

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2019

Radka Kovářová



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

STRESOVÁ ODOLNOST PHA AKUMULUJÍCÍCH BAKTERIÍ VŮČI PODMÍNKÁM V GASTROINTESTINÁLNÍM TRAKTU

STRESS RESISTANCE OF PHA ACCUMULATING BACTERIA AGAINST CONDITIONS ASSOCIATED WITH
GASTROINTESTINAL TRACT

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Radka Kovářová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1386/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Radka Kovářová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Stresová odolnost PHA akumulujících bakterií vůči podmínkám v gastrointestinálním traktu

Zadání bakalářské práce:

1. Prostudovat současný stav řešené problematiky
2. Experimentálně posoudit vliv podmínek spojených s gastrointestinálním traktem na viabilitu bakterií v kontextu jejich schopnosti akumulace PHA

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

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

Radka Kovářová
student(ka)

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá stresovou odolností bakterií produkující PHA vůči nepříznivým podmínkám v gastrointestinálním traktu. Za tímto účelem byly zvoleny dva bakteriální kmeny jako modelové mikroorganismy. *Cupriavidus necator* H16 produkující PHA a její mutantní kmen *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ bez schopnosti akumulace PHA. Pro experimentální část byly nejprve vybrány tři šťávy o různých koncentracích, konkrétně žaludeční, žlučová a pankreatická. Dále byla stanovována viabilita stresovaného bakteriálního kmene pomocí plotnové metody a průtokového cytometru. Mezi další využití metody patří antimikrobiální testy. První z těchto testů byla použita agarová difúzní metoda, díky které byly stanoveny a porovnány velikosti inhibičních zón. Poslední metoda, která byla provedena, je bujónová diluční metoda, sloužící k porovnání absorbcí čistých bakteriálních suspenzí a stresovaných suspenzí s danou šťávou o určité koncentraci. Z výsledků je patrné, že produkce PHA představuje v kontextu expozice stresovým podmínkám gastrointestinálního traktu především nevýhodu pro akumulující bakteriální kmen.

Abstract

This bachelor thesis is focused on stress resistance of PHA accumulating bacteria against unfavourable conditions associated with gastrointestinal tract. Two bacterial strains were chosen as model microorganisms for this purpose. *Cupriavidus necator* H16 producing PHA and its mutant strain *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ without the ability of PHA accumulation. Firstly, three gastrointestinal juices of different concentrations were chosen for the experimental part, namely gastric, bile and pancreatic juices. The stressed bacterial strain was then determined using a spread plate method and a flow cytometry. Other methods used include antimicrobial tests. The agar diffusion method was first tested to determine the size of the inhibition zones. The last method that has been performed is the broth dilution method, which serves to compare the absorbance of pure bacterial suspensions and stressed suspensions with the given juice of a certain concentration. The results show that the production of PHA represents a disadvantage in context of conditions associated with gastrointestinal tract of accumulating bacterial strain.

Klíčová slova

Cupriavidus necator, polyhydroxyalkanoáty (PHA), šťávy gastrointestinálního traktu, průtokový cytometr, antimikrobiální testy

Keywords

Cupriavidus necator, polyhydroxyalkanoates (PHA), juices from the gastrointestinal tract, flow cytometry, antimicrobial tests

KOVÁŘOVÁ, R. *Stresová odolnost PHA akumulujících bakterií vůči podmínkám v gastrointestinálním traktu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. 43 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

Prohlášení

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

.....
Radka Kovářová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce doc. Ing. Stanislavu Obručovi, PhD za odborné vedení a cenné rady při zpracování teoretické části a zpracování výsledků. Dále můj obrovský dík patří Ing. Evě Slaninové za pomoc při práci v laboratoři a za rady při zpracování bakalářské práci. Chtěla bych také poděkovat i Ing. Lucii Müllerové za pomoc při zpracování výsledků z průtokové cytometrie.

Obsah

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
	2.1 Bakterie.....	8
	2.1.1 Stavba a struktura bakterie	8
	2.1.2 Buněčná stěna	9
	2.1.3 Bakterie lidského těla.....	10
	2.1.4 Odpověď bakterií na nepříznivé podmínky	11
	2.2 Gastrointestinální trakt	12
	2.2.1 Žaludek (<i>gaster</i>).....	13
	2.2.2 Tenké střevo (<i>intestinum tenue</i>) a tlusté střevo (<i>intestinum crassum</i>).....	14
	2.3 Stresové faktory ovlivňující bakterie.....	15
	2.3.1 Teplotní vliv.....	15
	2.3.2 Vliv pH.....	16
	2.3.3 Vliv oxidoredukčního potenciálu.....	16
	2.3.4 Působení osmotického stresu	17
	2.4 Modelový organismus bakterie – <i>Cupriavidus necator</i>	17
	2.4.1 Vlastnosti bakterie <i>Cupriavidus necator</i>	18
	2.4.2 Stressová odpověď bakterií.....	18
	2.4.3 Struktura PHA a její unikátní vliv na buňku.....	18
	2.4.4 Využití produkce PHA.....	20
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
	3.1 Použité bakterie, chemikálie, přístroje	21
	3.1.1 Bakterie	21
	3.1.2 Potřebné chemikálie	21
	3.1.3 Přístrojová technika	21
	3.2 Kultivace mikroorganismu	22
	3.2.1 Příprava inokula	22
	3.2.2 Příprava živných médií a agarových misek	22
	3.3 Příprava modelových šťáv gastrointestinálního traktu.....	23
	3.3.1 Pankreatické šťávy	23
	3.3.2 Žlučové šťávy	23

3.3.3	Žaludeční šťávy.....	23
3.4	Stanovení viability modelové bakterie	23
3.4.1	Stanovení viability plotnovou metodou	23
3.4.2	Stanovení viability průtokovou cytometrií	24
3.4.3	Agarová difúzní metoda.....	24
3.4.4	Bujónová diluční metoda	25
4	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	26
4.1	Výsledky a vyhodnocení použitých metod.....	26
4.1.1	Využití plotnové metody ke stanovení viability buněk exponovaných gastrointestinálním šťávám	26
4.1.2	Využití průtokové cytometrie ke stanovení viability buněk exponovaných gastrointestinálním šťávám	28
4.1.3	Stanovení vlivu vybraných šťáv pomocí agarové difúzní metody	30
4.1.4	Vyhodnocení bujónové diluční metody	32
5	ZÁVĚR.....	37
6	ZDROJE	40

1 ÚVOD

Bakterie patří mezi nejrozšířenější mikroorganismy světa díky svým adaptačním vlastnostem a schopnostem přizpůsobit se veškerým nástrahám a nepříznivým podmínkám, jako je nízká či vysoká teplota, pH prostředí, UV a jiné. Různé bakteriální druhy mají rozlišné hodnoty optim pro jejich růst a dělení. Proto je možné bakterie nalézt v každé zeměpisné šířce. Bakterie jsou součástí člověka již od okamžiku narození, mohou tak příznivě i negativně ovlivňovat zdravotní stav lidského organismu. Vzhledem k tomu, že je mikroflóra nejvíce zastoupena v gastrointestinálním traktu (GIT), přináší tak pro lidský trakt spoustu výhod. Probiotika (*Lactobacillus* a *bifidobacterium*) jakožto živé organismy výrazně přispívají ke zlepšení stavu nejen trávicího traktu jedince. Podmínkou je vyvážené množství dávky, odolnost vůči šťávám GIT (pankreatická, žlučová a žaludeční šťáva) a samozřejmě dobrý imunitní stav jedince. V případě podání většího množství probiotik se stává probiotikum patogenním a člověku tak škodí. S tímto souvisí již dlouhodobě známá rezistence patogenních mikroorganismů především na antibiotika. Během léčby se patogenní bakterie přizpůsobí a stávají se tak rezistentní, to bývá způsobeno dlouhodobou nebo nevhodnou aplikací antibiotik a také adaptačními vlastnostmi mikroorganismů a jejich metabolismem. V současnosti je známo více než 200 druhů organismů, který mají negativní vliv na život jedince [1, 2, 3, 4, 5].

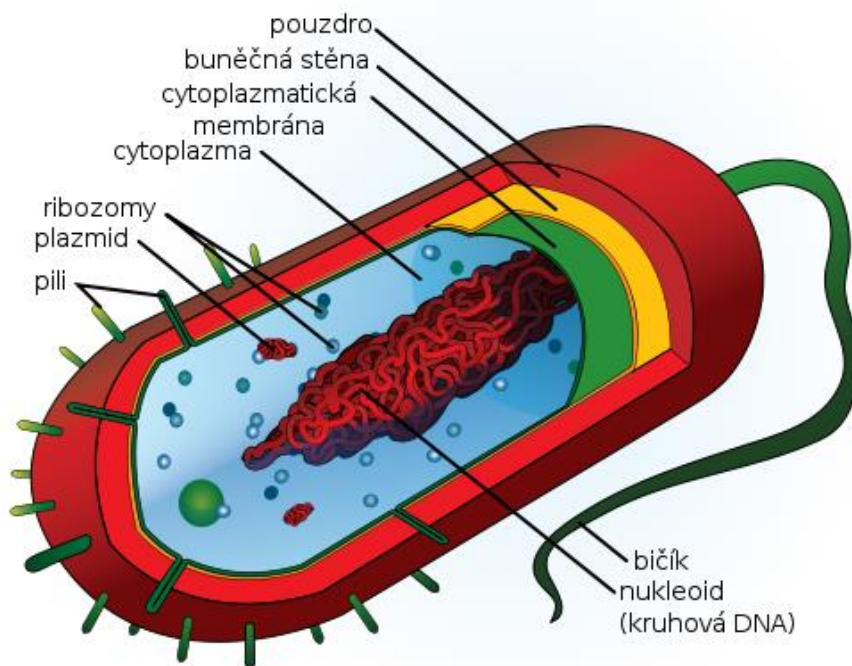
Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou přírodní polymery produkované prokaryotickými organismy, které jsou podobné svými vlastnostmi známému polypropylenu (PP). Lze tedy očekávat, že jsou v přírodě snadno odbouratelné. PHA produkuje zejména mnoho gramnegativních bakterií. Bakterie jsou schopny využívat vlastnost PHA jako odpověď při stresu. Stresovými faktory pro vybraný bakteriální kmen jsou například teplota lidského organismu, osmotický tlak, různé pH a koncentrace šťáv gastrointestinálního traktu. PHA slouží tedy mimo jiné jako zdroj zásobního uhlíku a energie akumulované ve formě granulí v cytoplazmatické membráně. Bakterie je tak způsobilá přečkat nepříznivé vlivy [6, 7].

Cílem bakalářské práce bylo především prozkoumání vlivu akumulace PHA na stresovou odolnost bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16 a jeho mutantního kmene *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ vůči vybraným modelovým šťávám trávicího traktu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Bakterie

Bakterie jsou prokaryotní typ jednobuněčných organismů. Obecně lze bakteriální buňku rozdělit na buněčnou stěnu, ochranné pouzdro, cytoplazmatickou membránu, plazmidy, ribozomy a chromozomy, jak můžete vidět na *Obrázku 1*. V buněčné struktuře se nevyskytují mitochondrie ani plastidy na rozdíl od eukaryotických buněk. Bakterie ve své struktuře obsahuje tzv. nepravé jádro (nukleoid), které je složeno z jedné molekuly kružnicové DNA. Jádro není ohraničeno žádnou membránou, jak je tomu u eukaryotické buňky, je tedy umístěno volně v prostoru bakteriální buňky. Bakterie se mohou rozmnožovat nepohlavně binárním dělením nebo pučením. energii získávají autotrofně i heterotrofně. Velikost bakterie je uváděna, až na několik výjimek, v rozmezí od 1 μm do 10 μm . Dále lze bakterie rozčlenit podle charakteristického tvaru do čtyř skupin (viz kapitola 2.1.1). Některé bakterie se mohou pohybovat pomocí bičků. S ohledem na buněčnou membránu rozlišujeme bakterie grampozitivní a gramnegativní, více informací ohledně rozlišení buněčné membrány v kapitole 2.1.2 [1, 8, 9].



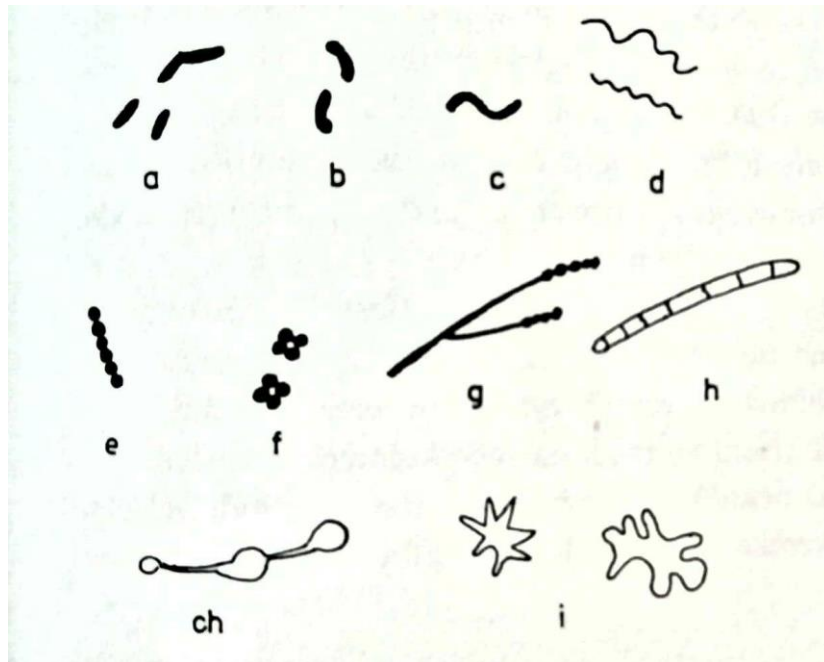
Obrázek 1: Prokaryotická buňka [10]

2.1.1 Stavba a struktura bakterie

Velikost bakteriálních buněk závisí na více faktorech. Takovými faktory mohou být nejen rozdělení bakterií podle druhu a rodu, ale i stáří a podmínky kultivace buněk. Všeobecně je známo, že nově vyvinuté buňky jsou silnější a větší. Rozměry tyčinkovitých bakterií se pohybují od 0,3 do 2,0 μm v průměru a dosahují až velikosti od 1 do 7 μm . Jsou známy i větší

bakterie, například spirochéty o velikosti od 5 do 500 μm a tloušťce od 0,20 μm do 0,75 μm [9].

Tvary buněk bakterií jsou důležité pro samotné rozčlenění bakterií. Bakterie rozdělujeme do těchto skupin – kulovité bakterie (koky), tyčinkovité bakterie, zakřivené bakterie, vláknité bakterie a větvičí bakterie, jak můžete vidět na *Obrázku 2*. Buňky tyčinkovitěho tvaru jsou charakteristické hojným rozmnožováním, konkrétně příčným dělením. Bakterie tyčinkovitěho charakteru se mohou nacházet ve více podobách, viz *Obrázek a, b*, v rovném, zakřiveném nebo v tvaru pravidelně a nepravidelně zakřiveném. Kulovité bakterie, známé jako koky, se liší podle způsobu rozmnožování. Buňky jsou schopny se rozmnožovat do různých uspořádání, například do podoby řetízků, tetád. Mohou vytvářet sarciny, což jsou tři k sobě kolmé roviny tvořící tzv. pravidelné balíčky obsahující až stovky buněk. Bakterie větvičího se tvaru dělíme do dvou podskupin. Do první skupiny náleží buňky, které se dělí podle schopnosti se větvit. Do druhé skupiny spadají bakterie schopné se rozvětvit v celém rozsahu. Příkladem těchto bakterií je druh *Streptomyces*. Mykobakterie jsou zástupci bakterií neúplně se větvičích [1, 8, 9, 11, 12].



