



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**INKORPORACE MIKROBIÁLNÍCH BUNĚK DO
HYDROGELOVÝCH NOSIČŮ**

INCORPORATION OF MICROBIAL CELLS IN HYDROGEL CARRIERS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Sofia Orišková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1478/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Sofia Orišková**
Studijní program: Spotřební chemie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Inkorporace mikrobiálních buněk do hydrogelových nosičů

Zadání diplomové práce:

1. Vypracovat aktuální literární rešerši na téma výzkumu a vývoje nosičů pro řízené a cílené uvolňování buněčných systémů s ohledem na relevantní aplikace.
2. Na základě vypracované rešerše navrhnout s ohledem na jejich cílené aplikace vhodné mikrobiální kultury, kompozice jejich hydrogelových nosičů a způsob inkorporace mikrobiálních buněk v nich.
3. Optimalizovat postup přípravy navržených nosičových systémů a provést podrobnou charakterizaci výsledných hydrogelových materiálů s ohledem na cílenou aplikaci.
4. Diskutovat získané experimentální výstupy, zhodnotit praktickou využitelnost vyvinutých materiálů.

Termín odevzdání diplomové práce: 31.7.2020:

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

Bc. Sofia Orišková
student(ka)

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Diplomová práca vychádza z moderného agrochemického konceptu využitia pôdnych baktérií podporujúcich rast rastlín ako ekologickej alternatívy konvenčného hnojenia. Inkorporácia bakteriálnych buniek do hydrogélových nosičov je už preštudovaný proces, no pre svoje nevýhody zatiaľ nenachádza širšie uplatnenie v poľnohospodárstve. Táto práca ponúka úplne nový koncept enkapsulácie baktérií geláciou priamo z kultúry. Tohto efektu sa dosiahne sieťovaním bakteriálneho alginátu, ktorý je produkovaný modelovým mikroorganizmom *Azotobacterom vinelandii*. Šlo o pilotné experimenty, kedy boli optimalizované kultivačné, ako aj gelačné podmienky. Gravimetricky bola stanovená koncentrácia alginátu, ktorého parametre boli charakterizované použitím vybraných analytických metód – infračervenej spektroskopie pre monitoring kľúčových štruktúrnych parametrov (monomérskej kompozície a miery acetylácie), dynamického rozptylu svetla na charakteristiku distribúcie veľkosti či AF4-MALS-dRI na stanovenie molekulovej hmotnosti. *Azotobacter vinelandii* je tiež producentom PHB, ktorého tvorba bola sledovaná pomocou plynovej chromatografie a infračervenej spektroskopie. Druhá časť práce je zameraná na optimalizáciu tvorby gélov sieťovaním bakteriálnej kultúry s vyprodukovaným alginátom pomocou CaCl_2 , kedy ku kvalitatívnemu popisu vzniknutej gélovej kompozície slúžili reometrické experimenty.

Bola dokázaná možnosť gelácie už po 24 h od naočkovania kultúry. Maximálna produkcia alginátu ($1,9 \pm 0,3$) g/l bola dosiahnutá v štvrtý deň od naočkovania. Bolo tiež zistené, že prídavok 5 g/l uhličitanu vápenatého podporí tvorbu alginátu, no vyšší prídavok CaCO_3 (30 g/l) negatívne vplyva na molekulovú hmotnosť alginátu, preto sa neodporúča. Pomocou FTIR aj GC bola potvrdená tvorba PHB, s maximálnym výťažkom (23 ± 3) % CDW. Reologické testy potvrdili, že produktom sieťovania kultúry je gél. V čase 0 min bol sledovaný vplyv koncentrácie sieťovacieho činidla a bolo zistené, že s vyššou koncentráciou vápenatých iónov je sprevádzaná tvorba hustejšej siete v štruktúre a vyššia rigidita gélu. Pri najvyššej skúmanej koncentrácii sieťovadla CaCl_2 bola hranica lineárnej viskoelastickej oblasti určená na ($5,0 \pm 0,7$) %. Na záver bola fotografiami potvrdená inkorporácia bakteriálnych buniek do gélu využitím lipofilného fluorescenčného farbiva BODIPY 439/503.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Azotobacter vinelandii, alginát, enkapsulácia, polyhydroxyalkanoáty, PGPB.

ABSTRACT

The presented diploma thesis focuses on the use of plant growth promoting bacteria as an ecological alternative to conventional fertilizers. The incorporation of bacterial cells into hydrogel carriers is already a well-studied topic, but due to its disadvantages it has not yet found wider application in agriculture. This work offers a novel concept of encapsulating bacteria by gelation directly from the culture. This is achieved by crosslinking the bacterial alginate produced by the model microorganism *Azotobacter vinelandii*. Since this process was not described before, first its optimization was needed. Alginate production was determined gravimetrically, and its parameters were further characterized using available analytical methods – infrared spectroscopy to monitor structural parameters (monomer composition and the extent of acetylation), dynamic light scattering to characterize the size distribution and AF4-MALS-dRI to obtain the molecular weight. Bacterial PHB production was also investigated using gas chromatography and infrared spectroscopy. The second part of the work is focused on the optimization of the gelling process using bacterial alginate from the culture and CaCl_2 as a crosslinking agent. Rheological experiments were used as a tool in understanding the viscoelastic properties of the prepared gels.

Gelation was demonstrated within the first day after inoculation. Maximum production of alginate ($1,9 \pm 0,3$) g/l was reached on the fourth day after inoculation. It was found that the addition of 5 g/l of calcium carbonate promotes the production of alginate. Nevertheless, further addition of CaCO_3 (30 g/l) showed adverse effects on the molecular weight and is therefore not recommended. Production of PHB was confirmed by both FTIR and GC measurements, with a maximum yield of (23 ± 3) % CDW. Rheological testing confirmed that the product of the crosslinking was a gel. It was found that the crosslinker concentration plays an important role at time 0 min of the gelation, forming a denser network in the structure and causing higher rigidity. Using the highest studied concentration of CaCl_2 , the critical strain reached values of ($5,0 \pm 0,7$) %. Finally, the incorporation of bacterial cells into the hydrogel was confirmed using fluorescence microscope.

KEY WORDS

Azotobacter vinelandii, alginate, encapsulation, polyhydroxyalkanoates, PGPB.

ORIŠKOVÁ, Sofia. *Inkorporace mikrobiálních buněk do hydrogelových nosičů*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/124083>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petr Sedláček.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....

Sofia Orišková

POĎAKOVANIE

V prvom rade chcem poďakovať môjmu mentorovi a vedúcemu tejto práce Ing. Petrovi Sedláčkovi, Ph.D, za všetky vedomosti, ktoré mi za roky našej spolupráce odovzdal, ako aj za pozitívne naladenie a preukázanú podporu, keď som ju potrebovala. Bolo mi čťou spolupracovať s mojím profesijným vzorom, ktorému ešte raz ďakujem za prejavenu dôveru v moje schopnosti. Obrovská vďaka patrí mojej konzultantke, Ing. Eve Slaninovej, za pomoc pri experimentoch a prejavenu záujem skvalitniť túto prácu vo všetkých smeroch. Ďalej patrí moja vďaka Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D za pomoc pri reologických experimentoch a Ing. Michalovi Kalinovi, Ph.D za pomoc a rady. Chcem poďakovať aj celému kolektívu z laboratória C242b, menovite Ing. Ivane Nováčkovej za profesionálny a milý prístup. Ďakujem aj mojím priateľom Kačke Seidlovej, Vaškovi Kubíčkovi a Hanke Mai za podporu a spríjemnenie štúdia. Chcem sa poďakovať Diane Černayovej za to, že je vynikajúcou priateľkou a prajem jej veľa úspechov v pokračovaní v téme tejto diplomovej práce v rámci jej doktorandského štúdia. Joãovi Fernandesovi ďakujem za všestrannú podporu, ako aj za inšpiráciu a motiváciu, ktorú čerpám z jeho pracovnej morálky. Na záver patrí moja obrovská vďaka mojej mame, Silvii Taricsovej, za to, že je za každých okolností mojou najväčšou fanúšičkou.

OBSAH

1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČASŤ	9
2.1 Rast podporujúce (rizo)baktérie	9
2.1.1 Zlepšenie tolerancie abiotického stresu v rastlinách	10
2.1.2 Fixácia dusíku	11
2.1.3 Rozpúšťanie fosforu	11
2.1.4 Produkcia fytohormónov	12
2.1.5 Produkcia prchavých organických zlúčenín	13
2.1.6 Produkcia sideroforov	13
2.1.7 Modelový mikroorganizmus <i>Azotobacter vinelandii</i>	13
2.2 Polyhydroxyalkanoáty	16
2.2.1 Molekulárna štruktúra PHA	16
2.2.2 Výhody PHA producentov v poľnohospodárstve	17
2.3 Alginát	18
2.3.1 Molekulárna štruktúra a kompozícia	18
2.3.2 Morfológia	19
2.3.3 Tvorba gélov	20
2.4 Enkapsulácia	22
2.4.1 Enkapsulačné techniky	22
3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	26
3.1 Charakterizácia nosiča pre baktérie	26
3.1.1 Enkapsulácia mikroorganizmov v poľnohospodárstve	27
3.2 Aplikačné formy PGPB	28
4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	29
4.1 Použité mikroorganizmy, chemikálie a prístroje	29
4.1.1 Použitý mikroorganizmus	29
4.1.2 Použité chemikálie	29
4.1.3 Prístrojové vybavenie	29
4.2 Kultivačné experimenty	31
4.2.1 Všeobecné kultivačné podmienky	31
4.2.2 Optimalizácia produkčného média	31
4.2.3 Produkčná kultivácia pre charakterizačné a gelačné experimenty	32
4.3 Analýza vzoriek bakteriálnych kultúr v priebehu kultivácie	32
4.3.1 Stanovenie obsahu sušiny a optickej hustoty kultúry	32
4.3.2 Analýza supernatantov získaných odstredením bunečnej kultúry	32
4.3.3 Analýza suchej biomasy bakteriálnych kultúr	34

4.4	Gelácia bunčných kultúr	34
4.4.1	Kvapková metóda tvorby gélov z kultúry a supernatantu.....	34
4.4.2	Mikroenkapsulácia	35
4.4.3	Tvorba makrogélov	35
4.5	Charakterizácia pripravených gélov	35
4.5.1	Analýza deformačných vlastností metódou oscilačnej reometrie	36
4.5.2	Overenie prítomnosti mikrobiálnych buniek v géli.....	37
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA	38
5.1	Optimalizácia kultivácie a jej charakterizácia	38
5.1.1	Výber kultivačného média	38
5.1.2	Rast bakteriálnej kultúry v optimálnom produkčnom médiu	39
5.1.3	Produkcia alginátu a charakterizácia jeho kvality.....	39
5.1.4	Stanovenie a charakterizácia PHB	50
5.1.5	Vplyv vyššieho prídavku CaCO ₃ na priebeh kultivácie.....	53
5.2	Gelácia vyprodukovaných bunčných kultúr	58
5.2.1	Mikroenkapsulácia	58
5.2.2	Tvorba makrogélov	59
5.2.3	Mechanické vlastnosti získaných makrogélov	60
5.3	Overenie prítomnosti bakteriálnych buniek v géli	67
6	ZÁVER	68
	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	70
	ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK	81
	PRÍLOHY	83

1 ÚVOD

Poľnohospodárstvo je jednou z aktivít človeka, ktorá najviac prispieva k nárastu chemického znečistenia, a to pre nadmerné používanie umelých hnojív a pesticídov. Tieto nebezpečné látky devastujúce životné prostredia a zároveň predstavujú i priamy risk pre zdravie ľudí. Oxid dusný, ktorý je zložkou dusíkatých hnojív, je jedným z príkladov látok zodpovedných za globálne znečistenie. Oficiálne údaje FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) ukazujú, že emisie pôsobené konvenčnými hnojivami v rámci 21. storočia majú rastúci trend a podľa posledných údajov z roku 2017 dosiahli hodnotu takmer 700 000 Gg [1]. Ďalším negatívnym dôsledkom konvenčných hnojív je znížená biologická fixácia dusíku. V poľnohospodárstve je dusík prítomný v hnojive vo forme dusičnanu amónneho. Prítomnosť symbiotických mikróbov je pre vysoký obsah amoniaku pre rastliny nepotrebná, a to vedie k masívnemu zníženiu ich zastúpenia v pôde. Amoniak sa následne dostáva do podzemných vôd alebo, vďaka denitrifikačným baktériám, späť do atmosféry [2].

Aplikácia baktérií podporujúcich rast rastlín (PGPB) môže byť čiastočnou náhradou či doplnkom ku konvenčnému hnojeniu, čím umožňuje znížiť dávky minerálnych hnojív a tým i odpovedajúcu environmentálnu záťaž. PGPB stimulujú rast rastlín, zvyšujú úrodu, zbavujú rastlinu patogénov a redukovujú biotický i abiotický stres rastlín. I keď všetky spomínané efekty boli preukázané na modelových experimentoch, v mnohých prípadoch PGPB nevyvolali požadované účinky pri aplikácii priamo do pôdy. Nedostatočná kolonizácia či inherentná heterogenita pôdy je kľúčovou prekážkou. Inokulované baktérie môžu mať ťažkosti pri adaptácii v porovnaní s lepšie adaptovanou prirodzenou mikroflórou. Problémom je aj otázka použitého nosiča. Ak sa žiadny nosič neaplikuje, baktérie sú vystavené prostrediu bez akejkoľvek ochrany. Bolo viackrát preukázané, že nosič je pre aplikáciu PGPB absolútne esenciálny a bez neho sú baktérie zväčša neživotaschopné. Na druhej strane, inkorporácia baktérií do nosiča je technologickou komplikáciou a je spojená s ďalšími finančnými nákladmi na nosný materiál.

Cieľom tejto práce je ponúknuť alternatívu riešenia spomínaných nedostatkov za využitia inherentných vlastností vybranej baktérie. Základom sú už známe koncepty bakteriálnej produkcie polymérov a využitie doposiaľ nepopísanej kombinácie týchto konceptov. Ide o nový prístup inkorporácie baktérií do hydrogélových nosičov, ktorý má potenciál zatriktívniť ich využitie v poľnohospodárstve.

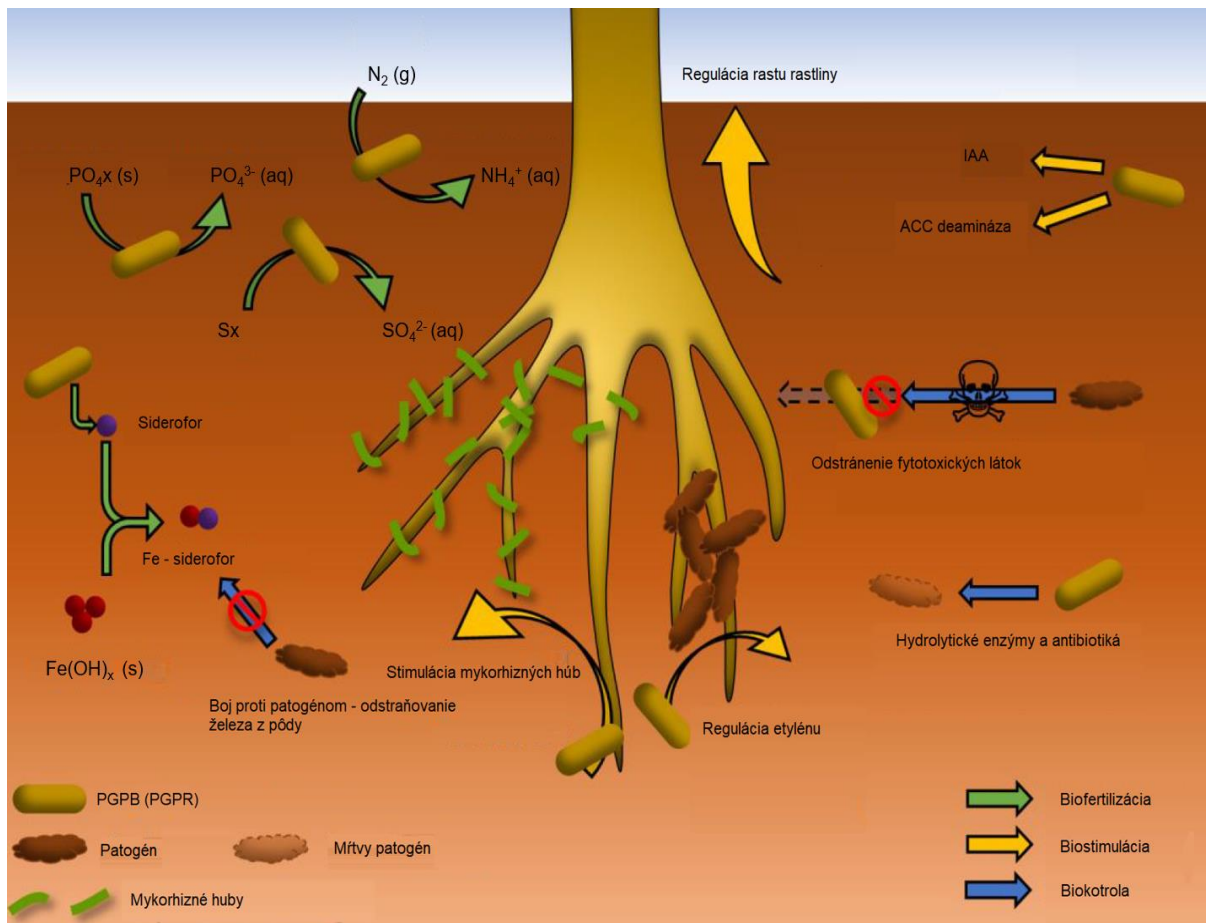
2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Rast podporujúce (rizo)baktérie

I keď o baktériách sa nevedelo až do ich objavenia holandským vedcom *Antonie van Leeuwenhoekom* (1876), ich využitie na stimuláciu rastu rastlín bolo využívané od staroveku. *Theofrastos z Eresu* (373–287 pred Kr.) radil „dodať pôde srdce“ zmiešaním rôznych vzoriek zeme [1]. V 19. storočí *Hellriegel* a *Wilfarth* skúmali kolonizáciu koreňov trávy a strukovín pôdnymi baktériami a ich schopnosť meniť atmosférický dusík na rastlinami využiteľnú formu [3]. Termín rizobaktérie podporujúce rast rastlín (*plant growth promoting rhizobacteria* – PGPR) bol zavedený *Kloepperom* a *Schrothom* v roku 1978, ktorí sa zaoberali skúmaním nárastu hmotnosti redkovky za prídavku rôznych kmeňov baktérií do pôdy [4]. *Plant growth promoting bacteria* – PGPB je širší termín, ktorý zahrňuje baktérie nachádzajúce sa v rizosfére, endosfére alebo fylosfére, ktoré majú pozitívny vplyv na rast rastliny [5]. Rizosféra je úzka zóna v pôde, ktorá obklopuje a ovplyvňuje korene rastlín. Jedná sa o jeden z najkomplexnejších ekosystémov na zemi, v ktorom sú prítomné baktérie, huby, riasovky, hlístovce, prvoky, riasy, vírusy, archeóny a článkonožce. Títo členovia mikrobiómu rizosféry sú súčasťou komplexnej potravinovej siete a využívajú veľké množstvo (5-30 % fotosynteticky viazaného uhlíku) výživných látok uvoľňovaných rastlinou (napr. cukry, organické kyseliny a aminokyseliny). Mikrobiálna populácia prítomná v rizosfére je relatívne odlišná od populácie okolitej pôdy pre prítomnosť koreňových exsudátov, ktoré sú zdrojom živín pre mikrobiálny rast. Kľúčové fyzikálne faktory ovplyvňujúce aktivitu rizosféry sú teplota, dostupnosť vody, pH, kyslík a štruktúra pôdy [6]. Ako dokázali *Weller* a *Thomashow* (1994), kvantita baktérií prítomných v okolí koreňov rastlín je spravidla desať až stokrát vyššia ako mimo rizosféry [7]. Keďže majoritná časť PGPB sa nachádza v rizosfére, často sú termíny PGPB a PGPR používané ako synonymá [8]. Príklady PGPB ako aj ich hlavné princípy pôsobenia na rastlinu sú zhrnuté v tab. 6 v prílohe. Ďalší podobný termín, tzv. bio hnojivá, zvyčajne označuje produkt, ktorý obsahuje pôdne mikroorganizmy aplikované pre podporu rastu rastlín. *Vessey* (2003) definoval bio hnojivá ako materiál obsahujúci živé mikroorganizmy, ktoré pri aplikácii k semenám, na povrch rastliny alebo do pôdy kolonizuje rizosféru alebo vnútro rastliny a podporuje rast zvýšením prísunu či prístupu základných živín hostujúcej rastliny [9].

Prvou úlohou pri možnom použití PGPB je nájsť vhodnú baktériu pre experimenty, čo závisí hlavne na pestovanej plodine a atribútoch pôdy, kde sa rastlina pestuje. V doterajších prácach zameraných na túto tému sa identifikovalo nespočetné množstvo PGPB s pestrými mechanizmami pôsobenia, ktoré sú pre lepšie porozumenie graficky zhrnuté na obr. 1. Je užitočné rozdeliť PGPB na základe rôznych kritérií. Podľa interakcie PGPR s rastlinou, PGPR môžeme rozdeliť na symbiotické baktérie, ktoré žijú vo vnútri rastlín a vymieňajú si s nimi metabolity priamo (napr. *Azorhizobium*, *Rhizobia*, *Sinorhizobium*); a voľne žijúce rizobaktérie, ktoré existujú mimo rastlinných buniek (napr. *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Enterobacter*). Ďalšie delenie môže byť na základe mechanizmu účinku – priamy a nepriamy. Príkladom priameho mechanizmu účinku je biofertilizácia, stimulácia rastu koreňov či kontrola stresu rastliny. Do tejto kategórie spadá tvorba rastlinných hormónov, napr. auxínov, cytokinázy, gibberelínov, etylénu alebo kyseliny abscisovej. Nepriamym mechanizmom je preventívna ochrana pred škodlivými efektmi fytopatogénnych organizmov, ktorej sa dosahuje produkciou sideroforov – malých molekúl viažucich kovy. Ďalším možným nepriamym mechanizmom je tvorba kyanovodíku a/alebo enzýmov degradujúcich steny plesňových buniek (napr. chitinázy, β -1, 3-glukanázy), kompetitívna exklúzia patogénov či odstránenie fyto toxických zlúčenín [3; 10; 11]. Na obr. 1 vidíme tri hlavné prúdy: baktérie buď syntetizujú užitočnú zlúčeninu pre rastlinu, napomáhajú príjmu v pôde prítomných živín alebo plnia ochrannú funkciu pred fytopatogénnymi organizmami (napr. *Colletotrichum acutatum*, *Verticillium dahliae*,

Rhizoctonia solani) [12; 13]. Jednotlivé pozitívne vplyvy sú bližšie popísané v ďalších kapitolách.



Obr. 1: Možné mechanizmy pôsobenia PGPB v rizosfére [14]

2.1.1 Zlepšenie tolerancie abiotického stresu v rastlinách

Abiotický stres je vplyv faktorov prostredia, ktorý nesúvisí s živými organizmami. Obvykle sa k týmto faktorom radí podnebie, ovzdušie, voda, vlhkosť, teplota, svetlo, salinita či koncentrácia ťažkých kovov [15]. Práve abiotický stres je vnímaný ako hlavná príčina redukcie výnosu úrody; závisí však na druhu pôdy a na pestovanej rastline. V tejto súvislosti sa využíva termínu indukovaná systémová tolerancia (angl. *Induced Systemic Tolerance* – IST), ktorý bol navrhnutý pre chemické a fyzikálne zmeny vyvolané PGPB, konkrétne zlepšenie tolerancie voči abiotickému stresu [16]. Spôsoby, ako by sa baktérie dali použiť v boji s abiotickým stresom, boli intenzívne študované: PGPB bojujú proti kontaminácii arzénom, ktorý sa nachádza v pôde ako výsledok ľudskej činnosti (používania pesticídov, ťažby nerastných surovín, skládkovania). Jedná sa o toxickú látku ohrozujúcu rast rastliny ako aj zdravie ľudí. Boli navrhnuté techniky kombinujúce mikroorganizmy a rastliny, ktoré vedú k zníženiu kontaminácie arzénom [17]. Napríklad *Pishchik* (2002) zistil, že určité kmene PGPB majú schopnosť viazať kadménaté ióny a tak znižovať toxicitu pôdy [18].

Extrémne sucho je jedným z najčastejších a najväznejších problémov v poľnohospodárstve. Preto je dôležité skúmať, ako by mohli PGPB pomôcť v tejto veci. Medzi pozitívne efekty pripisované PGPR patrí zvýšenie obsahu vody v rastline, redukcia poklesu potenciálu vody, zvýšenie foliárnej výživy a celkovej rastlinnej biomasy. Rovnako bola preukázaná i zvýšená

akumulácia prolínu v súvislosti s PGPB, ktorý slúži ako regulačný osmoprotektant a pomáha chrániť rastlinu pred suchom [19]

Salinita pôdy je tiež vážnym problémom, keďže 20 % všetkých polí a 33 % zavlažovaných polí je zasiahnutých vysokou mierou zasolenia. Predpokladá sa, že v roku 2050 bude zasiahnutých až 50 % celkovej ornej pôdy. Problémy súvisiace so salinitou pôdy skúmali napr. *Gonzalez* (2015) či *Fasciglione* (2015), ktorí použili bakteriálny kmeň *Azospirillum brasilense* na zlepšenie tolerancie jojoby a šalátu voči salinite tým, že tieto baktérie podporili zakorenenie rastlín v pôde [20; 21].

2.1.2 Fixácia dusíku

Ako už bolo zmienené vyššie, PGPB môžu zvyšovať koncentráciu živín v rizosfére rôznymi spôsobmi. Medzi najviac diskutované a najširšie skúmané patrí schopnosť fixácie vzdušného dusíku niektorými kmeňmi baktérií (napr. *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Azorhizobium*, *Rhizobia*). Dusík patrí medzi najdôležitejšie prvky v kontexte úrodnosti pôdy, pretože je pre rastliny potrebný na syntézu aminokyselín, proteínov, enzýmov, chlorofylu, DNA či RNA. Pre silné dažde dochádza k vyplavovaniu minerálnych látok a dusíku, čím dochádza k jeho deficitu v pôde. Bežným mechanizmom, ako je atmosférický dusík zavádzaný do pôdy je pomocou prokaryotov, ktorí ho menia na organickú formu ďalej využiteľnú rastlinami. Konkrétne, pre strukoviny sú špecifické symbiotické dusík-fixujúce baktérie [10]. Tie pomocou enzýmu nitrogenázy prevádzajú N_2 na amoniak. Typickým zástupcom sú baktérie *Rhizobia*, ktoré reagujú na molekuly flavonoidov – signály vyslané strukovinou. Týmto signálom sa indukuje expresia génov na tvorenie uzlín (angl. *nodulation*), čo spôsobí spätný signál na mitotické delenie buniek v koreni za tvorby uzlov. Jedná sa o komplikovaný molekulový dialóg medzi hostujúcou rastlinou a kompatibilným kmeňom baktérií [11]. Oproti tomu, nesymbiotická biologická fixácia N_2 je zabezpečená diazotrofmi, napr. kmeňmi *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* a iné. Medzi najčastejšie hostujúce rastliny patrí ryža, kukurica, cukrová repa či bavlna [3]. Blahodarné účinky inokulácie aeróbnou heterotrofnou baktériou *Azospirillum* viackrát opísal *Kennedy* (2004), vedec pracujúci v Centre pre fixáciu dusíku na univerzite v Sydney, na experimentoch na širokom spektre plodín [22; 23].

2.1.3 Rozpúšťanie fosforu

Fosfor tiež patrí medzi esenciálne prvky pre rastliny – je zodpovedný za reguláciu syntézy proteínov, hrá rolu pri delení buniek a prispieva k správne mu vývoju koreňového systému rastliny. Ironicky, pôdy majú veľkú zásobu celkového fosforu, no v nedostupnej forme pre rastliny. Rastliny prijímajú fosfor v dvoch formách: ako $H_2PO_4^-$ a HPO_4^{2-} , tie formy sú však v pôde v nízkych koncentráciách [24]. Dôvodom je vysoká reaktivita rozpustného fosforu s oxidmi železa a hliníka v kyslých pôdach. Veľká časť fosforu taktiež putuje do vôd, čo je výsledkom vysokej akumulácie fosforu v dôsledku dlhodobého hnojenia. Keďže sa jedná o neobnoviteľný zdroj, je potrebné vyvinúť systém s čo najlepším využitím fosforu a zároveň s minimálnym nepriaznivým vplyvom na životné prostredie. Ako jedným z riešení sa ponúkajú fosfor rozpúšťajúce mikroorganizmy, ktoré sú schopné premeniť nerozpustné zlúčeniny fosforu na rozpustné formy (väčšinou sa jedná o organické kyseliny obsahujúce fosfor) [25]. Medzi PGPB s touto schopnosťou patrí napr. bakteriálny rod *Bacillus* či *Pseudomonas*. *Wani* (2007) priniesol zaujímavý koncept, kedy navrhol inokulovať v kombinácii s dusík fixujúcimi baktériami aj fosfor rozpúšťajúce z dôvodu synergistickej vlastnosti kombinácie kmeňov *Azotobacter*, *Pseudomonas* a *Penicillium*. Modelová plodina, cícer, mala v prípade inokulácie zvýšený príjem dusíka aj fosforu, rástla rýchlejšie a mala viac plodov v porovnaní s cícerom bez pridania baktérií [26]. Zistenia o výhodách inokulácie kombináciou baktérií boli preukázané

aj iných prácach: Turan (2012) zistil, že pri jednotlivjej inokulácii kmeňmi *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* a *Azospirillum brasilense* bol výnos zŕn 24 %, 19 % a 19 %, no pri kombinácií týchto troch kmeňov sa zaznamenal nárast výnosu na 33% v porovnaní s neinokulovanou vzorkou [27]. Je teda dokázané, že zmiešaná inokulácia PGPB môže byť efektívna náhrada fosforových hnojív.

2.1.4 Produkcia fytohormónov

Rastlinné hormóny, nazývané fytohormóny, sú chemické mediátory ovplyvňujúce schopnosť rastlín reagovať na svoje prostredie. Sú to prírodné organické látky, efektívne vo veľmi malých koncentráciách. Väčšinou sú priamo syntetizované v niektorej časti rastliny a podľa potreby sú transportované do iných častí. Ovpľyňujú fyziologické funkcie ako rast, diferenciáciu a vývoj, ale aj biochemické a morfológické procesy. Niektoré typy fytohormónov sú tvorené mimo rastliny a nazývajú sa regulátormi rastu rastlín (angl. *plant growth regulator*) [28]. Tieto prírodné regulátory sú dôležitým článkom a nástrojom posilnenia poľnohospodárskej produkcie a preto si zaslúžia priestor na detailnejšie popísanie.

2.1.4.1 Auxíny

Táto skupina látok dostáva vo výskume veľa pozornosti, keďže patrí k najbežnejším fytohormónom, ktoré baktérie produkujú. Fyziologicky najviac aktívny auxín sa nazýva kyselina indol-3-octová, väčšinou uvádzaná skratkou IAA (z angl. *indole-3-acetic acid*). Táto látka je najlepšie charakterizovaná, keďže sa jedná o najbežnejšie sa vyskytujúci regulátor rastu rastlín. Až 80 % baktérií (napr. *Azotobacter*, *Bacillus*, *Dioscorea*) izolovaných z rizosféry dokáže syntetizovať IAA. Hlavným účinkom tohto rastlinného hormónu je podpora rastu koreňov a pozitívny efekt na klíčenie [29].

2.1.4.2 Cytokiníny

Cytokiníny sú tiež dôležitými fytohormónmi. Pre ich nízku koncentráciu vo vzorkách je ich ťažké identifikovať aj kvantifikovať. Majú výrazne pozitívny efekt na delenie buniek, ako aj na vývoj koreňov, tvorbu koreňových vláskov či rozpínavosť listov. Rastliny si tento hormón vytvárajú samy, ale dokážu ho produkovať aj niektoré kmene baktérií čo vedie k zvýšeniu obsahu cytokinínu v pôde. Medzi baktérie produkujúce cytokiníny patrí *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium leguminosarum* a *Paenibacillus polymyxa* [3]. Liu (2013) priamo preukázal príspevok produkcie cytokinínu baktériou *Bacillus subtilis*, ktorá sa vyznačuje vysokou produkciou cytokinínu, no nie je dusík fixujúca, neprodukuje iné fytohormóny ani siderofory a nepatrí ani medzi fosfor rozpúšťajúce baktérie, a teda všetky benefity v jeho práci mali pôvod v bakteriálnom cytokiníne [30].

2.1.4.3 Gibberelín

Ďalším významným fytohormónom je gibberelín, ktorého dominantným efektom je predĺženie výhonku. Taktiež vplýva na kvitnutie, vývoj plodu či rast listov. Príkladmi baktérií produkujúcich túto látku je napr. *Bacillus pumilus* či *Bacillus liceniformis* [31].

2.1.4.4 Etylén

Etylén je ďalším rastlinným hormónom riadiacim rôzne procesy, ako napr. dozrievanie ovocia, padanie listov, klíčenie semien či odozvy na stres. Na druhej strane, vysoké koncentrácie etylénu po klíčení vyvolá defoliáciu a bunkové procesy, ktoré vedú k inhibícii rastu koreňov a k predčasnému starnutiu rastlín. Výsledkom týchto negatívnych efektov je znížene úrody [10].

1-amynocyklopropán-1-karboxylát (ACC) je okamžitým prekursorom etylénu a je tvorený samotnou rastlinou. Niektoré baktérie vytvárajú enzým ACC deaminázu, nazývaný aj „odtok pre ACC“, ktorý hydrolyzuje ACC na α -ketobutyrate a amoniak, ktoré môžu byť baktériou využité

ako zdroj uhlíka a dusíka pre rast. Znižovaním vysokej koncentrácie etylénu nepriamo napomáha rastu rastliny. Medzi bakteriálne kmene, ktoré disponujú týmto enzýmom, patrí *Achromobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Phyllobacterium* či *Rhizobium* [32].

2.1.5 Produkcia prchavých organických zlúčenín

Prchavé organické zlúčeniny (z angl. *volatile organic compounds*, VOC) sú nízkomolekulárne zlúčeniny, ako alkoholy, aldehydy či ketóny, ktoré majú dostatočne vysoký tlak pár za normálnych podmienok na to, aby sa vyparovali a vstupovali do atmosféry. Tvorba VOC pôdnymi baktériami je dôležitým mechanizmom podpory rastu rastlín a medzi typických zástupcov týchto PGPB patria kmene ako *Bacillus subtilis* a *Enterobacter cloacae* [3]. Tieto baktérie produkujú látky 2,3-butándiol a acetoín, ktoré podporujú rast, zlepšujú odolnosť voči patogénom, zvyšujú rastlinnú biomasu a toleranciu voči abiotickému stresu [19]. Zhuang (2007) taktiež preukázal, že VOC produkované baktériami regulujú gény zodpovedné za modifikáciu bunkovej steny a produkciu auxínov. Presný mechanizmus pôsobenia VOC zatiaľ nie je jasne popísaný [33].

2.1.6 Produkcia sideroforov

Fe^{3+} kation sa bežne nachádza v prírode, no pre jeho nerozpustnosť vo forme minerálov je nedostupný rastlinám. Najviac zasiahnuté sú zásadité pôdy, ktoré majú vysoký deficit železa. Riešením problému sú siderofory, malé molekuly, ktoré viažu železité ióny z pôdy. Keď má rastlina nedostatok železa, baktérie produkujúce siderofory môžu tento deficit doplniť, čím nepriamo ovplyvňujú kondíciu rastliny [34]. Väzba železitých iónov môže byť použitá aj v boji proti fytopatogénnym organizmom. Produkcia sideroforov dovolí baktériám konkurovať patogénnym organizmom tým, že odstraňujú železo z prostredia. Tým zbavujú patogén esenciálnej látky pre ich rast a aktivitu [35]. Medzi bakteriálne rody produkujúce siderofory možno zaradiť napr. *Phyllobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* a iné [36].

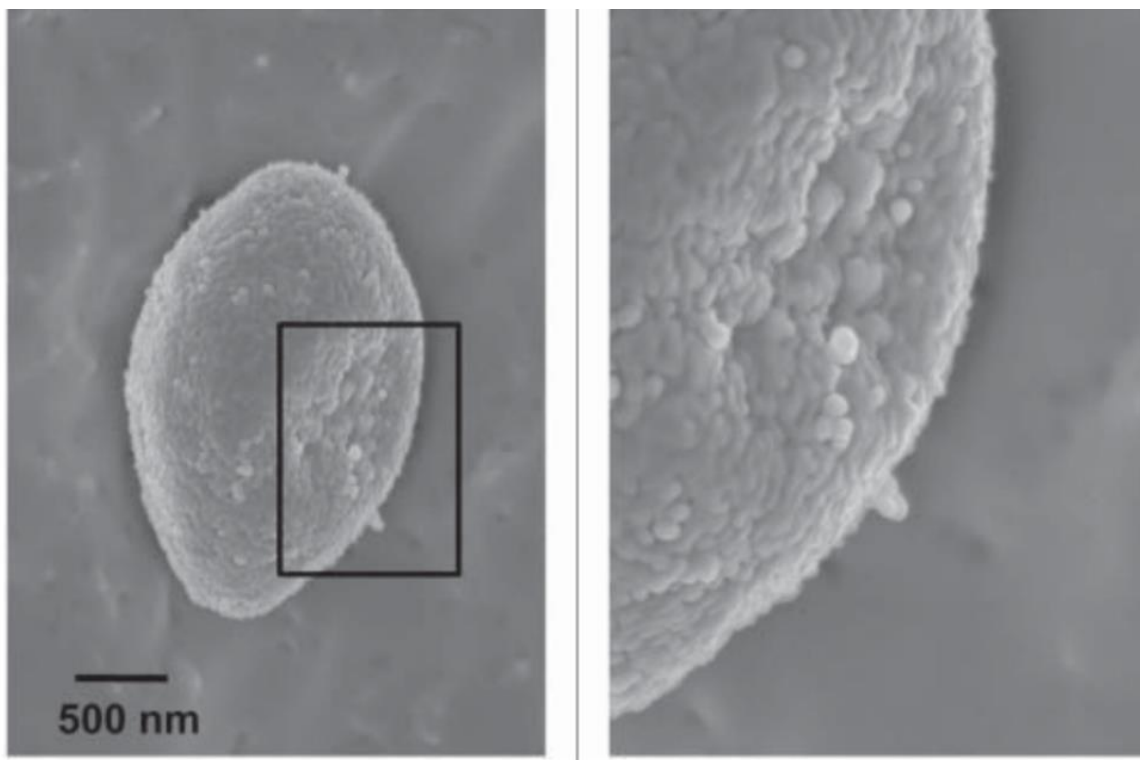
2.1.7 Modelový mikroorganizmus *Azotobacter vinelandii*

Z hľadiska témy tejto diplomovej práce bolo kľúčovým krokom výber modelového mikroorganizmu, ktorým sa stala baktéria *Azotobacter vinelandii*. Jedná sa o Gram-negatívnu, mezofilnú, striktno aeróbnu a široko distribuovanú voľne žijúcu pôdnu baktériu. Rastie na širokom spektre cukrov, alkoholov i organických kyselín. Na rozdiel od iných diazotrofov, *Azotobacter vinelandii* viaže N_2 z atmosféry aj v prítomnosti kyslíku. Je to zaujímavá vlastnosť, pretože nitrogenáza (enzým zodpovedný za štiepenie trojitej väzby v molekule N_2) je bežne aktívna len za anaeróbných podmienok. *Azotobacter vinelandii* však disponuje rôznymi mechanizmami, ktorými zabraňuje deaktivácii nitrogenázy kyslíkom. Medzi diskutované mechanizmy patrí tvorba komplexu takzvaným Shethna proteínom, sebaochrana redukovaním kyslíku na vodu či morfológická ochrana [37; 38].

