



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

ANALÝZA BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK POMOCÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE A FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE

ANALYSIS OF BACTERIAL CELLS EMPLOYING FLOW CYTOMETRY AND
FLUORESCENCE MICROSCOPY

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. Lucie Müllerová

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2016



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0941/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Bc. Lucie Müllerová	
Studijní program:	Chemie pro medicínské aplikace (N2846)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808T031)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Pavla Benešová	

Název diplomové práce:

Analýza bakteriálních buněk pomocí průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie

Zadání diplomové práce:

1. Vypracovat literární rešerši na téma single-cell analýza bakteriálních buněk
2. Vývoj a porovnání laboratorních postupů pro stanovení viability bakteriálních kultur
3. Vývoj a optimalizace cytometrické analýzy intracelulárních PHA granulí

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Lucie Müllerová
Student(ka)

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá možnostmi analýzy viability a obsahu polyhydroxyalkanoátů (PHA) bakteriálních buněk, a to pomocí průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie.

V části věnující se cytometrické analýze bakteriálních buněk byla otestována řada viabilních fluorescenčních sond, ale prakticky se osvědčily pouze dva systémy – propidium iodid a komerční BacLight™ kit, který vykazoval o něco vyšší přesnost stanovení viabilitně bakteriální kultury. Dále byla využita akridinová oranž k analýze fyziologického stavu mikrobiální kultury a dvě hydrofobní sondy, Nilská červeň a BODIPY 493/503, k analýze obsahu PHA v bakteriálních buňkách. Především sonda BODIPY 493/505 se zdá být velmi zajímavá, protože nevyžaduje permeabilizaci buněčných obalů a díky svým spektrálním vlastnostem je plně kompatibilní s propidium iodidem. Tato skutečnost otevírá možnost simultánní analýzy viability bakteriálních kultur a obsahu PHA.

V části vyhodnocování mikroskopických výsledků bylo prezentováno několik fluoroforů. Bylo zjištěno, že koncentrace fluoroforů využívaná pro cytometrické analýzy je pro mikroskopii příliš vysoká. SYTO9 svítící převážně v zeleném kanále měla určitý fluorescenční signál i v červeném kanále. Vzorky obarvené BODIPY 493/503 vykazovaly vysoké intenzity fluorescence při koncentraci barviva $10 \mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$. Zároveň byly jak u obou kmenů naměřeny záporné amplitudy intenzity fluorescence, výraznější byla u *C. necator H16*. U tohoto kmene byl překvapivý objev vysoké koncentrace barviva především na povrchu granulí PHB, kde byla zároveň téměř nulová anisotropie barviva (volná otáčivost sondy).

Klíčová slova: *Cupriavidus necator*, viabilita, fluorescence, polyhydroxyalkanoáty, průtoková cytometrie, fluorescenční mikroskopie

ABSTRACT

This thesis focuses on fluorescent analysis of viability and PHA content in bacterial cultures, the main methods of investigation were flow cytometry and fluorescent microscopy.

In order to determine viability of *C. necator H16*, several viability probes were tested, nevertheless, only BacLight™ kit and propidium iodide can be used to estimate portion of viable and live bacterial cell in samples. Further, Acridine orange was used to monitor physiological state of bacterial culture and two hydrophobic probes, Nile Red and BODIPY 493/503, were used to investigate PHA content in bacterial cells. Application of BODIPY 493/503 seems to be promising since this probe does not require permeabilization of bacteria cells and it can be used along with propidium iodide.

Furthermore, several fluorophores were tested in the microscopic part. It was found that concentrations used in cytometric analyses were too high for microscopic use. Emission from the SYTO9 fluorophore is seen mainly in the green channel but because of the high concentration some emission was visible in the red channel. Cells stained with BODIPY 493/503 had very high fluorescence intensities when the stain concentration was $10 \mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$. At the same time, negative amplitudes of fluorescence were measured in both strains of *C. necator*, but in case of *C. necator H16* that amplitude was much more pronounced. In this strain surprising high concentration of BODIPY stain was observed on the surface of PHB granules. Anisotropy of the fluorophore was nearing 0 which is very surprising.

Key words: *Cupriavidus necator*, viability, fluorescence, polyhydroxyalkanoates, flow cytometry, fluorescence microscopy

MÜLLEROVÁ, L. *Analýza bakteriálních buněk pomocí průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 75 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

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 bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování: Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a pomoc při práci. Jako dalším bych chtěla poděkovat Ing. Pavle Benešové a Ing. Danu Kučerovi za pomoc při práci v laboratoři. V neposlední řadě patří mé díky Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. za vedení a pomoc při práci s fluorescenčním mikroskopem. Mé rodině a přátelům patří také velké díky.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETIKÁ ČÁST	8
2.1	Fluorescence	8
2.1.4	Fluorescenční sondy	10
2.1.5	Průtoková cytometrie	10
2.1.6	Fluorescenční mikroskopie	13
2.1.7	Využití fluorescence při analýze bakteriálních buněk	15
2.1.8	Viabilita	16
2.1.8.1	Stanovení viability bakterií	17
2.1.8.2	Ethidium bromid	18
2.1.8.3	Near-IR Sonda	18
2.1.8.4	Propidium iodid	19
2.1.8.5	SYTO9	19
2.1.8.6	Fluorescein diacetát	20
2.1.8.7	Rhodamin 123	20
2.1.9	Analýza genové exprese	21
2.2	Polyhydroxyalkanoáty	22
2.2.4	PHA – struktura a vlastnosti	22
2.2.5	Metabolismus polyhydroxyalkanoátů bakterie <i>Cupriavidus necator</i>	24
2.2.6	Bakterie <i>C. necator</i> H16 jako modelový organismus	25
2.2.6.1	Výskyt, metabolismus a vlastnosti	25
2.2.7	Analýza PHA pomocí fluorescenčních sond	26
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
3.1	Použité bakterie, chemikálie a přístroje	28
3.1.4	Použité bakterie	28
3.1.5	Chemikálie pro kultivaci mikroorganismů	28
3.1.6	Fluorescenční sondy	28
3.1.7	Rozpouštědla pro fluorescenční sondy	28
3.1.8	Přístroje	28
3.2	Kultivace bakterií	29
3.2.4	Agarové plotny	29
3.2.5	Příprava inokula	29
3.2.6	Živná média	29
3.3	Stanovení biomasy	30
3.4	Růstová křivka	30
3.4.4	Inokulum	30
3.4.5	Produkční médium	30
3.4.6	Turbidimetrické stanovení hodnoty zákalu	30
3.4.7	Stanovení obsahu PHB	30
3.5	Stanovení viability pomocí průtokového cytometru	31
3.5.4	Použití ethidium bromidu	31

3.5.1	Použití propidium iodidu.....	31
3.5.2	Použití Near-IR sondy.....	31
3.5.3	Použití BacLight™ kitu	32
3.5.4	Použití fluorescein diacetátu	32
3.5.5	Použití Rhodaminu 123	33
3.6	Analýza PHA průtokovým cytometrem	33
3.6.4	Barvení Nilskou červení.....	33
3.6.5	Barvení BODIPY 439/503	33
3.7	Analýza genové exprese	33
3.8	Pozorování buněk pod fluorescenčním mikroskopem.....	34
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	35
4.1	Cytophotrické stanovení viability.....	35
4.1.4	Stanovení viability bakteriální kultury <i>C. necator</i> pomocí BacLight™ kitu	35
4.1.5	Porovnání BacLight™ kitu a propidium iodidu.....	36
4.1.6	Ethidium bromid	38
4.1.7	Fluorescein diacetát.....	40
4.1.8	Rhodamin 123	42
4.1.9	Near-IR sonda	42
4.2	Barvení Nilskou červení	44
4.2.4	Optimalizace koncentrace barviva	45
4.2.5	Korelace intenzity fluorescence a obsahu PHB	46
4.3	Barvení sondou BODIPY 493/503	48
4.4	Využití akridinové oranže jako sondy genové exprese	49
4.4.4	Optimalizace koncentrace sondy.....	49
4.4.5	Využití akridinové oranže při charakterizaci růstu bakterií.....	50
4.5	Mikroskopická analýza.....	52
4.5.4	Viabilní fluorofor SYTO9	52
4.5.5	Propidium iodid.....	54
4.5.6	Akridinová oranž.....	56
4.5.7	BODIPY 493/503	58
5	ZÁVĚR.....	65
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	68
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	74

1 ÚVOD

Metody analýzy založené na fluorescenci jsou stále využívány pro svou rozmanitou škálu možností aplikací. Fluorescenční analýzy jako jsou průtoková cytometrie a fluorescenční mikroskopie jsou široce rozšířeny v mnoha odvětvích výzkumu a průmyslových aplikací. Toto rozšíření je také umožněno zvýšením kvality přístrojů, jejich detekce a reprodukovatelnosti výsledků. Díky modernizaci techniky a zvýšení citlivosti se otevřely nové možnosti ve využití charakteristik buněk, v současné době je možné sledovat fundamentální buněčné charakteristiky jako jsou buněčná integrita, enzymatická aktivita, obsah RNA a DNA apod. Při použití vhodných fluorescenčních sond lze i z velmi malého objemu vzorku získat spoustu cenných informací o stavu buněčné kultury. Při práci s mikroorganismy je ale třeba dbát na samotnou kulturu buněk a její biologické charakteristiky, protože léta výzkumu ukázala, že jednu sondu nelze univerzálně použít při zachování stejného postupu pro různé zástupce třídy prokaryot. Každý organismus má svá specifika, a některé sondy jsou vhodnější na analýzu určité buněčné charakteristiky než jiné.

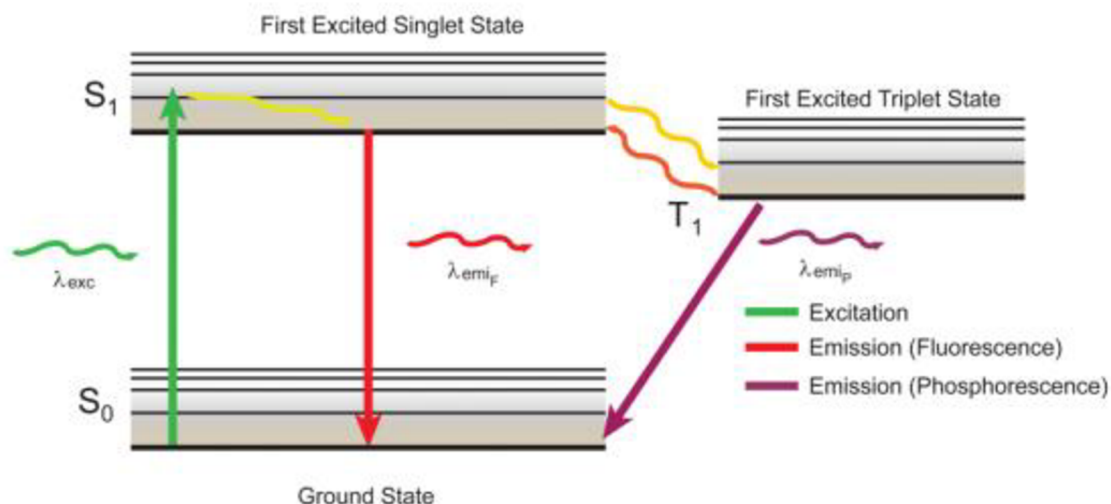
Cílem této práce je optimalizovat postupy při barvení fluorescenčními sondami kmen *Cupriavidus necator H16* a jeho mutant *Cupriavidus necator PHB-4* neschopný akumulace polyhydroxyalkanoátů. Bylo využito několika viabilitních, lipofilních a nukleové kyseliny značících sond vybraných na základě literární rešerše. U těchto sond byla snaha dosáhnout jak optimální koncentrace fluoroforu ve vzorku, tak i vhodných podmínek inkubace. Výsledky nejprve získané na průtokovém cytometru byly srovnávány s výsledky z fluorescenčního mikroskopu, kde byla vizuálně zkoumána a potvrzována místa navázání fluoroforů.

V případě lipofilních sond byl zkoumán obsah polyhydroxyalkanoátů produkovaných ve formě granúl buňkou, intenzita fluorescence byla porovnávána s obsahem PHA získaných pomocí plynové chromatografie. Důležitost těchto látek v posledních letech značně vzrostla především díky jejich možnému využití jako biodegradabilní alternativy k syntetickým plastům. Při biotechnologické produkci PHA je fluorescenční analýza s průtokovou cytometrií jako analytickou koncovkou možno využít jako rychlou procesní metodu pro monitoring biotechnologického procesu. Velmi zajímavá je také biologická role polyhydroxyalkanoátů a to především v rámci stresové odpovědi bakterií, a také v této oblasti výzkumu je fluorescenční analýza velice zajímavých a často klíčovým nástrojem pro detailní charakterizaci bakteriálních buněk.

2 TEORETIKÁ ČÁST

2.1 Fluorescence

Úkazy při kterých dochází k emisi světla se hromadně nazývají luminiscence, přičemž dva úkazy z této kolekce jsou skryty pod pojmem fotoluminiscence. V obou případech dochází k absorpci energie fluoroforem (ústřední molekula), tato energie je získána z fotonů a využita k excitaci molekuly ze základního stavu S_0 , kde je energetický stav nejmenší, do vyššího energetického stavu S_1 (na Obr. 1 je tento přechod znázorněn zelenou šipkou). Ve vyšších energetických stavech se nachází několik vibračních hladin a emise se právě uskutečňuje při přechodu z některé z vyšších vibračních hladin. Po vnitřním nezářivém přechodu na nejnižší vibrační hladinu prvního excitovaného stavu (Obr. 1, žlutá šipka) může nastat více případů emise. Nejvýhodnější je přímý přechod z S_1 na S_0 hladinu, tento jev se nazývá fluorescence (Obr. 1, červená šipka). Čas přechodu je v řádech nanosekund a je rychlejší než jakékoli jiné uvolnění energie, např. teplem. Z tohoto důvodu je fluorescence preferovanou formou uvolňování energie v případě molekuly s vysokou kvantovou účinností. [1][2]

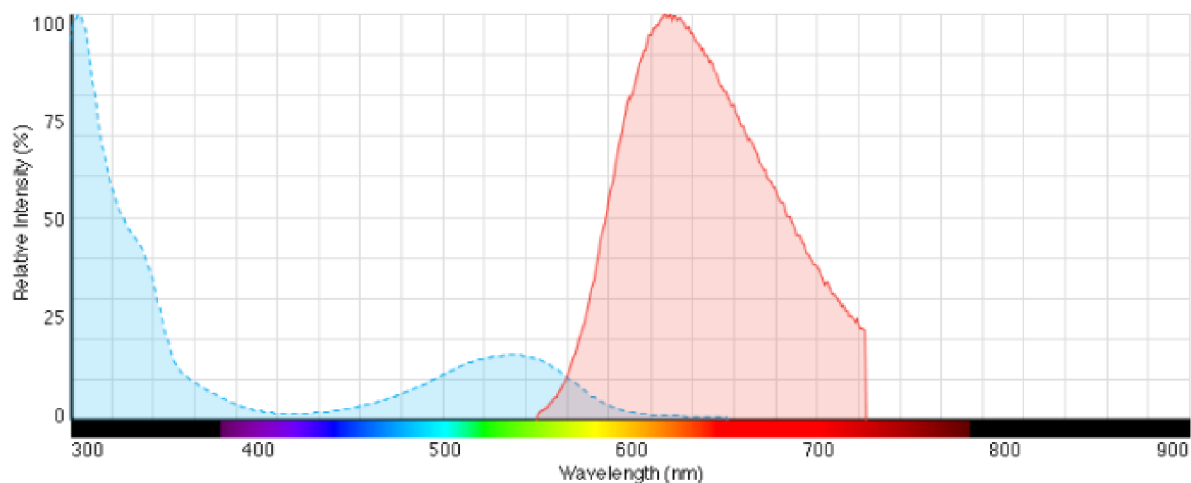


Obr. 1: Zjednodušený Jablonskiho diagram zobrazující princip excitace a emise fluoroforu. Molekula absorbuje energii (λ_{exc}) a dostává se ze základního S_0 do prvního excitovaného stavu S_1 (zelená šipka, doba přechodu cca 10^{-15} s). Poté dochází k vibrační relaxaci na nejnižší vibrační hladinu prvního excitovaného stavu (žlutá čára, doba přechodu přibližně 10^{-12} – 10^{-10} s). Po tomto přechodu molekula může de-excitací vyzářit foton (λ_{emiF} , červená šipka, doba přechodu v rozmezí 10^{-10} – 10^{-7} s), nebo může nastat málo pravděpodobná situace intersystémového přechodu na nejnižší energetickou hladinu tripletového stavu T_1 (oranžová vlnovka, doba přechodu přibližně 10^{-10} – 10^{-6} s). Časově posunutá emise ze stavu T_1 do stavu S_0 je známa pod pojmem fosforescence (λ_{emiP}). [2]

Při vynesení závislosti absorpce fluoroforu na použité excitační vlnové délce dostáváme spektrum, které je tvořeno celou řadou malých píků, některé z nich výraznější, některé méně. Velikost a pozice těchto píků odpovídá pravděpodobnosti s jakou se excitovaný elektron nachází na určité z vibračních hladin prvního excitovaného stavu, a zároveň vzdálenosti energetických stavů v molekule. Tato vzdálenost souvisí s konformací fluoroforu – aktuálním rozložením atomů a elektronů. Když se vezme do úvahy ten fakt, že molekula může nabývat různých konformací, potom se jednotlivé píky začnou slévat dohromady a získá se tak emisní

a excitační spektrum, každému fluoroforu typické a jedinečné, na Obr. 2 lze vidět příklad takového spektra. V případě emise nastává stejná situace. Elektron-vibrační stav molekuly přechází z excitovaného stavu do stavu základního a vibračního jakéhokoli z dostupných. Rozdíly mezi jednotlivými píky jsou opět způsobeny konformačními změnami v molekule a také tím faktem, že se nikdy nesleduje jedna molekula, ale velké počty molekul fluoroforu. [1]

Rozdíl excitačního (v grafu vždy nalevo) a emisního spektra (vždy vpravo) se nazývá Stokesův posun a tento posun vyjadřuje právě ztrátu energie při návratu zpět na základní hladinu a potažmo rozdílům ve vlnových délkách absorbovaného/emitovaného fotonu.



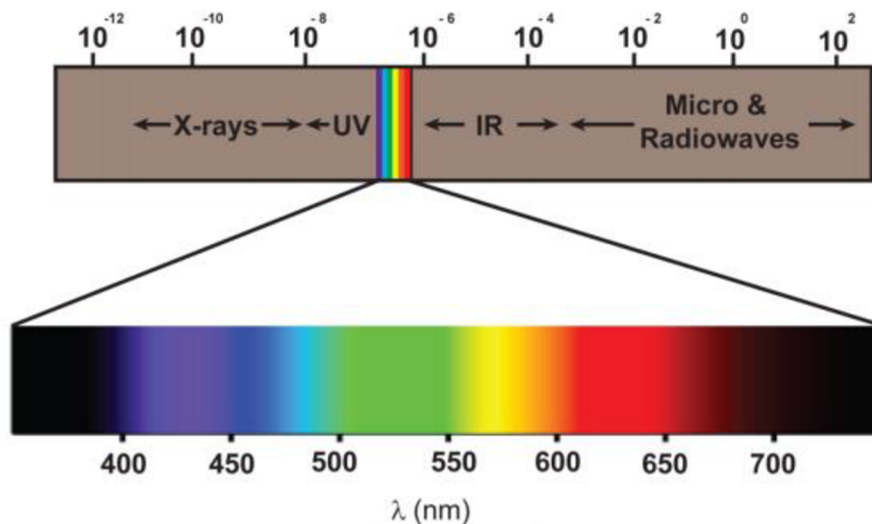
Obr. 2: Emisní a excitační spektrum propidium iodidu. [3]

Druhou možností je uvolnění energie tzv. fosforescencí. Jedná se o málo pravděpodobný intersystémový přechod, kdy dochází ke spinové konverzi ze systému S_1 do T_1 (oranžová šipka na Obr. 1). Tento přechod je kvantově mechanicky zakázán. Fialová šipka poté ukazuje opožděný přechod elektronu z hladiny T_1 na základní hladinu S_0 .

Kvůli ztrátě vibrační energii molekuly nacházející se na hladině S_1 nese emitovaný foton menší energii než původní, a vlnová délka je proto větší. Vztah mezi energií a vlnovou délkou je popsán rovnicí:

$$\Delta E = \frac{hc}{\lambda}, \quad [1.]$$

kde h je Planckova konstanta $6,6261 \cdot 10^{-34}$ Js, c je rychlost světla ve vakuu $3 \cdot 10^8$ ms a λ je vlnová délka. Z této rovnice vyplývá, že barva emitovaného světla bude posunuta směrem k červené barvě, jedná se o tzv. red-shift, protože čím menší energie fotonu, tím větší jsou hodnoty vlnových délek. [1][2]



Obr. 3: Ve vrchní části je zobrazeno elektromagnetické spektrum s vyznačenou částí pro viditelné světlo. Číslování je myšleno v jednotkách metrů. V dolní části je zobrazeno spektrum viditelného elektromagnetického záření. Světlo mající vlnovou délku v levé části, tedy modré světlo, má větší energii než světlo v pravé části spektra. [1]

2.1.4 Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy, fluorofory, jsou látky jejichž molekuly jsou schopné absorbovat foton elektromagnetického záření, přičemž tento foton excituje elektron-vibrační stav molekuly barviva. Tato excitace probíhá tak, jak bylo diskutováno u Obr. 1. Existuje několik parametrů fluoroforů, které jsou pro každou látku specifické, a měl by se na ně brát zřetel. Mezi tyto parametry patří absorpční maximum, emisní maximum, molární extinkční koeficient (ϵ , vyjadřuje schopnost molekuly absorbovat světlo, má velký vliv na fluorescenční vlastnosti molekuly), kvantový výtěžek (Φ , v podstatě podíl emitovaných a absorbovaných fotonů, vysoký kvantový výtěžek je žádoucí) a délka života (τ , jak průměrně dlouho je molekula v excitovaném stavu než vyžáří foton a vrátí se na stav základní). [1][4]

Fluorescenční značení patří mezi nejcitlivější a nejinformativnější metody analýzy buněk. Velkou výhodou je široká škála fluoroforů o různých parametrech, které byly zmíněny výše. Zároveň je možno barviva přizpůsobovat např. zaváděním funkčních skupin, výměnou rozpouštědel apod. Sondy se mohou k analyzovaným látkám vázat kovalentně nebo nekovalentně, v některých aplikacích se může využívat i protilátek. Nejčastěji značenými biomolekulami jsou aminokyseliny, peptidy, proteiny a DNA. [4]

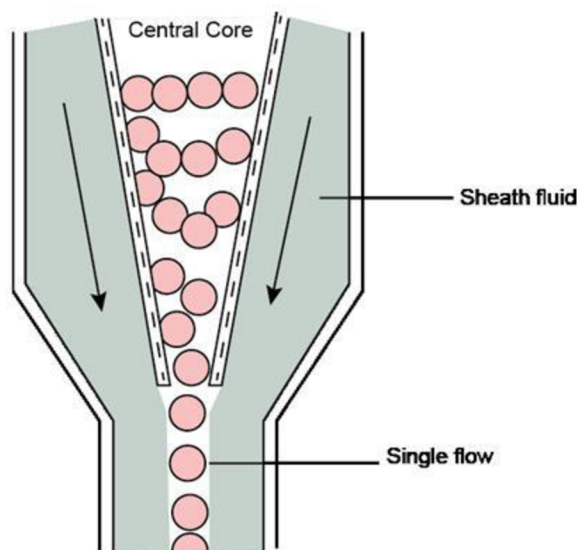
Výhoda analýz využívajících fluorescenci je ta, že buňky mikroorganismů je možno studovat v reálném čase neinvazivní metodou, tudíž organely nemusí být vyjmuty vně buňky, kde takovéto vyjmutí může mít velký vliv na studium interakce organela–fluorofor. [4]

Vybrané fluorofory jsou blíže diskutovány v kapitolách: 2.1.8.1 pro stanovení viability, 2.2.7 pro analýzu polyhydroxyalkanoátů a v 2.1.9 jsou popsány sondy genové exprese.

2.1.5 Průtoková cytometrie

Jedná se analytický nástroj umožňující rychlou analýzu několika tisíce buněk za sekundu a to na úrovni jedné buňky (single-cell-level). Instrumentace je optimalizována pro analýzu jednotlivých buněk. Buněčná suspenze je nasáta do průtokové cely, kam je dopravena pomocí nosné kapaliny. Buňky jsou v nasátém roztoku náhodně rozmístěny, pro analýzu je ovšem potřeba tyto buňky za sebe jednotlivě seřadit, aby mohly být analyzovány jednotlivě v rychlé

sérii. Tento proces je řízen fluidním systémem. Do centrálního jádra (central core) je přiváděna suspenze buněk, jádro je ohraničeno vnějším pláštěm, kterým protéká nosná kapalina. Kapalina strhává jednotlivé buňky z jádra díky její vysoké rychlosti, která mění tok v centrálním jádře na parabolický. Takový typ toku má nejvyšší rychlost uprostřed, tedy na ústí jádra, a takto vyvinutá tažná síla je schopna uvádět suspenzi s buňkami do pohybu. Tomuto efektu se říká hydrodynamická fokusace a znázornění je na Obr. 4. [5]

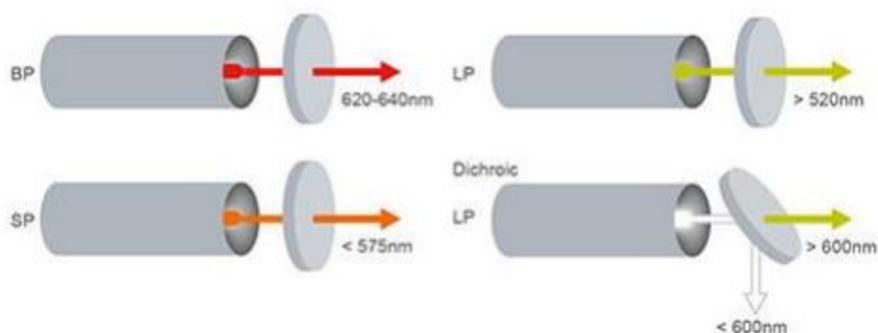


Obr. 4: Znázornění fluidního systému průtokového cytometru. [6]

Buňky vycházející z fluidní části cytometru ozařuje vhodný zdroj světla (nejčastěji se jedná o několik různých laserů). Zdroj světla musí být fokusovaný a mít konstantní vlnovou délku, proto jsou obvykle voleny lasery. Světlo dopadající na buňky je poté rozptýleno, a tento rozptyl je snímán ve dvou směrech dvěma detektory. Detektor umístěn ve směru 160–180° snímá přímý rozptyl (FS – forward scatter), kanál, který snímá tento typ rozptylu se nazývá jako přední rozptylový kanál (FSC – forward scatter channel). Další detektor je umístěn v úhlu 90° a je tedy nazýván detektor bočního rozptylu (SS – side scatter), kanál snímající světlo z tohoto rozptylu se nazývá boční rozptylový kanál (SSC – side scatter channel). Schéma optické části cytometru je zobrazeno na Obr. 6. [5]

Předtím, než jsou data kolektována prochází rozptýlené světlo sérií filtrů a fotonásobičů. Přímý rozptyl se vztahuje k relativní velikosti buněk, zatímco boční rozptyl dává informaci o vnitřní stavbě a povrchu buněk. Další informace jsou získány snímáním emise různých fluoroforů přidávaných ke vzorku po excitaci laserem s vhodnou vlnovou délkou. Filtry jsou zobrazeny na Obr. 5. [5]

Pro detekci emitované fluorescence jsou používány separované fluorescenční kanály. Detektory jsou nejčastěji křemíkové fotodiody nebo fotonásobiče (PMT). Detekce je řízena optickými filtry, které propouští světlo určitých vlnových délek, jiné jsou blokovány. Existují čtyři druhy filtrů. Band-pass (BP) filtr, který propouští světla pouze v určitém rozmezí vlnových délek. Long-pass (LP) propouští světlo o vyšší než specifikované vlnové délce. Short-pass (SP) je opakem, tedy propouští nižší než uvedené vlnové délky. Dichronické zrcadlo propouští světlo určité vlnové délky, blokové odráží pod úhlem 90°. [7]

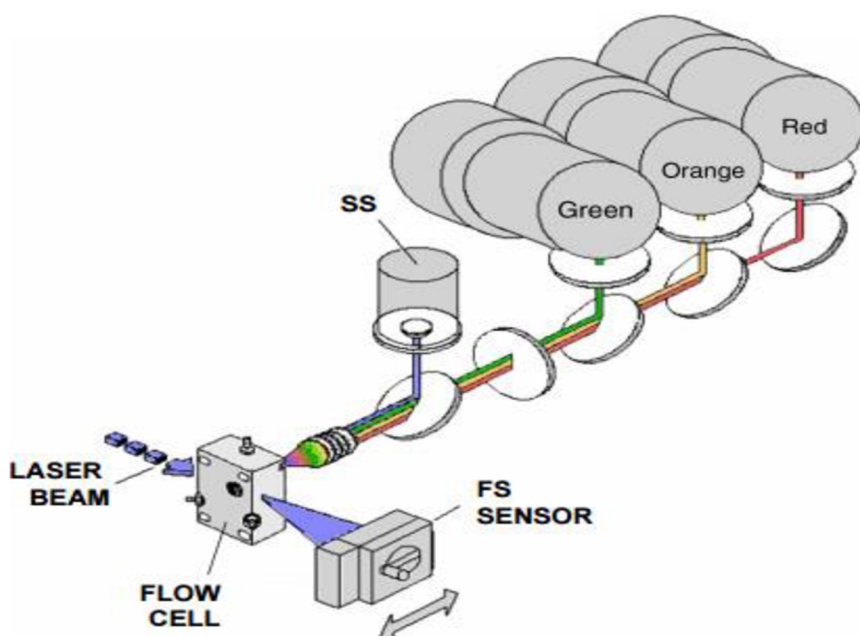


Obr. 5: Ukázka čtyř typů filtrů průtokového cytometru. [7]

Když foton emitovaného světla dorazí na detektor, vygeneruje se proud řádově několik mikroampérů silný. Proud je úměrný počtu fotonů, které jsou detekovány. Vzhledem k jeho malé hodnotě je potřeba jej několikrát zvýšit, toho se dosáhne sérií zesilovačů lineárních a logaritmických, a analogově zesilovacích konvertorů (ACD). Zesílený elektrický signál má hodnotu přibližně 10 voltů. [5]

Některé cytometry mají schopnost třídění buněk na základě nějakého parametru (barva fluorescence, velikost apod.), přístroje konvenčně používané pouze analyzují a poté odvádí buňky do odpadní nádoby. [8][9]

Překážkou v analýze pomocí průtokového cytometru je rozmanitost mikroorganismů. Použití každého fluoroforu musí být optimalizován pro každý určitý druh mikroorganismu. Některé fluorofory nejdou v některých případech vůbec použít, u některých musí být optimalizována jak jejich koncentrace ve vzorku, tak i podmínky inkubace, a to vše s ohledem na konkrétní testovanou mikrobiální kulturu. [8]



Obr. 6: Princip optické části standardního průtokového cytometru. Zobrazeny jsou detektory pro přímý (FS) a boční (SS) rozptyl. Světlo snimané z buněk obarvených vhodným fluoroforem je amplifikováno fotonásobiči. Zelená, oranžová a červená fluorescence je snímána kanály po přechodu příslušnými pásovými filtry. [5]

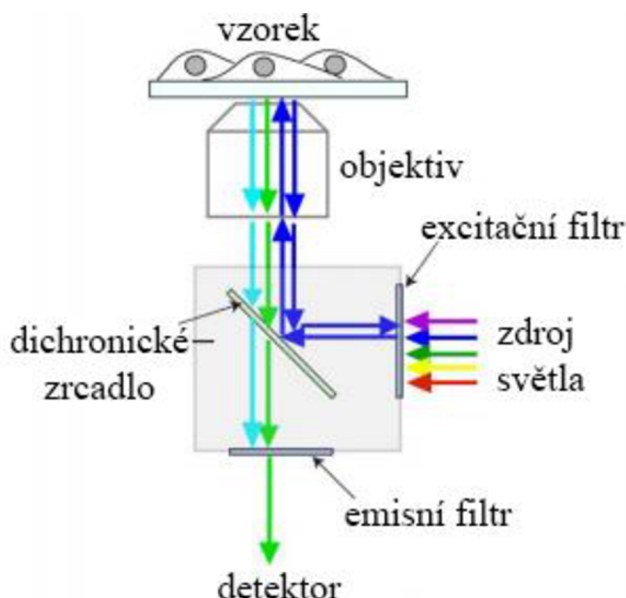
Velkou výhodou je případné využití multiparametrové analýzy, kde je snímáno několik emisí fluorescenčních barviv najednou. Jedná se velmi rozvíjenou oblast, analýza se stává velmi praktickou a její spolehlivost je větší než spolehlivost několikanásobného analyzování vzorku při použití různých fluoroforů jednotlivě. [10]

2.1.6 Fluorescenční mikroskopie

Mikroskopie jako taková je tradičně využívána k přímému počítání mikrobiálních buněk ve vzorku, optický mikroskop je široce využíván právě za tímto účelem. Sofistikovanější mikroskopy jako jsou ty fluorescenční využívají stejné optické principy jako klasické optické mikroskopy, velmi rozdílná je ovšem příprava vzorku a vyhodnocování dat. Největší rozdíl co se týče přístrojového zařízení je využití filtrů k vizualizaci zkoumaného vzorku obarveného určitou sondou. Právě možnost využití fluoroforů k analýze je hlavní výhodou této formy mikroskopie. Možnost barvení buněk zvýšila účinnost využití mikroskopie jak k počítání buněk, ale hlavně otevřela dveře k možnosti získání mnoha jiných informací jako je viabilita, obsah lipofilních látek apod. Existuje mnoho různých uspořádání mikroskopů a mikroskopických postupů či samotných přístrojů od epifluorescenční až ke konfokální fluorescenční mikroskopii.