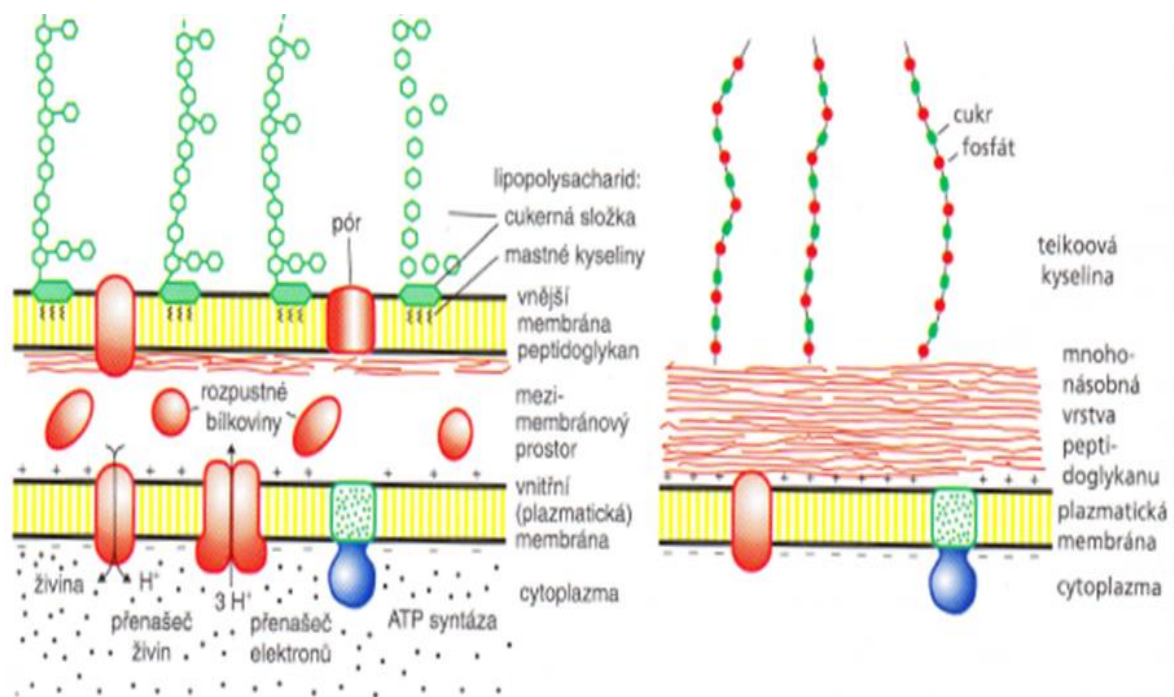
Obrázek 2: Tvar bakteriálních buněk [11]

2.1.2 Buněčná stěna

Jak už bylo zmíněno na začátku, dle složení a stavby je buněčná stěna rozlišována na grampozitivní a gramnegativní. Zatímco u gramnegativní buňky je přítomna v buněčné struktuře vnější membrána, složená z lipopolysacharidů, která je charakteristická vysokou propustností. Další část obalové vrstvy gramnegativní bakterie je tvořena vnitřní vrstvou tvořenou z peptidoglykanu. Gramnegativní bakterie rovněž postrádá ve svém složení kyselinu teichoovou, která slouží jako výplň. K ději však dopomáhá i poměrně tenká vrstva peptidoglykanu. Jak je patrné z *Obrázku 3*, gramnegativní bakterie obsahuje periplazmatický prostor. Nachází se poblíž vnější membrány a peptidoglykanu. Zástupci gramnegativních bakterií jsou například organismy zvané *Bordetella*, *Proteus*, *Vibria*, *Escherichia* nebo

Salmonella. Rozlišení mikroorganismů jsme schopni identifikovat pomocí tzv. Gramova barvení. Při Gramově barvení mikroorganismy reagují s krystalovou violetí (trifenylmetanové barvivo) a s Lugolovým činidlem (jodid draselný) za vzniku komplexu Gramova barviva. Působením organických rozpouštědel dosáhneme vyplavení komplexu ze stěn gramnegativních bakterií [1, 8, 11, 13].

Gramozitivní bakterie ve své struktuře obsahují navíc polysacharidy viz *Obrázek 3* napravo. Velice důležitou vlastností bakterií je přítomnost lipidů ve své stěně, která způsobuje odolnost bakterie vzhledem k tzv. tenzidům (povrchově aktivní látky). Mezi tenzidy se řadí žlučové kyseliny. Gramozitivní bakterie jsou schopny ve své struktuře udržet výše zmíněný komplex Gramova barviva. Což je pravděpodobně způsobené přítomností kyseliny teichoové a mnohonásobné vrstvy peptidoglykanu ve struktuře znázorněné na *Obrázku 3* napravo. Znemožní se tak vymytí barviva organickými rozpouštědly. Příkladem zástupců gramozitivních bakterií jsou bakterie zvané *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus* [8, 9, 11, 13].



Obrázek 3: Porovnání struktury gramnegativní a gramozitivní bakterie [1]

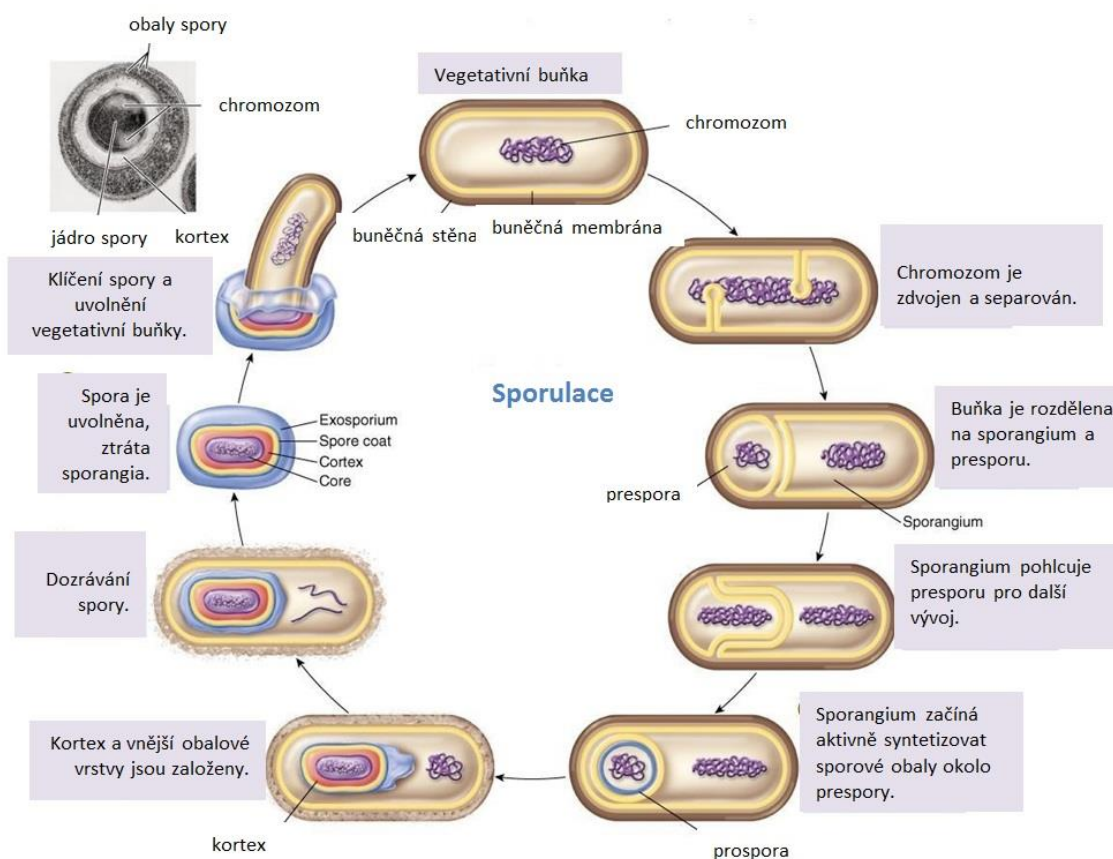
2.1.3 Bakterie lidského těla

Bakterie jsou všeobecně známé jako patogenní organismy. Negativním projevem vlivu patogenní bakterie na lidský organismus je děj zvaný infekce neboli nákaza a nejčastěji se nacházejí v oblasti pokožky, gastrointestinální sliznice, respiračního a urogenitálního traktu. Největší zastoupení bakterií nalezneme v dutině ústní nebo v trávicím traktu viz v kapitole 2.2 V trávicím traktu, nebo přesněji v lidském střevě, je zaznamenáno až 500 druhů bakterií. V konkrétních částech trávicího traktu jsou definovány přibližné hodnoty zastoupení mikroorganismů a to od 10^9 CFU/ml pro tenké střevo a pro tlusté střevo se hodnoty pohybují

od 10^{14} CFU/ml. Je uváděno, že v jednom gramu stolice je přítomno 10^{12} zástupců zhruba tří set druhů bakterií viz kapitola 2.2 [13, 14, 15, 16].

2.1.4 Odpověď bakterií na nepříznivé podmínky

Ne vždy žijí bakterie v ideálním prostředí, proto mají schopnost se nepříznivým podmínkám bránit, například tvorbou spor tzv. sporulace. Ke sporulaci viz *Obrázek 4* dochází, když se buňka nachází v prostředí, kde je bakterie dlouhodobě inhibována. V první řadě dochází ke vzniku jednoho vlákna, které vytvoří chromosomy. Následně se vyvine dvojvrstvá struktura prostřednictvím vychlípenin cytoplazmatické membrány. Poté nastane oddělení septa od mateřské buňky, které obsahuje veškeré živiny a enzymy potřebné k další fázi. Dále dochází k tvorbě prespory a další membrány uvnitř cytoplazmatické membrány. Následně se tvoří kortex, což vede ke vzniku sporové stěny. Sporová stěna je pro buňku existenčně důležitá, díky ní může daná spora vyklíčit. Ve fázi klíčení buňka postupně dozrává a v konečném stádiu buňka uvolní novou sporu. Právě endospory napomáhají mikroorganismům přežít, jelikož zlepšují odolnost buňky vůči toxickým látkám, radio rezistenci nebo vysychání či hladovění. Příkladem bakteriálních kmenů, které jsou schopny sporulace, jsou bakterie z kmene *Firmicutes*, *Actinobacterie* [8, 11, 17, 18].



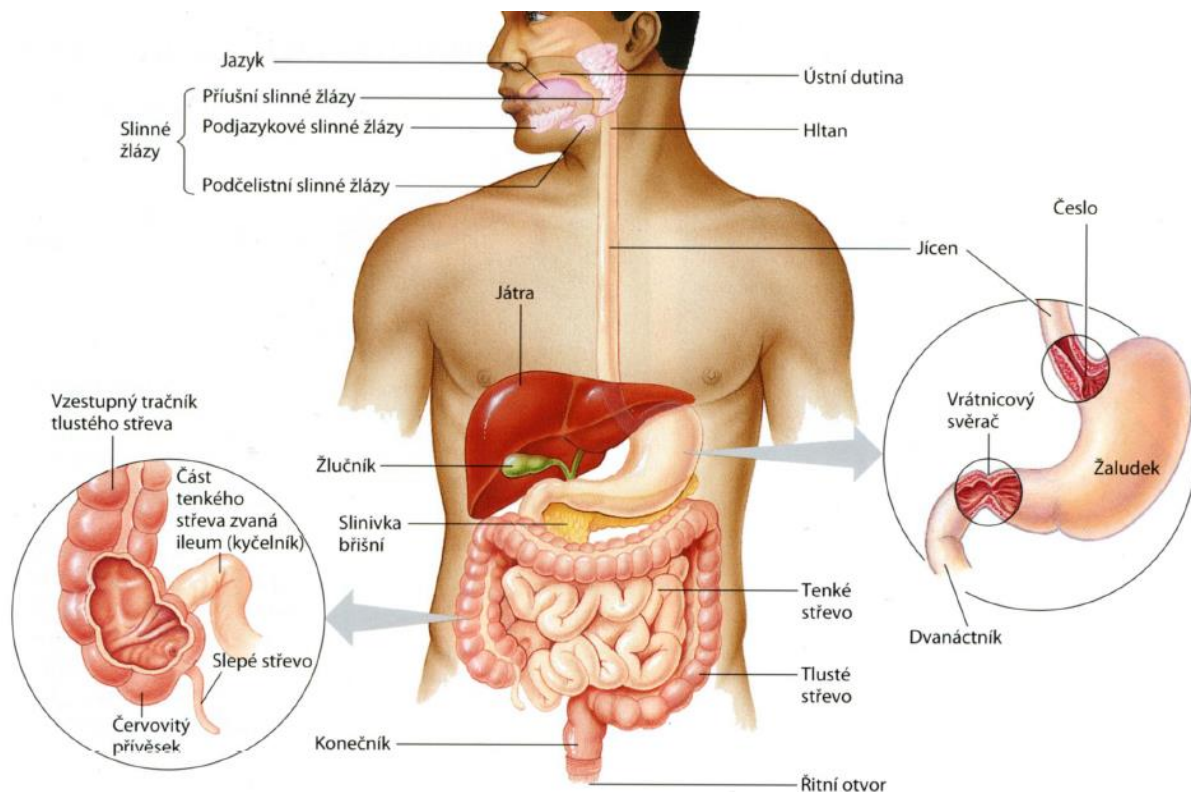
Obrázek 4: Průběh sporulace [19]

Další obranný mechanismus bakterií před nepříznivými vlivy je tvorba bakteriálních biofilmů. Jedná se o pohromadě žijící mikroorganismy v hydratovaném extracelulárním matrixu.

Biofilm příznivě a efektivně napomáhá přežití organismu, který se vyskytl v nevyhovujících podmínkách. Zásadou biofilmu jsou buňky odolnější vůči antimikrobiálním látkám, vyšším teplotám, vysychání a zároveň rychleji vyplavují zplodiny metabolismu a škodlivé látky. Buňky situované na hrubém povrchu biofilmu jsou schopny čerpat potřebné živiny z vnějšího okolí pomocí difúze. Dotují živinami i buňky, které se nacházejí v centru bakteriálního filmu [20, 21, 22].

2.2 Gastrointestinální trakt

Gastrointestinální trakt neboli trávicí systém začíná dutinou ústní a končí řitním otvorem viz *Obrázek 5*. Potrava prochází trávicím traktem a je rozkládána na jednotlivé složky, které dokáže živý organismus postupně vstřebávat. Každá trávicí trubice má svou určitou schopnost. Hlavní funkcí gastrointestinálního traktu je mechanické a chemické zpracování potravy, absorpce a přeměna živin. Okrajově je i součástí imunitního systému, neboť podporuje jeho funkci. Gastrointestinální trakt je řízen nervově nebo hormonálně. Existují dva typy pohybů, které jsou zodpovědné za posouvání potravy. Jsou to celkové (peristaltické) a lokální (segmentační a kývavé) pohyby. Peristaltické pohyby jsou zapříčiněny vznikajícími vlnami bazálního rytmu hladké svaloviny. Motorická aktivita je vykonávána pomocí příčně pruhovaného svalu v dutině ústní, hltanu a jícnu. Pohyby mohou být zapříčiněny podmíněnými nebo nepodmíněnými reflexy [23, 24, 25, 26, 27].



Obrázek 5: Trávicí soustava [25]

Dutina ústní (*cavitas oris*) slouží k rozmělnění a zpracování potravy. Významnou roli mají sliny, které jsou produktem slinných žláz, hltan a jícnu. V ústní dutině se nacházejí tři slinné žlázy. Složky, ze kterých jsou sliny složeny, se odvíjí od živin, jež lidský organismus přijme

a od jeho hormonálního i nervového rozpoložení. Enzymy vylučovány v podobě slin napomáhající trávení, příkladem enzymů je mucin (glykoprotein) nebo α -amylasa. Sliny zničí mnoho nežádoucích bakterií. Obsahují mimo jiné i pufr (bikarbonát), čímž ochraňují chrup před kyselinami, které produkují bakterie [1, 13, 25, 26, 28, 29].

V dutině ústní je přítomna velká škála anaerobních i aerobních mikroorganismů, jako jsou *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* a *Candida albicans*. Nejčastějšími nepatogenními zástupci jsou *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Trepomena* a *Peptostreptococcus*. Viridujícími bakteriemi okolo jazyku a sliznice jsou mikroorganismy zvané *Streptococcus salivarius*. Dalším příkladem viridujícího organismu mohou být *Streptococcus mitis* nebo *Streptococcus sanguis* vyskytující se na povrchu skloviny zubů [13, 14].

Díky hltanu (*pharynx*) a jícnu se potrava dostává tzv. reflexem do žaludku. Zatímco jícen (*oesophagus*) využívá peristaltických vln, kterými se potrava posouvá z hltanu do jícnu a poté do žaludku. Horní část jícnu se skládá z příčně pruhovaného svalstva [1, 25, 27].

2.2.1 Žaludek (*gaster*)

Žaludek je v těle umístěn v horní části dutiny břišní, v bezprostřední blízkosti pod bránicí. Žaludeční stěna je elastická a je schopna pojmout až 2 litry potravy a tekutin.

Tabulka 1: Množství a iontové složení žaludeční šťávy [26]

Střední množství	2,5 l/den	K⁺	10 mol/l
Hodnota pH	1,2–3,0	Cl⁻	120 mol/l
Na⁺	45 mol/l	HCO₃⁻	–

Úkolem žaludeční sliznice je vylučování žaludeční šťávy (1–2 l), jež je odpovědná za zpracování potravy. Šťáva denaturuje bílkoviny kvůli obsahu kyseliny chlorovodíkové a pepsinu. Základ žaludeční šťávy tvoří kyselina chlorovodíková, pepsin, gastrin, anorganické a makromolekulární látky viz Tabulka 1. Žaludeční šťáva obsahuje nejen alkalické, ale i kyselé látky. Alkalické látky jsou obsaženy v primárních sekretech buněk. Látky ve svém složení obsahují proteolytické enzymy – pepsinogen. Proteolytické enzymy (trávicí enzymy) sehrávají důležitou roli ve štěpení peptidových vazeb bílkovin zpravidla na směs peptidů o M_r 600–3000. Proteázy se rozdělují do dvou skupin, na exopeptidázy (karboxypeptidáza A, karboxypeptidáza B) nebo endopeptidázy (pepsin, trypsin, chymotrypsin), podle toho, jak štěpí peptidový řetězec. Endopeptidázy štěpí bílkoviny vždy uvnitř řetězce na konkrétním místě. Pepsin je rozčleněn na dva typy. Prvním je pepsin typu 3 a druhý typu 5. První typ pepsinu má svoji optimální hodnotu pH pro albumin 1,5 a pro hemoglobin 2,3. Naopak pepsin druhého typu, tedy gastrin, má svoji optimální hodnotu pH 3,2 pro hemoglobin. Princip vylučování kyseliny chlorovodíkové mají na starost krycí nebo tzv. parietální buňky, které tuto kyselinu produkují ve formě sekretu o velmi kyselém pH. Za běžných podmínek se pH žaludeční šťávy pohybuje v hodnotách od 1,2 do 3,0 [21, 23, 24, 26].