Azotobacter vinelandii syntetizuje dva významné priemyselné polyméry. Ako prvý spomeniem alginát, ktorý je syntetizovaný z fruktóza-6-fosfátu za pomoci mnoho enzýmov [39]. Alginát je zložený z podjednotiek D-mannurónovej (M) a L-gulurónovej (G) kyseliny, ktoré môžu byť čiastočne acetylované. Tieto monoméry sú distribuované v polymérom reťazci v blokoch, rovnako ako pri algináte extrahovanom z hnedých rias [40]. Najnovšie výskumy sú zamerané na modelovanie kultivačných podmienok baktérií tak, aby sa získal čo najvyšší výťažok alginátu o požadovaných vlastnostiach (molekulová hmotnosť, pomer M/G, miera acetylácie a iné). Napr. v článku od Fuminori (2015) sa porovnáva produkcia tvorby alginátu a PHB na rôznych zdrojoch uhlíka – sacharóze, glycerole a glukóze. Najvyšší výťažok alginátu bol dosiahnutý za použitia glukózy. Zároveň zistili, že produkcia alginátu a PHB je kompetitívny

proces. Pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie (SEM) (viď obr. 2) zachytili proces sekrécie alginátu bunkami *Azotobacter vinelandii* [41]. Tiež preukázali negatívny vplyv octanov, ktoré sa neodporúčajú pridávať do kultivačného média [42]. Treba však podotknúť, že iní autori naopak preukázali zvýšenú produkciu alginátu po prídavku acetátu [40], čo dobre ilustruje nakoľko komplexný a doposiaľ nie dokonale preštudovaný biotechnologický proces produkcia bakteriálneho alginátu predstavuje. V literatúre bolo taktiež preukázané, že prítomnosť uhličitanu vápenatého podporuje rast baktérií a fixáciu dusíku, no v pôde môže mať i negatívne účinky, kedy vie podporiť baktérie oxidujúce amoniak a akumulovať emisie N_2O [43]. V publikácii od *Browning a kol.* (2020) bola tiež preukázaná schopnosť alginátu adsorbovať sa na povrch $CaCO_3$ a tvoriť hydratované vrstvy, čoho by sa pri enkapsulácii baktérií mohlo využiť [44].

Publikácie týkajúce sa mikroorganizmu *Azotobacter vinelandii* sa zaoberajú aj vplyvom kyslíku na molekulárny mechanizmus tvorby alginátu a jeho molekulovú hmotnosť, konkrétne parametre *DOT* (z angl. *dissolved oxygen tension*) a *qO₂* (z angl. *specific oxygen uptake rate*). Čím menšie hodnoty nadobúdajú tieto veličiny, tým je vyššia molekulová hmotnosť alginátu [45; 46; 47]. V článku od *Pacheco-Leyva* (2016) sa upozorňuje na fakt, že acetylované M podjednotky sú chránené pred epimerizáciou, pretože len neacetylované M jednotky môžu epimerizovať na G jednotky pomocou enzýmu AlgG epimerázy. Jedná sa o dôležitý poznatok z hľadiska tvorby gélov, keďže za použitia Ca^{2+} ako sieťovacieho činidla je práve G podjednotka tou kľúčovou (viď 2.3). Je vhodné zmieniť, že niektorí autori tvrdia, že alginát produkovaný baktériou *Azotobacter vinelandii* nie je acetylovaný, kým v iných publikáciách potvrdili prítomnosť acetylovaných skupín [48; 49; 50]. Rovnako bol preukázaný významný vplyv prídavku vápenatých solí do kultivačného média na pomer G a M monomérov. Nízke koncentrácie Ca^{2+} podporili vznik mannurónovej kyseliny, pri zvýšenej koncentrácii bol vznikajúci polymér bohatší na gulurónovú kyselinu [47].



Obr. 2: Sekrécia alginátu z bunky baktérie *Azotobacter vinelandii* [41]

Druhým významným polymérom produkovaným bunkami kmeňa *Azotobacter vinelandii* je polyhydroxybutyrát (PHB), syntetizovaný v trojkrokovom procese z acetylkoenzýmu A za pomoci troch *phb* génov. *Azotobacter vinelandii* akumuluje PHB za stresových rastových podmienok aby ho v prípade potreby mohol využiť ako zdroj energie a uhlíku. PHB je prítomný v cytoplazme bakteriálnej bunky ako vo vode nerozpustné granule. Okrem toho, že PHB slúži ako rezervná látka, má sa podieľať aj na fixácii dusíku. O niektorých mutantoch baktérie *Azotobacter vinelandii* sa uvažuje ako o potenciálnom priemyselnom zdroji PHB [39; 41].

2.2 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) sú skupina známych biodegradovateľných biopolymérov. Od ich objavenia v baktérii *Bacillus megaterium* v roku 1926, bola identifikovaná široká škála PHA s rôznymi vlastnosťami u viac ako 90 rodov baktérií. Medzi producentov patria kmene *Pseudomonas sp.*, *Cupriavidus necator*, *Bacillus sp.* a *Azotobacter vinelandii*, ktoré syntetizujú PHA pod rastovým stresom. Bioprodukciou PHA sa vyznačujú aj niektoré transgénne rastliny, napr. *Arabidopsis thaliana*, *Camelina sativa*, *Nicotiana tabacum* a *Saccharum officinarum* [51]. PHA sa v ostatných rokoch venuje vysoká pozornosť, pretože sa považujú za alternatívu ku konvenčným petrochemickým plastom. Majú porovnateľné mechanické vlastnosti s polypropylénom, no navyše sú biokompatibilné a biodegradovateľné [52].

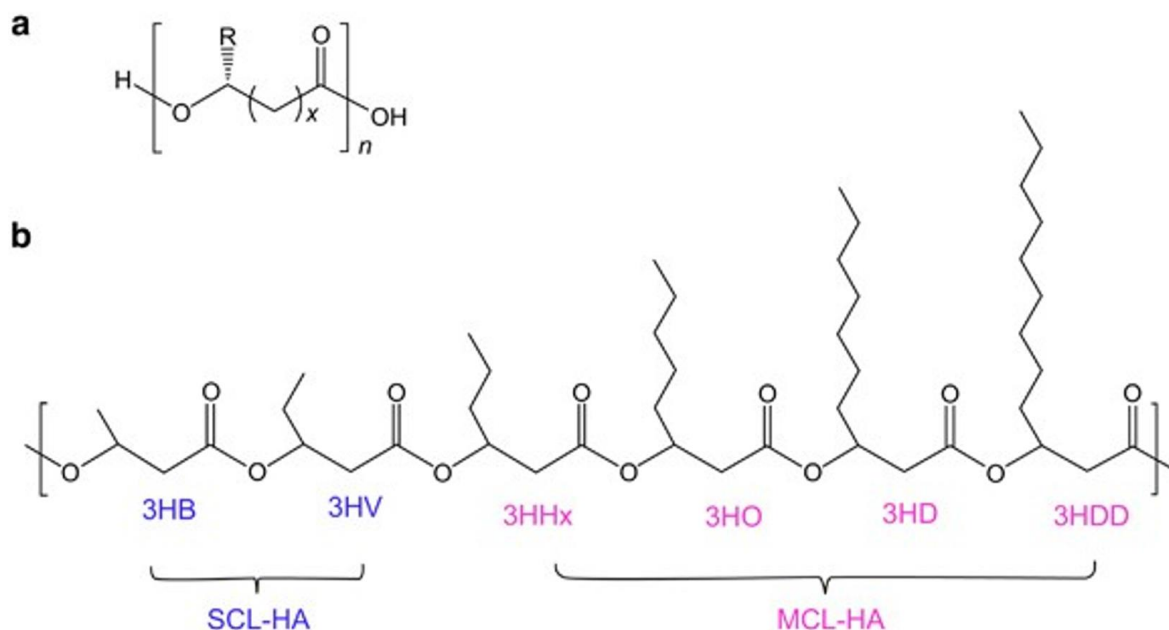
Poly(3-hydroxybutyrát) (skratka PHB) je v prírode najrozšírenejším PHA, laboratórne sa však podarilo pripraviť rôzne kopolyméry s lepšimi vlastnosťami alebo modifikáciami podľa aplikácie. Identifikácia nových bakteriálnych kmeňov so schopnosťou tvoriť nové PHA monoméry stále prebieha. Produkcia PHA na industriálnych fermentoroch je už doladený biotechnologický proces. Cieľom je čo najvyšší výťažok produkcie PHA s minimálnymi nákladmi. Ako zdroj uhlíku sa najčastejšie používa glukóza. PHA pre svoju biokompatibilitu nachádza uplatnenie v medicíne alebo vo farmaceutickom sektore (napr. pri príprave scaffoldu alebo enkapsulácii liečiv), no začína nájsť využitie aj v poľnohospodárstve (napr. materiál pre mulč a ochranné siete), kde je využívaná predovšetkým pre jej dobrú biodegradabilitu [53; 54].

2.2.1 Molekulárna štruktúra PHA

PHA sú lineárne polyester hydroxyalkanových kyselín. Jednotlivé hydroxyalkanové kyseliny sú spojené esterovou väzbou, ktoré vznikajú kondenzačnou reakciou medzi hydroxylovou a karboxylovou skupinou monomérov. Typ monomérov určuje vlastnosti výsledných materiálov [53].

PHA môžeme rozdeliť do troch skupín na základe počtu atómov uhlíku v monomérych jednotkách (viď obr. 3). PHA s krátkym reťazcom (angl. *short-chain-length hydroxyalkanoate* = SCL-HA) majú 3 až 5 atómov uhlíku, so stredne dlhým reťazcom (angl. *middle-chain-length hydroxyalkanoate* = MCL-HA) majú 6 až 14 atómov uhlíku a PHA s dlhým reťazcom (angl. *long-chain-length hydroxyalkanoate* = LCL-HA) má 14 a viac atómov uhlíku.

Poznáme až 150 rôznych PHA monomérov, čo z nich robí najväčšiu skupinu prírodných polyesterov. Zaujímavosťou je, že všetky doteraz charakterizované PHA majú atóm uhlíku substituovaný hydroxyskupinou v R-konfigurácii. Ide o dôsledok stereošpecifity enzýmov zapojených do produkcie PHA [55; 56].



Obr. 3: (a) Všeobecná molekulárna štruktúra PHA; hodnoty x typicky 1 až 8; hodnoty n typicky 100 až 1 000. (b) Bežne syntetizované monoméry s krátkym reťazcom a so stredne dlhým reťazcom. 3HB: 3-hydroxybutyrát; 3HV: 3-hydroxyvalerát, 3HHx: 3-hydroxyhexanónát; 3HO: 3-hydroxyoktanoát; 3HD: 3-hydroxydekanoát; 3HDD: 3-hydroxydodekanoát [52]

2.2.2 Výhody PHA producentov v poľnohospodárstve

Fixácia vzdušného dusíku, jedna z najdôležitejších príspevkov pôdných baktérií, je energeticky zaťažujúci proces. Producenti PHA majú (voči neproducentom PHA) výhodu, že môžu tieto energetické nároky čiastočne pokryť degradáciou zásobného PHA [57].

Ďalej je známe, že PHA podporuje prežitie baktérií za rôznych stresových podmienok. Štúdie zapojenia PHA do stresovej odpovedi baktérií sú založené na skúmaní stresových faktorov na producenta PHA v porovnaní s neproduktujúcim mutantom rovnakej baktérie. *Tal a kol.* (1985) preukázali vyššiu odolnosť voči UV žiareniu, extrémnemu suchu a osmotickému tlaku [58]. Bolo opakovane preukázané, že práve PHA zaručuje prežitie baktérií pri nízkych teplotách, dokonca boli nájdení PHB producenti v subarktických regiónoch [59; 60]. Produkcia PHA je dôležitá pre PGPR aj v procese nodulácie. *Aneja a kol.* (2005) preukázali, že ukladať zásoby PHB v bunkách je kľúčovým faktorom pre konkurenčné prežitie pri fluktuácii dostupnosti uhlíka [61].

Baktérie benefitujú z produkcie PHA aj pri biosanácii – procese odstránenia kontaminácie z vody či pôdy mikroorganizmami. Zo samotnej definície biosanácie je jasná jej limitácia: vysoké hodnoty kontaminantov sú obyčajne toxické nie len pre nás, ale aj pre samotné baktérie. Práve v tomto bode PHA pomôže svojim producentom prežiť, ktorí môžu pokračovať vo svojej prospešnej činnosti dekontaminácie [62].

Tieto vyššie uvedené ochranné funkcie chránia PHA producentov v pôde, kde sú vystavené už spomínaným stresovým faktorom. PHA produkciu, spojenú s celkovo lepšou kondíciou, robustnosťou a odolnosťou baktérií, považujem za silnú výhodu baktérií v poľnohospodárstve.

2.3 Alginát

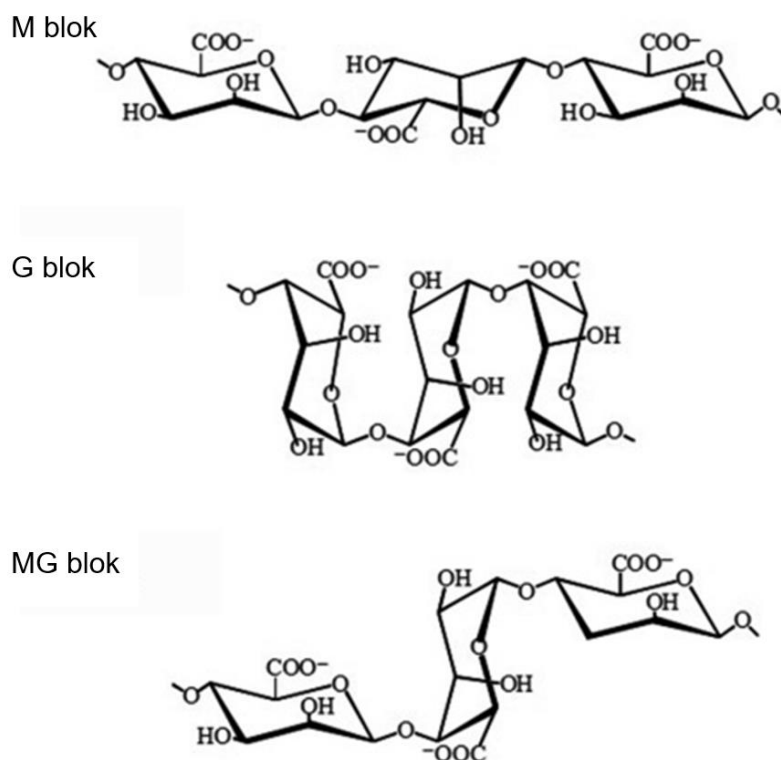
Alginát je polysacharid patriaci medzi lineárne biokopolyméry. Získava sa hlavne z hnedých morských rias, ktoré vďaka za pevnosť a pružnosť práve alginátu v ich bunčných stenách. Alginát poznáme vo forme alginovej kyseliny, no využívanjšia a viac preštudovaná je jej soľ, alginát sodný. Vo vodnom prostredí sa sieťuje pomocou viacmocných kationov za tvorby hydrogélu [63]. Hydrogély sú definované ako trojrozmerné sieťovité štruktúry, ktoré dokážu absorbovať veľké množstvo vody do svojej poréznej štruktúry. Sú to materiály, ktoré sa vytvárajú fyzikálnou interakciou alebo chemickým sieťovaním hydrofilného polymérneho reťazca. Molekuly vody prenikajú do intersticiálnych priestorov trojdimenzionálnej polymérnej siete, čím hydrogél imituje biologické tkanivo. Množstvo absorbovanej vody závisí na porozite hydrogélu a na hydrofilitite funkčnej skupiny polyméru. Aplikácia alginátových gélových častíc môže byť užitočná v potravinárskom, chemickom, farmaceutickom priemysle, ale aj v poľnohospodárstve [64].

Celková produkcia alginátu je asi 40 000 ton ročne, z čoho 30 % je použitých v potravinárstve [65]. Alginátové gélové častice sú často používané pre ich výborné vlastnosti ako biokompatibilita, biodegradabilita, jednoduchá a relatívne lacná výroba. Alginát je mimoriadne hodnotný pre jeho možnú aplikáciu pri enkapsulácii, kde pôsobí ako nosič pre aktívne materiály. V potravinárstve sa môže využiť jeho reologických vlastností (napr. zahustenie), výbornejšschopnosti viazať vodu, no používa sa aj ako stabilizačný alebo formotvorný element [66].

Gélové častice alginátu sa najbežnejšie získavajú iónovou geláciou. Veľkosť vzniknutých kapsúl závisí na spôsobe prípravy a pohybuje sa o priemere od niekoľkých stoviek nanometrov až po milimetre. Hustá štruktúra gélovej matrice uzamyká materiál v jadre a tvorí ochrannú bariéru, ktorá obmedzuje difúziu molekúl na základe ich veľkosti a/alebo náboja. Ďalej môže matrica minimalizovať degradáciu jadrového materiálu, zapríčinenú vonkajším prostredím či maskovať nežiaduce senzorické vlastnosti potravinárskych ingrediencií [67].

2.3.1 Molekulárna štruktúra a kompozícia

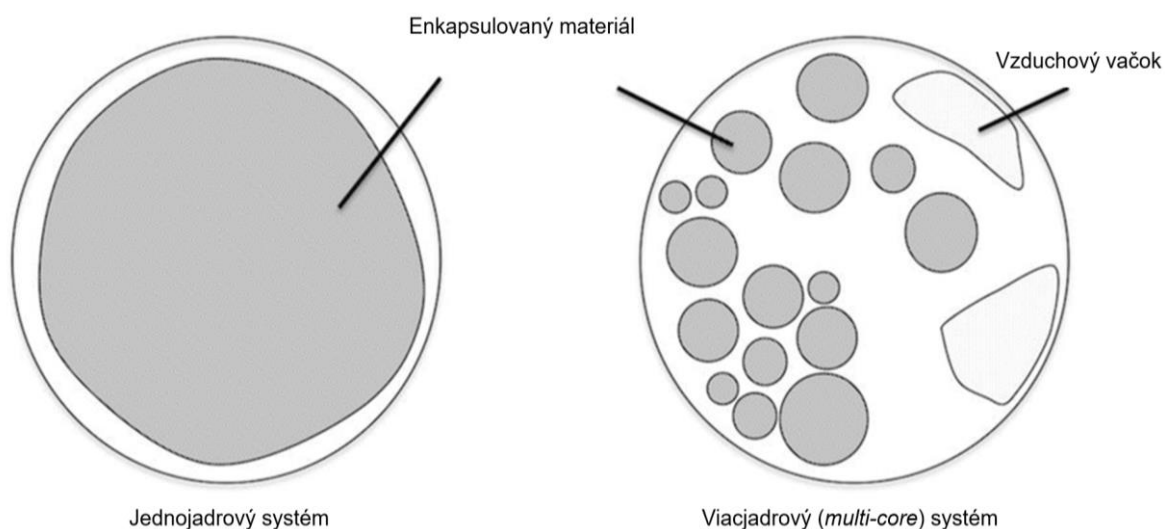
Alginát je tvorený dvoma monomérmi: β -D-mannurónovou kyselinou, označovanou "M", a α -L-gulurónovou kyselinou, označovanou "G". Tieto podjednotky sú viazané β -(1 \rightarrow 4) glykozidovými väzbami za tvorby kopolyméru – alginátu. Ako vidieť na obr. 4, alginát je tvorený blokmi, ktoré môžu obsahovať len M jednotky, len G jednotky alebo alternujúce bloky MG v rôznom pomere a poradí. Pomer a zastúpenie jednotlivých podjednotiek má kľúčový vplyv na možnosti sieťovania. Alginát môže extrahovaný z hnedých rias (*Phaeophyceae*) alebo získavaný bakteriálnou biosyntézou (napr. *Azotobacter*, *Pseudomonas*). Priemerná molekulová hmotnosť alginátu sa pohybuje okolo 20 000 až 200 000 Da [68; 69]. Alginát je komerčne dostupný vo forme sodnej, draselnej či amónnej soli [70].



Obr. 4: Chemická štruktúra M podjednotiek, G podjednotiek a MG podjednotiek alginátu [71]

2.3.2 Morfológia

Ako už bolo spomenuté, alginát je atraktívnym materiálom pri enkapsulácii – procese uzavretia aktívnej látky do ochranného obalu s účelom separácie aktívnej fázy od vonkajšieho prostredia. Kým úspešnosť tvorby gélov ovplyvňujú javy na molekulárnej úrovni, výsledná morfológia a veľkosť gélových častíc závisí najmä na metóde prípravy. Alginátové gélové častice môžu existovať ako jednojadrový (angl. *single-core*) alebo viacjadrový (angl. *multi-core*) systém, zobrazené na obr. 5. V jednojadrovom systéme je enkapsulovaná látka koncentrovaná v strede a je obalená vrstvou alginátového gélu. V druhom prípade je enkapsulovaný materiál dispergovaný v alginátovej matici [66].



Obr. 5: Možné morfológické usporiadania enkapsulovaného jadrového materiálu v alginátových gélových časticiach [66]

2.3.3 Tvorba gélov

Popri polysacharidoch ako chitozán, škrob či agar, aj alginát je schopných tvorby gélu. Existujú dve bežné metódy, ktorými možno alginát gellovať: iónové sieťovanie kationmi a kyslé zrážanie.

Kyslé gély sú tvorené, keď pH roztoku je znížená pod hodnotu disociačnej konštanty pK_a polyméru. M a G podjednotky alginátu majú hodnoty pK_a 3,38 a 3,65, v uvedenom poradí [72]. Z týchto hodnôt vyplýva, že alginát je záporne nabitý v širokom rozmedzí pH.

Existujú dve metódy ako znížiť pH. Prvou je rýchly postup, pri ktorom sa rýchlo zníži pH a alginát sa zráža vo forme agregátov. Druhou je pomalý postup, kedy sa tvorí kyselina alginová vo forme objemového gélu. Na rozdiel od iónových gélov, kyslé gély sú stabilizované vodíkovými väzbami a M jednotky hrajú kľúčovú rolu [63; 66].

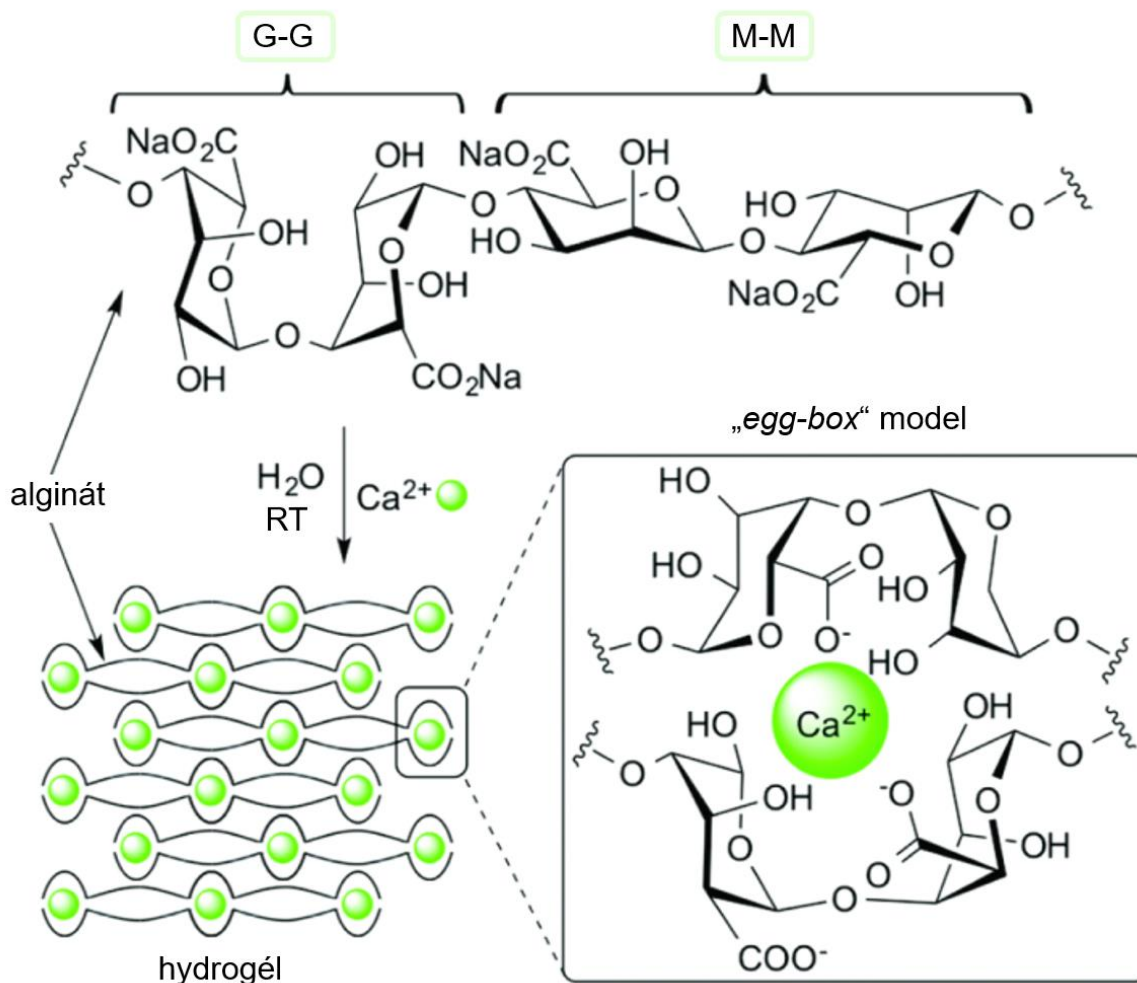
Iónové zrážanie je najrozšírenejší spôsob tvorby alginátového gélu. Využíva sa pri ňom prítomnosti viacvalentných iónov. Jedná sa o vysoko selektívny proces a afinita alginátu ku kationom narastá v nasledujúcom poradí:

$Mn < Zn, Ni, Co < Fe < Ca < Sr < Ba < Cd < Cu < Pb$.

Zo spomínaných kationov je použitie Cd, Cu a Pb limitované pre ich vysokú toxicitu. Zriedka sa používajú Sr a Ba kationy, ktoré sú mierne toxické. Najlepšou voľbou sú dvojvalentné kationy Ca^{2+} , ktoré sú netoxické a preto široko používané [73]. Negatívom vápenatých iónov (o ktorom sa málo diskutuje, ale predstavuje výrazný problém) je, že vytvorený gél sa ľahko destabilizuje chelátovými činidlami ako citráty, fosfáty, uhličitan a laktáty. Predstavuje to prekážku, keď potrebujeme uchovať enkapsulované baktérie v izotonickom prostredí (napr. vo fosfátovom pufre) [74].

Afinita alginátu ku kationom je priamo závislá na počte M, G a MG blokov prítomných v jeho štruktúre. Špecifickejšie, Ca^{2+} sa viaže s G a MG blokmi, Ba^{2+} s G a M blokmi a Sr^{2+} jedine s G blokmi [73]. Mechanizmus reakcie pozostáva z dimerizácie G jednotiek. Prídavok Ca^{2+} do roztoku polyméru spôsobí väzbu dvoch G reťazcov na opačných stranách. Týmto usporiadaním sa vytvorí „diera“ v tvare diamantu pozostávajúca z hydrofilnej dutiny, ktorá sa viaže s Ca^{2+} iónmi multikoordináciou, využívajúc atómy kyslíka z karboxylových skupín alginátu. Výsledkom tejto konfigurácie je tvorba takzvaného „egg-box“ modelu – 3D siete prepojených regiónov [75]. Ako vidieť na obr. 6, jeden kation sa viaže so štyrmi G jednotkami. Ak sa chce dosiahnuť kompaktniejšieho gélu, používajú sa trivalentné kationy, napr. Al^{3+} alebo Fe^{3+} [76].

V rámci iónového zrážania existujú dva prístupy. V najjednoduchšom prípade je roztok soli alginátu (najčastejšie alginátu sodného) kvapkaný do roztoku rozpustnej vápenatej soli (napr. $CaCl_2$). Okamžite nastáva tvorba gélov, ktoré si zachovávajú guľovitý tvar kvapiek. Druhým prípadom je interná metóda. Pri nej sú prítomné vápenaté ióny v chelatovanej forme. Zmenou pH sa Ca^{2+} ióny uvoľnia a tvoria gél s alginátom. Najštudovanejším systémom je uhličitan vápenatý s D-glukono- δ -laktónom, ktorý pomaly hydrolyzuje na glukónovú kyselinu, ktorá spôsobí zníženie pH čím sa zvyšuje rozpustnosť $CaCO_3$ a nastáva uvoľňovanie sieťovacích vápenatých iónov [72].



Obr. 6: Tvorba hydrogélu pomocou sieťovania alginátu kationmi Ca^{2+} [77]

Okrem kyslej a iónovej cesty tvorby gélov existujú aj nové, nekonvenčné metódy. Prvým príkladom je kryogelácia, ktorej zaujímavosťou je tvorba kryogélov s makropórmami až gigapórmami tvorenými rastúcimi kryštálmi rozpúšťadla. Ďalším príkladom je zrážanie ponorením. Vodný roztok alginátu sa ponorí do organického rozpúšťadla, najčastejšie do metanolu či etanolu. Molekuly alkoholu difundujú do vodného roztoku polyméru za vzniku alkogélu. Proces je sprevádzaný zmrštením. Posledný proces, ktorý spomeniem, je tvorba gélov indukovaná oxidom uhličitým. Do suspenzie uhličitanu (Ca, Sr, Ba, Zn, Cu, Ni alebo Co) vo vodnom roztoku alginátu sodného je privádzaný oxid uhličitý pod tlakom po dobu niekoľkých hodín. Nastáva uvoľnenie kationov z nerozpustnej alebo chelatovanej formy a vytvorí sa gél [72].

2.4 Enkapsulácia

Ako už bolo zmienené v podkapitole 2.3.2, enkapsuláciou sa separuje aktívna látka od vonkajšieho prostredia a to z rôznych dôvodov – buď ide o ochrannú funkciu, o maskovanie nežiadúcich vlastností, o postupné uvoľňovanie či predĺženie novej doby skladovania. Odvetia, pre ktoré je enkapsulácia vysoko atraktívna, sú potravinársky, farmaceutický či kozmetický priemysel [78].

Povaha aktívnej zložky ako aj obalu môže byť veľmi rôznorodá. Musí sa vychádzať z toho, prečo enkapsulujeme, čo enkapsulujeme a do čoho enkapsulujeme. Ako aktívne látky sa najčastejšie enkapsulujú enzýmy, liečivá, baktérie, vitamíny a oleje. Požiadavky na obalový materiál sa líšia, no najvyužívanejšie sú hydrofilné či hydrofóbne polyméry. V literatúre sa najčastejšie spomínajú nasledovné hydrogély: želatína, alginát, chitín, etyl celulóza a iné [79].

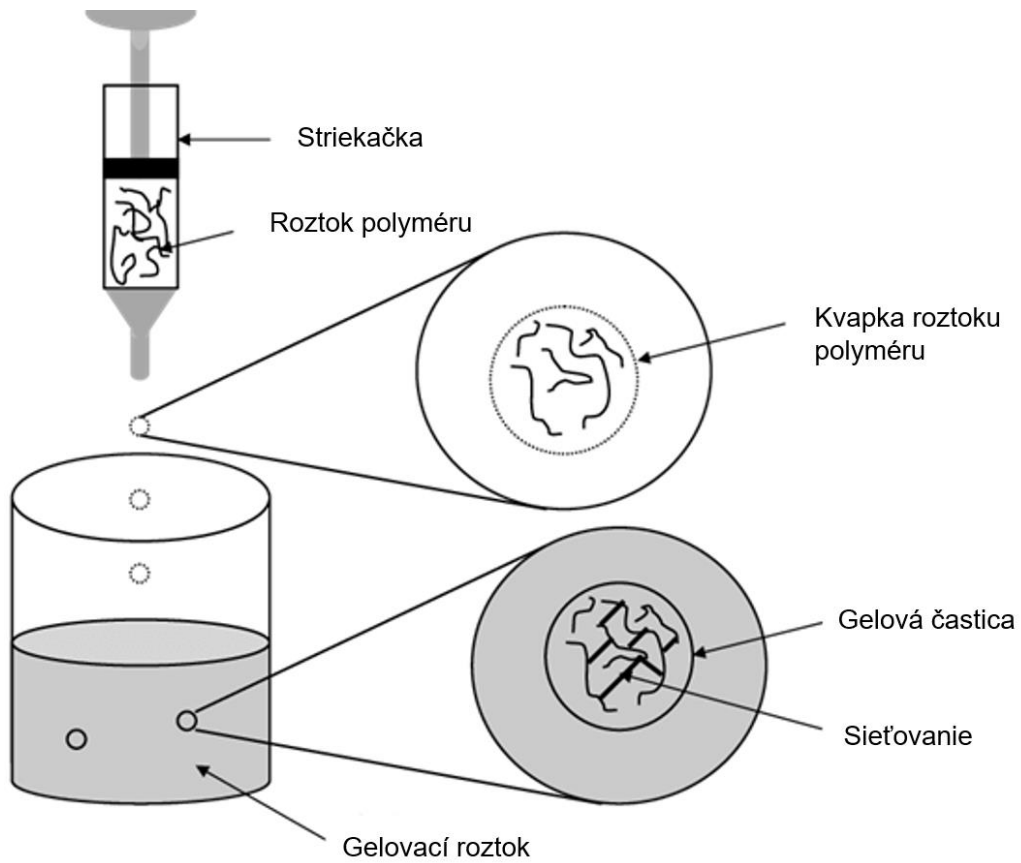
2.4.1 Enkapsulačné techniky

Pre väčšinu aplikácií je veľkosť gélových častíc kľúčový parameter. Mikrogély nachádzajú využitie predovšetkým v potravinárstve, kým menšie častice sa využívajú v medicíne. Nanogély o veľkosti 100-200 nm sa používajú pri pokusoch v boji s rakovinovými bunkami, zatiaľ čo pri intravenózne aplikácii liečiv sa používajú nanogély o veľkosti okolo 500 nm. Častice s veľkosťou nad 1 000 μm sa nazývajú makrogély, kým častice o priemere menšom než 1 000 μm sa nazývajú mikrogély [80]. Ako už bolo naznačené vyššie, enkapsulácia má široké uplatnenie v rôznych oboroch, pričom sa kladú rôzne požiadavky na finálny produkt. Preto bolo vyvinutých mnoho postupov, ako enkapsulovať a tie najpoužívanejšie techniky sú bližšie popísané v nasledujúcich podkapitolách.

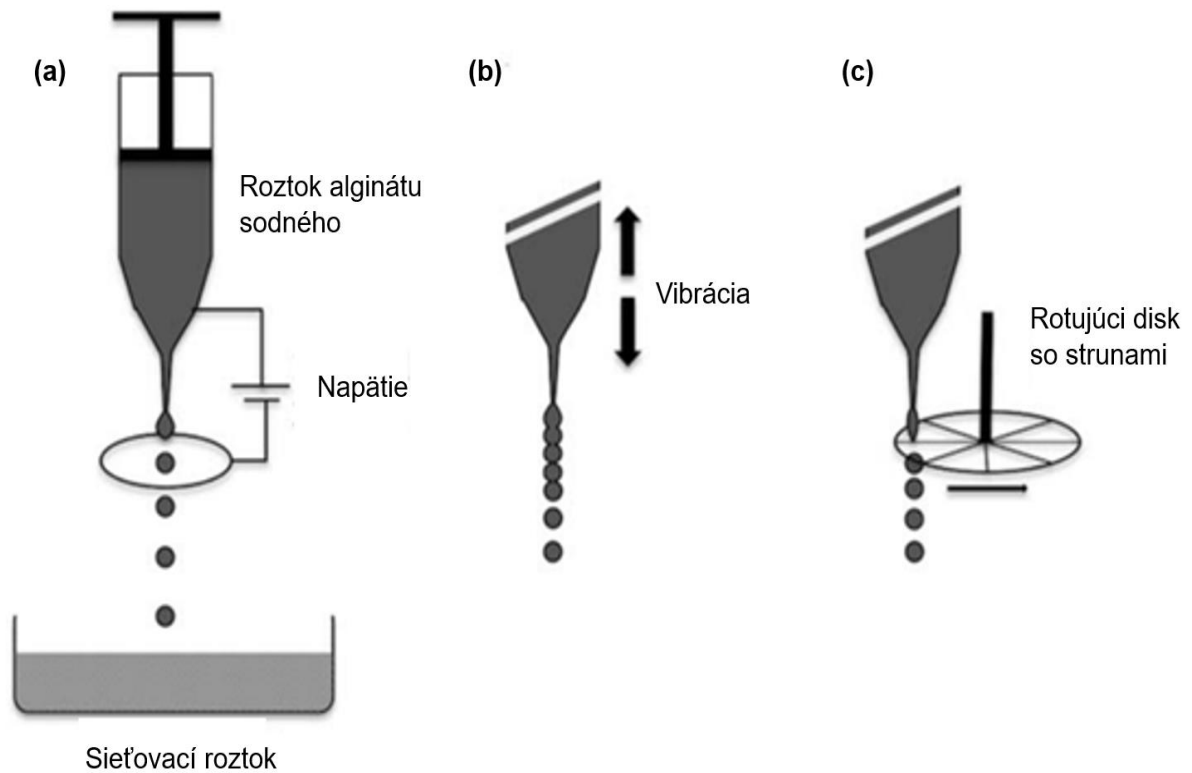
2.4.1.1 Extrúzia a modifikovaná extrúzia

Jedná sa o jednoduchú metódu, ktorá spočíva v kvapkaní roztoku alginátu do gelovacieho roztoku sieťovacieho činidla (najčastejšie roztok CaCl_2 o danej koncentrácii). Kvapky sa aplikujú pomocou striekačky. Pri aplikácii vzniká na špičke ihly kvapka, ktorá narastá až sa oddelí a padá do kúpele (viď obr. 7). Sférická kvapka sa vytvára pre povrchové napätie kvapaliny. Limitácia tejto metódy možnosť využitia len pre roztoky s nízkou viskozitou ($<200 \text{ mPa}\cdot\text{s}$), inak dôjde k upchatiu. Nevýhodou je aj neuniformita kvapiek a problémy s definíciou ich veľkosti. Extrúzia je používaná pre kvapalné enkapsulované materiály (napr. esenciálne oleje, príchuť), preto je táto technika populárna v potravinárstve [81].

Vďaka nedostatkom klasickej extrúzie boli vyvinuté rôzne modifikované postupy. Napríklad využitie vibrujúcej trysky, kde je pohyb zabezpečený piezoelektrickým materiálom. Frekvencia vibrovania určuje veľkosť generovaných kvapiek. Ďalšou možnosťou je pridať rotujúci disk s drôťmi pod trysku. Otáčanie disku naruší tok alginátu za vzniku definovaných kvapiek, ktorých veľkosť je určená uhlovou rýchlosťou disku. Nevýhoda tejto metódy je, že keď drôt prechádza cez prúd roztoku alginátu, materiál sa môže rozprsknúť do okolia alebo sa zachytiť na drôte a zaschnúť, čoho výsledkom je strata asi 5% materiálu. Inou alternatívou extrúzie je elektrostatická atomizácia, ktorá využíva efektu vonkajšieho elektrického poľa na hydrodynamické vlastnosti alginátových kvapiek. Elektrické pole spôsobí vznik elektrického náboja na povrchu kvapaliny, čím sa deformuje a predĺži tok. Náboj na povrchu zdokonalí guľový tvar [66]. Zmienené modifikované metódy sú schematicky zobrazené na obr. 8.



