



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNologiÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**POLYHYDROXYALKANOÁTY A JEJICH ROLE VE
STRUKTUŘE BAKTERIÁLNÍHO BIOFILMU**

POLYHYDROXYALKANOATES AND THEIR ROLE IN BACTERIAL BIOFILMS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Markéta Rucká

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1063/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Markéta Rucká**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Polyhydroxyalkanoáty a jejich role ve struktuře bakteriálního biofilmu

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše
2. Screening tvorby biofilmů u PHA produkujících bakterií
3. Studium vlivu přítomnosti PHA na strukturu a vlastnosti biofilmu

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

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

Bc. Markéta Rucká
student(ka)

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

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá polyhydroxyalkanoáty (PHA) a jejich rolí ve struktuře bakteriálního biofilmu. V teoretické části byla vypracována literární rešerše zabývající se polyhydroxyalkanoáty, bakteriálním biofilmem a jejich vzájemným vztahem. Práce byla zaměřena na rozdíly v produkci PHA planktonickými a biofilmovými buňkami. Za účelem studie byly použity bakteriální kmeny *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari*, které byly kultivovány s využitím CDC biofilmového reaktoru. Pozornost byla věnována kvantitě a zejména formě, v jaké se PHA vyskytují v planktonických a biofilmových buňkách. Výsledky Ramanovy spektroskopie ukázaly, že PHA se v planktonických bakteriálních buňkách vyskytuje výhradně v nativní amorfní formě. Naproti tomu v biofilmu PHA existuje také v částečně krystalické formě. Dále byla testována jednak odolnost planktonických a biofilmových buněk vůči působení různých stresových faktorů, a jednak vliv osmotického stresu na produkci PHA. Na základě výsledků experimentu, kdy byly bakterie vystaveny různým stresovým faktorům (vysoká teplota, nízká teplota, přítomnost detergentu a další), bylo zjištěno, že biofilmové buňky vykazují vyšší stresovou odolnost než buňky planktonické. Vystavení buněk zvýšenému osmotickému tlaku vedlo jednak ke zpomalení buněčného růstu a rozmnožování, ale také k poklesu produkce PHA. Planktonické buňky navíc reagovaly na vnější stimuly značně citlivěji než buňky biofilmové.

ABSTRACT

This master thesis deals with polyhydroxyalkanoates (PHA) and their role in bacterial biofilms. In the theoretical part the polyhydroxyalkanoates, bacterial biofilm and the relationship between them were reviewed. The experimental part focused on differences in PHA production by planktonic and biofilm cells. In order to study selected topic, bacterial strains of *Burkholderia cepacia* and *Burkholderia sacchari* were cultivated using a CDC biofilm reactor. The attention was paid to quantity and especially to the form in which PHA occurs in planktonic and biofilm cells. Results of Raman spectroscopy have shown that PHA exists exclusively in native amorphous form in planktonic bacterial cells. On the other hand, in biofilm PHA occurs also in a partially crystalline form. In addition, the resistance of planktonic and biofilm cells against various stress factors and the effect of osmotic stress on PHA production was tested too. According to the results of the experiment, when the bacteria were exposed to different stress factors (high temperature, low temperature, presence of detergent and so forth) biofilm cells showed a higher stress resistance than planktonic cells. Apart from slowing cell growth and reproduction, increased osmotic pressure in the culture medium also caused decrease of PHA production. In addition, planktonic cells responded to external stimuli more sensitively than biofilm ones.

KLÍČOVÁ SLOVA

polyhydroxyalkanoáty, polyhydroxybutyrát, bakteriální biofilm, planktonické buňky, CDC biofilmový reaktor, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari*

KEYWORDS

polyhydroxyalkanoates, polyhydroxybutyrate, bacterial biofilm, planktonic cells, CDC biofilm reactor, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari*

RUCKÁ, M. *Polyhydroxyalkanoáty a jejich role ve struktuře bakteriálního biofilmu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 70 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. 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

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé diplomové práce, panu doc. Ing. Stanislavovi Obručovi Ph.D., za jeho čas a cenné rady, které mi v průběhu práce poskytl. Velké poděkování patří rovněž konzultantům Ing. Pavle Benešové a Ing. Danovi Kučerovi za jejich ochotu a vstřícný přístup při práci v laboratoři i mimo ni. Dále bych ráda poděkovala Ústavu přístrojové techniky Akademie věd České republiky a jeho zaměstnancům, s jejichž pomocí byly realizovány analýzy využívající Ramanovu spektroskopii a metodu Kryoskenovací elektronové mikroskopie. V poslední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým za jejich podporu a zázemí, které mi při vypracovávání diplomové práce poskytl.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Polyhydroxyalkanoáty.....	8
2.1.1	Struktura a vlastnosti.....	8
2.1.2	Metabolismus PHA.....	9
2.1.3	Biologický význam PHA.....	10
2.1.4	Průmyslové využití PHA.....	12
2.2	Biofilm.....	12
2.2.1	Struktura a mechanické vlastnosti.....	12
2.2.2	Extracelulární matrice biofilmu a její složení.....	13
2.2.3	Vznik biofilmu.....	16
2.2.4	Význam biofilmu pro stresovou odolnost bakterií.....	19
2.3	Polyhydroxyalkanoáty ve vztahu k biofilmu.....	20
2.4	Rod <i>Burkholderia</i> jakožto producent PHA.....	22
1.1.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	22
1.1.2	<i>Burkholderia sacchari</i>	23
3	Experimentální část.....	24
3.1	Použité bakterie, chemikálie a přístroje.....	24
3.1.1	Použité bakterie.....	24
3.1.2	Seznam použitých chemikálií.....	24
3.1.3	Seznam použitých přístrojů.....	24
3.2	Kultivace bakterií.....	25
3.2.1	Uchovávání bakteriálních kultur a příprava inokula.....	25
3.2.2	Příprava živného média a dalších roztoků.....	25
3.2.3	Stanovení růstové křivky.....	26
3.2.4	Stanovení biomasy.....	26
3.3	Příprava biofilmu.....	26
3.4	Identifikace a kvantifikace tvorby biofilmu.....	27
3.4.1	Christensenova metoda kultivace v mikrotitrační destičce.....	27
3.4.2	Stanovení absorbance v 96-jamkové mikrotitrační destičce.....	28
3.5	Stanovení PHB pomocí plynové chromatografie.....	28
3.5.1	Stanovení kalibrační křivky PHB.....	28
1.1.3	Stanovení obsahu PHB v biomase.....	28
3.6	Stanovení PHB pomocí Ramanovy spektroskopie.....	29
3.7	Kryo-skenovací elektronová mikroskopie.....	29

3.8	Studium vlivu osmotického stresu	29
3.8.1	Kultivace bakterií	29
3.8.2	Stanovení optické hustoty	29
3.8.3	Stanovení biomasy	29
3.8.4	Stanovení tvorby biofilmu s využitím Christensenovy metody	30
3.8.5	Stanovení PHB pomocí plynové chromatografie	30
3.8.6	Stanovení distribuce PHB v buňkách pomocí průtokové cytometrie	30
3.9	Stanovení viability buněk pomocí průtokové cytometrie	30
3.9.1	Studium vlivu stresových faktorů na viabilitu buněk	31
4	Výsledky a diskuze	32
4.1	Stanovení růstové křivky	32
4.2	Optimalizace a kvantifikace tvorby biofilmu	32
4.3	Příprava biofilmu	34
4.3.1	Stanovení PHB pomocí plynové chromatografie	37
4.3.2	Stanovení PHB pomocí Ramanovy spektroskopie	37
4.3.3	Kryo-skenovací elektronová mikroskopie	39
4.4	Studium vlivu osmotického stresu	41
4.4.1	Stanovení růstové křivky	41
4.4.2	Stanovení biomasy	44
4.4.3	Stanovení tvorby biofilmu s využitím Christensenovy metody	45
4.4.4	Stanovení PHB pomocí plynové chromatografie	46
4.4.5	Stanovení distribuce PHB v buňkách pomocí průtokové cytometrie	46
4.5	Studium vlivu stresových faktorů na viabilitu buněk	49
5	Závěr	51
6	Zdroje	53
7	Seznam zkratk	63
8	Seznam příloh	64
9	Přílohy	65

1 ÚVOD

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) tvoří unikátní skupinu biodegradabilních polymerů. Jedná se o polyestery produkované intracelulárně celou řadou mikroorganismů, nejčastěji gramnegativními a grampozitivními bakteriemi. Tyto sloučeniny bakteriím primárně slouží jako alternativní zdroj uhlíku a energie, v případě vyčerpání exogenních zdrojů. Již bylo identifikováno více než 150 různých monomerů PHA [1]. Nejběžnějším a také nejstudovanějším zástupcem je poly-3-hydroxybutyrát (PHB). Dále jsou to například polyestery 3-hydroxypropionátu (3HP), 4-hydroxybutyrátu (4HB), 5-hydroxyvalerátu a další [2]. PHA se vyznačují svými termoplastickými a elastomerickými vlastnostmi, které se podobají vlastnostem polyethylenu nebo polypropylenu. Tyto vlastnosti se mohou v závislosti na složení polymerní směsi měnit. Z hlediska životního prostředí jsou PHA rozložitelné [3, 4, 5] a biokompatibilní [6]. Z těchto důvodů je mikrobiálním polyesterům v posledních letech věnována zvýšená pozornost, jakožto alternativní náhradě za běžné komoditní plasty.

Bakterie se v přírodních podmínkách obvykle nevyskytují pouze v jednobuněčných kočovních formách, ale vytvářejí biofilm. Biofilm lze definovat jako shluk buněk, které jsou pevně spojeny s povrchem a uzavřeny v matrici, kterou sami produkují [7, 8]. Tato matrice se skládá z extracelulárních polymerních látek (EPS), zejména polysacharidů, dále z DNA, proteinů a lipidů. Biofilm není pouze pasivní shluk buněk, nýbrž strukturně a dynamicky komplexní biologický systém, na jehož charakter má významný vliv jednak genom mikroorganismu a jednak prostředí, ve kterém se mikroorganismy nacházejí [9]. Struktura biofilmu poskytuje optimální prostředí pro tvorbu nutričního gradientu, výměnu genetického materiálu mezi buňkami, a také pro buněčnou signalizaci (*quorum sensing*). Bakterie vytvářející biofilm se mohou lišit od svých suspendovaných protějšků, a to především tvorbou EPS, sníženou růstovou rychlostí a regulací specifických genů. Biofilm se může tvořit na rozmanitých površích, včetně živých tkání, zdravotnických pomůcek, potrubních systémů a přírodních vodních systémů [10].

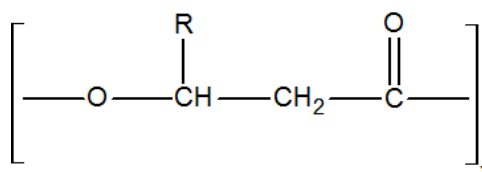
PHA nejsou jediné polymery, které mohou být bakteriemi syntetizovány. Mnoho bakterií může produkovat extracelulární polymerní látky (EPS) [11], které tvoří hlavní složku bakteriálního biofilmu. Metabolismus EPS a PHA se vzhledem ke sdíleným meziproductům biosyntézy a vzájemné kompetici o tok uhlíku v buňkách zdá být podobný [12]. Jako příklad mohou sloužit rhamnolipidy, jakožto složky biofilmové matrice bakterie *Burkholderia cepacia*. Strukturu jak rhamnolipidů, tak PHA tvoří kyselina 3-hydroxymáselná spojená esterovou vazbou. Při syntéze rhamnolipidů a PHA pak dochází k vzájemné kompetici o prekurzory mastných kyselin. Některé metabolity soutěží o biosyntetické prekurzory a mohou být bakteriemi využívány pro podobné účely. Ve skutečnosti jsou tyto látky většinou produkovány v různých okamžicích buněčného cyklu, aby reagovaly na rozličné podmínky prostředí. Vzájemná interakce mezi biosyntetickými drahami PHA a složkami biofilmové matrice jsou složité a mohou se lišit napříč mikroorganismy. Stále existuje mnoho neznámých aspektů, dle kterých bakterie řídí syntézu a degradaci těchto sloučenin na základě svých fyziologických potřeb [13].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Polyhydroxyalkanoáty

2.1.1 Struktura a vlastnosti

Základní strukturu polyhydroxyalkanoátů tvoří jednotlivé monomerní jednotky. Monomerní podjednotky se většinou vyskytují ve formě 3-hydroxy-substituovaných mastných kyselin, jak ukazuje Obrázek 1 [14, 15]. Na základě délky řetězce monomeru mohou být PHA obecně rozděleny na PHA s krátkým bočním řetězcem (scl-PHA), které obsahují zpravidla monomery s 2–5 atomy uhlíku, a na PHA se středně dlouhým bočním řetězcem (mcl-PHA), které tvoří monomery s 6–14 atomy uhlíku. Složení výsledného polyesteru závisí zejména na použitém substrátu [16, 17, 18].



Obrázek 1: Obecná struktura polyhydroxyalkanoátů produkovaných bakteriemi. PHA jsou obvykle tvořeny (R)-β-hydroxy mastnou kyselinou, přičemž R substituent se liší od methylu (C1) po tridecyl (C13) [14]

Délka řetězce monomerů a jejich molární poměr má výrazný vliv na fyzikální a mechanické vlastnosti PHA [19, 20]. Molekulová hmotnost PHA se liší podle typu producenta, obecně se však pohybuje v rozmezí 50 000–1 000 000 Da. Molekulová hmotnost PHA je tak dostatečně vysoká pro vytvoření polymerních vlastností, které se podobají konvenčním plastům, jako je např. polypropylen [14]. Všechny monomerní jednotky tvořící PHA se vyskytují v konfiguraci *D*. Tato skutečnost je způsobena stereospecifitou biosyntetizujících enzymů [21, 22, 23, 24]. U PHA se střední délkou bočního řetězce dochází ke snížení krystalinity, snížení teploty tání a snížení teploty skelného přechodu ve srovnání s PHA s krátkým bočním řetězcem. Tyto polymery se tak stávají měkčí, pružnější a mají odlišný rozsah aplikací ve srovnání s scl-PHA [25, 26]. Drtivá většina mikroorganismů syntetizuje buď scl-PHA, obsahující především jednotky 3HB, nebo mcl-PHA obsahující 3-hydroxyoktanoát (3HO) a 3-hydroxydekanooát (3HD) jako hlavní monomery [27].

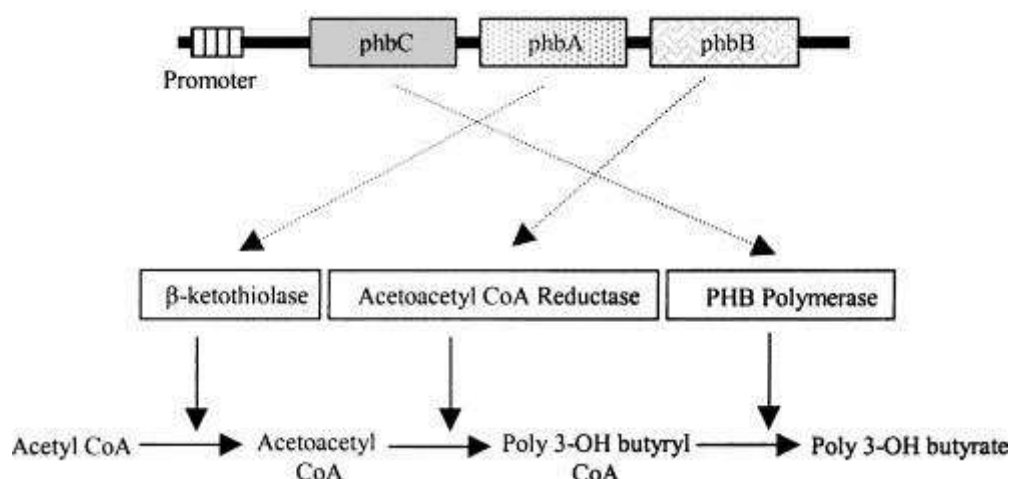
Nejhojněji produkovaným a nejlépe prostudovaným polyesterem je poly-3-hydroxybutyrát. Tento polyester má dokonale izotaktickou strukturu, která je tvořena orientovanými vlákny. PHB izolovaný z bakterií vykazuje 55–80% krystalinitu, zatímco molekuly uvnitř bakterií jsou amorfní a existují jako ve vodě nerozpustné inkluze [20]. Kopolymery PHB mohou vést rovněž ke vzniku polymerů, které obsahují monomery 3-hydroxyvalerátu (3HV) nebo 4-hydroxybutyrátu (4HB). Začleněním 3HV do struktury PHB vzniká kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát), který je oproti samotnému PHB měkčí a elastičtější [28].

2.1.2 Metabolismus PHA

2.1.2.1 Biosyntéza

Biosyntéza PHA může probíhat jak u čistých, tak u směsných bakteriálních kultur. Produkce PHA je pravděpodobně vyvolána v důsledku stresových podmínek prostředí, v nichž se bakterie mohou nacházet [29]. PHB je primárním produktem asimilace uhlíku a je produkován jako zásobní forma energie, která může být využita v případě, kdy nejsou k dispozici jiné energetické zdroje. Jako zdroj uhlíku pro syntézu PHA může posloužit celá řada substrátů, jako jsou například obnovitelné zdroje (škrob, sacharosa, celulóza, triacylglyceroly), fosilní zdroje (methan, minerální olej, hnědé a černé uhlí), vedlejší průmyslové produkty (melasa, syrovátka, glycerol), organické kyseliny (kyselina propionová a 4-hydroxymáselná) nebo i oxid uhličitý [27]. K hromadění PHB dochází v okamžiku, kdy je k dispozici nadbytek zdroje uhlíku a zároveň je vyčerpána některá z ostatních živin, což má za následek nevyvážený růst. Limitující živinou může být zdroj dusíku, síry, fosforu, železa, hořčíku nebo draslíku. Mimoto, u mnoha aerobních bakterií je hromadění PHA indukováno nedostatkem kyslíku [30].

V přírodě bylo vyvinuto několik možných způsobů vzniku PHA. Každý z těchto způsobů je závislý na životních podmínkách daného mikroorganismu v ekosystému [14]. U většiny PHA produkujících mikroorganismů se metabolická dráha biosyntézy PHB skládá ze tří navazujících reakcí katalyzovaných třemi různými enzymy, jak ukazuje Obrázek 2.



Obrázek 2: Metabolická dráha biosyntézy poly(3-hydroxybutyrátu). PHB je postupně ve třech krocích syntetizován působením β -ketoacyl-CoA thiolasy (*phbA*), acetoacetyl-CoA reduktasy (*phbB*) a PHB polymerasy (*phbC*). Operon *phbCAB* obsahuje geny kódující tři enzymy a je kompletně přepisován promotorem umístěným před genem *phbC* [14].

V první reakci dochází ke kondenzaci dvou molekul acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-CoA působením enzymu β -ketoacyl-CoA thiolasy, který je kódován genem *phbA*. V druhé reakci je acetoacetyl-CoA redukován na (R)-3-hydroxybutyryl-CoA pomocí NADPH-dependentní acetoacetyl-CoA dehydrogenasy, kódované genem *phbB*. Následně dochází k polymeraci (R)-3-hydroxybutyryl-CoA na PHB působením enzymu PHB polymerasy, který je kódován genem *phbC* [18]. Všechny tři geny, *phbA*, *phbB* a *phbC*, jsou většinou seskupeny a uspořádány v jednom operonu *phbCAB*. Lokusy kódující geny pro tvorbu PHA se u různých bakteriálních druhů liší. Rozmanitost biosyntetické dráhy PHB závisí na míře odlišnosti těchto lokusů. Geny kódující enzymy pro syntézu scl-PHA (*phb*) a geny kódující enzymy pro syntézu msc-PHA (*pha*) nemusí být vždy nutně navzájem seskupeny.

Organizace těchto genů a pořadí genů v operonu se mohou druh od druhu lišit [27]. Současně s biosyntézou intracelulárního PHB probíhá i jeho degradace. Zdá se tedy, že metabolismus PHB probíhá cyklickým mechanismem [30].

2.1.2.2 Degradace PHA

Degradace PHB je zahájena intracelulárně, aktivitou enzymu PHB depolymerasy, *phaZ*, která z PHB uvolňuje monomer D-3-hydroxybutyrát [31]. Monomer je následně oxidován působením 3-hydroxybutyrát dehydrogenasy na acetoacetát [32], který je v dalším kroku esterifikován na acetoacetyl-CoA enzymem acetoacetyl-CoA syntetasa [33]. Po hydrolýze acetoacetyl-CoA enzymem β -ketoacyl-CoA thiolasou je vzniklý acetyl-CoA asimilován enzymy citrátového a glyoxylátového cyklu [14].

Alternativně je PHB po lyzi buněk uvolněn do extracelulárního prostředí, kde dochází k jeho přeměně na částečně krystalický polymer. Ten může být dále zpracován extracelulární PHB depolymerasou [34]. Extracelulární degradační enzymy jsou fylogeneticky nepříbuzné s těmi intracelulárními. Hlavní rozdíl mezi těmito enzymy je zejména v substrátové specifitě, především ve schopnosti rozpoznávat amorfni a semikrystalické formy [34, 35].

2.1.3 Biologický význam PHA

2.1.3.1 PHA jako zásobní zdroj energie a uhlíku

Obecně je známo, že PHA slouží v první řadě jako záložní zdroj uhlíku a energie v případě vyčerpání externích zdrojů. PHA se v buňce vyskytují ve formě nerozpustných granulí. Na jednu buňku může připadat 8–12 PHA granulí, přičemž současně nedochází k výraznému ovlivnění osmotického tlaku či k jinému škodlivému efektu na buněčnou stěnu [36]. V případě absence exogenního zdroje uhlíku, mohou být PHA velmi snadno v buňkách imobilizovány pomocí PHA degradujícího enzymatického systému. To přináší buňkám velké výhody. V takovém případě totiž není zapotřebí rozkládat jiné esenciální makromolekuly, jako jsou proteiny nebo nukleové kyseliny. U některých druhů rodu *Bacillus* a *Azotobacter*, slouží PHB jako zdroj uhlíku a energie při procesech sporulace, případně encystace. Nicméně, přítomnost PHB pro průběh těchto procesů není nezbytná [37].

2.1.3.2 Využití PHB hlízkovitými bakteriemi při fixaci dusíku

PHB hraje určitou roli jako zdroj energie v procesu symbiotické fixace dusíku u některých rodů hlízkovitých bakterií, např. *Rhizobium* nebo *Bradyrhizobium* [38, 39]. Tyto bakterie napadají kořeny hostitelských rostlin, což vede k vytvoření kořenových nodulů, v nichž se tyto bakterie vyskytují ve formě bakteroidů. Bakteroidy jsou pleomorfní buňky schopné samostatného rozmnožování. Tyto buňky mají aktivní enzym nitrogenasu, který se jinak u volně žijících bakterií nevyskytuje [36]. PHB může tvořit až 50 % biomasy bakteroidů, a to navzdory tomu, že fixace dusíku a syntéza PHB vzájemně soutěží o přítomnost redukčních ekvivalentů [40]. Přesná role metabolismu PHB u těchto bakterií v průběhu infekce, nodulace a fixace dusíku zatím nebyla objasněna [41].

2.1.3.3 Význam PHB ve stresové odpovědi buňky

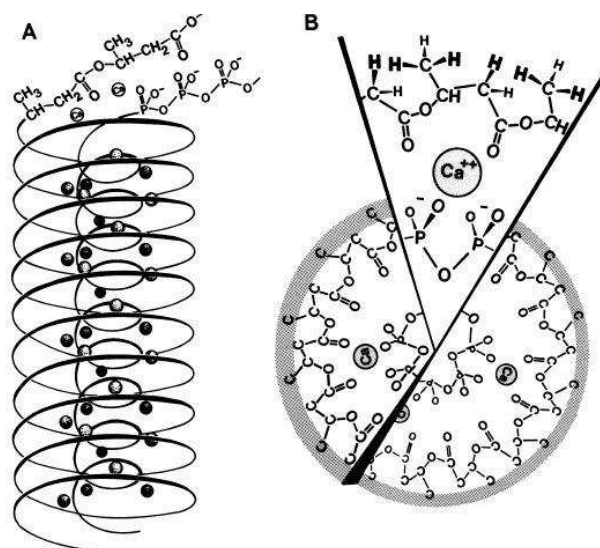
Existují údaje o tom, že akumulace a degradace PHB zvyšuje odolnost bakteriálních buněk vůči celé řadě nepříznivých podmínek, jako je např. vysoká teplota [42, 43], nízká teplota a mráz [43, 44], nebo oxidační stres [43, 45]. Mechanismy, kterými PHB přispívají ke zmírnění následků působení stresu, zatím nebyly plně objasněny. Granule PHB mohou

jednak poskytovat fyzickou bariéru při různých stresových podmínkách. Nicméně, správné fungování anabolické a katabolické dráhy PHB se zdá být nezbytné pro zajištění zvýšené ochrany buňky před stresem [30]. Bylo zjištěno, že intenzivní degradace intracelulárního PHB zvyšuje hladinu intracelulárního adenosintrifosfátu (ATP) a guanosin tetrafosfátu. Je známo, že guanosin tetrafosfát je induktorem exprese alternativního sigma faktoru *spoS*, navyšující expresi řady genů zapojených do stresové odezvy vůči širokému spektru stresových faktorů. Tímto se následně aktivuje exprese genů, poskytujících zkříženou ochranu vůči různým environmentálním stresům [46].

Zdá se, že 3-hydroxybutyrát, jakožto hlavní produkt degradace PHB, by mohl hrát roli i v další stresové odpovědi bakterií. Některé literární zdroje se zmiňují o 3HB jako o kompatibilních rozpustných látkách, zejména u bakterií žijících v hlubinách moří [47] a v poslední době také u *Pseudomonas* sp. CT13 [48]. U těchto bakterií 3HB zastává funkci chaperonů, které napomáhají stabilizaci proteinů v roztoku a k ochraně buněk před kombinovaným působením solného a tepelného stresu [48]. Kromě ochrany enzymů před tepelnou denaturací je 3HB schopný poskytovat ochranu před oxidativním poškozením působením Cu^{2+} a H_2O_2 . Dokonce se ukázalo, že protektivní účinek 3HB je vyšší než u trehalózy a srovnatelný s účinkem hydroxyektouinu, což jsou dobře známé chemické chaperony [49].

2.1.3.4 PHB jako složka prokaryotních a eukaryotních membrán

Jeden z nejzajímavějších objevů v oblasti biochemie PHA bylo zjištění přítomnosti PHB v membránách mikroorganismů. Zpočátku došlo k objevu PHB v plazmatické membráně grampozitivních a gramnegativních bakterií [50]. Později byl výskyt PHA objeven i v membráně eukaryotních mikroorganismů, s nejvyššími koncentracemi v mitochondriích a mikrosomech [51]. PHB mohou tvořit v membránách komplexy s anorganickými fosfáty. Tyto komplexy umožňují překlenutí membrány, a proto mohou hrát roli v regulaci intracelulární koncentrace vápníku a při vápníkové signalizaci. PHB tvoří vnější šroubovicovitý tunel, který obtáčí vnitřní šroubovici. Ta je složena z komplexů polyfosforečnanů s Ca^{2+} a propojuje oba polymery, jak znázorňuje Obrázek 3.



