšená produkce PHA je vyvolána stresovou odpovědí bakteriální buňky. Při vystavení buňky optimálnímu množství oxidačního stresu, začne daná buňka akumulovat NADPH. Nadbytek této sloučeniny zablokuje citrátový cyklus a v buňce se hromadí acetyl-CoA, což je výchozí látka pro syntézu PHA. Je známo, že polyhydroxyalkanoáty mají nejen zásobní, ale i ochrannou funkci. Při vystavení stresovým podmínkám, může také dojít k degradaci PHA na monomery či oligomery a ty chrání buňku před daným stresorem. V této práci byl jako stresor použit H_2O_2 tvořený přímo v kultivačním médiu, a to elektrochemickou redukcí kyslíku. Práce je rozdělena na elektrochemickou část, která se zabývala výrobou a charakterizací elektrodového systému schopného produkovat H_2O_2 při kultivačních podmínkách. Biotechnologická část se věnovala aplikaci tohoto systému při bakteriálních kultivacích.

V rámci práce byl sestaven elektrodový systém složený ze tří elektrod, a to pracovní nerezové ocelové elektrody, titanové protelektrody a pseudoreferenční Ag/AgCl elektrody. Elektrody byly vloženy do polypropylenového držáku, aby nedošlo k jejich zkratu. Takto sestavený systém byl charakterizován pro řadu potenciálů v produkčním médiu. Následně byl vybrán potenciál $-0,8\text{ V}$ a -1 V , u kterých byla stanovena produkce H_2O_2 v čase. Koncentrace H_2O_2 pro potenciál $-0,8\text{ V}$ se v čase pohybovala okolo $250\text{ }\mu\text{M}$ a pro potenciál -1 V mezi $270\text{--}400\text{ }\mu\text{M}$. Takto sestavený a charakterizovaný systém byl poté použit v kultivačních experimentech.

V rámci kultivací byl použit bakteriální kmen *Cupriavidus necator* H16. V počátečních kultivačních pokusech bylo zjištěno, že elektrochemická produkce H_2O_2 při aplikaci potenciálů $-0,8\text{ V}$ a -1 V je nedostatečná. Nedochozí k vyvolání chtěné stresové odpovědi, která vede k nadprodukcí PHB. Koncentrace biomasy a PHB u stresovaných skupin se výrazně nelišila od kontrolní skupiny s elektrodovým systémem. A ani nebyl patrný rozdíl mezi skupinami s aplikovaným potenciálem $-0,8\text{ V}$ a -1 V . Viditelný rozdíl byl mezi kontrolní skupinou a skupinami s vloženým elektrodovým systémem. Lze tedy říci, že samotná přítomnost elektrodového systému má vliv na růst bakteriální kultury a produkci PHB. Při bližším studiu bakteriálního růstu bylo zjištěno, že od 72 h klesá koncentrace biomasy a PHB pro stresované skupiny. To však pravděpodobně nebylo způsobeno přítomností H_2O_2 , ale vyčerpáním uhlíkového substrátu, jelikož je tento pokles patrný i u kontrolní skupiny s elektrodovým systémem.

Protože v dosavadních pokusech nebyl zjištěn vliv H_2O_2 , bylo rozhodnuto stanovit obsah kyslíku v kultivačním médiu. Bylo zjištěno, že po šesti hodinách kultivace klesne koncentrace O_2 na nulu a zde i zůstane. Bakteriální kmen *Cupriavidus necator* H16 použitý v této práci může žít za aerobních i anaerobních podmínek. Avšak při anaerobním růstu je koncentrace biomasy velmi nízká. Z průměrných výsledků koncentrace biomasy $7,95 \pm 0,09\text{ g/l}$ je však zřejmé, že růst kultury nebyl nijak ovlivněn. Proto můžeme tvrdit, že v médiu je obsažen kyslík, avšak není možné jej detekovat senzorem umístěným ve středu média, protože je spotřebován u hladiny média. Z proudových hustot získaných z kultivačních experimentů je zřejmé, že proudové hustoty média s bakteriemi jsou značně nižší než u média bez bakterií. Dochází tedy k redukčním reakcím, ale v nižším měřítku. Kromě kyslíku by mohla být také redukována fruktóza, která byla použita jako uhlíkový substrát. Avšak proudová hustota

v čase roste a koncentrace fruktózy bude v průběhu času klesat z důvodu využití bakteriemi. Další možností je elektrolyza vody, která by mohla nastat při použití potenciálu -1 V, avšak tato reakce nebyla nijak prokázána.

Kvůli předchozím zjištěním byl navrhnout nový elektrodový systém. V tomto systému byla pouze zaměněna pracovní elektroda za nerezovou ocelovou mřížku. Díky této výměně došlo k navýšení produkce H_2O_2 o 61,92 % pro potenciál $-0,8$ V. Nový systém mohl využívat vzdušný kyslík pro redukční reakci. Tento elektrodový systém byl otestován v kultivačním experimentu. Výsledky tohoto experimentu byly velmi podobné s experimentem se starým elektrodovým systémem, koncentrace biomasy byla $8,50 \pm 0,74$ g/l a PHB $4,35 \pm 0,55$ g/l, a to pro 72 h. Pro starý systém byla při použití potenciálu $-0,8$ V koncentrace biomasy $8,30 \pm 0,78$ g/l a PHB $4,94 \pm 0,54$ g/l a při aplikaci potenciálu -1 V byl obsah biomasy $8,19 \pm 0,78$ g/l a koncentrace PHB $4,62 \pm 0,85$ g/l (výsledky z kapitoly 4.2.3) pro 72 h kultivace. Při porovnání proudových hustot však bylo zjevné, že nový systém má vyšší proudovou hustotu, a tedy zde dochází k vícero redukčním reakcím. Koncentrace H_2O_2 zde musela být vyšší, avšak stále nedostatečná pro stimulaci bakteriálních buněk k nadprodukcí PHB. Dále byl testován vliv stáří kultury na stresovou odpověď. V tomto pokusu byl použit nový elektrodový systém, na který byl aplikován potenciál $-0,8$ V a to ve 48 h kultivace namísto 24 h. Nicméně výsledky pokusu nepotvrdily výrazný rozdíl v aplikaci stresu u různě starých bakteriálních kultur s ohledem na produkci PHB.

