

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2017

Kateřina Drábková



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

**BIOPOLYMERY PRODUKOVANÉ HALOFILNÍMI
BAKTERIEMI A JEJICH ROLE VE STRESOVÉ
ODPOVĚDI PROKARYOTICKÝCH BUNĚK**

BIOPOLYMERS PRODUCED BY HALOPHILIC BACTERIA AND THEIR ROLE IN STRESS RESPONSE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kateřina Drábková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1134/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Kateřina Drábková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Biopolymery produkované halofilními bakteriemi a jejich role ve stresové odpovědi prokaryotických buněk

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše
2. Výběr vhodných halofilních bakteriálních kmenů pro laboratorní experimenty
3. Experimentální ověření zapojení vybraných biopolymerů do stresové odpovědi bakterií

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

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

Kateřina Drábková
student(ka)

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předmětem této práce je studium halofilních mikroorganismů. Hlavní část se zabývá izolací a charakterizací extracelulárního polysacharidu (EPS) produkovaného archeálním hyperosmofilním kmenem *Haloferax mediteranei*. Chemická struktura extracelulárního polysacharidu byla studována prostřednictvím Ramanovy spektroskopie, FTIR a prvkové analýzy. Byla zjištěna velmi nízká koncentrace sulfátových skupin, což lze interpretovat tak, že modelová struktura EPS není zcela univerzální a zastoupení jednotlivých funkčních skupin, může záviset na kultivačních podmínkách a dalších parametrech. Protektivní účinek polysacharidu byl posouzen na modelovém prokaryotickém organismu *Cupriavidus necator* a eukaryotickém modelu – kvasince *Saccharomyces cerevisiae*. EPS vykazoval významné protektivní účinky vůči mražení, osmotickému stresu, vysoké teplotě a ethanolu u obou testovaných mikroorganismů.

ABSTRACT

The subject of this thesis is the study of halophilic microorganisms. The main part deals with isolation and characterization of the extracellular polysaccharide (EPS) produced by the archeal strain *Haloferax mediteranei*. Chemical structure was determined by Raman spectroscopy, FTIR and elemental analysis. Very low amount of sulphate groups indicate, that generally accepted structure of the EPS is not universal and can be dependent upon cultivation condition. Further, EPS revealed substantial protective effect for both model prokaryotic organisms – *Cupriavidus necator* and model eukaryotic microbe – *Saccharomyces cerevisiae* when the cells were exposed to various stress factors such as freezing, high temperature, osmotic pressure or ethanol.

KLÍČOVÁ SLOVA

Halofilní mikroorganismus, stresová odpověď, extracelulární polysacharid

KEYWORDS

Halophilic microorganism, stress response, extracellular polysaccharide

DRÁBKOVÁ, K. *Biopolymery produkované halofilními bakteriemi a jejich role ve stresové odpovědi prokaryotických buněk*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 43 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu své bakalářské práce doc. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, cenné rady a čas, který mi věnoval. Ráda bych poděkovala také Ing. Pavle Benešové a Ing. Danu Kučerovi za vstřícný přístup, pomoc při práci v laboratoři a rady při zpracování bakalářské práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Ing. Lucii Müllerové za pomoc a rady při realizaci experimentu.

OBSAH

1	Úvod	8
2	Teoretická část	9
2.1	Halofilní mikroorganismy	9
2.1.1	Charakteristika	9
2.1.2	Hypersalinní prostředí	10
2.2	Stresová odpověď	11
2.2.1	pH šok	11
2.2.2	Teplotní stres	12
2.2.3	Tlak	13
2.2.4	Vodní stres	13
2.3	Způsoby adaptace halofilních mikroorganismů	13
2.3.1	Osmoregulace	13
2.3.2	Proteiny	14
2.3.2.1	Tvorba proteinů závislá na koncentraci soli	15
2.3.3	Buněčná stěna a S-vrstva	16
2.3.4	Genom haloarcheí	16
2.3.5	Karotenoidy	17
2.3.6	Retinalové proteiny	17
2.3.7	Plynové vezikuly	17
2.3.8	Halocin	17
2.3.9	Extracelulární polysacharid	18
2.3.10	Polyhydroxyalkanoáty	18
2.4	Způsoby adaptace – <i>Haloferax mediterranei</i>	19
3	Experimentální část	21
3.1	Použité chemikálie, mikroorganismy a přístroje	21
3.1.1	Použité chemikálie	21
3.1.2	Použité přístroje	21
3.1.3	Využité mikroorganismy	21
3.2	Kultivace mikroorganismů	21

3.2.1	Kultivace <i>Haloferax mediterranei</i>	21
3.2.2	Kultivace <i>Cupriavidus necator</i> H16.....	22
3.2.3	Kultivace <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
3.3	Izolace extracelulárního polysacharidu	23
3.4	Studium extracelulárního polysacharidu	23
3.4.1	Stanovení celkových sacharidů pomocí Anthoronovy metody	23
3.4.2	Infračervená a Ramanova spektroskopie	24
3.4.3	Prvková elementární analýza.....	24
3.5	Výsev na pevné médium.....	24
3.6	Stanovení viability pomocí průtokového cytometru	25
3.6.1	Stresová odolnost mikroorganismu <i>Haloferax mediterranei</i>	25
3.6.1.1	Teplotní stres – vysoká teplota	25
3.6.1.2	Teplotní stres – mražení	25
3.6.2	Studium ochranných vlastností EPS ve stresové odpovědi eukaryotických a prokaryotických buněk.....	26
3.6.2.1	Teplotní stres – vysoká teplota	26
3.6.2.2	Teplotní stres – mražení	26
3.6.2.3	Osmotický stres.....	26
3.6.2.4	Ethanolový stres.....	27
3.6.2.5	Osmotický stres ve spojení s teplotním stresem	27
3.6.2.6	Ethanolový stres ve spojení s teplotním stresem	27
4	Výsledky	28
4.1	Stresová odolnost <i>Haloferax mediterranei</i>	28
4.2	Izolace extracelulárního polysacharidu	28
4.2.1	Kvantitativní zhodnocení izolačního postupu	29
4.3	Chemická charakterizace extracelulárního polysacharidu	30
4.3.1	Ramanova spektroskopie.....	30
4.3.2	Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací	32
4.3.3	Prvková elementární analýza.....	34

4.3.4	Vliv ochranných vlastností EPS ve stresové odpovědi prokaryotických buněk	35
4.3.5	Vliv ochranných vlastností EPS ve stresové odpovědi eukaryotických buněk	36
5	Závěr	37
6	Zdroje.....	38
7	Přílohy	41

1 ÚVOD

Halofilní mikroorganismy obývají hypersalinní prostředí. Přítomnost solí vyžadují ke svému růstu. Halofilní mikroorganismy můžeme dělit podle požadavků na koncentraci soli v prostředí na mírně halofilní, středně a extrémně halofilní. Vyžadují koncentraci soli pro svůj růst, ale je nežádoucí, aby voda difundovala dovnitř buňky. Proto disponují několika strategiemi, které jim umožňují přežít v prostředí s vysokou koncentrací solí. První strategie je akumulace anorganických iontů k vyrovnání osmotického tlaku (K^+ , Cl^-). Druhým mechanismem je schopnost některých druhů akumulovat organické vysokomolekulární sloučeniny rozpustné ve vodě, které zajišťují nízkou koncentraci solí. Významná může být také produkce polyhydroxyalkanoátů (PHA), speciálních proteinů, barviv, enzymů apod.

Stresová odpověď bakterií umožňuje jejich přežití v nepříznivých a proměnlivých podmínkách. Bakterie mají různé mechanismy, které rozeznávají změny prostředí a pomáhají se nepříznivým změnám přizpůsobit. Systémy stresových odpovědí mezi sebou interagují pomocí komplexu globální regulační sítě, což vede ke koordinované a účinné reakci na změnu. Bakteriální buňky mohou reagovat na širokou škálu stresových faktorů. Stresem se obvykle rozumí posun určitého faktoru mimo optimum, takovým faktorem může být například pH šok, tedy zásadité nebo kyselé prostředí, teplotní stres, tedy extrémně nízká či vysoká teplota, nebo také tlak, radiace či oxidativní stres.

Jedním ze způsobů adaptace mikroorganismů na stresové podmínky je tvorba extracelulárních či intracelulárních biopolymerů. Halofilní mikroorganismy si například vytváří a akumulují uvnitř buněk granulky polyhydroxyalkanoátů, které slouží jako zásobní zdroje energie. Četné druhy halofilů produkují pro svou ochranu extracelulární polysacharid, který mimo jiné přispívá k tvorbě biofilmu, a tak pomáhá buňku chránit. Pro své výhodné vlastnosti se vyznačuje širokou škálou potenciálního využití v mnoha oblastech, jako je například potravinářství, farmacie či ropný průmysl.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Halofilní mikroorganismy

Halofily jsou organismy, které obývají hypersalinní prostředí [1]. Přítomnost solí vyžadují ke svému růstu [2]. Patří mezi ně především mikroorganismy schopné přizpůsobovat se změnám osmotického tlaku prostředí. Organismy odolné vůči denaturačním účinkům solí. Halofilní mikroorganismy mohou být autotrofy i heterotrofy. Patří mezi ně například sinice *Aphanothece halophytica* nebo zelená řasa *Dunaliella salina* [1].

Halofilní organismy můžeme dělit podle jejich požadavků na koncentraci NaCl v prostředí na mírně halofilní (1 %–5 %), středně halofilní (3 %–25 %) nebo extrémně halofilní (20 %–30 %) [2].

2.1.1 Charakteristika

Halofily mají různé orgány, které jim pomáhají se prostředí přizpůsobit [1]. Různé strategie přizpůsobení byly vyvolány vysokou koncentrací solí v jejich okolí. Některé halofilní bakterie hromadí anorganické ionty (K^+ , Na^+ , Cl^-) v cytoplazmě, jedná se o typ „salt-in“ strategie vyrovnání osmotického tlaku s prostředím [3]. Halofilní organismy si také vyvinuly speciální proteiny, které jsou stabilní a aktivní v přítomnosti vysoké koncentrace anorganických solí. Tyto enzymy si zachovávají svou aktivitu nejen v přítomnosti vysokých koncentrací solí, ale také v zásaditém pH a vysokých teplotách. Většina proteinů a enzymů denaturuje v hypersalinním prostředí. Proteiny halofilních mikroorganismů vážou značné množství solí a vody. Tato vlastnost je závislá na počtu aminokyselin na povrchu proteinu, tedy na primární struktuře a dalších strukturách od ní odvozených [2].

Byl zkoumán vliv elektrostatických interakcí na stabilitu a tvorbu halofilních proteinů. Tento vliv je určujícím pro adaptaci na hypersalinní prostředí. Bylo zjištěno, že intracelulární ionty K^+ se nachází ve velmi vysokých koncentracích, přibližně 5 mol/dm^3 . Halofilní proteom se vyznačuje vysokým obsahem kyseliny asparagové a kyseliny glutamové a také vysokým obsahem aminokyselin se slabým hydrofobním charakterem. Naopak lysin je v něm zastoupen minimálně. Tyto charakteristiky připouští kooperaci s elektrostatickými interakcemi a přítomností většího počtu solných můstků [2].

Stabilita proteinu závisí na záporném náboji jeho povrchu v důsledku obsahu aminokyselin, hydrofobní skupiny v přítomnosti velké koncentrace soli a hydrataci povrchu proteinů v důsledku přítomnosti karboxylových skupin, kyseliny asparagové a glutamové. Mimo to jsou negativní povrchové náboje důležité pro solvataci proteinů, aby se zabránilo denaturaci, agregaci a srážení [2].

Středně halofilní mikroorganismy využívají i jiné mechanismy haloadaptace založené na biosyntéze či akumulaci specifických organických osmolytů v cytoplazmě. Ty poskytují osmotickou rovnováhu a udržují nízkou koncentraci intracelulární soli, aniž by byl narušen normální metabolismus buňky. Osmolyty lze získat přímo z prostředí. Mnoho halofilních

bakterií si hromadí ektoin nebo hydroxyektoin jako převládající kompatibilní soluty. Mezi další osmolyty patří glycin, betain a jiné neutrální glyceroly [2].

Jedním z vyvinutých mechanismů adaptace je modifikace profilu mastných kyselin ve fosfolipidech cytoplazmatické membrány a také v dalších vrstvách buněčných obalů. Strukturální úpravy byly pozorovány v S-elektronových vrstvách u halofilních mikroorganismů. Extrémní halofil obsahuje sulfatované zbytky kyseliny glukuronové a vyznačuje se vyšším stupněm glykosylace. To vede ke zvýšení hustoty povrchového náboje, což bylo zkoumáno u bakterie *Halobacterium salinarium*. Kromě toho jsou S-vrstvy elektronového obalu některých bakterií obohaceny o kyselé zbytky [2].

Díky svým vlastnostem získávají halofilní mikroorganismy velké uplatnění. Jsou využívány v biodegradaci organických znečišťujících látek, v odsolování odpadních vod, v oblasti nanotechnologií, při výrobě biopolymerů apod [2].

2.1.2 Hypersalinní prostředí

Hypersalinní prostředí je obecně definováno jako prostředí obsahující koncentraci solí vyšší než je v mořské vodě, tedy 3,5 % úplně rozpuštěných solí. Dvěma největšími a nejprozkoumanějšími hypersalinními jezery jsou Velké solné jezero a Mrtvé moře. Mrtvé moře obsahuje vysoké koncentrace solí hořčíku a je mírně zásadité. Poměr obsahu solí ve Velkém solném jezeru je srovnatelný s poměrem solí v mořské vodě. Jeho pH je mírně kyselé. V porovnání s menšími hypersalinními prostředími jsou jejich složení poměrně stálá [1].

