



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VYUŽITÍ MIKROSKOPIE ATOMÁRNÍCH SIL KE STUDIU VYBRANÉHO BAKTERIÁLNÍHO KMENE

THE UTILIZATION OF ATOMIC FORCE MICROSCOPY TO STUDY OF SELECTED BACTERIAL STRAIN

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Simona Nováková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1954/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Simona Nováková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Smilek, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Využití mikroskopie atomárních sil ke studiu vybraného bakteriálního kmene

Zadání bakalářské práce:

- Vypracovat literární rešerši zaměřenou na využití spektroskopických technik (nejenom AFM) ke studiu bakterií.
- Optimalizovat techniku mikroskopie atomárních sil ke studiu vybraného bakteriálního kmene.
- Otestovat použitelnost výše optimalizovaného postupu na vhodném bakteriálním kmenu.
- Diskutovat naměřené výsledky a vyvozovat logické závěry.
- Kriticky zhodnotit použitelnost mikroskopie atomárních sil ve studiu bakterií.

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2024:

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

Simona Nováková
studentka

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Předmětem bakalářské práce bylo studium vybraných bakteriálních kmenů prostřednictvím mikroskopie atomárních sil. Zkoumány byly termofilní purpurové bakterie – *Rhodobaca Barguzinensis*, *Rhodoblastus acidophilus*. Hlavním cílem bylo optimalizovat vybranou mikroskopickou metodu pro zobrazení ve vodném prostředí s nejvhodnějším výběrem fixace vzorku. Pro studium bakteriálních kmenů bylo nutné zachovat viabilitu buněčných mikroorganismů a dodržet optimální podmínky pro zachování nativního stavu při procesu měření. Dále byly vyhodnoceny mechanické vlastnosti – Youngův modul a adheze. Morfologie jednotlivých vzorků byla srovnávána u vzorků stejného druhu v odlišném pH kapalném prostředí a v prostředích s různou koncentrací rozpuštěné soli NaCl. Cíleno bylo i na schopnost produkce PHA granulí u purpurových bakterií, ovšem kvůli absenci PHA-syntázy první třídy nebylo PHA detekováno. Byly porovnány vlivy různých parametrů kultivace jako odlišná doba kultivace či rozdílné pH prostředí. Snímkování bakterií probíhalo pomocí hrotu SNL-10, který je vhodný pro bakteriální vzorky v kapalném prostředí a samotné měření probíhalo v módu QI™. K imobilizaci byl použit skleněný substrát pokrytý vrstvou Poly-L-lysinu. Na závěr byly vyhodnoceny mechanické vlastnosti prostřednictvím Youngova modulu a adheze u vzorků s různě proměnlivými faktory prostředí.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mikroskopie atomárních sil, *Rhodoblastus acidophilus*, *Rhodobaca barguzinensis*, polyhydroxyalkanoáty, extremofilní purpurové bakterie

ABSTRACT

The subject of the bachelor's thesis was the study of selected bacterial strains by a selected method of atomic force microscopy. Thermophilic purple bacteria – *Rhodoblastus acidophilus*, *Rhodobaca barguzinensis* – were investigated. The main aim of this theses was focused on optimizing the usage of this microscopic method for imaging in an aqueous environment with the most appropriate fixation of sample. Focusing on bacterial strains demanded to preserve the viability of microorganisms and to observe optimal conditions for maintaining the native state during the measurement process. Furthermore, mechanical properties were evaluated – Young's modulus and adhesion. The morphology of individual samples was compared for samples of the same species in different pH liquid environments and in environments with different concentrations of dissolved NaCl salt. The ability to produce PHA granules in purple bacteria was also targeted, however, due to the absence of first-class PHA synthase, PHA was not detected. The effects of different cultivation parameters such as different cultivation time or different pH of the environment were compared. Imaging of bacteria was carried out using the SNL-10 tip, which is suitable for bacterial samples in a liquid environment, and the measurement itself was carried out in QI™ mode. A glass substance covered with a layer of Poly-L-lysine was used for immobilization. Finally, the mechanical properties were evaluated through Young's modulus and adhesion for samples with various environmental factors.

KEYWORDS

Atomic force microscopy, *Rhodoblastus acidophilus*, *Rhodobaca barguzinensis*, polyhydroxyalkanoates, extremophilic purple bacteria

NOVÁKOVÁ, Simona. *Využití mikroskopie atomárních sil ke studiu vybraného bakteriálního kmene*. Brno, 2024. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156933>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Jiří Smilek.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D. za trpělivost a ochotu pomoci s obeznámením správné práce na AFM a poskytnutí odborných rad při postupu práce. Dále mé poděkování patří Ing. Viktorii-Alexandře Pacasové za odborný dohled a za poskytnutí cenných rad i pomoci při provádění mikrobiologické práce. Také děkuji Bc. Markétě Khýrové za zaučení práce na mikroskopu atomárních sil i za poskytnutí rad v oblasti přípravy vzorků na AFM. V neposlední řadě děkuji všem kolegům v laboratoři, kteří byli vždy ochotní poradit a pomoci. Na závěr chci poděkovat své rodině a přátelům mnohdy z řad kolegů za podporu při průchodu studiem i při tvorbě práce.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1. Mikroskopie atomárních sil.....	9
2.1.1. Princip mikroskopie atomárních sil.....	9
2.1.2. Srovnání módů AFM.....	10
2.2. Využití mikroskopie atomárních sil pro studium bakteriálních buněk	11
2.3. Vhodná příprava biologických vzorků pro studium pomocí AFM	11
2.4. Porovnání AFM s jinými mikroskopickými technikami pro morfologické studium bakterií.....	12
2.4.1. Elektronová mikroskopie	12
2.4.2. Fluorescenční mikroskopie.....	13
2.4.3. Konfokální mikroskopie.....	13
2.4.4. Ramanova spektroskopie.....	13
2.5. Polyhydroxyalkanoáty.....	14
2.5.1. Vlastnosti polyhydroxyalkanoátů.....	14
2.5.2. Syntéza a degradace polyhydroxyalkanoátů	15
2.6. Bakteriální buňka	17
2.6.1. Purpurové bakterie	18
2.6.2. Extremofilní purpurové bakterie	19
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
3.1. Použité chemikálie, přístroje a organismy	22
3.1.1. Chemikálie.....	22
3.1.2. Přístroje	22
3.1.3. Použité mikroorganismy.....	24
3.2. Kultivace	24
3.2.1. <i>Rhodoblastus acidophilus</i>	24
3.2.2. <i>Rhodobaca barguzinensis</i>	25
3.3. Charakterizace narostlých kultur.....	26
3.3.1. Optická hustota.....	26
3.3.2. Optimalizace přípravy vzorků na měření	26
3.3.3. Zobrazování v kapalině	26
3.3.4. Imobilizace vzorků v kapalném prostředí	27

3.3.5.	Fixace vzorků	28
3.3.6.	Příprava bakterií pro správné zobrazení na AFM.....	28
3.4.	Nastavení AFM pro měření v kapalném prostředí	28
3.5.	Měření mechanických vlastností	29
3.6.	Zpracování výstupu měření	29
4.	VÝSLEDKY A DISKUSE	30
4.1.1.	Plynová chromatografie	31
4.2.	Optimalizace měření bakteriálních kmenů v kapalném prostředí.....	31
4.2.1.	Nastavení parametrů měření.....	31
4.2.2.	Výsledné snímky	31
4.3.	Získané charakteristiky na AFM pro živé bakterie	33
4.4.	Youngův modul a adheze bakterií v různém prostředí.....	36
4.4.1.	Youngův modul.....	36
4.4.2.	Adheze.....	36
4.5.	Zobrazení bakterií v rozdílné hodnotě pH prostředí.....	37
5.	ZÁVĚR.....	41
6.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	42
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	48

1. ÚVOD

Pomocí mikroskopických metod je možné získat informace o vybraných mikroorganismech. V této práci je používána mikroskopie atomárních sil známá pod zkratkou AFM z anglického *atomic force microscopy* schopná zobrazit topografické snímky bakteriálních buněk. Princip funguje na detekci působení elektromagnetických sil mezi povrchem vzorku a hrotem. Tímto způsobem lze obdržet informaci o struktuře vzorku i trojrozměrné zobrazení a lze také zjistit mechanické vlastnosti [1, 2]. Purpurové bakterie dlouho sloužily pro pochopení základních biologických procesů účastnících se fotosyntézy. Tato skupina gramnegativních bakterií je schopna produkce celé škály pigmentů procesem fotosyntézy a také produkuje polyhydroxyalkanoáty jakožto sekundární metabolity. Polyhydroxyalkanoáty jsou obecně považovány za obnovitelné a biologicky odbouratelné alternativy k petrochemickým polymerům v mnoha aplikacích. Bylo zjištěno, že dokážou zlepšit odolnost bakterií vůči nepříznivým podmínkám (pH, teplota, iontová síla aj.) a získávají pozornost v řadě studií o akumulaci PHA u halofilů a termofilů – prokaryotických mikroorganismů adaptovaných na vysokou salinitu či teplotu [3]. Z chemického hlediska se jedná o lineární polyestery hydroxyalkanových kyselin [4]. Aby nám tato jejich schopnost mohla sloužit, potřebujeme zvolit vhodnou mikroskopickou metodu k pozorování bakteriálních mikroorganismů. V teoretické části je specifikována použitá metoda mikroskopie atomárních sil ke studiu purpurových bakterií. Tato skupina bakterií je zde reprezentována dvěma zástupci z extremofilních kmenů purpurových bakterií – *Rhodobaca*, *Rhodoblastus* – jejichž požadavky na optimální prostředí jsou dále klíčové pro průběh kultivace i měření. Uvedená je stavba bakteriální prokaryotické buňky a v neposlední řadě je popsán význam polyhydroxyalkanoátů, vlastnosti a proces syntézy a degradace těchto biopolymerů. Experimentální část je zaměřena na proces kultivace uvedených mikroorganismů v podmínkách s různým pH prostředí jak pro kmen halofilních bakterií kmene *Rhodobaca barguzinensis*, tak pro kmen acidofilního *Rhodoblastus acidophilus*. Dále pro kmen *Rhodobaca barguzinensis* došlo ke kultivaci i měření v prostředí s různou koncentrací soli NaCl. Poté následuje volba vhodné imobilizace a přípravy vzorků na podrobné měření pomocí AFM a optimalizace tohoto procesu přípravy. Připravené vzorky byly podrobeny měření za účelem získání topografických snímků a jiných charakteristik. Byly porovnány snímky shodných bakteriálních kmenů získaných v odlišných podmínkách a diskutovány vlivy na tyto změny.

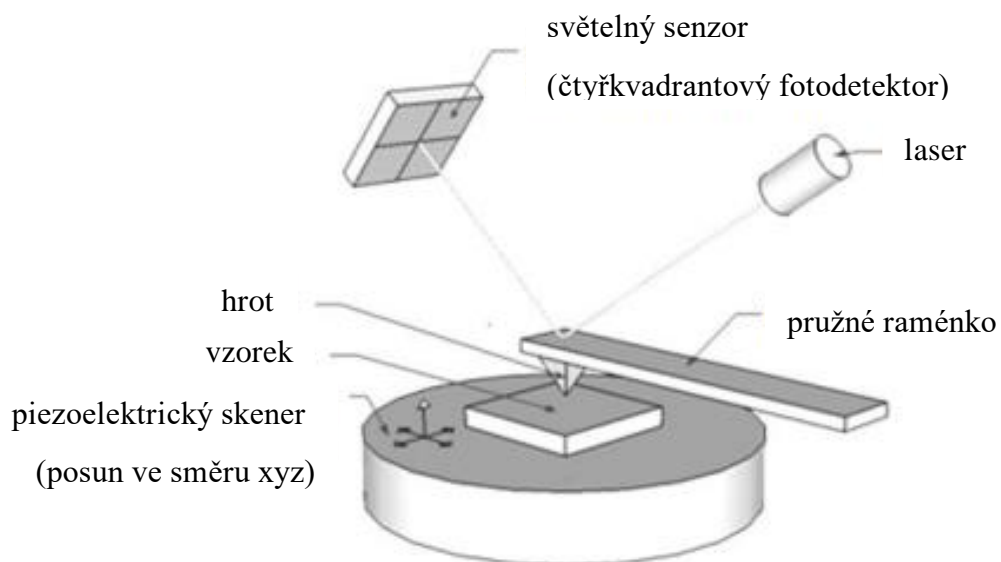
2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Mikroskopie atomárních sil

Mikroskopie atomárních sil je druh spektroskopické metody aplikované v oblastech charakterizace vzorků z hlediska zobrazování povrchu vzorku prostřednictvím trojrozměrných topografických snímků a slouží měření mechanických vlastností na nanoúrovni [1]. Využívá se pro mnoho studií k zobrazování bakteriálních buněk a měření interakcí mezi buněčným povrchem vzorku a hrotem [2, 5]. Pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM, *Atomic force microscopy*) můžeme zobrazovat snímky jak na vzduchu, tak v kapalině a pro biologické vzorky je možná studie ve fyziologickém prostředí. AFM poskytuje trojrozměrné topografické snímky povrchu vzorku v nanometrovém rozlišení [2, 6].

2.1.1. Princip mikroskopie atomárních sil

Princip činnosti AFM je založen na měření přitažlivé a v případě adheze odpudivé síly mezi atomy vzorku a atomy sondy. Používá konzolu typicky z křemíku či nitridu křemíku s ostrým hrotem (sondou) o poloměru v řádech nanometrů a tímto skenuje povrch vzorku a měří síly odpovídající vychýlení se nosníku s hrotem, které jsou způsobeny interakcí hrotu s povrchem vzorku. Celkový příspěvek těchto sil reprezentují přitažlivé síly na dlouhé vzdálenosti a elektrostatické síly a síly na krátké vzdálenosti, které jsou odpudivé. Celkově tyto síly patří do skupiny van der Waalsových sil. Síly krátkého dosahu představují síly plynoucí z Pauliho principu, kdy dojde k překryvu elektronových orbitalů. Při překročení vzdálenosti atomů odpovídající chemické vazbě dojde k adhezi (odpudivé interakci). Na různé atomy hrotu působí jak síly s různou velikostí a směrem v závislosti na vzdálenosti a jejich výslednice je dána součtem [7]. Princip měření pomocí AFM lze vystihnout na základě následujícího schématu (viz Obrázek 1) [8]. Na hrot dopadá laserový paprsek a jeho odraz přes zrcátko je shromažďován čtyřkvadrantovou fotodiodou. K pohybu hrotu slouží piezoelektrický skener. Jednotlivé odklony způsobené silovými výchylkami lze převést na data, která poskytnou topografické zobrazení [8, 9]. Naměřená data lze využít k výpočtu mechanických vlastností a Youngova modulu [9, 10].



Obrázek 1: Princip měření pomocí AFM [8]

2.1.2. Srovnání módů AFM

Na základě požadované aplikace lze mikroskopii atomárních sil použít v několika zobrazovacích módech. Obecně se zobrazovací módy dělí na statické a dynamické režimy. Statické nebo také kontaktní režimy se využijí, pokud není nežádoucí kontakt hrotu se vzorkem. Dynamické režimy, jako režim pokleповý nebo bezkontaktní, jsou schopné skenovat vzorky šetrněji než kontaktní režimy, a tak jsou volené pro zobrazování biologických vzorků, neboť dochází k menšímu poškození a narušení povrchu [1].

Kontaktní mód

Kontaktní zobrazovací režim je označován také jako statický. Tato technika se využívá pro zobrazování vzorků v režimu konstantní síly, kdy je interakční síla automaticky regulována nastavením výšky sondy v reakci na změnu povrchu vzorku. Režim konstantní síly je vhodný pro skenování pevných vzorků. Tento mód trpí omezením v nízké rychlosti odezvy a to ovlivňuje zobrazovací rychlost a dále odhad změny povrchu je ovlivněn neidealitami piezoelektrického akumulátoru. Mimo režimu s konstantní silou je využíván kontaktní režim s konstantní výškou, který není zatížen zmiňovaným omezením. Naměřená výchylka sondy je úměrná změně topografie povrchu vzorku, jelikož piezoelektrický akumulátor sondy nenastavuje polohu výšky. Hrozí zde však přetržení sondy AFM, neboť dochází k působení vyšší interakční síly. Režimem s konstantní výškou byla zobrazována kolagenová vlákna ve výsledku 40krát rychleji než v případě měření režimem s konstantní silou [11]. Obecně je tento konkrétní režim ideální pro zobrazení tvrdých vzorků s malými topografickými odchylkami [12]. Způsob měření v kontaktním režimu probíhá v kontaktu hrotu se vzorkem a často pracuje v odpudivém režimu sil, neboť dochází ke styku hrotu se vzorkem, a proto není ideální pro měření buněčných organismů ve vitálním stavu. Vlivem bezprostředního doteku dochází k měření sil na krátké vzdálenosti. Hrot kopíruje povrch vzorku a tím opisuje jeho povrchový profil. Dochází k ohybu nosníku od povrchu vzorku vlivem odpudivých sil [12].

Bezkontaktní mód

V případě bezkontaktního módu nedochází ke kontaktu hrotu se vzorkem a hrot se pohybuje blízko vlastní rezonanční frekvence o amplitudě 1-10 nm od povrchu vzorku. Dochází k měření slabých vazebných interakcí o různé vzdálenosti jako jsou van der Waalsovy síly představující síly odpudivé, elektrostatické aj. V důsledku interakce hrotu se vzorkem se mění amplituda kmitání, neboť dochází k oscilaci hrotu při konstantní frekvenci [9]. Síly působí v důsledku interakce mezi vzorkem a hrotem na frekvenci nosníku s hrotem a vyvolají změnu ve frekvenci, čímž dojde ke změně frekvence kmitání a parametr lze měřit. V porovnání s kontaktním módem se v tomto režimu vyskytuje více parametrů. Bezkontaktní režim se osvědčil při měření měkkých biologických vzorků jinak citlivých na porušení povrchu v důsledku pohybu a tlaku od hrotu [12, 13].

