



# 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

# VYUŽITÍ POKROČILÝCH TECHNIK ELEKTRONOVÉ MIKROSKOPIE PŘI ULTRASTRUKTURNÍ ANALÝZE MIKROBIÁLNÍCH BUNĚK A PRODUKTŮ MIKROBIÁLNÍCH TECHNOLOGIÍ

UTILIZATION OF ADVANCED TECHNIQUES OF ELECTRON MICROSCOPY IN ALTRASTRUCTURAL  
ANALYSIS OF MICROBIAL CELLS AND MICROBIAL BIOTECHNOLOGY PRODUCTS

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

**Bc. Anna Havlíčková**

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

**Ing. Vladislav Krzyžánek, Ph.D.**

**BRNO 2024**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1921/2023 Akademický rok: 2023/24  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Anna Havlíčková**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Procesy a materiály medicínských aplikací  
Vedoucí práce: **Ing. Vladislav Krzyžánek, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Využití pokročilých technik elektronové mikroskopie při ultrastrukturní analýze mikrobiálních buněk a produktů mikrobiálních technologií

### Zadání diplomové práce:

- Vypracovat aktuální literární rešerši na téma: pokročilé techniky přípravy biologických vzorků pro elektronovou mikroskopii (EM) a moderní přístupy k zobrazování ultrastruktury biologických vzorků pomocí EM.
- Na vhodné sadě reálných vzorků (mikrobiální kultury a produkty mikrobiálních biotechnologií) realizovat sérii experimentů zaměřenou na testování různých technik přípravy vzorku a jejich zobrazování pomocí EM.
- Na základě získaných dat diskutovat využitelnost jednotlivých testovaných technik. Navrhnout optimální kombinaci/kombinace technik přípravy a zobrazování pro korektní vizualizaci vnitřní struktury biologických vzorků.

### Termín odevzdání diplomové práce: 29.4.2024:

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

-----  
Bc. Anna Havlíčková  
studentka

-----  
Ing. Vladislav Krzyžánek, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

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

## ABSTRAKT

Tato diplomová práce se v teoretické části zabývá přímými a nepřímými mechanismy podpory růstu rostlin prostřednictvím rhizobakterií, na které navazuje část o vybraném modelovém organismu *Azotobacter vinelandii*. Druhá část teorie se zabývá elektronovou mikroskopií od možných interakcí elektronového svazku se vzorkem, přes typy elektronových mikroskopů až po různé metody přípravy biologických vzorků. V experimentální části je pojednáváno o kultivaci vybrané bakterie, gelaci připravených buněčných kultur prostřednictvím vybraných síťovacích činidel (chlorid vápenatý, kyselina jablečná, glukono- $\delta$ -lakton s uhličitanem vápenatým) a především o různých metodách přípravy a analýzy čistých i enkapsulovaných kultur pro elektronovou mikroskopii. Konkrétně byla vybrána analýza pomocí kryogenní skenovací elektronové mikroskopie a skenovací transmisní elektronové mikroskopie. Oběma technikami byly uvnitř bakterií pozorovány poly-3-hydroxybutyrátové granule, u kterých bylo potvrzeno, že jsou elastické i za kryogenních teplot. Dále bylo zjištěno, že dochází k síťování extracelulárního alginátu i u vzorků bez přídavku síťovacích činidel, avšak přítomná hydrogelová síť byla u těchto vzorků podstatně řidší než u vzorků s přídavkem všech použitých síťovacích činidel. V této práci byla také porovnávána hustota hydrogelové sítě síťované glukono- $\delta$ -laktonem, kdy při využití tohoto činidla s přídavkem uhličitanu vápenatého byla pozorována výrazně hustší hydrogelová síť, než při použití činidla samotného. V neposlední řadě bylo při porovnání získaných výsledků s literární rešerší zjištěno, že bakterie *A. vinelandii* tvoří kapsule, při jejichž tvorbě dochází ke změně tvaru z oválné na kulovitou bakterii a také ke zmenšení dané buňky. Z výsledných snímků bylo zjištěno, že jsou tyto kapsule tvořeny dvěma vrstvami, které se v literatuře nazývají jako elektrontransparentní intin a elektrondenšní exin.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Elektronová mikroskopie, kryogenní skenovací elektronová mikroskopie (cryo-SEM), skenovací transmisní elektronová mikroskopie (STEM), rhizobakterie podporující růst rostlin (PGPR), *Azotobacter vinelandii*, alginát, poly-3-hydroxybutyrát.

## ABSTRACT

In the theoretical part, this thesis deals with direct and indirect mechanisms of plant growth-promoting rhizobacteria, which is followed by a section on the selected model organism *Azotobacter vinelandii*. The second part of the theoretical section deals with electron microscopy starting with the possible interactions of the electron beam with the sample, through types of electron microscopes to various methods of preparing biological samples. The experimental part discusses the cultivation of selected bacterial cultures, the gelation of the cell cultures using chosen cross-linking agents (calcium chloride, malic acid, glucono- $\delta$ -lactone with calcium carbonate) and, above all, various methods of preparation and analysis of pure and encapsulated cultures by the means of electron microscopy. In particular, cryogenic scanning electron microscopy and scanning transmission electron microscopy imaging were selected. Using both techniques, poly-3-hydroxybutyrate granules, which were confirmed to be elastic even at cryogenic temperatures, were observed inside the bacteria. Furthermore, it was found that cross-linking of extracellular alginate occurs even in samples without the addition of cross-linking agents. However, the hydrogel network present in these samples was significantly thinner than in samples with the addition of all cross-linking agents used. In this work, the density of the hydrogel network cross-linked with glucono- $\delta$ -lactone was also compared. When using this agent with the addition of calcium carbonate, a significantly denser hydrogel network was observed in comparison with using the agent alone. Last but not least, when comparing the obtained results with the literature, it was found that the *A. vinelandii* bacteria form capsules, during the formation of the capsules the shape of the cells changes from an oval to a spherical bacterium and also the size of the given cell is reduced. From the resulting images, it was found that these capsules are made up of two layers, to which literature refers as electron-transparent intine and electron-dense exine.

## KEYWORDS

Electron microscopy, cryogenic scanning electron microscopy (cryo-SEM), scanning transmission electron microscopy (STEM), plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), *Azotobacter vinelandii*, alginate, poly-3-hydroxybutyrate.

HAVLÍČKOVÁ, Anna. *Využití pokročilých technik elektronové mikroskopie při ultrastrukturní analýze mikrobiálních buněk a produktů mikrobiálních technologií* [online]. Brno, 2024 [cit. 2024-04-24]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156640>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Vladislav Krzyžánek.

## PROHLÁŠENÍ

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

.....  
podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych ráda poděkovala svému vedoucímu Ing. Vladislavu Krzyžánkovi, Ph.D. za možnost realizovat diplomovou práci na Ústavu přístrojové techniky Akademie věd, dále také za profesionální vedení a cenné rady během mého působení v rámci jeho výzkumné skupiny. Dále mé velké díky patří konzultantce Ing. Kateřině Mrázové za její odbornou a trpělivou pomoc nejen při práci v laboratoři, ale také v průběhu zpracování této práce. Ještě bych ráda poděkovala Mgr. Kamile Hrubanové, Ph.D. za pomoc při cryo-SEM analýze. V neposlední řadě děkuji Ing. Martinu Súkeníkovi a Ing. Dianě Černayové za poskytnutí buněčných kultur.

# OBSAH

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Bakterie podporující růst rostlin .....	9
2.1.1	Přímé mechanismy .....	10
2.1.2	Nepřímé mechanismy .....	11
2.1.3	Modelový organismus <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	12
2.1.3.1	Alginát .....	13
2.1.3.2	Poly-3-hydroxybutyrát (PHB) .....	15
2.2	Elektronová mikroskopie.....	16
2.2.1	Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) .....	18
2.2.1.1	Chemická příprava biologických vzorků pro SEM .....	20
2.2.1.2	Mrazová příprava biologických vzorků pro SEM .....	22
2.2.2	Transmisní elektronová mikroskopie (TEM).....	24
2.2.2.1	Chemická příprava biologických vzorků pro TEM .....	25
2.2.2.2	Mrazová příprava biologických vzorků pro TEM .....	27
2.2.3	Skenovací transmisní elektronová mikroskopie (STEM) .....	28
3	Experimentální část.....	30
3.1	Použité mikroorganismy .....	30
3.2	Použité chemikálie.....	30
3.3	Použité přístroje .....	31
3.4	Kultivace mikroorganismů .....	31
3.5	Gelace buněčných kultur .....	32
3.6	Vysokotlaké mrazení vzorků.....	32
3.7	Příprava a analýza zmrazených vzorků pomocí cryo-SEM.....	33
3.8	Příprava a analýza zmrazených vzorků pomocí STEM.....	34
3.9	Chemická příprava vzorků a jejich analýza pomocí STEM .....	35
4	Výsledky a diskuze .....	37
4.1	Analýza vzorků pomocí cryo-SEM .....	37
4.2	Analýza vzorků pomocí STEM .....	43
4.2.1	Analýza vzorků připravených kryogenní metodou .....	43
4.2.2	Analýza vzorku připravených chemickou metodou .....	51
5	Závěr .....	53
6	Seznam použitých zdrojů .....	56

7	Seznam použitých zkratek a symbolů .....	64
7.1	Seznam použitých zkratek .....	64
7.2	Seznam použitých symbolů .....	65
8	Přílohy .....	66
8.1	Analýza vzorků pomocí cryo-SEM .....	66
8.2	Analýza vzorků připravených kryogenní metodou pomocí STEM.....	67

# 1 ÚVOD

Organizace pro výživu a zemědělství při OSN, známá pod zkratkou FAO, vydala v roce 2015 zprávu s názvem Stav světových půdních zdrojů (*Status of the World's Soil Resources*), podle které je v dnešní době většina celosvětově obdělávané půdy již značně vyčerpána vlivem neudržitelného zemědělství. To znamená, že dochází ke ztrátě organické hmoty a živin důležitých pro růst rostlin, což má za následek snížení výnosů zemědělských plodin. Kromě toho jsou se zhoršenou kvalitou zemědělské půdy spjaty i další současné problémy, jako je změna klimatu, emise skleníkových plynů, či snížení biodiverzity. Východiskem z této situace je udržitelné zemědělství a obnova dnes již degradované půdy.

