



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VYUŽITÍ METOD TERMICKÉ ANALÝZY PŘI STUDIU ÚČINKU MIKROBIÁLNÍCH INHIBITORŮ

UTILIZATION OF THERMAL ANALYSIS IN THE STUDY ON EFFECTS OF MICROBIAL INHIBITORS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Miriam Bošelová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1262/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Miriam Bošeřová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Využití metod termické analýzy při studiu účinku mikrobiálních inhibitorů

Zadání diplomové práce:

1. Vypracovat literární rešerši na téma diplomové práce.
2. Navrhnout modelový experiment pro experimentální popis účinků mikrobiálních inhibitorů (výběr modelových mikroorganismů, chemických inhibitorů apod.).
3. Otestovat a zhodnotit využitelnost metod termické analýzy při popisu účinků inhibitoru při realizaci modelového experimentu.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019:

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

Bc. Miriam Bošeřová
student(ka)

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Táto diplomová práca sa zaoberá využitím metód termickej analýzy pri štúdiu účinkov mikrobiálnych inhibítorov, kde hlavným cieľom tejto práce bolo otestovať využiteľnosť metódy, ktorá sa predovšetkým používa v odlišných oblastiach vedy a výskumu. Ako modelové mikroorganizmy boli zvolené tri bakteriálne kmene: *Cupriavidus necator* H16, jeho mutančný kmeň *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ a *Halomonas halophila*. Inhibičný účinok kyseliny levulovej na rast a mieru metabolickej aktivity bol sledovaný pomocou mikrokolorimetrie. Meraním bolo zistené, že baktérie boli schopné adaptovať sa na kyselinu levulovú do určitej koncentrácie – *Cupriavidus necator* do 5 g/l a *Halomonas halophila* do 2 g/l. Výsledky termickej analýzy boli porovnané s konvenčnou metódou, ktorá sa bežne používa na sledovanie rastu mikroorganizmov.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the use of thermal analysis in the study on effects of microbial inhibitors. The main aim of this work was to determine the utilization of the method, which is mainly used in different fields of science and research. Three bacterial strains: *Cupriavidus necator* H16, its mutant strain *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ and *Halomonas halophila*, were used as model microorganisms. The inhibitory effect of levulinic acid on growth and metabolic activity was monitored by microcalorimetry. It was found that bacteria were able to adapt to levulinic acid to a certain concentration - *Cupriavidus necator* to 5 g/l and *Halomonas halophila* to 2 g/l. The thermal analysis results were compared to a conventional method, which is commonly used to study the growth of microorganisms.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Cupriavidus necator, *Halomonas halophila*, kyselina levulová, mikrokolorimetria, inhibícia

KEYWORDS

Cupriavidus necator, *Halomonas halophila*, levulinic acid, microcalorimetry, inhibition

BOŠELOVÁ, Miriam. *Využití metod termické analýzy při studiu účinku mikrobiálních inhibitorů* [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-05-08]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113446>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petr Sedláček.

PREHLÁSENIE

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

.....
podpis študenta

Pod'akovanie:

Rada by som poďakovala vedúcemu mojej diplomovej práce Ing. Petrovi Sedláčkovi Ph.D. za jeho čas, cenné rady a pomoc pri vypracovávaní diplomovej práce. Ing. Jitke Krouske Ph.D. za jej ochotu, pomoc a čas, ktorý mi venoval počas merania experimentálnej časti. Ďalšie veľké ďakujem patrí Ing. Eve Slaninovej a Ing. Ivane Nováčkovej za pomocou a ich trpezlivosť pri práci v laboratóriu.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČASŤ	8
2.1	Mikroorganizmy	8
2.1.1	Rozdelenie mikroorganizmov	8
2.1.2	Rastová krivka mikroorganizmov	9
2.1.3	Vplyv vonkajších faktorov na rast mikroorganizmov	10
2.1.4	Enzýmy	11
2.1.5	Inhibítory	13
2.1.5.1	Rozdelenie inhibítorov	13
2.1.5.2	Kyselina levulová.....	14
2.2	Polyhydroxyalkanoáty	15
2.2.1	Štruktúra, vlastnosti, syntéza a degradácia polyhydroxyalkanoátov.....	15
2.2.2	Poly(3-hydroxybutyrát)	18
2.3	Modelový mezofilný producent polyhydroxyalkanoátov <i>Cupriavidus necator</i>	19
2.3.1	Vlastnosti a metabolizmus baktérie	19
2.4	Modelový extrémofilný producent polyhydroxyalkanoátov <i>Halomonas halophila</i>	20
2.5	Termická analýza.....	21
2.5.1	Úvod.....	21
2.5.2	Mikrokalorimetria	23
2.5.3	Thermal Activity Monitor III	24
3	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	25
3.1	Využitie konvenčných metód k štúdiu rastu a adaptácie mikroorganizmov	25
3.2	Využitie termických metód pri štúdiu rastu mikroorganizmov	27
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	30
4.1	Použité baktérie, chemikálie a prístroje.....	30
4.1.1	Baktérie	30
4.1.2	Použité chemikálie pri kultivácii baktérii.....	30
4.1.3	Použité prístroje	30
4.2	Kultivácia <i>Cupriavidus necator</i>	31
4.2.1	Príprava a zloženie inokulačného a produkčného média pre <i>Cupriavidus necator</i>	31
4.3	Kultivácia baktérie <i>Halomonas halophila</i>	31
4.3.1	Príprava a zloženie inokulačného a minerálneho média pre <i>Halomonas halophila</i>	31
4.4	Štúdium účinkov mikrobiálnych inhibítorov pomocou mikrokalorimetrie	32
4.4.1	Príprava roztokov s kyselinou levulovou.....	32

4.4.2	Príprava vzoriek pre mikrokalorimetrické meranie	33
4.4.3	Mikrokalorimetrické meranie.....	33
4.5	Štúdium rastových kriviek baktérii.....	33
5	Výsledky a diskusia	34
5.1	Vplyv kyseliny levulovej na rast baktérie <i>Cupriavidus necator</i> H16	34
5.2	Vplyv kyseliny levulovej na rast baktérie <i>Cupriavidus necator</i> PHB ⁴	42
5.3	Vplyv kyseliny levulovej na rast baktérie <i>Halomonas halophila</i>	48
5.3.1	Inhibícia kyselinou levulovou	48
5.3.2	Inhibícia kyselinou levulovou a nízkou salinitou	55
6	ZÁVER	59
7	POUŽITÁ LITERATÚRA	62
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	69

1 ÚVOD

Mikroorganizmy sa vyskytujú v aeróbnom aj anaeróbnom prostredí, v pôde, v sladkých aj v slaných vodách, v iných organizmoch a prechodne ich nachádzame aj v ovzduší, prostredníctvom ktorého sú schopné šíriť sa. Ich výskyt je určený tým, že sú jedinou skupinou organizmov, ktorá je schopná získavať energiu a zdroje uhlíka pre svoj rast pomocou fotoautotrofie, fotoorganotrofiou, chemolitotrofiou a chemoorganotrofiou. Každá zmena podmienok prostredia vytvára pre mikrobiálne bunky definovaný rozsah podmienok, v rámci ktorých je rýchlosť rastu pozitívna – dochádza k rastu mikroorganizmov, nulová – mikróby prežívajú, alebo negatívna – odumieranie mikroorganizmov. Aby mikrobiálne bunky mohli existovať buď v rastovej zóne alebo v zóne prežívania, musia sa adaptovať na prevládajúce podmienky. Výsledkom je „komfortná zóna“ charakterizovaná buď rastom alebo prežívaním baktérií, predstavujúca významnú úroveň vnútornej pružnosti organizmu a jeho schopnosti adaptovať sa a vzdorovať následkom, ktoré boli vyvolané zmenami prostredia.

V posledných rokoch sa množstvo štúdií zaoberá prokaryotami, ktoré sú schopné akumulovať polyhydroxyalkanoáty v podobe intracelulárnych granúl. Polyhydroxyalkanoáty (PHA) slúžia predovšetkým ako zásobáreň uhlíka a energie, avšak prítomnosť granúl v baktériách pravdepodobne zvyšuje odolnosť buniek voči rôznym stresovým faktorom. Nedávne výsledky poukazujú na pozitívny účinok PHA pri ochrane baktérii a zohrávajú dôležitú úlohu pri stresových reakciách, čím pomáhajú baktériam adaptovať sa a prežívať v stresových podmienkach ako sú nízka i vysoká teplotou, UV žiarenie, pred osmotickým a oxidatívnym stresom, atď. Diplomová práca diskutuje o zapojení PHA pri adaptácii baktérii na vybraný chemický inhibítor. Úloha PHA pri adaptácii bola porovnaná v rámci troch bakteriálnych kmeňoch, ktoré sa líšia prostredím v ktorom žijú (rôzna salinita prostredia) a schopnosťou akumulovať PHA.

Metabolické procesy mikroorganizmov sú spojené s energetickými procesmi, ktoré zodpovedajú zákonom termodynamiky. Počas ich rastu dochádza k produkcii tepla čo umožňuje zavedenie metód termickej analýzy k štúdiu rastu a miery metabolickej aktivity mikroorganizmov. Termická metóda zaznamenávajúca uvoľnené teplo systému v reálnom čase sa nazýva mikrokolorimetria, ktorá patrí medzi fyzikálne-chemické metódy používané v biologických vedách kvôli svojej vysokej citlivosti, vysokej presnosti, automatickosti. Vďaka nepretržitému zaznamenávaniu tepla poskytuje kvantitatívne o celkovom vyprodukovanom teple, rýchlosti rastu a rastovú krivku mikroorganizmov zo závislosti výkonu na čase.

Cieľom práce bolo otestovať a zhodnotiť využiteľnosť mikrokolorimetrie pri štúdiu mikrobiálnych inhibítorov. Mikrokolorimetria sa na Fakulte chemickej VUT Brno primárne nepoužíva k štúdiu mikrobiálneho rastu, avšak naša práca poskytla zaujímavé výsledky a nový pohľad na využitie tejto metódy v biologickom smere. Výsledky mikrokolorimetrie udávajú celkové metabolické teplo, ktoré však môže súvisieť s rastom alebo ďalšou metabolickou aktivitou. Kvôli tomu je potrebné získané výsledky porovnať s bežnými metódami, ktoré sa bežne používajú pri štúdiu mikroorganizmov. Doplnkovou metódou pre správnu interpretáciu výsledkov bolo fotometrické stanovenie optickej hustoty.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Mikroorganizmy

Mikoorganizmy sú nedeliteľnou súčasťou nášho sveta a patria medzi najjednoduchšie formy živej hmoty. Tvoria samostatnú ríšu organizmov, charakterizovanou vlastným metabolizmom (látkovou výmenou), ktorý zahŕňa súbor chemických reakcií prebiehajúcich v bunkách [1]. Za mikroorganizmy považujeme jednobunkové alebo viacbunkové organizmy, ktoré nie sú schopné tvoriť funkčne diferenciované tkanivá alebo pletivá [2]. Spoločným znakom mikroorganizmov sú veľmi malé rozmery ich tiel, napr. veľkosť vírusov je od 0,01 do 0,25 μm , baktérií 0,1 až 10 μm , prvoky 2 až 1000 μm . Ich názov je tak odvodený práve z ich malých rozmerov (*mikros* po grécky znamená malý). Druhým spoločným znakom je ich rýchla adaptácia na najrôznejšie živiny, fyzikálne alebo chemické podmienky [3]. Vplyvom meniacich sa podmienok prostredia a schopnosti orientovať sa v prostredí, mikroorganizmy svoj metabolizmus regulujú podľa aktuálnej situácie a na zmenu prostredia reagujú tzv. adaptáciou a genetickými mechanizmami a získavajú nové dedičné vlastnosti, ktoré im umožňujú prežiť vo vonkajšom prostredí. Takto získané nové dedičné vlastnosti môžeme vidieť napr. pri liečbe ochorení pomocou antibiotík, na ktoré sa mikroorganizmy prispôbili prostredníctvom genetickej zmeny a stali sa tak rezistentnými [1].

2.1.1 Rozdelenie mikroorganizmov

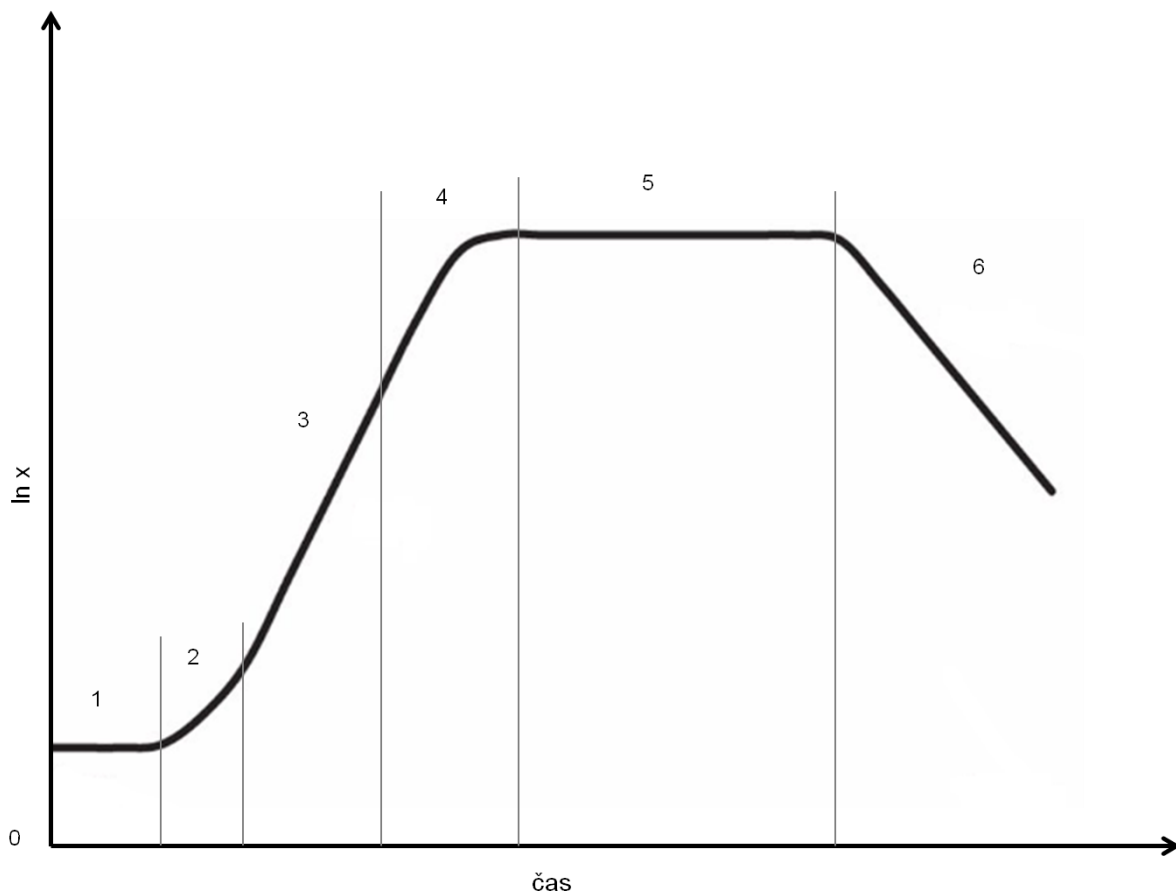
Organizmy sú klasifikované podľa systému troch domén – *archaea*, *baktérie*, *eukaryota*. Klasifikácia vychádza z rozdielov v štruktúre ribozomálnej RNA. Konkrétne na základe rozdielov v ich 16S rRNA génoch [4]. Pri porovnávaní sekvencií ribozómovej RNA bázy bolo zistené, že organizmy patriace do domény *eukaryota* sú viac podobné doméne *archaea* ako doméne baktérií. Z týchto výsledkov tak usúdili, že *archaea* a *eukaryota* patria do rovnakej línie [5]. *Archaea* sú na štruktúrnej úrovni rovnaké baktériám a ich štruktúru tvorí prokaryotická bunka, pričom prokaryotické a eukaryotické mikroorganizmy sa líšia v stavbe a zložení bunky a to konkrétne:

- prokaryotické bunky sú menšie, ich rozmery sú od 0,1 do 10 μm , majú jednoduchšiu štruktúru [6]. Veľkosť eukaryotických buniek je v rozmedzí 10 až 100 μm .
- Jadro prokaryotickej bunky je zložené len z DNA, ktorá predstavuje rovno chromozóm prokaryotickej bunky. Prokaryota nemajú jadro oddelené od cytoplazmy cytoplazmatickou membránou [7]. V bunke sa nenachádza ďalší endomembránový systém, ktorý by oddeľoval bunkové organely. Jediným membránovým útvarom u baktérií je plazmatická membrána.
- Ribozómy prokaryotických buniek sú voľne rozptýlené po celej cytoplazme. V eukaryotických bunkách sú ribozómy buď voľné alebo sú lokalizované na endoplazmatickom retikule [8].

Po fyziologickej stránke sú mikroorganizmy veľmi rozmanité. Jednotlivé skupiny mikroorganizmov sa vzájomne líšia svojimi nárokmi na výživu (autotrofné, heterotrofné), na kyslík (aerobné, anaerobné, mikroaerofilné, fakultatívne anaerobné), a na spôsob získavania potrebnej energie (fototrofné, chemotrofné) [9].

2.1.2 Rastová krivka mikroorganizmov

Rast mikroorganizmov je ovplyvnený podmienkami prostredia, v ktorom sa mikróby nachádzajú. Počas rastu dochádza k zväčšovaniu bunky a to vďaka príjmu energii a živiny z okolia. Zväčšovanie rozmerov bunky zahŕňa biosyntetické procesy, ktorých výsledkom je tvorba bunkových zložiek, predovšetkým ribozómov, bielkovín a nukleových kyselín [8]. Bunka však nemôže rásť donekonečna. Bakteriálna bunka sa potom rozdelí na dve samostatné bunky, ktoré sú schopné ďalej rásť. Pri optimálnych podmienkach by z jednej bunky v priebehu 48 hodín vzniklo 2^{144} čo je približne $2,5 \cdot 10^{43}$ buniek. Dostupnosť živín sa v prostredí rýchlo vyčerpáva a metabolity sa nahromadia v takej koncentrácii, ktorá bráni mikroorganizmom pri ďalšom raste. Keďže mikroorganizmy už nemôžu ďalej rásť, je potrebné ich presunúť do prostredia s optimálnymi kultivačnými podmienkami. Na Obr. 1 vidíme graficky znázornený nárast počtu živých buniek pomocou *rastovej krivky*, kde na ose x je vynesenej čas v príslušnej jednotke a na ose y logaritmus počtu živých buniek v 1 ml [3].



Obr. 1: Rastová krivka, kde na ose x je čas a na ose y je logaritmus počtu živých buniek v 1 ml, 1 - lag fáza, 2 - fáza zrýchleného rastu, 3 - exponenciálna fáza, 4 - fáza spomaleného rastu, 5 - stacionárna fáza, 6 - fáza odumierania [3]

V *lag fáze* nedochádza k rozmnožovaniu buniek, počet buniek sa znižuje odumieraním buniek vývojovo starších a menej životaschopných. Prežívajúce baktérie sa prispôbujú novým podmienkam, aktivujú potrebné enzýmy a zväčšujú svoj objem syntézou bunkových zložiek [8]. Dĺžka lag fázy závisí od druhu mikroorganizmu, fyziologického stavu buniek, veľkosti inokula a na zložení nového kultivačného média [3]. V súvislosti s lag fázou

je potrebné spomenúť ešte jav zvaný *diauxia*, s ktorým sa stretávame v súvislosti s indukciou enzýmov. V prípade, že bakteriálna kultúra rastie v prostredí s dvoma zdrojmi uhlíka, rast prebieha cez dve lag fázy a dve fázy exponenciálneho rastu, ktoré sú od lag fázy oddelené prechodnou fázou. *Diauxia* je spôsobená katabolickou represiou syntézy indukovaných enzýmov a ich postupnou indukciou [10]. Ďalej nasleduje *fáza zrýchleného rastu*, v ktorej sú bunky prispôbené novému prostrediu. Bunky sa začínajú množiť s narastajúcou rýchlosťou delenia a intenzita ich metabolizmu sa rýchlo zvyšuje. Vysoká fyziologická aktivita bunky je sprevádzaná zvýšenou citlivosťou k nepriaznivým faktorom prostredia [8].

V *exponenciálnej fáze* dochádza k intenzívnemu množeniu buniek a ich počet narastá geometrickou radou. Intenzívne delenie je sprevádzané aktívnym metabolizmom buniek, rýchlym využívaním substrátu a tvorbou metabolických produktov. Úbytok odumierajúcich buniek je v pomere k prírastku nových jedincov minimálny [8]. Číselná hodnota špecifickej rýchlosti rastu závisí od genetických faktorov a od podmienok prostredia (koncentrácia a zloženie živín, teplota, pH, iontová sila a pod) [10]. Predpokladá sa, že tvar krivky odráža rýchlosť príjmu živín mikrobiálnymi transportnými proteínmi. Pri dostatočne vysokých hladinách živín sú transportné systémy nasýtené a rýchlosť rastu sa s rastúcou koncentráciou živín ďalej nezvyšuje. Populácia je najviac homogénna z hľadiska chemických a fyziologických vlastností počas tejto fázy [7]. Po exponenciálnej fáze rastu pokračuje krátka prechodná *fáza spomaleného rastu*, pri ktorej dochádza k spomaleniu množenia i metabolizmu. Rýchlosť delenia sa znižuje, pretože dochádza k nárastu odumierajúcich buniek. Bunky odumierajú na základe vyčerpania dostupných živín v prostredí a kvôli hromadeniu metabolických produktov toxickkej povahy [8].

V *stacionárnej fáze* pretrvávajú nepriaznivé podmienky vďaka čomu sa počet odumierajúcich buniek môže vyrovnáť prírastku nových buniek alebo sa populácia prestane deliť, ale zostáva metabolicky aktívna [7]. Posledným úsekom je *fáza postupného odumierania buniek*, v ktorej narastá úbytok buniek nad ich prírastkom. Rýchlosť delenia tu klesá pod nulovú hodnotu a dosahuje tak záporné hodnoty. Táto fáza je výsledkom stále sa zhoršujúceho prostredia, v ktorom koncentrácia živín je pod kritickou hodnotou čo má za následok zníženie aktivity metabolizmu, postupné vyčerpanie rezervných látok a konečné hromadenie odumierajúcich buniek [8].

2.1.3 Vplyv vonkajších faktorov na rast mikroorganizmov

Rast mikroorganizmov závisí na podmienkach vonkajšieho prostredia, v ktorom okrem dostatočného množstva živín pre syntézu bunkovej hmoty, množstva zdrojov využiteľnej energie musia byť aj vhodné fyzikálne, chemické a biologické podmienky [3]. Nevhodné fyzikálne, chemické a biologické podmienky predstavujú pre mikroorganizmy stres, ktorý do istej miery negatívne ovplyvňuje ich rast. Ako veľmi citlivé sú mikroorganizmy na daný stres? Prírodná rezistencia zahŕňa evolučný výber rastovej formy, ktorá umožňuje mikróbu tolerovať stres bez nutnosti indukovať špecifické mechanizmy počas pôsobenia stresu [8]. Adaptívne mechanizmy zahŕňajú metabolický program známy ako reakcia na stres. Biologický účel reakcie na stres je ochrana bunkových organel pred potenciálne nebezpečnými faktormi. Stresová odpoveď sa prejavuje ako zmena metabolickej aktivity buniek, ktoré sú dôsledkom potlačania syntézy väčšiny proteínov vytvorených v bunke za normálnych fyziologických podmienok, a vyvolaniu syntézy špecifických skupín proteínov, ktoré umožňujú bunke fungovať v nových podmienkach. Biochemické zmeny sú sprevádzané fyziologickými zmenami, napr. dočasným spomalením alebo zastavením cyklu delenia, morfológickými zmenami v bunke alebo vzniku rezistencie voči rovnakému či inému stresovému faktoru [11].

Všetky mikroorganizmy majú spoločnú formu adaptácie na proces hladovania. Mikroorganizmy vtedy generujú bunky, ktoré sú schopné fungovať v stacionárnej fáze rastu. Tento typ buniek vzniká v dôsledku zmeny metabolizmu, sprostredkovaného mechanizmami všeobecnej stresovej odpovede, odpoveďou na teplotný šok atď. Baktérie v stacionárnej fáze sú charakterizované množstvom adaptačných mechanizmov, ktoré im umožňujú využívať šetrne dostupné zdroje energie a uhlíka. Najčastejšie k tomu dochádza prostredníctvom obmedzenia výdavkov na energiu pre rast a reprodukciu, znížením miery metabolizmu a aktiváciou autolýznych procesov, ktoré zabezpečujú zásobovanie nových živných substrátov. Bunkové štruktúry, ako je bunková stena, nukleoid a ribozómy sa menia tak, aby sa zvýšila ich stabilita. Výsledkom týchto zmien sú bunky odolné nielen na podmienky hladovania, ktoré sú charakteristické pre túto fázu rastu, ale aj pre ďalšie škodlivé fyzikálne vplyvy a chemické látky [12].

Schopnosť baktérií prispôbiť sa podmienkam je však daná určitou limitnou hranicou (bodom) a po jej prekročení dochádza k zastaveniu rastu alebo k usmrteniu bunky. Účinok vonkajších faktorov má zákonitý charakter a prejavuje sa charakteristickými bodmi minimálneho, optimálneho a maximálneho pôsobenie. Vzhľadom na životné prejavy baktérií môžeme minimálny účinok pôsobenia vonkajšieho faktoru vzťahovať na začiatok procesov metabolizmu. Najväčšej metabolickej aktivite, kedy je rýchlosť rastu maximálna odpovedá optimum a pri maximálnom účinku vonkajších faktorov sa životné procesy baktérie zastavujú a bunky odumierajú [3]. Vplyv vonkajších faktorov prostredia na baktérie môže byť pozitívny tak i negatívny. Priaznivo pôsobiace faktory sa používajú pri urýchlenní rastu alebo keď chceme zvýšiť metabolickú aktivitu. Faktory s nepriaznivým účinkom, tj. antibakteriálnym účinkom majú veľké uplatnenie pri podmienkach kedy prítomnosť baktérii nie je žiadúca dokonca je až škodlivá [8].

Metabolickú aktivitu mikroorganizmov môžeme rozdeliť do dvoch kategórií metabolických reakcií:

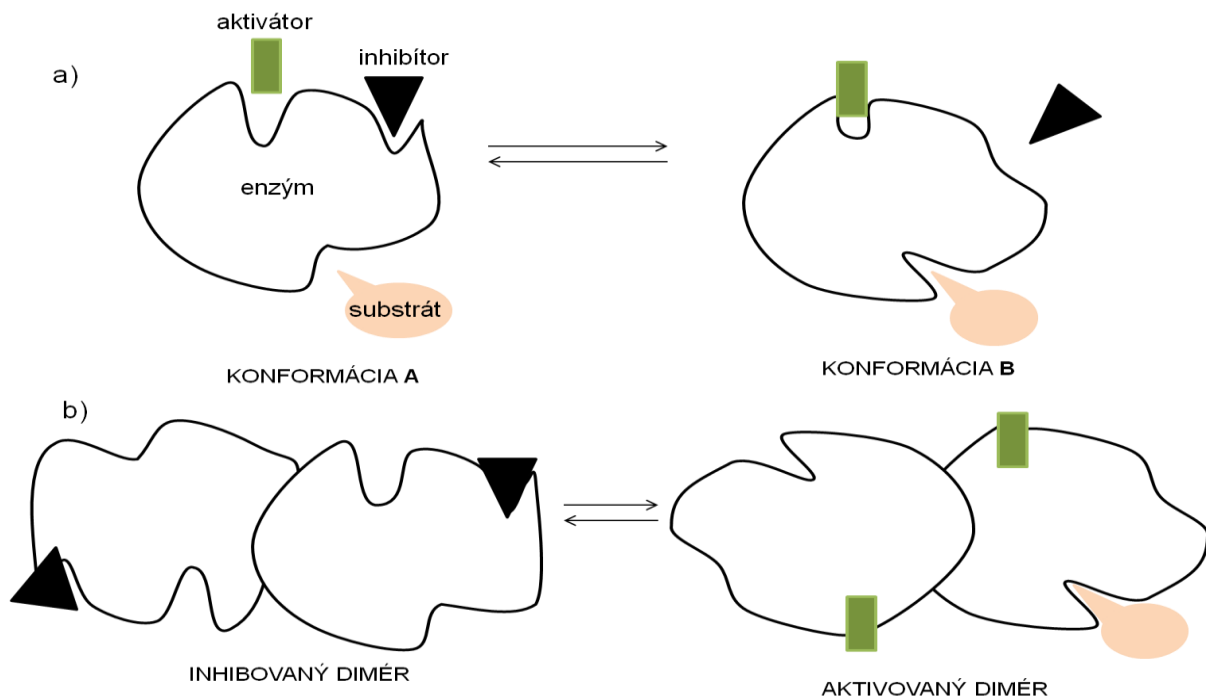
1. degradačné metabolické dráhy spojené s uvoľňovaním energie alebo *katabolizmus*;
2. biosyntetické dráhy spojené so spotrebou energie alebo *anabolizmus*.

Rast je tak výsledkom spojenia medzi procesmi katabolizmu a anabolizmu, pričom časť energie pochádzajúcej z degradácie látok a zároveň časť degradačných produktov sa využívajú pre procesy biosyntézy [10].

2.1.4 Enzýmy

Enzýmy majú významnú úlohu ako katalyzátory pri chemických reakciách v metabolizme mikroorganizmov. Všetky enzýmy sú syntetizované v bunke, ale len časť z nich (napr. α -amyláza, hexokináza, atď.) sa v bunke uplatňuje. Zvyšná časť sa vylučuje do okolitého prostredia, kde sa prejaví ich účinok [13]. Enzýmy ako špecifické katalyzátory reakcie nie len umožňujú, ale súčasne usmerňujú a dovoľujú riadiť rýchlosť reakcií. Vnútro-bunkové enzýmy sú natoľko špecifické, že katalyzujú premenu jednej určitej látky, označovanej ako substrát, na výslednú zlúčeninu nazývanú produkt [6]. Substrát sa na povrch molekuly enzýmu viaže na *aktívne miesto* a tvorba komplexu enzým-substrát sa realizuje pomocou stechiometrickej väzby molekuly substrátu na aktívne miesto enzýmu [2]. Prítomnosť aminokyselín v aktívnom mieste, ktoré viažu funkčné skupiny v substráte, zabezpečuje adekvátnu polohu substrátu a tvorbu prechodného medziproduktu [14]. Pri viacerých enzýmoch samotné aktívne miesto nestačí na špecifickú väzbu substrátu a jeho aktiváciu. V takýchto prípadoch sa substrát viaže aj prostredníctvom *koenzýmu*, ktorý je primárne súčasťou katalytického miesta [13].

Okrem aktívneho miesta môže enzým obsahovať ďalšie oblasti - miesta, kam sa viažu látky, ktoré fungujú ako modifikátory, tzv. *efektory* katalytickej funkcie enzýmu. Efektory sú napr. ióny kovov (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Pb, Hg, Cd,), ktoré sa podieľajú na stabilizácii štruktúry niektorých enzýmov alebo na zmene štruktúry podmieňujúcu alebo uľahčujúcu aktivitu enzýmu [15]. Aktivita oligomerných enzýmov nachádzajúcich sa na kľúčových miestach metabolických dráh je regulovaná alosterickými efektormi, teda látkami, ktoré sú schopné vyvolať jemné konformačné zmeny, ktoré sa šíria molekulou enzýmu a tým regulujú jeho aktivitu. Miesta pôsobenia týchto efektórov sú označované ako *alosterické centra* [16]. Príkladom regulácie aktivity oligomerných enzýmov je c-AMP-dependentná proteínkináza, ktorá je dôležitým regulačným enzýmom podieľajúcim sa na fosforylácii serínových a treonínových zvyškov. Tento enzým pozostáva zo štyroch podjednotiek; dve z nich sú katalytické a dve regulačné. Cyklický AMP (c-AMP) je alosterický aktivátor tohto enzýmu. Katalytická podjednotka viazaná na regulačnú podjednotku je neaktívna a väzba dvoch c-AMP molekúl na alosterické miesta každej regulačnej podjednotky indukuje ich konformačnú zmenu, ktorá vedie k disociácii tetramérneho komplexu a k aktivácii katalytických podjednotiek. Zníženie koncentrácie c-AMP vedie k jej disociácii z alosterického miesta a k asociácii regulačných a katalytických podjednotiek s následnou inaktíváciou katalytických podjednotiek [17]. Na obrázku 2 môžeme vidieť všeobecnú schému interakcie alosterického efektora s enzýmom, kde vo vrchnej časti je znázornený enzým, ktorý má väzbové miesto pre alosterický aktivátor i inhibítor. V konformácii A enzým pevne viaže inhibítor a neviaže aktivátor a substrát, pretože má nízku afinitu voči aktivátoru a substrátu. V konformácii B pevne viaže substrát a môže tak katalyzovať jeho premenu na produkt. V tejto konformácii enzým pevne viaže aj aktivátor, ktorého väzba uľahčuje vznik tejto konformácie. V dolnej časti obrázku je znázornená alosterická inhibícia a aktivácia dimérových enzýmov (skladajú sa z dvoch monomérov) [13].



Obr. 2: Schéma interakcie alosterického efektora s enzýmom; vrchná časť – enzým má väzbové miesto pre alosterický aktivátor a inhibítor. Konformácia A viaže pevne inhibítor, ale má malú afinitu pre aktivátor a substrát (S). Konformácie B pevne viaže substrát aj aktivátor B; spodná časť – alosterická inhibícia a aktivácia dimérových enzýmov [13].

Efektory môžu aktivitu enzýmov buď zvyšovať alebo znižovať. Zvyšovanie aktivity spôsobujú pozitívne efektory, tiež známe ako *aktivátory* enzýmovej aktivity. V kapitole 2.1.5 sú bližšie charakterizované negatívne efektory, tzv. *inhibítory*, ktoré enzýmovú aktivitu naopak znižujú. Efektory ďalej delíme na *prirodené* (fyziologické, endogénne) a *neprirodené* (exogénne). Medzi prirodené efektory patria zložky buniek (metabolity, koenzýmy), ktoré sú dôležité pri regulácii bunkového metabolizmu. Medzi neprirodené efektory patria modelové látky a mnohé liečivá [16].

2.1.5 Inhibítory

Inhibítory majú veľmi dôležité miesto v chápaní enzýmovej kinetiky a ich používanie zohralo významnú úlohu v histórii dynamickej biochémie. Kineticky môžeme inhibítory charakterizovať ako látky, ktoré spomaľujú priebeh enzýmovej reakcie [18]. Reagujú s niektorou dôležitou zložkou proteínovej skupiny (napr. HCN s meďou alebo železom v prostetickej skupine oxidáz), alebo s reaktívnymi skupinami proteínovej časti enzýmu (napr. formaldehyd sa viaže na voľné aminokyseliny a tým mení priestorovú štruktúru apoenzýmu) [13].

