



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

**ISOLACE PHA PRODUKUJÍCÍCH BAKTERIÍ ZE
SMĚSNÉHO MIKROBIÁLNÍHO KONSORCIA**

ISOLATION OF PHA PRODUCING BACTERIA FROM MIXED MICROBIAL CONSORTIA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Petr Plachý

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1420/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Petr Plachý**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Isolace PHA produkujících bakterií ze směsného mikrobiálního konsorcia

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Detekce PHA produkujících bakterií v aktivním kalu
3. Experimentální pokus o izolaci PHA produkujících bakterií z aktivního kalu

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

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

Petr Plachý
student(ka)

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

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce byla detekce polyhydroxyalkanoáty (PHA) produkujících bakterií v aktivovaném kalu a pokus o izolaci těchto bakterií. Teoretická část se zabývá obecnou problematikou PHA a bakteriální produkce PHA. Pozornost je věnována také charakteristice aktivovaného kalu. Součástí teoretické části je i popis vybraných metod použitých k detekci PHA produkujících bakterií v této práci. V experimentální části byla směsná kultura aktivovaného kalu kultivována s využitím různých uhlíkových zdrojů v živném médiu. Ze získaných směsných kultur byly izolovány potenciální PHA produkující bakterie na základě lipofilního barvení Nilskou červení. Přítomnost genu *phaC* podmiňujícího tvorbu PHA byla detekována pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) u 11 vzorků. Sekvenací DNA izolované z těchto vzorků se podařilo identifikovat 8 z 11 vzorků. Jednalo se o bakterie *Klebsiella pneumoniae* (1 x), *Paenirhodobacter enshiensis* (1 x) a *Pseudomonas putida* (6 x). U dvou z 11 izolovaných kultur byla pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) prokázána přítomnost PHA v biomase. Polyhydroxybutyrát (PHB) byl stanoven pomocí plynové chromatografie na 9,33 % hmot. sušiny biomasy (*Paenirhodobacter enshiensis*) a 1,18 % (neidentifikovaná kultura).

ABSTRACT

Aim of this bachelor thesis is detection of polyhydroxyalcanoates (PHA) producing bacteria from activated sludge and effort for isolation of these bacteria. The theoretical part deals with general issues of PHA and of bacterial production of PHA. Also there is attention paid to characterization of activated sludge and to selected methods used in this thesis for detection of PHA producing bacteria. In the experimental part, mixed microbial culture of the activated sludge was cultivated on different carbon sources. Potential PHA producers was isolated from these cultures with the use of lipophilic staining with Nile red and *phaC* gene (essential for PHA synthesis) was detected with the use of polymerase chain reaction (PCR) in 11 of the isolated cultures. By DNA sequencing 8 bacterial cultures were identified. It was *Klebsiella pneumoniae* (1 x), *Paenirhodobacter enshiensis* (1 x) and *Pseudomonas putida* (6 x). Presence of PHA in biomass was detected in 2 of the 11 isolated cultures by Fourier transformation infrared spectroscopy (FTIR) analysis. The content of polyhydroxybutyrate (PHB) was determined with the use of gas chromatography to 9,33 % of dry biomass (*Paenirhodobacter enshiensis*) and to 1,18 % (unidentified culture).

KLÍČOVÁ SLOVA

Bakteriální polyhydroxyalkanoáty, aktivovaný kal, PCR, PHA syntéza

KEY WORDS

Bacterial polyhydroxyalcanoates, activated sludge, PCR, PHA synthase

PLACHÝ, Petr. *Isolace PHA produkujících bakterií ze směsného mikrobiálního konsorcia*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. 43 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

Prohlášení

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

.....

podpis studenta

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce panu doc. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. a mé konzultantce Ing. Ivě Pernicové za pomoc, ochotu a trpělivost při vedení této práce.

OBSAH

| | |
|--|----|
| 1 ÚVOD | 7 |
| 2 TEORETICKÁ ČÁST..... | 8 |
| 2.1 Polyhydroxyalkanoáty..... | 8 |
| 2.1.1 Historie PHA | 9 |
| 2.1.2 Struktura PHA | 9 |
| 2.1.2.1 Druhy PHA..... | 10 |
| 2.1.3 Fyzikální vlastnosti PHA | 10 |
| 2.1.4 Biosyntéza PHA | 11 |
| 2.1.4.1 Rozdělení PHA syntáz | 12 |
| 2.1.5 Biodegradace PHA | 13 |
| 2.1.6 Ekonomické aspekty produkce PHA..... | 14 |
| 2.2 Aktivovaný kal | 14 |
| 2.2.1 Složení aktivovaného kalu | 14 |
| 2.3 Výhody směsné kultury..... | 15 |
| 2.4 Bakteriální producenti PHA | 15 |
| 2.5 Metody detekce PHA produkujících bakterií..... | 17 |
| 2.5.1 Barvení Nilskou červení..... | 17 |
| 2.5.2 Polymerázová řetězová reakce | 17 |
| 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 19 |
| 3.1 Použité chemikálie a přístroje | 19 |
| 3.1.1 Chemikálie použité ke kultivaci..... | 19 |
| 3.1.2 Komponenty pro PCR, gelovou elektroforézu a přečištění DNA..... | 19 |
| 3.1.3 Použité přístroje..... | 19 |
| 3.2 Kultivace mikroorganismů | 20 |
| 3.2.1 Kultivace směsné kultury | 20 |
| 3.2.2 Kultivace monobakteriálních kultur..... | 21 |
| 3.3 Použité metody..... | 22 |
| 3.3.1 Spektrofotometrické stanovení optické hustoty | 22 |
| 3.3.2 Gravimetrické stanovení biomasy..... | 22 |
| 3.3.3 Selektce bakterií na základě barvení NČ a izolace pozitivních kultur | 22 |
| 3.3.4 Izolace DNA pomocí tepelné lýze | 22 |
| 3.3.5 Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA | 22 |

| | |
|---|----|
| 3.3.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)..... | 22 |
| 3.3.7 Stanovení PCR amplikonů gelovou elektroforézou | 23 |
| 3.3.7.1 Příprava agarózového gelu | 24 |
| 3.3.8 Příprava vzorků na sekvenaci..... | 24 |
| 3.3.9 Příprava vzorků pro plynovou chromatografii | 24 |
| 3.3.10 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR)..... | 25 |
| 4 VÝSLEDKY A DISKUZE | 26 |
| 4.1 Rozdělení směsné kultury a stanovení biomasy..... | 26 |
| 4.2 Výběr potenciálních producentů PHA metodou lipofilního barvení | 26 |
| 4.3 Izolace DNA a detekce genů <i>16S rRNA</i> a <i>PhaC</i> | 27 |
| 4.3.1 Stanovení čistoty a koncentrace DNA | 27 |
| 4.3.2 Detekce <i>16S rRNA</i> a <i>phaC</i> genů pomocí PCR..... | 28 |
| 4.4 Identifikace bakteriálních druhů sekvenací DNA | 28 |
| 4.5 Stanovení biomasy a obsahu PHB při použití NB jako média pro kultivaci inokula | 29 |
| 4.5.1 Gravimetrické stanovení biomasy..... | 29 |
| 4.5.2 Spektrofotometrické stanovení zákalu | 30 |
| 4.5.3 Stanovení PHB pomocí plynové chromatografie..... | 31 |
| 4.6 Stanovení biomasy a obsahu PHB při použití min. média pro kultivaci inokula..... | 31 |
| 4.6.1 Gravimetrické stanovení biomasy..... | 31 |
| 4.6.2 Spektrofotometrické stanovení zákalu | 32 |
| 4.6.3 Detekce PHB pomocí FTIR | 33 |
| 4.6.4 Stanovení PHB pomocí plynové chromatografie..... | 33 |
| 5 ZÁVĚR..... | 34 |
| 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ | 36 |
| 7 PŘÍLOHY..... | 39 |

1 ÚVOD

Výroba plastů je velmi objemnou a výdělečnou součástí světového průmyslu. Plasty jsou velmi výhodné a užitečné materiály. Jejich největší výhody spočívají ve vlastnostech jako je lehkost, snadná tvarovatelnost, odolnost vůči degradaci vlivem vlhkosti, kyslíku nebo mikroorganismů, nulová elektrická vodivost a další. Díky těmto vlastnostem a relativně nízkým nákladům na výrobu vzrůstala jejich výroba v minulých dekáдах poměrně rychlým tempem. V roce 2015 vzrostla světová roční produkce plastů na 380 milionů tun. Většina konvenčních plastů končí po svém užití na skládkách nebo zůstává přítomna v životním prostředí, ve kterém se tyto plasty nerozkládají [1].

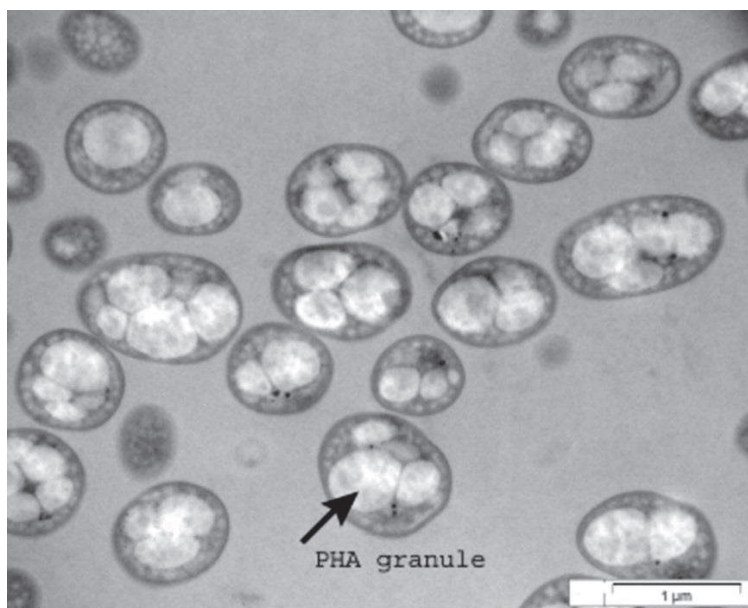
Potenciální řešení poskytují tzv. bioplasty, tedy biodegradabilní polymerní materiály. Významnou skupinu těchto materiálů tvoří polyhydroxyalkanoáty (PHA), polymery hydroxyalkanových kyselin. PHA jsou produkovány různými druhy bakterií jako zásoba energie a uhlíku a jsou rovněž odbouratelné v životním prostředí. Svými vlastnostmi mohou na trhu konkurovat běžným plastům vyrobeným z ropy (např. v oblasti jednorázově používaných výrobků), avšak náklady na jejich výrobu jsou zatím vyšší, a proto v současné době nemohou běžným plastům konkurovat. Vývoj a výzkum se proto soustředí na zefektivnění jejich výroby a snížení výrobních nákladů. Součástí tohoto snažení je i hledání nových druhů bakterií produkujících PHA [2, 3].

Aktivovaný kal je kal používaný biologickým čištěním vod, který obsahuje různé druhy mikroorganismů, jedná se tedy o typické směsné konsorcium. V aktivovaném kalu byl pozorován výskyt bakteriální PHA už v roce 1972. Účelem této práce je izolovat bakteriální producenty PHA z aktivovaného kalu [4, 5].

2 TEORETICKÁ ČÁST

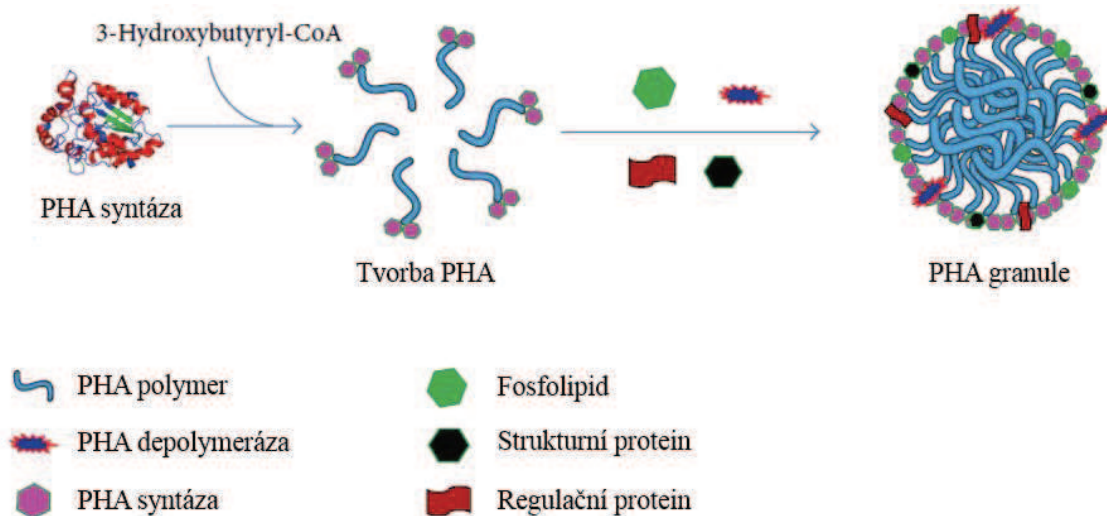
2.1 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou skupina polymerů produkovaných různými druhy mikroorganismů. Bakterie syntetizují PHA jako zásobní formu energie a rovněž jako zásobu uhlíku ve formě lipofilních granulí (obrázek 1). V cytoplazmě bakterií se vyskytují PHA granule o rozměrech 0,2 – 0,5 μm [2].



