



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

**IDENTIFIKACE PHA PRODUKUJÍCÍCH BAKTERIÍ POMOCÍ
NÁSTROJŮ MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE**

IDENTIFICATION OF PHA PRODUCING BACTERIA EMPLOYING MOLECULAR TECHNIQUES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Barbora Gajdová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP0977/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Barbora Gajdová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Identifikace PHA produkujících bakterií pomocí nástrojů molekulární biologie

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Optimalizace phaC specifické PCR
3. Identifikace PHA produkujících bakterií v přirozených konsorciích
4. Identifikace schopnosti akumulace PHA u vybraných bakteriálních kmenů

Termín odevzdání diplomové práce: 12.5.2017

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

Bc. Barbora Gajdová
student(ka)

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá identifikací bakterií, které jsou schopny produkce polyhydroxyalkanoátů (PHA). Mezi testovanými bakteriemi byli převážně zástupci rodu *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, dále vzorky z termofilní kultury a vzorky z přírodních zdrojů. Bakterie byly testovány pomocí molekulárně biologické metody PCR. Byla analyzována amplifikace genu kódujícího PHA syntázu (*phaC*). V první reakci byl detekován jak *phaC* gen zodpovědný za syntézu PHA, tak současně i *16S* rRNA, který slouží jako ověření bakteriální DNA a u neznámých vzorků z přírodních zdrojů sloužil také jako způsob identifikace konkrétního kmenu. Jednalo se o multiplexní PCR, která využívala více primerů ve směsi pro PCR. Druhou reakcí byl hledán amplicon, který je specifický pro syntázu, jež katalyzuje biosyntézu mcl-PHA (*phaCI*). Přítomnost genu pro tvorbu PHA syntázy byla prokázána u 11 vzorků a těmi byly *Bifidobacterium breve* CCM 7825^T, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T, *Lactobacillus zeae* CCM 7069^T, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CCM 7190^T, *Lactobacillus plantarum* CCM 7039^T, *Pseudomonas gessardii*, *Pseudomonas fulva*, *Arthrobacter protophormiae*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Mycobacterium neoaurum* a *Staphylococcus lentus*.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with identification of bacteria which are capable of producing polyhydroxyalkanoates (PHAs). Work included testing variety of genera including *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, thermophilic cultures and samples gathered from natural sources. Bacteria were investigated by molecular technique polymerase chain reaction – PCR. An amplification of the PHA synthase gene (*phaC*) was analyzed. In the first reaction *phaC* and *16S* rRNA genes were tested at the same time. *16S* rRNA gene is used as control for bacterial DNA and as an identification tool for natural source samples. This multiplex PCR used multiple primers in PCR mix. Second reaction search for amplicon specific for catalysing biosynthesis mcl-PHA (*phaCI*). The presence of the PHA synthase gene was verified in 11 samples which were *Bifidobacterium breve* CCM 7825^T, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T, *Lactobacillus zeae* CCM 7069^T, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CCM 7190^T, *Lactobacillus plantarum* CCM 7039^T, *Pseudomonas gessardii*, *Pseudomonas fulva*, *Arthrobacter protophormiae*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Mycobacterium neoaurum* and *Staphylococcus lentus*.

KLÍČOVÁ SLOVA

PCR, bakteriální polyhydroxyalkanoáty, elektroforéza, PHA syntáza,

KEY WORDS

PCR, bacterial polyhydroxyalkanoates, electrophoresis, PHA synthase

GAJDOVÁ, B. *Identifikace PHA produkujících bakterií pomocí nástrojů molekulární biologie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 56 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis diplomanta

Poděkování

Ráda bych poděkovala doc. Ing. Stanislavu Obručovi, PhD. a Ing. Ivě Pernicové za ochotu, vedení a pomoc při tvorbě této diplomové práce.

Obsah:

1. Úvod.....	8
2. Teoretická část.....	9
2.1. Bakteriální producenti PHA a jejich specifikace	9
2.2. Výhody směsné kultury	10
2.3. PHA	10
2.3.1. Druhy PHA	11
2.4. Biosyntéza PHA	12
2.5. PHA syntáza jako klíčový enzym metabolismu syntézy PHA	13
2.6. Metody pro identifikaci PHA produkujících bakterií.....	16
2.6.1. PCR	16
2.6.2. Gelová elektroforéza	19
2.6.3. Sekvenace DNA	19
3. Experimentální část.....	22
3.1. Použité chemikálie, přístroje a bakterie.....	22
3.1.1. Chemikálie pro kultivaci	22
3.1.2. Komponenty pro PCR, izolaci DNA a agarózovou gelovou elektroforézu	23
3.1.3. Primery	23
3.1.4. Použité přístroje	23
3.1.5. Použité bakterie.....	24
3.2. Kultivace bakterií	26
3.2.1. Uchovávání bakterií a příprava inokula	26
3.2.2. Kultivační média	27
3.2.3. Příprava TBE pufru pro gelovou elektroforézu	28
3.2.4. Příprava lyzačního pufru	28
3.2.5. Příprava nanášecího pufru pro agarovou gelovou elektroforézu	28
3.2.6. Příprava 2% agaróзовého gelu pro elektroforézu.....	28
3.3. Použité metody.....	29
3.3.1. Sběr vzorků z přírodních zdrojů.....	29
3.3.2. Ramanova spektroskopie.....	29
3.3.3. Izolace bakteriální DNA pomocí tepelné lýze	29
3.3.4. Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA.....	29

3.3.5.	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	30
3.3.6.	Příprava vzorků pro PCR.....	30
3.3.7.	Stanovení PCR ampliconů pomocí agarové elektroforézy.....	32
3.3.8.	Přečištění PCR produktů pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kitu.....	32
3.3.9.	Příprava vzorků pro sekvenaci.....	33
4.	Výsledky a diskuze	34
4.1.	Identifikace schopnosti akumulovat PHA u bakterií rodu <i>Pseudomonas</i> pomocí molekulárních technik.....	34
4.1.1.	Sekvenace DNA u <i>Pseudomonas fulva</i> a <i>Pseudomonas gessardii</i>	37
4.2.	Termofilní kultury	38
4.3.	Bakterie mléčného kvašení	39
4.3.1.	Sekvenace DNA u bakterií mléčného kvašení.....	43
4.4.	Vzorky z přírodních zdrojů.....	43
4.4.1.	Sekvenace DNA vzorků z přírodních zdrojů.....	47
4.5.	Ramanova spektroskopie vzorků pozitivních na geny kódující PHA syntázu	48
5.	Závěr	49
6.	Seznam zkratk.....	51
7.	Seznam použitých zdrojů	52
8.	Přílohy.....	56

1. Úvod

Plasty mají všestranné kvality jako pevnost, lehkost, trvanlivost a odolnost vůči degradaci. Plasty jsou nedílnou součástí téměř všech technických a průmyslových odvětví a nahradily sklo a papír, jakožto obalové materiály. Jejich žádané vlastnosti jsou však zároveň i jejich největším slabinou. Akumulace pomalu rozložitelných plastů v přírodě se stala globálním problémem. Řešení likvidace plastového odpadu zahrnuje spalování, recyklaci, ale hlavně foto- a bio- degradaci. Spalování ovšem může být potenciálně nebezpečné (vznik kyanovodíku) a drahé. Recyklace je řešením, ovšem jedná se o zdoluhavý a náročný proces. Kromě toho, přítomnost různých aditiv jako např. pigmentů, coatovacích vrstev nebo plnidel často znemožňuje další recyklaci a použití. Z toho důvodu se jeví biodegradabilní plasty jako nejlepší řešení pro snížení dopadu konvenčních plastů na životní prostředí [1].

Polyhydroxyalkanoáty patří mezi 100% odbouratelné biopolymery. Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou polyestery hydroxyalkanoátů syntetizované velkým množstvím bakterií, jakožto intracelulární zásobárna uhlíku a energie. Akumulují se v cytoplasmě ve formě granulí. Množství bakteriálních kmenů, které zahrnuje i některé zástupce rodů *Pseudomonas*, případně transgenní *Escherichia coli* jsou využívány pro průmyslovou produkci a dosahují vysoké produktivity. I přesto, že PHA jsou v současné době považovány za dobré kandidáty pro biodegradabilní polymery, vysoké výrobní náklady omezují jejich větší průmyslové využití [2]. Procesní náklady by bylo možné snížit, pokud by se podařilo izolovat a identifikovat nové mikrobiální producenty PHA, které jsou schopny utilizace levných vstupních surovin případně akumulace méně obvyklých PHA se zajímavými mechanickými vlastnostmi.

Produkci polyhydroxyalkanoátů buňkou je možné ověřit přítomností genů kódujících enzym PHA-syntázu, která je zodpovědná za tvorbu tohoto polymeru [3]. Tato diplomová práce se zabývá ověřením přítomnosti těchto genů u vybraných bakterií pomocí metod molekulární biologie.

2. Teoretická část

2.1. Bakteriální producenti PHA a jejich specifikace

V současné době je známá celá řada kmenů, které jsou schopny akumulovat polyhydroxyalkanoáty (PHA), jakožto zásobní látky [3]. PHA jsou syntetizovány celou řadou gram pozitivních i gram negativních bakterií minimálně ze 75 různých rodů, jak široká paleta bakterií je schopna akumulace PHA dokládá Tabulka 1. PHA mohou představovat až 90% hmotnosti sušiny buňky [4]. Nízkomolekulární PHB (homopolyester 3-hydroxybutyrátu) byla detekována v cytoplazmě a cytoplazmatické membráně *Escherichia coli*. Je také součástí membrán u kvasinek, rostlin i živočichů. Pravděpodobně hrají roli v napětím řízených hořčkových kanálů, v transportu DNA a ochraně makromolekul, ke kterým je vázána [4].

Přirozeně PHA produkující bakterie mají často nízké růstové rychlosti a relativně nízkou optimální růstovou teplotu. Tyto bakterie jsou často obtížně lyzovatelné a obsahují metabolickou dráhu pro degradaci intracelulárních zásob PHA. Bakterie, jako např. *E.coli*, nejsou schopny syntézy nebo degradace PHA, avšak rostou rychle, i při vysoké teplotě a snadno lyzují. Proto je často uvažována produkce PHA pomocí geneticky modifikovaných bakterií, které jsou transformovány právě za účelem produkce PHA. Rychlý růst umožní hromadit velké množství polymeru, biosyntéza navíc polymeru navíc může být spjata s růstem. Snadná lýze buněk šetří náklady na čištění PHA granulí [3].

Tabulka 1 Seznam rodů akumulujících PHA [37]

<i>Acinetobacter</i>	<i>Ferrobacillus</i>	<i>Paracoccus</i>
<i>Actinomycetes</i>	<i>Gamphospheria</i>	<i>Pedomicrobium</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Photobacterium</i>
<i>Aphanothece</i>	<i>Halobacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Aquaspirillum</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Rhodobacter</i>
<i>Asticcauius</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Rhodococcus</i>
<i>Azomonas</i>	<i>Lamprocystis</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>
<i>Azospirillum</i>	<i>Lampropedia</i>	<i>Rhodospirillum</i>
<i>Azotobacter</i>	<i>Leptothrix</i>	<i>Sphaerotilus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Methanomonas</i>	<i>Spirillum</i>
<i>Beggiatoa</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Spirulina</i>
<i>Beneckea</i>	<i>Methylocystis</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Caryophanon</i>	<i>Methylomonas</i>	<i>Syntrophomonas</i>

<i>Caulobacter</i>	<i>Methylovibrio</i>	<i>Thiobacillus</i>
<i>Chloroflexus</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Thiocystis</i>
<i>Chlorogloea</i>	<i>Microcoleus</i>	<i>Thiodictyon</i>
<i>Chromatium</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Thiopedia</i>
<i>Chromobacterium</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Thiosphaera</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Mycoplana</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Nitrobacter</i>	<i>Xanthobacter</i>
<i>Ectothiorhodospira</i>	<i>Nitrococcus</i>	
<i>Escherichia</i>	<i>Oceanospirillum</i>	

Pro účely diplomové práce bylo vybráno spektrum zástupců – především z rodů *Lactobacillus* a *Pseudomonas*.

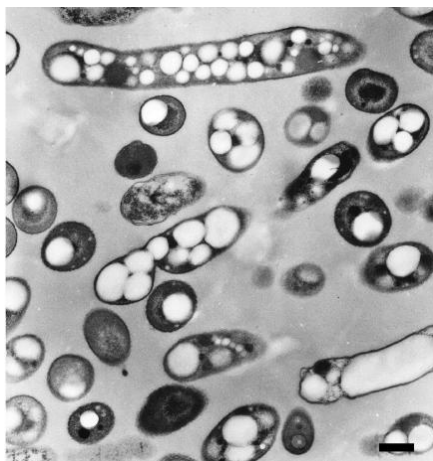
2.2. Výhody směsné kultury

Směsná kultura se skládá z 2 a více druhů mikroorganismů. Pro průmyslové využití se míchají konkrétní a přesně definované směsné kultury, které mají předem určený a jasně daný poměr jednotlivých mikroorganismů. Směsné kultury se ve velkém používají v aktivních systémech čističky odpadních vod. Aktivace spočívá v tvorbě směsné kultury mikroorganismů, volně rozptýlené ve vodě a ve větších počtech vázané ve vločkách, tvořících aktivovaný kal. Směsná kultura mikroorganismů je výsledkem spontánního směšování přitékající odpadní vody s recirkulovaným aktivovaným kalem a provzdušováním vzduchem za intenzivního míchání s určitou dobou zdržení se v aktivační nádrži [5].

2.3. PHA

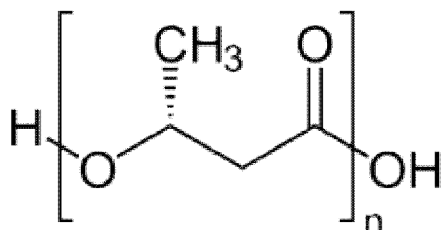
Polyhydroxyalkanoáty (PHAs) slouží jako intracelulární zdroje uhlíku a energie pro širokou skupinu mikroorganismů za zhoršených životních podmínek [1]. Těmto polymerům se v poslední době věnuje mnoho pozornosti z důvodu jejich potenciálního využití jako biodegradabilních termoplastů a elastomerů [6].

PHA se ukládají uvnitř bakteriálních buněk ve formě granulí, které jsou obalené vrstvou proteinů a fosfolipidů, jež zásadně ovlivňují tvorbu a následné využití PHA (Obrázek 1) [1].



Obrázek 1 PHB granule pod elektronovým mikroskopem [7]

V roce 1926 izoloval Lemoigne první z polyhydroxyalkanoátů - polyhydroxybutyrát (homopolymer, jehož stavební jednotkou je kyselina 3-hydroxybutanová) z bakterie *Bacillus megaterium* [8]. Na konci 50. let minulého století byla prokázána přítomnost polyhydroxybutyrátu (Obrázek 2) jako zásobní formy energie a uhlíku u řady dalších bakterií [1]. V roce 1974 byly kromě polyhydroxybutyrátu izolovány také kopolymery obsahující kromě 3-hydroxybutyrátu také 3-hydroxyvalerát a 3-hydroxyhexanoát. Od té doby byla identifikována řada mikroorganismů schopných syntézy různých polyhydroxyalkanoátů [9].



Obrázek 2 Struktura poly-(R)-3-hydroxybutyrátu

2.3.1. Druhy PHA

PHA lze rozdělit podle počtu uhlíků v monomeru a délky řetězce do 3 základních skupin: PHA s krátkým řetězcem obsahuje 3-5 uhlíků v monomeru (short-chain-length PHA, scl-PHA), PHA se středně dlouhým řetězcem obsahuje 6-14 uhlíků (medium-chain-length PHA, mcl-PHA) a PHA s dlouhým řetězcem (long-chain-length PHA, lcl-PHA), které se však příliš nevyskytují [9]. Do současné doby bylo popsáno asi 150 jednotlivých monomerů, které mohou tvořit PHA, většinou se jedná o 3-hydroxy-, vzácněji 4,6-hydroxykyseliny jak nasycené, tak nenasycené, větvené, případně s dalšími funkčními skupinami [10].

Konkrétní typ vznikajícího PHA závisí hlavně na použitém mikrobiálním kmenu, surovině, její koncentraci a délce kultivace. Některé bakterie jsou schopny syntetizovat kopolymery obsahující oba dva typy PHA (např. *Aeromonas hydrophila*) [9]. Jednotlivé druhy polymeru se liší i svými vlastnostmi – scl-PHA se vyznačuje vysokým stupněm krystaličnosti, křehkostí materiálu a vysokou tuhostí, zatímco mcl-PHA jsou elastický materiály s nižším stupněm krystaličnosti a teplotou tání (Obrázek 3).

Srovnání vybraných vlastností PHB, PHBV a polypropylenu (PP)

Mechanické vlastnosti	PHB	PHBV ^a	PP
Bod tání, °C	179	145	170
Pevnost v tahu, MPa	40	32	34,5
Youngův modul pružnosti, GPa	3,5	1,2	1,7
Tažnost, %	6	50	100–600
Hustota, kg dm ⁻³	1,2	1,15	0,9

^aSložení: 80 % PHB a 20 % PHV

Obrázek 3 Srovnání vybraných vlastností poly-3-hydroxybutyrátu (PHB), poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerátu) (PHBV) a polypropylenu (PP) [9]

Mezi nejznámější a nejběžnější zástupce scl-PHA patří poly-3-hydroxybutyrát (P3HB). Kromě něj existuje poly-4-hydroxybutyrát (P4HB) i kopolymery např. poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) – P(3HB-co-3HV), zkráceně P3HBV [3].