Podstata získání obrazu spočívá v nasvícení vzorku světlem o určité vlnové délce, excitaci fluoroforu a konečném snímání emitovaného světla. Velkou výhodou fluorescenční mikroskopie je rychlost získání výsledků oproti např. zkouškám viability kultur na pevných médiích (viz. kapitola 2.1.8.1). Ovšem obsluha přístroje a příprava vzorků jak při barvení fluoroforem, tak i finální přípravě vzorku na pozorování vyžaduje určité zkušenosti a obezřetnost. U mikroskopie nelze také sledovat velké počty buněk najednou, je zde limitace na pozorování několika málo buněk, často pouze jednu. Samotné nastavení přístroje, výměna filtrů a získávání ideálního rozlišení je práce časově náročná. [11][12]

Schéma uspořádání klasické (epifluorescenční) mikroskopie je na Obr. 7.

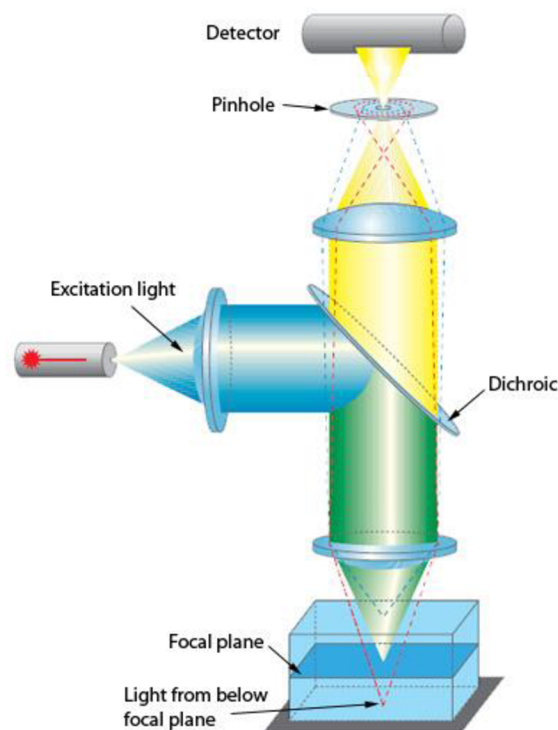


Obr. 7: Uspořádání klasického fluorescenčního mikroskopu.[13]

Zorné pole, tedy vzorek, je snímáno v jednom čase. Signál je snímán stejnou čočkou (objektivem) jakou prochází paprsky osvětlení. Zdroj světla může být libovolný zdroj studeného světla, nejčastěji je využívána rtuťová výbojka, světlo je monochromatické. Šedý

čtverec symbolizuje tzv. kostku skládající se ze dvou cut-off filtrů (excitačního a emisního) a dichronického zrcadla. První filtr je short-pass, což znamená, že jím projde světlo pouze o určité vlnové délce a menší. Přes dichronické zrcadlo se dostávají pouze vyšší vlnové délky, kratší se odráží a paprskový svazek je fokusován na vzorek. Světlo putující od vzorku do detektoru má vyšší vlnovou délku (red-shift efekt), proto zrcadlem prochází. Druhý (long-pass) filtr propouští vlnové délky vyšších hodnot a světlo je fokusováno do detektoru. [15] Velkou nevýhodou tohoto druhu mikroskopie je ten fakt, že signál přicházející do detektoru není pouze z ohniskové roviny, ale přichází i z prostoru mimo ni, signál je tedy mírně rozmazaný. [15]

Další možností je využití konfokálního rastrovacího mikroskopu, který řeší problém fluorescence přicházející z jiných než je fokusační rovina. Jako zdroj excitace se bere jeden zářící bod, celý vzorek není v jednom okamžiku osvětlen.



Obr. 8: Základní schéma konfokálního rastrovacího mikroskopu. [16]

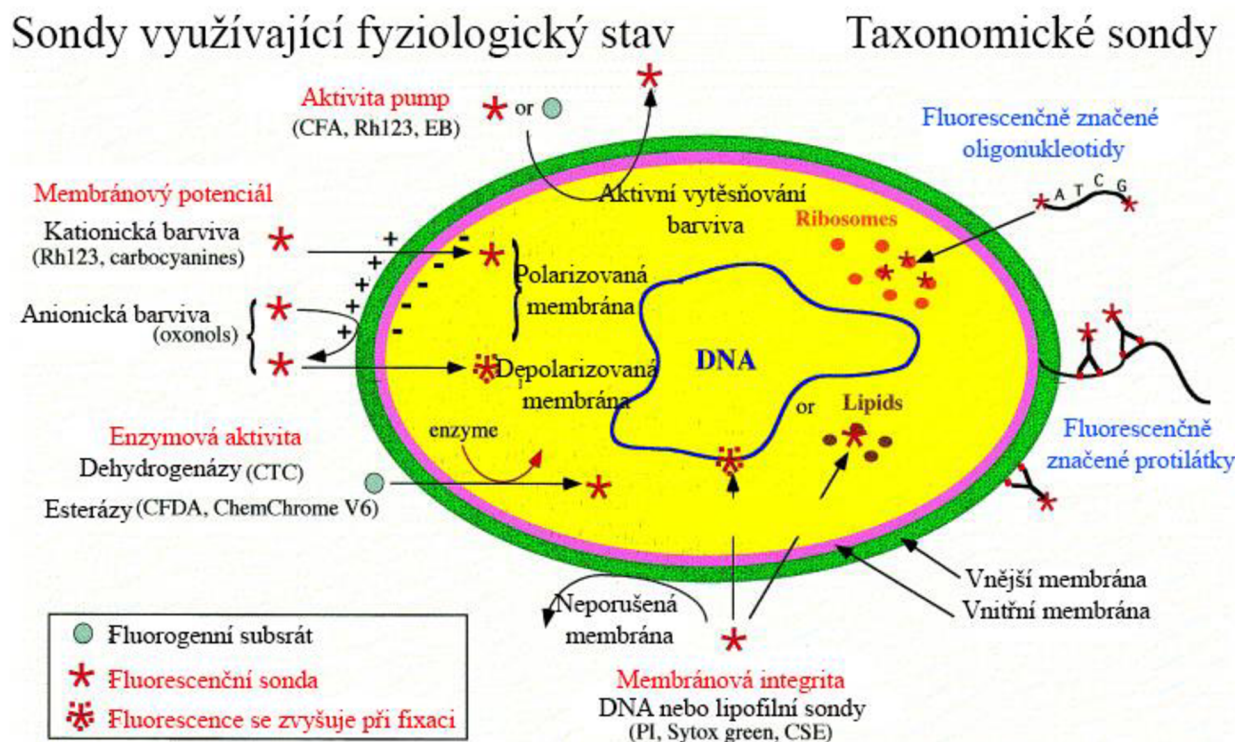
Emitované fotony z osvětleného bodu jdou ve stejném uspořádání jako bylo popsáno u epifluorescenčního uspořádání zpět skrze dichronické zrcadlo na fokusační čočku, poté jsou lámány do svého ohniska, které je v bodovém otvoru ve cloně. Z tohoto uspořádání plyne, že emise z jiných než zafokusovaných rovin je odříznuta právě tímto otvorem, tzv. pinhole. Signál, který projde, vstupuje do fotonásobiče, kde je zesílen a poté převeden do počítače. Aby mohl být vzorek skenován celý, v uspořádání navíc figurují rastrovací zrcátka vložená mezi zdrojovou čočku a dichronické zrcátko. Ty pohybují se směrem svazku, takto přejíždí po celém vzorku. Výsledkem je matice bodů, kde světlost každého bodu odpovídá jeho dané intenzitě detekované fotonásobičem. [17]

Jako zdroj excitace jsou používány sady pevnolátkových laserů. Pro použitou vlnovou délku laseru a použitou sondu je obvykle vhodné vyměnit dichronické zrcátko tak, aby byla vhodně

zvolena vlnová délka pro odraz světla. Nevýhodou tohoto typu mikroskopie je časová náročnost [17].

2.1.7 Využití fluorescence při analýze bakteriálních buněk

Fluorescence je široce využívána při charakterizaci buněk, ať už se jedná o fyziologický stav, či využití fluoroforu pro barvení určitých částí buňky. Existuje nepřeberné množství fluorescenčních barviv pro různé typy analýz. Při výběru fluoroforu je nutno dbát nejen na důvod a cíl barvení, je nutno brát ohled i na charakteristiky samotné sondy a jejich kompatibilitu s přístroji, na kterých bude prováděno měření.



Obr. 9: Přehled nejčastěji využívaných charakteristik buňky a typů fluoroforů pro jejich analýzu. [18]

Vnitřní prostor buňky je negativně nabit vzhledem k okolí, ve kterém se buňka nachází. Vzhledem k náboji fluorescenční barvy jsou její molekuly buď akumulovány v polarizovaných (barvy kationové povahy) nebo nepolarizovaných (barvy aniontové povahy) buňkách. Za vhodných podmínek je metabolická aktivita buňky přímo úměrná k množství proniklého fluoroforu. Mezi sondy membránového potenciálu patří např. Rhodamin 123 hojně využíván v průtokové cytometrii nebo CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) fluorofor využíván spíše v mikroskopii [18]. Výše uvedené sondy jsou často využívány jako viabilitní sondy, protože narušení membránového potenciálu je považováno za marker buněčné smrti.

Esterázová aktivita je měřena pomocí lipofilních, nenabitých a nefluoreskujících substrátů. Takto fluorescenčně neaktivní substrát je uvnitř živých buněk štěpen nespecifickými esterázami na fluorescenční produkt, který zůstává uvnitř buněk díky neporušeným membránám. Nejčastěji jsou využívány fluoresceinové deriváty nebo fluorescein samotný [18]. V případě Gram-negativních bakterií je ovšem potřeba permeabilizace vnější membrány, která je pro tyto sondy neprůnikatelná. Problémem těchto barev je aktivní

transfer ven z buněk pomocí pump [19]. Existuje mnoho náhrad a derivátů přizpůsobených pro barvení různých druhů bakterií jako je např. ChemChrome B [20].

Některé fluorofory mají možnost proniknutí do buněk skrze membránové pumpy, v živých buňkách jsou ovšem opět odváděny zpět do okolí. To je případ Rhodaminu 123 [21], karboxyfluoresceinu a ethidium bromidu [22]. Využití membránových pump jako ukazatele buněčného stavu je ovšem nevhodné z důvodu rozdílných a nejistých výsledků, protože každá buňka může mít aktivitu rozdílnou, a existuje mnoho parametrů v okolí buňky, které mohou interferovat s aktivitou konkrétní membránové pumpy [18].

Membránová integrita je často skloňovaný parametr ukazující na životaschopnost buňky. Existuje široce rozšířený názor, že mrtvé buňky mají membránu poškozenou, ovšem jak je diskutováno v sekci 2.1.8 a 2.1.8.1, poškození membrány nemůže být bráno jako jednoznačný parametr vypovídající o viabilitě buňky. Velmi důležitá je stavba buněčné stěny, protože Gram-negativní a Gram-pozitivní bakterie se značně liší její stavbou. Obal Gram-negativních bakterií se skládá ze tří částí: vnější membrána, peptidoglykanová vrstva a vnitřní (plasmatická) membrána. U Gram-pozitivních bakterií chybí vnější část membrány. Některé bakterie mají navíc vysoce hydratovaný polysacharidový povlak obalující buňku. Ve své podstatě využívá analýza membránové integrity nepropustnosti těchto obalů pro fluorofory, které když proniknou dovnitř buňky, tak intenzivně fluoreskují a dávají tak signál, že buňka má poškozenou membránu. Nejčastěji jsou používány barviva vázající se na nukleové kyseliny vzhledem k vysokým koncentracím těchto kyselin v buňce. Mezi takovéto fluorofory patří např. propidium iodid či jeho kombinace se SYTO9 v soupravě BacLightTM. [18]

Detekce poškozené DNA je využívána při charakterizaci buněk, které podlehly apoptóze a to hlavně u eukaryotických buněk. V prokaryotických buňkách to není tak jednoznačné, protože často dochází k uchování nepoškozené DNA i delší dobu po buněčné smrti, nebo naopak změny v DNA v důsledku nutričního strádání mohou být považovány za poškozenou DNA z důvodu úhynu [23]. Velmi často se používá sonda DAPI, která se široce využívá v analýze pitné vody [18].

Obsah celulórní rRNA může být pomocí fluorescence kvantifikován *in situ* hybridizací (FISH) pomocí fluorescenčně značených oligonukleotidů. Obsah tohoto typu RNA v buňce je velmi závislý na fyziologickém stavu buňky, a ve které části vývojového cyklu se nachází [18]. Samotná rRNA je vysoce stabilní, takže změnu obsahu v buňce nelze využít při zkoumání stresových podmínek a jejich vlivu na buňku. Pomocí akridinové oranži lze ovšem stanovit jak relativní obsah rRNA, tak i v kombinaci s fluorescencí závisující na obsahu DNA v buňce zjistit stav buňky a v jaké části životního cyklu se nachází.

2.1.8 Viabilita

Viabilními se obecně rozumí buňky živé, tedy ty se schopností růst, dělit se, metabolizovat a interagovat se svým okolím. Definice a detekce tohoto vcelku abstraktního pojmu je problémem pro mikrobiology dlouhou dobu. Překážkou, a největším otazníkem, je separace viabilních buněk od neviabilních. Růst bakterie je dynamický proces a jakákoli buněčná kultura v sobě obsahuje buňky živé a mrtvé. Jako mrtvé buňky jsou definovány ty, jejichž buněčné funkce jsou zastaveny, ovšem zde se dá říct, že i takové buňky mohou být aktivní ve smyslu produkce sekundárních metabolitů, a tyto sekundární metabolity mohou dopomáhat k růstu ostatním buňkám. V tomto případě se ovšem nelze bavit o aktivním metabolismu jako spíše pomalému rozpouštění a difuze buněčného materiálu do okolí, díky kterému buňky nejsou považovány za mrtvé. [18][25]

Obecně se mikroorganismy dají volně rozdělit do tří skupin: živé, dormantní ("spící"), mrtvé. Dormantní buňky jsou takové, jejichž metabolismus je zcela utlumen, ve světě kategorizování mají blíže kategorii "mrtvé buňky" než ty aktivní a živé. Tento stav utlumení je reverzibilní, ovšem mikroorganismus potřebuje určité ideální podmínky a adaptační čas, aby se mohl dostat do stavu, ve kterém je schopen plného metabolismu, růstu a dělení. [26][27]

2.1.8.1 Stanovení viability bakterií

Suspenze buněk v médiu obsahuje jak živé, tak i mrtvé buňky, proto je důležité, aby existovaly spolehlivé metody na rozlišení těchto dvou buněčných stavů [25]. Jako ukazatel viability se brala schopnost vytváření kolonií na pevném médiu obsahujícím dostatečnou výživu. Zde je ale problém ten, že tento postup neříká nic o nějaké absolutnější hodnotě viability ve vzorku, resp. neříká nic o životaschopnosti jednotlivých buněk, spíše pouze poukazuje na to, že ve vzorku existují buňky schopné růstu a dělení [24].

S touto metodou souvisí pojem buňky kultivovatelné, tedy takové, které jsou schopné růstu a rozrůstají se v kolonie. Zde je důležité si uvědomit, že ne všechny viabilní buňky jsou kultivovatelné, ale všechny buňky kultivovatelné jsou viabilní. První případ může nastat tehdy, nemá-li buňka ideální podmínky pro svůj růst a množení, tedy pod určitým stimulem povětšinou negativního vlivu. Zde se může jednat o nedostatek živin, teplotu, osmotický stres, nedostatečný/přílišný přísun kyslíku apod [31]. Jako mezinárodní pojem se ujalo označení "Cells Viable But Non Culturable - VBNC" a většina mikroorganismů má definovatelné podmínky pro tento stav. Takovéto buňky jsou potenciaálně převeditelné do stavu plné kultivovatelnosti, ale opět záleží na podmínkách, které jsou většinou specifické a úspěšnost se pohybuje spíše v hodnotách první čtvrtiny procentuální stovky. [25][28][29]

Proti tomuto tvrzení stojí názor, že viabilní buňky bez schopnosti množení je, vzhledem k definicím viability a hlavně části hovořící o viabilitě jako schopnosti růstu, koncept bez smyslu [30].

VBNC mikroorganismy se mohou řadit do skupiny dormant, stejně jako buňky poškozené, ale prozatím ne mrtvé. Zde je prezentován další problém při analýze viability buněk a to je rozeznání buněk poškozených a živých, ale nekultivovatelných. Stav poškození může vyústit v buněčnou smrt v momentě, kdy buňka není schopna při kumulovaném či jednorázovém poškození opětovně začít růst. V určitých ideálních podmínkách může ale buňka poškození napravit a opět začít růst a dělit se. Dormance ve smyslu buněčného útlumu, ale ne poškození, je povětšinou způsobena určitou formou strádání, ale resuscitace, jak již bylo zmíněno výše, může nastat při změně okolních podmínek směrem k ideálnímu rozmezí. [27]

Zde tedy dochází k rozporu o vypovídací hodnotě metody sázení na agarové plotny jako metody zjišťující viabilitu mikroorganismů. Proto byla potřeba vyvinutí nových metod zjišťujících tento parametr bez potřeby zahrnování viditelného růstu. Jako ideální se jeví právě fluorescenční analýzy aktivity metabolických pochodů či integrity buňky. Viabilita buněk může být zjišťována právě z hlediska buněčné integrity, metabolických pochodů či schopnosti replikovat se. [28]

Integrita buněčné stěny může být zjišťována pomocí sond, které mají určitou schopnost penetrace do buňky přes stěnu za určitých podmínek [32]. Buněčná stěna živých buněk je považována za neproniknutelnou pro většinu sond, na druhé straně stěna mrtvých buněk je brána jako poškozená a tudíž propustná. I toto tvrzení neplatí vždy, existují případy, kdy byla

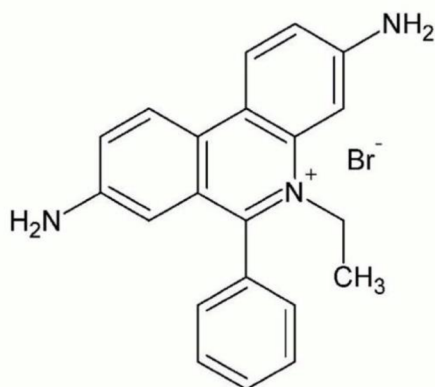
zachována membránová integrita, ačkoli buňky byly mrtvé [33]. Byly zaznamenány i případy, kdy byly buňky viabilní, ale díky velmi rychlému růstu došlo k poškození membrány, to hlavně v případě, že se buňky nacházely ve velmi výživném prostředí [34].

Metabolické pochody jsou naproti tomu často měřeny sondami interagujícími s ATP [35]. Schopnost replikace je nejčastěji určována tradičním výsevem na pevné médium.

Následující text se bude věnovat vybraným fluorescenčním sondám používaným ke stanovení viability mikroorganismů.

2.1.8.2 Ethidium bromid

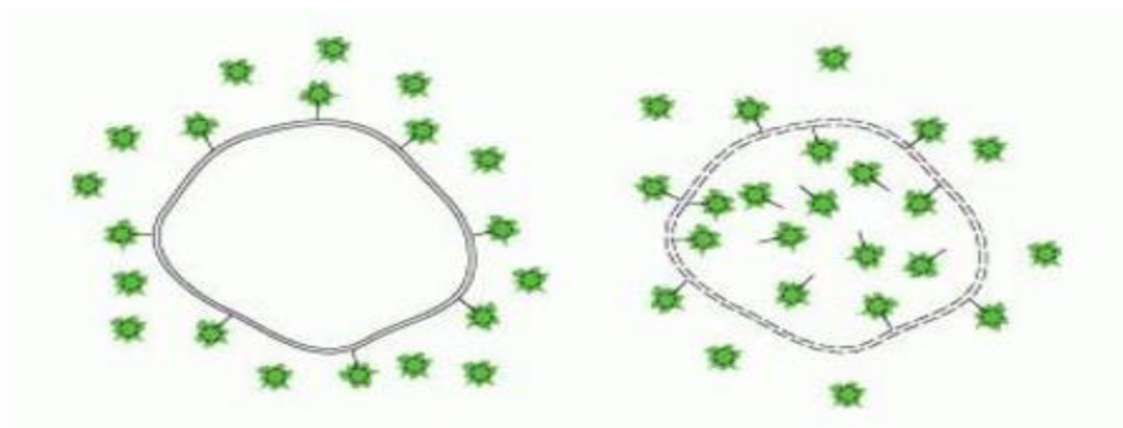
Jedná se o DNA viabilitní sondu, jejíž molekuly se zařazují mezi báze (přibližný počet je jedna molekula EB na 4 báze) v dvoušroubovici, a to jak eukaryotických, tak i prokaryotických buněk. Největší využití nachází v gelových elektroforetických analýzách. Ethidium bromid je relativně specifický, barvení probíhá s velkou rychlostí a není potřeba fixování vzorku. Velká nevýhoda je mutagenita ethidium bromidu, proto barvení vzorků a jejich následná likvidace musí probíhat s největší opatrností. [36]



Obr. 10: Vzorec ethidium bromidu. [37]

2.1.8.3 Near-IR Sonda

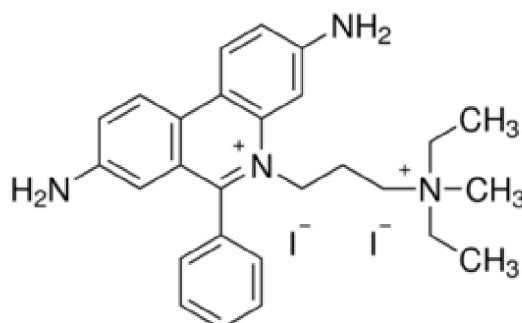
Tento fluorofor je součástí LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit. Principem je vytvoření kovalentní vazby mezi sondou a volnými aminovými skupinami proteinů uvnitř buňky po průchodu poškozenou membránou. Zároveň dochází k vytvoření vazby barva-amin na povrchu buněčné stěny, ale takto získaná fluorescence je několikanásobně nižší než v prvním uvedeném případě. Vzhledem k vysokým hodnotám excitačních a emisních vlnových délek (750/776) je tento fluorofor považován za vhodnou součást multiparametrických analýz. Nevýhoda barev reagujících s aminy, které jsou ve formě roztoku, je jejich časová nestabilita, proto se doporučuje rychlé spotřebování a to v rámci hodin. [38]



Obr. 11: Názorně ukázaný princip fungování Near-IR fluoroformu. Vlevo je případ živých buněk, kde se fluoroform nachází pouze na povrchu. Napravo je mrtvá buňka, jejíž poškozenou membránou barva prošla a zreagovala s aminy uvnitř. [38]

2.1.8.4 Propidium iodid

Jedná se o jednu z nejvíce používaných viabilitních sond. Živé buňky se od těch mrtvých liší schopností vylučovat, popř. úplně zabránit molekulám v proniknutí skrze buněčnou stěnu, což u mrtvých buněk s poškozenou membránou není možné. Velkou výhodou této sondy je její široké využití ať už v eukariotických či prokaryotických buňkách, dále je to jednoduchost použití, emitované světlo je jasné a výsledky přesné. [3][39]



Obr. 12: Chemický vzorec propidium idodidu. [3]

Nevýhodou této barvy je podezření na karcinogenost a tudíž zacházení vyžaduje opatrnost, obzvláště při manipulaci s práškovým PI. Sonda se po průchodu do buňky váže na DNA a to mezi báze, přičemž zařazování je náhodné. Přibližný odhad je jedna molekula propidia každé 4-5 báze. V multiparametrových analýzách je PI často používáno jako ukazatel mrtvých buněk. Metodické a přístrojové využití je široké, hodí se jak pro cytometrické stanovování, tak i pro fluorescenční mikroskopii. [39]

2.1.8.5 SYTO9

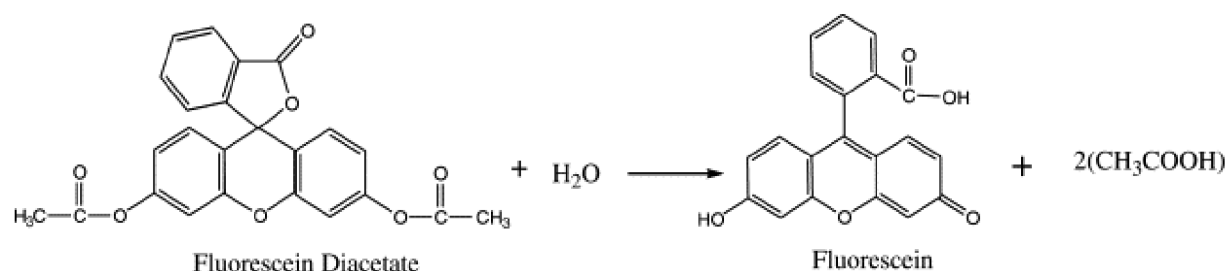
Další z řady DNA sond, SYTO9 proniká do buněk živých i mrtvých, Gram-pozitivních i Gram-negativních. Tento fluorofor se vyznačuje vysokým extinkčním koeficientem ($>50,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$), při nenavázání na DNA či RNA jsou hodnoty kvantových výtěžků menší než 0,01, při navázání jsou ovšem tyto hodnoty vyšší než 0,4. Vzhledem k rozpouštění v DMSO je potřeba opatrnosti při zacházení. Fluorofory řady SYTO emitují světla různých vlnových délek, zde popisovaná sonda emituje světlo zelené o vlnové délce 498 nm. [40]

Společně s propidium iodidem je SYTO9 součástí LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability kitu. Při použití těchto barviv lze s velkou přesností rozlišit buňky mrtvé od živých a to právě díky membránové integritě buněk. SYTO9 barví všechny buňky, propidium iodid pouze ty s poškozenou stěnou. V případě mrtvých buněk, kdy jsou přítomné oba fluorofory, PI vykazuje vyšší afinitu k DNA než SYTO9 a zároveň signál v zeleném kanálu je několikanásobně snížen. [41][42]

V některých případech byla pozorována zhoršená permeace buněčné stěny Gram-negativních bakterií, což mělo za následek zkreslené údaje o počtu mrtvých buněk ve vzorku. Zároveň je nebezpečí poškození membrány při stresu, dělení, syntéze apod., přičemž se tyto situace odehrávaly v okamžiku inkubace fluoroforu [42][43]. Aktivní exkluze barviva z cytoplazmy před jeho navázáním na DNA v živých buňkách může být dalším důvodem nepřesného měření [44].

2.1.8.6 Fluorescein diacetát

První využití této sondy se datuje až do roku 1963 a od té doby je fluorescein stále využívanou sondou indikující živé buňky [45]. FDA je substrátem pro cytoplasmatické esterázy, kde enzymatická aktivita převádí fluoresceinovou molekulu na zeleně fluoreskující formu a to formou hydrolyzy. Aktivita těchto esteráz ukazuje na životaschopnost buněk.

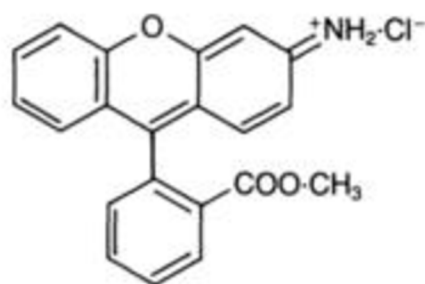


Obr. 13: Hydrolyza FDA na fluoreskující formu fluorescein [47]

Bylo poukázáno na dva problémy při používání FDA jakožto viabilitní sondy. Nefluorescenční forma může být hydrolyzována i při absenci živých buněk, a může docházet k výraznému zhášení fluorescence. Obě tyto situace mohou přinést značně zkreslené výsledky neodpovídající skutečnosti. Některá média a pufrů (Tris-HCl nebo sodno-fosfátový) byly označeny jako hydrolyzující. Je třeba vždy kontrolovat pH pracovního pufru používaného pro analýzu, protože fluorescein jako takový existuje v několika různých formách závislých na pH. [46][47]

2.1.8.7 Rhodamin 123

Schopnost zachování elektrochemického gradientu přes plasmatickou membránu je dalším znakem dle kterého se dají rozpoznat živé buňky od mrtvých. Je zachován pH a iontový gradient a existuje energie vyrábějící metabolismus mitochondrií. Rhodamin 123 je lipofilní sonda kationového charakteru, která se váže na mitochondriální membrány. Při funkčnosti a zachování gradientu této membrány se nefluorescenční forma Rhodaminu přeměňuje na aktivní, zeleně fluoreskující formu. Výhoda této sondy je vysoká citlivost a schopnost reagovat i na malé změny v membránovém potenciálu, plus reakční čas je velmi malý. [48]



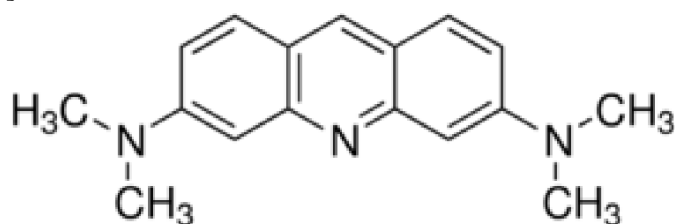
Obr. 14: Vzorec fluorescenční formy Rhodamimu 123. [48]

Tento fluorofor nemá cytotoxické účinky. Zároveň nebylo reportováno výrazné samo-zhášení při použití v průtokové cytometrii, ale problém byl při použití ke stanovení viability Gram-negativních bakterií, jejichž membrána výrazně ztěžovala průchod sondy. Tento problém byl ve větší míře vyřešen přidáním EDTA ke vzorku buněčné suspenze. Živé metabolizující bakterie jsou schopny akumulovat kationické látky lipofilní povahy. [49][50]

2.1.9 Analýza genové exprese

Akridinová oranž a pyronin Y jsou nejčastěji používané fluorofory barvící RNA, přičemž první zmiňovaný barví i DNA. AO našla uplatnění v širokém záběru technik a metod právě díky své unikátní vlastnosti barvení obou nukleových kyselin. Obsah DNA je v jedné buňce relativně stálý, ale právě díky změnám v obsahu RNA lze zjistit o buňce několik důležitých informací. Přibližně 80% buněčné RNA je rRNA, většina zbývajících procent je tRNA a velmi malé procento patří dalším druhům RNA jako např. mRNA. Z toho lze říci, že při zjišťování obsahu RNA dostáváme primárně informaci o přítomnosti určitého počtu ribosomů v buňce, což je v podstatě translační potenciál buňky.

Dělící se buňky dvojnásobí obsah všech svých organel, tedy i ribosomů. Jak tedy buňka prochází svým životním cyklem, celkový obsah RNA se výrazně mění a např. díky znásobenému obsahu RNA lze rozpoznat fázi buněčného dělení [51]. Buňky nacházející se ve fázích G_0 a G_{1Q} mají v průměru 5–10krát méně ribosomů než aktivně metabolizující a dělící se buňky [52].



Obr. 15: Vzorec akridinové oranže [53]

V cytometrickém stanovení buněčného cyklu za použití akridinové oranže se využívá různých absorpčních a emisních spekter při vazbě na dvou versus jedno-řetězové nukleové kyseliny. Tento jev se nazývá metachromazie. Molekula oranže vmezeřená do dvoušroubovice DNA má absorpční maximum 500–506 nm, emisní maximum se nachází mezi hodnotami 520–524 nm. [54]

V případě jednořetězové nukleové kyseliny se AO dostane mezi dvě sousední báze, neutralizuje náboj polymeru díky své kationové povaze a zároveň dochází ke kondenzaci a aglomeraci polymeru. Nakonec tedy dostáváme molekuly AO prokládané bázemi, které nemohou interagovat s kyslíkem či vodním prostředím (vychází to z povahy přeměny

na pevné skupenství při precipitaci). Absorpční spektrum je posunuto směrem k nižším hodnotám vlnových délek (blue-shift), kde maximum je mezi 426 a 458 nm. Emisní spektrum se pohybuje v rozmezí 630 a 644 nm. [54]

Nezanedbatelné procento řetězců tRNA a rRNA má dvoušroubovicové uspořádání, je tedy potřeba denaturovat tyto řetězce při zachování nativní formy DNA. Takovou denaturaci je možné iniciovat umístěním buněk do roztoku EDTA. Velkou roli zde hraje termodynamicky výhodnější interakce AO s jednořetězcovou DNA, a to při zvýšení koncentrace barvy vzhledem k fosfátovým skupinám. Výhodnější je slabší, ale početnější vazba AO na jednořetězcový polymer oproti silnější, ale méně časté (1:4) vazbě na dvouřetězcový polymer RNA. Velkou roli v této denaturaci hraje i iontová síla roztoku, která je relativně vysoká vzhledem ke koncentracím solí v barvicím roztoku (0.15M NaCl). Dochází ke kompetitivním interakcím řetězce s AO^+ a Na^+ a celková koncentrace volných molekul oranži v roztoku je tedy rozhodující při denaturaci. [55]

Z uvedených důvodů je tedy barvení akridínovou oranží závislé na podmínkách přípravy roztoků a barvení, pro ideální koncentrace fluoroforu a pomocných látek jsou velmi úzká rozmezí.

