



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**VLIV OXIDAČNÍHO STRESU NA BAKTERIÁLNÍ
KULTURY**

INFLUENCE OF OXIDATIVE PRESSURE ON BACTERIAL CELLS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Hana Dugová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1297/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Hana Dugová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název bakalářské práce:

Vliv oxidačního stresu na bakteriální kultury

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Optimalizace fluorescečních technik detekce ROS
3. Analýza vybraných mikrobiálních buněk

Termín odevzdání bakalářské práce: 21.5.2018

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

Hana Dugová
student(ka)

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

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Táto bakalárska práca sa zaoberá vplyvom oxidačného stresu na bakteriálny kmeň *Cupriavidus necator* v dvoch podobách: *Cupriavidus necator H16* tvoriaci PHB granule a *Cupriavidus necator PHB-4* ako mutant, ktorý nedokáže granule syntetizovať. Práca porovnáva vplyvy vyvolávajúce oxidačný stres, ktorý sa prejavuje výskytom ROS v bunke. Bunky boli ďalej analyzované na prietokovom cytometre a fluorescenčnom mikroskope. V analýze bolo potrebné pracovať s fluorescenčnými sondami rôzneho typu.

Na vytvorenie oxidačného stresu boli použité viaceré koncentrácie peroxidu vodíka, ďalej bola vyskúšaná Fentonova reakcia s použitím síranu železato-amonného a nakoniec hexahydrát chloridu kobaltnatého. Na zistenie viability bakteriálnych buniek sa používala fluorescenčná sonda propidium jodid, ako lipofilné farbivo bolo testované BODIPY. Na záver to boli fluorescenčné sondy na detekciu ROS v bunke H2DCFDA a CM-H2DCFDA, tieto sondy museli byť optimalizované pre danú techniku. Záverom práce je potvrdenie hypotézy, že schopnosť produkcie PHA granúl zvyšuje odolnosť *C. necator* proti oxidačnému stresu.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the impact of oxidative pressure on the bacterial strain *Cupriavidus necator* in its two forms: *Cupriavidus necator H16* producing PHB granules and *Cupriavidus necator PHB-4* as a mutant that is not capable of producing granules. The thesis compares different influences causing oxidative stress that is demonstrated by the occurrence of ROS in the cell. Furthermore, the cells were analysed with a flow cytometer and a fluorescence microscope. During the analysis it was necessary to use different types of fluorescence probes.

The oxidative stress was created by means of hydrogen peroxide at various concentrations. Further tests focused on Fenton's reaction including ammonium iron sulfate and cobalt chloride hexahydrate. Propidium iodide as a fluorescence probe was used to determine the viability of the bacterial cells, and BODIPY was tested as a lipophilic dye. Finally, the ROS in the cell was detected by H2DCFDA and CM-H2DCFDA, fluorescence probes that had to be optimised for the respective technique. The result of this bachelor thesis is the confirmation of the hypothesis that PHA granules production increase the resistance of *Cupriavidus necator* against oxidative stress.

Kľúčové slová:

reaktívne formy kyslíka, oxidačný stres, *Cupriavidus necator*, polyhydroxyalkanoáty, prietoková cytometria,

Key words:

reactive oxygen species, oxidative stress, *Cupriavidus necator*, polyhydroxyalkanoates, flow cytometry

DUGOVÁ, H. *Vliv oxidačního stresu na bakteriální kultury*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 44 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

Prehlásenie

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

.....
podpis študenta

Podakovanie: Rada by som poďakovala vedúcemu mojej bakalárskej práce doc. Ing. Stanislavovi Obručovi, Ph.D. za odborné vedenie. Ďalej by som chcela poďakovať Ing. Lucii Müllerovej za celkovú pomoc pri práci v laboratóriu a pri práci s prietokovým cytometrom. Vďaka patrí aj Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. a Bc. Kateřině Bílkovej za analýzu vzoriek na fluorescenčnom mikroskope. V neposlednom rade ďakujem svojej rodine a priateľovi za podporu pri práci.

Obsah

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČASŤ	8
2.1	Oxidačný stres	8
2.1.1	Reaktívne formy kyslíka (ROS).....	8
2.1.2	Fentonova reakcia	8
2.1.3	Ochrana baktérií voči ROS	9
2.2	Polyhydroxyalkanoáty (PHA)	9
2.2.1	Produkcia polyhydroxyalkanoátov	10
2.2.2	Syntéza polyhydroxyalkanoátov	11
2.2.3	Cupriavidus necator ako baktéria produkujúca polyhydroxyalkanoáty	12
2.2.4	Ochranné účinky polyhydroxyalkanoátov na baktérie	13
2.3	Fluorescencia	13
2.3.1	Jablonského-Perrinov diagram	14
2.3.2	Stokesov posun.....	15
2.4	Fluorescenčná mikroskopia	16
2.4.1	Fluorescenčný mikroskop	16
2.5	Prietoková cytometria.....	17
2.6	Fluorescenčné sondy.....	19
2.6.1	Propidium jodid.....	19
2.6.2	BODIPY 493/503	20
2.6.3	H ₂ DCFDA	21
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	22
3.1	Použité baktérie, fluorescenčné sondy a ostatné pomôcky.....	22
3.1.1	Použité baktérie	22
3.1.2	Fluorescenčné sondy	22
3.1.3	Používané prístroje.....	22
3.2	Kultivácia baktérií	22
3.2.1	Zloženie použitých medií	22
3.2.2	Agarová platňa	23
3.2.3	Inokulum	23
3.2.4	Minerálne médium	23
3.2.5	Navodenie oxidačného stresu.....	24

3.2.6	Príprava vzoriek na analýzu	24
3.3	Analýza prietokovým cytometrom	24
3.3.1	Farbenie vzoriek fluorescenčnými sondami	24
3.4	Zistenie obsahu PHB v bakteriálnych bunkách pomocou plynovej chromatografie. 25	
3.5	Analýza fluorescenčným mikroskopom	25
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA	26
4.1	Reakcia na oxidačný stres spôsobený peroxidom vodíka.....	26
4.1.1	Stanovenie viability pomocou fluorescenčnej sondy propidium jodid	26
4.1.2	Stanovenie pomocou fluorescenčnej sondy BODIPY 493/503	27
4.1.3	Analýza pôsobenia peroxidu vodíka fluorescenčnou mikroskopiou.....	29
4.1.4	Stanovenie obsahu PHB v bakteriálnych bunkách.....	30
4.1.5	Analýza stresovej odpovedi buniek v čase.....	30
4.1.6	Pôsobenie vysokej koncentrácie peroxidu vodíka na bakteriálne bunky	31
4.2	Optimalizácia fluorescenčnej sondy H2DCFDA	32
4.2.1	Analýza vplyvu oxidačného stresu na bakteriálne bunky pomocou fluorescenčnej sondy CM-H2DCFDA a H2DCFDA	33
4.3	Fentonova reakcia.....	34
4.3.1	Analýza Fentonovej reakcie fluorescenčnou mikroskopiou	35
4.4	Oxidačný stres vyvolaný hexahydrátom chloridu kobaltnatého.....	37
4.4.1	Mikroskopická analýza buniek po pôsobení hexahydrátu chloridu kobaltnatého	38
5	ZÁVER	39
6	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	40
	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	44

1 ÚVOD

Bakalárska práca sa zaoberá vplyvom oxidačného stresu na bakteriálnu kultúru, konkrétne ide o kmeň *C. necator H16*, ktorý je schopný produkovať granule PHA a mutantný kmeň *C. necator PHB-4*, ktorému bol odobratý enzým a granule PHA tvoriť nedokáže. Tento druh baktérie je veľmi dôležitý pre výskum polyhydroxyalkanoátov, pretože až 90% suchej bakteriálnej hmotnosti môžu tvoriť granule PHA.

Výskum PHA sa v posledných rokoch stáva stále dôležitejším a je na to až niekoľko ekologických dôvodov. S plastami sa denne stretáva každý jeden z nás a jedná sa o veľkú skupinu polymérov, najčastejšiu zo skupiny polyesterov. Používajú sa ako obalové materiály, na výrobu fliaš alebo ako jednorazové pomôcky. Takéto výrobky majú spoločnú surovinu, ropu, a to je hlavným problémom ich celosvetového používania. Ropa sa dá ako zdroj vyčerpať a polyméry, ktoré sú z neho vyrobené vytvárajú veľký ekologický problém tým, že sa voľne v prírode nerozložia.

PHA by mohli byť v budúcnosti náhradou polymérov vyrobených z ropy. Problémom je vysoká cena produkcie a niektoré mechanické vlastnosti. Preto je dôležité pracovať na ich výskume, aj keď to nie je priamo produkcia PHA, rovnako dôležitým faktorom je dokonale poznať ich fyzikálne a chemické vlastnosti a snažiť sa ich zlepšovať.

Oxidačný stres je faktor, ktorý nepôsobí len na mikroorganizmy ale na všetky živé bunky, spôsob akým sa bunky bránia je často podobný a ide o enzymatickú činnosť a metabolizmus. V prípade bakteriálneho kmeňa *C. necator H16* (aj u ostatných MO produkujúcich PHA) existuje hypotéza, že granule PHA majú pre bunku aj protektívnu úlohu a pri výskyte ROS v bunke vedú k zvýšeniu jej odolnosti.

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo potvrdiť hypotézu o protektívnych účinkoch PHA voči oxidačnému stresu pôsobiacemu na bunky, čo sa aj podarilo. Zároveň bolo nutné optimalizovať techniky farbenia bakteriálnej kultúry fluorescenčnými sondami, kedy pri najvhodnejšej koncentrácii sondy bola stredná hodnota fluorescencie najvyššia a pri ďalšom zvyšovaní koncentrácie dochádzalo k samozhášaniam.

Pre analýzu vlastností buniek boli použité sondy na zistenie životaschopnosti, lipofilná sonda, ktorá indikovala výskyt PHA v bunke tým, že sa zabudovala do membrán obsahujúcich fosfolipidy. Taktiež sa využili sondy na priamu detekciu ROS v bunke. Takto sa dalo použitím jednej metódy, prietokovej cytometrie, analyzovať viac informácií o bunkách a mohol vzniknúť komplexnejší profil toho, ako bunky reagujú na prítomnosť ROS.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Oxidačný stres

Tento pojem označuje v súčasnej dobe výrazne skúmanú oblasť, označuje totižto proces, ktorý nepôsobí len na mikroorganizmy, ale spôsobuje aj značnú časť civilizačných ochorení. Táto kapitola sa zaoberá tým, čo to vlastne oxidačný stres je. Je prirodzené, že bunky v rámci metabolických procesov produkujú určité množstvo voľných radikálov, presnejšie nazývaných reaktívne formy kyslíka alebo dusíka, ktoré majú nepriaznivý vplyv na bunky. V zdravých a životaschopných bunkách sa nachádza dostatočné množstvo antioxidantov, ktoré by voľné radikály premieňali na neškodné metabolity. Dochádza však k situáciám, kedy sa v bunke začne hromadiť až nadmerné množstvo reaktívnych foriem kyslíka (ROS – reactive oxygen species) a bunka sa poškodí. Dochádza k porušeniam cytoplazmatickej membrány, porušeniu lipidov, proteínov alebo báz v DNA, to spôsobuje mutácie. Okrem toho, že oxidačný stres môže byť vyvolaný produktami metabolických dráh v organizme, dá sa vyvolať aj exogénne a to napríklad UV žiarením alebo RTG žiarením, ozónom, rôznymi liekmi, v prípade mikroorganizmov býva oxidačný stres vyvolaný zámerné a to v laboratóriu, pridaním chemických látok, ktoré ho spustia. [1] [2]

2.1.1 Reaktívne formy kyslíka (ROS)

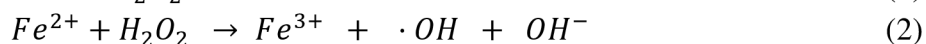
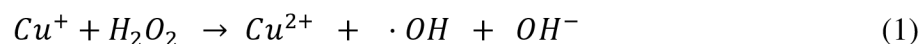
Ide o voľné radikály, ale aj o látky, ktoré majú silné oxidačné vlastnosti a pritom radikálmi nie sú. Ako voľný radikál sa označuje atóm, molekula alebo ión, ktorý má vo svojej valenčnej vrstve aspoň jeden nespárovaný elektrón a tým sa stáva oveľa reaktívnejším ako ich stabilná forma. [1]

Medzi voľné kyslíkové radikály patria napríklad superoxid ($O_2^{\cdot-}$), hydroxylový radikál (HO^{\cdot}), hydroperoxyl (HO_2^{\cdot}), peroxy (ROO^{\cdot}) alebo alkoxy (RO^{\cdot}). Látky, ktoré nie sú voľnými radikálmi, ale patria k reaktívnym druhom kyslíka sú peroxid vodíka, kyselina chlórna, ozón, alebo aj singletový kyslík. Endogénna tvorba ROS prebieha ako autooxidácia v podobe Fentonovej reakcie, ako respiračné vzplanutie spôsobené enzýmom NADPH oxidázou. V eukaryotických bunkách sú zdrojom ROS taktiež mitochondrie. [1] [3]

K základným reakciám ROS patrí adícia radikálu na inú molekulu, odštiepenie atómu vodíka z C–H väzby, oxidácia alebo redukcia neradikálových látok a v neposlednom rade reakcie medzi 2 radikálmi. [1] [3]

2.1.2 Fentonova reakcia

Je to reakcia, v ktorej sa vytvára nebezpečný hydroxylový radikál pomocou peroxidu vodíka s iónom prechodného kovu. Kovom môže byť železnatý alebo meďnatý ión, tie sa v stopových množstvách nachádzajú aj v bunkách, ale reakcia s peroxidom vodíka môže mať pre bunku fatálne následky. Priebeh Fentonovej reakcie je umožnený katalýzou enzýmu superoxidasmutáza, ktorý zaisťuje odbúranie najčastejšie sa vyskytujúceho sa voľného radikálu, superoxidu, ktorý sa spontánne premieňa na peroxid vodíka. Peroxid vodíka v menších množstvách nemá veľmi negatívny dopad na bunku, no jeho nebezpečenstvo tkvie v povahe premieňať sa na iné oveľa reaktívnejšie formy kyslíka. [4]



Zastúpenie železa v organizme býva vyššie ako zastúpenie medi, no s peroxidom vodíka reaguje rýchlejšie práve meď. V reakcii vzniká nebezpečný hydroxylový anión, pričom sa prechodný kov oxiduje na Fe^{3+} , Cu^{2+} , reakcie sú zobrazené v rovnici 1 a 2. Keďže polčas rozpadu voľného radikálu je rádovo niekoľko nanosekúnd tak dokáže migrovať len na vzdialenosť v mikrometroch, teda reaguje takmer s čímkkoľvek. Dokáže rozštiepiť napríklad väzbu C–H, N–H alebo O–H, dokáže adovať OH skupinu na nenasýtené väzby ako je napríklad C=C, alebo na aromatický kruh. [4]

Organizmus sa voči takýmto reakciám bráni dvomi ochrannými mechanizmami, čiže snaha odstrániť jeden alebo druhý substrát Fentonovej reakcie (Fe^{2+}/Cu^+ , H_2O_2). Na odstránenie peroxidu vodíka sú použité enzýmy a na odstránenie iónu kovu to môže byť oxidáciou železa na trojmocný či väzbou prvku v pevnom cheláte. [4] [5] [6]

2.1.3 Ochrana baktérií voči ROS

Ochrana bunky pred vplyvom reaktívnych foriem kyslíka prebieha dvomi cestami, prvá je enzymatická a druhá neenzymatická. Medzi enzymatické tzv vysokomolekulové antioxidanty patria superoxid dismutáza, kataláza a glutatiónový systém. Najznámejšou z nich je superoxid dismutáza a tá môže byť cytoplazmatická alebo extracelulárna podľa miesta pôsobenia, avšak vyskytuje sa len v aeróbných organizmoch. Jej úlohou je premieňať radikálový superoxid na menej reaktívny peroxid vodíka, ten sa dá odbúrať ďalšími enzýmami, ako napríklad α - tokoferol. Kataláza patrí k vysoko reaktívnym enzýmom a reaguje s peroxidom vodíka za vzniku vody a molekulárneho kyslíka. Glutathion peroxidáza katalyzuje zníženie množstva hydroperoxidov, použitím GSH antioxidantu tvoreného tromi aminokyselinami, čím chráni bunky pred oxidačným poškodením. [7] [4]

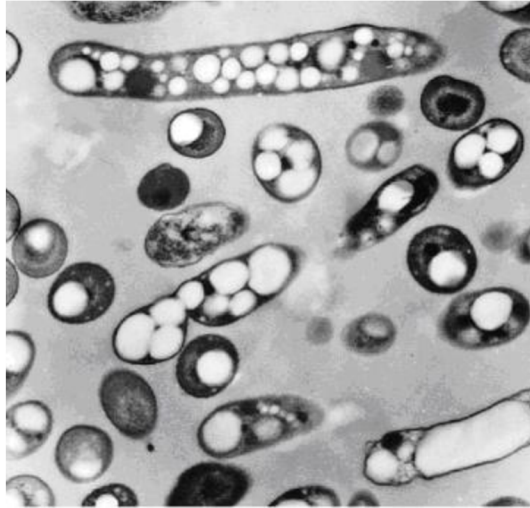
Druhá možnosť ochrany buniek pred ROS sú nízkomolekulové antioxidanty, medzi ktoré patrí už spomínaný glutatión, vitamíny C,E, karotenoidy, koenzým Q_{10} , flavonoidy a iné látky vyskytujúce sa v prírode. Flavín je antioxidant obsahujúci enzým thioredoxyreduktáza, pomocou ktorej je schopný redukovať ROS. Na podobnom princípe pracuje aj β -karotén, ktorý účinne vychytáva O_2 . [1]

2.2 Polyhydroxyalkanoáty (PHA)

Väčšina všeobecne známych plastov má jednu spoločnú ekologickú nevýhodu a to je ich ťažká odbúrateľnosť v prírode. Tým sa tvorí obrovské množstvo odpadu, ktorý je náročné a drahé uskladňovať. Z tohto dôvodu sa začínajú hľadať iné materiály, ktoré by mohli klasické syntetické polyméry nahradiť. Jednou z možností ako nahradiť polyméry z ropy je použiť ľahko odbúrateľné biopolyméry, ktoré sú produkované živými organizmami a práve k takýmto materiálom patria polyhydroxyalkanoáty. [8]