Pokleповý mód

Pokleповý režim (TM, *Tapping mode*) je řazen pod dynamické módy a kombinuje optimální vlastnosti předchozích režimů. Představuje výhodu vysoké rychlosti skenování měření a poskytuje tak povrchovou charakteristiku vzorku. Využívá se k přesnému stanovení mechanických vlastností měřeného vzorku. Způsob proměřování je až na moment doteku shodný s bezkontaktním režimem. Principiálně k měření dochází přiblížením oscilující

konzolové sondy v nanoměřítku k povrchu vzorku. Konzola kmitá v blízkosti své rezonanční frekvence. Amplituda pohybu se pohybuje v rozmezí 20-200 nm [13]. Dochází ke kontaktu sondy s povrchem vzorku během každého cyklu oscilace nastavením amplitudy a blízkosti oscilace. Po dotyku ztratí hrot energii a opět přejde do kmitání. Změna amplitudy sondy je ovlivněna více faktory. Amplituda oscilací je ovlivněna van der Waalsovými silami, dále je zde vliv elektrostatické síly, adhezní síly, tlumivé vlivy prostředí i síly při kontaktu se vzorkem [14]. Pokleповý režim se využívá pro zobrazení měkkých vzorků na vzduchu i v kapalině. Poskytuje vysoké rozlišení podobné kontaktnímu režimu, ale ke vzorku je šetrnější, nicméně i tak dochází ke kontaktu. Poklepávání snižuje boční sílu a tím je kontakt mírnější a vzorek je kontaktován krátce [13].

2.2. Využití mikroskopie atomárních sil pro studium bakteriálních buněk

Mikroskopie atomárních sil je účinná metoda k zobrazování živých buněk za daných fyziologických podmínek. Udává informaci o dynamických procesech – zda je buňka poškozená, částečně poškozená, či zanikající, dále lze analyzovat produkci sekundárních metabolitů a získat informaci o buněčném dělení a růstu. AFM silová spektroskopie měří adhezní síly a síly vychýlení v řádech 10^{-12} N, což vede k identifikaci mechanických vlastností vybraného bakteriálního kmene. Mechanické vlastnosti jsou klíčové při tvorbě biofilmu – organizovaného buněčného společenství, který je tvořen přichycením mikroorganismů k povrchu a přispívá k antimikrobiální schopnosti mikroorganismu. Polyaniontové extracelulární látky biofilmu jsou tvořeny z 90 až 97 % vodou. Obsahují polysacharidy, fosfolipidy, proteiny a jiné polymerní látky [15]. AFM zobrazování může zkoumat morfologické modifikace buněk vyvolané léky a pomáhá k pochopení mechanismu účinku léčiv jako například antibiotických účinků bakterií či objasnění bakteriální rezistence multirezistentních kmenů. Slouží k pozorování cytotoxicity léků na kultivovaných buňkách nebo extrahovaných z pacienta. Bakteriální buňky interagují prostřednictvím svého povrchu s okolním prostředím, a proto se mnoho studií věnuje vizualizaci morfologie bakterií. Prostřednictvím AFM byly pozorovány bičíky bakterií z hlediska vlivu pH, které při okyselení či alkalizaci vedlo ke zmenšení průměru bičíků. Byla pozorována souvislost mezi časným stadiem tvorby bakteriálního biofilmu a orientace bičíku. Dále je studován kapslový polysacharid, který plní pro bakterie funkci přežití proti fagocytóze, zátěži prostředí, příjmu živin a přilnavosti povrchu. Mimo morfologie lze specifikovat mechanické vlastnosti bakterií pomocí Youngova modulu pružnosti. Objasnění těchto vlastností slouží k určení mechanismů růstu a chování buněk v různých podmínkách [16]. AFM může měřit přesně adhezní sílu mezi povrchem vzorku a sondou na základě znalosti velikosti konstanty pružiny. Výchylka je převedena na sílu dle Hookova zákona, kde F [N] je síla, k [N/m] představuje konstantu pružiny a d [m] zastupuje vertikální výchylku [17].

$$F = k \cdot d \quad (1)$$

2.3. Vhodná příprava biologických vzorků pro studium pomocí AFM

Pro pozorování bakteriálních kmenů je ve většině případech nutná malá či žádná příprava vzorků, nedbáme-li na zachování nativní funkce. Pro mikrobiologické bakteriální vzorky je nutné zvolit vhodné podmínky, fixaci a postupy a k zachování viability provádět měření v kapalném prostředí. Biologické vzorky lze sondovat v kapalném prostředí při zachování dané

morfologie a mechanických vlastností. Důležitým krokem je výběr vhodného fixačního činidla pro imobilizaci vzorku [17]. Fixační metody je možné rozdělit do dvou skupin – aditivní a denaturační fixace. Aditivní, též síťující fixace, využívá různé aldehydy např. paraformaldehyd nebo glutaraldehyd. Tato metoda je schopná zachovat přirozenou strukturu buněčných proteinů. Naopak u denaturační fixace snížením rozpustnosti proteinu či narušením hydrofobních interakcí může být vyvolána denaturace proteinu vedoucí k modifikaci terciální struktury a inaktivaci enzymů. Docíleno je tak za pomoci alkoholů, nejčastěji methanolu a ethanolu v kombinaci s acetonem či kyselinou octovou. Samotné alkoholy vyvolávají nežádoucí smršťování buněk [18]. K imobilizaci buněk jsou v nanomechanice používány různé látky jako glutaraldehyd nebo Poly-L-Lysin. Tyto látky však nezaručují zachování viability vzorků a efektivity připevnění při procesu měření. Nedávné experimenty využily modifikované konzoly potažené polydopaminem pro měření adhezních sil v živých bakteriálních buňkách. Životaschopnost buněk v prostředí fyziologického roztoku během experimentu byla zachována ve snaze objasnit účinek laktobacilů narušujících biofilm [17].

2.4. Porovnání AFM s jinými mikroskopickými technikami pro morfologické studium bakterií

Mikroskopie atomárních sil není jedinou využívanou mikroskopickou technikou měření. Mimo AFM je využívána rastrovací elektronová mikroskopie (SEM), konfokální mikroskopie či totální vnitřní reflexní fluorescenční mikroskopie [13]. Rastrovací elektronová mikroskopie a mikroskopie atomárních sil se často vzájemně doplňují. Při měření vlastností buněčných organismů vyniká AFM v poskytnutí detailnějšího membránového a intracelulárního zobrazení oproti SEM protějšku [19]. Využít lze i rezonanční Ramanovu spektroskopii, při které je nežádoucí zmíněná fluorescence látek při sledování Ramanových spekter. Analogická charakteristická zobrazení mohou být získána též průtokovou cytometrií [20].

2.4.1. Elektronová mikroskopie

Elektronovou mikroskopii rozdělujeme do dvou typů – skenovací elektronová mikroskopie (SEM) a transmisní elektronová mikroskopie (TEM) [21]. Skenovací elektronová mikroskopie využívající elektronový mikroskop je jednou z hojně využívaných analytických metod pro studium biologických vzorků. Elektronová mikroskopie poskytuje informace o struktuře vzorku. Proud fotonů jako u světelné mikroskopie je zde nahrazen elektronovým proudem a snímá jej elektromagnetická čočka. Čočka vytváří magnetické pole a vychyluje dráhu elektronů. Rozlišovací schopnost je přímo úměrná vlnové délce, jelikož elektrony mají kratší vlnovou délku nežli světlo, je elektronová mikroskopie výhodnější v poskytnutí většího rozlišení i zvětšení a to až 0,1 nm podobně jako u např. mikroskopie atomárních sil [22, 23]. Skenovací elektronová mikroskopie je využívána celosvětově v mnoha disciplínách k účinné analýze organických i anorganických materiálů v měřítku nanometrů až mikrometrů [24]. Technika SEM vyžaduje invazivnější ošetření povrchu vzorku oproti studiu pomocí AFM, což je pro buněčné vzorky nevhodné, chceme-li nenarušit jejich optimální podmínky a nativní strukturu. Bylo prokázáno, že obě metody jsou schopné poskytnout analogická data [2]. Dále je při této metodě požadováno, aby byl vzorek zcela suchý, neboť je pracováno v oblasti vakua. V případě transmisní elektronové mikroskopie je obraz vynášen na základě interakce elektronů, které prošli skrze tenký vzorek. Zkoumány jsou tenké řezy bakterií [21].

2.4.2. Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je dominantní metodou pro sledování fyziologie buněk. Konstrukce fluorescenčního mikroskopu cílí na zvýšení prostorového rozlišení a kontrastu. Fluorescence funguje na principu absorpce světelné energie fotonu a následné emise části této energie světla o nepatrný časový úsek v řádech nanosekund později. Absorbovaný foton je tedy energeticky bohatší než foton následně emitovaný. Stejně tak emitované světlo má delší vlnovou délku než absorbované, a naopak má menší energii. Jednotlivé molekulární přechody vysvětluje Jablonského diagram [25]. K zobrazování bakteriálních kmenů je využívána epifluorescenční mikroskopie, pomocí níž lze bakteriální buňky spočítat jako přímé životaschopné buňky za použití fluorescenčního barvení. K vizualizaci buněk jsou využívána fluorescenční barviva jako akridinová oranž nebo fluorescein [21].

2.4.3. Konfokální mikroskopie

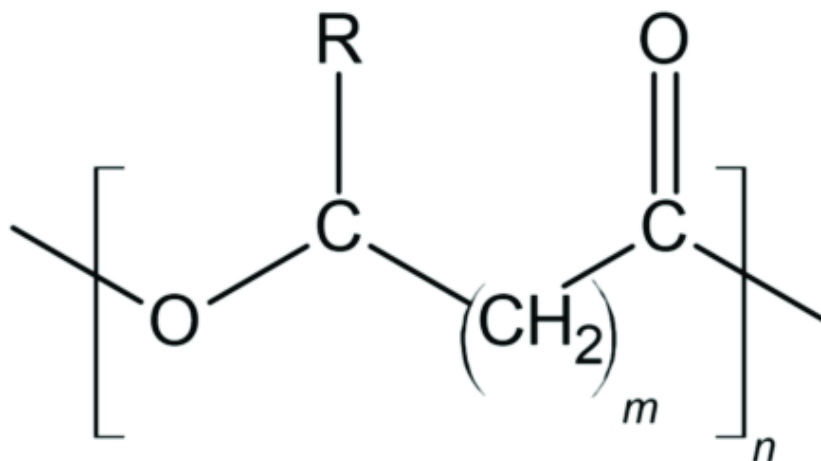
Skenovací laserovou konfokální mikroskopií (LSCM) lze detekovat rozložení bakterií v rhizosféře. Pozorovány jsou nedestruktivní optické řezy [21]. Metoda LSCM je schopna zobrazení morfologie biologických tkání i dynamických intracelulárních procesů v živých buňkách [26]. Metoda splňuje požadavky pro studium molekul s nehomogenním prostředím jako je buněčná membrána. Poskytuje 3D zobrazení objektů *in vivo* i *in vitro* a je často kombinována s TEM a AFM. Dochází zde k využití zaostřeného laserového paprsku na průhledný vzorek a toto světlo je emitováno zpět přes malou díрку. Optické skeny jsou pořizovány do hloubky a je poskytnuto dobré prostorové rozlišení. Excitační výkon laseru je třeba optimalizovat. Vhodné je maximum výkonu, neboť se zvyšuje poměr signál – šum a zároveň musí být dostatečně nízký pro zamezení foto-indukovaným reakcím, které by zkreslily data [27].

2.4.4. Ramanova spektroskopie

Ramanova spektrometrie umožňuje získat spektra různých vrstev bakteriální buňky při excitaci zářením o různých vlnových délkách v rozmezí 220 - 250 nm, kdy se neobjevuje rušivá fluorescence. Při krátkých vlnových délkách je buňka pro záření prakticky nepropustná a získáme tak spektrum jejího povrchu. Záření větších vlnových délek proniká do nitra buňky a lze tímto způsobem analyzovat spektra peptidoglykanu, proteinů vnější membrány i vnitřních struktur a excitací při 250 nm je pak zaznamenáno především spektrum nukleových kyselin. Spektra mohou být zaznamenávána z jediné buňky i směsné kultury [20]. Mezi výhody této metody patří schopnost studie vnitřního prostředí buňky ve vodním prostředí. Nevýhodu představují vysoce koncentrované paprsky, které poruší materiál vzorku. Pomocí Ramanovy spektroskopie je studována široká škála biologických systémů. Polární sloučeniny jako karbonyly, aminy a amidy vykazují slabá spektra. Naopak je tomu u thiosloučenin, kyanosloučenin, sloučenin s přítomností dvojných vazeb mezi uhlíky a aromatických sloučenin [28].

2.5. Polyhydroxyalkanoáty

Mikroskopií atomárních sil lze analyzovat mimo jiné i polymerní látky např. polyhydroxyalkanoáty. Polyhydroxyalkanoáty jsou lineární polyester hydroxyalkanových kyselin, které jsou schopny některé gram pozitivní tak i gram negativní bakterie syntetizovat za podmínek nevyváženého růstu jako je fyzický nebo nutriční stres [4]. Mohou vznikat pouze ve stacionární fázi růstu jakožto produkty sekundárního metabolismu mikrobiálních buněk, kde se akumulují ve formě intracelulárních granulí sloužících jako zdroje energie a uhlíku. Ke zvýšené produkci PHA dochází za extrémních a pro bakterii stresových podmínek včetně změn poměru C: N, přičemž bylo zjištěno, že bakterie kultivované při nedostatku uhlíku a energie obsahovaly čtyřikrát méně Poly-(R)-3-hydroxybutyrátu (nejčastěji produkovaný zástupce skupiny polyhydroxyalkanoátů – dále PHB), než organismy jejichž kultivace probíhala v médiu s nedostatkem dusíku. Bez zdroje uhlíku došlo k úplné degradaci PHB [29]. Dále mohou vznikat při vychýlení podmínek od optima pro růst mikroorganismů, kdy se hodnoty pH, teploty a tlaku odchylují od standardních podmínek [30]. PHA jsou v dnešní době zkoumány i v souvislosti s využitím jejich schopnosti rozkladu odpadního materiálu (např. plastu) z hlediska jejich biodegradability. Je známo více než 150 různých monomerů těchto polymerních látek. Nejvýznačnějšími zástupci jsou běžné polymery poly-3-hydroxybutyrát P(3HB), poly-3-hydroxyvalerát P(3HV) a další, které mohou být použity k tvorbě homopolymerů, statických nebo blokových kopolymerů, což vede k rozmanitosti jejich materiálových vlastností [31]. Tyto polymery lze klasifikovat podle počtu uhlíků v řetězci: s krátkým řetězcem (*scl-short chain lenght* PHA s počtem 3-5 uhlíků), se středním (*mcl-medium chain lenght* PHA, 6-14 atomů uhlíku) a s dlouhým řetězcem (*lcl-long chain lenght* PHA, s 15 a více atomů uhlíku) [32]. Všeobecná struktura polyhydroxyalkanoátů je zobrazená na Obrázek 2., kde R zastupuje alkylová skupina a n značí počet opakujících se jednotek [30].



Obrázek 2: Všeobecná struktura PHA, převzato a upraveno [33]

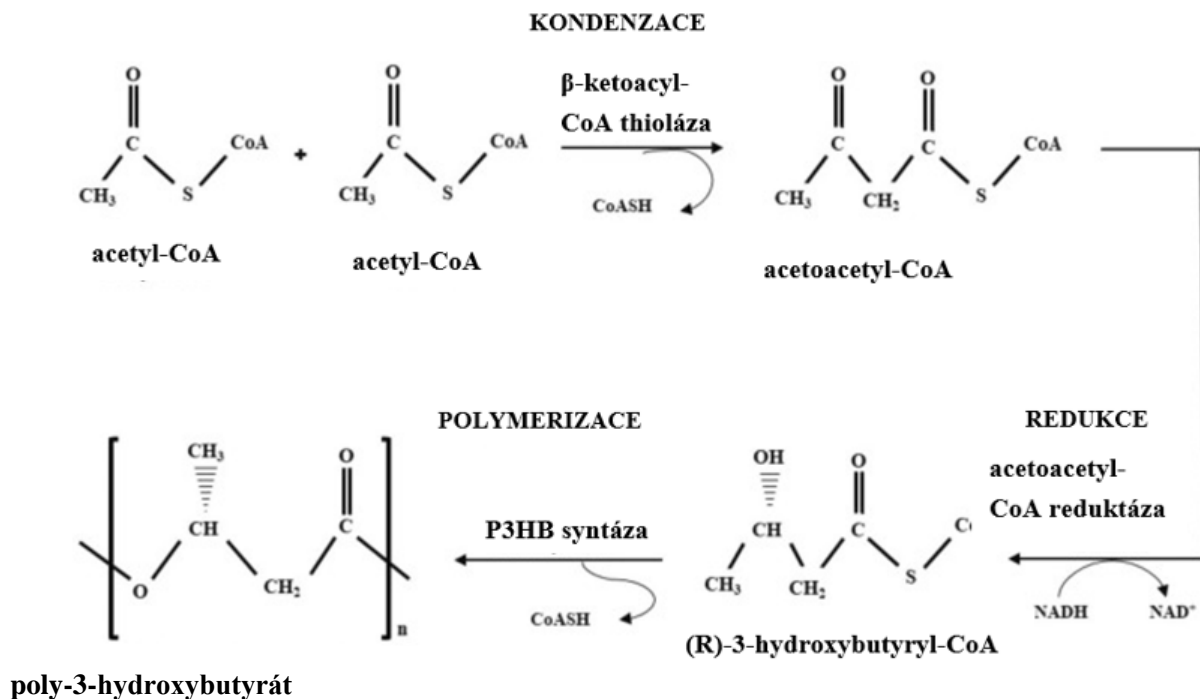
2.5.1. Vlastnosti polyhydroxyalkanoátů

Nejčastěji produkovaný homopolymer P(3HB) nemá komerčně příliš široké využití kvůli své omezené flexibilitě, pevnosti v tahu a tvarovatelnosti. Při zařazení jiných monomerních jednotek do jeho řetězce a vytvořením kopolymerů by bylo možné je využívat jako náhradu

konvekčních plastů díky svým termoplastickým vlastnostem. Vynikají antimikrobiálními a antioxidačními vlastnostmi, a proto jsou vhodné pro studium v oblasti tkáňového inženýrství jako náhrada pro již využívané materiály a kontrolované uvolňování léčiva v těle [34]. Morfologie biopolymerů je studována na škále nanometrů prostřednictvím mikroskopie atomárních sil a k jejímu určení stačí pro tuto metodu nepatrné množství materiálu. Mikroskopie atomárních sil dokáže změřit elasticitu polyhydroxyalkanoátů a následně vypočítat modul pružnosti pomocí datových křivek síla-vzdálenost. Tímto měřením byl prokázán rostoucí modul pružnosti s časem [35]. P(3HB) je produkován v přírodě různými bakteriemi a jedná se o nejprodukovanější PHA bakteriemi a řadí se mezi jednoho z nejběžnějších zástupců PHA. Je akumulován v cytoplazmě bakteriálních buněk ve formě granulí o velikosti 200-500 nm, které jsou ve vodě nerozpustné. PHB bylo podrobeno pozorování mikroskopii atomárních sil za účelem podrobného popsání polymeračního procesu. Organizace P(3HB) řetězce a polyhydroxyalkanoát-syntázy byly přímo vizualizovány prostřednictvím pyrolytického grafitu. Bylo zaznamenáno prodloužení fibrilárního materiálu [36]. Jednou z diskutovaných možností využití PHA je také distribuce léčiv uvnitř organismu. Zvýšený zájem o toto využití existuje zejména kvůli tomu, že nejsou toxické a vyznačují se dále biologickou rozložitelností a kompatibilitou s biologickým materiálem. Překážku představují vysoké výrobní náklady jako u mnoha jiných alternativ a byla snaha snížit náklady vlivem levných obnovitelných zdrojů uhlíku, ze kterých šlo následně PHA získat. Příznivé výsledky mají experimentální studie s distribucí in vivo biologicky aktivních látek, steroidů i protinádorových medikamentů. Značná snaha proběhla v kardiovaskulárním odvětví medicíny, kde byla pozorována kultivace bakterií produkujících PHA u pacientů s aterosklerózou a následně byla prokázána v získaných výsledcích závislost biologické aktivity polyhydroxyalkanoátů na specifičnosti jejich povrchu, ale také na výchozím stavu pacientů před a po zásahu. PHA může být využito ke screeningu toxicity povrchových reliéfů pro kardiovaskulární chirurgii a pro monitoring buněčných událostí u pacientů po fyzickém výkonu [37]. Další využití představuje technika elektrostatického zvlákňování využívající PHA polymerů k výrobě inovativních scaffoldů pro regeneraci tkání. Tento proces umožňuje sprádkání polymerů do vláken a stimuluje β -formu v polymerních řetězcích, což provádí natažení a orientaci vláken ve směru elektrostatického pole a tato orientace vláken dále definuje mechanické vlastnosti [32].