2.2 Polyhydroxyalkanoáty

Přítomnost PHA granulí v některých mikroorganismech je známá už delší dobu. První vědec, který si všimnul těchto struktur byl Beijerinck v roce 1888, a to jako vysoce světlo refraktujících inkluzí [57]. Ovšem složení těchto granulí bylo zjištěno až o čtyři dekády později v roce 1927 vědcem Lemoigne. Jeho práce s bakterií *Bacillus megaterium* dokázala schopnost bakterie degradovat PHB na polyhydroxybutyrátové monomery a to v anaerobních podmínkách. Od 50. let 20. století bylo objeveno mnoho dalších mikroorganismů, které jsou schopny syntézy různých druhů polyhydroxyalkanoátů, velká pozornost je v nynějších časech věnována zejména PHB polymerům a mikroorganismům schopným je syntetizovat. [58]

Pozornost vědecké komunity, a potažmo zástupců různých odvětví průmyslu, získaly PHA polymery především díky jejich výjimečným vlastnostem jakožto biodegradovatelných náhrad nyní využívaných plastů (např. obalové materiály). Velkou nevýhodou jsou vysoké náklady při produkci a to hlavně cena substrátu pro růst mikroorganismů a vysokou cenovou položkou jsou i tzv. downstream procesy při získávání čistého PHA z buněk. Z tohoto důvodu je velmi atraktivní strategie kultivace produkčních mikroorganismů na zbytkových a odpadních substrátech jako jsou například různé odpadní oleje. [57]

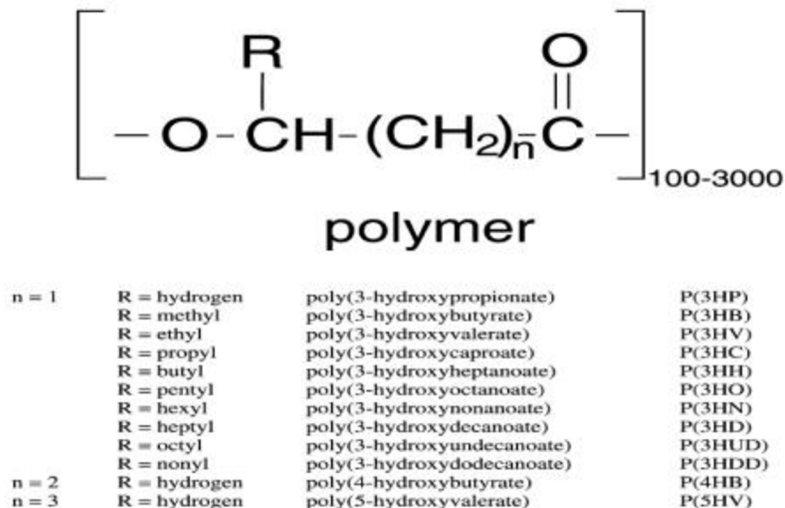
2.2.4 PHA – struktura a vlastnosti

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou produkovány různými kmeny mikroorganismů (Gram-pozitivních i Gram-negativních) jako intracelulární zásoba uhlíku a energie, a to v podmínkách kde je přítomen přebytek zdroje uhlíku [60]. Obecně se dá ovšem říci, že produkce polyhydroxyalkanoátů je vyvolána jako odezva na stresové podmínky. Polymer je akumulován po "přepnutí" metabolických drah [57].

PHA jsou strukturně polyhydroxykyseliny jejichž monomery jsou R-hydroxyalkanoické kyseliny. Existují dvě hlavní skupiny do kterých se PHA dělí, dělení záleží na délce řetězců monomerů. Polyestery složené z hydroxykyselin o délce 3–5 atomů uhlíku se označují jako short-chain-length (SCL-PHA), PHA obsahující monomery o délce 6–14 atomů uhlíku se řadí do skupiny medium-chain-length (MCL-PHA) (Obr. 16). Skupina SCL-PHA je

reprezentována produkcí *C. necator*, druhá skupina je produkována především mikroorganismy skupiny *Pseudomonas*. Některé polyestery jsou složeny z monomerů a různých délkách řetězce, potom se jedná o SCL–MLC PHA kopolymery. [61]

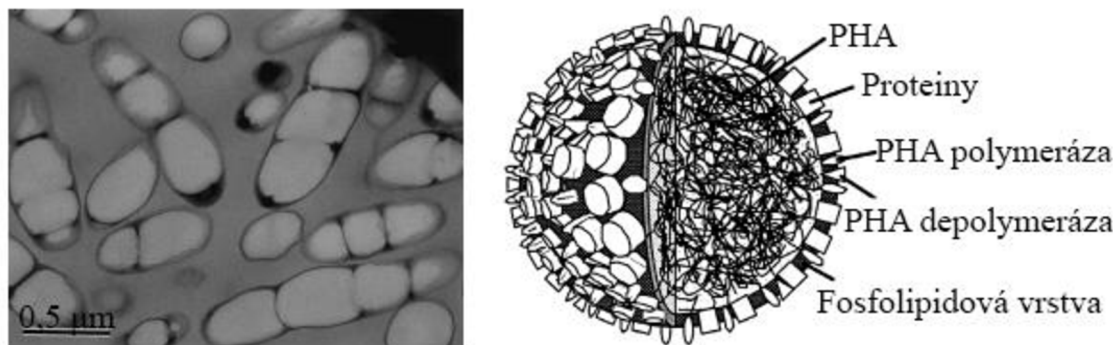
Enzymatickou katalýzou *in vitro* byla dosažena i produkce long-chain-length LCL–PHA s 15 a více uhlíky, ovšem tento polymer nebyl nalezen volně v přírodě. [62]



Obr. 16: Struktura PHA a přehled bočních řetězců R. [63]

PHA se nachází v cytoplasmě v buňkách ve formě granulí (Obr. 17). Počet a velikost granulí závisí na kultivačních podmínkách, v jednotlivých mikrobiálních kulturách produkujících PHA se taktéž liší. PHA jádro je obaleno fosfolipidovou vrstvou, do které jsou zabudovány faziny (strukturní proteiny), PHA syntázy, PHA depolymerázy a různé jiné proteiny [64]. PHA syntázy jsou pevně vázány na řetězce polymeru na rozdíl od PHA depolymeráz [65]. Řetězec polymeru má hydrofobní charakter, což je pro mikrobiální buňky výhodné, protože akumulace PHA nezvyšuje intracelulární osmotický tlak. [64][65]

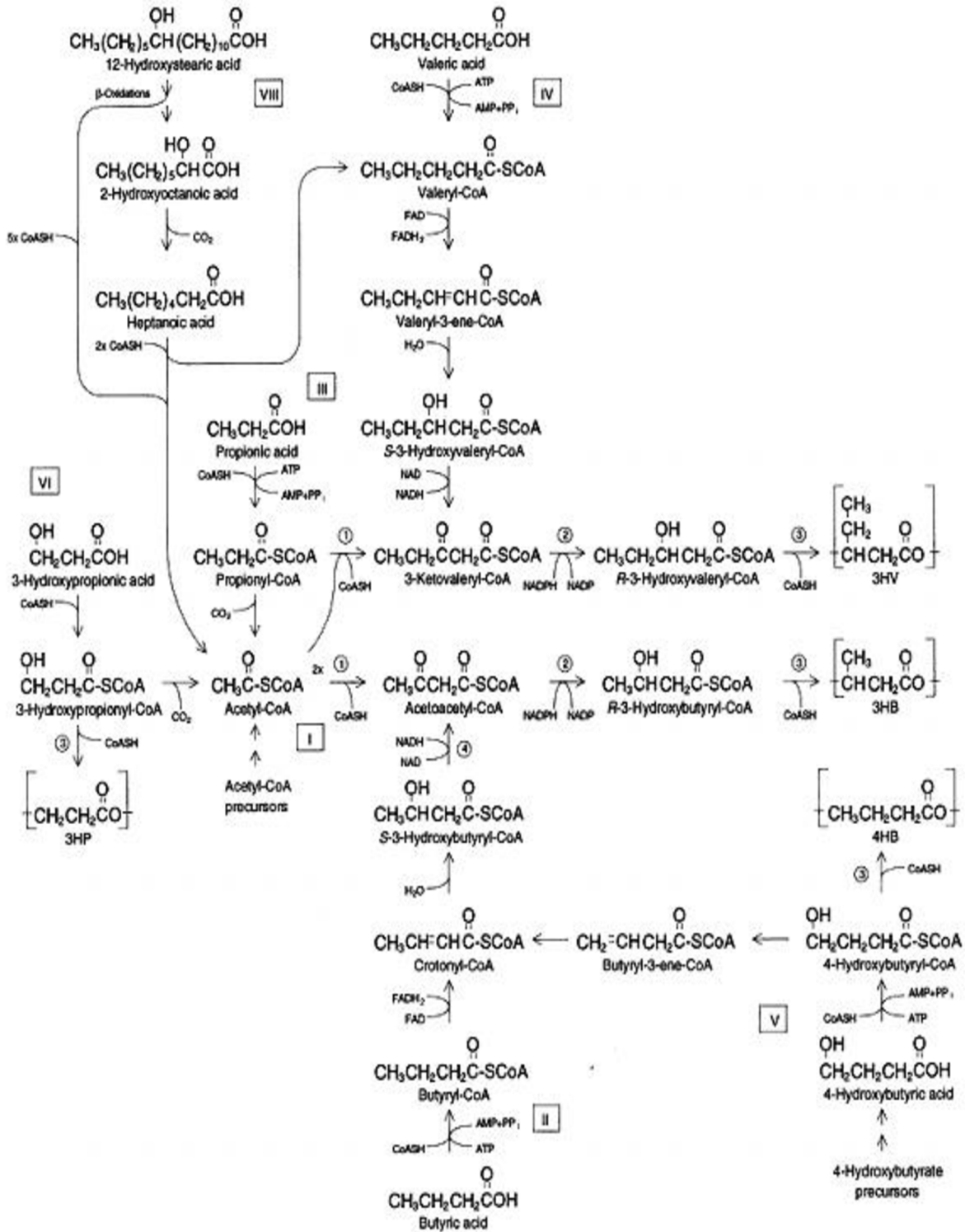
Co se týče fyzikálních vlastností, extracelulární P(3HB) je vysoce krystalický polymer, teplota tání je okolo 180 °C a skelný přechod nastává dosáhne-li teplota 4 °C. Některými termickými a mechanickými vlastnostmi velmi připomíná polypropylen, jedná se o relativně tuhý a křehký polymer. Mechanické vlastnosti se dají ovšem změnit inkorporováním jednotek poly(3-hydroxyvalerátu). [66]



Obr. 17: Nalevo je obrázek z transmisní elektronové mikroskopie ukazující buňky *C. necator* H16 s viditelnými granulemi PHA. Nalevo je vyobrazeno schéma struktury PHA granule. [64]

2.2.5 Metabolismus polyhydroxyalkanoátů bakterie *Cupriavidus necator*

Metabolismus PHA je značně komplikovaný enzymatický sled reakcí, které jsou závislé na mnoha faktorech jako je např. složení substrátu, přítomnost klíčových enzymů apod. Tyto dráhy jsou zobrazeny na Obr. 18. [57]



Obr. 18: Schéma zobrazující metabolické dráhy syntézy různých SCL-PHA bakterie *C. necator*. [57]

Centrální molekulou biosyntézy homopolymeru poly(3-hydroxybutyrátu) je acetyl-CoA získaný metabolizací organických uhlíkatých sloučenin na pyruvát a jeho následnou dehydrogenací. V nestresovém prostředí dochází k oxidaci acetyl-CoA v Krebsově cyklu na CO₂ a získání redukovaných enzymů NADH, NADPH a FADH₂, které jsou následně reoxidovány v dýchacím řetězci za vzniku ATP. Když ale dojde k limitaci obsahu určitých látek v živném substrátu, NADH a NADPH se začne akumulovat a klíčový enzym Krebsova cyklu – citrát syntáza je inhibována. Vytvářený acetyl-CoA je pak možné použít pro syntézu P(3HB). [67]

Existují tři klíčové enzymy PHB metabolismu. Prvním z nich, 3-ketothioláza reverzibilně kondenzuje dvě molekuly acetyl-CoA na acetoacetyl-CoA. Poté následuje redukce na R-(-)-3-hydroxybutyryl-CoA a to za přítomnosti (R)-specifické NADPH dependentní acetoacetyl-CoA reduktázy. Hlavním enzymem celé dráhy je PHB syntáza katalyzující polymerizaci a vytvoření P(3HB) řetězce. [70][56][57]

2.2.6 Bakterie *C. necator H16* jako modelový organismus

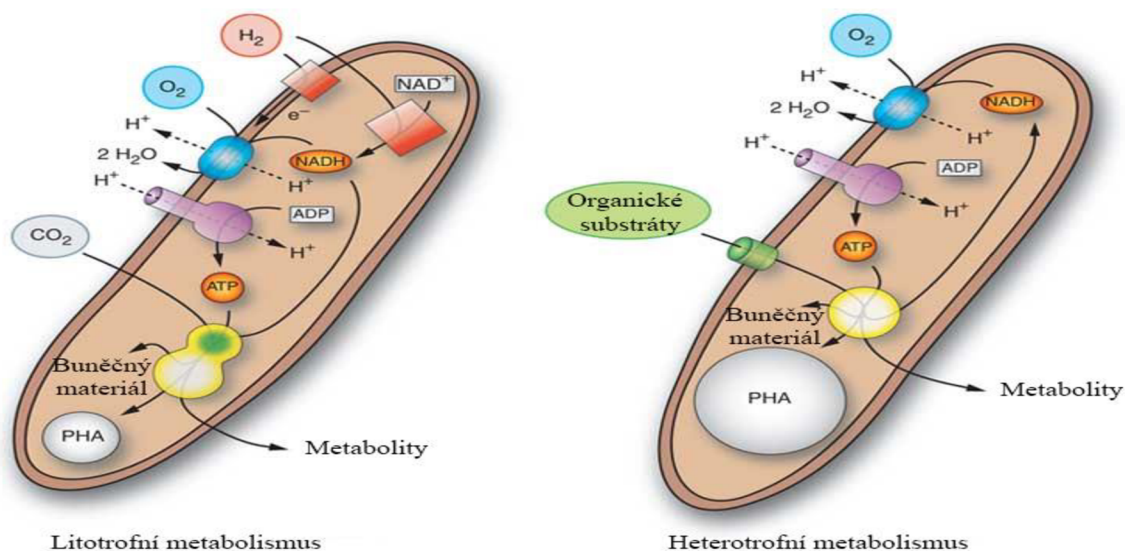
Cupriavidus necator, v literatuře je velmi používaný i starší název *Ralstonia eutropha*, je jedním z nejznámějších mikroorganismů produkujících polyhydroxyalkanoáty. Mezi starší názvy patří i *Wautersia eutorpha* a *Alcaligenes eutrophus*. Tato bakterie reprezentuje modelový systém pro metabolismus syntézy a intracelulární degradace polyhydroxyalkanoátů. [69]

2.2.6.1 Výskyt, metabolismus a vlastnosti

Obecně řečeno, bakterie se může nacházet ve sladké vodě i v půdě. *C. necator* je Gram-negativní fakultativně chemolitotrofní organismus, v nepřítomnosti organických substrátů schopen využívat H₂ a CO₂ jako jediných zdrojů energie. To je možné díky přítomnosti dvou různých energií uchovávajících hydrogenáz. Jedná se o NiFe metaloproteiny katalyzující oxidaci H₂. V nepřítomnosti O₂ bakterie začne využívat procesu anaerobního dýchání; cesta kompletní denitrifikace, kde dusičnany (př. NO²⁻ a NO³⁻) slouží jako akceptory elektronů [70].

CO₂ je ze vzduchu fixován v Calvin-BensonBasshamovu cyklu. Uhlík pocházející z organických substrátů je fixován jako poly[R-(-)-3-hydroxybutyrát] a to ve formě granul tvořících až 90% objemu buňky. Tato fixace je důkazem adaptace na fluktuující hladiny O₂ v okolí, protože granule se formují vždy, když je přítomen přebytek uhlíku, ale faktory jako právě O₂ nebo fosfáty či dusík jsou růst-limitující. V této bakterii však není přítomen enzym fruktóza-1,6-bisfosfátaldoláza, a proto jsou fruktóza, glukóza a jiné cukerné látky zpracovány Entner-Doudoroffovou drahou. [70]

Bylo vytvořeno několik mutantních kmenů neprodukujících P(3HB). Nejdůležitější z nich je *C. necator PHB-4*, který je nejčastěji používán jako hostitel pro expresi PHA syntáz z jiných bakterií. [70]



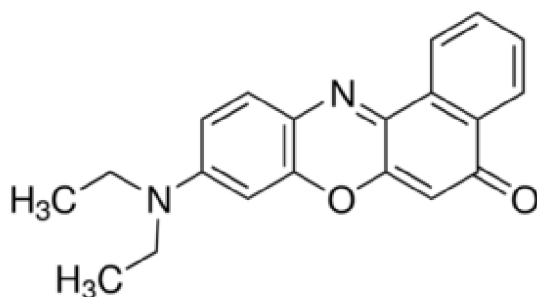
Obr. 19: Schéma zobrazující litotrofní a heterotrofní metabolismy. Žlutý kruh představuje procesy centrálního metabolismu, Calvin-BensonBasshamův cyklus je znázorněn žluto-zeleným kruhem. PHA granule jsou vyobrazeny jako šedý kruh. [70]

2.2.7 Analýza PHA pomocí fluorescenčních sond

Metoda první volby při analýze PHA je plynová chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Tyto metody nejsou ovšem vhodné na on-line monitorování a příprava vzorků vyžaduje přesnost a bývá zdlouhavá. Průtoková cytometrie začala být používána při analýze nejprve bez použití jakékoli sondy, bylo spoléháno na dostatečné změny granulovitosti buněk, kterou je možné detekovat v bočním rozptylovém kanálu. Velká výhoda této metody byla téměř nulová příprava vzorků a rychlé získání měřených dat [72].

Velmi rozšířenou metodou je obarvení PHA lipofilním fluoroforem následovaného měřením na průtokovém cytometru nebo vizualizací fluorescenční spektroskopií. Mezi takové lipofilní sondy patří např. Sudan Black B [73], Nilská modř A, a Nilská červeň [74], které jsou využívány zejména při rozlišení PHB-pozitivních a PHB-negativních kmenů. Při použití takovýchto sond je nevyhnutelná smrt buněk, při rozpouštění fluoroforů je totiž použito organických rozpouštědel jako je ethanol (Sudan Black), aceton nebo DMSO (Nilská červeň), která zároveň výrazně napomáhají k penetraci barviva do buňky. Profesor Steinbuchel a jeho tým [74] přinesli metodu kultivace *C. necator* v přítomnosti rozpouštědla a barviva (jmenovitě DMSO a Nilské červeni) při velmi nízkých koncentracích (DMSO: 0,002% v/v, Nilská červeň: 0,5–5,0 $\mu\text{g/ml}$). Jejich závěr byl, že ani rozpouštědlo či fluorofor v takovýchto koncentracích neovlivňují růst bakterie, a že barvivo se do buňky dostává v koncentracích dostatečných pro fluorescenční analýzu např. mikroskopickou.

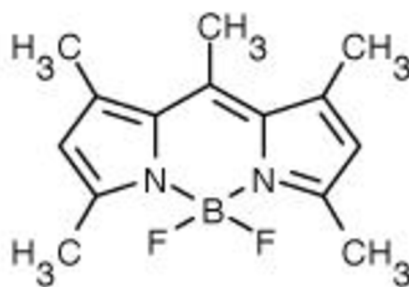
Nevýhoda barvení Nilskou červení je její nespecifičnost. Ačkoli ve velkých koncentracích difunduje do PHA granulí a váže se na tento polymer, Nilská červeň barví i další hydrofobní buněčné kompartmenty jako jsou lipidy nacházející se v buňkách. Stejná situace je nejen u kmenů produkujících polyhydroxyalkanoáty, ale i produkující jiné hydrofobní látky jako jsou např. olejnaté kapky apod. [75]



Obr. 20: Vzorec Nilské červeně [76]

Jako náhrada Nilské červeně jsou v posledních několika letech využívány fluorofory z řady BODIPY, jejich vlastnosti byly několikrát ukázány jako superiorní a to jak díky lepší fotostabilitě, sensitivitě a reprodukovatelnosti výsledků, tak i z hlediska lepší permeability buněčnou stěnou při použití menších množství organických rozpouštědel [77][78][79][80].

BODIPY fluorofory jsou chemicky 4,4'-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceny, jsou nepolární a lze je použít při analýze širokého spektra nepolárních lipofilních látek a neutrálních lipidů. Díky nižší molekulové hmotnosti (262 Da) než má Nilská červeně (318 Da) je BODIPY schopno rychleji difundovat přes membrány [81].



Obr. 21: Vzorec BODIPY 493/503 [82]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité bakterie, chemikálie a přístroje

3.1.4 Použité bakterie

Bylo pracováno s bakterií *Cupriavidus necator H16* získanou z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně. Dále byl použit kmen *Cupriavidus necator PHB- 4* zakoupený v Leibnitz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Braunschweig, Německo.

3.1.5 Chemikálie pro kultivaci mikroorganismů

Agar Powder (Himedia)

Beef extrakt (Himedia)

NutrientBroth (Himedia)

Peptone (Himedia)

3.1.6 Fluorescenční sondy

Akridinová oranž (Sigma Aldrich)

BacLight™ kit (Thermo Fisher Scientific)

BODIPY 439/503 (Thermo Fisher Scientific)

Ethidium bromid (eBioscience)

Fluorescein diacetát (Sigma Aldrich)

Nilská červeň (Sigma Aldrich)

LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit (Thermo Fisher Scientific)

Propidium jodid (eBioscience)

Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a.

3.1.7 Rozpouštědla pro fluorescenční sondy

Aceton

Dimethylsulfoxid

Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a.

3.1.8 Přístroje

Analytické váhy, Boeco

Centrifuga, Boeco U-32R

Centrifuga, Hettich MIKRO 200

Fluorescenční mikroskop, MicroTime 200, PicoQuant GmbH

Laminární box Aura mini, Bio Air Instruments

Nanofotometr, IMPLEN pH metr, SensoDirect

Plynový chromatograf: GC-FID (Thermo, TRACE 1300)

Kolona – DB-WAX 30 m by 0,25 mm

Thermo Software Xcalibur

Průtokový cytometr, Apogee A50, ApogeeFlow Systems

Temperovaná třepačka, Heidolph1000, Labicom s.r.o

Termostat, LS-35
Vortex, Heidolph Reax Top

3.2 Kultivace bakterií

3.2.4 Agarové plotny

Bakterie byly kultivovány 168 h na Petriho miskách obsahující pevné médium Nutrient Broth, kultivace probíhala v termostatu při teplotě 30 °C. Po uplynutí této doby byly bakterie uchovávány při teplotě 4 °C. Každých 30 dní byly kultury přeočkovány na nové misky při zachování stejného postupu kultivace.

3.2.5 Příprava inokula

Inokulum pro všechny kultivace bylo připravováno do Erlenmayerových baněk, jejichž objem byl 100 ml, přičemž obsah inokula byl 50 ml. Vysterylizované inokulum bylo třikrát zaočkováno bakteriologickou kličkou z agarové plotny. Kultivace probíhala po dobu 24 hod na temperované třepačce, kde frekvence třepání byla 160 rpm a teplota 30 °. Po uplynutí této doby bylo zaočkováno minerální a produkční médium, bylo přidáváno 5 % inokula vzhledem k celkovému objemu média.

3.2.6 Živná média

Pro uchování kultury bylo použito agarové médium Nutrient broth.

Složení Nutrient Broth:

Beef extract	10 g · l ⁻¹
Pepton	10 g · l ⁻¹
NaCl	5 g · l ⁻¹
Agar	20 g · l ⁻¹

Pro přípravu inokulačního média bylo použito:

Nutrient Broth	25 g · l ⁻¹
Destilovaná voda	1 000 ml

Pro přípravu minerálního média pro kultivaci bakterií *C. necator H16* a *C. necator PHB- 4* bylo použito:

KH ₂ PO ₄	310 mg
K ₂ HPO ₄	310 mg
NH ₄ Cl	760 mg
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	71,2 mg
Yeast extract	330 mg
Roztok stopových prvků *	1 ml
Destilovaná voda	1 000 ml

* Roztok stopových prvků

FeCl ₃	9,7 g
CaCl ₂	7,8 g
CuSO ₄	0,156 g

CoCl ₂	0,119 g
NiCl ₂	0,118 g
CrCl ₂	0,062 g
0,1 M HCl	1 000 ml

Sterilizace všech médií probíhala v tlakovém hrnci se zavřeným ventilem po dobu 60 minut. Roztoky fruktózy a stopových prvků byly přidávány až po sterilaci a vychladnutí médií na laboratorní teplotu. Tyto roztoky byly sterilovány separátně, před každým použitím byly navíc umístěny do kultivačního boxu, kde docházelo k jejich ozáření UV světlem.

3.3 Stanovení biomasy

Růst *C. necator* byl sledován metodou gravimetrického stanovení obsahu sušiny. Z média bylo odebráno 10 ml do centrifugačních kyvet. Centrifugace probíhala 5 minut při 8000 rpm. Sedimentované buňky byly promyty destilovanou vodou a centrifugovány, poté byla biomasa sušena při teplotě 80° C do konstantní hmotnosti. Sušina byla zvážena na analytických vahách.

3.4 Růstová křivka

3.4.4 Inokulum

Růstová křivka byla stanovována u obou kmenů, tedy *C. necator H16* a *C. necator PHB-4*. Kultivace ve vysterilizovaném inokulu probíhala po dobu 24 hodin při 30° C, 160 rpm. Toto inokulum bylo použito k zaočkování produkčního média.

3.4.5 Produkční médium

Sledování růstu probíhalo po dobu čtyř dnů, na každý den byla připravena vždy jedna Erlenmayerova baňka pro každý kmen.

Bylo připraveno 300 ml minerálního média do 500 ml Erlenmayerovy baňky, následovala sterilizace při 121° C po dobu 60 minut. Médium bylo připraveno přidáním 5 obj. % inokula, 15 ml fruktosového roztoku a 0,1 ml stopových prvků.

3.4.6 Turbidimetrické stanovení hodnoty zákalu

Měření bylo prováděno při vlnové délce 630 nm, jako blank byla použita destilovaná voda. Odběry byly prováděny v intervalu 4 hodin, každý den byl odběr prováděn třikrát. Byl odebrán 1 ml média, který byl poté změřen v křemenné kyvetě. Hodnota zákalu by se měla pohybovat v rozmezí 0,2-1,0; v opačném případě byl vzorek vhodně naředěn destilovanou vodou.

3.4.7 Stanovení obsahu PHB

Zároveň s turbidimetrickým stanovováním byl stanovován i obsah PHB v sušině. Vždy bylo odebráno 10 ml média, následovalo stanovení hmotnosti sušiny. Centrifugace probíhala po dobu 10 minut při 8 000 rpm. Usazená biomasa byla rozsuspendována v 10 ml vody a opět byla stočena, supernatant odlit a následovalo vysušení do konstantní hmotnosti při 80° C.

Do 2 ml vialek bylo naváženo přibližně 10 mg sušiny, následovalo přidání 1 ml chloroformu a 0,8 ml 15% kyseliny sírové v methanolu. Po zavičkování následovala esterifikace, kdy byly vialky udržovány při teplotě 100 °C po dobu 3 hodin. Po esterifikaci byla směs ochlazená na

laboratorní teplotu, převedena do 4 ml vialek a pro extrakci byl přidán 0,5 ml NaOH o koncentraci $0,05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Po vytvoření fázového rozhraní byla spodní chloroformová frakce odebrána a převedena do vialek o obsahu 2 ml. Následovalo stanovení obsahu PHB pomocí plynové chromatografie plamenovým ionizačním detektorem.

3.5 Stanovení viability pomocí průtokového cytometru

Ve všech případech přípravy vzorku byla připravena suspenze, ve které se nacházelo přibližně 10^6 buněk. Buňky se nacházely v roztoku PBS, při přípravě suspenze byly dvakrát promyty tímto pufrem. Jako pracovní objem vzorku byl zvolen 1 ml suspenze v mikrovialkách typu Eppendorf.

Pro srovnání kvality analýzy jednotlivých fluoroforů mezi sebou byla každá sonda měřena procentuální metodou. Tzn. byly připraveny dva typy buněčných suspenzí - jedna živá, právě odebraná z média, druhá mrtvá, která byla považena ve vroucí době po dobu 30 minut. Následně byly tyto suspenze smíchány do mikrovialek v následujících poměrech:

Vzorek č.	1	2	3	4	5	6
Živé buňky [ml]	0	0,2	0,4	0,6	0,2	1,0
Mrtvé buňky [ml]	1,0	0,8	0,6	0,4	0,8	0

Cytometr byl nastaven na nástřik vzorku $19 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ a objem zkoumaného vzorku na 150 μl . Díky tomu, že každý fluorofor má svou specifickou excitační a emisní vlnovou délku, bylo nutné nastavit excitační lasery a snímací kanály individuálně, dle potřeb každého barviva. Vzhledem k mnohým toxickým, mutagenním apod. vlastnostem různých fluoroforů byly provedeny potřebné ochranné kroky a bylo dbáno na zvýšenou bezpečnost při barvení a následném měření.

3.5.4 Použití ethidium bromidu

Pro barvení byl připraven zásobní roztok ethidium bromidu o koncentraci $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, jako rozpouštědlo byla použita destilovaná voda. Pro stanovení optimální koncentrace ethidium bromidu ve vzorku byly připraveny vzorky, do kterých bylo přidáno 0,1; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 μl ze zásobního roztoku. Z této řady byla vybrána optimální koncentrace, se kterou se pracovalo při dalších experimentech. Čas inkubace byl 5 min.

Ethidium bromid má podobné excitační a emisní spektrum jako propidium iodid, proto byl na excitaci použit laser o vlnové délce 488 nm, emise byla snímána v červeném, $690 \pm 35 \text{ nm}$, kanále.

3.5.1 Použití propidium iodidu

Byl připraven zásobní roztok o koncentraci $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ barviva, jako rozpouštědlo byla použita destilovaná voda. Koncentrace propidium iodidu ve vzorku byla $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Po obarvení vzorku následovala inkubace za laboratorní teploty v temnu po dobu 15 minut. Na excitaci barviva byl použit laser o vlnové délce 488 nm, fluorescence byla snímána v červeném kanálu, tedy $690 \pm 35 \text{ nm}$.

3.5.2 Použití Near-IR sondy

Byla použita LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR Dead Cell Stain sada obsahující barvivo emitující v blízké infračervené oblasti a DMSO jako rozpouštědlo v individuálních vialkách.

Po přivedení na laboratorní teplotu bylo do vialky obsahující barvivo napipetováno 50 μ l rozpouštědla.

Po dvojitým promytí suspenze buněk pomocí PBS pufru byla suspenze buněk vhodně naředěna tak, aby v 1 ml bylo obsaženo přibližně 10^6 buněk. Poté byl přidán 1 μ l barviva a vzorek byl řádně promíchán. samotná inkubace probíhala 30 minut, 1 hod a 2 hod. Bylo použito několik postupů pro optimalizaci barvicího postupu - byly použity různé teploty, při kterých probíhala inkubace, některé vzorky byly po inkubaci opětovně promyty PBS pufrem, tyto postupy jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1: Přehled podmínek barvení jednotlivých vzorků.

Číslo vzorku	Doba inkubace	Teplota inkubace	Promyto po inkubaci PBS pufrem
1	30 minut	Uloženo k ledu	Ano
2			Ne
3		25 °C	Ano
4			Ne
5		37 °C	Ano
6			Ne
7	1 hod	Uloženo k ledu	Ano
8			Ne
9		25 °C	Ano
10			Ne
11		37 °C	Ano
12			Ne
13	2 hod	Uloženo k ledu	Ano
14			Ne
15		25 °C	Ano
16			Ne
17		37 °C	Ano
18			Ne

Na excitaci barviva byly použity lasery o vlnové délce 488 nm a 633 nm, fluorescence byla snímána ve vzdáleném červeném kanálu, tedy 740 ± 35 nm.

3.5.3 Použití BacLight™ kitu

Použit byl komerčně dostupný DEAD/LIVE Bac Light™ kit od firmy Invitrogen, který obsahuje dva fluorofory a to propidium iodid a SYTO9. Barvení vzorku bylo prováděno dle příloženého návodu. Z každého fluoroforu bylo odebráno 1,5 μ l, poté následovala inkubace v temnu za laboratorní teploty po dobu 15 minut.

Oba fluorofory jsou excitovány při vlnové délce 488 nm, SYTO9 bylo snímáno v zeleném, 535 ± 35 nm, kanálu, propidium v červeném, 690 ± 35 nm, kanálu.

3.5.4 Použití fluorescein diacetátu

Zásobní roztok obsahoval 1 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ práškového FDA, jako rozpouštědlo byl použit aceton. K buněčné suspenzi bylo přidáno 2 μ l ze zásobního roztoku, inkubace probíhala ve tmě při teplotě 37 °C po dobu 30 minut, 1 hod a 2 hod.

Analýza probíhala za excitace laserem o vlnové délce 488 nm, pro snímání fluorescence byl použit zelený kanál - 535 ± 35 nm.

3.5.5 Použití Rhodaminu 123

Byl připraven zásobní roztok Rhodaminu 123 o koncentraci $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ v destilované vodě. Do vzorků bylo přidáno 5 μl z tohoto roztoku, inkubace probíhala v temnu při teplotě 37°C po dobu 5 min.

Stejně jako mnohé jiné viabilitní sondy, i Rhodamin je excitován při 488 nm, pro snímání emisní fluorescence byl použit zelený 535 ± 35 nm kanál.