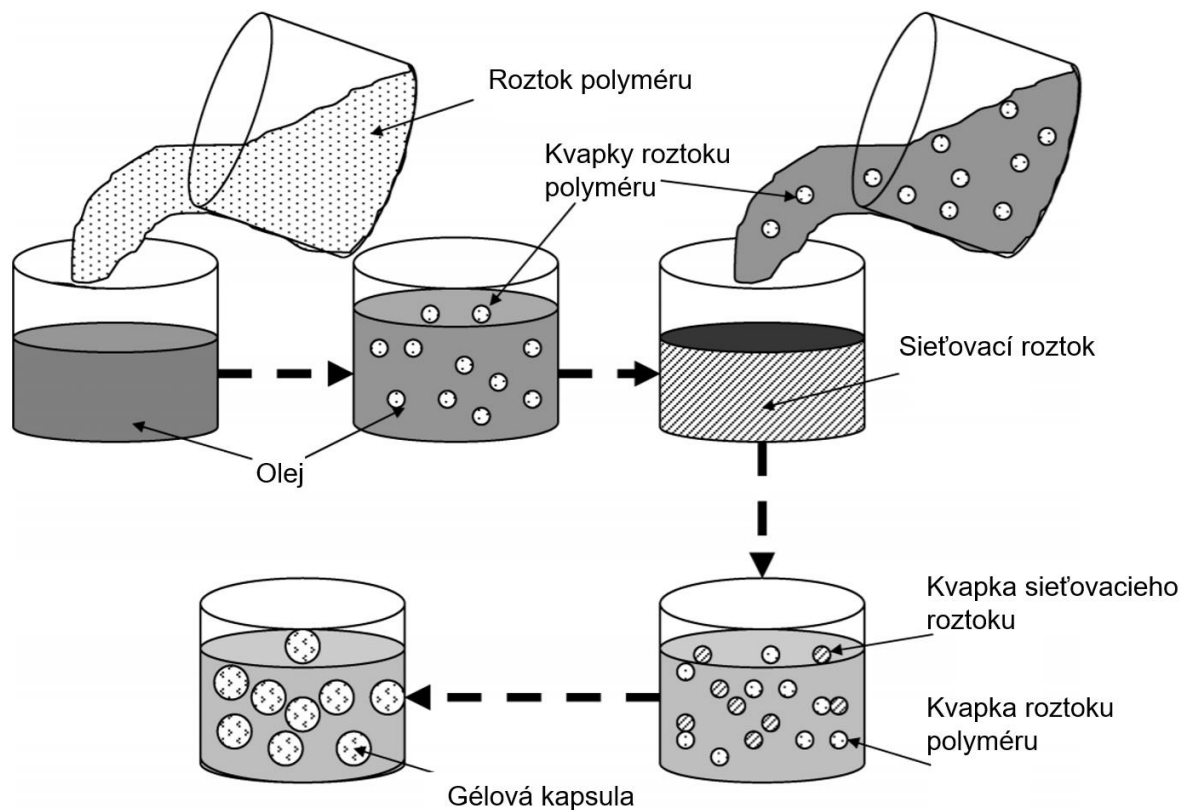
Obr. 7: Schéma extrúzie [82]



Obr. 8: Modifikovaná extrúzia: (a) elektrostatická atomizácia, (b) vibračná tryska, (c) rotujúci disk [66]

2.4.1.2 Emulgácia

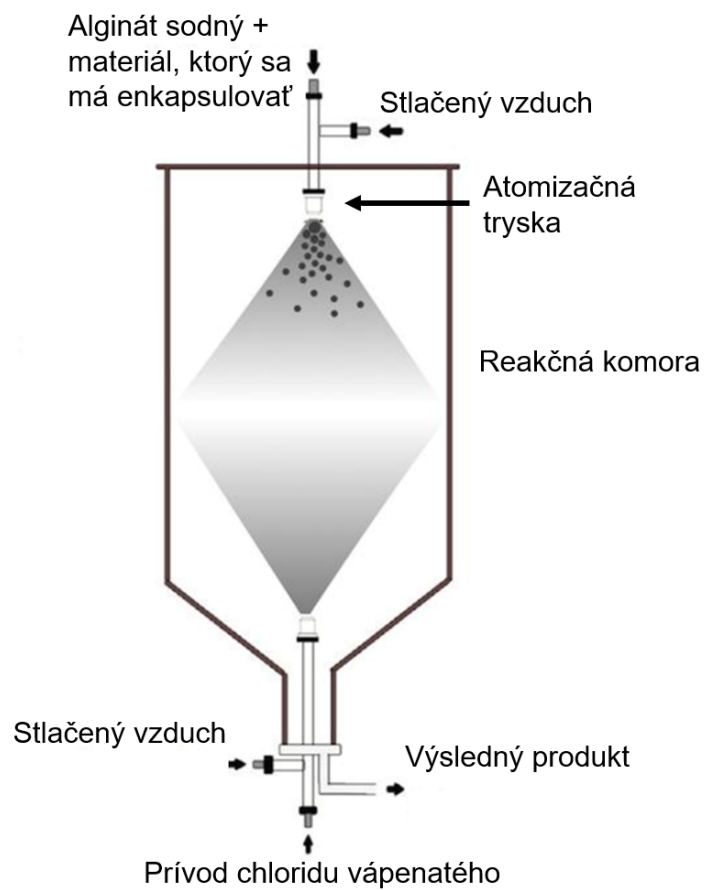
Ďalšou enkapsulačnou technikou je emulgácia. Vo väčšine prípadov ide o emulziu voda v oleji, kde malé množstvo vo vode rozpustného polyméru je pridané do veľkého objemu rastlinného oleja (sójového, slnečnicového či kukuričného). Zmes sa mechanicky homogenizuje pomocou mixérov, miešadiel alebo koloidného mlynu za tvorby emulzie voda v oleji a polymér je zosieťovaný za vzniku malých gélových častíc v olejovej fáze (viď obr. 9). Olejová fáza sa oddelí centrifugáciou. Veľkosť vznikajúcich častíc (25 μm až 2 mm) je kontrolovaná rýchlosťou miešania, typom emulgátoru, koncentráciou a pomerom zložiek. Vo všeobecnosti platí, že emulgátory (napr. Span 80, Tween 80) znižujú veľkosť častíc [83].



Obr. 9: Tvorba gélových častíc emulgáciou [82]

2.4.1.3 Tvorba gélu pomocou aerosólu

Nevýhodou extrúzných metód, či už klasickej alebo modifikovanej extrúzie, je nevyhnutnosť gélovacej lázne, ktorá robí z enkapsulácie vsádzkový proces. Ten je nevýhodný, pri zväčšovaní výroby a je energeticky náročný. Aby sa predišlo týmto nevýhodám, bola navrhnutá tvorba gélu pomocou aerosólu. Ako vidieť na obr. 10, podstata spočíva v protichodnej atomizácii roztoku sieťovacieho činidla a alginátu v reakčnej komore. Malé kvapky atomizovaného alginátu sodného sú okamžite gelované pri kontakte s roztokom vápenatých iónov. Novo vytvorené zosieťované alginátové mikrokapsule sa usadia na dne reaktoru, kde sú potom odvádzané [84].



Obr. 10: Schéma reakčnej komory pre tvorbu gélu pomocou aerosólu [66]

3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

Jedným z možných riešení redukcie používania konvenčných hnojív je použitie už zmienených PGPB, ktorých pozitívne účinky a mechanizmy pôsobenia boli popísané v kapitole 2.1. Zatiaľ však baktérie a ich inokulácia predstavujú nízky podiel v celosvetovom poľnohospodárstve. Je to pre nekonzistentné vlastnosti inokulovaných PGPB, pre vysokú cenu a technologické komplikácie. Kľúčom k úspešnému používaniu PGPB je v prvom rade prežitie týchto baktérií v pôde. Minimálny počet buniek, ktorý je dostatočný na získanie požadovaných efektov sa líši od kmeňa, no väčšinou sa pohybuje okolo hodnoty 10^6 až 10^7 buniek baktérií na rastlinu. Preto je dôležitá formulácia inokulácie. Je nevyhnutné sústrediť sa na baktérie, ktoré majú zvýšenú odolnosť voči abiotickému stresu (napr. producenti PHA) a poskytnúť baktériám vhodné mikroprostredie, ktoré bude mať dostatočnú ochrannú funkciu [85]. Prvým cieľom pri použití PGPB musí byť správny výber bakteriálneho kmeňa alebo kombinácie niekoľkých PGPB. Dnes je už detailne popísané veľké množstvo PGPB a ich výber by mal byť založený na cieľovej plodine a s ohľadom na typ pôdy, kde sa bude aplikovať. Ďalším krokom je návrh formulácie inokula. Posledným bodom je metóda aplikácie PGPB do pôdy, ktorá by mala brať do úvahy limity a možnosti poľnohospodárstva.

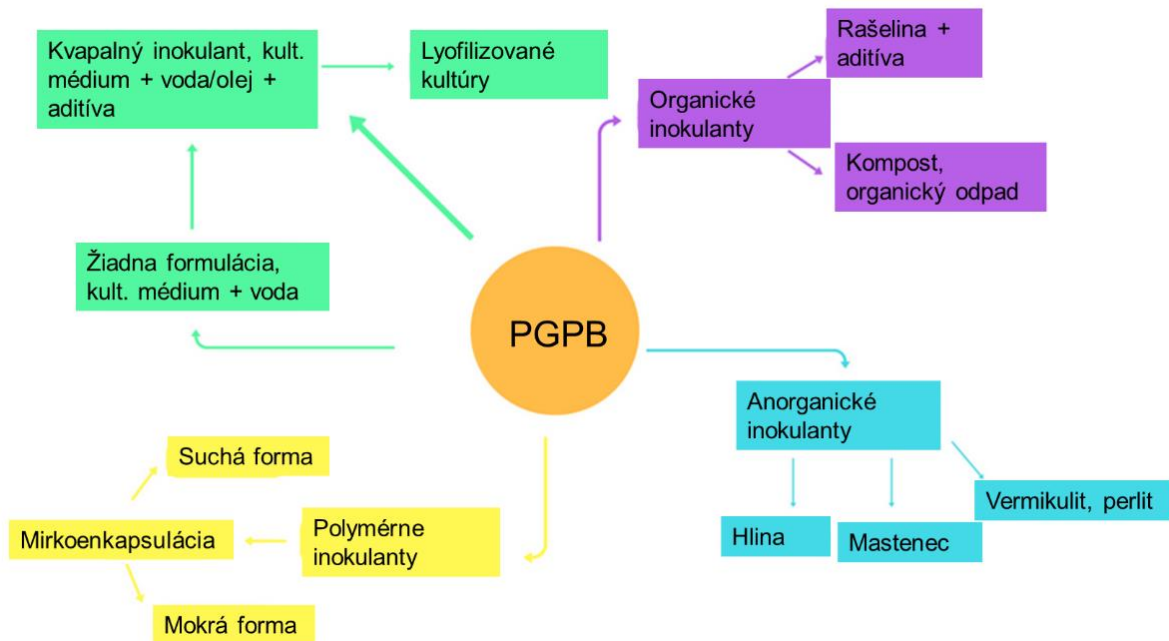
3.1 Charakterizácia nosiča pre baktérie

Nosičom nazývame abiotický substrát, ktorý používame pri formulačnom procese. Môže sa jednať o pevnú, kvapalnú či gélovú štruktúru. Formulácia je laboratórny alebo industriálny proces spájania PGPB a nosiča. Inokulum je teda finálny produkt formulácie baktérie a nosiča. Medzi základné poľnohospodárske požiadavky pre ideálne inokulum patrí jednoduchosť použitia, kompatibilita s výsevným zariadením, možnosti skladovania, variabilita použitia pre rôzne plodiny a rôzne typy pôdy a netoxičita materiálov. Z pohľadu funkcie by malo inokulum spĺňať tieto fundamentálne predpoklady: nosič by mal chrániť PGPB, podporovať ich rast a zaručiť, že v dobe inokulácie pôdy bude dodaný dostatočný počet živých baktérií v dobrej kondícii pre rastlinu. Dva hlavné aspekty, ktoré sú potrebné pre celkovú úspešnosť procesu využitia baktérií v agropriemysle, je teda efektívnosť bakteriálneho izolátu a správna technológia jeho aplikácie do pôdy [86].

Dôležitým aspektom produkcie nosičov je ich sterilizácia, ktorá je esenciálna pre dosiahnutie čo najvyššieho počtu baktérií vo konečnej formulácii ako aj pre predĺženie novej doby skladovania produktu. Väčšina komerčných formulácií je však nesterilná pre vysoké náklady spojené s týmto procesom. Sterilizácia je však dôležitá pre rast a prežitie baktérií. Medzi trendy v sterilizácii patrí ožiarenie produktov v polyetylénovom vrecku γ -žiarením. Nevýhodou sú náklady a zdĺhavosť tohto kroku. Lacnejšou alternatívou je použitie autoklávy (väčšinou 60 min pri 121 °C) [87].

Nosiče možno rozdeliť do niekoľkých kategórií. Môže sa jednať o lyofilizáciu alebo olejom sušené baktérie, ďalej je ako nosič využívaná zemina, rašelina, uhlie íl či anorganické pôda. Odpadové rastlinné materiálu priemyselného či poľnohospodárskeho pôvodu sú tiež možnou alternatívou. Ďalšou skupinou nosičov sú inertné materiály, napr. polyméry či spracované fragmenty hornín (vermikulitu či perlitu). Sú známe aj kvapalné nosiče, kedy je do média PGPB pridaná látka podporujúca lepkavosť a stabilitu [85].

V článkoch sa toto delenie môže mierne líšiť, preto viď obr. 11, kde je znázornené delenia nosičov podľa rôznych zdrojov.



Obr. 11: Alternatívne delenie nosičov PGPB, upravené z [86]

Dnes sú už na trhu prítomné rôzne formulácie. Príkladmi komerčne dostupných formulácií sú baktérie v rašelinovom nosiči (napr. HiStick®) alebo v kvapalnom nosiči (Rhizoliq®). I keď viaceré štúdie naznačili, že najperspektívnejším sú polymérne nosiče, stále nie sú priemyselne využívané [88]. Bioenkapsulácia je úspešnou novovznikajúcou oblasťou vo farmaceutickom priemysle, nanotechnológiách, liekoch a v kozmetike. V poľnohospodárskom priemysle je teda nevyhnutná modernizácia, rýchlejšia reakcia na nové vedecké poznatky a prebratie už zabehnuté procesy z iných odvetví.

3.1.1 Enkapsulácia mikroorganizmov v poľnohospodárstve

Enkapsulácia zabezpečuje dočasnú ochranu pred prostredím v pôde a pred mikrobiálnymi konkurentmi a postupné uvoľňovanie baktérií z kapsule. Uvoľnenie PGPB nastáva, keď je ochranný materiál degradovaný, napr. inými pôdnymi organizmami. Najčastejšie používanými materiálmi sú alginát, chitozan, pektín a iné. Podmienkou použitia materiálu je netoxičita, pomalá degradácia pôdnymi mikróbmami, poskytnutie fyzikálnej ochrany PGPB, dispergovateľnosť vo vode pre umožnenie prechodu baktérie z polyméru k rastline. Alginát je najobľúbenejším polymérom v tejto oblasti, hlavne pre cenovú dostupnosť, jednoduchý proces tvorby gélov a pre zabezpečenie dostatočnej vlhkosti pre baktérie [89]. Najčastejšie sa vzniknutá gélová forma inokulantu prevádza do suchej podoby, napr. lyofilizáciou alebo sušením vzduchom pri teplote okolo 40 °C. Aby sa zlepšili vlastnosti kapsúl, pridávajú sa rôzne látky, ktoré majú skvalitniť inokulum v rôznych smeroch. Môže ísť o prídavok sekundárneho polyméru za účelom zvýšenia mechanickej pevnosti a stability povrchu kapsúl. Typickým druhotným polymérom je polyetylénimín podporujúci elasticitu. Často sa používa aj kombinácia alginátu s chitozonom, kedy bola preukázaná zvýšená mechanická odolnosť. Chitozan tiež predlžuje dobu ochrany baktérií, keďže má pomalšie degradovať v pôde [90]. Inkorporácia škrobu do alginátových kapsúl vedie k zvýšeniu sušiny, napomáha k postupnému uvoľňovaniu mikroorganizmov a preukázateľne chráni baktérie pri aplikácii do extrémne suchých pôd [91; 86]. V literatúre sa hovorí aj o prídavku mastenca či kaolínu k suchej formulácii alginátových kapsúl po lyofilizácii, čo vedie k zlepšeniu podmienok na prežitie pre niektoré baktérie (napr. *Streptomyces*) [92]. Najnovšie štúdie obohacujú alginát o huminové látky, ktoré slúžia ako zdroj uhlíku pre baktérie v gélovej matrici a tým napomáhajú k ich

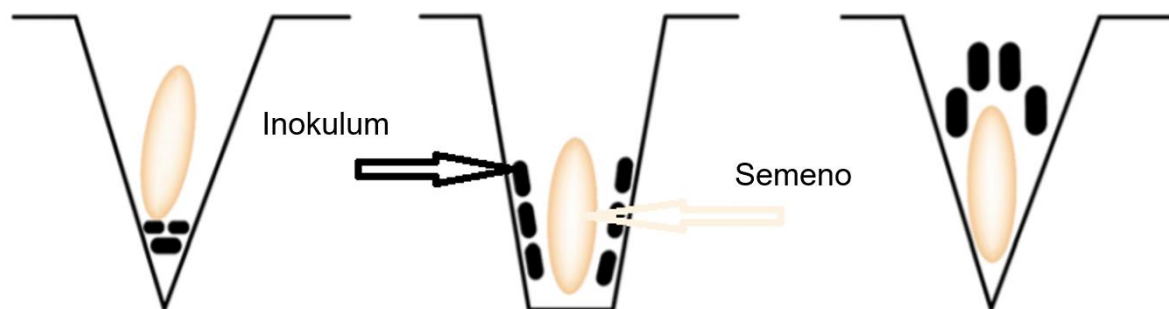
viabilite. [93]. Vďaka benefítom kombinácie týchto látok bola preukázaná dlhšia možná doba skladovania (5 mesiacov), ako aj lepšia adaptácia v pôde [93; 94].

3.2 Aplikačné formy PGPB

Ako už bolo spomenuté, existuje veľmi veľké množstvo publikácií ohľadom PGPB a takisto o konvenčných či moderných nosičových systémoch. Opak je však pravdou pri získavaní informácií o technologických aplikačných formách spomínaných formulácií PGPB a nosiča. Veľakrát je (aj napriek dobrej formulácii) prekážkou práve aplikačná forma pre širšie využívanie PGPB. Poľnohospodárske postupy sa zriedka menia v snahe prispôbiť sa novým technológiám. V porovnaní s medicínou či farmaceutickým priemyslom ide o konzervatívnejšie odvetvie, s menším prísunom peňazí. Preto treba mať na mysli výrobcov ako aj farmárov pri formulácii PGPB. Ľahká manipulácia a rýchla obsluha sú kľúčové k plnému odštartovaniu tohto koncept zúrodňovania pôd [95].

V poľnohospodárstve sa používajú dve hlavné aplikačné formy. Prvou je inokulácia semien rastlín. Pred zasiatím sa semená poprášia najčastejšie rašelinovým inokulantom, ktorý sa však pri ďalších procesoch ľahko oddelí. Aby sa predišlo stratám, zvyčajne sa pridávajú adhezívne látky, napr. arabská guma, karboxymetylcelulóza či rastlinné oleje. Ďalším aditívom môže byť vápenec, ktorý sa používa v prípade kyslých pôd. Tri hlavné štýly inokulácie semien sú inkrustácia, filmový poťah a peletovanie [96; 97]. Nevýhodou inokulácie semien je, že môžu byť obalené limitovaným množstvom baktérií. Proces môže viesť k poškodeniu semien, čoho efektom je, že rastlina nevyklíči [86].

Druhou možnosťou je inokulácia samotnej pôdy. Jedná sa väčšinou o granule, ktoré sú vložené v semeništi pod, nad alebo pozdĺž semien v čase siatia (viď obr. 12). Medzi hlavné pozitíva tejto metódy patrí, že nedochádza k poškodeniu semien či k stratám materiálu. Navyše sú rastliny vystavené vyššej koncentrácii baktérií. Nevýhodou je, že pri aplikácii tejto techniky je potrebné mať špeciálne vybavenie a počíta sa s vyšším množstvom inokula, čo sa odrazí v cene [86].



Obr. 12: Rôzne pozície inokula a semena [86]

Ako už bolo spomenuté, enkapsulácia PGPB do hydrogéllov je študovaný proces, no doposiaľ nebola popísaná enkapsulácia polymérom priamo produkovaným baktériou. Týmto novým prístupom dôjde k úspore na nosičovom materiáli, k technologickému zjednodušeniu procesu a zároveň budú využité už opísané benefity alginátu ako nosiča PGPB.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité mikroorganizmy, chemikálie a prístroje

4.1.1 Použitý mikroorganizmus

Pri práci sa ako modelový mikroorganizmus použila baktéria z Českej zbierky *Azotobacter vinelandii* so zbierkovým číslom CCM 289.

4.1.2 Použité chemikálie

4.1.2.1 Chemikálie pre kultiváciu mikroorganizmov

Dihydrogénfosforečnan draselný (Lachner)
Dihydrogénfosforečnan sodný dihydrát (Lachner)
Glukóza monohydrát (Lachema)
Hydrogénfosforečnan amónny (Lachner)
Hydrogénfosforečnan sodný dodekahydrát (Lachner)
Chlorid sodný (Lachner)
Chlorid železitý (Lachner)
Molybdénan sodný dihydrát (Lachema)
Síran amónny (Lachner)
Síran horečnatý heptahydrát (Lachner)
Síran vápenatý (Lachner)
Yeast extract (HiMedia)

4.1.2.2 Ostatné chemikálie

Azid (Lachner)
BODIPY 439/503 (Thermo Fisher Scientific)
Etanol (Lachner)
Fenol (Lachner)
Hydroxid sodný (Lachner)
Chlorid vápenatý (Lachner)
Chloroform (Lachner)
Kyselina 3,5-dinitrosalicylová (Lachner)
Kyselina sírová, konc. (Lachner)
Kyseliny benzoová (Lachner)
Toluén (Penta)
Vínan sodno-draselný (Lachner)

4.1.3 Prístrojové vybavenie

Automatický mikro viskozimeter, Anton Paar
Centrifuga EBA Hettich
DLS – ZetaSizer Nano ZS, Malvern Instrument
Enkapsulátor BUCHI B-395
Fluorescenčný mikroskop, MicroTime 200, PicoQuant GmbH
Hustomer DMA 4500, Anton Paar
FTIR spektrofotometer Nicoletis50, Thermo Scientific
Inkubátor biologický IP100-U, Biotech
Laminárny box Aura Mini, Bio Air Instruments
Miechačka magnetická bez ohrevu MMS-300
Miechačka magnetická KARTELL TKO
Nanofotometer PEARL
Reometer AR G2, TA Instruments

AF4 Eclipse AF4 system s detektormi
MALS Dawn Heleos II a
dRI Optilab T-rEX
Termoblok SBH130 Stuart
Trepáčka digitálna, orbitálna SHO-2D, ZWYR-D2401, Labwit
Trepáčka temperovaná ES20 Biosan
Trepáčka Vortex BV 1000-E
Váhy analytické PA224C
Váhy EW 620
Vodná kúpeľ BL 4/150
ZetaSizer Nano ZS, Malvern Instruments
Zostava pre GC: Finnigan Trace GC Ultra, kolóna – DB-WAX 30 m/0,25 mm, FID detektor

4.2 Kultivačné experimenty

4.2.1 Všeobecné kultivačné podmienky

4.2.1.1 Uchovávanie kultúry

Do sterilnej kryoskúmavky s 0,5 ml 30% glycerolu bol pridaný 1 ml inokula a následne bola kultúra zamrazená a uchovaná v mrazničke pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.1.2 Príprava inokula

Do 100 ml Erlenmeyerovej banky bolo pripravených 33 ml média (médium 1A, vid' nižšie). Banka bola následne sterilizovaná v tlakovej nádobe po dobu 40 min a po jej ochladení na laboratórnu teplotu bolo v sterilnom boxe pridaných 1,7 ml glukózy a 0,8 ml rozmrazenej baktérie v glycerole.

4.2.1.3 Teplota kultivácie

Azotobacter vinelandii je mezofilná (teplotné optimum od 20 do 40 $^{\circ}\text{C}$) baktéria, preto bola počas všetkých experimentov kultivovaná na temperovanej trepačke pri 30 $^{\circ}\text{C}$ za intenzívneho miešania (200 rpm).

4.2.2 Optimalizácia produkčného média

Najprv bol prevedený základný skriningový kultivačný experiment, ktorého cieľom bolo zvoliť optimálne produkčné médium pre následné hlavné produkčné kultivácie. Pre kultiváciu *Azotobacter vinelandii* boli na základe rešerše zvolené dve média a to s ohľadom na čo najvyššiu produkciu alginátu [41; 98; 42]. Denne boli odobrané vzorky, z ktorých bol gravimetricky stanovený alginát (vid' 4.3.2.1). Experiment trval 10 dní. Zloženie produkčných médií sú uvedené nižšie:

Produkčné médium 1A

Glukóza	20 g
Yeast extract	6 g
Na ₂ HPO ₄	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,6 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3 g
Destilovaná voda	1000 ml

Produkčné médium 1B

Zloženie produkčného média 1B sa líši od 1A len prídavkom 5 g/l CaCO₃.

Produkčné médium 2A (modifikované Burkovo médium)

Glukóza	20 g
NaCl	0,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
CaSO ₄	0,05 g
FeCl ₃	0,0029 g
K ₂ HPO ₄	0,027 g
KH ₂ PO ₄	0,66 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,16 g
Destilovaná voda	1000 ml

Produkčné médium 2B (modifikované Burkovo médium)

Zloženie produkčného média 2B sa líši od 2A len prídavkom 5 g/l CaCO₃.

4.2.3 Produkčná kultivácia pre charakterizačné a gelačné experimenty

Kedže z gravimetrických meraní bolo určené médium 1B ako optimálne (ďalej v texte ako *optimálne médium*), médium 1A, 2A ani 2B neboli používané pri ďalších experimentoch. Pre nasledujúce kultivácie a teda i charakterizačné a gelačné testy bolo využívané len optimálne médium. Následne, keďže bol pozorovaný pozitívny efekt prídavku uhličitanu vápenatého na tvorbu alginátu, boli baktérie tiež kultivované v rovnakom médiu, ale s vyšším prídavkom, konkrétne 30 g/l CaCO₃, a sledovali sa rozdiely spôsobené vyššou koncentráciou CaCO₃.

4.3 Analýza vzoriek bakteriálnych kultúr v priebehu kultivácie

V priebehu kultivačných experimentov boli každý deň stanovené základné rastové parametre (viď podkapitola 4.3.1) a zvlášť bol analyzovaný supernatant (viď podkapitola 4.3.2) a biohmota (viď podkapitola 4.3.3). Supernatant bol získaný odstredením 10 ml kultúry pri 6 000 rpm po dobu 5 min. Biomasa bola premytá 10 ml destilovanej vody a znova centrifugovaná za rovnakých podmienok. Následne sa vzorky biomasy sušili pri 70 °C.

4.3.1 Stanovenie obsahu sušiny a optickej hustoty kultúry

Po výbere optimálneho kultivačného média bol gravimetricky stanovený obsah sušiny. Denne bolo odpipetovaných 10 ml kultúry do napred zvážených skúmaviek, ktoré sa následne centrifugovali pri 6 000 rpm po dobu 5 min. Odliat sa supernatant a biomasa bola resuspendovala v 10 ml destilovanej vody a opäť centrifugovala. Po odliatí supernatantu, bola biomasa sušená pri 70 °C. Po úplnom vysušení boli vzorky zvážené na analytických váhach.

Pre stanovenie optickej hustoty kultúry bola denne meraná absorbanca vzoriek pri vlnovej dĺžke 630 nm. Vzorky kultúry boli pre potrebu merania päťdesiatkrát riedené destilovanou vodou a každé meranie bolo zopakované trikrát.

4.3.2 Analýza supernatantov získaných odstredením bunečnej kultúry

4.3.2.1 Gravimetrické stanovenie alginátu

Alginát môže byť zrážaný zo supernatantu odstredenej kultúry (viď 4.4) prídavkom rôznych rozpúšťadiel ako etanol, izopropanol či acetón. Precipitát sa následne premyje, vysuší a zváži [98]. V tejto práci bol využívaný etanol, vďaka ktorému sa najprv stanovoval výťažok alginátu pri rôznom zložení médií. Ďalej sa pracovalo s optimálnym médiom, poprípade s vyšším prídavkom CaCO₃ (30 g/l), pričom bol skúmaný trend tvorby alginátu v čase.

V oboch prípadoch bol použitý nasledujúci postup: najprv bol scentrifugovaním kultúry získaný supernatant, s ktorým sa ďalej pracovalo. Supernatant bol zmiešaný s etanolom v pomere 1:3. Nasledovala centrifugácia pri 8 000 rpm a 4 °C po dobu 15 min. Supernatant bol opatrne odliaty a gélovitý zvyšok bol resuspendovaný v 1 objeme destilovanej vody pomocou vortexu. Znova boli pridané 3 objemové jednotky vychladeného etanolu a bola zopakovaná centrifugácia za rovnakých podmienok. Vyzrážaný alginát bol potom sušený pri 70 °C a následne bol suchý výťažok zvážený.

U vybraných vzoriek vyzrážaného alginátu bola stanovená molekulová hmotnosť. Pre jej určenie bolo použitá frakcionácie AF4 (z angl. *asymmetric flow field-flow fractionation*) v kombinácii s detekciou pomocou detektorov MALS (z angl. *multiangle light scattering* – viacuhlový rozptyl svetla) a dRI (koncentračný detektor). Meranie sa začalo nástrekom vzorky (300 µl) na separačný kanál s výškou tzv. *spacer* 350 µm a membránou kanála z regenerovanej celulózy s *cut-off* 10 kDa. Najprv je kanál fokusovaný protiprúdom a následne je spustená elúcia vzorky, kedy je vzorka vymývaná z kanála za súčasnej aplikácie

tangenciálneho toku. Mobilnou fázou bol NaNO₃ o koncentrácii 0,1 mol/l; prietok mobilnej fáze bol 4 ml/min s konštantným tokom do detektoru 1 ml/min a rozdielnym, tzv. *cross flow* tangenciálnym tokom mobilnej fáze. Vzorky boli pripravené rozpustením 1 g/l gravimetricky získaného alginátu v destilovanej vode

Vzorky vyzrážaného alginátu pripravené v rámci produkčných experimentov (viď kapitola 4.2.3) boli taktiež analyzované metódou intračervenej spektroskopie s Fourierovou transformáciou, a to postupom vhodným pre analýzu biomasy, ktorý je popísaný v kapitole 4.3.3.2.

4.3.2.2 Stanovenie zvyškovej glukózy pomocou 3,5-dinitrosalicylovej kyseliny

Metóda je založená na reakcii kyseliny 3,5-dinitrosalicylovej (DNS) s redukujúcimi sacharidmi (v tomto prípade s glukózou) za vzniku 3-amino-5-nitrosalicylovej kyseliny, ktorá silne absorbuje svetlo pri vlnovej dĺžke 540 nm [99].

Príprava reakčného činidla

Postup prípravy použitého roztoku DNS bol nasledovný: bolo navážené 2 g DNS, ktorý bol rozpustený v 100 ml destilovanej vody. Ďalej bolo pridaných 40 ml 2 mol/l NaOH. Následne bolo pridaných 60 g vínanu sodno-draselného a objem bol doplnený destilovanou vodou na 200 ml.

Príprava kalibračnej krivky

Za účelom stanovenia kalibračnej závislosti bol pripravený roztok glukózy o koncentrácii 4 g/l a do skúmaviek bolo napipetovaných 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 a 3,5 ml tohto roztoku. Následne sa objemy upravili na 4 ml pridaním destilovanej vody. Bolo odobraných 0,5 ml týchto vzoriek a k nim bolo pridaných 0,5 ml činidla 3,5-dinitrosalicylovej kyseliny. Skúmavky boli inkubované pri 70 °C vo vodnom kúpeli po dobu 10 min. Po vychladnutí bol objem doplnený na 10 ml a po premiešaní bola stanovená absorbancia pri vlnovej dĺžke 540 nm. Body boli vynesené do grafu a bola určená rovnica kalibračnej krivky.

Stanovenie zvyškovej glukózy vo vzorkách bunčných kultúr

Pri samotnom stanovení bolo použitých 0,5 ml vhodne nariadenej vzorky supernatantu a 0,5 ml pripraveného činidla 3,5-dinitrosalicylovej kyseliny. Vzorky boli zahrievané vo vodnom kúpeli o teplote 70 °C po dobu 10 min. Vzorky sa schladili na laboratórnu teplotu a boli doplnené destilovanou vodou na objem 10 ml. Takto pripravené vzorky boli analyzované spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 540 nm. Absorbancia bola stanovená trikrát. Koncentrácia bola vypočítaná z rovnice kalibračnej krivky (viď príloha obr. 49) a z priemerných hodnôt minimálne dvoch opakovaní každého merania.

4.3.2.3 Stanovenie hustoty a viskozity

Viskozita bola meraná za účelom rýchleho nepriameho skrínungu obsahu alginátu ako doplnková metóda ku gravimetrickému stanoveniu alginátu.

Po dobu 6 dní bolo denne odobraných 20 ml kultúry, ktorá sa odstredila pri 6 000 rpm po dobu 5 min, aby sa oddelila biomasa. K supernatantom bol pridaný roztok azidu, ktorý slúži ako konzervant. Takto pripravené vzorky boli uchované v chladničke až po deň experimentu.

Hustota bola meraná pomocou hustomeru Anton Paar DMA 4500 Density Meter. Prístroj bol kalibrovaný metódou Density Check za použitia destilovanej vody. Pred každým meraním bola meracia cela premytá vodou, prúdom suchého vzduchu a samotnou vzorkou. Experiment prebiehal pri 25°C a opakoval sa dvakrát.

K určení kinematickej viskozity bol použitý kapilárny mikroviskozimeter. Kapilára, v ktorej sa nachádza guľôčka, bola naplnená stanovovanou vzorkou. Princípom experimentu bolo meranie času, za ktorý guľôčka urazí vzdialenosť medzi dvoma ryskami v naklonenej kapiláre. Merania boli štyrikrát opakované a prebiehali pri 25 °C a pri uhle 60°. Zo získaných hodnôt hustoty a kinematickej viskozity bola vypočítaná dynamická viskozita.

4.3.2.4 Stanovenie veľkosti a stability častíc rozptylovými technikami

Na prístroji Zetasizer Nano ZS bola stanovená veľkosť častíc, ζ -potenciál a index polydispersity (PDI). V softvéri prístroja bol nastavený režim *Size and Zeta Potencial* a nasledujúce hodnoty: 30 s temperácie, 25 °C, 30 cyklov a tri merania. Ako materiál bol zvolený polymér a ako rozpúšťadlo voda. Táto metóda slúži ako skríning veľkosti polymérnych reťazcov ako aj prítomnosti a veľkosti vznikajúcich agregátov. Ide o dopĺňujúcu veľkokapacitnú metódu k MALS.

4.3.3 Analýza suchej biomasy bakteriálnych kultúr

4.3.3.1 Chromatografické stanovenie obsahu PHB

Pre stanovenie obsahu PHB v bunkách bola použitá metóda plynovej chromatografie (GC) s plameňovou ionizačnou detekciou (FID). V súčasnosti je plynová chromatografia najbežnejšou metódou analýzy PHB. Pre túto analýzu je potrebná predúprava analyzovaných vzoriek, ktorá spočíva v kyslej transesterifikácii polyesterov za vzniku metylesterov odpovedajúcich hydroxykyselín. Následne sú tieto metylestery stanovené využitím plynovej chromatografie.

Predúprava vzoriek a meranie prebiehalo podľa nasledujúcich krokov: bolo navážených 8 až 10 mg suchej biomasy do vialiek. Ďalej bol pridaný 1 ml chloroformu a 0,8 ml vnútorného štandardu (5 mg/ml kyselina benzoová a 15% kyselina sírová v metanole). Vialky boli uzavreté a zmes bola reesterifikovaná pri 90 °C po dobu 3 h. Následne bolo do väčších vialiek napipetovaných 0,5 ml 50 mmol/l NaOH a bol pridaný obsah malých vialiek. Vzorky boli rýchlo uzavreté, pretrepané a ponechané stáť, aby došlo k oddeleniu fáz. Do vialiek s insertom bolo napipetovaných 900 μ l chloroformu a 50 μ l spodnej chloroformovej fáze z väčších vialiek a vzorky boli pripravené na analýzu.

4.3.3.2 Štruktúrna analýza metódou infračervenej spektroskopie

Suché vzorky biomasy (získané postupom v bode 4.3.1) boli analyzované na FTIR spektrofotometre Nicolet iS50 metódou zoslabeného úplného odrazu (z angl. *Attenuated Total Reflection* – ATR) za použitia jednodrazového diamantového ATR kryštálu. Každé spektrum bolo získané ako priemer 32 skenov. Experimenty prebiehali pri štandardnom rozsahu 4 000 až 400 cm^{-1} a v rozlíšení 2 cm^{-1} . Rovnakým spôsobom boli analyzované tiež vybrané vzorky vyzrážaného alginátu (viď podkapitola 4.3.2.1).

4.4 Gelácia bunčných kultúr

4.4.1 Kvapková metóda tvorby gélov z kultúry a supernatantu

Ďalej bola denne charakterizovaná samotná kultúra (produkčná kultivácie, viď podkapitola 4.2.3) a jej supernatant kvapkovou metódou, ktorá vizuálne monitorovala mieru gelácie. Konkrétne, do Petriho misky s dostatočným množstvom 1 hm. % roztoku CaCl_2 (ktorý slúžil ako sieťovacie činidlo pre alginát) bolo za použitia Pasteurovej pipety pridané malé množstvo kultúry alebo supernatantu. Účinnosť tvorby gélu bola hodnotená vizuálne a z každého dňa boli zhotovené fotografie.

4.4.2 Mikroenkapsulácia

Medzi ďalšiu metódu, ktorá bola otestovaná za účelom tvorby gélu, bola mikroenkapsulácia. Disperzia baktérie *Azotobacter vinelandii* v kulivačnom médiu bola premiestnená do reagenčnej fľaše, z ktorej boli vedené dve hadice; jedna na prívod vzduchu a ďalšia na dávkovanie vzorky do enkapsulátora. Prívod vzduchu bol regulovaný tak, aby bol prúd kvapaliny čo najtenším, a zároveň nedošlo k zásekom toku. Pod tryskou bol umiestnený roztok CaCl_2 o koncentrácii 1 hm. %, ktorý mal slúžiť k sieťovaniu padajúcich kvapiek. Bola použitá tryska s priemerom 700 μm . Ďalej boli nastavené nasledujúce parametre: frekvencia 800 Hz, napätie 2 500 V a tlak bol korigovaný podľa potreby v rozmedzí od 12 až 28 mPa.

4.4.3 Tvorba makrogélov

Pre skúmanie rozličných faktorov na úspešnosť tvorby gélu boli pripravené makrogély v rôznych variáciách (viď tab. 1). Výber skúmaných faktorov bol inšpirovaný dostupnou literatúrou [100; 101].

K 4 ml živej kultúry (po 4 dňoch kultivácie) bol pridaný určitý objem (2, 4 alebo 6 ml) o danej koncentrácii (1, 3 alebo 5 hm. %) roztoku CaCl_2 . Pre podporu tvorby gélu bol k niektorým vzorkám pridaný škrob tak, aby bolo dosiahnuté výslednej koncentrácie 1 alebo 2 hm. % (pre prehľad vzoriek viď tab. 1). Vzorky boli prikryté a ponechané stáť pri laboratórnej teplote po dobu 30 h.

Tab. 1: Popis vzoriek pre makrogelačné experimenty

Popis	$V_{\text{kultúra}}:V_{\text{CaCl}_2}$	W_{CaCl_2}	$W_{\text{škrob}}$	C_{CaCO_3}	Popis	$V_{\text{kultúra}}:V_{\text{CaCl}_2}$	W_{CaCl_2}	$W_{\text{škrob}}$	C_{CaCO_3}
1A	4:2				6A	4:2			
1B	4:4	1 hm. %	0 hm. %	5 g/l	6B	4:4	1 hm. %	0 hm. %	30 g/l
1C	4:6				6C	4:6			
2A	4:2				7A	4:2			
2B	4:4	3 hm. %	0 hm. %	5 g/l	7B	4:4	3 hm. %	0 hm. %	30 g/l
2C	4:6				7C	4:6			
3A	4:2				8A	4:2			
3B	4:4	5 hm. %	0 hm. %	5 g/l	8B	4:4	5 hm. %	0 hm. %	30 g/l
3C	4:6				8C	4:6			
4A	4:2				9A	4:2			
4B	4:4	5 hm. %	1 hm. %	5 g/l	9B	4:4	5 hm. %	1 hm. %	30 g/l
4C	4:6				9C	4:6			
5A	4:2				10A	4:2			
5B	4:4	5 hm. %	2 hm. %	5 g/l	10B	4:4	5 hm. %	2 hm. %	30 g/l
5C	4:6				10C	4:6			

Nakoniec bola vyvinutá snaha pripraviť gél tak, aby bolo možné čo najefektívnejšie odstrániť sieťovacie činidlo a ďalej manipulovať s gélom. Optimalizovaný postup bol nasledovný: do skúmavky bolo pridaných 1,5 ml roztoku CaCl_2 a pomocou pipety bolo pridaných 0,5 ml kultúry. V rôznych časoch bol pomocou Pasteurovej pipety oddelený zvyšok sieťovacieho činidla a bolo možné opatrne manipulovať s gélom za použitia lyžičky.

4.5 Charakterizácia pripravených gélov

Vzorky gélov boli najprv charakterizované z hľadiska mechanických vlastností. Bolo potrebné potvrdiť, že naozaj ide o gél a porovnať mechanické vlastnosti v závislosti na použitej kultúre a spôsobe sieťovania. Okrem potvrdenia vznikajúceho gélu bolo potrebné potvrdiť, že gély

skutočne obsahujú inkorporované baktérie, k čomu slúžila analýza na fluorescenčnom mikroskope.

4.5.1 Analýza deformačných vlastností metódou oscilačnej reometrie

Vybrané gély (viď tab. 2) pripravené modifikovaným postupom (viď podkapitola 4.4.3) boli podrobené reologickej charakterizácii v podobe dvoch testov – amplitúdového testu a frekvenčného testu.

4.5.1.1 Amplitúdový test

Amplitúdový test je metóda, ktorá slúži k charakterizácii gélu, k potvrdeniu, či vzorka vôbec vykazuje deformačné chovanie charakteristické pre gély, ako aj k zisteniu takzvanej lineárnej viskoelastickej oblasti (LVO), na základe ktorej je vybraná hodnota konštantnej amplitúdy deformácie pre frekvenčné testy (viď 4.5.1.2).