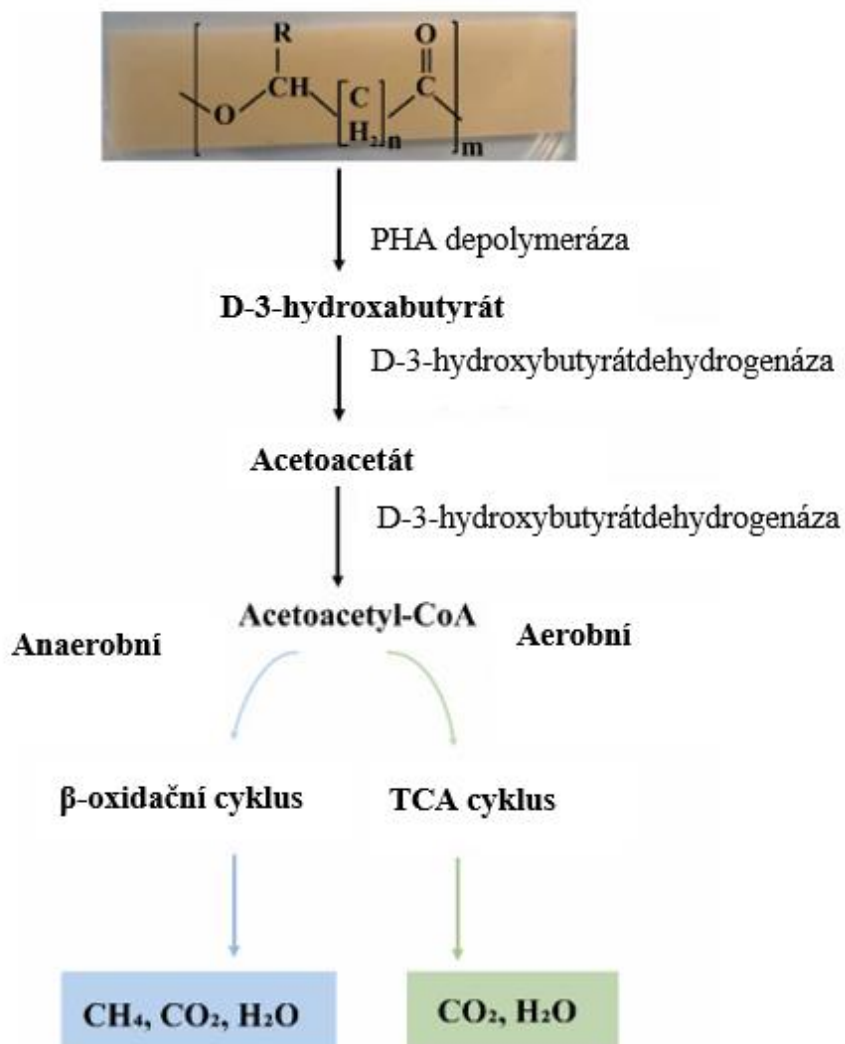
2.5.2. Syntéza a degradace polyhydroxyalkanoátů

Existuje široká škála půdních mikroorganismů schopná syntetizovat i degradovat PHA jako jsou *Achromobacter*, *Nocardia*, *Variovorax* a dále *Streptomyces*, což je rod produkující nejvyšší množství PHA depolymeráz [32]. U bakterií *Haloarchaea* bylo identifikováno několik cest poskytujících monomer PHA za využití cukrů, n-alkoholů a mastných kyselin. Nejznámější je dráha využívající kondenzace dvou jednotek acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-CoA, který je redukován enzymem acetoacetyl-CoA reduktázou na 3-hydroxybutyryl-CoA. Následuje působení enzymu PHA-syntázy, která katalyzuje prostřednictvím esterifikace polymeraci 3-hydroxybutyryl-CoA, ze kterého vznikají polymery 3-hydroxybutyrátu (viz Obrázek 3) [38].



Obrázek 3: Schéma syntézy PHA [29]

Proces degradace polyhydroxyalkanoátů je prováděn intracelulárními a extracelulárními depolymerázami PHA produkovanými mikroorganismy (viz Obrázek 4). Rychlost degradačního procesu závisí na mnoha faktorech včetně molekulové hmotnosti, krystalinity, složení polymeru, tloušťky a zároveň na podmínkách prostředí [39]. Izolované mikroorganismy schopné degradace PHA byly nalezeny v různých prostředích včetně půdy, kompostu a moří. PHA může být degradován na oxid uhličitý a vodu za aerobních podmínek (v půdě, moři). Degradace na oxid uhličitý a metan probíhá za anaerobních podmínek (sedimenty, skládky). Při rozkladu zcela nerozpustných PHA na menší molekuly (oligomery) rozpustné ve vodě při počátečním procesu degradace jsou nezbytné mikrobiální exoenzymy. Oligomery a monomery jsou zdroje uhlíku a energie pro další úplnou degradaci stejnými nebo jinými mikroorganismy. Existují dvě biofyzikální cesty degradace – intracelulární a extracelulární. Intracelulární degradace PHA spočívá v uvolňování jejich monomerů PHA depolymerázou a oligomerní hydrolázou. Monomer je dále metabolizován CoA-transferázou a β -oxidační cestou. Extracelulární degradace PHA je založena především na extracelulární PHA depolymeráze, která se váže na ve vodě rozpustné oligomery a monomery náhodným štěpením. Mezitím lipázy pomáhají štěpit esterovou vazbu PHA polymeru [40].

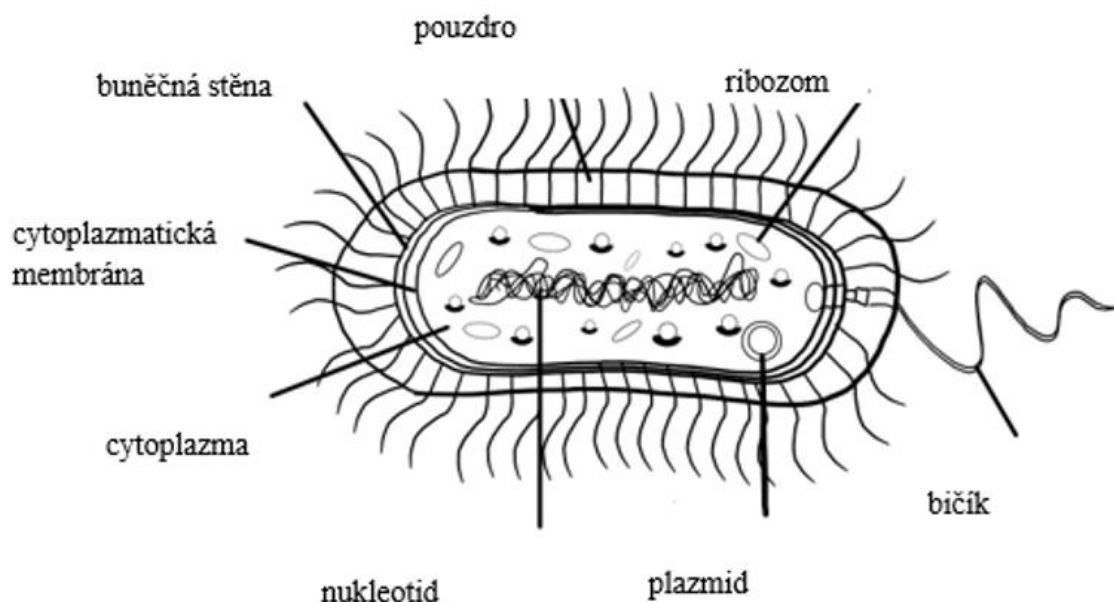


Obrázek 4: Schéma degradace PHA [40]

2.6. Bakteriální buňka

Bakterie se řadí mezi prokaryotické, který se od eukaryotické buňky liší stavbou i velikostí. U eukaryotické buňky došlo evolučně k tvorbě sofistikovanější buněčné kompartmentace. Nachází se v nich pravé jádro ohraničené membránou a vyvinuly se další složky jako mitochondrie, Golgiho aparát, Endoplazmatické retikulum a lysozomy, které ve stavbě prokaryotické buňky chybí [41]. Existuje široká morfologická biodiverzita bakterií, avšak zároveň je pro danou skupinu přísně definovaný určitý tvar (tyčinky, koky, vlákna, spirály). Vyskytují se i neobjasněné tvary tzv. polymorfismus či pleomorfismus. Tato morfologická diverzita je odlišná pro grampozitivní a gramnegativní bakteriální buňky. Rozdíl je zejména v organizaci struktury buněčné stěny [42]. Buněčná stěna je tvořena rozsáhlou

molekulou peptidoglykanu. Peptidoglykan (též mukopeptid nebo murein) je složen z vrstev polysacharidových řetězců vzájemně spojených krátkými peptidy. Obsahuje střídavě dva cukry, *N-acetylglusamin* a kyselinu *N-acetylmuramovou* navzájem spojených β -1-4 vazbami [43, 44]. Na karboxyl *N-acetylmuramové* kyseliny jsou navázány vzájemně propojené 4 aminokyseliny. Bakteriální buněčná stěna je jediným pevným útvarem bakteriální buňky, uděluje buňce tvar a jako tuhý obal ji mechanicky chrání před okolním prostředím. Tato stěna není nepropustná, ale má charakter síta. U grampozitivních bakterií je přibližně 20 nm silná a je tvořena mohutnou vrstvou peptidoglykanu, skrze kterou pronikají na povrch lineární řetězce kyseliny teichoové. Teichoová kyselina je v základě tvořena ve vodě rozpustnými lineárními polymery glycerolfosfátu nebo ribitolfosfátu s glykosidicky navázanými cukry a tyto dvě jednotky se vzájemně opakují. Buněčná stěna gramnegativních bakterií je strukturně složitější a přesto tenší (přibližně 15 nm). Skládá se ze zevní membrány, pod kterou je uložen jako součást periplazmatického prostoru jednovrstevný peptidoglykan tvořený kyselinou diaminopimelovu. Zevní membrána obsahuje fosfolipidy, lipopolysacharidy a proteiny. Uskupení fosfolipidů vytváří fosfolipidovou dvojvrstvu analogicky jako tomu je v cytoplazmatické membráně. V této vrstvě jsou uloženy různé bílkoviny, z nichž některé vytvářejí kanálky plnící funkci transportu živin do periplazmatického prostoru (viz Obrázek 5) [44].



Obrázek 5: Struktura bakteriální buňky [45]

2.6.1. Purpurové bakterie

Purpurové bakterie se řadí mezi fotosyntetické gramnegativní prokaryota přeměňující světelnou energii na chemickou energii procesem anoxygenní fotosyntézy. Tato skupina bakterií vyžaduje jak světlo (fotoheterotrofie) tak anaerobní podmínky, ale je schopná přežít a prosperovat v podmínkách na světle i za tmy a za přístupu vzduchu. Kombinace světelných podmínek a nerovnoměrného přístupu vzduchu se nejčastěji nachází v rybnících, jezerech, ústích řek a dalších vodních prostředích, kde je přítomen H_2S , který je vysoce jedovatý pro rostliny

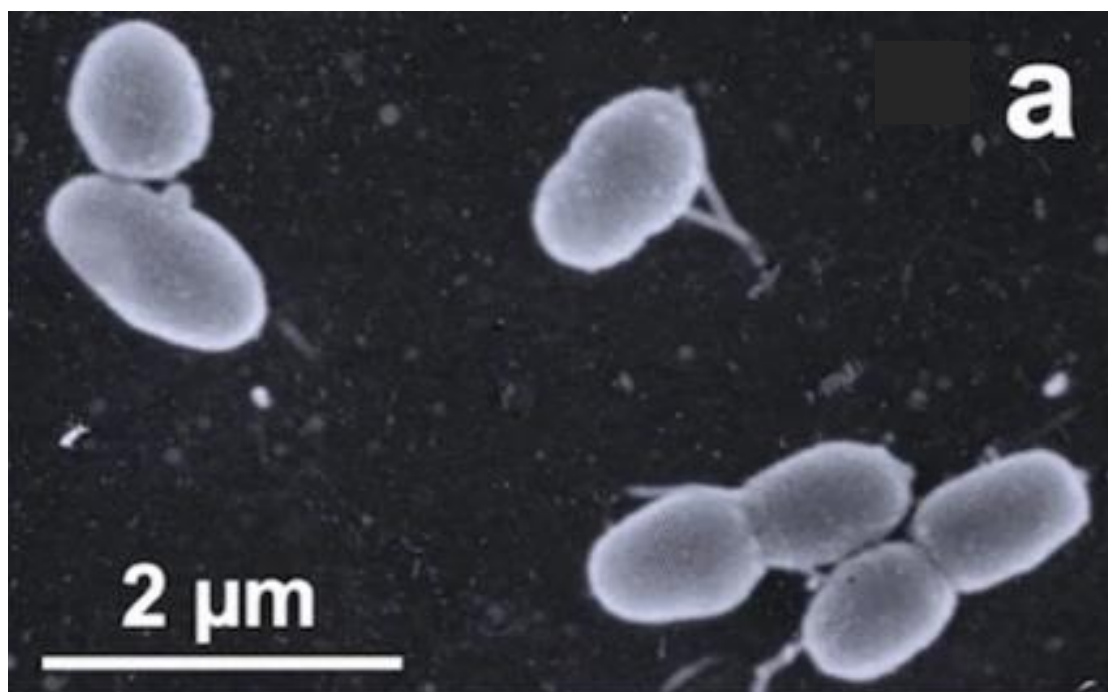
i živočichy. Můžeme je rozlišit na fialové sírné a fialové nesírné bakterie. Purpurové sírné bakterie využívají jako donor elektronů vodík a sulfid či jiné sírné sloučeniny. V případě nesírných bakterií je zdrojem elektronů vodík a dále jsou zapotřebí organické sloučeniny jako zdroj uhlíku. Rozdíl v metabolismu síry obnáší tvorbu libovolných forem síry, které si sírné bakterie ukládají buď mimo buňku nebo intracelulárně, což lze mikroskopicky rozeznat. Purpurové bakterie jsou schopné oxidovat sulfidy na netoxické formy síry jako je elementární síra a sírany a tím zajistí vhodné podmínky v prostředí, které by jinak v přítomnosti sirovodíku bylo pro organismy nežádoucí. Purpurové bakterie dlouho sloužily jako modelové organismy pro pochopení základních biologických procesů, které se účastní světelných reakcí fotosyntézy [46]. Tyto fotosyntetizující mikroorganismy produkují celou škálu pigmentů – bakteriochlorofyl *a,b,c* a karotenoidy – sferoidiny, spirilloxantiny [47]. Růst purpurových bakterií může probíhat fototroficky s organickými sloučeninami, s oxidem uhličitým jako zdrojem uhlíku a zároveň i chemotrofní respirací nebo fermentací [48]. Tyto organismy jsou schopné produkce polyhydroxyalkanoátů (PHA), jakožto sekundárních metabolitů [47]. Zástupci purpurových halofilních bakterií se vyskytují v přírodní slané vodě, ze které se je podařilo izolovat. Byly například izolovány z Mrtvého moře [49].

2.6.2. Extremofilní purpurové bakterie

Purpurové extremofilní bakterie byly doposud izolovány z prostředí s různými extrémními podmínkami jako jsou vysoká a nízká teplota, kyselá a zásaditá hodnota pH nebo z prostředí s vysokou koncentrací soli. U těchto neobvyklých případů došlo k vyvinutí důležitého řešení fotosyntézy za stresových podmínek v rámci molekulové adaptace. Tyto reakčně všestranné mikroorganismy obsahují speciální reakční centrum typu II (feofytin-chinon), založené na bakteriochlorofylu, který iniciuje světlem řízené reakce katalyzované transmembránové separace náboje. Výsledný tok elektronů vede k přeměně zářivé energie na elektrochemický protonový gradient řídící proces uchování energie prostřednictvím syntézy ATP pomocí F1F0 ATP syntázy [46]. Zaprvé dochází k proteinové adaptaci extremofilů prostřednictvím remodelace vlastních enzymů, aby zůstaly funkčně aktivní i za nepříznivých podmínek. Jinak by docházelo k agregaci, vysrážení nebo denaturaci enzymů např. za vysoké teploty u termofilů. Enzymatické adaptace extremofilové docílí udržováním těsného hydratačního obalu pro zadržení vody a zvýšením povrchového náboje molekuly, který podporuje enzymatické funkce v přítomnosti vysoké koncentrace nevodných organických rozpouštědel. Extremofilní organismy mohou dále disponovat adaptativním mechanismem na extrémní pH (alkalofilové, acidofilové) snížením permeability buněčné membrány. Extremofilní halofilní mikroorganismy vyvinuly svůj buněčný aparát tak, aby se jim dařilo v různých koncentracích soli. Jejich proteiny zůstávají aktivní obohacením svého povrchu o kyselé nebo krátké aminoskupiny polárního postranního řetězce a snížením objemných hydrofobních zbytků. Halofilní proteiny mají větší počet solných můstků než jiné proteiny a většina z nich je stabilní [50].

