



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

**VYUŽITÍ SPEKTROSKOPICKÝCH METOD PŘI STUDIU
STRESOVÉ ODOLNOSTI BAKTERIÍ NA ÚROVNI
JEDNOTLIVÝCH BUNĚK**

UTILIZATION OF SPECTROSCOPY IN STUDY ON STRESS-RESISTANCE OF BACTERIA ON THE SINGLE-CELL LEVEL

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Klaudia Köbölová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1273/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Klaudia Kőbőlová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Využití spektroskopických metod při studiu stresové odolnosti bakterií na úrovni jednotlivých buněk

Zadání diplomové práce:

1. Vypracovat literární rešerši na téma diplomové práce.
2. Navrhnout modelový experiment pro experimentální popis účinků různých typů fyzikálních nebo chemických stresů na vybrané modelové mikroorganismy.
3. Vybrat vhodné analytické metody v dispozici pracoviště pro popis stresové odolnosti modelových mikroorganismů na úrovni jednotlivých buněk.
3. Otestovat a zhodnotit využitelnost vybraných metod na základě výsledků modelového experimentu.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019:

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

Bc. Klaudia Kőbőlová
student(ka)

Ing. Petr Sedláček, 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

Táto diplomová práca sa zaoberá možnosťami analýzy stresovej odolnosti bakteriálnych buniek *Cupriavidus necator* H16 a PHB⁻⁴ pomocou spektroskopických metód a otestovaním vhodnosti akridinovej oranži ako viabilného farbiva. Na základe literárnej rešerše boli navrhnuté vhodné analytické metódy, konkrétne prietokový cytometer a fluorescenčný mikroskop.

Prvá časť experimentálnej práce bola zameraná na fluorescenčný mikroskop, ktorým bol potvrdený základný charakter akridinovej oranži. Na sledovanie viability boli vybrané tri stresové faktory, 50% a 70% etanol a kyslé pH (pH = 1). Baktérie po expozícii etanolom fluoreskovali zelenou farbou a vedľa buniek sa nachádzali červené škvry, čo naznačuje ich stratu integrity. V kyslom prostredí baktérie fluoreskovali červene, pretože došlo k čiastočnému porušeniu DNA. Výsledky boli overené kombináciou propídium jodidu so SYTO9 a pri tejto metóde sa osvedčila vhodnosť akridinovej oranži. Obrazové záznamy boli spracované pomocou obrazovej analýzy.

V druhej časti bola akridinová oranž použitá pri sledovaní fluorescencie pomocou prietokového cytometra. Výsledkom merania bola fluorescencia vyjadrená vo forme histogramov pre jednotlivé kanály, kde fluorescencia bola charakterizovaná mediánom a priemernou intenzitou. Porovnaním použitých metód sa akridinová oranž javí ako vhodnejšie fluorescenčné farbivo pre mikroskop ako pre prietokový cytometer, v ktorom bolo zložitejšie získať informácie o životaschopnosti buniek. V poslednej časti experimentálnej práce boli skúmané zaujímavé fotofyzikálne vlastnosti akridinovej oranži.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Cupriavidus necator, prietokový cytometer, fluorescenčný mikroskop, akridinová oranž, propídium jodid, SYTO9, stres

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the possibilities of stress resistance analysis of the *Cupriavidus necator* H16 and PHB⁻⁴ bacterial cells by spectroscopic methods and by testing the suitability of acridine orange as a viable dye. Based on research in literature, suitable analytical methods have been proposed, namely flow cytometer and fluorescence microscope.

The first part of the experimental work was focused on the fluorescence microscope, which confirmed the basic character of acridine orange. Three stress factors, 50% and 70% ethanol, and acidic pH (pH = 1) were selected for viability monitoring. The bacteria fluoresced with green color after exposure to ethanol and red spots were found next to the cells, indicating their loss of integrity. In an acidic environment, the bacteria fluoresced red because of a partial DNA breakdown. The results were verified by the combination of propidium iodide with SYTO9 and the acridine orange suitability proved to be useful in this method. Image records were processed using image analysis.

In the second part, acridine orange was used to monitor fluorescence using a flow cytometer. The result of the measurement was fluorescence expressed as histograms for individual channels, where fluorescence was characterized by median and mean intensity. By comparing the methods used, the acridine orange appears to be a more suitable fluorescent dye for the microscope than for a flow cytometer in which it was more difficult to obtain cell viability information. In the last part of the experimental work interesting photophysical properties of acridine orange were investigated.

KEY WORDS

Cupriavidus necator, flow cytometry, fluorescence microscope, acridine orange, propidium iodide, SYTO9, stress

KÖBÖLOVÁ, Klaudia. *Využití spektroskopických metod při studiu stresové odolnosti bakterií na úrovni jednotlivých buněk*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113447>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petr Sedláček

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Na tomto mieste by som chcela poďakovať vedúcemu mojej diplomovej práce Ing. Petrovi Sedláčkovi, Ph.D. za jeho odborné vedenie, užitočné rady, trpezlivosť a za pomoc pri riešení experimentálnej časti. Ďalej moja obrovská vďaka patrí Ing. Evy Slaninovej za pomoc pri práci v laboratórií, a za podporu. V neposlednom rade moje poďakovanie patrí doc. Ing. Stanislavovi Obručovi, Ph.D., Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. a RNDr. Márii Veselej, Ph.D. za vedenie a pomoc pri práci s metódami.

OBSAH

1	Úvod	8
2	Teoretická časť	9
2.1.	Baktérie a stres.....	9
2.1.1.	Stresová odpoveď baktérii	10
2.1.2.	Charakterizácia vybraných stresových faktorov	11
2.2.	Polyhydroxyalkanoáty	13
2.2.1.	Štruktúra a vlastnosti	13
2.2.2.	Zapojenie PHA do stresovej odpovedi	15
2.2.3.	Využitie.....	15
2.3.	Modelový mikroorganizmus – <i>Cupriavidus necator</i>	16
2.3.1.	Taxonómia	16
2.3.2.	Vlastnosti a metabolizmus	17
2.4.	Fluorescencia	19
2.4.1.	Fluorofóry a ich využitie pri charakterizácii bakteriálnych buniek	20
2.4.2.	Charakterizácia vybraných fluorescenčných sond.....	22
2.4.3.	Prietoková cytometria	24
2.4.4.	Fluorescenčná mikroskopia	26
3	Súčasný stav riešenej problematiky.....	28
4	Experimentálna časť	31
4.1.	Použité mikroorganizmy, chemikálie a prístroje	31
4.1.1.	Použité mikroorganizmy.....	31
4.1.2.	Použité chemikálie.....	31
4.1.3.	Použité prístroje	31
4.2.	Kultivácia baktérii	32
4.2.1.	Živné média	32
4.2.2.	Skladovanie bakteriálnych kultúr a príprava inokula	32
4.3.	Meranie stresovej odpovedi.....	33
4.3.1.	Expozícia bakteriálnych buniek etanolom	33
4.3.2.	Expozícia bakteriálnych buniek v kyslom pH	33
4.4.	Príprava fluorescenčných sond	33
4.4.1.	Použitie propidium jodidu a SYTO9	33
4.4.2.	Farbenie bunečných kultúr akridinovou oranžou	34

4.5.	Postup analýzy na prietokovom cytometry	34
4.6.	Postup analýzy na epifluorescenčnom mikroskopy.....	35
5	Výsledky a diskuzia.....	36
5.1.	Stanovanie stresovej odozvy buniek pomocou fluorescenčného mikroskopu .	36
5.1.1.	Farbenie s akridinovou oranž.....	36
5.1.2.	Farbenie s pripídium jodidom a SYTO9.....	42
5.2.	Stanovenie stresovej odozvy buniek pomocou prietokového cytometra.....	46
5.2.1.	Farbenie s akridinovou oranž.....	46
5.2.2.	Farbenie so SYTO9 a PI	52
5.3.	Obrazová analýza	53
5.4.	Zaujímavé atribúty pozorované u fluorescencie akidinovej oranži.....	66
6	Záver.....	71
7	Zoznam použitých zdrojov	74
8	Zoznam použitých skratiek a symbolov	85
9	Príloha.....	86

1 ÚVOD

V posledných 20 rokov došlo k pozoruhodného nárastu v používaní fluorescencie v biologických vedách. V súčasnosti je dominantnou metodikou, lebo detekcia je vysoko citlivá a nie sú potrebné drahé ťažko manipulovateľné rádioaktívne indikátory. V biologických vedách sa používa hlavne pre identifikáciu a delenie buniek v prietokovom cytometri alebo pri zobrazovaní bunkových zložiek a štúdiu zmien v morfológii buniek pomocou fluorescenčného mikroskopu.

Baktérie patria medzi najviac zastúpené organizmy na svete. Sú to vysoko premenlivé mikroorganizmy, ktoré vďaka svojej prispôsobivosti obsadili každý biotop na Zemi. Jedna z najzákladnejších otázok, ktorú mikrobiológovia riešia je otázka, či bakteriálna bunka je živá alebo mŕtva. Život je všeobecne charakterizovaný prítomnosťou štruktúry, premenlivou genetickou informáciou, metabolizmom a schopnosťou rozmnožovania a rastu. Zastúpenie životaschopných čiže viabilných buniek v populácii je jednou z kľúčových informácií využívaných k hodnoteniu fyziologického stavu kultúry. Tradičnou technikou na stanovenie životaschopnosti je kultivácia na pevných médiách, avšak táto metodika má svoje obmedzenia a je časovo náročná. Preto boli vyvinuté alternatívne postupy, medzi ktoré patrí aj fluorescenčná analýza. Stanovenie viability buniek je založené na detekcii životne dôležitých funkcií, ktoré sú sledované pomocou selektívneho značenie fluorescenčnými sondami.

Cieľom tejto diplomovej práce je posúdiť vhodnosť epifluorescenčného mikroskopu pri štúdiu stresovej odozvy bakteriálnych buniek. Ako modelový organizmus pre tento účel bola vybraná baktéria *Cupriavidus necator* H16 a jej mutantný kmeň *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴. Stresová odpoveď bola sledovaná pri dvoch vybraných stresových faktorov, a to etanol a kyslé pH. Tieto stresy boli vybrané z dôvodu odlišnosti pôsobenia, kým etanol rozrušuje membrány, zatiaľ čo kyslé pH má denaturačné účinky na DNA. Na stanovenie životaschopnosti buniek boli vybrané dve metódy, konkrétne epifluorescenčný mikroskop a prietokový cytometer. Mikroskop patrí medzi jednoduchšie metódy, ktorý udáva vizuálnu informáciu o štruktúre a stave buniek. Prietokový cytometer analyzuje vzorku taktiež na úrovni jednej bunky, avšak za niekoľko sekúnd je schopný detegovať tisíce buniek. Ako fluorofór na meranie bola vybraná kombinácia propídium jodidu so SYTO9, ktorý je súčasťou komerčného kitu. Ďalším cieľom bolo sledovať použiteľnosť akridinovej oranži ako vhodného fluorescenčného farbiva pre stanovenie životaschopnosti buniek. Táto sonda bola vybraná z dôvodu zaujímavého charakteru farbenia a následne porovnaná k bežnému kitu.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1. Baktérie a stres

Baktérie sú jednobunkové prokaryotické organizmy, ktoré z pohľadu fyziológie tvoria jednu z najpestrejších skupín mikroorganizmov. Prokaryotická bunka je charakteristická svojou štruktúrnou jednoduchosťou a rozmerom. Z hľadiska morfológie sú pomerne jednotné a medzi jednotlivými rodmi nepozorujeme veľké rozdiely. Tvar buniek je najčastejšie tyčinkovitý, guľovitý a niekedy špirálovitý [1]. Priemerná veľkosť je približne v rozsahu od 0,5 μm do 5 μm u kokov (guľovitých baktérií), tyčinky majú obvykle hrúbku v rozmedzí 0,3–2 μm a dĺžku 1–7 μm [2]. Pričom veľkosť baktérii v rámci druhov je ovplyvnená podmienkami prostredia, v ktorom rastú, starobou kultúry a fyziologickým stavom [3].

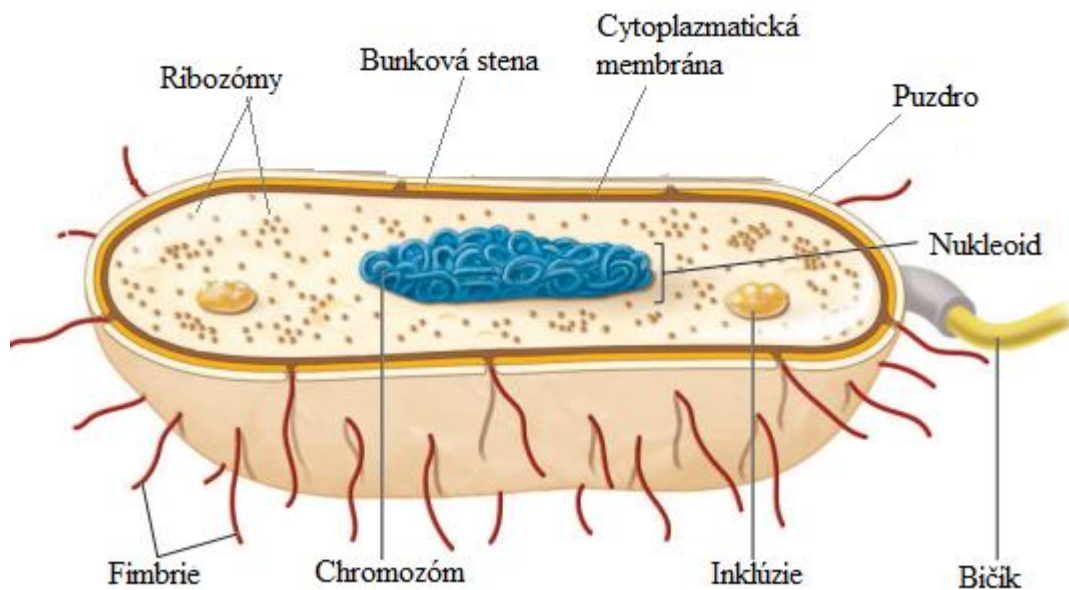
Narozdiel od bunky eukaryotickej, bunka prokaryotická sa vyznačuje svojou jednoduchosťou. Rozoznávame v prokaryotickej bunke základné štruktúry ako bunková stena, cytoplazmatická membrána, cytoplazma, ribozómy, a jadrová hmota (nukleoid). Okrem týchto základných štruktúr môžu mať baktérie tiež doplnkové útvary, ako napríklad puzdro, bičíky, spory alebo zásobné inkúzie vid'. obr. 1 [3].

Hlavným znakom prokaryotickej bunky je tzv. nepravé jadro, ktoré nie je ohraničené membránou od cytoplazmy. Toto jadro sa nachádza v strede cytoplazmy a tvorí asi 10 % objemu bunky. Označuje sa aj ako nukleoid a je tvorené z jednej molekuly dvojzávitnicovitej DNA, ktorej tvar býva často kružnicový [4]. Mnoho baktérii okrem jadrovej DNA obsahujú v cytoplazme DNA vo forme malých kruhových uzavretých molekúl tzv. plazmidov. Plazmidy nesú doplnkovú genetickú informáciu a kódujú funkcie (rezistenciu voči antibiotikom ai.), ktoré síce nie sú životne nepostrádateľné, ale umožňujú baktérii prežiť v rôznych podmienkach [1].

Významnou zložkou prokaryotickej bunky je cytoplazma bakteriálnej bunky, ktorá je tvorená z vodného viskózneho roztoku, respektívne gélu, ktorý obsahuje anorganické i organické rozpustné látky. V cytoplazme sa nachádzajú všetky už spomenuté bunkové komponenty a zásobné látky. Významnou zložkou cytoplazmy prokaryot je vysoký obsah RNA [5]. Ribozóm je bunkový komponent, ktorý má tvar elipsovitého telieska s priemerom 20 μm a je tvorený RNA a bielkovinami. Ich vysoký počet v bunke umožňuje rýchlu syntézu bunečnej hmoty [3].

Medzi ďalšie časti prokaryotickej bunky patrí cytoplazmatická membrána, ktorá obklopuje cytoplazmu a je chránená bunkovou stenou. Táto membrána je jemná, tenká a zložená z fosfolipidov a proteínov, ktoré tvoria až 50–70 % jej sušiny. Membrána je semipermeabilná a tvorí osmotickú bariéru nepriepustnú pre niektoré látky s malou hmotnosťou, zatiaľ čo bunková stena baktérii je pevná, elastická a chráni pred nepriaznivými vplyvmi. Základnú zložku bunkovej steny tvorí heteropolymér peptidoglykán, tvorený molekulami N-acetylglukozaminu a N-acetylmuramovej kyseliny. Funkciou peptidoglykánu je tvorba opornej kostry bunkovej steny a zároveň podmieňuje rigiditu steny. Na peptidoglykánovú kostru sa môžu viazať rôzne látky, ktoré sú rozdielne pri gramnegatívnych a grampozitívnych baktériách [6]. U grampozitívnych baktérii peptidoglykanová zložka obsahuje viac vrstiev

a na vonkajšej strane sú naviazané molekuly kyseliny teichoové. Gramnegatívne baktérie majú ďalšiu vonkajšiu membránu, ktorá má vysokú priepustnosť. Táto vonkajšia vrstva obsahuje lipopolysacharidy, ktoré často určujú antigénne vlastnosti bakteriálneho povrchu [7].



Obr. 1: Štruktúra bakteriálnej bunky [6]

2.1.1. Stresová odpoveď baktérii

Život mikroorganizmov a ich vývoj je priamo závislý na vonkajšom prostredí. Aby sa mohli rozmnožovať a rásť potrebujú dostatočné množstvo surovín pre syntézu bunkovej hmoty a zdroje využiteľnej energie. Zároveň musia byť splnené vhodné fyzikálne, chemické a biologické podmienky. Baktérie sú schopné prispôbiť sa vonkajším podmienkam nie len zmenou enzýmového vybavenia svojich buniek, ale do určitej miery sú schopné zmeniť tvar a zloženie buniek, aby boli odolnejšie voči nepriaznivým podmienkam. Napríklad častá morfológická zmena je tvorba endospórov, ktoré im pomáhajú pri prežití hladovania alebo sa stávajú rezistentné voči teplote a žiareniu. Ďalší obranný mechanizmus sa prejavuje napr. pri druhoch, ktoré sú pohyblivé a môžu sa pohybovať smerom k zdroju živín alebo naopak od zdroja jedovatých látok. Tiež veľmi záleží o akú skupinu baktérii sa jedná vzhľadom ku tolerancii voči teplotám (termofily, hypertermofily atď.), pH (neutrofilny, acidofily, alkalofily), osmotickému tlaku (halofily) a iné. Avšak všetky schopnosti baktérii, ktoré im pomáhajú pri prekonaní nepriaznivých situácií majú určitý limit. Po prekročení tohto limitu dochádza k inhibícii až k zastaveniu rastu alebo aj k usmrteniu buniek [1; 8].

Ako už bolo spomenuté na začiatku, stresová odpoveď u baktérii má mimoriadny význam, pretože biotop, v ktorom baktérie žijú sa neustále mení a i samotný organizmus môže byť stresovým faktorom. Baktérie vyvinuli rýchlu reakciu na molekulárnej úrovni, ktorá opravuje poškodenia vyvolané stresom a následne ochraňuje bunky v prípade vystavenia rovnakému alebo rozdielnemu stresu [9]. Odozva na vyvolaný stres dosahuje až do génovej expzie určitých génov, ktorých produkty sú potrebné na boj proti inhibičnému pôsobeniu stresu [10].

Tabuľka 1: Príklady exogénnych stresových faktorov [8]

Fyzikálny stres	Chemický stres	Biologický stres
Teplotný šok	Etanol a ďalšie metabolické toxiny	Bunkové starnutie
Osmotický šok	Hladovanie	Genotypové zmeny
Dehydratácia, vysušenie	Oxidačný stres	Konkurencia inými organizmami
Vysoký hydrostatický tlak	pH šok	-
Šmykový stres	Kovové ióny	-
Radiácia	Chemická mutagenéza	-

Jedna skupina transkripčných faktorov, ktorá hrá veľkú úlohu v stresovej rezistencii je podjednotka RNA polymerázy sigma faktor. Asociácia rôzneho sigma faktoru prítomného v bakteriálnej bunke s katalytickým jadrom RNA polymerázy je nevyhnutná pre iniciáciu transkripcie, kde pomáha pri rozpoznávaní promótorovej oblasti. Každý z niekoľkých sigma faktorov v bunke je potrebný na transkripciu špecifickej podskupiny génov, konkrétne operónov v rámci ich regulónu [10; 11]. Sigma faktory sú rozdelené do dvoch štruktúrne nesúvisiacich skupín: skupina σ^{54} a σ^{70} . Podjednotky obsahujúce skupinu σ^{54} sa často označujú ako σ^N , lebo ich hlavná funkcia je regulácia metabolizmu dusíka. Oproti tomu skupina σ^{70} je väčšia a rôznorodejšia a je rozdelená do štyroch skupín na základe primárnych sekvencií a štruktúr. Do skupiny I patria primárne sigma faktory (napr. *Bacillus subtilis* σ^A), ktoré sú označované aj ako „housekeeping“ sigma faktory. Táto skupina riadi transkripciu génov dôležitých pre rast a metabolizmus baktérií. Sigma faktory vo zvyšných skupinách sú označované ako alternatívne sigma faktory, pretože často regulujú špecifické fyziologické procesy, napr. sporuláciu [11]. Pričom aktívny komplex RNA polymerázy so sigma faktorom je kontrolovaný väzobným partnerom známym ako anti-sigma faktor, ktorý môže byť regulovaný napríklad cieľenou proteolýzou alebo fosforyláciou [10].

Ďalším obranným mechanizmom na stres je fosforylácia. Je to dvojzložkový regulačný systém, ktorý sa skladá zo senzorickej kinázy, ktorá je kanonicky membránovo zabudovaná a z regulátoru odpovede. Po prijatí stresového signálu fosfokináza autofosforyluje histidín pred prenesením fosforylovej skupiny na nemenný aspartát, a tým aktivuje svoju latentnú biologickú aktivitu. Regulátory odpovede sú najčastejšie aktivátory transkripcie, ktoré aktivujú promótor tým, že regulujú a stimulujú začiatok transkripcie interakciou so sigma-viazanou RNA polymerázou. Okrem obranných mechanizmov, ktoré spôsobia na molekulárno-biologickom úrovni existuje ešte celá rada nešpecifických mechanizmov, ako napríklad produkcia kompatibilných solutov (tzv. chemické chaperony) [10].

2.1.2. Charakterizácia vybraných stresových faktorov

Táto diplomová práca sa zaoberá štúdiom vybraných stresov, konkrétne pôsobením etanolu a kyslého pH, pretože patria medzi najbežnejšie používané stresové faktory a majú odlišný mechanizmus pôsobenia na bunkovú smrť.

Antibakteriálne účinky etanolu

Alkoholy patria medzi najpoužívanejšie dezinfekčné prostriedky a antiseptiká. Sú baktericidné a fungicidné, avšak nie sú schopné zničiť spóry. Medzi najpoužívanejšie alkoholické germicídy patrí etanol a izopropylalkohol [6].

Etanol je inhibítorom rastu pri relatívne nízkych koncentráciách, zatiaľ čo vysoké koncentrácie znižujú vitalitu buniek a spôsobujú bunkovú smrť. Etanol ďalej ovplyvňuje bunkový metabolizmus znižovaním množstva akumulácie RNA a proteínov, denaturovaním intracelulárnych biomolekúl a znižovaním ich aktivity [12].

Keďže etanol je malá molekula schopná voľne prechádzať cez bakteriálne membrány, môže byť považovaný ako chemický analóg vody, ktorý obsahuje hydroxylové skupiny a je schopný vytvárať vodíkové väzby. Pri tvorbe týchto väzieb dochádza ku konkurencii medzi etanolom a vodou, avšak etanol je menej polárny ako voda, a kvôli tomu účinnejšie interaguje a prevyšuje molekuly vody v hydrofóbnom jadre membrány. Nahradenie molekúl vody objemnejšími molekulami etanolu môže zmeniť skladanie a interakcie makromolekúl ako v cytoplazme, tak aj v membráne. Tento efekt znižuje pevnosť hydrofóbných interakcií a oslabuje membránovú bariéru, čím zvyšuje polaritu, permeabilitu membrány a teplotnú labilitu. Okrem toho môže viesť k zmenám i v samotnej štruktúre proteínov [13].

Vplyv pH

Rast mikroorganizmov a ich biochemická aktivita je silne ovplyvnená tiež koncentráciou vodíkových iónov v prostredí. Ako už bolo vyššie spomenuté, každý druh je schopný rásť v určitom rozsahu pH, tzv. jeho pH optime. Podľa pH optima delíme mikroorganizmy do 3 skupín. Acidofily majú svoje pH optimum medzi 0 a 5,5, neutrofilny pH medzi 5,5 a 8, alkalofily pH medzi 8 a 12,5. Pričom väčšina baktérii rastie v neutrálnom a slabo alkalickom prostredí. Zmeny vonkajšieho pH tiež môže zmeniť ionizáciu molekúl živín a tým znížiť ich dostupnosť pre organizmus [6; 1].

Mikroorganizmy v prírode väčšinou rastú v širokom rozsahu pH, často ďaleko od svojho optima. Avšak každý organizmus má svoje limity tolerancie. Keď je vonkajšie pH nízke, koncentrácia vodíkových katiónov je omnoho väčšia ako vo vnútri bunky a vodíkové katióny budú mať tendenciu pohybovať sa do cytoplazmy a znižovať tak cytoplazmatické pH. Cytoplazma je schopná do určitej koncentrácie H^+ sa chovať ako pufrovací systém, avšak drastické zmeny pH nie je schopná kompenzovať. Extrémne pH potom ovplyvňuje štruktúru biomolekúl a poškodzuje cytoplazmatickú membránu. Napríklad vodíkové väzby v DNA sa rozkladajú pri bazickom pH alebo zmena koncentračného gradientu H^+ narúša produkciu energie, ATP. Najcitlivejšou zložkou bunky na pH sú proteíny, ktoré sú zásadné pre život organizmov. Preto i mierne zmeny pH modifikujú ionizáciu funkčných skupín aminokyselín a dochádza k narušeniu vodíkovej väzby, čo spôsobuje zmeny v skladaní proteínu, denaturáciu a stratu aktivity. Väčšina mikróbov umiera, ak vnútorné pH klesne výrazne pod 5,0 až 5,5 [6; 14].

2.2. Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) sú biopolyméry, ktoré boli objavené francúzskym vedcom Lemoigne v roku 1925. Od objavenia sú v strede pozornosti vďaka svojich dobrým vlastnostiam ako je biodegradabilita a biokompatibilita, čím ponúkajú veľký aplikačný potenciál pri náhrade ropných zdrojov. PHA sú syntetizované mikroorganizmami ako hydrofóbne intracelulárne granule, a to len za určitých podmienok, konkrétne pri nadbytku uhlíka a pri limitnej koncentrácii esenciálnych rastových živín, ako je dusík alebo fosfor. Tieto intracelulárne granule tvoria podstatnú časť bunky (až 90 %), kde jadro PHA je obklopené proteínovým obalom, ktorý tak tvorí fázové rozhranie medzi hydrofóbnym PHA a hydrofilnou cytoplazmou. Bakteriálna produkcia PHA primárne ako úložisko zásobného materiálu má tiež podľa nových poznatkov ochrannú úlohu pred rôznymi stresmi (UV, teplo, ai.) vid'. kapitola 2.2.2 [15; 16].

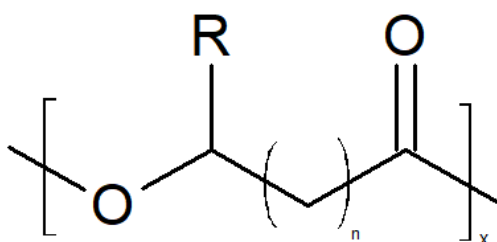
2.2.1. Štruktúra a vlastnosti

PHA patrí do triedy lineárnych polyesterov skladajúcich sa z hydroxykyselinových monomérov spojených esterovou väzbou. V závislosti na počte atómov uhlíka v monoméroch sú PHA klasifikované do troch skupín na PHA s krátkym (scl – *short chain lenght*), stredným (mcl – *medium chain lenght*) a dlhým (lcl – *long chain lenght*) reťazcom. Scl-PHA obsahujú menej ako 5 atómov uhlíka v monomére, mcl-PHA majú 5 až 14 atómov uhlíka v monomérnej jednotke a tretia skupina lcl-PHA sa skladá z viac ako 14 atómov uhlíka v monomére. Posledná skupina je menej častá a kvôli tomu je doteraz pomerne málo študovaná.

Bočný reťazec môže byť nasýtený alebo nenasýtený, môže obsahovať rozvetvené, aromatické, halogénované alebo aj epoxidované monoméry. Veľmi často sa používajú rôzne chemické modifikácie bočných reťazcov PHA, ktorých význam je predovšetkým k tomu, aby sa pridala požadovaná funkčná skupina do prírodných PHA, ktoré do značnej miery ovplyvňujú materiálové vlastnosti polymérov.

Okrem štruktúry bočného reťazca môžeme materiálové vlastnosti ovplyvniť aj tvorbou kopolymérov. V závislosti na baktérii a použitom substráte sú baktérie schopné produkovať kopolyméry, konkrétne scl-kopolyméry, ako napr. poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) a mcl-kopolyméry, ako napr. poly(3-hydroxyhexanoát-co-3-hydroxyoktanoát). Okrem toho niektoré baktérie produkujú aj scl-mcl-kopolyméry a pri vhodných podmienkach sú baktérie schopné syntetizovať dokonca i blokové kopolyméry [16; 17].

Vlastnosti jednotlivých druhov PHA sú veľmi odlišné, keďže sú závislé na jednotlivých typov inkorporovaných monomérov, ktoré sú zase priamo závislé na druhu bakteriálneho producenta a fermentačných podmienkach. Materiálové vlastnosti PHA sú porovnateľné s petrochemickými polymermi, ako je polypropylén a polystyrén (vid'. tabuľka 2).



Obr. 2: Štruktúra polyhydroxyalkanoátu, kde $n=1-4$, $x=100$ až $300\ 000$, R - reprezentuje alkylový bočný reťazec [16]

PHA je nerozpustný vo vode, má dobrú odolnosť voči hydrolytickému napadnutiu a je odolný voči UV žiareniu. Okrem toho ako už bolo spomenuté je biokompatibilný a biologicky odbúrateľný, a chová sa ako piezoelektrické materiály. PHA je rozpustný v chloroforme a iných chlórovaných rozpúšťadlách [17].

Tabuľka 2: Porovnanie vlastností scl-PHA, mcl-PHA, poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerátu), poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyoktanoátu) s polypropylénom [16]

	Homopolymér scl-PHA	Homopolymér mcl-PHA	Kopolymér poly(3-HB-co-3-HV)	Kopolymér poly(3-HB-co-3-HD)	Polypropylén
Teplota topenia [°C]	179	80	137-170	130	176
Teplota skleného prechodu [°C]	4	-40	-6 až 10	-8	-10
Youngov modul [GPa]	3,5	-	0,7-2,9	-	1,7
Ťažnosť pri pretrhnutí [%]	40	300	30-38	680	38
Pevnosť v ťahu [MPa]	5	20	Viac ako 690	17	400

Scl-PHA sú vysoko kryštalické s vysokou teplotou topenia a nízkymi teplotami skleného prechodu. Vysoká kryštalinita (55–80%) ich robí tuhými a krehkými materiálmi. Teplota topenia je v rozsahu od 173 do 180 °C, zatiaľ čo teplota skleného prechodu leží medzi 5 a 9 °C. Kopolyméry s krátkym reťazcom, ako je poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát), sú známe ako lepšie materiály v porovnaní scl-homopolymérmí, pretože ich teplota topenia je oveľa nižšia a sú menej kryštalické, ľahšie sa formujú a sú tvrdšie..

Zatiaľ čo mcl-PHA pôsobia ako elastoméry vo veľmi úzkom teplotnom rozsahu kvôli ich nízkej teplote topenia. Ich teplota topenia je v rozsahu 39 až 61 °C a je silne závislá od tepelnej histórie materiálu. Teplota skleného prechodu mcl-PHA je zvyčajne nižšia ako teplota miestnosti a sú približne z 25% kryštalické. Vďaka týmto vlastnostiam sú mcl-PHA flexibilnejšie a pružnejšie materiály ako scl-PHA [16; 18].

2.2.2. Zapojenie PHA do stresovej odpovedi

Ako už bolo spomenuté v kapitole 2.1.1 baktérie vďaka svojim schopnostiam sa vedia do určitej miery prispôbiť na zmeny prostredia. Príkladom je akumulácia PHA, ktorá pomáha baktérii prežiť v prostredí s kolísavou dostupnosťou živín. Okrem svojej primárnej skladovacej funkcie má PHA aj ďalšie fyziologické úlohy ako napríklad udržiavanie anoxickej fotosyntézy [19].

Akumulácia PHA tak môže zvýšiť schopnosť prežitia týchto baktérií v extrémnych prostrediach. Napríklad baktérie izolované z polárnych oblastí, konkrétne z Antarktického prostredia *Pseudomonas extremaustralis* je schopný syntetizovať PHA. Podľa výsledkov štúdie [20] je PHB nevyhnutný pre rast baktérií pri nízkej teplote a pomáha tolerovať oxidačný stres odvodený z hladu. Obruča a kol. sledovali rozdiel medzi PHA produkujúci kmeňom a PHA-negavítnym kmeňom pri rôznych stresových podmienkach. Ochranný účinok PHB bol sledovaný pri mrazení a rozmrazovaní, ktoré predstavuje kombináciu niekoľkých stresových faktorov. Výsledky preukázali, že PHA hrá dôležitú úlohu pri prežívaní baktérii a tiež má aj kryprotektívne účinky [21]. Ďalej bol potvrdený jeho protektívny účinok proti UV žiareniu. Granule majú schopnosť rozptyľovať UV žiarenie, chrániť bakteriálnu DNA pred žiarením a zabráňujú generovaniu reaktívnych foriem kyslíka [22]. Zhao a kolektív porovnávali PHA produkujúci kmeň proti PHA-negavítnemu kmeňu pri rôznych stresových podmienkach, ako nízka a vysoká teplota, UV žiarenie, etanolový, osmotický a oxidatívny stres. Výsledky merania v každom prípade potvrdili, že kmeň produkujúci PHA bol odolnejší voči stresom, ktorým bol vystavený počas experimentu [23].

Ochranný mechanizmus intracelulárnych PHA granúl je spôsobený ich amorfitou. Keď sú bakteriálne bunky vystavené stresom dochádza k indukcii agregácie granúl a k následnej kryštalizácii polyméru [24].

2.2.3. Využitie

Ako už bolo spomínané, PHA sú považované za možnú biodegradabilnú alternatívu petrochemických polymérov. Na druhej strane, široká škála ich východiskových vlastností (termoplastičita, atoxicita, biokompatibilita) so sebou nesie aj niektoré nevýhody, ako napr. vysoká cena a niektoré horšie mechanické vlastnosti (odolnosť). Dneska ešte neexistuje žiadna aplikácia vo vysokom objeme. PHA majú veľkú budúcnosť v biomedicíne, poľnohospodárstve a ako priemyselné suroviny, ktoré sú bližšie popísané v nasledujúcom odstavci [18].

Najznámejšia a najmenej náročná z hľadiska materiálových požiadavok je aplikácia PHA vo forme baliaceho materiálu. V tejto oblasti môže slúžiť ako alternatívne a možné riešenie na zníženie množstva odpadu. Konkrétne poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) je schválený ako materiál, ktorý môže prísť do styku s potravinami, vďaka tomu sa používa pri balení potravín a krmív. PHA sa môže použiť na výrobu denných komoditných položiek, ako sú holiace strojčky, plienky, hygienické výrobky, šálky, riad, igelitové tašky, fľaše alebo v poľnohospodárstve môže slúžiť na výrobu mulčovacej fólie. Ďalšie využitie je v papierenskom priemysle vo forme latexových povlakov. Vďaka tomu poťahovaný papier by

bol pevnejší, lesklý a hlavne by bol biologicky odbúrateľný na rozdiel od papier, ktorý je potiahnutý bežnými fóliami [25].

PHA je dnes najviac využívaný v oblasti medicíny. Vďaka svojim skvelým vlastnostiam je vhodným kandidátom pre biomedicínske aplikácie. Jedna z možností je implantátový materiál na báze PHA, ktorý nespôsobuje imunitnú reakciu v hostiteľských organizmoch, podporujúci adhéziu a proliferáciu buniek/tkanív, a je považovaný za biologicky bezpečný. PHA môže byť použiteľný pri fixácii zlomenín alebo ako materiál pre opravu a regeneráciu poškodených tkaní. Ďalšou potenciálnou oblasťou je kontrolované uvoľňovanie liečiva, hlavne vďaka ľahko modifikovateľnej štruktúre, kontrolovanej difúzii a kryštalinite zvyšujúcej retenciu liečiva v polymérnej matici. Ďalšie možnosti využitia sú: obvazy, chirurgické špendlíky, skrutky, stehy alebo sofistikované chirurgické predmety (krvné cievy a žilné chlopne, chrptové fúzne kliečky a kľby) [26; 27].

2.3. Modelový mikroorganizmus – *Cupriavidus necator*

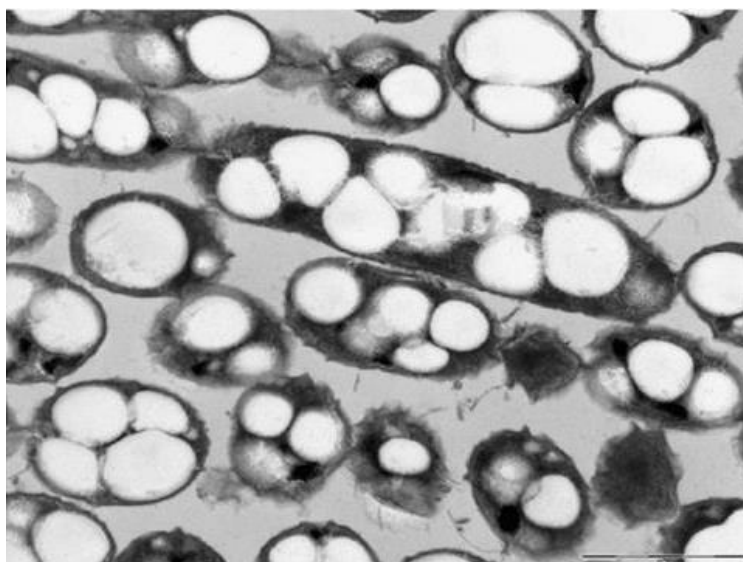
Ako modelové mikroorganizmy pre meranie v tejto diplomovej práci boli vybrané dva bakteriálne kmene *Cupriavidus necator* z dôvodu dlhodobého štúdia na pracovisku Fakulty chemické VUT v Brne, ktorý slúži ako modelový organizmus produkujúci polyhydroxyalkanoáty a zároveň k štúdiu stresovej odolnosti. Konkrétne boli vybrané bakteriálne kmene *Cupriavidus necator* H16 a jeho mutantný kmeň *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, ktorý neakumuluje PHA.

2.3.1. Taxonómia

Cupriavidus necator počas rokov prešiel mnohými zmenami pomenovania. V 20. storočí tento kmeň patril do skupiny *Hydrogenomonas*, do tzv. skupiny „vodíkových baktérií“. Do tejto skupiny patrili mikroorganizmy, ktoré sú aeróbne chemolitotrofy a sú schopné využívať oxidáciu molekulárneho vodíka ako zdroj energie. Ďalej sú gramnegatívne baktérie s bičíkom a s charakteristickou žltou pigmentáciou. Neskoršie práce ukázali, že predpoklad o tom, že patrí do tejto skupiny je nepravdivý. Po ďalších analýzách a charakterizáciách bunkovej morfológie a metabolizmu sa ukázalo, že *Hydrogenomonas eutropha* má degenerované peritrichálne bičíky. Preto bol tento bakteriálny kmeň zaradený do rodu *Alcaligenes* a premenovaný na *Alcaligenes eutrophus* [28]. V roku 1995 na základe skúmania fenotypu, zloženia lipidov a mastných kyselín, fylogenetickej analýzy nukleotidovej sekvencie 16S rRNA sa zistilo, že patrí do rodu *Ralstonia* a bolo navrhnuté meno *Ralstonia eutropha* [29]. Po ďalšom štúdiu sa zistilo, že rod *Ralstonia* obsahuje fenotypovo a genotypovo dve odlišné skupiny. Nový rod *Wautersia* bol vytvorený z jednej skupiny, ktorá má charakteristické znaky ako peritrichálne bičíky, neschopnosť produkovať kyseliny z glukózy a citlivosť na kolistín. *Ralstonia eutropha* bol reklasifikovaný do tohto nového rodu a bol premenovaný na *Wautersia eutropha* [30]. V tom istom roku *Wautersia eutropha* bola porovnaná už s dlhodobo známou baktériou *Cupriavidus necator*. Po aplikácii elektroforetickej analýzy a DNA-DNA hybridizácie sa zistilo, že sa jedná o rovnaký organizmus. Vzhľadom k tomu, že pomenovanie *Cupriavidus necator* je najstaršie podľa Medzinárodného kódexu nomenklatury baktérii bol tento názov pridelený k tomu mikroorganizmu [31].

2.3.2. Vlastnosti a metabolizmus

Cupriavidus necator H16 je nepatogénny gramnegatívny mikroorganizmus patriaci do β -podtriedy *Proteobacterii*. Tento bakteriálny kmeň sa vyskytuje v pôdnych a sladkovodných biotopov a je prispôsobený aj k podmienkam anoxie. Jedná sa o litoautotrófnu baktériu, ktorá má schopnosť alternatívne využívať molekulový H_2 a CO_2 ako zdroj energie a uhlíka v neprítomnosti organických zlúčenín. Ďalšou charakteristickou vlastnosťou je, že tento kmeň je schopný akumulovať PHB vo forme granúl. Granule sú bunkové inklúzie zložené z hydrofóbného jadra a proteínového obalu a tvoria až 90% bunky vid'. obr. 3. Okrem toho, že *Cupriavidus necator* H16 zohráva kľúčovú úlohu pri skúmaní chemolitoautotrófie, slúži ako modelový organizmus polyhydroxyalkanoátového metabolizmu už viac ako 50 rokov [33]. Ďalším známym reprezentantom je jeho mutantný kmeň *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴. Tento kmeň podobne ako i ďalšie PHB-negatívne mutanty, bol pripravený v laboratórnych podmienkach. Okrem neschopnosti produkovať polyhydroxybutyrát (PHB) má rovnaké vlastnosti ako *Cupriavidus necator* H16 a je často využívaný pre identifikáciu génov PHB syntázy z iných baktérií [34].



