



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 MIKROSKOPIE ATOMÁRNÍCH SIL PŘI MORFOLOGICKÉ A FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ ANALÝZE MIKROBIÁLNÍCH BUNĚK A BUNĚČNÝCH KOMPONENT

CHARACTERIZATION OF MORPHOLOGICAL AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF
MICROORGANISMS AND COMPONENTS OF CELL BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ondřej Blaňka

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Eva Slaninová, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1743/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Ondřej Blaňka**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **Ing. Eva Slaninová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Využití mikroskopie atomárních sil při morfologické a fyzikálně–chemické analýze mikrobiálních buněk a buněčných komponent

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracovat literární rešerši na téma: i. využití mikroskopie atomárních sil (AFM) při analýze buněk a buněčných komponent, ii. intracelulární granule polyhydroxyalkanoátů (PHA) – jejich struktura, vlastnosti a biologická úloha.
2. Na základě literární rešerše navrhnout a optimalizovat postup analýzy bakteriálních buněk, příp. buněčných komponent metodou AFM.
3. Na vybrané sadě buněčných kultur (např. PHA produkující vs. neprodukující mikroorganismy) a buněčných komponent (např. izolované granule PHA) realizovat sadu AFM analýz s využitím optimalizovaného postupu.
4. Diskutovat využitelnost techniky AFM při studiu vlivu přítomnosti PHA na morfologické a fyzikálně–chemické charakteristiky mikrobiálních buněk.

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

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

Ondřej Blaňka
student

Ing. Eva Slaninová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Cílem bakalářské práce byla charakterizace bakteriálních buněk *Rhodospirillum rubrum*, které produkují polyhydroxyalkanotáty (PHA) a *Rhodospirillum rubrum* Δ *phaC* bez schopnosti produkce intracelulárních granulí PHA pomocí mikroskopie atomárních sil. Dále byly touto metodou také charakterizovány izolované polyhydroxyalkanoátových granulí v jejich nativním stavu. Při přípravě vzorků, konkrétně pro fixaci bakteriálních buněk i izolovaných PHA granulí byl využit Poly-L-lysin, který byl aplikován na oplazmovaná podložní sklíčka při koncentraci 0,01 mg/ml. Testovaným hrotem byl hrot MLCT – A. První získanou charakteristikou byly topografické snímky buněk *Rhodospirillum rubrum* a *Rhodospirillum rubrum* Δ *phaC* a izolovaných PHA granulí. Bakteriální buňky a PHA granule byly dále charakterizovány pomocí Youngova modulu. Pro jeho získání byla navržena metoda, při které byly nejprve snímány celé buňky, respektive PHA granule, a následně bylo v případě buněk provedeno měření zaměřené na jednotlivá místa na buňce. Naměřená data byla nejprve vyhodnocena v softwaru JPK Data Processing pomocí Hertzova modelu aproximace dat. Toto vyhodnocení se ukázalo jako nespolehlivé, proto byla navržena druhá metoda, při které se k vyhodnocení použily směrnice přímků získaných se strmých částí křivky „extend“. Jako spolehlivější měření bylo zvoleno měření celých buněk, protože u něj vycházely menší odchylky a byly získány informace o celém povrchu buňky či granule. Směrnice *Rhodospirillum rubrum* dosahovala hodnoty $(-4,5 \pm 1,5)$ nN/ μ m a pro *Rhodospirillum rubrum* Δ *phaC* $(-14,1 \pm 4,4)$ nN/ μ m. Z toho byl potvrzen předpoklad, že buňky *Rhodospirillum rubrum* obsahující PHA granule vykazují rozdílnou tuhost oproti buňkám *Rhodospirillum rubrum* Δ *phaC* bez přítomnosti PHA granulí. Směrnice pro izolované PHA granule byla stanovena $(-9,0 \pm 1,0)$ nN/ μ m. Při jejím porovnání se směrnicemi bakteriálních buněk vyplývá, že PHA granule vykazují tuhost, která se nachází v rozmezí mezi tuhostí *Rhodospirillum rubrum* a *Rhodospirillum rubrum* Δ *phaC*.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mikroskopie atomárních sil, *Rhodospirillum rubrum*, PHA granule, Poly-L-lysin, Youngův modul

ABSTRACT

The aim of this bachelor thesis was to characterize *Rhodospirillum rubrum* bacterial cells that produce polyhydroxyalkanoate (PHA) and *Rhodospirillum rubrum* Δ *phaC* without the ability to produce intracellular PHA granules using atomic force microscopy. Furthermore, isolated polyhydroxyalkanoate granules in their native state were also characterized by this method. Poly-L-lysine was used in the preparation of the samples, specifically for fixation of bacterial cells and isolated PHA granules, and was applied to slides that had been exposed to plasma at a concentration of 0.01 mg/ml. The tip tested was the MLCT - A tip. The first characteristics obtained were topographic images of *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodospirillum rubrum* Δ *phaC* cells and isolated PHA granules. The bacterial cells and PHA granules were further characterized using Young's modulus. To obtain it, a method was designed in which whole cells and PHA granules were first imaged, respectively, and then, in the case of cells, measurements were made targeting individual locations on the cell. The measured data were first evaluated in JPK Data Processing software using the Hertzian data approximation model. This evaluation proved to be unreliable, so a second method was devised using the directive lines obtained with the steep parts of the "extend" curve to evaluate. Whole-cell measurement was chosen as a more reliable measurement because it yielded smaller deviations and provided information about the entire surface of the cell or granule. The *Rhodospirillum rubrum* directive was (-4.5 ± 1.5) nN/ μ m and for *Rhodospirillum rubrum* Δ *phaC* was (-14.1 ± 4.4) nN/ μ m. This confirmed the hypothesis that *Rhodospirillum rubrum* cells containing PHA granules exhibit different stiffness compared to *Rhodospirillum rubrum* Δ *phaC* cells without the presence of PHA granules. The directive for isolated PHA granules was determined to be (-9.0 ± 1.0) nN/ μ m. When compared with the directives of bacterial cells, it shows that the PHA granules exhibit a stiffness that lies between that of *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodospirillum rubrum* Δ *phaC*.

KEYWORDS

Atomic force microscopy, *Rhodospirillum rubrum*, PHA granules, Poly-L-lysine, Young's module

BLAŇKA, Ondřej. *Využití mikroskopie atomárních sil při morfologické a fyzikálně-chemické analýze mikrobiálních buněk a buněčných komponent* [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-05-22]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/148952>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Eva Slaninová.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval Ing. Evě Slaninové, Ph.D. za trpělivost a věcné rady, které mi velmi pomohly při psaní této bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat doc. Ing. Petru Sedláčkovi, Ph.D. za odborné rady při vyhodnocování výsledků, Bc. Markétě Khýrové za naučení práce s mikroskopem atomárních sil a kolegům v laboratoři, kteří mi vždy ochotně pomohli. V neposlední řadě mé díky patří rodině a přátelům, kteří mě skrz celé mé studium podporovali.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Modelové mikroorganismy.....	9
2.1.1 Producenti polyhydroxyalkanoátů	9
2.1.2 Struktura a vlastnosti polyhydroxyalkanoátů	9
2.1.3 Metabolismus polyhydroxyalkanoátů.....	10
2.2 Intracelulární granule polyhydroxyalkanoátů.....	11
2.2.1 Vlastnosti intracelulárních PHA granulí.....	11
2.2.2 Modely formace polyhydroxyalkanoátových granulí.....	12
2.2.3 Vlastnosti extrahovaných polyhydroxyalkanoátových granulí.....	13
2.2.4 Biologické úlohy polyhydroxyalkanoátů.....	15
2.2.5 Metody izolace intracelulárních granulí	16
2.3 Mikroskopie atomárních sil	17
2.3.1 Obecná charakteristika.....	17
2.3.2 Režimy měření mikroskopie atomárních sil	17
2.3.3 Využití mikroskopie atomárních sil při zkoumání biologických vzorků	19
2.3.4 Fixace vzorků.....	20
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
3.1 Použité chemikálie, přístroje a organismy.....	21
3.1.1 Chemikálie	21
3.1.2 Přístroje.....	21
3.1.3 Použité mikroorganismy	22
3.1.4 Použité izolované granule polyhydroxyalkanoátů	22
3.2 Kultivace.....	22
3.2.1 <i>Rhodospirillum rubrum</i> a <i>Rhodospirillum rubrum</i> Δ phaC.....	22
3.3 Charakterizace buněčných kultur	24
3.3.1 Měření optické hustoty	24
3.3.2 Plynová chromatografie.....	24
3.4 Měření vzorků pomocí AFM	24
3.4.1 Příprava podložních sklíček.....	24
3.4.2 Příprava bakteriálních vzorků.....	25
3.4.3 Příprava vzorků s izolovanými granulemi polyhydroxyalkanoátů	25

3.4.4	Nastavení AFM.....	25
3.5	Vyhodnocování Youngova modulu z výstupů měření	26
3.5.1	Vyhodnocení Youngova modulu softwarem JPK Data Processing.....	26
3.5.2	Vyhodnocení pomocí směrnic křivek „extend“ a „retract“	26
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	27
4.1	Charakteristika získaných kultur	27
4.1.1	Spektrofotometrické stanovení biomasy.....	27
4.1.2	Gravimetrické stanovení biomasy a stanovení PHB	27
4.2	Snímání bakteriálních kultur v kapalném prostředí pomocí mikroskopu atomárních sil 28	
4.2.1	Příprava vzorků.....	28
4.2.2	Optimalizace nastavení měření.....	29
4.2.3	Získané snímky	29
4.3	Snímání izolovaných polyhydroxyalkanoátových granulí pomocí mikroskopu atomárních sil.....	32
4.3.1	Příprava vzorků.....	32
4.3.2	Nastavení měření	32
4.3.3	Získané snímky	33
4.4	Vyhodnocení Youngova modulu.....	36
4.4.1	Nastavení měření	36
4.4.2	Vyhodnocení Youngova modulu pomocí softwaru JPK Data Processing	36
4.4.3	Vyhodnocení směrnic křivek „extend“ a „retract“	39
5.	ZÁVĚR.....	42
6.	POUŽITÁ LITERATURA	44
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	49
8.	PŘÍLOHY	50
8.1	Vyhodnocené Youngovy moduly pomocí software JPK Data Processing.....	50
8.1.1	<i>Rhodospirillum rubrum</i> Δ <i>phaC</i>	50
8.2	Vyhodnocení křivek „extend“ a „retract“	52
8.2.1	Výběr bodů z křivek „extend“ a „retract“ pro proložení přímkou.....	52

1. ÚVOD

Polyhydroxyalkanoáty známé pod zkratkou PHA jsou mikrobiální polyestery, které se akumulují uvnitř mikroorganismů ve formě intracelulárních granulí. Chemicky se jedná o polyestery hydroxykarboxylových kyselin. Bakteriím, které jsou schopny produkovat PHA, slouží hlavně jako zásobárna energie, ale bylo také zjištěno, že dokáží zvýšit odolnost bakterií vůči nepříznivým podmínkám (např. vysoká teplota, pH, Uv aj.). Pokud PHA extrahujeme z buněk mikroorganismů, dosahují podobných vlastností jako běžné plasty. Jejich hlavní výhodou oproti běžným plastům je jejich biodegradabilita a biokompatibilita. Momentálně je ovšem jejich produkce finančně náročná, a proto je nutné další zkoumání PHA-produkujících mikroorganismů s cílem zefektivnění produkce PHA [1].

Jednou z metod, pomocí které by bylo možné PHA-produkující mikroorganismy zkoumat, je mikroskopie atomárních sil známá pod zkratkou AFM z anglického *atomic force microscopy*. Tato metoda je založena na působení elektromagnetických sil, které vychází z atomů vzorku, na velmi ostrý hrot, což se projeví jeho vychýlením a tím získáme informaci o struktuře vzorku. AFM se hojně využívá k trojrozměrnému zobrazování povrchů a pomocí ní můžeme získat i různé vlastnosti vzorku, mezi které patří například Youngův modul či adheze. Výhodou AFM je možnost měření na vzduchu i v kapalném prostředí, ve kterém si buňky mikroorganismů a PHA granule zachovávají svůj nativní stav. V kapalném prostředí je nutné vzorek fixovat na substrát, aby nedocházelo k jeho pohybu při měření [2, 3].

V teoretické části práce jsou rozebrány vlastnosti a metabolismus PHA. Dále je zde popsána formace PHA granulí uvnitř buňky a rozdíl ve struktuře PHA granulí uvnitř a mimo buňku. V této části práce jsou také zmíněny příklady PHA-produkujících mikroorganismů a metody extrakce PHA granulí z buněk mikroorganismů. Poslední část teoretické části práce se zabývá jednotlivými režimy AFM, jeho použitím k měření biologických vzorků a jsou zde popsány metody fixace vzorků v kapalném prostředí.

Experimentální část práce byla zaměřena na získání snímků buněk *Rhodospirillum rubrum*, které jsou schopny akumulovat PHA, a *Rhodospirillum rubrum* Δ *phaC*, které PHA neprodukuje, v jejich nativním stavu pomocí AFM. Dále byla optimalizována metoda fixace u přípravy vzorků a následného měření izolovaných PHA granulí pomocí AFM v kapalném prostředí. Poslední experimentální část práce byla zaměřena na získání Youngova modulu pro buňky *Rhodospirillum rubrum* a *Rhodospirillum rubrum* Δ *phaC* a pro izolované PHA granule.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Modelové mikroorganismy

2.1.1 Producenti polyhydroxyalkanoátů

Rhodospirillum rubrum

Bakteriální kmen Rhodospirillum rubrum se řadí mezi grampozitivní bakterie a velikost buněk dosahuje rozměrů v rozsahu 800 až 1000 nm. *Rhodospirillum rubrum* patří mezi fakultativní anaeroby, z čehož plyne, že jako finální akceptor elektronů využívá kyslík, avšak při jeho nedostatku dokáže tento mikroorganismus využít alternativních akceptorů elektronů, mezi které patří například dimethylsulfoxid. Barva bakterie se mění v závislost na buněčném cyklu. Pokud se bakterie ve fázi růstu nachází v prostředí s dostatkem kyslíku, je bezbarvá. Avšak za anaerobních podmínek započne *Rhodospirillum rubrum* cyklus fotosyntézy, což se projeví fialovým zbarvením, jež je způsobeno produkcí pigmentů, mezi které patří například karotenoidy. *Rhodospirillum rubrum* dokáže za anaerobních podmínek syntetizovat PHA, a to především jejich nejjednodušší formu, což jsou polyhydroxybutyráty (PHB) [4, 5].

Cupriavidus necator H16

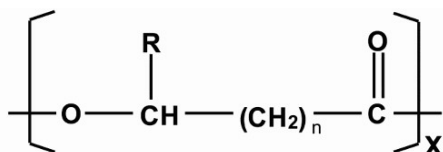
Tato gramnegativní bakterie se vyskytuje v půdních a sladkovodních biotopech a dokáže přežít i za nedostatku kyslíku. Bakterie dokáže využívat jako zdroj energie organické látky i molekulární vodík, a to buď současně či alternativně. *Cupriavidus necator* získává molekulární vodík díky metabolické aktivitě mikrobů, kteří dokáží vázat molekulární dusík. Schopností využívat vodík jako zdroj energie disponuje *Cupriavidus necator* H16 díky přítomnosti enzymů hydrogenáz, které katalyzují oxidaci molekuly H₂, což slouží organismu jako zdroj energie a redukčních činidel. *Cupriavidus necator* H16 je dále schopna využít jako finální akceptory elektronů při nedostatku kyslíku i dusíkaté látky, mezi které patří dusičnany a dusičnany [6].

Cupriavidus necator patří mezi největší producenty PHA. Dosahuje taktéž vysokých výtěžků *scf*PHA, které mohou činit až 90 % celkové hmotnosti vysušené buňky, což taktéž způsobuje vysoký výnos biomasy. Schopnost *Cupriavidus necator* akumulovat PHB ve formě intracelulárních granúl je ovlivněna pouze dostatečným zdrojem uhlíku, nedostatek kyslíku a další faktory se projevují jako faktory limitující růst organismu. Za samotnou syntézu PHB zodpovídá několik druhů enzymů. PHB syntáza (*PhaCI*) nejprve katalyzuje polymerizaci 3-hydroxybutyryl-CoA. Následuje enzym β -ketothioláza (*PhaA*) katalyzuje kondenzaci dvou molekul acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-CoA. Třetím enzymem je NADPH-dependentní acetoacetyl-CoA reduktáza (*PhaB*), která katalyzuje redukci acetoacetyl-CoA na 3-hydroxybutyryl-CoA [6, 7].

2.1.2 Struktura a vlastnosti polyhydroxyalkanoátů

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou syntetizovány řadou mikroorganismů. Jedná se o mikrobiální polyestery, které se v buňkách akumulují ve formě intracelulárních granúl. Chemicky se jedná o alifatické řetězce tvořené monomery (*R*)-3-hydroxy mastných kyselin,

kde R značí uhlovodíkový zbytek. Výslednou strukturu lze pozorovat na Obrázku 1. PHA řetězce se taktéž chovají jako opticky aktivní látky [1].