Při použití nového elektrodového systému bylo pozorováno pokrytí mřížky pracovní elektrody bakteriemi. Zda se tento materiál pokrývá biofilmem či se jednalo pouze o zachycené buňky na mřížce bylo zjištěno pomocí SEM. Jak na pracovní, tak i na protielektrodě bylo patrné pokrytí bakteriemi, a to již v 24 h kultivace. Stanovení biofilmu v průběhu kultivačních experimentů s tvorbou H_2O_2 nebylo provedeno, ale z obrázků pořízených na konci kultivace i výsledkům měření z kapitoly 4.7 je možné říci, že i v těchto experimentech byla elektroda pokryta biofilmem. Vznik biofilmu je překvapivý, protože u bakterie *Cupriavidus necator* H16 by nemělo docházet k jeho vzniku. Dále byl pozorován vliv materiálů částí elektrodového systému na bakteriální kulturu. Bylo zjištěno, že PP disk a titanový drát mají pozitivní vliv na růst kultury. Ten mohl být způsobem interakcí bakterií s povrchem těchto materiálů. Pro PP disk byla koncentrace biomasy $8,85 \pm 0,06$ g/l a PHB $4,83 \pm 0,35$ g/l. U titanového drátu byla koncentrace biomasy stanovena na $8,35 \pm 0,55$ g/l a koncentrace PHB na $4,06 \pm 0,55$ g/l.

Závěrem lze tedy říci, že v práci nebylo dosaženo nadprodukce PHA vlivem elektrochemicky tvořeného peroxidu vodíku. A to z důvodu nízké produkce peroxidu vodíku zvláště kvůli nízké koncentraci O_2 v médiu. Dalším důvodem je, že díky pokrytí elektrod biofilmem se zmenšil povrch elektrod, a tudíž i volná plocha pro adsorpci kyslíku pro vznik H_2O_2 . Což vedlo k nižší tvorbě H_2O_2 , než bylo předpokládáno. Druhým důvodem je obecně známý fakt, že bakterie tvořící biofilm jsou odolnější vůči stresu. Pro budoucí pokusy by bylo dobré vybrat materiál, na kterém nebude vznikat bakteriální biofilm jako je například PEDOT:PSS. Pokud by ani s tímto materiálem nebyl patrný vliv elektrochemicky generovaného peroxidu vodíku dal by se elektrodový systém využít i jiným způsobem, a to například pro úpravu pH média či tvorbu jiných sloučenin pomocí redoxních reakcí např. chlornanu. Přínosem této práce by mohla být tvorba biofilmu bakterie *Cupriavidus necator* H16 na titanu a nerezové oceli. Pokud by tato bakterie opravdu tvořila biofilm na těchto materiálech, bylo by možné toho využít v procesu elektro-fermentaci za účelem tvorby nových látek.

6. Citace

- [1] SCHIEVANO, Andrea; PEPÉ SCIARRIA, Tommy; VANBROEKHOVEN, Karolien; DE WEVER, Heleen; PUIG, Sebastià et al. Electro-Fermentation – Merging Electrochemistry with Fermentation in Industrial Applications. Online. *Trends in Biotechnology*. 2016, roč. 34, č. 11, s. 866-878. ISSN 01677799. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.007>. [cit. 2024-04-20].
- [2] CHAI, Jun Meng; AMELIA, Tan Suet May; MOURIYA, Govindan Kothandaraman; BHUBALAN, Kesaven; AMIRUL, Al-Ashraf Abdullah et al. Surface-Modified Highly Biocompatible Bacterial-poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate): A Review on the Promising Next-Generation Biomaterial. Online. *Polymers*. 2021, roč. 13, č. 1. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym13010051>. [cit. 2024-04-18].
- [3] OBRUCA, Stanislav; MAROVA, Ivana; STANKOVA, Marie; MRAVCOVA, Ludmila; SVOBODA, Zdenek et al. Effect of ethanol and hydrogen peroxide on poly(3-hydroxybutyrate) biosynthetic pathway in *Cupriavidus necator* H16: From Catalyst Design to Device Setup. Online. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010, roč. 26, č. 7, s. 1261-1267. ISSN 0959-3993. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0296-8>. [cit. 2024-04-19].
- [4] FERNANDES, Miguel; SALVADOR, Andreia; ALVES, Madalena M.; VICENTE, António A.; MORBIDELLI, Massimo et al. Factors affecting polyhydroxyalkanoates biodegradation in soil: The case of polyhydroxyalkanoates. Online. *Polymer Degradation and Stability*. 2020, roč. 182, č. 1. ISSN 01413910. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2020.109408>. [cit. 2024-04-18].
- [5] SAHARAN, Baljeet Singh; KAMAL, Neel; BADONI, Prerana; KUMAR, Ramesh; SAINI, Mayuri et al. Biopolymer and polymer precursor production by microorganisms: applications and future prospects. Online. *Polymer Degradation and Stability*. 2024, roč. 99, č. 1, s. 17-30. ISSN 0268-2575. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jctb.7524>. [cit. 2024-04-18].
- [6] MUKHERJEE, Anindya; KOLLER, Martin; BADONI, Prerana; KUMAR, Ramesh; SAINI, Mayuri et al. Microbial PolyHydroxyAlkanoate (PHA) Biopolymers—Intrinsically Natural: applications and future prospects. Online. *Bioengineering*. 2023, roč. 10, č. 7, s. 17-30. ISSN 2306-5354. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/bioengineering10070855>. [cit. 2024-04-18].
- [7] ALVES, A. A.; SIQUEIRA, E. C.; BARROS, M. P. S.; SILVA, P. E. C.; HOULLOU, L. M. et al. Polyhydroxyalkanoates: a review of microbial production and technology application. Online. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2023, roč. 20, č. 3, s. 3409-3420. ISSN 1735-1472. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13762-022-04213-9>. [cit. 2024-04-18].