Rhodobaca barguzinensis

Rhodobaca barguzinensis je řazena do skupiny alkalických purpurových nesírných bakterií. Produkuje červená pigmenty, ale i žluté pigmenty, které jsou jinak nepřítomny u ostatních purpurových nesírných bakterií a není schopen autotrofního růstu nebo fixace molekulárního dusíku [51]. Jako nový kmen se jej podařilo izolovat ze sedimentů malého sodového jezera s koncentrací soli 60 g/l poblíž jezera Algin (Barguzin Valley, Burjatská republika) na Sibiři v Rusku. Obsahuje bakteriochlorophyl *a* a karotenoidy alternativní skupiny sferoidenu s převažujícím demethylsferoidenonem. Vzácností u druhu *Rhodobaca* je fakt, že postrádá periferní anténní světlosběrný komplex (LH2), což u těchto purpurových bakterií zapříčiňuje ojedinělou žlutou barvu kultur [47]. Růst tohoto kmene je možný v rozmezí salinity 5-80 g/l NaCl a optimum salinity je 20-30 g/l NaCl při optimální teplotě 25-30 °C a hodnotě pH okolo 9,0. Analýza sekvencí genomu 16S rRNA potvrdila 99% podobnost s purpurovou nesírnou bakterií *Rhodobaca bogoriensis*, jejíž izolát byl získán ze sodových jezer africké příkopové zóny. Za aerobních podmínek tvoří bakterie *Rhodobaca barguzinensis* světle růžové zaoblené kolonie, které se po delším vystavení světlu zbarví do sytě červené. Za anaerobních podmínek jsou kultury béžové a vločkovité [48].



Obrázek 6: *Rhodobaca barguzinensis* [52]

Rhodoblastus acidophilus

Rhodoblastus acidophilus je acidofilní fototrofní fialová bakterie. Poprvé byl izolován před více než 40 lety německým mikrobiologem Norbertem Phennigem ze vzorků vody jezer, bažin a pramenů v Evropě a USA. Tento bakteriální kmen byl nejprve popsán jako nový druh rodu *Rhodopseudomonas*, *Rps. acidophila*, ale jakmile došlo k podrobnějšímu zkoumání fylogeneze organismu, byl zařazen jako vlastní druh *Rhodoblastus acidophilus*. Optimální pH pro růst mikroorganismu tohoto druhu je mírně kyselé 5,8 a rozsah se pohybuje od hodnoty 4,8 do 7,2.

Tato bakterie produkuje klasické pigmenty purpurových bakterií na rozdíl od bakterií *Rhodobaca* a lze pozorovat u tohoto zástupce kmeny fialovočervené nebo oranžovohnědé [53].



Obrázek 7: *Rhodoblastus acidophilus* [53]

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části byla optimalizace metody mikroskopie atomárních sil využitelné nejenom k zobrazování různých bakteriálních kmenů, ale i k porovnání mechanických vlastností bakterií na lokální úrovni. Tyto vybrané bakterie byly zobrazovány pomocí techniky mikroskopie atomárních sil v kapalném prostředí. Důraz byl kladen na správnou přípravu vzorku z hlediska imobilizace, volbu hrotu pro zobrazení bakterií bez poškození a zachování viability měřených mikrobiologických vzorků. Měření bylo provedeno na přístroji NanoWizard 4 na Fakultě chemické VUT.

3.1. Použité chemikálie, přístroje a organismy

3.1.1. Chemikálie

Tryptone ES (Casitose, ES) RM9111-500G (Himedia)

D-Fruktóza (Lach-Ner)

Acetát (Lach-Ner)

Biotin (Sigma Aldrich)

Yeast extract (Himedia)

NaOH 30% (Lach-Ner)

HCl 1 M (Penta)

NaCl (Lach-Ner)

KCl (Lach-Ner)

Na₂HPO₄ · 12H₂O (Lachema)

KH₂PO₄ (Lach-Ner)

Poly-L-lysine hydrobromide (P6282, Sigma Aldrich Inc.)

3.1.2. Přístroje

Analytické váhy, Boeco

AFM NanoWizard 4, Bruker/JPK

Magnetická míchačka (Scout Pro)

Magnetická míchačka technoKartell

Mikrocentrifuga Sartorius (Sigma)

Vortex Bench mixer V2 (Benchmark)

Temperovaná třepačka Witeg

Santorius NanoPhotometr P3

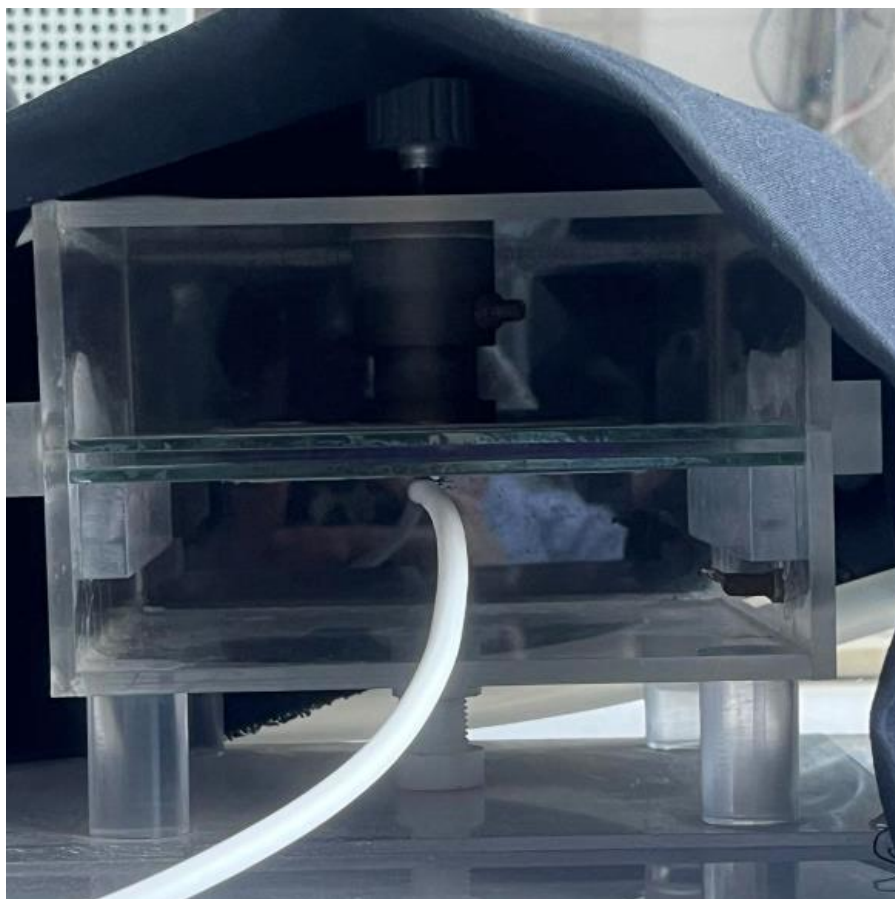
pH metr 50+ DHS (XS instruments)

Plynový chromatograf

Laminární box Aura mini (Bio Air Instruments)

Přístroj pro plazmochemické opracování

Nanophotometr (Implen)



Obrázek 8: Přístroj pro vývoj plazmochemického opracování, fotografie vlastní

Testované hroty

SNL-10 Tento zvolený hrot vykazuje lepší pružnost a je trojúhelníkového tvaru a zadní strana nosníku hrotu je potažena zlatem. Je uváděn jako univerzální pro měření jakéhokoliv vzorku. Konstanty pružnosti jsou uváděny výrobcem v intervalu od 0,06 N/m do 0,35 N/m. Rezonanční frekvence se pohybuje v rozmezí 18 kHz až 65 kHz.

3.1.3. Použité mikroorganismy

V experimentální části byly používány bakteriální kmeny extrémofilních purpurových bakterií ze skupiny acidofilních a alkalofilních bakterií. Konkrétně bakterie *Rhodobaca barguzinensis* DMS 19920 a *Rhodoblastus acidophilus* DMS 137 poskytnuté sbírkou Leibnizova institutu.

3.2. Kultivace

Bakteriální kmeny *Rhodoblastus acidophilus* DMS 137, *Rhodobaca barguzinensis* DMS 19920 byly uchovávány v kryozkumavkách v 15 obj. % glycerolu jakožto kryoprotektantu v celkovém množství 1 ml směsi při -80 °C. Jednotlivé kmeny vyžadovaly odlišné podmínky kultivace rozepsané níže.

3.2.1. *Rhodoblastus acidophilus*

Pro kultivaci bakteriálního kmene *R. acidophilus* bylo použito jako inokulační i produkční médium komplexní médium LB. Do 100ml Erlenmeyerových baněk bylo umístěno 75 ml připraveného LB o dvou různých pH a to pH 5,7 a pH 6,2 o složení LB média:

Destilovaná voda	1 l
Yeast extract	5 g
NaCl	5 g
Trypton ES	10 g

Jednotlivá pH byla stanovena pomocí pH metru a dle potřeby upravena přidavkem koncentrované 1M HCl a případně 30% roztokem NaOH.

Takto připravené baňky byly zazátkovány a ponechány sterilovat při zvýšené teplotě a tlaku po dobu 35 minut. Po sterilizaci proběhlo chlazení baněk s médiem na laboratorní teplotu a následně proběhlo zaočkování médií příslušnou kulturou za sterilních podmínek v laminárním boxu. Každé inokulum bylo vždy kultivováno v duplikátu a do připravených baněk bylo přidáno 500 µl suspenze rozmrazených bakterií z kryozkumavky. Po zaočkování byly 100 ml Erlenmeyerovy baňky s 75 ml inokula ihned umístěny do tmy a kultivovány za laboratorní teploty při 160 rpm. Po 24hodinové kultivaci byla změřena OD jednotlivých inokul a dle toho vypočten požadovaný objem inokula, aby byla počáteční optická hustota produkčního média po zaočkování inokulem 0,2. Jako produkční médium bylo použito LB obohacené o polokomplexní uhlíkatý substrát o složení:

Destilovaná voda	1 l
Yeast extract	5 g
NaCl	5 g
Trypton ES	10 g
Fruktóza 1,5M	10 ml
Acetát 1M	10 ml

Takto nachystané produkční médium bylo opět upraveno na požadované pH a následně rozlito do 250 ml Erlenmeyerových baněk po 100 ml. Sterilizace proběhla obdobně jako je zmíněno výše u sterilizace LB. Baňky byly posléze ponechány zchladit na laboratorní teplotu. Tímto způsobem připravené baňky byly naočkovány vypočteným objemem, který zajistil počáteční optickou hustotu 0,2 a byly umístěny na třepačku za laboratorní teploty a při 160 rpm po dobu 48 h. Po uplynutí této doby byla měřena OD oproti LB jako referenčnímu vzorku vyprodukovaných kultur a proběhla příprava odebraných 1 ml vzorků pro měření na AFM. Vzorky byly ředěny příslušným pufrům o požadovaném pH dle požadavku výsledné absorbance v rozmezí hodnot 0,1 – 0,2.

3.2.2. *Rhodobaca barguzinensis*

Pro tvorbu inokula bakterie *Rhodobaca barguzinensis* DMS 19920 bylo připraveno komplexní živné médium LB o níže uvedeném složení a požadovaném pH 8,2 a 9,2:

Destilovaná voda	1 l
Yeast extract	5 g
NaCl	20 g
Trypton ES	10 g

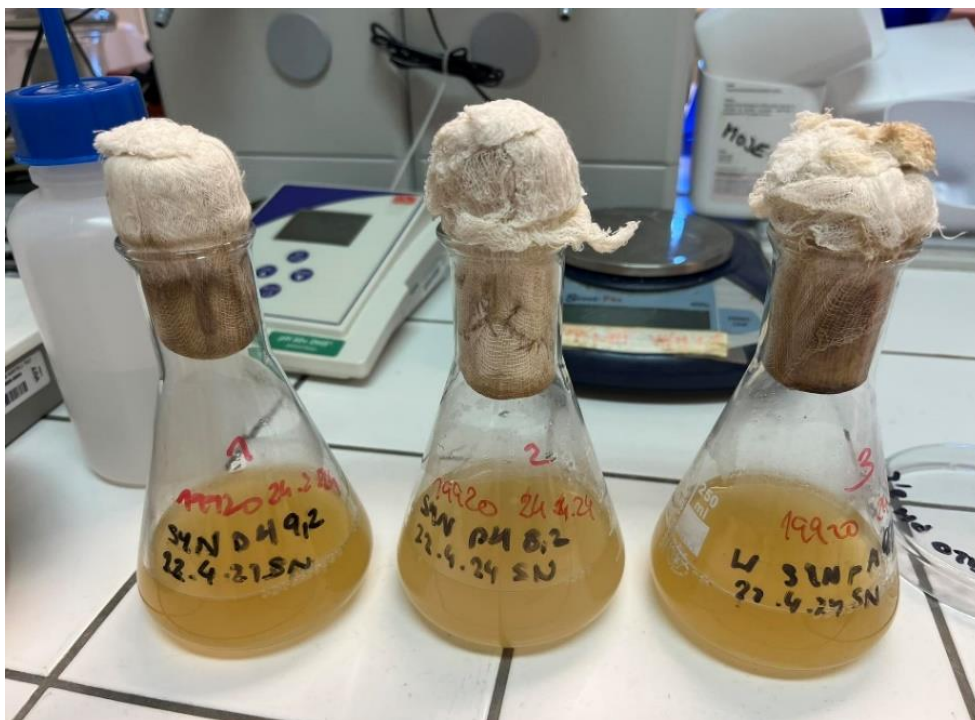
Takto připravené médium bylo po 75 ml rozlito do 100 ml Erlenmeyerových baněk, které byly dále opatřeny zátkou a sterilovány za zvýšeného tlaku a teploty. Následně po zchlazení baněk na teplotu okolo 30 °C došlo k zaočkování bakteriálního kmene v laminárním boxu za sterilních podmínek. Očkování proběhlo z kryozkumavek a do každého inokulačního média bylo zaočkováno 500 µl. Inokula byla kultivována na temperované třepačce za teploty 30 °C a při 160 rpm po dobu 48 hodin. Jako produkční médium sloužilo SYN médium skládající se z komponent uvedených níže:

Destilovaná voda	1 l
SYN salts (5x)	200 ml
K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 7	0,5 ml
Biotin	10 µl
Fruktóza 1,5 M	10 ml
Acetát 1 M	10 ml
Yeast extract roztok	20 ml (autokláv 50 g)

Takto připraveným produkčním mediím bylo upraveno pH na 8,2 a 9,2. Požadovaného pH bylo docíleno dle potřeby pomocí přikapávání z kapátka s 30% roztokem NaOH.

Do Erlenmeyerových baněk (250 ml) se 100 ml vysterilizovaného produkčního média bylo při očkování v laminárním boxu sterilně napipetováno 100 µl biotinu o koncentraci 2 mg/l.

Dále bylo do těchto baněk přeočkováno požadované množství inokula, aby byla počáteční optická hustota v produkčním médiu 0,1. Kultury byly kultivovány třepačce s zamezeným přístupem světla po dobu 48 hodin, při 160 rpm a 30 °C.



Obrázek 9: Produkční média *Rhodobaca barguzinensis* narostlé kultury po 48 h, vlastní fotografie

3.3. Charakterizace narostlých kultur

3.3.1. Optická hustota

Po kultivaci bylo provedeno měření optické hustoty (OD, z angl. *optical density*). Absorbance byla měřena při vlnové délce 660 nm pro všechny bakteriální kmeny a vždy s referenčním vzorkem příslušného fosfátového pufru (PBS). Byl odebrán vždy 1 ml vhodně naředěné bakteriální kultury do plastové kyvety. Pro každé měření byly získány dvě hodnoty, které byly poté zprůměrovány.

3.3.2. Optimalizace přípravy vzorků na měření

Pro správné zobrazení vzorků v kapalném prostředí měřených na AFM a optimalizaci metody byl kladen důraz na správně zvolenou fixaci bakterií a efektivnost přípravy. Důležité bylo odpovídající ředění kultur tak, aby byly na AFM pozorovatelné i jednotlivé bakterie samostatně. Příprava vzorků probíhala na sterilních podložních sklíčkách, na které byly vzorky uchyceny pomocí ošetření povrchu fyzikální plazmou a nanesením fixačního činidla (Poly-L-lysinu) uložených v Petriho miskách pro zabránění možné kontaminace.

3.3.3. Zobrazování v kapalině

Po odebrání vzorku po kultivaci byly bakterie 2x promyty fosfátovým pufrům (PBS) o požadovaném složení a příslušném pH:

Destilovaná voda	1 l
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	13,86 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g

Tyto navážky byly použity pro všechny tři fosfátové pufrů. Připraven byl fosfátový pufr (PBS) o pH 5,5 přidavkem HCl. Dále alkalický PBS o pH 9,15 pomocí přidavku 30% NaOH. Tento alkalický pufr byl ještě následně připraven znovu s přidavkem 4 g soli NaCl, tak aby pufrovací prostředí vyhovovalo požadavku bakteriálního kmene o koncentraci soli 20 g/l.

3.3.4. Imobilizace vzorků v kapalném prostředí

K imobilizaci bakteriálních kultur byl zvolen Poly-L-lysin. Po dvojnásobném promytí bakteriálních kultur v příslušném PBS dle požadovaného pH konkrétních bakterií byly bakterie zředěny příslušným pufrům dle naměřené OD narostlé bakteriální kultury.

3.3.5. Fixace vzorků

Pro fixaci vzorku bylo důležité zvolit správné fixační činidlo. Vybrán byl Poly-L-lysin ve formě Poly-L-lysin hydrobromidu naředěného dle instrukcí výrobce na koncentraci 1mg/ml. Poly-L-lysin o objemu 100 µl byl aplikován na podložní sklíčko. Všechna sklíčka byla uložena ve sterilních Petriho miskách, tak aby bylo zamezeno kontaminaci vzorku prachem a jinými nečistotami. Tato podložní skla byla předem ošetřena fyzikální plazmou, které byla vystavena po dobu 40 s. Nanesené fixační činidlo se nechalo 0,5 – 1,5 h schnout v sušárně na 48 °C.