Co se týká výskytu bakterií v žaludku, je zde zastoupení těchto buněk podstatně nižší, což je způsobeno především kyselým prostředím. Kyselé pH může být zvýšeno na mírnější kyselost

a tím se tato bariéra pro bakterie může zmenšit (například zvýšený přísun tekutin – naředění příslušných šťáv). Laktobacily nebo enterokoky jsou zástupci, kteří jsou schopni využívat kyselého prostředí [25].

2.2.2 Tenké střevo (*intestinum tenue*) a tlusté střevo (*intestinum crassum*)

Tenké střevo je stěžejním orgánem pro trávení a absorpci živin do krve. Skládá se ze tří částí. Prvním z nich je dvanáctník. Ve dvanáctníku dochází k promíchání přijaté potravy společně s trávicími enzymy, které pocházejí ze slinivky břišní, jater, žlučníku a z vlastních žláz samotného tenkého střeva. Obsahuje jednu z důležitých šťáv – pankreatickou šťávu (odpovědná za neutralizaci tráveniny). Stejně jak tomu bylo i u žaludeční šťávy, její vlastnosti jsou závislé na stravě a hormonální, či nervové situaci. Pankreatická šťáva obsahuje složky hydrogenuhlíčné soli (viz Tabulka 2), jejíž přítomnost vytváří alkalické prostředí. Šťáva obsahuje proteolytické i další enzymy například trypsin, chymotrypsin, elasthan, karboxypeptidázy, α -amylasu, lipázu, fosfolipázu A_2 , ribonukleázu a deoxyribonukleázu. Zmíněné enzymy jsou produkovány v neaktivní formě, která je aktivována proteolýzou. Bez pankreatické šťávy bychom nebyli schopni zcela trávit lipidy, sacharidy ani bílkoviny [25, 29].

Tabulka 2: Množství a iontové složení pankreatické šťávy [26]

Střední množství	0,9 l/den	K⁺	8 mol/l
Hodnota pH	7,4–8,3	Cl⁻	120 mol/l
Na⁺	140 mol/l	HCO₃⁻	35 mol/l

Dalším důležitým orgánem jsou játra, která produkují žluč, jež se hromadí ve žlučníku. Dále se žluč vylévá do duodenu, za což je zodpovědný pankreozym. Žluč obsahuje žlučové soli (5 g/100 ml), které jsou produktem cholesterolu a napomáhají rychlému trávení a za vstřebání tuků a fosfolipidů. Obsahuje barviva (bilirubin a biliverdin), která jsou produktem při rozpadu červených krvinek v játrech. Z těla jsou odváděna stolicí. Mimo soli a barviva žluč obsahuje vodu, žlučové pigmenty, cholesterol, mastné kyseliny, tuky, lecitin a anorganické soli viz Tabulka 3 [26, 27, 29].

Tabulka 3: Množství a iontové složení žlučové šťávy [26]

Střední množství	0,7 l/den	K⁺	7 mol/l
Hodnota pH	6,2–8,5	Cl⁻	105 mol/l
Na⁺	145 mol/l	HCO₃⁻	30 mol/l

Prostředí žluči má mírně alkalické pH. Žlučová šťáva je důležitá pro vstřebávání nejen tuků, ale i vitamínů, které jsou schopny se rozpouštět v tucích. Napomáhá k plně funkční pankreatické lipáze, což je enzym, jenž není možné rozpustit v tucích [26, 29, 30].

V tenkém střevě se vyskytují mikroorganismy, jako jsou například streptokoky, koliformní bakterie, laktobacily, bakteroidy, bifidobakterie, fusobakterie. Pro dvanáctník je obsah žlučových solí důležitým faktorem, jelikož znamenají pro patogenní bakterie smrt. Výjimkou

jsou enterobakterie a enterokoky, protože jsou odolné vůči prostředí obsahující soli žlučové šťávy [13, 31, 32].

Tlusté střevo (*intestinum crassum*) je konečnou částí trávicí trubice. Skládá se ze tří částí, tj. slepé střevo, tračník (vzestupný, sestupný, příčný, esovitý) a konečník. Délka tlustého střeva činí cca 1,5 m. Hlavní funkcí tlustého střeva je zpětná resorpce vody, kdy se zbytky tráveniny zahušťují a podléhají hnití a kvašení, za což je odpovědná mikroflóra. Bakterie zajišťují, aby v tlustém střevě docházelo k odštěpení kyseliny glukuronové a tím tak došlo k přeměně barviva bilirubinu na výsledný produkt sterkobilinogen nebo k přeměně z cholesterolu na koprosterol. Po průchodu stolice přes žlučovou šťávu je bezbarvá. Charakteristickou hnědou barvu stolice získává díky látce zvané sterkobilin. Zastoupení mikroorganismů v tlustém střevě je výrazně vyšší nežli v jiných částech trávicího traktu. Z rozboru stolice byli zjištěni zástupci *Bacteriodes*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Fusobacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterobacter*, *Veillonella*, *Fusobacterium prausnitzii* [1, 13, 24, 25, 29, 33, 34]

2.3 Stresové faktory ovlivňující bakterie

Pro bakterie jakožto živý organismus je důležitý nejen zdroj uhlíku, kyslíku, energie, ale i faktory okolního prostředí, které ovlivňují růst bakterií nebo jejich viabilitu. Přestože jsou bakterie schopny se vnějším podmínkám dobře přizpůsobit, například změnou složení své membrány nebo enzymů. I to má svá omezení a hranice. Nejdůležitějšími faktory jsou teplota, pH, tlak a oxidační děje [8].

2.3.1 Teplotní vliv

Každý organismus má svou optimální teplotu, při které je schopen nejefektivněji růst. Nicméně existuje teplota, při které je bakterie schopna stále růst tzv. minimální teplota. Maximální teplota je nejvyšší možná teplota, kdy je bakterie způsobilá růstu. Dle hodnot optimální teploty lze bakterie rozdělit do několika skupin. Bakterie, které mají svou optimální teplotu v rozmezí 20–45 °C, jsou nazývány mezofilní bakterie (například *Stenotrophomonas panacihumi*, *Clostridium perfringens*). Další skupinou jsou psychofilní bakterie, pro niž je optimální teplota 0 °C–15 °C. Jsou to zástupci nepatogenních organismů (*Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*). Termofilní bakterie se vyskytují o teplotě v rozmezí od 45 °C do 70 °C. Pro extrémní termofilní bakterie může optimální teplota dosahovat až 90 °C. Hypertermofilní bakterie vyžadují pro svůj růst vysokých teplot, jež mohou dosahovat až 85 °C–110 °C. Při náhlém poklesu teploty jsou výše zmiňované skupiny mikroorganismů do jisté míry schopny adaptace, aby daný mikroorganismus byl schopen přežít. Pro přežití má mikroorganismus několik možných obranných mechanismů, například změna složení mastných kyselin ve fosfolipidech, pozastavení růstu či využití specifických bílkovin. (CspA protein – cold shock protein) jsou schopny přizpůsobit metabolismus bakterií (např. *E. coli*). Dále existují tzv. heat shock proteins (HSPs) neboli proteiny teplotního šoku, které hrají důležitou roli při homeostáze proteinů. HSPs tedy obstarávají buňkám termotoleranci [8, 9, 11, 13, 35, 36, 37].

Pro patogenní organismy je optimální teplota 35 °C až 37 °C, což odpovídá teplotě lidského těla. Při zvýšení teploty napadeného organismu se růst bakterií zpomaluje až do doby, kdy se teplota navýší natolik, že dojde k úplnému zastavení růstu nebo k usmrcení mikroorganismů. Je to doprovázeno denaturací proteinů (i při nejnižší možné inaktivační teplotě). S tím však souvisí doba, která rozhoduje o letálním účinku na buňku. Potřebnou dobu letálního účinku je rovněž velmi ovlivněna prostředím, ve kterém se buňka nachází. V případě vlhkého prostředí se letální účinek opět navyšuje a tím se doba životnosti mikroorganismu zkracuje. Příkladem patogenního organismu je *Neisseria gonorrhoeae* nebo *Bacillus cereus* [8, 9, 11, 13].

2.3.2 Vliv pH

Pro růst bakterií je klíčové i pH prostředí a koncentrace vodíkových iontů, která s pH úzce souvisí. Metabolismus mikroorganismů je silně závislý na jeho okolním pH, neboť ovlivňuje výstupní látky metabolismu. Samotné pH uvnitř buněk je jen málo závislé na pH vnějšího prostředí. Díky přítomnosti pufrů, obsahující aminokyseliny, polypeptidy a proteiny, je možné regulovat dané pH. S ohledem na teplotu okolního prostředí platí pravidlo, čím menší výkyv od optimálního pH, tím větší odolnost při vyšších teplotách. Bakteriím, které jsou schopny růstu v kyselém prostředí, bylo definováno pH v rozmezí od 2 do 3,5. Tyto bakterie jsou nazývány jako acidofilní. Existují však i acidofilní bakterie, které se i nadále rozmnožují při pH <1 (např. *Thiobacillus thiooxidans*). Většina bakterií, které jsou známé jako neutrofilní, mají hodnotu optimálního pH od 6,2 do 7,8. Konkrétně fakultativní neutrofilny (kvasinky, plísně) se množí při neutrálním pH. Přičemž pro bakterie je ideální množení při pH 6. Alkalické prostředí v hodnotách pH od 9 do 10,5 je nejpříznivější pro mikroorganismy zvané alkalofilní. Příkladem alkalofilních mikroorganismů, který roste pouze jen v alkalickém prostředí v rozmezí pH od 7,4 do 9,6, je *Vibrio cholerae*. Organismy, které jsou schopny snášet alkalické prostředí, nazýváme alkalotolerantní (např. *Proteus*). Zástupci této skupiny mají schopnost štěpit ureu a proteiny. Obvykle alkalotolerantní mikroorganismy (nacházející se v kyselém prostředí) za účelem navýšení pH, vylučují do uzavřeného prostoru výstupní látky metabolismu alkalické povahy [1, 8, 9, 11, 13].

2.3.3 Vliv oxidoredukčního potenciálu

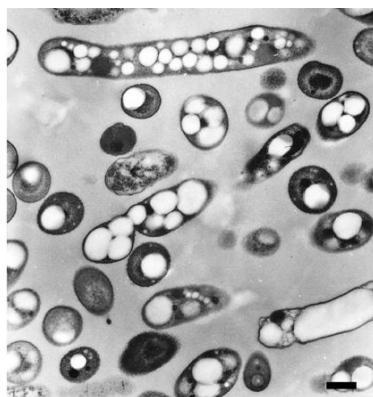
Každá anaerobní a aerobní bakterie je závislá na přítomnosti oxidačních (kyslík, dusičnany, peroxidy, Fe^{2+}) nebo redukčních (Fe^{3+} , vodík) činidel, tedy na oxidačně redukčním potenciálu (E_h), který je vyjádřen v číselných hodnotách. Potenciál byl vyčíslen za pomoci rozdílu potenciálů naměřených na dvou elektrodách. Pro aerobní bakterie a jejich růst je nutná přítomnost kyslíku a hodnoty potenciálu (E_h) nabývající kladných hodnot, přesněji od +0,2 do +0,4 V, v prostředí o pH 7, kdežto pro anaerobní bakterie je zásadní, aby E_h nabývalo záporných hodnot (nejvíce -0,2 V při pH 7) vzhledem k nepříznivým účinkům kyslíku. Anaerobní bakterie mohou růst i za přítomnosti kyslíku, ale je nutné, aby prostřední bylo upraveno (např. přidáním kyseliny asparagové). Jinak by látky v neredukovaném stavu nebyly aktivní a došlo by k pozastavení růstu nebo k letálnímu účinku [8, 9, 11, 13].

2.3.4 Působení osmotického stresu

Osmotický tlak je další faktor, který je schopen výrazně ovlivnit bakteriální buňku. Snížení a zvýšení osmotického tlaku může po fyzikální a chemické stránce vyvolat spoustu následků. Při navýšení koncentrace látek extracelulárním prostředím se přímou úměrou navyšuje již zmíněný osmotický tlak. Jak je všeobecně známo, osmotický tlak uvnitř buňky u většiny bakterií nabývá hodnot v rozmezí od 0,35 do 0,60 MPa, konkrétně pro osmofilní organismy platí hodnota 30 MPa. Zvýšení osmotického tlaku je typické pro tzv. hypertonické prostředí, které je charakteristické omezeným přístupem živin pro bakteriální buňky, jež jsou obsaženy ve vodě. Zároveň dochází k tzv. plazmolýze, kdy se buňka snaží vyrovnat koncentrace látek extracelulárního a intracelulárního prostředí. Dochází k přesunu většího množství vody z vnitřního prostředí do vnějšího. V důsledku toho se buňka smrští a při dlouhodobém trvání nastává usmrcení buňky. Naopak v hypotonickém prostředí, to znamená nižší koncentraci soli v extracelulárním prostředí nežli v intracelulárním prostředí, má voda snadnější přístup pro vniknutí do buňky. Díky koncentračnímu spádu proudí voda ve směru z méně koncentrovaného prostředí dovnitř buňky a tlak uvnitř bakteriální buňky se zvyšuje. Vzhledem k přítomnosti rigidní buněčné stěny k plazmolýze nedochází. Jestliže se buňka nachází v prostředí o stejné koncentraci, jako koncentrace intracelulárního prostředí nazývá se toto prostředí izotonické. Osmolalita bakterií je definovaná jakožto osmotický tlak k určité teplotě. Běžné prostředí pro mikroorganismy je v rozmezí koncentrací nad 0 mol/kg do 16 mol/kg. Koncentraci lze navýšit například přidávkem solí nebo sacharidů. Bakterie jsou rozdělovány do skupin podle toleranci vůči těmto solím na halofilní, halotolerantní, obligátní halofily a extrémní halofily [8, 9, 11, 13].

2.4 Modelový organismus bakterie – *Cupriavidus necator*

Jako modelové organismy byly zvoleny dva bakteriální kmeny *Cupriavidus necator* viz *Obrázek 6*, konkrétně *Cupriavidus necator* H16 a jeho mutantní kmen *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, které jsou dlouhodobě využívány na Fakultě chemické VUT. Tyto bakteriální kmeny slouží jako modelové mikroorganismy produkující polyhydroxyalkanoáty (PHA) za určitých podmínek.



Obrázek 6: Cupriavidus necator H16 (granule PHB) [38]

2.4.1 Vlastnosti bakterie *Cupriavidus necator*

Bakteriální kmen patří do skupiny gramnegativních fakultativních bakterií, netvořící spory, třídy β -proteobakterií. Dříve byla bakterie označovaná jako *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes eutroplus* nebo *Wausteria eutropha*. Jedná se o chemolitoautotrofní bakterie, které získávají energii díky oxidaci z anorganických látek například z oxidu uhličitého (CO_2). Bakterie dokáže využít energii i z organických látek nebo z molekul vodíku (H_2). Při nepříznivých podmínkách je organismus schopen zajistit energii z produktů metabolické dráhy mikroorganismů, které fixují molekulu N_2 [39, 40, 41].

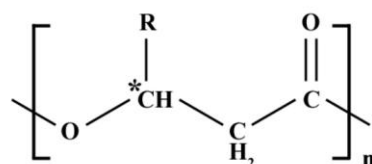
Při nedostatku kyslíku je bakterie odkázaná na anaerobní metabolismus. Je tedy považovaná za velice flexibilní organismus, využívající dusičnany (akceptor elektronů denitrifikace). Jak už bylo zmíněno výše, bakteriální kmen *Cupriavidus necator* H16 je schopný produkce a akumulace PHA na rozdíl od jeho mutantního kmene *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴. Bakterie *Cupriavidus necator* H16 si PHA tvoří jako zásobní látku energie a uhlíku. Bylo zjištěno, že bakterie odpovídá na stres tvorbou PHA [39, 42].

2.4.2 Stressová odpověď bakterií

Jak již bylo zmíněno výše, produkce PHA je pro bakterie podstatná nejen ve zdroji zásobních látek (uhlíku a energie), ale i v obranném mechanismu při vystavení bakterie fyzikálně chemickým stresům, jako jsou například nízká teplota, UV záření, osmotický tlak, oxidační šok nebo pH prostředí. Lze tak tedy očekávat, že u bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16, jež je schopný produkce, PHA bude zodpovědná za zvýšení schopnosti udržet intracelulární hladinu. Bakteriální kmen se tak stává díky produkci PHA vysoce rezistentní vůči extrémním podmínkám prostředí. Dále tvoří buňku vysoce robustní například při osmotickém stresu a taktéž zvyšuje celistvost bakteriálního kmene [43, 44, 45].

2.4.3 Struktura PHA a její unikátní vliv na buňku

PHA viz *Obrázek 7* jsou lineární polyestery hydroxykyselin patřící mezi biokompatibilní a biodegradovatelné polymery. PHA dělíme do skupin podle počtu uhlíku v jednom monomeru hydroxykyseliny. V případě, že řetězec monomeru obsahuje 3–5 atomů uhlíku, se jedná o short-chain-length PHA (scl-PHA). Zatímco Medium-chain-length PHA (mcl-PHA) obsahuje v monomerní jednotce 6–14 atomů uhlíku. Dále jsou všechny monomerní jednotky v R-konfiguraci díky vysoké stereospecifitě biosyntetických enzymů. Příprava polymerních látek spočívá v esterifikaci karboxylovou skupinou jedné z předchozí hydroxyskupiny kyseliny. Produkce polymeru se odvíjí od zdroje uhlíku a od dalších faktorů, jako je metabolismus a substrátová specifita. Vybraná modelová bakterie a mnoho dalších produkuje biodegradabilní homopolymer zvaný poly- β -hydroxybutyrát spadající do podskupiny PHA. Mimo jiné existuje i produkce kopolymerů, které se liší svými mechanickými vlastnostmi a jako monomery obsahují například 3-hydroxyvalerát a 3-hydroxyhexanoát. Organismus bakteriální buňky (např. *Aeromonas hydrophila*) je schopen prostřednictvím substrátů k homopolymeru přiřadit vhodný substrát zvaný kopolymer PHBV [7, 46, 47, 48, 49, 50, 51].