Obrázek 1: Obecná struktura PHA [1]

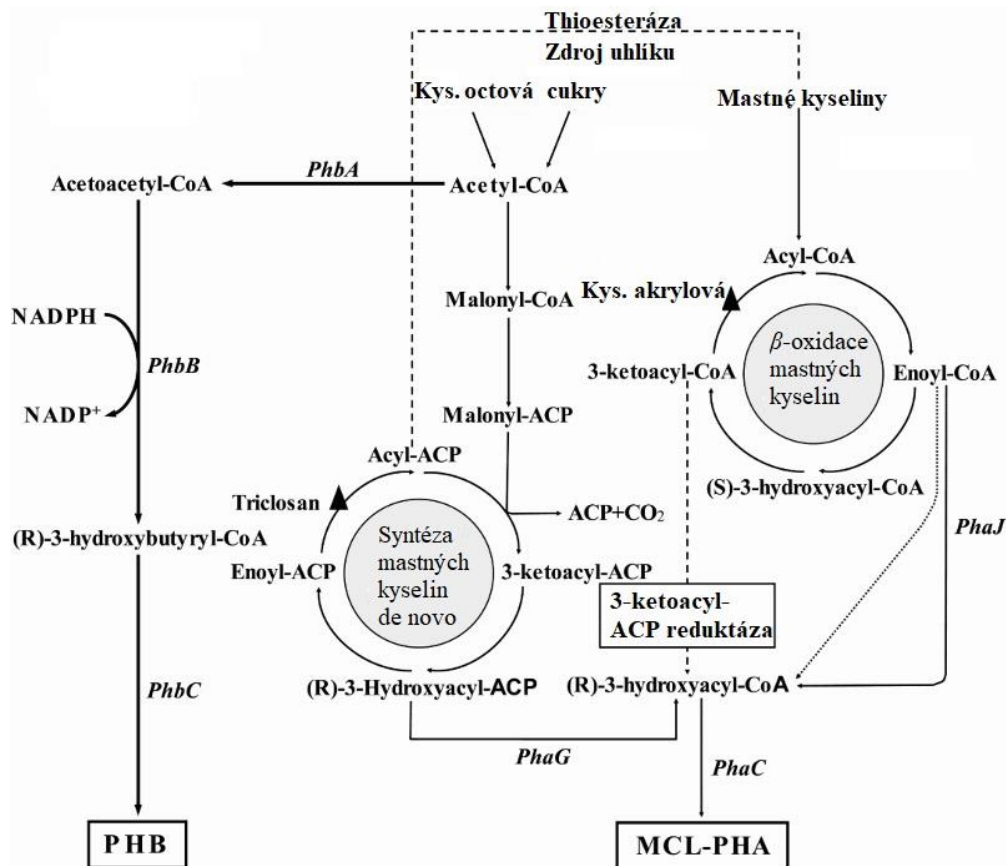
K polymerizaci dochází díky vytvoření esterové vazby mezi karboxylovou skupinou jednoho monomeru a hydroxylovou skupinou druhého monomeru. Kvůli stereospecifitě enzymů, které produkují PHA, se všechny doposud známé PHA vyskytují v R -konfiguraci na uhlíku s navázanou hydroxylovou skupinou, avšak u některých PHA se chiralita nevyskytuje. Přítomnost chirálního centra ve struktuře PHA znemožňuje jejich snadnou chemickou syntézu [1, 8].

Z hlediska délky postranního řetězce v monomeru lze PHA klasifikovat do tří skupin. PHA s řetězcem tvořeným 3 až 5 uhlíky patří mezi PHA s krátkým řetězcem (*sc*/PHA) a jsou produkovány například bakterií *Ralstonia eutropha*. Mezi PHA se středně dlouhým řetězcem (*mc*/PHA) se řadí PHA s 6 až 14 uhlíky. Posledním skupinou jsou PHA s dlouhým řetězcem (*lc*/PHA), u nichž je řetězec tvořen 15 a více uhlíky. Zatímco *sc*/PHA vykazují vyšší teplotu tání a podobné znaky jako běžné plasty, *mc*/PHA mají nižší teplotu tání a svými vlastnostmi spíše připomínají gumy či elastomery. PHA se vyznačují vysokou variabilitou své struktury, jelikož enzymy syntetizující PHA se vyznačují nízkou substrátovou specifitou, a proto mohou být PHA tvořeny až 150 různými hydroxyalkanovými kyselinami. O homopolymer se jedná, pokud je obsah jednoho typu monomeru větší než 99 %. P3HB se vyznačují svojí teplotní stabilitou a mechanickými vlastnostmi. U *mc*/PHA se ve všech případech jedná o kopolymery, jelikož vždy obsahují i jiný monomer. Výhoda kopolymerů je možnost modifikace jejich vlastností různými kombinacemi monomerů. Kopolymery bývají nejčastěji kombinovány s již zmíněným P3HB, který je nejčastěji využívaným polyhydroxyalkanoátem. Příkladem může být zakomponování 3-hydroxyvalerátu do struktury 3-hydroxybutyrátu za vzniku kopolymeru poly(3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyvalerát), jež vykazuje nižší teplotu tání a nižší krystalickou strukturu oproti poly(3-hydroxybutyrátu) (P3HB). Postranní řetězce PHA mohou obsahovat různé funkční skupiny, mezi které patří dvojná a trojná vazba mezi atomy uhlíku, atomy halogenu nebo aromatická jádra. Funkční skupiny lze zainkorporovat do postranního řetězce použitím vhodného substrátu s potřebnou funkční skupinou. Mezi nejdůležitější vlastnosti PHA se řadí jejich biokompatibilita a biodegradabilita, díky kterým mají předpoklad k možnému budoucímu využití ve formě bioplastů nebo v tkáňovém inženýrství [9, 10, 11, 12, 13].

2.1.3 Metabolismus polyhydroxyalkanoátů

Syntéza PHA probíhá v cytosolu mikroorganismů pomocí enzymatických reakcí. Jedná se o několika krokovou reakci, při které nejčastěji vznikají *sc*/PHA, z nichž nejvíce vzniká PHB, a dále mohou vznikat v menším množství *mc*/PHA. Prvním krokem reakce je kondenzace

dvou molekul acetyl-CoA katalyzovaná enzymem β -ketoacyl-CoA thiolázou (*PhbA*) za vzniku acetoacetyl-CoA. Vzniklý acetoacetyl-CoA je v následujícím kroku redukován účinkem enzymu acetoacetyl-CoA reduktázy (*PhbB*), jejíž účinnost se odvíjí od přítomnosti NADPH, za vzniku (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA. Vzniklý (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA je následně polymerizován účinkem enzymu P(3HB) polymerázou (*PhbC*) za vzniku PHB [1, 14].



Obrázek 2: Schéma syntézy PHB [1]

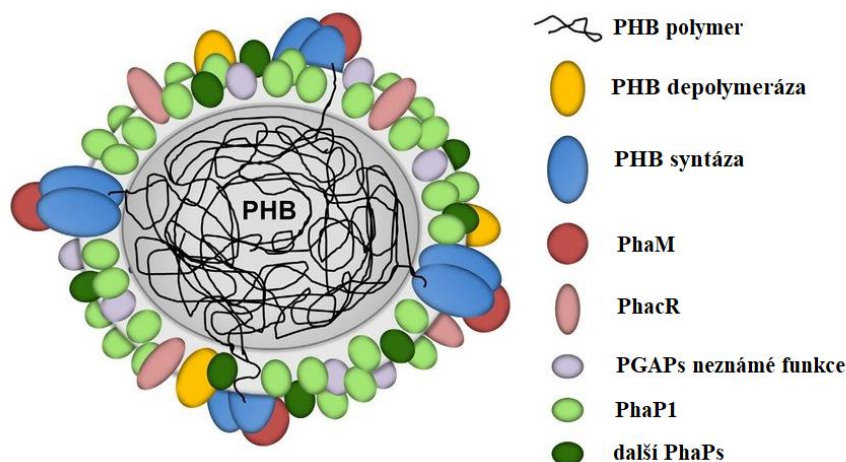
Na Obrázku 2 lze pozorovat schéma syntézy PHB. Acetyl-CoA potřebný k syntéze PHB získává buňka z cukrů, kyseliny octové nebo ze syntézy mastných kyselin. Mikroorganismy mohou ovšem také syntetizovat i *mcl*PHA. Jako substrát k jejich syntéze slouží (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA, který buňka získává oxidací enoyl-CoA, který vznikl β -oxidací mastných kyselin, katalyzovanou enzymem enoyl-CoA hydratázou (*PhaJ*) za vzniku (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA o různé délce uhlíkatého řetězce. Druhým způsobem zisku (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA je přeměnou (*R*)-3-hydroxyacyl-ACP vzniklého biosyntézou mastných kyselin pomocí transacylázy *PhaG*, která katalyzuje přenos (*R*)-3-hydroxyacylu z thioesteru (ACP) na CoA opět za vzniku (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA. Vzniklý (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA je následně polymerizován enzymem *PhaC* za vzniku *mcl*PHA [1].

2.2 Intracelulární granule polyhydroxyalkanoátů

2.2.1 Vlastnosti intracelulárních PHA granulí

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.1.1, PHA se v organismech, které jsou schopny je produkovat, akumuluje ve formě intracelulárních granulí. Ve výzkumu z roku 2016 bylo zjištěno, že granule

PHA neobsahují in vivo na svém povrchu fosfolipidy. Povrchová vrstva PHA granulí je dle studie tvořena vrstvou proteinů. Povrch PHA, který je hydrofobní, bývá částečně v kontaktu s cytoplazmou, a jelikož se PHA granule často akumulují při pólech buňky může dojít i ke kontaktu s cytoplazmatickou membránou. Právě díky akumulaci PHA granulí poblíž cytoplazmatické membrány může dojít k navázání fosfolipidů na její povrch, což vysvětluje dřívější detekce fosfolipidů u PHA granulí. V důsledku toho lze detekovat stopy fosfolipidů i v izolovaných in vitro granulích [15].



Obrázek 3: Model granule PHB in vivo [15]

2.2.2 Modely formace polyhydroxyalkanoátových granulí

Vznik PHA granulí je popsán pomocí několika modelů, mezi které patří „pučící“ model, „scaffold“ model a „micelový“ model.

„Pučící“ model vychází z předpokladu, že se PHA granule začínají formovat v blízkosti vnitřní strany membrány nebo přímo na ní. Jakmile započne růst PHA granule, dojde k obklopení PHA membránou. Po dosažení určité velikosti granule dojde k odtržení i s kusem membrány. Tento model ovšem předpokládá, že se v povrchové vrstvě PHA granulí vyskytují fosfolipidy, což bylo některými studiemi vyvráceno [15, 16].

„Scaffold“ model tvrdí, že v buňce jsou obsaženy molekuly, které slouží při formaci PHA granulí jako „lešení“. Na toto „lešení“, jehož chemická struktura nebyla doposud zjištěna, se naváže PHA syntáza a započne syntézu PHA, které se budou akumulovat na povrchu „lešení“. Jelikož dle „scaffold“ modelu není k formaci PHA granulí potřeba cytoplazmatická membrána, je umístění PHA granulí v buňce závislé pouze na povaze a umístění „lešení“ v buňce před započnutím formace [17].

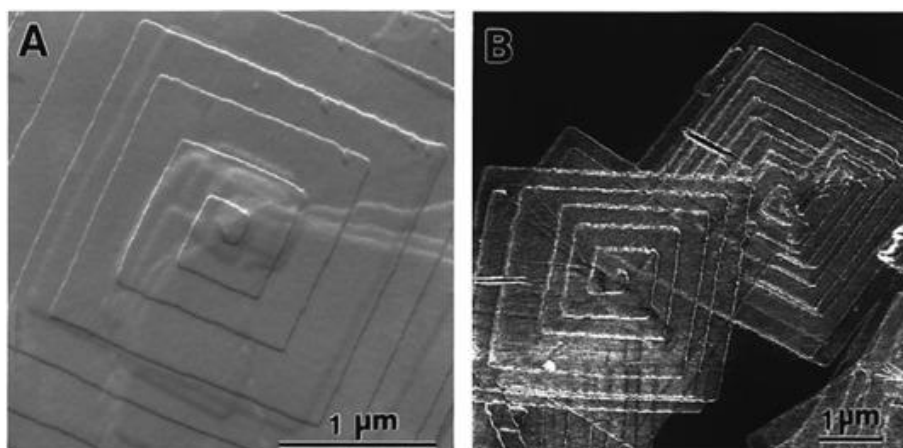
Posledním známým modelem formace PHA granulí je „micelový“ model, dle kterého jsou PHA granule formovány přímo v cytoplazmě, a to díky agregaci vzniklých PHA řetězců, které mají

na svém povrchu kovalentně vázané PHA syntázy. Dále tento model předpokládá, že se v cytoplazmatické membráně vyskytují náhodně rozmístěné PHA syntázy, a to i před započnutím formace granule. Z tohoto důvodu není nutná přítomnost žádného molekulárního „lešení“. Dle výsledků studií tohoto modelu vyplývá, že se v rané fázi syntézy PHA vyskytují dlouhé řetězce PHA navázané k PHA syntázám. Takto spojené molekuly následně agregují a vytvářejí granulovitou strukturu, které dosahují rozměrů 100 až 250 nm. U vzniklých granulí se hydrofobní řetězce PHA vyskytují uvnitř granule, zatímco hydrofilní PHA syntáza se objevuje na povrchu granule a vytváří tak její obal [18, 19].

2.2.3 Vlastnosti extrahovaných polyhydroxyalkanoátových granulí

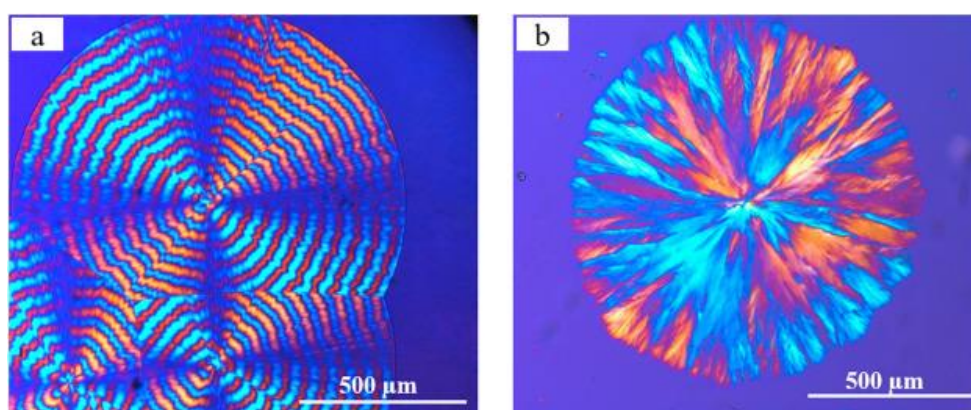
Molekuly PHA si v intracelulárním prostoru zachovávají amorfni charakter a nachází se v buňce ve formě ve vodě nerozpustných granulí, avšak při jejich extrakci mimo buňku se jejich struktura přemění na krystalickou s 55 až 80% krystalinitou. Samotná krystalizace PHA probíhá pomocí několika krokového procesu, během kterého se teplota PHA musí pohybovat mezi jejich teplotou skelného přechodu a teplotou tání. Molekulová struktura PHA a podmínky, které byly použity během krystalizace, ovlivňují morfologii vzniklého krystalu, díky této skutečnosti je možné získat za rozdílných podmínek odlišné krystalové struktury PHA [20, 21].

Krystaly PHA mohou mít různý tvar. První krystalickou formou PHA je monokrystal. Této struktury nabývají krystaly PHB. K získání monokrystalu byl rozpuštěn PHB v roztoku chloroformu s methanolem v objemovém poměru 1:7, aby koncentrace PHB dosáhla 0,25 mg/ml. Při teplotě 60 °C došlo ke zformování monokrystalu, jehož struktura byla tvořena kvádry, které připomínají laťky, díky čemuž se tato struktura nazývá jako laťkovitá. Šířka vzniklého monokrystalu činila 0,3 μm a jeho délka byla 5–10 μm. Monokrystal PHA byl taktéž získán z poly-3-hydroxyvalerátu (P3HV), který byl připraven pomalým ochlazením jeho 0,025 hm% roztoku ve směsi chloroformu a methanolu. Morfologie krystalů byla následně zkoumána pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM), která prokázala strukturu monokrystalu o přibližném tvaru čtverce 2–4 μm, jehož tloušťka činila 5–6 nm. Objemový poměr roztoku chloroformu s methanolem ovlivňoval morfologii vzniklého krystalu, a to konkrétně velikost a pravidelnost struktury. Při použití roztoku chloroformu s methanolem v objemovém poměru 1:49 docházelo ke snížení morfologické pravidelnosti a výskytu spirálních dislokací. Použití roztoku chloroformu s methanolem v objemovém poměru 1:99 způsobilo vznik menších krystalů bez dislokací. Strukturu monokrystalu PHV lze pozorovat na Obrázku 4 [21, 22, 23].



Obrázek 4: Získané snímky monokrystalu PHV pomocí AFM; A) pravotočivá dislokace B) levotočivá dislokace [21]

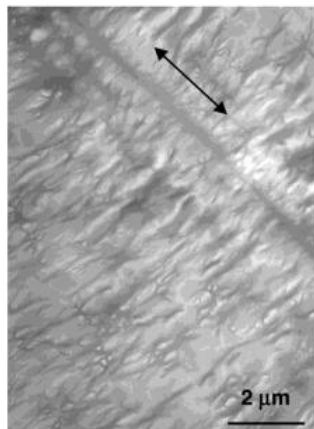
Druhým druhem krystalové morfologie PHA jsou sférolity, které zároveň patří mezi nejčastější krystalickou formu polymerů. Sférolity vznikají při prudkém ochlazení koncentrované taveniny PHA nebo vysrážením z koncentrovaného roztoku. Výsledná struktura sférolitu je tvořena řadou vrstev. Ve struktuře sférolitu se nachází molekulový řetězec, jenž je kolmý k radiálnímu směru. Rychlost tvorby sférolitu se při konstantní teplotě nemění. Při použití techniky roztavení PHA a jejich následnému ochlazení nedochází k vytváření velkého množství krystalizačních jader. Kvůli této skutečnosti probíhá krystalizace pomocí této metody pomalu. Ve studii z roku 2021 bylo zjištěno, že sférolity mohou být tvořeny homopolymery poly(3-hydroxy-2-methylbutyrátu) P(3H2MB) i jeho kopolymery, z nichž kopolymer P(80 mol% 3H2MB-co-3HB) krystalizuje rychleji než homopolymer PHB. Změna krystalizační teploty ovlivňuje výslednou morfologii krystalu, jelikož při jejím zvýšení dochází k přeměně páskovitých sférolitů na nepáskovité, což je způsobeno torzí mezi lamelami a periodickým růstem krystalů, díky které se zvyšující teplotou narůstá vzdálenost mezi páskovanými sférolity. Tuto přeměnu lze pozorovat na Obrázku 5 [21, 24].



Obrázek 5: Krystaly PHB vzniklé krystalizací za konstantní teploty a) 100 °C b) 120 °C [21]

Další možnou strukturou krystalů tvořených PHA je „shish-kebab“ struktura, ve kterém je molekulový řetězec PHA orientován ve směru toku a po jeho následném narovnání je vytvořena „shish-kebab“ struktura. Řetězce polymeru krystalizují kolmo na nukleační jádro, což je možné díky nízké nukleační bariéře, a vytvářejí tak „shish-kebab“ strukturu. Tvorba

„shish-kebab“ krystalů může být ovlivněna několika faktory, mezi které patří intenzita toku a molekulová hmotnost, při jejichž navýšení dochází k podpoře tvorby „shish-kebab“ krystalů. „Shish-kebab“ krystaly je možné připravit rozpuštěním PHB v chloroformu, kde koncentrace PHB činí 0,5 w/v%. Dalším krokem je vytvoření tenkého filmu PHB, čehož je dosaženo zahřátím směsi na 60 °C, čímž se úplně odpaří chloroform. „Shish-kebab“ struktura tvořená z PHB se následně formuje po dobu 8–16 hodin. Výslednou strukturu je možné vidět na Obrázku 6 [21, 25].