Obrázek 3: (A) Návrh struktury kanálku prostupujícího membránou a zobrazení vzájemného vztahu mezi PHB, polyfosfátů a Ca^{2+} . (B) Vnitřní pohled směrem dolů, podél osy struktury membránového kanálku. Obrázek znázorňuje pouze 4 vazby Ca^{2+} , přičemž zbylé 4 jsou otočeny zespod a nejsou zobrazeny [30, 51].

Vnější PHB helix sčítá 14 monomerních jednotek na otočku. Methylové a methylenové skupiny tvoří lipofilní schránku, zatímco karbonylové kyslíky tvoří polární výplň dutiny. Polyfosforečnanový helix je tvořen monomerními jednotkami, jejichž fosforylované kyslíky jsou orientované směrem ven. Na každou otočku připadá 7 monomerních jednotek a 3,5 jednotek Ca^{2+} . Každý iont tvoří koordinační vazbu se 4 fosforylovanými atomy kyslíku a 4 atomy karbonylového kyslíku [30, 51].

2.1.4 Průmyslové využití PHA

Polyhydroxyalkanoáty se svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi podobají petrochemickým plastům [52]. Při velkoobjemové produkci bioplastů však narážíme na významné problémy, díky kterým bioplasty zatím nejsou schopny plně konkurovat syntetickým polymerům. V prvé řadě je to vysoká cena výroby PHA, oproti syntetickým polymerům. Vysoké náklady na produkci se připisují především vysoké ceně použitého zdroje uhlíku, kterým je glukosa nebo sacharóza. V současnosti je snaha tyto poměrně drahé substráty nahradit levnými odpadními materiály nebo vedlejšími produkty zemědělské a potravinářské výroby, které by zvýšily konkurenceschopnost PHA [53, 54]. Dalším problémem biotechnologické produkce PHA je nedostatek rychlých a spolehlivých analytických nástrojů, které by umožnily rychlé a citlivé stanovení PHA uvnitř buněk v průběhu biotechnologického procesu [55]. V poslední řadě je velkoobjemová produkce PHA komplikována speciálními růstovými podmínkami, které jsou produkčními mikroorganismy vyžadovány [52].

Dříve byly PHA využívány výhradně pro výrobu plastových lahví, vláken, obalů, latexu a produktů pro zemědělské nebo komerční využití [15, 56]. Později se tyto polyestery začaly využívat i pro medicínské aplikace [15, 52, 56].

2.2 Biofilm

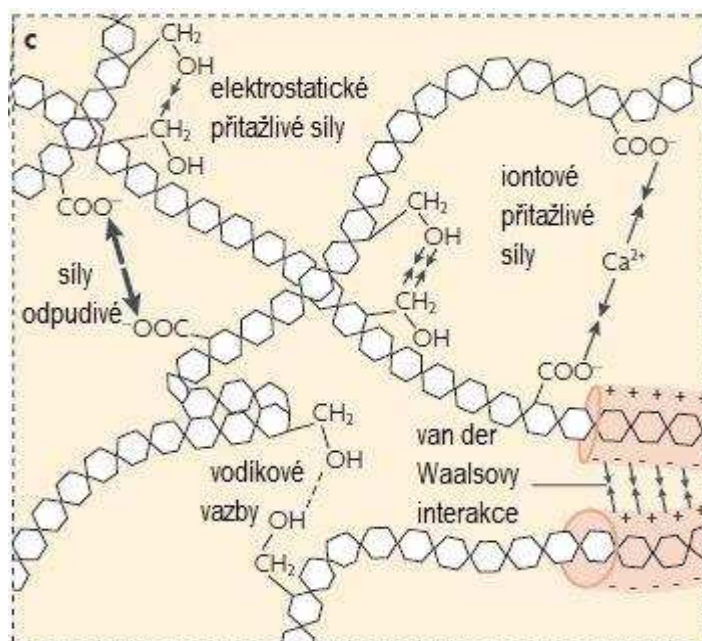
2.2.1 Struktura a mechanické vlastnosti

Každý biofilm konkrétního mikrobiálního společenstva je unikátní, nicméně existují určité znaky společné všem biofilmům [57]. Na strukturu biofilmu má vliv několik faktorů. Jsou to zejména hydrodynamické podmínky, koncentrace živin, pohyblivost bakterií, mezibuněčná komunikace, ale také samotné mikroorganismy uvnitř biofilmu [10].

Základní strukturní jednotkou biofilmu jsou mikrokolonie bakteriálních buněk [10]. Tyto mikrokolonie jsou uzavřeny v EPS matici a odděleny od jiných mikrokolonií vodními kanálky [58]. Tok kapaliny uvnitř těchto kanálků umožňuje difuzi živin, kyslíku, ale i antimikrobiálních činidel [10]. Těsné uspořádání buněk v mikrokoloniích nebo mezi mikrokoloniami poskytuje ideální prostředí pro vytvoření gradientu živin, výměnu genů a *quorum sensing*. Mikrokolonie mohou být složeny z více bakteriálních druhů. Díky tomu může snadno docházet ke koloběhu různých živin (např. dusíku, síry a uhlíku) prostřednictvím redoxních reakcí probíhajících v půdních a vodních biofilmech [10]. Mikrobiální buňky uvnitř mikrokolonií se časem mohou stát pohyblivé a migrovat z jedné mikrokolonie do druhé. V důsledku toho se mikrokolonie mohou vzájemně mísit a měnit svou strukturu od kompaktní až po volnější. Pohyblivé buňky mohou být nakonec z biofilmu úplně dispergovány, což vede k rozpuštění mikrokolonie [10].

Přestože má biofilm slizovitou konzistenci, tedy že jeho struktura není rigidní, je důležitá mechanická odolnost biofilmu. K mechanické odolnosti biofilmu přispívají zejména EPS a působící smyková síla [59, 60]. Vznik bakteriálních mikrokolonií byl zpozorován na

površích, které byly vystaveny působení permanentních smykových sil [60]. Biofilmy obecně vykazují viskoelastické vlastnosti. V závislosti na silách působících na matici může biofilm podléhat buďto vratné pružné reakci, nebo nevratné deformaci. Na základě kompresních experimentů bylo zjištěno, že v důsledku reakce na tlak biofilmy procházejí fází elastického chování, až dosáhnou bodu zlomu, po kterém se biofilm chová jako viskózní tekutina. Tento fakt je pravděpodobně způsoben rozdílnými vazebnými interakcemi mezi složkami EPS, které jsou drženy pohromadě slabými fyzikálně-chemickými interakcemi, jako jsou vodíkové vazby, van der Waalsovy síly a elektrostatické interakce Obrázek 4.



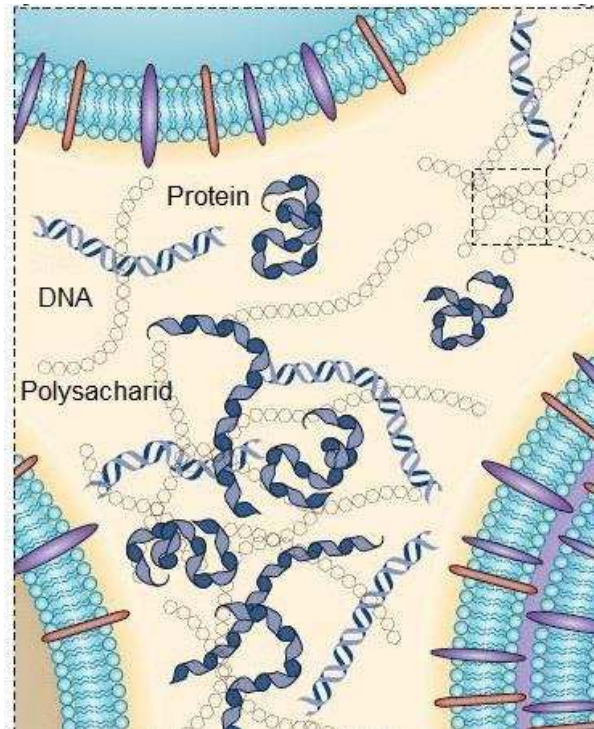
Obrázek 4: Skupiny slabých fyzikálně-chemických interakcí a zapletení biopolymerů, které ovlivňují stabilitu EPS matrice [61].

Kromě polysacharidů mohou být do struktury biofilmu zapleteny další biopolymery, což přispívá ke zvýšení stability matrice [61]. Elastické materiály mohou při působení napětí absorbovat energii, což se projeví jejich deformací. Za účelem zmírnění působení smykové stresu může dojít k přeskupení biofilmu. Biofilm tak může pomocí vratné deformace odolávat přechodným stresovým událostem. Je možné, že biofilm je schopen, v reakci na mechanické namáhání, na přechodnou dobu zvýšit pevnost strukturní matrice biofilmu zvýšením produkce EPS. Na mechanické vlastnosti biofilmu může mít dále výrazný vliv interakce vícemocných anorganických iontů s EPS. Například přítomnost Ca^{2+} dokáže zvýšit mechanickou odolnost mukoidu v biofilmu bakterie *P. aeruginosa*. Tento účinek se vysvětluje tím, že Ca^{2+} zprostředkovávají zesílení polyaniontových molekul alginátu [62].

2.2.2 Extracelulární matrice biofilmu a její složení

Ve většině bakteriálních biofilmů buňky tvoří méně než 10 % sušiny. Zbytek, tedy více než 90 %, obvykle tvoří matrice, kterou bakterie sami produkují do bezprostředního okolí. Matrice sestává ze směsi různých extracelulárních polymerních látek (EPS), zejména polysacharidů, dále z proteinů, nukleových kyselin a lipidů (Obrázek 5). Tyto látky jsou zodpovědné za adhezi buněk k povrchu a za stabilitu biofilmu [61]. EPS přechodně imobilizují buňky v biofilmu a udržují je v těsné blízkosti, což bakteriím umožňuje vzájemnou buněčnou komunikaci a vznik mikrokolonií. EPS mohou rovněž sloužit jako zdroj živin.

Nicméně, některé komponenty EPS jsou jen málo rozložitelné a vzhledem ke složitosti EPS by kompletní degradace všech složek EPS vyžadovala široké spektrum enzymů. Matrici biofilmu si lze představit, mimo jiné, jako externí trávicí systém. Extracelulární enzymy přítomné v matrici umožňují buňkám, které se nacházejí v jejich bezprostředním okolí, metabolizovat biopolymery přítomné v biofilmu [59].



Obrázek 5: Hlavní komponenty matrice biofilmu (polysacharidy, DNA, proteiny) jsou nerovnoměrně rozptýleny mezi buňkami, a vytvářejí tak rozdíly v jednotlivých místech matrice [59].

2.2.2.1 Exopolysacharidy

Primárně jsou EPS přítomné v matrici tvořeny polysacharidy [62, 63]. Většina těchto polysacharidů tvoří dlouhé lineární nebo větvené molekuly s molekulovou hmotností $0,5\text{--}2 \cdot 10^6$ Da [64]. Jedná se většinou o heteropolysacharidy, které jsou složeny ze směsi neutrálních nebo nabitých sacharidových zbytků. Ve své struktuře mohou obsahovat organické či anorganické substituenty, které výrazně ovlivňují jejich biologické a fyzikální vlastnosti [65]. Řada známých extracelulárních polysacharidů, jako jsou např. alginát, xanthan, nebo kyselina kolagenová, má polyaniontový charakter. Záporný náboj polysacharidů je způsoben přítomností pyruvátu, nebo uronových kyselin, jako jsou kyseliny D-glukuronová, D-galakturonová a mannuronová [65, 66]. Tato vlastnost je důležitá, protože umožňuje asociaci dvojmocných kationtů, jako je vápník a hořčík, což hraje důležitou roli při tvorbě polymerních vláken. Zároveň dochází ke zvýšení vazebné síly ve vzniklém biofilmu [65]. V případě některých gram-pozitivních bakterií, jako jsou stafylokoky, může být složení EPS zcela odlišné a v první řadě mohou mít kationtovou povahu [69].

Prostřednictvím vodíkových vazeb jsou EPS schopné do své struktury vázat velké množství vody. Až na výjimky má většina EPS jak hydrofobní, tak hydrofilní charakter a liší se navzájem v rozpustnosti. Struktura a složení polysacharidů může mít významný vliv na vlastnosti biofilmu. Například, mnoho bakteriálních EPS ve své struktuře obsahují řetězce s 1,3- nebo 1,4-beta-vázanými hexózovými zbytky, díky nimž mají tendenci být tyto

polysacharidy tužší, méně deformovatelné a v některých případech málo rozpustné či zcela nerozpustné. Jiné molekuly EPS, v závislosti na jejich struktuře, mohou být naopak ve vodě dobře rozpustné. Struktura EPS v biofilmu není obecně jednotná, ale může se lišit v čase a prostoru [66]. Různé organismy produkují různé množství EPS, ale obecně se produkce EPS zvyšuje se stářím biofilmu [70]. EPS se mohou spojovat s ionty kovů, dvojmocnými kationty, nebo jinými makromolekulami, jako jsou proteiny, DNA, lipidy nebo dokonce huminové látky [65]. Je známo, že produkce EPS je ovlivněna přítomností živin v růstovém médiu. Nadbytek uhlíku a omezené množství dusíku, draslíku, nebo fosforu podporuje syntézu EPS [66]. EPS díky svému vysokému stupni hydratace zabraňují vysoušení biofilmu a také mohou přispět k antimikrobiální rezistenci biofilmu. To je umožněno pravděpodobně díky tomu, že EPS vytváří přímou vazbu s antibiotickými prostředky, a brání tak transportu těchto agens skrze biofilm [71].

2.2.2.2 Enzymy

V rámci biofilmu byly detekovány různé extracelulární enzymy, které jsou zapojeny do procesu degradace polymerů [72]. Biopolymery mohou být enzymy štěpeny na nízkomolekulární produkty, které mohou být následně využity jako zdroj uhlíku a energie. Kromě toho mohou být některé enzymy zapojeny do procesu degradace strukturálních EPS, a napomáhat tak odtržení buněk z biofilmu. Jiné enzymy jsou důležitým faktorem virulence při infekčních procesech [59]. Extracelulární enzymy mohou být spolehlivě uchovány v biofilmu díky interakcím s polysacharidy [72, 73]. Díky těmto interakcím je zachována enzymatická aktivita v blízkosti buněk a krátká difuzní vzdálenost pro enzymatické produkty, které tak mohou být buňkou snadněji přijímány. Kromě toho interakce mezi enzymy a strukturálními exopolysacharidy zvyšuje tepelnou stabilitu enzymů a jejich odolnost vůči proteolýze [74].

2.2.2.3 Strukturní proteiny

Kromě enzymů se v matrici nacházejí i proteiny neenzymatické povahy. Jedná se především o proteiny vytvářející vazbu s buněčným povrchem bakterií a extracelulární proteiny vytvářející vazbu se sacharidy, nazývané též lektiny. Lektiny se podílí na vzniku a stabilizaci matricové sítě a tvoří spojení mezi bakteriálním povrchem a EPS [59]. U řady bakteriálních druhů se vyskytuje tzv. Bap protein a jemu podobné proteiny. Jedná se o vysokomolekulární látky na povrchu bakteriálních buněk, jejichž doména je tvořena tandemovými repeticemi. Tyto repetice jsou nezbytné pro vznik biofilmu a hrají roli při bakteriální infekci [75]. Jiné ubikvitní proteinové komponenty matrice jsou amyloidy – fibrilární proteiny se strukturou β skládaného listu. Amyloidy se účastní adheze k neživým povrchům a hostitelským buňkám. Rovněž fungují jako cytotoxiny jak pro rostlinné, tak pro bakteriální buňky [76]. Jako konstrukční prvky matrice mohou v poslední řadě sloužit vláknité útvary na povrchu buněk, jako jsou bičíky nebo fimbrie, které mohou interagovat s jinými složkami EPS [77].

2.2.2.4 Extracelulární DNA

V biofilmech různých původů byla prokázána přítomnost extracelulární DNA (eDNA). Obzvláště velké množství eDNA bylo objeveno v biofilmech pocházejících z odpadních vod [78]. Množství produkované eDNA se může lišit i mezi blízkými příbuznými druhy [59]. Přestože byla eDNA zpočátku považována za zbytkový materiál lyzovaných buněk, vědci se čím dál tím častěji přiklánějí k názoru, že eDNA tvoří nezbytnou součást matrice a biofilmového způsobu života [79]. V závislosti na bakteriálním druhu se eDNA podílí zejména na shlukování buněk, buněčné adhezi, mezibuněčné komunikaci a antimikrobiální

aktivitě buněk [59]. Zdá se, že původ eDNA v matrici se liší mezi druhy. U kmenů grampozitivních proteobakterií se vyskytuje eDNA jednak podobná genomové DNA, ale také eDNA zcela odlišná [80]. Tato skutečnost naznačuje, že eDNA nepochází pouze z usmrcených buněk [59].

2.2.2.5 Lipidy a povrchově aktivní látky

V matrici biofilmu byla rovněž objevena přítomnost lipidů [81]. Lipidy se mohou v matrici vyskytovat ve formě lipopolysacharidů (LPS), které jsou u některých bakteriálních druhů nezbytné pro adhezi k povrchu [82]. Jiné bakteriální druhy produkují extracelulární lipidy s povrchově aktivními vlastnostmi [83]. Příkladem mohou být rhamnolipidy přítomné v matrici biofilmu bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Tyto látky vykazují povrchovou aktivitu, což usnadňuje bakteriím přichycením na povrchu jejich migraci, počáteční vznik mikrokolonií a tvorbu houbovité struktury. Kromě toho, rhamnolipidy brání kolonizaci vodních kanálků a hrají určitou roli při disperzi biofilmu [84, 85].

Povrchově aktivní vlastnosti nesou i některé EPS, zejména pak ty s obsahem surfaktinu, viskosinu a emulsanu. Tyto látky mohou způsobit disperzi hydrofobních látek a zajistit tím biokompatibilitu EPS. To je výhodné zejména pro mikrobiální utilizaci ropných materiálů a bioremediaci ropných skvrn. Biosurfaktanty mohou mít antibakteriální a antifungální vlastnosti a jsou důležité v procesu přichycení a odloučení bakterií z olejových kapiček [86]. Důležitou roli obvykle mají biosurfaktanty, které jsou produkovány mikroorganismy v povrchových vodách na rozhraní vzduch-voda. Tyto látky ovlivňují povrchové napětí vody, což umožňuje efektivnější výměnu plynů mezi kapalinou a atmosférou [87].

2.2.2.6 Voda

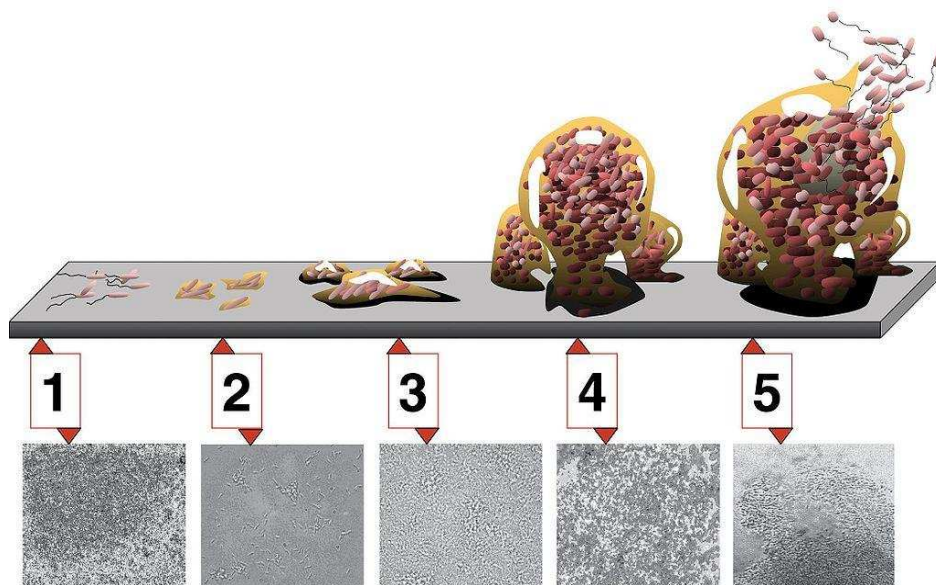
Největší podíl matrice tvoří voda. EPS uvnitř matrice poskytují mikroorganismům vysoce hydratované prostředí, díky němuž biofilm vysychá pomaleji než jeho okolí. Bakterie tak mohou díky produkci EPS aktivně reagovat na vysychání biofilmu, a poskytnout buňkám ochranu před výkyvy vodního potenciálu [88, 89]. Ochrana před vysycháním se zdá být jednou z velkých výhod jak pro producenty EPS, tak pro další členy tvořící mikrobiální společenstvo biofilmu [90]. V závislosti na obsahu vody v matrici se liší vzdálenost jednotlivých komponent EPS od sebe. Při vysychání matrice se komponenty EPS přibližují k sobě, čímž dochází k jejich zakoncentrování. Současně se zvyšuje počet nespecifických vazebných míst, která mohou mezi sebou reagovat, což vede k celkovému snížení objemu biofilmu a stočení jeho struktury [59].

2.2.3 Vznik biofilmu

Přechod bakterií z planktonického do přisedlého způsobu života je reakcí na změny životního prostředí. Síť regulačních mechanismů v důsledku reakce na signály životního prostředí způsobí expresi genů, které mají za následek reorganizaci bakteriální buňky. Toto buněčné přeprogramování vede ke změnám v expresi povrchových molekul, ve využívání živin a ke změně faktoru virulence [91]. Přirozené ekosystémy jsou obecně chudé na dostupné živiny a tvorba biofilmu je důležitým adaptačním procesem pro přežití za těchto podmínek [92].

Molekulární mechanismus vzniku biofilmu je složitý a v přesných detailech se u jednotlivých bakteriálních druhů může lišit [93]. Nicméně, existuje obecný model vzniku biofilmu, jak ukazuje Obrázek 6, který zahrnuje tyto odlišné fáze:

- 1) počáteční zachycení buněk k povrchu
- 2) vznik monomolekulární vrstvy
- 3) vznik vícevrstvé mikrokolonie
- 4) produkce extracelulární matrice
- 5) zrání biofilmu, vytvoření charakteristické trojrozměrné struktury.



Obrázek 6: Vývoj biofilmu v 5 fázích. Fáze 1, počáteční zachycení k povrchu; fáze 2, ireverzibilní přichycení k povrchu, vznik monomolekulární vrstvy; fáze 3, vznik vícevrstvé kolonie s následnou produkcí extracelulární matrice; fáze 4, zrání biofilmu, vznik trojrozměrné struktury; fáze 5, disperze buněk [94].

2.2.3.1 Přichycení buněk k povrchu a vznik monovrstvy

V závislosti na pohyblivosti bakterií rozlišujeme aktivní a pasivní přilnutí buněk k substrátu. Pasivní přichycení je poháněno gravitací, difúzí a dynamikou kapaliny. Při aktivní adhezi je přichycení buněk k povrchu usnadněno řadou látek, jako jsou například různé povrchové proteiny, extracelulární proteiny, kapsulární polysacharidy, adhesin a autolysin [9]. Přichycení trvá většinou od 5 do 30 sekund a probíhá ve dvou etapách: reversibilní přilnutí, po kterém následuje ireverzibilní adheze [92]. Reverzibilní přichycení je způsobeno interakcemi bakterií se substrátem vlivem van der Waalsových sil, elektrostatických sil a hydrofobních interakcí. Během této fáze bakterie stále vykonávají Brownův pohyb a lze je s použitím mírné smykové síly odstranit [95]. Ireverzibilní přichycení je výsledkem ukotvení bakteriálních přívěsků (pili, bičíky nebo protein adhesin) k povrchu, které je většinou následováno produkcí extracelulárních polymerů [96]. Jelikož jsou bakteriální buňky a substrát často záporně nabitě, vznikají mezi nimi odpudivé síly, které obvykle brání přímému kontaktu bakterií se substrátem. Vazby mezi bakteriálními přívěsky a substrátem jsou zprostředkovány silami s krátkým dosahem, jako jsou interakce typu dipól-dipól, vodíkové vazby, hydrofobní vazby a iontové kovalentní vazby [95]. K této vazbě obvykle dochází během několika hodin od kontaktu bakterií s povrchem [97]. Odstranění ireverzibilně přichycených buněk je obtížné a vyžaduje použití silné smykové síly, například drhnutím nebo škrábáním, nebo chemické rozrušení vazebných sil působením enzymů, detergentů, povrchově aktivních látek či dezinfekčních prostředků [95].

2.2.3.2 Vznik mikrokolonií a produkce EPS

Po ireversibilním přichycení buněk k povrchu následuje tvorba mikrokolonií, pokud jsou k tomu vhodné růstové podmínky. Vznik mikrokolonií je výsledkem současně probíhající agregace buněk a růstu mikroorganismů, doprovázeno produkcí EPS. Studie bakteriálních druhů přirozených systémů ukázaly, že v důsledku mezibuněčné komunikace (*quorum sensing*) se agregace buněk mohou účastnit i planktonní bakterie z okolního média [98, 99]. Adheze a tvorba biofilmu u jednotlivých mikroorganismů podléhá rozličné genové regulaci [95]. Mechanismus vzniku biofilmu je dobře popsán u bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. U této bakterie je počáteční přichycení buněk k povrchu následováno transkripcí genu *algC*. Vlivem toho dochází ke snížení syntézy bičíku a ke zvýšení exprese genu *algT*, genu pro syntézu alginátu, hlavní složky EPS pro tento druh [100]. EPS jsou rovněž produkovány jako reakce na přichycení buněk a jako odezva na podněty z prostředí, jako je osmotický tlak, teplota, pH nebo hladovění [95]. Gen *crc* bakterie *P. aeruginosa* kóduje vývoj biofilmu stejně jako katabolickou represi. Tento *crc* gen se rovněž podílí na regulaci genů *pilA* a *pilB*, které kódují hlavně pilusy čtvrtého typu [100]. Genetický kontrolní mechanismus propojující metabolismus uhlíku (*crc* gen) a seskupení pilusů (*pili* gen) je neznámý, ale údaje naznačují, že existuje souvislost mezi dostupností živin a tvorbou biofilmu [101]. Na základě genetické analýzy tvorby biofilmu se ukázalo, že k zahájení vývoje biofilmu je využíváno vícenásobné genetické cesty. Bezprostředně po přichycení buněk k povrchu následuje produkce EPS. Produkce polysacharidů je u gamnegativních bakterií zahájena 5 až 6 hodin po přichycení buněk [102]. Přesné složení EPS není známé, většinou se však jedná o směs polymerů [95].

2.2.3.3 Zrání biofilmu

Pokud jsou podmínky vhodné pro dostatečný růst a aglomeraci buněk, může dojít ke zrání biofilmu a vzniku jeho organizované struktury. Zralý biofilm se může skládat z jedné vrstvy buněk, uzavřené v porézním extracelulárním polymeru, nebo z vícevrstevných volně uložených mikrokolonií, které drží pohromadě v extracelulární matrici proložené vodními kanálkami [95]. Biofilm je tvořen základem, z něhož vyčnívají výběžky, a již zmíněnými vodními kanálkami. Struktura biofilmu je houbovitá. Horní část biofilmu má tvar houby s úzkým stonkem pronikajícím do vodních kanálků [103].

