

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4101-Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Katedra: Katedra speciální produkce rostlinné

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Metody pro hodnocení životaschopnosti bakterií *Xanthomonas*
euvesicatoria po ošetření nízkoteplotním plazmatem**

Autor diplomové práce: Bc. Marta Zemanová

Vedoucí diplomové práce: Ing. Pavel Beran, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

České Budějovice 2017

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta zemědělská

Akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Marta ZEMANOVÁ**
Osobní číslo: **Z14297**
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**
Název tématu: **Metody pro hodnocení životaschopnosti bakterií *Xanthomonas euvesicatoria* po ošetření nízkoteplotním plazmatem**
Zadávací katedra: **Katedra speciální produkce rostlinné**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Obsah: Desetinné členění s uvedením stran jednotlivých kapitol diplomové práce.

Úvod: Stručný nástin problému a aktuální situace v oblasti ošetřování bakterií nízkoteplotním plazmatem a metod pro zjišťování jejich životaschopnosti.

Literární přehled: Charakteristika a význam použitých bakteriálních druhů, princip metod použitých v diplomové práci, obecný popis přístrojů pro vyvíjení nízkoteplotního plazmatu.

Cíl práce: Jednotlivé cíle diplomové práce shrnuté v bodech.

Materiál a metody: Detailní popis bakteriálních kmenů (původ, kultivace, měření koncentrace), detailní postup jednotlivých použitých metod, přesné hodnoty plazmování, způsob vyhodnocení získaných dat.

Výsledky a diskuse: Vyhodnocení spolehlivosti, přesnosti a náročnosti jednotlivých metod pro zkoumání účinku nízkoteplotního plazmatu na fytopatogenní bakterie, porovnání vlastních výsledků s literárními údaji, posouzení možností praktického uplatnění dosažených výsledků, poznatků a doporučení.

Závěr: Přehledné shrnutí nejdůležitějších poznatků, závěrů a doporučení, vyplývajících z řešené problematiky.

Seznam použité literatury: V abecedním řazení podle ČSN 01 01 97 "Bibliografická citace".

Rozsah grafických prací: 10 - 15 stran

Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Kaprálek F. Fyziologie bakterií. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 1986, 608 s. (Vybrané kapitoly).

Kúdela V., Novacky A., Fucikovský L. Rostlinolékařská bakteriologie. Academia Praha, 2002, 347 s.

Sedláček I. Taxonomie prokaryot. Masarykova univerzita v Brně, 2007, 270 s. (Vybrané kapitoly).

Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Koptíková J. Metody molekulární biologie. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 194 s.

Literární rešerše z databází: AGRIS, Web of Science, Biological Abstracts a další

Vedoucí diplomové práce: Ing. Pavel Beran, Ph.D.

Katedra speciální produkce rostlinné

Konzultant diplomové práce: doc. Ing. Ivan Mráz, CSc.

Datum zadání diplomové práce: 9. března 2015

Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2016


M.Š.

prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studeniská 13
370 05 Česká Budějovice
L.S.


V.Č.

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 9. března 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že předkládanou bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 21. 4. 2017

.....

Bc. Marta Zemanová

Poděkování

Velice ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce Ing. Pavlu Beranovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a trpělivost při vypracovávání diplomové práce. Dále děkuji celé mé rodině za veškerou podporu v průběhu celého studia.

Abstrakt

Práce se zabývá metodami pro hodnocení životaschopnosti fytopatogenní bakterie *Xanthomonas euvesicatoria* po ošetření nízkoteplotním plazmatem. Ke generování plazmatu byl použit experimentální přístroj gliding arc. Viabilita bakteriálních buněk byla sledována pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) a měřením fluorescence prostřednictvím chemické reagensie PrestoBlue v zařízení Smart-DARTTM. Byla optimalizována metodika pro přípravu vzorků k ošetření nízkoteplotním plazmatem a následné vyhodnocení použitými metodami. Prostřednictvím SEM byly prokázány letální účinky gliding arc plazmatu na tuto gramnegativní bakterii. Na povrchu buňky dochází k výrazným strukturálním změnám. Hodnocení životaschopnosti *X. euvesicatoria* pomocí přístroje Smart-DARTTM představuje rychlé, časově nenáročné a levné zhodnocení viability buněk. Velkou výhodou tohoto zařízení je měření fluorescence v reálném čase. Nevýhodou této metody je prozatím její nižší spolehlivost.

Klíčová slova – *Xanthomonas euvesicatoria*; nízkoteplotní plazma; gliding arc; PrestoBlue; resazurin; SEM; Smart-DARTTM

Abstrakt

The thesis deals with methods for viability evaluation of the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas euvesicatoria* after low-temperature plasma treatment. Low-temperature plasma produced by Gliding Arc experimental device was used for treatment of *X. euvesicatoria*. The viability of the bacterial cells was assessed using a scanning electron microscope (SEM) and by measuring of the fluorescence in the Smart-DART™ device using PrestoBlue chemical reagent. Methodology has been optimised for the sample preparation for the treatment by low temperature plasma and used for evaluation of applied methods. Lethal effect of gliding arc plasma to this gram-negative bacteria was verified by SEM – which showed. There is significant structural changes on the cell surface. Viability assessment of *X. euvesicatoria* using Smart-DART™ device is a fast, time-saving and inexpensive evaluation of cell viability. The great advantage of this device is its ability to measure the fluorescence in real time. The disadvantage of this method is lower reliability in current stage of research.

Keywords – *Xanthomonas euvesicatoria*; low-temperature plasma; Gliding Arc; PrestoBlue; resazurin; SEM; Smart-DART™

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Literární přehled.....	10
2.1	Charakteristika <i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	10
2.1.1	Morfologie	10
2.1.2	Hostitelé	10
2.1.3	Význam a výskyt.....	10
2.1.4	Příznaky.....	11
2.1.5	Způsob přenosu a šíření	12
2.1.6	Ochrana	12
2.2	Nízkoteplotní plazma	13
2.2.1	Definice plazmatu	13
2.2.2	Vznik plazmatu	13
2.2.3	Dělení plazmatu	13
2.2.4	Nízkoteplotní plazma získané za atmosférického tlaku	14
2.2.4.1	Gliding Arc Discharge (GAD).....	14
2.2.4.2	Dielektrické bariérové plazma	15
2.2.4.3	Korónový výboj plazmatu	15
2.2.4.4	Jiskrový výboj plazmatu	16
2.2.4.5	Obloukový výboj plazmatu.....	16
2.2.5	Nízkoteplotní plazma získané za sníženého tlaku.....	16
2.2.5.1	Mikrovlnně vázané plazma	16
2.2.5.2	Doutnavý výboj plazmatu.....	17
2.2.6	Faktory ovlivňující sterilizační účinky nízkoteplotního plazmatu.....	17
2.2.7	Mechanismy sterilizačních účinků nízkoteplotního plazmatu	18
2.2.8	Aplikace plazmatu.....	19
2.3	Metody detekce životaschopných buněk.....	20
2.3.1	Chemické reagenty používané k detekci životaschopných buněk.....	20
2.3.1.1	Tetrazolium	20
2.3.1.2	Resazurin	20
2.3.2	Smart-DART™	21
2.3.3	Elektronová mikroskopie	22
2.3.3.1	Transmisní elektronový mikroskop (TEM)	23
2.3.3.2	Skenovací elektronový mikroskop (SEM).....	23
2.3.3.3	Další typy elektronové mikroskopie	24

3	Cíle práce	25
4	Materiál a metody	26
4.1	Kultivační podmínky <i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	26
4.2	Hodnocení životaschopnosti přístrojem Smart-DART™	26
4.2.1	Příprava vzorků k ošetření nízkoteplotním plazmatem.....	26
4.2.2	Ošetření <i>X. euvesicatoria</i> nízkoteplotním plazmatem	27
4.2.3	Vyhodnocení vzorků po ošetření nízkoteplotním plazmatem.....	27
4.3	Hodnocení životaschopnosti prostřednictvím SEM	28
4.3.1	Příprava vzorků k ošetření nízkoteplotním plazmatem.....	28
4.3.2	Ošetření <i>X. euvesicatoria</i> nízkoteplotním plazmatem	28
4.3.3	Příprava vzorků pro SEM	28
4.3.4	Pozorování objektů v SEM	29
5	Výsledky a diskuze	30
6	Závěr	33
7	Seznam použité literatury.....	34
8	Tabulky	42
9	Obrázky	44

1 Úvod

Plazmové technologie se v současné době stále více uplatňují v zemědělství jako jedna z možností fyzikální ochrany rostlin. Bylo prokázáno, že nízkoteplotní plazma má dekontaminační a sterilizační účinky na celou řadu patogenů včetně fytopatogenních bakterií. Nyní se výzkum soustřeďuje na ochranu potravin proti různým patogenním mikroorganismům a na účinky nízkoteplotního plazmatu po ošetření povrchu semen (zrn) různých kulturních plodin. Velkou výhodou plazmových technologií využívaných k ošetření povrchu rostlin, potravin či semen je jejich šetrnost. Nezpůsobuje žádná mechanická poškození a nevyužívá žádných chemických látek (Dobrin a kol., 2015).

Stanovení životaschopných neboli viabilních buněk je důležité pro hodnocení účinků nízkoteplotního plazmatu na patogenní organismy. Tradiční a zároveň nejčastější metodou pro sledování životaschopných buněk je kultivace mikroorganismů na pevných médiích. Nevýhodou této metody je její časová náročnost a poměrně vysoká možnost vzniku kontaminace. Rychlejší a přesnější získání výsledků nabízejí molekulárně biologické metody. Ty jsou však časově a finančně náročné. Využití polymerázové řetězové reakce (PCR) pro stanovení životaschopných buněk je možné pouze ve spojení s barvivem ethidium bromid monoazide (EMA) či podobných barviv. Toto barvivo však může pronikat i živými buňkami. V současné době jsou preferovány metody, které hodnotí životaschopnost buněk pomocí fluorescence. Jednoznačné letální účinky gliding arc plazmatu na mikroorganismy poskytuje elektronová mikroskopie. Hlavním limitujícím faktorem této metody je její finanční náročnost.

2 Literární přehled

2.1 Charakteristika *Xanthomonas euvesicatoria*

Xanthomonas euvesicatoria Jones et al., 2004 (syn. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye) způsobuje bakteriální skvrnitost rajčete a papriky (Sherf a MacNab, 1986). V ČR a EU se řadí mezi karanténní organismy (Kůdela a kol., 2002).

Patogen způsobující bakteriální skvrnitost byl identifikován v roce 1921 v jižní Africe E. M. Doidge. Bakterie byla detekovaná na rajčeti a pojmenována jako *Bacterium vesicatorium* (Jones a kol., 2004).

2.1.1 Morfologie

X. euvesicatoria patří mezi gramnegativní, přísně aerobní, oxidativní, nesporující bakterie. Buňky jsou krátké, tyčinkovitého tvaru o velikosti 0,4-0,6 x 1,0-1,8 µm. Vyskytují se buď samostatně, nebo ve dvojicích. Pohyb je zajištěn jedním polárním bičíkem (monotrich). Na kultivačním médiu *X. euvesicatoria* vytváří hladké, mírně slizovité (mukoidní) kolonie žluté barvy. Žlutý pigment se nazývá xanthomonadin, který produkuje exopolysacharid xanthan. Tento heteropolysacharid se využívá v různých průmyslových odvětvích. Optimální růstová teplota je 25 až 27 °C o pH 7,2 (Schaad a Stall, 1989; Swings a Civerelo, 1993; Kůdela a kol., 2002). *X. euvesicatoria* vykazuje slabě amylolytickou a pektolytickou aktivitu (Scortichini a kol., 2013).

2.1.2 Hostitelé

Ekonomicky nejvýznamnější hostitelé *X. euvesicatoria* jsou rajče (*Lycopersicon* spp.) a paprika (*Capsicum* spp.). Patogen může napadat i některé další rostliny z čeledi *Solanaceae* (lilkovité). Především napadá plevelné rostliny např., blín (*Hyoscyamus* spp.), durman (*Datura* spp.), kustovnici (*Lycium* spp.), lilek (*Solanum* spp.), mochyň (*Physalis* spp.) a tabák selský (*Nicotiana rustica*) (Hayward a Waterson, 1964).

2.1.3 Význam a výskyt

Patogen bakteriální skvrnitosti rajčete a papriky je závažným onemocněním v tropických a subtropických oblastech (Argentina, Austrálie, Egypt, Indie, Nigérie a USA). Onemocnění způsobuje značné ekonomické ztráty. Napadené plody jsou

poškozeny korkovitými skvrnami a tudíž jsou neprodejné. V České republice způsobuje *X. euvesicatoria* velké škody na jižní Moravě (Dougherty, 1979; Bashan a kol., 1985). Výskyt patogenu je hlášen ze všech pěti kontinentů.

Evropa: Belgie, Bělorusko, Bulharsko, Česká republika, Francie, Chorvatsko, Itálii (včetně Sardinie a Sicílie), Maďarsko, Monako, Německo, Polsko, Rakousko, Rumunsko, Rusko (evropská část), Řecko, Slovensko, Slovinsko, Španělsko, Švýcarsko, Turecko (evropská část).

Asie: Čína, Filipíny, Indie, Izrael, Japonsko, Kazachstán, Severní Korea, Jižní Korea, Pákistán, Rusko (asijská část), Tchaj-wan, Thajsko, Turecko (asijská část).

Afrika: Egypt, Etiopie, JAR, Keňa, Malawi, Maroko, Mozambik, Niger, Nigérie, Réunion, Senegal, Seychely, Súdán, Togo, Tunisko, Zambie a Zimbabwe.

