



# 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

# ZAPOJENÍ POLYHYDROXYALKANOÁTŮ DO STRESOVÉ ODPOVĚDI TERMOFILNÍ BAKTERIE SCHLEGELELLA THERMODEPOLYMERANS

INVOLVEMENT OF POLYHYDROXYALKANOATES IN STRESS RESPONSE OF THERMOPHILIC BACTERIUM  
SCHLEGELELLA THERMODEPOLYMERANS

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

**Matyáš Berger**

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

**Ing. Eva Slaninová, Ph.D.**

**BRNO 2023**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1742/2022 Akademický rok: 2022/23  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Student: **Matyáš Berger**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: bez specializace  
Vedoucí práce: **Ing. Eva Slaninová, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Zapojení polyhydroxyalkanoátů do stresové odpovědi termofilní bakterie *Schlegelella thermodepolymerans*

### Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na téma stresová odpověď mikroorganismů s důrazem na termofilní bakterie
2. Zavedení a optimalizace postupu pro stanovení viability kultury *Schlegelella thermodepolymerans* pomocí průtokové cytometrie
3. Posouzení vlivu obsahu PHA na robustnost mikrobiálních buněk vůči vybraným stresorům
4. Využití elektronové mikroskopie ke studiu dopadu stresových podmínek na morfologii mikrobiálních buněk

### Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

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

-----  
Matyáš Berger  
student

Ing. Eva Slaninová, Ph.D.  
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřena na zkoumání vlivu rozdílných stresových faktorů na bakterii *Schlegelella thermodepolymerans*, která je schopná produkce polyhydroxyalkanoátů. V tomto případě ve formě poly(3-hydroxybutyrátu). Vybranými stresovými faktory byly teplotní šok, opakované zmrazení a rozmrazení. Posledním stresovým faktorem byl osmotický stres, vyvolaný roztoky chloridu sodného o různé koncentraci. V teoretické části byly charakterizovány polyhydroxyalkanoáty, termofilní organismy, mechanismy jednotlivých stresů a metody analýzy polyhydroxyalkanoátů.

V experimentální části byly porovnány dva kmeny termofilní bakterie *Schlegelella thermodepolymerans*, a to M 15344 a DSM 15344. Byla porovnána odolnost vůči stresu obou kmenů, měřením viability za pomoci metody průtokové cytometrie. Během měření byl sledován nárůst optické hustoty, a za pomoci GC-FID byl stanoven obsah P(3HB) v biomase. Morfologické změny způsobené stresy byly pozorovány pomocí metod elektronové mikroskopie Cryo-SEM a STEM. Kmen DSM 15344 vykazoval lepší růst a produkci P(3HB), než kmen M 15344, který naopak lépe odolával vystavenému stresu.

## KLÍČOVÉ SLOVA

Polyhydroxyalkanoáty, stresová odpověď mikroorganismů, termofilní mikroorganismy, *Schlegelella thermodepolymerans*, průtoková cytometrie

## **ABSTRACT**

This bachelor's thesis is focused on investigating the effect of different stress factors on the bacteria *Schlegelella thermodepolymerans*, which is capable of producing polyhydroxyalkanoates. In this case, in the form of poly(3-hydroxybutyrate). The selected stress factors were temperature shock, repeated freezing and defrosting. The last stress factor was osmotic stress, caused by sodium chloride solutions of different concentrations. In the theoretical part, polyhydroxyalkanoates, thermophilic organisms, mechanisms of individual stresses and methods of analysis of polyhydroxyalkanoates were characterized.

In the experimental part, two strains of the thermophilic bacteria *Schlegelella thermodepolymerans* were compared, namely M 15344 and DSM 15344. The stress resistance of both strains was compared by measuring viability using flow cytometry. During the measurement, the increase in optical density was monitored, and the content of P(3HB) in the biomass was determined using GC-FID. Morphological changes caused by stresses were observed using Cryo-SEM and STEM electron microscopy methods. The DSM 15344 strain showed better growth and P(3HB) production than the M 15344 strain, which, on the other hand, showed better stress resistance.

## **KEYWORDS**

Polyhydroxyalkanoates, stress response of microorganisms, termophilic microorganism, *Schlegelella thermodepolymerans*, flow cytometry

BERGER, Matyáš. *Zapojení polyhydroxyalkanoátů do stresové odpovědi termofilní bakterie Schlegelella thermodepolymerans* [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-05-22]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/148954>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Eva Slaninová.

## 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

Rád bych poděkoval vedoucí mé bakalářské práce Ing. Evě Slaninové, Ph.D. za její ochotný a vstřícný přístup, odborné vedení, trpělivost a čas. Dále bych chtěl poděkovat konzultantce Ing. Kateřině Mrázové za ochotu naučit mě novým dovednostem a za vřelý přístup při sepisování této práce. Také chci poděkovat všem ostatním členům laboratoře za ochotný a vřelý přístup.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	9
2.1	Polyhydroxyalkanoáty .....	9
2.1.1	Charakterizace .....	9
2.1.2	Rozdělení.....	9
2.1.3	Syntéza PHA .....	10
2.1.4	Využití PHA.....	11
2.1.5	Zapojení PHA do stresové odpovědi.....	12
2.2	Termofilní organismy .....	13
2.2.1	Charakterizace .....	13
2.2.2	Příklady termofilů produkujících PHA .....	13
2.2.3	Vybraní termofilní a mezofilní producenti PHA.....	14
2.3	Stresová odpověď mikroorganismů na vybrané faktory .....	15
2.3.1	Teplotní stres .....	15
2.3.2	Vystavení nízkým teplotám.....	16
2.3.3	Osmotický stres .....	17
2.4	Metody analýzy PHA .....	17
2.4.1	Průtoková cytometrie .....	18
2.4.2	Elektronová mikroskopie .....	18
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	21
3.1	Použité mikroorganismy.....	21
3.2	Použité chemikálie .....	21
3.3	Přístrojové vybavení.....	21
3.4	Kultivace bakterií .....	22
3.4.1	Příprava inokulačního média.....	22
3.4.2	Příprava a složení produkčního média .....	23
3.5	Použité metody .....	24
3.5.1	Stanovení optické hustoty spektrofotometricky.....	24
3.5.2	Gravimetrické stanovení obsahu biomasy.....	24
3.5.3	Příprava vzorku na stanovení P(3HB) pomocí plynové chromatografie	24
3.5.4	Měření viability pomocí průtokové cytometrie.....	25

3.5.5 Sledování morfologických změn buněk pomocí elektronové mikroskopie  
26

4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	28
4.1	Optimalizace fluorescenční sondy.....	28
4.2	Optimalizace vlivu promývání .....	28
4.3	Optimalizace vhodné kultury budoucí využití .....	29
4.4	Vliv vystavení stresovým podmínkám .....	31
4.4.1	Teplotní šok.....	31
4.4.2	Vliv opakovaného rozmrazování a zmražení .....	33
4.4.3	Osmotický stres .....	34
4.5	Vyhodnocení snímků z elektronové mikroskopie .....	36
5	ZÁVĚR .....	39
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	41
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	47

# 1 ÚVOD

V současné době je jednou z nejdůležitějších priorit ochrana životního prostředí. S ochranou životního prostředí je často spojena problematika nadměrného užívání plastů. Nejrozšířenější jsou petrochemické plasty, které jsou pro dobrou odolnost a nízkou cenu využívány v mnoha odvětvích. Kvůli širokému využití, nevhodnému nakládání s odpadem a netříděním odpadu k recyklaci se hromadí v přírodě, a zde tvoří ekologické riziko. Petrochemické plasty mají mnoho nevýhod, například nejsou biologicky rozložitelné a vyrábějí se z neobnovitelných zdrojů. Z těchto důvodů se hledají nová alternativní řešení, jednou z variant by mohlo být využití polyhydroxyalkanoátů.

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou polyestery hydroxyalkanových kyselin, které jsou produkovány některými druhy bakterií ve formě intracelulárních granulí, například termofilními bakteriemi. Tyto granule slouží v buňce jako zásobní zdroj uhlíku. Akumulace a následná degradace PHA usnadňuje bakteriím schopnost přežít, zvyšuje toleranci vůči stresu a zlepšuje kondici při měnících se podmínkách. Hlavní výhody PHA jsou biodegradabilita a biokompatibilita. Nicméně nevýhodou těchto látek oproti běžným plastům jsou zejména vysoké náklady, jejich řešením by mohlo být využití odpadních materiálů jako zdrojů uhlíku.

Termofilní organismy se zdají být slibnými producenty PHA, díky zvýšené teplotě kultivace jsou odolnější vůči kontaminaci mezofilními organismy, což snižuje nároky na sterilizaci. Kultivační proces termofilních bakterií je považován za energeticky účinnější, protože odpadá také potřeba chlazení.

Extrémní teploty mají negativní účinek projevující se na struktuře a biologické aktivitě mikroorganismů. Při dlouhodobém vystavení mikroorganismu určité formě stresu, dochází k rozvoji vlastního protektivního aparátu. Stres je funkční stav živého organismu, kdy je tento organismus vystaven mimořádným podmínkám. Aby mikroorganismus přežil i přes nepříznivé a proměnné podmínky musí umět rozpoznat různé změny prostředí a vhodně na ně zareagovat. Cílem stresové odpovědi je zachování homeostáze a zabránění poškození nebo smrti organismu. Mikroorganismy často reagují současně na celou řadu stresů a různé systémy stresových odpovědí spolu vzájemně interagují a tvoří komplex regulačních sítí.

Cílem práce bylo posoudit vliv schopnosti bakterií akumulovat PHA na odolnost vůči extrémním podmínkám.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Polyhydroxyalkanoáty

#### 2.1.1 Charakterizace

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou mikrobiální polyestery hydroxyalkanových kyselin, produkované zejména prokaryotami, s funkcí zásobních látek. V buňce jsou uchovávány ve formě intracelulárních granulí. Tyto granule mohou být někdy nazývány karbonosomy, jádro těchto útvarů je tvořeno polymery polyhydroxyalkanoátů. Na jejich povrchu najdeme bílkoviny, které zajišťují rozhraní mezi hydrofobními polymery a hydrofilní cytoplasmou buňky. Bylo také zjištěno, že tyto bílkoviny se účastní syntézy PHA, degradace PHA a také samotné regulace těchto procesů. PHA tvoří významnou součást prokaryot, může tvořit až devadesát procent sušiny buňky. Aktuální výzkumy nicméně ukazují, že tyto přírodní polyestery mají nezanedbatelný vliv na odolnost bakterií na různé formy stresových situací, kterým může být bakterie vystavena. Například ve formě náhlých změn osmotického tlaku, UV záření, nízké nebo vysoké teploty. Dokonce umožňují bakteriím přežít opakované zmrazování a rozmrazování. Přesto hlavní funkcí polyhydroxyalkanoátů v buňce je zásobárna energie a uhlíku. Dále se účastní vzniku symbiózy mezi rostlinami a prokaryotami, nebo mezi hmyzem a prokaryotami [1].

Pro člověka jsou tyto látky zajímavé tím, že by se mohli v budoucnu stát vhodnou náhradou za petrochemické polymery, které tvoří základ většiny dnešních plastů. Oproti petrochemickým polymerům jsou biodegradabilní, biokompatibilní a obnovitelné [1].

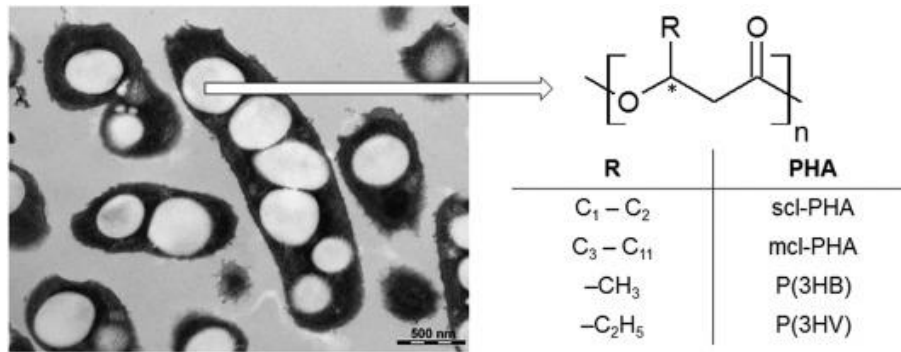
Polyhydroxyalkanoáty lze získat z některých druhů bakterií, na rozdíl od syntetických polymerů, které jsou často získávány z fosilních paliv. Významnými producenty PHA jsou například *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis*, *Cuprivadus necator*, *Pseudomonas mendocina* a *Alcaligenes latus*, které jsou pěstovány za kontrolovaných podmínek. Vlastností PHA je odbourávání za fyziologických podmínek do metabolitů jako 3-hydroxybutyrát a hydroxyacyl koenzym A. Tento proces je důvodem, proč jsou PHA biokompatibilní a schopné bioresorbce, což jim umožňuje jednoduché včlenění do biologického systému [2].

Granule polyhydroxyalkanoátů produkované bakteriemi se mohou lišit uspořádáním a obsahem na základě typu producenta, který je vytváří. Struktura samotných polyhydroxyalkanoátů je ovlivněna několika faktory, jako zdrojem uhlíku, mikrobiálním kmenem a fermentačním procesem. Díky vlivu těchto faktorů je možné ovlivnit strukturu požadovaného polyhydroxyalkanoátu. Přestože, mají polyhydroxyalkanoáty mnoho výhod, jejich nevýhodou je vysoká cena, která je hlavně způsobena vysokými pořizovacími náklady materiálu. V tomto případě zdroj uhlíku, a následným zpracováním [3].

#### 2.1.2 Rozdělení

Polyhydroxyalkanoáty se dělí podle délky postranního řetězce na dvě základní skupiny (Obrázek 1). Do první skupiny patří polymery obsahující postranní řetězec o délce tří až pěti atomů uhlíku, nazývají se short-chain-length PHA, zkráceně scl-PHA. První dokumentované pozorování granulí tvořených PHA pochází z roku 1926, kdy byly u bakterie *Bacillus*

*megaterium* zjištěny granule poly(3-hydroxybutyrátu), zkráceně P(3HB) nebo PHB. Přestože tvorba PHA byla od objevu tohoto významného zástupce skupiny scl-PHA, zjištěna u řady dalších prokaryot, zůstává P(3HB) nejběžnějším a nejlépe prostudovaným zástupcem polyhydroxyalkanoátů. Polymery s postranním řetězcem obsahujícím šest až čtrnáct atomů uhlíku se nazývají medium-chain-length PHA, zkráceně mcl-PHA [4].



**Obrázek 1:** Rozdělení polyhydroxyalkanoátů [3]

Scl-PHA je možné popsat jako krystalické, tuhé, křehké materiály s vysokou teplotou tání a termoplastickými vlastnostmi. Tento typ je nejrozšířenějším typem PHA mezi prokaryotami. Mcl-PHA jsou elastické, méně krystalické látky pevné v tahu s nižší teplotou tání než látky scl-PHA. Syntézy tohoto typu PHA jsou schopny jen některá prokaryota, například bakterie *Pseudomonas*. U některých bakterií se můžeme setkat s kopolymerem sestávajícího ze scl-PHA i mcl-PHA. *Aeromonas hydrophila* a *Aeromonas caviae* jsou příklady bakterií schopných syntézy tohoto kopolymeru PHA [1].

Tepelné a mechanické vlastnosti polyhydroxyalkanoátů lze měnit vytvářením kompozitů nebo směsí tvořených scl-PHA i mcl-PHA. Další možností úpravy je vytvoření kovalentně vázaných kopolymerů, čehož lze dosáhnout změnou zdroje substrátu během produkce [2].

PHA tvoří buď homopolyestery, které se skládají z jednoho typu monomeru, nebo heteropolyestery. Heteropolyestery se dají dále dělit na kopolyestery, jejichž monomery se liší hlavním nebo postranním řetězcem, a na terpolyestery, které se skládají z monomerů lišících se jak základním řetězcem, tak i postranním řetězcem [5].