Obr. 1: *Pseudomonas putida* obsahující PHA granule [6]

Tyto granule vznikají v důsledku syntézy PHA enzymem PHA syntázou, která se nachází volně v cytoplazmě. PHA syntáza přetváří vhodné prekurzory na polymerní vlákna PHA. Tato vlákna se později shlukují vlivem hydrofobních interakcí a dochází ke zformování lipofilní PHA granule. Na povrchu granulí zůstávají PHA syntázy a dále se podílejí na prodlužování PHA řetězců, čímž dochází ke zvětšování granulí (obrázek 2) [7].



Obr. 2: Vznik a struktura PHA granule [7]

PHA lze izolovat z biomasy a upravit je do čisté formy podobající se plastům. Díky své biodegradabilitě jsou slibným řešením problému akumulace plastového odpadu v životním prostředí. Svými fyzikálními vlastnostmi se totiž v mnohých ohledech vyrovnávají konvenčním plastům produkovaným z ropy, narozdíl od nich jsou však biodegradabilní, tedy mohou být rozkládány organismy přítomnými v životním prostředí. Další výhodou PHA je skutečnost, že mohou být produkovány výhradně z obnovitelných zdrojů. V neposlední řadě je třeba zmínit biokompatibilitu PHA, díky které jejich potenciální přítomnost v životním prostředí nezpůsobuje žádné negativní efekty na toto prostředí. Mimo to jsou díky této vlastnosti použitelné i v oblasti medicíny [2].

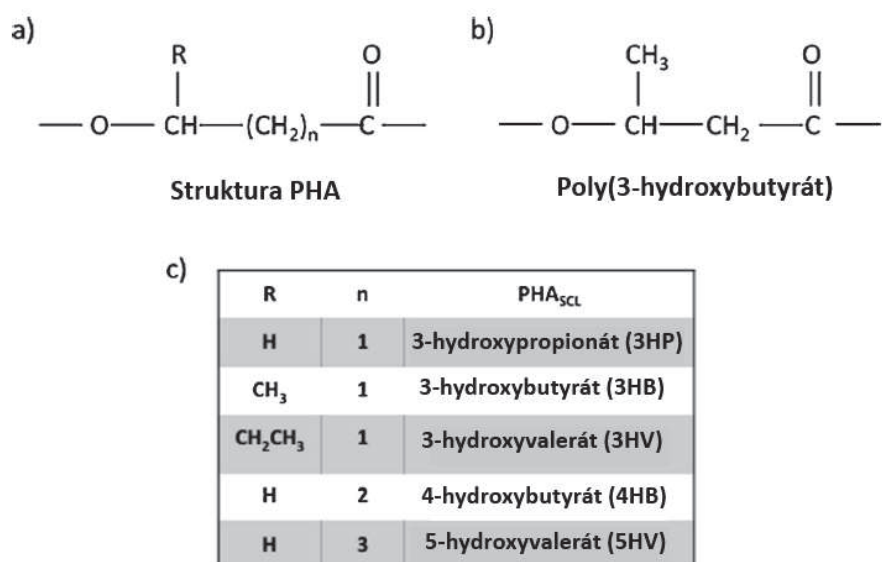
2.1.1 Historie PHA

PHA byly poprvé popsány v roce 1926 francouzským chemikem M. Lemoignem. Jednalo se o polyhydroxybutyrát (PHB), který byl pozorován v bakteriích druhu *Bacillus megaterium*. PHA se střední délkou postranního řetězce (mcl-PHA) byly poprvé pozorovány až v roce 1983 u druhu *Pseudomonas oleovorans*. Výzkum bakteriální produkce PHA byl poněkud akcelerován začátkem 70. let v souvislosti s tehdejší ropnou krizí [8].

Dnes je důležitou motivací pro výzkum bakteriální produkce PHA ochrana životního prostředí. Dalším motivem je snaha o udržitelnou ekonomiku, jelikož díky schopnosti PHA produkujících bakterií využívat rozsáhlou paletu zdrojů uhlíku mohou být PHA, narozdíl od běžných plastů, produkovány za použití obnovitelných zdrojů. V současnosti jsou PHA produkovány maloobjemově, protože náklady na jejich výrobu stále omezují jejich schopnost konkurovat na trhu plastům produkovaným z ropných zdrojů. Tato malovýroba se proto soustředí ve větší míře na produkci PHA pro biomedicínské aplikace, kde jejich využitelnost převažuje nároky na nízkou cenu [2].

2.1.2 Struktura PHA

PHA jsou polymery hydroxyalkanových kyselin, které jsou vzájemně propojeny esterovou vazbou mezi karboxylovou a hydroxylovou skupinou, jedná se tedy o polyestery. Obecná struktura PHA a struktury několika konkrétních PHA jsou na obrázku 3. Mohou se vyskytovat jako homopolymery, tedy obsahující pouze jeden druh monomeru, nebo jako kopolymery obsahující různé druhy monomerů v jednom řetězci [2].



Obr. 3: a) obecná struktura PHA; b) struktura PHB; c) tabulka scl-PHA [8]

2.1.2.1 Druhy PHA

PHA lze rozdělit na základě počtu uhlíkových atomů v jednom monomeru. Pokud je tento počet nižší nebo roven 5, jde o scl-PHA, kde zkratka scl znamená short-chain length. Pro PHA, jejichž monomerní jednotky obsahují 6 až 14 uhlíkových atomů, se užívá označení mcl-PHA (medium-chain length) a PHA s vyšším počtem uhlíkových atomů v monomeru se označují jako lcl-PHA (long-chain length). Byly popsány i PHA řetězce obsahující zároveň monomery spadající do skupin scl- a mcl-PHA nebo scl- a lcl-PHA [9].

Některé bakteriální kmeny projevují schopnost začlenit do struktury PHA různé funkční skupiny přítomné ve sloučeninách vyskytujících se v živném médiu. Postranní řetězce, které např. u PHB tvoří výhradně methylová skupina a u PHV zase ethylová skupina, mohou potom obsahovat různé struktury. Jedná se např. o fenylovou skupinu, fenoxyskupinu, olefinovou skupinu, halogeny, alkyly a mnoho dalších. Tato schopnost byla pozorována u *Pseudomonas putida* [10].

V současné době je známo přibližně 150 různých druhů hydroxyalkanových kyselin jako možných monomerů PHA [8].

2.1.3 Fyzikální vlastnosti PHA

Fyzikální vlastnosti PHA záleží na typech hydroxyalkanových kyselin v řetězci, a tudíž na druhu produkujícího organismu a na typu zdroje uhlíku v produkčním médiu [11].

Faktory jako délka postranního řetězce, přítomnost funkčních skupin v postranním řetězci nebo kombinace různých typů monomerů u kopolymerů mohou významně ovlivnit fyzikální vlastnosti výsledného materiálu jako je bod tání, termoplastičita, pevnost v tahu, ale i biokompatibilita a biodegradabilita [2].

Některé vlastnosti vybraných PHA jsou porovnány s vlastnostmi polypropylenu v tabulce 1.

Tab. 1: Fyzikální a teplotní vlastnosti některých PHA a polypropylenů [12]

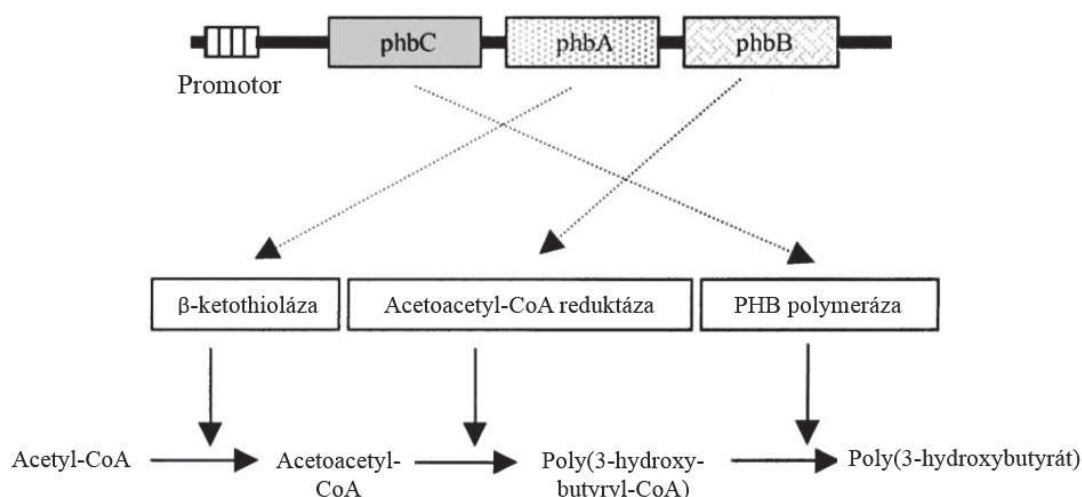
| Vlastnost | PHB | P(HB-HV) ^a | PHO ^b | polypropylen |
|--------------------------------|-----|-----------------------|------------------|--------------|
| Bod tání (°C) | 175 | 145 | 61 | 176 |
| Teplota skelného přechodu (°C) | 15 | -1 | -35 | -10 |
| Krystalinita (%) | 80 | 40 | 30 | 70 |
| Pevnost v tahu (MPa) | 40 | 32 | 10 | 38 |
| Prodloužení při přetržení (%) | 6 | — | 300 | 400 |

^aP(HB-HV) kopolymer obsahující 20 mol. % C5 a 80 mol. % C4 monomerů. ^bPHO kopolymer obsahující 4 mol. % C10, 86 mol. % C8 a 10 mol. % C6 monomerů.

2.1.4 Biosyntéza PHA

Mikroorganismy syntetizují PHA jako zásobní zdroj energie a uhlíku. Produkce značně závisí na složení živného média, zejména na poměru uhlíku a dusíku. Někteří bakteriální producenti PHA proto vyžadují limitaci určité živiny v médiu (např. dusík, fosfor, hořčík, ...) [13].

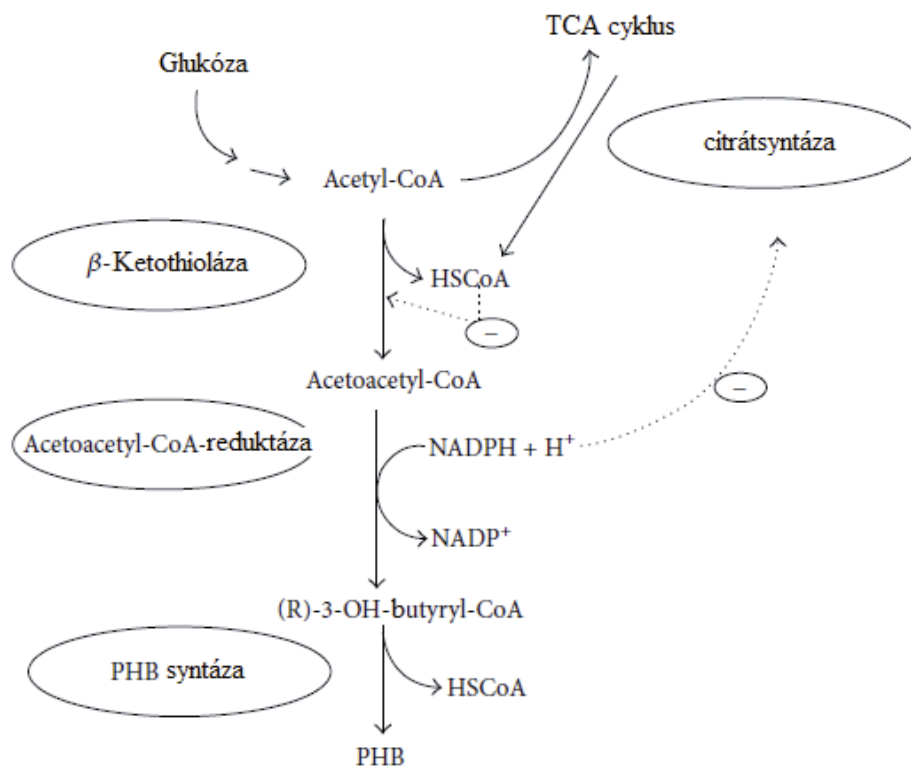
Syntéza PHA je realizována složitým enzymovým aparátem v mnoha reakčních krocích. Pro syntézu PHB jsou klíčové enzymy *phbA* (acetyl-CoA acetyltransferáza), *phbB* (acetoacetyl-CoA reduktáza) a *phbC* (PHA syntáza). V současnosti je detailně známa struktura těchto tří enzymů u druhu *Cupravidus necator*. DNA sekvence kódující tyto enzymy se nachází na jednom operonu (obrázek 4) [14].