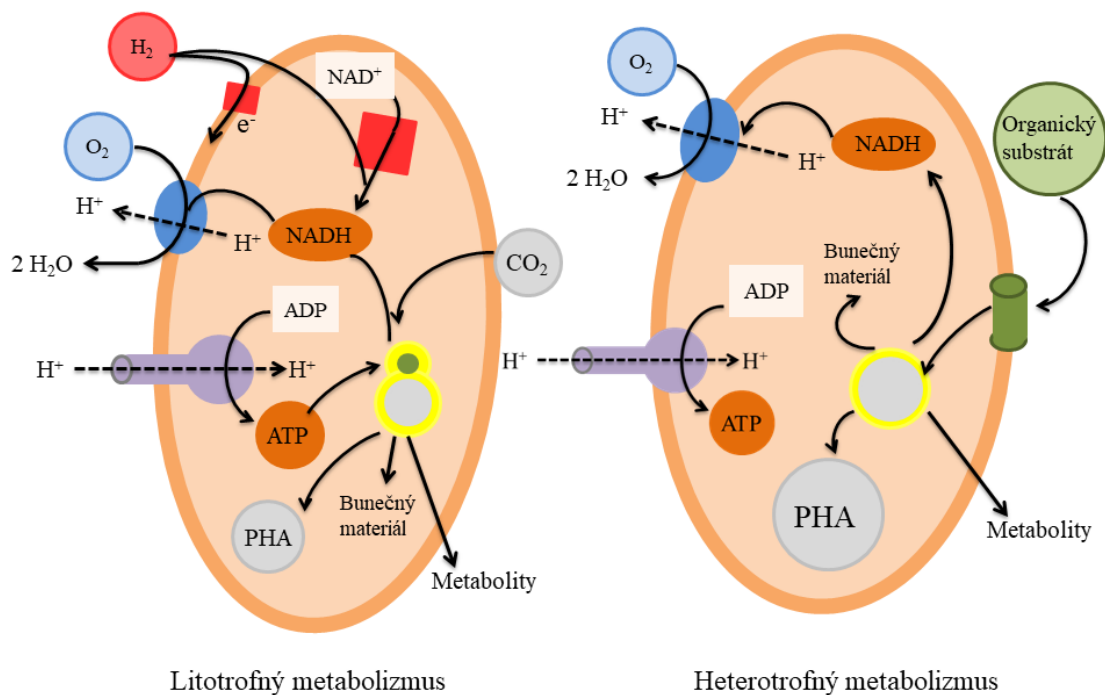
Obr. 3: Morfológia baktérii *Cupriavidus necator* H16 z transmisného elektrónového mikroskopu [32]

Jednou z vlastností *Cupriavidus necator* H16 je jeho schopnosť prepínať medzi heterotrofným rastom a autotrofnou fixáciou CO_2 . Podobne ako všetky proteobakteriálne litoautotrofy, aj tento kmeň používa Calvin-Benson-Basshamovu dráhu na fixáciu CO_2 . Ako zdroj energie slúži molekulárny vodík, ktorý je oxidovaný NiFe hydrogenázmi. Rýchlosť rastu je najviac ovplyvňovaná pomerom plyných substrátov, konkrétne H_2 , O_2 a CO_2 [33; 35].

Pre heterotrofný rast je schopný využívať širokú škálu organických zlúčenín. Typické substráty sú medzi produkty citrátového cyklu, cukorné kyseliny, mastné kyseliny alebo aminokyseliny. Schopnosť metabolizovať cukry u kmeňa *Cupriavidus necator* H16 je obmedzená na fruktózu a N-acetylglukozamín, kedy fruktóza je metabolizovaná prostredníctvom Entner-Doudorffovej dráhy. Dôvodom je, že kľúčové enzýmy Embden-Meyerhoff-Parnas a pentózofosfátovej dráhy, konkrétne fosfofruktokináza a 6-

fosfoglukonátdehydrogenáza, sú enzymaticky neaktívne [35; 36]. Heterotrófny a litoautotrófny metabolizmus je znázornený na obr. 4.

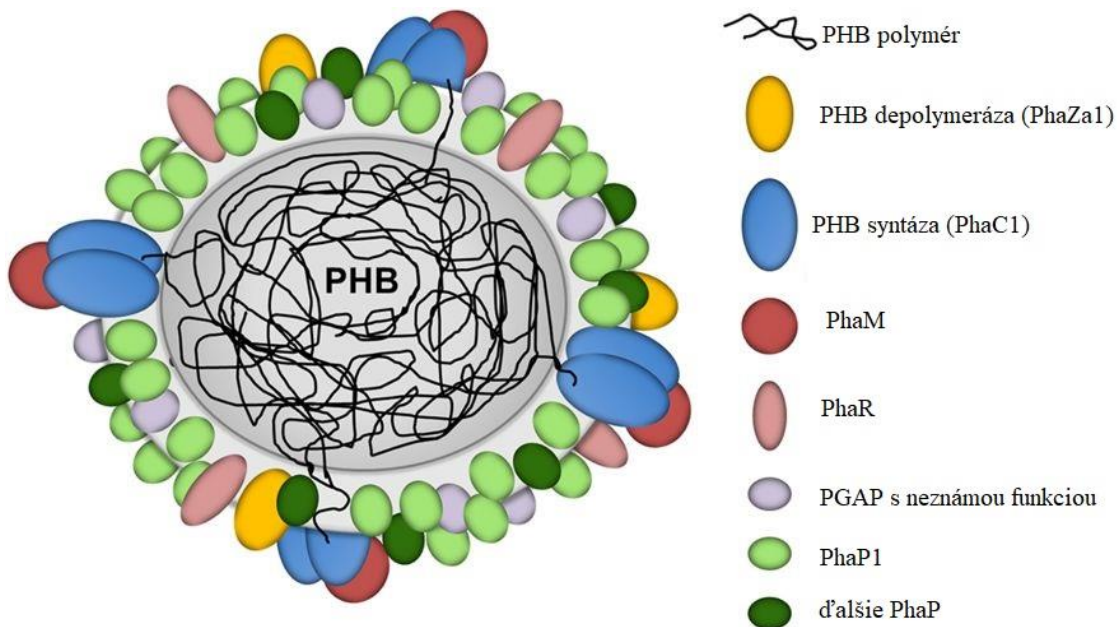
Medzi ďalšie vlastnosti *Cupriavidus necator* H16 patrí schopnosť prejsť na anaeróbné dýchanie v neprítomnosti environmentálneho kyslíka. Denitrifikácia je alternatívny proces respirácie v prostredí bez kyslíka, pri ktorom sa ako terminálne akceptory elektrónu používajú oxidované zlúčeniny dusíka. Proces využíva 4-oxidoreduktázy, ktoré katalyzujú redukcii dusičnanov, dusitanov, oxidu dusnatého a oxidu dusného [36].



Obr. 4 Schematické znázornenie ilustrujúce kľúčové aspekty litotrofného a heterotrofného metabolizmu u *Cupriavidus necator* H16 [35]

Ako už bolo vyššie spomenuté kmeň H16 je schopný syntetizovať a akumulovať veľké množstvo PHB v cytoplazme. PHB je syntetizovaný v trojstupňovej reakcii, pričom syntéza vychádza z acetyl-CoA pri kultivácii na sacharidovom substráte alebo na pyruváte. Prvým krokom je kondenzácia dvoch molekúl acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-CoA pomocou enzýmu β -ketoacylthiolázy. Následne je produkt stereošpecificky redukovaný acetoacetyl-CoA reduktázou na R-3-hydroxybutyryl-CoA. Nakoniec sa PHB syntetizuje polymerizáciou R-3-hydroxybutyryl-CoA [37; 38]. V súčasnosti sa diskutuje o niekoľkých modeloch tvorby granúl PHB. Takzvaný Mickelov model predpokladá, že molekuly PHB syntázy začínajú produkovať hydrofóbnu molekulu PHB, keď je koncentrácia R-3-hydroxybutyryl-CoA dostatočná. Vzhľadom na hydrofóbnosť a nízku rozpustnosť PHB vo vodnom prostredí, vznikajúce polymérne reťazce agregujú a vytvárajú štruktúry podobné micelám v cytoplazme s čiastočne hydrofílnymi molekulami proteínov, ktoré sa nachádzajú na povrchu polymérov.

Buddingový model predpokladá, že PHB syntáza je pripojená k cytoplazmatickej membráne, a že rastúci PHB reťazec je uvoľnený do dvojvrstvy ich membrány. Tretí model (*Scaffold Model*) predpokladá, že PHB syntáza vznikajúcich PHB granúl sa stáva pripojená k doteraz neznámej molekule v bunke [39]. Ani jedna z hypotéz nie je do dneska potvrdená, ale bola objasnená štruktúra PHB a povrchová vrstva je tvorená len proteínmi a neobsahuje doteraz zvažované fosfolipidy [40].

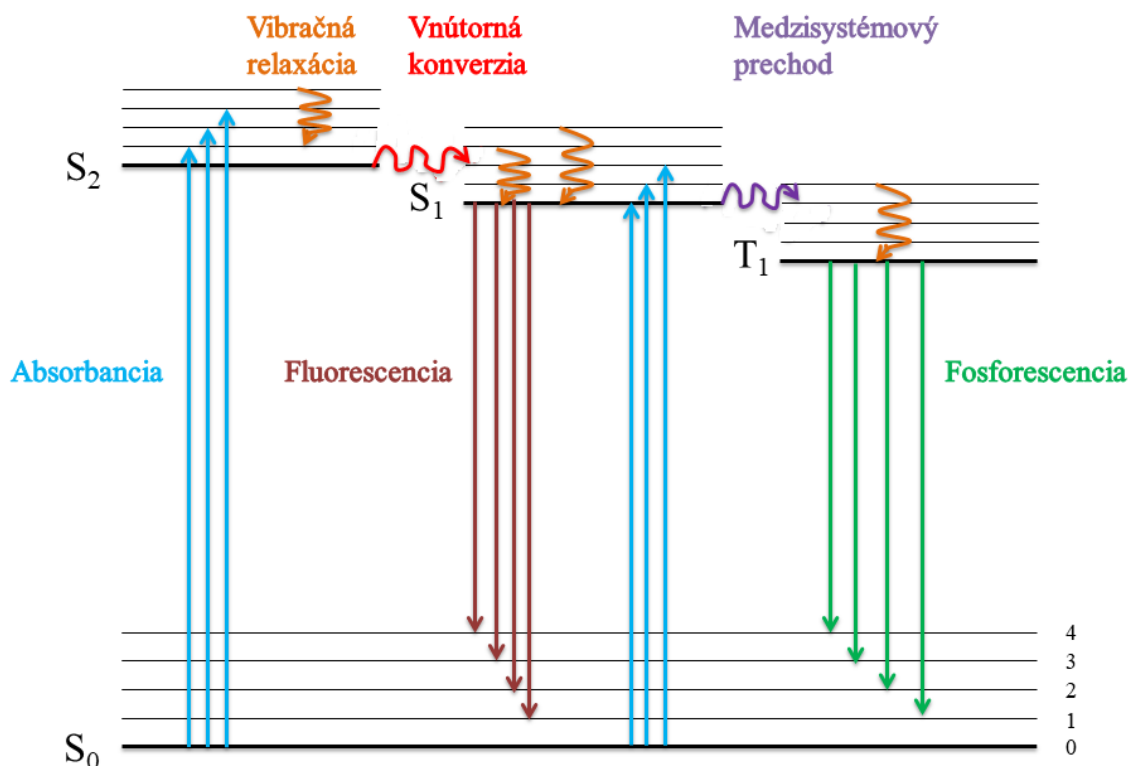


Obr. 5: Štruktúra PHB granuli v *R. eutropha* H16. Povrchová vrstva obsahuje len proteíny spojené s PHB granulami (PGAP), ktoré sú symbolizované farebnými guľôčkami [40].

2.4. Fluorescencia

Luminiscencia je fyzikálny jav, pri ktorom dochádza k emisii svetla. Existujú rôzne druhy luminiscencie, ktoré sú rozdelené podľa spôsobu excitácie. Fluorescencia je konkrétnym prípadom luminiscencie, kde spôsob excitácie je absorpcia jedného alebo viacerých fotónov [41].

Počas fluorescencie dochádza k absorpcii energie molekulou (fluorofórom). Táto energia je získaná z fotónov elektromagnetického žiarenia o vhodnej vlnovej dĺžke a je využitá k excitácii elektrónov do vyššieho energetického stavu. Molekuly sa za normálnych podmienok nachádzajú v základnom energetickom a vibračnom stave. Elektróny sú lokalizované na základnej singletovej hladine S_0 [42]. Po excitácii prejde elektrón zo základného stavu do energeticky vyššieho S_1 alebo S_2 , pričom absorbovaná energia musí zodpovedať energetickému rozdielu týchto dvoch stavov. Počas excitácie elektróny väčšinou obsadia vyššie vibračné hladiny. Pred emisiou u fluorescencie dochádza k vibračnej relaxácii a vnútornej konverzii. Tento jav má za následok to, že k fluorescenčnému prechodu dochádza z najnižšej vibračnej hladiny excitovaného stavu S_1 , aj keď po absorpcii došlo k excitácii do vyšších vibračných a energetických hladín. Je to spôsobené malým energetickým rozdielom medzi hladinou S_1 a S_2 , vďaka ktorému medzi nimi prednostne prebiehajú veľmi rýchle nežiarivé procesy [41; 43].



Obr. 6: Zjednodušený Jablonski diagram zobrazujúci excitáciu a emisiu fluorofóru. S_0 je základná singletová hladina, S_1 a S_2 sú excitované singletové hladiny, T_1 je tripletová excitovaná hladina [42].

Počas vyhasínania excitovaného stavu dochádza k strate časti energie, pretože energia vyžiareného fotónu je vždy nižšia ako energia excitačného fotónu. Energetický rozdiel medzi excitačným a emisným spektrom sa nazýva ako Stokesov posun. Okrem toho pre väčšinu fluorofórov je absorpčné spektrum zrkadlovým obrazom emisného spektra. Tento jav definuje pravidlo zrkadlovej symetrie, ktoré hovorí, že absorpcia a emisia z príslušných vibračných hladín majú rovnakú pravdepodobnosť, keďže rozdiely medzi vibračnými hladinami u základného a excitovaného stavu sú podobné [41].

Emisia fotónov je tak rýchla ako ich absorpcia, a to približne 10^{-15} s. Avšak excitované molekuly ostávajú v stave S_1 určitý čas, niekoľko desiatok pikosekúnd pred emitovaním fotónu alebo pred podstúpením iných procesov deexcitácie. Doba života fluorescencie je 10^{-8} s [42].

2.4.1. Fluorofóry a ich využitie pri charakterizácii bakteriálnych buniek

Fluorofóry sú malé molekuly, u ktorých po ožiarení svetlom o určitej vlnovej dĺžke dochádza k excitácii elektrónov a následne k návratu do základného stavu, pričom prebytočná energia je vyžiarená vo forme svetla. Táto vlastnosť je daná ich chemickou štruktúrou, ktorá obsahuje konjugované dvojité väzby alebo aromatické kruhy, ktoré fungujú ako „anténa“ pre žiarenie. Fluorescenčné vlastnosti molekúl sú závislé na štruktúre danej látky a na okolitom prostredí. Každý fluorofór má svoje vlastné špecifické fluorescenčné vlastnosti.

Fluorofóry rozdeľujeme na vnútorné a vonkajšie. Vnútorné sondy spôsobujú prirodzenú fluorescenciu, tzv. autofluorescenciu, ktorú vykazujú napríklad aminokyseliny a kofaktory. Vonkajšie fluorofóry sú umelo zavedené do študovaného systému, a po pridaní sa viažu na cieľovú štruktúru kovalentne (fluorescenčné značky) alebo nekovalentne (fluorescenčné sondy). Cieľové štruktúry sú hlavne makromolekuly, ako napríklad proteíny, membrány alebo DNA [44].

Dnes na sledovanie fyziologického stavu alebo na skúmanie určitých častí buniek sa hojne využíva fluorescenčná analýza. Existuje veľké množstvo fluorescenčných farbív, ktoré sú schopné selektívne farbiť určité časti bakteriálnej štruktúry [45]. Z hľadiska princípu detekcie fluorescenčné sondy môžeme rozdeliť na dve veľké skupiny na sondy využívané pre štúdium fyziologického stavu bunky a na taxonomické sondy vid'. obr. 7 [46].

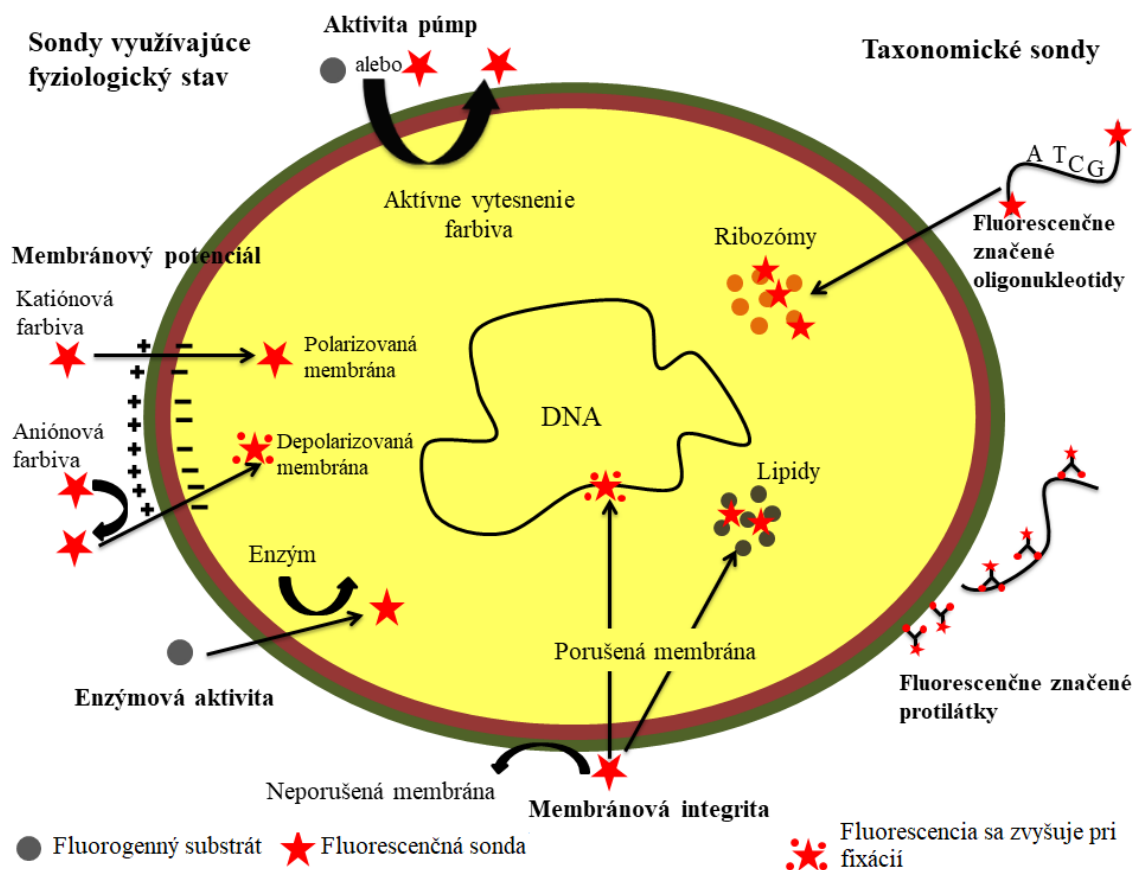
Membránový potenciál

Indikátorom bunkovej viability môže byť transmembránový potenciál udržiavaný na cytoplazmatickej membráne činnosťou iónových pump. Vnútorný priestor bunky je negatívne nabitý vzhľadom k okoliu, v ktorom sa bunka nachádza. Na meranie tohto potenciálu sa používajú tzv. "distribučné sondy". Sú to lipofilné farbivá, ktoré môžu voľne prechádzať cytoplazmatickou membránou do buniek a hromadiť sa v nich v závislosti na ich náboji. Pri vhodných podmienkach je metabolická aktivita bunky priamo úmerná množstvu preniknutého fluorofóru. Tradične ako kationová sonda je využívaný rhodanin 123, ale dnes už mu konkurujú cyaninová farbivá. Z aniónových sond je najznámejší bis-oxonol.

Enzymová aktivita

Jednou z možností ako sledovať enzymovú aktivitu v bunke je pomocou sledovania jej respirácie, kde sa zameriavame na dehydrogenázovú aktivitu. Schopnosť respirácie u aeróbných mikroorganizmov môžeme merať pomocou indikátorov oxidatívneho metabolizmu, napríklad tetrazoliovými soľami. Vo vnútri bunky sú nefarebné tetrazoliové soli redukované za účasti dehydrogenáz prítomných v elektrónovom transportnom systéme zmenené na červene fluoreskujúci formazán. Pretože prenos elektrónov priamo súvisí s metabolizmom bunky, schopnosť buniek redukovať tetrazoliové zlúčeniny sa môže považovať za indikátor bakteriálnej aktivity.

Ďalšou možnosťou je sledovanie intracelulárnej enzymovej aktivity pomocou lipofilných nefluorescenčných sond schopných prechádzať voľnou difúziou do buniek. V bunke sú prostredníctvom enzýmov premenené na fluorescenčné látky nesúce náboje, vďaka čomu sú v bunke zadržované a koncentrované. Vedľa enzymovej aktivity ide teda zároveň o stanovenie membránovej integrity, pretože ak je cytoplazmatická membrána bunky narušená, fluorochrómy sú opäť vyplavované von do extracelulárneho priestoru. Najbežnejšie sú substráty intracelulárnych esteráz, ktoré sú vo všetkých žijúcich organizmoch prirodzene prítomné. Jedna z najznámejších fluorescenčných sond založená na tomto princípe je fluorescein diacetát.



Obr. 7: Bunkové cieľové miesta pre taxonomické a fyziologické fluorescenčné farbivá [46]

Integrita cytoplazmatickej membrány

Strata integrity membrány predstavuje významné poškodenie buniek v dôsledku straty viacerých funkcií spojených s plazmatickou membránou. Udržiavanie membránovej integrity sa bežne meria v eukaryotických a prokaryotických bunkách ako indikátor bunkového poškodenia alebo bunkovej smrti. Hodnotenie membránovej integrity baktérií je komplikované kvôli ich komplexnej membránovej štruktúre.

Detekcia membránovej integrity je založené na aplikácii látok, ktoré za bežných podmienok neprechádzajú neporušenými bunkovými membránami, prípadne sú ihneď vylučované späť do extracelulárneho prostredia. Naopak, ak je cytoplazmatická membrána narušená natoľko, že môžu do bunky prejsť, dôjde k väzbe na zložky bunkovej hmoty a na zosilnenie alebo posunu spektra fluorescencie. Takmer výhradne sa využívajú látky, ktoré sa v bunke viažu na nukleové kyseliny, pretože tie sa vyskytujú vo všetkých bunkách v dostatočnom množstve a umožňujú tak univerzálne použitie u väčšiny mikroorganizmov. Do tejto skupiny patri najrozšírenejšia fluorescenčná sonda propídium jodid (PI) [45; 46].

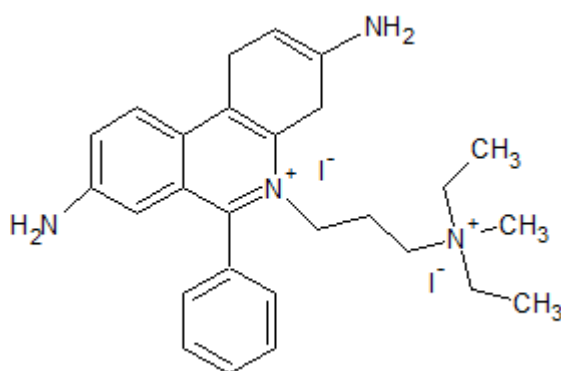
2.4.2. Charakterizácia vybraných fluorescenčných sond

Propídium jodid

Patrí medzi najviac využívané fluorescenčné sondy pre určenie viability buniek. Jedná sa o membránovo nepriepustné farbivo, ktoré je všeobecne vylúčené zo životaschopných buniek.

Mŕtve bunky majú porušenú cytoplazmatickú membránu, a PI preniká cez membránu a viaže sa na nukleové kyseliny vďaka svojej vysokej väzobnej afinite. PI sa viaže medzi bázami DNA, na každých 4–5 pár báz s malými alebo žiadnymi sekvenčnými preferenciami. Jeho veľkou výhodou je, že interaguje aj s DNA i s RNA, vďaka čomu sa stáva univerzálnym interkalačným činidlom. Ďalšou pozitívnou vlastnosťou je, že hneď ako sa PI viaže na DNA alebo RNA, jeho fluorescencia sa zvyšuje 20–30-násobne a takáto zmena signálu sa dá veľmi ľahko detegovať fluorescenčným detektorom.

PI je excitovaný pri 488 nm a s relatívne veľkým Stokesovým posunom vyžaruje pri maximálnej vlnovej dĺžke 617 nm. Vzhľadom k týmto spektrálnym charakteristikám sa PI môže používať v kombinácii s inými fluorochrómami excitovanými pri 488 nm, ako napríklad fluoresceín izotiokyanát a fykoerytrín [47; 48].



Obr. 8: Chemická štruktúra propídiu jodidu [47]

SYTO9

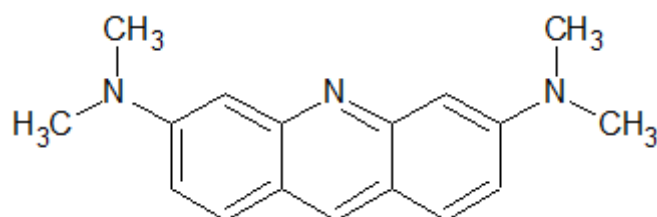
Rodina SYTO farieb má mnoho vlastností, ktoré ich robia užitočnými na označenie živých buniek, vrátane dobrej membránovej priepustnosti, nízkej cytotoxicity a zvýšenej fluorescencie v prítomnosti DNA [49].

SYTO 9 je vynikajúca zelená fluorescenčná kontrastná sonda zameraná tak na jadernú hmotu, čiže nukleoid, tak aj na chromozómy. Keďže táto sonda je schopná prenikat' cez prokaryotickú i eukaryotickú bunkovú membránu. SYTO 9 má vysokú afinitu k DNA a vykazuje zvýšenú fluorescenciu po naviazaní a to v excitačnom maxime pri 483 nm a fluorescenčným emisným maximom pri 503 nm. SYTO 9 je obzvlášť užitočná ako nukleárna kontrastná látka pre bakteriálne testy, pretože farbí tak živé, ako aj mŕtve, grampozitívne aj gramnegatívne baktérie [50].

SYTO9 spoločne s propídiu jodidom sa používa v LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability kitu. Pri použití týchto farbív možno s veľkou presnosťou rozlíšiť bunky mŕtve od živých a to práve vďaka membránovej integrite buniek. SYTO9 farbí všetky bunky a propídiu jodid iba tie s poškodenou bunkovou membránou. Baktérie s intaktnými bunkovými membránami sú zafarbené fluorescenčne zelenými farbami a sú považované za životaschopné; a baktérie s poškodenými membránami farbí červenou farbou a sú označené ako neživé [51].

Akridinová oranž

Akridinová oranž je N, N, N', N'-tetramethylakridin-3,6,diamín (AO), ktorý patrí do veľkej skupiny organických zlúčenín, tzv. akridinov. Jedná sa o interkalačné činidlo, ktoré farbí nukleové kyseliny. AO veľmi ľahko prechádza cez bunkovú membránu pri neutrálnom pH, avšak pri kyslom pH sa sústreďuje v lyzozómoch a stane sa membránovo neprechodným. Jeho fluorescenčné vlastnosti sú tiež závislé na pH. Svoju popularitu získala vďaka tomu, že farbí odlišne živé a mŕtve bunky. Po interakcii s dvojvláknovou nukleovou kyselinou fluoreskuje na zeleno, zatiaľ čo pri väzbe na jednovláknové nukleové kyseliny vykazuje červenú fluorescenciu [52; 53].



Obr. 9: Chemická štruktúra akridinovej oranži [52]

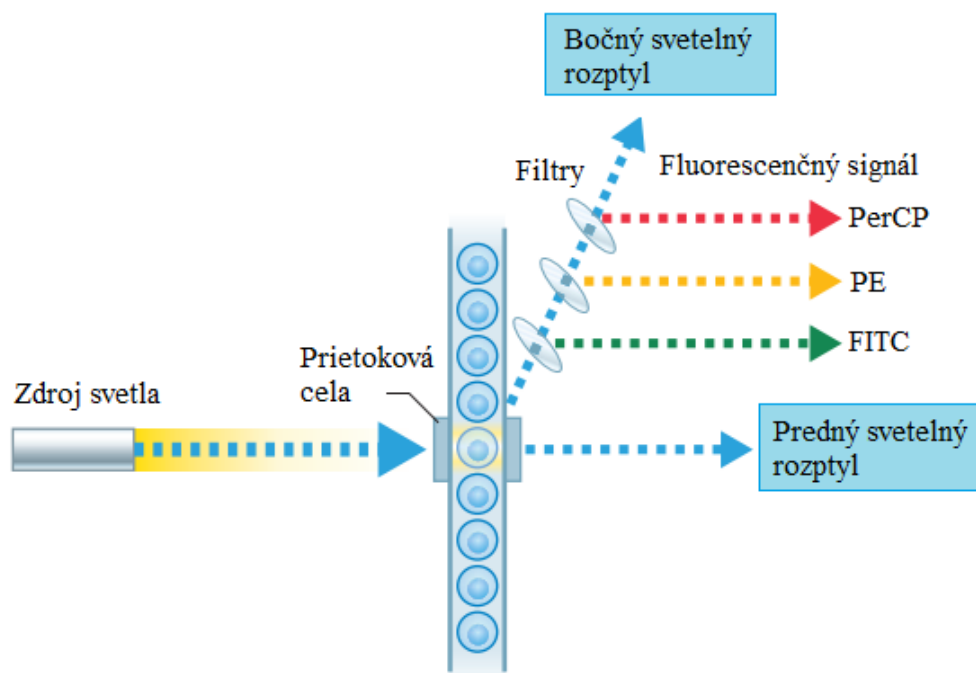
Roztoky AO vykazujú jav metachromácie, ktorý spočíva v rozdielnych spektrálnych vlastnostiach farbiva v jeho monomérnych, dimérnych a polymérnych formách. Po interakcii AO s nukleovou kyselinou vznikajú dva typy komplexov. Prvý typ komplexov vzniká pri interakcii AO s dvojvláknovou DNA alebo s dvojvláknovými oblasťami RNA. Počet molekúl AO k počtu nukleotidových molekúl je v pomere 1:4. Tento typ komplexu je charakterizovaný absorpčným maximom pri 502–504 nm a zelenou fluorescenciou s maximom pri 530 nm. V tomto komplexe molekuly AO sú v takej vzdialenosti, že nie sú schopné vytvárať diméry. Druhý typ komplexov sa značne líši od prvého. Jeho absorpčné maximum je pri 475 nm a je charakterizované červenou fluorescenciou pri 640 nm. V tomto komplexe sa AO viaže na jednovláknové RNA a na denaturovanú DNA. AO interaguje skoro s každou nukleotidovou molekulou, vďaka čomu sú jeho molekuly dostatočne blízko k tomu, aby vytvorili diméry alebo polyméry. Na základe týchto dvoch javov, sa AO často využíva na odlišenie živých a mŕtvych buniek [54; 55].

2.4.3. Prietoková cytometria

Prietoková cytometria je analytická metóda, ktorá súčasne meria a analyzuje viaceré fyzikálne vlastnosti jednotlivých častíc, najčastejšie buniek. Najväčšou výhodou tejto metódy je analýza niekoľko tisíc buniek za sekundu na úrovni jednej bunky (*single-cell analysis*).

Základný princíp merania je založený na bunkách, ktoré sú strhávané prúdom kvapaliny a prechádzajú cez fokusovaný zdroj svetla v kapiláre. Fotodetektory zachytávajú signály rozptylu svetla a/alebo fluorescencie. Tieto signály z jednotlivých buniek sú spracovávané a umožňujú vyhodnotiť veľkosť, zrnitosť alebo diferenciaciu bunkových typov, prítomnosť membránových receptorov a obsah DNA. Analýza je vyhodnotená graficky, ako histogramy alebo bodové grafy, ktoré môžu slúžiť na identifikáciu a kvantifikáciu bunkových populácií [56; 57].

Základné komponenty prietokového cytometra sú znázornené na obr. 10, kde je vyobrazený fluidný systém, zdroj svetla, optický systém, elektronická sieť a počítač. Fluidný systém leží v srdci prietokového cytometra. Účelom tohto systému je dopraviť častice (bunky) po jednom do stredy laserového lúča. Tento proces je dosiahnutý hydrodynamickou fokusáciou. Bunky sú privedené do centrálného jadra, ktoré je ohraničené vonkajším plášťom, v ktorom preteká nosná kvapalina. Kvapalina v plášti má väčšiu rýchlosť ako vzorky, vďaka ktorému strháva jednotlivé bunky z centrálného jadra a mení tok na parabolický. Najvyššia rýchlosť je v strede toku, čo je v tomto prípade v zúženej ústi kapiláry, vďaka ktorému sa suspenzia buniek rozhybe a vytvorí reťazec jednotlivých buniek [58; 59]. Bunky prechádzajú svetelným lúčom a buď ho rozptyľujú v rôznych uhloch alebo dôjde k excitácii a k následnej emisii fluorescencie. Svetlo je zachytené pomocou detektorov. Cytometer má dva rôzne detektory na rozptyl svetla. Detektor predného svetelného rozptylu (*forward scatter channel* FCS) meria intenzitu signálu v smere uhlov 160–180°. Nameraná intenzita poskytuje informáciu o veľkosti častíc. Detektor bočného svetelného rozptylu (*side scatter channel* SSC) meria lomené alebo odrazené svetlo v uhle 90° a udáva informácie o bunkovej granulovitosti a vnútornej komplexnosti. Pre detekciu emitovanej fluorescencie sú používané fluorescenčné kanály. Vnímanie signálu je riadené optickými filtrami, ktoré prepúšťajú svetlo o určitej vlnovej dĺžke, iné sú blokované. Jednotlivé svetelné signály sú prevedené na elektrické impulzy a sú zosilnené s fotonásobičom. Elektrický signál je potom spracovaný počítačom a je vyhodnotený v grafickej a číselnej forme [59].



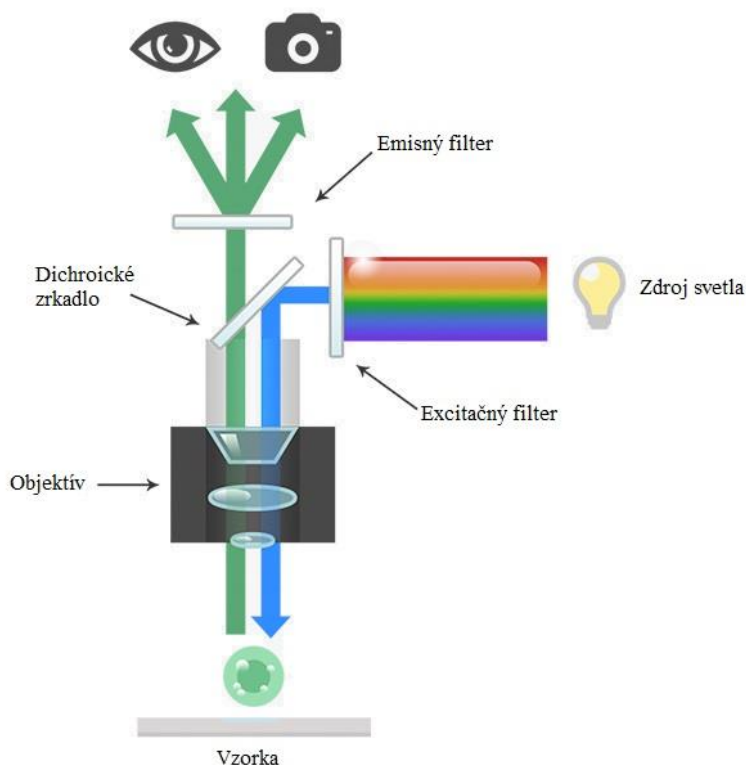
Obr. 10: Zjednodušená schéma prietokového cytometra s jedným zdrojom svetla. Modré šípky značia nefluorescenčné a farebné šípky fluorescenčné detektory. FITC – zelené, PE – žlté a PerCP červené svetlo [58].

2.4.4. Fluorescenčná mikroskopia

Fluorescenčná mikroskopia je ďalším silným nástrojom mikro- a nanoštruktúrnych systémov, či už sú to živé bunky a biologické tkanivá, alebo koloidy, polyméry a vlákna. Jeho najatraktívnejšou vlastnosťou je schopnosť simultánneho zobrazenia a kvantitatívnej analýzy.

Fluorescenčný mikroskop je špeciálnym typom optického mikroskopu. V bežnom optickom mikroskope je vzorka osvetlená zdrojom svetla a zachytené je to isté svetlo po interakcii s vzorkou (rozptyl, odraz, absorpcia). Zatiaľ čo u fluorescenčného mikroskopu je detegované svetlo emitované zo samotnej vzorky [42; 60].

U klasického fluorescenčného (epifluorescenčný) mikroskopu je excitačné svetlo odrazené smerom k vzorke pomocou dichroického zrkadla. Toto špeciálne zrkadlo je umiestnené v uhle 45° smerom k prichádzajúcemu svetlu a odráža len fotóny zvolenej vlnovej dĺžky. Potom dochádza k excitácii fluorofóru a k následnej detekcii emitovaného signálu. Emitované svetlo dopadá na dichroické zrkadlo, ktoré ho prepustí ďalej na bariérový filter. U tohto typu excitačné žiarenie prechádza cez rovnaký objektív, ktorým je snímaná aj fluorescencia vzorky vid' obr. 11. Slovo epi pochádza z gréčtiny a znamená rovnaké [61; 62].



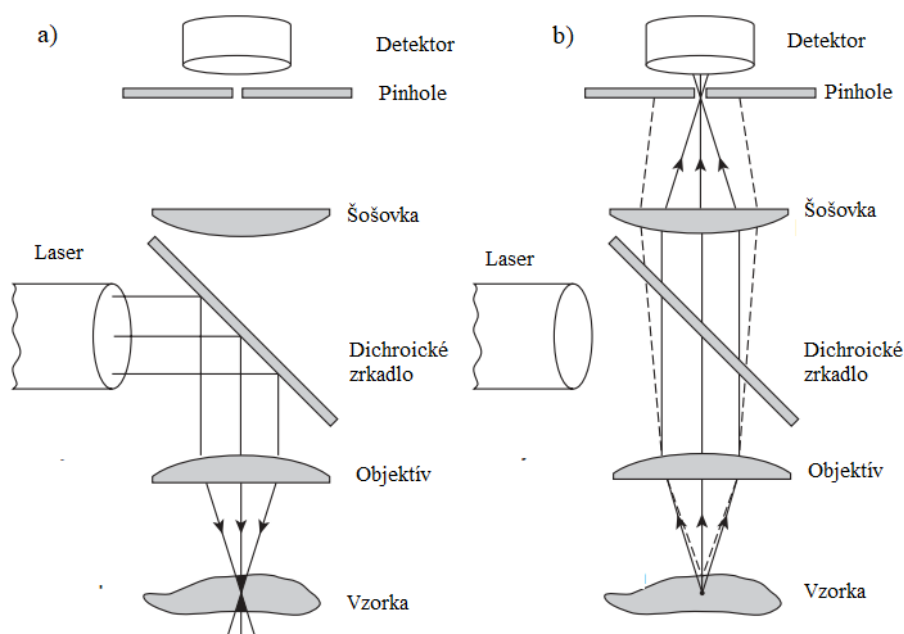
Obr. 11: Schéma svetelnej dráhy v epifluorescenčnom mikroskope. Modrá šípka znázorňuje excitačné svetlo a zelená šípka emisné svetlo [62].

Nevýhodou tejto metódy je, že nedokáže rozlíšiť dva objekty, ktoré sú od seba vzdialené menej ako 200 nm. Okrem toho celá vzorka je osvetlená v rovnakom čase a signál nepochádza len z ohniskovej roviny, ale i z celého okolia. Kvôli tomu obraz nie je tak čistý a výsledky môžu byť skreslené. Ďalším problematickým parametrom je hĺbka poľa. Jednak

počas merania nie sú známe informácie o hĺbke a nedajú sa preto vyvodit' žiadne závery o objeme z obrazu. Keď vzorky sú hrubšie ako hĺbka ostrosti, obrazy sú rozmazané, lebo ich fluorescencia je mimo ohniskovej roviny. Existujú možné korekcie, ale všeobecne sa uprednostňujú iné techniky ako napr. konfokálny mikroskop [42; 62].

Konfokálny mikroskop je špeciálna forma štandardnej fluorescenčnej mikroskopie, ktorý používa špeciálne optické komponenty na vytvorenie obrazu s vysokým rozlíšením. Základný princíp je podobný s epifluorescenčným mikroskopom. Excitované a emitované svetlo dopadne na dichroické zrkadlo, kde emitované svetlo je odrazené. Pomocou emisného filtra sa vyberie požadovaný rozsah vlnových dĺžok, ktorý môže dopadnúť na detektor. Lúč potom dopadne na fokusačnú šošovku, kde sa láme do svojho ohniska. To je umiestnené v štrbine (pinhole), kde bod pre prechod lúča je veľmi malý. Na detektor dopadnú len fotóny z ohniskovej roviny vid' obr. 12. Fluorescencia, ktorá pochádza z inej ohniskovej roviny alebo sa vytvára mimo konfokálneho objemu, cez clonu prechádza len jej veľmi malá časť alebo je úplne odfiltrovaná. To je hlavná výhoda tohto typu mikroskopu, pomocou ktorého sú detegované len fotóny, ktoré pochádzajú z ohniskovej roviny a to vedie k vysoko kontrastnému obrazu s dobrým pomerom signálu k šumu [63; 64].

V dôsledku používania clony v jednom okamžiku je vždy pozorovaná len prísne obmedzená oblasť vzorky. Ďalšia vlastnosť, ktorá odlišuje konfokálny mikroskop od iných je skenovanie, ktoré sa uskutočňuje pomocou vibračných zrkadiel alebo rotujúceho disku obsahujúceho viac štrbín v špirálovom usporiadaní. Snímky sa získavajú pixel po pixeli. Jedným z charakteristických znakov je, že môže vytvoriť optické rezy definovanej hrúbky. Preto pohybom vzorky smerom nahor a nadol sa získa trojrozmerný (3D) obraz [42].