Po chemickej stránke sú inhibítory ióny (Hg^+ , Fe^{2+} , Cu^+ , Pb^{2+}), organické látky (N-etylmaleimid, diizopropylfosfluoridát, oligomycín), nízkomolekulové látky alebo vysokomolekulové látky (peptidy, proteín, atď.). Inhibítory môžu vyvolať zmenu štruktúry molekuly, následkom čoho enzým stráca schopnosť katalytickej účinnosti. Ďalej môžu inhibítory konkurovať substrátu v pôsobení na aktívne miesto a znižujú tak rýchlosť premeny alebo neaktivujú voľný enzým, ktorý je spolu so substrátom komplexom. Inhibícia enzýmovej aktivity je jedným z hlavných regulačných prostriedkov živej bunky. Okrem toho má aj praktický význam, kde použitie inhibitorov je jednou z najdôležitejších diagnostických metód enzymológie. Poskytuje nám dôležité údaje o špecifite enzýmu, stavbe aktívneho miesta a mechanizme účinku, ale zohráva významnú úlohu aj pri identifikácii intermediátov rôznych metabolických ciest. Inhibítory zároveň umožňujú zasahovať do látkovej premeny organizmu a vďaka tomu nachádzajú široké uplatnenie napríklad v medicíne a hygiene v boji proti infekciám (sulfonamidy), pri transplantáciach (imunosupresíva tlmiace imunitný systém), v záhradníctve (herbicídy) [16].

2.1.5.1 Rozdelenie inhibitorov

Ako už bolo zmienené v predchádzajúcej kapitole, inhibitorov je celá škála a často ich rozdeľujeme podľa špecifity účinku na *špecifické* a *nešpecifické*. Špecifické pôsobia len na jeden enzým a medzi ne patria jedly a lieky, ktoré spôsobujú inhibíciu enzýmov v baktériách, vírusoch alebo rakovinových bunkách. Nešpecifické vyvolávajú inaktiváciu viacerých rôznych enzýmov a pôsobia tak väčšina denaturačných činidiel (teplota, kyseliny a zásady, alkoholy, ťažké kovy, redukčné činidlá), ktoré denaturujú proteínovú časť enzýmu a táto inhibícia je nezvratná [19].

Inhibícia môže byť *vratná*, kedy je možné inhibitor odstrániť napr. dialýzou kedy sa aktivita enzýmu obnoví. Pri vratnej inhibícii je inhibitor väčšinou viazaný na enzým pomocou nekovalentnej väzby [13]. Druhou možnosťou je *nevratná*, kedy aktivitu enzýmu už neobnovíme nijakým zásahom. Nevratný inhibitor sa veľmi pomaly disociuje od svojho cieľového enzýmu, pretože sa pevne viaže na enzým kovalentnou alebo silnou nekovalentnou väzbou. Medzi ireverzibilné inhibítory patria niektoré dôležité lieky, ako napr. penicilín, ktorý pôsobí kovalentnou modifikáciou enzýmovej transpeptidázy, čím zabraňuje syntéze bakteriálnej bunkovej stene a dochádza tak k odumieraniu baktérie [20]. Podľa

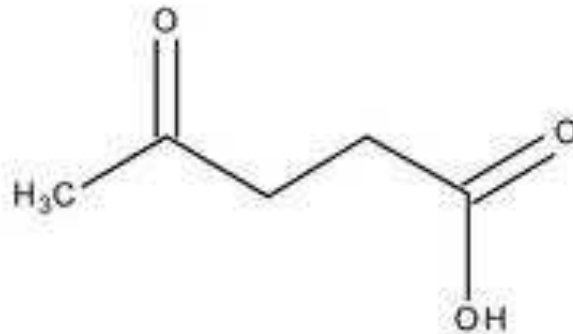
kinetickej charakteristiky a pri vratnej inhibícii aj podľa miesta na povrchu molekuly enzýmu, na ktoré sa viaže inhibítor, rozoznávame *kompetitívne*, *nekompetitívne*, *akompetitívne* a *alosterické* inhibítory [13].

- kompetitívne (súťaživé) inhibítory, ktorých štruktúra je veľmi podobná štruktúre substrátu, takže enzým nie je schopný ich rozoznať a vytvorí sa tak inaktívny komplex s inhibítorom, ktorý sa nepremení na produkt, namiesto komplexu so substrátom. Tvorba komplexu s inhibítorom je vratná a účinok inhibítora môžeme odstáť dostatočne veľkou koncentráciou substrátu [16]. Príkladom kompetitívneho inhibítora je metotrexát, ktorý je štruktúrnym analógom tetrahydrofolátu, čo je koenzým pre enzým dihydrofolátreduktázu, ktorý zohráva úlohu pri biosyntéze purínov a pyrimidínov. Metotrexát sa viaže na dihydrofolátreduktázu 1000-násobne pevnejšie ako prirodzený substrát a inhibuje tak syntézu nukleotidovej bázy [20].
- nekompetitívne inhibítory neovplyvňujú väzbu substrátu na enzým, ale znižujú rýchlosť jeho premeny na produkt. Účinok je potom nezávislý na koncentrácií substrátu a nie je teda možné odstrániť inhibítor zvýšením koncentrácie substrátu. Inhibítor sa viaže mimo aktívne miesto, čím ovplyvňuje afinitu k substrátu, alebo ireverzibilne inaktivuje priamo aktívne miesto [13]. Príkladom nekompetitívnych inhibítorov sú koagulačné kaskádové serínové proteázy. Protrombinázový komplex, ktorý štiepi a aktivuje protrombín, pozostáva z faktora Va a faktora Xa serínovej proteázy, sa nachádza napovrchu aktivovaných krvných doštičiek. Para-aminobenzamidín, ktorý sa viaže v S1 kapse serínových proteáz, je nekompetitívnym inhibítorom protrombínového štiepenia protrombinázou [21].
- akompetitívne inhibítory sa viažu na komplex ES (enzým-substrát), neinterferuje s väzbou substrátu do aktívneho miesta, ale zabráňuje disociácii komplexného enzýmového substrátu a zabráňuje tak jeho premene na produkt [16].
- alosterické sa uplatňujú pri oligomerných enzýmoch (zložené z niekoľkých podjednotiek). Väzba inhibítora na alosterické miesto, ktoré nie je totožné s aktívnym miestom. Väzbou alosterického inhibítora vznikajú konformačné zmeny v povrchu štruktúry molekuly enzýmu a enzým už nie je schopný viazať substrát alebo ho aktivovať [13].

2.1.5.2 Kyselina levulová

Kyselina levulová, ktorej štruktúrny vzorec je zobrazený na Obr. 3, je päť uhlíkatá zlúčenina, ktorá patrí medzi kľúčové chemikálie v priemyselnom odvetí. Kyselina levulová patrí medzi mastné kyseliny s krátkym reťazcom a molekulový vzorcom $C_5H_8O_3$. Kyseliny má vo svojej štruktúre ketónovú karbonylovú skupinu a kyslú karboxylovú skupinu, ktoré jej tak umožňujú reagovať s rôznymi funkčnými skupinami za vzniku širokého spektra derivátov. Vďaka tomu je kyselina levulová považovaná za vysoko variabilnú chemikáliu [22]. Kyselina levulová je dôležitým biologickým stavebným prvkom pre kyselinu valérovú, metyltetrahydrofuran, alkyl levulinát, kyselinu difenolovú, kyselinu δ -amino levulovú a kyselinu jantárovú [23]. Jej využitie je pri výrobe rôznych molekúl z obnoviteľných surovín. Konkrétne v oblasti chirálnych činidiel, biologicky aktívnych materiálov, polyhydroxyalkanoátov, polymérov, iniciátorov polymerácie, mazív, adsorbentov, tlačiarenských farieb, fotografií, drug delivery systémov alebo v oblasti inhibítorov [24]. Používa sa pri príprave sklenenej syntetickej živice ako zložky hydraulických brzdových kvapalín a pri výrobe nylonu a gummy. Sodná soľ kyseliny bola navrhnutá ako náhrada etylénglykolu v nemrznúcej zmesi [25]. Kyselina levulová je potenciálnym prekursorom paliva dostupným z pentózových aj hexózových cukrov. Hexózové cukry sú dehydratované kyslou katalýzou na hydroxymetylfurfural (HMF), ktorý je ďalej konvertovaný

rehydratáciou na LA a jednému ekvivalentu kyseliny mravčej. Konverzia glukózy na HMF však nie je ľahká, preto prebieha najprv izomerizácia glukózy na fruktózu napríklad Lewisovými kyselinami, enzýmami alebo bázami. Pentózové cukry sa ľahko konvertujú na furfural kyslou katalýzou a je ďalej hydrogenovaný na furfurylalkohol, z ktorého kyslou katalýzou dostaneme LA [26].



Obr. 3: Štruktúrny vzorec kyseliny levulovej [22]

Kyselina levulová ako organická kyselina je v určitej koncentrácii toxická pre mikroorganizmy. Bolo však zistené, že niektoré mikróby sú schopné nízke koncentrácie LA metabolizovať a využiť ju pre akumuláciu polyhydroxyalkanoátov. Napríklad u baktérii *Cupriavidus necator* kyselina levulová indukuje biosyntézu terpolymeru poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát-co-4-hydroxyvalerát). Kyselina je metabolizovaná cez acetyl-CoA a propionyl-CoA thioesterázovou dráhou, tak ako všetko organické kyseliny s krátkym reťazcom [27].

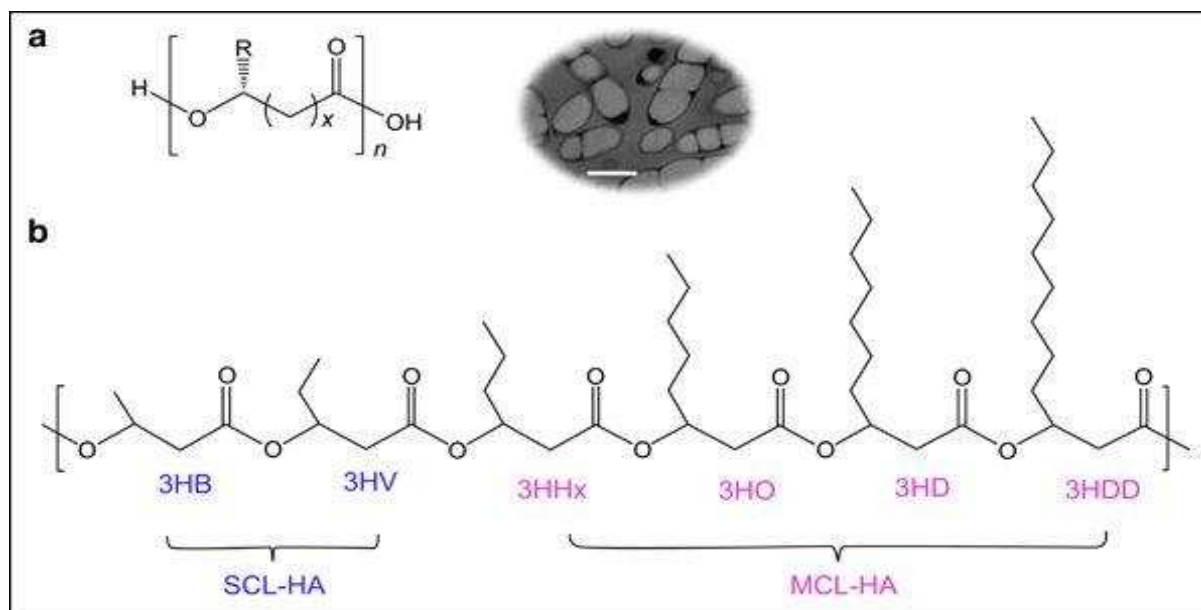
2.2 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) sú biologicky odbúrateľné polyestery produkované na širokej škále mikroorganizmov ako zdroj uhlíka a energie. PHA pôsobí ako ideálna skladovacia zlúčenina kvôli jej nerozpustnosti vo vnútri bakteriálnej cytoplazmy a pomáha tak baktériam prežiť počas hladovania, pretože PHA ako energetický rezervný materiál, spomaľuje bunkovú autolýzu a následne jej smrť [28]. Okrem toho PHA monoméry vytvorené metabolizmom PHA chránia enzýmy a iné biologické molekuly pred škodlivými účinkami oxidačného tlaku, vysokej teploty, rozptyľujú UV žiarenie, čím poskytuje UV-ochrannú funkciu [29, 30].

2.2.1 Štruktúra, vlastnosti, syntéza a degradácia polyhydroxyalkanoátov.

Baktérie sú schopné syntetizovať polyméry a ukladať ich vo forme nerozpustných sférických inklúzií alebo PHA granúl. Štruktúra granúl pozostáva z hydrofobného polyesterového jadra, ktorého lipofilná povaha zabráňuje zvyšovaniu osmotického tlaku pri akumulácii. Okolo polyesterového jadra se nachádza vrstva funkčných a štruktúrnych proteínov, ktoré zahŕňujú PHA polymerázu, PHA depolymerázau, fazíny a regulačné proteíny [31, 32]. Štruktúra PHA je tvorená lineárnymi polymérami 3-hydroxymastných kyselín [33]. V závislosti od počtu uhlíkov v monoméroch PHA klasifikujem PHA s krátkym reťazcom (SCL), ktorých monomér má 3 až 5 uhlíkov a PHA s priemernou dĺžkou reťazca (MCL), ktorých monomér má 6 až 14 uhlíkov. Napr. poly(3-hydroxybutyrát) (PHB), poly(3-hydroxyvalerát) (PHV) a ich kopolymér sú typickými príkladmi PHA s krátkym reťazcom, poly(3-hydroxyoktanoát) (PHO) a poly(3-hydroxynonanoát) (PHN), ktoré sú primárne vytvorené ako kopolyméry s 3-

hydroxyhexanoátom (HHx), 3-hydroxyheptanoátom (HH) a / alebo 3-hydroxydecanoátom (HD), sú typickými príkladmi MCL-PHAs [34].



Obr. 4: a) všeobecný vzorec PHA, kde $x=1-8$ a $n = 100$ do 1000 b) niektoré syntetizované monoméry PHA s krátkym reťacom (SCL-HA) a monoméry PHA so stredným reťacom (MCL-HA). 3HB: 3-hydroxybutyrát, 3HV: 3-hydroxyvalerát, 3HHx: 3-hydroxyhexanoát, 3HO: 3-hydroxyoctanoát, 3HD: 3-hydroxydecanoát, 3HDD: 3-hydroxydodecanoát. Snímka z TEM zobrazuje tenké rezy rekombinantných buniek *R. eutropha* PHB⁴, ktoré obsahujú veľké množstvo poly(3HB-co-5mol% 3HHx) [34]

V závislosti od druhu baktérií a podmienok rastu, môžu vznikať buď homopolyméry, náhodné kopolyméry alebo blokové kopolyméry PHA [35]. Vlastnosti kopolymérov PHA silne závisia od typu, obsahu a distribúcie monomérnych jednotiek tvoriacich polymérne reťazce, priemernej molekulovej hmotnosti a distribúcie molekulovej hmotnosti [36]. Usporiadanie monomérov určuje vlastnosti týchto polymérov, ktoré sa pohybujú od termoplastických po elastoméne s rôznymi stupňami kryštalinity a adhéznymi vlastnosťami [33]. PHA sú nerozpustné vo vode, ale rozpustné v chloroforme a iných chlórovaných rozpúšťadlách, sú odolné voči UV žiareniu a uľahčujú anaerobnú biodegradáciu v sedimentoch. Okrem toho sú biokompatibilné a biologicky odbúrateľné (napr. podliehajú degradácii v pôde) a správajú sa ako piezoelektrické materiály. Teplota skleneného prechodu, teplota topenia, teplota tepelného rozkladu, pevnosť v ťahu a Youngov modul sa líšia podľa typu vzniknutého polyméru a zloženia monomérnych jednotiek [37]. Pre predstavu a porovnanie sú v Tab. 1 uvedené fyzikálne vlastnosti poly(3-hydroxybutyrátu), poly(4-hydroxybutyrátu) a poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerátu).

Tab. 1: Fyzikálne vlastnosti poly(3-hydroxybutyrátu), poly(4-hydroxybutyrátu) a poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerátu) [38]

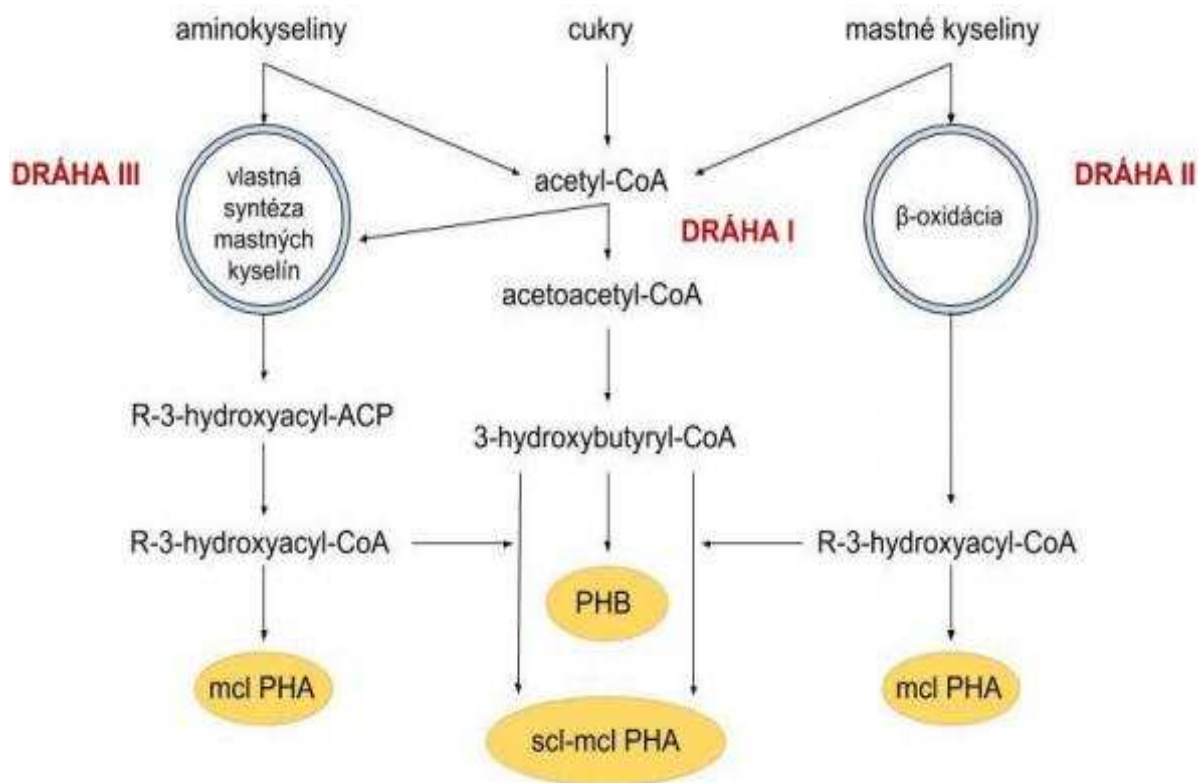
Vlastnosti	poly(3HB)	poly(4HB)	poly(3HB-3HV)
teplota skleneného prechodu [°C]	4	-50	-7,25
teplota topenia [°C]	177	60	150
pevnosť v ťahu [MPa]	40	104	25

Baktérie produkujú rôzne typy PHA prostredníctvom série enzymatických reakcií a baktérie rozdeľujeme podľa biosyntézy PHA do dvoch skupín. V prvej skupine sú baktérie (*Cupriavidus necator*, *Pseudomonas oleovorans* a *Pseudomonas putida*), ktoré akumulujú PHA len pri obmedzenom množstve živín ako je fosfor, dusík, kyslík alebo horčík [37]. Druhá skupina baktérií (napr. rekombinantná *Escherichia coli*) akumulujú PHA počas rastovej fázy a nepotrebuje žiadne obmedzenie živín [39].

Polyhydroxyalkanoáty sú syntetizované a degradované cyklickým mechanizmom, takže biosyntéza i degradácia PHA prebiehajú v bunkách súčasne [40]. Mikroorganizmy sú schopné akumulovať PHA z rôznych uhlíkových zdrojov od rastlinných olejov, cez mastné kyseliny, alkány až po jednoduché sacharidy [28]. Konečná štruktúra polyméru tak zodpovedá metabolickej dráhe biosyntézy PHA. Rozlišujeme tri základné metabolické dráhy podľa zdroju uhlíka. Prvou dráhou dochádza k vzniku polyhydroxybutyrátu, ktorý je produkovaný baktériou *C. necator*, ktorá disponuje scl PHA-syntázou. Detailný popis je zhrnutý v kapitole 2.2.2.

Druhá dráha syntézy PHA je spájaná s mikrobiálnym príjmom mastných kyselín. Po β -oxidácii mastných kyselín acetyl-CoA vstupuje do procesu syntézy monomérov PHA. Pomocou enzýmu R-3-hydroxyacyl-CoA-hydratázy je enoyl-CoA vznikajúci v β -oxidácii prevedený na R-3-hydroxyacyl-CoA, a ten je prekursorom polymerizácie mcl PHA. Polymerizáciu zabezpečuje mcl PHA-syntáza. Túto dráhu je možné pozorovať napríklad u *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas oleovorans* a *Pseudomonas aeruginosa*.

Tretia dráha vychádza z in situ syntézy mastných kyselín. Tento cyklus poskytuje na syntézu PHA R-3-hydroxyacyl-ACP. Kľúčovým enzýmom je 3-hydroxyacyl-ACP-CoA-transferáza, ktorá prevádza 3-hydroxyacyl-ACP opäť na 3-hydroxyacyl-CoA. Ukázalo sa, že vlastná syntéza mastných kyselín a β -oxidácia môžu prebiehať nezávisle na sebe k dopĺňaniu prekursorov pre syntézu PHA [41]. Degradácia PHA, ako je popísaná vo väčšine baktérií, začína depolymerizáciou PHA na D- β -hydroxybutyrátové monomery pomocou PHA depolymerázy (kódovanej pomocou phaZ). Degradácia PHA môže ďalej pokračovať intracelulárne alebo extracelulárne. Extracelulárne PHA depolymerázy sú vylučované mnohými baktériami z veľmi rozmanitých prostredí v aeróbných a anaeróbných podmienkach na využitie zvyšných PHA v prostredí po lýze buniek, v ktorých sa tieto zlúčeniny nahromadili. Naopak intracelulárne PHA depolymerázy degradujú intracelulárne PHA granule v akumuláčnom kmeni, s cieľom mobilizovať polyhydroxyalkanoáty v neprítomnosti vhodného zdroja exogénneho uhlíka alebo zdroja energie [40].



Ob. 5: Hlavné metabolické dráhy syntézy polyhydroxyalkanoátov podľa použitého uhlíkového zdroja [41]

2.2.2 Poly(3-hydroxybutyrát)

Poly(3-hydroxybutyrát) je najpreskúmanejším polyhydroxyalkanoátom a prvý krát bol popísaný v roku 1925 francúzskym vedcom Lemoignem. Od vtedy bolo objavené veľké množstvo mikroorganizmov (archaeobaktérie, grampozitívne i gramnegatívne baktérie, fotosyntetické baktérie vrátane cyanobaktérií), ktoré sú schopné akumulovať PHB aerobným alebo anaerobným spôsobom [28]. *Cupriavidus necator* akumuluje polyhydroxybutyrát pri obmedzenom množstve živín a pri nadbytku uhlíka. PHB sa syntetizuje z acetyl-CoA tromi sekvenčnými enzýmami kódovanými génmi *phaA*, *phaB* a *phaC* [42]. Najprv dochádza ku kondenzácii dvoch acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-CoA katalyzovaného β -ketotiolázou (*phaA*). Potom je acetoacetyl-CoA redukovaný na (R)-3-hydroxybutyryl-CoA pomocou NADPH-dependentnej acetoacetyl-CoA reduktázy (*phaB*). PHA syntáza (*phaC*) nakoniec polymerizuje (R)-3-hydroxybutyryl-CoA s rastúcim reťazcom PHB. Počas normálneho rastu baktérie je 3-ketotioláza inhibovaná voľným koenzýmom A, ktorý vychádza z Krebsovho cyklu. Avšak ak vstup acetyl-CoA do Krebsovho cyklu je obmedzený (počas obmedzenia výživy bez obsahu uhlíka), nadbytok acetyl-CoA je vedený do biosyntézy PHB [39].

PHB je izotaktický polokryštalický polymér, relatívne krehký a tuhý [43]. Teplota topenia a tepelného rozkladu PHB je veľmi podobná a preto je tepelne nestabilný a citlivý na tepelnú degradáciu [34]. Na zlepšenie vlastností PHB sa produkujú kopolyméry poly(3-hydroxybutyrát-ko-3-hydroxyvalerát) nahradením metylovej skupiny v hlavnom reťazci PHB etylovou skupinou. Tieto mikrobiálne kopolyméry sa syntetizujú z kyseliny propiónovej alebo pentánovej baktériami *Cupriavidus necator*. Pridanie polyhydroxyvalerátu (PHV) do matrice PHB zvyšuje spracovateľnosť polyméru v dôsledku zníženej krehkosti [43].

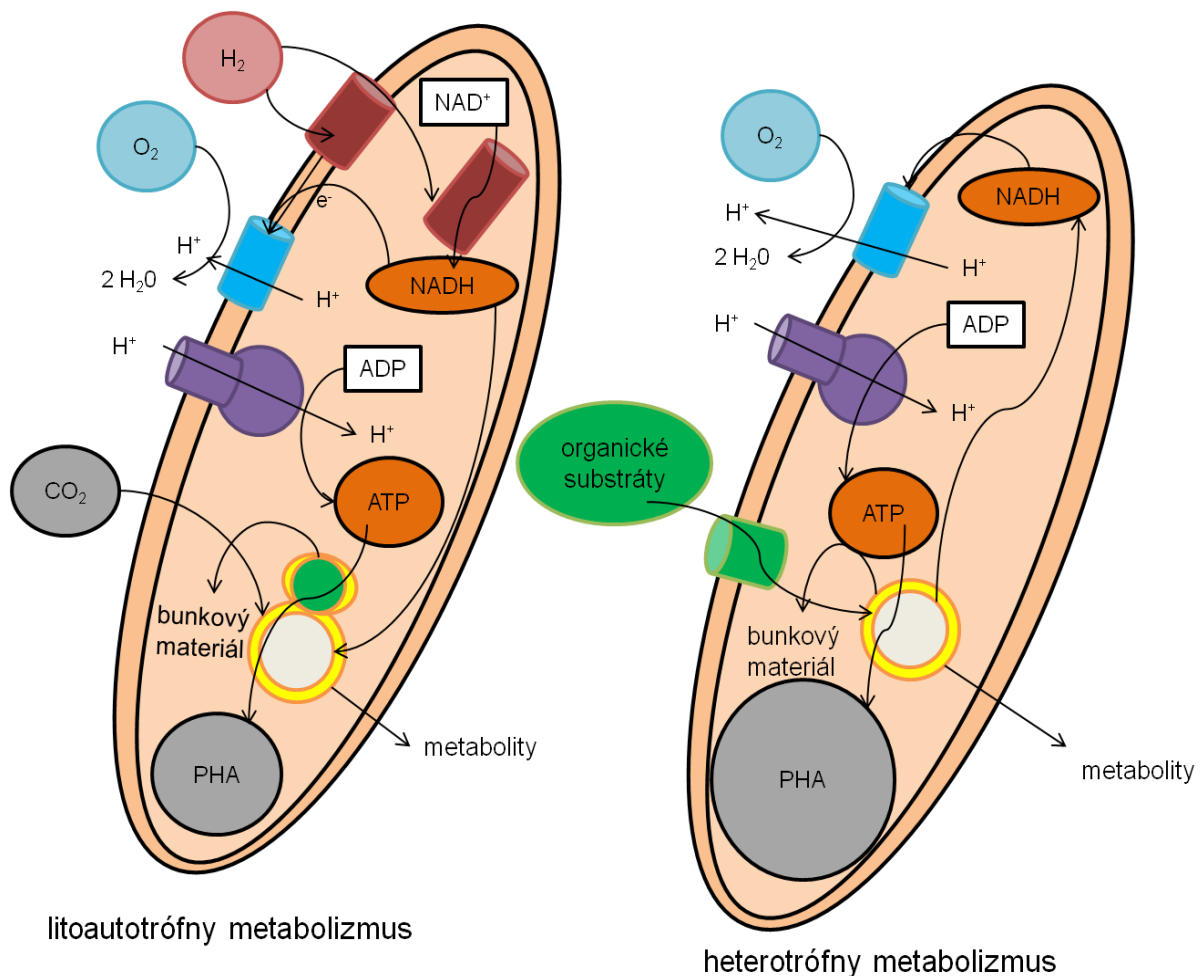
2.3 Modelový mezofilný producent polyhydroxyalkanoátov *Cupriavidus necator*

Pre porovnanie rôznych stratégií adaptácie na stres boli vybraté bakteriálne kmene, ktoré sú schopné žiť v extrémnych a pri normálnych podmienkach. Modelový mezofilným bakteriálnym kmeňom použitým v tejto diplomovej práci bola baktéria *Cupriavidus necator* H16, ktorá je tiež známa pod jej skorším názvom *Ralstonia eutropha* H16 alebo *Wautersia eutropha* H16 [42]. Veľký záujem o túto baktériu prišiel pred 50 rokmi a to vďaka jej schopnosti produkovať a skladovať veľké množstvo poly(3-hydroxybutyrátu) (PHB) [44]. Najvýznamnejším mutantným kmeňom je *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, ktorý síce nevytvára PHB, ale vykazuje podobný rast ako pôvodný kmeň (*wild type*) *Cupriavidus necator* H16. Tento mutantný kmeň je známym, pretože sa často používa na identifikáciu génov PHB syntézy z iných baktérií [45].

2.3.1 Vlastnosti a metabolizmus baktérie

Cupriavidus necator je nepatogénna, gramnegatívna, β -proteobaktéria, ktorá sa vyskytuje vo vode i v pôde. Je to chemolitoautotrofná baktéria a vie prechádzať medzi heterotrofným rastom, kedy využíva organické zlúčeniny ako zdroj energie, a autotrofnou fixáciou CO₂, kedy využíva H₂ ako zdroj energie (Obr. 6). Počas autotrofného rastu, kedy nie sú prítomné organické substráty, je CO₂ fixovaný do Calvin-Benson-Basshamovho cyklu a H₂ je oxidovaný katalýzou dvoch NiFe hydrogenáz. V anaerobných podmienkach môže bunka rásť použitím nitrátovej reduktázy a reduktázy oxidu dusnatého, ktoré sú súčasťou denitrifikačnej dráhy s použitím NO₃⁻ a NO₂⁻ ako akceptorov elektrónov [46]. *Cupriavidus necator* ako zdroj energie pre heterotrofný rast využíva medziprodukty cyklu trikarboxylových kyselín, cukrové kyseliny ako kyselina glukónová, mastné kyseliny alebo iné organické kyseliny a aminokyseliny. Gény kódujúce metabolizmus organických kyselín sa nachádzajú na chromozóme 1 a schopnosť kmeňa H16 metabolizovať cukry je obmedzená na fruktózu a N-acetylglukozamín. *C. necator* H16 nemá fosfofruktokinázový enzým, ktorý premieňa fruktózu-6-fosfát na fruktózu-1,6-bisfosfát v Embden-Meyerhof-Parnas dráhe. Preto sa pre metabolizmus hexóz používa Entner-Doudoroff dráha [44]

Cupriavidus necator má veľký potenciál pre biotechnologické využitie, preto je potrebné analyzovať sekvenciu genómu, ktorý poskytuje pohľad na jeho pozoruhodnú všestrannosť metabolizmu. Genóm baktérie pozostáva z troch kruhových replikónov (chromozóm 1, chromozóm 2 a megaplazmid pHG1) a jeho celková veľkosť je 7 416 678 bp [44]. Megaplazmid pHG1 má veľkosť 452 156 bp a nesie 429 génov, ktoré obsahujú základnú genetickú informáciu pre fakultatívne litoautotrofný a fakultatívne anaerobný spôsob rastu. Najväčšia funkčná skupina má 41 génov, ktoré súvisia s litoautotrofiou baktérie. Ďalší veľký klaster zase nesie genetickú informáciu pre denitrifikáciu. V oblasti denitrifikácie je tiež umiestnená skupina génov pre biosyntézu cytochrómu c [47]. Genóm obsahuje i sedem génov, ktoré kódujú izoenzymy PHB depolymerázy. Gény phaZ1 a phaZ2 sú umiestnené na chromozóme 1, phaZ3, phaZ5, phaZ6 a phaZ7 na chromozóme 2 a phaZ4 na megaplazmide pHG1 [44].



Obr. 6: Schématické znázornenie kľúčových aspektov litoautotropného a heterotrofického metabolizmu. Žlté kruhy predstavujú procesy centrálneho metabolizmu, zatiaľ čo žltozelený kruh je cyklus Calvin-Benson-Bassham. Červené valce symbolizujú dve NiFe hydrogenázy. Šedé kruhy vo vnútri baktérie označujú granule na ukladanie polyhydroxyalkanoátov (PHA) [44]

2.4 Modelový extrémofilný producent polyhydroxyalkanoátov *Halomonas halophila*

Halomonas halophila patrí medzi extrémofilné baktérie a z tohoto dôvodu môžeme predpokladať rozdielnú adaptáciu na kyseliny levulové v porovnaní s mezofilnou baktériou *Cupriavidus necator*. *Halomonas halophila* je známa tiež ako *Deleya halophila*, ktorá bola izolovaná zo slaných pôd v blízkosti mesta Alicante v juhovýchodnom Španielsku. Patrí medzi gram-negatívne, striktné aróbné, nesporeujúce baktérie tyčinkovitého tvaru. Bunka môže obsahovať jeden až osem bičičkov, vďaka ktorým sa pohybuje [48].

Tieto tyčinkovité baktérie rastú v prostredí, kde obsah chloridu sodného je od 2 do 30 % (optimum 7,5 %). Halofilné mikróby vyvíjajú stratégie na prekonávanie osmotického stresu vyvolaného vysokými koncentraciami solí v prostredí. Boli opísané dva základné mechanizmy osmoadaptácie: (1) typ KCl, ktorý si udržiava cytoplazmatickú koncentráciu KCl podobnú podmienkam prostredia a (2) kompatibilný typ rozpustenej látky s použitím organických osmolytov, nazývaných tiež kompatibilné rozpustené látky (prípadne *chemické chaperony*). Tieto osmolyty patria medzi organické zlúčeniny s nízkou molekulovou hmotnosťou, ktoré vyvažujú osmotický tlak a udržiavajú vysoký intracelulárny turgor [49].