Obr. 4: Operon obsahující geny pro syntézu PHB [15]

PhaA (β-ketothioláza) katalyzuje reakci o dvou krocích. V prvním kroku se acetyl-CoA, tedy jeden z nejdůležitějších prekurzorů syntézy PHA, naváže na aktivní místo enzymu. Acetyl je kovalentně navázán na enzym thiol-esterickou vazbou a odstupuje volný CoA. V druhém

kroku přistupuje k aktivnímu místu další acetyl-CoA, je deprotonován a kondenzuje s přítomným acetylem na acetoacetyl-CoA. Bakterie mohou obsahovat i jiné typy enzymu β -ketothiolázy (např. *C. necator*), které umožňují kondenzaci acetylu s odlišnými acyl-CoA, což umožní následnou syntézu různých druhů PHA. PhaB (acetoacetyl-CoA-reduktáza v případě syntézy PHB) redukuje acetoacetyl-CoA na (R)-3-hydroxybutyryl-CoA. Jako kofaktor se uplatňuje NADPH. PhaC (PHA syntáza) je enzym odpovědný za polymerizaci hydroxyalkanových kyselin. Schéma metabolické dráhy, jak probíhá u *C. necator*, mapuje obrázek 5. PHA syntázy mají širokou substrátovou specifitu. V současnosti bylo popsáno více než 150 různých acyl-CoA pocházejících z odlišných metabolických drah, které sloužící jako jeho substrát. Bylo pozorováno více než 60 odlišných genů kódujících různé formy PhaC. Tyto enzymy byly rozděleny do 4 tříd na základě odlišností ve struktuře enzymu a substrátové specifity [14].



Obr. 5: Metabolická dráha syntézy PHB u *C. necator* [7]

2.1.4.1 Rozdělení PHA syntáz

PHA syntázy byly rozděleny do 4 tříd na základě odlišností ve struktuře enzymu a substrátové specifity. Do třídy I spadají PHA syntázy tvořeny jednou podjednotkou PhaC a jejich produkty jsou výhradně scl-PHA. Třídou II tvoří PHA syntázy tvořené také pouze jednou podjednotkou PhaC, avšak produkující výhradně mcl-PHA. PHA syntázy třídy III se skládají ze dvou podjednotek, PhaC a PhaE, zatímco syntázy třídy IV se skládají z podjednotek PhaC a PhaR. Všechny 4 třídy zachycuje obrázek 6. PHA syntázy obou posledních tříd produkují pouze scl-PHA stejně jako syntázy třídy I [16].

| Třída | Podjednotky | Druh | Substrát |
|-------|------------------------------|-------------------------------|---|
| I | PhaC ~60-73 kDa | <i>Ralstonia eutropha</i> | 3HA _{SCL} -CoA (~C3-C5), 4HA _{SCL} -CoA, 5HA _{SCL} -CoA, 3MA _{SCL} -CoA |
| II | PhaC ~60-65 kDa | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 3HA _{MCL} -CoA (~≥C5) |
| III | PhaC PhaE ~40 kDa ~40 kDa | <i>Allochromatium vinosum</i> | 3HA _{SCL} -CoA (3HA _{MCL} -CoA [~C6-C8], 4HA-CoA, 5HA-CoA) |
| IV | PhaC PhaR ~40 kDa ~22 kDa | <i>Bacillus megaterium</i> | 3HA _{SCL} -CoA |

Obr. 6: Třídy PHA syntáz [17]

2.1.5 Biodegradace PHA

Biodegradace je proces, při kterém dochází k odbourávání látky působením živých organismů. PHA jsou odbourávány na oxid uhličitý, vodu a biomasu. Mohou být odbourávány působením mikroorganismů běžně přítomných v životním prostředí (obrázek 7). V širším smyslu se jedná o přirozené odbourávání látek v životním prostředí [3].



Obr. 7: Biodegradace PHA lahví v půdě, dvouměsíční expozice [18]

Biodegradace PHA zahrnuje tři kroky. Prvním krokem je biodeteriorace, při níž se mění fyzikální vlastnosti materiálu působením mikroorganismů na povrchu, popř. pod povrchem materiálu. Může probíhat fyzikální cestou, kdy se mikroorganismy rozrůstají na povrchu biopolymeru a vytváří sliz, který vniká do štěrbin materiálu a narušuje jeho strukturu nebo je materiál prorůstán mycelii mikroorganismů. Také může jít o chemické vlivy, kdy mikroorganismy mohou produkovat minerální nebo organické kyseliny a další látky, které přispívají k narušení struktury polymeru. Poslední možností je enzymatická biodeteriorace, kdy mikroorganismy produkují specifické enzymy, které rozkládají dané vazby přítomné v polymeru. Druhým krokem je biofragmentace, kdy je polymer působením mikroorganismů

rozložen na menší fragmenty jako jsou oligomery a monomery. Tento jev je způsobován mikrobiální produkcí enzymů nebo volných radikálů. Z hlediska biodegradace PHA je nejdůležitějším jevem produkce extracelulárních PHA depolymeráz. Třetí krok je asimilace, tedy spotřebovávání fragmentů mikroorganismy za vzniku oxidu uhličitého a vody, popř. integrace těchto fragmentů do biomasy. Fragmenty musí mít dostatečně malý rozměr, aby mohly být transportovány do nitra buňky [3, 19].

2.1.6 Ekonomické aspekty produkce PHA

Přestože PHA nacházejí potenciální uplatnění ve více oborech, jejich produkce stále není dostatečně ekonomicky efektivní. Ceny PHA se pohybují od 1,5 do 5 eur za kilogram. Pro srovnání cena polypropylenu je v rozmezí 0,2 až 0,4 eur za kilogram. Cena PHA je navyšována několika různými faktory. Jde především o cenu substrátu, kterým je živena produkující biomasa. Tato položka zpravidla představuje přibližně 50 % celkových nákladů na produkci. Dalšími faktory jsou relativně nízká výtěžnost oproti synteticky produkovaným plastům. V neposlední řadě se na nákladech podílí extrakce produktu z biomasy. Cenu lze snížit pomocí různých přístupů. Jedním z nich je snížit cenu substrátu. Z tohoto důvodu je prováděno mnoho výzkumů, které se zabývají možnostmi produkce PHA z různých odpadních substrátů, jako jsou otruby, škrob, melasa, odpadní oleje, odpadní voda a jiné. Další cestou je koprodukce, tedy výroba dalšího produktu společně s PHA, což znamená vyšší výnos při zhruba stejných nákladech. Z tohoto hlediska představují určitou perspektivu směsné kultury. Jiné výzkumy se zase zajímají o zefektivnění dosud nákladné extrakce PHA z biomasy. V neposlední řadě se jako možnost naskytuje zvýšení výtěžnosti produkce. Jedním z postupů je hledání nových bakteriálních producentů, modernější způsob potom zahrnuje tzv. řízenou evoluci [2, 8].

2.2 Aktivovaný kal

Aktivovaný kal je směsná kultura používaná při aktivačním procesu v rámci biologického čištění odpadních vod. Původně vznikl provzdušňováním městských splašků. Aktivační proces se začal vyvíjet ke konci 19. století. Znečištěná voda je přiváděna do aktivační nádrže, kde je smíšena s recirkulovaným aktivovaným kalem. Tato směs je provzdušňována, přičemž mikroorganismy přítomné v aktivovaném kalu spotřebovávají organické látky, probíhá také denitrifikace, odstraňování fosforu a další procesy. Aktivačnímu procesu musí předcházet mechanické odstranění hrubých nečistot. Potom se aktivovaný kal separuje od přečištěné vody sedimentací v dosazovací nádrži (dosazováku). Schopnost sedimentace je zapříčiněna tvorbou vloček v aktivovaném kalu. Při procesu dochází k nárůstu biomasy, část aktivovaného kalu se tedy nerekuluje a tvoří tzv. přebytečný aktivovaný kal [4, 20].

2.2.1 Složení aktivovaného kalu

Aktivovaný kal obsahuje přibližně 98 % vody. Má hnědou barvu a zemitý pach. Anorganické látky mohou tvořit 20 – 35 % sušiny. Dále jsou přítomny organické látky z odpadních vod, lipidy, sacharidy a bílkoviny. Bakterie jsou v aktivovaném kalu vázány na vločky, tedy shluky tyčinkovitých bakterií obklopených gelovou hmotou polysacharidového charakteru. Tyto shluky jsou tvořeny bakteriemi *Zooglea ramigera*, *Zooglea uva* a dalšími. Dále

se zde vyskytují zástupci rodů *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromacter*, *Azotobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Nocardia* apod. Také se zde mohou vyskytovat denitrifikační bakterie rodů *Nitrosomonas* a *Nitrobacter*. V menší míře jsou zastoupeny houby, plísně a kvasinky, z vyšších organismů např. vířníci a hlístice [4, 20, 21].

2.3 Výhody směsné kultury

Směsné kultury sestávají ze 2 nebo více mikrobiálních druhů. Typickou směsnou kulturou je aktivovaný kal využívaný při čištění odpadních vod. Využití směsných kultur na bázi aktivovaného kalu k produkci PHA s sebou nese řadu výhod. Obsah PHA v aktivovaném kalu může za anaerobních podmínek dosáhnout až 20 % sušiny. Za přesně definovaných aerobních podmínek může hmotnost PHA dosáhnout až 62 % sušiny. Aktivovaný kal je poměrně snadno dostupnou směsnou kulturou, která není substrátově tolik specifická jako většina čistých kultur a je schopná pro tvorbu PHA využívat odpadní látky. Narozdíl od čistých kultur nevyžaduje směsná kultura aseptický přístup, což může značně snížit procesní náklady [22].

2.4 Bakteriální producenti PHA

Schopností syntetizovat a akumulovat PHA nedisponují všechny bakterie, ale pouze vybrané druhy. Bakterie produkující PHA jsou shrnuty v tabulce 2. Podle některých zdrojů bylo od objevení bakteriálního PHB až po současnost popsáno více než 90 bakteriálních druhů akumulujících PHA [2].

Tab. 2: Rody bakterií produkujících PHA [23]

| | | |
|-----------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| <i>Acidovorax</i> | <i>Ferrobacillus</i> | <i>Paracoccus</i> |
| <i>Acinetobacter</i> | <i>Gamphosphaeria</i> | <i>Paucispirillum</i> |
| <i>Actinobacillus</i> | <i>Gloeocapsa</i> | <i>Pedomicrobium</i> |
| <i>Actinomycetes</i> | <i>Gloeotheca</i> | <i>Photobacterium</i> |
| <i>Aeromonas</i> | <i>Haemophilus</i> | <i>Protomonas</i> |
| <i>Alcaligenes</i> | <i>Halomonas</i> | <i>Pseudomonas</i> |
| <i>Allochromatium</i> | <i>Hydrogenophaga</i> | <i>Ralstonia</i> |
| <i>Anabaena</i> | <i>Hyphomicrobium</i> | <i>Rhizobium</i> |
| <i>Aphanothece</i> | <i>Chloroflexus</i> | <i>Rhodobacter</i> |
| <i>Aquaspirillum</i> | <i>Chlorogloea</i> | <i>Rhodococcus</i> |
| <i>Asticcaulus</i> | <i>Chromatium</i> | <i>Rhodopseudomonas</i> |
| <i>Axobacter</i> | <i>Chromobacterium</i> | <i>Rhodospirillum</i> |
| <i>Azohydromonas</i> | <i>Klebsiella</i> (rekombinantní) | <i>Rubrivivax</i> |

| | | |
|------------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| <i>Azomonas</i> | <i>Lamprocystis</i> | <i>Saccharophagus</i> |
| <i>Azospirillum</i> | <i>Lampropedia</i> | <i>Shinorhizobium</i> |
| <i>Azotobacter</i> | <i>Legionella</i> | <i>Sphaerotilus</i> |
| <i>Bacillus</i> | <i>Leptothrix</i> | <i>Spirillum</i> |
| <i>Beggiatoa</i> | <i>Methanomonas</i> | <i>Spirulina</i> |
| <i>Beijerinckia</i> | <i>Methylobacterium</i> | <i>Staphylococcus</i> |
| <i>Beneckea</i> | <i>Methylocystis</i> | <i>Stella</i> |
| <i>Bradyrhizobium</i> | <i>Methylomonas</i> | <i>Streptomyces</i> |
| <i>Brachymonas</i> | <i>Methylosinus</i> | <i>Synechococcus</i> |
| <i>Burkholderia</i> | <i>Methylovibrio</i> | <i>Syntrophomonas</i> |
| <i>Caryophanon</i> | <i>Micrococcus</i> | <i>Thiobacillus</i> |
| <i>Caulobacter</i> | <i>Microcoleus</i> | <i>Thiocapsa</i> |
| <i>Clostridium</i> | <i>Microcystis</i> | <i>Thiococcus</i> |
| <i>Comamonas</i> | <i>Microlunatus</i> | <i>Thiocystis</i> |
| <i>Corynebacterium</i> | <i>Microvoleus</i> | <i>Thiodictyon</i> |
| <i>Cupriavidus</i> | <i>Moraxella</i> | <i>Thiopedia</i> |
| <i>Cyanobacterium</i> | <i>Mycoplana</i> | <i>Thiosphaera</i> |
| <i>Defluviicoccus</i> | <i>Nitrobacter</i> | <i>Variovorax</i> |
| <i>Delftia</i> | <i>Nitrococcus</i> | <i>Vibrio</i> |
| <i>Derrxia</i> | <i>Nocardia</i> | <i>Xanthobacter</i> |
| <i>Ectothiorhodospira</i> | <i>Nostoc</i> | <i>Zoogloea</i> |
| <i>Erwinia</i> | <i>Oceanospirillum</i> | |
| <i>Escherichia</i> (rekombinantní) | <i>Oscillatoria</i> | |

Jedná se jak o grampozitivní, tak i o gramnegativní druhy. Některé kmeny jsou za určitých podmínek schopné naakumulovat množství PHA dosahující až 90 % hmotnosti sušiny buněk. Bakterie produkující PHA zpravidla vykazují relativně nízkou rychlost růstu. Teplotní optimum těchto bakterií je rovněž poněkud nižší. Často disponují poměrně tlustou buněčnou stěnou, což do značné míry znesnadňuje lyzi buněk, čímž dochází k částečnému zvýšení finančních nákladů na downstreamové procedury v potenciálním průmyslovém zpracování [15].

