



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ**

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**METODY IDENTIFIKACE PHA PRODUKUJÍCÍCH BAKTERIÍ**

METHODS FOR IDENTIFICATION OF PHA PRODUCING BACTERIA

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

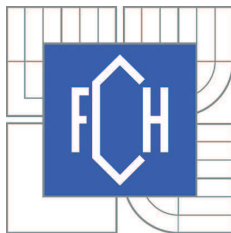
**Bc. Veronika Skřivanová**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

**BRNO 2016**



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

## Zadání diplomové práce

|                        |                                                  |                                  |
|------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------|
| Číslo diplomové práce: | <b>FCH-DIP0980/2015</b>                          | Akademický rok: <b>2015/2016</b> |
| Ústav:                 | Ústav chemie potravin a biotechnologií           |                                  |
| Student(ka):           | <b>Bc. Veronika Skřivanová</b>                   |                                  |
| Studijní program:      | Chemie a technologie potravin (N2901)            |                                  |
| Studijní obor:         | Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010) |                                  |
| Vedoucí práce          | <b>doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.</b>         |                                  |
| Konzultanti:           | Ing. Hana Obručová, Ph.D.                        |                                  |

### Název diplomové práce:

Metody identifikace PHA produkujících bakterií

### Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na téma PHA a možnost identifikace bakterií se schopností akumulace PHA
2. Experimentální zavedení a ověření kultivačních technik pro stanovení PHA akumulujících buněk
3. Experimentální zavedení a ověření mikroskopických metod pro stanovení PHA akumulujících buněk
4. Experimentální zavedení a ověření spektroskopických metod pro stanovení PHA akumulujících buněk
5. Experimentální zavedení molekulárních metod pro stanovení PHA akumulujících buněk

### Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Bc. Veronika Skřivanová  
Student(ka)

-----  
doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá testováním, optimalizací a porovnáním metod vhodných pro identifikaci bakterií produkujících polyhydroxyalkanoáty. V rámci práce byly využity metody kultivační a mikroskopické, kde byly bakteriální buňky barveny lipofilními barvivy Nilská červen a Sudánová čern. Dále byla využita průtoková cytometrie a metody spektroskopické, a to Ramanova spektroskopie a infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací a také metody molekulárně biologické, kde byla analyzována přítomnost genu kódujícího PHA syntázu (*phaC*) pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). PCR test se skládá ze dvou reakcí, v první reakci je *phaC* gen amplifikován společně s *16S* rRNA oblastí společnou pro všechny bakterie (multiplexní PCR). Druhá reakce je pak specifická pro PHA syntázu katalyzující biosyntézu mcl-PHA. Podle výsledků práce je při identifikaci PHA produkujících kmenů za účelem eliminace falešně pozitivních výsledků metod analyzujících genotyp a falešně negativních výsledků metod zkoumající fenotyp kombinovat oba přístupy. Jako velice perspektivní se jeví kombinace PCR pro stanovení přítomnosti *phaC* genu a následné analýzy přítomnosti PHA v bakteriálních buňkách. K tomuto účelu se nám nejlépe osvědčila Ramanova mikrospektroskopie, která je schopna zachytit i nízký obsah PHA v buňkách a zároveň nehrozí záměna PHA za jiné lipidické látky. Výsledky práce poskytují přehled testovaných metod, jejich výhody a nevýhody a také porovnání různých kritérií, dle kterých je možné vybrat metodu identifikace v závislosti na nastavených požadavcích.

## ABSTRACT

This diploma thesis deals with testing, optimizing and comparing methods for the identification of bacteria producing polyhydroxyalkanoates. Work included cultivation and microscopy methods, wherein the bacterial cells were stained with lipophilic dyes Nile red and Sudan black. Further, we also used flow cytometry and spectroscopic methods - Raman spectroscopy and infrared spectroscopy with Fourier transformation, and molecular biological methods, which analyzed the presence of a gene encoding PHA synthase (*phaC*) by polymerase chain reaction (PCR). PCR assay consist of two reactions, the first one is based on amplification of *phaC* gene along with *16S* rRNA gene, which is common for all the bacteria (multiplex PCR). The second reaction is focused on specific amplification of PHA synthase catalyzing biosynthesis of mcl-PHA. In order to overcome false positive results typical for methods analyzing genotype and also to avoid false negative results occurring in phenotype analyzing methods, the best strategy is to combine both approaches. According to our results, analysis of presence of *phaC* gene by PCR can be combined with methods capable of determining presence of PHA in bacterial cells. For this purpose, Raman microspectroscopy seems to be very promising tool, since it is able to detect low content of PHA in cells and PHA can not be confused with other lipid metabolites. The results provide an overview of test methods, their advantages and disadvantages and also to compare different criteria according to which it is possible to choose the method of identification in depending on the adjustable requirements.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Bakteriální polyhydroxyalkanoáty, lipofilní barviva, Ramanova spektroskopie, FTIR, průtoková cytometrie, PCR

## **KEYWORDS**

Bacterial polyhydroxyalkanoates, lipophilic dyes, Raman spectroscopy, FTIR, flow cytometry, PCR

SKŘIVANOVÁ, V. Metody identifikace PHA produkujících bakterií. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 72 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 vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Stanislavu Obručovi, PhD. za pomoc, ochotu a cenné rady při zpracování tématu. Můj dík patří také Ing. Haně Obručové, PhD. za její ochotu, vedení a rady v rámci molekulární části diplomové práce. Chtěla bych poděkovat také všem, se kterými jsem se setkala v laboratoři, za jejich vstřícnost a pomoc. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala své rodině a mým nejbližším za podporu a trpělivost po celou dobu studia. Práce byla podpořena z projektů: Ministerstvo školství a tělovýchovy L01211 a GACR - GA 15-206445S.*

# OBSAH

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Úvod .....                                                                                 | 9  |
| 2. Teoretická část.....                                                                       | 10 |
| 2.1 Polyhydroxyalkanoáty (PHA) – struktura a vlastnosti .....                                 | 10 |
| 2.1.1 Polyhydroxybutyrát (PHB) .....                                                          | 11 |
| 2.1.2 Kopolymer PHB-PHV .....                                                                 | 11 |
| 2.1.3 Intracelulární granule PHA .....                                                        | 12 |
| 2.2 Biologická role PHA .....                                                                 | 13 |
| 2.3 Biosyntéza polyhydroxyalkanoátů .....                                                     | 13 |
| 2.3.1 Syntéza scl-PHA .....                                                                   | 13 |
| 2.3.2. Syntéza mcl-PHA.....                                                                   | 15 |
| 2.3.3 PHA syntáza.....                                                                        | 16 |
| 2.4 Průmyslová produkce a aplikace PHA .....                                                  | 18 |
| 2.5 Vybraní producenti PHA .....                                                              | 18 |
| 2.5.1 <i>Cupriavidus necator</i> H16.....                                                     | 18 |
| 2.5.2 <i>Burkholderia cepacia</i> .....                                                       | 19 |
| 2.5.3 <i>Burkholderia sacchari</i> .....                                                      | 19 |
| 2.5.4 <i>Pseudomonas putida</i> .....                                                         | 20 |
| 2.5.5 <i>Pseudomonas chlororaphis</i> .....                                                   | 20 |
| 2.6 Stručná charakteristika metod použitých pro identifikaci PHA produkujících bakterií. .... | 20 |
| 2.6.1 Barvení Nilskou červení .....                                                           | 20 |
| 2.6.2 Barvení Sudánovou černí.....                                                            | 20 |
| 2.6.3 Fluorescenční mikroskop .....                                                           | 21 |
| 2.6.4 Průtoková cytometrie .....                                                              | 21 |
| 2.6.5 Ramanova spektroskopie .....                                                            | 21 |
| 2.6.6 Infračervená spektroskopie .....                                                        | 23 |
| 2.6.7 Analýza nukleových kyselin a polymerázová řetězová reakce (PCR) .....                   | 24 |
| 3. Experimentální část .....                                                                  | 27 |
| 3.1 Použité chemikálie, přístroje a bakterie.....                                             | 27 |
| 3.1.1 Chemikálie pro kultivaci.....                                                           | 27 |
| 3.1.2 Komponenty pro izolaci DNA, PCR a agarózovou gelovou elektroforézu.....                 | 27 |
| 3.1.3 Použité primery .....                                                                   | 28 |

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.4 Ostatní chemikálie .....                                             | 28 |
| 3.1.5 Použité přístroje .....                                              | 28 |
| 3.1.6 Použité bakterie.....                                                | 29 |
| 3.2 Kultivace bakterií .....                                               | 29 |
| 3.2.1 Uchovávání bakterií a příprava inokula .....                         | 29 |
| 3.2.2 Kultivační média .....                                               | 29 |
| 3.3 Příprava roztoků .....                                                 | 30 |
| 3.3.1 0,05% roztok Sudánové černě.....                                     | 30 |
| 3.3.2 0,3% roztok Sudánové černě.....                                      | 30 |
| 3.3.3 Roztok Nilské červeně .....                                          | 30 |
| 3.3.4 Příprava PBS pufru .....                                             | 31 |
| 3.3.5 Příprava TBE pufru pro gelovou elektroforézu .....                   | 31 |
| 3.3.6 Příprava nanášecího pufru pro agarózovou gelovou elektroforézu ..... | 31 |
| 3.3.7 Příprava 2% agarózového gelu pro elektroforézu.....                  | 31 |
| 3.4 Použité metody .....                                                   | 31 |
| 3.4.1 Kultivační techniky .....                                            | 31 |
| 3.4.2 Mikroskopické techniky.....                                          | 32 |
| 3.4.3 Spektroskopické techniky .....                                       | 32 |
| 3.4.3 Průtoková cytometrie .....                                           | 32 |
| 3.4.4 Molekulárně biologické metody .....                                  | 33 |
| 3.4.5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA .....        | 33 |
| 3.4.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....                             | 34 |
| 4. Výsledky a diskuze.....                                                 | 36 |
| 4.1 Kultivační techniky.....                                               | 36 |
| 4.1.1 Barvení kolonií Nilskou červení .....                                | 36 |
| 4.1.2 Barvení kolonií Sudánovou černí.....                                 | 39 |
| 4. 2 Mikroskopické techniky .....                                          | 41 |
| 4.2.1 Barvení buněk Nilskou červení.....                                   | 41 |
| 4.2.2 Barvení buněk Sudánovou černí .....                                  | 41 |
| 4.3 Průtoková cytometrie.....                                              | 42 |
| 4.4 Spektroskopické techniky .....                                         | 44 |
| 4.4.1 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací.....           | 44 |
| 4.4.2 Měření Ramanova spektra Ramanovským mikroskopem .....                | 45 |

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4. 5 Identifikace schopnosti akumulovat PHA pomocí molekulárně biologických technik   | 48 |
| 4.5.1 Izolace bakteriální DNA kitem Nucleo Spin Tissue.....                           | 48 |
| 4.5.2 Přímá izolace bakteriální DNA pomocí DNAzolu a tepelnou lyzí buňky .....        | 50 |
| 4.5.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované bakteriální DNA . | 52 |
| 4.5.4 Optimalizace PCR s primery cílenými do oblasti 16S rRNA a <i>phaC</i> .....     | 52 |
| 4.5.5 PCR s primery cílenými na <i>phaC1</i> gen.....                                 | 54 |
| 4.5.6 Optimalizace PCR s primery cílenými na <i>phaC1</i> gen .....                   | 55 |
| 4.6 Porovnání jednotlivých metod.....                                                 | 61 |
| 5. Závěry.....                                                                        | 63 |
| 6. Použitá literatura .....                                                           | 65 |



## 1. ÚVOD

Syntetické polymery jsou chemickým průmyslem produkovány od roku 1930, a jelikož jsou odolné vůči mikrobiálnímu rozkladu, zůstávají v životním prostředí, kde se hromadí. Právě kvůli této negativní vlastnosti je snaha o nalezení jiných materiálu, které se budou svými vlastnostmi, podobat syntetickým polymerům, ale které zároveň budou rozložitelné a nebudou zatěžovat životní prostředí. Tyto podmínky by mohly splňovat některé tzv. biologicky odbouratelné plasty, například polyhydroxyalkanoáty [1, 2].

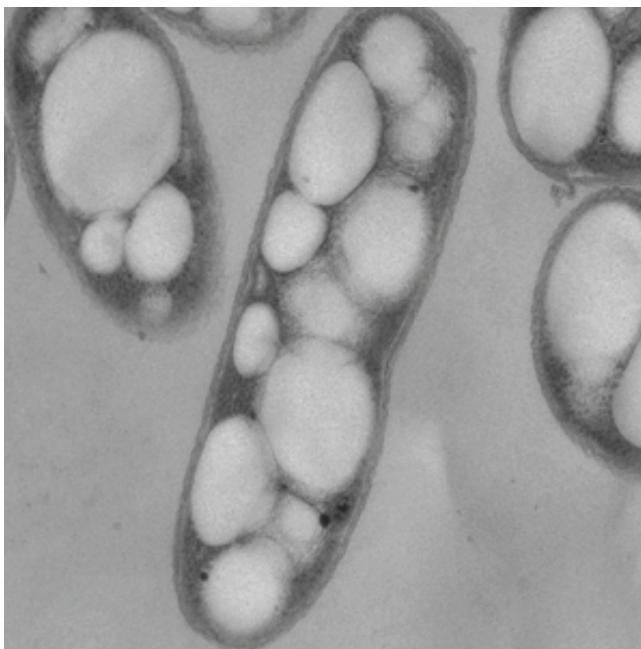
Polyhydroxyalkanoáty jsou fascinující bakteriální polymery, které mají jednak výrazné průmyslové využití jako biodegradabilní plasty, ale také velice důležitou biologickou úlohu, protože bakteriím pomáhají přežít limitaci substrátem, ale i další stresové podmínky [1, 2]. Z pohledu výzkumu PHA produkujících mikroorganismů je pro izolaci klíčové správně identifikovat PHA produkující buňky, k čemuž je možné použít řadu technik – kultivačních, mikroskopických, spektroskopických i molekulárně biologických. Tato diplomová práce je zaměřena právě na vývoj, porovnání a optimalizaci těchto technik.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Polyhydroxyalkanoáty (PHA) – struktura a vlastnosti

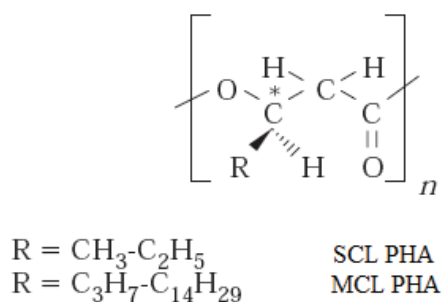
Polyhydroxyalkanoáty jsou přírodní polyestery mastných hydroxykyselin. Řadí se do skupiny opticky aktivních biologických monomerů, které obsahují (*R*)-3-hydroxyalkanové kyseliny. Tyto kyseliny jsou v *R* konfiguraci z důvodu stereospecifity PHA syntázy [1, 3].

Prvním izolovaným polyhydroxyalkanoátem byl polyhydroxybutyrát, z bakterie *Bacillus megaterium*, který byl izolován francouzským chemikem Lemoignem v roce 1926. Od té doby byl nalezen v mnoha druzích Grampozitivních i Gramnegativních bakterií a také u Archaeobakterií. K syntéze polyhydroxyalkanoátů u bakterií dochází, pokud je v prostředí dostatek uhlíkatého zdroje a pokud zároveň dojde k limitaci některou důležitou živinou. PHA poté slouží jako zásobní zdroj uhlíku, energie a redukční síly. Po vyčerpání uhlíkatého zdroje dokáží bakterie PHA rozložit pomocí intracelulárních depolymeráz na uhlík a zdroj energie a dále využít na důležité buněčné pochody [1, 3].



Obrázek 1: Granule PHA v buňce mikroorganismu [3]

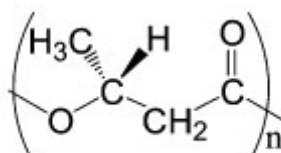
PHA se dělí na dvě skupiny. Polyestery, které mají ve struktuře monomeru 3-5 uhlíků se nazývají scl-PHA (short-chain-length), druhou skupinu tvoří ty, které mají ve struktuře monomeru 6-14 uhlíkových atomů a nazývají se mcl-PHA (medium-chain-length). Tyto dvě skupiny polyesterů se liší délkou řetězce, a tedy i svými vlastnostmi. Zatímco scl-PHA se vyznačují vysokým stupněm krystaličnosti, díky němuž jsou velmi tuhé a křehké, mcl-PHA jsou elastické materiály s nižším stupněm krystaličnosti a také s nižší teplotou tání. [4] Schopnost akumulovat mcl-PHA je jedinečná pro skupinu *Pseudomonad* [1]. Obecná struktura polyhydroxyalkanoátů je uvedena na Obrázku 2.



Obrázek 2: Obecná struktura PHA [1]

### 2.1.1 Polyhydroxybutyrát (PHB)

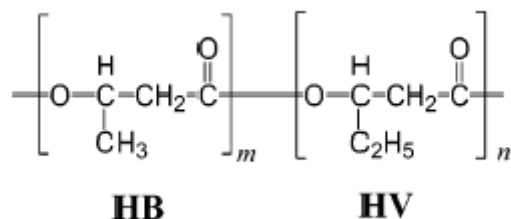
Nejznámějším polymerem ze skupiny scl-PHA je 3 – polyhydroxybutyrát (PHB). Homopolymer PHB je zcela stereospecifický polyester, který má v *R*-konfiguraci všechny uhlíky asymetrické, a proto je vysoce krystalický. Díky této vysoké krystalinitě je relativně křehký a tuhý. Teplota tání PHB se pohybuje v rozmezí 173 – 180 °C a teplota degradace kolem 200 °C, tedy velmi blízko teploty tání. Mechanickými vlastnostmi se polyhydroxybutyrát podobá polypropyleny, nicméně je ve srovnání s polypropylenem tužší a křehčí. Využívá se v plastikářském průmyslu a díky biodegradabilitě jej lze také využít pro výrobu nosičů léčiv. Je netoxický a organismy je tolerován i ve vysokých koncentracích. Syntéza PHB je regulována na enzymatické úrovni i na úrovni genové exprese a samotný polymer vzniká kondenzací 3-hydroxybutyryl-CoA, katalyzovanou enzymem PHA syntázou [1, 5].



Obrázek 3: Struktura PHB [6]

### 2.1.2 Kopolymer PHB-PHV

Mechanické vlastnosti polymeru se výrazně zlepší, pokud se do struktury začlení jednotky 3 – hydroxyvalerátu, což je možné díky relativně široké substrátové specifitě PHA syntázy, která je schopna do struktury polymer inkorporovat. A také další hydroxykyseliny ve formě příslušného acyl-CoA. U kopolymeru 3-hydroxybutyrátu (3HB) a 3-hydroxyvalerátu (3HV) (P[3HB-co-3HV]) dojde také ke snížení teploty tání, ale teplota degradace zůstává zachována [1].



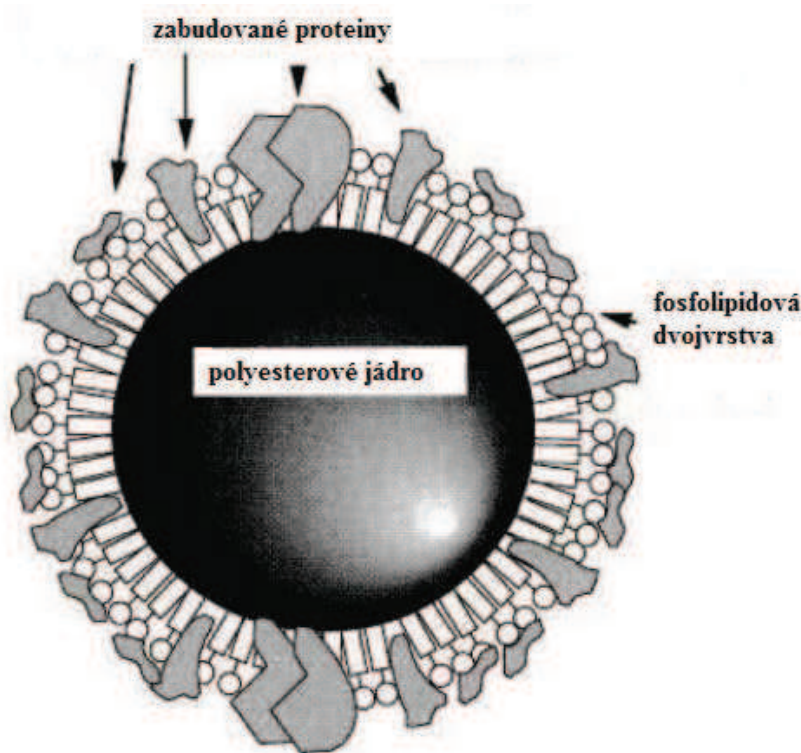
Obrázek 4: Obecná struktura kopolymeru P[3HB-co-3HV] [7]

Díky těmto vlastnostem lze využít kopolymer pro tepelné zpracování jako taveninu bez degradace materiálu. Obecně lze říci, že pokles teploty tání i zvýšení flexibility materiálu pozitivně koreluje s molárním obsahem 3HV v polymeru [1].

### 2.1.3 Intracelulární granule PHA

Polyhydroxyalkanoáty se v buňce ukládají ve formě granulí. Spektroskopií nukleární magnetické rezonance bylo prokázáno, že se polyester v buňkách vyskytuje v nestabilní amorfní formě. Izolované granule se skládají především z polyesterů, proteinů a fosfolipidů nebo lipidů. Například u bakterie *Bacillus megaterium* je granule tvořena z 97,7 % z polyesteru, z 1,87 % z proteinů a 0,46 % fosfolipidů nebo lipidů [1]. Hustota granulí se pohybuje v rozmezí  $1,18 - 1,24 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$  a jejich velikost v průměru je obvykle od 0,2 do 0,5  $\mu\text{m}$  [1, 3]. Granule jsou tvořeny hydrofobním polyesterovým jádrem, které je obklopeno vrstvou fosfolipidů, do které jsou zabudovány proteiny pro jejich syntézu nebo degradaci. [7] Polyesterová jádra, která se spojují s proteiny, se nazývají phasiny. Phasiny jsou nízkomolekulární proteiny, u nichž se předpokládá, že umí kromě granule vytvořit také velmi tenkou proteinovou vrstvu. Tato vrstva tvoří rozhraní mezi hydrofilním prostředím cytoplazmy a hydrofobním prostředím PHA. Kromě toho se phasiny podílejí také na regulaci a ukládání PHA, mechanismus ovšem není zcela objasněn [1, 3].

Množství, velikost a složení granulí závisí na druhu bakterie a také na kultivačních podmínkách [1].



Obrázek 5: Struktura PHA granule [3]

## 2.2 Biologická role PHA

Mikroorganismy potřebují pro svůj růst a přežití vhodné podmínky prostředí. Především se jedná o dostatečné množství surovin pro tvorbu buněčné hmoty, také zdroj energie a celkově vhodné chemické a fyzikální podmínky. Pokud se prostředí stane nepříznivým, dochází obecně ke stresovým podmínkám a mikroorganismus na tyto podmínky reaguje stresovou reakcí [8, 9].

Bakterie mohou být vystaveny mnoha stresovým faktorům, jako je například hladovění a špatné fyzikální chemické nebo biologické podmínky. Všechny tyto podmínky jsou proměnné, a proto i bakterie mají různé mechanismy, jak se s těmito změnami vyrovnat. Jedna ze strategií je i hromadění polymerů, jako jsou polyhydroxyalkanoáty [10].

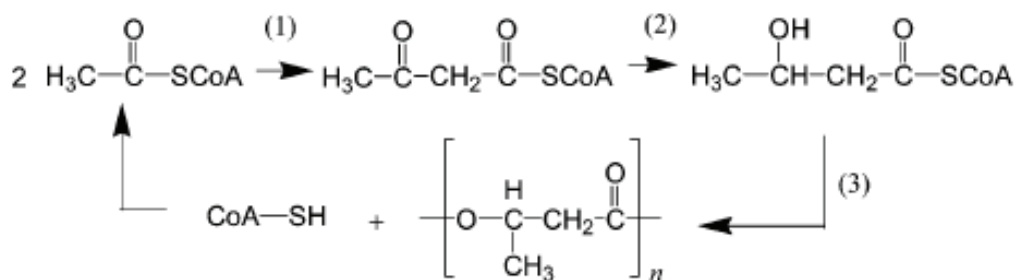
Vztah k akumulaci PHA je různý. Kadouri a kolektiv uvádí, že mutantní bakterie *Azospirillum brasilense* s narušenou schopností produkce nebo degradace PHA přežívá při hladovění, velkých výkyvech teplot nebo pH, při osmotickém šoku, působení volných radikálů nebo UV záření kratší dobu než divoký kmen bakterie, který má v buňkách vyšší obsah PHA. Zvýšená odolnost vůči těmto faktorům, nemusí být způsobena samotnou přítomností PHA v buňkách, ale může to být i pouhou správnou funkcí PHA cyklu. Dále také uvádí, že akumulace PHA v buňkách může podporovat množení buněk v nepřítomnosti exogenního zdroje uhlíku. Mechanismy, kterými PHA cyklus napomáhá zvládnutí stresových podmínek, není zcela objasněn [10, 11].

Ruiz a kolektiv uvádí, že zvýšení intracelulární koncentrace ATP a guanosin tetrafosfátu (ppGpp) v buňce je spjata s degradací PHA. ppGpp slouží jako buněčný alarmon a aktivuje exprese alternativních sigma faktorů, především pak RpoS. Nárůst koncentrace ATP a ppGpp při degradaci PHA byl pozorován pouze u divokého typu *Pseudomonas oleovorans*. U mutantu, který nebyl schopen degradace polymeru, k tomuto nedochází. Během depolymerace u *Pseudomonas oleovorans* také dochází k aktivaci exprese genů podílejících se na přežití buněk ve stacionární fázi růstu a poskytujících ochranu proti různým stresům [11].

## 2.3 Biosyntéza polyhydroxyalkanoátů

### 2.3.1 Syntéza scl-PHA

Biochemie syntézy scl-PHA je předmětem mnoha studií. U většiny bakterií, například u bakterie *Cupriavidus necator* H16, je PHB syntetizován ve třech krocích. Reakce začíná kondenzací dvou acetyl-CoA vznikem acetoacetyl-CoA, která je katalyzována enzymem  $\beta$ -ketothiolázou. Produkt reakce je za účasti NADP-dependentní acetoacetyl-CoA reduktázy stereoselektivně redukován na (R)-3-hydroxybutyryl-CoA. V posledním kroku syntézy dochází k polymeraci (R)-3-hydroxybutyryl-CoA na PHB za současného odštěpení HS-CoA [1, 6, 12].