### 2.1.3 Syntéza PHA

Biosyntéza granulí PHA probíhá v momentě, kdy má prokaryota přebytek uhlíku a dalších složek potřebných k tvorbě biomasy. Takto uložený uhlík je zužitkován v momentě, kdy je okolní prostředí na tento prvek chudé. Schopnost produkce PHA můžeme najít u množství mikroorganismů, jako jsou gram pozitivní a gram negativní bakterie. Ale i u organismů nazývaných archea, které můžeme dělit na aerobní, anaerobní, autotrofní, heterotrofní a fototrofní, můžeme nalézt možnost produkovat PHA. Lze tedy usoudit, že schopnost syntézy PHA je jedna z nejběžnějších a nejlépe fungujících mikrobiálních strategií, jak se vypořádat s nevhodnými přírodními podmínkami [4].

Na základě složení podjednotek a preferovaném substrátu můžeme PHA syntázy dělit do čtyř tříd. První třída zahrnuje enzymy s jedinou podjednotkou, označenou PhaC, preferující tvorbu

scl-PHA monomerů. Charakteristickým zástupcem této třídy je *Cuprivus necator*. Druhá třída zahrnuje také enzymy s jednou podjednotkou, PhaC1 nebo PhaC2, na rozdíl od první třídy preferují tyto enzymy tvorbu mcl-PHA monomerů. Tento typ syntézy je běžný mezi rodem bakterií *Pseudomonads*. Dvě podjednotky jsou typické pro syntázy třetí třídy, pro správné fungování enzymu jsou potřebné obě PhaC a PhaE podjednotky. Tento typ můžeme nalézt u *Allochromanium vinosum*. Poslední třída je typická enzymy s podjednotkami PhaC a PhaR. Tento typ je rozšířený mezi *Bacilli* a jejich podobnými druhy. Unikátní vlastností tohoto typu je přítomnost alkoholu, kdy podjednotka katalyzuje alkoholové štěpení řetězce PHA. Tohoto procesu lze využít k modifikaci karboxylového konce a následnému začlenění aktivních skupin, což může být výhodné pro další funkce či modifikace polymeru. Toto rozdělení do čtyř tříd prochází v současné době úpravou, protože nově objevené PHA syntázy nezapadají ani do jedné třídy. Do nově vznikající třídy lze zařadit nově objevené syntázy izolované z antarktických bakterií [1].

Substrát pro syntézu PHA je získáván třemi různými způsoby a katalyzován třemi specifickými enzymy. První cesta je katalyzována  $\beta$ -ketothiolázou, která vede ke kondenzaci dvou molekul acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-CoA. Poté následuje redukce acetoacetyl-CoA za pomoci NADPH-dependentní acetoacetyl-CoA dehydrogenázy. Působením poly(3-hydroxybutyrát) syntázy dochází k polymerizaci monomerů (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA na poly(3-hydroxybutyrát). Další cestou produkce PHA, kterou se vydaly některé bakterie jsou sekundární mechanismy jako de-novo syntéza z mastných kyselin a dráha spojená s methylmalonyl-CoA. U několika zástupců třídy  $\alpha$ -Proteobacteria byly nalezeny geny PhaA a PhaB, které jsou zapojené do obnovy glyoxylátu. Studiemi bylo prokázáno, že mnohé termofilní bakterie produkující PHA patří do třídy  $\alpha$ -Proteobacteria. Z toho lze usoudit, že tyto geny jsou zodpovědné za produkci PHA u termofilních bakterií [3].

Pro syntézu PHA heteropolyesterů se typicky využívají substráty strukturně příbuzné požadovaným monomerům. Příkladem může být začlenění monomerů 3-hydroxyvalerátu (3HV) do krystalické matrice homopolyesteru poly(3-hydroxybutyrátu). Příklady těchto látek jsou propionát nebo valerát, kyselina levulová nebo produkty ozonolýzy mastných kyselin. Pro přípravu 4-hydroxybutyrátu, který tvoří jedinou důležitou achirální složku PHA, byly využity prekurzory strukturně související s 4HB, jako je  $\gamma$ -butyrolakton. Mezi produkčními kmeny můžeme najít výjimky jako je *Haloferax mediterranei*, které jsou schopné produkce 3HV, i ze zdrojů jako je cukr nebo glycerol [5].

#### 2.1.4 Využití PHA

Díky tomu, že polyhydroxyalkanoáty mají užitečné vlastnosti, jako jsou biodegradabilita, biokompatibilita a s tím související netoxický charakter, jsou do budoucna považovány za možnou náhradu za petrochemické polymery. Během posledních let vzbudily polyhydroxyalkanoáty zájem některých firem, které je začaly využívat v biomedicíně, zemědělství a jako obalový materiál. PHA byly prokazatelně využity jako lahve od šampónů, bariéry proti vlhkosti v hygienických produktech nebo suroviny pro výrobu latexových barev. Mohou být také využity jako nosiče pro dlouhodobě uvolňované insekticidy nebo herbicidy. Vzhledem ke svým vlastnostem jsou PHA slibné materiály zejména při použití v biomedicíně.

Ať už jako materiály pro výrobu kardiovaskulárních produktů například srdečních chlopní, stentů a cévních štěpů. Jako nosiče léčiv ve formě tablet nebo mikronosiče při protinádorové terapii. Ve formě stehů, nervových manžet a tampónů během ošetřování ran. V ortopedii jako kostní ploténky a implantáty v páteři [6,7].

Přestože výroba biologicky rozložitelných obalových materiálů, např. pro potravinářský sektor, je považována za prioritní oblast aplikace PHA a souvisejících produktů, její využití v lékařství, potažmo v chirurgické, farmaceutické a terapeutické oblasti je silně se rozvíjející se obor s velkým potenciálem [8,9,10].

Tyto progresivní aplikace PHA pomáhají překonat jejich hlavní překážku, která brání širokému pronikání na trh, a to problémy s vysokými náklady. Náklady jsou faktorem zásadního významu pro komerční využití polymerů z obnovitelných zdrojů pro aplikaci ve velkém měřítku, například jako obalový materiál. Pokročilé lékařské aplikace, jako jsou stehy, zařízení pro regeneraci tkání, kardiovaskulární stehy, nosiče léčiv na bázi polymerů pro řízené uvolňování léčiv a další, otevírají dveře pro ekonomicky proveditelnou implementaci termoplastických materiálů na biologické a biodegradabilní bázi. Tyto specializované produkty jsou primárně posuzovány z hlediska materiálových vlastností, a teprve následně z hlediska výrobních nákladů [11].

PHA však stále vykazují nedostatky ve svých materiálových vlastnostech, jako je průměrná mechanická stabilita, nevhodná rychlost biodegradace nebo příliš vysoký či naopak příliš nízký stupeň krystalinity. Proto vývoj pokročilých procesů produkce PHA, které se stále více uchylují k metabolickému či genetickému inženýrství a syntetickým biologickým přístupům, je neustále doprovázen vytvářením nových kompozitních materiálů, které obsahují PHA v kombinaci s dalšími kompatibilními organickými nebo anorganickými materiály. Výsledné produkty, které obsahují směsi a kompozity různého složení, mohou zlepšit mechanické vlastnosti, rychlost biodegradace nebo spouštět biologickou aktivitu [12,13,14,15,16].

### **2.1.5 Zapojení PHA do stresové odpovědi**

Obecně se předpokládá, že polyhydroxyalkanoáty jsou v bakteriální říši jeden z nejrozšířenějších typů zásobních materiálů. Polyhydroxyalkanoáty usnadňují bakteriím s možností jejich akumulace, přežití ve stresových podmínkách [17,18].

U antarktického bakteriálního kmene *Pseudomonas* byla pozorována odolnost vůči mrazu, a to za podmínek kdy kultura akumulovala PHB a za podmínek, kdy jej neakumulovala. Kultura, která akumulovala PHB, měla výrazně zvýšenou odolnost vůči mrazu [19].

Oproti tomu však ve studii Sardesai a Babu testovali bakteriální kmen *Rhizobium* DDSS69 a dospěli k závěrům, že při stresu způsobeném nízkou teplotou dochází k poklesu hladiny PHB, ale že to nesouvisí se stresovou odpovědí, a schopnost produkovat PHB tedy není zodpovědná za odolnost bakterie vůči mrazu. Snížené množství intracelulárního PHB bylo způsobeno inhibicí biosyntézy PHB a zvýšením jeho rozpadu [20].

Zhao a tým výzkumníků ve svých experimentech porovnávali divoký kmen *Aeromonas hydrophila* 4AK4, produkujícího kopolyestery skládající se z 3-hydroxybutyrátu

a 3-hydroxyhexynoátu, a mutantní kmen *Aeromonas hydrophila* CQ4 s narušenou PhaC-syntázou. *Aeromonas hydrophila* 4AK4 poskytovala lepší rezistenci proti celé řadě přírodních stresových faktorů včetně vysokých teplot, působení mrazu, peroxidu vodíku, UV záření, ethanolu a vysokému osmotickému tlaku v porovnání s kmenem neschopným produkce PHA [21].

## 2.2 Termofilní organismy

### 2.2.1 Charakterizace

Teplota je jednou z nejdůležitějších proměnných v našem prostředí. Pro každý organismus existuje určitý užitečný teplotní rozsah, ve kterém je schopen růstu a rozmnožování. Proto jednou z klasifikací živých organismů je jejich vztah k teplotě. Mikroorganismy lze z toho hlediska rozdělit do tří základních skupin, a to na psychofilní, mezofilní a termofilní (Tabulka 1) [22].

Tabulka 1: Rozdělení mikroorganismů podle teploty [23]

Třída	Optimální teplota růstu [°C]	Zástupce
Psychrofilny	< 20	<i>Bacillus globisporus</i> <i>Micrococcus cryophilus</i>
Mezofily	20–40	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Bacillus subtilis</i>
Termofily	45–65	<i>Clostridium thermocellum</i> <i>Bacillus stearothermophilus</i>
Extrémní termofily	> 70	<i>Thermus aquaticus</i> <i>Bacillus caldotenax</i>

Obecně lze organismy s teplotou > 50 °C nazývat termofilními. Termofilní mikroorganismy se dají dále dělit na extrémně termofilní, které mají optimální teplotu růstu do 80–85 °C. A také na hypertermofilní, které mohou růst při teplotách nad 80 až 85 °C. Hypertermofilní organismy můžeme nalézt v extrémně horkém prostředí, spojeném s geotermální a vulkanickou činností, jako jsou gejzíry, horké prameny, ropné nádrže nebo hlubokomořské hydrotermální průduchy. Psychofilní mikroorganismy mají optimální teplotu růstu kolem 15 °C a nižší, proto byl jejich výskyt zaznamenán hlavně v polárních oblastech, ledovcích a oceánských hlubinách. U mezofilních mikroorganismů můžeme pozorovat optimální teplotu růstu v rozmezí 20–45 °C, mohou být izolovány z půdy, ale také z vodního prostředí [22,24,25,26].

### 2.2.2 Příklady termofilů produkujících PHA

Mikroorganismy produkující PHA jsou v přírodě široce rozšířeny, hlavně u bakterií žijících v půdě, ale také v mořích nebo v některých extrémních prostředích. PHA tedy syntetizuje široká škála gram-pozitivních i gram-negativních bakterií v aerobním a anaerobním prostředí.

Většina těchto producentů PHA se řadí k rodům *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Methylothermus*, *Azotobacter* a *Rhodospirillum* [8]. Mezi termofilní bakterie, které jsou schopny syntetizovat PHA řadíme i *Aneurinibacillus*, který byl izolován z ropného pole v Číně. Jeho optimální teplota pro růst je okolo 55 °C. Termofilní bakterie *Thermus thermophilus* HB8 je schopna využít laktózu z médií na bázi syrovátky k biosyntéze heteropolymeru, který se skládá z 3-hydroxyvalerátu, 3-hydroxyheptanoátu a 3-hydroxyundekanoátu. Mezi gram-negativní bakterie schopné produkce PHA při zvýšených teplotách řadíme rod *Chelatococcus*. Pro tento rod je optimální teplota růstu okolo 50 °C [27,28,29].

### 2.2.3 Vybraní termofilní a mezofilní producenti PHA

#### 2.2.3.1 *Schlegelella thermodepolymerans*

*Schlegelella thermodepolymerans* byla poprvé izolována v roce 2003, jako termofilní bakterie schopná degradovat poly(3-hydroxybutyrát) a také kopolymery obsahující 3-hydroxybutyrát a 3-merkaptopropionát spojené thioesterovými vazbami. Pojmenována byla na počest H. G. Schlegela, průkopníka výzkumu PHA. Byla popsána jako gramnegativní aerobní bakterie, tyčinkovitého tvaru netvořící spory. Optimální teplota růstu je kolem 50 °C, přičemž teplotní rozsah pro růst je mezi 37 °C a 60 °C. Fylogeneticky patří rod do  $\beta$  – podtřídy Proteobakterií. Buňky *Schlegelella thermodepolymerans* lze charakterizovat jako 1,0–2,8  $\mu\text{m}$  dlouhé a 0,5–0,6  $\mu\text{m}$  široké, pohyb buněk je zajištěn pomocí polárního monotrichálního bičíku. Rozsah pH pro růst je 6 až 9, s optimem při pH 7 [30].

*Schlegelella thermodepolymerans* je schopná nejen degradace, ale i syntézy P(3HB). Za nejvhodnější zdroj uhlíku je považována xylóza. Optimální kultivační teplota pro produkci PHA byla experimentálně stanovena na 55 °C. U bakterie byla dále zkoumána schopnost diauxie, což je schopnost buňky ze dvou zdrojů uhlíku vybrat ten výhodnější, a po jeho vyčerpání zpracovat i méně výhodný zdroj. Během experimentu byla bakterii dodána jako zdroj uhlíku směs xylózy a glukózy. Nejdříve bakterie spotřebovávala xylózu rychlostí 0,19 l/h a glukózu rychlostí 0,03 l/h. Avšak po 48 hodinách kultivace klesla koncentrace xylózy na takovou úroveň, že bakterie začala preferovat glukózu s rychlostí spotřeby 0,17 l/h, rychlost konzumace xylózy klesla na 0,06 l/h [31].

Během posledního experimentu byla zkoumána možnost zavedení 3-hydroxyvalerátu (3HV) a 4-hydroxybutyrátu (4HB) do polymerního řetězce. Ze zkoumaných prekurzorů 3HV, byla jako nejlepší vyhodnocena kyselina valerová. Na druhou stranu kyselina valerová fungovala jako inhibitor růstu bakterií. V závěru byla schopnost *Schlegelella thermodepolymerans* produkovat poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát) vyhodnocena jako nedostačující [31].

#### 2.2.3.2 *Cupriavidus necator* H16

Jako *Schlegelella thermodepolymerans* tak i *Cupriavidus necator* H16 patří do  $\beta$  – podtřídy Proteobakterií. Tato bakterie je brána jako modelový organismus pro studium syntézy polyhydroxyalkanoátů [32].

V literatuře se můžeme setkat s dalšími názvy této bakterie, jako jsou *Hydrogenomonas eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*, *Wautersia eutropha*, a *Ralstonia eutropha*. Schopnost

akumulovat velké množství P(3HB), a to až do množství, které tvoří 90 % hmotnosti sušiny, dělá tuto bakterii vhodným modelovým organismem pro studium produkce PHA [33], [34].

Další užitečná vlastnost bakterie *Cupriavidus necator* H16 je její schopnost využívat široké množství sloučenin jako zdroj uhlíku. Například cukry, amino cukry, oxid uhličitý, mastné kyseliny, rostlinné oleje, živočišné tuky, glycerol a fenolické sloučeniny. U divokého kmene této bakterie *Cupriavidus necator* H16 byla prokázána neschopnost konzumace laktózy či glukózy. Nízké substrátové specifity je dosaženo přeměnou různých zdrojů uhlíku na acetyl-CoA, který je poté přeměněn na P(3HB) [32,35,36,37].