V pobřežních oblastech je mnoho míst, kde dochází k odpařování a vznikají malá hypersalinní prostředí. Mezi taková významná místa patří Solar Lake, Gavish Sabkha, jezero Sivash nedaleko Černého moře nebo je můžeme nalézt také například na Antarktidě [1].



Obrázek 1: Letecký pohled na břeh Velkého solného jezera [4]

Mezi další takové vodní plochy patří obzvláště dynamické prostředí, kde dochází k výrazným změnám velikosti, slanosti a teploty. Nebo jsou to oblasti, které vznikly zaplavením dávných moří [1].

Kromě přírodních hypersalinních jezer jsou četné i uměle vytvořené. Obvykle se jedná o sérii mělkých jezer, které se snadno odpařují. Propojují je obvykle nejružnější kanály. Společným znakem hypersalinních prostředí je dynamika koncentrace solí. Tento proces vede k tomu, že se halofilní mikroorganismy musí umět přizpůsobit různému obsahu solí v prostředí [1].

2.2 Stresová odpověď

Stresová odpověď bakterií umožňuje jejich přežití v nepříznivých a proměnlivých podmínkách [5]. Bakterie mají různé mechanismy, které rozeznávají změny prostředí a pomáhají se těmto změnám přizpůsobit. Bakteriální buňky mohou reagovat na širokou škálu stresových faktorů. Systémy stresových odpovědí mezi sebou interagují pomocí komplexu globální regulační sítě. To vede ke koordinované a účinné reakci na změnu. Tyto regulační systémy upravují expresi efektorů, které pomáhají udržet stabilitu buňky, eliminují stresové faktory, opravují poškození a pomáhají obnovit homeostázu [6]. Rozlišujeme několik stresových faktorů.

2.2.1 pH šok

Zásaditost a kyselost můžeme charakterizovat jako míru koncentrace protonů. Používaným měřítkem je pak pH. Neutrální pH, tedy pH okolo hodnoty 7, je optimálním prostředím pro život mnoha organismů. V přírodě se však nachází i prostředí s extrémními podmínkami. Organismy žijící v takových prostředích musí čelit tomuto stresu. Obvykle se změnám pH přizpůsobují tak, že udržují neutrální pH v cytoplazmě [6].

Alkalické prostředí je obecně charakterizováno jako přirozené prostředí s pH vyšším než 9. Organismy žijící v takovém prostředí nazýváme jako alkalofily. Jsou známy alkalofily, které žijí aerobním způsobem, ale i alkalofilní organismy s anaerobním způsobem života. Růst těchto organismů je optimální při hodnotách pH vyšších než 9, často v rozmezí mezi 10 a 12. Nemohou růst, nebo jen velmi pomalu, při neutrálním pH. Povrch buňky hraje klíčovou roli pro přežití. Udržuje rozmezí pH mezi 7–8,5. Ještě nebyly objasněny adaptační mechanismy, i přesto našly alkalofily velké uplatnění v průmyslových aplikacích [7].

Mezi známé adaptační mechanismy patří vnitřní údržba pH pomocí aktivních nebo pasivních regulačních mechanismů. Nízká propustnost membrány způsobená odlišnou strukturou představuje pasivní regulaci. Buněčná stěna obsahuje kyselé polymery, které fungují jako záporně nabitá matrice, čímž může být sníženo pH na povrchu buněk. Sodíkové iontové kanály řídí aktivní regulaci. Bylo dokázáno, že se u alkalofilů vyvinuly enzymy stabilní při různém pH [7].

Nejvýznamnějšími příklady přirozeně se vyskytujících alkalických prostředí jsou prostředí obsahující sodu. Jedná se o pouště nebo jezera, např. jezero Magadi v Keni. Mnoho organismů izolovaných z alkalického prostředí vyžaduje také vyšší koncentraci soli v prostředí, čehož se

dosáhne přidáním NaCl k izolačnímu médiu. Zejména alkalická hypersalinní prostředí jsou obydlena alkalofilními zástupci halofilních archaeí. Buňky těchto organismů obsahují plynové váčky ve stacionární fázi růstu, jsou červeně zbarveny. Jsou známy také alkalofilní sinice a metenogenní organismy [7].

Kyselé prostředí je velmi zajímavé, protože obecně platí, že nízké hodnoty pH prostředí mohou být důsledkem mikrobiálního metabolismu. Acidofily jsou organismy žijící v prostředích, kde se hodnoty pH nachází v rozmezí 1–5. Můžeme je nalézt například v prostředí kyseliny sírové, v gejzírech nebo dokonce ve vlastním žaludku [8].

Za normálních okolností vysoké koncentrace kyseliny ničí buňky. Acidofily si ovšem vyvinuly řadu specializovaných mechanismů, aby bylo udrženo jejich vnitřní pH na neutrální úrovni. Jsou známy pasivní i aktivní regulace. Pasivní regulace spočívá hlavně v propustnosti membrány proti nepříznivým podmínkám. Některé mikroorganismy vytváří biofilm, který zpomaluje difúzi jednoduchých kyselin do buňky. Jiné jsou schopny do své membrány začlenit látky, jako jsou mastné kyseliny, které buňku chrání. Dalším pasivním způsobem regulace je vylučování tlumivých roztoků [8].

Některé mikroorganismy si vyvinuly účinnou regulaci pH. Spočívá ve schopnosti pumpovat vodíkové ionty z jejich buněk konstantní vysokou rychlostí. Díky tomu jsou schopny udržet své vnitřní pH v rozmezí hodnot 6,5 až 7 [8].

2.2.2 Teplotní stres

Teplota je dalším kritickým parametrem. Určuje, zda je přítomná voda v kapalném skupenství. Pokud je teplota příliš nízká, dochází ke snížení membránové fluidity a zpomalení enzymatické aktivity. Vysoké teploty mohou způsobit nevratnou změnu struktury biomolekul, např. proteinů. Zvyšuje se membránová fluidita. Rozpustnost plynu obvykle negativně koreluje s teplotou, což činí potíže při vysokých teplotách pro vodní organismy, které vyžadují kyslík nebo oxid uhličitý [9].

Rozlišujeme teplotní stres způsobený extrémně nízkou či vysokou teplotou. Psychrofilny definujeme jako organismy, jejichž optimální teplota pro růst je 15 °C a méně. Maximální teplota pro růst byla stanovena na asi 20 °C, minimální na 0 °C i méně. Nejnížší zaznamenaná teplota optimální pro aktivní mikrobiální společenstva byla –18 °C [10].

Zmrazení vody uvnitř buňky u mnohobuněčných organismů vždy vede ke smrti. Jedinou přírodní výjimkou je hlístice *Panagrolaimus Davidi*, která má schopnost takovéto zmrazení přežít. Mechanismy, které pomáhají přežít zmrazení, musí zahrnovat i mechanismy, které pomáhají přežít rozmrazování. Jsou syntetizovány tzv. nemrznoucí proteiny či nemrznoucí molekuly. Ty mohou snížit bod tuhnutí vody na –9 °C až –18 °C [9].

Mezi další změny v buňkách, které dovolují přežít v těchto nepříznivých podmínkách, řadíme změny ve struktuře enzymů. Tekutost buněčných membrán se snižuje s teplotou. Zjednodušeně řečeno, psychrofilny vykazují zvýšený poměr nenasycených mastných kyselin k nasyceným mastným kyselinám. Tím se zachovává požadovaná pružnost membrány [9].

Všechny teplomilné mikroorganismy vyžadují prostředí horké vody. Některým se daří ve více než jednom extrémě, např. prostředí s vysokým obsahem síry, uhličitanu vápenatého, apod. Schopnost termofilů přežít v horkém prostředí spočívá v tom, že obsahují tzv. extremozymy, což jsou enzymy specializované na práci při extrémně vysokých teplotách. Aminokyseliny těchto enzymů mají speciální strategie, jak udržet svou strukturu stálou i ve vysoké teplotě, kdy by jiné enzymy nebyly schopny další existence [10]. Stabilita nukleových kyselin je zvýšena přítomností solí, která chrání DNA před zničením [9].

2.2.3 Tlak

Tlak má podstatný vliv na fyziologii a biochemii živých buněk. Mikroorganismy obývající hlubinné plochy a plochy podpovrchové mají schopnost přežít v prostředí s hydrostatickým a lithostatickým tlakem, které jsou vyšší než 1 atmosféra [11]. Studie barotolerantních organismů (organismy, které snáší vysoký tlak) a barofilních organismů (organismy závislé na vysokém tlaku) ukázaly, že oba tyto typy jsou přítomny v hlubinných prostředích a distribuce těchto organismů je funkcí hloubky [9].

2.2.4 Vodní stres

Prostředí bez vody jsou ta, kde je běžné vysoušení. Voda zde představuje vzácný zdroj. U takovýchto prostředí bývají teploty buď velmi vysoké nebo extrémně nízké. Tento extrémní ekosystém je také chápán jako potenciální analog pro případný život na Marsu [12].

V nepřítomnosti vody dochází k poškození struktury lipidů, proteinů a nukleových kyselin [12]. Tzv. anhydrobiosis je strategie užívaná organismy pro přežití v suchu. V buňkách je obsaženo pouze minimální množství vody. Nedochozí k žádné metabolické aktivitě. Během vysoušení dochází k tomu, že se zvyšuje koncentrace látek v důsledku snižování objemu vody. Zvýšení koncentrace látek vede ke stresové odpovědi v buňce. Tento mechanismus je podobný jako při vystavení buňky vysokým koncentracím solí [9].

2.3 Způsoby adaptace halofilních mikroorganismů

K přežití mikroorganismů v hypersalinních prostředích musely být vyvinuty různé mechanismy či úpravy polymerů, které je chrání před těmito nepříznivými podmínkami [14]. Základní mechanismy byly již představeny v kapitole 2.1.1, v následujícím textu budou rozvedeny podrobněji.

2.3.1 Osmoregulace

Udržování osmotické rovnováhy a ochrana proteinů před vyšší koncentrací soli jsou důležité pro život organismů [15]. Mikroorganismy, které jsou vystaveny slanému prostředí, musí mít mechanismus bránící úniku vody osmózou [16]. Výrazné rozdíly v mechanismu přizpůsobení velkému osmotickému tlaku, který byl vyvolán médiem s vysokou koncentrací soli, pozorujeme u halofilních a halotolerantních mikroorganismů [17]. Cytoplazmatická membrána je pro vodu volně propustná. Cytoplazma proto musí být adaptována tak, aby měla stejný osmotický potenciál jako má extracelulární prostředí. V mikrobiálním světě jsou známy dvě hlavní strategie [16]. V obou případech bylo zkoumáno, že jsou ionty Na^+ co nejvíce

vyučovány z cytoplazmatické membrány. Jelikož Na^+ ionty narušují funkčnost buněk, všechny haloofilní mikroorganismy obsahují účinný transportní mechanismus, obvykle založený na antiportu Na^+/H^+ , který pomáhá k odstranění Na^+ z buňky [17].

První strategie je založena na kumulaci K^+ a Cl^- iontů v buňkách, což napomáhá k udržení osmotické rovnováhy. Halobakterie jsou schopny ve svých buňkách kumulovat KCl až do koncentrace 5 mol/l. Tato koncentrace je ovlivněna koncentrací NaCl v médiu. Zdá se, že všechny halobakterie disponují chloridovou pumpou. Tento systém může být nezávislý na světle s efluxem Na^+ nebo také na světle závislý. Systém závislý na světle, dovnitř řízené čerpadlo-halorhodopsin, funguje na bázi sítnice. Ionty draslíku pasivně vstupují do buňky v důsledku chloridového gradientu. Je ovšem zapojen také aktivní transport. Jelikož halobakterie rostou dobře také ve tmě, musí mít na světle nezávislé mechanismy, které udržují rovnováhu iontů. Iontová rovnováha je udržována odstraněním Na^+ z cytoplazmy a akumulací K^+ pomocí Na^+/H^+ antiportu a K^+ symportu [17] [18].

Komponenty buněk kumulujících K^+ musí být speciálně adaptovány, aby byly schopny přežít velmi vysokou hladinu iontů [16]. Především proteiny v cytoplazmě musí být chráněny před denaturací. Toho je dosaženo adaptativní změnou složení aminokyselin. Většina proteinů haloarchaeí obsahuje malé množství hydrofobních zbytků a velké množství kyselých aminokyselin, které jsou schopné vázat kationty pro zachování hydratovaného obalu buňky. V důsledku toho je obvyklé, že proteiny haloarcheí mají izoelektrický bod v kyselé oblasti v rozmezí hodnot pH 4 až 5 [15].

Druhá strategie přizpůsobení osmotického tlaku je založena na vyloučení soli z cytoplazmy a akumulaci organických látek pro udržení rovnováhy [17]. Využívá se malých organických molekul. Těmito organickými molekulami jsou například glycinbetain, polyoly, cukry. Tak je zajištěna rovnováha koncentrace soli mezi buňkou a prostředím. Pro tento mechanismus není vyžadována změna proteomu [15].

U řas, kvasinek či hub hraje významnou roli glycerol. U prokaryot je jeho role omezena. Všechny prokaryotické osmolyty jsou vysoce polární a nenabitě za normálních podmínek. Obsahují obvyklé strukturní motivy, zejména deriváty aminokyselin. Mezi osmolyty patří cukry (například trehalóza), jejich polyol deriváty, glycinbetain, tetrahydropyrimidiny (ektoiny), alfa-aminokyseliny (prolin, glutamin), N-acetylované diaminokyseliny a další [14].

Glycinbetain (N,N,N-trimethylglycin) je produkován fototrofními bakteriemi. Bývá akumulován z prostředí jako osmolyt. Vzniká z cholinu oxidací, nebo methylací glycinu [18]. Vzhledem k velkému rozvoji fototrofních bakterií je hojný v hypersalinním prostředí. Může sloužit jako substrát organotrofním bakteriím [14].