PHA sa nachádzajú a vytvárajú ako zásobný zdroj uhlíka v bakteriálnych bunkách. Ako prvý bol v roku 1926 izolovaný polyhydroxyalkanoát – polyhydroxybutyrát z baktérie *Bacillus megaterium*. Postupom času bolo preukázané, že tieto látky sú produkované veľkou škálou

mikroorganizmov. Najzaujímavejšie na nich je to, že sa svojimi vlastnosťami veľmi podobajú polypropylénu, čiže materiálu, ktorý sa používa na výrobu klasických plastových vecí, no na rozdiel od neho sú schopné v prírode sa úplne rozložiť za niekoľko mesiacov, pričom rozloženie polypropylénu môže trvať niekoľko desiatok alebo až stoviek rokov. Doteraz je veľkou nevýhodou polyhydroxyalkanoátov vysoká cena ich izolácie, a celkovo práca s mikroorganizmami je finančne a časovo náročná. To je aj dôvod, prečo sa zatiaľ nerozšírili do bežného používania a povedomia ľudí. [8] [9]



Obrázok 1: Baktérie akumulujúce polyhydroxyalkanoáty vo forme granúl vo vnútri buniek, zaberajúce až 90 % suchého obsahu baktérie *Cupriavidus Necator* [8]

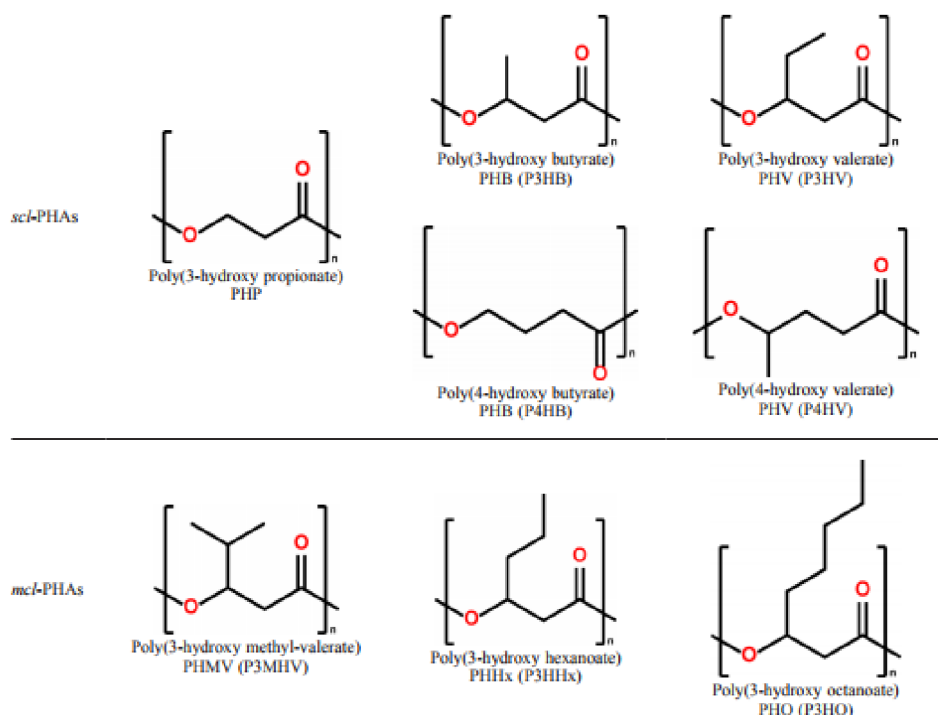
2.2.1 Produkcia polyhydroxyalkanoátov

Mikroorganizmy v sebe dokážu zhromažďovať zásoby uhlíka vo forme PHA, a to až do 90% ich suchej hmotnosti. Schopnosť produkovať PHA má veľké množstvo gramnegatívnych i grampozitívnych baktérií a to v rôznych formách. V súčasnej dobe je známych viac ako 300 rôznych mikroorganizmov, schopných syntetizovať a akumulovať PHA. Na zozname sa nachádzajú napríklad divoké typy baktérií ako sú: *Cupriavidus necator*, viac druhov *Azotobacter* a *Pseudomonas*, ale sú to aj známe druhy ako je napríklad *Escherichia coli*. [10]

Tieto baktérie syntetizujú PHA homopolyméry alebo kopolyméry a ukladajú ich vo forme granúl v cytoplazme, to je možné vidieť na Obrázok 1. Napriek tomu, že schopnosť tvoriť polyméry má veľa organizmov, tak ako priemyselné a laboratórne producenty sa používajú len niektoré z nich, je to z dôvodu, že nie všetky dokážu syntetizovať také množstvo PHA aby to bolo pre výrobu zaujímavé. Ďalším dôležitým aspektom je produkčná cena, tú ovplyvňuje napríklad to aké podmienky na život majú organizmy, teplota potrebná na kultiváciu, pH, nároky na dusík, kyslík, fosfor, živiny a iné. Kultivácia takých organizmov väčšinou prebieha na cukroch alebo olejových surovinách, ako lacnejšia alternatíva sa začínajú využívať odpadné látky ako sú fritovacie oleje, kávova usadenina, melasa a mnoho iných látok. [11]

2.2.2 Syntéza polyhydroxyalkanoátov

Polyhydroxyalkanoáty delíme na takzvané homopolyméry, ktoré sa skladajú len z jedného druhu monomérov, alebo heteropolyméry, tie obsahujú viacero monomérov. Väčšina baktérií produkuje homopolyméry ako PHB – polyhydroxybutyrát. Ďalšia možnosť delenia je podľa dĺžky reťazca monoméru a to na scl (short chain length) krátke reťazce a mcl (medium chain length) stredná dĺžka reťazca. Medzi scl-PHA patria 2 najznámejšie zástupcovia a to už spomínaný poly(-3-hydroxybutyrát) a poly(-3-hydroxyvalerát). Tieto reťazce majú 3 až 5 atómov uhlíka pre jeden monomér a majú odlišné vlastnosti oproti mcl, ktoré majú 4 až 16 atómov uhlíka na jedno monomérnu jednotku. [11]

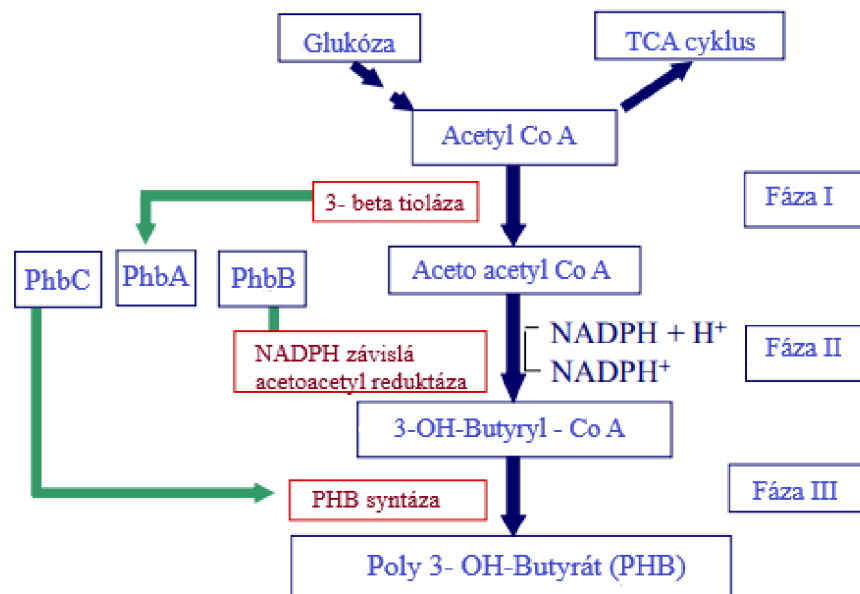


Obrázok 2: Niekoľko základných polyhydroxyalkanoátov rozdelených podľa dĺžky reťazca monoméru [11]

Jedným z rozdielov v ich vlastnostiach je teplota skleneného prechodu, pre scl-PHA je to 0– 5°C no kopolymerizáciou môže byť drasticky znížená, mcl-PHA majú oproti nim nižšiu teplotu skleneného prechodu. Rozdielom je aj to, že mcl-PHA sú pružnejšie, scl-PHA sú viac krehké, menej pevné, a majú nižšiu mechanickú odolnosť, to môže spôsobovať obmedzenie v ich priemyselnej výrobe. Úprava nežiadúcich vlastností týchto látok sa dá doceliť zmenou substrátu, fyziologických podmienok, genetickou modifikáciou alebo aj modifikáciou metabolickej dráhy. Kopolymerácia s 3-hydroxyvalerátom dokáže u PHA zvýšiť prietlačnosť a znížiť teplotu topenia zo 180°C až na 140°C, takto upravené PHA sa svojimi vlastnosťami približujú polyméru kyseliny mliečnej. Najznámejšie PHA sú zobrazené na Obrázok 2. [11]

Samotnú syntézu PHA ovplyvňuje veľké množstvo enzýmových pochodov Obrázok 3. Za normálnych okolností, teda ak je v bunke dusík v dostatočnom množstve tak pomer NAD(P)H ku NAD(P) klesá a acetyl-CoA ide do citrátového cyklu. Tým sa uvoľní CoA pre ďalšie využitie v bunke, avšak akumulácia CoA inhibuje aktivitu enzýmu β -ketothiolázy, ktorý je

potrebný ako prvý krok biosyntézy PHA. Na druhej strane produkcia PHA sa v bunke zvyšuje vtedy ak sa zvyšuje aj pomer NAD(P)H ku NAD(P), to inhibuje enzýmy citrát syntázu a isocitrát dehydrogenázu a dochádza k zablokovaniu citrátového cyklu. V dôsledku toho sa začne hromadiť acetyl- CoA a znižuje sa množstvo CoA, vďaka tomu sa aktivuje enzým β -ketothioláza a začína prvá fáza biosyntézy PHA. Táto fáza vedie k vytvoreniu acetoacetyl-CoA, ten sa pomocou acetoacetylreduktázy transformuje na 3-OH-butyryl-CoA v druhej fáze. Proces syntézy sa ukončí výrobou polyhydroxybutyrátu a to polymerizáciou 3-OH-butyryátových monomérov, pomocou PHB syntázy. Enzýmy biosyntetickej dráhy PHB sú kódované génmi *phaA*, *phaB*, *phaC* a sú organizované do CAB operónu. [10]



Obrázok 3: Schéma biosyntézy polyhydroxyalkanoátov [10]

2.2.3 *Cupriavidus necator* ako baktéria produkujúca polyhydroxyalkanoáty

Mikroorganizmus *Cupriavidus necator* je v súčasnej dobe skúmaný hlavne kvôli produkcii poly-3-hydroxybutyrátu. Tento organizmus patrí k fakultatívne chemolitotrofným gram-negatívnym baktériám známy tiež pod názvom *Ralstonia Eutropha*, *Autersia Eutropha* alebo *Lacaligenes eutrophus*. Dokáže vykonávať aeróbne aj anaeróbne dýchanie. *C. necator* je schopný využiť jednoduché i zložité zdroje uhlíka a to najmä vo forme sacharidov, olejov, mastných kyselín alebo aj z oxidu uhličitého. Rovnako je schopná využiť ako zdroj uhlíka priemyselný odpad, vďaka čomu sa dajú znížiť náklady na produkciu PHB a zároveň odpadové látky zužitkovať. V rámci tejto práce sú významné dva kmene a to *C. necator HI6*, čo je pôvodný kmeň mikroorganizmu produkujúci polyhydroxyalkanoáty a potom je to *C. necator PHB-4*, jedná sa o mutantný kmeň, ktorému bol náhodnou genetickou modifikáciou poškodený enzým potrebný pre tvorbu polyhydroxyalkanoátov a používa sa ako kontrolná vzorka pri analýze produkcie PHA. [12] [13]

2.2.4 Ochranné účinky polyhydroxyalkanoátov na baktérie

Baktérie ako také, majú schopnosť prispôbiť sa podmienkam, v ktorých sa vyskytujú, patria sem: zmena teploty, dostupnosť živín alebo zmena pH. Na baktérie môže pôsobiť aj iný faktor a tým je výskyt ROS v bunkách. Možnosti ktorými sa bunka bráni, boli popísané v kapitole 2.3.1, no dá sa predpokladať, že túto funkciu dokážu zastáť aj PHA[14]. PHA pre bunku predstavujú zásobu uhlíka a energie, ktorú môžu kedykoľvek využiť. Počet granúl v bunke sa pohybuje okolo 10–15 a dosahujú priemer približne 200–400 nm, tieto hodnoty sú však len orientačné pretože záleží na fyziologickom stave konkrétneho mikroorganizmu. Povrch granúl má hydrofóbny charakter a skladá sa okrem iného z rôznych proteínov, pričom každý z nich má špecifický účinok. Množstvo proteínov, vyskytujúcich sa na povrchu granúl, má zatiaľ neobjasnenú funkciu a rovnako mechanizmy prebiehajúce pri premene látok a odbúravaní oxidačného stresu sú veľmi náročné a ich presné fungovanie zatiaľ nebolo preskúmané. [14]

Je však známe, že bunky sa do určitej miery dokážu brániť pred UV žiarením a pred inými formami oxidačného stresu, práve vďaka obsahu PHA. Výskumy dokázali, že kmeň *C. necator H16* je voči takýmto vplyvom odolnejší ako PHA netvoriaci mutant. [14]

Podobné výsledky sa ukázali aj u iného bakteriálneho kmeňa a to *Pseudomonas sp.* teplota, pri ktorej prebieha jeho kultivácia je 28 °C, tento organizmus bol po dobu kultivácie vystavený teplote 10 °C. Rovnako bol použitý pôvodný organizmus produkujúci PHA granule a jeho mutant *phaC*. Výsledky ukázali, že doba zdvojenia pôvodného a mutantného kmeňa bola pri 28 °C veľmi podobná, no pri vystavení 10 °C alebo oxidačnému stresu v podobe peroxidu vodíka bol pôvodný kmeň produkujúci PHA odolnejší. [14] [15]

2.3 Fluorescencia

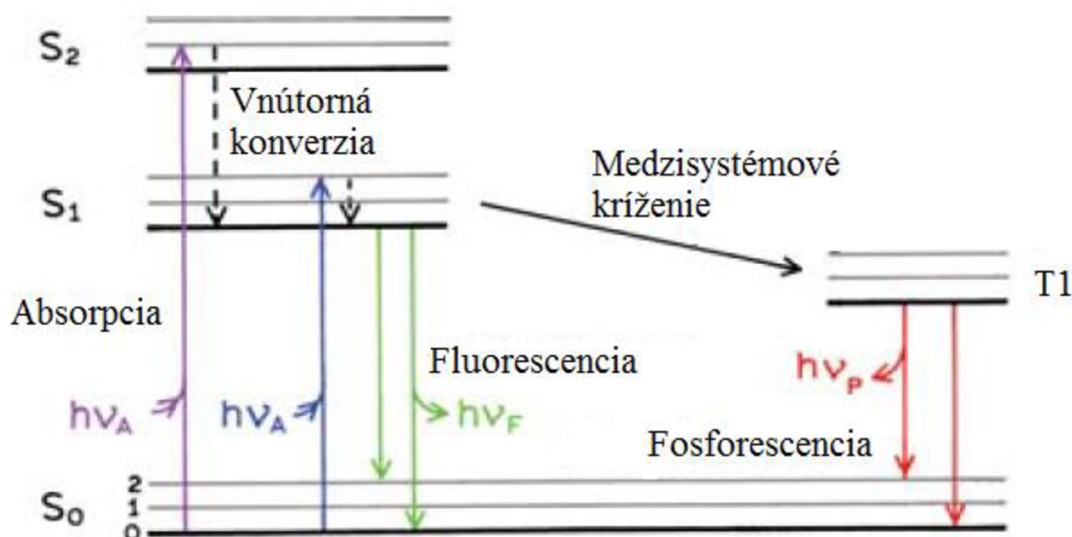
Fluorescencia bola prvý krát pozorovaná už v roku 1565 a zmienka o nej sa nachádzala v správe španielskeho fyzika a botanika N. Monardesa. Avšak vedci sa skutočne začali touto témou zaoberať až v 19. storočí. Prvým objaveným fluorofórom bol chinín v roku 1845, o tento objav sa zapríčinil anglický astronóm a matematik Sir John Fredrich William Herschel, ten ako prvý popísal fluorescenčnú vlastnosť chinínu, keď preukázal, že na slnečnom svetle emituje modré svetlo vlnovej dĺžky približne 450 nm. [18]

Tento prvý známy fluorofór sa zapríčinil o stimuláciu vývoja prvých spektrofluorometrov o ktoré bol záujem v roku 1950 počas druhej svetovej vojny a to z dôvodu lepšieho preskúmania liekov na maláriu obsahujúcich práve chinín. Tieto prvotné testy viedli k výrobe prvého praktického spektrofluorometru.

Fluorescencia je jav, ktorý patrí pod fotoluminiscenciu, čiže prechod do vybudeného stavu je spôsobený svetelným žiarením o vhodnej excitačnej energii. Pre uskutočnenie fluorescencie je potrebné, aby sa elektrón nachádzal v singletovom stave a teda aby mal opačný spin ako jeho párový elektrón v základnom stave. Prechod excitovaného elektrónu späť na základnú hladinu nie je spinovo zakázaný a prebehne veľmi rýchlo, rádovo je to v čase 10^{-10} až 10^{-8} s. [18]

2.3.1 Jablonského-Perrin diagram

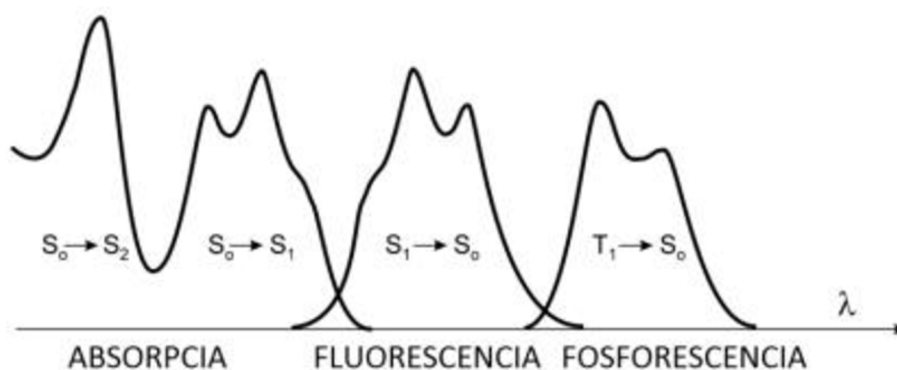
Diagram zobrazuje rôzne procesy, ktoré sa môžu udiť v molekule: absorpcia fotónu, vnútorná konverzia, prechod medzi systémami, fluorescencia, fosforescencia a iné. Singletové elektrónové stavy sú v tomto diagrame označené ako (S_0, S_1, S_2, \dots) a tripletové stavy (T_1, T_2, \dots).