## **2.3 Stresová odpověď mikroorganismů na vybrané faktory**

Bakterie v přírodě jsou vystaveny množství proměnlivých faktorů například změnám teplot, změnám dostupnosti živin a vody a přítomnosti toxických látek, které se mohou vyskytovat ve vnějším prostředí, ale i ve formě produktů jejich vlastního metabolismu. Pro přežití v tomto měnícím se prostředí si bakterie vytvořily řadu adaptivních reakcí, které jim umožňují přežít. Bakteriální reakce vede ve většině případů k transkripční aktivaci genů, jejichž produkty se vyrovnávají s daným fyzikálně-chemickým stresem. Specifické signály, jako jsou environmentální a buněčné signály vyvolávají reakci genových regulátorů ve formě stimulace nebo inhibice transkripce, translace nebo jiného děje v genové expresi, takže rychlost syntézy genových produktů je vhodně modifikována [37].

### **2.3.1 Teplotní stres**

Při vystavení zvýšené teplotě je pro přežití buňky rozhodující citlivost proteinů a enzymů na tepelnou inaktivaci a denaturaci. V případě vystavení teplotnímu stresu, který není pro buňku smrtící dochází ke třem různým formám buněčné odezvy. První chrání buňky a organismy před vážnými poškozeními, druhá umožňuje obnovení běžných buněčných a fyziologických aktivit, poslední třetí vede ke zvýšení termotolerance [38].

Před účinky tepelného stresu chrání buňku adaptivní mechanismy. Na molekulární úrovni je tepelný šok přechodný proces změny v buněčných aktivitách, které se vyznačují syntézou HSP (heat-shock proteins) a ovlivněním standardní syntézy proteinů. HSP patří mezi molekulární chaperony, které jsou charakteristické schopností rozpoznávat a vázat substrátové proteiny, které jsou v neaktivním nebo nestabilním stavu. Všechny buněčné proteiny musí alespoň jednou za svůj život interagovat s chaperony, například během procesů jako je syntéza nebo degradace [38].

Mezi nejčastější HSP patří chaperony, například DnaK a GroEL, a dále ATP-závislé proteázy. Tyto látky mají důležitou roli při skládání, transportu a opravě proteinů za stresových a nestresových podmínek. Bakterie si vyvinuly transkripční kontrolní mechanismus heat-shock genů, které regulují hladinu HSP za pomoci různých strategií, aby byl při vystavení buňky teplotnímu nebo jinému stresu zajištěn maximální růst a přežití [39].

### 2.3.2 Vystavení nízkým teplotám

Změnami teploty se mění fluidita membrány, flexibilita proteinů a konformace nukleových kyselin. V bakteriálních buňkách dochází po chladovém šoku k modifikacím, které pomáhají zajistit optimální fluiditu membrány. Například u *Escherichia coli* zvýšením stupně nenasycení u proteinu A, který je adaptovaný na chlad. U *Bacillus subtilis* dochází ke změnám v profilu rozvětvených mastných kyselin a zvýšení hladiny desaturázy. Pokud dojde ke snížení teploty na 15 °C, přestanou buňky *Escherichia coli* růst a dojde k potlačení syntézy většiny proteinů. Při chladovém šoku se syntéza asi 15 proteinů zvyšuje. Jedním z těchto proteinů je i CspA, což je hlavní protein studeného šoku (CSP), který představuje až 10 % celkové syntézy proteinů. CspA a další CSP patří mezi hlavní proteiny zapojující se do teplotního šoku, které byly zatím objeveny [37].

Během zmrazování a rozmrazování jsou buňky vystaveny změnám teploty, obsahu vody, změně skupenství vody a koncentrace rozpuštěných látek. Bylo zjištěno, že tepelné, mechanické a biochemické děje během stresu způsobeného během zmrazení a rozmrazení, stejně jako následné poškození jsou závislé na rychlosti ochlazení a ohřívání, konečné teplotě, době zmrazování a na složení média [40].

Při ochlazení buněčné suspenze na teploty pod 0 °C, dochází z počátku k podchlazení média i buněk. Tvorba extracelulárních ledových krystalů předchází intracelulárnímu zmrazení a je určena bodem tuhnutí média a přítomností činidel podporujících tvorbu ledových krystalů (nukleátory). Na základě osmotické koncentrace se předpokládá, že bod tuhnutí cytoplazmy bude vyšší než -2 °C. Intracelulární prostor obvykle nezamrzá, dokud nedosáhne teploty -5 °C až -10 °C. Tento jev lze vysvětlit tak, že buněčná membrána brání prorůstání extracelulárního ledu do nitra buňky a samotná buňka zřejmě neobsahuje nukleátory, které by iniciovaly vznik intracelulárních krystalů ledu [40,41].

Po zmrazení externího prostředí a přechlazením vnitřního prostředí dochází ke vzniku chemického gradientu pro volnou vodu mezi extracelulárním médiem obsahujícím led a intracelulární přechlazenou vodou. Tento nestabilní stav může být vyřešen buď odtokem vody nebo zamrznutím intracelulárního prostoru. Při pomalém ochlazení vznikají ledové krystaly zejména extracelulárně a odtok vody je dostatečný pro obnovení chemické rovnováhy a minimalizaci intracelulárního přechlazení. Při rychlém ochlazení dochází k rozsáhlému intracelulárnímu přechlazení, což vede ke vzniku chemického gradientu, který je nakonec eliminován zmrazením intracelulární vody. Hlavními faktory, které určují kritickou rychlost ochlazování, při které dochází ke vzniku intracelulárních ledových krystalů, jsou zejména poměr objemu k povrchu buňky a schopnost propouštět vodu. Nižší kritickou rychlost chlazení mají větší, kulovité buňky a buňky méně propustné pro vodu [40,42].

Dokud nezačne tvorba extracelulárních ledových krystalů a trvá přechlazení média, ve kterém jsou buňky suspendovány, buňky jsou vystaveny pouze poklesu teploty. Za těchto podmínek bylo hlášeno poškození buněčných struktur a inhibice buněčných funkcí, zdá se však, že životaschopnost buněk je sotva ovlivněna, z čehož lze usoudit, že pokles teploty sám o sobě není nijak zvlášť pro buňky škodlivý [40].



Když dojde ke vzniku extracelulárních ledových krystalů, jsou buňky zachyceny mezi ledovými krystaly, a jsou vystaveny mechanickému a adheznímu namáhání. Intracelulární poškození způsobené pronikáním ledových krystalů buněčnými strukturami se stále studuje, a není jednoznačně popsán mechanismus tohoto procesu. Kromě toho bylo pozorováno vytváření elektrických polí a plynových bublin, což způsobuje poškození buňky v důsledku destabilizace a mechanického poškození membrán [43,44].

Nejenom tvorba intracelulárních krystalů, ale i odtok vody jsou spojeny s poškozením plazmatické membrány a buněčné stěny. Elastické vlastnosti buněk nejsou neomezené. Buňky jsou schopny se zmenšit bez poškození pouze do určitého objemu. Poškození membrány je pro buňku považováno za škodlivější než poškození stěny. Intracelulární ledové krystaly mohou protrhnout plazmatickou membránu, což má za následek uvolnění buněčných složek do prostředí [40,44].

### 2.3.3 Osmotický stres

Mezi nejčastější stresové faktory životního prostředí patří změna osmolarity. Z tohoto důvodu si skoro všechny prokaryotické mikroorganismy vyvinuly mechanismy, které jim pomáhají zvládat následky osmotického stresu. Schopnost akumulovat PHA zvyšuje odolnost nehalofilních bakterií vůči osmotickému stresu. Velké množství halofilů vykazujících schopnost biosyntézy PHA dokazuje vliv PHA ke zvýšení odolnosti bakteriálních buněk vůči osmotickému stresu [4,45].

U *Cupriavidus necator* H16 zabránila přítomnost granulí PHA masivní plazmolýze. Analýza buněk pomocí transmisní elektronové mikroskopie odhalila schopnost granulí PHA částečně opravit a stabilizovat buněčné membrány ucpáním malých mezer vzniklých během plazmolýzy. Pokud dojde k plazmolýze v blízkosti granulí PHB, granule byly schopny influxu do periplazmatického prostoru. Díky svým vlastnostem podobným kapalině mohou částečně ochránit membrány před osmotickým šokem. Úroveň dehydratace a kolísání intracelulární hodnoty pH byly nižší u kultury schopné biosyntézy PHA. U mutantního kmene neakumulujícího PHA došlo vlivem osmotického šoku k masivní plazmolýze, která vedla k poškození cytoplazmatické membrány a uvolnění cytoplazmatického obsahu [4].

## 2.4 Metody analýzy PHA

Metody detekce a analýzy intracelulárního mikrobiálního PHA jsou užitečné při identifikaci nových mikrobů produkujících PHA nebo pro rutinní monitorování bio-procesů produkce PHA. Jsou dostupné různé metody, které detekují PHA nebo kapacitu produkce PHA u mikrobů. Tyto metody zahrnují barvení kolonií/buněk, detekci genu polymerázové řetězové reakce (PCR) a transmisní elektronovou mikroskopii (TEM) [46].

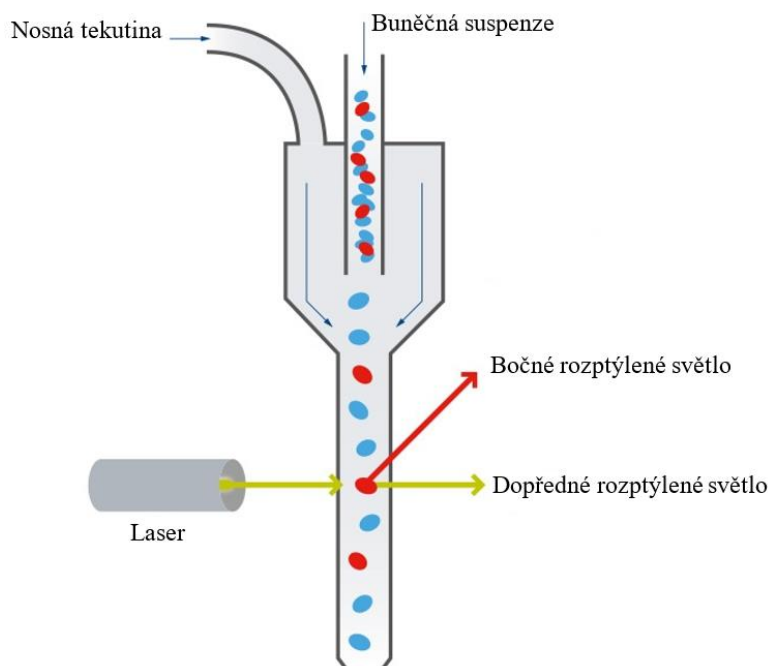
Barvení buněk a detekce genů se často využívají jako prvotní metody pro screening a identifikaci nových mikrobů s potenciálem produkce PHA, hlavně díky relativně snadné přípravě vzorku a krátké době analýzy. Na druhé straně transmisní elektronová mikroskopie umožňuje přímou vizualizaci PHA, které se zobrazuje jako intracelulární granule. Jednou z nevýhod je časová a finanční náročnost přípravy vzorku, proto tato metoda není vhodná pro účely screeningu [46].

### 2.4.1 Průtoková cytometrie

Široce používanou metodou pro rychlou analýzu buněk je průtoková cytometrie. Umožňuje simultánní multiparametrovou analýzu jednotlivých buněk, charakterizaci a definování různých typů buněk v heterogenní buněčné populaci a analýzu velikosti a objemu buněk. Používá se převážně k měření intenzity fluorescence produkované fluorescenčními sondami, detekujícími proteiny nebo ligandy vážící se na specifické molekuly v buňce [47].

Buněčná suspenze prochází cytometrem za pomoci nosné tekutiny. Tato nosná tekutina se využívá k hydrodynamickému zaostření buněčné suspenze přes malou trysku. Nepatrný proud tekutiny následně strhává buňky podél laserového světla jednu po druhé (Obrázek 2) [47].

Buňky procházející laserovým paprskem způsobují rozptyl světla, který je detekován. Detektor před světelným paprskem měří dopředný rozptyl (FS) a detektory umístěné po stranách měří boční rozptyl (SS). Fluorescenční detektory měří fluorescenci vyzařovanou z pozitivně obarvených buněk. Dopředný rozptyl koreluje s velikostí buněk, zatím co boční rozptyl je úměrný granularitě buněk. Tímto způsobem lze rozlišit populace buněk na základě jejich velikosti a granularity. Dopředné a boční rozptýlené světlo a fluorescence z obarvených buněk jsou rozděleny do definovaných vlnových délek a vedeny sadou filtrů a zrcadel v průtokovém cytometru. Filtrace fluorescenčního světla se provádí, aby každý senzor detekoval fluorescenci o stanovené vlnové délce. Tyto senzory se nazývají fotonásobiče (PMT) [47].



Obrázek 2: Průtoková cytometrie [47]

### 2.4.2 Elektronová mikroskopie

Elektronové mikroskopy jsou optické přístroje, které světelný svazek nahradily elektrony urychlené elektrickým polem. Pro omezení interakcí elektronů s atmosférou, jsou pozorovaný vzorek i svazek elektronů umístěny ve vakuu. Hlavní charakteristikou mikroskopů je mezní rozlišovací schopnost, která je úměrná vlnové délce použitého záření. Elektronové záření má

kratší vlnovou délkou ( $\sim 0,01\text{--}0,001\text{ nm}$ ), než má viditelné světlo ( $400\text{--}700\text{ nm}$ ). Z toho plyne, že elektronová mikroskopie umožňuje dosáhnout mnohem vyššího rozlišení [48].

#### 2.4.2.1 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

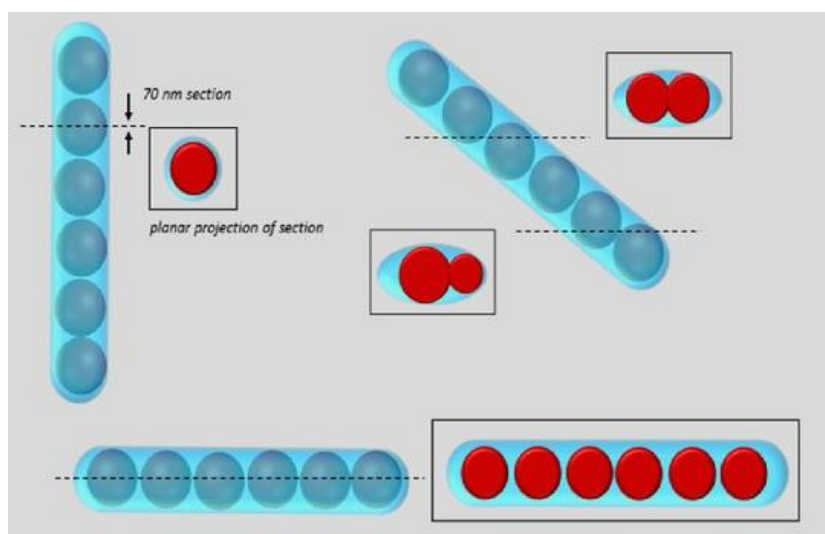
Skenovací elektronová mikroskopie je využívána pro analýzu povrchů vzorků. Skenovací elektronový mikroskop využívá sekundární elektrony, což jsou elektrony vyražené z excitačního objemu po dopadu primárního svazku na vzorek. Na rozdíl od transmisního elektronového mikroskopu, který využívá prošlé elektrony.

Principem je, že na vzorek dopadá tenký svazek elektronů, který interaguje se vzorkem. Odražené (emitované) elektrony se následně převádí na viditelný obraz. K vytvoření obrazu se používají sekundární a zpětně odražené elektrony. Sekundární elektrony hrají roli při detekci morfologie a topografie vzorku, zatímco zpětně odražené elektrony znázorňují kontrast ve složení prvků vzorku [48,49].

#### 2.4.2.2 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Transmisní (prozařovací) elektronová mikroskopie poskytuje informace o morfologické, strukturní a chemické úrovni jednotlivých buněk. Oproti skenovací elektronové mikroskopii je u této metody složitější příprava vzorků. Důležité je, aby byl vzorek dostatečně tenký ( $10\text{--}500\text{ nm}$ ), aby byl zajištěn průchod elektronů. Také musí být pozorovaný objekt umístěn ve vakuu, což není možné při pozorování živých organismů. Výsledný obraz se vytváří na fluorescenčním stínítku pokrytém lumiforem, pomocí svazku elektronů, které prošly vzorkem nebo které ve vzorku difraktovaly [48,50,51].