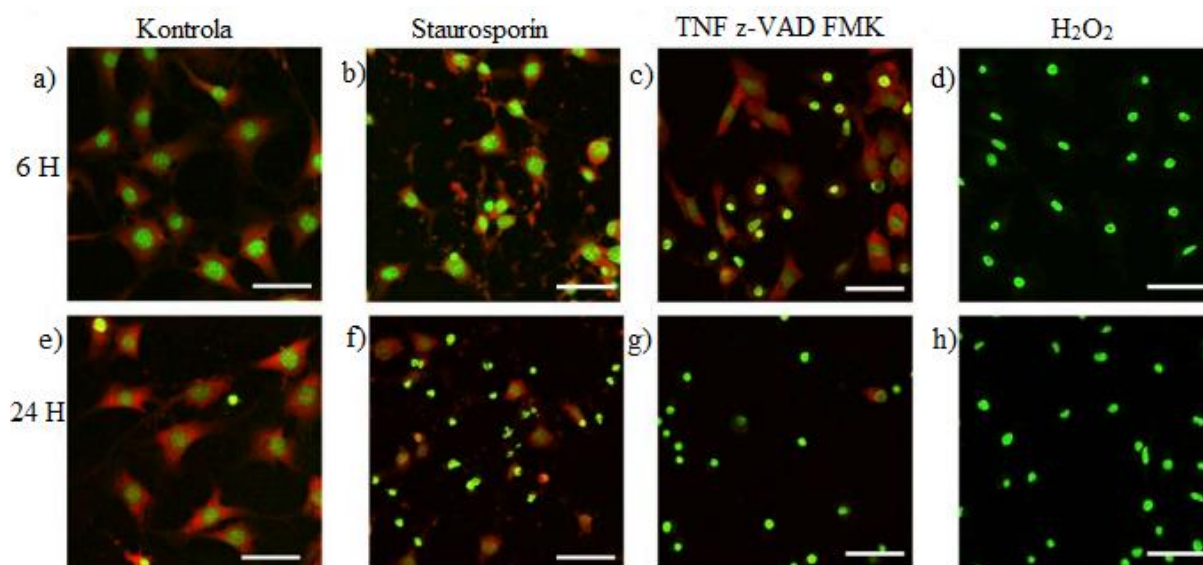
Obr. 12: Schéma konfokálneho fluorescenčného mikroskopu. a) Excitácia, kde excitované svetlo nie je prepustený cez dichroické zrkadlo na detektor. b) Emisa, kde fluorescencia generované v ohnisku cez pinhole dopadne na detektor. Lúče mimo ohnisku sú odfiltrované [42].

3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

Táto diplomová práca bola primárne zameraná na zhodnotenie možností využitia akridinovej oranži ako vhodného fluorescenčného farbiva pre LIVE/DEAD analýzu prokaryotických buniek. AO bola syntetizovaná v roku 1889, ale prvé aplikácie v biológii boli publikované až v roku 1940, kde prišli nato, že živé a odumreté bunky rastliny vykazovali odlišnú farbu fluorescence. Bol to veľký objav, a vedci sa snažili pochopiť a popísať chovanie AO [55]. Jej chovanie je popísané v kapitole 2.4.2.

U eukaryotických buniek farbenie s AO je viac špecifické, lebo AO interkaluje s DNA v jadrách, čo dáva zelenú fluorescenciu, zatiaľ čo RNA v cytoplazme fluoreskuje hnedo, červenohnedo, oranžovo alebo jasne červeno, v závislosti na jej množstve. Životaschopné bunky vykazujú vždy zelenú, zatiaľ čo mŕtve oranžovú fluorescenciu [65].

Poškodenie buniek a smrť sú základným aspektom ochorenia, avšak techniky vizualizácie týchto procesov v tkanive sú obmedzené. Plemel a kol. v roku 2017 používali na vizualizáciu bunkovej smrti AO. Na merania boli využívané ľudské oligodendrocytové bunky a fibroblasty. Cytoplazma živých buniek vykazovala červenú farbu a zreteľne zelené jadro obsahujúce červené body. Červený signál značil prítomnosť RNA. Oligodendrocyty a fibroblasty boli vystavené toxínom, ktoré podporujú bunkovú smrť rôznymi mechanizmami ako H_2O_2 , inhibítor proteinkinázy staurosporín, inhibítor pan-kaspázy a faktor nádorovej nekrózy. Všetky mechanizmy bunkovej smrti vyvolali stratu RNA, a tým zníženie červenej fluorescence. Apoptické bunky úplne stratili červený signál v cytoplazme, ale jadro obsahovalo buď červenú alebo fragmentovanú zelenú farbu. Na rozdiel od toho nekrotické bunky nevykazovali žiadny červený signál, lebo došlo k úplnej strate molekúl RNA a svietilo u nich len okrúhle, jasné a zelené jadro (viď. Obr. 13) [66].



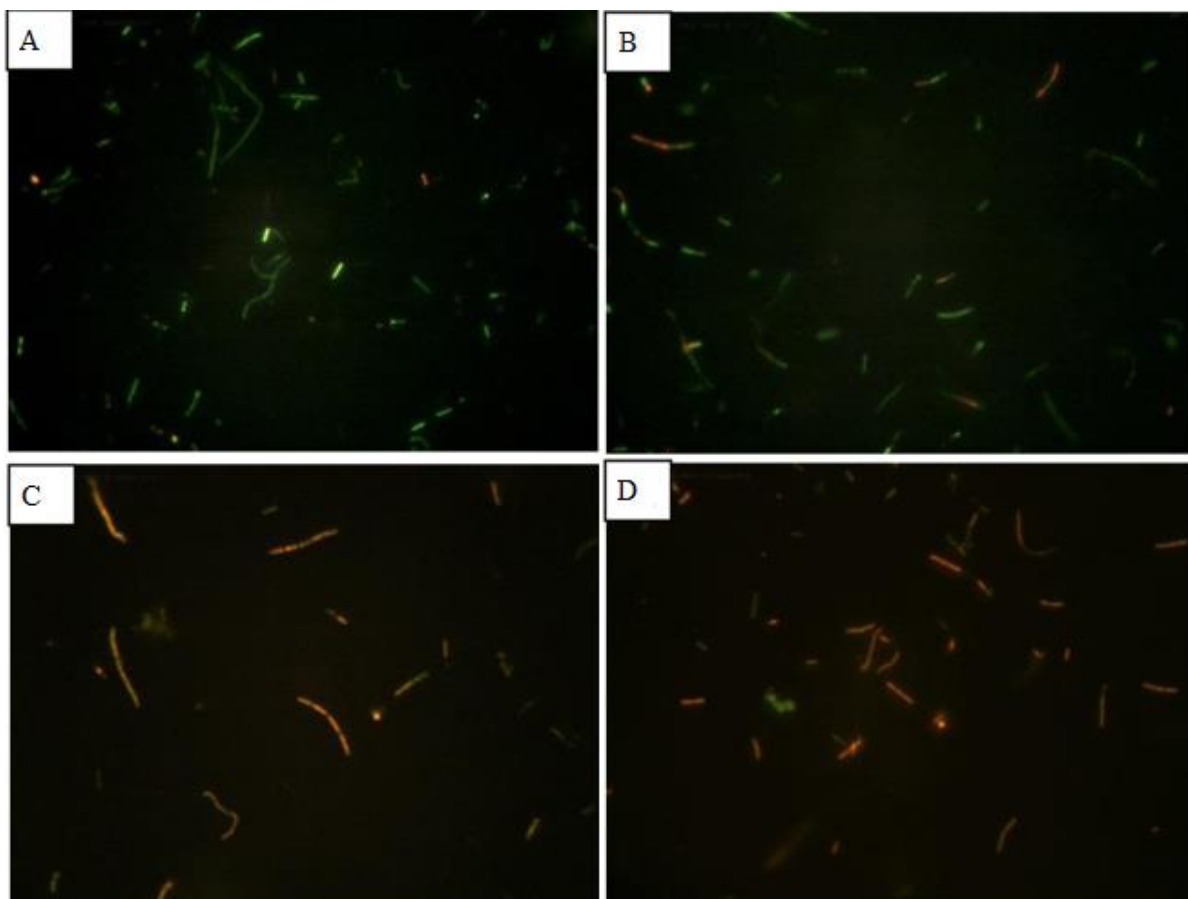
Obr. 13: Reprezentatívne obrázky stresovaných a nestresovaných eukaryotických buniek farebných AO. Zdravé bunky mali veľké, dobre ohraničené granulované jadrá. Apoptóza (b,f) bola charakterizovaná zmrštením jadra a bunkovou fragmentáciou. Počas nekrózy (d,h) alebo nekrotózy (c,g) bunky postrácali bunkovú RNA a mali hladké, scvrknuté a jasné jadro [66].

Taktiež Niknazar a spol. v roku 2019 sledovali podobne apoptózu indukovanou H_2O_2 vlasových buniek. Študovali ochranný účinok apelinu-13, či zvyšuje životaschopnosť stresovaných buniek. Bunky boli označené AO a analyzované fluorescenčným mikroskopom. Kontrolné a ošetrované bunky s apelin-13 vykazovali zelenú fluorescenciu, narozdiel od apoptických buniek indukované H_2O_2 s a bez ochrannej látky, ktoré mali granulované jadro v žlto-zelenej farby. Počet apoptických buniek významne poklesol v skupine liečenej apelinom-13 v porovnaní s stresovanými vzorkami [67].

Schopnosť AO rozlíšiť živé a mŕtve bunky bolo starostlivo skúmané mnohými vedcami. Takzvaný Struggerov efekt, kde mŕtve bunky fluoreskujú červene a živé zeleno, bol potvrdený v mnohých prípadoch. Napríklad pri teplotnom strese u *Escherichia coli* (1991) [68], sledovaní dezinfekčných vlastností chlóru (1983) [69] alebo k hodnoteniu bakteriálnej citlivosti na pôsobenie antibiotika gentamicínu (1997) [70]. Postupne sa však začali objavovať výskumné práce, ktoré popisovali rozpor s už spomínaným Struggerovom efektom (1956, 2004) [71; 72]. Autori štúdie (1991) [73] uvádzajú, že v prípade bakteriálnych buniek v dôsledku nedefinovanej povahy jadra a veľkého množstva RNA oranžová fluorescencia značí živé bunky a zelená odumreté bunky. Je to z predpokladu, že živé prokaryotické bunky majú veľký obsah RNA, čo potlačí fluorescenciu DNA v jadre. U mŕtvych buniek sa metabolizmus zastaví a zníži obsah RNA, čo má za následok zvýšenie zelenej fluorescencie. Podľa výsledkov sfarbenia AO môže indikovať fyziologickú aktivitu buniek čo však vyvoláva množstvo otázok jeho univerzálnej extrapolácia. Dá sa povedať, že všetky aspekty chovania AO u prokaryotických buniek doteraz nie sú dostatočne pochopené. Výsledky z merania fluorescencie AO sú veľmi kontroverzné, kedy niektorí autori potvrdzujú Struggerov efekt, iní práve naopak.

Rapposch a kol. v roku 2000 sledovali vplyv teploty na fyziologický stav baktérii. Časť baktérii bola nechaná po dobu 24 hodín pri $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, ktoré boli brané ako inaktívne bunky. Po analýze na fluorescenčnom mikroskope živé bunky s vyššou metabolickou aktivitou vykazovali oranžovú fluorescenciu a neživé zelenú. Keďže zníženie teploty má vysoký inhibičný vplyv na bakteriálny metabolizmus, v dôsledku toho sa zvýšila zelená fluorescencia AO. Po inkubácii pri laboratórnej teplote ich fyziologický stav sa zmenil – začali rásť, ich metabolická aktivita bola vyššia a znovu sa zvýšila aj intracelulárna červená farba [74].

Na stanovanie životaschopnosti buniek AO sa už z uvedených dôvodov často používa s kombináciou druhého fluorescenčného farbiva, ktoré dopĺňa jej nedostatky. Krishnamoorthy a spol. v roku 2018 sledovali antimikrobiálne účinky nanoemulzie na rezistentné bakteriálne kmene. Životaschopnosť buniek bola analyzovaná kombináciou dvoch fluorescenčných farbív, a to AO a etídium bromidu (EB). Živé a intaktné bunky fluoreskovali zelene, AO voľne prechádzalo cez bunkovú stenu, zatiaľ čo bunky namáhané s nanoemulziou boli červené. Červená fluorescencia naznačovala, že došlo k porušeniu bunkovej membrány, vďaka čomu EB bol schopný cez ne prechádzať. Po penetrácii EB sa viaže na DNA a vykazuje červenú fluorescenciu [75]. Okrem EB sa veľmi často používa AO v kombinácii s propídium jodidom. PI podobne značí poškodenie membrány a bunky vykazujú červenú fluorescenciu. AO fluoreskuje vo vzorkách zelene vid'. obr. 14 [76; 77; 78].



Obr. 14: *Bacillus cereus* po ošetrení odlišnou koncentráciou iónovej kvapaliny farbené s AO a propidium jodidom [78]

Kvôli kontroverzným výsledkom sa AO dnes používa skôr na stanovanie a počítanie mikroorganizmov a na ich detekciu v klinických vzorkách. Autori článku [79] Pak a Koo v roku 2013 používali AO na sledovanie kinetiky rastu, kde zelená fluorescencia AO odpovedala optickej hustote baktérii v roztoku. Ďalšia jej aplikácia je použitie na vizualizáciu biofilmov, kde kolónie buniek vykazujú oranžovú fluorescenciu [80; 81]. Ukázalo sa, že AO je účinným farbivom na detekciu mikroorganizmov z krvi, vďaka čomu mohlo slúžiť ako náhrada Gramovo farbení. Po interakcii mikroorganizmov s AO dochádza k červenej fluorescencii, zatiaľ čo červené krvinky sa nezfarbia alebo svietia zelene. Jeho hlavná výhoda je, že jasne pomarančové mikroorganizmy sú ľahko rozpoznateľné proti čiernemu až slabému zelenému pozadiu [82; 83]

Podľa spracovanej literárnej rešerše je viditeľné, že farbenie eukaryotických buniek s AO dáva výsledky, ktoré sú dobre reprodukovateľné a konzistentné na rozdiel od prokaryotických buniek. Kvôli tejto kontroverznosti sme chceli vyskúšať ako sa spomínané farbivo správa u producentov PHB, konkrétne u *Cupriavidus necator* H16 a PHB⁴.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1. Použité mikroorganizmy, chemikálie a prístroje

4.1.1. Použité mikroorganizmy

Pre experimentálnu časť bol použitý bakteriálny kmeň *Cupriavidus necator* H16 získané z Českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity v Brne a kmeň *Cupriavidus necator* PHB⁴ bol kúpený Leibnitz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Braunschweig, Nemecko.

4.1.2. Použité chemikálie

Kultivácia baktérii

Nutrient Broth, (Himedia)
Síran amónny, (Lach-Ner, ČR)
Dihydrogenfosforečnan draselný, (Lach-Ner, ČR)
Dihydrát hydrogenfosforečnan disodný, (Lach-Ner, ČR)
Heptahydrát síranu hořčnatého, (Lach-Ner, ČR)
Fruktóza, p.a., (Lach-Ner, ČR)
Destilovaná voda

Stresové faktory

Chlorid draselný, (Sigma Aldrich Inc.)
Kyselina chlorovodíková 35%, (Lach-Ner, ČR)
Potravínarský etanol

Fluorescenčné sondy a rozpúšťadlá

Akridinová oranž, (Sigma Aldrich Inc.)
Propídium jodid, (eBioscience)
SYTO 9, (Thermo Fisher Scientific)
Kyselina citrónová bezvodá (Lach-Ner, ČR)
Hydrogenfosforečnan disodný (Lach-Ner, ČR)
EDTA (Sigma Aldrich Inc.)
Triton X-100 (Sigma Aldrich Inc.)

4.1.3. Použité prístroje

Analytické váhy, Boeco
Centrifúga, Hettich zentrifugen EBA 200
Laminárny box Aura mini, Bio Air Instruments
Temperovaná trepačka Heidolph1000, Labicom s.r.o
Rotátor MultiBio RS-24 Biosan
Termostat, LS-35
Fluorescenčný mikroskop, MicroTime 200, PicoQuant GmbH
Epifluorescenčný mikroskop, Nikon Eclipse E200, s CCD kamerou PixelLink PL-A662
Prietokový cytometer, Apogee A50, ApogeeFlow System

4.2. Kultivácia baktérii

4.2.1. Živné média

Na skladovanie bakteriálnych kultúr (s agarom) a na prípravu inokula bolo používané Nutrient Broth médium.

Zloženie média Nutrient Broth:

Beef extrakt	10 g.l ⁻¹
Pepton	10 g.l ⁻¹
NaCl	5 g.l ⁻¹
Agar	20 g.l ⁻¹

Zloženie minerálneho produkčného média:

(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	1,02 g
Na ₂ HPO ₄	11,1 g
MgSO ₄	0,2 g
Fruktóza	20 g
Roztok stopových prvkov	1 ml
Destilovaná voda	1000 ml

Roztok stopových prvkov:

FeCl ₃	9,7 g
CaCl ₂	7,8 g
CuSO ₄	0,156 g
CoCl ₂	0,119 g
Fruktóza	20 g
NiCl ₂	0,118 g
CrCl ₂	0,062 g
0,1 M HCl	1000 ml

Všetky média boli sterilizované v tlakovom hrnci so zatvoreným ventilom po dobu 40 minút, zatiaľ čo fruktóza bola sterilizovaná za rovnakých podmienok pri otvorenom ventile.

4.2.2. Skladovanie bakteriálnych kultúr a príprava inokula

Lyofilizované bunky boli najprv oživené a potom naočkované na Petriho misky s Nutrient Broth médiom. Misky so zaočkovanou kultúrou boli kultivované pri 30 °C približne 24 hodín. Po náraste kolónii boli misky uchované v chladničke pri 4 °C. preočkovanie bakteriálnych kultúr bolo opakované pravidelne každých 30 dní.

Inokulum pre kultiváciu bolo pripravené v Erlenmayerových baňkách o objemu 100 ml s 50 ml Nutrient Broth médiom. Inokulum bol pripravený pre každý kmeň v dvoch paralelných sérii. V sterilnom laminárnom boxu bolo do média zaočkované trikrát malé

množstvo kultúry z Petriho misky pomocou bakteriálnej kľučky. Potom bolo inokulum uchované 24 hodín na temperovanej trepačke pri frekvencii 170 rpm a teplote 30°C. Po 24 hodín bola časť inokula preočkovaná do minerálneho produkčného média, presnejšie v množstve 5 %objemu média.

4.3. Meranie stresovej odpovedi

Na sledovanie chování mikroorganizmov počas stresu boli vybrané dva stresové faktory. Etanol, ktorý rozrušuje bunečnú membránu a kyslé pH ako denaturačné činidlo biomolekúl.

4.3.1. Expozícia bakteriálnych buniek etanolom

Boli pripravené zásobné roztoky etanolu z 97% roztoku postupný riedením s destilovanou vodou na koncentráciu 50% a 70%. 5 ml kultúry bola odobraná z produkčného média a centrifugovaná 5 minút pri otáčkach 5000 rpm. 5 ml etanolu o určitej koncentrácii bol napipetovaný k supernatantu. Kultúra s etanolom bola kultivovaná 20 minút na rotačnom trepačke pri 10 rpm v laboratórnej teplote. Pripravená zmes po uplynutí času bola odstredená pri otáčkach 5000 rpm po dobu 5 minút. Sediment bol rozsuspendovaný v 5 ml fosfátovým pufrom o pH 7,4.

Vzorky boli farbené fluorescenčnou sondou a ich odozva na stres bola stanovená na prietokom cytometry a na fluorescenčnom mikroskopy.

4.3.2. Expozícia bakteriálnych buniek v kyslom pH

Bol pripravený zásobný roztok o pH1. K príprave 200 ml roztoku bol použitý 50 ml 0,2 M KCl a 134 ml 0,2 M HCl. Zvyšný objem bol doplnený destilovanou vodou.

Vzorky boli pripravené podobným spôsobom ako je popísané v kapitole 4.3.1. Bunečná suspenzia po odstredení bola rozsuspendovaná v 5 ml roztoku o pH1. Zmes bola kultivovaná podobne 20 minút a premytá dvakrát fosfátovým pufrom o pH 7,4.

Pripravené ošetrované vzorky boli označené fluorescenčnou sondou a následne bola stanovená ich odozva na stres pomocou prietokového cytometra a fluorescenčného mikroskopy.

4.4. Príprava fluorescenčných sond

4.4.1. Použitie propídium jodidu a SYTO9

Bol pripravený zásobný vodný roztok propídium jodidu o koncentrácii 1 mg.ml⁻¹ rozpustením PI v deionizovanej vode. Roztok bol skladovaný pri 4 °C v tme po dobu 14 dní. V prípade prípravy vzorky pre prietokový cytometer do 983,5 µl fosfátového pufru o pH 7,4 bol napipetovaný 5 µl PI zo zásobného roztoku, 1,5 µl 5 mM SYTO9 a 10 µl ošetrenej kultúry (na celkový objem zmesi 1000 µl). Po pridaní fluoroforu sa vzorka nechala 15 minút inkubovať v tme pri laboratórnej teplote. Pre fluorescenčný mikroskop bol postup podobný, len boli použité vyššie koncentrácie, 10 µl PI a 60 µl ošetrenej kultúry.

Pre merania v prietokovom cytometry bola excitačná vlnová dĺžka laseru 488 nm a signál bola detegovaná v červenom (680 ± 35 nm) a zelenom (535 ± 35 nm) kanálu. Pri fluorescenčnom mikroskopy excitačná vlnová dĺžka bola v rozmedzí 450–490 nm.

4.4.2. Farbenie bunčných kultúr akridinovou oranžou

Pre fluorescenčný mikroskop

Bol pripravený zásobný roztok akridinovej oranži rozpustením 10 mg AO v 50 ml destilovanej vode. Následne roztok bol miešaný s fosfátovým pufrum o pH = 6 v pomere 1:2. K príprave fosfátového pufru o pH = 6 bol použitý 12,2 ml 1 M K_2HPO_4 a 86,8 ml 1 M KH_2PO_4 . Roztok bol uchovávaný pri 4 °C v tme po dobu maximálne jeden mesiac.

K stresovaným vzorkám bol pridaný pripravený zmes AO v pomere 1:1. Vzorky boli inkubované 5 minút v tme pri laboratórnej teplote. Pri meraní bola použitá excitačná vlnová dĺžka v rozmedzí 450–490 nm.

Pre prietokový cytometer

Zásobný roztok akridinovej oranži bol pripravený rozpustením AO v destilovanej vode tak, aby výsledná koncentrácia bola 1 mg/ml. Potom bol pripravený roztok A pridaním 0,1 ml Triton X-100, 8 ml 1 M roztoku HCl, 0,877 g NaCl a doplnený destilovanou vodou na 100 ml. Druhým krokom bol príprava roztoku B. Jeho základom bol 100 ml pufr, ktorý bol pripravený miešaním 37 ml 0,1 M kyseliny citrónovej a 63 ml 0,2 M Na_2HPO_4 . Do pufru bol pridaný 0,877 g NaCl a bol miešaný až do jeho úplného rozpúšťania. Ďalej bol ešte pridaný 34 mg EDTA a 0,6 ml AO zo zásobného roztoku (1 mg/ml). Jednotlivé roztoky boli uchované pri 4 °C v tme po dobu niekoľko mesiacov.

Do skúmavky typu Eppendorf bola napipetovaná 0,2 ml ošetrenej kultúry. Potom bol napipetovaný pomaly 0,4 ml ochladený roztok A a zmes bola uchovaná v tme 15 sekúnd. Po uplynutí času bol pomaly pridaný 1,2 ml ochladeného roztoku B. Pripravený roztok bol nameraný v priebehu 2–10 minút. Pre merania bola excitačná vlnová dĺžka laseru 488 nm a signál bola detegovaná v červenom (680 ± 35 nm) a zelenom (535 ± 35 nm) kanálu.

4.5. Postup analýzy na prietokovom cytometry

Na začiatku merania bola nastavená pracovná plocha podľa typu merania. Bol nastavený scattergram SALS/SALS a SALS/LALS, ktorý je vhodný na výber populácie. Boli nastavené meracie kanály a histogramy vytvorené z výšky píkovej fluorescencie zaznamenaných detektorom.

Potom bol nastavený prietok vzorku na $16,7 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$ a nasatie na 100 μl . Pre všetky vzorky bola nastavená hodnota PMT, kde bolo dôležité aby jednotlivé hodnoty boli rovnaké pre porovnávajúce vzorky. Na excitáciu bol používaný laser o vlnovej dĺžke 488 nm. Zelená fluorescencia živých buniek z AO a SYTO9 bol detegovaný na zelenom kanálu o vlnovej dĺžke 535 ± 35 nm. Červená fluorescencia mŕtvych buniek z AO a PI bola snímaná na červenom (680 ± 35 nm) a čiastočne a oranžovom (590 nm) kanály.

Výsledné informácie boli získané pomocou manuálneho výberu oblasti záujmu (*region of interest ROI*), kde sa z cytogramu vybrala populácia alebo časť populácie na ďalšiu analýzu. V tejto diplomovej práci boli používané hodnoty, ako priemer a medián intenzity fluorescence a počet zaznamenaných buniek.

4.6. Postup analýzy na epifluorescenčnom mikroskopy

Vzorky na fluorescenčný mikroskop boli pripravené postupom popísané v kapitole 4.4.1 a 4.4.2. Obsah zafarbených skúmaviek bol premiešaný a odobraný 10 μ l mikropipetou na podložné sklíčko. Vzorka bola pokrytá krycím sklíčkom a odstránená prebytočná kvapalina. Potom bola vložená na stolík epifluorescenčného mikroskopu Eclipse E200. Na záznam obrazov bol použitý program Lucia Net. Mikroskopováno bolo pod rozlíšením 40 \times a 100 \times . Získané záznamy boli uložené vo formáte .jp2 a ďalej boli upravované a analyzované pomocou programu ImageJ.

5 VÝSLEDKY A DISKUZIA

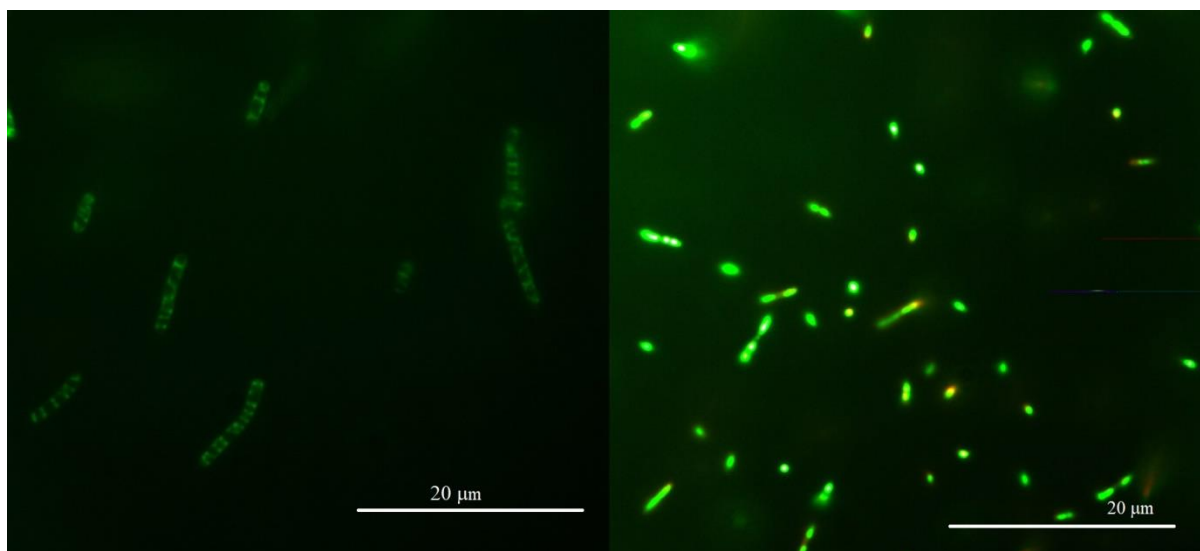
Táto diplomová práca nadväzuje na dlhodobý výskum, ktorý sa v rámci Fakulty chemickej VUT zameriava na úlohu PHA v stresovej odolnosti baktérií. Cieľom práce bolo posúdiť využiteľnosť epifluorescenčného mikroskopu pri štúdiu stresovej odozvy bakteriálnych producentov PHA na úrovni jednotlivých buniek. Ako modelový organizmus pre tento účel boli vybrané baktérie *Cupriavidus necator* H16 a ako PHB-negatívna kontrolná kmeň *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴. K analýze stresovej odpovedi boli vybrané 2 bežné faktory, a to etanol o dvoch rôznych koncentráciách a kyslé pH, a to predovšetkým z toho dôvodu, že expozícia týmito faktormi spôsobuje fundamentálne odlišné efekty. Zatiaľ čo v prípade etanolu je primárne narušená integrita bunkovej steny, kyslé prostredie funguje ako nešpecifické denaturačné činidlo, ktoré spôsobuje stratu natívnej štruktúry a biologickej aktivity biopolymerných bunkových komponentov. Na stanovenie stresovej odozvy buniek boli využívané dve dobré známe metódy – fluorescenčný mikroskop a prietokový cytometer. Kým fluorescenčná mikroskopia je založená na priamej vizualizácii jednotlivých buniek po inkorporácii vhodného fluorescenčného farbivá, prietoková cytometria meria fluorescenčnú odozvu taktiež na úrovni jednotlivej bunky, ale umožňuje túto odozvu zhromaždiť a analyzovať pre štatisticky významný súbor buniek. Ako fluorescenčná bunková sonda pre analýzu stresovej odozvy na bunkách boli použité jednak rutinne používané farbiva s dobre popísanou fotofyzikou a špecifickým mechanizmom bunkového účinku (propídium jodid, SYTO9), ale ďalej tiež akridínová oranž, pre ktorú boli pri štúdiu literatúry nájdené veľmi nejednoznačné interpretácie spektrálneho správania pri farbení prokaryotických buniek.

5.1. Stanovenie stresovej odozvy buniek pomocou fluorescenčného mikroskopu

5.1.1. Farbenie s akridínovou oranž

Kontrolné (nestresované) bakteriálne kultúry

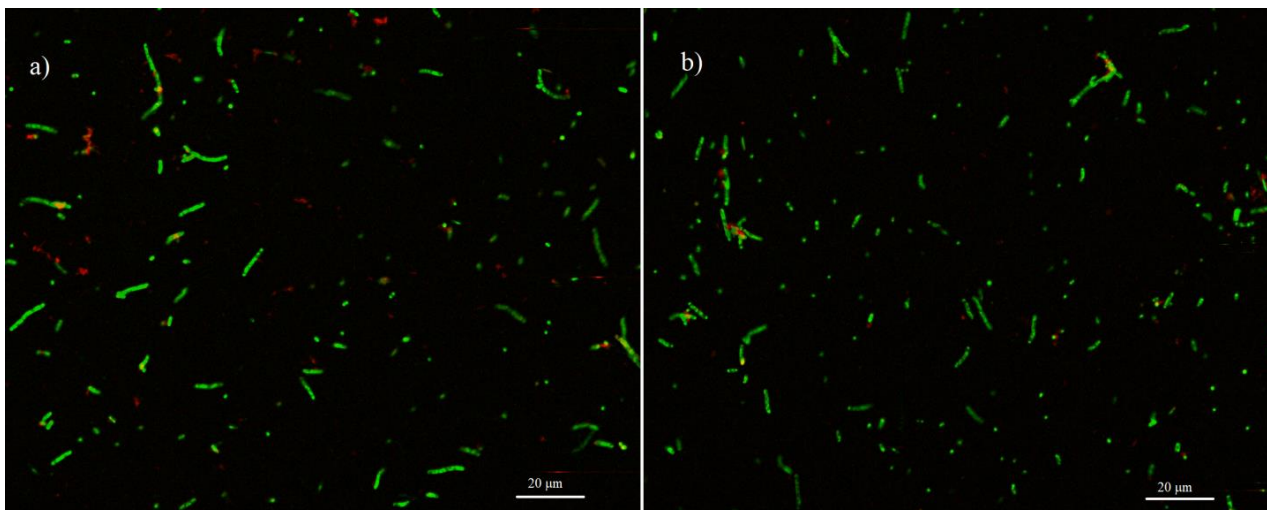
AO je dlhodobo známe farbivo s potenciálnou použiteľnosťou na stanovenie stresovej odozvy buniek. Je schopná penetrovať do bunky a v závislosti na ich stave, ofarbiť ich zelene či červene. Na stanovenie stresovej odozvy boli v prvom kroku nasnímané živé bunky *C. necator* H16 a PHB⁻⁴. Obi dve kultúry vykazovali intenzívnu zelenú fluorescenciu. Bunky boli nasnímané pri rozlíšení 100× a boli rozoznaiteľné podľa morfológických znakov a veľkosti. Bunky *C. necator* H16 sú väčšie v porovnaní s PHB⁻⁴. Z morfológického hľadiska je pekne viditeľná ich granulovitosť, ktorá tvorí väčšiu časť bunky. Granule neobsahujú nukleové kyseliny a kvôli tomu nevykazovali žiadnu fluorescenciu, keďže AO je schopný špecificky sa viazať len na nukleové kyseliny. *C. necator* PHB⁻⁴ je mutantný kmeň bez granúl. V tomto prípade celé telo bunky rovnomerne fluoreskovalo zelenou farbou. Niektoré miesta sú mierne sfarbené do oranžova, čo naznačuje oblasti so zvýšeným obsahom RNA.



Obr. 15: Živé bunky *C. necator* H16 (vľavo) a PHB⁴ (vpravo) farbené s AO pri rozlíšení 100×

Expozícia etanolu

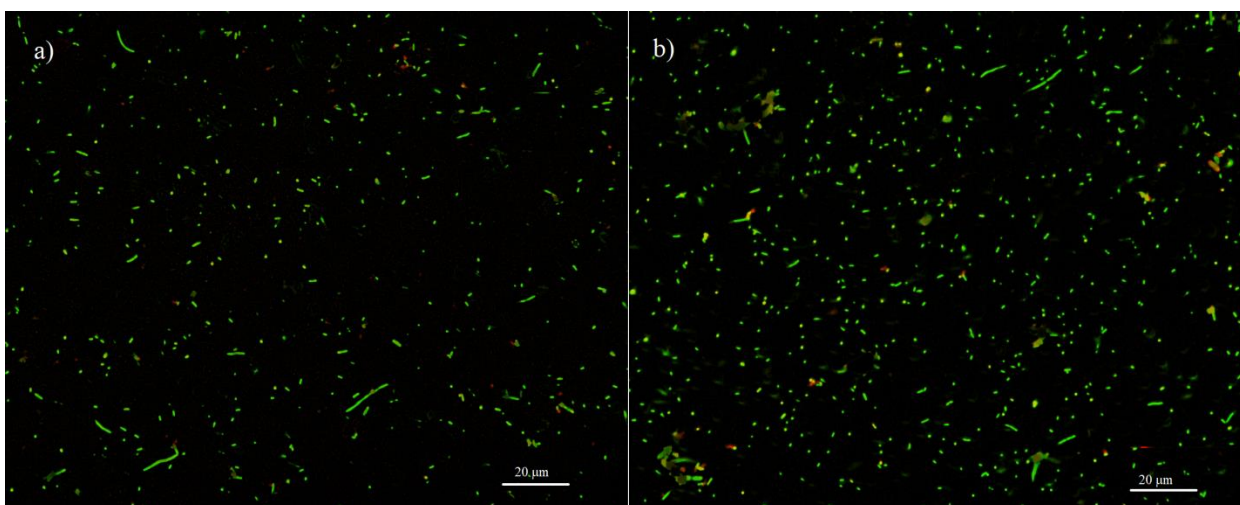
Kultúry vystavené expozícii etanolu boli pripravené podľa postupu v kapitole 4.3.1. Etanol je silným dezinfekčným činidlom, ktorý rozrušuje bunkovú membránu. Na obr. 16 je znázornený vplyv 50% a 70% etanolu na *C. necator* H16. Obrázok znázorňuje zmiešanú vzorku, ktorá bola získaná zmiešaním kultúry exponovanej etanolom a kontrolnej kultúry (nestresovanej) v objemovom pomere 1:1. Na obrázku je zrejmé, že všetky bunky fluoreskovali zelene a nedalo sa rozlíšiť živé bunky od buniek exponovaných etanolom. Je to z dôvodu, že etanol nespôsobuje denaturáciu DNA a bunkové jadro bolo intaktné, vďaka ktorému väzba medzi DNA a AO bola rovnaká ako u buniek z kontrolnej kultúry (živých buniek). V určitých častiach obrázku sú viditeľné červené škvrny, ktoré sa väčšinou nachádzajú v priamej blízkosti buniek. Pôsobením etanolu dochádza k rozrušeniu membrány a k vyliatiu vnútorných bunkových orgánov. Predpokladáme, že červené škvrny sú tvorené lýzovaným obsahom bunky, hlavne molekulami RNA a plazmidmi. Výsledky ukazujú, že bunky ošetrené s vyššou koncentráciou etanolu sa nelíšili od 50% etanolu. Tieto koncentrácie už sú príliš vysoké a prekročujú limit buniek, ktoré by boli schopné ešte prežiť. Vyvolaný účinok etanolu bol rovnaký pri oboch koncentráciách.



Obr. 16: Živé a stresované bunky (zmes kultúr v pomere 1:1) *C. necator* H16 farbené s AO pri rozlíšení 40×. a) 50% etanol b) 70% etanol

Vybrané záznamy z expozície etanolu u *C. necator* PHB⁻⁴ sú uvedené na obr. 17. Podobne ako u H16 vzorky obsahovali pol na pol živé i stresované bunky. Baktérie aj v tomto prípade vykazovali zelenú fluorescenciu s prípadnými červenými škvrnami vedľa nich. Etanol mal podobný účinok aj na tento kmeň a podľa očakávania etanol spôsobil porušenie integrity membrány.

Ako bolo popísané v kapitole 2.2.2, v experimente publikovanom autormi Zhao a kol. pri expozícii 10% etanolu PHB granule vykazovali protektívny účinok. Avšak ani jeden kmeň neprežil 15% a 20% koncentráciu etanolu [23]. Podľa týchto poznatkov môžeme konštatovať, že naše používané koncentrácie boli príliš vysoké nato, aby to baktérie prežili. Takéto vysoké koncentrácie etanolu sú nad ich limitné prispôsobenie a dochádza k úplnej deštrukcii membrány. Etanolvý stres v našom prípade vyvolal rovnaký efekt u oboch sledovaných kmeňoch, žiadny protektívny efekt nebol potvrdený v bunkách bakteriálneho kmeňa *C. necator* H16 prítomnosťou PHB granúl.



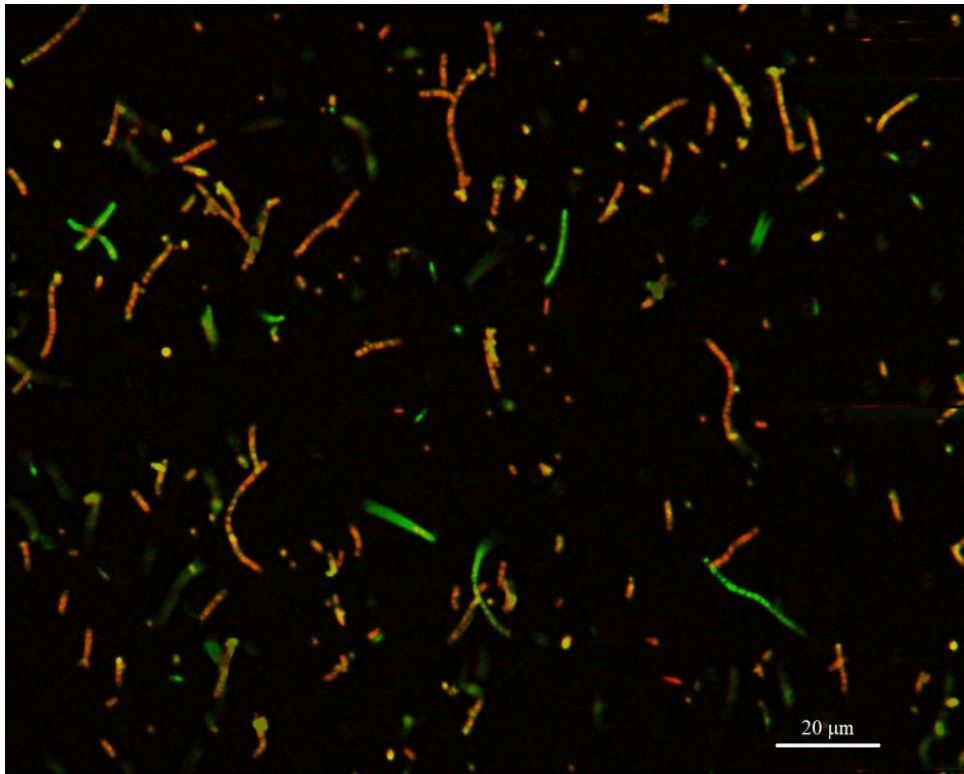
Obr. 17 Živé a stresované bunky (zmes kultúr v pomere 1:1) *C. necator* PHB⁻⁴ farbené s AO pri rozlíšení 40×. a) 50% etanol b) 70% etanol

Toxicita etanolu sa pripisuje jeho prednostnej interakcii k lipidovým dvojvrstvám v mikrobiálnych membránach v hydrofóbnom prostredí, čo vedie k poruchám membránovej štruktúry. Keďže plazmatická membrána chráni bunku pred vonkajším prostredím, jej integrita sa považuje za dôležitý indikátor životaschopnosti buniek pri skúmaní účinku stresu. V miešanej kultúre obsahujúci živé i stresované bunky po farbení s AO sa dalo identifikovať a sledovať vplyv etanolu na bunky. Červené škvrny naznačujú stratu integrity membrány, avšak nepotvrdzujú úplne usmrtenie buniek, z hľadiska fluorescencie pozorovaných buniek neboli pozorované žiadne spektrálne zmeny, na základe ktorých by bolo možné posúdiť mieru usmrtenia vplyvom expozície etanolu.

Expozícia kyslom pH

Postup prípravy vzoriek je popísaný v kapitole 4.3.2. Na analýzu bola používaná zmes baktérii obsahujúca polovičné množstvo živých a mŕtvych buniek. *C. necator* patrí do skupiny neutrofilov, čo znamená, že ich pH optimum je okolo pH 7. Mierne výkyvy pH sú schopné mikroorganizmy prežiť a adaptovať sa. V tejto práci boli baktérie vložené do extrémne kyslého pH, konkrétne do roztokov o pH = 1. Takéto prostredie a zmeny pH už nie sú schopné prežiť žiadne bakteriálne kmene okrem extrémofilov.