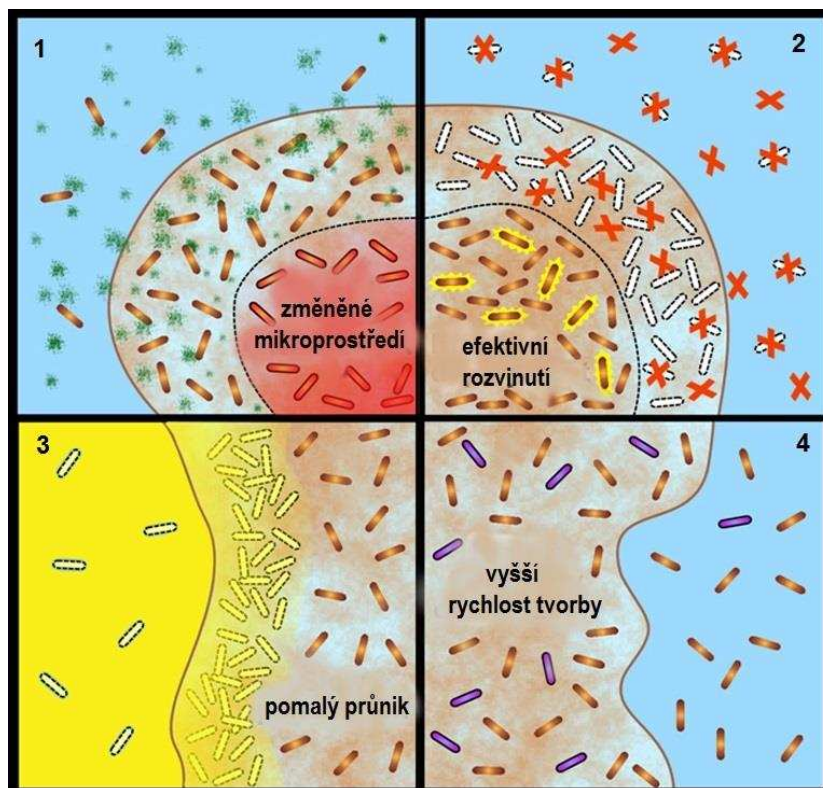
Při vzniku biofilmu se vytváří koncentrační gradient živin a kyslíku, který klesá směrem od povrchu ke spodní části biofilmu. V různých místech biofilmu tak vzniká rozdílná metabolická aktivita. Část biofilmu může být z celku odtržena, čímž vytvoří základ pro vznik nové kolonie v jiném místě. Odtrhávat se mohou jednotlivé buňky nebo shluky buněčných agregátů [95].

2.2.3.4 Podmínky ovlivňující vznik biofilmu

Při vzniku a vývoji biofilmu hraje zásadní roli bakteriální adheze, která je závislá na fyzikálně-chemických vlastnostech buňky a jejího povrchu [95, 104]. Přílnavé vlastnosti buňky jsou ovlivněny buněčným obalem, který se mění v závislosti na environmentálních podmínkách a *quorum sensing*. Ireversibilní přichycení buňky k povrchu je fyziologický proces, který podléhá genové regulaci. Geny zodpovědné za expresi povrchových proteinů, přílnavost a produkci EPS jsou aktivovány vnějšími podněty, jako je hustota populace, stres nebo limitace živin. Počáteční fáze bakteriální adheze je rovněž závislá na složení a vlastnostech okolního média, zejména na jeho povrchovém napětí, pH, přítomnosti živin a smáčecím úhlu [95, 105]. Bakterie mají negativní povrchový náboj a obvykle se chovají jako částečně hydrofobní částice. Stupeň hydrofobicity se může měnit s růstovou fází bakterie. Hydrofobicita obecně klesá se zvyšující se růstovou rychlostí [106].

2.2.4 Význam biofilmu pro stresovou odolnost bakterií

Bakterie zaznamenávají určitý stupeň ochrany a homeostázy, jestliže setrvávají v biofilmu [100]. Na odolnosti bakterií vůči různým stresovým podmínkám životního prostředí mají významný vliv zejména EPS. EPS mohou chránit buňky biofilmu především před UV zářením, vysycháním, osmotickým šokem nebo výkyvy pH [107]. Rovněž bylo prokázáno, že EPS jsou schopné adsorbovat organické látky, jako jsou např. pesticidy, nebo jiné cizorodé látky rozpuštěné v toku kapaliny. V důsledku toho se pak bakterie nemusejí vypořádávat se škodlivými látkami a mohou se soustředit jen na přítomné růstové látky a živiny [108]. EPS přítomné v matici rovněž slouží jako potenciální fyzická bariéra. Dále EPS plní funkci iontoměniče, čímž zamezují difuzi sloučenin z okolního prostředí do biofilmu, a chrání tak biofilm před působením některých antimikrobiálních činidel [109]. Existuje několik hypotetických mechanismů ochrany buněk před působením antimikrobiálních látek, jak znázorňuje Obrázek 7:



Obrázek 7: Hypotetické modely mechanismu ochrany buněk biofilmu před působením antimikrobiálních činidel [110].

1. Samostatně žijící buňky využívají živiny, ale nemají dostatečnou metabolickou aktivitu, aby čerpaly substrát ze sousedních buněk. Na rozdíl od toho, kolektivní metabolická aktivita skupiny buněk tvořící biofilm vede ke vzniku substrátového koncentračního gradientu a lokalizovaného chemického mikroprostředí. Snížení metabolické aktivity může mít za následek menší náchylnost k antimikrobiálním látkám [110].

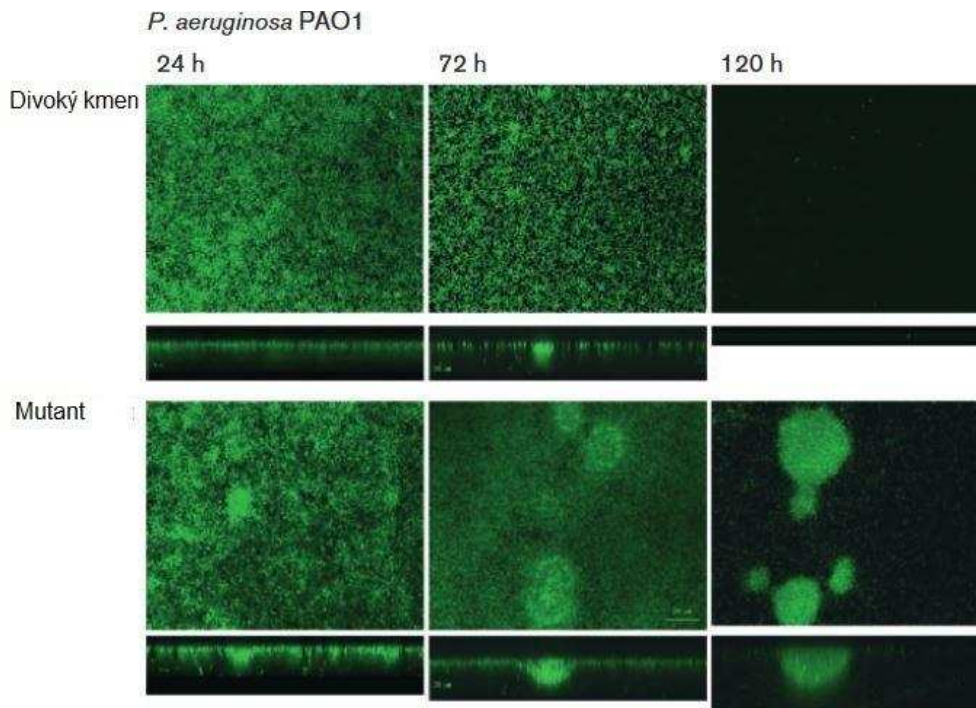
2. Volně žijící buňky nesou genetický kód pro řadu ochranných reakcí na stres. Nicméně, planktonické buňky jsou rychle zahlceny antimikrobiálním činidlem a umírají dříve, než může být reakce na stres aktivována. Naproti tomu v biofilmu mohou některé buňky účinně rozvinout stresovou odpověď na úkor jiných buněk, které umrtní [110].
3. Planktonické buňky jsou schopné antimikrobiální činidla neutralizovat. Avšak, kapacita jediné buňky je nedostatečná pro vyvážení antimikrobiální látky z okolí buňky, ve srovnání s buňkami biofilmu. Ty využívají kolektivní neutralizační sílu, která vede k pomalému nebo neúplnému průniku antimikrobiálních látek do biofilmu [110].
4. Poslední hypotetický model ochrany buněk před působením antimikrobiálních látek je založen na vzniku perzistentních, tedy stálých, buněk. Perzistentní buňky se mohou v malé míře tvořit i v planktonních kulturách za podmínek pomalého růstu, například ve stacionární fázi. V přítomnosti růstového média přecházejí planktonické buňky ze stavu perzistence opět do náchylného stavu. Na rozdíl od toho, návrat perzistentních buněk do citlivého stavu v případě biofilmu není tak snadný. Perzistentní buňky fyzicky setrvávají v matrici biofilmu, čímž dochází k jejich akumulaci [110].

Kromě antibiotik jsou EPS schopny na sebe vázat i kovy, kationty a toxické látky [107, 111].

2.3 Polyhydroxyalkanoáty ve vztahu k biofilmu

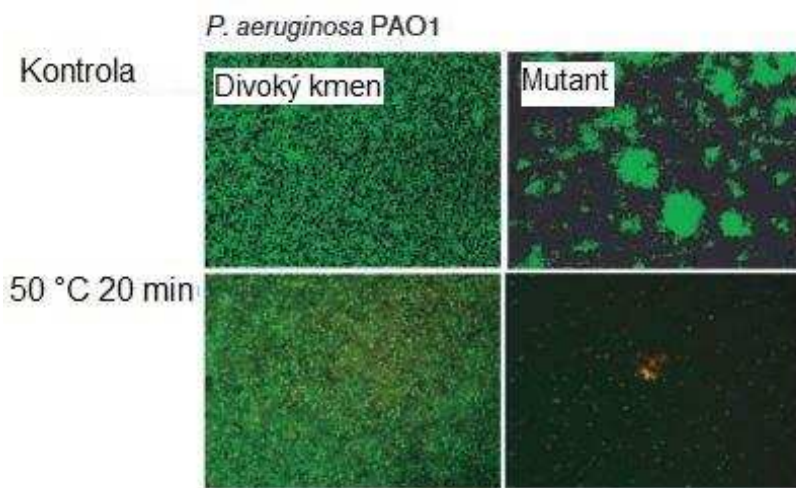
Genové studie bakterie *B. cepacia* prokázaly přítomnost *rhIABC*, genu zodpovědného za syntézu rhamnolipidů, které hrají důležitou roli v architektuře biofilmu a v tvorbě vodních kanálků [112, 113]. Většina fluorescentních pseudomonád, mezi které se dříve řadila i bakterie *Burkholderia cepacia*, než byla z rodu *Pseudomonas* vyčleněna, je schopna syntetizovat a ukládat velké množství PHA [18]. Existují studie vlivu biosyntézy PHA na biosyntézu alginátu, hlavního polysacharidu pseudomonádového biofilmu, rhamnolipidů a také na toleranci vůči stresu. Předmětem studie byly bakterie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, které byly porovnávány se svými protějšky deficientními v biosyntéze PHA [12]. Přítomnost PHA může mít určitý vliv na počáteční fázi vzniku biofilmu. Syntéza PHA má vliv, mimo jiné, na produkci sloučenin ovlivňující povrchové vlastnosti buněk [114]. Biofilmové buňky akumulující PHA mají nižší přilnavost k plastovým materiálům než jejich PHA deficientní mutanti. Důvodem je pravděpodobně drobný rozdíl v povrchové hydrofobicitě buněk. Buňky, akumulující PHA vykazovaly vyšší hydrofilnost, než buňky PHA deficientní. To může být způsobeno přesměrováním toku uhlíku do biosyntézy mastných kyselin v buňkách, které nehromadí PHA. Vyšší produkce mastných kyselin se pak projeví zvýšenou hydrofóbností buněčného povrchu [115, 116]. Dále se ukázalo, že u PHA-negativních mutantů PAO1 došlo téměř k trojnásobnému nárůstu biosyntézy alginátu ve srovnání s divokým typem. Co se týče vývoje biofilmu, PHA-negativní mutanti tvořili stabilní biofilm s velkými, zřetelně diferencovanými mikrokoloniami. Oproti tomu divoký kmen *P. aeruginosa* vytvářel mikrokolonie mnohem menší, které se navíc po 5 dnech značně rozptýlily, jak dokazuje Obrázek 8. Tyto údaje naznačují, že biosyntéza PHA a biosyntéza biofilmu jsou ve vzájemné kompetici s ohledem na společný prekursor, kterým je acetyl-CoA. Acetyl-CoA vstupuje buď do biosyntézy mastných kyselin, kde slouží k syntéze PHA, nebo do citrátového cyklu, kde slouží mimo jiné k syntéze alginátu [12]. Biosyntéza rhamnolipidů rovněž závisí na dostupnosti prekursoru, v tomto případě 3- β -hydroxydekanoyl-3- β -hydroxydekanoátu. Dříve se vědci domnívali, že tento prekursor je syntetizován pomocí PHA synthasy [117, 118]. Pozdější experimenty však tuto hypotézu nepotvrdily. U bakterií, kterým

byly odebrány geny pro PHA syntasů byla i nadále zachována schopnost produkce rhamnolipidů. Tento fakt naznačuje, že žádná z PHA syntas není přímo zapojena do biosyntézy rhamnolipidů [12]. V zásadě platí, že bakterie mají tendenci tvořit PHA v přítomnosti omezujících růstových faktorů, které brání organismům využívat biologickou spotřebu kyslíku na růst biomasy [119]. Obecně lze předpokládat, že mutované buňky defektní v produkci PHA jsou citlivější na nutriční stres než buňky divokého typu a absence tohoto rezervního polymeru může vyvolat stres z hladovění. Jednou z funkcí biofilmu je poskytnout buňkám příznivé podmínky a chránit je před těmito nepříznivými vlivy. Z toho důvodu může být vznik strukturovaného biofilmu a nadprodukce polysacharidů, včetně alginátu, výhodná zejména pro vyhladovělé buňky, které nemají PHA rezervy [12].



Obrázek 8: Srovnání biofilmů vytvářených kmeny *P. aeruginosa* a jejich příslušnými PHA-negativními mutanty. Biofilmy byly barveny pomocí SYTO 9 a vizualizovány s využitím konfokální laserové mikroskopie se zvětšením přibližně 140x. Horní panely představují konfokální obrazy shora dolů, spodní panely představují příčné řezy biofilmem [12].

Další experimenty prokázaly jednoznačnou souvislost mezi PHA a odolností bakteriálního biofilmu vůči vysokým teplotám. Divoké kmeny bakterií a jejich PHA deficientní mutanti byli vystaveni teplotnímu stresu (50 °C) za hladovějících podmínek. U PHA deficientních bakterií došlo již po 10 minutách k výraznému poklesu životaschopných buněk a k silnému narušení struktury biofilmu, jak dokazuje Obrázek 9. Tato skutečnost ukazuje, že PHA plní důležitou úlohu při stresové odpovědi buňky a zvyšuje stresovou odolnost biofilmových buněk [12].



Obrázek 9: Snímky biofilmů vystavených teplotě 50 °C po 20 minutách získané pomocí konfokální laserové mikroskopie. Zelená barva reprezentuje životaschopné buňky, zatímco červená barva představuje buňky s poškozenou buněčnou membránou, tedy mrtvé buňky [12].

2.4 Rod Burkholderia jakožto producent PHA

Taxonomické zařazení rodu Burkholderia je následující:

doména *Bacteria*

kmen *Proteobacteria*

třída *Betaproteobacteria*

řád *Burkholderiales*

čeleď *Burkholderiaceae* [120]

1.1.1 Burkholderia cepacia

Bakterie *Burkholderia cepacia*, dříve nazývaná *Pseudomonas cepacia*, známá jako rostlinným patogenem, se v posledních letech objevuje i jako lidský oportunní patogen. Nejčastěji vyvolává infekci dolních cest dýchacích, čímž se stává reálnou hrozbou pro osoby s oslabenou funkcí plic [121]. *B. cepacia* často, společně s bakteriemi *Pseudomonas aeruginosa*, vytváří smíšený biofilm, který napadá plíce pacientů trpících cystickou fibrózou [122]. *B. cepacia* byla poprvé objevena v roce 1949 Walterem Burkholderem, který tuto bakterii označil za původce hnilobných procesů cibule [123]. Jedná se o gramnegativní, nesporulující, aerobní, pohyblivou bakterii s respiračním metabolismem. Je příkladem typické kataláza pozitivní a oxidáza pozitivní bakterie. Je schopna produkovat nefluorescenční barviva [124]. Za určitých podmínek je *B. cepacia* schopna přeměnit širokou škálu uhlíkatých zdrojů na PHA s krátkým řetězcem, které obsahují homopolymery polyhydroxybutyrátu a polyhydroxyvalerátu [121]. V přítomnosti glukosy a kyseliny propionové (případně jiného prekurzoru 3HV), jakožto zdroje uhlíku, tak může dojít k produkci kopolymeru poly(hydroxybutyrát-co-hydroxyvalerátu) (PHB-co-PHV) [125]. *B. cepacia* disponuje schopností tvořit bakteriální biofilm. Exopolysacharidy přítomné v biofilmu obsahují zejména rhamnosu, mannosu, galaktosu, glukosu a zbytky kyseliny glukuronové [126, 127]. Optimální růstová teplota *B. cepacia* dosahuje 30–35 °C [124]. Vyskytuje se přirozeně v půdě, vodě a na rostlinách [128].

1.1.2 *Burkholderia sacchari*

Burkholderia sacchari, bakterie schopná akumulovat polyhydroxyalkanoáty, byla poprvé izolována z půdy třtinové plantáže v Brazílii a identifikována v roce 2001. Jedná se o gramnegativní, kataláza pozitivní a oxidáza pozitivní bakterii [129]. Je schopna přeměnit celou řadu uhlíkatých zdrojů na PHA, a to s vysokou účinností. PHA nahromaděné v bakteriích *B. sacchari* mohou tvořit více než 75 % buněčné sušiny [130]. Na živném médiu tato bakterie tvoří bílé neprůhledné kolonie v důsledku nahromadění PHB a kopolymeru poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerátu) (P(3HB-co-HV)). Buňky *B. sacchari* mají tyčinkovitý tvar. Díky přítomnosti několika polárních bičků na povrchu buňky se jedná o pohyblivou bakterii. Tyto bakterie poměrně dobře rostou v teplotním rozmezí 25–37 °C, optimální růstová teplota však dosahuje 28–30 °C. Tvorba spor a produkce extracelulárních proteolytických enzymů nebyla u *B. sacchari* zpozorována [129].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité bakterie, chemikálie a přístroje

3.1.1 Použité bakterie

V diplomové práci byly využity bakterie *Burkholderia cepacia* CCM 2656, které byly získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně. Dále byl použit kmen *Burkholderia sacchari* DSM 17165 zakoupený v Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Braunschweig, Německo.

3.1.2 Seznam použitých chemikálií

- Citrát amonno-železitý (Fluka)
- D-glukosa monohydrát p.a. (Penta)
- DiD roztok (Thermo Fisher Scientific)
- Dihydrát chloridu vápenatého (Lachema)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lachner)
- Dimethylsulfoxid (Lachner)
- Dodecylsírán sodný (Serva)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Lachner)
- Ethanol (VWR Chemicals)
- Granulát komerčních PHA (Sigma-Aldrich)
- Heptahydrát síranu hořečnatého (Lachner)
- Hydroxid sodný (Lachner)
- Hydrogenfosforečnan sodný (Lachner)
- Chloroform (VWR Chemicals)
- Chlorid draselný (Lachner)
- Chlorid sodný (Lachner)
- Krystalová violet (Sigma-Aldrich)
- Kyselina benzoová (Lachner)
- Kyselina octová 99,8% (Lachner)
- Kyselina sírová (Lachner)
- Methanol (VWR Chemicals)
- Nilská červeň (Sigma)
- NutrientBroth 1% peptone (Himedia)
- Peroxid vodíku 30% (Fluka)
- Propidium-jodid (Sigma)
- Savo Original (Unilever)
- Síran amonný (Lachner)
- Trypton-sojový bujón (Sigma-Aldrich)

3.1.3 Seznam použitých přístrojů

- Analytické váhy, Boeco
- Biofilmový reaktor, CBR 90-3 CDC Biofilm Reactor, BioSurface Technologies
- Centrifuga, Boeco U-32R
- Centrifuga, Hettich MIKRO 200
- Cryo-skenovací elektronový mikroskop, Magellan 400/L, FEI
- Fotometr pro 96-ti jamkové mikrotitrační destičky, ELx808, BioTek Instrumentals
- Laboratorní váhy, Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH
- Laminární box Aura mini, Bio Air Instruments
- Nanofotometr, IMPLEN

- Plynový chromatograf: GC-FID (Thermo, TRACE 1300),
- Průtokový cytometr, Apogee A50, ApogeeFlow Systems
- Renishaw inVia Raman Spectrometer, Renishaw plc.
- Temperovaná třepačka, Heidolph1000, Labicom s.r.o
- Termostat, LS-35
- Vortex, Heidolph Reax Top
- Vakuová komora, Leica EM ACE600, Leica Microsystems

3.2 Kultivace bakterií

3.2.1 Uchovávání bakteriálních kultur a příprava inokula

Za účelem dlouhodobého skladování byly bakterie uchovávány v lyofilizovaném stavu v mrazničce. Pro přípravu inokula byla kultura z kryozkumavky převedena do Erlenmayerovy baňky se 100 ml tekutého produkčního média. Jako produkční médium bylo použito médium NutrientBroth o koncentraci 25 g média na 1 000 ml vody. Kultivace probíhala na temperované třepačce při teplotě 30 °C a frekvenci otáčení 180 ot·min⁻¹ po dobu alespoň 24 hodin.

3.2.2 Příprava živného média a dalších roztoků

Pro přípravu inokula bylo použito pevné médium NutrientBroth, které obsahovalo:

Beefextract	10 g·l ⁻¹
Pepton	10 g·l ⁻¹
NaCl	5 g·l ⁻¹
Agar	20 g·l ⁻¹

Pro produkci bakteriálního biofilmu bylo připraveno minerální médium, které obsahovalo:

(NH ₄) ₂ SO ₄	1,00 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	9,02 g
KH ₂ PO ₄	1,50 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,10 g
NH ₄ -Fe(III) citrát	0,06 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,20 g
destilovaná voda	1 000 ml
roztok glukosy (400 g·l ⁻¹)	50 ml
roztok stopových prvků	1 ml (viz níže)

Pro přípravu minerálního média byl použit roztok stopových prvků o následujícím složení:

FeCl ₃	9,700 g
CaCl ₂	7,800 g
CuSO ₄	0,156 g
CoCl ₂	0,119 g
NiCl ₂	0,118 g
CrCl ₂	0,062 g
HCl (0,1M)	1 000 ml

Pro některá stanovení byl použit tzv. pufovaný fyziologický roztok (PBS), který obsahoval:

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Na ₂ HPO ₄	1,42 g
destilovaná voda	1 000 ml

3.2.3 Stanovení růstové křivky

Pro monitoring růstu bakterií *B. sacchari* a *B. cepacia* v submerzním médiu byly sestaveny zjednodušené růstové křivky. Za tímto účelem byla provedena kultivace bakterií v minerálním médiu při teplotě 30 °C a frekvenci otáčení 180 ot·min⁻¹ po dobu 64 hodin. Během kultivace byl přibližně každé 3 hodiny odebrán vzorek 1 ml bakteriální suspenze. V případě nutnosti byly vzorky naředěny destilovanou vodou. U takto připravených vzorků byla změřena absorbance při vlnové délce 630 nm oproti čisté destilované vodě. Zjednodušená růstová křivka byla sestavena jako závislost optické hustoty na době kultivace.

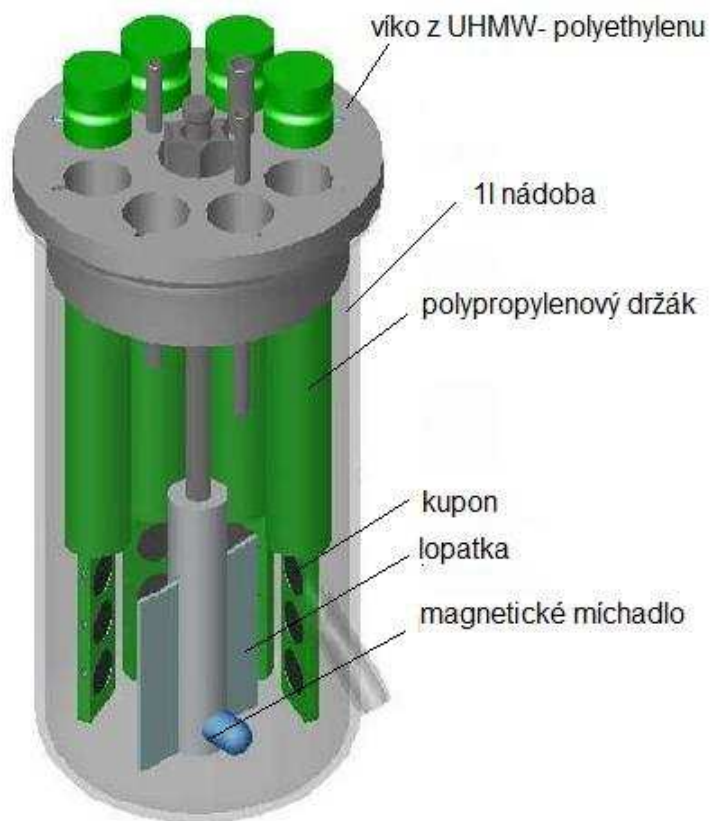
3.2.4 Stanovení biomasy

Pro stanovení biomasy bylo odebráno 10 ml bakteriální suspenze do přesně zvážené centrifugační zkumavky. Zkumavka byla centrifugována při frekvenci 8 000 ot·min⁻¹ po dobu 4 minut. Supernatant byl ze zkumavky odstraněn a k sedimentu bylo přidáno 5 ml destilované vody. Obsah zkumavky byl vortexován a následně opět centrifugován. Po odstranění supernatantu byla biomasa při teplotě 80 °C vysušena do konstantní hmotnosti. Vysušené buňky byly zváženy a byla stanovena jejich koncentrace v mg·ml⁻¹.

3.3 Příprava biofilmu

K přípravě biofilmu byl použit sterilní Center for Disease Control (CDC) biofilmový reaktor, jehož schéma znázorňuje Obrázek 10. Jedná se o skleněnou nádobu o objemu 1 litr, která je opatřena polyethylenovým krycím víkem. Do víka je zasazeno 8 vyjímatelných polypropylenových držáků s třemi otvory pro upevnění kuponů. Kuponky svým tvarem připomínají čočku a mohou být vyrobeny z různých materiálů, zejména skla, polyvinylchloridu, vinylu, nerezové oceli a polykarbonátu. Tyto kuponky v reaktoru slouží pro vytvoření patřičného povrchu potřebného pro vznik biofilmu. Promíchávání tekutiny v celém objemu nádoby zajišťuje magnetické míchadlo. Nádoba reaktoru je opatřena vstupním a výstupním otvorem pro přívod a odvod kapaliny v případě kontinuální kultivace [131].