Severní Amerika: Bermudy, Kanada, Mexiko, USA.

Střední Amerika a Karibské ostrovy: Barbados, Dominika, Dominikánská republika, Guadeloupe, Guatemala, Honduras, Jamajka, Kostarika, Kuba, Martinik, Nikaragua, Portoriko, Salvador, Svatý Kryštof a Nevis, Svatý Vincenc, Trinidad a Tobago.

Jižní Amerika: Argentina, Brazílie, Chile, Kolumbie, Paraguay, Surinam, Uruguay, Venezuela.

Austrálie a Oceánie: Nový Jižní Wales, Queensland, Tasmánie, Victoria, Západní Austrálie, Fidži, Mikronésie, Nový Zéland, Palau a Tonga (OEPP/EPPO, 1988).

2.1.4 Příznaky

Patogen napadá všechny nadzemní části rostlin rajčete a papriky. První příznaky onemocnění se objevují na spodní straně listů. Zpočátku se jedná o malé vodnaté skvrny s nepravidelným černým středem a žlutým ohraničením. Později se objevují chlorotické léze o velikosti 0,2-0,5 cm. Listy jsou zkroucené, nekrotizují a nakonec opadávají (Obr. 1). Na stoncích se objevují podlouhlé chlorotické léze. Na plodech rajčat a paprik se na počátku onemocnění objevují malé vodnaté léze se světle zeleným chlorotickým prstencem (tzv. halo). Léze se postupně zvětšují (0,2-1 cm), hnědnou a nekrotizují (Obr. 2). Tyto léze nepronikají hluboko do plodů a vytvářejí strupovitý povrch. Příznaky způsobené *X. euvesicatoria* lze zaměnit s příznaky vyvolanými bakterií *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Goode a Sasser, 1980; Venette a kol., 1996; Kúdela a kol., 2002; Sun a kol., 2002).

2.1.5 Způsob přenosu a šíření

Patogen přežívá na povrchu i uvnitř semen. Tím je zajištěna dlouhá doba přežití, až 10 let. Dále bakterie přežívají v posklizňových zbytcích, půdě a na kořenech nehostitelských rostlin (Bashan a kol., 1982). Do hostitelské rostliny patogen proniká buď přímo, přes přirozené otvory (hydatodami, průduchy) nebo nepřímo, přes poranění (vpichy po hmyzu, oděrkami způsobené větrem, deštěm, kroupami nebo oděrkami vzniklými mechanickými prostředky). Vhodnými podmínkami pro šíření patogenu je vysoká vzdušná vlhkost (85 %), vysoké teploty nad 30 °C a silné větrné deště (Diab a kol., 1982a,b; Pohronezny a kol., 1990). Patogen se rovněž může šířit vzdušnými proudy (McInnes a kol., 1988).

2.1.6 Ochrana

Ochranná opatření proti tomuto patogenu jsou založena především na prevenci. Ta spočívá v používání certifikovaného osiva, dodržování hygienických zásad, střídání hostitelských rostlin a zabránění poranění rostliny (Goode a Sasser, 1980). Současná chemická ochrana je zaměřena na používání měďnatých sloučenin a acylbenzolar-S-methylu. Pro zvýšení bakteriocidních účinků mědi se doporučuje měďnaté prostředky kombinovat např., s manebem nebo zinebem v několikadenních intervalech (Dougherty, 1979; Stall a Thayer, 1962; EFSA, 2014). Moss a kol., (2007) uvádějí ve své studii možnost využití *hrp* mutantů *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* jako biologické ochrany proti bakteriální skvrnitosti (Moss a kol., 2007). Dále lze jako biologickou ochranu použít antagonistické kmeny bakterií *Rahnella aquatilis*, *Pseudomonas putida* a *Pseudomonas syringae* (Campbell a kol., 1998; El-Hendawy a kol., 2005). V současné době se využívají i odrůdy rezistentní vůči bakteriální skvrnitosti rajčete a papriky (Ritchie, 2002; Moss a kol., 2007). Také lze uměle navodit indukovanou systémovou rezistenci (IRS) proti patogenu bakteriální skvrnitosti pomocí *Trichoderma* spp. Tato houba je schopna kolonizovat kořenový systém rajčat (Fontenelle a kol., 2011).

2.2 Nízkoteplotní plazma

2.2.1 Definice plazmatu

Plazma je částečně nebo zcela ionizovaný plyn. Je složeno z částic, které jsou v trvalé interakci s elektrickým polem. Tyto částice zahrnují fotony, elektrony, kladné a záporné ionty, volné radikály, atomy a molekuly (elementární a excitované). Elektrony a fotony se považují za lehké částice, kdežto ostatní částice za těžké. Plazma je často označováno za čtvrté skupenství látek a tvoří více než 99 % hmoty vesmíru (Chen, 1984; Stach, 1989).

2.2.2 Vznik plazmatu

Plazma vzniká buď zahříváním, nebo různými elektrickými výboji. Zahříváním se plazma vytváří chemicky nebo smršťováním objektu. Chemicky je plazma vytvářeno oxidací (hořením) nebo termojadernou syntézou. Smršťováním objektu je plazma vytvářeno gravitací či elektrickým polem. Dále je plazma vytvářeno různými elektrickými výboji. Při průchodu elektrického proudu (střídavého nebo stejnosměrného) vzniká elektrický výboj. Základem vzniku elektrického výboje je interakce jednotlivých částic plazmatu s elektrickým polem (Kleczek, 1968; Stach, 1989).

Chování plazmatu určuje stupeň ionizace a velmi závisí na teplotě. Ve slabě ionizovaném plazmatu je koncentrace nabitých částic velmi nízká oproti koncentraci neutrálních molekul. Naopak je tomu u silně ionizovaného plazmatu, kdy koncentrace nabitých částic je vyšší než koncentrace neutrálních molekul (Chen, 1984).

2.2.3 Dělení plazmatu

Klasifikace plazmatu je založena na relativních energetických hladinách elektronů, elektronové hustotě a těžkých částic obsažených v plazmatu. Obecně se rozlišují dva základní druhy plazmatu, vysokoteplotní plazma (thermal) a nízkoteplotní plazma (non-thermal, low-temperature) (Tendero a kol., 2006; Misra a kol., 2011).

Pro vysokoteplotní plazma (thermal) je charakteristické, že elektrony mají přibližně stejnou teplotu jako těžké částice. Mezi elektrony a těžkými částicemi je téměř ustanovena termodynamická rovnováha. Tato teplota může být velmi vysoká

($10^6 - 10^8$ K). Také hustota elektronů je velmi vysoká ($10^{21} - 10^{26} \text{ m}^{-3}$). Vysokoteplotní plazma se získává za vysokého tlaku a pro jeho vytvoření je potřeba značná energie. Tento typ plazmatu se nachází ve hvězdách, v plazmatických hořácích a setkáváme se s ním v experimentech při termojaderné syntéze (Fridman a kol., 1999; Tendero a kol., 2006; Moreau a kol., 2008).

Pro nízkoteplotní plazma (non-thermal (NTP), low-temperature) je charakteristické, že teplota elektronů je mnohem vyšší, než je teplota těžkých částic. Teplota elektronů je přibližně 10 000 až 100 000 K, kdežto teplota těžkých částic je 300 až 1000 K. Elektronová hustota je oproti vysokoteplotnímu plazmatu nízká ($< 10^{19} \text{ m}^{-3}$). Dále se vyznačuje nízkým stupněm ionizace. Nízkoteplotní plazma se získává za atmosférického nebo sníženého tlaku (vakuum) a vyžaduje méně energie. Nachází se např. v zářivkách, výbojkách a v elektrickém oblouku (Moreau a kol., 2008; Misra a kol., 2011). V této práci bylo použito nízkoteplotní plazma za atmosférického tlaku.

2.2.4 Nízkoteplotní plazma získané za atmosférického tlaku

2.2.4.1 Gliding Arc Discharge (GAD)

Technika GAD neboli klouzavý obloukový výboj se nachází na rozhraní vlastností nízkoteplotního a vysokoteplotního plazmatu. Proto bývá často označována za třetí kategorii plazmatu. Plazma je vytvářeno za podmínek atmosférického tlaku a okolní teploty. Pro plazmatický výboj je charakteristická vysoká hustota plazmatu a využívá velmi vysoké elektrické energie. V roce 1988 Lesueur a jeho kolegové patentovaly princip techniky GAD. Dále byla tato technika rozvíjena Czernichowski a jeho kolegy. V současné době se gliding arc považuje za pokročilou oxidativní techniku se sterilizačními účinky (Moreau a kol., 2008). Gliding arc způsobuje významné strukturální změny v bakteriální membráně (Moreau a kol., 2007).

Přístroj gliding arc se skládá ze dvou či více rozcházejících se kovových elektrod (měď, hliník), které zvyšují rozdíl potenciálu. Dále se skládá ze dvou generátorů, vysokovoltážního (5000 V) a sekundárního zdroje (1000 V). Vysokovoltážní zdroj se uplatňuje při počátku výboje, kde poskytuje dostatečně vysoké elektrické napětí k vytvoření elektrického pole. Do obvodu je nutné zapojit proměnlivý rezistor ($R = 0 - 25 \Omega$) (Obr. 3). Vývoj gliding arc se skládá se tří fází:

iniciační fáze (break down), rovnovážného a nerovnovážného stavu. Při iniciační fázi je do mezery mezi elektrodami za určitého tlaku vehnán plyn (většinou vlhký vzduch nebo argon). Ten klouže podél elektrod, dokud v nejužším místě elektrod nevznikne obloukový klouzavý elektrický výboj (Obr. 4). Vzniklý výboj se prodlužuje, dokud nevystoupí nad elektrody. Poté se výboj ihned přeměňuje a vstupuje do nového cyklu. (Fridman a kol., 1999; Moreau a kol., 2008).

V plazmatu gliding arc vznikají těžké reaktivní částice. Radikály OH a NO jsou hlavní částice vznikající ve výboji vytvořeném při použití vlhkého vzduchu. Hydroxilový radikál (OH⁻) je zodpovědný za silný oxidační účinek na bakteriální buňku. Tento radikál je v plazmatu obsažen ve velkém množství. Oxid dusnatý (NO⁻) způsobuje kyselinotvorný účinek. Volné radikály významně ovlivňují permeabilitu bakteriální membrány, transmembránový potenciál a intracelulární pH (Benstaali a kol., 1998a,b; Moreau a kol., 2007).

2.2.4.2 Dielektrické bariérové plazma

Dielektrický bariérový výboj vzniká v mezeře mezi dvěma kovovými elektrodami. Ty jsou od sebe vzdáleny 1 cm a jsou napájeny střídavým napětím. Alespoň na jedné z elektrod je vhodná dielektrická vrstva (sklo, křemen, keramika, polymer). Ta zabrání transportu náboje a tvorbě jisker. Obvykle pracují při frekvencích mezi 0,05 a 500 kHz. Bariérové výboje lze rozdělit na objemové a povrchové. Tento typ výboje byl dříve označován jako tichý výboj (Bogaerts a kol., 2002; Scholtz, 2012, 2015). Technologie založené na dielektrickém bariérovém plazmatu se užívají v generaci ozónu z atmosféry, jako UV zdroj v lampách a v biologických disciplínách jako prostředek k ničení mikroorganismů. (Fridman a kol., 2005; Tendero a kol., 2006).

2.2.4.3 Korónový výboj plazmatu

Korónový výboj je také nazýván jako Eliášův oheň. Jedná se o samostatný, slabě světélkující elektrický výboj. Koróna vzniká v silně nehomogenním elektrickém poli, které je vytvářeno v okolí ostrých hrotů či tenkých drátů, tj. elektrody s malým poloměrem křivosti. V důsledku toho je dosaženo vysoké intenzity elektrického pole, ve kterém dochází ke vzniku lokálních elektronových lavin a lokálnímu průrazu. Koróna tak ke svému vzniku nepotřebuje žádný vnější zdroj nosičů náboje. Základní vlastnosti tohoto výboje určuje polarita korónující

(hrotové) elektrody a druhu připojeného napětí. Podle polarit y lze rozlišit unipolární (kladná nebo záporná) a bipolární korónu. Většinou vzniká unipolární koróna, kde je proud ve vnější oblasti výboje tvořen ionty stejného náboje oproti koróně vznikající na dvou elektrodách. (Fridman a kol., 2005; Moreau a kol., 2008; Scholtz, 2012). Korónový výboj je využíván pro velké množství aplikací, například ošetření povrchů, kapalin a aerosolů (Chang a kol., 1991; Bellakhal a kol., 1997a,b).

2.2.4.4 Jiskrový výboj plazmatu

Jiskrový oblouk vzniká z korónového výboje, pokud napětí mezi elektrodami dosáhne hodnoty potřebné pro lavinovitou tepelnou ionizaci, tzv. hodnoty průrazného napětí. Jiskrový oblouk má krátkou dobu trvání a má charakter klikatých, tenkých jasně svítících a rozvětvlujících se nitek nebo kanálů. Tyto nitky či kanály vznikají buď přímo na elektrodách, nebo v prostoru mezi elektrodami a mají vysokou teplotu (10^4 K) a tlak (10^7 Pa). Jedná se o nehomogenní typ výboje. Při tepelné ionizaci dochází k rozpínání plynu, kde vzniká jiskra a dochází ke vzniku různých zvukových jevů (praskání). Blesk je příkladem mohutného jiskrového výboje v přírodě. Napětí mezi mrakem a zemí dosahuje 10^9 V. V laboratorních podmínkách lze demonstrovat jiskrový oblouk Ruhmkorffovým transformátorem (Stach, 1989).