Boli skúmané rôzne faktory a ich vplyv na úspešnosť tvorby gélov priamo z kultúr (viď tab. 2). Do malých skúmaviek bolo napipetovaných 1,5 ml sieťovacieho roztoku CaCl_2 o rôznych koncentráciách (viď tab. 2). Opatrne bolo na spodok skúmavky pridaných 0,5 ml kultúry. V rôznych časových intervaloch (viď tab. 2) bol odpipetovaný roztok CaCl_2 a vzniknutý gél bol analyzovaný prostredníctvom reometra.

Tab. 2: Popisy vzoriek pre amplitúdové a frekvenčné testy (označené *)

Popis	c_{CaCO_3}	w_{CaCl_2}	$t_{\text{sieťovania}}$	Popis	c_{CaCO_3}	w_{CaCl_2}	$t_{\text{sieťovania}}$
1A			0 min	4A			0 min
1B	5 g/l	0,3 hm. %	60 min	4B	30 g/l	0,3 hm. %	60 min
1C			120 min	4C			120 min
2A			0 min	5A			0 min
2B	5 g/l	0,5 hm. %	60 min	5B	30 g/l	0,5 hm. %	60 min
2C			120 min	5C			120 min
*3A			0 min	*6A			0 min
*3B	5 g/l	5,0 hm. %	60 min	*6B	30 g/l	5,0 hm. %	60 min
*3C			120 min	*6B			120 min

Amplitúdový test prebiehal pri teplote 25 °C, odpočívací krok, slúžiaci na teplotu a relaxáciu gélu, trval 60 s. Amplitúda deformácie bola najprv nastavená na 0,01 % až 1 000 %, no gél bol priveľmi deformovaný, takže bolo upravené maximum na 100 %. Frekvencia oscilácie, ktorá je pri amplitúdovom teste konštantná, bola nastavená na hodnotu 0,5 Hz. Amplitúda deformácie bola aplikovaná vo vzrastajúcom móde v logaritmickej režime so 6 bodmi na dekádu.

Aby bola preukázaná opakovateľnosť merania, v prvok kroku bola osemkrát premeraná rovnaká vzorka 1A (viď tab. 2). Keďže bola potvrdená opakovateľnosť, ďalšie vzorky boli z časových dôvodov merané iba dvakrát.

4.5.1.2 Frekvenčný test

Na amplitúdový test nadväzoval už zmienený frekvenčný test. Ide o test s konštantnou amplitúdou deformácie, ktorá bola na základe LVO určená na 0,6 %. Ostatné nastavenia techniky boli zachované. Rozsah frekvencií bol nastavený na 0,02 až 20 Hz. Všetky merania boli trikrát opakované.

Pre vyššiu časovú náročnosť tohto testu boli skúmané len vzorky sieťované pomocou CaCl_2 s koncentráciou 5 hm. % (v tab. 2 označené *).

4.5.2 Overenie prítomnosti mikrobiálnych buniek v géli

Na základe výsledkov nameraných pomocou reometra (viď podkapitola 5.2.3) boli vybrané a pripravené gély 3B a 6B (pre popis viď tab. 2). Následne bol kúsok gélu premiestnený do skúmavky s 1,5 ml destilovanej vody. Pomocou pipety boli pridané 2 μ l lipofilného fluorescenčného farbiva BODIPY 439/503 a vzorky boli ďalej inkubované v tme po dobu 5 min pri laboratórnej teplote. Vzorky boli následne analyzované na fluorescenčnom mikroskope a boli zhotovené fotografie.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

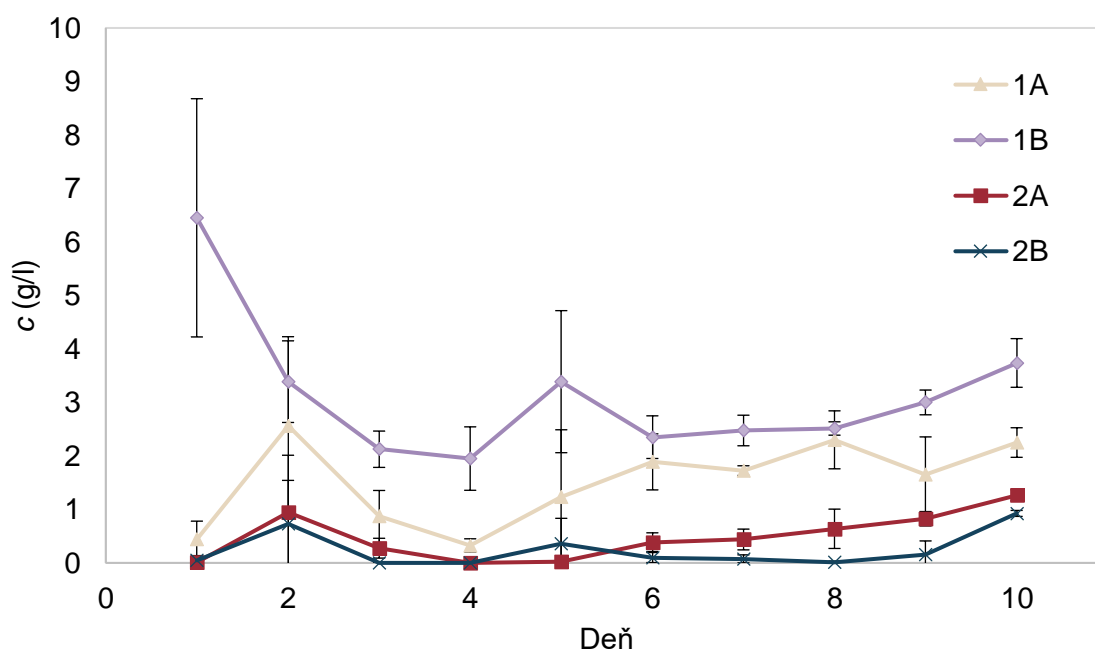
5.1 Optimalizácia kultivácie a jej charakterizácia

Prvým krokom práce bola optimalizácia kultivačného média pre modelový mikroorganizmus *Azotobacter vinelandii*. Keďže sa s touto baktériou na fakulte doposiaľ nepracovalo, boli navrhnuté kultivačné médiá na základe dostupnej literatúry [41; 98; 42]. Po výbere optimálneho média bolo toto médium charakterizované s ohľadom na produkciu alginátu a PHB.

5.1.1 Výber kultivačného média

Kritériom výberu optimálneho kultivačného média bola čo najvyššia produkcia bakteriálneho alginátu. Boli skúmané dve rôzne médiá (viď 4.2.2) v dvoch variantoch – s prídavkom 5 g/l CaCO_3 alebo bez prídavku a bol priebežne stanovený výťažok alginátu (viď 4.3.2.1) po dobu 10 dní. Hlavný rozdiel v zložení produkčných 1 a 2 bol obsah dusíku v médiu 1.

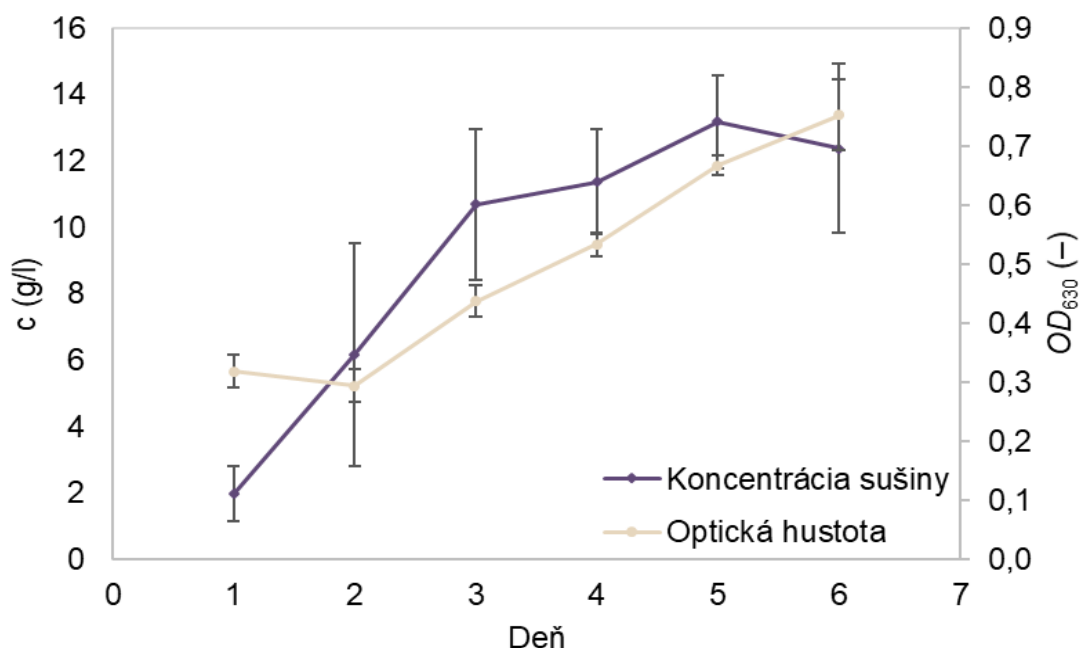
Pri porovnaní média 1 a 2 (viď obr. 13), jasne vidieť, že médium 1 má lepší vplyv na produkciu alginátu. Môže to byť spôsobené tým, že médium 2 neobsahuje dusík, ktorý podľa literatúry môže ovplyvňovať produkciu alginátu [102]. Najpriaznivejší vplyv na produkciu alginátu malo produkčné médium 1B, s výťažkami v rozmedzí od (2 ± 2) do (6 ± 2) g/l. Vychádzajúc z týchto údajov bolo pre ďalšie experimenty používané toto zloženie média (ďalej len *optimálne médium*). Šlo o pilotné experimenty optimalizácie alginátu, kde dochádzalo k vyšším odchýlkam výsledkov pravdepodobne pre odoberanie príliš malého objemu k analýze (2 ml). Napriek tomu, maximum produkcie alginátu bolo jednoznačne pozorovateľné počas odoberania kultúry a potvrdzujú to aj údaje z grafu na obr. 13. S ohľadom na presnejšie výsledky bolo pre ďalšie gravimetrické stanovenia alginátu odoberaných 10 ml vzorky (viď podkapitola 5.1.3.2).



Obr. 13: Výťažok alginátu za použitia testovaných médií; pre presné zloženie viď 4.2.2

5.1.2 Rast bakteriálnej kultúry v optimálnom produkčnom médiu

K získaniu informácií o raste baktérií boli zvolené dva postupy: gravimetrické stanovenie sušiny a odčítanie optickej hustoty bunečnej suspenzie v časovom rozmedzí šiestich dní. Z rastových kriviek baktérií v optimálnom médiu (viď obr. 14) plynie, že prvé dva dni rastú baktérie pomalšie (lag fáza) a ďalšie dni prebieha exponenciálna (log) fáza. Stacionárna fáza je pravdepodobne zatienená prítomnosťou nerozpustného CaCO_3 . Výsledky koncentrácie sušiny za použitia gravimetrickej metódy sú zaťažené väčšou chybou, pravdepodobne spôsobenou prítomnosťou málo rozpustného CaCO_3 v sušine.



Obr. 14: Porovnanie závislosti koncentrácie sušiny a optickej hustoty kultúry na čase

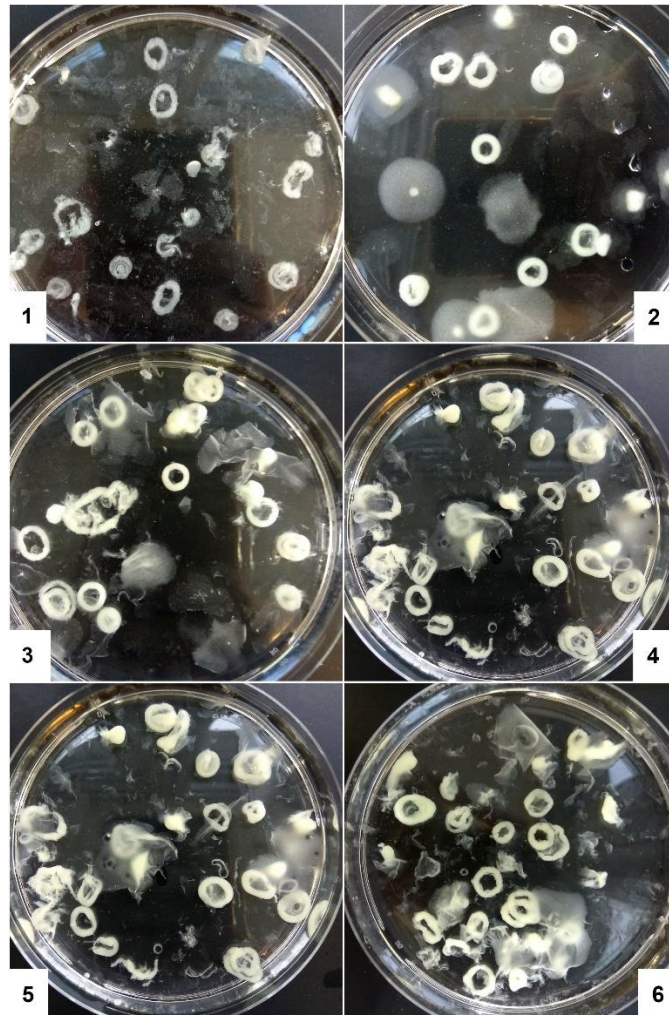
5.1.3 Produkcia alginátu a charakterizácia jeho kvality

Okrem charakterizácie samotného rastu buniek je dôležité zistiť trend tvorby bakteriálneho alginátu, keďže ide o kľúčový produkt v kontexte tejto práce, ktorej hlavným cieľom je otestovať možnosť enkapsulácie baktérií do alginátu, ktorý si sami vytvorí. Keďže úspešnosť tvorby gélu závisí na koncentrácii alginátu, jeho molekulovej hmotnosti, na zastúpení M a G podjednotiek ako aj miere acetylácie, bola vyvinutá snaha dostupnými metódami priamo stanoviť, prípadne aspoň nepriamo monitorovať ich zmeny v priebehu kultivácie.

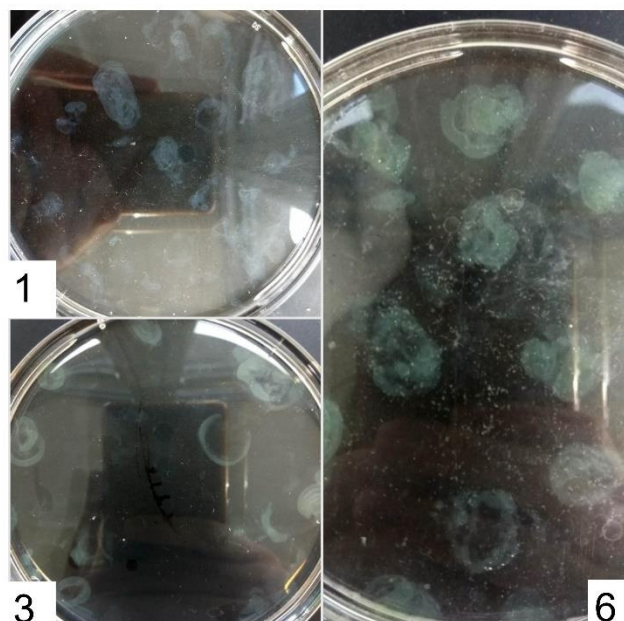
5.1.3.1 Skríning gelačných schopností bunečnej kultúry kvapkovou metódou

Kvapková metóda slúžila ako rýchly test náchylnosti danej bunečnej kultúry pre tvorbu gélu v náväznosti na jeho konkrétne chemické a štruktúrne parametre ako sú napr. koncentrácia alginátu, jeho molekulová hmotnosť či M/G pomer kultúry. Na tento experiment bola použitá kompletná bunečná kultúra, ako aj supernatant zbavený biomasy. Cieľom tvorby gélu zo supernatantu bolo zistiť, či majú v kultúre prítomné baktérie negatívny vplyv na tvorbu gélu. Ako vidieť na fotkách (obr. 15 a obr. 16), gél sa pri kultivácii v optimálnom médiu tvorí už v prvý deň (čiže po 24 h) od naočkovania kultivačných médií. Jedná sa o málo rigidný gél, ktorý sa ľahko dezintegruje (napr. aj pri jemnom premiešaní spôsobenom pohybom Petriho misky). V druhý deň bol pozorovaný gél kompaktnější a stabilnejší a v ďalšie dni sa už nedali vizuálne rozoznať žiadne významné rozdiely.

Gél vytváraný priamo z kultúry má spočiatku bielu farbu (1. deň) a od tretieho dňa je nažltlý (viď obr. 15). Za použitia supernatantu vzniká priesvitný gél (viď obr. 16), ktorý je menej pevný. Subjektívnym pozorovaním bolo vyvedené, že za použitia kultúry vzniká rigidnejší gél a sieťovanie je efektívnejšie. Tento skriningový experiment je v kontexte zamerania práce veľmi významný, keďže dokazuje všeobecnú možnosť tvorby gélu priamo z kultúry, bez akýchkoľvek prídavkov (napr. prídavných gélotvorných polymérov).



Obr. 15: Kvapková metóda tvorby gélu za použitia kultúry, deň 1 až 6



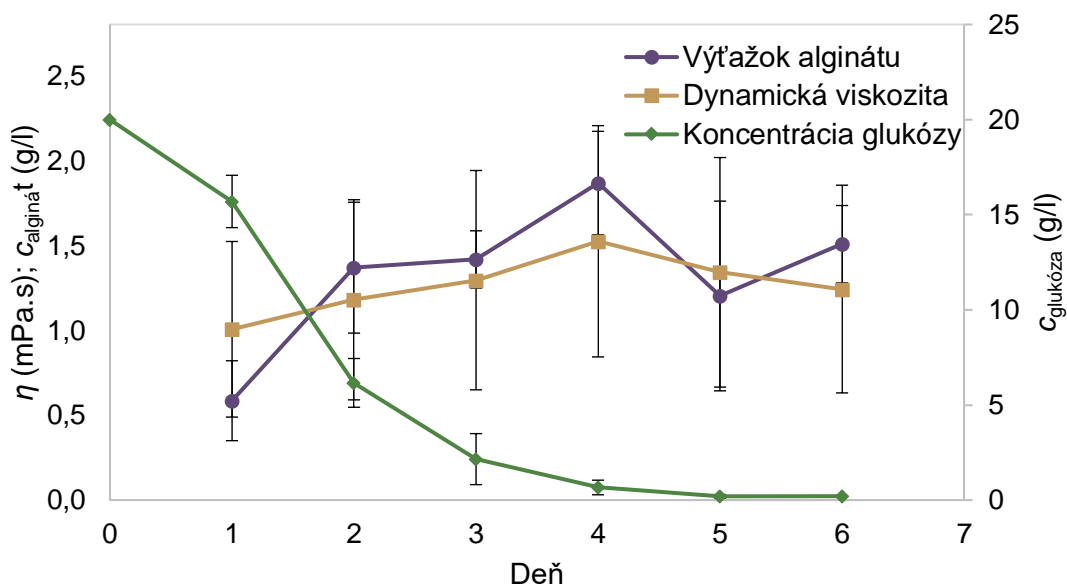
Obr. 16: Kvapková metóda tvorby gélu za použitia supernatantu kultúry, deň 1, 3 a 6

5.1.3.2 Stanovenie koncentrácie alginátu a zvyškovej glukózy

Pre ďalšiu skupinu experimentov bola opakovaná kultivácia za použitia optimálneho média a po dobu šiestich dní bol stanovený alginát. Taktiež bol sledovaný vplyv úbytku glukózy na výťažok alginátu, ako aj korelácia dynamickej viskozity supernatantov s gravimetricky stanoveným množstvom produkovaného alginátu.

Bakteriálny alginát bol stanovený gravimetrickou metódou – bežným postupom stanovovania tohto polysacharidu. Ako sa predpokladalo, v prvý deň bol zaznamenaný mierny nárast koncentrácie alginátu, konkrétne ($0,6 \pm 0,2$) g/l, a nasledujúce dni produkcia rástla. Na obr. 17 vidieť, že maxima koncentrácie alginátu, konkrétne ($1,9 \pm 0,3$) g/l, sa dosiahlo v 4. deň. Ďalšie dni nastal pokles tejto hodnoty.

Príčinu poklesu tvorby alginátu možno hľadať v zmenách koncentrácie glukózy –substrátu pre biosyntézu alginátu. Zmena koncentrácie zvyškovej glukózy bola skúmaná pomocou DNS (viď kapitola 4.3.2.1). Na začiatku kultivácie (0. deň) bolo pridaných 20 g/l glukózy a v ďalšie dni bol sledovaný pokles jej zásob. Ako vidieť z grafu (obr. 17), v piaty deň je koncentrácia glukózy prakticky nulová – ($0,19 \pm 0,09$) g/l čo je sprevádzané aj poklesom tvorby alginátu. Na základe týchto údajov možno usúdiť, že od piateho dňa ďalej nemožno očakávať novú tvorbu alginátu.



Obr. 17: Gravimetrický výtťažok alginátu, dynamická viskozita supernatantu a koncentrácia zvyškovej glukózy v kultúre v priebehu 6 dní

5.1.3.3 Stanovenie hustoty a dynamickej viskozity

Ako už bolo prezentované vyššie (viď obr. 17), alginát, ako hlavná extracelulárna polymérna zložka bunecnej kultúry, bude výrazne ovplyvňovať viskozitu supernatantu. Boli stanovené hodnoty dynamickej viskozity supernatantov kultúry počas šiestich dní. Viskozimetrom bola určená kinematická viskozita vzoriek a po stanovení hustoty boli vypočítané hodnoty dynamickej viskozity jednoduchým vzťahom:

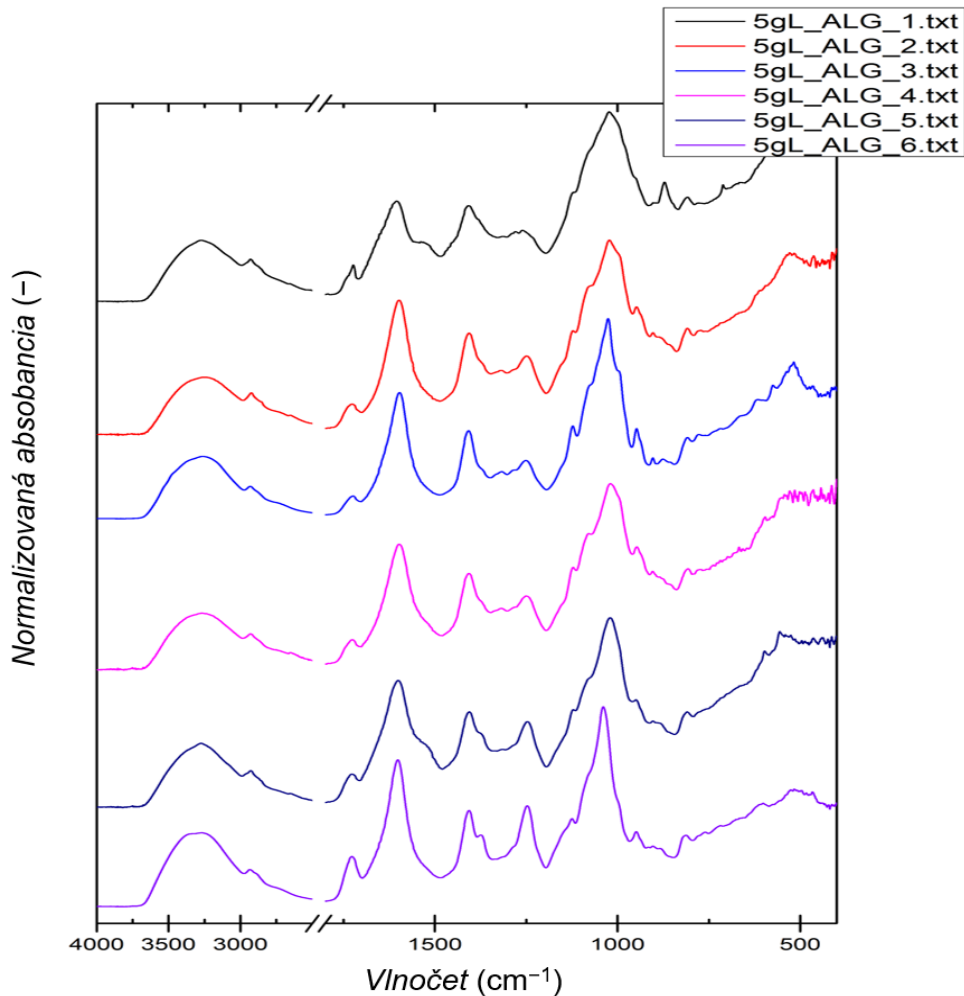
$$\eta = \rho \cdot \nu \quad (1)$$

Cieľom bolo stanoviť zmeny dynamickej viskozity supernatantov optimálnej kultúry v jednotlivé dni kultivácie a zhodnotiť využitelnosť viskozimetrie ako jednoduchej techniky k monitoringu produkcie alginátu, bez nutnosti jeho priamej izolácie (ako je tomu v prípade gravimetrického stanovení). Ako vidieť z grafu (viď obr. 17), hodnoty dynamickej viskozity a hodnoty gravimetricky stanovených koncentrácií alginátu majú rovnaký trend a obe krivky dosahujú maximum vo štvrtý deň, kedy dynamická viskozita nadobúda hodnotu $(1,524 \pm 0,002)$ mPa·s. Toto zistenie je dôležité, lebo ponúka jednoduchú a rýchlu možnosť získania informácie o tom, aká je koncentrácia alginátu v kultúre (gravimetrická metóda je časovo náročnejšia a musí sa počkať na vysušenie vzoriek), i keď viskozita súvisí aj s molekulovou hmotnosťou alginátu, ktorá sa v jednotlivé dni kultivácie môže meniť. Ako už bolo spomenuté, z grafu (obr. 17) vidieť, že v piaty deň baktérie spotrebujú takmer všetku glukózu a nastáva aj pokles viskozity, resp. koncentrácie produkovaného alginátu. Baktérie už nemajú stavebné bloky pre ďalšiu tvorbu alginátu. Z týchto dôvodov som určila štvrtý deň ako optimálny pre gelačné experimenty.

5.1.3.4 Charakterizácia alginátu pomocou IČ

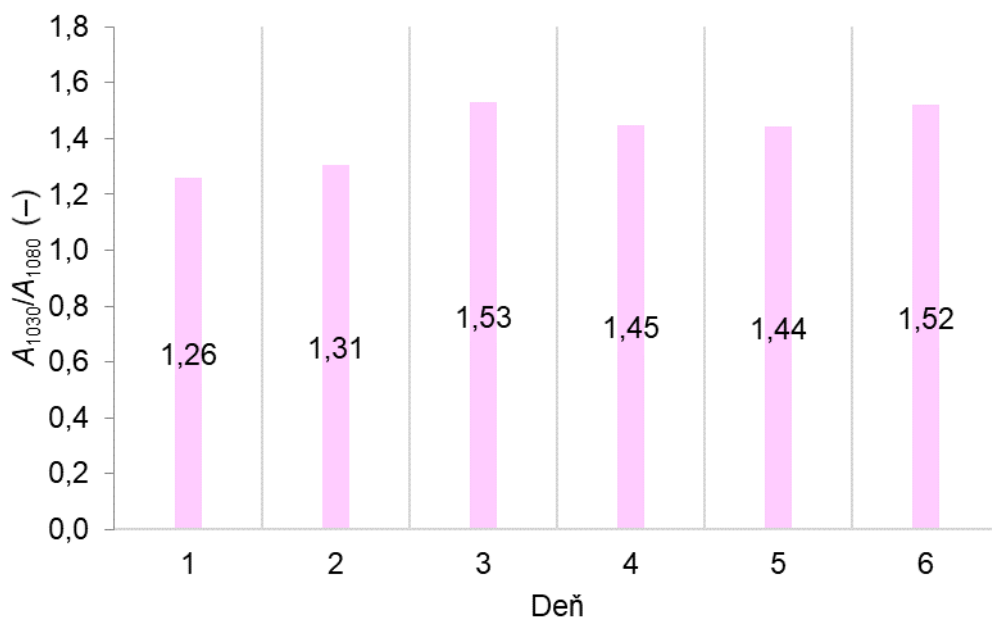
Ako už bolo spomenuté (viď 2.3.3), relatívne zastúpenie podjednotiek M a G je kľúčová vo vzťahu k tvorbe gélu. Keďže sa Ca^{2+} ióny viažu silnejšie s G podjednotkami, alginát s nižším pomerom M/G bude vhodnejší pre geláciu. Boli charakterizované vzorky gravimetricky získaného alginátu z jednotlivých dní. Na základe literatúry bol navrhnutý postup orientačného stanovenie pomeru M a G podjednotiek alginátu [103]. V krátkosti ide o určenie pomeru píku pri približne $1\,030\text{ cm}^{-1}$, ktorý sa mení v závislosti na zastúpení M podjednotiek, a píku $1\,080\text{ cm}^{-1}$, ktorý je zvolený ako vnútorný štandard. Pík $1\,030\text{ cm}^{-1}$ reprezentuje

deformačnú vibráciu OH skupiny a koreluje so zastúpením M podjednotiek. V prípade spektier skúmaných vzoriek bol tento pík posunutý smerom k vlnočtu $1\ 020\ \text{cm}^{-1}$, takže bolo určené maximum v tejto oblasti. Pík $1\ 080\ \text{cm}^{-1}$ bol pridelený C-O-C väzbovej vibrácii šesťčlenného kruhu M a G podjednotky. Pre súhrnné priradenie píkov viď obr. 53 v prílohe. IČ spektra jednotlivých vzoriek sú zobrazené na obr. 18.



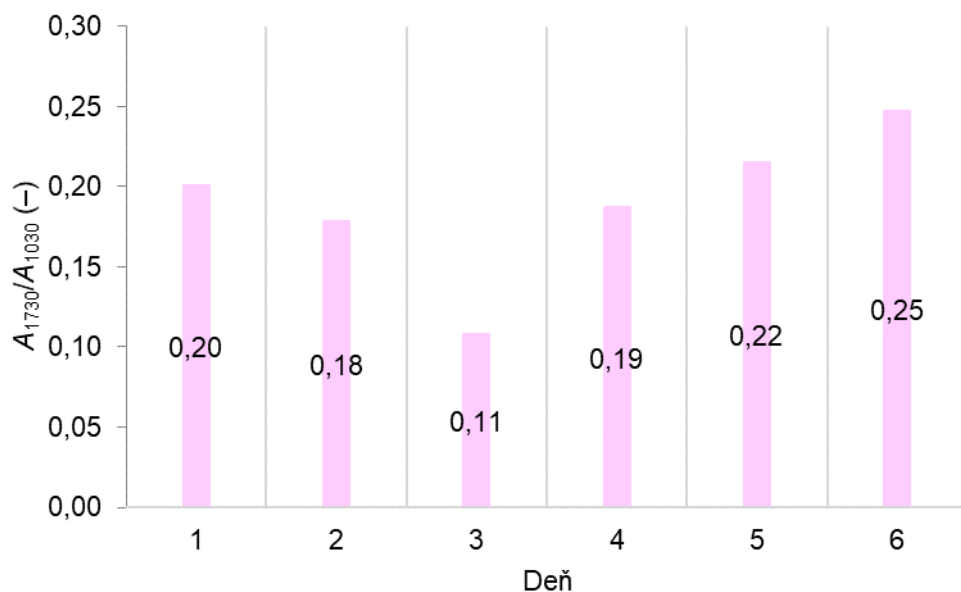
Obr. 18: FTIR spektra bakteriálneho alginátu (číselné označenie vzoriek v legende grafu reprezentuje dĺžku kultivácie v dňoch)

Výsledky stanovenia relatívneho pomeru M/G sú znázornené v stĺpcovom grafe (viď obr. 19). Celkové výsledky indikujú, že alginát produkovaný v jednotlivé dni kultivácie sa v pomere M/G líšia minimálne. V tretí deň vidíme mierny nárast zastúpenia M podjednotiek, čo sa môže prejaviť v horších gélotvorných schopnostiach. Pri orientačnej tvorbe gélov kvapkovou metódou (viď podkapitola 5.1.3.1) však neboli pozorované žiadne zjavné zmeny v kvalite gélov. Vysvetlením môže byť, že v prípade alginátu produkovaného v analyzovaných kultiváciách je celková koncentrácia alginátu je dôležitejším faktorom pre úspešnú tvorbu gélov ako pomer M/G podjednotiek.



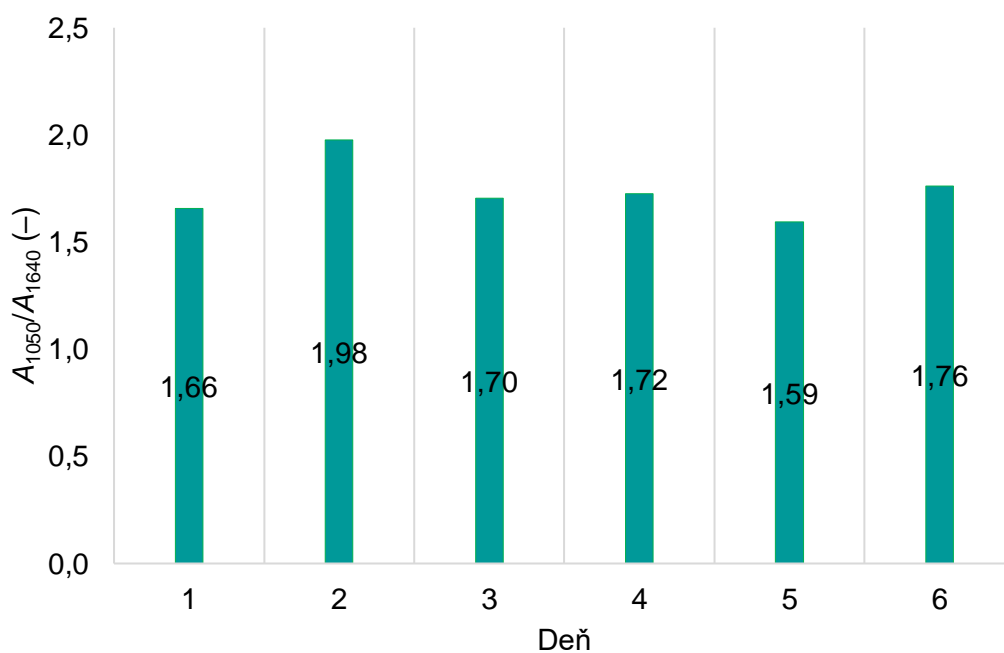
Obr. 19: Pomer absorbancií pri $1\ 030\ \text{cm}^{-1}$ a $1\ 080\ \text{cm}^{-1}$ charakterizujúci pomer M/G

Ako už bolo uvedené v teoretickej časti práce, tvorbu gélov okrem pomeru M/G ovplyvňuje aj miera acetylácie (viď 2.1.7). Publikácie hovoria o vplyve acetylácie na vlastnosti alginátu, napr. na viskozitu, interakciu s vápenatými iónmi. Tiež je známe, že acetylované M pojednotky sú neschopné epimerizácie na G podjednotku [104]. Všetky tieto vplyvy môžu mať efekt na výslednú tvorbu gélov. Preto bola pomocou IČ skúmaná aj miera acetylácie vzoriek v jednotlivé dni kultivácie. Charakteristické píky pre O-acetylované skupiny alginátu sú $1\ 730$ a $1\ 250\ \text{cm}^{-1}$ (viď obr. 53 v prílohe). V spektrách všetkých skúmaných vzoriek boli tieto píky identifikované, čo dokazuje, že bol alginát čiastočne acetylovaný. Ide o dôležitú skutočnosť, keďže v publikáciách nevládne konsenzus v otázke, či je alginát produkovaný *Azotobacterom vinelandii* acetylovaný alebo nie [48; 49; 50]. Z pomeru pík pri $1\ 730$ a $1\ 020\ \text{cm}^{-1}$ boli stanovené relatívne zmeny acetylácie alginátu (viď obr. 20). Prvé tri dni miera acetylácie klesá a ďalej znova rastie. Teoreticky by teda v tretí deň mala byť umožnená najvyššia miera epimerizácia M na G.



Obr. 20: Pomer absorbancií pri $1\,730\text{ cm}^{-1}$ a $1\,030\text{ cm}^{-1}$ charakterizujúci mieru acetylácie alginátu

Ďalej bola skúmaná prítomnosť alginátu v sušine. Boli porovnané absorbancie pri $1\,050\text{ cm}^{-1}$ (charakterizujúce alginát) a $1\,640\text{ cm}^{-1}$ (charakteristický vibračný pás proteínov, tzv. amid I, reprezentujúci zvyškovú biomasu). Výsledky sú zobrazené na obr. 21. Ako vidieť, medzi jednotlivými dňami sa tento pomer príliš nemení. Maximum bolo dosiahnuté v druhý deň. Bolo zistené, že i napriek odstredeniu a premytiu biomasy je v nej alginát stále prítomný v podobe malých guľčiek. Vďaka nim, ako aj vďaka CaCO_3 prítomnom v sušine, bol náročný homogénny odber vzorky pre analýzu. Z týchto dôvodov sú priložené výsledky skôr orientačné, každopádne však hovoria o prítomnosti alginátu v biomase.



Obr. 21: Pomer absorbancií pri $1\,050\text{ cm}^{-1}$ a $1\,640\text{ cm}^{-1}$ charakterizujúci prítomnosť alginátu v biomase

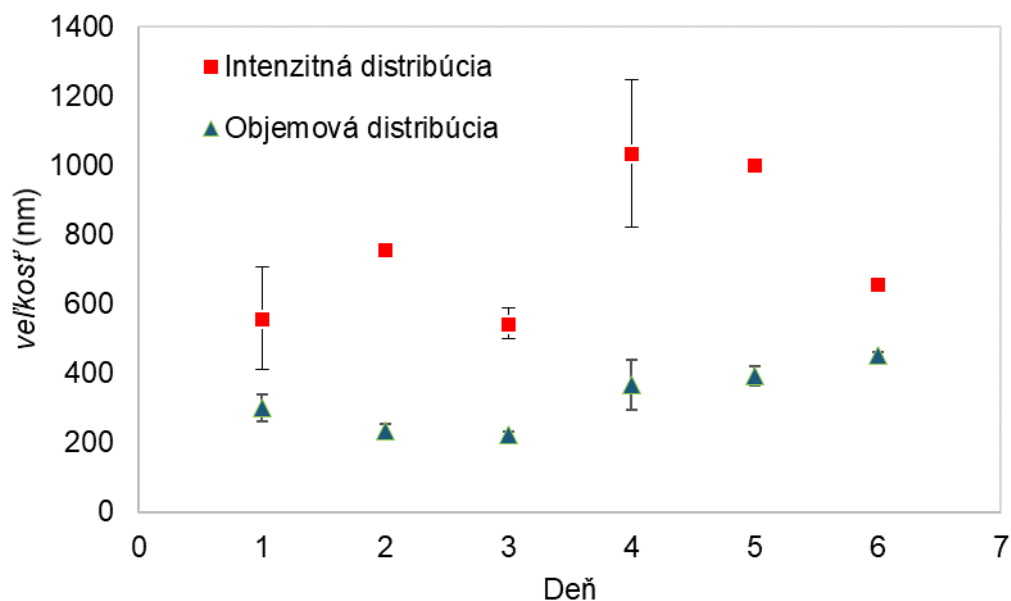
5.1.3.5 Veľkosť a stabilita častíc v supernatante

Supernatanty jednotlivých dní kultúry boli podrobené rovnako analýze veľkosti a stability meraním dynamického rozptylu svetla (DLS). Vzorky boli zmerané trikrát a z týchto hodnôt bol vypočítaný priemer a smerodajná odchýlka (viď tab. 3). Ak predpokladáme, že dominujúcim zdrojom rozptylu žiarenia v supernatantu je extracelulárne produkovaný alginát, môže táto metóda poskytnúť cenné informácie, ako sa mení veľkosť, stabilita a agregáčny chovanie alginátu v priebehu kultivácie. Keďže presné stanovenie molekulovej hmotnosti alginátu je všeobecne metodologicky a inštrumentálne pomerne náročné, podobne ako tomu bolo u viskozimetrie, bola taktiež technika DLS navrhnutá ako alternatívna metóda umožňujúca nepriamy monitoring prípadných zmien v polymeračnom stupni alginátu v závislosti na kultivačných podmienkach.