Mezi nově vyvíjené moderní technologie potenciálně použitelné v rámci udržitelného zemědělství patří biohnojiva, sestávající se z bakterií podporujících růst rostlin (PGPB, *plant growth-promoting bacteria*). Jedná se o bakterie mající příznivý vliv na růst rostlin prostřednictvím různých přímých a nepřímých mechanismů. Příkladem těchto bakterií jsou rhizobakterie, jež kolonizují kořeny nebo se nacházejí v jejich bezprostřední blízkosti. Mezi tyto rhizobakterie spadá modelový organismus *Azotobacter vinelandii*. Jedná se o půdní, nepatogenní, gramnegativní bakterii. Mechanismus podpory růstu rostlin prostřednictvím této bakterie spočívá ve schopnosti fixace a následného poskytnutí vzdušného dusíku, či v tvorbě sideroforů vázajících železo. Kromě toho je tato bakterie producentem intracelulárního poly-3-hydroxybutyrátu, což je polymer potenciálně využitelný namísto dnes používaných syntetických polymerů jako je například polypropylen. Dále *A. vinelandii* produkuje extracelulární alginát, který nejen že chrání před vysycháním samotnou bakterii, ale také přítomné rostliny, což je jeden z mechanismů podpory růstu rostlin.

Tato bakterie je dnes hojně zkoumána pro využití v zemědělství právě kvůli přímé produkci alginátu, který není pro enkapsulaci bakterie potřeba doplňovat, což tuto metodu činí technologicky jednodušší a levnější. Enkapsulace těchto PGPB je důležitá kvůli chránění vitálních bakterií před různými stresovými faktory prostředí.

Elektronová mikroskopie je součástí výzkumu *A. vinelandii*, sloužící ke zjištění morfologie a ultrastruktury této bakterie. Avšak tradiční protokoly přípravy bakteriálních suspenzí pro skenovací i transmisní elektronovou mikroskopii zahrnují použití relativně velkého množství chemikálií, které jsou jednak často pro zdraví škodlivé a také mohou ovlivňovat výslednou ultrastrukturu bakterií. Oproti tomu pro kryogenní techniky není přídavek dalších chemikálií nutný, jelikož dochází k fixaci fyzikálním způsobem, konkrétně zmrazením. Z tohoto důvodu je tato metoda pro přípravu bakteriálních suspenzí velmi atraktivní, jelikož připravené preparáty jsou podobné nativnímu stavu jednotlivých buněk. Avšak zkoumaná bakterie *A. vinelandii* je enkapsulovaná v alginátu, konkrétně ve formě hydrogelu, což pro kryogenní techniky přináší problém při přípravě vzorků zmrazením. Při mrazení má totiž dojít k tvorbě amorfního ledu, což je podmíněno velmi rychlým zmrazením. Oproti tomu u standardně používaných chemických technik je zde problém s prosycováním preparátů, jelikož přítomná hydrogelová struktura ztěžuje penetraci fixativ, dehydratačních činidel a u přípravy pro transmisní elektronovou mikroskopii také pryskyřice. S využitím nejen těchto poznatků o různých přípravách preparátů pro elektronovou mikroskopii byly pro tuto práci vybrány techniky pro přípravu čistých i enkapsulovaných kultur modelového organismu *Azotobacter vinelandii*.



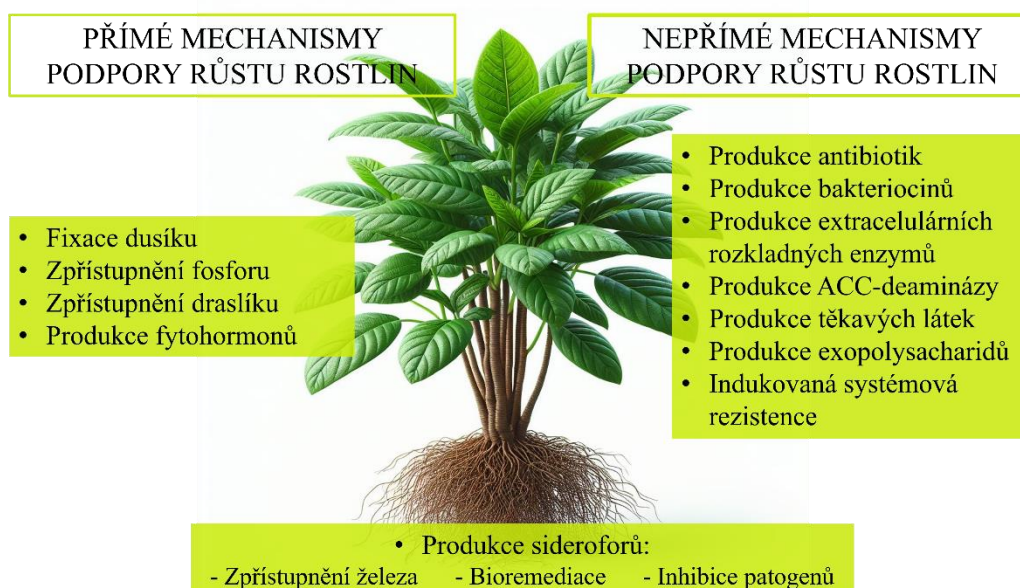
## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Bakterie podporující růst rostlin

V současném světě pozorujeme trvalý nárůst populace, což vede ke stále rostoucí potřebě zajištění dostatečného množství potravin. Nicméně další rozšiřování zemědělské půdy je téměř nemožné a již existující zemědělská půda je značně vyčerpána působením abiotických a biotických stresových faktorů. K abiotickým stresovým faktorům patří sucho, vodní a větrná eroze, zasolení půdy a s tím spojené změny pH půdy. Naopak mezi biotické stresové faktory se řadí především různé choroby rostlin způsobené houbami, bakteriemi, viry či parazity [1].

Jedním z potenciálně využitelných hnojiv pro zvýšení výnosnosti půd v rámci udržitelného zemědělství jsou biohnojiva. Mezi tato hnojiva se především řadí mikroorganismy podporující růst rostlin, označované též jako PGPM (*plant growth-promoting microorganism*), mezi něž spadají například rhizobakterie podporující růst rostlin (PGPR, *plant growth-promoting rhizobacteria*) [2]. Jedná se o půdní bakterie, které v první řadě kolonizují povrchy kořenů, kde vytvářejí oblast zvanou rhizosféra. Z druhé mají tyto bakterie pozitivní vliv na růst rostlin, což spočívá ve vzájemné symbióze těchto dvou organismů nebo nepřímém ovlivňování rostlinného růstu. Rostliny vylučují do půdy sacharidy prostřednictvím kořenového systému, což představuje výhodu pro dané bakterie, které je následně využívají jako zdroj uhlíku. Zároveň dochází k příznivému vlivu bakteriálních metabolických procesů na růst rostlin [1]. PGPR se mohou vyskytovat buď uvnitř kořenového systému, kde tvoří kořenové uzliny, a proto jsou označovány jako intracelulární, nebo naopak mohou být extracelulární, vyskytující se na povrchu nebo v bezprostřední blízkosti kořene, kde uzliny netvoří [3].

Mechanismy podpory růstu rostlin rhizobakteriemi lze obecně rozdělit na přímé a nepřímé. Mezi přímé mechanismy patří všechny procesy, při kterých dochází ke stimulaci transportu živin nebo produkci fytohormonů bakteriemi. Druhou skupinou jsou nepřímé mechanismy, které jsou spojeny s potlačením abiotických a biotických stresových faktorů působících na rostlinu (obrázek 1) [3].



Obrázek 1: Schéma rozdělení mechanismů podpory růstu rostlin (vychází z [3]).