2.2.4.5 Obloukový výboj plazmatu

Pro obloukový výboj je charakteristická vysoká teplota katody, velká proudová hustota v okolí katody, vysoký elektrický proud (1 A až 10^5 A), nízké napětí (60 V) a intenzivní vyzařování světla při výboji. Elektrický obvod je tvořen dvěma uhlíkovitými elektrodami a sériově zapojeným rezistorem, který stabilizuje výboj. Elektrony vznikají mezi elektrodami tepelnou ionizací. Dále vznikají kladné ionty, které se v elektrickém poli pohybují směrem ke katodě, a tím udržují vysokou teplotu potřebnou pro vznik elektronů tepelnou ionizací. Obloukový výboj se využívá v tavicích pecích a při obloukovém svařování. Vysoké teploty elektrod při obloukovém výboji se využívají v plazmových hořácích, tzv. plazmatrony (Stach, 1989).

2.2.5 Nízkoteplotní plazma získané za sníženého tlaku

2.2.5.1 Mikrovlnně vázané plazma

Mikrovlnně vázané plazma je generováno v magnetronu (speciální elektronka) pomocí elektromagnetických vln o vysokých frekvencích 1 – 5,6 GHz (obvykle 2,45 GHz).

Elektromagnetické vlny jsou v rezonanci. Potřebný příkon k vytvoření plazmatu je až 200 W. Mikrovlnný zářič je umístěn v reaktoru, kde se nachází plyn. Anténa přenáší energii do pracovního plynu, který je ihned přeměněn v plazma (Aubrecht, 2003; Tendero a kol., 2006; Scholtz a kol., 2015). Ke generaci plazmatu se používají především následující pracovní plyny: kyslík, oxid dusný, helium a argon. Moisan a kol. (2002) uvádí, že mikrovlnné plazma je účinné pouze ve spolupráci mezi UV zářením a chemickými složkami plazmatu. První pokusy s technikou mikrovlnně vázaného plazmatu začaly ve druhé polovině 20. století (Moreau a kol., 2008). V současné době je již tato technika certifikována pro medicínské využití (Scholtz a kol., 2015). Oproti technice gliding arc jsou systémy využívající k vytvoření plazmatu mikrovlnné výboje velmi nákladné (Moreau a kol., 2007).

2.2.5.2 Doutnavý výboj plazmatu

Jedná se o samostatný typ elektrického výboje v plynu. Doutnavý výboj vzniká za sníženého tlaku (10^2 až 10^3 Pa) ve výbojové trubici se studenou katodou. Z této trubice je postupně odčerpáván vzduch a při dostatečně vysokém rozdílu potenciálu vzniká mezi dvěma elektrodami doutnavý výboj. Do obvodu je nutné zapojit rezistor, jelikož v důsledku výboje klesne mezi elektrodami napětí. To je mezi elektrodami rozloženo nerovnoměrně. Doutnavý výboj je charakterizován poměrně malými proudy. Technika využívající doutnavý výboj se uplatňuje při vytváření tenkých vrstev a úpravě povrchů (Stach, 1989; Bogaerts a kol., 2002).

2.2.6 Faktory ovlivňující sterilizační účinky nízkoteplotního plazmatu

Antimikrobiální účinnost nízkoteplotního plazmatu (NTP) je ovlivněna procesními parametry plazmatu, chemickými vlastnostmi a vlastnostmi mikroorganismů (Liao a kol., 2017).

Mezi důležité procesní parametry ovlivňující letální efekt plazmatu patří elektrické napětí a frekvence (kmitočet). Vyšší účinnosti plazmatu je dosaženo při vyšším elektrickém napětí a kmitočtu, kdy je produkována vyšší vstupní hustota energie. Dalším důležitým parametrem je režim expozice. Bylo prokázáno, že přímé působení plazmatu má vyšší sterilizační účinky než nepřímá expozice (Fridman a kol., 2007). Dále mezi fyzikální parametry ovlivňující efekt nízkoteplotního plazmatu patří délka ošetření, průtok a typ pracovního plynu. Ke generaci plazmatického výboje se využívají různé druhy pracovních plynů (O_2 , N_2 , vzduch,

H₂, halogeny, N₂O, H₂O, H₂O₂, CO₂, SO₂, SF₆, aldehydy) či jejich kombinace (O₂/Ar, O₂/CF₄, CO₂/CF₄) (Nelson a Berger, 1989; Chau a kol., 1996; Hury a kol., 1998).

Mezi chemické vlastnosti mající vliv na sterilizační účinek plazmatu patří pH, relativní vlhkost vzduchu a typ ošetřovaného povrchu. Vlhkost vzduchu má velký vliv na vznik reaktivních částic, zejména OH radikálů vykazujících velký inaktivační účinek (Guo a kol., 2015).

Efektivnost sterilizace nízkoteplotním plazmatem ovlivňuje také typ mikroorganismu. V mnoha studiích bylo zjištěno, že grampozitivní bakterie jsou více odolné vůči ošetření nízkoteplotním plazmatem nežli gramnegativní bakterie (Moisan a kol., 2001; Moreau a kol., 2008; Ermolaeva a kol., 2011; Liao a kol., 2017).

2.2.7 Mechanismy sterilizačních účinků nízkoteplotního plazmatu

Rozlišují se biologické a fyzikální mechanismy sterilizačních účinků nízkoteplotního plazmatu (NTP). Velký význam v inaktivačním mechanismu NTP mají reaktivní částice, zejména NO, NO₂, O, O₃, OH (Laroussi, 2005). Podle několika studií je hlavním faktorem pro mikrobiální inaktivaci reaktivní kyslík. Ten je aktivně transportován přes membránu buněk a způsobuje oxidační poškození intracelulárních komponent buňky (nukleových kyselin, proteinů, lipidů, sacharidů atd.). Dále reaktivní kyslík hraje významnou roli signální molekuly v různých biologických drahách. V buňce indukuje oxidativní stres a programovanou buněčnou smrt (apoptóza). Doporučuje se krátké ošetření NTP, aby došlo k bakteriocidním účinkům reaktivního kyslíku (Liao a kol., 2017). Rovněž reaktivní dusík má velký význam na sterilizační účinek NTP. Ten způsobuje kyselinotvorný efekt (Weltmann a von Woedtke, 2011). Podle Deng a kol. (2006) je dosaženo účinnější sterilizace při použití pracovního plynu čistého helia než jeho kombinace s kyslíkem. Dále sterilizační účinek NTP spočívá v indukci UV záření při interakci s mikroorganismy. Fotony UV záření dopadající na buňky organismů jsou nukleovou kyselinou absorbovány a dochází k tvorbě thyminového dimeru. Tato mutace má letální účinek na buňku. Bakteriální buňky nejsou schopny replikace.

Hromaděním nabitých částic v plazmatickém výboji vznikají elektrostatické síly. Ty způsobují narušení buněčné membrány a poté buněčnou smrt. Rovněž elektrické pole vznikající v plazmatu má antimikrobiální efekt. Působením

dostatečně silného elektrického pole dochází v membráně buněk ke vzniku pórů a následné buněčné smrti. Tento mechanismus sterilizačních účinků NTP však není příliš prozkoumán. Poškození buněk vyvolané působením NTP nemusí ihned znamenat buněčnou smrt. Bylo zjištěno, že ošetřené buňky jsou životaschopné, ale nekultivovatelné (Misra a kol., 2011; Guo a kol., 2015; Liao a kol., 2017).

2.2.8 Aplikace plazmatu

Nízkoteplotního plazmatu se využívá k likvidaci různých bakteriálních patogenů. Nízkoteplotní plazma efektivně ničí fytopatogenní bakterie *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* a *Erwinia chrysanthemi* (Moreau a kol., 2005). Dále se využívá mikrobicidního účinku nízkoteplotního plazmatu k ničení oportunních bakterií *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes* vyskytujících se běžně v nemocničních zařízeních a způsobujících infekce ran (Yang a kol., 2009; Ermoleava a kol., 2011). Rovněž se technika nízkoteplotního plazmatu s úspěchem využívá k ničení spor bakterie *Bacillus subtilis* (Moreau a kol., 2000; Boudam a kol., 2006) a významné patogenní bakterie *Escherichia coli*, jež kontaminuje různé druhy potravin, vodu a rovněž se běžně vyskytuje v nemocničních zařízeních (Ermoleava a kol., 2011; Gurol a kol., 2012). Rovněž ve studii Niemira (2012) byl prokázán antimikrobiální vliv nízkoteplotního plazmatu za atmosférického tlaku na *E. coli* a také *Salmonella* na povrchu mandlí a arašídů (Niemira a kol., 2012). Studie Pasquali a jeho kolegů (2015) prokazuje dekontaminační účinek nízkoteplotního plazmatu (dielektrické bariérové plazma) vůči *E. coli* na povrchu listů *Cichorium intybus* (Pasquali a kol., 2015).

Plazmové technologie se využívají i při ošetření osiva. Mají pozitivní vliv na klíčivost semen (zrn), růst a vývoj rostlin. Ve studii Kuchtova a kol. (2013) byly ošetřovány semena máku setého (*Papaver somniferum*) pomocí gliding arc (Kuchtova a kol., 2013). Ve studii Dobrin a kol. (2015) byl rovněž prokázán pozitivní vliv plazmatu na zrna pšenice seté (*Triticum aestivum*). V současné době se provádějí studie zaměřené na ošetření čerstvých potravin nízkoteplotním plazmatem vůči patogenům po jejich vložení do obalu. Pozitivní účinek tohoto ošetření byl prokázán u jahod (*Fragaria ananasa*) a cherry rajčat. Vliv na kvalitu ošetřených potravin nízkoteplotním plazmatem nebyl prokázán a u cherry rajčat rovněž došlo k inaktivaci enzymu peroxidázy (Misra a kol., 2014a,b).

2.3 Metody detekce životaschopných buněk

2.3.1 Chemické reagensie používané k detekci životaschopných buněk

K detekci životaschopných eukaryotických buněk, kvasinek a bakterií se používají oxidačně redukční indikátory, tetrazolium a resazurin. Ty jsou založeny na mitochondriální enzymové aktivitě buněk.

2.3.1.1 Tetrazolium

V metabolicky aktivních buňkách se modrá sloučenina tetrazolium, za účasti dehydrogenačních enzymů, mění na různě barevnou sloučeninu formazen. Podle užití tetrazoliové sloučeniny může být oranžový nebo fialový (Lall a kol., 2013). Ke kvantitativnímu stanovení životaschopnosti a cytotoxicity buněk se používají různé tetrazoliové sloučeniny. Nejčastěji se užívají následující: MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-3,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide], MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium], XTT [2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide] a WST-1 (Water soluble tetrazolium salts). Ty se dále rozdělují podle náboje (Berridge a kol., 1996).

MTT je sloučenina s kladně nabitým nábojem. Snadno proniká do metabolicky aktivních buněk. Zde se za účasti NAD(P)H redukuje na fialovou sloučeninu formazen a vytváří v buňce nerozpustný krystal. Ten se dále za pomoci organických rozpouštědel a speciálních postupů rozpouští. Životaschopnost buněk se stanovuje měřením absorbance. Tato chemická reagensie je široce využívána již od roku 1983 (Riss a kol., 2013; Xu a kol., 2015).

MTS, XTT a WTS-1 jsou naopak sloučeniny se záporným nábojem. Velmi těžko pronikají do metabolicky aktivních buněk, kde se však samostatně rozpouštějí. XTT tetrazoliová sloučenina se redukuje na oranžový formazen. Často využívají akceptor elektronů (NADH a NADPH), jenž přenáší elektrony z cytoplazmy nebo plazmatické membrány k usnadnění redukce tetrazolium na formazen (Riss a kol., 2013).

2.3.1.2 Resazurin

Resazurin (sodná sůl) je slabě fluorescenční netoxická sloučenina modrofialového zabarvení. V metabolicky aktivních buňkách se za účasti

dehydrogenačních enzymů (NADPH, FADH, FMNH, NADH a cytochromů) mění na resorufin, silně fluorescenční sloučeninu růžové barvy (Obr. 5). Z těchto enzymů přijímá elektrony. Touto barevnou změnou lze rychle vizuálně odlišit životaschopné buňky (McNicholl a kol., 2006; Sarker a kol., 2007; Xu a kol., 2015).

Pomocí absorbance či fluorescence lze resorufin kvantitativně měřit a následně stanovit životaschopnost buněk (Lall a kol., 2013). Množství resorufinu je přímo úměrné počtu životaschopných buněk ve vzorku v daném čase. Při fluorescentním stanovení jsou životaschopné buňky detekovány při použití excitační vlnové délky 530-600 nm a emisní vlnové délky 590-615 nm. Absorbance je detekována v rozsahu vlnových délek 570-600 nm. Velkou výhodou indikátoru resazurinu oproti tetrazoliovým látkám je jeho větší citlivost, krátká inkubační doba a poměrně nízká cena. Rovněž přesněji stanovuje minimální inhibiční koncentraci (MIC). Při fluorescentním vyhodnocení testu je zde možnost fluorescentního rušení z testované sloučeniny (Riss a kol., 2013).

Na této chemické látce jsou založeny komerční výrobky PrestoBlue a almarBlue. Na rozdíl od výrobku almarBlue, jehož inkubační doba je 1 – 4 hodiny, má PrestoBlue velmi krátkou inkubační dobu (≥ 10 minut) (Invitrogen, 2012; Lall a kol., 2013). Chemická reagentie PrestoBlue byla použita k hodnocení životaschopnosti bakterie *X. euvesicatoria* v této práci.