2.3.2 Proteiny

Přežití halofilů v prostředích s vysokou koncentrací solí vyžaduje úpravu jejich proteinů. Proteiny jim umožňují zůstat stabilními a funkčními v hypersalinním prostředí. Sůl má významný vliv na rozpustnost, stabilitu a konformaci proteinů, což úzce souvisí se schopností

proteinu správně fungovat. Jak již bylo zmíněno, organismy žijící v extrémně slaných prostředích mají dva hlavní způsoby adaptace. Jedním způsobem je zabránění vstupu NaCl do buňky tvorbou malých organických molekul. Druhým je kumulace K^+ a Cl^- iontů v buňkách [15] [19].

Při vysoké koncentraci soli je omezená dostupnost vody k proteinu, protože je obklopen iontovou mřížkou soli. Nižší dostupnost vody může vést k dehydrataci a agregaci hydrofobních aminokyselin [15] [19].

Jedním z nejvýznamnějších rozdílů mezi haloofilními a nehaloofilními proteiny je vysoký nárůst kyselých zbytků, jako jsou glutamová kyselina a asparagová kyselina, na povrchu proteinu. Existuje celá řada vysvětlení role těchto kyselých zbytků. Má se za to, že zvýšený záporný náboj na povrchu proteinu mu umožňuje soutěžit s různými ionty o molekuly vody, a tedy udržení proteinu v roztoku. Toto je podporováno krystalovou strukturou haloofilních proteinů, které umožňují tvorbu vodíkových vazeb s těmito kyselými zbytky na povrchu proteinu. Bioinformativní analýza také ukázala, že sekvence u haloofilních proteinů obsahuje méně serinu. Serin sice dobře interaguje s vodou, ale jeho konkurenční schopnost vůči iontům je chabá. Proto se předpokládá, že je méně vhodný [15].

Alternativním vysvětlením je to, že kyselé zbytky vážou hydratované kationty, čímž tvoří stálou hydratovanou skořápku okolo proteinu. Krystalové struktury vykazují specifické vazby mezi kationtem a proteinem. Prevalence této vazby není dobře srozumitelná. Zejména proto, že krystalové struktury haloofilních proteinů nejsou schopné dobře rozlišovat molekuly soli a vody, protože obě tyto molekuly mají 10 elektronů [15].

Podle některých bioinformačních studií se haloofilní proteiny kromě většího počtu kyselých zbytků liší od proteinů mezofilních bakterií odlišným obsahem hydrofobních zbytků v sekvenci proteinů. Za využití známé krystalové struktury 15 párů haloofilních a nehaloofilních proteinů bylo zjištěno, že hydrofobní kontakt v jádře haloofilních proteinů, které je vystaveno molární koncentraci anorganických solí, je trvale menší než u mezofilních proteinů. Ale je zajímavé, že tohle neplatí pro proteiny haloofilních bakterií, které jsou vystaveny molární koncentraci anorganických solí. Předpokládá se, že nižší hydrofobní kontakt v jádře může vyvážit zvýšenou pevnost hydrofobních interakcí v prostředí s vysokou koncentrací soli. Většina haloofilních proteinů obsahuje menší aromatické hydrofobní aminokyseliny. V homologicky modelové struktuře haloofilní dihydrofolát reduktázy byl zjištěn nižší obsah velkých hydrofobních aminokyselin a redukce enzymového jádra. Slabší hydrofobní interakce v důsledku menšího počtu hydrofobních zbytků může zvýšit flexibilitu proteinů v prostředí s vysokým obsahem soli, protože brání hydrofobnímu jádru stát se příliš rigidním [15].

2.3.2.1 Tvorba proteinů závislá na koncentraci soli

Významným pokrokem v porozumění adaptace haloofilních proteinů bylo zjištění, že se proteiny spoléhají při své tvorbě na přítomnost soli. Tento objev ukazuje, že adaptace haloofilů na své prostředí není založena jen na obsahu proteinů, které mají schopnost udržet svou aktivitu i v hypersalinním prostředí, ale ve skutečnosti haloofilní mikroorganismy potřebují sůl ke své

funkčnosti. Studie cysteinyl-tRNA syntetázy u *Halobacterium salinarum* NRC-1 ukazuje, jak nejen složení enzymu závisí na zvyšující se koncentraci soli, ale také se enzym stává stabilnější a je chráněn před tepelnou denaturací [15].

Tvorba proteinů závislá na koncentraci soli v médiu může být důležitá pro časné proteiny. Typické úpravy aminokyselin, které pozorujeme u halofilů, byly objeveny nedávno také ve struktuře vykonstruovaných prebiotických proteinů. Těmito typickými úpravami myslíme zvýšení obsahu kyselých zbytků a snížení obsahu hydrofobních aminokyselin, jak již bylo zmíněno. Nyní je známo deset aminokyselin, které ke své tvorbě nepotřebují biosyntetickou dráhu. Patří mezi ně alanin, glycin, isoleucin, leucin, kyselina asparagová, kyselina glutamová, prolin, serin, threonin a valin. Výzkum Longa a spol. ukázal, že mechanismus tvorby těchto aminokyselin vede k proteinu s halofilní funkcí a můžou využívat soli ke své tvorbě. To naznačuje, že halofilní prostředí může být důležité pro biogenezi [15].

2.3.3 Buněčná stěna a S-vrstva

Archaea se od domény bakterií liší mimo jiné také nepřítomností peptidoglykanu a periplazmatického prostoru. Membrány extrémních halofilů charakterizuje množství fosfatidylglycerol methylfosfátu (PGP-Me). PGP-Me obsahuje 50-80 % polárních lipidů. Membrány jsou také charakterizovány absencí fosfolipidů s cholinem, inositolem, serinem a ethanolaminem. Tyto membrány jsou stabilní při koncentraci soli NaCl v rozmezí 3-5 M [20].

Většina archaeí má bílkovinnou S-vrstvu, jen výjimečně mají polysacharidovou buněčnou stěnu. K těmto výjimkám patří rod *Halococcus*. Jeho silnou buněčnou stěnu tvoří komplex heteropolysacharidu, který obsahuje velké množství sulfátových zbytků a neobvyklé komponenty, jako jsou N-acetylglukosaminuronová kyselina a N-glycyl substituovaný glukosaminovými zbytky [15].

Bílkovinná S-vrstva poskytuje vysokou pevnost obalu [21]. Jedná se o jednoduchou vrstvu hexagonálně uspořádaných podjednotek polymeru vně cytoplazmatické membrány [14]. Obdobně jako většina bílkovinných složek haloarchaeí je i tato vrstva bohatá na obsah kyselých zbytků v porovnání s nehalofily [22].

2.3.4 Genom haloarcheí

Haloarchaea obsahují především jeden hlavní chromosom s vysokým obsahem GC, jeho obsah je vyšší než 60 %, s jedním až osmi menšími replikony, u kterých je obsah GC nižší [23]. Vysoký obsah GC s velkou pravděpodobností pomáhá zabránit formování tyminových dimerů, které je vyvolané UV zářením, a možnosti akumulace mutací [24].

Obecně má genom halofilních mikroorganismů vyšší obsah GA/TC, CG a AC/GT dinukleotidů. Bylo zjištěno, že na druhé pozici kodonu genů se nejčastěji vyskytuje 14 dinukleotidů GA, GT a AC. Tento zvýšený výskyt dinukleotidů má zřejmě souvislost s výskytem Asp, Glu, Thr a Val zbytků v proteinech [25].

2.3.5 Karotenoidy

Pro halofily je typická produkce karotenoidů, červenooranžových barviv. Jsou nezbytné pro opravu tyminových dimerů. Mezi nejčastěji se vyskytující karotenoidy řadíme C₅₀ bakterioruberiny. Mimo to se mohou vyskytovat také menší množství meziproductů β-karotenu a lykopenu [25].

2.3.6 Retinalové proteiny

Retinalované proteiny vznikají oxidativním štěpením β-karotenu. Retinalové proteiny slouží jako fotoreceptory nebo iontové pumpy závislé na světle. Jsou popsány čtyři skupiny retinalových proteinů, a to bakteriorhodopsin, halorhodopsin, senzoričtý rhodopsin Is a senzoričtý rhodopsin II [25] [26].

Senzoričtý rhodopsin Is slouží ke zprostředkování negativní a pozitivní fototaxe. Rhodopsin IIs zprostředkovává pouze negativní fototaxi. Halorhodopsin má funkci chloridové pumpy. Retinal na sebe váže chloridové anionty, přenáší je do buňky a tam se chlorid může akumulovat v cytoplazmě. Bakteriorhodopsin patří mezi membránové proteiny. Jedná se o protein vytvářený za světla. Byl zkoumán například u *Halobacterium salinarum*. Bakteriorhodopsin se vyznačuje purpurovým zbarvením. Jeho rozmístění v cytoplazmě není rovnoměrné [26].

Potenciální revoluční retinalový protein zvaný bakteriorhodopsin je využíván v buněčné membráně halobakterií jako transmembránová, světlem řízená, protonová pumpa. Bakteriorhodopsin, který se vyskytuje pouze u velmi halofilních archaeí, se skládá z proteinu opsinu a fialové sítnice, molekuly absorbující světlo. Když vyzářený foton narazí na bakteriorhodopsin, retinal izomerizuje z all-trans na 13-cis formu a následně se tepelně rozkládá přes několik kroků zpět do původního stavu. Během tohoto procesu se přemisťuje proton přes buněčnou membránu ven z buňky. Bakteriorhodopsin vytváří protonový gradient, který může využít ATPáza pro syntézu ATP za anaerobních podmínek. Kromě syntézy ATP může být elektrochemický gradient využit také k řízení exportu iontů Na⁺ a importu K⁺ a živin [15].

2.3.7 Plynové vezikuly

Plynové vezikuly slouží k regulaci vznášivé hustoty. Umožňují buňce pohyb ve vodním prostředí nebo přizpůsobují hustotu buňky tak, aby se pohybovala v zónách vhodných pro život [15]. Plynové vezikuly zaujímají vřetenovitý nebo válcovitý tvar s kuželovými konci. Jejich šířka se pohybuje okolo 200 nm a délka v rozmezí od 400 do 1500 nm [27].

Hlavní složkou vezikulu je malý hydrofobní protein (GvpA) vytvářející semikrystalické spirálovité lamely, které jsou kolmé k podélné ose plynového vezikula. Další složkou je strukturální protein (GvpC) obsahující vnitřní aminokyselinové repetice. Hraje roli při určování tvaru vezikulu. Vezikuly mohou také obsahovat proteiny s regulační funkcí [27].

2.3.8 Halocin

Halociny jsou proteinová antibiotika produkovaná členy extrémních halofilů z domény archaea. Jsou externalizovány do prostředí, kde zabíjí nebo inhibují jiné haloarcheony. Halociny jsou

v podstatě ekvivalenty proteinů antibiotik zvaných bakteriociny, které jsou produkovány některými rody domény bakterií. Ačkoli archeony sdílí s bakteriemi stejnou prokaryotickou jadernou strukturu a morfologický motiv, jsou samostatnou doménou a jsou pouze vzdáleně příbuzné. V důsledku toho, halociny a jiná proteinová antibiotika produkováná mikroorganismy z domény archaea jsou více příhodně klasifikovány jako „archeociny“ než jako „bakteriociny“ [27].

Halociny můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin podle velikosti. Většina je složena z proteinů o molekulové hmotnosti 30 až 35 kDa. Malé peptidy s molekulovou hmotností 5 až 10 kDa označujeme jako mikrocin. Obě tyto skupiny jsou citlivé na působení proteáz. Halocin je obvykle aktivní u kultur na počátku stacionární fáze [27].

I přes hojnost halocinů je jen hrstka charakterizována na úrovni proteinů (např. halociny H6, H4 a R1). Pouze jeden halocin (H4) byl charakterizován jak na úrovni genu, tak na úrovni mRNA transkripce. Mechanismus účinku byl stanoven pouze pro halocin H6. Gen halocinu H4 a nyní i halocinu S8 slouží jako užitečný model pro studium exprese genů halobakterií ve stacionární fázi [27].

2.3.9 Extracelulární polysacharid

Extracelulární polysacharidy (EPS) jsou vylučovány některými bakteriemi na vnější straně buněčných stěn. Vyskytují se ve dvou základních formách, a to jako kapsle, kdy je polymer úzce spojen s povrchem buňky, nebo jako sliz volně asociovaný na povrch buňky. Jejich složení a struktura jsou velmi různorodé, může se jednat o homopolysacharidy, ale také heteropolysacharidy. Mohou obsahovat řadu různých anorganických i organických složek. Většina homopolysacharidů představuje neutrální glukany, zatímco převaha heteropolysacharidů má povahu polyanionovou kvůli přítomnosti kyseliny uronové. Kromě toho může být záporný náboj zapříčiněn například přítomností sulfátových či fosfátových skupin. EPS působí jako adhezní činidla a podporují interakce a buněčné sdružování mezi mikroorganismy, jsou důležité při tvorbě biofilmu. Podílí se na ochraně bakterií před škodlivými vlivy prostředí a na přilnavosti k povrchům [28] [29].

V oblasti biotechnologií EPS vyvolaly velký zájem kvůli široké škále potenciálních aplikací. Mohou být využívány v oblastech jako je farmacie, potravinářství, kosmetika či ropný průmysl. Zde mohou být použity jako emulgační, viskózní, suspenzační a chelatační činidla. Během posledních 50 let bylo popsáno značné množství EPS. Komerční úspěchy však nebyly velké. Buď nebyly nabídnuty lepší vlastnosti než jaké jsou již na trhu, nebo se vyskytly potíže při hledání nových aplikací [28] [29].