- [8] ALBUQUERQUE, Priscilla B.S.; MALAFAIA, Carolina B.; BARROS, M. P. S.; SILVA, P. E. C.; HOULLOU, L. M. et al. Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates: a review of microbial production and technology application. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, roč. 107, č. 3, s. 615-625. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.026>. [cit. 2024-04-18].
- [9] VIGNESWARI, Sevakumaran; NOOR, Muhammad Shahrul Md; AMELIA, Tan Suet May; BALAKRISHNAN, Karthnee; ADNAN, Azila et al. Recent Advances in the Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates from Lignocellulosic Feedstocks: applications and future prospects. Online. *Life*. 2021, roč. 11, č. 8, s. 17-30. ISSN 2075-1729. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/life11080807>. [cit. 2024-04-22].
- [10] KHATAMI, Kasra; PEREZ-ZABALETA, Mariel; OWUSU-AGYEMAN, Isaac; CETECIOGLU, Zeynep; HOULLOU, L. M. et al. Waste to bioplastics: How close are we to sustainable polyhydroxyalkanoates production? Online. *Waste Management*. 2021, roč. 119, č. 3, s. 374-388. ISSN 0956053X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.10.008>. [cit. 2024-04-18].
- [11] RAZA, Zulfiqar Ali; ABID, Sharjeel; BANAT, Ibrahim M.; CETECIOGLU, Zeynep; HOULLOU, L. M. et al. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. Online. *Waste Management*. 2018, roč. 126, č. 3, s. 45-56. ISSN 09648305. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001>. [cit. 2024-04-18].
- [12] KATAGI, Vrunda; VYTILA, Ramachandra Murty a SOMASHEKARA, Divyashree. Integrated production of microbial biopolymer (PHA) with other value-added bioproducts: an innovative approach for sustainable production. Online. *Green Chemistry Letters and Reviews*. 2024, roč. 17, č. 1. ISSN 1751-8253. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/17518253.2023.2289983>. [cit. 2024-04-22].
- [13] PRADHAN, Sushobhan; DIKSHIT, Pritam Kumar; MOHOLKAR, Vijayanand S.; CETECIOGLU, Zeynep; HOULLOU, L. M. et al. Production, Characterization, and Applications of Biodegradable Polymer: Polyhydroxyalkanoates. Online. *Advances in Sustainable Polymers*. Materials Horizons: From Nature to Nanomaterials. 2020, roč. 126, č. 3, s. 51-94. ISBN 978-981-15-1250-6. ISSN 09648305. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-981-15-1251-3_4. [cit. 2024-04-18].
- [14] CHAN, Clement Matthew; VANDI, Luigi-Jules; PRATT, Steven; HALLEY, Peter; RICHARDSON, Desmond et al. Composites of Wood and Biodegradable Thermoplastics: A Review. Online. *Polymer Reviews*. Materials Horizons: From Nature to Nanomaterials. 2017, roč. 58, č. 3, s. 444-494. ISBN 978-981-15-1250-6. ISSN 1558-3724. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/15583724.2017.1380039>. [cit. 2024-04-18].
- [15] CHOI, So Young; CHO, In Jin; LEE, Youngjoon; KIM, Yeo-Jin; KIM, Kyung-Jin et al. Microbial Polyhydroxyalkanoates and Nonnatural Polyesters: A Review. Online. *Advanced Materials*. Materials Horizons: From Nature to Nanomaterials. 2020, roč. 32, č. 35, s. 444-494. ISBN 978-981-15-1250-6. ISSN 0935-9648. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/adma.201907138>. [cit. 2024-04-18].

- [16] SARAVANAN, Koushika; UMESH, Mridul a KATHIRVEL, Preethi. Microbial Polyhydroxyalkanoates (PHAs): A Review on Biosynthesis, Properties, Fermentation Strategies and Its Prospective Applications for Sustainable Future. Online. *Journal of Polymers and the Environment*. 2022, roč. 30, č. 12, s. 4903-4935. ISSN 1566-2543. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10924-022-02562-7>. [cit. 2024-04-18].
- [17] VICENTE, Diogo; PROENÇA, Diogo Neves a MORAIS, Paula V. The Role of Bacterial Polyhydroalkanoate (PHA) in a Sustainable Future: A Review on the Biological Diversity. Online. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2023, roč. 20, č. 4, s. 4903-4935. ISSN 1660-4601. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijerph20042959>. [cit. 2024-04-18].
- [18] HADDADI, M. H.; ASADOLAHI, R.; NEGAHDARI, B.; MOLONEY, Maurice a SHAH, Saleh. The bioextraction of bioplastics with focus on polyhydroxybutyrate: a review. Online. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2019, roč. 16, č. 7, s. 3935-3948. ISSN 1735-1472. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02352-0>. [cit. 2024-04-18].
- [19] WANG, Qian; LIU, Xiaolong; QI, Qingsheng a SOGA, Kazuo. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose with elevated 3-hydroxyvalerate fraction via combined citramalate and threonine pathway in *Escherichia coli*: A Review on the Biological Diversity. Online. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014, roč. 98, č. 9, s. 3923-3931. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5494-5>. [cit. 2024-04-18].
- [20] HUIJBERTS, G N; DE RIJK, T C; DE WAARD, P; EGGINK, G a SHAH, Saleh. ¹³C nuclear magnetic resonance studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis: a review. Online. *Journal of Bacteriology*. 1994, roč. 176, č. 6, s. 1661-1666. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/jb.176.6.1661-1666.1994>. [cit. 2024-04-18].
- [21] CHEN, Guo-Qiang; HAJNAL, Ivan; WU, Hong; LV, Li a YE, Jianwen. Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates: A Review on the Biological Diversity. Online. *Trends in Biotechnology*. 2015, roč. 33, č. 10, s. 565-574. ISSN 01677799. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.07.007>. [cit. 2024-04-18].
- [22] RAZA, Zulfiqar Ali; TARIQ, Muhammad Rizwan; MAJEED, Muhammad Irfan; BANAT, Ibrahim M.; ZHANG, Huihui et al. Recent developments in bioreactor scale production of bacterial polyhydroxyalkanoates: Feedstocks, strains, and production strategy. Online. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2019, roč. 42, č. 6, s. 901-919. ISSN 1615-7591. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02093-x>. [cit. 2024-04-18].
- [23] FU, Xuemei; XU, Heng; ZHANG, Qi; XI, Jiaying; ZHANG, Huihui et al. A review on polyhydroxyalkanoates production from various organic waste streams: Feedstocks, strains, and production strategy. Online. *Resources, Conservation and Recycling*. 2023, roč. 198, č. 6, s. 1661-1666. ISSN 09213449. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2023.107166>. [cit. 2024-04-18].