Obrázek 6: Schéma syntézy PHA [6]

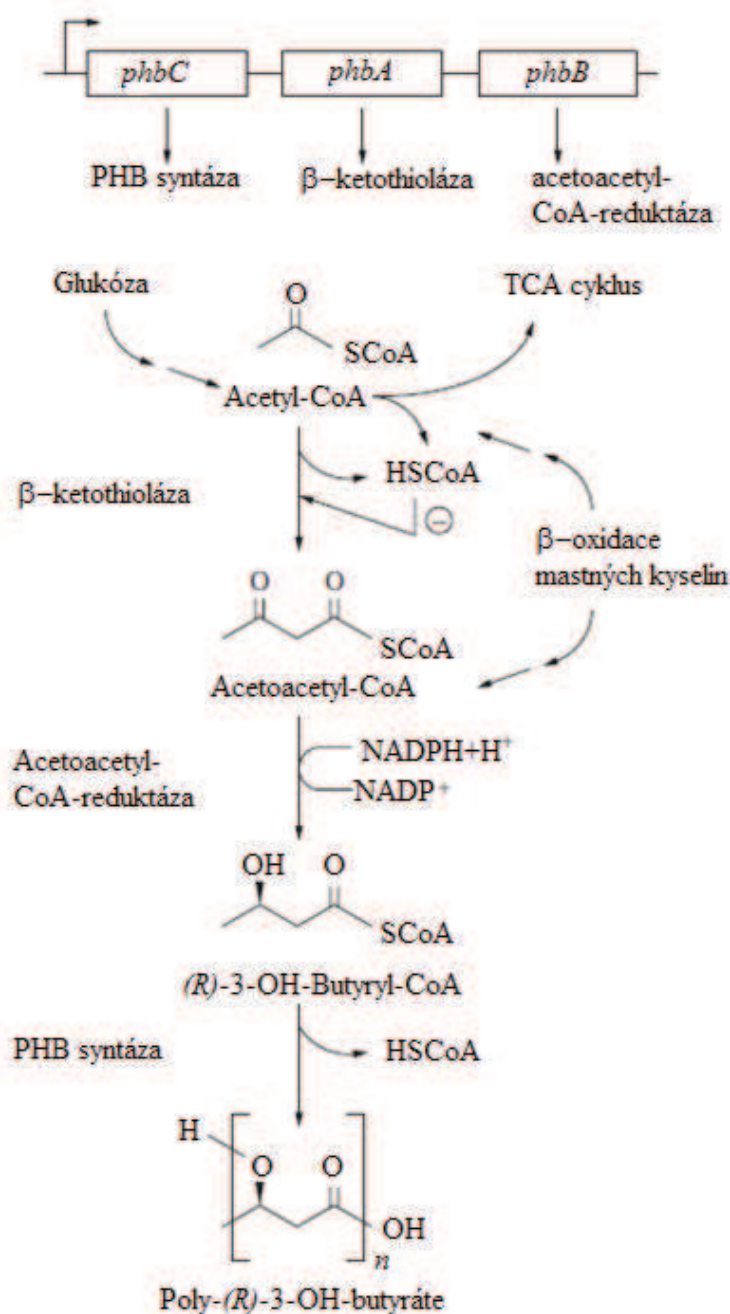
Tento cyklus se aktivuje, jakmile dojde k omezení vstupu acetyl-CoA do Krebsova cyklu z důvodu nedostatku živin (obvykle fosfor, dusík nebo kyslík) potřebných k dalšímu metabolismu acetyl-CoA pro růst buněk [6]. Pro regulaci syntézy PHB je důležitá intracelulární koncentrace acetyl-CoA a koenzymu A jako takového. Pokud nedochází k limitaci žádnou živinou, kdy je organismus kultivován na dostatečně bohatém médiu, je acetyl-CoA odbouráván v Krebsově cyklu za průběžného odbourávání vznikajícího NADH. V médiu s limitujícím množstvím dusíku se hromadí NADH což má za následek inhibici enzymů Krebsova cyklu, citrát syntázy a isocitrát dehydrogenázy, a dochází k syntéze PHB dle výše uvedeného schématu. Enzym  $\beta$ -ketothioláza je inhibován volným koenzymem A, který se uvolňuje při oxidaci acetyl-CoA v Krebsově cyklu. Zdrojem uhlíku pro tvorbu acetyl-CoA mohou být různé substráty například cukry, pyruvát nebo acetát [1, 13].

Existují však výjimky. Například u rodu *Rhodospirillum rubrum* dochází k tvorbě (S)-3-hydroxybutyryl-CoA, který je dále převeden na (R)-3-hydroxybutyryl-CoA pomocí dvou stereospecifických enoyl-CoA hydratáz [1].

Kopolymer P(3HB-co-3HV) může být syntetizován například u rodu *Cupriavidus necator*, ale také u řady dalších mikroorganismů. K tvorbě kopolymeru dochází buďto na směsném substrátu obsahujícím cukry a kyselinu propionovou nebo přímo z prekurzoru 3-hydroxyvalerátu. Je-li přiváděn propionát, je biochemická cesta tvorby kopolymeru stejná jako u syntézy PHB s tím rozdílem, že dochází ke kondenzaci propionyl-CoA a acetyl-CoA za vzniku 3-ketovaleryl-CoA, přičemž reakce je také katalyzována 3-ketothiolázou. V tomto kroku tedy dochází k začlenění monomerní jednotky 3-hydroxyvalerátu do polymeru. Pokud jsou v reakci zdrojem uhlíku mastné kyseliny s delším řetězcem, tvoří se 3-hydroxyvalerát pomocí  $\beta$ -oxidace přímo z těchto kyselin [1, 6, 12, 14].

Geny kódující tvorbu enzymů -  $\beta$ -ketothioláza, NADP-dependentní acetoacetyl-CoA reduktáza a PHA syntáza, jsou umístěny v bakteriálním genomu, a to na *phbCAB* operonu [1, 6, 12, 14]. Schéma operonu je uvedeno na Obrázku 7.





Obrázek 7: Geny pro tvorbu enzymů nezbytných pro biosyntézu PHB u mikroorganismu *Cupriavidus necator* [1]

### 2.3.2. Syntéza mcl-PHA

Tvorba mcl-PHA je typická pro rod *Pseudomonas*. K syntéze PHA jsou jako zdroj uhlíku využívány meziproducty  $\beta$ -oxidace mastných kyselin, syntézy mastných kyselin *de novo* nebo oxidace různých alkanů, alkoholů, případně jiných organických sloučenin. Syntéza mcl-PHA probíhá přes R(S)-3-hydroxyacyl-CoA, enoyl-CoA, R-3-hydroxyacyl carrier protein

(ACP) nebo přes příslušné 3-ketoacyl-CoA. Tyto sloučeniny jsou prekurzorem pro polymerizaci mcl-PHA, která je katalyzována enzymem PHA syntázou [12, 14, 15, 16].

### 2.3.3 PHA syntáza

PHA syntáza je klíčový enzym syntézy PHA, který katalyzuje polymerizaci hydroxyacyl-CoA na polyhydroxyalkanoáty. Nejznámějšími PHA syntázami jsou scl-PHA syntáza a mcl-PHA syntáza. Pokud jde o syntázu s nízkou substrátovou specifitou, může dojít k polymerizaci na scl i mcl PHA. Takovou širokou substrátovou specifitu má ale velmi malé množství syntáz. Jako příklad lze uvést syntázu u některých bakterií rodu *Pseudomonas* [15].

PHA syntázy se v současné době dělí do čtyř tříd v závislosti na primární struktuře, substrátové specifitě a uspořádání podjednotky [12, 14].

Třída I a II se skládají pouze z jednoho typu podjednotky (*phaC*) s molekulovou hmotností od 60 do 70 kDa. Syntázy třídy I (např. *Cupriavidus necator*) využívají přednostně jako substrát CoA-thioestery různých (*R*)-3-hydroxy mastných kyselin se 3 až 5 atomy uhlíku. Zatímco syntázy třídy II využívají CoA-thioestery různých (*R*)-3-hydroxy mastných kyselin se 6 až 14 atomy uhlíku [12, 14, 15].

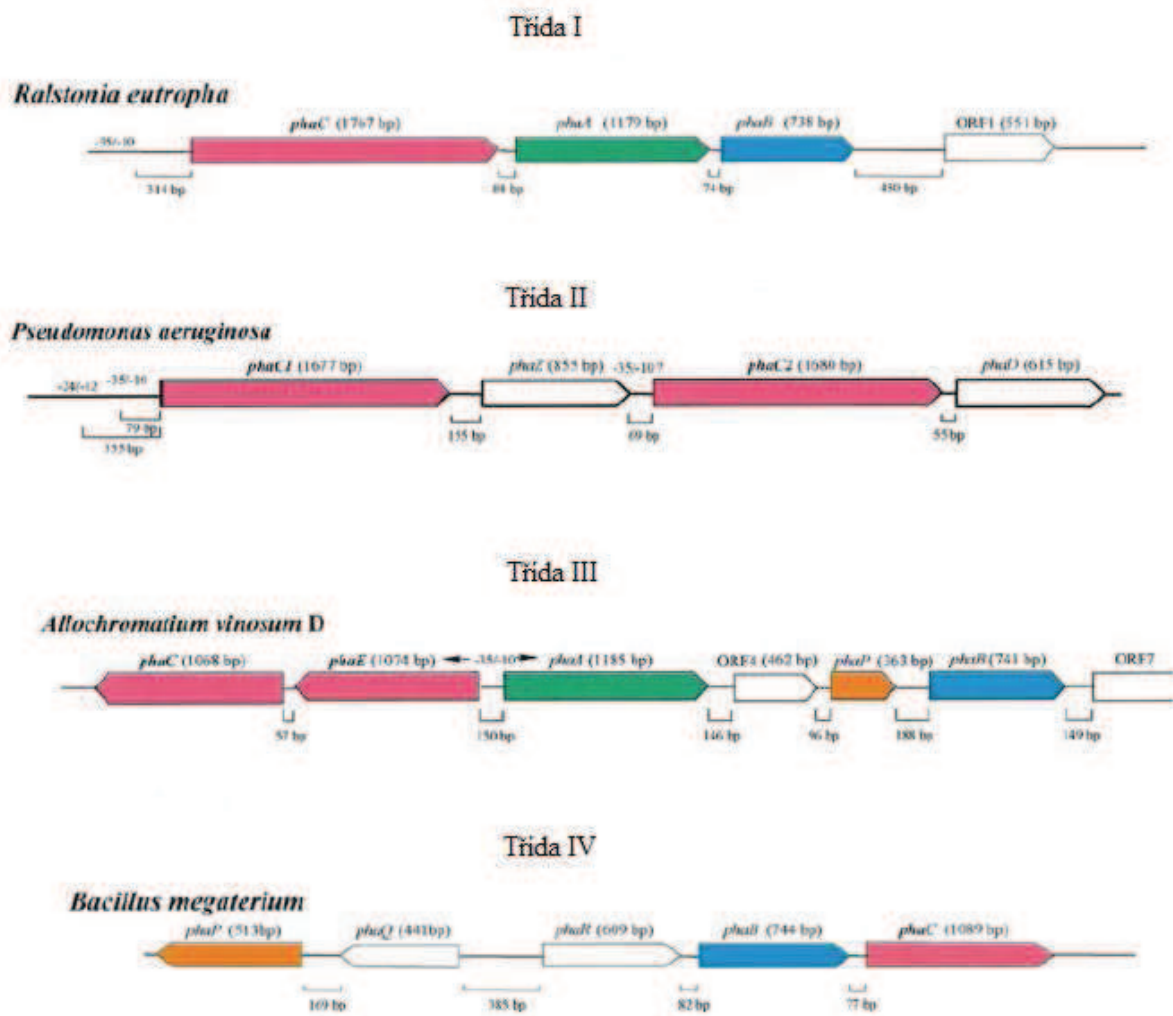
Syntázy třídy III (např. *Allochromatium vinosum*) jsou tvořeny dvěma různými podjednotkami, z nichž jedna vykazuje podobné sekvence aminokyseliny jako podjednotka syntáz třídy I a II – *phaC* (velikost je okolo 40 kDa) a druhá podjednotka (*phaE* – velikost kolem 40 kDa) tyto podobnosti nevykazuje. Jako substrát využívají syntázy třídy III CoA-thioestery (*R*)-3-hydroxy mastných kyselin se 3 až 5 atomy uhlíku [6, 12, 14].

Třída IV má obdobné uspořádání podjednotek jako třída III, pouze podjednotka *phaE* je zde nahrazena podjednotkou *phaR* (asi 20 kDa) [12, 14].

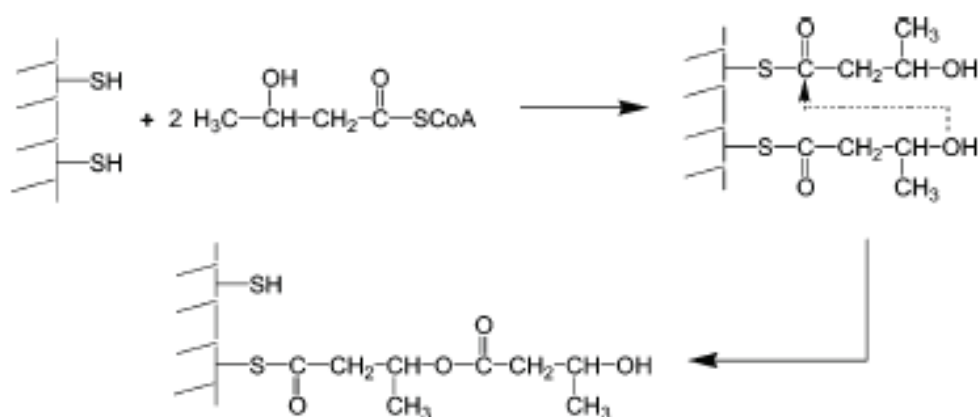
Po srovnání více než 50-ti syntáz z různých druhů bakterií bylo zjištěno, že zastoupení aminokyselin ve struktuře se značně podobá [14]. Všechny PHA syntázy mají ve svém aktivním místě aminokyselinu cystein, který funguje (společně s histidinem a aspartátem – katalytická triáda) jako katalytické aktivní místo pro připojení rostoucího řetězce polyhydroxyalkanoátu [12].

Klíčovou roli v mechanismu katalýzy hrají dvě thiolové skupiny, které jsou zapojeny do aktivního místa pro zahájení reakce a následnou polymerizaci. Po zahájení thiolové skupiny vytvoří thioestery se dvěma molekulami monomeru, které následně podstoupí thioester-oxyester výměnou reakci v aktivním místě za vzniku dimeru a současného uvolnění jedné z thiolových skupin, která se zapojí do dalšího šíření reakce. Následuje připojení dalšího monomeru na volnou thiolovou skupinu a k další výměnné reakci za vzniku trimeru. Tímto způsobem postupuje reakce dále. Model katalýzy byl navržen dle termodynamicky nejvýhodnějších reakcí [6, 14].





Obrázek 8: Organizace genu kódujících různé třídy PHA syntáz [14]



Obrázek 9: Model mechanismu katalýzy PHA syntázy [6]

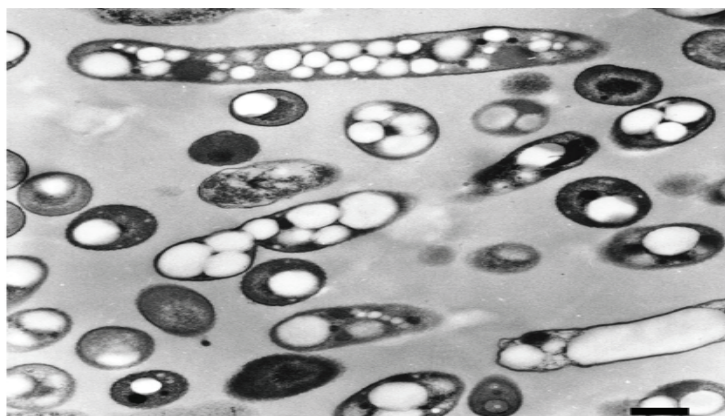
## 2.4 Průmyslová produkce a aplikace PHA

Jedním z hlavních problémů rozšíření komerční výroby a použití PHA jsou vysoké výrobní náklady ve srovnání s výrobou plastů z petrochemických zdrojů. Proto je dnes velká snaha o výrobu PHA z odpadních zdrojů, například z potravinářských nebo zemědělských výrob, čímž by se značně snížily výrobní náklady těchto bioplastů. Velmi perspektivní je využití PHA jako obalového materiálu, který je zcela kompostovatelný. Tyto materiály mají také zajímavé akustické a oscilační vlastnosti, což je činí využitelnými například při výrobě sluchátek, mikrofونů nebo měřidel tlaku. Polyhydroxyalkanoáty jsou také, díky své biodegradabilitě a šetrnosti k životnímu prostředí, zajímavé pro potenciální aplikaci v zemědělství, ve formě mulčovacích fólií, a v neposlední řadě také v medicíně, kde by se daly využít například jako implantáty nebo systémy pro řízený transport léčiv [1, 17, 18].

## 2.5 Vybraní producenti PHA

### 2.5.1 *Cupriavidus necator* H16

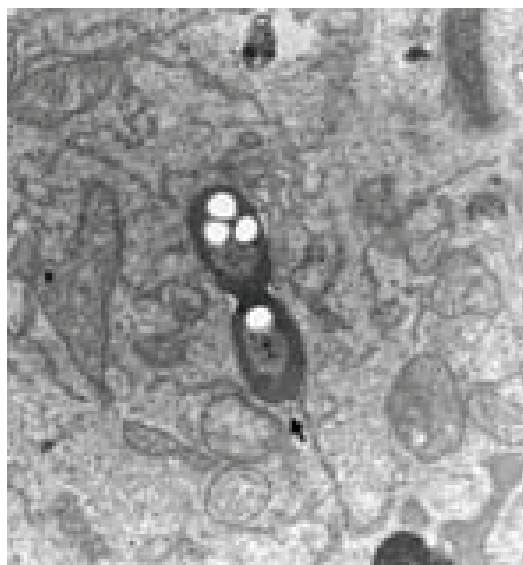
Jedná se o Gram-negativní, fakultativně chemolitoautotrofní bakterii patřící do skupiny proteobakterií, vyskytující se v půdě a sladké vodě. V nepřítomnosti organického substrátu využívá jako jediný zdroj energie vodík a oxid uhličitý. Pokud není v prostředí přítomen kyslík, může bakterie přepnout na kompletní denitrifikační dráhu, kdy využívá alternativní donory elektronů, jako jsou  $\text{NO}^3$  a  $\text{NO}^2$ . Jde tedy o anaerobní respiraci. Pro metabolismus glukózy, fruktózy a dalších sacharidů je využívána Entner-Deudoroffova dráha, jelikož bakterie netvoří enzym fruktóza-1,6-bisfosfát aldolázu. *Cupriavidus necator* H16 dříve též označovaný jako *Ralstonia eutropha*, *Wautersia eutropha* a *Alcaligenes eutrophus*, patří mezi organismy, které při nadbytku zdroje uhlíku a limitaci některými živinami, tvoří polyhydroxyalkanoáty – konkrétně polyhydroxybutyrát. Jedná se o nejlépe prozkoumanou bakterii produkující PHB. Dříve byl tento kmen považován za potenciálního producenta tzv. single-cell proteinu, který byl určen k výživě dobytka a kosmonautů, zde mělo být využito jeho schopnosti fixace  $\text{CO}_2$  vydýchaného kosmonauty v přítomnosti  $\text{H}_2$ . PHB ovšem nemůže být v zažívacím traktu zvířat ani lidí stráven, a proto byly vytvořeny i mutanty tohoto kmene, které PHB neprodukují. Nejznámějším mutantem je *Cupriavidus necator* PHB-4 [19, 20, 21].



Obrázek 10: *Cupriavidus necator* H16 s granulemi PHB [22]

### 2.5.2 *Burkholderia cepacia*

*Burkholderia cepacia* byla popsána poprvé v roce 1950 jako původce bakteriální hniloby cibule. Jde o Gram-negativní, nefermentující, pohyblivou, tyčinkovitou bakterii tvořící biofilm [23]. Tvoří společně s dalšími bakteriemi tzv. *Burkholderia cepacia* komplex (BCC-zkratka *Burkholderia cepacia* complex). V současné době tento komplex obsahuje dvacet úzce příbuzných, ale odlišných bakterií, které se vyskytují téměř všude v přírodě, zejména v půdě a ve sladké vodě. Organismy patřící do BCC komplexu jsou oportunními patogeny. Mohou způsobit infekční onemocnění u imunodeficitních jedinců nebo u osob s cystickou fibrózou plic. Bakterie CBB komplexu jsou vysoce rezistentní vůči antibiotikům [24]. *B. cepacia* je značně rezistentní vůči dezinfekčním prostředkům, například vůči kvarterním amonným bázím (Ajatin). Dokáže vázat oxid uhličitý ze vzduchu, a je tedy, do jisté míry, schopna rozmnožovat se i v prostředí pouze se zdrojem dusíku. Napadení dýchacích cest touto bakterií způsobuje, u lidí trpících cystickou fibrózou plic znatelné zhoršení průběhu onemocnění. Bakterie roste na běžných půdách, kde jako cukerný zdroj uhlíku využívá glukózu [25]. Pro produkci PHA využívá jako zdroj uhlíku glukózu, ovšem je schopna produkovat také na zdrojích obsahujících xylózu jako jsou například hemicelulózové hydrolyzáty dřeva [26].



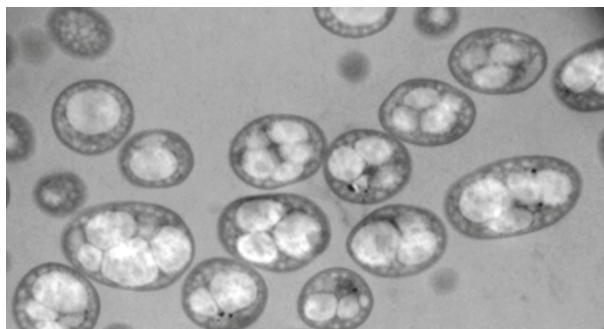
Obrázek 11: *Burkholderia cepacia* pod elektronovým mikroskopem [27]

### 2.5.3 *Burkholderia sacchari*

Tato bakterie byla izolována v Brazílii z půdy plantáží cukrové třtiny. Jde tedy o Gram-negativní bakterii vyskytující se především v půdě, vykazující nepatogenní interakce s rostlinami. Hromadí až 75% buněčné hmoty ve formě PHA. Jedná se o kmen perspektivní z hlediska produkce PHA, jelikož dokáže tvořit PHA na substrátech s využitím například hemicelulózových hydrolyzátů z výlisků cukrové třtiny [28]. *B. sacchari* je schopna produkovat PHA také směsí glukózy, xylosy a arabinosy, ale přednostně využívá jako zdroj uhlíku glukosu. Při využití pentóz dochází k prodloužení procesu a také ke snížení produktivity PHA [29, 30].

#### 2.5.4 *Pseudomonas putida*

*Pseudomona putida* je rychle rostoucí, Gram-negativní bakterie, vyskytující se především v půdě nebo ve vodě [31, 32]. Členové rodu *Pseudomonas* mají schopnost růst v jednoduchém médiu na úkor nejrozličnějších organických látek a rod *Pseudomonas putida* je schopný degradovat například toluen, benzen nebo ethylbenzen, což je velmi zajímavé z hlediska řešení znečištění životního prostředí. Bakterie produkuje mcl-PHA z různých mastných substrátů jako n-alkanů, n-alkoholů a n-mastných kyselin. Dále je schopný PHA produkovat na surovém glycerolu, různých rostlinných olejích nebo na některých odpadních látkách, jako je třeba živočišný odpad z porážky zvířat nebo zpracování masa [33, 34].



Obrázek 12: PHA granule uvnitř buněk *Pseudomonas putida* [35]

#### 2.5.5 *Pseudomonas chlororaphis*

Jedná se o Gram-negativní, nepatogenní bakterii. Vyskytuje se například v půdě nebo na kořenech rostlin, které kolonizuje, a je rozšířena po celém světě. Vykazuje antimikrobiální činnost proti různým choroboplodným patogenům. Dobře se přizpůsobuje životnímu prostředí díky komplexnímu regulačnímu mechanismu. Dále také dokáže degradovat organické sloučeniny a metabolizovat nitrilové sloučeniny. Tohoto dobrého přizpůsobování se dá využít například v zemědělství nebo pro podporu produkce některých antibiotik [36]. *Pseudomonas chlororaphis*, stejně jako *Pseudomonas putida*, produkuje mcl-PHA, a to na obdobných substrátech [37].

### 2.6 Stručná charakteristika metod použitých pro identifikaci PHA produkujících bakterií

#### 2.6.1 Barvení Nilskou červí

Nilská červeň je fluorescenční, lipofilní barvivo, vhodné v rámci spektrofotometrie, pro kvantitativní analýzu. Obecně, fluorescenční barviva umožňují nepřímou detekci intracelulárních lipidů. Fluorescence obarvených buněk se většinou měří pomocí spektrofotometrie, kdy se využívá fluorescenční mikroskopie nebo průtoková cytometrie. Díky tomu, že metoda je poměrně jednoduchá, je možná automatizace procesu měření [38].

#### 2.6.2 Barvení Sudánovou černí

Barvivo Sudan Black je lipofilní barvivo. Barví různé lipidy, jako jsou například fosfolipidy v buněčných membránách, steroly nebo neutrální tuky nebo granule PHA, které mají také lipidický charakter [1, 3, 39]. Tohoto barvení se dá využít pro barvení kolonií přímo na Petriho misce po kultivaci nebo pro světelnou mikroskopii [40].

### 2.6.3 Fluorescenční mikroskop

Fluorescenční mikroskopie je jedna ze základních metod využívaných v biologii, biomedicínských vědách a při výzkumu materiálů tam, kde se nedají využít ostatní mikroskopické techniky. Využitím řady fluorochromů je možné oddělit buňky a buněčné části s vysokým stupněm specifičnosti od nefluoreskujícího materiálu. Při použití více fluorescenčních sond je možné současně identifikovat několik molekul. Světlo určité vlnové délky, vyslané zdrojem, způsobí fluorescenci vzorku. Vzorek poté emituje fluorescenční světlo, které dopadne na bariérový filtr, a ten je propustí. To znamená, že vzorek sám o sobě obsahuje fluorofory nebo je ke vzorku přidána vhodná fluorescenční sonda (například Nilská červeň) [41].

### 2.6.4 Průtoková cytometrie

Průtokový cytometr je systém, který využívá principy mikroskopie a citlivé detekce světelného signálu. Analýza buněk probíhá v měrné cele, kam se buňky dostaly pomocí proudu nosné kapaliny. Pro to, aby mohla fluorescenční sonda rozlišit signál neobarvených buněk od těch, které obarveny jsou, je potřeba nastavit vhodné napětí fotonásobiče cytometru. Napětí fotonásobiče umožňuje ovlivnit intenzitu signálu. I u této techniky se využívá fluorescenčních barviv, která mohou procházet přes membránu do buněk, kde se navazují na lipidové struktury [42].

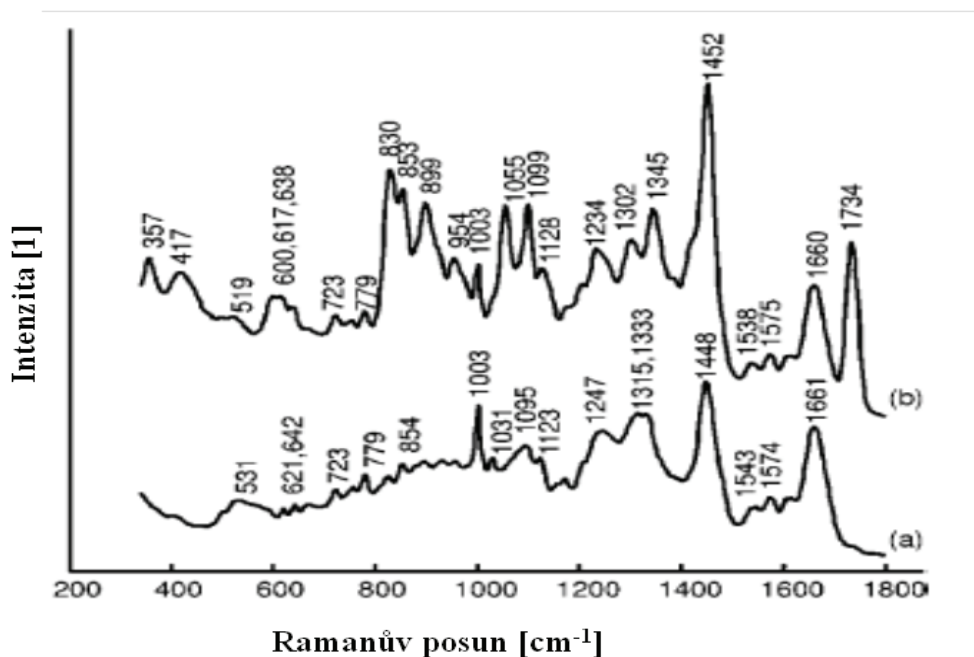
Průtokovou cytometrii využili pro monitorování produkce PHB bakteriemi například Maslow a kolektiv, Vidal-Mas a kolektiv nebo Kacmar a kolektiv. Všichni pro barvení bakteriálních buněk použili Nilskou červeň. Uvádějí, že buňky obsahující PHB vykazují při měření průtokovým cytometrem vyšší fluorescenci než buňky, které PHB neobsahují [43, 44, 45].