2.3.2 Smart-DART™

Zařízení Smart-DART™ je určeno pro rychlou detekci specifických DNA nebo RNA fragmentů. Přístroj je navržen tak, aby mohl pracovat i bez napájení ze sítě a zajišťoval stálé teplotní podmínky (probíhá izotermický děj). Životnost baterie je až 5 hodin. Úspěšně se používá s amplifikační metodou LAMP (Loop mediated isothermal amplification). Ve studii Yasuhara-Bell a jeho kolegů (2016) byla tato amplifikační metoda ve spojení s přístrojem Smart-DART™ úspěšně využita k detekci fytopatogenní bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* v polních podmínkách. Dále je možné přístroj využít ve spojení s amplifikační metodou RPA (Recombinase polymerase amplification) a NEAR (Nicking enzyme amplification reaction).

Přístroj umožňuje analyzovat 8 vzorků za periodického měření fluorescence v reálném čase. V zařízení lze nastavit potřebnou teplotu a periodicitu měření fluorescence (Keremane a kol., 2015; Yasuhara-Bell a kol., 2016). Těto funkce

přístroje bylo využito pro hodnocení životaschopnosti bakteriálních buněk *X. euvesicatoria* po ošetření NTP.

Přístroj je ovládán přes bezdrátové rozhraní (Bluetooth) prostřednictvím vlastní aplikace fungující na operačním systému Android (Obr. 6). Vzorky ve zkumavkách typu eppendorf (0,5 ml) jsou umístěny do očíslovaných jamek zleva doprava a poté zakryty víkem. V tomto směru je čtena hodnota fluorescence. Ta je zaznamenávána ve dvou optických spektrech (F1 nebo F2). Optické spektrum F1 je 470 nm/550 nm a optické spektrum F2 je 525 nm/600 nm. Reakce je označena jako pozitivní pokud je pozorován trvalý růst fluorescence přesahující prahovou hodnotu vzhledem k počátečnímu šumu pozadí. Během reakce lze kontrolovat teplotu zařízení, aktuální čas reakce a stav baterie. Získaná data jsou odesílána přes bluetooth do mobilního zařízení (tablet, smartphone). Naměřené hodnoty fluorescence jsou zaznamenávány v reálném čase do grafu a uloženy v přenosném zřízení. Poté lze data poslat například na e-mail (Indiegogo, 2015; Keremane a kol., 2015).

2.3.3 Elektronová mikroskopie

Roku 1931 E. Ruska zkonstruoval první jednoduchý transmisní elektronový mikroskop. Za svůj objev získal Nobelovu cenu (1986). Při konstrukci vycházel z teoretických a experimentálních poznatků E. Abbeho a Louise de Broglie, který v roce 1925 formuloval základy vlnové mechaniky. Na základě výzkumné práce C. W. Oatleyho byl v roce 1965 představen první komerční skenovací mikroskop (Cais, 2015).

Elektronový mikroskop je optický přístroj velmi podobný klasickému světelnému mikroskopu. Fotony jsou nahrazeny elektrony a skleněné čočky elektromagnetickými čočkami. Ty představují cívky vytvářející magnetické pole. Pracovním prostředím elektronového mikroskopu je vakuum (minimálně 10^{-3} až 10^{-5} Pa). Elektrony jsou emitovány elektronovou tryskou (autoemisní katoda). Ta je tvořena wolframovým drátkem ve tvaru písmene V a je obklopena válcem, vytvářejícím elektrické pole. Proti katodě je umístěna anoda s kovovým otvorem, kudy proletí urychlený svazek elektronů. Dále prochází soustavou elektromagnetických čoček a poté preparátem. Důležitým parametrem mikroskopu je jeho rozlišovací schopnost. Hranice rozlišení je přímo úměrná vlnové délce použitého záření. Proud elektronů má podstatně kratší vlnovou délku než viditelné světlo a tudíž má elektronový mikroskop mnohem vyšší rozlišovací schopnost,

teoreticky až o 5 řádů (Habrová, 1990; Kubínek a kol., 2011; Beneš a kol., 2015; Cais, 2015)

Obecně se rozlišují dva základní typy elektronového mikroskopu:

- a) transmisní elektronový mikroskop (TEM)
- b) skenovací (rastrovací) elektronový mikroskop (SEM).

2.3.3.1 Transmisní elektronový mikroskop (TEM)

Transmisní elektronový mikroskop zobrazuje vnitřní struktury vzorku. Rozlišovací schopnost činí 0,15 – 0,25 nm a jeho zvětšení je x 50 až x 1 500 000. Urychlovací napětí elektronů je 100 – 400 kV. Viditelný obraz je vytvářen na fluorescenčním stínítku elektrony prošlými zkoumaným objektem. Poté jsou detekovány a zviditelněny pomocí kamery. Pro použití TEM se vyžaduje dostatečně tenký vzorek, tzv. ultratenké řezy (10 až 50 nm). Tloušťka pozorovaného objektu nesmí být větší než 100 nm. Základním krokem přípravy preparátu je jeho fixace (glutaraldehyd, formaldehyd). Dále následuje odvodnění tkáně, zalití do pryskyřice, zhotovení tenkých řezů na ultramikrotomu, nanesení řezů na síťky a navázání atomů těžkých kovů (olovo, uran, mangan) na některé struktury ve tkáni pro zvýšení kontrastu. Dále se využívají totální preparáty a repliky. Pomocí totálních preparátů se připravují suspenze makromolekul (viry, vlákna DNA). Repliky jsou otisky povrchových struktur. Dnes se využívají v technice mrazového lámání. Pomocí této techniky lze znázornit charakter buněčných membrán (Habrová, 1990; Kubínek a kol., 2011; Cais, 2015).

2.3.3.2 Skenovací elektronový mikroskop (SEM)

Pro SEM je charakteristický 3D obraz s velmi vysokou hloubkou ostrosti. Rozlišovací schopnost SEM je 1 – 1,5 nm a zvětšení od x 25 do x 1 000 000. Urychlovací napětí elektronů je 0,1 – 30 kV. Viditelný obraz je vytvářen pomocí zpětně odražených elektronů a sekundárních elektronů od povrchu objektu. Zobrazovací systém se skládá z vychylovací cívky, objektivu, detektoru a obrazovky. Velikost vzorků může být až několik centimetrů. Důležité je, aby byl vzorek vysušený. Nejprve se provede jeho fixace, odvodnění, vysušení a povrch objektu se pokoví ve vakuu tenkou vrstvou zlata pro zvýšení povrchové vodivosti. Obdobně jako při přípravě preparátů u TEM (Goldstein a kol., 1992; Kubínek a kol., 2011).

2.3.3.3 Další typy elektronové mikroskopie

Mezi další typy elektronové mikroskopie patří vysokovoltážní elektronová mikroskopie (HVEM), skenovací transmisní elektronová mikroskopie (STEM) a environmentální skenovací elektronová mikroskopie (eSEM). HVEM využívá vysoké urychlovací napětí elektronů od 200 kV do 1 – 3 milionů kV. Jedná se o velmi speciální přístroje využívané pro prozáření relativně silných preparátů ve stereografii a následnou rekonstrukci prostorového uspořádání buněčných organel. STEM je typem mikroskopie kombinující transmisní a skenovací režim. Pomocí eSEM lze pozorovat biologické objekty v původním stavu (*in vivo*) v podmínkách vysokého tlaku plynů (nad 611 Pa). Za těchto podmínek lze vlhký vzorek uchránit před vysycháním (Chvátalová, 2003; Kubínek a kol., 2011). Dále se využívá rentgenová analýza realizovaná v elektronovém mikroskopu. Využívá se při prvkové analýze (Goldstein a kol., 2011; Kubínek a kol., 2011).

3 Cíle práce

1. Optimalizovat přípravu vzorku pro hodnocení životaschopnosti bakteriálních buněk po ošetření nízkoteplotním plazmatem pomocí elektronové mikroskopie
2. Optimalizovat přípravu vzorku pro vyhodnocení životaschopnosti bakteriálních buněk po ošetření nízkoteplotním plazmatem přístrojem Smart-DARTTM.
3. Zhodnocení vhodnosti použitých metod pro hodnocení životaschopnosti bakteriálních buněk po ošetření nízkoteplotním plazmatem
4. Navržení vhodné metodiky k ošetření fytopatogenních bakterií nízkoteplotním plazmatem

4 Materiál a metody

4.1 Kultivační podmínky *Xanthomonas euvesicatoria*

K ošetření nízkoteplotním plazmatem byla použita fytopatogenní bakterie *Xanthomonas euvesicatoria* kmen LMG 928 získaný z Belgian Co-ordinated Collection of Microorganisms v Gentu (BCCM).

Bakteriální kmen byl kultivován na MPAG médiu (masopeptonový agar s glukosou: 40 g živného agaru č. 2; 5,2 g kvasničného autolyzátu; 10 g glukosy; 5 g agaru, doplněno destilovanou H₂O do 1 litru a 1 M NaOH pro úpravu pH na hodnotu 7,2) v termostatu při 25 °C po dobu 1-3 dnů. Pro zajištění čistoty byl kmen z jedné bakteriální kolonie přeočkován na novou Petriho misku s MPAG a kultivován za stejných podmínek.

Po kultivaci na Petriho misce s MPAG byla *Xanthomonas euvesicatoria* přeočkována do tekutého C - média (10 g tryptonu; 5 g kvasničného autolyzátu; 5 g glukosy; 5 g NaCl; doplněno destilovanou H₂O do 1 litru a 1 M NaOH pro úpravu pH na hodnotu 7,2). Do Erlenmayerovy baňky bylo nalito 25 ml C – média, do něhož byl naočkován bakteriální kmen z Petriho misky. Erlenmayerova baňka byla umístěna na laboratorní třepačku (Jeio Tech, Korea) při frekvenci otáčení 150 rpm a teplotě 25 °C po dobu 24 hodin.

4.2 Hodnocení životaschopnosti přístrojem Smart-DART™

4.2.1 Příprava vzorků k ošetření nízkoteplotním plazmatem

Po kultivaci bakterie v C-médiu bylo napipetováno 100 µl narostlé bakteriální suspenze na podložní sklíčka (8 vzorků). Podložní sklíčka se vzorky byla umístěna na laboratorní topnou desku (Sci logex ms-h-pro⁺) a vysoušena při 37 °C dokud nebyla vytvořena na podložním sklíčku tenká vrstva bakteriálního kmenu. Poté byly vzorky vloženy do kónických zkumavek o V= 45 ml. Součástí přípravy vzorků byla i pozitivní a negativní kontrola. Pozitivní kontrola byla připravena za stejných podmínek jako vzorky pro ošetření nízkoteplotním plazmatem. Negativní kontrola byla po vytvoření tenké vrstvy na podložním sklíčku smyta 100 µl C – média. Vzniklá bakteriální suspenze byla napipetována do zkumavky typu eppendorf (0,5 ml) a vložena do termocyklu (Bioer Technology Co., Ltd., Hangzhou) po dobu 15 min při 99 °C, aby došlo k usmrcení bakterie.

4.2.2 Ošetření *X. euvesicatoria* nízkoteplotním plazmatem

Ošetření *X. euvesicatoria* bylo prováděno pomocí experimentálního přístroje gliding arc poskytnutého firmou SurfaceTreat, a.s., jehož princip je popsán v literárním přehledu (podkapitola 2.2.4.1). Obsluhu přístroje zajišťoval pan Mgr. Zbyněk Havelka v prostorách Vědeckotechnického parku Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. *X. euvesicatoria* byla ošetřována výbojem nízkoteplotního plazmatu za atmosférického tlaku (0,1-1 atm) v časových intervalech: 40, 60, 80, 100, 120 a 160 s při pokojové teplotě ($t = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$). Vzorky byly umístěny ve vzdálenosti $d = 4\text{ cm}$ od atmosférické plazmové trysky experimentálního přístroje (Obr. 7) a průtok pracovního plynu (atmosférický vzduch) byl $Q = 30\text{ SCFH}$ (standardních krychlových stop za hodinu), tj. $0,85\text{ m}^3/\text{h}$.

Pomocí transformátoru vysokého napětí (10 kV/160 mA) byl generován výboj mezi dvě nerezové, růžkovité elektrody. Ty byly od sebe vzdáleny 5 mm. Zdroj pracoval na frekvenci 50 Hz a přetlak vzduchu byl udržován na 600 kPa.

4.2.3 Vyhodnocení vzorků po ošetření nízkoteplotním plazmatem

Po ošetření nízkoteplotním plazmatem byly jednotlivé vzorky smyty 100 μl C – média, včetně pozitivní a negativní kontroly. Poté bylo 100 μl každého vzorku přepipetováno do mikrozkušavky typu eppendorf (0,5 ml). Pro vyhodnocení životaschopnosti byla použita chemická reagencie Presto Blue (Life technology, USA). Ke každému vzorku (včetně negativní a pozitivní kontroly) bylo přidáno 10 μl této chemické reagencie. Jednotlivé vzorky byly promíchány a vloženy do přístroje Smart-DARTTM RNBT-ADC3 (Diagenetix IncTM, Honolulu, HI). Pro vyhodnocení životaschopnosti byl zvolen program při 26°C po dobu 2 h (teplota LAMP: 26°C , reakční čas LAMP: 120 min, denaturační teplota: 26°C , doba denaturace: 0 min, interval zaznamenávání fluorescence: 60 s). Fluorescence byla zaznamenávána v excitačním a emisním spektru vhodném pro resazurin. Při spouštění zařízení a nastavování použitého programu bylo postupováno podle dostupné uživatelské příručky. Poté byl přístroj vložen do laboratorní třepačky po dobu 2h při teplotě 22°C a rychlosti otáčení 30 rpm, aby nedocházelo k přehřívání přístroje a bylo zajištěno promíchávání vzorků. Po skončení nastaveného programu pro vyhodnocení životaschopnosti *X. euvesicatoria* byla naměřená data uložena v mobilním zařízení graficky. Získané výsledky byly odeslány na e-mail ve formátu csv. Naměřené hodnoty fluorescence v jednotlivých časových intervalech jsou uvedeny v tabulce

(Tab. 1). Na základě získaných hodnot byl sestrojen graf v programu Microsoft Excel (Obr. 8).