Pro přípravu biofilmu bylo do reaktoru v laminárním boxu převedeno 200 ml minerálního média, jehož složení popisuje kapitola výše. Médium bylo zaočkováno v inokulačním poměru 1:10. Zaočkovaný bioreaktor byl umístěn na magnetické míchadlo, kde probíhala vsádková kultivace po dobu 6 dní. Během kultivace došlo k vytvoření biofilmu, zejména na stěnách reaktoru a na lopatkách míchadla. Po ukončení kultivace byl narostlý biofilm odebrán do Eppendorfovy zkumavky, promyt v 1 ml destilované vody a centrifugován při 10 000 ot·min⁻¹ po dobu 4 minut. Následně byl supernatant ze zkumavky odstraněn. Současně bylo z reaktoru odebráno 10 ml submerzního podílu do centrifugačních zkumavek pro stanovení planktonických buněk. Suspenze planktonických buněk byla centrifugována při frekvenci 8 000 ot·min⁻¹ po dobu 4 minut. Supernatant byl ze zkumavky odstraněn a k sedimentu bylo přidáno 5 ml destilované vody. Obsah zkumavky byl vortexován a následně opět centrifugován. Po odstranění supernatantu byly jak planktonické tak biofilmové buňky uchovány pro další stanovení.



Obrázek 10: Schéma CDC biofilmového reaktoru [132].

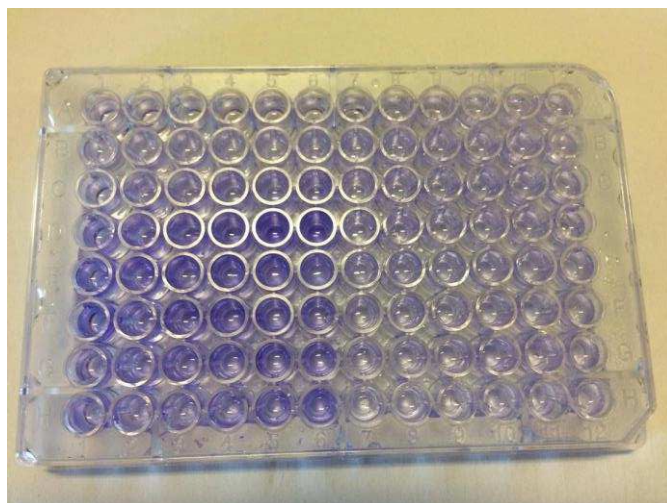
3.4 Identifikace a kvantifikace tvorby biofilmu

3.4.1 Christensenova metoda kultivace v mikrotitrační destičce

Za účelem průkazu tvorby biofilmu a studia vlivu různých podmínek kultivace na růst biofilmu se využívá Christensenova metoda. Ta je založena na kultivaci zkoumaného mikroorganismu v mikrotitrační destičce s následným barvením biofilmu vytvořeného na stěnách jamek [133]. NB médium bylo zaočkováno bakteriemi *B. cepacia* a *B. sacchari* a kultivováno při 30 °C alespoň 24 hodin. Následně byla kultura smíchána v poměru 1:100 s čerstvým médiem. Takto připravená kultura byla pipetována v objemu 100 nebo 150 μl do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky. Uzavřená destička se byla opatřena parafilmem a kultivována za podmínek vhodných pro růst daného mikroorganismu. Kultivace *B. cepacia* a *B. sacchari* probíhala po dobu 48 hodin, při teplotě 30 °C a otáčkách 180 $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$. Po ukončení kultivace byly zbytky média, spolu s planktonickými buňkami, odstraněny prudkým vytřepáním a promytím destičky v destilované vodě. Následně byly prstence biofilmu narostlého na stěnách jamek barveny krystalovou violetí. Do každé jamky bylo napipetováno 125 μl 0,1% roztoku krystalové violeti. Destička s barvivem byla ponechána 10 minut při laboratorní teplotě. Po 10 minutách byly zbytky barviva opět odstraněny prudkým vytřepáním a promytím destičky v destilované vodě [134]. Tímto způsobem byla umožněna identifikace tvorby biofilmu vybranými bakteriemi.

3.4.2 Stanovení absorbance v 96-jamkové mikrotitrační destičce

Za účelem kvantifikace se biofilm obarvený krystalovou violetí v jednotlivých jamkách rozpustí v 200 μl 30% kyseliny octové. Destička s kyselinou octovou se ponechá 15 minut stát při laboratorní teplotě. Následně se pipetuje 125 μl roztoku kyseliny octové s rozpuštěným barvivem do čisté mikrotitrační destičky. Pomocí fotometru se stanoví optická hustota v jednotlivých jamkách při vlnové délce 562 nm oproti čisté kyselině octové [134].



Obrázek 11: Stanovení absorbance roztoků v jednotlivých jamkách mikrotitrační destičky po obarvení biofilmu krystalovou violetí a rozpuštění v kyselině octové.

3.5 Stanovení PHB pomocí plynové chromatografie

3.5.1 Stanovení kalibrační křivky PHB

Pro přípravu kalibračních roztoků byl použit granulát komerčního PHA, který obsahoval 88 % poly-3-hydroxybutyrátu a 12 % poly-3-hydroxyvalerátu. Granulát byl odvážen do vialky a smíchán se 4 ml chloroformu tak, aby konečná koncentrace činila přibližně $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. V uzavřených vialkách se nechal granulát rozpustit při teplotě $70 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu asi 20 minut. Po ochlazení bylo postupně pipetováno 0,05; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1 ml roztoku rozpuštěného granulátu do připravených vialek. Vialky byly postupně doplněny chloroformem na konečný objem 1 ml. Dále bylo přidáno 0,8 ml roztoku methanolu, který obsahoval 15 % kyseliny sírové a $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ vnitřního standardu, kterým byla kyselina benzoová. Vialky byly opatřeny krymplovacím víčkem a ponechány v termostatu při teplotě $95 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 3 hodin. Během této doby došlo k transesterifikaci PHA na těkavé methylestery. Po ochlazení a odstranění víčka z vialek byla provedena extrakce. Objem vialek byl smíchán a důkladně protřepán s 0,5 ml 0,05M NaOH. Po krátké chvíli došlo k rozdělení organické a vodné fáze. Do čistých vialek bylo pipetováno 50 μl spodní organické fáze, která obsahovala rozpuštěné PHA, a 950 μl chloroformu. Takto připravené vzorky byly uzavřeny víčkem se septem a podrobeny analýze pomocí plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem.

1.1.3 Stanovení obsahu PHB v biomase

Do vialek bylo naváženo asi přesně 10 mg biomasy. K biomase byl přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml roztoku methanolu s 15 % kyseliny sírové a $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ vnitřního standardu, tedy kyseliny benzoové. Vialky byly opatřeny krymplovacím víčkem a ponechány v termostatu při teplotě $95 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 3 hodin. Dále byl postup shodný jako při stanovení kalibrační křivky (viz 3.5.1).

3.6 Stanovení PHB pomocí Ramanovy spektroskopie

Pro stanovení PHA pomocí Ramanovy spektroskopie byly využity biofilmové a planktonické buňky připravené postupem, který popisuje kapitola 3.2. Po kultivaci byla na čisté kalciumfluoridové sklíčko nanášena hustá suspenze buněk. Za účelem dosažení přesnějších výsledků měření se ze sklíčka nechala odpařit přebytečná voda, která by při měření mohla odrážet světlo. Za snížené intenzity osvětlení bylo provedeno měření s využitím laseru o vlnové délce 785 nm.

3.7 Kryo-skenovací elektronová mikroskopie

Kryo-skenovací elektronová mikroskopie (Cryo-SEM) je metoda, která umožňuje poměrně detailní vizualizaci biologického materiálu za velmi nízkých teplot, obvykle v rozmezí $-175\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$, což umožňuje zkoumat vzhled vzorku v plně hydratovaném a chemicky nemodifikovaném stavu [135]. Pro uskutečnění metody Cryo-SEM se malé množství suspenze buněk rychle zmrazí v kapalném dusíku. Následně se vzorky přenesou do vakuové komory, kde dochází vlivem nízké teploty k lámání a krátké sublimaci při teplotě $-95\text{ }^{\circ}\text{C}$. V dalším kroku se vzorky přemístí v prostředí vysokého vakua do skenovacího elektronového mikroskopu, kde probíhá jejich vizualizace pomocí 1keV elektronového paprsku při teplotě $-135\text{ }^{\circ}\text{C}$ [136].

3.8 Studium vlivu osmotického stresu

3.8.1 Kultivace bakterií

Jednou z popisovaných rolí biofilmu a PHB je buňkám poskytovat ochranu před nepříznivými podmínkami prostředí a působením stresu [46, 109]. Za účelem studie vlivu osmotického stresu na produkci PHA a vznik biofilmu byla provedena kultivace bakterií *B. cepacia* a *B. sacchari* v médiích s různou koncentrací NaCl. Podle postupu, který popisuje kapitola 3.2.1 byla připravena inokula bakterií. Do Erlenmayerových baněk byla připravena sada minerálního média, která obsahovala 0, 5, 10, 15 a $20\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl. Kultivační média s různou koncentrací NaCl byla zaočkována v inokulačním poměru 1:10 a kultivována na třepačce při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a frekvenci otáčení $180\text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$. Během kultivace byly odebírány vzorky bakteriální suspenze pro stanovení optické hustoty. Celková doba kultivace činila 64 hodin. Po ukončení kultivace byly bakteriální buňky z kultivačního média odstředěny a využity pro stanovení dalších parametrů. Souběžně s kultivací bakteriálních kmenů byla za účelem stanovení kvantifikace biofilmu provedena, za stejných experimentálních podmínek, i Christensenova metoda (viz níže).

3.8.2 Stanovení optické hustoty

Za účelem monitoringu růstu bakterií v průběhu kultivace byly pravidelně odebírány vzorky submerzního podílu a byla stanovena jejich optická hustota. Měření optické hustoty se často používá v mikrobiologii jako jednoduchý nástroj k určení koncentrace počtu buněk v suspenzi. V laminárním boxu byl do čistých zkumavek přibližně každé 3 hodiny odebrán 1 ml vzorku. V případě nutnosti byly vzorky naředěny destilovanou vodou. U takto připravených vzorků byla změřena absorbance při vlnové délce 630 nm oproti čisté destilované vodě.

3.8.3 Stanovení biomasy

U bakteriálních buněk kultivovaných za zvýšeného osmotického tlaku, a také u buněk kultivovaných v izosmotickém prostředí, tedy bez přídavku soli, byla stanovena biomasa. Stanovení biomasy probíhalo shodným způsobem, jako uvádí kapitola 3.2.4.

3.8.4 Stanovení tvorby biofilmu s využitím Christensenovy metody

Za účelem stanovení tvorby biofilmu při různých koncentracích NaCl byla provedena Christensenova metoda kultivace v mikrotitrační destičce. Sada připravených minerálních médií o koncentraci 0, 5, 10, 15 a 20 g·l⁻¹ NaCl byla zaočkována bakteriemi *B. cepacia* a *B. sacchari* v inokulačním poměru 1:10. Do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 150 µl zaočkovaného média. Destička byla opatřena parafilmem a kultivována za stejných experimentálních podmínek jako kultivace v Erlenmayerových baňkách, tedy při teplotě 30 °C a frekvenci otáčení 180 ot·min⁻¹. Kultivace v mikrotitrační destičce probíhala 48 hodin. Následně bylo provedeno barvení biofilmu krystalovou violetí a stanovení absorbance při vlnové délce 562 nm. Podrobný postup popisuje kapitola 3.4

3.8.5 Stanovení PHB pomocí plynové chromatografie

Obsah PHB byl stanoven u bakteriálních buněk kultivovaných za zvýšeného osmotického tlaku, a také u buněk kultivovaných v izoosmotickém prostředí. Postup stanovení se shoduje s postupem uvedeným v kapitole 3.5.

3.8.6 Stanovení distribuce PHB v buňkách pomocí průtokové cytometrie

Ke stanovení distribuce PHB v buňkách byla využita průtoková cytometrie. Tato metoda poskytuje multiparametrickou analýzu jedné buňky v buněčné populaci. Princip stanovení PHB pomocí průtokové cytometrie spočívá v barvení intracelulárních PHB granulí uvnitř buněk barvivem Nilská červeň. V jednotlivých planktonických a biofilmových buňkách je pak stanovena fluorescence obarvených PHB granulí v závislosti na jejich četnosti výskytu v buněčné populaci. Ke stanovení PHB průtokovou cytometrií byl využit bakteriální kmen *B. sacchari*. Tyto bakterie byly kultivovány v médiích s různou koncentrací NaCl, jak popisuje kapitola 3.8.1 Po ukončení kultivace byl pro stanovení planktonických buněk z Erlenmayerovy baňky odebrán 1 ml submerzního podílu do Eppendorfovy zkumavky. Pro stanovení biofilmových buněk byl narostlý biofilm převeden do Eppendorfovy zkumavky s 1 ml PBS pufru. Všechny zkumavky byly centrifugovány při frekvenci 10 000 ot·min⁻¹ po dobu 2 minut. Následně byl supernatant ze zkumavek odstraněn a biofilmové i planktonické buňky byly rozsuspendovány v 1 ml pufrovaného fyziologického roztoku (PBS). Následovala opět centrifugace a odstranění supernatantu. K sedimentovaným buňkám byl přidán 1 ml vychlazeného 20% roztoku ethanolu za účelem permeabilizace buněčné stěny. Buňky rozsuspendované v ethanolu byly ponechány 10 minut v lednici. Po vyndání z lednice byly buňky centrifugovány a zbytky ethanolu byly odstraněny. Buňky byly opět jednou promyty v PBS pufru. Na závěr byly buňky rozsuspendovány v 1 ml PBS pufru. K suspenzi buněk bylo přidáno 5 µl roztoku Nilské červeně, který byl připraven rozpuštěním 1 mg Nilské červeně v 1 ml dimethylsulfoxidu. Zkumavky s přidáním barvivem byly ponechány 10 minut ve tmě. Následně bylo barvivo navázané na PHB granule detekováno pomocí průtokového cytometru s excitačním zdrojem – laserem o vlnové délce 488 nm.

3.9 Stanovení viability buněk pomocí průtokové cytometrie

Jednou z možností stanovení viability buněk je využití průtokové cytometrie. Tato metoda poskytuje poměrně rychlou a spolehlivou informaci o zastoupení životaschopných buněk v populaci. Metoda využívá interkalačního činidla propidium jodidu, který se váže na nukleové kyseliny a zastává funkci fluorescenční sondy. Za normálních podmínek propidium jodid vstupuje pouze do buněk s porušenou cytoplazmatickou membránou. Následně dochází k vazbě na složky buněčné hmoty a zesílení intenzity fluorescence emitované v červené oblasti spektra [137]. Na základě toho lze od sebe rozeznat zastoupení živých a mrtvých buněk v populaci.

3.9.1 Studium vlivu stresových faktorů na viabilitu buněk

Za účelem studie vlivu stresových faktorů na viabilitu buněk byla provedena kultivace bakteriálního kmene *B. sacchari* v 24-jamkových destičkách pro přípravu tkáňových kultur. Do jamek destiček byl pipetován 1 ml minerálního média, které bylo připraveno standardním způsobem, který popisuje kapitola 3.2.1. Jamky destiček byly zaočkovány připraveným inokulem v inokulačním poměru 1:10. Destičky s bakteriální kulturou byly kultivovány na třepačce při 30 °C a frekvenci otáčení 180 ot·min⁻¹ po dobu 72 hodin. Během kultivace došlo k nárůstu biomasy a vytvoření jemného biofilmu na stěnách jamek.

Po ukončení kultivace byly biofilmové i planktonické buňky vystaveny stresovým podmínkám po dobu 60 minut. Použité stresové faktory shrnuje Tabulka 1. Některé z uvedených faktorů se používají jako běžné baktericidní látky. Pro srovnání byly připraveny slepé vzorky s biofilmovými a planktonickými buňkami, které stresovému působení vystaveny nebyly.

Tabulka 1: Přehled použitých chemických a fyzikálních stresorů

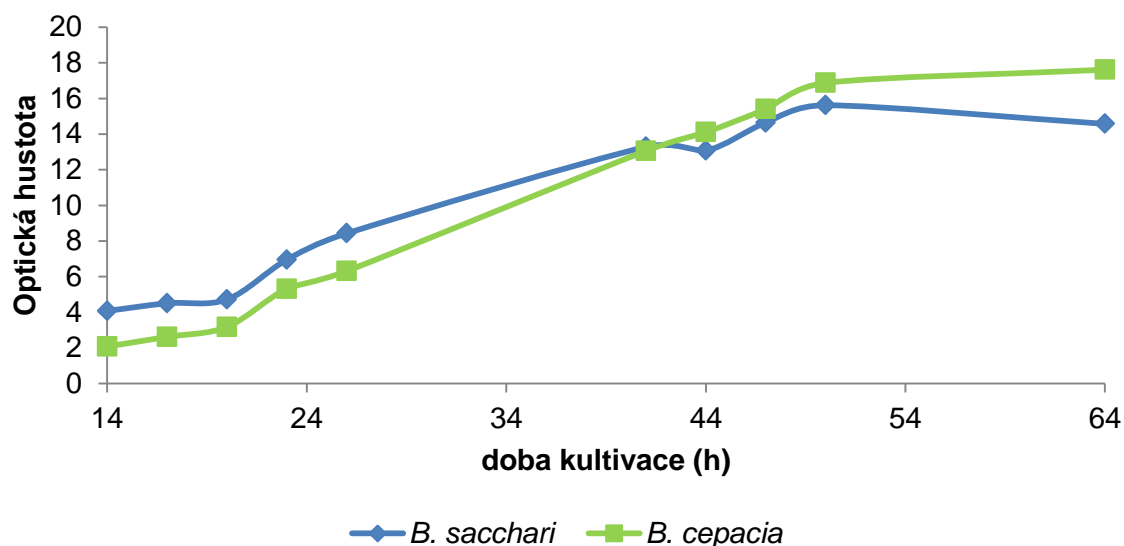
Chemické stresové faktory					
	Chlorid sodný	Ethanol	Savo	Detergent (SDS)	Peroxid vodíku
Koncentrace	200 g·l ⁻¹	10 %	10 %	5 g·l ⁻¹	50 mM
Fyzikální stresové faktory					
	Vysoká teplota		Mražení		
Teplota	75 °C		-30 °C		

Po uplynutí 60 minut byla stanovena viabilita planktonických a biofilmových buněk vystavených stresovým podmínkám pomocí průtokové cytometrie. Pro stanovení planktonických buněk bylo z jednotlivých jamek destičky odebráno 0,5 ml submerzního podílu do Eppendorfovy zkumavky. Pro stanovení biofilmových buněk byl narostlý biofilm z destiček převeden do Eppendorfovy zkumavky s 0,5 ml PBS pufru. Všechny zkumavky byly centrifugovány při frekvenci 10 000 ot·min⁻¹ po dobu 2 minut. Následně byl supernatant ze zkumavek odstraněn a biofilmové i planktonické buňky byly rozsuspendovány v 1 ml pufovaného fyziologického roztoku (PBS). Následovala opět centrifugace a odstranění supernatantu. Sedimentované buňky byly rozsuspendovány v 1 ml PBS pufru a ke vzniklé suspenzi bylo přidáno 5 µl roztoku propidium-jodidu, který byl připraven rozpuštěním 1 mg propidium-jodidu v 1 ml destilované vody. Zkumavky s přidaným barvivem byly ponechány 15 minut ve tmě. Následně bylo interkalační barvivo detekováno pomocí průtokového cytometru s excitačním zdrojem – laserem o vlnové délce 488 nm.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Stanovení růstové křivky

Za účelem stanovení jednoduché růstové křivky bakterií *B. sacchari* a *B. cepacia* byla provedena kultivace těchto bakterií po dobu 64 hodin. Během kultivace byly v pravidelných intervalech odebírány vzorky bakteriální suspenze a byla stanovena jejich optická hustota. Růstové křivky byly sestrojeny jako závislost optické hustoty bakteriální suspenze na době kultivace (viz Graf 1). Podrobnější data poskytuje Příloha 1.



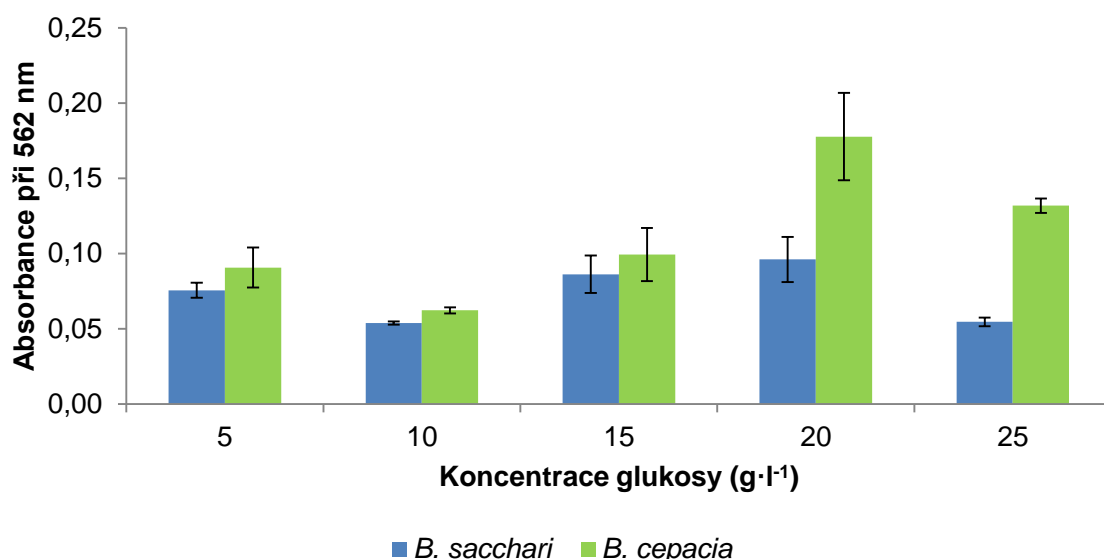
Graf 1: Růstová křivka bakteriálního kmene *B. sacchari* a *B. cepacia* pro submerzní kultivaci v minerálním médiu

Podíváme-li se na růstové křivky obou použitých bakteriálních kmenů, na první pohled je patrné, že trajektorie obou křivek jsou si navzájem podobné a přibližně odpovídají obecnému modelu růstové křivky bakteriální populace. V rané fázi kultivace byly naměřené hodnoty absorbance pro oba kmene poměrně nízké a jednotlivé hodnoty se od sebe, až do 20. hodiny, příliš nelišily. Z toho lze usuzovat, že bakterie se nacházely v tzv. lag fázi, kdy probíhala adaptace buněk na nové prostředí a k jejich rozmnožování docházelo minimálně. Přibližně od 20. hodiny můžeme u obou bakteriálních kmenů zpozorovat intenzivnější nárůst absorbance. V této fázi již byly buňky pravděpodobně plně přizpůsobeny podmínkám prostředí, a tak z lag fáze přecházely do fáze zrychleného růstu, následované exponenciální fází. V této fázi docházelo k intenzivnímu množení buněk za současné spotřeby substrátu. Přibližně ve 47. hodině kultivace již nebyl zaznamenán tak markantní nárůst absorbance. Lze předpokládat, že kultivace přešla do fáze zpomaleného růstu, kdy v důsledku úbytku živin a hromadění metabolitů došlo ke zpomalení rozmnožování obou bakteriálních kmenů. Od 50. hodiny kultivace se již bakterie nacházely ve fázi stacionární. Naměřené hodnoty absorbancí, a tedy i počet bakteriálních buněk byl již nadále víceméně konstantní.

4.2 Optimalizace a kvantifikace tvorby biofilmu

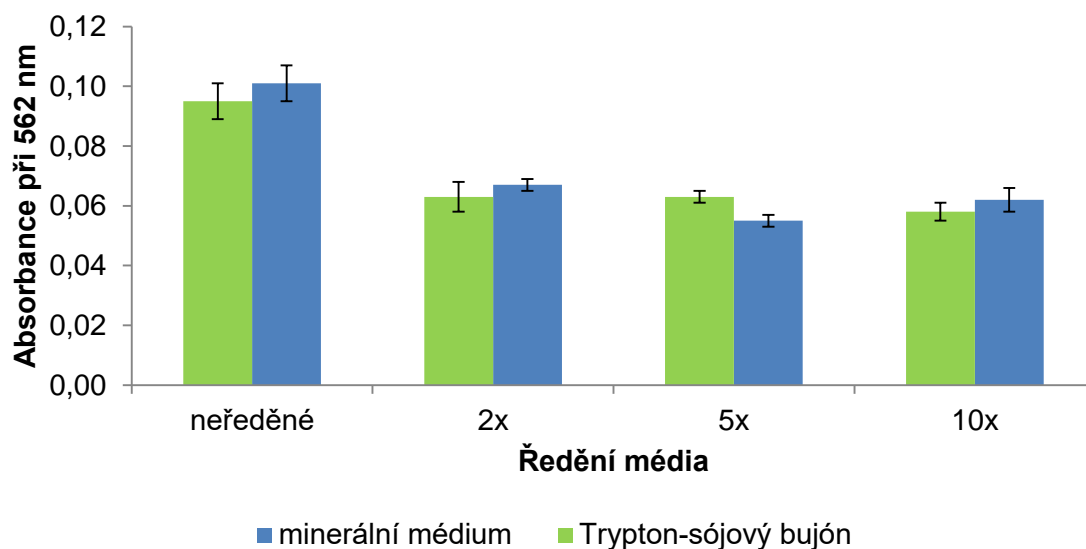
Za účelem identifikace a kvantifikace biofilmu za různých podmínek kultivace byla využita Christensenova metoda. Ta spočívala v kultivaci bakterií v 96 jamkové mikrotitrační destičce s následným barvením vzniklého biofilmu a spektrofotometrickým stanovením pomocí fotometru. Během této metody byl zkoumán zejména vliv koncentrace glukosy v kultivačním médiu a vznik biofilmu bakterií *B. sacchari* a *B. cepacia*. U bakteriálního kmene *B. sacchari*

bylo rovněž zkoumáno, zda má typ použitého kultivačního média a jeho ředění vliv na vznik biofilmu. Za tímto účelem bylo použito připravené minerální médium a komerčně dostupný trypton-sójový bujón (TSB). Absorbance byla stanovována vždy v 6 paralelních opakování. Na základě Dean-Dixonova testu byly ze souboru dat vyloučeny odlehlé hodnoty. Z naměřených hodnot byl vypočítán aritmetický průměr a směrodatné odchylky, které byly do grafu vyneseny jako chybové úsečky. U výsledků, které se na první pohled jevily být rozdílné, byl využit Moorův test pro testování shodnosti výsledků. Výsledky stanovení shrnuje Graf 2 a Graf 3. Podrobnější data ke stanovení poskytuje Příloha 2 a Příloha 3.