### 2.6.5 Ramanova spektroskopie

Tato technika se využívá pro zjištění struktury a fyzikálních vlastností látek a zabývá se vibračními a rotačními spektry. Sleduje se při ní sekundární rozptýlené záření, které vzniká při dopadu primárního záření (UV, VIS) na molekulu. Velká část dopadajícího záření je odražena tzv. elastickým Rayleighovým rozptylem s nezměněnou vlnovou délkou a u malé části záření se v důsledku neelastické interakce s molekulou posunou frekvence k nižším nebo vyšším hodnotám. Hodnoty posunů od posunů od frekvence primárního záření jsou charakteristické pro strukturu molekul. U identifikace PHA jde především o důkaz vodíkové vazby ve struktuře (skupina C-H...O). Tato metoda umožňuje analyzovat živé buňky [46, 47].

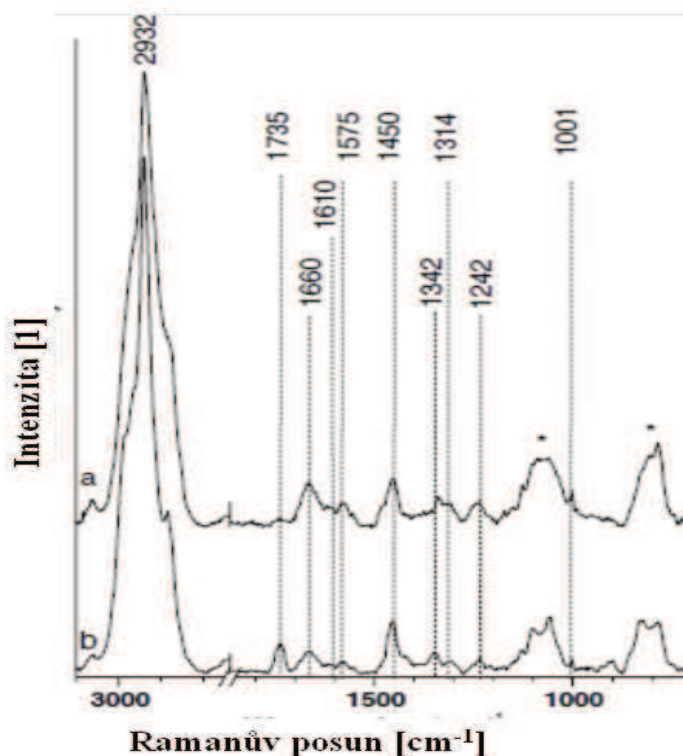
De Gelder a kolektiv zkoumali potenciální využití Ramanovy spektroskopie pro monitorování produkce PHB u bakterií. Pro experiment využili kmen *Cupriavidus necator* H16 a jeho mutantní formu *C. necator* PHB<sup>-</sup>4. Zjistili, že koncentrace PHB přímo koreluje s pásy na Ramanově spektru v oblasti 1734 cm<sup>-1</sup> a Ramanovu spektroskopii označili jakou rychlou a vhodnou metodu pro monitorování PHB v bakteriích. Uvádí, že spektrum pro PHB mutantní formu bakterie vykazuje nižší intenzity pásů v oblasti 1452 a 1734 cm<sup>-1</sup>, a že nejvýznamnější příspěvky bakteriálního PHB jsou v oblastech 357, 423, 607, 830, 1055, 1101, 1351, 1453 a 1734 cm<sup>-1</sup>. Vibrace v oblasti 1734 cm<sup>-1</sup> jsou přítomny pouze u kmene produkujícího PHB [48].





Obrázek 13: Ramanovo spektrum pro *C. necator* H16 (a) a *C. necator* PHB<sup>-</sup> 4 (b) [48]

Ciobota a kolektiv uvádí, že typické bakteriální Ramanovo spektrum má: dva pásy v oblasti 1660 a 1242  $\text{cm}^{-1}$  charakteristické pro vibrace amidových skupin, pásy aminokyselin, viditelné v oblasti 1001  $\text{cm}^{-1}$ . Ostré pásy u 1610  $\text{cm}^{-1}$  charakteristické pro phenylalanin a tyrosin. Pás v oblasti 1575  $\text{cm}^{-1}$  je specifický pro nukleové kyseliny, speciálně pro adenin a guanin, zatímco pásy u cca 1314  $\text{cm}^{-1}$  jsou typické pro vibrace skupin  $\text{CH}_3/\text{CH}_2$ . Nejvýraznějším prvkem Ramanova spektra bakterií je široký pás se středem v 2932  $\text{cm}^{-1}$ , což je vazba CH ve skupinách  $\text{CH}_3$  a  $\text{CH}_2$  v bílkovinách, lipidech, nukleových kyselinách a sacharidech. Signál v oblasti 1735  $\text{cm}^{-1}$  je přiřazen vibracím karbonylové vazby C=O. Taktéž uvádí, že PHA jsou látky pravděpodobně zodpovědné za přítomnost pásu 1735  $\text{cm}^{-1}$  [49].



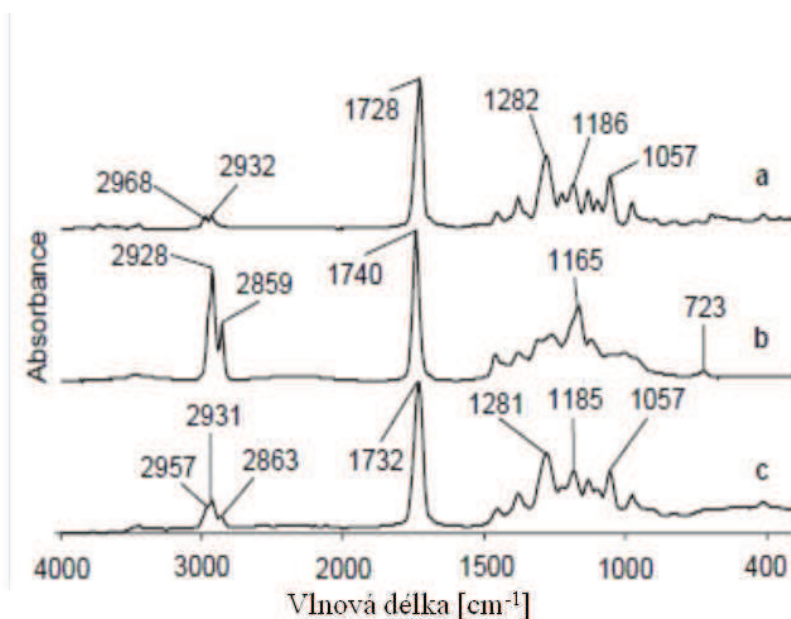
Obrázek 14: Ramanovo spektrum pro buňky bakterie *Bacillus megaterium* s obsahem PHB (b) a bez PHB (a) [49]

## 2.6.6 Infračervená spektroskopie

Konvenční infračervená spektroskopie se zabývá především oblastí v rozsahu asi  $3600 - 200 \text{ cm}^{-1}$ . Energie v této oblasti spektra odpovídají přechodům mezi vibračními nebo rotačně vibračními stavy, při kterých se mění symetrie nebo dipólový moment molekuly, případně obojí. Při přechodu dochází k pohlcení záření. Spektra jsou vysoce charakteristická pro daný typ molekuly. Porovnáním spekter je možné rozlišit i složití biopolymery. Přítomnost PHA v buňce je většinou charakterizována silnými karbonylovými pásy ( $\text{C}=\text{O}$ ) v okolí  $1740 \text{ cm}^{-1}$  s doprovodnými pásy různých druhů PHA, které poukazují na hromadění PHA v buňkách. Při analýze PHA je problémem voda v prostředí. Voda má totiž široký pás v oblasti spektra PHA. Vzorky je tedy nutné nejdříve vysušit [46, 50]. FTIR je metoda vhodná pro studium mikroorganismů a jejich buněčných částí v neporušené podobě.

PHA vykazuje silné pásy v oblasti  $1730 \text{ cm}^{-1}$  v důsledku vibrací vazby  $\text{C}=\text{O}$  a dále také v oblasti  $1280 \text{ cm}^{-1}$  a  $1165 \text{ cm}^{-1}$ , které se připisují skupině  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ .

Qiong a kolektiv se zabývali studiem mikrobiálních polyhydroxyalkanoátů pomocí FTIR. Uvádějí, že vibrace způsobující pásy v oblastech  $1700 - 1760 \text{ cm}^{-1}$  a v oblastech  $2910 - 3010 \text{ cm}^{-1}$  jsou připsány skupinám  $\text{C}=\text{O}$  a  $\text{C}-\text{H}$  [51]. Hong a kolektiv využili FTIR pro rychlou kvalitativní analýzu PHA v neporušených buňkách bakterií a uvádí, že FTIR spektra PHA vykazují silné vibrace ve stejné oblasti jako v předchozím případě [52].



Obrázek 15: Spektrum PHA získaného z různých buněk, a - PHB z *Azotobacter vinelandii*, b- (mcl)-PHA z *Pseudomonas mendocina* a c - PHA obsahující PHB a mcl hydroxyacetát (HA) z *Pseudomonas pseudoalkaligenes*[52]

### 2.6.7 Analýza nukleových kyselin a polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR je reakce, která využívá principu replikace nukleových kyselin pro rychlé a snadné namnožení specifického úseku DNA *in vitro* na základě přítomnosti alespoň jedné kopie. Amplifikovaný úsek DNA je ohraničen dvojicí oligonukleotidů, tzv. primerů, které tvoří začátek pro nové molekuly DNA. Primery jsou komplementární s hledanou cílovou sekvencí na obou vláknech DNA. Nové molekuly DNA se syntetizují podle původních denaturovaných řetězců a mají s nimi shodnou sekvenci. Při amplifikaci jedné molekuly vznikají vždy dvě další, počet molekul s každým cyklem exponenciálně narůstá [39, 53].

PCR je velice senzitivní metoda, která umožňuje detekovat i přítomnost jediné molekuly DNA ve vzorku. Ovšem tato vysoká citlivost je nevýhodná v tom, že je celý proces náchylný ke kontaminaci [39, 53].

Hlavním materiálem pro průběh PCR jsou vhodně zvolené primery, DNA polymeráza, deoxynukleotidtrifosfáty (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) – základní stavební kameny reakce, a vhodné reakční prostředí – tedy pufr obsahující  $Mg^{2+}$  ionty. Tyto ionty jsou důležité, protože tvoří s dTP komplexy a teprve ty jsou vhodné pro syntézu a napomáhají správné funkci DNA polymerázy [39, 53].

Prvním krokem při analýze nukleových kyselin je jejich izolace z biologického materiálu. Při izolaci musí nejdříve proběhnout lyze buňky, kdy dojde k rozrušení buněčných membrán, denaturaci bílkovin a uvolnění buněčného obsahu do prostředí. Pro izolaci se využívají různé lyzační roztoky obsahující detergenty, chelatační činidla a enzymy. Takto získaná DNA se sráží ethanolem a po dostatečném promytí se rozpustí ve vhodném pufru. Dále se může



využívat izolace pomocí adsorpčních kolonek, kdy se nukleové kyseliny sorbují na povrch z oxidu křemičitého v přítomnosti chaotropní soli (např. jodid sodný). Síla vazby přitom závidí na typu nukleové kyseliny, pH prostředí a jeho iontové síle. Pro izolaci je také možno využít fenol-chloroformovou extrakci, izolaci pomocí magnetických částic nebo vysolovací metodu [39, 53].

K amplifikaci DNA dochází pomocí pravidelných a přesně regulovaných změn teploty, které se mění v jednotlivých částech cyklu. Tyto změny teploty jsou zajištěny pomocí tzv. termocycleru, do kterého se vkládají zkumavky se vzorky v malém objemu (0,2 nebo 0,5 ml) [39, 53].

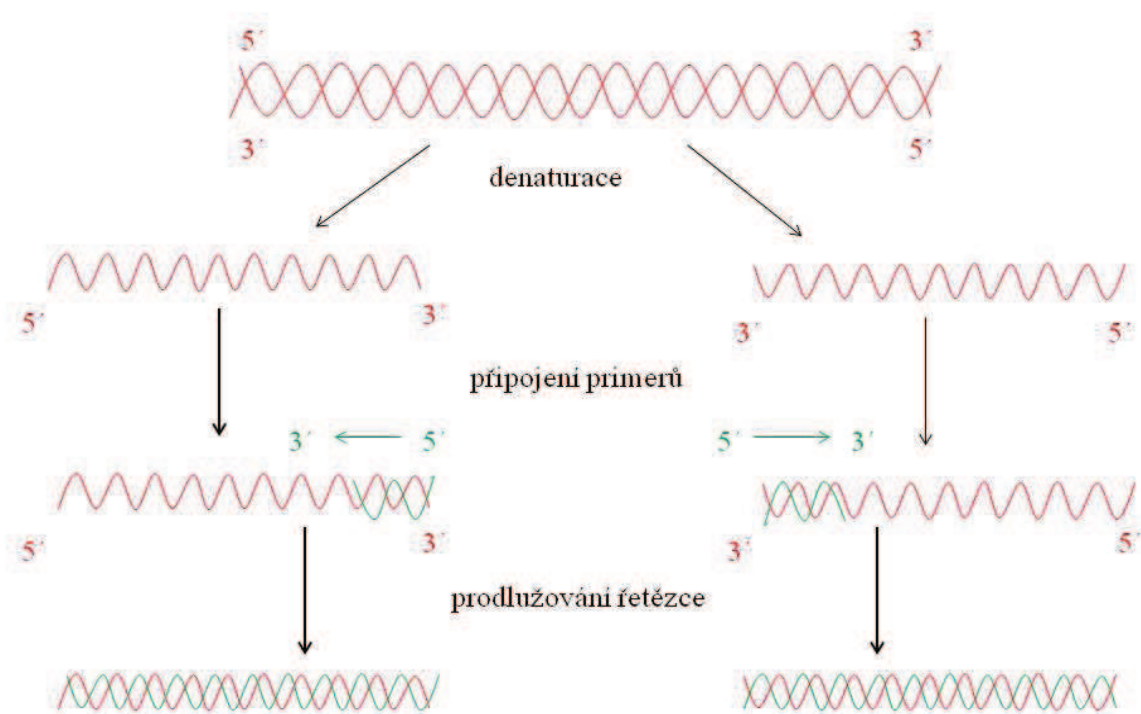
**Jeden cyklus amplifikace je zajištěn třemi základními reakcemi:**

**1. Denaturace dvouřetězcové DNA**, která slouží jako matrice pro nově vznikající komplementární řetězce. Tento krok většinou probíhá při teplotě od 94 do 98 °C po dobu 1 – 10 minut a dochází k rozpletení dvoušroubovice původní DNA.

**2. Navázání primerů na jednořetězcové molekuly DNA** (rozpletená matrice). Primery jsou oligonukleotidy velikosti obsahující 18-28 nukleotidů a každý z dvojice primerů je komplementární ke koncové sekvenci na protilehlých řetězcích amplifikované DNA. Teplota připojení primerů je specifická pro každou sekvenci oligonukleotidů a stanovuje se na základě zastoupení G/C a A/T párů. Vhodná teplota připojení primerů (tzv. annealingová teplota) je v rozmezí 55-65 °C a doba potřebná pro nasednutí primerů se pohybuje od 15 do 60 s.

**3. Prodlužování řetězců DNA neboli elongace.** Teplota elongace je závislá na použité DNA polymeráze a pohybuje se okolo 72 °C a doba elongace je mezi 20-60 s. Většinou se využívají termostabilní polymerázy izolované z termofilních mikroorganismů (např. bakteriální *Taq* polymeráza z *Thermus aquaticus*). Doba prodlužování je závislá na použité polymeráze a také na délce prodlužovaného řetězce, přičemž prodlužování probíhá ve směru 5' → 3' od navázání primerů [39, 53].

Dostatečné množství produktu je ve směsi přítomno po 30-35 cyklech. Výsledek PCR se detekuje nejčastěji pomocí agarózové gelové elektroforézy nebo elektroforézou v polyakrylamidovém gelu [39, 53].



Obrázek 16: Schéma PCR

Jak již bylo uvedeno výše (viz. 2.3.3 PHA syntáza), produkce PHA je podmíněna přítomností enzymu PHA syntáza, která je kódována genem *phaC*. V tomto případě jde tedy u PCR o namnožení úseku DNA, který je zodpovědný za tvorbu PHA syntázy [14, 54].

Wang a kolektiv využili pro detekci genů kódujících PHA syntázu kolonovou PCR. Primery měli navrženy podle sekvence *phaC* genu u bakterie *C. necator* H16 (dříve *Ralstonia eutropha*) a uvádějí, že výsledky experimentu s těmito primery prokazují amplifikaci fragmentu DNA genů kódujících PHA syntázu [55]. Metodu PCR pro detekci *phaC* genu využili i Solaiman a kolektiv u bakterií rodu *Pseudomonas* pro potvrzení genů pro produkci mcl-PHA [56].

Polymerázovou řetězovou reakci pro amplifikaci fragmentu genu kódujícího tvorbu PHA syntázy třídy I (*phaC*) a také třídy II (*phaC1* a *phaC2*) pro detekci PHA produkujících bakterií využili i Revelo Romo a kolektiv přičemž byly touto metodou schopni zjistit, zda bakterie PHA produkuje a také o jaký typ polymerázy se jedná [57].

Ciesielski a kolektiv použili PCR k detekci genů pro PHA syntázu, přičemž tyto geny analyzovali u bakterií rodu *Pseudomonas* a *Janthinobacterium*, které izolovali ze sladkovodních nádrží v podhůří ledovce na Antarktidě a zjistili, že všechny bakterie rodu *Pseudomonas* měly potenciál produkovat mcl-PHA a bakterie rodu *Janthinobacterium* měly přítomny geny pro produkci scl-PHA i mcl-PHA, tedy byl analyzován gen pro tvorbu PHA syntázy třídy I a II [58].

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Použité chemikálie, přístroje a bakterie

##### 3.1.1 Chemikálie pro kultivaci

- Nutrient Broth (HIMEDIA, IND)
- Peptone (HIMEDIA, IND)
- Beef extrakt (HIMEDIA, IND)
- Agar powder (HIMEDIA, IND)
- chlorid sodný p.a., NaCl (Lach-ner, ČR)
- síran amonný p.a.,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Lach-ner, ČR)
- hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát p.a.,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (Lach-ner, ČR)
- dihydrogenfosforečnan draselný p.a.,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Lach-ner, ČR)
- síran hořečnatý heptahydrát p.a.,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Lach-ner, ČR)
- chlorid železitý,  $\text{FeCl}_3$  (Lach-ner, ČR)
- chlorid vápenatý,  $\text{CaCl}_2$  (Lach-ner, ČR)
- síran měďnatý,  $\text{CuSO}_4$  (Lach-ner, ČR)
- chlorid kobaltnatý,  $\text{CoCl}_2$  (Lach-ner, ČR)
- chlorid nikelnatý,  $\text{NiCl}_2$  (Lach-ner, ČR)
- chlorid měďnatý  $\text{CuCl}_2$  (Lach-ner, ČR)
- chlorid vápenatý dihydrát,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Lachema, ČR)
- citrát železito-amonný, (Fluka, ČR)
- D – fruktóza p.a.,  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  (Lach-ner, ČR)
- D – glukóza p.a.,  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  (Lach-ner, ČR)
- kyselina chlorovodíková 35% p.a., HCl (Lach-ner, ČR)

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

- souprava NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, SRN)
- DNAzol Direct (Molecular Research Center, USA)
- master mix One *Taq* Hot Start (2x koncentrovaný) se standartním puforem; složení: 20 mM Tris-HCl (pH 8,9), 1,8 mM  $\text{MgCl}_2$ , 22 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}_2$ , 22 mM KCl, 0,2 mM dNTPs, 5% glycerol, 0,06% IGEPAL CA-630, 0,05% Tween 20, 25 jednotek/ml One *Taq* Hot Start DNA polymeráza (New England BioLabs, UK)
- 25 mM  $\text{MgCl}_2$  (Thermo Scientific, USA)
- primery (Generi-Biotech, ČR)
- Tris (hydroxymethyl) aminomethan (Lach-ner, ČR)
- kyselina boritá (Lachema, ČR)
- ethylendiamintetraacetát sodný (Lach-ner, ČR)
- bromfenolová modř (Serva, SRN)
- glycerol (Lachema, ČR)
- agaróza (Serva, SRN)
- Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe, SRN)

- DNA standard (New England Biolabs, UK) obsahující fragmenty o velikosti 1 517, 1 200, 1 000, 900, 800, 700, 600, 500/517, 400, 300, 200, 100 bp
- DNA standard (New England Biolabs, UK) obsahující fragmenty o velikosti 3 000, 1 500, 1 000, 900, 800, 700, 600, 500/517, 400, 300, 200, 100 bp

### 3.1.3 Použité primery

V experimentální části se pracovalo se třemi páry primerů:

Tabulka 1: Využité primery

|                     | Velikost<br>[bp] | Primer | Sekvence bazí                      | Teoretická<br>teplota tání<br>[°C] |
|---------------------|------------------|--------|------------------------------------|------------------------------------|
| <b>16S rRNA</b>     | 1500             | 16S-F  | AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG        | 54,6                               |
|                     |                  | 16S-R  | GGT TAC CTT GTT ACG ACT T          | 49,4                               |
| <b><i>phaC</i></b>  | 551              | G-D    | GTG CCG CCS YRS ATC AAC AAG T      | 62,7                               |
|                     |                  | G1R    | GTT CCA GWA CAG SAK RTC GAA        | 54,5                               |
| <b><i>phaC1</i></b> | 1965             | E1-D   | GGA GCG TCG TAG ATG AGT AAC AAG AA | 58                                 |
|                     |                  | E1R    | AGG TTG GCG CCG ATG CCG TTG AA     | 66,2                               |

### 3.1.4 Ostatní chemikálie

- ethanol 99,8% pro UV spektrometrii (Lach-ner, ČR)
- Sudánová čerň B (Sigma Aldrich, SRN)
- Nílská červeň (Sigma Aldrich, SRN)

### 3.1.5 Použité přístroje

- laminární box Aura mini (Bio Air Instruments)
- laminární box Biohazard Airstream (ESCO)
- inkubátor IP 60 (LTE)
- blokový termostat Stuart SBH 200D (Bibby Scientific)
- průtokový cytometr Apogee A50 (Apogee Flow Systems)
- nanofotometr Pearl (Implen)
- laboratorní váha Scout Pro (Ohaus)
- laboratorní váha EW 620 (Kern)
- centrifuga AG 1-14 (Sartorius)
- centrifuga Mikro 120 (Hettich)
- centrifuga Z 100 M (Hermle LaborTechnik)
- gradientový Palm-cycler (Corbett Research)
- zdroj napětí MP 300 V (Major science)
- duální vizualizační systém Ultra Viewer (Ultra Lum)
- transiluminátor TVR 3121 (Spectroline)
- Ramanovský mikroskop (Renishaw)
- spektrometr Nicolet iS 50 FT-IR
- fluorescenční mikroskop, MicroTime 200, PicoQuant GmbH

### 3.1.6 Použité bakterie

V experimentální části se pracovalo s bakteriemi *Cupriavidus necator* H16 CCM 3726, *Burkholderia cepacia* CCM 2656, *Pseudomonas chlororaphis* CCM 1975T a *Escherichia coli* CCM 7395, které byly získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně. Dále s bakteriemi *Cupriavidus necator* PHB<sup>4</sup>, *Burkholderia sacchari* DSM 17165 a *Pseudomonas putida* DSM 6125, které pocházejí z Leibnitz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures Braunschweig, Německo.

## 3.2 Kultivace bakterií

### 3.2.1 Uchovávání bakterií a příprava inokula

Bakterie dodávané v lyofilizovaném stavu byly oživeny dle přiloženého návodu a kultivovány na Petriho miskách obsahujících pevné médium Nutrient Broth v termostatu při teplotě 30 °C. Po kultivaci byly bakterie uchovávány při teplotě 4 °C a pravidelně přeočkovávány na nové Petriho misky v intervalu asi 30 dní.

Inokula pro všechny kultivace byla připravována v Erlenmeyerových baňkách o objemu 100 ml obsahujících 50 ml kultivačního média Nutrient Broth. Inokulum bylo třikrát zaočkováno z agarové plotny pomocí bakteriologické kličky. Kultivace byla prováděna na temperované třepačce při teplotě 30 °C a 170 rpm po dobu 24 hodin. Poté bylo inokulem zaočkováno minerální (produkční) médium. Do produkčního média bylo obvykle přidáváno 5 % z celkového objemu.

### 3.2.2 Kultivační média

Pro uchování všech použitých bakterií bylo použito pevné agarové médium Nutrient Broth o složení:

|              |        |
|--------------|--------|
| Pepton       | 10 g/l |
| Beef extrakt | 10 g/l |
| NaCl         | 8 g/l  |
| Agar         | 20 g/l |

Minerální (produkční) médium pro kultivaci bakterií *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB<sup>4</sup> bylo použito:

|                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>       | 3 g     |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O | 11,1 g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 1,05 g  |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                 | 0,2 g   |
| Fruktóza                                              | 20 g    |
| Roztok stopových prvků <sup>1</sup>                   | 1 ml    |
| Destilovaná voda                                      | 1000 ml |

<sup>1</sup>Roztok stopových prvků

|                   |         |
|-------------------|---------|
| FeCl <sub>3</sub> | 9,7 g   |
| CaCl <sub>2</sub> | 7,8 g   |
| CuSO <sub>4</sub> | 0,156 g |
| CoCl <sub>2</sub> | 0,119 g |
| NiCl <sub>2</sub> | 0,118 g |
| CuCl <sub>2</sub> | 0,062 g |
| 0,1 M HCl         | 1000 ml |

Minerální (produkční) médium pro kultivaci bakterií *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* bylo použito:

|                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 1,5 g   |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O | 3,54 g  |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>       | 1 g     |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                 | 0,2 g   |
| CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O                 | 0,01 g  |
| Citrát železito amonný                                | 0,06 g  |
| Glukóza                                               | 20 g    |
| Roztok stopových prvků <sup>2</sup>                   | 1 ml    |
| Destilovaná voda                                      | 1000 ml |

<sup>2</sup>Roztok stopových prvků

|                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                 | 0,1 g   |
| MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O                 | 0,03 g  |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                        | 0,3 g   |
| CaCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O                 | 0,2 g   |
| CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O                | 0,02 g  |
| NiCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O                | 0,02 g  |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O | 0,03 g  |
| 0,1 M HCl                                             | 1000 ml |

Pokud bylo připravováno pevné (agarové) médium, bylo vždy přidáno 20 g/ l agaru.

### 3.3 Příprava roztoků

#### 3.3.1 0,05% roztok Sudánové černě

5 mg Sudánové černě bylo rozpuštěno v 10 ml 99,8% ethanolu.

#### 3.3.2 0,3% roztok Sudánové černě

30 mg Sudánové černě bylo rozpuštěno v 10 ml 60% ethanolu.

#### 3.3.3 Roztok Nílské červeně

1 mg Nílské červeně byl rozpuštěn v 1 ml dimethylsulfoxidu.