- [24] CUI, You-Wei; SHI, Yun-Peng a GONG, Xiao-Yu. Effects of C/N in the substrate on the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and extracellular polymeric substances by *Haloferax mediterranei* via kinetic model analysis. Online. *RSC Advances*. 2017, roč. 7, č. 31, s. 18953-18961. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C7RA02131C>. [cit. 2024-04-19].
- [25] XU, Zhongshuo; DAI, Xiaohu a CHAI, Xiaoli. Effect of influent pH on biological denitrification using biodegradable PHBV/PLA blends as electron donor. Online. *Biochemical Engineering Journal*. 2018, roč. 131, č. 31, s. 24-30. ISSN 1369703X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.12.008>. [cit. 2024-04-19].
- [26] WINNACKER, Malte; DAI, Xiaohu a CHAI, Xiaoli. Polyhydroxyalkanoates: Recent Advances in Their Synthesis and Applications. Online. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2019, roč. 121, č. 11, s. 24-30. ISSN 1438-7697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ejlt.201900101>. [cit. 2024-04-19].
- [27] ZHOU, Wen; BERGSMA, Simon; COLPA, Dana Irene; EUVERINK, Gert-Jan Willem a KROONEMAN, Janneke. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) synthesis and degradation by microbes and applications towards a circular economy: Recent Advances in Their Synthesis and Applications. Online. *Journal of Environmental Management*. 2023, roč. 341, č. 11, s. 24-30. ISSN 03014797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118033>. [cit. 2024-04-19].
- [28] ACHARJEE, Shiva Aley; BHARALI, Pranjal; GOGOI, Bhagyudoy; SORHIE, Viphezoliz; WALLING, Bendangtula et al. PHA-Based Bioplastic: a Potential Alternative to Address Microplastic Pollution. Online. *Journal of Environmental Management*. 2023, roč. 234, č. 1, s. 24-30. ISSN 0049-6979. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11270-022-06029-2>. [cit. 2024-04-19].
- [29] GUO, Wentai; YANG, Keli; QIN, Xiusen; LUO, Rui; WANG, Hui et al. Polyhydroxyalkanoates in tissue repair and regeneration: a Potential Alternative to Address Microplastic Pollution. Online. *Engineered Regeneration*. 2022, roč. 3, č. 1, s. 24-40. ISSN 26661381. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.engreg.2022.01.003>. [cit. 2024-04-19].
- [30] SABARINATHAN, Devaraj; CHANDRIKA, Sabapathy Poorna; VENKATRAMAN, Pitchaikannu; EASWARAN, Muruges; SUREKA, Chandrasekaran Senbagavadivoo et al. Production of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Pseudomonas plecoglossicida* and its application towards cancer detection: a Potential Alternative to Address Microplastic Pollution. Online. *Informatics in Medicine Unlocked*. 2018, roč. 11, č. 1, s. 61-67. ISSN 23529148. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.imu.2018.04.009>. [cit. 2024-04-19].
- [31] ABBASI, Sajjad; ALIREZAZADEH, Mustafa; RAZEGHI, Nastaran; REZAEI, Mahrooz; POURMAHMOOD, Hanie et al. Microplastics captured by snowfall: A study in Northern Iran. Online. *Science of The Total Environment*. 2022, roč. 822, č. 1, s. 61-67. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153451>. [cit. 2024-04-19].