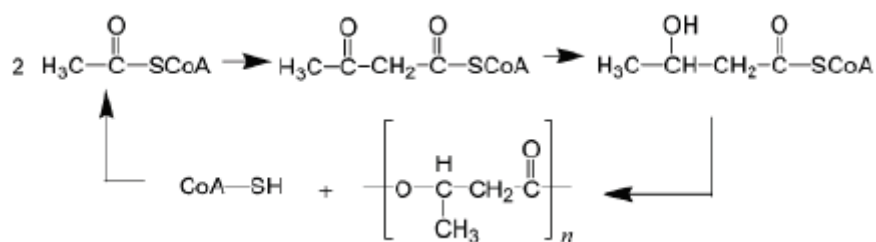
2.4. Biosyntéza PHA

Stanier, Wilkinson a spol. potvrdili, že PHB granule slouží v bakterii jako intracelulární zdroj potravy a úložiště energie [11]. Polymer je produkován buňkou jako odpověď na nedostatek živin v prostředí jako jsou dusík, fosfor, vápník případně další prvky (nicméně nadbytek uhlíkového zdroje je nezbytný) a jeho úkolem je zabránit vyhladovění. Limitace dusíkem případně dalšími prvky jinými než uhlíkatým substrátem obvykle zastaví růst a dělení bakterií a aktivuje PHB akumulaci. Na metabolické úrovni dochází k přesměrování toku acetyl-CoA z Krebsova cyklu do PHA biosyntetické dráhy. PHA představuje pro bakterie ideální zásobní zdroj uhlíku, jelikož je nerozpustný ve vodě, chemicky a osmoticky inertní a může být snadno převeden na acetyl-CoA řadou enzymatických reakcí [4].

Reakce zahrnuté v metabolické cestě odpovědné za biosyntézu PHB z kyseliny octové byly nejprve identifikovány Stanierem a spol. v roce 1959 ve studiích o tvorbě PHB u *R. rubrum*. Avšak specifické enzymy, které katalyzovaly reakce pro syntézu kyseliny 3-hydroxymáselné, monomeru pro PHB, nebyly identifikovány až do roku 1973, kdy Schlegel na univerzitě v Göttingenu, Německo a Dawes na univerzitě v Holu, Anglie, pracující nezávisle na sobě, byli schopni izolovat a charakterizovat tyto enzymy [11].

Reakce začíná pomocí dvou enzymů, které se podílejí na reakci převedení acetyl-CoA na kyselinu 3-hydroxymáselnou. Enzymem je β -ketothioláza, které katalyzuje kondenzaci dvou acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-CoA a acetoacetyl-CoA reduktáza, která katalyzuje redukci acetoacetyl-CoA na (R)-3-hydroxybutyryl-CoA (Obrázek 4) [12]. Tento monomer se

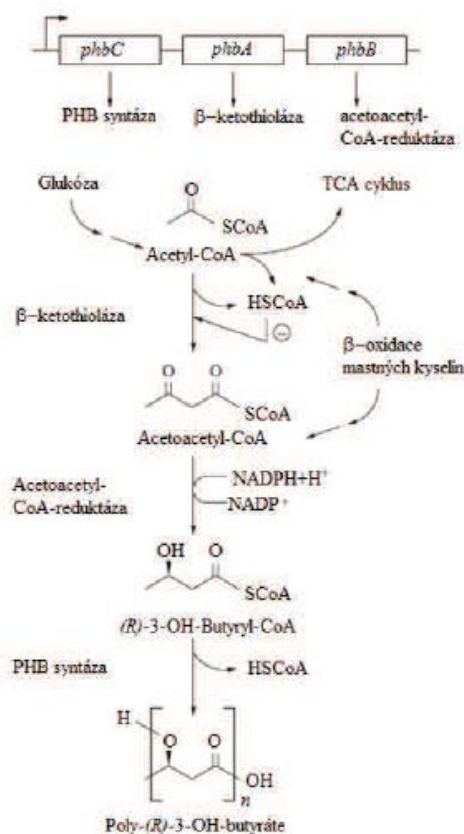
následně polymerizuje na PHB pomocí PHA-syntázy za současného odštěpení HS-CoA [13]. PHA-syntáza je tedy klíčový enzym celé biosyntézy. Z toho důvodu je na něj soustředěna experimentální část diplomové práce.



Obrázek 4 Schéma syntézy PHA [13]

2.5. PHA syntáza jako klíčový enzym metabolismu syntézy PHA

PHA syntáza je enzym, který katalyzuje stereoselektivní polymeraci (*R*)-3-hydroxybutyryl(acyl)-CoA na PHA [14]. Těchto enzymů je celá řada a můžeme je rozdělit do čtyř tříd podle počtu a uspořádání podjednotek, podle substrátové specifity a podle primární struktury [15].



Obrázek 5 Princip biosyntézy PHB u *Cupravidus necator* [16]

PHA syntázy náležící do I. a II. skupiny se skládají pouze z jedné podjednotky (*phaC*) s molekulovou hmotností od 60 do 70 kDa [17]. Dle jejich substrátové specifity bylo zjištěno, že syntázy třídy I preferují utilizaci (R)-3-hydroxyacyl-CoA s počtem uhlíků 3 až 5. Tyto syntázy se vyskytují např. u *Cupravidus necator* H16 (dříve nazývaná také jako *Ralstonia eutropha*) (Obrázek 5) [18].

Syntázy třídy II oproti tomu preferují CoA-thioestery různých (R)-3-hydroxy mastných kyselin o počtu uhlíků 6 až 14 [17]. Tyto syntázy najdeme např. u bakterií rodu *Pseudomonas* [19].

Syntázy III třídy patří mezi dimerní enzymy a katalyzují (R)-3-hydroxyacyl-CoA s počtem uhlíků 3 až 5. Mezi zástupce této třídy patří např. *Allochromatium vinosum*. První enzym vykazuje stejnou sekvenci jako podjednotka *phaC* (velikost 40 kDa), druhý enzym (podjednotka *phaE*) se však svojí strukturou liší.

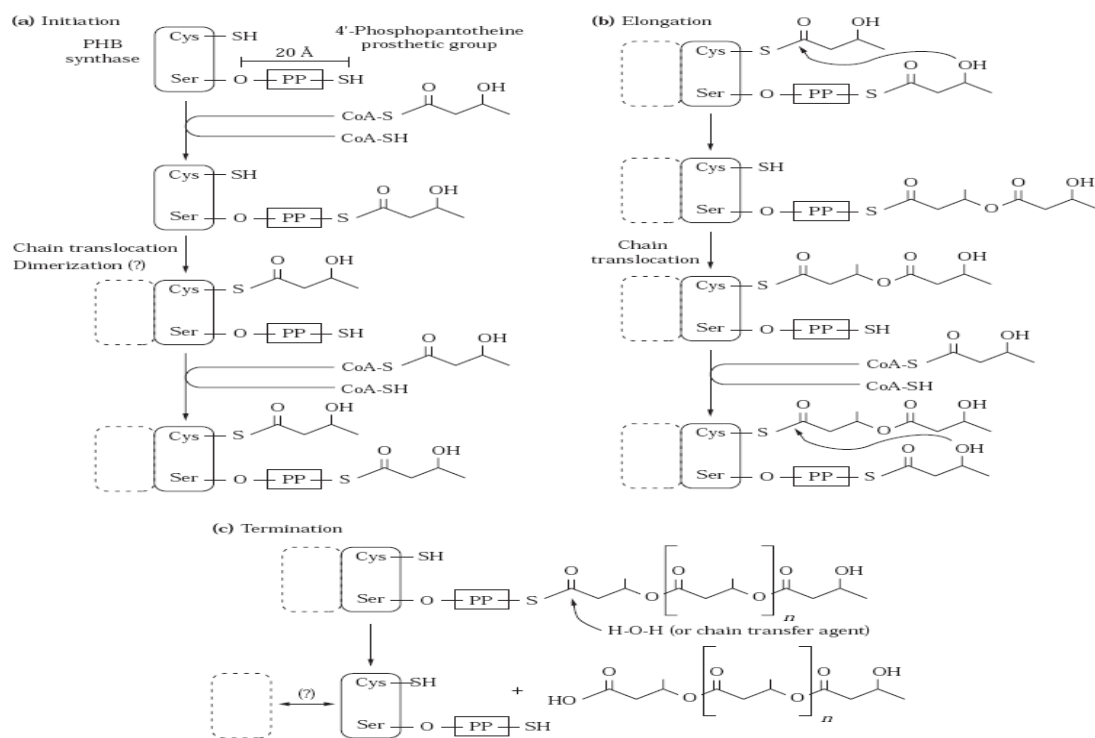
Syntázy třídy IV mají podobnou strukturu jako třída III, liší se pouze v druhé podjednotce (*phaR*) (Obrázek 6).

třída	podjednotky	bakterie	substrát
I	 ~60-73 kDa	<i>Ralstonia eutropha</i>	$3\text{HA}_{\text{SCL}}\text{-CoA}$ (-C3-C5) $4\text{HA}_{\text{SCL}}\text{-CoA}$, $5\text{HA}_{\text{SCL}}\text{-CoA}$, $3\text{MA}_{\text{SCL}}\text{-CoA}$
II	 ~60-65 kDa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$3\text{HA}_{\text{MCL}}\text{-CoA}$ (-C5)
III	 ~40 kDa ~40 kDa	<i>Allochromatium vinosum</i>	$3\text{HA}_{\text{SCL}}\text{-CoA}$ ($3\text{HA}_{\text{MCL}}\text{-CoA}$ [-C6-C8], $4\text{HA}\text{-CoA}$, $5\text{HA}\text{-CoA}$)
IV	 ~40 kDa ~22 kDa	<i>Bacillus megaterium</i>	$3\text{HA}_{\text{SCL}}\text{-CoA}$

Obrázek 6 Rozdělení tříd PHA syntáz [20]

Pravděpodobný princip syntézy PHA z monomerních jednotek je zobrazen na Obrázek 7. Klíčovým místem PHA-syntázy je Cystein₃₁₉. Enzym ke své aktivitě potřebuje také posttranslační modifikaci 4-fosfopanthothinem na serinu. V první fázi iniciace se 3-hydroxybutyryl-CoA naváže na thiolovou skupinu modifikovaného serinu a následně uvolní CoA. V další kroku se 3-hydroxybutyryl přesouvá z modifikovaného serinu na thiolovou skupinu cysteinu. Acylace Cysteinu₃₁₉ je pravděpodobně doprovázena připojením druhé jednotky PHA syntázy a také změnou konformace proteinu. Dimerní forma PHA-syntázy má větší substrátovou specifitu a kratší *Lag*-fázi tvorby polymeru.

Druhý monomer se znovu váže na modifikovaný serin a jeho 3-hydroxyskupina atakuje thioesterickou vazbu předcházejícího monomeru na Cys za vzniku dimeru. Po opětovném přesunu dimeru na Cystein₃₁₉ může modifikovaný serin přijmout další monomer. Tento proces se bez přestání opakuje a tak dochází k elongaci polyesteru. Ukončení procesu pravděpodobně způsobí voda, která uvolní vzniklý polymer z enzymu PHA syntázy.



Obrázek 7 Princip syntázy PHA [21]

2.6. Metody pro identifikaci PHA produkujících bakterií

2.6.1. PCR

Jedná se o základní molekulární techniku. Za objev polymerázové řetězové reakce (PCR – polymerase chain reaction) byla jejímu autorovi K. Mullisovi v roce 1993 (10 let po samotném objevu) udělena Nobelova cena [22]. Tato metoda slouží k amplifikaci konkrétního úseku DNA. Princip amplifikace DNA touto metodou *in vitro* je podobný replikaci DNA *in vivo* – jedná se především o komplementaritu bází. Vysoká teplota způsobí denaturaci dvoušroubovice DNA a vzniklé vlákna slouží jako templát pro samotnou reakci.

V další fázi je zapotřebí tzv. primerů – uměle připravených oligonukleotidů (velikost obvykle 20-25 bp), které se připojují na komplementární úseky řetězců DNA tak, že jejich 3'-OH konce směřují proti sobě. Pomocí primerů je zároveň vymezen úsek DNA, který bude amplifikován. Vymezeným úsekem je zpravidla konkrétní gen, který si přejeme amplifikovat pro další zpracování. Celá reakce probíhá v přístroji zvaném thermocycler (Obrázek 8). Toto zařízení je schopné v prostoru pro vzorky rychle a přesně měnit teplotu [23].



Obrázek 8 Thermocycler [24]

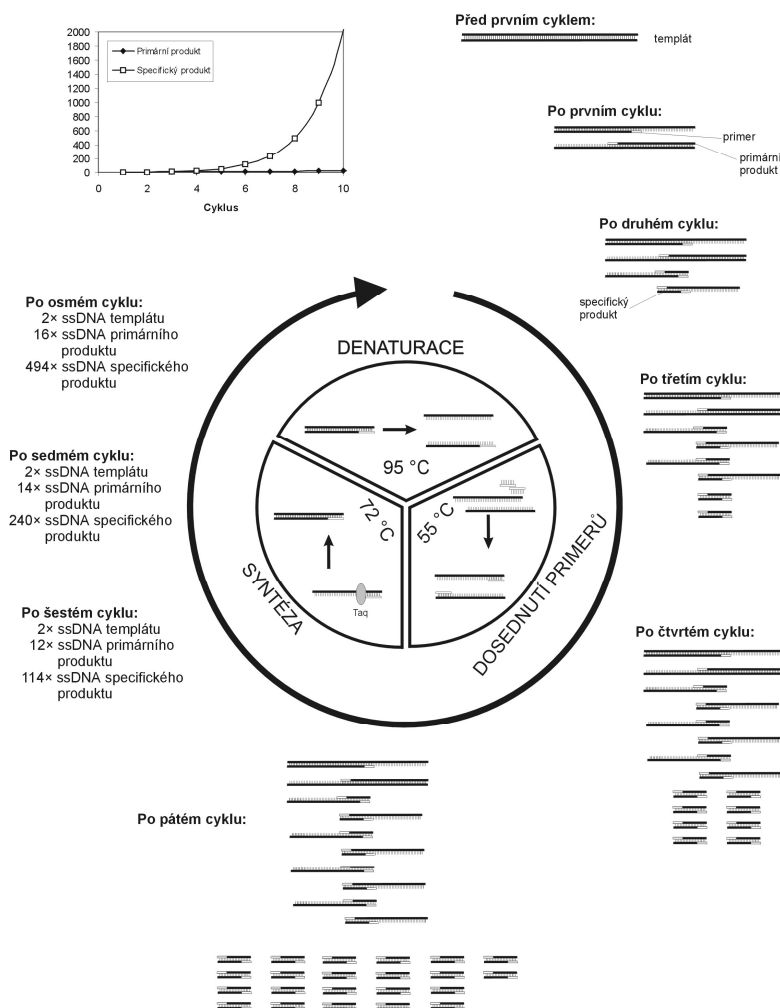
Složení reakční směsi:

- **Templátová DNA** – je zapotřebí pouze velmi malé množství vzorku (řádově jednotky μl), jelikož metoda je velmi citlivá. Při izolaci DNA musí nejdříve dojít k lyzi buňky, kde dojde k rozrušení buněčných membrán, denaturaci bílkovin a vyplavení vnitřního obsahu buňky do prostředí. Izolaci lze provést např. fenol-chloroformovou extrakcí, vysolováním, adsorpcí pomocí kolonek z oxidu křemičitého. Reaktanty nesmí být látky, které by inhibovaly DNA polymerázu, proto všechny způsoby izolace obsahují krok čištění (ethanol) a promývání.
- **Primery** – pro standardní PCR se používají primery v párech – přední, tzv. „forward“ primer a zadní tzv. „reverse“ primer. Primery v daném páru musí mít srovnatelný počet GC/AT párů. Tento údaj je velmi důležitý pro samotné nastavení reakce, jelikož podle počtu GC párů se určuje annealingová teplota. Pokud by poměr bází nebyl přibližně stejný, docházelo by k velkému množství nespecifických amplifikací. Primery se připravují na míru pro konkrétní geny specializovanými firmami.
- **Taq polymeráza** - samotnou syntézu provádí termostabilní DNA polymeráza, izolovaná nejčastěji z bakterie *Thermus aquaticus*, odkud pochází i označení *Taq* polymeráza. Jelikož je tento enzym termostabilní, uchovává si svou aktivitu i přes několikeré působení teploty blíží se teplotě varu. Polymerázy se vyrábí pomocí rekombinantních technik.
- **MgCl₂** – pufr obsahující Mg^{2+} ionty, které zajišťují stabilní prostředí reakce. Jejich koncentrace se odvíjí podle koncentrace dNTP, jelikož tento poměr určuje specifitu reakce. Působí jako kofaktor polymerázy.
- **dNTP směs** – deoxynukleotidtrifosfáty jsou základní stavební kameny pro tuto reakci. dATP, dTTP, dCTP a dGTP se obvykle nachází v roztoku v koncentraci 0,2 mM.