Rod *Halomonas* a jeho príbuzné druhy syntetizujú a mobilizujú polyhydroxyalkanoáty (PHA), napr. poly(3-hydroxybutyrát), ako súčasť ich prirodzeného metabolizmu. Halofily sú obzvlášť zaujímavé v produkcii PHA v dôsledku nižších nákladov na fermentáciu [50]. Kučera a kolektív vo svojej práci zistili, že bakteriálne bunky *Halomonas halophila* akumulujú podstatne viac PHA v minerálnom médiu s obmedzeným obsahom dusíka, pričom obsah PHA granúl v bunkách bohatých na PHA predstavuje približne $38,4 \pm 2,7$ % objemu buniek. Horná hranica obsahu PHA v bunkách je určená geometriou buniek a stérickými faktormi. Z hľadiska materiálových vlastností produkovaného PHA je veľmi zaujímavé, že v prípade *H. halophila* obsah soli v kultivačnom médiu ovplyvňuje aj molekulovú hmotnosť polyméru a jeho polydisperzitu. Pri nízkej koncentrácii NaCl sa akumuluje PHB s nižšou hmotnosťou, ale veľmi úzkou polydisperzitou, zatiaľ čo molekulová hmotnosť polyméru a tiež polydisperzita sa zvyšujú paralelne so zvyšujúcim sa osmotickým tlakom. Pri vyššej koncentrácii NaCl (60, 80 a 100 g/l) sa akumulujú polyméry s vysokou molekulovou hmotnosťou. *H. halophila* je schopná rásť na širokom spektre cukerných substrátov ako je napr. ramnóza, sacharóza, glukóza, celobióza, xylóza, manóza alebo galaktóza, a použiť ich ku akumulácii PHB. PHB tak môže byť akumulované z rôznych lacných substrátov ako sú lignocelulózy alebo melasy [51].

2.5 Termická analýza

2.5.1 Úvod

Termická analýza ako vedná disciplína vznikla až v roku 1887, kedy Le Chatelier publikoval výsledky termického správania ílovitých hornín tzv. *heating curve* metódou, ktorá odpovedá diferenčnej termickej analýze bez referenčnej vzorky. Vplyv teploty na vlastnosti rôznych materiálov ľudia študovali už dávnejšie, avšak na konci 19. storočia kedy už bola k dispozícii meriaca a prístrojová technika (teplomery, teplotné stupnice, termočlánky, pyrometre atď.) použiteľná k definovaniu teplotného programu a zaznamenaniu teploty a hodnoty študovanej vlastnosti boli položené základy pre termickú analýzu [52].

Pojem termická analýza zahŕňa skupinu metód, ktoré zaznamenávajú chemické a fyzikálne zmeny zloženia a vlastností látky v závislosti na teplote. Tepelné zaťaženie vzorky prebieha podľa nastaveného programu a môže byť dynamické štúdium vlastností materiálov v širšom teplotnom rozmedzí (ochladzovanie alebo zahrievanie) alebo statické (pri konštantnej teplote v závislosti na čase), ktoré sa používa na meranie tepelných vlastností (tepelná kapacita, entalpia, entropia a voľná energia) s vysokou presnosťou [53]. Podľa vlastností, ktorej zmena sa mení s teplotou sa nazýva i príslušná analýza. Jednotlivé metódy sa nachádzajú v tabuľke 2.

Počas merania môže dôjsť v materiáli k zmene jednej alebo viacerých týchto vlastností. Zmena môže byť fyzikálna, napr. topenie, odparovanie alebo môže byť chemická, ktorá zahŕňa zmenu chemickej štruktúry materiálu prebiehajúcimi reakciami. Okrem fyzikálnej a chemickej zmeny môže dôjsť k zmene v biologických procesoch, ako je metabolizmus, biologická interakcia alebo biologický rozklad [54].

Tab. 2: Metódy termickej analýzy [55]

Metóda	Sledovaná vlastnosť (okrem teploty)
Termometria	čas
Diferenčná termická analýza	teplotný rozdiel
Dilatometria	dĺžka alebo objem
Termomechanická analýza	rozmer a mechanické vlastnosti
Termogravimetria	hmotnosť
Dynamická mechanická analýza	namáhanie, čas
Elektrická termická analýza	elektrický výboj
Analýza elektrickej vodivosti	elektrický odpor
Emanačná termická analýza	uvoľnenie rádioaktívnych látok z materiálu
Analýza vyvíjaného plynu	pyrolýza s analýzou plynu
Analýza tepelnej vodivosti	tepelná vodivosť
Analýza tepelnej difúznosti	tepelná difuzivita
Termoakustická analýza	akustické vlastnosti
Termofraktografia	tepelná frakcionácia spojená s tenkou vrstvou chromatografiou
Termoluminiscenčná analýza	emisia svetla
Termomagnetická analýza	magnetická citlivosť
Termooptická analýza	optické vlastnosti
Termosonimetria	zvukové efekty
Kalorimetria	teplo

Termická analýza je založená na princípoch termodynamiky a je veľmi dôležité ich vedieť rozpoznať. Prvý termodynamický zákon hovorí, že energia izolovaného systému je konštantná. Druhý termodynamický zákon: v izolovanom systéme, spontánne procesy sú sprevádzané so zvyšovaním entropie. Entropia (S) systému je termodynamická funkcia súvisiaca so štatistickým rozdelením energie v rámci tohto systému. Druhý zákon popisuje systém a okolie, ktoré spontánne zmenia stav s nízkou pravdepodobnosťou na stav maximálnej pravdepodobnosti, ktorý bude rovnovážnym stavom. Jedným z príkladov je miešanie dvoch ideálnych plynov pri atmosférickom tlaku. Dôjde k tomu spontáne vtedy, ak existujúcu bariéru medzi nimi odstránime. Žiadna zmena teploty alebo tlaku nie je zahrnutá, ale zmena jasne zahŕňa nárast náhodnosti systému po zmiešaní plynov. Tretí zákon termodynamiky hovorí: všetky perfektné kryštály majú rovnaké entropie pri absolútnej nule. Na použitie entropie, ako kritéria pre spontánne zmeny, je potrebné preskúmať systém i jeho okolie. Z tohoto pohľadu lepšie slúži Gibbsová voľná energia systému, ktorej zmena (ΔG) pri konštantnom tlaku a teplote je daná vzťahom:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S, \quad (1)$$

kde ΔH je zmena entalpie, T je absolútna teplota a ΔS je zmena entropie počas procesu. Každý systém sa snaží za konštantnej teploty a konštantného tlaku dosiahnuť stav s nižšou hodnotou Gibbsovej voľnej energie [54]. Ako príklad môžeme uviesť modifikačnú premenu látky z jednej kryštalickej formy do druhej, ktorá má za danej teploty nižšiu hodnotu Gibbsovej voľnej energie a je stabilnejšia. K vytvoreniu kryštalickej štruktúry alebo iného stavu s nižšou hodnotou voľnej Gibbsovej energie môže dôjsť pri ohreve i cez jednotlivé medzistupne [53]. Vďaka širokému rozsahu merania sa termická analýza používa pri základnej charakterizácii materiálov, vo výskume, vývoji a kontrole kvality v priemysle a vo vedeckom odvetví [56].

2.5.2 Mikrokalorimetria

V porovnaní s konvenčnými kalorimetrickými metódami majú metódy mikrokalorimetrie zvýšenú citlivosť a sú schopné odhaliť zmeny tepla, ktoré prebiehajú v mikromolárnych množstvách reaktantov s tepelnými účinkami v rozsahu mikrowatov. Mikrokalorimetria tak predstavuje všestranú techniku pre štúdium tepelnej aktivity z hľadiska tepla, tepelného toku a tepelnej kapacity. Mikrokalorimetria patrí medzi nedeštruktívna a neinvazívna metóda, ktorá priamo a nepretržite meria študovaný proces. Vďaka tejto metóde môžeme študovať procesy spojené s malými tepelnými zmenami u látok v pevnom, kvapalnom i plynnom skupenstve [57]. Do popredia sa dostáva využitie mikrokalorimetrie k štúdiu mikroorganizmov čomu sa prispôsobuje zloženie prístrojov, ktoré pre mikrobiologické merania obsahujú termoelektrické články, cez ktoré prúdi teplo vyrobené počas reakcie čo vedie k elektrickému prúdu, ktorý je priamo úmerný tepelnému toku. Termočlánok je zvyčajne doska vyrobená z polovodičového materiálu a produkuje slabý potenciál (milivolty), ktorý je zosilnený na signál vhodný pre záznam [58].

Počas mikrobiálnej aktivity stimulovanej prítomnosťou živín sa generuje tok tepla, ktorý priamo súvisí so zvýšením alebo znížením uvoľňovanej energie z rôznych zdrojov. Na sledovanie zmeny energetických stavov je mikrokalorimetrická technika užitočným nástrojom, pretože táto metóda vyžaduje len znalosť hodnoty počiatočného a konečného energetického stavu a je nezávislá od druhu organizmov a reakčných ciest [59]. Mikrokalorimetria tak poskytuje všeobecný analytický nástroj na charakterizáciu mikrobiálneho rastu. Jedným z najvýznamnejších znakov procesu mikrobiálneho rastu je uvoľňovanie tepla v dôsledku enzymatických katabolických reakcií. Ak je teplo monitorované mikrokalorimetrom a vynesené v závislosti na čase, môžeme tak získať tepelný profil alebo termogram, ktorý nám poskytne kvalitatívne a kvantitatívne informácie [58]. Tvar termogramu sa mení v priebehu cyklu rastu mikrobov, začína sa v logaritmickú fázu, ďalej stúpa ak rast mikroorganizmu pokračuje v kultúre, potom klesá s poklesom metabolickej aktivity a nakoniec sa zastaví. Každý typ mikrobov má jedinečnú stopu závislosti výkonu na čase (*power-time*) zaznamenanú mikrokalorimetrom pri definovaných podmienkach rastu. Každá látka, ktorá môže modifikovať procesy metabolického rastu zapojené do bunky, zmení krivku závislosti výkonu na čase získanú z mikrokalorimetra. Z kriviek výkonu na čase sa dá získať nielen termodynamická, ale aj kinetická informácia [60]. Analýzou exponenciálnej fázy rastových kriviek výkonu na čase môžeme vyhodnotiť kinetické parametre, ako je rýchlostná konštanta rastu baktérií a maximálny výkon pre mikrobiálnu aktivitu [61]. Tepelný efekt vyplývajúci z každého metabolizmu mikroorganizmov je dôležitou hodnotou pre štúdium charakteristík mikrobiálnej aktivity. Pri tejto metóde sa všetky zaznamenané aeróbne a anaeróbne udalosti kvantifikujú hodnotami entalpie. Týmto spôsobom sa kalorimetria javí ako vhodná technika na sledovanie biologického procesu v heterogénnych systémoch [62]. Analýzou niektorých kvantitatívnych informácií z kriviek výkonu na čase je možné presne vyhodnotiť účinky liekov na mikrobiálny rast a poskytnúť užitočné informácie pre potenciálne použitie týchto zlúčenín ako nových antibakteriálnych látok [63].

2.5.3 Thermal Activity Monitor III

Na experimentálnu prácu bol použitý systém TAM III (Thermal Activity Monitor) od spoločnosti TA Instruments. TAM III je multikanálový mikrokolorimetrický systém, ktorý ponúka maximálnu citlivosť, flexibilitu a výkon. Môže byť použitý s najcitlivejšími mikrokolorimetrami a širokou škálou príslušenstva na presné riadenie experimentálnych podmienok. TAM III je úplne modulárny a umožňuje pridávať viac kalorimetrov k zvýšeniu kapacity alebo funkčnosti vzorky. Pridaním multikalorimetra obsahujúceho šesť nezávislých minikalorimetrov dôjde k podstatnému zvýšeniu výkonnosti merania [57]. Je navrhnutý tak, aby nepretržite monitoroval širokú škálu procesov a komplexných systémov, ako je tepelná aktivita fyzikálnych, chemických a biologických procesov z hľadiska tepla, tepelného toku a tepelnej kapacity v teplotnom rozmedzí 15-150 °C [64]. Mikrokolorimeter je vhodný pri experimentoch v oblastiach izotermickej titračnej kalorimetrie, stanovení rozpúšťacieho tepla, štúdiu tepelných zmien pri raste mikroorganizmov vo vzorke alebo pri štúdiu vplyvu vlhkosti na správanie vzorky. Základ mikrokolorimetru, tvorí termostat s citlivosťou 0,0001 °C, ktorý môže pracovať v izotermickom, krokovo izotermickom alebo teplotne skenovacom režime. Ďalšou súčasťou je súbor štyroch rôznych kalorimetrov s rozdielnymi objemami meriacej cely (nanokalorimeter, mikrokolorimeter, multikalorimeter so šiestimi minikalorimetrami a rozpúšťací kalorimeter) [65].



Obr. 7: Meriaca cela multikalorimetra so šiestimi minikalorimetrami [65]

3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

3.1 Využite konvenčných metód k štúdiu rastu a adaptácie mikroorganizmov

Existuje mnoho rôznych spôsobov merania rastu mikrobiálnych populácií. Väčšina metód je založená na nepriamom stanovení – turbidimetria, meranie metabolickej aktivity, alebo na priamom počítaní – filtrácia, počítanie buniek pomocou mikroskopu, počítanie buniek pomocou výsevu na agarových platniach.

Merania optickej hustoty (OD) je štandardným prístupom používaným v mikrobiológii na charakterizáciu koncentrácií baktérií v kultivačnom médiu. OD je založená na meraní optickej absorbancie vzorky pri jednej vlnovej dĺžke. Samantha E. McBirney a jej kolegovia (2016) vo svojej práci sledovali rast dvoch rôznych druhov baktérií *Pseudomonas aeruginosa* ako laboratórny referenčný kmeň a štyri rôzne klinické kmene *Staphylococcus aureus*. Rast bol pozorovaný pomocou Tecan Magellan Sunrise Spektrofotometra pri jednej vlnovej dĺžke (600 nm, OD600) a pomocou Biochrom WPA Spectrawave S1200 Spektrofotometra v rozmedzí vlnových dĺžok od 350 do 800 nm. Práca bola zameraná na implementáciu kroku normalizácie vlnovej dĺžky do analýzy, čo umožní presnejšiu charakterizáciu rastu baktériálnych kultúry oproti konvenčnej technike OD600. K normalizovanému meraniu bolo pre každú baktériu vybraných sedem vlnových dĺžok na základe rovnakých kritérií. Pre všetky štyri kmene *S. aureus* je vlnová dĺžka, ktorá podlieha maximálnej zmene 446 nm a vlnová dĺžka, ktorá podlieha minimálnej zmene je 787 nm. Pri *P. aeruginosa* sa vlnová dĺžka 644 nm mení najviac, zatiaľ čo 600 nm sa mení najmenej, hoci je to vlnová dĺžka používaná v typických meraniach OD600. Pre všetky štyri kmene data normalizované vlnovou dĺžkou vykazujú dobre definovanú logaritmickú fázu rastu. Naproti tomu OD600 vykazuje v priebehu sledovaného obdobia kombinovaný lineárny a logaritmický trend. V prípade *P. aeruginosa* OD600 nie je schopný spoľahlivo detegovať rast, pretože šum v údajoch je väčší ako signál, zatiaľ čo prístup založený na vlnovej dĺžke ľahko deteguje rastovú krivku s vysokou vernosťou. Kvôli zlej absorbancii pri 600 nm, klasická metóda merania OD600 nie je schopná spoľahlivo detekovať rýchlosť rastu. Protokol o normalizácii vlnových dĺžok na detekciu rýchlosti rastu baktérií sa ukázal ako účinnejší a môže byť ľahko prijatý výskumnými laboratóriami, pretože vyžaduje iba použitie štandardného spektrofotometra a implementáciu metódy priamej analýzy údajov [66].

Alonso-Calleja a kolektív (2015) sledovali adaptáciu a krížovú adaptáciu *Escherichia coli* ATCC 12806 na rôzne koncentrácie biocídov – fosforečnan trisodný (TSP), dusitan sodný (SNI) a chlórnan sodný (SHY). MIC (minimálna inhibičná koncentrácia) bola stanovená ako najnižšia koncentrácia biocídu potrebná na zabránenie rastu po 48 hodinách inkubácie. Rast bol sledovaný dvoma spôsobmi: meraním optických hustôt (OD) s použitím širokopásmového filtra (oblasť pásma 420 – 580 nm; OD420 – 580) a počítaním životaschopných buniek v agare po 48 hodinách inkubácie pri 37 °C. Stupeň korelácie medzi optickými hustotami a mikrobiálnymi počtami bol skúmaný lineárnou kontinuálnou regresiou dát. Po zistení MIC bol sledovaný vplyv inhibítorov na rast *E.coli* bol monitorovaný pred inkubáciou (v hodine 0) a každú hodinu až do uplynutia 120 hodín. Turbidimetrická metóda poskytla lineárny vzťah optickej hustoty len v rozsahu 0,2 – 0,7 v porovnaní s počtom životaschopných buniek. Tieto výsledky sú v súlade s ďalšími štúdiami, ktoré ukázali, že táto metóda je schopná detegovať koncentrácie buniek približne 10^7 buniek/ml. Na druhej strane, po 30 hodinách inkubácie neboli údaje lineárne a boli vyradené, pretože ku koncu exponenciálnej fázy rastu dochádza k bunkovej smrti s následným poklesom životaschopných baktérií. Avšak turbidimetrické meranie určuje ako životaschopné, tak aj

neživotaschopné bunky, a teda nie je pozorované žiadne zníženie optickej hustoty ako dôsledok smrti buniek. Hodnoty MIC biocídov pre *E. coli* pred vystavením sub-inhibičným koncentráciám biocídov boli: 10,4 mg/ml (TSP), 14,9 mg/ml (SNI) a 0,2 mg/ml (SHY). Po niekoľkých pasážach prostredníctvom postupne vyšších koncentrácií biocídov boli maximálne koncentrácie zlúčenín, ktoré umožnili rast baktérií po 72 hodinách inkubácie pri 37 °C boli 1,1, 2,5 a 1,7-násobok hodnoty MIC materských (nepriprôsobených) buniek. V neprítomnosti selektívneho tlaku sa bunky adaptované na TSP vrátili k citlivosti pred adaptáciou. Keď sa bakteriálne kultúry prispôsobené SNI alebo SHY nechali prejsť cez médium bez biocídu počas 7 dní, bunky boli schopné rásť v prítomnosti maximálnej koncentrácie biocídov umožňujúcej rast baktérií bezprostredne po adaptácii. Tieto výsledky tak naznačujú, že adaptívna tolerancia voči SNI a SHY pre *E. coli* ATCC 12806 bola stabilná aspoň 7 pasáží a vystavenie subletálnym koncentráciám tak prispieva k adaptácii baktérii na tieto biocídy. Autori pomocou výsledkov dospeli k záveru, že nevhodné použitie biocídov v potravinárskom priemysle predstavuje skutočné riziko pre rozvoj adaptácie a krížovej adaptácie na množstvo antimikrobiálnych látok [67].

Vplyv naringenínu na tvorbu biofilmu *Streptococcus mutans* pozorovali Yue a kolektív (2018), ktorý antimikrobiálne účinky stanovili pomocou minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC), rastových kriviek a rýchlosti inhibície biofilmu. Hodnota MIC naringenínu bola stanovená medzi 100 a 200 µg/ml. Rastové krivky *S. mutans* ukázali, že 100 i 200 µg/ml naringenínu spôsobujú inhibíciu rastu a koncentrácia 200 µg/ml naringenínu pri 4 a 24 hodinách takmer úplne inhibovala tvorbu biofilmu. Koncentrácia 100 µg/ml naringenínu vykazovala približne 70% inhibičný účinok a 50 µg/ml naringenínu inhibovalo takmer 50% tvorby biofilmov. Naringenín úspešne inhiboval druhé a tretie štádium tvorby biofilmu *S. mutans* a vďaka týmto antimikrobiálnym účinkom má veľký potenciál pre zubné kliniky pri boji proti zubnému kazu. Naringenín môže napríklad slúžiť ako základný náter pre zubné lepidlo alebo aditívum ústnej vody, aby sa zabránilo rastu biofilmu *S. mutans*, čo vedie k požadovanej stabilite väzby estetickej obnovy a čistému mikroprostrediu ústnej dutiny [68].

Mikrobiálna toxicita nanočastíc oxidov kovu (CuO, NiO, ZnO, Sb₂O₃) bola sledovaná na *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* a *Streptococcus aureus* v štúdií Yong-Wook Baek a Youn-Joo An (2011). Nanočastice oxidov kovu boli dôkladne dispergované v kultivačnom médiu a mikroorganizmy boli kultivované na agarových Petriho miskách s Luria-Bertani (LB) médiom obsahujúcich rôzne koncentrácie nanočastíc oxidu kovu. Mikroorganizmy na Petriho miskách boli inkubované pri teplote 37 °C počas noci a následne boli počítané z hľadiska jednotiek tvoriacich kolónie (CFU). Účinky nanočastíc oxidov kovov na mikrobiálny rast sa preukázali ako druhovo špecifické – citlivosť na testované nanočastice bola rôzna pri testovaných mikroorganizmoch. Najcitlivejším druhom bola *E. coli* a *B. subtilis* spolu s *S. aureus* boli menej citlivé na nanočastice CuO. Pri vystavení nanočasticiam NiO a ZnO sa ukázalo, že *B. subtilis* a *S. aureus* sú citlivejšie ako *E. coli*. V súčasnosti nie je možné interpretovať druhovú citlivosť z hľadiska bakteriálnej klasifikácie (Gram + a Gram -). Na LB agarových platniach boli pozorované rozdiely vo veľkosti bakteriálnych kolónií, pričom existuje kvantitatívny vzťah medzi koncentraciami oxidov kovov, počtom kolónií a veľkosťou kolónií. Tri testované mikroorganizmy vytvorili relatívne málo kolónií v prítomnosti všetkých testovaných nanočastíc oxidov kovov, takže všetky testované nanočastice oxidu kovu preukázali mikrobiálnu toxicitu pre testované druhy. Nanočastice CuO boli najtoxickejšie z testovaných nanočastíc, po ktorých nasledovali nanočastice ZnO (okrem *S. aureus*), NiO a Sb₂O₃ [69].

Ann a kolektív (2014) študovali antibakteriálny účinok dvoch (ZnO-1, ZnO-2) rozdielnych štruktúr ZnO na tri typy patogénnych kožných baktérií, a to *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Rast baktérií bol meraný pomocou spektrofotometra s vlnovou dĺžkou svetelného zdroja 600 nm bola stanovená optická hustota (OD), ktorá indikovala úroveň rozptylu svetla spôsobenú turbiditou baktérií, pričom vyšší počet bakteriálnych kolónií odpovedá vyššej hodnote OD. Merania OD baktérií *S. aureus* a *P. aeruginosa* prebiehalo pravidelne každú hodinu po dobu 8 hodín. Vzhľadom na typický pomalý rast *S. pyogenes* sa rast baktérií monitoroval až do 10 hodín. *S. aureus* v prítomnosti ZnO-1 a ZnO-2 vykazoval exponenciálny rast a obidva typy ZnO majú podobné inhibičné trendy v tom, že zvýšená koncentrácia ZnO (0,5; 1,0; 1,5 a 2,0 mM) zvyšuje inhibíciu. V porovnaní s kontrolou *S. aureus* sa OD výrazne znížila po pridaní ZnO. Vzorky ZnO (0,5; 1,0; 1,5 a 2,0 mM) významne znižujú rast baktérií a po 8 hodinách od prídania ZnO sa množstvo bakteriálnych buniek znížilo o 69% (ZnO-1) a 52% (ZnO-2) v porovnaní s kontrolou. Pri *P. aeruginosa* zvýšená koncentrácia ZnO-1 a ZnO-2 viedla k zníženiu OD a k zníženiu rastu baktérií. ZnO-1 významne znížil rast baktérií pri koncentrácii viac ako 1,0 mM, zatiaľ čo ZnO-2 významne inhiboval rast baktérií pri koncentrácii vyššej ako 1,5 mM. Po 8 hodinách inkubácie s ZnO-1 a ZnO-2 znížili množstvo *P. aeruginosa* o 72% a 66%. Koncentrácia 0,5 mM ZnO-1 aj ZnO-2 vykazovali vysokú inhibíciu voči *S. pyogenes* a redukcia bakteriálneho množstva ZnO-1 a ZnO-2 bola 84% a 85%. Koncentrácie 1,0, 1,5 a 2,0 mM potlačili rast *S. pyogenes* a spôsobili vysoké percento bakteriálnej inhibície (> 95%). Predpokladá sa, že ZnO-1 a ZnO-2 vykazujú vysoký toxický účinok a potenciálny baktericídny účinok voči baktériám. Po 8 až 10 hodinách inkubácie ZnO-1 a ZnO-2 vykazovali najväčšiu afinitu voči *S. pyogenes* v porovnaní so *S. aureus* a *P. aeruginosa* [70].

3.2 Využitie termických metód pri štúdiu rastu mikroorganizmov

Kalorimetria sa v súčasnosti sa využíva pri štúdiu interakcii liekov a organizmov (vrátane orgánov, buniek, organel a biomakromolekúl atď.), čo má veľký význam pri usmerňovaní návrhu liekov a odhaľovaní interakcii medzi liekmi a prírodnými mikroorganizmami.

Guo a kolektív (2012) skúmali vplyv rôznych koncentrácií antimykotických liečiv, konkrétne ketokonazolu (KTZ) a itrakonazolu (ITZ), na rast kvasinky *Candida albicans*. K štúdiu inhibičného efektu bol použitý multikanálový monitoro tepelnej aktivity TAM 2277 spolu s peristaltickou pumpou, ktorou bola prietokom 50 ml/h čerpaná kultúra kvasinky a liečivá. Meranie bolo ukončené v momente, kedy sa krivka tepelnej energie vrátila na základnú líniu. Rastová krivka *C. albicans* v neprítomnosti liečivá má 4 fázy rastu: lag fázu, exponenciálnu fázu, stacionárnu fázu a fázu poklesu. Krivky tepelného výkonu odrážajú účinok KTZ na rast *C. albicans* a metabolickú aktivitu. V porovnaní s krivkou tepelného výkonu kontrolnej skupiny, rast *C. albicans* v prítomnosti liečiva ukázal dlhšiu lag fázu, posun rastového vrcholu a pokles maximálneho tepelného výkonu rastovej fáze, ako aj celkovej vyrobeného tepla. So zvýšením koncentrácie lieku sa zmena stala zrejmejšou, čo naznačuje významnú inhibíciu KTZ na rast a metabolizmus *C. albicans*. Itrakonazol posobil tiež inhibične na rast kvasinky, dokonca jeho vplyv bol v porovnaní s ketokonazolom vyšší [71].

Účinok efedrínu bol sledovaný Zhao (2013) a kolektívom na baktérii *Escherichia coli* pomocou mikrokolorimetrie. Metabolické krivky v podobe závislosti tepelného výkonu na čase baktérie boli získané izotermickým mikrokolorimetrom pri teplote 37 °C a pri meraní vo vzduchovej atmosfére. Rastovú krivku *E. coli* bez prídavku efedrínu môžeme rozdeliť do piatich fáz: lag fáza, prvá exponenciálna fáza, stacionárna fáza, druhá exponenciálna fáza a fáza odumierania. Inhibičný účinok efedrínu bol závislý od koncentrácie kedy

sa percento inhibície rastu baktérií zvýšilo so zvýšením koncentrácie tejto zlúčeniny. Koncentrácia 376,8 µg/ml efedrínu môže spôsobiť 50% inhibíciu rastu *E. coli*. Všetky tieto výsledky ilustrujú, že efedrín, ako sympatomimetický amín, vykazuje silné antibakteriálne účinky na patogénne *E. coli* [63].

Sledovanie mikrobiálnej aktivity umožňuje tiež štúdovať toxicitu látok na životné prostredie. Mikrokolorimetriu, ktorej metodika je založená na zmenách tepla uvoľneného mikroorganizmami, vo svojej práci použili aj Salgado a kolektív (2017), ktorí sledovali mikrobiálnu aktivitu pôd po prídavku glukózy ako substrátu a rôznych koncentráciách dvoch iónových kvapalín (IL). K meraniu bol použitý izotermický mikrokolorimeter TAM 2277, v ktorom bola nastavená teplota merania 25 °C. Z výsledkov získali krivku výkonu a času, ktorá mala štyri fázy: lag, log, stacionárnu a fázu poklesu. Výsledky ukázali veľmi dlhú lag fázu a úzky, vysoký exotermický vrchol. Zistili, že toxický účinok nezávisí len na koncentrácii iónových kvapalín, ale aj na type pôdy (hodnota pH) a druhu mikroorganizmu v pôde, ktorý má významný vplyv na účinok iónových kvapalín na pôdu. Mikrokolorimetrické výsledky tak ukázali, že navrhovaný postup by mohol byť veľmi spoľahlivou metódou na štúdium toxických účinkov IL na mikrobiálnu aktivitu v rôznych druhoch pôd. Mohol by byť použitý na všetky druhy pôd a so všetkými IL. Výhoda mikrokolorimetrie oproti iným tradičným technikám je predovšetkým nepretržité monitorovanie pôdnej mikrobiálnej aktivity, ktorá poskytuje skutočné a priame informácie, ktoré vedú k dôležitým záverom týkajúcim sa inhibície alebo dokonca toxického účinku vyvolaného pridaním IL [72].

Biologický efekt uhlíkový bodiek (CDs) na pôdne mikroorganizmy sledovali Liu a kolektív (2015) pomocou mikrokolorimetrie. Vo svojej práci použili multikanálový mikrokolorimeter TAM III, ktorý zaznamenával tok tepla mikrobiálneho biologického procesu pri teplote 28 °C. Zaznamenané rastové krivky sa s nárastom koncentrácie CDs pravidelne menia a profil krivky má dva typické píky. Metabolizmus mikroorganizmov v pôde je veľmi zložitý a rôzne vrcholy krivky závislosti výkonu na čase môžu byť z metabolizmu rôznych mikroorganizmov, alebo z tých istých mikroorganizmov, ktoré môžu využívať rôzne metabolické dráhy. Prvý vrchol predsavuje prípadnú adaptáciu pôdnych mikroorganizmov (aerobné, fakultatívne anaerobné) na aeróbný metabolizmus a druhý vrchol sa pripisuje anaeróbnym prispôsobujúcim sa anaeróbným podmienkam. Konštanta rýchlosti metabolizmu a maximálny tepelný výkon rastovej fázy sú významné termodynamické parametre pre metabolizmus, pretože vykazujú schopnosť mikroorganizmu rásť za špecifických podmienok. Pri nízkych koncentráciách CDs (0–50 µg/g) sa ich hodnoty zvyšujú so zvyšovaním koncentrácie CDs, takže CDs majú pozitívny vplyv na aktivitu pôdnych mikroorganizmov. Pri koncentrácii 50 µg/g sú ich hodnoty maximálne z čoho vyplýva, že pri nízkych koncentráciách CDs nemajú škodlivý vplyv na rast pôdnych mikróbov. Negatívny vplyv nastáva až pri vyšších koncentráciách CDs (100–1000 µg/g) keda sa hodnoty rýchlostnej konštanty a maximálneho tepelného výkonu sa znižujú. Zmena celkového tepelného výkonu sa s rastúcou koncentráciou CDs v čase nemení a v porovnaní s konštantou rýchlosti a maximálnym tepelným výkonom rastovej fázy je hodnota celkového tepelného výkonu konštantná. Je to pravdepodobne preto, že prítomnosť CDs nemení metabolický spôsob mikroorganizmov v pôde, pričom toxická aktivita CDs okamžite neobmedzuje metabolizmus pôdnych mikroorganizmov - spôsobuje len malé poškodenie ich fyziologickej funkcie a postupne dochádza ku chronickej toxicite. Predpokladá sa, že časť tepelného účinku pochádza z prínosu aktivity biomasy a prežívajúcich mikroorganizmov, čo vysvetľuje prečo je celkový tepelný účinok v podstate konštantný aj napriek zvyšujúcej sa koncentrácii CDs. Z výsledkov tak zistili, že CDs mierne ovplyvňujú metabolizmus mikroorganizmov v pôde a nižšie koncentrácie CDs môžu mať stimulujúci účinok na rast pôdnych mikróbov. Potenciál uhlíkových nanotrubic ako

netoxických fotoluminiscenčných nanočastic pre bio-aplikácie je vďaka týmto výsledkom veľmi vysoký [73].

Mikrobiálna aktivita sa bežne určuje v čistej kultúre a výsledky jej stanovenia tak poskytujú dôležitý pohľad na to, ako určitý organizmus alebo druh prežíva alebo sa prispôbuje nespočetným množstvám premenných. Mnohé infekcie u ľudí a zvierat sa vyskytujú ako asociácie dvoch alebo viacerých bakteriálnych druhov. Izolovaná čistá kultúra sa môže správať veľmi odlišne, ako keď sa skombinuje s inými druhmi. Preto sa Fredua-Agyeman (2018) a jeho kolegovia zamerania na štúdium správania *Pseudomonas aeruginosa* v zmiešanej kultúre so *Staphylococcus aureus* alebo *Escherichia coli* pomocou mikrokolorimetrie. Výsledky boli získané izotermickým mikrokolorimeterom TAM 2277 pri teplote 37 °C. Rast mikroorganizmov v mikrokolorimetri typicky vedie k exponenciálne zvyšujúcemu sa signálu (reprezentujúcemu teplo produkované rastúcim mikroorganizmom), až kým sa koncentrácia zdroja energie nestane obmedzením, a dochádza k tvorbe toxických metabolitov, pričom v takomto prípade sa signál pomaly vracia k základnej línii. Táto štúdia ukázala, že *P. aeruginosa*, *S. aureus* a *E. coli* majú charakteristické rastové krivky v kultivačnom médiu Nutrient Broth. Pri zmiešaní v rôznych hustotách bola pozorovaná dominancia rastu jedného druhu nad druhým, ktorá môže byť spôsobená adaptáciou a efektívnym použitím živín v médiu alebo produkciou inhibičných látok, ktoré by mohli ovplyvniť rast ostatných druhov. Izotermická mikrokolorimetria sa tak ukázala ako cenná metóda na štúdium správania zmiešaných kultúr a môže byť potenciálne použitá na štúdium klinicky relevantnej interakcie [74].