Pomocí transmisní elektronové mikroskopie pozorujeme morfologii buněk obsahujících PHA, počet granulí v bakteriálních buňkách, jejich velikost a lokalizace v buňce. Spolehlivost výsledků transmisní elektronové mikroskopie závisí na pozicích buněk v místě, kde byl veden tenký řez (*Obrázek 3*). Pouze v případě buněk a granulí, kdy byl řez veden přesně středem, lze určit průměry. Bez statické analýzy nejsou získané snímky ideální pro vyhodnocení velikosti a tvaru bakteriálních buněk a granulí PHA [52].



**Obrázek 3:** Vliv vedení řezu na pozorování morfologie [52]

#### **2.4.2.3 Kryo-skenovací elektronová mikroskopie (Cryo-SEM)**

Kryo-skenovací elektronová mikroskopie umožňuje pozorování vzorků obsahujících kapalinu ve zmrazeném stavu. U jiných metod SEM by došlo vlivem vysokého vakua k okamžitému odpaření kapaliny. V této metodě je vzorek zmrazen, nejčastěji za použití tekutého dusíku, a uchováván při nízké teplotě i v samotném mikroskopu. Díky zmrazení dochází k zachování původní struktury vzorku [53].

#### **2.4.2.4 Skenovací transmisní elektronová mikroskopie (STEM)**

Spojení technik SEM a TEM se nazývá STEM. Při TEM dochází k ozáření celého povrchu vzorku, ke vzniku obrazu tedy dochází v jednom okamžiku. U STEM je elektronový svazek zaměřen na konkrétní místo, a za pomoci detektoru umístěného pod vzorkem se určuje intenzita prošlých elektronů. Obraz je získáván postupně, protože elektronový svazek analyzuje bod po bodu. Při měření detekujeme dva oddělené signály. První je způsoben elektrony, které projdou přímo vzorkem, a druhý elektrony odchýlenými od své dráhy [54].

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Použité mikroorganismy

V praktické části bakalářské práce byly použity bakteriální kmeny *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 zakoupený z německé sbírky Liebnitz Institut DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, a *Schlegelella thermodepolymerans* M 15344 původem z německé sbírky, který byl podroben opětovné lyofilizaci v české sbírce mikroorganismů.

### 3.2 Použité chemikálie

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, LachNer (Česká republika)

Chlorid amonný, LachNer (Česká republika)

Síran hořečnatý heptahydrát, LachNer (Česká republika)

Chlorid vápenatý dihydrát, LachNer (Česká republika)

Citrát železito-amonný, Fluka (Česká republika)

Kvasniční extrakt, HiMedia (India)

Dihydrogenfosforečnan draselný LachNer (Česká republika)

Chlorid sodný, LachNer (Česká republika)

Glycerol, LachNer (Česká republika)

Chlorid draselný, LachNer (Česká republika)

Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát, LachNer (Česká republika)

Propidium jodid, Invitrogen (Velká Británie)

Sytox Blue, Invitrogen (Velká Británie)

Trypton, HiMedia (India)

Síran amonný, Lachema (Česká republika)

Isopropanol, Penta (Česká republika)

Xylóza, HiMedia (India)

Chloroform, VWR Internacional (USA)

Kyselina sírová, LachNer (Česká republika)

Kyselina benzoová, LachNer (Česká republika)

Metanol, LachNer (Česká republika)

Hydroxid sodný, Lachema (Česká republika)

Hovězí extrakt, HiMedia (India)

Pepton, HiMedia (India)

Nutrient Broth, HiMedia (Indie)

### 3.3 Přístrojové vybavení

Předvážky Kern EW 620-3NM (Německo)

Analytické váhy, Boeco (Německo)

Nanofotometr PEARL, Implen (Německo)

Centrifuga EBA 200, Maneko (Česká republika)

Vortex, Mixer Bench V2 Vortex, 230V, BenchramkScientific, Inc. (USA)

Magnetická míchačka Kartell, MERCI s.r.o. (Česká republika)

Třepačka KS 4000, IKA-WERKE (Německo)  
 Blokový termostat Stuart SBH 200 D, Cole-Parmer (USA)  
 Blokový termostat Stuart SBH 130, Cole-Parmer (USA)  
 Plynový chromatograf s FID, Thermo Scientific Trace 1300 (USA)  
 Průtokový cytometr Cytex NL-2000, Cytex Biosciences (USA)  
 Inkubátor IP60, LTE Scientific (Velká Británie)  
 Jednotka pro vysokotlaké mražení EM ICE, Leica Microsystems (Německo)  
 Mrazicí substituční jednotka AFS2, Leica Microsystems (Německo)  
 Kryová vakuová preparační komora ACE 600, Leica Microsystems (Německo)  
 Skenovací elektronový mikroskop vybavený kryo stolcem Magellan 400/L, FEI (USA)  
 Skenovací elektronový mikroskop Helios G4 HP vybavený STEM3+  
 detektorem, ThermoFisher Scientific (USA)

### 3.4 Kultivace bakterií

#### 3.4.1 Příprava inokulačního média

Mikroorganismy byly uchovávány v hlubokomrazícím boxu při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  v kryozkumavkách o objemu 1,5 ml. Kryozkumavky byly připraveny z 0,5 ml 30% roztoku glycerolu, který plní funkci kryoprotektantu. Po přidání glycerolu byly kryozkumavky sterilizovány, a následně ve sterilním laminárním boxu zaočkovány 1 ml narostlého inokulačního média (konečná koncentrace glycerolu 10 %). Z takto připravených kryozkumavek bylo naočkováno komplexní médium, Nutrient broth (NB) nebo Lysogeny broth (LB), které bylo připravováno do Erlenmeyerových baněk o objemu 100 ml, do kterých bylo nalito komplexní médium o objemu 50 ml.

##### 3.4.1.1 *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344

U tohoto bakteriálního kmene bylo použito komplexní médium Nutrient broth o koncentraci 25 g/l. Složení média je uvedeno v *tabulce 2*. Po sterilizaci byla do média zaočkována bakteriální kultura z připravených kryozkumavek. Inokula byla poté kultivována na třepačkách při teplotě  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  při 160 rpm po dobu 20 hodin.

*Tabulka 2: Složení média Nutrient broth*

Látka	Koncentrace [g/l]
Hovězí extrakt	10
Pepton	10
NaCl	5

##### 3.4.1.2 *Schlegelella thermodepolymerans* M 15344

U tohoto bakteriálního kmene bylo použito komplexní médium Lysogeny broth o koncentraci 20 g/l. Složení média je uvedeno v *tabulce 3*. Po sterilizaci byla do média zaočkována bakteriální kultura z připravených kryozkumavek. Inokula byla poté kultivována na třepačkách při teplotě  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 160 rpm po dobu 20 hodin.

**Tabulka 3:** Složení média Lysogeny broth

Látka	Koncentrace [g/l]
Trypton	10
Kvasniční extrakt	5
NaCl	5

### 3.4.2 Příprava a složení produkčního média

Produkční minerální médium bylo připravováno do Erlenmeyerových baněk o objemu 250 ml, do kterých bylo nalito produkční minerální médium o objemu 100 ml. Složení média je uvedeno v *tabulce 4*. Po vysterilizování bylo médium vytemperováno na 50 °C.

Do připravených médií byl ve sterilním boxu přidán zdroj uhlíku ve formě 5 ml xylózy a roztok stopových prvků TES II. Složení roztoku TES II je uvedeno v *tabulce 5*. Následně bylo minerální médium zaočkováno 5 ml bakteriálního inokula (5 obj. %). Zaočkováná média byla poté kultivována na třepačkách při 50 °C a 160 rpm po dobu 72 hodin.

**Tabulka 4:** Složení produkčního minerálního média

Látka	Koncentrace [g/l]
$\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	9,0
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,5
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,02
$\text{Fe}^{(\text{III})}\text{NH}_4$ citrát	0,0012
Kvasniční extrakt	0,5
TES II	1 ml/l

**Tabulka 5:** Složení roztoku stopových prvků

Látka	Koncentrace [g/l]
EDTA	50
$\text{FeCl}_3$	13,8
$\text{ZnCl}_2$	0,84
$\text{CuCl} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,13
$\text{CoCl} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,1
$\text{MnCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,016
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,1

### 3.5 Použité metody

#### 3.5.1 Stanovení optické hustoty spektrofotometricky

Po 72 hodinách kultivace při teplotě 50 °C byla spektrofotometricky stanovena intenzita zákalu. Absorbance byla stanovena při vlnové délce 600 nm, každý vzorek byl proměřen třikrát. Jako slepý vzorek (blank) byl použit fosfátový pufr (PBS).

*Tabulka 6: Složení PBS pufru*

Látka	Koncentrace [g/l]
NaCl	8
KCl	0,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	1,44

Stanovení optické hustoty bylo využito pro sestavení a porovnání růstových křivek bakteriálních kmenů DSM 15344 a M 15344. Byly sestaveny dvě sady růstových křivek, při zachování stejných podmínek kultivace. Každý kmen byl kultivován ve dvou paralelních baňkách, a odběry byly prováděny po dobu 72 hodin.

#### 3.5.2 Gravimetrické stanovení obsahu biomasy

72 hodin od začátku kultivace bylo z Erlenmeyerových baněk odebráno 10 ml kultury. Odebraný vzorek byl odstředěn na centrifuze při 6000 rpm po dobu 5 minut. Vzniklý supernatant byl vylit, poté bylo přidáno 5 ml pufru PBS. Vzorek byl poté vortexován a znovu odstředěn na centrifuze, při stejných podmínkách jako předchozí centrifugace. Supernatant byl vylit a získaný vzorek biomasy byl sušen při teplotě 70 °C do konstantní hmotnosti. Vysušená biomasa byla zvážena na analytických vahách. Získané hodnoty byly následně přepočítány na mg/ml.

#### 3.5.3 Příprava vzorku na stanovení P(3HB) pomocí plynové chromatografie

Do krimpovacích vialek byla na analytických vahách navážena vysušená biomasa, v optimálním množství 8–11 mg. Do vialek byl přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml interního standardu (směs 15 % kyseliny sírové a 5 mg/ml kyseliny benzoové v methanolu). Vzorek se dal esterifikovat při 94 °C po dobu 3 hodin. Došlo ke kysele katalyzované hydrolyze polyhydroxyalkanoátů, a následně došlo k transesterifikaci monomerních jednotek za vzniku methylesterů 3-hydroxybutyrové kyseliny. Celý objem krimpovacích vialek byl poté přelit do 4 ml vialek, které obsahovaly 0,5 ml 50 mM hydroxidu sodného, tím dojde k neutralizaci vzorku. Po protřepání, a ustálení fází bylo ze spodní organické fáze přeneseno 50 µl do vialek, které obsahovaly 900 µl isopropylalkoholu. Obsah P(3HB) byl následně stanoven pomocí GC-FID (plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem), a následně vyjádřen v hmotnostních procentech.



### **3.5.4 Měření viability pomocí průtokové cytometrie**

Pro stanovení viability byly vzorky v Eppendorfových zkumavkách 1000x naředěny fosfátovým pufrem, a poté došlo k přidání fluorescenční sondy. Jako fluorescenční sondy jsme použili propidium jodid a Sytox blue, tyto sondy slouží k odlišení živých a mrtvých buněk. Průtokový cytometr byl nastaven na měření 10 000 buněk, a rychlost průtoku byla na hodnotě low.

Propidium jodid má excitační maximum při vlnové délce 535 nm a vlnová délka emisního maxima je 617 nm. Emisní vlnová délka odpovídá při měření na průtokovém cytometru kanálu B6. U mrtvých nebo poškozených buněk proniká propidium jodid snadno do buněk, kde dochází k interkalaci do DNA. Živé buňky s neporušenými membránami mají schopnost fluorescenční sondu vyloučit. Během experimentu jsme pracovali s koncentrací 4  $\mu$ l propidium jodidu na 1 ml vzorku. Koncentrace roztoku propidium jodidu byla použita 1 mg/ml v destilované vodě. Doba inkubace ve tmě je 15 minut za laboratorní teploty po přidání sondy.

Sytox blue excituje při vlnové délce 440 nm a vlnová délka emise je 480 nm. Emisní vlnová délka odpovídá při měření na průtokovém cytometru kanálu V4. Sytox blue je fluorescenční sonda vážící se na nukleové kyseliny, snadno proniká přes poškozené plazmatické membrány do buněk. Do buněk s neporušenými membránami, ale neproniká. Během experimentu jsme pracovali s koncentrací 1  $\mu$ l sondy na 1 ml vzorku. Koncentrace použitého roztoku Sytox blue byla 1mM v dimethylsulfoxidu. U této sondy je doba inkubace ve tmě zkrácena na 5 minut za laboratorní teploty po přidání sondy.

#### ***3.5.4.1 Viabilita při optimalizaci vlivu promývání***

Pro stanovení vhodné rychlosti centrifugace bylo provedeno porovnání pro rychlosti 3000 rpm, 4000 rpm a 5000 rpm. Samotné promývání bylo prováděno následovně. Byl odebrán 1 ml kultury z Erlenmeyerovy baňky do centrifugačních zkumavek, zkumavky byly poté centrifugované po dobu jedné minuty při zvolených otáčkách za minutu. Supernatant byl poté slit, následně byl přidán 1 ml pufru PBS vytemperovaného na teplotu 50 °C. Obsah zkumavky byl poté vortexován, dokud nedošlo k homogenizaci obsahu zkumavky. Centrifugace byla provedena za laboratorní teploty, po jejím ukončení byly vzorky okamžitě vráceny do termostatu vyhřátého na 50 °C, aby došlo k minimalizaci následků vystavení nižší teplotě. Vzorky byly 1000krát zředěny desítkovým ředěním fosfátovým pufrem. Po přidání propidium jodidu a 15 minutách ve tmě byly vzorky analyzovány na průtokovém cytometru.

#### ***3.5.4.2 Viabilita po teplotním šoku***

Pro stanovení viability byly vzorky po 72 hodinách kultivace na minerálním médiu vystaveny teplotám 30 °C a 70 °C. Viabilita byla posouzena po 15, 30, 60 minutách, a u kmene DSM 15344 i po 120 minutách. Vzorky byly 1000krát zředěny desítkovým ředěním fosfátovým pufrem. Po přidání propidium jodidu a 15 minutách ve tmě byly vzorky analyzovány na průtokovém cytometru. Pro porovnání byl stejnému procesu vystaven i kontrolní vzorek uchovávaný při 50 °C.

### **3.5.4.3 Viabilita po zmrazení**

Pro prozkoumání vlivu mrazícih cyklu na viabilitu buněk byla odebrána kultura po 1 ml do tří Eppendorfových zkumavek. Vzorky byly umístěny do mrazíciho boxu při teplotě -25 °C, po 60 minutách byly vzorky vyjmuty, a po rozmrznutí byla stanovena na průtokovém cytometru viabilita prvního z nich. Zbylé vzorky byly vráceny do mrazíciho boxu, a po 60 minutách byly vzorky vyjmuty, a byla stanovena viabilita druhého vzorku. Poslední vzorek byl vrácen do mrazíciho boxu, za 60 minut byla stanovena i jeho viabilita pomocí propidium jodidu na průtokovém cytometru. Před měřením viability na průtokovém cytometru byly vzorky 1000krát zředěny desítkovým ředěním fosfátovým pufrém.