4.3 Hodnocení životaschopnosti prostřednictvím SEM

4.3.1 Příprava vzorků k ošetření nízkoteplotním plazmatem

Po kultivaci na Petriho misce s MPAg byla *X. euvesicatoria* přeočkována do 1 ml fyziologického roztoku (0,85 g NaCl bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody). Vzniklá bakteriální suspenze byla pečlivě promíchána a naředěna 10 x a 100 x. Na podložní sklička bylo napipetováno 50 µl bakteriální suspenze. Současně byla připravena (za stejných podmínek) pozitivní a negativní kontrola. Podložní sklička byla umístěna na laboratorní topnou desku a vysušena při 37 °C. Negativní kontrola byla vysušena při 99 °C po dobu 10 min, aby došlo k usmrcení bakterie. Po vyschnutí fyziologického roztoku a vytvoření tenké vrstvy bakterie byla podložní sklička vložena do kónických zkumavek o V= 45 ml a odnesena k ošetření NTP typu gliding arc.

4.3.2 Ošetření *X. euvesicatoria* nízkoteplotním plazmatem

Ošetřování vzorků bylo provedeno za stejných podmínek jako při ošetření *X. euvesicatoria* pro hodnocení životaschopnosti pomocí přístroje Smart-DART™ (podkapitola 4.2.2). Doba ošetřování vzorků NTP byla zvolena po dobu 160 s při pokojové teplotě (t= 22 °C).

4.3.3 Příprava vzorků pro SEM

Po ošetření nízkoteplotním plazmatem typu gliding arc byly vzorky odneseny do Laboratoře elektronové mikroskopie Biologického centra Akademie věd v Českých Budějovicích. Vzorky *X. euvesicatoria* byly již při přípravě k ošetření nízkoteplotním plazmatem zcela vysušeny. Technik laboratoře elektronové mikroskopie (paní Petra Masařová) zajistil přípravu vzorků pro pozorování v SEM. Vzorky byly nalepeny na hliníkový terč umístěný na karuselovém držáku podložek. Poté byly vzorky v naprašovacím zařízení potaženy tenkou vrstvou kovu (zlata) s dobrou elektrickou a tepelnou vodivostí.

4.3.4 Pozorování objektů v SEM

Připravené vzorky *X. euvesicatoria* byly pozorovány skenovacím elektronovým mikroskopem JOEL JSM-7401F FESEM (Obr. 10). Počáteční seřízení mikroskopu a výměnu vzorků zařizoval technik přítomný na pracovišti elektronové mikroskopie. Rozlišovací napětí elektronů bylo 4 kV. Pracovní vzdálenost (WD) byla 8 mm. Objekty byly pozorovány v režimu LEI při zvětšeních 2500x, 10000x a 20000x.

5 Výsledky a diskuze

Diplomová práce se zabývá metodami pro hodnocení životaschopnosti fytopatogenní bakterie *X. euvesicatoria* po ošetření gliding arc plazmatem. Viabilita bakteriálních buněk byla sledována pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) a měřením fluorescence prostřednictvím chemické reagensie PrestoBlue v zařízení Smart-DARTTM.

V rámci bakalářské práce na téma: „Sledování životaschopnosti fytopatogenních bakterií po ošetření nízkoteplotním plazmatem“ byla využita elektromagnetická spektroskopická metoda UV/VIS spektrofotometrie. K vyhodnocení životaschopnosti buněk po ošetření plazmatem gliding arc byla v této práci rovněž použita chemická reagensie PrestoBlue. Tato metoda je vhodná k hodnocení životaschopnosti různých druhů fytopatogenních bakterií. Gramnegativní bakterie *Xanthomonas vesicatoria* kmen CFBP 2537 reagovala na ošetření nízkoteplotním plazmatem nejméně a proměnlivě. Významného snížení životaschopných buněk bylo dosaženo po 80 sekundách vystavení plazmatickému výboji v porovnání s neošetřenou kontrolou. Naopak po 160 sekundách vystavení nízkoteplotnímu plazmatu došlo k nejnižšímu usmrcení bakteriálních buněk (Obr. 10) (Zemanová, 2014). Navržená metodika pro hodnocení životaschopnosti fytopatogenních bakterií po ošetření technologií gliding arc byla citlivá, ale časově poměrně náročná.

Měření fluorescence je však mnohem citlivější (100 až 1000x) a jednodušší nežli stanovení absorbance a proto je více preferovanou detekční metodou. Přístroj Smart-DARTTM umožňuje měřit fluorescenci v reálném čase a této funkce bylo využito pro náš experiment. Primárně se Smart-DARTTM využívá ve spojení s amplifikační metodou LAMP k polní detekci fytopatogenů. Podle studie Keremane a kol. (2015) je však detekce bakteriálních buněk pomocí přístroje Smart-DARTTM mnohem citlivější než tradiční molekulárně biologická metoda real time PCR. V dostupné literatuře nebylo nalezeno podobné využití tohoto zařízení pro hodnocení životaschopných buněk na základě měření fluorescence pomocí chemické reagensie PrestoBlue. Jedná se o sekundární a zcela nové využití tohoto zařízení pro detekční účely. Vliv gliding arc plazmatu na životaschopnost *X. euvesicatoria* byl variabilní podobně jako v bakalářské práci Zemanová 2014. Po 120 sekundách ošetřování plazmatem nebyl zaznamenán téměř žádný vliv na životaschopnost buněk v porovnání s neošetřenou kontrolou. Ošetřování nízkoteplotním plazmatem po dobu

80 a 160 sekund se nejvíce blížilo negativní kontrole (Obr. 9). Jelikož se jedná o první využití tohoto zařízení k hodnocení viability bakteriálních buněk nejsou výsledky zcela optimální. Studie Branská a kol. 2011 uvádí, že nejproblematictější částí fluorescenční analýzy je optimalizace a ověření metodiky. Lepších výsledků by nejspíš bylo možné dosáhnout využitím jiné chemické reagentie pro stanovení životaschopnosti buněk, např. interkalačního činidla PMA (propidium monoazide) a EMA (ethidium bromid monoazide) využívané ve spojení s real time PCR. Dále by bylo možné využít fluorofor fluorescein, který byl použit v práci Keremane a kol. 2015. Navzdory složité optimalizaci jde o rychlou, poměrně citlivou, časové nenáročnou a levnou metodu pro hodnocení životaschopných buněk po jejich ošetření nízkoteplotním plazmatem.

Také ve studii Moreau a kol. (2007) byla zjištěna variabilita v citlivosti gramnegativních bakterií kmenu *Erwinia* spp. k ošetření nízkoteplotním plazmatem typu gliding arc. Zjištěná variabilita fytopatogenních bakterií na ošetření gliding arc plazmatem může být způsobena nestabilitou tohoto systému. Během vývoje plazmového výboje gliding arc dochází ke změně proudu, napětí a neustále se mění počet vznikajících částic a sloučenin (fotony UV, radikály, ozon). Z tohoto důvodu by byla vhodná chemická analýza plazmatu gliding arc při různých fyzikálních parametrech. Ta by mohla významně přispět k objasnění chemického složení sloučenin a částic vznikajících při plazmatickém procesu. Na základě chemické analýzy lze lépe nastavit fyzikální parametry přístroje gliding arc. Pro zajištění stabilních podmínek k ošetření fytopatogenních bakterií by bylo vhodné využít nízkoteplotního plazmatu generovaného za vakua, kde nedochází k nejasným interakcím mezi okolními látkami a plazmatickým výbojem. Během našeho experimentu však nebyl tento přístroj k dispozici.

V současné době nejvhodnější a nespolehlivější metodu pro hodnocení letálních účinků gliding arc plazmatu na fytopatogenní bakterii *X. euvesicatoria* představuje elektronová mikroskopie. Prostřednictvím skenovacího elektronového mikroskopu lze sledovat morfologickou stavbu bakteriální buňky. Využití elektronové mikroskopie je poměrně časově, ale především finančně náročné. Z pozorování ve skenovacím elektronovém mikroskopu je patrné, že technologie gliding arc plazmatu způsobuje na povrchu bakteriální buňky významné strukturální změny (Obr. 11). Povrch bakterie vystavené 160 sekundám plazmatu gliding arc je velmi nepravidelný (Obr. 11 C, D) v porovnání s neošetřenou kontrolou (Obr. 11 A).

Bakteriální buňka zrací svůj typický tvar, jsou patrné rozsáhlé povrchové praskliny a deformace, dochází k elektroporaci a ztrátě tenké buněčné membrány obklopující cytoplazmatický obsah. Struktury obklopující poškozenou bakteriální buňku mohou být části buněčné membrány nebo uvolněné části vnitřních komponent buňky (Obr. 11 C, D). Povrchové struktury bakteriální buňky ošetřené nízkoteplotním plazmatem jsou podobné strukturám buňky ošetřené tepelně po dobu 10 min při 99 °C (Obr. 11 B). Podobné morfologické změny bakteriální buňky po ošetření nízkoteplotním plazmatem jsou zjištěny i ve studii Moreau a kol. (2007). V této studii byl pomocí SEM zkoumán letální efekt plazmatu gliding arc na fytopatogenní gramnegativní bakterii *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* způsobující měkkou hnilobu hlíz. Buňky *Erwinia carotovora* vystavené účinkům gliding arc plazmatu po dobu 2 minut vykazují tvarové a povrchové deformace. Buňka ztrácí svůj protáhlý tvar a jsou viditelné praskliny (Obr. 12). Rovněž studie Bermúdez-Aguirre a kol. (2013) prokazuje dekontaminační účinky nízkoteplotního plazmatu na významnou gramnegativní patogenní bakterii *Escherichia coli* pomocí skenovací elektronové mikroskopie Tato bakterie se spolu s *Erwinia carotovora* řadí do stejné čeledi *Enterobacteriaceae*. Po ošetření nízkoteplotním plazmatem buňky *Escherichia coli* vykazují významné morfologické deformace v porovnání s kontrolou. Na povrchu buňky je patrný vysoký počet perforací, dochází ke ztrátě tyčinkovitého tvaru a buněčné membrány (Obr. 13). Také studie Laroussi a kol., 2005 uvádí rozsáhlé povrchové deformace bakteriálních buněk *Escherichia coli* po vystavení účinků nízkoteplotního plazmatu.

Příčinou poškození buněčné membrány mohou být interakce mezi bakteriální buňkou a elektrickým polem. Hromaděním nabitých částic na vnější membráně bakteriálních buněk vznikají elektrostatické síly, které mohou způsobit prasknutí buněčné membrány. Dále mohou být morfologické změny způsobeny přítomností reaktivních kyslíkových radikálů a UV fotonů (Laroussi a kol., 2005; Deng a kol., 2006).

Vhodné by bylo využít kromě skenovacího elektronového mikroskopu i transmisní elektronový mikroskop. Pomocí tohoto typu elektronového mikroskopu by bylo možné zobrazit rozsah poškození vnitřních komponent buňky po ošetření nízkoteplotním plazmatem a lépe charakterizovat struktury obklopující poškozené bakteriální buňky.

6 Závěr

1. Byla navržena vhodná metodika přípravy vzorků pro hodnocení životaschopnosti fytopatogenní bakterie *X. euvesicatoria* po ošetření nízkoteplotním plazmatem pomocí skenovacího elektronového mikroskopu.
2. Byl optimalizován postup k přípravě vzorků pro rychlé hodnocení životaschopnosti fytopatogenní bakterie *X. euvesicatoria* po ošetření nízkoteplotním plazmatem pomocí přístroje Smart-DART™.
3. Nejspolehlivější a velmi přesnou metodou pro hodnocení viability bakteriálních buněk je skenovací elektronová mikroskopie. Ta prokazuje jednoznačné letální účinky gliding arc plazmatu na gramnegativní bakterii *X. euvesicatoria*. Bylo prokázáno, že na povrchu buňky dochází k výrazným strukturálním změnám, které vedou k usmrcení buňky. Určitou nevýhodou SEM je její časová a především finanční náročnost. Hodnocení životaschopnosti *X. euvesicatoria* pomocí přístroje Smart-DART™ představuje rychlé, časově nenáročné a levné zhodnocení viability buněk po ošetření nízkoteplotním plazmatem. Velkou výhodou tohoto zařízení je měření fluorescence v reálném čase. Nevýhodou této metody je prozatím její nižší spolehlivost. Pro lepší vyhodnocení spolehlivosti by bylo vhodné, kromě užití různých chemických reagensů pro zjišťování viability bakteriálních buněk, zařadit i více bakteriálních druhů (gramnegativních i grampozitivních) pro zjištění vhodnosti využití této metody pro různé mikroorganismy.
4. Byla navržena vhodná metodika pro ošetření fytopatogenních bakterií nízkoteplotním plazmatem typu gliding arc. Bylo by vhodné hodnotit životaschopnost bakteriálních buněk při různých technických parametrech přístroje gliding arc (zvýšit průtok pracovního plynu, různá vzdálenost vzorku od plazmové trysky či užití různých pracovních plynů). Pro další výzkum sledování viability fytopatogenních bakterií lze využít metodu průtokové cytometrie, která v tomto směru představuje velký potenciál.