### 2.1.1 Přímé mechanismy

První přímý mechanismus podpory růstu rostlin prostřednictvím rhizobakterií spočívá v jejich schopnosti fixovat vzdušný dusík ( $N_2$ ) a chemicky jej přeměnit na formy absorbovatelné rostlinou. Konkrétně se jedná o amoniak ( $NH_3$ ) a dusičnany ( $NO_3^-$ ) [3]. Interakce rostlin s dusík fixujícími PGPR může být buď symbiotická, která se vyskytuje u intracelulárních PGPR, například bakterie rodu *Rhizobium*, nebo nesymbiotická interakce, která se vyskytuje u extracelulárních PGPR. Extracelulární bakterie také fixují dusík, ale uvolňují jej do půdy, odkud je následně absorbován rostlinami. Mezi tyto extracelulární PGPR patří například *Azospirillum*, *Azotobacter* a *Bacillus* [1]. Mechanismus biologické fixace atmosférického dusíku je energeticky náročný proces, pro fixaci jedné molekuly  $N_2$  je zapotřebí až 16 molekul adenosintrifosfátu (ATP). Biologická fixace dusíku zahrnuje dva klíčové enzymy, dohromady označované jako nitrogenázový komplex. Prvním enzymem je nitrogenáza, neboli FeMo-protein, který váže a redukuje molekulu  $N_2$  na molekulu  $NH_3$ . Druhým přítomným enzymem je nitrogenáza-reduktáza, jinak označovaná jako Fe-protein, jež je donorem potřebných elektronů. Činnost tohoto enzymu je rychlost určující krok celé fixace atmosférického dusíku [4; 5]. Následně může docházet k přeměně  $NH_3$  na  $NO_3^-$  v procesu zvaném nitrifikace [3].

Dalším klíčovým prvkem pro růst rostlin je fosfor, který, podobně jako dusík, je v přírodě hojně zastoupený, avšak rostliny jsou schopné absorbovat pouze ionty odvozené od kyseliny fosforečné, konkrétně  $H_2PO_4^-$  a  $HPO_4^{2-}$ . Fosfor v přírodě může být vázán v anorganických i organických sloučeninách, podle čehož se liší mechanismus jeho zpřístupnění [6]. Fosfor ve formě nerozpustných anorganických sloučenin, přesněji ve formě solí kyseliny fosforečné (například  $Ca_3(PO_4)_2$ ,  $AlPO_4$ ,  $FePO_4$ ), je rozpouštěn prostřednictvím nízkomolekulárních organických kyselin, jako je kyselina glukonová, octová, jablečná, vinná a další. Tyto kyseliny jsou vylučovány PGPR v rámci jejich metabolismu sacharidů [3]. Organické kyseliny snižují pH půdy, což vede ke zvýšení rozpustnosti anorganických sloučenin fosforu, a zároveň slouží jako chelatační činidla, která vážou kationty z anorganických solí na tyto kyseliny, přičemž se uvolňuje potřebný fosforečnanový anion. Do této skupiny patří zástupci z rodů *Bacillus*, *Azotobacter* nebo *Pseudomonas* [7]. Druhou skupinu tvoří fosfor vázaný v organických sloučeninách, jako jsou fosfolipidy a nukleové kyseliny. Odbourávání a přeměna těchto látek na formy absorbovatelné rostlinou probíhá pomocí enzymů, zejména fosfatáz. Tyto enzymy produkují zástupci z rodů *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, či *Rhizobium* [3].

Posledním prvkem z primárních živin je draslík, který se v přírodě obvykle vyskytuje ve formě minerálů jako je živec. Avšak pro rostliny je draslík dostupný pouze ve formě draselného kationtu. Mechanismus rozpouštění nedostupných draselných sloučenin je obdobný jako u rozpouštění fosfátů. PGPR vylučují organické kyseliny, které následně rozpouští nedostupné formy draslíku a uvolňují jej ve formě kationtu. Mezi tyto organické kyseliny patří například kyselina šťavelová, glukonová a vinná. Mezi organismy produkující tyto kyseliny patří zástupci rodu *Bacillus*, či *Pseudomonas* [3; 8].

Železo je častým kofaktorem důležitých enzymů. Obecně existují dva oxidační stavy železa: první je železnatý kation, který je při fyziologickém pH rozpustný, a druhý je kation železitý, který rozpustný není. Avšak většina železa se v přírodě vyskytuje právě v nerozpustném stavu. Podpora růstu rostlin prostřednictvím zpřístupnění železa spočívá v tvorbě sideroforů, což jsou nízkomolekulární sloučeniny, schopné reverzibilně vázat kationt železitý. Tento kationt je

následně redukován na kationt železnatý, který může být absorbován rostlinou [3]. Kromě tohoto přímého mechanismu vykazují siderofory také dva nepřímé mechanismy podpory růstu rostlin. První spočívá ve snížení dostupnosti železa v půdě, čímž je inhibován růst patogenních organismů, které pro svůj růst železo potřebují [1]. Druhým nepřímým mechanismem je proces zvaný bioremediace, jehož podstatou je navázání nežádoucích těžkých kovů na rhizobakterie podporující růst rostlin, čímž dochází k odstranění těchto kontaminantů z půdy [9]. Siderofory jsou produkovány bakteriemi patřícími do rodů *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Escherichia*, či *Streptomyces* [3].

Kromě výše uvedených přímých mechanismů mají PGPR schopnost produkovat fytohormony, což jsou molekuly regulující růst rostlin již při nízkých koncentracích. Mezi tyto fytohormony patří auxiny, jejichž hlavním zástupcem je kyselina indol-3-octová (IAA). Když je IAA produkována PGPR, působí příznivě na růst kořenů, čímž je zvětšována jejich plocha, což je důležité pro výměnu živin [1]. Další skupinou fytohormonů jsou cytokiny, které působí podobně jako auxiny, mají tedy pozitivní vliv na vývoj a dělení kořenů, ale zároveň inhibují jejich prodlužování [3]. Poslední zde zmíněnou skupinou fytohormonů jsou gibereliny, které přispívají k celkovému růstu rostlin, protože i když jsou tyto hormony původně přijímány kořeny, mohou být distribuovány do nadzemních částí rostliny, což rozšiřuje jejich účinek [1].

### 2.1.2 Nepřímé mechanismy

Jak již bylo zmíněno výše, nepřímé mechanismy podpory růstu rostlin prostřednictvím PGPR spočívají v potlačení účinku abiotických i biotických stresových faktorů, které omezují růst a vývoj rostlin. Mezi tyto nepřímé mechanismy patří například schopnost PGPR produkovat antibiotika, což jsou nízkomolekulární látky, které již při nízkých koncentracích inhibují metabolismus nebo usmrcují jiné v daném místě přítomné mikroorganismy, ale také houby a prvoky [3]. Příkladem producentů antibiotik je rod *Bacillus*, jehož zástupci vytvářejí látky jako subtilin, bacilyzin nebo mykobacilin. Naopak zástupci rodu *Pseudomonas* jsou producenty 2,4-diacetyl floroglucinolu, azomycinu, či karalycinu [1].

Dalším nepřímým mechanismem je produkce bakteriocinů. Jedná se o mikrobiální proteiny mající baktericidní, či bakteriostatické vlastnosti vůči bakteriím stejného nebo blízké příbuzného druhu, což má za následek zvýhodnění dané bakterie. Producenty těchto látek jsou zástupci z rodu *Escherichia*, *Enterobacteriaceae*, či *Pseudomonas* [3; 10].

Mezi nepřímé mechanismy patří také schopnost produkovat extracelulární rozkladné enzymy. Tyto enzymy mají schopnost katalyzovat degradaci různých polymerů přítomných v buněčné stěně nežádoucích patogenů, čímž způsobí jejich lýzi [3]. Jedním z příkladů těchto enzymů je chitináza, která katalyzuje degradaci chitinu, lineárního polysacharidu složeného z molekul N-acetyl-D-glukosaminu spojených  $\beta$ -1,4-glykosidickou vazbou. Chitin se vyskytuje v buněčných stěnách hub, exoskeletů korýšů nebo členovců [11]. Dalším příkladem je enzym  $\beta$ -glukanáza, enzym štěpící glykosidické vazby v  $\beta$ -glukanu, což je polysacharid skládající se z  $\beta$ -D-glukopyranózových podjednotek spojených buď  $\beta$ -1,4- nebo  $\beta$ -1,3-glykosidickými vazbami. I tento polysacharid se nachází v buněčných stěnách hub a kvasinek [12]. Oba výše zmíněné polysacharidy jsou v buněčné stěně hub obsaženy v proteinové matici, která může být degradována proteinázou [3].

Ethylen je fytohormon důležitý ve vývoji rostlin, například stimuluje růst listů, květů a plodů [13]. Avšak za abiotických podmínek, jako je sucho nebo zasolení, dochází k jeho nadměrné produkci, což vyvolává nežádoucí účinky, například stárnutí a odlupování listů nebo vadnutí květů. Mechanismus nepřímé podpory růstu rostlin spočívá v produkci ACC-deaminázy, což je enzym degradující 1-aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinu, která v rostlině funguje jako prekurzor pro tvorbu ethylenu. Tím dochází k inhibici syntézy nadměrného množství ethylenu, což snižuje celkovou stresovou reakci rostliny [3].