### 3.3.4 Příprava PBS pufru

Pro přípravu PBS pufru bylo použito:

|                                                      |         |
|------------------------------------------------------|---------|
| NaCl                                                 | 8 g     |
| KCl                                                  | 0,2 g   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 0,24 g  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O | 1,44 g  |
| Destilovaná voda                                     | 1000 ml |

### 3.3.5 Příprava TBE pufru pro gelovou elektroforézu

Pro přípravu TBE pufru 10x koncentrovaného bylo použito:

|                                  |         |
|----------------------------------|---------|
| Tris (hydroxymethyl) aminomethan | 108 g   |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>   | 55 g    |
| EDTA                             | 9,3 g   |
| Destilovaná voda                 | 1000 ml |

### 3.3.6 Příprava nanášecího pufru pro agarózovou gelovou elektroforézu

Pro přípravu nanášecího pufru bylo použito:

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Bromfenolová modř | 20 mg |
| Glycerol          | 3 ml  |
| Destilovaná voda  | 7 ml  |

### 3.3.7 Příprava 2% agarózového gelu pro elektroforézu

Ke 2 g agarózy bylo přidáno 100 ml TBE pufru. Směs byla zahřívána v mikrovlnné troubě, dokud nedošlo k varu a úplnému rozpuštění všech pevných částic. Poté bylo do gelu přidáno 5 µl barviva Midori Green a gel byl nalit do elektroforetické vaničky s hřebínky. Po ztuhnutí byly hřebínky vyjmuty a bylo odříznuto potřebné množství gelu. Nespotřebované množství gelu bylo uchováváno zalité 1x koncentrovaným TBE pufrem v lednici.

## 3.4 Použité metody

### 3.4.1 Kultivační techniky

#### 3.4.1.1 Barvení kolonií Nilskou červení

Bylo připraveno 250 ml agarového minerálního média pro bakterie *C. necator*, *B. cepacia* a *B. sacchari*. Po sterilizaci a vychladnutí média (cca 40 – 50 °C) bylo přímo do média přidáno 75 µl barviva Nilská červeně o koncentraci 1 mg/ml. Média byla nalita na Petriho misky a po vychladnutí byla zaočkována příslušnými bakteriemi pomocí křížového roztěru bakteriologickou kličkou a také roztěrem očkovací hokejkou. Poté byly bakterie kultivovány při 30 °C po dobu 48 hodin. Po kultivaci byl pod UV analyzátozem pozorován rozdíl fluorescence.

#### 3.4.1.2 Barvení kolonií Sudánovou černí

Byly připraveny Petriho misky s agarovým minerálním médiem pro *C. necator*, *B. cepacia* a *B. sacchari*. Poté byla média zaočkována příslušnými bakteriemi pomocí křížového roztěru a kultivována při 30 °C po dobu 48 hodin. Po kultivaci bylo na kolonie rozprášeno 800 µl 0,05% ethanolického roztoku barviva Sudánová černě a barvivo bylo ponecháno na koloniích



po dobu 30 minut. Poté byly kolonie promyty 96% ethanolem a byl pozorován rozdíl ve zbarvení.

### **3.4.2 Mikroskopické techniky**

Bakterie pro přípravu vzorků pro mikroskopické techniky byly kultivovány v tekutém minerálním médiu.

#### **3.4.2.1 Barvení buněk Nílskou červení**

Byl odebrán 1 ml bakteriální kultury, který byl zcentrifugován (10 000 rpm/5 min), supernatant byl slit a nahrazen 1 ml PBS pufru. Směs byla poté centrifugována (10 000 rpm/3 min) supernatant byl odlit, byl přidán 1 ml 20% ethanolu a vzorek byl umístěn na 10 minut do lednice. Poté byl vzorek opět centrifugován (10 000 rpm/3 min), byl odlit ethanol a byl opět přidán 1 ml PBS pufru a vzorek byl centrifugován (10 000 rpm/3 min). Poté byl opět odlit supernatant, ke vzorku byl přidán 1 ml PBS pufru a 5 µl barviva Nílská červeně o koncentraci 1 mg/ml. Takto připravený vzorek byl pozorován pomocí fluorescenčního mikroskopu.

#### **3.4.2.2 Barvení buněk Sudánovou černí**

Byl odebrán 1 ml bakteriální kultury. Poté byla směs dvakrát promyta 1 ml PBS pufru a centrifugována (10 000 rpm/3 min). Po promytí byl přidán 1 ml PBS pufru a vzorek byl nakápnut na podložní sklíčko a ponechán vyschnout na vzduchu při laboratorní teplotě. Po vyschnutí byl převrstven 0,3% ethanolickým roztokem Sudánové černě a ponechán 10 minut stát. Po té bylo přebytečné barvivo slito, vzorek byl promyt destilovanou vodou a sledován pod mikroskopem.

### **3.4.3 Spektroskopické techniky**

#### **3.4.3.1 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR)**

Pro infračervenou spektroskopii byly bakterie kultivovány v tekutém minerálním médiu. Bylo odebráno 10 ml kultury. Odebrané vzorky byly centrifugovány (10 000 rpm/3 min), poté byla biomasa promyta destilovanou vodou a opět centrifugována (10 000 rpm/3 min). Vzorky byly poté sušeny při 74,5 °C do kompletního vysušení.

#### **3.4.3.2 Ramanova spektroskopie**

Pro Ramanovu spektroskopii byly vzorky připraveny křížovým roztěrem příslušných bakterií na agarové minerální médium, přičemž bakterie byly kultivovány při 30 °C po dobu 48 hodin, a poté bylo měřeno Ramanovo spektrum na Ramanovském mikroskopu Renishaw přímo na bakteriální kultuře na Petriho misce (bez jakékoliv předúpravy).

### **3.4.3 Průtoková cytometrie**

Vzorky pro průtokovou cytometrii byly připraveny stejným způsobem jako vzorky pro fluorescenční mikroskopii, viz kapitola 3.4.2.1. Připravené vzorky byly měřeny na průtokovém cytometru při 600 PMT, kdy byl nastaven nástřik vzorku na 16,7 µl/min a dávkování vzorku bylo 120 µl. Jako excitační zdroj byl využit laser o vlnové délce 488 nm. Detekce fluorescence Nílské červeně navázané na PHA granule byla uskutečněna v kanále FL2.

### 3.4.4 Molekulárně biologické metody

#### 3.4.4. 1 *Izolace bakteriální DNA*

Pro izolaci DNA byly bakterie očkované křížovým roztěrem bakteriologickou kličkou na agarové médium Nutrient Broth a kultivovány při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin. Vzorky izolované DNA byly uchovávány při -30 °C.

#### **Izolace pomocí komerčního kitu Nucleo Spin Tissue**

Do sterilní Eppendorfovy zkumavky bylo napipetováno 200 µl T1 pufru. Poté bylo přidáno a resuspendováno asi  $10^7$  buněk (asi 3 bakteriologické kličky), dále bylo přidáno 25 µl proteinasy K a 200 µl pufru B3. Vše bylo promícháno a inkubováno při 70 °C po dobu 15 minut. Po inkubaci bylo přidáno 210 µl 96% ethanolu a směs byla opět důkladně promíchána. Následně byly použity speciální nástavce se silikátovou membránou do sběrných Eppendorfových zkumavek. Vzorek byl napipetován na membránu a centrifugován (10 000 rpm/1 min). Sběrná zkumavka byla vylita a znovu použita. Na membránu bylo poté napipetováno 500 µl BW pufru a vzorek byl opět centrifugován (10 000 rpm/1 min). Dále bylo na membránu napipetováno 600 µl B5 pufru a vzorek byl centrifugován stejně jako v předchozích případech. Poté byla sběrná zkumavka vylita a vzorek byl ještě jednou centrifugován. Membrána byla vložena do sterilní Eppendorfovy zkumavky, na membránu se vzorkem bylo přidáno 100 µl BE pufru a vzorek byl opět centrifugován jako v předešlých případech. Pokud nebyl vzorek ihned využit pro PCR, byl uchován pro další použití.

#### **Izolace pomocí DNAzol Direct Reagent**

Suspenze bakteriálních buněk byla připravena tak, že ve 100 µl sterilní vody byla resuspendována jedna bakteriologická klička buněk. Do sterilní Eppendorfovy zkumavky bylo napipetováno 100 µl DNAzolu a bylo přidáno 10 µl připravené suspenze. Vzorek byl inkubován při 90 °C po dobu 15 minut, a pokud nebyl ihned využit pro PCR, byl uchován pro další použití.

#### **Izolace tepelnou lyzí buňky v BE pufru**

Ve 100 µl BE pufru byla resuspendována jedna bakteriologická klička buněk a vzorek byl inkubován při 90 °C po dobu 15 minut. Poté byl vzorek centrifugován (10 000 rpm/15 min) a supernatant byl následně odebrán do sterilní Eppendorfovy zkumavky. Pokud nebyl vzorek ihned využit pro PCR, byl uchován pro další použití.

### 3.4.5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Měření bylo prováděno na spektrofotometru NanoPhotometer™ Implen (lid 5), kdy byl jako blank využit BE pufr (izolace tepelnou lyzí buňky) nebo DNAzol (izolace DNAzolem) v množství 5 µl. Poté byly proměřeny vzorky izolované DNA v množství také 5 µl. Na přístroji byla přímo odečtena hodnota koncentrace DNA v ng/µl a také poměr  $A_{260}/A_{280}$ , jako ukazatel čistoty DNA.

### 3.4.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro PCR byla prováděna amplifikace fragmentu DNA o velikosti 1500 bp pomocí primerů 16S-F a 16S-R. Jedná se o fragment *16S* rRNA, který se vyskytuje u všech bakterií a archaeí a kóduje ribozomální RNA [59]. Byla prováděna také 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 také fragmentu DNA o délce 1965 bp, pomocí primerů E1-D a E1R, pro selektivní amplifikaci PHA syntázy třídy II (syntéza mcl-PHA).

#### 3.4.6.1 Příprava PCR směsi

Všechny komponenty pro PCR byly před použitím krátce centrifugovány. Do zkušavky pro PCR bylo napipetováno 12,5 µl master mixu, 8 µl sterilní vody, po 1 µl příslušných dvojic vhodně naředěných primerů a 2 µl vzorku DNA. Pro negativní kontrolu byla místo DNA matrice přidána sterilní voda o objemu 2 µl.

#### 3.4.6.2 Průběh amplifikace

Připravené vzorky byly krátce centrifugovány a umístěny do termocycleru. Použitý teplotní program se lišil dle dvojic primerů a bude popsán ve výsledkové části.

### Optimalizace annealingové teploty

Pro optimalizaci annealingové teploty (teplota připojení primerů) byla připravena PCR směs pro 13 reakcí dle kapitoly 3.4.6.1, která byla rozpipetována do dvanácti zkušavek pro PCR. Pro optimalizaci byla použita stejná DNA. Připravené vzorky byly krátce centrifugovány a umístěny do jedné řady termocycleru (12 pozic), kde byl nastaven gradient annealingové teploty dle dvojic primerů, jejichž annealingové teploty byly optimalizovány.

### Optimalizace koncentrace $Mg^{2+}$ iontů

Do osmi zkušavek pro PCR bylo napipetováno 12,5 µl master mixu, po 1 µl příslušných dvojic vhodně naředěných primerů a 2 µl vzorku DNA. Poté bylo do zkušavek dopipetováno vypočtené množství roztoku  $MgCl_2$  a sterilní vody, pro získání požadované koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů v reakci. Pro optimalizaci byla použita stejná DNA. Připravené vzorky byly krátce centrifugovány a umístěny do termocycleru, kde byl použit teplotní program s již zoptimalizovanou annealingovou teplotou, který se opět lišil dle použitých dvojic primerů.

### Optimalizace časových úseků PCR

Optimalizace časových úseků byla prováděna pouze u primerů E1-D a E1R. Do jedné zkušavky byla připravena směs pro PCR dle kapitoly 3.4.6.1 (s již zoptimalizovanou koncentrací  $Mg^{2+}$ ). Takto připravený vzorek byl poté krátce centrifugován a byl vložen do termocycleru, kde byl použit teplotní program se zoptimalizovanou annealingovou teplotou a s prodlouženými časy některých kroků reakce (viz kapitola 4.5.6.3).

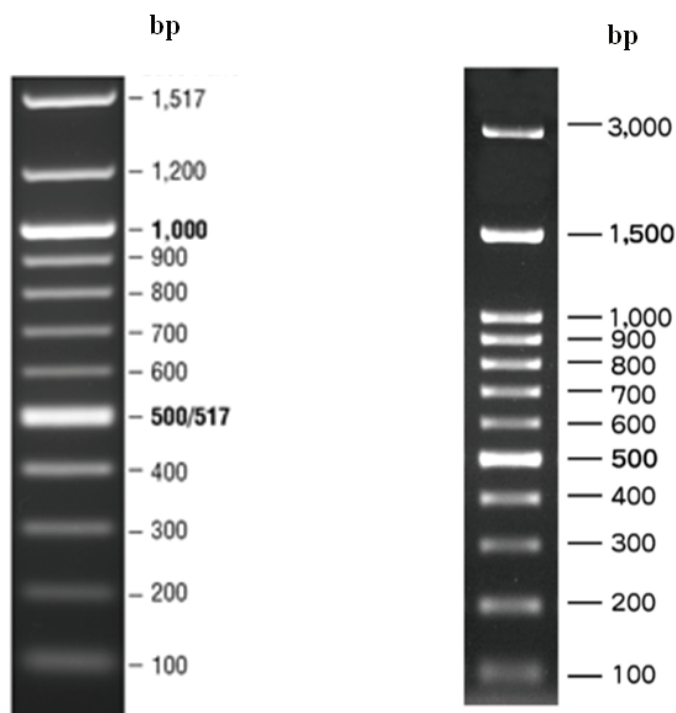
#### 3.4.6.3 Detekce PCR produktů agarózovou gelovou elektroforézou

Byl připraven 2% agarózový gel. K 5 µl nanášecího pufru bylo přidáno 10 µl PCR produktu. Směs byla promíchána a nanášena do jednotlivých komůrek gelu v množství 10 µl, do zvláštní komůrky byl nanášen standard. Vanička s gelem byla vložena do elektroforetické

vany a převrstvena asi 800 ml TBE pufru. Poté byla elektroforéza spuštěna při napětí 90 V. Přibližně po 90 minutách byla elektroforéza zastavena a gel byl pozorován pod UV analyzátozem.

#### 3.4.6.4 Velikostní standardy

Pro stanovení velikosti produktů PCR pomocí agarózové gelové elektroforézy byly využity dva DNA standardy. Standardy obsahovaly následující fragmenty DNA:



Obrázek 17: DNA standardy (100 bp)

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Práce je zaměřena na metody vhodné pro identifikaci bakterií produkujících PHA a jejich případnou kvantifikaci ve smíšeném bakteriálním konsorciu. V rámci práce byly využity kultivační, mikroskopické, spektroskopické a také molekulární metody. Jednotlivé metody byly nejen otestovány a optimalizovány, ale také porovnány, a to dle časové a finanční náročnosti, reprodukovatelnosti, opakovatelnosti i dalších aspektů.

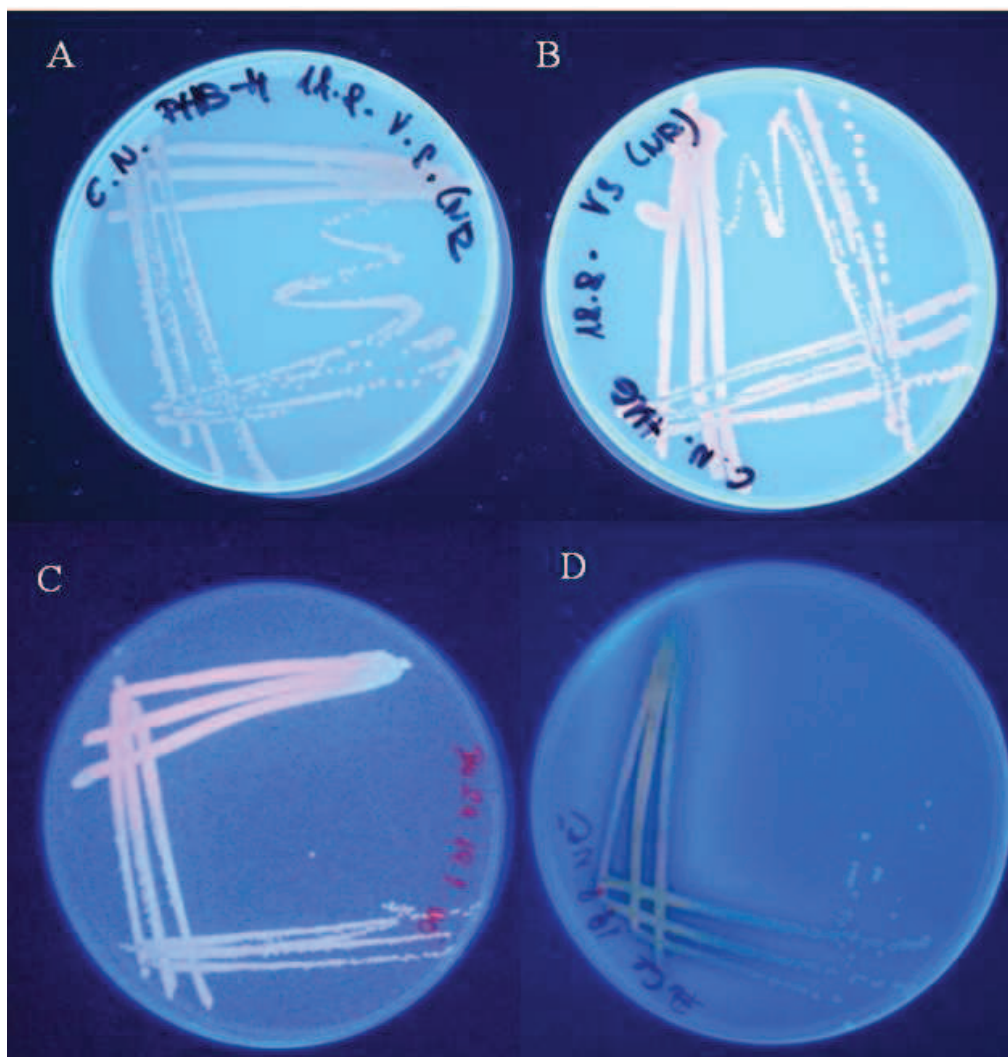
### 4.1 Kultivační techniky

Pro kultivační techniky byly vybrány bakterie *Cupriavidus necator* H16, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari* jako kmeny PHA produkující, a jako kmen PHA neprodukující mutantní bakterie *Cupriavidus necator* PHB<sup>-</sup>4.

#### 4.1.1 Barvení kolonií Nilskou červení

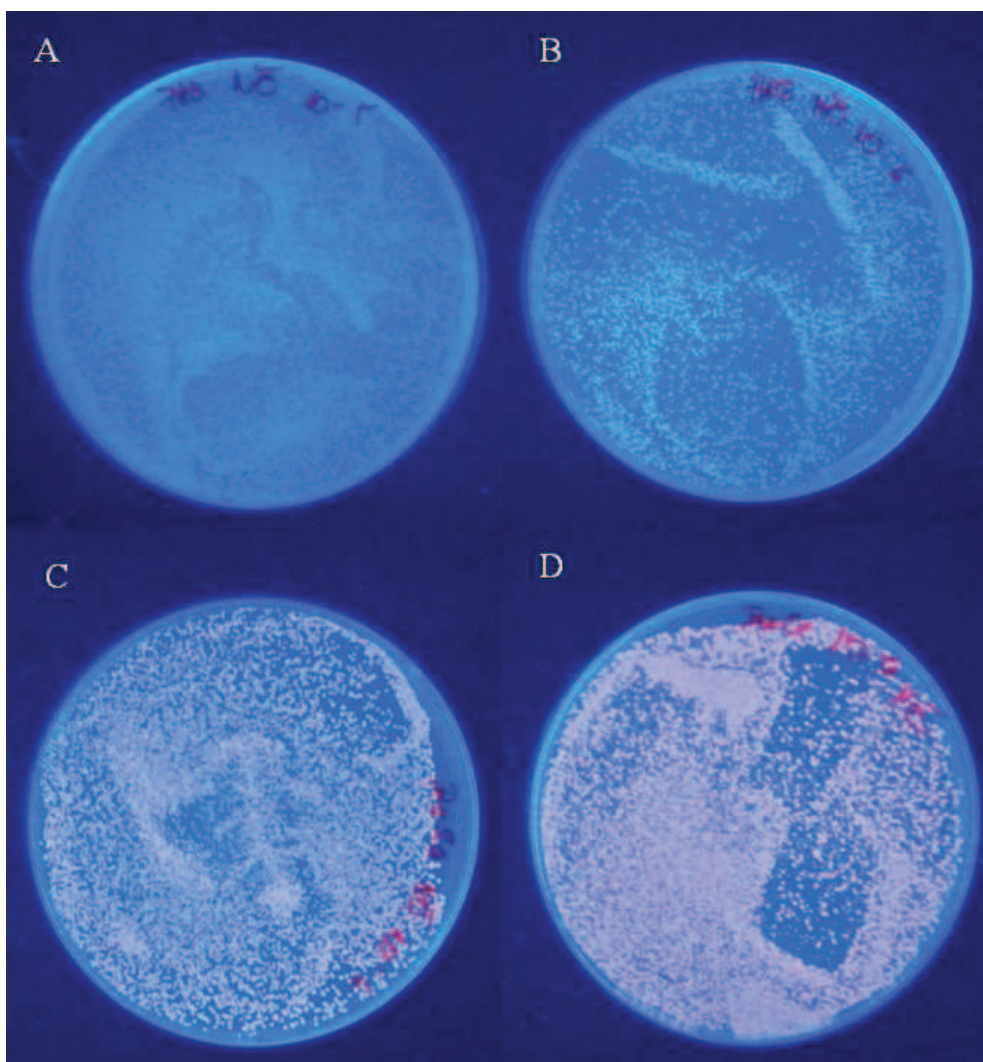
Nilská červen je hydrofobní fluorescenční sonda, která při inkorporaci do hydrofobního prostředí, jako jsou právě PHA granule, ale také například lipidické inkluze, vykazuje intenzivní oranžovou fluorescenci. Voda pak fluorescenci Nilské červeně zhasí. Spiekeeman a kol. vyvinuli metodu spočívající v přidavku Nilské červeně do média před zatuhnutím agaru. Během růstu Nilská červen penetruje do bakteriální buňky a bakteriální buňky obsahující PHA granule vykazují patřičnou fluorescenci [60].

Cílem experimentu bylo otestovat tuto techniku s výše uvedenými kmeny a pozorovat rozdíly ve fluorescenci pod zdrojem UV záření v závislosti na nepřítomnosti resp. přítomnosti PHA.



Obrázek 18: *Cupriavidus necator* PHB<sup>-</sup>4 (A), *Cupriavidus necator* H16 (B), *Burkholderia sacchari* (C) a *Burkholderia cepacia* (D) na minerálním médiu s přidavkem Nílské červeně očkované křížovým roztěrem





Obrázek 19: *Cupriavidus necator* PHB<sup>-</sup>4 (A), *Cupriavidus necator* H16 (B), *Burkholderia sacchari* (C) a *Burkholderia cepacia* (D) na minerálním médiu s přidavkem Nílské červeně očkované roztěrem hokejkou

Na Obrázku 18 a Obrázku 19 jsou demonstrovány výsledky barvení kolonií Nílskou červení. Z obou obrázků je patrné, že vyšší fluorescenci pod UV analyzátozem vykazují kultury, které PHA produkují, a to *Cupriavidus necator* H16, *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari*. U mutantní bakterie *Cupriavidus necator* PHB<sup>-</sup>4 pozorujeme fluorescenci nižší, což je způsobeno nepřítomností PHA granulí. Malá část Nílské červeně se u PHA neprodukcující bakteriální kultury pravděpodobně inkorporovala do membrány, kde byla schopna poskytovat fluorescenci, ale její intenzita byla v porovnání s buňkami obsahujícími PHA výrazně nižší. Rozdíly v intenzitě fluorescence jsou viditelnější při roztěru hokejkou (Obrázek 19). Z tohoto obrázku je také patrné, že nejvyšší fluorescenci vykazují buňky bakterie *Burkholderia cepacia*.

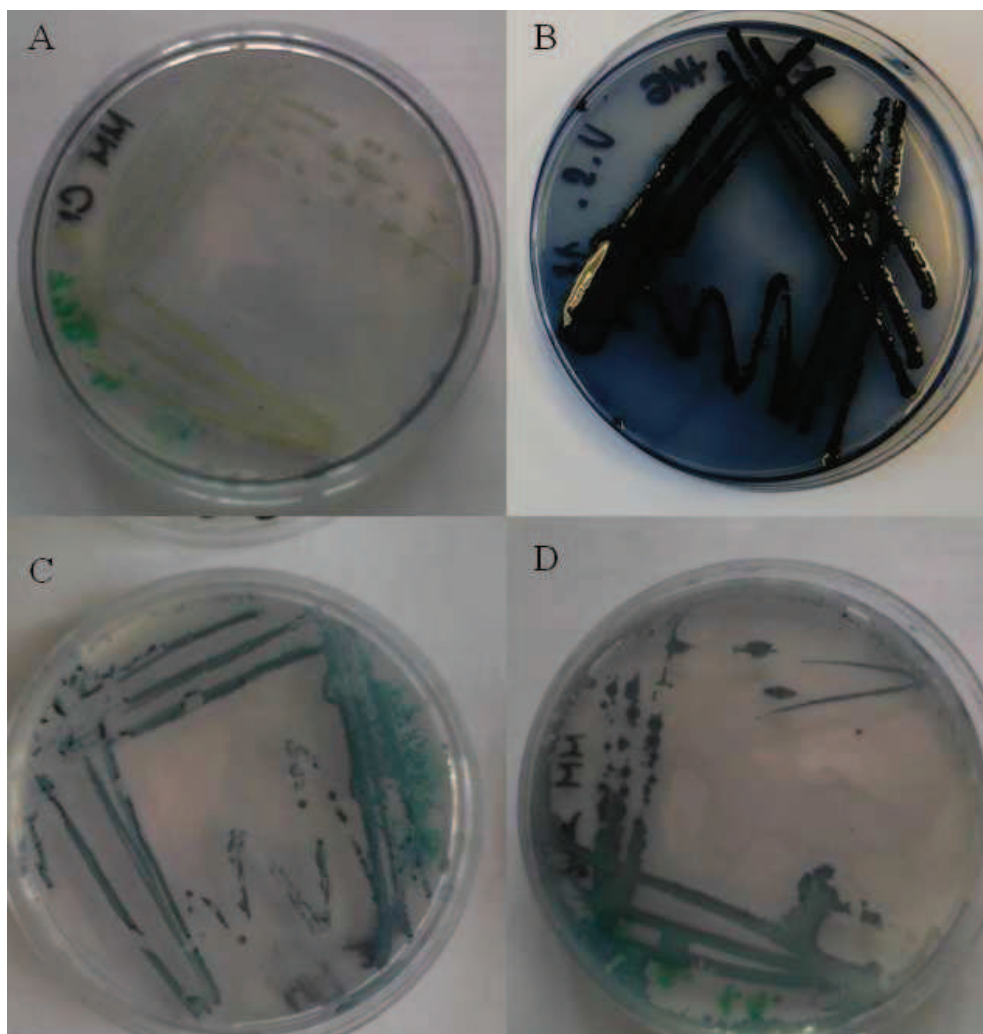
Tuto metodu je tedy principiálně možno využít pro identifikaci případně kvantifikaci PHA akumulujících kmenů ve smíšeném bakteriálním konsorciu. Mezi hlavní výhody metody můžeme zařadit její relativně rychlé a jednoduché provedení a vyhodnocení. Ovšem výsledky



jsou ovlivněny kultivačními podmínkami. Je možné, že kultivační podmínky (zvolené kultivační médium, teplota, uhlíkatý substrát, atd.) neaktivují akumulaci PHA ani u některých bakteriálních kmenů, které disponují schopností biosyntézy PHA (falešné negativní výsledky). Vyhodnocení může být v některých případech nejednoznačné – což jsme mohli pozorovat u křížového roztěru bakterií na *Obrázku 18* a technika může také poskytovat falešné výsledky, jelikož Nílská červeně je barvivo, které se neselektivně váže na všechny lipofilní struktury v buňce, jako jsou například buněčné membrány a membrány organel. Je tedy možné, že PHA akumulující bakteriální izoláty mohou být nesprávně označena. Totéž platí pro bakteriální buňky schopné akumulace lipidů případně bakteriální izoláty vykazující silnou autofluorescenci.