Obrázek 6: TEM snímek shish-kebab struktury PHB [21]

2.2.4 Biologické úlohy polyhydroxyalkanoátů

PHA granule slouží buňce primárně jako zásobárna přebytečného uhlíku, avšak nejedná se o jejich jedinou funkci. U buněk produkující PHA granule byla pozorována vyšší odolnost vůči stresovým faktorům [26].

Ve výzkumu profesora Obruči bylo zjištěno, že buňky bakterie *Cupriavidus necator* obsahující PHA disponují mechanismem, který je brání před nízkými teplotami. Buňky, které obsahovaly PHA, vykazovaly vyšší životaschopnost i po několika cyklech mražení a tání. I při velmi nízkých teplotách měly molekuly PHB stále své flexibilní vlastnosti. Díky této skutečnosti by granule PHA mohly zabraňovat tvorbě intracelulární ledových krystalů, které by poškodily buňky a způsobily jejich smrt. Tato hypotéza byla dále podpořena zjištěním, že buňky obsahující PHA dokáží mnohem lépe transportovat vodu přes membránu než buňky bez PHA, což snižuje tvorbu vnitrobuněčných ledových krystalů [27].

Mezi další stresový faktor, před kterým jsou PHA schopny buňku ochránit, patří osmotický šok. Při vystavení buněk hypertonickým podmínkám došlo u buněk, které neobsahovaly PHA, k plasmolýze, jež způsobila poškození membrány, přes kterou následně docházelo k úniku cytoplazmy. Oproti tomu buňky obsahující PHA byly schopny zabránit úniku cytoplazmy tím, že PHB granule ucply otvory v membráně, čímž ji dokázaly částečně opravit. PHB granule toho byly schopny díky tomu, že vykazovaly vlastnosti podobné kapalině. Buňky obsahující PHA byly po vystavení hypertonickým podmínkám méně dehydratované a nedocházelo u nich k výrazným změnám pH uvnitř buňky na rozdíl od buněk bez PHA, díky čemuž byly PHA obsahující buňky schopny hypertonickým podmínkám odolat [28].

2.2.5 Metody izolace intracelulárních granulí

Extrakce PHA z buněk je finančně nejnáročnější část jejich průmyslové výroby, což momentálně brání velkovýrobě z nich produkovaných materiálů. Bylo patentováno několik různých metod extrakce PHA z buněk, avšak všechny tyto metody mají podobné kroky. Nejprve je nutné zakoncentrovat buňky, čehož lze dosáhnout pomocí centrifugace, filtrace s křížovým tokem nebo flokulace. Pro izolaci PHA ze zakoncentrovaných buněk existují dvě metody, mezi které patří extrakce na vodní bázi a extrakce na bázi rozpouštědla [1].

Při použití extrakce na bázi rozpouštědla je nejprve zakoncentrovaná biomasa vysušena a samotná extrakce je následně provedena pomocí organických rozpouštědel, jako je například chloroform, které rozpustí buňku na jednotlivé buněčné komponenty, jež jsou filtrací odstraněny a PHA jsou z roztoku vysráženy pomocí studeného ethanolu či methanolu. Délka řetězce PHA ovlivňuje jejich rozpustnost v různých rozpouštědlech. Zatímco pro rozpouštění *scf*PHA jsou nejvhodnější rozpouštědla obsahující atomy chloru, mezi které patří například chloroform, *mcl*PHA lze rozpustit ve větší řadě rozpouštědel, do kterých patří například aceton [1, 29].

Mezi další možnosti získání PHA z buněk se řadí chemická digesce. Jako rozpouštědlo lze použít například NaClO nebo NaOH, z čehož by NaOH mohlo být ekologičtější variantou oproti organickým rozpouštědlům. Použitím těchto rozpouštědel je možné dosáhnout vysokých výtěžků s vysokou čistotou, čehož bylo využito ve výzkumu z roku 2022. Při použití 0,3 M NaOH činil výsledný výtěžek PHA z čisté biomasy 88 % a jeho čistota dosáhla 57 %. Oproti použití NaOH byly pomocí digesce lyofilizované biomasy 9% roztokem NaClO získány PHA s čistotou přibližně 99 % a výtěžkem okolo 90 %. Nevýhodou použití NaClO je možnost tvorby toxických halogenových sloučenin, které by mohly představovat problém při jejich využití [30].

Alternativou k extrakci pomocí rozpouštědla je enzymatická digesce. Mezi používané enzymy se řadí proteolytické enzymy, které jsou schopny velmi dobře rozpouštět proteiny, avšak může dojít k částečné degradaci PHA. Buněčná suspenze obsahující PHA je nejprve zahřáta, následně jsou přidány enzymy, které způsobí hydrolýzu. Po hydrolýze je vzorek ošetřen povrchově aktivní látkou a k jeho odbarvení se používá peroxid vodíku. K zahájení hydrolýzy lze využít například enzymy bromelain a pankreatin. Při použití bromelainu během izolace PHB z buněk *Cupriavidus necator H16* lze získat vzorky s 88,8% obsahem PHB o čistotě 59,1 %. Při využití pankreatinu, který i cenově výhodnější, byl po izolaci obsah PHB 90,3 % a vykazoval 62,2 % čistotu [31, 32].

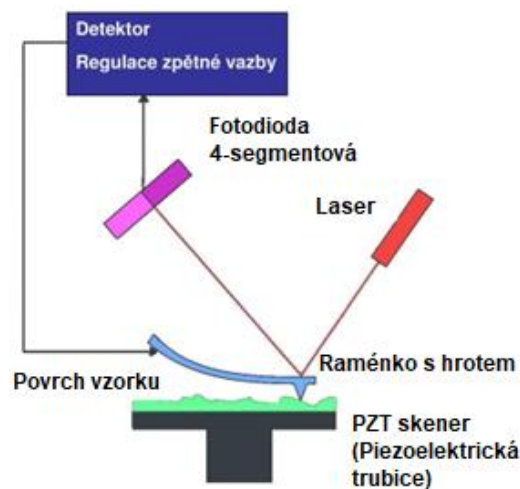
PHA je dále možné izolovat mechanickou disrupcí, která je rozdělena do dvou odvětví. Při využití kulového mlýnu dochází k využití pevného stříhu. Základ kulového mlýnu tvoří válcová mlecí komora, uvnitř které se nachází soustředný válec s nastavitelnou rychlostí točení. Směs buněk je do přístroje přiváděna zespoda a následně prochází vzhůru prstencovitou mezerou mezi statorem a rotorem, kde dochází k rozrušení buněk. Druhá metoda mechanické izolace využívá kapalínového stříhu a lze ji provádět pomocí vysokotlakého homogenizátoru. Vysokotlaká homogenizace funguje na principu objemového čerpadla, které pod vysokým tlakem protlačuje buňky skrze dvě paralelní štěrby, což způsobuje vznik dvou paralelních

proudů tekutiny, které narážely na vertikální desku, proudily proti sobě, což způsobilo jejich rekombinaci a následně byly vytlačeny z přístroje ven. Optimální teplota pro narušení buněk se u této metody pohybovala okolo 25 °C. Nevýhodou vysokotlakého homogenizátoru je jeho nízká účinnost při nízkých koncentracích a jeho časté ucpávání [31].

2.3 Mikroskopie atomárních sil

2.3.1 Obecná charakteristika

Mikroskopie atomárních sil (atomic force microscopy – AFM) patří mezi mikroskopické techniky sloužící k trojrozměrnému zobrazování povrchů. Metoda je založena na působení elektromagnetických sil atomárního původu vzorku na hrot připevněném na nosníku, který se taktéž nazývá „cantilever“ či raménko s hrotem. Během měření se velmi ostrý hrot pohybuje nad vzorek a buď se jej přímo dotýká, nebo se nad ním pohybuje v určité výšce. Hrot je pomocí atomárních sil na povrchu vzorku přitahován nebo odpuzován, což se projeví vychýlením nosníku, což je následně zaznamenáno na detektoru a je získáván obraz povrchu vzorku bod po bodu. Na hrot mohou působit různé síly, mezi které patří van der Waalovy síly, jež jsou schopné interagovat s hrotem i na větší vzdálenost, a repulzivní síly plynoucí z Pauliho principu výlučnosti, které působí pouze při dotyku hrotu se vzorkem. Mezi další komponenty AFM patří laser, který vyzařuje laserový paprsek na nosník, ze kterého je odražen na fotodiodu, která slouží jako detektor a je rozdělena na 4 kvadranty. Schéma AFM lze pozorovat na Obrázku 7 [2, 3].



Obrázek 7: Schéma AFM

2.3.2 Režimy měření mikroskopie atomárních sil

Kontaktní režim

Dotykový režim je založen na velmi blízkém kontaktu hrotu se vzorkem. Při této vzdálenosti působí na hrot síly odpuzivé, které dosahují hodnot okolo 10^{-7} N. Během tohoto režimu může dojít k poškození vzorku hrotem, pokud nosník vykazuje vyšší tuhost než tuhost atomů vzorku držících pohromadě. Na interakci mezi hrotem a vzorkem se podílí jen malé množství atomů hrotu, avšak zbytek hrotu je ovlivňován nežádoucími dalekodosahovými silami. Měření je možné provádět ve dvou režimech [2, 33].

Prvním režimem je režim s konstantní výškou. Tento režim využívá nastavené konstantní výšky, zatímco dochází ke změnám sil, které jsou způsobeny povrchem vzorku, což způsobuje vychýlení nosníku. K určení vzdálenosti od povrchu se používá síla, která způsobila vychýlení hrotu. Tento typ měření je vhodný pro skenování vzorků s malými výškovými rozdíly, jelikož není vyžadována zpětná vazba. Avšak u vzorků, u kterých se objevují větší výškové rozdíly může dojít ke srážce hrotu s povrchem vzorku, což může poškodit povrch vzorku nebo zničit samotný hrot. Díky rychlosti skenů lze tuto metodu využít ke skenování biologických vzorků, u kterých dochází k rychlým změnám struktur [33].

Druhým režimem je režim s konstantní silou. Během této metody je udržováno konstantní ohnutí nosníku a ke skenovacímu pohybu se přidává posun vzorkem ve směru osy z. Tento režim je používán častěji, jelikož nedochází k závislosti prohnutí nosníku na kapilárních silách. Nevýhodou tohoto režimu je neustálý kontakt hrotu se vzorkem, kvůli kterému vznikají třecí síly, které mohou poškodit povrch vzorku. Tento režim je oproti režimu s konstantní výškou časově náročnější [2, 33].

Bezkontaktní režim

Kvůli obavám z možného porušení vzorku přímým stykem hrotu se vzorkem, byl vyvinut bezdotykový režim. Hrot se při této metodě pohybuje ve vzdálenosti 1–10 nm nad povrchem vzorku, což způsobuje, že na něj působí pouze van der Waalsovy síly, které se pohybují řádově v 10^{-12} N. Pro bezdotykový režim je nutné zvolit nosník, jenž vykazuje dostatečnou pružnost, ale je zároveň tuhý, aby se nezachytával na povrchu vzorku. Při bezdotykovém režimu dochází k rozkmitání nosníku v oblasti jeho první rezonanční frekvence. Pro měření je nutné vhodně zvolit amplitudu kmitání, aby bylo zabráněno kontaktu hrotu se vzorkem. Výhodou bezkontaktního režimu je téměř nulová tvorba třecích sil, v důsledku čehož nedochází k narušení povrchu vzorku. Avšak kvůli tomu, že se hrot přímo nedotýká vzorku, nelze získat snímky se stejně vysokým rozlišením jako v případě použití kontaktního režimu [2, 33]

Semikontaktní režim

Pokleповý režim vznikl jako kombinace dotykového a bezdotykového režimu a jeho cílem je snížení vlivu hrotu na vzorek a jeho optimalizace rozlišení. Během tohoto režimu hrot osciluje nad povrchem vzorku a pohybuje se skrz silový gradient nad jeho povrchem, díky čemuž může dojít ke kontaktu hrotu s povrchem vzorku. Při vhodném nastavení přístroje je kontakt se vzorkem jen velmi krátký a snižuje se tedy riziko poškození vzorku. V důsledku interakce hrotu s povrchem vzorku dojde ke snížení amplitudy oscilace hrotu a fázovému posunu, pomocí čehož získáme informaci o povrchové topografii vzorku. Při využití semikontaktního režimu je vhodné použít měkčí hroty, aby se snížilo riziko poškození vzorku. Režim je taktéž optimalizován tak, aby při pohybu hrotu do strany nebyl hrot v kontaktu se vzorkem, což zabraňuje možnému poškození vzorku. Režim bývá využíván hlavně kvůli vysokému rozlišení snímků, nízkému riziku narušení vzorku a možnosti použití na vzduchu i ve vodném prostředí [2, 33, 34].

Kvantitativní zobrazovací režim (Quantitative Imaging QI™)

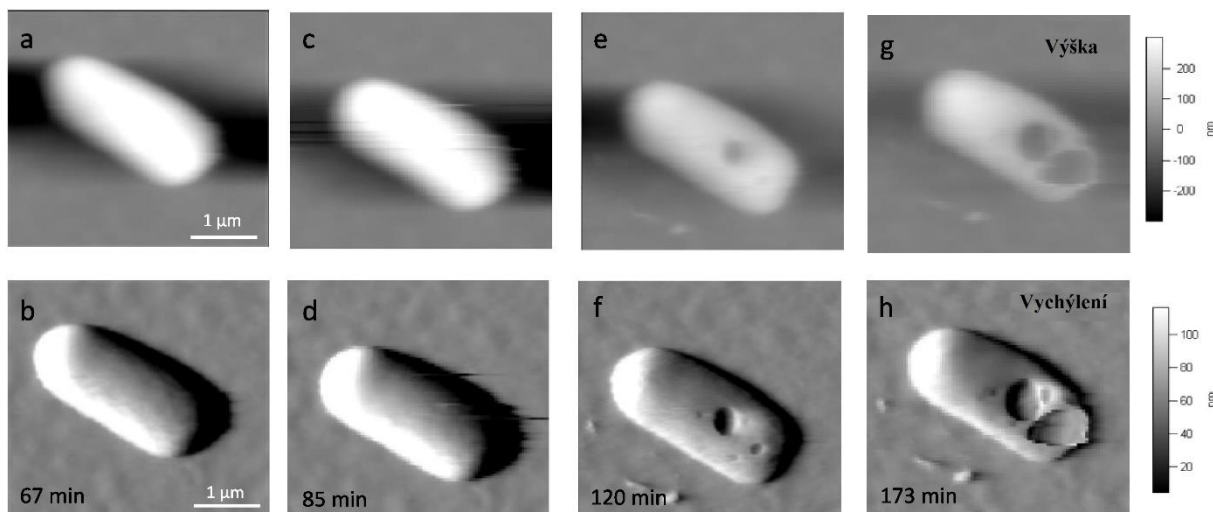
Kvantitativní zobrazovací režim patří mezi moderní režimy měření. Během měření jednoho pixelu dochází ke kontaktu hrotu se vzorkem pouze jedenkrát, což snižuje riziko poškození vzorku. Během měření se hrot přibližuje k povrchu vzorku, dokud nedosáhne určité síly a následně se hrot oddálí. Software režimu dokáže z naměřených dat vypočítat adhezi, Youngův modul a další parametry vzorku. Díky svým vlastnostem lze tento režim využít ke skenování mikroorganismů na vzduchu i ve vodném prostředí [35].

2.3.3 Využití mikroskopie atomárních sil při zkoumání biologických vzorků

AFM je hojně využívána při studiu morfologie mikroorganismů díky tomu, že poskytuje povrchovou topografii vzorku. Buňky mikroorganismů lze pomocí AFM pozorovat vysušené, ale taktéž ve vodném prostředí nebo pufru, kde lze získat snímky buněk v jejich přirozeném stavu [36].

Při měření buněk pomocí AFM na vzduchu je nejprve nutné vzorky vysušit, čehož lze dosáhnout pomocí vzduchu či dusíku. Vysušené vzorky mikroorganismů dosahují vysoké tvrdosti, díky které nedochází při skenování pomocí AFM k významným topografickým změnám na povrchu vzorku [36].

Ve studii z roku 2016 bylo využito AFM k pozorování defektů na povrchu buněk *Klebsiella pneumoniae*, které byly způsobeny antimikrobiálním peptidem caerinem. Buňky byly skenovány dotykovým režimem. I když kontaktní režim mohl způsobit větší poškození vzorku, u pozorovaných vzorků variabilita jejich poškození naznačovala, že narušení buněčné stěny bylo způsobeno antimikrobiálním peptidem a vliv hrotu AFM nebyl tak signifikantní. Získané snímky lze vidět na Obrázku 8 [37].



Obrázek 8: Buňky *Klebsiella pneumoniae* ponořené do 6 μM caerinu po dobu: a) a b) 67 minut; c) a d) 85 minut; e) a f) 120 minut; g) a h) 173 minut [37]

Hlavní výhodou použití AFM při zkoumání buněk ve vodném prostředí či pufru, je možnost pozorování živých buněk v reálném čase. Díky této skutečnosti lze zkoumat mikrobiální procesy přímo *in vitro*. Nevýhodou této metody je náročnější příprava oproti vzorkům

na vzduchu, jelikož ve vodném prostředí dochází k pohybu buněk, a proto je nutné vzorek zafixovat [36].

2.3.4 Fixace vzorků

Pro získání kvalitních snímků buněk pomocí AFM je nutné zvolit vhodnou formu fixace. Hlavní nevýhodou biologických vzorků je jejich tuhost a pružnost, kvůli které je obtížné skenovat vzorky ve vodném prostředí [3].