3.6 Analýza PHA průtokovým cytometrem

Byly připraveny suspenze buněk jako v případě stanovení viability - v 1 ml se nacházelo přibližně 10^6 buněk. Buňky byly dvakrát promyty PBS pufrem. Jako pracovní objem vzorku byl zvolen 1 ml suspenze v mikrovialkách typu Eppendorf.

Pro oba fluorofory byla vytvořena kalibrační křivka, kde byla do závislosti dána střední hodnota fluorescence a obsah PHB získaný plynovou chromatografií.

3.6.4 Barvení Nilskou červení

Nejprve byla provedena optimalizace koncentrace barviva ve vzorku, pracováno bylo se vzorkem obsahujícím přibližně 10^6 buněk *C. necator HI6*, *C. necator PHB-4* byl použit jako kontrola, protože jeho fluorescence by měla být minimální oproti prvnímu kmenu díky nepřítomnosti PHB granulí. Po přípravě suspenze následovalo stočení na centrifuze (8 000 rpm, 2 min), fixace 1 ml 20% ethanolem při 4°C po dobu 10 minut, a nakonec byla suspenze dvakrát promyta 1 ml PBS pufrem.

Ze zásobního roztoku Nilské červeně, kde koncentrace NČ byla $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, jako rozpouštědlo bylo použito DMSO, bylo přidáno do 1 ml vzorku buněk 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5 a 5 μl . Inkubace probíhala při laboratorní teplotě ve tmě po dobu 15 minut.

Nilská červeně je excitována laserem o vlnové délce 488 nm, emise byla snímána v kanále 590 ± 35 nm.

3.6.5 Barvení BODIPY 439/503

V případě barvení tímto lipofilním fluoroforem byla připravena suspenze obsahující 10^6 buněk v 1 ml, a to jak pro kmen *C. necator HI6*, tak i pro kmen *C. necator PHB-4*. Jedna polovina vzorků byla fixována 35% ethanolem. Poté následovalo dvojité promytí 1 ml PBS pufrem.

Zásobní roztok byl připraven o koncentraci $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ fluoroforu, který je poté uchováván ve zmraženém stavu, z něho byl připraven 1 ml o koncentraci $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, se kterým se nadále pracuje.

Pro optimalizaci koncentrace barviva pro cytometrické analýzy bylo ke vzorkům přidáno 1; 2,5; 5; 10 a 20 μl roztoku fluoroforu. Pro excitaci byl použit laser o vlnové délce 488 nm, emise byla snímána v zeleném kanále - 535 ± 35 nm.

3.7 Analýza genové exprese

Byla připravena suspenze buněk v PBS pufrem o koncentraci přibližně 10^6 buněk v 1 ml. byly provedeny dva postupy barvení, jeden fixující buňky, druhý nikoliv. Buňky byly fixovány 70% ledovým ethanolem, poté dvakrát promyty PBS pufrem.

Nejprve byla provedena zkouška barvitelnosti buněk, která zároveň sloužila jako vodítko při volbě koncentrace použité pro další barvení. K 1 ml připravené buněčné suspenze byl o přidáno 0,5; 1; 2,5; 5 a 10 μl ze zásobního roztoku akridinové oranž o koncentraci $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Na průtokovém cytometru byl použit laser o vlnové délce 488 nm, emise sondy vmezeřená do DNA byla snímána v $535 \pm 35 \text{ nm}$ kanále, RNA emise v 690 nm kanále.

Byly zapisovány střední hodnoty fluorescence v DNA a RNA emisních kanálech a koncentrace, při jejímž použití byl podíl těchto střední hodnot nevyšší byla zvolena jako pracovní pro další experimenty.

V obou postupech bylo odebráno 0,2 ml suspenze buněk a ve zkumavkách k nim bylo přidáno 0,4 ml roztoku A, po 15 sekundách bylo přidáno 1,2 ml roztoku B (viz. Tabulka 2). Poté byly buňky ponechány ve tmě se inkubovat. Měření probíhalo 2–10 minut po přidání obou roztoků.

Tabulka 2: Složení roztoků potřebných při barvení akridinovou oranží.

Roztok A		Roztok B	
Triton X-100, 0,1% (v/v)	0,1 ml	Akridinová oranž, 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$	1 ml
HCl, 1 M	8 ml	EDTA-Na	34 mg
NaCl	0,877 g	Roztok kyseliny citronové, 0,1M	37 ml
dH ₂ O	91,9 ml	Roztok Na ₂ HPO ₄	63 ml

3.8 Pozorování buněk pod fluorescenčním mikroskopem

Každý fluorofor použitý pro cytometrické stanovení byl použit pro barvení buněk a jejich následné sledování pod fluorescenčním mikroskopem. Jednotlivé koncentrace barviv ve vzorcích byly stanoveny předchozími měřeními na průtokovém cytometru, v tabulce 3 jsou uvedeny jednotlivé časy a teploty inkubace a koncentrace barviv.

Tabulka 3: Přehled charakteristik barvení jednotlivých vzorků.

Vzorek číslo	Fluorofor	Koncentrace [$\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Čas inkubace [min]	Teplota inkubace
1	Propidium iodid	5	15	Laboratorní teplota
2	BacLight™ kit	1,5 (PI) 1,5 (SYTO9)	15	Laboratorní teplota
3	Akridinová oranž	10	2	Laboratorní teplota
4	BODIPY 493/503	0,01	10	Laboratorní teplota

Příprava buněčných suspenzí byla standardní jako při cytometrických měřeních, koncentrace buněk byla upravena vhodným ředěním na hodnotu přibližně 10^6 v 1 ml.

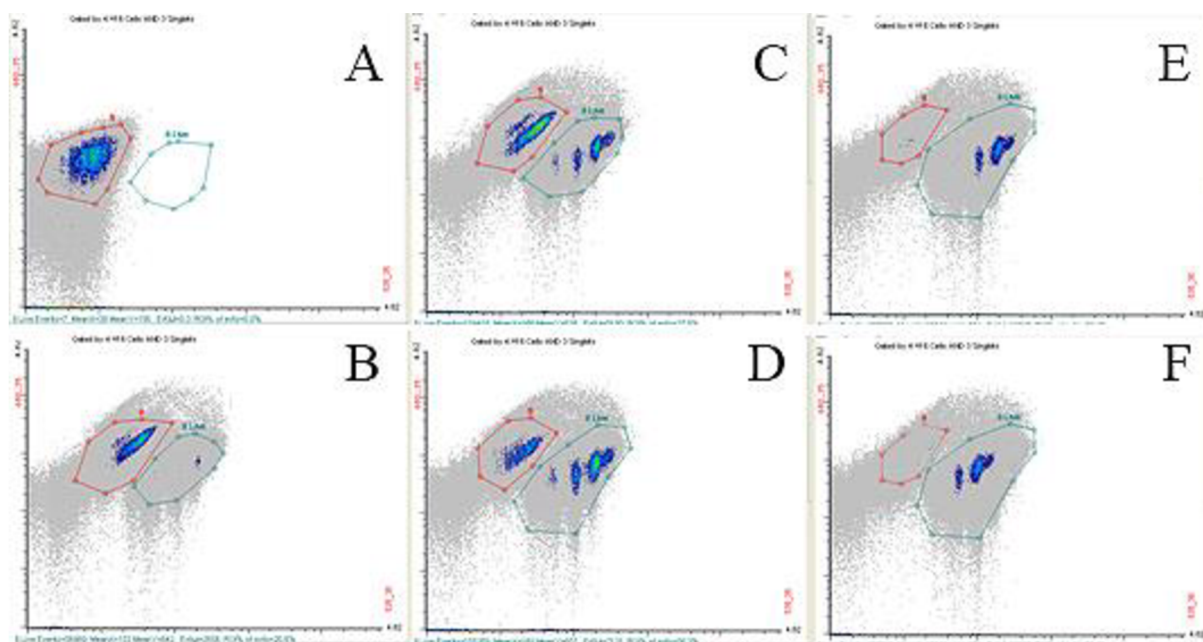
Samotné obarvené vzorky byly na mikroskopickém sklíčku fixovány 2% roztokem agaru těsně před vložením pod mikroskop. Vzorky byly pozorovány na konfokálním mikroskopu, byl použit vodní imerzní objektiv. Na excitaci byl použit 467 nm laser.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Cytometrické stanovení viability

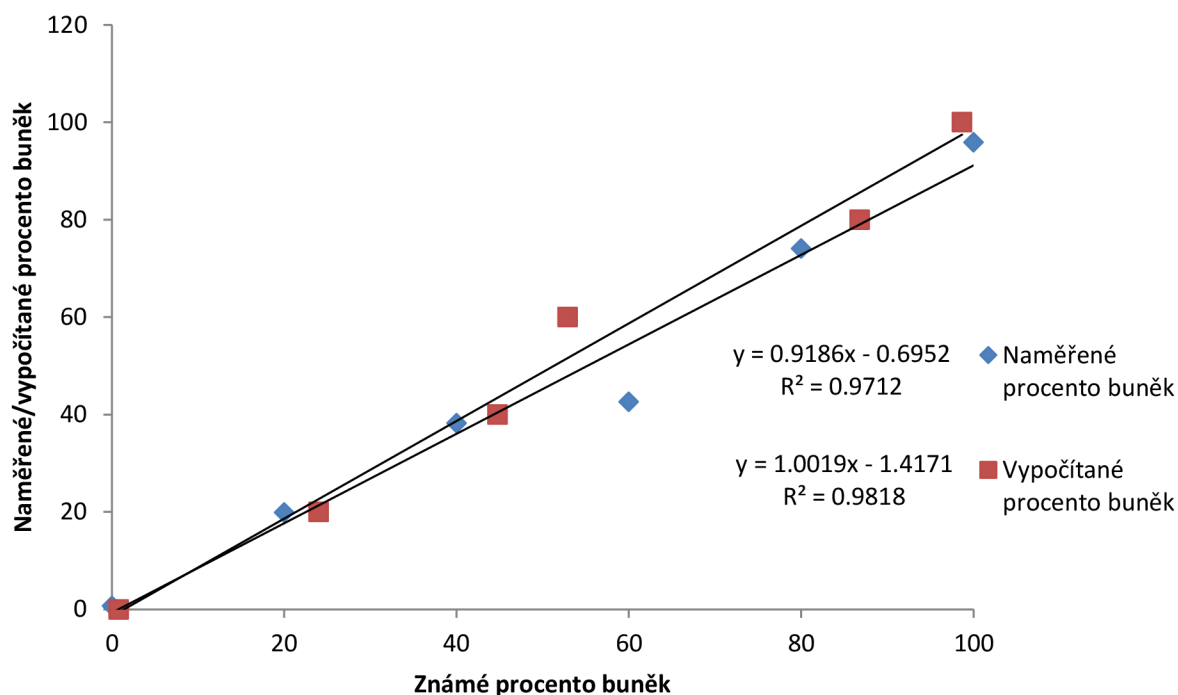
4.1.4 Stanovení viability bakteriální kultury *C. necator* pomocí BacLight™ kitu

Komerční kit BacLight™ je určen ke stanovení viability bakteriálních kultur a obsahuje dvě fluorescenční sondy: SYTO9 a propidium iodid. SYTO9 je schopno penetrovat buňky bakterií bez ohledu na jejich fyziologický stav a viabilitu, propidium iodid pak prochází pouze do mrtvých buněk s poškozenou buněčnou membránou. Živé buňky tedy vykazují zelenou fluorescenci, mrtvé fluorescenci červenou, protože propidium iodid zhasí fluorescenci SYTO9 v mrtvých buňkách.



Obr. 22: Cytogramy pro sadu BacLight™. Jedná se o vzorky procentuální řady živých buněk. Červená oblast označuje oblast, ve které se nacházejí mrtvé buňky, zeleně ohraničená oblast ukazuje oblast živých buněk. Na ose x je intenzita červené fluorescence, na ose y intenzita zelené fluorescence. (A): 100 % mrtvé, 0 % živé, (B): 80 % mrtvé, 20 % živé, (C): 60 % mrtvé, 40 % živé, (D): 40 % mrtvé, 60 % živé, (E): 50 % mrtvé, 80 % živé, (F): 0 % mrtvé, 100 % živé.

Jak je ukázáno na cytogramech výše (Obr. 22), rozlišení živých a mrtvých bakteriálních buněk je jasné. Díky intenzitám fluorescencí na osách (na ose x je intenzita fluorescence z červeného kanálu, na ose y intenzita zelené fluorescence) lze rozpoznat rozdílně fluoreskující buňky. Další velkou výhodou při vyhodnocování je jasné oddělení bakteriálních buněk od částic abiotických, což je velmi výhodné při analýzách např. půd či pitných vod. Výrobce této soupravy v dodaném manuálu barvení tvrdí, že vzhledem k použití dvou fluoroforů a pro získání přesnějších výsledků je nutné jisté přepočítání počtu živých buněk.



Obr. 23: Graf porovnávající procenta vypočítaných a naměřených buněk pro sadu BacLight™.

Jak lze vidět z tohoto grafu, po přepočítání počtu živých buněk podle výrobcem dodaného návodu, vypočítané výsledky se opravdu mírně liší od těch získaných z průtokového cytometru bez přepočtu. Tento rozdíl může překračovat hranici 10 %, nicméně principiálně poskytuje kit spolehlivý nástroj pro posouzení viability testované bakteriální kultury. Faktor R^2 je pro regresní přímku vypočítaného procenta buněk vyšší ($R^2=0,9818$), ovšem rozdíl 0,01 v těchto faktorech je minimální. Následující tabulka přibližuje tyto výsledky.

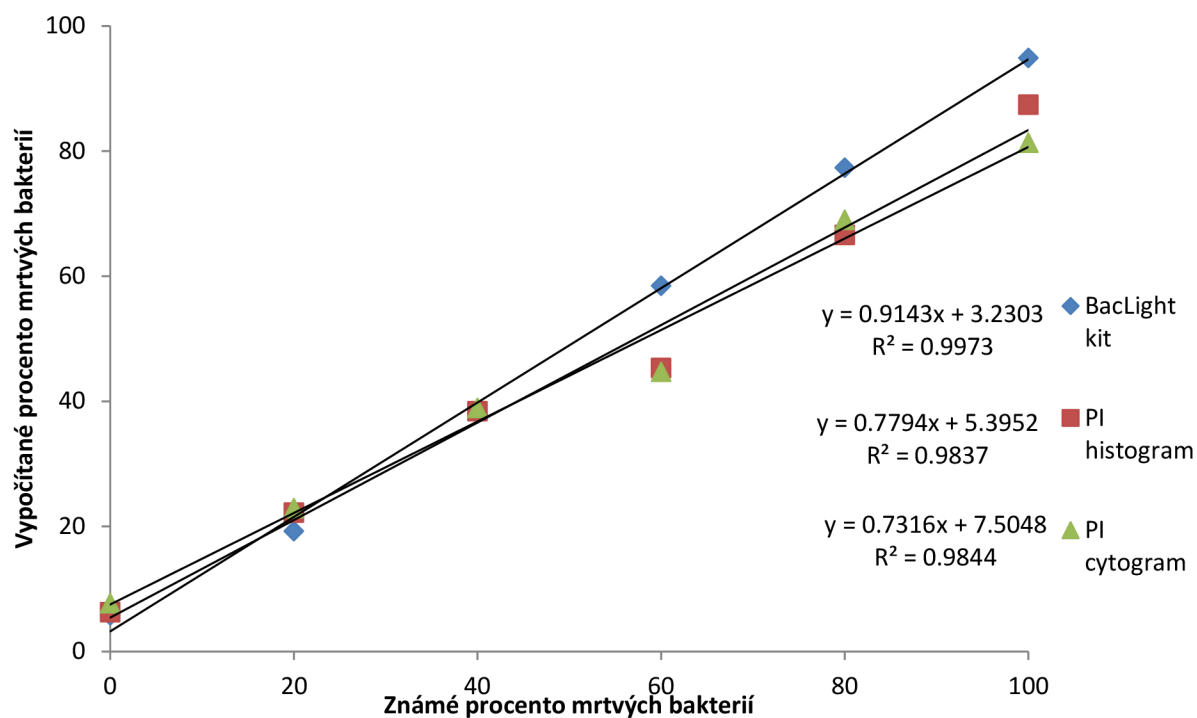
Tabulka 4: Pro přehled v procentech jsou výsledky prezentovány i v tabulkové formě. Lze si povšimnout výrazných rozdílů v hodnotách procent změřených a vypočítaných, obzvláště v druhé třetině výsledků.

Znamé % živých b.	Změřené % živých b.	Vypočítané % živých b.
0	0,7	0,8
20	19,9	24,0
40	38,2	44,8
60	42,6	52,9
80	74,1	86,8
100	95,9	98,7

4.1.5 Porovnání BacLight™ kitu a propidium iodidu

V rámci dalšího experimentu bylo porovnáno stanovení viability bakteriální kultury pomocí BacLight™ kitu se základním postupem využívajícím pouze propidium iodid. Obě metody byly porovnány na stejných vzorcích obsahujících různé poměry mrtvých a živých buněk.

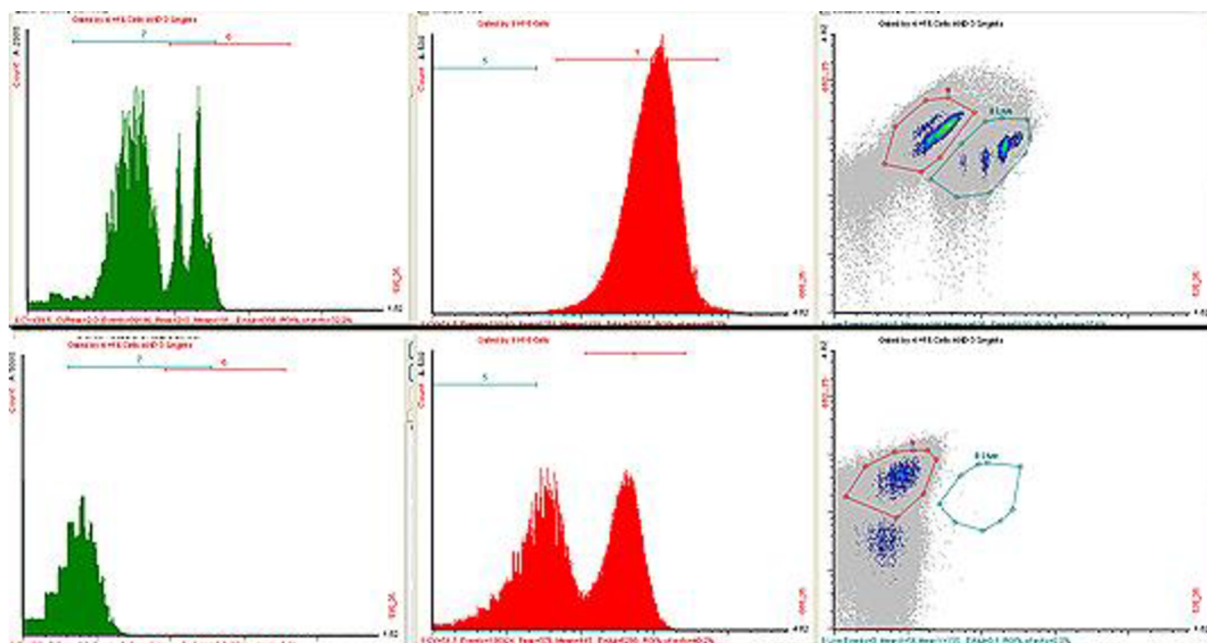
Tyto dva fluorofory byly porovnávány v jejich schopnosti zobrazení určitého procenta mrtvých buněk ve vzorku. Vzorky byly připraveny stejným způsobem jako je popsán v kapitolách 3.5.1 a 3.5.3.



Obr. 24: Graf zobrazující porovnání známého a naměřeného procenta mrtvých buněk, data pro propidium iodid byly získány jak z cytogramů, tak i z histogramů.

Jak lze vidět z grafu výše (Obr. 24) BacLight™ vykazuje lepší korelaci mezi známým procentem mrtvých bakterií a procentem naměřeným. Zároveň vykazují data lepší linearitu - regresní koeficient je velmi blízké ideální hodnotě 1, jedná se o hodnotu $R^2=0,9939$.

Při použití propidium iodidu nebylo dosaženo takové linearitu, nejprve lze sledovat vzrůst v hodnotách, který je v hodnotě 60 % mrtvých bakterií vystřídán mírným propadem. Ačkoli je koeficient R^2 v rozmezí 0,95 až 0,97, spolehlivost je stále vysoká.



Obr. 25: Histogramy a cytogramy pro BacLight™ sadu (horní část) a propidium iodid (dolní část). Vlevo je zelený kanál využitý pro sběr fluorescence SYTO9, poté červený kanál využitý pro sběr fluorescence propidium iodidu. Vzorek obsahoval 40 % živých buněk a 60 % mrtvých buněk.

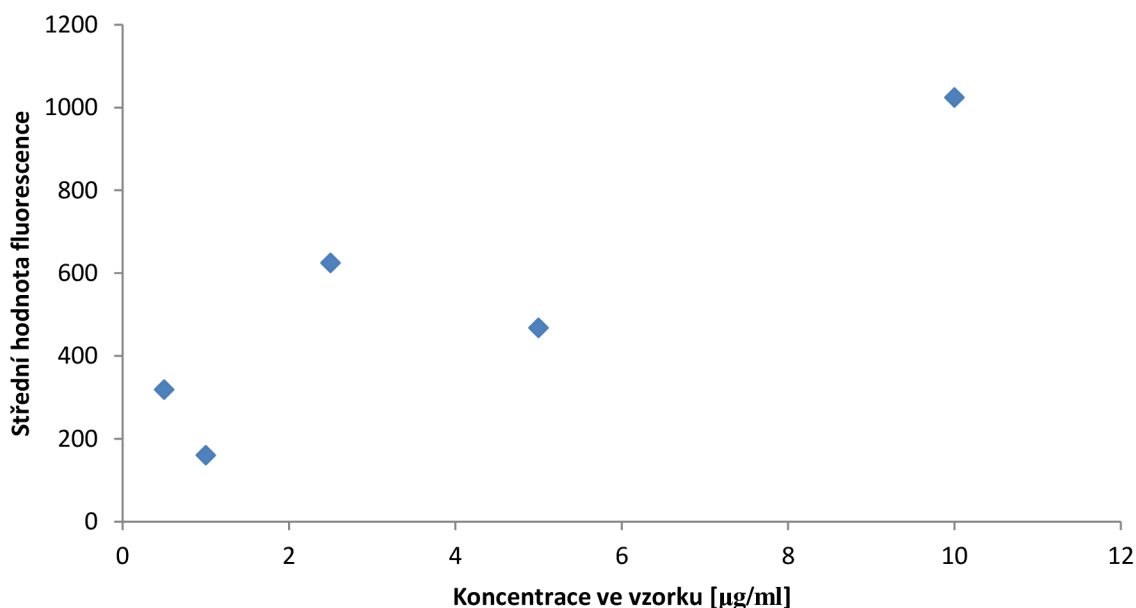
Při porovnání těchto barviv vzhledem k jejich vypovídající hodnotě o procentu mrtvých bakterií ve vzorku lze říci, že BacLight™ je fluorofor mající pravdivější výpovědní hodnotu o skutečných hodnotách mrtvých buněk. Toto je pravděpodobně způsobeno použitím dvou fluoroforů v sadě - SYTO9 barví živé buňky a PI buňky mrtvé. Díky tomu, že oba případy viability jsou pokryty obarvením jedním (živé buňky), popř. oběma fluorofory (mrtvé buňky), statisticky je chyba rozeznání a měření menší.

Výhodou využití propidium iodidu je jak jednodušší oddělení mrtvých a živých buněk z histogramu popř. cytogramu, a také jeho cena. Pro analýzy čistých buněčných suspenzí je proto PI dostačující viabilní sondou.

4.1.6 Ethidium bromid

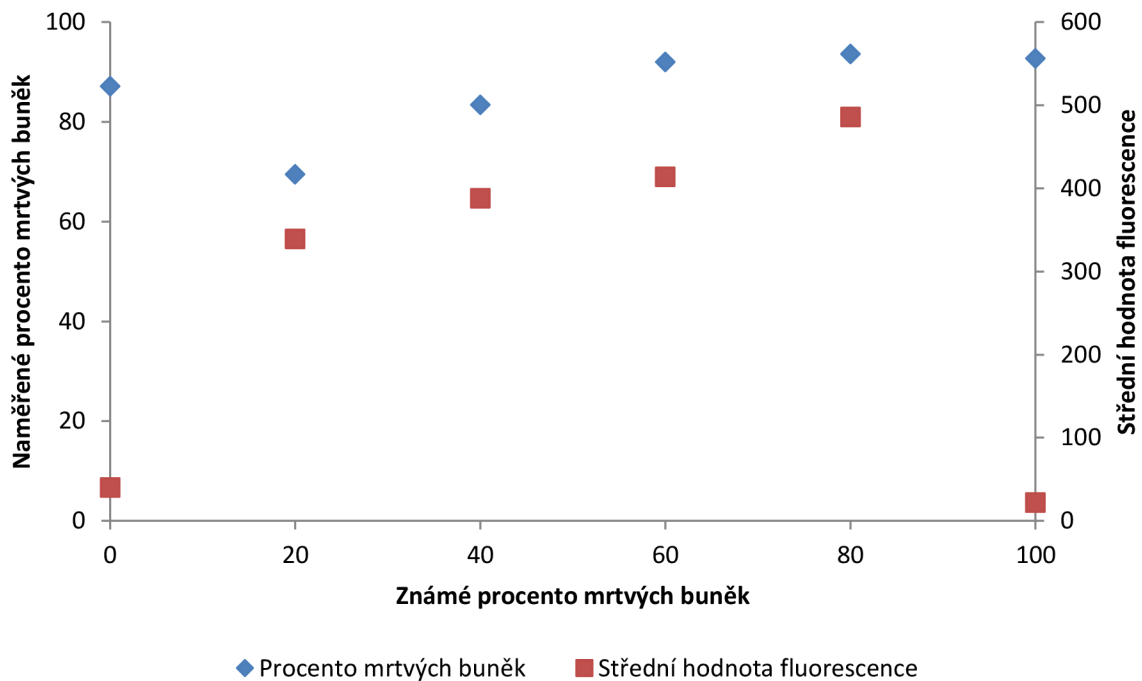
Další testovanou viabilní fluorescenční sondou byl ethidium bromid, který, podobně jako propidium iodid, interkaluje DNA mrtvých buněk s poškozenými buněčnými obaly.

Na základě literární rešerše byly vybrány koncentrace ethidium bromidu v měřeném vzorku, tyto hodnoty byly 0,5; 1; 2,5; 5 a 10 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Z těchto různých koncentrací byl cíl vybrat ideální, se kterou se dále bude pracovat při stanovování mrtvých buněk bakteriální kultury *C. necator*.

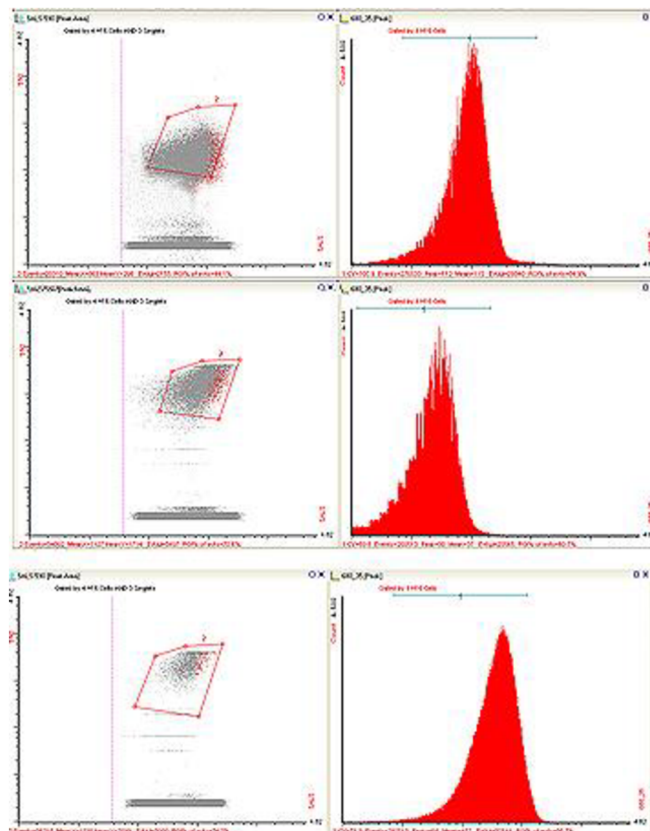


Obr. 26: Grafické znázornění závislosti střední hodnoty fluorescence na koncentraci barviva ve vzorku.

Jak lze vidět z výše zobrazeného grafu, nebyla nalezena žádná závislost, která by popisovala nějaký trend vývoje intenzity fluorescence při zvyšování koncentrace fluoroforu. Ačkoli intenzita fluorescence roste při globálnějším pohledu, z experimentu nelze vyvodit nějakou závěrečnou ideální koncentraci. Pro další pokus byla zvolena koncentrace 5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.



Obr. 27: Grafické znázornění experimentu s ethidium bromidem. Modré body vyjadřují obsah mrtvých buněk ve vzorku v procentech v jednotlivých vzorcích, červené se vztahují k intenzitě fluorescence těchto vzorků.



Obr. 28: Ukázkový cytogram a histogram pro buňky barvené ethidium bromidem. V horní části je vzorek, ve kterém se nachází 0 % mrtvých buněk a 100 % živých. Ve střední části je vzorek se 100 % mrtvých buněk a 0 % živých. V dolní části je vzorek obsahující 50 % živých a 50 % mrtvých buněk. Cytogramy ani histogramy těchto vzorků neukazují jednoznačně rozdíl mezi živými a mrtvými buňkami.

Při experimentu bylo zjištěno, že ethidium bromid je sonda značně nevhodná pro použití pro bakteriální kultury *C. necator*. Jak lze vidět v grafu na Obr. 27, získané hodnoty procent mrtvých buněk ve vzorku vůbec nekorelují se skutečným obsahem viabilních buněk ve vzorku. S největší pravděpodobností nefungoval aktivní transport barviva ven z buněk skrze póry v buněčné stěně, a proto vysokou fluorescenci vykazovali i živé buňky, a byly tedy falešně pozitivně označeny jako mrtvé. Další možností je až příliš vysoká koncentrace barviva, která naprosto narušila schopnost této exkluze. Jedná se pouze o spekulace, pro získání závěru opřené o určitá data by bylo vhodné zopakovat tento experiment s větším počtem koncentrací fluoroforu, a porovnat jej s příbuznými kmeny bakterií.

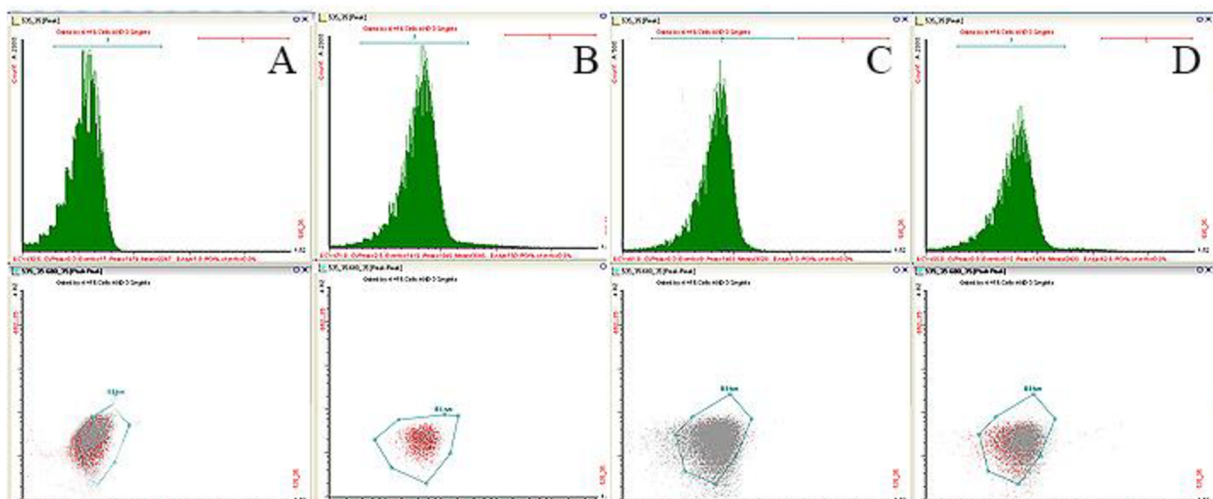
Co se týče střední hodnoty fluorescence, zde také nebyl nalezen nějaký trend. První a poslední vzorek (obsahující 0 a 100 % mrtvých buněk) navíc vykazoval minimální fluorescenci, což u posledního vzorku (100 % mrtvých bakterií) není v souladu s teorií, která praví, že čím více mrtvých buněk ve vzorku je, tím větší je intenzita fluorescence. Prostřední čtyři vzorky korespondovaly svou intenzitou s počtem mrtvých buněk.

V této fázi lze říct, že ethidium bromid není vhodnou sondou pro cytometrické stanovování.

4.1.7 Fluorescein diacetát

Další testovanou viabilní sondou byl fluorescein diacetát. Na rozdíl od předchozích viabilních sond tento fluorofor neposuzuje viabilitu vzorku na základě integrity buněčných obalů, ale jedná se o fluorescenční sondu metabolické aktivity. Fluorescein diacetát je ve viabilních buňkách štěpen nespecifickými esterázami za vzniku fluoresceinu. V tomto případě jsou to tedy živé buňky, které teoreticky vykazují vyšší intenzitu zelené fluorescence.