#### **4.1.2 Barvení kolonií Sudánovou černí**

Další testovanou lipofilní barvičkou byla Sudánová černě. I tu je možné využít k barvení bakteriální kultury narostlé na pevném médiu, nicméně na rozdíl od Nílské červeně ji není možné přidat přímo do kultivačního média. Barvení ethanolovým roztokem Sudánové černě a následné odbarvení pomocí ethanolu je podrobně popsáno v kapitole 3.4.1.2 a jeho provedení prakticky ukončí kultivaci, protože ethanol bakteriální kulturu spolehlivě inaktivuje. Naopak u barvení pomocí Nílské červeně popsanému v kapitole 4.1.1 je teoreticky možné pozorovat změnu v obsahu PHA v průběhu kultivace opakovaně.



Obrázek 20: *Cupriavidus necator* PHB<sup>-</sup> (A), *Cupriavidus necator* H16 (B), *Burkholderia sacchari* (C) a *Burkholderia cepacia* (D) na minerálním médiu s následným obarvením ethanolickým roztokem Sudánové černě

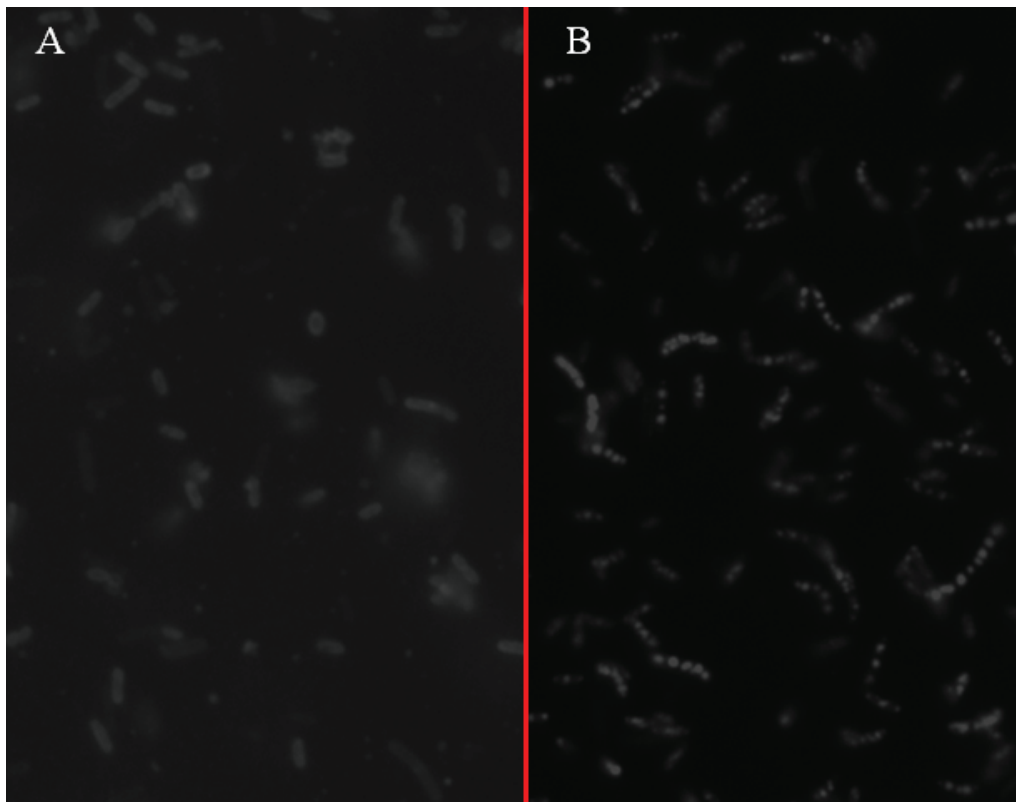
Po obarvení buněk Sudánovou černí můžeme vidět zřetelné rozdíly ve zbarvení jednotlivých bakteriálních kultur. Bakteriální kultura *Cupriavidus necator* PHB<sup>-</sup> není zbarvena vůbec, zatímco ostatní testované bakteriální kultury – *Cupriavidus necator* H16, *Burkholderia sacchari* a *Burkholderia cepacia* jsou zbarveny modře. Můžeme tedy říci, že bakterie produkující PHA získávají působením Sudánové černě modré zbarvení, což je opět způsobeno přítomností lipofilních granulí PHA v buňce. Výhody a nevýhody metody jsou podobné jako v předchozím případě. Za daných kultivačních podmínek tedy hrozí falešně negativní stanovení izolátů v důsledku nedostatečné aktivace biosyntézy PHA u izolátů s PHA akumulacím potenciálem a naopak falešně pozitivní stanovení při analýze bakteriálních izolátů akumulujících významné množství lipidů. Ovšem další nevýhodou této metody je větší časová náročnost oproti barvení Nilskou červení, jelikož se buňky Sudánovou černí barví až po kultivaci.

## 4. 2 Mikroskopické techniky

Pro mikroskopické techniky byly vybrány bakterie *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB<sup>-</sup>4. Bakteriální buňky byly obarveny Nilskou červení a Sudánovou černí podle postupu uvedeného v kapitole 3.4.2.1 a 3.4.2.2.

### 4.2.1 Barvení buněk Nilskou červení

Buňky obarvené Nilskou červení byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem.

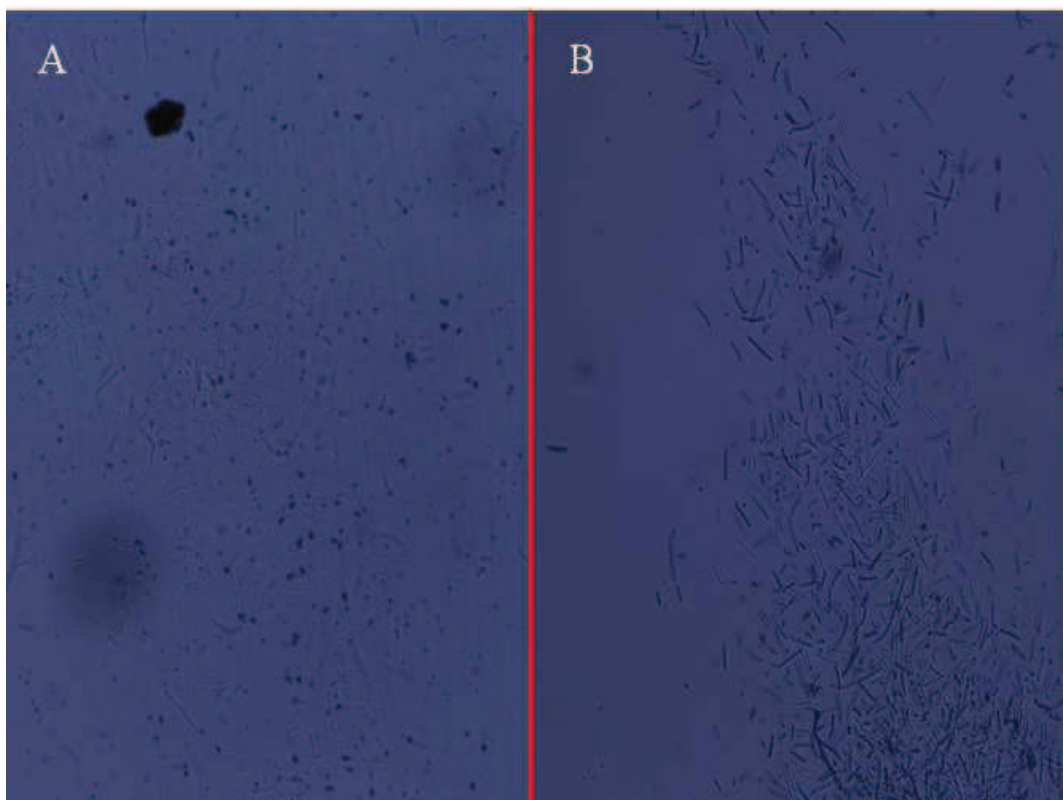


Obrázek 21: *Cupriavidus necator* PHB<sup>-</sup>4 (A) a *Cupriavidus necator* H16 (B) po obarvení Nilskou červení pozorovány fluorescenčním mikroskopem

Obě bakterie mají tyčinkovitý tvar. Zatímco buňky mutantního kmene jsou pod fluorescenčním mikroskopem viditelné jako celek (Nilská červeň slabě fluoreskuje z buněčných obalů), u bakterie *C. necator* H16 jsou v buňkách zřetelné granule PHA a můžeme také pozorovat, že buňky s obsahem PHA jsou protaženy do větší délky. Je tedy patrné, že vyšší fluorescenci vykazovaly buňky *C. necator* H16. Velkou výhodou této techniky je to, že vidíme přímo buňky a můžeme tedy pozorovat obsah PHA, čímž jsou vyloučeny falešné pozitivní výsledky v důsledku silné autofluorescence případně i akumulace lipidů. Mezi nevýhody bychom mohli zařadit větší časovou náročnost, než tomu bylo u kultivačních technik a stejně jako v předchozím případě je výsledek analýzy závislý na vhodnosti kultivačních podmínek pro biosyntézu PHA u testovaných bakteriálních kultur.

### 4.2.2 Barvení buněk Sudánovou černí

Jelikož Sudánová černá není fluorescenční barvivo, byl pro pozorování buněk obarvených tímto barvivem využit světelný mikroskop.



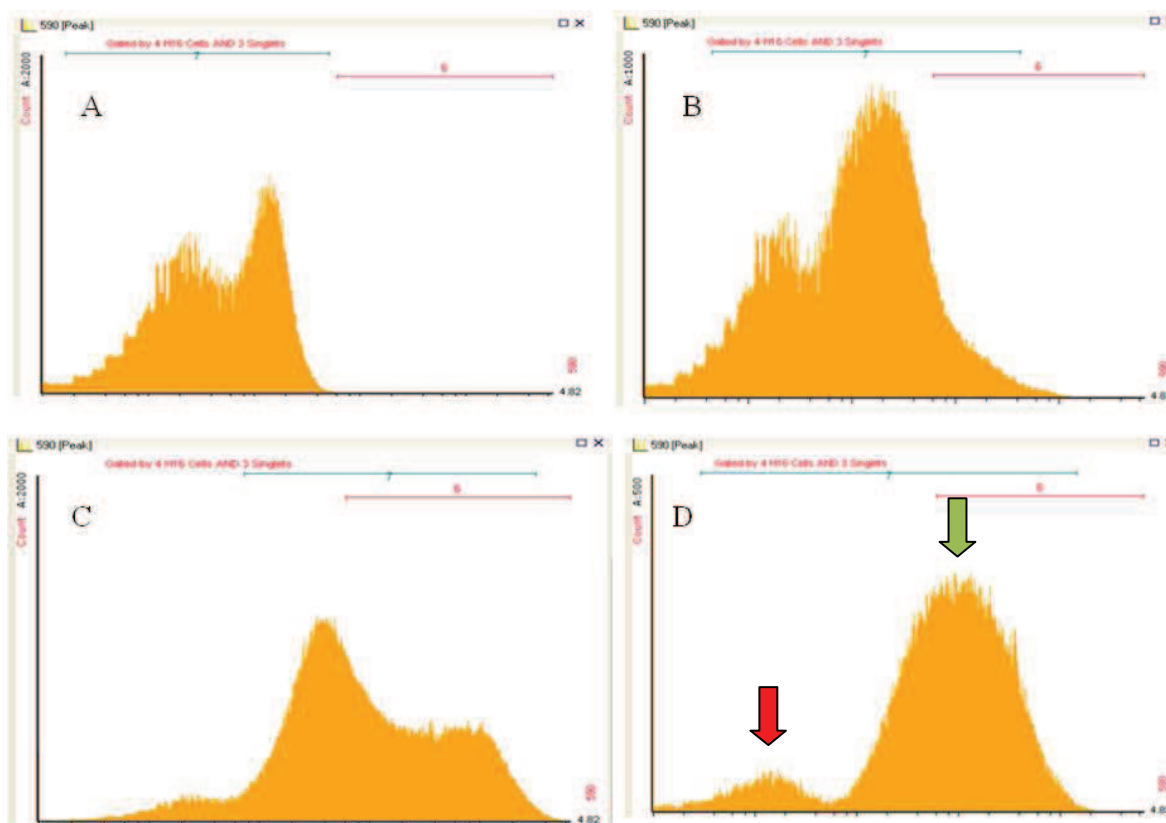
Obrázek 22: *Cupriavidus necator* PHB<sup>-</sup>4 (A) a *Cupriavidus necator* H16 (B) po obarvení Sudánovou černí pozorovány světelným mikroskopem

I zde je zřejmé, že bakterie *C. necator* mají tyčinkovitý tvar. Po porovnání viditelnosti buněk obou kmenů můžeme říci, že buňky bakterie *C. necator* PHB<sup>-</sup>4 jsou poměrně špatně viditelné, naopak buňky obsahující PHA granule jsou pravděpodobně v důsledku vyššího kontrastu daného Sudánovou černí lépe viditelné. Ovšem rozdíly mezi oběma kmeny jsou nepříliš patrné a při nižším obsahu PHA by pravděpodobně bylo PHA produkující kulturu od PHA neakumulující kultury prakticky nemožné odlišit. Metoda je opět časově náročnější než techniky kultivační.

#### 4.3 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie byla v rámci diplomové práce využita pro stanovení intenzity fluorescence bakterií *Cupriavidus necator* PHB<sup>-</sup>4, *Cupriavidus necator* H16, *Burkholderia sacchari* a *Burkholderia cepacia*. Fluorescence byla u buněk vždy měřena s použitím barviva Nilská červeně. Ukazatelem intenzity fluorescence byla střední hodnota fluorescence (Mean), výsledky je také možné znázornit ve formě histogramu, kde na ose X je vynesena intenzita signálu příslušné fluorescence a na ose Y počet událostí (buněk) odpovídající dané intenzitě signálu. Histogram tedy umožňuje provést relativně podrobnou analýzu určitého znaku v testované bakteriální populaci, přičemž jednotlivým subpopulacím odpovídají jednotlivé píky v histogramu. Příkladem může být záznam cytometrické analýzy kultury *B. cepacia* na Obrázku 23 (D). Červená šipka ukazuje subpopulaci buněk vykazující nízkou intenzitu fluorescence, tedy buněk které pravděpodobně neobsahovaly PHA. Zelená šipka pak označuje

majoritní subpopulaci vykazující výrazně vyšší fluorescenci, tedy buňky bohaté na PHA. Průtoková cytometrie je tedy schopná postihnout heterogenitu distribuce PHA i v bakteriálních monokulturách. Pomocí vhodného softwaru je možné snadno provést absolutní i relativní kvantifikaci jednotlivých subpopulací a odečíst tak, kolik buněk je PHA pozitivních a kolik PHA negativních.



Obrázek 23: Histogram při měření fluorescence mutantního, neproduktujícího kmene -- *Cupriavidus necator* PHB-4 (A) a producentů PHA *Cupriavidus necator* H16 (B), *Burkholderia sacchari* (C), *Burkholderia cepacia* (D) při obarvení Nilskou červení

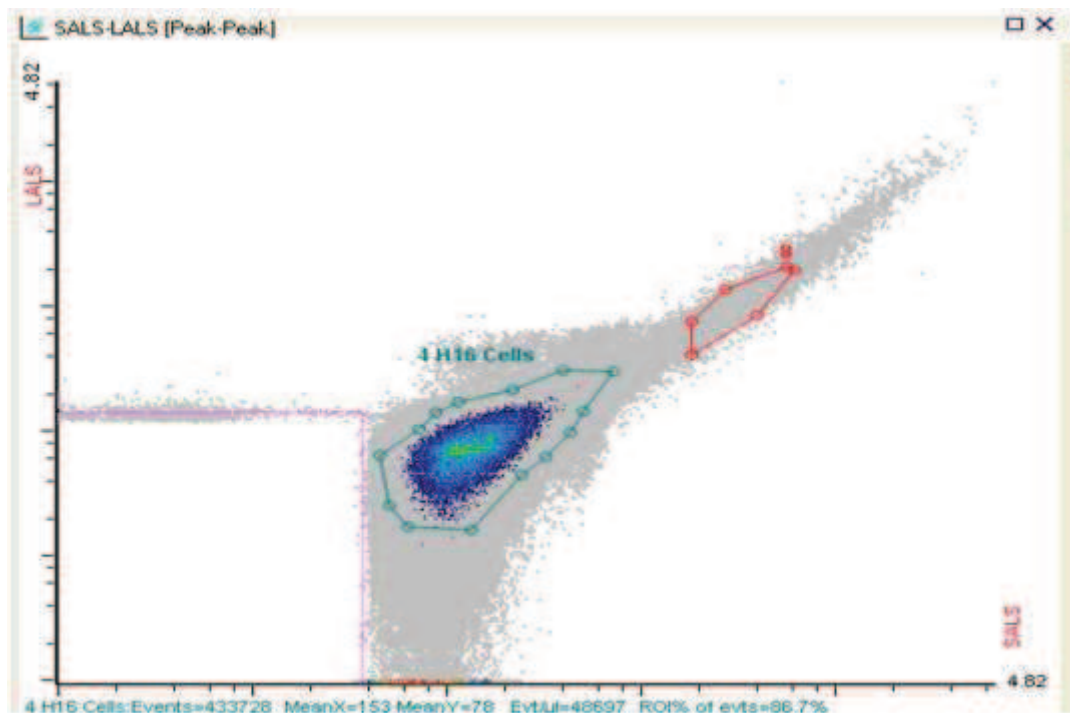
Tabulka 2: Střední hodnoty fluorescence testovaných kmenů při měření průtokovým cytometrem

| Mikroorganismus                  | Střední hodnota fluorescence |
|----------------------------------|------------------------------|
| <i>Cupriavidus necator</i> PHB-4 | 78                           |
| <i>Cupriavidus necator</i> H16   | 1697                         |
| <i>Burkholderia sacchari</i>     | 3186                         |
| <i>Burkholderia cepacia</i>      | 1441                         |

Princip barvení Nilskou červení pro průtokovou cytometrii je stejný jako u barvení kolonií nebo barvení pro fluorescenční mikroskop. Nejvyšší průměrná intenzita fluorescence byla zaznamenána u buněk *Burkholderie sacchari*, naopak nejnižší intenzitu fluorescence vykazovaly buňky bakterie *Cupriavidus necator* PHB-4. Rozdíly mezi intenzitou



fluorescence producentů a mutantního kmene jsou znatelné. Zatímco producenti vykazují intenzitu fluorescence v řádech tisíců, u mutantního kmene je to pouze řád desítek.



Obrázek 24: Označení populace (SALS - Small angle light scattering, LALS - large angle light scattering)

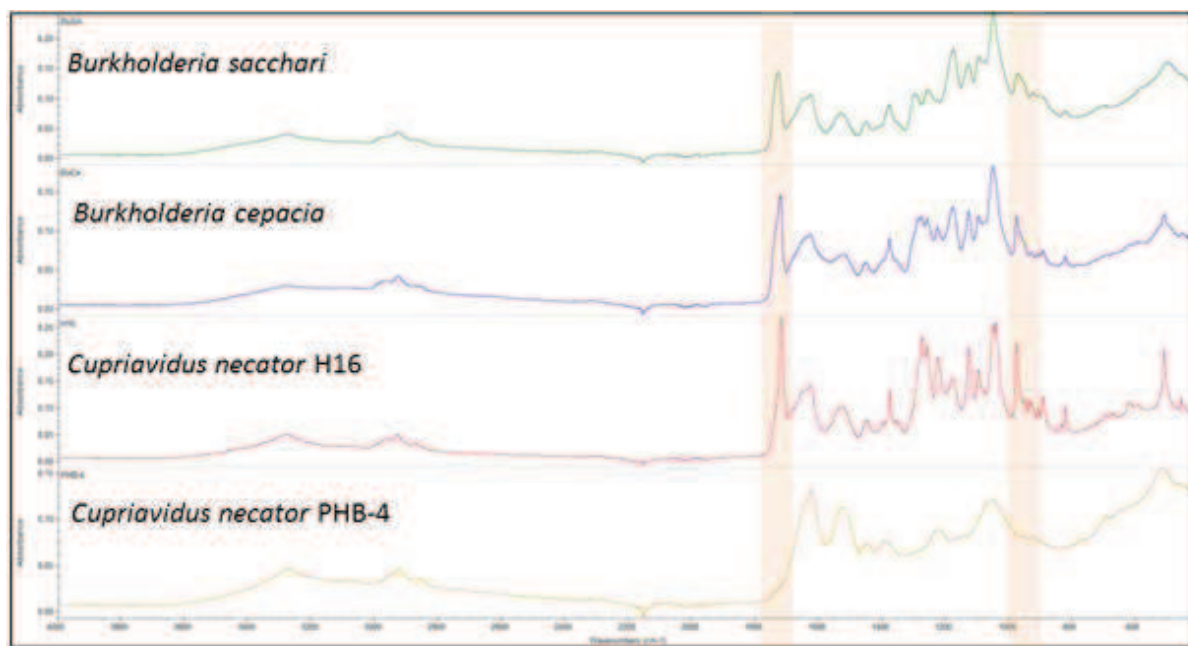
#### 4.4 Spektroskopické techniky

Pro spektroskopické techniky byly využity bakterie *Cupriavidus necator* H16, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari* a *Cupriavidus necator* PHB<sup>+</sup>4.

##### 4.4.1 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

Další potenciálně velice užitečnou skupinou metod jsou spektroskopické techniky. Nejdříve jsme se věnovali infračervené spektroskopii. Ta je schopna detekovat širokou paletu molekul a jednoznačně prokázat jejich přítomnost ve vzorku. Díky této své vlastnosti by mohla pro náš úkol, stanovení přítomnosti PHA v bakteriálních buňkách, být ideální. Výsledky FTIR analýzy pro bakterie *C. necator* H16 a *C. necator* PHB<sup>+</sup>4, *B. cepacia* a *B. sacchari* jsou presentovány na Obrázku 25.





Obrázek 25: IČ spektra vybraných bakteriálních kmenů

Spektra jednotlivých bakteriálních kultur jednoznačně dokazují, že v absorpčním spektru v infračervené oblasti existují píky typické pro PHA (na Obrázku 25 znázorněny oranžovými pásy). Takže FTIR spektroskopii je principiálně možné použít k průkazu PHA v bakteriální biomase. Vzhledem k povaze FTIR je možné dokonce předpokládat, že podrobnou analýzou spektra by bylo možné identifikovat typ polymeru (mcl-PHA a nebo scl-PHA). Na druhou stranu, velkou nevýhodou FTIR je, že analyzované vzorky musí být zbaveny vody. Vysušení biomasy nejen komplikuje identifikaci především svými časovými nároky a také vysokými požadavky na minimální množství biomasy, ale také znemožňuje další kultivační práci s analyzovanými bakteriálními izoláty.

#### 4.4.2 Měření Ramanova spektra Ramanovským mikroskopem

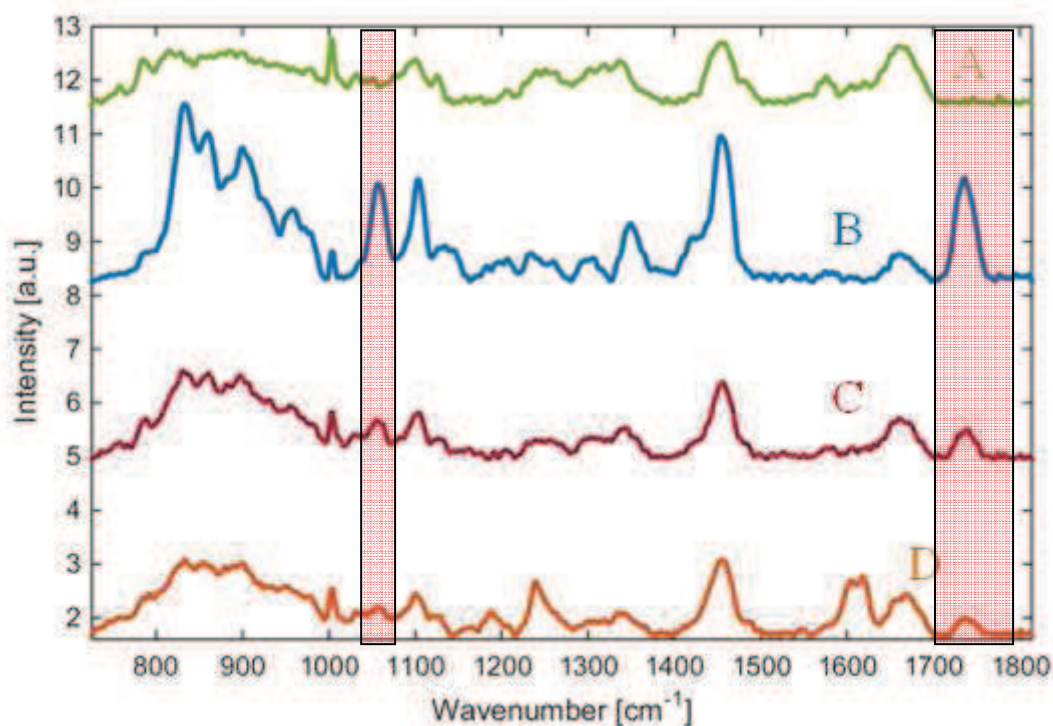
Měření probíhalo na Ramanovském mikroskopu Renishaw na Ústavu přístrojové techniky Akademie věd ČR v Brně, přičemž jako vzorky byly využity bakterie *Cupriavidus necator* PHB4, *Cupriavidus necator* H16, *Burkholderia sacchari* a *Burkholderia cepacia* očkované na minerálním agarovém médiu. Měření bylo prováděno přímo na koloniích na Petriho miskách.