- H_2O – slouží pro doplnění reakce na požadovaný objem. Musí být sterilní, purifikovaná a nesmí obsahovat žádné ionty [23].

Princip reakce:

Reakce se skládá z několika částí – denaturace, annealing a syntéza (Obrázek 9). Obvykle se cyklus 30x opakuje. Po 30 cyklech by mělo být ve směsi přítomno dostatečné množství produktu, který narůstá exponenciálně. Reakce začíná úvodní denaturací a ukončuje se závěrečným ochlazením [23].

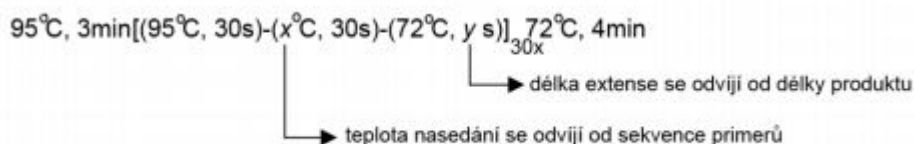


Obrázek 9 Princip PCR [25]

Reakce probíhá v několika krocích:

1. Úvodní denaturace – je důležitá hlavně u genomové DNA vzhledem k její délce. Provádí se při teplotě 95°C po dobu 3-5 minut. Proběhne pouze v prvním cyklu.
2. Denaturace – provádí se při teplotě 94-94 °C po dobu 30 – 90 s.

3. Nasednutí primerů („annealing“) – Při této teplotě dochází k nasednutí primerů na templátový řetězec. Doba nasedání bývá zpravidla 30 s. Teplota nasednutí je pro každý primer specifická a určuje se z poměru zastoupení GC:AT párů.
4. Elongace – V tomto kroku vzniká nové vlákno. Doba prodlužování je závislá na aktivitě polymerázy a délce produktu (Obrázek 10). Obvykle při produktech 100-800 bp trvá 30 s.
5. Závěrečné ochlazení – zajišťuje dosyntetizování všech produktů, ochlazuje směs na 4°C po dobu minimálně 3 minut.



Obrázek 10 Obecné schéma profilu PCR [23]

Výsledkem PCR je produkt, který obsahuje naamplifikovaný konkrétní úsek DNA. Množství vznikajícího produktu je možné pozorovat pomocí tzv. real-time PCR, kdy se fluorescenční sonda váže na amplifikovanou část DNA a přírůstek produktu tak můžeme sledovat v reálném čase [26]. Namnožený úsek DNA se následně může použít k sekvenaci, vnášení mutací do vzorku nebo např. v kriminalistice k identifikaci osob. PCR se nejčastěji detekuje gelovou elektroforézou [26].

2.6.2. Gelová elektroforéza

Jedná se o separační metodu, kdy dochází k oddělení produktů na základě odlišné velikosti náboje. Molekula DNA nese záporný náboj a pohybuje se gelem v elektrickém poli od katody k anodě. Gel tvoří síť s definovanou velikostí pórů, kterou molekuly prochází – jedná se tedy o techniku molekulového síta [27]. Pro elektroforézu DNA se používá agarózový gel, nosičem pro proteiny je polyakrylamid. Separovaná DNA je po barvení pozorována pod UV světlem. Nejčastěji používaným barvivem je ethydiumbromid, od kterého se ovšem v poslední době upouští, jelikož je velmi toxický a karcinogenní [28]. Řešením jsou nové netoxické barviva jako např. Midori Green [29]. Obecně se jedná o interkalační činidla, která se vmezeřují do struktury DNA a pouze po této vazbě vykazují fluorescence s detekovatelnými kvantovými výtěžky.

2.6.3. Sekvenace DNA

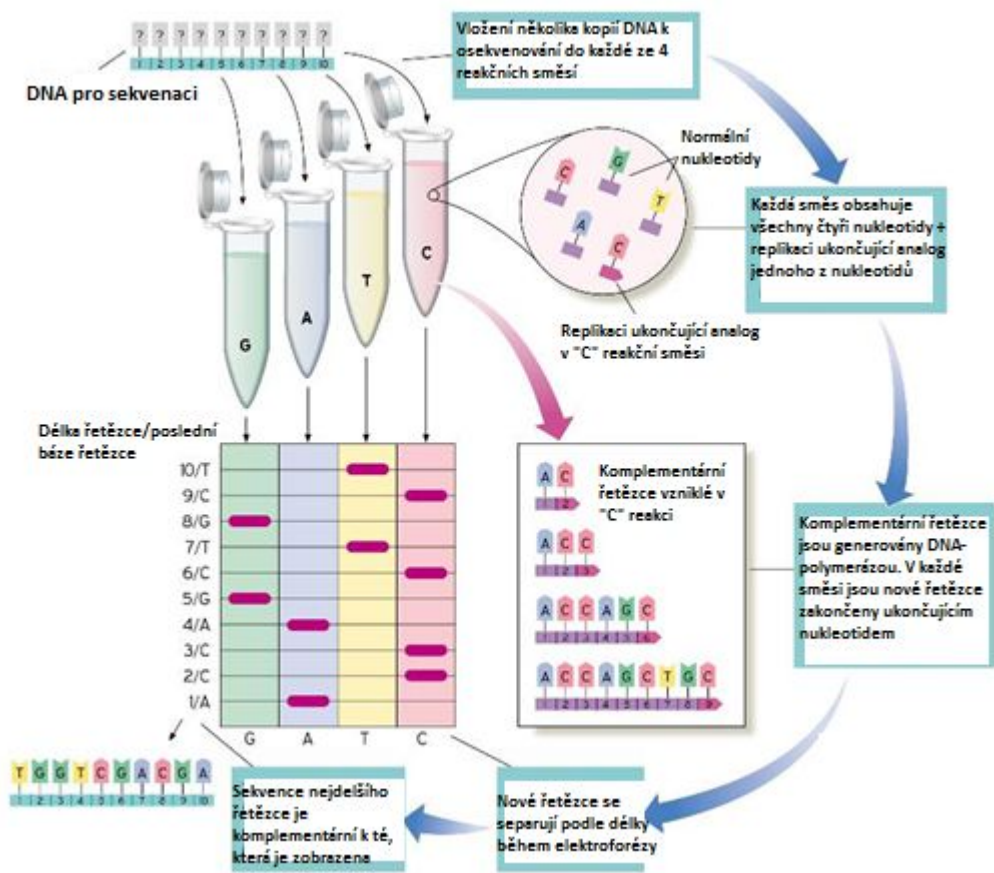
Pomocí sekvenace zjišťujeme pořadí nukleových bází (A, C, G, T) v krátkých sekvencích DNA. První sekvenace probíhaly v 70. letech minulého století pomocí pracných metod založených na dvoudimenzionální chromatografii. Později se vyvíjely metody na bázi fluorescence a DNA sekvenaceru [29]. DNA sekvenování se stalo jednodušší a řádově rychlejší. Nejčastější způsob sekvenace je pomocí Sangerovy metody.

Sangerova metoda (někdy také bývá označovaná jako metoda „plus a mínus“, „dideoxy“ metoda nebo metoda „primed synthesis“) spočívá v syntéze nového vlákna DNA

podle templátové jednovlákně DNA, která slouží jako předloha. Syntézu zprostředkovává DNA-polymeráza a syntéza nového vlákna končí na konkrétním místě v závislosti na sekvenci DNA, se kterou pracujeme. Reakce probíhá přidáváním nukleotidů ve směru 5'-3'. Nové nukleotidy jsou přidávány pomocí DNA-polymerázy. Ke správnému průběhu reakce tedy potřebujeme templátovou ssDNA, nukleotidtrifosfáty (dATP, dCTP, dGTP a dTTP), dideoxynukleotidtrifosfáty (ddCTP, ddATP, ddGTP a ddTTP) a DNA-polymerázy. Nukleotidtrifosfáty obsahují 2-deoxyribózu (tzn. na druhém C ribózy není OH-skupina), zatímco dideoxynukleotidtrifosfátům chybí OH-skupina na druhém i třetím uhlíku. Při sekvenování se využívá tři „klasických“ nukleotidů a jednoho dideoxynukleotidtrifosfátu.

Reakce probíhá standardním způsobem, až do okamžiku, kdy se místo „klasického“ nukleotidu naváže dideoxynukleotid. Když se DNA-polymeráza následně pokusí připojit další nukleotid, nebude to možné, jelikož na 3. uhlíku bude chybět OH-skupina a nedojde proto k vytvoření fosfodiesterové vazby a syntéza zde skončí. Následně se úsek rozdělí na gelu pomocí elektroforézy, čímž zjistíme délku nově vytvořeného řetězce a určíme tak pozici prvního nukleotidu (např. guaninu) [30].

Pozici dalšího guaninu v řetězci zjistíme tak, že do směsi se přidá nejenom dideoxynukleotid, ale i jeho normální partner – tedy deoxynukleotid. Poměr těchto nukleotidů musí být 100 dCTP : 1 ddCTP. Tím zajistíme, že pravděpodobnost, že se připojí další ddCTP je pouze 1%. Ve směsi je tedy přítomno více templátových vláken a syntéza probíhá na všech z nich. Získáme tedy velké množství dalších templátů. Když se DNA-polymeráza dostane do místa, kde je na templátu přítomný guanin, pravděpodobnost, že se připojí ddCTP je pouze 1:100 a došlo by k zastavení syntézy. Pokud se však připojí dCTP syntéza pokračuje dále až do té doby, než se připojí další ddCTP. Tímto způsobem získáme velké množství směsí, které všechny končí guaninem. Seřadíme-li je podle velikosti, zjistíme přesně, na kterých místech se daná báze nachází. Stejný postup se provádí i s ostatními bázemi [27].



Obrázek 11 Sangerova metoda [31]

3. Experimentální část

3.1. Použité chemikálie, přístroje a bakterie

3.1.1. Chemikálie pro kultivaci

- Nutrien Broth (HIMEDIA, IND)
- Peptone (HIMEDIA, IND)
- Agar powder (HIMEDIA , IND)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Lach-ner, ČR)
- KH_2PO_4 (Lach-ner, ČR)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Lach-ner, ČR)
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Lach-ner, ČR)
- Roztok stopových prvků
- Rostlinný olej – kukuřičný (Vitae d'Oro, SRN)
- Kyselina oktanová (Sigma-Aldrich, SRN)
- Spirit Blue agar (Sigma-Aldrich, SRN)
- MRS Broth (HIMEDIA, IND)
- Ethanol (Lach-ner, ČR)
- Tryptone soya broth (OXOID, UK)
- Sterilní voda pro injekce (B Braun, USA)
- Midori Green (NIPPON Genetics EUROPE, EU)

Složení roztoku stopových prvků:

FeCl_3	9,7 g
CaCl_2	7,8 g
CuSO_4	0,156 g
CoCl_2	0,119 g
NiCl_2	0,118 g
CuCl_2	0,062 g
0,1 M HCl	1 000 ml

3.1.2. Komponenty pro PCR, izolaci DNA a agarózovou gelovou elektroforézu

- Master mix OneTaq Hot Start (2x koncentrovaný) se standardním pufrem;
složení: 20 mM Tris-HCl (pH 8,9), 1,8 mM MgCl₂, 22 mM NH₄Cl₂, 22 mM KCl, 0,2 mM dNTPs, 5% glycerol, 0,06% IGEPAL CA-630, 0,05% Tween 20, 25 jednotek/ml OneTaq Hot Start DNA polymeráza (New England Bio Labs, UK)
- 25 mM MgCl₂ (ThermoScientific, USA)
- Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe, SRN)
- Sterilní voda Aqua pro injectione (B.BraunMedical, SRN)
- Primery (Generi- Biotech, ČR)
- Agarosa (Sigma-Aldrich, SRN)
- DNA ladder – velikost fragmentů 3 000, 1 500, 1 000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp (Nippon Genetics Europe, EU)
- NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, SRN)

3.1.3. Primery

	Primer	Velikost [bp]	Sekvence bází	Teoretická teplota tání [°C]
phaC	G-D	551	GTGCCGCCSYRSATCAACAAGT	62,7
	G1-R		GTTCCAGWACAGSAKRTCAGAA	54,5
phaC1	E1-D	1965	GGAGCGTCGTAGATGAGTAACAAGAA	58
	E1-R		AGGTTGGCGCCGATGCCGTTGAA	66,2
16S RNA	16S-F	1500	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	54,6
	16S-R		GGTTACCTTGTTACGACTT	49,4

Modifikace Y = C/T, R = A/G, K = G/T, S = G/C, W = A/T

Výrobce: firma Generi-Biotech

3.1.4. Použité přístroje

- Zdroj napětí MP 300 V (Major Science)
- Gradientový Palm-cycler (CorbettResearch)
- Laminární box (Bio Air Instruments)
- Laboratorní váhy Scout Pro (Ohaus)

- Centrifuga (Sigma Santorius)
- UV – transluminátor (Major Science)
- Ramanův spektrofotometr
- blokový termostat Stuart SBH 200D (Bibby Scientific)
- nanofotometr Pearl (Implen)

3.1.5. Použité bakterie

Pro experimentální část byly použity bakterie z České sbírky mikroorganismů Masarykovy university v Brně (Czech Collection of Microorganisms – CCM). Další část bakterií pocházela z přírodních zdrojů.

Tabulka 2 Bakterie z České sbírky mikroorganismů CCM (pokud není označeno jinak)

Název bakterie	Označení vzorku
<i>Cupravidus necator</i> H16 CCM 3726	H16
<i>Escherichia coli</i> CCM 7395	E.coli
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCM 4833 ^T	L1
<i>Bifidobacterium longum</i> CCM 4990	LONG
<i>Bifidobacterium breve</i> CCM 7825 ^T	BRE
<i>Bifidobacterium bifidum</i> CCM 3762	BIF
<i>Lactobacillus amylovorus</i> CCM 4380 ^T	L2
<i>Lactobacillus johnsonii</i> CCM 2935	L3
<i>Lactobacillus gasserri</i> CCM 7009 ^T	L4
<i>Lactobacillus fermentum</i> CCM 7192 ^T	L5
<i>Lactobacillus salvarius subsp. salivarius</i> CCM 7274	L6
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCM 1825 ^T	L7
<i>Bifidobacterium animalis</i> CCM 4988 ^T	L8
<i>Lactobacillus salvarius subsp. salivarius</i> CCM 7561 ^T	L9
<i>Lactobacillus salvarius subsp. salivarius</i> CCM 7857	L10
<i>Lactobacillus paracasei subsp. tolerans</i> CCM 7092 ^T	L11
<i>Lactobacillus paracasei</i> CCM 7053	L12
<i>Lactobacillus zeae</i> CCM 7069 ^T	L13
<i>Oxalicibacterium flavum</i> CCM 7086 ^T	L14
<i>Lactobacillus casei</i> CCM 4798	L15
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> CCM 7190 ^T	L16
<i>Lactobacillus plantarum</i> CCM 7039 ^T	L17

Tabulka 3 Seznam vzorků z přírodních zdrojů

Označení vzorku	Místo sběru	Doba expozice v prostředí [min]
K1	Koňská stáj, Karviná	20
K2	Koňská stáj, Karviná	20
K3	Koňská stáj, Karviná	20
K4	Koňská stáj, Karviná	20
K5	Koňská stáj, Karviná	20
K6	Koňská stáj, Karviná	20
Z1	Záchodové prkýnko v domácnosti, Brno	30
KO	Kočí záchod, silikátové stelivo, Brno	15
BA	Balkonový parapet, 5. patro, Brno	20
BR	Pokoj v rodinném domě, Zašová	20
LE1	Lesní půda, Zašová	30
LE2	Lesní půda, Zašová	30
KL1	Kuchyňská linka v domácnosti, Brno	30
KL2	Kuchyňská linka v domácnosti, Brno	30
KL3	Kuchyňská linka v domácnosti, Brno	30
T1	Termofilní kultura, čistička odpadních vod, Brno	Tekutá kultura
T2	Termofilní kultura, čistička odpadních vod, Brno	Tekutá kultura

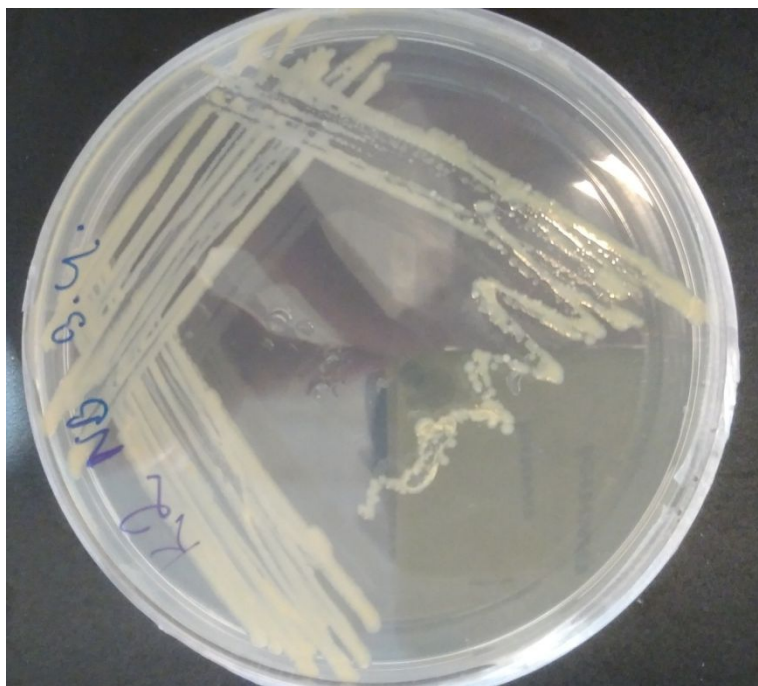
Tabulka 4 Bakterie rodu *Pseudomonas*

<i>Pseudomonas gessardii</i> Stěr z půdy, dodáno firmou Dekonta a.s.	D2
<i>Pseudomonas fulva</i> Stěr z půdy, dodáno firmou Dekonta a.s.	D3

3.2. Kultivace bakterií

3.2.1. Uchovávání bakterií a příprava inokula

Bakterie dodávané v lyofilizovaném stavu (H16, *E.coli*) byly oživeny dle přiloženého návodu a kultivovány na Petriho miskách obsahujících pevné médium Nutrient Broth v termostatu při teplotě 30 °C. Po kultivaci byly všechny bakterie uchovávány při teplotě 4°C a pravidelně přeočkovávány na nové Petriho misky pomocí křížového roztěru (Obrázek 12).