Mezi povrchy, které jsou vhodné pro nanesení vzorků, se řadí sklo, křemenné sklo, slída a zlato, protože se na jejich povrch dokáží vzorky uchytit pomocí fyzikální adsorpce nebo chemické fixace. Při immobilizaci biologických preparátů se nejčastěji používá slída, její povrch je na atomární úrovni plochý, což umožňuje snadnou adsorpci vzorku. Fixací pomocí slídy lze získat snímky biomolekul s vysokým rozlišením, avšak tato metoda není vhodná pro velké vzorky, mezi které patří bakterie, protože kontaktní plocha je příliš malá, což by vedlo k jejich snadnému odtržení při kontaktu s hrotem. Pevné fixace na specifický substrát lze dosáhnout vysušením buněk, avšak při této metodě dochází ke ztrátě vody uvnitř organismu, což vede ke snížení životaschopnosti buněk. Vzorky lze taktéž zafixovat pomocí kovalentních vazeb mezi vzorkem a nosičem nebo použitím síťovacích činidel, jako je například glutaraldehyd. Při kovalentní fixaci je vzorek pevně navázán na nosič a nedochází tak k odtržení vzorku od povrchu při kontaktu s hrotem a výsledný snímek dosahuje vysokého rozlišení, avšak při tvorbě kovalentních vazeb mezi nosičem a mikrobiální buňkou dochází k denaturaci či kontaminaci mikrobiální buněčných stěn, což snižuje životaschopnost buňky [3].

Mezi další metody fixace buněk patří immobilizace pomocí polykationtů, jako je například poly-L-lysin (PLL). Jeho kladné náboje na koncích řetězců interagují se zápornými náboji na povrchu mikrobiální buňky. Ve studii z roku 2010 byla sklíčka obalena tenkou vrstvou PLL, na níž byla následně nanášena kapka bakteriální suspenze a po 30 minutách inkubace byla suspenze opatrně smyta pomocí pufru PBS a následně v něm bylo sklíčko uloženo až do skenování pomocí AFM, které probíhalo v destilované vodě. U PLL docházelo při měření pomocí AFM k občasnému odtržení buněk od povrchu, ale i přesto byla immobilizace poměrně úspěšná a nedocházelo při ní k narušení bakteriální struktury [38].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části byla optimalizace postupu měření buněk a izolovaných PHA granulí pomocí mikroskopie atomárních sil v kapalném prostředí. Hlavním cílem práce bylo provedení sady měření na buňkách *Rhodospirillum rubrum* produkujících PHA, *Rhodospirillum rubrum* Δ *phaC* neprodukujících PHA a na izolovaných PHA granulích. Poslední část této experimentální práce se věnovala optimalizaci vyhodnocování Youngova modulu pružnosti z naměřených dat a diskuze rozdílů mezi jednotlivými zkoumanými vzorky.

3.1 Použité chemikálie, přístroje a organismy

3.1.1 Chemikálie

Agar (Himedia)

Biotin (Sigma Aldrich Inc.)

CaCl₂·2H₂O (Lach-ner)

CH₃Cl (Penta)

Isopropylalkohol (Penta)

KCl (Lach-ner)

KH₂PO₄ (Lach-ner)

Kyselina benzoová (Lach-ner)

MgSO₄·7H₂O (Lach-ner)

MOPS (VWR Life Science)

NaCl (Lach-Ner)

Na₂HPO₄·2H₂O (Lach-ner)

NaOH (Lachema)

Poly-L-lysine hydrobromide (P6282, Sigma Aldrich Inc.)

SYN salts

Yeast extract powder (Himedia)

3.1.2 Přístroje

Analytické váhy, Boeco

Bruker/JPK NanoWizard 4 AFM

Laboratorní sklo a běžné vybavení laboratoře

Laminární box Aura mini, Bio Air Instruments

Magnetická míchačka MMS-3000, Biosan

Mikrocentrifuga Sigma 1-14, Sartorius

NanoPhotometr P3, IMPLEN

pH metr, XS Instruments

Plynový chromatograf Trace 1300 s FID DB-WAX 30 m/0,25 mm, Thermo Scientific

Přístroj pro plazmochemické opracování RPS50+, CEPLANT, ROPLASS s. r. o.

Stolní centrifuga EBA 200

Tlakový hrnec, Tefal

Třepačka Unimax 1010, Heidolph

Vortex, Benchmixer V2

3.1.3 Použité mikroorganismy

V práci byly použity dva bakteriální kmeny *Rhodospirillum rubrum* DSM 467, z nichž jeden dokázal akumulovat PHA a jeho mutantní kmen, kterému chyběl gen pro syntázu PhaC potřebnou k akumulování PHA (*Rhodospirillum rubrum* Δ phaC). Oba kmeny byly z německé sbírky.

3.1.4 Použité izolované granule polyhydroxyalkanoátů

Izolované granule byly poskytnuty paní doktorkou Slaninovou, která je izolovala v rámci stáže v Německu. Tyto nativní granule byly vyprodukované bakteriálním kmenem *Cupriavidus necator* H16 DSM 3726 a izolovány dle postupu R. Handrick a kol. (2001) [39]. Izolované granule byly skladovány v uzavíratelné zkumavce v mrazáku při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2 Kultivace

3.2.1 *Rhodospirillum rubrum* a *Rhodospirillum rubrum* Δ phaC

Oba kmeny byly skladovány v kryozkumavkách v 10% glycerolu v mrazáku při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Z kryozkumavek byly následně bakterie zaočkovány ve sterilním boxu na Petriho misky, ve kterých bylo pevné medium LB broth s agarem o složení:

Agar	15 g
NaCl	5 g
Trypton	10 g
Yeast extract	5 g
Destilovaná voda	1 l

Poté byly Petriho misky s mikroorganismy přeneseny do termostatu, kde byly kultivovány po dobu 5 dní za tmy při teplotě $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po 5 dnech byly takto připravené kultury buď ihned využity pro zaočkování inokula, nebo uchovány v lednici za teploty $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

V dalším kroku byly kultury přeočkovány z pevného média do tekutého inokula. Kultury i inokulum bylo nejprve nutné temperovat na $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bakterie byly následně ve sterilním boxu

přeočkovány do sterilních 500 ml Erlenmeyerových baněk, které obsahovaly 100 ml inokula LB broth o složení:

NaCl	5 g
Trypton	10 g
Yeast extract	5 g
Destilovaná voda	1 l

Erlenmeyerovy baňky byly následně přeneseny na temperovanou třepačku, kde byly buňky kultivovány za tmy po dobu 48 hodin při teplotě 30 °C a 160 rpm. Po 48 hodinách byla změřena optická hustota (OD) bakteriální suspenze při vlnové délce 660 nm. Získaná bakteriální suspenze byla přepipetována do dvou sterilních 500 ml Erlenmeyerových baněk obsahujících 100 ml produkčního SYN média, aby výsledné OD v produkčním médiu činilo přibližně 0,1. Jeden litr produkčního SYN média byl složen z:

Acetát (1 M)	10 ml
Biotin (20 mg/l)	0,1 ml
K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ (191 mM)	0,5 ml
SYN Salts	200 ml
Destilovaná voda	789,4 ml

Příčemž SYN Salts bylo tvořeno:

CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,66 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,25 g
MOPS	10,5 g
NH ₄ Cl	5 g
NiCl ₂ (20 mM)	5 ml
Chelated FeMo	50 ml
Destilovaná voda	945 ml
Roztok NaOH	Po kapkách do pH = 7,1

Erlenmeyerovy baňky byly opět umístěny na temperovanou třepačku a byly ponechány 48 hodin ve tmě při teplotě 30 °C a 160 rpm. Po uplynutí 48 hodin bylo změřeno OD při 660 nm a kultivace byla ukončena.

Média byla sterilována v tlakovém hrnci vodní parou při uzavřeném ventilu po dobu 30 minut. Účinnost sterilace byla kontrolována pomocí lepících pásek pro indikaci sterilizace.

3.3 Charakterizace buněčných kultur

3.3.1 Měření optické hustoty

Optická hustota (OD) byla měřena pomocí spektrofotometru při vlnové délce 660 nm. Jako blank sloužil 1 ml destilované vody. V případě, že absorbance přesáhla hodnotu 1, byl vzorek naředěn, aby se výsledná absorbance pohybovala v rozmezí 0,2–0,9. Vynásobením absorbance ředěním bylo následně získáno OD.

3.3.2 Plynová chromatografie

Po ukončení kultivace bylo odebráno 2x po 10 ml bakteriální suspenze do centrifugačních zkumavek. Vzorky byly odstředěny při 6000 rpm po dobu 5 minut za laboratorní teploty. Po centrifugaci byl supernatant slit a pelet byl promyt 10 ml pufru PBS o složení:

KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
NaCl	8 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,44 g
Destilovaná voda	1 l

Směs byla následně zhomogenizována pomocí vortexu a znovu odstředěna. Po slití supernatantu byly zkumavky s pelety biomas umístěny do sušárny při teplotě 70 °C.

Po řádném vysušení, bylo naváženo 9–11 mg vysušené biomasy z každého vzorku do krimpovacích vialek. Do vialek byl přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml vnitřního standardu, který se skládal z 15% kyselina sírové v methanolu a kyseliny benzoové o koncentraci 5 mg/ml. Vialky byly následně uzavřeny a umístěny k esterifikaci do topného bloku nastaveného na 94 °C po dobu 3 hodin.

Po esterifikaci byly jednotlivé vzorky přelity do 4 ml vialek, kde k nim bylo napipetováno 0,5 ml 50 mM NaOH. Směs byla důkladně protřepána, čímž došlo k rozdělení na spodní organickou a horní vodnou fázi. Z organické fáze bylo odebráno po 50 µl do 1 ml vialky a následně bylo přidáno 900 µl izopropylalkoholu. Vzorky byly následně charakterizovány pomocí plynové chromatografie.

3.4 Měření vzorků pomocí AFM

3.4.1 Příprava podložních sklíček

Při přípravě vzorků na měření mikroskopem atomárních sil byla podložní sklíčka vyjmuta z ethanolu a vysušena pomocí speciální buničiny, která nezanechává vlákna. Následně byla sklíčka oplazmována přístrojem pro plazmochemické opracování RPS50+ při vstupním napětí 10,5 V. Každé sklíčko bylo umístěno do držáku, který je součástí přístroje. Hlava přístroje byla umístěna nad sklíčko do výšky 1,8 cm. Následně byla zapnuta plazma a držákem bylo pomocí tlačítek přejížděno zprava doleva a obráceně. Celkový počet projetí držáku se sklíčkem pod hlavou plazmy byl 42. Po dokončení procesu byla tato sklíčka uložena do Petriho misek, kde byl na jejich povrch ihned nanesen 1 ml 0,01 mg/ml roztoku Poly-L-lysinu (PLL). Sklíčka

s naneseným roztokem PLL byla poté vysušena při 50 °C v sušárně. Během sušení bylo nutné kontrolovat, zda je PLL rovnoměrně rozprostřen po celém povrchu sklíčka. V opačném případě byl PLL pomocí pipety rozetřen a sklíčka byly v Petriho miskách navraceny do sušárny. Jakmile byl PLL zcela vysušen, byly Petriho misky se sklíčky vyjmuty ze sušárny a po jejich ochlazení na laboratorní teplotu bylo možné na ně nanést připravené vzorky bakteriálních suspenzí či izolovaných PHB granulí.

3.4.2 Příprava bakteriálních vzorků

Do 1 ml eppendorfových mikrozkušavek bylo napipetováno po 0,1 ml nakultivovaných bakteriálních suspenzí a 0,9 ml pufru PBS. Tyto vzorky byly následně odstředěny při 6000 rpm po dobu 5 minut. Následně byl slit supernatant a byl opět přidán 1 ml pufru PBS. Jednotlivé roztoky byly zvortexovány a následně opět zcentrifugovány při 6000 rpm po dobu 5 minut. Každý supernatant byl opět slit a byl přidán 1 ml pufru PBS a po zvortexování byl daný vzorek pomocí pipety nanesen na celý povrch připraveného podložního sklíčka umístěného v Petriho misce, kde byl ponechán 30 minut. Sklíčko bylo následně opláchnuto 10 ml pufru PBS a následně zalito 20 ml pufru PBS.

3.4.3 Příprava vzorků s izolovanými granulemi polyhydroxyalkanoátů

Zkušavka s izolovanými granulemi byla vyjmuta z mrazáku a byla umístěna na drcený led, aby došlo k pozvolnému roztátí roztoku izolovaných granulí. Ze suspenze izolovaných PHB granulí bylo napipetováno 0,5 µl izolovaných granulí, které byly zředěny pufrům PBS, aby výsledné OD při 660 nm vzorku činilo přibližně 0,1. Následně byl napipetován 1 ml zředěného vzorku granulí na připravené podložní sklíčko a bylo postupováno stejně jako v případě bakteriálních vzorků (viz 3.4.2).

3.4.4 Nastavení AFM

Pro všechna měření byl zvolen hrot MLCT – A a režim QI™, jelikož je z dostupných režimů nejvhodnější pro skenování biologických vzorků ve vodném prostředí, což bylo projednáváno v kapitole 2.3.2. Měření probíhala při teplotě 25 °C, nastavené střední adhezi a výšce vzorku 1 µm.

Hrot MCLT byl umístěn do hlavy AFM, která byla následně přenesena na pracovní plochu. Pod hlavu AFM byla umístěna Petriho miska s připraveným vzorkem ponořeným v pufru PBS a pomocí polohovacích šroubů byla vybrána oblast měření. Následně byl spuštěn program JPK SPM Desktop, v němž byl zvolen režim QI™. Dále bylo nutné zaměřit paprsek laseru na hrot, což bylo prováděno na vzduchu pomocí šroubů. Samotné umístění laseru a hrotu bylo možné pozorovat díky kameře. Po detekci signálu na hrotu byla upravena poloha zrcátka, aby odpovídala vzdušnému prostředí, což se projevilo nárůstem signálu. Dalšími úpravami polohy zrcátka a laseru byl získán co největší možný signál. Dále byla šrouby nastavena poloha detektoru, aby se signál nacházel uprostřed středového čtverce na obrazovce.

Poté byl hrot spuštěn pod hladinu kapaliny, kvůli čemuž bylo nutné upravit pouze polohu zrcátka a detektoru, jelikož laser byl již z předchozího kroku na hrot zaměřen. Hrot byl pod hladinou ponechán 30 minut, v případě nutnosti byla upravena poloha detektoru. Poté byla provedena kalibrace hrotu s teplotou nastavenou na 25 °C a prostředím na vodu. Aby přístroj

dokázal přiblížit hrot ke vzorku, bylo nutné nastavit hodnotu *Setpoint* (síla hrotu na vzorek) na minimálně 0,4 nN. Jakmile bylo přiblížení hrotu ke vzorku úspěšné byl v závislosti na druhu měření nastaven *Setpoint*, *pixel time* (doba skenování jednoho pixelu), rozlišení snímků a velikost snímku.

Snímky bakteriálních buněk a izolovaných granulí

Pro skenování bakteriálních buněk a izolovaných PHB granulí bylo nutné nastavit různé parametry, jako například *Setpoint* v rozmezí 0,18–0,20 nN a *pixel time* na 10 až 20 ms. Rozlišení snímků bylo kvůli úspoře času nastaveno na 256x256 a oblast skenu byla jako čtverec o straně 20 μm . Jakmile byla nalezena vhodná buňka (resp. granule), bylo rozlišení v případě buněk zvětšeno na 512x512 (u granulí bylo ponecháno 256x256) a oblast skenu byla zaměřena na zkoumanou buňku (resp. granuli).

Měření Youngova modulu pružnosti bakteriálních buněk a izolovaných granulí

Setpoint byl pro všechna měření nastaven na 0,2 nN, *pixel time* na 16 ms a rozlišení na 128x128. Po nalezení vhodné granule byla oblast měření zaměřena na ni a byla provedena 3 měření. V případě buněk byla nejprve 3x skenována celá buňka a následně byly vybrány 3 oblasti, na nichž byly provedeny vždy 3 měření o velikosti 0,1x0,1 μm .

3.5 Vyhodnocování Youngova modulu z výstupů měření

3.5.1 Vyhodnocení Youngova modulu softwarem JPK Data Processing

Naměřená data byla otevřena v programu JPK Data Processing. *Segment* byl nastaven na „extend“, *Model Type* na „Hertz/Sneddon“, *Tip Shape* na „Triangular Pyramid“, *Angle* na 19,17° a *Poisson Ratio* na 0,3. Celá křivka „extend“ byla následně automaticky proložena a software z ní vyhodnotil hodnotu Youngova modulu. V případech, kdy software nebyl schopen celou křivku proložit, byla manuálně zvolena pouze oblast strmého klesání křivky „extend“.

3.5.2 Vyhodnocení pomocí směrnic křivek „extend“ a „retract“

Při této metodě byla naměřená data exportována do programu MS Excel. Následně byly vybrány oblasti strmého klesání křivek „extend“ a „retract“, které byly aproximovány na přímkou pomocí funkce LINREGRESE. Získané směrnice pro křivky „extend“ a „retract“ byly zprůměrovány zvlášť pro měření celých buněk (resp. granulí) a zvlášť pro měření po částech.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Charakteristika získaných kultur

4.1.1 Spektrofotometrické stanovení biomasy

Bakteriální kultury byly charakterizovány pomocí optické hustoty (OD), jejíž postup byl popsán v kapitole 3.3.1, v různých částech kultivace, která je popsána v kapitole 3.2.1. Nejprve bylo OD 2x změřeno po 48 hodinách kultivace v inokulu ($OD_{inokulum\ 48\ h}$) a byl určen průměr a směrodatná odchylka. Z této hodnoty bylo vypočteno množství kultury, které je nutné napipetovat do 100 ml produkčního média SYN, aby OD v SYN médiu ($OD_{SYN\ 0\ h}$) činilo přibližně 0,1. Po 48 hodinách kultivace v produkčním médiu bylo změřeno OD ($OD_{SYN\ 48\ h}$) 3x, naměřené hodnoty byly zprůměrovány a byla určena směrodatná odchylka. Získané optické hustoty kultur, které lze pozorovat v Tabulce 1, byly pouze orientační a byly využívány hlavně při přípravě vzorků.