Graf 2: Vliv rozdílné koncentrace glukosy v kultivačním médiu na vznik biofilmu bakterií *B. sacchari* a *B. cepacia*

Při pohledu na graf závislosti absorbance naměřené při 562 nm na koncentraci glukosy v kultivačním médiu nelze obecně říci, že podléhá určitému trendu. Nejvyšší hodnoty absorbance byly u obou bakteriálních kmenů naměřeny při koncentraci 20 g·l⁻¹. Lze tedy říci, že právě tato koncentrace glukosy v kultivačním médiu se pro vznik biofilmu bakteriemi *B. sacchari* a *B. cepacia* jeví jako neoptimálnější. Z toho důvodu byla při všech následujících kultivacích použita právě tato koncentrace glukosy v minerálním médiu. Není však zárukou, že při aplikaci těchto podmínek na kultivaci v Erlenmayerových baňkách nebo bioreaktoru bude dosaženo stejných výsledků. Jedná se o obecný problém, se kterým se scale-up procesy tak složitých pochodů, jako je tvorba biofilmu, potýkají. Srovnáme-li mezi sebou hodnoty naměřených absorbancí u *B. sacchari* a *B. cepacia* pro koncentrace glukosy 5, 10, a 15 g·l⁻¹ nebyl shledán výrazný rozdíl. Při těchto koncentracích se tyto bakterie od sebe ve vývoji biofilmu příliš nelišily. Jiná situace nastala při koncentracích glukosy 20 a 25 g·l⁻¹. Zde bylo dosaženo statisticky významného rozdílu absorbancí naměřených pro bakterie *B. sacchari* a *B. cepacia*. Lze tedy konstatovat, že tyto koncentrace glukosy poskytovali kmeni *B. cepacia*, ve srovnání s kmenem *B. sacchari*, lepší podmínky pro vznik biofilmu. Na druhou stranu jsou naměřené hodnoty absorbance pro všechny koncentrace glukosy poměrně nízké, z čehož lze usuzovat, že se biofilm za použitých podmínek nevyvíjel příliš intenzivně. Hodnoty směrodatných odchylek byly v některých případech poměrně vysoké, a tak lze výsledky stanovení posuzovat spíše za orientační.



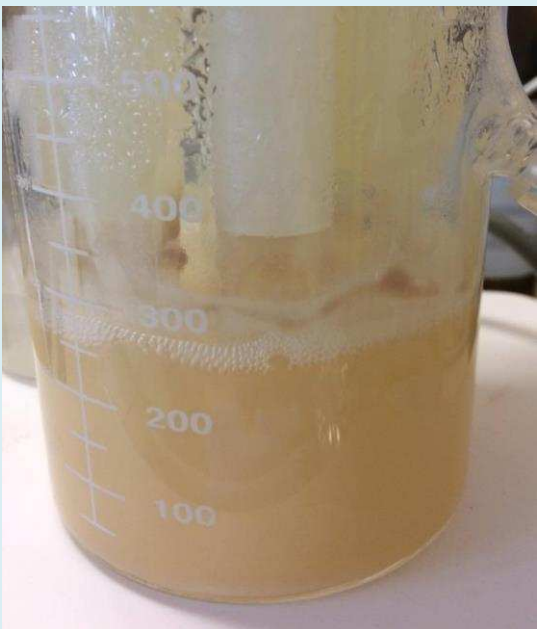
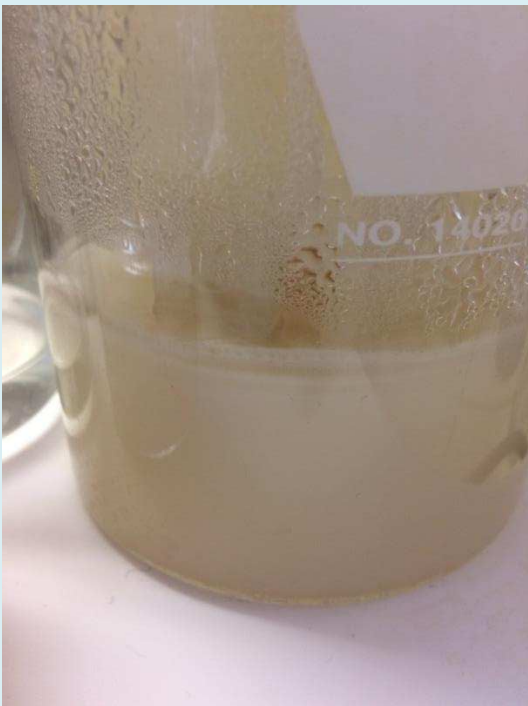
Graf 3: Vliv použitého kultivačního média a ředění média na vznik biofilmu *B. sacchari*

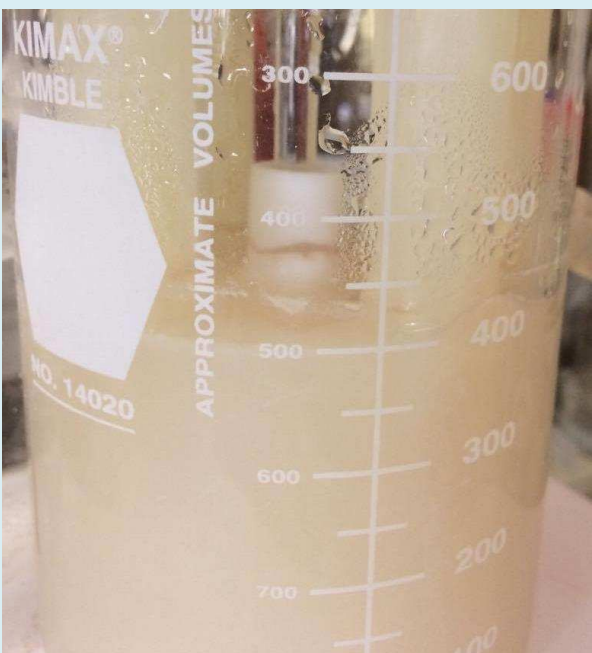
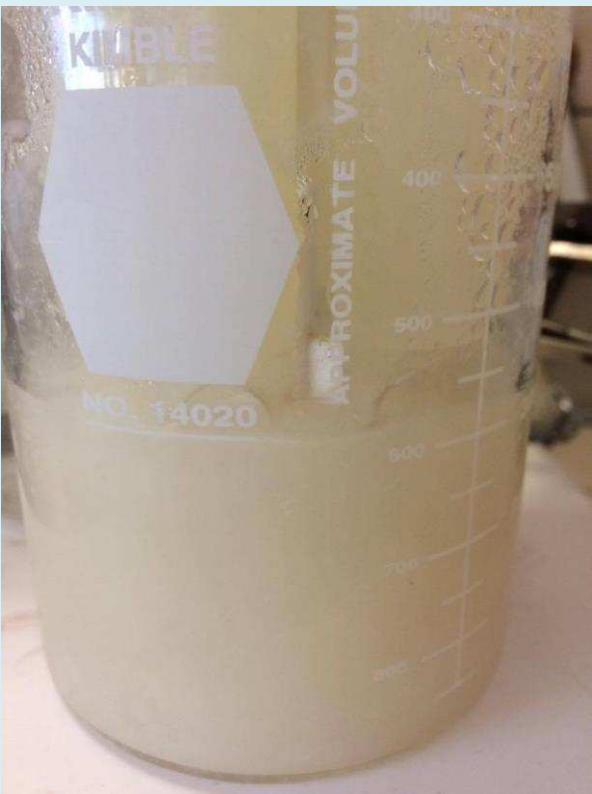
Testování vlivu použitého média a ředění média na vznik biofilmu přineslo jednoznačné výsledky. Ukázalo se, že pro přípravu biofilmu lze využít jak minerální médium, tak trypton-sójový bujón bez výrazných rozdílů na výsledek. Co se týče ředění kultivačního média, pro vznik bohatého biofilmu *B. sacchari* je nutné použít neředěné médium. Autoři literatury zabývající se vznikem biofilmu se často rozcházejí v názoru na složení média optimálního pro růst biofilmu. Zatímco jedni tvrdí, že pro vznik bohatého biofilmu jsou vhodnější nutričně bohatá média, například TSB [138], jiní naopak doporučují média nutričně chudá, například tzv. minimal salt medium (MSM) obohacené o zdroj uhlíku [40]. Na základě výše uvedených výsledků se nelze přiklonit ani k jednomu z těchto názorů. Použití nutričně bohatého média, tedy TSB, i nutričně chudého, tedy minerálního média, vedlo k prakticky shodným výsledkům.

4.3 Příprava biofilmu

Za účelem studie rozdílů, zejména z hlediska obsahu a formy PHB, mezi planktonickými a biofilmovými buňkami bakterií *B. sacchari* a *B. cepacia* byla provedena kultivace těchto mikroorganismů v CDC biofilmovém reaktoru. Kultivace byla prováděna vždy po dobu 6 dní, při teplotě 30 °C, což odpovídá optimální růstové teplotě použitých bakterií. Další podmínky kultivace a obrázky vzniklého biofilmu poskytuje Tabulka 2. Pro zhodnocení nárůstu biofilmu byla vytvořena ordinální stupnice, která posuzuje mohutnost narostlého biofilmu. Hodnocení pomocí této stupnice je zcela subjektivní a slouží jako orientační parametr pro další využití bioreaktoru. Po ukončení kultivace byly odebrány vzorky planktonických a biofilmových buněk, které byly použity pro stanovení dalších parametrů. Výsledky a diskuze těchto stanovení shrnují následující podkapitoly.

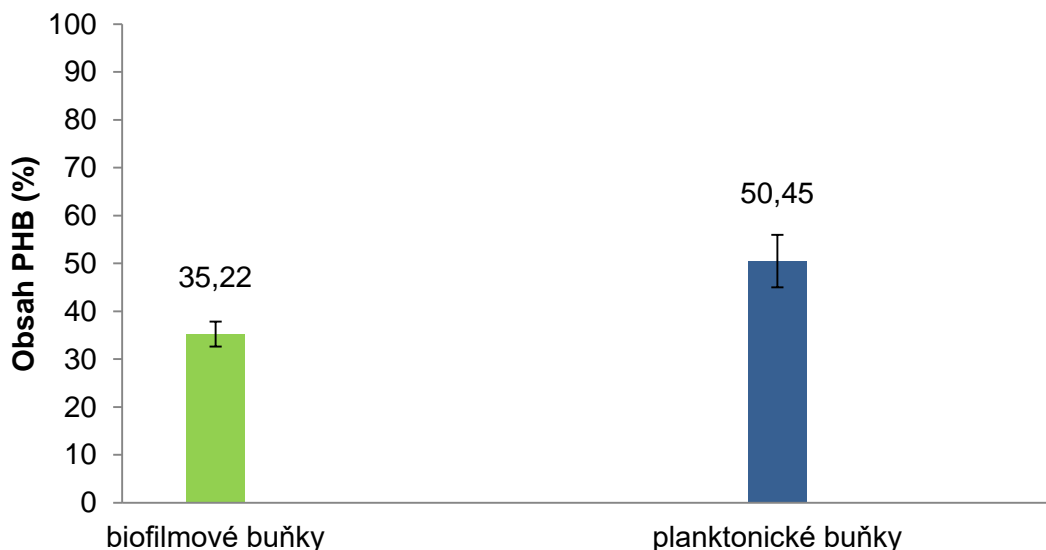
Tabulka 2: Podmínky kultivace bakterií *B. sacchari* a *B. cepacia* v biofilmovém reaktoru a hodnocení mohutnosti narostlého biofilmu

Použitý MO	Počet otáček (min ⁻¹)	Konc. glukosy (g·l ⁻¹)	Obrázek narostlého biofilmu	Nárůst biofilmu
<i>B. cepacia</i>	180	10		+++++ (velmi silný)
<i>B. sacchari</i>	180	10		+++ (střední)

Použitý MO	Počet otáček (min ⁻¹)	Konc. glukosy (g·l ⁻¹)	Obrázek narostlého biofilmu	Nárůst biofilmu
<i>B. sacchari</i>	180	20		++ (slabý)
<i>B. sacchari</i>	120	10		+ (velmi slabý)

4.3.1 Stanovení PHB pomocí plynové chromatografie

Zá účelem kvantifikace PHB v planktonických a biofilmových buňkách byla provedena kultivace bakteriálního kmene *B. sacchari* v CDC biofilmovém reaktoru. Obsah PHB v buňkách byl stanoven pomocí plynové chromatografie ve třech paralelních opakováních. Z naměřených hodnot byl vypočítán aritmetický průměr a směrodatné odchylky, které byly do grafu vyneseny jako chybové úsečky. Pomocí Moorova testu byla otestována odlehlost výsledků. Výsledky stanovení shrnuje Graf 4. Podrobná data poskytuje Příloha 6.

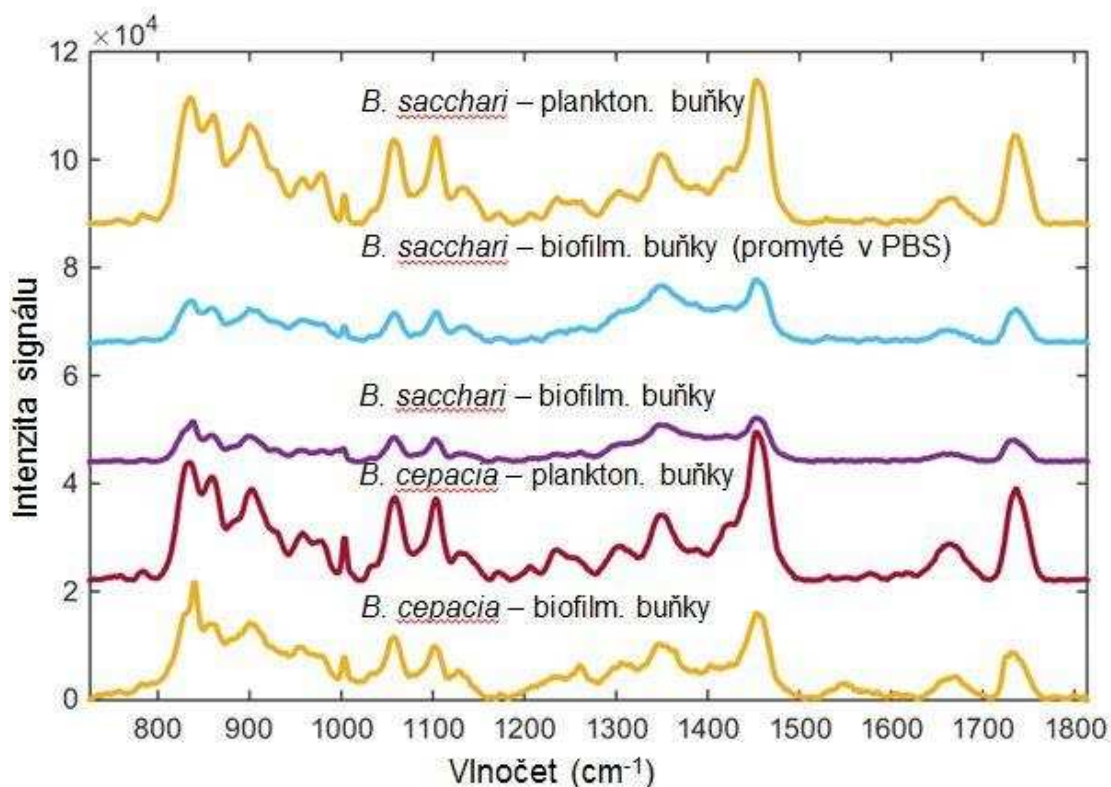


Graf 4: Stanovení obsahu PHB v biofilmových a planktonických buňkách bakterie *B. sacchari*

Srovnáme-li obsah PHB v biofilmových a planktonických buňkách bakteriálního kmene *B. sacchari* lze jednoznačně říci, že vyšší obsah PHB se vyskytoval v buňkách planktonických. Výsledky Moorova testu potvrdily, že mezi obsahem PHB v biofilmových a planktonických buňkách byl shledán statisticky významný rozdíl na hladině statistické významnosti $\alpha = 0,05$. Tato skutečnost potvrzuje hypotézu, že syntéza biofilmu a PHB vychází ze stejného prekursoru, totiž acetyl-CoA, čímž dochází ke kompetici o tento zdroj [12]. Část acetyl-CoA se v biofilmových buňkách spotřebuje na vznik biofilmu a jen část vstupuje do syntézy mastných kyselin za účelem produkce PHB.

4.3.2 Stanovení PHB pomocí Ramanovy spektroskopie

Zatímco plynová chromatografie poskytuje výsledky pouze o kvantitativním složení PHB v buňkách, Ramanova spektroskopie může poskytnout informaci i o formě, v jaké se PHB v buňkách vyskytuje. Výstup z měření planktonických a biofilmových buněk bakteriálních kmenů *B. sacchari* a *B. cepacia* pomocí Ramanovy spektroskopie poskytuje Graf 5.

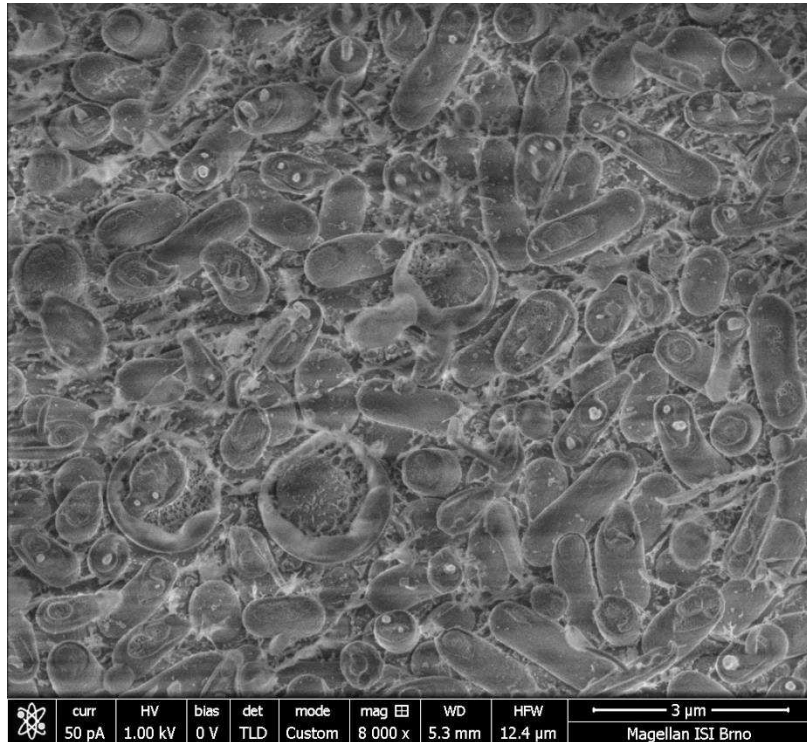


Graf 5: Srovnání výsledků měření planktonických a biofilmových buněk *B. sacchari* a *B. cepacia* pomocí Ramanovy spektroskopie. Graf zobrazuje závislost intenzity měřeného signálu na vlnočet.

PHB poskytuje v Ramanově spektru několik píků, které mohou být využity pro identifikaci PHB v buňkách. Konkrétně se jedná o píky v oblasti 837, 1 455 a 1 736 cm⁻¹ [139]. Z intenzit signálů naměřených v oblasti 1 455 a 1 736 cm⁻¹, které odpovídají PHB, lze jednoznačně usoudit, že obsah PHB byl v planktonických buňkách výrazně vyšší než v buňkách biofilmových, a to jak u *B. sacchari*, tak u *B. cepacia*. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky plynové chromatografie. Za účelem přesné kvantifikace PHB v buňkách pomocí Ramanovy spektroskopie by bylo nutné sestavit kalibrační přímkou. Přesná kvantifikace PHB však nebyla předmětem měření. Co lze dále z grafu vyčíst je forma, v jaké se PHB v buňkách vyskytuje. Je známo, že PHB se uvnitř buněk vyskytuje ve formě amorfni. Dojde-li k exkreci PHB mimo buňku, dochází k přechodu PHB z amorfni na krystalickou formu [20]. Kvalitativní rozdíl mezi krystalickým a amorfni polymerním stavem může být vyhodnocen jednoduchým sledováním píku PHB v oblasti 1 736 cm⁻¹. V případě krystalizace dochází k posunu píku směrem doleva. Vzniklý pík se tak může lišit až o 15 cm⁻¹ (od asi 1 736 cm⁻¹ do asi 1 721 cm⁻¹), což je zřetelné na první pohled [139]. Naklonění píků směrem doleva můžeme pozorovat u biofilmových buněk, a to jak v případě *B. sacchari*, tak *B. cepacia*. Kromě toho, že se tedy v biofilmových buňkách vyskytuje menší množství PHB než v buňkách planktonických, PHB se v biofilmových buňkách částečně vyskytuje v krystalické formě. Tyto výsledky mohou naznačovat, že u některých buněk přítomných v biofilmu došlo k jejich lyzi, a tím i k uvolnění PHB do prostředí. Tento fakt potvrzuje hypotézu, že část buněk v biofilmu podstoupí lyzi, čímž poskytne ostatním buňkám stavební materiál pro výstavbu biofilmu, jak uvádí např. Whitchurch a kolektiv [140].

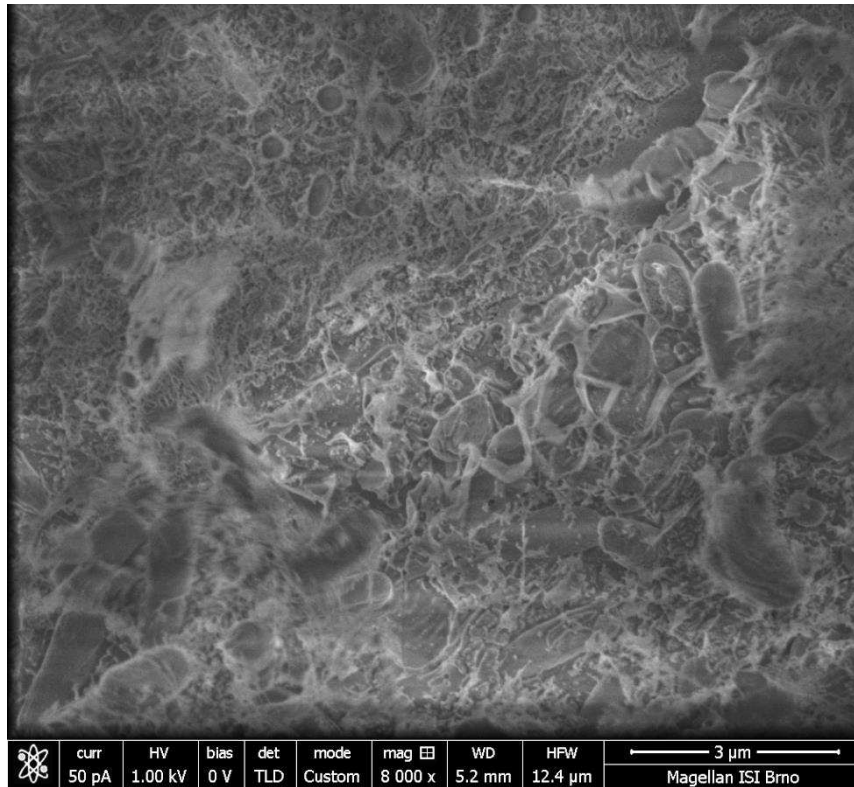
4.3.3 Kryo-skenovací elektronová mikroskopie

Metoda Cryo-SEM umožňuje zkoumat morfologii buněčných struktur v poměrně jemných detailech. Tato metoda byla využita ke sledování planktonických a biofilmových buněk bakteriálního kmene *B. sacchari*. Výstupy z elektronového mikroskopu ukazují Obrázek 12-14.

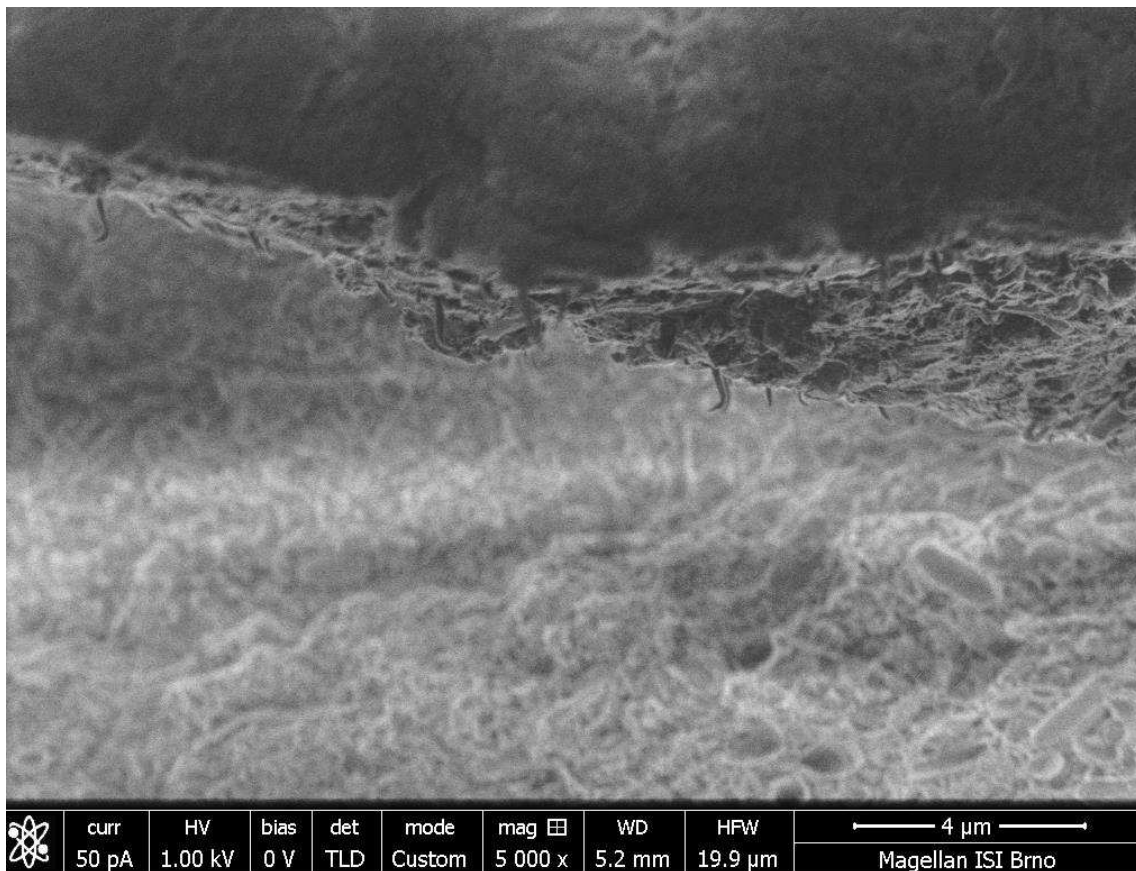


Obrázek 12: Pozorování planktonických buněk *B. sacchari* pomocí skenovacího elektronového mikroskopu

Na snímku planktonických buněk bakteriálního kmene *B. sacchari* jsou patrné tyčinkovité útvary, které odpovídají právě buňkám této bakterie. Mezi těmito tyčinkovitými buňkami můžeme v menší míře vidět i buňky kulatého tvaru, pravděpodobně se jedná o kontaminující kvasinky. Uvnitř tyčinkovitých bakterií můžeme dále pozorovat světlé kulovité útvary. Tyto útvary odpovídají intracelulárním PHB granulím. PHB produkované bakterií *B. sacchari* může tvořit více než 75 % buněčné sušiny [130]. Na základě výsledků Cryo-SEM je však patrné, že se PHB v planktonických buňkách *B. sacchari* nevytvořily v takové míře, jako to tato bakterie umí.