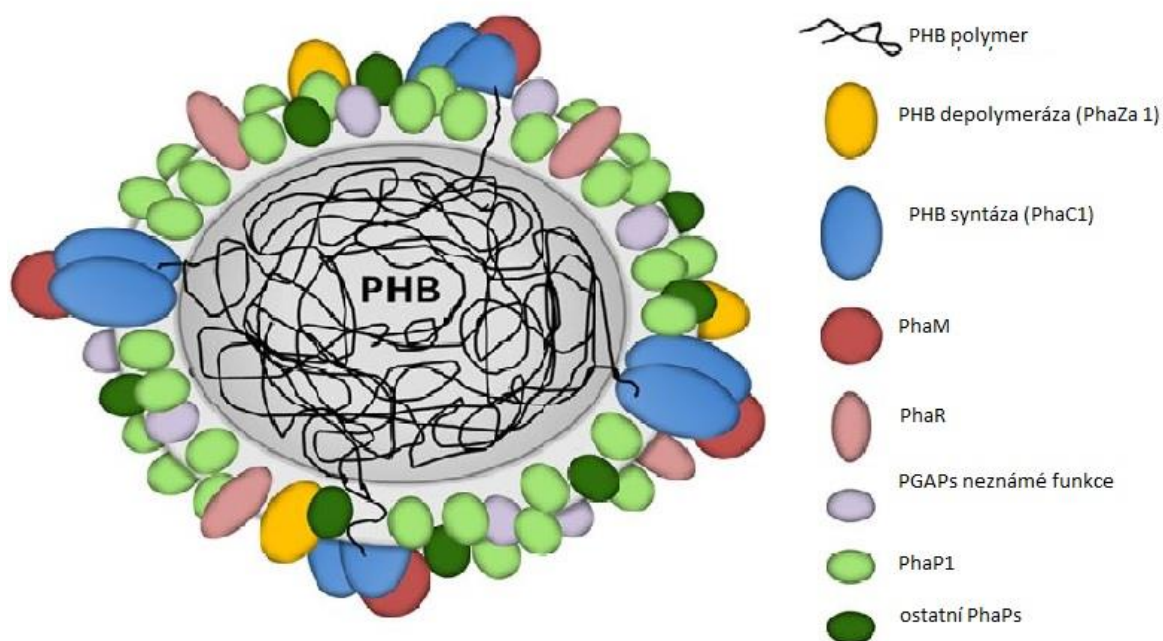


Poly(3-hydroxyalkanoate)

R group	Carbon no.	PHA polymer
methyl	C ₄	Poly(3-hydroxybutyrate)
ethyl	C ₅	Poly(3-hydroxyvalerate)
propyl	C ₆	Poly(3-hydroxyhexanoate)
butyl	C ₇	Poly(3-hydroxyheptanoate)
pentyl	C ₈	Poly(3-hydroxyoctanoate)
hexyl	C ₉	Poly(3-hydroxynonanoate)
heptyl	C ₁₀	Poly(3-hydroxydecanoate)
octyl	C ₁₁	Poly(3-hydroxyundecanoate)
nonyl	C ₁₂	Poly(3-hydroxydodecanoate)
decyl	C ₁₃	Poly(3-hydroxytridecanoate)
undecyl	C ₁₄	Poly(3-hydroxytetradecanoate)
dodecyl	C ₁₅	Poly(3-hydroxypentadecanoate)
tridecyl	C ₁₆	Poly(3-hydroxyhexadecanoate)

Obrázek 7: Struktura PHA [52]

PHA, jak již bylo zmíněno výše, jsou produkovány při odpovědi vůči stresu formou intracelulárních inkluzí. Slouží bakteriím primárně jako zásobní zdroj uhlíku a energie. *Cupriavidus necator* je nejvíce studovaný prokaryotní organismus produkující poly(3-hydroxybutyrát). Granule polyhydroxybutyrátu (PHB), označované taktéž jako karbonosomy, což je multifunkční komplex sestavený z jádra amorfního polymeru PHB, které je ohraničeno povrchovou proteinovou vrstvou (funkčních a strukturních proteinů). PHB granule je dále složena ze šesti druhů proteinů (viz Obrázek 8), které sestavují proteinovou vrstvu. Prvním z proteinů je PHB syntáza (PhaC1), která sehrává klíčovou roli enzymu, který syntetizuje PHB a katalyzuje proces zvaný polymerace látky produkované metabolismem 3hydroxybutyryl-CoA. Phasin protein (PhaPs) tvoří větší část povrchu PHB granule a zabraňuje splynutí granulí. Dále PHB depolymeráza (PhaZs) je významná pro mobilizaci polymeru v době, kdy má buňka nedostatek živin. Proteiny PhaRs regulují expresi vybraných phasinových genů a PhaM představuje vzor proteinu asociovaného s PHB granulemi. Dříve byly připisovány (podle *in vitro* dat) do povrchových struktur granulí i fosfolipidy. Avšak prostřednictvím *in vivo* dat fosfolipidová vrstva nikdy nebyla prokázána. Tloušťka povrchové vrstvy je 2,9–3,8 nm [53, 54].



Obrázek 8: Složení PHB granule [55]

2.4.4 Využití produkce PHA

Produkce PHA je výhodná nejen pro prokaryotní organismy, jelikož navyšuje rezistenci vůči extrémním podmínkám, kterým bývají bakterie mnohdy vystaveny, ale i pro lidstvo samotné. Příroda je vzhledem k nadměrné produkci synteticky vyrobených plastů zaplněná těžce rozložitelnými plasty ve všech zákoutích světa. Tento fakt se stává pro naše životní prostředí vážným problémem. Celosvětově rozšířený negativní dopad plastových výrobků na environmentální prostředí by mohl být vyřešen právě biodegradabilním polymerem, který poskytují bakterie akumulující PHA. Synteticky vyrobené plasty se v přírodě zpravidla rozkládají v extrémním časovém horizontu stovek let, přičemž bakteriálně produkovaný polymer v rozmezí pouze několika měsíců. Potíže se objevují ve výrobním procesu a ceně, jenž je mnohokrát rozhodující [7].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité bakterie, chemikálie, přístroje

3.1.1 Bakterie

K experimentální části byly vybrány dva bakteriální kmeny, konkrétně *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ (PHA neakumulující mutant bakterie) a *Cupriavidus necator* H16 (PHA akumulující). Kmen *Cupriavidus necator* H16 byl získán z České sbírky mikroorganismů z Masarykovy univerzity v Brně. Kmen *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ byl získán z Leibnitz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Braunschweig Německo.

3.1.2 Potřebné chemikálie

NutrientBroth (HiMedia)

Agar Powder (HiMedia)

Peptone (HiMedia)

Beef extract (HiMedia)

Propidium jodid (eBioscience)

Síran amonný

Dihydrogenfosforečnan sodný

Dihydrát hydrogenfosforečnansodný

Heptahydrát síranu hořečnatého

Fruktóza

Chlorid sodný

Chlorid draselný

Pankreatin

Žlučové soli

Pepsin

Hydrogenuhlíčitan sodný

Kyselina chlorovodíková

3.1.3 Přístrojová technika

Centrifuga, Boeco U-32R

Temperovaná třepačka Heidolph Unimax 1010, Labicom s.r.o.

Temperovaná třepačka, Orbital shaker-Incubator ES-20, Biosan

Předvážky, Kern EW 620–3NM

Laminární box Aura mini, Bio Air Instrument

Termostat, LS–35

Průtokový cytometr, Apogee A50, Apogee Flow Systems

ELISA reader – Elx808, BioTek Instruments, Inc.

Inkubátor, IP60

Spektrofotometr, Biotech Implen

Vortex, TK3S, Tecno Kartell

Multikanálová pipeta

Běžné laboratorní sklo a vybavení

3.2 Kultivace mikroorganismu

3.2.1 Příprava inokula

Inokulum bylo připravováno v Erlenmayerových baňkách o objemu 100 ml vždy ve dvou paralelních pokusech. Objem roztoku média Nutrient Broth (NB) tvořil polovinu z objemu baňky. Do vysterilovaného inokula byly zaočkovány kmeny bakteriologickou kličkou z agarové plotny. Zaočkování vždy probíhalo ve sterilním prostředí laminárního boxu. Inokulum bylo kultivováno na temperované třepačce při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin při 170 rpm. Narostlé inokulum bylo dále využito pro zaočkování produkčního minerálního média.

3.2.2 Příprava živných médií a agarových misek

K tomu, aby byla kultura bakterií zachována, bylo využito pevné agarové médium NB.

Složení NB:

- Beef extract 10 g·l⁻¹
- NaCl 5 g·l⁻¹
- Pepton 10 g·l⁻¹

Složení minerálního produkčního média ke kultivaci bakterie bylo následující:

- (NH₄)₂SO₄ 1 g
- KH₂PO₄ 1,02 g
- Na₂HPO₄ 11,1 g
- MgSO₄·7H₂O 0,2 g
- *Roztok stopových prvků (MES) 1 ml
- Fruktosa 20 g
- Destilovaná voda 1000 ml

*Roztok stopových prvků a jeho složení (MES):

- FeCl₃ 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 1000 ml

Navážky minerálních solí byly přesypány do Erlenmayerových baněk o objemu 250 ml společně se 100 ml destilované vody. Roztoky byly připraveny tak, aby pokryly dvě paralelní kultivace pro každý kmen. Baňky byly dále umístěny na temperovanou třepačku pro úplné rozpuštění látek. Poté bylo médium sterilizováno v tlakovém hrnci po dobu 30 min. Po sterilizaci se médium zaočkovalo 5 ml inokula, 5 ml fruktosy a 0,1 ml MES ve sterilním prostředí zajištěným laminárním boxem. Zaočkováná média se kultivovala na temperované třepačce při 170 rpm a 30 °C po dobu 72 hodin.

Agarové misky byly připraveny pro experimentální část zabývající se agarovým difuzním testem. Do Erlenmayerových baněk bylo odváženo 20 g chemikálie Agar Powder, NB a 1000 ml destilované vody. Po sterilizaci byl agarový roztok rozlit na Petriho misky.

3.3 Příprava modelových šťáv gastrointestinálního traktu

3.3.1 Pankreatické šťávy

Modelová pankreatická šťáva byla pro experiment připravena z následujících chemikálií. Bylo naváženo 0,125 g pankreatinu a 0,750 g hydrogenuhličitanu sodného (NaHCO_3). Navážky byly rozpuštěny v 50 ml destilované vody v odměrné baňce, kdy pH odpovídalo 8,9. Tímto způsobem byla připravena 100% pankreatická šťáva, která byla dále naředěna destilovanou vodou na žádané koncentrace tj. 50% a 10%.

3.3.2 Žlučové šťávy

Pro přípravu modelové žaludeční šťávy bylo nejprve nutné připravit 50 mM fosfátový pufr o pH 8. Nejprve bylo naváženo 0,532 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, poté 16,680 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ v objemu 1 000 ml destilované vody. Samotná 100% modelová žlučová šťáva obsahovala 0,2 g žlučových solí a 50 ml 50 mM fosfátového pufru. Jako v předcházející kapitole 3.3.1 byly připraveny koncentrace 50% a 10% z původního 100% roztoku žlučové šťávy.

3.3.3 Žaludeční šťávy

Žaludeční šťáva byla připravena z 0,125 g pepsinu a 0,42 ml 35% HCl v odměrné baňce o objemu 50 ml. Výsledné pH modelové žaludeční šťávy bylo 0,9. Pro přípravu 10%, 5% a 1% šťávy se postupovalo stejným způsobem jako u ostatních modelových šťáv.

3.4 Stanovení viability modelové bakterie

3.4.1 Stanovení viability plotnovou metodou

Do deseti centrifugačních zkumavek bylo sterilně odpipetováno 5 ml zaočkovaného minerálního produkčního média s příslušnou kulturou. Poté byly zkumavky umístěny do Centrifugy (Boeco U-32R) na 5 000 rpm /5 minut. Z centrifugačních zkumavek se do kádinky

slil supernatant a k sedimentu se připipetovalo 5 ml z jednotlivých modelových štáv nebo 5 ml PBS (kontrola). Zkumavky se umístily na automatickou rotační třepačku 10 rpm v temperované třepačce kvůli prostředí o teplotě 37 °C na dobu 20 minut. Během času, kdy se vzorky míchaly na automatické rotačce, se připravily zkumavky typu Eppendorf, do kterých se odpipetovalo vždy 0,9 ml PBS. Po ukončení expozice stresu bylo odebráno 0,1 ml roztoku z centrifugačních zkumavek do prvních eppendorfek. Do zbylých zkumavek se provedlo desítkové ředění. Ředění bylo provedeno do koncentrace 10^{-7} , kontrola do 10^{-8} . Poté bylo odpipetováno 0,1 ml vybrané koncentrace buněk na pevné agarové médium a pomocí hokejky byl proveden roztěr, viz Tabulka 4. Agarové plotny se vzorky byly dále kultivovány při 37 °C. Po 72 hodinách kultivace byly bakterie přepočítány na miskách o počtu kolonií v rozmezí od 20–200.

Tabulka 4: Koncentrace vybraných modelových štáv

Modelová štáva	Vybraná koncentrace			Ředění		
	100%	50%	10%	10^{-3}	10^{-5}	10^{-7}
Pankreatická štáva	100%	50%	10%	10^{-3}	10^{-5}	10^{-7}
Žlučová štáva	100%	50%	10%	10^{-3}	10^{-5}	10^{-7}
Žaludeční štáva	10%	5%	1%	10^{-3}	10^{-5}	10^{-7}

Složení pufru PBS:

- NaCl 8,0 g
- KCl 0,2 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,144 g
- KH_2PO_4 0,24 g
- Destilovaná voda 1000 ml

3.4.2 Stanovení viability průtokovou cytometrií

Průtoková cytometrie je multiparametrická metoda, která je schopna analyzovat buňky rychlostí 100 000 částic za sekundu. Princip průtokové cytometrie využívá fluorescence o určitých vlnových délkách a jde o velice citlivou analýzu buněk. Buněčná suspenze daných kultur je po aplikaci unášena nosnou kapalinou laminárním prouděním do tzv. průtokové cely. Částice jsou rozptýleny různě v prostoru cytometru. Pro důsledné měření dochází k tomu, že částice buněčné suspenze jsou systematicky tříděny jednotlivě za sebe, což obstarává fluidní systém a následuje hydrodynamická fokusace. Výhodou metody je možnost sledování více parametrů [56, 57, 58].

Pro tuto metodu bylo využíváno vzorků z předcházející metody, kdy byly měřeny buněčné suspenze o koncentraci 10^{-2} . Pro zjištění přeživších buněk bylo do buněčné suspenze přidáno fluorescenční barvivo zvané Propidium jodid (PI) o objemu 5 μl . PI se vmezeří do DNA mrtvých nebo poškozených buněk bakteriálního kmene [59].

3.4.3 Agarová difúzní metoda

Agarovou difúzní metodou je stanovována minimální inhibiční koncentrace v prostředí agarového média. Nejprve bylo nanášeno 100 μl zředěné kultury vybraného testovaného mikroorganismu na silnou agarovou vrstvu. Po dvaceti minutách se do agarového média

vytvořily hloubené jamky, kdy jedna agarová plotna obsahovala vždy tři hloubené jamky pro jednu konkrétní koncentraci. Do jamek bylo aplikováno za pomoci pipety 75 μ l roztoku příslušné šťávy o dané koncentraci. Po 24hodinové kultivaci při 37 °C, byly proměřeny velikosti inhibičních zón.

3.4.4 Bujónová diluční metoda

Bujónová diluční metoda spadá do metod, stanovujících antimikrobiální aktivitu mikroorganismů. Aby se mohla stanovit antimikrobiální aktivita je zapotřebí vhodného výběru kultivačních medií [60].

Cílem bujónové diluční metody je najít minimální inhibiční koncentraci testovaných látek, v mém případě tedy minimální inhibiční koncentraci žaludeční, žlučové a pankreatické šťávy.