Následující mechanismus spočívá v produkci těkavých látek, které následně ovlivňují růst rostlin. Například zástupci z rodu *Bacillus* produkují 3-hydroxybutanon a 2,3-butandiol, což jsou sloučeniny s inhibičními účinky na houbové patogeny. Zástupci také z rodu *Bacillus*, či *Pseudomonas* jsou schopni vylučovat kyanovodík, který způsobuje inhibici růstu nežádoucích okolních rostlin, přičemž pro hostitelskou rostlinu je neškodný [3].

V neposlední řadě jsou PGPR schopné také produkovat extracelulární polysacharidy, neboli exopolysacharidy (EPS), které jsou klíčové při přilnutí bakterií na kořeny rostlin a tvorbě biofilmu. Kromě toho hrají roli v zadržování vody v rhizosféře, zejména pokud jsou přítomné polysacharidy v hydratovaném stavu, tedy ve formě hydrogelu, čímž dochází k ochraně rostlin před suchem. Většina EPS bývá přítomna ve formě aniontu, kvůli přítomnosti pyruvátové, fosfátové, či síranové skupiny. Tyto polymery jsou často kyselé, jelikož obsahují karboxylové a hydroxylové skupiny [14]. Z těchto skutečností plyne jejich afinita ke kationtům kovů, což může vést k separaci těžkých kovů jak z rostlin, tak i z půdy [15]. Mezi bakterie produkující extracelulární polysacharidy patří zástupci z rodu *Bacillus*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, či *Streptococcus* [3].

Indukovaná systémová rezistence (ISR) představuje další nepřímý mechanismus podpory růstu rostlin prostřednictvím rhizobakterií. Jedná se o nespecifické posílení obranyschopnosti rostlin vůči působení bakteriálních, virových, či houbových patogenů. Zisk této vlastnosti je vyvolán působením specifických environmentálních podnětů, jako jsou již dříve zmíněné siderofory, lipopolysacharidy, 3-hydroxybutanon nebo 2,4-butandiol. ISR má za následek spuštění obranných enzymů, včetně výše zmíněné chitinázy a  $\beta$ -glukanázy, stejně jako řady dalších enzymů, například katalázy, peroxidázy nebo lipoxygenázy [1; 3]

### 2.1.3 Modelový organismus *Azotobacter vinelandii*

Zástupci z rodu *Azotobacter* představují striktně aerobní, nepatogenní bakterie, jejichž morfologie je polymorfní [5]. Konkrétně mají oválný až kulovitý tvar s velikostí 2 až 10  $\mu\text{m}$  na délku a 1 až 2  $\mu\text{m}$  na šířku [16]. Jedná se o gramnegativní bakterie, z čehož plyne, že jejich buněčná stěna je složena ze dvou vrstev: vnitřní peptidoglykanové a vnější lipopolysacharidové membrány [17]. Růst a vývoj těchto bakterií je citlivý na teplotu a kyselé pH [16].

Bakterie rodu *Azotobacter* jsou hojně zastoupeny v půdě, kde podporují růst rostlin přímými i nepřímými mechanismy. Přímé mechanismy zahrnují schopnost fixace dusíku a uvolňování jeho přebytečného množství do půdy. Dále mají schopnost produkce fytohormonů, jako jsou auxiny (zejména IAA), cytokiny a gibereliny. Bakterie rodu *Azotobacter* rovněž produkují siderofory, které působí přímým i nepřímými mechanismy. Dochází k zpřístupnění železa rostlinám, inhibici růstu patogenů, jejichž růst je na železe závislý, a eliminaci těžkých kovů

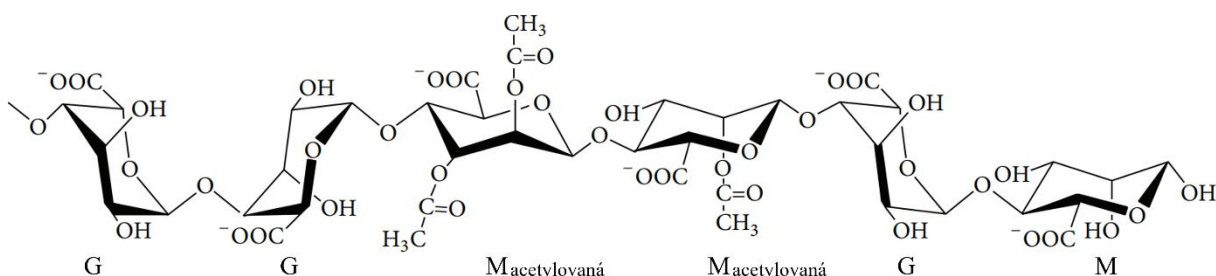
z půdy. Kromě toho syntetizují tyto bakterie různé exopolysacharidy a antimikrobiální látky, které působí proti nežádoucím patogenům [16].

*Azotobacter vinelandii* je modelový organismus významný pro studium fixace dusíku, respirace a dalších metabolických aktivit. Tento zástupce obsahuje tři různé typy nitrogenáz, lišících se přítomným kofaktorem, který může obsahovat buď molybden a železo, vanad a železo nebo samotné železo. Tato variabilita nitrogenáz je výhodná, protože umožňuje bakterii fixovat dusík i za podmínek, kdy nějaký z kofaktorů chybí [5]. Fixaci dusíku inhibuje přítomnost kyslíku, avšak kvůli vysoké rychlosti respirace v porovnání s ostatními bakteriemi za obdobných podmínek, dochází k udržení nízkých koncentrací intracelulárního kyslíku. Tím je umožněna fixace  $N_2$  i při vysokých koncentracích extracelulárního kyslíku [18]. Schopnost fixace vzdušného dusíku umožňuje růst těchto bakterií v minimálním médiu bez zdroje dusíku [19]. Další výhodou tohoto organismu je schopnost růst na široké škále uhlíkových substrátů jako jsou sacharidy, organické kyseliny a alkoholy [20]. *Azotobacter vinelandii* rovněž produkuje různé druhy sideroforů, například azotobactin. Jedná se o neonově zelenou látku syntetizovanou za nedostatku železa, která je schopná vázat nejen železo, ale také molybden a vanad [21]. V neposlední řadě syntetizuje tato bakterie užitečné biopolymery, konkrétně intracelulární poly-3-hydroxybutyrát (PHB), který funguje jako zásobní polymer, a extracelulární alginát, chránící bakterii před vysycháním [5].

#### 2.1.3.1 Alginát

Alginát je lineární aniontový polysacharid složený z kyseliny  $\beta$ -D-manuronové (M) a jejího epimeru kyseliny  $\alpha$ -L-guluronové (G), propojených  $\beta$ -1,4-glykosidickou vazbou (obrázek 2) [22]. Molekulová hmotnost komerčně dostupného alginátu sodného se pohybuje mezi 32 a 400 kDa [23]. Tento polymer lze extrahovat z hnědých mořských řas, konkrétně rodu *Laminaria* nebo *Macrocystis*. Nicméně izolovaný alginát vykazuje širokou distribuci molekulové hmotnosti, poměru a rozložení M a G jednotek. Pro získání alginátu s přesnými vlastnostmi, jako je molekulová hmotnost, distribuce M a G jednotek a stupeň acetylce, se upřednostňuje bakteriální produkce. Alginát je vylučován bakteriemi, čímž tvoří vnější obal buněčné stěny, což jim poskytuje ochranu před vysycháním. U bakteriemi produkováného alginátu dochází k různému stupni acetylce M-jednotek. Bakterie schopné syntetizovat extracelulární alginát náleží do rodu *Pseudomonas* nebo *Azotobacter* [5; 18; 24].

Alginát je netoxický, biokompatibilní a biodegradabilní polysacharid, který nachází uplatnění v medicíně jako materiál pro vlhké hojení ran nebo ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu jako zahušťovadlo a stabilizátor [24]. Savci však nejsou schopni alginát odbourat, protože jim chybí enzym zvaný algináza [23]. Alginát také lze využít k obalení bakterií podporujících růst rostlin, přičemž u bakterií produkujících alginát je možná jejich enkapsulace přímo. Enkapsulace alginátu slouží k regulaci koncentrace kyslíku nebo k ochraně před suchem [5].

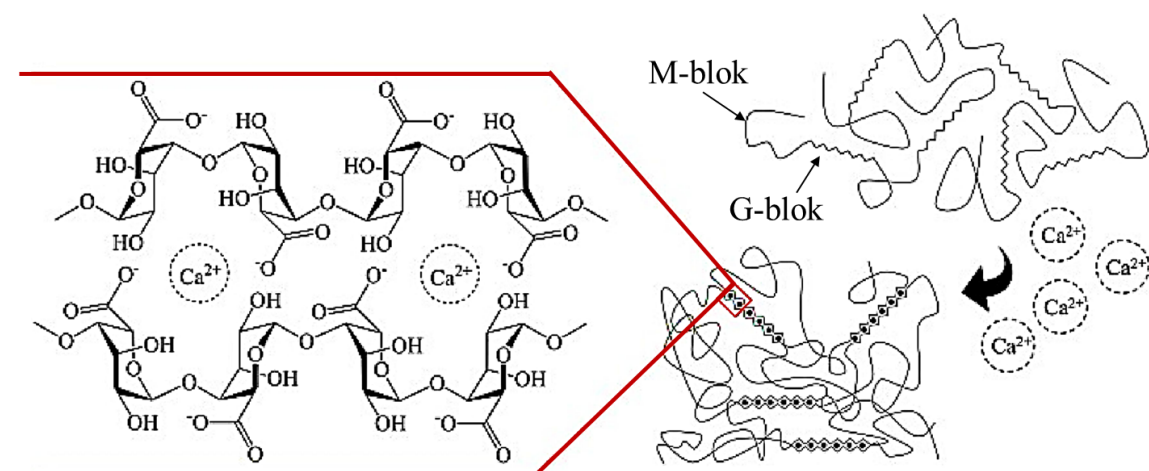


Obrázek 2: Struktura alginátu, kde G označuje kyselinu  $\alpha$ -L-guluronovou a M kyselinu  $\beta$ -D-manuronovou [24].