Na obr. 18 je vybraný obrazový záznam zmesi kultúry *C. necator* H16 po pH šoku so zmiešanými živými (nestresovanými) bunkami. Niektoré baktérie vykazujú zelenú a niektoré červenú/oranžovú fluorescenciu. Zelene fluoreskujúce baktérie sú brané ako živé. Ich intenzita a morfológia odpovedá bunkám bez akéhokoľvek namáhania (obr. 15). Bunky s červenou fluorescenciou stratili svoju životaschopnosť. Kyslé pH vyvoláva zmenu koncentračného gradientu H^+ vo vnútri bunky. Táto zmena má denaturačné účinky na biomolekuly prítomné v bunke. Červená farba buniek je daná naviazaním AO na denaturované plazmidy a na čiastočne rozplynuté úseky bakteriálnej DNA. Telo buniek nie je rovnomerne farebné, čo práve závisí na množstve naviazaných AO molekúl. Oblasti viac do červene obsahujú veľa po seba naviazaných molekúl AO, ktoré sú takto schopné vytvoriť oligoméry alebo polyméry.

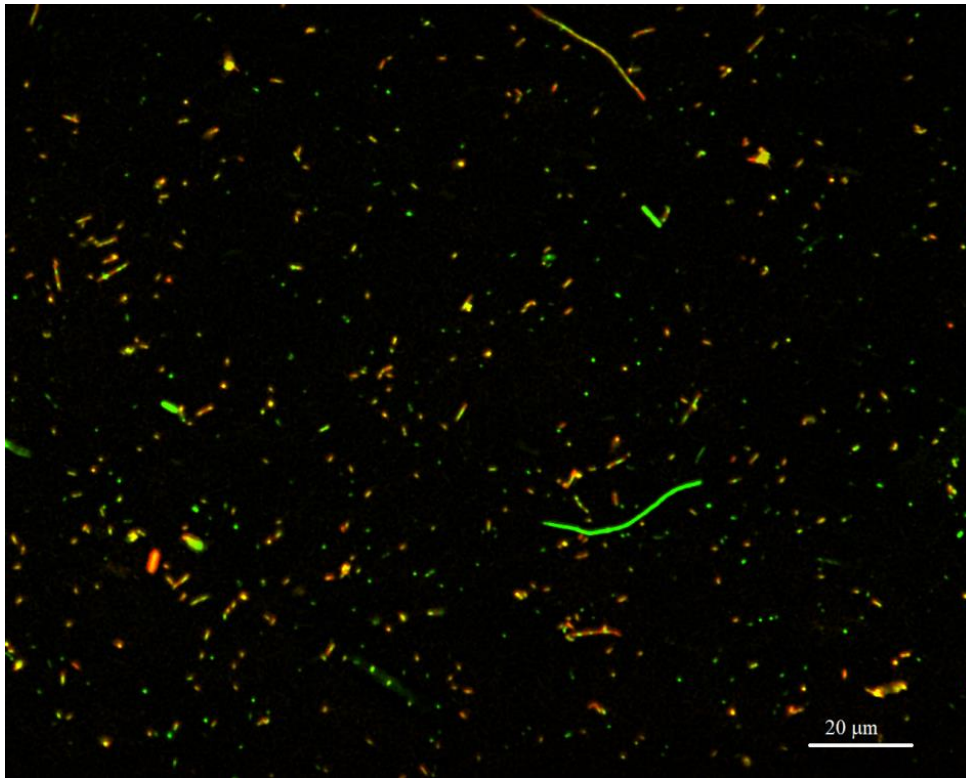


Obr. 18: Živé a ošetrované bunky *C. necator* H16 pri pH 1 farbené s AO pri rozlíšení $40\times$

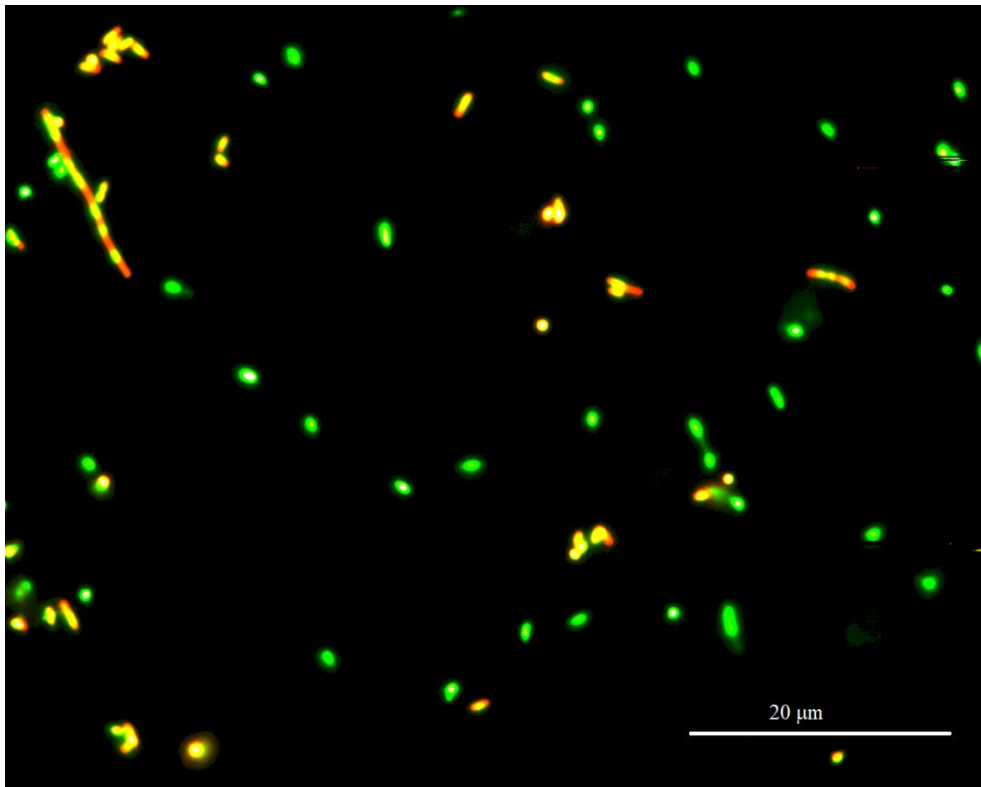
Na obr. 19 je znázornený vplyv kyslého prostredia (pH = 1) na kmeň *C. necator* PHB⁴. Charakter fluorescencie je veľmi podobný bunkám H16. Intenzívne zelené bunky sú živé a bunky farbené do oranžova sú mŕtve. Ani u tohto kmeňa fluorescencia jednotlivých buniek nie je rovnomerná. Na obr. 20 je zobrazené nevyvážené rozloženie farby AO. Žlté bodky v tele buniek môžu naznačovať čiastočne denaturované úseky bakteriálnej DNA, lebo trojrozmerná štruktúra nukleoidu je veľmi stabilná a nepodlieha ľahko rozpleteniu. Na tieto miesta sa viaže menšie množstvo AO, ktorá je schopná vytvoriť len diméry a ich emisia je posunutá k nižším vlnovým dĺžkam.

Rovnako ako v prípade expozície etanolu, tiež pri expozícii kyslému prostrediu obidva testované kmene reagovali podobným spôsobom. Pri takomto nízkom pH je predpokladané okamžitá bunková smrť. Túto teóriu potvrdzujú aj obrázky, kde veľká časť buniek vykazuje červenú fluorescenciu. Prítomnosť PHB granúl mohla mať mierny protektívny účinok, avšak vizuálne sa to nedá odhadnúť. Aby bolo možné posúdiť ochrannú vlastnosť PHA, bolo by potrebné spočítať bunky a porovnať počet živých a mŕtvych medzi vybranými kmeňami.

AO sa pri tomto strese ukázal ako vhodný indikátor na stanovenie LIVE/DEAD analýzy. Živé a mŕtve bunky sa dali rozlíšiť veľmi jednoducho už na prvý pohľad. Keďže pH do určitej miery pôsobí na nukleové kyseliny prítomné v bunke, tak výsledky z mikroskopu môžeme považovať ako relevantný znak viability.



Obr. 19: Živé a ošetrované bunky *C. necator* PHB⁴ pri pH = 1 farbené s AO pri rozlíšení 40×



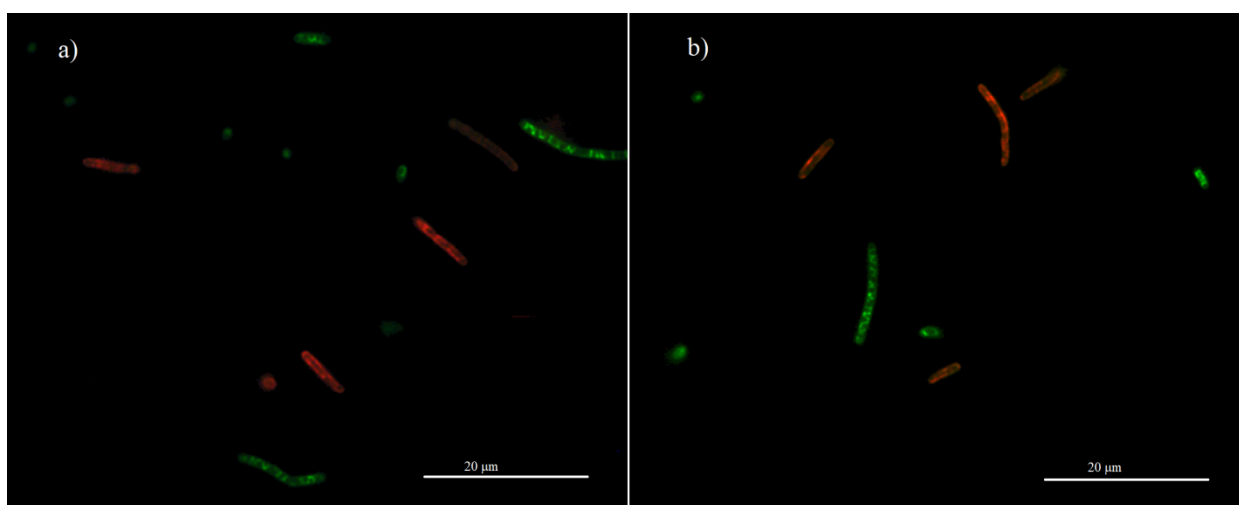
Obr. 20: Živé a ošetrované bunky *C. necator* PHB-4 pri pH = 1 farbené s AO pri rozlíšení 100×

5.1.2. Farbenie s pripídiom jodidom a SYTO9

Kombinácia týchto dvoch fluorescenčných sond je súčasťou bežne používaného komerčného kitu BacLight™. Tento kit je dneska najbežnejšou sondou na stanovenie viability buniek. SYTO9 penetruje do buniek bez ohľadu na ich fyziologický stav či životaschopnosť. PI prechádza len do buniek s porušenou bunkovou membránou. Živé bunky vykazujú zelenú fluorescenciu, mŕtve bunky sú červené lebo PI v nich zháša fluorescenciu spôsobenú SYTO9.

Expozícia etanolom

Pomocou kombinácie fluorescenčných sond PI a SYTO9 bola overená vhodnosť AO ako viabilné farbivo. Na obr. 21 sú zobrazené bunky *C. necator* H16 po ošetrení s 50% a 70% etanolom. Kombinácia týchto sond veľmi pekne odlišuje živé a mŕtve bunky. Vizualne je to veľmi prehľadné a jednoduché na pochopenie.



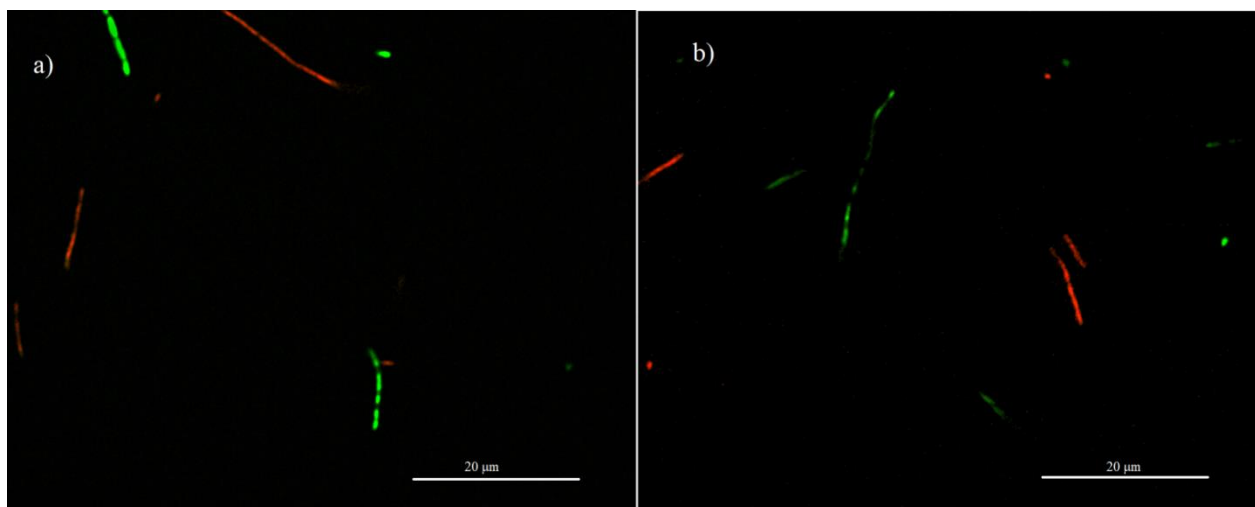
Obr. 21: Živé a ošetrované bunky *C. necator* H16 farbené s kombináciou PI a SYTO9 pri rozlíšení 100×.
a) 50% etanol, b) 70% etanol

Bolo vybraných 10 náhodných obrazových záznamov z merania, pri ktorých boli počítané zelene a červené svietiace bunky (príloha 1, príloha 2). Výsledky počítania sú zhrnuté v tabuľke 3. V prípade 50% etanolu 52% buniek vykazovalo zelenú fluorescenciu a 48% červenú. Pri vyššej koncentrácii vyšlo, že 52% buniek je mŕtvych a 48% je živých. Keďže vzorky obsahovali pol na pol natívne a ošetrované bunky dá sa odvodiť, že etanol pri použitých koncentráciách spôsobil 100% úmrtie buniek. Pri vyššej koncentrácii počet odumretých buniek je vyšší, ale tento rozdiel je veľmi malý skoro až zanedbateľný.

Tabuľka 3: Porovnanie počtov živých a mŕtvych buniek u *C. necator* H16

		Číslo obrázku										Percento
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
EtOH50	zelené	5	4	4	3	4	6	4	3	3	3	52 %
	červené	4	4	3	4	4	4	4	3	2	4	48 %
EtOH70	zelené	3	3	4	3	3	2	5	3	2	4	48 %
	červené	3	3	2	4	3	4	2	5	4	4	52 %

Na obr. 22 je znázornený bakteriálny kmeň *C. necator* PHB⁻⁴ po farbení kombinovanými fluorescenčnými sondami. Červené bunky charakterizujú baktérie s rozrušenou membránou, pričom zelené sú intaktné bunky. Zdanlivo etanolový stres mal rovnaký vplyv ako u H16.



Obr. 22: Živé a ošetrované bunky *C. necator* PHB⁻⁴ farbené s kombináciou PI a SYTO9 pri rozlíšení 100×. a) 50% etanol, b) 70% etanol

Aj v tomto prípade bolo vybrané 10 náhodných obrázkov, kde boli počítané zelené a červené fluoreskujúce baktérie (príloha 3, príloha 4). U 50% etanolu pomer živých a mŕtvych buniek bol skoro pol na pol. To naznačuje, že pri tejto koncentrácii došlo k úplnej strate životaschopnosti ošetrovaných baktérii. V prípade 70% etanolu percento neživých buniek prevyšuje nad živými. Vzorky by mali obsahovať v rovnakom pomere živé i neživé baktérie, avšak skoro 70% buniek vykazoval červenú fluorescenciu.

Tabuľka 4: Porovnanie počtu živých a mŕtvych buniek u *C. necator* PHB⁻⁴

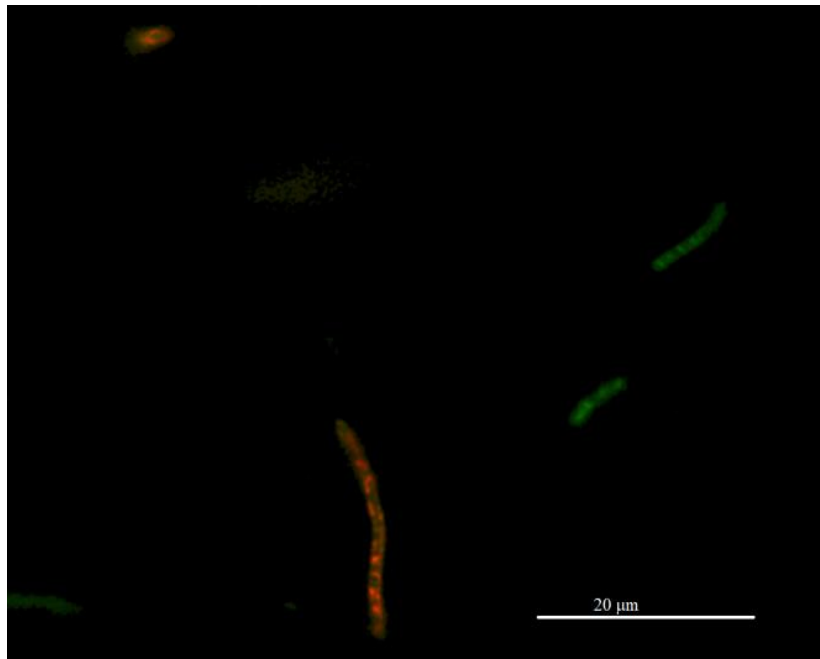
		Číslo obrázku										Percento
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
EtOH50	zelené	4	3	4	5	3	3	3	3	3	3	49 %
	červené	4	4	3	4	4	4	3	3	2	4	51 %
EtOH70	zelené	1	1	2	3	4	5	4	3	5	2	32 %
	červené	4	9	9	7	5	6	6	3	10	6	68 %

Keď porovnáваме tieto dve sledované bakteriálne kmene tak z percentuálneho hľadiska je zrejmé, že stresová odozva buniek u H16 bola trochu väčšia pri oboch koncentráciách etanolu. To môže naznačovať, že granule pomáhajú odolávať proti etanolovému stresu. Avšak táto koncentrácia už je tak vysoká aj pre tieto kmene, že ich stresová odolnosť je minimálna. Podobne ako u farbení s AO môžeme skonštatovať, že ich odolnosť sa neprejavovala a bunky exponované účinkom etanolu boli mŕtve.

Expozícia v kyslom pH

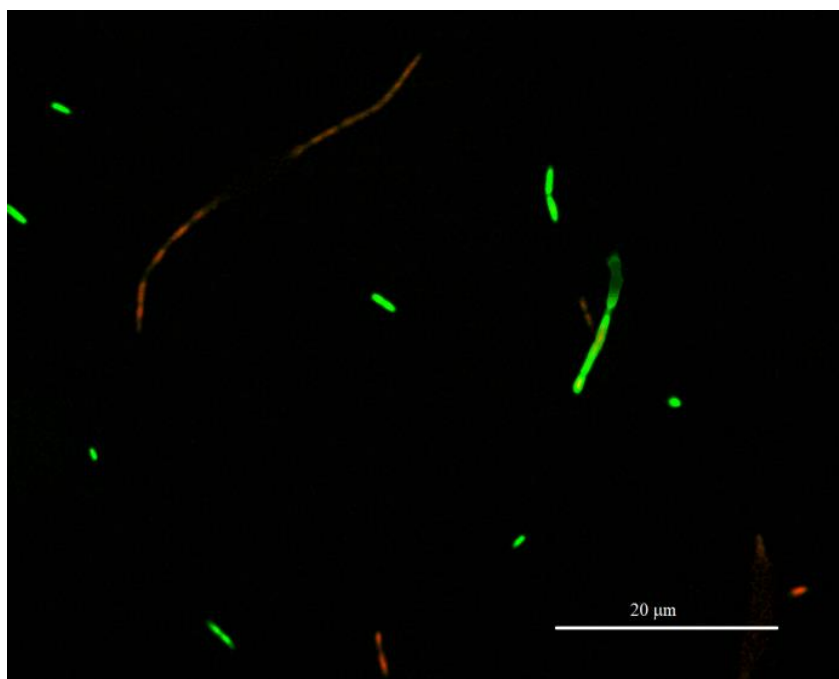
Taktiež vplyv kyslého pH bol overený aj pomocou komerčnej sondy. Na obr. 23 je vzorový príklad *C. necator* H16 po pH strese. Mŕtve bunky nie sú zafarbené úplne do červena ako

v prípade etanolového stresu. Je to spôsobené s tým, že PI je schopný prechádzať len cez porušenú membránu. U kmeňa H16 pri tomto namáhaní došlo len k čiastočnému poškodeniu membrány a len malé množstvo PI bolo schopné penetrovať sa do bunky, ktoré nebolo dostačujúce na vytesnenie zelenej fluorescence SYTO9. Nevýhodou PI je, že je vhodné farbivo na indikáciu straty integrity, ale iné zmeny tiež vedúce k jej smrti v bunke nevie identifikovať. Pri porovnaní výsledkov z farbenia s AO tak môžeme povedať, že čiastočne červené bunky sú mŕtve.



Obr. 23: Zmesová kultúra živých buniek *C. necator* H16 a buniek exponovaných kyslému pH, farbený PI a SYTO9, rozlíšenie 100×

V prípade kmeňa *C. necator* PHB⁻⁴ červená fluorescence bola intenzívnejšia a neobsahovala náznaky zelenej fluorescence. To môže byť spôsobené s tým, že kmeň H16 vďaka svojim granulám bol odolnejší voči stresu, kým mutant bez granúl bol náchylnejší aj na rozrušenie membrány. Zaujímavosť je, že PI sa v bunke hromadí len v určitých miestach. Pri menších bunkách je to začiatok a koniec, a v prípade dlhších buniek bodovo pozdĺž tela.



Obr. 24: Zmesová kultúra živých buniek *C. necator* PHB⁻⁴ a buniek exponovaných kyslému pH, farbený PI a SYTO9, rozlíšenie 100×

Vplyv pH = 1 bol porovnaný u oboch kmeňoch pomocou počítania červených a zelených buniek podobne ako v predchádzajúcej kapitole. Obrazové záznamy, ktoré boli vybrané na počítanie sú v prílohách (príloha 5, príloha 6). U *C. necator* H16 oranžové a červené bunky so zelenou fluorescenciou boli započítané ako mŕtve bunky. Percento životaschopných buniek v prípade H16 bolo 52% a u PHB⁻⁴ 56%. Takéto prostredie je ďaleko od pH optima týchto organizmov. Tento výsledok by mohol znamenať, že časť buniek prežila prostredie s pH = 1, však môže to byť spôsobené aj nehomogenitou vzorky (lokálnym združovaním buniek z jednotlivých komponentov zmiešanej kultúry). Táto odchýlka mohla byť spôsobená tým, že v baktériách kde nedošlo k porušeniu membrány sa PI nemohol penetrovať.

Tabuľka 5: Porovnanie živých a mŕtvych buniek u pH šoku

		Číslo obrázku										Percento
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
H16	zelené	3	1	4	4	5	3	4	4	3	2	52 %
	červené	3	4	4	4	2	2	3	2	2	4	48 %
PHB ⁻⁴	zelené	3	6	9	8	4	4	4	4	5	5	56 %
	červené	7	3	4	3	3	5	3	3	5	5	44 %

V poslednom rade je porovnaná účinnosť bežne používanej zmesi fluorescenčných sond s AO. V prípade zmesi SYTO9 a PI obrázky z mikroskopu boli viac názorné a jednoduchšie na pochopenie na prvý pohľad. Živé a mŕtve bunky boli pekne od seba odlišiteľné a porovnateľné. Vďaka tejto vlastnosti bolo možné obrázky z epifluorescenčného mikroskopu použiť na ďalšiu jednoduchú analýzu. Nevýhodou zmesi je vlastnosť PI, ktorý sa penetruje len do buniek s porušenou membránou. Praktická výhoda AO je to, že stačí jedna

sonda na stanovenie stresovej odozvy buniek. Ako bolo popísané v kapitole 3 jej využitie ako viabilná sonda je veľmi diskutované. Jej účinnosť bola vyskúšaná na dva stresové faktory, ktoré spôsobujú bunkovú smrť odlišným mechanizmom. Obrázky neboli tak kvalitné a čisté ako v prípade komerčného kitu, ale dalo sa rozlíšiť živé bunky od stresovaných. Navyše je zrejmé, že spektrálne prechody u AO sú značne závislé na študovanom bakteriálnom kmeni a na konkrétnom mechanizme jeho stresovej odozvy, čo by mohlo byť využité pri podrobnejšom štúdiu stresovej odpovede daného kmeňa na rôzne stresové faktory, kde už jednoduchá a špecifická odozva bežných LIVE/DEAD viabilných sond žiadne podrobnejšie informácie ponúknuť nemôže. Preto si myslím, že AO pre jednoduché organizmy, ako sú bakteriálne kmene testované v tejto práci, môže byť vhodné fluorescenčné farbivo na podrobnejšie štúdium ich životaschopnosti a stresovej odozvy.

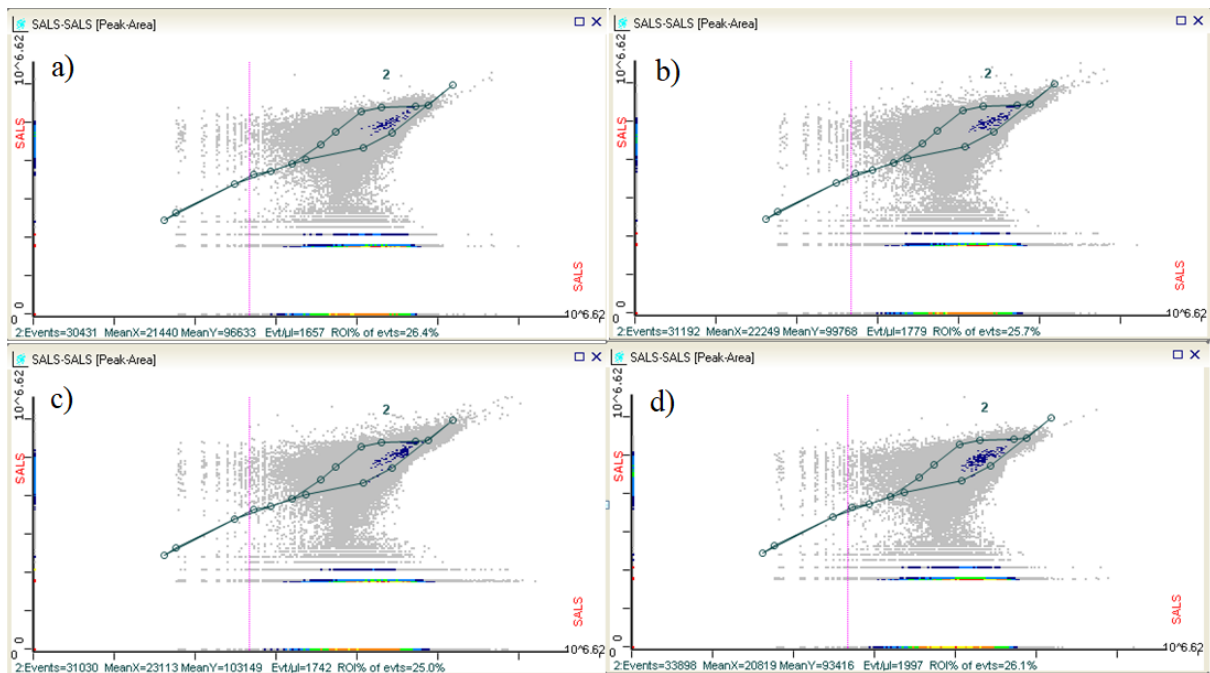
5.2. Stanovenie stresovej odozvy buniek pomocou prietokového cytometra

V tejto časti bola testovaná využiteľnosť AO ako viabilná sonda na prietokovej cytometrii, ktorá je veľmi populárna a častá metóda na stanovenie životaschopnosti buniek.

5.2.1. Farbenie s akridinovou oranž

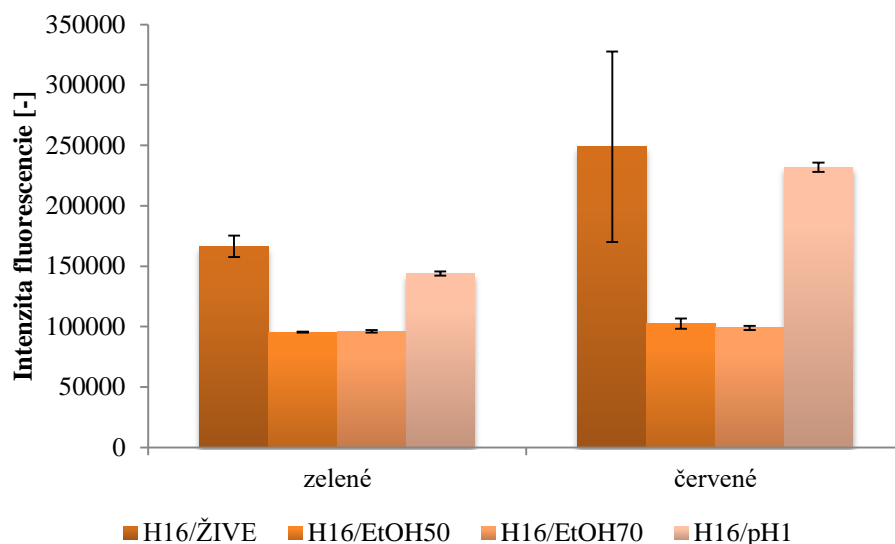
Stresové namáhanie vzoriek bolo podobné ako u epifluorescenčnom mikroskope, ale postup farbenia bol odlišný vid'. kapitola 4.4.2. Iný postup prípravy roztoku fluorescenčnej sondy a farbenie buniek bol potrebný kvôli tomu, lebo intenzita fluorescencie bola príliš vysoká a ťažko interpretovateľná.

Najprv ako základ bol nameraný charakter populácii a intenzita fluorescencie v jednotlivých kanáloch pre kontrolnú kultúru (živé) a pre kultúru exponovanou stresom (stresované bunky). Zo SALS/SALS cytogramu pre *C. necator* H16 vyplýva, že všetky vzorky obsahovali len jednu populáciu buniek. Rozloženie cytogramov je veľmi podobné, z ktorého vyplýva, že stresy nespôsobili výraznú zmenu vo veľkosti. Cytogramy pre *C. necator* PHB⁻⁴ (príloha 7) sú veľmi podobné a jediný rozdiel je, že populácia je posunutá doľava, keďže tieto bunky sú menšie v porovnaní s H16.

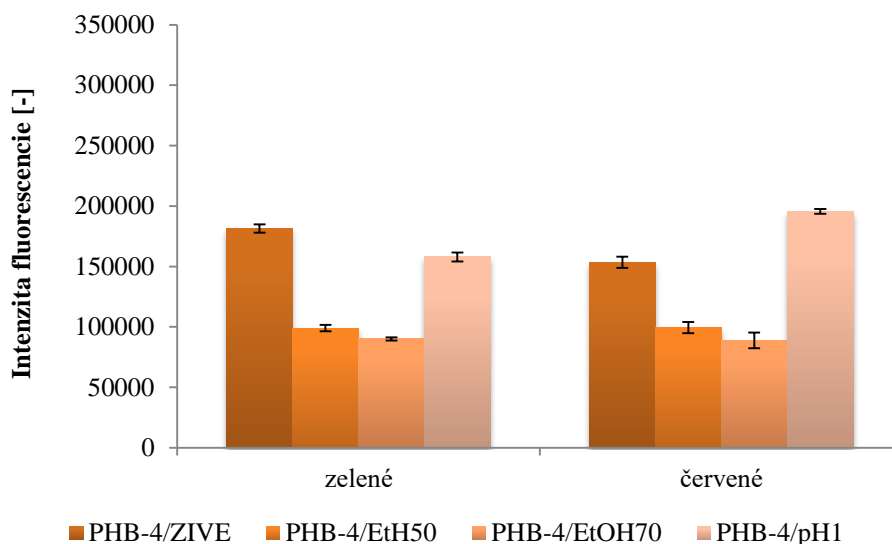


Obr. 25: SALS/SALS cytogram *C. necator* H16. a) Nenamáhané bunky (kontrolná kultúra) b) 50% etanol c) 70% etanol d) pH 1

Pre oblasti záujmu (ROI) definované na jednotlivých cytogramoch modrou hranicou (vid' obr. 25) bola následne určená distribúcia intenzít fluorescence jednotlivých buniek vrátane základných štatistických parametrov (priemerná intenzita, medián intenzity). Na obr. 26 a obr. 27 je zobrazená závislosť priemernej intenzity fluorescence jednej bunky v jednotlivých kanáloch pre stresované a kontrolné bunky *C. necator* H16 a PHB⁻⁴. Intenzita a trend píkov je podobný u oboch kmeňoch. V zelenom kanáli najväčšiu intenzitu vykazovali živé bunky, podľa očakávania intenzita zelenej fluorescence pre bunky exponované stresovom prostredí klesala. Avšak neočakávane živé bunky fluoreskovali aj červene a priemerná intenzita červenej fluorescence v prípade H16 bola vyššia oproti zelenej fluorescence. Táto červená fluorescence v mikroskope nebola viditeľná a môže byť spôsobená molekulami RNA farbenými AO. U etanolového stresu sa nedalo rozlíšiť vplyv koncentrácie etanolu, pretože ich charakter správania bol rovnaký aj u H16 i u PHB⁻⁴. Intenzita v červenom a zelenom kanáli bola rovnaká, v oboch prípadoch bol zaznamenaný zreteľný pokles priemernej intenzity oproti kontrolnej (nestresovanej) vzorky. Malá intenzita červenej fluorescence môže byť spôsobená s tým, že došlo k vyliatiu obsahu bunky a etanol nespôsobuje denaturáciu DNA. To odpovedá výsledkom z epifluorescenčného mikroskopu, kde bunky fluoreskovali len zelene (5.1.1.). U kyslého pH namáhané bunky svietili červene, čo sa objavilo aj u prietokového cytometra zvýšením signálu intenzity červenej fluorescence. Okrem priemernej hodnoty bol určený aj medián intenzity fluorescence na jednotlivých kanáloch a jeho grafické znázornenie je v prílohe (príloha 8, príloha 9).

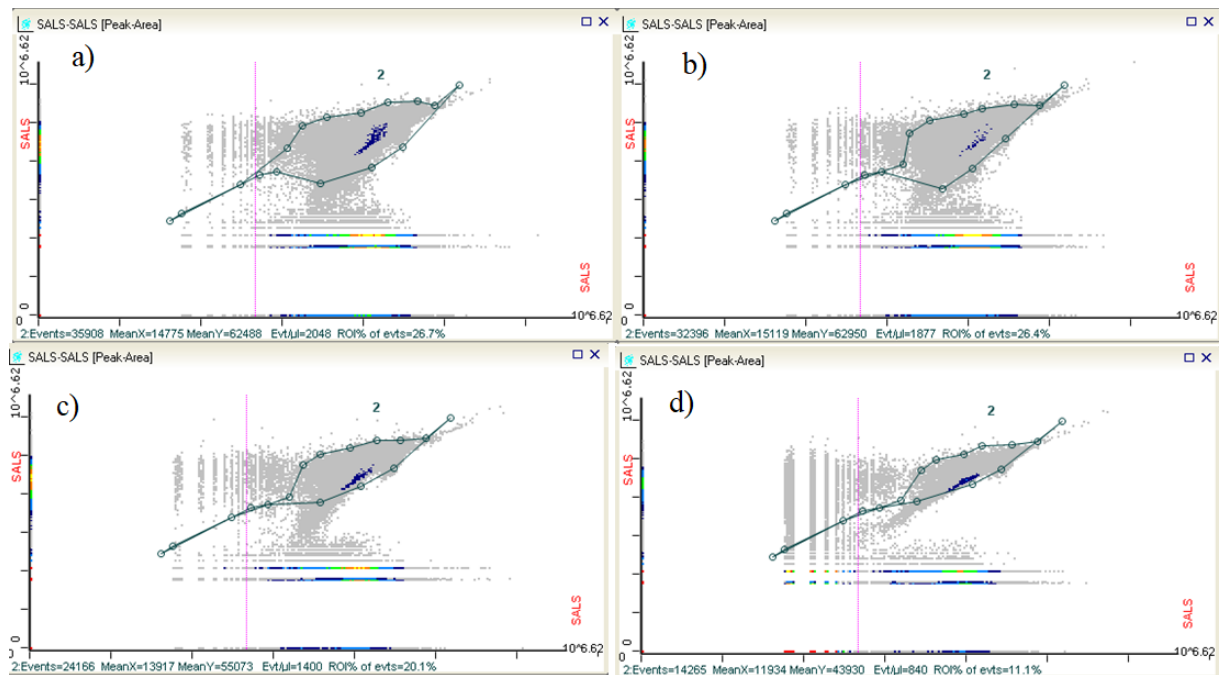


Obr. 26: Závislosť priemernej intenzity fluorescence na jednotlivé kanály pre *C. necator* H16, farbenie s AO



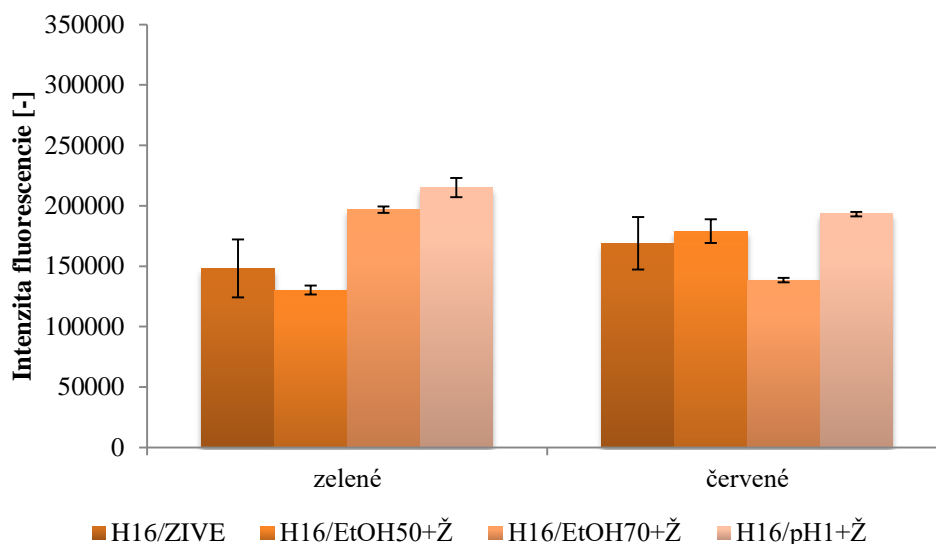
Obr. 27: Závislosť priemernej intenzity fluorescence na jednotlivé kanály pre *C. necator* PHB⁴, farbenie s AO

V ďalšom kroku bola AO testovaná ako sonda pre LIVE/DEAD analýzu u prietokového cytometra – bola testovaná jej schopnosť v zmesi rozlíšiť bunky živé od buniek exponovaných silnému stresujúcemu prostrediu. Vzorky opäť obsahovali pol na pol stresované a živé bunky. Po miešaní SALS/SALS cytogram bol porovnaný k cytogramu živých buniek. V každom cytograme bola len jedna populácia rovnomerne rozložená. Stresované a živé bunky sa nelíšili veľkosťou. Na ukážku bol vybraný cytogram pre *C. necator* H16, ktorý je na obr. 28. Cytogram pre PHB⁴ je v prílohe 10.

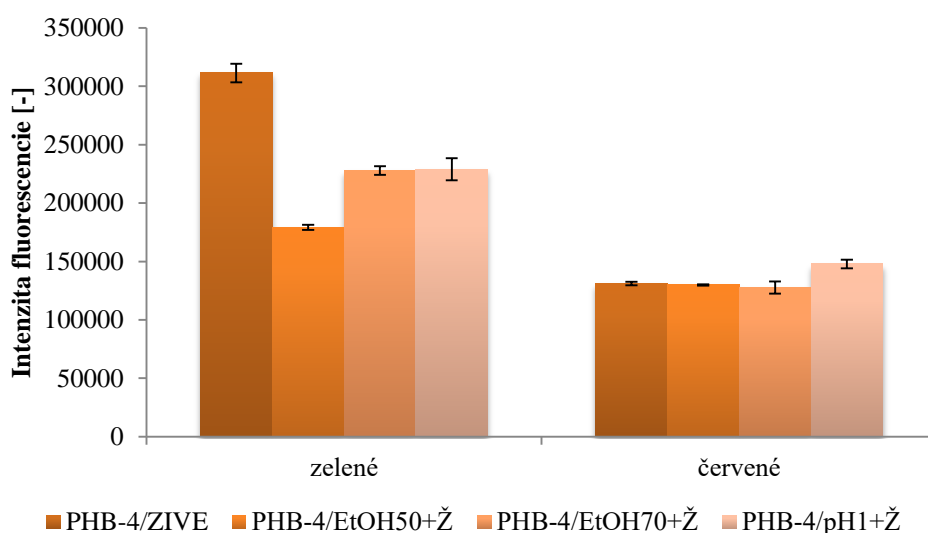


Obr. 28: SALS/SALS cytogram *C. necator* H16 a) živé bunky b) 50% etanol + živé c) 70% etanol + živé d) pH = 1 + živé

Živé bunky boli znovu premerané pre túto sadu. Ich fluorescencia v prípade H16 sa znížila a u PHB⁻⁴ sa skoro dvojnásobne zvýšila. Toto zvýšenie intenzity mohlo byť spôsobené starobou farbiva oproti predchádzajúcemu experimentu. Odlišnosť je viditeľná aj v hustote populácii, kedy v druhom prípade vzorka obsahovala viac buniek. Keď porovnáme len namáhané bunky so zmesou pozorujeme tak viditeľnú odlišnosť v trendoch. Zelená intenzita v prípade H16 bol vyššia alebo rovnaká ako u živých buniek. U etanolového stresu tá intenzita je daná zelene fluoreskujúcimi stresovanými bunkami. U pH = 1 priemerná intenzita bola vyššia, čo naznačuje že časť namáhaných buniek vykazovala totožné vlastnosti ako živé. U *C. necator* PHB⁻⁴ trend v zelenom kanáli je veľmi podobný. Intenzita zmesi je vyššia oproti kultúre len stresovaných buniek, čo je spôsobené fluorescenciou živých buniek. V červenom kanáli intenzita červenej fluorescencie je takmer rovnaká v každom prípade. U živých a etanolovej zmesi tá podobnosť je viditeľná aj na epifluorescenčnom mikroskope. Ako už bolo spomínané etanol pôsobí len na membránu a baktérie fluoreskujú zelene. Keďže tá intenzita je veľmi podobná intenzite živých buniek, jedná sa zrejme o fluorescenciu molekúl RNA a plazmidu vo vnútri alebo mimo bunku. U expozície kyslému pH výsledky z cytometra nie sú v súlade s mikroskopom. V mikroskope baktérie fluoreskovali silne oranžovo-červene. Je možné, že červený kanál cytometru bol schopný detegovať len určitú časť tejto fluorescencie, a v tomto prípade by bol vhodnejší na analýzu signál z oranžového kanálu. Aj v tomto prípade bol určený taktiež medián intenzity fluorescencie a jeho výsledky sú v prílohe 11 a prílohe 12.