Nejprve byl proveden experiment, díky kterému byla zvažována vhodnost sondy FDA v případě stanovování viability bakterie *C. necator*. Pro oba kmeny bakterie (PHA produkující divoký typ i PHA neakumulující mutant) byly připraveny suspenze mrtvých a živých buněk dle návodu popsaného v experimentální části (3.5.4), a byla také otestována koncentrační řada barviva. Vzorky byly proměřeny v různých časech inkubace s fluorescenční sondou a hodnoty fluorescence byly vyneseny do tabulky (Tabulka 5).



Obr. 29: Ukázka histogramů a cytogramů pro bakteriální buňky *C. necator* HI6 barvené FDA. (A) 100 % mrtvých buněk, (B) 40 % mrtvých buněk, (C) 60 % mrtvých buněk, (D) 100 % mrtvých buněk. Jak lze vidět z těchto snímků, není možné rozlišit mrtvé a živé buňky.

Tabulka 5: Tabulka s hodnotami procent a středních hodnot fluorescence pro vzorky s různou koncentrací FDA. Byly namíchány dvě řady vzorků - jedna řada živých buněk, druhá mrtvých buněk. K nim bylo poté přidáváno určité množství fluoroforu. Pomocí cytometru byl v určitých časech změřen počet fluoreskujících buněk a střední hodnota této fluorescence.

*SHF - Střední hodnota fluorescence získaná z histogramu pro daný vzorek

% - procento buněk vykazujících fluorescenci, získané z histogramu pro daný vzorek

Cupriavidus necator H16														
Koncentrace FDA [µg/ml]	Ihned				1 hod				2 hod					
	Živé buňky		Mrtvé buňky		Živé buňky		Mrtvé buňky		Živé buňky		Mrtvé buňky			
	%	SHF*	%	SHF*	%	SHF*	%	SHF*	%	SHF*	%	SHF*		
0,5	92,4	36	89,7	8	91	114	88,9	14	100	20	88,3	16		
1	95	213	91,1	12	75,7	65	91,1	23	90,9	688	91,8	31		
2	91	86	90,8	9	88,7	29	90,6	13	86,6	33	91,1	14		
5	91,2	165	91,9	21	91,6	774	89,1	27	99,3	1428	90,6	36		
10	89,5	112	89,7	37	81,5	118	90,2	57	89,6	165	88,6	66		
blank		13												
Cupriavidus necator PHB-4														
Koncentrace FDA [µg/ml]	Ihned				1 hod				2 hod					
	Živé buňky		Mrtvé buňky		Živé buňky		Mrtvé buňky		Živé buňky		Mrtvé buňky			
	%	SHF*	%	SHF*	%	SHF*	%	SHF*	%	SHF*	%	SHF*		
0,5	78,3	65	88	7	63,6	76	88,7	23	84,6	305	92,3	30		
1	90,4	89	89,8	13	87	296	90,2	20	80,3	42	86,8	27		
2	89,8	99	91,5	15	86,5	315	90,3	30	95	980	89,8	45		
5	91,3	185	90,1	31	79,6	20	91,6	80	89,5	1036	90,8	93		
10	75,6	115	79,7	49	72,5	432	77,8	191	80,4	609	80,2	208		
blank		13												
	PMT hodnota 400					PMT hodnota 450					PMT hodnota 550			

Jak lze z tabulky vidět díky barevnému odlišení různých hodnot PMT, hlavní problém této sondy byl právě v nemožnosti měření při konstantní hodnotě PMT a tudíž jednotlivé vzorky v různých časech nemohly být porovnávány mezi sebou. Při vyšších koncentracích a delších časech inkubace bylo potřeba hodnoty PMT zmenšit až o hodnotu 150. Dále je vhodné si povšimnout samotných hodnot středních hodnot fluorescence, které jsou v řádech stovek, maximální hodnoty dosahující přes 1 000. Rozdíl mezi mrtvými a živými buňkami je znatelný při delší inkubaci (1 hod, 2 hod), intenzita fluorescence je u živých buněk několikanásobně vyšší. Tento výsledek je v souladu s teorií, že FDA proniká do buněk a pouze u těch s aktivními hydrolytickými enzymy je nefluorescenční forma sondy převedena na fluoreskující molekulu fluoresceinu.

Nebyl vysledován žádný trend nárůstu intenzity fluorescence, který by se dal aplikovat na širší škálu vzorků, a který by zároveň umožnil vybrání ideální koncentrace barviva FDA ve finální suspenzi buněk.

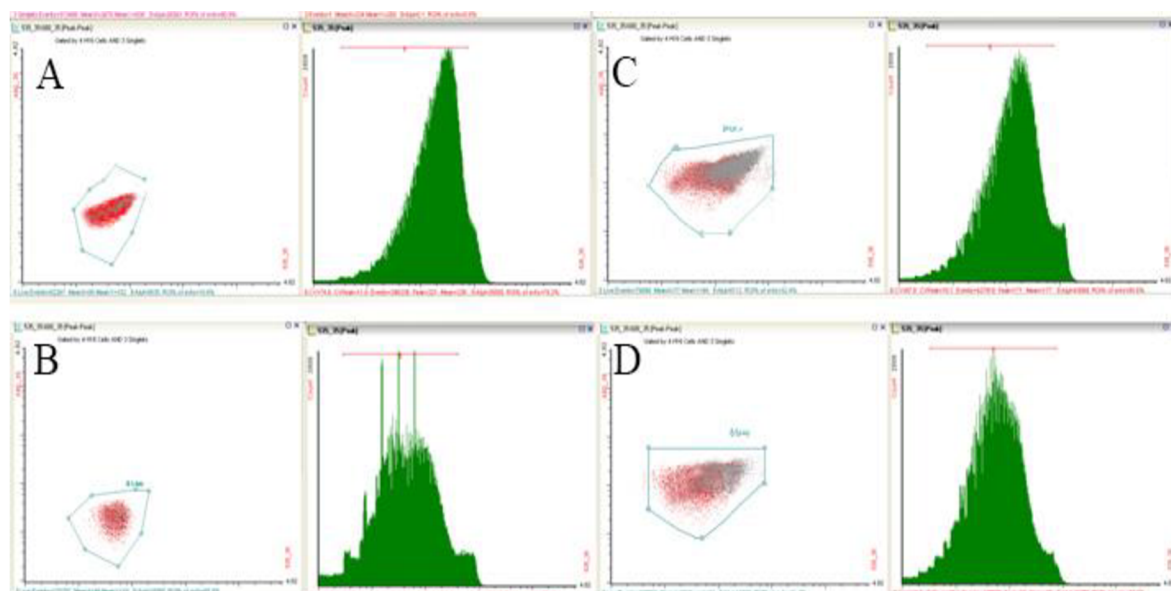
Pro řádnou optimalizaci by byl pravděpodobně zapotřebí průtokový cytometr s citlivější optikou.

4.1.8 Rhodamin 123

Další testovanou viabilní sondou byl Rhodamin 123, který detekuje transmembránový potenciál živých buněk. Pro optimalizaci barvení touto sondou byla připravena procentuelní řada poměrů živých a mrtvých buněk tak jako v předchozích případech (viz kapitola 3.5).

Tabulka 6: Výsledky měření viability sondou Rhodamin 123. Naměřené procento živých buněk bylo bráno ze stejného histogramu jako střední hodnota fluorescence.

Znamé % živých buněk	Střední hodnota fluorescence	Naměřené % živých buněk
0	32	80,3
20	45	60,7
40	22	75,6
60	41	82,4
80	38	89,9
100	44	91,2
blank	18	



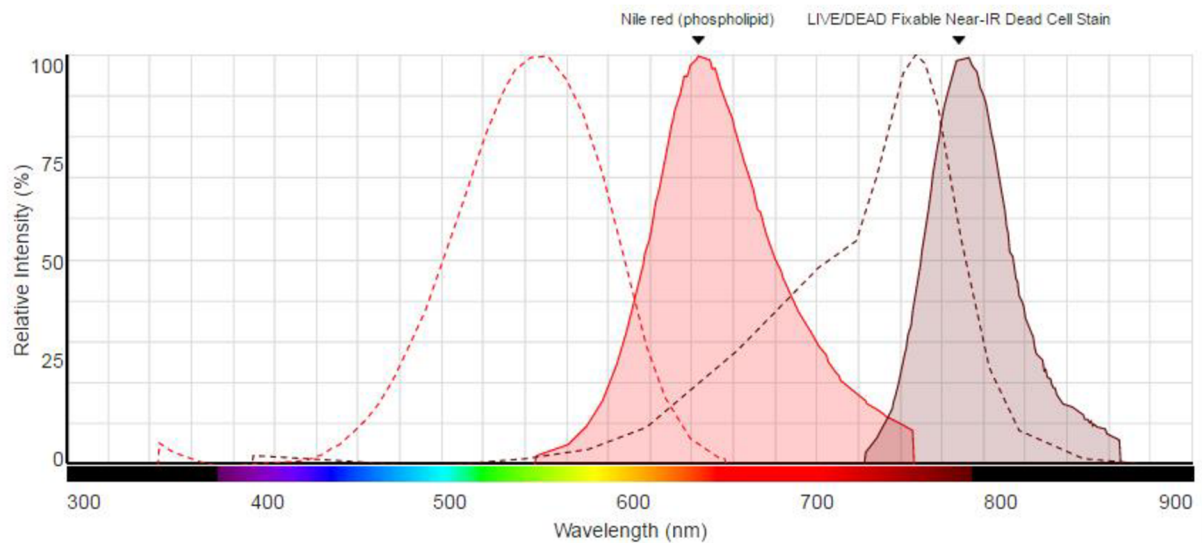
Obr. 30: Ukázka histogramů a cytogramů probučky *C. necator* H16 sondou Rhodamin 123. (A): 0 % živých buněk, (B): 40 % živých buněk, (C): 80 % živých buněk, (D): 100 % živých buněk.

Dle literatury by se měla zvyšovat intenzita fluorescence se zvyšujícím se procentem živých buněk. To vychází ze schopnosti sondy přeměny na fluorescenční formu v buňkách, které mají funkční membránový gradient. V případě tohoto měření se tak ovšem nedělo, navíc naměřené procento živých buněk nekorespondovalo s reálnými hodnotami ve vzorku. Na vině mohlo být stáří sondy nebo také nízká permeabilita bakteriálních buněk pro Rhodamin 123. Do budoucna by bylo vhodné vyzkoušet i další sondy z řady Rhodamin.

4.1.9 Near-IR sonda

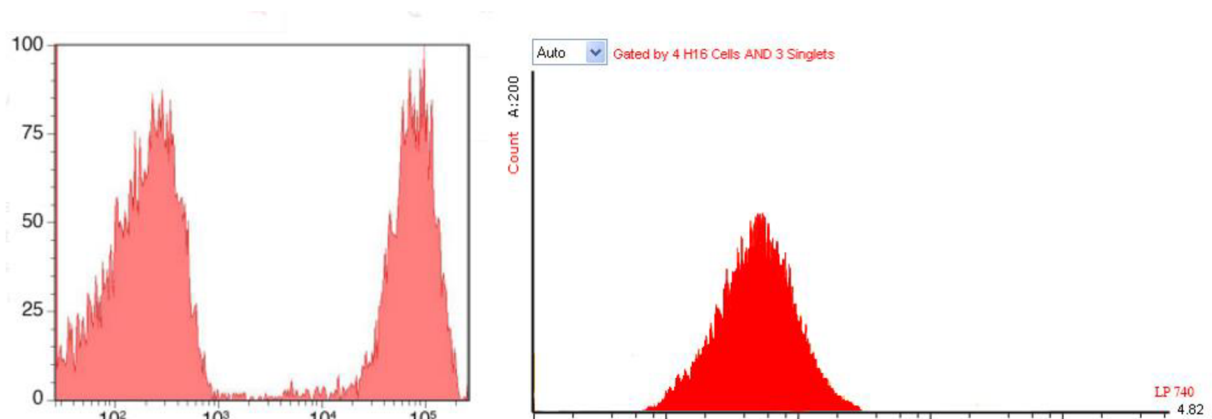
Další testovanou viabilní sondou byla Near-IR sonda. Jedná se také o sondu membránové integrity, ovšem na rozdíl od propidium iodidu a dalších interkalačních fluoroforů se tato sonda neinkorporuje do DNA, ale váže se kovalentní vazbou na intracelulární proteiny. Díky

tomu se jedná o takzvanou fixovatelnou sondu – po stanovení buněčné viability je možné s buňkami dále pracovat, např. permeabilizovat jejich buněčné obaly pro další barvení s tím, že informace o viabilitě zůstane díky pevné vazbě sondy na proteiny buňky zachována. V našem případě by použití této fluorescenční viabilitní sondy bylo zajímavé, protože by v rámci jedné analýzy bylo možné provést paralelní stanovení intracelulárního obsahu PHA pomocí Nilské červeně (která vyžaduje permeabilizaci buněk) a zároveň posoudit viabilitu jednotlivých buněk, případně dát oba parametry do vzájemných souvislostí. Použití sondy Near-IR, která se excituje laserem o vlnové délce 633 nm a jejíž fluorescence je detekována v FL4 kanále zároveň eliminuje riziko spektrálního překryvu obou sond.



Obr. 31: Díky dostatečně rozdílným emisním spektrům se Nilská červeně (vlevo) a Near-IR sonda (vpravo) při analýzách na průtokovém cytometru neovlivňují.

Dle návodu by se měly mrtvé a živé populace snadno rozeznat z histogramu při cytometrické analýze. Pík v levé části by měl reprezentovat buňky živé a pík v pravé části buňky mrtvé. Ovšem jak je ukázáno na Obr. 32, naše vzorky nevykazovaly rozdělení píků dle populací. I při změně nastavení přístroje byl stále zobrazován pouze jeden pík, jehož hodnoty byly zaznamenány do následující tabulky. Do tabulky byly zaznamenány hodnoty střední hodnoty fluorescence a počet fluoreskujících buněk pro vzorky, ve kterých bylo 50 % živých a 50 % mrtvých buněk.



Obr. 32: Porovnání histogramů, vlevo histogram dodaný firmou ThermoFisher v návodu na použití barvy, vpravo histogram z našeho měření. Všechny další histogramy vypadaly téměř identicky.

Tabulka 7: Výsledky měření z Near-IR sondou zaneseny do tabulky. Jsou zaneseny pouze hodnoty pro jeden píku vzhledem k neexistenci druhého píku. Výsledky jsou uvedeny pro vzorky, ve kterých bylo 50 % živých a 50 % mrtvých buněk. Procento naměřených buněk zde zapsaných je získané z histogramu o jednom píku.

Číslo vzorku	Doba inkubace	Teplota inkubace	Promyto po inkubaci PBS pufrem	Střední hodnota fluorescence	Procento naměřených buněk
1	30 minut	Uloženo k ledu	Ano	32	78,6
2			Ne	47	79,3
3		25 °C	Ano	28	85,2
4			Ne	53	88,5
5		37 °C	Ano	40	66,4
6			Ne	45	91,2
7	1 hod	Uloženo k ledu	Ano	95	86,3
8			Ne	108	74,9
9		25 °C	Ano	98	93,8
10			Ne	105	98,6
11		37 °C	Ano	89	87,4
12			Ne	104	64,3
13	2 hod	Uloženo k ledu	Ano	250	94,1
14			Ne	287	89,9
15		25 °C	Ano	286	88,8
16			Ne	316	92,3
17		37 °C	Ano	257	96,5
18			Ne	322	87,8

Jak lze vidět z tabulky, v čase se fluorescence mírně zvyšovala, což byl očekávaný jev. Fluorofor měl delší dobu na interakci s buňkami a vazbu na intracelulární proteiny. Velice nízké hodnoty fluorescence pravděpodobně značí, že fluorofor nebyl schopen se dostat do buňky. Tento předpoklad je podporován absencí druhého píku odpovídajícího mrtvým nebo živým buňkám. Vzorky nepromyté po inkubaci měly nepatrně vyšší hodnoty. Při promývání buněk PBS pufrem byla pravděpodobně část fluoroforu vázaného na aminové skupiny buněčné stěny odplavena pryč, takže i o fixovatelnosti této fluorescenční sondy mohou panovat pochyby.

Near-IR sonda byla testována především pro eukaryotické buňky, jejichž morfologie je odlišná od prokaryot. Liší se také ve stavbě membrán oddělujících vnitřní prostor buňky od okolí, většina eukaryotických buněk postrádá právě těžce proniknutelnou strukturu buněčné stěny. Kvůli tomuto faktu je možné, že barvivo nemůže proniknout přes buněčnou stěnu bakterie *C. necator*, a proto je na základě našich experimentů možné jej považovat za nevhodnou viabilní sondu pro další měření viability bakteriálních buněk.

4.2 Barvení Nilskou červení

Dalším cílem této práce bylo prostudovat možnosti cytometrické analýzy intracelulárních PHA granulí v bakteriálních buňkách. Samotná sonda vykazuje velmi nízkou permeabilitu, buňky je tedy před samotnou analýzou nutné permeabilizovat pomocí ledového roztoku ethanolu o koncentraci 20 obj. %.

4.2.4 Optimalizace koncentrace barviva

Nejprve byla stanovena optimální koncentrace barviva Nilské červeně ve vzorku již permeabilizovaných buněk. Vzorky PHA akumulujícího kmene *C. necator H16* i negativní kontroly – PHA neakumulujícího mutantu *C. necator PHB-4*, byly připraveny z kultur starých 96 hodin, což je doba kultivace, při které obsah PHA v akumulujícím kmeni dosahuje vysokých hodnot. Na základě studia literatury byly zvoleny koncentrace fluoroforu v rozmezí hodnot 0,1 až 5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

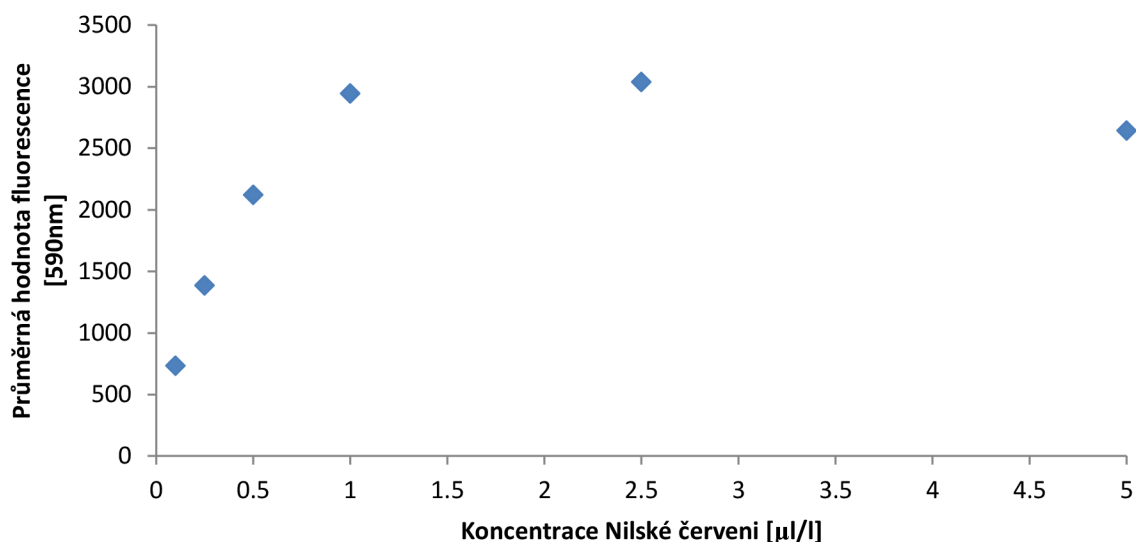
Tabulka 8: Přehled středních hodnot fluorescence sepsané z histogramů pro 590 nm a hodnotu LALS (large angle light scattering, udává velikost buňky, rozptýlené světlo je zachyceno detektorem umístěným v přímém směru).

Koncen. Nilské červeně [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]	<i>C. necator PHB-4</i>		<i>C. necator H16</i>	
	Intenzita fluor. v oranžovém kanálu	Hodnota LALS	Intenzita fluor. v oranžovém kanálu	Hodnota LALS
0,1	22	57	734	376
0,25	31	59	1387	375
0,5	31	59	2121	367
1	28	57	2946	361
2,5	34	59	3039	355
5	30	62	2643	346

V tabulce lze pozorovat výrazný rozdíl v hodnotách intenzity fluorescence jednotlivých kmenů. U kmene *C. necator PHB-4* fluoreskuje barvivo vázané především na lipidové struktury jako útvary v buněčné membráně a některé lipidy uvnitř buňky. Při vyšších koncentracích barviva nedošlo k výrazným změnám v intenzitě. Koncentrace sondy tedy u tohoto kmene nehraje roli.

U bakterie *C. necator H16* je intenzita několikanásobně vyšší, lze tedy usoudit, že Nilská červeně jasně barviva PHB granule. Při zvyšující se koncentraci sondy ve vzorku se intenzita zvyšovala, grafický průběh je znázorněn na následujícím grafu.

Hodnota LALS (large angle light scattering) udává složitost vnitřní struktury bakteriálních buněk, světlo je zachycováno detektorem umístěným v bočním směru. Lze si povšimnout několikanásobně vyšších hodnot tohoto parametru u *C. necator H16*, což je způsobeno právě naakumulovaným PHA v granulích. U neakumulujícího mutantu *C. necator PHB-4* tyto granule chybí.



Obr. 33: Grafické znázornění závislosti intenzity fluorescence na koncentraci Nilské červení ve vzorku kultury *C. necator* H16.

Z průběhu tohoto grafu lze usoudit, že až do koncentrace $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ je intenzita téměř lineárně závislá na množství přidaného barviva, od této hodnoty ale dochází k samozhášení fluorescence fluoroforu, u koncentrace $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ je úbytek intenzity zřetelný. Proto byla koncentrace $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ vybrána jako ideální a bylo s ní dále pracováno.

4.2.5 Korelace intenzity fluorescence a obsahu PHB

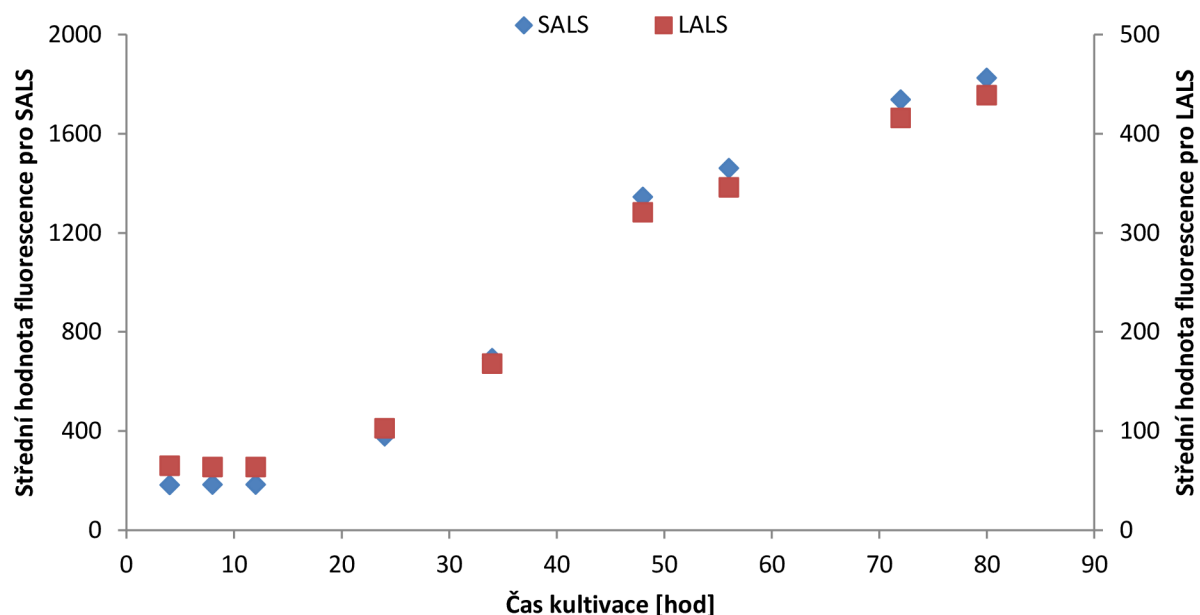
Pro tento pokus byly využity vzorky odebrané při stanovování růstu a růstové křivky pro kmen *C. necator* H16. Obsah PHB byl změřen pomocí plynové chromatografie.

Tabulka 9: Přehled naměřených intenzit fluorescence při 590 nm a hodnoty pro přímý a boční rozptyly (LALS a SALS respektive).

Vzorek	Stř. hodnota fluor. při 590 nm	Hodnota LALS	Hodnota SALS	Obsah PHB [%]
Inokulum	270	82	294	20,8
4h	99	65	183	16,2
8h	158	64	184	14,1
12h	443	64	184	29,7
24h	1554	103	379	52,3
34h	1558	168	694	55,9
48h	2532	321	1346	66,0
56h	2816	346	1462	69,1
72h	2742	416	1738	68,5
80h	3098	439	1826	72,1

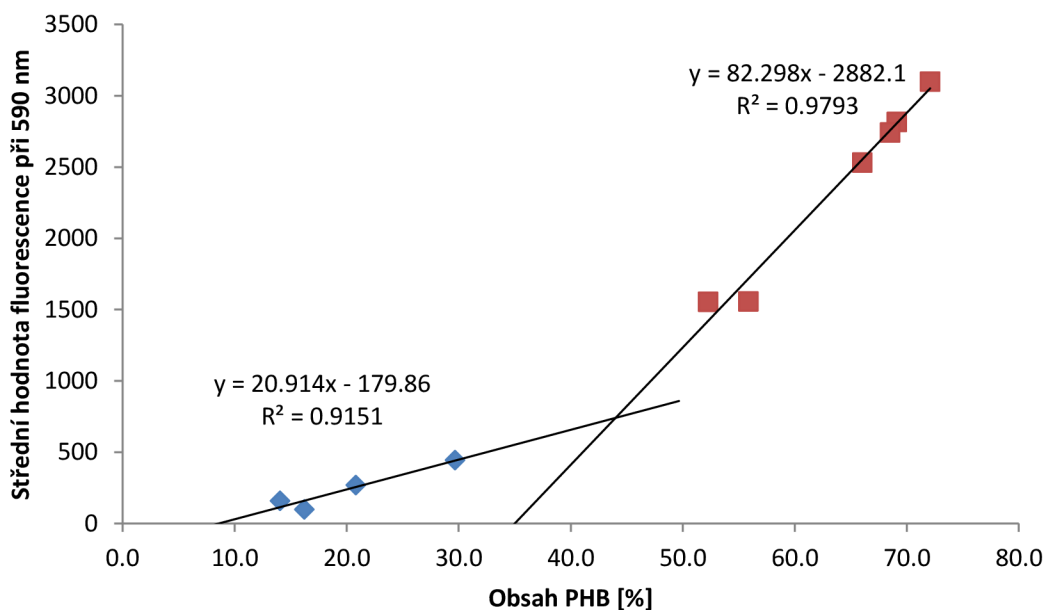
V této tabulce si lze všimnout zvyšujících se hodnot LALS i SALS se zvyšujícím se časem kultivace. Jedná se o průměrné hodnoty ve vzorku. Jak buňky v kultuře rostou, zvyšuje se nejen jejich počet, ale zejména jejich velikost. V důsledku akumulace PHA také narůstá granulovitost buněk, což se projeví zvýšenými hodnotami SALS - bočního rozptylu světla,

kteřý vypovídá o vnitřní složitosti buněk. Jinými slovy, čím vyšší tato hodnota je, tím více fázových přechodů v buňce existuje.



Obr. 34: Závislost hodnot pro boční a přímý rozptyl v různých časech kultivace

Ve výše zobrazeném grafu si lze povšimnout, že obě hodnoty rozptylů začínají stoupat ve stejném čase okolo 24. hodiny a jejich průběh je téměř identický. Tato skutečnost podporuje tvrzení, že granule PHB jsou důvodem nejvyššího přírůstku velikosti stejně tak jako granulovitosti buněk. Hodnoty vcelku přesně kopírují tradiční průběh růstové křivky (je zajímavý průběh mezi 10 až 50 hodinou, která by se dala považovat za log fázi růstu bakterie). Lze proto předpokládat, že při delší kultivaci a odebrání až do 100 hodin, by intenzita signálu příliš výrazně nestoupala, její průběh by byl spíše stacionární.



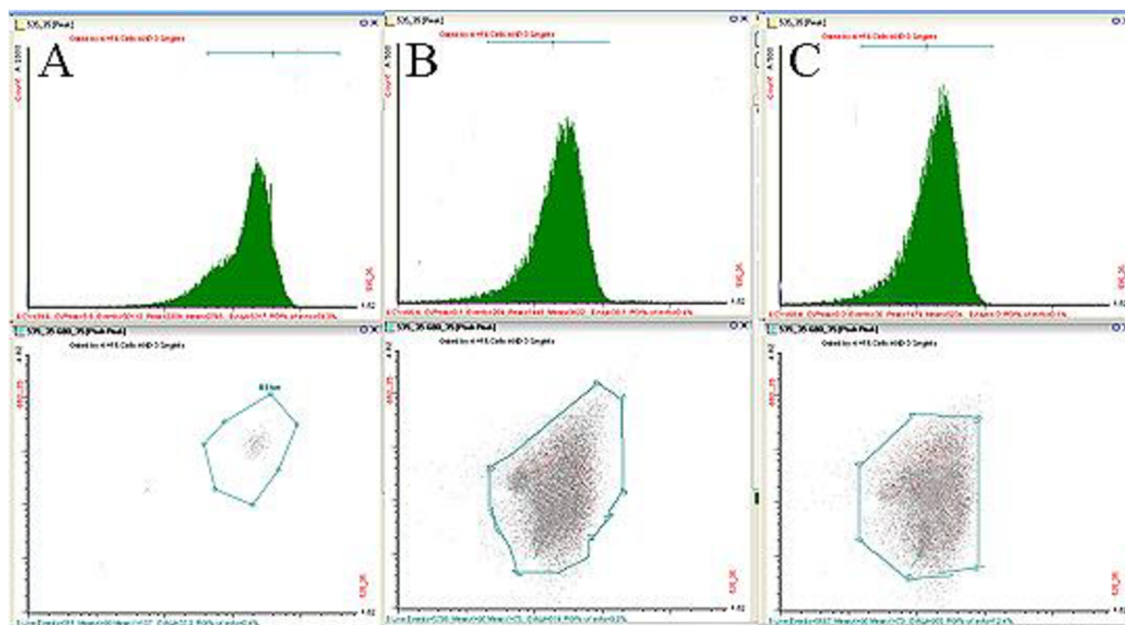
Obr. 35: Závislost intenzity fluorescence na obsahu PHB v buňkách.

Při vynesení závislosti intenzity oranžové fluorescence na obsahu PHB v buňce do grafu byly nalezeny dvě oblasti, které bylo možné proložit lineárními přímkami, které vyjadřovaly její průběh. Pravděpodobným důvodem je větší plocha a potažmo objem granulí, do kterého barvivo proniká, a tato závislost mezi plochou/objemem a obsahem barviva, tedy intenzitou fluorescence, se v určité fázi kultivace mění a závislost se stává strmější.

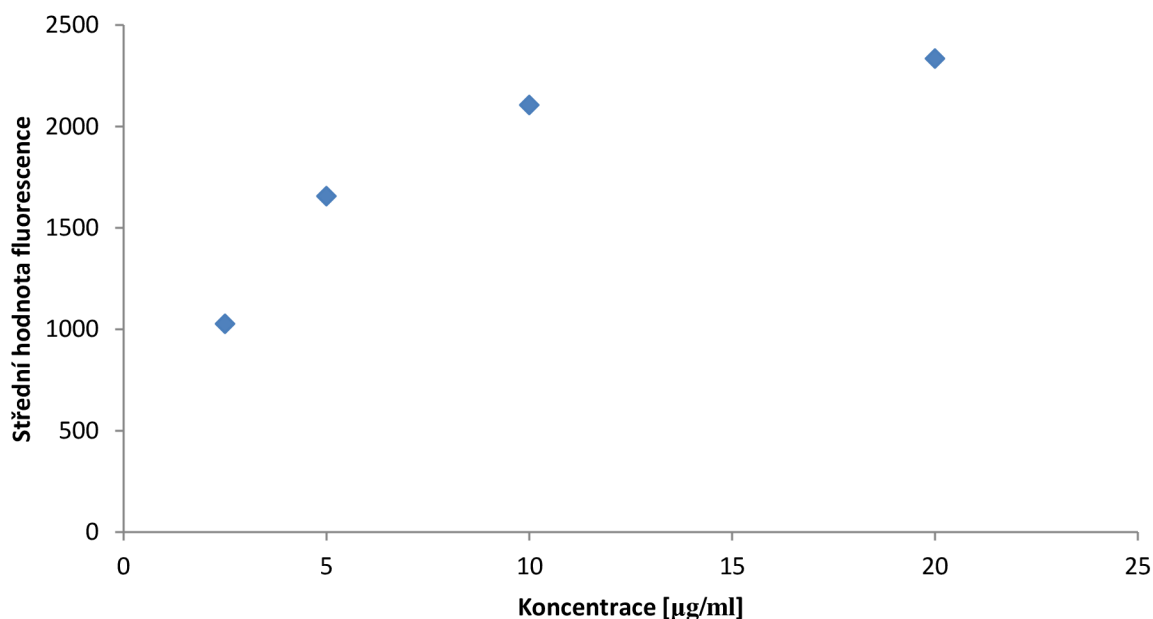
Tento poznatek je zvláštní a další zkoumání tohoto jevu by bylo zcela jistě velmi zajímavé. Navíc je zřejmé, že je průtoková cytometrie velice zajímavou technikou umožňující pozorovat heterogenitu bakteriálních buněk a distribuci vybraných buněčných parametrů v analyzované buněčné populaci. Nicméně kvantifikace vybraného parametru není silnou stránkou této metody. Jedním z důvodů může být řada interferujících fyziologických parametrů, které mohou vést k odchylkám od obecně akceptovaných analytických vztahů (jako je třeba jedna lineární kalibrační závislost mezi signálem a koncentrací). I přesto, že je cytometrická metoda velice rychlá, nemůžeme ji doporučit jako procesní metodu pro biotechnologickou produkci PHA.