Obrázok 4 Jablonského – Perrinov diagram [17]

Prvý krok znázornený na diagrame je absorpcia fotónu fluorofórom, ktorý bol emitovaný určitým zdrojom svetla, tento fotón má energiu rovnú $h\nu_A$. Elektrón sa tak dostane do excitovaného stavu a prechádza do vyššieho energetického stavu S_1 , na ktorom sa nachádza niekoľko vibračných hladín, elektrón zotrva v excitovanom stave od desiatín až po desiatky nanosekúnd. [16]

Vnútorná konverzia je elektrónový prechod medzi elektrónovými stavmi s rovnakou spinovou multiplicitou. Jedná sa o vnútorný nežiarivý prechod na najnižšiu vibračnú hladinu príslušného excitovaného stavu (Obrázok 4. prerušovaná šípka). Od tohto prechodu môže nastať viac typov emisie. Energeticky najvýhodnejší je priamy prechod z S_1 na hladinu S_0 , ktorý obecné zobrazuje fluorescenciu (Obrázok 4. zelená šípka). Ďalším možným prechodom do základného stavu je medzisystémové kríženie, kedy prebieha nežiarivá deexcitácia zo stavu S_1 do tripletového stavu T_1 . Tento prechod je vo svojej podstate kvantovo zakázaný avšak spin-orbitálna interakcia je v tomto prípade natoľko výrazná, že sa tento proces stáva pravdepodobným. Následne môžu nastať 2 rôzne posuny elektrónu. Prvým je, že dôjde k spätnému medzisystémovému kríženiu zo stavu T_1 do stavu S_1 , po tomto prechode nastáva oneskorená fluorescencia, tá má rovnaké emisné spektrum ako fluorescencia len prebehne s časovým oneskorením. Intenzita tohto deja je závislá od teploty prostredia a v niektorých zdrojoch sa nazýva aj tepelne aktivovaná fluorescencia. Druhou možnosťou je prechod zo stavu T_1 do stavu S_0 (Obrázok 4. červená šípka) kedy je emitované žiarenie vo forme fosforescencie. Fosforescencia môže byť aktívne pozorovaná najmä pri nízkych teplotách a v pevných látkach. Spektrum fosforescencie je oproti fluorescencii posunuté k väčším vlnovým dĺžkam (Obrázok 5), je to spôsobené tým, že energia stavu S_1 je vždy väčšia ako energia stavu T_1 . [19]

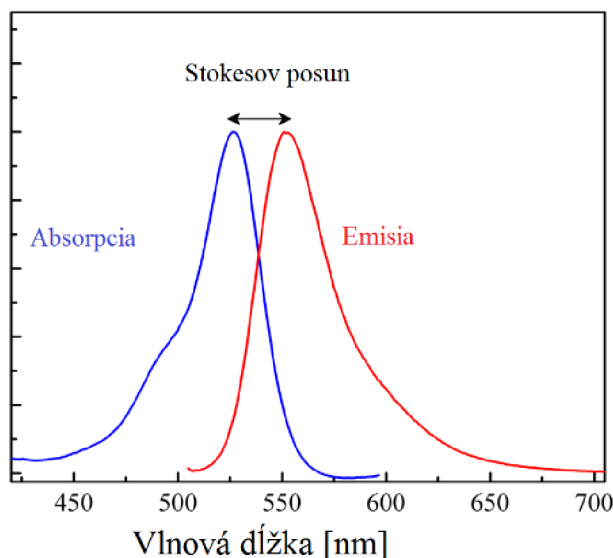


Obrázok 5: Luminiscenčné spektrá [13]

2.3.2 Stokesov posun

Vlnová dĺžka excitačného žiarenia je prakticky vždy kratšia ako vlnová dĺžka emitovaného žiarenia (Obrázok 6). Tomuto javu sa hovorí Stokesov posun a prvý krát bol pozorovaný G.G. Stokesom v roku 1852. Objavu predchádzal jednoduchý experiment s chinínom na slnečnom svetle, ktoré prechádzalo cez modrý pohár, čo spôsobovalo ultrafialové žiarenie. Cez tento filter prechádzalo žiarenie s vlnovou dĺžkou menšou ako 400 nm. Chinín žiarenie absorboval a to vyvolalo fluorescenciu vyskytujúcu sa pri vlnovej dĺžke 450 nm. [16]

Z experimentu sa dá posúdiť, že energetické straty medzi excitáciou a emisiou sú bežným dejom prevádzajúcim fluorescenciu. Príčin posunu je viac no hlavnou je rýchly presun elektrónu na najnižšiu vibračnú hladinu S_1 a následný pokles do vyššej vibračnej hladiny S_0 . Prebytočná vibračná energia sa takto môže premeniť na teplo a teda dochádza k ďalším stratám excitačnej energie. [16]



Obrázok 6: Stokesov posun

2.4 Fluorescenčná mikroskopia

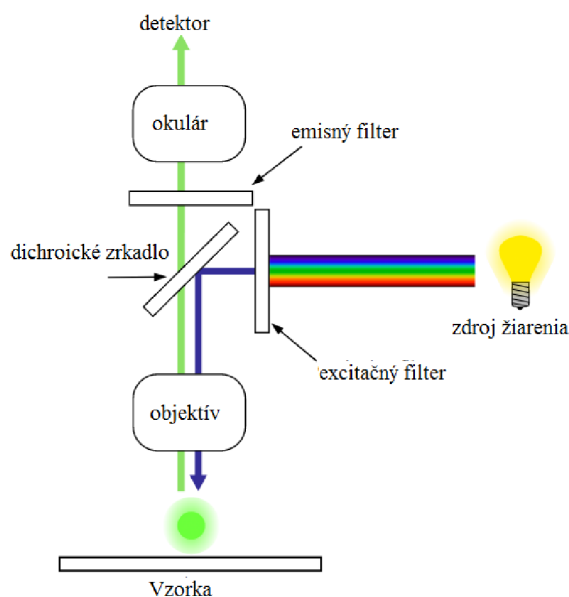
Z informácii o fluorescencii, ktoré sú uvedené vyššie sa dá zistiť ako prebieha samotný dej emisie určitého žiarenia. No na lepšie pozorovanie bolo potrebné vymyslieť sprostredkovateľa, ktorý by umožnil pozorovať veľmi malé objekty ľudským okom a tým sa stal fluorescenčný mikroskop. Na bežnú laboratórnu prácu sa používa väčšie množstvo rôznych mikroskopov. Všetky pracujú na inom princípe, no vždy ide o priblíženie a preskúmanie drobných preparátov. Fluorescencia v tomto smere umožňuje špecifické označenie molekúl v tkanivách, zviditeľnenie niektorých bunkových štruktúr, nájdenie určitých sekvencií nukleotidov v DNA či RNA. [21] [27]

Pokusy o vytvorenie fluorescenčného mikroskopu siahajú na počiatok 20 storočia. Prvý fluorescenčný mikroskop vychádzal z konštrukcie mikroskopu pre UV žiarenie no využitie tohto objavu nebolo ešte niekoľko desaťročí docenené. Ďalšie pokusy vyvinuli techniku sekundárnej fluorescencie v roku 1930. O 50 rokov neskôr Daniel Axelrod vytvoril metódu excitácie vzorkou pomocou evanescentných vln pri totálnom odraze a podarilo sa mu získať lepšie rozlíšenie malých detailov. Súčasná konštrukcia fluorescenčných mikroskopov pochádza z roku 1932 od E. Singera. [21]

2.4.1 Fluorescenčný mikroskop

Sú známe dva rôzne typy fluorescenčných mikroskopov. Prvým z nich je transfluorescenčný, tento mikroskop osvetľuje vzorky z druhej strany ako je objektív. Svetlo prechádza excitačným filtrom a na preparát dopadá zospodu.

Druhým, častejšie používaným, typom je epi-fluorescenčný mikroskop, ktorý osvetľuje vzorku cez objektív. V tomto mikroskope musí byť zabudované dichroické zrkadlo, ktoré odráža excitačné svetlo do objektívu a prepúšťa emisné svetlo do okuláru. [18] Mikroskop sa skladá z niekoľkých základných častí ako je osvetlenie, dichroické zrkadlo, objektív, filtre, detektor (Obrázok 7).



Obrázok 7: Schéma priechodu žiarenia epi-fluorescenčným mikroskopom [21]

Osvetlenie musí byť monochromatickým svetelným zdrojom, ktoré emituje dostatočne intenzívne žiarenie v ultrafialovej a viditeľnej oblasti. Najčastejšie sa používajú lasery. [20]

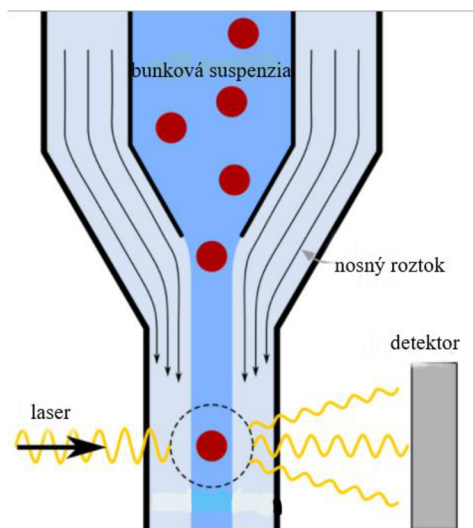
Sústava filtrov je zoradená do špeciálnej filtovej kocky, v ktorej excitačný filter prepúšťa iba svetlo, ktoré je potrebné k excitácii. Nachádza sa medzi zdrojom svetla a vzorkou. Ďalší filter je dichroické zrkadlo, to slúži k oddeleniu excitovaného a emitovaného svetla. Ak sa umiestni do optickej dráhy v uhle 45° , kratšie vlnové dĺžky odráža a dlhšie ním prechádzajú. Jeho hlavnou prednosťou je veľká efektívnosť oddelenia excitačného a fluorescenčného svetla. Účinnosť odrazu excitačného svetla je viac ako 90 % a účinnosť prechodu fluorescenčného svetla je rovnako väčšia ako 90 %. Celková účinnosť oddelenia je teda viac ako 80 %. Posledný filter v tejto sústave je bariérový (emisný), ten prepúšťa iba fluorescenčné (emitované) svetlo, čím poskytuje čierne pozadie k fluorescenčnému obrazu. Nachádza sa medzi vzorkou a okulárom. Navyše umožňuje z fluorescenčného spektra nechať prejsť iba jeho časť. Vhodná kombinácia dichroického zrkadla, excitačného a emisného filtra pre použitý druh fluorochromu je základom úspešného pozorovania fluorescenčným mikroskopom alebo mikroskopom s epifluorescenčným nastavcom. [20].

Poslednou dôležitou časťou fluorescenčného mikroskopu je detektor pripojený na software pre obrazovú analýzu. Umožňuje spracovávať obrazový výstup kvantitatívnym i kvalitatívnym spôsobom. [21]

2.5 Prietoková cytometria

Prietoková cytometria je analytická metóda, ktorá umožňuje kvalitatívne a kvantitatívne sledovanie vlastností jednotlivých buniek. Moderné prístroje umožňujú analyzovať súbežne až okolo 15 parametrov na jednej konkrétnej bunke a preto sa používa aj označenie viacrozmerná prietoková cytometria. [24]

Analyzačný postup tejto metódy začína výberom vhodného fluoroforu, tento proces je náročný a závislý na veľa parametroch, napr. podľa toho či ide o viabilitu buniek alebo obsah určitej látky v bunke, taktiež je potrebné zohľadniť možnú toxicitu a objem použitého farbiva. Vzorka na analýzu sa najskôr spracúva enzymatickou degradáciou, centrifugáciou alebo filtráciou, aby sa vyizolovali požadované bunky, suspenzia je potom zafarbená už spomínaným vhodne vybraným fluorescenčným farbivom. Až vtedy je možné použiť ju na cytometriu. Vzorka sa najskôr nasaje do fluidného systému, kde okolo suspenzie preteká nosný roztok, ktorý so sebou strháva bunky a zaisťuje prietok buniek v 1 rade za sebou. Tento jav sa nazýva hydrodynamická fokusácia a je zobrazená na Obrázok 8. Pri vyššom rozdieli tlakov nosnej kvapaliny a vzorku preteká široký prúd vzorky, ak je rozdiel tlakov nastavený na vhodný, teda nižší, rozdiel tak preteká úzky tok vzorky, čo znamená vždy jednu bunku v plošnom priereze.

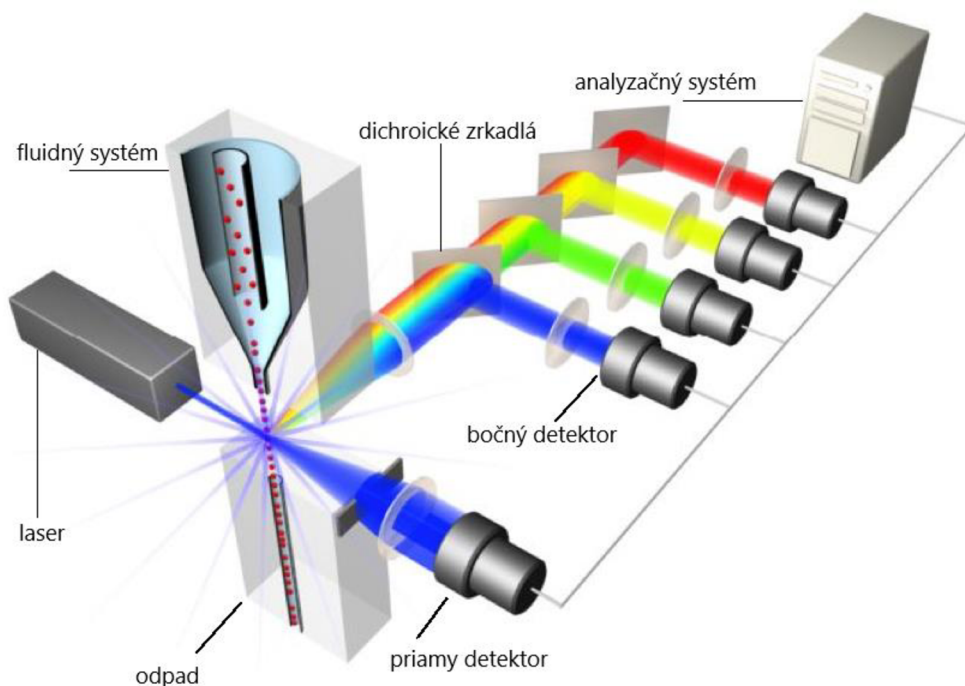


Obrázok 8: Fluidný systém prietokovej cytometrie [25]

Ako zdroj svetla sa v prietokovej cytometrii používa laser. V súčasnej dobe sú to najčastejšie 2 lasery, jeden je modrý s vlnovou dĺžkou 488 nm a druhý červený s vlnovou dĺžkou 635 nm. Lúč svetla sa zameria na prietokovú komôrku a sníma jednotlivé bunky označené fluoroforom. Bunka časť svetla pohltí, časť rozptýli do všetkých smerov a časť je vyžiarená vo forme fluorescence. [24]

Ďalšou časťou prietokového cytometra je optika, je to systém filtrov a zrkadiel, ktoré majú za úlohu zber vyžiareného svetla. Na Obrázok 9 je možné vidieť, že svetlo je zachytávané v dvoch smeroch. Senzor predného rozptylu, alebo tiež forward scatter channel (FSC), zachytáva signál v približnom uhle 160° od vychádzajúceho laserového lúča. FSC teda poskytuje informácie korelujúce s veľkosťou bunky a viabilitou, dokáže rozlíšiť živé bunky od mŕtvych. Svetelný rozptyl, ktorý je zachytávaný v 90° uhle sa nazýva bočný rozptyl. Side scatter channel (SSC), kanál sa skladá zo série dichroických zrkadiel, ktoré poskytujú informácie o členitosti a rozmanitosti vnútorného priestoru bunky. Dichroické zrkadlá sú charakteristické tým, že prepúšťajú iba žiarenie o určitej vlnovej dĺžke. Zrkadlá môžu byť long pass (LP) to znamená, že prepúšťa všetky vlnové dĺžky vyššie ako špecifikovaná vlnová dĺžka, short pass (SP), ktoré prepúšťajú všetky vlnové dĺžky kratšie ako špecifikovaná vlnová dĺžka alebo existujú band pass (BP) filtre, tie prepustia len špecifikované rozmedzie vlnových dĺžok. Filter býva umiestnený v uhle 45° , časť dopadajúceho svetla je odrazená v uhle 90° od prichádzajúceho lúča, časť svetla je prepustená ďalej, kde sa nachádza ďalšie zrkadlo. Pri postavení viacerých filtrov za sebou dochádza k rozdeleniu svetelného lúča do jednotlivých farebných fluorescenčných kanálov. [26]

Ako detektor sa používa fotonásobič, ten má za úlohu znásobiť a transformovať lúče viditeľného svetla na elektrický impulz pozostávajúci z veľkého množstva elektrónov. Pri dopade fotónov na fotokatódu sa uvoľní veľmi malé množstvo elektrónov, tie interagujú s elektródami, ktoré majú povrch upravený tak, že dokážu násobiť impulz. Tým sa uvoľňuje stále viac elektrónov, dopadajú na anódu fotonásobiča a vytvorí sa tak merateľný elektrický impulz, ktorý sa spracováva. [30]



Obrázok 9: Prietoková cytometria [23]

2.6 Fluorescenčné sondy

Látky, ktoré vykazujú fluorescenciu sú nazývané fluorofory alebo tiež fluorescenčné farbivá. Medzi takéto látky patria hlavne aromatické zlúčeniny, ako sú polyaromatické deriváty uhlovodíkov alebo heterocyklov. Fluoreskujúce molekuly sú používané na výskum fyzikálno-chemických, biochemických, a biologických systémov a delia sa na 3 skupiny. Vnútorne fluorofory (prirodzené), vonkajšie kovalentne naviazané fluorofory (fluorescenčné značky) a vonkajšie asociačné fluorofory (fluorescenčné sondy). [19]