Tabulka 1: Naměřené hodnoty optické hustoty při 660 nm pro jednotlivé kultury

Bakteriální kmen	<i>R. rubrum</i>	<i>R. rubrum</i> Δ phaC	<i>R. rubrum</i>	<i>R. rubrum</i> Δ phaC
$OD_{inokulum\ 48\ h\ 1}$	1,37	0,34	0,72	0,41
$OD_{inokulum\ 48\ h\ 2}$	1,33	0,35	0,76	0,43
Průměr	1,35	0,34	0,74	0,42
Odchylka	0,02	0,01	0,03	0,01
$OD_{SYN\ 0\ h}$	0,13	0,15	0,10	0,11
$OD_{SYN\ 48\ h\ 1}$	0,81	1,05	0,95	1,04
$OD_{SYN\ 48\ h\ 2}$	0,81	1,08	1,00	1,07
$OD_{SYN\ 48\ h\ 3}$	0,83	1,18	0,94	1,07
Průměr	0,82	1,10	0,96	1,06
Odchylka	0,01	0,07	0,03	0,02

Získané hodnoty OD po 48 h kultivace v inokulu se lišily mezi jednotlivými bakteriálními kmeny, ale i mezi stejnými kmeny při jednotlivých kultivacích. Tento rozdíl mohl být způsoben přenesením různého množství bakteriální kultury z Petriho misky do inokula. Po následných 48 hodinách v produkčním SYN médiu došlo ve všech případech k nárůstu OD na hodnotu 0,8 až 1,1. Podle této hodnoty bylo následně zvoleno ředění kultury pro přípravu vzorků na měření pomocí AFM. Všechny použité kultury byly ředěny 10x pomocí pufru PBS.

4.1.2 Gravimetrické stanovení biomasy a stanovení PHB

Bakteriální biomasa byla charakterizována i pomocí gravimetrie, kdy byl vypočteno množství biomasy v g/l pro jednotlivé bakteriální kultury. U bakteriálních kultur byl dále stanoven pomocí plynové chromatografie obsah PHB v celkové biomase, aby mohl být diskutován vliv obsahu intracelulárních PHB granulí na morfologii bakteriálních buněk. Postup stanovení byl popsán v kapitole 3.3.2 a získané hodnoty byly zapsány do Tabulky 2.

Tabulka 2: Získané hodnoty množství biomasy a obsahu PHB v celkové biomase pro jednotlivé bakteriální kmeny

Bakteriální kmen	Biomasa (g/l)	PHB (mg/l)	PHB (%)
<i>R. rubrum</i> (1)	0,29	2,3	0,79
<i>R. rubrum</i> Δ <i>phaC</i> (1)	0,55	0	0
<i>R. rubrum</i> (2)	0,49	0,9	0,19
<i>R. rubrum</i> Δ <i>phaC</i> (2)	0,58	0	0

U kultur, jež byly určeny k charakterizaci morfologie pomocí AFM (označené 1), byl obsah PHB pro *Rhodospirillum rubrum* stanoven na 0,79 % a u *Rhodospirillum rubrum* Δ *phaC* nebyl obsah PHB detekován. Mezi buňkami jednotlivých bakteriálních kmenů tedy bylo možné pozorovat rozdíly v jejich morfologii a výšce v závislosti na tom, zda obsahují intracelulární PHB granule či nikoliv.

Kultury sloužící k optimalizaci metody měření buněk pomocí AFM pro vyhodnocování Youngova modulu byly označeny číslem 2. Obsah PHB v kultuře *Rhodospirillum rubrum* činil 0,19 % a u kultury *Rhodospirillum rubrum* Δ *phaC* nebyl obsah PHB detekován. Bylo tedy opět možné sledovat rozdíly v morfologii buněk v závislosti na přítomnosti PHB uvnitř buňky a také rozdíly v Youngově modulu, který byl z naměřených dat vyhodnocen.

4.2 Snímání bakteriálních kultur v kapalném prostředí pomocí mikroskopu atomárních sil

Cílem této části práce bylo získání topografických snímků buněk bakteriálních kultur v jejich nativním stavu. Aby byl zachován jejich nativní stav, byly buňky bakteriálních kultur snímány ponořené v pufru PBS. Jako hrot pro měření byl zvolen MLCT – A.

4.2.1 Příprava vzorků

Podložní sklíčka bylo nutné před použitím důkladně umýt saponátem, opláchnout destilovanou vodou a následně ethanolem. Toto čištění bylo prováděno, aby byly odstraněny jakékoliv nečistoty, které by se při kontaktu s hrotem mohly na něj zachytit a tím znehodnotit celé měření. Nečistoty na sklíčkách by dále mohly způsobit nevratné poškození hrotu. Připravená sklíčka byla následně uchovávána ponořená v ethanolu v 500 ml kádince. Při další manipulaci se sklíčky byly používány rukavice, aby se zabránilo jejich znečištění.

Oplazmování sklíček, které je popsáno v kapitole 3.4.1, bylo prováděno, aby došlo k uchycení PLL k podložnímu sklíčku. PLL byl zvolen jako imobilizační činidlo na základě literární rešerše (kapitola 2.3.4). Během vysoušení roztoku PLL, které je popsáno v kapitole 3.4.1, byl roztok špičkou pipety roztírán po celém povrchu sklíčka, aby byla plocha k uchycení bakteriálních buněk co největší.

Během přípravy vzorků bakteriálních kultur, která je popsána v kapitole 3.4.2, byly bakteriální suspenze ředěny pufrům PBS, aby se snížil počet buněk ve vzorku a nedocházelo k jejich překrývání, a aby také byly odstraněny případné nečistoty obsažené v médiu. Vzhledem k naměřeným hodnotám OD (kapitola 4.1.1) bylo jako nejvhodnější ředění voleno ředění 10x.

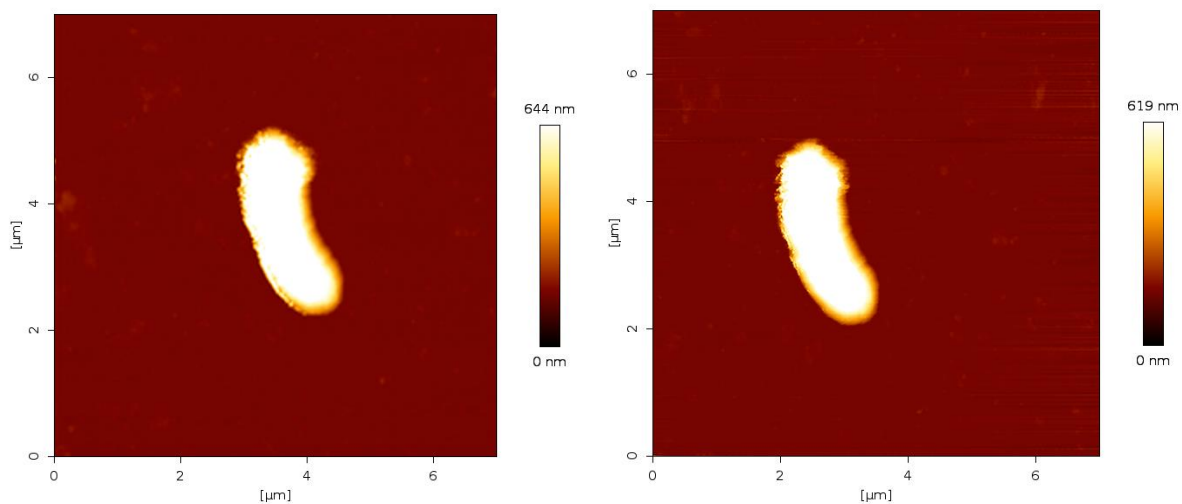
Ponechání naneseného vzorku na podložním sklíčku v Petriho misce po dobu 30 minut (kapitola 3.4.2) bylo prováděno, aby došlo k pevnému uchycení co největšího množství buněk k PLL. Následné opláchnutí 10 ml pufru PBS bylo vykonáváno s cílem odstranění případných nečistot a neuchycených buněk, které by ve vzorku volně plavaly a mohly by znehodnotit prováděné snímky. Vzorky byly nakonec zality 20 ml pufru PBS, který byl zvolen z důvodu zachování nativního stavu bakteriálních buněk.

4.2.2 Optimalizace nastavení měření

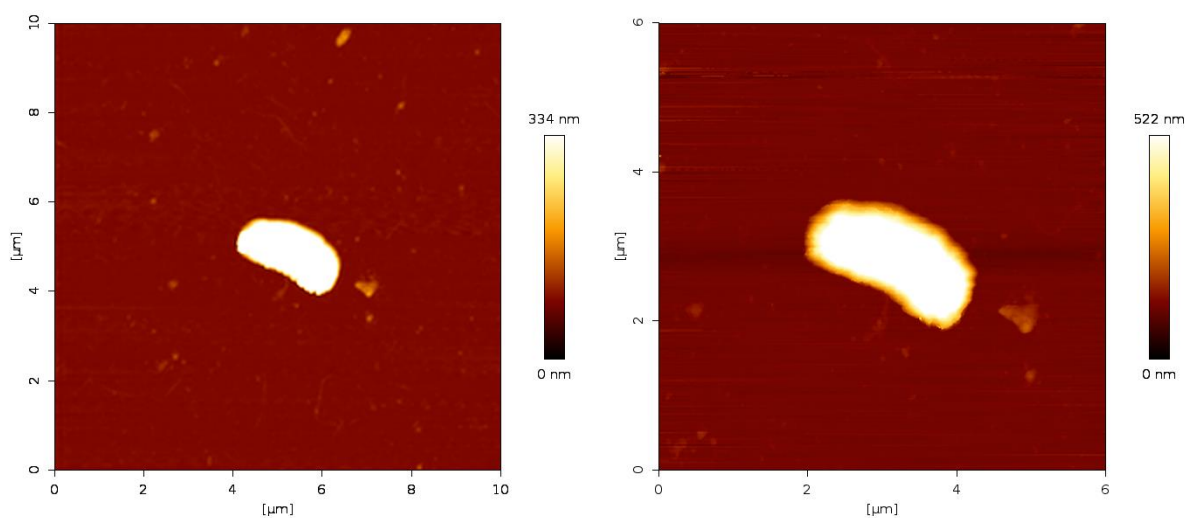
Pro skenování bakteriálních buněk v kapalném prostředí byl *Setpoint* nastavován v rozmezí 0,18–0,20 nN, protože při těchto hodnotách nedocházelo k poškození bakteriálních buněk. Hrot se ovšem při takto nastaveném *Setpointu* nedokázal pomocí automatického přiblížení přiblížit ke vzorku. Z tohoto důvodu bylo nejprve nutné *Setpoint* zvýšit na hodnoty okolo 0,4 nN, při kterých se hrot dokázal ke vzorku automaticky přiblížit. Následně byl *Setpoint* přenastaven na 0,18–0,20 nN a bylo zahájeno měření. *Pixel time* byl pro měření volen v rozmezí 10–20 ms. *Pixel time* odpovídal době, kterou přístroj strávil měřením jednoho pixelu vzorku. Při nastavení vyšší hodnoty byly získávány kvalitnější snímky, ale prodloužila se i doba měření. Z tohoto důvodu byl *pixel time* při hledání buněk ke skenování nastavován na nižší hodnoty (10 ms) a při finálním měření buněk na hodnoty vyšší (16–20 ms). Velikost prvního skenu byla vždy zvolena 10x10 μm , aby došlo k přizpůsobení hrotu na prostředí v blízkosti vzorku. Následně byly prováděny větší skeny (20x20 μm až 30x30 μm) s cílem nalezení nepoškozené a vhodně orientované buňky, která by byla možná použít k finálnímu skenování. Je nutné zmínit, že při změně oblasti měření byl hrot od vzorku oddálen, aby nedocházelo k poškození vzorku. Po nalezení vhodné buňky byla oblast měření zaměřena na tuto buňku. Oblast měření byla volena větší než samotná buňka, protože docházelo k drobnému pohybu buněk, při změně oblasti měření. Cílem bylo, aby se měřená buňka nacházela přibližně uprostřed snímku.

4.2.3 Získané snímky

Nejprve byly získány snímky *Rhodospirillum rubrum*, u kterých činil po kalibraci parametr *Sensitivity* 29,7 nm/V a parametr *Spring constant* 0,051 N/m. Zbylé parametry byly nastaveny dle kapitol 3.4.4 a 4.2.2.

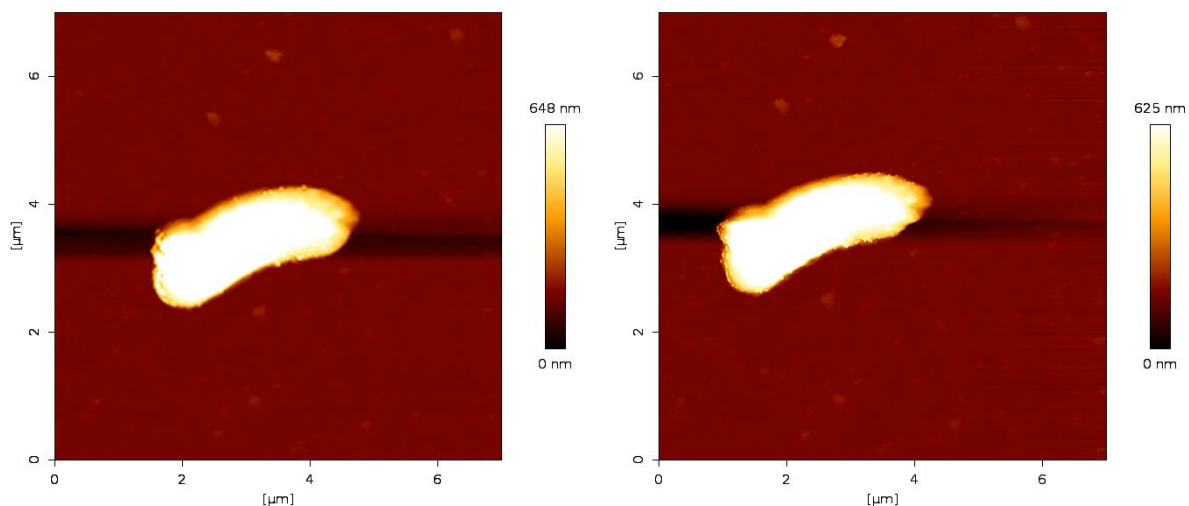


Obrázek 9: *Rhodospirillum rubrum*: *Setpoint* = 0,2 nN, *pixel time* = 10 ms, 256x256 (vlevo);
Setpoint = 0,18 nN, *pixel time* = 20 ms, 512x512 (vpravo)

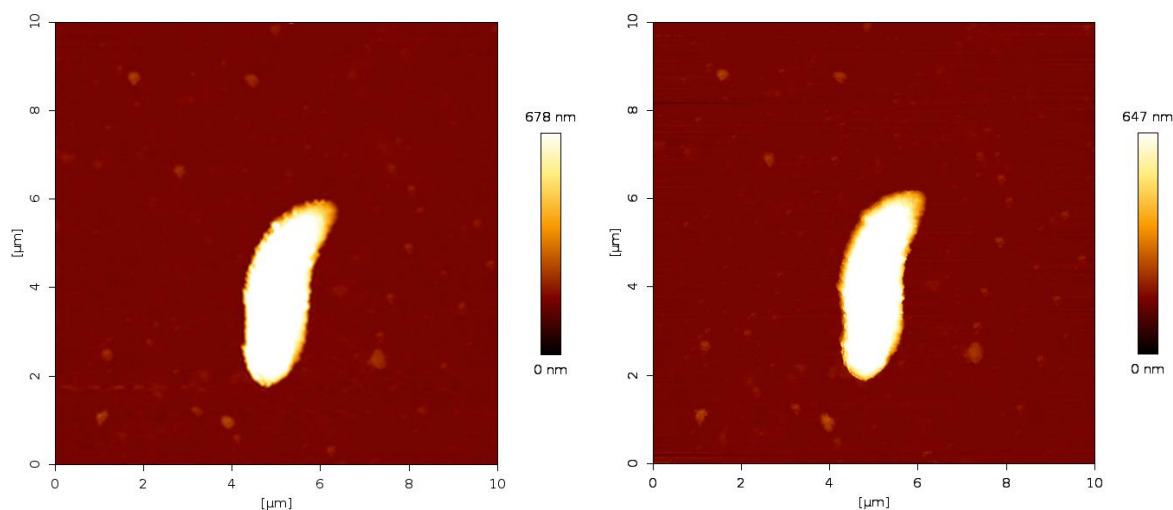


Obrázek 10: *Rhodospirillum rubrum*: *Setpoint* = 0,24 nN, *pixel time* = 10 ms, 256x256
(vlevo); *Setpoint* = 0,2 nN, *pixel time* = 15 ms, 512x512 (vpravo)

Snímky *Rhodospirillum rubrum* Δ *phaC* byly získány po kalibraci hrotu při parametrech: *Sensitivity* = 23,75 nm/V a *Spring constant* = 0,054 N/m. Ostatní parametry měření byly nastaveny opět dle kapitol 3.4.4 a 4.2.2.



Obrázek 11: *Rhodospirillum rubrum* Δ *phaC*: Setpoint = 0,20 nN, pixel time = 10 ms, 256x256 (vlevo); Setpoint = 0,2 nN, pixel time = 10 ms, 512x512 (vpravo)



Obrázek 12: *Rhodospirillum rubrum* Δ *phaC*: Setpoint = 0,20 nN, pixel time = 10 ms, 256x256 (vlevo); Setpoint = 0,2 nN, pixel time = 15 ms, 512x512 (vpravo)

Na Obrázku 9 a 10 lze pozorovat buňky kultury *Rhodospirillum rubrum*, jejíž OD se rovnalo $0,82 \pm 0,01$, množství biomasy dosahovalo 0,29 g/l a obsah PHB činil 0,79 %. Buňka na Obrázku 9 dosahovala délky přibližně 3 μ m, šířky přibližně 0,9 μ m a výšky 0,619 μ m. Oproti tomu délka buňky na Obrázku 10 byla přibližně 2 μ m, šířka 1 μ m a výška 0,522 μ m. Bylo tedy možné pozorovat rozdíly ve velikosti a tvaru buněk i mezi buňkami ze stejné kultury. Na okrajích obou buněk lze zvláště při rozlišení 512x512 pozorovat neostré zaoblení buněk. Tento jev mohl způsobit hrot, který mohl poškodit okraj buňky, nebo nebyl schopen dokonale snímat okraj buňky.

Snímky buněk *Rhodospirillum rubrum* Δ *phaC* lze pozorovat na Obrázku 11 a 12. OD kultury, ze které buňky pocházely, činila $1,10 \pm 0,07$, množství biomasy dosahovalo 0,55 g/l a obsah PHB nebyl detekován. Délka buňky na Obrázku 11 činí přibližně 3 μ m, její šířka přibližně 1 μ m a výška 0,625 μ m. Buňka na Obrázku 12 dosahovala délky 4 μ m, šířky 1 μ m a výšky

0,647 μm . U buněk je opět možné vidět neostré okraje, které se objevily i u *Rhodospirillum rubrum*.