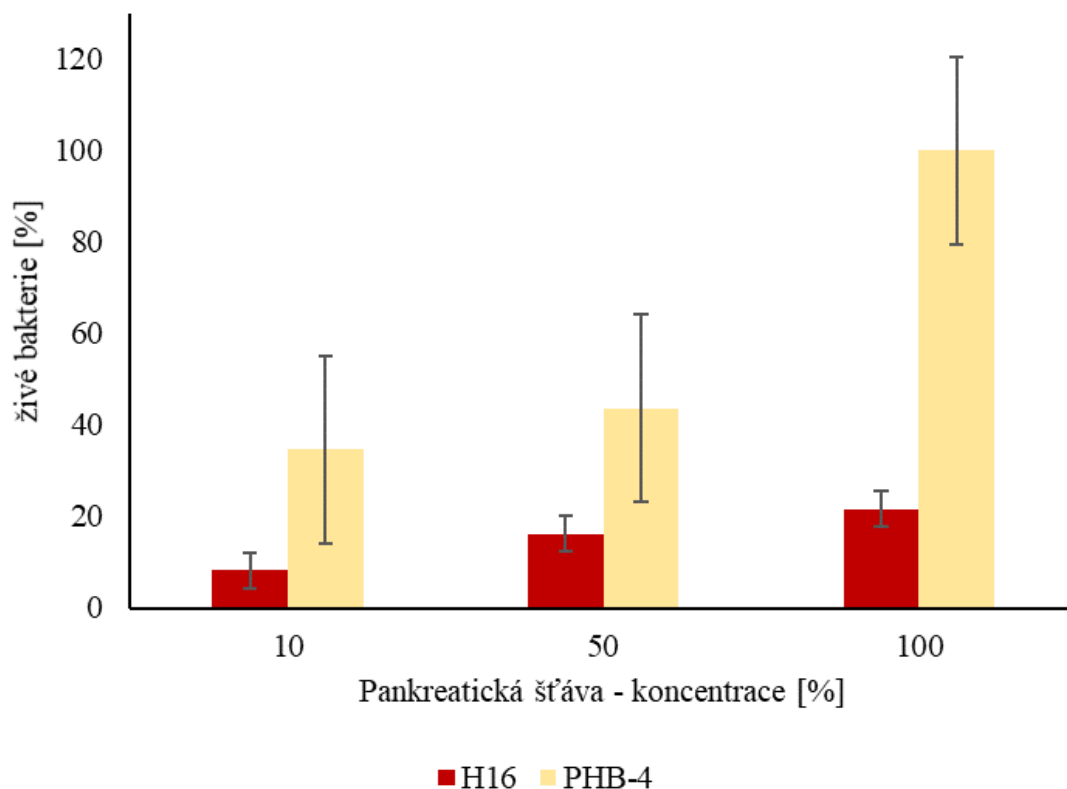
Nejprve bylo nutné si vhodně naředit kulturu sterilním médiem NB tak, aby se při 630 nm absorbance pohybovala okolo 0,1. V prvních třech jamkách mikrotitrační destičky bylo odpipetováno 50 μ l destilované vody jako blank. Poté se do ostatních jamek odpipetovalo 150 μ l zředěné suspenze bakteriálních buněk v NB médiu, ke kterým bylo napipetováno 50 μ l vybraných šťáv tak, aby výsledná koncentrace jamek udávala konečnou koncentraci. Jednotlivé koncentrace byly připraveny v triplikátech. Po dobu mimo měření byly mikrotitrační destičky umístěny na temperované třepačce při 37 °C a 170 rpm. Testy byly proměřovány na Elisa readeru v době 0, po 4, 8, 12 a 24 hodinách.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

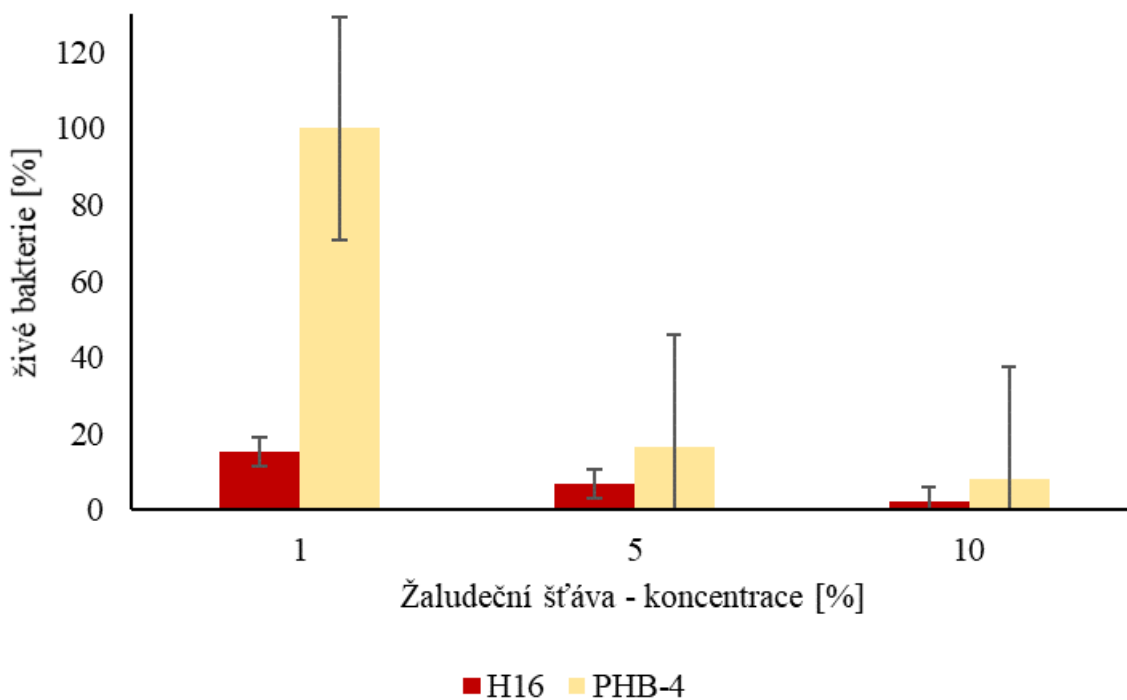
4.1 Výsledky a vyhodnocení použitých metod

4.1.1 Využití plotnové metody ke stanovení viability buněk exponovaných gastrointestinálním šťávám

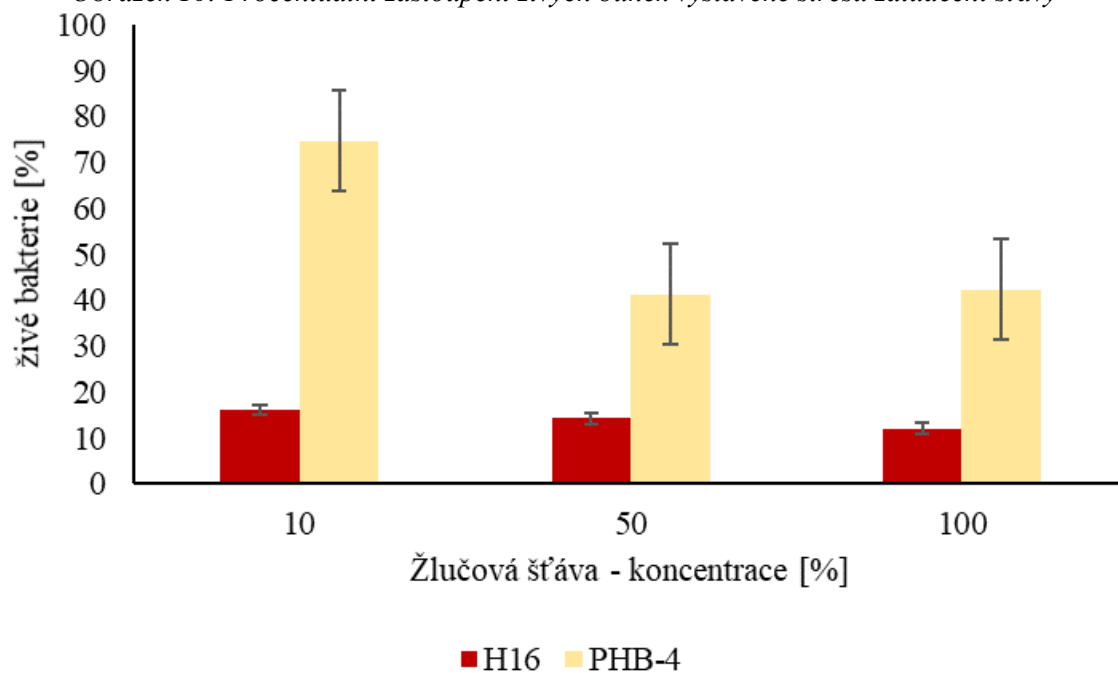
Plotnovou metodou byla stanovena viabilita bakteriálních buněk exponovaných pankreatické, žlučové a žaludeční šťávě. Všechny šťávy byly testovány ve třech koncentracích: pankreatická šťáva 100%, 50%, 10%, žlučová šťáva 100%, 50%, 10% a žaludeční šťáva 10%, 5%, 1%. Testování šťáv v různých koncentracích není pochopitelně fyziologicky relevantní, v gastrointestinálním traktu jsou bakterie reálně exponovány pouze koncentrovaným šťávám, nicméně použití různých koncentrací mělo za cíl především odhalit rozdíl v senzitivně použitých mikrobiálních kultur v případě, že by stresový efekt jednotlivých koncentrovaných šťáv byl příliš vysoký. Z agarové plotny byl také vyhodnocen vzorek s modelovým organismem vybrané bakterie pro kontrolu bez stresu, procento přeživších bakterií bylo vztaženo právě k této kontrole.



Obrázek 9: Procentuální zastoupení živých buněk vystavené stresu pankreatické šťávy



Obrázek 10: Procentuální zastoupení živých buněk vystavené stresu žaludeční šťávy



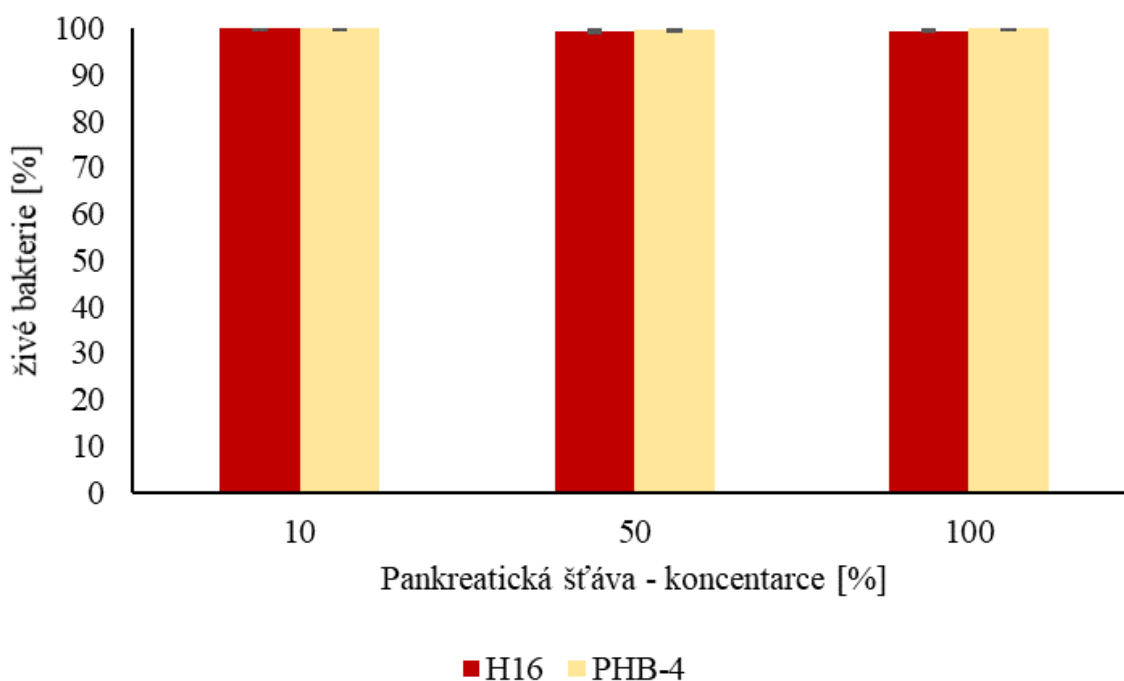
Obrázek 11: Procentuální zastoupení živých buněk vystavené stresu žlučové šťávy

Z výsledků získaných prostřednictvím plotnové metody vyplývá, že akumulace PHA bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16 představuje obecně negativní vliv pro všechny modelové šťávy, což je oproti původním předpokladům, protože na základě literární rešerše jsme předpokládali, že schopnost akumulace PHA bude mít spíše protektivní působení. V případě pankreatické šťávy testovaná metoda vykazuje poněkud zvláštní vliv. Jak lze vidět

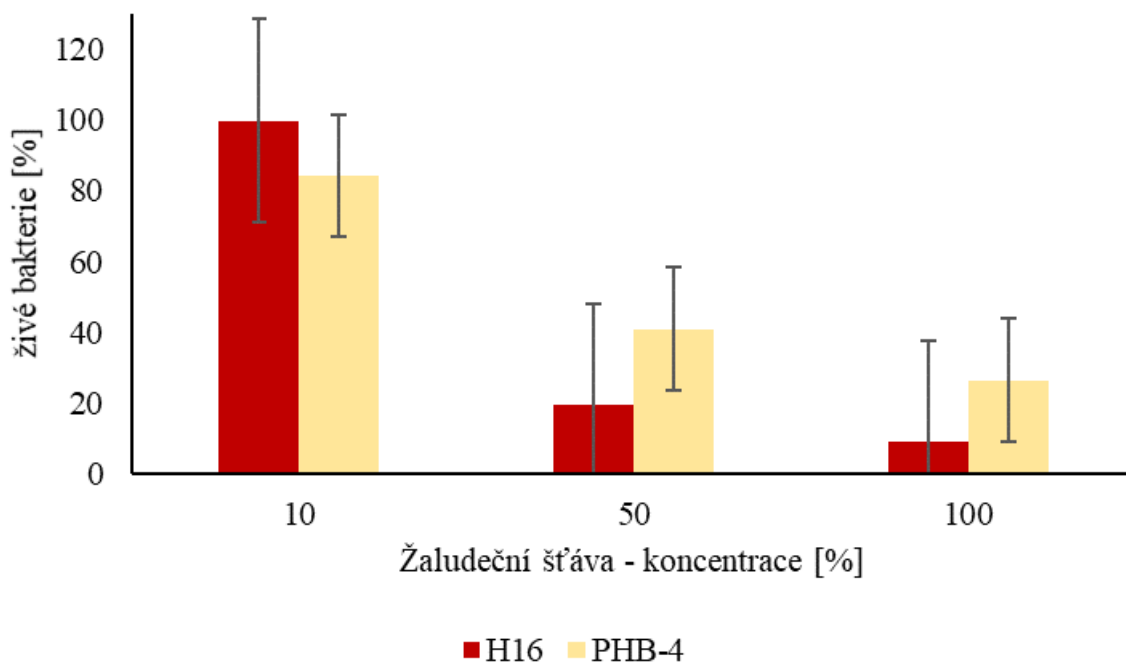
na *Obrázku 9* s rostoucí koncentrací roste i počet živých buněk. Takovéto razantní odchylky výsledků od původních předpokladů mohly být způsobeny odlišnou produkcí zásobních látek. Dále je vhodné zmínit v případě pankreatické šťávy citlivost bakteriálních buněk skrz enzymy, které obsahují. U žaludeční šťávy je citlivost bakteriálních buněk díky přítomnosti proteáz a především velice nízkého pH vyšší.

4.1.2 Využití průtokové cytometrie ke stanovení viability buněk exponovaných gastrointestinálním šťávám

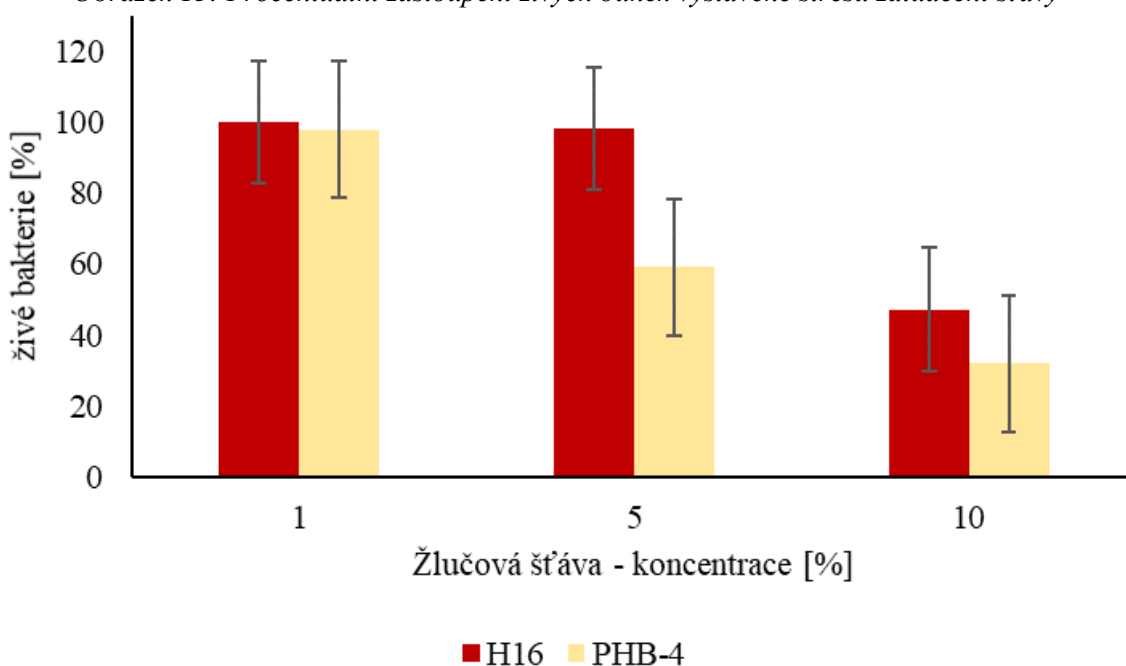
Pro vyhodnocení viability bakterií byla využita jedna z nejpřesnějších metod – průtoková cytometrie. Testované bakteriální kmeny byly kultivovány po dobu 72 hodin a následně byly vystaveny vůči stresům vybraných šťáv (1–2 hod.). Fluorescenční sonda propidium jodid (PI) využívaná pro vyhodnocení, má schopnost interagovat s DNA příslušných buněk. Mrtvé bakteriální buňky propustí díky poškozené membráně do své struktury PI, ten se interkaluje do struktury nukleových kyselin a následně fluoreskuje. Přístroj pak vyhodnotí soubor mrtvých a přeživších buněk. Principiálně jde tedy o odlišný princip stanovení buněčné viability než je plotnová metoda. U průtokové cytometrie je v našem případě za mrtvou buňku označena každá buňka s poškozenou membránou bez ohledu na její metabolickou aktivitu nebo schopnost se dále dělit. Naopak u plotnové metody je za živou buňku označena pouze buňka, která je schopna se dělit. Tento principiální rozdíl je pochopitelně příčinou zdánlivé nekonzistence výsledků obou technik.