3.3.6. Příprava bakterií pro správné zobrazení na AFM

Z narostlé bakteriální kultury byl odebrán 1 ml kultury do 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky a následně změřena optická hustota této odebrané kultury proti příslušnému pufru. Dále byl takto odebraný vzorek po centrifugaci při 6000 rpm na 5 minut vylit, aby se zbavilo supernatantu. Po odstranění supernatantu bylo přidáno do Eppendorfovy zkumavky 1 ml příslušného PBS, takto byl vzorek roztřepán na Vortexu a následně byla opět provedena centrifugace s předchozími parametry. Opět byl vzorek po centrifugaci zbaven supernatantu a znovu bylo přidáno 1 ml nového PBS. Takto byly bakterie roztřepány na Vortexu. Následně pokud bylo potřeba dle OD doředit takto připravený vzorek, došlo k ředění příslušným fosfátovým pufrem. Takto připravené bakterie byly naneseny v množství 1 ml na podložní sklíčko ošetřené plazmou s naneseným suchým fixačním činidlem. Dále byla bakteriální kultura ponechána na sklíčku 30 minut, aby se adsorbovala na dané fixační činidlo. Po uplynutí této doby bylo sklíčko vyjmuté z Petriho misky a opláchnuto postupně až 10 ml PBS. Následně bylo sklíčko vloženo zpět do Petriho misky a zalito 20 ml příslušného fosfátového pufru. Po tomto vzorky byly připraveny na měření.

3.4. Nastavení AFM pro měření v kapalném prostředí

Měření jednotlivých vzorků bakterií probíhalo v programu *JPK SPM Desktop* a byl zvolen mód *QI™ Advanced Imaging*. Tento univerzální mód je šetrný a vhodný pro zobrazování živých buněk. Všechna měření probíhala za teploty 25 °C a za vhodného nastavení přístroje, které zahrnovalo správný výběr hrotu s parametry ovlivňujícími měření. Hrot byl nasazen opatrnou manipulací nejprve do držáku a poté umístěn do hlavy mikroskopu. Dále byl umístěn vzorek v otevřené Petriho misce na základnu přístroje a nad základnu se vzorkem byla umístěna hlava s hrotem. Následně byla vybrána vhodná skenovací pozice pohybem vzorku pomocí pozičních šroubů. Samotné měření v programu se skládá z několika kroků. Nejprve byl zvolen vhodný mód (*QI™ Advanced Imaging*) a poté je třeba za pomoci detektoru a manipulace se zrcátkem dostat paprsek laseru na vybraný hrot. Manipulace probíhá vyrovnaním polohy vertikální a horizontální polohy a následně je nutné zacílit laser do čtyřkvadrantového detektoru. Dále je potřeba v programu vybrat správný název použitého čipu a typ prostředí (v tomto případě kapalně), ve kterém měření probíhá, výšku vzorku a teplotu okolního prostředí. Poslední krok představuje kalibraci nosníku dle zadaných parametrů z předchozího nastavení. Před provedením kalibrace je držákem s hrotem sjeto do kapalného prostředí a provedena korekce zrcátka vzhledem k odlišnému indexu lomu světla v porovnání s plynnou fází. Poté byla provedena kalibrace, která určí hodnotu *Setpoint* představující sílu hrotu působící na vzorek. Před zahájením měření je hrot přiblížen ke vzorku za pomoci piezoelektrického efektu a na kartě *Acquire data* upraveny parametry *Setpoint* (dle kalibrace), *Pixel time* (doba skenování jednoho pixelu), *Z Speed*, velikost skenovací plochy

(až 100x100 μm) a rozlišení získaného zobrazení pod názvem *Pixels*. Pro měření bylo ze začátku vždy vybráno menší rozlišení (zpravidla 128 x 128 pixelů) a širší oblast snímku 20 x 20 μm . Teprve po proměření více oblastí bylo vždy zacíleno na nejlépe osamocenou bakterii a poté měřeny snímky s lepším rozlišením na menší oblasti.

3.5. Měření mechanických vlastností

V rámci měření byla provedena charakterizace mechanických vlastností. Byly proměřeny vlastnosti bakteriálního kmene *Rhodobaca barguzinensis* a *Rhodoblastus acidophilus*. Cílem bylo získání křivek pro vyhodnocení Youngova modulu u obou kmenů a adheze u vzorků s různým pH kapalného prostředí.

3.6. Zpracování výstupu měření

Jednotlivá zobrazení získaných snímků i křivek byla zpracována a vyhodnocena v programu JPK Data Processing. Pro snímky lze vybrat samostatně charakteristiku *Adhesion*, *Height* a *Slope fit*. Dále lze snímek doplnit výškovým rozměrem, měřítkem, osami či přímkou udávající vzdálenost dvou bodů. Ze získaných křivek byla spočtena adheze vzorku a Youngův modul pomocí karty *Batch processing*.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1. Charakteristika měřených bakteriálních mikroorganismů

4.1.1 Charakterizace narostlých kultur a ředění na AFM

Z výsledků naměřené optické hustoty suspenzí bakteriálních kultur, která probíhala výše uvedeným postupem v kapitole 3.3.1. experimentální části bylo vyhodnoceno následující ředění pro analýzu vzorků pomocí AFM. Ředění bylo zvoleno vždy tak, aby se pohybovalo v rozmezí 0,1 – 0,2 OD pro zobrazení na AFM.

Tabulka 1: Naměřené hodnoty OD; údaje o ředění, pufru a kultivaci

	OD [-]	ředěno pro OD	ředěno pro AFM	použitý pufr
<i>Rhodobaca barguzinensis</i> (20 g/l)	0,654	10x	40x	PBS pH 9,15; 20 g/l NaCl
<i>Rhodobaca barguzinensis</i> (bez přídavku soli)	0,585	10x	30x	PBS pH 9,15
<i>Rhodoblastus acidophilus</i>	0,038	10x	5x	PBS pH 5,7

V případě měření OD u kmene *Rhodobaca barguzinensis* DSM 19920 byl viditelný nárůst kultur a z toho důvodu už při měření OD voleno nejprve ředění 10x (900 µl PBS a 100µl odebrané kultury). Po získání naměřených hodnot bylo následně určeno finální ředění pro zobrazení na AFM. V tomto případě bylo potřeba ještě 4x a 3x menších hodnot, tak aby se výsledná hodnota pohybovala v rozmezí 0,1 – 0,2. Použitá ředění byla 40x a 30x. Pro bakterie rodu *Rhodoblastus acidophilus* DSM 137 vyšla hodnota OD pod daným rozmezím, a tudíž došlo k volbě menšího ředění pro AFM, neboť manipulace a pipetování malých objemů suspenzí s bakteriemi není optimální. Jako referenční vzorek bylo použito nesterilní LB médium.

V druhém případě byla měřena OD vykultivovaných bakterií rodu *Rhodobaca* a to po 48h kultivaci a bakterií rodu *Rhodoblastus* po 24 h kultivaci. Postup byl obdobný jako pro předchozí měření. Bylo vyzorováno, že pro časově kratší kultivaci byly naměřeny vysoké hodnoty OD, neboť v této fázi bakterie vynaložily hlavní část energie pro růst, a proto bylo nezbytné ředění až 150x. Následně bylo z hlediska přípravy vzorku pro AFM obtížnější manipulovat s malým objemem suspenze bakterií. Nicméně tyto vzorky se podařilo na AFM zobrazit (viz Obrázek 19). Pro měření bylo referenčním vzorkem LB médium, ve kterém proběhla i samotná kultivace bakterií.

Tabulka 2: Naměřené OD; údaje o ředění, pufru a kultivaci

	OD [-]	ředěno pro OD	ředěno pro AFM	použitý pufr	doba kultivace
<i>Rhodobaca barguzinensis</i>	1,046	2x	10x	PBS pH 9,2	48 h
<i>Rhodobaca barguzinensis</i>	2,168	2x	20x	PBS pH 8,2	48 h
<i>Rhodoblastus acidophilus</i>	>2,5	150x	150x	PBS pH 6,0	24 h
<i>Rhodoblastus acidophilus</i>	>2,5	150x	150x	PBS pH 5,7	24 h

4.1.1. Plynová chromatografie

Výsledky měření na GC potvrdily nepřítomnost PHA-syntázy 1.třídy u těchto bakterií, proto neprodukuje PHB, ale zároveň zde byla zaznamenána přítomnost nejspíše jiné syntázy (3. třídy), protože obsah PHA byl identifikován nad limitem detekce a pod limitem kvantifikace.

4.2. Optimalizace měření bakteriálních kmenů v kapalném prostředí

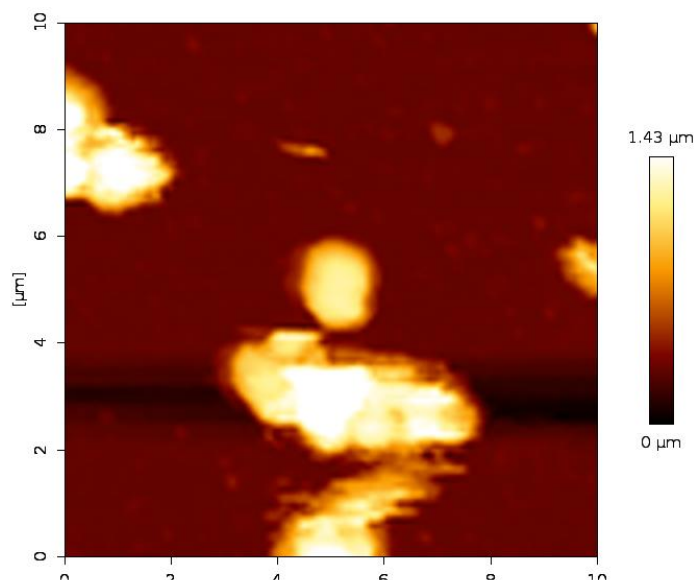
4.2.1. Nastavení parametrů měření

Pro měření vzorků v kapalném prostředí (PBS pufru) bylo důležité nastavit hodnotu výšky vzorku. Tato hodnota byla nastavena dle výškového rozměru na 1 μm . Po provedení kalibrace bylo nezbytné upravit hodnotu *Setpoint*, která byla z kalibrace získána, avšak téměř vždy nepatrně upravena kolem hodnoty 1,0 nN. Hodnoty *Z Length* byly v řádech stovek nm a ve většině případů měření byla tato hodnota 500 nm. Osvědčilo se nejprve postupovat od snímků větších ploch. Jednalo se o velikosti snímku 20×20 μm nebo 10×10 μm a rozlišení těchto snímků bylo vždy 128×128 pixelů. Dále bylo vhodné pokračovat ve vybrané oblasti se snímky osamostatněných bakterií, které se dle velikosti bakterie pohybovaly v rozmezí velikosti okolo 5×5 nebo 7×7 μm . Zobrazování bakterií v kapalném prostředí představovalo úskalí v tom, že mohlo dojít k porušení povrchu bakterie hrotem, anebo k pohnutí celé oblasti skenu vlivem kapaliny. Čím kvalitnější rozlišení bylo voleno, tím skenování trvalo déle a tím častěji docházelo k nepovedenému snímku, proto jako nejspolehlivější se projevíly snímky o rozlišení 256×256 pixelů. Toto rozlišení společně s nastavením ostatních parametrů trvalo pro jeden sken 16 minut.

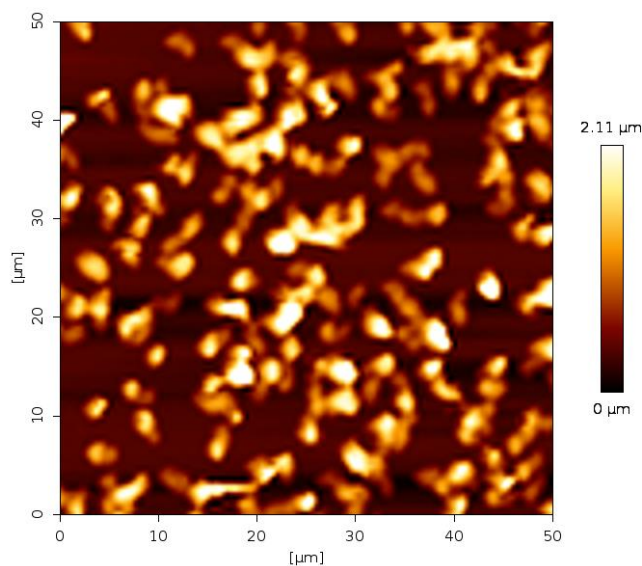
4.2.2. Výsledné snímky

Výstupy v podobě snímků byly zpracovány v programu *JPK Data Processing*. Bylo zde možné snímek upravit v podobě přidání os a stupnic výškového rozměru ve směru osy z (viz Obrázek

11). Dále upravit ostrost snímků a proložit útvary přímkou udávající vzdálenost mezi dvěma zvolenými body. Výrobce uváděná hodnota *Spring Constant* neboli konstanta tuhosti nosníku je uváděna 0,24 N/m. Po kalibraci hrotu se tato hodnota konstanty tuhosti pohybovala okolo 0,07 N/m (0,06 N/m od výrobce uváděno jako minimum). Hodnota *Spring Constant* od výrobce pro hroty vhodné k měření v kapalném prostředí bývá nižší než pro hroty určené k měření na vzduchu. Pokud docházelo k časově delšímu hledání povrchu vzorku při automatickém přibližování hrotu, byla upravena hodnota *Pixel Time* a pohybovala se v rozmezí 10 – 20 m/s.



Obrázek 10: *Rhodoblastus acidophilus*, velikost skenu $10 \times 10 \mu\text{m}$, 128×128 pixelů

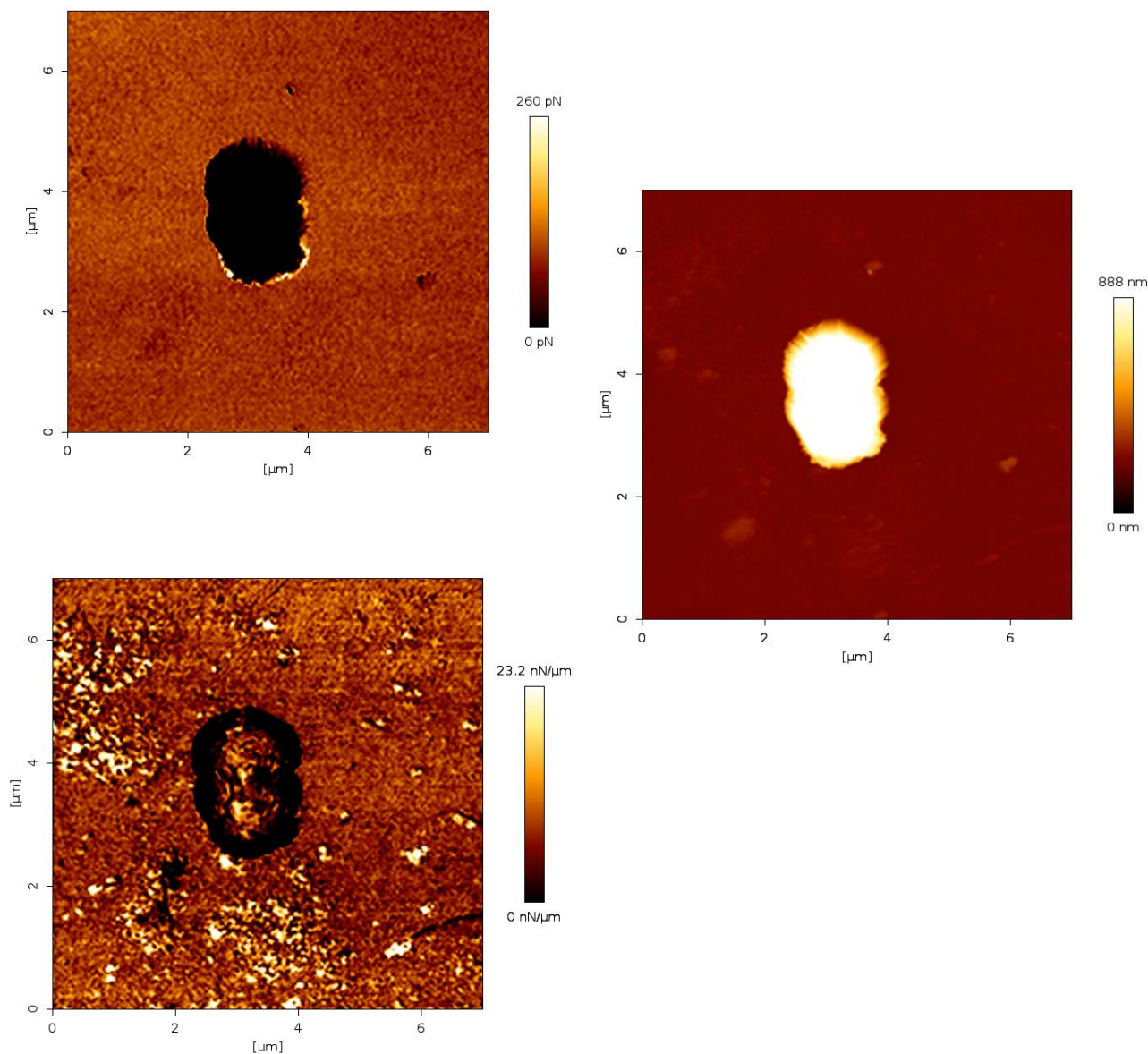


Obrázek 11: Bakteriální suspenze, špatné ředění

Na obrázku výše lze pozorovat nevhodné ředění bakteriální suspenze pro AFM, kdy je těžké získat osamostatněnou bakterii, neboť bakterie se shlukují. Byl zvolen rozměrově nejširší možný snímek.