Obrázek 13: Pozorování biofilmových buněk *B.sacchari* pomocí skenovacího elektronového mikroskopu



Obrázek 14: Jiný detail biofilmových buněk *B.sacchari* pozorovaný pomocí skenovacího elektronového mikroskopu

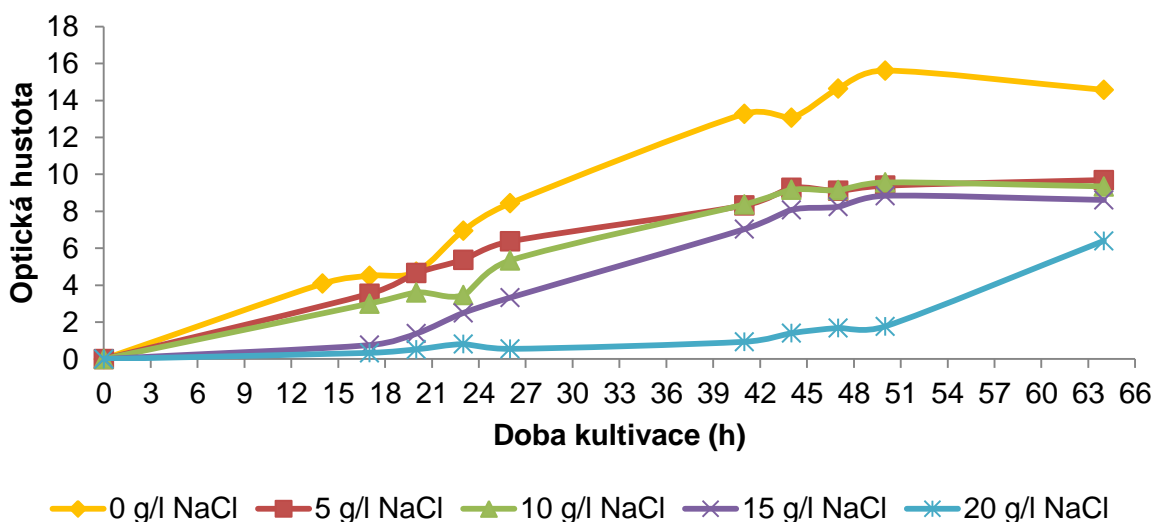
Na snímku biofilmových buněk (Obrázek 13) *B. sacchari* nejsou tak patrné tyčinkovité buňky, jako tomu bylo v případě planktonických buněk. Lze předpokládat, že během kultivace došlo k produkci biofilmové matrice, která jednotlivé buňky obaluje a udržuje je ve větší vzdálenosti od sebe. Na Obrázku 13 v podstatě nelze pozorovat PHB granule, což jen potvrzuje fakt, že se PHB v biofilmových buňkách vyskytují v mnohem menší míře než v buňkách planktonických. Nicméně Obrázek 14 potvrzuje, že i v biofilmových buňkách *B. sacchari* se určité množství PHB vyskytovalo. V průběhu zmrazování a lámání buněk obsahujících intracelulární PHB byl zaznamenán zajímavý morfologický jev. Metoda cryo-SEM nám umožňuje pozorovat po zlomení buňky vznik jehlicovitých plastických deformací, jak je patrné na obrázku 15. Stejněho pozorování dosáhli i další autoři, například Obruča a kolektiv [141]. Tyto plastické deformace jsou projevem unikátních vlastností intracelulárních PHB granulí. PHB jsou v nativní formě spíše než krystalickým polymerem tvořeny vysoce mobilním amorfním elastomerem, který svým chováním připomíná podchlazenou kapalinu [142]. Na základě toho lze předpokládat, že přítomnost PHB granulí v cytoplazmě významně ovlivňuje fyzikálně-chemické a mechanické vlastnosti, které mohou hrát důležitou roli při expozici buněk stresovým podmínkám [141].

4.4 Studium vlivu osmotického stresu

Za účelem studie vlivu osmotického stresu na produkci PHA a vznik biofilmu byly použity bakteriální kmeny *B. sacchari* a *B. cepacia*. Kultivace probíhala po dobu 64 hodin v minerálním médiu o koncentraci 0, 5, 10, 15 a 20 g·l⁻¹ NaCl. V průběhu kultivace byly odebrány vzorky submerzní kultury. Ty byly v případě potřeby vhodně naředěny destilovanou vodou a pomocí fotometru byla stanovena jejich absorbance při vlnové délce 630 nm. Po ukončení kultivace byly bakteriální buňky dále využity pro stanovení biomasy, stanovení obsahu PHB pomocí plynové chromatografie, stanovení PHB a viability buněk pomocí průtokové cytometrie. Soubežně s kultivací bakteriálních kmenů byla za stejných experimentálních podmínek provedena i Christensenova metoda kvantifikace biofilmu. Výsledky zmíněných měření jsou interpretovány a diskutovány v následujících kapitolách.

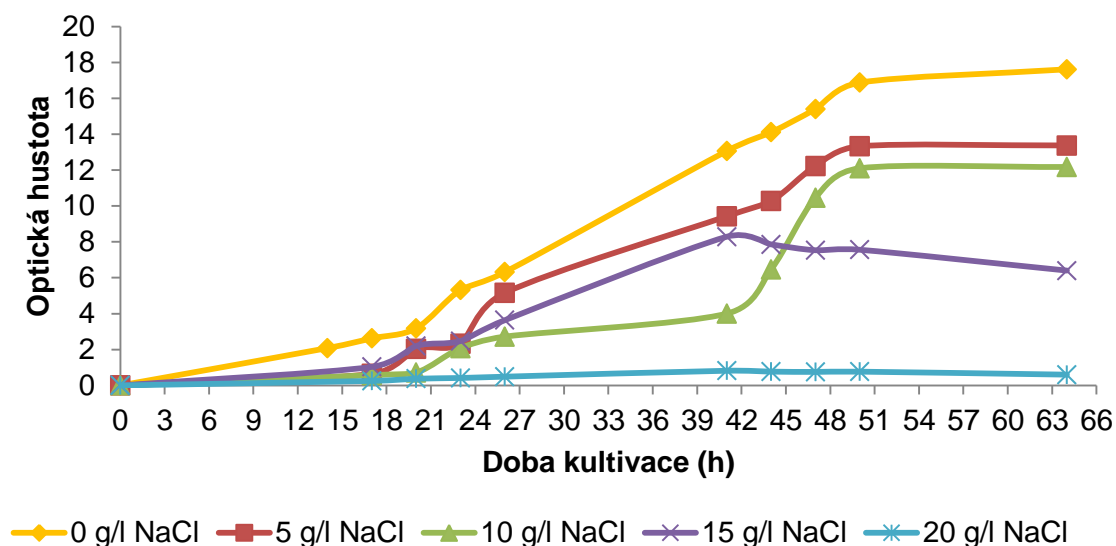
4.4.1 Stanovení růstové křivky

Za účelem stanovení jednoduché růstové křivky bakterií *B. sacchari* a *B. cepacia* v prostředí se zvýšeným osmotickým tlakem byla provedena kultivace těchto bakterií v médiích s různou koncentrací NaCl. Pro srovnání byla paralelně provedena kultivace těchto kmenů v izoosmotickém prostředí, tedy bez přídavku NaCl. Během kultivace byly v pravidelných intervalech odebrány vzorky bakteriální suspenze a byla stanovena jejich optická hustota. Růstové křivky byly sestrojeny jako závislost optické hustoty bakteriální suspenze na době kultivace (viz. Graf 6 a Graf 7). Podrobná data ke stanovení poskytuje Příloha 7 a Příloha 8.



Graf 6: Růstová křivka bakteriálního kmene *B. sacchari* pro submerzní kultivaci v minerálním médiu se zvýšeným osmotickým tlakem

Z grafu 6 můžeme vidět, jaký vliv měla různá koncentrace NaCl v kultivačním médiu, a tedy i různá hodnota osmotického tlaku, na růst bakteriálního kmene *B. sacchari*. Obecně lze říci, že se zvyšující se koncentrací NaCl v kultivačním médiu docházelo k inhibici bakteriálního růstu, což se projevilo sníženou optickou hustotou bakteriální suspenze. Trajektorie křivek pro koncentraci 5 a 10 g·l⁻¹ NaCl v médiu jsou si dost podobné. Tyto dvě křivky se v podstatě kopírují, až na to, že u bakterií v médiu s koncentrací 10 g·l⁻¹ NaCl došlo k zřetelnému prodloužení lag fáze, která v tomto případě trvala přibližně do 23. hodiny kultivace. U růstových křivek pro koncentraci 5 a 15 g·l⁻¹ není příliš zřetelná lag fáze, na druhou stranu zde není zřejmý ani výrazný nástup fáze exponenciální. Je možné, že lag fáze proběhla již v době před zahájením prvního odběru. Další možností je, že lag fáze pozvolna přešla do fáze zpomaleného růstu, tedy že fáze exponenciálního růstu vlivem zvýšeného osmotického tlaku vůbec nenastala, a tak jednotlivé růstové fáze od sebe nejsou jednoznačně odděleny. Co se týče růstové křivky bakterií v kultivačním médiu s obsahem 20 g·l⁻¹ NaCl, lze konstatovat, že tato koncentrace měla výrazný inhibiční vliv na růst bakteriální populace. Při této koncentraci NaCl došlo k markantnímu prodloužení lag fáze až do přibližně 41. hodiny kultivace, po které následovala fáze zpomaleného růstu, která byla rovněž neobvykle dlouhá a trvala přibližně do 50. hodiny kultivace. Teprve v 50. hodině kultivace byl při zmíněné koncentraci NaCl zaznamenán nástup exponenciální fáze růstu, zatímco v ostatních médiích bylo v tuto dobu již dosaženo fáze stacionární a růst bakteriální populace byl ukončen.

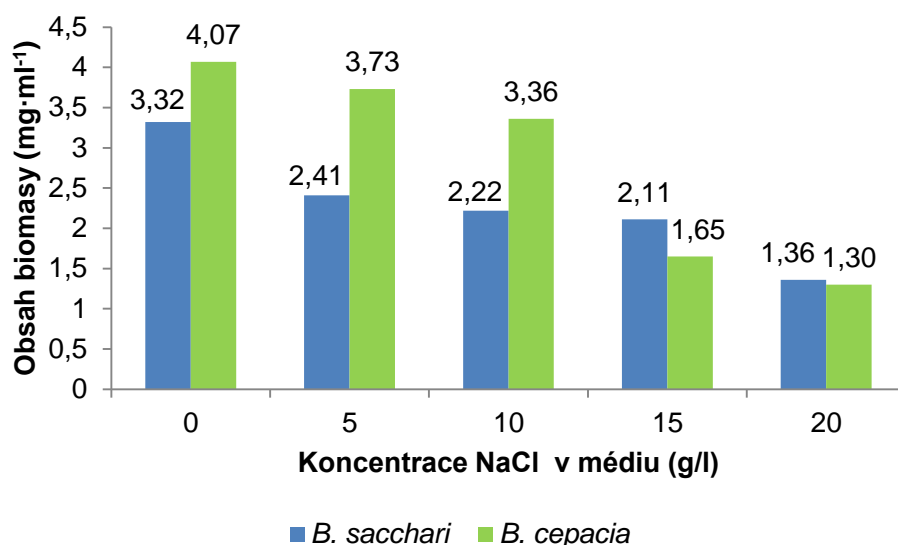


Graf 7: Růstová křivka bakteriálního kmene *B. cepacia* pro submerzní kultivaci v minerálním médiu se zvýšeným osmotickým tlakem

Z růstových křivek sestavených pro bakteriální kmen *B. cepacia* se jeví, že tento kmen, ve srovnání s kmenem *B. sacchari*, reaguje na přítomnost soli v kultivačním médiu citlivěji. Srovnáme-li růstovou křivku pro koncentraci $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl v médiu s křivkou pro médium bez přídavku soli, můžeme vidět, že přítomnost $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl v médiu neměla zásadní vliv na vývoj růstové křivky. Trajektorie těchto dvou křivek jsou si podobné s rozdílem, že v případě koncentrace $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl došlo k mírnému prodloužení lag fáze a celkovému snížení hodnoty optické hustoty. Výrazný vliv na růst bakteriální populace však měly koncentrace $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ a vyšší. Koncentraci $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl způsobil markantní prodloužení lag fáze, která trvala přibližně do 41. hodiny kultivace. Po lag fázi následovala fáze zpomaleného růstu a exponenciální fáze, která je ve srovnání s ostatními křivkami, nejzřetelnější. Nástup stacionární fáze v médiích s koncentrací $0, 5$ a $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl nastal přibližně po 50. hodině kultivace. Zvláštní jev můžeme pozorovat u růstové křivky pro koncentraci NaCl $15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Zde není dobře patrná lag fáze, ale pravděpodobně byla tato fáze mnohem kratší, než tomu bylo v případě koncentrace $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Zároveň však došlo, v porovnání s ostatními křivkami, k mnohem dřívějšímu nástupu fáze stacionární, a to již přibližně po 41 hodinách kultivace. Z růstové křivky pro médium s koncentrací $15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl také není zcela jasné vyčíst, kdy došlo k zahájení exponenciální fáze růstu bakterií. Je možné, že lag fáze pozvolna přešla do fáze zpomaleného růstu, po níž následovala fáze stacionární, tedy že fáze exponenciálního růstu vlivem zvýšeného osmotického tlaku vůbec nenastala, a tak jednotlivé růstové fáze od sebe nejsou zřetelně odděleny. Z grafu se na první pohled jeví, že koncentrace $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl v kultivačním médiu měla zcela inhibiční vliv na růst bakteriální populace *B. cepacia*. Nicméně, níže uvedené výsledky stanovení biomasy prokázaly, že i při této koncentraci NaCl se v médiu určité množství buněk vyskytovalo. Přítomnost vysoké koncentrace soli v médiu měla pravděpodobně za následek vznik buněčných agregátů. Vzniklé agregáty pak během spektrofotometrického stanovení zřejmě nebyly zaznamenány.

4.4.2 Stanovení biomasy

Po ukončení kultivace byla gravimetricky stanovena koncentrace biomasy v kultivačních médiích s různou koncentrací NaCl. Výsledky stanovení shrnuje Graf 8.

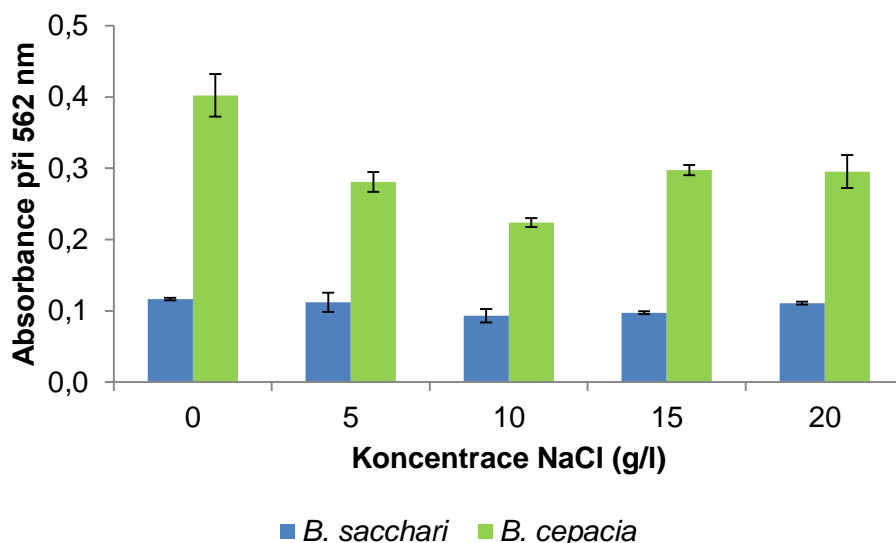


Graf 8: Obsah biomasy v mg na 1 ml kultivačního média v závislosti na koncentraci NaCl v kultivačním médiu.

Výsledky stanovení produkce biomasy bakteriemi kultivovanými v hyperosmotickém a izosmotickém prostředí odpovídají sestaveným růstovým křivkám v předchozí kapitole 4.4.1. Nejvyšší obsah biomasy byl stanoven v kultivačním médiu bez přídavku NaCl, a to jak u bakteriálního kmene *B. sacchari*, tak u *B. cepacia*. Se zvyšující se koncentrací NaCl klesal obsah biomasy v kultivačním médiu. U bakteriálního kmene *B. sacchari* nebyly pro jednotlivé koncentrace NaCl v médiu zjištěny až takové rozdíly v poklesu obsahu biomasy, jako tomu bylo v případě bakteriálního kmene *B. cepacia*. Dá se říct, že kmen *B. cepacia* sice produkoval během kultivace za daných podmínek více biomasy než kmen *B. sacchari*, na druhou stranu *B. cepacia* reagovala na přídavek NaCl značně citlivěji. U *B. cepacia* každý přídavek NaCl znamenal znatelný pokles v produkci biomasy, zatímco u *B. sacchari* obsah biomasy v médiu s koncentrací 5, 10 a 15 g·l⁻¹ zůstával téměř konstantní. V každém případě je z grafu zřejmé, že zvýšený osmotický tlak v kultivačním médiu má značný inhibiční vliv na růst bakteriální populace a produkci biomasy.

4.4.3 Stanovení tvorby biofilmu s využitím Christensenovy metody

Výsledky Christensenovy metody stanovení biofilmu shrnuje Graf 9. Podrobná data stanovení poskytuje Příloha 9.



Graf 9: Vliv rozdílné koncentrace NaCl v kulturačním médiu na vznik biofilmu bakteriálních kmenů *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari*

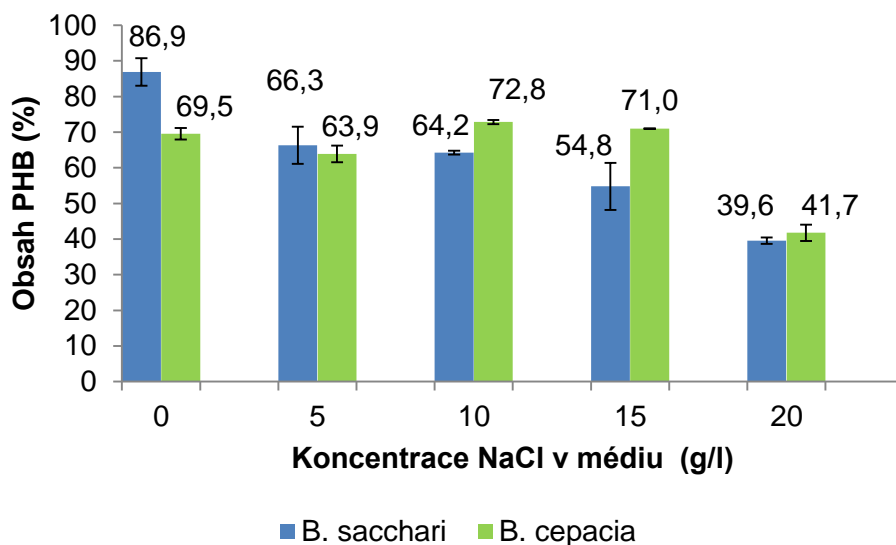
Z grafu závislosti absorbance extrakčního činidla na koncentraci NaCl je patrné několik skutečností. U bakteriálního kmene *Burkholderia sacchari* absorbance rozpouštědla, použitého pro extrakci biofilmu obarveného krystalovou violetí, dosahovala poměrně nízkých hodnot. Tyto hodnoty se navíc u rozdílných koncentrací NaCl od sebe příliš nelišily. Z toho lze usuzovat, že bakterie *B. sacchari* tvořila biofilm za podmínek experimentu jen velmi omezeně. Poměrně odlišných výsledků bylo dosaženo u bakteriálního kmene *Burkholderia cepacia*. Tato bakterie tvořila nejochotněji biofilm v izosmotickém prostředí, tedy v médiu bez přídavku NaCl. Za těchto podmínek byla naměřena nejvyšší hodnota absorbance extrakčního činidla. Nicméně, tento výsledek je zároveň zatížen nejvyšší chybou. V prostředí se zvýšeným osmotickým tlakem, ve srovnání s izotonickým prostředím, došlo u *B. cepacia* ke snížení schopnosti tvorby biofilmu. Snížená schopnost tvorby biofilmu v prostředí NaCl může být způsobena zejména tím, že některé vícemocné kationty přítomné v biofilmové matici, zejména Ca^{2+} , mohou být nahrazeny kationty Na^+ , podobně jako popisuje autor Pronk a kolektiv [143]. Je známo, že u některých bakteriálních kmenů přítomnost vícemocných kationtů zprostředkovává zesílení EPS, a zvyšuje tak mechanickou odolnost biofilmu [63]. Absence těchto iontů v matici biofilmu tak mohla způsobit oslabení EPS biofilmu a celkové narušení jeho stability.

Srovnáme-li schopnost obou bakteriálních kmenů tvořit biofilm, je patrné, že *B. cepacia* v izosmotickém i hyperosmotickém prostředí tvořila biofilm mnohem ochotněji než *B. sacchari*. Autoři Behrends a kolektiv se zmiňují o stresem vyvolaných genetických změnách bakterie *B. cepacia*, a některých dalších mikroorganismů, které těmto bakteriím pomáhají přežít v prostředí s vysokou koncentrací soli. Byly navrženy tři možné strategie, pomocí kterých se bakterie *B. cepacia* s osmotickým stresem vypořádává. Může se jednat o permanentně zvýšenou koncentraci (dokonce i v izotonickém prostředí) osmoprotektivních sloučenin, jako je například glycin betain nebo trehalosa. Jinou možností je zvýšena

produkce osmoprotektivních látek až jako odezva na působící osmotický stres. V posledním řadě se může jednat o zvýšenou koncentraci aminokyselin, zejména alaninu, glutamátu a fenylalaninu, v reakci na přítomnost solí v prostředí [144].

4.4.4 Stanovení PHB pomocí plynové chromatografie

Pomocí plynové chromatografie byl stanoven obsah PHB v buňkách, které byly po dobu 64 hodin kultivovány v médiu se zvýšeným osmotickým tlakem. Zároveň byl pro srovnání stanoven obsah PHB v buňkách kultivovaných v izosmotickém prostředí. Výsledky stanovení shrnuje Graf 10. Podrobnější data poskytuje Příloha 10 a Příloha 11.



Graf 10: Výsledky stanovení obsahu PHB v buňkách *B. sacchari* a *B. cepacia* kultivovaných v hyperosmotickém a v izosmotickém prostředí.

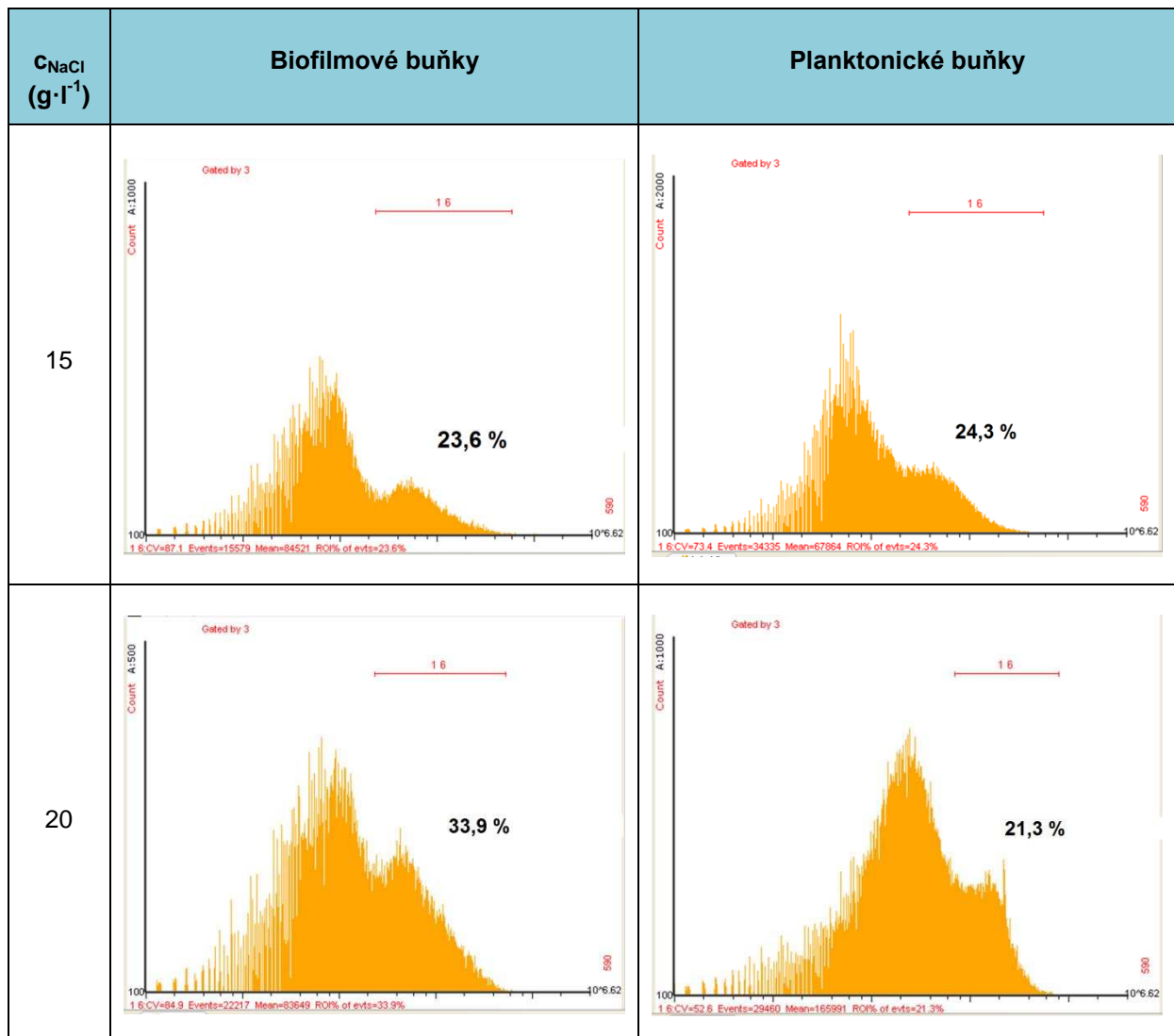
Trend závislosti obsahu PHB v buňkách na koncentraci NaCl v kultivačním médiu se u *B. sacchari* a *B. cepacia* mírně rozcházejí. U kmene *B. sacchari* byl nejvyšší obsah PHB stanoven v buňkách, které byly kultivovány v médiu bez přídavku NaCl. Následně, se zvyšující se koncentrací NaCl v médiu obsah PHB v buňkách postupně klesal. Sůl byla do média přidána již na počátku kultivace, což kromě zpomalení růstu pravděpodobně způsobilo i inhibici buněčných pochodů, včetně produkce PHB. Jiná situace nastala v případě kmene *B. cepacia*. Zde byl nejvyšší obsah PHB naměřen v buňkách kultivovaných v médiu s obsahem $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl. Téměř shodných výsledků bylo dosaženo v buňkách kultivovaných v médiu s obsahem 0 a $15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl. Nejnižší obsah PHB byl jak u *B. sacchari*, tak u *B. cepacia* stanoven v buňkách kultivovaných v médiu s obsahem $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl.