Syntézu bakteriálně produkovaného alginátu graficky znázorňuje obrázek 5. Výchozí molekulou této syntézy je fruktóza-6-fosfát, která je prostřednictvím enzymu fosfomanózaizomeráza (PMI-GMP, AlgA) izomerizována na manózu-6-fosfát. Tato manóza-6-fosfát je dále transformována fosfomanomutázou (PMM, AlgC) na manóza-1-fosfát. Další reakce se opět účastní enzym PMI-GMP, a vzniká GDP-manóza, která je následně oxidována GDP-manózadehydrogenázou (GMD, AlgD) na kyselinu GDP-manuronovou. Polymerací této kyseliny pomocí enzymu manuronátová polymeráza (MP, Alg8) vzniká polymanuronová kyselina. Tato kyselina může dále podléhat acetylaci nebo epimerizaci za vzniku guluronátu. U bakterie *Azotobacter vinelandii* následuje sedm reakcí, které vedou k vytvoření výsledného alginátu [22; 24].

Alginát se vyznačuje schopností vytvářet hydrogely, přičemž jejich vlastnosti jsou závislé na chemickém složení, molekulové hmotnosti polymeru a typu síťování. Nejčastěji využívaným mechanismem pro síťování alginátu je iontové síťování, jehož principem je snížení elektrostatického odpuzování mezi karboxylovými kyselinami alginátu, přičemž mezi kationtem a kyselinou vzniká iontová vazba [25]. Tyto vazby vznikají jen mezi G-jednotkami alginátu a kationty, protože G-jednotky poskytují vysoký stupeň koordinace kationtů. Výsledný gel je tím pevnější a křehčí, čím více G-jednotek obsahuje, a naopak, čím více M-jednotek, tím měkčí, ale pružnější hydrogel (obrázek 3) [23; 26]. Kromě toho jsou výsledné vlastnosti hydrogelu závislé na molekulové hmotnosti alginátu, protože čím vyšší molekulová hmotnost, tím pevnější hydrogel, avšak nad 240 kDa je závislost pevnosti na molekulové hmotnosti zanedbatelná [25].

Nejčastěji využívaným síťovacím činidlem pro alginát je kation vápenatý ( $\text{Ca}^{2+}$ ), konkrétně ve formě  $\text{CaCl}_2$ . Tyto hydrogely vznikají rychle, ale jsou méně uspořádané. Pro zpomalení gelace a tedy i vznik uspořádanějších a pevnějších gelů se používají pufrы obsahující fosfátové skupiny, které kompetitivně reagují s  $\text{Ca}^{2+}$  ionty, nebo lze využít  $\text{CaCO}_3$ , který je sice ve vodném prostředí nerozpustný, avšak po přidavku D-glukono- $\delta$ -laktonu (GDL) dochází postupně k uvolňování potřebných  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, čímž vzniká uspořádaný hydrogel. Kromě  $\text{Ca}^{2+}$  lze k síťování využít i další kationty ( $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , atd.), včetně trojmocných ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) i jednomocných ( $\text{H}^+$ ). Mechanismus gelace prostřednictvím  $\text{H}^+$  je dán protonací karboxylových kyselin alginátových jednotek, příkladem použitelného síťovacího činidla je samotné GDL. Zde je síťování alginátu závislé na hodnotě pH jeho roztoků, jelikož platí, že čím nižší pH, tím pevnější hydrogel, protože dochází k většímu množství interakcí a také vzniku většího počtu vodíkových můstků [23; 25].

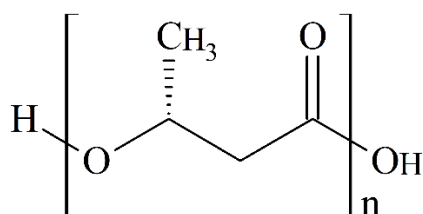


Obrázek 3: Schéma gelace alginátu prostřednictvím  $\text{Ca}^{2+}$  [27].

### 2.1.3.2 Poly-3-hydroxybutyrát (PHB)

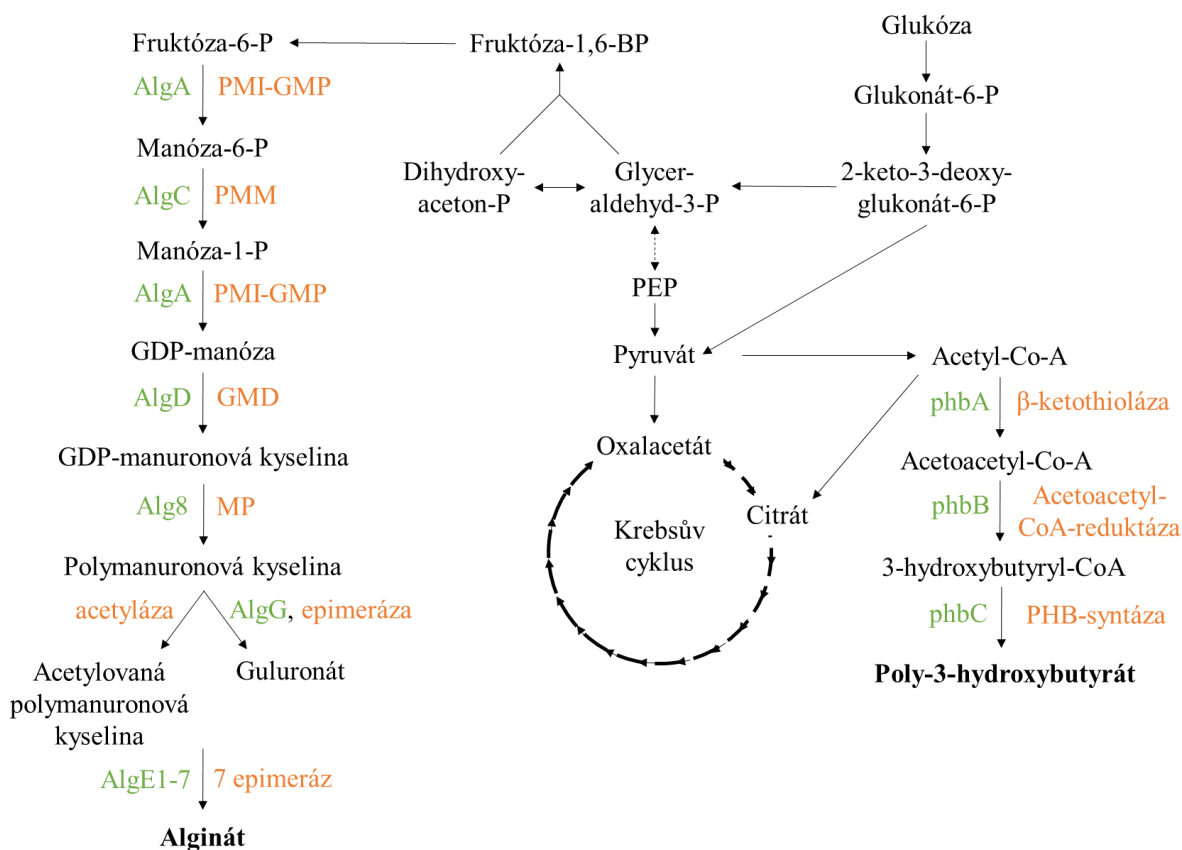
Poly-3-hydroxybutyrát se skládá z monomerů 3-hydroxybutyrátu, které jsou spojeny esterovou vazbou (obrázek 4). Tento polymer patří do skupiny polyhydroxyalkanoátů (PHA) s krátkým řetězcem. Některé gramnegativní i grampozitivní bakterie mohou syntetizovat PHB za nevyvážených podmínek, kdy je v médiu přebytek uhlíku, ale nedostatek dalších živin, jako je kyslík, fosfor nebo draslík [28; 29]. Produkce intracelulárního PHB ve formě ve vodě nerozpustných granulí slouží bakteriím jako zásobárna uhlíku a energie. Tyto granule mohou představovat až 80 % celkové hmotnosti buněk v suchém stavu [28].