- [32] SHIMIZU, Kazuyuki; MATSUOKA, Yu; RAZEGHI, Nastaran; REZAEI, Mahrooz; POURMAHMOOD, Hanie et al. Redox rebalance against genetic perturbations and modulation of central carbon metabolism by the oxidative stress regulation: A study in Northern Iran. Online. *Biotechnology Advances*. 2019, roč. 37, č. 8, s. 61-67. ISSN 07349750. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107441>. [cit. 2024-04-19].
- [33] ZHAO, Xilin; DRLICA, Karl; SOUSA, João P.; SILVA, Alda F. Q.; ARRAIANO, Cecília M. et al. Reactive oxygen species and the bacterial response to lethal stress: A study in Northern Iran. Online. *Current Opinion in Microbiology*. 2014, roč. 21, č. 8, s. 1-6. ISSN 13695274. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.06.008>. [cit. 2024-04-19].
- [34] SEIXAS, André F.; QUENDERA, Ana P.; SOUSA, João P.; SILVA, Alda F. Q.; ARRAIANO, Cecília M. et al. Bacterial Response to Oxidative Stress and RNA Oxidation: A study in Northern Iran. Online. *Frontiers in Genetics*. 2022, roč. 12, č. 8, s. 61-67. ISSN 1664-8021. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.821535>. [cit. 2024-04-19].
- [35] SHCHERBIK, Natalia; PESTOV, Dimitri G.; SOUSA, João P.; SILVA, Alda F. Q.; ARRAIANO, Cecília M. et al. The Impact of Oxidative Stress on Ribosomes: From Injury to Regulation. Online. *Cells*. 2019, roč. 8, č. 11, s. 1-6. ISSN 2073-4409. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cells8111379>. [cit. 2024-04-19].
- [36] IMLAY, James A.; SLAUCH, James M.; SOUSA, João P.; SILVA, Alda F. Q.; ARRAIANO, Cecília M. et al. Oxidative Stress: From Injury to Regulation. Online. *EcoSal Plus*. 2009, roč. 3, č. 2, s. 1-6. ISSN 2324-6200. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.5.4.4>. [cit. 2024-04-19].
- [37] M, Sudharsan; N, Rajendra Prasad; RAJENDRASOZHAN, Saravanan; SILVA, Alda F. Q.; ARRAIANO, Cecília M. et al. Bacterial redox response factors in the management of environmental oxidative stress: From Injury to Regulation. Online. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2023, roč. 39, č. 1, s. 1-6. ISSN 0959-3993. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03456-5>. [cit. 2024-04-19].
- [38] KOBAYASHI, Kazuo; PONNIRESAN, Veeramani kandan; GOVINDASAMY, Kanimozhi; PRASAD, Nagarajan Rajendra; ARRAIANO, Cecília M. et al. Sensing Mechanisms in the Redox-Regulated, [2Fe-2S] Cluster-Containing, Bacterial Transcriptional Factor SoxR: From Injury to Regulation. Online. *Accounts of Chemical Research*. 2017, roč. 50, č. 7, s. 1672-1678. ISSN 0001-4842. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00137>. [cit. 2024-04-19].
- [39] SEN, Ananya; IMLAY, James A.; GOVINDASAMY, Kanimozhi; PRASAD, Nagarajan Rajendra; ARRAIANO, Cecília M. et al. How Microbes Defend Themselves From Incoming Hydrogen Peroxide: From Injury to Regulation. Online. *Frontiers in Immunology*. 2021, roč. 12, č. 9, s. 2355-2366. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.667343>. [cit. 2024-04-19].

- [40] LI, Xin; IMLAY, James A.; GOVINDASAMY, Kanimozhi; PRASAD, Nagarajan Rajendra; ARRAIANO, Cecília M. et al. Improved measurements of scant hydrogen peroxide enable experiments that define its threshold of toxicity for *Escherichia coli*: From Injury to Regulation. Online. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018, roč. 120, č. 9, s. 217-227. ISSN 08915849. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.025>. [cit. 2024-04-19].
- [41] CHOI, Hee-Jung; KIM, Seung-Jun; MUKHOPADHYAY, Partha; CHO, Sayeon; WOO, Joo-Rang et al. Structural Basis of the Redox Switch in the OxyR Transcription Factor: From Injury to Regulation. Online. *Cell*. 2001, roč. 105, č. 1, s. 103-113. ISSN 00928674. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00300-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00300-2). [cit. 2024-04-19].
- [42] SEN, Ananya; ZHOU, Yidan; IMLAY, James A. a MULLINEAUX, Conrad W. During Oxidative Stress the Clp Proteins of *Escherichia coli* Ensure that Iron Pools Remain Sufficient To Reactivate Oxidized Metalloenzymes. Online. *Journal of Bacteriology*. 2020, roč. 202, č. 18. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/JB.00235-20>. [cit. 2024-04-19].
- [43] IMLAY, James A.; ZHOU, Yidan; IMLAY, James A. a MULLINEAUX, Conrad W. Where in the world do bacteria experience oxidative stress? Online. *Environmental Microbiology*. 2019, roč. 21, č. 2, s. 521-530. ISSN 1462-2912. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14445>. [cit. 2024-04-19].
- [44] OBRUCA, Stanislav; SEDLACEK, Petr; KOLLER, Martin a MULLINEAUX, Conrad W. The underexplored role of diverse stress factors in microbial biopolymer synthesis. Online. *Bioresource Technology*. 2021, roč. 326, č. 2, s. 521-530. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124767>. [cit. 2024-04-19].
- [45] DE ALMEIDA, Alejandra; CATONE, Mariela V.; RHODIUS, Virgil A.; GROSS, Carol A. a PETTINARI, M. Julia. Unexpected Stress-Reducing Effect of PhaP, a Poly(3-Hydroxybutyrate) Granule-Associated Protein, in *Escherichia coli*. Online. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, roč. 77, č. 18, s. 6622-6629. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/AEM.05469-11>. [cit. 2024-04-19].
- [46] MÜLLER-SANTOS, Marcelo; KOSKIMÄKI, Janne J; ALVES, Luis Paulo Silveira; DE SOUZA, Emanuel Maltempi; JENDROSSEK, Dieter et al. The protective role of PHB and its degradation products against stress situations in bacteria. Online. *FEMS Microbiology Reviews*. 2020, roč. 45, č. 3, s. 6622-6629. ISSN 1574-6976. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa058>. [cit. 2024-04-19].
- [47] ZHANG, Qingran; CHEN, Yinguang; PAN, Jian; DAIYAN, Rahman; LOVELL, Emma C. et al. Electrosynthesis of Hydrogen Peroxide through Selective Oxygen Reduction: A Carbon Innovation from Active Site Engineering to Device Design. Online. *Small*. 2023, roč. 19, č. 40, s. 6622-6629. ISSN 1613-6810. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/sml.202302338>. [cit. 2024-04-19].