### **3.5.4.4 Viabilita po osmotickém stresu**

Pro měření viability bylo do 4 centrifugačních zkumavek odebráno po 10 ml kultury. Zkumavky byly umístěny do centrifugy po dobu 5 minut při 5000 rpm, poté byl slit supernatant. Do zkumavek bylo přidáno po 10 ml fosfátového pufru vytemperovaného na 50 °C, a obsah zkumavky byl vortexován. Došlo k centrifugaci za stejných podmínek, a vzniklý supernatant byl slit. Do každé zkumavky bylo poté přidáno 10 ml roztoku NaCl o těchto koncentracích. Do první byl přidán roztok o koncentraci 50 g/l, do druhé 100 g/l a do třetí 200 g/l. Poslední vzorek sloužil jako porovnávací, proto do něj bylo přidáno 10 ml fosfátového pufru. Zkumavky byly vortexovány, a jejich obsah byl přelit do Erlenmeyerových baněk o objemu 50 ml. Baňky byly umístěny na třepačku vyhřátou na 50 °C. Viabilita byla měřena po 60 a 120 minutách, před měřením viability na průtokovém cytometru byly vzorky 1000krát zředěny desítkovým ředěním fosfátovým pufrém. Tímto krokem byly odstraněny soli, které by způsobovaly zhášení fluorescenční sondy.

## **3.5.5 Sledování morfologických změn buněk pomocí elektronové mikroskopie**

### **3.5.5.1 Vysokotlaké mrazení vzorku**

Do Eppendorfovy zkumavky byl přenesen 1 ml koncentrované bakteriální suspenze kultivované podle postupu v kapitole 3.4, která byla poté centrifugována při otáčkách 3000 rpm po dobu 3 minut. Malé množství odstředěné biomasy bylo naneseno na pozlacený nosič o velikosti 3 mm pokrytého vrstvou 1% roztoku lecitinu v chloroformu pro STEM. Pro Cryo-SEM byl použit hliníkový nosič o velikosti 6 mm. Poté došlo k fixaci pomocí jednotky pro vysokotlaké mrazení EM ICE.

### **3.5.5.2 Příprava vzorků pro STEM**

Fixované vzorky byly přeneseny do mrazíci substituční jednotky AFS2. K substituci byl použit 1,5% roztok OsO<sub>4</sub> v acetonu. Substituce probíhala za těchto podmínek, 72 hodin při -90 °C, následně 24 hodin při teplotě -20 °C a nakonec 18 hodin při teplotě 4 °C. Při laboratorní teplotě byly vzorky promyty 3x po dobu 15 minut acetonem. Zalití vzorku do pryskyřice probíhalo následovně, pomocí směsi epoxidové pryskyřice a acetonu v poměrech 1:2, 1:1, 2:1 a čisté pryskyřice. Změny směsí probíhaly po 60 minutách. Vzorky byly v čerstvé pryskyřici ponechány přes noc v exikátoru připojenému k vývěvě. Po odstranění pryskyřice byly vzorky přeneseny do BEEM kapsulí, zde byly zality čerstvou pryskyřicí a ponechány v termostatu při

teplotě 60 °C po dobu 48 hodin. Za pomoci diamantového nože s úhlem řezu 45° byly vzorky v pryskyřici nařezány na ultratenké řezy.

### ***3.5.5.3 Příprava vzorků a měření metodou Cryo-SEM***

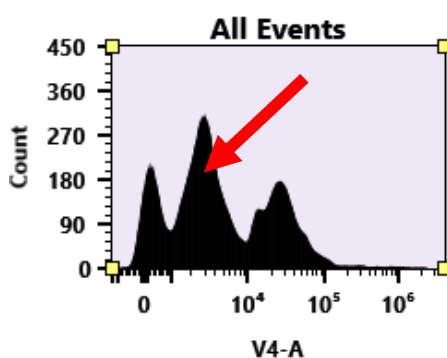
Vzorky na nosičích byly v tekutém dusíku přeneseny do kryo vakuové preparační komory, kde došlo poškrábání (freeze-fracturing) pomocí skalpelu. Díky tomuto kroku bylo možné pozorovat i vnitřní části buněk za použití metody Cryo-SEM. Následovala sublimace při teplotě -95 °C po dobu 7 minut. Za využití kryo transferu byly vzorky přeneseny do skenovacího elektrovaného mikroskopu vybaveného kryo stolkem, kde byly vzorky pozorovány při teplotě -120 °C, napětí 2 kV a proudu elektronového paprsku 6,3 pA. Vzorky byly vyfotografovány při 5000, 8000, 10000, 15000 a 20000 násobném zvětšení.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Optimalizace fluorescenční sondy

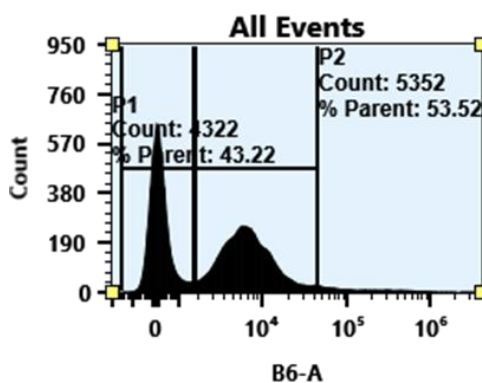
Na počátku experimentu bylo potřeba vybrat vhodnou fluorescenční sondu pro měření viability bakteriálních buněk. Byly porovnávány dvě fluorescenční sondy, a to Propidium jodid a Sytox blue. Porovnávané sondy se liší ve svých vlastnostech, tak i ve způsobech použití, tyto rozdíly jsou blíže popsány v kapitole 3.5.4.

Díky menší spotřebě a kratší době inkubace, popsané v kapitole 3.5.4, se zpočátku zdála jako vhodnější fluorescenční sonda Sytox blue. V průběhu měření, ale docházelo občasně k detekci třetího píku, který znemožňuje vyhodnocení daného měření. Takovýto pík je znázorněn na obrázku 4 níže. Použití sondy Sytox blue lze tedy hodnotit jako problematické.



*Obrázek 4: Histogram při měření viability s pomocí fluorescenční sondy Sytox blue, kdy se objevil třetí pík*

Z tohoto důvodu jsme se rozhodli pro všechna další měření využít fluorescenční sondu Propidium jodid, u které se třetí pík nevyskytoval. Histogram této sondy je možné pozorovat na obrázku 5.



*Obrázek 5: Histogram při měření viability s pomocí fluorescenční sondy Propidium jodid*

### 4.2 Optimalizace vlivu promývání

Dále byl během experimentu zkoumán vliv promývání na studovanou kulturu. Byla porovnávána viabilita promytých a nepromytých vzorků, za využití centrifugace za různých otáček za minutu. Postup přípravy a měření je popsán v kapitole 3.5.4.1.

**Tabulka 7:** Výsledky porovnání promytých a nepromytých vzorků

Podmínky		Živé [%]	Odchylka [%]
5000 RPM	promyté	82,42	0,41
	nepromyté	77,25	0,17
4000 RPM	promyté	82,89	0,65
	nepromyté	78,02	0,18
3000 RPM	promyté	82,01	0,85
	nepromyté	76,25	0,00

Z výsledků, znázorněných v *tabulce 7*, je možné stanovit, že promývání má pozitivní vliv na hodnoty viability změřené pomocí průtokové cytometrie. Promývání má pozitivní vliv na sondu samotnou než, že by promývání přímo ovlivňovalo viabilitu buněk. Fluorescenční sondy, jsou zpravidla velice citlivé na prostředí, kterému jsou vystaveny, například na hodnotu pH. Promytím tedy dochází k eliminaci faktorů, které způsobují zhášení samotné fluorescenční sondy.

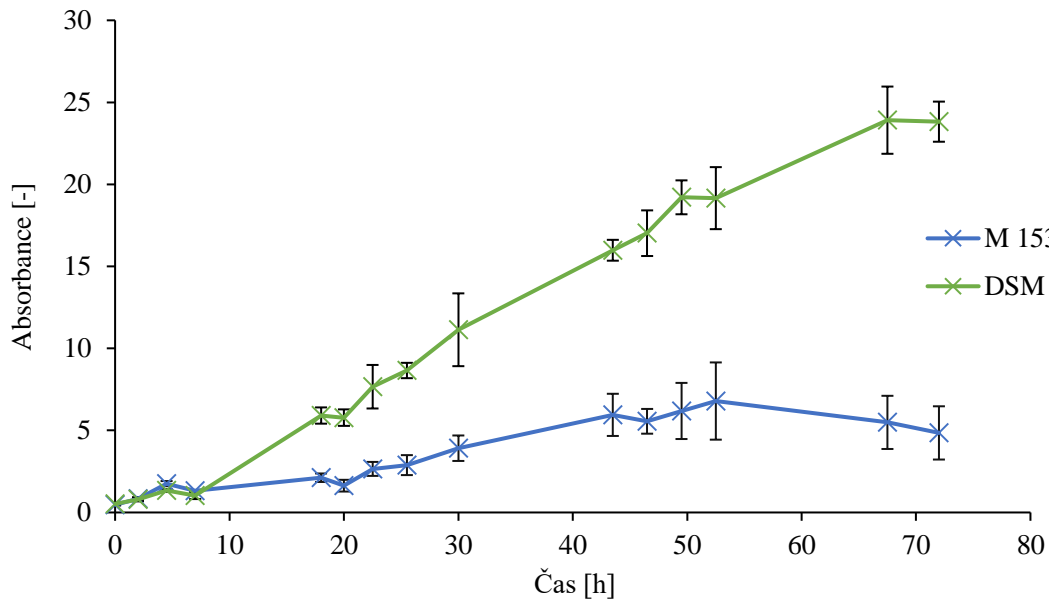
### 4.3 Optimalizace vhodné kultury budoucí využití

U tohoto experimentu došlo k porovnání využitých kultur *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 a *Schlegelella thermodepolymerans* M 15344. K jejich porovnání došlo spektrofotometrickým změřením optické hustoty, blíže popsáném v kapitole 3.5.1, a následným sestavením růstových křivek.

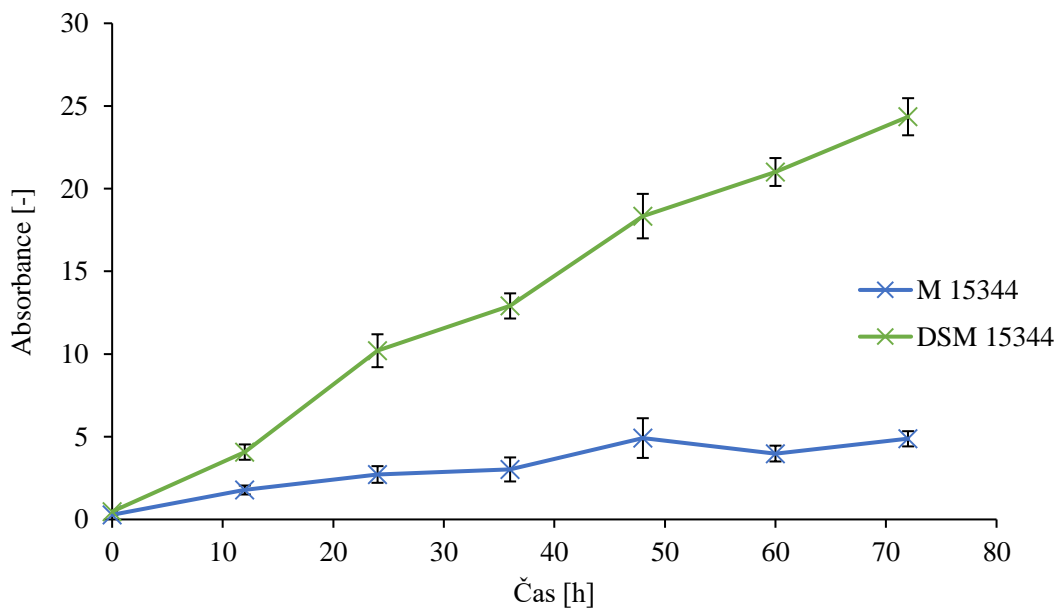
Z *obrázku 6* a *obrázku 7* je možné vidět, že hodnota absorbance u kmene DSM 15344 po celou dobu experimentu rostla o poznání rychleji než u kmene M 15344. Z tohoto důvodu byla průměrná hodnota absorbance v čase ukončení experimentu u kmene DSM 15344, na hodnotě 23,82. U kmene M 15344 byla tato hodnota 4,85 (*Obrázek 6*). U druhého provedení experimentu, byla hodnota průměrné absorbance ve stejném čase jako u prvního provedení experimentu, u kmene DSM 15344 na hodnotě 24,35 a u kmene M 15344 na hodnotě 4,88 (*Obrázek 7*). V obou experimentech byl kmen DSM 15344 znatelně více narostlý než kmen M 15344.

V grafu na *obrázku 6* můžeme pro kmen DSM 15344 do 7 hodin pozorovat lag fázi, kdy dochází k adaptaci na nové prostředí. Poté následovala exponenciální fáze růstu, která trvala až do času 67,5 hodin. Od tohoto okamžiku následovala stacionární fáze, která trvala až do ukončení experimentu. Pro kmen M 15344 trval lag fáze po dobu 7 hodin, exponenciální fáze trvala přibližně do 52,5 hodin. Následovala stacionární fáze do doby 67,5 hodin. Od této hodiny již pozvolně nastala fáze odumírání.

Z důvodů větších rozestupů mezi odběry není možné na *obrázku 7* stanovit lag fázi růstu u obou kmenů. Pro kmen DSM 15344 je možné pozorovat pouze exponenciální fázi. U kmene M 15344 můžeme do 48 hodin pozorovat exponenciální fázi, která následně přechází ve stacionární fázi až do ukončení experimentu.

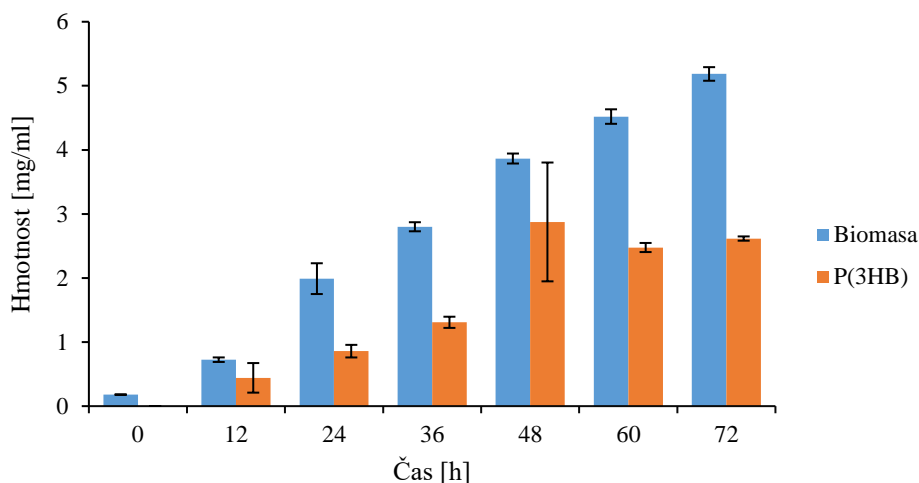


**Obrázek 6:** Růstová křivka termofilů DSM 15344 a M 15344 v čase 0-72 hodin, první provedení experimentu



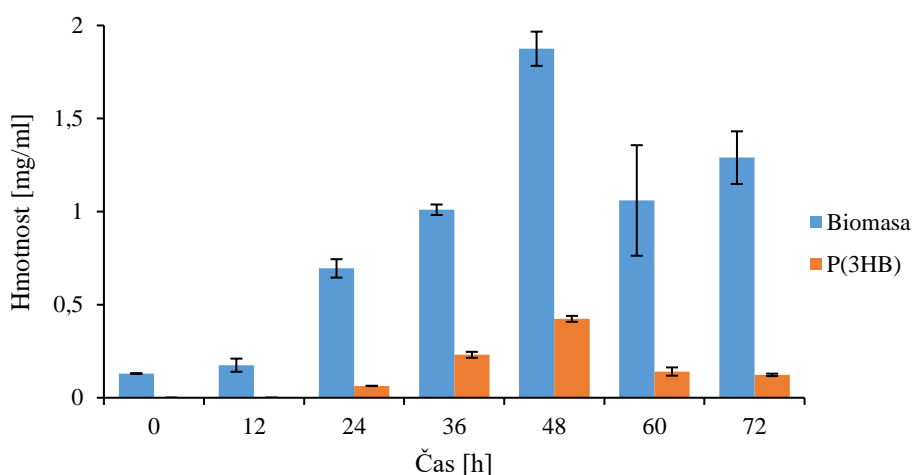
**Obrázek 7:** Růstová křivka termofilů DSM 15344 a M 15344 v čase 0-72 hodin druhé provedení experimentu

Během druhého provedení experimentu došlo u každého odběru k odebrání 10 ml kultury pro pozdější stanovení množství biomasy a obsahu P(3HB) v kultuře. I zde byly pozorovány rozdíly mezi kulturami podobné rozdílům mezi růstovými křivkami. V grafu na *obrázku 8* můžeme u kmene DSM 15344 vidět stálý růst množství biomasy, až na odběr v čase 48 hodin můžeme obdobný růst pozorovat i v obsahu P(3HB).