Na základě kultivačních podmínek syntézy polymeru lze bakteriální producenty PHA rozdělit do dvou hlavních skupin. První skupinu tvoří bakterie, které jsou schopné syntetizovat

intracelulární PHA pouze v případě limitujících koncentrací některých základních biogenních prvků (např. dusík, hořčík, síra, fosfor) za současného nadbytku uhlíku. U některých druhů rozhoduje o produkci PHA především poměr dusíku a uhlíku v živném médiu. Do druhé skupiny potom spadají bakterie, které jsou schopné syntetizovat PHA bez těchto limitujících faktorů a mohou tak akumulovat PHA již v růstové fázi produkčního cyklu. Tuto skupinu tvoří především mutantní a rekombinantní bakteriální kmeny [13].

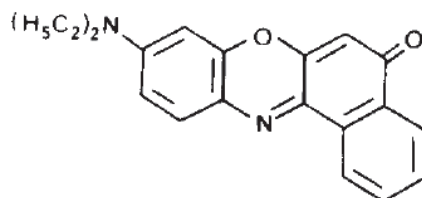
Se stoupající úrovní molekulární biologie a genových technologií se objevují i tendence k vytváření geneticky modifikovaných producentů. Mezi takové producenty patří např. rekombinantní *Escherichia coli*, do jejichž výhod spadají vyšší růstová rychlost, snadná manipulace s geny a absence metabolické dráhy odbourávající PHA [15].

2.5 Metody detekce PHA produkujících bakterií

Existuje více různých metod detekce PHA produkujících bakterií. V této kapitole jsou popsány metody používané v experimentální části práce. Jedná se o lipofilní barvení Nilskou červení a detekci genu *phaC*, který u bakterií podmiňuje produkci PHA.

2.5.1 Barvení Nilskou červení

Intracelulární PHA granule jsou lipofilní povahy podobně jako lipidové inkluze. Mohou být indikovány lipofilními barvivy. Vhodným barvivem pro tuto indikaci je Nilská červeň. Její systematický název je 9-(diethylamino)-5H-benzo[*a*]fenoxazin-5-on (obrázek 8), patří tedy mezi fenoxazony. Toto barvivo je málo rozpustné ve vodě. Zatímco v polárním prostředí nevykazuje žádnou fluorescenci, v lipofilním prostředí je silně fluorescentní. Nerozpouští dané lipofilní látky a chemicky neinteraguje s živým materiálem, takže dovoluje vitální barvení. Nilská červeň se rozpouští v lipofilních inkluzích mikroorganismů. Při vystavení těchto mikroorganismů UV záření emitují takové inkluze jasné záření, které může nabývat žluté až červené barvy. Tímto způsobem lze indikovat přítomnost lipofilních útvarů, do kterých spadají i PHA granule. Indikace však není selektivní a projevuje se i v prostředí cholesterolu a jeho esterů, triacylglycerolů a fosfolipidů. Na základě barvení Nilskou červení lze izolovat potenciální PHA produkující kultury. Barvení Nilskou červení má také vysoký potenciál v oblasti kvantitativního stanovení hydrofobních bakteriálních PHA [24, 25]



Obr. 8: Struktura Nilské červeně [24]

2.5.2 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda, kterou je možné amplifikovat vybraný gen ze vzorku DNA. Metoda byla vyvinuta Kary B. Mullisem v roce 1985. Pro amplifikaci konkrétního genu jsou potřeba tzv. primery, což jsou krátké oligonukleotidové řetězce se

specifickým pořadím bází, které je kompatibilní s úseky vymezujícími oblast vybraného genu. Po tepelné denaturaci DNA nasedají primery na protilehlé polynukleotidové řetězce. Od každého primeru probíhá syntéza nového vlákna DNA polymerázou. Vzniklé útvary se opět denaturují a celý děj se opakuje. Provádí se několik po sobě jdoucích cyklů a při každém cyklu se počet kopií genu zdvojnásobí. Pokud se ve vzorku úsek komplementární pro použité primery nenachází, primery se neváží na templátovou DNA a reakce má negativní výsledek [26].

S využitím specifických primerů lze amplifikovat gen *phaC* podmiňující tvorbu enzymu PHA syntázy. Amplifikací tohoto genu lze detekovat bakteriální producenty PHA. Pro ověření bakteriálního původu je možné provést tzv. multiplex PCR, kdy dochází k amplifikaci více genů při jedné reakci, v tomto případě genu *phaC* a zároveň genu *16S rRNA* specifického pro bakterie. Při této metodě však může docházet k diskriminaci delších DNA fragmentů, v tomto případě fragmentu *16S rRNA*. Produkty PCR lze detekovat pomocí gelové elektroforézy [26, 27].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie a přístroje

3.1.1 Chemikálie použité ke kultivaci

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (Lach-Ner, ČR)
- KH_2PO_4 (Lach-Ner, ČR)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (Lach-Ner, ČR)
- NH_4Cl (Lach-Ner, ČR)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Lach-Ner, ČR)
- $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NH}_4$ -citrát (Sigma-Aldrich, SRN)
- Yeast Extract Powder (HIMEDIA, IND)
- Glycerol (Lach-Ner, ČR)
- γ -butyrolakton (Sigma-Aldrich, SRN)
- Kyselina levulová (Sigma-Aldrich, SRN)
- D-glukóza (Lach-Ner, ČR)
- Agar powder (HIMEDIA, IND)
- Nutrient Broth (HIMEDIA, IND)
- Nílská červeň v DMSO (Sigma-Aldrich, SRN)

3.1.2 Komponenty pro PCR, gelovou elektroforézu a přečištění DNA

- Master Mix OneTaq Hot Start (2x koncentrovaný) se standardním pufrem
 - složení: 20 mM Tris-HCl (pH 8,9), 1,8 mM MgCl_2 , 22 mM NH_4Cl , 22 mM KCl, 0,2 mM dNTPs, 5% glycerol, 0,06% IGEPAL CA-630, 0,05% Tween 20, 25 jednotek/ml OneTaq Hot Start DNA polymeráza (New England Bio Labs, UK)
- 25 mM MgCl_2 (ThermoScientific, USA)
- Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics Europe, EU)
- Sterilní voda Aqua pro injectione (B.BraunMedical, SRN)
- Primery (Generi-Biotech, ČR)
- Agaróza (Sigma-Aldrich, SRN)
- DNA žebříček s fragmenty o délce 3000, 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 a 100 bp (Nippon Genetics Europe, EU)
- NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, SRN)

3.1.3 Použité přístroje

- Váhy (Kern EW 620-3NM)
- Laminární box Aura Mini (Bio Air Instruments)
- Temperovaná třepačka Heidolph Unimax 1010 + Inkubator 1000
- UV – transluminátor (Major Science)
- Nanofotometr Implen
- Analytické váhy (Ohaus)
- Centrifuga Hettich EBA 20
- Mikrocentrifuga Sigma 1-14

- Vortex (Benchmark)
- Blokový termostat Stuart SBH 200D
- Termocykler Biorad MyCycler
- Zdroj napětí MP-300V (Major Science)
- Plynový chromatograf, Thermo Scientific, Trace 1300; kolona: DB-WAX 30 m by 0,25 mm

3.2 Kultivace mikroorganismů

3.2.1 Kultivace směsné kultury

Pro kultivaci směsné kultury byla použita čtyři minerální média lišící se uhlíkovým zdrojem. Každé médium o objemu 100 ml v 250ml Erlenmayerově baňce bylo zaočkováno 2,5 ml vzorku aktivovaného kalu. Kultivace probíhala na rotační třepačce při 180 rpm za teploty 30 °C po dobu 72 hodin. Při přípravě média s kyselinou levulovou jako uhlíkovým zdrojem bylo pH média upraveno 30% NaOH na pH 7.

Tab. 3: Složení minerálního média:

| | |
|--|----------|
| Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O | 9 g |
| KH ₂ PO ₄ | 1,5 g |
| MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 0,2 g |
| NH ₄ Cl | 1 g |
| CaCl ₂ · 2 H ₂ O | 0,02 g |
| Fe ^{III} NH ₄ -citrát | 0,0012 g |
| Yeast Extract | 0,5 |
| TES II thermo | 1 ml |
| Zdroj uhlíku | |
| Destilovaná voda | 1000 ml |

Tab. 4: Zdroje uhlíku a jejich koncentrace

| | |
|-------------------|---------|
| Glycerol | 20 g/l |
| γ-butyrolakton | 7,4 g/l |
| Kyselina levulová | 5 g/l |
| Glukóza | 20 g/l |

Tab. 5: Složení roztoku stopových prvků TES II thermo

| | |
|--|---------|
| EDTA | 50 g |
| FeCl ₃ | 8,3 g |
| ZnCl ₂ | 0,84 g |
| CuCl ₂ · 2 H ₂ O | 0,13 g |
| CoCl ₂ · 6 H ₂ O | 0,1 g |
| MnCl ₂ · 6 H ₂ O | 0,016 g |
| H ₃ BO ₃ | 0,1 g |
| Destilovaná voda | 1000 ml |

V průběhu kultivace byly odebrány vzorky směsných kultur. U vzorků bylo použito tzv. desítkové ředění destilovanou vodou. Zředěné vzorky o objemu 1 ml byly očkované plošným roztěrem na agarové plotny na Petriho miskách s příslušnými minerálními médii obsahujícími Nilskou červeň v množství 0,5 mg/ml. Zaočkování proběhlo v laminárním boxu pomocí sterilních L kliček. Kultury byly kultivovány v termostatu při teplotě 30 °C. Koncentrace agaru pro přípravu pevných médií byla 17 g/l.

3.2.2 Kultivace monobakteriálních kultur

Vybrané bakteriální kultury byly pomocí sterilních bakteriálních kliček přeočkovány z agarových ploten se směsnými kulturami na nové agarové plotny s příslušnými živnými médii a přídavkem Nilské červeně. Očkovalo se metodou křížového roztěru.

Pro kultivaci inokul bylo připraveno opět stejné minerální médium o objemu 50 ml do Erlenmayerových baněk o objemu 100 ml. Do baněk byly očkovány čisté bakteriální kultury z agarových ploten pomocí sterilních bakteriálních kliček.

V jednom z experimentů bylo jako médium pro kultivaci inokula použito namísto minerálního média komplexní médium Nutrient Broth (NB) v koncentraci 25 g/l. V obou případech byla inokula kultivována na rotační třepačce za výše uvedených podmínek po dobu 48 hodin.

Kultivace za účelem produkce PHA probíhala vždy ve výše uvedeném minerálním médiu s příslušným zdrojem uhlíku. Pomocí automatické pipety bylo přeneseno 10 ml inokula do Erlenmayerovy baňky o objemu 250 ml obsahující 100 ml média. Kultivace kultur probíhala opět za uvedených podmínek po dobu 72 hodin.

3.3 Použité metody

3.3.1 Spektrofotometrické stanovení optické hustoty

Pro orientační posouzení produkce biomasy byla u vzorků spektrofotometricky stanovována optická hustota pro záření o vlnové délce 630 nm proti destilované vodě. Vzorky byly vždy vhodně zředěny, aby naměřená absorbance nabývala hodnot od 0 do 1.

3.3.2 Gravimetrické stanovení biomasy

Z příslušné bakteriální kultury bylo odebráno 10 ml do centrifugační zkumavky. V této zkumavce byl vzorek centrifugován při 6000 rpm po dobu 5 minut. Vzniklý supernatant byl odlit, k sedimentu bylo přidáno 10 ml destilované vody, sediment byl resuspendován na vortexu a postup byl opakován. Supernatant byl opět odlit a k sedimentu byl přidán 1 ml destilované vody. Po resuspendování sedimentu byl obsah zkumavky kvantitativně převeden do mikrozkuvek typu Eppendorf, které byly předem zváženy. V těchto mikrozkuvkách byl vzorek centrifugován při 10000 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl odlit a otevřené mikrozkuvky byly ponechány při teplotě 60 °C po dobu 24 hodin. Následně byly zváženy na analytických vahách a obsah biomasy byl stanoven v g/l.

3.3.3 Selektce bakterií na základě barvení NČ a izolace pozitivních kultur

Směsné kultury byly kultivovány na pevném médiu s obsahujícím Nilskou červeně způsobem uvedeným výše. Petriho misky s těmito kulturami byly vloženy na UV transluminátor, kde byly prosvíceny UV zářením. Kultury obsahující lipofilní útvary byly za těchto podmínek vlivem Nilské červeně zbarveny oranžově. Vybrané kolonie projevující tento znak byly přeočkovány na nové agarové plotny metodou křížového roztěru.