4.3 Barvení sondou BODIPY 493/503

Další testovanou fluorescenční hydrofobní sondou, kterou je možné použít k analýze intracelulárních PHA granulí je BODIPY 493/503. Tato sonda při vazbě na PHA granule vykazuje intenzivní zelenou fluorescenci. Na základě literatury byly otestovány čtyři koncentrace sondy ve vzorku. Jak lze vidět v grafu (Obr. 37), chování této sondy s narůstající koncentrací bylo velmi podobné chování Nilské červeni. Jako ideální pro další experimenty byla vybrána koncentrace $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, při jejímž použití byla dosažena výrazná střední hodnota fluorescence. Při vyšší koncentraci jsou patrné sklony k samozhášení.



Obrázek 36: Ukázka histogramů a cytogramů pro bakteriální kultury *C. necator* obarvené BODIPY 493/503. (A) *C. necator* PHB-4, (B) *C. necator* H16 bez fixování ethanolom, (C) buňky *C. necator* H16 fixované ethanolom.



Obr. 37: Závislost intenzity fluorescence na koncentraci sondy BODIPY 493/503 ve vzorku.

Graf je vytvořen z dat z následující tabulky. Jak lze v této tabulce vidět, hodnoty intenzity fluorescence se příliš neliší u vzorků fixovaných ethanolom a těch nefixovaných. Z toho bylo usouzeno, že v případě *C. necator* není potřeba před analýzou PHA pomocí BODIPY 493/503 fixace ethanolom. Navíc, vzhledem k tomu, že BODIPY 493/503 má jen nepatrný spektrální překryv s propidium iodidem je teoreticky možné využít duální barvení propidium iodidem a BODIPY 493/503 k cytometrické analýze vlivu akumulace PHA na stresovou odolnost bakterie *C. necator*. Nalézt kombinaci fluorescenčních sond pro duální barvení PHA a viability buněk byl jeden z cílů této diplomové práce.

Tabulka 10: Přehled různých středních hodnot fluorescence, ukázáno pro oba kmeny *C. necator*.

*SHF: Střední hodnota fluorescence

% buněk: procento buněk vykazujících nejvyšší hodnoty intenzity fluorescence

Koncent. [µg · ml ⁻¹]	<i>C. necator</i> PHB-4				<i>C. necator</i> H16			
	Použití ethanolu		Bez ethanolu		Použití ethanolu		Bez ethanolu	
	SHF*	% buněk	SHF*	% buněk	SHF*	% buněk	SHF*	% buněk
2,5	131	93,9	127	94,4	1027	78,9	997	89,4
5	199	80,2	180	87,3	1656	94,3	1587	88,6
10	227	79,7	217	81,5	2106	85,6	2045	93,4
20	282	77,6	227	88,5	2335	81,7	2244	91,2

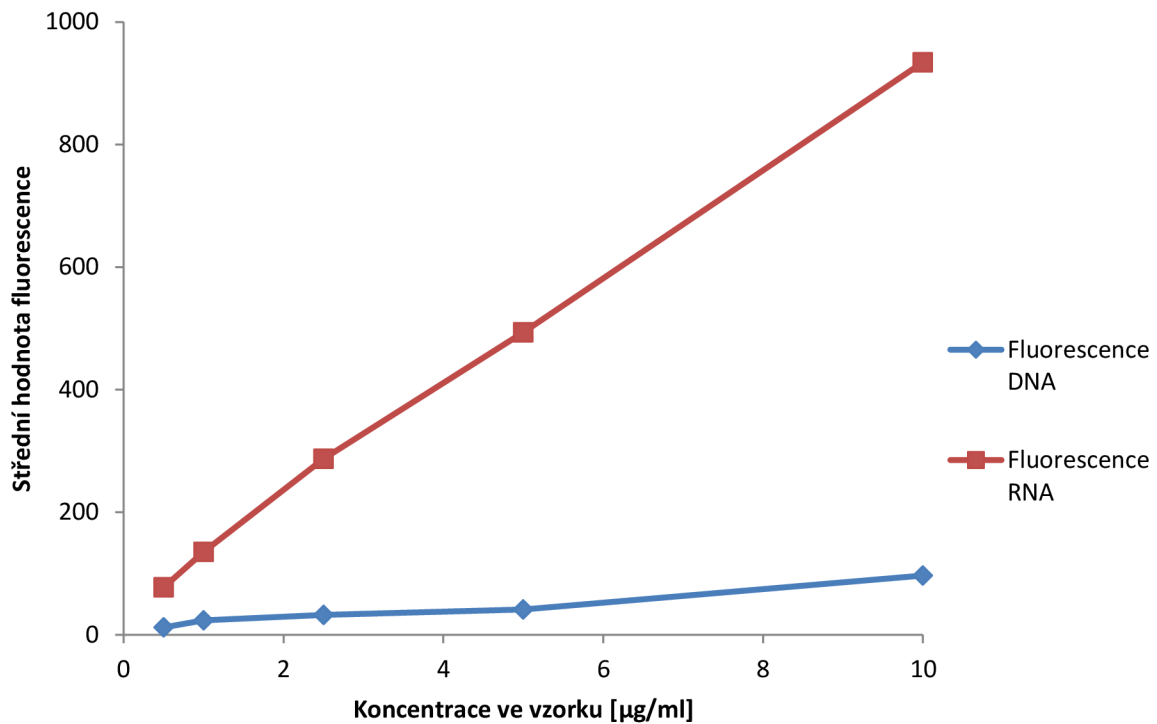
BODIPY 493/503 stále zůstává předmětem zájmu a bude podrobena dalším experimentům při budoucím studiu.

4.4 Využití akridinové oranže jako sondy genové exprese

4.4.4 Optimalizace koncentrace sondy

Akridinovou oranž je možné využít k paralelní analýze buněčného obsahu DNA a RNA, protože vazba na obě nukleové kyseliny výrazně mění emisní vlastnosti sondy.

Na základě literární rešerše bylo vybráno několik koncentrací akridinové oranže ve vzorku. K buňkám *C. necator* H16 fixovaným ethanolem (nejčastější postup) byly přidány různé objemy sondy a poté byla měřena fluorescence ve dvou kanálech. Sonda navázaná na RNA šroubovici má emisní maximum 633–640 nm a pro DNA-vázaný fluorofor je toto maximum 520–524 nm. Protože bylo snahou najít takovou koncentraci barviva, která by dávala nejlepší rozlišení mezi obsahem RNA a DNA ve vzorku, tudíž největší rozdíl intenzit fluorescence, byly poté získané hodnoty intenzit postaveny proti sobě. Koncentrace, při které byl tento rozdíl nejvyšší byla poté zvolena jako pracovní.

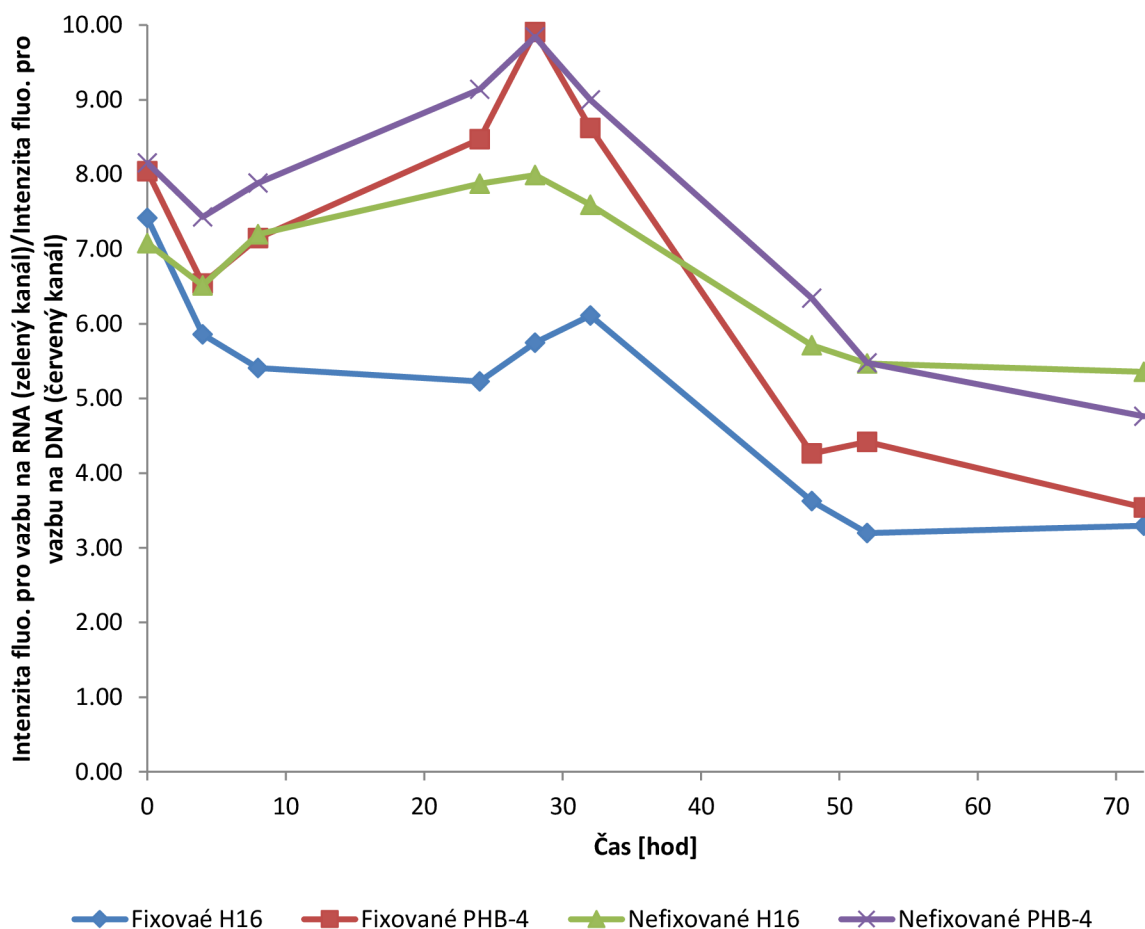


Obr. 38: Intenzity RNA a DNA-vázané sondy položené proti sobě v jednom grafu.

Jak lze vidět z výše zobrazeného grafu, nejvyšší rozdíl intenzit byl při nejvyšší koncentraci, tedy $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Intenzita RNA vázaného fluoroforu je zde přibližně 10krát vyšší než hodnota pro molekuly vázané na DNA.

4.4.5 Využití akridinové oranže při charakterizaci růstu bakterií

Cílem tohoto experimentu bylo zjištění, zda jdou pomocí akridinové oranže zachytit rozdíly v jednotlivých částech růstové křivky obou kmenů *C. necator*. Vzhledem k dvojímu postupu (ethanolem fixované a nefixované buňky) byly vytvořeny čtyři řady vzorků. V teoretické části byl popsán měnící se obsah RNA v buňce v závislosti na části životního cyklu, ve kterém se buňka nachází.

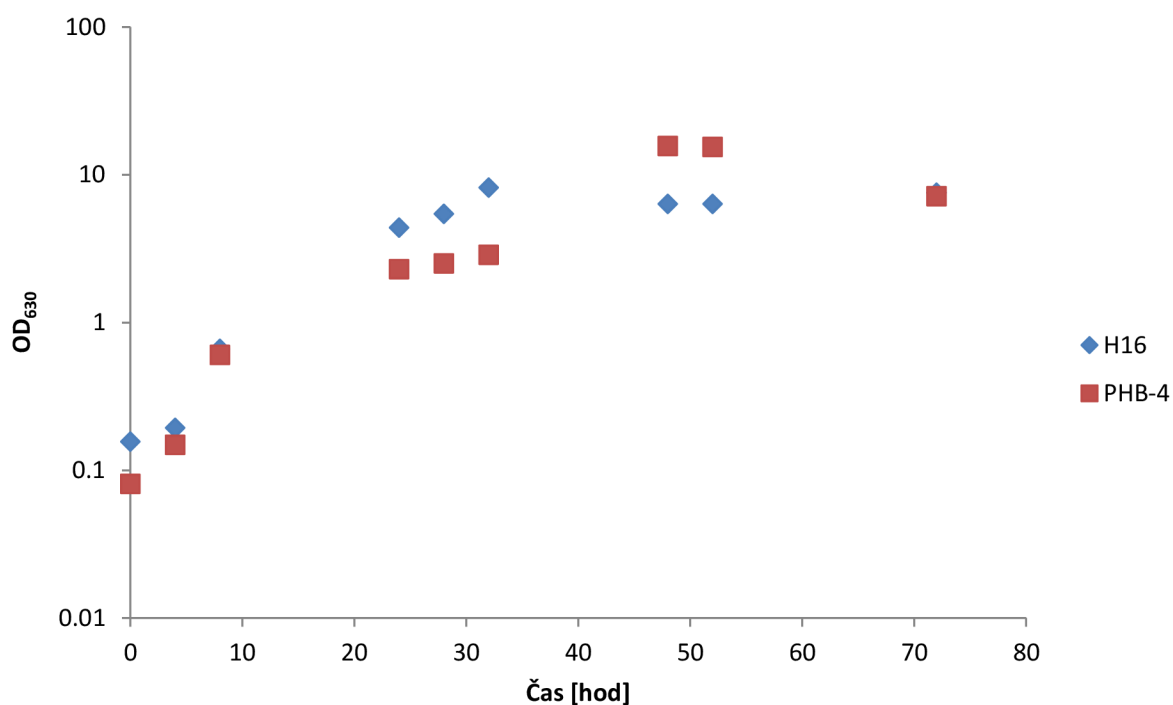


Obr. 39: Poměr intenzit fluorescenci pro RNA a DNA vázanou sondou pro všechny odběry během růstu.

V teorii, čím vyšší je obsah RNA v buňce, tím vyšší je podíl RNA:DNA obsahu, a tím pravděpodobněji se buňka dělí, případně je z jiného důvodu výrazně akcentována exprese proteinů. Pokles při přechodu z prvního do druhého bodu v grafu lze vysvětlit tím, že bod v nulté hodině je vzorek odebrán ihned po přidavku inokula do média. Médium inokula je nastaveno tak, aby bakterie měly co nejvyšší příděl živin, nastartoval se metabolismus a buňky se rychle dělily. Po 4 h kultivace v produkčním médiu se pravděpodobně v důsledku aklimatizace na nové podmínky metabolismus bakteriálních buněk částečně zpomalil (tzv. lag-fáze) a tedy poklesl poměr RNA:DNA.

Mezi 4. a 24. hodinou dochází k mírnému růstu podílu, obsah RNA se tedy zvyšuje. Tato fáze, jak je patrné z grafu turbidimetrického monitoringu růstu (**Error! Reference source not found.**), je patrně exponenciální fáze. V této fázi dochází k rychlému dělení buněk, což je právě provázáno zvýšeným obsahem RNA. Ve 28. hodině (u fixované *C. necator H16* je to 32. hodina) je znatelná nejvyšší hodnota podílu, což by se dalo považovat právě za kulminaci exponenciální fáze.

Po 32. hodině dochází k poklesu podílu, což značí, že obsah RNA se značně snižuje. Buňky se tedy dostaly do stacionární fáze (tento fakt je potvrzen opět v následujícím grafu, kde stacionární fáze nastává taktéž po 32. hodině), na konci lze vysledovat (obzvláště u fixovaných i nefixovaných vzorků *C. necator PHB-4*) počátek fáze odumírání. Buňky zcela umírají, obsah RNA se tedy značně snižuje, až by eventuelně dosáhl minimálních hodnot. V následujícím grafu lze úbytek buněk sledovat v 72. hodině.



Obr. 40: Růstová křivka pro oba kmene *C. necator* H16 a *C. necator* PHB-4 stanovená turbidimetricky.

4.5 Mikroskopická analýza

Vzorky byly připraveny dle standardního postupu barvení, který byl používán i pro cytometrickou analýzu (viz. kapitola 3.8).

4.5.4 Viabilní fluorofor SYTO9

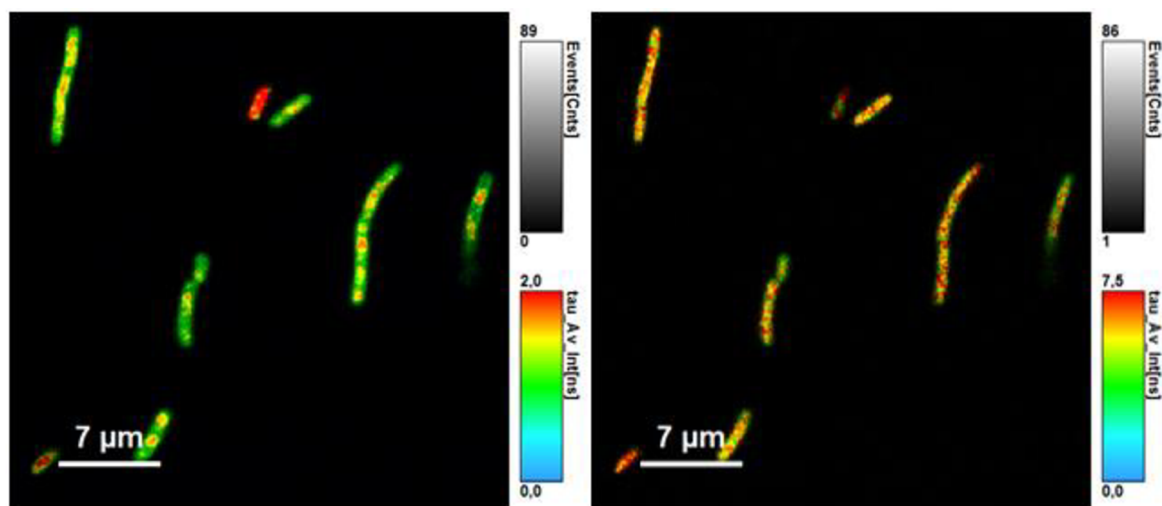
V tomto případě byla zkoumána kultura *C. necator* H16. Vzhledem k tomu, že SYTO9 barví jak živé, tak i mrtvé buňky, byl předpoklad nulového rozdílu mezi vzorky živých a mrtvých buněk.

SYTO9 lze v našich podmínkách snímat jak v zeleném, tak i v červeném kanálu. Emisní maximum SYTO9 je 498 nm pro DNA vázanou sondu a 501 nm pro RNA vázanou. Na vině může být až příliš vysoká koncentrace barviva (přidávaný objem 1,5 μ l byl doporučen především pro cytometrická stanovení). Emisní spektrum pro SYTO9 zasahuje až k hodnotám 650 nm. Tento fluorofor tak může ovlivňovat výsledky, které jsou získány při používání BacLight™ sady, kde se používá i propidium iodid. Proto se zdá jako důležité nastavit koncentraci SYTO9 ve vzorku tak, aby nedocházelo k přelévání signálu i do červeného kanálu, kde je snímána emise propidia.

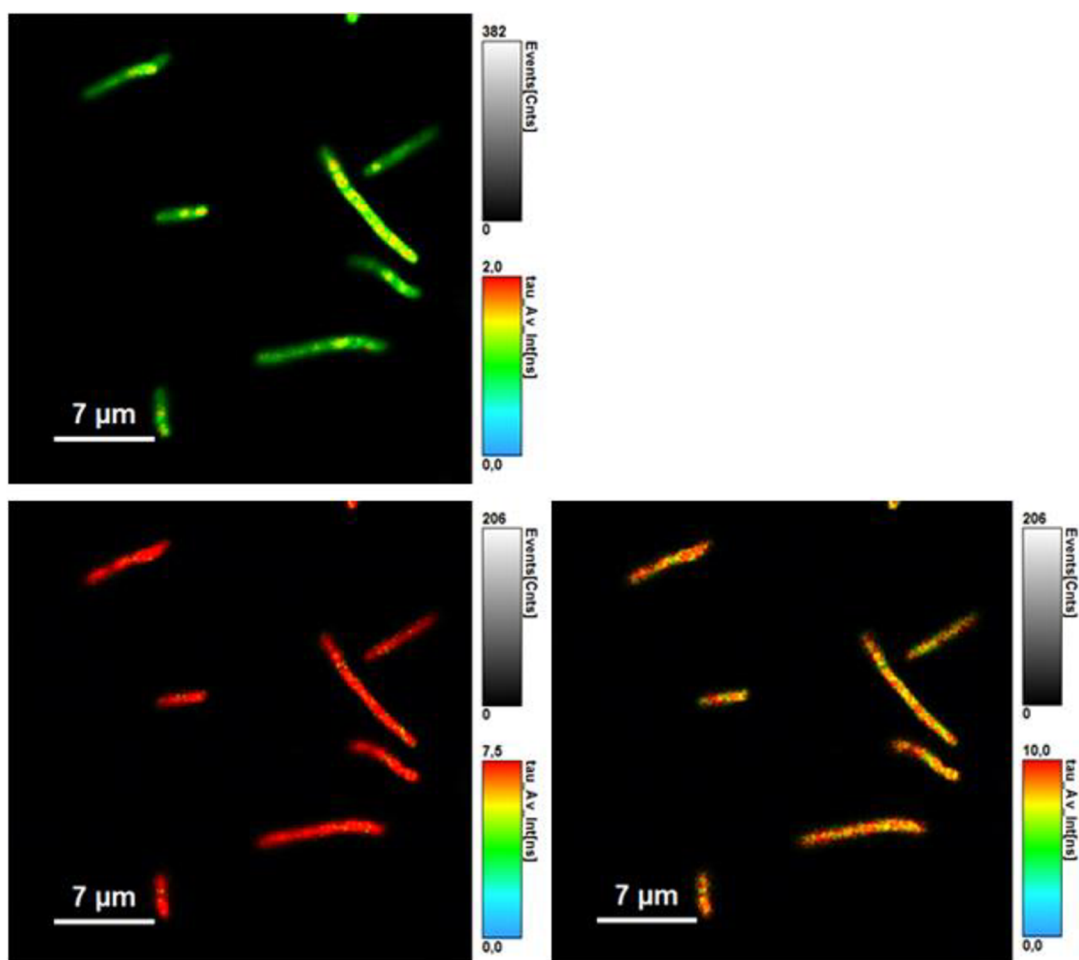
V literatuře bylo poukazováno na náchylnost tohoto fluoroforu na fotovybělování, ovšem zde nebyl žádný takovýto fenomén zaznamenán.

Byly změřeny doby života fluorescence ve všech kanálech. Pro živé buňky se jednalo o hodnoty $1,158 \pm 0,004$ ns v zeleném kanálu a $5,45 \pm 0,08$ ns v červeném kanálu. Pro mrtvé buňky to jsou hodnoty $1,03 \pm 0,01$ ns a $7,76 \pm 0,16$ ns. Časy v zelených kanálech jsou si vcelku blízké, ovšem pro červený kanál se liší o přibližně 2 ns. V literatuře byl nalezen čas 4 ns a to pro zelený kanál.

Dále bylo zjištěno, že SYTO9 je přítomno ve vysoké koncentraci kolem granulí PHB. Na snímcích lze vidět několik míst v každé bakterii, které mají vysokou intenzitu fluorescence a jsou podobné svým tvarem právě granulím PHB, a to jak u živých, tak i mrtvých bakterií. Tomuto fenoménu by jistě bylo zajímavé se věnovat v rámci další práce.



Obr. 41: Živé buňky *C. necator* H16 obarveny fluoroforem SYTO9. Napravo lze vidět výsledný obraz získaný ze zeleného kanálu, napravo z červeného kanálu.

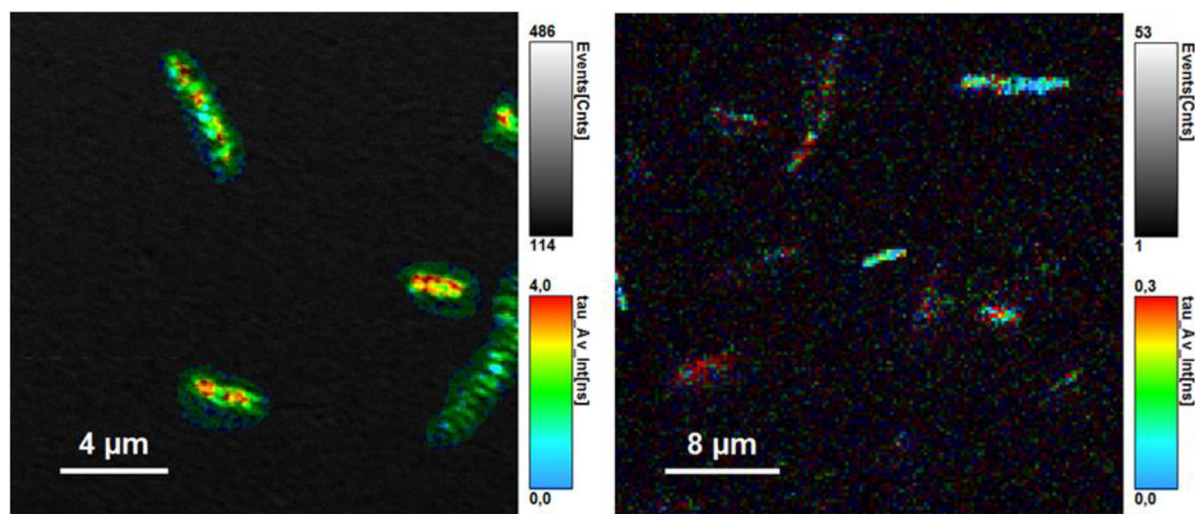


Obr. 42: Mrtvé buňky *C. necator* H16. Vrchní obrázek je pořízen v zeleném kanálu, dolní dva jsou oba z červeného kanálu, rozdíl je v prahování časů.

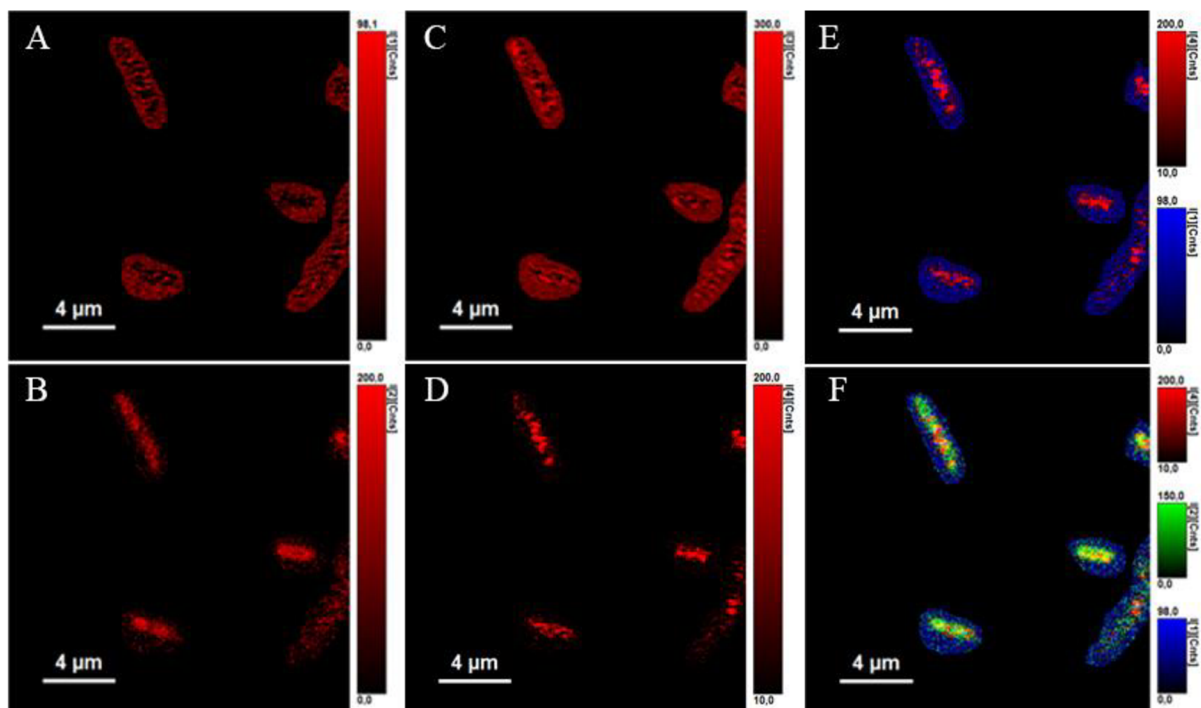
4.5.5 Propidium iodid

Propidium iodid je fluorofor vážící se jak na DNA, tak i RNA řetězce. Váže se na DNA buněk mrtvých (či značně poškozených). Může procházet přes vnější buněčnou membránu gram-negativních bakterií, ale pokud není poškozená plazmatická membrána buňky, fluorofor je aktivně transportován z buňky ven. Proto je předpoklad vysoké intenzity fluorescence ve vzorcích mrtvých buněk, a téměř žádné v buňkách živých.

Jak je vidět na Obr. 43, rozdíly v intenzitě mezi mrtvými (vlevo) a živými (vpravo) buňkami jsou velké. Na snímku mrtvých buněk si lze povšimnout oblastí uvnitř buněk s vysokou intenzitou fluorescence, jedná se o oblast jádra, kde se PI navázal na DNA, popř. můžeme počítat s fluorescencí RNA navázané sondy. Na okrajích jsou vidět jasné hranice mezi okolím buňky nemající žádnou intenzitu a fluoreskující oblastí. Lze předpokládat, že se jedná o membrány, na kterých se zachytilo barvivo, pravděpodobně z důvodu přílišné koncentrace sondy ve vzorku (bylo přidáváno 1 μ l, tedy stejně jako na cytometrickou analýzu). Tento předpoklad je podporován výsledky zobrazených na Obr. 44. V části A a C jsou zobrazeny v největší pravděpodobnosti membrány, do kterých je sonda vmezeřena. Jak bylo popsáno v teoretické části, intenzita fluorescence PI při navázání na DNA (či RNA) je až 40násobně vyšší než intenzita volného fluoroforu. Kromě membrán jsou pravděpodobně zobrazeny i ribosomy s RNA vázanou sondou a část oblastí s DNA vázaným fluoroforem, tedy všechny primárně fluoreskující oblasti. Na obrázcích B a D jsou pravděpodobně zobrazeny oblasti DNA vázaného propidia, přičemž B jakožto snímek ukazující největší intenzitu dopadajících fotonů zobrazuje právě oblast s nejvíce koncentrovanou sondou, tedy oblast kde se nachází DNA. Právě snímek B má nejvyšší hodnotu času života fluorescence a to 10,9 ns.



Obr. 43: Buňky *C. necator* H16 obarvené propidium iodidem. Na levém obrázku jsou mrtvé buňky, na pravém buňky živé.



Obr. 44: Mrtvé buňky *C. necator* H16. Oblasti buňky lišící se průměrnými dobami života fluorescence a velikostí proudu dopadajících fotonů. (A) τ je 0,82 ns, $I(1)=122,9\pm 7,2$ kCnts. (B) τ je 10,9 ns, $I(2)=294\pm 4$ kCnts. (C) τ je 0,065 ns, $I(3)=1809\pm 15$ kCnts. (D) τ je 0,311 ns, $I(4)=519\pm 11$ kCnts. (E) je kombinací A a C. (F) je kombinací A, B a C.

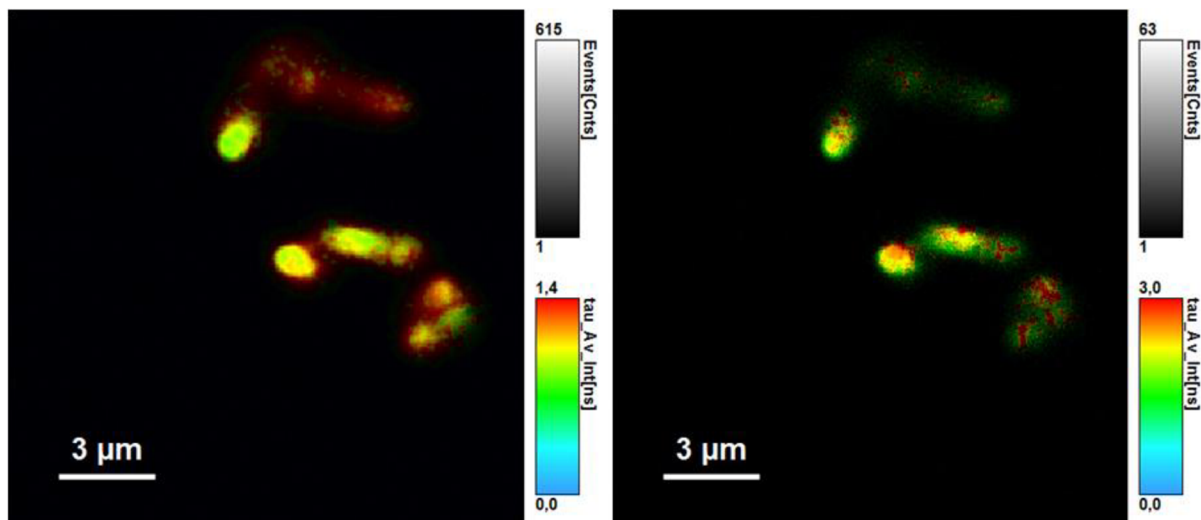
Čas života fluorescence u mrtvých buněk byl určen na $1,304\pm 0,05$ ns, u živých $0,1302\pm 0,0085$ ns. V literatuře byly nalezeny výsledky života fluorescence s hodnotami vyššími než 15 ns. K tomuto výsledku se nejvíce blíží právě hodnoty snímku B (10,9 ns). Nižší hodnota na obrázku mrtvých buněk může být způsobena zahrnutím všech různých fluorescencí, které v buňce existovaly po osvětlení.