Mezi buňkami jednotlivých kmenů byly pozorovány drobné rozdíly. Buňky *Rhodospirillum rubrum* ΔphaC dosahovaly větších rozměrů oproti *Rhodospirillum rubrum*. To ovšem mohlo být způsobeno kultivací, jelikož u mutantního kmene bylo množství biomasy téměř 2x vyšší než u kmene druhého. Buňky mutantního kmene mohly tedy být po kultivaci více narostlé. Obsah PHB se zásadně neprojevil na výšce buněk *Rhodospirillum rubrum*, které byly i přes opačný předpoklad nižší než buňky mutantního kmene, které PHB neobsahovaly.

4.3 Snímání izolovaných polyhydroxyalkanoátových granulí pomocí mikroskopu atomárních sil

Izolované granule PHA byly měřeny ponoření v pufru PBS, aby byl zachován jejich nativní stav. Pro všechna měření byl použit hrot MLCT – A.

4.3.1 Příprava vzorků

U vzorků izolovaných PHA granulí bylo stejně důležité, aby se na podložních sklíčkách nevyskytovaly žádné nečistoty, proto byly umyty stejně jako v případě bakteriálních vzorků (kapitola 4.2.1). Jelikož byla koncentrace izolovaných granulí v zásobním roztoku vysoká, bylo nutné tento roztok zředit puftrem PBS. K charakterizaci vzorku nesloužil násobek ředění, ale optická hustota vzorku při 660 nm, jelikož bylo odpipetováno vždy velmi malé množství (0,5 μl) izolovaných granulí, které nebylo vždy kvůli vysoké hustotě celé vytlačeno ze špičky pipety. Z tohoto důvodu byla jako vhodnější charakteristika zvolena optická hustota.

Jelikož se velikost izolovaných granulí pohybovala v rozmezí 0,2–0,5 μm , byla připravena i negativní kontrola, aby nedošlo k záměně PHA granule s nečistotou na podložním sklíčku. Postup přípravy byl stejný jako v kapitole 3.4.2, akorát místo naředěného vzorku byl na podložní sklíčko nanesen 1 ml pufru PBS.

4.3.2 Nastavení měření

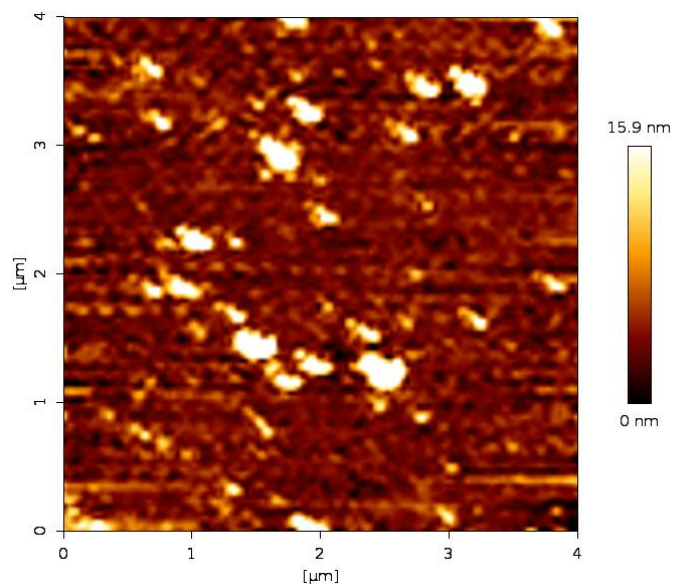
Pro všechna měření byla hodnota *Setpoint* nastavena na 0,2 nN, *pixel time* na 16 ms a rozlišení na 256x256. Aby se hrot ke vzorku přiblížil, bylo nutné nastavit *Setpoint* na hodnotu okolo 0,4 nN stejně jako v případě bakteriálních buněk (kapitola 4.2.2). Při hledání granulí byla velikost skenu volena 10x10 μm a při nalezení vhodných granulí byla oblast měření zaměřena tak, aby se granule nacházely přibližně uprostřed snímku. Před započnutím měření byla vždy provedena kalibrace hrotu ve vodném prostředí. Parametry *Sensitivity* a *Spring constant* získané kalibrací lze pozorovat v Tabulce 3.

Tabulka 3: Parametry hrotu při měření jednotlivých vzorků

Vzorek	Sensitivity (nm/V)	Spring constant (N/m)
OD = 0,228	29,30	0,045
OD = 0,173	43,35	0,045
OD = 0,147	53,95	0,045
Negativní kontrola	53,95	0,045

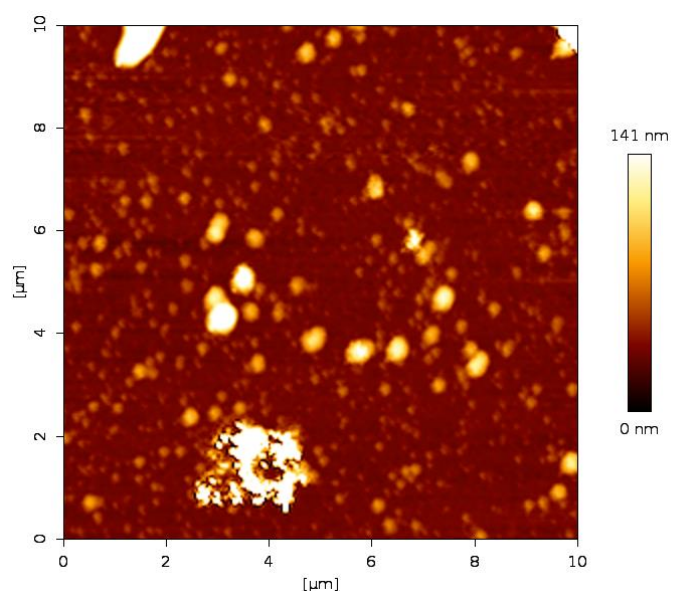
4.3.3 Získané snímky

Před začátkem měření připravených vzorků byla nejprve změřena negativní kontrola, které sloužila k ověření, zda jsou pozorované částice granule PHB nebo nečistoty či nerovnosti na podložním sklíčku.



Obrázek 13: Negativní kontrola: $Setpoint = 0,20$ nN, $pixel\ time = 16$ ms, 256×256

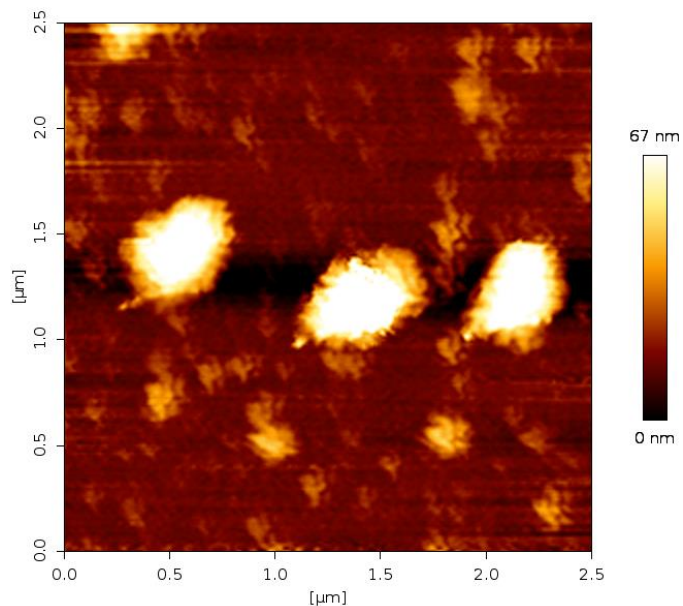
Po získání snímku negativní kontroly bylo započnuto měření. Nejprve byly provedeny větší skeny, pomocí kterých byly nalezeny vhodné granule, které byly dále měřeny.



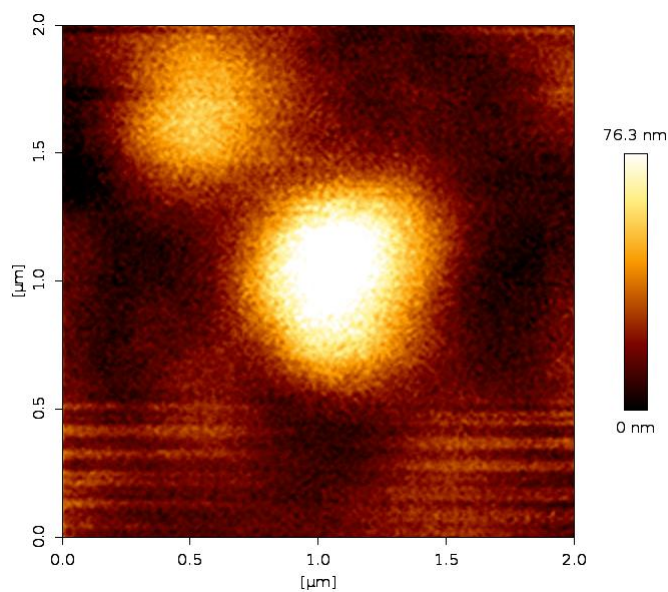
Obrázek 14: Snímek vzorku PHB granulí s $OD = 0,228$: $Setpoint = 0,20$ nN, $pixel\ time = 16$ ms, 256×256

Na Obrázku 14 lze pozorovat snímek izolovaných granulí s $OD = 0,228$ o velikosti 10×10 μm. Na snímku je možné vidět útvary, které svým tvarem připomínají buňky mikroorganismů. Jedná

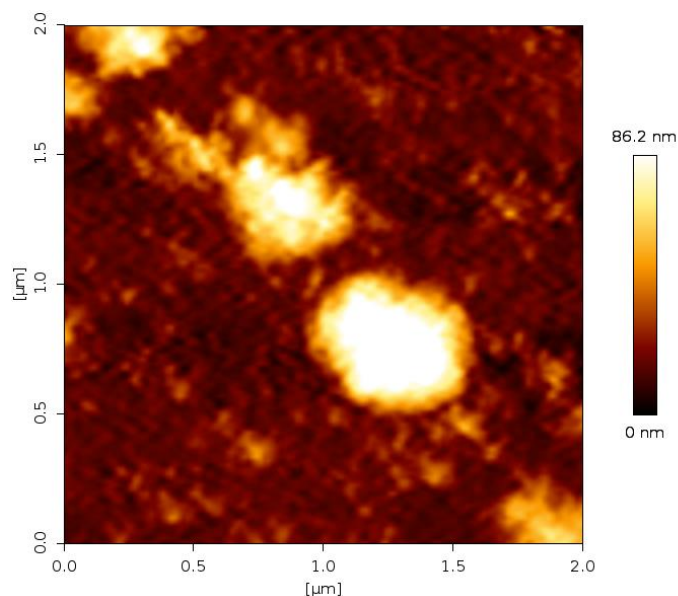
se tedy pravděpodobně o zbytky buněk *Cupriavidus necator* H16, které nebyly při přečištění odstraněny. Oblast měření byla následně zaměřena granule o velikosti 0,2–0,5 μm .



Obrázek 15: Přiblížený snímek PHB granulí s OD = 0,228: *Setpoint* = 0,20 nN, *pixel time* = 16 ms, 256x256



Obrázek 16: Přiblížená PHB granule s OD = 0,173: *Setpoint* = 0,20 nN, *pixel time* = 16 ms, 256x256



Obrázek 17: Přiblížená PHB granule s $OD = 0,147$: $Setpoint = 0,20$ nN, $pixel\ time = 16$ ms, 256×256

Na Obrázku 15 lze pozorovat 3 PHB granule, které dosahují průměru okolo $0,4\ \mu\text{m}$ a výšky $67\ \text{nm}$. Snímek ovšem není příliš kvalitní, protože se na něm i nečistoty, které znehodnocují snímek. Dále pravděpodobně došlo k poškození granulí působením hrotu, což se projevilo nezaoblenými okraji granulí.

Další granuli lze pozorovat na Obrázku 16. Tato granule dosahuje průměru $0,5\ \mu\text{m}$ a výšky $76,3\ \text{nm}$. Na snímku je granule rozostřená, což bylo způsobeno nízkým rozlišením a vysokým přiblížením granule. Snímek s rozlišením 512×512 nebyl naměřen, protože již v polovině skenování se na snímku objevovaly deformace, které mohly být způsobeny pohybem granule. Vzhledem k časové náročnosti měření snímků 512×512 (1 hodina a 15 minut) a pohybu granulí při tomto měření byly izolované granule měřeny pouze v rozlišení 256×256 .

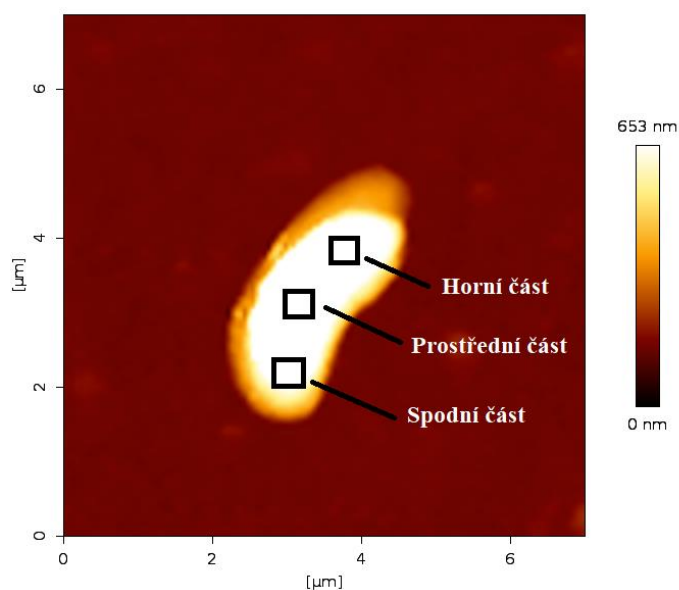
Na Obrázku 17 lze pozorovat granuli o průměru $0,5\ \mu\text{m}$ a výšce $86,2\ \text{nm}$. Granule vykazovala kulatý tvar bez větších deformací na okraji. Na snímku lze také pozorovat i menší granuli, která byla pravděpodobně poškozena působením hrotu. Zaměření pouze na nepoškozenou granuli nebylo úspěšné, protože při změně oblasti měření došlo vždy k náhodnému posunu granule mimo zvolenou oblast měření a při zvětšení oblasti měření se na snímku objevovaly i poškozené granule či nečistoty.

V článku od Bourbonnais et al. byly PHB granule snímány pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) [40]. Při porovnání snímků ze SEM se získanými snímky z AFM je možné vidět, že snímky ze SEM dosahují vyššího rozlišení. Avšak výhodou AFM oproti SEM je snadnější příprava vzorků a možnost skenování granulí ve vodném prostředí, a tedy v jejich nativním stavu.

4.4 Vyhodnocení Youngova modulu

4.4.1 Nastavení měření

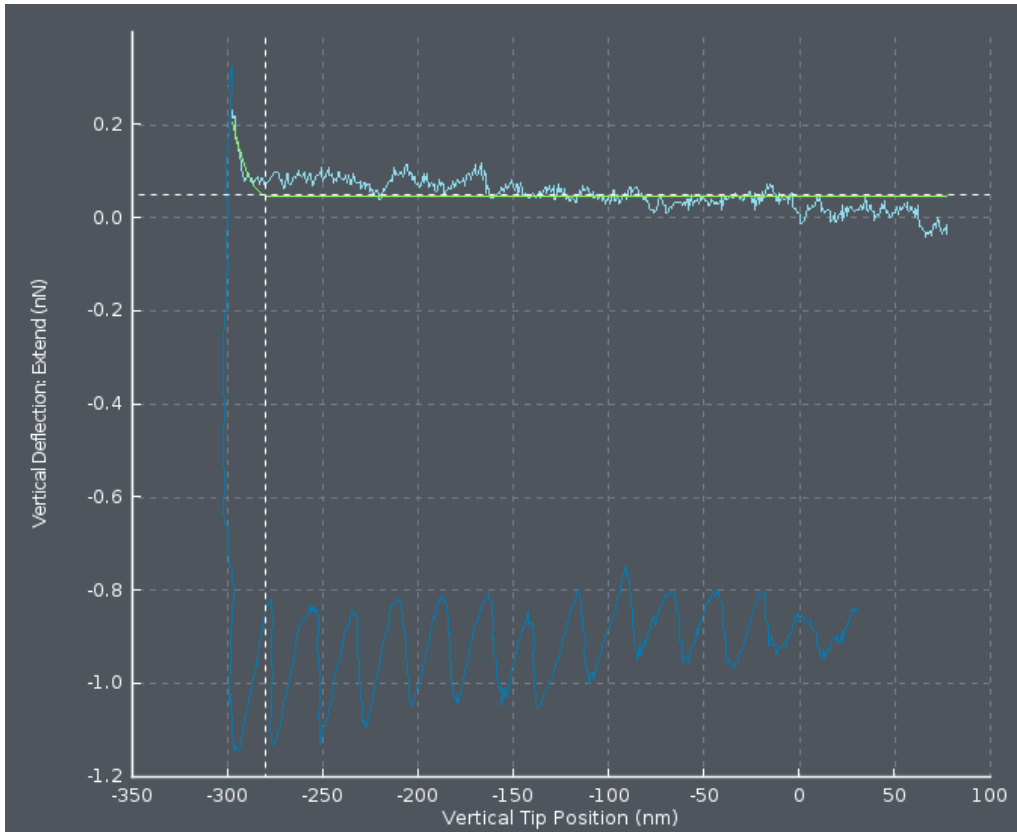
Pro všechna měření byl *Setpoint* nastaven na 0,2 nN, *pixel time* na 16 ms a rozlišení na 128x128 pixelů. Rozlišení bylo zvoleno nižší než v případě získávání snímků z důvodu časové úspory, kdy jeden sken při rozlišení 128x128 trval přibližně 5 minut. Bylo tedy možné získat více dat pro následné vyhodnocení Youngova modulu. Nejprve byly měřeny celé buňky. Oblast měření byla zvolena, aby se na snímku nacházela měřená buňka. Celá buňka byla změřena 3x. Následně byly na buňce vybrány 3 oblasti, na kterých byly provedeny vždy 3 skeny o rozsahu 100x100 nm. Měření na různých oblastech buňky mělo za cíl pozorovat rozdílné vlastnosti v různých částech buňky. U izolovaných granulí byla pouze změřena celá granule 3x.