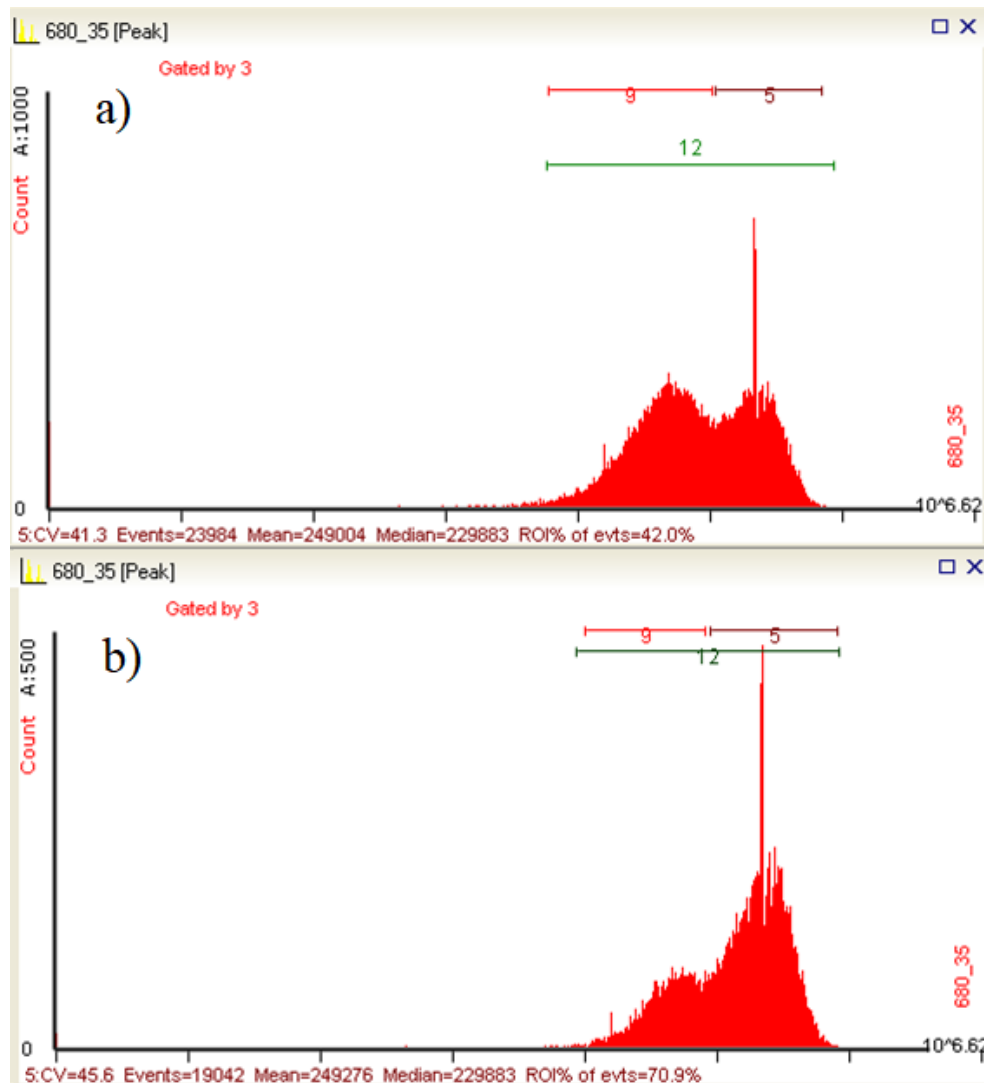
Obr. 29: Závislosť priemernej intenzity fluorescence na jednotlivé kanály pre *C. necator* H16, farbenie s AO



Obr. 30: Závislosť priemernej intenzity fluorescence na jednotlivé kanály pre *C. necator* PHB⁴, farbenie s AO

U *C. necator* H16 červená fluorescence zmesi 50% etanolu so živými bunkami bola vyššia v porovnaní s nenamáhanými bunkami. Za toto prevýšenie sú zodpovedné vyliate molekuly RNA a denaturované plazmidy. V červenom kanáli u ďalších dvoch stresových faktorov, konkrétne 70% etanolu a $\text{pH} = 1$ sa objavili dva navzájom prekrývajúce píky (obr. 31). Tieto píky naznačujú, že v populácii sú dve skupiny buniek s odlišnou intenzitou červenej fluorescence. Pri zmesi 70% etanolu priemerná intenzity dvoch pík je v pomere 1:3, pričom 55% buniek tvorí pík s nižšou intenzitou a 45% pík s vyššou intenzitou. Tento pomer je podobný k pomeru intenzít buniek zo základnej cytometrovej analýzy kontrolných a čisto stresovaných buniek. Pomer priemernej intenzity len etanolom stresovaných buniek k živým je približne 1:2,5. Z toho vyplýva, že prvý pík tvoria kompletne stresované bunky a druhý nenamáhané. V prípade zmesi kontrolných buniek a buniek exponovaných $\text{pH} = 1$

pomer priemerných intenzít je 1:3 a v základnom meraní je skoro 1:1 (intenzita živých k intenzite stresovaných). Nízkú priemernú intenzitu vykazujú iba 28 % buniek zo vzorky, ktoré sú brané ako namáhané bunky. Súhrnný graf závislosti intenzity fluorescence na kanály s rozdelením na jednotlivé populácie je v prílohe 13 a prílohe 14.



Obr. 31: Závislosť počtu buniek na intenzitu fluorescence pre *C. necator* H16 a) 70% etanol + živé bunky b) pH = 1 + živé bunky

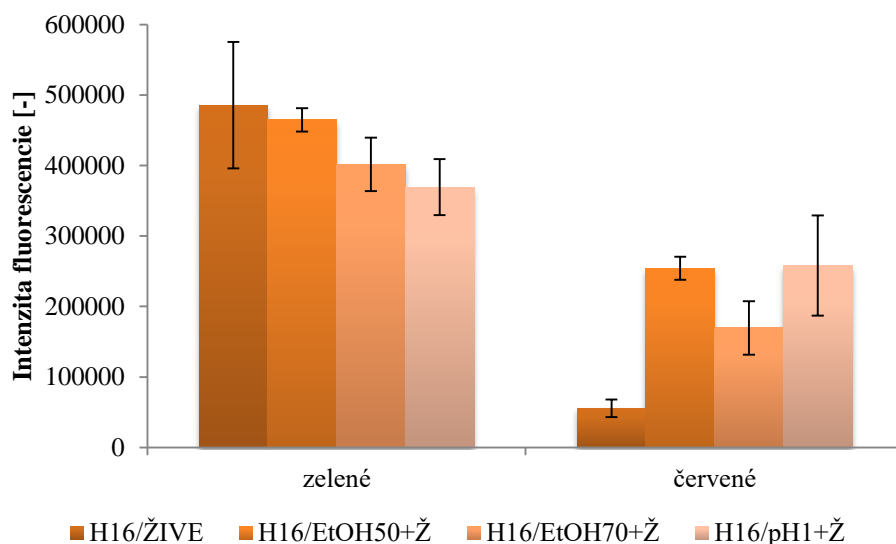
Tabuľka 6: Priemerné intenzity fluorescence pri dvoch typov stresu u *C. necator* H16

Typ stresu	Stredná intenzita fluorescence [-]	Percento buniek [%]
EtOH 70	45 573	54,48
	249 253	45,52
pH = 1	48 845	28,06
	251 896	71,94

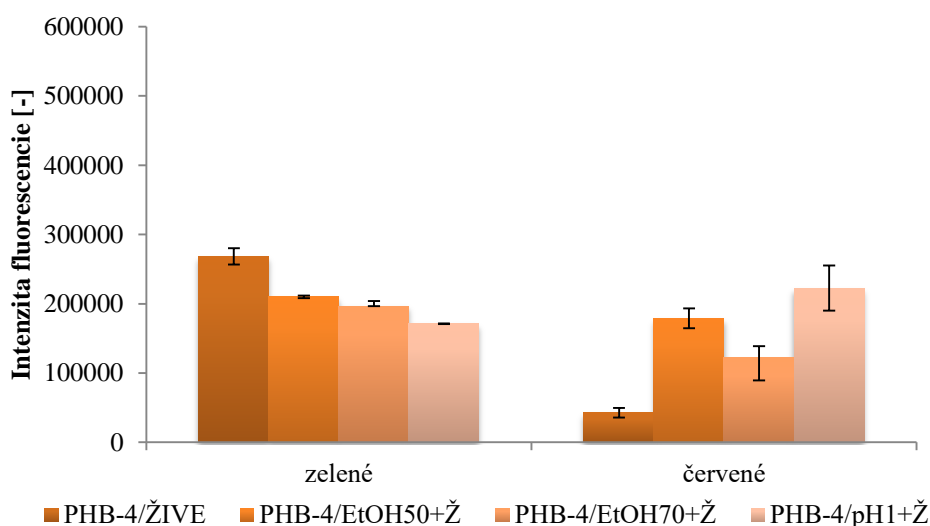
5.2.2. Farbenie so SYTO9 a PI

Výsledky z merania s AO boli overené komerčne používaným viabilitným kitom obsahujúcim SYTO9 a PI. Vzorky boli pripravené podľa postupu v kapitole 4.4.1 a obsahovali opäť rovnomerne rozdelené množstvo živých a stresovaných buniek. Na prvý pohľad sa obidva kmene *C. necator* chovali rovnakým spôsobom pri stresovom namáhaní (obr. 32 a obr. 33). Hlavný rozdiel je v intenzite, ktorá v prípade H16 dosahuje až päťstotisíc a u kmeňa PHB⁴ maximálna hodnota je okolo tristotisíc. Živé bunky vykazovali najväčšiu intenzitu zelenej fluorescence. V červenom kanáli je intenzita minimálna, prítomnosť signálu môže byť spôsobená tým, že v roztoku už mohli byť staršie bunky kde penetroval PI. Intenzita stresovaných buniek v zelenom kanáli je nižšia oproti živými, čo je v súlade s menším počtom živých buniek vo vzorkách. Červená fluorescence pri 50% etanolu a pH = 1 pre obidva kmene bola totožná, čo znamená, že do buniek penetrovalo približne rovnaké množstvo PI. Pri expozícii 70% etanolu bola intenzita menšia, ktorá naznačuje, že tento stres bol menej účinný a cez membránu prechádzalo menšie množstvo farbiva PI. Medián intenzity fluorescence pre farbenie SYTO9 a PI je v prílohe 15 a prílohe 16. Z výsledkov analýzy je zrejmé, že komerčne viabilitný kit je možné dobre rozlíšiť živé a mŕtve bunky predovšetkým pri sledovaní fluorescence na červenom kanáli.

Cieľom tohto merania bolo potvrdiť vhodnosť AO ako sondu pre LIVE/DEAD analýzu. Výsledky z obidvoch merania sú porovnateľné. Výhodou komerčného farbiva je to, že postup a jeho chovanie je štandardizované, aj človek, ktorý sa úplne nevyzná v problematike je schopný veľmi rýchlo pochopiť jeho princíp a pracovať s ním. AO má potenciál vo využití, avšak na analýzu je náročnejší. Jej princíp farbenia je zložitejší a je potrebné pred analýzou charakterizovať jednotlivé vzorky z hľadiska fyziológie. Na druhej strane rovnako ako v prípade použitia AO v epifluorescenčnom mikroskopy aj v prípade cytometrie môže zložitejšia spektrálna odozva AO na rôzne podnety (tvorba monomérov, dimérov alebo polymérnych agregátov) poskytnúť podrobnejšie informácie o konkrétnom mechanizme stresovej reakcie buniek oproti špecifických viabilitným sondám, ako je PI. Cytometria pritom predstavuje veľmi cenný doplnok fluorescenčnej mikroskopie pri takejto analýze. Kým mikroskopia umožňuje interpretáciu stresovej odozvy na základe sledovania spektrálnych zmien u viacerých jednotiek, maximálne desiatok buniek (s výhodou ich priamej vizualizácie), cytometria umožňuje rozšíriť túto analýzu na vzorky obsahujúce štatisticky podstatne významnejší súbor testovaných buniek, avšak samozrejme bez možnosti ich priameho zobrazenia. Obe metódy sa tak vzájomne veľmi dobre dopĺňajú a ich kombinácia predstavuje veľmi cenný analytický nástroj pri štúdiu stresovej odozvy baktérií.



Obr. 32: Závislosť priemernej intenzity fluorescence na jednotlivé kanály pre *C. necator* H16, farbenie s PI + SYTO9

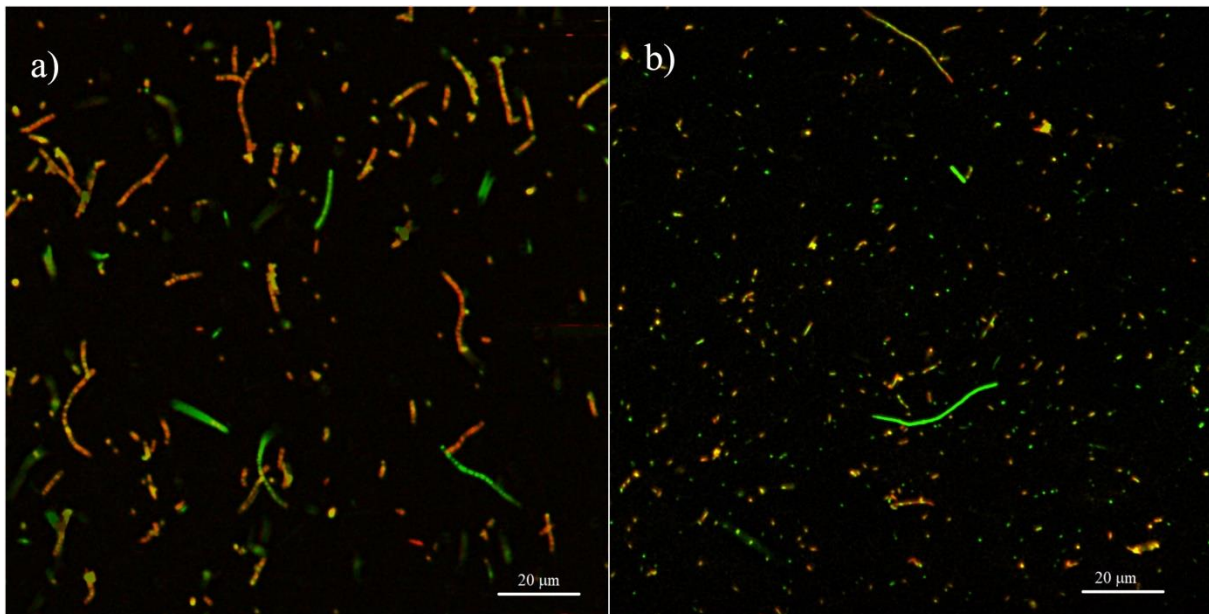


Obr. 33: Závislosť priemernej intenzity fluorescence na jednotlivé kanály pre *C. necator* PHB⁴, farbenie s PI + SYTO9

5.3. Obrazová analýza

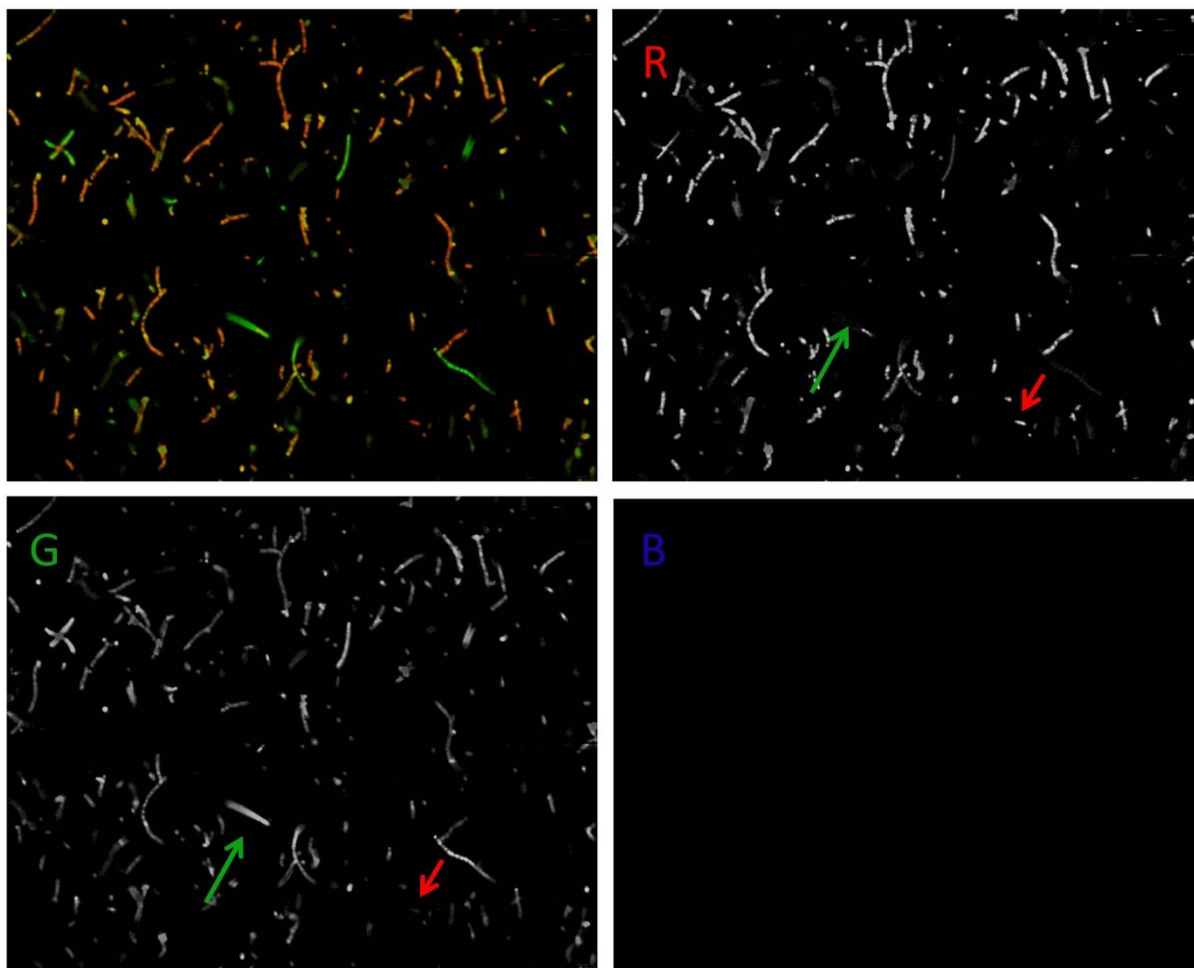
K úprave a analýze obrazových záznamov z epifluorescenčného mikroskopu bol využitý voľne dostupný open-source software ImageJ (veria 1.51, National Institutes of Health, USA). Všetky záznamy pre zvýšenie pomeru signál/šum zbavené pozadia, a to podľa konkrétneho typu obrazu buď pomocou farebného prahovania (pomocou príkazu *Image* → *Adjust* → *Color threshold*) alebo pomocou príkazu *Substract background* (*Process* → *Substract Background*). Ďalej bol podľa potreby upravený kontrast (*Image* → *Adjust* → *Brightness/Contrast*), a to na všetkých farebných kanáloch (RGB), aby nedošlo k žiadnemu zásahu do relatívneho zastúpenia jednotlivých farebných zložiek (ktorých posúdenie bolo základom následných analýz).

Pre základné otestovanie možností, ktoré môžu techniky obrazovej analýzy poskytnúť pre hlbšiu interpretáciu získaných obrazových záznamov, boli ako modelové testované mikroskopické záznamy zvolené fotografie zmesi bakteriálnych kultúr vystavených nízkemu pH s odpovedajúcou kontrolnou kultúrou (nevystavené kyslému prostrediu), a to pre oba testované bakteriálne kmene (*C. necator* H16 resp. PHB⁻⁴) a v oboch priblíženiach, v ktorých boli záznamy urobené (40× resp. 100×). Na obr. 34 sú uvedené vybrané záznamy získané pri priblížení 40×, ktoré boli podrobené následnej obrazovej analýze.



Obr. 34: Obrazové záznamy, zhotovené pri priblížení 40×, ktoré boli podrobené obrazovej analýze v programe ImageJ. Jedná sa o fotografie kultúr *C. necator* H16 (a) a PHB⁻⁴ (b), vystavených pH = 1, a to vždy v zmesi s kontrolou (pH nenamáhané) kultúrou. Kultúry boli zafarbené AO.

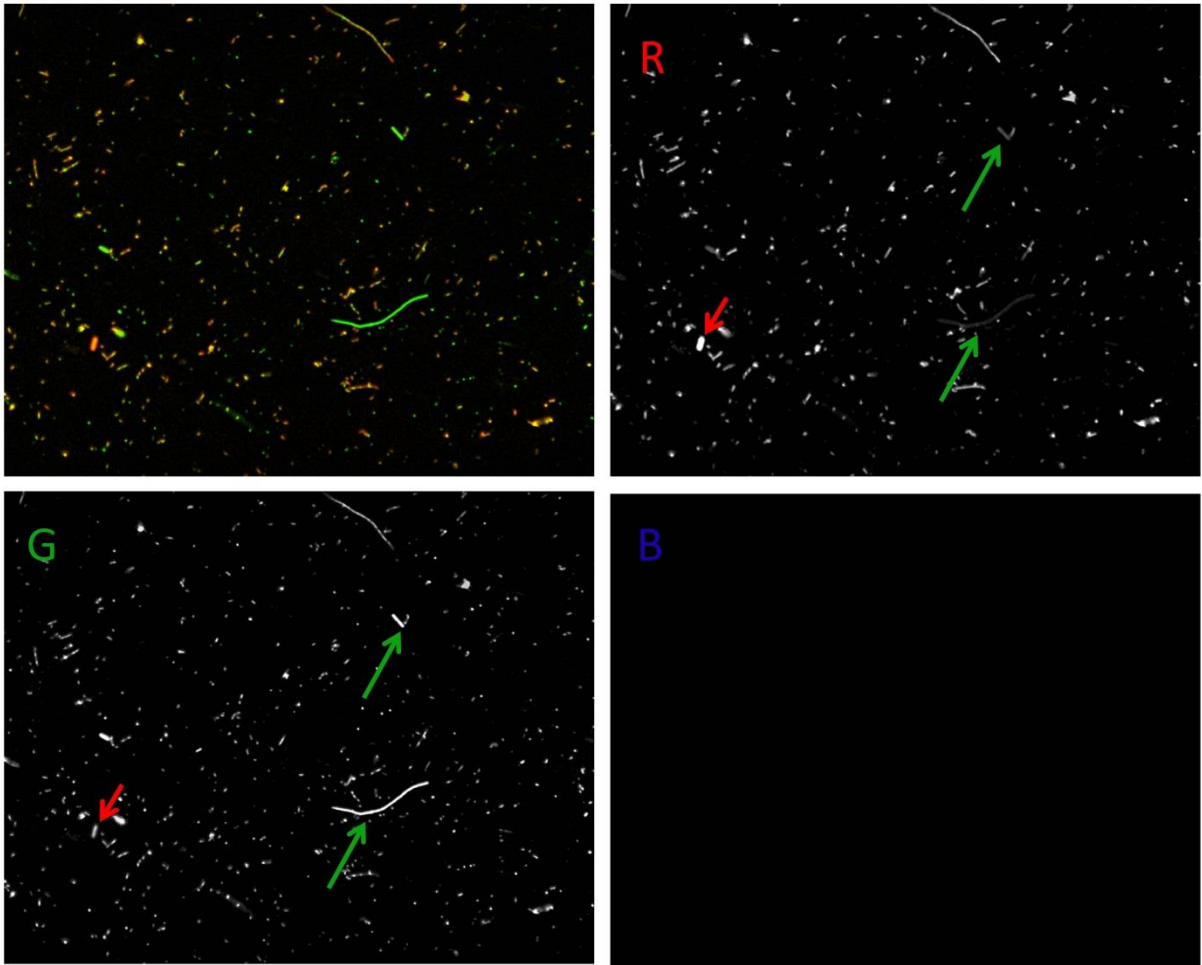
Obrazová analýza by mala slúžiť predovšetkým k objektívnemu potvrdeniu poznatkov, ktoré boli diskutované na základe subjektívneho hodnotenia záznamov v predchádzajúcich kapitolách (viď. kapitola 5.1.1). Na obr. 34 je zrejme, že v prípade obstarania obrazového záznamu vzorky pri priblížení 40× obrázok reprezentuje štatistickú vzorku bakteriálnych buniek, ktoré sa voči sebe na prvý pohľad líšia svojou farebnosťou. Obrazová analýza môže slúžiť k tomu, aby tieto rozdiely vo farebnosti boli posúdené objektívne. Navrhnutá a testovaná metóda analýzy sa zameriavala práve na toto objektívne posúdenie rozdielov vo farebnosti jednotlivých buniek na zázname. Za týmto účelom bol záznam vždy najprv rozdelený na jednotlivé farebné komponenty - červenú (R), zelenú (G) a modrú (B), a to pomocou príkazu *Image* → *Type* → *RGB Stack*. Rozdelenie na farebné komponenty je pre záznamy oboch testovaných kultúr uvedené na obr. 35 a obr. 36.



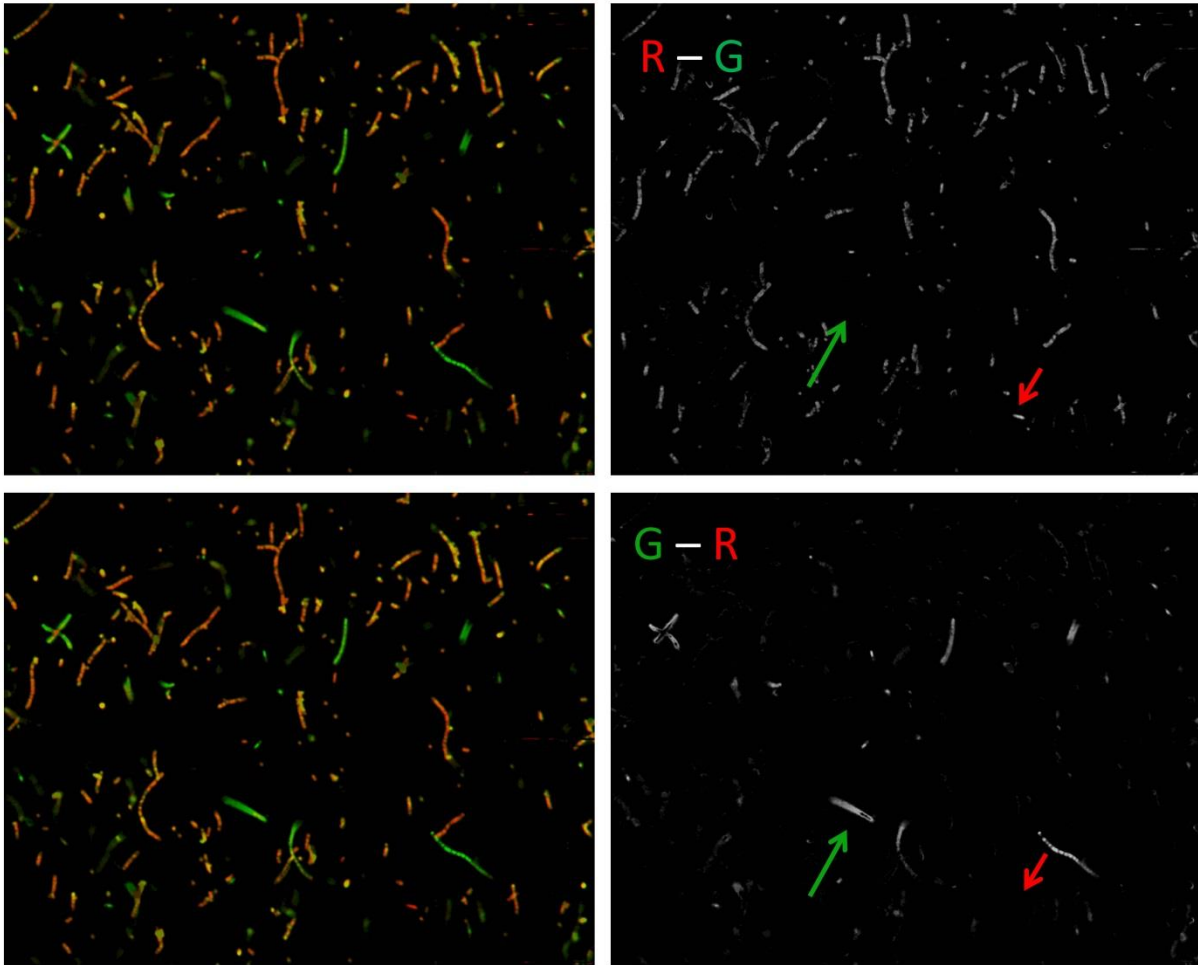
Obr. 35: Extrakcia jednotlivých farebných komponentov RGB z testovaného obrazového záznamu vyhotoveného pri priblížení 40× pre kultúr *C. necator* H16.

Na obrázkoch je zrejmé, že jednotlivé zobrazené bunky sa líšia intenzitou na kanáloch R a G, zatiaľ čo kanál B je prakticky bez akejkoľvek informácie (čo je známkou kvalítne odstráneného šumu na pozadí). Šípky znázorňujú bunky, ktoré sa vyznačujú veľkým rozdielom intenzít na kanáloch R a G.

Pre ešte lepšie rozlíšenie rozdielov záznamu na červenom a zelenom kanáli poskytuje program ImageJ celý rad ďalších možností. Jednou z nich je vzájomné odpočítanie oboch komponentných záznamov. Za týmto účelom je možné využiť nástroj *Image calculator* (*Process* → *Image calculator*). Výsledný obraz, vzniknutý po vzájomné odpočítaní oboch komponentných obrazov, je pre kultúru *C. necator* H16 uvedený na obr. 37 a pre *C. necator* PHB⁻⁴ na obr. 38. Farebné šípky upozorňujú na rovnaké bunky, ako v prípade predchádzajúcich obrázkov. Je zrejmé, že na výsledku vzájomného odpočtu jednotlivých komponentných obrazov sú rozdiely vo farebnosti jednotlivých buniek lepšie viditeľné ako na komponentných obrazoch pred odpočítaním.

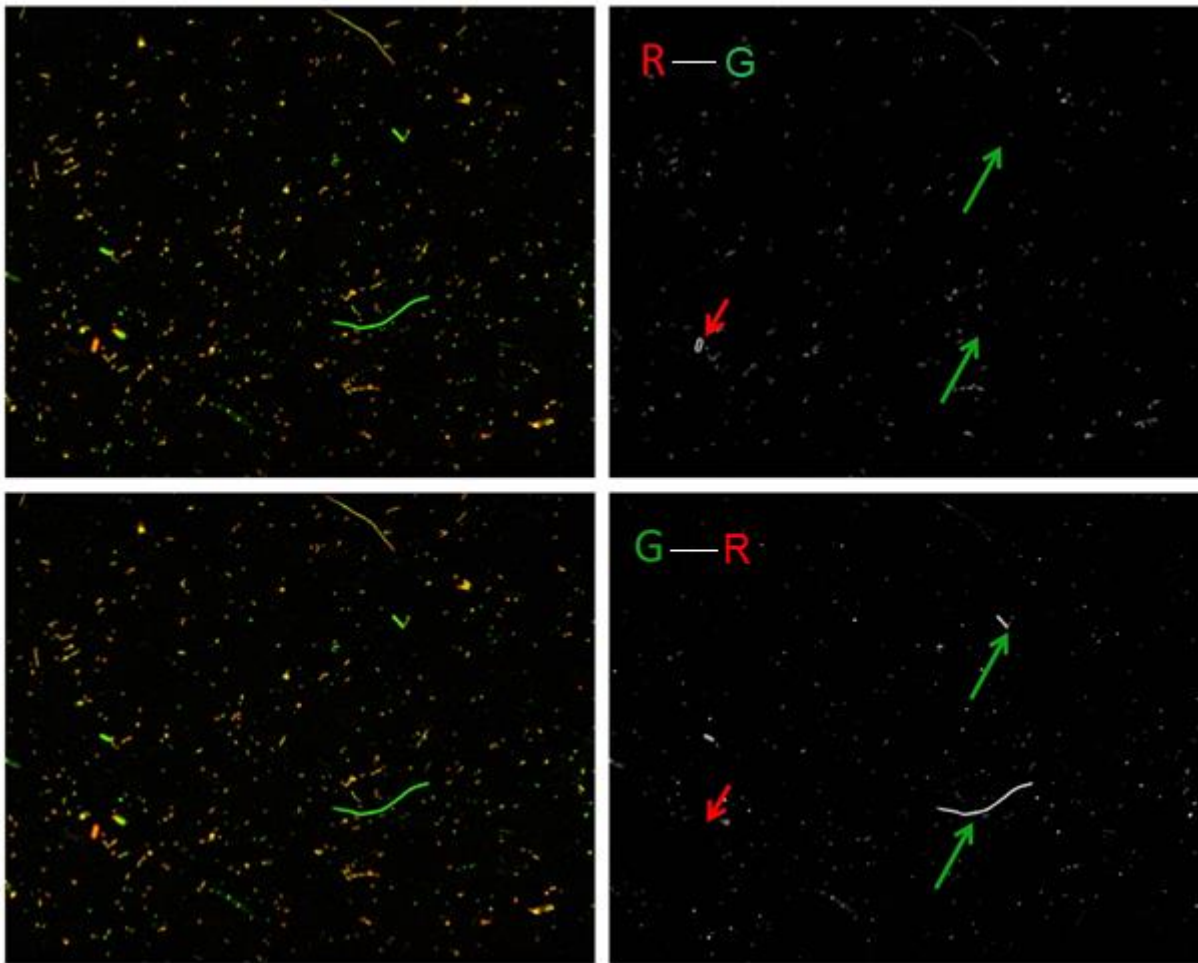


*Obr. 36: Extrakcia jednotlivých farebných komponentov RGB z testovaného obrazového záznamu vyhotoveného pri priblížení 40× pre kultúr *C. necator* PHB⁴*

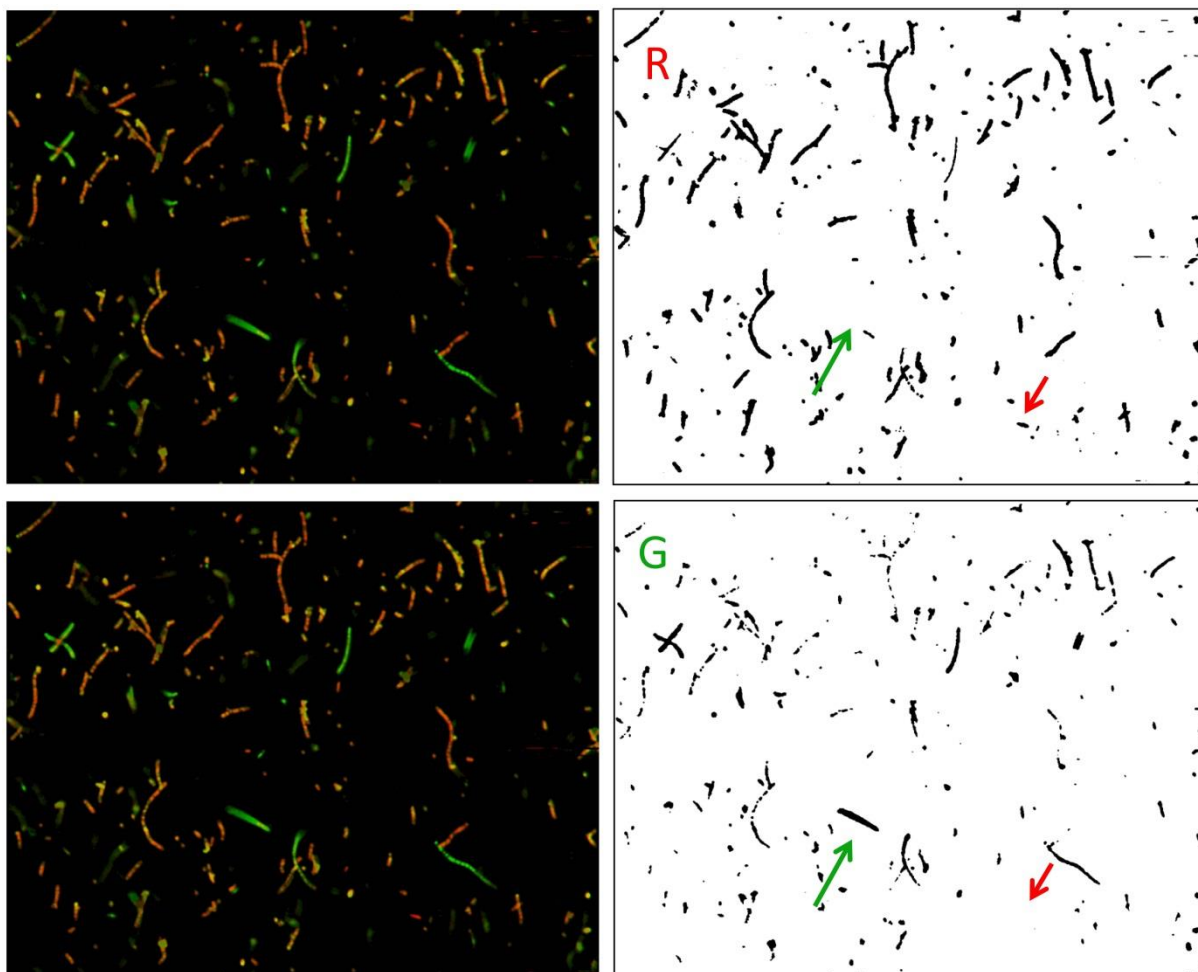


Obr. 37: Pôvodný obrazový záznam pre kultúru *C. necator* H16 (vľavo) a výsledok vzájomného odpočtu zelenej komponenty od červenej komponenty tohto záznamu (vpravo hore), resp. odpočtu červenej komponenty od zelenej komponenty (vpravo dole).

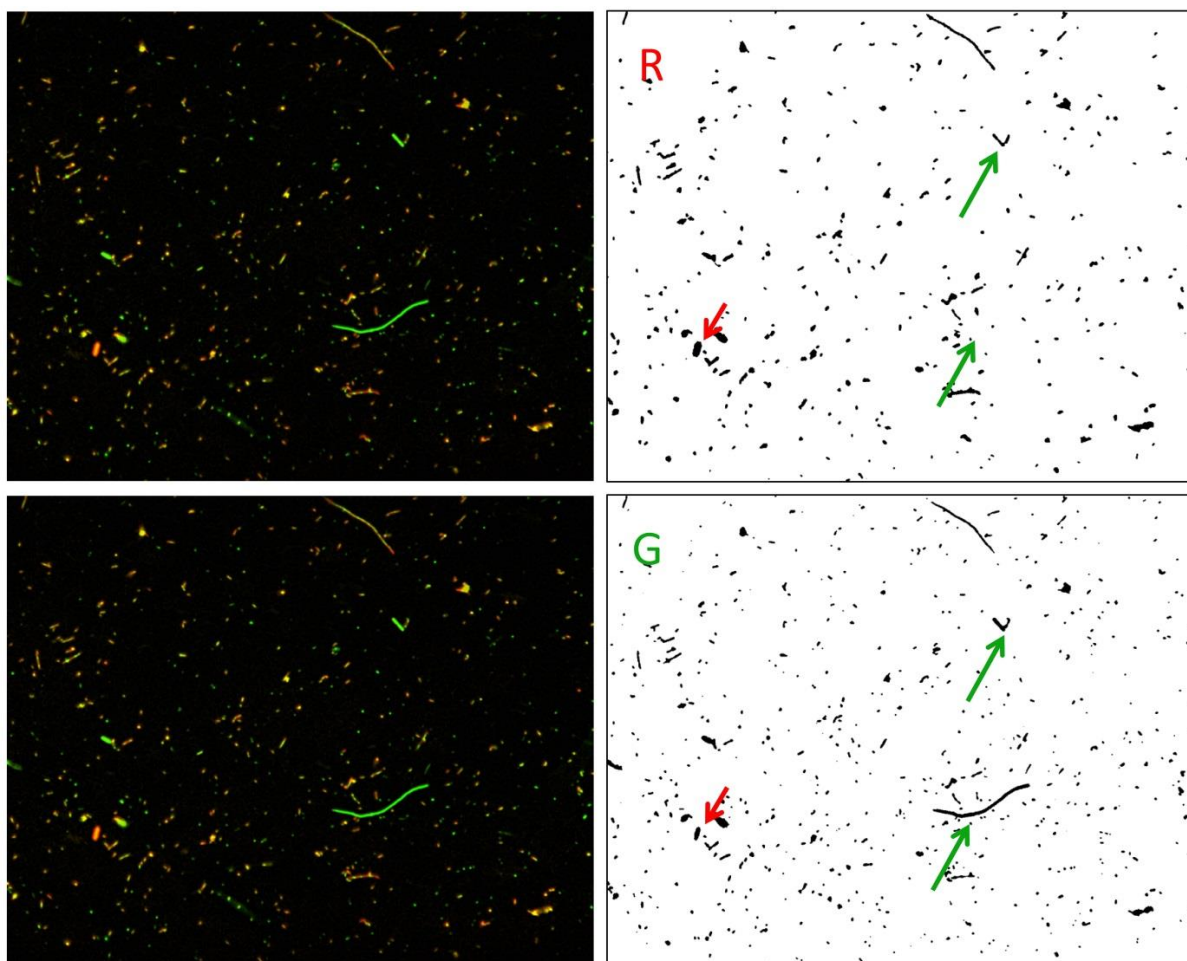
Ďalšou funkciou, ktorá umožňuje objektívne a kvantitatívne rozlíšiť rozdiely vo farebnosti jednotlivých buniek na získaných obrazových záznamoch, predstavuje analýza veľkosti častíc na farebných komponentoch R a G. Na tento účel je potrebný najprv vytvoriť binárny obraz jednotlivých komponentov. To umožňuje príkaz *Threshold (Image → Adjust → Threshold)*, ktorý ponúka prahovanie obrazu s využitím rôznych prahovacích algoritmov. V našom prípade bol na základe vizuálneho hodnotenia jednotlivých algoritmov zvolený algoritmus *MaxEntropy*, ktorý viedol k najlepšiemu zachovaniu hraníc buniek v porovnaní s pôvodným záznamom. Výsledky prahovania jednotlivých komponentov uvádza pre *C. necator* H16 obr. 39 a pre *C. necator* PHB⁻⁴ obr. 40. Farebné šípky opäť zvyrazňujú rovnaké bunky s rozdielnou farebnosťou ako u predchádzajúcich spracovaní záznamu.