Obrázek 12 Přesazení vzorku K2 pomocí křížového roztěru

Termofilní kultury T1 a T2, které byly získány pomocí křížového roztěru ze směsné termofilní kultury, byly kultivovány v tekutém médiu v Erlenmayerových baňkách o objemu 100 ml obsahujících 50 ml média Tryptone Soya Broth. Kultivace byla prováděna na temperované třepačce při teplotě 60°C a 180 rpm po dobu 48 hodin. Poté bylo inokulem naočkováno produkční médium. Do tekutého média bylo obvykle přidáváno 5 % z celkového objemu inokula. Termofilní kultury byly následně přesazovány na pevné médium pomocí křížového roztěru.

Bakterie *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium bifidum* byly kultivovány na Petriho miskách obsahující pevné médium MRS Broth. Kultivace probíhala po dobu 24 hodin při 30°C.

Bakterie mléčného kvašení L2-L17 byly získány ve formě čistých DNA lyzátů a byly použity přímo pro PCR.

Vzorky z přírodních zdrojů byly prvotně kultivovány na pevném minerálním médiu s přídavkem rostlinného oleje a MES a na pevném médiu Spirit Blue agar s přídavkem rostlinného oleje. Vzhledem ke špatnému růstu na médiu Spirit Blue agar bylo pro další kultivaci používáno pouze minerální médium. Kultivace probíhala po dobu 48-76 hodin v závislosti na typu média při teplotě 30°C.

3.2.2. Kultivační média

Pro uchování bakterií z přírodních zdrojů bylo použito pevné agarové médium Nutrient Broth o složení:

Pepton	10 g/l
Beef extrakt	10 g/l
NaCl	8 g/l
Agar	17 g/l

Pro kultivaci bakterií *L.acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium bifidum* bylo použito pevné médium MRS Broth o složení:

Proteosový pepton	10 g/l
Beef extrakt	10 g/l
Yeast extrakt	5 g/l
Dextrosa	20 g/l
Polysorbát 80	1 g/l
$C_6H_{14}N_2O_7$	2 g/l
$C_2H_3NaO_2$	5 g/l
$MgSO_4$	0,1 g/l
$MnSO_4$	0,05 g/l
K_2HPO_4	2 g/l
Agar	17 g/l

Pro kultivaci termofilních kultur bylo použito médium Tryptone Soya Broth o složení:

Pankreatickými enzymy štěpený kasein	17 g/l
Enzymaticky štěpené sojové boby	3 g/l
NaCl	5 g/l
K_2HPO_4	2,5 g/l
Glukóza	2,5 g/l
Agar	17 g/l

Minerální (produkční) médium pro kultivaci přírodních vzorků obsahovalo:

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	11,1 g/l
$(NH_4)_2SO_4$	1 g/l
KH_2PO_4	1,05 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g/l
Agar	17 g/l

MES	1 ml/l
Rostlinný olej	20 g/l

Pro kultivaci a získání vzorků bylo použito médium Spirit Blue agar o složení:

Enzymaticky hydrolyzovaný kasein	10 g/l
Yeast extrakt	5 g/l
Spirit Blue	0,15 g/l
Agar	17 g/l
Rostlinný olej	30 ml/l

3.2.3. Příprava TBE pufru pro gelovou elektroforézu

Pro přípravu 10x koncentrovaného TBE pufru bylo použito:

Tris (hydroxymethyl) aminomethan	108 g
H ₃ BO ₃	55 g
EDTA	9,3 g
Destilovaná voda	1000 ml

3.2.4. Příprava lyzačního pufru

Pro přípravu pufru bylo použito:

Tris(hydroxymethyl)aminomethan 5mM pH 8,5 0,0605 g

Tato navážka byla rozpuštěna v 80 ml destilované vody, následně bylo pH upraveno pomocí HCl a roztok se doplnil na objem 100 ml. Následně byl roztok vysterilizován a zamražen pro další použití

3.2.5. Příprava nanášecího pufru pro agarovou gelovou elektroforézu

Pro přípravu nanášecího pufru bylo použito:

Bromfenolová modř 20 mg
Glycerol 3 ml
Destilovaná voda 7 ml

3.2.6. Příprava 2% agaróзовého gelu pro elektroforézu

K navážce 2 g agarózy bylo přidáno 100 ml TBE pufru. Směs byla poté opakovaně zahřívána v mikrovlnné troubě až do úplného rozpuštění všech částic agarózy. Po částečném ochlazení bylo do roztoku napipetováno 5 µl barviva Midori Green. Gel byl nalit do vany pro elektroforézu, v které byly přichystány hřebínky pro tvorbu jamek na pipetování roztoku do gelu. Po ztuhnutí gelu byly hřebínky vyjmuty. Gel byl popřípadě uchováván v 1x koncentrovaném TBE pufru v ledničce.

3.3. Použité metody

3.3.1. Sběr vzorků z přírodních zdrojů

Petriho misky obsahující minerální médium s přidavkem rostlinného oleje a Petriho misky obsahující médium Spirit Blue agar s přidavkem rostlinného oleje byly po dobu 15-30 minut otevřeny a volně položeny na předem vybraném místě (koňská stáj, záchodová mísa, kuchyňská linka, atd). Místa byly vybírány pro získání co největšího spektra mikrorganismů. Následně byly vzorky kultivovány 48 hodin při teplotě 30°C.



Obrázek 13 Vzorek získaný z kočičího záchodu, směs různých kultur

3.3.2. Ramanova spektroskopie

Vzorky pro Ramanovu spektroskopii byly připraveny pomocí roztěru bakterií na agarové minerální médium, které obsahovalo přidavek kyseliny oktanové o koncentraci 0,25 g/l a kultivovány po dobu 48 hodin při teplotě 30°C. Vzorky byly dále měřeny bez jakékoliv další úpravy přímo na misce na Ramanovském mikroskopu Renishaw.

3.3.3. Izolace bakteriální DNA pomocí tepelné lýze

Do 100 μ l lyzačního pufru byla přidána jedna bakteriologická klička buněk a následně byl vzorek inkubován po dobu 15 minut při teplotě 90°C v blokovém termostatu. Následně byl vzorek centrifugován po dobu 15 minut při 10 000 rpm. V laminárním boxu za sterilních podmínek byl následně slit supernatant do čisté Eppendorfovy zkumavky. Vzorek byl následně uchováván zmražený při teplotě – 30°C.

3.3.4. Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA

Měření byla prováděna na spektrofotometru NanoPhotometerTMImplen (lid 10). Jako blank byl využíván čistý pufr o objemu 3 μ l. Následně byly proměřeny vzorky izolované DNA. Byl použit stejný objem – tedy 3 μ l. Byla odečtena hodnota koncentrace DNA v μ g/ml a poměr A260/A280 pro kontrolu čistoty. Ideální poměr je 1,800, nižší hodnota indikuje znečištění proteiny, vyšší kontaminaci RNA.

3.3.5. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pomocí PCR byla prováděna amplifikace fragmentů DNA o velikosti 1500 bp pomocí primerů 16S-F a 16S-R. Tyto primery byly navrženy a syntetizovány firmou Generi- Biotech. Jedná se o gen *16S* rRNA, který se vyskytuje u všech bakterií a kóduje ribozomální RNA. Tento gen je často využíván v mikrobiologii jako rychlý a levný způsob pro identifikaci bakterií [34]. Zároveň byla prováděna amplifikace fragmentu DNA o velikosti 551 bp pomocí primerů G-D a G1R, které selektivně amplifikují *phaC* gen kódující tvorbu syntázy třídy I a II. Dále bylo také provedeno stanovení *phaC1* genu, jakožto fragmentu o délce 1965 bp, pomocí primerů E1-D a E1R. Tato PCR reakce sloužila pro selektivní amplifikaci PHA syntázy třídy II (syntéza mcl-PHA) a byla provedena pouze u bakterií, u kterých byla prokázána přítomnost genu *phaC*.

Při každé reakci byla použita negativní a pozitivní kontrola. Negativní kontrolu představovala směs, která obsahovala místo 2 μ l DNA 2 μ l vody. Tímto způsobem bylo ověřováno, zda nedošlo ke kontaminaci jednotlivých komponent. Jako pozitivní kontrola byl využíván vzorek DNA, který obsahoval hledané geny.

3.3.6. Příprava vzorků pro PCR

Směs pro PCR amplifikující geny *16S* rRNA a *phaC* obsahovala tyto složky:

Tabulka 5 Obsah smědi pro PCR s geny *16S* rRNA a *phaC*

Komponenta	Objem [μ l]
MasterMix	12,5
DNA	2
Mg ²⁺ ionty	2,6
Primery (16S-F + 16S-R a G-D + G1R)	1+1
Sterilní voda	5,9
Celkový objem:	25

Pro PCR byl použit teplotní program s annealingovou teplotou 55°C.

Tabulka 6 Teplotní program PCR pro geny *16S* rRNA nebo *phaC*

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
1	94	30	1
2	94	30	30
	55	30	
	68	90	
3	68	300	1
	30	60	

Pro vzorky, u kterých byl amplifikován gen pro *phaC1* byla použita koncentrace Mg²⁺ iontů 1,8 mM.

Tabulka 7 Obsah směsi pro PCR s geny *phaCI*

Komponenta	Objem [μ l]
MasterMix	12,5
DNA	2
Mg ²⁺ ionty	1,8
Primery (E1D + E1R)	1+1
Sterilní voda	6,7
Celkový objem:	25

Pro PCR byl použit teplotní program s annealingovou teplotou 60°C.

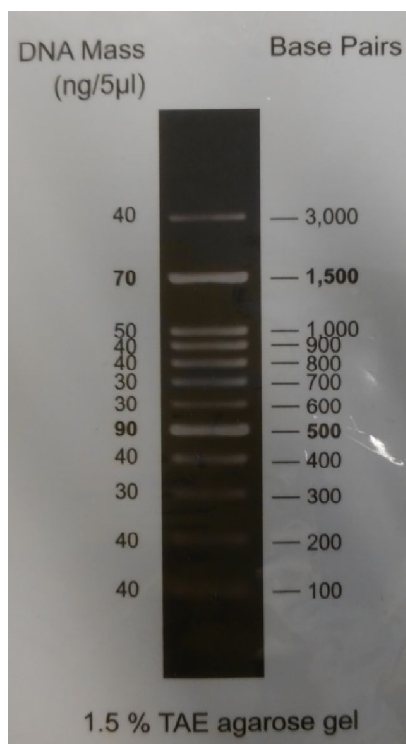
Tabulka 8 Teplotní program PCR pro gen *phaCI*

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
1	94	30	1
2	94	30	30
	60	30	
	68	90	
3	68	300	1
	30	60	

3.3.7. Stanovení PCR ampliconů pomocí agarové elektroforézy

Do 2% agaróзовého gelu do nanášecí jamky bylo napipetováno 10 μ l směsi, která se skládala z 5 μ l nanášecího pufru a 10 μ l vzorku. Do jedné z jamek v gelu byl také napipetován DNA žebříček s definovanou velikostí fragmentů (20)

Vana s gelem byla převrstvena TBE puftrem, tak aby byl celý gel ponořený. Poté byla spuštěna elektroforéza na 90 minut při napětí 90 V. Po 90 minutách byl gel vyjmut a pozorován pod UV transluminátorem.



Obrázek 14 DNA standard 3 000 bp

3.3.8. Přečištění PCR produktů pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kitu

Vzorky, které byly určeny pro sekvenaci bylo nutné přečistit, aby nedocházelo k rušení signálu díky zbytkům proteinů, solí a dalších kontaminací přítomných v PCR produktu.

Vzorky byly upraveny na objem min. 30 μ l. Následně byly smíchány s NTI puftrem v poměru 1:2. Následně byly vzorky převedeny do kolonky obsahující křemíkovou mikrofiltrační membránu. Tato kolonka byla vložena do sběrné zkumavky. Vzorky byly poté centrifugovány po dobu 30 s při 11 000 x g. Roztok ze sběrné zkumavky byl vylit a kolonka znovu vložena na zkumavku.

Následně bylo do kolonky napipetováno 700 μ l NT3 pufru a vzorky byly opět centrifugovány 30 s při 11 000 x g. Poté byla sběrná zkumavka ještě jednou vylita a nasazena zpět na kolonku. Pro úplné vysušení kolonky od NT3 pufru byla kolonka inkubována 3 minuty při teplotě 70 °C a následně opět centrifugována po dobu 1 min při 11 000 x g.

Následně byla na kolonku nasazena nová čistá Eppendorfova zkumavka. Na membránu bylo napipetováno 20 μ l NE pufru a zkumavka byla inkubována při teplotě 70°C po dobu 3 minut. Tímto krokem bylo dosaženo uvolnění většího množství DNA do roztoku. Následně byl vzorek centrifugován 1 minutu při 11 000 x g. Kolonka byla odebrána a nevyužitý vzorek byl zamrazen pro pozdější použití.



Obrázek 15 Princip přečištění PCR produktu [39]

3.3.9. Příprava vzorků pro sekvenaci

Pro sekvenaci byly použity přečištěné vzorky pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kitu. Vzorky byly zasílány do firmy SEQme s.r.o. Bylo napipetováno 5 μ l vzorku do čisté Eppendorfovy zkumavky a k vzorku bylo přidáno 5 μ l odpovídajícího primeru. „forward“ a „reverse“ primer byly přidávány ke každému vzorku zvlášť – tzn., že pro sekvenaci jednoho genu bylo potřeba připravit dva vzorky. Čistota vzorku byla ověřena pomocí spektrofotometru. Všechny vzorky dosahovaly velmi dobré čistoty v rozmezí poměru absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 1,700-1,850. Průměrná koncentrace vzorků byla 45 $\mu\text{g/ml}$, což splňovalo požadavky firmy pro správnou sekvenaci [32].

4. Výsledky a diskuze

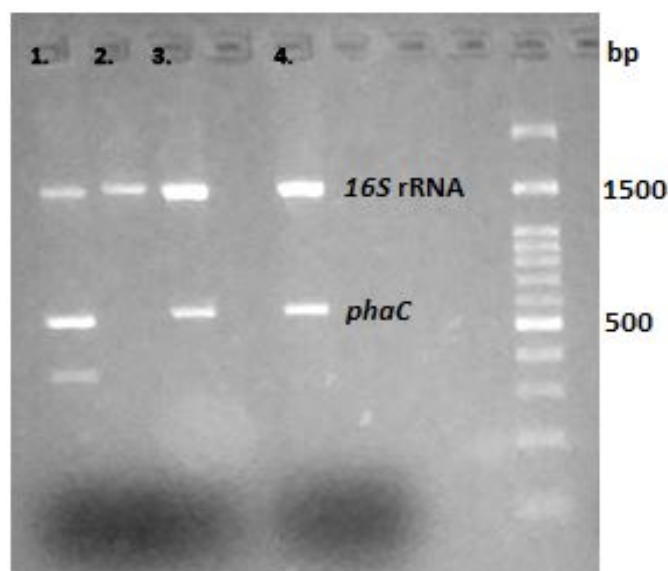
Cílem práce bylo otestovat vybrané bakteriální kmeny na přítomnost genu pro PHA syntázu. Mezi vybrané bakteriální kmeny patřily bakterie rodu *Pseudomonas* dále bakterie mléčného kvašení, vzorky termofilních kultur a vzorky z přírodních zdrojů. U neznámých vzorků byla následně zjišťována přesná sekvence bázi pro identifikaci bakterie, případně stanovení sekvence *phaC* genu kódujícího PHA syntázu. V rámci práce byly použity spektroskopické, mikrobiální a molekulární techniky.