Len malé množstvo látok prirodzene fluoreskuje ako napríklad niektoré aminokyseliny v proteínoch (napr. tryptofan). Vo väčšine, látky ktoré sú skúmané samé nefluoreskujú a je potrebné pridať k nim fluorescenčnú sondu alebo značku. Výrobe fluorescenčných značiek predchádza zložitá syntéza a preto sa vo výskume najčastejšie používajú fluorescenčné sondy. Ich základná schopnosť je, že sa rozmiestnia v skúmanej molekule do mikro-prostredia na základe fyzikálno-chemických vlastností. Výber vhodnej fluorescenčnej sondy je veľmi dôležitá časť fluorescenčnej mikroskopie. Podľa skúmanej látky sa vyberá hydrofilný, hydrofóbny alebo amfifilný charakter. Rovnako záleží aj na citlivosti sondy na jej tvare, veľkosti a fotostabilite. [16] [18]

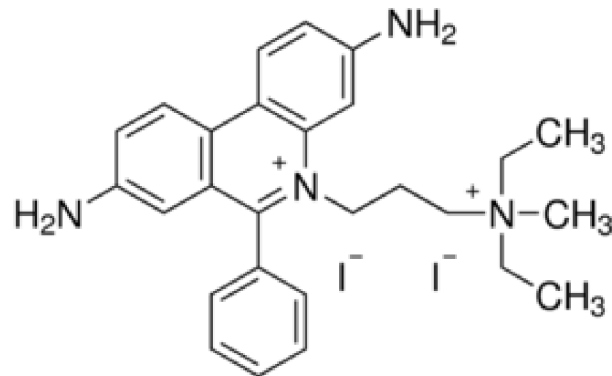
Fluorescenčné sondy sa ďalej delia na polárne, viskózne, membránové, na sondy pre membránový potenciál, sondy pre nukleové kyseliny a sondy na prenos energie. [18]

2.6.1 Propidium jodid

Patrí k fluorescenčným značkám, používa sa na stanovenie vitality buniek. Je to látka nepriepustná pre intaktnú cytoplazmatickú membránu. Farbivo sa viaže na nukleovú kyselinu a prejaví sa červenou farbou. Živé bunky sa od mŕtvych líšia napríklad schopnosťou vylučovať, prípadne úplne zabrániť molekulám preniknúť cez cytoplazmatickú membránu, naopak mŕtve

bunky s poškodenou membránou tomu nedokážu zabrániť a preto sa PI nazýva sondou membránovej integrity. Táto sonda má uplatnenie ako v prokaryotických tak v eukaryotických bunkách, má jednoduché použitie a emitované svetlo je jasné. Vo vodnom roztoku má sonda excitačné maximum 493 nm a emisné maximum 636 nm. [27] [29]

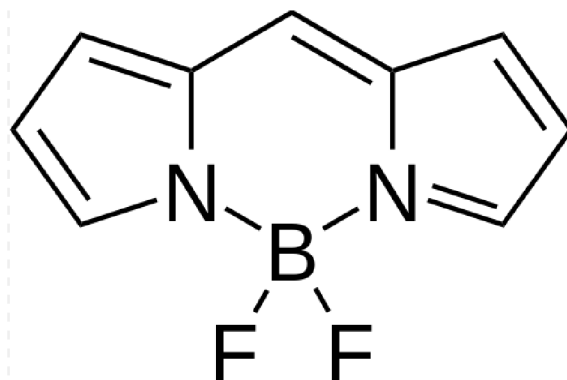
Manipulácia s týmto farbivom by mala byť veľmi opatrná a to z dôvodu možnej karcinogenosti. Sonda sa v bunke viaže na DNA konkrétne medzi bázami, výber miesta a zaradenie je náhodný. Propidium jodid (Obrázok 10) má dobré využitie ako na mechanické počítanie buniek, tak na fluorescenčnú mikroskopiu alebo pri cytometrickej analýze. [27]



Obrázok 10: Propidium jodid [32]

2.6.2 BODIPY 493/503

Celým názvom je to 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene, Obrázok 11, je to pomerne nová skupina fluorescenčných sond. Molekula tohto farbiva obsahuje atómy bóru a má veľmi dobré vlastnosti. Jednou z nich je schopnosť modifikovať ich molekulárnu kosť, čo poskytuje možnosti meniť optické vlastnosti tohto farbiva. BODIPY má veľmi malý Stokesov posun a teda vysoký fluorescenčný kvantový výťažok, tepelnú stabilitu a fotostabilitu v soľných a pevných stavoch. Excitačné / emisné maximum tejto sondy je 493/503 nm. Patrí k lipofilným sondám čo znamená, že má schopnosť vnoriť sa do lipidových dvojvrstiev cytoplazmatickej membrány a tiež ďalších hydrofóbných organel, napr. do PHA granúl. [19] [31]

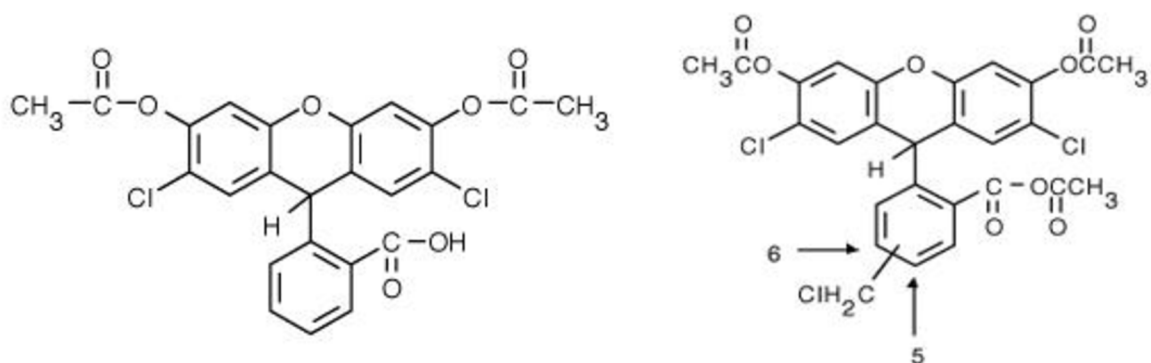


Obrázok 11: farbivo BODIPY [19]

2.6.3 H₂DCFDA

Jedná sa o redukovanú formu fluoresceínu, ktorá slúži ako indikátor ROS v bunke, sonda v prvom kroku difunduje do bunky. Pri výskyte ROS sa odštiepia acetálové skupiny pomocou intracelulárnych esteráz a sonda sa oxiduje z nefluorescenčnej H₂DCFDA na vysoko fluorescenčný 2,7-dichlór-fluoresceín (DCF). Sonda sa pred použitím musí rozpustiť v DMSO alebo v ethanole, následne je citlivá na teplo a svetlo, preto sa skladuje v tme pri 5 °C. Excitačné spektrum leží vo vlnovej dĺžke 492–495 nm a emisné spektrum leží vo vlnovej dĺžke 517–527 nm. [33]

Pre bunkovú analýzu sa používa i derivát vyššie spomínanej sondy a to konkrétne chlórmetyl derivát H₂DCFDA (CM-H₂DCFDA). Ten vykazuje lepšiu retenciu v živých bunkách, kde okrem acetálových skupín reaguje aj thiol reaktívna chlórmetyl skupina s intracelulárnym glutatiómom. Nasleduje oxidácia na vytvorenie výsledného produktu, ktorý je zachytený vo vnútri bunky a poskytuje silnú fluorescenciu. [34]



Obrázok 12: naľavo štruktúra fluorescenčnej sondy H₂DCFDA, napravo štruktúra fluorescenčnej sondy CMH₂DCFDA [33] [34]

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Použité baktérie, fluorescenčné sondy a ostatné pomôcky

3.1.1 Použité baktérie

Pre túto bakalársku prácu sa používali baktérie druhu *Cupriavidus necator H16*, ktoré boli získané z Českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity v Brne. Ako kontrolný organizmus sa používal kmeň *Cupriavidus necator PHB-4*, ktorý bol zakúpený v Liebnitz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Braunschweig, Nemecko.

3.1.2 Fluorescenčné sondy

BODIPY 493/503	(Thermo Fisher Scientific)
Propidium jodid	(eBioscience)
H2DCFDA	(Thermo Fisher Scientific)
CM-H2DCFDA	(Thermo Fisher Scientific)

3.1.3 Používané prístroje

Analytické váhy, Boeco
Bežné laboratórne pomôcky a sklo
Fluorescenčný mikroskop, Micro Time 200, PicoQuant GmbH
Laminárny box Aura mini, Bio Air Instruments
Odstredivka, Sigma 1–14
Plynový chromatograf GC-FID, Hewlett Packard, Series II 5890
Kolóna: DB-WAX 30 m by 0,25 mm
Prietokový cytometer, Apogee A50, ApogeeFlow Systems
Temperovaná trepačka, Heidolph unimax 1010
Termostat, LS-35
Váhy, Kern EW
Vortex, Benchmark

3.2 Kultivácia baktérií

3.2.1 Zloženie použitých medií

Pre výrobu pevného agarového média, na ktorom boli uchovávané bakteriálne kultúry a zároveň na prípravu inokula bolo používané submerzné médium Nutrient Broth (NB)

Zloženie Nutrient Broth:

Beef extract	10 g · l ⁻¹
Pepton	10 g · l ⁻¹
NaCl	5 g · l ⁻¹
Agar	20 g · l ⁻¹

Zloženie inokulačného média:

Nutrient Broth	25 g · l ⁻¹
Destilovaná voda	1 000 ml

Minerálne médium pre kultiváciu *C. necator* H16 a PHB-4 sa skladalo z:

KH ₂ PO ₄	1,02 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g
Na ₂ HOP ₄	11,1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
destilovaná voda	1 000 ml
Roztok stopových prvkov	1 ml

Zloženie roztoku stopových prvkov:

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	1 000 ml

Zloženie fosfátového pufru (PBS):

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

3.2.2 Agarová platňa

Agarová platňa sa skladala z agaru, submerzného média NB a destilovanej vody. Pripravený roztok bol sterilizovaný v tlakovom hrnci po dobu 60 minút. Následne bolo médium v Laminárnom boxe rovnomerne rozliate na Petriho misky, po jeho ochladení a stuhnutí naň bola zaočkovaná bakteriálna kultúra. Následne boli Petriho misky umiestnené do termostatu na 30 °C po dobu 24 hodín. Bakteriálna kultúra sa uchovávala na Petriho miskách pri teplote 4 °C a bola preočkovaná každých 30 dní.

3.2.3 Inokulum

Inokulum pre bakteriálnu kultiváciu bolo pripravované do 100 ml Erlenmeyerových baniek, tie obsahovali 50 ml sterilného roztoku NB v destilovanej vode. Očkovanie prebiehalo v sterilnom prostredí laminárneho boxu a bakteriálna kultúra bola niekoľkokrát prenesená bakteriologickou kľučkou z Petriho misky do inokulačného média. Takto pripravené inokulum sa 24 hodín inkubovalo na temperovanej trepačke pri teplote 30 °C a frekvencii 180 rpm.

3.2.4 Minerálne médium

Minerálne médium bolo pripravené podľa receptu (bez roztoku stopových prvkov) a sterilizovalo sa 60 minút v tlakovom hrnci. Následne bolo v sterilnom prostredí pridané 0,1 ml roztoku stopových prvkov, 5 ml roztoku fruktózy v destilovanej vode s koncentráciou 40 g/100 ml. Na záver sa do minerálneho média pridalo 10 ml inokula. Tento roztok bol po dobu 78 hodín kultivovaný na temperovanej trepačke pri teplote 30 °C a frekvencii 180 rpm.

3.2.5 Navodenie oxidačného stresu

Pre navodenie oxidačného stresu boli použité 3 druhy látok. Peroxid vodíka v jeho 30% roztoku, ten bol pridávaný do 100 ml bakteriálnej kultúry, podľa požadovanej koncentrácie (10 mM roztok, 100 mM roztok, 1 M roztok), následne bola kultúra na 15 minút ponechaná na temperovanej trepačke pri teplote 30 °C a frekvencii 180 rpm.

Fentonova reakcia bola pripravená pomocou 2 mM roztoku peroxidu vodíka (30% roztok) ten bol pridaný k 100 ml bakteriálnej kultúry a ponechaný 1 hodinu na temperovanej trepačke pri 30 °C a pri frekvencii 180 rpm. Následne bol pridaný hexahydrát síranu železato-amónneho na koncentráciu 0,1 mM.

Posledný experiment bol pripravený pomocou hexahydrátu chloridu kobaltnatého. Látka bola pridaná do 100 ml bakteriálnej kultúry na koncentráciu 0,5 mM a 5 mM. Roztok bol ponechaný na 10 minút na temperovanej trepačke pri 30 °C a pri frekvencii 180 rpm.

Takto pripravené 100 ml Erlenmayerove banky, obsahujúce bakteriálnu kultúru s prídavkom reaktantu, boli ďalej pripravené na analýzu popísanú v nasledujúcej kapitole.

3.2.6 Príprava vzoriek na analýzu

Vzorky na prietokový cytometer aj fluorescenčný mikroskop boli pripravované rovnakou metódou. Bol odobratý 1 ml kultúry, koncentrácia bola upravená na 10^6 buniek, ktorý bol odstreďovaný po dobu 90 sekúnd pri 7 000 rpm. Usadená kultúra bola dva krát premytá roztokom PBS a následne rovnako doplnená roztokom PBS na 1 ml. Obsah vzorku sa menil podľa druhu látky, ktorá spôsobovala oxidačný stres.

3.3 Analýza prietokovým cytometrom

Analyzovaná vzorka v mikroskúmavke typu Ependorf bola vložená do prietokového cytometra, kde bola podľa nastavených parametrov nasatá fluidným systémom do prístroja. Prietok bol pre všetky merania nastavený na $16,7 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ a objem analyzovanej vzorky bol 100 μl .

3.3.1 Farbenie vzoriek fluorescenčnými sondami

Každá fluorescenčná sonda vyžadovala vlastné podmienky kultivácie, ako je koncentrácia, inkubačná doba a pracovná teplota. Keďže fluorescenčné sondy patria k toxickým a mutagénym látkam, bolo potrebné dodržiavať bezpečnostné opatrenia ako je nosenie ochranných rukavíc a ochranného plášťa. Všetky fluorescenčné sondy sú na svetle a pri laboratórnej teplote nestabilné preto boli skladované v tme pri 4 °C. Pre tri zo štyroch použitých fluorescenčných sond už bola optimalizácia vykonaná a potrebná koncentrácia sa jednoducho pridala do vzorky. U farbiva H2DCFDA bolo potrebné vykonať optimalizáciu použitím rôznych koncentrácií.

Fluorescenčná sonda CM-H2DCFDA bola zriedená na koncentráciu $50 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$, použitím dimethylsulfoxidom (DMSO). Následne bola pridaná k analyzovanej vzorke do mikroskúmavky typu Ependorf podľa Tabuľka 1: Použité fluorescenčné sondy.

Tabuľka 1: Použité fluorescenčné sondy

Názov sondy	Koncentrácia [$\mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$]	Inkubačná doba [min]	Teplota inkubácie
Propidium jodid	7	15	Laboratórna teplota
BODIPY	2,5	10	Laboratórna teplota
H2DCFDA	10	10	Laboratórna teplota
CM– H2DCFDA	5	10	Laboratórna teplota

Sonda H2DCFDA (dichlorofluoresceindiacetát) je rovnako ako CM – H2DCFDA sondou na detekciu ROS v bunke, to znamená, že sa pôsobením ROS dokáže premeniť na DCF, ktorý je silne fluorescenčný. Na jej optimalizáciu bol použitý základný roztok, roztok 100 krát zriedený a 1 000 krát zriedený. Zriedené roztoky boli použité v koncentrácii $5 \mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$ a $10 \mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$.

3.4 Zistenie obsahu PHB v bakteriálnych bunkách pomocou plynovej chromatografie

Do plastovej skúmavky bola odobratá bakteriálna kultúra, tá bola v odstredivke 2 krát premytá destilovanou vodou a vzniknutá biomasa sa nechala vysušiť pri $70 \text{ }^\circ\text{C}$ niekoľko dní. Zo suchej biomasy sa navážilo presne 8–10 mg, následne bol pridaný 1 ml chloroformu a 0,8 ml roztoku 15% kyseliny sírovej v methanole s vnútorným štandardom, kyselinou benzoovou. Takto pripravené vialky boli umiestnené do termostatu na $100 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 3 hodín. Počas tejto doby prebehla hydrolýza PHA a esterifikácia za vzniku methylesterov.

Po hydrolýze boli nečistoty rozpustené vo vode a extrahované $0,5 \text{ ml } 0,05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztokom NaOH. Po extrakcii bola odobratá chloroformová frakcia do novej vialky s chloroformom na celkový objem 1 ml a bola ihneď uzavretá. Meranie sa skladalo z kalibračnej krivky, ktorá pozostávala zo štandardnej vzorky kopolyméru P(3HB-co-3HV) a samotnej analýzy.

Nosný plyn prechádzal stacionárnou fázou v kolóne, vzorka bola pomocou injektora vnesená do vyhrievacieho bloku, kde dochádzalo k odpareniu, následne bol prenesený nosným plynom na kolónu. Zložky vzorky boli separované na základe ich mobilite k stacionárnej fáze. Na konci kolóny sú látky analyzované detektorom, ktorý stanoví kvalitatívne a kvantitatívne zastúpenie látok vo vzorke, výsledky sú zobrazené na chromatograme,

3.5 Analýza fluorescenčným mikroskopom

Vzorky boli pripravené podľa kapitoly 3.2.6, k 1 ml vzorku bola pridaná fluorescenčná sonda podľa typu merania, koncentrácie boli totožné s tými, ktoré sa používali na prietokový cytometer. Zafarbená bunková suspenzia bola aplikovaná na mikroskopické sklíčko v objeme približne $10 \mu\text{l}$, následne bola fixovaná 2% roztokom agarózy s teplotou pod $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Všetky vzorky boli pozorované na konfokálnom mikroskope s použitím vodného imerzného objektívu. Laser použitý na excitáciu mal vlnovú dĺžku 467 nm .