Obr. 38: Pôvodný obrazový záznam pre kultúru *C. necator* PHB⁴ (vľavo) a výsledok vzájomného odpočtu zelenej komponenty od červenej komponenty tohto záznamu (vpravo hore), resp. odpočtu červenej komponenty od zelenej komponenty (vpravo dole).



Obr. 39: Porovnanie pôvodného obrazového záznamu pre kultúru *C. necator* HI6 (vľavo) a výsledku prahovania červenej komponenty tohto záznamu (vpravo hore) resp. výsledku prahovania zelenej komponenty (vpravo dole).

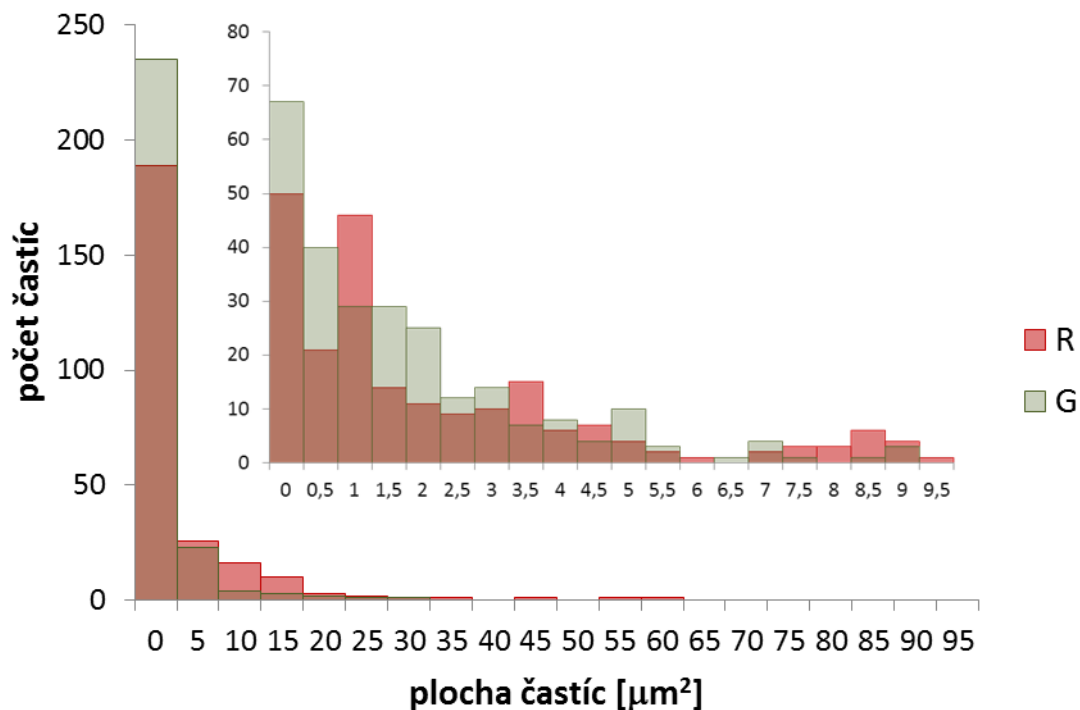


Obr. 40: Porovnanie pôvodného obrazového záznamu pre kultúru *C. necator* PHB⁻⁴ (vľavo) a výsledku prahovania červenej komponenty tohto záznamu (vpravo hore) resp. výsledku prahovania zelenej komponenty (vpravo dole).

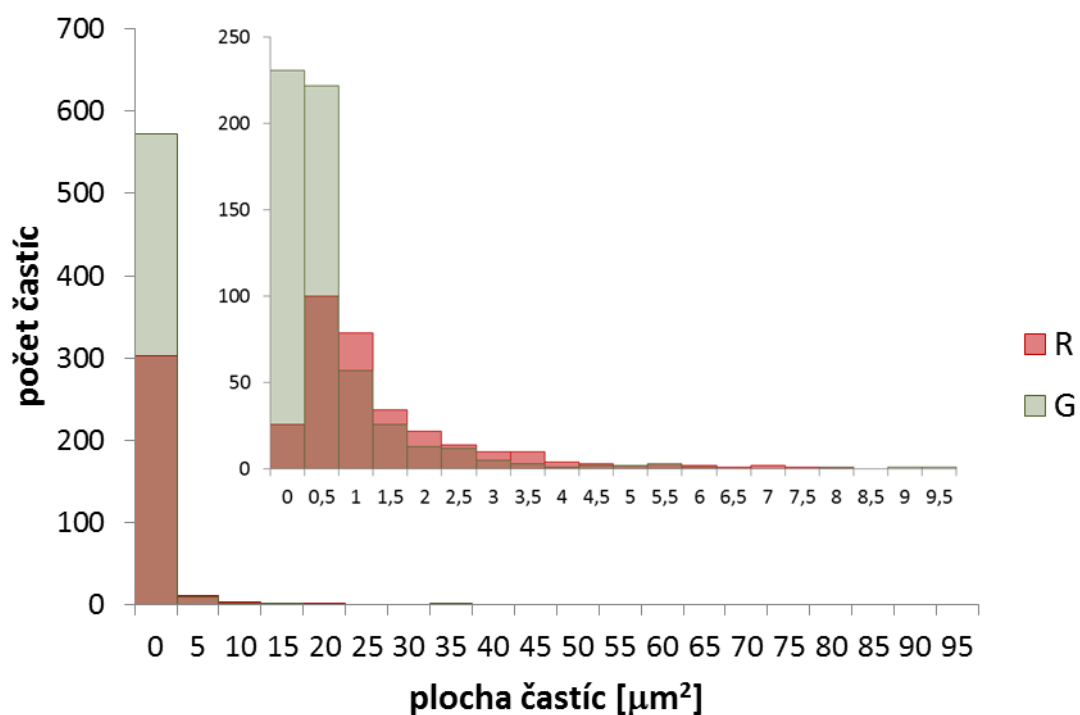
Binárne obrazy, vzniknuté prahovaním jednotlivých komponentov, je možné následne podrobiť analýze veľkosti častíc pomocou nástroja *Particle analysis* (*Analyze* → *Analyze particles*). Výsledkom tejto analýzy je detekcia jednotlivých častíc v obraze a súhrn rôznych informácií, reprezentujúce ich veľkosť (štatistické informácie o distribúcii plôch a obvodov častíc).

Jedným z dôležitých výsledkov pre objektívne posúdenie farebnosti jednotlivých buniek je celková plocha detegovaných častíc na zelenom a červenom kanáli. Pri pohľade na tieto plochy je na prvý pohľad zrejmá odlišnosť medzi oboma testovanými kultúrami. Zatiaľ čo v prípade testovanej kultúry *C. necator* H16 je celková plocha detegovaných častíc na červenom kanáli o 75% vyššia oproti kanálu zelenému, u kultúry *C. necator* PHB⁻⁴ je tento rozdiel iba 2%.

Podrobnejšie informácie o veľkosti jednotlivých detegovaných častíc (je potrebné mať na pamäti, že jednotlivé detegované častice nezodpovedajú jednotlivým bunkám, pretože jednak dochádza k ich čiastočnému prekrytiu, a ďalej je sledovaná rozdielna farebnosť jednotlivých častí jednej bunky (viď obr. 39 a obr. 40) poskytujú histogramy distribúcie plôch častíc, uvedený pre obe testované kultúry na obr. 41 a obr. 42.



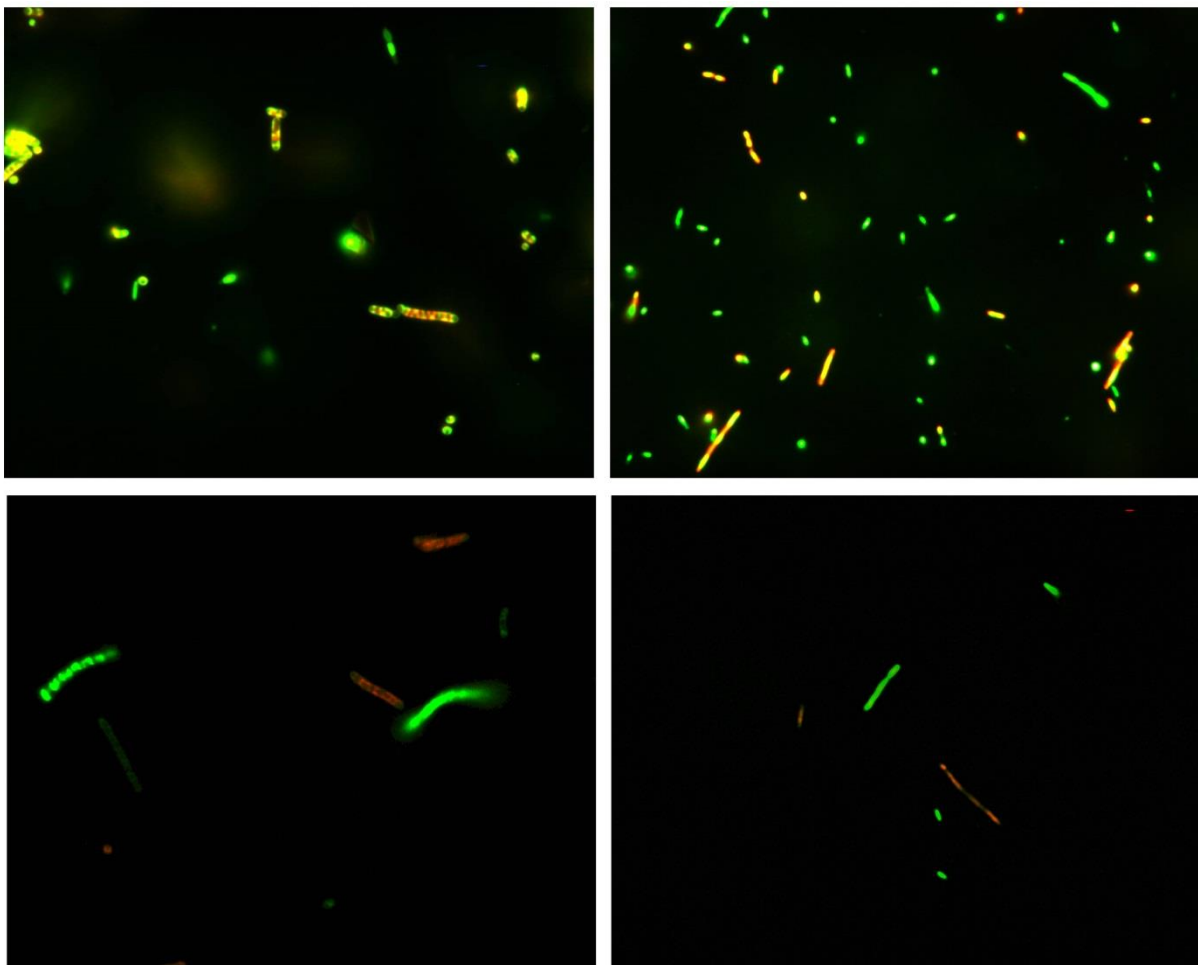
Obr. 41: Distribúcia plôch častíc, detegovaných po prahovaní na červenej (R) a zelenej (G) komponente obrazového záznamu vyhotoveného pre kultúru *C. necator* H16.



Obr. 42: Distribúcia plôch častíc, detegovaných po prahovaní na červenej (R) a zelenej (G) komponente obrazového záznamu vyhotoveného pre kultúru *C. necator* H16

Na oboch histogramoch je zrejme, že zastúpenie častíc detegovaných na zelenom kanáli je všeobecne posunuté smerom k menším plochám (tj. menším časticiam) oproti časticiam, detegovaných na červenom kanáli.

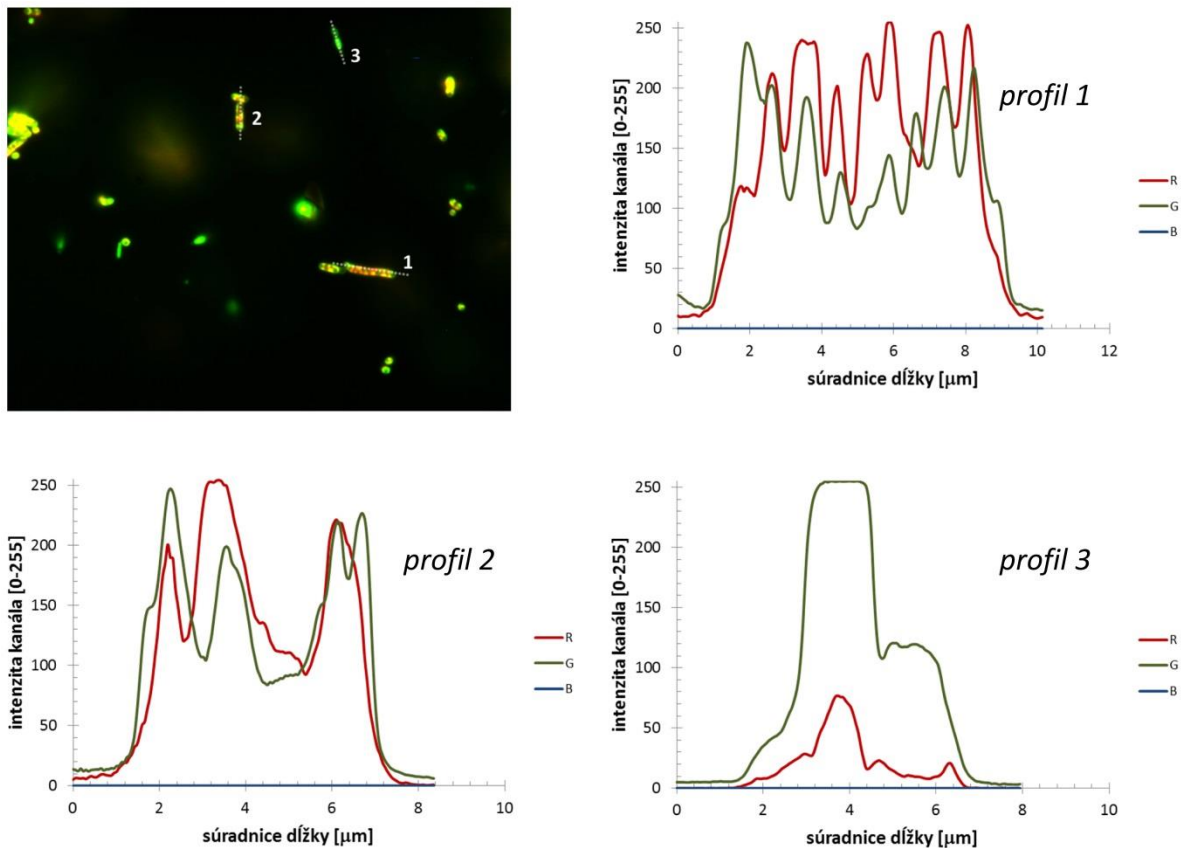
U záznamov urobených pri priblížení 100× je aj pri vizuálnom hodnotení dobre viditeľné rozlíšenie farebnosti bakteriálnych buniek, a to až na úrovni jednotlivých častí bunky (sú zjavné lokálne rozdiely vo farebnosti jednotlivých bunkových častí). Preto bola pre tieto záznamy navrhnutá a otestovaná metóda objektívneho posúdenia farebnosti na subcelulárnej úrovni. Za týmto účelom bol využitý nástroj *Line*, ktorým je na zázname definovaný lineárny výrez, ktorého farebný profil bol následne určený pomocou rozdelenia obrázku do jednotlivých farebných komponentov (príkazom *Analyze* → *Plot profile*).



Obr. 43: Obrazové záznamy, zhotovené pri priblížení 100×, ktoré boli podrobené obrazovej analýze v programe ImageJ. Jedná sa o fotografie kultúr *C. necator* H16 (vľavo) a *C. necator* PHB⁴ (vpravo), vystavených pH = 1, a to vždy v zmesi s kontrolnou (pH nenamáhané) kultúrou. Kultúry boli zafarbené AO (hore) resp. kombináciou PI a SYTO9 (dole).

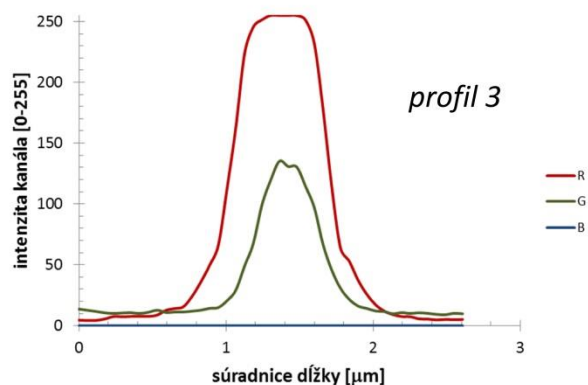
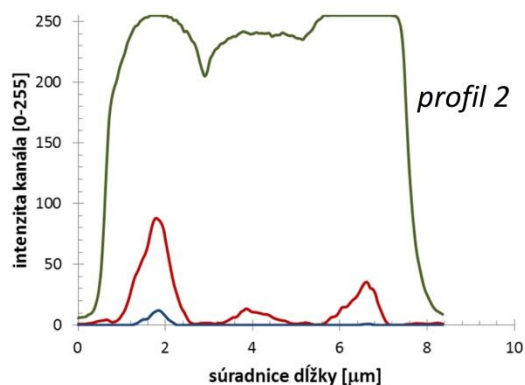
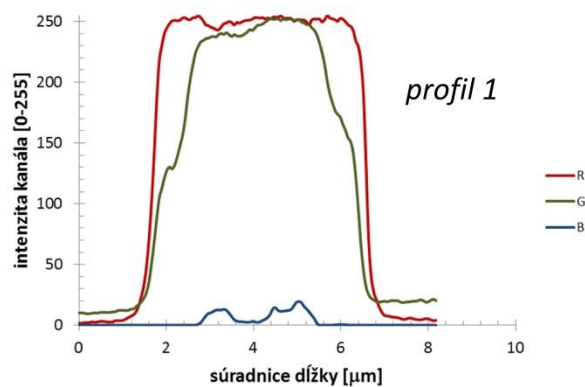
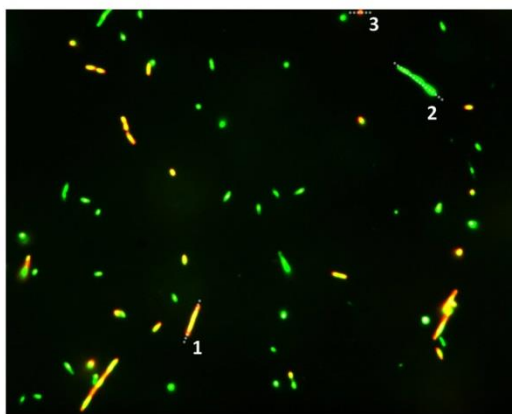
Na obr. 44 môžeme vidieť, že pri farbení pomocou AO farba baktérii je nejednotná, sú tam oblasti červenej, zelenej a žltej farby. Žltá farba je zmes červenej a zelenej fluorescence. V prípade baktérii pod číslom 1 a 2 je viditeľná silná korelácia medzi červenou a zelenou farbou. Na začiatku a konci tela bunky prevláda zelená fluorescence, pričom v strede sú

zakoncentrované červené oblasti. Tieto červené oblasti môžu byť spôsobené čiastočne denaturovaným DNA a plazmidmi. Baktérie vykazujúci takýto profil boli brané ako mŕtve. Profil 3 je charakterizovaný markantným zeleným píkomi, ktorý dosahuje maximálnu intenzitu kanálu. Zelená fluorescencie je najvýraznejšia v strede bunky. Červená fluorescencia oproti zelenej je veľmi nízka, na obrazovom zázname vizuálne je neviditeľná. Túto fluorescenciu vykazujú molekuly RNA v bunke. Baktérie je braná ako kontrolná, čiže živá bunka. Modrá fluorescencie neprejavuje ani u jednej bunky.



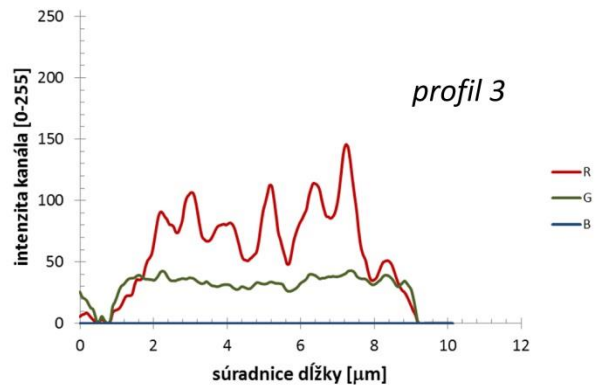
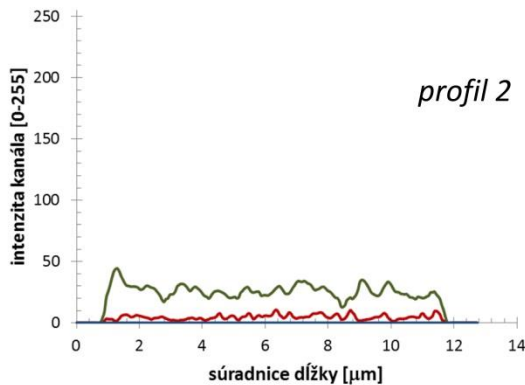
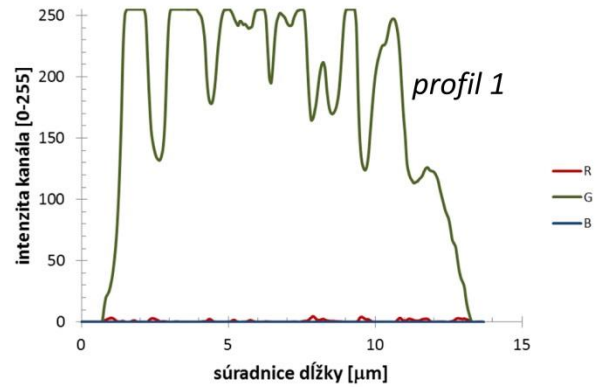
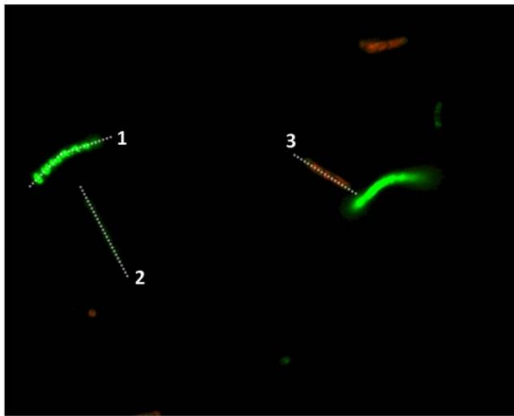
Obr. 44: Vybrané lineárne výrezy obrazového záznamu, nadobudnutého pri priblížení 100× pre kultúru *C. necator* H16 vystavenej pH = 1 v zmesi s kontrolnou (pH nenamáhané) kultúrou. Kultúry boli zafarbené AO. Pre každý z lineárnych výrezov je uvedený zodpovedajúci profil na jednotlivých farebných kanáloch.

V prípade bakteriálneho kmeňa *C. necator* PHB⁻⁴ pri farbení s AO sa jednotlivé profily veľmi líšili. Baktéria označená číslom 1 vizuálne má žltú až oranžovú farbu. Táto farba je daná miešaním červenej a zelenej fluorescencie. Na konci bakteriálneho tela prevláda červená farba, kým stred bunky vykazuje obidve farby s maximálnou intenzitou. Baktéria 2 fluoreskuje skoro v celom obsahu zelene s rovnakou intenzitou. Táto baktéria podobne ako u H16 bola braná ako živá. Tretí profil charakterizuje baktériu, ktorá má intenzívnu červenú fluorescenciu a jej veľkosť je oveľa menšia v porovnaní k ostatným. Zložka B aj pri týchto profiloch bola skoro nulová, jedine zvýšenie je pri profile 1, kde aj na pôvodnom obrázku je viditeľný šum v pozadí baktérie.



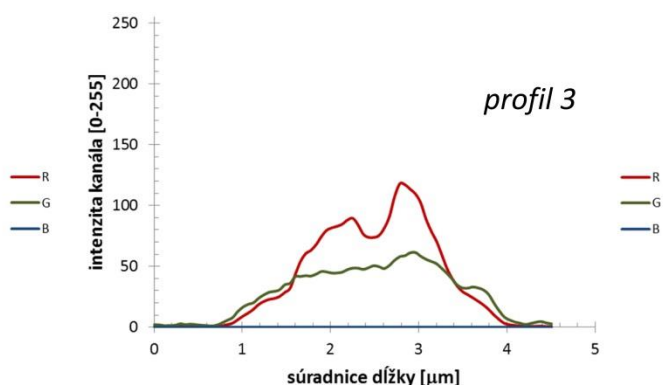
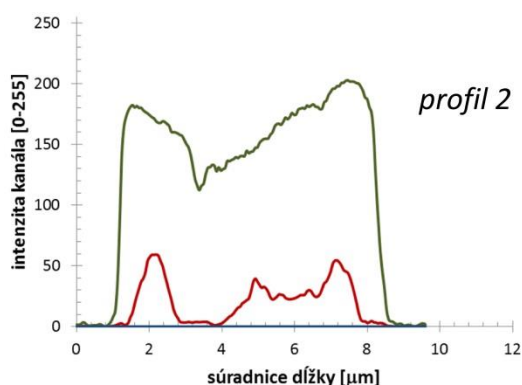
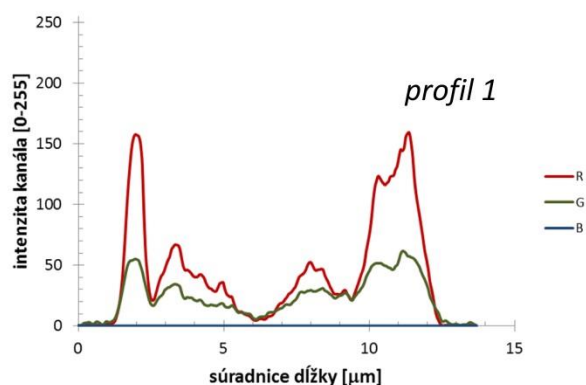
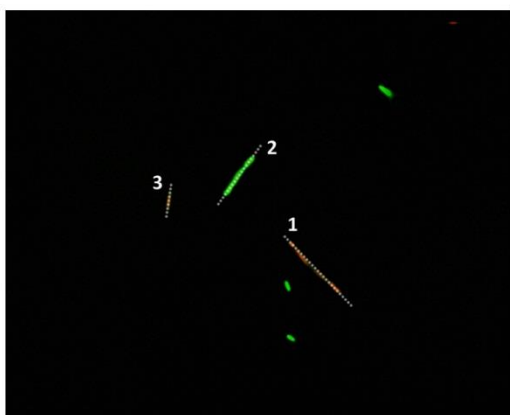
Obr. 45: Vybrané lineárne výrezy obrazového záznamu, nadobudnutého pri priblížení $100\times$ pre kultúru *C. necator* PHB⁻⁴ vystavenej $pH = 1$ v zmesi s kontrolnou (pH nenamáhané) kultúrou. Kultúry boli zafarbené AO. Pre každý z lineárnych výrezov je uvedený zodpovedajúci profil na jednotlivých farebných kanáloch.

Na obr. 46 a obr. 47 je uvedené analogické spracovanie obrazových záznamov pre testované kultúry farbené zmesou farbív PI a SYTO9. Táto komerčná kombinácia fluorescenčných sond sa používa na rozlíšenie živých a mŕtvych buniek, kde mŕtve bunky by mali svietiť len červene, lebo PI zhasá fluorescenciu SYTO9. Baktéria s číslom 1 má len charakteristický zelený profil s miestnymi maximálnymi intenzitami. Červená a modrá zložka je nulová, čo nám naznačuje, že baktérie sú živé a nedošlo k porušeniu membrány, teda PI nebol schopný penetrovať bunky. Miestne maxima sú podobne umiestení PHB granúl v bunke. V prípade baktérii s číslom 2 zelená fluorescencie je málo intenzívna. To môže byť spôsobené s tým, že baktéria sa nachádzala v inej hladine, mimo ohniskovej hladiny. Profil 3 naznačuje charakteristický profil PI. pH šok nespôsobuje rozrušenie membrány a do bunky bolo schopné prechádzať len určité množstvo PI. PI by mal v mŕtvych bunkách úplne potlačiť fluorescenciu SYTO9, ktorá avšak v tomto prípade je stále prítomná ale menej intenzívna.



Obr. 46: Vybrané lineárne výrezy obrazového záznamu, nadobudnutého pri priblížení $100\times$ pre kultúru *C. necator* H16 vystavenej $pH = 1$ v zmesi s kontrolnou (pH nenamáhané) kultúrou. Kultúry boli zafarbené kombináciou PI a SYTO9. Pre každý z lineárnych výrezov je uvedený zodpovedajúci profil na jednotlivých farebných kanáloch.

U *C. necator* PHB⁻⁴ červená fluorescencia je prítomná vo forme škvŕn v niektorých častiach bunky. V prípade dlhších baktérii červené škvŕny sa nachádzali pozdĺž tela, čo je viditeľné aj na profile 1. Medzi ňakmi sú tmavšie oblasti, kde v kanáli je viditeľný značný pokles intenzity. V prípade kratšej baktérii (číslo 3) červená škvŕna sa nachádzala v strede tela. Okolo $3\ \mu\text{m}$ červená fluorescencia dosahuje svoju maximálnu intenzitu. Baktéria s číslom 3 vizuálne má len zelenú farbu, ale jeho fluorescenčný profil naznačuje aj prítomnosť červenej fluorescencie. Zelená fluorescencia to niekoľko krát preyšuje, avšak jej intenzita je výrazne nižšia v porovnaní s kmeňom *C. necator* H16.



Obr. 47: Vybrané lineárne výrezy obrazového záznamu, nadobudnutého pri priblížení 100× pre kultúru *C. necator* PHB⁻⁴ vystavenej pH = 1 v zmesi s kontrolnou (pH nenamáhané) kultúrou. Kultúry boli zafarbené kombináciou PI a SYTO9. Pre každý z lineárnych výrezov je uvedený zodpovedajúci profil na jednotlivých farebných kanáloch.

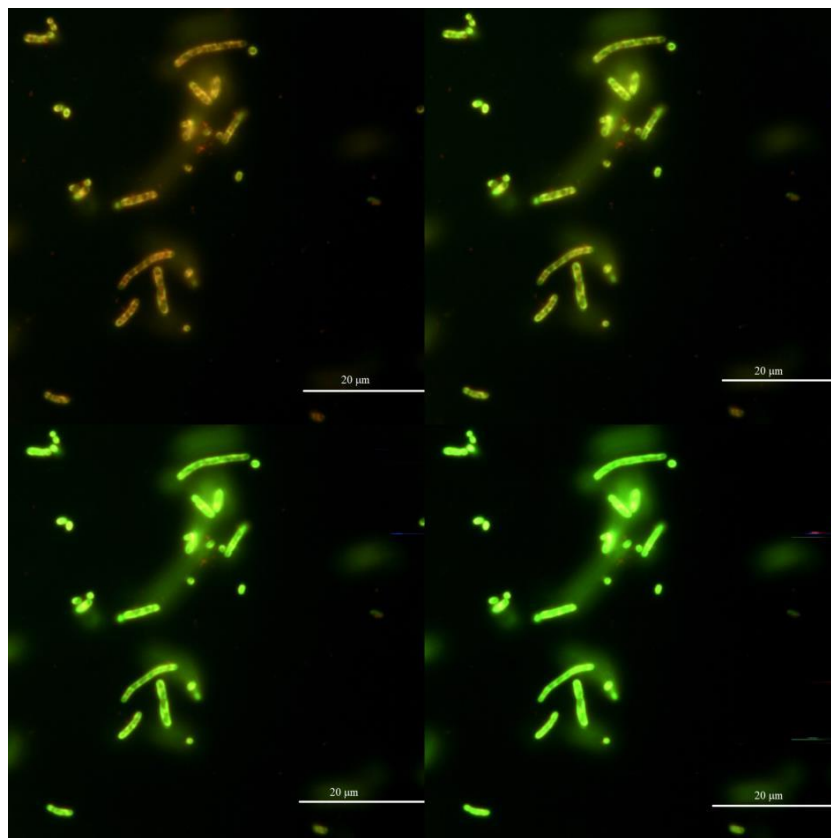
5.4. Zaujímavé atribúty pozorované u fluorescence akidinovej oranži

V priebehu merania na epifluorescenčnom mikroskope vzorky stresované pri pH 1 farbené s AO pri excitácii s vlnovou dĺžkou v rozmedzí 450–490 nm emitovali červené svetlo, ako bolo popísané v kapitole 5.1.1. Po dlhšom svietení na vzorky nedošlo k vybielovaniu červenej fluorescence ako bolo očakávané, ale fluoreskujúce baktérie sa postupne zazelenali a rozžiarili. Tento dej sa vyskytoval u oboch kmeňoch s rozdielnou dynamikou. U *C.necator* H16 baktérie zmenili svoju fluorescence približne po 5 sekundách a u PHB⁻⁴ červená fluorescence bola stála približne do 15–20 sekúnd, než došlo k posunu fluorescence do zelenej oblasti.

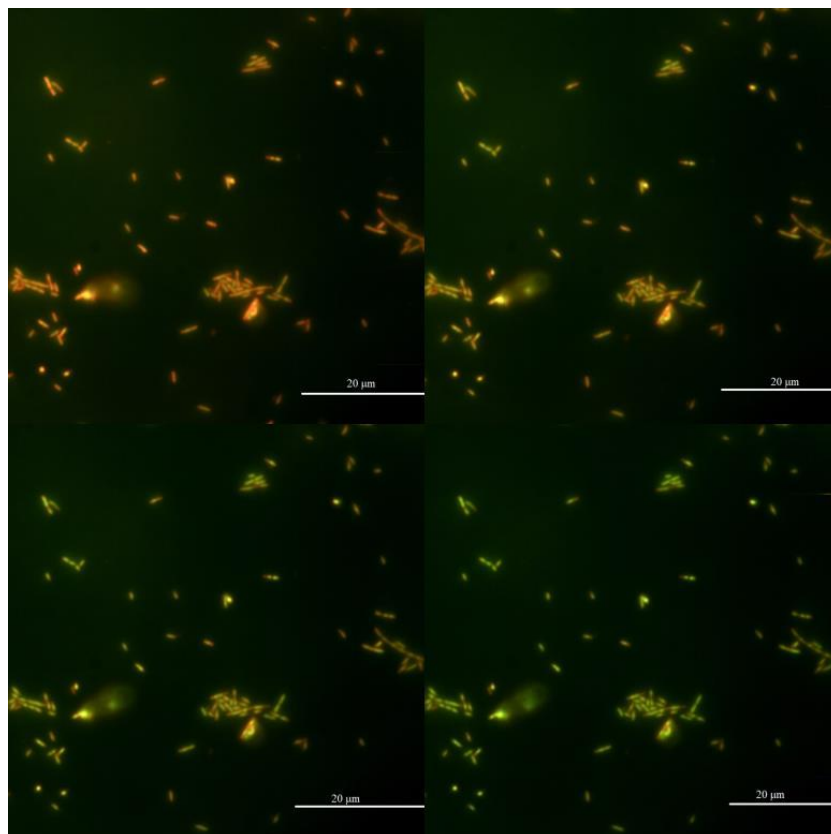
U *C.necator* H16 farebná zmena bola veľmi výrazná, rýchla a intenzívna. Po svietení intenzita zelenej fluorescence sa zvyšovalo a ani po 30–40 sekundách nedošlo k vybieleniu. Baktérie na začiatku emitovali červenú fluorescenciu v častiach okolo granúl. Granule nevykazovali žiadnu fluorescenciu. V priebehu zmeny fluorescence baktérie sa rozžiarili a celé telo baktérie fluoreskovalo zelene a už sa nedalo rozoznať granule (obr. 48). U mutantného kmeňa táto zmena nebola tak výrazná. Na začiatku celá baktéria fluoreskovala červene a postupne sa posúvala do zelena, avšak intenzita tej zelenej fluorescence sa nezvýšila (obr. 49). Odfarbovanie baktérii bolo nasnímané aj pri rozlíšení 40×, kde jeho doba

trvania sa zvýšila pri H16 približne na 20 sekúnd a u PHB⁻⁴ na 60 sekúnd a zelená fluorescencia už nebola výrazná (príloha 17, príloha 18).

Tento dej sa vyznačuje podobnými spektrálnymi atribútami ako napr. fotodisociácia, kde dochádza k štiepeniu chemických zlúčenín na menšie molekuly/atómy/radikály v dôsledku absorpcie svetla. AO sa v neživých bunkách, kde je čiastočne denaturovaná DNA viaže vo väčšom množstve a vytvorí diméry alebo polyméry. Tieto polyméry emitujú červenú fluorescenciu. Keď dôjde k excitácii tieto molekuly najprv vykazujú túto červenú fluorescenciu. Keď na jeden bod svietime dlhšiu dobu, tak fluorofór neustále absorbuje fotóny zo svetla. Uvedené pozorovanie naznačuje, že absorbované fotóny interagujú s molekulami AO a ovplyvnia ich chemickú a fyzikálnu väzbu. Zdá sa, že intenzívna excitácia spôsobuje štiepení agregátu AO v bunke na formu monomérov, ktoré už majú odlišný emisný spektrum, konkrétne fluoreskujú zelene.



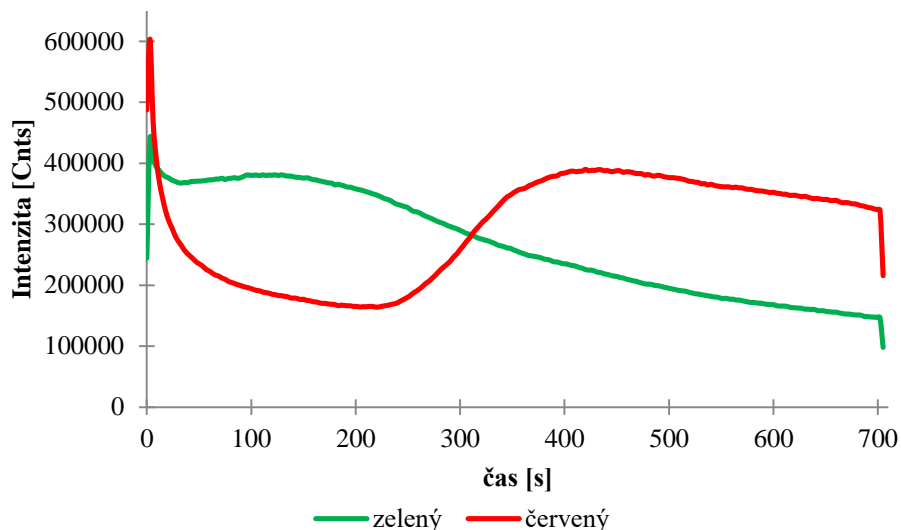
Obr. 48: Porovnanie fluorescencie *C. necator* H16 pri pH 1 v rôznych časoch 0, 3, 5 a 8 sekúnd. (farbenie AO, rozlíšenie 100×)



Obr. 49: Porovnanie fluorescencie *C. necator* PHB-4 pri pH 1 v rôznych časoch 0, 5, 8 a 10 sekúnd (farbenie s AO, rozlíšenie 100×)

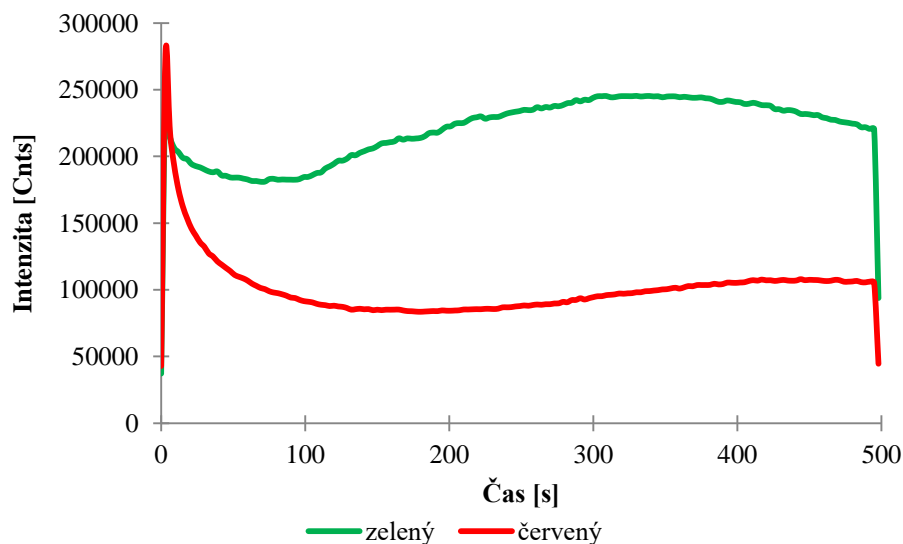
Pre overenie poznatkov z epifluorescenčného mikroskopu vzorky boli premerané na konfokálnom mikroskopy. Na konfokálnom mikroskopy bola použitá metóda TimeTrace. Pomocou tejto metódy sa sleduje závislosť intenzity fluorescencie na čase. Vďaka tejto metóde sa dajú pozorovať výkyvy intenzity fluorescencie. Zmeny v intenzite boli sledované u troch vzoriek: zmes živých buniek a namáhaných pri pH1 bol sledovaný u *C.necator* H16 a PHB⁻⁴ a len živé bunky u H16.

Závislosť intenzity fluorescencie na čase u *C. necator* H16 je znázornené na obr. 50. V prípade živých buniek sa intenzita zelenej fluorescencie na začiatku mierne zvýšila, čo by znamenalo, že sa baktérie rozžiarili. Toto mierne rozjasnenie bolo viditeľné aj u epifluorescenčného mikroskopu, avšak na nasnímaných obrázkach nebol pozorovaný výrazný rozdiel. Zaujímavé je, že po uplynutí 300 sekúnd červená fluorescencie, ktorá do tej doby bola minimálna oproti zelenej sa začala rapídne zvyšovať. Po dosiahnutí určitej intenzity sa stala konštantnou. V epifluorescenčnom mikroskopu červená fluorescencia sa neprejavila.