- [48] LI, Shiliang; MA, Jinxing; XU, Fei; WEI, Luying; HE, Di et al. Fundamental principles and environmental applications of electrochemical hydrogen peroxide production: A review. Online. *Chemical Engineering Journal*. 2023, roč. 452, č. 40, s. 6622-6629. ISSN 13858947. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.139371>. [cit. 2024-04-19].
- [49] TIAN, Yuhui; DENG, Daijie; XU, Li; LI, Meng; CHEN, Hao et al. Strategies for Sustainable Production of Hydrogen Peroxide via Oxygen Reduction Reaction: From Catalyst Design to Device Setup. Online. *Nano-Micro Letters*. 2023, roč. 15, č. 1, s. 6622-6629. ISSN 2311-6706. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40820-023-01067-9>. [cit. 2024-04-29].
- [50] SHIN, Heejong; LEE, Seongbeom; SUNG, Yung-Eun; LI, Meng; CHEN, Hao et al. Industrial-scale H₂O₂ electrosynthesis in practical electrochemical cell systems: From Catalyst Design to Device Setup. Online. *Current Opinion in Electrochemistry*. 2023, roč. 38, č. 1, s. 6622-6629. ISSN 24519103. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2023.101224>. [cit. 2024-04-19].
- [51] JIANG, Yuanyuan; NI, Pengjuan; CHEN, Chuanxia; LU, Yizhong; YANG, Ping et al. Selective Electrochemical H₂O₂ Production through Two-Electron Oxygen Electrochemistry: From Catalyst Design to Device Setup. Online. *Advanced Energy Materials*. 2018, roč. 8, č. 31, s. 6622-6629. ISSN 1614-6832. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/aenm.201801909>. [cit. 2024-04-19].
- [52] YANG, Xiaoxuan; ZENG, Yachao; ALNOUSH, Wajdi; HOU, Yang; HIGGINS, Drew et al. Tuning Two-Electron Oxygen-Reduction Pathways for H₂O₂ Electrosynthesis via Engineering Atomically Dispersed Single Metal Site Catalysts. Online. *Advanced Materials*. 2022, roč. 34, č. 23. ISSN 0935-9648. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/adma.202107954>. [cit. 2024-04-20].
- [53] ZHOU, Wei; MENG, Xiaoxiao; GAO, Jihui; ALSHAWABKEH, Akram N.; SVOBODA, Zdenek et al. Hydrogen peroxide generation from O₂ electroreduction for environmental remediation: A state-of-the-art review. Online. *Chemosphere*. 2019, roč. 225, č. 7, s. 588-607. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.042>. [cit. 2024-04-19].
- [54] CHUNG, Tae Hyun; MESHREF, Mohamed N.A.; HAI, Faisal I.; AL-MAMUN, Abdullah; DHAR, Bipro Ranjan et al. Microbial electrochemical systems for hydrogen peroxide synthesis: Critical review of process optimization, prospective environmental applications, and challenges. Online. *Bioresource Technology*. 2020, roč. 313, č. 7, s. 588-607. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123727>. [cit. 2024-04-19].
- [55] HERNANDEZ, Cesar A.; OSMA, Johann F.; GAO, Jihui a ALSHAWABKEH, Akram N. Microbial Electrochemical Systems: Deriving Future Trends From Historical Perspectives and Characterization Strategies. Online. *Frontiers in Environmental Science*. 2020, roč. 8, s. 588-607. ISSN 2296-665X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00044>. [cit. 2024-04-28].

- [56] VIRDIS, Bernardino; D. HOELZLE, Robert; MARCHETTI, Angela; BOTO, Santiago T.; ROSENBAUM, Miriam A. et al. Electro-fermentation: Sustainable bioproductions steered by electricity. Online. *Biotechnology Advances*. 2022, roč. 59. ISSN 07349750. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107950>. [cit. 2024-04-21].
- [57] CHANDRASEKHAR, K.; NARESH KUMAR, A.; KUMAR, Gopalakrishnan; KIM, Dong-Hoon; SONG, Young-Chae et al. Electro-fermentation for biofuels and biochemicals production: Current status and future directions. Online. *Bioresource Technology*. 2021, roč. 323, č. 11, s. 866-878. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124598>. [cit. 2024-04-20].
- [58] ALBERTO GARCÍA MOGOLLÓN, Carlos; CARLOS QUINTERO DÍAZ, Juan; OMAR GIL POSADA, Jorge; BOTO, Santiago T.; ROSENBAUM, Miriam A. et al. Production of acetone, butanol, and ethanol by electro-fermentation with *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4: Sustainable bioproductions steered by electricity. Online. *Bioelectrochemistry*. 2023, roč. 152. ISSN 15675394. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2023.108414>. [cit. 2024-04-21].
- [59] SRIRAM, Saranya; WONG, Jonathan W.C.; PRADHAN, Nirakar; BOTO, Santiago T.; ROSENBAUM, Miriam A. et al. Recent advances in electro-fermentation technology: A novel approach towards balanced fermentation. Online. *Bioresource Technology*. 2022, roč. 360. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127637>. [cit. 2024-04-21].
- [60] GONG, Ziyang; YU, Huan; ZHANG, Junqi; LI, Feng; SONG, Hao et al. Microbial electro-fermentation for synthesis of chemicals and biofuels driven by bi-directional extracellular electron transfer: A novel approach towards balanced fermentation. Online. *Synthetic and Systems Biotechnology*. 2020, roč. 5, č. 4, s. 304-313. ISSN 2405805X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2020.08.004>. [cit. 2024-04-21].
- [61] VASSILEV, Igor; AVERESCH, Nils J.H.; LEDEZMA, Pablo; KOKKO, Marika; SONG, Hao et al. Anodic electro-fermentation: Empowering anaerobic production processes via anodic respiration. Online. *Biotechnology Advances*. 2021, roč. 48, č. 4, s. 304-313. ISSN 07349750. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107728>. [cit. 2024-04-21].
- [62] STURM-RICHTER, Katrin; GOLITSCH, Frederik; STURM, Gunnar; KIPF, Elena; DITTRICH, André et al. Unbalanced fermentation of glycerol in *Escherichia coli* via heterologous production of an electron transport chain and electrode interaction in microbial electrochemical cells: Empowering anaerobic production processes via anodic respiration. Online. *Bioresource Technology*. 2015, roč. 186, č. 4, s. 89-96. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.116>. [cit. 2024-04-21].
- [63] BURSAC, Thea; GRALNICK, Jeffrey A.; GESCHER, Johannes; KIPF, Elena; DITTRICH, André et al. Acetoin production via unbalanced fermentation in *Shewanella oneidensis*: Empowering anaerobic production processes via anodic respiration. Online. *Biotechnology and Bioengineering*. 2017, roč. 114, č. 6, s. 1283-1289. ISSN 0006-3592. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bit.26243>. [cit. 2024-04-21].