**Obrázek 8:** Množství biomasy a P(3HB) u kmene DSM 15344

V obrázku 9 může být od času 48 hodin pozorován pokles množství biomasy a P(3HB), následovaný u biomasy růstem, což odpovídá hodnotám v obrázku 7.



**Obrázek 9:** Množství biomasy a P(3HB) u kmene M 15344

Z důvodů lepšího a konzistentního růstu, byla jako slibnější pro další, případné průmyslové, využití vyhodnocena bakterie *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344.

#### 4.4 Vliv vystavení stresovým podmínkám

Byl zkoumán vliv různých stresových faktorů, konkrétně teplotního šoku, vlivu opakovaného zmrazování a rozmrazování a osmotického stresu na bakteriální kmeny DSM 15344 a M 15344. Účinek na viabilitu buněk byl stanoven pomocí průtokové cytometrie.

##### 4.4.1 Teplotní šok

Prvním testovaným stresovým faktorem byl teplotní šok, postup práce je popsán v kapitole 3.5.4.2. V experimentu byl teplotní šok dosažen umístěním kultury do prostředí vyhřátého v prvním případě na 30 °C, a v druhém na 70 °C. U kmene M 15344 byl experiment proveden dvakrát, za stejných podmínek a provedení, kdy v prvním provedení byla viabilita

pomocí PI změřena pouze po 15 minutách expozice, pro prvotní stanovení vlivu teplotního šoku na buňky. Poté už bylo množství živých buněk měřeno i po 30 a 60 minutách expozice.

Pro kmen DSM 15344 byl vliv teplotního šoku zkoumán třikrát, za stejných podmínek a provedení, a to v časech expozice 15, 30, 60 a 120 minut. Z důvodů přípravy vzorků pro elektronovou mikroskopii byly u třetího provedení stanoveny pouze časy 15 a 60 minut.

*Tabulka 8 a tabulka 9* ukazují, že vystavení teplotnímu šoku má zejména na kmen *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 negativní účinek. Největší rozdíl mezi kmeny byl pozorován při vystavení teplotě 70 °C, kdy kmen *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344 vykazoval znatelně nižší viabilitu, než druhý porovnávaný kmen. Porovnáním viability kmenů při teplotě 30 °C dojdeme ke stejnému výsledku jako u teploty 70 °C. U M 15344 se bez ohledu na dobu expozice se viabilita pohybovala nad 80 %. U kmene DSM 15344 se viabilita mezi provedenými experimenty značně lišila. U prvního provedení byly výsledky podobné s druhým kmenem, pohybovaly se v rozmezí 84 % až 73 % živých buněk. U druhého provedení byly hodnoty viability znatelně nižší, a to v rozmezí 60 % až 19 %. U vzorků uchovaných při teplotě 50 °C můžeme, hlavně u DSM 15344 pozorovat časem pokles viability. K umírání buněk docházelo, také kvůli manipulaci během přípravy vzorků, pokud jsme provedli ve stejném čase kontrolní měření viability u vzorku odebraného přímo z Erlenmeyerovy baňky, byla hodnota viability tohoto vzorku vysoká, v rozmezí 83 % až 75 % živých buněk. Při prvním provedení byl u kmene M 15344 obsah P(3HB) 56,50 hm. %, a při druhém provedení 47,96 hm. %. Nižší obsah P(3HB) je u tohoto kmene spojen s vyšší hodnotou viability, s největší pravděpodobností tedy došlo k zapojení P(3HB) v adaptaci na stres. U kmene DSM 15344 byl obsah P(3HB) u prvního provedení 71,33 hm. %, u druhého provedení 48,00 hm. % a u třetího provedení 74,33 hm. %. Z důvodů značných rozdílů mezi jednotlivými provedeními u kmene DSM 15344, nebylo možné s jistotou určit vliv P(3HB) na viabilitu při vystavení teplotnímu šoku.

**Tabulka 8:** Viabilita po vystavení teplotnímu šoku u bakteriálního kmene *Schlegelella thermodepolymerans* M 15344

Stres	Provedení experimentu	Expozice [min]	Živé [%]
30 °C	1	15	81,64 ± 0,00
		15	81,98 ± 0,54
	2	30	83,15 ± 0,00
		60	81,89 ± 0,44
50 °C	1	15	62,47 ± 0,00
	2	15	82,05 ± 0,26
		30	82,22 ± 0,51
		60	78,52 ± 0,24
70 °C	1	15	37,62 ± 0,00
	2	15	66,90 ± 1,15
		30	59,73 ± 0,51
		60	63,17 ± 0,28



**Tabulka 9:** Viabilita po vystavení teplotnímu šoku u bakteriálního kmene *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344

Stres	Provedení experimentu	Expozice [min]	Živé [%]	
30 °C	1	15	27,25 ± 0,00	
		30	83,29 ± 0,00	
		60	74,08 ± 0,00	
		120	73,21 ± 0,00	
	2	15	59,3 ± 0,34	
		30	46,71 ± 1,43	
		60	27,72 ± 2,94	
		120	19,87 ± 0,45	
	3	15	73,64 ± 1,27	
		60	17,91 ± 0,22	
	50 °C	1	15	6,65 ± 0,00
			30	76,43 ± 0,00
60			54,43 ± 0,00	
120			23,98 ± 0,00	
2		15	70,48 ± 1,10	
		30	25,19 ± 2,10	
		60	7,60 ± 0,44	
		120	5,76 ± 0,03	
3		15	70,37 ± 0,56	
		60	12,36 ± 0,24	
70 °C		1	15	15,83 ± 0,00
			30	6,09 ± 0,00
	60		11,49 ± 0,00	
	120		3,67 ± 0,00	
	2	15	3,83 ± 0,06	
		30	2,36 ± 0,08	
		60	10,69 ± 0,25	
		120	24,31 ± 0,82	
	3	15	43,50 ± 0,89	
		60	4,26 ± 0,10	

#### 4.4.2 Vliv opakovaného rozmrazování a zmražení

Dalším zkoumaným stresovým faktorem bylo opakované rozmrazování a zmrazování, popsané v kapitole 3.5.4.3. Podle rychlosti zmrazování dochází ke vzniku ledových krystalů uvnitř buňky, zejména u pomalého zmrazování, kdy dochází k většímu poškození buněk než při rychlém zmrazení. Vzorky byly umístěny do mrazícího boxu při teplotě -25 °C, po 60 minutách

byly vzorky vyjmuty a po rozmrznutí byla stanovena viabilita prvního z nich. Zbylé vzorky byly vráceny do mrazicího boxu, a po 60 minutách se postup opakoval. Poslední vzorek absolvoval celkem tři cykly zmrazení následované rozmrazením.

**Tabulka 10:** Viabilita kmene *S. thermodepolymerans* M 15344 po opakovaném zmražení

Stres	Provedení experimentu	Počet mrazicích cyklů	Živé [%]
Mráz	1	1	54,35 ± 0,00
		2	30,37 ± 0,00
		3	23,06 ± 0,00
	2	1	67,51 ± 0,09
		2	62,18 ± 2,15

**Tabulka 11:** Viabilita kmene *S. thermodepolymerans* DSM 15344 po opakovaném zmražení

Stres	Provedení experimentu	Počet mrazicích cyklů	Živé [%]
Mráz	1	1	25,42 ± 0,00
		2	20,99 ± 0,00
		3	16,49 ± 0,00
	2	1	13,67 ± 1,38
		2	8,4 ± 0,42

U jednotlivých kmenů se mezi jednotlivými provedeními hodnoty viability liší. U M 15344 bylo po prvním zmrazení a rozmrazení 54 % a 67 % živých buněk. Po druhém mrazicím cyklu se už hodnoty znatelně lišily, u prvního provedení klesl počet živých buněk na 30 %, u druhého provedení na 62 %. U DSM 15344 byl po prvním cyklu počet živých buněk 25 % a 13 %. Po druhém mrazicím cyklu klesl počet živých buněk u obou provedení o přibližně 5 %. Z tabulky 10 a tabulky 11 je zřejmé, že vůči zmrazování je odolnější kmen *S. thermodepolymerans* M 15344, jeho odolnost s přibývajícím cykly klesá, ale tato tendence je pozorována i u kmene *S. thermodepolymerans* DSM 15344, který snáší mráz znatelně hůře. Při prvním provedení byl u kmene M 15344 obsah P(3HB) 56,50 hm. %, a při druhém provedení 47,96 hm. %. Buňky s nižším obsahem P(3HB) vykazovaly vyšší viabilitu. U kmene DSM 15344 byl obsah P(3HB) u prvního provedení 71,33 hm. % a u druhého provedení 48,00 hm. %, bylo pozorováno, že vyšší obsah P(3HB), je spojen s vyšší viabilitou.

#### 4.4.3 Osmotický stres

Posledním testovaným stresovým faktorem byl osmotický stres. 60 minut po přidání roztoku NaCl byla změřena viabilita buněk kmene *S. thermodepolymerans* DSM 15344. Z důvodu špatného růstu, který byl pozorován v kapitole 4.3, nebyl zkoumán vliv tohoto stresu na kmen

M 15344. Viabilita byla změřena znovu po uplynutí dalších 60 minut. Před stanovením viability byly naředěním odstraněny soli, které by způsobovaly zhasnutí fluorescenční sondy. Pracovní postup je popsán v kapitole 3.5.4.4.

*Tabulka 12: Viabilita po vystavení osmotickému stresu ve formě roztoků NaCl o různé koncentraci*

Stres	Provedení experimentu	Expozice [min]	Živé [%]
0 g/l NaCl	1	60	80,90 ± 0,00
		120	80,58 ± 0,00
	2	60	72,76 ± 1,51
50 g/l NaCl	1	60	51,05 ± 0,00
		120	17,96 ± 0,00
	2	60	73,57 ± 0,90
100 g/l NaCl	1	60	13,28 ± 0,00
		120	10,71 ± 0,00
	2	60	55,40 ± 0,10
200 g/l NaCl	1	60	12,67 ± 0,00
		120	7,89 ± 0,00
	2	60	52,50 ± 1,16

Při prvním provedení experimentu bylo možné z výsledků stanovit, že 60 minut po přidání roztoku se projevil silně negativní účinek u vzorků, do kterých byl přidán roztok NaCl o koncentraci 100 g/l a 200 g/l (*Tabulka 12*). Za dalších 60 minut nebyl pokles viability tak značný jako při předchozím měření. Zajímavější byl vzorek obsahující roztok NaCl o koncentraci 50 g/l, zde nebyly po prvním měření účinky tak smrtící jako u ostatních vzorků. Ale po uplynutí dalších 60 minut, se úroveň viability blížila ostatním vzorkům. Při tomto provedení byl obsah P(3HB) 71,33 hm. %.

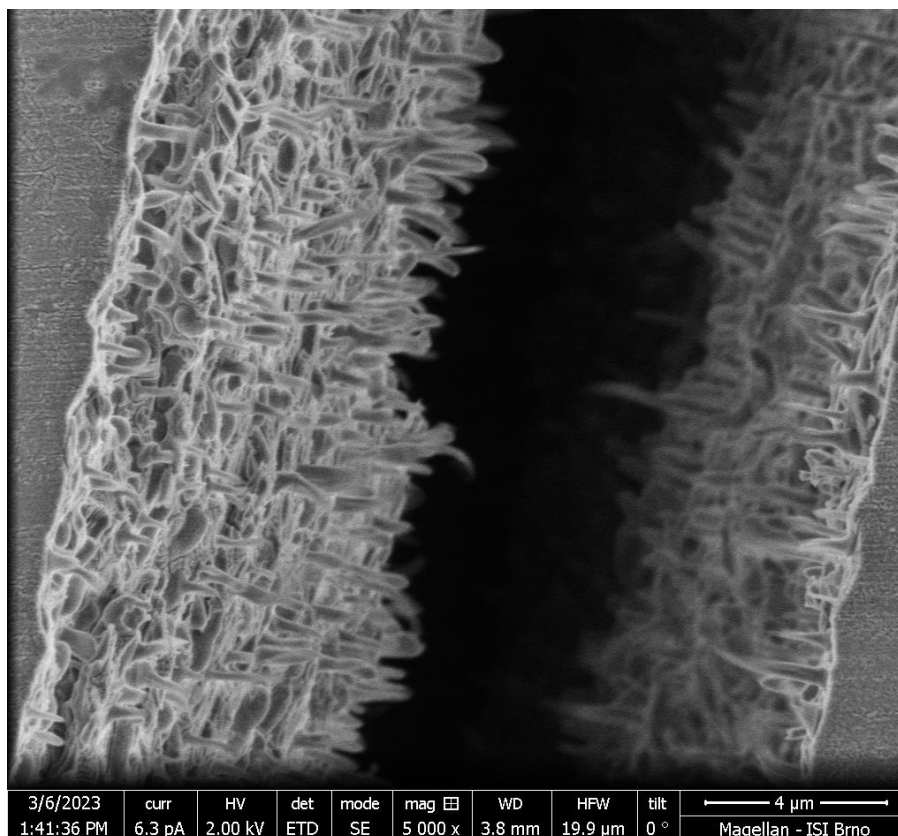
Během druhého provedení experimentu byla situace naprosto odlišná od předchozího provedení. Při odběru provedeném po 60 minutách byla hodnota viability u všech vzorků vyšší než 52 %. Což je hodnota vyšší, než která byla naměřena u prvního provedení experimentu při koncentraci roztoku NaCl 50 g/l (*Tabulka 12*). U tohoto provedení byl obsah P(3HB) 48,00 hm. %, s nižším obsahem P(3HB) je u tohoto stresového faktoru spojena vyšší hodnota viability.

Přes použití stejných postupů a stejné bakterie se výsledné hodnoty značně lišily, takže reprodukovatelnost tohoto experimentu nebude vysoká, ale toto mohlo být způsobeno nízkým počtem provedení experimentu. Pro přesnější závěr by byl zapotřebí větší počet opakování experimentů.