Ramanova mikrospektroskopie má oproti FTIR spektroskopii velkou výhodu při analýze biologických vzorků, protože umožňuje přímou analýzu vysoce hydratovaných vzorků, tedy i viabilních buněk. Zatímco v infračervené spektroskopii vykazuje voda široký absorpční pík, který interferuje a svou intenzitou zastíní většinu analyticky relevantních funkčních skupin, v Ramanově spektroskopii poskytuje voda ve spektru relativně úzký pík, který navíc neinterferuje s dalšími významnými skupinami. Proto bylo v našem případě možné provést analýzu přítomnosti PHA granulí v bakteriálních buňkách přímo na Petriho miskách (viz. Obrázek 26). Tuto techniku je tedy možné použít k analýze zastoupení PHA akumulujících kmenů ve směsné bakteriální kultuře, která byla vyseta na misku, protože postupně mohou být proměřeny jednotlivé kolonie a jednoznačně může být prokázána

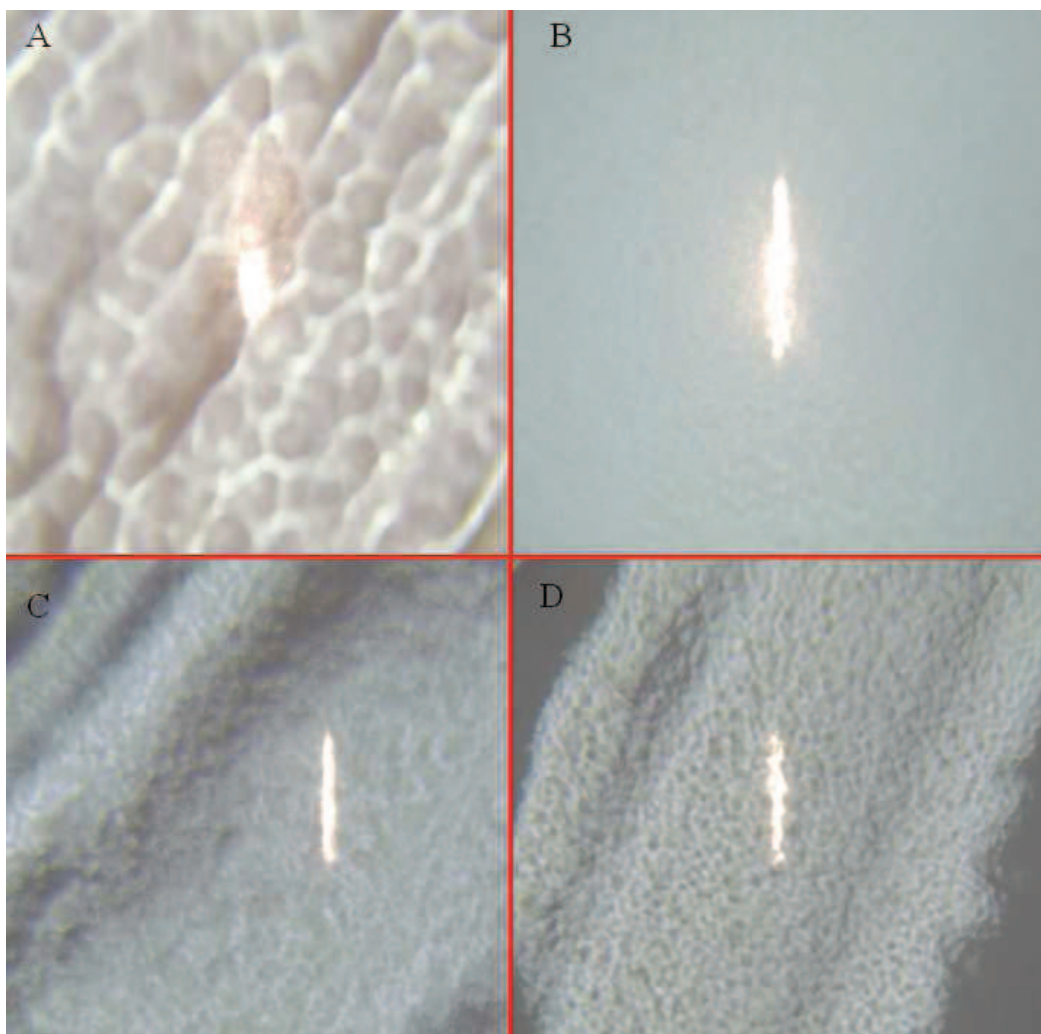
přítomnost nebo absence PHA granulí v buňkách. Nevýhodou této metody je pak to, že je prakticky nemožné během měření udržet sterilní podmínky a s analyzovanými vzorky není z důvodu pravděpodobné kontaminace možné dále kultivačně pracovat.



Obrázek 26: Měření Ramanova spektra Ramanovským mikroskopem u bakterie *Cupriavidus necator* PHB-4, celkový pohled (vlevo) a detail při excitaci laserem (vpravo)



Obrázek 27: Ramanovo spektrum naměřené Ramanovským mikroskopem pro *Cupriavidus necator* PHB-4 (A), *Cupriavidus necator* H16 (B), *Burkholderia sacchari* (C) a *Burkholderia cepacia* (D), barevnými zónami jsou znázorněny pásy jednoznačně příslušející PHA



Obrázek 28: Povrch bakteriálních kolonií *Cupriavidus necator* PHB-4 (A), *Cupriavidus necator* H16 (B), *Burkholderia sacchari* (C) a *Burkholderia cepacia* (D) pozorovaných Ramanovským mikroskopem při excitaci laserem

Jak již bylo uvedeno v kapitole 3.4.3.2, pro kmeny produkující PHA jsou charakteristické pásy v oblasti  $1734\text{ cm}^{-1}$ . Na Obrázku 27 můžeme vidět Ramanovo spektrum pro všechny čtyři testované kmeny. Z tohoto obrázku je patrné, že mutantní bakterie *C. necator* PHB<sup>-4</sup> (A) nevykazuje žádný pás v oblasti  $1734\text{ cm}^{-1}$ , zatímco všechny ostatní bakteriální kultury mají v této oblasti pásy viditelné. Dále můžeme také říci, že nejvyšší obsah PHA mají buňky *C. necator* H16 (B), dále *B. sacchari* a nejméně PHA obsahují buňky *B. cepacia*. Velkou výhodou této metody, při měření Ramanovským mikroskopem, je její nenáročnost. Díky tomu, že analýza probíhá přímo po kultivaci na miskách, jde o velmi rychlou, jednoduchou a průkaznou analýzu. Další významnou výhodou Ramanovy mikrospektroskopie oproti výše popsaným kultivačním a mikroskopickým technikám je jednoznačnost průkazu PHA v bakteriálních buňkách, protože Ramanovský pás odpovídající PHA není možné zaměnit s lipidy ani jinými významnými metabolity. Ramanovská mikrospektroskopie je také schopna jednoznačně detekovat i nízké obsahy PHA v buňkách (viz *B. cepacia* (D) na Obrázku 27) a dokonce je možné předpokládat, že při správné interní kalibraci by bylo možné provést i



přibližnou kvantifikaci obsahu PHA v analyzovaných vzorcích. Nevýhoda této techniky je, stejně jako u všech analytických technik analyzujících PHA na úrovni fenotypu, závislost výsledků analýzy na kultivačních podmínkách a tedy možnost falešně negativního určení PHA akumulčního potenciálu u buněk kultivovaných za nevhodných podmínek.

#### **4. 5 Identifikace schopnosti akumulovat PHA pomocí molekulárně biologických technik**

Cílem této části práce bylo zavést metodu, která bude schopna identifikovat potenciál bakteriálních kmenů akumulovat PHA na úrovni genotypu. Jako metodu jsme využili polymerázovou řetězovou reakci (PCR), která dokáže namnožit specifický úsek DNA. Předkrokem PCR je samotná izolace DNA. Za tímto účelem jsme využili tří různých izolačních přístupů a tyto částečně srovnali. Jedná se o izolaci pomocí komerčně dostupného izolačního kitu Nucleo Spin Tissue a dále o rychlou izolaci založenou na chemické lyzi buňky pomocí reagentu DNAzol Direct a taktéž jsme využili teplotní lyze buňky.

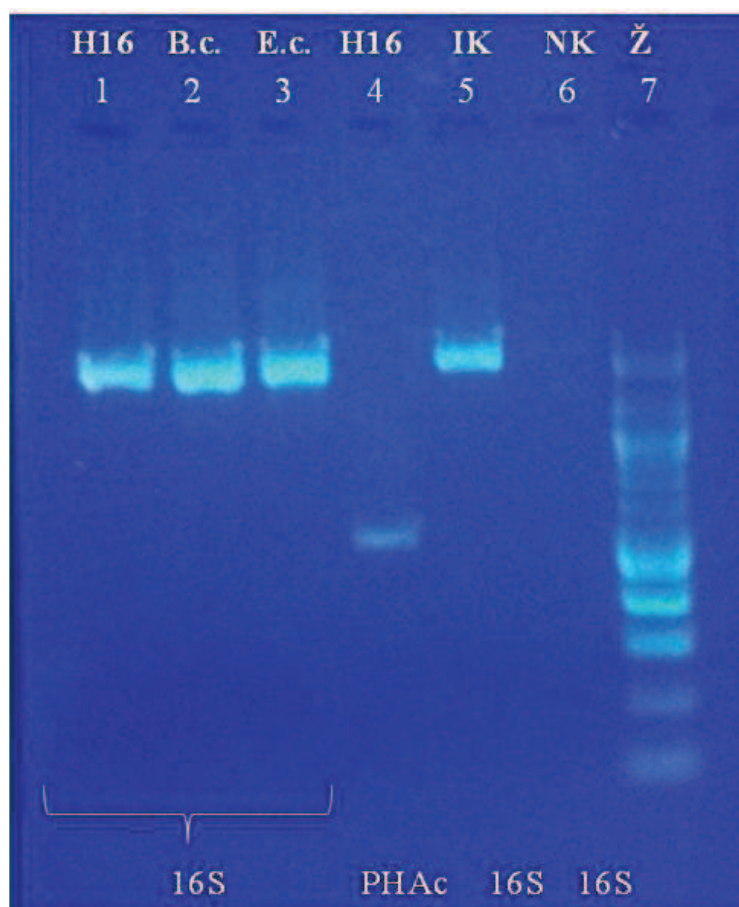
Za účelem amplifikace byly navrženy reakce tak, aby v první reakci byly detekovány jak *16S* rRNA (kontrola izolace), tak současně i *phaC* gen zodpovědný za syntézu PHA. Toto bylo navrženo jako multiplexní PCR (využívající více primerů v jedné reakci). Poslední nezávislá PCR spočívala v amplifikaci genu *phaCI*, umožňujícího určit substrátovou specifitu PHA syntázy, protože ampikon vznikající v této reakci je specifický pro PHA syntázu katalyzující biosyntézu mcl-PHA. Jednotlivé reakce byly optimalizovány a budou specifikovány v textu níže.

##### **4.5.1 Izolace bakteriální DNA kitem Nucleo Spin Tissue**

DNA byla izolována z bakteriálních buněk *Cupriavidus necator* H16, *Burkholderia cepacia* a *Escherichia coli* pomocí komerčního kitu Nucleo Spin Tissue. Přítomnost bakteriální DNA byla prokázána pomocí PCR reakce s primery cílenými do oblasti *16S* rRNA a produkty reakce byly následně detekovány agarózovou gelovou elektroforézou a vizualizovány pomocí interkalačního činidla MidoriGreen, který představuje bezpečnější alternativu k potenciálněmu karcinogennímu ethidium bromidu. Jako DNA standard byl využit žebříček obsahující fragmenty od 1517 do 100 bp. Podmínky PCR byly nastaveny podle protokolu k použité polymeráze a annealingová teplota byla volena podle vypočtených teoretických teplot jednotlivých primerů. U jednoho vzorku byla také provedena orientační PCR s primery pro *phaC* gen, tzn. annealingová teplota zde byla stejná jako u *16S* rRNA. V tomto případě jednalo o zkoušku, zda budou primery cílené na *phaC* gen nasedat při stejné teplotě jako primery pro *16S* rRNA. Koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů byla 1,8 mM. Pro PCR (primery cílené do oblasti *16S* rRNA a *phaC* genu) byl navržen následující teplotní program:

Tabulka 3: Teplotní program pro PCR s primery cílenými do oblasti 16S rRNA a phaC

| Krok | Teplota [°C] | Čas [s] | Počet cyklů |
|------|--------------|---------|-------------|
| 1    | 94           | 30      | 1           |
| 2    | 94           | 30      | 30          |
|      | 54           | 30      |             |
|      | 68           | 90      |             |
| 3    | 68           | 300     | 1           |
|      | 4            | 60      | 1           |



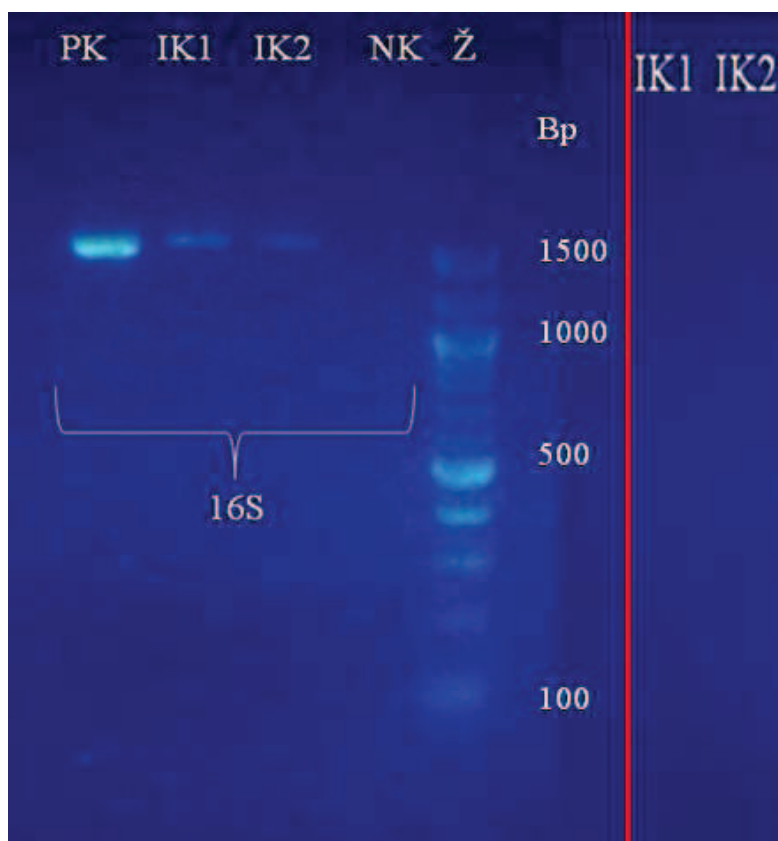
Obrázek 29: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR reakce po izolaci DNA komerčním kitem Nucleo Spin Tissue z bakteriálních buněk *C. necator* H16 (1, 4), *B. cepacia* (2) a *E. coli* (3). Do gelu byla nanášena také izolační kontrola (5), negativní kontrola (6) a DNA standard (7).

Výsledek agarózové gelové elektroforézy, uvedený na Obrázku 29, prokázal přítomnost amplifikovaného fragmentu o velikosti asi 1500 bp (16S rRNA). Amplifikace oblasti 16S rRNA je totiž typická pro všechny bakterie, kdežto *phaC* gen není přítomen u všech bakterií. Běhy 1 – 3 ukazují pozitivní výsledek amplifikace 16S rRNA. V běhu 4 je potom pozitivní výsledek PCR s primery cílenými na *phaC* gen. Zde jde pouze o orientační reakci, touto problematikou se budeme zabývat dále. Negativní kontrola, nanášená v běhu 6, nevykazuje žádné známky přítomnosti bakteriální DNA, čímž byla potvrzena čistota komponent pro PCR a také správná manipulace s nimi. Běh 5 pak představuje izolační

kontrolu, což je kontrola komponent izolačního kitu a čistoty pracovního postupu izolace DNA. Jelikož se izolační kontrola dělala jako první a všechny zkumavky s bakteriálními kmeny se ihned po manipulaci uzavíraly, nepředpokládáme, že by kontaminace, která je dost silná, byla způsobena špatným pracovním postupem. Zde předpokládáme, že komponenty, přiložené filtrační zkumavky apod. byly kontaminované bakteriální DNA již z výroby. Taktéž výrobce nedeklaruje DNA a bacterial DNA free kit. Vzhledem k poměrně vysoké náročnosti a složitosti izolace, a také k přítomnosti kontaminace, nebyla metoda nadále pro izolaci využívána.

#### 4.5.2 Přímá izolace bakteriální DNA pomocí DNAzolu a tepelnou lyzí buňky

Pro izolaci byly využity bakteriální kultury *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* PHB<sup>-</sup>4, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas chlororaphis* a *Escherichia coli*. Po izolaci byla provedena PCR pro kontrolu čistoty izolačních komponent (DNAzolu a pufru). PCR probíhala při teplotním programu popsáném v *Tabulce 3* s koncentrací  $Mg^{2+}$  iontů 1,8 mM. Jako DNA standard byl využit žebříček obsahující fragmenty od 1517 do 100 bp.

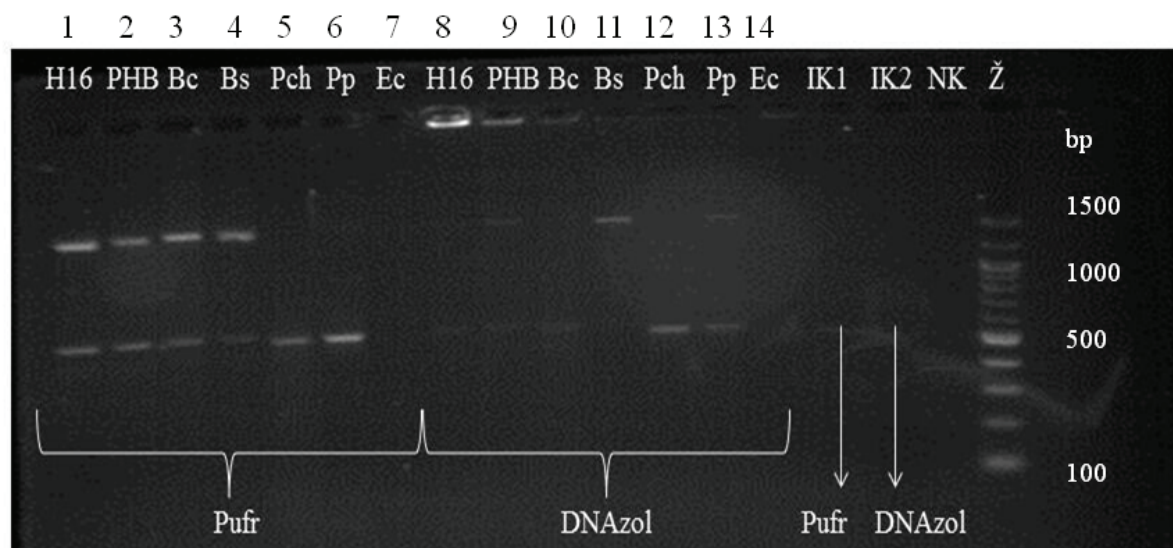


Obrázek 30: Kontrola čistoty izolačních komponent před sterilací (vlevo) a po sterilaci (vpravo), izolace DNAzolem (1), izolace tepelnou lyzí buňky (2)

V levé části *Obrázku 30* jsou výsledky kontroly čistoty izolačních roztoků bez jejich sterilace. V běhu označeném jako IK1 a IK2 jsou jasně viditelné produkty PCR o velikosti asi 1500 bp (16S rRNA charakteristickou pro bakterie). Jako pozitivní kontrola (PK) byla použita DNA izolovaná z bakterie *C. necator* H16 tepelnou lyzí buňky. Jelikož byly i tyto izolační



komponenty kontaminované, byla navržena jejich sterilace. Sterilace byla prováděna při teplotě 121 °C po dobu 25 minut. Výsledky kontroly čistoty pro sterilované izolační roztoky vidíme v pravé části *Obrázku 30*. Zde je již patrné, že obě izolační kontroly jsou bez kontaminace. V obou případech můžeme také sledovat, že negativní kontrola (NK) není kontaminována.



*Obrázek 31: Gelová elektroforéza produktů izolace tepelnou lyzí buňky (1-7) a DNAzolem (8-14), běh 1 a 8 – C. necator H16, běh 2 a 9 – C. necator PHB4, běh 3 a 10 – B. cepacia, běh 4 a 11 – B. sacchari, běh 5 a 12 – P. chlororaphis, běh 6 a 13 – P. putida a běh 7 a 14 – E. coli*

Pro PCR byly využity obě sady primerů (pro 16S rRNA a pro *phaC* gen) v jedné reakci – multiplexní PCR. V běhu 1 – 7 je nanášena DNA izolovaná tepelnou lyzí buňky za použití pufru (tepelná lyze) a v běhu 8 – 14 DNA izolovaná DNAzolem (chemická lyze). Po srovnání obou typů izolace můžeme říci, že PCR produkty izolované tepelnou lyzí buňky za použití pufru vykazují viditelnější výsledky než izolace DNAzolem. V běhu 1 – 4 a 9 a 13 vidíme, že došlo k amplifikaci obou genů. Naopak v běhu 5, 6, 8, 10 a 12 došlo k amplifikaci pouze genu pro *phaC* a v běhu 11 proběhla pouze amplifikace genu pro 16S rRNA. V prvním případě, amplifikace pouze *phaC* genu a ne 16S rRNA (která je typická pro všechny bakterie a měla by mít tedy ve všech případech pozitivní výsledek) byla způsobena velikostí výsledného amplikonu. Amplikon specifický pro *phaC* gen je mnohem kratší úsek a dochází zde tedy k preferenční amplifikaci. Amplikon oblasti 16S rRNA se tedy v některých případech nemusí při pozitivním výsledku amplifikace *phaC* objevit. Při pozitivním výsledku amplifikace *phaC* genu není amplikon 16S rRNA důležitý. Amplikon 16S rRNA nás informuje v případě negativního výsledku amplifikace *phaC* genu o správnosti izolace. Podmínky této PCR nebyly optimalizovány, ale šlo pouze o kontrolu izolace DNA. Izolovaná DNA byla potvrzena u isolátů z *C. necator* H16, *C. necator* PHB-4, *B. cepacia*, *B. sacchari* a *P. putida*. U isolátu *P. chlororaphis* došlo pouze k amplifikaci genu pro *phaC* a u isolátu z *E. coli* nebyl detekován žádný výsledek amplifikace. U izolačních kontrol ani negativní kontroly nebyly detekovány kontaminace. Následně byla provedena optimalizace PCR – bude uvedeno dále.

#### 4.5.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované bakteriální DNA

Pro stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA byl použit přístroj NanoPhotometer™ Implen. Pro posouzení čistoty DNA sloužila hodnota  $A_{260}/A_{280}$ . Čistá DNA obvykle vykazuje hodnoty poměru  $A_{260}/A_{280}$  v rozmezí 1,8 – 2,0 přičemž hodnoty nižší než 1,8 poukazují na kontaminaci proteiny, pokud je naopak hodnota vyšší než 2, je vzorek kontaminován RNA [61].

Tabulka 4: Koncentrace a čistota izolované DNA

| Vzorek                               | Typ izolace        |                   |               |                   |
|--------------------------------------|--------------------|-------------------|---------------|-------------------|
|                                      | Tepelná lyze buňky |                   | DNAzol        |                   |
|                                      | c DNA [ng/μl]      | $A_{260}/A_{280}$ | c DNA [ng/μl] | $A_{260}/A_{280}$ |
| <i>C. necator</i> H16                | 191,0              | 2,068             | 72,8          | 1,540             |
| <i>C. necator</i> PHB <sup>-</sup> 4 | 290,0              | 1,983             | 106,0         | 1,527             |
| <i>B. cepacia</i>                    | 149,0              | 1,697             | 31,5          | 1,432             |
| <i>B. sacchari</i>                   | 124,0              | 1,814             | 7,5           | 1,364             |
| <i>P. chlororaphis</i>               | 158,0              | 1,667             | 22,0          | 1,630             |
| <i>P. putida</i>                     | 77,5               | 1,330             | 44,0          | 1,323             |
| <i>E. coli</i>                       | 68,8               | 1,425             | 29,0          | 1,390             |

Koncentrace izolované DNA se pohybovala od 7,5 do 290 ng/μl. Při izolaci tepelnou lyzí buňky byla izolována DNA ve vyšší koncentraci než při izolaci DNAzolem, přičemž nejvyšší koncentrace DNA byla izolovaná z bakterie *C. necator* PHB<sup>-</sup>4 a to tepelnou lyzí buňky. DNA izolovaná DNAzolem, vykazovala větší znečištění proteiny než DNA izolovaná tepelnou lyzí buňky.

#### 4.5.4 Optimalizace PCR s primery cílenými do oblasti 16S rRNA a phaC

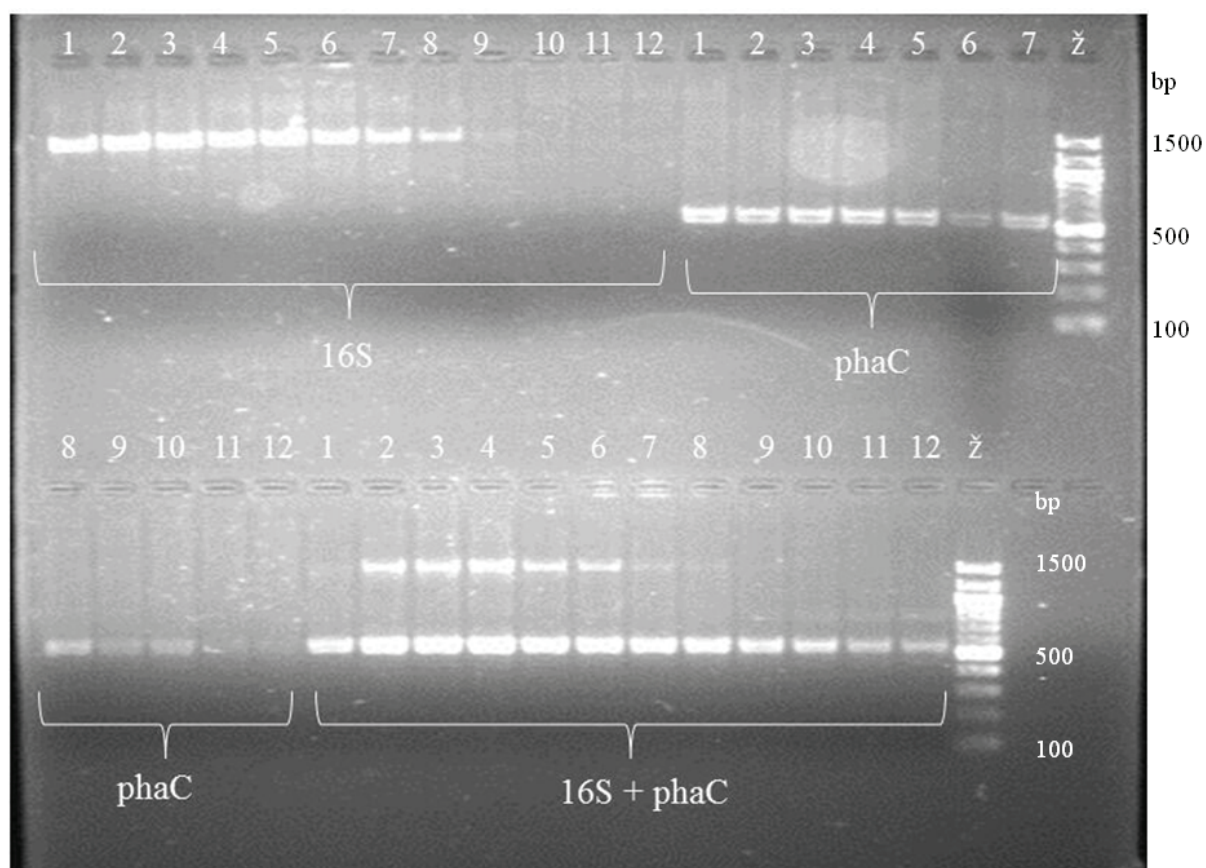
Byla provedena optimalizace annealingové teploty, pro kterou byl vybrán vzorek *B. sacchari* izolovaný tepelnou lyzí buňky a dále také optimalizace koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů, kde byl využit vzorek *P. putida* izolovaný DNAzolem. Jako DNA standard byl využit žebříček obsahující fragmenty od 1517 do 100 bp. Gelová elektroforéza produktů PCR s těmito primery je uvedena na Obrázku 31 v kapitole 4.5.2.

##### 4.5.4.1 Optimalizace annealingové teploty pro oba primery – gradientová PCR

Pro optimalizaci annealingové teploty byl použit teplotní program popsáný v Tabulce 3, na termocycleru byl nastaven gradient od 52 do 62 °C (tzv. gradientová PCR, což znamená, že při stejném cyklu lze nastavit v různých pozicích termocycleru různé teploty). Teploty v jednotlivých pozicích termocycleru jsou uvedeny v Tabulce 5:

Tabulka 5: Teploty annealingu v jednotlivých pozicích termocycleru (16S rRNA a phaC)

| Pozice | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   |
|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| T [°C] | 51,9 | 52,8 | 53,8 | 54,7 | 55,7 | 56,5 | 57,4 | 58,2 | 59,1 | 60,0 | 60,9 | 61,8 |



Obrázek 32: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů optimalizace annealingové teploty pro primery cílené do oblastí 16S rRNA a phaC, Ž – žebříček

PCR byla provedena pro oba primery zvlášť a také dohromady v jedné reakci, jako multiplexní PCR. Na Obrázku 32 je jasně viditelné, že nejlepšího výsledku pro oba primery dohromady bylo dosaženo v bězích 3 a 4, přičemž nejsilnější bandy jsou viditelné u čísla 4. To odpovídá teplotám 53,8 °C (3) a 54,7 °C (4). Z výsledku optimalizace byla jako nejlepší annealingová teplota zvolena teplota 55 °C.