- [64] YAMADA, Shohei; TAKAMATSU, Yuki; IKEDA, Sota; KOUZUMA, Atsushi; WATANABE, Kazuya et al. Towards Application of Electro-Fermentation for the Production of Value-Added Chemicals From Biomass Feedstocks: Empowering anaerobic production processes via anodic respiration. Online. *Frontiers in Chemistry*. 2022, roč. 9, č. 6, s. 1283-1289. ISSN 2296-2646. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.805597>. [cit. 2024-04-21].
- [65] WANG, Jianfei; REN, Kexin; ZHU, Yan; HUANG, Jiaqi; LIU, Shijie et al. A Review of Recent Advances in Microbial Fuel Cells: Preparation, Operation, and Application. Online. *BioTech*. 2022, roč. 11, č. 4, s. 1283-1289. ISSN 2673-6284. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biotech11040044>. [cit. 2024-04-21].
- [66] BAZINA, Naser; AHMED, Tariq G.; ALMDAAF, Mostafa; JIBIA, Shamsudeen; SARKER, Mosh et al. Power generation from wastewater using microbial fuel cells: A review. Online. *Journal of Biotechnology*. 2023, roč. 374, č. 4, s. 17-30. ISSN 01681656. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2023.07.006>. [cit. 2024-04-21].
- [67] ROY, Hridoy; RAHMAN, Tanzim Ur; TASNIM, Nishat; ARJU, Jannatul; RAFID, Md. Mustafa et al. Microbial Fuel Cell Construction Features and Application for Sustainable Wastewater Treatment: A review. Online. *Membranes*. 2023, roč. 13, č. 5, s. 17-30. ISSN 2077-0375. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/membranes13050490>. [cit. 2024-04-21].
- [68] GREENMAN, John; GAJDA, Iwona; YOU, Jiseon; MENDIS, Buddhi Arjuna; OBATA, Oluwatosin et al. Microbial fuel cells and their electrified biofilms: A review. Online. *Biofilm*. 2021, roč. 3, č. 5, s. 17-30. ISSN 25902075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2021.100057>. [cit. 2024-04-21].
- [69] BHADURI, Soumyadeep; BEHERA, Manaswini; YOU, Jiseon; MENDIS, Buddhi Arjuna; OBATA, Oluwatosin et al. From single-chamber to multi-anodic microbial fuel cells: A review. Online. *Journal of Environmental Management*. 2024, roč. 355, č. 5, s. 17-30. ISSN 03014797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.120465>. [cit. 2024-04-21].
- [70] JALILI, Payam; ALA, Amirhosein; NAZARI, Parham; JALILI, Bahram; GANJI, Davood Domiri et al. A comprehensive review of microbial fuel cells considering materials, methods, structures, and microorganisms: A review. Online. *Heliyon*. 2024, roč. 10, č. 3, s. 17-30. ISSN 24058440. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25439>. [cit. 2024-04-21].
- [71] CALIGNANO, Flaviana; TOMMASI, Tonia; MANFREDI, Diego; CHIOLERIO, Alessandro; GANJI, Davood Domiri et al. Additive Manufacturing of a Microbial Fuel Cell—A detailed study: A review. Online. *Scientific Reports*. 2015, roč. 5, č. 1, s. 17-30. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/srep17373>. [cit. 2024-04-21].
- [72] CETINKAYA, Ahmet; KAYA, S. Irem; OZKAN, Sibel A. a ALSHAWABKEH, Akram N. A collection of the best practice examples of electroanalytical applications in education: from polarography to sensors. Online. *Journal of Solid State Electrochemistry*. 2024, roč. 28, č. 3-4, s. 869-895. ISSN 1432-8488. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10008-023-05637-0>. [cit. 2024-04-24].