Toxický efekt kadmia na *Candida humicola* a *Bacillus subtilis* bol sledovaný pomocou mikrokolorimetrie autorom Chen a jeho kol. (2008). V tejto štúdií bol k vyhodnoteniu krátkodobého účinku kadmia v rôznych koncentráciách použitý multikanálový mikrokolorimeter TAM III. Kadmium bolo pridávané ako k čistým kultúram tak i k zmiešanej kultúre mikroorganizmov. Časové závislosti tepelného výkonu pre rast *C. humicola*, *B. subtilis* a ich zmes pri 28 °C v prítomnosti rôznych koncentrácií Cd^{2+} môžu byť rozdelené do štyroch fáz: lag fázy, logaritmickej fázy, stacionárnej fázy a fázy poklesu. Výkonové krivky pre zmiešanú kultúru sa dajú tiež rozdeliť na štyri fázy, v ktorých log fáza a fáza poklesu sú veľmi podobné, avšak stacionárna fáza sa výrazne odlišujú od stacionárnej fázy čistých kultúr *C. humicola* a *B. subtilis*. Prostredníctvom experimentov vyhodnotili inhibičný efekt Cd^{2+} na mikroorganizmy *B. subtilis* a *C. humicola*. Efekt na *C. humicola* je odlišný od *B. subtilis*. Nízka dávka (0 až 60 $\mu\text{g/ml}$ pre *B. subtilis*, 0 až 200 $\mu\text{g/ml}$ pre *C. humicola*) ťažkého kovu Cd^{2+} bude stimulovať rast dvoch mikroorganizmov v krátkom čase a vysoká koncentrácia 60-240 $\mu\text{g/ml}$ pre *B. subtilis*, 200 až 800 $\mu\text{g/ml}$ pre *C. humicola*) bude inhibovať rast týchto dvoch mikroorganizmov [64].

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité baktérie, chemikálie a prístroje

4.1.1 Baktérie

Experimentálna časť bola zameraná na baktériu *Cupriavidus necator* H16, jej mutantný kmeň *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ a baktériu *Halomonas halophila*. Bakteriálny kmeň *Cupriavidus necator* H16 a *Halomonas halophila* pochádzajú z Českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity v Brne a *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ pochádza z Leibnity Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Braunschweig, Nemecko.

4.1.2 Použité chemikálie pri kultivácii baktérii

Nutrient Broth, (HiMedia)

Pepton (HiMedia)

Yeast extract (HiMedia)

Dihydrogenfosforečnan draselný, (Lach-Ner, ČR)

Dihydrát hydrogenfosforečnan sodný, (Lach-Ner, ČR)

Síran amonný, (Lach-Ner, ČR)

Heptahydrát síranu horečnatého, (Lach-Ner, ČR)

Fruktóza, p.a., (Lach-Ner, ČR)

Glukóza monohydrát (Lach-Ner, ČR)

Chlorid sodný (Lach-Ner, ČR)

Kyselina levulová (Sigma Aldrich Inc.)

Destilovaná voda

4.1.3 Použité prístroje

Analytické váhy, Boeco

Centrifuga, Hettich zentrifugen EBA 200

Laminárny box Aura mini, Bio Air Instruments

Temperovaná trepačka Heidolph1000, Labicom s.r.o

Termostat, LS-35

Modulárny mikrokolorimeter TAM III, TA Instruments

ELISA reader ELx808, BioTek

4.2 Kultivácia *Cupriavidus necator*

4.2.1 Príprava a zloženie inokulačného a produkčného média pre *Cupriavidus necator*

Pre kultiváciu bolo pripravené inokulum do 100 ml Erlenmayerovej banky, ktorá obsahovala 50 ml submerzného média Nutrient Broth o koncentrácii 25 g/l. Inokulum i minerálne produkčné médium boli sterilizované v tlakovom hrnci pri zavretom ventilu po dobu 55 minút. Ďalšie použité roztoky (fruktózy, kyseliny levulovej) boli sterilizované pri otvorenom ventilu rovnako 55 minút. V laminárnom boxe Aura mini bolo inokulum sterilne zaočkované buď z kryoskúmavky alebo pomocou bakteriálnej kľučky bola izolovaná kolónia baktérie z agarovej misky nanesená trikrát na steny Erlenmayerovej banky. Po zaočkovaní bolo inokulum kultivované 24 hodín na temperovanej trepačke pri teplote 30 °C a frekvencii trepania 180 rpm.

Zloženie Nutrient Broth:

Beef extract	10 g
Pepton	10 g
NaCl	5 g
Agar	20 g
Destilovaná voda	1000 ml

Po 24 hodinách bolo 5 obj.% inokula použitého na zaočkovanie produkčného minerálneho média, v ktorom boli baktérie ďalej kultivované 72 hodín na temperovanej trepačke pri rovnakých podmienkach.

Zloženie minerálneho produkčného média a roztoku stopových prvkov

(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	1,02 g
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	11,1 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2 g
Fruktóza	20 g
Destilovaná voda	1000 ml
Roztok stopových prvkov:	1 ml
FeCl ₃	9,7 g
CaCl ₂	7,8 g
CuSO ₄	0,156 g
CoCl ₂	0,119 g
NiCl ₂	0,118 g
CrCl ₂	0,062 g
0,1 M HCl	1000 ml

4.3 Kultivácia baktérie *Halomonas halophila*

4.3.1 Príprava a zloženie inokulačného a minerálneho média pre *Halomonas halophila*

Na kultiváciu baktérie bolo do dvoch 100 ml Erlenmeyerových baniek pripravené inokulačné médium o celkovom obsahu 50 ml. Médium bolo vysterilizované pri uzavretom ventilu na keramickej dvojplatinke po dobu 35 minút. Po sterilizácii a vychladnutí média

na laboratórnu teplotu, bolo inokulum v laminárnom boxe sterilne zaočkované pomocou kryoskúmavky. Pripravené inokulum bolo kultivované 24 hodín v temperovanej trepačke pri teplote 30 °C a rýchlosti trepanie 180 rpm.

Zloženie inokula:

pepton	15 g
yeast extract	3 g
glukóza	1 g
NaCl	66 g
destilovaná voda	1000 ml

Po 24 hodinách bola kultúra preočkovaná do minerálneho média, ktoré je pre produkciu PHA najvhodnejšie. Do 250 ml Erlenmeyerovej banky bolo pripravených 100 ml minerálneho média, ktoré bolo vysterilizované v tlakovom hrnci s uzavretým ventilom po dobu 35 minút. Po sterilizácii a vychladnutí bolo v laminárnom boxe do minerálneho média pridaných 5 ml bakteriálnej kultúry, 5 ml glukózy zo sterilného zásobného roztoku o koncentrácii 20 g/l a 0,1 ml MES.

Zloženie minerálneho média:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1 g
KH_2PO_4	1,02 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	11,1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g
NaCl	66 g
destilovaná voda	1000ml

Pripravené médium bolo kultivované po dobu 72 hodín v temperovanej trepačke pri teplote 30°C a rýchlosti trepanie 180 rpm.

4.4 Štúdium účinkov mikrobiálnych inhibítorov pomocou mikrokolorimetrie

Cieľom experimentálnej časti bolo otestovať a zhodnotiť využiteľnosť metód termickej analýzy pri popise účinku inhibítora pri realizácii modelového experimentu. Na otestovanie vybranej metódy boli baktérie vystavené rôznym koncentraciám kyseliny levulovej, ktorá bola zvolená ako mikrobiálny inhibítor. Analyzované boli obidva bakteriálne kmene *C. necator* a baktéria *Halomonas halophila* kultivované v minerálnom médiu. Použité koncentrácie kyseliny levulovej boli: 0,1; 0,5; 0,6; 0,75; 0,9; 1; 2; 3; 4; 5 a 10 g/l. Roztok bez kyseliny levulovej slúžil ako kontrola pri každom meraní.

4.4.1 Príprava roztokov s kyselinou levulovou

Základom všetkých roztokov bolo 2,5 g peptonu a od vybranej koncentrácie pomer objemu zásobného roztoku kyseliny levulovej o koncentrácii 10 g/l a fosfátového pufru 50 mM, pH 7,4. Stresové roztoky pre *Halomonas halophila* boli pripravené v dvoch sadách – prvá sada bola bez prítomnosti NaCl, druhá sada obsahovala 66 g/l NaCl.

Zloženie fosfátového pufru, 50 mM, pH 7,4

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	6,89 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,761 g
Destilovaná voda	1000 ml

4.4.2 Príprava vzoriek pre mikrokolorimetrické meranie

Z nakultivovanej bakteriálnej kultúry bolo v laminárnom boxe odobraných 5 ml suspenzie, ktorá bola zcentrifugovaná pri 5000 rpm po dobu 5 minút. Supernatant bol zliaty a biomasa bola rozsuspendovaná v 5 ml roztoku kyseliny levulovej (viz 4.4.1). Z takto pripravenej bunečnej suspenzie bol do mikrokolorimetrickej ampulky odpipetovaný 1 ml a ampulka bola pomocou kliešti sterilne uzavretá.

4.4.3 Mikrokolorimetrické meranie

Mikrokolorimetrické meranie bolo prevedené v modulárnom mikrokolorimetry TAM III od firmy TA Instruments. Pripravené vzorky (viz 4.4.2) boli umiestnené do multikolorimetrickej meriacej cely so šiestimi minikolorimetrami. Meranie sa uskutočnilo v izotermickom režime pri teplote 25 °C. Výsledky boli ďalej spracované v MS Excell.

4.5 Štúdium rastových kriviek baktérii

Pomocou absorbančného fotometru boli sledované rastové krivky baktérie *Cupriavidus necator* H16, jeho mutantného kmeňa PHB⁻⁴ a baktérie *Halomonas halophila*. Z produkčnej kultúry bolo v laminárnom boxe odpipetovaných 500 µl kultúry CN H16, ktorá bola zcentrifugovaná po dobu 5 minút a 5000 otáčkach. Po vyliatí supernatantu bol sediment rozsuspensovaný v 9,5 ml stresovaného roztoku kyseliny levulovej o rôznej koncentrácii (0; 0,1; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 10 g/l). Z bakteriálnej kultúry CN PHB⁻⁴ a *Halomonas halophila* bolo odpipetovaných 500 µl, ktoré boli rozsuspensované v 4,5 ml stresového roztoku.

Z takto pripravených bakteriláných kultúr bolo pridaných 200 µl kultúry do každej jamky mikrotitračnej platničky, pričom každá koncentrácia bola pripravená v piatich opakovaníach. Takto pripravené mikrotitračné platničky boli zatvorené a ponechané pri laboratórnej teplote. Meranie bolo nastavené na teplotu 25 °C, vlnovú dĺžku 630 nm a pred začiatkom merania pretrepanie platničky pred meraním absorpcie a samotné meranie prebehlo v troch opakovaníach. V MS Excelli boli z nameraných hodnôt vypočítané priemer a smerodatná odchylka absorpcie pre každú koncentráciu. Rastové krivky boli zostrojené v závislosti absorpcie na čase.

5 Výsledky a diskusia

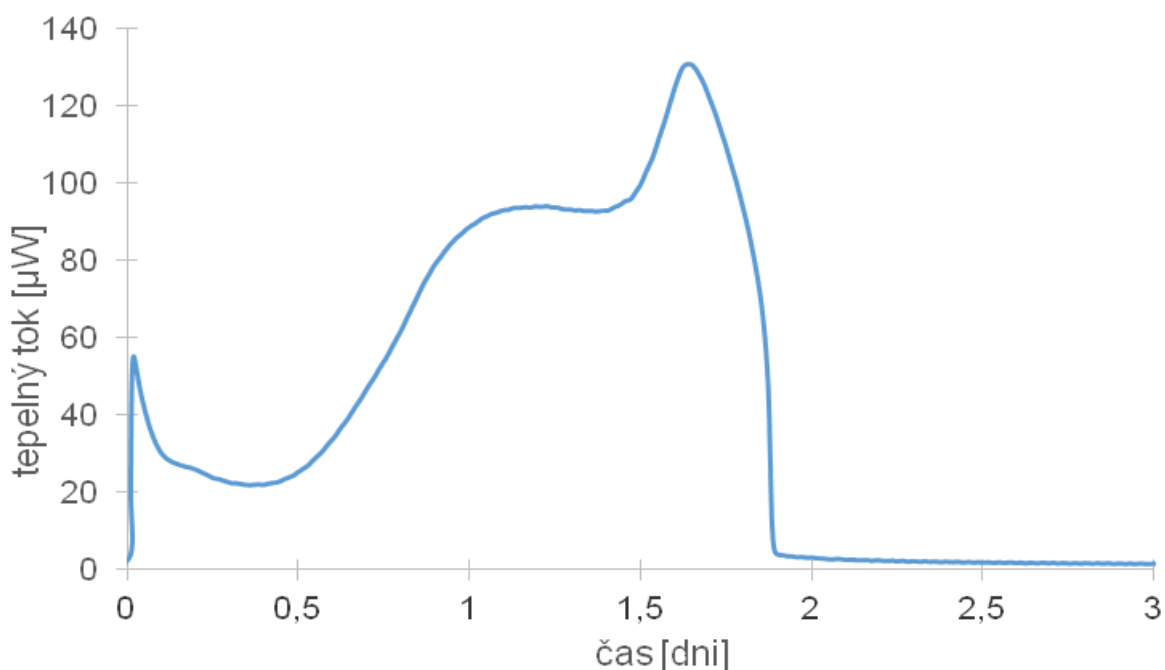
Hlavným cieľom práce bolo otestovať využiteľnosť mikrokolorimetrie pri sledovaní metabolickej aktivity mikroorganizmov, pretože mikrokolorimetria nepatrí bežné metódy, ktoré sa v rámci Fakulty chemickej VUT Brno používajú k sledovaniu metabolickej aktivity mikroorganizmov. K optimalizácii metódy boli vybraté dva veľmi študované baktériálne kmene produkujúce PHA, ktorého prítomnosť má dôležitú úlohu pri prežívaní a adaptácii prevažne na fyzikálne stresy [29, 30, 75]. U vybraných baktérií môžeme predpokladať rôzny mechanizmus stresovej adaptácie, pretože *Cupriavidus necator* je mezofilnou baktériou a *Halomonas halophila* patrí medzi extrémofilné baktérie. Okrem rôznych metabolických stratégií adaptácie sme sme mali možnosť posúdiť úlohu PHA pri adaptácii vďaka mutantnému kmeňu CN PHB⁻⁴, ktorý neakumuluje PHA. Obidve baktérie patria medzi aerobné mikroorganizmy, preto bolo veľmi dôležité zvoliť vhodný objem meranej vzorky tak, aby pomer kultúry voči vzduchu bol dostačujúci pre dlhodobé meranie a nedochádzalo tak k odumieraniam baktérii vyčerpaním vzduchu.

5.1 Vplyv kyseliny levulovej na rast baktérie *Cupriavidus necator* H16

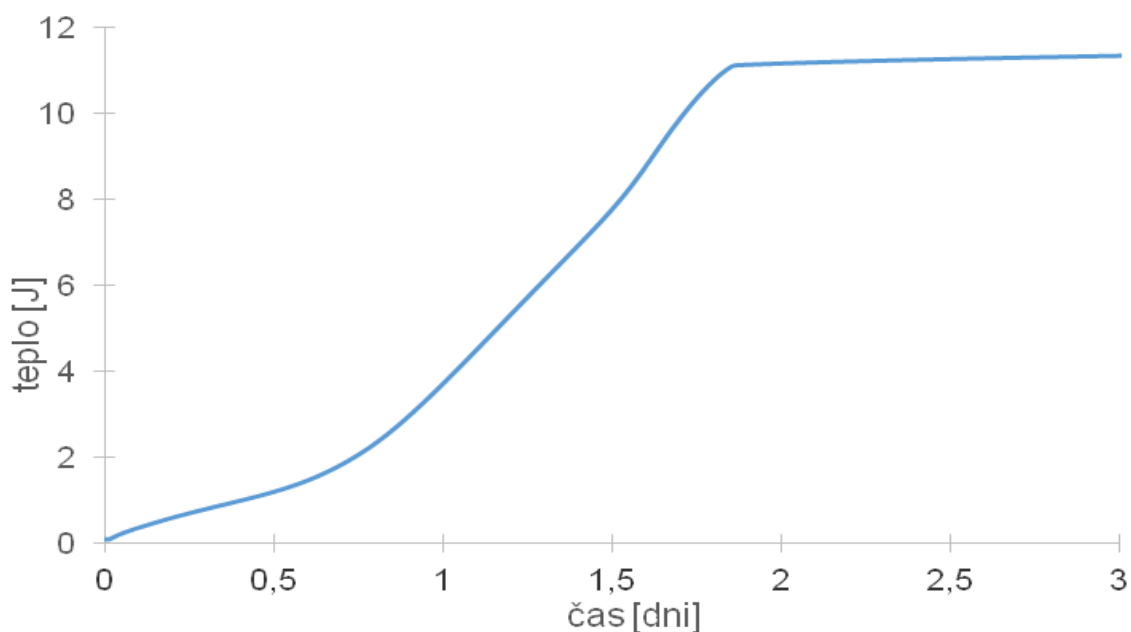
Jedným z cieľov diplomovej práce bolo overiť využiteľnosť mikrokolorimetrie pri štúdiu rastu a metabolickej aktivity mikroorganizmov. Jednotlivé merania trvali niekoľko dní, pokiaľ tepelný tok pri všetkých vzorkách neklesel späť na základnú líniu. Na Obr. 8 pozorujeme závislosť tepelného toku na čase pre kontrolnú vzorku (obsahuje pepton - zdroj zmiešaných peptidov, voľných aminokyselín, organického dusíka - vo fosfátovom pufrí) baktérie *Cupriavidus necator* H16, ktorá nám umožňuje sledovať priebeh adaptácie a mieru metabolickej aktivity. Začiatok krivky začína ostrým nárastom tepelného toku, ktorý je spojený s vložením mikrokolorimetrickej ampule do meriacej cely a nesúvisí s vlastným metabolizmom baktérie. Metabolická aktivita sa prejavuje najprv tzv. adaptačnou fázou, počas ktorej sa baktérie prispôbia daným podmienkam. Po adaptácii dochádza k zvýšeniu metabolickej aktivity, ktorá sa prejavuje nárastom tepelného toku, ktorý vytvára dva píky na krivke – jeden pri 100 μW a druhý ostrejší pík o hodnote 140 μW . Dva píky môžu byť prejavom viacerých metabolických ciest baktérie, alebo napr. v našom prípade by mohlo dochádzať k diauxickému rastu, kedy z využiteľných substrátov si baktéria vyberie pre seba ten výhodnejší a po jeho vyčerpaní je schopný spracovať ďalší substrát. Po ostrom píku dochádza k strmému poklesu tepelného toku a po dvoch dňoch tak dochádza k obmedzeniu metabolickej aktivity na minimum.

Časovým integrálom tepelného toku, získame závislosť celkového vyprodukovaného tepla na čase, ktorá je zobrazená na Obr. 9. Profil krivky vyprodukovaného tepla môžeme porovnať s krivkou tepelného toku v čase, kde môžeme pozorovať spoločné znaky:

- nárast tepla je zo začiatku veľmi malý čo odpovedá ostrému píku tepelného toku, ktorý vznikol vložením ampule do meriacej cely a tepelnému toku nesprevádzanej adaptácie baktérie;
- približne v čase 0,5 dňa po adaptácii sa metabolická aktivita prejavuje lineárnym nárastom tepla;
- medzi 1,5 až 2 dňami pozorujeme nárast ostrého píku v závislosti tepelného toku na čase, ktorý sa pri vyprodukovanom teple prejavuje zmenou smernice krivky, kedy dochádza k maximálnej hodnote celkového tepla;
- obmedzením metabolickej aktivity po vyčerpaní substrátu dochádza k poklesu tepelného toku, avšak hodnota tepla sa už ďalej nemení, ostáva konštantná.



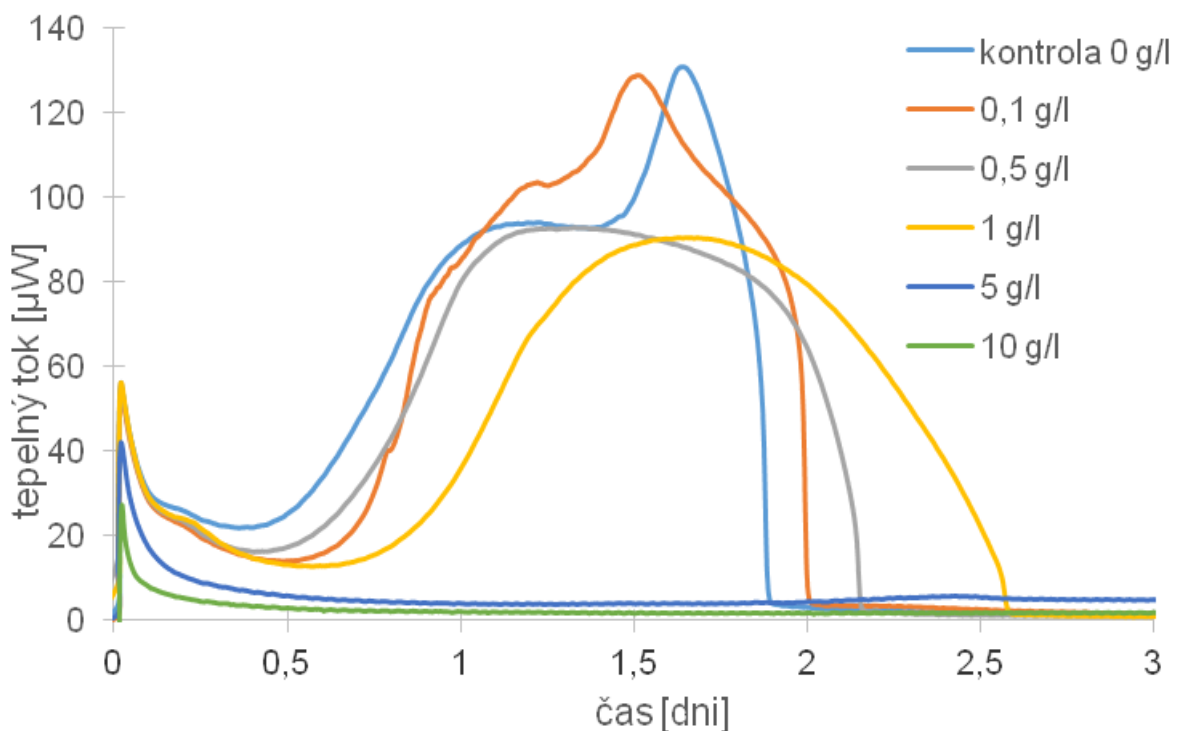
Obr. 8: Závislosť tepelného toku na čase kontrolnej vzorky pre baktériu *Cupriavidus necator* H16



Obr. 9: Závislosť tepla na čase kontrolnej vzorky pre baktériu *Cupriavidus necator* H16

Ďalším krokom práce bolo zistiť vplyv koncentrácií kyseliny levulovej na metabolickú aktivitu baktérie. Na Obr. 10 vidíme závislosť tepelného toku na čase pre koncentrácie kyseliny levulovej 0,1; 0,5; 1; 5 a 10 g/l a kontrolu (svetlo modrá krivka), ktorá neobsahuje kyselinu levulovú. Z výsledkov pozorujeme, že baktérie vykazujú rôzny priebeh metabolickej aktivity pri jednotlivých koncentráciách kyseliny levulovej a zároveň môžeme vidieť vplyv koncentrácií kyseliny levulovej na dĺžku adaptácie. Modrou farbou je vyznačená kontrola, ktorej metabolická aktivita bola popísaná na predchádzajúcich dvoch obrázkoch. Koncentrácia kyseliny 0,1 g/l (oranžová krivka) má podobný priebeh metabolickej aktivity čo sa týka počtu

píkov. Rozdielom je vyšší pokles tepelného toku približne do 18 hodín (0,75 dňa), kedy došlo k spomaleniu metabolizmu v rámci adaptácie baktérii na kyselinu levulovú. Po adaptácii dochádza k zvýšeniu tepelného toku, ktorý v čase medzi 1 až 1,5 dňom prevyšuje hodnoty tepelného toku kontroly. Pri koncentráciach 0,5 g/l (šedá krivka) a 1 g/l (žltá krivka) je profil krivky v porovnaní s kontrolou jednoduchší – nedochádza k druhému ostrému nárastu tepelného toku. Čas, potrebný na adaptáciu sa s rastúcou koncentráciou samozrejme zvyšuje, čím sa predlžuje samotná dĺžka metabolickej aktivity. Napr. v prípade kontroly baktérie po vyčerpaní substrátu nevykazujú metabolickejšiu aktivitu už v druhom dni, pri koncentrácii 1 g/l v druhom dni dochádza k spomaleniu metabolickej aktivity, ktorá sa zastaví po 2,5 dňoch. Pri koncentráciach 5 g/l (tmavo modrá krivka) a 10 g/l (zelená krivka) nepozorujeme žiadnu metabolickejšiu aktivitu, kde ani po troch dňoch nedošlo k zvýšeniu tepelného toku.



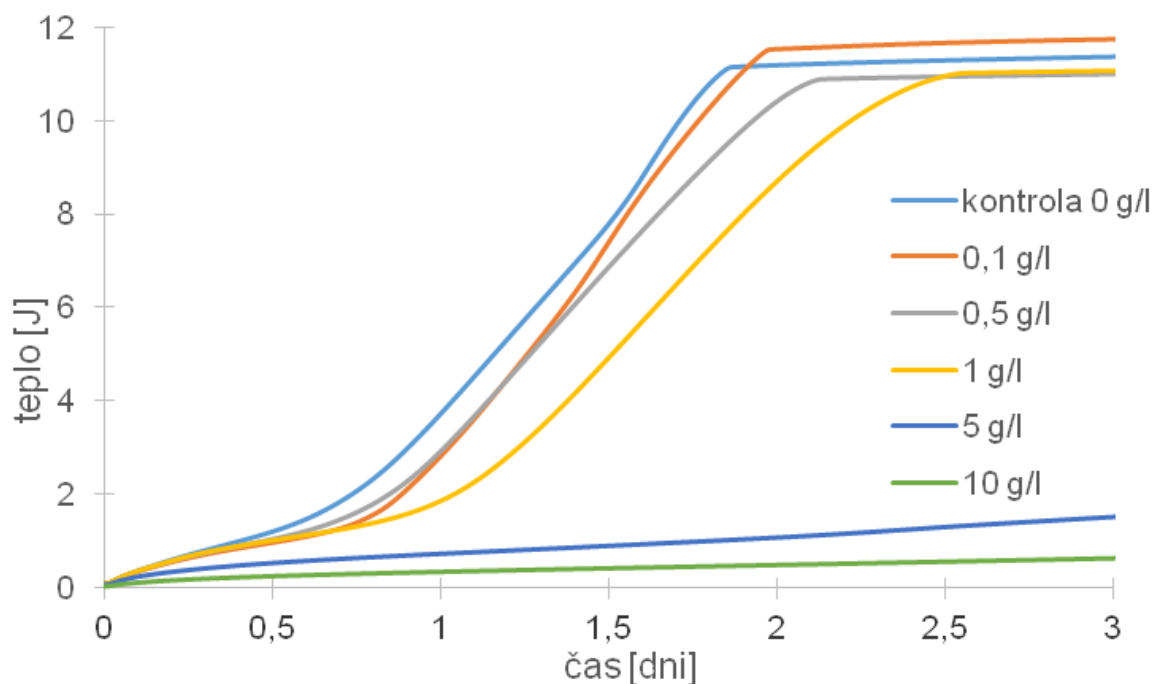
Obr. 10: Závislosť tepelného toku na čase baktérie *Cupriavidus necator* H16 v prítomnosti koncentrácií kyseliny levulovej v rozsahu od 0,1 g/l do koncentrácie 10 g/l a kontrolnej vzorky bez prítomnosti kyseliny levulovej

Z výsledkov na Obr. 11, môžeme vidieť závislosť tepla na čase, kde celkové vyprodukované teplo pri 0,1 g/l je o niečo málo väčšie ako pri kontrole, ktorá maximálne teplo vyprodukovala skôr, keďže okrem peptonu nemala prítomný iný substrát. Môžeme tak predpokladať, že koncentrácia 0,1 g/l miesto inhibície, rast aktivuje a kyselina levulová slúži ako ďalší substrát a zdroj uhlíka pre baktérie. Koncentrácie do 1 g/l majú minimálny vplyv na celkové vyprodukované teplo, ktoré vzniká po adaptácii. Baktérie po adaptácii nestrácajú svoju metabolickejšiu aktivitu.

Preložením prvých dvoch častí krivky zo závislosti tepla na čase lineárnou regresiou a nájdením ich spoločného priesečníka sme získali približne hodnoty doby adaptácie jednotlivých koncentrácií, ktoré sú zobrazené v Tab. 3. Rast baktérii v kontrolnej vzorke začal rásť po 18 hodinách. Adaptácia na kyselinu levulovú baktériam pri koncentrácii 0,1 g/l trvala o 3 hodiny viac ako v prípade kontroly, kde mali baktérie pepton ako substrát. Pri 1 g/l je rozdiel v začiatku rastu kontroly a rastu baktérii po adaptácii na LA približne 8 hodín.

Tab. 3: Hodnoty vypočítaných dób adaptácie pre kontrolu a koncentrácie 0,1; 0,5 a 1 g/l.

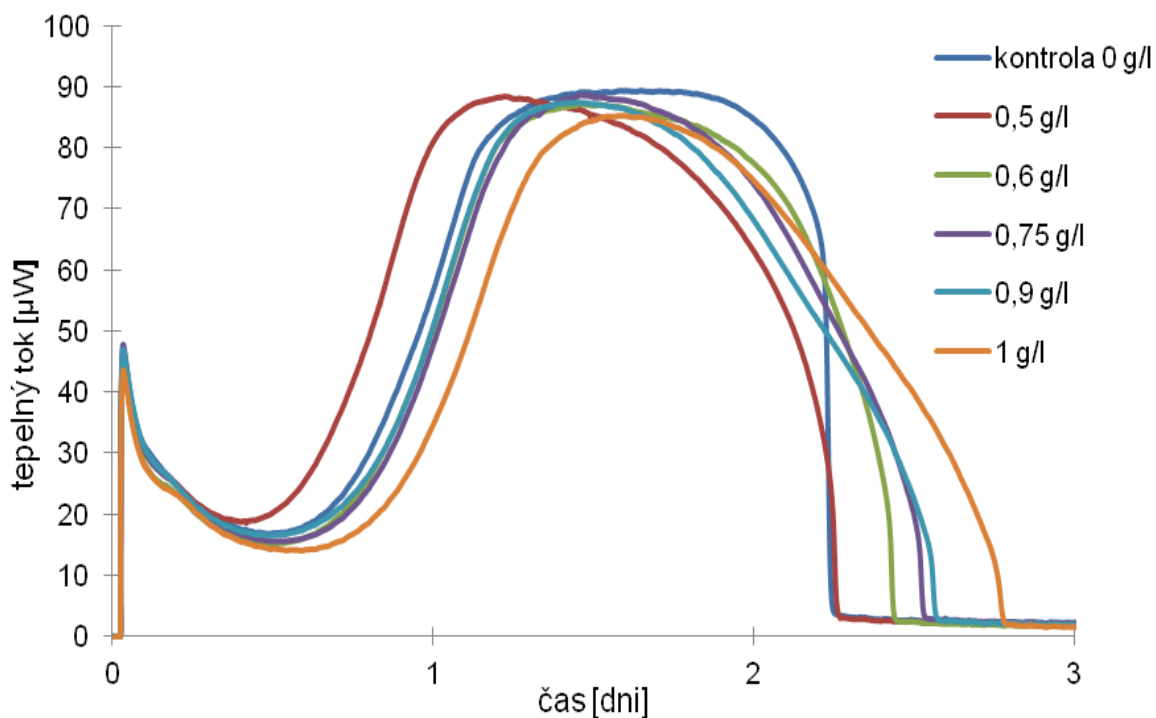
koncentrácie [g/l]	doba adaptácie [hod]
kontrola 0	18,5
0,1	21,3
0,5	19,8
1	26,0



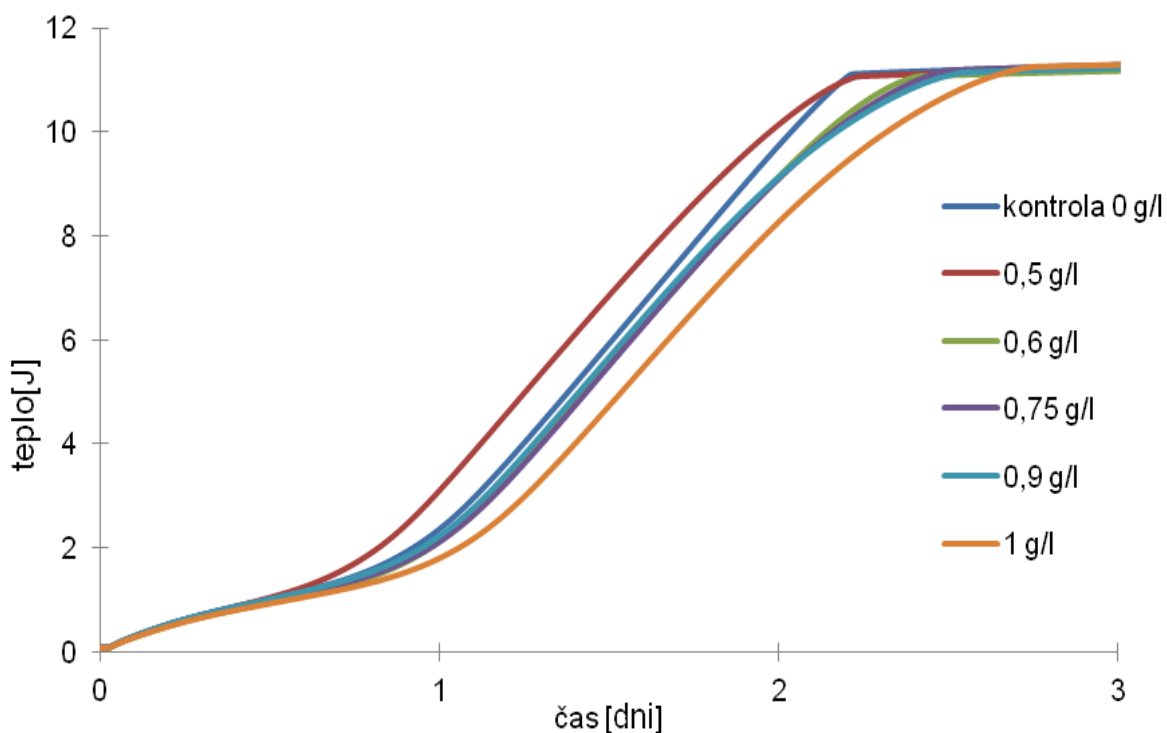
Obr. 11: Závislosť tepla na čase pre baktériu *Cupriavidus necator* H16 bez kyseliny levulovej a pri koncentráciach od 0,1 g/l do 10 g/l

Porovnaním koncentrácií 0,5 (šedá krivka) a 1 g/l (žltá krivka) na Obr. 10, pozorujeme dlhšiu adaptáciu baktérie na vyššiu koncentráciu kyseliny levulovej. Pre lepšiu predstavu boli pridané koncentrácie v rozsahu od 0,5 g/l až 1 g/l (Obr. 12). Z výsledkou môžeme vidieť, že pri tomto experimente u koncentrácie 0,5 g/l (červená krivka) došlo k rýchlejšiemu začiatku rastu ako pri kontrole, čo však pri predchádzajúcom meraní nebolo pozorované. Koncentrácie v rozmedzí od 0,6 do 0,9 g/l majú začiatok rastu skoro rovnaký s kontrolou a nepozorujeme tu žiadne adaptačnú fázu. Jediným rozdielom pri týchto koncentráciach je pokles tepelného toku spôsobený odumieraním baktérii. V prípade kontroly je tento pokles strmší ako pri koncentráciach 0,6-0,9 g/l čo pravdepodobne súvisí s vyčerpaním peptonu ako jediného zdroja uhlíka pre rast. Posun rastu v čase vplyvom kyseliny levulovej ako inhibítora je viditeľný až pri koncentracii 1 g/l.