Tab. 3: Priemerné hodnoty veľkosti častíc (objemová distribúcia), index polydisperzity a ζ -potenciálu

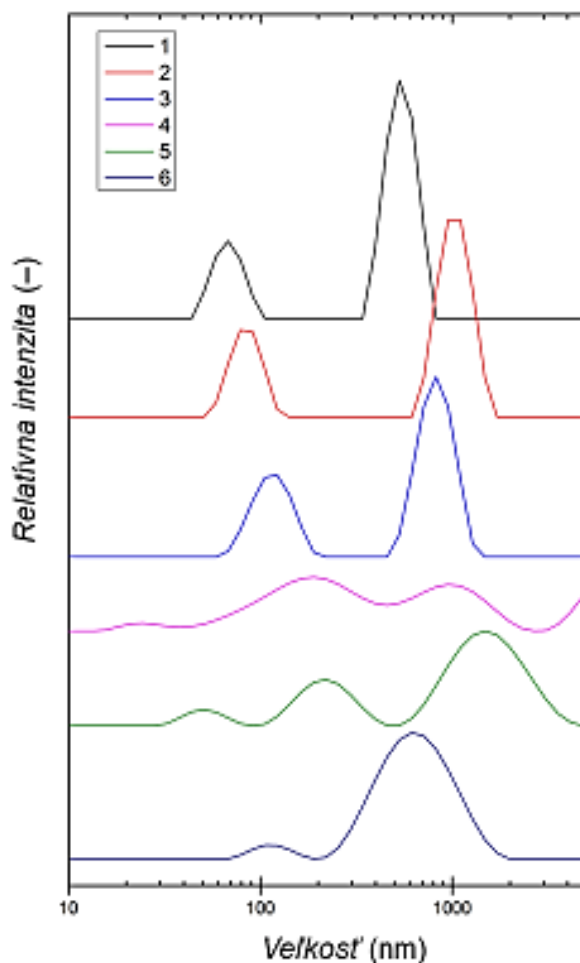
Deň	veľkosť (nm)	PDI (-)	ζ -potenciál (mV)
1	301 ± 38	0,84 ± 0,07	-27,4 ± 0,8
2	235 ± 20	0,69 ± 0,05	-26,4 ± 0,1
3	224 ± 9	0,69 ± 0,06	-29,9 ± 0,4
4	368 ± 71	0,9 ± 0,1	-27,1 ± 0,2
5	394 ± 29	0,651 ± 0,005	-23,9 ± 0,3
6	454 ± 10	0,25 ± 0,01	-27,5 ± 0,2

Napriek tomu, že fundamentálna distribúcia veľkosti generovaná pomocou DLS je intenzitná distribúcia (relatívny príspevok častíc o danej veľkosti k intenzite meraného signálu, t. j. fluktuácia intenzity rozptýleného žiarenia), túto hodnotu možno podľa matematickej Mie teórie previesť na objemovú distribúciu. Intenzitná distribúcia môže byť zavádzajúca, pretože malé množstvo agegrátov (alebo veľkých častíc) dominuje celej distribúcii. Kým intenzitná distribúcia opisuje relatívny podiel viacerých zložiek na základe rozptylu, objemová distribúcia ho opisuje na základe ich hmotnosti/objemu. Aby bola možná transformácia z intenzitnej na objemovú distribúciu, musia byť prijaté tieto predpoklady: všetky častice sú sférické a homogénne, sú známe optické parametre častíc (reálna a imaginárna zložka indexu lomu) a že v distribúcii intenzity nie je žiadna chyba. Objemová distribúcia je síce zaťažená matematickou chybou (danou obmedzenou platnosťou týchto predpokladov pre reálny analyzovaný systém) a nemala by sa považovať za absolútnu, no je výhodná pre porovnávacie účely v prípade prítomnosti viac veľkostných frakcií v systéme, teda i v prípade týchto meraní. V grafe na obr. 22 sú porovnané hodnoty intenzitnej a objemovej distribúcie meraných vzoriek a vidíme výrazný nárast v priemernej veľkosti medzi tretím a štvrtým dňom. Podobné výrazné skoky v rámci štvrtého dňa boli pozorované aj pri gravimetrickom stanovení alginátu (viď 5.1.3.2) či skúmaní viskozity (viď 5.1.3.3). Keďže metódou DLS bol detekovaný vyšší rozptyl, možno tvrdiť, že výsledky zo spomínaných meraní korelujú a bol potvrdený štvrtý deň kultivácie ako optimálny pre gelačné experimenty.



Obr. 22: Porovnanie priemerných veľkostí častíc v priebehu kultivácie stanovených z intenzitnej resp. objemovej distribúcie veľkosti častíc

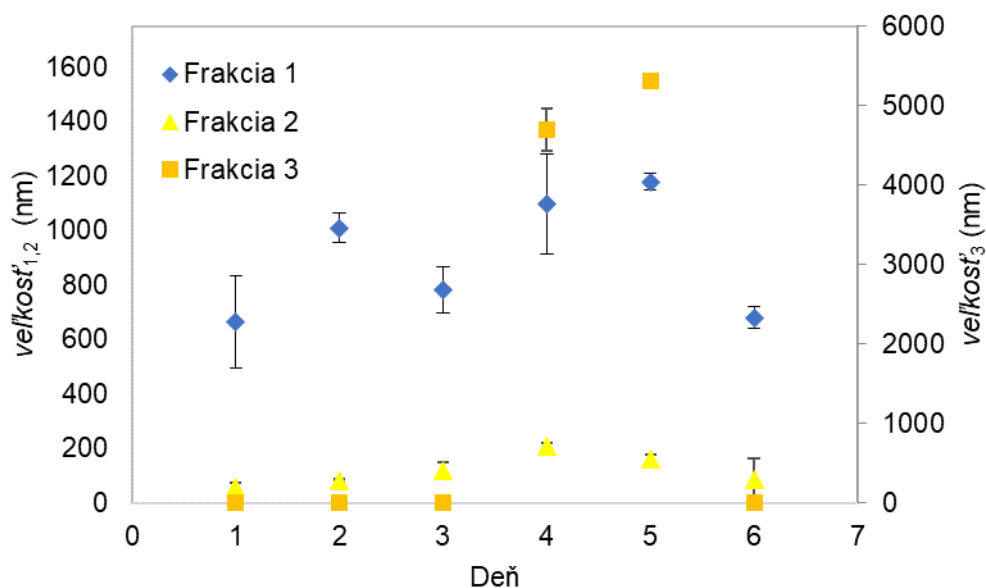
Globálne priemery, uvedené v grafe na obr. 22, však neposkytujú dostatočne prehľadnú ilustráciu veľkostných zmien, ktoré v systéme v priebehu kultivácie nastávajú. Za týmto účelom je vhodná podrobnejšia analýza distribučných kriviek, ktoré sú znázornené na obr. 23. Z porovnania distribúcií na obr. 23 je vidieť, že prvé tri dni sú v skúmanom supernatante prítomné dve dobre separované veľkostné frakcie (dva píky). V literatúre je tento jav vysvetlený dvoma relaxačnými režimami alginátu v prítomnosti solí [105]. Rýchly režim je spojený s jednotlivými molekulami alginátu, kým pomalý režim reprezentuje dynamiku väčších štruktúr – agregátov. Agregáty vznikajú vďaka prítomnosti kladne nabitých iónov v roztoku, ktoré prepájajú záporné skupiny v reťazci alginátu. Tento jav bol opakovane dokázaný, kedy v roztoku alginátu (alebo iných polyelektrolytov) bez solí je prítomný iba jeden pík [105]. Keďže je málo pravdepodobné, že by boli vo vzorke dve frakcie alginátu s tak odlišnou veľkosťou, väčšie frakcie boli priradené práve spomínaným agregátom.



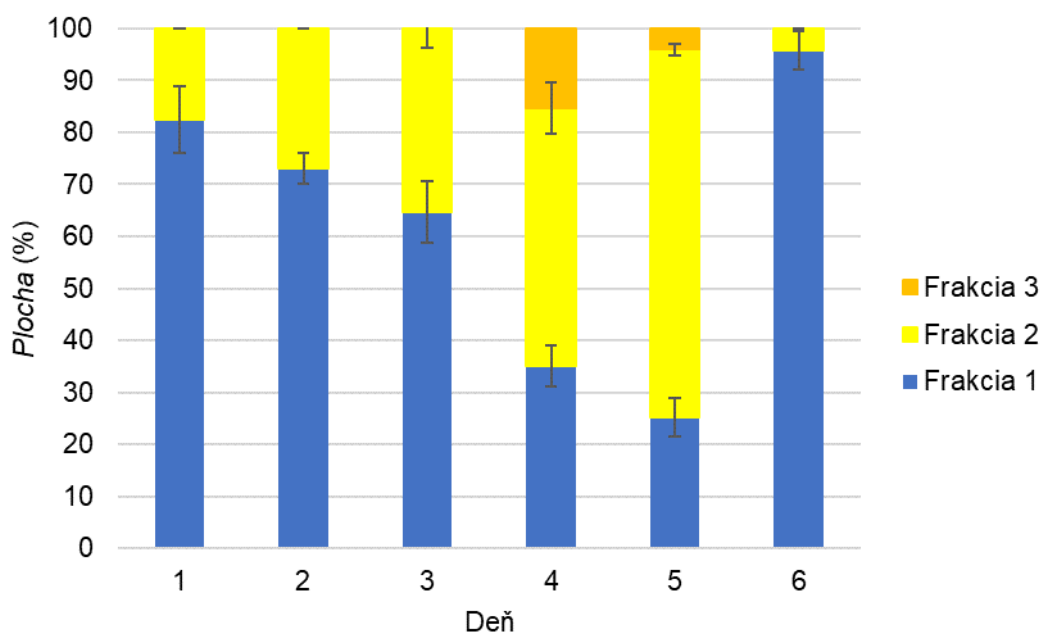
Obr. 23: Intenzitná distribúcia veľkosti častíc v supernatante analyzovaných bunčných kultúr v závislosti na dobe kultivácie – dni 1 až 6

Pre každú zo spomínaných frakcií bola zvlášť určená priemerná veľkosť v jednotlivé dni. Ako vidieť z grafu (viď obr. 24), frakcia 1 má najnižšiu veľkosť v prvý deň, konkrétne (664 ± 169) nm, a najvyššiu veľkosť v piaty deň, s hodnotou ($1\,179 \pm 31$) nm. Frakcia 2 má tiež minimum v druhý deň, s hodnotou (58 ± 17) nm a maximum v štvrtý deň s hodnotou (209 ± 11) nm. Tretia frakcia je prítomná iba v štvrtý a piaty deň s rádovo vyššími hodnotami, konkrétne ($4\,699 \pm 271$) nm v štvrtý deň a ($5\,312 \pm 85$) nm v piaty deň.

Taktiež boli stanovené percentuálne zastúpenie jednotlivých frakcií, konkrétne na obr. 25, kde sú porovnané plochy jednotlivých frakcií v %. Napr. v prvý deň vidíme, že viac než 80 % častíc patrí (väčšej) frakcii 1, čiže väčšina alginátu je agregovaná pôsobením prítomných kationov. Ďalšie dni bol zaznamenaný nárast zastúpenia menších častíc reprezentovaných frakciou 2. Keďže táto frakcia má reprezentovať samotné molekuly alginátu, možno tieto výsledky vysvetliť nárastom koncentrácie alginátu (pričom sa koncentrácia kationov a teda kapacita pre vznik elektrostaticky sieťovaných agregátov v roztoku nemení), ktorá bola dokázaná napr. gravimetrickým stanovením (viď 5.1.3.2).



Obr. 24: Zmeny priemernej veľkosti (intenzitná distribúcia) jednotlivých frakcií zastúpených v supernatante bunecnej kultúry počas šiestich dní kultivácie



Obr. 25: Percentuálne zastúpenie častíc v jednotlivých frakciách (intenzitná distribúcia)

Ďalej boli prostredníctvom DLS ZetaSizer stanovené hodnoty *PDI*, ktorý je definovaná ako podiel štandardnej odchýlky distribúcie priemeru častí stredným priemerom častíc. Používa sa na odhad priemernej uniformity častíc v roztoku. Čím vyššia je hodnota *PDI*, tým je vyššia distribúcia veľkosti častíc vo vzorke [106]. Vzorka sa považuje za monodisperznú, ak je *PDI* menší ako 0,05. Ak je hodnota vyššie ako 0,7, vzorka môže byť nevhodná na techniku DSL. Keďže hodnoty *PDI* meraných vzoriek sú počas viacerých dní vyššie ako spomínaná hodnota 0,7, je vhodné brať získané dáta skôr ako orientačné. *PDI* je najvyšší vo štvrtý deň, konkrétne $0,9 \pm 0,1$. Znamená to, že v tieto dni je najširšiu distribúciu veľkosti častíc. Najnižšia distribúcia častíc bola v šiesty deň s hodnotou $0,25 \pm 0,01$.

Pre stabilitu častíc je dôležitý náboj zabraňujúci agregácii častíc. Veľkosť povrchového náboja určuje ζ -potenciál, ktorý bol meraný technikou elektroforetického rozptylu svetla (ELS) na rovnakom zariadení (ZetaSizer Nano ZS). Z nameraných hodnôt ζ -potenciálu bolo zistené, že systém je najstabilnejší v tretí deň s hodnotou ζ -potenciálu ($-29,9 \pm 0,4$) mV. Berúc do úvahy odchýlku, jedine v tento deň prekračuje ζ -potenciál hraničnú hodnotu stability -30 mV (vo všeobecnosti považujeme častice za stabilné, keď je absolútna hodnota ζ -potenciálu väčšia ako 30 mV). Najmenej stabilná bola vzorka z piateho dňa s hodnotou ($-23,9 \pm 0,3$) mV. Znamená to, že vzorky sú na pomedzí stability a nemožno vylúčiť, že budú agregovať.

5.1.4 Stanovenie a charakterizácia PHB

Ako už bolo popísané (viď 2.1.7), druhým významným polymérom, ktorý *Azotobacter vinelandii* produkuje, je PHB. Tento bakteriálny polymér síce nie je kľúčový z hľadiska tvorby gélov, avšak, ako bolo uvedené v teórii (viď 2.2.2), produkcia a akumulácia PHB môže mať zásadný vplyv na bunečnú robustnosť a stresovú odolnosť, čo môže byť veľmi dôležité pre prípadné aplikačné rozmery práce (ak sú bunky odolnejšie a robustnejšie, je väčšia pravdepodobnosť, že prežijú pri aplikácii do pôdy) (viď podkapitola 2.2.2). Preto boli stanovené a charakterizované výťažky PHB v jednotlivé dni kultivácie pomocou techník GC a IČ a bližšie výsledky sú popísané v nasledujúcich podkapitolách nižšie.

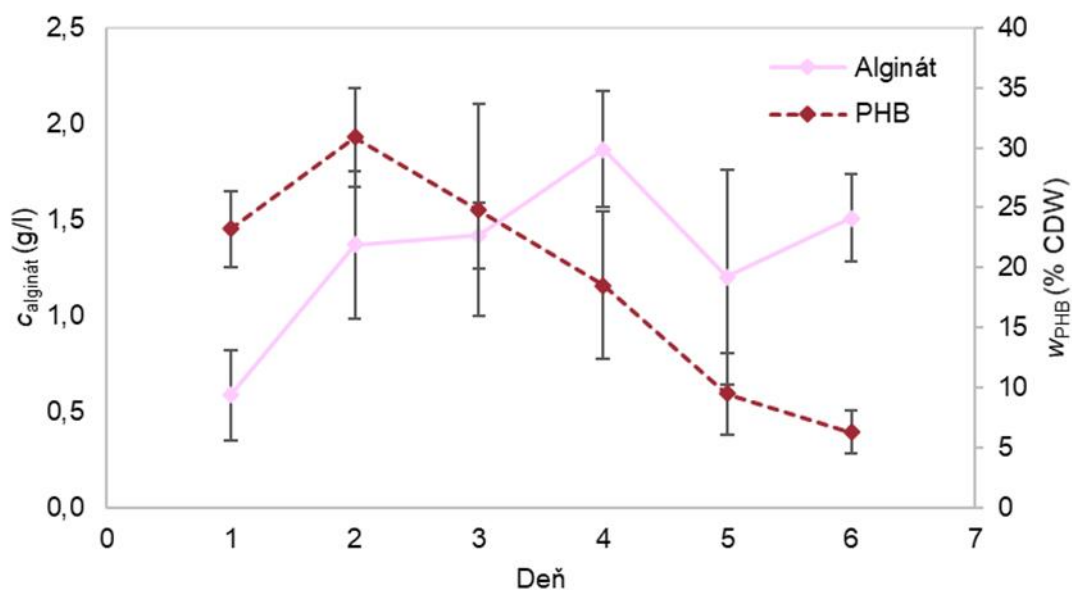
5.1.4.1 Stanovenie PHB pomocou GC

Je známe, že produkcia alginátu a PHB baktériou *Azotobacter vinelandii* je kompetitívny proces, preto je užitočné mať informáciu o trende tvorby oboch polymérov [41]. Zaujímalo nás, či baktérie za daných kultivačných podmienok produkujú PHB a trend jeho produkcie s ohľadom na súvisiacu produkciu alginátu. Zo vzoriek odoberaných v priebehu predošlých experimentov v rozmedzí šiestich dní boli pripravené triplikáty. V tabuľke (viď tab. 4) sú výsledky týchto meraní. Po 24 h (1. deň) bol obsah PHB (23 ± 3) % suchej hmotnosti buniek (ang. *cell dry weight* – CDW). Druhý deň sa zaznamenalo maximum s hodnotou (31 ± 4) % CDW PHB. Ďalšie dni nasleduje pokles koncentrácie PHB, pravdepodobne spôsobený nedostatkom glukózy. Baktérie v tejto fáze siahajú na zásoby energie a uhlíku uložené v podobe PHB, preto vidíme pokles jeho koncentrácie.

Tab. 4: Stanovenie PHB počas šiestich dní; optimálne médium

Deň	w_{PHB} (% CDW)
1	23 ± 3
2	31 ± 4
3	25 ± 9
4	19 ± 6
5	10 ± 3
6	6 ± 2

Na obr. 26 je porovnanie trendu tvorby alginátu a PHB baktériami – dvoch kompetitívnych procesov. Vidieť, že zo začiatku (prvý a druhý deň) dominuje tvorba PHB. Od tretieho dňa však zaznamenávame zlom, kedy je tvorba alginátu zjavne preferenčným procesom – bolo dosiahnuté maximum jeho tvorby, kým koncentrácia PHB klesá. Táto preferencia produkcie alginátu je logické uprednostnenie úschovy energie v porovnaní s PHB. Z podstaty tejto práce sa prioritizuje tvorba alginátu (v porovnaní s tvorbou PHB), preto bol určený štvrtý deň (s maximom produkcie alginátu) ako optimálny. Každopádne, miera intracelulárnej akumulácie PHB v tento deň kultivácie zostáva pomerne významná, čo vzhľadom k vyššie uvedenému môže predstavovať ďalšiu výhodu gelácie bunečných kultúr práve v tejto rastovej fáze.

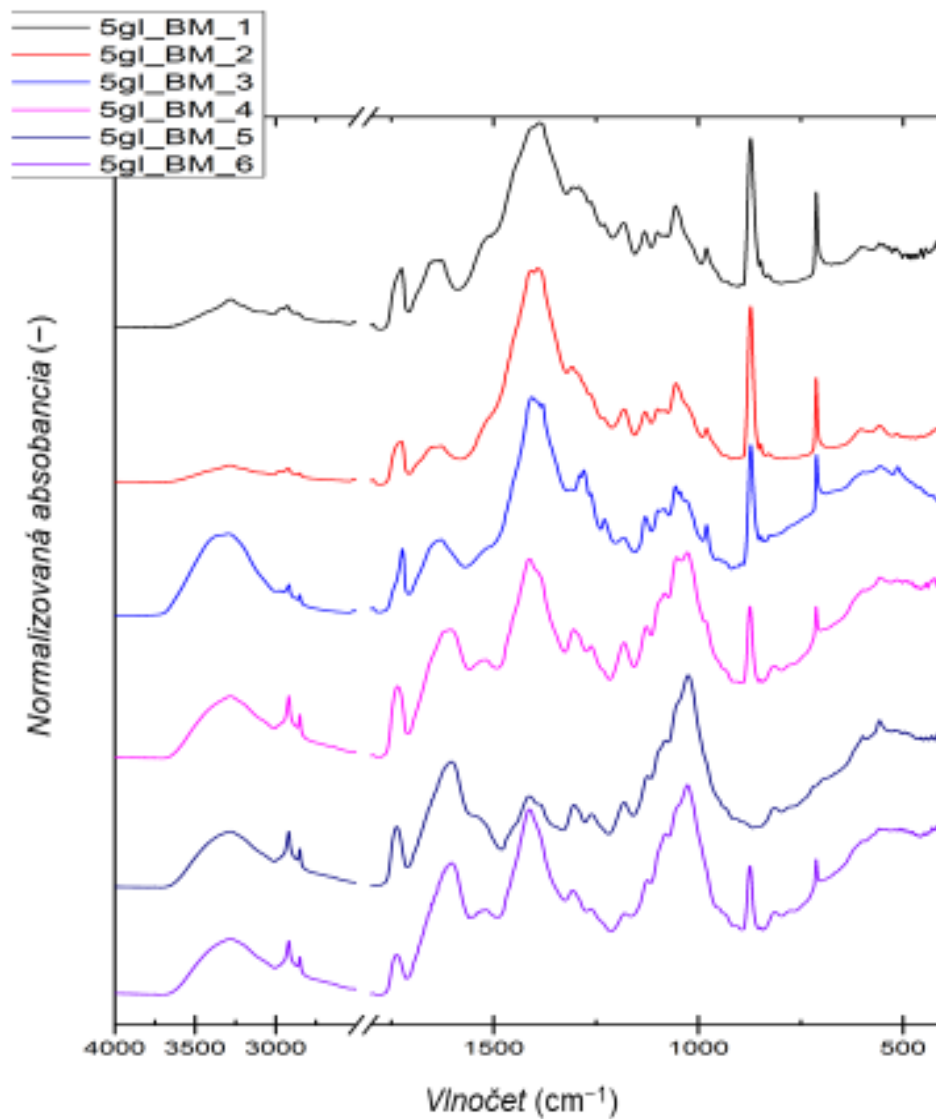


Obr. 26: Porovnanie produkcie alginátu a PHB

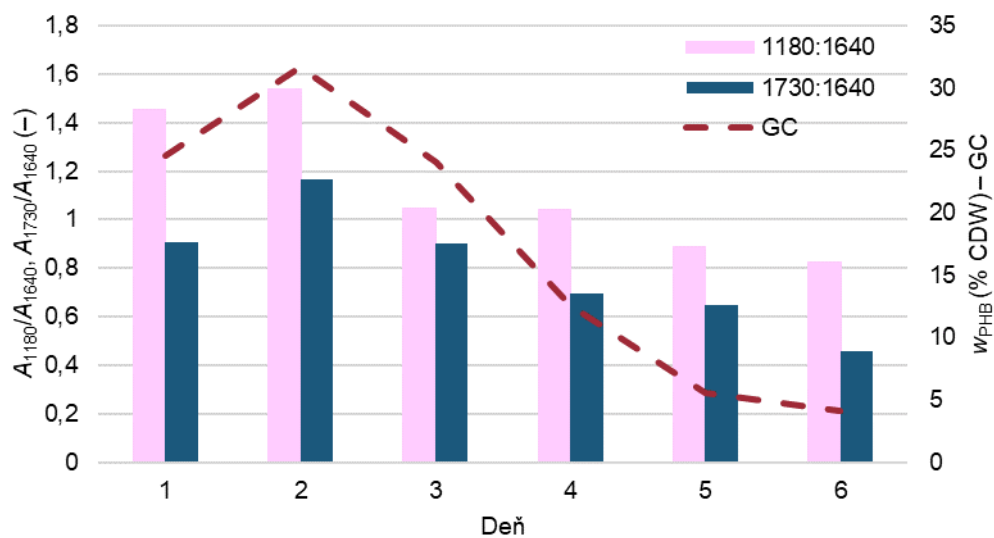
5.1.4.2 Štruktúrna analýza PHB v biomase metódou infračervenej spektroskopie

PHB v biomase možno identifikovať pomocou infračervenej spektroskopie (spektrá vid' obr. 27). Pík pri vlnočte 1730 cm^{-1} , signifikantný pre PHB, reprezentuje väzbovú vibráciu funkčnej skupiny C=O esterov. Presná poloha píku a jeho tvar sa môžu meniť v závislosti od kryštalinity PHB. Ďalší charakteristický pík pre PHB je pri vlnočte 1180 cm^{-1} , ktorého výhodou je, že neinterferuje s alginátom (nedochádza ku prekrytiu so žiadnym z vibračných pásov charakteristických pre alginát). Píky pri spomenutých vlnočtoch boli porovnávané s píkom pri asi 1640 cm^{-1} , ktorý je charakteristický pre biomasu (Amid I pás proteínov biomasy). Pre súhrnné priradenie píkov vid' obr. 54 v prílohe.

Ako ukazuje graf (vid' obr. 28), v prípade oboch skúmaných pomerov bol zaznamenaný nárast v prvé dva dni a následne koncentrácia PHB klesá. Pri porovnaní výstupov z GC bolo zistené, že údaje veľmi dobre korelujú. Oboma metódami bola dokázaná prítomnosť PHB v biomase s maximom produkcie v druhý deň. Z tohto výsledku je patrné, že FTIR analýza ako pomerne dostupná, jednoduchá a časovo nenáročná metóda bez nárokov na úpravu vzoriek môže slúžiť nielen k potvrdeniu prítomnosti, ale i k základnému monitoringu zmien v koncentrácii PHB v produkovanej biomase.



Obr. 27: IČ spektrá biomasy

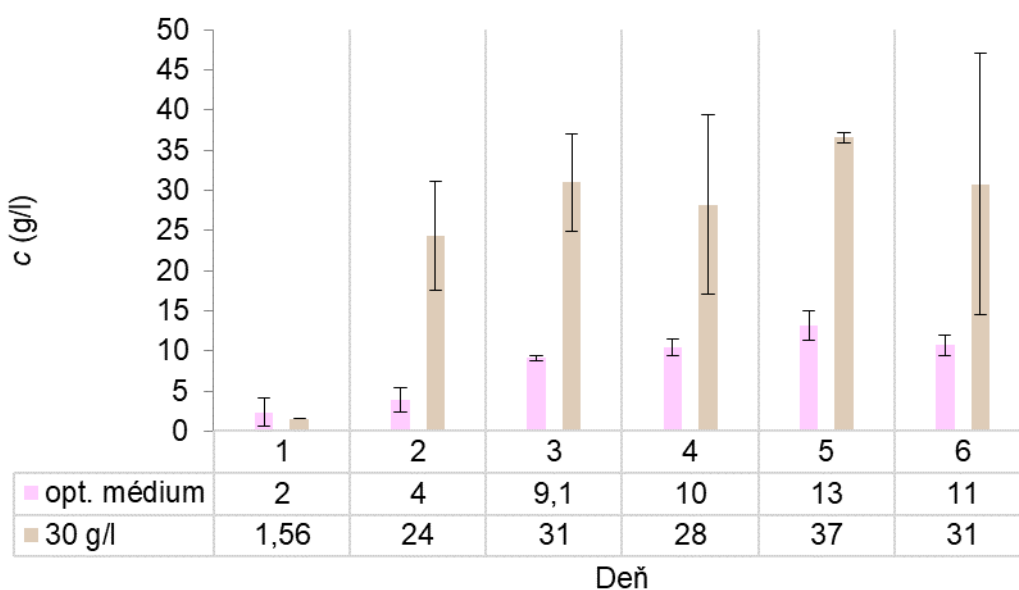


Obr. 28: Porovnanie dvoch metód (FTIR a GC) stanovenie výťažku PHB

5.1.5 Vplyv vyššieho prídavku CaCO₃ na priebeh kultivácie

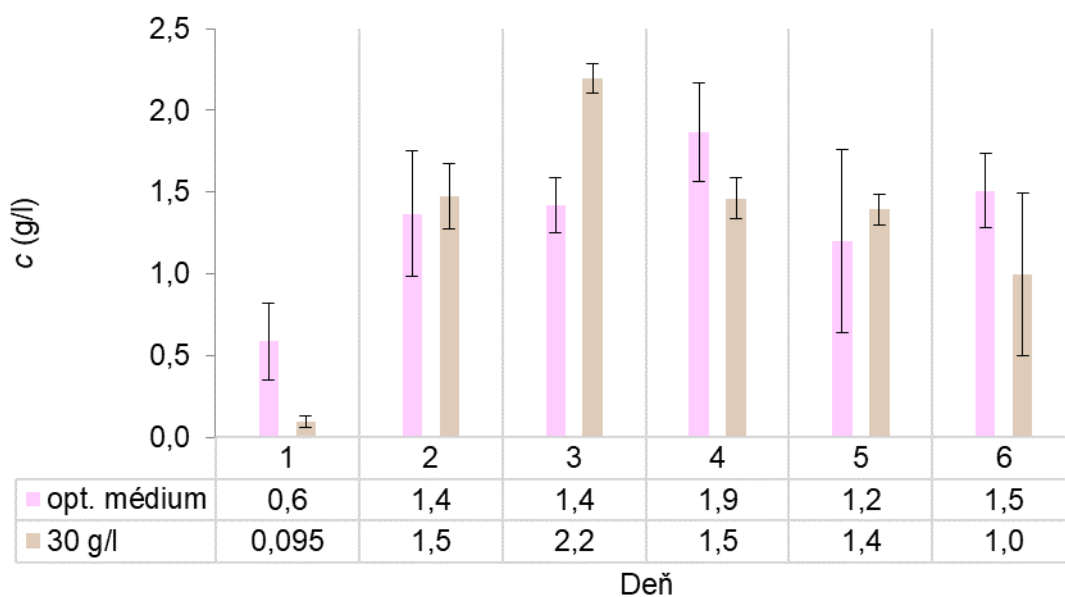
V kapitole 5.1.1 (Výber kultivačného média) sme mohli vidieť, že pri pridaní uhličitanu vápenatého v koncentrácii 5 g/l k produkčnému média 1A bola zvýšená produkcia bakteriálneho alginátu (pre grafické zobrazenie vid' obr. 13). Z tohto dôvodu a na základe literatúry (vid' podkapitola 2.1.7) bola realizovaná tiež kultivácia pri navýšenej koncentrácii uhličitanu vápenatého na 30 g/l a boli sledované efekty tohto prídavku v porovnaní s optimálnym médiom, v ktorom je koncentrácia uhličitanu vápenatého 5 g/l.

Čo sa týka výťažku sušiny, boli zaznamenané vyššie hodnoty v porovnaní s optimálnym médiom (vid' obr. 29). Tieto výsledky sú zaťažené vyššou chybou, pravdepodobne spôsobenou nehomogénnym odberom vzoriek pre vysoký obsah CaCO₃, ktorý sa usadzoval na dno banky. Rastová krivka určená odčítaním optickej hustoty vykazovala podobný trend ako v prípade optimálneho média s nižšou koncentráciou uhličitanu (5 g/l) a je zobrazená v prílohe (vid' obr. 50).



Obr. 29: Porovnanie výťažkov sušiny v rozmedzí šiestich dní, optimálne médium resp. médium s prídavkom 30 g/l CaCO₃

Taktiež v prípade kultivácie so zvýšeným obsahom CaCO₃ bol gravimetricky stanovený výťažok alginátu. Z grafu (vid' obr. 30) vidieť, že vyšší prídavok CaCO₃ podporí tvorbu alginátu, ktorá dosahuje maximum už v tretí deň (pre optimálne médium je to štvrtý deň) s hodnotou (2,2 ± 0,1) g/l. V porovnaní s optimálnym médiom s maximálnym výťažkom (1,9 ± 0,3) g/l a berúc do úvahy odchýlky, ide o podobné hodnoty. Významný je však rozdiel v tom, že pri 30 g/l CaCO₃ sa dosahuje tohto maxima o deň skôr (v tretí deň kultivácie).

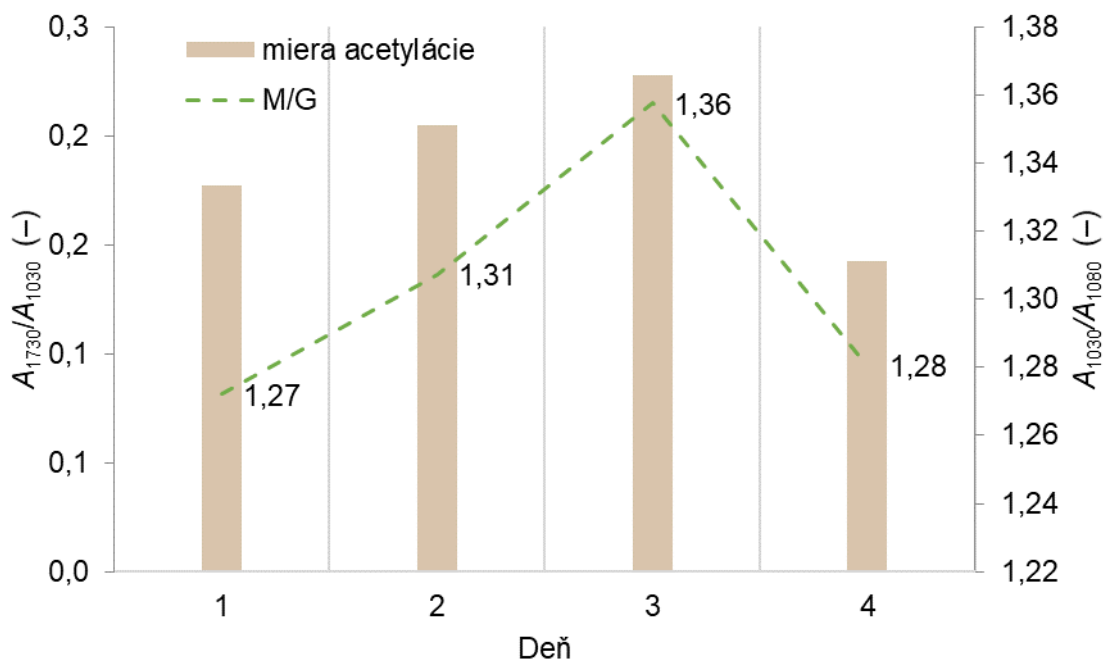


Obr. 30: Porovnanie výťažkov alginátu v rozmedzí šiestich dní; optimálne médium resp. médium s prídavkom 30 g/l CaCO_3

Podobne ako výťažok alginátu bol porovnaný aj výťažok PHB stanovený prostredníctvom GC v jednotlivé dni kultivácie. Celkový trend tvorby PHA (viď v prílohe obr. 51) je podobný ako v prípade optimálneho média s 5 g/l CaCO_3 . Podobne ako pri optimálnom médiu, bolo maximum dosiahnuté v druhý deň s mierne vyšším výťažkom (35 ± 3 %), ako pri optimálnom médiu s výťažkom (31 ± 4 %). Znovu možno skonštatovať, že v rámci odchýlky sa jedná o štatisticky nevýznamné rozdiely. Ďalšie navýšenie obsahu uhličitanu vápenatého teda nemá významný vplyv na produkciu PHB v bunkách.

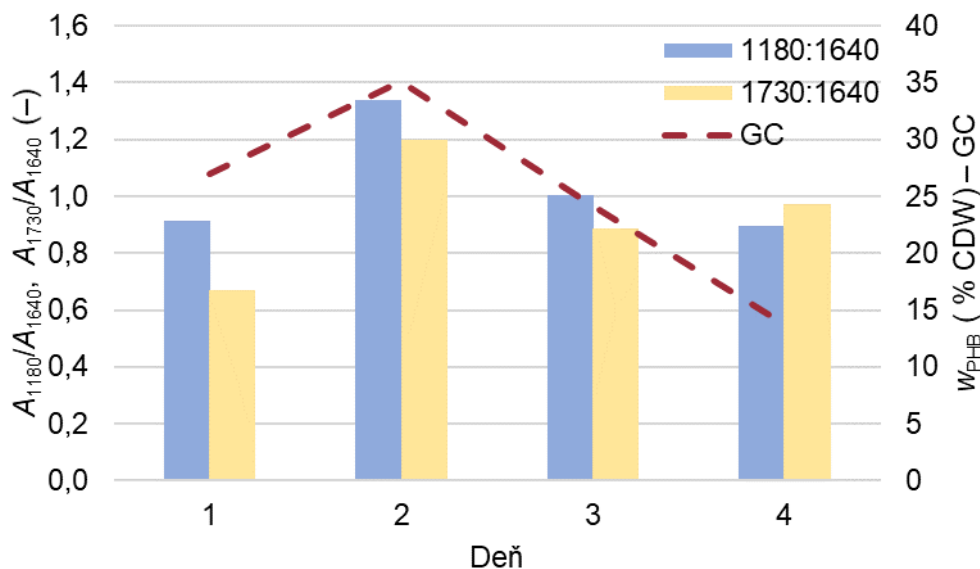
Vzorky s vyšším prídavkom CaCO_3 boli podrobené už zmieneným analýzám metódou FTIR (viď kapitoly 5.1.3.4 a 5.1.4.2) a výsledky boli porovnané s dátami za použitia optimálneho média. Spektrá sú zobrazené na obr. 55 a obr. 56 v prílohe. Čo sa týka orientačného stanovenia pomeru M/G, hodnoty v jednotlivé dni sa prakticky nelíšili; maximálne zastúpenie M podjednotiek bolo najvyššie v tretí deň a priemerná hodnota v rámci všetkých dní bola ($1,30 \pm 0,03$). V porovnaní s optimálnym médiom, kde priemerná hodnota M/G bola ($1,4 \pm 0,1$), možno potvrdiť, že s vyššou koncentráciou vápenatých solí klesá podiel M podjednotiek. Tieto výsledky korešpondujú s literatúrou [47].

Ďalej bola opäť sledovaná miera acetylácie, kedy bol zaznamenaný podobný trend ako pri pomere M/G (viď obr. 31). Porovnanie týchto hodnôt zodpovedá teórii, keďže pri vysokej miere acetylácie sa predpokladá vyššie zastúpenie M podjednotky, keďže nemajú byť schopné epimerizovať [47; 50].



Obr. 31: Vplyv miery acetylácie na pomer M/G, médium s prídavkom 30 g/l CaCO_3

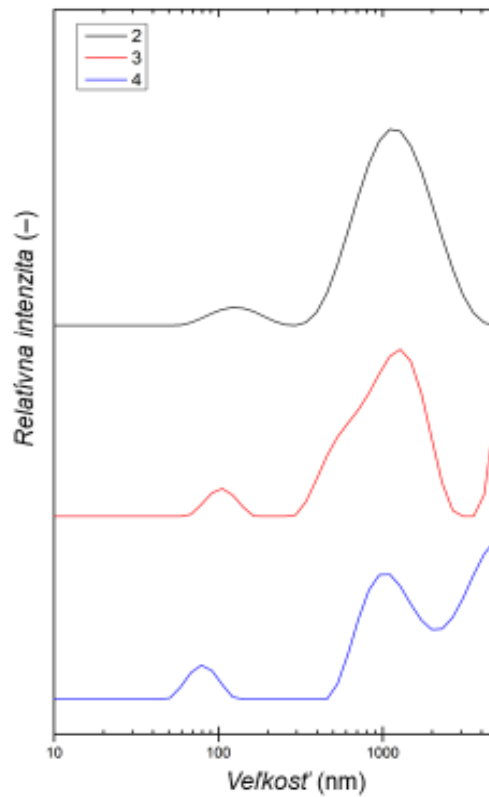
Pomocou FTIR spektroskopie bola skúmaná aj prítomnosť PHB v biomase. Získané dáta boli opäť porovnané s výstupom z GC, podobne ako o optimálneho média (viď kapitola 5.1.4.2). Údaje na grafe nižšie (viď obr. 32) opäť potvrdzujú, že je možné stanovenie PHB ako za použitia GC, tak za FTIR.