3.3.4 Izolace DNA pomocí tepelné lýze

Vzorek bakteriální kultury byl pomocí bakteriální kličky asepticky přidán do mikrozkuvky typu Eppendorf k 90 µl lyzačního pufru. Takto připravené vzorky byly inkubovány v blokovém termostatu při teplotě 90 °C po dobu 15 minut. Poté byly vzorky centrifugovány při 10000 rpm po dobu 10 minut. Asepticky bylo 70 µl supernatantu obsahujícího DNA převedeno do čisté mikrozkuvky. Takto připravené vzorky byly uchovávány při teplotě -30 °C.

3.3.5 Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA

Čistota a koncentrace DNA v lyzátech byla měřena na nanofotometru. Princip metody spočívá v měření absorbance při 260 a 280 nm proti čistému lyzačnímu pufru. Pro měření byly používány objemy 3 µl. Přístroj zobrazoval koncentraci DNA v ng/µl a poměr A260/A280 jako míru čistoty DNA. Poměr by se měl ideálně blížit hodnotě 1,8. Nižší hodnoty znamenají znečištění vzorku proteiny, vyšší hodnoty zase znečištění RNA.

3.3.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

U vzorků DNA byly pomocí PCR zjišťovány geny *16S rRNA* pro prokázání bakteriálního původu DNA a *phaC* pro prokázání genotypu umožňujícího syntézu PHA.

K amplifikaci fragmentu o délce přibližně 1500 bp vztahujícího se ke genu *16S rRNA* byly použity primery 16S-F a 16S-R dodané firmou Generi Biotech. Pro amplifikaci genu *phaC* (délka 551 bp) byly využity primery G-D a G1-R.

Tab. 6: Složení směsi pro PCR

| Složka | Objem (μl) |
|----------------------------------|------------|
| MasterMix | 12,5 |
| DNA | 2 |
| Mg ²⁺ ionty | 2,6 |
| Primery (16S-F, 16S-R, G-D, G1R) | 4 x 1 |
| Sterilní voda | 5,9 |

Tab. 7: Sekvence použitých primerů (modifikace: Y = C/T, R = A/G, K = G/T, S = G/C, W = A/T)

| primer | sekvence |
|--------|------------------------|
| G-D | GTGCCGCCSYRSATCAACAAGT |
| G1R | GTTCCAGWACAGSAKRTCGAA |
| 16S-F | AAGAGTTTGATCCTGGCTCAG |
| 16S-R | GGTTACCTTGTTACGACTT |

Byla připravena také pozitivní kontrola, kde byly použity 2 μl lyzátu DNA bakterie *Cupriavidus necator* H16 namísto 2 μl vzorku a negativní kontrola, kde byly místo vzorku 2 μl sterilní vody.

Tab. 8: Teplotní program PCR

| Krok | Teplota (°C) | Čas (s) | Počet cyklů |
|------|--------------|---------|-------------|
| 1 | 94 | 30 | 1 |
| 2 | 94 | 30 | 30 |
| | 55 | 30 | |
| | 68 | 90 | |
| 3 | 68 | 300 | 1 |
| | 30 | 60 | |

3.3.7 Stanovení PCR ampliconů gelovou elektroforézou

Gelová elektroforéza slouží k detekci PCR produktů. Pro gelovou elektroforézu byl připraven 2% agarózový gel. Do jamek v gelu bylo aplikováno 10 μl směsi vzniklé smícháním

10 µl produktu PCR s 3 µl barviva Midori Green. Do jedné z jamek byl vždy nanesen tzv. DNA žebříček, tedy směs DNA fragmentů s definovanou délkou, pro identifikaci ampliconů na základě jejich délky.

Gel s nanesenými vzorky byl umístěn do elektroforetické vany a převrstven TBE pufrem. Bylo vloženo napětí 90 V. Elektroforéza probíhala po dobu přibližně 50 minut. Poté byl gel vložen na UV transluminátor a byly pozorovány amplicony vzorků.

Tab. 9: Složení TBE pufru (10x koncentrováný)

| | |
|--------------------------------|---------|
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan | 108 g |
| Kyselina boritá | 55 g |
| EDTA | 9,3 g |
| Destilovaná voda | 1000 ml |

3.3.7.1 Příprava agarózového gelu

V 80 ml TBE pufru bylo rozpuštěno 1,6 g agarózy. Směs byla pětkrát povařena v mikrovlnné troubě. Po 3 – 4 opakováních bylo vyčkáno až gel částečně zchladne a gel byl vylit do připravené vaničky s nastaveným hřebínkem pro tvorbu jamek. Po ztuhnutí byl gel připraven k elektroforéze.

3.3.8 Příprava vzorků na sekvenaci

Produkty PCR určené k sekvenaci byly přečištěny NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kitu. Vzorky o objemu 30 µl byly smíchány s NTI pufrem v poměru 1:2. Vzniklá směs byla převedena na kolonku s křemíkovou mikrofiltrační membránou. Kolonka byla vložena do sběrné zkumavky. Vzorky byly centrifugovány 30 s při 11000 x g. Sběrná zkumavka byla vylita, kolonka se opět vložila do sběrné zkumavky a bylo na ni pipetováno 700 µl NT3 pufru. Vzorky byly opět centrifugovány 30 s při 11000 x g. Obsah sběrné zkumavky byl poté opět vylit. Po vložení kolonky zpět do sběrné zkumavky byla kolonka inkubována 3 minuty při teplotě 70 °C pro vysušení NT3 pufru. Následně byla opět centrifugována při 11000 x g po dobu 1 minuty.

Kolonka byla poté vložena do čisté Eppendorfovy mikrozukavky a na membránu bylo napipetováno 20 µl NE pufru určeného k eluci DNA. Kolonka byla inkubována 3 minuty při teplotě 70 °C. Vzorek byl následně centrifugován 1 minutu při 11000 x g.

Všechny takto přečištěné vzorky byly přepipetovány k sekvenaci. Od každého vzorku bylo pipetováno po 5 µl do dvou čistých Eppendorfových mikrozukavek. Ke vzorkům byly přidány příslušné primery, přičemž do jedné zkumavky byl vždy přidán „forward“ primer a do druhé „reverse“ primer. Primery byly přidávány v množství 5 µl. Takto připravené vzorky byly odeslány na sekvenaci do firmy SEQme s. r. o.

3.3.9 Příprava vzorků pro plynovou chromatografii

Vzorky vysušené biomasy byly odváženy do vialek. Bylo dbáno na to, aby navážka každého vzorku činila alespoň 8 mg, pokud to množství vzorku umožnilo. Do vialek byl

přidáván 1 ml chloroformu a 0,8 ml 15% kyselinou sírovou v methanolu s 0,5 mg/ml kyseliny benzoové jako vnitřní standard. Vialky byly zazátkovány a inkubovány v blokovém termostatu při teplotě 94 °C po dobu 3 hodin za účelem transesterifikace. Vzniklá směs byla poté extrahována 1 ml 0,05M NaOH. Ze spodní chloroformové fáze bylo odebráno 50 µl do čisté vialky. K tomuto množství bylo přidáno 950 µl chloroformu. Takto připravené vzorky byly analyzovány plynovou chromatografií, pomocí které bylo možné stanovit obsah methylesterů hydroxyalkanových kyselin.

3.3.10 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR)

Vzorek bakteriální kultury byl odebrán z Petriho misky sterilní kličkou a nanesen na ATR krystal. Poté bylo pozorováno charakteristické infračervené spektrum PHB.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

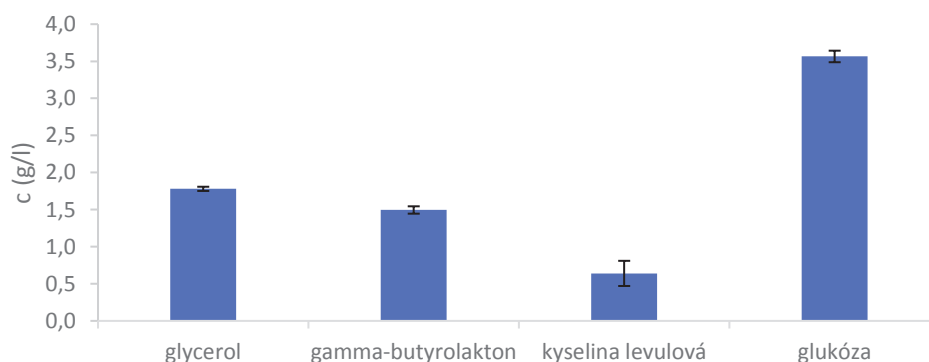
4.1 Rozdělení směsné kultury a stanovení biomasy

Směsná kultura byla kultivována na minerálním médiu s přidávkou čtyř různých biotechnologicky relevantních uhlíkových substrátů za účelem získání širokého spektra bakteriálních kultur. Pro tento experiment byly jako uhlíkové substráty vybrány glycerol (vedlejší produkt výroby bio-dieselu), γ -butyrolakton (prekurzor pro syntézu kopolymerů obsahujících 4-hydroxybutyrát), kyselina levulová (ekonomicky relevantní prekurzor pro syntézu kopolymerů obsahujících 3-hydroxybutyrát) a glukóza (standardní monosacharid).

Po 72hod. kultivaci byla u těchto směsných kultur stanoven obsah biomasy gravimetricky.

Tab. 10: Obsah biomasy u různých uhlíkových substrátů

| uhlíkový substrát | c_1 (g/l) | c_2 (g/l) | \bar{c} (g/l) | Smodch výběr |
|------------------------|-------------|-------------|-----------------|--------------|
| glycerol | 1,80 | 1,76 | 1,78 | 0,03 |
| γ -butyrolakton | 1,46 | 1,53 | 1,50 | 0,05 |
| kyselina levulová | 0,52 | 0,76 | 0,64 | 0,17 |
| glukóza | 3,62 | 3,51 | 3,57 | 0,08 |



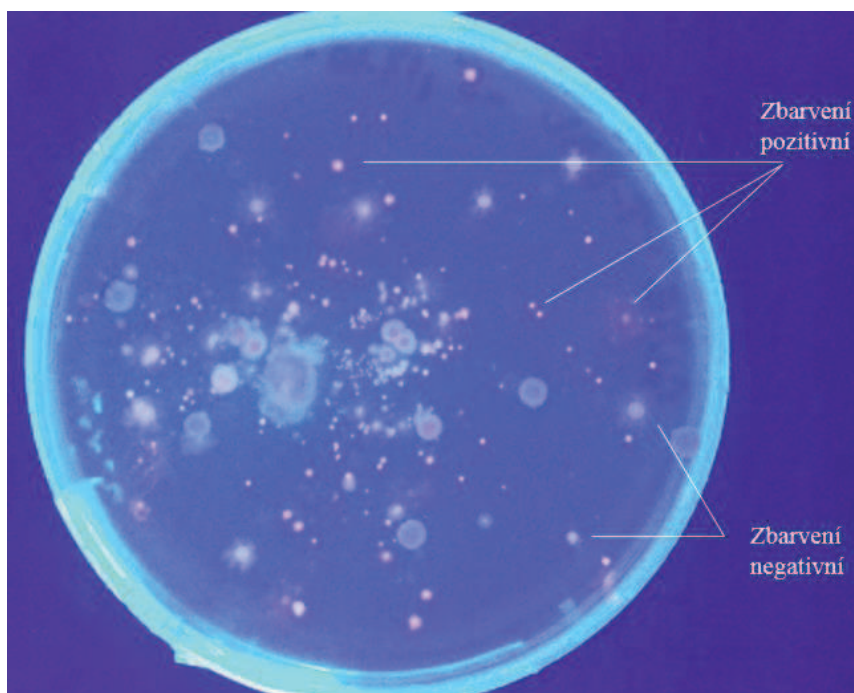
Graf 1: Obsah biomasy u různých uhlíkových substrátů

Nejvíce biomasy se podařilo získat s použitím glukózy. Zhruba poloviční výtěžek byl získán v případě glycerolu a γ -butyrolaktonu, přičemž u glycerolu byl výtěžek lehce vyšší. Nejnižší množství biomasy bylo zaznamenáno při použití kyseliny levulové.

4.2 Výběr potenciálních producentů PHA metodou lipofilního barvení

Směsné kultury kultivované na uvedených uhlíkových substrátech byly zaočkovány plošným roztěrem na pevné médium s příslušným uhlíkovým substrátem a přidávkou Nilské červeně. Pro rozlišení jednotlivých kolonií bylo použito zředění 10^5 , 2×10^5 a 2×10^7 v závislosti na koncentraci jednotlivých kultur. Kultury byly poté pozorovány pod UV

transluminátorem (obrázek 9). Obarvené kolonie byly přeočkovány na nové Petriho misky křížovým roztěrem. Tyto misky rovněž obsahovaly Nilskou červeň a bylo pozorováno zbarvení kultur. Takto bylo připraveno 31 čistých kultur potenciálních producentů PHA. Kultury se lišily nárůstem biomasy i intenzitou zbarvení.



Obr. 9: Směsná kultura barvená Nilskou červeň

4.3 Izolace DNA a detekce genů *16S rRNA* a *phaC*

Použitím tepelné lýze buněk a následné centrifugace byla izolována DNA buněk jednotlivých kultur. U izolátů DNA byla stanovena koncentrace a čistota DNA spektrofotometricky. Následně byla použita PCR pro amplifikaci genů *16S rRNA* a *PhaC*.