7 Seznam použité literatury

Aubrecht, V. (2003) Technické aplikace plazmatu. Brno: Vitium. 25 s. ISBN 80-214-2517-2.

Bashan, Y., Azaizeh, M., Diab, S., Yunis, H. a Okon, Y. (1985) Crop loss of pepper plants artificially infected with *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in relation to symptom expression. *Crop Prot.* 4, 77-84.

Bashan, Y., Diab, S. a Okon, Y. (1982) Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper seeds and roots, in symptomless and dry leaves in non-host plants and in the soil. *Plant and Soil* 68, 161-170.

Bellakhal, N., Draou, K., Cheron, B. G. a Brisset, J. L. (1997a) Protective films formed on copper by oxygen plasma treatment. *J. Electroanal. Chem.* 431, 297-299.

Bellakhal, N., Draou, K. a Brisset, J. L. (1997b) Electrochemical investigation of copper oxide films formed by oxygen plasma treatment. *J. Appl. Electrochem.* 27, 414-421.

Beneš, J., Jiráček, D., Wallace, C. a Víték, F. (2015) Základy lékařské fyziky. Vydání 4. Univerzita Karlova v Praze: Karolinum, s. 204-205. ISBN 978-80-246-2645-1.

Benstaali, B., Moussa, D., Addou, A., Brisset, J. L. (1998a) Plasma treatment of aqueous solutes: some chemical properties of gliding arc in humid air. *Eur. Phys. J. Appl.* 4, 171-179.

Benstaali, B., Moussa, D., Sauvage, L., Addou, A., Cheron, B. G., Brisset, J. L. (1998b) Interaction between plasma and aqueous solutes. In: The proceedings of the international Symposium on High Pressure, Low temperature plasma chemistry. *Hakone VI*, Cork, Ireland 148-152.

Bermúdez-Aguirre, D., Wemlinger, E., Pedrow, P., Barbosa-Cánovas, G. a Garcia-Perez, M. (2013) Effect of atmospheric pressure cold plasma (APCP) on the inactivation of *Escherichia coli* in fresh produce. *Food Control* 34, 149-157.

Berridge, M. V., Tan, A. S., McCoy, K. D. a Wang, R. (1996) The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochem.* 4, 14-19.

Bogaerts, A., Neyts, E., Gijbels, R., van der Mullen, J. (2002) Gas discharge plasmas and their applications. *Spectrochim. Acta, Part B.* 57, 609-658.

- Boudam, M. K., Moisan, M., Saoudi, B., Popovici, C., Gherardi, N. a Massines, F.** (2006) Bacterial spores inactivation by atmospheric-pressure plasmas in the presence or absence of UV photons obtained with the same gas mixture. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 39, 3494-3507.
- Bránská, B., Linhová, M., Patáková, P., Paulová, L. a Melzoch, K.** (2011) Stanovení viability mikroorganismů pomocí fluorescenční analýzy. *Chem. Listy*, 105, 586-593.
- Cais, J.** (2015) Elektronová mikroskopie. Metalografie. Metodická příručka. Praha: Centrum pro studium vysokého školství, v. v. i. 28 s. ISBN 978-80-86302-67-6.
- Campbell, L., Moss, B. J., Dianese, A. a Wilson, M.** (1998) The good, the bad, and the ugly: biocontrol of bacterial spot of tomato. Highlights of Agricultural Research. *Ala. Agric. Exp. St.* 45, 8-10.
- Deng, X. T., Shi, J. J. a Kong, M. G.** (2006) Physical mechanisms of inactivation of *Bacillus subtilis* spores using cold atmospheric plasmas. *IEEE Trans. Plasma Sci.* 34, 1310-1316.
- Diab, S., Bashan, Y., Okon, Y. a Henis, Y.** (1982a) Effects of relative humidity on bacterial scab caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on pepper. *Phytopathology* 72, 1257-1260.
- Diab, S., Bashan, Y. a Okon, Y.** (1982b) Studies on infection with *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial scab of pepper in Israel. *Phytoparasitica* 10, 183-191.
- Dobrin, D., Magureanu, M., Mandache, N. B. a Ionita, M. D.** (2015) The effect of non-thermal plasma treatment on wheat germination and early growth. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* 29, 255-260.
- Dougherty, D. E.** (1979) Yield reduction in tomato caused by bacterial spot and disease control with copper sprays. *P. Fl. St. Hortic. Soc.* 91, 291-293.
- EFSA Panel on plant health** (2014) Scientific opinion on the pest categorisation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye. *EFSA Journal* 12, 1-26.
- El-Hendawy, H. H., Osman, M. E. a Sorour, N. M.** (2005) Biological control of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by *Rahnella aquatilis*. *Microbiol. Res.* 160, 343-352.

- Ermolaeva, S. A., Varfolomeev, F., Chernukha M. Yu., Yurov, D. S., Vasiliev, M. M., Kaminskaya, A. A., Moisenovich, M. M., Romanova, J. M., Murashev, A. N., Selezneva, I. I., Shimizu, T., Sysolyatina, E. V., Shaginyan, I. A., Petrov, O. F., Mayevsky, E. I., Fortov, V. E., Morfill, G. E., Naroditsky, B. S. a Gintsburg, A. L.** (2011) Bactericidal effects of non-thermal argon plasma *in vitro*, in biofilms and in the animal model of infected wounds. *J. Med. Microbiol.* 60, 75-83.
- Fontenelle, A. D. B., Guzzo, S. D., Lucon, C. M. M. a Harakava, R.** (2011) Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. *Crop Prot.* 30, 1492-1500.
- Fridman, A., Nester, S., Kennedy, L. A., Saveliev, A. a Muaf-Yardimci, O.** (1999) Gliding arc gas discharge. *Prog. Energy Combust. Sci.* 25, 211-231.
- Fridman, A., Chirokov, A. a Gutsol, A.** (2005) Non-thermal atmospheric pressure discharges. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 38, R01.
- Fridman, G., Brooks, A.D., Balasubramanian, M., Fridman, A., Gutsol, A., Vasilets, V. N., Ayan, H. a Friedman, G.** (2007) Comparison of direct and indirect effects of non-thermal atmospheric pressure plasma on bacteria. *Plasma Process. Polym.* 4, 370-375.
- Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Echlin, P., Joy, D. C., Romig, A. D., Lyman, Ch. E., Fiori, Ch. a Lifshin, E.** (1992) Scanning elektron microscopy and X-ray microanalysis. A text for biologist, materials scientists, and geologists. Vydání 2. New York: Plenum Press. 807 s. ISBN-13: 978-1-4612-7653-1.
- Goode, M. J. a Sasser, M.** (1980) Prevention - the key to controlling bacterial speck and bacterial speck of tomato. *Plant Dis.* 64, 831-834.
- Guo, J., Huang, K. a Wang, J.** (2015) Bacterial effect of various non- thermal plasma agents and the influence of experimental conditions in microbial inactivation: A review. *Food Control* 50, 482-490.
- Gurol, C., Ekinci, F. Y., Aslan, N. a Korachi, M.** (2012) Low Temperature Plasma for decontamination of *E. coli* in milk. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 1-5.
- Habrová, V.** (1990) Mikroskopická technika. Vydání 1. Praha: Státní pedagogické nakladatelství. 158 s. ISBN 80-7066-149-6.

- Hayward, A. C. a Waterston, J. M.** (1964) *Xanthomonas vesicatoria*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. *CAB International*, Wallingford, UK.
- Hury, S., Vidal, D. R., Desor, F., Pelletier, J. a Lagarde, T.** (1998) A parametric study of the destruction efficiency of *Bacillus* spores in low pressure oxygen-based plasmas. *Lett. in Appl. Microbiol.* 26, 417-421.
- Chang, J. S., Lawless, P. A. a Yamamoto, T.** (1991) Corona discharge processes. *IEE Trans. Plasma Sci.* 19, 1152-1165.
- Chau, T. T., Kao, K. C., Blank, G. a Madrid, F.** (1996) Microwave plasmas for low-temperature dry sterilization. *Biomaterials* 17, 1273-1277.
- Chen, F. F.** (1984) Úvod do fyziky plazmatu. Vydání 1. Praha: Academia. 328 s.
- Chvátalová, L.** Elektronové mikroskopy. *VUT Brno* [online]. 2003 [cit. 7-11. 2016]. Dostupné z:
<http://www.fch.vut.cz/~zmeskal/obring/presentace_2003/20_elektronove_mikroskopy.pdf>.
- Indiegogo, Inc.** (2015) Smart-DART™ platform user manual.
- Invitrogen** (2012) PrestoBlue cell viability reagent protokol. Product information sheet by Life Technologies.
- Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E. a Schaad, N. W.** (2004) Reclassification of the Xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *System. Appl. Microbiol.* 27, 755-762.
- Keremane, M. L., Ramadugu, Ch., Rodriguez, E., Kubota, R., Shibata, S., Hall, D. G., Roose, M. L., Jenkins, D. a Lee, R. F.** (2015) A rapid field detection systém for citrus huanglongbing associated *Candidatus Liberibacter asiaticus* from the psyllid vector, *Diaphorina citri* Kuwayama and its implications in disease management. *Crop Prot.* 68, 41-48.
- Kleczek, J.** (1968) Plazma ve vesmíru a laboratoři. Praha: Academia. 330 s.
- Kubínek, R., Šafářová, K., Vůjtek, M.** (2011) Elektronová mikroskopie. Vydání 1. Olomouc: Univerzita Palackého. 50s. ISBN 978-80-244-2739-3.
- Kuchtova, P., Šerá, B., Gavril, B., Šerý, M. a Hnautic, E.** (2013) Gliding arc plasma modified number of capsules in poppy seed. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24S, S133.

- Kůdela, V., Novacky, A. a Fucikovsky, L.** (2002) Rostlinolékařská bakteriologie. Vydání 1. Praha: Academia. 374 s. ISBN 80-200-0899-3.
- Lall, N., Henley-Smith, C. J., De Canha, M. N., Oosthuizen, C. B. a Berrington, D.** (2013) Viability reagent, PrestoBlue, in comparison other available reagens, utilized in cytotoxicity and antimicrobial assays. *Int. J. Microbiol.* 2013, 1-5.
- Laroussi, M.** (2005) Low temperature plasma-based sterilization: overview and state-of-the-art. *Plasma Process. Polym.* 2, 391-400.
- Liao, X., Liu, D., Xiang, Q., Ahn, J., Chen, S., Ye, X. a Ding, T.** (2017) Inactivation mechanism of non-thermal plasma on microbes: A review. *Food Control.* 75, 83-91.
- McInnes, T. B., Gitaitis, R. D., McCarter, S. M., Jaworski, C. A. a Phatak, S. C.** (1988) Airborne dispersal of bacteria in tomato and pepper transplant fields. *Plant Dis.* 72, 575-579.
- McNicholl, B. P., McGrath, J. W. a Quit, J. P.** (2006) Development and application of a resazurin-based biomass activity test for activated sludge plant management. *Water Res.* 41, 127–133.
- Misra, N. N., Tiwari, B. K., Rahavarao, K. S. M. S. a Cullen, P. J.** (2011) Nonthermal plasma inactivation of food-borne pathogens. *Food Eng. Rev.* 3, 159-170.
- Misra, N. N., Keener, K. M., Bourke, P., Mosnier, J. P. a Cullen, P. J.** (2014a) In-package atmospheric pressure cold plasma treatment of cherry tomatoes. *J. Biosci. Bioeng.* 118, 177-182.
- Misra, N. N., Patil, S., Moiseev, T., Bourke, P., Mosnier, J. P., Keener, K. M. a Cullen, P. J.** (2014b) In-package atmospheric pressure cold plasma treatment of strawberries. *J. Food Eng.* 125, 131-138.
- Moisan, M., Barbeau, J., Moreau, S., Pelletier, J. Tabrizian, M. a Yahia, L. H.** (2001) Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and analysis of the inactivation mechanisms. *Int. J. Pharm.* 226, 1-21.
- Moisan, M., Barbeau, J., Crevier, M. C., Pelletier, J., Philip, N. a Saoudi, B.** (2002) Plasma sterilization. Methods and mechanisms. *Pure Appl. Chem.* 74, 349-358.