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

4.1 Reakcia na oxidačný stres spôsobený peroxidom vodíka

4.1.1 Stanovenie viability pomocou fluorescenčnej sondy propidium jodid

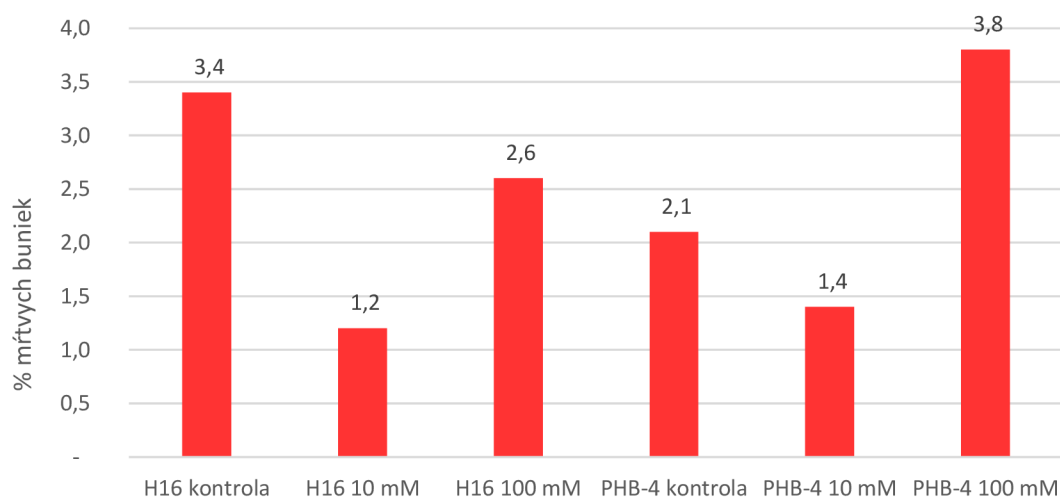
Bunky kultúry *Cupriavidus necator* boli v rámci prvého experimentu exponované peroxidu vodíka a následne boli podrobené analýze na prietokovom cytometre. Pre stanovenie viability bola použitá fluorescenčná sonda propidium jodid, tá má schopnosť prenikať cez cytoplazmatickú membránu mŕtvych buniek, ktoré navyše strácajú schopnosť cudziu látku vypudiť. Na analýzu boli použité bunky baktérie *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB-4.

Tabuľka 2: Zobrazenie výsledkov celej analýzy, farbenie sondou propidium jodid, pomocou ktorej sa dá určiť percentuálne zastúpenie živých a mŕtvych buniek. Na analýzu boli použité 3 vzorky pre každý kmeň. Prvá bola slepá vzorka, druhá s 10 mM koncentráciou peroxidu vodíka a tretia so 100 mM koncentráciou peroxidu vodíka

*SHF – Stredná hodnota fluorescencie získaná z histogramu pre danú vzorku

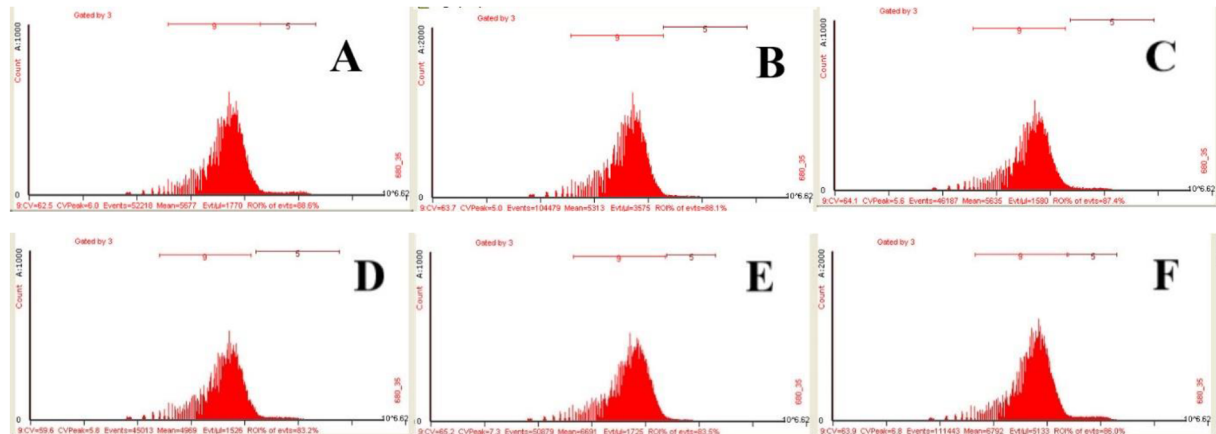
% zastúpenie živých a mŕtvych buniek ukazuje bunky, ktoré boli vybraté z cytogramu pre danú vzorku, v tomto výbere sa nachádza skupina najpodobnejších buniek, keďže bunky boli prítomné aj mimo tento okruh tak percentuálne zastúpenie z celej vzorky nikdy nebude 100%.

<i>Cupriavidus necator</i>	Propidium jodid					
	Koncentrácia peroxidu vodíka	Počet buniek	červený kanál			
			SHF*	% živých	SHF*	% mŕtvych
H16	slepá vz.	63 589	5 862	89,0	75 911	3,4
H16	10 mM	134 462	5 298	87,9	51 814	1,2
H16	100 mM	59 869	5 792	87,0	63 747	2,6
PHB-4	slepá vz.	59 529	5 491	84,8	59 817	2,1
PHB-4	10 mM	70 867	6 690	83,5	49 073	1,4
PHB-4	100 mM	148 315	6 792	86,0	73 715	3,8



Graf 1: Na osi y je zobrazené % mŕtvych baktérii, farbených viabilnou sondou PI. Na osi x je typ vzorky, pre oba kmene baktérie boli použité dve rôzne koncentrácie peroxidu vodíka a jedna kontrolná vzorka bez peroxidu

V tabuľke 2 je možné pozorovať, že stredná hodnota fluorescence (SHF) živých buniek je oveľa nižšia ako u mŕtvych, to je spôsobené práve vlastnosťami viabilnej sondy, ktorá preniká do mŕtvych buniek. Z Graf 1 je viditeľné, že prídavok 100 mM peroxidu vodíka mal väčší vplyv na kmeň *C. necator* PHB-4, keďže vzrástlo percento mŕtvych buniek avšak rozdiel nie je natoľko závažný. Takéto pozorovanie buniek je zaťažené odchýlkami spôsobenými napríklad rozličným množstvom buniek vo vzorkách.

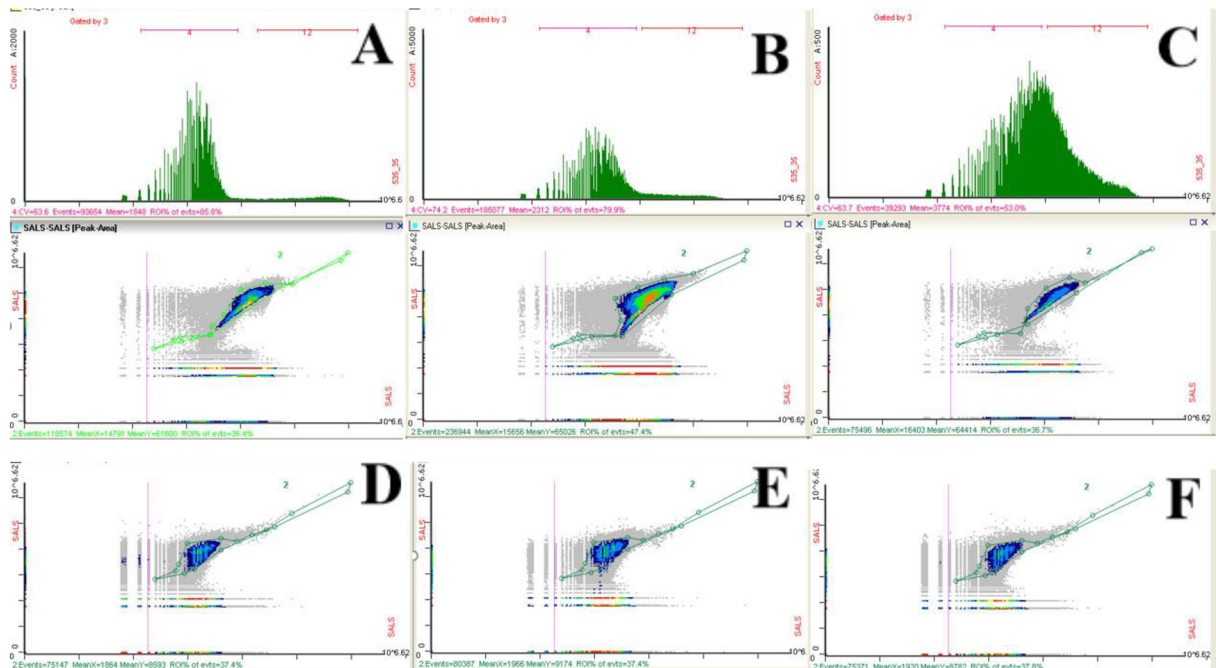


Obrázok 13: Histogram zobrazujúci signál z červeného kanála u baktérii farbených PI. Horná rada zobrazuje rod *C. necator* H16 a dolná rada rod *C. necator* PHB-4. (A), (D) kontrolné vzorky, (B), (E) prídavok 10mM peroxidu vodíka, (C), (F) prídavok 100mM peroxidu vodíka. Vysoký pik nľavo zachytáva živé bunky.

4.1.2 Stanovenie pomocou fluorescenčnej sondy BODIPY 493/503

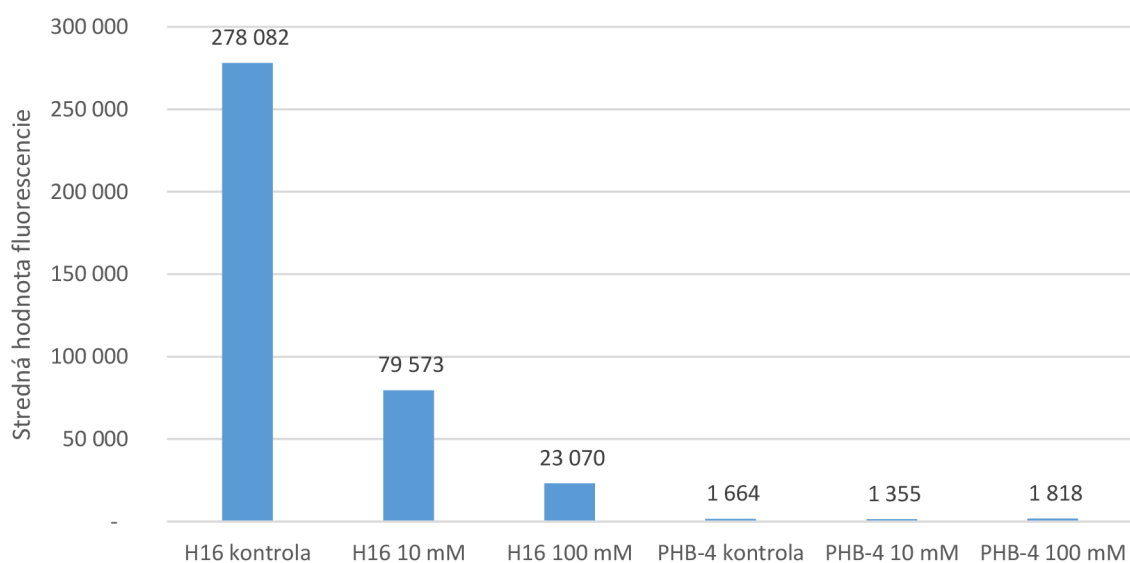
Farbenie lipofilnou fluorescenčnou sondou BODIPY sa používa k analýze intracelulárnych granúl PHA. Sonda sa viaže na hydrofilné PHA granule, to znamená, že baktérie *C. necator* H16 obsahujúce PHA budú vykazovať oveľa vyššiu strednú hodnotu fluorescence ako *C. necator* PHB-4, ktorý granule PHA neobsahuje.

Analýza vzoriek pomocou lipofilného farbiva BODIPY bola vykonaná na rovnakom type vzoriek ako analýza PI. Pre baktérie *C. necator* H16 bolo pozorované, že stredná hodnota fluorescence bola najvyššia u vzorky čistých buniek a s pribúdajúcou koncentráciou peroxidu vodíka sa znižovala. To mohlo byť spôsobené postupným znižovaním intracelulárnych PHA v bunkách pôsobením peroxidu vodíka.



Obrázok 14: Prvé dva rady obrázkov zachytávajú bunky *C. necator* H16, k tým je priložený aj histogram zo zeleného kanála, vzorky (A), (B) ukazujú vyšší pik naľavo ale i druhý, menej zreteľný pik napravo. To naznačuje výskyt subpopulácie. Posledný rad vzoriek (D,E,F) predstavuje kmeň *C. necator* PHB-4, u ktorého sa subpopulácia nevyskytovala a preto histogramy nie sú priložené.

Obrázok 14 zobrazuje okrem pôsobenia peroxidu vodíka na bakteriálnu kultúru i záznamy z cytogramov. Na osi x a y sa nachádza veličina SALS (small angle light scatter), ktorá je zachytávaná zo senzoru predného rozptylu a hovorí o veľkosti buniek. V dôsledku toho je bakteriálny kmeň *C. necator* H16 vyššie vpravo pretože vďaka obsahu PHA sú jeho bunky väčšie. V prietokovej cytometrii sa pracuje aj s druhou veličinou, ktorou je LALS (large angle light scatter), tá je zachytávaná zo senzoru bočného rozptylu a poskytuje informácie o vnútornej členitosti bunky.



Graf 2: Zobrazenie vlastností lipofilného zeleného farbiva BODIPY, prvé tri vzorky zobrazujú pokles strednej intenzity fluorescencie u baktérii *C. necator* H16, ktoré obsahujú granule PHA. Ďalšie tri vzorky zobrazujú nízku SHF pre baktérie *C. necator* PHB-4.

Na Graf 2 sa dajú pozorovať 2 rôzne veci. Prvou je fakt, že bakteriálna kultúra, ktorá neobsahuje PHA má niekoľkonásobne nižšiu strednú hodnotu fluorescence. To je spôsobené lipofilnou sondou BODIPY, tá sa viaže na hydrofóbne časti bunky, ktorých má *C. necator H16* výrazne viac v podobe povrchu každej PHA granule a preto poskytuje vysokú hodnotu SHF, tak *C. necator PHB-4* má lipofilnú časť zastúpenú najviac na cytoplazmatickej membráne bunky a okrem nej sa v bunke nachádza len málo ohraníc, na ktoré by sa farbivo mohlo naviazať.

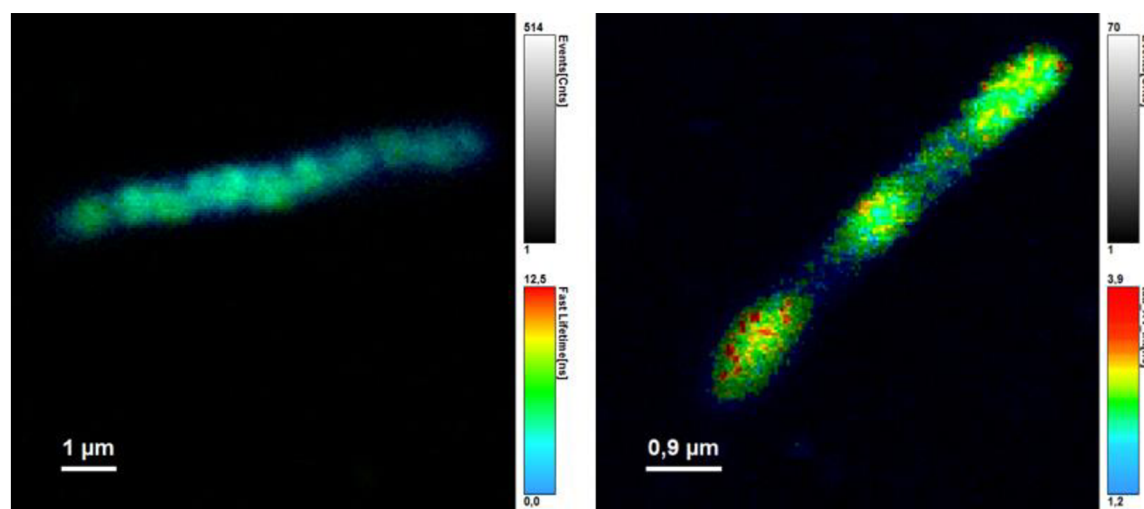
Druhá vec pozorovaná na Graf 2 je výrazný pokles SHF po pridaní peroxidu vodíka. Dej, ktorý sa odohral zatiaľ nie je jednoznačne popísaný. Časť granúl PHA mohla byť spotrebovaná bunkou na odbúranie ROS, no pri porovnaní s plynovou chromatografiou (kapitola 4.1.4) je viditeľné, že bunka nie je schopná spotrebovať až tak výraznú časť PHA granúl. Je možné, že peroxid vodíka mohol spôsobiť prechod granúl z amorfneho do kryštalického stavu a to následne ovplyvnilo dostupnosť PHA granúl pre fluorescenčnú sondu avšak táto teória si zaslúži ďalšie experimentálne skúmanie, ktoré je nad rámec tejto bakalárskej práce.

Tabuľka 3: Hodnoty odpovedajúce ku Graf 2

Vzorka	Počet buniek	zelený kanál	
		Stredná hodnota fluorescence	% buniek
H16 kontrola	114 470	278 082	93,2
H16 10 mM	236 939	79 573	90,4
H16 100 mM	74 198	23 070	93,6
PHB-4 kontrola	75 139	1 664	94,0
PHB-4 10 mM	80 417	1 355	92,1
PHB-4 100 mM	75 359	1 818	93,4

4.1.3 Analýza pôsobenia peroxidu vodíka fluorescenčnou mikroskopiou

Vzorky merané na prietokovom cytometre boli podrobené i analýze na fluorescenčnom mikroskope, obrázok zobrazuje štandardnú podobu buniek *C. necator H16* naľavo v ktorej sú viditeľné PHB granule. Na pravej strane je podoba *C. necator PHB-4*, ktorá granule neobsahuje.