2.3.10 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou intracelulární sloučeniny akumulované jako energetické rezervy mnoha mikroorganismy za určitých stresových podmínek. Řadí se k lineárním polyesterům. Jedná se o 2- až 6-hydroxyalkanoáty. Esterová vazba se nachází mezi hydroxylovou skupinou řetězce jednoho monomeru a karboxylovou skupinou druhého monomeru. Značné množství bakterií hromadí PHA ve formě granulí, když je zásoba uhlíku

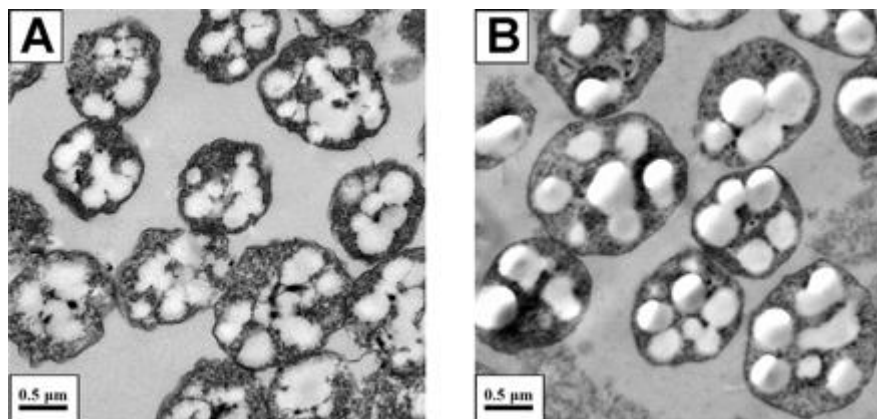
nadbytečná a zároveň přísun dalších esenciálních látek pro buněčný růst není dostatečný. Mezi tyto esenciální látky patří například forfor, síra, hořčík či kyslík. Pokud je poté mikroorganismus vystaven stresovým podmínkám a dochází k omezení přísunu energie, dochází k využití rezervního zdroje ve formě granulí PHA [30] [31].

Pozornost věnovaná PHA je dána jeho vlastnostmi, kterými se podobá petrochemickým plastům. Významná je jeho biokompatibilita a úplná biologická rozložitelnost. Mikrobiální aktivita v přírodním prostředí pomáhá k rozkladu bioplastů za uvolnění oxidu uhličitého a vody nebo methanu za aerobních a anaerobních podmínek. Nejběžnější formou syntetizovaných PHA je poly(3-hydroxybutyrát), PHB. Jeho nepříznivými vlastnostmi jsou vysoká krystalinita, křehkost, tuhost. Nicméně, pokud tyto PHB mají vysokou molekulovou hmotnost, mohou být zpracovány s dobrými vlastnostmi. Pro zlepšení polymerních vlastností se vytváří kopolymery s látkami, jako je například 3-hydroxyvalerát, 3-hydroxyhexanoát či 4-hydroxybutyrát [30] [31].

2.4 Způsoby adaptace – *Haloferox mediterranei*

Haloferox mediterranei je extrémně halofilní mikroorganismus patřící k rodu *Halobacteriaceae* domény Archaea. Roste rychleji než většina ostatních členů *Halobacteriaceae* a vykazuje pozoruhodnou metabolickou účinnost a stabilitu genomu při vysokých koncentracích solí. Díky těmto vlastnostem slouží jako dobrý model pro studium fyziologie a metabolismu haloarcheí [32].

Je znám kvůli produkci poly- β -butyrátu (PHB) ve formě intracelulárních granulí ve velkém množství. Jedná se o zajímavý biopolymer s potenciálním využitím jako biologicky rozložitelný termoplast. Jako zdroje uhlíku pro biosyntézu PHB slouží škrob či glukóza [33]. *Haloferox mediterranei* je schopen akumulovat také PHBV z mnoha jednoduchých zdrojů uhlíku. Jedná se o kopolymer PHB s valerátem. U *H. mediterranei* byly nalezeny dva klíčové enzymy (PhaEC a Phab) a strukturální protein (Phap) podílející se na biosyntéze PHBV [32].



Obrázek 2: Akumulace PHBV granulí u *H. mediterranei* [32]

Extrémně halofilní archaea *Haloferox mediterranei* mimo jiné produkuje také extracelulární sulfatovaný polysacharid. Extracelulární bipolymer dává koloniím typický slizký charakter a je zodpovědný za vzhled povrchové vrstvy. Má velmi dobré reologické vlastnosti. Vyznačuje se

velkou odolností vůči vlivům okolního prostředí, včetně vysoké koncentrace soli. Pro produkci EPS je vyžadován cukr jako zdroj uhlíku [33] [34].

Hlavní složkou heteropolysacharidu je manóza, glukózy, galaktózy a další neidentifikované cukry jsou součástí tohoto polymeru. Nachází se zde značné množství sulfátových skupin, které jsou zodpovědné za kyselou povahu polymeru. Byla prokázána nepřítomnost acylových skupin. Neobvyklá je přítomnost kyseliny uronové [34].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie, mikroorganismy a přístroje

3.1.1 Použité chemikálie

Nutriet Broth (Himedia)

Peptone (Himedia)

Propidium jodid (eBioscience)

Anthron (Sigma Aldrich)

Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a. a vyšší.

3.1.2 Použité přístroje

Průtokový cytometr, Apogee A50, Apogee Flow Systems

Analytické váhy, Boeco

Laminární box Aura mini, Bio air instrument

Centrifuga U-32R, Boeco

Centrifuga Sigma, Sartorius

Předvážky EW 620, Kern

Vortex TK3S, techno Kartell

Temperovaná třepačka, Heidolph Unimax 1010, Labicom s.r.o (ČR)

Spektrofotometr Helios δ , Unicam

Ultrafiltrační aparatura KrosFlo, Spectrum Labs (GRC)

Elementární analyzátor EA 3000

FTIR spektrometr Nicolet iS50 s Ramanovským modulem

Běžné laboratorní sklo a pomůcky

3.1.3 Využité mikroorganismy

V experimentální části byla využita kultura archeálního kmene *Haloferax mediterranei* DSM 1411. Tato kultura byla získána z Liebnitz institutu, Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur Braunschweig. Dále byla použita bakterie *Cupriavidus necator H16*, která byla získána z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně (CCM 3726). Také byla použita kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, která byla získána ze sbírky CCM 8191 v Bratislavě.

3.2 Kultivace mikroorganismů

3.2.1 Kultivace *Haloferax mediterranei*

Inokulum *Haloferax mediterranei* bylo připraveno v objemu 50 ml do 100 ml Erlenmeyerových baněk. Následná kultivace probíhala na temperované třepačce po dobu 4 dní při teplotě 37 °C.

Pro přípravu inokula bylo připraveno následující živné médium, které bylo použito také jako produkční.

NaCl	150 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,69 g
KCl	4 g
NH ₄ FeIII citrát	0,063 g
SL6	1,25 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	20 g
NaHCO ₃	0,25 g
NaBr	0,5 g
Kvasnicový extrakt	6,25 g
Glukóza	30 g
Destilovaná voda	1000 ml

Připravené médium bylo autoklávováno při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Roztoky stopových prvků a glukózy byly autoklávovány při teplotě 115 °C a byly k médiu přidány až po sterilaci média v laminárním boxu.

3.2.2 Kultivace *Cupriavidus necator* H16

Inokulum *Cupriavidus necator* H16 bylo připraveno v objemu 100 ml do 200 ml Erlenmeyerových baněk. Následná kultivace probíhala na temperované třepačce po dobu 3 dnů při teplotě 30 °C.

Pro přípravu inokula bylo připraveno následující živné médium, které bylo použito také jako produkční.

(NH ₄)SO ₄	3 g
KH ₂ PO ₄	1,02 g
Na ₂ HPO ₄	11,1 g
MgSO ₄	0,063 g
Roztok stopových prvků*	1 ml
Fruktóza	20 g
Destilovaná voda	1000 ml

*Roztok stopových prvků

FeCl ₃ ·6H ₂ O	9,7 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	7,8 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,156 g
CoCl ₂ ·2H ₂ O	0,119 g
NiCl ₂ ·4H ₂ O	0,118 g
0,1 M HCl	1000 ml

3.2.3 Kultivace *Saccharomyces cerevisiae*

Inokulum pro *Saccharomyces cerevisiae* bylo připraveno v objemu 150 ml do 300 ml Erlenmeyerových baněk. Následná kultivace probíhala na temperované třepačce při teplotě 32 °C po dobu 24 hodin.

Pro přípravu inokula bylo připraveno následující živné médium, které bylo použito také jako produkční.

Kvasnicový extrakt	10 g
Bakteriální pepton	20 g
D-glukóza	20 g
Destilovaná voda	1000 ml

3.3 Izolace extracelulárního polysacharidu

Pro izolaci EPS produkovaného archeálním kmenem *Haloferax mediterranei* bylo připraveno celkem 1200 ml výše zmíněného média, do kterého byl mikroorganismus naočkovan. Inokulum bylo připraveno v objemu 200 ml do šesti 500 ml Erlenmeyerových baněk. Následná kultivace probíhala na termostátované třepačce při teplotě 37 °C po dobu 4 dní.

Po čtyřdenní kultivaci byla provedena izolace. Ze supernatantu, který byl získán centrifugací biomasy, bylo odpipetováno 200 ml vzorku do předem zvážených centrifugačních zkumavek. Následně bylo přidáno 400 ml vychlazeného ethanolu. Směs byla protřepána, čímž došlo k vysrážení extracelulárního polysacharidu. Vzorek byl opět centrifugován při 9000 ot/min po dobu 3 min. Byla odlita kapalná část. Vysrážený EPS byl rozpuštěn v destilované vodě a opět vysrážen ethanolem v poměru 1:2. Poté byl vzorek centrifugován za výše uvedených podmínek. Proces čištění byl zopakován a tímto postupem byl vyisolován polysacharid z celého objemu 1200 ml.

K izolaci extracelulárních polysacharidů z média bylo následně využito ultradialýzy KrosFlo. Ultradialýza byla využita za účelem odstranění NaCl, který se v produkčním médiu nacházel v koncentraci 150 g/l, a dalších komponent nacházejících se v médiu. Produkční médium, které bylo zbaveno buněk, bylo dialyzováno přes membránu o velikosti pórů 5 kDa. Následně byl extracelulární polysacharid lyofilizován pro další studium.

3.4 Studium extracelulárního polysacharidu

Archeální kmen *Haloferax mediterranei* je znám pro produkci extracelulárního aniontového polysacharidu s vysokou molekulovou hmotností, což má za následek typický viskózní charakter. EPS představuje sulfatovaný polysacharid, které se skládá z opakujících se trisacharidových jednotek. Trisacharidovou jednotku tvoří manóza se dvěma skupinami kyseliny 2-acetamido-2-deoxyglukuronové (GlcNAcA). Přítomna je sulfoesterová vazba, která se nachází na třetím uhlíku druhé molekuly GlcNAcA [34].

3.4.1 Stanovení celkových sacharidů pomocí Anthronovy metody

Nejdříve byl připraven roztok kyseliny sírové o koncentraci 75 obj. %. Poté byl připraven roztok anthronu. Bylo naváženo 0,5 g anthronu do malé kádinky s 10 ml absolutního ethanolu, anthron byl rozpuštěn. Tento roztok byl přidán do 250 ml odměrné baňky a doplněn předem připraveným roztokem 75% kyseliny sírové.

Pro sestrojení kalibrační křivky byl připraven zásobní roztok glukózy o koncentraci 100 mg/l, ze kterého byla připravena kalibrační sada roztoků dle tabulky:

Tabulka 1: Anthronova metoda – kalibrační křivka

Objem destilované vody	Objem roztoku glukózy	Výsledná koncentrace
10 ml	0 ml	0 mg/l
8 ml	2 ml	20 mg/l
6 ml	4 ml	40 mg/l
4 ml	6 ml	60 mg/l
2 ml	8 ml	80 mg/l
0 ml	10 ml	100 mg/l

Z každého připraveného roztoku byl odpipetován 1 ml do zkumavky. Poté byly přidány 2 ml 75% roztoku kyseliny sírové. Následně byly přidány 4 ml roztoku anthronu. Směs byla důkladně promíchána, zahřata na teplotu 100 °C po dobu 15 min a po ochlazení na pokojovou teplotu byla změřena absorbance všech roztoků na spektrofotometru při vlnové délce 578 nm. Jako blank sloužil roztok s koncentrací glukózy 0 mg/l.

Obdobně byly připraveny vzorky pro měření. Z každého vzorku byl odpipetován 1 ml, k němuž byly přidány 2 ml 75% kyseliny sírové a 4 ml roztoku anthronu a důkladně promíchány. Jelikož byly vzorky příliš koncentrované, byly 10krát naředěny. Vzorky byly zahřaty na teplotu 100 °C po dobu 15 min a po ochlazení na pokojovou teplotu také měřeny na spektrofotometru při vlnové délce 578 nm.

3.4.2 Infračervená a Ramanova spektroskopie

Pro analýzu pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) a Ramanovy spektroskopie byl využit přístroj (Nicolet iS50). Při stanovení IČ spektra byla využita metoda úplného zeslabeného odrazu (jednodrazový diamantový ATR nástavec), Ramanovo spektrum bylo měřeno ve speciálním aditivním modulu.

3.4.3 Prvková elementární analýza

Prvková analýza byla provedena na elementárním analyzátoru EA 3000, kde jednotlivé plynné složky generované ve spalovacím reaktoru jsou separovány za pomoci principu plynové chromatografie a následně jsou detekovány vysoce citlivým teplotně vodivostním detektorem (TCD). Byly stanovovány prvky C, H, N, S, obsah O byl stanoven dopočítáním.