#### 4.5.4.2 Optimalizace koncentrace $Mg^{2+}$ iontů (multiplexní PCR oblasti 16S rRNA a phaC)

Pro optimalizace koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů byly zvoleny koncentrace uvedeny v Tabulce 6:

Tabulka 6: Koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů pro optimalizaci

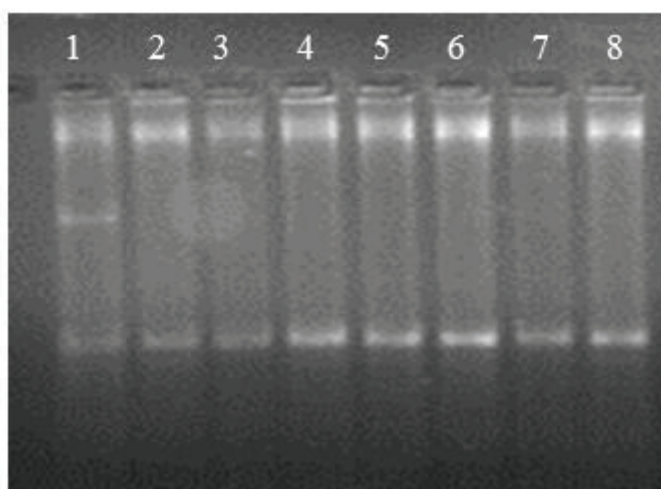
| Číslo vzorku     | 1*  | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   |
|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| c $Mg^{2+}$ [mM] | 1,8 | 2,0 | 2,2 | 2,4 | 2,5 | 2,6 | 2,8 | 3,0 |

\* původní koncentrace

Pro PCR byl využit teplotní program s již zoptimalizovanou annealingovou teplotou 55 °C:

Tabulka 7: Teplotní program PCR pro optimalizaci koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů

| Krok | Teplota [°C] | Čas [s] | Počet cyklů |
|------|--------------|---------|-------------|
| 1    | 94           | 30      | 1           |
| 2    | 94           | 30      | 30          |
|      | 55           | 30      |             |
|      | 68           | 90      |             |
| 3    | 68           | 300     | 1           |
|      | 4            | 60      | 1           |



Obrázek 33: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů - optimalizace koncentrace  $Mg^{2+}$  (16S rRNA a *phaC*)

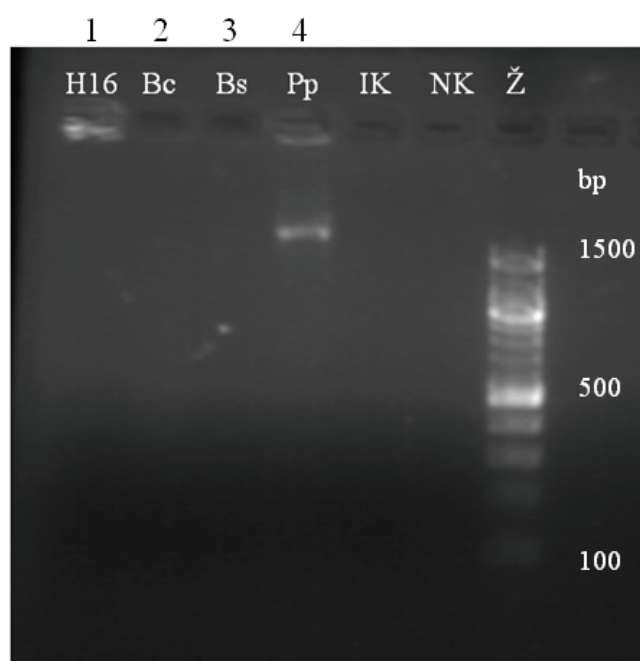
Z Obrázku 33 je patrné, že nejlepšího výsledku PCR bylo dosaženo s koncentrací  $Mg^{2+}$  2,6 mM (běh 6).

#### 4.5.5 PCR s primery cílenými na *phaC1* gen

Byla provedena orientační PCR se sadou primerů pro *phaC1* při původní koncentraci  $Mg^{2+}$  iontů 1,8 mM. Jako vzorky byly využity izoláty DNA z bakterií *C. necator* H16, *B. cepacia*, *B. sacchari* a *P. putida* izolované DNazolem. DNA standard byl žebříček obsahující fragmenty od 1517 do 100 bp. Pro PCR byl nastaven následující teplotní program:

Tabulka 8: Teplotní program pro PCR s primery cílenými do oblasti *phaC1*

| Krok | Teplota [°C] | Čas [s] | Počet cyklů |
|------|--------------|---------|-------------|
| 1    | 94           | 30      | 1           |
| 2    | 94           | 30      | 30          |
|      | 60           | 30      |             |
|      | 68           | 90      |             |
| 3    | 68           | 300     | 1           |
|      | 4            | 60      | 1           |



Obrázek 34: Gelová elektroforéza produktů orientační PCR s primery cílenými do oblasti *phaC1*, běh 1 – *C. necator* H16, běh 2 – *B. cepacia*, běh 3 – *B. sacchari*, běh 4 – *P. putida*

V této reakci byla využita sada primerů pro amplifikaci fragmentu DNA o velikosti 1965 bp odpovídající genu pro *phaC1*, tedy genu kódujícího tvorbu enzymu PHA syntáza zodpovědné za produkci mcl-PHA. Je zřejmé, že k amplifikaci fragmentu došlo pouze u vzorku naneseném v běhu 4 – *Pseudomonas putida*. Jak již bylo uvedeno v teoretické části práce, schopnost produkce mcl-PHA mají bakterie rodu *Pseudomonas*. Ostatní bakteriální kmeny využití v reakci tuto schopnost nemají, a proto nemohlo dojít k amplifikaci fragmentu.

#### 4.5.6 Optimalizace PCR s primery cílenými na *phaC1* gen

Pro optimalizaci byl použit izolát *Pseudomonas putida*, izolovaný DNazolem. Jako DNA standard byl využit žebříček obsahující fragmenty od 3000 do 100 bp.

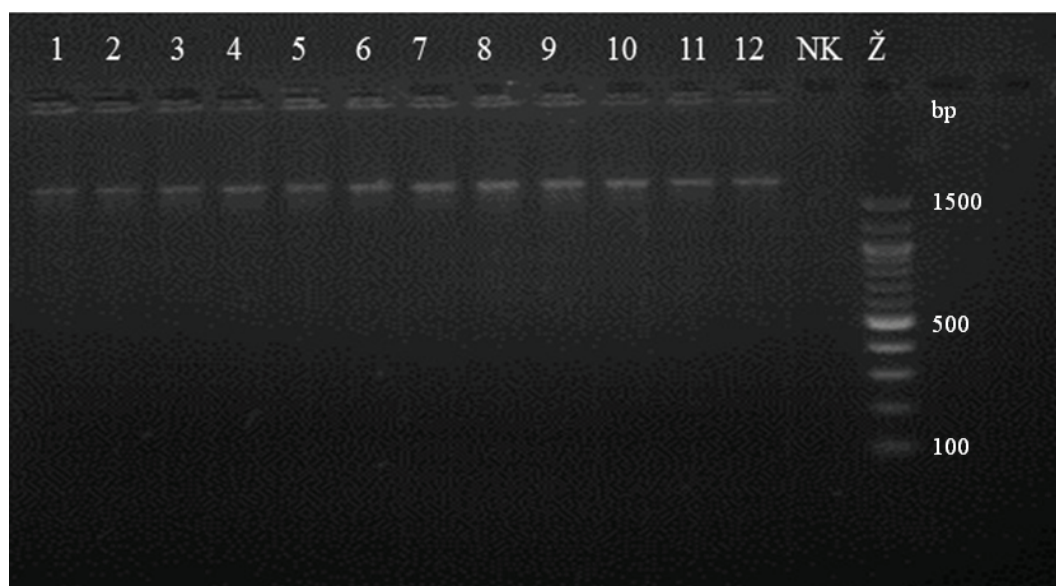
##### 4.5.6.1 Optimalizace annealingové teploty – gradientová PCR

Pro optimalizaci annealingové teploty byl použit teplotní program popsáný v Tabulce 3 s nastaveným gradientem teplot od 55 do 65 °C. Teploty v jednotlivých celách termocycleru jsou uvedeny v následující tabulce:



Tabulka 9: Teploty annealingu v jednotlivých pozicích termocycleru (*phaC1*)

| Pozice | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   |
|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| T [°C] | 55,0 | 55,8 | 56,8 | 57,7 | 58,6 | 59,5 | 60,4 | 61,3 | 62,2 | 63,1 | 64,1 | 65,0 |



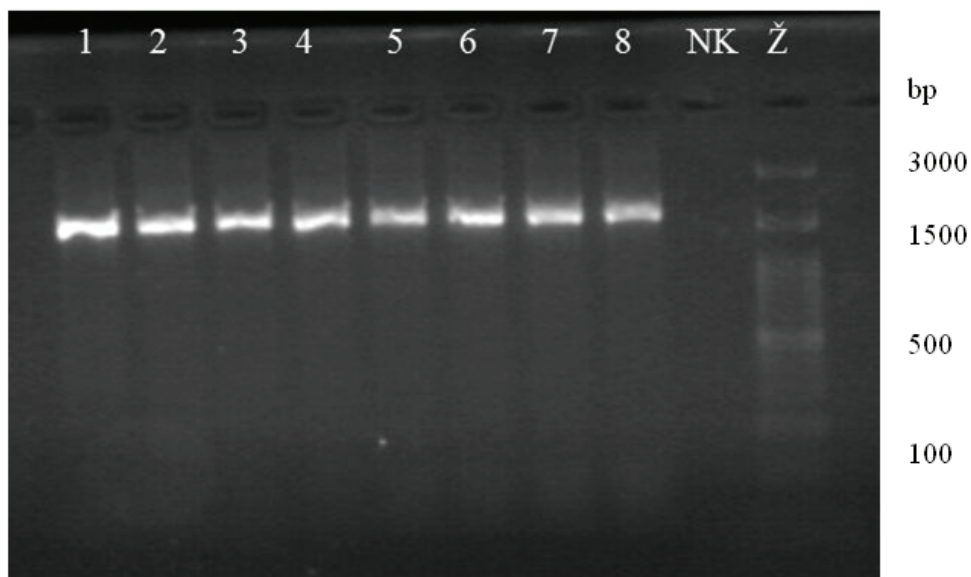
Obrázek 35: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR s primery cílenými do oblasti *phaC1* při optimalizaci annealingové teploty

U této optimalizace bylo vyhodnocení nejvhodnější teploty poměrně obtížné, jelikož všechny bandy jsou málo viditelné. Jako nejlepší výsledky (lépe viditelné pouhým okem pod transiluminátorem) byly vyhodnoceny vzorky v běžích 8, 9 a 10, které odpovídají teplotám 61,3 °C (8), 62,2 °C (9) a 63,1 °C (10). Jako nejlepší annealingová teplota byla nakonec zvolena teplota 62 °C.

#### 4.5.6.2 Optimalizace koncentrace $Mg^{2+}$ iontů (*phaC1*)

Pro optimalizaci koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů byly zvoleny stejné koncentrace jako v případě optimalizace 16S RNA a *phaC*. Koncentrace jsou uvedeny v Tabulce 6. Výsledky potom na Obrázku 36. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo u vzorku číslo 1, tedy koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů 1,8 mM, která je součástí master mixu.





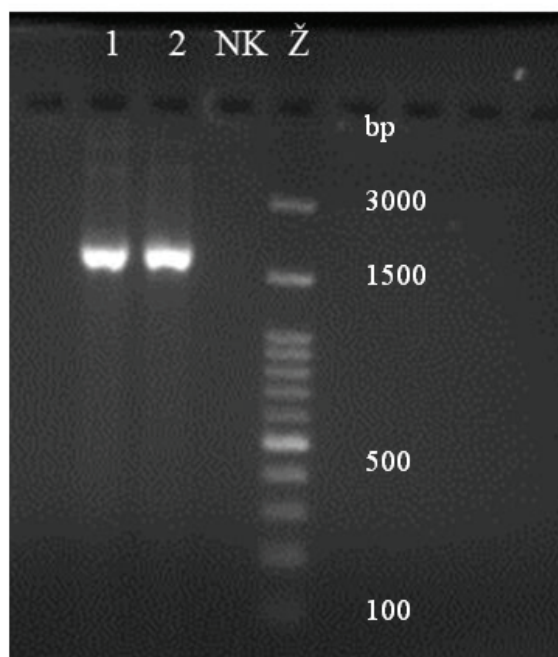
Obrázek 36: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů - optimalizace koncentrace  $Mg^{2+}$  (phaC1)

#### 4.5.6.3 Optimalizace časových úseků jednotlivých kroků PCR reakce

Vzhledem k větší velikosti amplifikovaných fragmentů DNA byla provedena také optimalizace času jednotlivých kroků PCR. Probíhala s již zoptimalizovanou annealingovou teplotou 62 °C, koncentrací  $Mg^{2+}$  1,8 mM dle následujícího programu:

Tabulka 10: Teplotní program pro PCR - optimalizace časových úseků

| Krok | Teplota [°C] | Čas [s] | Počet cyklů |
|------|--------------|---------|-------------|
| 1    | 94           | 30      | 1           |
| 2    | 94           | 45      | 30          |
|      | 62           | 45      |             |
|      | 68           | 120     |             |
| 3    | 68           | 600     | 1           |
| 4    | 4            | 60      | 1           |



Obrázek 37: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR probíhající při původním časovém programu (1) a při novém časovém programu (2)

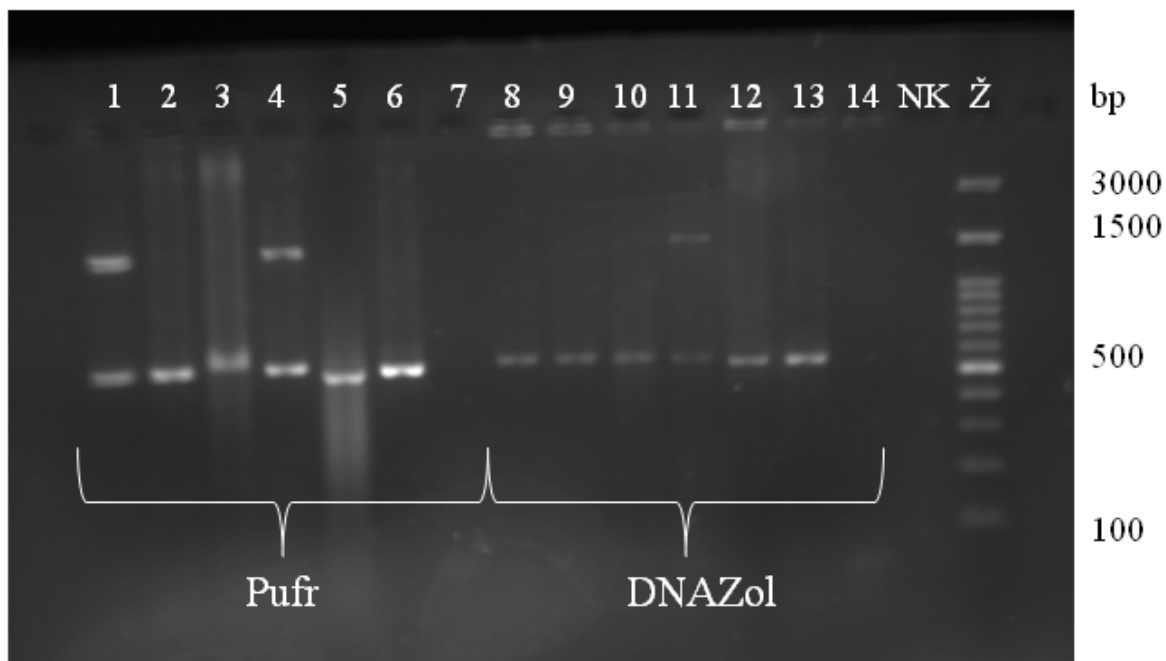
V běhu 1 je nanesen PCR produkt, který byl amplifikován za použití původním programu (uveden v *Tabulce 8*, na straně 55). V běhu 2 je detekován PCR produkt, který byl amplifikovaný za použití nového programu, tedy s prodlouženými časy uvedeného v *Tabulce 10*. Program s prodlouženými časy nijak výrazně neovlivnil intenzitu fragmentu na gelu, a tedy vzhledem k délce programu bude zachován původní s kratšími časy.

#### 4.5.6.1 Amplifikace izolované DNA za použití zoptimalizované PCR s primery cílenými do oblasti 16S rRNA a phaC

V této části práce byla DNA izolovaná z bakteriálních kmenů rychlou izolací (pomocí DNazolu a tepelnou lyzí buňky) amplifikovaná za použití zoptimalizované PCR s primery cílenými na oblasti 16S rRNA a phaC. Amplifikace obou oblastí probíhala v jedné reakci jako multiplexní PCR. Optimální podmínky pro reakci jsou uvedeny v *Tabulce 11*.

Tabulka 11: Optimální podmínky PCR (16S rRNA a phaC)

| c Mg <sup>2+</sup> [mM] | Teplotní program |              |         |             |
|-------------------------|------------------|--------------|---------|-------------|
| 2,6                     | Krok             | Teplota [°C] | Čas [s] | Počet cyklů |
|                         | 1                | 94           | 30      | 1           |
|                         | 2                | 94           | 30      | 30          |
|                         |                  | 55           | 30      |             |
|                         |                  | 68           | 90      |             |
|                         | 3                | 68           | 300     | 1           |
|                         | 4                | 60           | 60      | 1           |



Obrázek 38: Agarózová gelová elektroforéza optimalizované PCR s primery cílenými do oblasti 16S rRNA a *phaC*, DNA izolovaná tepelnou lyzí buňky (1 – 7) a DNAzolem (8 – 14), běh 1 a 8 – *C. necator* H16, běh 2 a 9 – *C. necator* PHB-4, běh 3 a 10 – *B. cepacia*, běh 4 a 11 – *B. sacchari*, běh 5 a 12 – *P. chlororaphis*, běh 6 a 13 – *P. putida*, běh 7 a 14 – *E. coli*, NK – negativní kontrola, Ž – žebříček

U vzorků DNA izolovaných přímou lyzí buňky (1 – 7) jsou bandy opět viditelnější než u izolace DNAzolem (8 – 14). Z Obrázku 38 je zřejmé, že u všech vzorků, kromě vzorku *E. coli* (7 a 14), došlo k amplifikaci fragmentu o velikosti asi 500 bp. Jde o úsek DNA kódující tvorbu PHA syntázy, která je zodpovědná za produkci scl-PHA i mcl-PHA. Tento úsek DNA detekujeme i v běhu 2 a 9, kde je nanesena DNA izolována z bakterie *C. necator* PHB<sup>-</sup>4, která nemá schopnost produkce PHA. Zjistili jsme tedy, že mutantní kmen *C. necator* PHB<sup>-</sup>4 má ve struktuře DNA přítomen úsek kódující PHA syntázu, ale PHA syntáza není funkční, jelikož jsme si ostatními technikami ověřili, že tento kmen PHA neprodukuje. Oproti metodám, které jsou zaměřeny na detekci přítomnosti PHA v bakteriálních buňkách (analýze konkrétního znaku fenotypu), u kterých je častá falešně negativní chyba schopnosti akumulovat PHA u bakteriálních isolátů, molekulárně biologické metody zacílené na konkrétní znak genotypu (přítomnost genu *phaC*) mohou naopak generovat falešně pozitivní výsledky. Jak ukazuje příklad bakterie *C. necator* PHB<sup>-</sup>4 molekulárně biologické metody detekují také nefunkční geny případně geny, které nejsou aktivně exprimovány. Proto je pro objektivní analýzu schopnosti akumulovat PHA u vybraných bakteriálních kmenů ideální kombinovat oba přístupy – tedy analýzu genotypu i fenotypu.

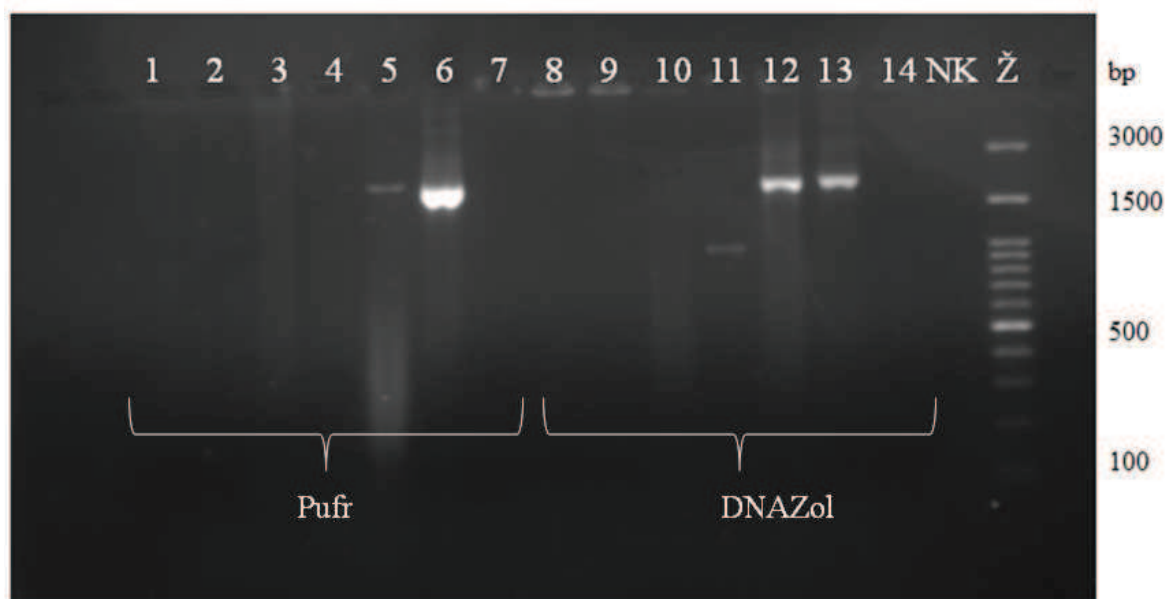
Amplifikaci fragmentu o velikosti asi 1500 bp můžeme vidět pouze v běhu 1, 4 a 11. Úsek DNA o této velikosti odpovídá genu pro 16S rRNA charakteristickou pro všechny bakterie. K jeho amplifikaci u ostatních kmenů zřejmě nedošlo v důsledku amplifikace *phaC* genu, který jak již bylo řečeno, má menší velikost a amplifikuje se tedy snadněji.

#### 4.5.6.2 Amplifikace izolované DNA za použití zoptimalizované PCR s primery cílenými na *phaC1* gen

V této části práce byla DNA izolovaná z bakteriálních kmenů rychlou izolací (pomocí DNAzolu a tepelnou lyzí buňky) amplifikovaná za použití zoptimalizované PCR s primery cílenými na oblast *phaC1*. Optimální podmínky pro reakci jsou uvedeny v Tabulce 12.

Tabulka 12: Optimalizované podmínky pro PCR (*phaC1*)

| c Mg <sup>2+</sup> [mM] | Teplotní program |              |         |             |
|-------------------------|------------------|--------------|---------|-------------|
| 1,8                     | Krok             | Teplota [°C] | Čas [s] | Počet cyklů |
|                         | 1                | 94           | 30      | 1           |
|                         | 2                | 94           | 30      | 30          |
|                         |                  | 62           | 30      |             |
|                         |                  | 68           | 90      |             |
|                         | 3                | 68           | 300     | 1           |
|                         | 4                |              | 60      | 1           |



Obrázek 39: Agarózová gelová elektroforéza optimalizované PCR s primery cílenými do oblasti *phaC1*, DNA izolovaná tepelnou lyzí buňky (1 – 7) a DNAzolem (8 – 14), běh 1 a 8 – *C. necator* H16, běh 2 a 9 – *C. necator* PHB-4, běh 3 a 10 – *B. cepacia*, běh 4 a 11 – *B. sacchari*, běh 5 a 12 – *P. chlororaphis*, běh 6 a 13 – *P. putida*, běh 7 a 14 – *E. coli*, NK – negativní kontrola, Ž – žebříček

Výsledky elektroforézy ukazují, že produkty PCR byly detekovány v běhu 5, 6, 12 a 13. Tyto běhy odpovídají DNA izolované z bakterií rodu *Pseudomonas*, přičemž běhy 5 a 6 odpovídají izolaci tepelnou lyzí buňky a běhy 12 a 13 izolaci DNAzolem. Reakcí jsme ověřili, že úsek DNA kódující tvorbu PHA syntázy zodpovědnou za produkci mcl-PHA je přítomen pouze u bakterií rodu *Pseudomonas* a nikoli u ostatních bakterií použitých v experimentu.

Tabulka 13: Porovnání použitých metod

| Metoda                                                      | Kultivačně závislá | Časová náročnost<br>přípravy vzorku<br>a samotné<br>analýzy | Principiální detekce<br>schopnosti<br>akumulace PHA | Interference                         | Citlivost | Finanční<br>náročnost<br>zařízení | Finanční<br>nároky na<br>spotřební<br>materiál | Potenciální<br>možnost<br>kvantifikace | mcl vs.<br>scl<br>PHA |
|-------------------------------------------------------------|--------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------|-----------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------|
| Barvení Niskou<br>červení na miskách                        | ano                | 5 minut                                                     | na úrovni fenotypu                                  | lipidické látky,<br>autofluorescence | střední   | nízká                             | nízké                                          | ne                                     | ne                    |
| Barvení Sudánovou<br>černí na miskách                       | ano                | 20 minut                                                    | na úrovni fenotypu                                  | lipidické látky                      | střední   | nízká                             | nízké                                          | ne                                     | ne                    |
| Fluorescenční<br>mikroskopie s<br>využitím Niské<br>červeně | ne                 | 40 minut                                                    | na úrovni fenotypu                                  | lipidické látky,<br>autofluorescence | střední   | vysoká                            | nízké                                          | ne                                     | ne                    |
| Optická mikroskopie<br>s využitím Sudánové<br>černě         | ne                 | 40 minut                                                    | na úrovni fenotypu                                  | lipidické látky                      | nízká     | nízká                             | nízké                                          | ne                                     | ne                    |
| Průtoková<br>cytometrie                                     | ne                 | 40 minut                                                    | na úrovni fenotypu                                  | lipidické látky,<br>autofluorescence | střední   | vysoká                            | nízké                                          | ano                                    | ne                    |
| FTIR analyza                                                | ano                | 1 den                                                       | na úrovni fenotypu                                  | bez interference                     | vysoká    | vysoká                            | nízké                                          | ano                                    | ano                   |
| Ramanova<br>mikrospektroskopie                              | ano                | 20 minut                                                    | na úrovni fenotypu                                  | bez interference                     | vysoká    | vysoká                            | nízká                                          | ano                                    | obtížně               |
| PCR detekce <i>phnC</i><br><i>genu</i>                      | ano                | 4 hodiny                                                    | na úrovni genotypu                                  | bez interference                     | vysoká    | střední                           | vysoká                                         | ne                                     | ano                   |

## 4.6 Porovnání jednotlivých metod

V Tabulce 13 jsou shrnuty různé aspekty, které byly hodnoceny u metod testovaných v rámci práce.

Kultivační techniky, tedy barvení kolonií na miskách, se řadí mezi nejrychlejší metody identifikace produkce PHA bakteriemi. Barvení kolonií Nilskou červení je díky tomu, že barvivo se přidává již do média, metodou nejrychlejší. Mezi další výhody metod můžeme zařadit také nízké náklady na jejich provedení. Kultivační techniky jsou schopné detekovat produkci PHA na úrovni fenotypu. Mají velkou nevýhodu v podobě interferencí látkami lipidické povahy, které jsou přítomny v buňkách bakterií. U barvení kolonií Nilskou červení se k této nevýhodě řadí také možná autofluorescence buněk. Kultivačními technikami nejsme schopni kvantifikovat množství PHA v buňkách a také nelze rozlišit, o jaký typ PHA se jedná.