4.4.5 Stanovení distribuce PHB v buňkách pomocí průtokové cytometrie

Za účelem stanovení heterogenity bakteriální populace a distribuce PHB v planktonických a biofilmových buňkách v závislosti na koncentraci NaCl v médiu byla provedena analýza bakteriálního kmene *B. sacchari* pomocí průtokové cytometrie. Bakteriální kmen *B. cepacia* vykazuje autofluorescenci, a tak pro stanovení pomocí průtokové cytometrie není příliš vhodný. Výsledky analýzy poskytuje Tabulka 3.

Tabulka 3: Výsledky analýzy planktonických a biofilmových buněk bakteriálního kmene *B. sacchari* po kultivaci v izoosmotické a hyperosmotickém prostředí.

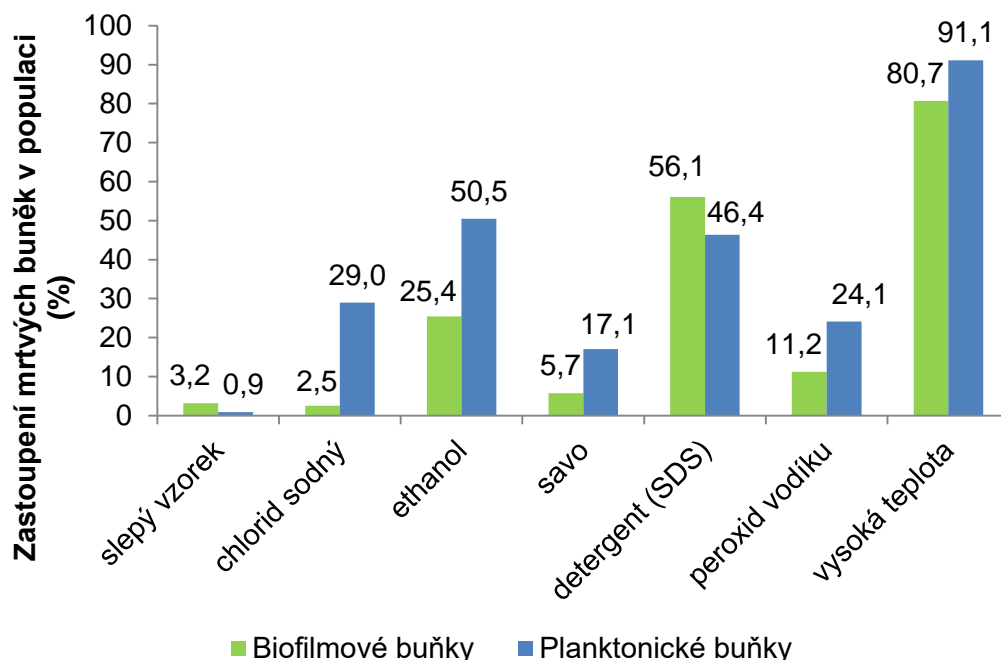
C_{NaCl} ($g \cdot l^{-1}$)	Biofilmové buňky	Planktonické buňky
0		
5		
10		



Výstupem analýzy pomocí průtokové cytometrie jsou histogramy, které nám mohou poskytnout informaci jednak o heterogenitě bakteriální populace ve vzorku, jednak o distribuci PHB v jednotlivých subpopulacích. Uvedené histogramy jak biofilmových, tak planktonických buněk bakteriálního kmene *B. sacchari* jsou si vzájemně podobné. Z uvedených histogramů je patrné, že v obou případech došlo k rozdělení buněčné populace na dvě subpopulace. Jedna ze subpopulací je vždy bohatší na obsah PHB ve srovnání s druhou subpopulací. V populaci bakterií kultivovaných v médiu bez přídavku NaCl převažuje subpopulace bohatá na obsah PHB nad subpopulací chudou na obsah PHB. V případě bakterií kultivovaných v médiu s koncentrací $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl je poměr obou subpopulací přibližně stejný. Pro zbylé koncentrace NaCl v médiu platí, že subpopulace chudá na obsah PHB převyšovala nad PHB bohatou subpopulací. Je tedy jednoznačné, že přítomnost soli v kultivačním médiu potlačila růst populace bohaté na obsah PHB. V bakteriálních populacích kultivovaných v médiu s obsahem $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl a více v podstatě chyběla subpopulace bohatá na PHB. Se zvyšující se koncentrací NaCl v médiu klesal obsah PHB v biofilmových buňkách, což se projevilo posouváním píků histogramu na ose x směrem doleva. Vzájemný poměr dvou subpopulací biofilmových buněk, tedy bohaté a chudé na obsah PHB, však zůstal od koncentrace NaCl $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ prakticky stejný. Z toho lze usuzovat, že biofilmové buňky nejsou tak citlivé na vnější stimuly, oproti buňkám planktonickým.

4.5 Studium vlivu stresových faktorů na viabilitu buněk

Viabilita buněk po působení stresových faktorů byla stanovena pomocí průtokové cytometrie. Vliv použitého stresového faktoru na úmrtnost buněk v populaci shrnuje Graf 11.



Graf 11: Zastoupení mrtvých buněk v populaci v závislosti na typu použitého stresového faktoru

Během zkoumání vlivu stresových faktorů na viabilitu buněk bylo použito celkem 7 typů stresorů, z toho 5 chemických a 2 fyzikální. Z grafu je na první pohled patrné, že jednotlivé typy použitých stresorů se od sebe lišily svým baktericidním účinkem. Nejvyššího baktericidního účinku, a tedy nejvyšší úmrtnosti bakterií, bylo dosaženo po vystavení buněk vysoké teplotě. Po působení teploty 75 °C po dobu 60 °C došlo k usmrcení až 91 % buněk. Naopak velmi nízké úmrtnosti buněk bylo dosaženo v případě použití nízké teploty a prostředku Savo Original, jakožto stresového faktoru. Vůbec nejnižšího baktericidního účinku pak bylo dosaženo u biofilmových buněk, které byly vystaveny působení NaCl. Zde zastoupení mrtvých buněk v populaci tvořilo pouhých 2,5 %. Nicméně, kromě velmi nízkého zastoupení mrtvých buněk se na záznamu z cytometru objevil i nízký počet analyzovaných událostí. Po přidání NaCl ke vzorku bakteriální kultury bylo možné pozorovat agregaci buněk. Tyto agregáty pak bylo velmi těžké při přípravě vzorku rozsuspendovat. Během měření tak mohlo dojít k podhodnocení skutečného počtu buněk v důsledku počítání agregátů jako jedné buňky, což mohlo vést k nestandardnímu chování analyzovaného vzorku.

U většiny případů použitých stresových faktorů došlo k dosažení vyšší úmrtnosti u buněk planktonických než biofilmových. Tato skutečnost je v souladu s literaturou, která uvádí, že biofilm poskytuje buňkám ochranu před působením celé řady stresových faktorů [107]. Výjimku tvoří biofilmové buňky v případě použití detergentu SDS. V tomto případě bylo větší zastoupení mrtvých buněk v populaci naměřeno u buněk biofilmových než planktonických. Jedním z možných důvodů je, že SDS mohlo způsobit solubilizaci složek bakteriálního

biofilmu. Díky tomu mohlo dojít k celkovému narušení struktury biofilmu, a buňky uvnitř něj se pravděpodobně staly náchylnější k působení škodlivých podmínek. Navíc, obsah PHA, které plní rovněž protektivní funkci, je u biofilmových buněk nižší než u buněk planktonických. V konečném důsledku tak byl biofilmovým buňkám v přítomnosti detergentu zřejmě poskytnut nižší stupeň ochrany než buňkám planktonickým, což vedlo k většímu počtu mrtvých buněk v populaci.

5 ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na polyhydroxyalkanoáty a jejich roli ve struktuře bakteriálního biofilmu. K této studii byly využity bakteriální kmeny *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari*, jakožto kmeny schopné jednak tvořit biofilm a jednak produkovat polyhydroxyalkanoáty.

Za účelem zkoumání role PHA v bakteriálním biofilmu bylo v první řadě nutné připravit stabilní biofilm v množství dostatečném pro další analýzu. Tato fáze experimentální části byla jednou ze stěžejních a potýkala se s řadou nesnází. K přípravě biofilmu byl použit komerčně dodávaný CDC biofilmový reaktor. Navzdory snaze zachovat během přípravy biofilmu vždy konstantní podmínky (teplota, složení média, stáří inokula a další), byly výsledky kultivace často rozdílné. Zatímco v některých případech se podařilo v CDC reaktoru připravit velmi bohatý a stabilní biofilm, jindy došlo k nárustu biofilmu pouze nepatrně. Z jakého důvodu k této skutečnosti docházelo se nepodařilo objasnit. Literatura tvrdí, že na vznik biofilmu má značný vliv složení média. Někteří autoři se přiklánějí k názoru, že pro přípravu bohatého biofilmu je vhodné nutričně bohaté médium [138], jiní naopak doporučují médium nutričně chudé [40]. Na základě výsledů Christensenovy metody kvantifikace biofilmu se nelze přiklonit k ani jednomu z názorů. Použití jak nutričně chudého, tak nutričně bohatého média pro přípravu biofilmu vedlo k prakticky shodným výsledkům. Pro přípravu bohatého biofilmu je však nezbytné použít neředěné médium. Ředění kultivačního média mělo inhibiční vliv na vznik biofilmu. Optimalizace podmínek pro přípravu biofilmu a studium vlivu prostředí na vývoj biofilmu je časově náročné a mohlo by být předmětem samostatného zkoumání.

Velká část diplomové práce byla zaměřena na PHA. Předmětem zkoumání byly rozdíly v kvantitě a zejména rozdíl ve formě, ve které se PHA vyskytují v biofilmových a planktonických buňkách. Výsledky plynové chromatografie a Ramanovy spektroskopie jednoznačně prokázaly, že vyšší obsah polyhydroxybutyrátu se vyskytuje v buňkách planktonických. V biofilmových buňkách dochází ke kompetici o stejný prekurzor, tedy acetyl-CoA, jednak pro výstavbu biofilmu, jednak pro syntézu PHA. Tato kompetice vede ke sníženému toku acetyl-CoA do metabolické dráhy mastných kyselin, která je nezbytná pro vznik PHA. V důsledku toho je obsah PHA v bakteriálních buňkách žijících v biofilmu obecně nižší, v porovnání s buňkami planktonickými. Rozdíly byly shledány i ve formě, v jaké se PHA vyskytují v jednotlivých buňkách. Výsledky Ramanovy spektroskopie ukázaly, že v planktonických buňkách se PHB vyskytuje výhradně ve své nativní amorfní formě. Naproti tomu v buňkách biofilmových se kromě amorfní formy část PHB vyskytovala ve formě krystalické. V Ramanově spektru se tato skutečnost projevila nakloněním píku v oblasti 1736 cm^{-1} , tedy píku charakteristického pro PHB, směrem doleva. Ke vzniku krystalické struktury dochází po uvolnění PHB z granulí do extracelulárního prostředí. Výskyt krystalické formy PHB v biofilmových buňkách může poukazovat na přítomnost lyzovaných buněk uvnitř biofilmu. Tato skutečnost by odpovídala tvrzení autorů Whitchurch a kolektiv, že část buněk uvnitř biofilmu podstupuje lyzi, čímž poskytuje ostatním buňkám stavební materiál pro výstavbu biofilmu [140]. PHA uvnitř buněk primárně slouží jako zdroj energie a uhlíku v případě hladovění. Je možné, že by stejnou funkci PHA mohli zastávat i v biofilmové matici, po jejich uvolnění z buněk a částečné krystalizaci. Extracelulární PHA uvnitř biofilmu by mohly poskytnout substrát mikroorganismům, které jsou vybaveny extracelulární PHA depolymerasou, jako jsou např. bakteriální rody *Pseudomonas* [34], *Cupravidus* [145], *Alcaligenes* [146] a další. Degradace extracelulární PHA a aktivita extracelulárních PHA depolymeras uvnitř bakteriálního biofilmu by mohla být předmětem dalšího zkoumání.

Poslední fáze diplomové práce byla zaměřena na vliv osmotického stresu a dalších stresových faktorů na viabilitu a růst buněk a na celkovou produkci PHA. Obecně lze říci, že se zvyšujícím se osmotickým tlakem kultivačního média klesá schopnost buněk růst a množit se. Při vysokých koncentracích solí v médiu dochází k úplné inhibici bakteriálního růstu. Se zpomaleným buněčným růstem zároveň dochází ke zpomalení metabolických procesů v buňce, včetně produkce PHA. Výsledky plynové chromatografie prokázaly snížený obsah PHB v buňkách, které byly exponovány prostředí s vyšším osmotickým tlakem. Stejného výsledku bylo dosaženo pomocí průtokové cytometrie, která navíc ukázala, že planktonické buňky, v porovnání s biofilmovými, reagují mnohem citlivěji na vnější stimuly. Biofilmové buňky jsou odolnější vůči stresovým podmínkám a dalším negativním vlivům vnějšího prostředí, a to zejména díky protektivnímu charakteru EPS přítomných v biofilmové matici.

6 ZDROJE

- [1] Steinbüchel A., Lütke-Eversloh T (2003) Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal* 16(2):81–96
- [2] Wang Q, Zhuang Q, Liang Q, Qingsheng QI (2013) Polyhydroxyalkanoic acids from structurally-unrelated carbon sources in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(8):3301–3307
- [3] Tokiwa Y, Calabia BP (2004) Degradation of microbial polyesters. *Biotechnol Lett* 26:1181–1189
- [4] Williams DF, Miller ND (1987) The degradation of polyhydroxybutyrate (PHB). *Adv Biomater* 7:471–476
- [5] Yue CL, Gross RA, McCarthy SP (1996) Composting studies of poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate). *Polym Degrad Stabil* 51:205–210
- [6] Brandl H, Gross RA, Lenz RW, Fuller RC (1990) Plastics from bacteria and for bacteria: poly(beta-hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 41:77–93
- [7] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318–22
- [8] Donlan RM, Costerton JW (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15:167–93
- [9] Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2:95–108
- [10] Donlan RM (2002) Biofilms: Microbial Life on Surface. *Emerging Infectious Diseases* 8:881–887
- [11] Rehm BH (2010) Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nat Rev Microbiol* 8:578
- [12] Pham TH, Webb JS, Rehm BHA (2004) The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. *Microbiology* 150(10):3405–3413
- [13] López NI, Pettinari MJ, Nikel PI, Méndez BS (2015) Polyhydroxyalkanoates: Much More than Biodegradable Plastics. *Advances in Applied Microbiology* 93:73–106
- [14] Madison LL, Huisman GW (1999) Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev* 6(1):21–53
- [15] Steinbüchel A, Fächtenbusch B (1998) Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends Biotechnol* 16:419–427
- [16] Brandl H, Gross RA, Lenz RW, Fuller RC (1988) *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(B-hydroxyalkanoates) for potential application as biodegradable polyester. *Appl Environ Microbiol* 54:1977–1982

- [17] Lageveen RG, Huisman GW, Preusting H, Ketelaar P, Eggink G, Witholt B (1988) Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrate on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkanoates. *Appl Environ Microbiol* 54:2924–2932
- [18] Huisman GW, Leeuwde O, Eggink G, Witholt B (1989) Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads. *Appl Environ Microbiol* 55:1949–1954
- [19] Doi Y, Kitamura S, Abe H (1995) Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules* 28:4822–4828
- [20] Sudesh K, Abe H, Doi Y (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* 25:1503–1504
- [21] Senior PJ, Beech GA, Ritchie GAF, Dawes EA (1972) The role of oxygen limitation in the formation of poly- β -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azobacter beijerinckii*. *Biochem J* 128:1193–1201
- [22] Dawes EA, Senior PJ (1973) The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Adv Microb Physiol* 10:135–266
- [23] Oeding V, Schlegel HG (1973) Beta-ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* HI6 and its significance in the regulation of polybeta-hydroxybutyrate metabolism. *Biochem J* 134:239–248
- [24] Wang JG, Bakken LR (1998) Screening of soil bacteria for polybeta-hydroxybutyric acid production and its role in the survival of starvation. *Microb Ecol* 35:94–101
- [25] Gross RA, DeMello C, Lenz RW, Brandl H, Fuller RC (1989). Biosynthesis and characterization of poly(B-hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromolecules* 22:1106–1115
- [26] Preusting HA, Nijenhuis, Witholt B (1990) Physical characteristics of poly(3-hydroxyalkanoates) and poly(3-hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on aliphatic hydrocarbons. *Macromolecules* 23:4220–4224
- [27] Reddy CSK, Ghai R, Rashmi, Kalia VC (2003) Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresour Technol* 87:137–146
- [28] Marchessault RH (1996) Tender morsels for bacteria: recent development in microbial polyester. *Trends Polym Sci* 4:163–168
- [29] Laycock B, Halley P, Pratt S, Werker A, Lant P (2013) The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in Polymer Science* 38:536–583.
- [30] Kadouri D, Jurkevitch E, Okon Y (2005) Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Crit Rev Microbiol* 31:55–67
- [31] Delafield FP, Doudoroff M, Palleroni NJ, Lusty CJ, Contopoulos R (1965) Decomposition of poly-3-Hydroxybutyrate by Pseudomonads. *J Bacteriol* 90(5):1455–1466

- [32] Aneja P, Charles TC (1999) Poly-3-hydroxybutyrate degradation in *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *meliloti*: isolation and characterization of a gene encoding 3-hydroxybutyrate dehydrogenase. *J Bacteriol* 181(3):849–857
- [33] Cai G, Driscoll BT, Charles TC (2000) Requirement for the enzymes acetoacetyl coenzyme A synthetase and poly-3-hydroxybutyrate (PHB) synthase for growth of *Sinorhizobium meliloti* on PHB cycle intermediates. *J Bacteriol* 182(8):2113–2118
- [34] Jendrossek D, Handrick R (2002) Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annu Rev Microbiol* 56:403–432
- [35] Tanio T, Fukui T, Shirakura Y, Saito T, Tomita K, Kaiho T, Masamune S (1982) An extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis*. *Eur J Biochem* 124(1):71–11
- [36] Anderson JA, Dawes EA (1990) Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews* 54:450–472
- [37] *Products of primary metabolism*. 2nd, compl. rev. ed. Weinheim: VCH, c1996. Biotechnology (VCH).
- [38] Karr DB, Waters JK, Suzuki F, Emerich DW (1984) Enzymes of the poly- β -hydroxybutyrate and citric acid cycles of *Rhizobium japonicum* bacteroids. *Plant Physiol* 75:1158–1162
- [39] McDermott TR, Griffith SM, Vance CP, Graham PH (1989) Carbon metabolism in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. *FEMS Microbiol Rev* 63:327-340
- [40] Dewanti R, Wong ACL (1995) Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol* 26(2):147–64
- [41] Trainer MA, Charles TC (2006) The role of PHB metabolism in the symbiosis of *Rhizobia* with legumes. *Appl Microbiol Biotechnol* 71:377–386
- [42] Wu D, He J, Gong Y, Chen D, Zhu X, Qiu N, Sun M, Li M, Yu Z (2011) Proteomic analysis reveals the strategies of *Bacillus thuringiensis* YBT-1520 for survival under long-term heat stress. *Proteomics* 11:2580–2591
- [43] Iustman LJR, Tribelli PM, Ibarra JG, CatoneMV, Venero ECS, Lopez NI (2015) Genome sequence analysis of *Pseudomonas extremaustralis* provides new insights into environmental adaptability and extreme conditions resistance. *Extremophiles* 19:207–220
- [44] Pavez P, Castillo JL, Gonzales C, Martinez M (2009) Poly- β -hydroxyalkanoate exert protective effect against carbon starvation and frozen conditions in *Sphingopyxis chilensis*. *Curr Microbiol* 59:636–640
- [45] Goh L-K, Purama RK, Sudesh K (2014) Enhancement of stress tolerance in polyhydroxyalkanoate producers without mobilization of the accumulated granules. *Appl Biochem Biotechnol* 172:1585–1598

- [46] Ruiz JA, Lopez NI, Fernandez RO, Mendez BS (2001) Polyhydroxyalkanoate degradation is associated with nucleotide accumulation and enhances stress resistance and survival of *Pseudomonas oleovorans* in natural water microcosm. *Appl Environ Microbiol* 67:225–230
- [47] Martin DD, Bartlett DH, Roberts MF (2002) Solute accumulation in the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum*. *Extremophiles* 6:507–514
- [48] Soto G, Setten L, Lisi C, Maurelis C, Mozzicafreddo M, Cuccioloni M, Angeletti M, Ayub ND (2012) Hydroxybutyrate prevents protein aggregation in the halotolerant bacterium *Pseudomonas* sp. CT13 under abiotic stress. *Extremophiles* 16:455–462
- [49] Obruča S, Sedláček P, Mravec F, Samek O, Márová I (2015) Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly(3-hydroxybutyrate) accumulating cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:1365–1376
- [50] Reusch RN, Sadoff HL (1983) D(-)-Poly-p-hydroxybutyrate in membranes of genetically competent bacteria. *J Bacteriol* 156:778–788.
- [51] Reusch RN (1989) Poly-,B-hydroxybutyrate/calcium polyphosphate complexes in eukaryotic membranes. *Proc. Soc Exp Biol Med* 191:377–381
- [52] Luengo JM, García B, Sandoval A, Naharro G, Olivera ER (2003) Bioplastics from mikroorganisms. *Current Opinion in Microbiology* 6:251–260
- [53] Tan G-YA, Chen C-L, Li L, Ge L, Wang L, Razaad IMN, Li Y, Zhao L, Mo Y, Wang J-Y (2014) Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers* 6:706–754
- [54] Liu CC, Zhang LL, An J, Chen B, Yang H (2015) Recent strategies for efficient production of polyhydroxyalkanoates by micro-organisms. *Lett Appl Microbiol* 62:9–15
- [55] Koller M, Rodriguez-Contreras A (2015) Techniques for tracing PHA-producing organisms and for qualitative and quantitative analysis of intra- and extracellular PHA. *Eng Life Sci* 15:558–581
- [56] Angelova N, Hunkeler D (1999) Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends Biotechnol* 17:409–421
- [57] Tolker-Nielsen T, Molin S (2000) Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microb Ecol* 40:75–84
- [58] Lewandowski Z: *Biofilms: recent advances in their study and control*, Harwood Academic publishers; Amsterdam 2000.
- [59] Flemming H-C, Wingender J (2010) The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8(9):626
- [60] Rupp CJ, Fux CA, Stoodley P (2005) Viscoelasticity of *Staphylococcus aureus* biofilms in response to fluid shear allows resistance to detachment and facilitates rolling migration. *Appl Environ Microbiol* 71:2175–2178

- [61] Mayer C et al. (1999) The role of intermolecular interactions studies on model systems for bacterial biofilms. *Int J Biol Macromol* 26:3–16
- [62] Körstgens V, Flemming HC, Wingender J, Borchard W (2001) Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Water Sci Technol* 43:49–57
- [63] Shaw T, Winston M, Rupp CJ, Klapper I, Stoodley P (2004) Commonality of elastic relaxation times in biofilms. *Phys Rev Let* 93:098–102
- [64] Karatan E, Watnik P (2009) Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* 73:310–347
- [65] Flemming H–C, Wingender J, Griegbe, Mayer C (2000) Physico-chemical properties of biofilms. In: Evans LV, editor. *Biofilms: recent advances in their study and control*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers. p. 19–34.
- [66] Sutherland IW (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147:3–9
- [67] Sutherland IW (2007) The best and most comprehensive overview of the polysaccharide moiety of EPS. *Comprehensive Glycoscience* 2:521–558
- [68] Götz F (2002) *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 43:1367–1378
- [69] Hussain M, Wilcox MH, White PJ (1993) The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol Rev* 104:191–208
- [70] Leriche V, Sibille P, Carpentier B (2000). Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *Appl Environ Microbiol* 66:1851–1856
- [71] Donlan RM (2000) Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO J* 46:47–52
- [72] Wingender J, Neu T, Flemming H-C: *Microbial Extracellular Polymeric Substances Characterization, Structure and Function*, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, Berlin 1999.
- [73] Wingender J, Jaeger K-E: *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, Wiley, New York 2002.
- [74] Skillman L, Sutherland IW, Jonse MV (1999) The role of exopolysaccharides in dual species biofilm development. *J Appl Microbiol* 85:13–18
- [75] Lasa I, Penadés JR (2006). Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol* 157:99–107
- [76] Otzen D, Nielsen PH (2007) We find them here, we find them there: functional bacterial amyloid. *Cell Mol Life Sci* 65:910–927
- [77] van Schaik EJ et al. (2005) DNA binding: a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili. *J Bacteriol* 187:1455–1464.

- [78] Frølund B, Palmgren R, Keiding K, Nielsen PH (1996) Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Res* 30:1749–1758
- [79] Molin S, Tolker-Nielsen T (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biotechnol* 14:255–261
- [80] Böckelmann U et al. (2006) Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure. *FEMS Microbiol Lett* 262:31–38
- [81] Conrad A et al. (2003) Fatty acid lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs. *Lipids* 38:1093–1105.
- [82] Sand W, Gehrke T (2006) Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria. *Res Microbiol* 157:49–56
- [83] Matsuyama T, Nakagawa Y (1996) Surface-active exolipids: analysis of absolute chemical structures and biological functions. *J. Microbiol. Methods* 25: 165–175
- [84] Boles BR, Thoendel M, Singh PK (2004) Self-generated diversity produces “insurance effects” in biofilms communities. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:16630–16635
- [85] Pamp SJ, Gjermansen M, Tolker-Nielsen T (2007). *The Biofilm Mode of Life. Mechanisms and Adaptations*. Norfolk, UK, Horizon Bioscience; p. 37–69.
- [86] Ron E, Rosenberg ZE (2001) Natural role of biosurfactants. *Environ Microbiol* 3:229–236
- [87] Leck C, Bigg EK (2005) Biogenic particles in the surface microlayer and overlaying atmosphere in the central Arctic Ocean during summer. *Tellus B* 57:305–316
- [88] Tamaru Y, Takami Y, Yoshida T, Sakamoto T (2005) Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Appl Environ Microbiol* 71:7327–7333
- [89] Roberson EB, Firestone MK (1992) Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. *Appl Environ Microbiol* 58:1284–1291
- [90] Potts M (1994) Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev* 58:755–805
- [91] Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ (2013) Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3:a010306.
- [92] Mittelman MW (1998) Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *J Dairy Sci* 81:2760–2764.