4.3. Získané charakteristiky na AFM pro živé bakterie

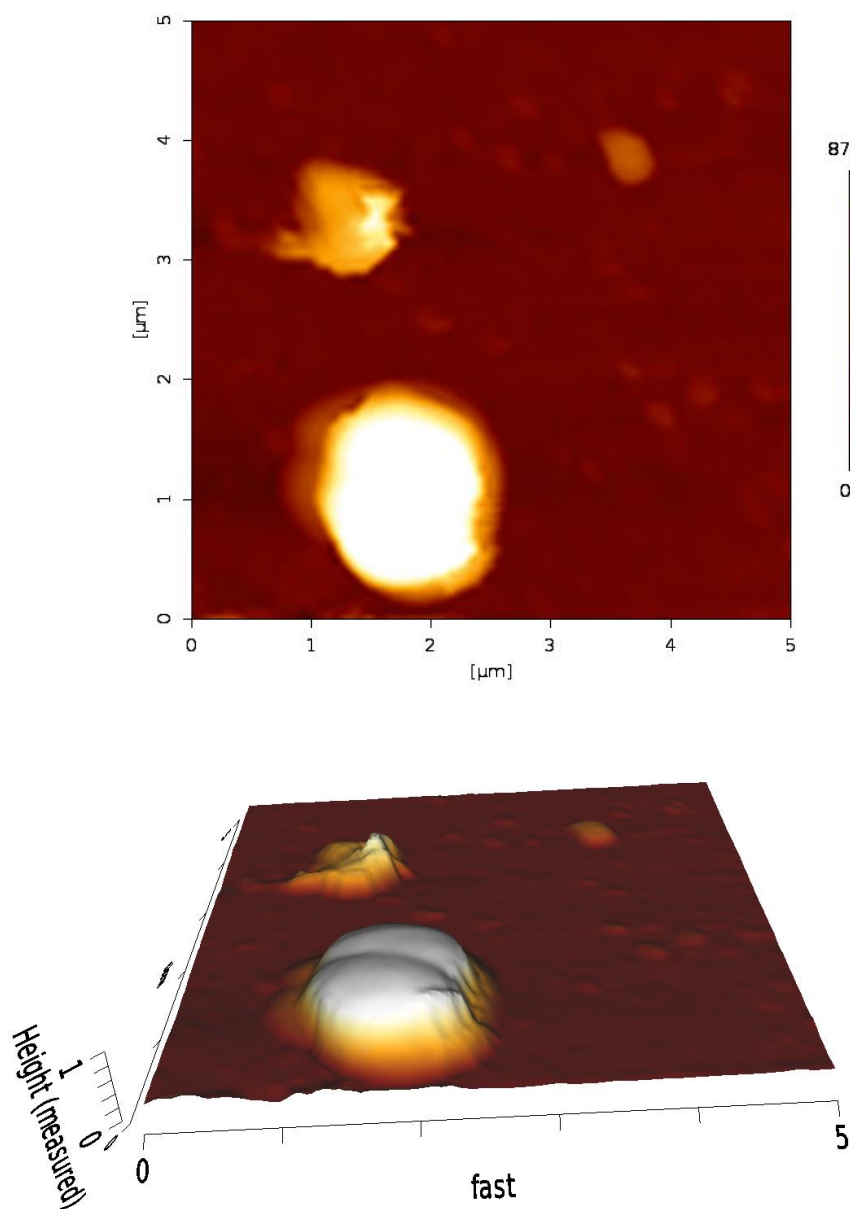
Získané skeny bakteriálních kmenů lze pomocí programu JPK Data Processing zobrazit v několika provedeních na základě vybrané charakteristiky. Lze si zvolit několik možností i více možností zároveň, mezi ně patří – *Slope Fit*, *Adhesion*, *Height*. Charakteristika *Slope fit* je uvedena u všech proměřených bakteriálních kmenů a jedná se o parametr vyjádřený v N/m.



Obrázek 12: Charakteristiky *Adhesion*, *Height*, *Slope Fit* pro *Rhodoblastus acidophilus*

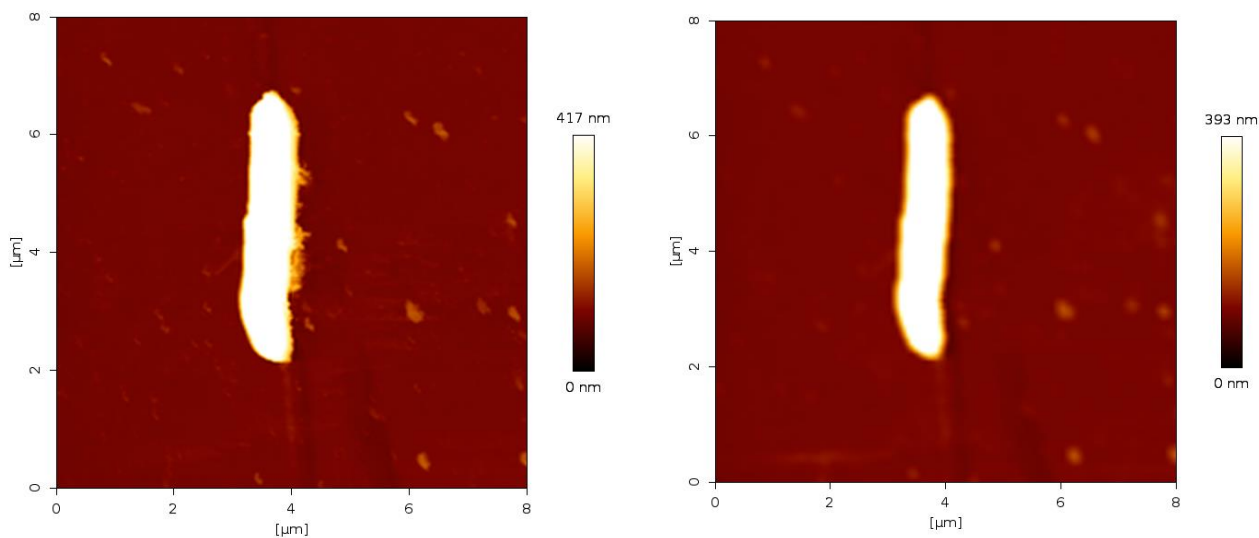
Uvedené charakteristiky byly získány pro kmen *Rhodoblastus* v PBS pufru o pH 5,7. Velikost skenu 7x7 μm s rozlišením 256x256. Takto byla zjištěna výška 888 nm, hodnota adheze 260 pN, která značí sílu potřebnou ke zpětnému pohybu hrotu od povrchu vzorku. Dále byla získána hodnota parametru elasticity vzorku prostřednictvím charakteristiky *Slope Fit* 23,2 μN/μm, pro jejíž přesnější stanovení je nezbytné spočítat Youngův modul. Mapa elasticity je vyhodnocena jako lineární proložení křivek závislosti síly na vzdálenosti.

V rámci pokročilejších úprav lze získat i 3D zobrazení snímku, které lze vygenerovat pro lepší představu o povrchu snímaného objektu. Níže je zobrazena bakterie *Rhodoblastus acidophilus*, která mohla být mechanicky poškozena, neboť je viditelná v horní oblasti oddělená část výškově podobná samotné bakterii (viz Obrázek 12). Byla zjištěna výška vzorku 870 nm u 168 h kultivovaných bakterií za světla, které měly kulovitý až nepravidelný tvar. Těmto vzorkům přístup světla umožnil využít energii pro produkty fotosyntézy, což u ostatních kmenů bylo potlačeno právě kultivací v prostředí se zamezeným přístupem světla. V nepřítomnosti světelné energie bakterie využijí větší část energie pro syntézu např. PHA a je tak zamezeno možnosti fotosyntézy a poskytování produktů fotosyntézy, čehož jsme chtěli docílit.



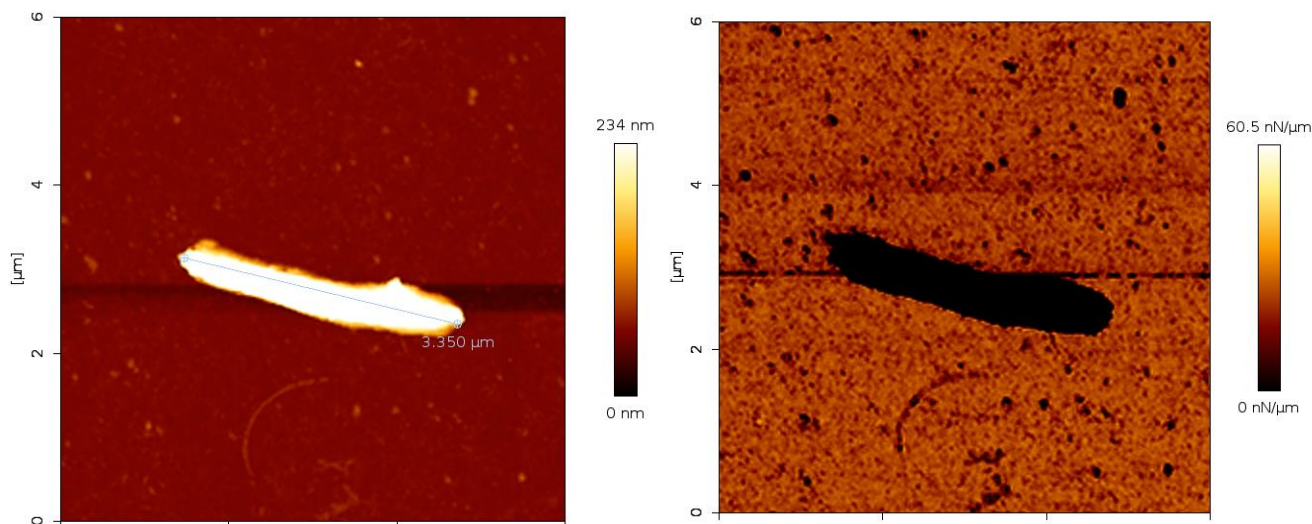
Obrázek 13: *Rhodoblastus acidophilus* charakteristika Height (výše) a 3D snímek (níže)

Bylo získáno zobrazení i druhého bakteriálního kmene *Rhodobaca barguzinensis* a to v prostředí PBS pufru o hodnotě pH 9,15. Při tomto pH se bakterii dařilo jednoduše zobrazit bez zřetelného poškození vzorků. Tvar byl tyčinkovitý jako je uváděno v literatuře. Níže lze porovnat rozlišení skenů 512×512 a 256×256 pixelů. Na snímku o lepším rozlišení lze pozorovat nepravidelné okraje, neboť tento snímek trvá cca 30 minut a v průběhu dochází vlivem kapalného prostředí patrně k pohybu snímaného vzorku.



Obrázek 14: *Rhodobaca barguzinensis* snímek 8×8 μm , 512×512 pixelů (vlevo), 256×256 pixelů (vpravo)

V tomto případě došlo také k zobrazení pro tuto bakterii v prostředí s koncentrací soli NaCl v PBS pufru 20 g/l. Dále je v programu možné změřit vzdálenost dvou vybraných bodů, a tak i délku bakterií, která v prostředí vyšší koncentrace soli byly viditelně kratší a vybraný vzorek měřil přibližně 3,35 μm . Výška byla také nižší dle hodnoty získané z charakteristiky *Height* (viz Obrázek 14). Menší rozměry mohly být zapříčiněny vyšší koncentrací soli, která podpořila buněčnou reakci na hypertonické prostředí, která vede později k plazmolýze.



Obrázek 15: *Rhodobaca barguzinensis* v PBS pufru s koncentrací soli NaCl 20 g/l, 6×6 μm , 256×256 pixelů

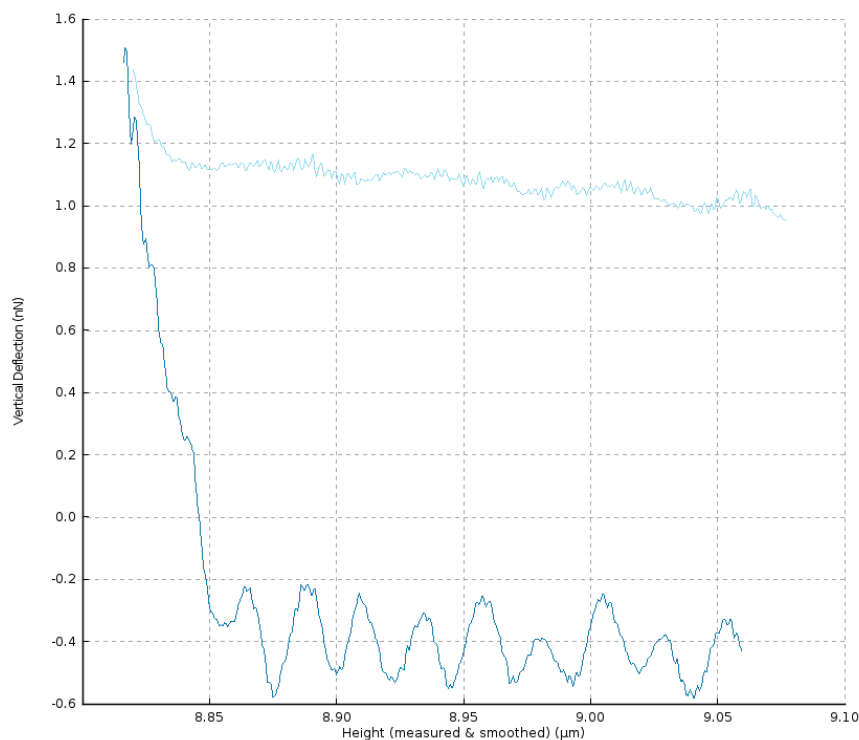
4.4. Youngův modul a adheze bakterií v různém prostředí

4.4.1. Youngův modul

Po provedení optimalizace zobrazování bakterií byla provedena charakterizace mechanických vlastností vzorků. Pro zjištění Youngova modulu (E) došlo k vyhodnocení získaných adhezních křivek pro snímky bakterií. Byly vybrány bakteriální kmeny *Rhodobaca barguzinensis* s rozdílnou koncentrací soli v prostředí. Koncentrace soli NaCl byla navýšena 4krát oproti druhému případu (5 g/l) a to na 20 g/l. Vyhodnocení ukazovalo na vyšší hodnoty pro Youngův modul kmene *Rhodobaca* s vyšší koncentrací soli. Pro prostředí s koncentrací soli 5 g/l byla aproximovaná hodnota Youngova modulu (20 ± 8) MPa pro kmen *Rhodobaca*. Při vyhodnocení prostředí s koncentrací NaCl 20 g/l vycházela tato hodnota pro kmen *Rhodobaca* vyšší a to (22 ± 6) MPa. Odchyšky jsou v rámci chyb stanovení.

4.4.2. Adheze

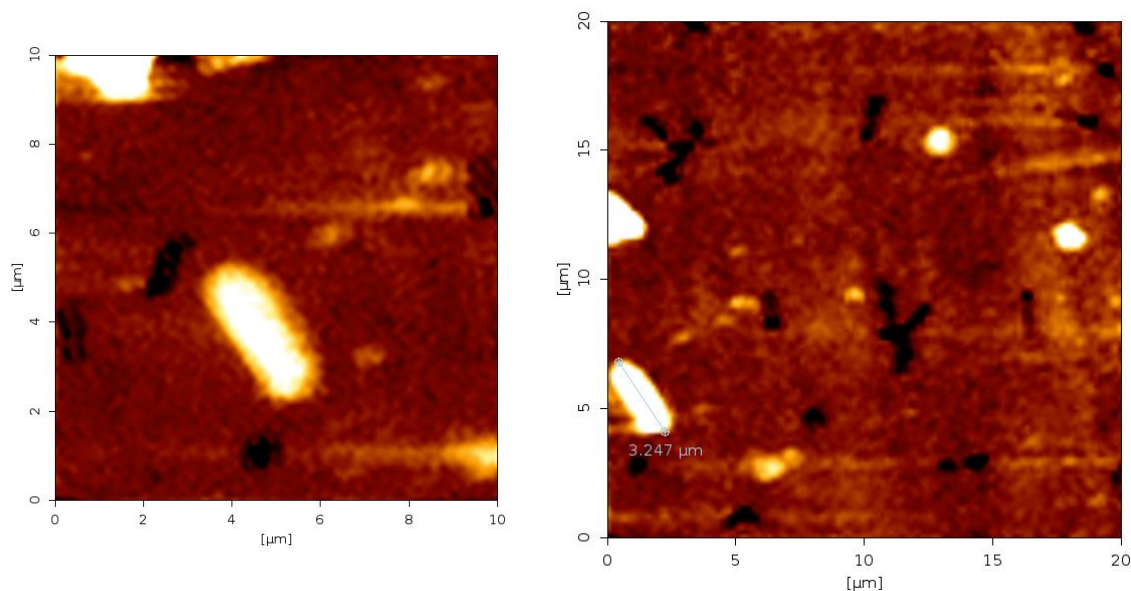
Ze získaných dat byla zjištěna charakteristika adheze pro vzorky stejného bakteriálního kmene v prostředí s odlišnou hodnotou pH, kdy vyšší hodnota se pohybovala v optimálním rozmezí pro danou bakterii, které je 9,0 - 9,5. V druhém případě byla hodnota pH nižší a nevyhovovala optimu. Druhé prostředí mělo hodnotu pH 8,2. K tomuto sloužila karta *Adhesion* v jednotkách N, kde získáme křivku závislosti síly na vzdálenosti. Tato hodnota představuje silovou interakci mezi hrotem a povrchem vzorku. Výpočet je určen ze záporné oblasti grafu – retrakce. V kapalném prostředí vykazovaly bakterie nízkou adhezi v rámci stovek pN. Pro vzorek kmene *Rhodobaca* v kyselejších prostředí s hodnotou pH 9,2 byla stanovena hodnota adheze na 265 pN. U druhého vzorku v prostředí s pH 8,2 vycházela adheze nižší a to 52 pN. Dle předchozích studií by hodnota adheze měla být ovlivněna hodnotou pH roztoku. Bylo prokázáno, že adhezni



Obrázek 16: Křivka získaná softwarem u středové části bakterie *Rhodobaca barguzinensis*

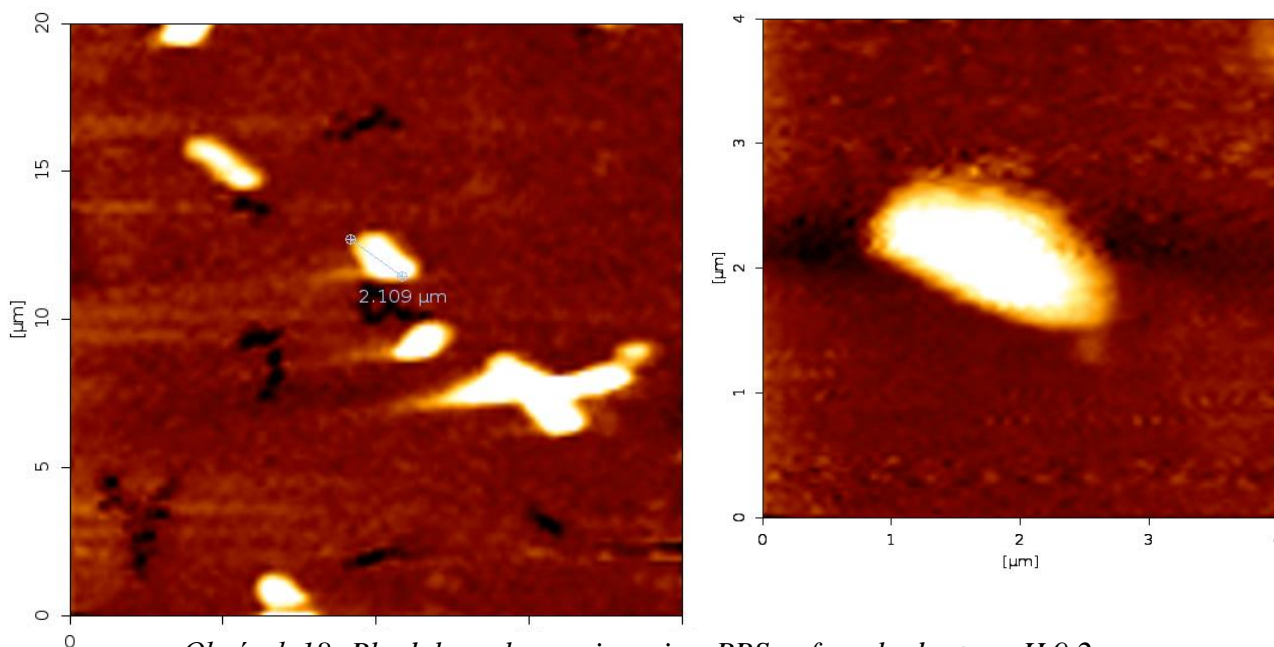
síla bakterie – kov dosáhla nejvyšší hodnoty, když bylo pH roztoku blízko izoelektrickému bodu bakterií, tj. při nulovém náboji [5]. Adhezní síly byly pH 9 vyšší než při pH 7, což odpovídá našemu výsledku. Křivky získané ze vzorků měřených v kapalném prostředí (zde konkrétně pro kmen *Rhodobaca*) se výrazně odchyľují od průběhu křivek vysušených bakterií.