- [73] FRANKLIN, R.K.; MARTIN, S.M.; STRONG, T.D. a BROWN, R.B. Chemical and Biological Systems: Chemical Sensing Systems for Liquids. Online. Reference Module in Materials Science and Materials Engineering. 2016. ISBN 9780128035818. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012803581800549X> [cit. 2024-04-21].
- [74] GOES, Shannon L.; MAYER, Mikayla N.; NUTTING, Jordan E.; HOOBER-BURKHARDT, Lena E.; STAHL, Shannon S. et al. Deriving the Turnover Frequency of Aminoxyl-Catalyzed Alcohol Oxidation by Chronoamperometry: An Introduction to Organic Electrocatalysis. Online. *Journal of Chemical Education*. 2021, roč. 98, č. 2, s. 600-606. ISBN 9780128035818. ISSN 0021-9584. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.0c01244>. [cit. 2024-04-21].
- [75] REZAEI, Behzad a IRANNEJAD, Neda. Chapter 2 - Electrochemical detection techniques in biosensor applications. Online. In: *Electrochemical Biosensors*. 2019. Elsevier, s. 11-43. ISBN 9780128164914. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128164914000024>. [cit. 2024-04-21].
- [76] RUNŠTUKOVÁ, Nikola. Elektrochemická generace peroxidu vodíku pro biotechnologické aplikace. Diplomová práce. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií, 2023.
- [77] FLORIAN, Vojtěch. Příprava a charakterizace mikro-referenčních elektrod pro bioelektronické systémy. Bakalářská práce. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie materiálů, 2022.
- [78] MORLINO, Maria Silvia; SERNA GARCÍA, Rebecca; SAVIO, Filippo; ZAMPIERI, Guido; MOROSINOTTO, Tomas et al. Cupriavidus necator as a platform for polyhydroxyalkanoate production: An overview of strains, metabolism, and modeling approaches. Online. *Biotechnology Advances*. 2023, roč. 69. ISSN 07349750. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108264>. [cit. 2024-04-21].
- [79] UGHY, Bettina; NAGYAPATI, Sarolta; LAJKO, Dezi B.; LETOHA, Tamas; PROHASZKA, Adam et al. Reconsidering Dogmas about the Growth of Bacterial Populations: An overview of strains, metabolism, and modeling approaches. Online. *Cells*. 2023, roč. 12, č. 10. ISSN 2073-4409. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cells12101430>. [cit. 2024-04-21].
- [80] CREUS, Jordi; MIOLA, Matteo a PESCARMONA, Paolo P. Unravelling and overcoming the challenges in the electrocatalytic reduction of fructose to sorbitol. Online. *Green Chemistry*. 2023, roč. 25, č. 4, s. 1658-1671. ISSN 1463-9262. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D2GC04451J>. [cit. 2024-04-21].
- [81] BAUSE, S.; DECKER, M.; NEUBAUER, P.; VONAU, W.; MARTIN, Peter J. et al. Optimization of the chemolithoautotrophic biofilm growth of *Cupriavidus necator* by means of electrochemical hydrogen synthesis: Possible uses as antibacterial and antibiofilm agent. Online. *Chemical Papers*. 2018, roč. 72, č. 5, s. 1205-1211. ISSN 2585-7290. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11696-018-0382-1>. [cit. 2024-04-21].

- [82] DÍAZ DE RIENZO, Mayri A.; BANAT, Ibrahim M.; DOLMAN, Ben; WINTERBURN, James; MARTIN, Peter J. et al. Sophorolipid biosurfactants: Possible uses as antibacterial and antibiofilm agent. Online. *New Biotechnology*. 2015, roč. 32, č. 6, s. 720-726. ISSN 18716784. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.02.009>. [cit. 2024-04-21].
- [83] JOHNSTON, Brian; RADECKA, Iza; CHIellini, Emo; BARSi, David; ILIEVA, Vassilka Ivanova et al. Mass Spectrometry Reveals Molecular Structure of Polyhydroxyalkanoates Attained by Bioconversion of Oxidized Polypropylene Waste Fragments: Possible uses as antibacterial and antibiofilm agent. Online. *Polymers*. 2019, roč. 11, č. 10, s. 1205-1211. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym11101580>. [cit. 2024-04-21].
- [84] BELMONTE, Guilherme Kretzmann; CHARLES, German; STRUMIA, Miriam Cristina; WEIBEL, Daniel Eduardo; NAKHAEI, KourosH et al. Permanent hydrophilic modification of polypropylene and poly(vinyl alcohol) films by vacuum ultraviolet radiation: Possible uses as antibacterial and antibiofilm agent. Online. *Applied Surface Science*. 2016, roč. 382, č. 4, s. 93-100. ISSN 01694332. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.04.091>. [cit. 2024-04-21].
- [85] GHASSEMI, Amirreza; ISHIJIMA, Manabu; HASEGAWA, Masakazu; MOHAMMADZADEH REZAEI, Naser; NAKHAEI, KourosH et al. Biological and Physicochemical Characteristics of 2 Different Hydrophilic Surfaces Created by Saline-Storage and Ultraviolet Treatment: Possible uses as antibacterial and antibiofilm agent. Online. *Implant Dentistry*. 2018, roč. 27, č. 4, s. 405-414. ISSN 1056-6163. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/ID.0000000000000773>. [cit. 2024-04-21].
- [86] TANG, Yiping; CAI, Yukui; WANG, Lei; LUO, Xichun; WANG, Bing et al. Formation mechanism of superhydrophobicity of stainless steel by laser-assisted decomposition of stearic acid and its corrosion resistance: Possible uses as antibacterial and antibiofilm agent. Online. *Applied Surface Science*. 2022, roč. 153, č. 4, s. 93-100. ISSN 00303992. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2022.108190>. [cit. 2024-04-21].
- [87] CONNERS, Eric M; RENGASAMY, Karthikeyan a BOSE, Arpita. Electroactive biofilms: how microbial electron transfer enables bioelectrochemical applications. Online. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2022, roč. 49, č. 4. ISSN 1367-5435. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jimb/kuac012>. [cit. 2024-04-22].

7. Seznam použitých zkratek

ATP	adenosintrifosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
Dps	dodekametrický mini-feritin
EIS	elektrochemická impedanční spektroskopie
HRP	křenová peroxidáza
lcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s dlouhým řetězcem
MES	roztok stopových prvků
mcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty se středně dlouhým řetězcem
NADH	nikotinamidadeninukleotid
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NB	nutrient broth
ORR	redukční reakce kyslíku
PBS	fosfátový pufr
PEDOT:PSS	poly(3,4-ethyldioxythiofen): polystyrensulfonát
PHA	polyhydroxyalkanoáty
PHB	polyhydroxybutyrát
PP	polypropylen
ROS	reaktivní formy kyslíku
RHE	reverzibilní vodíková elektroda
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
scl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s krátkým řetězcem
TMB	tetramethylbenzidin