Základem bylo použití metody, která by ověřila schopnost produkce PHA na úrovni genotypu. Jako vhodná metoda byla vybrána polymerázová řetězová reakce (PCR), která dokáže replikovat specifický úsek DNA. Prvním krokem procesu byla izolace DNA. Jednalo se o izolaci DNA pomocí tepelné lýze buňky. Za účelem amplifikace byly reakce nastaveny tak, aby v první reakci byl detekován jak *phaC* gen zodpovědný za syntézu PHA tak současně i *16S* rRNA, který slouží jako ověření bakteriální DNA a u neznámých vzorků z přírodních zdrojů sloužil také jako způsob identifikace konkrétního kmenu. Jednalo se tedy o multiplexní PCR, která využívala více primerů ve směsi pro PCR.

Pro vzorky u kterých byla prokázána přítomnost genu *phaC*, byla následně připravena PCR reakce amplifikující gen *phaC1*. Tento gen umožňuje určit substrátovou specifitu PHA syntázy. Amplikon, který vzniká v této reakci je specifický pro syntázu, jež katalyzuje biosyntézu mcl-PHA. Nastavení PCR reakcí bylo převzato z práce Ing. Veroniky Skřivanové, která se zabývala optimalizací této metody [33].

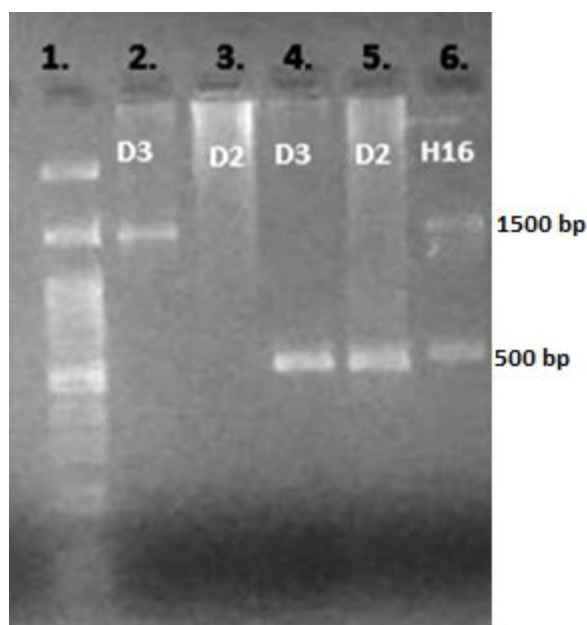
4.1. Identifikace schopnosti akumulovat PHA u bakterií rodu *Pseudomonas* pomocí molekulárních technik

Pro PCR byly využity obě sady primerů multiplexní PCR. Reakce probíhala při programu popsaném v Tabulka 6. DNA byla izolována pomocí tepelné lýze buněk. Izoláty D2 a D3 (*Pseudomonas fulva* a *Pseudomonas gessardii*) byly získány z půdy zamořené ropou. Vzorky byly dodány firmou DEKONTA,a.s., z toho důvodu jsou označovány jako D2 a D3. K vzorkům D2 a D3 byla přidána také bakterie *Escherichia coli*, která sloužila jako negativní kontrola pro *phaC* gen. Bakterie *E.coli*, pokud se nejedná o rekombinantního mutanta, hledaný gen nemá [40]. Dále byla do běhu přidána tzv. pozitivní kontrola – jednalo se o bakterii *Cupravidus necator H16*, u které byla přítomnost obou těchto genů již prokázána [34]. Jako DNA standard byl použit žebříček obsahující fragmenty o velikosti 100 až 3 000 bp.



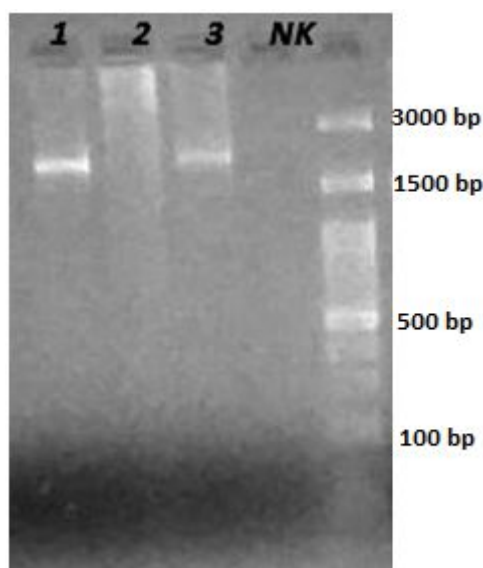
Obrázek 16 Gelová elektroforéza pro vzorky *Pseudomonas fulva* (1), *E.coli* (2), *Pseudomonas gessardii* (3) a *Cupravidus necator* H16 (4)

Na Obrázek 16 můžeme pozorovat pozitivní výsledek pro gen *phaC* u vzorků 1., 3. a 4. Všechny testované bakterie obsahují gen *16S* rRNA. U vzorku D3 (1) je vidět přítomnost třetího fragmentu o velikosti cca 300 bp. Tento band by mohl být způsoben nespecifickou amplifikací nebo se může jednat o amplifikaci způsobenou kombinací primerů. Bylo prokázáno, že se jedná o fragment, který byl naamplifikován spojením primeru 16S-F a G-D. Byla provedena PCR, kdy byly k vzorkům přidány primery zvlášť a k této nespecifické amplifikaci již nedocházelo, což dokazuje Obrázek 17.



Obrázek 17 Gelová elektroforéza pro vzorky *Pseudomonas fulva* (2+4), *Pseudomonas gessardii* (3+5) a *Cupravidus necator* H16 (6)

Na Obrázek 17 u vzorku 3 (*Pseudomonas fulva*) není patrný žádný band, pravděpodobně z důvodu příliš vysoké koncentrace DNA. U vzorku 5 je ovšem velmi dobře čitelný band pro gen *phaC*. Amplifikace pouze *phaC* genu a ne *16S* rRNA je způsobená délkou amplifikovaného úseku. Jelikož *phaC* gen je mnohem kratší, dochází k preferenční amplifikaci. *16S* rRNA je gen typický pro bakterie a měl by mít vždy pozitivní výsledek. Z toho důvodu, pokud se *16S* rRNA neamplifikuje a *phaC* ano, stále je možné hovořit o pozitivním výsledku pro oba geny. Přítomnost obou dvou genů u *Pseudomonas fulva* a *Pseudomonas gessardii* byla potvrzena opakovaně.



Obrázek 18 Gelová elektroforéza pro vzorky *Pseudomonas fulva* (1) a *Pseudomonas gessardii* (2+3) a negativní kontrola

Vzhledem k potvrzení přítomnosti genu *phaC* byly následně vzorky D2 a D3 podrobeny dalšímu cyklu analýzy PCR pro gen *phaC1*. Vzhledem k příliš vysoké koncentraci vzorku D2 při amplifikaci *phaC* (viz Obrázek 18), byla koncentrace DNA ve vzorku snížena na 1 μ l namísto 2 (vzorek 2) a na 0,5 μ l (vzorek 3). Při snížení obsahu DNA ve vzorku na 0,5 μ l byl band pro *phaC1* mnohem výraznější a jasnější. Koncentrace Mg^{2+} v PCR směsi činila 1,8 mM. Vzhledem k síle a viditelnosti bandu u *Pseudomonas fulva*, byla tato bakterie používána v dalších reakcích jako pozitivní kontrola.

Reakcí bylo tedy ověřeno, že úsek DNA kódující tvorbu mcl-PHA je přítomen u bakterií *Pseudomonas fulva* a *Pseudomonas gessardii*.

Tabulka 9 Přehled výsledků pro bakterie rodu *Pseudomonas*

	<i>phaC</i>	<i>phaC1</i>
<i>Pseudomonas gessardii</i> (D2)	✓	✓
<i>Pseudomonas fulva</i> (D3)	✓	✓

4.1.1. Sekvenace DNA u *Pseudomonas fulva* a *Pseudomonas gessardii*

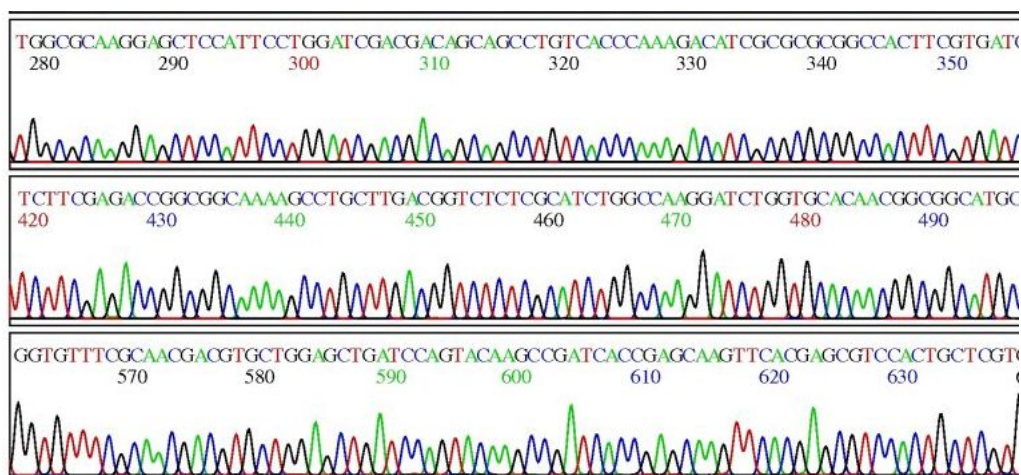
Vzhledem k pozitivnímu výsledku na přítomnost genu *phaC1* u *Pseudomonas fulva* a *Pseudomonas gessardii*, byly tyto vzorky poslány do firmy SEQme pro získání sekvence tohoto genu. Sekvenace u bakterie *Pseudomonas fulva* (D3) proběhla úspěšně a byl získána její kompletní sekvence genu *phaC1*. Tento gen primárně neslouží k určení konkrétní bakterie, ale v případě, kdy druh předem známe, je možné jej použít k ověření.

Následně po zpracování dat byla tato sekvence zadána do programu BLAST[®] (Basic Local Alignment Search Tool). Tento program zahrnuje největší databázi dosud popsanych bakterií a sekvencí jejich genů. Po zadání sekvence program vyhledá bakterie a porovná shodu těchto sekvencí.

V Obrázek 19 je vidět příklad čisté sekvenace bez polymikrobiální kontaminace. Jednotlivé píky jsou vysoké, zřetelně oddělené a nepřekrývají se. Pro kompletní sekвени genu bylo potřeba spojit výsledky pro „forward“ i „reverse“ primery. Kompletní sekvenace vzorku D3 – viz Příloha 1 Kompletní sekvenace genu *phaC* u bakterie *Pseudomonas fulva*.

V případě vzorku D3 (*Pseudomonas fulva*) bylo ověřeno, že se jedná o PHA syntázu typickou pro rod *Pseudomonas sp* se shodou 96 %. Jelikož vzorek pochází z přírody, dochází zde k mutacím a shoda je nižší než 100 %.

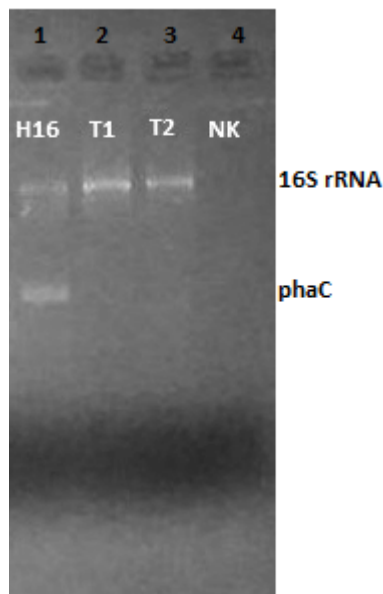
Vzorek D2 (*Pseudomonas gessardii*) se nepodařilo osekvenovat ani při opakovaných pokusech. Příčinou byla pravděpodobně příliš nízká koncentrace vzorku (20 µg/ml) a příliš velká délka genu.



Obrázek 19 Ukázka sekvenace *Pseudomonas fulva* pomocí primeru E1-D

4.2. Termofilní kultury

Termofilní bakterie mají vyšší teplotní optimum kultivace, zpravidla 40-60 °C. Díky tomu je velmi nízká pravděpodobnost kontaminace vzorků při kultivaci jinými mikroorganismy v laboratorních podmínkách. Termofilní kultura byla získána z čističky odpadních vod. Kultura byla rozmrazena z kryozkumavek a následně kultivována v tekutém médiu při 60 °C. Z této směsné kultury byly následně získány dva vzorky T1 a T2 pomocí křížového roztěru na pevném médiu. Vyčištění vzorků probíhalo několikanásobným přesazením.



Obrázek 20 Gelová elektroforéza s termofilními vzorky, pozitivní kontrola *Cupravidus necator* H16 (1), vzorek T1 (2), vzorek T2 (3), NK (4)

Do směsi byly přidány primery pro amplifikaci genů *16S* rRNA a *phaC*. Vzorky tedy obsahovaly dvě sady primerů.

U termofilních kultur T1 a T2 byla opakovaně prokázána přítomnost pouze genu *16S* rRNA, z čehož vyplývá, že tyto bakterie nejsou schopny produkce PHA syntázy (Obrázek 20).

U termofilních bakterií z čističky odpadních vod T1 a T2 nebyla prováděna PCR pro přítomnost genu kódujícího mcl-PHA, jelikož nebyla prokázána v první řadě ani přítomnost genu *phaC*.

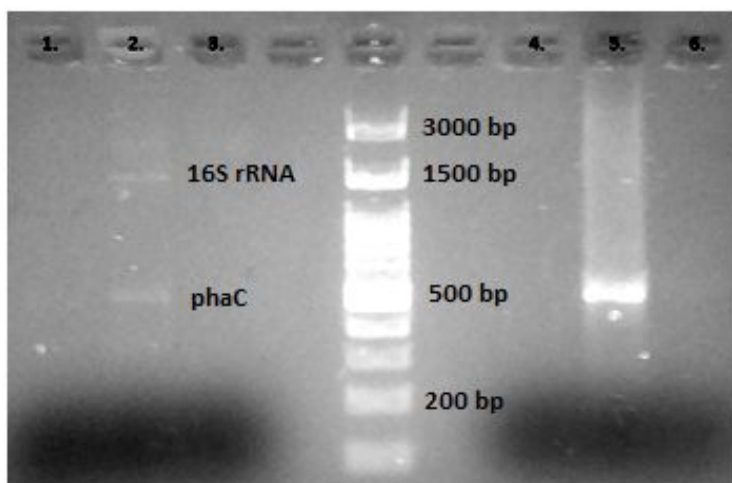
Tabulka 10 Přehled výsledků pro termofilní kultury

	<i>phaC</i>	<i>phaC1</i>
Termofilní kultura T1	x	x
Termofilní kultura T2	x	x

4.3. Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení jsou jedny z nejvíce průmyslově využívaných bakterií. Jsou obsaženy v mléčných výrobcích a potravinových doplncích. DNA bakterií mléčného kvašení (především zástupci rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*) byla amplifikována pomocí multiplexní PCR a byly použity primery pro *phaC* a *16S* rRNA. Podmínky PCR jsou uvedeny v Tabulka 6 Teplotní program PCR pro geny *16S* rRNA nebo *phaC*.

Kromě 17 vzorků, které byly získány jako purifikovaná DNA, jsme pracovali i se 4 vzorky, které pocházely z tekutého média. Jednalo se o bakterie *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T (L1), *Bifidobacterium longum* CCM 4990 (LONG), *Bifidobacterium bifidum* CCM 7825^T (BIF) a *Bifidobacterium breve* CCM 3762 (BRE). Tyto čtyři vzorky byly testovány na přítomnost genu *phaC*.



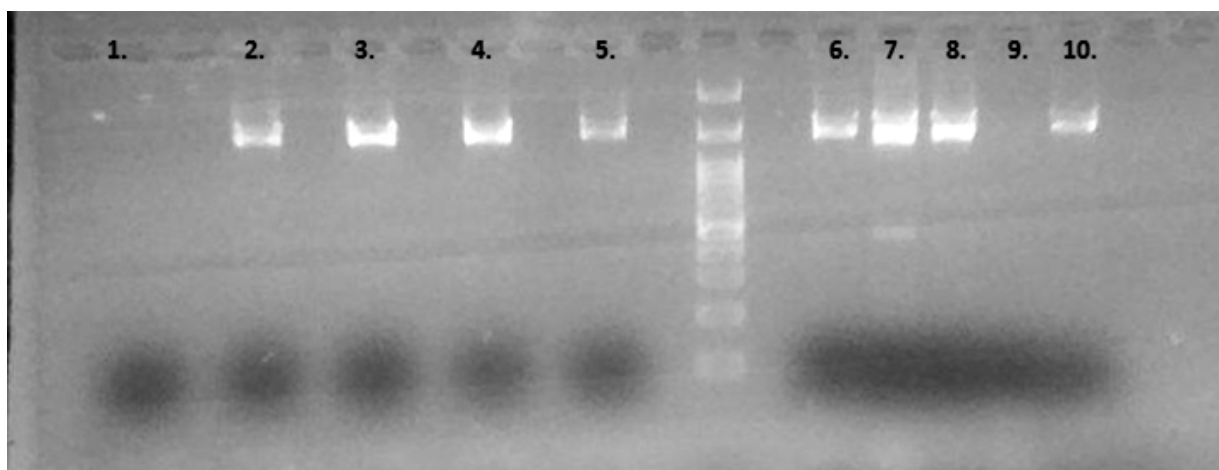
Obrázek 21 Gelová elektroforéza pro vzorky *Lactobacillus acidophilus* (vzorek 1), *Bifidobacterium breve* (2), *Bifidobacterium longum* (3), *Bifidobacterium bifidum* (4), pozitivní kontrola D3 (*Pseudomonas fulva*) a negativní kontrola (6)

Z těchto čtyř vzorků došlo k pozitivní amplifikaci genu *phaC* u vzorku číslo 2 (*Bifidobacterium breve*) (Obrázek 21). Tento vzorek byl dále testován na přítomnost genu *phaC1*, která se ovšem neprokázala. Vzorek byl následně zaslán na sekvenaci.