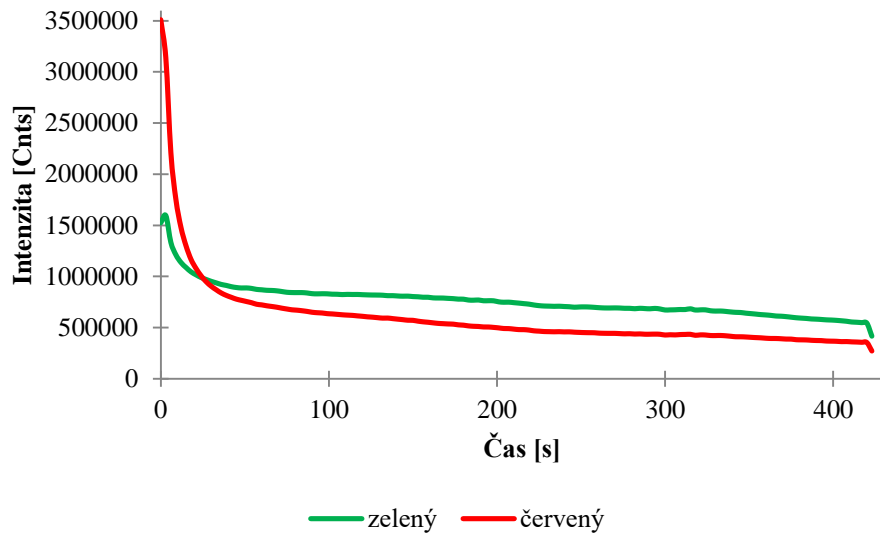
Obr. 50: Závislosť intenzity fluorescencie na čase živých buniek u *C. necator* H16

V prípade zmesi kontrolných buniek s namáhanými bunkami pri $\text{pH} = 1$ na začiatku merania prevyšovala intenzita červenej fluorescencie, ktorá postupne časom klesala až na konštantnú úroveň. Zelená fluorescencia sa približne po minúte začala zvyšovať. Klesanie červenej a zvýšenie zelenej fluorescencie potvrdzuje fenomén, ktorý bol sledovaný u epifluorescenčnom mikroskopy. Doba trvania ja odlišná, ktorá môže byť zapríčinená využitím odlišného lasera s rôznou intenzitou excitácie.



Obr. 51: Závislosť intenzity fluorescencie na čase u *C. necator* H16 zmes živých a namáhných buniek u $\text{pH} = 1$

U mutantného kmeňa na začiatku intenzita červenej fluorescencie bola veľmi vysoká, viac ako 6 krát väčšia ako u kmeňa H16 v oboch prípadoch. Táto intenzita extrémne rýchlo klesala a po 25 sekundách už jeho intenzita bola podobná zelenej fluorescencie a ďalej sa nezmenila. U epifluorescenčného mikroskopy aj v tomto prípade bola viditeľná zmena farby, ktorá sa u tohto typu merania neprejavila.



Obr. 52: Závislosť intenzity fluorescencie na čase u *C. necator* PHB⁻⁴ zmes živých a namáhných buniek u pH = 1

6 ZÁVER

Predložená diplomová práca nadväzuje na dlhodobý výskum na Fakulty chemickej, ktorý zameriava na úlohu PHA v stresovej odolnosti baktérii. Cieľom práce bolo otestovať využiteľnosť kombinácii dvoch fluorescenčných techník, a to fluorescenčný mikroskop a prietokový cytometer, a zaznamenávať informácie, ktoré môžu poskytnúť „jednoduché sondy“ (komerčný kit) a sonda s trošku zložitejším spektrálnym chovaním (AO). Táto sonda by mohla poskytnúť viac podrobností o mechanizme a vplyve stresu na daný organizmus. Ako modelový organizmus bola vybraná baktéria *C. necator* H16 a jej mutantný kmeň PHB⁻⁴. Na analýzu stresovej odpovedi boli vybrané dva bežné stresové faktory, a to etanol a kyslé pH z toho dôvodu, že expozícia týmito faktormi má odlišný efekt na bunky.

AO má veľkú históriu, avšak jej schopnosť rozlišovať živé a mŕtve bunky je často diskutovaná. Kvôli tomu, ako prvá metóda bola zvolená fluorescenčná mikroskopia. Na základe rešeršnej časti sa predpokladalo, že živé bunky vykazujú zelenú a mŕtve červenú fluorescenciu pri farbení pomocou AO. Tento predpoklad bol potvrdený. Živé bunky u oboch kmeňoch fluoreskovali zelene. Pri expozícii etanolu, ako modelový stresujúci faktor, ktorý primárne ovplyvňuje integritu bunkovej steny, baktérie tiež fluoreskovali zelene a v blízkosti niektorých buniek s nachádzali červené škvrny. Zelená farba je spôsobená tým, že etanol spôsobí rozrušenie membrány, avšak bakteriálna DNA pri tomto strese je intaktná. Strata integrity je braná ako bunková smrť, avšak zelená fluorescencia neposkytuje o tom informáciu. Červené škvrny vedľa buniek sa prejavili len pri tomto strese, preto predpokladáme, že je to spôsobené vyliatím obsahu buniek. Červená fluorescencia je spôsobená interakciou AO s molekulami RNA a denaturovanými plazmidmi. Rozdiel medzi 50% a 70% etanolom nebol, keď červené škvrny berieme ako znak straty integrity, tak môžeme povedať, že všetky bunky boli mŕtve pri týchto koncentráciách. Druhý stresový faktor bolo kyslé pH. *C. necator* patrí do skupiny neutrofilov, čiže jeho pH optimum je okolo pH = 7. Očakávalo sa, že extrémne kyslé pH (pH = 1) spôsobí okamžitú bunkovú smrť. Bunky fluoreskovali červene a sonda bola nerovnomerne rozložená v tele buniek. Vodíkové kationy majú denaturačný účinok v bunke, ale nukleoid má stabilnú štruktúru a aj pri tomto pH dochádza len k čiastočnému rozpleteniu niektorých úsekov. Na miesta kde je viac zastúpená denaturovaná forma sa viaže väčšie množstvo AO a tieto miesta fluoreskujú intenzívnou červenou farbou. Miesta menšieho poškodenia mali žltú až oranžovú fluorescenciu. Existuje teória podľa ktorého PHB granule prítomné v *C. necator* H16 majú protektívne účinky. Jeho účinky pri tomto meraní sa neprejavili, keďže tieto stresy už presahujú ich limity prežitia.

Výsledky z epifluorescenčného mikroskopu boli porovnané s bežne používaným kitom, ktorý obsahuje kombináciu dvoch fluorescenčných sond SYTO9 a PI. V každom prípade už na prvý pohľad sa dalo rozlíšiť živé bunky od mŕtvych. U etanolového stresu mŕtve baktérie vykazovali intenzívnu červenú fluorescenciu, avšak u pH = 1 baktérie neboli rovnomerne červené. U *C. necator* H16 namáhané baktérie fluoreskovali červene, ale vždy bola prítomná aj zelená fluorescencia SYTO9. Bunky neobsahovali také množstvo PI, ktoré by bolo schopné zhasť fluorescenciu SYTO9. U *C. necator* PHB⁻⁴ fluorescencia bola červená, ale nebola rovnomerná, svietili len určité body v tele bunky. Nerovnomerné farbenie v prípade pH = 1 je

spôsobený s tým, že kyslé pH nemá za účinnok rozrušenie membrány a PI nie je schopný penetrovať do buniek. Je schopný prejsť len na miesta kde došlo napr. k denaturácii membránových proteínov. Účinnosť stresových faktorov bola analyzovaná pomocou manuálneho počítania živých a mŕtvych buniek na 10 náhodne vybraných obrázkoch. Výsledky potvrdili, že namáhanie neprežili bunky ani u jedného kmeňa.

Na základe týchto experimentov je možné konštatovať, že AO by mohla byť ako vhodná voľba sondy pre štúdium stresovej odozvy na fluorescencnom mikroskopy. Výsledky boli v súlade s komerčne používaným kitom, kde si človek môže byť istý s jeho správnosťou. AO by mohla slúžiť ako doplnkové farbivo pri stresovej odozve daného kmeňa, ktorá síce nedokáže tak pekne a jednoducho rozlíšiť živé a mŕtve bunky, ale mohol by poskytnúť ďalšie podrobnejšie informácie, ktoré bežné LIVE/DEAD viabilné sondy neposkytujú.

Druhá metóda, ktorá je bežne používaná na stanovenie viability buniek je prietoková cytometria. Pri tomto meraní boli používané poznatky z mikroskopu. Pre fluorescencnú sondu AO boli najprv namerané intenzity fluorescencie v jednotlivých kanáloch pri vzorkách, ktoré obsahovali len živé a len namáhané bunky. V prípade zmesi živých a stresovaných buniek histograme popisujúce distribúciu intenzít fluorescencie jednotlivých buniek boli podobné u oboch kmeňov. Intenzita fluorescencie bola vyššia v zelenom kanáli ako v červenom. U *C. necator* H16 intenzita v zelenom kanáli pri zmesi sa zvyšovala, čo u etanolového stresu mohlo byť spojené s tým, že bunky po namáhaní aj v mikroskope vykazovali zelenú farbu. U živých buniek červený signál v kanáli je spôsobený molekulami RNA v bunke. U 50% etanolu sa táto intenzita zvýšila, červene fluoreskovali molekuly RNA a denaturované plazmidy mimo bunky. U expozícii 70% etanolu a pH = 1 histogram sa rozdelil na dve vzájomne prekrývajúce píky. Po porovnaní intenzít s intenzitami len namáhaných a len živých buniek bolo odvodené, že nižšou intenzitou fluoreskovali mŕtve bunky a vyššia intenzita patrí nestresovaným (neexponovaným) bunkám. V prípade 70% etanolu pomer počtu buniek v jednotlivých píkoch bol v súlade s miešanou kultúrou (cca. v pomere 1:1), avšak u pH šoku prvý pík obsahoval len 28% buniek. U PHB⁻⁴ signál v červenom kanáli je rovnaký u živých a u zmesi. U živých buniek a u buniek exponovaných v etanole je červená fluorescencia daná molekulami RNA a plazmidmi v bunke alebo mimo bunku. V prípade pH = 1 táto malá intenzita na červenom kanáli nie je v súlade s výsledkami z epifluorescencného mikroskopu.

V prípade farbení s PI a SYTO9 závislosť intenzity fluorescencie na jednotlivé kanáli u jednotlivých kmeňoch bola úplne totožná. Jediný rozdiel bol v intenzite, kde u H16 maximálna hodnota sa pohybovala okolo päťstotisíc a u PHB⁻⁴ okolo tristotisíc. Intenzita v zelenom kanáli postupne klesala, čo odpovedá tomu, že zmesi obsahovali menšie množstvo živých buniek. Červená fluorescencie u etanolového stresu bola výraznejšia ako u pH= 1. To môže byť spôsobené tým, že tento typ stresu nespôsobuje stratu integrity a do buniek penetrovalo menšie množstvo PI.

Pre prietokový cytometer AO je menej vhodná sonda na stanovenie stresovej odozvy. Výsledky boli ťažšie interpretovateľné a nedalo sa na 100% rozhodnúť či daný signál patrí k mŕtvym alebo živým bunkám. Pre túto metódu bol vhodnejší komerčný kit, aj za predpokladu, že PI je vhodný len pre značenie buniek s porušenou membránou.

Počas merania s AO sa objavil fenomén, ktorý ešte doteraz nebol popísaný v literatúre. Vzorky po namáhaní s $\text{pH} = 1$ fluoreskovali červene len určitú dobu a postupne sa začali zelenat' a rozžiarili sa. Tento jav je práve opakom, čo by sa dalo očakávať od fluorescenčnej sondy. Po dlhšom svietení nedošlo k vybieleniu, ale k rozsvietení (zvýšeniu intenzity fluorescencie). Predpokladáme, že agregáty AO podliehajú fotodisociácii. Dochádza k rozštiepeniu väzieb medzi molekulami AO v agregáte a jej emisné spektrum sa posunie z červenej oblasti do zelenej. Pomocou konfokálneho mikroskopu a metódy TimeRace bola sledovaná intenzita fluorescencie v čase. V prípade baktérii H16 bol jav potvrdený aj s touto metódou, pričom pri PHB^{-4} došlo k extrémne rýchlemu zníženiu červenej intenzity, ktorá potom ostala konštantná spolu so zelenou fluorescenciou.

Jedným cieľom experimentálnej časti tejto diplomovej práce bolo porovnanie a zhodnotenie využiteľných metód. Obidve metódy patria medzi klasické metódy slúžiace na sledovanie viability buniek. Prietoková cytometria je sofistikovanejšia, drahšia metóda a ťažšia na obsluhu. Jeho hlavná výhoda je, že analyzuje každú bunku po jednom a z jednej vzorky sa dá získať obrovské množstvo dát. Meranie je relatívne rýchle a automatizované. Pomocou tejto metódy sa dajú získať informácie o populácii, veľkosti a granulovitosti buniek, a ďalšie informácie v závislosti na použitej fluorescenčnej sonde. Epifluorescenčný mikroskop je jednoduchšia, lacnejšia metóda, ktorá je veľmi ľahká na obsluhu. Výhodou je, že priamo zobrazuje bunky (čo sa dá spojiť s obrazovou analýzou a získať veľa ďalších informácií o sledovaných bunkách). Na druhej strane mikroskop umožňuje sledovať len desiatku buniek, pričom cytometria umožňuje rozšíriť túto analýzu na vzorku obsahujúcu štatisticky podstatne významnejší súbor testovaných buniek. Obe metódy sa tak vzájomne veľmi dobre dopĺňajú a ich kombinácie predstavuje veľmi cenný analytický nástroj pri štúdiu stresovej odozvy baktérií

7 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [2] MADIGAN, Michael. *Brock biology of microorganisms*. Fourteenth edition. Boston: Pearson, 2015. ISBN 978-0-321-89739-8.
- [3] KALHOTKA, Libor a Marta TESAŘOVÁ. *Potravinářská mikrobiologie pro Zahradnickou fakultu*. Vyd. 1. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2014. ISBN 978-80-7509-015-7.
- [4] ROZSYPAL, Stanislav. *Obecná bakteriologie*. 1. vyd. Ilustroval Věra JANOŠTÍKOVÁ. Praha: SPN, 1981. Učebnice pro vysoké školy (Státní pedagogické nakladatelství).
- [5] MORSE, Stephen, G F. BROOKS, Karen CARROLL, J S. BUTEL a Timothy MIETZNER. *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*. 26th ed. London: McGraw Hill, 2013. ISBN 978-0-07-179031-4.
- [6] WILLEY, Joanne, Linda SHERWOOD a Christopher WOOLVERTON. *Prescott's microbiology*. Tenth edition. New York, NY: McGraw-Hill, 2017. ISBN 978-1-259-28159-4.
- [7] HRSTKA, Miroslav. *Obecná biologie*. Vyd. 2. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2007, 111 s. : il. ISBN 978-80-214-3464-6.
- [8] WALKER, Graeme. *Yeast physiology and biotechnology*. New York: J. Wiley & Sons, 1998. ISBN 978-0-471-96446-9.
- [9] VOROB'EVA, L. Stressors, Stress Reactions, and Survival of Bacteria: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology* [online]. New York: Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, 2004, **40**(3), 217-224 [cit. 2019-03-22]. DOI: 10.1023/B:ABIM.0000025941.11643.19. ISSN 0003-6838.
- [10] MARLES-WRIGHT, Jon a Richard LEWIS. Stress responses of bacteria. *Current Opinion in Structural Biology* [online]. 2007, **17**(6), 755-760 [cit. 2019-03-22]. DOI: 10.1016/j.sbi.2007.08.004. ISSN 0959440X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959440X0700111X>
- [11] BOOR, Kathryn. Bacterial Stress Responses: What Doesn't Kill Them Can Make Them Stronger. *PLoS Biology* [online]. 2006, **4**(1) [cit. 2019-03-22]. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040023. ISSN 1545-7885. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.0040023>
- [12] STANLEY, D., A. BANDARA, S. FRASER, P.J. CHAMBERS a G.A. STANLEY. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of*

- Applied Microbiology* [online]. 2010 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04657.x. ISSN 13645072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2009.04657.x>
- [13] INGRAM, Lonnie. Ethanol Tolerance in Bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology* [online]. Taylor & Francis, 1989, **9**(4), 305-319 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.3109/07388558909036741. ISSN 0738-8551.
- [14] LUND, Peter, Angela TRAMONTI a Daniela DE BIASE. Coping with low pH: molecular strategies in neutrophilic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2014, **38**(6), 1091-1125 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1111/1574-6976.12076. ISSN 1574-6976. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/1574-6976.12076>
- [15] LI, Zibiao, Jing YANG a Xian LOH. Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Materials* [online]. 2016, **8**(4), 265-265 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1038/am.2016.48. ISSN 1884-4049. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/am201648>
- [16] MOŻEJKO-CIESIELSKA, Justyna a Robert KIEWISZ. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous?. *Microbiological Research* [online]. 2016, 192, 271-282 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1016/j.micres.2016.07.010. ISSN **09445013**. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S094450131630043X>
- [17] RAZA, Zulfiqar, Sharjeel ABID a Ibrahim BANAT. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. 2018, 126, 45-56 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.10.001. ISSN 09648305. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830517300276>
- [18] CHODAK, Ivan. Polyhydroxyalkanoates: Origin, Properties and Applications. Monomers, Polymers and Composites from *Renewable Resources* [online]. Elsevier, 2008, s. 451-477 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1016/B978-0-08-045316-3.00022-3. ISBN 9780080453163. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080453163000223>
- [19] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Martin KOLLER, Dan KUCERA a Iva PERNICOVA. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnology Advances* [online]. 2018, **36**(3), 856-870 [cit. 2019-04-26]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.006. ISSN 07349750. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975017301581>
- [20] TRIBELLI, Paula a Nancy LÓPEZ. Poly(3-hydroxybutyrate) influences biofilm formation and motility in the novel Antarctic species *Pseudomonas extremaustralis* under

- cold conditions. *Extremophiles* [online]. 2011, 15(5), 541-547 [cit. 2019-04-26]. DOI: 10.1007/s00792-011-0384-1. ISSN 1431-0651. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00792-011-0384-1>
- [21] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Vladislav KRZYZANEK et al. Accumulation of Poly(3-hydroxybutyrate) Helps Bacterial Cells to Survive Freezing. *PLOS ONE* [online]. 2016, 11(6) [cit. 2019-04-07]. DOI: 10.1371/journal.pone.0157778. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0157778>
- [22] SLANINOVA, Eva, Petr SEDLACEK, Filip MRAVEC et al. Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2018, 102(4), 1923-1931 [cit. 2019-04-07]. DOI: 10.1007/s00253-018-8760-8. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-018-8760-8>
- [23] ZHAO, Yan, Hong LI, Ling QIN, Hong WANG a Guo-Qiang CHEN. *Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in Aeromonas hydrophila reduces its survival ability under stress conditions*. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2007, 276(1), 34-41 [cit. 2019-04-26]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00904.x. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2007.00904.x>
- [24] SEDLACEK, Petr, Eva SLANINOVA, Vojtech ENEV et al. What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2019, 103(4), 1905-1917 [cit. 2019-04-26]. DOI: 10.1007/s00253-018-09584-z. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-018-09584-z>
- [25] KOLLER, Martin, Anna SALERNO a Gerhart BRAUNEGG. Polyhydroxyalkanoates: Basics, Production and Applications of Microbial Biopolyesters. KABASCI, *Stephan, ed.*, Stephan KABASCI. *Bio-Based Plastics* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2013, s. 137-170 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1002/9781118676646.ch7. ISBN 9781118676646. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118676646.ch7>
- [26] MASOOD, Farha, Tariq YASIN a Abdul HAMEED. Polyhydroxyalkanoates – what are the uses? Current challenges and perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology* [online]. 2014, 35(4), 514-521 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.3109/07388551.2014.913548. ISSN 0738-8551. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388551.2014.913548>
- [27] PEPTU, Cristian a Marek KOWALCZUK. Biomass-Derived Polyhydroxyalkanoates. Biomass as Renewable *Raw Material* to Obtain Bioproducts of High-Tech Value [online]. Elsevier, 2018, s. 271-313 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1016/B978-0-444-63774-1.00008-9. ISBN 9780444637741. Dostupné z:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444637741000089>

- [28] DAVIS, D., M. DOUDOROFF, R. STANIER a M. MANDEL. Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: *Taxonomic implications*. *International Journal of Systematic Bacteriology* [online]. 1969, 19(4), 375-390 [cit. 2019-03-14]. DOI: 10.1099/00207713-19-4-375. ISSN 0020-7713. Dostupné z: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-19-4-375>
- [29] YABUUCHI, Eiko, Yoshimasa KOSAKO, Ikuya YANO, Hisako HOTTA a Yukiko NISHIUCHI. *Transfer of Two Burkholderia and An Alcaligenes Species to Ralstonia* Gen. Nov. *Microbiology and Immunology* [online]. 1995, 39(11), 897-904 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.1111/j.1348-0421.1995.tb03275.x. ISSN 03855600. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1348-0421.1995.tb03275.x>
- [30] VANECHOUTTE, M. *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia [Pseudomonas] syzygii* (Roberts et al. 1990) comb. nov. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* [online]. 2004, 54(2), 317-327 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1099/ijs.0.02754-0. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.02754-0>
- [31] VANDAMME, P. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* [online]. 2004, 54(6), 2285-2289 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1099/ijs.0.63247-0. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.63247-0>
- [32] MRAVEC, Filip, Stanislav OBRUCA, Vladislav KRZYZANEK et al. *Accumulation of PHA granules in Cupriavidus necator as seen by confocal fluorescence microscopy*. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2016, 363(10) [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1093/femsle/fnw094. ISSN 1574-6968. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1093/femsle/fnw094>
- [33] PARK, Jong, Tae KIM a Sang LEE. Genome-scale reconstruction and in silico analysis of the *Ralstonia eutropha* H16 for polyhydroxyalkanoate synthesis, lithoautotrophic growth, and 2-methyl *citric acid* production. *BMC Systems Biology* [online]. 2011, 5(1) [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1186/1752-0509-5-101. ISSN 1752-0509. Dostupné z: <http://bmcsystbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1752-0509-5-101>
- [34] RABERG, Matthias, Birgit VOIGT, Michael HECKER, Alexander STEINBÜCHEL a Marie-Joelle VIROLLE. A Closer Look on the Polyhydroxybutyrate- (PHB-) Negative Phenotype of *Ralstonia eutropha* PHB-4. *PLoS ONE* [online]. 2014, 9(5) [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1371/journal.pone.0095907. ISSN 1932-6203. Dostupné z:

<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0095907>

- [35] POHLMANN, Anne, Wolfgang FRICKE, Frank REINECKE et al. Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature Biotechnology* [online]. 2006, 24(10), 1257-1262 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1038/nbt1244. ISSN 1087-0156. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nbt1244>
- [36] 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. 2019-04-17]. DOI: 10.1159/000142893. ISSN 1660-2412. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/142893>
- [37] REINECKE, Frank, *STEINB&UUML a Alexander CHEL*. *Ralstonia eutropha* H16 as Model Organism for PHA Metabolism and for Biotechnological Production of Technically Interesting **Biopolymers**. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* [online]. 2009, 16(1-2), 91-108 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1159/000142897. ISSN 1660-2412. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/142897>
- [38] SAGONG, Hye-Young, *Hyeoncheol SON*, So CHOI, Sang LEE a Kyung-Jin KIM. Structural Insights into Polyhydroxyalkanoates Biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 2018, 43(10), 790-805 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1016/j.tibs.2018.08.005. ISSN 09680004. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000418301531>
- [39] JENDROSSEK, Dieter a Daniel PFEIFFER. *New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate)*. *Environmental Microbiology* [online]. 2014, 16(8), 2357-2373 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1111/1462-2920.12356. ISSN 14622912. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1462-2920.12356>
- [40] BRESAN, Stephanie, Anna SZNAJDER, Waldemar HAUF, Karl FORCHHAMMER, Daniel PFEIFFER a Dieter JENDROSSEK. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids. *Scientific Reports* [online]. 2016, 6(1) [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1038/srep26612. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/srep26612>
- [41] LAKOWICZ, Joseph. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York: Springer, 2006. ISBN 978-0387-31278-1.
- [42] VALEUR, Bernard. Molecular fluorescence: principles and applications. New York: Wiley-VCH, 2002. ISBN 3-527-29919-x.
- [43] ZÁRUBA, Kamil. Analytická chemie. Vydání první. Praha: Vysoká škola chemicko-

technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-951-8.

- [44] ALBANI, Jihad. Principles and applications of fluorescence spectroscopy. Ames, Iowa: Blackwell Science, 2007. ISBN 9781405138918.
- [45] BRANSKÁ, Barbora, Michaela LINHOVÁ, Petra PATÁKOVÁ, Leona PAULOVÁ a Karel MELZUCH. STANOVENÍ VIABILITY MIKROORGANISMŮ POMOCÍ FLUORESCENČNÍ ANALÝZY. Chemické listy. 2011, (10582011, 8.
- [46] JOUX, Fabien a Philippe LEBARON. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. Microbes and Infection [online]. 2000, 2(12), 1523-1535 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1016/S1286-4579(00)01307-1. ISSN 12864579. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457900013071>
- [47] NIU, Yanyan, Sensen LI, Zongtao LIN, Meixian LIU, Daidong WANG, Hong WANG a Shizhong CHEN. Development of propidium iodide as a fluorescence probe for the on-line screening of non-specific DNA-intercalators in Fufang Banbianlian Injection. Journal of Chromatography A [online]. 2016, **1463**, 102-109 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.08.013. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967316310573>
- [48] Flow Cytometry Protocol for Analysis of Cell Viability using Propidium Iodide. *R&D Systems: a biotechne brand* [online]. Minneapolis: R&D Systems, Inc., 2014 [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: <https://www.rndsystems.com/resources/protocols/flow-cytometry-protocol-analysis-cell-viability-using-propidium-iodide>
- [49] MONIS, Paul, Steven GIGLIO a Christopher SAINT. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Analytical Biochemistry* [online]. 2005, **340**(1), 24-34 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1016/j.ab.2005.01.046. ISSN 00032697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269705000904>
- [50] SYTO 9 Stain. Thermo Fisher Scientific [online]. United Kingdom: Thermo Fisher Ltd, b.r. [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/syto-9.html>
- [51] HU, Wei, Kotaro MURATA a Daizhou ZHANG. Applicability of LIVE/DEAD BacLight stain with glutaraldehyde fixation for the measurement of bacterial abundance and viability in rainwater. *Journal of Environmental Sciences* [online]. 2017, 51, 202-213 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1016/j.jes.2016.05.030. ISSN 10010742. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1001074216302339>
- [52] SCHMIDT, Andreas a Ming LIU. Recent Advances in the Chemistry of Acridines [online]. Elsevier, 2015, s. 287-353 [cit. 2019-03-27]. Advances in Heterocyclic Chemistry. DOI: 10.1016/bs.aihch.2015.04.004. ISBN 9780128021293. Dostupné z:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065272515000124>

- [53] TRAGANOS, Frank. Mechanism of Antitumor Drug Action Assessed by Cytometry. *Cytometry, 4th Edition: New Developments [online]*. Elsevier, 2004, s. 257-305 [cit. 2019-03-27]. *Methods in Cell Biology*. DOI: 10.1016/S0091-679X(04)75011-6. ISBN 9780125641708. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091679X04750116>
- [54] KASTEN, FREDERICK. Introduction to Fluorescent Probes: Properties, History and Applications. *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity [online]*. Elsevier, 1999, s. 17-39 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1016/B978-012447836-7/50004-X. ISBN 9780124478367. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012447836750004X>
- [55] ZELENIN, ALEXANDER. Acridine Orange as a Probe for *Cell and Molecular Biology****To the memory of my teacher Professor Maxim N. Meissel, the founder of fluorescence microscopy in Russia. Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity [online]*. Elsevier, 1999, s. 117-135 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1016/B978-012447836-7/50011-7. ISBN 9780124478367. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124478367500117>
- [56] MACEY, Marion. *Flow cytometry: principles and applications*. Totowa, NJ: Humana Press, 2007. ISBN 1-59745-451-6.
- [57] BAJGELMAN, Marcio. Principles and applications of flow cytometry. *Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources [online]*. Elsevier, 2019, s. 119-124 [cit. 2019-03-28]. DOI: 10.1016/B978-0-12-816548-5.00008-3. ISBN 9780128165485. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128165485000083>
- [58] FLEISHER, Thomas a Joao OLIVEIRA. 92 - Flow Cytometry. *Clinical Immunology: Principles and Practice*. 5th Edition. Elsevier Ltd., 2019, s. 1239-1251. ISBN 978-0-7020-6896-6.
- [59] ADAN, Aysun, Günel ALIZADA, Yağmur KIRAZ, Yusuf BARAN a Ayten NALBANT. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology [online]*. 2015, 37(2), 163-176 [cit. 2019-03-28]. DOI: 10.3109/07388551.2015.1128876. ISSN 0738-8551. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388551.2015.1128876>
- [60] KOČÁREK, Eduard, Martin PÁNEK a Drahuše NOVOTNÁ. *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky : vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 2., upr. vyd. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 9788024618807.
- [61] KUBITSCHECK, Ulrich. *Fluorescence microscopy: from principles to biological*

applications. Weinheim: Wiley-Blackwell, 2013. ISBN 35-273-2922-6.

- [62] Epifluorescence Microscope Basics. *Thermo Fisher Scientific* [online]. Thermo Fisher Ltd, b.r. [cit. 2019-04-28]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/fundamentals-of-fluorescence-microscopy/epifluorescence-microscope-basics.html>
- [63] PETERSON, D.A. *Confocal Microscopy*. Encyclopedia of Movement Disorders [online]. Elsevier, 2010, s. 250-252 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1016/B978-0-12-374105-9.00230-6. ISBN 9780123741059. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123741059002306>
- [64] NAREDI-RAINER, Nikolaus, Jens *PRESCHER*, Achim *HARTSCHUH* a Don *LAMB*. Confocal Microscopy. KUBITSCHHECK, Ulrich, ed., Ulrich KUBITSCHHECK. Fluorescence Microscopy [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2013, s. 175-213 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1002/9783527671595.ch5. ISBN 9783527671595. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527671595.ch5>
- [65] MANIKANDAN, M. a *Hui-Fen WU*. Rapid differentiation and quantification of live/dead cancer cells using differential photochemical behavior of acridine orange. Photochemical & Photobiological Sciences [online]. 2013, 12(11) [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1039/c3pp50165e. ISSN 1474-905X. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3pp50165e>
- [66] PLEMEL, Jason, Andrew *CAPRARIELLO*, Michael *KEOUGH* et al. Unique spectral signatures of the nucleic acid dye acridine orange can distinguish cell death by apoptosis and necroptosis. The Journal of Cell Biology [online]. 2017, 216(4), 1163-1181 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1083/jcb.201602028. ISSN 0021-9525. Dostupné z: <http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.201602028>
- [67] NIKNAZAR, Somayeh, Hojjat-Allah *ABBASZADEH*, Hassan *PEYVANDI*, Omidvar *REZAEI*, Hosna *FOROOGHIRAD*, Shahrokh *KHOSHSIRAT* a Ali *PEYVANDI*. Protective effect of [Pyr1]-apelin-13 on oxidative stress-induced apoptosis in hair cell-like cells derived from bone marrow mesenchymal stem cells. European Journal of Pharmacology [online]. 2019, 853, 25-32 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.03.012. ISSN 00142999. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299919301670>
- [68] BACK, J.P. a R.G. *KROLL*. The differential fluorescence of bacteria stained with acridine orange and the effects of heat. Journal of Applied Bacteriology [online]. 1991, 71(1), 51-58 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1991.tb04662.x. ISSN 00218847. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.1991.tb04662.x>

- [69] HUNTER, Alastair a *Rhona MCCORQUODALE*. Evaluation of the direct epifluorescent filter technique for assessing the hygienic condition of milking equipment. *Journal of Dairy Research* [online]. 1983, 50(01) [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1017/S0022029900032477. ISSN 0022-0299. Dostupné z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0022029900032477
- [70] MASON, David a *David LLOYD*. Acridine orange as an indicator of bacterial susceptibility to gentamicin. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 1997, 153(1), 199-204 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb10482.x. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10482.x>
- [71] VON BERTALANFFY, LUDWIG a *IVAR BICKIS*. IDENTIFICATION OF CYTOPLASMIC BASOPHILIA (RIBONUCLEIC ACID) BY FLUORESCENCE MICROSCOPY. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* [online]. 2016, 4(5), 481-493 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1177/4.5.481. ISSN 0022-1554. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/4.5.481>
- [72] GOPAL, Judy, RP *GEORGE*, P MURALEEDHARAN a HS KHATAK. Photocatalytic Inhibition of Microbial Adhesion by Anodized Titanium. *Biofouling* [online]. 2004, 20(3), 167-175 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1080/08927010400008563. ISSN 0892-7014. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08927010400008563>
- [73] MCFETERS, G.A., A. SINGH, S. BYUN, P.R. CALLIS a S. WILLIAMS. Acridine orange staining reaction as an index of physiological activity in *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 1991, 13(2), 87-97 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1016/0167-7012(91)90009-F. ISSN 01677012. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016770129190009F>
- [74] RAPPOSCH, S., P. ZANGERL a W. GINZINGER. Influence of Fluorescence of Bacteria Stained with Acridine Orange on the Enumeration of Microorganisms in Raw Milk. *Journal of Dairy Science* [online]. 2000, 83(12), 2753-2758 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(00)75170-8. ISSN 00220302. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030200751708>
- [75] KRISHNAMOORTHY, Rajapandiyam, Jegan *ATHINARAYANAN*, *Vaiyapuri PERIASAMY*, Abdulraheem ADISA, Mohammed AL-SHUNIABER, Mustafa GASSEM a Ali ALSHATWI. Antimicrobial activity of nanoemulsion on drug-resistant bacterial pathogens. *Microbial Pathogenesis* [online]. 2018, 120, 85-96 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.04.035. ISSN 08824010. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401018302110>
- [76] SZALA, Mateusz a *Andrzej BORKOWSKI*. Toxicity assessment of SiC nanofibers and nanorods against bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2014, 100,

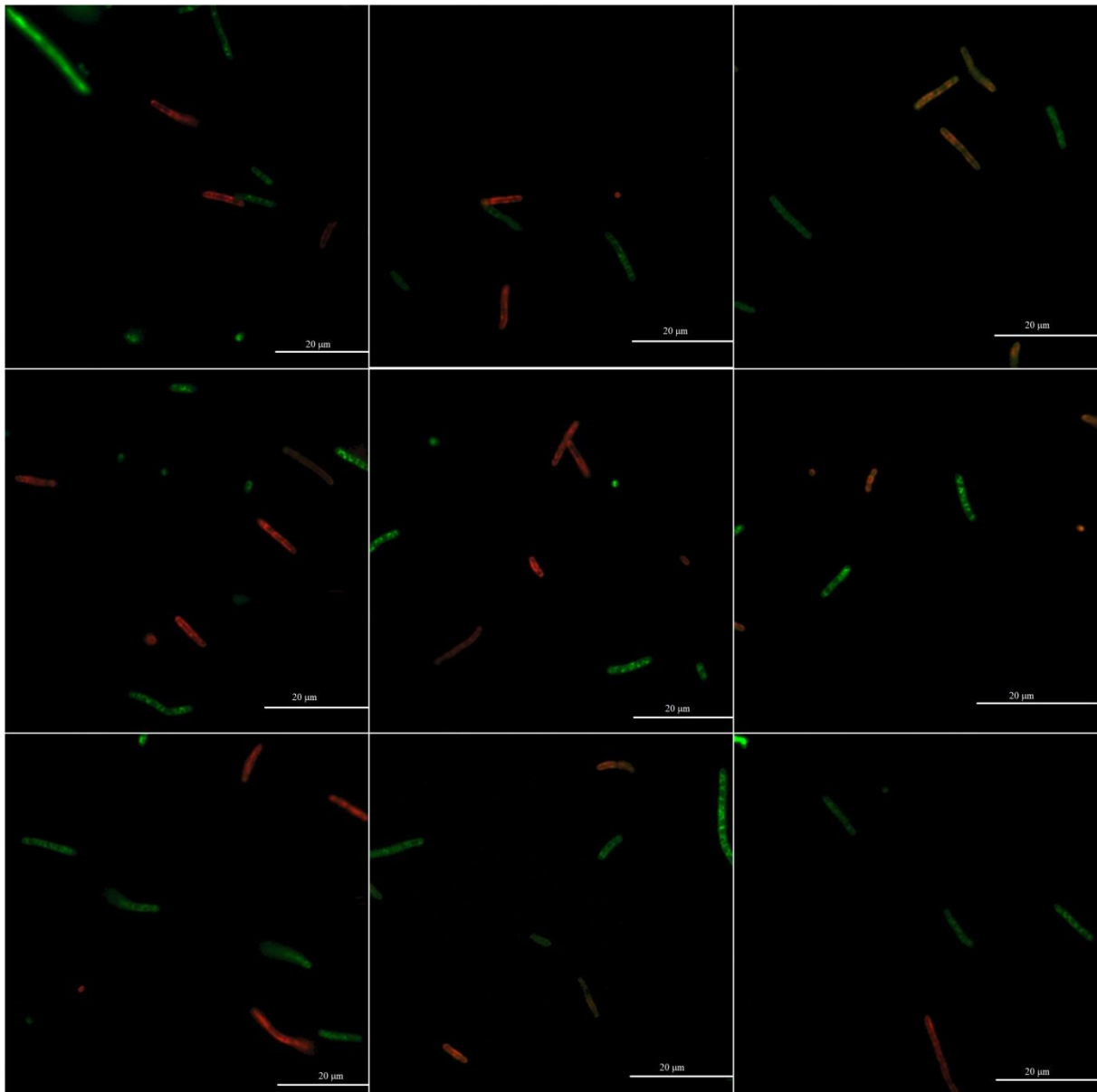
- 287-293 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2013.10.030. ISSN 01476513. Dostępne z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651313004752>
- [77] BORKOWSKI, Andrzej, Mateusz SZALA, Paweł KOWALCZYK, Tomasz CŁAPA, Dorota NAROŻNA a Marek SELWET. Oxidative stress in bacteria (*Pseudomonas putida*) exposed to nanostructures of silicon carbide. *Chemosphere* [online]. 2015, 135, 233-239 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.04.066. ISSN 00456535. Dostępne z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653515004129>
- [78] BORKOWSKI, Andrzej, Łukasz ŁAWNICZAK, Tomasz CŁAPA, Dorota NAROŻNA, Marek SELWET, Daria PeZIĄK, Bartosz MARKIEWICZ a Łukasz CHRZANOWSKI. Different antibacterial activity of novel theophylline-based ionic liquids – Growth kinetic and cytotoxicity studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2016, 130, 54-64 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2016.04.004. ISSN 01476513. Dostępne z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651316301117>
- [79] PAK, Dolar, Ok KOO, Robert STORY, Corliss O'BRYAN, Philip CRANDALL, Sun-Ok LEE a Steven RICKE. Acridine orange as an alternative to optical density to study growth kinetics of *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 7517. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* [online]. 2013, 48(6), 512-515 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1080/03601234.2013.761919. ISSN 0360-1234. Dostępne z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03601234.2013.761919>
- [80] CHTIOUI, Omar, Krasimir DIMITROV, Frédérique GANCEL, Pascal DHULSTER a Jordan NIKOV. Rotating discs bioreactor, a new tool for lipopeptides production. *Process Biochemistry* [online]. 2012, 47(12), 2020-2024 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1016/j.procbio.2012.07.013. ISSN 13595113. Dostępne z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511312002978>
- [81] PALESTRANT, Daniel, Zoie HOLZKNECHT, Bradley COLLINS, William PARKER, Sara MILLER a R. BOLLINGER. Microbial Biofilms in the Gut: Visualization by Electron Microscopy and by Acridine Orange Staining. *Ultrastructural Pathology* [online]. 2009, 28(1), 23-27 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1080/usp.28.1.23.27. ISSN 0191-3123. Dostępne z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/usp.28.1.23.27>
- [82] BEHERA, B, P MATHUR a B GUPTA. Blood culture gram stain, acridine orange stain and direct sensitivity-based antimicrobial therapy of bloodstream infection in patients with trauma. *Indian Journal of Medical Microbiology* [online]. Medknow Publications, 2010, 28(2), 138-142 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.4103/0255-0857.62491. ISSN 0255-0857. Dostępne z: <http://www.ijmm.org/article.asp?issn=0255-0857;year=2010;volume=28;issue=2;spage=138;epage=142;aulast=Behera;type=0>
- [83] NEERAJA, M., V. LAKSHMI, C. PADMASRI a K. PADMAJA. Utility of Acridine Orange staining for detection of bacteria from positive blood cultures. *Journal of*

Microbiological Methods [online]. 2017, 139, 215-217 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1016/j.mimet.2017.06.014. ISSN 01677012. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701217301641>

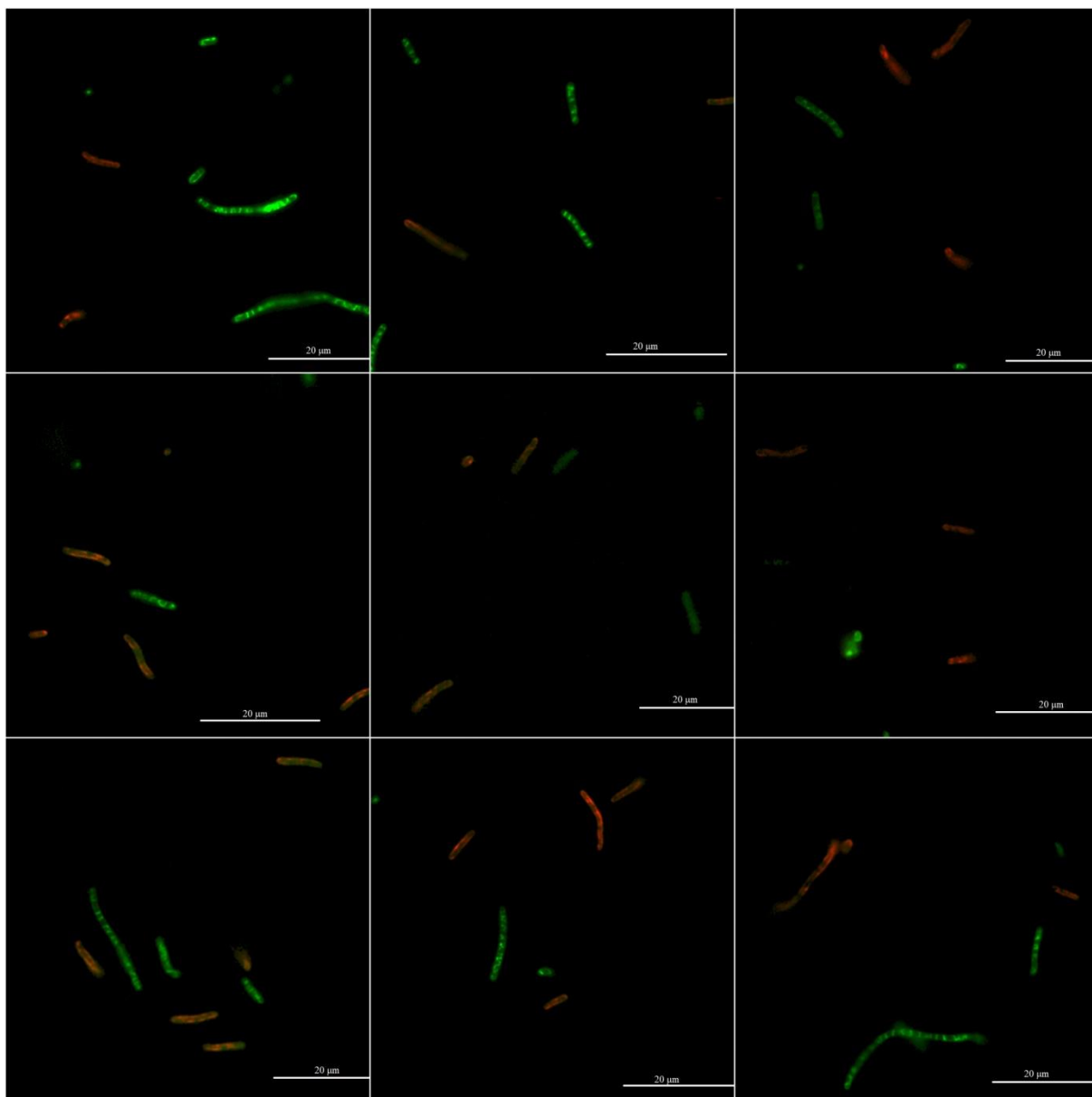
8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