- Moreau, S., Moisan, M., Tabrizian, M., Barbeau, J., Pelletier, J. a Ricard, A.** (2000) Using the flowing afterglow of plasma to inactivate *Bacillus subtilis* spores: influence of the operating conditions. *J. Appl. Phys.* 88, 1166-1174.
- Moreau, M., Feuilloy, M. G. J., Orange, N. a Brisset J. L.** (2005) Lethal effect of the gliding arc discharges on *Erwinia* spp. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1039-1046.
- Moreau, M., Feuilloy, M. G. J., Veron, W., Meylheuc, T., Chevalier, S., Brisset, J. L. a Orange, N.** (2007) Gliding arc discharge in the potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*: mechanism of lethal action and effect on membrane-associated molecules. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5904-5910.
- Moreau, M., Orange, N. a Feuilloy, M. G. J.** (2008) Non – thermal plasma technologies: New tools for bio – decontamination. *Biotechnol. Adv.* 26, 610-617.
- Moss, W. P., Byrne, J. M., Campbell, H. L., Ji, P., Bonas, U., Jones, J. B. a Wilson, M.** (2007) Biological control of bacterial spot of tomato using *hrp* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Biol. Control* 41, 199-206.
- Nelson, C. L. a Berger, T. J.** (1989) Inactivation of microorganisms by oxygen gas plasma. *Curr. Microbiol.* 18, 275-276.
- Niemira, B. N.** (2012) Cold plasma reduction of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on almonds using ambient pressure gases. *J. Food Sci.* 77, 171-175.
- OEPP/EPPO** (1988) Data sheets on quarantine organisms No. 157, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Bull. OEPP/EPPO Bulletin* 18, 521-526.
- Pasquali, F., Stratakos, A. Ch., Koidis, A., Berardinelli, A., Cevoli, Ch., Ragni, L., Mancusi, R., Manfreda, G. a Trevisani, M.** (2015) Atmospheric cold plasma process for vegetable leaf decontamination: A feasibility study on radicchio (red chicory, *Cichorium intybus* L.). *Food Control.* 60, 552-559.
- Pohronezny, K., Moss, M. A., Dankers, W. a Schenk, J.** (1990) Dispersal and management of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* during thinning of direct-seeded tomato. *Plant Dis.* 74, 800-805.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Benink, H. A., Worzella, T. J. a Minor, L.** Cell viability assays. *Assay Guidance Manual. NCBI* [online]. 2013 [cit. 14. 1. 2016]. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>>.

Ritchie, D. F. Bacterial spot of pepper and tomato. *The plant health instruktör. APS* [online]. 2000 [cit. 10. 11. 2015]. Dostupné z:

<<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Pages/Bacterialsport.aspx>>.

Sarker, S. D., Nahar, L. a Kumarasamy, Y. (2007) Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 42, 321-342.

Scortichini, M., Stefani, E., Elphinstone, J. G. a Bergsma Vlami, M. (2013) PM 7/110 (1) *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*) causing bacterial spot of tomato and sweet pepper. *Bull. OEPP/EPPO Bulletin*, 43, 7-20.

Sherf, A. F. a MacNab, A. A. (1986) Vegetable diseases and their control. Vydání 2. New York: Wiley. 728 s. ISBN: 0-471-05860-2.

Schaad, N. W. a Stall, R. E. (1989) *Xanthomonas*. Guide for identification of plant pathogenic bacteria. *APS Press, St Paul (US)*, 81-94.

Scholtz, V. Nízkoteplotná plazma I: Čo je to plazma?. *Aldebaren bulletin* [online]. 2012, 22 [cit. 27. 2. 2016].

Dostupné z: <http://www.aldebaran.cz/bulletin/2012_22_pla.php>.

Scholtz, V., Pazlarova, J., Souskova, H., Khun, J. a Julak, J. (2015) Nonthermal plasma – A tool for decontamination and disinfection. *Biotechnol. Adv.* 33, 1108-1119.

Stall, R. E. a Thayer, P. L. (1962) Streptomycin resistance of bacterial spot pathogen and control with streptomycin. *Plant Dis. Rep.* 46, 389-393.

Stach, V. (1989) Plazma – čtvrté skupenství hmoty. Vydání 1. Praha: Státní pedagogické nakladatelství. 96 s.

Sun, X., Nielsen, C. a Miller, W. (2002) Bacterial spot of tomato and pepper. *Plant pathology circular*, 129.

Swings, J. G. a Civerelo, E. L. (1993) *Xanthomonas*. Vydání 1. Londýn: Chabman and Hall. 399 s. ISBN: 0-412-43420-2.

Tendero, C., Tixier, Ch., Tristant, P., Desmaison, J. a Leprince P. (2006) Atmospheric pressure plasmas: A review. *Spectrochim. Acta, Part B.* 61, 2-30.

Venette, J. R., Lamey, H. A., Smith, R. C. Bacterial spot and bacterial speck of tomato. *North Dakota State university* [online] 1996, [cit. 2. 12. 2016]. Dostupné z: <<https://library.ndsu.edu/repository/bitstream/handle/10365/17253/PP-736-1996.pdf?sequence=2>>.

Weltmann, k. D. a von Woedtke, Th. (2011) Basic requirements for plasma sources in medicine. *Eur. Phys. J. Appl. Phys.* 55, 13807-p6.

Xu, M., McCanna, D. J. a Sivak, J. G. (2015) Use of viability reagent PrestoBlue in comparison with almarBlue and MTT to asses te viability of human corneal epithelial cells. *J. Pharmacol. Toxicol Methods* 71, 1-7.

Yang, L., Chen, J. a Gao, J. (2009) Low temperature argon plasma sterilization effect on *Pseudomonas aeruginosa* and its mechanisms. *J. Electrostat.* 67, 646-651.

Yasuhara-Bell, J., de Silva, A., Heuchelin, S. A., Chaky, J. L. a Alvarez, A. M. (2016) Detection of Gross's wilt patogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* in maize by look-mediated amplification. *Phytopathol.* 106, 226-235.

Zemanová, M. (2014) Sledování životaschopnosti fytopatogenních bakterií po ošetření nízkoteplotním plazmatem. [Bakalářská práce]. České Budějovice, 59 s. Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, katedra rostlinné výroby a agroekologie.

8 Tabulky

Tab. 1: Hodnoty relativní fluorescence v jednotlivých časových intervalech po ošetření *X. euvesicatoria* nízkoteplotním plazmatem (pokračování tabulky na str. 43).

Čas [min]	K – P	40 s	60 s	80 s	100 s	120 s	160 s	K – N
5	-7180	32	425	-76	-1100	521	-120	26
10	-28950	30	302	-1148	-3888	910	-748	-107
15	-17051	-71	339	-1968	-7079	1794	-1243	-222
20	-180	-171	44	-2788	-10707	2636	-1738	-337
25	11674	-271	-246	-3608	-13798	3429	-2233	-412
30	20952	1231	-536	-4428	-17060	4005	-2728	-527
35	28864	6979	-826	-5248	-20336	3978	-3223	-642
40	35871	9946	-1116	-6068	-23630	3623	-3718	-757
45	41605	10179	-1274	-6888	-26915	3979	-4213	-871
50	46761	10074	351	-7708	-30461	8787	-4708	-973
55	51001	9969	2370	-8528	-33733	15659	-5203	-1084

K – P = kontrola pozitivní, K – N = kontrola negativní;

40, 60, 80, 100, 120 a 160 s = doba ošetření gliding arc plazmatem;

čas [min] = záznam hodnoty fluorescence v 5ti minutovém intervalu

Tab. 1: Hodnoty relativní fluorescence v jednotlivých časových intervalech po ošetření *X. euvesicatoria* nízkoteplotním plazmatem (pokračování tabulky ze str. 42).

Čas [min]	K – P	40 s	60 s	80 s	100 s	120 s	160 s	K – N
60	54892	9864	3970	-9348	-37612	22808	-5678	-1199
65	58363	9759	5379	-10168	-41712	30182	-6173	-1262
70	61309	9654	5084	-10988	-45015	31430	-6645	-1215
75	63632	9549	4789	-11808	-46578	31075	-7140	-1044
80	65004	9444	4494	-12628	-46988	31136	-7635	-1014
85	66238	9339	8755	-13448	-46937	33444	-8130	-934
90	65853	9234	12697	-14268	-47114	37962	-8490	-964
95	65138	9129	13125	-15088	-47367	42042	-8845	-976
100	65348	9024	12830	-15908	-48910	47574	-9340	-1091
105	65907	8919	12944	-14207	-50839	51474	-9642	-1145
110	67420	8814	15666	-14037	-51252	56263	-9951	-922
115	68709	8709	16596	-14778	-50853	60708	-10414	-746
120	68338	8604	16301	-15181	-50823	64410	-10521	-792

K – P = kontrola pozitivní, K – N = kontrola negativní;

40, 60, 80, 100, 120 a 160 s = doba ošetření gliding arc plazmatem;

čas [min]= záznam hodnoty fluorescence v 5ti minutovém intervalu

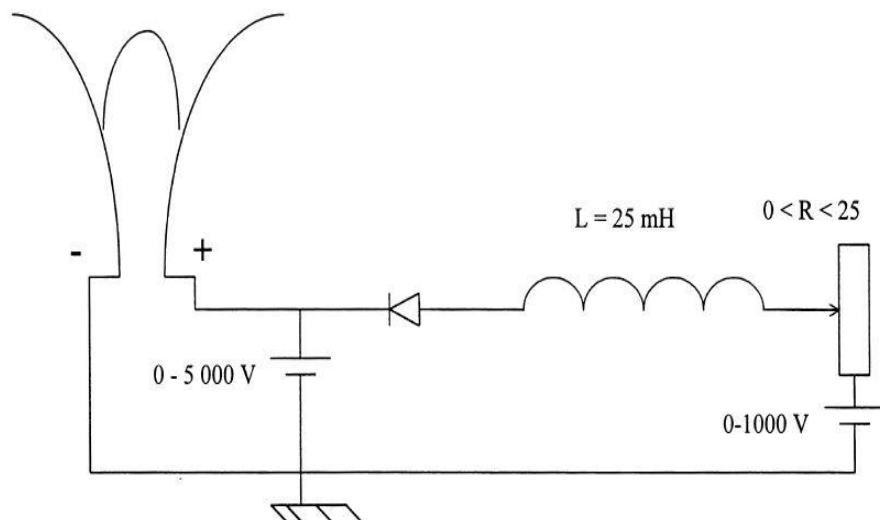
9 Obrázky



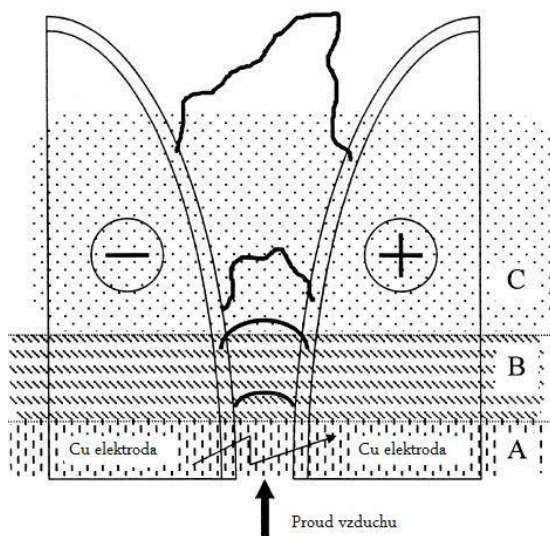
Obr. 1: Příznaky bakteriální skvrnitosti způsobené *X. euvesicatoria* na listu rajčete.
(http://bygl.osu.edu/bygl_archive2015/sites/default/files/main/articles/origimage_9_n15264.JPG)



Obr. 2: Příznaky bakteriální skvrnitosti způsobené *X. euvesicatoria* na plodu rajčete.
(<http://u.osu.edu/vegetablediseasefacts/files/2014/06/bacterialLeafSpot03-1say9pr.jpg>)



Obr. 3: Základní schéma zapojení přístroje gliding arc (převzato dle Fridman a kol. 1999).



Obr. 4: Fáze výboje gliding arc: (A) iniciační fáze; (B) rovnovážná fáze výboje; (C) nerovnovážná fáze výboje (převzato a upraveno dle Fridman a kol. 1999).



A



B

Obr. 5: Barevná změna rezazurinu (A) na resorufin (B) v metabolicky aktivních buňkách (vlastní foto).

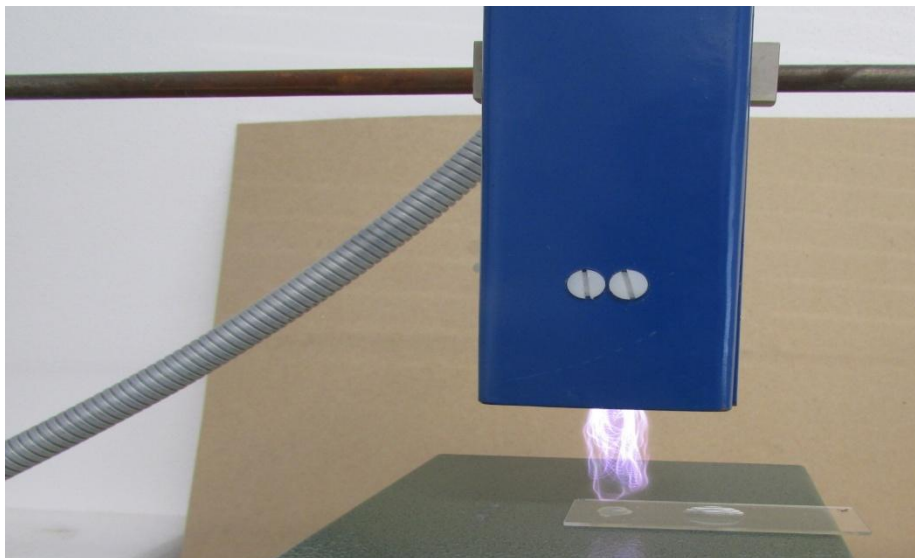


Obr. 6: Zařízení Smart-Dart™ je ovládáno přes bluetooth pomocí speciální aplikace v mobilním zařízení (převzato z Smart-DART™ platform: user manual, 2015)