4.5. Zobrazení bakterií v rozdílné hodnotě pH prostředí



Obrázek 17: *Rhodobaca barguzinensis* v PBS pufru s hodnotou pH 8,2

Zobrazení *Rhodobaca barguzinensis* v pH 8,2. Délka bakterií se pohybovala konkrétně v tomto případě kolem hodnoty 3,25 μm , což odpovídá předchozímu měření této bakterie. Tvarově byla tato kultivace rovněž tyčinkovitá. Rozlišení skenu bylo 128×128 pixelů a vždy se začalo s větší plochou snímku a posléze byla vybrána samostatná bakterie. V okolí jsou znatelné nejspíše

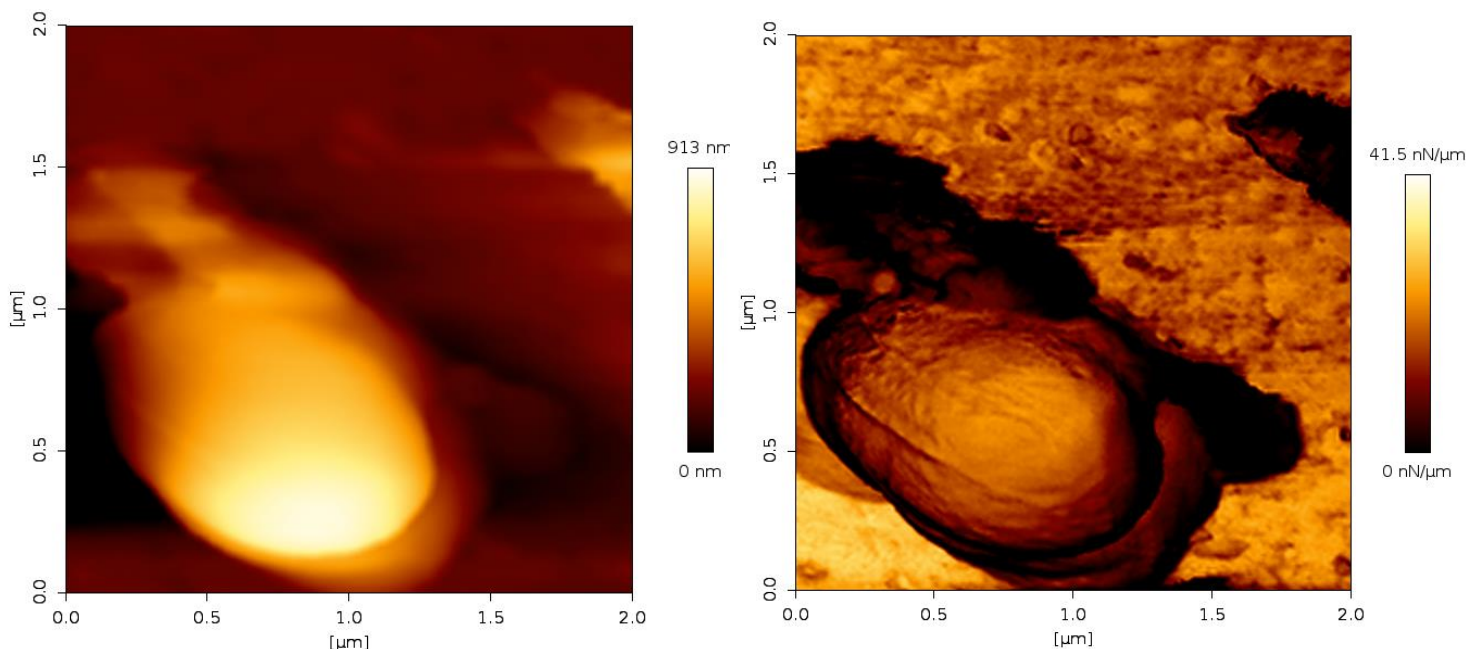


Obrázek 18: *Rhodobaca barguzinensis* v PBS pufru s hodnotou pH 9,2

shluky solí pufrového prostředí v podobě krystalků. Vybraná samostatná bakterie ze snímku byla použita ke zjištění adheze v rámci vyhodnocování mechanických vlastností.

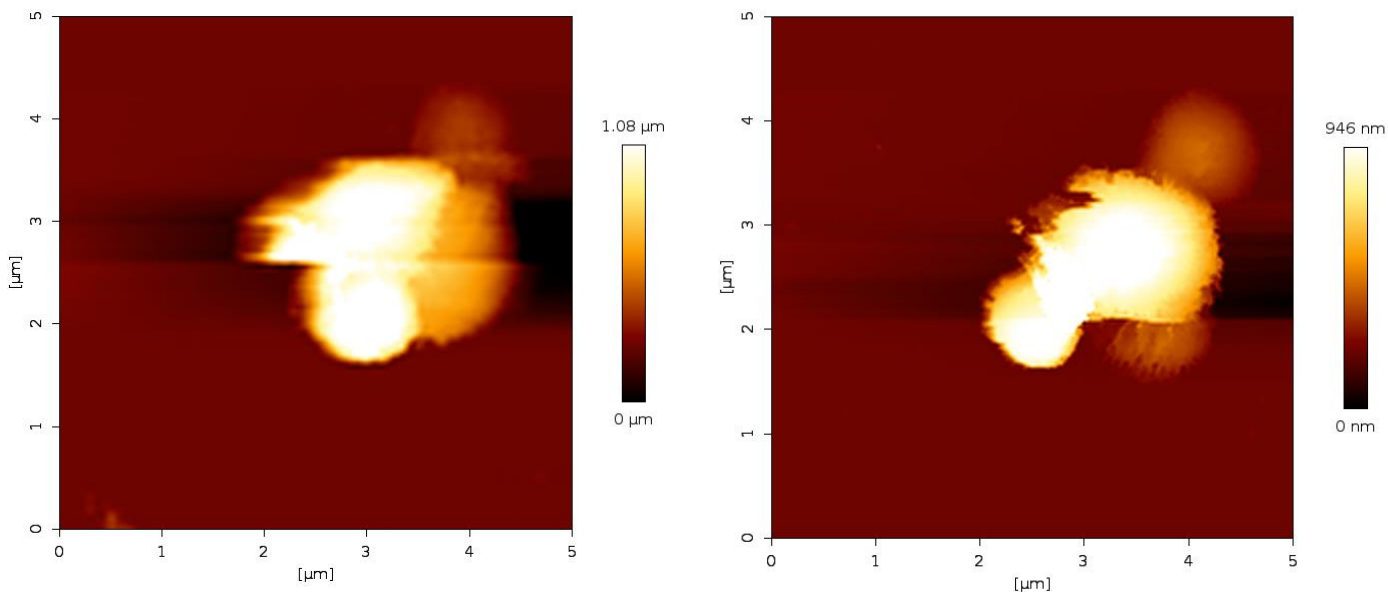
V druhém případě *Rhodobaca barguzinensis* v PBS pufru s hodnotou pH prostředí 9,2 proběhlo obdobně se stejným rozlišením. Modře je naznačena vybraná bakterie, na kterou bylo dále soustředěno měření a i vyhodnocování adhezních vlastností. Velikost u této bakterie byla přibližně 1,53 μm , a tedy tato alkalofilní bakterie kultivovaná ve více zásaditém pH oproti předchozí byla menší. Vykazovala 4x vyšší hodnotu adheze než předchozí bakterie stejného kmene. V obou případech se jednalo o 48 h kultivace, jejichž hodnoty OD jsou vypsány výše (viz Tabulka 2). Tyto alkalofilní bakterie kultivované v pH 9,2 byly rozměrově menší než předchozí. Vykazovaly naopak přibližně 4x vyšší hodnotu adheze oproti bakteriím stejného kmene produkovaných v prostředí s hodnotou pH 8,2.

Bylo provedeno zobrazení i druhého kmene acidofilní povahy. *Rhodoblastus acidophilus* byl měřen v kapalných prostředích s pH 6 a 5,7 v PBS pufru o daném pH. Tyto vzorky byly poškozeny od pohybu hrotu po povrchu, což zapříčiní u takto poškozeného vzorku buněčnou apoptózu. Výška povrchu bakterií v pH 6 měla hodnotu do 1 μm , čemuž vyhovovalo nastavení výšky vzorku na AFM na tuto hodnotu, avšak povrch byl nepravidelný (lépe viz Obrázek 18 charakteristika *Slope Fit*), a proto došlo při posuvu hrotu k poškození. Mohlo také dojít k uvolnění bakterií v důsledku nedostatečné imobilizace. Tvar bakterií je zobrazen jako kulovitý a velikost přibližně 1x1,5 μm . Měření bylo provedeno v rozlišení 256x256 pixelů a byla snížena ostrost porušených okrajů. Důvodem poničení mohlo být i použití nového hrotu, který nebyl dostatečně otupen.



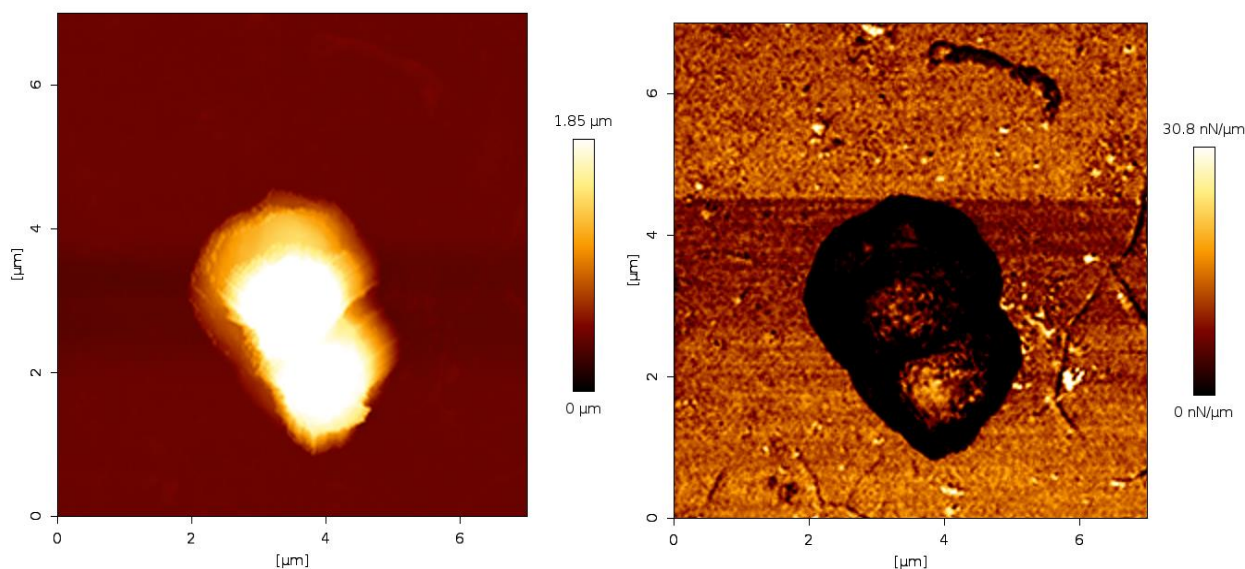
Obrázek 19: *Rhodoblastus acidophilus* v PBS pufru s hodnotou pH 6

Následující acidofilní byly dle měření nepatrně vyšší v prostředí PBS pufru o pH 5,7. Jejich výškový rozměr v některých případech přesahoval 1 μm a došlo k viditelnému poškození povrchu. Rozlišení snímků je 256×256 pixelů o velikosti $5 \times 5 \mu\text{m}$.



Obrázek 20: *Rhodoblastus acidophilus* v PBS pufru s hodnotou pH 5,7

Po opotřebenání hrotu při měření byly získány snímky celistvé bakterie, které potvrdily kulovitý tvar. U zobrazeného vzorku je potvrzena výška téměř 2 μm , a tedy přesahující výšku vzorku v nastavení, z toho lze usuzovat, že bakterie z předchozích měření mohly být původně vyšší, avšak tlak hrotu propíchl buněčnou stěnu a tím se bakterie výrazně snížily.



Obrázek 21: *Rhodoblastus acidophilus* v PBS pufru s hodnotou pH 6

Bakterie z odlišného kmene se lišily především tvarem i velikostí. Kmen *Rhodobaca barguzinensis* s koncentrací soli 5 g/l (viz Obrázek 14: *Rhodobaca barguzinensis* snímek 8×8 μm, 512×512 pixelů (vlevo), 256×256 pixelů (vpravo)) vykazovala podobnost s modelovým organismem purpurových bakterií – *Rhodospirillum Rubrum* DSM 467. V obou případech se jedná o vibrioidní až spirálovité buňky. *Rubrum* dle snímku z elektronové mikroskopie vykazuje délku 0,8 - 1 μm, což je kratší 2 - 3x než u *Rhodobaca* [54].

Změna fyzikálně – chemických podmínek (pH, teplota, živiny, dostupnost světla aj.) představují pro mikroorganismy stresovou situaci. Stresové prostředí vytváří i průmyslové procesy používané pro sběr sekundárních metabolitů (enzymy, organické látky, toxiny) a v důsledku tohoto termofily vytvářejí stresovou odpověď. Ta může představovat aktivaci systému deoxidace reaktivních forem kyslíku, morfologické změny, kompatibilní akumulace rozpuštěných látek atd. za účelem dosažení homeostázy. U termofilních bakterií je odezva na stresové situace používána jako modelová, a proto je pečlivě zkoumána pro účely aplikované biologie [55]. Změnou pH hodnoty lze podpořit růst nebo naopak inhibovat a v extrémních případech způsobit zánik buněčné populace. Z růstových změn bakterií můžeme vyvodit, zda pro ně změna pH byla prospěšná [56] . V případě kmene *Rhodobaca* se dá ze snímku považovat za optimálnější méně alkalické prostředí pH 8,2, kdy byly bakterie větší (viz Obrázek 17).

Důležitou roli hraje nejen faktor pH ale i iontová síla roztoku pro přilnavost bakterií, která hraje klíčovou roli při zobrazování pomocí AFM. Výsledky studií ukazují, že iontová síla roztoků ovlivňuje interakci bakterie – kov a vyšší iontová síla má za následek vyšší adhezi mezi v rozmezí vzorek – hrot. Toto je způsobeno silnější elektrostatickou přitažlivou silou mezi kladně nabitým iontovým povrchem a záporně nabitým bakteriálním povrchem. Vliv na buněčnou adhezi má také pH roztoku, stáří kultivace či časový vývoj adhezivního kontaktu [5]. V našem případě se iontová síla roztoku mění po přidavku vyšší koncentrace soli NaCl u kmene *Rhodobaca barguzinensis*.

5. ZÁVĚR

Využití mikroskopických metod je důležité pro porozumění vlastností mikroorganismů. Práce z větší části sloužila topografickému zobrazení bakterií za využití mikroskopie atomárních sil. Pozorovány pomocí mikroskopie atomárních sil byly termofilní purpurové bakterie – *Rhodoblastus acidophilus* DSM 137 a *Rhodobaca barguzinensis* DSM 19920. Tyto bakterie mají předpoklady pro produkci PHA, která ovšem nebyla potvrzena plynovou chromatografií vzhledem k tomu, že detekované množství bylo pod limitem detekce. Bylo tedy zjištěno, že produkce u těchto bakterií je tak malá, že jejich potenciál jako PHA producentů byl vyvrácen. Z tohoto důvodu se práce zaměřila na pozorování různých změn vyvolaných změnou podmínek od optimálních podmínek těchto bakterií, jako např. změnou pH prostředí a kultivace v rozdílných koncentracích soli.

Snímky byly pořizovány vždy v kapalném prostředí PBS pufru o daném pH a díky volbě vhodného postupu fixace a přípravy vzorků byly vhodně zobrazeny. Jako fixační činidlo byl dle užití v předchozích pracích zvolen Poly-L-lysin. Při měření se docílilo nejostřejšího zobrazení o rozlišení 512x512 pixelů. Na snímcích byla pozorovatelná poškození zejména na okrajích, která mohla být způsobena pohybem hrotu po povrchu vzorku. Byl potvrzen předpoklad, že obsah PHA granulí v bakteriích je zanedbatelný, neboť na snímcích není znatelný. Dále se podařilo získat rozdíl morfologie u kmene *Rhodoblastus acidophilus* v hypertonickém prostředí a dále porovnána morfologie tohoto kmene u různé doby kultivace. Pro kmeny *Rhodobaca barguzinensis* byla pozorována mimo tvaru i velikostní odlišnost a poté došlo ke stanovení mechanických vlastností v odlišných pH prostředích.