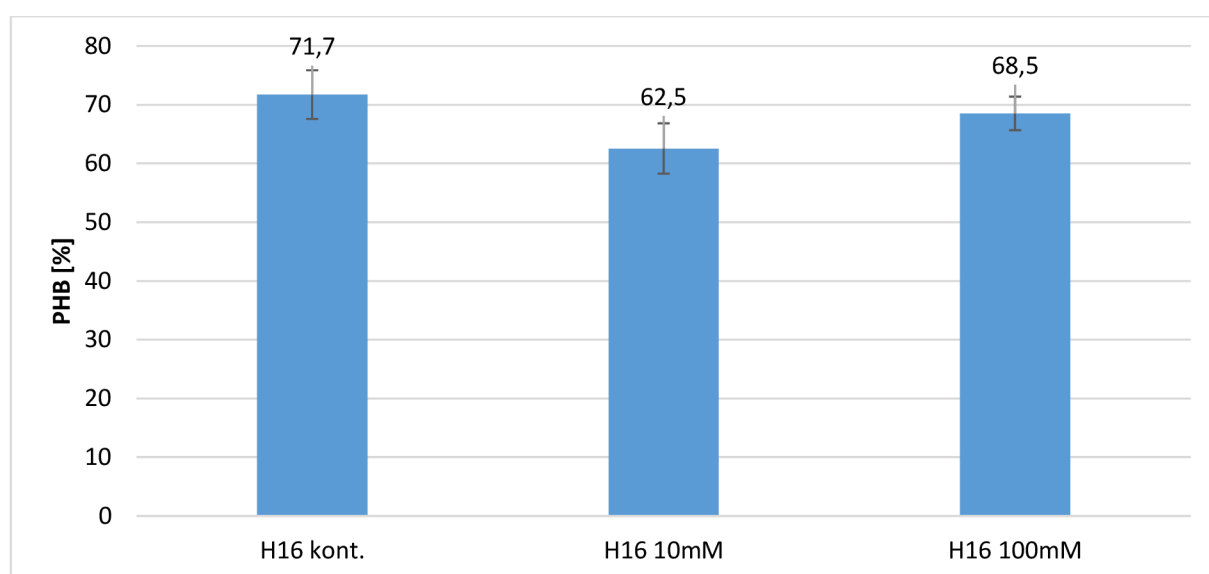


Obrázok 15: Na ľavej strane sa nachádza snímka baktérie *C. necator H16* vystavená pôsobeniu 100mM roztoku peroxidu vodíka, v ktorej sú viditeľné PHB granule. Napravo baktéria *C. necator PHB-4* v rovnakých podmienkach.

4.1.4 Stanovenie obsahu PHB v bakteriálnych bunkách

Obsah PHB bol stanovený v sušine. Z produkčného média bolo odobraté 10 ml, biomasa bola premytá, centrifugovaná a následne vysušená do konštantnej hmotnosti. Ďalej bolo čo najpresnejšie navážených 10 mg biomasy, esterifikovaných a následne prebehla extrakcia, kde sa na stanovenie plynovou chromatografiou použila chloroformová frakcia.

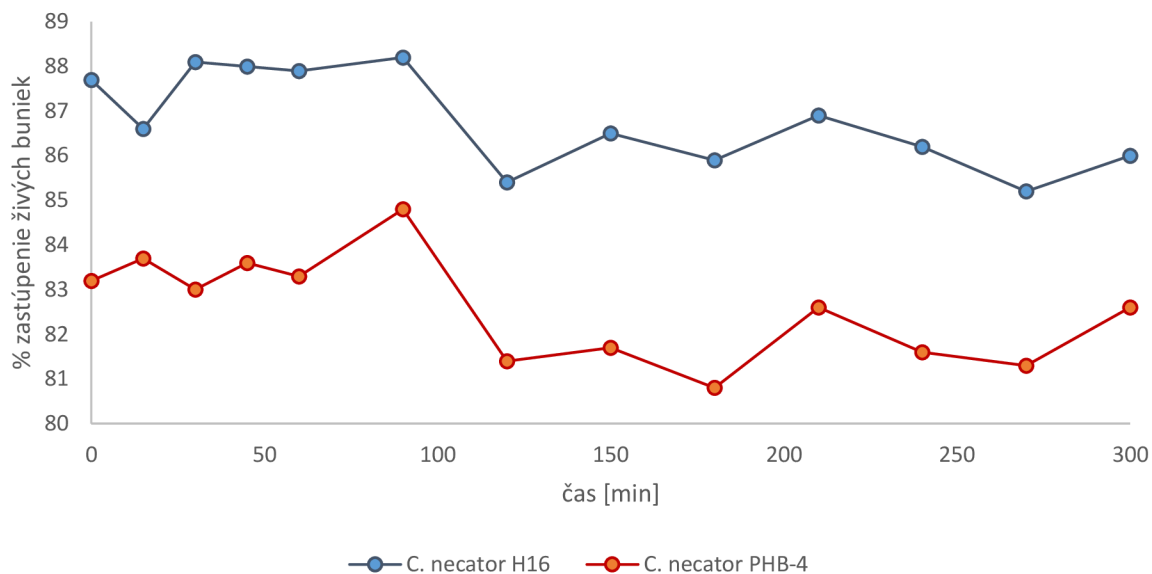
Na stanovenie plynovou chromatografiou boli použité 3 vzorky, *C. necator H16* čistá kultúra, bunečná suspenzia obsahujúca 10 mM roztok peroxidu vodíka a 100mM roztok peroxidu vodíka. Najväčší výskyt PHB sa predpokladal u baktérií ktoré neboli vystavené oxidačnému stresu a to sa potvrdilo aj meraním. Ďalšie 2 vzorky už obsahovali o niekoľko percent menší obsah PHB, dá sa predpokladať, že baktérie spotrebovali časť PHB ako zdroj energie pri odbúravaní ROS no rovnako je možné, že tento rozdiel nie je štatisticky významný a jedná sa len o odchýlku.



Graf 3: Percentuálne zastúpenie PHB v bakteriálnych bunkách *C. necator H16*.

4.1.5 Analýza stresovej odpovedi buniek v čase

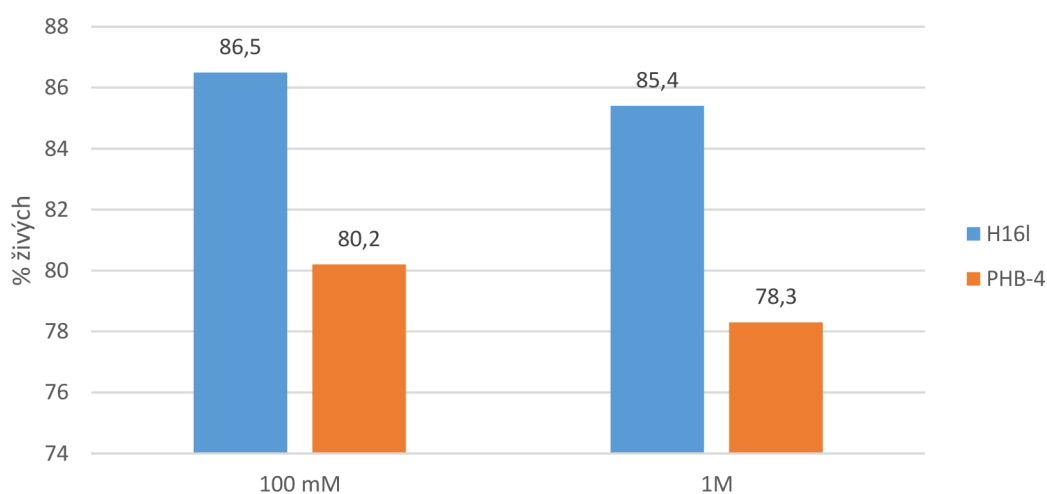
Bunky boli vystavené pôsobeniu peroxidu vodíka v koncentrácii 100 mM a boli podrobené analýze na prietokovom cytometre v časových intervaloch od 30 min až do 24 hodín. Ako fluorescenčná sonda bola použitá látka propidium jodid. Graf 4. nižšie zobrazuje závislosť počtu živých buniek na čase. Na prvý pohľad je možné pozorovať, že percentuálne zastúpenie živých buniek je vyššie u baktérií *C. necator H16*. Ďalej je vidno podobný priebeh krivky pre oba rody baktérií, napr. po 90 minútach výrazne kleslo množstvo živých baktérií, čo môže značiť čas dokedy boli baktérie vystavené oxidačnému stresu a teda obsahovali ROS. Ďalší priebeh krivky naznačuje, že bunkový metabolizmus sa obnovil až na pôvodné hodnoty, pretože percento živých buniek začalo významne stúpať. Taktiež po niekoľkých hodinách sa vo vzorkách už nenachádzal peroxid vodíka, bunky sa začali deliť a nové bunky neboli pod vplyvom oxidačného stresu.



Graf 4: Zobrazenie závislosti percentuálneho zastúpenia živých buniek v čase pri pôsobení 100 mM roztoku peroxidu vodíka

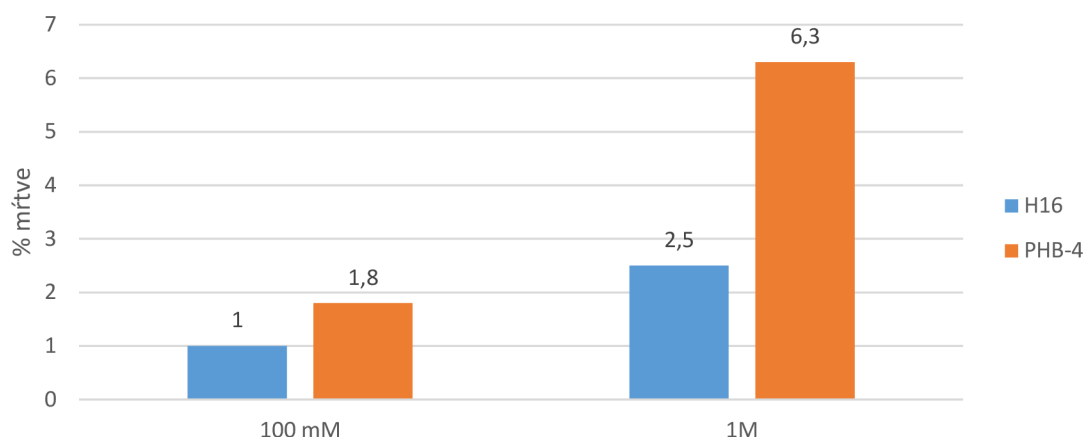
4.1.6 Pôsobenie vysokej koncentrácie peroxidu vodíka na bakteriálne bunky

Štandardné koncentrácie peroxidu vodíka v tejto bakalárskej práci boli 10 mM roztok a 100 mM roztok. Táto kapitola rozoberá vzorky s 1 M roztokom peroxidu vodíka.



Graf 5: Percentuálne zastúpenie živých buniek oboch kmeňov, zafarbené propidium jodidom

Graf 5 a 6 zobrazujú percentuálne zastúpenie živých a mŕtvych buniek, ktoré boli vystavené pôsobeniu peroxidu vodíka. Je možné pozorovať, že vyššia koncentrácia peroxidu vodíka spôsobila výrazný pokles viability buniek. Pri 100 mM roztoku bolo viac mŕtvych buniek u zafarbeného roztoku a to z dôvodu, že PI preniká cez membrány mŕtvych buniek. Nezafarbený 1M roztok mal rovnaké vlastnosti ako nižšia koncentrácia peroxidu vodíka a prídavkom viabilnej fluorescenčnej sondy bol viditeľný nárast mŕtvych baktérií na ktoré sa naviazalo farbivo, zvýšila sa tak stredná hodnota fluorescencie. U vzoriek je viditeľné, že *C. necator H16* má vždy vyššie zastúpenie živých buniek a teda je aj oveľa odolnejší voči ROS.



Graf 6: Percentuálne zastúpenie mŕtvych buniek oboch kmeňov, zafarbené propidium jodidom pri použití 100 mM roztoku peroxidu vodíka a 1 M roztoku peroxidu vodíka

Tabuľka 4: Hodnoty namerané prietokovým cytometrom pre 100 mM a 1M roztok peroxidu vodíka, použitím viabilnej fluorescenčnej sondy, propidium jodid. Tabuľka obsahuje zafarbené vzorky, udáva percentuálne zastúpenie živých buniek a strednú hodnotu intenzity fluorescencie (SHF).

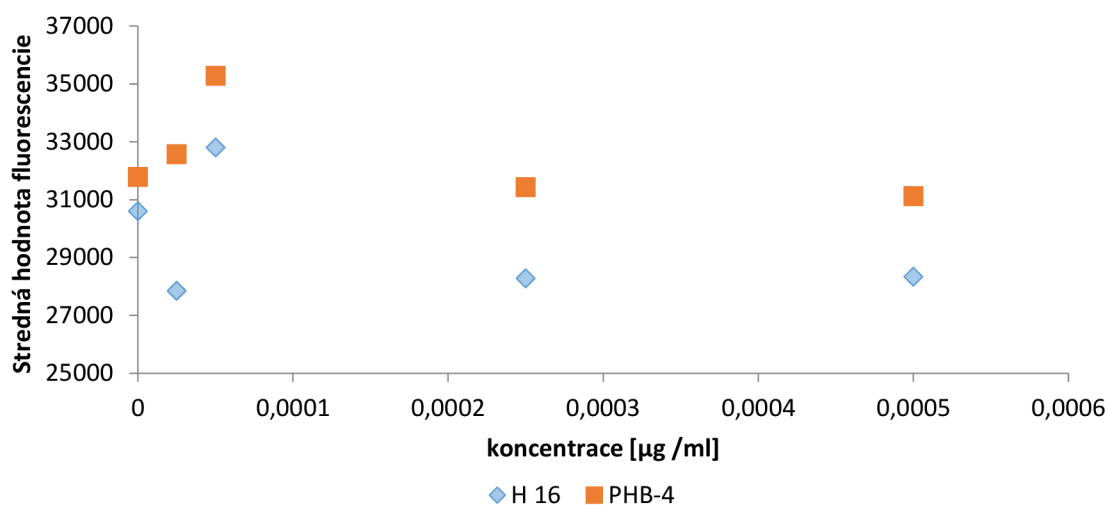
Konzentrácia peroxidu vodíka	Prítomnosť sondy	<i>C. necator</i> H16		<i>C. necator</i> PHB-4	
		% buniek	SHF	% buniek	SHF
100 mM	PI	86,5	7766	80,2	7280
1M	PI	85,4	7918	78,3	7427

4.2 Optimalizácia fluorescenčnej sondy H2DCFDA

Pre nasledujúce meranie sú použité fluorescenčné sondy a H2DCFDA (ďalej označované ako B1) a CM-H2DCFDA (ďalej označované ako B2), druhá sonda už bola na cytometrickú analýzu optimalizovaná. Tieto fluorescenčné sondy sú chemicky redukované formy fluoresceínu, ktoré slúžia na detekciu ROS v bunkách.

Tabuľka 5: Hodnoty namerané prietokovým cytometrom pre rôzne koncentrácie fluorescenčnej sondy H2DCFDA pri optimalizácii

<i>Cupriavidus necator</i>	Riedenie	Pridaný objem [μ l]	stredná hodnota fluorescencie	koncentrácia [μ g /ml]	počet buniek/ml
H16	–	0	30604	0	3 161 000
PHB-4	–	0	31788	0	4 267 000
H16	koncentrovaná	5	91322	0,025	4 607 000
H16	100 krát	5	28290	0,00025	4 261 000
H16	100 krát	10	28340	0,0005	5 071 000
H16	1000 krát	5	27857	0,000025	1 522 000
H16	1000 krát	10	32802	0,00005	5 436 000
PHB-4	koncentrovaná	5	118417	0,025	1 830 000
PHB-4	100 krát	5	31439	0,00025	1 456 000
PHB-4	100 krát	10	31126	0,0005	1 567 000
PHB-4	1000 krát	5	32576	0,000025	1 516 000
PHB-4	1000 krát	10	35286	0,00005	1 550 000

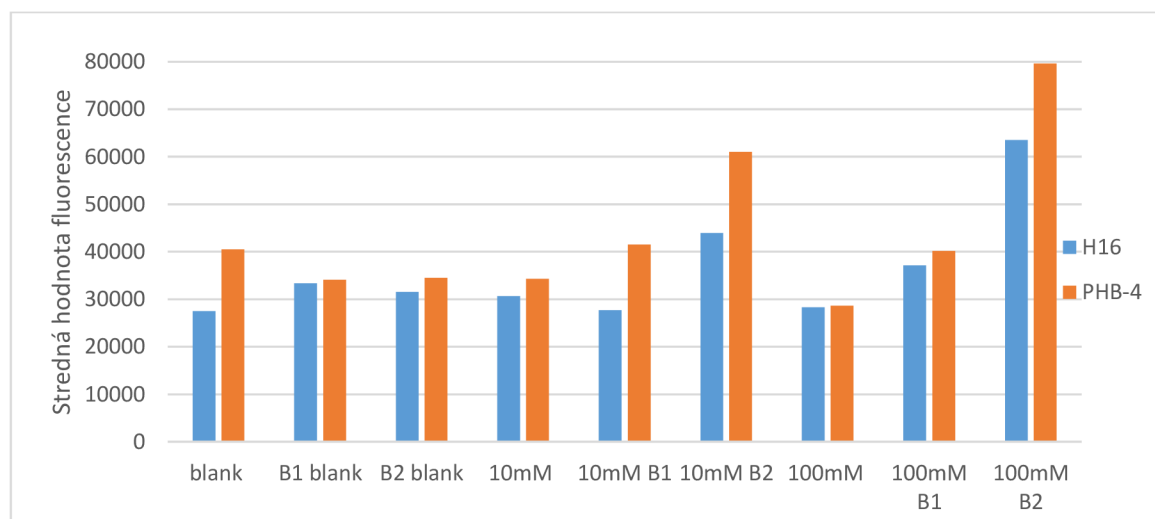


Graf 7: Závislosť strednej hodnoty fluorescencie na koncentrácii farbiva vo vzorku pri optimalizácii fluorescenčnej sondy H2DCFDA.