Syntéza PHB vychází z acetyl-CoA, kde  $\beta$ -ketothioláza (phbA) katalyzuje kondenzaci dvou acetyl-CoA, což vede ke vzniku acetoacetyl-CoA. Následně acetoacetyl-CoA-reduktáza (phbB) redukuje acetoacetyl-CoA na 3-hydroxybutyryl-CoA za současné oxidace molekuly NADPH. 3-hydroxybutyryl-CoA je základním monomerem pro tvorbu poly-3-hydroxybutyrátu prostřednictvím PHB-syntázy (phbC) (obrázek 5) [22; 30]. Mezi bakterie schopné produkovat PHB patří zástupci rodu *Cupriavidus*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* a další [29].



Obrázek 4: Struktura poly-3-hydroxybutyrátu [29].

Poly-3-hydroxybutyrát je netoxický, biokompatibilní a biodegradabilní polymer, jehož termoplastické vlastnosti jsou srovnatelné s polyethylenem nebo polypropylenem [30]. PHB je pevný, ale křehký semikrystalický materiál s vysokým stupněm krystalinity. Molekulární hmotnost se pohybuje v rozmezí 10 až 3000 kDa [28; 29]. Z těchto jeho vlastností plyne jeho možné využití jako alternativa k dnes hojně používaným syntetickým polymerům, což může přispět ke snížení množství používaných syntetických polymerů a tím také k menšímu zatížení životního prostředí [31].



Obrázek 5: Schéma syntézy alginátu a PHB bakterií *Azotobacter vinelandii* (upraveno) [22].

## 2.2 Elektronová mikroskopie

Vynálezu prvního elektronového mikroskopu předcházela řada důležitých objevů, které umožnily jeho sestavení. Prvním z těchto důležitých objevů bylo popsání záporně nabitých částic, které později dostaly název elektrony, a to anglickým fyzikem J.J. Thomsonem v roce 1897. Dalším významným krokem bylo zjištění L. de Broglie v roce 1924, že dualismus vlny a částice platí také pro elektrony, a sestavil rovnici, která popisuje vztah mezi vlnovou délkou  $\lambda$  a hmotností elektronu  $m_e$ , kde  $\hbar$  je Planckova konstanta a  $v$  rychlost elektronu (rovnice 1). V roce 1926 H. Busch navázal na tyto poznatky a zjistil, že na elektron v magnetickém poli působí síla  $\vec{F}$ , je-li úhel  $\alpha$  mezi vektorem rychlosti elektronu  $\vec{v}$  a vektorem magnetické indukce pole  $\vec{B}$  nenulový. Tato síla zapříčiňuje zakřivení dráhy elektronu (rovnice 2). Toto zjištění vedlo k vytvoření elektromagnetické čočky, která slouží k vychýlení dráhy elektronů. Všechny tyto objevy byly potřebné k tomu, aby roku 1932 němečtí vědci E. Ruska a M. Knoll sestavili první transmisní elektronový mikroskop. Skenovací elektronový mikroskop byl poprvé sestaven o šest let později M. von Ardenem. Vývoj elektronové mikroskopie umožnil studovat vzorky při větším zvětšení a s větší rozlišovací schopností [32].

$$\lambda = \frac{\hbar}{m_e \cdot v} \quad (1)$$



$$\vec{F} = e \cdot \vec{v} \times \vec{B} \cdot \sin \alpha \quad (2)$$

Elektrony jsou částice s hmotností zanedbatelně malou ve srovnání s hmotností protonů či neutronů. Díky jejich zápornému náboji mohou být urychleny elektrickým napětím  $U$ , což vytváří kinetickou energii, která je dána rovnicí 3. Ze spojení této rovnice s de Broglieho rovnicí (rovnice 1) plyne, že vlnová délka  $\lambda$  urychlených elektronů je nepřímo úměrná hmotnosti elektronu  $m_e$  a také použitému napětí  $U$ , jak ukazuje rovnice 4 [32].

$$e \cdot U = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 \quad (3)$$

$$\lambda = \frac{\hbar}{\sqrt{2 \cdot m_e \cdot e \cdot U}} \quad (4)$$

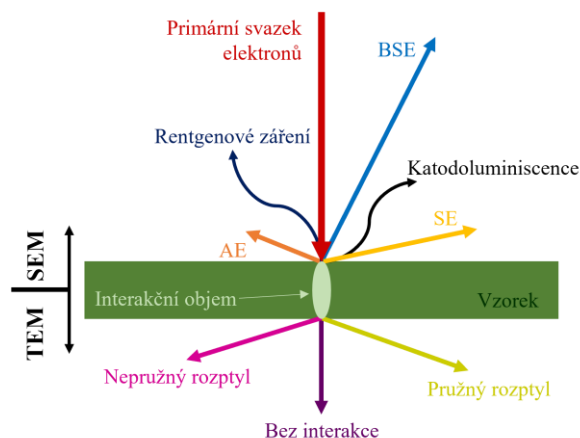
Využití elektronů v elektronové mikroskopii umožňuje větší zvětšení a rozlišení díky jejich kratší vlnové délce oproti viditelnému světlu používanému v optických mikroskopech. Rozlišovací schopnost mikroskopů je funkcí vlnové délky a je dána rovnicí 5, kde  $\lambda$  představuje vlnovou délku použitého záření,  $n$  označuje index lomu a  $\alpha'$  je poloviční aparturní úhel čočky. Zjednodušením výrazu, kdy je jmenovatel roven jedné, získáme rozlišovací schopnost rovnu přibližně polovině vlnové délky daného záření. To znamená, že pro viditelné světlo má rozlišovací schopnost stovky nanometrů, zatímco pro elektrony je teoreticky tato schopnost v řádech pikometrů [33].

$$\text{Rozlišovací schopnost} = \frac{0,61 \cdot \lambda}{n \cdot \sin \alpha'} \quad (5)$$

Proud elektronů představuje ionizující záření, které disponuje dostatečnou energií na odtržení elektronu z elektronového obalu atomu. Když primární svazek elektronů interaguje se vzorkem, generuje různé užitečné signály (obrázek 6). Signály, které jsou uvedeny nad vzorkem (obrázek 6) využívá skenovací elektronová mikroskopie, patří sem sekundární elektrony (SE), zpětně odražené elektrony (BSE), Augerovy elektrony (AE), rentgenové záření a katodoluminiscence. Oproti tomu signály, které jsou zobrazeny pod vzorkem (obrázek 6), jsou využívány v transmisní elektronové mikroskopii a jedná se o pružně a nepružně rozptýlené elektrony [34].

Sekundární elektrony vznikají předáním části energie primárního svazku elektronu s nižší energií obsaženém ve vzorku, čímž ho ionizuje a dodává mu malou kinetickou energii. Tyto SE nesou informace o topografii vzorku. Zpětně odražené elektrony pocházejí z větší hloubky vzorku než SE a poskytují informace o povrchu vzorku a jeho složení, jelikož je jejich produkce úměrná protonovému číslu daného atomu ve vzorku. Při tvorbě sekundárních elektronů došlo k vyzáření elektronu z nižší hladiny, což je energeticky nestabilní stav. Proto dochází k přechodu elektronu z vyšší hladiny do nižší, čímž je zaplněno prázdné místo, přitom dojde pro daný atom k vyzáření charakteristického rentgenového záření, které nese informace o složení vzorku. Tato metoda se nazývá energiově disperzní spektroskopie (EDS). Augerovy elektrony jsou vytvořeny obdobným způsobem a také poskytují informaci o prvkovém složení vzorku. Kromě toho může dojít po dopadu primárních elektronů na vzorek k jevu zvanému katodoluminiscence, neboli k emisi fotonů [35; 36].

Při interakci elektronů se vzorkem dochází také k jejich rozptylu. Pružný rozptyl elektronů vede ke změně jejich směru, ale nedochází ke ztrátě energie, vlnová délka je tedy zachována. Oproti tomu nepružný rozptyl elektronů způsobuje ztrátu energie, z čehož vyplývá změna jejich vlnové délky. Rozptyl elektronů ovlivňuje tloušťka vzorku, přičemž platí, že čím tlustší je vzorek, tím delší je dráha elektronů, což vede k jejich mnohonásobnému rozptylu, a to jak pružnému, tak nepružnému. Dojde-li vlivem nepružných rozptylů ke ztrátě veškeré energie je elektron vzorkem absorbován. Část vzorku, do které prostupují primární elektrony, se nazývá interakční objem, který roste s energií elektronů a klesá s rostoucím atomovým číslem. Poslední možností je, že elektrony s látkou při průchodu vůbec neinteragují [34].



Obrázek 6: Schéma signálů generovaných po interakci primárního svazku elektronů se vzorkem [34].

### 2.2.1 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Skenovací elektronová mikroskopie slouží zejména k analýze povrchu vzorku. K tomu se využívá pohyblivý svazek elektronů, který proniká do vzorku a generuje signály, jež jsou následně zpracovány pro vytvoření detailního obrazu. Tyto signály zahrnují nejen zpětně odražené a sekundární elektrony, které jsou klíčové v tvorbě výsledného obrazu, ale jak již bylo zmíněno výše (kapitola 2.2), dochází k emisi i dalších typů záření, které mohou být využity pro analýzu prvkového složení vzorku nebo určení orientace krystalů. Významnou výhodou SEM oproti optickému mikroskopu je vysoké rozlišení, které se pohybuje pod 10 nm, u nejlepších verzí mikroskopů lze dosáhnout rozlišení i 1 nm [37; 38].