V následující části práce bylo provedeno měření mechanických vlastností jednotlivých bakteriálních kultur. V programu *JPK Data Processing* proběhlo proměření 15 křivek získaných z nejlépe středu daného vzorku. U křivek s nejshodnějšími hodnotami byla stanovena průměrná hodnota a odchylka v MS Excel pro Youngův modul a adhezi. Tyto výsledky lze porovnat pro odlišná prostředí s různou koncentrací soli (5 g/l a 20 g/l) u kmene *Rhodobaca barguzinensis*, kdy byla zjištěna hodnota Youngova modulu této bakterie (20,0±8,0) MPa a u tohoto kmene kultivovaného a následně i měřeného v prostředí s 4krát vyšší koncentrací soli NaCl byla tato hodnota větší a to (22±6) MPa a vykazoval tak větší tuhost. Stanovení adheze proběhlo pro kmen *Rhodobaca barguzinensis* v prostředích s různou hodnotou pH a to 8,2 a 9,2. V slaběji zásaditém prostředí o pH 8,2 byla vypočtena adheze 52 pN a pro prostředí o pH 9,2 byla adheze vybrané bakterie 295 pN. Byly potvrzeny vyšší adhezivní síly u vzorku s vyšším pH.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SHINATO, Kebede W., Feifei HUANG a Ying JIN. Principle and application of atomic force microscopy (AFM) for nanoscale investigation of metal corrosion. *Corrosion Reviews* [online]. 2020, **38**(5), 423–432. ISSN 2191-0316. Dostupné z: doi:10.1515/corrrev-2019-0113
- [2] EFREMOV, Yu.M., E.A. PUKHLYAKOVA, D.V. BAGROV a K.V. SHAITAN. Atomic force microscopy of living and fixed *Xenopus laevis* embryos. *Micron* [online]. 2011, **42**(8), 840–852. ISSN 09684328. Dostupné z: doi:10.1016/j.micron.2011.05.010
- [3] OBRUČA, Stanislav, Pavel DVOŘÁK, Petr SEDLÁČEK, Martin KOLLER, Karel SEDLÁŘ, Iva PERNICOVÁ a David ŠAFRÁNEK. Polyhydroxyalkanoates synthesis by halophiles and thermophiles: towards sustainable production of microbial bioplastics. *Biotechnology Advances* [online]. 2022, **58**, 107906. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2022.107906
- [4] THORAT GADGIL, Bhagyashri S., Naresh KILLI a Gundloori V. N. RATHNA. Polyhydroxyalkanoates as biomaterials. *MedChemComm* [online]. 2017, **8**(9), 1774–1787. ISSN 2040-2503. Dostupné z: doi:10.1039/C7MD00252A
- [5] SHENG, Xiaoxia, Yen Peng TING a Simo Olavi PEHKONEN. The influence of ionic strength, nutrients and pH on bacterial adhesion to metals. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2008, **321**(2), 256–264. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcis.2008.02.038
- [6] SHIBATA-SEKI, Teiko, Kazuki TAJIMA, Hiroki TAKAHASHI, Hiroya SEKI, Junji MASAI, Hiroshi GOTO, Eiry KOBATAKE, Toshihiro AKAIKE a Norihiko ITOH. AFM characterization of chemically treated corneal cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2015, **407**(9), 2631–2635. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-015-8473-0
- [7] VOIGTLÄNDER, Bert. *Atomic Force Microscopy* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2019. ISBN 978-3-030-13653-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-13654-3
- [8] SHINATO, Kebede W., Feifei HUANG a Ying JIN. Principle and application of atomic force microscopy (AFM) for nanoscale investigation of metal corrosion. *Corrosion Reviews* [online]. 2020, **38**(5), 423–432. ISSN 2191-0316. Dostupné z: doi:10.1515/corrrev-2019-0113
- [9] KABANOV, Daniil, Simon KLIMOVIC, Vladimir ROTREKL, Martin PESL a Jan PRIBYL. Atomic force spectroscopy is a promising tool to study contractile properties of cardiac cells. *Micron* [online]. 2022, **155**, 103199. ISSN 09684328. Dostupné z: doi:10.1016/j.micron.2021.103199
- [10] LI, Yan, Qi ZHENG, Xiao CHANG, Li HUANG, Xiao LIN, Zhi-Hai CHENG a Hong-Jun GAO. Atomic, molecular, charge manipulation and application of atomic force

- microscopy. *Acta Physica Sinica* [online]. 2021, **70**(13), 136802. ISSN 1000-3290. Dostupné z: doi:10.7498/aps.70.20202129
- [11] PICCO, L M, L BOZEC, A ULCINAS, D J ENGLEDEW, M ANTOGNOZZI, M A HORTON a M J MILES. Breaking the speed limit with atomic force microscopy. *Nanotechnology* [online]. 2007, **18**(4), 044030. ISSN 0957-4484. Dostupné z: doi:10.1088/0957-4484/18/4/044030
- [12] LAVANYA, S.B. a G.R. JAYANTH. Control of interaction force in constant-height contact mode atomic force microscopy. *Mechatronics* [online]. 2022, **88**, 102914. ISSN 09574158. Dostupné z: doi:10.1016/j.mechatronics.2022.102914
- [13] JOSHUA, A.M., G. CHENG a E.V. LAU. Soft matter analysis via atomic force microscopy (AFM): A review. *Applied Surface Science Advances* [online]. 2023, **17**, 100448. ISSN 26665239. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsadv.2023.100448
- [14] SUN, Baishun, Xuyang HUO, LiGuo TIAN, Jiajia WANG, Zhengxun SONG a Zuobin WANG. Molecular dynamics models of tapping mode atomic force microscopy. *Physica Scripta* [online]. 2023, **98**(5), 055008. ISSN 0031-8949. Dostupné z: doi:10.1088/1402-4896/acc7d4
- [15] TAJKARIMI, Mehrdad, Scott H. HARRISON, Albert M. HUNG a Joseph L. GRAVES. Mechanobiology of Antimicrobial Resistant Escherichia coli and Listeria innocua. *PLOS ONE* [online]. 2016, **11**(2), e0149769. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0149769
- [16] PILLET, Flavien, Louise CHOPINET, Cécile FORMOSA a Étienne DAGUE. Atomic Force Microscopy and pharmacology: From microbiology to cancerology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 2014, **1840**(3), 1028–1050. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2013.11.019
- [17] AGUAYO, S, N DONOS, D SPRATT a L BOZEC. Single-bacterium nanomechanics in biomedicine: unravelling the dynamics of bacterial cells. *Nanotechnology* [online]. 2015, **26**(6), 062001. ISSN 0957-4484. Dostupné z: doi:10.1088/0957-4484/26/6/062001
- [18] CHAO, Yuanqing a Tong ZHANG. Optimization of fixation methods for observation of bacterial cell morphology and surface ultrastructures by atomic force microscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2011, **92**(2), 381–392. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-011-3551-5
- [19] FRANCIS, L.W., D. GONZALEZ, T. RYDER, K. BAER, M. REES, J.O. WHITE, R.S. CONLAN a C.J. WRIGHT. Optimized sample preparation for high-resolution AFM characterization of fixed human cells. *Journal of Microscopy* [online]. 2010, **240**(2), 111–121. ISSN 0022-2720. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2818.2010.03392.x
- [20] JAROSLAV JULÁK. *Identifikace bakterií metodami instrumentální chemické analýzy*. 1998.

- [21] MISHRA, Mini a Pratima CHAUHAN. Applications of Microscopy in Bacteriology. *Microscopy Research* [online]. 2016, **04**(01), 1–9. ISSN 2329-3306. Dostupné z: doi:10.4236/mr.2016.41001
- [22] NAVRÁTIL LEOŠ a ROSINA JOZEF. *Medicínská biofyzika*. 1. Praha: Grada, 2005.
- [23] DUFRENE, Yves F. Atomic force microscopy and chemical force microscopy of microbial cells. *Nature Protocols* [online]. 2008, **3**(7), 1132–1138. ISSN 1754-2189. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2008.101
- [24] A. ABDULLAH a A. MOHAMMED. Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review. *International Conference on Hydraulics and Pneumatics*. 2018.
- [25] SANDERSON, Michael J., Ian SMITH, Ian PARKER a Martin D. BOOTMAN. Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2014, **2014**(10), pdb.top071795. ISSN 1940-3402. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.top071795
- [26] BAYGUINOV, Peter O., Dennis M. OAKLEY, Chien-Cheng SHIH, Daniel J. GEANON, Matthew S. JOENS a James A. J. FITZPATRICK. Modern Laser Scanning Confocal Microscopy. *Current Protocols in Cytometry* [online]. 2018, **85**(1). ISSN 1934-9297. Dostupné z: doi:10.1002/cpcy.39
- [27] FÖLDES-PAPP, Zeno, Ulrike DEMEL a Gernot P. TILZ. Laser scanning confocal fluorescence microscopy: an overview. *International Immunopharmacology* [online]. 2003, **3**(13–14), 1715–1729. ISSN 15675769. Dostupné z: doi:10.1016/S1567-5769(03)00140-1
- [28] SMITH, Ewen a Geoffrey DENT. *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach* [online]. B.m.: Wiley, 2004. ISBN 9780471496687. Dostupné z: doi:10.1002/0470011831
- [29] PALMEIRO-SÁNCHEZ, Tania, Vincent O’FLAHERTY a Piet N.L. LENS. Polyhydroxyalkanoate bio-production and its rise as biomaterial of the future. *Journal of Biotechnology* [online]. 2022, **348**, 10–25. ISSN 01681656. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiotec.2022.03.001
- [30] RAZA, Zulfiqar Ali, Sharjeel ABID a Ibrahim M. BANAT. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. 2018, **126**, 45–56. ISSN 09648305. Dostupné z: doi:10.1016/j.ibiod.2017.10.001
- [31] WANG, Ying, Jin YIN a Guo-Qiang CHEN. Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2014, **30**, 59–65. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2014.06.001
- [32] SANHUEZA, Claudia, Francisca ACEVEDO, Sebastian ROCHA, Pamela VILLEGAS, Michael SEEGER a Rodrigo NAVIA. Polyhydroxyalkanoates as biomaterial for electrospun scaffolds. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2019, **124**, 102–110. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.11.068

- [33] GOMES GRADÍSSIMO, Diana, Luciana PEREIRA XAVIER a Agenor VALADARES SANTOS. Cyanobacterial Polyhydroxyalkanoates: A Sustainable Alternative in Circular Economy. *Molecules* [online]. 2020, **25**(18), 4331. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25184331
- [34] PHILIP, S., T. KESHAVARZ a I. ROY. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* [online]. 2007, **82**(3), 233–247. ISSN 0268-2575. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.1667
- [35] KALIA, Vipin Chandra, Sanjay Kumar SINGH PATEL, Ramasamy SHANMUGAM a Jung-Kul LEE. Polyhydroxyalkanoates: Trends and advances toward biotechnological applications. *Bioresource Technology* [online]. 2021, **326**, 124737. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.124737
- [36] KIKKAWA, Yoshihiro, Masaharu NARIKE, Tomohiro HIRAISHI, Masatoshi KANESATO, Kumar SUDESH, Yoshiharu DOI a Takeharu TSUGE. Organization of Polyhydroxyalkanoate Synthase for In Vitro Polymerization as Revealed by Atomic Force Microscopy. *Macromolecular Bioscience* [online]. 2005, **5**(10), 929–935. ISSN 1616-5187. Dostupné z: doi:10.1002/mabi.200500115
- [37] OA BALOGUN-AGBAJE, OA ODENIYI a MA ODENIYI. Applications of Polyhydroxyalkanoates in Drug Delivery. *Fabard Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019.
- [38] MITRA, Ruchira, Tong XU, Guo-Qiang CHEN, Hua XIANG a Jing HAN. An updated overview on the regulatory circuits of polyhydroxyalkanoates synthesis. *Microbial Biotechnology* [online]. 2022, **15**(5), 1446–1470. ISSN 1751-7915. Dostupné z: doi:10.1111/1751-7915.13915
- [39] SANHUEZA, Claudia, Francisca ACEVEDO, Sebastian ROCHA, Pamela VILLEGAS, Michael SEEGER a Rodrigo NAVIA. Polyhydroxyalkanoates as biomaterial for electrospun scaffolds. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2019, **124**, 102–110. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.11.068
- [40] ZHOU, Wen, Simon BERGSMA, Dana Irene COLPA, Gert-Jan Willem EUVERINK a Janneke KROONEMAN. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) synthesis and degradation by microbes and applications towards a circular economy. *Journal of Environmental Management* [online]. 2023, **341**, 118033. ISSN 03014797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jenvman.2023.118033
- [41] BAUM, David A a Buzz BAUM. An inside-out origin for the eukaryotic cell. *BMC Biology* [online]. 2014, **12**(1), 76. ISSN 1741-7007. Dostupné z: doi:10.1186/s12915-014-0076-2
- [42] PAVLOVA, M. D., A. M. ASATUROVA a A. E. KOZITSYN. Bacterial Cell Shape: Some Features of Ultrastructure, Evolution, and Ecology. *Biology Bulletin Reviews* [online]. 2022, **12**(3), 254–265. ISSN 2079-0864. Dostupné z: doi:10.1134/S2079086422030070

- [43] M. BEDNÁŘ, V. FRAŇKOVÁ, J. SCHINDLER, A. SOUČEK a J. VÁVRA. *Lékařská mikrobiologie*. B.m.: Triton, 1996.
- [44] MIROSLAV VOTAVA. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. vyd. B.m.: Neptun, 2005.
- [45] MICHAEL DAVIDSON. W. Bacteria Cell Structure. *The Florida State University*. 2015.
- [46] NIEDERMAN, Robert A. Photosynthesis in the Purple Bacteria. In: *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017, s. 193–224. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-51365-2_6
- [47] MADIGAN, Michael T. a Deborah O. JUNG. An Overview of Purple Bacteria: Systematics, Physiology, and Habitats. In: [online]. 2009, s. 1–15. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4020-8815-5_1
- [48] BOLDAREVA, E. N., V. N. AKIMOV, V. A. BOYCHENKO, I. N. STADNICHUK, A. A. MOSKALENKO, Z. K. MAKHNEVA a V. M. GORLENKO. Rhodobaca barguzinensis sp. nov., a new alkaliphilic purple nonsulfur bacterium isolated from a soda lake of the Barguzin Valley (Buryat Republic, Eastern Siberia). *Microbiology* [online]. 2008, **77**(2), 206–218. ISSN 0026-2617. Dostupné z: doi:10.1134/S0026261708020148
- [49] HIGUCHI-TAKEUCHI, Mieko a Keiji NUMATA. Marine Purple Photosynthetic Bacteria as Sustainable Microbial Production Hosts. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2019, **7**. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2019.00258
- [50] KUMAR, Ashutosh, Anwar ALAM, Deeksha TRIPATHI, Mamta RANI, Hafeeza KHATOON, Saurabh PANDEY, Nasreen Z. EHTESHAM a Seyed E. HASNAIN. Protein adaptations in extremophiles: An insight into extremophilic connection of mycobacterial proteome. *Seminars in Cell & Developmental Biology* [online]. 2018, **84**, 147–157. ISSN 10849521. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcd.2018.01.003
- [51] MADIGAN, Michael T., Kelly S. BENDER, Sophia A. SANGUEDOLCE, Mary N. PARENTEAU, Marisa H. MAYER, Yukihiro KIMURA, Zheng-Yu WANG-OTOMO a W. Matthew SATTLEY. Genomic basis for the unique phenotype of the alkaliphilic purple nonsulfur bacterium Rhodobaca bogoriensis. *Extremophiles* [online]. 2023, **27**(2), 19. ISSN 1431-0651. Dostupné z: doi:10.1007/s00792-023-01304-4
- [52] KEMPER, Megan L. a Michael T. MADIGAN. Phylogeny and photoheterotrophy in the acidophilic phototrophic purple bacterium Rhodoblastus acidophilus. *Archives of Microbiology* [online]. 2012, **194**(7), 567–574. ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/s00203-012-0790-5
- [53] KEMPER, Megan L. a Michael T. MADIGAN. Phylogeny and photoheterotrophy in the acidophilic phototrophic purple bacterium Rhodoblastus acidophilus. *Archives of Microbiology* [online]. 2012, **194**(7), 567–574. ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/s00203-012-0790-5

- [54] MUNK, A. Christine, Alex COPELAND, Susan LUCAS, Alla LAPIDUS, Tijana Glavina DEL RIO, Kerrie BARRY, John C. DETTER, Nancy HAMMON, Sanjay ISRANI, Sam PITLUCK, Thomas BRETTIN, David BRUCE, Cliff HAN, Roxanne TAPIA, Paul GILNA, Jeremy SCHMUTZ, Frank LARIMER, Miriam LAND, Nikos C. KYRPIDES, Konstantinos MAVROMATIS, Paul RICHARDSON, Manfred ROHDE, Markus GÖKER, Hans-Peter KLENK, Yaoping ZHANG, Gary P. ROBERTS, Susan RESLEWIC a David C. SCHWARTZ. Complete genome sequence of *Rhodospirillum rubrum* type strain (S1T). *Standards in Genomic Sciences* [online]. 2011, **4**(3), 293–302. ISSN 1944-3277. Dostupné z: doi:10.4056/sigs.1804360
- [55] RANAWAT, Preeti a Seema RAWAT. Stress response physiology of thermophiles. *Archives of Microbiology* [online]. 2017, **199**(3), 391–414. ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/s00203-016-1331-4
- [56] RATZKE, Christoph a Jeff GORE. Modifying and reacting to the environmental pH can drive bacterial interactions. *PLOS Biology* [online]. 2018, **16**(3), e2004248. ISSN 1545-7885. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pbio.2004248

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AFM	Mikroskopie atomárních sil
PHA	Polyhydroxyalkanoáty
PHB	Polyhydroxybutyrát
<i>sc</i> PHA	short-chain-length PHA
<i>mc</i> PHA	medium-chain-length PHA
<i>lc</i> PHA	long-chain-length PHA
OD	Optická hustota (Optical density)
PLL	Poly-L-lysin
E	Youngův modul
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
QI	Kvantitativní zobrazování (Quantitative Imaging)
LB	Luria-Bertani
RPM	Otáčky za minutu (Rotations per minute)