3.5 Výsev na pevné médium

Nejdříve byly připraveny agarové plotny pro následný růst kultur. Bylo připraveno živné médium pro mikroorganismus *Haloferax mediteranei*, jehož složení je uvedeno v kapitole 3.2.1, do kterého bylo přidáno 5 g agaru na 250 ml živného média. Roztok byl po dobu 45 minut sterilován v tlakovém hrnci. Roztok stopových prvků a glukózy byl přidán po sterilaci ve sterilním boxu. Následně byl tento roztok rozlit ve sterilním boxu do Petriho misek.

Pro studium viability byly připraveny dva vzorky, kdy jeden vzorek byl vystaven stresovému faktoru – vysoké teplotě, který je uveden v kapitole 3.6.1.1. Druhým vzorkem byla kultura, která nebyla vystavena žádnému stresovému faktoru. Oba vzorky byly naředěny desítkovým

ředěním 100krát, 1000krát a 10000krát. Následně bylo odpipetováno 0,1 ml každého vzorku a sterilní hokejkou byl proveden roztěr vždy 2krát pro každé ředění daného vzorku.

3.6 Stanovení viability pomocí průtokového cytometru

Stanovení viability lze provést několika způsoby. Jedním způsobem je stanovení životaschopnosti výsevem na pevné médium. Metoda je však časově náročná. Principem stanovení viability je detekce životně důležitých funkcí. Životně důležité funkce mohou být sledovány pomocí selektivního značení fluorescenčními sondami. Pro sledování buněk můžeme kromě fluorescenčního mikroskopu použít také například průtokovou cytometrii. Stanovení viability bylo provedeno pomocí průtokového cytometru, což je moderní přístroj umožňující studovat buňky jednotlivě. Dává nám informace o velikosti a granulovitosti buněk prostřednictvím měření rozptylu světla v přímém a bočním směru. Pomocí barvení fluorescenční sondou, interkalačním činidlem, a následným měřením fluorescence lze stanovit viabilitu. Jako fluorescenční sonda byl použit propidium jodid. Interkalační činidlo, které vstupuje zejména do mrtvých buněk, které mají porušenou membránu [35].

3.6.1 Stresová odolnost mikroorganismu *Haloferox mediterranei*

Jedním z cílů mé práce bylo studovat stresovou odolnost archeálního kmene *Haloferox mediterranei*. Pro každé měření byly připraveny dva vzorky. První vzorek představoval 1 ml kultury. Druhý vzorek byl připraven centrifugací 1 ml kultury. Poté byl slit supernatant a k usazenině byl přidán 1 ml roztoku PBS* s koncentrací soli 150 g/l a vzorek byl rozsuspendován pomocí vortexu. Oba tyto vzorky byly vystaveny stejným stresovým podmínkám. Poté byla stanovena viabilita obou vzorků pomocí průtokového cytometru.

* Složení pufru PBS

NaC	18 g/l
KCl	0,2 g/l
KH ₂ PO ₄	0,24 g/l
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,44 g/l
Destilovaná voda	1000 ml

3.6.1.1 Teplotní stres – vysoká teplota

Nejdříve byly připraveny vzorky kultury v živném médiu a v roztoku PBS do dvou mikrozkuvek. Poté byly oba vzorky uloženy do vodní lázně a vystaveny varu po dobu 10 min. Poté byly oba vzorky zcentrifugovány, byl slit supernatant a byl přidán 1 ml roztoku PBS s koncentrací soli 150 g/l, vzorky byly rozsuspendovány. Následně byl každý vzorek 10krát naředěn roztokem PBS s koncentrací soli 150 g/l. Po přidání 5 µl propidium jodidu (PI) a 20 minutách v temnu byly vzorky analyzovány na průtokovém cytometru.

3.6.1.2 Teplotní stres – mražení

Nejdříve byly připraveny vzorky kultury v živném médiu a v roztoku PBS do dvou mikrozkuvek. Poté byly oba vzorky uloženy do mrazícího boxu a vystaveny teplotě -30 °C po dobu jednoho dne. Následně byly při laboratorní teplotě rozmrazeny. Oba vzorky byly zcentrifugovány, byl slit supernatant a byl přidán 1 ml roztoku PBS s koncentrací soli 150 g/l,

vzorky byly rozsuspendovány. Následně byl každý vzorek 10krát naředěn roztokem PBS s koncentrací soli 150 g/l. Po přidání 5 μ l PI a 20 minutách v temnu byly vzorky analyzovány na průtokovém cytometru.

3.6.2 Studium ochranných vlastností EPS ve stresové odpovědi eukaryotických a prokaryotických buněk.

Část mé práce byla zaměřena na studium ochranných vlastností extracelulárního polysacharidu pro eukaryotické a prokaryotické buňky. Pro studium ochranných vlastností extracelulárního polysacharidu ve stresové odpovědi prokaryotických buněk byl použit mikroorganismus *Cupriavidus necator H16*, ve stresové odpovědi eukaryotických buněk mikroorganismus *Saccharomyces cerevisiae*. Pro každé měření byly připraveny dva vzorky. Do dvou mikrozkušavek bylo napipetováno 0,5 ml kultury daného mikroorganismu. Oba vzorky byly centrifugovány při 7000 ot/min po dobu 5 min. Poté byl slit supernatant a k sedimentu jednoho vzorku bylo přidáno 0,5 ml roztoku PBS a vzorek byl rozsuspendován pomocí vortexu. K sedimentu druhého vzorku bylo přidáno 0,5 ml roztoku PBS s koncentrací EPS 10 g/l. Oba tyto vzorky byly vystaveny stejným stresovým podmínkám. Poté byla stanovena viabilita obou vzorků pomocí průtokového cytometru.

3.6.2.1 Teplotní stres – vysoká teplota

Nejdříve byly připraveny dva vzorky kultury v roztoku PBS a dva vzorky v roztoku PBS obohaceném o 10g/l EPS do čtyř mikrozkušavek. Poté byly všechny vzorky uloženy do vodní lázně a vystaveny teplotě 70 °C. Jeden vzorek v roztoku PBS a jeden vzorek v roztoku PBS s koncentrací EPS 10 g/l po dobu 5 min, další dva vzorky po dobu 15 min. Následně byly vzorky centrifugovány při 7000 ot/min po dobu 5 min. Supernatanty byly slity. K usazeninám bylo přidáno 0,5 ml PBS. Vzorky byly rozsuspendovány na vortexu. Poté byl od každého vzorku odebrán 0,1 ml a naředěn 0,9 ml roztoku PBS. Vzorky tedy byly 10krát naředěny. Po přidání 5 μ l PI a 20 minutách v temnu byly vzorky analyzovány na průtokovém cytometru.

3.6.2.2 Teplotní stres – mražení

Nejdříve byly připraveny vzorky kultury v roztoku PBS a v roztoku PBS obohaceném o 10 g/l EPS do dvou mikrozkušavek. Poté byly oba vzorky uloženy do mrazícího boxu a vystaveny teplotě -30 °C po dobu jedné hodiny. Po rozmražení byly oba vzorky centrifugovány při 7000 ot/min po dobu 5 min. Supernatanty byly slity. K usazeninám bylo přidáno 0,5 ml PBS. Vzorky byly rozsuspendovány na vortexu. Poté byl od každého vzorku odebrán 0,1 ml a naředěn 0,9 ml roztoku PBS. Vzorky tedy byly 10krát naředěny. Po přidání 5 μ l PI a 20 minutách v temnu byly vzorky analyzovány na průtokovém cytometru.

3.6.2.3 Osmotický stres

Nejdříve byly připraveny vzorky kultury v roztoku PBS a v roztoku PBS obohaceném o 10 g/l EPS do dvou mikrozkušavek. Poté byl do obou vzorků přidán NaCl o výsledné koncentraci 200 g/l. Vzorky byly osmotickému stresu vystaveny po dobu 1 hodiny. Následně byly oba vzorky centrifugovány při 7000 ot/min po dobu 5 min. Supernatanty byly slity. K usazeninám bylo přidáno 0,5 ml PBS. Vzorky byly rozsuspendovány na vortexu. Poté byl od každého

vzorku odebrán 0,1 ml a naředěn 0,9 ml roztoku PBS. Vzorky tedy byly 10krát naředěny. Po přidání 5 μ l PI a 20 minutách v temnu byly vzorky analyzovány na průtokovém cytometru.

3.6.2.4 *Ethanolový stres*

Nejdříve byly připraveny vzorky kultury v roztoku PBS a v roztoku PBS obohaceném o 10 g/l EPS do dvou mikrozkušavek. Poté byl do obou vzorků přidán ethanol, aby bylo dosaženo výsledné koncentrace 10 obj. % ethanolu ve vzorku. Oba vzorky byly vystaveny ethanolovému stresu po dobu 1 hodiny. Následně byly vzorky centrifugovány při 7000 ot/min po dobu 5 min. Supernatanty byly slity. K usazeninám bylo přidáno 0,5 ml PBS. Vzorky byly rozsuspendovány na vortexu. Poté byl od každého vzorku odebrán 0,1 ml a naředěn 0,9 ml roztoku PBS. Vzorky tedy byly 10krát naředěny. Po přidání 5 μ l PI a 20 minutách v temnu byly vzorky analyzovány na průtokovém cytometru.

3.6.2.5 *Osmotický stres ve spojení s teplotním stresem*

Nejdříve byly připraveny vzorky kultury v roztoku PBS a v roztoku PBS obohaceném o 10 g/l EPS do dvou mikrozkušavek. Poté byl do obou vzorků přidán NaCl o výsledné koncentraci 200 g/l. Vzorky byly osmotickému stresu vystaveny po dobu 1 hodiny. Poté byly oba vzorky vystaveny teplotě 70 °C po dobu 5 min. Následně byly vzorky centrifugovány při 7000 ot/min po dobu 5 min. Supernatanty byly slity. K usazeninám bylo přidáno 0,5 ml PBS. Vzorky byly rozsuspendovány na vortexu. Poté byl od každého vzorku odebrán 0,1 ml a naředěn 0,9 ml roztoku PBS. Vzorky tedy byly 10krát naředěny. Po přidání 5 μ l PI a 20 minutách v temnu byly vzorky analyzovány na průtokovém cytometru.

3.6.2.6 *Ethanolový stres ve spojení s teplotním stresem*

Nejdříve byly připraveny vzorky kultury v roztoku PBS a v roztoku PBS obohaceném o 10 g/l EPS do dvou mikrozkušavek. Poté byl do obou vzorků přidán ethanol, aby bylo dosaženo výsledné koncentrace 10 obj. % ethanolu ve vzorku. Oba vzorky byly vystaveny ethanolovému stresu po dobu 1 hodiny. Poté byly oba vzorky vystaveny teplotě 70 °C po dobu 5 min. Následně byly oba vzorky centrifugovány při 7000 ot/min po dobu 5 min. Supernatanty byly slity. K usazeninám bylo přidáno 0,5 ml PBS. Vzorky byly rozsuspendovány na vortexu. Poté byl od každého vzorku odebrán 0,1 ml a naředěn 0,9 ml roztoku PBS. Vzorky tedy byly 10krát naředěny. Po přidání 5 μ l PI a 20 minutách v temnu byly vzorky analyzovány na průtokovém cytometru.

4 VÝSLEDKY

4.1 Stresová odolnost *Haloferax mediterranei*

V rámci této části práce jsme se setkali s velkou komplikací při stanovení viability extrémně halofilní mikrobiální kultury. Nespolehlivost výsledků měření viability pomocí průtokové cytometrie mohla být způsobena tím, že koncentrace soli ve vzorku mohla zhaset fluorescenci [36]. Dalším možným důvodem je to, že se mikroorganismus *Haloferax mediterranei* vyznačuje autofluorescencí, která mohla rušit fluorescenci vzniklou působením propidium jodidu [37]. Výsledky mohly být také ovlivněny stavbou buněčné stěny archaeí. Chemická stavba archeálních membrán je unikátní. Skládá se sice z fosfolipidů, jako membrány bakterií i eukaryot, ale fosfolipidy archeí jsou složeny z glycerol-etherlipidů, zatímco fosfolipidy bakterií a eukaryot jsou tvořeny glycerol-esterlipidy. Etherové vazby archaeí jsou stabilnější, což může bránit průniku interkalačního barviva do buňky [38].

Pro nepřesnost výsledků byla viabilita studována také pomocí výsevu na agarovou plotnu s živným médiem. Mikroorganismus *Haloferax mediterranei* roste ve viskózních vrstvách, takže nebylo možné jednotlivé kolonie spočítat. Dalším problémem bylo to, že přidaná sůl často vykrytalizovala, a tak mikroorganismus nemohl růst.

Protože nebylo možné stanovit viabilitu tohoto archeálního kmene ani měřením fluorescence pomocí průtokového cytometru ani výsevem na pevné médium, rozhodli jsme se pro studium extracelulárního polysacharidu. Cílem bylo extracelulární biopolymer izolovat a studovat jeho chemickou charakteristiku a vliv ve stresové odpovědi prokaryotických i eukaryotických buněk.

4.2 Izolace extracelulárního polysacharidu

Pro izolaci EPS produkovaného archeálním kmenem *Haloferax mediterranei* bylo připraveno celkem 1200 ml média, do kterého byl mikroorganismus naočkován. Inokulum bylo připraveno v objemu 200 ml do šesti 500 ml Erlenmeyerových baněk. Následná kultivace probíhala na termostatované třepačce při teplotě 37 °C po dobu 4 dní.