Pri koncentráciach 0,5 až 1 g/l kyseliny levulovej maximálna hodnota tepelného toku (Obr. 12) a celkového tepla (Obr. 13) sú porovnaním s kontrolou rovnaké a pri tomto meraní nedochádza k výraznému poklesu tepelného toku alebo tepla. Koncentrácia 1 g/l má mierny inhibičný efekt, ktorý je pozorovaný práve oneskoreným začiatkom rastu, ale po adaptácii nedochádza k zníženiu metabolickej aktivity baktérie, keďže hodnota celkového tepla je rovnaká ako pri kontrole a zvyšných koncentráciach.

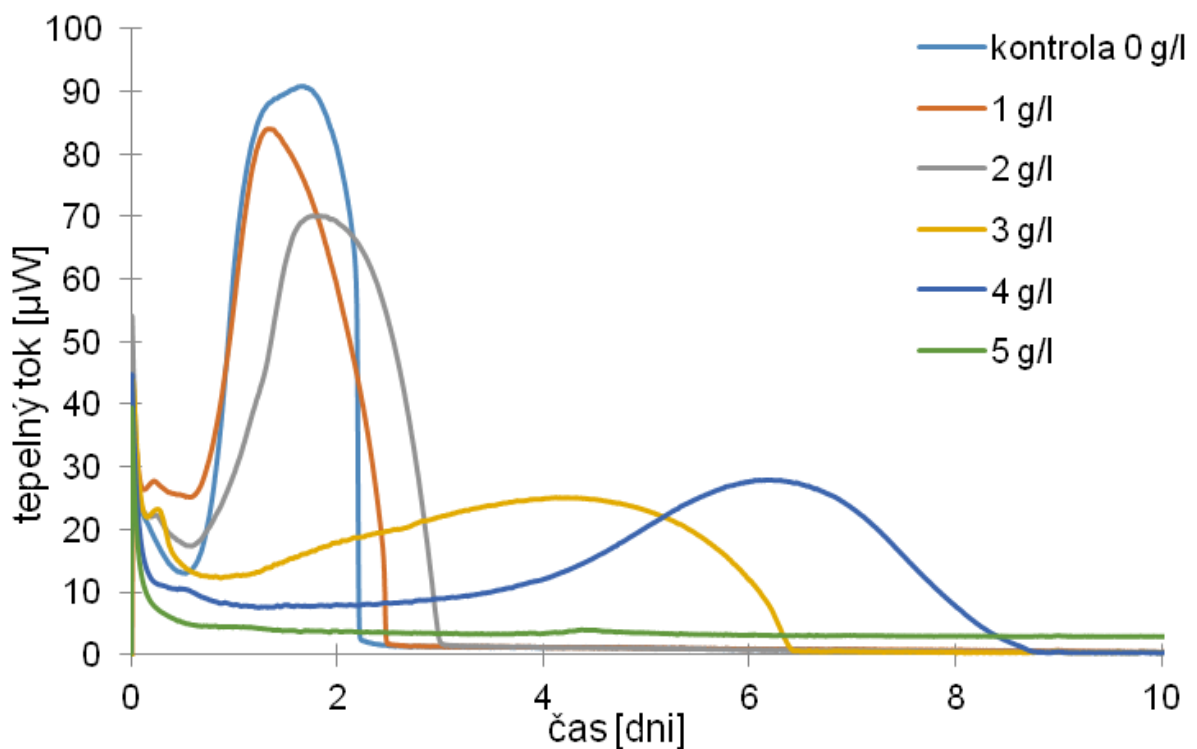


Obr. 12: Závislosť tepelného toku na čase baktérie *Cupriavidus necator* H16 bez kyseliny levulovej ako kontroly (tmavo modrá krivka) a v prítomnosti koncentrácií kyseliny levulovej v rozsahu od 0,5 g/l do koncentrácie 1 g/l



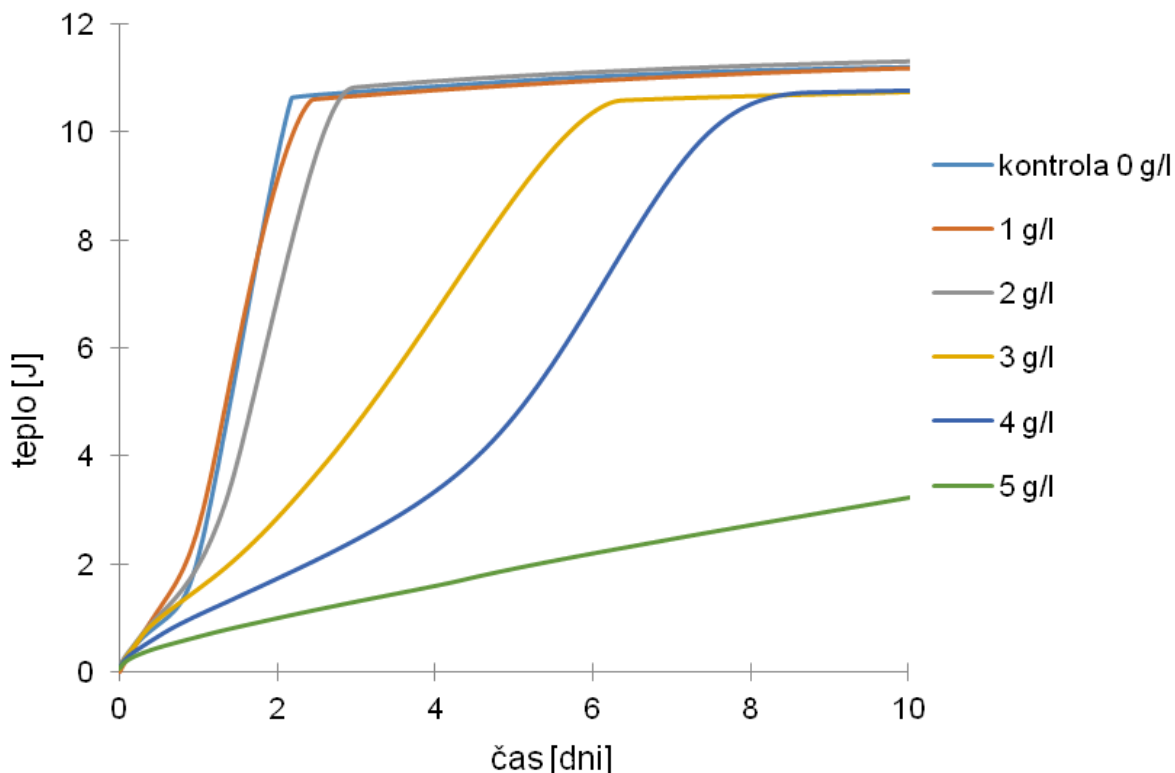
Obr. 13: Závislosť tepla na čase baktérie *Cupriavidus necator* H16 bez kyseliny levulovej ako kontroly (tmavo modrá krivka) a v prítomnosti koncentrácií kyseliny levulovej v rozsahu od 0,5 g/l do koncentrácie 1 g/l

Z predošlých experimentov bola zistená hraničná koncentrácia kyseliny levulovej, ktorá má inhibičný efekt. Otázkou však ostávalo, ktorá koncentrácia v rozmedzí medzi od 1 g/l do 5 g/l je ešte dostatočná pre rast baktérii? Výsledky merania zobrazené na Obr. 14, korešpondujú s tými predchádzajúcimi a potvrdzujú tak, že koncentrácie kyseliny levulovej nižšie ako 5 g/l je *Cupriavidus necator* H16 schopný metabolizovať a využiť ich ako zdroj uhlíku. Pri tomto koncentračnom rozmedzí porozujeme najdlhší adaptačný čas baktérii. Baktérie po dlhšom čase boli schopné sa adaptovať aj na vyššie koncentrácie, pri ktorých obmedzili svoju metabolickú aktivitu len k ich rastu. Vplyv vyšších koncentrácií pozorujeme aj na tvare krivky, kde pri koncentráciách do 2 g/l po adaptácii dochádza k rýchlejšiemu rastu, ktorý sa prejavuje ostrým pík, kdežto pri vyšších koncentráciách (nad 2 g/l) je rast pomalší v dôsledku dlhšej adaptácie a vzniknutý pík nie je ostrý.



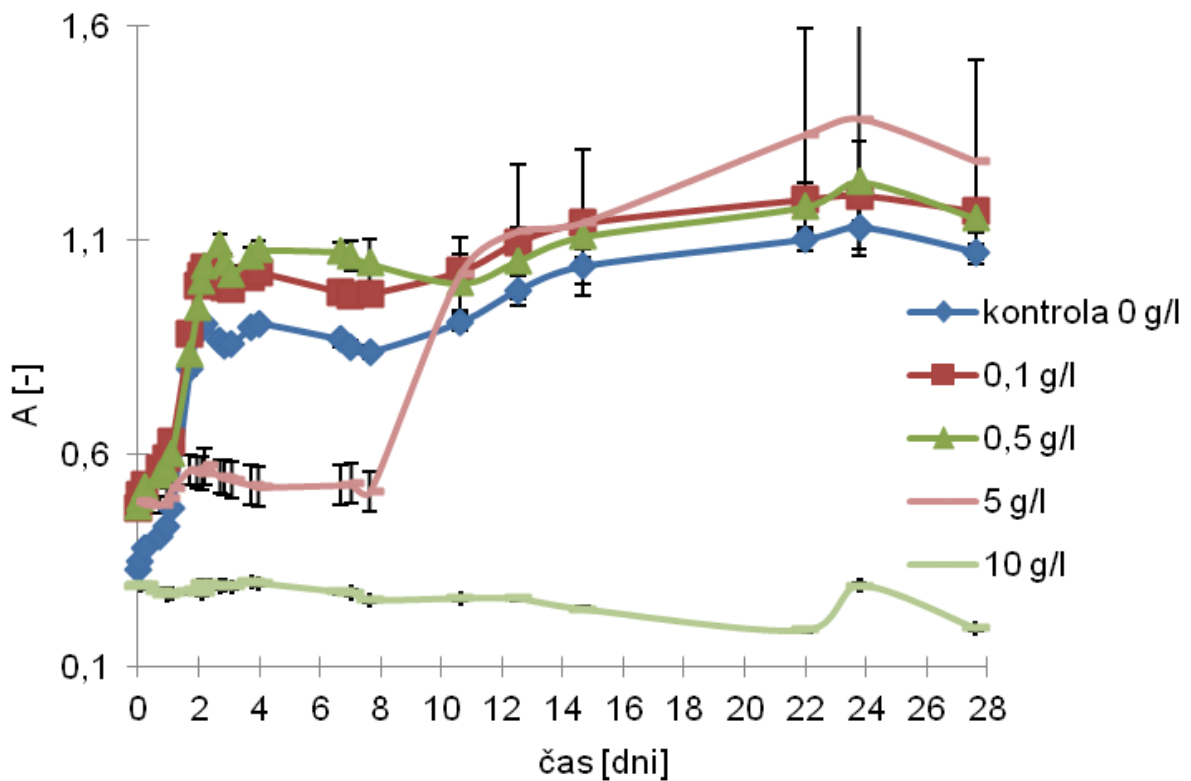
Obr. 14: Závislosť tepelného toku na čase baktérie *Cupriavidus necator* H16 bez kyseliny levulovej ako kontroly (svetlo modrá krivka) a v prítomnosti koncentrácií kyseliny levulovej v rozsahu od 1 g/l do koncentrácie 5 g/l

Koncentráciu 2 g/l môžeme považovať ako hraničnú čo sa týka vplyvu kyseliny na mieru metabolickej aktivity, kde hodnoty maximálneho vyprodukovaného tepla dosahujú baktérie rovnaké, len za dlhší čas porovnaní s kontrolou (Obr. 15). Nad touto hranicou dochádza k zníženiu celkovej metabolickej aktivity baktérii, ktoré ani za dlhší časový úsek nevyprodukovali rovnaké konštantné celkové teplo ako kontrola. Ako už bolo spomenuté, koncentrácia 5 g/l má silný inhibičný efekt na metabolickú aktivitu a celkové vyprodukované teplo po 14 dňoch merania činilo 37 % z celkového tepla kontroly.

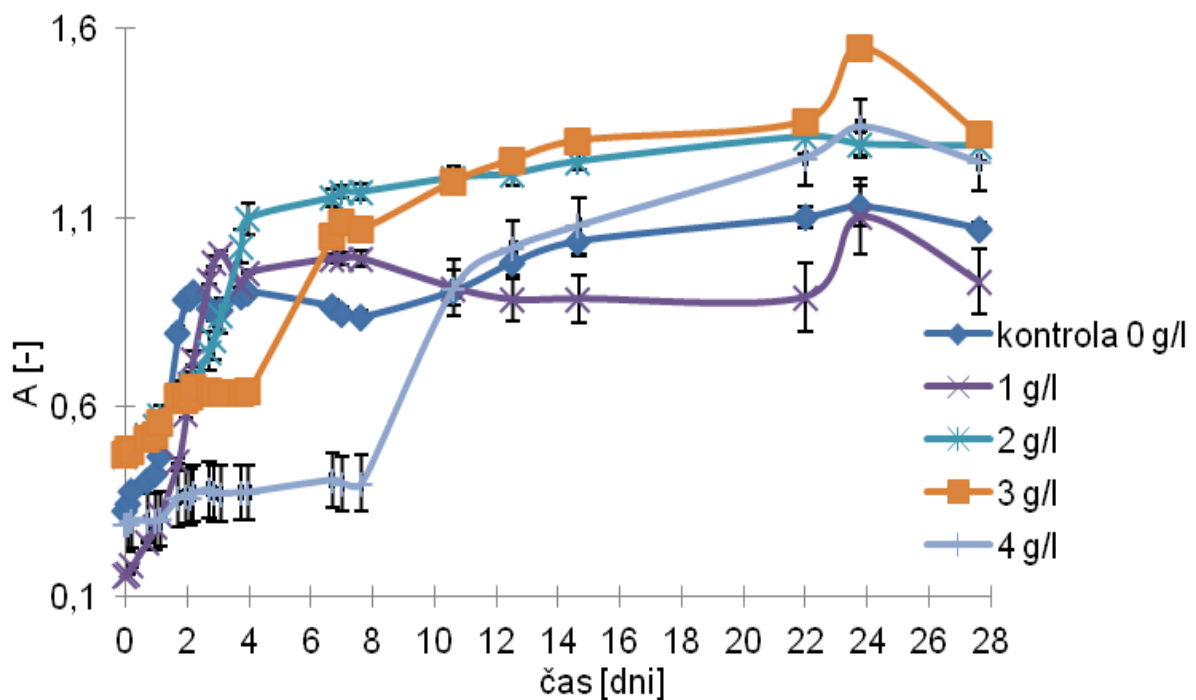


Obr. 15: Závislosť tepla na čase pre baktériu *Cupriavidus necator* H16 bez kyseliny levulovej (svetlo modrá krivka) a pri koncentráciách od 1 g/l do 5 g/l

Mikrokalorimetrickým meraním získame informáciu o celkovom vyprodukovanom teple, ktoré pripisujeme rastu a ďalšej metabolickej aktivite baktérii. Pre správnu interpretáciu termogramov boli výsledky mikrokalorimetrie porovnané s rastovými krivkami baktérii, ktoré boli sledované pomocou fotometrického stanovenia optickej hustoty, ktorého postup je popísaný v kapitole 4.5. Na Obr. 16 vidíme rastové krivky baktérie *Cupriavidus necator* H16 s koncentraciami 0,1; 0,5; 5 a 10 g/l, kde rast kontroly, 0,1 g/l a 0,5 g/l nastal približne po 27 hodinách, čo sa v mikrokalorimetrii prejavuje postupným nárastom tepla, ktoré po dosiahnutí maximálnej hodnoty ostáva konštantné. Hodnoty absorbancie sa s rastom zvyšujú a po prekročení 55 hodiny absorbancia postupne stúpa a klesá. Tieto výkyvy hodnôt môžu byť spôsobené buď tým, že v prípade keď mikrotitračná platnička bola zarosená, bolo potrebné ju v laminárnom boxe otvoriť, čím baktérie došli do styku so vzduchom, a tým znovu zintenzívnili svoju metabolickú aktivitu čo sa prejavilo práve zvýšením absorbancie napr. medzi 500 až 600 hodinou. Alebo to môže súvisieť s prítomnosťou mŕtvych buniek, ktoré úplne nelyzovali a mali vplyv na optickú hustotu. V prípade kalorimetrie oproti tomu vyprodukované maximálne teplo ostáva konštantné a prítomnosť mŕtvych buniek nemá vplyv na produkciu tepla. Pri koncentrácii 5 g/l boli baktérie schopné adaptovať sa na kyselinu levulovú a začať rásť približne po 200 hodinách. Výsledky zo stanovenia optickej hustoty tak korelujú s výsledkami z mikrokalorimetrie (Obr. 15), pri ktorých bol pozorovaný nárast celkového tepla spojený s rastom baktérii, avšak baktérie pravdepodobne spomalia svoj metabolizmus – tepelný tok nerastie a hodnota tepla je nízka – a prítomné zdroje živín využijú predovšetkým na svoj rast. Úplný inhibičný účinok sa potvrdil pri koncentrácii 10 g/l, pri ktorej nedochádza k rastu ani k produkcii tepla. Pri porovnaní koncentracii od 1 do 4 g/l (Obr. 17) s výsledkami z mikrokalorimetrie (Obr. 15) pozorujeme rovnaký vplyv kyseliny levulovej na rast baktérii, kde silnejší inhibičný efekt sa prejavuje dlhšou dobou adaptácie až pri 3 a 4 g/l .



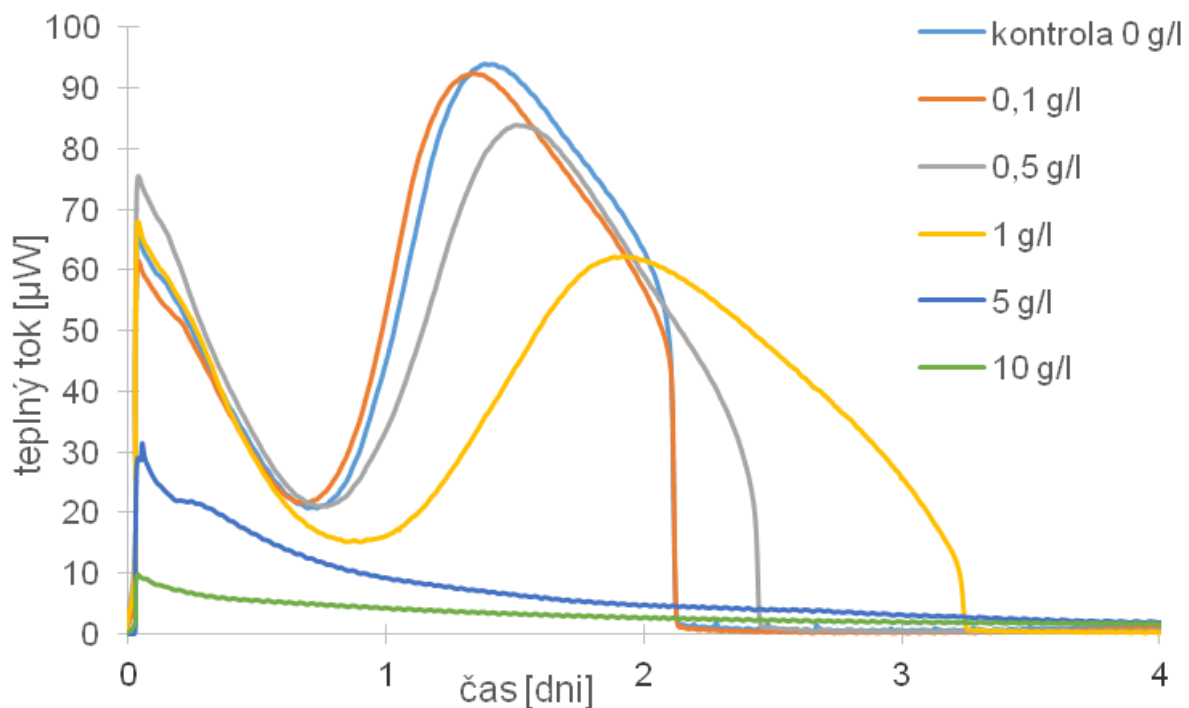
Obr. 16: Rastová krivka baktérie *Cupriavidus necator* H16 v prítomnosti koncentrácií kyseliny levulovej (0,1; 0,5; 5 a 10 g/l) a bez kyseliny levulovej ako kontroly (tmavo modrá krivka)



Obr. 17: Rastová krivka baktérie *Cupriavidus necator* H16 v prítomnosti koncentrácií kyseliny levulovej (1; 2; 3 a 4 g/l) a bez kyseliny levulovej ako kontroly (tmavo modrá krivka)

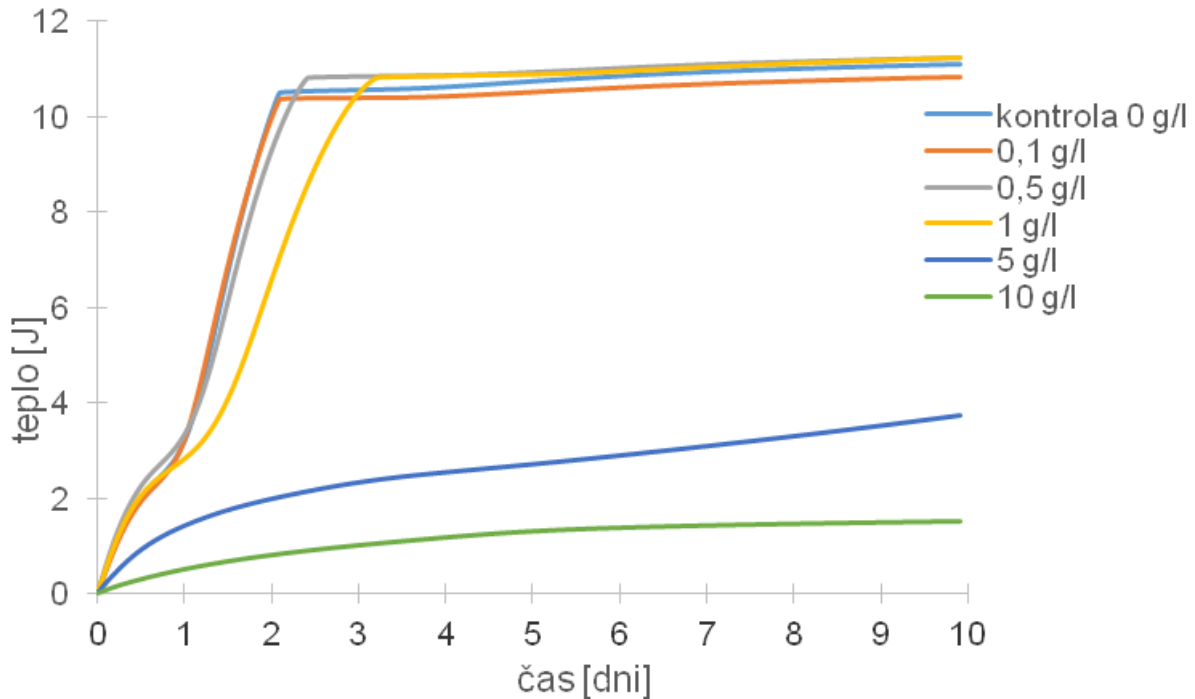
5.2 Vplyv kyseliny levulovej na rast baktérie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴

Cupriavidus necator PHB⁻⁴ je mutantný kmeň, ktorý je nie schopný akumulovať polyhydroxyalkanoáty. Keďže kyselina levulová môže byť baktériou využitá ako zdroj uhlíku pri produkcii PHA alebo ako zdroj živín pri raste, pri tomto mutantnom kmeni sa LA využíva len ako zdroj uhlíku potrebný pre rast. Postup práce a hodnoty koncentrácií kyseliny levulovej boli rovnaké ako pri baktérii *Cupriavidus necator* H16. Na Obr. 18 vidíme znázornené krivky metabolickej aktivity baktérie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, kde svetlo modrá krivka je kontrola (bez kyseliny levulovej). Vplyv kyseliny levulovej s rastúcou hodnotou koncentrácií pozorujeme pri predĺžovaní lag fázy, pričom koncentrácia 0,1 g/l (oranžová krivka) sa opäť javí stimulačne, kde ostrý nárast tepelného toku začína skôr ako pri kontrole. Pri koncentráciách 0,5 g/l (šedá krivka) a 1 g/l (žltá krivka) je vplyv kyseliny na začiatok rastu viditeľnejší a doba potrebná na adaptáciu narastá so zvyšujúcou sa koncentráciou. Koncentrácie 5 g/l (tmavo modrá krivka) a 10 g/l (zelená krivka) sú aj pre tento kmeň toxické a majú značný inhibičný účinok na baktériu.



Obr. 18: Závislosť tepelného toku na čase baktérie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ bez kyseliny levulovej ako kontroly (svetlo modrá krivka) a v prítomnosti koncentrácií kyseliny levulovej v rozsahu od 0,1 g/l do koncentrácie 10 g/l

Pri koncentráciách 0,5 g/l a 1 g/l došlo síce k posklesu tepelného toku, avšak hodnota celkového tepla (Obr. 19) odpovedá hodnote tepla pre kontrolu. Celkové vyprodukované teplo je približne rovnako veľké a bolo dosiahnuté za dlhší časový úsek ako pri kontrolnej vzorke. Tieto výsledky poukazujú na skutočnosť, že po adaptácii majú baktérie rovnako veľkú metabolickú aktivitu ako v prípade kontroly, dokonca pri 0,5 g/l a 1 g/l je hodnota tepla vyššia než u kontroly. Pri koncentráciách 5 g/l (4 J) a 10 g/l (1,5 J) ani po 10 dňoch nebol pozorovaný nárast tepla rovný teplu kontrolnej vzorky (11,1 J) a prítomné baktérie tak mali nízku metabolickú aktivitu spôsobenú prítomnosťou kyseliny levulovej ako inhibítora.



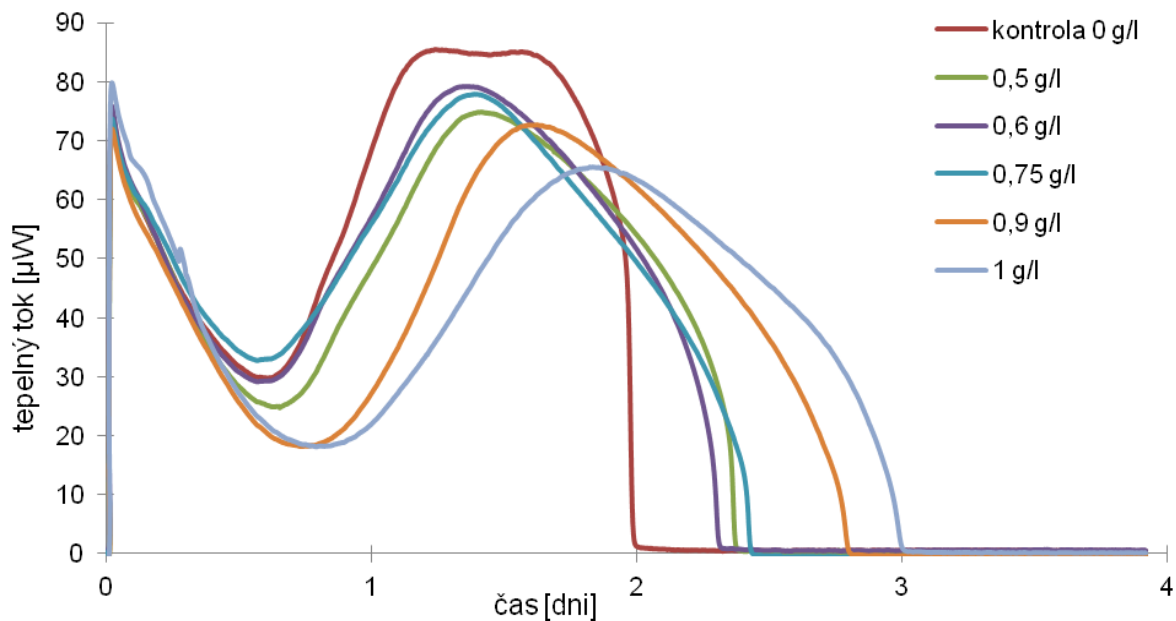
Obr. 19: Závislosť vyprodukovaného tepla na čase pre baktériu *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ bez kyseliny levulovej (svetlo modrá krivka) a pri koncentráciach kyseliny levulovej v rozmedzí od 0,1 g/l do 10 g/l

Pri *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ dochádza k rastu kontroly po 26 hodinách a baktéria potrebuje ďalších 10 hodín, aby sa adaptovala na koncentráciu 1 g/l kyseliny levulovej (Tab. 4). Ako už bolo vyššie spomenuté, koncentrácia 0,1 g/l má zrejme aktivačný účinok na rast baktérie, ktorý začal o 2 hodiny skôr ako pri kontrole.

Tab. 4: Hodnoty vypočítaných dôb adaptácie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ pre kontrolu a koncentrácie 0,1; 0,5 a 1 g/l.

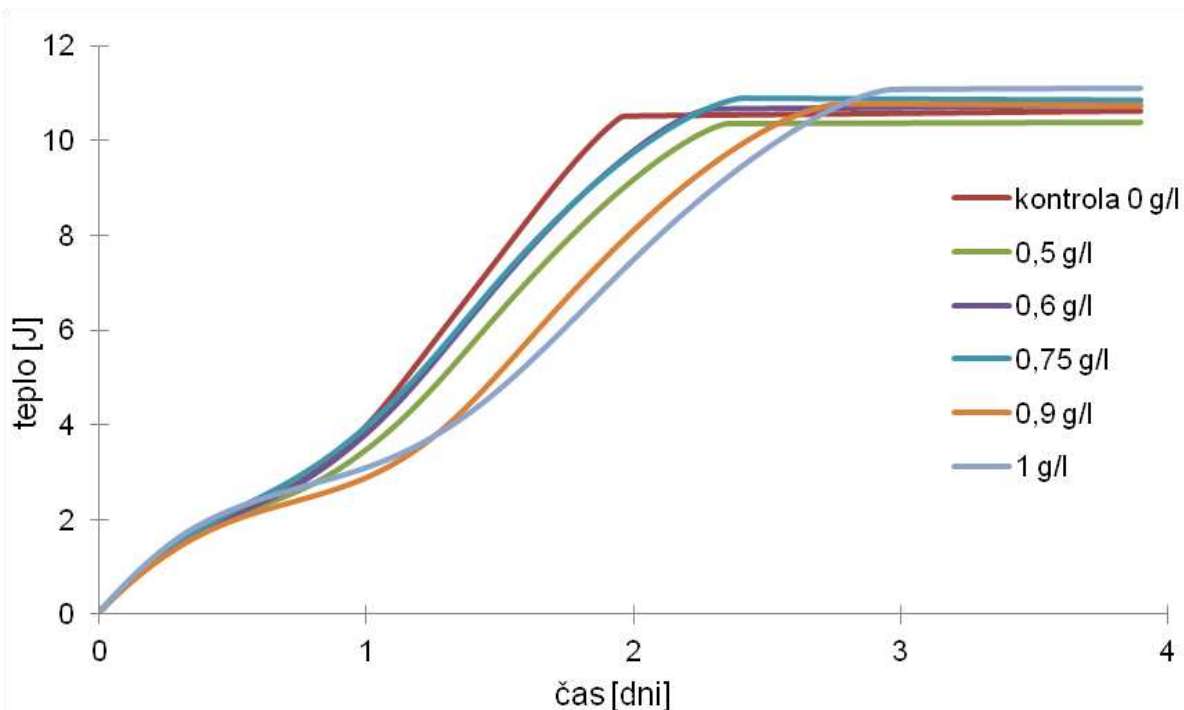
koncentrácia [g/l]	doba adaptácie [hod]
kontrola 0	25,8
0,1	24,4
0,5	28,4
1	36,2

Pokles tepelného toku medzi koncentraciám 0,5 a 1 g/l je výraznejší u *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ (Obr. 20) v porovnaní s *Cupriavidus necator* H16 (Obr. 10). Pri *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ majú koncentrácie 0,6 a 0,75 g/l rovnaký priebeh rastu i hodnotu tepelného toku. Hodnota tepelného toku pri koncentracii 0,5 g/l je nižšia a porovnateľná s hodnotou tepelného toku koncentracii 0,9 g/l, pri ktorej však dochádza k posunu rastu v čase a maximálnu hodnotu tepelného výkonu dosahuje za dlhší čas. Najväčší pokles tepelného toku je pri najvyššej koncentrácii (1 g/l), pri ktorej adaptácia baktérii trvá samozrejme najdlhšie.



Obr. 20: Závislosť tepelného toku na čase baktérie *Cupriavidus necator* PHB⁴ bez kyseliny levulovej ako kontroly (červená krivka) a v prítomnosti koncentrácií kyseliny levulovej v rozsahu od 0,5 g/l do koncentrácie 1 g/l

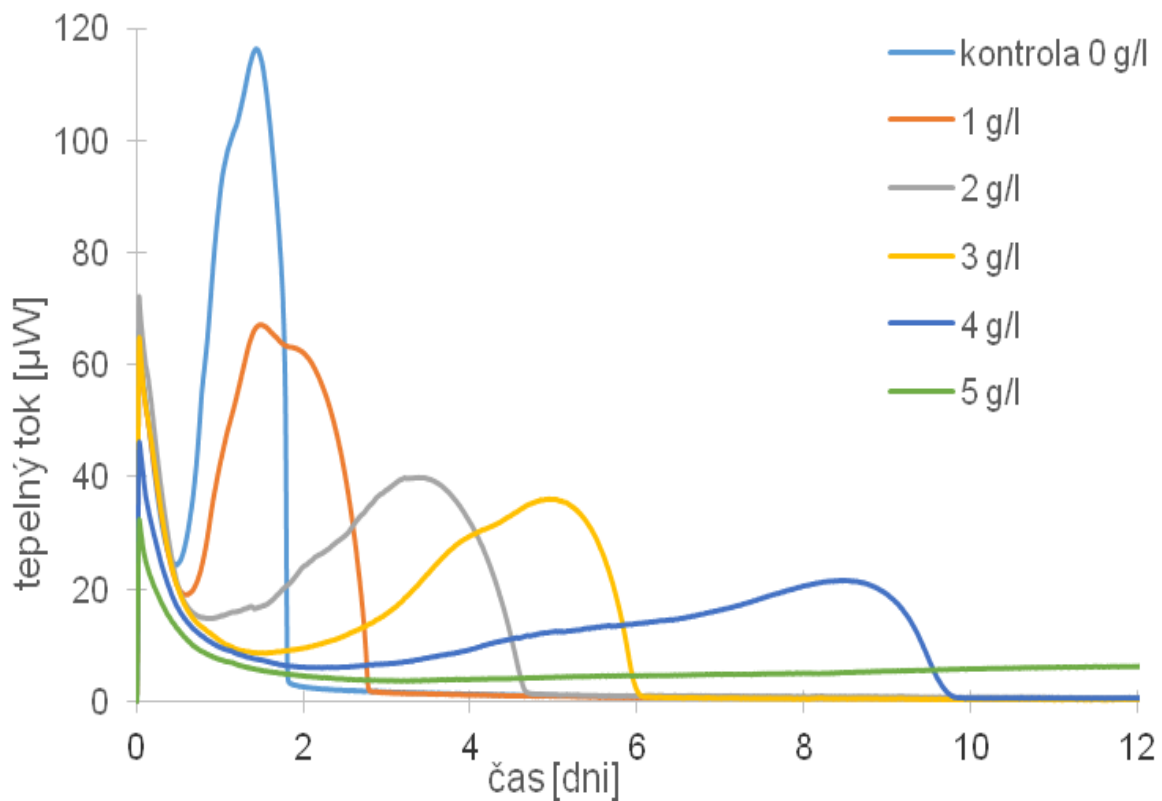
Zo závislosť vyprodukovaného tepla na čase pozorujeme, že baktéria *Cupriavidus necator* PHB⁴ je schopná vyprodukovať prakticky rovnaké maximálne teplo pri všetkých použitých koncentráciách. Baktériam trvá rôzne dlho kým sa adaptujú sa danú koncentráciu kyseliny levulovej, preto hodnotu maximálneho tepla dosahujú v rozličnom čase.