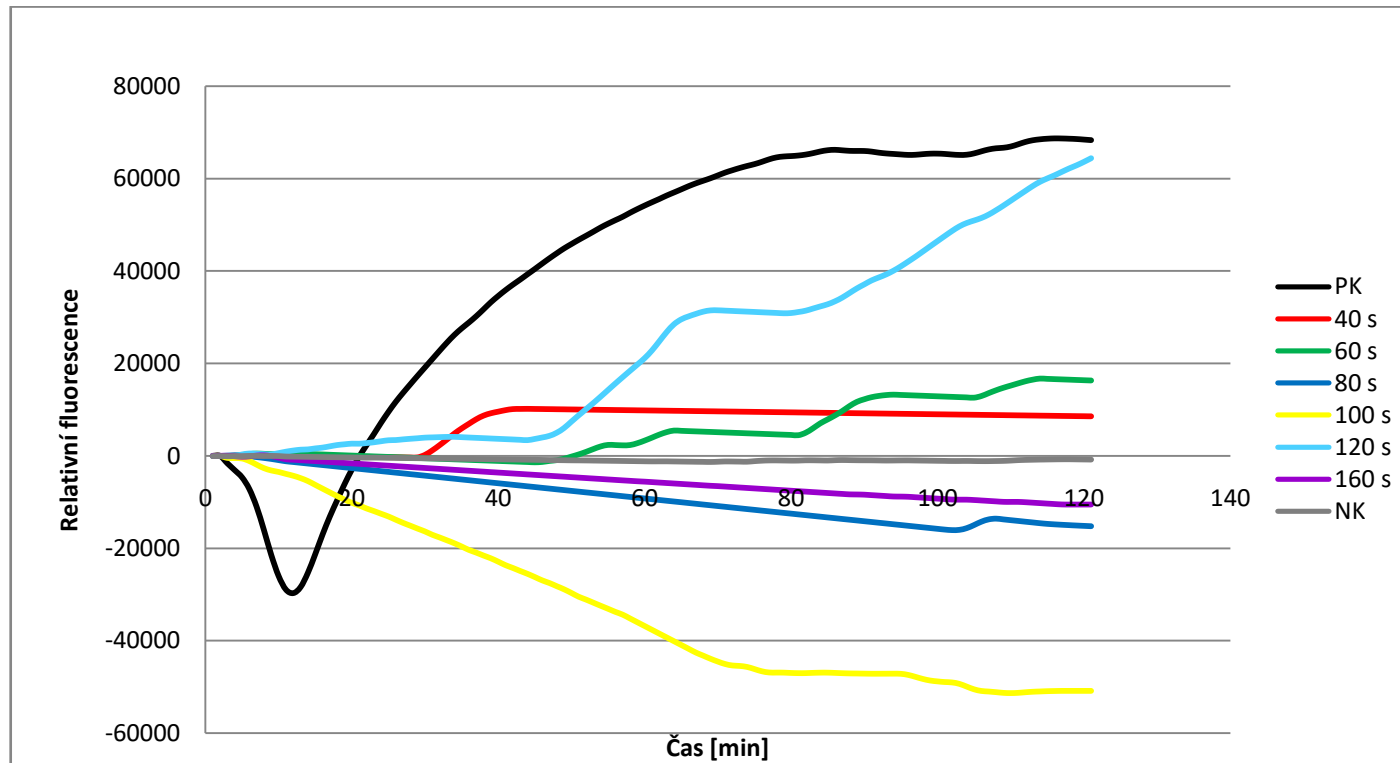
A



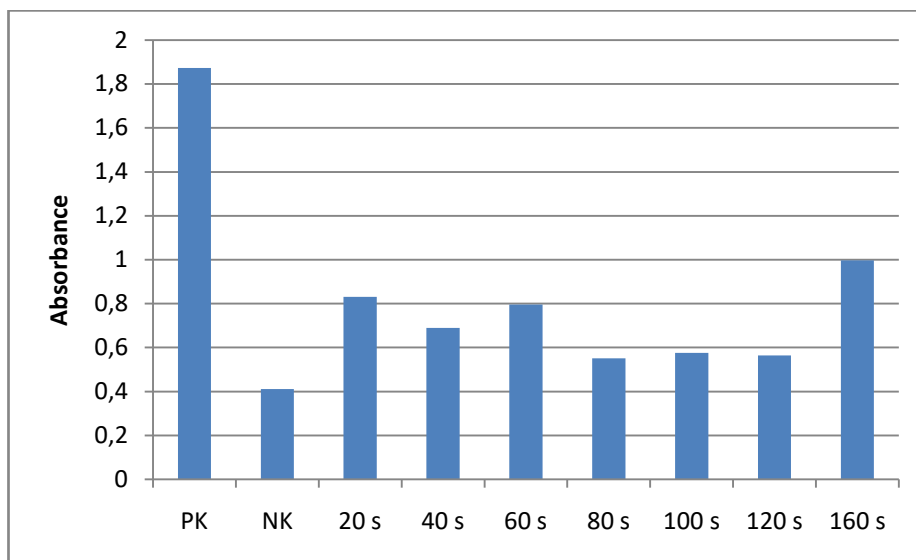
B



Obr. 7: Přístroj gliding arc: (A) zdroj; (B) plazmová atmosférická tryska generující výboj při ošetřování tenké vrstvy fytopatogenní bakterie na podložním sklíčku (vlastní foto).



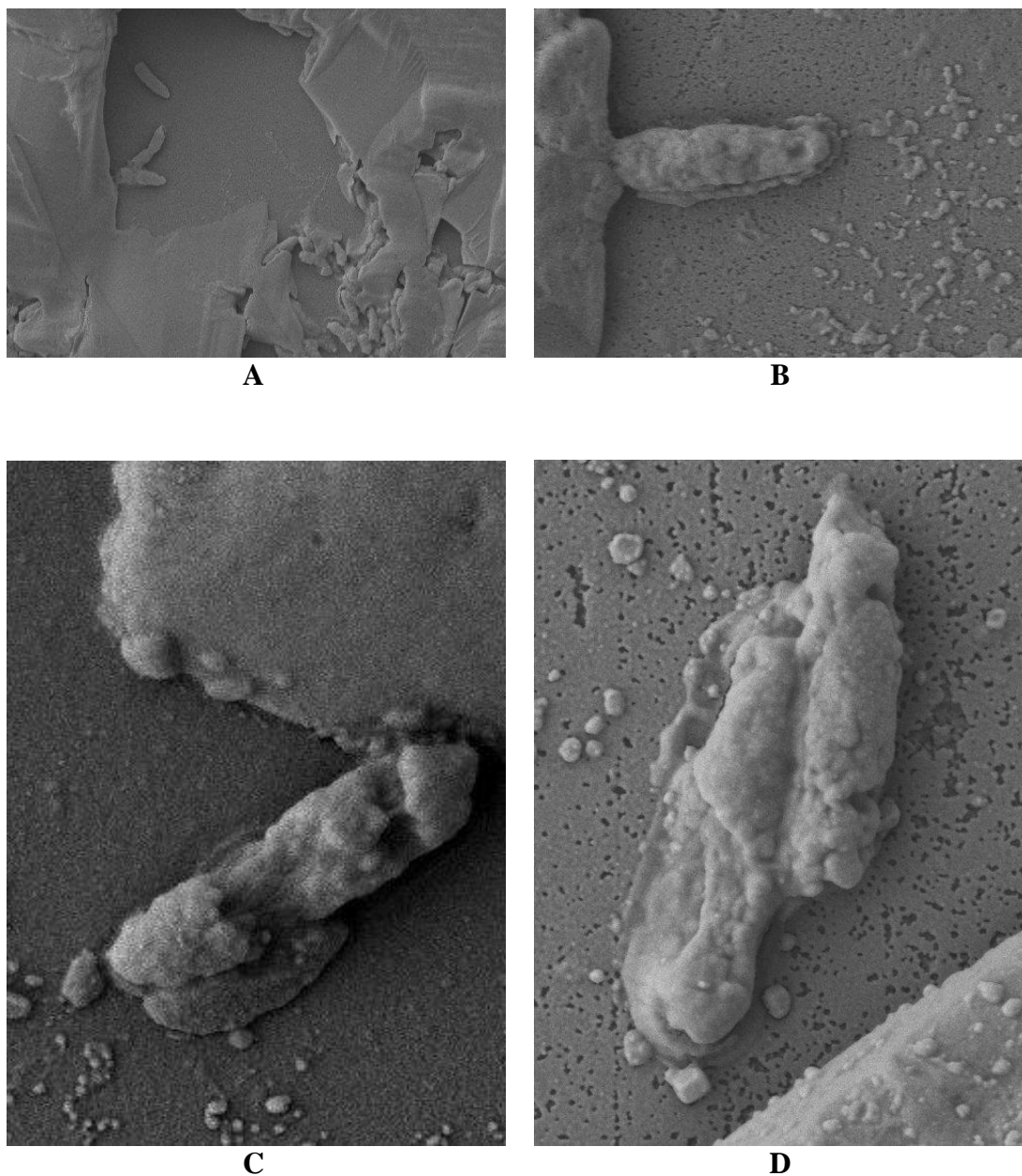
Obr. 8: Hodnocení životaschopnosti *X. euvesicatoria* přístrojem Smart-DARTTM po ošetření nízkoteplotním plazmatem (PK= pozitivní kontrola; NK= negativní kontrola; 40 s, 60 s, 80 s, 100 s, 120 s, 160 s = doba ošetření *X. euvesicatoria* gliding arc plazmatem).



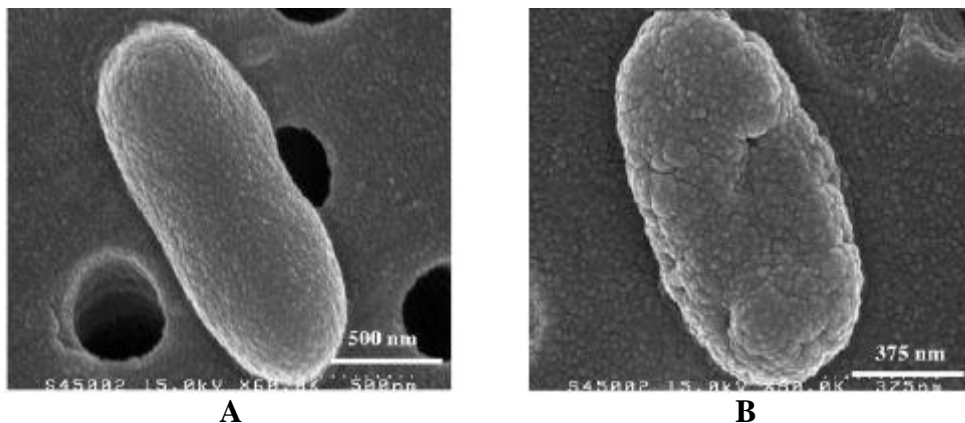
Obr. 9: Hodnocení životaschopnosti *Xanthomonas vesicatoria* CFBP 2537 po ošetření gliding arc plazmatem pomocí UV/VIS spektrofotometrie (PK- pozitivní kontrola, NK- negativní kontrola) (Zemanová, 2014).



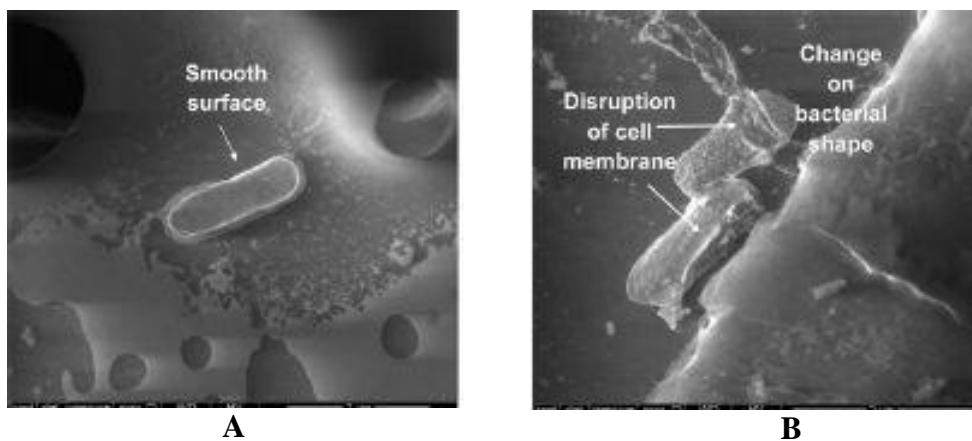
Obr. 10: Skenovací elektronový mikroskop Joel JSM 7401 F (http://www.jeol.co.jp/products/detail/product_file/file/p130_04_1.jpg).



Obr. 11: Snímky ilustrující účinky plazmatu gliding arc na morfologii *X. euvesicatoria* pořízené skenovacím elektronovým mikroskopem: (A) Typický tyčinkovitý tvar neošetřených buněk (pozitivní kontrola). (B) Morfologická struktura *X. euvesicatoria* po vystavení 99 °C po dobu 10 min. (C, D) Morfologie *X. euvesicatoria* po 160 s ošetřování gliding arc plazmatem. Viditelné výrazné tvarové a povrchové deformace (vlastní foto).



Obr. 12: Snímky pořízené skenovacím elektronovým mikroskopem prokazující efekt gliding arc plazmatu na strukturu fytopatogenní bakterie *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. (A) Typický vzhled neošetřené bakteriální buňky. (B) Buňky *E. carotovora* ošetřené gliding arc po dobu 2 min. Celková struktura organismu je výrazně ovlivněna (převzato a upraveno dle Moreau a kol. 2007).



Obr. 13: Snímky *Escherichia coli* ze skenovacího elektronového mikroskopu. (A) Neošetřená bakteriální buňka. (B) Účinky nízkoteplotního plazmatu na morfologii *E. coli* (převzato a upraveno dle Bermúdez – Aguirre a kol. 2013).