Hodnota pro DNA/RNA nevázaný fluorofor je obecně menší než 2 ns. Fluorescence z volného barviva mohla být zahrnuta do výsledných výpočtů pro obrázky A a C, proto jsou tyto doby tak nízké.

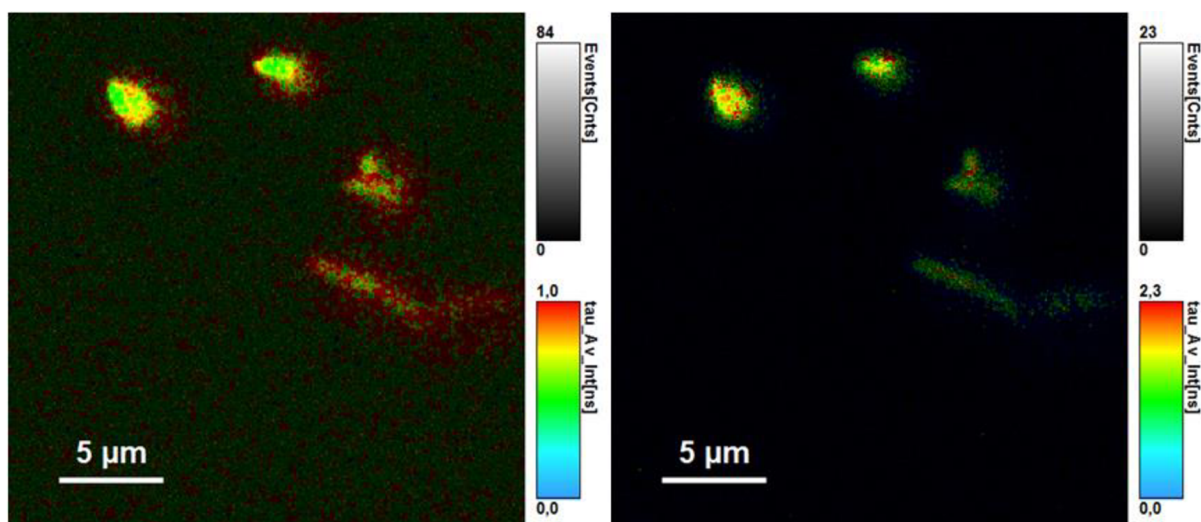
Na Obr. 43 jsou zobrazeny živé buňky, ke kterým byl přidán propidium iodid. Vzhledem k existenci jisté nízké fluorescence lze říci, že některé buňky byly poškozené, popř. zbytkové barvivo bylo v okamžiku pořizování snímku přítomno v mezimembránovém prostoru a nebylo transportováno v buňky ven. Lze vidět poměrně vysoký šum pozadí, může se jednat o volné barvivo v roztoku. Čas života fluorescence je přibližně 10krát nižší než u buněk mrtvých.

4.5.6 Akridinová oranž

Akridinová oranž je fluorofor barvící DNA a RNA a emise různě vázaných sond je rozdílná. V zeleném kanálu lze pozorovat fluorescenci DNA vázané sondy, v červeném RNA vázané. Bylo zajímavé lokalizovat oblasti s nejvyššími časy života fluorescence.



Obr. 45: Buňky *C. necator* H16. Vlevo snímek ze zeleného kanálu, vpravo z červeného kanálu.

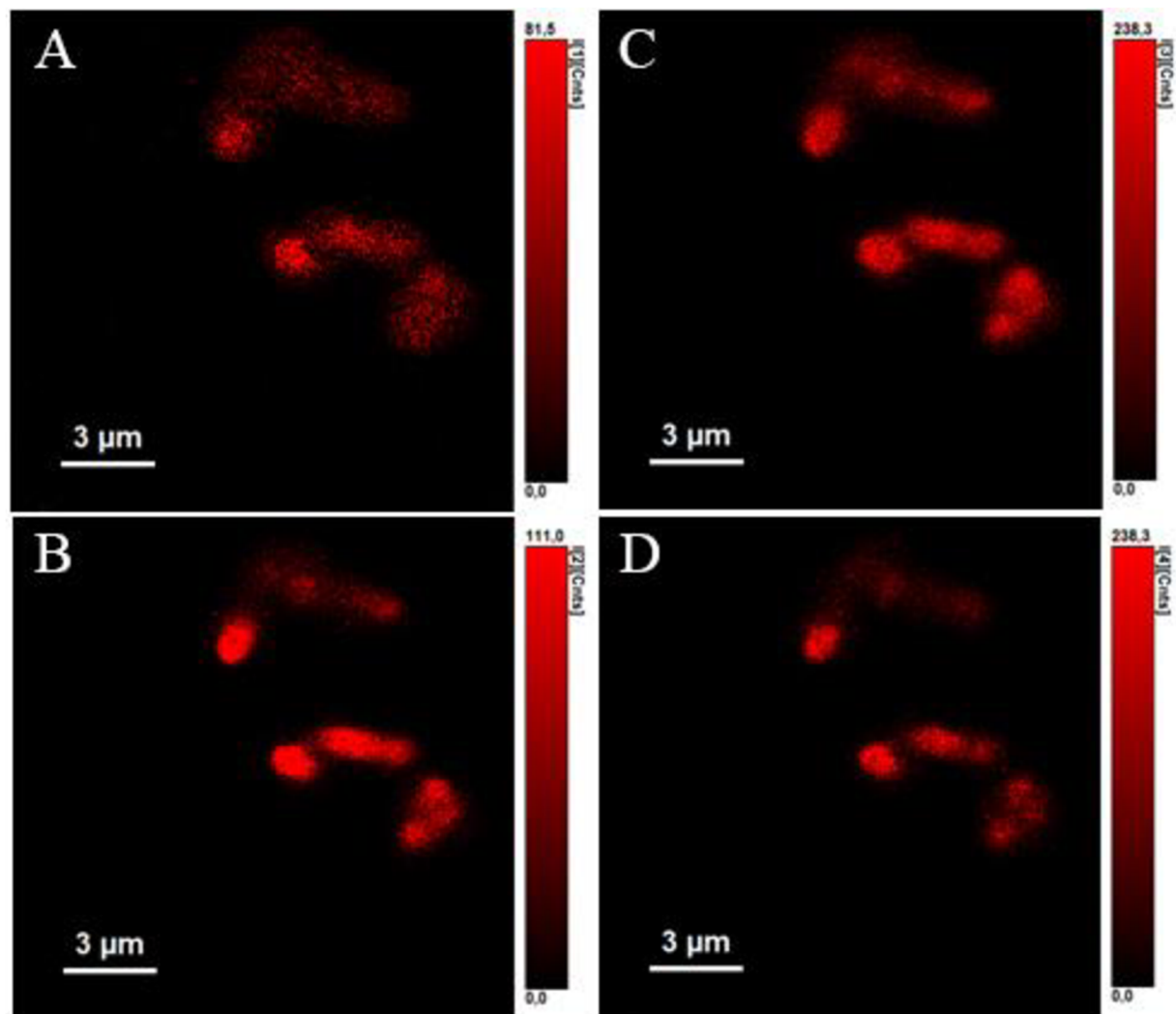


Obr. 46: Buňky *C. necator* PHB-4 obarvené akridinovou oranží. Vlevo snímek ze zeleného kanálu, vpravo z kanálu červeného.

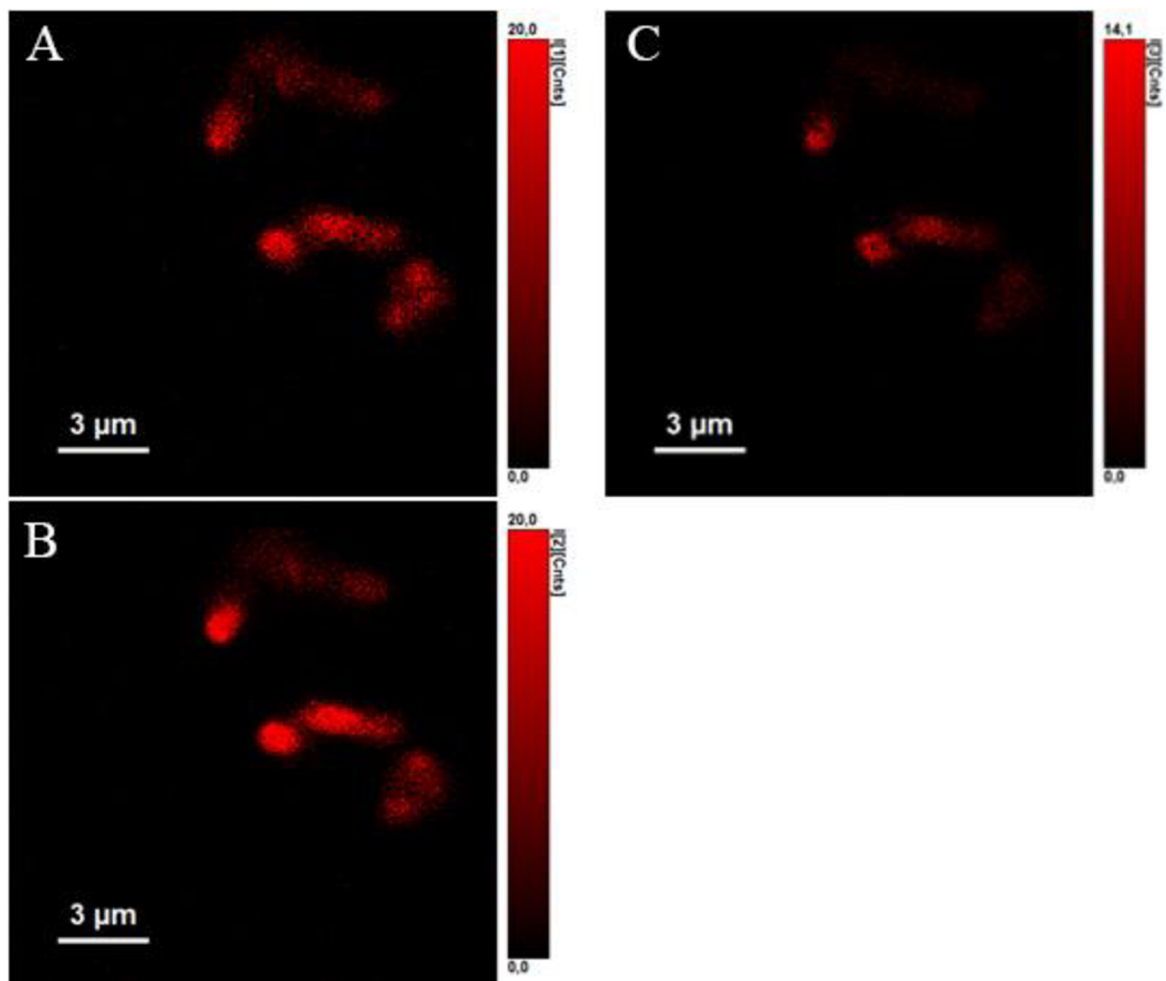
V případě buněk kmene *C. necator* H16 byl čas života fluorescence v zeleném kanále naměřen 1,47 ns, v červeném 2,64 ns. U *C. necator* PHB-4 to byly hodnoty 1,88 ns v zeleném kanále a 3,04 ns v červeném. Literatura hovoří, že průměrný čas života fluorescence pro DNA vázanou sondu je 5 ns a pro RNA vázanou je až 20 ns při laboratorní teplotě. V našich výsledcích lze pozorovat vyšší hodnoty časů v červených kanálech, ovšem stále jsou naše výsledky několikanásobně menší než ty uváděné v literatuře.

Při zobrazování kultury *C. necator* H16 byl učiněn podobný objev jako v případě SYTO9; barvivo se ve vysoké koncentraci vyskytovalo okolo granulí PHB. Na Obr. 45 si lze všimnout této skutečnosti hlavně v zeleném kanále. V případě kultury *C. necator* PHB-4 byla barva přítomna v celém objemu bakterie. Celkově byla intenzita fluorescence vyšší v zeleném

kanálu, což je zajímavé, protože v případě cytometrického měření byly intenzivnější hodnoty fluorescence RNA vázané sondy (tedy v červeném kanále).



Obr. 47: Oblasti buňky lišící se průměrnými dobami života fluorescence a velikostí proudu dopadajících fotonů, data jsou získány ze zeleného kanálu. (A) τ je $3,31 \pm 0,16$ ns, $I(1) = 946 \pm 122$ kCnts. (B) τ je $0,079 \pm 0,001$ ns, $I(2) = 914 \pm 4$ kCnts. (C) τ je $1,662 \pm 0,033$ ns, $I(3) = 3553 \pm 91$ kCnts. (D) τ je $0,5650 \pm 0,0091$ ns, $I(4) = 1297 \pm 32$ kCnts.



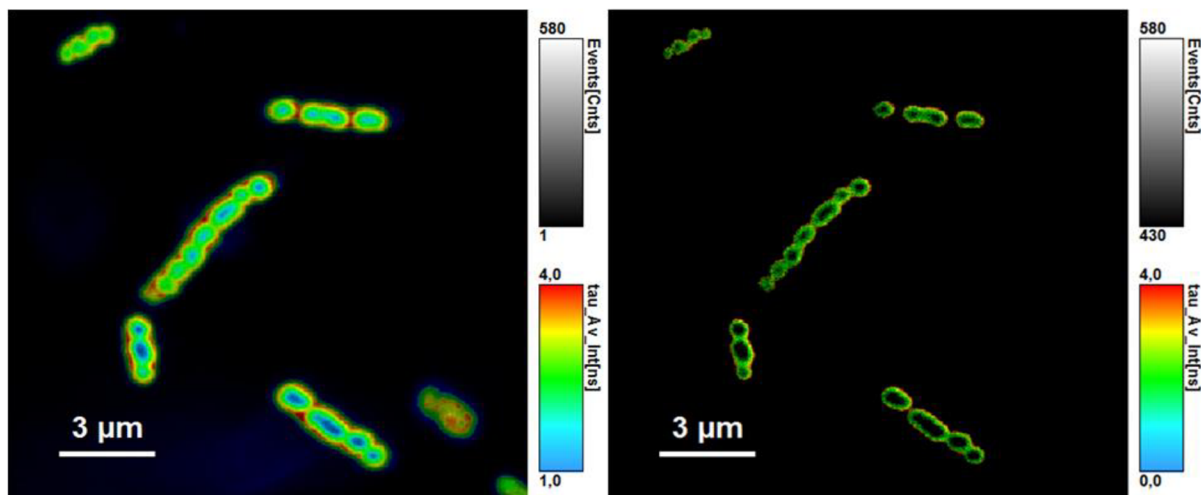
Obr. 48: Oblasti buňky lišící se průměrnými dobami života fluorescence a velikostí proudů dopadajících fotonů, data jsou získána z kanálu červeného. (A) τ je $5,07 \pm 0,28$ ns, $I(1) = 121,5 \pm 4,7$ kCnts. (B) τ je $1,228 \pm 0,037$ ns, $I(2) = 21,2 \pm 1,7$ kCnts. (C) τ je $0,133 \pm 0,025$ ns, $I(3) = 21,2 \pm 1,7$ kCnts.

Na Obr. 47 (zelený kanál) a Obr. 48 (červený kanál) jsou zobrazeny blíže oblasti s různými dobami života v buňkách *C. necator H16*. Je zajímavé, že existuje několik dob života fluorescence, ovšem žádná z těchto oblastí se nevybočuje, všechny se víceméně prolínají, prostorově se opět můžeme bavit spíše o okolí granulí PHB. Na snímcích ze zeleného kanálu (DNA vázaná sonda) lze pozorovat vyšší počet fotonů dopadajících na detektor.

4.5.7 BODIPY 493/503

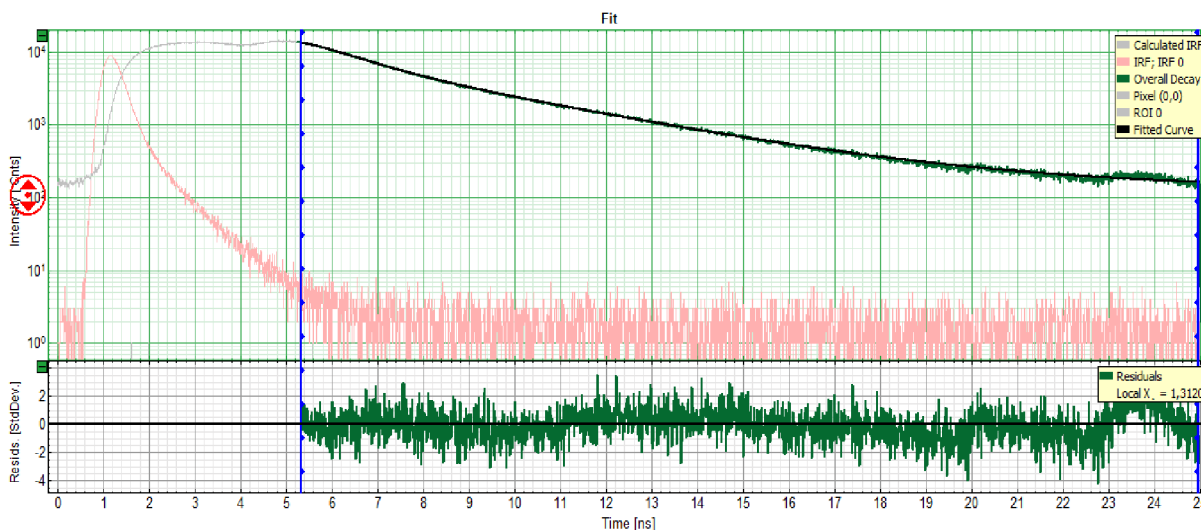
Byly zkoumány obě kultury *C. necator H16* a *C. necator PHB-4* při použití koncentrace $0,038 \mu\text{M}$ barviva ve vzorku. Jedná se o lipofilní fluorofor a cílem bylo zobrazení granulí PHB s minimálním šumem pozadí vznikajícím navázáním se fluoroforu na jiné lipidové struktury. Doposud používaná Nilská červeň nemá ideální vlastnosti pro pozorování pod fluorescenčním mikroskopem, proto byl fluorofor BODIPY 493/503 zkoumán jako eventuelní náhrada.

Na Obr. 49 jsou vyobrazeny obarvené buňky *C. necator H16*. Co je velmi zajímavé, barvivo vypadá, že se koncentruje převážně na povrchu granulí a existuje určitá neochota průniku do granulí. BODIPY 493/503 je velmi malá molekula ($M_w = 262,1085$), která nemá nejmenší problémy přechodu před membránu nefixovaných buněk. Tohoto úkazu by bylo vhodné dále využít a zkoumat.

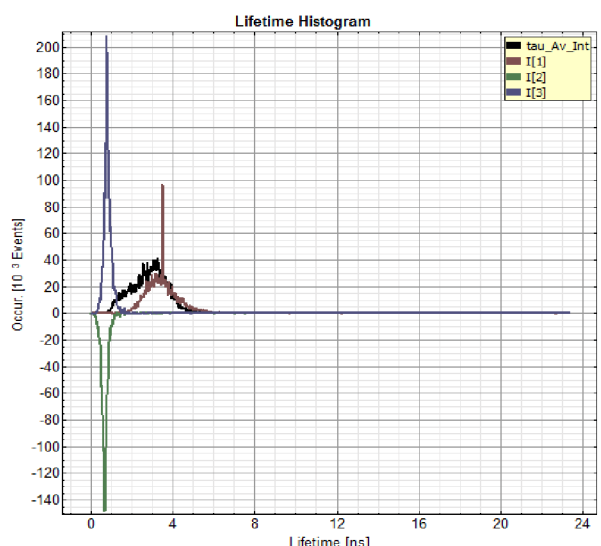


Obr. 49: Kmen *C. necator* H16 obarven BODIPY 493/503. Obrázky se liší v prahování průměrné doby života fluorescence.

Bylo využito FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) k dalším analýzám BODIPY fluoroforu. Na Obr. 50 lze vidět TCSPC histogram zobrazující průběh intenzity fluorescence v čase. Levá část byla vyloučena, na fitování nelze použít rekonvoluci kvůli nezvyklému průběhu na začátku histogramu. V tomto regionu před modrou čarou si lze všimnout dvojitého nárůstu s jistým lokálním minimem. S největší pravděpodobností se jedná o excimery, které fluorofor BODIPY 493/503 tvoří při vysokých koncentracích ve vzorku. Do dalších výpočtů byl použit tail-fit, který není tak přesný jako fitting celého průběhu, ale v tomto případě to byla jediná cesta.

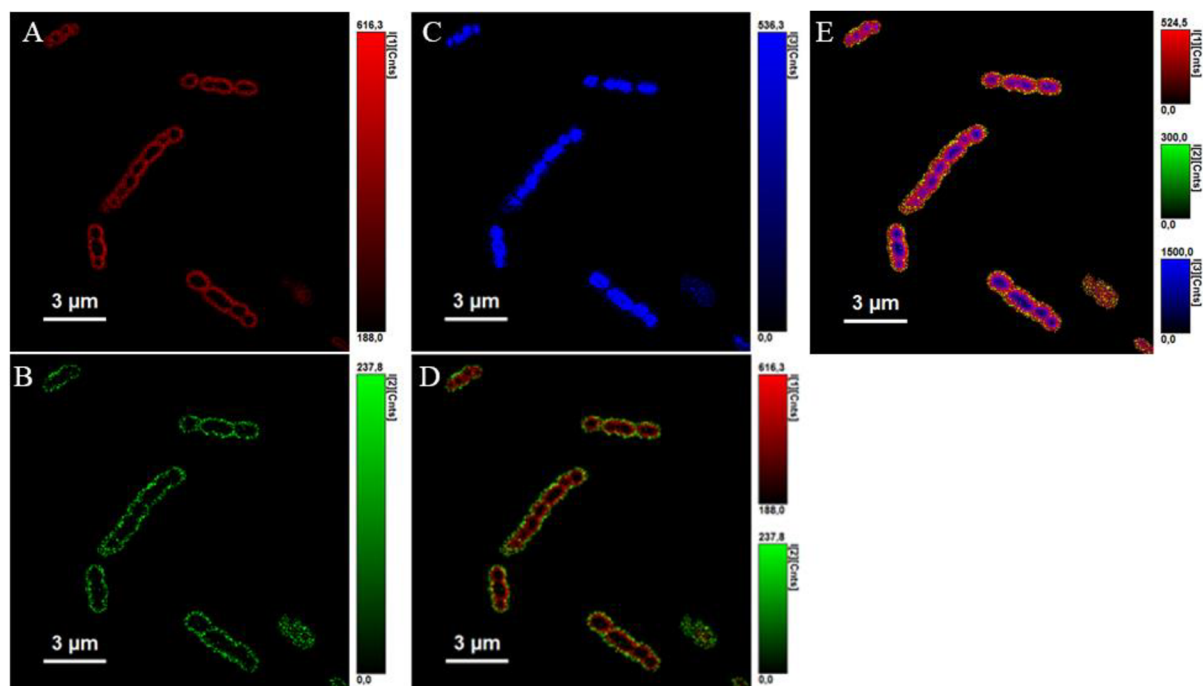


Obr. 50: Průběh intenzity fluorescence v čase, kultura *C. necator* H16.



Obr. 51: Histogram různých průměrných dob života fluorescence. Je důležité si povšimnout záporné amplitudy, zde zeleně vyobrazená.

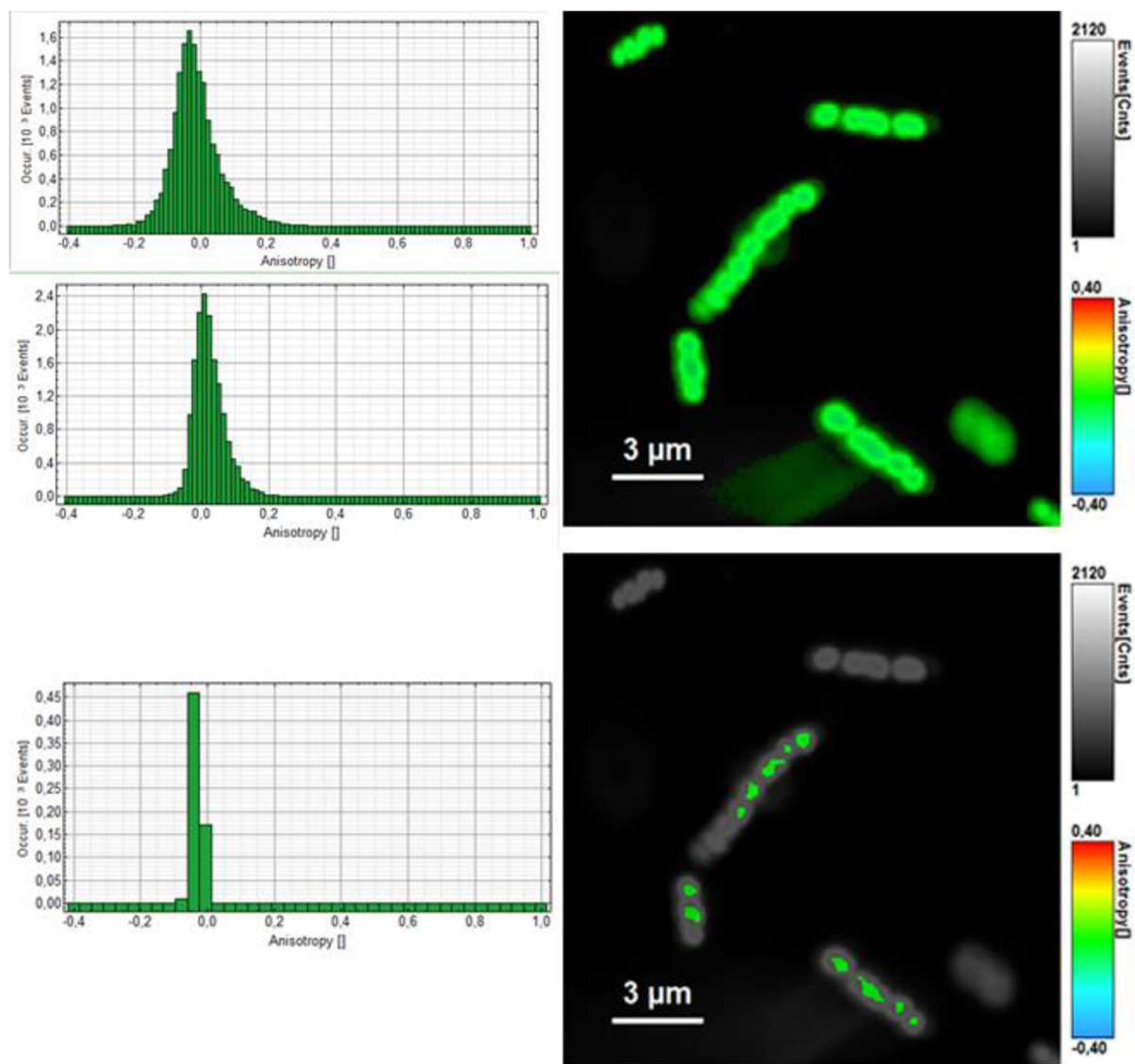
Jak lze vidět z Obr. 51, existují tři různé dílčí průměrné doby života fluorescence. Ty jsou zobrazeny na Obr. 52. Na snímku A si lze všimnout lokalizace fluoroforu na okraji granulí PHB. Zároveň je tento čas života nejdelší ($3,5310 \pm 0,0055$ ns). Na snímku B je vyobrazena část, kde je amplituda barviva záporná ($I(2) = -3410 \pm 45$ kCnts). Je zajímavé, že tyto dvě oblasti se nepřekrývají, jak je ukázáno na snímku D. Snímek C je zajímavý lokalizací fluorescence, vypadá to, že část barviva pronikla do granulí, ovšem toto procento není tak vysoké, jak bylo předpokládáno. Na snímku E lze vidět všechny oblasti. Zápornou amplitudu mají granule na svém nejzevnějším perimetru a poté následuje oblast s nejdelší průměrnou dobou života.



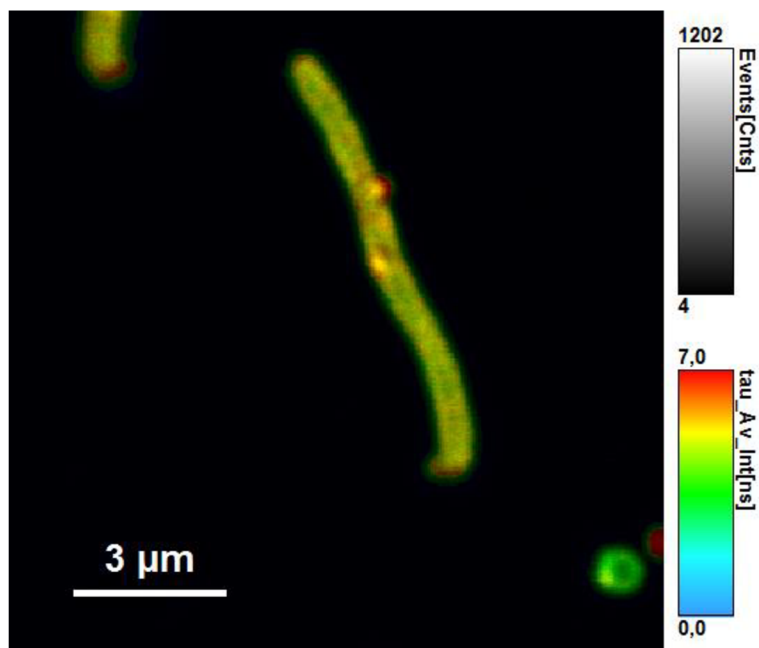
Obr. 52: Lokalizace různých průměrných dob života fluorescence. (A) $\tau = 3,5310 \pm 0,0055$ ns, $I(1) = 37310,4 \pm 8,9$ kCnts, (B) $\tau = 0,7020 \pm 0,0079$ ns, $I(2) = -3410 \pm 45$ kCnts, (C) $\tau = 0,7810 \pm 0,0076$ ns, $I(3) = 4276 \pm 53$ kCnts. (D) je průřez A a B. (E) je průřez A, B a C.

Vzhledem k formujícím se excimerům a velmi vysoké intenzitě fluorescence (až $37310,4 \pm 8,9$ kCnts na povrchu granulí) je určitě vhodné studovat různé menší koncentrace barviva ve vzorku.

Byla zkoumána i anisotropie barviva. Na Obr. 53 jsou vyobrazeny snímky bakterií a histogramy k nim pasující. Co je velmi zajímavé a zarážející je anisotropie okolo nuly. To znamená, že molekula je ve svém prostředí volně otáčivá, což je možné ve fluidních roztocích. Granule PHA jsou dostatečně amorfní, aby docházelo k určité rotaci molekuly, ale úplně volná rotace je nepravděpodobná. Tento poznatek by byl zcela jistě zajímavé téma k dalšímu studiu.

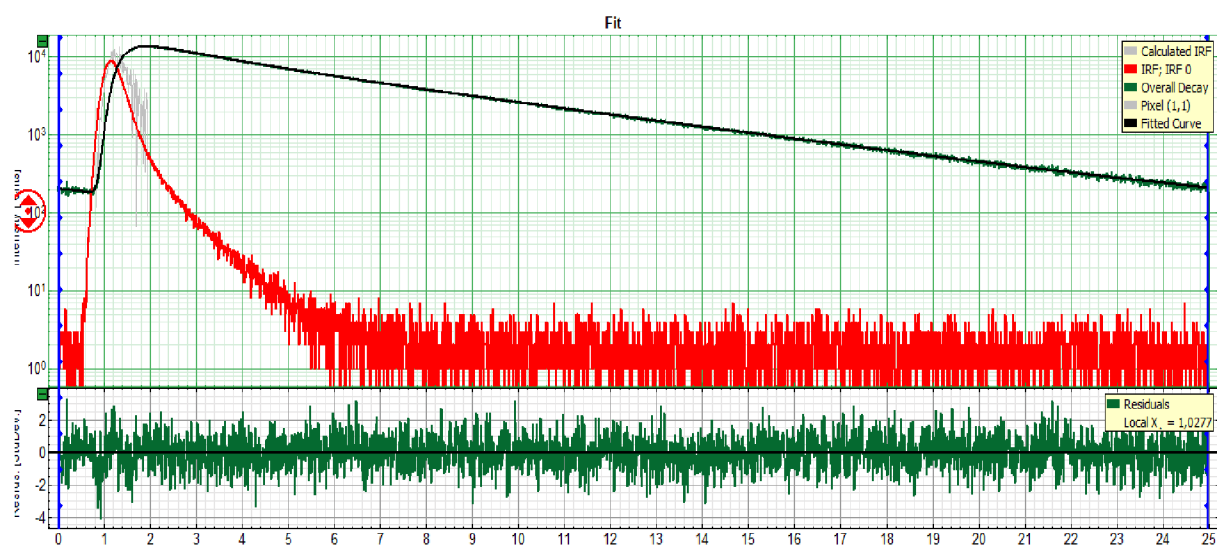


Obr. 53: Anisotropie fluoroforu barvícího *C. necator* H16. První dva histogramy se liší prahováním, vizuálně dávaly téměř stejné výsledky. Dolní histogram je počítán při vybrání pouze středu granulí.