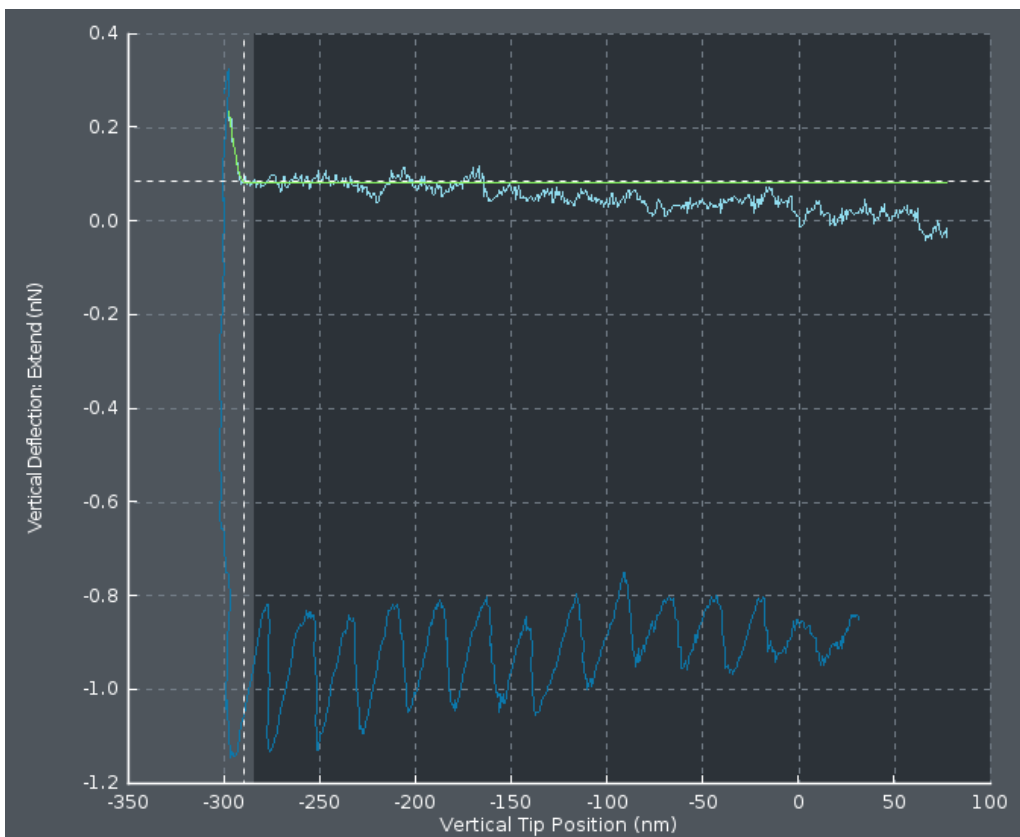
Obrázek 18: Výběr oblastí pro měření Youngova modulu u buňky *Rhodospirillum rubrum*

4.4.2 Vyhodnocení Youngova modulu pomocí softwaru JPK Data Processing

Naměřená data byla převedena do formátu „q-series“ a byla otevřena v programu JPK Data Processing. Před vyhodnocením bylo nutné upravit parametry dle kapitoly 3.5.1. Parametr *Poisson Ratio*, který je definován jako poměr deformace vytvořené v příčném směru k deformaci vytvořené ve směru aplikace tlakového napětí, byl nastaven na 0,3 [41]. Hodnota 0,3 byla zvolena jako střední hodnota mezi doporučenou hodnotou pro biologické vzorky, která činí 0,5, a hodnotou pro materiál hrotu, která činí 0,23 [42]. Youngův modul byl následně vyhodnocen pomocí Hertzova modelu aproximace dat [42]. Proložení dat ovšem nebylo ve všech případech úspěšné, proto byla taktéž pro všechna měření upravena oblast, ze které byl Youngův modul vyhodnocován, pouze na oblast strmého klesání křivky „extend“.



Obrázek 19: Proložení křivky „extend“ softwarem (neupraveno)



Obrázek 20: Proložení křivky „extend“ softwarem (upraveno)

Tabulka 4: Získané Youngovy moduly pro *Rhodospirillum rubrum* při měření celé buňky

<i>Rhodospirillum rubrum</i> celá buňka		
Buňka a měření	$E_{\text{neupraveno}}$ (kPa)	E_{upraveno} (kPa)
Buňka 1.1	0,69	85,23
Buňka 1.2	1,28	112,4
Buňka 1.3	2,31	189,3
Buňka 2.1	1,88	106,9
Buňka 2.2	0,98	165,5
Buňka 2.3	1,54	402,3
Buňka 3.1	15,03	28,79
Buňka 3.2	2,98	80,38
Buňka 3.3	2,76	42,41

Tabulka 5: Získané Youngovy moduly pro první buňku *Rhodospirillum rubrum* při měření po částech

<i>Rhodospirillum rubrum</i> buňka 1			
Oblast	Měření	$E_{\text{neupraveno}}$ (kPa)	E_{upraveno} (kPa)
Spodní část	1	2,67	29,33
Spodní část	2	nelze proložit	185,3
Spodní část	3	3,16	58,28
Spodní část	4	2,88	38,69
Horní část	5	1,86	33,51
Horní část	6	1,51	46,81
Prostřední část	7	0,94	464,3
Prostřední část	8	1,06	139
Prostřední část	9	1,86	472,5
Horní část	10	3,00	58,22

Tabulka 6: Získané Youngovy moduly pro druhou buňku *Rhodospirillum rubrum* při měření po částech

<i>Rhodospirillum rubrum</i> buňka 2			
Oblast	Měření	$E_{\text{neupraveno}}$ (kPa)	E_{upraveno} (kPa)
Spodní část	1	0,65	199,6
Spodní část	2	2,00	51,33
Spodní část	3	0,96	157
Prostřední část	4	1,74	31,46
Prostřední část	5	1,16	300,9
Prostřední část	6	1,99	158,1

Tabulka 7: Získané Youngovy moduly pro třetí buňku *Rhodospirillum rubrum* při měření po částech

<i>Rhodospirillum rubrum</i> buňka 3			
Oblast	Měření	$E_{\text{neupraveno}}$ (kPa)	E_{upraveno} (kPa)
Spodní část	1	1,47	24,87
Spodní část	2	0,291	26,82
Spodní část	3	nelze proložit	23,4
Prostřední část	4	2,97	44,7
Prostřední část	5	2,29	228,2
Prostřední část	6	1,65	284,8
Horní část	7	4,43	21,9
Horní část	8	13,06	38,76
Horní část	9	10,05	30,25

Tabulka 8: Získané Youngovy moduly pro izolovanou PHB granuli

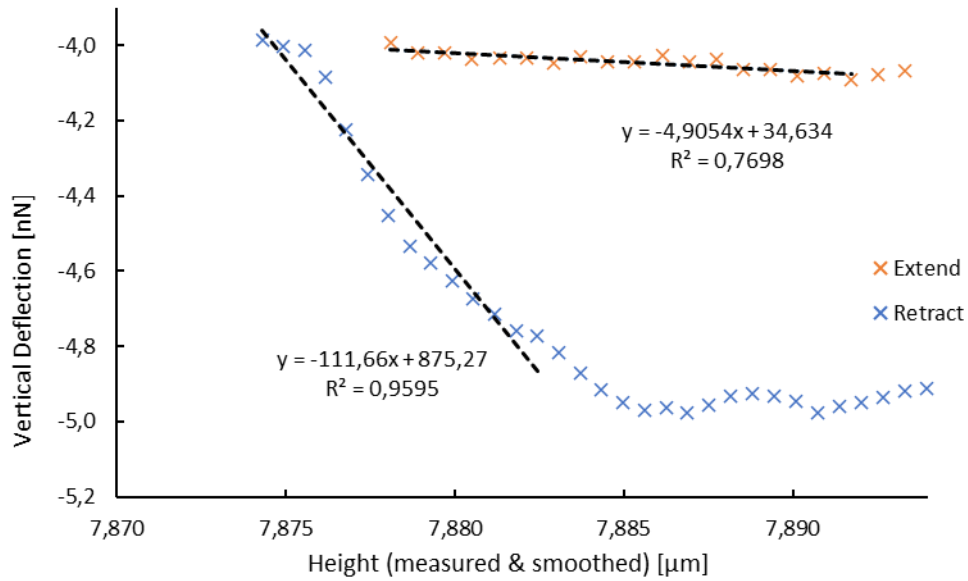
Izolovaná PHB granule		
Měření	$E_{\text{neupraveno}}$ (kPa)	E_{upraveno} (kPa)
1	0,71	5176
2	39,15	3200
3	3,22	3540

Získané Youngovy moduly při měření *Rhodospirillum rubrum* jako celé buňky i po částech (Tabulky 4, 5, 6 a 7) dosahovaly hodnot, které se v neupravené formě pohybovaly v rámci přibližně jednoho řádu. Totéž platilo i pro upravená data. Avšak u *Rhodospirillum rubrum* ΔphaC (Tabulky 10, 11, 12 a 13 nacházející se v kapitole 8.1.1) se u neupravených dat lišily vypočtené Youngovy moduly i v rámci stejného měření i o několik řádů. Upravení dat nepřineslo výraznou změnu a Youngovy moduly vycházely spíše náhodně. U izolovaných granulí (Tabulka 8) byla každá z vypočtených hodnot Youngova modulu z neupravených dat v jiném řádu. Po úpravě vycházely Youngovy moduly v rámci jednoho řádu.

Vzhledem k značným rozdílům ve výsledných Youngových modulech, a to zvláště u *Rhodospirillum rubrum* ΔphaC a izolovaných PHB granulí, nelze tuto metodu vyhodnocování považovat za spolehlivou. Z toho důvodu byla docentem Sedláčkem navržena metoda směrnic křivek „extend“ a „retract“, ve které se pro vyhodnocení použila surová data naměřená pomocí AFM.

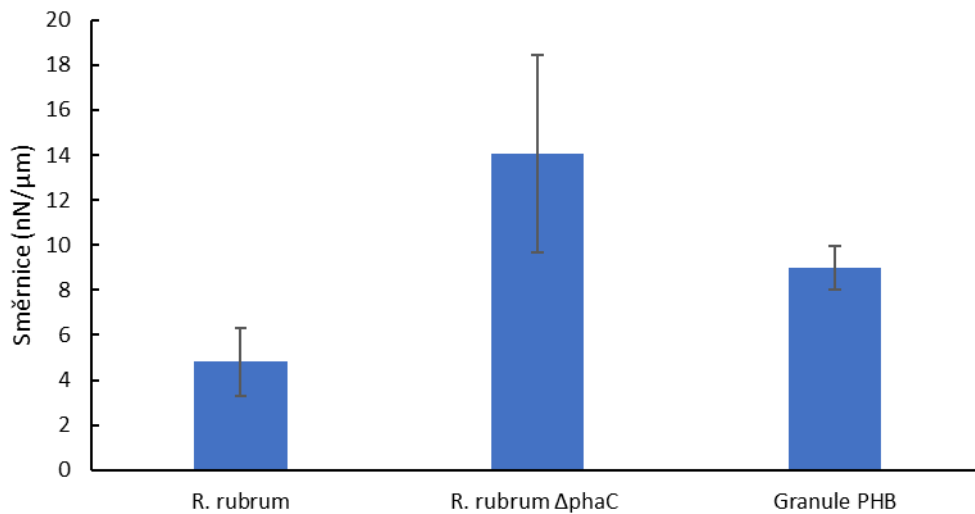
4.4.3 Vyhodnocení směrnic křivek „extend“ a „retract“

Při této metodě byly naměřená data exportována do programu MS Excel, kde byla vynesena do grafu. Bylo vybráno několik bodů ze strmě klesající oblasti křivky „extend“ a křivky „retract“. Příklad výběru bodů je možný vidět na Obrázku 24 v kapitole 8.2.1. Vybrané body byly následně proloženy přímkou a její směrnice byla vypočtena pomocí funkce LINREGRESE. Příklad proložení je možné vidět na Obrázku 21.

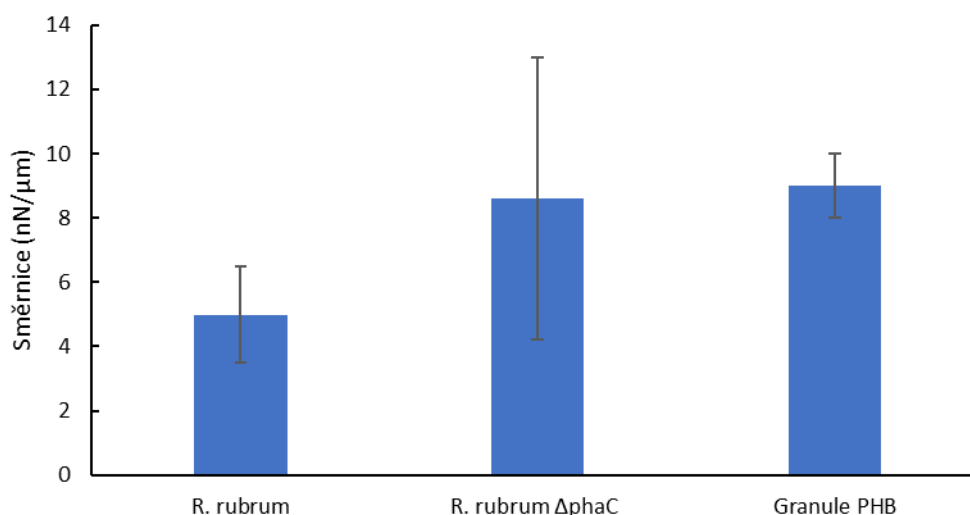


Obrázek 21: Proložení křivek „extend“ a „retract“ přímkami

Postup byl opakován u všech naměřených dat. Směrnice byly následně zprůměrovány a rozděleny podle toho, zda bylo měření prováděno po částech nebo jako měření celé buňky. Korelace bylo dosaženo pouze u křivky „extend“, proto nebyla křivka „retract“ pro vyhodnocení použita.



Obrázek 22: Průměrné směrnice při měření celých buněk (v absolutní hodnotě)



Obrázek 23: Průměrné směrnice při měření buněk po částech (v absolutní hodnotě)

Tabulka 9: Výsledné směrnice křivky

	<i>R. rubrum</i>		<i>R. rubrum ΔphaC</i>		PHB granule
	Celá buňka	Po částech	Celá buňka	Po částech	Celá granule
Průměr (nN/μm)	-4,8	-4,9	-14,1	-8,6	-9,0
Odchylka (nN/μm)	1,5	2,1	4,4	3,3	1,0

Ze získaných hodnot směrnice pro jednotlivé bakteriální kmeny při měření celých buněk, lze vyčíst, že buňky *Rhodospirillum rubrum* vykazují rozdílnou tuhost oproti jejímu mutantnímu kmeni, a to i přes poměrně nízký obsah PHB (0,19 %). U směrnice, které byly vytvořeny u měření po částech, dosahují odchylky vyšších hodnot, a proto není metoda měření po částech příliš spolehlivá. Hodnota směrnice pro PHB granule se pohybuje mezi hodnotami jednotlivých bakteriálních kmenů.

Optimalizace metody pro stanovení Youngova modulu bakteriálních buněk byla úspěšná. Navržený postup lze využít pro další bakteriální kmeny, které jsou schopny akumulovat větší množství PHA granulí, jako je například *Curpiavidus necator*. Dále by bylo možné metodu využít ke zkoumání změn Youngova modulu bakteriálních buněk, které obsahují či neobsahují PHA granule, při jejich vystavení stresovým podmínkám, jako je například teplota či pH.

5. ZÁVĚR

Zkoumání buněk mikroorganismů pomocí mikroskopických metod je důležité pro lepší porozumění jejich struktuře a funkcím. V první části práce byly získávány topografické snímky bakteriálních kmenů *Rhodospirillum rubrum*, který produkuje PHA a jejího mutantního kmene *Rhodospirillum rubrum ΔphaC*, který není schopen PHA akumulovat, pomocí AFM v jejich nativním stavu. Snímání bylo prováděno v pufru PBS, aby byl zachován nativní stav jednotlivých buněk. Jako imobilizační činidlo byl použit Poly-L-lysin, který dokázal buňky dostatečně fixovat. Byly získány snímky jednotlivých bakteriálních buněk s rozlišením 512x512, avšak na okrajích buněk bylo možné pozorovat poškození, která mohla být způsobena hrotem. Z tohoto důvodu by bylo vhodné metodu více optimalizovat, například využitím jiných hrotů.

Další částí práce byla optimalizace metody měření izolovaných nativních PHB granulí pomocí AFM. Pro fixaci granulí byl využit stejný postup jako v případě buněk. Nicméně v porovnání s celými buňkami, bylo u získaných snímků PHB granulí kvůli jejich malé velikosti obtížné rozeznat, zda se jedná o granuli nebo nečistotu. Aby se zabránilo případné záměně PHB granule za nečistotu, bylo nutné změřit i pozadí vzorku, což bylo provedeno pomocí negativní kontroly, kdy bylo změřeno podložní sklíčko s Poly-L-lysinem bez vzorku. Snímky granulí byly získány pouze v rozlišení 256x256, protože při měření ve větším rozlišení docházelo k malému pohybu granulí, což se ovšem projevilo deformací tvaru granule na výsledném snímku. Některé zobrazené granule byly stejně jako v případě bakteriálních buněk poškozené na svých okrajích, což bylo pravděpodobně způsobeno působením hrotu na vzorek. I přes nedokonalosti získaných snímků byla úspěšně navržena metoda, kterou lze měřit PHA granule v nativním stavu pomocí AFM. Metoda by mohla být dále zdokonalena vyzkoušením dalších hrotů a úpravami nastavení přístroje pro získání snímků s vyšším rozlišením.