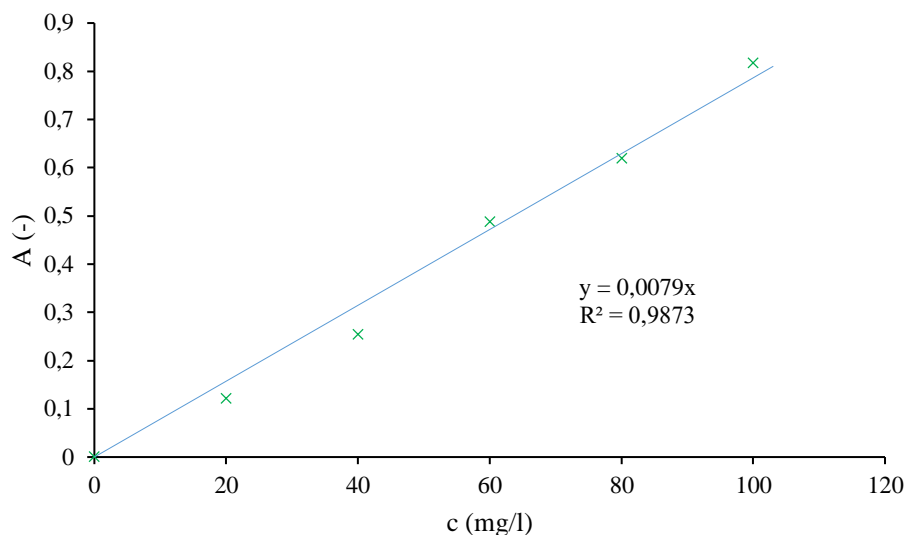
Po čtyřdenní kultivaci byla provedena izolace. Ze supernatantu, který byl získán centrifugací biomasy, bylo odpipetováno 200 ml vzorku do předem zvážených centrifugačních zkumavek. Následně bylo přidáno 400 ml vychlazeného ethanolu. Směs byla protřepána, čímž došlo k vysrážení extracelulárního polysacharidu. Vzorek byl opět centrifugován při 9000 ot/min po dobu 3 min. Byla odlita kapalná část. Vysrážený EPS byl rozpuštěn v destilované vodě a opět vysrážen ethanolom v poměru 1:2. Poté byl vzorek centrifugován za výše uvedených podmínek. Proces čištění byl zopakován a tímto postupem byl vyisolován polysacharid z celého objemu 1200 ml.

Jelikož vzorek obsahoval stále vysokou koncentraci soli a mnoho dalších komponent nacházejících se v médiu, bylo nutné jej vyčistit. K izolaci extracelulárního polysacharidu z média bylo tedy následně využito ultradialýzy KrosFlo. Produkční médium, které bylo zbaveno buněk, bylo dialyzováno přes membránu o velikosti pórů 5 kDa. Byly získány dva

permeáty a retentát, kdy v retentátu byla detekována nejvyšší koncentrace celkových sacharidů, z čehož je patrné že produkce a izolace EPS proběhla úspěšně.

4.2.1 Kvantitativní zhodnocení izolačního postupu

Nejdříve byla sestrojena kalibrační křivka proměřením připravených vzorků na spektrofotometru.



Graf 1: Anthronova metoda – kalibrační křivka

Anthronovou metodou byl stanoven obsah celkových sacharidů ve vzorku odebraném po izolaci EPS srážením (1), vzorku odebraném z druhého permeátu po ultradialýze (2) a vzorek finálně vyzolovaného vyčištěného extracelulárního polysacharidu (3).

Tabulka 2: Anthronova metoda – tabulka výsledků

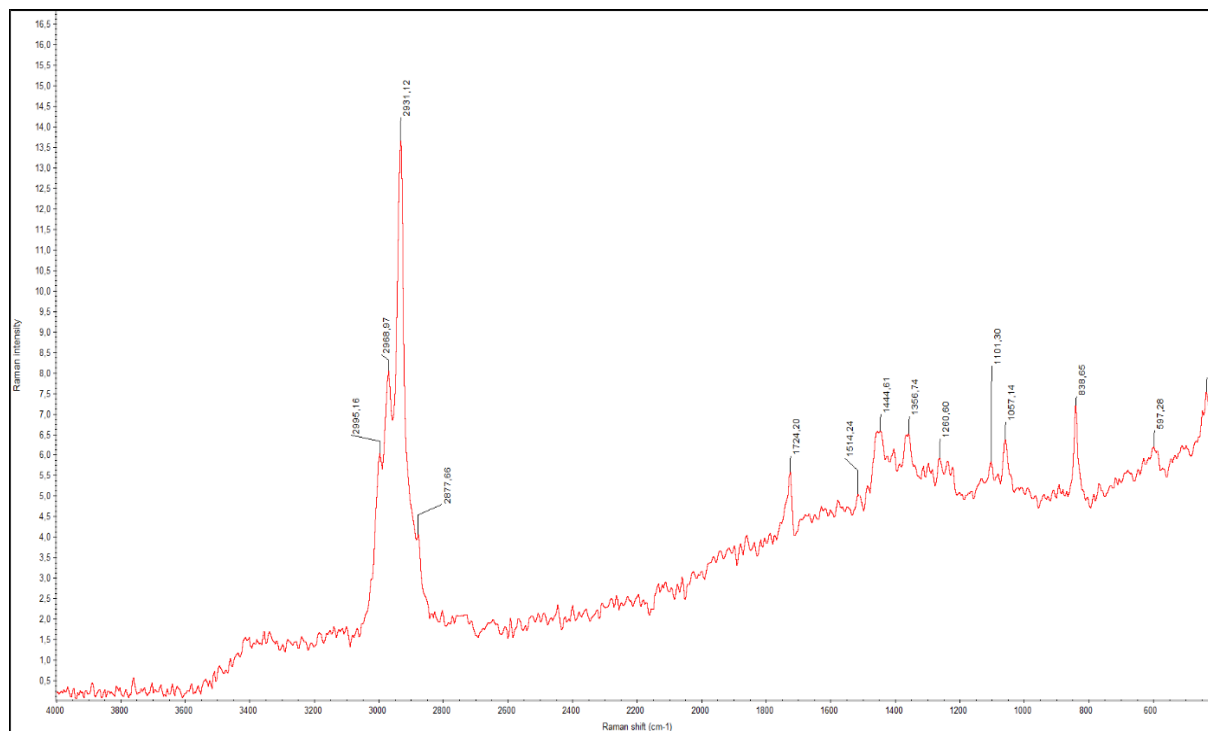
Vzorek	Absorbance	Koncentrace
1	0,135	17,1 mg/l
2	0,667	84,5 mg/l
3	0,329	41,6 mg/l

Byla vypočítána koncentrace celkových sacharidů dosazením naměřených hodnot absorpance do rovnice kalibrační přímky. Výsledky měření ukazují na to, že byl EPS po ultradialýze nejdříve zakoncentrován, poté došlo k jeho purifikaci. Při lyofilizaci finálního produktu bylo získáno 257 mg EPS, které byly dále chemicky charakterizovány a také byly posouzeny potenciální protektivní vlastnosti EPS u modelového eukaryotického a prokaryotického mikroorganismu vůči celé řadě stresových faktorů.

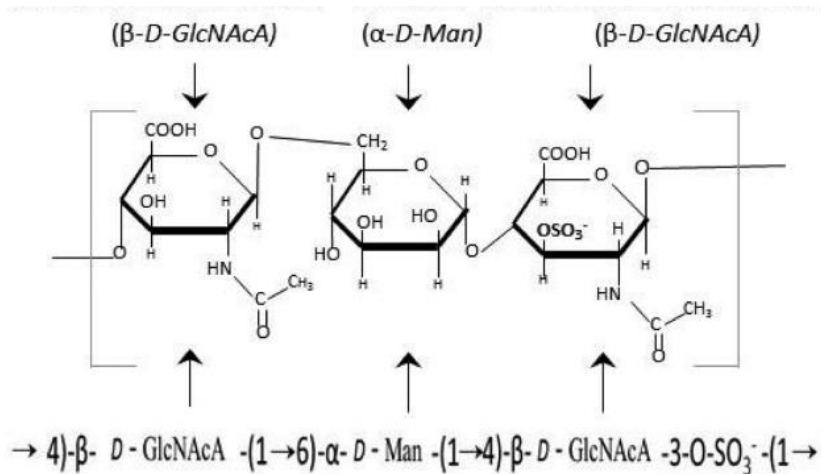
4.3 Chemická charakterizace extracelulárního polysacharidu

4.3.1 Ramanova spektroskopie

V prvním experimentu jsme EPS charakterizovali pomocí Ramanovy spektroskopie. Ramanovské spektrum je znázorněno níže (Obrázek 3), nejvýznamnější píky spektra pak shrnuje Tabulka 3.



Obrázek 3: Ramanova spektroskopie – spektrum



Obrázek 4: Strukturální vzorec EPS [34]

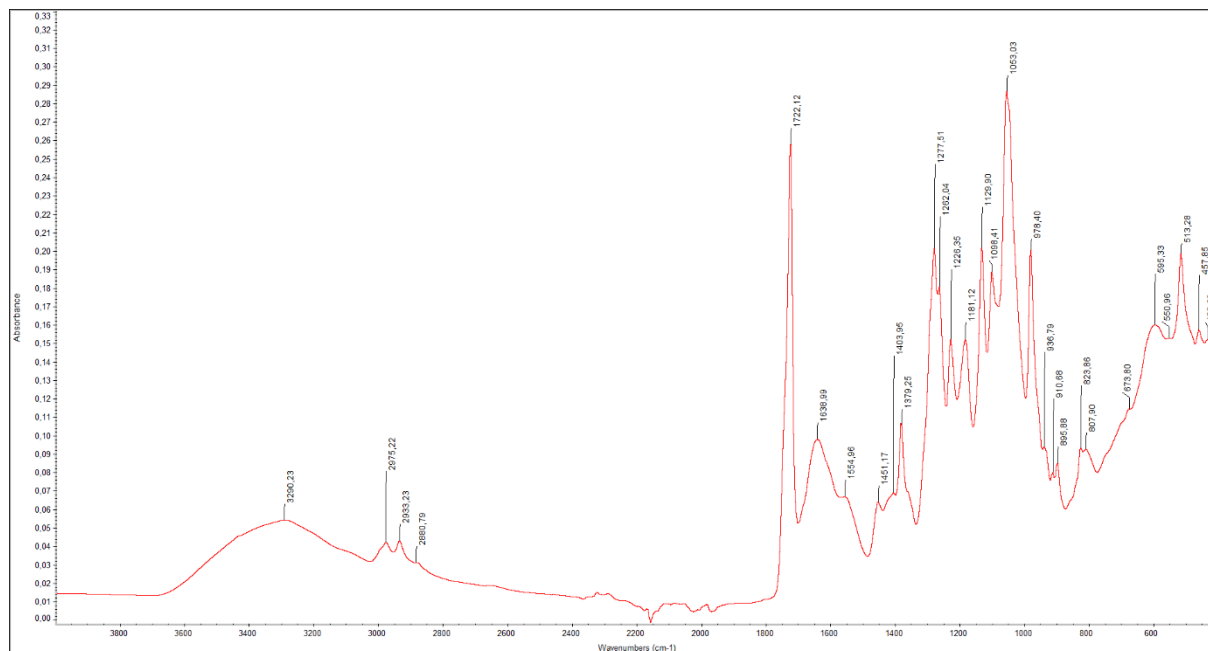
Tabulka 3: Ramanova spektroskopie – tabulka výsledků

Vlnočet (cm ⁻¹)	Přiřazení
838,65	R-OH vibrace v primárních a sekundárních alkoholech
1057,14	C-O vibrace v primárních alkoholech
1101,3	C-O vibrace v sekundárních alkoholech
1260,6	C-OH vibrace v primárních a sekundárních alkoholech
1356,74	Deformační vibrace CH ₃ →C-CH ₃
1444,61	Deformační vibrace CH ₃ →C-CH ₃ a deformační vibrace -OH a valenční C-O v COOH
1514,24	N-H vibrace v sekundárních aminech
1724,2	C=O vibrace v -COOH
2877,66	C-H symetrická vibrace v skupinách CH ₂
2931,12	C-H asymetrická vibrace v skupinách -CH ₂ -
2968,97	C-H asymetrická vibrace v skupinách CH ₂
2995,76	C-H asymetrická vibrace v skupinách CH ₃
3200-3400	N-H a O-H vibrace v alkoholech a sekundárních aminech

Při srovnání výsledků z měření pomocí Ramanovy spektroskopie se strukturálním vzorcem EPS (Obrázek 4) vidíme, že zobrazené signály odpovídají struktuře daného polysacharidu. Nebyly však zobrazeny vibrace, které by vypovídaly o přítomnosti sulfoesterové vazby, a tedy sulfátové skupiny na třetím uhlíku druhé skupiny 2-acetamido-2-deoxyglukuronové kyseliny. Důvodem může být příliš nízká koncentrace sulfátových skupin, což mohlo být způsobeno tím, že nebyl získán dokonale čistý vzorek extracelulárního polysacharidu, ale jednalo se o extracelulární matici, která obsahovala také další sacharidy či proteiny. Případně je možné, že míra sulfonace závisí na kultivačních podmínkách a dalších parametrech kultivace. Je tedy možné, že v současné době akceptovaná struktura extracelulárního polysacharidu *Haloferax mediterranei* není zcela universální.

4.3.2 Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací

Druhou použitou charakterizační technikou byla FTIR spektroskopie. Příslušné spektrum znázorňuje Obrázek 5 a nejvýznamnější píky spektra jsou následně představeny v tabulce (Tabulka 4).