Při opakování PCR u vzorku 1 (*Lactobacillus acidophilus*) došlo k amplifikaci genu *phaC*. Tento výsledek se napodruhé již nepodařilo reprodukovat, z toho důvodu se jeví jako pravděpodobné, že se jednalo o falešně pozitivní výsledek. Vzorky 3 a 4 při opakování vykazovaly band pouze pro gen *16S* rRNA.

Tabulka 11 Přehled výsledku pro vzorky L1, LONG, BRE a BIF

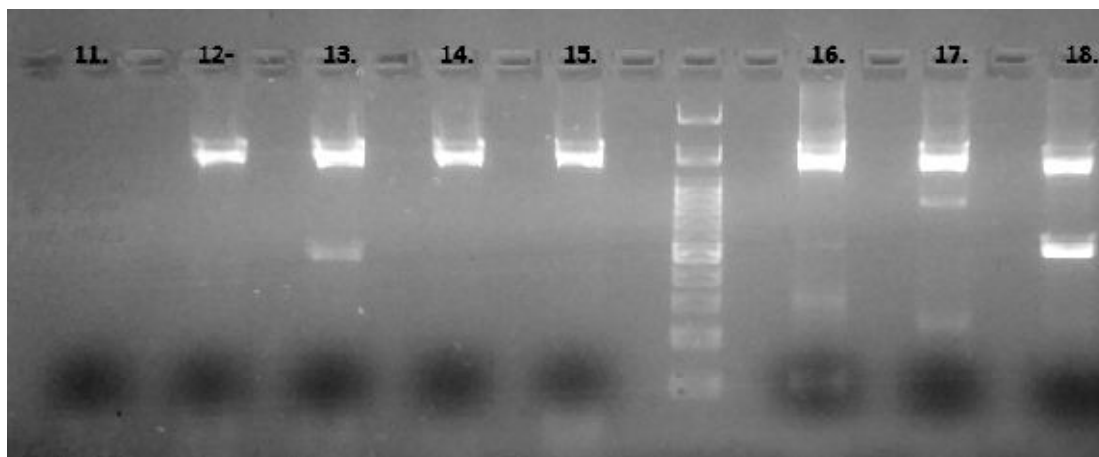
	Označení vzorku	<i>phaC</i>	<i>phaC1</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	L1	x	x
<i>Bifidobacterium longum</i>	LONG	x	x
<i>Bifidobacterium breve</i>	BRE	✓	x
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	BIF	x	x



Obrázek 22 Gelová elektroforéza vzorků L1-L10

Další kolo PCR bylo prováděno se vzorky L1 až L17. Pracovalo se přímo s purifikovanou DNA.

Z prvních 10 vzorků došlo k amplifikaci genu *phaC* u vzorku 7 (*Lactobacillus rhamnosus*), proto byl tento vzorek dále testován na gen *phaC1* a tento vzorek byl následně i odeslán na sekvenaci (Obrázek 22). U vzorku 1 (*Lactobacillus acidophilus*) a u vzorku 9 (*Lactobacillus salivarius subsp. salivarius*) nedošlo k amplifikaci žádného z genů. Jelikož se jedná o bakterie, amplifikace genu *16S* rRNA by měla určitě proběhnout. Příčinou negativního výsledku může být nízká koncentrace DNA, nepřesnosti při pipetování nebo mohlo dojít k chybě při purifikaci DNA.

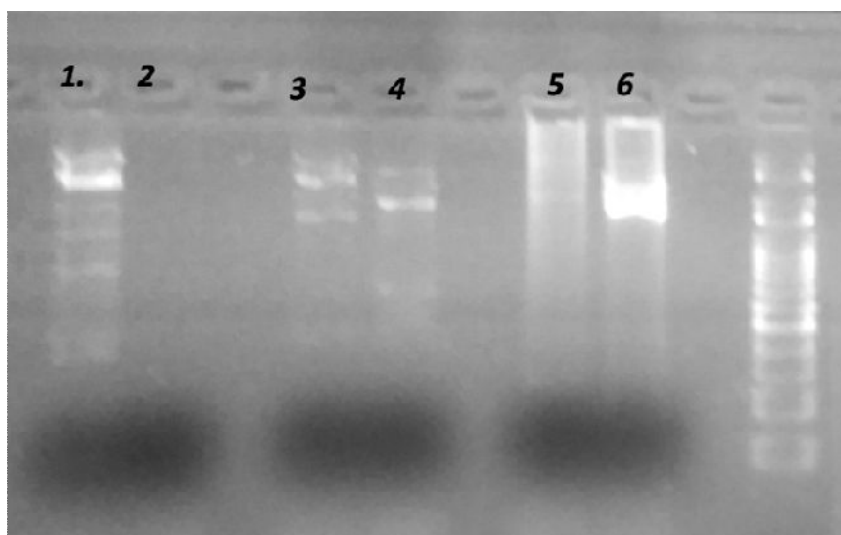


Obrázek 23 Gelová elektroforéza bakterií mléčného kvašení L11-L17 (11-17), PK – H16 (18)

Na Obrázek 23 je zobrazena další skupina vzorků bakterií mléčného kvašení. U vzorků L13 (*Lactobacillus zeae*), L16 (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) a L17 (*Lactobacillus plantarum*) byla přítomnost genu *phaC* opakovaně potvrzena a tyto vzorky byly podrobeny dalšímu kolu PCR na přítomnost genu *phaC1* a byly následně odeslány na sekvenaci.

Vzorky L16 (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) a L17 (*Lactobacillus plantarum*) vykazovaly velkou míru nespecifických amplifikací. Tyto nespecifické amplifikace se podařilo částečně eliminovat pomocí zvýšení annealingové teploty z 55 °C na 58 °C. Zbylé amplifikace mohly být tvořeny stejně jako u vzorku D3 kombinací primerů obou hledaných genů dohromady.

U vzorku 11 (*Lactobacillus salivarius subsp. salivarius*) opět nedošlo k amplifikaci bakterii určujícího genu *16S* rRNA. Příčinou je pravděpodobně stáří vzorků nebo příliš nízká koncentrace DNA.



Obrázek 24 Gelová elektroforéza bakterií mléčného kvašení pro gen *phaC1* se vzorky 1 (*Lactobacillus rhamnosus*), 2 (*Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*), 3 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), 4 (*Lactobacillus plantarum*) a jako pozitivní kontrola D2 (5) a D3 (6)

V další části byly vzorky, které byly pozitivní na přítomnost genu *phaC* testovány na gen *phaC1* (Obrázek 24). Jako pozitivní kontrola byl vybrán vzorek D2 (*Pseudomonas gessardii*). Tento vzorek stejně jako D3 (*Pseudomonas fulva*) při vyšších koncentracích tvořil na gelu barevné pruhy. Tato PCR byla pro ověření výsledků zopakována a byla prokázána přítomnost genu *phaC1* u vzorku L7 (*Lactobacillus rhamnosus*), L16 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) a L17 (*Lactobacillus plantarum*). Přítomnost genu *phaC1* byla ověřena i u vzorku L13 (*Lactobacillus zae*). U všech vzorků můžeme pozorovat velké množství nespecifických amplifikací. Pro eliminaci nespecifických amplifikací by bylo potřeba optimalizovat annealingovou teplotu, ovšem studium této problematiky nebylo cílem této diplomové práce.

Tabulka 12 Přehled výsledků pro bakterie mléčného kvašení

	označení vzorku	<i>phaC</i>	<i>phaC1</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	L1	x	x
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	L2	x	x
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	L3	x	x
<i>Lactobacillus gasserri</i>	L4	x	x
<i>Lactobacillus fermentum</i>	L5	x	x
<i>Lactobacillus salvarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	L6	x	x
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	L7	✓	✓
<i>Bifidobacterium animalis</i>	L8	x	x
<i>Lactobacillus salvarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	L9	x	x
<i>Lactobacillus salvarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	L10	x	x
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	L11	x	x

<i>Lactobacillus paracasei</i>	L12	x	x
<i>Lactobacillus zeae</i>	L13	✓	✓
<i>Oxalicibacterium flavum</i>	L14	x	x
<i>Lactobacillus casei</i>	L15	x	x
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	L16	✓	✓
<i>Lactobacillus plantarum</i>	L17	✓	✓

4.3.1. Sekvenace DNA u bakterií mléčného kvašení

Na základě přítomnosti amplifikonů pro geny *phaC* a *phaC1* byly tyto vzorky zaslány na sekvenaci: BRE (*Bifidobacterium breve*), L7 (*Lactobacillus rhamnosus*), L13 (*Lactobacillus zeae*), L16 (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) a L17 (*Lactobacillus plantarum*).

Vzorek BRE (*Bifidobacterium breve*) se podařilo osekvenovat gen *phaC*. Databáze poskytla shodu s *Pseudomonas sp./ Pseudomonas PHA synthasa*. Bylo tedy potvrzeno, že se jedná opravdu o gen kódující PHA syntázu se shodou 95 %. Primárním důvodem pro získání sekvence tohoto genu byla možnost jej následně porovnat s dalšími enzymy, které se podílejí na biosyntéze PHA nebo jej hledat u dalších kmenů pomocí této konkrétní sekvence.

Vzorek L16 (*Lactobacillus delbrueckii*) se podařilo osekvenovat částečně. Jednalo se sekvenci genu *phaC1*. Byla nalezena shoda s kmenem *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ATCC 11842 s identifikací 98%.

Vzorek L17 (*Lactobacillus plantarum*) se podařilo osekvenovat částečně. Jednalo se sekvenci genu *phaC1*. Byla nalezena shoda s kmenem *Lactobacillus delbrueckii* s identifikací 95%.

Vzorky L7, L13 a L16 se nepodařilo osekvenovat. Důvodem byla pravděpodobně příliš nízká koncentrace DNA ve vzorku.

4.4. Vzorky z přírodních zdrojů

DNA získaná ze vzorků z přírodních zdrojů, které byly připraveny pomocí tepelné lýze buněk byly z hlediska diskuze výsledků nejobtížnější. Vzorky byly izolovány na předem vybraných místech.

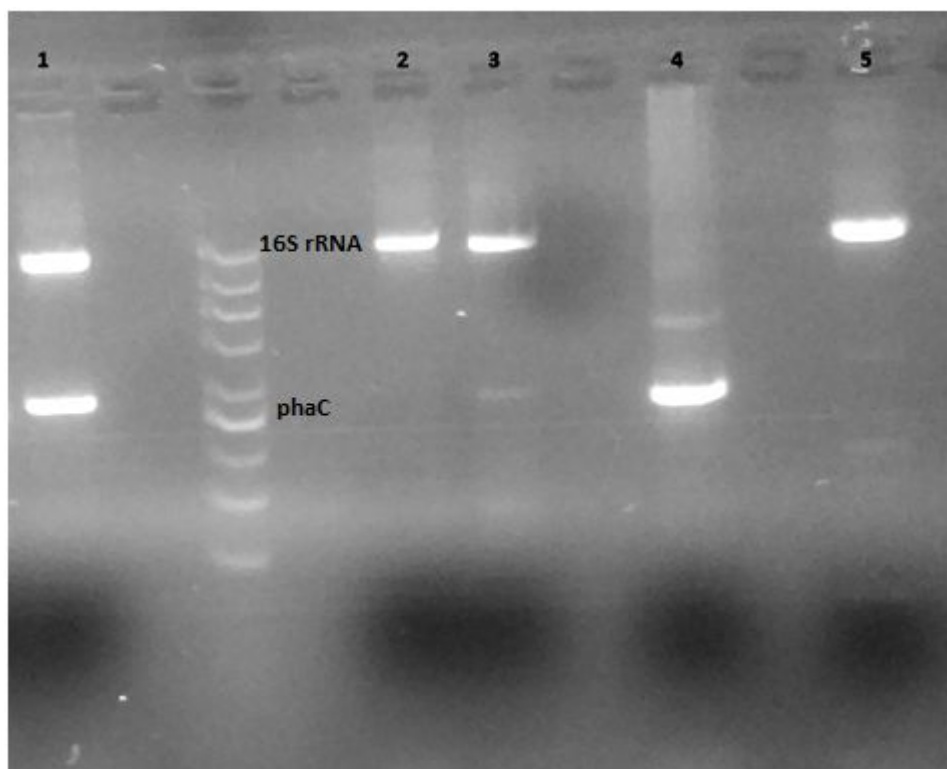
Sterilní Petriho miska s médiem byla na 13-30 min otevřena a mikroorganismy volně dopadaly na misku. Následně byl vzorek inkubován při 30°C 24 hodin (Obrázek 25). Po 24 hodinách byly z misky vybrány kolonie, které byly následně přesazeny na nové médium a kultivovány za stejných podmínek. Po několikanásobném přesazení, které sloužilo zároveň jako přečištění, byla ze vzorků izolovaná DNA pomocí tepelné lýze buněk.



Obrázek 25 Ukázka Petriho misky po 24 hod inkubaci s přírodními vzorky

Tabulka 13 Popis vzhledu kolonií vzorků z přírodních zdrojů

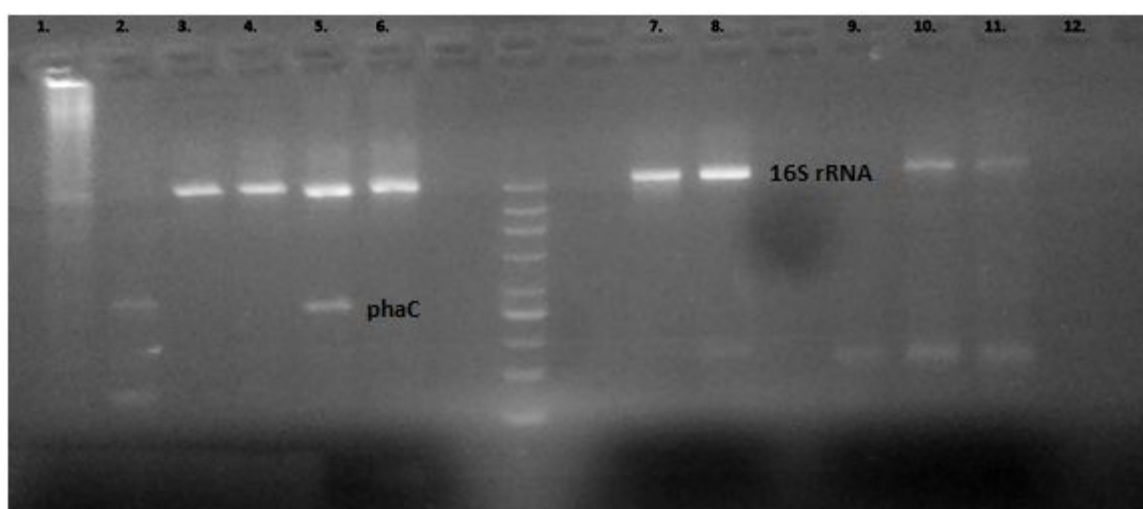
Označení vzorku	Popis kolonie
K1	žluto-krémová barva, drobné vystouplé kolonie, světlejší okraje
K2	světle žlutá barva, kulaté kolonie, oblý povrch
K3	žlutá barva, velké kulaté kolonie, nerovný okraj
K4	žlutá barva, jednolitá kolonie, vystouplá
K5	růžovo-oranžová barva, ploché kruhové kolonie, velmi drobné
K6	bílo-žlutá barva, pravidelné okraje, drobné kolonie
Z1	oranžovo-žlutá barva, vyvýšená kolonie, jasné okraje
KO	žluto-bílá barva, velmi husté a drubné, zaoblený okraj, vystouplé
BA	světlé bílé až mlhavé, nepravidelný tvar, světlejší okraje
BR	krémově bílá barva, vystouplé, shluky kolonií
LE1	žlutá barva, podlouhlé kolonie, roztřepené světlejší okraje
LE2	bílo-žlutá barva, velmi drobné kolonie, kulatý tvar
KL1	smetanová barva, světlé okraje až transparentní, vystouplé kolonie
KL2	bílo-krémová barva, oválný tvar, jasné ohraničené
KL3	bílo-zeleno-žlutá, velké kolonie, jasné ohraničené



Obrázek 26 Gelová elektroforéza vzorků z přírodních zdrojů *Cupravidus necator* H16 (1), BR (2), Z1 (3), KO (4), BA (5)

Amplifikace genu *phaC* proběhla u dvou vzorků – záchodové prkýnko Z1 (vzorek 3) a kočičí stelivo KO (4) (Obrázek 26). Oba dva vzorky byly dále testovány na přítomnost genu *phaC1* a byly zaslány na sekvenaci. Jako pozitivní kontrola byla použita bakterie *Cupravidus necator* H16.