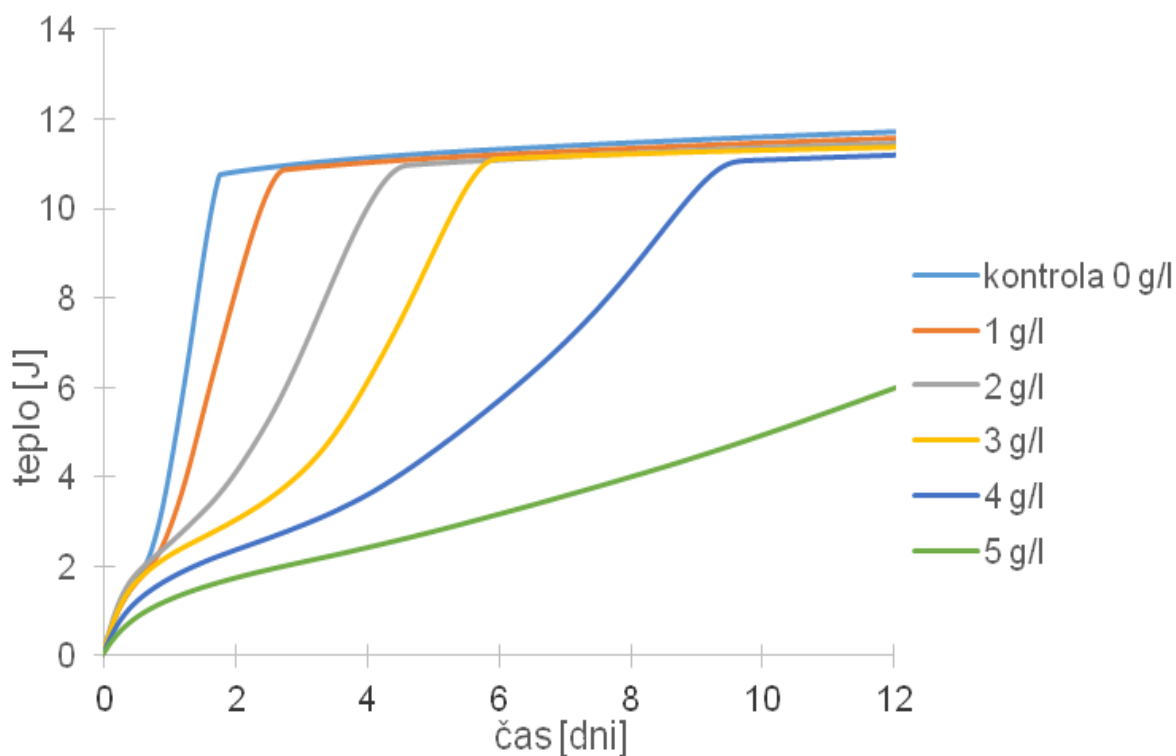
Obr. 21: Závislosť vyprodukovaného tepla na čase pre baktériu *Cupriavidus necator* PHB⁴ bez kyseliny levulovej (červená krivka) a pri koncentráciách kyseliny levulovej v rozmedzí od 0,5 g/l do 1 g/l

Inhibičný efekt kyseliny levulovej môžeme pozorovať na Obr. 22, kde svetlo modrou farbou je kontrola bez prítomnosti kyseliny levulovej. Zvyšovaním koncentrácie kyseliny levulovej dochádza k zvýšeniu času potrebného k adaptácii baktérii, k zníženiu metabolickej aktivity a k poklesu maximálneho tepelného toku. Koncentrácia 5 g/l má pre baktériu najsilnejší inhibičný efekt z vybraných použitých koncentrácií. Metabolická aktivita baktérie pri tejto koncentrácii (5 g/l) nie je dostatočne vysoká aby bola zaznamenaná mikrokalorimetrom ako nárast tepelného toku.

Maximálne vyprodukované teplo, ktorého priebeh v čase je znázornený na Obr. 23, bolo dosiahnuté pri kontrole a pri koncentráciách v rozmedzí 1 až 4 g/l. Baktérie sa adaptujú tým, že metabolizujú kyselinu levulovú a využívajú ju pre svoj rast. S rastúcou koncentráciou kyseliny levulovej sa zvyšuje potrebný čas pre adaptáciu na kyselinu levulovú a dosiahnutie maximálneho tepla. Pri koncentráciách 1 až 4 g/l je dosiahnuté rovnaké relatívne množstvo tepla ako celkové teplo kontroly a adaptované baktérie majú rovnakú mieru metabolickej aktivity ako kontrola (Obr. 23). Pri koncentrácii 5 g/l nebol pozorovaný nárast tepelného toku v dôsledku rastu, čo neplatí pre teplo, kde hodnota vyprodukovaného tepla v 12 dni bola 6 J čo činí takmer polovicu maximálne tepla vyprodukovaného pri kontrole (11,7 J).



Obr. 22: Závislosť tepelného toku na čase baktérie *Cupriavidus necator* PHB⁴ bez kyseliny levulovej ako kontroly (svetlo modrá krivka) a v prítomnosti koncentrácií kyseliny levulovej v rozsahu od 1 g/l do koncentrácie 5 g/l



Obr. 23: Závislosť vyprodukovaného tepla na čase pre baktériu *Cupriavidus necator* PHB⁴ bez kyseliny levulovej (svetlo modrá krivka) a pri koncentráciach kyseliny levulovej v rozmedzí od 1 g/l do 5 g/l

Cupriavidus necator PHB⁴ slúžil ako negatívna kontrola, ktorá nemá metabolickú cestu k produkcii PHB. Publikované výsledky experimentov založených na porovnávaní týchto dvoch kmeňov poukazujú na odolnosť bakteriálnych buniek voči rôznym stresovým podmienkam (najmä fyzikálnym stresom) vďaka intracelulárnej akumulácii a degradácii PHB (viď. [29, 30, 75]). Výsledky porovnania dĺžok adaptačných fázy a celkového tepla vyprodukovaného baktériami CN H16 a CN PHB⁴ po 14 dňoch merania (Tab. 5) poskytujú tieto informácie:

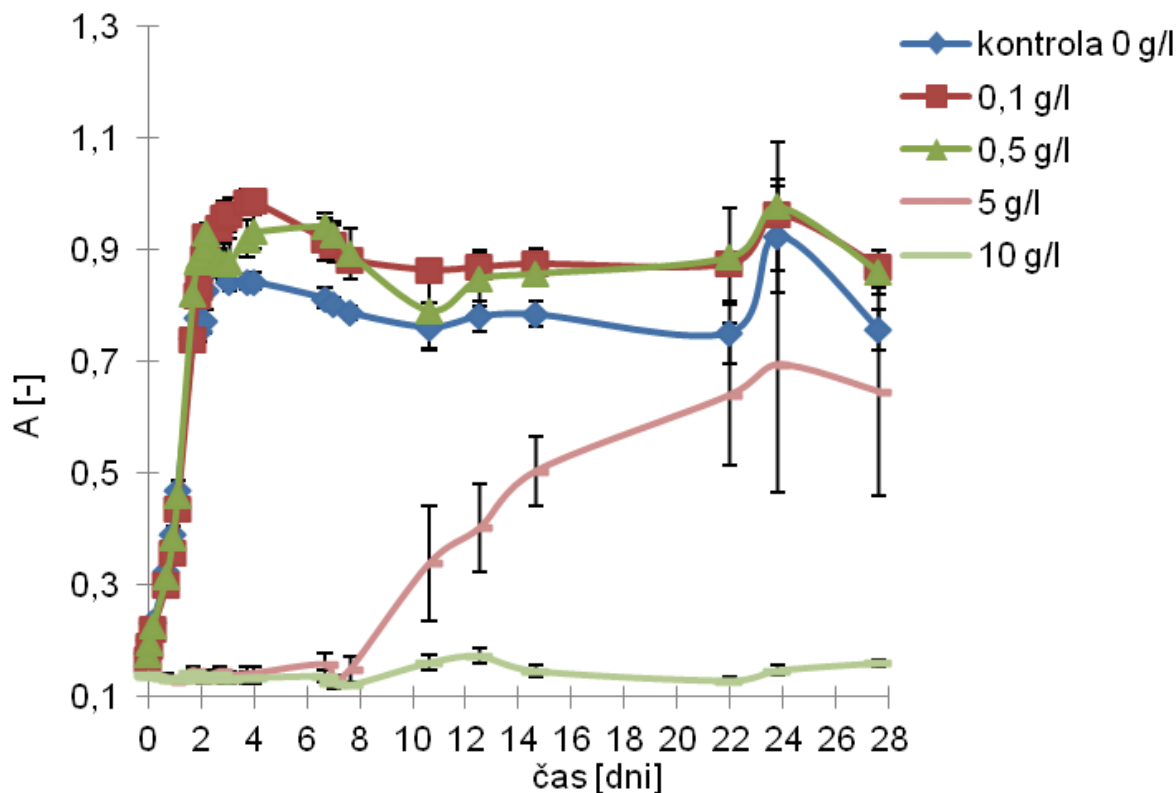
- vyššie koncentrácie LA vedú k pomalšej adaptácii a dĺžka adaptačnej fázy narastá strmšie v prípade mutantného kmeňa, napr. adaptácia 2 g/l je skoro trojnásobne dlhšia ako lag fáza pri kontrole, kdežto pri CN H16 je nárast miernejší a porovnaním s kontrolou pri 2 g/l sa dĺžka adaptácie zvýšila o 30 %;
- celkové vyprodukované teplo je pri CN H16 sice nižšie, avšak pred experimentom nebol zistený počet buniek vo vzorke, preto nie je isté, že tento kmeň má nižšiu metabolickú aktivitu;
- porovnaním relatívneho vyprodukovaného tepla pri rôznych koncentráciach vzhľadom ku kontrole sme zistili, že metabolická aktivita baktérii sa vplyv LA výrazne neznížila a napr. koncentrácia 4 g/l viedla k menej ako 5 % poklesu celkového tepla

Z týchto výsledkov môžeme predpokladať, že baktéria CN H16 sa rýchlejšie adaptuje na kyselinu levulovú vďaka jej metabolickým dráham, ktoré vedia kyselinu využiť ako zdroj uhlíka a energie pre rast a akumuláciu PHB, ktorý má pozitívny vplyv na adaptáciu a prežívanie baktérii. Kyselina levulová má vplyv na dĺžku adaptácie, ale neovplyvňuje mieru metabolickej aktivity ani pri jednom zo porovnávaných kmeňov.

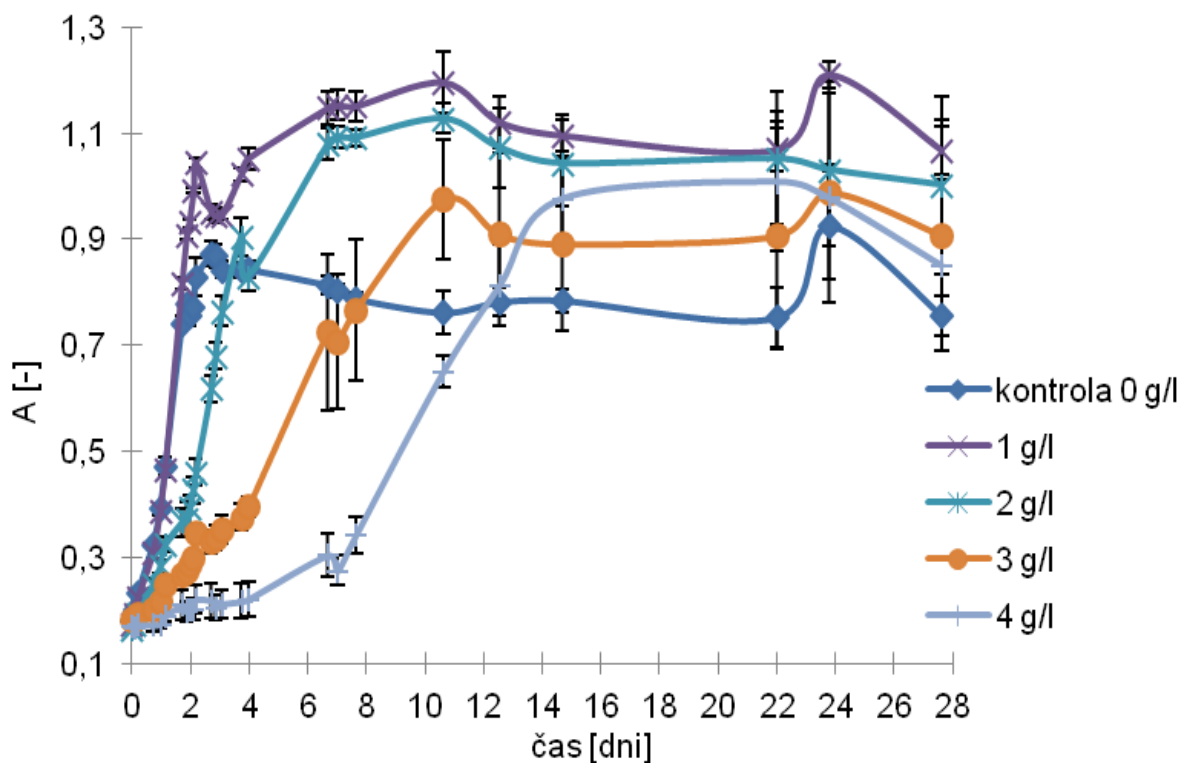
Tab. 5: Porovnanie doby adaptácie a celkového tepla vyprodukovaného po 14 dňoch merania pre baktérie *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB⁴ kontroly a koncentracii 1,2,3 a 4 g/l

koncentrácia [g/l]	CN H16		CN PHB ⁴	
	doba adaptácie [hod]	celkové teplo [J]	doba adaptácie [hod]	celkové teplo [J]
kontrola 0	22,3	11,3	19,4	11,8
1	21,8	11,3	24,9	11,6
2	28,5	11,4	53,0	11,5
3	53,2	10,8	76,9	11,4
4	103,3	10,8	114,8	11,3

Predĺžovanie lag fázy pri rastových krivkách baktérie *Cupriavidus necator* PHB⁴ (Obr. 24, Obr. 25) nekoreluje so zvyšovaním koncentracii kyseliny levulovej ako je to pri mikrokolorimetrickom meraní. Negatívny vplyv LA pozorujeme až pri koncentraciách vyšších ako 1 g/l, pričom pri mikrokolorimetrickom meraní 1 g/l má mierny inhibičný účinok a doba adaptácie v porovnaní s kontrolou je dlhšia. Pri vyšších koncentraciách nad 1 g/l, baktéria *Cupriavidus necator* metabolizuje kyseliny levulové a využíva ju ako zdroj uhlíku pre svoj rast, čo odpovedá stále zvyšujúcej sa hodnote absorbancie. Nárast absorbancie pri koncentracii 5 g/l pozorujeme približne po 8 dňoch pričom nárast absorbancie stále pokračoval. Výsledky mikrokolorimetrie poukazujú na produkciu tepla počas rastu (Obr. 23), ale miera metabolickej aktivity nie je dostatočne vysoká, aby bol pozorovaný nárast tepelného toku v čase (Obr. 22). Tento nárast absorbancie však môže byť ovplyvnený tiež prítomnosťou mŕtvych buniek, ktoré sa úplne nerozpadli.



Obr. 24: Rastová krivka baktérie *Cupriavidus necator* PHB⁴ v prítomnosti koncentracii kyseliny levulovej (0,1; 0,5; 5 a 10 g/l) a bez kyseliny levulovej ako kontroly (tmavo modrá krivka)

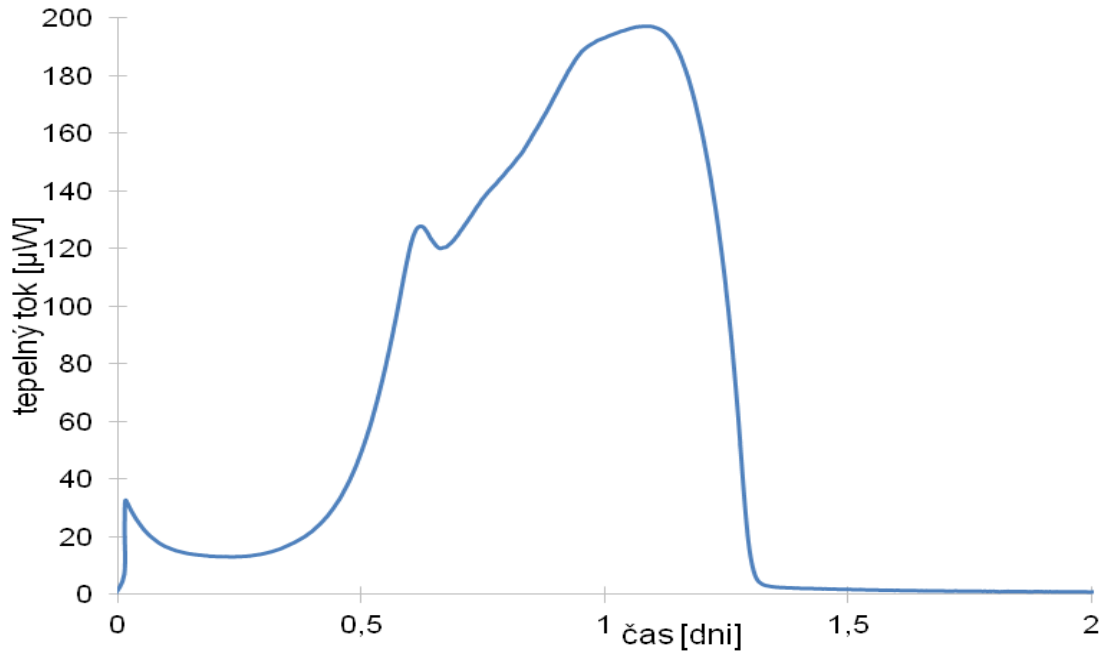


Obr. 25: Rastová krivka baktérie *Cupriavidus necator* PHB⁴ v prítomnosti koncentrácií kyseliny levulovej (1 g/l až 4 g/l) a bez kyseliny levulovej ako kontroly (tmavo modrá krivka)

5.3 Vplyv kyseliny levulovej na rast baktérie *Halomonas halophila*

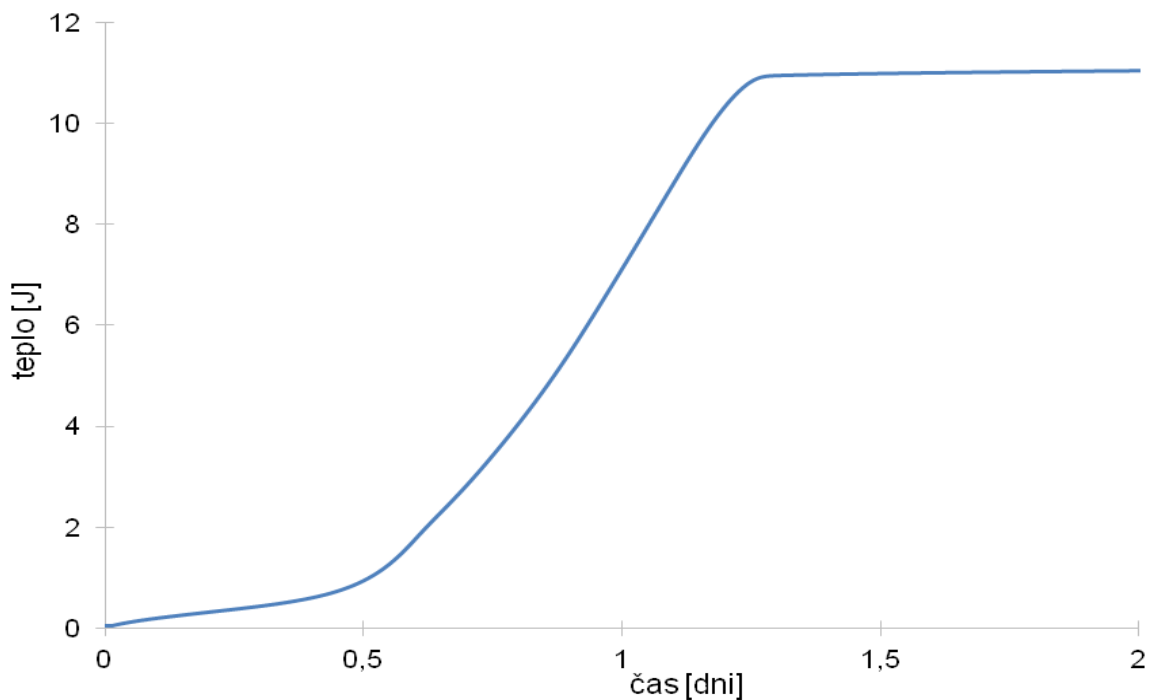
5.3.1 Inhibícia kyselinou levulovou

Postup práce pri inhibícii kyselinou levulou u baktérie *Halomonas halophila* (HH) bol rovnaký ako pri baktérii *Cupriavidus necator* (CN). Na Obr. 26 závislosť tepelného toku na čase, ktorý zaznamenáva adaptáciu baktérie na prítomné substráty. Prvotný ostrý nárast tepelného toku bol opäť spôsobený vloženíím ampulky do meriacej cely a nepripisujeme ho metabolizmu baktérie. Po vložení dochádza k poklesu tepelného toku v dôsledku metabolickej aktivity baktérie počas lag fázy. Po lag fáze dochádza k zvýšeniu metabolickej aktivity využitím substrátu k rastu, pričom dochádza k nárastu tepelného toku na hodnotu 130 μ W. Tepelný tok následne mierne klesne a následne opäť rastie približne do hodnoty 200 μ W, po ktorej dochádza k strmému poklesu tepelného toku odumieraním buniek späť na základnú líniu a hodnota tepelného toku ostáva konštantná. Porovnaním kontroly s kontrolou CN H16 (Obr. 8) u oboch baktérii pozorujeme prítomnosť dvoch píkav počas rastu a zároveň vidíme, že hodnoty tepelného toku pri HH sú vyššie čo môže byť prejavom zvýšenej citlivosti mikrokalorimetrie k štúdiu použitých halofilných baktérii. Vyššia hodnota tepelného toku však môže byť aj prejavom vyššej koncentrácie buniek vo vzorkách HH, takže nie sme schopní vyvodit' presný záver z týchto výsledkov.



Obr. 26: Závislosť tepelného toku na čase baktérie *Halomonas halophila* v prítomnosti NaCl pre kontrolu

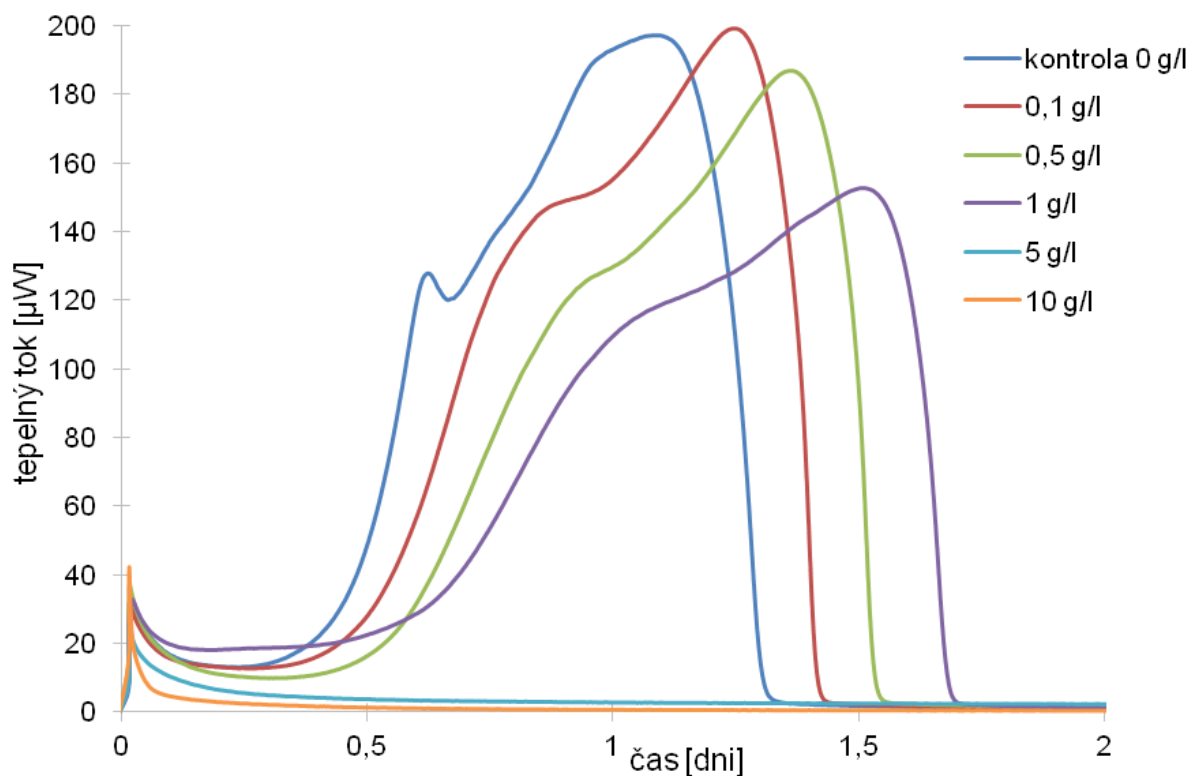
Závislosť tepla na čase znázorňuje mieru metabolickej aktivity počas adaptácie, kde v približne 0,5 dňa bol nárast tepla pomalý a nízky rovnako ako pri zázname tepelného toku (Obr. 27). Približne v polke dňa došlo k rýchlemu nárastu tepla vyprodukovaného počas rastu. Maximálna hodnota tepelného toku bola dosiahnutá približne v 1,2 dni čo odpovedá hodnote maximálneho vyprodukovaného tepla v rovnakom čase. Po 1,2 dni baktérie postupne odumierali čo nemalo vplyv na vyprodukované teplo, pretože jeho maximálna hodnota ostala naďalej konštantná.



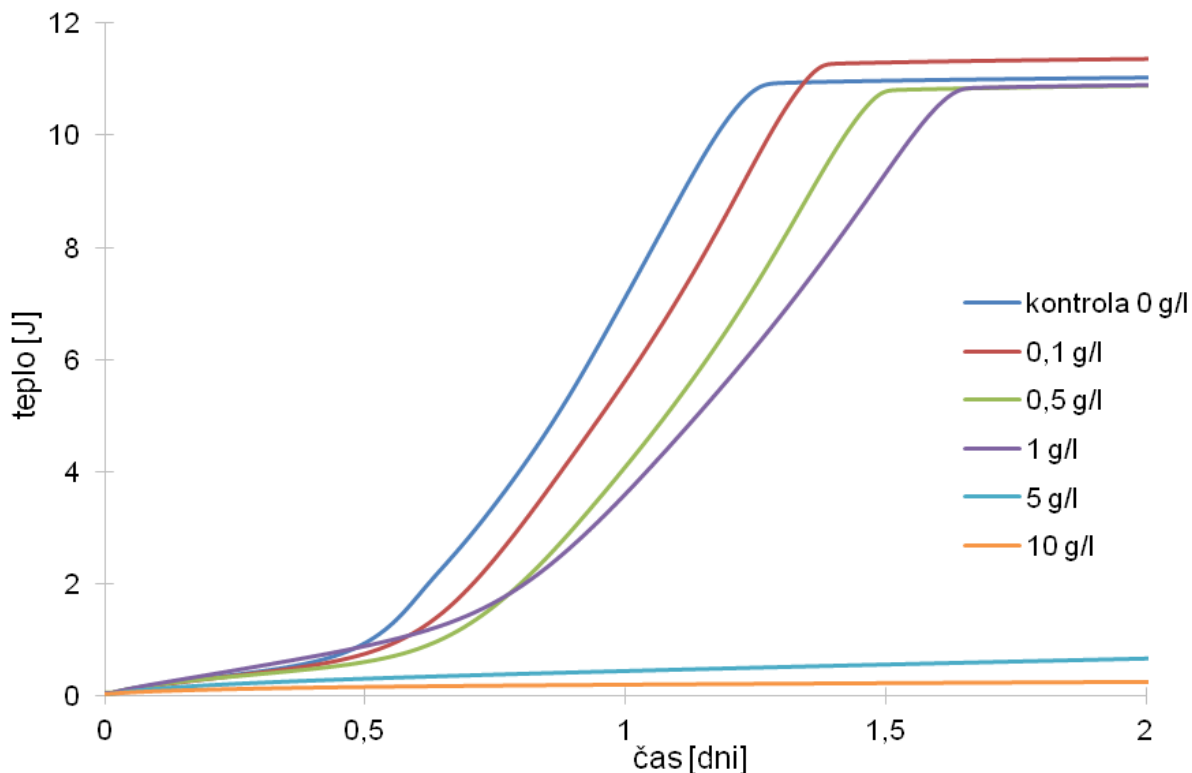
Obr. 27: Závislosť tepla na čase baktérie *Halomonas halophila* v prítomnosti NaCl pre kontrolu

Prvotný screening zobrazený na Obr. 28 poskytuje prvotný náhľad, z ktorého môžeme vidieť, že *Halomonas halophila* je citlivejšia na prítomnosť kyseliny levulovej už i pri nízkych koncentráciach hoci profil metabolickej krivky je pri týchto koncentráciach rovnaký ako pri kontrole (prítomnosť dvoch píkov). Zo zvyšujúcou sa koncentráciou dochádza k adaptácii baktérie na kyselinu levulovú predĺžovaním adaptačnej fázy. Koncentrácie 5 g/l a 10 g/l majú silný inhibičný efekt na rast a ďalšiu metabolickú aktivitu baktérie.

Celkové vyprodukované teplo, ktorého priebeh je zobrazený na Obr. 29 nám poskytuje informáciu o miere metabolickej aktivity, kde červenou farbou je koncentrácia 0,1 g/l, pri ktorej pozorujeme vyššie vyprodukované celkové teplo, ktoré môže byť prejavom vyššej metabolickej aktivity adaptovaných baktérii alebo aktivačným vplyvom tejto nízkej koncentrácie LA. Adaptované baktérie pri koncentráciach do 1 g/l boli metabolicky menej aktívne ako kontrola a LA mala mierny inhibičný vplyv na ich metabolizmus. Vyššie koncentrácie boli natoľko inhibičné, že prítomné baktérie buď odumreli alebo sa na prítomnosť LA prispôbili odmedzením alebo úplným spomalením svojej metabolickej aktivity.