Obrázek 5: FTIR – spektrum

Tabulka 4: FTIR – tabulka výsledků

Vlnočet (cm ⁻¹)	Přiřazení
936,79	Deformační vibrace C-O-H v COOH
1053,03	Vibrace C-O v primárních alkoholech
1098,41	Vibrace C-O v etherech
1129,90	Vibrace C-N v sekundárních aminech
1181,12	Vibrace C-O v etherech
1262,04	Vibrace O-H v alkoholech
1277,51	Vibrace O-H v alkoholech
1379,25	Vibrace C-H v CH ₃ skupinách
1451,17	Vibrace C-H v CH ₂ a CH ₃ skupinách
1554,96	Vibrace N-H v sekundárních aminech
1638,99	Vibrace N-H v sekundárních aminech
1722,12	Vibrace =O v COOH
2880,79	Symetrická valenční vibrace C-H v CH ₃ skupinách
2933,23	Asymetrická valenční vibrace C-H v -CH ₂ - skupinách
2975,22	Asymetrická valenční vibrace C-H v CH ₃ skupinách
3290,23	Vibrace O-H a N-H v alkoholech a sekundárních aminech

Obdobně jako při analýze Ramanovou spektroskopií odpovídají zvýrazněné signály struktury extracelulárního polysacharidu. Výsledky vypovídají o tom, že se ve struktuře nachází karboxylové skupiny, skupiny sekundárních aminů, karbonylové skupiny či hydroxylové skupiny alkoholů, které se v teoretické struktuře uvedené na Obrázek 4 opravdu nachází. Ve struktuře extracelulárního polysacharidu se ovšem nachází také sulfátová skupina, která nebyla detekována ani pomocí FTIR ani Ramanovy spektroskopie, což může vypovídat o velmi nízkém množství sulfatovaných skupin, jak bylo uvedeno v předchozí kapitole.

4.3.3 Prvková elementární analýza

Poslední použitou charakterizační technikou byla elementární analýza. Její výsledky jsou znázorněny v následující tabulce (Tabulka 5).

Tabulka 5: Prvková elementární analýza – tabulka výsledků

Prvek	Reálný obsah	Teoretický obsah
Dusík	3,42 %	4,22 %
Uhlík	45,69 %	38,01 %
Vodík	6,58 %	4,68 %
Síra	0,49 %	4,83 %
Kyslík	43,82 %	48,27 %

V porovnání reálného obsahu prvků s vypočítaným teoretickým obsahem prvků pro modelovou strukturu polysacharidu zobrazenou na Obrázek 4 vidíme jisté odlišnosti. Zejména v obsahu síry, kdy v reálném vzorku byl obsah prvku mnohem nižší. Prvková elementární analýza potvrzuje úvahu o velmi nízké koncentraci sulfátových skupin, tyto výsledky zároveň potvrzují pozorování obou výše uvedených spektroskopických metod. Jelikož se neliší teoretické a reálné hodnoty pouze v obsahu síry, můžeme uvažovat nečistotu vzorku. Vzorek mohl obsahovat i další látky, které se nacházely v původním roztoku. Takovými látkami mohou být zejména další doprovodné polysacharidy, jelikož se reálný vzorek liší zvýšeným obsahem uhlíku, vodíku a kyslíku. Druhou možností je, že teoretická struktura polysacharidu není zcela univerzální, a že zastoupení jednotlivých funkčních skupin (sulfátové, acetylové, aminoskupiny) se může v průběhu kultivace měnit anebo může být závislé na kultivačních podmínkách, případně i částečně kmenově specifické.

4.3.4 Vliv ochranných vlastností EPS ve stresové odpovědi prokaryotických buněk

Vzhledem k tomu, že nebylo možné posoudit protektivní účinek EPS u samotného produkčního kmene (viz. kapitola 4.1), byl jako modelový prokaryotický kmen zvolen *Cupriavidus necator H16*. Jedná se o běžnou půdní bakterii, která je, stejně jako *Haloferax mediterranei*, schopna akumulace PHA. Bakterie byla exponována různým stresovým podmínkám v PBS pufru v přítomnosti EPS a nebo bez EPS. Výsledky experimentu jsou shrnuty níže, viz Tabulka 6.

Tabulka 6: Studium ochranných vlastností EPS – *Cupriavidus necator H16*

<i>Cupriavidus necator H16</i>			
Stresový faktor	Přídavek EPS	Živé buňky	Mrtvé buňky
Vysoká teplota, 5 min	ano	100,0	0,0
Vysoká teplota, 5 min	ne	40,2	59,8
Vysoká teplota, 15 min	ano	100,0	0,0
Vysoká teplota, 15 min	ne	24,4	75,6
Mražení	ano	53,3	46,7
Mražení	ne	53,1	46,9
Osmotický stres	ano	84,9	15,9
Osmotický stres	ne	49,6	50,4
Ethanolový stres	ano	35,6	64,4
Ethanolový stres	ne	23,9	76,2
Osmotický stres, vysoká teplota	ano	100,0	0,0
Osmotický stres, vysoká teplota	ne	46,1	53,9
Ethanolový stres, vysoká teplota	ano	0,0	100,0
Ethanolový stres, vysoká teplota	ne	0,0	100,0

Výsledky ukazují, že EPS má velmi dobré ochranné vlastnosti. Ochranné vlastnosti extracelulárního polysacharidu se projevily nejvíce při stresu způsobeném vysokou teplotou a při osmotickém stresu spojeném s vysokou teplotou. Nejméně se protektivní efekt EPS projevil při stresu způsobeném mražením. Obecně však lze konstatovat, že EPS poskytoval ochranu proti většině testovaných stresů. To naznačuje jeho možnou biologickou roli, ale otevírá také řadu možných aplikací v mikrobiálních biotechnologiích. Pouze ethanolový stres spojený s vysokou teplotou byl pro mikroorganismus zcela smrtící i při přidání extracelulárního polysacharidu.

4.3.5 Vliv ochranných vlastností EPS ve stresové odpovědi eukaryotických buněk

Vedle prokaryotického modelového organismu byl protektivní účinek EPS posouzen také pro eukaryotický mikroorganismus – *Saccharomyces cerevisiae*. Výsledky ukazuje Tabulka 7.

Tabulka 7: Studium ochranných vlastností EPS – *Saccharomyces cerevisiae*

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
Stresový faktor	Přídavek EPS	Živé buňky	Mrtvé buňky
Vysoká teplota, 5 min	ano	98,2	1,8
Vysoká teplota, 5 min	ne	5,6	94,4
Vysoká teplota, 15 min	ano	97,1	2,9
Vysoká teplota, 15 min	ne	7,0	93,0
Mražení	ano	100,0	0,0
Mražení	ne	77,4	22,6
Osmotický stres	ano	100,0	0,0
Osmotický stres	ne	25,1	74,9
Ethanolový stres	ano	100,0	0,0
Ethanolový stres	ne	95,4	4,6
Osmotický stres, vysoká teplota	ano	98,4	1,6
Osmotický stres, vysoká teplota	ne	14,8	85,2
Ethanolový stres, vysoká teplota	ano	98,0	2,0
Ethanolový stres, vysoká teplota	ne	16,5	83,5

Při studiu ochranných vlastností EPS u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* byly zkoumány stejné stresové faktory jako při studiu ochranných vlastností EPS u *Cupriavidus nectator H16*. Byly prokázány velmi dobré ochranné vlastnosti u všech testovaných stresů. Obecně byl protektivní účinek EPS ještě výraznější než tomu bylo u *C. nectator H16*. Nejméně se ochranné schopnosti projeví u ethanolového stresu. Důvodem může být to, že mikroorganismus *Saccharomyces cerevisiae* se běžně účastní ethanolového kvašení a je proti působení ethanolu relativně rezistentní [39].

5 ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na studium ochranných vlastností biopolymerů produkovaných mikroorganismem *Haloferox meditaranei*. Konkrétně byla pozornost věnována extracelulárnímu polysacharidu, který tento extrémně halofilní prokaryotický mikroorganismus produkuje.

Se záměrem studovat vlastnosti a ochranné schopnosti extracelulárního polysacharidu byl tento biopolymer izolován. Byl vysrážen ethanolem a zcentrifugován. Jelikož se v roztoku vyzolovaného EPS nacházela vysoká koncentrace soli, byl tento roztok podroben ultrafiltraci za účelem odstranění nežádoucích komponent.

Vlastnosti extracelulárního polysacharidu byly studovány několika metodami. Pomocí Anthronovy metody byl stanoven celkový obsah sacharidů, z čehož bylo možné odvodit, že byl extracelulární polysacharid nejdříve zakoncentrován a poté byly odstraněny nečistoty. Chemická struktura extracelulárního polysacharidu byla studována prostřednictvím Ramanovy spektroskopie, infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací a prvkové elementární analýzy. Byla zjištěna velmi nízká koncentrace sulfátových skupin nebo dokonce jejich nepřítomnost, což pravděpodobně vypovídá o přítomnosti nežádoucích složek, případně je možné, že modelová struktura tohoto EPS není zcela univerzální a struktura, případně zastoupení jednotlivých funkčních skupin, může záviset na kultivačních podmínkách.

Práce s extremofilním kmenem byla komplikovaná, například žádná ze standardních metod stanovení viability (průtoková cytometrie ani počítání kolonií) neposkytovala důvěryhodné výsledky, a proto byl protektivní účinek polysacharidu posouzen na modelovém prokaryotickém a eukaryotickém mikroorganismu – bakterii *Cupriavidus necator H16* a kvasince *Saccharomyces cerevisiae*.

EPS vykazoval významné protektivní účinky proti celé paletě stresů u obou testovaných mikroorganismů. To jednak naznačuje, že *H. meditarenei* produkuje EPS právě za účelem navýšení své stresové odolnosti. Výsledky této práce však mohou mít i aplikační aspekt – EPS by mohl být využit jako protektivní látka v mikrobiálních biotechnologiích, například při úschově mikrobiálních buněk ve formě kryokonzerv, případně by mohl být aplikován v aplikacích, ve kterých jsou mikrobiální buňky exponovány stresovým faktorům (bioremediace, biodegradace polutantů atd.). Zároveň by teoreticky bylo možné využít protektivní účinky EPS také v oblasti farmacie a kosmetiky, nicméně praktická realizace a experimentální ověření tohoto myšlenkového směru by vyžadovala velké experimentální úsilí.

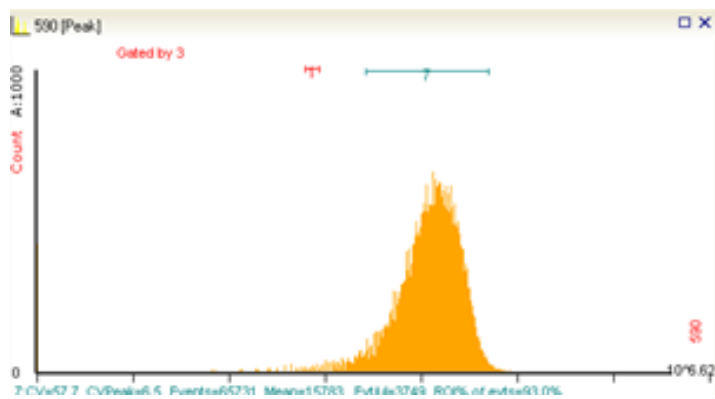
6 ZDROJE

- [1] DASSARMA, Shiladitya a Priya DASSARMA. Halophiles. ELS [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2001 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000394.pub3. ISBN 0470016175. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470015902.a0000394.pub3>
- [2] DALMASO, Gabriel, Davis FERREIRA a Alane VERMELHO. Marine Extremophiles: A Source of Hydrolases for Biotechnological Applications. *Marine Drugs* [online]. 2015, 13(4), 1925-1965 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.3390/md13041925. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1660-3397/13/4/1925/>
- [3] ANDREI, Adrian-Ştefan, Horia Leonard BANCIU a Aharon OREN. Living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2012, 330(1), 1-9 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02526.x. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2012.02526.x>
- [4] NYSSOLA, A., J. KEROVUO, P. KAUKINEN, N. VON WEYMARN a T. REINIKAINEN. Extreme Halophiles Synthesize Betaine from Glycine by Methylation. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2000, 275(29), 22196-22201 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1074/jbc.M910111199. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M910111199>
- [5] ROSENBERG, Eugene. The prokaryotes -prokaryotic physiology and biochemistry: prokaryotic physiology and biochemistry. 4th ed. New York: Springer, 2013. ISBN 978-3-642-30140-7
- [6] REQUENA, Jose M. Stress response in microbiology. Norfolk, UK: Caister Academic Press, c2012. ISBN 1908230045.
- [7] HORIKOSHI K. Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1999;63(4):735-750.
- [8] GONZALEZ-TORIL, E., E. LLOBET-BROSSA, E. O. CASAMAYOR, R. AMANN a R. AMILS. Microbial Ecology of an Extreme Acidic Environment, the Tinto River. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2003, 69(8), 4853-4865 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1128/AEM.69.8.4853-4865.2003. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.69.8.4853-4865.2003>
- [9] ROTHSCHILD, Lynn J. a Rocco L. MANCINELLI. Life in extreme environments. *Nature* [online]. 409(6823), 1092-1101 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1038/35059215. ISSN 00280836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/35059215>
- [10] MORITA RY. Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Reviews*. 1975;39(2):144-167.
- [11] BITTON, Gabriel. *Encyclopedia of environmental microbiology*. New York: Wiley, c2002. ISBN 04-713-6051-1.
- [12] MADIGAN, Michael T., John M. MARTINKO, Jack PARKER a Thomas D. BROCK. *Brock biology of microorganisms*. 8th ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, c1997. ISBN 01-352-0875-0.
- [13] JOYCE S. The dead zones: oxygen-starved coastal waters. *Environmental Health Perspectives*. 2000;108(3):A120-A125.
- [14] HORIKOSHI, Kōki. a W. D. GRANT. *Extremophiles: microbial life in extreme environments*. New York: Wiley-Liss, c1998. ISBN 04-710-2618-2
- [15] CAVICCHIOLI, Ricardo. *Archaea: molecular and cellular biology*. Washington, DC: ASM Press, c2007. ISBN 1555813917.