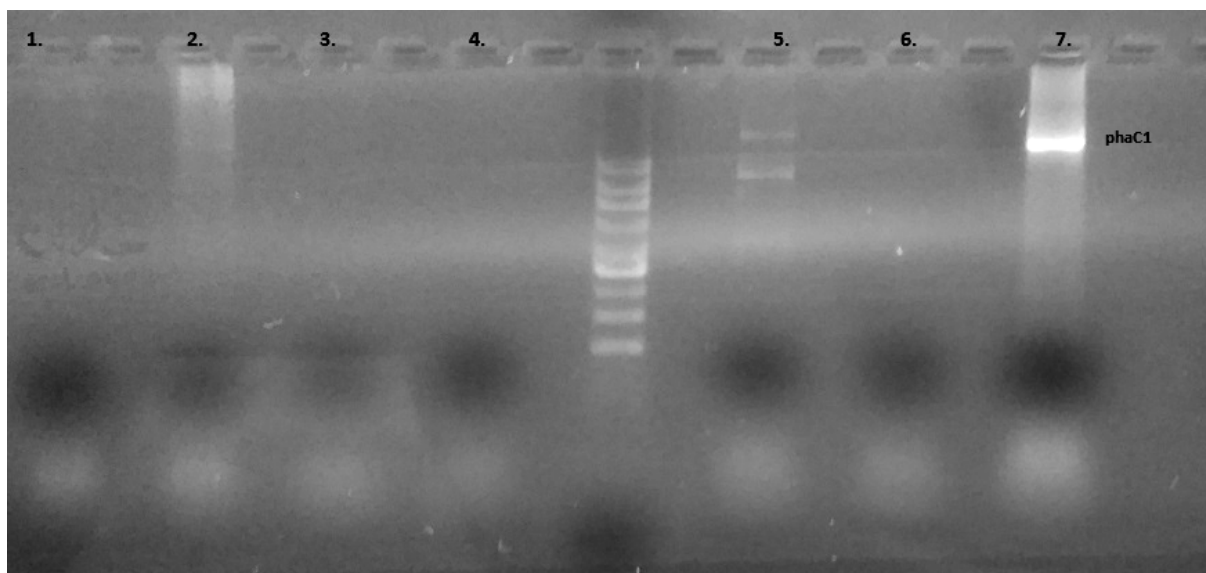
U vzorků z pokoje z rodinného domu BR (2) a balkonu (5) byla pozorována amplifikace pouze genu *16S* rRNA.



Obrázek 27 Gelová elektroforéza pro vzorky z přírodních zdrojů K1-6 (1-6), L1 (7), L2 (8), KL1-3 (9-11), NK (12)

Mezi další sadou vzorků byly nalezeny dva, které obsahovaly gen *phaC* (Obrázek 27). Jednalo se o dva vzorky z koňské stáje – K2 a K5. U obou dvou byla následně testována přítomnost *phaC1* genu a tyto vzorky byly zaslány na sekvenaci.

U ostatních vzorků (K1, K3, K6, L1, L2, KL1, KL2 a KL3) došlo pouze k amplifikaci genu *16S* rRNA.



Obrázek 28 Gelová elektroforéza pro vzorky K1 (1), K2 (2), K5 (3), BA (4), Z1 (5), L2 (6), KO (7)

Vzorky, u kterých byla opakovaně potvrzena přítomnost ampliconu pro gen *phaC* nebo PCR nebylo jednoznačné, byly podrobeny dalšímu kolu PCR – tentokrát pro gen *phaC1* (Obrázek 28). Přítomnost tohoto genu byla potvrzena u tří vzorků – vzorku z koňské stáje K2, záchodového prkýnka (Z1) a kočičího steliva (KO).

Tabulka 14 Přehled výsledků pro vzorky z přírodních zdrojů

	označení vzorku	<i>phaC</i>	<i>phaC1</i>
Koňská stáj, Karviná	K1	x	x
Koňská stáj, Karviná	K2	✓	✓
Koňská stáj, Karviná	K3	x	x
Koňská stáj, Karviná	K4	x	x
Koňská stáj, Karviná	K5	✓	x
Koňská stáj, Karviná	K6	x	x
Záchodové prkýnko v domácnosti, Brno	Z1	✓	✓
Kočí záchod, silikátové stelivo, Brno	KO	✓	✓
Balkonový parapet, 5. patro, Brno	BA	x	x
Pokoj v rodinném domě, Zašová	BR	x	x
Lesní půda, Zašová	LE1	x	x
Lesní půda, Zašová	LE2	x	x
Kuchyňská linka v domácnosti, Brno	KL1	x	x

Kuchyňská linka v domácnosti, Brno	KL2	x	x
Kuchyňská linka v domácnosti, Brno	KL3	x	x

4.4.1. Sekvenace DNA vzorků z přírodních zdrojů

Na sekvenaci byly poslány celkem 4 vzorky – vzorek z koňské stáje (K5), vzorek z koňské stáje (K2), záchodového prkýnka (Z1) a kočičího steliva (KO). Vzorky K2, Z1 a KO byly sekvenovány pro gen *phaC1* a *16S* rRNA, vzorek K5 pro gen *phaC* a *16S* rRNA.

Sekvenace se zdařila u většiny vzorků a bylo tedy možné přiřadit ke vzorkům konkrétní druhy bakterií. V tomto případě hrál gen *16S* rRNA zásadní roli. Sekvenace DNA některých vzorků ukázala na polymikrobiální kontaminaci.

U vzorku K5, který jako jediný gen pro PHA syntázu amplifikoval pouze gen *phaC*, se podařilo osekvenovat *phaC* gen i bakteriální *16S* rRNA. Osekvenování obou genů se podařilo pouze u tohoto vzorku, dá se tedy říci, že jeho taxonomické zařazení, je velmi přesné. Dle databáze se jedná o bakterii *Curtobacterium flaccumfaciens* /*Curtobacterium* sp. se shodou 100 %. Jedná se o půdní gram pozitivní bakterii, která způsobuje různá onemocnění rostlin [41]. Tento fytopatogen má široký rozsah hostitelů – především sóju, tulipány a rajčata [42].

U vzorku K2 se podařilo osekvenovat gen *16S* rRNA. Pro určení konkrétního druhu bakterie by tato sekvenace měla být dostačující, ovšem výsledky ukazovaly na polymikrobiální kontaminaci. Z toho důvodu by pro přesné určení bylo potřeba další přečištění a nová sekvenace. Databáze našla shodu 98 % s bakterií *Arthrobacter protophormiae*, co se týče konkrétního řetězce, jedná se přímo o partial *16S* rRNA strain (Příloha 2). Patří mezi gram pozitivní půdní bakterie a další použití pro produkci PHA se jeví jako možnost pro další výzkum, jelikož je schopna růstu na levných zdrojích cukru jako např. cukrová třtina nebo řepná melasa [43].

Vzorek z kočičího steliva KO byl za pomoci genu *16S* rRNA určen jako *Staphylococcus* sp./ *staphylococcus lentus* F1142 *s6_trimmed_contig_24*, *whole genome shotgun sequence* se shodou 100 % Příloha 3. Jedná se o gram pozitivní zvířecí patogen, který pouze zřídka napadá člověka [44]. Patří mezi pravděpodobnou příčinu mastitid u koz.

Jako poslední byl sekvenován vzorek získaný expozicí na záchodovém prkýnku Z1. Dle genu *16S* rRNA, který se jako jediný podařilo osekvenovat, se jedná o bakterii *Mycobacterium* sp / *Mycobacterium neoaurum* se shodou 99 %. Jedná se o velmi vzácný lidský patogen, většina infekcí spojená s tímto organismem souvisí s přístroji a zavádění přístrojů do pacienta v nemocničním prostředí. V přírodě se vyskytuje v půdách, prachu a ve vodě. Má schopnost přežít v extrémních podmínkách – jako jsou extrémně vysoké teploty nebo velmi nízké pH [45].

Tabulka 15 Přehled výsledků sekvenace dle genu *16S* rRNA

	označení vzorku	bakterie	shoda sekvence DNA
Koňská stáj, Karviná	K2	<i>Arthrobacter protophormiae</i>	98 %
Koňská stáj, Karviná	K5	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> / <i>Curtobacterium</i> sp	100 %
Záchodové prkýnko v domácnosti, Brno	Z1	<i>Mycobacterium</i> sp / <i>Mycobacterium neoaurum</i>	99 %
Kočí záchod, silikátové stelivo, Brno	KO	<i>Staphylococcus</i> sp./ <i>Staphylococcus lentus</i>	100 %

4.5. Ramanova spektroskopie vzorků pozitivních na geny kódující PHA syntázu

Vzorky pozitivní na přítomnost jednoho nebo obou genů pro tvorbu PHA syntázy byly kultivovány na pevném médiu s přidavkem kyseliny oktanové při 30 °C 48 hodin. Následně byly tyto vzorky měřeny pomocí Ramanovy spektroskopie. I přes genotypové ověření přítomnosti genu pro tvorbu klíčového enzymu v biosyntéze PHA, nebyla pomocí této metody zaznamenána žádná fenotypová produkce. U žádných z testovaných vzorků nedošlo k akumulaci PHA. Vzhledem k specifickým podmínkám kultivace nelze tento výsledek brát za konečný. Je zapotřebí dalšího výzkumu, při úpravě média a podmínek je možné produkci PHA vyvolat.

5. Závěr

- Diplomová práce byla věnována ověření přítomnosti genu pro tvorbu PHA syntázy u vybraných bakteriálních rodů. Práce je členěna dle typů bakterií na bakterie mléčného kvašení, bakterie rodu *Pseudomonas*, termofilní kultury a vzorků z přírodních zdrojů.
- Metoda PCR umožňuje detekci produkce PHA na genotypové úrovni. Pomocí PCR byly nejdříve detekovány geny *phaC* a *16S* rRNA. Gen *16S* rRNA sloužil jako ověření bakteriální DNA a pro určení konkrétního druhu bakterie u neznámých vzorků. Gen *phaC* kóduje tvorbu PHA syntázy. Substrátová specifita PHA syntázy byla u *phaC* pozitivních kmenů otestována další PCR reakcí, při které byly využity primery selektivně amplifikující gen kódující PHA syntázu pro produkci mcl-PHA.
- Přítomnost genu *phaC1* byla potvrzena u bakterií *Pseudomonas fulva* a *Pseudomonas gessardii*, které jsou průmyslově využívány k dekontaminaci ropou znečištěných lokalit. Skutečnost, že bakterie jsou schopny produkce PHA, může mít další aplikační potenciál. Jednak jak při bioremediačních technologiích, kdy může schopnost akumulace PHA navyšovat rezistenci testovaných bakterií vůči různým stresovým podmínkám. Zároveň by bylo zajímavé ověřit PHA akumulární potenciál u těchto isolátů a zvážit jejich využití při biotechnologické produkce mcl-PHA.
- Geny kódující PHA syntázu obou isolátů byly odeslány k sekvenaci. Sekvence se zdařila pouze u bakterie *Pseudomonas fulva* a byla získána kompletní sekvence jejího genu *phaC1*, podle této analýzy se jedná o mcl-PHA syntázu typickou pro rod *Pseudomonas*.
- Při testování vzorků bakterií mléčného kvašení bylo nalezeno pět bakterií, které obsahují geny kódující PHA syntázu. Jednalo se o kmeny: *Lactobacillus rhamnosus* (CCM 1825^T), *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (CCM 7190^T), *Lactobacillus plantarum* (CCM 7039^T), *Lactobacillus zeae* (CCM 7069^T) a *Bifidobacterium breve* (CCM 7825^T). I přesto, že podle některých zdrojů jsou bakterie mléčného kvašení schopné produkce PHA, nebyl tento fenomén doposud intenzívně zkoumán. Podle našich informací je tato práce první pokusem o identifikaci a molekulární charakterizaci PHA syntázy u této biotechnologicky extrémně významné skupiny mikroorganismů.
- Podařilo se osekvenovat *phaC* gen u *Bifidobacterium breve* a gen *phaC1* u *Lactobacillus plantarum*. Dle databáze byla potvrzena přítomnost *phaC* kódujícího genu u *Bifidobacterium breve*.
- Mezi vzorky izolovanými z přírodních zdrojů byly nalezeny čtyři vzorky pozitivní pro PHA syntázu. U vzorků z přírodních zdrojů byl kladen důraz i na gen *16S* rRNA, díky kterému bylo možné po sekvenaci určit konkrétní druh bakterie. Vzorek získaný z koňské stáje K5 je podle našich výsledků schopen akumulace scl-PHA. Vzorky K2

(také získaný z koňské stáje), Z1 (expozice na záchodovém prkýnku) a KO (expozice v kočičím záchodě na stelivu) jsou pak schopny produkce mcl-PHA.

- Dle sekvence získaných genů byl ke každému vzorku přiřazen konkrétní druh bakterie. Bakterie K2 se shodovala s *Arthrobacter protophormiae* 98% shodou, vzorek K5 byl určen jako *Curtobacterium flaccumfaciens* /*Curtobacterium sp* se 100 % shodou, Z1 se shodoval s *Mycobacterium sp* / *mycobacterium neoaurum* shodou 99 % a vzorek KO byl určen jako *Staphylococcus sp.* / *staphylococcus lentus* se shodou 100 %.

6. Seznam zkratk

PHA – polyhydroxyalkanoát(y)

PCR – polymerázová řetězová reakce

mcl-PHA – PHA se středně dlouhým řetězcem

scl-PHA – PHA s krátkým řetězcem

lcl-PHA – PHA s dlouhým řetězcem

TBE – Tris-borát-EDTA

P3HB – poly-3-hydroxybutyrát

P4HB – poly-4-hydroxybutyrát

P3HBV – poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)

NK – negativní kontrola

7. Seznam použitých zdrojů

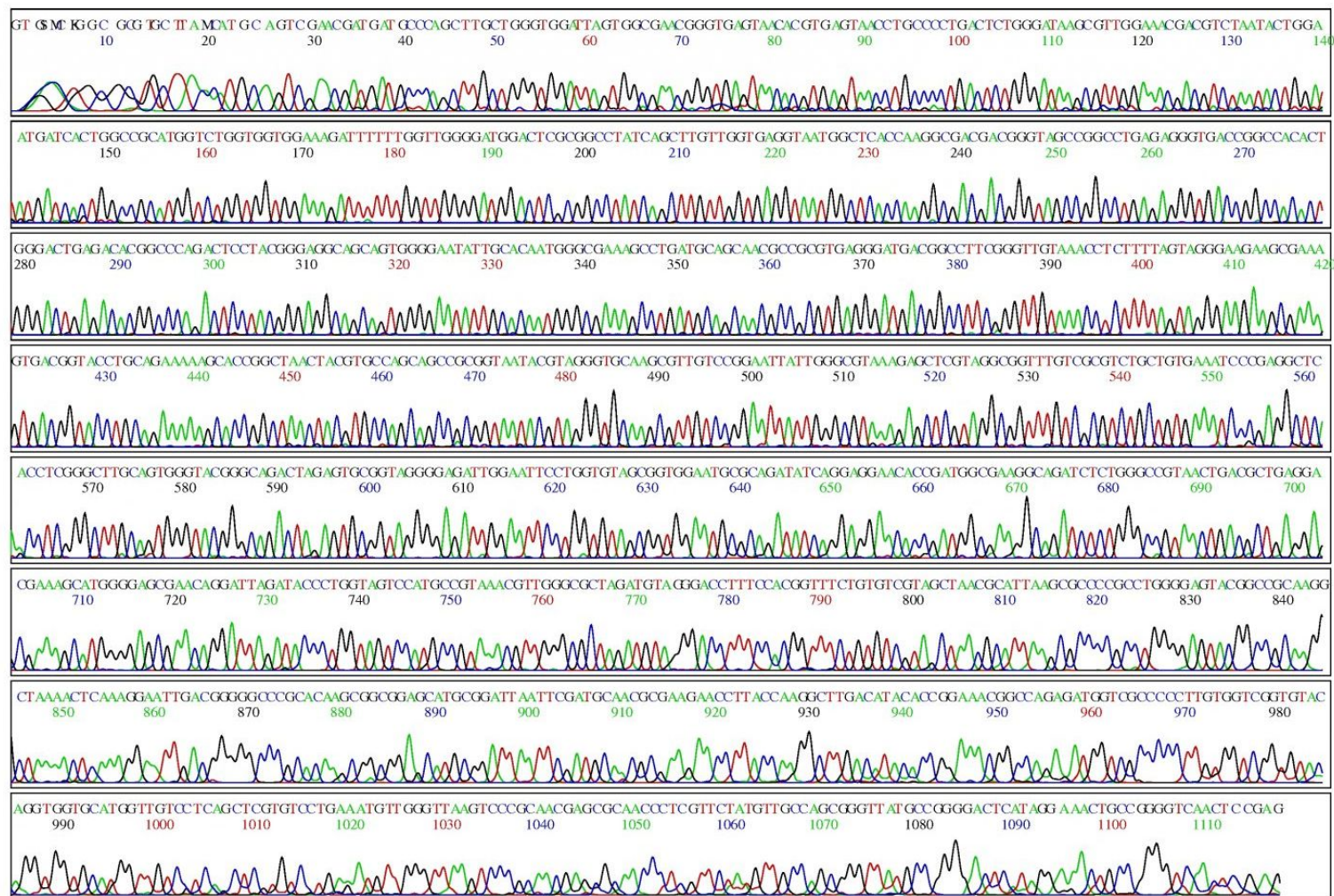
1. SUDESH, K, H ABE a Y DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. Progress in Polymer Science [online]. Elsevier, 2000, 25(10), 1503-1555 [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6. ISSN 0079-6700.
2. CHIELLINI, E. Biorelated polymers sustainable polymer science and technology. New York: Kluwer Academic/Plenum, 2001. ISBN 15-912-4649-0.
3. REDDY, C.S.K, R GHAI, V.C RASHMI a V.C KALIA. Polyhydroxyalkanoates: an overview. Bioresource Technology [online]. Elsevier, 2003, 87(2), 137-146 [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2. ISSN 0960-8524
4. SENIOR, P J a E A DAWES. The role and regulation of poly-beta-hydroxybutyrate synthesis in *Azotobacter beijerinckii*. The Biochemical journal [online]. 7107, 123(4), 29P [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1042/bj1230029Pa. ISSN 0264-6021.
5. AMBROŽOVÁ, J. Mikroskopické praktikum z hydrobiologie. Praha: VŠCHT Praha, 2002. ISBN 80-7080-496-3.
6. POLYHYDROXYALKANOÁTY – Přírozeně odbouratelné plasty. Gate2Biotech [online]. [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/polyhydroxyalkanoaty-prorozene-odbouratelne-plasty/>
7. TIAN, Jiamin, Anthony J SINSKEY a Joanne STUBBE. Kinetic studies of polyhydroxybutyrate granule formation in *Wautersia eutropha* H16 by transmission electron microscopy. Journal of bacteriology [online]. 0506, 187(11), 3814 [cit. 2017-04-26]. ISSN 0021-9193.
8. PATNAIK, Pratap. Perspectives in the Modeling and Optimization of PHB Production by Pure and Mixed Cultures. Critical Reviews in Biotechnology [online]. Boca Raton: Taylor, 2005, 25(3), 153-71 [cit. 2017-04-25]. ISSN 07388551.
9. ZAPLETAL, Martin a Jiří TREJBAL. IZOLACE POLYHYDROXYALKANOÁTŮ Z MIKROBIÁLNÍ BIOMASY. Chemické listy. 2016, 110, 860-867. ISSN 1213-7103.
10. YANG, Xianshuang, Kai ZHAO a Guo-Qiang CHEN. Effect of surface treatment on the biocompatibility of microbial polyhydroxyalkanoates. Biomaterials [online]. Elsevier, 2002, 23(5), 1391-1397 [cit. 2017-04-18]. DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00260-5. ISSN 0142-9612.
11. STANIER, R. Y., M. DOUDOROFF, R. KUNISAWA a R. CONTOPOULOU. The Role of Organic Substrates in Bacterial Photosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [online]. National Academy of Sciences of the United States of America, 1959, 45(8), 1246-1260 [cit. 2017-04-21]. ISSN 00278424.