4.3.1 Stanovení čistoty a koncentrace DNA

Spektrofotometricky byla stanovena čistota a koncentrace DNA v získaných izolátech. Celkem se podařilo získat 29 vzorků DNA použitelných pro PCR. Výsledky tohoto měření jsou uvedeny v tabulce 11. Vzorky 1 – 9 byly izolovány z média s glycerolem, vzorky 10 – 18 z γ -butyrolaktonu, 19 – 26 z kyseliny levulové a 27 – 29 z glukózy.

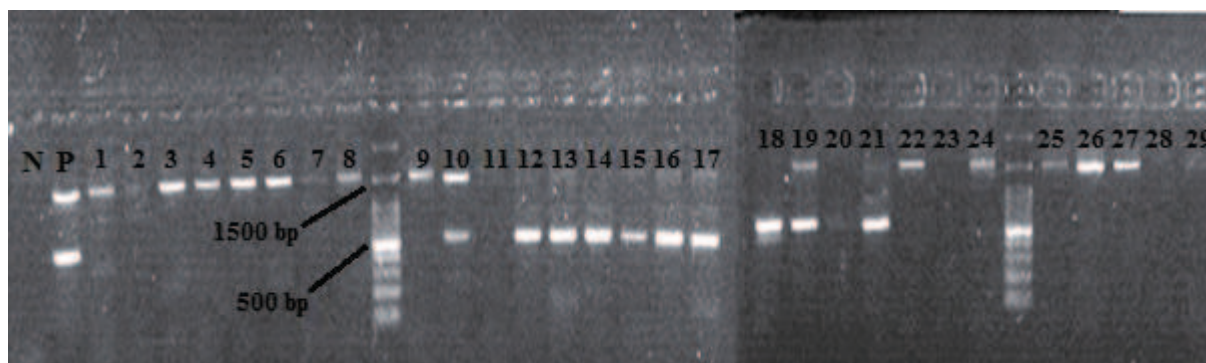
Tab. 11: Koncentrace a čistota DNA

| vz. č. | c (ng/ μ l) | A ₂₆₀ /A ₂₈₀ | vz. č. | c (ng/ μ l) | A ₂₆₀ /A ₂₈₀ | vz. č. | c (ng/ μ l) | A ₂₆₀ /A ₂₈₀ |
|--------|-----------------|------------------------------------|--------|-----------------|------------------------------------|--------|-----------------|------------------------------------|
| 1 | 222 | 1,939 | 11 | 51,1 | 1,619 | 21 | 83,7 | 1,898 |
| 2 | 143 | 1,851 | 12 | 140 | 1,667 | 22 | 27,1 | 2,077 |
| 3 | 36,1 | 1,565 | 13 | 95,7 | 1,769 | 23 | 53,1 | 1,828 |
| 4 | 55,6 | 1,881 | 14 | 172 | 1,949 | 24 | 28,1 | 1,647 |

| | | | | | | | | |
|----|------|-------|----|------|-------|----|-------|-------|
| 5 | 234 | 1,627 | 15 | 30,1 | 2,069 | 25 | 7,014 | 2,000 |
| 6 | 66,6 | 1,928 | 16 | 149 | 1,774 | 26 | 152 | 1,634 |
| 7 | 155 | 1,907 | 17 | 209 | 1,610 | 27 | 313 | 1,441 |
| 8 | 199 | 1,704 | 18 | 307 | 1,698 | 28 | 327 | 1,436 |
| 9 | 124 | 1,810 | 19 | 153 | 1,614 | 29 | 313 | 1,408 |
| 10 | 118 | 1,542 | 20 | 208 | 1,582 | | | |

4.3.2 Detekce *16S rRNA* a *phaC* genů pomocí PCR

Získané vzorky DNA byly použity pro multiplex PCR. Amplifikovány byly geny *16S rRNA* pro prokázání bakteriálního původu vzorku a *phaC* pro detekci bakteriálních producentů PHA. Produkty PCR byly identifikovány pomocí agarové gelové elektroforézy (obrázek 10).



Obr. 10: Gelová elektroforéza produktů PCR obsahující negativní (N) a pozitivní (P) kontrolu a polynukleotidový žebříček

Přibližně na úrovni fragmentu o velikosti 1500 bp byl detekován gen *16S rRNA*. U některých vzorků byl prokázán gen *phaC* poblíž úrovně 500 bp. Celkem byl tento gen prokázán u 11 vzorků. Jednalo se o vzorky 1, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 a 21. Z výsledku je patrné, že metoda předselekcce pomocí barvení Nilskou červení je pouze orientační. Vzorky, u kterých nebyl detekován gen *phaC*, zřejmě produkovaly jiné lipidické molekuly poskytující pozitivní barvení pomocí Nilské červeně. U některých vzorků nedošlo k amplifikaci *16S rRNA* v důsledku zvýhodnění kratších fragmentů při multiplex PCR.

4.4 Identifikace bakteriálních druhů sekvenací DNA

Gen *16S rRNA* od všech 11 vzorků, u kterých byla prokázána přítomnost genu *phaC*, byl připraven k sekvenaci pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kitu. Vzorky byly odeslány na sekvenaci do firmy SEQme s. r. o. Identifikace se zdařila pouze u 8 vzorků z 11 v důsledku znečištění cizorodou DNA (pravděpodobně se nejednalo o zcela axenické kultury). U vzorku č. 18 se sekvenace zdařila pouze částečně. Získané sekvence byly vyhodnoceny programem BLAST[®] volně dostupnou na <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Výsledky jsou v tabulce 12. Získané sekvence a ukázka výstupu ze sekvenátoru jsou v uvedeny Přílohách.

Tab. 12: Výsledky sekvenace DNA izolovaných PHA produkujících bakterií

| vz. č. | druh | pravděpodobnost identifikace |
|--------|------------------------------------|------------------------------|
| 1 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 99,51 % |
| 10 | <i>Paenirhodobacter enshiensis</i> | 97,96 % |
| 12 | <i>Pseudomonas putida</i> | 99,91 % |
| 13 | polymikrobiální | - |
| 14 | <i>Pseudomonas putida</i> | 99,82 % |
| 15 | <i>Pseudomonas putida</i> | 99,91 % |
| 16 | <i>Pseudomonas putida</i> | 99,91 % |
| 17 | <i>Pseudomonas putida</i> | 100,00 % |
| 18 | <i>Pseudomonas putida</i> | 100,00 % |
| 19 | polymikrobiální | - |
| 21 | polymikrobiální | - |

U druhů *Klebsiella pneumoniae* a *Paenirhodobacter enshiensis* zatím nebyla popsána schopnost produkovat PHA. Produkce PHA byla popsána u *Pseudomonas putida*, jedná se však výhradně o produkci mcl-PHA [28, 29].

K. pneumoniae může způsobovat pneumonii, jedná se tedy o patogenní bakterii nevhodnou pro potenciální biotechnologické využití [30].

4.5 Stanovení biomasy a obsahu PHB při použití NB jako média pro kultivaci inokula

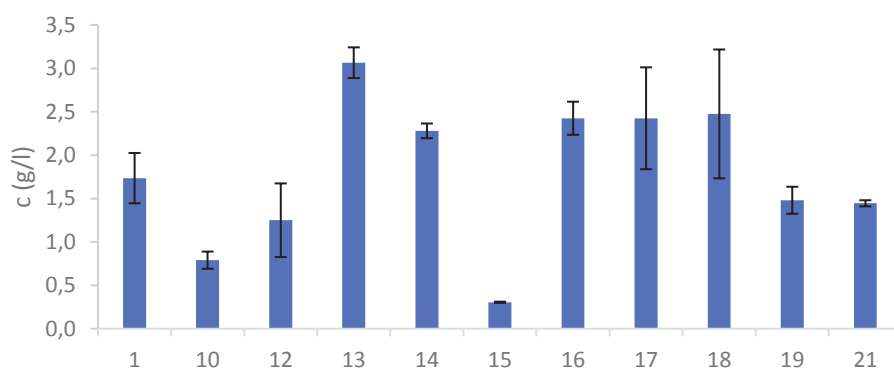
V tomto experimentu bylo použito komplexní médium pro kultivaci inokula. Pro následnou produkci bylo použito minerální médium. Biomasa byla stanovena gravimetricky. Proběhlo také orientační měření biomasy spektrofotometrickým měřením zákalu. V biomase byl poté stanovován PHB jakožto nejběžněji se vyskytující PHA. PHB byl transesterifikován na nízkomolekulární methylester, který byl stanovován plynovou chromatografií.

4.5.1 Gravimetrické stanovení biomasy

Tab. 13: Výsledky stanovení biomasy

| vz. č. | c ₁ (g/l) | c ₂ (g/l) | \bar{c} (g/l) | Smodch výběr |
|--------|----------------------|----------------------|-----------------|--------------|
| 1 | 1,94 | 1,53 | 1,74 | 0,29 |
| 10 | 0,72 | 0,86 | 0,79 | 0,10 |

| | | | | |
|----|------|------|------|------|
| 12 | 0,95 | 1,55 | 1,25 | 0,42 |
| 13 | 3,19 | 2,94 | 3,07 | 0,18 |
| 14 | 2,22 | 2,34 | 2,28 | 0,08 |
| 15 | 0,30 | 0,31 | 0,31 | 0,01 |
| 16 | 2,56 | 2,29 | 2,43 | 0,19 |
| 17 | 2,84 | 2,01 | 2,43 | 0,59 |
| 18 | 1,95 | 3,00 | 2,48 | 0,74 |
| 19 | 1,59 | 1,37 | 1,48 | 0,16 |
| 21 | 1,47 | 1,42 | 1,45 | 0,04 |



Graf 2: Stanovení biomasy gravimetricky

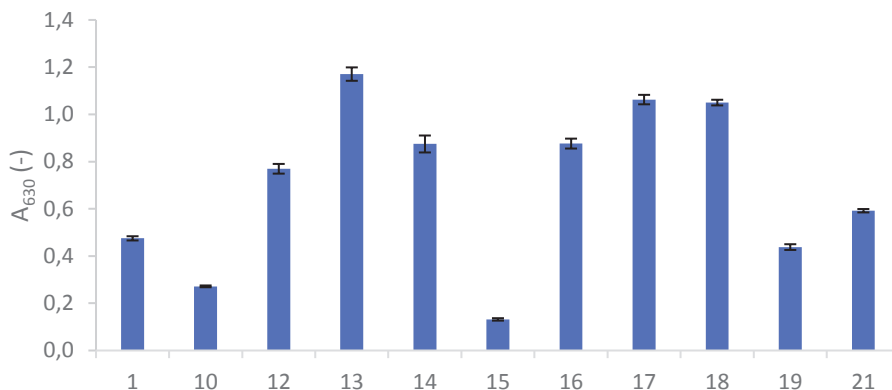
4.5.2 Spektrofotometrické stanovení zákalu

V rámci orientačního stanovení biomasy byl stanovován zákal 10 x zředěných vzorků při vlnové délce 630 nm.

Tab. 14: Stanovení zákalu

| vz. č. | A ₁ (-) | A ₂ (-) | A ₃ (-) | \bar{A} (-) | Smodch výběr |
|--------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------|--------------|
| 1 | 0,465 | 0,478 | 0,482 | 0,475 | 0,009 |
| 10 | 0,269 | 0,270 | 0,276 | 0,272 | 0,004 |
| 12 | 0,746 | 0,782 | 0,781 | 0,770 | 0,021 |
| 13 | 1,140 | 1,176 | 1,196 | 1,171 | 0,028 |
| 14 | 0,888 | 0,902 | 0,834 | 0,875 | 0,036 |
| 15 | 0,136 | 0,133 | 0,126 | 0,132 | 0,005 |
| 16 | 0,855 | 0,897 | 0,877 | 0,876 | 0,021 |
| 17 | 1,070 | 1,078 | 1,040 | 1,063 | 0,020 |

| | | | | | |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|
| 18 | 1,062 | 1,038 | 1,050 | 1,050 | 0,012 |
| 19 | 0,430 | 0,432 | 0,452 | 0,438 | 0,012 |
| 21 | 0,600 | 0,586 | 0,590 | 0,592 | 0,007 |



Graf 3: Stanovení zákalu

Graf 3 ztelně koresponduje s Grafem 2 získaným gravimetrickým stanovením biomasy. Gravimetrické stanovení disponuje výraznějšími odchylkami měření. Při gravimetrickém stanovení mohlo docházet ke ztrátám v důsledku nedokonalé sedimentace.

4.5.3 Stanovení PHB pomocí plynové chromatografie

Byla provedena transesterifikace za účelem převedení potenciálně přítomného PHB na nízkomolekulární methylester. Tento methylester měl být stanoven plynovou chromatografií. Všechny 11 vzorků zaznamenalo negativní výsledek. Za podmínek tohoto experimentu izolované bakterie neprodukovaly PHB.

4.6 Stanovení biomasy a obsahu PHB při použití min. média pro kultivaci inokula

V tomto experimentu proběhla pouze 48 hodinová kultivace na minerálním médiu v objemu 50 ml. Biomasa byla stanovena gravimetricky a spektrofotometricky byl stanoven zákal.