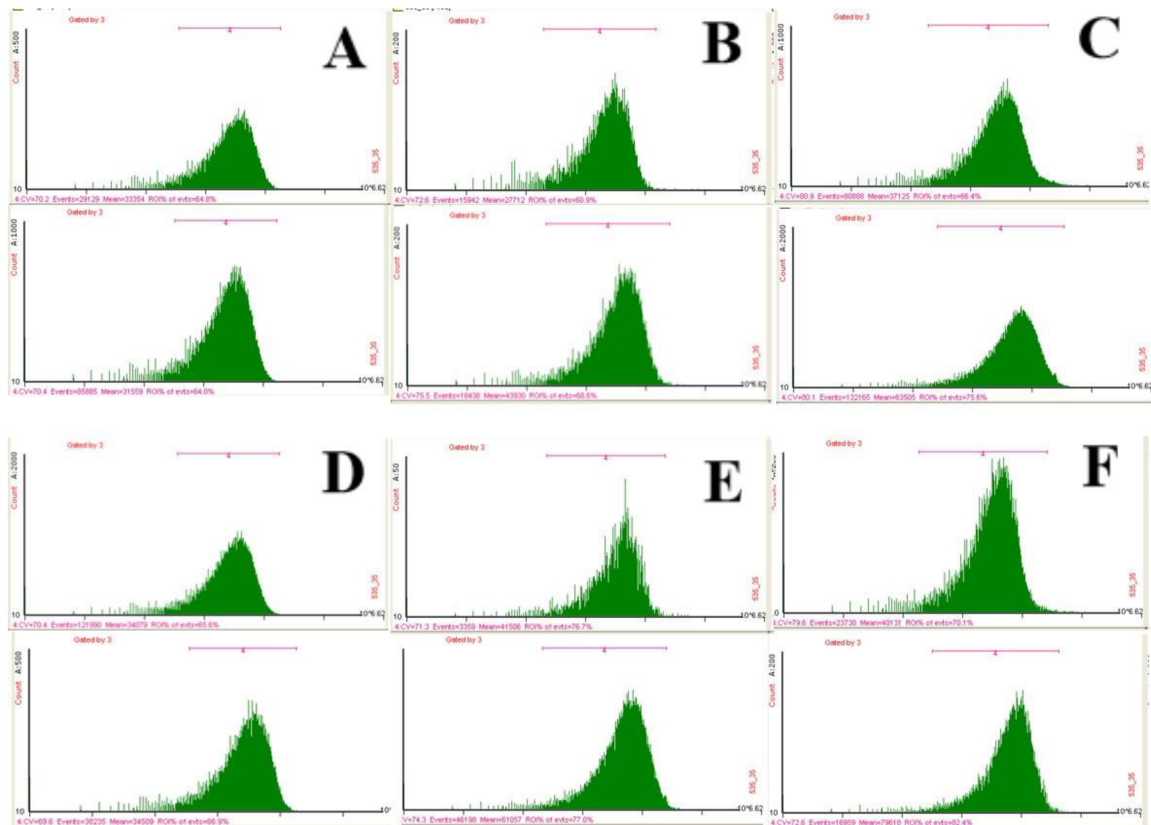
Na optimalizáciu bola použitá bakteriálna suspenzia, ktorá bola vrstvená 100mM roztok peroxidu vodíka. V grafe je možné vidieť, že s rastúcou koncentráciou farbiva rastie aj SHF vzorku, pri koncentrácii 10µl/ml 1000 krát zriedeného farbiva sa nachádza maximálna hodnota fluorescencie, ďalším pridávaním farbiva dochádza k tzv. samozhášaniu, čo je zhášanie fluorescenčnej sondy sebou sama pri nadbytočnej koncentrácii fluorescenčnej sondy.

4.2.1 Analýza vplyvu oxidačného stresu na bakteriálne bunky pomocou fluorescenčnej sondy CM-H2DCFDA a H2DCFDA

Táto kapitola sa venuje popisu pôsobenia fluorescenčnej sondy H2DCFDA a CM-H2DCFDA na bakteriálne bunky a detekcii ROS v bunkách pôsobením rôznych koncentrácií peroxidu vodíka.



Graf 8: Závislosť strednej hodnoty fluorescencie na type vzorky. Sú to vzorky bez prídavku peroxidu vodíka a s dvomi koncentraciami peroxidu vodíka. Všetky typy vzoriek boli merané nezafarbené a zafarbené sondami H2DCFDA (B1) a CM-H2DCFDA (B2).



Obrázok 16: Obrázok zachytáva histogramy rovnakých vzoriek, ale s použitím 2 rôznych farieb. Vrchný obrázok vždy B1 a spodný obrázok B2. (A) *C. necator* H16, (B) *C. necator* H16 10mM peroxid vodíka, (C) *C. necator* H16 100mM peroxid vodíka, (D -F) zachytáva *C. necator* PHB-4 v rovnakej postupnosti ako (A-C).

Graf 8 sa dá rozdeliť do niekoľkých sektorov. Prvé tri vzorky zobrazujú bakteriálnu kultúru bez pridania peroxidu vodíka, je viditeľné že hodnoty SHF sú si u buniek *C. necator* H16 a *C. necator* PHB-4 veľmi podobné. Štvrtá a siedma vzorka ukazujú veľmi podobné vlastnosti pretože sa jedná o nezafarbené vzorky.

Výraznejšie rozdiely sa nachádzajú pri vzorkách, ktoré boli vystavené peroxidu vodíka a následne zafarbené fluorescenčnou sondou. Nárast SHF v tomto prípade ukazuje na zvýšený výskyt ROS v bunkách. Vo všetkých prípadoch ukazujú bunky *C. necator* PHB-4 väčší výskyt ROS, to je pravdepodobne spôsobené absenciou PHA granúl.

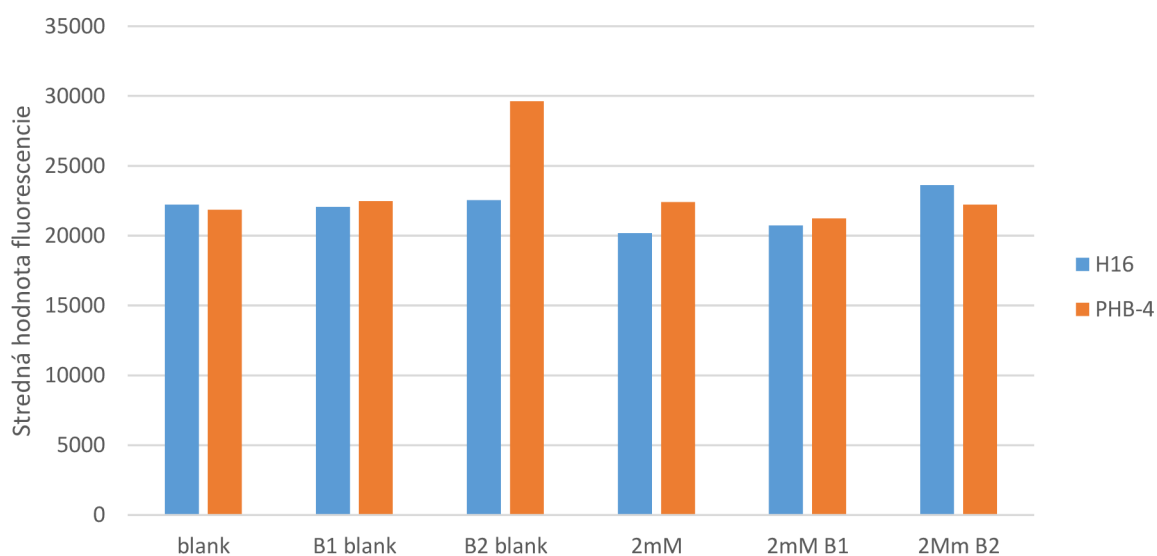
4.3 Fentonova reakcia

Fentonova reakcia bola prevedená pomocou hexahydrátu síranu železato-amónneho (100 mM roztok) a peroxidu vodíka (2 mM roztok). Použité koncentrácie boli čerpané z odbornej literatúry, no bakteriálna kultúra je voči samotnému peroxidu vodíka natoľko odolná, že malé koncentrácie použité pri experimente nedosahovali požadovaný efekt. [35] [36] [37]

Z toho je možné usúdiť, že tento typ reakcie musí mať optimalizované koncentrácie železnatého iónu a peroxidu vodíka alebo celkovo nie je vhodný pre bakteriálnu kultúru *Cupriavidus necator*. Fentonova reakcia sa používa napríklad pri degradácii farmák v ekosystéme.

Tabuľka 6: Analýza Fentonovej reakcie pri použití 2 mM roztoku peroxidu vodíka a síranu železnato-amónneho. Použité fluorescenčné sondy H2DCFDA (B1) a CM-H2DCFDA (B2).

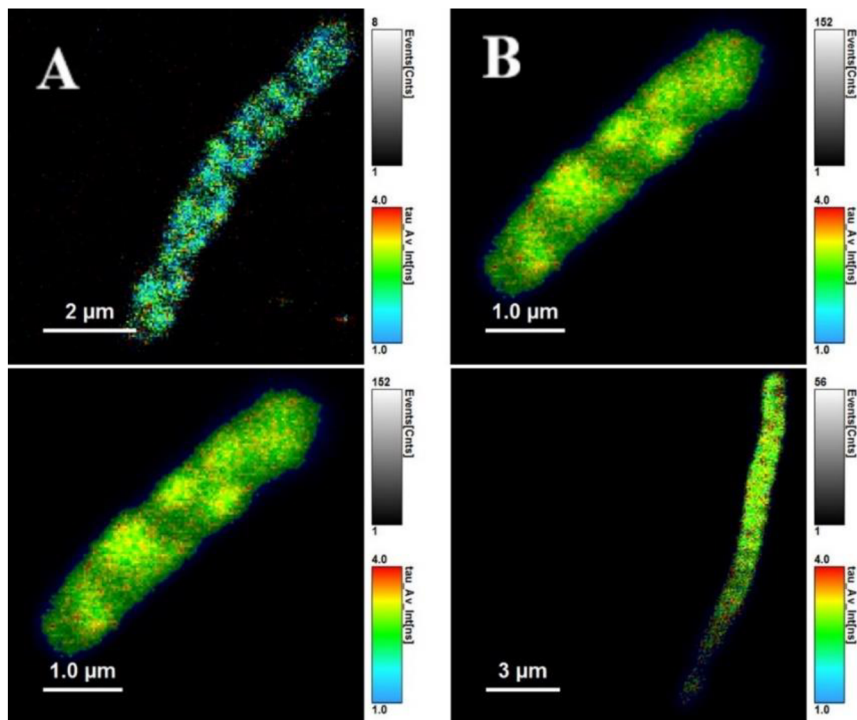
Vzorka PHB-4	SHF	Počet buniek/ml	Vzorka H16	SHF	Počet buniek/ml
slepá vzorka	21858	7343000	slepá vzorka	22217	10923000
slepá vzorka B1	22485	11939000	slepá vzorka B1	22061	9418000
slepá vzorka B2	29632	14568000	slepá vzorka B2	22533	2816000
2 mM	22403	16367000	2 mM	20193	12506000
2 mM B1	21227	14085000	2 mM B1	20725	10629000
2 mM B2	22217	13955000	2 mM B2	23619	2674000



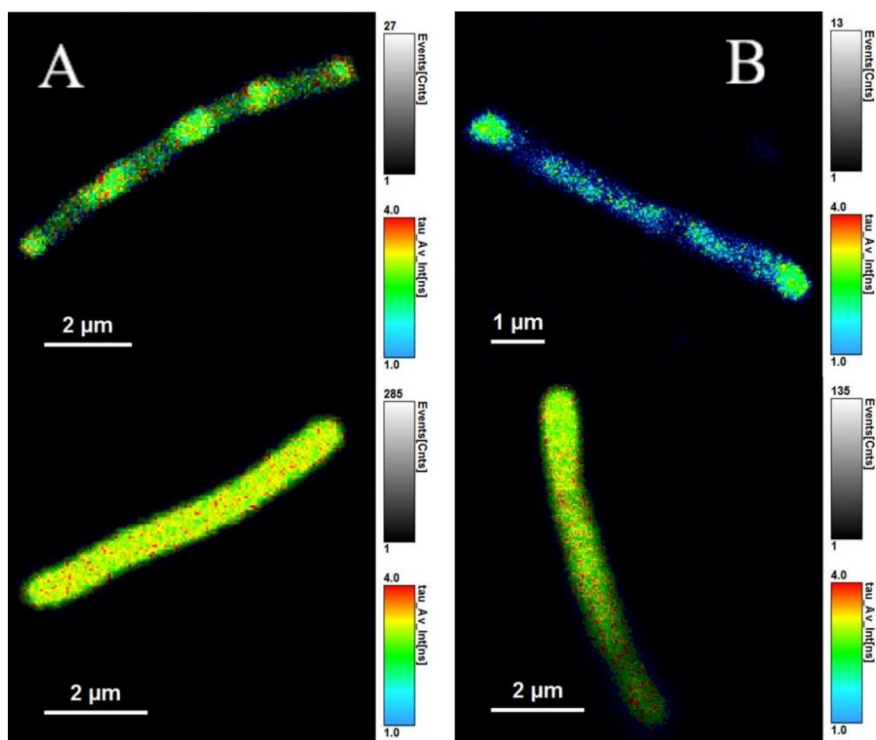
Graf 9: Závislosť SHF na rôznych typoch vzoriek pri prevedení Fentonovej reakcie a pri analýze samostatnej vzorky bez pridania látok vyvolávajúcich oxidačný stres

4.3.1 Analýza Fentonovej reakcie fluorescenčnou mikroskopiou

Analýza buniek pod fluorescenčným mikroskopom poskytuje informácie o tvaroch bunky, o veľkosti a o dobre života fluorescencie. Pod mikroskopom je možné pozorovať jednotlivé bunky no je veľmi náročné rozlíšiť vplyv oxidačného stresu. Výrazným znakom, ktorý možno pozorovať je, že doba života fluorescencie je u kmeňa *C. necator* PHB-4 nižšia ako u pôvodného granule tvoriaceho kmeňa.



Obrázok 17: Analýza *C. necator* H16 (A) Slepá vzorka, horný obrázok nezfarbená, dolný obrázok je zafarbený fluorescenčnou sondou CM-H2DCFDA, (B) vzorky vystavené Fentonovej reakcii, horný obrázok bez farby, dolný obrázok zafarbený.



Obrázok 18: Analýza *C. necator* PHB-4 (A) Slepá vzorka, horný obrázok neofarbená, dolný obrázok je zafarbený fluorescenčnou sondou CM-H2DCFDA, (B) vzorky vystavené Fentonovej reakcii, horný obrázok bez farby, dolný obrázok zafarbený.

4.4 Oxidačný stres vyvolaný hexahydrátom chloridu kobaltnatého

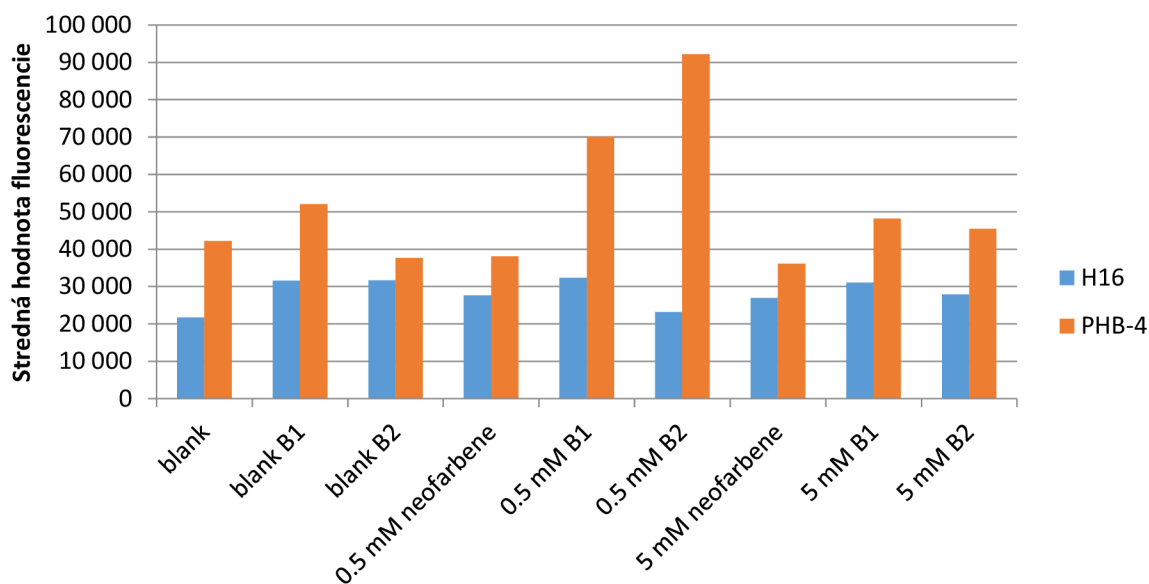
Táto kapitola sa zaoberá pôsobením hexahydrátu chloridu kobaltnatého na bakteriálnu kultúru. Sledované vzorky sa líšili koncentráciou tejto látky, pozorovaným javom bol počet buniek vo vzorke a stredná hodnota intenzity fluorescence, ktorá bola po prídavku fluorescenčnej sondy ovplyvňovaná výskytom ROS.

Vybraná nižšia koncentrácia hexahydrátu CoCl_2 bola zvolená podľa odborného článku. Následne 10 násobná koncentrácia bola zvolená po predchádzajúcej skúsenosti s Fentonovou reakciou, kedy boli bunky natoľko odolné, že vplyv oxidačného stresu bol minimálny. Po zmeraní bola najvyššia stredná hodnota fluorescence nameraná pri koncentracii 0,5 mM. Dôvodom mohlo byť rozloženie, oslabenie funkcie alebo porucha priepustnosti pre fluorescenčné sondy. [38]

Tabuľka 7: Výsledky analýzy z prietokového cytometra za použitia látky hexahydrátu CoCl_2 ako pôvodca oxidačného stresu. Vzorky boli farbené fluorescenčnými sondami H2DCFDA (B1) a CM-H2DCFDA (B2).