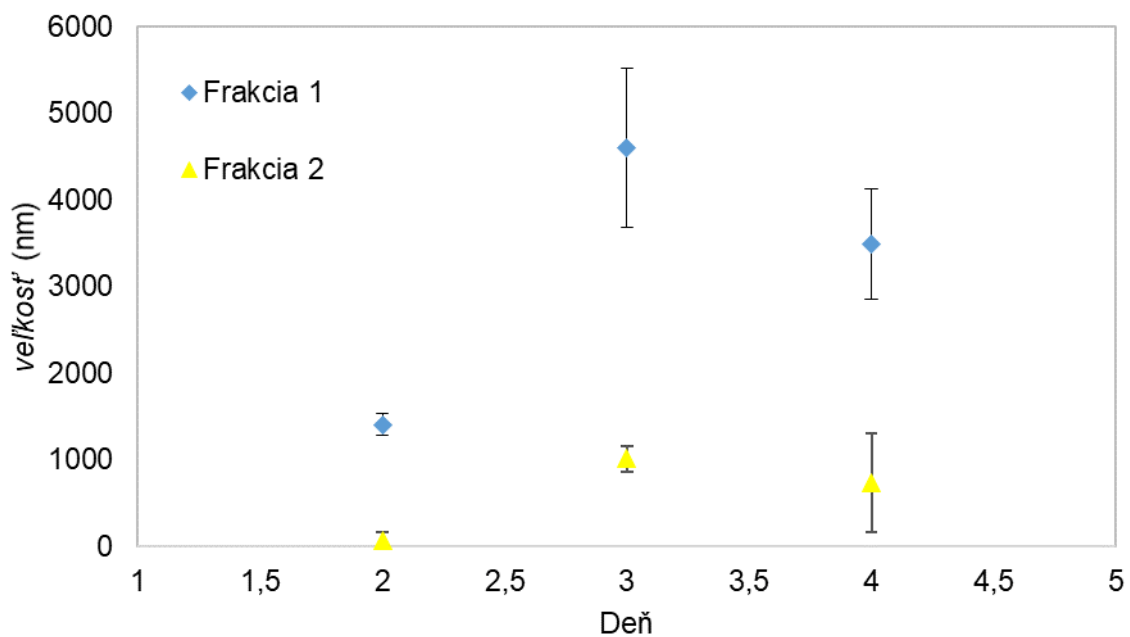
Obr. 32: Porovnanie dvoch metód (FTIR a GC) stanovenie výťažku PHB; médium s prídavkom 30 g/l CaCO_3

Ďalej boli skúmané vzorky v priebehu kultivácie (od 2. dňa od počiatku kultivácie) pomocou DLS a dáta boli analyzované rovnakým postupom ako pre optimálne médium (viď kapitola 5.1.3.5). Ako vidieť na obr. 33, sú prítomné dve dominantné frakcie, podobne ako u optimálneho média. V druhý deň je vzorka najmenej polydisperzná s hodnotou PDI ($0,39 \pm 0,08$). Ďalej, v grafe (viď obr. 34) sú znázornené zmeny vo veľkosti častíc jednotlivých

frakcií. Obe frakcie dosahujú maximálnu veľkosť v tretí deň. Čo sa týka zastúpenia častíc, výrazne dominujú väčšie častice. Je to možné vysvetliť tým, že v tomto médiu je vyššia koncentrácia vápenatých iónov, ktoré prispievajú k tvorbe už diskutovaných agregátov, ktoré sú reprezentované frakciou 1.



Obr. 33: Intenzitná distribúcia veľkosti častíc alginátu v priebehu kultivácie; médium s 30 g/l CaCO₃



Obr. 34: Zmeny veľkosti jednotlivých frakcií (intenzitná distribúcia) v priebehu kultivácie; médium s 30 g/l CaCO₃

5.1.5.1 Stanovenie molekulovej hmotnosti alginátu

Ako už bolo zmienené, molekulová hmotnosť alginátu je kľúčovým faktorom pri tvorbe gélov, preto bola pre vybrané vzorky priamo stanovená pomocou AF4-MALS. Bol porovnaný bakteriálny alginát tvorený baktériami v optimálnom produkčnom médiu, ako aj v médiu s prídavkom 30 g/l CaCO₃. Pre obe médiá bola stanovená hmotnostne stredná molekulová hmotnosť M_w z dvoch rôznych kultivácií (viď tab. 5). Bolo stanovené, že za použitia optimálneho média má alginát vyššiu molekulovú hmotnosť, konkrétne (107 ± 5) kDa, ako pri vyššom prídavku uhličitanu vápenatého (61 ± 11) kDa. Ako je známe, vyššia molekulová hmotnosť alginátu podporuje schopnosť gelácie, preto je pre účely tejto práce jednoznačne lepšie použiť optimálne médium.

Tab. 5: Stanovenie M_w alginátu z optimálneho média z média s prídavkom 30 g/l CaCO₃

Médium	M_w (kDa)	Priemer M_w (kDa)
optimálne	103,7 ± 2,5 110,2 ± 2,7	107 ± 5
s prídavkom 30 g/l CaCO ₃	54,6 ± 4,5 67,0 ± 7,3	61 ± 11

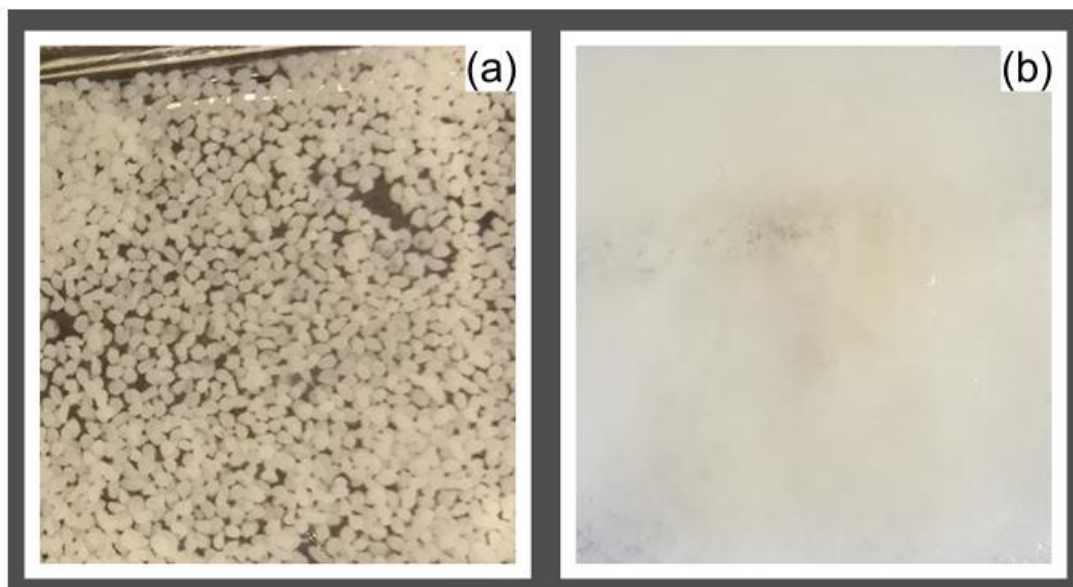
5.2 Gelácia vyprodukovaných bunečných kultúr

Existuje niekoľko prístupov tvorby gélov z alginátu (bližšie popísané v kapitole 2.3.3). V tejto práci nebol tvorený gél zo samotného alginátu, ale priamo z kultúry obsahujúcej živé baktérie. Keďže sa jedná o nový prístup, bolo nutné tento proces optimalizovať. Využitie gelačné prístupy bolo limitované pre prítomnosť baktérií v gelačnom procese. Vo všetkých prípadoch bola použité sieťovanie roztokmi CaCl_2 . Ako už bolo spomenuté (viď 2.3.3), ide o najjednoduchší a najbežnejší spôsob tvorby alginátových gélov, ktorý zároveň nepredstavuje hrozbu pre prítomné baktérie.

5.2.1 Mikroenkapsulácia

Pre povzbudivé výsledky orientačnej kvapkovej tvorby gélov (viď 5.1.3.1) bolo pristúpené k pokusu o mikroenkapsuláciu na enkapsulátore BUCHI B-395. Experimenty však nedopadli podľa predstáv. Zapríčinila to pravdepodobne nízka pevnosť vznikajúceho gélu, ktorý sa pri tomto drsnejšom procese rýchlo dezintegroval. Na obrázku (viď obr. 35b) je výsledok tohto experimentu. Pre porovnanie prikľadam fotografiu (viď obr. 35a) „vydarenej“ enkapsulácie (za použitia práškoveho alginátu z hnedých rias) z mojej bakalárskej práce.

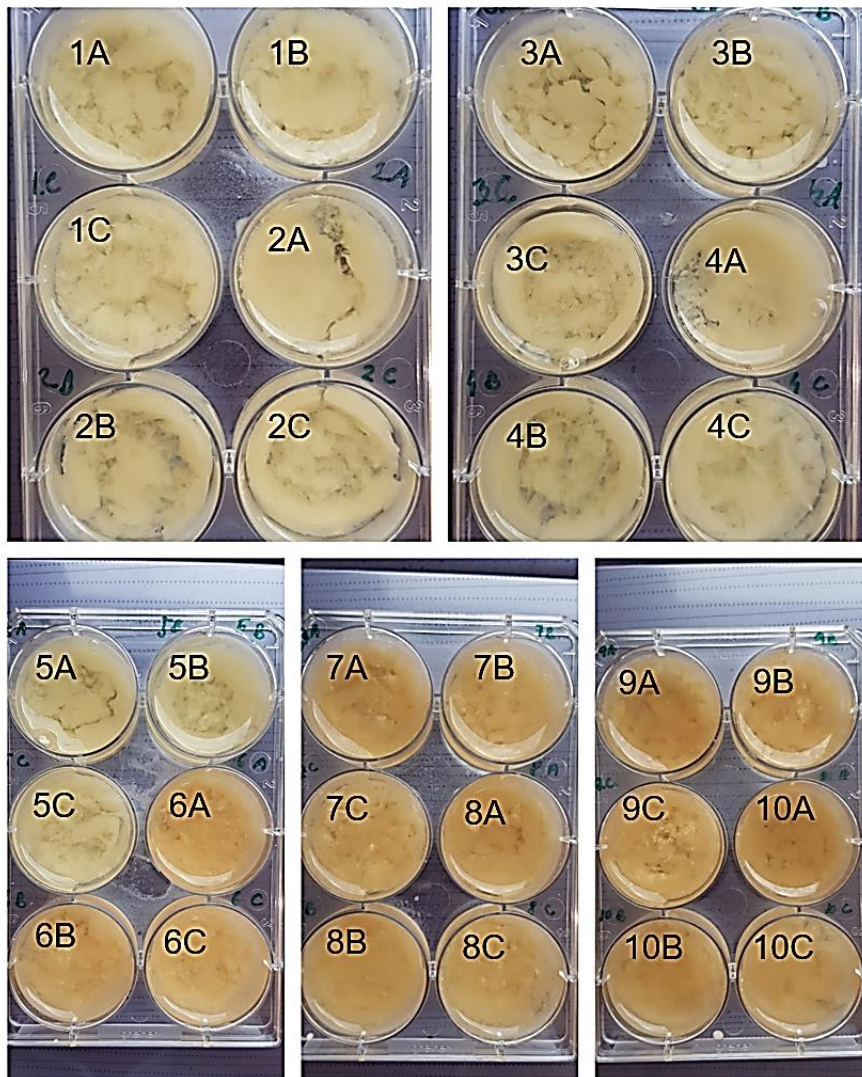
Na základe skúseností s mikroenkapsulačnou technikou (získaných v rámci riešenia bakalárskej práce) je možné usudzovať, že za neúspechom mikroenkapsulačného postupu stoja nevhodné štruktúrne parametre produkovaného alginátu (molekulová hmotnosť, monoméne zloženie). Keďže sa jedná o pilotnú prácu, ktorej účelom bolo všeobecne otestovať využiteľnosť samotného konceptu gelácie bunečných kultúr, nebola technike mikroenkapsulácie venovaná ďalšia experimentálna pozornosť. Avšak v rámci nadväzujúceho výskumu by bolo možné o tejto technike znovu uvažovať v prípade, keby boli nájdené možnosti úpravy kultivačného postupu, ktoré by viedli k produkcii alginátu s vhodnejšími gelačnými predpokladmi.



Obr. 35: Enkapsulačné pokusy (a) úspešná enkapsulácia baktérie *Cupriavidus H16* [107], (b) neúspešná enkapsulácia baktérie *Azotobacter vinelandii* priamo z kultivačného média

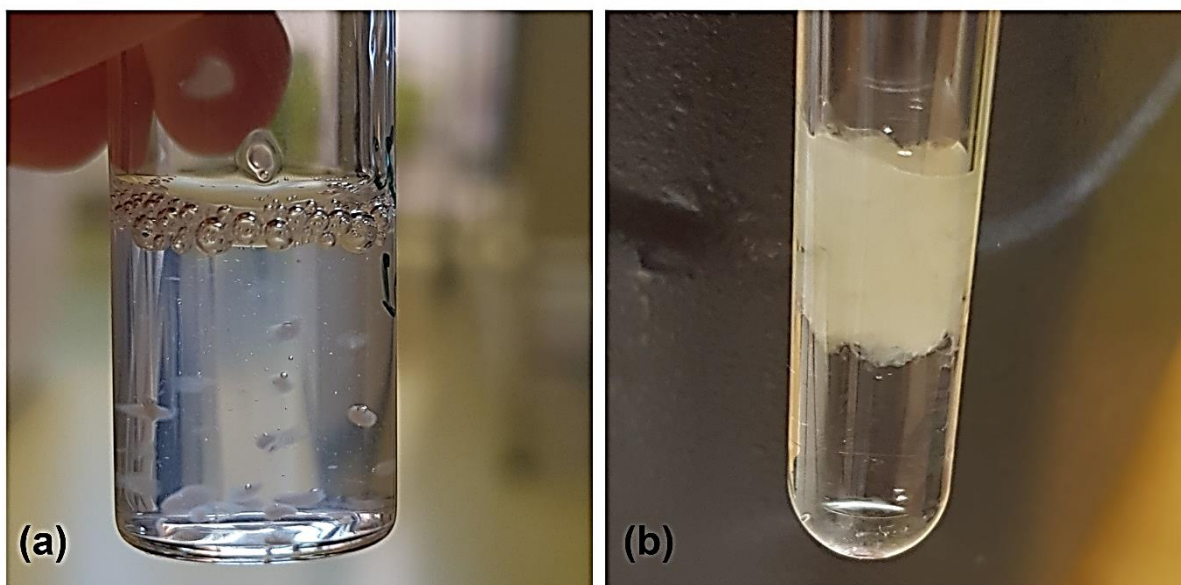
5.2.2 Tvorba makrogélov

Pre komplikácie pri mikroenkapsulácii boli nasledujúce snahy zamerané na vplyv faktorov na úspešnosť tvorby makrogélov. Skúmala sa vplyv koncentrácie sieťovacieho činidla CaCl_2 (1, 3 a 5 hm. %) ako aj CaCO_3 v kultivačnom médiu (5 a 30 g/l). Ďalej boli podľa vzoru dostupnej literatúry skúmané rôzne pomery kultúry a CaCl_2 (4:2, 4:4 a 4:6) a prídavok škrobu pre zvýšenie viskozity bunečnej kultúry pre geláciu (1 resp. 2 hm. %). Na fotografiách (viď obr. 36) vidieť, že sa gély tvoria lokálne a nie homogénne v celom objeme, ako by bolo žiadúce. Na základe subjektívneho pozorovania bolo stanovené, že najvyššia použitá koncentrácia (5 g/l) CaCl_2 a jeho najvyšší použitý objem (6 ml) majú najlepší vplyv na tvorbu gélu (viď 3C a 8C na obr. 36), čo súhlasí aj s literatúrou [100; 101]. Pri prídavku škrobu ako modelového zahusťovadla neboli sledované žiadne pozitívne efekty na výsledné gélácie.



Obr. 36: Vplyv rôznych faktorov na tvorbu gélu

V rámci optimalizácie bolo ďalej zistené, že je vhodnejšie pridávať kultúru do roztoku CaCl_2 než naopak. Pri vytvorení malých „guličiek“ za použitia pipety, si gély v roztoku zachovávajú svoj tvar a sedimentujú na dno (viď obr. 37a), no pri akejkoľvek manipulácii gély znova dezintegrujú. Je vhodnejšia príprava gélu v skúmavke, kedy sa najprv pridá asi 1,5 ml sieťovacieho činidla a následne je cez ponorenú pipetu pridaná kultúra (pre lepšiu predstavu viď obr. 37b). Pri pokusoch o filtrovanie sieťovacieho činidla sa takto pripravený gél dezintegruje, ale je možné jeho izolácia odsatím prebytočného roztoku pomocou pipety. S takto pripraveným gélom je možná opatrná manipulácia za použitia lyžičky.



Obr. 37: Gelačné experimenty: (a) usádzanie gélov v nádobe, (b) vytvorenie súvislej vrstvy gélu

5.2.3 Mechanické vlastnosti získaných makrogélov

Reologické experimenty boli použité pre potvrdenie, že vzniknutý materiál je naozaj gél, ako aj pre podrobnú charakterizáciu gélov pripravených rôznymi sieťovacími postupmi. Porovnávala sa tvorba gélov v závislosti od koncentrácie sieťovacieho činidla CaCl_2 , od času sieťovania a od koncentrácie CaCO_3 v kultivačnom médiu (viď tab. 2).

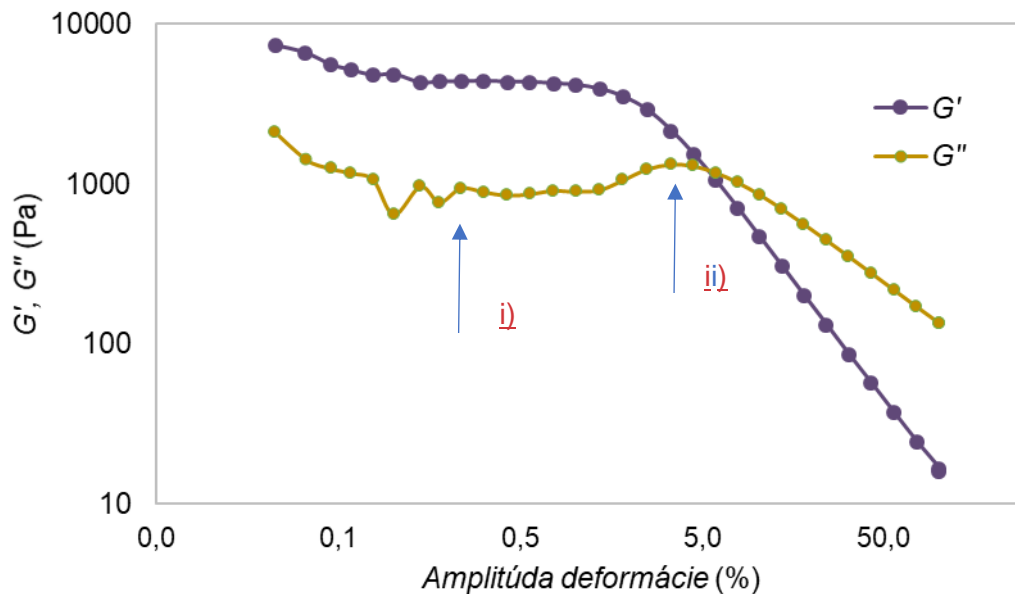
5.2.3.1 Vyhodnotenie amplitúdového testu

V prvom kroku bola osemkrát premeraná vzorka 1A (pre popis vzorky viď tab. 2), aby bola zistená opakovateľnosť a odchýlky v meraní. U vzorky tohto gélu boli predpokladané najhoršie výsledky (pre najnižšiu koncentráciu CaCl_2 a najkratší čas sieťovania) a teda i najvyššie odchýlky. Na grafoch v prílohe je znázornená závislosť komplexného modulu G^* (viď príloha obr. 57) a stratového uhlu (viď príloha obr. 58) na amplitúde deformácie. Na základe chybových úsečiek možno usúdiť, že merania pri malých hodnotách amplitúdy deformácie sú zaťažené vyššou chybou, ale celková opakovateľnosť je dobrá. Z relatívnych smerodajných odchýlok tohto merania boli potom vypočítané smerodajné odchýlky pre ostatné vzorky.

Pre zhodnotenie, či je skúmaný materiál gél alebo nie, platia nasledovné kritériá: i) v lineárnej viskoelastickej oblasti LVO je elastický modul G' väčší ako viskózný modul G'' ; ii) pri navýšení amplitúdy deformácie má dôjsť k miernemu nárastu G'' , ktoré dosahuje maximum a potom znova strmo klesá.

Druhý zmieneny deformačný znak typické pre gélové materiály opisuje stratu časti deformačnej energie v podobe vnútorného trenia počas deformácie. Vysvetľuje sa to tým, že

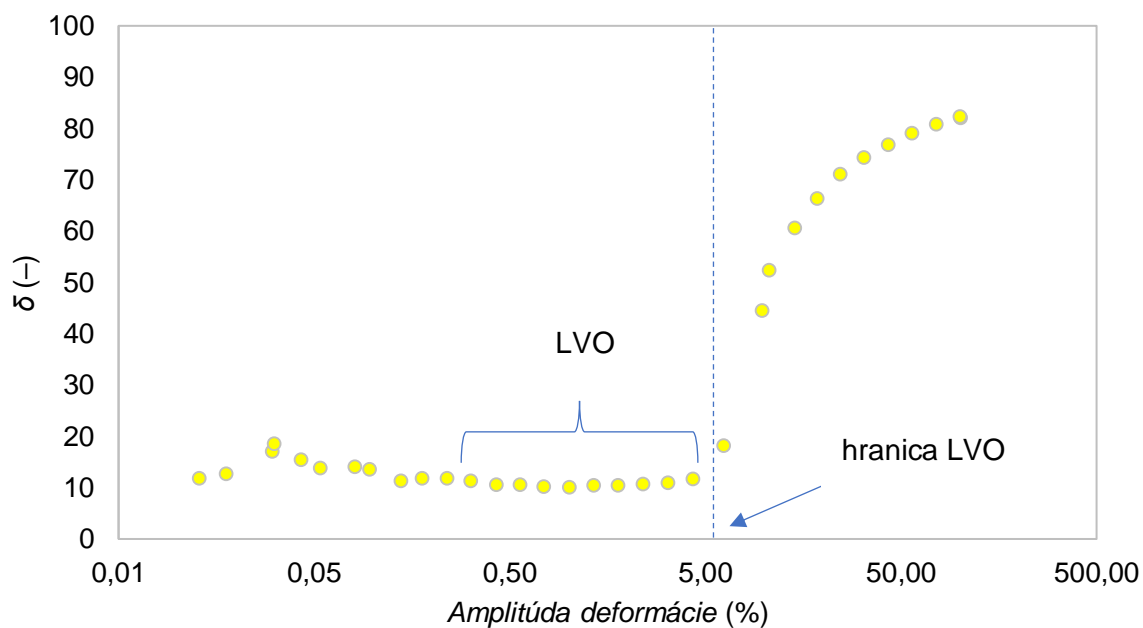
malými trhlinami vzniknú voľne pohyblivé fragmenty, ktoré už nie sú integrované v sieti. Tieto fragmenty začínajú vykazovať vnútorné viskózne trenie, a teda nastáva premena deformačnej energie na teplo [107]. Ako vidieť na reprezentatívnom grafe vzorky 3B (viď obr. 38), zmienené kritériá sú splnené a jedná sa teda o gél.



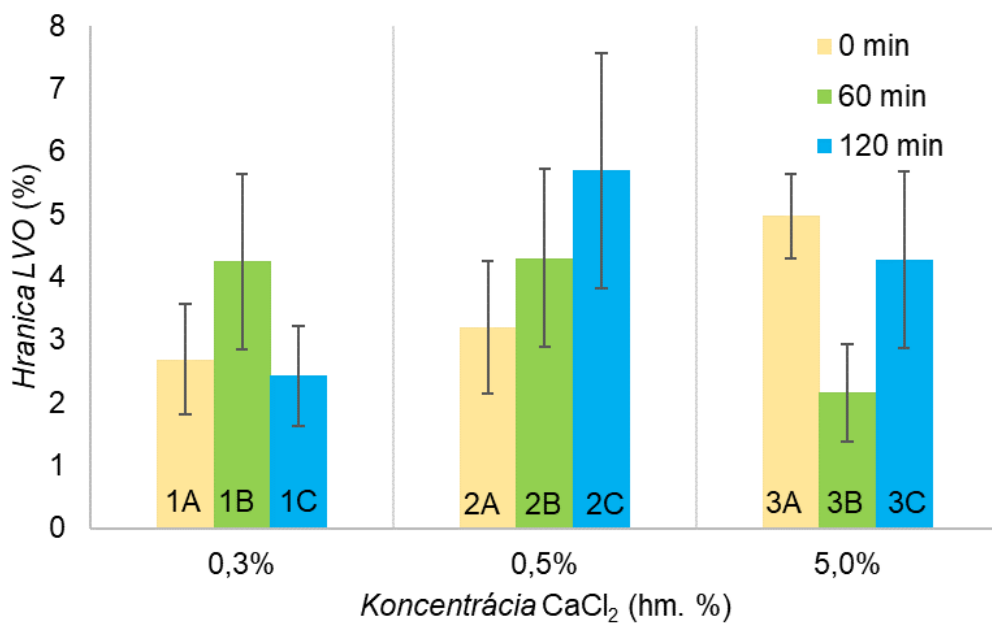
Obr. 38: Príklad závislosti viskoelastických modulov pri amplitúdovom teste (vzorka 3B). Šípkou sú vyznačené oba typické rysy chovania gélových materiálov

Zo závislosti stratového uhlu δ na amplitúde deformácie bola určená lineárna viskoelastická oblasť LVO a hranica linearity LVO pre jednotlivé vzorky. Pre lepšiu predstavu je na obr. 39 zobrazený vzorový graf s vyznačenou oblasťou LVO a naznačením hranice LVO. V rámci samotného merania bola porovnaná hranica LVO jednotlivých vzoriek. Ide o hodnotu amplitúdy deformácie, kedy sa nevratne mení štruktúra materiálu a je narušená vratná (elastická) zložka systému. Porovnané vzorky sú zobrazené v grafoch na obr. 40 a obr. 41. Pre optimálne médium (vzorky 1A až 3C) sa hraničné hodnoty LVO pohybujú od $(2,2 \pm 0,8)$ % pre vzorku 3B, do (6 ± 2) % pre vzorku 2C. Podľa údajov možno skonštatovať, že skúmané parametre nemajú výrazný vplyv na hranicu LVO. Znamená to, že o hranici LVO rozhodujú skôr parametre alginátu (koncentrácia, štruktúra, molekulová hmotnosť) a až tak nezáleží na koncentrácii vápenatých iónov či na dobe gelácie. Výnimkou vidíme iba pri čase 0 min, kedy s rastúcou koncentráciou CaCl_2 rastie aj hranica LVO (viď žlté stĺpce na obr. 40). Tohto by bolo vhodné využiť pri procese enkapsulácie, kde je potrebné, aby bol hneď pri kontakte alginátu so sieťovacím činidlom (čiže v čase 0) vytvorený dostatočne rigidný gél, ktorý sa nerozpadne. Pre budúce experimenty je teda vhodné voliť čo najvyššiu koncentráciu sieťovacieho činidla.

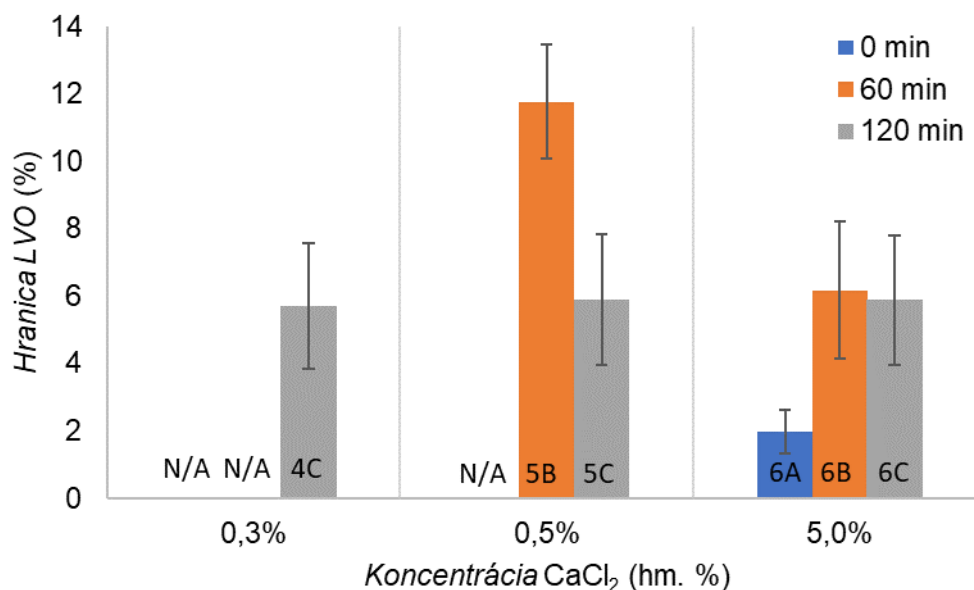
Pri médiu s vyšším prídavkom CaCO_3 (vzorky 4A až 6C) sa hodnoty pohybujú od $(2,0 \pm 0,6)$ % pre vzorku 6A, do (12 ± 2) % pre vzorku 4B. Pri niektorých vzorkách nebolo určená limitná hodnota LVO, pretože i pri opakovanom meraní nebolo možné pripraviť gél vyhovujúci vyššie spomínaným kritériám.



Obr. 39: Závislosť δ na amplitúde deformácie; v grafe je vyznačený rozsah amplitúd vyhodnocovaný ako lineárna viskoelastická oblasť LVO a určenie hranice LVO

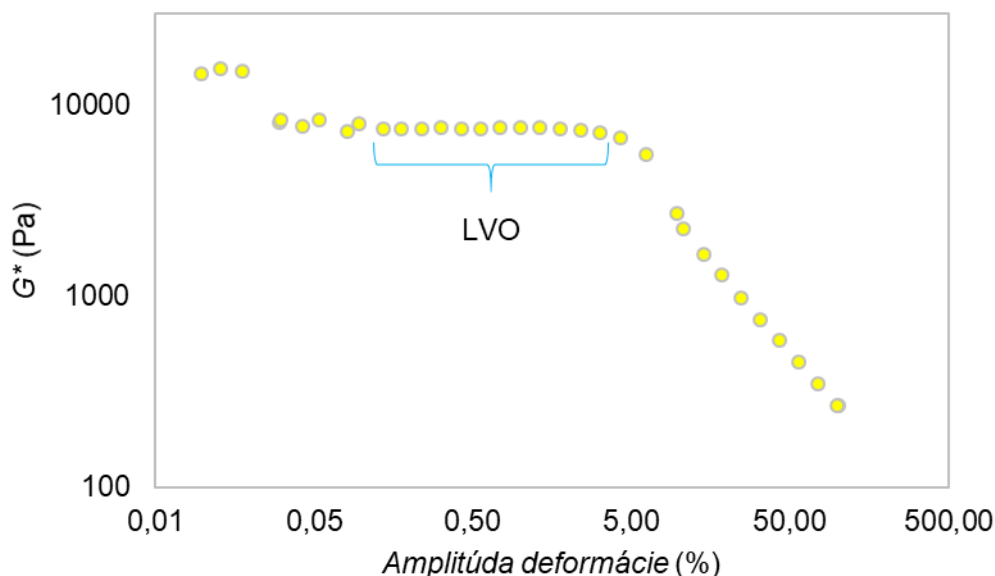


Obr. 40: Porovnanie hodnôt hranice LVO v závislosti na rôznych koncentráciách CaCl₂ a rôznych časoch; optimálne médium

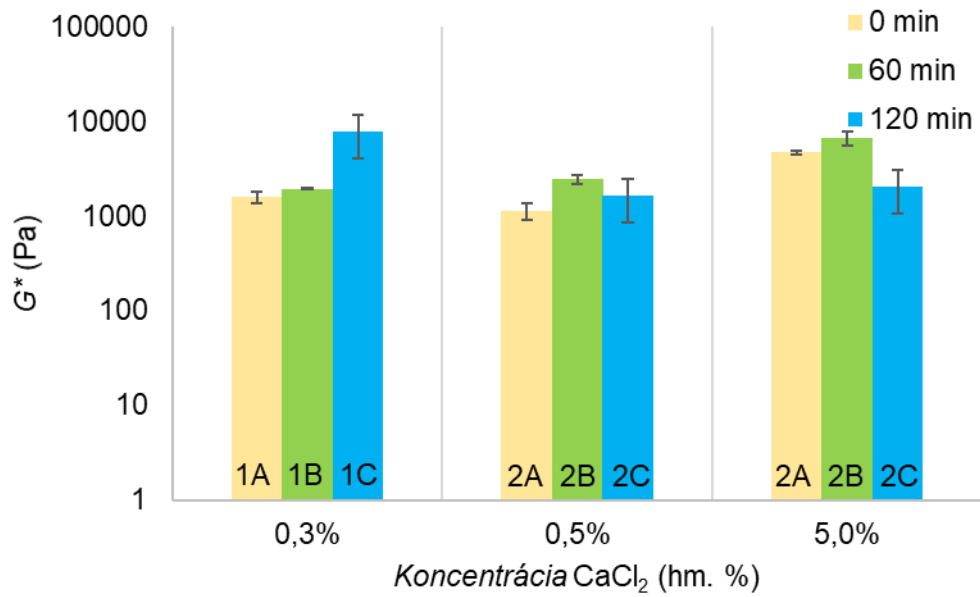


Obr. 41: Porovnanie hodnôt hranice LVO v závislosti na rôznych koncentráciách CaCl₂ a rôznych časoch; médium s prídavkom 30 g/l CaCO₃. (N/A = dáta nie sú k dispozícii).

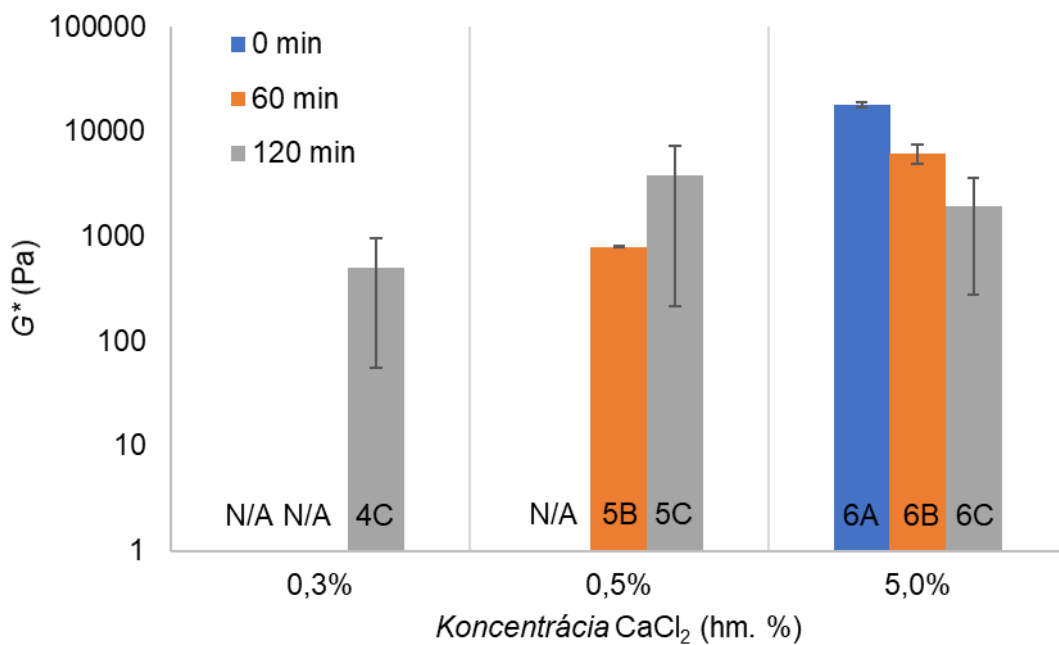
Ďalej bola skúmaná priemerná hodnota komplexného modulu G^* v lineárnej oblasti (pri amplitúdach deformácie nižších ako hranica LVO) (viď obr. 42). Táto hodnota reprezentuje celkový odpor voči deformácii, bez ohľadu na to, či ide o elastickú (vratnú) alebo viskóznú (nevratnú) deformáciu. Inými slovami, komplexný modul G^* indikuje rigiditu gélu pri deformácii. Pri porovnaní hodnôt v čase nula (žlté stĺpce na obr. 43) vidíme rovnaký trend ako pri hranici LVO – s rastúcou koncentráciou sieťovacieho činidla je tvorený gél rigidnejší. Rovnako to platí aj pre čas 60 min. Je však zaujímavé, že pri meraniach po 120 min pôsobenia CaCl₂ je opačný trend. Možným dôvodom je, že počas dlhšieho časového intervalu dochádza k rozpúšťaniu gélu v nadbytku roztoku sieťovadla.



Obr. 42: Závislosť G^* na amplitúde deformácie



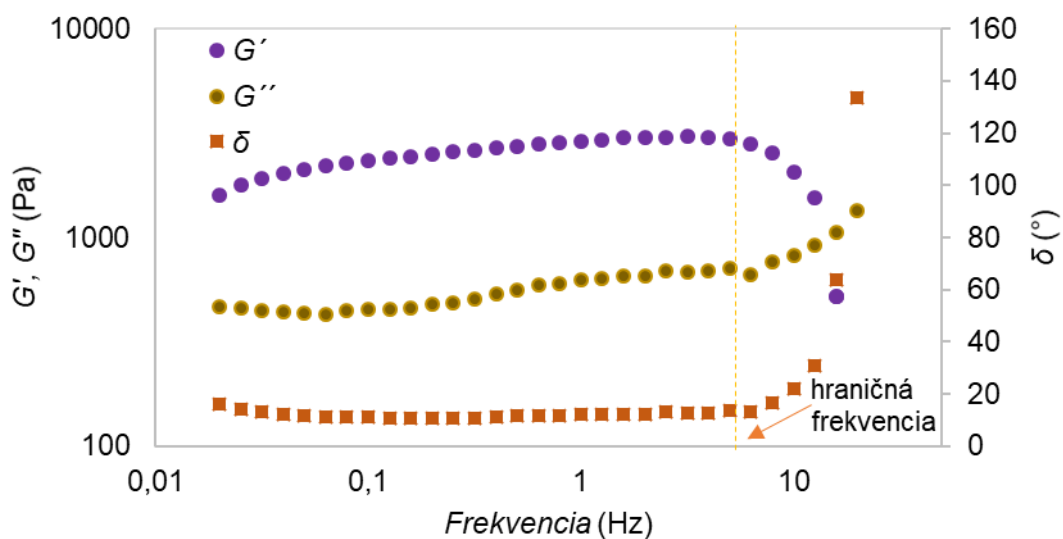
Obr. 43: Porovnanie G^* v LVO v závislosti na rôznych koncentráciách CaCl_2 a rôznych časoch; optimálne médium



Obr. 44: Porovnanie G^* v LVO v závislosti na rôznych koncentráciách CaCl_2 a rôznych časoch; médium s prídavkom 30 g/l CaCO_3 . (N/A = dáta nie sú k dispozícii).

5.2.3.2 Vyhodnotenie frekvenčného testu

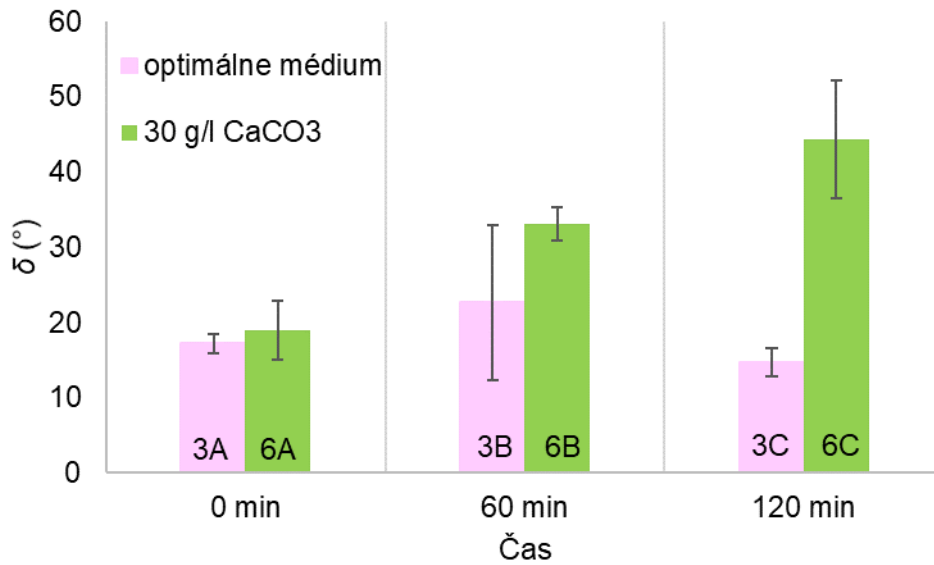
Frekvenčné testy vo všeobecnosti slúžia na opis správania gélu v rozsahu nedeštruktívnej deformácie (určenej z amplitúdových testov). Vysoké frekvencie simulujú rýchly pohyb v krátkom čase, kým nízke frekvenciu simulujú pomalý pohyb v širšom časovom rozmedzí. Táto metóda môže slúžiť aj k rozhodnutiu či v materiáli pri danom charakteristickom čase deformácie prevláda elastická alebo viskózna zložka deformačnej odozvy. Rozdielny charakter viskoelastického telesa kvapalného charakteru (*liquid-like*) a tuhého charakteru (*solid-like*) sa pri tomto teste prejavuje v lineárnych viskoelastických moduloch G' a G'' . Ak má elastický modul G' vyššiu hodnotu ako viskózný modul G'' , potom možno považovať systém za *solid-like*. Zároveň pre gély má platiť, že v danom rozmedzí frekvencií sú krivky G' a G'' rovnobežné a že stratový uhol nadobúda hodnoty pod 45° . Ako vidieť na demonštratívnej vzorke 3B (viď obr. 45), spomenuté kritériá platia, čo opäť potvrdzuje gélový charakter vzniknutého materiálu.