Obrázek 12: Procentuální zastoupení živých buněk vystavené stresu pankreatické šťávy



Obrázek 13: Procentuální zastoupení živých buněk vystavené stresu žaludeční šťávy



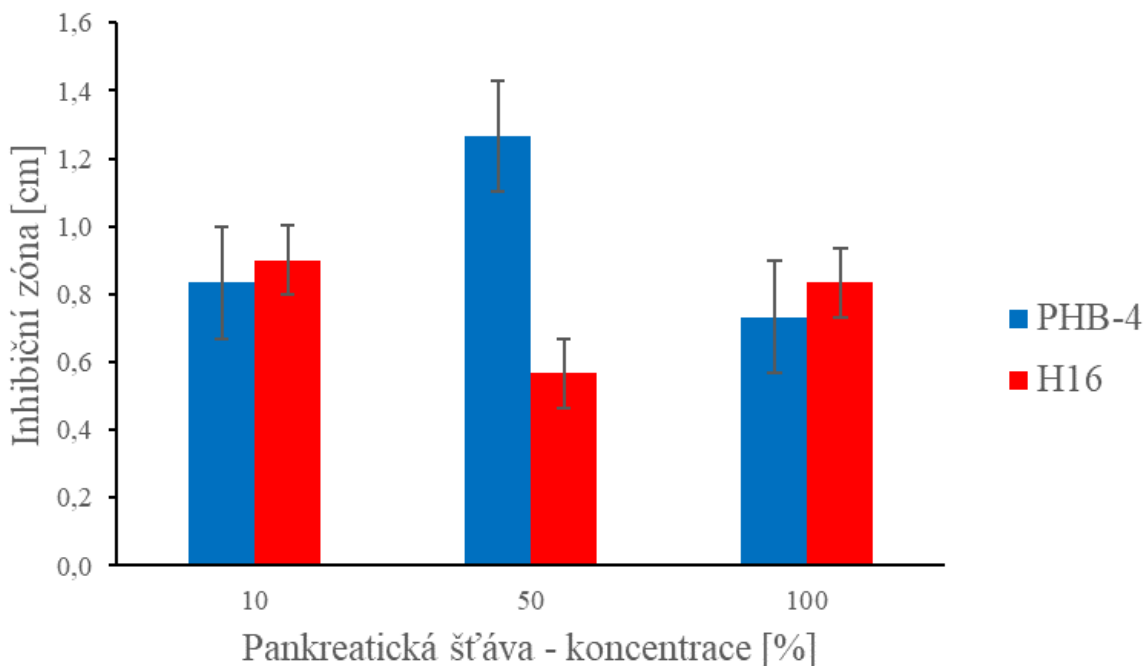
Obrázek 14: Procentuální zastoupení živých buněk vystavené stresu žlučové šťávy

Odchyly z výstupu cytometru mohly být způsobeny tím, že PI se dostal jak do mrtvých, tak i do živých buněk, které měly poškozenou stěnu. Cytometr také mohl vyhodnotit jako živé buňky, které nebyly schopné další reprodukce, což plotnovou metodou určit nelze. Existují i tzv. spící (dormantní) buňky, které mohly způsobit odchylku od reálných výsledků společně s náchylnějšími buňkami, které jsou mrtvé, ale zůstávají celé.

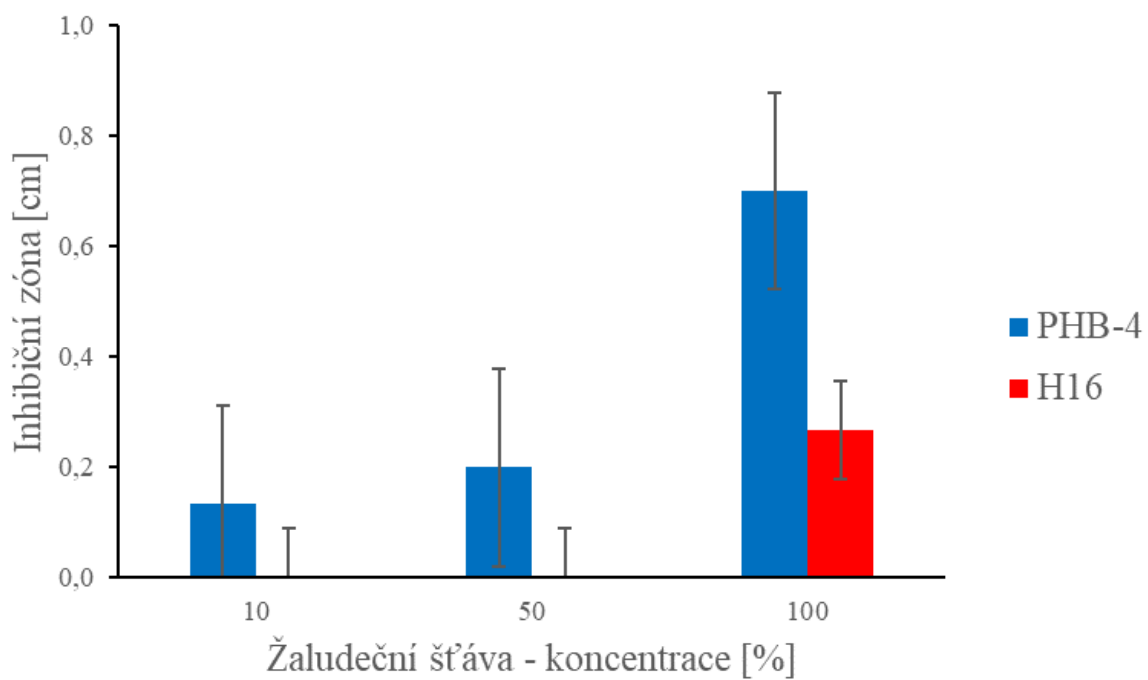
Průtoková cytometrie vyhodnotila, jak lze vidět na *Obrázku 12*, že pankreatická šťáva nemá žádný vliv na vybrané bakteriální kmeny. Znamená to tedy, že modelová šťáva nijak nepoškozuje buněčnou integritu bakteriálního kmene, nicméně podle výsledků plotnové metody překvapivě především v nízké koncentraci poškozuje schopnost buňky se dále dělit. Na *Obrázku 13* a *Obrázku 14*, kde jsou znázorněny výsledky z cytometrie pro modelovou žaludeční a žlučovou šťávu, lze sice pozorovat jisté rozdíly mezi PHA akumulujícími bakteriemi a bakteriemi bez schopnosti produkce PHA, než vypovídá plotnová metoda. Rozdíly jsou však vzhledem k velikosti odchylek stanovené cytometrem statisticky nevýznamné. Dále lze tedy opět říci, že bakteriální kmen *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ je překvapivě odolnější vůči působení stresu gastrointestinálního traktu.

4.1.3 Stanovení vlivu vybraných šťáv pomocí agarové difúzní metody

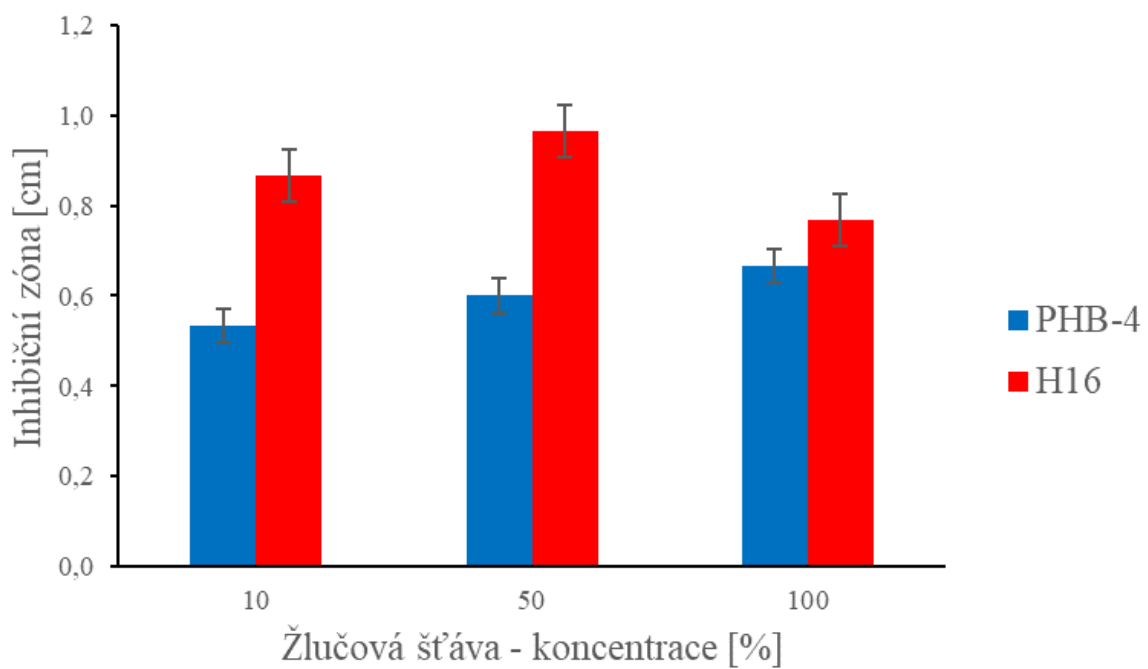
Do předem připravených misek s agarem byly vytvořeny vždy 3 jamky viz *Obrázek 18*, do kterých byly zaočkovány buněčné suspenze obsahující příslušnou šťávu gastrointestinálního traktu. V případě že byl testovaný mikroorganismus schopný růst k vyhloubené jamce znamená to, že na něj šťávy nemají větší vliv, který by mu uškodil. Jestliže má kolem sebe jamka větší zónu, mikroorganismu škodí. Vybrané kultury byly pro experiment zředěny na koncentraci 10^{-2} .



Obrázek 15: Modelová pankreatická šťáva - inhibiční zóna



Obrázek 16: Modelová žaludeční šťáva - inhibiční zóna



Obrázek 17: Modelová žlučová šťáva - inhibiční zóna



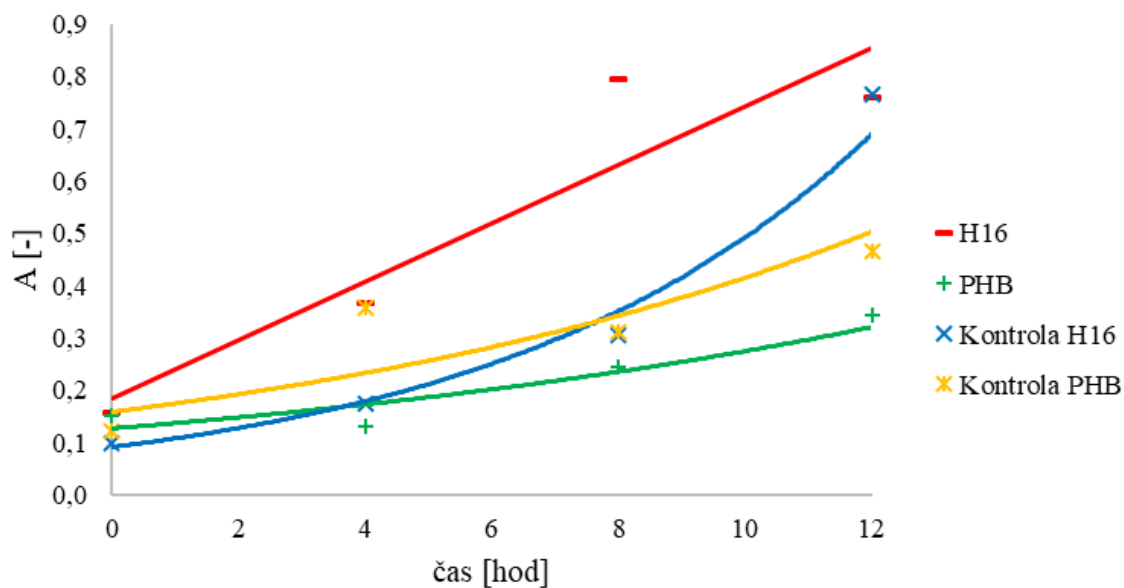
Obrázek 18: Agarová difúzní metoda

Prostřednictvím agarové difúzní metody jsme schopni určit minimální inhibiční zónu bakteriálního kmene. Avšak díky nepatrným rozdílům z výsledků testované techniky můžeme říci, že spolehlivost této metody je minimální. Nicméně i přesto se především u žaludeční šťávy podařilo prokázat překvapivou větší odolnost PHA neakumulujícího kmene *C. necator* PHB⁻⁴, což je v souladu s výsledky plotnové metody a částečně také průtokové cytometrie.

4.1.4 Vyhodnocení bujónové diluční metody

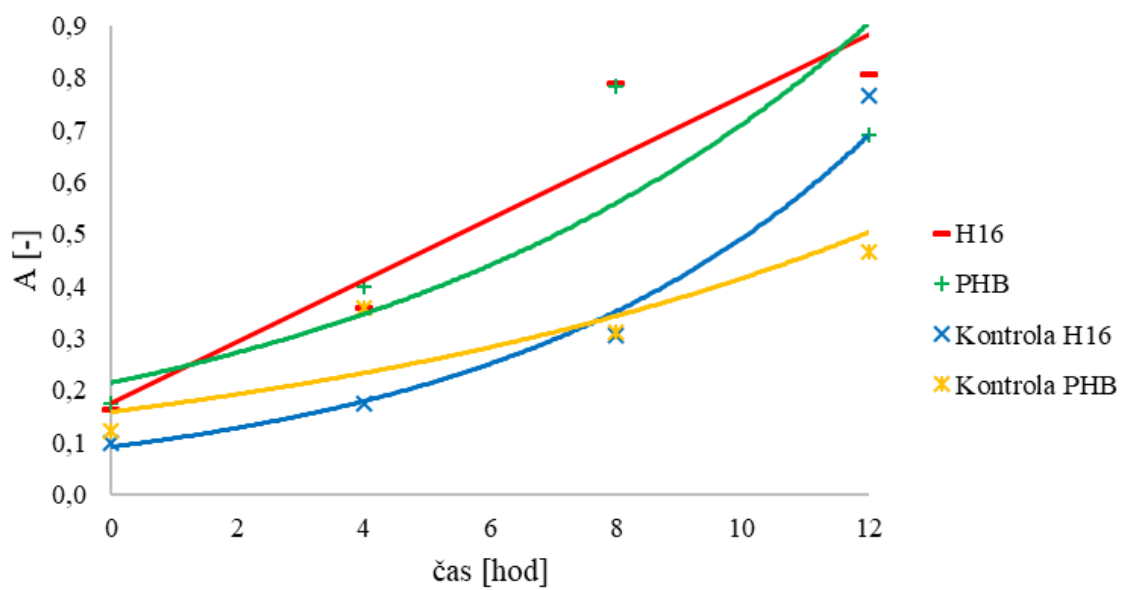
Metoda se provádí na tzv. mikrotitračních destičkách ve sterilním prostředí. Výsledky se vyhodnocují přístrojem (ELISA Reader). Do jamek, jež obsahuje destička se odpipetuje 50 μ l tekutin z gastrointestinálního traktu o určité koncentraci a 150 μ l buněčné suspenze.