12. POIRIER, Yves a Nadine ERARD. Synthesis of polyhydroxyalkanoate in the peroxisome of *Saccharomyces cerevisiae* by using intermediates of fatty acid beta-oxidation. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. Washington: American Society for Microbiology, 2001, 67(11), 5254-5260 [cit. 2017-04-27]. DOI: 10.1128/AEM.67.11.5254-5260.2001. ISSN 00992240.
13. LENZ, R a R MARCHESSAULT. Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. *Biomacromolecules* [online]. 2005, 6(1), 1-8 [cit. 2017-04-21]. DOI: 10.1021/bm049700c. ISSN 1525-7797.
14. LEE, S Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and bioengineering* [online]. 1996, 49(1), 1 [cit. 2017-04-27]. ISSN 0006-3592.
15. SCOTT, Charles. Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation. *Chemical Engineering Progress* [online]. New York: American Institute of Chemical Engineers, 2000, 96(4), 72 [cit. 2017-04-27]. ISSN 03607275.
16. OBRUCA, S., I. MAROVA, Z. SVOBODA a R. MIKULIKOVA. Use of controlled exogenous stress for improvement of poly(3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator*. *Folia Microbiologica* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 1001, 55(1), 17-22 [cit. 2017-04-27]. DOI: 10.1007/s12223-010-0003-z. ISSN 0015-5632.
17. SOMLEVA, Maria N., Oliver P. PEOPLES a Kristi D. SNELL. PHA Bioplastics, Biochemicals, and Energy from Crops. *Plant Biotechnology Journal* [online]. 1302, 11(2), 233-252 [cit. 2017-04-27]. DOI: 10.1111/pbi.12039. ISSN 1467-7644.
18. KHANNA, Shilpi a Ashok K. SRIVASTAVA. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry* [online]. Elsevier, 2005, 40(2), 607-619 [cit. 2017-04-27]. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.01.053. ISSN 1359-5113.
19. YANG, Taek, Yu JUNG, Hye KANG, Tae KIM, Si PARK a Sang LEE. Tailor-made type II *Pseudomonas* PHA synthases and their use for the biosynthesis of polylactic acid and its copolymer in recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 1104, 90(2), 603-614 [cit. 2017-04-27]. DOI: 10.1007/s00253-010-3077-2. ISSN 0175-7598.
20. Mikrobielle Polyester. WWU Münster [online]. Münster, 2010 [cit. 2017-04-27]. Dostupné z: <https://www.uni-muenster.de/Biologie.IMMB.Steinbuechel/Forschung/PHA.html>
21. Flickinger, Michael C.; Drew, Stephen W. *Encyclopedia of Bioprocess Technology - Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation, Volumes 1-5*. John Wiley & Sons, 1999. 2024-2133 s. ISBN 1-59124-457-9
22. The Nobel Prize in Chemistry 1993. Nobel prize [online]. Stockholm [cit. 2017-04-21]. Dostupné z: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/

23. POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR). LAB Guide průvodce laboratoří [online]. 2014 [cit. 2017-04-21]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/pcr/>
24. Facilities. In: Battaglia Research Group [online]. London, 2017 [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: <http://www.battagliaresearchgroup.org/facilities.html>
25. MUDR. VEJRAŽKA, Martin. Schéma PCR [online]. In: . [cit. 2017-04-29]. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Pcr.jpg>
26. GARIBYAN, Lilit a Nidhi AVASHIA. Polymerase Chain Reaction. Journal of Investigative Dermatology [online]. Elsevier, 1303, 133(3), 1-4 [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1038/jid.2013.1. ISSN 0022-202X.
27. RACLAVSKÝ, Vladislav. Úvod do základních metod molekulární genetiky. Olomouc: Univerzita Palackého. Lékařská fakulta, 1998. ISBN 80-706-7892-5.
28. CHROMÝ, Vratislav. Bioanalytika: analytická chemie v laboratorní medicíně. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2002. ISBN 80-210-2917-X.
29. Midori Green Advance. Nippon Genetics Europe [online]. [cit. 2017-04-21]. Dostupné z: <https://www.nippongenetics.eu/products/dnarna-electrophoresis/midori-dna-stains/midori-green-advance/>
30. MULLIS, Kary B. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. Scientific American. 1990, 262(4), 56-65. DOI: 10.1038/scientificamerican0490-56. ISSN 0036-8733. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/scientificamerican0490-56>
31. GATC Biotech: Sangerovo sekvenování [online]. Praha: BIOGEN PRAHA, 2017 [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: <http://www.biogen.cz/gatc-biotech-sangerovo-sekvenovani>
32. StandardSeq Jak připravit vzorky. In: SEQme seq & qpcr company [online]. Dobříš [cit. 2017-04-27]. Dostupné z: <https://www.seqme.eu/upload/documents/seqme-standardseq-cz-2.pdf>
33. SKŘIVANOVÁ, Veronika. Metody identifikace PHA produkujících bakterií. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2016, 72 stran
34. CLARRIDGE, Jill E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clinical microbiology reviews [online]. 0410n. 1, 17(4), 840 [cit. 2017-04-26]. ISSN 0893-8512.
35. RÉDEI, George P. Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics, and Informatics. 3rd edition. Springer, 2008. ISBN 978-1-4020-6755-6.
36. MADISON, L L a G W HUISMAN. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. Microbiology and molecular biology reviews: MMBR [online]. 9903, 63(1), 21 [cit. 2017-04-25]. ISSN 1092-2172.

37. BRAUNEGG, Gerhart a Rodolfo BONA. Polyhydroxyalkanoates (PHAs): sustainable biopolyester production. *Polimery*. 2002, 2002(47), 479-484. ISSN 0032-2725.
38. CHOI, J. a S. Y. LEE. Economic considerations in the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by bacterial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 0006n. l., 53(6), 646-649 [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1007/s002530000326. ISSN 0175-7598.
39. NucleoSpin gDNA Clean-up XS. In: BIO KÉ [online]. Leiden, Netherlands, 2017 [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: <https://www.bioke.com/webshop/mn/740904.html>
40. WANG, Qian, Qianqian ZHUANG, Quanfeng LIANG a Qingsheng QI. Polyhydroxyalkanoic acids from structurally-unrelated carbon sources in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 1304, 97(8), 3301-3307 [cit. 2017-05-07]. DOI: 10.1007/s00253-013-4809-x. ISSN 0175-7598.
41. FRANCIS, Michelle J, Richard R DOHERTY, Minoo PATEL, John F HAMBLIN, Samar OJAIMI a Tony M KORMAN. *Curtobacterium flaccumfaciens* septic arthritis following puncture with a Coxspur Hawthorn thorn. *Journal of clinical microbiology* [online]. 1107, **49**(7), 2759 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1128/JCM.00340-11.
42. SAMMER, Ulrike F. a Katharina REIHER. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* on Soybean in Germany – A Threat for Farming. *Journal of Phytopathology* [online]. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 1206, 160(6), 314-316 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2012.01902.x. ISSN 0931-1785.
43. WESTERBERG, K., A. M. ELVANG, E. STACKEBRANDT a J. K. JANSSON. *Arthrobacter chlorophenolicus* sp. nov., a new species capable of degrading high concentrations of 4-chlorophenol. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*. 2000, **50**(6), 2083-2092. DOI: 10.1099/00207713-50-6-2083. ISSN 1466-5026. Dostupné také z: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-50-6-2083>
44. MAZAL, C. a B. SIEGER. *Staphylococcus lentus*: The troublemaker. *International Journal of Infectious Diseases* [online]. Elsevier, 2010, 14, e397-e397 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1016/j.ijid.2010.02.502. ISSN 1201-9712.
45. AWADH, Hesham, Munthir MANSOUR a Mahmoud SHORMAN. Bacteremia with an Unusual Pathogen: *Mycobacterium neoaurum*. *Case Reports in Infectious Diseases* [online]. New York: Hindawi Publishing Corporation, 2016 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1155/2016/5167874. ISSN 20906625.

8. Přílohy



Příloha 1 Kompletní sekvence genu *phaC* u bakterie *Pseudomonas fulva*

Arthrobacter protophormiae partial 16S rRNA gene, strain 041201

Sequence ID: [AM422805.1](#) Length: 1400 Number of Matches: 1

Range 1: 310 to 1376 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1917 bits(1038)	0.0	1059/1069(99%)	2/1069(0%)	Plus/Minus
Query 1	CTTGCTGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTC	60		
Sbjct 1376	CTTGCTGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTC	1317		
Query 61	TGGGATAAGCCCGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCATGGGACGCATGTCTTGT	120		
Sbjct 1316	TGGGATAAGCCCGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCATGGGACGCATGTCTTGT	1257		
Query 121	GGTGGAAAGATTTATCGGTTGGGGATGGACTCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAA	180		
Sbjct 1256	GGTGGAAAGATTTATCGGTTGGGGATGGACTCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAA	1197		
Query 181	TGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACT	240		
Sbjct 1196	TGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACT	1137		
Query 241	GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAA	300		
Sbjct 1136	GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAA	1077		
Query 301	GCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGT	360		
Sbjct 1076	GCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGT	1017		
Query 361	AGGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCA	420		
Sbjct 1016	AGGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCA	957		
Query 421	GCCGCGGTAAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTA	480		
Sbjct 956	GCCGCGGTAAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTA	897		
Query 481	GGCGGTTTGTGCGCTCTGCCGTGAAAGTCCGAGGCTCAACCTCGGATCTGCGGTGGGTAC	540		
Sbjct 896	GGCGGTTTGTGCGCTCTGCCGTGAAAGTCCGAGGCTCAACCTCGGATCTGCGGTGGGTAC	837		
Query 541	GGGAGACTAGAGTGATGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAG	600		
Sbjct 836	GGGAGACTAGAGTGATGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAG	777		
Query 601	ATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCATTTACTGACGCTGAGGAG	660		
Sbjct 776	ATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCATTTACTGACGCTGAGGAG	717		
Query 661	CGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGG	720		
Sbjct 716	CGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGG	657		
Query 721	CACTAGGTGTGGGGGACATTCACGTTTTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCG	780		
Sbjct 656	CACTAGGTGTGGGGGACATTCACGTTTTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCG	597		
Query 781	CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCG	840		
Sbjct 596	CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCG	537		
Query 841	GCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTTT	900		
Sbjct 536	GCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTTT	477		
Query 901	CAGACCGCCTCAGAGATGGGGTTTCCCTTCGGGGCTGGTTACAGGTGGTGCATGGTTGT	960		
Sbjct 476	CAGACCGCCTCAGAGATGGGGTTTCCCTTCGGGGCTGGTTACAGGTGGTGCATGGTTGT	417		
Query 961	CGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACAGCGCAGCCCTCGTTTCT	1020		
Sbjct 416	CGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACAGCGCAGCCCTCGTTTCT	357		
Query 1021	TGTTGCCAGCGGGTTATGCCGGGGCTCCTGGGGAACTGCCCGGGGTC	1069		
Sbjct 356	TGTTGCCAGCGGGTTATGCCGGGGACTCATGGG-AGACTGCC-GGGGTC	310		

Staphylococcus lentus F1142 s6_trimmed_contig_24, whole genome shotgun sequence
Sequence ID: [NZ_AJXO01000024.1](#) Length: 1650 Number of Matches: 1

Range 1: 454 to 1346		GenBank	Graphics	Next Match	Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
658 bits(356)	0.0	730/905(81%)	47/905(5%)	Plus/Minus	
Query	187	GATGGGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGTAAATGGCTACCAAGGCGACGACGGG		246	
Sbjct	1346	GATGGGCCCGCGCGTATTAGCTAGTTGTTAAGGTAAACGGCTACCAAGGCAACGATACG		1287	
Query	247	TAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGCCCCAGACTCCTACG		386	
Sbjct	1286	TAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAACGAGACACGGTCCAGACTCCTACG		1227	
Query	387	GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTG		366	
Sbjct	1226	GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGAGCAACGCCGCGTG		1167	
Query	367	AGGGATGACGGCCTTCGGGTGTGAAA-C-CT-CT-TT----CAGCACAGA--CG--A--A		412	
Sbjct	1166	AGTGATGAAGGTCTTAGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAATTTGTTAGTA		1187	
Query	413	GC-G--CAAG--TGACGGTATGTGCAGAAGAAGGAC-CGGCCAACTACGTGCCAGCAGC		465	
Sbjct	1186	ACTGAACAAGTCTTGACGGTACCT-AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC		1848	
Query	466	CGCGGTAATACGTAGGGTCCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGG		525	
Sbjct	1847	CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCTAGG		988	
Query	526	TGGTTTGTGCGGT-TGTTGCTGAAAATTCACAGCTTAACGTGG-BCGTGCGGGCGATAC		583	
Sbjct	987	CGGTTCTTAAGTCTGAT-GTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGT-CATTGGAAAC		938	
Query	584	-GGGCAGACTAGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCA		642	
Sbjct	929	TGGGGA-ACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCA		871	
Query	643	GATATCAGGAGGAACACCGGTGBCGAAGGCGGGTCTCTGGBCAGTAACTGACGCTGAGGA		782	
Sbjct	878	GAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGATGT		811	
Query	783	GCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGG		762	
Sbjct	818	GCGAAAGCGTGGGGATCAAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGA		751	
Query	763	GTACTA-G-G-T-GTGGGTTTCCTTCCCTTGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAAGTA		818	
Sbjct	758	GTGCTAAGTGTTAGGGGGTTCCGCCCTT--A--GTGCTGCAGCTAACGCATTAAAGCA		686	
Query	819	CCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAC		878	
Sbjct	695	CTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCAC		636	
Query	879	AAGCGGCGGAGCATGTGGATTAAATCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACA		938	
Sbjct	635	AAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAACTTTGACA		576	
Query	939	TGCACAGGA-CGCTGGTAGAGATACAG--TT-CCCTT--GTGGCCTGTGTG-CAGGTGG		991	
Sbjct	575	T-CCTTTGATCGCT-CTAGAGATA-GAGTTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGG		519	
Query	992	TGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA		1851	
Sbjct	518	TGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA		459	
Query	1852	CCCTT	1856		
Sbjct	458	CCCTT	454		

Příloha 3 Ověření sekvence genu *16S* rRNA u vzorku KO