Schéma skenovacího elektronového mikroskopu znázorňuje obrázek 7. Zdrojem elektronů je tzv. elektronové dělo, které slouží k vytvoření stabilního elektronového svazku. Skládá se z katody, která může být ve formě žhaveného wolframového vlákna, jenž je vytvarováno do písmene „V“ a lze jej považovat za relativně levný typ katody [37]. Dalším možným zdrojem elektronů je krystal z hexaboridu lanthanu ( $\text{LaB}_6$ ), který ale vyžaduje vyšší vakuum než wolframové vlákno [33]. Oproti tomu u autoemisních zdrojů probíhá emise především elektrickým polem, patří sem zdroje vysokoteplotní a zdroje pracující při laboratorní teplotě. Obecně autoemisní zdroje vytvářejí více koherentní svazek elektronů než předchozí termoemisní [39]. Pro termoemisní zdroje obecně platí, že na vlákno je přivedeno vysoké záporné napětí a stejnosměrný proud, což má za následek ohřátí kovového vlákna a emisi elektronů. Optimální teplota je pro každý typ vlákna odlišná, ale vždy je nejvhodnější dosáhnout bodu nasycení vlákna, což je teplota, při níž je emitován nejvyšší počet elektronů.

Při dalším zahřívání počet emitovaných elektronů již neroste a dochází k přesycení, které má za následek poškození vlákna. Emitované elektrony se šíří do všech směrů, pro jejich usměrnění se používá Wehneltův válec. Následně jsou elektrony přitahovány k uzemněné anodě, která má tvar disku s kruhovým otvorem uprostřed [37; 40].

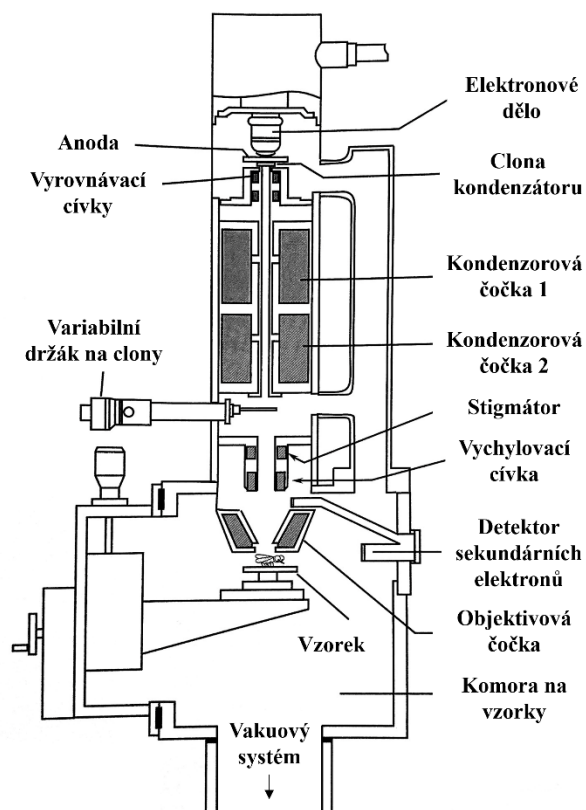
Tímto otvorem v anodě následně prochází část elektronového svazku dále ke kondenzorovým čočkám, jejichž role spočívá ve zpřesnění svazku na výstupu ze systému čoček. Počet použitých čoček se odvíjí od potřebné rozlišovací schopnosti, avšak standartně se používá série dvou až tří čoček. Elektromagnetické čočky vykazují různé typy vad, které snižují výsledné rozlišení. Mezi tyto vady patří sférická aberace, která je způsobena tvarem čoček, kdy dochází k výraznějšímu lomu paprsku na okraji než uprostřed čočky, což má za následek jiné zvětšení okrajů a středu obrazu. Pro odstranění této vady se používají clony, které odstiňují okrajové části paprsku nebo také lze zmenšit ohniskovou vzdálenost. Další vadou je chromatická aberace, která souvisí s nejednotnou energií elektronů. Elektrony s nižší energií, tedy s delší vlnovou délkou mají ohnisko blíže než elektrony s energií vyšší, to má za následek opět snížení rozlišení. Řešením tohoto typu vady je například použití monochromátoru. Poslední vadou je astigmatismus, který je způsoben nedokonalostmi geometrie čočky a také nečistotami na čočkách či v mikroskopu, které se nabíjí a tím ovlivňují svazek elektronů. Dochází k tomu, že paprsky z bodového elektronového svazku se po průchodu čočkou neprotnou opět v jednom bodě, což je způsobeno tím, že elektromagnetické pole čočky je silnější v jednom směru, což má za následek eliptické zobrazení kulovitých objektů. Pro korekci této vady je v mikroskopu umístěn stigmátor. Jeho funkce spočívá v přívodu malého protilehlého pole v opačném směru, než ve kterém dochází k astigmatismu, a výsledkem je kulatý elektronový svazek [37; 41].

Po soustavě kondenzorových čoček pokračuje elektronový svazek přes vychylovací cívku, která vychyluje elektronový svazek, jenž následně skenuje vzorek bod po bodu, čímž vzniká výsledný obdélníkový rastr. Poté prochází konečnou objektivovou čočkou až na vzorek, který je připevněn na uzemněný kovový nosič, aby nedocházelo k hromadění náboje a tepla. Interakcí svazku se vzorkem dochází ke generování různých signálů, především k emisi sekundárních elektronů, které se šíří do všech směrů. Často používaným detektorem je Everhart-Thornleyho elektronový detektor, jenž se skládá z kovové mřížky, na které je udržováno kladné napětí, kvůli kterému jsou SE s nízkou energií přitahovány. Tyto elektrony jsou dále ještě více přitahovány scintilátorem, na který je umístěno ještě vyšší kladné napětí. Scintilátor je fosforeskující materiál, který přeměňuje dopadající elektrony na fotony. Vzniklé fotony jsou následně světlovodem přivedeny na fotonásobič, který příchozí signál zesílí [37; 42].

Kontrast výsledného obrazu je tvořen 3 základními složkami. První je topografický kontrast vycházející z nerovností povrchu, místa položená blíže detektoru jsou světlejší než místa vzdálenější. Další složkou je hranový kontrast, při kterém jsou hrany výrazně světlejší než plochy, jelikož na hranách dochází k větší emisi SE. Poslední a nejdůležitější složkou pro interpretaci kontrastu je materiálový kontrast, který souvisí s protonovým číslem, protože emise BSE je přímo úměrná protonovému číslu, což znamená, že prvky s nižším protonovým číslem budou tmavší než prvky s vysokým protonovým číslem [37; 42].

Poslední neméně důležitou částí skenovacího elektronového mikroskopu je vakuový systém, který se skládá z řady vývěv, ventilů a ochranných prvků. Jeho úkolem je udržování vakua od

elektronového děla až po komoru se vzorkem, čímž dochází ke chránění katody před oxidací, zabránění kolizí elektronového svazku s molekulami plynu, a také k ochraně vzorku před kontaminací [37].



Obrázek 7: Schéma zobrazující hlavní části skenovacího elektronového mikroskopu [37].

### 2.2.1.1 Chemická příprava biologických vzorků pro SEM

Obecně platí, že vzorky pro skenovací elektronovou mikroskopii by měly být vodivé, mechanicky i tepelně stabilní a v neposlední řadě bezvodé, aby nedocházelo ke zhoršení vakua a tím i obrazu vlivem odparu vody ze vzorku [43]. Avšak tyto podmínky biologické vzorky nespĺňují, proto musí projít řadou procesů, aby je bylo možné pozorovat v SEM. Během chemické přípravy musí biologické vzorky projít očištěním povrchu, fixací ultrastruktury, která vzorky chrání před smrštěním v průběhu následujícího sušení. Poté jsou vzorky připevněny na nosič a nakonec je možné pokovit jejich povrch. Až po těchto úkonech může být vzorek přesunut do komory skenovacího elektronového mikroskopu a pozorován [44]. Velikost vzorku pro SEM je často omezena pouze velikostí vzorkové komory, protože zde není nutné, aby fixační činidla penetrovala celým vzorkem, jelikož bude pozorován pouze jejich povrch. Problém může nastat u vzorků, které jsou v průběhu přípravy řezány kvůli odhalení vnitřní struktury. V tomto případě musí být vzorek dostatečně malý (do 1 mm<sup>3</sup>), proto aby bylo možné jej kompletně prosytit fixačními činidly [33].

Prvním krokem chemické přípravy biologických vzorků je čištění povrchu od nečistot, proto aby při další manipulaci se vzorkem nedocházelo k jejich fixaci, což by mělo za následek zakrytí struktury povrchu vzorku. Nečistoty se nejčastěji odstraňují oplachem roztokem pufru, který je vhodný pro daný vzorek. Vhodný pufr znamená, že musí mít optimální pH, teplotu

a osmotickou sílu, tak aby nedocházelo k poškození vzorku [37]. Mezi nejčastěji používané pufrů patří fosfátový nebo kakodylanový pufr [33].