AO	akridinová oranž
ATP	adenozíntrifosfát
B	modrá
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EB	etídium bromid
FCS	predný svetelný rozptyl
G	zelená
lcl-PHA	polyhydroxyalkanoát s dlhým reťazcom
mcl-PHA	polyhydroxyalkanoát so stredným reťazcom
PHA	polyhydroxyalkanoát
PHB	polyhydroxybutyrát
PI	propídium jodid
R	červená
RNA	ribonukleová kyselina
ROI	región záujmu
S ₀	základná singletová energetická hladina
S ₁	prvá vyššia energetická singletový hladina
S ₂	druhá vyššia energetická singletový hladina
scl-PHA	polyhydroxyalkanoát s krátkym reťazcom
SSC	bočný svetelný rozptyl
T ₁	prvá vyššia energetická tripletová hladina

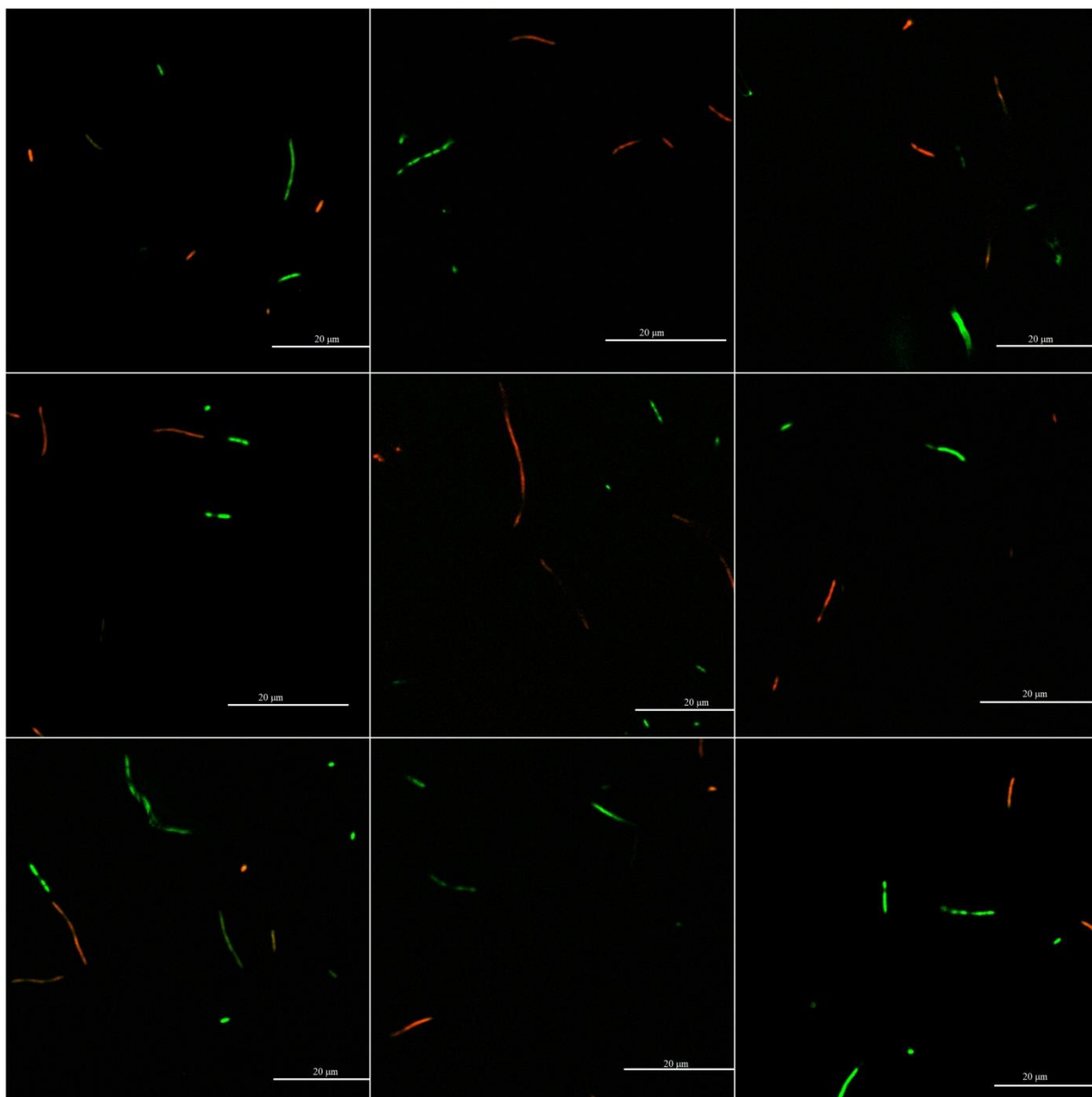
9 PRÍLOHA



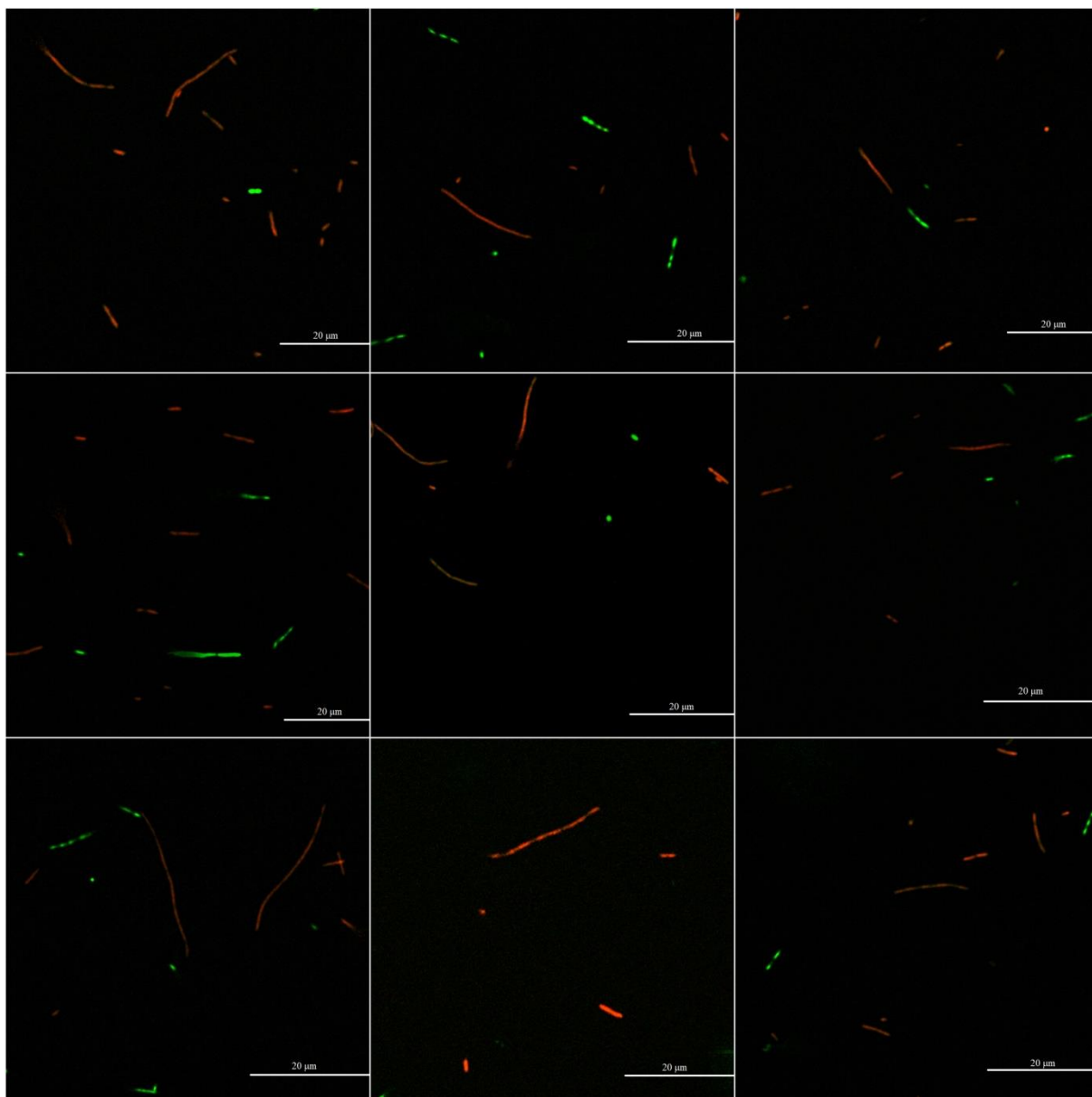
Príloha 1: Živé a ošetrované bunky *C. neator* H16, 50% etanolový stres, farbený PI a SYTO9, rozlíšenie 100×



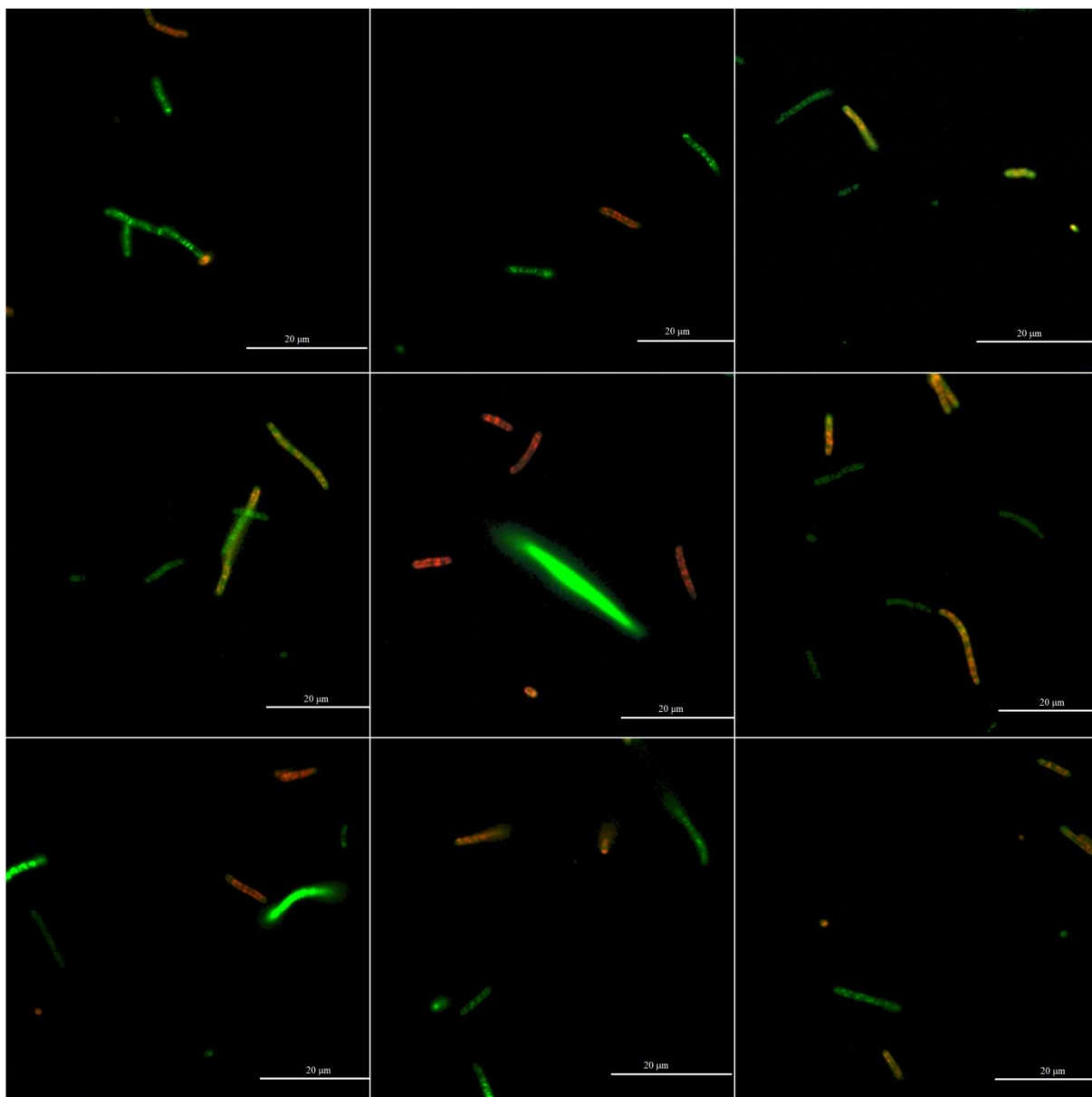
Príloha 2: Živé a ošetrované bunky *C. neator* H16, 70% etanolový stres, farbený PI a SYTO9, rozlíšenie 100×



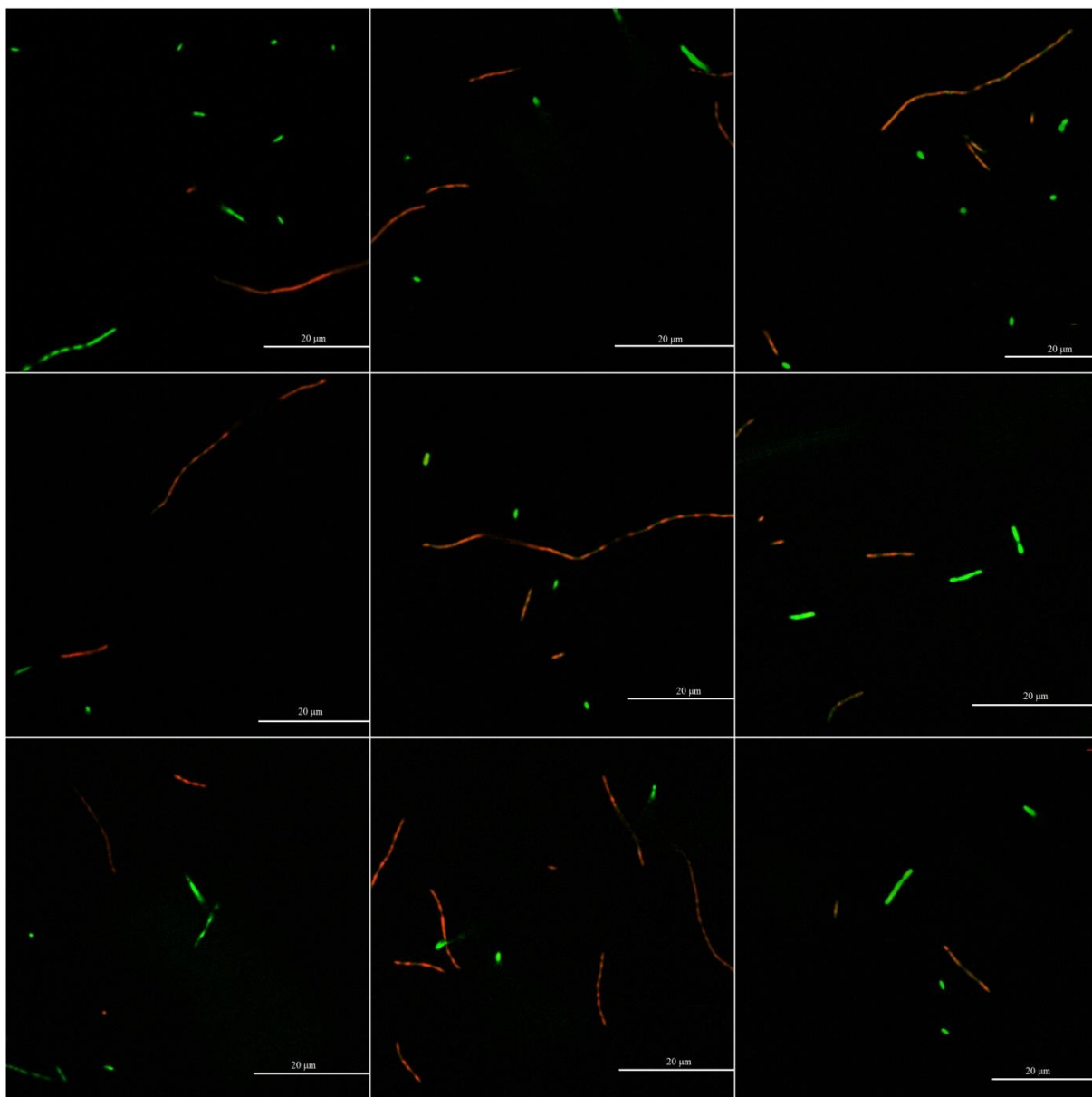
Príloha 3: Živé a ošetrované bunky C. neator PHB⁻⁴, 50% etanolový stres, farbený PI a SYTO9, rozlíšenie 100×



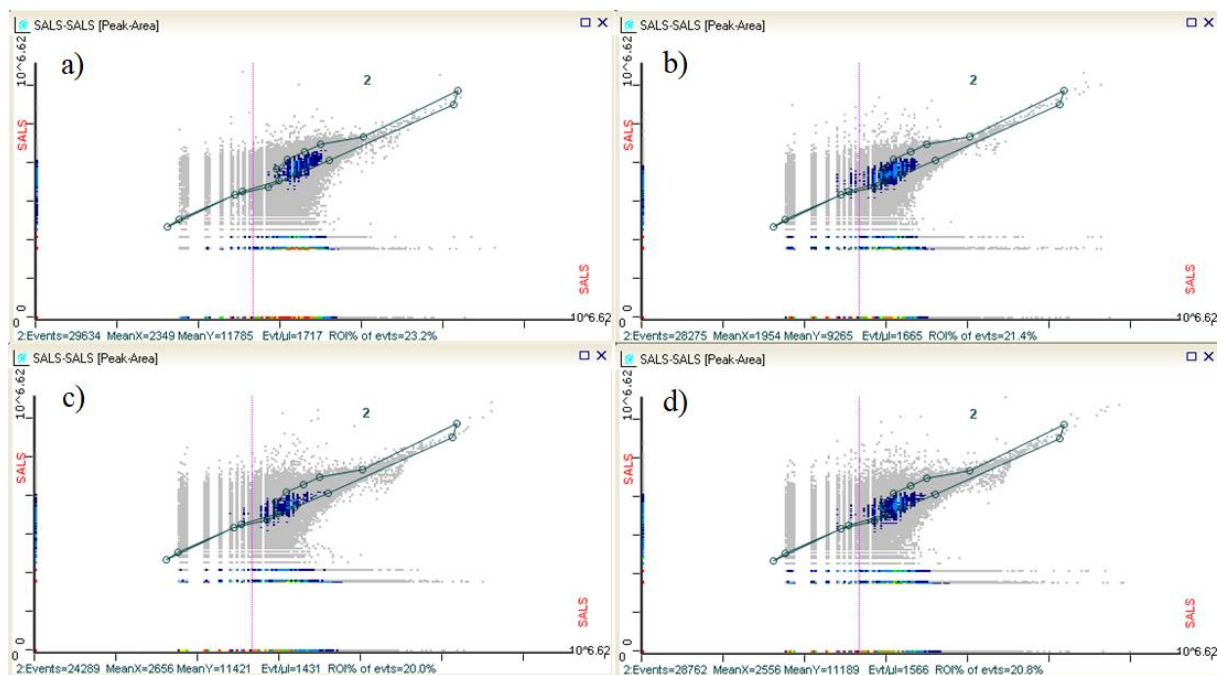
Príloha 4: Živé a ošetrované bunky C. neator PHB-4, 70% etanolový stres, farbený PI a SYTO9, rozlíšenie 100×



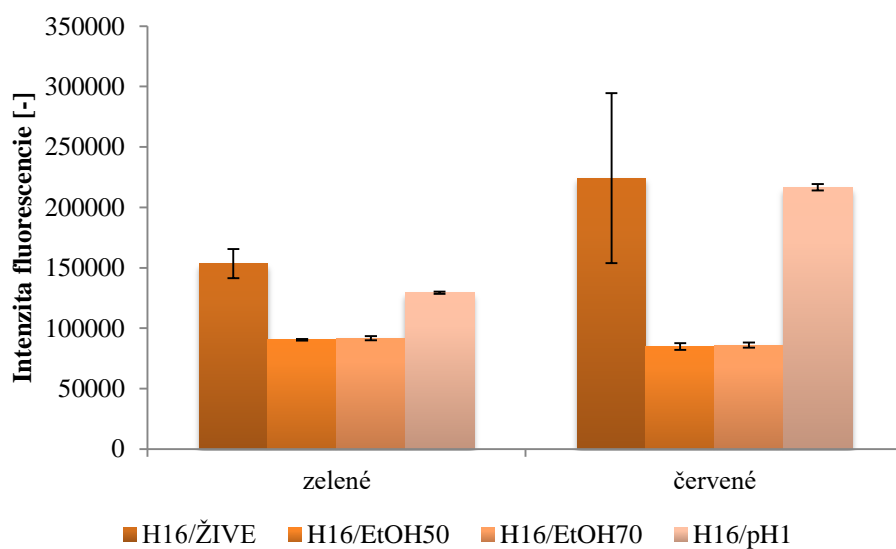
Priloha 5: Živé a ošetrované bunky C. neator H16. pH 1, farbený PI a SYTO9, rozlíšenie 100×



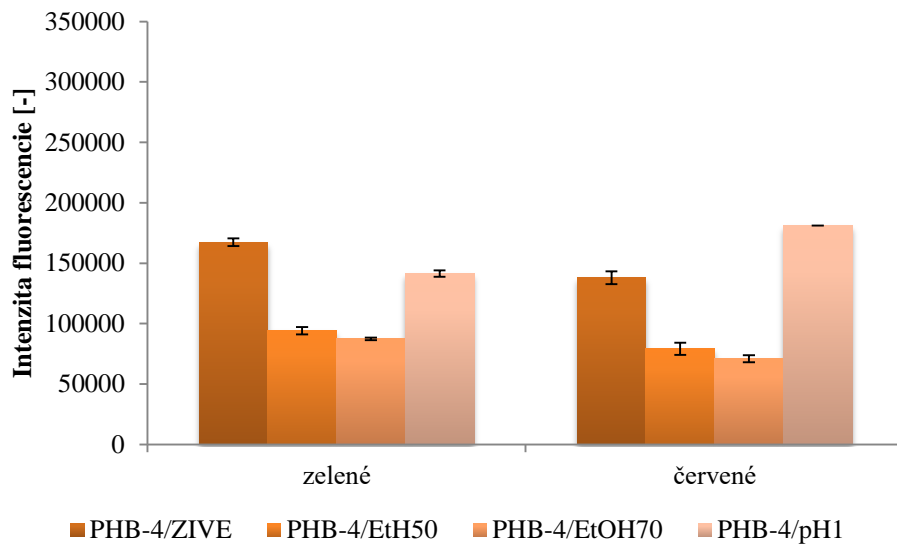
Príloha 6: Živé a ošetrované bunky *C. neator* PHB⁴, pH 1, farbený PI a SYTO9, rozlíšenie 100×



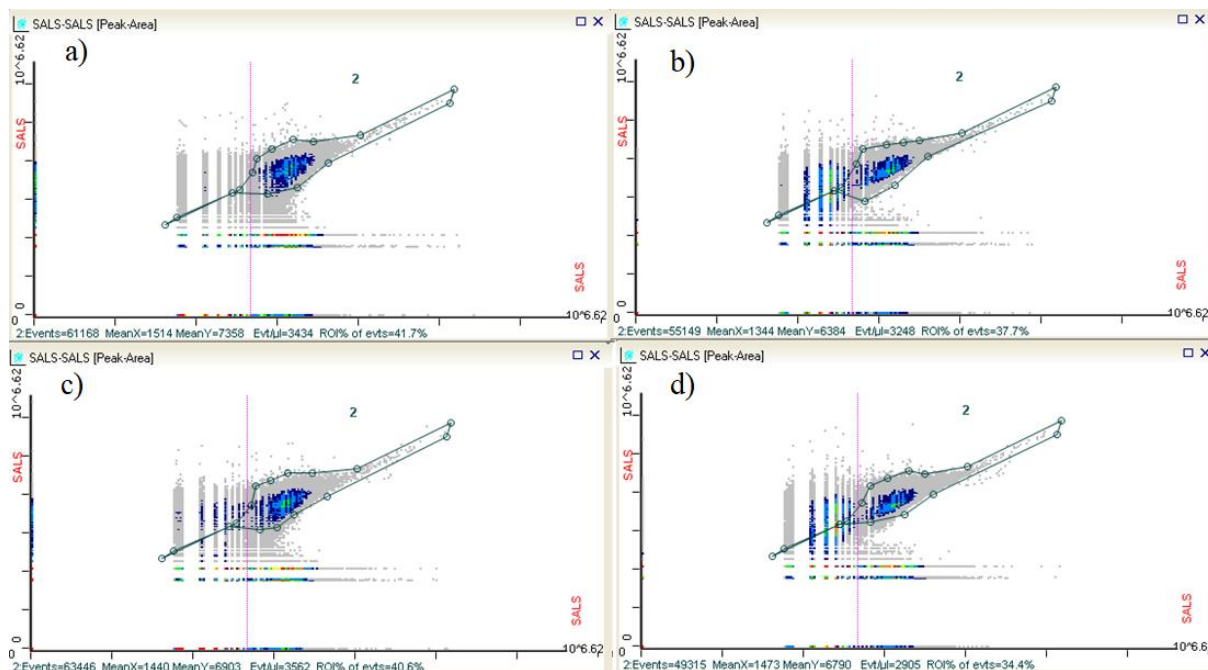
Príloha 7: SALS/SALS cytogram pre *C. necator* PHB⁻⁴ a) Nenamáhané bunky b) 50% etanol c) 70% etanol d) pH 1



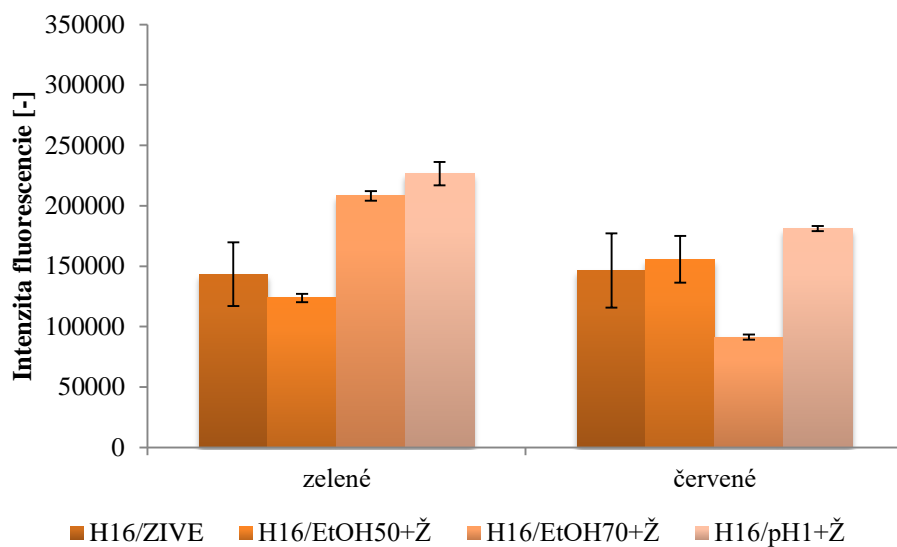
Príloha 8: Závislosť mediánu intenzity na jednotlivé fluorescenčné kanály pre *C. necator* H16, farbenie s AO



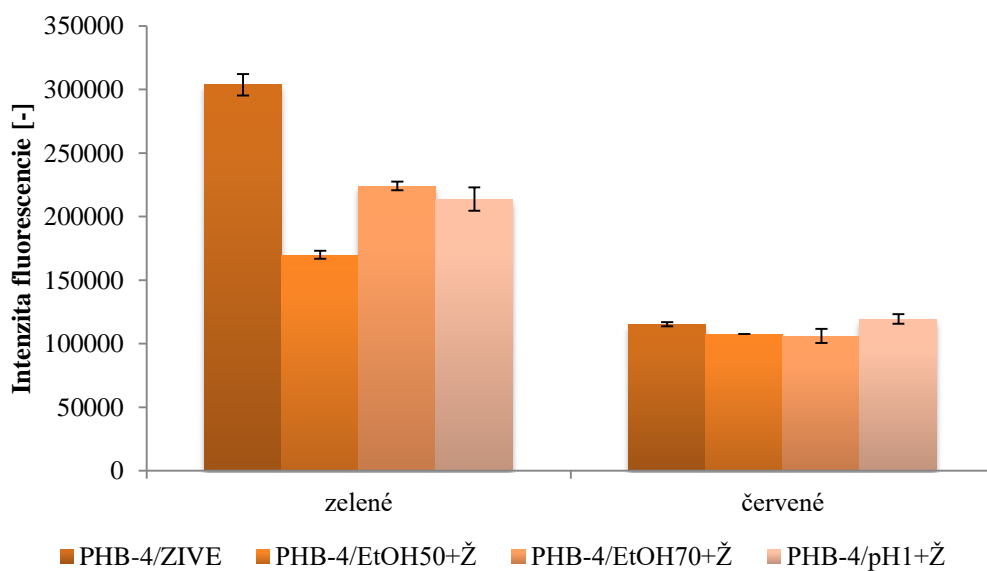
Príloha 9: Závislosť mediánu intenzity na jednotlivé fluorescenčné kanály pre *C. necator* PHB⁴, farbenie s AO



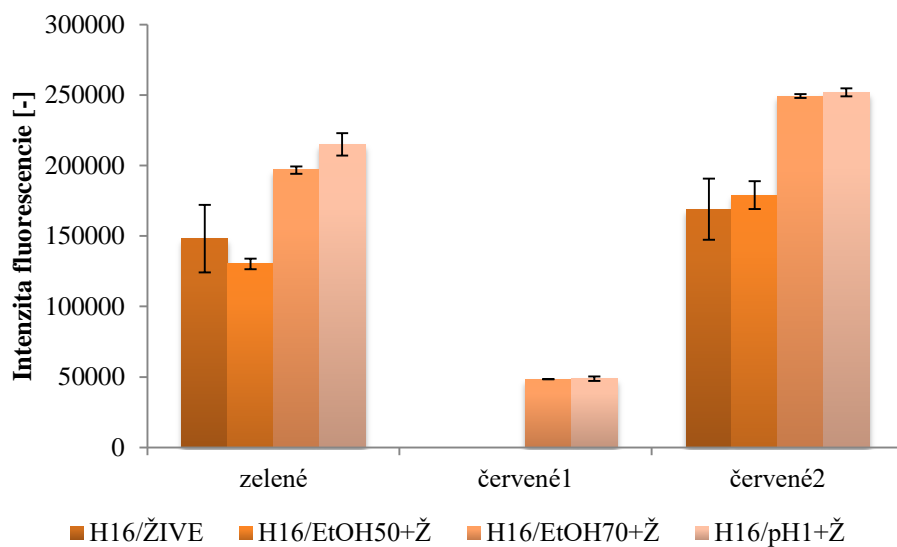
Príloha 10: SALS/SALS cytogram pre *C. necator* PHB-4 a) živé bunky b) 50% etanol + živé c) 70% etanol + živé d) pH 1 + živé



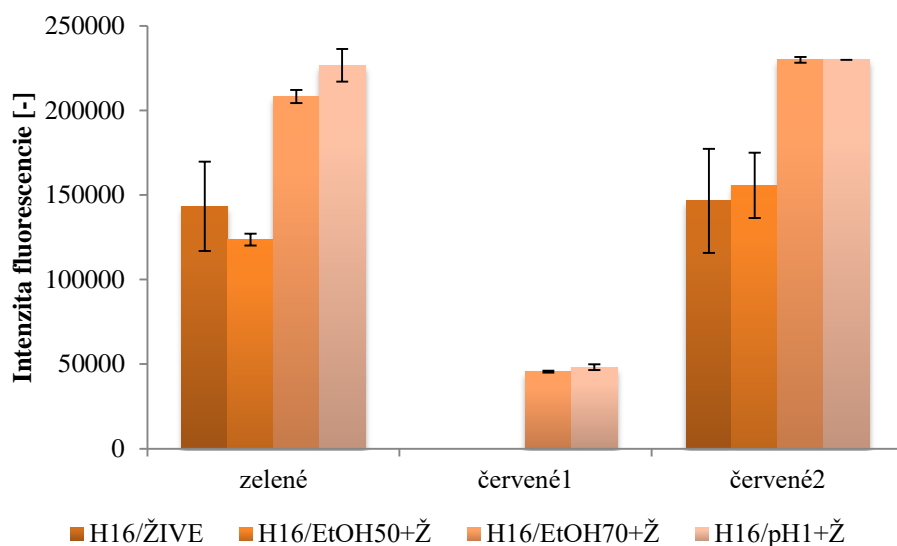
Príloha 11: Závislosť mediánu intenzity na jednotlivé fluorescenčné kanály pre *C. necator* H16, farbenie s AO



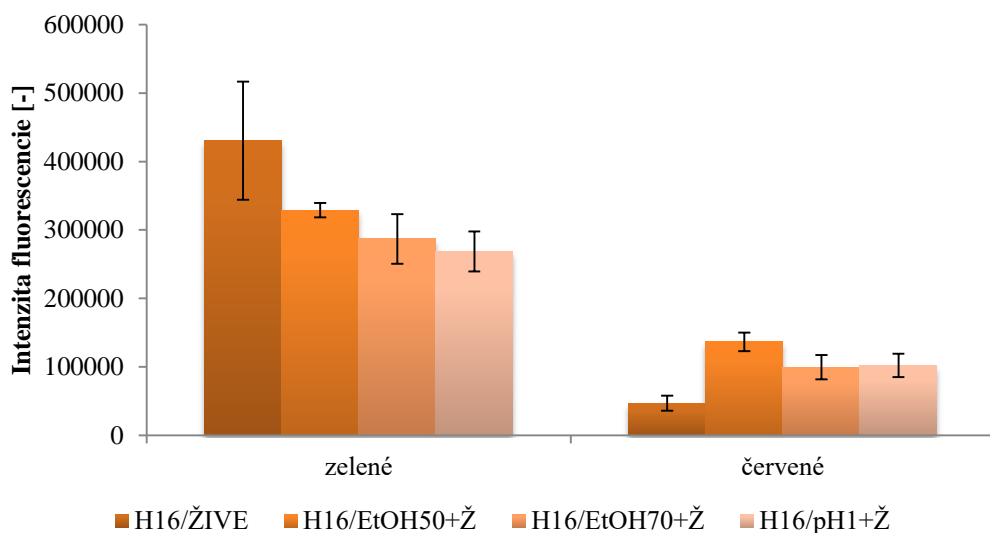
Príloha 12: Závislosť mediánu intenzity na jednotlivé fluorescenčné kanály pre *C. necator* PHB⁴, farbenie s AO



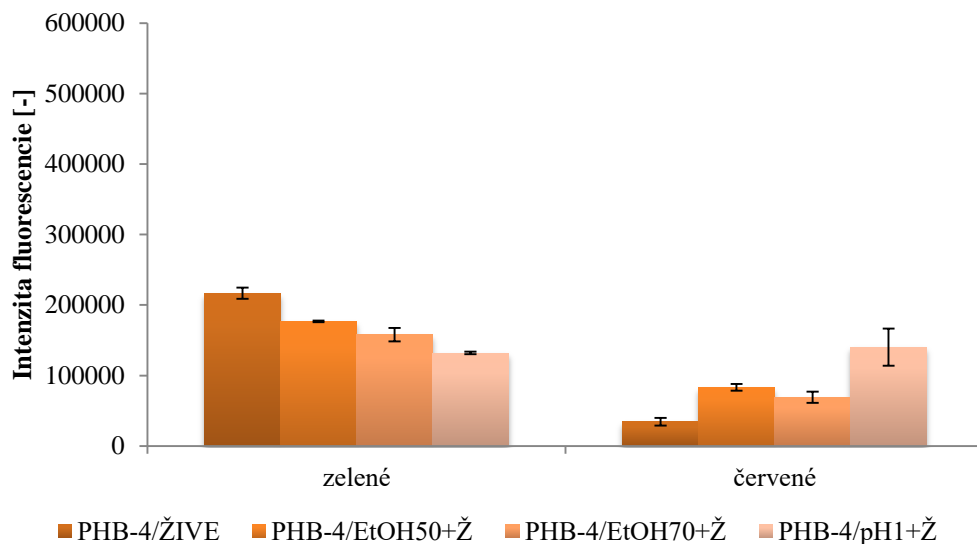
Príloha 13: Závislosť priemernej intenzity na jednotlivé fluorescenčné kanály pre *C. necator* H16, kde červené1 je pík s menšou intenzitou a červené2 je pík s väčšou intenzitou v červenom kanáli, farbenie s AO



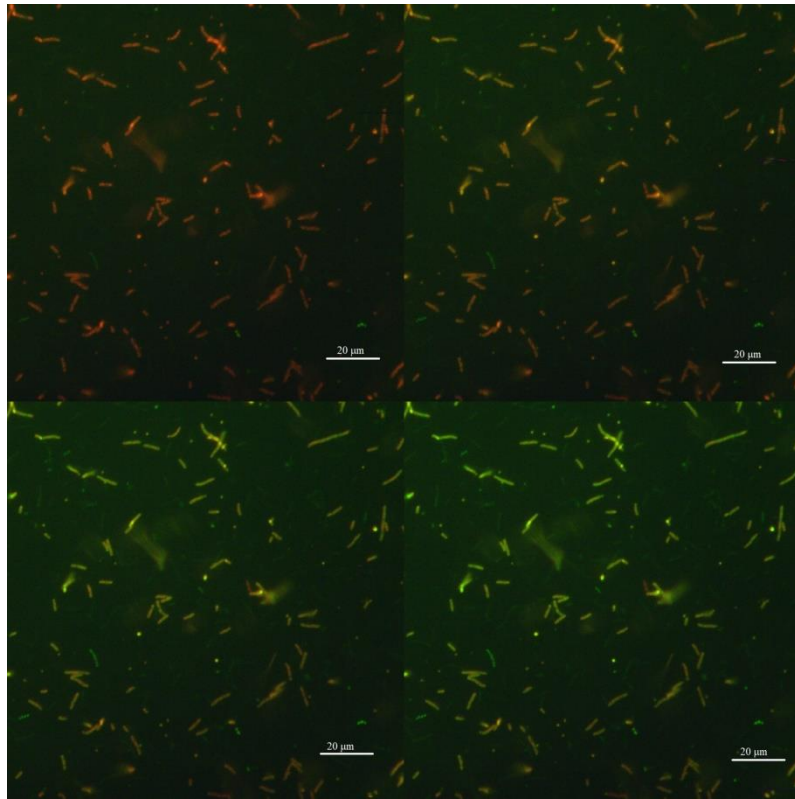
Príloha 14: Závislosť mediánnej intenzity na jednotlivé fluorescenčné kanály pre *C. necator* H16, kde červené1 je pík s menšou intenzitou a červené2 je pík s väčšou intenzitou v červenom kanáli, farbenie s AO



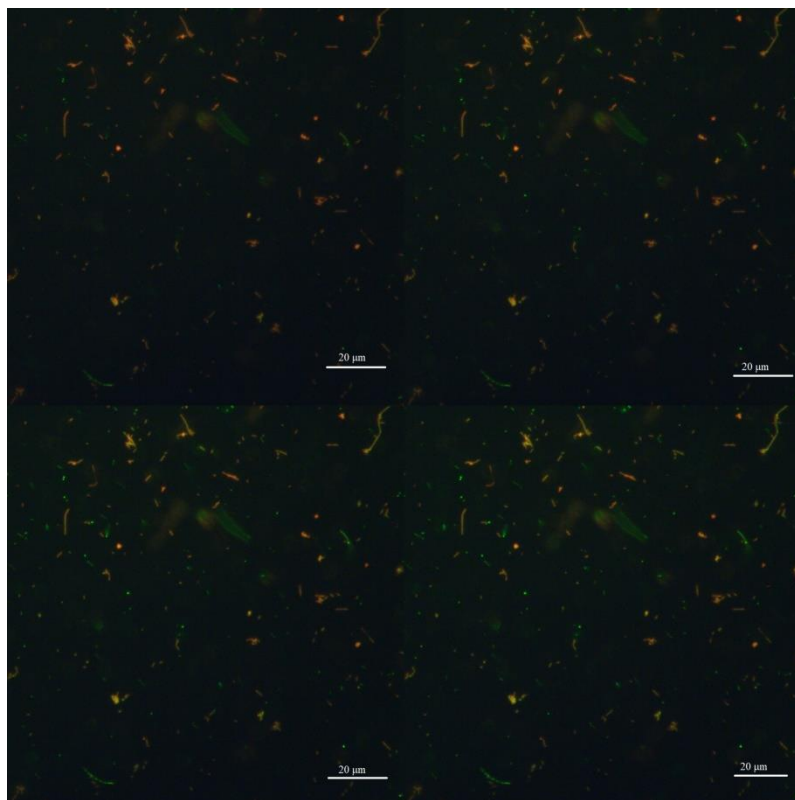
Príloha 15: Závislosť mediánu intenzity na jednotlivé fluorescenčné kanály pre *C. necator* H16, farbenie s PI a SYTO9



Príloha 16: Závislosť mediánu intenzity na jednotlivé fluorescenčné kanály pre *C. necator* PHB⁴, farbenie s PI a SYTO9



Príloha 17: Porovnanie fluorescencie *C. necator* H16 pri pH 1 v rôznych časoch. (farbenie AO, rozlíšenie 40×)



Príloha 18: Porovnanie fluorescencie *C. necator* PHB⁴ pri pH 1 v rôznych časoch. (farbenie AO, rozlíšenie 40×)