Pankreatická šťáva 100%

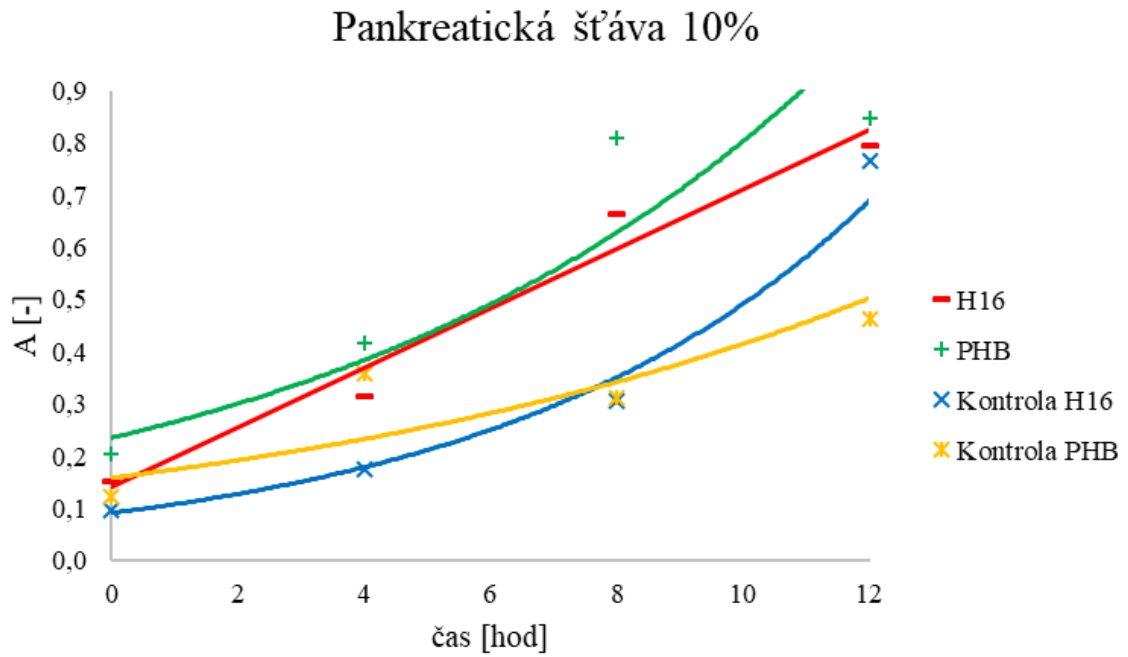


Obrázek 19: Změna absorbance v čase u 100% pankreatické šťavy

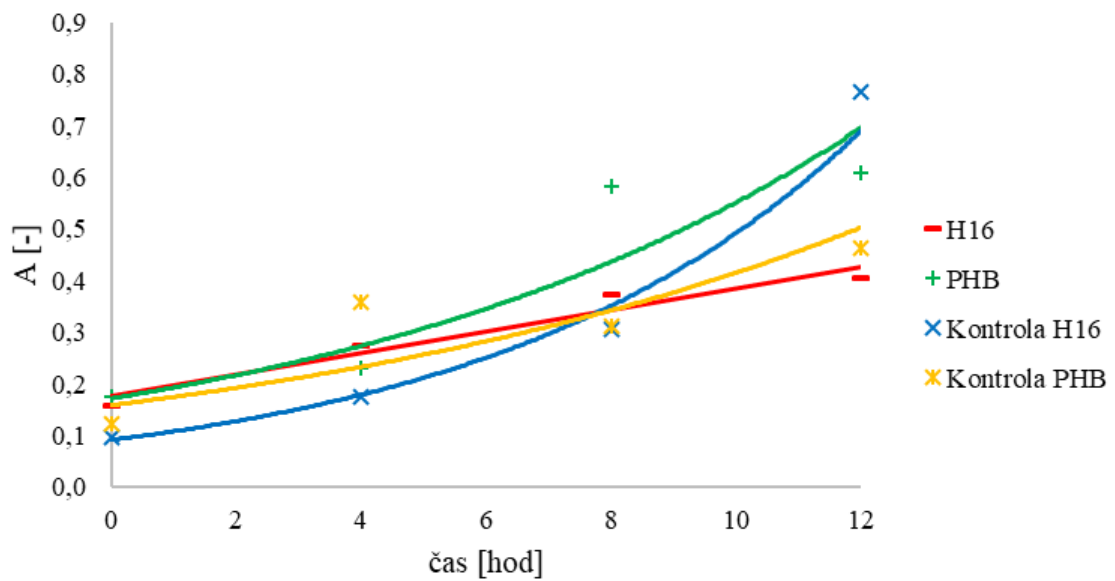
Pankreatická šťáva 50%



Obrázek 20: Změna absorbance v čase u 50% pankreatické šťavy

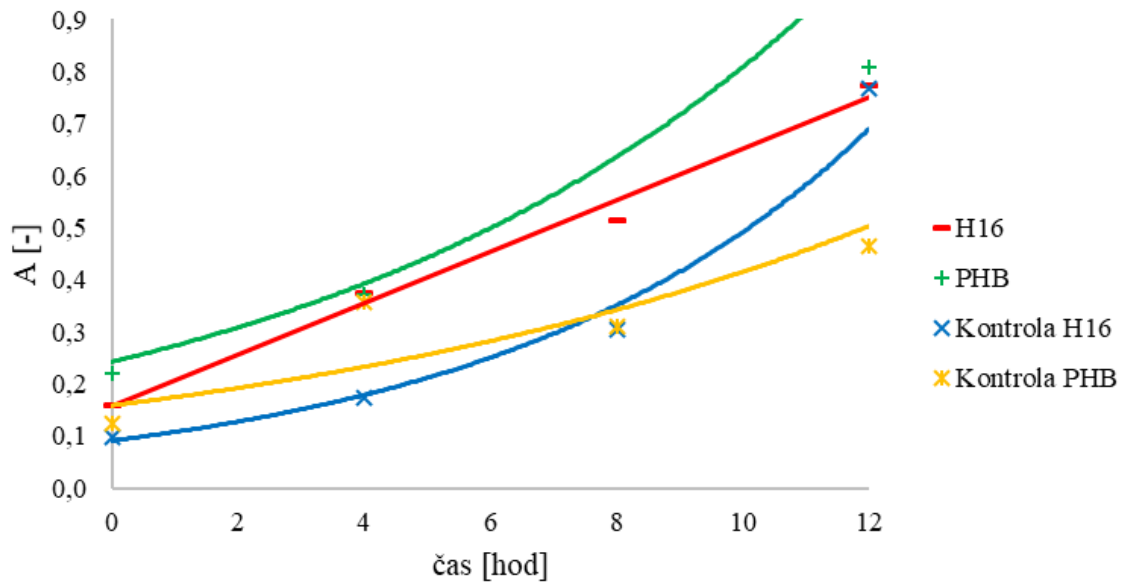


Obrázek 21: Změna absorbance v čase u 10% pankreatické šťavy
Žlučová šťáva 100%



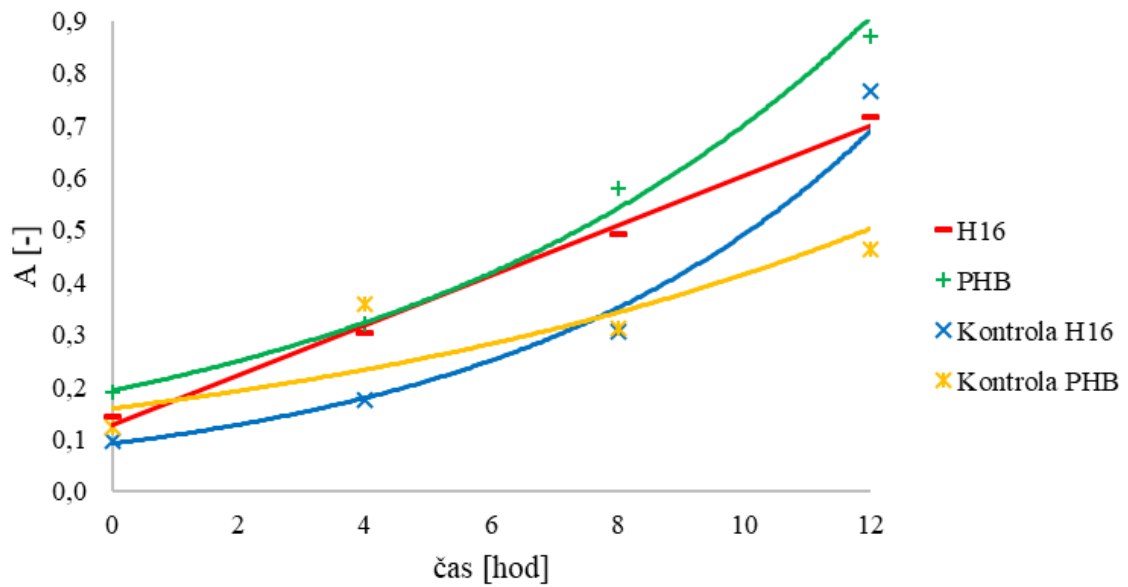
Obrázek 22: Změna absorbance v čase u 100% žlučové šťavy

Žlučová šťáva 50%



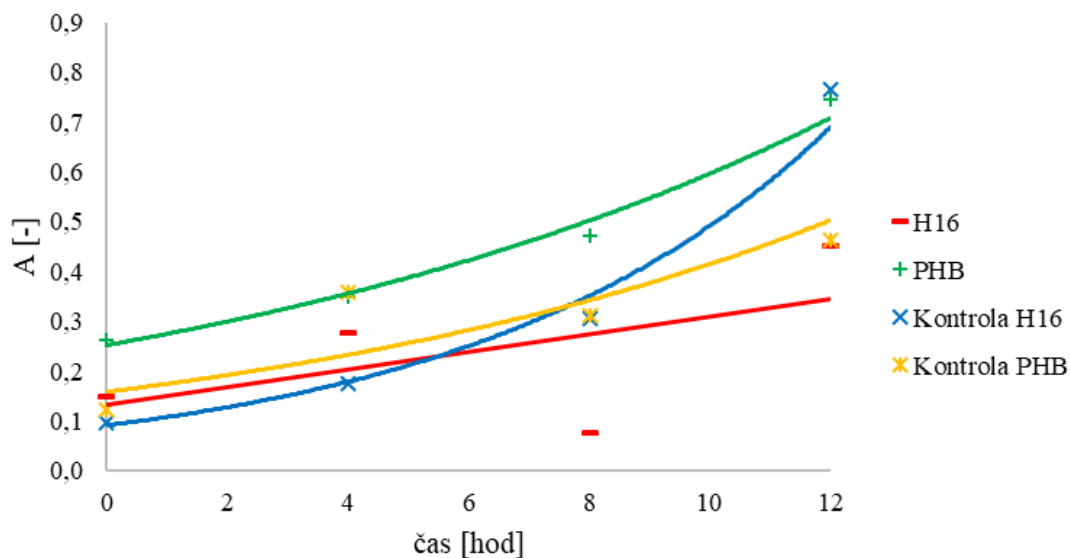
Obrázek 23: Změna absorbance v čase u 50% žlučová šťavy

Žlučová šťáva 10%



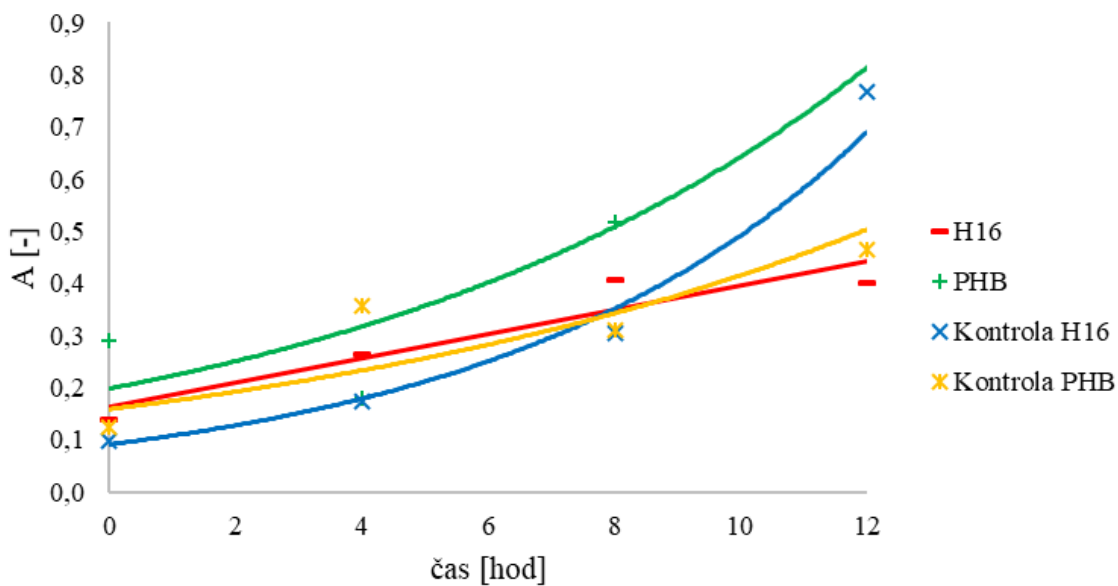
Obrázek 24: Změna absorbance v čase u 10% žlučové šťavy

Žaludeční šťáva 10%



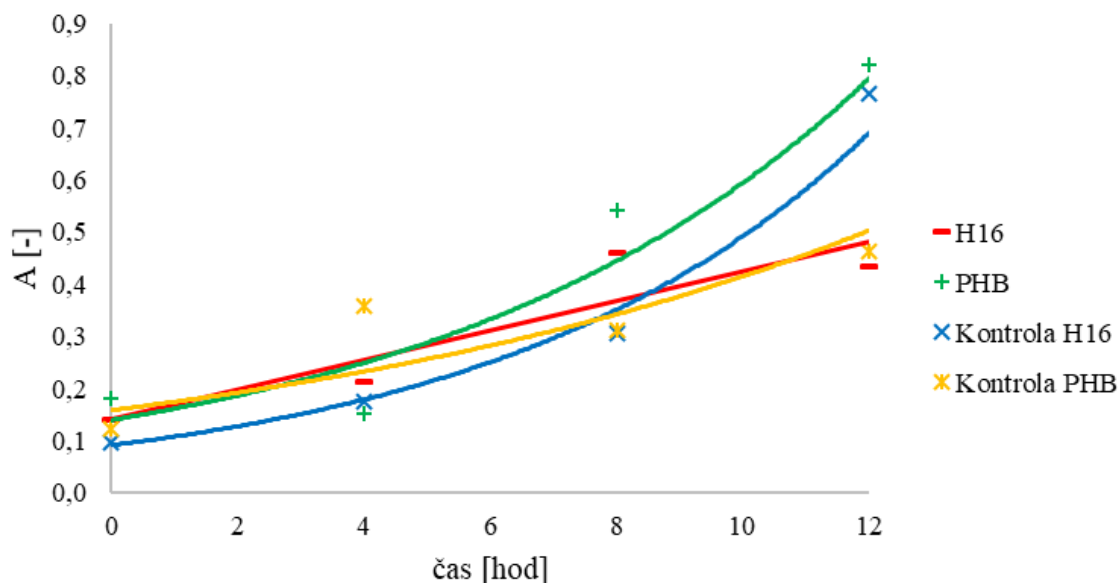
Obrázek 25: Změna absorbance v čase u 10% žaludeční šťavy

Žaludeční šťáva 5%



Obrázek 26: Změna absorbance v čase u 5% žaludeční šťavy

Žaludeční šťáva 1%



Obrázek 27: Změna absorbance v čase u 1% žaludeční šťavy

Bujonová diluční metoda taktéž určuje minimální inhibiční koncentraci pro růst bakteriálního kmene. Při metodě mohly být odchylky způsobené nejen rozpadem buněk (tzv. lyze buněk), které způsobily navýšení hodnot absorbance, jenž mimo to značí schopnost růstu bakterií. Výsledky experimentu jsou nicméně především značně zkreslené díky inkubační teplotě srovnatelnou s tělesnou teplotou. Tomuto zkreslení se bohužel nedalo předejít vzhledem k nutné sterilitě během testování. Celkově vykazovaly bakterie během testu velice nízký růst a to i nestresované kontrolní kmeny, je možné, že především vzhledem k velice pravděpodobné limitaci kyslíkem není v případě kultur *C. necator* kultivace standardních mikrotitračních destičkách vhodná.

5 ZÁVĚR

Cílem mé bakalářské práce bylo stanovit citlivost vybraného bakteriálního kmene vzhledem k nepříznivým vlivům šťáv z gastrointestinálního traktu o různých koncentracích (pankreatická, žaludeční a žlučová šťáva). Je však nutné říci, že zředěné koncentrace modelových šťáv nejsou přítomny v prostředí gastrointestinálního traktu. Nižší koncentrace byly zvoleny pro větší rozsah dat a k přesnějšímu určení citlivosti testovaných kmenů na stresové podmínky trávicího traktu.

Modelovým bakteriálním kmenem byl *Cupriavidus necator* H16, který je schopný akumulace PHA ve formě granulí umístěných v cytoplazmatické membráně bakterie. Dále testovaným mutantním kmenem bez schopnosti akumulace biodegradabilního polymeru byl *Cupriavidus necator* PHB⁴. V experimentu byla pro kultivaci bakterií zvolena tělesná teplota lidského organismu 37 °C. Avšak pro vybraný modelový bakteriální kmen je optimální kultivační teplota 30 °C. Dále byly zvoleny koncentrace šťáv trávicího traktu. Pro pankreatickou a žlučovou šťávu byly vybrány koncentrace 100%, 50% a 10%. V prvních pokusech byly zvoleny stejné koncentrace i pro žaludeční šťávu, ale vzhledem k tomu, že dané prostředí vykazovalo vůči bakterii vysoké bakteriocidní účinky, byly koncentrace upraveny na 10%, 5% a 1%.

Pro určení odolnosti bakteriálního kmene byly provedeny čtyři testovací metody. Prvním z testovaných metod byla agarová plotnová metoda. Následovalo stanovení citlivosti bakterie pomocí průtokové cytometrie. Metody se svými výsledky přesně neshodují. Odlišnost výsledků mohla být způsobena především tím, že cytometr označil životaschopnou buňku, která má poškozenou buňku, kdežto u plotnové metody je selekčním parametrem schopnost se dělit. I přestože je průtoková cytometrie v experimentu nejspolehlivější metodou i zde mohly vzniknout drobné odchylky zapříčiněné proniknutím fluorescenční sondy propidium iodide do bakteriálních buněk, které mají jakkoli poškozenou membránu nebo jsou dormantního charakteru. Nicméně z obou testovaných metod vyplývá jednoznačně negativní vliv pro PHA akumulující kmen, což by mohlo být ovlivněno odlišnou produkcí zásobních látek kmene *Cupriavidus necator* H16. Dále je vhodné zmínit v případě pankreatické šťávy, že se zvyšující se koncentrací roste i viabilita bakteriálních buněk skrz enzymy, které daná šťáva obsahuje. Naopak z průtokové cytometrie je zřejmé, že pankreatická šťáva nepoškozuje buněčné obaly. Dále u žaludeční šťávy lze sice pozorovat jisté rozdíly mezi testovanými kmeny z průtokové cytometrie, ale díky velikosti odchylek jsou tyto rozdíly zanedbatelné, nejsou tedy nijak rozdílné. U modelové žlučové šťávy lze říci totéž. Neakumulující mutant je tedy odolnější vůči působení vybraného stresu.