Vzorka	Koncentrácia $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [mM]	H16		PHB-4	
		počet/ml	SHF	počet/ml	SHF
Slepá vzorka	0	4 589 000	21 710	5 093 000	42 164
Slepá vzorka B1	0	4 891 000	31 608	5 999 000	52 035
Slepá vzorka B2	0	3 910 000	31 652	2 185 000	37 676
Bez sondy	0,5	3 592 000	27 646	2 267 000	38 073
B1	0,5	5 234 000	32 345	2 738 000	70 110
B2	0,5	57 903 000	23 213	3 075 000	92 245
Bez sondy	5	5 023 000	26 964	3 432 000	36 139
B1	5	4 587 000	31 098	1 936 000	48 200
B2	5	1 248 000	27 851	5 554 000	45 427

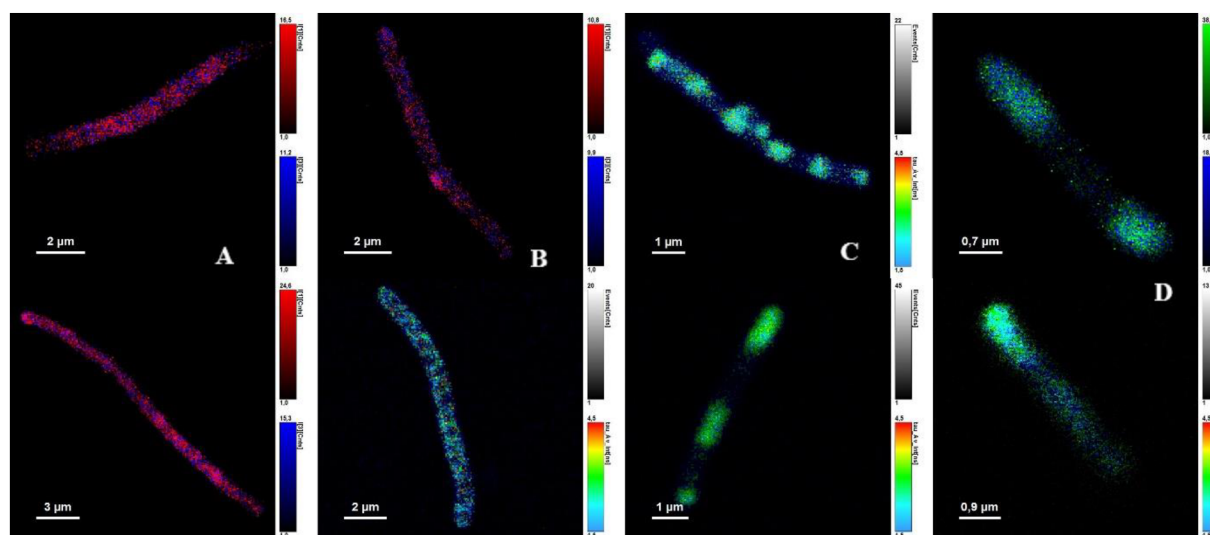
Lepšie výsledky ukazovala fluorescenčná sonda CM-H2DCFDA, to potvrdilo teoretické vedomosti o tejto sonde. Pri zvýšenej koncentracii hexahydrátu CoCl_2 bola stredná hodnota fluorescence znovu nižšie. Preto bolo potvrdené, že nižšia koncentrácia látky vykazovala lepšie podmienky pre meranie ROS v bunke. Bunky, ktoré obsahovali ROS ale neboli zafarbené fluorescenčnou sondou ukazovali rovnaké hodnoty SHF ako nestresované bunky, pretože práve fluorescenčná sonda sa po reakcii v bunke naviaže na ROS dokáže ich detekovať.



Graf 10: Závislosť SHF na druhu vzorku.

4.4.1 Mikroskopická analýza buniek po pôsobení hexahydrátu chloridu kobaltnatého

Výsledky z fluorescenčného mikroskopu by mohli ukazovať na poruchu priepustnosti alebo účinnosti fluorescenčnej sondy nakoľko meranie na prietokovom cytometre ukázalo, že väčší výskyt ROS je v bunkách obsahujúcich 0,5 mM roztok $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Oproti tomu na fluorescenčnom mikroskope mali kratšiu dobu života fluorescencie baktérie, na ktoré sa pôsobilo 10 násobným množstvom látky. Konkrétne je to priemerná dĺžka doby života pre nižšiu koncentráciu $\tau = 4,09$ ns a pre vyššiu koncentráciu $\tau = 3,95$ ns. Dalo by sa teda domnievať, že baktérie obsahujúce 5 mM roztok $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ boli poškodené viac, ale fluorescenčná sonda nebola pre túto látku vhodne zvolená. Z toho dôvodu nie je zrejmé ktorá koncentrácia spôsobovala vyšší výskyt ROS v bunke.



Obrázok 19: Výsledky z fluorescenčného mikroskopu zachytávajúce pôsobenie chloridových iónov. (A) *C. necator* H16 vystavený 0,5mM roztoku $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ horný obrázok je vzorka nezafarbená a dolný obrázok vzorka zafarbená fluorescenčnou sondou H2DCFDA. (B) *C. necator* H16 vystavený 5mM roztoku $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, (C) *C. necator* PHB-4 vystavený 0,5mM roztoku $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, (D) *C. necator* PHB-4 vystavený 5mM roztoku $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

5 ZÁVER

Pre zistenie životaschopnosti buniek bola použitá fluorescenčná sonda PI, ktorá má schopnosť prechádzať cez porušenú cytoplazmatickú membránu mŕtvych buniek a nedokáže prejsť cez membránu živých. Vďaka tomu bolo určené percentuálne zastúpenie mŕtvych buniek po pôsobení peroxidu vodíka v rôznych koncentráciách. Najvyššie percento mŕtvych buniek sa ukázalo v 100 mM roztoku peroxidu vodíka v bakteriálnej kultúre *C. necator PHB-4*. Kmeň tvoriaci granule PHA vykazoval vyššiu odolnosť. Avšak rozdiely viability u oboch kultúr neboli nijako zásadné a celkovo sa zdá, že je bakteriálna kultúra voči pôsobeniu peroxidu vodíka do veľkej miery rezistentná.

Použitie hydrofóbnej fluorescenčnej sondy BODIPY detekovalo najväčšie zastúpenie PHA granúl v bunke, na ktorú sa nepôsobilo žiadnym oxidačným stresom. Po prídavku peroxidu vodíka sa SHF výrazne znížila. Malá časť granúl mohla byť spotrebovaná pri ochrane voči ROS. Pokles bol ale natoľko výrazný, že v bunke museli prebiehať ešte iné, nedostatočne popísané deje – ponúka sa napríklad čiastočná kryštalizácia PHA granúl, ktorá mohla tiež spôsobiť pokles fluorescence. Pozorovaný efekt by mohol byť námetom pre ďalšiu laboratórnu činnosť. Kmeň neschopný tvoriť granule mal len veľmi malú hodnotu SHF práve z dôvodu, že farbivo sa viazalo vo veľkej miere len na ich cytoplazmatickú membránu.

Analýza plynovou chromatografiou potvrdila, že bunka môže obsahovať vysoké percentuálne zastúpenie PHA na suchú hmotnosť bunky. Bolo to konkrétne 71,7 % pri čistej bakteriálnej kultúre. Po prídavku peroxidu vodíka sa obsah PHA v bunke znížil o priemerne 5%. Tieto granule boli bunkami spotrebované ako zdroj energie a uhlíka pri odbúravaní ROS.

Pôsobenie peroxidu vodíka bolo analyzované aj v časovanom meraní, ktoré ukázalo prvotný pokles životaschopnosti buniek no po 24 hodinách sa dalo pozorovať, že životaschopnosť bakteriálnej kultúry sa obnovila na pôvodné hodnoty

Pri zistení nakoľko odolné sú bunky voči oxidačnému stresu bol použitý 1 M roztok peroxidu vodíka, ktorý len potvrdil vyššiu odolnosť bakteriálneho kmeňa *C. necator H16*. Hodnoty SHF boli bez použitia fluorescenčnej sondy podobné u všetkých vzoriek. PI detekoval prítomnosť mŕtvych buniek.

Pre detekciu ROS v bunke boli použité fluorescenčné sondy H2DCFDA a CM-H2DCFDA. Sonda H2DCFDA bola pre meranie optimalizovaná a bolo určené ideálne množstvo pre farbenie bakteriálnej kultúry. Použilo sa 10 μ l 1 000 krát zriedeného farbiva. Vyššie koncentrácie farbiva už spôsobovali samozhášanie fluorescence.

Ako lepšie farbivo na detekciu ROS sa ukázalo CM-H2DCFDA, ktoré ukazovalo vyššie hodnoty SHF ako H2DCFDA. A pri pôsobení 100 mM peroxidu vodíka bol vyšší výskyt ROS v bakteriálnom kmeni *C. necator PHB-4*.

Fentonova reakcia bola testovaná ako účinný prostriedok pre vytvorenie ROS v bunke, ale nakoľko boli použité nízke koncentrácie peroxidu vodíka a kationu kovu tak bol výsledný efekt minimálny a bunky boli schopné prípadné ROS odbúrať.

Pridanie hexahydrátu chloridu kobaltnatého ukázalo výskyt ROS v 0,5 mM roztoku. Prídavok 10 násobného množstva tejto látky prekvapivo neukazoval takmer žiadny výskyt ROS, dôvodom mohlo byť samozhášanie fluorescenčnej sondy.

6 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMAN, 2004. *Biochemie pro studující medicíny*. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0851-0.
- [2] LUDOVICO, Paula a William C. BURHANS, 2014. Reactive oxygen species, ageing and the hormesis police. *FEMS Yeast Research* [online]. 14(1), 33-39 [cit. 2018-01-19]. DOI: 10.1111/1567-1364.12070. ISSN 15671356. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/1567-1364.12070>
- [3] MATÉS, José M a Francisca M SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 2000. *Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy* [online]. 32(2), 157-170 [cit. 2018-01-19]. DOI: 10.1016/S1357-2725(99)00088-6. ISSN 13572725. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272599000886>
- [4] BRAY, Robert C., Stephen A. COCKLE, E. Martin FIELDEN, Peter B. ROBERTS, Giuseppe ROTILIO a Lilia CALABRESE, 1974. Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochemical Journal* [online]. 139(1), 43-48 [cit. 2018-01-19]. DOI: 10.1042/bj1390043. ISSN 0264-6021. Dostupné z: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/bj1390043>
- [5] BANNISTER, Joe V., William H. BANNISTER a Giuseppe ROTILIO, 2008. Aspects of the Structure, Function, and Applications of Superoxide Dismutas. *Critical Reviews in Biochemistry* [online]. 22(2), 111-180 [cit. 2018-01-19]. DOI: 10.3109/10409238709083738. ISSN 1040-8355. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10409238709083738>
- [6] HE, Jie, Xiaofang YANG, Bin MEN a Dongsheng WANG, 2016. Interfacial mechanisms of heterogeneous Fenton reactions catalyzed by iron-based materials: A review. *Journal of Environmental Sciences* [online]. 39, 97-109 [cit. 2018-01-19]. DOI: 10.1016/j.jes.2015.12.003. ISSN 10010742. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1001074215004544>
- [7] SLAUCH, James M., 2011. How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. *Molecular Microbiology* [online]. 80(3), 580-583 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07612.x. ISSN 0950382X.
- [8] OBRUČA, Stanislav, 2007. Polyhydroxyalkanoáty - přirozeně odbouratelné plasty. *Agris* [online]. Praha: Agris [cit. 2018-01-19]. Dostupné z: <http://www.agris.cz/clanek/155286>
- [9] PHILIP, S., T. KESHAVARZ a I. ROY, 2007. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Wiley InterScience* [online]. 82(3), 233-247 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1002/jctb.1667. ISSN 02682575. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1667>
- [10] RAY, Subhasree a Vipin Chandra KALIA, 2017. Microbial Cometabolism and Polyhydroxyalkanoate Co-polymers. *Indian Journal of Microbiology* [online]. 57(1), 39-

- 47 [cit. 2018-01-19]. DOI: 10.1007/s12088-016-0622-4. ISSN 0046-8991. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12088-016-0622-4>
- [11] LUEF, K. P., 2015. Poly(hydroxy alkanate)s in Medical Applications. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*[online]. 29(2), 287-297 [cit. 2018-01-19]. DOI: 10.15255/CABEQ.2014.2261. ISSN 03529568. Dostupné z: http://pierre.fkit.hr/hdki/cabeq/pdf/29_2_2015/Cabeq_2015-02-web_Luef.pdf
- [12] IENCZAK, J., L.K. QUINES, A.A. DE MELO, J.M. GALVAN, W. SCHMIDELL a G.M.F. ARAGÃO, 2009. High density culture strategy for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator*. *New Biotechnology* [online]. 25, S242-S243 [cit. 2018-01-19]. DOI: 10.1016/j.nbt.2009.06.236. ISSN 18716784. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678409003367>
- [13] GUILLOUET, Stéphane, Lucie CRÉPIN, Jillian MARC, Estelle GROUSSEAU a Nathalie GORRET, 2016. Metabolic pathway engineering in *Cupriavidus necator* as platform for biofuel and chemicals production from CO₂. *New Biotechnology*[online]. 33(1), S36- [cit. 2018-01-19]. DOI: 10.1016/j.nbt.2016.06.849. ISSN 18716784. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678416316326>
- [14] SLANINOVA, Eva, Petr SEDLACEK, Filip MRAVEC, et al., 2018. Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation. *Applied Microbiology and Biotechnology*[online]. 102(4), 1923-1931 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1007/s00253-018-8760-8. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-018-8760-8>
- [15] AYUB, Nicolás D., Paula M. TRIBELLI a Nancy I. LÓPEZ, 2009. Polyhydroxyalkanoates are essential for maintenance of redox state in the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. 14-3 during low temperature adaptation. *Extremophiles* [online]. 13(1), 59-66 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1007/s00792-008-0197-z. ISBN 10.1007/s00792-008-0197-z. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00792-008-0197-z>
- [16] VALEUR, Bernard, 2013. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Second Edition. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. ISBN 978-3-527-65003-3.
- [17] Photodynamic Therapy: An overview, 2012. In: *Photochemistry.wordpress* [online]. -: - [cit. 2018-05-07]. Dostupné z: <https://photochemistry.wordpress.com/tag/jablonski-diagram/>
- [18] JOSEPH R.LAKOWICZ. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006. ISBN 9780387463124.
- [19] FIŠAR, Zdeněk. Fluorofory v biomedicině. *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách* [online]. 2009 [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>

- [20] SEHADOVÁ, Hana, 2011. *Fluorescenční a konfokální mikroskopie*. Biologické centrum AVČR, České Budějovice. Dostupné také z: <http://alfa.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/Fluorescencni-a-konfokalni-mikroskopie.pdf>
- [21] VESELÁ, Mária. Fluorescenční mikroskopie. *Chempoint* [online]. [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/fluorescencni-mikroskopie>
- [22] https://commons.wikimedia.org/wiki/File:FluorescenceFilters_2008-09-28.svg
- [23] ROWLEY, Tom, *Flow Cytometry - A Survey and the Basics* [online]. [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.13070/mm.en.2.125. ISBN 10.13070/mm.en.2.125. Dostupné z: <http://www.labome.com/method/Flow-Cytometry-A-Survey-and-the-Basics.html>
- [24] JAHAN-TIGH, Richard R., Caitriona RYAN, Gerlinde OBERMOSER a Kathryn SCHWARZENBERGER, 2012. Flow Cytometry. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 132(10), 1-6 [cit. 2018-01-19]. DOI: 10.1038/jid.2012.282. ISSN 0022202x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15354877>
- [25] <https://www.ptb.de/cms/en/ptb/fachabteilungen/abt8/fb-84/ag-841/flowzytometrie-841.html>
- [26] MARINOV, Iuri, 2008. *Průtoková cytometrie v klinické hematologii: [minimum pro praxi]*. 2., přeprac. a rozš. vyd. Praha: Triton. Levou zadní. ISBN 978-80-7387-143-7
- [27] JANTOVÁ, Soňa, 2009. *Viabilita, proliferácia a smrť buniek kultivovaných v in vitro podmienkach*. Bratislava, Vazovova 5: STU. ISBN 978-80-227-3111-9.
- [28] POSPIECH, Matej, Bohuslava TREMLOVÁ, Zdeňka JAVURKOVÁ, Zuzana ŘEZÁČOVÁ LUKÁŠOVÁ a Michaela PETRÁŠOVÁ, 2014. *Mikroskopie potravin*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN 978-80-7305-694-4.
- [29] Propidium iodide. ThermoFisher Scientific [online]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/P1304MP?ICID=search-product>
- [30] NAVRÁTIL, Leoš a Jozef ROSINA, 2005. *Medicínská biofyzika*. Praha: Grada. ISBN 80-247-1152-4.
- [31] ULRICH, Gilles, Raymond ZIESSEL a Anthony HARRIMAN, 2008. The Chemistry of Fluorescent Bodipy Dyes: Versatility Unsurpassed. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 47(7), 1184-1201 [cit. 2018-01-19]. DOI: 10.1002/anie.200702070. ISSN 14337851. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200702070>
- [32] Propidium iodide, 2018. In: *Sigmaaldrich* [online]. St. Louis, Missouri: Sigmaaldrich [cit. 2018-05-01].
- [33] H2DCFDA, *Thermofisher* [online]. [cit. 2018-05-07]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D399>
- [34] CM-H2DCFDA, *Thermofisher* [online]. [cit. 2018-05-07]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C6827>

- [35] TAMARIT, Jordi, Elisa CABISCOL a Joaquim ROS, 1998. Identification of the Major Oxidatively Damaged Proteins in Escherichia coli Cells Exposed to Oxidative Stress. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 273(5), 3027-3032 [cit. 2018-05-14]. DOI: 10.1074/jbc.273.5.3027. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.273.5.3027>
- [36] MIN, Cho, Chung HYENMI, Choi WONYONG a Yoon JEYONG, 2004. Different Inactivation Behaviors of MS-2 Phage and Escherichia coli in TiO₂ Photocatalytic Disinfection. *American Society for Microbiology*[online]. 1(-), 270-275 [cit. 2018-05-14]. DOI: 10.1128 / AEM.71.1.270-275.2005.
- [37] TAMARIT, Jordi, Elisa CABISCOL a Joaquim ROS, 1998. Identification of the Major Oxidatively Damaged Proteins in Escherichia coli Cells Exposed to Oxidative Stress. *Journal of Biological Chemistry* [online]. -(-), 3027-3023 [cit. 2018-05-14]. DOI: 10.1074 / jbc.273.5.3027.
- [38] TOMARO, Maria L., Judith FRYDMAN a Rosalia B. FRYDMAN, 1991. Heme oxygenase induction by CoCl₂, Co-protoporphyrin IX, phenylhydrazine, and diamide: Evidence for oxidative stress involvement. 610-617 [online]. -(2) [cit. 2018-05-14]. DOI: 10.1016/0003-9861(91)90088-Z. ISBN 10.1016/0003-9861(91)90088-Z. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000398619190088Z>

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
LALS	Large angle light scatter
MES	Roztok stopových prvkov
NB	Nutrient Broth
PBS	Fosfátový pufor
PHA	Polyhydroxyalkanoát
PHB	Polyhydroxybutyrát
PI	Propidium jodid
ROS	Reaktívne formy kyslíka
SALS	Small angle light scatter
SHF	Stredná hodnota fluorescencie