Poslední část práce byla zaměřená na měření Youngova modulu pružnosti *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodospirillum rubrum ΔphaC* a izolovaných PHB granulí. Při této metodě byly buňky měřeny nejprve celé a následně byly vybrány 3 jejich části, na kterých byly následně provedeny měření. Přičemž PHB granule byly měřeny celé. Youngův modul byl nejprve vyhodnocován pomocí softwaru JPK Data Processing pomocí Hertzova modelu aproximace dat. Tato metoda se ovšem ukázala jako nespolehlivá, protože hodnoty Youngova modulu se i v rámci stejných měření lišily o několik řádů. Z tohoto důvodu byla navržena metoda, při které se využily směrnice strmé části křivek „extend“ a „retract“. Získané směrnice byly zvláště zprůměrovány pro měření celých buněk a zvláště pro měření zaměřených na specifická místa buněk. Pro vyhodnocení byly zvoleny směrnice vytvořené z křivky „extend“, protože u nich docházelo k vyšší korelaci. Jako vhodnější měření se ukázalo měření celých buněk, protože při měření po částech docházelo k vzniku vyšší odchylky buněk u kmene *Rhodospirillum rubrum ΔphaC*. Směrnice *Rhodospirillum rubrum* dosahovala hodnoty $(-4,5 \pm 1,5)$ nN/ μm a pro *Rhodospirillum rubrum ΔphaC* $(-14,1 \pm 4,4)$ nN/ μm . Mezi těmito hodnotami je znatelný rozdíl, proto lze usoudit, že buňky *Rhodospirillum rubrum* budou vykazovat vyšší tuhost než buňky *Rhodospirillum rubrum ΔphaC*. Byl tedy potvrzen předpoklad, že buňky obsahující intracelulární granule PHB jsou tužší než buňky, které je neobsahují. Metoda vyhodnocování pomocí směrnic by mohla být dále využita pro studium bakteriálních kmenů, které jsou schopny

akumulovat větší množství PHA granulí, mezi které patří například *Cupriavidus necator* H16. Hodnota směrnice pro PHB granule činila $(-9,0 \pm 1,0)$ nN/ μm , čehož plyne, že tuhost PHB granulí je vyšší než tuhost buněk *Rhodospirillum rubrum* ΔphaC , které žádné PHB granule neobsahují. Navrženou metodu by bylo možné dále využít při zkoumání PHA granulí o různém složení.

6. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] MUHAMMADI, Anne, Wolfgang Florian SHABINA, Muhammad AFZAL, et al. Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chemistry Letters and Reviews*. 2015, **8**(3-4), 56-77. ISSN 1751-8253. Dostupné z: doi:10.1080/17518253.2015.1109715
- [2] MACHALA, Libor, Milan VŮJTEK, Roman KUBÍNEK a Miroslav MAŠLÁŇ. Mikroskopie skenující sondou. In: *Atmilab.upol.cz* [online]. Olomouc: Univerzita Palackého Olomouc, 2003 [cit. 2022-02-11]. Dostupné z: <http://atmilab.upol.cz/mss/>
- [3] DOROBANTU, Loredana S., Murray R. GRAY, Rita C.P. ALLI, et al. Application of atomic force microscopy in bacterial research: Extraction Optimization and Polymer Characterization. *Scanning*. 2010, **32**(2), 74-96. ISSN 01610457. Dostupné z: doi:10.1002/sca.20177
- [4] SCHULTZ, J. E., P. F. WEAVER a Jonas CONTIERO. Fermentation and Anaerobic Respiration by *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodopseudomonas capsulata*: Recent reports on *Pseudomonas*-derived molecules of increasing industrial interest. *Journal of Bacteriology*. 1982, **149**(1), 181-190. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/jb.149.1.181-190.1982
- [5] SMITH, R.L., T.P. WEST a W.R. GIBBONS. *Rhodospirillum rubrum*: utilization of condensed corn solubles for poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production. *Journal of Applied Microbiology*. 2008, **104**(5), 1488-1494. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03685.x
- [6] POHLMANN, Anne, Wolfgang Florian FRICKE, Frank REINECKE, et al. Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16: utilization of condensed corn solubles for poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production. *Nature Biotechnology*. 2006, **24**(10), 1257-1262. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt1244
- [7] HÄNISCH, Jan, Marc WÄLTERMANN, Horst ROBENEK a Alexander STEINBÜCHEL. The *Ralstonia eutropha* H16 phasin PhaP1 is targeted to intracellular triacylglycerol inclusions in *Rhodococcus opacus* PD630 and *Mycobacterium smegmatis* mc2155, and provides an anchor to target other proteins: utilization of condensed corn solubles for poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production. *Microbiology*. 2006, **152**(11), 3271-3280. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi:10.1099/mic.0.28969-0
- [8] LEE, Sang Yup; LEE, Young; WANG, Fulai. Chiral compounds from bacterial polyesters: sugars to plastics to fine chemicals. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, **65**.3: 363-368. doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19991105)65:3<363::AID-BIT15>3.0.CO;2-1
- [9] LENZ, Robert W. a Robert H. MARCHESSAULT. Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. *Biomacromolecules*. 2005, **6**(1), 1-8. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm049700c

- [10] HAZER, Baki, Alexander STEINBÜCHEL a Jonas CONTIERO. Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications: Recent reports on Pseudomonas-derived molecules of increasing industrial interest. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, 74(1), 1-12. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-006-0732-8
- [11] KUNIOKA, Masao, Akira TAMAKI a Yoshiharu DOI. Crystalline and thermal properties of bacterial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Macromolecules*. 1989, 22(2), 694-697. ISSN 0024-9297. Dostupné z: doi:10.1021/ma00192a031
- [12] NITSCHKE, Marcia, Siddhartha G.V.A.O. COSTA a Jonas CONTIERO. Rhamnolipids and PHAs: Recent reports on Pseudomonas-derived molecules of increasing industrial interest. *Process Biochemistry*. 2011, 46(3), 621-630. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2010.12.012
- [13] RIAZ, Shahina, Kyong Yop RHEE, Soo Jin PARK, Richard A. STRUGNELL, Frances SEPAROVIC, M. GABERSCEK a K. STANA-KLEINSCHEK. Polyhydroxyalkanoates (PHAs): Biopolymers for Biofuel and Biorefineries. *Polymers*. InTech, 2021, 2013-01-23, 13(2), 1091-1098. ISBN 978-953-51-0941-9. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym13020253
- [14] REHM, Bernd H. A., Wolfgang Florian SHABINA, Muhammad AFZAL, et al. Genetics and Biochemistry of Polyhydroxyalkanoate Granule Self-assembly: The Key Role of Polyester Synthases. *Biotechnology Letters*. 2006, 28(4), 207-213. ISSN 0141-5492. Dostupné z: doi:10.1007/s10529-005-5521-4
- [15] BRESAN, Stephanie, Anna SZNAJDER, Waldemar HAUF, et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids: The Key Role of Polyester Synthases. *Scientific Reports*. 2016, 6(1), 207-213. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep26612
- [16] THOMSON, Nicholas, David SUMMERS, Easan SIVANIAH, et al. Synthesis, properties and uses of bacterial storage lipid granules as naturally occurring nanoparticles: The Key Role of Polyester Synthases. *Soft Matter*. 2010, 6(17), 1092-1099. ISSN 1744-683X. Dostupné z: doi:10.1039/b927559b
- [17] *Environmental Microbiology*. 16. 2014. ISSN 14622912. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1462-2920.12356>
- [18] BEEBY, M., M. CHO, J. STUBBE, et al. Growth and Localization of Polyhydroxybutyrate Granules in *Ralstonia eutropha*: The Key Role of Polyester Synthases. *Journal of Bacteriology*. 2012, 194(5), 1092-1099. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.06125-11
- [19] HIRAISHI, Tomohiro, Yoshihiro KIKKAWA, Masahiro FUJITA, et al. Atomic Force Microscopic Observation of in Vitro Polymerized Poly[(R)-3-hydroxybutyrate]: Insight into Possible Mechanism of Granule Formation. *Biomacromolecules*. 2005, 6(5), 2671-2677. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm0500749
- [20] SUDESH, K, H ABE, Y DOI, et al. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*.

- 2000, **25**(10), 1503-1555. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/S0079-6700(00)00035-6
- [21] WANG, Qian, Yunsheng XU, Pengwu XU, et al. Crystallization of microbial polyhydroxyalkanoates: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022, **209**(10), 330-343. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.04.018
- [22] IWATA, Tadahisa, Yoshiharu DOI, Ken-ichi KASUYA, et al. Visualization of Enzymatic Degradation of Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] Single Crystals by an Extracellular PHB Depolymerase: A review. *Macromolecules*. 1997, **30**(4), 833-839. ISSN 0024-9297. Dostupné z: doi:10.1021/ma961352m
- [23] IWATA, Tadahisa, Yoshiharu DOI, Ken-ichi KASUYA, et al. Morphology and Crystal Structure of Solution-Grown Single Crystals of Poly[(R)-3-hydroxyvalerate]: A review. *Macromolecules*. 2000, **33**(15), 5559-5565. ISSN 0024-9297. Dostupné z: doi:10.1021/ma000186m
- [24] FURUTATE, Sho, Hideki ABE, Takeharu TSUGE, et al. Thermal properties of poly(3-hydroxy-2-methylbutyrate-co-3-hydroxybutyrate) copolymers with narrow comonomer-unit compositional distributions: A review. *Polymer Journal*. 2021, **53**(12), 1451-1457. ISSN 0032-3896. Dostupné z: doi:10.1038/s41428-021-00545-4
- [25] FUJITA, Masahiro, Yoshitaka TAKIKAWA, Shinya TERAMACHI, et al. Morphology and Enzymatic Degradation of Oriented Thin Film of Ultrahigh Molecular Weight Poly[(R)-3-hydroxybutyrate]: A review. *Biomacromolecules*. 2004, **5**(5), 1787-1791. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm049886f
- [26] 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*. 2018, **36**(3), 856-870. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2017.12.006
- [27] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Vladislav KRZYZANEK, et al. Accumulation of Poly(3-hydroxybutyrate) Helps Bacterial Cells to Survive Freezing. *PLOS ONE*. 2016, **11**(6). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0157778
- [28] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Filip MRAVEC, et al. The presence of PHB granules in cytoplasm protects non-halophilic bacterial cells against the harmful impact of hypertonic environments. *New Biotechnology*. 2017, **39**, 68-80. ISSN 18716784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2017.07.008
- [29] JIANG, Xuan, Juliana A. RAMSAY, Bruce A. RAMSAY, et al. Acetone extraction of mcl-PHA from *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Microbiological Methods*. 2006, **67**(2), 212-219. ISSN 01677012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2006.03.015
- [30] RODRIGUES, Ana Marta, Rita Dias Guardão FRANCA, Madalena DIONÍSIO, et al. Polyhydroxyalkanoates from a Mixed Microbial Culture: Extraction Optimization and Polymer Characterization. *Polymers*. 2022, **14**(11), 212-219. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym14112155

- [31] JACQUEL, Nicolas, Chi-Wei LO, Yu-Hong WEI, et al. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates): Extraction Optimization and Polymer Characterization. *Biochemical Engineering Journal*. 2008, **39**(1), 15-27. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2007.11.029
- [32] KAPRITCHKOFF, Fernanda M., Alexandre P. VIOTTI, Rita C.P. ALLI, et al. Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*: Extraction Optimization and Polymer Characterization. *Journal of Biotechnology*. 2006, **122**(4), 453-462. ISSN 01681656. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiotec.2005.09.009
- [33] MAVER, U., T. MAVER, Z. PERSIN, M. MOZETIC, A. VESEL, M. GABERSCEK a K. STANA-KLEINSCHEK. Polymer Characterization with the Atomic Force Microscope. *Polymer Science*. InTech, 2013, 2013-01-23. ISBN 978-953-51-0941-9. Dostupné z: doi:10.5772/51060
- [34] NNEBE, Ijeoma, James W. SCHNEIDER, Z. PERSIN, M. MOZETIC, A. VESEL, M. GABERSCEK a K. STANA-KLEINSCHEK. Characterization of Distance-Dependent Damping in Tapping-Mode Atomic Force Microscopy Force Measurements in Liquid. *Langmuir*. InTech, 2004, 2013-01-23, **20**(8), 3195-3201. ISBN 978-953-51-0941-9. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la030324b
- [35] *The NanoWizard AFM Handbook: Version 6.0* [online]. Berlin: JPK Instruments, 2018
- [36] LIU, Shaoyang a Yifen WANG. Application of AFM in microbiology: a review. *Scanning*. 2010, **32**(2), 61-73. ISSN 01610457. Dostupné z: doi:10.1002/sca.20173
- [37] MULARSKI, Anna, Jonathan J. WILKSCH, Eric HANSEN, Richard A. STRUGNELL, Frances SEPAROVIC, M. GABERSCEK a K. STANA-KLEINSCHEK. Atomic force microscopy of bacteria reveals the mechanobiology of pore forming peptide action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. InTech, 2016, 2013-01-23, **1858**(6), 1091-1098. ISBN 978-953-51-0941-9. ISSN 00052736. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamem.2016.03.002
- [38] LOUISE MEYER, Rikke, Xingfei ZHOU, Lone TANG, Ayyoob ARPANA EI, Peter KINGSHOTT a Flemming BESENBACHER. Immobilisation of living bacteria for AFM imaging under physiological conditions. *Ultramicroscopy*. 2010, **110**(11), 1349-1357. ISSN 03043991. Dostupné z: doi:10.1016/j.ultramic.2010.06.010
- [39] HANDRICK, René, Simone REINHARDT, Maria Letizia FOCARETE, Mariastella SCANDOLA, Grazyna ADAMUS, Marek KOWALCZUK a Dieter JENDROSSEK. A New Type of Thermoalkalophilic Hydrolase of *Paucimonas lemoignei* with High Specificity for Amorphous Polyesters of Short Chain-length Hydroxyalkanoic Acids. *Journal of Biological Chemistry*. 2001, **276**(39), 36215-36224. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M101106200
- [40] BOURBONNAIS, Robert a Robert H. MARCHESSAULT. Application of Polyhydroxyalkanoate Granules for Sizing of Paper. *Biomacromolecules*. 2010, **11**(4), 989-993. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm9014667

- [41] Co je Poissonův poměr? | Je to kompletní návod | 5+ otázek a odpovědí. In: Cs.lamdageeks.com [online]. [cit. 2023-05-18]. Dostupné z: <https://cs.lamdageeks.com/poissons-ratio/>
- [42] Application Note: Determining the elastic modulus of biological samples using atomic force microscopy [online]. In: . JPK Instruments [cit. 2023-05-18]. Dostupné z: <https://www.jpk.com/app-technotes-img/AFM/pdf/jpk-app-elastic-modulus.14-1.pdf>

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

OD	Optická hustota (Optical density)
PHA	Polyhydroxyalkanoáty
PHB	Polyhydroxybutyrát
<i>sc</i> PHA	short-chain-length PHA
<i>mc</i> PHA	medium-chain-length PHA
<i>lc</i> PHA	long-chain-length PHA
AFM	Mikroskopie atomárních sil
PLL	Poly-L-lysin
E	Youngův modul
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
QI	Kvantitativní zobrazování (Quantitative imaging)
LB	Luria-Bertani

8. PŘÍLOHY

8.1 Vyhodnocené Youngovy moduly pomocí software JPK Data Processing

8.1.1 *Rhodospirillum rubrum* Δ phaC

Tabulka 10: Získané Youngovy moduly pro *Rhodospirillum rubrum* Δ phaC při měření celé buňky

<i>Rhodospirillum rubrum</i> Δ phaC celá buňka		
Buňka a měření	$E_{\text{neupraveno}}$ (kPa)	E_{upraveno} (kPa)
Buňka 1.1	1,18	11620
Buňka 1.2	17500	41650
Buňka 1.3	1400	2536
Buňka 2.1	0,17	891,6
Buňka 2.2	nelze proložit	213100
Buňka 2.3	nelze proložit	4813
Buňka 3.1	nelze proložit	35050
Buňka 3.2	nelze proložit	19580
Buňka 3.3	1,24	1633

Tabulka 11: Získané Youngovy moduly pro první buňku *Rhodospirillum rubrum* Δ phaC při měření po částech

<i>Rhodospirillum rubrum</i> Δ phaC buňka 1			
Oblast	Měření	$E_{\text{neupraveno}}$ (kPa)	E_{upraveno} (kPa)
Spodní část	1	nelze proložit	10940
Spodní část	2	17500	41210
Spodní část	3	1,29	4517
Prostřední část	4	234,1	444,8
Prostřední část	5	0,90	258,6
Prostřední část	6	321	600
Horní část	7	1,11	3986
Horní část	8	134,7	320,8
Horní část	9	3,67	102,5

Tabulka 12: Získané Youngovy moduly pro druhou buňku *Rhodospirillum rubrum* Δ phaC při měření po částech

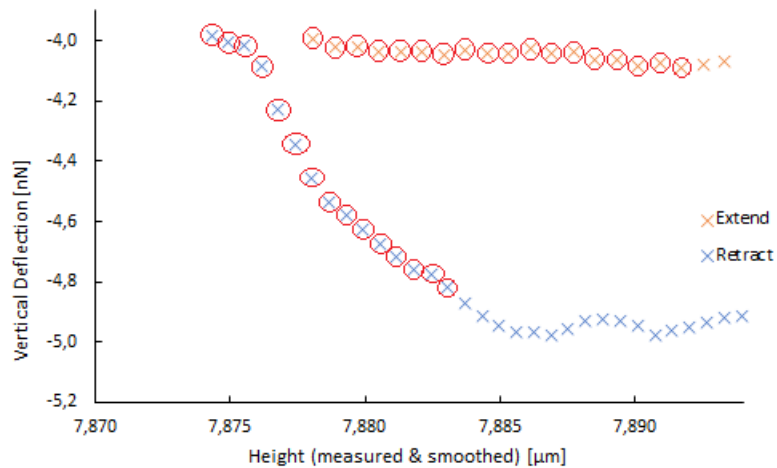
<i>Rhodospirillum rubrum</i> Δ phaC buňka 2			
Oblast	Měření	$E_{\text{neupraveno}}$ (kPa)	E_{upraveno} (kPa)
Spodní část	1	2,22	4110
Spodní část	2	0,91	1424
Spodní část	3	2,59	6182
Prostřední část	4	43,66	1627
Prostřední část	5	2,2	32850
Prostřední část	6	1,13	1090
Horní část	7	19,05	990,4
Horní část	8	1,70	11910
Horní část	9	91,06	10600

Tabulka 13: Získané Youngovy moduly pro třetí buňku *Rhodospirillum rubrum* Δ phaC při měření po částech

<i>Rhodospirillum rubrum</i> Δ phaC buňka 3			
Oblast	Měření	$E_{\text{neupraveno}}$ (kPa)	E_{upraveno} (kPa)
Spodní část	1	4,98	3066
Spodní část	2	1,10	23930
Spodní část	3	13,70	727,4
Prostřední část	4	17,91	371,5
Prostřední část	5	1,05	1804
Prostřední část	6	0,88	561,7
Horní část	7	25,48	334,8
Horní část	8	0,86	1201
Horní část	9	3,56	6794

8.2 Vyhodnocení křivek „extend“ a „retract“

8.2.1 Výběr bodů z křivek „extend“ a „retract“ pro proložení přímkou



Obrázek 24: Výběr bodů křivek „extend“ a „retract“ pro proložení přímkou