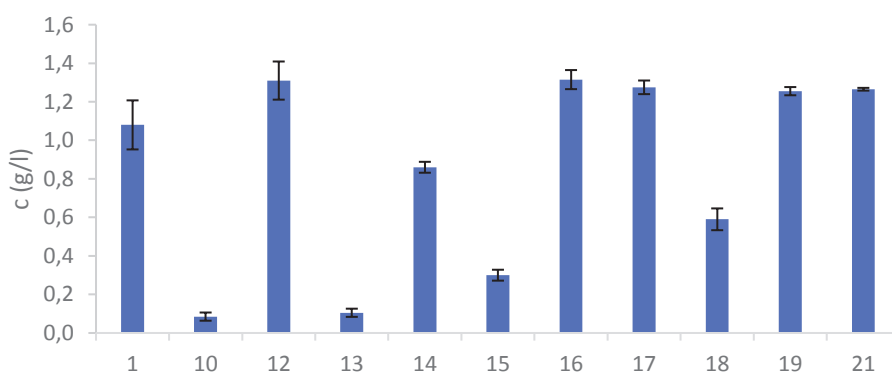
Kultury byly kultivovány také na pevném médiu. Vzorky odebrané z těchto kultur byly analyzovány metodou infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) za účelem detekce PHB. Vzorky z tekutých médií odpovídající vzorkům s pozitivní odezvou na PHB byly analyzovány s využitím plynové chromatografie za účelem stanovení PHB.

4.6.1 Gravimetrické stanovení biomasy

Tab. 15: Výsledky stanovení biomasy

| vz. č. | c_1 (g/l) | c_2 (g/l) | \bar{c} (g/l) | Smodch výběr |
|--------|-------------|-------------|-----------------|--------------|
| 1 | 0,99 | 1,17 | 1,08 | 0,13 |
| 10 | 0,07 | 0,10 | 0,09 | 0,02 |

| | | | | |
|----|------|------|------|------|
| 12 | 1,38 | 1,24 | 1,31 | 0,10 |
| 13 | 0,12 | 0,09 | 0,11 | 0,02 |
| 14 | 0,88 | 0,84 | 0,86 | 0,03 |
| 15 | 0,28 | 0,32 | 0,30 | 0,03 |
| 16 | 1,35 | 1,28 | 1,32 | 0,05 |
| 17 | 1,30 | 1,25 | 1,28 | 0,04 |
| 18 | 0,63 | 0,55 | 0,59 | 0,06 |
| 19 | 1,24 | 1,27 | 1,26 | 0,02 |
| 21 | 1,27 | 1,26 | 1,27 | 0,01 |



Graf 4: Stanovení biomasy gravimetricky

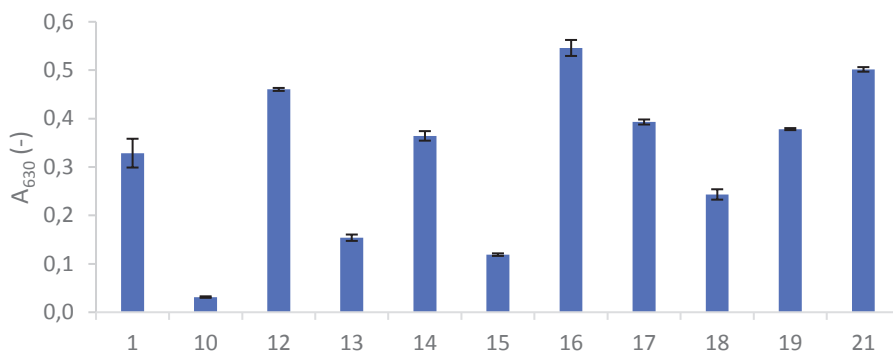
4.6.2 Spektrofotometrické stanovení zákalu

V rámci orientačního stanovení biomasy byl stanovován zákal 10 x zředěných vzorků při vlnové délce 630 nm.

Tab. 16: Stanovení zákalu

| vz. č. | A ₁ (-) | A ₂ (-) | A ₃ (-) | \bar{A} (-) | Smodch výběr |
|--------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------|--------------|
| 1 | 0,312 | 0,311 | 0,363 | 0,329 | 0,030 |
| 10 | 0,031 | 0,030 | 0,033 | 0,031 | 0,002 |
| 12 | 0,461 | 0,463 | 0,457 | 0,460 | 0,003 |
| 13 | 0,161 | 0,148 | 0,153 | 0,154 | 0,007 |
| 14 | 0,370 | 0,370 | 0,353 | 0,364 | 0,010 |
| 15 | 0,122 | 0,118 | 0,117 | 0,119 | 0,003 |
| 16 | 0,562 | 0,547 | 0,529 | 0,546 | 0,017 |
| 17 | 0,390 | 0,390 | 0,399 | 0,393 | 0,005 |

| | | | | | |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|
| 18 | 0,250 | 0,231 | 0,249 | 0,243 | 0,011 |
| 19 | 0,379 | 0,380 | 0,376 | 0,378 | 0,002 |
| 21 | 0,507 | 0,498 | 0,500 | 0,502 | 0,005 |



Graf 5: Stanovení zákalu

4.6.3 Detekce PHB pomocí FTIR

Vzorky kultur odebrané z pevných médií byly analyzovány pomocí FTIR. Z 11 vzorků se podařilo detekovat PHB u 2 vzorků, šlo o vzorky č. 10 a 13. U těchto vzorků byla pozorována spektra charakteristická pro PHB. Oba vzorky pocházely z médií využívajících γ -butyrolakton jako zdroj uhlíku.

4.6.4 Stanovení PHB pomocí plynové chromatografie

Byla provedena transesterifikace za účelem převedení potenciálně přítomného PHB na nízkomolekulární methylester. Tento methylester byl stanoven plynovou chromatografií. Obsah PHB v sušině biomasy byl stanoven na 9,33 hmot. % u vzorku č. 10 a na 1,18 hmot. % u vzorku č. 13.

5 ZÁVĚR

Tato práce měla za cíl detekovat PHA produkující bakterie vyskytující se v aktivovaném kalu a pokusit se o izolaci těchto bakterií. Výskyt PHA v aktivovaném kalu je zmiňován v některých vědeckých pracích zabývajících se touto tematikou, některé z nich jsou citovány v teoretické části.

V experimentální části byla směsná kultura aktivovaného kalu kultivována na minerálním médiu s přidávkou čtyř různých zdrojů uhlíku. Pro tento účel byl vybrán glycerol, γ -butyrolakton, kyselina levulová a glukóza. Největší výtěžky biomasy byly získány z média s glukózou, nejnižší s kyselinou levulovou, média s glycerolem a γ -butyrolaktonem vyprodukovala velmi podobná množství biomasy.

Na základě lipofilního barvení bylo izolováno 31 kultur. 9 kultur využívalo jako zdroj uhlíku glycerol, dalších 9 γ -butyrolakton, 8 kyselinu levulovou a 5 glukózu. U 29 z nich bylo možné provést PCR pro amplifikaci genů *16S rRNA* a *phaC*. Tímto experimentem bylo detekováno 11 bakteriálních producentů PHA. Jako zdroj uhlíku využívala 1 kultura glycerol, 8 γ -butyrolakton a 2 kyselinu levulovou.

U 11 získaných vzorků PHA produkujících bakterií proběhl pokus o identifikaci těchto bakterií pomocí sekvenace genu *16S rRNA*. Bylo identifikováno 8 kultur, u 3 zbývajících se identifikace nezdařila vlivem znečištění vzorků cizorodou DNA. Jeden vzorek byl identifikován jako *Klebsiella pneumoniae* (využívající jako zdroj uhlíku glycerol), jeden vzorek jako *Paenirhodobacter enshiensis* a u zbývajících 6 se jednalo o *Pseudomonas putida* (oba druhy využívající γ -butyrolakton). Celkem se tedy podařilo izolovat 3 různé bakteriální kultury disponující genem *phaC*. Je známo, že *P. putida* produkuje PHA, omezuje se však na mcl-PHA. Pravděpodobně z tohoto důvodu nebyl u tohoto druhu detekován PHB. U *K. pneumoniae* a *P. enshiensis* nebyla dosud popsána schopnost produkce PHA.

Byla provedena submerzní kultivace těchto vzorků na minerálním médiu. V průměru dosahovaly nejvyšších výtěžků biomasy kultury využívající γ -butyrolakton. Výtěžky biomasy však byly poměrně různé. Spektrofotometrické stanovení vykazovalo relativně nižší statistické odchylky paralelních pokusů než gravimetrické stanovení, mohlo však být ovlivněno více faktory souvisejícími se složením měřených vzorků.

Pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací byl detekován výskyt PHB v biomase 2 z 11 izolovaných kultur kultivovaných na pevném minerálním médiu s příslušnými uhlíkovými zdroji. Oba pozitivní vzorky využívaly jako zdroj uhlíku γ -butyrolakton. Jeden z pozitivních vzorků byl na základě předcházející sekvenace vyhodnocen jako *Paenirhodobacter enshiensis*, u druhého vzorku se identifikace nezdařila.

Tyto dva vzorky byly kultivovány submerzně. V prvním experimentu byla inokula kultur kultivována na komplexním médiu (NB). Po 72 kultivaci těchto kultur v minerálním médiu s příslušným uhlíkovým zdrojem proběhl pokus o stanovení obsahu PHB v biomase s využitím plynové chromatografie. Bylo zjištěno, že za daných podmínek žádná z kultur neprodukovala PHB.

V následujícím experimentu byly vzorky kultur zaočkovány do minerálního média (bez kultivace inokula v komplexním médiu), doba kultivace byla z časových důvodů zkrácena na 48 hodin. Následně byl opět stanovován obsah PHB v biomase pomocí plynové chromatografie. Zde bylo dosaženo pozitivních výsledků u obou vzorků. Obsah PHB v biomase *Paenirhodobacter enshiensis* byl stanoven na 9,33 %, obsah PHB v biomase neidentifikované kultury byl stanoven na 1,18 %. V porovnání s výtěžky PHB požadovanými pro průmyslovou produkci PHB jde o velmi slabé výtěžky.

Za daných podmínek kultivace byly izolované bakterie schopné produkovat PHB ve velmi omezené míře, nebo neprodukovaly vůbec. V případě *K. pneumoniae* je potenciální biotechnologické využití omezené skutečností, že se jedná o patogenní druh. Zvýšení produkce PHB těmito bakteriemi je teoreticky možné optimalizací kultivačních podmínek. Tyto podmínky se mohou týkat např. složení živného média, teploty kultivace nebo pH prostředí.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] GEYER, Roland, Jenna R. JAMBECK a Kara Lavender LAW. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances* [online]. 2017, **3**(7) [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1126/sciadv.1700782. ISSN 2375-2548. Dostupné z: <http://advances.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/sciadv.1700782>
- [2] RAZA, Zulfiqar Ali, Sharjeel ABID a Ibrahim M. BANAT. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. Elsevier, 2018, **126**, 45-56 [cit. 2018-12-02]. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.10.001. ISSN 0964-8305.
- [3] EMADIAN, S. Mehdi, Turgut T. ONAY a Burak DEMIREL. Biodegradation of bioplastics in natural environments. *Waste Management* [online]. Elsevier, 2017, **59**, 526-536 [cit. 2018-12-02]. DOI: 10.1016/j.wasman.2016.10.006. ISSN 0956-053X.
- [4] DOHÁNYOS, Michal, Jan KOLLER a Nina STRNADOVÁ. *Čištění odpadních vod*. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 1998, 177 s. ISBN 80-7080-316-9.
- [5] WALLEN, Lowell L. a William K. ROHWEDDER. Poly-.beta.-hydroxyalkanoate from activated sludge. *Environmental Science & Technology* [online]. 1974, **8**(6), 576-579 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1021/es60091a007. ISSN 0013-936X. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es60091a007>
- [6] WARD, P. G., G. DE ROO a K. E. O'CONNOR. Accumulation of Polyhydroxyalkanoate from Styrene and Phenylacetic Acid by *Pseudomonas putida* CA-3. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2005, **71**(4), 2046-2052 [cit. 2019-04-19]. DOI: 10.1128/AEM.71.4.2046-2052.2005. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.71.4.2046-2052.2005>
- [7] SHRIVASTAV, Anupama, Hae-Yeong KIM a Young-Rok KIM. Advances in the Applications of Polyhydroxyalkanoate Nanoparticles for Novel Drug Delivery System. *BioMed Research International* [online]. 2013, **2013**, 1-12 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1155/2013/581684. ISSN 2314-6133. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/581684/>
- [8] URTUVIA, Viviana, Pamela VILLEGAS, Myriam GONZÁLEZ a Michael SEEGER. Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. Elsevier B.V., 2014, **70**, 208-213 [cit. 2018-12-02]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.06.001. ISSN 0141-8130.
- [9] SINGH, A. K. a N. MALLICK. Enhanced production of SCL-LCL-PHA co-polymer by sludge-isolated *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7925. *Letters in Applied Microbiology* [online]. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2008, **46**(3), 350-357 [cit. 2018-12-02]. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02323.x. ISSN 0266-8254.
- [10] KIM, Do Young, Young Baek KIM a Young Ha RHEE. Evaluation of various carbon substrates for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates bearing functional groups by