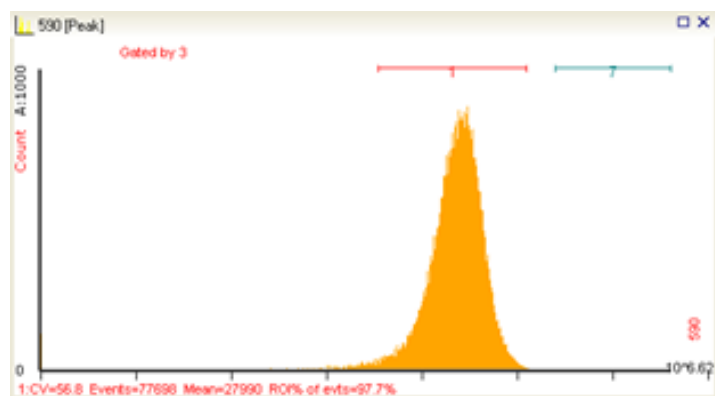
- [16] OREN, Aharon. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* [online]. 2008, 4(1), 2- [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1186/1746-1448-4-2. ISSN 1746-1448. Dostupné z: <http://aquaticbiosystems.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-1448-4-2>
- [17] GRANT, W. D. Life at low water activity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. 2004, 359(1448), 1249-1267 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1098/rstb.2004.1502. ISSN 0962-8436. Dostupné z: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2004.1502>
- [18] ANDREI, Adrian-Ştefan, Horia Leonard BANCIU a Aharon OREN. Living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2012, 330(1), 1-9 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02526.x. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2012.02526.x>
- [19] TENCHOV, B., E. M. VESCIO, G. D. SPROTT, M. L. ZEIDEL a J. C. MATHAI. Salt Tolerance of Archaeal Extremely Halophilic Lipid Membranes. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2006, 281(15), 10016-10023 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1074/jbc.M600369200. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M600369200>
- [20] EICHLER, Jerry. Facing extremes: archaeal surface-layer (glyco) proteins. *Microbiology*, 2003, 149.12: 3347-3351.
- [21] FUKUCHI, Satoshi, et al. Unique amino acid composition of proteins in halophilic bacteria. *Journal of molecular biology*, 2003, 327.2: 347-357.
- [22] SOPPA, J., et al. Genomics and functional genomics with haloarchaea. *Archives of microbiology*, 2008, 190.3: 197-215.
- [23] PAUL, Sandip, et al. Molecular signature of hypersaline adaptation: insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes. *Genome biology*, 2008, 9.4: R70.
- [24] JOO, Won-A.; KIM, Chan-Wha. Proteomics of halophilic archaea. *Journal of Chromatography B*, 2005, 815.1: 237-250.
- [25] SOPPA, Jörg. From replication to cultivation: hot news from Haloarchaea. *Current opinion in microbiology*, 2005, 8.6: 737-744.
- [26] OFFNER, Sonja, et al. Eight of fourteen gvp genes are sufficient for formation of gas vesicles in halophilic archaea. *Journal of bacteriology*, 2000, 182.15: 4328-4336.
- [27] PRICE, Lance B.; SHAND, Richard F. Halocin S8: a 36-amino-acid microhalocin from the haloarchaeal strain S8a. *Journal of bacteriology*, 2000, 182.17: 4951-4958.
- [28] LLAMAS, Inmaculada, et al. Characterization of the exopolysaccharide produced by *Salipiger mucosus* A3T, a halophilic species belonging to the Alphaproteobacteria, isolated on the Spanish mediterranean seaboard. *Marine drugs*, 2010, 8.8: 2240-2251.
- [29] LLAMAS, Inmaculada, et al. The potential biotechnological applications of the exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas almeriensis*. *Molecules*, 2012, 17.6: 7103-7120.
- [30] MERRICK, J. M. *Biopolymers: Polyesters I: Biological Systems and Biotechnological Production*. Weinheim: Wiley-VCH, 2002, s. 105-122. ISBN 3-527-30224-7
- [31] RATHI, D.-N., H.G. AMIR, R.M.M. ABED, A. KOSUGI, T. ARAI, O. SULAIMAN, R. HASHIM a K. SUDESH. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis and simplified polymer recovery by a novel moderately halophilic bacterium isolated from hypersaline microbial mats. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2013, 114(2), 384-395 [cit.

- 2017-05-7]. DOI: 10.1111/jam.12083. ISSN 13645072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.12083>
- [32] LU, Qiuhe, et al. Genetic and biochemical characterization of the poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) synthase in *Haloferax mediterranei*. *Journal of bacteriology*, 2008, 190.12: 4173-4180.
- [33] RODRIGUEZ-VALERA, F., J. A. Garcia LILLO, Josefa ANTÓN a Inmaculada MESEGUER. Biopolymer Production by *Haloferax Mediterranei*. *General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms* [online]. Boston, MA: Springer US, 1991, s. 373 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1007/978-1-4615-3730-4_45. ISBN 978-1-4613-6660-7. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-3730-4_45
- [34] KOLLER, M. Study on the Production and Re-use of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and Extracellular Polysaccharide by the Archaeon *Haloferax mediterranei* Strain DSM 1411. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* [online]. 2015-7-12, 29(2), 87-98 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.15255/CABEQ.2014.2058. ISSN 03529568. Dostupné z: http://pierre.fkit.hr/hdki/cabeq/pdf/29_2_2015/Cabeq%202015-02-web%20Koller.pdf
- [35] ANTÓN, Josefa; MESEGUER, Inmaculada; RODRIGUEZ-VALERA, F. Production of an extracellular polysaccharide by *Haloferax mediterranei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54.10: 2381-2386.
- [36] JETTE, Eric; WEST, William. Studies on Fluorescence and Photosensitization in Aqueous Solution. II. Fluorescence in Aqueous Solution. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 1928, 121.787: 299-312.
- [37] ANTÓN, Josefa, et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environmental Microbiology*, 1999, 1.6: 517-523.
- [38] KOGA, Yosuke; MORII, Hiroyuki. Biosynthesis of ether-type polar lipids in archaea and evolutionary considerations. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2007, 71.1: 97-120.
- [39] DING, Junmei, et al. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to ethanol stress involves actions of protein *asr1p*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2010, 20.12: 1630-1636.

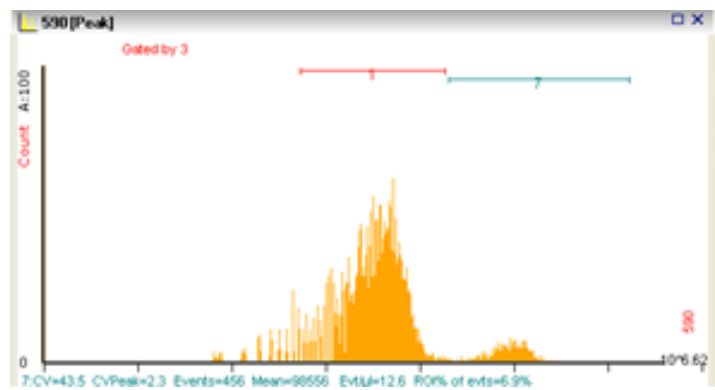
7 PŘÍLOHY



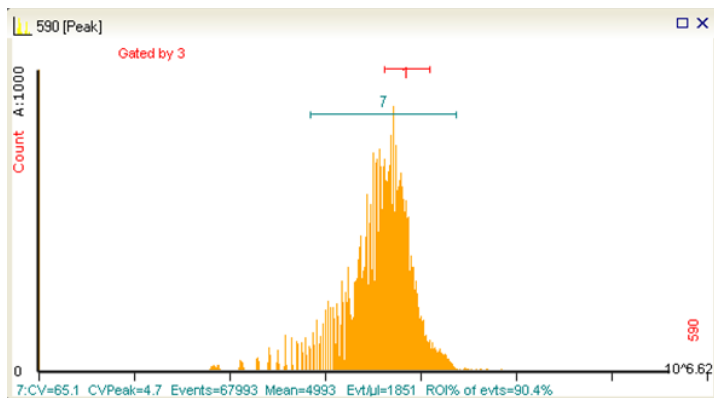
Obrázek 6: *H. mediteranei* – mrtvé buňky



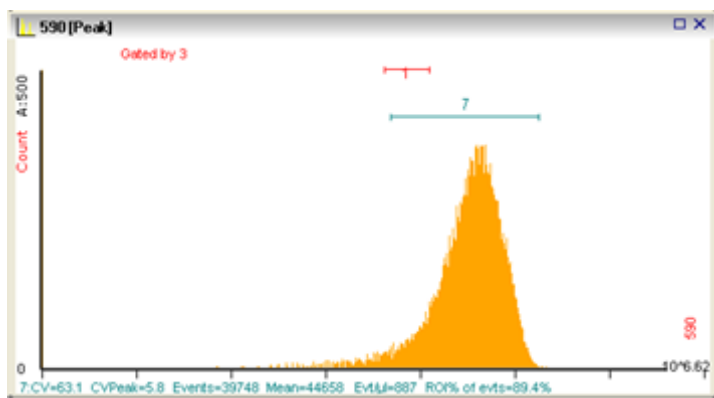
Obrázek 7: *H. mediteranei* – var, médium



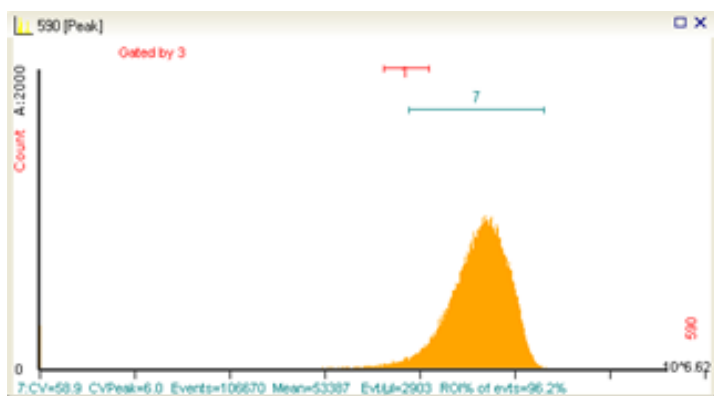
Obrázek 8: *H. mediteranei* – var, PBS



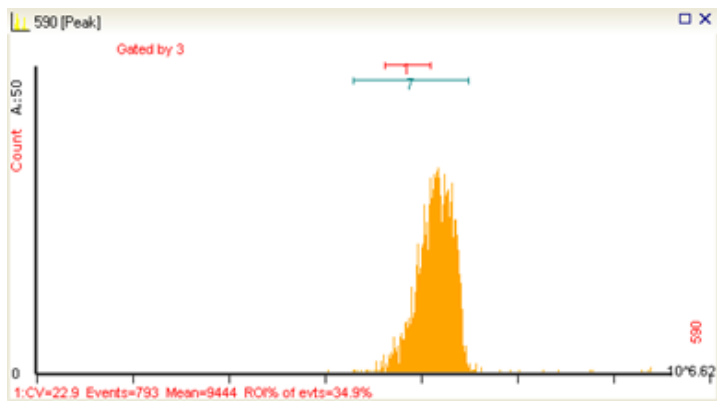
Obrázek 9: *C. necator* – živé buňky



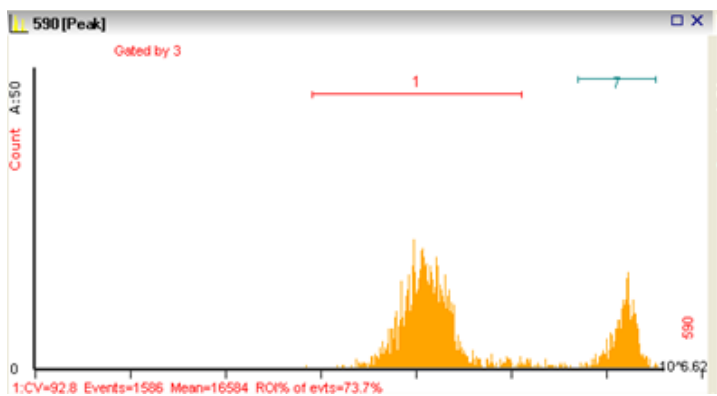
Obrázek 10: *C. necator* – EtOH, 70 °C, s EPS



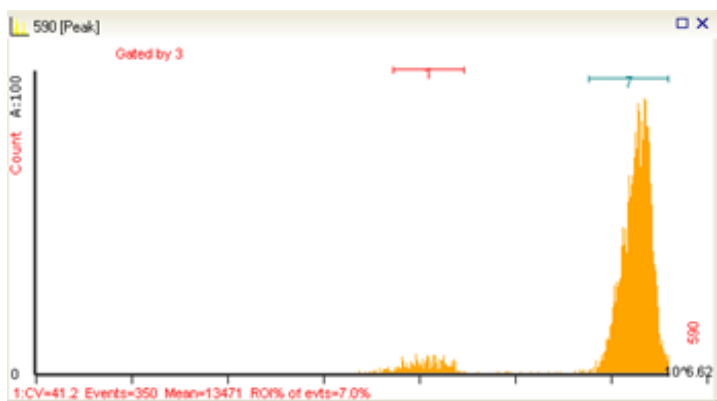
Obrázek 11: *C. necator* – EtOH, 70 °C, bez EPS



Obrázek 12: *S. cerevisiae* – živé buňky



Obrázek 13: *S. cerevisiae* – mražení, bez EPS



Obrázek 14: *S. cerevisiae* – 70 °C, 15 min, bez EPS