Mikroskopické techniky a průtoková cytometrie jsou metody časově náročnější než metody kultivační, ale stále je můžeme zařadit mezi metody rychlé. Stejně jako u kultivačních technik je možná detekce na úrovni fenotypu a i zde dochází k interferencím lipidickými látkami a autofluorescencí. Ani jedna z metod není schopna rozlišit, jaký typ PHA bakterie produkuje. Fluorescenční mikroskopie je metoda poměrně nákladná, avšak má dobrou citlivost a její velkou výhodou je viditelnost PHA granulí pod fluorescenčním mikroskopem. Naproti tomu na mikroskopii s využitím Sudánové černě nejsou tak vysoké náklady, ale metoda poskytuje nízkou citlivost. Mikroskopické techniky nemají, na rozdíl od průtokové cytometrie, možnost kvantifikace PHA.

FTIR analýza je metoda mající vysokou citlivost, je schopna rozlišit o jaký typ polymeru se jedná a také je možné kvantifikovat množství PHA v buňkách. Nedochází zde k žádným interferencím, jako tomu bylo u kultivačních a mikroskopických technik a průtokové cytometrie. Je to ovšem analýza vyžadující nákladné zařízení a v rámci testovaných metod jde o nejvíce časově náročnou analýzu, kvůli nutnosti odstranění veškeré vody ze vzorku.

Ramanova mikrospektroskopie poskytuje obdobné výhody a nevýhody jako FTIR analýza, s tím rozdílem, že možnost rozlišení typu PHA je obtížnější než v předchozím případě. Po srovnání časové náročnosti je zřejmé, že se Ramanova mikrospektroskopie řadí, společně s kultivačními technikami, mezi nejrychlejší metody. Oproti FTIR je její velkou výhodou také to, že umožňuje analýzu viabilních buněk bez nutnosti odstranit vodu. Důkaz přítomnosti PHA Ramanovou spektroskopií je jednoznačný a metoda navíc dovoluje detekovat i nízký obsah PHA v bakteriálních buňkách.

PCR detekce *phaC* genu můžeme zařadit do metod časově náročnějších a také nákladnějších a to z především z hlediska spotřebního materiálu. Touto metodou není možná kvantifikace množství PHA v buňkách, ale její výhodou je vysoká citlivost, schopnost určení typu produkovaného PHA a také to, že nedochází k žádným interferencím. Jako jediná z použitých metod detekuje PCR tvorbu PHA na úrovni genotypu.



## 5. ZÁVĚRY

- Diplomová práce byla věnována testování různých metod pro identifikaci PHA produkujících bakterií. Práce je členěna do čtyř větších kapitol – kultivační techniky, mikroskopické techniky a průtoková cytometrie, spektroskopické techniky a molekulárně biologické techniky identifikace.
- Barvení kolonií Nilskou červení se ukázalo jako metoda vhodná pro rychlou analýzu produkce PHA bakteriemi, ne však pro možnou kvantifikaci PHA v buňkách ani pro stanovení typu produkovaného PHA. Byla potvrzena vyšší fluorescence u bakteriálních kultur, které PHA produkují v důsledku navázání lipofilního barviva Nilské červeně na lipidické granule PHA. Tuto metodu je principiálně možné využít pro identifikaci PHA produkujících bakterií ve směsné kultuře po jejím rozočkování na Petriho misky.
- Při barvení kolonií Sudánovou černí byly viditelné zřetelné rozdíly mezi jednotlivými bakteriálními kulturami, přičemž bakterie, které mají schopnost produkce a akumulace PHA získaly modré zbarvení také v důsledku navázání barviva na granule PHA. Kultivační techniky se tedy ukázaly jako velmi rychlé a poměrně nenákladné techniky pro identifikaci produkce PHA bakteriemi. Jejich nevýhodou ovšem je, že mohou poskytovat falešné negativní nebo pozitivní výsledky časově náročná je pak také samotná kultivace.
- Fluorescenční mikroskopie tyto falešné pozitivní nebo negativní výsledky eliminuje, jelikož vidíme přímo do buňky a tedy vidíme i PHA granule uvnitř buňky. Jedná se také o metodu poměrně rychlou, která je ale finančně náročná a není vhodná pro kvantifikaci množství PHA v buňkách ani pro určení typu polymeru akumulovaného bakteriemi.
- Optická mikroskopie s využitím Sudánové černě se jeví jako nejméně vhodná metoda pro identifikaci PHA akumulujících bakterií, jelikož citlivost metody je poměrně nízká a rozdíly mezi produkujícími a neprodukujícími bakteriálními kulturami jsou špatně viditelné a při nižším obsahu PHA by bylo obtížné tyto kultury odlišit.
- Při využití průtokové cytometrie vykazují vyšší fluorescenci bakterie produkující a akumulující PHA. Rozdíly v hodnotě fluorescence mezi produkčními a neprodukčními kmeny jsou znatelné. Metodou je také možné kvantifikovat kolik buněk je PHA pozitivních a kolik PHA negativních, ovšem není možné stanovit, zda bakterie produkují scl nebo mcl PHA a metoda se řadí mezi metody nákladnější co do ceny zařízení.
- Pomocí spektroskopických technik je možná i kvantifikace PHA v buňkách, přičemž je možné také určit typ produkovaného PHA. Při Ramanově mikrospektroskopii je možné analyzovat buňky přímo po kultivaci na Petriho miskách, je tedy možné

analyzovat i viabilní buňky, takže se tato metoda řadí mezi velmi rychlé analýzy. Ovšem identifikace typu PHA je obtížnější než u FTIR. FTIR analýza má proti Ramanově mikrospektroskopii při analýze biologických vzorků nevýhodu v podobě sušení vzorku, a tedy delší doby jeho přípravy. Obě metody se řadí mezi finančně náročnější.

- PCR detekce *phaC* genu umožňuje detekci produkce PHA na úrovni genotypu. Pomocí PCR byl nejdříve detekován pouze *phaC* gen, tedy gen zodpovědný za tvorbu PHA syntázy třídy I, který byl detekován u všech bakterií využitých v experimentu, a to i u bakterie PHA neprodukující – *C. necator* PHB<sup>-</sup>4. Tato bakterie má tedy gen pro tvorbu PHA syntázy přítomen, ale vzniklá PHA syntáza je zřejmě nefunkční, jelikož ostatní techniky, které detekující akumulaci PHA na úrovni fenotypu, produkci polymeru u tohoto kmenu nezaznamenaly. Byla provedena také detekce *phaC1* genu, kódujícího syntézu PHA syntázy třídy II, přičemž tyto geny byly detekovány pouze u bakterií rodu *Pseudomonas*, které se řadí mezi producenty mcl-PHA. Metoda tedy umožňuje identifikaci typu PHA, ale neumožňuje jeho kvantifikaci. Jedná se o velice citlivou metodu, která je ale časově i finančně náročnější.
- Metody, které jsou zaměřeny na detekci přítomnosti PHA v bakteriálních buňkách (analýza konkrétního znaku fenotypu), jsou náchylné k falešně negativním chybám, kdy za podmínek kultivace nedojde k akumulaci PHA i přesto, že je toho daná bakterie schopna. Naopak molekulárně biologické metody zacílené na konkrétní znak genotypu (přítomnost genu *phaC*) mohou generovat falešně pozitivní výsledky, protože gen identifikovaný pomocí PCR technik nemusí být v dané bakterii exprimován v aktivní enzym. Proto je pro objektivní analýzu schopnosti akumulovat PHA u vybraných bakteriálních kmenů ideální kombinovat oba přístupy – tedy analýzu genotypu i fenotypu. Z námi otestovaných metod umožňujících detekci PHA v bakterii na základě fenotypu se jako velice perspektivní jeví Ramanova mikrospektroskopie, která je rychlá, umožňuje analyzovat buňky bez jakékoliv předchozí úpravy a zároveň je schopna identifikovat i nízké buněčné obsahy PHA, přičemž důkaz PHA je velice specifický a prakticky znemožňuje interferenci jiných lipidických látek

## 6. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] 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]. 2010, **55**(1), 17-22 [cit. 2016-02-20]. DOI: 10.1007/s12223-010-0003-z. ISSN 0015-5632. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12223-010-0003-z>
- [2] OBRUČA, S.: Controlled production and degradation of selected biomaterials. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 169 s. Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [3] SUDESH, K, H ABE a Y DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* [online]. 2000, 25(10), 1503-1555 [cit. 2016-04-06]. DOI: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6. ISSN 00796700. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670000000356>
- [4] CRUZ, Madalena V., Filomena FREITAS, Alexandre PAIVA, Francisca MANO, Madalena DIONÍSIO, Ana Maria RAMOS a Maria A.M. REIS. Valorization of fatty acids-containing wastes and byproducts into short- and medium-chain length polyhydroxyalkanoates. *New Biotechnology* [online]. 2016, 33(1), 206-215 [cit. 2016-04-06]. DOI: 10.1016/j.nbt.2015.05.005. ISSN 18716784. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678415000990>
- [5] CZERNIECKA, A., A. MAGOŃ, J. SCHLIESSER, B.F. WOODFIELD a M. PYDA. Heat capacity of poly(3-hydroxybutyrate). *The Journal of Chemical Thermodynamics* [online]. 2014, **73**, 76-84 [cit. 2016-04-06]. DOI: 10.1016/j.jct.2013.10.020. ISSN 00219614. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196141300387X>
- [6] LENZ, Robert W. a Robert H. MARCHESSAULT. Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. *Biomacromolecules* [online]. 2005, **6**(1), 1-8 [cit. 2016-04-06]. DOI: 10.1021/bm049700c. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm049700c>
- [7] ROSA, D.S, R.P FILHO, Q.S.H CHUI, M.R CALIL a C.G.F GUEDES. The biodegradation of poly- $\beta$ -(hydroxybutyrate), poly- $\beta$ -(hydroxybutyrate-co- $\beta$ -valerate) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) in compost derived from municipal solid waste. *European Polymer Journal* [online]. 2003, **39**(2), 233-237 [cit. 2016-04-30]. DOI: 10.1016/S0014-3057(02)00215-X. ISSN 00143057. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001430570200215X>
- [8] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. Praha: Academia, 2008. ISBN 978-80-200-1703-1.

[9] WALKER, Graeme M. Yeast physiology and biotechnology. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. New York: J. Wiley, c1998. ISBN 04-719-6446-8.

[10] AYUB, Nicolas D., M. Julia PETTINARI, Jimena A. RUIZ a Nancy I. LoPEZ. A Polyhydroxybutyrate-Producing *Pseudomonas* sp. Isolated from Antarctic Environments with High Stress Resistance. *Current Microbiology* [online]. 2004, 49(3), - [cit. 2016-04-15]. DOI: 10.1007/s00284-004-4254-2. ISSN 0343-8651. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-004-4254-2>

[11] 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. 2016-04-15]. DOI: 10.1080/10408410590899228. ISSN 1040-841x. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408410590899228>

[12] JENDROSSEK, D. Polyhydroxyalkanoate Granules Are Complex Subcellular Organelles (Carbonosomes). *Journal of Bacteriology* [online]. 2009, 191(10), 3195-3202 [cit. 2016-04-06]. DOI: 10.1128/JB.01723-08. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.01723-08>

[13] EGGINK, Gerrit, Hetty VAN DER WAL, Gern N.M. HUIJBERTS a Pieter DE WAARD. Oleic acid as a substrate for poly-3-hydroxyalkanoate formation in *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas putida*. *Industrial Crops and Products* [online]. 1992, 1(2-4), 157-163 [cit. 2016-04-06]. DOI: 10.1016/0926-6690(92)90014-M. ISSN 09266690. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/092666909290014M>

[14] REHM, Bernd H. A. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal* [online]. 2003, 376(1), 15-33 [cit. 2016-04-06]. DOI: 10.1042/bj20031254. ISSN 0264-6021. Dostupné z: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/bj20031254>

[15] CHEN, Guo-Qiang, Ivan HAJNAL, Hong WU, Li LV a Jianwen YE. Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates. *Trends in Biotechnology* [online]. 2015, 33(10), 565-574 [cit. 2016-04-06]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2015.07.007. ISSN 01677799. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779915001596>

[16] CRUZ, Madalena V., Diana ARAÚJO, Vítor D. ALVES, Filomena FREITAS a Maria A.M. REIS. Characterization of medium chain length polyhydroxyalkanoate produced from olive oil deodorizer distillate. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2016, 82, 243-248 [cit. 2016-04-06]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.10.043. ISSN 01418130. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813015300477>

- [17] G., Chen, Zhang G., Park S. a Lee S. Industrial scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2001-10-1, 57(1-2), 50-55 [cit. 2016-05-01]. DOI: 10.1007/s002530100755. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002530100755>
- [18] OBRUČA, Stanislav. Polyhydroxyalkanoáty – „plasty“ vyráběné bakteriemi. In: *ChemPoint* [online]. Brno, 2011 [cit. 2016-03-14]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/obruca-1>
- [19] REINECKE, Frank a Alexander STEINBÜCHEL. *Ralstonia eutropha* Strain H16 as Model Organism for PHA Metabolism and for Biotechnological Production of Technically Interesting Biopolymers. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* [online]. 2009, 16(1-2), 91-108 [cit. 2016-04-06]. DOI: 10.1159/000142897. ISSN 1660-2412. Dostupné z: <http://www.karger.com/doi/10.1159/000142897>
- [20] RAMM, Rainer. Genomic View of Energy Metabolism in *Ralstonia eutropha* H16. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* [online]. 2009, vol. 16, 1- 2, pp. 38-52 [cit. 2016-04-06]. Dostupné z: <http://www.karger.com/doi/10.1159/000142893>.
- [21] POHLMANN, Anne, Wolfgang Florian FRICKE, Frank REINECKE, Bernhard KUSIAN, Heiko LIESEGANG, Rainer CRAMM, Thomas EITINGER, Christian EWERING, Markus PÖTTER, Edward SCHWARTZ, Axel STRITTMATTER, Ingo VOß, Gerhard GOTTSCHALK, Alexander STEINBÜCHEL, Bärbel FRIEDRICH a Botho BOWIEN. Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bakterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature Biotechnology* [online]. 2006, vol. 24, no. 10, pp. 1257-1262 [cit. 2016-04-06]. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nbt1244>.
- [22] TIAN, J., A. J. SINSKEY a J. STUBBE. Kinetic Studies of Polyhydroxybutyrate Granule Formation in *Wautersia eutropha* H16 by Transmission Electron Microscopy. *Journal of Bacteriology* [online]. 2005, 187(11), 3814-3824 [cit. 2016-04-06]. DOI: 10.1128/JB.187.11.3814-3824.2005. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.187.11.3814-3824.2005>
- [23] MAKAREWICZ, Oliwia, Mareike KLINGER-STROBEL, Julia ERNST, Christian LAUTENSCHLAEGER, Mathias W. PLETZ a Dagmar FISCHER. A blue fluorescent labeling technique utilizing micro- and nanoparticles for tracking in LIVE/DEAD® stained pathogenic biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Burkholderia cepacia*. *International Journal of Nanomedicine* [online]. , 575- [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.2147/IJN.S98401. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <https://www.dovepress.com/a-blue-fluorescent-labeling-technique-utilizing-micro--and-nanoparticl-peer-reviewed-article-IJN>

[24] MATTHAIIOU, D.K., E. CHASOU, S. ATMATZIDIS a P. TSOLKAS. A case of bacteremia due to Burkholderia cepacia in a patient without cystic fibrosis. Respiratory Medicine CME [online]. 2011, 4(3), 144-145 [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.1016/j.rmedc.2010.11.002. ISSN 17550017. Dostupné z <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1755001710000606>

[25] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5

[26] PAN, Wenyang, Joseph A. PERROTTA, Arthur J. STIPANOVIC, Christopher T. NOMURA a James P. NAKAS. Production of polyhydroxyalkanoates by Burkholderia cepacia ATCC 17759 using a detoxified sugar maple hemicellulosic hydrolysate. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology [online]. 2012, 39(3), 459-469 [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.1007/s10295-011-1040-6. ISSN 1367-5435. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-011-1040-6>

[27] *University of Minnesota* [online]. Minnesota: Regents of the University of Minnesota, 2009 [cit. 2016-04-27]. Dostupné z: <http://www.micab.umn.edu/faculty/Mohr.html>

[28] MENDONÇA, T.T., J.G.C. GOMEZ, E. BUFFONI, R.J. SÁNCHEZ RODRIGUEZ, J. SCHRIPSEMA, M.S.G. LOPES a L.F. SILVA. Exploring the potential of Burkholderia sacchari to produce polyhydroxyalkanoates. Journal of Applied Microbiology [online]. 2014, 116(4), 815-829 [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.1111/jam.12406. ISSN 13645072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.12406>

[29] LOPES, Mateus Schreiner Garcez, Rafael Costa Santos ROCHA, Sandra Patricia ZANOTTO, José Gregório Cabrera GOMEZ a Luiziana Ferreira da SILVA. Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. World Journal of Microbiology and Biotechnology [online]. 2009, 25(10), 1751-1756 [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.1007/s11274-009-0072-9. ISSN 0959-3993. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-009-0072-9>

[30] LOPES, Mateus Schreiner Garcez, Guillermo GOSSET, Rafael Costa Santos ROCHA, José Gregório Cabrera GOMEZ a Luiziana FERREIRA DA SILVA. PHB Biosynthesis in Catabolite Repression Mutant of Burkholderia sacchari. Current Microbiology [online]. 2011, 63(4), 319-326 [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.1007/s00284-011-9981-6. ISSN 0343-8651. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-011-9981-6>

[31] MARTINS DOS SANTOS, Vitor A. P., Kenneth N. TIMMIS, Burkhard TÜMMLER a Christian WEINEL. Genomic Features of Pseudomonas putida Strain KT2440. *Pseudomonas* [online]. Boston, MA: Springer US, 2004, s. 77 [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.1007/978-1-4419-9086-0\_3. ISBN 978-1-4613-4788-0. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-9086-0\\_3](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-9086-0_3)



[32] *Pseudomonas putida* F1. *Genome Portal* [online]. Kalifornie: The Regents of the University of California, 2016 [cit. 2016-03-28]. Dostupné z: <http://genome.jgi.doe.gov/psepu/psepu.home.html>

[33] POBLETE-CASTRO, Ignacio, Danielle BINGER, Rene OEHLERT a Manfred ROHDE. Comparison of mcl-Poly(3-hydroxyalkanoates) synthesis by different *Pseudomonas putida* strains from crude glycerol: citrate accumulates at high titer under PHA-producing conditions. *BMC Biotechnology* [online]. 2014, **14**(1), - [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.1186/s12896-014-0110-z. ISSN 1472-6750. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/14/962>

[34] MUHR, Alexander, Eva Maria RECHBERGER, Anna SALERNO, et al. Novel Description of mcl-PHA Biosynthesis by *Pseudomonas chlororaphis* from Animal-Derived Waste. *Journal of Biotechnology* [online]. 2013, **165**(1), 45-51 [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2013.02.003. ISSN 01681656. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165613000667>

[35] WARD, P. G., G. DE ROO a K. E. O'CONNOR. Accumulation of Polyhydroxyalkanoate from Styrene and Phenylacetic Acid by *Pseudomonas putida* CA-3. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2005, **71**(4), 2046-2052 [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.1128/AEM.71.4.2046-2052.2005. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.71.4.2046-2052.2005>

[36] CHEN, Yawen, Xuemei SHEN, Huasong PENG, Hongbo HU, Wei WANG a Xuehong ZHANG. Comparative genomic analysis and phenazine production of *Pseudomonas chlororaphis*, a plant growth-promoting rhizobacterium. *Genomics Data* [online]. 2015, **4**, 33-42 [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.1016/j.gdata.2015.01.006. ISSN 22135960. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213596015000082>

[37] WALSH, M. Plant Oils and Products of Their Hydrolysis as Substrates for Polyhydroxyalkanoate Synthesis. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* [online]. 2015-7-12, **29**(2), 123-133 [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.15255/CABEQ.2014.2252. ISSN 03529568. Dostupné z: [http://pierre.fkit.hr/hdki/cabeq/pdf/29\\_2\\_2015/Cabeq%202015-02-web%20Walsh.pdf](http://pierre.fkit.hr/hdki/cabeq/pdf/29_2_2015/Cabeq%202015-02-web%20Walsh.pdf)

[38] MORSCHETT, Holger, Wolfgang WIECHERT a Marco OLDIGES. Automation of a Nile red staining assay enables high throughput quantification of microalgal lipid production. *Microbial Cell Factories* [online]. 2016, **15**(1), - [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.1186/s12934-016-0433-7. ISSN 1475-2859. Dostupné z: <http://www.microbialcellfactories.com/content/15/1/34>

[39] Hematologie a transfuzní lékařství. 1. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0

[40] LEGAT, Andrea, Claudia GRUBER, Klaus ZANGGER, Gerhard WANNER a Helga STAN-LOTTER. Identification of polyhydroxyalkanoates in Halococcus and other haloarchaeal species. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2010, 87(3), 1119-1127 [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.1007/s00253-010-2611-6. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-010-2611-6>

[41] SPRING, Kenneth R. Fluorescence Microscopy. *Encyclopedia of Optical Engineering*. 2003, s. 548-555. ISSN 9780824709402. Dostupné z: [http://www.microscopyu.com/references/pdfs/Spring\\_Fluorescence\\_Microscopy.pdf](http://www.microscopyu.com/references/pdfs/Spring_Fluorescence_Microscopy.pdf)

[42] RANSKÁ, Barbora, Michaela LINHOVÁ, Petra PATÁKOVÁ, Leona PAULOVÁ a Karel MELZOCH. Stanovení viability mikroorganismů pomocí fluorescenční analýzy. *Chemické listy*. 2011, roč. 105, s. 586-593. ISSN 1213-7103

[43] MASKOW, Thomas, Susann MÜLLER, Andreas LÖSCHE, Hauke HARMS a Richard KEMP. Control of continuous polyhydroxybutyrate synthesis using calorimetry and flow cytometry. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2006, 93(3), 541-552 [cit. 2016-04-18]. DOI: 10.1002/bit.20743. ISSN 0006-3592. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.20743>

[44] VIDAL-MAS, J., O. RESINA-PELFORT, E. HABA, J. COMAS, A. MANRESA a J. VIVES-REGO. *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. 80(1), 57-63 [cit. 2016-04-18]. DOI: 10.1023/A:1012208225286. ISSN 00036072. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1012208225286>

[45] KACMAR, James, Ross CARLSON, Steven J. BALOGH a Friedrich SRIENC. Staining and quantification of poly-3-hydroxybutyrate in *Saccharomyces cerevisiae* and *Cupriavidus necator* cell populations using automated flow cytometry. *Cytometry Part A* [online]. 2006, 69A(1), 27-35 [cit. 2016-04-18]. DOI: 10.1002/cyto.a.20197. ISSN 1552-4922. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.a.20197>

[46] JULÁK, Jaroslav. Identifikace bakterií metodami instrumentální chemické analýzy. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-451-9

[47] SATO, Harumi, Jiří DYBAL, Rumi MURAKAMI, Isao NODA a Yukihiro OZAKI. Infrared and Raman spectroscopy and quantum chemistry calculation studies of C–H···O hydrogen bondings and thermal behavior of biodegradable polyhydroxyalkanoate. *Journal of Molecular Structure* [online]. 2005, 744-747, 35-46 [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.1016/j.molstruc.2004.10.069. ISSN 00222860. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002228600400835X>

- [48] DE GELDER, Joke, Diana WILLEMSE-ERIX, Maarten J. SCHOLTES, et al. Monitoring Poly(3-hydroxybutyrate) Production in *Cupriavidus necator* DSM 428 (H16) with Raman Spectroscopy. *Analytical Chemistry* [online]. 2008, 80(6), 2155-2160 [cit. 2016-04-19]. DOI: 10.1021/ac702185d. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac702185d>
- [49] CIOBOTĂ, Valerian, Eva-Maria BURKHARDT, Wilm SCHUMACHER, Petra RÖSCH, Kirsten KÜSEL a Jürgen POPP. The influence of intracellular storage material on bacterial identification by means of Raman spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2010, 397(7), 2929-2937 [cit. 2016-04-19]. DOI: 10.1007/s00216-010-3895-1. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-010-3895-1>
- [50] HONG, K., S. SUN, W. TIAN, G. Q. CHEN a W. HUANG. A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 1999-4-23, 51(4), 523-526 [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.1007/s002530051427. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002530051427>
- [51] Wu, Q., Tian, G., Sun, S., Noda, I. and Chen, G.-Q. (2001), Study of microbial polyhydroxyalkanoates using two-dimensional Fourier-transform infrared correlation spectroscopy. *J. Appl. Polym. Sci.*, 82: 934–940. doi:10.1002/app.1925
- [52] HONG, K., S. SUN, W. TIAN, G. Q. CHEN a W. HUANG. A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 1999-4-23, 51(4), 523-526 [cit. 2016-04-18]. DOI: 10.1007/s002530051427. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002530051427>
- [53] CHROMÝ, Vratislav. *Bioanalytika: analytická chemie v laboratorní medicíně*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2002. ISBN 80-210-2917-X.
- [54] SHAMALA, T.R., A. CHANDRASHEKAR, S.V.N. VIJAYENDRA a L. KSHAMA. Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing *Bacillus* spp. using the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2003, 94(3), 369-374 [cit. 2016-04-06]. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.01838.x. ISSN 1364-5072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.2003.01838.x>
- [55] WANG, Yun-Ting, Chia-Yin LEE a Der-Shyan SHEU. Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. *Microbiology* [online]. 2000, 146(8), 2019-2025 [cit. 2016-04-19]. DOI: 10.1099/00221287-146-8-2019. ISSN 1350-0872. Dostupné z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-146-8-2019>

- [56] SOLAIMAN, D. K. Y., R. D. ASHBY a T. A. FOGLIA. Rapid and specific identification of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate synthase gene by polymerase chain reaction. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2000-6-13, 53(6), 690-694 [cit. 2016-04-19]. DOI: 10.1007/s002530000332. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002530000332>
- [57] REVELO ROMO, Dolly Margot; GROSSO, María Victoria; MORENO SOLANO, Nubia Carmenza y MONTOYA CASTANO, Dolly. A most effective method for selecting a broad range of short and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate producing microorganisms. *Electron. J. Biotechnol.* [online]. 2007, vol.10, n.3 [cit. 2016-04-27], pp. 348-357 . Dostupné z: <[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-34582007000300002&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-34582007000300002&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 0717-3458.
- [58] CIESIELSKI, Slawomir, Dorota GÓRNIK, Justyna MOŻEJKO, Aleksander ŚWIĄTECKI, Jakub GRZESIAK a Marek ZDANOWSKI. The Diversity of Bacteria Isolated from Antarctic Freshwater Reservoirs Possessing the Ability to Produce Polyhydroxyalkanoates. *Current Microbiology* [online]. 2014, 69(5), 594-603 [cit. 2016-04-28]. DOI: 10.1007/s00284-014-0629-1. ISSN 0343-8651. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-014-0629-1>
- [59] DESANTIS, T. Z., I. DUBOSARSKIY, S. R. MURRAY a G. L. ANDERSEN. Comprehensive aligned sequence construction for automated design of effective probes (CASCADE-P) using 16S rDNA. *Bioinformatics* [online]. 2003, 19(12), 1461-1468 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1093/bioinformatics/btg200. ISSN 1367-4803. Dostupné z: <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/bioinformatics/btg200>
- [60] SPIEKERMANN, Patricia, Bernd H. A. REHM, Rainer KALSCHEUER, Dirk BAUMEISTER a A. STEINBÜCHEL. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Archives of Microbiology* [online]. 1999-1-14, 171(2), 73-80 [cit. 2016-04-29]. DOI: 10.1007/s002030050681. ISSN 0302-8933. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002030050681>
- [61] BARBAS, Carlos F., Dennis R. BURTON, Jamie K. SCOTT a Gregg J. SILVERMAN. Quantitation of DNA and RNA. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2010, 2007(11), pdb.ip47- [cit. 2016-04-25]. DOI: 10.1101/pdb.ip47. ISSN 1940-3402. Dostupné z: <http://www.cshprotocols.org/lookup/doi/10.1101/pdb.ip47>