- [93] Verma P., Maheshwaril S, Mathur KA (2013) A review on Bacterial Biofilm Formation and Disassembly. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 4(7):2900–2906
- [94] Monroe D (2007) Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biol* 5(11):307
- [95] Chmielewski RAN, Frank JF (2003) Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 2:22–32
- [96] Sutherland IW (1983) Microbial exopolysaccharides – Their role in microbial adhesion in aqueous systems. *Crit Rev Microbiol* 10(2)
- [97] Hood SK, Zottola EA (1997) Isolation and identification of adherent gram-negative microorganisms from four meat processing facilities. *J Food Prot* 60(9):1135–8
- [98] McLean RJC, Whiteley M, Stickler D, Fuqua WC (1997) Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 154:259–63
- [99] Pesci EC, Milbank JBJ, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP, Iglewski BH (1999) Quinolone signaling in the cell-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Nat Acad Sci* 96(20):11229–34
- [100] Davey ME, O’Toole GA (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64(4):847–67
- [101] Kjelleberg S, Humphrey B, Marshall K (1983) Initial phases of starvation and activity of bacteria at surfaces. *Appl Environ Microbiol* 46: 978–84
- [102] Allison D, Sutherland I (1987) The role of exopolysaccharide in adhesion of freshwater bacteria. *J Gen Microbiol* 133:1319–27
- [103] Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U (2000) Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev* 24:661–71
- [104] Montag D, Frant M, Horn H, Liefelth K (2012) Dependence of the initial adhesion of biofilm forming *Pseudomonas putida* mt2 on physico-chemical material properties. *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research* 28:315–327
- [105] van Loosdrecht MC, Lyklema J, Norde W, Schraa G, Zehnder AJ (1987) Electrophoretic mobility and hydro-phobicity as a measured to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Appl Environ Microbiol* 53:1898
- [106] Boulange-Petermann L, Rault J, Bellon-Fontaine M-N (1997) Adhesion of *Streptococcus thermophilus* to stainless steel with different surface topography and roughness. *Biofouling* 11(3):201–216
- [107] Flemming H-C (1993) Biofilms and environmental protection. *Water Sci Technol* 27:1–10
- [108] Wolfaardt GM, Lawrence JR, Robarts RD, Caldwell DE (1998) In situ characterization of biofilm exopolymers involved in the accumulation of chlorinated organics. *Microb Ecol* 35: 213–223

- [109] Gilbert P, Das J, Foley I (1997) Biofilms susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* 11: 160–167
- [110] Key characteristics of biofilms (2003) *Montana State University* [online]. Bozeman (Montana): Center for biofilm engineering. Available at: http://www.biofilm.montana.edu/biofilm-basics/key_characteristics_of_biofilms.html
- [111] Decho AW (1990) Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 28:73–153
- [112] Bartell JA, Yen P, Vajga JJ, Goldberg JB, Papin JA (2014) Comparative Metabolic Systems Analysis of Pathogenic *Burkholderia*. *J Bacteriol* 196(2):210–226
- [113] Davey ME, Caiazza NC, O'Toole GA (2003) Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 185:1027–1036
- [114] Di Martino C, Catone MV, López NI, Lustman LJR (2014) Polyhydroxyalkanoate Synthesis Affects Biosurfactant Production and Cell Attachment to Hydrocarbons in *Pseudomonas* sp. KA-08. *Curr Microbiol* 68:735
- [115] Chang WN, Liu CW, Liu HS (2009) Hydrophobic cell surface and bioflocculation behavior of *Rhodococcus erythropolis*. *Process Biochem* 44:955–962
- [116] Berlanga M, Domènech O, Guerrero R (2014) Biofilm formation on polystyrene in detached vs. planktonic cells of polyhydroxyalkanoate-accumulating *Halomonas venusta*. *International Microbiology* 17:205–212
- [117] Deziel E, Lepine F, Milot S, Villemur R (2003) rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*, 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* 149:2005–2013.
- [118] Rehm BHA, Mitsky TA, Steinbüchel A. (2001) Role of fatty acid de novo biosynthesis in polyhydroxyalkanoic acid (PHA) and rhamnolipid synthesis by pseudomonads, establishment of the transacylase (PhaG)-mediated pathway for PHA biosynthesis in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 67:3102–3109
- [119] Lenz RW, Marchessault RH (2005) Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules* 6(1):1–8
- [120] Sedláček I (2007). *Taxonomie prokaryot* 1. vyd., Brno: Masarykova univerzita.
- [121] Keenan TM, Tanenbaum SW, Stipanovic AJ, Nakas JP (2004) Production and characterization of poly- β -hydroxyalkanoate copolymers from *Burkholderia cepacia* utilizing xylose and levulinic acid. *Biotechnol Prog* 20:1697–1704
- [122] Huber B, Riedel K, Hentzer M, Heydorn A, Gotschlich A, Givskov M, Molin S, Eberl L (2001) The *cep quorum-sensing* system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology* 147: 2517–2528
- [123] Burkholder WH (1950) Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology* 40:115

- [124] Palleroni NJ: *Bergey's Manual of systemic bacteriology*, vol 1. Williams and Wilkins Co., Baltimore 1984.
- [125] Ramsay BA, Ramsay JA, Cooper DG (1989) Production of poly- β -hydroxyalkanoic acid by *Pseudomonas cepacia*. *Applied and Environmental Microbiology* 55:584–589
- [126] Sage A, Linker A, Evans LR, Lessie TG (1990) Hexose phosphate metabolism and exopolysaccharide formation in *Pseudomonas cepacia*. *Curr Microbiol* 20:191–198
- [127] Allison DG, Goldsbrough MJ (1994) Polysaccharide production in *Pseudomonas cepacia*. *J Basic Microbiol* 34:3–10
- [128] Holmes B (1986) The identification of *Pseudomonas cepacia* and its occurrence in clinical material. *J Appl Bacteriol* 61:299–314
- [129] Bramër CO, Vandamme P, da Silva LF, Gomez JG, Steinbüchel A (2001) *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51:1709–1713
- [130] Gomez JGC, Rodrigues MFA, Alli RCP, Torres BB, Bueno-Netto CL, Oliveira MS, Silva LF (1996) Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. *Applied Microbiology And Biotechnol* 45:785–791
- [131] Biosurface technologies corp., *CDC Biofilm Reactor: Operators Manual*. Bozeman, Montana.
- [132] Williams D, Bloebaum RD (2010) Observing the Biofilm Matrix of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 Grown Using the CDC Biofilm Reactor. *Microscopy and Microanalysis* 16(2):143-52
- [133] Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ et al. (1985) Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical microbiology* 22:996-1006
- [134] Merrit JH, Kadouri DE, O'Toole GA (2011) Growing and Analyzing Static Biofilms. *Curr Protoc Microbiol* 22:1B.1.1.–1B.1.18
- [135] Cryo-SEM. 2016. *John Innes Centre* [online]. Norwich: John Innes Centre. Available at: https://www.jic.ac.uk/microscopy/more/T5_19.htm
- [136] Krzyžánek V, Hrubanová K, Samek O, Obruča S, Márová I, Bernatová S, Šiler M, Zemánek P (2015) Cryo-SEM and Raman Spectroscopy Study of the Involvement of Polyhydroxyalkanoates in Stress Response of Bacteria. *Microsc Microanal* 21:183
- [137] Shapiro HM: *Practical Flow Cytometry*, 3. vyd. Wiley-Liss, Inc., USA 1995.
- [138] Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH (1982) Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* 37(1): 318-326

- [139] Samek O, Obruča S, Siler M Sedláček P, Benešová P Kučera D, Márová I, Ježek J, Bernatová S, Zemánek P (2016) Quantitative Raman Spectroscopy Analysis of Polyhydroxyalkanoates Produced by *Cupriavidus necator* H16. *Sensors* 16:1808
- [140] Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS (2002) Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. *Science* 295:1487.
- [141] Obruča S, Doskočil L, Krzyžánek V, Hrubanová K, Sedláček P, Mravce F. Samek O, Kučera D, Benešová P, Márová I (2016) Polyhydroxyalkanoates in bacterial cells – more than just storage materials. *Materials Science Forum* 851:20-25
- [142] Bonthron KM, Clasuss J, Horowitz DM, Hunter BK, Sanders JKM (1992) The biological and physical chemistry of polyhydroxyalkanoates as seen by NMR spectroscopy. *FEMS Microbiol Rev* 103:269-278
- [143] Pronk M, Bassin JP, De Kreuk MK, Kleerebezem R, Van Loosdrecht MCM (2014) Evaluating the main and side effects of high salinity on aerobic granular sludge. *Appl Microbiol Biotechnol* 98(3):1339–1348
- [144] Behrends V, Bundy JG, Williams HD (2011) Differences in strategies to combat osmotic stress in *Burkholderia cenocepacia* elucidated by NMR-based. *Letters in Applied Microbiology* 52:619–625
- [145] Jendrossek D. *Biopolymers Online*. 3b. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 2002. Extracellular polyhydroxyalkanoate (PHA) depolymerases: the key enzymes of PHA degradation; pp. 41–77.
- [146] Bachmann BM, Seebach D, (1999) Investigation of the enzymatic cleavage of diastereomeric oligo(3-hydroxybutanoates) containing two to eight HB units. A model for the stereoselectivity of PHB depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T₁. *Macromolecules* 32(6):1777–1784.

7 SEZNAM ZKRATEK

ATP	adenosintrifosfát
CDC	The Center for Disease Control
eDNA	extracelulární deoxyribonukleová kyselina
EPS	extracelulární polymerní látky (extracellular polymeric substance)
IS	interní standard
LPS	lipopolysacharidy
mcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty se středně dlouhým řetězcem (medium chain length polyhydroxyalkanoates)
MO	mikroorganismus
OMPs	vnější membránové proteiny (outer membrane proteins)
PHB	poly-3-hydroxybutarát
P(3HB-co-HV)	poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)
PBS	phosphate buffered saline
PHA	polyhydroxyalkanoáty
PIA	polysacharidový intercelulární adhesin
PNAG	poly- <i>N</i> -acytelglukosamin
scl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s krátkým řetězcem (short chain length polyhydroxyalkanoates)
UHMW	ultravysokomolekulární (ultra high molecular weight)

8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Stanovení optické hustoty během kultivace bakteriálního kmene Burkholderia sacchari a Burkholderia cepacia

Příloha 2: Kvantifikace vzniku biofilmu bakteriálního kmene Burkholderia sacchari a Burkholderia cepacia v závislosti na rozdílné koncentraci glukosy v kultivačním médiu

Příloha 3: Kvantifikace vzniku biofilmu bakteriálního kmene Burkholderia sacchari v závislosti na rozdílném ředění kultivačního média

Příloha 4: Kalibrační řada pro stanovení PHB pomocí plynové chromatografie

Příloha 5: Kalibrační přímka pro stanovení PHB pomocí plynové chromatografie

Příloha 6: Podrobná data ke stanovení obsahu P3HB v biofilmových a planktonických buňkách bakteriálního kmene Burkholderia sacchari

Příloha 7: Stanovení optické hustoty bakteriálního kmene Burkholderia sacchari během kultivace v prostředí se zvýšeným osmotickým tlakem

Příloha 8: Stanovení optické hustoty bakteriálního kmene Burkholderia cepacia během kultivace v prostředí se zvýšeným osmotickým tlakem

Příloha 9: Kvantifikace vzniku biofilmu bakteriálního kmene Burkholderia sacchari a Burkholderia cepacia v závislosti na rozdílné koncentraci chloridu sodného v kultivačním médiu

Příloha 10: Kalibrační řada pro stanovení PHB v buňkách kultivovaných v prostředí se zvýšeným osmotickým tlakem

Příloha 11: Kalibrační přímka pro stanovení PHB v buňkách kultivovaných v prostředí se zvýšeným osmotickým tlakem

9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Stanovení optické hustoty během kultivace bakteriálního kmene *Burkholderia sacchari* a *Burkholderia cepacia*

Bakterie	Doba kultivace (h)	Optická hustota			Směrodatná odchylka	Průměrná hodnota optické hustoty
<i>Burkholderia sacchari</i>	14	4,02	4,12	4,10	0,04	4,08 ± 0,04
	17	4,42	4,53	4,57	0,06	4,51 ± 0,06
	20	4,70	4,73	4,73	0,01	4,72 ± 0,01
	23	6,91	6,96	6,99	0,03	6,95 ± 0,03
	26	8,40	8,41	8,48	0,04	8,43 ± 0,04
	41	13,22	13,42	13,20	0,10	13,28 ± 0,10
	44	13,02	13,10	13,10	0,04	13,07 ± 0,04
	47	14,58	14,66	14,68	0,04	14,64 ± 0,04
	50	15,52	15,70	15,64	0,07	15,62 ± 0,07
64	14,52	14,64	14,56	0,05	14,57 ± 0,05	
<i>Burkholderia cepacia</i>	14	2,01	2,08	2,15	0,06	2,08 ± 0,06
	17	2,54	2,60	2,73	0,08	2,62 ± 0,08
	20	3,11	3,23	3,21	0,05	3,18 ± 0,05
	23	5,26	5,33	5,37	0,05	5,32 ± 0,05
	26	6,14	6,29	6,51	0,15	6,31 ± 0,15
	41	12,98	13,12	13,08	0,06	13,06 ± 0,06
	44	13,80	14,24	14,28	0,22	14,11 ± 0,22
	47	15,16	15,44	15,60	0,18	15,40 ± 0,18
	50	16,76	16,96	16,90	0,08	16,87 ± 0,08
64	17,76	17,52	17,56	0,10	17,61 ± 0,10	

Příloha 2: Kvantifikace vzniku biofilmu bakteriálního kmene *Burkholderia sacchari* a *Burkholderia cepacia* v závislosti na rozdílné koncentraci glukosy v kultivačním médiu

Bakterie	Konc. glukosy (g·l ⁻¹)	Absorbance při 562 nm						Směrodatná odchylka	Průměrná hodnota absorbance
<i>Burkholderia sacchari</i>	5	0,070	0,072	0,077	0,083	0,116	0,108	0,005	0,076 ± 0,005
	10	0,055	0,055	0,053	0,054	0,054	0,052	0,001	0,054 ± 0,001
	15	0,091	0,110	0,083	0,082	0,069	0,082	0,012	0,086 ± 0,012
	20	0,119	0,090	0,105	0,159	0,091	0,075	0,015	0,096 ± 0,015
	25	0,058	0,055	0,055	0,053	0,057	0,049	0,003	0,055 ± 0,003
<i>Burkholderia cepacia</i>	5	0,102	0,106	0,103	0,080	0,081	0,072	0,013	0,091 ± 0,013
	10	0,058	0,063	0,062	0,064	0,063	0,063	0,002	0,062 ± 0,002
	15	0,118	0,121	0,109	0,092	0,077	0,079	0,018	0,099 ± 0,018
	20	0,222	0,197	0,161	0,192	0,160	0,134	0,029	0,178 ± 0,029
	25	0,134	0,124	0,137	0,132	0,170	0,102	0,005	0,132 ± 0,005

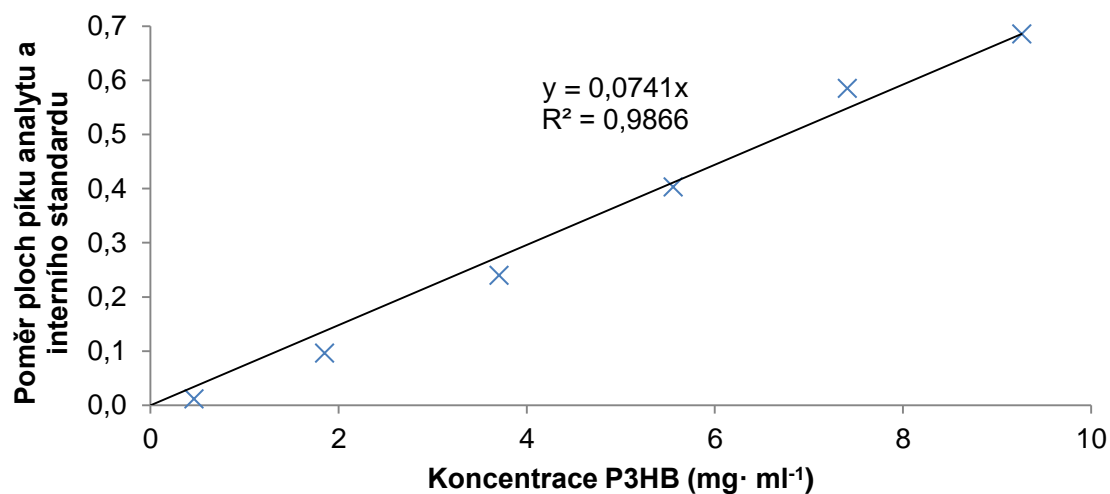
Příloha 3: Kvantifikace vzniku biofilmu bakteriálního kmene *Burkholderia sacchari* v závislosti na rozdílném ředění kultivačního média

Bakterie	Typ média	Ředění média	Absorbance při 562 nm						Směrodatná odchylka	Průměrná hodnota absorbance
<i>Burkholderia sacchari</i>	minerální	žádné	0,099	0,091	0,106	0,104	0,108	0,100	0,006	0,101 ± 0,006
		10x	0,067	0,064	0,065	0,057	0,057	0,060	0,004	0,062 ± 0,004
		5x	0,057	0,056	0,053	0,054	0,054	0,058	0,002	0,055 ± 0,002
		2x	0,069	0,066	0,069	0,064	0,065	0,066	0,002	0,067 ± 0,002
	TSB	žádné	0,104	0,098	0,096	0,099	0,087	0,088	0,006	0,095 ± 0,006
		10x	0,057	0,062	0,053	0,060	0,054	0,060	0,003	0,058 ± 0,003
		5x	0,067	0,059	0,063	0,062	0,066	0,058	0,003	0,063 ± 0,003
		2x	0,072	0,061	0,059	0,06	0,067	0,058	0,005	0,063 ± 0,005

Příloha 4: Kalibrační řada pro stanovení PHB pomocí plynové chromatografie

Koncentrace standardu (mg·ml ⁻¹)	Objem standardu (ml)	Konc. P3HB (mg·ml ⁻¹)	Plocha píku P3HB	Plocha píku IS	Poměr ploch píku P3HB a IS
10,525	0,05	0,46	316	27543	0,011
	0,2	1,85	1833	19152	0,096
	0,4	3,70	5009	20927	0,239
	0,6	5,56	17 764	44075	0,403
	0,8	7,41	13791	23582	0,585
	1	9,26	27383	39941	0,686

Příloha 5: Kalibrační přímka pro stanovení PHB pomocí plynové chromatografie



Příloha 6: Podrobná data ke stanovení obsahu P3HB v biofilmových a planktonických buňkách bakteriálního kmene *Burkholderia sacchari*

Buňky	Stanovení	Navážka biomasy (mg)	Plocha píku P3HB	Plocha píku IS	Poměr ploch píku P3HB a IS	Konc. P3HB ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Obsah P3HB v buňkách (%)	Průměrný obsah P3HB v buňkách (%)	Moorův test		
									Variační rozpětí	Vypočítané testové kritérium	Kritická tabel. hodnota $U_{0,05}$
biofilmové	1	10,5	11 109	45 874	0,242	3,440	32,76	35,22 ± 2,62	6,10	0,783	0,635
	2	13,5	17 396	52 360	0,332	4,596	34,04				
	3	10,1	11 530	41 185	0,280	3,925	38,86				
planktonické	1	8,6	14 403	40 047	0,360	4,948	57,53	50,45 ± 5,48	13,34	0,783	0,635
	2	8,8	14 145	51 045	0,277	3,889	44,19				
	3	8,9	15 039	47 232	0,318	4,418	49,65				

Příloha 7: Stanovení optické hustoty bakteriálního kmene *Burkholderia sacchari* během kultivace v prostředí se zvýšeným osmotickým tlakem

Bakterie	Konc. NaCl v médiu (g·l ⁻¹)	Doba kultivace (h)	Optická hustota			Směrodatná odchylka	Průměrná hodnota optické hustoty
<i>Burkholderia sacchari</i>	5	17	3,46	3,56	3,58	0,05	3,53 ± 0,05
		20	4,64	4,65	4,67	0,01	4,65 ± 0,01
		23	5,35	5,36	5,42	0,03	5,38 ± 0,03
		26	6,38	6,36	6,36	0,01	6,37 ± 0,01
		41	8,34	8,32	8,30	0,02	8,32 ± 0,02
		44	9,08	8,96	9,76	0,35	9,27 ± 0,35
		47	9,12	9,08	9,12	0,02	9,11 ± 0,02
		50	9,40	9,40	9,36	0,02	9,39 ± 0,02
		64	9,76	9,68	9,64	0,05	9,69 ± 0,05
	10	17	2,96	3,00	3,04	0,03	3,00 ± 0,03
		20	3,60	3,61	3,60	0,00	3,60 ± 0,00
		23	3,50	3,44	3,43	0,03	3,46 ± 0,03
		26	5,34	5,34	5,33	0,00	5,34 ± 0,00
		41	8,38	8,36	8,38	0,01	8,37 ± 0,01
		44	9,16	9,14	9,18	0,02	9,16 ± 0,02
		47	9,04	9,10	9,28	0,10	9,14 ± 0,10
		50	9,56	9,58	9,54	0,02	9,56 ± 0,02
		64	9,28	9,40	9,36	0,05	9,35 ± 0,05
	15	17	0,73	0,79	0,74	0,03	0,75 ± 0,03
		20	1,36	1,36	1,41	0,02	1,38 ± 0,02
		23	2,47	2,49	2,52	0,02	2,49 ± 0,02
		26	3,32	3,32	3,33	0,00	3,32 ± 0,00
		41	7,00	7,04	7,06	0,02	7,03 ± 0,02
		44	8,06	8,08	8,08	0,01	8,07 ± 0,01
		47	8,22	8,28	8,24	0,02	8,25 ± 0,02
		50	8,86	8,84	8,82	0,02	8,84 ± 0,02
		64	8,60	8,64	8,60	0,02	8,61 ± 0,02
	20	17	0,30	0,39	0,31	0,04	0,33 ± 0,04
		20	0,51	0,53	0,53	0,01	0,52 ± 0,01
		23	0,76	0,77	0,88	0,05	0,80 ± 0,05
		26	0,52	0,50	0,63	0,06	0,55 ± 0,06
		41	0,94	0,92	0,94	0,01	0,93 ± 0,01
		44	1,54	1,28	1,38	0,11	1,40 ± 0,11
		47	1,66	1,70	1,68	0,02	1,68 ± 0,02
		50	1,80	1,74	1,76	0,02	1,77 ± 0,02
		64	6,28	6,36	6,56	0,12	6,40 ± 0,12

Příloha 8: Stanovení optické hustoty bakteriálního kmene *Burkholderia cepacia* během kultivace v prostředí se zvýšeným osmotickým tlakem

Bakterie	Konc. NaCl v médiu (g·l ⁻¹)	Doba kultivace (h)	Optická hustota			Směrodatná odchylka	Průměrná hodnota optické hustoty
<i>Burkholderia cepacia</i>	5	17	0,65	0,62	0,66	0,02	0,64 ± 0,02
		20	2,06	2,08	2,00	0,03	2,05 ± 0,03
		23	2,32	2,34	2,33	0,01	2,33 ± 0,01
		26	3,78	7,90	3,79	1,94	5,16 ± 1,94
		41	9,44	9,52	9,32	0,08	9,43 ± 0,08
		44	10,34	10,22	10,26	0,05	10,27 ± 0,05
		47	11,68	12,28	12,72	0,43	12,23 ± 0,43
		50	13,16	13,28	13,54	0,16	13,33 ± 0,16
	64	13,28	13,40	13,44	0,07	13,37 ± 0,07	
	10	17	0,56	0,58	0,59	0,01	0,58 ± 0,01
		20	0,71	0,72	0,71	0,00	0,71 ± 0,00
		23	2,05	2,08	2,10	0,02	2,08 ± 0,02
		26	2,72	2,71	2,73	0,01	2,72 ± 0,01
		41	4,02	3,96	4,02	0,03	4,00 ± 0,03
		44	6,48	6,52	6,40	0,05	6,47 ± 0,05
		47	10,54	10,32	10,52	0,10	10,46 ± 0,10
		50	12,16	12,02	12,12	0,06	12,10 ± 0,06
	64	12,08	12,20	12,24	0,07	12,17 ± 0,07	
	15	17	0,99	1,06	1,05	0,03	1,03 ± 0,03
		20	2,09	2,22	2,29	0,08	2,20 ± 0,08
		23	2,42	2,45	2,55	0,06	2,47 ± 0,06
		26	3,69	3,58	3,64	0,04	3,64 ± 0,04
		41	8,30	8,30	8,26	0,02	8,29 ± 0,02
		44	7,88	7,82	7,88	0,03	7,86 ± 0,03
		47	7,50	7,50	7,60	0,05	7,53 ± 0,05
		50	7,62	7,50	7,56	0,05	7,56 ± 0,05
	64	6,40	6,28	6,52	0,10	6,40 ± 0,10	
	20	17	2,44	2,57	2,58	0,06	2,53 ± 0,06
		20	3,70	3,82	3,75	0,05	3,76 ± 0,05
		23	4,10	4,12	4,27	0,08	4,16 ± 0,08
		26	4,87	4,90	4,92	0,02	4,90 ± 0,02
		41	8,20	8,24	8,14	0,04	8,19 ± 0,04
		44	7,66	7,68	7,74	0,03	7,69 ± 0,03
		47	7,48	7,50	7,64	0,07	7,54 ± 0,07
		50	7,68	7,68	7,70	0,01	7,69 ± 0,01
	64	6,00	5,96	6,08	0,05	6,01 ± 0,05	

Příloha 9: Kvantifikace vzniku biofilmu bakteriálního kmene *Burkholderia sacchari* a *Burkholderia cepacia* v závislosti na rozdílné koncentraci chloridu sodného v kultivačním médiu

Bakterie	Konc. NaCl (g·l ⁻¹)	Absorbance při 562 nm				Směrodatná odchylka	Průměrná hodnota absorbance
<i>Burkholderia sacchari</i>	0	0,114	0,117	0,118	0,137	0,002	0,116 ± 0,002
	5	0,102	0,116	0,132	0,098	0,013	0,112 ± 0,013
	10	0,092	0,082	0,108	0,090	0,009	0,093 ± 0,009
	15	0,123	0,100	0,097	0,095	0,002	0,097 ± 0,002
	20	0,113	0,084	0,111	0,108	0,002	0,111 ± 0,002
<i>Burkholderia cepacia</i>	0	0,393	0,358	0,437	0,421	0,030	0,402 ± 0,030
	5	0,275	0,292	0,264	0,302	0,014	0,281 ± 0,014
	10	0,234	0,220	0,249	0,251	0,006	0,224 ± 0,006
	15	0,304	0,292	0,305	0,289	0,007	0,298 ± 0,007
	20	0,259	0,303	0,296	0,323	0,023	0,295 ± 0,023

Příloha 10: Kalibrační řada pro stanovení PHB v buňkách kultivovaných v prostředí se zvýšeným osmotickým tlakem

Koncentrace standardu (mg·ml ⁻¹)	Objem standardu (ml)	Konc. P3HB (mg·ml ⁻¹)	Plocha píku P3HB	Plocha píku IS	Poměr ploch píku P3HB a IS
13,025	0,05	0,57	3 458	70 816	0,049
	0,2	2,29	12 133	97 835	0,124
	0,4	4,58	18 021	65 041	0,277
	0,6	6,88	24 434	57 980	0,421
	0,8	11,46	49 300	65 275	0,755
	1	0,57	3 458	70 816	0,049

Příloha 11: Kalibrační přímka pro stanovení PHB v buňkách kultivovaných v prostředí se zvýšeným osmotickým tlakem