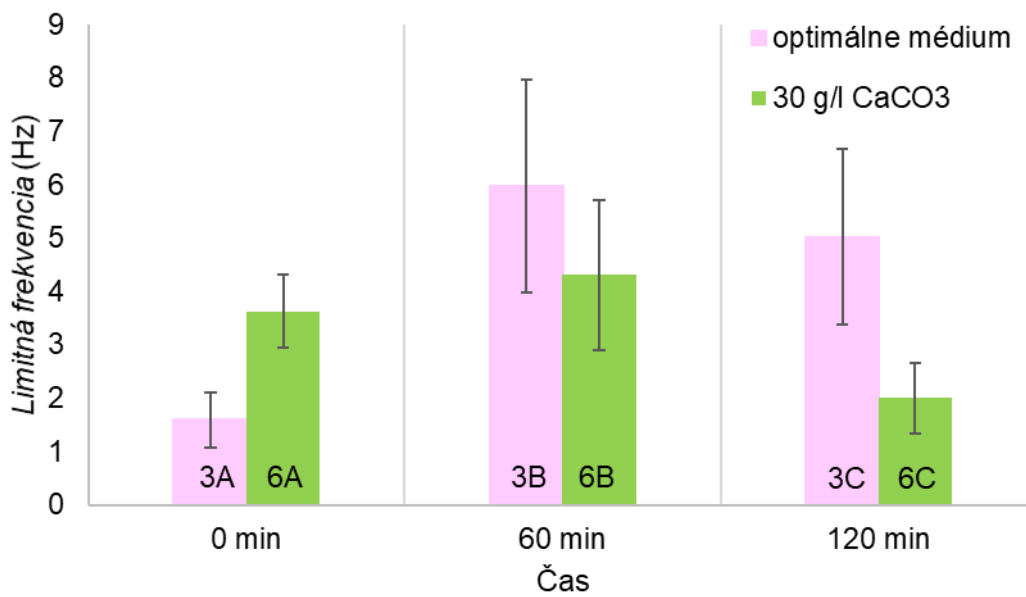
Obr. 45: Závislosť G' , G'' a δ na frekvencii; vzorka 3B

Ďalej boli porovnané priemerné hodnoty stratového uhlu vzoriek v lineárnej oblasti. Platí, že čím má viskoelastická látka nižšiu hodnotu stratového uhlu, tým viac je podobná elastickému („hookovskému“) materiálu. Ako vidieť z grafu (viď obr. 46), vzorky nadobúdajú hodnoty od $(15 \pm 2)^\circ$ po $(44 \pm 8)^\circ$. Hodnoty stratového uhlu (okrem vzorky 6C, berúc do úvahy odchýlku) odpovedajú typickým hodnotám gélov (t. j. pod 45°). Elastická zložka, za ktorú je zodpovedná sieťová štruktúra gélu, má za podmienok experimentu vyššie hodnoty ako viskózna zložka. Výsledky tiež naznačujú, že pri médiu s 30 g/l CaCO_3 sú gély (napriek podobnej koncentrácii alginátu) menej elastické. Takisto, kým pre optimálne médium možno považovať stratový uhol nezávislý od doby sieťovania (berúc do úvahy odchýlku), pri vyššom prídavku CaCO_3 klesá elasticita s dlhšou dobou sieťovania.

Pre stanovované vzorky boli porovnané aj hodnoty limitných frekvencií (kedy prestáva byť charakter odozvy nezávislý na frekvencii deformácie; deformácia začína byť rýchlejšia než relaxácia siete). Z výsledkov (viď obr. 47) vyplýva, že vzorky sieťované po dobu 60 min dokázali odolávať najvyšším frekvenciám, a to (6 ± 2) Hz v prípade optimálneho média (vzorka 3B) a (4 ± 1) Hz v prípade média s vyšším obsahom CaCO_3 (vzorka 6B). Tieto údaje by mali byť brané do úvahy pri budúcich enkapsulačných experimentoch, kedy na základe týchto údajov odporúčam ponechať vzorky v roztoku CaCl_2 po dobu 60 min.



Obr. 46: Vplyv času sietovania na stratový uhol v oblasti konštantnej frekvenčnej odozvy; optimálne médium a médium s 30 g/l CaCO₃



Obr. 47: Vplyv času sietovania na limitnú frekvenciu; optimálne médium a médium s 30 g/l CaCO₃

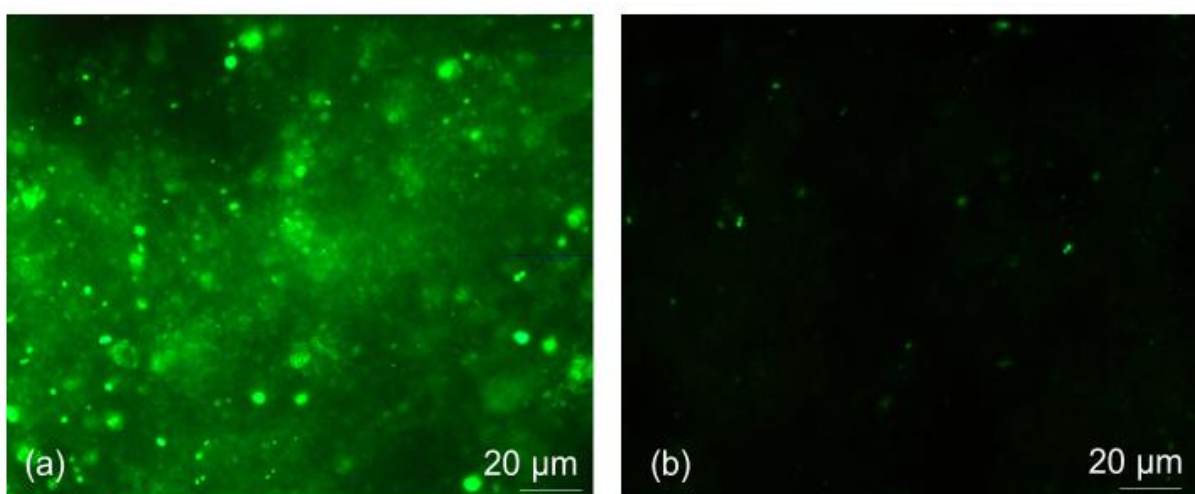
5.3 Overenie prítomnosti bakteriálnych buniek v géli

Ako už bolo zmienené, zatiaľ čo pri kvapkových gelačných testoch za použitia odstredeného supernatantu (t. j. po odstredení buniek z alginátového roztoku kultúry) vznikal priehľadný gél, pri gelácii kompletnej bunkovej kultúry vykazovali vznikajúce gélové kvapky žltobiely zákal. Farba vznikajúcich gélov je tak sama o sebe známkou úspešnej inkorporácie buniek do gélovej matrice. Avšak, pre nezávislé potvrdenie tohto faktu bola navyše použitá metóda fluorescenčnej mikroskopie so špecifickým fluorescenčným farbením buniek.

Vybrané gély boli skúmané na fluorescenčnom mikroskope za použitia fluorescenčného farbiva. BODIPY 493/503 je lipofilný fluorofor, ktorý je schopný nafarbiť bunkové steny baktérií, ako aj PHB. Cieľom tohto experimentu bolo preukázať, že baktérie sú enkapsulované v štruktúre gélu.

Na obr. 48 vidíme fotografiu baktérií zachytených v géle, ktorý je tvorený výlučne bakteriálnym alginátom a to priamo z kultúry. Je zjavné, že baktérie sú prítomné v hojnom počte a že neunikli počas experimentu do roztoku CaCl_2 , respektíve do vody kde prebiehalo farbenie. Ďalej obrázok ukazuje, že sú baktérie prítomné v zhlukoch, čo potvrdzuje, že sú silne enkapsulované v štruktúre hydrogélu.

Na druhej strane, za použitia média s 30 g/l CaCO_3 nebol dosiahnutý rovnaký výsledok. Na fotografii vidieť baktérie zachytené v štruktúre gélu, ktoré sú pravdepodobne viac rozptýlené vo vrstvách (mikroskop dokáže snímať len jednu optickú hladinu). Keďže gél je v tomto prípade tvorený alginátom s nižšou molekulovou hmotnosťou (viď podkapitola 5.1.5.1), pravdepodobne sa nevytvorí dostatočne hustá sieť pre imobilizáciu baktérií.



Obr. 48: Snímky z fluorescenčného mikroskopu: (a) gél za použitia optimálneho média, (b) gél za použitia média s vyšším prídavkom CaCO_3 , 40x zväčšenie

6 ZÁVER

Diplomová práca bola zameraná na optimalizáciu kultivácie dusík fixujúcej modelovej baktérie *Azotobacter vinelandii*, so zameraním na produkciu alginátu. Ide o jednu z PGPB, ktorá je navyše producentom dvoch významných biopolymérov – extracelulárne produkovaného alginátu a intracelulárne akumulovaného PHB. Produkcia oboch polymérov bola detailne študovaná z hľadiska optimalizácie kultivačného procesu i z hľadiska kvality a koncentrácie produkovaných polymérov.

V prvom rade bolo zistené, že prítomnosť dusíka a uhličitanu vápenatého v kultivačnom médiu podporuje tvorbu alginátu a na základe týchto výsledkov sa určilo optimálne médium, ktoré boli použité vo všetkých konšekutívnych experimentoch. Bolo stanovené, že vo štvrtý deň od naočkovania kultúry je koncentrácia alginátu najvyššia, čo predstavuje úplne zásadný parameter pre gelačný potenciál buncenej kultúry. Gelačnými experimentmi bola vizuálne hodnotená možnosť tvorby gélov, kedy už 24 h po naočkovaní bola zaznamenaná tvorba málo rigidného gélu. K pochopeniu gelotvorných schopností alginátu boli experimentálne študované všetky premenné, ktoré môžu hrať v tejto veci rolu. Okrem už stanovenej koncentrácie boli skúmané štruktúrne parametre ako monoméne zloženie (pomer M/G podjednotiek), miera acetylácie, molekulová hmotnosť a hydrodynamický priemer. Zo spomenutých parametrov majú najvýraznejší efekt na tvorbu gélov koncentrácia a molekulová hmotnosť alginátu. Pri skúmaní zmien pomeru M/G podjednotiek v jednotlivé dni neboli zaznamenané významné zmeny, išlo však o orientačné stanovenie, preto by bolo v budúcnosti vhodné získať presnejšie výsledky, napr. pomocou ^{13}C -NMR či spektroskopie cirkulárneho dichroizmu [107; 103]. Pomocou IČ spektier boli detekované aj acetylové skupiny, o ktorých prítomnosť/nepítomnosti v bakteriálnom algináte sa názory v literatúre doposiaľ rozchádzali.

Bol študovaný i vplyv vyššieho prídavku uhličitanu vápenatého v kultivačnom médiu a boli pozorované nasledujúce benefity: produkcie alginátu dosiahla maximum produkcie o deň skôr ako za použitia optimálneho média a podiel žiaducich G podjednotiek je v porovnaní s optimálnym médiom vyšší. Na druhej strane, boli nájdené nasledujúce negatívne vplyvy: tvorili sa v roztoku agregáta a bolo menšie zastúpenie nezagregovaného alginátu v supernatante. Tiež bola molekulová hmotnosť alginátu v porovnaní s optimálnym médiom takmer polovičná. Ohľadom produkcie PHB či trendu rastu buniek neboli pozorované významné rozdiely. Vyplývajúc z literatúry, ako aj na základe vlastných skúseností považujem rozdiely v molekulovej hmotnosti za kľúčovú v kontexte tvorby gélov. Keďže alginát produkovaný pri prídavku 30 g/l v médiu má približne polovičnú molekulovú hmotnosť, prídavok vyšších koncentrácií uhličitanu vápenatého neodporúčam pre budúce gelačné experimenty.

Napriek tomu, že kvapkovou metódou bolo možné buncené médiá jednoducho enkapsulovať, za použitia enkapsulátoru bol proces neúspešný, pretože gél nebol dostatočne rigidný a hneď sa dezintegroval. Preto bola ťažiskom druhej polovice práce príprava gélov a ich charakterizácia pomocou reometrických experimentov, z ktorých vyplynuli dve užitočné informácie. V prvom rade, pri okamžitom kontakte so sieťovacím činidlom má jeho koncentrácia rozhodujúci vplyv na hustotu tvorby siete, a teda i na rigiditu a stabilitu vznikajúcich gélov. Pre budúce enkapsulačné experimenty je vhodné voliť vyššie koncentrácie chloridu vápenatého. Ďalej bol určený čas 60 min ako optimum doby gelácie.

Posledným experimentom bola pomocou fluorescenčného mikroskopu potvrdená inkorporácia baktérií do matrice tvoreného alginátom, ktorý bol vlastnou produkciou modelového mikroorganizmu.

I keď inkorporácia baktérií do hydrogélů je už dlhodobo a systematicky študovaný proces, v dostupnej literatúre nie je žiadna zmienka o využití samotného bakteriálneho alginátu na *in situ* tvorbu gélov priamo z kultúry. Vďaka tomuto prístupu odpadá finančná záťaž spojená s externým nosičom, a zároveň sa zabezpečuje ochrana baktérií, ako aj možný prospekt postupného uvoľňovania baktérií, ktorého mechanizmus by mal byť v budúcnosti detailne skúmaný. Práca taktiež čiastočne rieši ďalší problém pri použití PGPB – nízku viabilitu baktérií v pôde. Vďaka preukázanej posilnenej odolnosti producentov PHB voči stresovým faktorom, je *Azotobacter vinelandii* výborným kandidátom pre aplikáciu v poľnohospodárstve. Ďalší výskum by mal byť orientovaný na zlepšenie gelačných vlastností alginátu, možno ďalšími alternatívami média alebo zmenou ostatných kultivačných podmienok. Po úspešnej enkapsulácii by mal byť študovaný mechanizmus uvoľňovania baktérií z hydrogélů, ako aj štúdium správania v pôde. Ďalej by mala byť zvažovaná možnosť koenkapsulácie, či už iných zástupcov PGPB alebo iných materiálov, napr. huminových látok. Na záver by mali byť študované efekty PGPB v danom nosiči na konkrétnu rastlinu.

ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] Emissions (CO₂ equivalent), Synthetic Nitrogen fertilizers. In: © FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations [online]. Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2019 [cit. 2020-03-31]. Dostupné z: <http://www.fao.org/faostat/en/?#data/GY/visualize>
- [2] GALLOWAY, J., A. TOWNSEND, J. ERISMAN et al. Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. *Science* [online]. 2008, 320(5878), 889-892 [cit. 2020-03-31]. DOI: 10.1126/science.1136674. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1136674>
- [3] BHATTACHARYYA, P. a D. JHA. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2012, 28(4), 1327-1350 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1007/s11274-011-0979-9. ISSN 0959-3993. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-011-0979-9>
- [4] KLOEPPER, Joseph a M. SCHROTH. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes: IV international conference on plant pathogenic bacteria. France, 1978.
- [5] ANDREOTE, Fernando, Thiago GUMIERE a Ademir DURRER. Exploring interactions of plant microbiomes. *Scientia Agricola* [online]. 2014, 71(6), 528-539 [cit. 2020-04-21]. DOI: 10.1590/0103-9016-2014-0195. ISSN 0103-9016. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162014000600013&lng=en&tlng=en
- [6] MENDES, Rodrigo, Paolina GARBEVA a Jos RAAIJMAKERS. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2013, 37(5), 634-663 [cit. 2020-04-21]. DOI: 10.1111/1574-6976.12028. ISSN 1574-6976. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/1574-6976.12028>
- [7] WELLER, David a Linda THOMASHOW. Current Challenges in Introducing Beneficial Microorganisms into the Rhizosphere. *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag, 1994, , 1-18 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1002/9783527615810.ch1. ISBN 9783527615810. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527615810.ch1>
- [8] OLANREWAJU, Oluwaseyi, Bernard GLICK a Olubukola BABALOLA. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2017, 33(11) [cit. 2020-04-21]. DOI: 10.1007/s11274-017-2364-9. ISSN 0959-3993. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-017-2364-9>
- [9] VESSEY, J. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers [online]. 2003, (255), 571-586 [cit. 2018-04-22]. Dostupné z: https://www.jstor.org/stable/24123974?seq=1#page_scan_tab_contents
- [10] VEJAN, Pravin, Rosazlin ABDULLAH, Tumirah KHADIRAN, Salmah ISMAIL a Amru NASRULHAQ BOYCE. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. *Molecules* [online]. 2016, 21(5) [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.3390/molecules21050573. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/5/573>
- [11] HAYAT, Rifat, Safdar ALI, Ummay AMARA, Rabia KHALID a Iftikhar AHMED. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology* [online]. 2010, 60(4), 579-598 [cit. 2020-01-19]. DOI: 10.1007/s13213-010-0117-1. ISSN 1590-4261. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13213-010-0117-1>
- [12] BERG, Gabriele, Annette KRECHEL, Michaela DITZ, Richard SIKORA, Andreas ULRICH a Johannes HALLMANN. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant

- pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. 2005, 51(2), 215-229 [cit. 2020-04-13]. DOI: 10.1016/j.femsec.2004.08.006. ISSN 01686496. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1016/j.femsec.2004.08.006>
- [13] ARORA, Naveen, Ekta KHARE a Dinesh MAHESHWARI. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Constraints in Bioformulation, Commercialization, and Future Strategies [online]. [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1007/978-3-642-13612-2_5. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-13612-2_5
- [14] FERREIRA, Carlos, Helena SOARES a Eduardo SOARES. Promising bacterial genera for agricultural practices: An insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. *Science of The Total Environment* [online]. 2019, 682, 779-799 [cit. 2020-04-13]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.04.225. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969719317541>
- [15] ZAIDI, Najam, Manzoor DAR, Sudhanshu SINGH a U.S. SINGH. Trichoderma Species as Abiotic Stress Relievers in Plants. *Biotechnology and Biology of Trichoderma* [online]. Elsevier, 2014, , 515-525 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1016/B978-0-444-59576-8.00038-2. ISBN 9780444595768. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444595768000382>
- [16] SHRIVASTAVA, Pooja a Rajesh KUMAR. Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences* [online]. 2015, 22(2), 123-131 [cit. 2020-01-18]. DOI: 10.1016/j.sjbs.2014.12.001. ISSN 1319562X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1319562X14001715>
- [17] ALKA, Sadiya, Shafinaz SHAHIR, Norahim IBRAHIM, Tsun-Thai CHAI, Zaratulnur MOHD BAHARI a Fazilah ABD MANAN. The role of plant growth promoting bacteria on arsenic removal: A review of existing perspectives [online]. 2020, 17 [cit. 2020-04-01]. DOI: 10.1016/j.eti.2020.100602. ISSN 23521864. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352186419305942>
- [18] PISHCHIK, V.N., N.I. VOROBYEV, I.I. CHERNYAEVA, S.V. TIMOFEEVA, A.P. KOZHEMYAKOV, Y.V. ALEXEEV a S.M. LUKIN. Experimental and mathematical simulation of plant growth promoting rhizobacteria and plant interaction under cadmium stress. *Plant and Soil* [online]. 2002, 243(2), 173-186 [cit. 2020-07-21]. DOI: 10.1023/A:1019941525758. ISSN 0032079X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1019941525758>
- [19] CALVO, Pamela, Louise NELSON a Joseph KLOEPPER. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil* [online]. 2014, 383(1-2), 3-41 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1007/s11104-014-2131-8. ISSN 0032-079X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11104-014-2131-8>
- [20] GONZALEZ, Ana, Ezequiel LARRABURU a Berta LLORENTE. Azospirillum brasilense increased salt tolerance of jojoba during in vitro rooting. *Industrial Crops and Products* [online]. 2015, 76, 41-48 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.06.017. ISSN 09266690. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669015301874>
- [21] FASCIGLIONE, Gabriela, Elda CASANOVAS, Victoria QUILLEHAUQUY, Alejandra YOMMI, María GOñI, Sara ROURA a Carlos BARASSI. Azospirillum inoculation effects on growth, product quality and storage life of lettuce plants grown under salt stress. *Scientia Horticulturae* [online]. 2015, 195, 154-162 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.09.015. ISSN 03044238. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304423815301795>
- [22] KENNEDY, I. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited?. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 2004, 36(8), 1229-1244 [cit. 2020-03-24]. DOI:

- 10.1016/j.soilbio.2004.04.006. ISSN 00380717. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071704001221>
- [23] DEAKER, R a I. KENNEDY. Legume seed inoculation technology-a review. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 2004, 36(8), 1275-1288 [cit. 2020-07-17]. DOI: 10.1016/j.soilbio.2004.04.009. ISSN 00380717. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071704001269>
- [24] GLASS, Anthony D. M. *Plant nutrition: an introduction to current concepts*. 1. California, USA: Jones and Bartlett Publishers, 1989. ISBN 9780867200805.
- [25] FROSSARD, E., L. CONDRON, A. OBERSON, S. SINAJ a J. FARDEAU. Processes Governing Phosphorus Availability in Temperate Soils. *Journal of Environmental Quality* [online]. 2000, 29(1), 15-23 [cit. 2020-03-25]. DOI: 10.2134/jeq2000.00472425002900010003x. ISSN 0047-2425. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2134/jeq2000.00472425002900010003x>
- [26] WANI, Parvaze, Mohammad KHAN a Almas ZAIDI. Synergistic effects of the inoculation with nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing rhizobacteria on the performance of field-grown chickpea. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* [online]. 2007, 170(2), 283-287 [cit. 2020-03-25]. DOI: 10.1002/jpln.200620602. ISSN 14368730. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jpln.200620602>
- [27] TURAN, Metin, Medine GULLUCE, Nicolaus VON WIRÉN a Fikrettin SAHIN. Yield promotion and phosphorus solubilization by plant growth-promoting rhizobacteria in extensive wheat production in Turkey. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* [online]. 2012, 175(6), 818-826 [cit. 2020-03-25]. DOI: 10.1002/jpln.201200054. ISSN 14368730. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jpln.201200054>
- [28] DAVIES, Peter J. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. 1. New York, NY, USA: Springer, Dordrecht, 1995. ISBN 978-0-7923-2985-5.
- [29] SWAIN, Manas, Samir NASKAR, Ramesh RAY a Manas SWAIN. Indole-3-acetic acid production and effect on sprouting of yam (*Dioscorea rotundata* L.) minisets by *Bacillus subtilis* isolated from culturable cowdung microflora. *Polish journal of microbiology* [online]. 2007, 56(2), 103-110 [cit. 2020-04-20]. ISSN 1733-1331. Dostupné z: <http://search.proquest.com/docview/70760729/>
- [30] LIU, Fangchun, Shangjun XING, Hailin MA, Zhenyu DU a Bingyao MA. Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platycladus orientalis* container seedlings. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2013, 97(20), 9155-9164 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1007/s00253-013-5193-2. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-013-5193-2>
- [31] GUTIERREZ-MANERO, Francisco, Beatriz RAMOS-SOLANO, Agusti' PROBANZA, Jalel MEHOUACHI, Francisco R. TADEO a Manuel TALON. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum* [online]. 2001, 111(2), 206-211 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2001.1110211.x. ISSN 0031-9317. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1399-3054.2001.1110211.x>
- [32] CONTESTO, Céline, Guilhem DESBROSSES, Cécile LEFOULON et al. Effects of rhizobacterial ACC deaminase activity on *Arabidopsis* indicate that ethylene mediates local root responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Science* [online]. 2008, 175(1-2), 178-189 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1016/j.plantsci.2008.01.020. ISSN 01689452. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168945208000228>
- [33] ZHUANG, Xuliang, Jian CHEN, Hojae SHIM a Zhihui BAI. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment International* [online]. 2007, 33(3), 406-413 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1016/j.envint.2006.12.005.

- ISSN 01604120. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412007000037>
- [34] CARSON, Kerry, Jean-Marie MEYER a Michael DILWORTH. Hydroxamate siderophores of root nodule bacteria. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 2000, 32(1), 11-21 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1016/S0038-0717(99)00107-8. ISSN 00380717. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071799001078>
- [35] RAAIJMAKERS, Jos, Timothy PAULITZ, Christian STEINBERG, Claude ALABOUVETTE a Yvan MOËNNE-LOCCOZ. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil* [online]. 2009, 321(1-2), 341-361 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1007/s11104-008-9568-6. ISSN 0032-079X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11104-008-9568-6>
- [36] PERSELLO-CARTIEAUX, F., L. NUSSAUME a C. ROBAGLIA. Tales from the underground: molecular . plant-rhizobacteria interactions. *Plant, Cell and Environment* [online]. 2003, 26(2), 189-199 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1046/j.1365-3040.2003.00956.x. ISSN 0140-7791. Dostupné z:
<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-3040.2003.00956.x>
- [37] VAN DOMMELEN, Anne a Jos VANDERLEYDEN. Associative Nitrogen Fixation. *Biology of the Nitrogen Cycle* [online]. Elsevier, 2007, s. 179-192 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.1016/B978-044452857-5.50013-8. ISBN 9780444528575. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444528575500138>
- [38] MAIER, R. a F. MOSHIRI. Role of the Azotobacter vinelandii Nitrogenase-Protective Shethna Protein in Preventing Oxygen-Mediated Cell Death. *Journal of Bacteriology* [online]. 2000, 182(13), 3854-3857 [cit. 2020-07-21]. DOI: 10.1128/JB.182.13.3854-3857.2000. ISSN 1098-5530. Dostupné z: <https://JB.asm.org/content/182/13/3854>
- [39] GALINDO, Enrique, Carlos PEÑA, Cinthia NÚÑEZ, Daniel SEGURA a Guadalupe ESPÍN. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by Azotobacter vinelandii. *Microbial Cell Factories* [online]. 2007, 6(1) [cit. 2020-07-13]. DOI: 10.1186/1475-2859-6-7. ISSN 14752859. Dostupné z: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-6-7>
- [40] LARSEN, Bjørn a Arne HAUG. Biosynthesis of alginate. *Carbohydrate Research* [online]. 1971, 17(2), 287-296 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1016/S0008-6215(00)82536-7. ISSN 00086215. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621500825367>
- [41] YONEYAMA, Fuminori, Mayumi YAMAMOTO, Wataru HASHIMOTO a Kousaku MURATA. Production of polyhydroxybutyrate and alginate from glycerol by Azotobacter vinelandii under nitrogen-free conditions. *Bioengineered* [online]. 2015, 6(4), 209-217 [cit. 2020-04-02]. DOI: 10.1080/21655979.2015.1040209. ISSN 2165-5979. Dostupné z:
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21655979.2015.1040209>
- [42] CLEMENTI, Francesca, Paolo FANTOZZI, Francesca MANCINI a Mauro MORESI. Optimal conditions for alginate production by Azotobacter vinelandii. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 1995, 17(11), 983-988 [cit. 2020-04-02]. DOI: 10.1016/0141-0229(95)00007-0. ISSN 01410229. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0141022995000070>
- [43] MINAMI, Katsuyuki a Sadao FUKUSHI. Effects of phosphate and calcium carbonate application on emission of N₂O from soils under aerobic conditions. *Soil Science and Plant Nutrition* [online]. 1983, 29(4), 517-524 [cit. 2020-07-24]. DOI: 10.1080/00380768.1983.10434654. ISSN 0038-0768. Dostupné z:
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00380768.1983.10434654>

- [44] LOUISE BROWNING, Kathryn, Isabella STOCKER, Philipp GUTFREUND a Stuart MATTHEW CLARKE. The effect of alginate composition on adsorption to calcium carbonate surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2020 [cit. 2020-07-23]. DOI: 10.1016/j.jcis.2020.07.088. ISSN 00219797. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002197972030970X>
- [45] SABRA, W., A.-P. ZENG, H. LÄ- Å½NSDORF a W.-D. DECKWER. Effect of Oxygen on Formation and Structure of *Azotobacter vinelandii* Alginate and Its Role in Protecting Nitrogenase. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2000, 66(9), 4037-4044 [cit. 2020-06-29]. DOI: 10.1128/AEM.66.9.4037-4044.2000. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://AEM.asm.org/content/66/9/4037>
- [46] FLORES, Celia, Soledad MORENO, Guadalupe ESPÍN, Carlos PEÑA a Enrique GALINDO. Expression of alginases and alginate polymerase genes in response to oxygen, and their relationship with the alginate molecular weight in *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2013, 53(2), 85-91 [cit. 2020-06-29]. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2013.04.010. ISSN 01410229. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022913001014>
- [47] PACHECO-LEYVA, Ivette, Felipe GUEVARA PEZOA a Alvaro DÍAZ-BARRERA. Alginate Biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*: Overview of Molecular Mechanisms in Connection with the Oxygen Availability. *International Journal of Polymer Science* [online]. 2016, 2016, 1-12 [cit. 2020-04-02]. DOI: 10.1155/2016/2062360. ISSN 1687-9422. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ijps/2016/2062360/>
- [48] DELUCCA, Anthony, William CONNICK, Deborah FRAVEL, Jack LEWIS a John BLAND. The use of bacterial alginates to prepare biocontrol formulations. *Journal of Industrial Microbiology* [online]. 1990, 6(2), 129-134 [cit. 2020-07-25]. DOI: 10.1007/BF01576432. ISSN 0169-4146. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01576432>
- [49] COHEN, Gary a Donald JOHNSTONE. EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDES OF *AZOTOBACTER VINELANDII*1. *Journal of Bacteriology* [online]. 1964, 88(2), 329-338 [cit. 2020-07-25]. DOI: 10.1128/JB.88.2.329-338.1964. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <https://JB.asm.org/content/88/2/329>
- [50] DAVIDSON, I., I. SUTHERLAND a C. LAWSON. Localization of O-Acetyl Groups of Bacterial Alginate. *Journal of General Microbiology* [online]. 1977, 98(2), 603-606 [cit. 2020-07-25]. DOI: 10.1099/00221287-98-2-603. ISSN 0022-1287. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-98-2-603>
- [51] DOBROGOJSKI, Jędrzej, Maciej SPYCHALSKI, Robert LUCIŃSKI a Sławomir BOREK. Transgenic plants as a source of polyhydroxyalkanoates. *Acta Physiologiae Plantarum* [online]. 2018, 40(9) [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1007/s11738-018-2742-4. ISSN 0137-5881. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11738-018-2742-4>
- [52] 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. 2020-07-12]. DOI: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6. ISSN 00796700. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670000000356>
- [53] SHARMA, Sanjay a Ackmez MUDHOO. *Handbook of Applied Biopolymer Technology: Synthesis, Degradation and Applications*. 1. Cambridge: Royal Society of Chemistry, The, 2011. ISBN 978-184-9731-515.
- [54] AMELIA, Tan, Sharumathiy GOVINDASAMY, Arularasu TAMOTHRAN, Sevakumaran VIGNESWARI a Kesaven BHUBALAN. Applications of PHA in Agriculture. KALIA, Vipin Chandra, ed., Vipin KALIA. *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates* [online]. Singapore: Springer Singapore, 2019, s. 347-361

- [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1007/978-981-13-3759-8_13. ISBN 978-981-13-3758-1. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-3759-8_13
- [55] DO YOUNG, Kim, Kim HYUNG WOO, Chung MOON GYU a Rhee YOUNG HA. Biosynthesis, Modification, and Biodegradation of Bacterial Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates. *The Journal of Microbiology* [online]. 2007, 45(2), 87-97 [cit. 2020-07-12]. 17483792. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Young_Rhee2/publication/6347200_Biosynthesis_modification_and_biodegradation_of_bacterial_medium-chain-length_polyhydroxyalkanoates/links/0912f509b08fe5d1da000000.pdf
- [56] MUHAMMADI, , SHABINA, Muhammad AFZAL a Shafqat HAMEED. Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chemistry Letters and Reviews* [online]. 2015, 8(3-4), 56-77 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1080/17518253.2015.1109715. ISSN 1751-8253. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17518253.2015.1109715>
- [57] ROGERS, Kara. *Bacteria and Viruses* [online]. 1. New York, NY, USA: Britannica Educational Pub. in association with Rosen Educational Services, 2011 [cit. 2020-07-15]. ISBN 9781615303069. Dostupné z: https://books.google.cz/books?hl=en&lr=&id=vcWbAAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=yqRULrdHpz&sig=IIVkB_5hzem0si4JDV3PgEwIYul&redir_esc=y#v=onepage&q=doi&f=false
- [58] TAL, Sara a Yaacov OKON. Production of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. *Canadian Journal of Microbiology* [online]. 1985, 31(7), 608-613 [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1139/m85-115. ISSN 0008-4166. Dostupné z: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/m85-115>
- [59] KAARTOKALLIO, H, DH SØGAARD, L NORMAN, S RYSGAARD, L TISON J, B DELILLE a DN THOMAS. Short-term variability in bacterial abundance, cell properties, and incorporation of leucine and thymidine in subarctic sea ice. *Aquatic Microbial Ecology* [online]. 2013, 71(1), 57-73 [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.3354/ame01667. ISSN 0948-3055. Dostupné z: <http://www.int-res.com/abstracts/ame/v71/n1/p57-73/>
- [60] AYUB, Nicolás, Paula TRIBELLI a Nancy LÓPEZ. Polyhydroxyalkanoates are essential for maintenance of redox state in the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. 14-3 during low temperature adaptation. *Extremophiles* [online]. 2009, 13(1), 59-66 [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1007/s00792-008-0197-z. ISSN 1431-0651. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00792-008-0197-z>
- [61] ANEJA, P, A ZACHERTOWSKA a T CHARLES. Comparison of the symbiotic and competition phenotypes of *Sinorhizobium meliloti* PHB synthesis and degradation pathway mutants. *Canadian Journal of Microbiology* [online]. 2005, 51(7), 599-604 [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1139/w05-042. ISSN 0008-4166. Dostupné z: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/w05-042>
- [62] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Martin KOLLER, Dan KUCERA a Iva PERNICOVA. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnology Advances* [online]. 2018, 36(3), 856-870 [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.006. ISSN 07349750. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975017301581>
- [63] DRAGET, Kurt, Gudmund SKJÅK-BRÆK a Bjørn STOKKE. Similarities and differences between alginic acid gels and ionically crosslinked alginate gels. *Food Hydrocolloids* [online]. 2006, 20(2-3), 170-175 [cit. 2019-11-25]. DOI:

- 10.1016/j.foodhyd.2004.03.009. ISSN 0268005X. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X05001049>
- [64] BROWNSEY, Geoff. Thermoreversible gelation of polymers and biopolymers. By Jean-Michel Guenet, Academic Press, London 1992, 278 pp., hardback £ 40, ISBN 0-12-305380-5 [online]. [cit. 2018-04-01]. DOI: 10.1002/adma.19930050316. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adma.19930050316>
- [65] RINAUDO, Marguerite. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International* [online]. 2008, 57(3), 397-430 [cit. 2020-04-03]. DOI: 10.1002/pi.2378. ISSN 09598103. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pi.2378>
- [66] CHING, Su, Nidhi BANSAL a Bhesh BHANDARI. Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2016, 57(6), 1133-1152 [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.1080/10408398.2014.965773. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2014.965773>
- [67] TANAKA, Hideo, Masatoshi MATSUMURA a I. VELIKY. Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 1984, 26(1), 53-58 [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.1002/bit.260260111. ISSN 0006-3592. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.260260111>
- [68] RINAUDO, Marguerite. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials [online]. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1002/pi.2378. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pi.2378>
- [69] TØNNESEN, Hanne a Jan KARLSEN. Alginate in Drug Delivery Systems [online]. [cit. 2018-04-08]. DOI: 10.1081/DDC-120003853. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1081/DDC-120003853>
- [70] DRAGET, K., M. SIMENSEN, E. ONSØYEN a O. SMIDSRØD. Gel strength of Ca-limited alginate gels made in situ. *Hydrobiologia* [online]. 1993, 260-261(1), 563-565 [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.1007/BF00049071. ISSN 0018-8158. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00049071>
- [71] SMIDSRØD, Olav. Solution properties of alginate. *Carbohydrate Research* [online]. 1970, 13(3), 359-372 [cit. 2020-07-17]. DOI: 10.1016/S0008-6215(00)80593-5. ISSN 00086215. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621500805935>
- [72] GURIKOV, Pavel a Irina SMIRNOVA. Non-Conventional Methods for Gelation of Alginate. *Gels* [online]. 2018, 4(1) [cit. 2020-07-08]. DOI: 10.3390/gels4010014. ISSN 2310-2861. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2310-2861/4/1/14>
- [73] MØRCH, Ýrr, Ivan DONATI a Berit STRAND. Effect of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ on Alginate Microbeads. *Biomacromolecules* [online]. 2006, 7(5), 1471-1480 [cit. 2019-11-29]. DOI: 10.1021/bm060010d. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm060010d>
- [74] MØRCH, Ýrr A. Novel Alginate Microcapsules for Cell Therapy: A study of the structure-function relationships in native and structurally engineered alginates. Trondheim, Norway, 2008.. Dizertačná práca. Norwegian University of Science and Technology. Vedoucí práce Prof. Gudmund Skjåk-Bræk.
- [75] KRISTIANSEN, Kåre, Bjørn SCHIRMER, Finn AACHMANN, Gudmund SKJÅK-BRÆK, Kurt DRAGET a Bjørn CHRISTENSEN. Novel alginates prepared by independent control of chain stiffness and distribution of G-residues: Structure and gelling properties. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2009, 77(4), 725-735 [cit. 2019-11-30]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2009.02.018. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861709001088>

- [76] YANG, Ying a Marek URBAN. Self-healing polymeric materials. *Chemical Society Reviews* [online]. 2013, 42(17) [cit. 2018-10-13]. DOI: 10.1039/c3cs60109a. ISSN 0306-0012. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3cs60109a>
- [77] ALEGRE-REQUENA, Juan, Marleen HÄRING, Raquel HERRERA a David DÍAZ DÍAZ. Regulatory parameters of self-healing alginate hydrogel networks prepared via mussel-inspired dynamic chemistry. *New Journal of Chemistry* [online]. 2016, 40(10), 8493-8501 [cit. 2019-11-30]. DOI: 10.1039/C6NJ02367C. ISSN 1144-0546. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6NJ02367C>
- [78] JOHN, Rojan, R.D. TYAGI, S.K. BRAR, R.Y. SURAMPALLI a Danielle PRÉVOST. Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery [online]. [cit. 2017-05-02]. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388551.2010.513327>
- [79] SCHOEBITZ, Mauricio, Maria LÓPEZ a Antonio ROLDÁN. Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil–plant fertilization. A review. DOI: 10.1007/s13593-013-0142-0. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13593-013-0142-0>
- [80] NEDOVIC, Viktor, Ana KALUSEVIC, Verica MANOJLOVIC, Steva LEVIC a Branko BUGARSKI. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* [online]. 2011, 1, 1806-1815 [cit. 2020-01-18]. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.265. ISSN 2211601X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211601X11002665>
- [81] TACKENBERG, Markus a Peter KLEINEBUDE. Encapsulation of Liquids Via Extrusion - A Review [online]. [cit. 2018-03-30]. DOI: 10.2174/1381612821666151008150142.
- [82] BUREY, P., B. BHANDARI, T. HOWES a M. GIDLEY. Hydrocolloid Gel Particles: Formation, Characterization, and Application. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2008, 48(5), 361-377 [cit. 2020-01-18]. DOI: 10.1080/10408390701347801. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408390701347801>
- [83] KRASAEKOOPT, Wunwisa, Bhesh BHANDARI a Hilton DEETH. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt [online]. [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1016/S0958-6946(02)00155-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694602001553>
- [84] SOHAIL, Asma, Mark TURNER, Allan COOMBES, Thor BOSTROM a Bhesh BHANDARI. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2011, 145(1), 162-168 [cit. 2020-01-18]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.007. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160510006975>
- [85] BASHAN, Yoav. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances* [online]. 1998, 16(4), 729-770 [cit. 2020-04-20]. DOI: 10.1016/S0734-9750(98)00003-2. ISSN 07349750. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975098000032>
- [86] BASHAN, Yoav, Luz DE-BASHAN, S. PRABHU a Juan-Pablo HERNANDEZ. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013) [online]. [cit. 2018-05-12]. DOI: 10.1007/s11104-013-1956-x. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11104-013-1956-x>
- [87] ALBAREDA, Marta, Dulce RODRÍGUEZ-NAVARRO, María CAMACHO a Francisco TEMPRANO. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 2008, 40(11), 2771-2779 [cit. 2020-04-01]. DOI: 10.1016/j.soilbio.2008.07.021. ISSN 00380717. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071708002496>