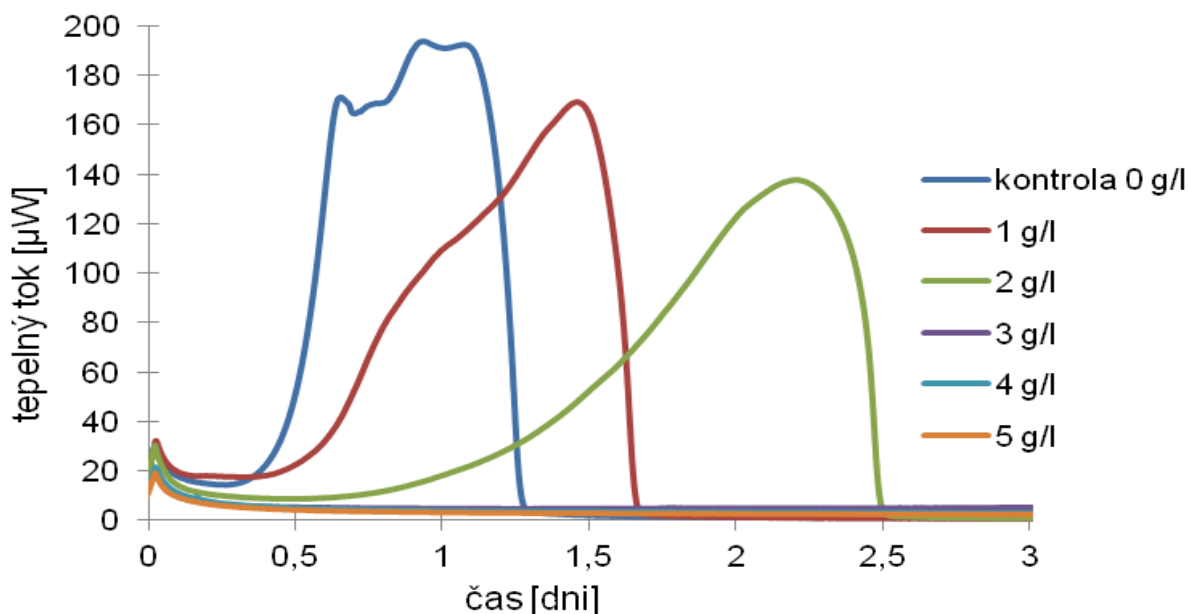


Obr. 28: Závislosť tepelného toku na čase baktérie *Halomonas halophila* v prítomnosti NaCl s koncentračným rozmedzím kyseliny levulovej od 0,1 g/l do 10 g/l a kontrolou (červená krivka)



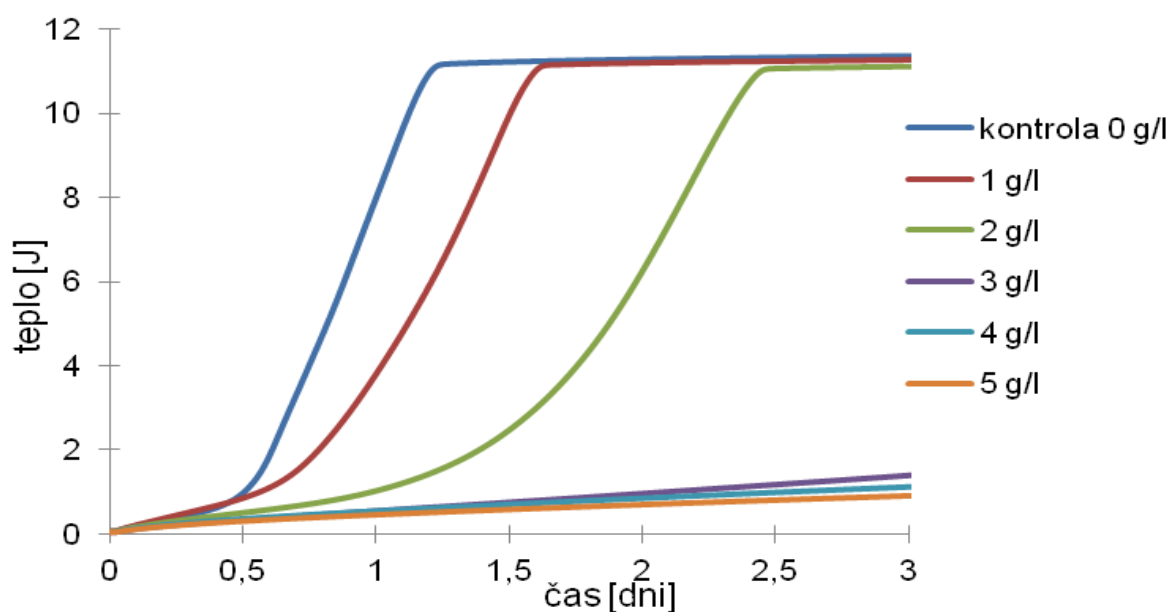
Obr. 29: Závislosť celkového tepla na čase baktérie *Halomonas halophila* v prítomnosti NaCl bez kyseliny levulovej a koncentračného rozmedzia kyseliny levulovej od 0,1 g/l do 10 g/l

K silnej inhibícii kyselinou levulovou dochádza medzi koncentráciou 1 g/l a 5 g/l rovnako ako pri baktérii *Cupriavidus necator*. Na Obr. 30 vidíme závislosť tepelného toku na čase baktérie *Halomonas halophila* v prítomnosti NaCl a v koncentračnom rozmedzí kyseliny levulovej 1-5 g/l, kde tmavo modrá krivka odpovedá kontrole (bez kyseliny levulovej), pri ktorej pozorujeme nárast tepelného toku v dôsledku rastu a metabolicky aktívnych baktérii. Pri koncentráciach 1 g/l (červená krivka) a 2 g/l (zelená krivka) pozorujeme adaptáciu baktérie na prítomnosť kyseliny levulovej a aj tu platí priama úmera, kde s rastúcou koncentráciou sa predlžuje doba adaptácie – baktérie musia obmedziť energiu pre reprodukciu, znížiť metabolickú aktivitu a využiť prítomné zdroje živín pre svoj rast. Koncentrácie vyššie ako 2 g/l sú pre *H. halophila* veľmi inhibičné a baktéria nie je schopná sa na tieto koncentrácie adaptovať. Samotné meranie trvalo 8 dní, avšak ani po tak dlhom čase nedošlo k nárastu tepelného toku, ktorý by signalizoval rast baktérii. Baktérie sú schopné prispôbiť sa a rásť len do koncentrácie 2 g/l. Pri vyšších koncentráciach baktérie spomalia svoj metabolizmus a vďaka prítomnému peptonu prežívajú až do jeho vyčerpania.



Obr. 30: Závislosť tepelného toku na čase baktérie *Halomonas halophila* v prítomnosti NaCl a v koncentračnom rozmedzí kyseliny levulovej 1-5 g/l, kde tmavo modrá krivka odpovedá kontrole (bez kyseliny levulovej)

Zo závislosti tepla na čase opäť pozorujeme schopnosť adaptovaných baktérií vyprodukovať maximálne teplo pri vzorkách do 2 g/l odpovedajúce kontrole, čo znamená, že adaptované baktérie majú rovnakú celkovú mieru metabolickej aktivity a prítomnosť LA ju neznižuje (Obr. 31). S rastúcimi koncentraciami pozorujeme zmenu v profile krivky, kde s postupnou adaptáciou dochádza k predĺžovaniu nárastu tepla vplyvom adaptácie, čo sa prejavuje postupným ohýbaním krivky. Pri koncentráciach vyšších ako 2 g/l vyprodukované teplo je veľmi malé z čoho môžeme predpokladať, že prítomné baktérie obmedzili svoju metabolickú aktivitu na minimum a všetku energiu využili pre svoj rast.



Obr. 31: Závislosť tepla na čase baktérie *Halomonas halophila* v prítomnosti NaCl a v koncentračnom rozmedzí kyseliny levulovej 1-5 g/l, kde tmavo modrá krivka odpovedá kontrole (bez kyseliny levulovej)

Zo závislosti tepla na čase boli pre všetky tri použité baktérie vypočítané doby adaptácie, ktoré sa spolu s celkovým vyprodukovaným teplom po 9 dňoch merania nachádzajú v Tab. 6 pre HH a v Tab. 5 pre CN. Porovnaním doby adaptácie sme zistili, že:

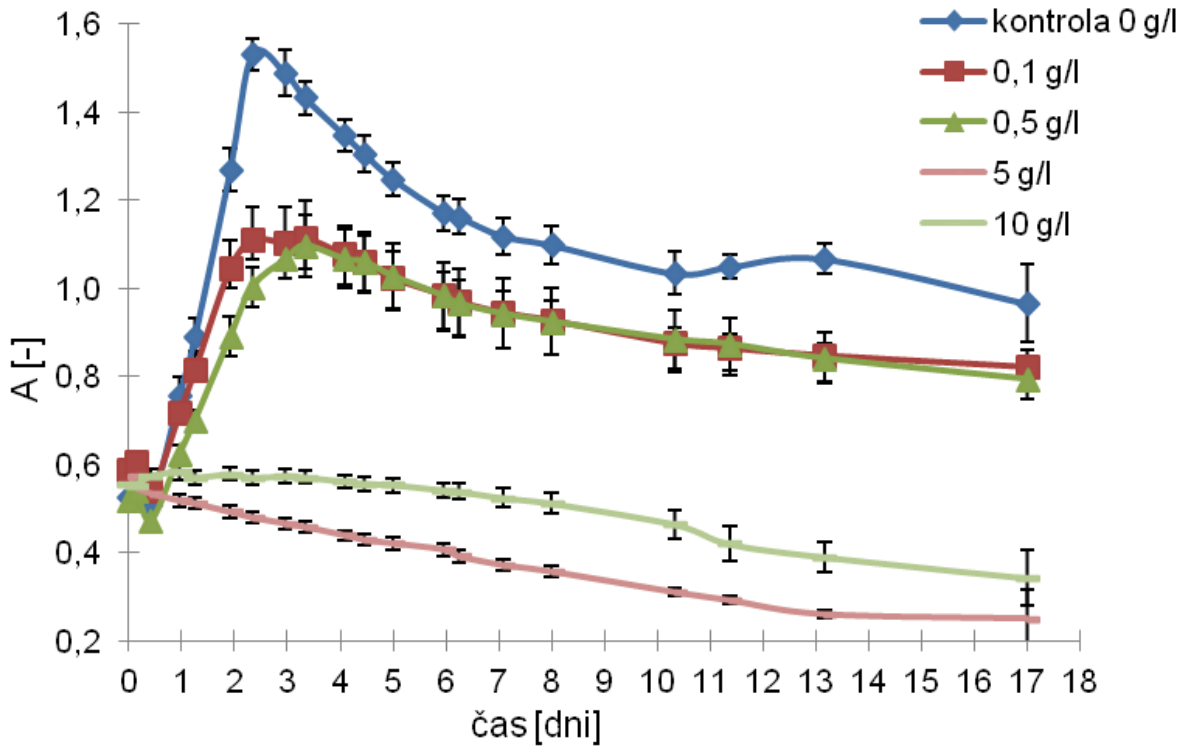
- porovnaním kontrol vidíme, že HH ako extrémofil má odlišný metabolizmus a k jej rastu dochádza skoro o polovicu kratší čas ako v prípade CN;
- nárast doby potrebnej pre adaptáciu s koncentráciami LA je pri HH zreteľnejší a relatívny začiatok rastu pri prvých dvoch koncentráciach vzhľadom ku kontrole odpovedá relatívnym dĺžkam adaptácie CN PHB⁻⁴, napr. pri 2 g/l relatívna doba adaptácie vzhľadom ku kontrole je vyššia o 150 % pri HH, o 173 % pri mutantom kmeni CN PHB⁻⁴ a len o 28 % pri CN H16.

Porovnaním relatívneho vyprodukovaného tepla vzhľadom ku kontrole bolo opäť zistené, že baktérie HH neutrácajú svoju metabolickú aktivitu vplyvom kyseliny levulovej a pokles pri 2 g/l je pri všetkých troch baktériach menší ako 4 % celkového vyprodukovaného tepla jednotlivým kmeňom. Z výsledkov môžeme predpokladať, že metabolizmus CN H16 je zo skúmaných baktérií najviac prispôsobený pre spracovanie a využitie LA ako substrátu pre svoj rast.

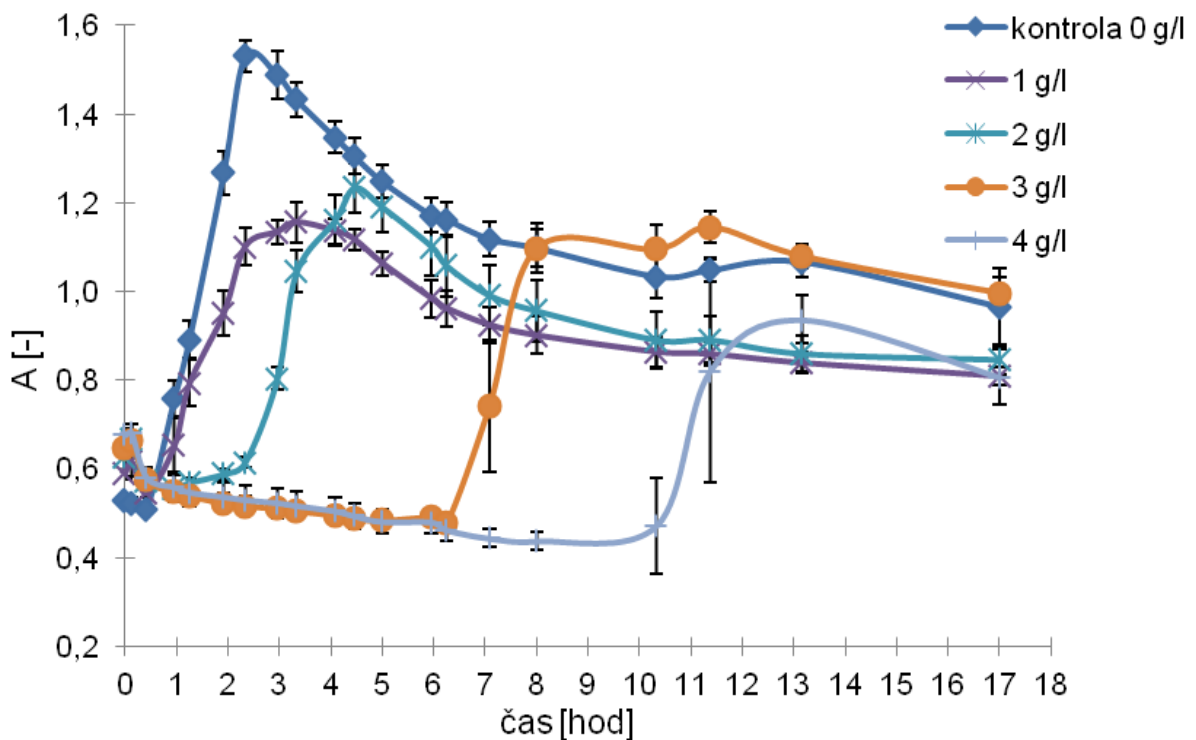
Tab. 6: Porovnanie dĺžky adaptácie a celkového vyprodukovaného tepla po 9 dňoch merania pre všetky tri baktérie

koncentrácie [g/l]	<i>Halomonas halophila</i>	
	doba adaptácie [hod]	celkové teplo [J]
kontrola 0	13,2	11,7
1	18,5	11,5
2	33,6	11,3

Rastové krivky *Halomonas halophila* zobrazené na Obr. 33 a Obr. 33 potvrdzujú rast baktérii pri koncentráciách do 4 g/l, pričom táto koncentrácia je pre ňu inhibičná a baktérie potrebuje výrazne dlhší čas na adaptáciu vyšších koncentrácií ako 1 g/l. Baktéria nie je schopná adaptovať sa na vyššie koncentrácie ako 4 g/l, pri ktorých nedochádza k rastu, ale postupnému odumieraniu buniek. Porovnaním s rastovou krivkou baktérie *Cupriavidus necator* H16 alebo PHB⁻⁴ pozorujeme silnejší inhibičný efekt kyseliny levulovej pri baktérii *Halomonas halophila*, ktorá je schopná adaptovať sa len na koncentrácie do 4 g/l, pričom *Cupriavidus necator* je schopný adaptovať sa a rásť až do koncentrácie 5 g/l. Tento rozdiel v limitnej koncentrácii môže byť spôsobený odlišným metabolizmom baktérii a schopnosťou metabolizovať kyselinu levulovú ako zdroj uhlíka pre svoj rast.



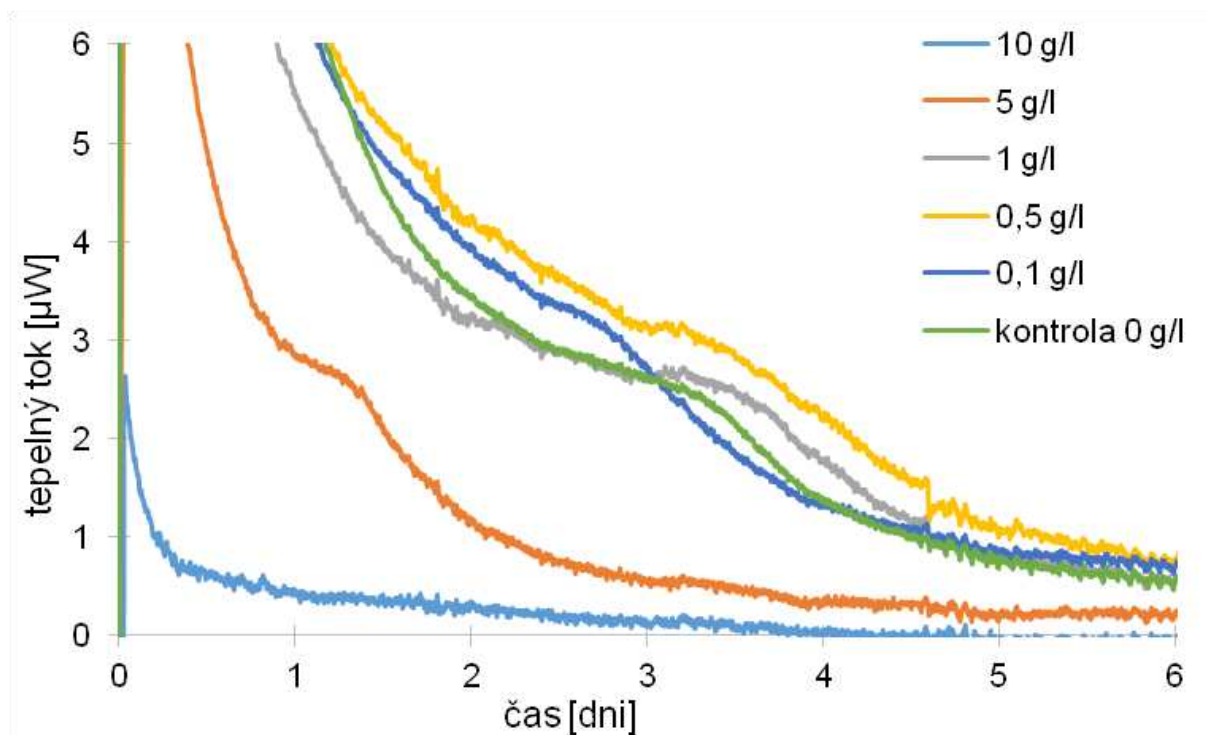
Obr. 32: Rastové krivky *Halomonas halophila* v prítomnosti NaCl a koncentracii kyseliny levulovej od 0,1; 0,5; 5 a 10 g/l, kde tmavo modrá krivka je kontrola (bez kyseliny levulovej)



Obr. 33: Rastové krivky *Halomonas halophila* v prítomnosti NaCl a koncentračnom rozmedzí kyseliny levulovej od 1 g/l do 4 g/l, kde tmavo modrá krivka je kontrola (bez kyseliny levulovej)

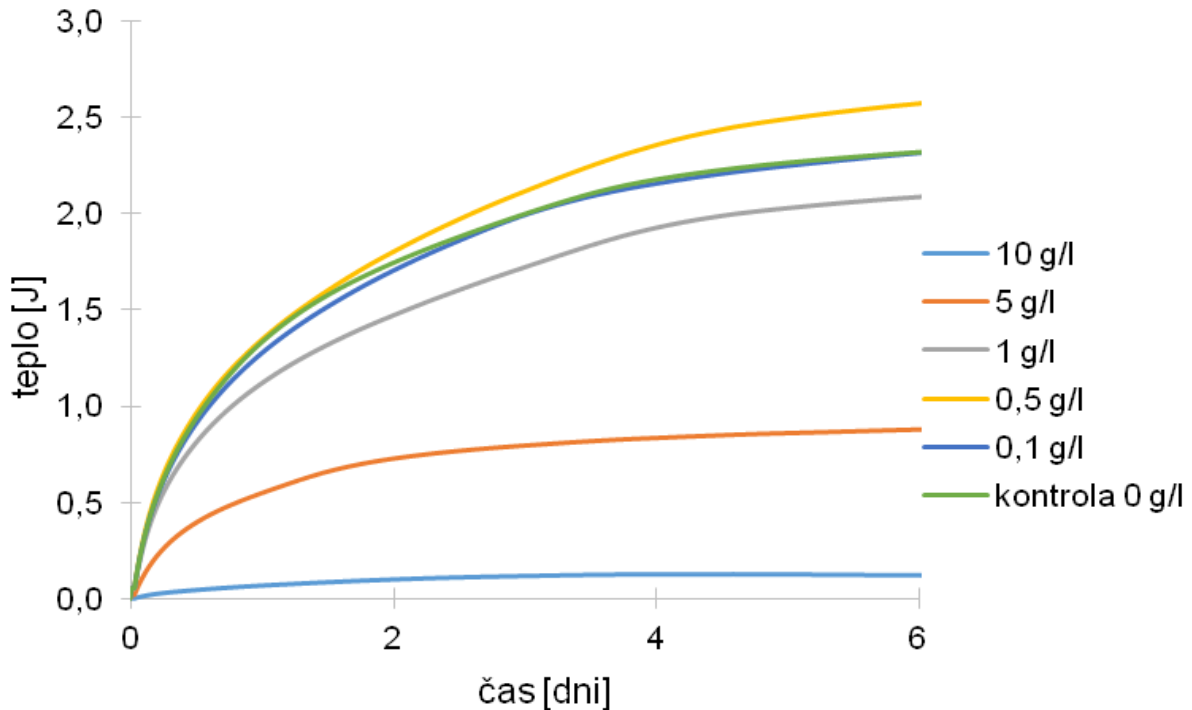
5.3.2 Inhibícia kyselinou levulovou a nízkou salinitou

V kapitole 5.3.1 *Halomonas halophila* bola v prostredí o vysokej salinite, v ktorom je metabolicky aktívna a dochádza k jej rastu. Pre porovnanie metabolicky aktívnych a neaktívnych baktérii bola v ďalšom experimente pridaný negatívny vplyv nízkej salinity (vzorky neobsahovali prídavok chloridu sodného) za predpokladu, že *Halomonas halophila* nebude schopná rásť a jej metabolická aktivita sa spomalí až úplne zastaví. Výsledky zobrazené na Obr. 34 potvrdili, že v prostredí bez chloridu sodného *Halomonas* znižuje svoju metabolickú aktivitu na minimum - tepelný tok sa postupne znižuje s nárastom mŕtvych buniek. Koncentrácie kyseliny levulovej do 5 g/l majú podobný priebeh ako kontrola, z čoho môžeme usúdiť, že baktérie neboli schopné metabolizovať prítomný pepton a kyselinu levulovú a využiť ich ako zdroj energie. Oranžová krivka patrí koncentrácii 5 g/l, ktorej priebeh je od kontroly odlišný a spomalenie až úplne obmedzenie metabolickej aktivity pri tejto koncentrácii je výraznejšie a dochádza k tomu skôr – odumieranie baktérii pri tak vysokej koncentrácii začalo skôr ako pri nižších koncentráciach.



Obr. 34: Závislosť tepelného toku na čase baktérie *Halomonas halophila* bez prítomnosti chloridu sodného a s koncentraciami kyseliny levulovej v rozmedzí od 10 g/l do 0,1 g/l, pričom zelená krivka odpovedá kontrole (bez kyseliny levulovej)

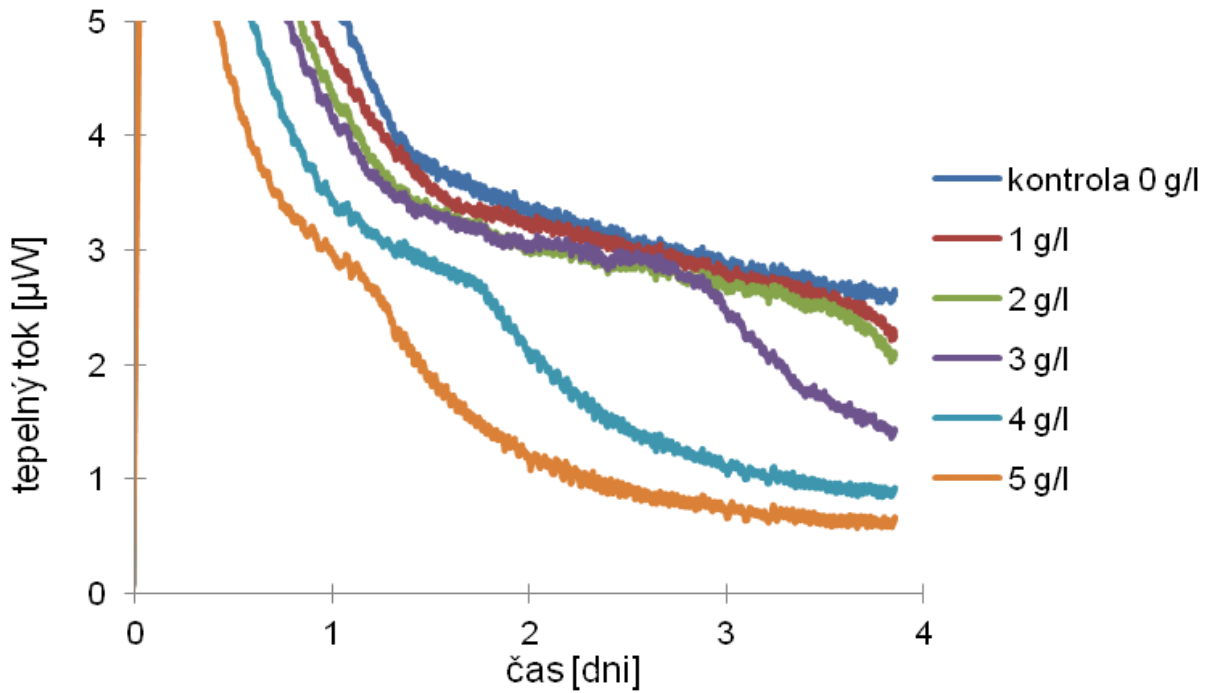
Na Obr. 35 porozujem závislosť tepla na čase bez prítomnosti NaCl a s koncentraciami kyseliny levulovej v rozmedzí od 10 g/l do 0,1 g/l, pričom zelená krivka odpovedá kontrole (bez kyseliny levulovej). Z výsledkov pozorujeme, že baktérie počas prežívania vyprodukovali teplo o hodnote približne 3 J a bez prítomnosti potrebnej soli baktérie spomalili svoj metabolizmus a adaptovali sa daným podmienkam tak, aby boli schopné prežiť čo najdlhšie.



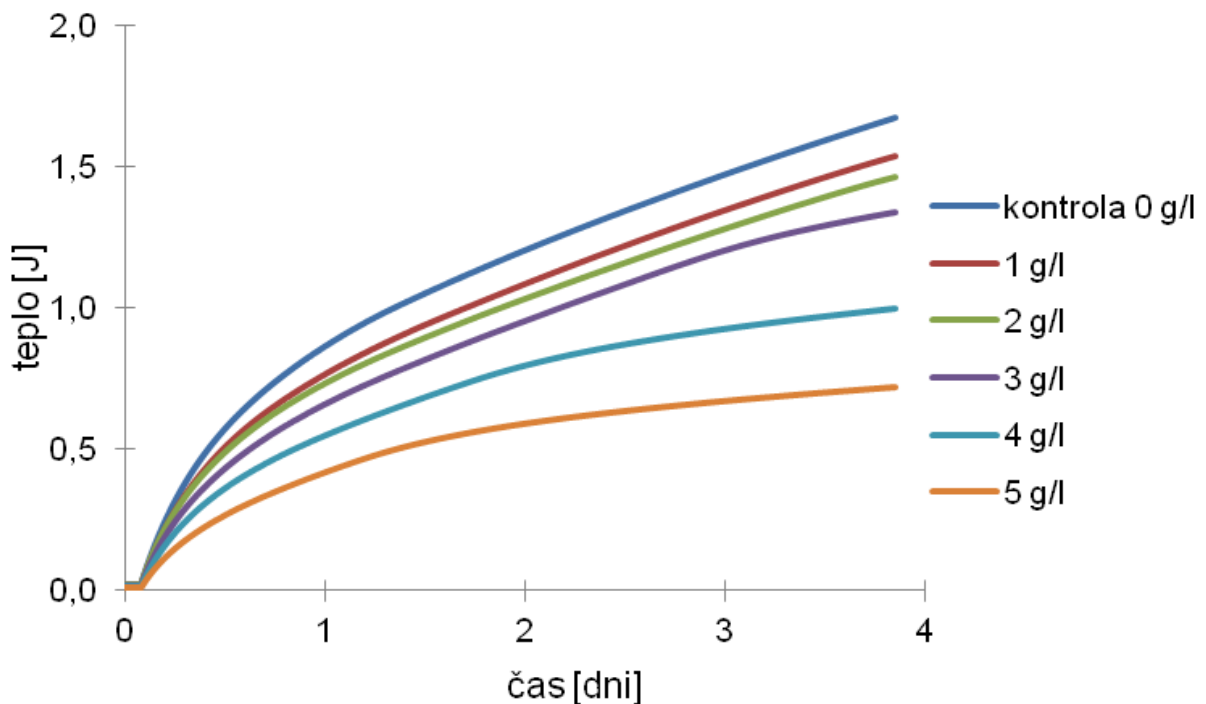
Obr. 35: Závislosť tepla na čase baktérie *Halomonas halophila* bez prítomnosti chloridu sodného a s koncentraciami kyseliny levulovej v rozmedzí od 10 g/l do 0,1 g/l, pričom zelená krivka odpovedá kontrole (bez kyseliny levulovej)

V koncentračnom rozmedzí 1-5 g/l (Obr. 36) pozorujeme postupný pokles tepelného toku s časom, počas ktorého boli baktérie v prítomnosti kyseliny levulovej a bez NaCl stále životaschopné a metabolicky aktívne. Najnižšie dve koncentrácie sú porovnateľné s kontrolnou vzorkou v dĺžke prežívania, kde prítomnosť kyseliny levulovej výrazne neovplyvnila spomalenie metabolickej aktivity životaschopných baktérii. Fialová krivka značí koncentráciu 3 g/l, pri ktorej boli baktérie životaschopné po dobu troch dní. Po troch dňoch došlo k postupnému poklesu tepelného toku s nárastom metabolicky neaktívnych baktérii. Koncentrácie 4 a 5 g/l mali silnejší inhibičný efekt, kde druhý pokles tepelného toku pozorujeme v priebehu prvých dvoch dní.

Z výsledkov na Obr. 37 pozorujeme postupný nárast celkového vyprodukovaného tepla s rastúcou koncentráciou kyseliny levulovej v rozmedzí od 1 do 5 g/l. Hodnoty prvých troch koncentracii a kontroly sú mierne vyššie ako zvyšných dvoch koncentracii, presne ako je to v prípade tepelného toku, ktorý začal klesať vplyvom odumierania buniek skôr.



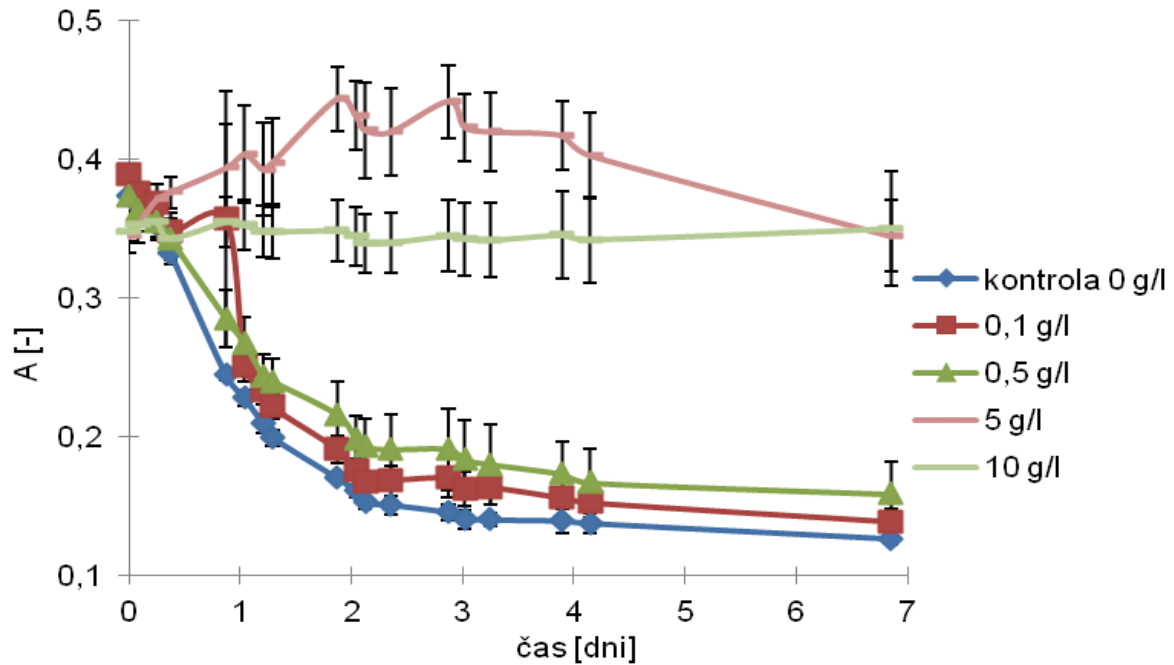
Obr. 36: Závislosť tepelného toku na čase baktérie *Halomonas halophila* bez prítomnosti chloridu sodného a s koncentraciami kyseliny levulovej v rozmedzí od 1 g/l do 5 g/l, pričom tmavo modrá krivka odpovedá kontrole (bez kyseliny levulovej)



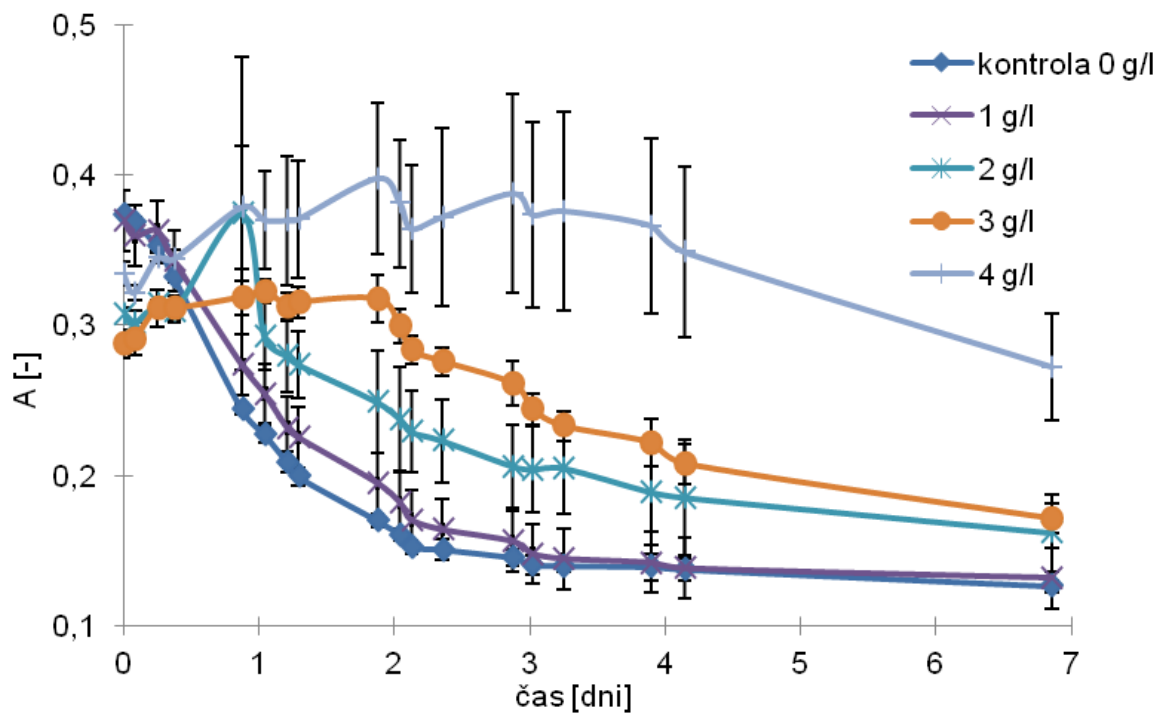
Obr. 37: Závislosť tepla na čase baktérie *Halomonas halophila* bez prítomnosti chloridu sodného a s koncentraciami kyseliny levulovej v rozmedzí od 1 g/l do 5 g/l, pričom tmavo modrá krivka odpovedá kontrole (bez kyseliny levulovej)

Mikrokalorimetrické výsledky sú v súlade s rastovými krivkami baktérie (Obr. 38, Obr. 39), na ktorých pozorujeme pokles absorbancie pri kontrole a koncentráciach do 3 g/l v dôsledku postupného vyčerpania živín potrebných pre rast. Pri koncentráciach 4 g/l a 5 g/l najprv dochádza k mierneho nárastu a poklesu absorbancie podobne ako pri poklese tepelného

toku pri mikrokolorimetrii. Ďalší nárast a pokles absorbančii pravdepodobne už nesúvisí s rastom, ale s prítomnosťou mŕtvych buniek, ktoré sa úplne nerozpadli. Silný inhibičný efekt mala koncentrácia 10 g/l, pri ktorej neboli baktérie dlho životaschopné (absorbancia sa v priebehu merania výrazne nezmenila – nedošlo ani k jej nárastu ani k strmému poklesu).