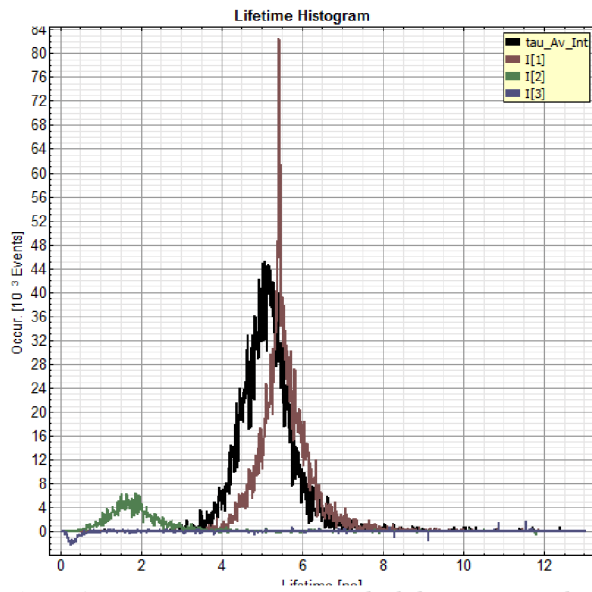
Obr. 54: *C. necator* PHB-4 obarvená BODIPY 493/503.

Po obarvení druhého kmene, *C. necator* PHB-4, bylo barvivo pravděpodobně lokalizováno především na povrchu buněk a v různých lipidových tělískách uvnitř cytoplasmy. Při zobrazení TCSPC histogramu nepozorujeme žádné deviace od průběhu vhodného pro fitování, bylo tedy použito rekonvoluce.

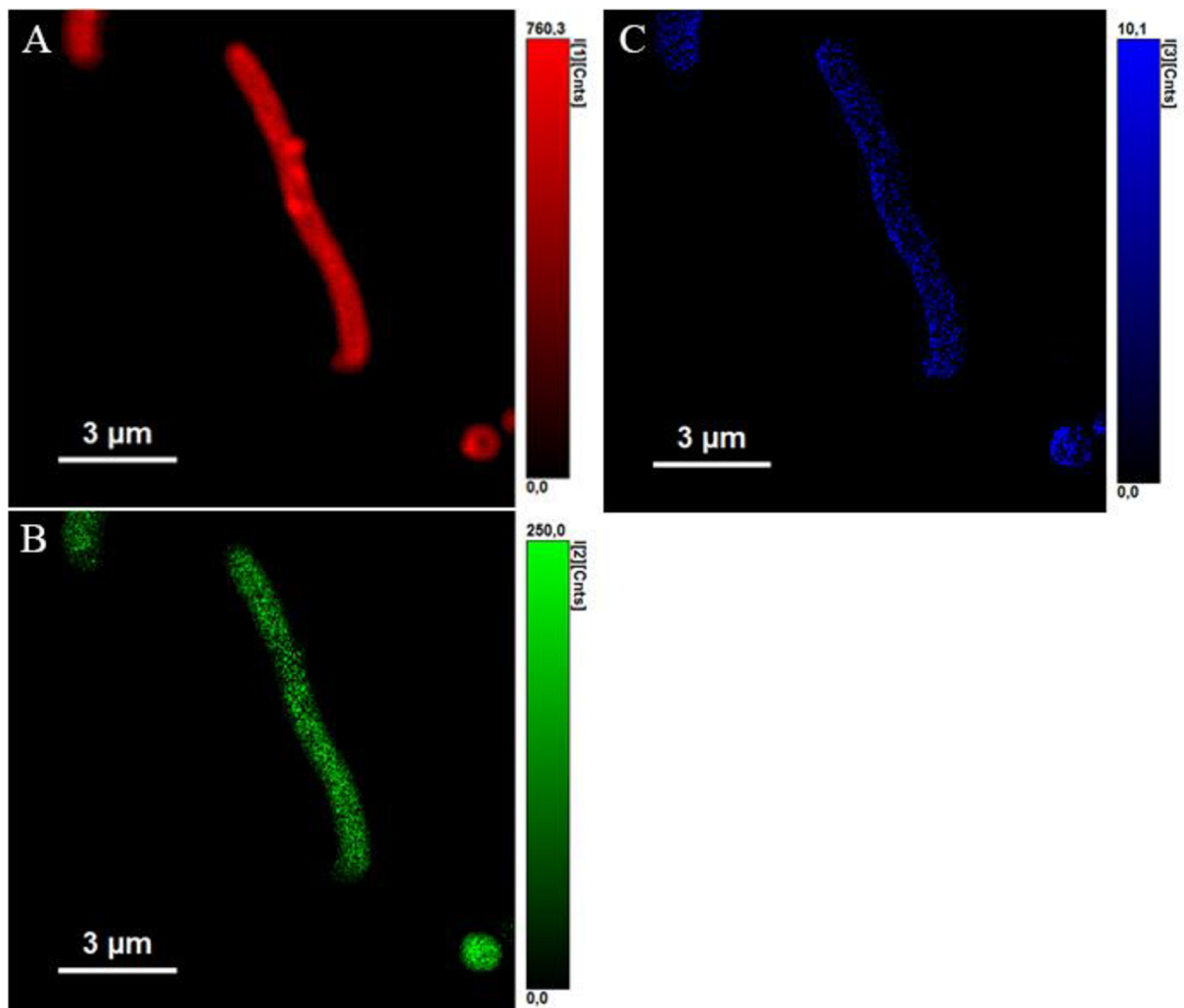


Obr. 55: Průběh intenzity fluorescence v čase.

Jak lze vidět z histogramu na Obr. 56, i v případě barvení této kultury je přítomná záporná amplituda, ovšem v minimálním zastoupení. Existují tři různé doby života, jejich lokalizace je zobrazena na Obr. 57.



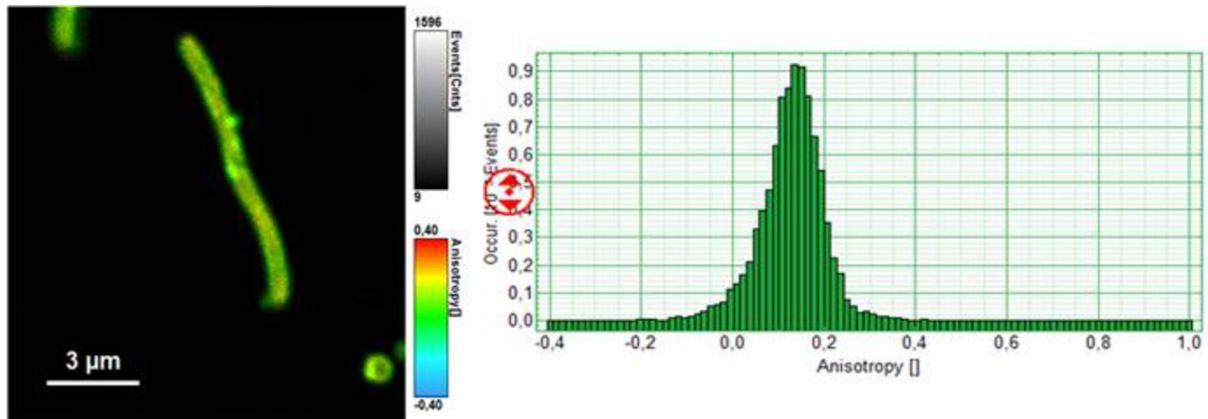
Obr. 56: Histogram průměrných dob života pro kulturu *C. necator* PHB-4.



Obr. 57: Zobrazení lokalizací různých průměrných dob života fluorescence. (A) $\tau=5,418\pm0,014$ ns, $I(1)=7917\pm28$ kCnts, (B) $\tau=1,521\pm0,057$ ns, $I(2)=1093\pm20$ kCnts, (C) $\tau=0,246\pm0,014$ ns, $I(3)=-42\pm12$ kCnts,

Existují tři různé doby života fluorescence, které jsou lokalizované v celém objemu bakterie. Doba života se zápornou amplitudou, jejíž lokalizace je vyobrazena na snímku C, má nejnižší dobu života fluorescence ($\tau=0,246\pm0,014$ ns). Záporná amplituda fluorescence má hodnotu přibližně 20krát nižší než oblast A s nejvyšší dobou života fluorescence.

Průměrná anisotropie byla naměřena na hodnotu 0,12, což je vyšší hodnota než pro *C. necator HI6*, ale stále blízko nule a volné otáčivosti.



Obr. 58: Anisotropie fluoroforu barvícího *C. necator PHB-4*.

Tento fluorofor je velmi zajímavý z mnoha důvodů. Ať už se jedná o umístění z velké části na povrchu granulí PHB nebo o téměř nulové hodnoty anisotropie, BODIPY 493/503 je jistě zajímavá sonda pro budoucí studium. Bylo by vhodné využít jeho vlastnosti barvit povrch granulí PHB a např. kombinovat jej s jinými lipofilními fluorofory. Ovšem pro všechny další studie je nutno upravit koncentraci fluoroforu ve vzorku na nižší.

5 ZÁVĚR

- V rámci této diplomové práce byla otestována vhodnost řady viabilitních fluorescenčních sond pro cytometrické stanovení viability bakteriální kultury *Cupriavidus necator*. V řadě případů (ethidium bromid, fluorescein diacetát, Rhodamine 123) nebylo dosaženo rozlišení mrtvých a živých buněk.
- Při optimalizaci koncentrace ethidium bromidu ve vzorku nebyl nalezen žádný trend popisující vývoj intenzity fluorescence při zvyšování koncentrace fluoroforu.
- Další experimenty s koncentrací $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ EB ve vzorku ukázaly, že sonda není vhodná pro stanovování počtu mrtvých buněk ve vzorku. Naměřené hodnoty se neshodovaly s reálnými, a intenzita fluorescence taktéž neměla žádný vývojový trend. Sonda je považována za nevhodnou pro barvení buněk *C. necator*.
- Při barvení fluoroforem fluorescein diacetátem tkvěl hlavní problém experimentu v nemožnosti získání středních hodnot fluorescence při konstantním PMT u živých buněk. Mrtvé buňky vykazovaly mírný růst intenzity v závislosti na čase, a to při konstantní hodnotě PMT 550. Pro živé buňky musela být tato hodnota měněna na 500 a 450. V čase a při zvyšující se koncentraci barviva intenzita značně rostla, ovšem nebyl nalezen žádný trend či přepočtení pro tento nárůst.
- Při použití sondy Rhodamin 123 nekorespondovalo naměřené procento živých buněk se známým procentem živých buněk. Intenzita fluorescence byla minimální. Tento fluorofor je považován za nevhodný při určování viability *C. necator*.
- Při testování Near-IR sondy histogramy ukazovaly pouze jeden pik, ačkoli by měly existovat jasně rozeznatelné dva piky. Střední hodnota fluorescence sice v čase rostla, ovšem hodnoty nevykazovaly žádnou závislost. S největší pravděpodobností došlo k zadržování barviva v okolním prostoru, protože barvivo nemohlo proniknout do buňky. Tato sonda je tedy považována za nevhodnou pro další měření viability bakteriálních buněk.
- Naopak dobrého rozlišení pro mrtvé a živé buňky bylo dosaženo při použití BacLight™ sady fluoroforů. Je doporučeno řídit se přepočtem naměřeného počtu živých a celkových buněk pro získání reálné hodnoty obsahu živých buněk ve vzorku. Jisté rozdíly mezi naměřenými a přepočítanými procenty buněk existují, nicméně rozdíly jsou minimální.
- V případě porovnání BacLight™ sady a propidium iodidu jakožto viabilních sond bylo učiněno závěru, že při použití sady dostáváme naměřené hodnoty živých buněk, které se blíží těm reálným více než v případě použití samotného propidium iodidu. Pro získání přesnějších hodnot je doporučeno využívat sadu BacLight™, velkou nevýhodou této sady je ovšem její cena, proto je nutno zvážit i finanční aspekty analýzy.
- Dále byla optimalizována koncentrace Nilské červeni při použití pro barvení granulí PHB. Optimální koncentrace je $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Při vyšších koncentracích dochází ke samozhášení.
- Byla vytvořena grafická závislost střední hodnoty intenzity fluorescence na obsahu P(3HB) v buňkách. V grafu se vyskytly dvě lineární závislosti. To vede k závěru, že průtoková cytometrie není vhodnou metodou pro absolutní stanovení obsahu P(3HB) v buňkách a nelze ji tak použít k monitoringu biotechnologického procesu produkce PHA.

- Jako alternativní sonda pro značení PHA granulí bylo otestováno BODIPY493/503, u kterého byla stanovena optimální koncentrace o hodnotě $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.
- Byly využity dvě řady vzorků, buňky fixované ethanolem a buňky nefixované. V intenzitě fluorescence vzorků obou řad byl minimální rozdíl. Tato skutečnost společně s minimálním spektrálním překryvem pro BODIPY 493/503 a propidium iodid přináší možnost duálního barvení a cytometrické analýzy vlivu akumulace PHA na stresovou odolnost bakterie *C. necator*.
- Byla hledána ideální koncentrace fluoroforu akridinová oranž pro získání nejlepšího podílu emitované fluorescence pro RNA a DNA vázanou sondu. Tato koncentrace je $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.
- Další částí bylo využití nukleových kyselin a fluoroforu na ně se vážící akridinové oranži, k charakterizaci buněčného cyklu. Jak se ukázalo, podíl intenzit fluorescencí RNA-vázané sondy/DNA-vázané sondy koresponduje s růstovou křivkou získanou turbidimetrickým monitoringem buněčné kultury. Lze jasně rozpoznat exponenciální fázi od stacionární s nejvyšším píkem intenzit podílu právě při kulminaci exponenciální fáze a začátku stacionární fáze. Lze také vyzorovat začátek odumírání kultury. Tento experiment byl prováděn s oběma kmeny *C. necator H16* a *C. necator PHB-4*, a bylo dosaženo téměř shodných výsledků.
- V části věnované mikroskopické analýze bakteriálních buněk bylo otestováno několik fluoroforů. Nejprve to byla sonda SYTO9. Byla zaznamenána fluorescence nejen v zeleném, ale i v červeném kanále. To je pravděpodobně zapříčiněno vysokou koncentrací barviva. Pro další mikroskopické analýzy je doporučeno tuto koncentraci snížit.
- SYTO9 barvilo jak mrtvé, tak i živé buňky tak, jak bylo popsáno v literatuře. Střední čas života fluorescence v zeleném kanálu byl stanoven pro živé buňky na hodnotu $1,158 \pm 0,004 \text{ ns}$, pro buňky mrtvé je to hodnota $1,03 \pm 0,01 \text{ ns}$, což jsou hodnoty menší, než udává literatura (4 ns).
- Buňky obarvené propidium iodidem vykazovaly několik různých oblastí s různými časy života a intenzitou fluorescence. Tyto oblasti byly identifikovány jako nukleus s DNA vázanou sondou, buněčné membrány, a ribosomy s RNA vázaným propidiem. Pro zamezení interference fluorescence membránově a RNA-vázané sondy je vhodné snížit koncentraci barviva.
- U akridinové oranži byly naměřeny až čtyřikrát nižší hodnoty časy života fluorescence než jsou uvedeny v literatuře. Zároveň byl fluorofor převážně pozorován v oblasti kolem granulí u *C. necator H16* a v objemu celé bakterie v případě *C. necator PHB-4*.
- Při studování akridinové oranži na fluorescenčním mikroskopu byla intenzita fluorescence zaznamenána převážně v zeleném kanále, tedy z DNA vázaného barviva. Při měření průtokovou cytometrií tomu bylo naopak, intenzivnější fluorescenci emitovala na RNA vázaná oranž.
- Při barvení *C. necator H16* sondou BODIPY493/503 bylo dosaženo zajímavých výsledků. Sonda barviva především a velmi výrazně povrch granulí PHB. Anisotropie byla okolo nuly, což značilo volnou otáčivost fluoroforu, což je nepravděpodobný stav vzhledem k lokaci navázání sondy – v obalech PHB granulí je určitá možnost sondy se otáčet, ale ne zcela volně.

- Koncentrace BODIPY 493/503 $10 \mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$ byla pro mikroskopické analýzy příliš vysoká, je třeba ji několikanásobně snížit. Při této koncentraci se tvořily excimery, které značně komplikovaly fitting při FLIM analýzách.
- Při barvení *C. necator PHB-4* byl fluorofor BODIPY 493/503 rozprostřen po celém obsahu bakterie. Anisotropie byla 0,12, což je vyšší než u předchozího kmene, ale stále blízké nule.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] VALEUR, Bernard a M BERBERAN-SANTOS. *Molecular fluorescence: principles and applications*. Second edition. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013. ISBN 9783527328468.
- [2] JOSEPH R. LAKOWICZ. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006. ISBN 9780387463124.
- [3] Propidium iodide. *ThermoFisher Scientific* [online]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/P1304MP?ICID=search-product>
- [4] EDITED BY W.T. MASON. *Fluorescent and luminescent probes for biological activity a practical guide to technology for quantitative real-time analysis*. 2nd ed. San Diego, Calif: Academic Press, 1999. ISBN 9780080531779.
- [5] MACEY, Marion G. *Flow cytometry: principles and applications*. Totowa, N.J.: Humana Press, c2007. ISBN 1597454516.
- [6] <http://nptel.ac.in/courses/102103016/module2/lec19/3.html>
- [7] Introduction to flow cytometry. *Abcam* [online]. Cambridge, USA. Dostupné z: <http://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>
- [8] Alvarez-Barrientos, A., Arroyo, J., Canton, R., Nombela, C. & Sanchez-Perez, M. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2000, **13**, 167-195.
- [9] Davey, H. M. Flow cytometric techniques for the detection of microorganisms. *Methods Cell Sci.* 2002, **24**, 91-97.
- [10] Shapiro, H. M. & Nebe-von-Caron, G. Multiparameter flow cytometry of bacteria. *Methods Mol Biol.* 2004, **263**, 33-44.
- [11] Biggerstaff, J. P., Le Puil, M., Weidow, B. L., Prater, J., Glass, K., Radosevich, M. & White, D. C. New methodology for viability testing in environmental samples. *Mol Cell Probes.* 2006, **20**, 141-146.
- [12] Maruyama, F., Yamaguchi, N., Kenzaka, T., Tani, K. & Nasu, M. Simplified sample preparation using frame spotting method for direct counting of total bacteria by fluorescence microscopy. *J Microbiol Methods.* 2004, **59**, 427-431.
- [13] http://www.gakushuin.ac.jp/univ/sci/top/jimu-info/mono/mono_pdf/3-2-1.pdf
- [14] <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/filters.html>
- [15] KUBITSCHICK, Ulrich. *Fluorescence microscopy: from principles to biological applications*. Weinheim: Wiley-Blackwell, 2013. ISBN 3527329226.
- [16] <http://microscopy.duke.edu/learn/introtomicroscopy/confocals.html>
- [17] NAREDI-RAINER, Nikolaus, Jens PRESCHER, Achim HARTSCHUH a Don C. LAMB. Confocal Microscopy. *Fluorescence Microscopy*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013, s. 175. DOI: 10.1002/9783527671595.ch5. ISBN 9783527671595. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527671595.ch5>
- [18] JOUX, Fabien a Philippe LEBARON. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes and Infection.*

- 2000, 2(12), 1523-1535. DOI: 10.1016/S1286-4579(00)01307-1. ISSN 12864579. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457900013071>
- [19] MOLENAAR, D. a H. BOLHUIS. The efflux of a fluorescent probe is catalyzed by an ATP-driven extrusion system in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* [online]. 1992, **174**, 3118–3124. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC205976/>
- [20] REYNOLDS, D. T. a C. R. FRICKER. Application of laser scanning for the rapid and automated detection of bacteria in water samples. *Journal of Applied Microbiology.* 1999, **86**(5), 785-795. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1999.00721.x. ISSN 1364-5072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.1999.00721.x>
- [21] UECKERT, J., P. BREEUWER, T. ABEE, P. STEPHENS, G. Nebe VON CARON a P.F. TER STEEG. Flow cytometry applications in physiological study and detection of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology.* 1995, **28**(2), 317-326. DOI: 10.1016/0168-1605(95)00066-6. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168160595000666>
- [22] CARON, G. Nebe-von, STEPHENS a BADLEY. Assessment of bacterial viability status by flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Applied Microbiology.* 1998, **84**(6), 988-998. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1998.00436.x. ISSN 1364-5072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.1998.00436.x>
- [23] JOUX, F. Succession of cellular states in a *Salmonella typhimurium* population during starvation in artificial seawater microcosms. *FEMS Microbiology Ecology.* **22**(1), 65-76. DOI: 10.1016/S0168-6496(96)00077-3. ISSN 01686496. Dostupné z: [http://doi.wiley.com/10.1016/S0168-6496\(96\)00077-3](http://doi.wiley.com/10.1016/S0168-6496(96)00077-3)
- [24] Nystrom, T. Stationary-phase physiology. *Annu Rev Microbiol.* 2004, **58**, 161-181.
- [25] Nystrom, T. Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death. *Arch Microbiol.* 2001, **176**, 159-164.
- [26] Bar, M., von Hardenberg, J., Meron, E. & Provenzale, A. Modelling the survival of bacteria in drylands: the advantage of being dormant. *Proc Biol Sci.* 2002, **269**, 937-942.
- [27] Kell, D. B., Kaprelyants, A. S., Weichart, D. H., Harwood, C. R. & Barer, M. R. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1998, **73**, 169-187.
- [28] Barer, M. R. & Harwood, C. R. Bacterial viability and culturability. *Adv Microb Physiol.* 2007, **41**, 93- 137.
- [29] Roszak, D.B. Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. *Appl. Environ. Microbiol.* 1987, **53**, 2889–2893.
- [30] Barer, M. R. Viable but non-culturable and dormant bacteria: time to resolve an oxymoron and a misnomer? *J Med Microbiol.* 1997, **46**, 629-631.
- [31] Oliver, J. D. The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol.* 2005, **43**, 93-100.
- [32] McFeters, G. A., Yu, F. P., Pyle, B. H. & Stewart, P. S. Physiological assessment of bacteria using fluorochromes. *J Microbiol Methods.* 1995, **21**, 1-13.
- [33] Trevors JT. Can dead bacterial cells be defined and are genes expressed after cell death? *J Microbiol Meth.* 2012, **90**(1), 25–8.

- [34] Shi L, Gunther S, Hubschmann T, Wick LY, Harms H, Muller S. Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. *Cytom Part A*. 2007, **71A**(8), 592–8.
- [35] Chu, C. P., Lee, D. J., Chang, B. V. & Liao, C. S. Using ATP bioluminescence technique for monitoring microbial activity in sludge. *Biotechnol Bioeng*. 2001, **75**, 469-474.
- [36] ROSER, David J. Ethidium bromide: A general purpose fluorescent stain for nucleic acid in bacteria and eucaryotes and its use in microbial ecology studies. *Soil Biology and Biochemistry*. 1980, **12**(4), 329-336. DOI: 10.1016/0038-0717(80)90005-X. ISSN 00380717. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/003807178090005X>
- [37] <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15585011>
- [38] <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L34975>
- [39] VAN NEVEL, Sam, Stefan KOETZSCH, Hans-Ulrich WEILENMANN, Nico BOON a Frederik HAMMES. Routine bacterial analysis with automated flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods*. 2013,**94**(2), 73-76. DOI: 10.1016/j.mimet.2013.05.007. ISSN 01677012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701213001589>
- [40] <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp07572.pdf>
- [41] Stocks SM. Mechanism and use of the commercially available viability stain. *BacLight Cytometry A*. 2004, **61**(2), 189–95.
- [42] STIEFEL, Philipp, Sabrina SCHMIDT-EMRICH, Katharina MANIURA-WEBER a Qun REN. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiology*. 2015, **15**(1), 36-. DOI: 10.1186/s12866-015-0376-x. ISSN 1471-2180. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/15/36>
- [43] Tawakoli PN, Al-Ahmad A, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C. Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm. *Clin Oral Investig*. 2013, **17**(3), 841–50.
- [44] Boulos L, Prevost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R. LIVE/DEAD (R) BacLight (TM): application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Meth*. 1999, **37**(1), 77–86.
- [45] KRAMER, D. N. a G. G. GUILBAULT. A Substrate for the Fluorometric Determination of Lipase Activity. *Analytical Chemistry*. 1963,**35**(4), 588-589. DOI: 10.1021/ac60197a027. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60197a027>
- [46] YGUERABIDE, Juan, Eva TALAVERA, Jose Mariaa ALVAREZ a Bartolomea QUINTERO. STEADY-STATE FLUORESCENCE METHOD FOR EVALUATING EXCITED STATE PROTON REACTIONS: APPLICATION TO FLUORESCEIN. *Photochemistry and Photobiology*. 1994,**60**(5), 435-441. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1994.tb05130.x. ISSN 0031-8655. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-1097.1994.tb05130.x>
- [47] CLARKE, Joanne M., Michael R. GILLINGS, Nanda ALTAVILLA a Andrew J. BEATTIE. Potential problems with fluorescein diacetate assays of cell

- viability when testing natural products for antimicrobial activity. *Journal of Microbiological Methods*. 2001, **46**(3), 261-267. DOI: 10.1016/S0167-7012(01)00285-8. ISSN 01677012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701201002858>
- [48] *Flow cytometry in microbiology: technology and applications*. Norfolk: Caister Academic Press, 2015. ISBN 9781910190111.
- [49] KAPRELYANTS, A.S. a D.B. KELL. Rapid assessment of bacterial viability and vitality by rhodamine 123 and flow cytometry. *Journal of Applied Bacteriology*. 1992, **72**, 410-422. Dostupné z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.654.7527&rep=rep1&type=pdf>
- [50] BARACCA, Alessandra, Gianluca SGARBI, Giancarlo SOLAINI a Giorgio LENAZ. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2003, **1606**(1-3), 137-146. DOI: 10.1016/S0005-2728(03)00110-5. ISSN 00052728. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005272803001105>
- [51] DARZYNKIEWICZ, Zbigniew, Donald P. EVENSON, Lisa STAIANO-COICO, Thomas K. SHARPLESS a Myron L. MELAMED. Correlation between cell cycle duration and RNA content. *Journal of Cellular Physiology*. 1979, **100**(3), 425-438. DOI: 10.1002/jcp.1041000306. ISSN 0021-9541. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.1041000306>
- [52] FAN, Hung a Sheldon PENMAN. Regulation of protein synthesis in mammalian cells. *Journal of Molecular Biology*. 1970, **50**(3), 655-670. DOI: 10.1016/0022-2836(70)90091-4. ISSN 00222836. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022283670900914>
- [53] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/235474?lang=en®ion=CZ>
- [54] EDITED BY ZBIGNIEW DARZYNKIEWICZ, J. Paul Robinson. *Essential cytometry methods*. 1st ed. Amsterdam: Academic, 2009. ISBN 9780123750464.
- [55] TRAGANOS, F., Z. DARZYNKIEWICZ, T. SHARPLESS a M. R. MELAMED. Simultaneous staining of ribonucleic and deoxyribonucleic acids in unfixed cells using acridine orange in a flow cytofluorometric system. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1977, **25**(1), 46-56. DOI: 10.1177/25.1.64567. ISSN 0022-1554. Dostupné z: <http://jhc.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/25.1.64567>
- [56] York, G.M. a kol. *Ralstonia eutropha* H16 encodes two and possibly three intracellular Poly[D-(-)-3-hydroxybutyrate] depolymerase genes. *J. Bacteriol.* 2003, **185**, 3788–3794. DOI: 10.1128/JB.185.13.3788-3794.2003
- [57] Braunegg G., Lefebvre G. and Tender K.F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*. 1998, **65**, 127–161.
- [58] Keshavarz T. and Roy I. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current opinion in microbiology*. 2010, **13**, 321–326.

- [59] GIRDHAR, Amandeep, Mayuri BHATIA, Sunil NAGPAL, Amol KANAMPALLIWAR a Archana TIWARI. Process Parameters for Influencing Polyhydroxyalkanoate Producing Bacterial Factories: An Overview. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*[online]. 2013, **04**(05). DOI: 10.4172/2157-7463.1000155. ISSN 21577463.
- [60] Anderson AJ, Dawes EA. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*. 1990;54(4):450-472.)
- [61] CHEN, Jingyu, Lei ZHANG, Jinchun CHEN a Guoqiang CHEN. Biosynthesis and Characterization of Polyhydroxyalkanoate Copolyesters in *Ralstonia eutropha* PHB-4 Harboring a Low-Substrate-Specificity PHA Synthase PhaC2Ps from *Pseudomonas stutzeri* 1317. *Chinese Journal of Chemical Engineering* [online]. 2007, **15**(3), 391–396. DOI: 10.1016/S1004-9541(07)60097-4. ISSN 10049541.
- [62] Lu X., Zhang J., Wu Q., Chen G-Q. Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) via manipulating the fatty acid L-oxidation pathway in *E. coli*. *FEMS Microbiology Letters*. 2003, **221**, 97–101.
- [63] Wu H-A., Sheu D-S. and Lee C-Y. Rapid differentiation between short-chainlength and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria with spectrofluorometry. *Journal of Microbiological Methods*. 2003, **53**, 131–135.
- [64] Zinn, M., B. Witholt & T. Egli. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001, **53**(1), 5–21. doi: 10.1016/S0169-409X(01)00218-6.
- [65] Koller, M. a kol. Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. *Biomacromolecules*. 2003, **6** (2), 561–565. doi: 10.1021/bm049478b.
- [66] Sudesh K, Abe H, Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog Polym Sci*. 2000, **25**, 1503–1555. doi: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6.
- [67] Khanna S. and Srivastava A.K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*. 2005, **40**, 607–619.
- [68] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. Kvasinky a kvasinkovitě mikroorganizmy. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1982. 483 s
- [69] Wróbel M., Zebrowski J. and Szopa J. Polyhydroxybutyrate synthesis in transgenic flax. *Journal of Biotechnology*. 2004, **107**, 41–54.
- [70] POHLMANN, Anne, Wolfgang Florian FRICKE a Frank REINECKE. Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature Biotechnology*. 2006, **24**, 1257 - 1262. DOI: 10.1038/nbt1244.
- [71] TODAR, Kenneth. The growth of bacterial populations. *Online Textbook of Bacteriology* [online]. Madison, Wisconsin, 2010. Dostupné z: <http://www.textbookofbacteriology.net/index.html>
- [72] Srienc F, Arnold B, Bailey JE. Characterization of intracellular accumulation of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) in individual cells of *Alcaligenes eutrophus* H16 by flow cytometry. *Biotechnol Bioeng*. 1984, **26**, 982–987.

- [73] SCHLEGEL, H. G., R. LAFFERTY a I. KRAUSS. The isolation of mutants not accumulating poly-3-hydroxybutyric acid. *Archiv for Mikrobiologie*. 1970, **71**(3), 283-294. DOI: 10.1007/BF00410161. ISSN 0302-8933. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00410161>
- [74] SPIEKERMANN, Patricia, Bernd H. A. REHM, Rainer KALSCHEUER, Dirk BAUMEISTER a A. STEINBÜCHEL. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Archives of Microbiology*. 1999-1-14, **171**(2), 73-80 DOI: 10.1007/s002030050681. ISSN 0302-8933. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002030050681>
- [75] DEGELAU, A., T. SCHEPER, J. E. BAILEY a C. GUSKE. Fluorometric measurement of poly- β hydroxybutyrate in *Alcaligenes eutrophus* by flow cytometry and spectrofluorometry. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1995, **42**(5), 653-657 DOI: 10.1007/BF00171939. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00171939>
- [76] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n3013?lang=en®ion=CZ>
- [77] VELMURUGAN, Natarajan, Minji SUNG, Sung Sun YIM, Min S. PARK, Ji Won YANG a Ki Jun JEONG. Evaluation of intracellular lipid bodies in *Chlamydomonas reinhardtii* strains by flow cytometry. *Bioresource Technology*. 2013, **138**, 30-37. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.03.078. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096085241300446X>
- [78] RUMIN, Judith, Hubert BONNEFOND, Bruno SAINT-JEAN, Catherine ROUXEL, Antoine SCIANDRA, Olivier BERNARD, Jean-Paul CADORET a Gaël BOUGARAN. The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. *Biotechnology for Biofuels*. 2015, **8**(1), 42-. DOI: 10.1186/s13068-015-0220-4. ISSN 1754-6834. Dostupné z: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/8/1/42>
- [79] KACMAR, James, Ross CARLSON, Steven J. BALOGH a Friedrich SRIENC. Staining and quantification of poly-3-hydroxybutyrate in *Saccharomyces cerevisiae* and *Cupriavidus necator* cell populations using automated flow cytometry. *Cytometry Part A*. 2006, **69A**(1), 27-35. DOI: 10.1002/cyto.a.20197. ISSN 1552-4922. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.a.20197>
- [80] Gocze P, Freeman DA. Factors underlying the variability of lipid droplet fluorescence in MA-10 Leydig tumor cells. *Cytometry* 1994, **17**, 151–158.
- [81] JOHNSON, M.E., D.A. BERK, D. BLANKSCHTEIN, D.E. GOLAN, R.K. JAIN a R.S. LANGER. Lateral diffusion of small compounds in human stratum corneum and model lipid bilayer systems. *Biophysical Journal*. 1996, **71**(5), 2656-2668. DOI: 10.1016/S0006-3495(96)79457-2. ISSN 00063495. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349596794572>
- [82] <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D3922>

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ATP	Adenintrifosfát
AO	Akridinová oranž
DMSO	Dimethylsulfoxid
EB	Ethidium bromid
FDA	Fluorescein diacetát
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging
MO	Mikroorganismus
PBS	Fosfátový pufr
PHA	Polyhydroxyalkanoát
PHB	Polyhydroxybutyrát
PI	Propidium iodid
SHF	Střední hodnota fluorescence