V další experimentální části byly vybrány o podstatně méně spolehlivé antimikrobiální testy. Prvním z nich byla testována mikrobiální viabilita prostřednictvím agarové difúzní metody. Při této metodě byly zkoumány inhibiční zóny. Vzniklý koncentrační gradient, tak poukázal na minimální koncentraci látek neboli koncentraci inhibující růst. Avšak pro vybrané testované kmeny se výsledky měření nijak výrazně neliší. Spolehlivost testovací techniky je tedy nejmenší. Druhou metodou antimikrobiálních testů byla bujonová diluční metoda.

Analýza určuje opět minimální inhibiční koncentraci pro růst bakteriálního kmene. Při metodě mohly být odchylky způsobené nejen rozpadem buněk (tzv. lyze buněk), které způsobily navýšení hodnot absorbance, jenž mimo to značí schopnost růstu bakterií. Výsledky bujonové diluční metody jsou dále značně zkreslené i vůči nepříznivým podmínkám nastavené inkubační teploty shodné s tělesnou teplotou lidského organismu. Při měření nebylo možné vůči nutné sterilitě osušit víko mikrotitrační destičky.

6 ZDROJE

- [1] ROSYPAL, Stanislav a kolektiv autorů. *Nový přehled biologie*. Praha: NAKLADATELSTVÍ SCIENTA, spol., 2003. ISBN 978-80-86960-23-4.
- [2] RADA, Vojtěch. Využití probiotik, prebiotik a synbiotik. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2010, 2(12), 92-97 [cit. 2019-02-18]. Dostupné z: http://www.internimedcina.cz/artkey/int-201002-0008_Vyuziti_probiotik_prebiotik_a_synbiotik.php
- [3] LUKÁŠ, Karel, Václava KUNOVÁ a Jiří NEVORAL. Probiotika. *PharmaNEWS* [online]. 2004, 4(3), 22-27 [cit. 2019-02-24]. Dostupné z: <http://www.pharmanews.cz/clanek/probiotika-2/>
- [4] KOLÁŘ, Milan, Karel URBÁNEK, Vojtěch HANULÍK a Vladimíra VOJTOVÁ. Vliv antibiotické léčby na vývoj bakteriální rezistence. *SOLENE MEDICAL EDUCATION* [online]. 2010, 4(24), 181-183 [cit. 2019-02-24]. Dostupné z: <http://solen.cz/pdfs/far/2010/04/04.pdf>
- [5] ZBOŘIL, Vladimír. Fyziologie mikroflóry trávicího ústrojí jako základ probiotické terapie. *Zdravotnictví a média* [online]. Masarykova Univerzita, Fakultní nemocnice Brno-Bohunice, Interní-gastroenterologická klinika: Mladá fronta, 2002 [cit. 2019-02-24]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/fyziologie-mikroflory-traviciho-ustroji-jako-zaklad-probiotike-t-149871>
- [6] LEE, Sung Yup. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 1996, 1(49), 1-14 [cit. 2019-02-24]. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960105\)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960105)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P). Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/action/doSearch?ContribAuthorStored=Lee%2C+Sang+Yup>
- [7] MIHULKA, Stanislav ;. POLYHYDROXYALKANOÁTY – Přirozeně odbouratelné plasty. *Gate2Biotech* [online]. České Budějovice: Jihočeská agentura pro podporu inovačního podnikání o.p.s. (JAIP), 2007 [cit. 2019-02-24]. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/polyhydroxyalkanoaty-prorozene-odbouratelne-plasty/>
- [8] HUDECOVÁ, Daniela a Viktor MAJTÁN. *Mikrobiológia I*. Bratislava: Nakladatelství STU v Bratislavě, 2002. ISBN 80-227-1663-4.
- [9] ROSYPAL, Stanislav, Karel HOŤÁK, Theodor MARTINEC a Miloslav KOCUR. *Obecná bakteriologie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, n. p., 1981. ISBN 14-549-81.
- [10] ŠÍPEK, Antonín. Schéma prokaryotní buňky. In: *Genetika-Biologie* [online]. Praha: Národní knihovna ČR, 2014 [cit. 2019-01-02]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/prokaryota>
- [11] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2. vydání. Praha 1: VICTORIA PUBLISHING, 1995. ISBN 80-85605-71-6.
- [12] SKLÁDANKA, Jiří. Fytopatologie cvičení. *Inovace studijních programů AF MENDELU směrem k internacionalizaci studia* [online]. AF Mendelu v Brně: MU, 2012 [cit. 2019-01-

- 02]. Dostupné z:
http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=130&typ=html
- [13] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. vydání. Brno-Jundrov: NEPTUN, 2005. ISBN 80-86850-00-5.
- [14] VOTAVA, Miroslav a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 2. vydání. Brno: NEPTUN, 2003. ISBN 80-902896-6-5.
- [15] OJETTI, V., G. GIGANTE, M.E. AINORA, F. FIORE, F. BARBARO a A. GASBARRINI. Microflora imbalance and gastrointestinal diseases. *Digestive Liver Disease Supplements* [online]. 2009, **3**(2), 35-39 [cit. 2019-01-02]. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1594-5804\(09\)60017-6](https://doi.org/10.1016/S1594-5804(09)60017-6). Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1594580409600176>
- [16] MACELA, Aleš. *Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií*. Praha: Grada, 2006. Malá monografie (Grada). ISBN 80-247-0664-4.
- [17] KAPRÁLEK, František. *Fyziologie bakterií*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986. ISBN 14-600-86.
- [18] ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero, 1999. ISBN 80-902906-0-4.
- [19] KOPECKÁ, Jana a Gabriela ROTKOVÁ. Průběh sporulace. In: *Skripta ke cvicení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií* [online]. Brno: Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, 2017 [cit. 2019-01-02]. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pics/obr_43.jpg
- [20] Biofilms: microbes and disease. In: YADAV, Sarita, Madhu SHARMA a APARNA. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* [online]. India: Scielo, 2008, s. 526-530 [cit. 2019-01-02]. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-86702008000600016>. ISBN 1413-8670. ISSN 1678-4391. Dostupné z: <http://www.scielo.br>
- [21] MAH, Thien-Fah a GA O'TOOLE. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology* [online]. 2001, **issue 1**(volume 9), 34-39 [cit. 2019-01-02]. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01913-2](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01913-2). Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X00019132>
- [22] NADELL, Carey D., Joao B. XAVIER a Kevin R. FOSTER. The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2009, **1**(33), 206-224 [cit. 2019-01-02]. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00150.x>. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsre/article/33/1/206/2683812>
- [23] BARTŮNĚK, Petr, Dana JURÁSKOVÁ, Jana HECZKOVÁ a Daniel NALOS, ed. *Vybrané kapitoly z intenzivní péče*. Praha: Grada Publishing, 2016. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-4343-1.
- [24] DOBIAŠ, Martin. Gastrointestinální trakt - anatomie a fyziologie. *Tvorba a ověření e-learningového prostředí pro integraci výuky preklinických a klinických předmětů na LF a*

FZV UP Olomouc [online]. Ústav patologické fyziologie LF UP Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta, Ústav patofyziologie, 2012 [cit. 2019-01-03]. Dostupné z: <http://pfyziolklin.upol.cz/?p=4375>

[25] CAMPBELL, Neil A. a Jane B. REECE. *Biologie: Anatomie A Fyziologie Živočichů*. Praha: Computer Press, 2006. ISBN 80-251-1178-4.

[26] KARLSON, Peter, Wolfgang GEROK a Werner. *Pathobiochemie*. 2. vydání. Praha: československé akademie věd, 1987. ISBN 21-041-87.

[27] LANGMEIER, Miloš, Otomar KITTNAR, Dana MAREŠOVÁ a Jaroslav POKORNÝ. *Základy lékařské fyziologie*. Praha: Grada Publishing, 2009. ISBN 978-80-247-2526-0.

[28] ŠVESTKA, Tomislav. Mikroflóra trávicího traktu a probiotika. *Medicina pro praxi* [online]. Praha, 2007, **4**(10), 423-425 [cit. 2019-01-03]. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2007/10/09.pdf>

[29] DUCHOŇ, Jiří, Jiří KRAML, Konstantín BARNA, et al. *Lékařská chemie a biochemie*. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, n. p., 1985. ISBN 08-004-85.

[30] LUKÁŠ, Karel a Jiří HOCH, ed. *Nemoci střev*. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-271-0353-9.

[31] LATA, Jan a Jana JURÁNKOVÁ. Střevní mikroflóra, slizniční bariéra a probiotika u některých interních chorob. *SOLENE MEDICAL EDUCATION* [online]. 2011, **7**(5), 212-217 [cit. 2019-03-01]. Dostupné z: www.praktickelekarenstvi.cz/savepdfs/lek/2011/05/04.pdf

[32] SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada, 2014. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-4771-2.

[33] SAARELA, M, L LÄHTEENMÄKI, R CRITTENDEN, S SALMINEN a T MATTILA-SANDHOLM. Gut bacteria and health foods—the European perspective. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2002, **78**(1-2), 99-117 [cit. 2019-03-01]. DOI: 10.1016/S0168-1605(02)00235-0. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160502002350>

[34] ŠVESTKA, Tomislav, 2007. Mikroflóra trávicího traktu a probiotika. *Medicina pro praxi* [online]. U Nemocnice 2, 212 08 Praha, 2007, 2007(4(10), 423-425 [cit. 2018-04-14]. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2007/10/09.pdf>

[35] TKÁČOVÁ, Jana a Mária ANGELOVIČOVÁ. Heat Shock Proteins (HSPs): a Review. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies* [online]. 2012, 2012, **2012**(45), 1-5 [cit. 2019-01-30]. Dostupné z: <http://www.spasb.ro/index.php/spasb/article/view/598/556>

[36] PHADTARE, Sangita, Janivette ALSINA a Masayori INOUYE. Cold-shock response and cold-shock proteins. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 1999, **2**(2), 175-180 [cit. 2019-03-01]. DOI: 10.1016/S1369-5274(99)80031-9. ISSN 13695274. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527499800319>

[37] JEON, Hyun Jeong a Mal Nam KIM. Isolation of mesophilic bacterium for biodegradation of polypropylene. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online].

2016, **115**, 244-249 [cit. 2019-03-01]. DOI: 10.1016/j.ibiod.2016.08.025. ISSN 09648305. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830516303146>

[38] TIAN, Jiamin, Anthony J. SINSKEY a JoAnne STUBE. TEM image of *W. eutropha* at 48 h in PHBU. In: *AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY* [online]. Journal of bacteriology, 1969 [cit. 2019-03-02]. Dostupné z: <https://jb.asm.org/content/187/11/3814/F8>

[39] REINECKE, Frank a Alexander STEINBÜCHE. *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* [online]. 2008, **16**(1-2), 91-108 [cit. 2019-03-02]. DOI: 10.1159/000142897. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18957865>

[40] POHLMANN, Anne, Wolfgang Florian FRICKE, Frank REINECKE, et al. Corrigendum: Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature Biotechnology* [online]. 2007, **25**(4), 478-478 [cit. 2019-03-02]. DOI: 10.1038/nbt0407-478e. ISSN 1087-0156. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nbt0407-478e>

[41] CRAMM, Rainer. Genomic View of Energy Metabolism in *Ralstonia eutropha* H16. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* [online]. 2009, **16**(1-2), 38-52 [cit. 2019-03-02]. DOI: 10.1159/000142893. ISSN 1660-2412. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/142893>

[42] KAHAR, Prihardi, Takeharu TSUGE, Kazunori TAGUCHI a Yoshiharu DOI. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2004, **83**(1), 79-86 [cit. 2019-03-02]. DOI: 10.1016/S0141-3910(03)00227-1. ISSN 01413910. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391003002271>

[43] CASTRO-SOWINSKI, Susana, Saul BURDMAN, Ofra MATAN a Yaacov OKON. Natural Functions of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Microbiology Monographs* [online]. 2009, **1**(14), 39-61 [cit. 2019-02-25]. DOI: 10.1007/978-3-642-03287-5_3. Dostupné z: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-03287-5_3

[44] KADOURI, Daniel, Edouard JURKEVITCH, Yaacov OKON a Susana CASTRO-SOWINSKI. Ecological and Agricultural Significance of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. 2005, **2**(31), 55-67 [cit. 2019-02-25]. DOI: 10.1080/10408410590899228. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408410590899228>

[45] OBRUČA, Stanislav, Petr SEDLÁČEK, Filip MRAVEC, Ivana MÁROVÁ a Ota SAMEK. Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly(3-hydroxybutyrate) accumulating cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2016, **3**(100), 1365–1376 [cit. 2019-02-25]. DOI: 10.1007/s00253-015-7162-4. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-015-7162-4>

- [46] POTTER, M. The complex structure of polyhydroxybutyrate (PHB) granules: four orthologous and paralogous phasins occur in *Ralstonia eutropha*. *Microbiology* [online]. 2004, **150**(7), 2301-2311 [cit. 2019-03-02]. DOI: 10.1099/mic.0.26970-0. ISSN 1350-0872. Dostupné z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.26970-0>
- [47] ZAPLETAL, Martin a Jiří. Izolace polyhydroxyalkanoátů z mikrobiální biomasy. *Chemické listy* [online]. 2016, **10**(12), 1-8 [cit. 2019-03-02]. ISSN 0009-2770. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/120/120>
- [48] CHEN, Yi-Jr, Yan-Chia HUANG a Chia-Yin LEE. Production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas mosselii* TO7. In: *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2014, **118**(2), s. 145-152 [cit. 2019-03-02]. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.01.012. ISSN 13891723. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172314000310>
- [49] FLICKINGER, Michael C. a Stephen W. DREW. *The encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation*. New York: Wiley, c1999. ISBN 978-0471166689.
- [50] SOMLEVA, Maria N., Oliver P. PEOPLES a Kristi D. SNELL. PHA Bioplastics, Biochemicals, and Energy from Crops. *Plant Biotechnology Journal* [online]. 2013, **11**(2), 233-252 [cit. 2019-03-02]. DOI: 10.1111/pbi.12039. ISSN 14677644. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/pbi.12039>
- [51] ZHAO, Wei a Guo-Qiang CHEN. Production and characterization of terpolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) by recombinant *Aeromonas hydrophila* 4AK4 harboring genes *phaAB*. *Process Biochemistry* [online]. 2007, **42**(9), 1342-1347 [cit. 2019-03-02]. DOI: 10.1016/j.procbio.2007.07.006. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511307001870>
- [52] TAN, Giin-Yu, Chia-Lung CHEN, Ling LI, et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA) chemical structure. In: *Polymers* [online]. 2014 [cit. 2019-03-02]. Dostupné z: https://res.mdpi.com/polymers/polymers-06-00706/article_deploy/html/images/polymers-06-00706-g001-1024.png
- [53] WAHL, Andreas, Nora SCHUTH, Daniel PFEIFFER, Stephan NUSSBERGER a Dieter JENDROSSEK. PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in *Ralstonia eutropha*. *BMC Microbiology* [online]. 2012, **12**(262), 1 [cit. 2019-02-25]. DOI: 10.1186/1471-2180-12-262. Dostupné z: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-12-262>
- [54] BRESAN, Stephanie, Anna SZNAJDER, Waldemar HAUF, Karl FORCHHAMMER, Daniel PFEIFFER a Dieter JENDROSSEK. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids. *SCIENTIFIC REPORTS* [online]. 2016, **6**(26612), 1 [cit. 2019-02-25]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/srep26612>

- [55] Figure 8: Model of an in vivo PHB granule in *R. eutropha* H16. In: *Scientific Reports* [online]. Scientific Reports: Springer Nature Publishing, 2016 [cit. 2019-02-25]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/srep26612/figures/8>
- [56] BRÁNSKÁ, Barbora, Michaela LINHOVÁ, Petra PATÁKOVÁ, Leona PAULOVÁ a Karel MELZOCH. STANOVENÍ VIABILITY MIKROORGANISMŮ POMOCÍ FLUORESCENČNÍ ANALÝZY. *Chemické listy* [online]. 2011, **105**(8), 586-593 [cit. 2019-03-02]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Barbora_Branska/publication/267544506_STANOVENI_VIABILITY_MIKROORGANISMU_POMOCI_FLUORESCENCNI_ANALYZY/links/55e4ad9908ae6abe6e903052.pdf
- [57] ORMEROD, Michael G. Flow Cytometry. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine* [online]. Weinheim, Germany, 2006, 2006-09-15 [cit. 2019-03-02]. DOI: 10.1002/3527600906.mcb.200300144. ISBN 3527600906. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/3527600906.mcb.200300144>
- [58] MACEY, Marion G. *Flow cytometry: principles and applications*. Totowa, N.J.: Humana Press, c2007. ISBN 978-1588296917.
- [59] THERMO FISHER. Propidium iodide. *Thermo Fisher* [online]. 2006 [cit. 2019-03-02]. Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp01304.pdf>
- [60] BALOUIRI, Mounyr, Moulay SADIKI a Saad Koraichi IBNSOUDA. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. 2016, **6**(2), 71-79 [cit. 2019-03-02]. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005. ISSN 20951779. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095177915300150>