Obr. 38: Rastové krivky *Halomonas halophila* bez chloridu sodného a koncentráciach kyseliny levulovej 0,1; 0,5; 5 a 10 g/l a tmavo modrá krivka je kontrola (bez kyseliny levulovej)



Obr. 39: Rastové krivky *Halomonas halophila* bez chloridu sodného v koncentračnom rozmedzí kyseliny levulovej od 1 g/l do 4 g/l a tmavo modrá krivka je kontrola (bez kyseliny levulovej)

6 ZÁVER

Cieľom práce bolo otestovať využiteľnosť metód termickej analýzy k štúdiu vplyvu kyseliny levulovej na metabolickú aktivitu vybraných mikroorganizmov. Mikrokolorimetria vychádza zo skutočnosti, že všetky chemické reakcie zahŕňajú energetické zmeny, pri ktorých dochádza buď k uvoľňovaniu tepla (exotermická reakcia) alebo k absorpcii tepla (endotermická reakcia). Metabolická aktivita a rast mikroorganizmov sú spojená práve s uvoľňovaním tepla, vďaka čomu sme schopní toto uvoľnené teplo zaznamenávať pomocou mikrokolorimetra. Meraním vieme získať hodnotu celkového vyprodukovaného tepla, ktoré udáva mieru metabolickej aktivity. Zo závislosti tepelného toku na čase vieme sledovať inhibičný efekt kyseliny levulovej na rast baktérii.

Na experimentálnu prácu boli vybraté tri modelové mikroorganizmy – mezofilná baktéria *Cupriavidus necator* H16, jeho mutantný kmeň *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ a extrémofilnú baktériu *Halomonas halophila*. CN H16 a HH produkujú PHA avšak sú schopné žiť v prostrediach s rôznou salinitou – vďaka čomu sme predpokladali rozdielny mechanizmus stresovej adaptácie. K posúdeniu úlohy PHA pri adaptácii sme použili mutantný kmeň CN PHB⁻⁴ neakumulujúci PHA. Všetky bakteriálne kmene patria medzi aeróbne mikroorganizmy, avšak baktérie neboli počas merania v mikrokolorimetrii miešané, preto bolo potrebné zvoliť vhodný objem kultúry k objemu vzduchu v 4 ml kalorimetrickej ampulke. Tento krok optimalizácie metódy bol nevyhnutný, aby nedochádzalo k rýchlemu odumieraniu baktérii vyčerpaním vzduchu a tým k nepresným výsledkom. Objem 1 ml kultúry sa osvedčil ako vhodný objem, pri ktorom bolo možné zaznamenávať metabolickú aktivitu baktérii počas desiatich dňoch bez toho, aby dochádzala k ich usmrteniu vyčerpaním vzduchu. Inhibičný efekt kyseliny levulovej bol sledovaný v koncentračnom rozmedzí od 0,1 g/l do 10 g/l. Adaptácia baktérii na vybrané koncentrácie kyseliny levulovej boli porovnané s kontrolnou vzorkou, ktorej obsah kyseliny levulovej bol 0 g/l.

Pri bakteriálnom kmeni *Cupriavidus necator* H16 bola pozorovaná adaptácia na koncentrácie kyseliny levulovej menšie ako 5 g/l, pri ktorých boli baktérie metabolicky aktívne a došlo k ich rastu. Baktérie počas rastu vyprodukovali rovnaké množstvo tepla ako kontrola a metabolická aktivita nebola znížená prítomnosťou LA. S rastúcou koncentráciou kyseliny levulovej sa doba adaptácie predlžuje a tým aj čas, za ktorý boli baktérie schopné vyprodukovať celkové teplo. Koncentrácia 5 g/l má silný inhibičný účinok a baktérie spomaľujú metabolickú aktivitu natoľko, že počas merania nedochádza k výraznému nárastu tepelného toku v dôsledku rastu. Metabolická aktivita sa spomalí a vyprodukované teplo po 14 dňoch činí 37 % tepla kontroly, pričom adaptované baktérie využívajú všetku energiu a zdroje živín pre svoj rast. Úplný inhibičný účinok na metabolickú aktivitu i rast má koncentrácia 10 g/l, pri ktorej nie je pozorovaný nárast tepelného toku ani celkového tepla.

Vplyv kyseliny levulovej na *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ je veľmi podobný ako na PHA produkujúci kmeň *Cupriavidus necator* H16. *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ je rovnako schopný adaptovať sa na koncentrácie kyseliny levulovej do 5 g/l a zachovať si metabolickú aktivitu. S rastúcou koncentráciou kyseliny dochádzalo k neskoršiemu rastu vplyvom dlhšej adaptácie. Celkové vyprodukované teplo pri týchto koncentráciach bolo približne rovnaké a metabolická aktivita adaptovaných baktérii tak bola rovnako silná ako pri kontrole. Koncentrácia 5 g/l mala silný inhibičný účinok na metabolickú aktivitu a rast baktérii nebol pozorovaný v závislosti tepelného toku na čase. Baktérie po 14 dňoch vyprodukovali 59 % z celkového tepla vyprodukovaného kontrolou. Kyselina o koncentracii 10 g/l mala natoľko silný inhibičný účinok a k adaptácii nedošlo ani po desiatich dňoch.

Negatívnou kontrolou ku *Cupriavidus necator* H16 z hľadiska schopnosti produkovať PHA bol jej mutantný kmeň *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴. Tieto kmene sú schopné kyselinu levulovú metabolizovať a použiť ju ako zdroj energie a uhlíka pre ich rast a v prípade *Cupriavidus necator* H16 ju využiť aj k tvorbe kopolyméru. Porovnaním s *Cupriavidus necator* H16 mutantný kmeň bol citlivejší na nízke koncentrácie od 0,5 do 1 g/l a čas potrebný na adaptáciu sa postupne zvyšoval. Pri *Cupriavidus necator* H16 mali koncentrácie 0,6-0,9 g/l rovnaký začiatok rastu a dlhšia adaptácia bola pozorovaná až pri koncentrácii 1 g/l. Hlavným rozdielom je vplyv koncentrácií 1-4 g/l kyseliny levulovej na dĺžku adaptácie a *Cupriavidus necator* H16 je schopný sa rýchlejšie adaptovať na rovnakú koncentráciu kyseliny levulovej ako mutantný kmeň *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, napr. pri koncentrácii 2 g/l sa relatívna dĺžka adaptácie zvýšila o 28 % pri CN H16 a 173 % pri CN PHB⁻⁴. Z výsledkou tak môžeme predpokladať, že *Cupriavidus necator* H16 lepšie reaguje na kyselinu levulovú a to vďaka metabolickým dráham, ktorými ju vie metabolizovať alebo účinnou obranou proti jej negatívnemu vplyvu vďaka biosyntéze a degradácii PHA.

Tretím študovaným bakteriálnym kmeňom bola *Halomonas halophila*, pri ktorej bol sledovaný vplyv kyseliny levulovej a kombinácia dvoch inhibícií v podobe inhibície kyselinou levulovou a hypoosmotickým prostredím. Inhibícia samotnou kyselinou levulovou má pre *Halomonas halophila* silnejší inhibičný účinok ako v prípade *Cupriavidus necator*. Dĺžka adaptácia HH postupne narastala už pri nízkych koncentráciách, zatiaľ čo pri CN bol posun začiatku rastu zaznamenaný pri koncentráciách nad 1 g/l. Koncentráciám do 2 g/l je baktéria HH schopná adaptovať sa, avšak táto koncentrácia je pre ňu limitná a pri vyšších koncentráciách už nedochádza k rastu vplyvom adaptácie na kyselinu levulovu. Množstvo tepla vyprodukovaného pri koncentrácia do 2 g/l odpovedá hodnote tepla vyprodukovaného kontrolu a metabolická aktivita sa po adaptácii neznižuje. Nad koncentráciu 2 g/l nebol pozorovaný nárast tepelného toku v dôsledku adaptácie a tieto koncentrácie boli príliš vysoké pre baktérie. Môžeme tak predpokladať, že *Halomonas halophila* má odlišný metabolický aparát a baktéria je schopná prispôbiť sa prítomnosti kyseliny do koncentrácie 2 g/l, avšak vyššie koncentrácie sú pre ňu natoľko inhibičné, že obmedzujú jej rast a metabolickú aktivitu. Výsledky získané spojením dvoch inhibícií jasne ukazujú postupné odumieranie baktérií v dôsledku neprítomnosti chloridu sodného, ktorý je kľúčový pre ich rast a prítomnosť kyseliny levulovej len podporila inhibíciu. Tepelný tok hneď po začiatku merania začal klesať, metabolická aktivita bola obmedzaná, a postupným odumieraním buniek sa tepelný tok priblížil k základnej línii. Vyprodukované teplo pri dvojitej inhibícii bolo veľmi malé a s rastúcou koncentráciou kyseliny levulovej bola hodnota maximálneho tepla nižšia.

Porovnaním dĺžky adaptácie a celkového vyprodukovaného tepla všetkých troch kmeňov pozorujeme pri HH vplyvom odlišného metabolického aparátu kratšiu dobu lag fázy u kontroly porovnaním s CN. Koncentrácie kyseliny levulovej mali výraznejší vplyv na HH a relatívne predĺženie adaptácie je podobné relatívnym hodnotám (vzťahnutým ku kontrolnej vzorke) doby adaptácie pre baktériu CN PHB⁻⁴. Z výsledkov môžeme predpokladať, že metabolizmus CN H16 je najviac prispôsobený pre spracovanie a využitie LA ako substrátu pre svoj rast. Miera metabolickej aktivity bola približne rovnaká pri všetkých troch kmeňov u jednotlivých koncentrácií. Pokles ich relatívneho celkového tepla nebol nižší ako 4 % celkového tepla jednotlivých kontrol. Z hľadiska celkového tepelného toku boli maximálne hodnoty vyššie pri HH ako pri CN, preto by sme mohli predpokladať, že mikrokolorimetria môže byť citlivejšia k štúdiu metabolickej aktivity *Halomonas halophila*. Avšak vyššia hodnota tepelného toku môže byť prejavom vyššej koncentrácie buniek vo vzorke, preto by bolo potrebné stanoviť počet životaschopných buniek vo všetkých meraných vzorkách.

Výsledky mikrokolorimetrie poskytujú vo všeobecnosti množstvo tepla, ktoré boli baktérie schopné vyprodukovať. Samotné teplo, však neposkytuje úplné informácie o metabolickej aktivite a jednotlivých formách metabolickej aktivity – raste, delení buniek, atď. Pre potvrdenie našich predpokladov a bližšiu charakteristiku vplyvu kyseliny levulovej sme pomocou merania optickej hustoty vzoriek kultivovaných v mikrotitračných platničkách zaznamenávali rastové krivky baktérii. Výsledky pri všetkých prvých troch experimentálnych častiach potvrdili naše predpoklady, že nárast tepla je spojený s rastom baktérii a v prípade spojených inhibícií je pokles tepla spojený s odumieraním baktérii.

Experimentálnou prácou sme preukázali, že mikrokolorimetria ako fyzikálne-chemická metóda je vysoko univerzálna, citlivá a vhodná k štúdiu mikroorganizmov a ich metabolickej aktivity. Na prvý pohľad netypická metóda poskytla termodynamické informácie, ktoré nie je možné získať konvenčnými biologickými technikami. Samotné výsledky z mikrokolorimetrie nie sú dostatočujúce pre úplny popis inhibičného účinku a neposkytujú kompletné informácie o adaptačných stratégiách. Napr. celkové vyprodukované teplo môže súvisieť buď s rastom alebo s aktiváciou inej metabolickej dráhy. Pre lepšiu interpretáciu získaných mikrokolorimetrických výsledkov je potrebné túto techniku kombinovať s ďalším analytickým prístupom, napr. ako v navrhnutom prípade s metódou zameranou na stanovenie rastových kriviek, sledovanie viability buniek, stanovenie obsahu PHA v čase, monitorovanie koncentrácie kyseliny levulovej a peptonu v čase, atď.

Výsledky tejto diplomovej práce preukázali využiteľnosť mikrokolorimetrie pri štúdiu mikrobiálnych inhibítorov. Vysoká citlivosť počas nepretržitého merania v reálnom čase, automatickosť a nepotrebná pred úprava meraných vzoriek poskytujú mikrokolorimetrii vysoký potenciál využitia pri mikrobiologickom výskume. Môžeme tak predpokladať, že táto metóda sa v blízkej budúcnosti stane súčasťou základných mikrobiologických techník zameraných na stanovenie rastu a adaptácie mikroorganizmov.

7 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] PODSTATOVÁ, Hana. *Mikrobiologie, epidemiologie, hygiena*. Olomouc: EPAVA, 2001. ISBN 80-862-9707-1.
- [2] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie pro studenty středních škol a všechny, které láká tajemství živé přírody*. Praha: Scientia, 1998. ISBN 80-718-3083-6.
- [3] HUDECOVÁ, Daniela a Viktor MAJTÁN. *Mikrobiológia I*. Bratislava: Vydavateľstvo STU, 2002. Edícia skript. ISBN 80-227-1663-4.
- [4] BROOKS, Geo., Karen CARROLL, Janet BUTEL a Stephen MORSE. *Jawetz Melnick&Adelbergs Medical Microbiology 26/E* (Lange Medical Books). 26th. New York: McGraw-Hill Education / Medical, 2012. ISBN 978-0-07-179031-4.
- [5] VAN DER GULIK, P.T.S., W.D. HOFF a D. SPEIJER. In defence of the three-domains of life paradigm. *BMC Evolutionary Biology*. 2017, 17(1). DOI: 10.1186/s12862-017-1059-z. ISSN 1471-2148.
- [6] ROZSYPAL, Stanislav. *Přehled biologie*. 2. upr. vyd., ve Scientii 1. vyd. Praha: Scientia, 1994. ISBN 80-858-2732-8.
- [7] WILLEY, Joanne, Linda SHERWOOD a Christopher WOOLVERTON. *Prescott's microbiology*. Tenth edition. New York, NY: McGraw-Hill, 2017. ISBN 978-1-259-28159-4.
- [8] ROZSYPAL, Stanislav, Karel HOĐÁK, Theodor MARTINEC a Miloslav KOCUR. *Obecná bakteriologie*. 1. Praha: SPN, 1981. Učebnice pro vysoké školy (Státní pedagogické nakladatelství).
- [9] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [10] BETINA, Vladimír. *Mikrobiológia*. Bratislava: Slovenská technická univerzita, 1995. ISBN 80-227-0755-4.
- [11] SCHIMEL, Joshua, Teri BALSER a Matthew WALLENSTEIN. MICROBIAL STRESS-RESPONSE PHYSIOLOGY AND ITS IMPLICATIONS FOR ECOSYSTEM FUNCTION. *Ecology*. 2007, 88(6), 1386-1394. DOI: 10.1890/06-0219. ISSN 0012-9658.
- [12] ŚWIŁĘCIO, Agata a Iwona ZYCH-WEZYK. Bacterial Stress Response as an Adaptation to Life in a Soil Environment. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2013, 22(6), 1577-1587.
- [13] FERENČÍK, M., B. ŠKÁRKA, M. NOVÁK a L. TURECKÝ. *Biochémiá*. Bratislava: SAP-Slovak Academic Press, 2000. ISBN 80-88908-58-2.
- [14] BLANCO, Antonio a Gustavo BLANCO. *Medical biochemistry*. San Diego, CA: Academic Press, an imprint of Elsevier, 2017. ISBN 978-0-12-803550-4.

- [15] MEDYANTSEVA, El'vina, Margarita VERTLIB a German BUDNIKOV. Metal ions as enzyme effectors. *Russian Chemical Reviews*. 1998, 67(3), 225-232. DOI: 10.1070/RC1998v067n03ABEH000228. ISSN 0036-021X.
- [16] VODRÁŽKA, Zdeněk, Pavel RAUCH a Jan KÁŠ. *Enzymologie*. Vyd. 3. přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. ISBN 80-708-0330-4.
- [17] TURNHAM, Rigney a John SCOTT. Protein kinase A catalytic subunit isoform PRKACA; History, function and physiology. *Gene*. 2016, 577(2), 101-108. DOI: 10.1016/j.gene.2015.11.052. ISSN 03781119.
- [18] ŠÍPAL, Zdeněk. *Biochemie: Celostát.vysokoškol.učeb.pro stud.pedag.a přírodověd.fak.stud.oboru 76-12-8 učitelství všeobecněvzdělávacích předmětů*. Praha: SPN, 1992. Učebnice pro vysoké školy (Státní pedagogické nakladatelství). ISBN 80-042-1736-2.
- [19] Enzyme Inhibitors. Virtual Chembook [online]. Illinois: Elmhurst College, 2003 [cit. 2019-02-26]. Dostupné z: <http://chemistry.elmhurst.edu/vchembook/573inhibit.html>
- [20] BERG, Jeremy, John TYMOCZKO, Lubert STRYER a Lubert STRYER. *Biochemistry*. 5th ed. New York: W.H. Freeman, 2002. ISBN 07-167-3051-0.
- [21] BLAT, Yuval. *Non-Competitive Inhibition by Active Site Binders*. 2010, 75(6), 535-540. DOI: 10.1111/j.1747-0285.2010.00972.x. ISSN 17470277.
- [22] MORONE, Amruta, Mayura APTE a R.A. PANDEY. Levulinic acid production from renewable waste resources: Bottlenecks, potential remedies, advancements and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015, 51, 548-565. DOI: 10.1016/j.rser.2015.06.032. ISSN 13640321.
- [23] CARNEVALI, Davide, Marco RIGAMONTI, Tommaso TABANELLI, Gregory PATIENCE a Fabrizio CAVANI. Levulinic acid upgrade to succinic acid with hydrogen peroxide. *Applied Catalysis A: General*. 2018, 563, 98-104. DOI: 10.1016/j.apcata.2018.06.034. ISSN 0926860X.
- [24] BOZELL, Joseph, L MOENS, D.C ELLIOTT, Y WANG, G.G NEUENSCWANDER, S.W FITZPATRICK, R.J BILSKI a J.L JARNEFELD. Production of levulinic acid and use as a platform chemical for derived products. *Resources, Conservation and Recycling*. 2000, 28(3-4), 227-239. DOI: 10.1016/S0921-3449(99)00047-6. ISSN 09213449.
- [25] CHA, J.Y a M.A HANNA. Levulinic acid production based on extrusion and pressurized batch reaction. *Industrial Crops and Products*. 2002, 16(2), 109-118. DOI: 10.1016/S0926-6690(02)00033-X. ISSN 09266690.
- [26] LILGA, Michael, Asanga PADMAPERUMA, Deanna AUBERRY, Heather JOB a Marie SWITA. Ketonization of levulinic acid and γ -valerolactone to hydrocarbon fuel precursors. *Catalysis Today*. 2018, 302, 80-86. DOI: 10.1016/j.cattod.2017.06.021. ISSN 09205861.

- [27] JAREMKO, Matt a Jian YU. The initial metabolic conversion of levulinic acid in *Cupriavidus necator*. *Journal of Biotechnology*. 2011, 155(3), 293-298. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2011.07.027. ISSN 01681656.
- [28] CHEE, Jiun, S.S. YOGA, Nyok-Sean LAU a S.C. LING. Bacterially produced polyhydroxyalkanoate (PHA): Converting renewable resources into bioplastic. MÉNDEZ-VILAS, A. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. 2. Spain: Formatex Research Center, 2010, s. 1395-1404.
- [29] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Filip MRAVEC, Ota SAMEK a Ivana MAROVA. Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly(3-hydroxybutyrate) accumulating cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, 100(3), 1365-1376. DOI: 10.1007/s00253-015-7162-4. ISSN 0175-7598.
- [30] SLANINOVA, Eva, Petr SEDLACEK, Filip MRAVEC et al. Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018, 102(4), 1923-1931. DOI: 10.1007/s00253-018-8760-8. ISSN 0175-7598.
- [31] GRAGE, Katrin, Anika JAHNS, Natalie PARLANE, Rajasekaran PALANISAMY, Indira RASIAH, Jane ATWOOD a Bernd REHM. Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. *Biomacromolecules*. 2009, 10(4), 660-669. DOI: 10.1021/bm801394s. ISSN 1525-7797.
- [32] BRESAN, Stephanie, Anna SZNAJDER, Waldemar HAUF, Karl FORCHHAMMER, Daniel PFEIFFER a Dieter JENDROSSEK. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids. *Scientific Reports*. 2016, 6(1). DOI: 10.1038/srep26612. ISSN 2045-2322.
- [33] VALDÉS, J., G. KUTRALAM-MUNIASAMY, B. VERGARA-PORRAS, R. MARSCH, F. PÉREZ-GUEVARA a M.R. LÓPEZ-CUELLAR. Heterologous expression of phaC2 gene and poly-3-hydroxyalkanoate production by recombinant *Cupriavidus necator* strains using canola oil as carbon source. *New Biotechnology*. 2018, 40, 200-206. DOI: 10.1016/j.nbt.2017.08.001. ISSN 18716784.
- [34] LI, Zibiao, Jing YANG a Xian LOH. Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Materials*. 2016, 8(4), 265-265. DOI: 10.1038/am.2016.48. ISSN 1884-4049.
- [35] SHARMA, Parveen, Riffat MUNIR, Warren BLUNT, Chris DARTIALH, Juijun CHENG, Trevor CHARLES a David LEVIN. Synthesis and Physical Properties of Polyhydroxyalkanoate Polymers with Different Monomer Compositions by Recombinant *Pseudomonas putida* LS46 Expressing a Novel PHA SYNTHASE (PhaC116) Enzyme. *Applied Sciences*. 2017, 7(3). DOI: 10.3390/app7030242. ISSN 2076-3417.
- [36] NODA, Isao, Phillip GREEN, Michael SATKOWSKI a Lee SCHECHTMAN. Preparation and Properties of a Novel Class of Polyhydroxyalkanoate Copolymers †. *Biomacromolecules*. 2005, 6(2), 580-586. DOI: 10.1021/bm049472m. ISSN 1525-7797.

- [37] RAZA, Zulfiqar, Sharjeel ABID a Ibrahim BANAT. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. 2018, 126, 45-56. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.10.001. ISSN 09648305.
- [38] PHILIP, S., T. KESHAVARZ a I. ROY. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. 2007, 82(3), 233-247. DOI: 10.1002/jctb.1667. ISSN 02682575.
- [39] VERLINDEN, R.A.J., D.J. HILL, M.A. KENWARD, C.D. WILLIAMS a I. RADECKA. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*. 2007, 102(6), 1437-1449. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x. ISSN 1364-5072.
- [40] KADOURI, Daniel, Edouard JURKEVITCH, Yaacov OKON a Susana CASTRO-SOWINSKI. Ecological and Agricultural Significance of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Critical Reviews in Microbiology*. 2008, 31(2), 55-67. DOI: 10.1080/10408410590899228. ISSN 1040-841X.
- [41] CHEN, Guo-Qiang, Ivan HAJNAL, Hong WU, Li LV a Jianwen YE. Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates. *Trends in Biotechnology*. 2015, 33(10), 565-574. DOI: 10.1016/j.tibtech.2015.07.007. ISSN 01677799.
- [42] PARK, Jong, Tae KIM a Sang LEE. Genome-scale reconstruction and in silico analysis of the *Ralstonia eutropha* H16 for polyhydroxyalkanoate synthesis, lithoautotrophic growth, and 2-methyl citric acid production. *BMC Systems Biology*. 2011, 5(1). DOI: 10.1186/1752-0509-5-101. ISSN 1752-0509.
- [43] KESKIN, Gülsah, Gülnur KIZIL, Mikhael BECHELANY, Céline POCHAT-BOHATIER a Mualla ÖNER. Potential of polyhydroxyalkanoate (PHA) polymers family as substitutes of petroleum based polymers for packaging applications and solutions brought by their composites to form barrier materials. *Pure and Applied Chemistry*. 2017, 89(12). DOI: 10.1515/pac-2017-0401. ISSN 1365-3075. I
- [44] POHLMANN, Anne, Wolfgang FRICKE, Frank REINECKE et al. Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature Biotechnology*. 2006, 24(10), 1257-1262. DOI: 10.1038/nbt1244. ISSN 1087-0156.
- [45] RABERG, Matthias, Birgit VOIGT, Michael HECKER, Alexander STEINBÜCHEL a Marie-Joelle VIROLLE. A Closer Look on the Polyhydroxybutyrate- (PHB-) Negative Phenotype of *Ralstonia eutropha* PHB-4. *PLoS ONE*. 2014, 9(5). DOI: 10.1371/journal.pone.0095907. ISSN 1932-6203.
- [46] CRAMM, Rainer. Genomic View of Energy Metabolism in *Ralstonia eutropha* H16. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2009, 16(1-2), 38-52. DOI: 10.1159/000142893. ISSN 1660-2412.

- [47] SCHWARTZ, Edward, Anke HENNE, Rainer CRAMM, Thomas EITINGER, Bärbel FRIEDRICH a Gerhard GOTTSCHALK. Complete Nucleotide Sequence of pHG1: A *Ralstonia eutropha* H16 Megaplasmid Encoding Key Enzymes of H₂-based Lithoautotrophy and Anaerobiosis. *Journal of Molecular Biology*. 2003, 332(2), 369-383. DOI: 10.1016/S0022-2836(03)00894-5. ISSN 00222836.
- [48] QUESADA, E., A. VENTOSA, F. RUIZ-BERRAQUERO a A. RAMOS-CORMENZANA. *Deleya halophila*, a New Species of Moderately Halophilic Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1984, 34(3), 287-292. DOI: 10.1099/00207713-34-3-287. ISSN 0020-7713.
- [49] ROTHENSTEIN, Dirk, Johannes BAIER, Thomas SCHREIBER, Vera BARUCHA a Joachim BILL. Influence of zinc on the calcium carbonate biomineralization of *Halomonas halophila*. *Aquatic Biosystems*. 2012, 8(1). DOI: 10.1186/2046-9063-8-31. ISSN 2046-9063.
- [50] ROMMEL, Tyler, Kazuhiko KUROSAWA, Lucy MCCULLY, Mark SILBY, Vanni BUCCI, Christopher BRIGHAM a J. THRASH. Draft Genome Sequence of *Halomonas* sp. Strain SL1, a Putative Polyhydroxyalkanoate-Producing Halophile. *Microbiology Resource Announcements*. 2019, 8(1), 00915-18. DOI: 10.1128/MRA.00915-18. ISSN 2576-098X.
- [51] KUCERA, Dan, Iva PERNICOVÁ, Adriana KOVALCIK et al. Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *Bioresource Technology*. 2018, 256, 552-556. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.02.062. ISSN 09608524.
- [52] ŠTRAHA, Pavel a Zdeněk TRÁVNÍČEK. *Termická analýza*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011.
- [53] KLOUŽKOVÁ, A., P. ZEMENOVÁ, J. KLOUŽEK a W. PABST. *Termická analýza: Zřízení laboratoře pro praktickou výuku termické analýzy se zaměřením na anorganické nekovové materiály*. Praha: VŠCHT, 2012.
- [54] HAINES, P. *Principles of thermal analysis and calorimetry*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2002. ISBN 08-540-4610-0.
- [55] WUNDERLICH, B. *Thermal Analysis*. *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*. Elsevier, 2001, , 9134-9141. DOI: 10.1016/B0-08-043152-6/01648-X. ISBN 9780080431529.
- [56] EDITED BY PAUL GABBOTT., . *Principles and applications of thermal analysis*. 1. ed. Oxford: Blackwell Pub, 2008. ISBN 978-047-0697-702.
- [57] RUSSEL, Mohammed, Jun YAO, Huilun CHEN a Fein WANG. Different Technique of Microcalorimetry and Their Applications to Environmental Sciences: A Review. *Journal of American Science*. 2009, 5(4), 194-208. ISSN 1545-1003.
- [58] MORELLO, J. The Use of Microcalorimetry and Impedance in Clinical Microbiology. *Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1985, , 207-214. DOI: 10.1007/978-3-642-69943-6_27. ISBN 978-3-642-69945-0.

- [59] CHEN, Hui-Lun, Jun YAO, Lin WANG, Fei WANG, Emilia BRAMANTI, Thomas MASKOW a Gyula ZARAY. Evaluation of solvent tolerance of microorganisms by microcalorimetry. *Chemosphere*. 2009, 74(10), 1407-1411. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.11.005. ISSN 00456535.
- [60] XI, Li, Liu Yi, Wu JUN a Qu SONGSHENG. The effect of the selenomorpholine derivatives on the growth of *Staphylococcus aureus* studied by microcalorimetry. b.r. DOI: 10.1016/S0040-6031(01)00515-9.
- [61] ZHANG, Li-Xia, Yi LIU, Li-Hua CIA, Yan-Jun HU, Jun YIN a Pei-Zhi HU. Inhibitory study of some novel Schiff base derivatives on *Staphylococcus aureus* by microcalorimetry. *Thermochimica Acta*. 2006, 440(1), 51-56. DOI: 10.1016/j.tca.2005.10.012. ISSN 00406031.
- [62] CRITTER, Silvana, Sueli FREITAS a Claudio AIROLDI. Microbial biomass and microcalorimetric methods in tropical soils. *Thermochimica Acta*. 2002, 394(1-2), 145-154. DOI: 10.1016/S0040-6031(02)00247-2. ISSN 00406031.
- [63] ZHAO, Yanling, Lei JIA, Jiabo WANG et al. Microcalorimetry with correspondence analysis for studying the antibacterial effect of ephedrine on *Escherichia coli*. *Thermochimica Acta*. 2013, 557, 50-54. DOI: 10.1016/j.tca.2013.01.001. ISSN 00406031.
- [64] CHEN, Hai-Yan, Jun YAO, Yong ZHOU et al. Investigation of the toxic effect of cadmium on *Candida humicola* and *Bacillus subtilis* using a microcalorimetric method. *Journal of Hazardous Materials*. 2008, 159(2-3), 465-470. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2008.02.040. ISSN 03043894.
- [65] KROUSKÁ, Jitka. Využití kalorimetru při zkoumání termodynamiky chování kapalných, pevných i gelových vzorků. CHEMPOINT [online]. Brno: Fakulta chemická, 2012 [cit. 2018-11-26]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/vyuziti-kalorimetru-pri-zkoumani-termodynamiky-chovani-kapalnych-pevných-i-gelových-vzorku>
- [66] MCBIRNEY, Samantha, Kristy TRINH, Annie WONG-BERINGER a Andrea ARMANI. Wavelength-normalized spectroscopic analysis of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* growth rates. *Biomedical Optics Express*. 2016, 7(10). DOI: 10.1364/BOE.7.004034. ISSN 2156-7085.
- [67] ALONSO-CALLEJA, Carlos, Emilia GUERRERO-RAMOS, Alicia ALONSO-HERNANDO a Rosa CAPITA. Adaptation and cross-adaptation of *Escherichia coli* ATCC 12806 to several food-grade biocides. *Food Control*. 2015, 56, 86-94. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.03.012. ISSN 09567135.
- [68] YUE, Jiayi, Hongye YANG, Siying LIU, Fangfang SONG, Jingmei GUO a Cui HUANG. Influence of naringenin on the biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Journal of Dentistry*. 2018, 76, 24-31. DOI: 10.1016/j.jdent.2018.04.013. ISSN 03005712.
- [69] BAEK, Yong-Wook a Youn-Joo AN. Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. *Science of The Total Environment*. 2011, 409(8), 1603-1608. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.01.014. ISSN 00489697.

- [70] ANN, Ling, Shahrom MAHMUD, Siti BAKHORI, Amna SIRELKHATIM, Dasmawati MOHAMAD, Habsah HASAN, Azman SEENI a Rosliza RAHMAN. Antibacterial responses of zinc oxide structures against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus pyogenes*. *Ceramics International*. 2014, 40(2), 2993-3001. DOI: 10.1016/j.ceramint.2013.10.008. ISSN 02728842.
- [71] GUO, Qing-Lian, Juan ZHANG, Zi-Qiang XU, Ran LI, Feng-Lei JIANG, Qi XIAO a Yi LIU. Comparative study on the effects of two antifungal drugs against *Candida albicans* by microcalorimetry and transmission electron microscopy. *Thermochimica Acta*. 2012, 543, 82-87. DOI: 10.1016/j.tca.2012.05.005. ISSN 00406031.
- [72] SALGADO, J., J.J. PARAJÓ, T. TEIJEIRA et al. New insight into the environmental impact of two imidazolium ionic liquids. Effects on seed germination and soil microbial activity. *Chemosphere*. 2017, 185, 665-672. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.07.065. ISSN 00456535.
- [73] LIU, Wenjuan, Jun YAO, Hankuai CHAI, Zhibo ZHAO, Chi ZHANG, Jingnan JIN a Martin CHOI. Concentration-dependent effect of photoluminescent carbon dots on the microbial activity of the soil studied by combination methods. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2015, 39(2), 857-863. DOI: 10.1016/j.etap.2015.02.009. ISSN 13826689.
- [74] FREDUA-AGYEMAN, Mansa, Simon GAISFORD a Anthony BEEZER. Observation with microcalorimetry: Behaviour of *P. aeruginosa* in mixed cultures with *S. aureus* and *E. coli*. *Thermochimica Acta*. 2018, 663, 93-98. DOI: 10.1016/j.tca.2018.03.009. ISSN 00406031.
- [75] SEDLACEK, Petr, Eva SLANINOVA, Martin KOLLER, Jana NEBESAROVA, Ivana MAROVA, Vladislav KRZYZANEK a Stanislav OBRUCA. PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnology*. 2019, 49, 129-136. DOI: 10.1016/j.nbt.2018.10.005. ISSN 18716784.

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

A	absorbancia
β	lineárna konštanta rýchlosti ohrevu
bp	bázový pár
CoA	koenzým A
C_s	špecifická tepelná kapacita
DNA	deoxyribonukleová kyselina
$f(T, t)$	tepelný tok z kinetických procesov
ΔG	zmena Gibbsovej energie
ΔH	zmena entalpie
HCN	kyanovodík
LA	kyselina levulová
MCL	middle chain lenght
MS Excel	Microsoft Excel
NADPH	nikotínamidadeníndinukleotidfosfát
PHA	polyhydroxyalkanoát
PHB	polyhydroxybutyrát
rRNA	ribozomálna ribonukleová kyselina
σ	smerodajná odchylka
ΔS	zmena entropie
SCL	short chain lenght
T	absolútna teplota
TAM	Thermal activity monitor
UV	ultrafialové svetlo
°C	stupeň Celsia
%	percento