- [88] BERG, Gabriele. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2009, 84(1), 11-18 [cit. 2020-07-26]. DOI: 10.1007/s00253-009-2092-7. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-009-2092-7>
- [89] BASHAN, Y. Superior Polymeric Formulations and Emerging Innovative Products of Bacterial Inoculants for Sustainable Agriculture and the Environment. *Agriculturally Important Microorganisms: Commercialization and Regulatory Requirements in Asia* [online]. 1. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd, 2016, s. 3-34 [cit. 2020-07-26]. DOI: 10.1007/978-981-10-2576-1_2. ISBN 978-981-10-2576-1. Dostupné z: <http://www.bashanfoundation.org/gmaweb/2016.-Bashan-AIM.pdf>
- [90] CHANRATANA, Mak, Gwang HAN, Manoharan MELVIN JOE, Aritra ROY CHOUDHURY, Seshadri SUNDARAM, Md. HALIM a Tongmin SA. Evaluation of chitosan and alginate immobilized *Methylobacterium oryzae* CBMB20 on tomato plant growth. *Archives of Agronomy and Soil Science* [online]. 2018, 64(11), 1489-1502 [cit. 2020-07-26]. DOI: 10.1080/03650340.2018.1440390. ISSN 0365-0340. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03650340.2018.1440390>
- [91] SCHOEBITZ, Mauricio, H el ene SIMONIN a Denis PONCELET. Starch filler and osmoprotectants improve the survival of rhizobacteria in dried alginate beads. *Journal of Microencapsulation* [online]. 2012, 29(6), 532-538 [cit. 2020-07-26]. DOI: 10.3109/02652048.2012.665090. ISSN 0265-2048. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/02652048.2012.665090>
- [92] SABARATNAM, Siva a James TRAQUAIR. Formulation of a *Streptomyces* Biocontrol Agent for the Suppression of *Rhizoctonia* Damping-off in Tomato Transplants. *Biological Control* [online]. 2002, 23(3), 245-253 [cit. 2020-04-16]. DOI: 10.1006/bcon.2001.1014. ISSN 10499644. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S104996440191014X>
- [93] YOUNG, Chiu-Chung, P.D. REKHA, Wei-An LAI a A.B. ARUN. Encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate beads enriched with humic acid. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2006, 95(1), 76-83 [cit. 2020-04-16]. DOI: 10.1002/bit.20957. ISSN 0006-3592. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.20957>
- [94] SIVAKUMAR, P.K., R. PARTHASARTHI a V.P. LAKSHMIPRIYA. Encapsulation of plant growth promoting inoculant in bacterial alginate beads enriched with humic acid. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* [online]. 2014, 3(6), 415-422 [cit. 2020-07-26]. ISSN 2319-7706. Dostupné z: <https://www.ijcmas.com/vol-3-6/P.K.Sivakumar,%20et%20al.pdf>
- [95] DATE, R. A. Advances in inoculant technology: a brief review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* [online]. 2001, 41(3) [cit. 2020-07-26]. DOI: 10.1071/EA00006. ISSN 0816-1089. Dostupné z: <http://www.publish.csiro.au/?paper=EA00006>
- [96] DEAKER, R. Legume seed inoculation technology - A Review. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 2004, 36(8), 1275-1288 [cit. 2020-04-01]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.107423. ISSN 00380717. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071704001269>
- [97] MA, Ying. Seed coating with beneficial microorganisms for precision agriculture. *Biotechnology Advances* [online]. 2019, 37(7) [cit. 2020-04-01]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.107423. ISSN 07349750. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975019301235>
- [98] CLEMENTI, Francesca, Mauro MORESI a Eugenio PARENTE. Alginate from *Azotobacter vinelandii*. *Carbohydrate Biotechnology Protocols* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 1999, , 23-42 [cit. 2020-02-23]. *Methods in Biotechnology*TM. DOI:

- 10.1007/978-1-59259-261-6_3. ISBN 978-0-89603-563-8. Dostupné z:
http://link.springer.com/10.1007/978-1-59259-261-6_3
- [99] NEGRULESCU, Anamaria, Viorica PATRULEA, Manuela MINCEA, Cosmin IONASCU, Beatrice VLAD-OROS a Vasile OSTAFE. Adapting the reducing sugars method with dinitrosalicylic acid to microtiter plates and microwave heating. *Journal of the Brazilian Chemical Society* [online]. 2012, 23(12), 2176-2182 [cit. 2020-02-23]. DOI: 10.1590/S0103-50532013005000003. ISSN 0103-5053.
- [100] RAMDHAN, Tezar, Su CHING, Sangeeta PRAKASH a Bhesh BHANDARI. Time dependent gelling properties of cuboid alginate gels made by external gelation method: Effects of alginate-CaCl₂ solution ratios and pH. *Food Hydrocolloids* [online]. 2019, 90, 232-240 [cit. 2020-06-28]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2018.12.022. ISSN 0268005X. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X18315595>
- [101] DA SILVA FERNANDES, Renan, Fabrício TANAKA, Márcia DE MOURA a Fauze AOUADA. Development of alginate/starch-based hydrogels crosslinked with different ions: Hydrophilic, kinetic and spectroscopic properties. *Materials Today Communications* [online]. 2019, 21 [cit. 2020-06-28]. DOI: 10.1016/j.mtcomm.2019.100636. ISSN 23524928. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352492819302508>
- [102] REVIN, Victor, Elena KOSTINA, Nadezhda REVINA a Vitalina SHUTOVA. Effect of Nutrient Sources on the Alginate Accumulation in the Culture Liquid of *Azotobacter vinelandii* D-05 and Obtaining Biocomposite Materials. *Brazilian Archives of Biology and Technology* [online]. 2018, 61(0) [cit. 2020-07-25]. DOI: 10.1590/1678-4324-2018160406. ISSN 1678-4324. Dostupné z:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132018000100407&lng=en&tlng=en
- [103] SAKUGAWA, Keiju, Atsushi IKEDA, Akio TAKEMURA a Hirokuni ONO. Simplified method for estimation of composition of alginates by FTIR. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2004, 93(3), 1372-1377 [cit. 2020-07-24]. DOI: 10.1002/app.20589. ISSN 0021-8995. Dostupné z:
<http://doi.wiley.com/10.1002/app.20589>
- [104] NIVENS, David E. Role of Alginate and Its O Acetylation in Formation of *Pseudomonas aeruginosa* Microcolonies and Biofilms. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* [online]. 2001, 183(3), 047–1057 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1128/JB.183.3.1047–1057.2001. Dostupné z:
<https://kopernio.com/viewer?doi=10.1128%2Fjb.183.3.1047-1057.2001&token=WzEzMDk5NzYsljEwLjExMjgvaWVMTgZLjMuMTA0Ny0xMDU3LjIwMDEiXQ.VPO5QTmVI8mjnvcld5Jnf4Q4U4>
- [105] LIMA, Aline, Valdir SOLDI a Redouane BORSALI. Dynamic light scattering and viscosimetry of aqueous solutions of pectin, sodium alginate and their mixtures: effects of added salt, concentration, counterions, temperature and chelating agent. *Journal of the Brazilian Chemical Society* [online]. 2009, 20(9), 1705-1714 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1590/S0103-50532009000900020. ISSN 0103-5053. Dostupné z:
https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532009000900020
- [106] CLAYTON, Katherine, Janelle SALAMEH, Steven WERELEY a Tamara KINZER-URSEM. Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry. *Biomicrofluidics* [online]. 2016, 10(5) [cit. 2020-07-18]. DOI: 10.1063/1.4962992. ISSN 1932-1058. Dostupné z:
<http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.4962992>
- [107] Amplitude sweeps. *Www.anton-paar.com* [online]. [cit. 2020-07-27]. Dostupné z:
<https://wiki.anton-paar.com/en/amplitude-sweeps/>
- [108] WILLIAMS, Peter a Glyn PHILLIPS. Rapid Determination of Alginate Monomer Composition using Raman Spectroscopy and Chemometrics. *Gums and Stabilisers*

- for the Food Industry 14 [online]. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2008, , 543-551 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1039/9781847558312-00543. ISBN 978-0-85404-461-0. Dostupné z: <http://ebook.rsc.org/?DOI=10.1039/9781847558312-00543>
- [109] KHALID, A., M. ARSHAD a Z.A. ZAHIR. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2004, 96(3), 473-480 [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.02161.x. ISSN 1364-5072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.2003.02161.x>
- [110] COMPANT, Stéphane, Christophe CLÉMENT a Angela SESSITSCH. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 2010, 42(5), 669-678 [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1016/j.soilbio.2009.11.024. ISSN 00380717. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071709004398>
- [111] DE LAJUDIE, P., E. LAURENT-FULELE, A. WILLEMS et al. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *International Journal of Systematic Bacteriology* [online]. 1998, 48(4), 1277-1290 [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1099/00207713-48-4-1277. ISSN 0020-7713. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-48-4-1277>
- [112] LEE, Kyung-Bum, Philippe DE BACKER, Toshihiro AONO et al. The genome of the versatile nitrogen fixer *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *BMC Genomics* [online]. 2008, 9(1) [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1186/1471-2164-9-271. ISSN 1471-2164. Dostupné z: <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-9-271>
- [113] JAISWAL, Sanjay a Felix DAKORA. Widespread Distribution of Highly Adapted Bradyrhizobium Species Nodulating Diverse Legumes in Africa. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2019, 10 [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00310. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.00310/full>
- [114] GLÖER, Jens, Robert THUMMER, Heike ULLRICH a Ruth SCHMITZ. Towards understanding the nitrogen signal transduction for *nif* gene expression in *Klebsiella pneumoniae*. *FEBS Journal* [online]. 2008, 275(24), 6281-6294 [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06752.x. ISSN 1742464X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-4658.2008.06752.x>
- [115] SARKER, Bapi, Dimitrios PAPAGEORGIOU, Raquel SILVA et al. Fabrication of alginate–gelatin crosslinked hydrogel microcapsules and evaluation of the microstructure and physico-chemical properties. *Journal of Materials Chemistry B* [online]. 2014, 2(11), 1473–1474 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1039/c3tb21509a. ISSN 2050-750X. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3tb21509a>
- [116] DOMÍNGUEZ-DÍAZ, Maraolina, Angélica MENESES-ACOSTA, Angel ROMO-URIBE, Carlos PEÑA, Daniel SEGURA a Guadalupe ESPIN. Thermo-mechanical properties, microstructure and biocompatibility in poly- β -hydroxybutyrates (PHB) produced by OP and OPN strains of *Azotobacter vinelandii*. *European Polymer Journal* [online]. 2015, 63, 101-112 [cit. 2020-07-29]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2014.12.002. ISSN 00143057. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305714004327>

ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK

^{13}C -NMR	Nukleárna magnetická rezonancia na ^{13}C izotope uhlíku
3HB	3-hydroxybutyrát
3HD	3-hydroxydekanóat
3HDD	3-hydroxydodekanoát
3HHx	3-hydroxyhexanonát
3HO	3-hydroxyoktanoát
3HV	3-hydroxyvalerát
A	Absorbancia (dolný index značí vlnovú dĺžku/vlnočet, pri ktorej bola hodnota A odčítaná)
ACC	1-aminocyklopropán-1-karboxylát
AF4	z angl. <i>assymetric flow field-flow fractionation</i>
ATR	Zoslabený úplný odraz
CDW	<i>Cell dry weight</i> – suchá hmotnosť buniek
Da	Dalton
DLS	Dynamický rozptyl svetla
ELS	<i>Electroforetic light scattering</i> – elektroforetický rozptyl svetla
FID	Plameňový ionizačný detektor
FTIR	<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i> – infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou
G	Kyselina α -L-gulurónová
G^*	Komplexný modul
G'	Elastický modul
G''	Viskózný modul
GC	Plynová chromatografia
Hz	Hertz
IAA	Kyselina indolyl-3-octová
IČ	Infračervená spektroskopia
IST	Indukovaná systémová tolerancia
LCL-HA	Z angl. <i>long-chain-length hydroxyalkanoate</i> – PHA s dlhým reťazcom
LVO	Lineárna viskoelastická oblasť
M	Kyselina β -D-mannurónová
MALS	<i>Multangle light scattering</i> – viacuhlový rozptyl svetla
MCL-HA	Z angl. <i>middle-chain-length hydroxyalkanoate</i> – PHA so stredne dlhým reťazcom

M_w	Hmotnostne stredná molekulová hmotnosť
N/A	Skratka pre angl. <i>not applicable</i> – použité, keď dáta nie sú k dispozícii
OD	Optická hustota (dolný index značí vlnovú dĺžku, pri ktorej bola hodnota OD odčítaná)
PGPB/PGPR	Oba termíny označujú rast podporujúce (rizo)baktérie
PHA	Polyhydroxyalkanoát
PHB	Polyhydroxybutyrát
SCL-HA	Z angl. <i>short-chain-length hydroxyalkanoate</i> – PHA s krátkym reťazcom
SEM	Skenovací elektrónový mikroskop
UV	Ultrafialové žiarenie
UV/VIS	Spektrofotometria v ultrafialovej a viditeľnej oblasti
VOC	Prchavé organické látky
δ	Stratový uhol
η	Dynamická viskozita
ν	Kinematická viskozita
ρ	Hustota

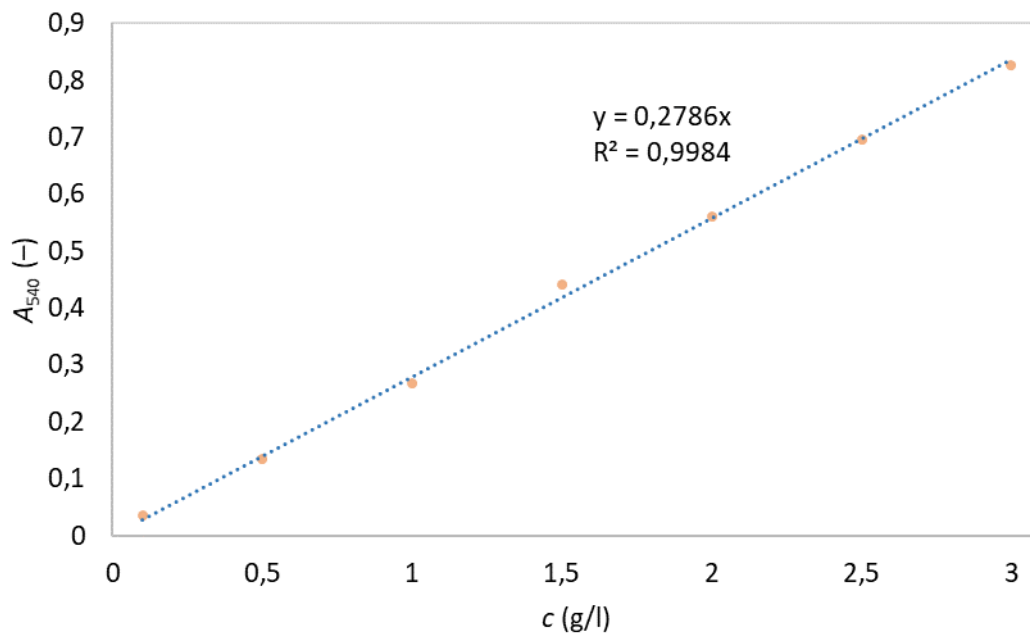
PRÍLOHY

Tab. 6: Prehľad baktérií a ich pôsobenia na rôzne plodiny [16], [19], [9], [11], [10], [3], [108], [109], [110], [111], [112], [113].

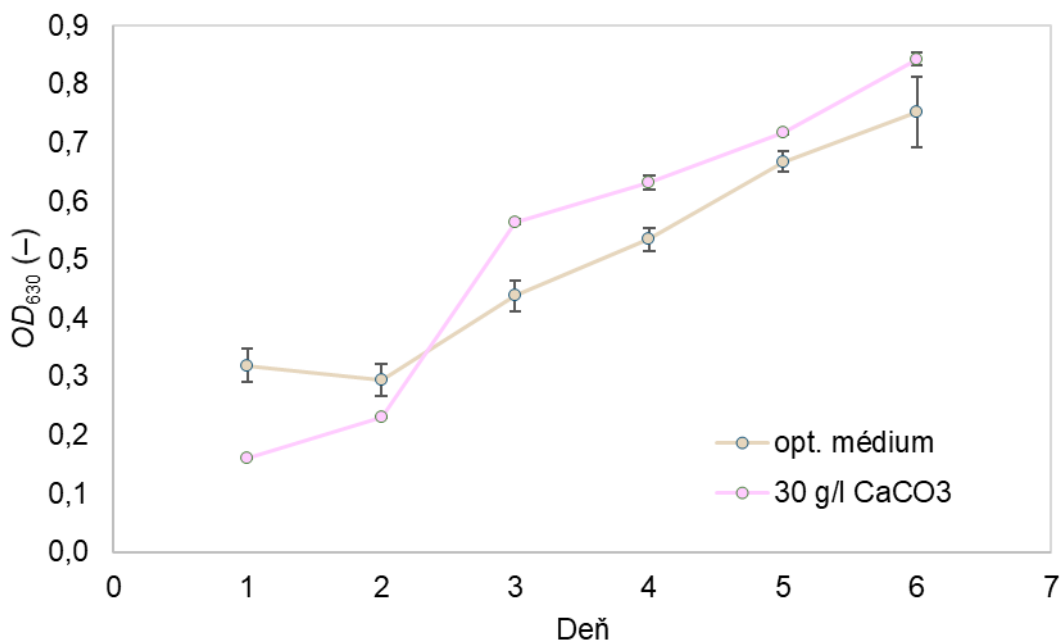
Číslo	Baktéria	Plodina	Efekt
1	<i>Acinetobacter & Pseudomonas</i>	jačmeň a ovos	Tvorba ACC deaminázy a IAA.
2	<i>Aeromonas</i>	ryža	Tvorba IAA.
3	<i>Aeromonas, Bacillus</i>	pšenica	Zvyšuje produkciu exopolysacharidov.
4	<i>Achromobacter piechaudii</i>	rajčiny	Znižuje level etylénu a napomáha rastu rastlín.
5	<i>Agrobacterium</i>	šalát	Tvorba IAA.
6	<i>Allorhizobium</i>	<i>Neptunia natans</i>	Symbiotická baktéria, N ₂ -fixátor.
7	<i>Ayorhizobium</i>		Symbiotická baktéria. N ₂ -fixátor.
8	<i>Azoarcus</i>	ryža	N ₂ -fixátor.
9	<i>Azobacter</i>	uhorka	Syntéza cytokinínu.
10	<i>Azorhizobium</i>	pšenica	Symbiotická baktéria, N ₂ -fixátor.
11	<i>Azospirillum</i>	kukurica, cukrová trstina, ryža	Obmedzuje príjem Na ⁺ a podporuje príjem Ca ²⁺ a K ⁺ . Zvyšuje aktivitu nitrát reduktázy a nitrogenázy. N ₂ -fixátor. Tvorba IAA.
12	<i>Azospirillum lipoferum</i>	pšenica	Voľne žijúca baktéria. Napomáha koreňovému systému aj pri ťažkej kontaminácii olejom.
13	<i>Azotobacter</i>	pšenica, ryža, kukurica, ľan, tabak, čaj, káva, kokos, jačmeň, slnečnica, ovos, cvikla	N ₂ -fixátor; prdukcia IAA.
14	<i>Bacillus</i>	zemiaky, uhorka, paprika, kukurica, <i>alfaalfa</i> , špenát, pšenica, <i>arabidopsis thaliana</i>	Syntéza cytokinínu, gibberelínu, sideroforov, IAA, auxínov. Solubilizácia K, produkcia antibiotík. Tkanivovo špecifická regulácia transportéru sodíka HKT1. N ₂ -fixátor.
15	<i>Beijerinckia</i>	cukrová trstina	N ₂ -fixátor.
16	<i>Bradyrhizobium</i>	strukoviny	Symbiotická baktéria. N ₂ -fixátor.
17	<i>Brachy bacterium, Brevibacterium, Haerero halobacter</i>	arašidy	Vysoký pomer K ⁺ /Na ⁺ a zvýšený obsah Ca ²⁺ , fosforu a dusíku.

18	<i>Burkholderia</i>	ryža	N ₂ -fixátor.
19	<i>Enterobacter</i>	ryža	Voľne žijúca baktéria, tvorba IAA.
20	<i>Frankia</i>	alnus	N ₂ -fixátor.
21	<i>Gluconacetobacter</i>	cukrová trstina	N ₂ -fixátor.
22	<i>Herbaspirillum</i>	ryža, setaria viridis	N ₂ -fixátor.
23	<i>Chryseobacterium</i>	rajčiny	Produkcia sideroforov.
24	<i>Klebsiella</i>		Voľne žijúce. N ₂ -fixátor.
25	<i>Kluyvera ascorbata</i>	rajčiny, repka	Tvorba sideroforov, IAA.
26	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Brassica</i>	Symbiotická baktéria. Tvorí chróm-azurol, siderofory, HCN, IAA. Podpora vegetatívneho rastu.
27	<i>Mycobacterium</i>	kukurica	Povzbudenie odolnosti rastlín voči stresu.
28	<i>Paenibacillus</i>	borovica, čierne korenie	Syntéza IAA, solubilizácia K.
29	<i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Rhizobium phaseoli</i>	mungo fazuľa	Aktivita ACC deaminázy a zlepšene rastu.
30	<i>Phyllobacterium</i>	jahody	Solubilizácia fosfátu, produkcia sideroforov.
31	<i>Pseudomonas</i>	mungo fazuľa, pšenica, bavlna, kukurica, zemiaky	Produkcia chitinázy, beta-glukanózy, ACC deaminázy, antibiotík, sideroforov a auxínu. Povzbudenie odolnosti rastlín voči stresu.
32	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	arašidy	Voľne žijúce. Tvorí siderofory, IAA. Zúčastňuje sa na tvorbe ACC deaminázy a sideroforov. Pomáha k nodulácii a k zvýšeniu úrody.
33	<i>Pseudomonas mendocina</i>	šalát	Aktivita ACC deaminázy a zvýšený príjem esenciálnych živín.
34	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> , <i>Bacillus pumilus</i>	ryža	Zvyšuje koncentráciu glycin betaínu. Znižuje peroxidáciu lipidov a aktivitu superoxid dismutázy.
35	<i>Pseudomonas putida</i>	bavlna	Zvyšuje absorpcia Mg ²⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ a znižuje príjem Na ⁺ rastlinou z pôdy.

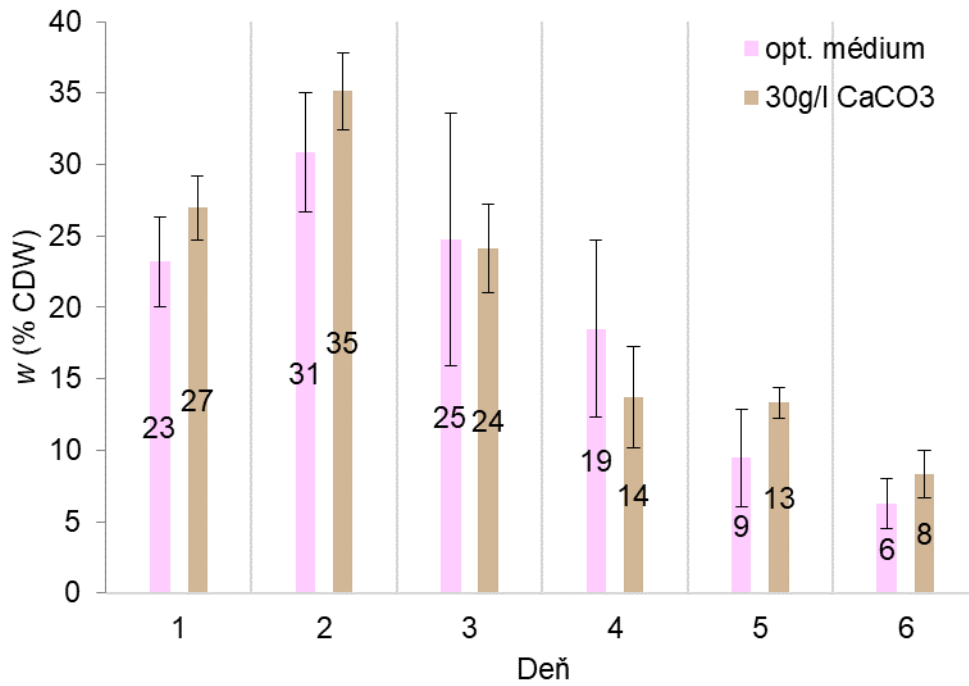
36	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Serratia ficaria</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i>	pšenica	Zvýšenie percenta klíčenia, rýchlosti klíčenia a zvýšený príjem živín.
37	<i>Pseudomonas rathonis/denitrificans</i>	pšenica, arašidy	Tvorba auxínu.
38	<i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i>	kukurica	Zvyšuje aktivitu ACC deaminázy.
39	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	<i>Brassica</i>	Ochrana pred inhibičnými účinkami kadmia. Tvorí siderofory, IAA.
40	<i>Rhizobium</i> & <i>Pseudomonas</i>	mungo fazuľa	Tvorba IAA a aktivita ACC diaminázy.
41	<i>Rhizobacteria</i>	ryža, pšenica	Tvorí IAA a auxín. Najviac auxínu produkuje v nesterilizovanej pôde.
42	<i>Rhizobia</i>	strukoviny, arašidy, ryža	N ₂ -fixátor, produkcia HCN. Povzbudenie odolnosti rastlín voči stresu.
43	<i>Rhizobium</i>	ryža, paprika, rajčiny, šalát, mrkva, mungo fazuľa	Symbiotická baktéria. Syntéza IAA, ACC deaminázy, sideroforov. N ₂ -fixátor.
44	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	ryža, red'kovka, šalát	Tvorba IAA a cytokinínu.
45	<i>Rhizobium phaseoli</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> ; <i>Pseudomonas flourescens</i> ,	mungo fazuľa	Zvýšená aktivita ACC deaminázy a zvýšená účinnosť využívania vody.
46	<i>Rhizobium</i> , <i>Pseudomonas</i>	kukurica	Znižuje unikanie elektrolytov a zvyšuje produkciu prolínu. Udržiava relatívny obsah vody v listoch a selektívny príjem K ⁺ .
47	<i>Roultella planticola</i>	bavlna	Aktivita ACC deaminázy.
48	<i>Sinorhizobium</i>	<i>Cajanus cajan</i>	Symbiotická baktéria. Produkcia chitinázy, beta-glukanózy.
49	<i>Sphingomonas</i>	rajčiny	Syntéza gibberelínu.
50	<i>Streptomyces</i>	azadirachta indická, "mikro tom" rajčiny	Aktivita ACC deaminázy a tvorba IAA. Solubilizácia fosfátu.



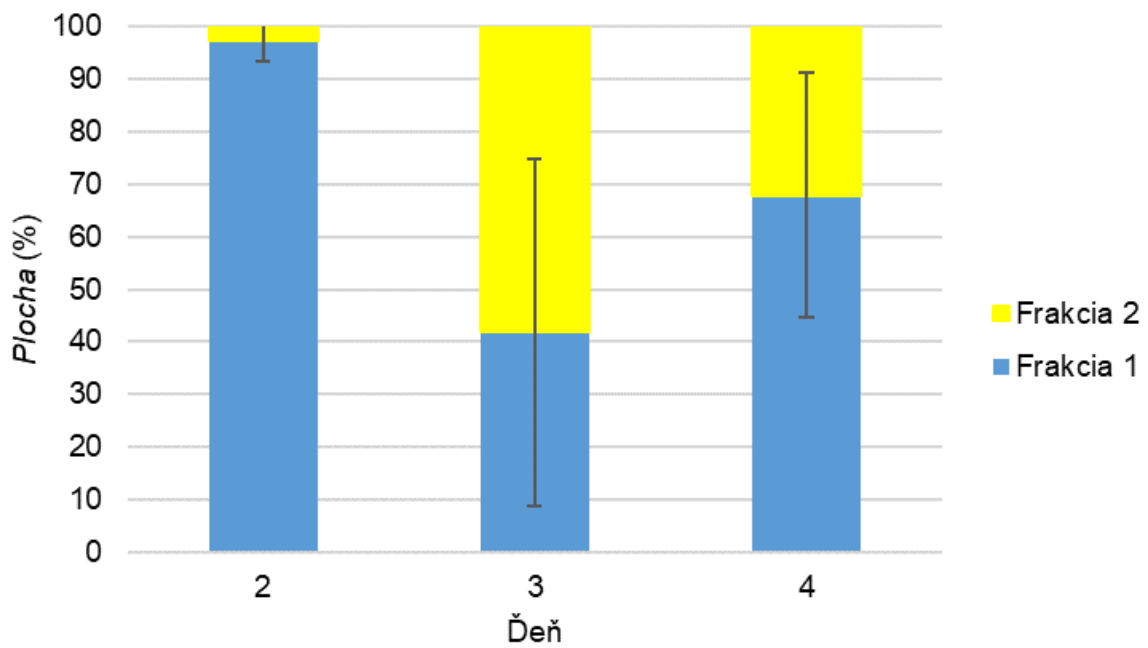
Obr. 49: Kalibračná krivka pre stanovenie zvyškovej glukózy pomocou DNS



Obr. 50: Porovnanie nárastu optickej hustoty v jednotlivé dni odberu, prídavok 5 alebo 30 g/l $CaCO_3$



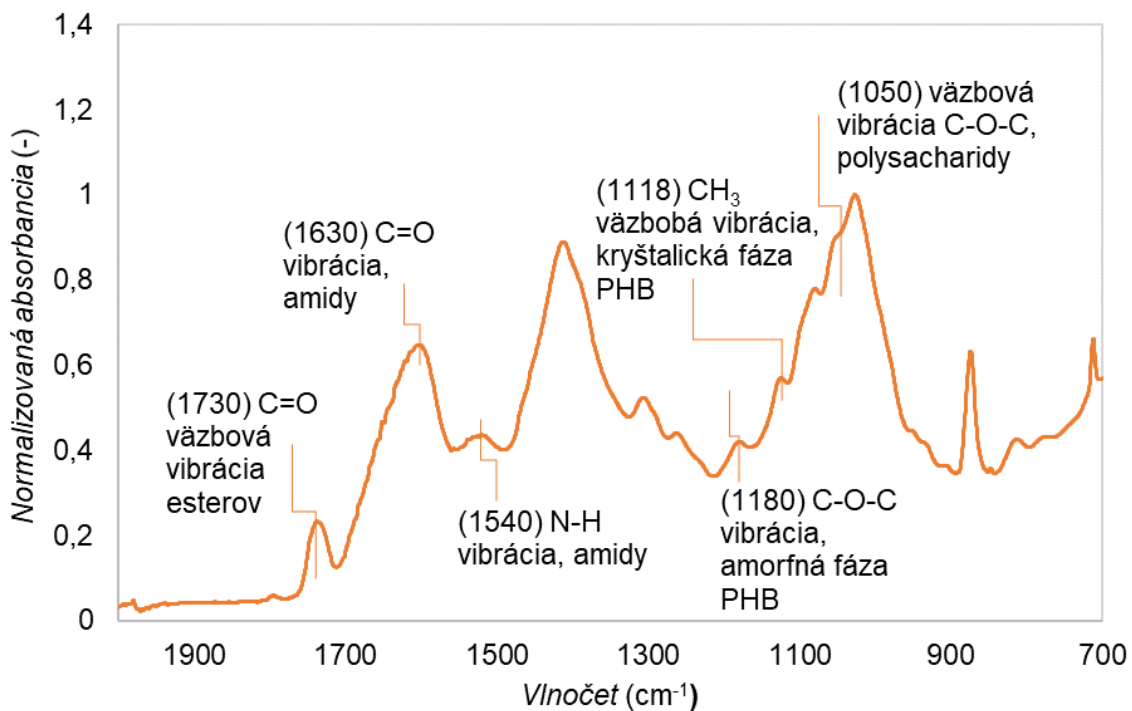
Obr. 51: Porovnanie trendu tvorby PHB za kultivácie v optimálnom médium alebo v médiu s prídavkom 30 g/l CaCO₃



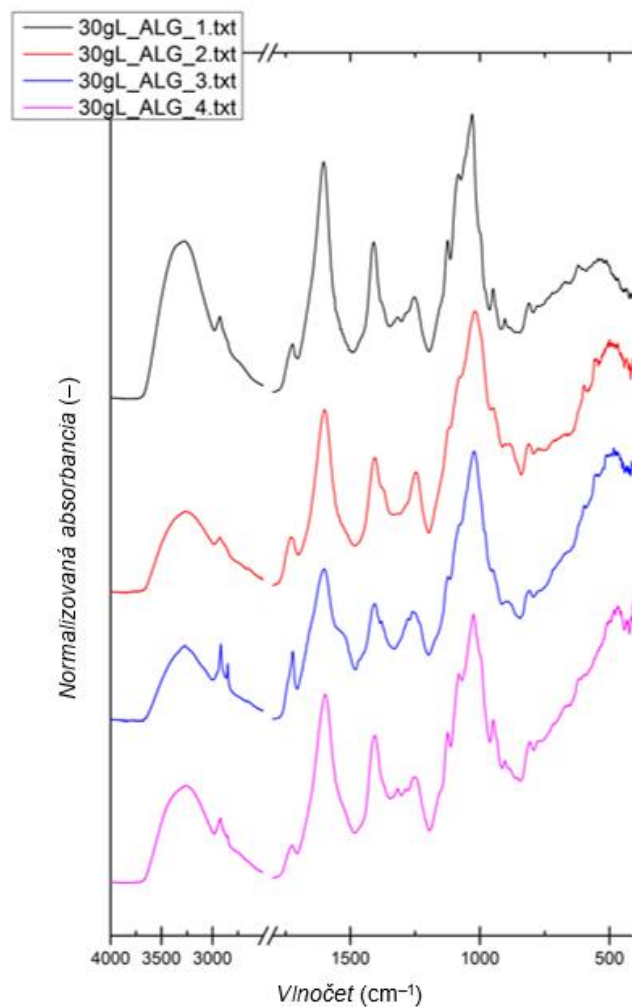
Obr. 52: Percentuálne zastúpenie častíc v jednotlivých frakciách; médium s prídavkom 30 g/l CaCO₃



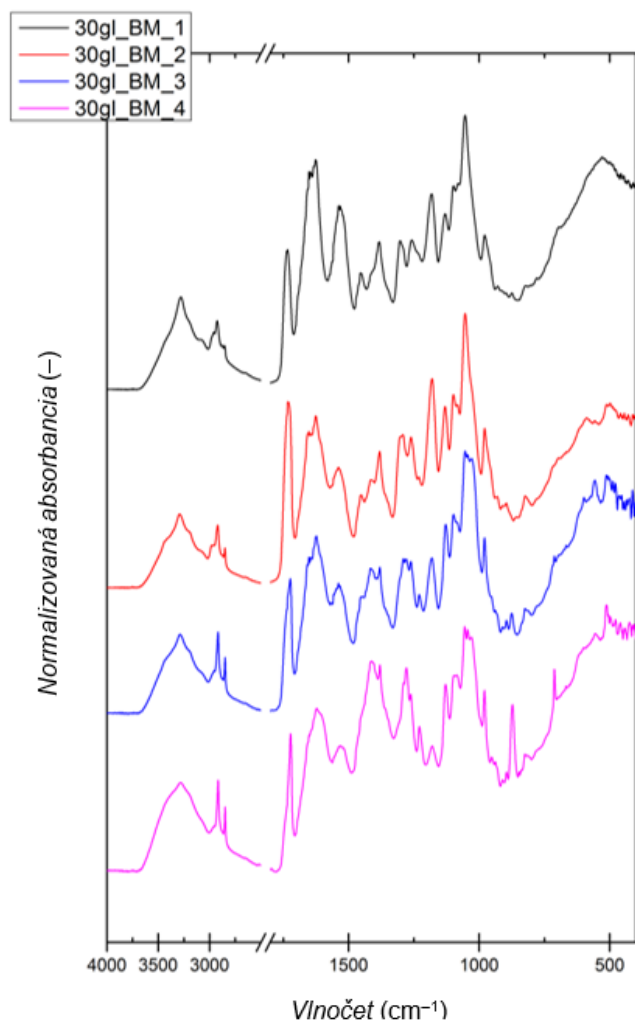
Obr. 53: Priradenie píkov v IČ spektre alginátu [107; 103; 114]



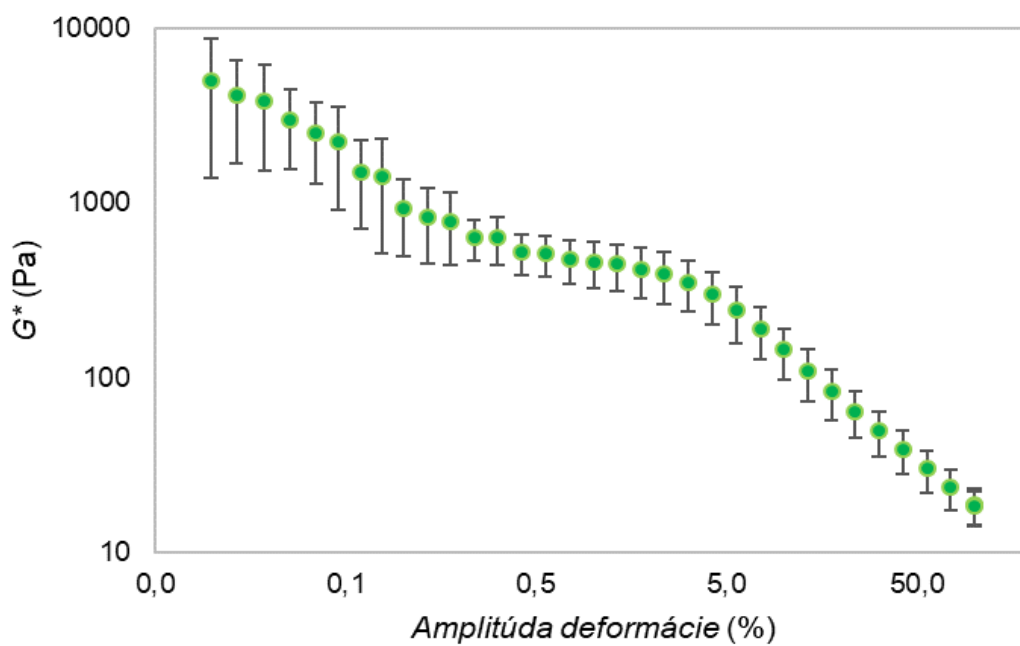
Obr. 54: Priradenie píkov v IČ spektre biomasy [115]



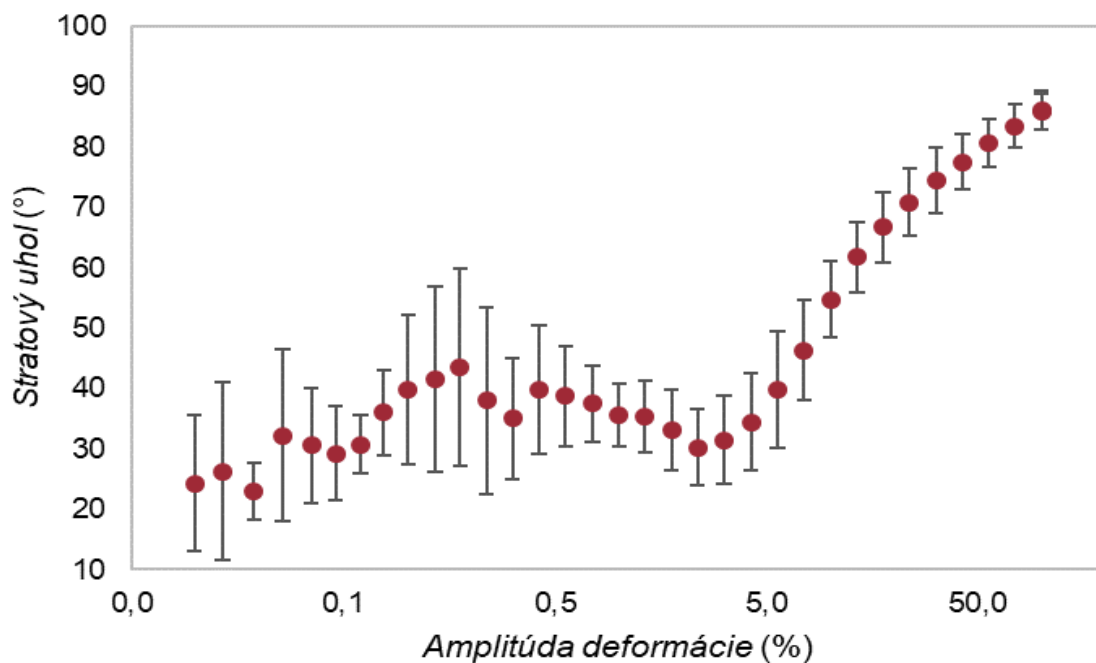
Obr. 55: IČ spektrá bakteriálneho alginátu, médium s prídavkom 30 g/l CaCO₃



Obr. 56: IČ spektrá biomasy; médium s prídavkom 30 g/l CaCO_3



Obr. 57: Závislosť G^* na amplitúde deformácie; priemer z ôsmich opakovaní, vzorka 1A



Obr. 58: Závislosť stratového uhlu na amplitúde deformácie; priemer z ôsmych opakovaní, vzorka 1A

Tab. 7: Priemerné hodnoty veľkosti častíc (objemová distribúcia), indexu polydisperzity a ζ -potenciálu; médium s prídavkom 30 g/l CaCO_3

Deň	d (nm)	PDI (-)	ζ -potenciál (mV)
2	997 ± 311	0,39 ± 0,08	-12 ± 1
3	1 946 ± 1 162	0,61 ± 0,04	-14,5 ± 0,5
4	1876 ± 247	0,66 ± 0,09	-20,1 ± 0,4