- Pseudomonas putida*. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. Elsevier B.V, 2000, **28**(1), 23-29 [cit. 2018-12-02]. DOI: 10.1016/S0141-8130(00)00150-1. ISSN 0141-8130.
- [11] GORENFLO, V, G SCHMACK, R VOGEL, A STEINBUCHER a A STEINBUCHER. Development of a Process for the Biotechnological Large-Scale Production of 4-Hydroxyvalerate-Containing Polyesters and Characterization of Their Physical and Mechanical Properties. *Biomacromolecules* [online]. 2001, **2**(1), 45-57 [cit. 2018-12-02]. DOI: 10.1021/bm0000992. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <http://search.proquest.com/docview/754547960/>
- [12] POIRIER, Yves, Christianae NAWRATH a Chris SOMERVILLE. Production of Polyhydroxyalkanoates, a Family of Biodegradable Plastics and Elastomers, in Bacteria and Plants. *Nature Biotechnology* [online]. 1995, **13**(2), 142-150 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1038/nbt0295-142. ISSN 1087-0156. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nbt0295-142>
- [13] MUHAMMADI, Muhammad, Shafqat SHABINA, Shafqat AFZAL a Shafqat HAMEED. Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chemistry Letters and Reviews* [online]. Taylor & Francis, 2015, **8**(3-4), 56-77 [cit. 2018-12-02]. DOI: 10.1080/17518253.2015.1109715. ISSN 1751-8253.
- [14] SAGONG, Hye-Young, Hyeoncheol Francis SON, So Young CHOI, Sang Yup LEE a Kyung-Jin KIM. Structural Insights into Polyhydroxyalkanoates Biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. Elsevier, 2018, **43**(10), 790-805 [cit. 2018-12-02]. DOI: 10.1016/j.tibs.2018.08.005. ISSN 0968-0004.
- [15] REDDY, C.S.K, R GHAI, V.C RASHMI a V.C KALIA. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology* [online]. Elsevier, 2003, **87**(2), 137-146 [cit. 2018-12-02]. DOI: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2. ISSN 0960-8524.
- [16] CHEN, Yi-Jr, Pei-Chien TSAI, Chun-Hua HSU a Chia-Yin LEE. Critical residues of class II PHA synthase for expanding the substrate specificity and enhancing the biosynthesis of polyhydroxyalkanoate. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. Elsevier, 2014, **56**(C), 60-66 [cit. 2018-12-02]. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2014.01.005. ISSN 0141-0229.
- [17] Mikrobielle Polyester, In: *Universität Münster* [online]. *Münster, 2010* [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: https://www.uni-muenster.de/Biologie.IMMB.Steinbuechel/Forschung/PHA.html#PHA_Synthesen
- [18] PHA: promising, versatile, biodegradable, In: *Bio Based Press* [online]. Amsterdam, 2016 [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <https://www.biobasedpress.eu/2016/08/pha-promising-versatile-biodegradable/>
- [19] LUCAS, Nathalie, Christophe BIENAIME, Christian BELLOY, Michèle QUENEUDEC, Françoise SILVESTRE a José-Edmundo NAVA-SAUCEDO. Polymer

- biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review. *Chemosphere* [online]. Elsevier, 2008, **73**(4), 429-442 [cit. 2018-12-02]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.06.064. ISSN 0045-6535.
- [20] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana. *Aplikovaná a technická hydrobiologie*. Vyd. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2003. ISBN 978-80-7080-521-3.
- [21] PITTER, Pavel. *Hydrochemie*. Praha: SNTL, 1981, 373 s.
- [22] IVANOV, V., V. STABNIKOV, Z. AHMED, S. DOBRENKO a A. SALIUK. Production and applications of crude polyhydroxyalkanoate-containing bioplastic from the organic fraction of municipal solid waste. *International Journal of Environmental Science and Technology* [online]. 2015, **12**(2), 725-738 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1007/s13762-014-0505-3. ISSN 1735-1472. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13762-014-0505-3>
- [23] M. KOLLER et al.: Biotechnological Polymer Synthesis, *Food Technol. Biotechnol.* **48** (3) 255–269 (2010)
- [24] GREENSPAN, P. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *The Journal of Cell Biology* [online]. 1985, **100**(3), 965-973 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1083/jcb.100.3.965. ISSN 0021-9525. Dostupné z: <http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.100.3.965>
- [25] GORENFLO, V., A. STEINBÜCHEL, S. MAROSE, M. RIESEBERG a T. SCHEPER. Quantification of bacterial polyhydroxyalkanoic acids by Nile red staining. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 1999, **51**(6), 765-772 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1007/s002530051460. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002530051460>
- [26] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [27] CONTE, Enrico, Vittoria CATARA, Sebastiana GRECO, et al. Regulation of polyhydroxyalkanoate synthases (phaC1 and phaC2) gene expression in *Pseudomonas corrugata*. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2006, **72**(5), 1054-1062 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1007/s00253-006-0373-y. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-006-0373-y>
- [28] *Pseudomonas putida* KT2442 Cultivated on Glucose Accumulates Poly(3-Hydroxyalkanoates) Consisting of Saturated and Unsaturated Monomers. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992, **58**(2), 536-544.
- [29] MEYER, Jean-Marie. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Archives of Microbiology* [online]. 2000, **174**(3), 135-142 [cit. 2019-05-23]. DOI: 10.1007/s002030000188. ISSN 0302-8933. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002030000188>
- [30] *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998, **11**(4), 589-603.

7 PŘÍLOHY

Příloha 1: Sekvence genu *16S rRNA* u vzorku č. 1

GATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAAYGTCGCAAG
ACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTA
GCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAG
GATGACCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGT
GAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGTTAAGGT
TAATAACCTTGGCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTA
AAGCGCACGCAGGCGGTCCGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTG
GGAAGTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCC
AGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGG
CCTCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTT
GAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCC
GCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATG
TGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAAC
TTTGCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTG
TCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTT
ATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAAGTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAA
CTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTA
CACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGG
ACCTCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAG
TCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCA

Příloha 2: Sekvence genu *16S rRNA* u vzorku č. 10

CGGGGGAAAGATTTATCGGCAAAGGATCGGCCCGCGTTGGATTAGGTAGTTGGT
GAGGTAACGGCTCACCAAGCCGACGATCCATAGCTGGTTTGGAGAGGATGATCAG
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
TCTTAGACAATGGGGGAAACCCTGATCTAGCCATGCCGCGTGAGCGATGAAGGC
CTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGCTGGGAAGATAATGACGGTACCAGCAGAAGA
AGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCTAGCGTT
GTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATTGGAAAGTTGGGGGTG
AAATCCCGGGGCTCAACCTCGGAACTGCCTCCAAAACCTCCAGTCTTGAGGTCGA
GAGAGGTGAGTGGAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGA
ACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAG
CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAA
TGCCAGTCGTCGGCAAGCATGCTTGTTCGGTGACACACCTAACGGATTAAGCATTC
CGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAA

CCCTTGACATCGAGATCGCGGTTACCAGAGATGGTTTCCTTCAGTTCGGCTGGAT
CTTAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTTCGGTTAA
GTCCGGCAACGAGCGCAACCCACACTTCCAGTTGCCATCATTTCAGTTGGGCACTC
TGGAAGAACTGCCGATGATAAGTCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCCTC
ATGGCCCTTACGGGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGATGACAATGGGCTA
ATCCCAAAAAGTCGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAG

Příloha 3: Sekvence genu *16S rRNA* u vzorku č. 12

ATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAG
CCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGT
AACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGC
CATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGG
AAGGGCAGTAAGCTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCG
GCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA
ATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAAGCCCC
GGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGG
TGGTGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGA
GCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCG
TTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGG
GAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAGTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACA
TGCAGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGACACAGGTGC
TGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAG
CGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTG
CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTAC
GGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCG
AGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCG
ACTGCGTGAAGTCGG

Příloha 4: Sekvence genu *16S rRNA* u vzorku č. 14

ACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGG
GTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCAC
ACAGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTCGGGAATATT
GGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTC
GGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGT
TTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGT
GGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAA
ACTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAA

ATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATA
CTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCG
CAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTC
AAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAG
CAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGA
TTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGT
CGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCA
GCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
GGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACA
ATGGTCCGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACC
GATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCG

Příloha 5: Sekvence genu *16S rRNA* u vzorku č. 15

AGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAG
TTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATG
ATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAG
AAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTAAT
ACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGC
GCGCGTAGGTGGTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTAACCTGGGAAC
TGCATCCAAAACCTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCT
GGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA
CCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATT
TTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGT
TAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA
ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAG
AGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAG
CTCGTGTGTCGTCGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTA
GTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGA
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACAC
GTGCTACAATGGTCCGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTC
ACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACT

Příloha 6: Sekvence genu *16S rRNA* u vzorku č. 16

GAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATT
AGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGA
GGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTG

TGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAG
CTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTG
CCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGT
AAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTG
GAACTGCATCCAAAAGTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTC
CTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCCA
CCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTT
GAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCG
CAAGGTTAAAAGTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT
GGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAAGT
TTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGT
CGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTG
TCCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAA
CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTA
CACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTA
ATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAG
TCGG

Příloha 7: Sekvence genu *16S rRNA* u vzorku č. 17

TTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTA
ATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACT
GAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA
CAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGAT
TGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTG
ACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
AGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTT
TGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAAGT
GCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGA
CACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGGAGATTTTAGTGGCGCAGC
TAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAGTCAAAT
GAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAAC
GCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAAGTTCAGAGATGGATTGGT
GCCTTCGGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCG
GATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACG
TTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGA
TGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGT
CGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCG
TAGTCCGGATCGCAGTCTGCAAC

Příloha 8: Částečná sekvence genu *16S rRNA* u vzorku č. 18

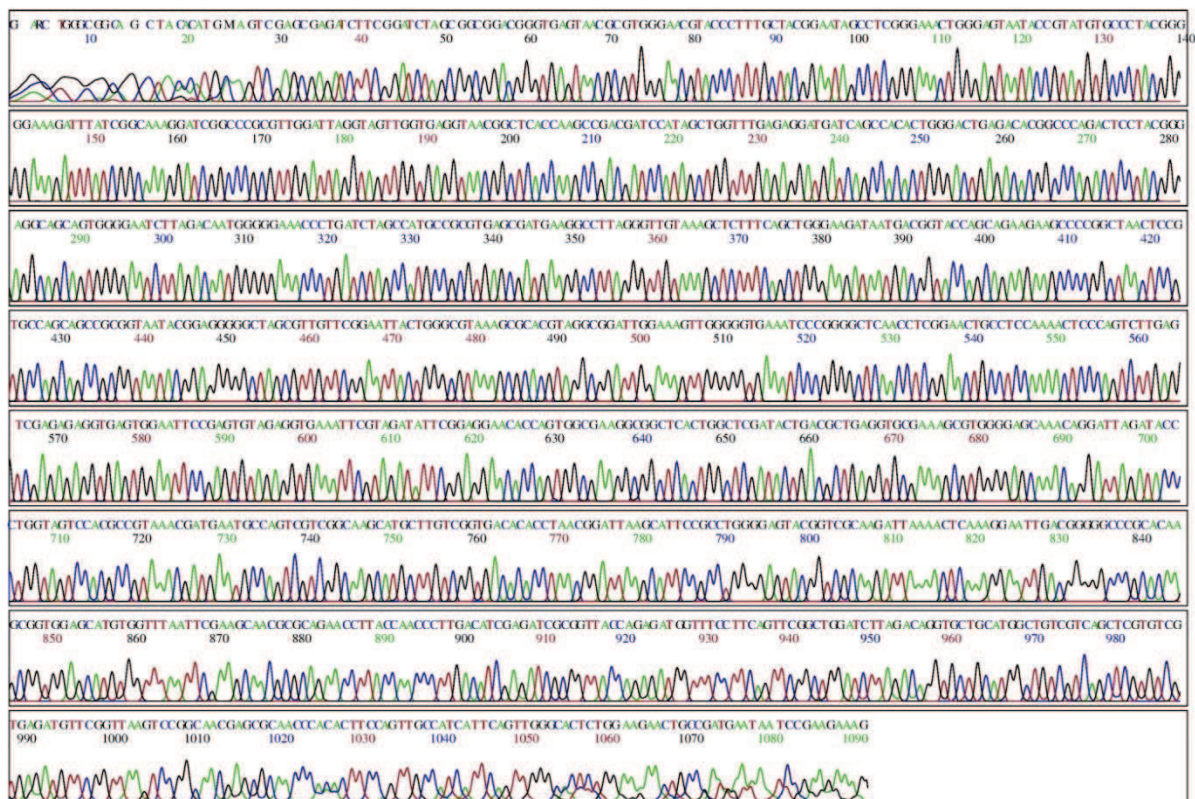
ACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTG
 CAAGCGTTAATCGGAATACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTT
 GGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCAAGCTA
 GAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATA
 GGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGT
 GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
 CGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATT
 AAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACG
 GGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGA
 CTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGG
 AACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGG
 TTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGG
 GCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
 GTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAGA
 GGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGA
 TCGCAGTCTGCAA

Příloha 9: Výstup ze sekvenátoru pro vzorek č. 10



Sample name: PP2_16SF

User name: Iva Pernicová
 Order no.: 192110404
 Order date: 14.02.2019



Please notice that it is highly recommended to interpret obtained sequences based on .ab1 files.