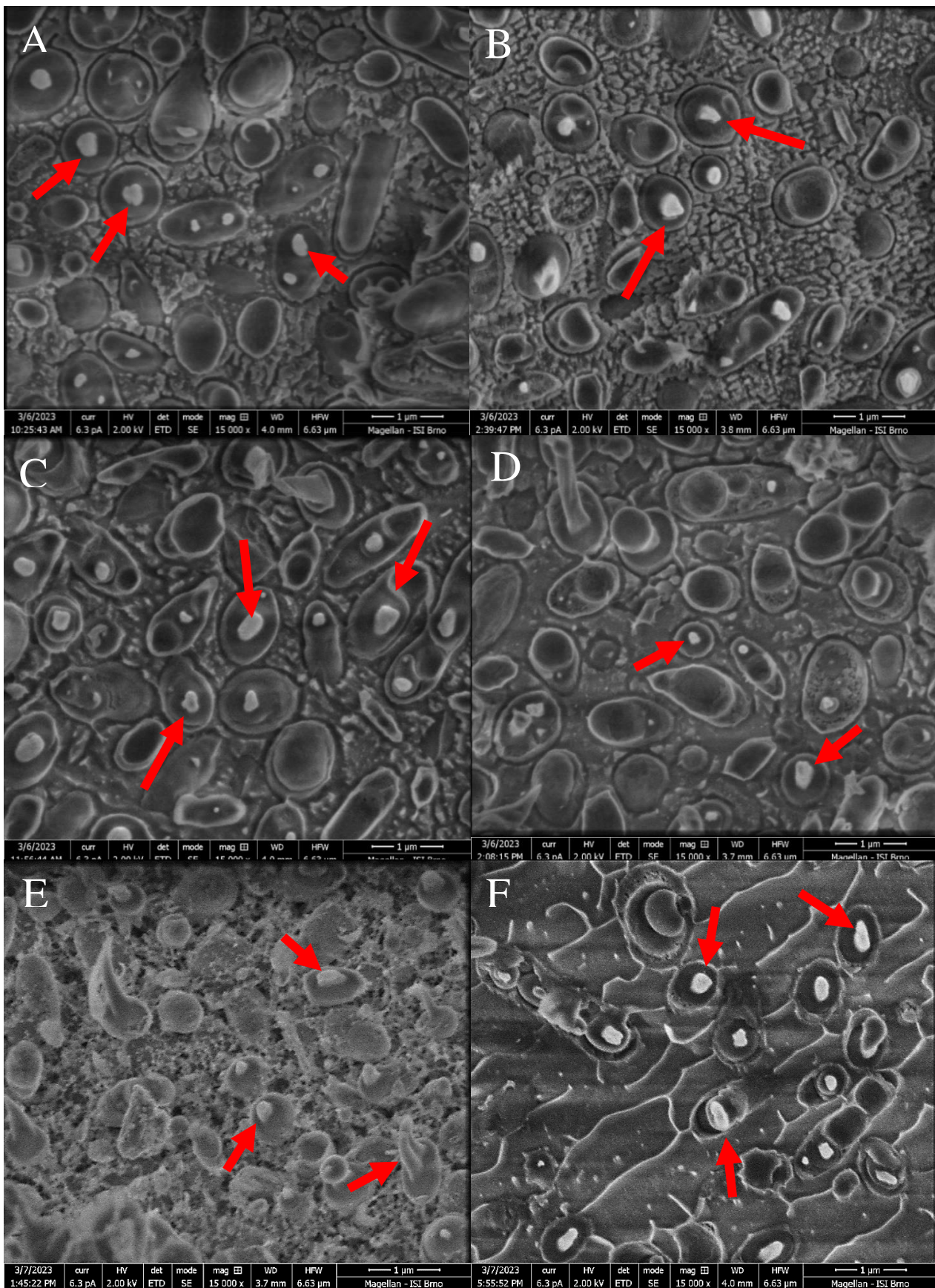
#### 4.5 Vyhodnocení snímků z elektronové mikroskopie

Jako závěrečný experiment byly buňky analyzovány za pomoci elektronové mikroskopie. Byly použity metody Cryo-SEM a STEM, pro posouzení morfologických změn způsobených působením stresových faktorů na buňky.

Na *obrázku 10* jsou vidět granule P(3HB) ve formě jehlic, během pořízení snímku se projevily elastické vlastnosti PHA při kryogenních podmínkách. Ke vzniku těchto útvarů dochází při mrazovém lámání buněk. V momentě zaostření začalo vlivem procházení elektronů docházet k mizení útvarů zpět do buněčné hmoty.

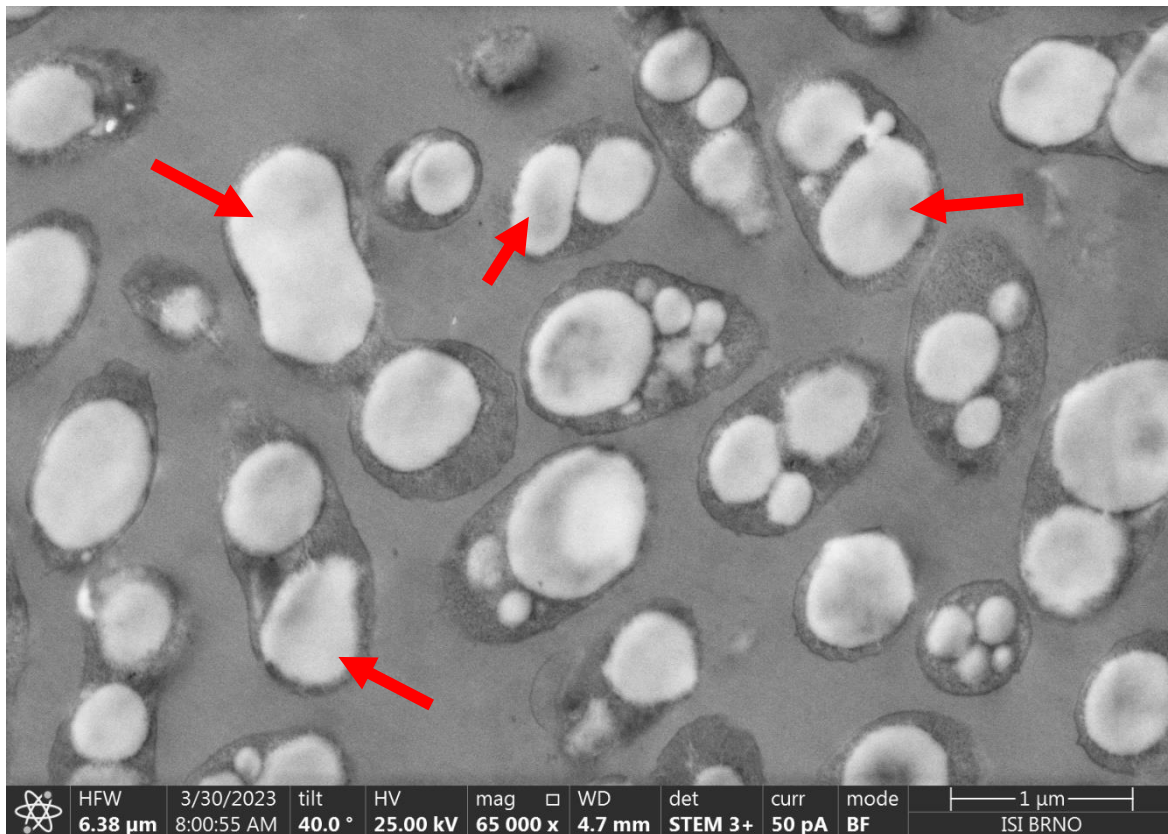


**Obrázek 10:** Snímek pořízený pomocí Cryo-SEM zachycující jehlice P(3HB)



**Obrázek 11:** Snímek pořízený pomocí Cryo-SEM zachycující vzorky: živé/kontrola (A), vystavené mrazu (B), vystavené 30 °C (C), vystavené 70 °C (D), vystavené roztoku NaCl o koncentraci 50 g/l (E) a vystavené roztoku NaCl o koncentraci 100 g/l (F)

Na obrázku 11 jsou znázorněny snímky pořízené pomocí Cryo-SEM. U buněk, které se podařilo rozlomit, bylo možné pozorovat kromě jejich povrchu vnitřní strukturu. Na všech snímcích je možné pozorovat granule P(3HB). U snímků D a E je možné pozorovat granule P(3HB) ve formě jehlic. Tento jev tedy nebyl rozhodně ojedinělý. Bakteriální buňky jsou tyčinkovitěho tvaru, který je charakteristický pro rod *Schlegelella*. Buňky dosahovaly délky kolem 1,5  $\mu\text{m}$  a průměru 0,5  $\mu\text{m}$ . Následky vystavení stresovým faktorům, bylo možné na morfologii buněk sledovat ve formě zvrásnění buněčné stěny. Mezi jednotlivými stresovými faktory, kterým byly buňky vystaveny jsou opravdu minimální rozdíly. Pro porovnání viability buněk je vhodnější metoda průtokové cytometrie.



**Obrázek 12:** Snímek ze STEM znázorňující obsah P(3HB) v buňkách vystavených teplotě 30 °C

Za pomoci metody STEM byl pořízen snímek bakterií vystavených teplotě 30 °C (Obrázek 12). Ze snímku je patrné, že buňky obsahovaly velké množství P(3HB), který se v buňkách nacházel ve formě granulí, jejichž počet se mohl v jednotlivých buňkách lišit. Pomocí STEM můžeme pozorovat buněčné struktury, které u metody Cryo-SEM zůstanou zalité v ledu, protože nedojde k jejich odhalení sublimací. Je tedy lépe možné pozorovat, zda došlo k deformaci buněčné stěny, jako u snímku níže, nebo k prasknutí buněčné stěny.

## 5 ZÁVĚR

V této bakalářské práci bylo zkoumáno zapojení polyhydroxyalkanoátů do stresové odpovědi termofilní bakterie *Schlegelella thermodepolymerans*. Byly využity kmeny DSM 15344 a M 15344 této bakterie. Pro oba kmeny byly sestaveny růstové křivky, množství biomasy bylo stanoveno gravimetricky a obsah P(3HB) za pomoci plynové chromatografie. Po vystavení stresovým faktorům ve formě teplotního šoku, mrazících cyklů a osmotickému stresu způsobenému roztoky chloridu sodného, byla porovnána viabilita u obou kmenů za pomoci metody průtokové cytometrie.

Z růstových křivek bylo stanoveno, že kmen DSM 15344 vykazuje zřetelně lepší a stabilnější růst než kmen M 15344. Po 72 hodinách kultivace byla u DSM 15344 hodnota absorbance 23,82 při prvním provedení experimentu a 24,35 u druhého provedení. Ve stejném čase byla u kmene M 15344 byla hodnota absorbance 4,88 a 4,85. Během druhého provedení experimentu došlo k průběžnému stanovení množství biomasy a obsahu P(3HB) v kultuře. Při ukončení experimentu byl u DSM 15344 obsah biomasy 5,19 mg/ml a obsah P(3HB) 2,62 mg/ml. U kmene M 15344 byl ve stejném čase obsah biomasy 1,29 mg/ml a obsah P(3HB) 0,12 mg/ml. Nejvyšší obsah biomasy a P(3HB) byl u tohoto kmene v čase kultivace 48 hodin. S hodnotami obsahu biomasy 1,88 mg/ml a P(3HB) 0,42 mg/ml.

Pro měření viability za využití metody průtokové cytometrie bylo nejdříve zapotřebí vybrat vhodnou sondu. Byly porovnány fluorescenční sondy Propidium jodid a Sytox blue. V důsledku nižší spotřeby a kratší době inkubace se zdála jako vhodnější sonda Sytox blue. U této sondy, bohužel dochází k občasnému objevení třetího píku, který znemožňuje vyhodnocení daného měření. Z tohoto důvodu byla pro další měření využívána fluorescenční sonda Propidium jodid. Také byl posouzen vliv promývání na měření hodnoty viability studovaných kultur. Z výsledků je zřejmé, že promývání má pozitivní dopad na výsledek měření. Promytím dochází k odstranění faktorů, které způsobují zhášení fluorescenční sondy.

Hlavní část práce byla zaměřena na posouzení vlivu stresových faktorů na viabilitu bakteriálních kmenů DSM 15344 a M 15344. Při vystavení teplotnímu šoku byl největší rozdíl mezi kmeny pozorován při teplotě 70 °C, kdy kmen DSM 15344 vykazoval znatelně nižší viabilitu. U teploty 30 °C se u kmene M 15344 viabilita pohybovala nad 80 %. U kmene DSM 15344 se mezi provedeními výsledky značně lišily. Při prvním provedení byla viabilita v rozmezí 84 % až 73 %, u druhého byla v rozmezí 60 % až 19 %. U tohoto stresu se lišili obsah P(3HB) nejen mezi kmeny, ale i mezi jednotlivými provedeními. Při prvním provedení byl u kmene M 15344 obsah P(3HB) 56,50 hmot. %, a při druhém provedení 47,96 hmot. %. U kmene DSM 15344 byl obsah P(3HB) u prvního provedení 71,33 hmot. %, u druhého provedení 48,00 hmot. % a u třetího provedení 74,33 hmot. %.

Obdobná situace nastala při zkoumání vlivu opakovaného zmrazování a rozmrazování. U obou kmenů se hodnoty mezi provedeními lišily, rozdíly byly i v obsahu P(3HB). Z výsledků vyplývá, obdobně jako u teplotního šoku, že kmen M 15344 je proti stresu odolnější než DSM 15344.

Osmotický stres má na buňky negativní vliv, ale i v tomto případě se hodnoty mezi provedeními lišily, a to i v obsahu P(3HB). Při druhém provedení byla po 60 minutách hodnota viability u všech koncentrací roztoku chloridu sodného vyšší než 52 %. Což byla viabilita vzorku o nejnižší koncentraci soli při prvním provedení experimentu.

Při analýze vzorků za pomoci metod elektronové mikroskopie pozorovány morfologické změny buněk vystavených stresovým faktorům. Morfologické změny byly mezi vzorky minimální, projevovaly se formě zvrásnění buněčné stěny. Byly pozorovány jehlice P(3HB), které vznikají při mrazovém lámání buněk. Díky elastickým vlastnostem P(3HB) i za kryogenních podmínek.

Na závěr lze z výsledků říci, že kmen DSM 15344 je schopný lépe růst a produkovat P(3HB) než kmen M 15344. Zdá se tedy být pro budoucí využití při produkci P(3HB) slibnější volbou. Na druhou stranu kmen M 15344 projevil vyšší odolnost vůči stresu. Z výsledných dat se zdá být pravděpodobné, že tento kmen je ve stavu, kdy se adaptuje na stres, a nemá proto takové prostředky pro růst jako DSM 15344. Z tohoto důvodu je u kmene M 15344 vyšší viabilita pozorována u vzorků s nižším obsahem P(3HB). U kmene DSM 15344 došlo při zkoumání vlivu opakovaného zmrazování a rozmrazování, k potvrzení předpokládaného výsledku, ve formě vyšší odolnosti proti stresu u buněk s vyšším obsahem P(3HB). U osmotického stresu nedošlo k potvrzení předpokládaného výsledku, při vystavení byla vyšší viabilita stanovena u buněk s nižším obsahem P(3HB). Tato skutečnost by mohla být cílem budoucího výzkumu.



## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] 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 [cit. 2022-06-24]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2022.107906
- [2] GREGORY, David, Caroline TAYLOR, Annabelle FRICKER, Emmanuel ASARE, Santosh TETALI, John HAYCOCK a Ipsita ROY. Polyhydroxyalkanoates and their advances for biomedical applications. *Trends in Molecular Medicine* [online]. 2022, 28(4), 331-342 [cit. 2022-06-24]. ISSN 14714914. Dostupné z: doi:10.1016/j.molmed.2022.01.007
- [3] CHAVAN, Shraddha, Bhoomika YADAV, R.D. TYAGI a Patrick DROGUI. A review on production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters by thermophilic microbes using waste feedstocks. *Bioresource Technology* [online]. 2021, 341 [cit. 2022-06-24]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.125900
- [4] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Martin KOLLER, Dan KUCERA a Iva PERNICOVA. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnology Advances* [online]. 2018, 36(3), 856-870 [cit. 2022-06-24]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2017.12.006
- [5] KOLLER, Martin. Biodegradable and Biocompatible Polyhydroxy-alkanoates (PHA): Auspicious Microbial Macromolecules for Pharmaceutical and Therapeutic Applications. *Molecules* [online]. 2018, 23(2) [cit. 2023-02-22]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23020362
- [6] LI, Zibiao, Jing YANG a Xian LOH. Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Materials* [online]. 2016, 8(4), 265-265 [cit. 2023-02-21]. ISSN 1884-4049. Dostupné z: doi:10.1038/am.2016.48
- [7] MOŽEJKO-CIESIELSKA, Justyna a Robert KIEWISZ. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous?. *Microbiological Research* [online]. 2016, 192, 271-282 [cit. 2023-02-21]. ISSN 09445013. Dostupné z: doi:10.1016/j.micres.2016.07.010
- [8] ZHANG, Junyu, Ekaterina SHISHATSKAYA, Tatiana VOLOVA, Luiziana DA SILVA a Guo-Qiang CHEN. Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2018, 86, 144-150 [cit. 2023-02-22]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2017.12.035
- [9] LUEF, K. P. Poly(hydroxy alkanoate)s in Medical Applications. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* [online]. 2015, 29(2), 287-297 [cit. 2023-02-22]. ISSN 03529568. Dostupné z: doi:10.15255/CABEQ.2014.2261
- [10] WILLIAMS, Simon a David MARTIN. Applications of Polyhydroxyalkanoates (PHA) in Medicine and Pharmacy. *Biopolymers* [online]. 2002, 4, 91-127 [cit. 2023-02-22]. Dostupné z: doi:10.1002/3527600035.bpol4004

- [11] KOLLER, Martin, Lukáš MARŠÁLEK, Miguel DE SOUSA DIAS a Gerhart BRAUNEGG. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnology* [online]. 2017, 37, 24-38 [cit. 2023-02-22]. ISSN 18716784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2016.05.001
- [12] TAN, D., J. YIN a G.-Q. CHEN. Production of Polyhydroxyalkanoates. In: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* [online]. Elsevier, 2017, s. 655-692 [cit. 2023-02-22]. ISBN 9780444636621. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-63662-1.00029-4
- [13] JOST, Verena a Rodian KOPITZKY. Blending of Polyhydroxybutyrate-co-valerate with Polylactic Acid for Packaging Applications – Reflections on Miscibility and Effects on the Mechanical and Barrier Properties. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* [online]. 2015, 29(2), 221-246 [cit. 2023-02-22]. ISSN 03529568. Dostupné z: doi:10.15255/CABEQ.2014.2257
- [14] PÉREZ AMARO, Lucia, H. CHEN, A. BARGHINI a Andrea CORTI. High Performance Compostable Biocomposites Based on Bacterial Polyesters Suitable For Injection Molding and Blow Extrusion. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* [online]. 2015, 29(2), 261-274 [cit. 2023-02-22]. ISSN 03529568. Dostupné z: doi:10.15255/CABEQ.2014.2259
- [15] MISRA, Superb, Sabeel VALAPPIL, Ipsita ROY a Aldo BOCCACCINI. Polyhydroxyalkanoate (PHA)/Inorganic Phase Composites for Tissue Engineering Applications. *Biomacromolecules* [online]. 2006, 7(8), 2249-2258 [cit. 2023-02-22]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm060317c
- [16] PIETRINI, Matteo, Lex ROES, Martin PATEL a Emo CHIELLINI. Comparative Life Cycle Studies on Poly(3-hydroxybutyrate)-Based Composites as Potential Replacement for Conventional Petrochemical Plastics. *Biomacromolecules* [online]. 2007, 8(7), 2210-2218 [cit. 2023-02-22]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm0700892
- [17] JENDROSSEK, Dieter. Fluorescence Microscopical Investigation of Poly(3-hydroxybutyrate) Granule Formation in Bacteria. *Biomacromolecules* [online]. 2005, 6(2), 598-603 [cit. 2022-06-24]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm049441r
- [18] KADOURI, Daniel, Edouard JURKEVITCH, Yaacov OKON a Susana CASTRO-SOWINSKI. Ecological and Agricultural Significance of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. 2008, 31(2), 55-67 [cit. 2022-06-24]. ISSN 1040-841X. Dostupné z: doi:10.1080/10408410590899228
- [19] AYUB, Nicolás, Paula TRIBELLI a Nancy LÓPEZ. Polyhydroxyalkanoates are essential for maintenance of redox state in the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. 14-3 during low temperature adaptation. *Extremophiles* [online]. 2009, 13(1), 59-66 [cit. 2022-06-24]. ISSN 1431-0651. Dostupné z: doi:10.1007/s00792-008-0197-z
- [20] SARDESAI, Nagesh a Cherukeri BABU. Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate Metabolism Is Affected by Changes in Respiratory Enzymatic Activities Due to Cold Stress in Two Psychrotrophic Strains of *Rhizobium*. *Current Microbiology* [online]. 2001, 42(1), 53-58 [cit. 2022-06-24]. ISSN 0343-8651. Dostupné z: doi:10.1007/s002840010178

- [21] ZHAO, Yan, Hong LI, Ling QIN, Hong WANG a Guo-Qiang CHEN. Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Aeromonas hydrophila* reduces its survival ability under stress conditions. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2007, 276(1), 34-41 [cit. 2022-06-24]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00904.x
- [22] KRISTJANSSON, Jakob K. *Thermophilic Bacteria*. Boca Raton: CRC Press, 2021. ISBN 9781000141696.
- [23] BERGQUIST, P. L., D. R. LOV, J. E. CROFT, M. B. STREIFF, R. M. DANIEL a W. H. MORGAN. Genetics and Potential Biotechnological Applications of Thermophilic and Extremely Thermophilic Microorganisms. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* [online]. 2013, 5(1), 199-244 [cit. 2023-05-06]. Dostupné z: doi:10.1080/02648725.1987.10647838
- [24] CHARLIER, D. a L. DROOGMANS. Microbial Life at high temperature, the challenges, the strategies. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* [online]. 2005, 62(24), 2974-2984 [cit. 2023-05-06]. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-005-5251-8
- [25] GUPTA, G.N., S. SRIVASTAVA, S.K. KHARE a V. PRAKASH. Extremophiles: An Overview of Microorganism from Extreme Environment. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology* [online]. 2014, 7(2) [cit. 2023-05-06]. ISSN 0974-1712. Dostupné z: doi:10.5958/2230-732X.2014.00258.7
- [26] SCHIRALDI, Chiara a Mario DE ROSA. Mesophilic Organisms. *Encyclopedia of Membranes* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016, 2014-12-09, 1-2 [cit. 2023-05-07]. ISBN 978-3-642-40872-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-40872-4\_1610-2
- [27] XIAO, Zijun, Yu ZHANG, Lijun XI, Fangfang HUO, Jing-yi ZHAO a Jing LI. Thermophilic production of polyhydroxyalkanoates by a novel *Aneurinibacillus* strain isolated from Gudao oilfield, China. *Journal of Basic Microbiology* [online]. 2015, 55(9), 1125-1133 [cit. 2023-05-07]. ISSN 0233111X. Dostupné z: doi:10.1002/jobm.201400843
- [28] PANTAZAKI, Anastasia A., Christos P. PAPANEOPHYTOU, Agathi G. PRITSA, Maria LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES a Dimitrios A. KYRIAKIDIS. Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8. *Process Biochemistry* [online]. 2009, 44(8), 847-853 [cit. 2023-05-07]. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2009.04.002
- [29] KOLLER, Martin. Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters by Extremophiles?. *MOJ Polymer Science* [online]. 2017, 1(2) [cit. 2023-05-07]. ISSN 25749773. Dostupné z: doi:10.15406/mojps.2017.01.00011
- [30] ELBANNA, Khaled, Tina LÜTKE-EVERSLOH, Stefanie VAN TRAPPEN, Joris MERGAERT, Jean SWINGS a Alexander STEINBÜCHEL. *Schlegelella thermodepolymerans* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic bacterium that degrades poly(3-hydroxybutyrate-co-3-mercaptopropionate). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2003, 53(4), 1165-1168 [cit. 2023-02-26]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.02562-0

- [31] KOURILOVA, Xenie, Iva PERNICOVA, Karel SEDLAR, Jana MUSILOVA, Petr SEDLACEK, Michal KALINA, Martin KOLLER a Stanislav OBRUCA. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a thermophilic strain of *Schlegelella thermodepolymerans* from xylose rich substrates. *Bioresource Technology* [online]. 2020, 315 [cit. 2023-02-26]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.123885
- [32] REINECKE, Frank a Alexander STEINBÜCHEL. *Ralstonia eutropha*/i Strain H16 as Model Organism for PHA Metabolism and for Biotechnological Production of Technically Interesting Biopolymers. *Microbial Physiology* [online]. 2008, 16(1-2), 91-108 [cit. 2023-02-27]. ISSN 2673-1665. Dostupné z: doi:10.1159/000142897
- [33] PASSANHA, Pearl, Sandra ESTEVES, Gopal KEDIA, Richard DINSDALE a Alan GUWY. Increasing polyhydroxyalkanoate (PHA) yields from *Cupriavidus necator* by using filtered digestate liquors. *Bioresource Technology* [online]. 2013, 147, 345-352 [cit. 2023-02-27]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2013.08.050
- [34] OBRUCA, Stanislav, Pavla BENESOVA, Jana OBORNA a Ivana MAROVA. Application of protease-hydrolyzed whey as a complex nitrogen source to increase poly(3-hydroxybutyrate) production from oils by *Cupriavidus necator*. *Biotechnology Letters* [online]. 2014, 36(4), 775-781 [cit. 2023-02-27]. ISSN 0141-5492. Dostupné z: doi:10.1007/s10529-013-1407-z
- [35] RIEDEL, Sebastian, Jingnan LU, Ulf STAHL a Christopher BRIGHAM. Lipid and fatty acid metabolism in *Ralstonia eutropha*: relevance for the biotechnological production of value-added products. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2014, 98(4), 1469-1483 [cit. 2023-02-27]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-013-5430-8
- [36] CIESIELSKI, Slawomir, Justyna MOŻEJKO a Nipon PISUTPAISAL. Plant oils as promising substrates for polyhydroxyalkanoates production. *Journal of Cleaner Production* [online]. 2015, 106, 408-421 [cit. 2023-02-27]. ISSN 09596526. Dostupné z: doi:10.1016/j.jclepro.2014.09.040
- [37] RAMOS, Juan, María-Trinidad GALLEGOS, Silvia MARQUÉS, Maria-Isabel RAMOS-GONZÁLEZ, Manuel ESPINOSA-URGEL a Ana SEGURA. Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 2001, 4(2), 166-171 [cit. 2023-02-28]. ISSN 13695274. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-5274(00)00183-1
- [38] SCHÖFFL, Fritz, Ralf PRÄNDL a Andreas REINDL. Regulation of the Heat-Shock Response. *Plant Physiology* [online]. 1998, 117(4), 1135-1141 [cit. 2023-03-20]. ISSN 1532-2548. Dostupné z: doi:10.1104/pp.117.4.1135
- [39] YURA, Takashi a Kenji NAKAHIGASHI. Regulation of the heat-shock response. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 1999, 2(2), 153-158 [cit. 2023-03-20]. ISSN 13695274. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-5274(99)80027-7
- [40] TANGHE, An, Patrick VAN DIJCK a Johan THEVELEIN. Determinants of Freeze Tolerance in Microorganisms, Physiological Importance, and Biotechnological Applications. In: *Advances in Applied Microbiology Volume 53* [online]. Elsevier, 2003,

- s. 129-176 [cit. 2023-02-28]. *Advances in Applied Microbiology*. ISBN 9780120026555. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-2164(03)53004-0
- [41] MAZUR, Peter. THE ROLE OF CELL MEMBRANES IN THE FREEZING OF YEAST AND OTHER SINGLE CELLS\*. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 1965, **125**(2), 658-676 [cit. 2023-05-06]. ISSN 00778923. Dostupné z: doi:10.1111/j.1749-6632.1965.tb45420.x
- [42] MAZUR, Peter. Cryobiology: The Freezing of Biological Systems. *Science* [online]. 1970, **168**(3934), 939-949 [cit. 2023-05-06]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.168.3934.939
- [43] GROUT, B, J MORRIS a M MCLELLAN. Cryopreservation and the maintenance of cell lines. *Trends in Biotechnology* [online]. 1990, **8**, 293-297 [cit. 2023-05-06]. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/0167-7799(90)90201-8
- [44] MORRIS, Justin R. Factors Influencing Grape Juice Quality. *HortTechnology* [online]. 1998, **8**(4), 471-478 [cit. 2023-05-06]. ISSN 1063-0198. Dostupné z: doi:10.21273/HORTTECH.8.4.471
- [45] NOVACKOVA, Ivana, Vendula HRABALOVA, Eva SLANINOVA et al. The role of polyhydroxyalkanoates in adaptation of *Cupriavidus necator* to osmotic pressure and high concentration of copper ions. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2022, 206, 977-989 [cit. 2023-03-20]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.03.102
- [46] TAN, Giin-Yu, Chia-Lung CHEN, Ling LI, et al. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers* [online]. 2014, **6**(3), 706-754 [cit. 2023-05-05]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym6030706
- [47] Introduction to flow cytometry. *Abcam* [online]. Cambridge [cit. 2023-05-05]. Dostupné z: <https://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry#Fluidics>
- [48] JÄGER, A. a V. GÄRTNEROVÁ. *Elektronovým mikroskopem do nitra materiálů aneb jak vypadá jejich struktura* [online]. Praha: Fyzikální ústav Akademie věd České republiky, 2017 [cit. 2023-05-05]. Dostupné z: <https://www.fzu.cz/aktuality/elektronovym-mikroskopem-do-nitra-materialu-aneb-jak-vypada-jejich-struktura>
- [49] MOKOBI, Faith a Sagar ARYAL. Scanning Electron Microscope (SEM)- Definition, Principle, Parts, Images. *Microbe Notes* [online]. Nepal, 2022 [cit. 2023-05-05]. Dostupné z: <https://microbenotes.com/scanning-electron-microscope-sem/#principle-of-scanning-electron-microscope-sem>
- [50] SCIAU, Ph. *Transmission Electron Microscopy* [online]. Elsevier, 2016, 2016, 43-67 [cit. 2023-05-05]. *Advances in Imaging and Electron Physics*. ISBN 9780128048108. Dostupné z: doi:10.1016/bs.aiep.2016.09.002
- [51] SOBUSTA, Jan. Elektronová mikroskopie transmisní a rastrovací. *Společná laboratoř optiky Univerzity Palackého v Olomouci a Fyzikálního ústavu Akademie věd ČR* [online]. [cit. 2023-05-05]. Dostupné z: [http://jointlab.upol.cz/~soubusta/OSYS/El\\_mikr/El\\_mikr.html](http://jointlab.upol.cz/~soubusta/OSYS/El_mikr/El_mikr.html)

- [52] MRAVEC, Filip, Stanislav OBRUCA, Vladislav KRZYZANEK, et al. Accumulation of PHA granules in *Cupriavidus necator* as seen by confocal fluorescence microscopy. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2016, **363**(10) [cit. 2023-05-05]. ISSN 1574-6968. Dostupné z: doi:10.1093/femsle/fnw094
- [53] SRIAMORNSAK, Pornsak, Nartaya THIRAWONG, Kamonrak CHEEWATANAKORNKOOL, Kanokporn BURAPAPADH a Witoon SAE-NGOW. *Kryo-scanning electron microscopy (kryo-SEM) as a tool for studying the ultrastructure during bead formation by ionotropic gelation of calcium pectinate. International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2008, 352(1-2), 115-122 [cit. 2023-05-11]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2007.10.038
- [54] MACEK, Karel, František HNILICA a Vladimír STARÝ. *Experimentální metody v materiálovém inženýrství*. Praha: Nakladatelství ČVUT, 2008. ISBN 978-80-01-03934-2.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

GC-FID	plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem
P(3HB)	poly(3-hydroxybutyrát)
Cryo-SEM	kryo-skenovací elektronová mikroskopie
STEM	skenovací transmisní elektronová mikroskopie
PHA	polyhydroxyalkanoáty
Scl-PHA	PHA s krátkým řetězcem
Mcl-PHA	PHA se středním řetězcem
PhaC	podjednotka PHA syntázy
PhaE	podjednotka PHA syntázy
CoA	koenzym A
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát redukováná forma
PhaA	gen syntézy PHA
PhaB	gen syntézy PHA
3HV	3-hydroxyvalerát
4HB	4-hydroxybutyrát
PHB	polyhydroxybutyrát
UV	ultrafialové záření
HSP	proteiny teplotního šoku
DnaK	protein teplotního šoku
GroEL	protein teplotního šoku
CSP	protein studeného šoku
CspA	protein A studeného šoku
FS	dopředný rozptyl
SS	boční rozptyl
PMT	fotonásobiče
TES II	roztok stopových prvků
PBS	fosfátový pufr