Dalším krokem chemické přípravy je fixace. Jejím cílem je stabilizace a imobilizace jednotlivých složek vzorku, proto aby nedocházelo ke změně jeho struktury nebo k jeho poničení. Fixace může být až dvoukrokový proces, kdy k primární fixaci dochází pomocí aldehydů, které síťují proteiny, poté následuje sekundární fixace pomocí sloučenin těžkých kovů, které reagují s nenasycenými mastnými kyselinami [43]. I u fixačních činidel je třeba dbát na optimální složení, proto jsou tato činidla připravena v roztoku vhodného pufru. Nejčastěji používanými aldehydy pro primární fixaci je glutaraldehyd, formaldehyd a jejich směs. Systematický název glutaraldehydu je pentandial, z čehož plyne, že se jedná o molekulu obsahující na každém svém konci aldehydickou skupinu. Této skutečnosti se využívá právě pro fixaci, kdy mohou reagovat obě aldehydické skupiny a síťovat tak přítomné proteiny, u kterých zůstává zachována terciální struktura. Nevýhodou tohoto činidla je jeho pomalé pronikání do vzorku a při vyšších koncentracích vykazuje denaturační účinky [37]. Druhým často používaným aldehydem je formaldehyd, neboli methanal, který naopak do biologických vzorků proniká rychle, protože se jedná o malou molekulu, avšak kvalita fixace je oproti vzorkům fixovaným glutaraldehydem nižší, jelikož obsahuje pouze jednu aldehydickou skupinu [41]. Použití směsi těchto dvou aldehydů spojuje pozitiva formaldehydu, tedy rychlou fixaci, kterou je tkáň dočasně stabilizována, a glutaraldehydu, který sice proniká do vzorku pomaleji, ale síťuje jej kvalitněji. Tato směs se využívá především pro větší vzorky [45]. Použití sekundárních fixačních činidel je vhodné ze dvou důvodů. Prvním důvodem je další síťování vzorku, jelikož tato činidla oxidují nenasycené mastné kyseliny obsažené v membránách buněk. Zároveň dochází k redukci těžkého kovu fixačního činidla, což má za následek jeho ztmavnutí, které je důležité pro získání kontrastu. Často používaným sekundárním fixačním činidlem je oxid osmičelý, který sice do vzorku proniká pomaleji než dříve zmíněné aldehydy, ale kvůli své hodnotě molekulové hmotnosti poskytuje po interakci s elektronovým svazkem velké množství sekundárních elektronů, které jsou následně detekovány [37]. Kromě OsO<sub>4</sub> je možné také použít uranyl acetát nebo manganistan draselný. Primární i sekundární fixace se provádí buď ponořením vzorku do roztoku daného činidla nebo u některých činidel je možná fixace i v jeho parách. Speciální technikou fixace biologických preparátů je perfuzní fixace, při které dochází k prosycení vzorku činidlem pomocí cévního systému přítomného ve vzorku, jenž činidlo rozvede i do složitých vnitřních struktur [41].

Po fixaci vzorku je nutné jej opláchnout, aby došlo k vymytí nezreagovaného činidla a k odstranění pufrůvacích solí. Poté následuje sušení vzorku, které je důležité především u biologických vzorků, jež obsahují velké množství vody. Existují tři základní sušící metody, lyofilizace, metoda kritického bodu a sušení na vzduchu. U každé z těchto metod dochází více či méně ke smrštění vzorku, které je nežádoucí, proto je potřeba individuálně pro každý vzorek vybrat optimální metodu. Podstatou lyofilizace neboli sušení mrazem je rychlé zmrazení vzorku při teplotě minimálně  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a za vakua. Následně dochází k sublimaci ledu ze vzorku, kdy vznikající pára je buď odváděna vakuovým systémem nebo absorbována vysoušecím činidlem. Jakmile je proces sušení u konce, dojde ke skokovému zlepšení vakua. Při této metodě dochází sice pouze k malému smrštění vzorku, avšak metoda se příliš často nevyužívá z důvodu vzniku krystalické formy ledu [37; 41]. Druhou metodou je metoda kritického bodu, při které je

nejdříve veškerá voda obsažená ve vzorku substituována ethanolovou nebo acetonovou řadou, tedy roztoky s postupně rostoucí koncentrací vybraného činidla. Následně je vzorek dán do tlakové nádoby, ve které je ethanol nebo případně aceton substituován za kapalný oxid uhličitý. Poté za využití znalosti fázového diagramu daného rozpouštědla dochází k postupnému zvyšování teploty až nad hodnotu kritického bodu, což je kombinace tlaku a teploty, při které mizí rozhraní mezi kapalinou a plynem, a tudíž mizí povrchové napětí, které by mohlo vzorek poškodit. Po dosažení tohoto bodu je udržována konstantní teplota, ale postupně se snižuje tlak, což má za následek přechod kapalného CO<sub>2</sub> na plynný, který je postupně uvolňován z komory. Konec sušení je dán dosažením atmosférického tlaku, kdy veškerý kapalný CO<sub>2</sub> byl přeměněn v plyn, čímž byl vzorek vysušen [37]. Oxid uhličitý se pro tuto metodu využívá kvůli relativně nízké teplotě (31,1 °C) a tlaku (7,3 MPa) v kritickém bodě. Tato metoda je oproti lyofilizaci rychlá, ale může docházet k většímu smrštění vzorku [41]. Poslední metodou sušení vzorku je prosté sušení na vzduchu, které ale není vhodné pro vzorky, jež obsahují velké množství vody, jelikož by při sušení došlo k výraznému smrštění a tedy i ke zborcení struktury vzorku. Tuto metodu je možné použít pro vzorky obsahující kapaliny s nižším povrchovým napětím, než má voda, jako je například hexamethyldisilazan [37].

Takto fixovaný a dehydratovaný vzorek je připevněn na kovový nosič. Posledním krokem chemické přípravy vzorků může být potažení povrchu vzorku velmi tenkou vrstvou kovu nebo uhlíku. Výhoda této vrstvy spočívá v zabránění hromadění náboje, což by jinak mělo za následek vznik artefaktů na výsledném obrazu. Zároveň dochází k tepelné ochraně vzorku a také je tento povlak zdrojem detekovatelných sekundárních elektronů [37]. První metodou pokovení je naprašování, jejímž principem je srážka iontu nebo neutrálního atomu s dostatečnou energií s kovovým terčem ve vakuu. To má za následek, že některé atomy z terče dostanou dostatečnou energii na porušení vazeb, čímž dojde k jejich uvolnění, následně dopadají povrch na vzorku, kde tvoří vrstvu daného kovu. Druhou technikou pokovení je vakuové napařování. Daný kov je ve vysokém vakuu postupně zahříván až na teplotu, kdy dochází k postupnému odpařování jednotlivých atomů, které po styku s chladnějším vzorkem nazpět kondenzují a tvoří vrstvu kovu na jeho povrchu. [46].

### *2.2.1.2 Mrazová příprava biologických vzorků pro SEM*

Kryogenní skenovací elektronová mikroskopie, zkráceně cryo-SEM, spojuje klasickou skenovací elektronovou mikroskopii s kryogenními technikami, kdy oproti chemické přípravě vzorků (kapitola 2.2.1.1) nedochází k přidavku žádné cizorodé látky, ale biologický vzorek je fixován fyzikální cestou, konkrétně rychlým zmrazením. Při cryo-SEM jsou vzorky nejen připraveny kryogenními technikami, ale také jsou v mikroskopu upevněny na speciální cryo-držák, jenž je v průběhu pozorování chlazen tekutým dusíkem. [33].

Prvním krokem mrazové přípravy vzorků je právě zmrazení, jehož průběh určuje úspěšnost celé přípravy. Jsou-li parametry mrazení vybrány správně, nedochází v jeho průběhu k porušení vnitřní struktury daného vzorku vlivem vzniku krystalického ledu. Cílem mrazení biologických vzorků je tvorba amorfni struktury ledu, která vzniká procesem nazývaným vitifikace. Hlavními parametry mrazení je rychlost mrazení a rychlost odvodu tepla ze vzorku. Biologické vzorky musejí být zamrazeny co nejrychleji, proto aby došlo k tvorbě amorfniho ledu, který nepoškozuje jejich strukturu. Oproti tomu rychlost odvodu tepla je dána schopností zabránit

vzniku takzvaného Leidenfrostova jevu, u kterého dochází při styku kapaliny s výrazně teplejším povrchem, ke vzniku izolační vrstvy páry této kapaliny, což následně prodlužuje i dobu zmrazení. Mezi používané kryogeny patří kapalný ethan, propan nebo dusík. Nevýhodou kapalného dusíku je blízká hodnota teploty varu a tání, kvůli čemuž může dojít po kontaktu se vzorkem ke vzniku Leidenfrostova jevu. Tento jev lze potlačit buď aplikací vysokého tlaku během mrazení nebo použitím tzv. *slush* N<sub>2</sub>, což je systém obsahující jak kapalný, tak pevný dusík, který zmenšuje tloušťku izolační vrstvy páry [47]. Oproti tomu nevýhodou ethanu a propanu je hořlavost jejich par, proto je při práci s těmito kryogeny potřeba výrazné obezřetnosti [33].

Zmrazení biologických vzorků může být uskutečněno mnoha metodami. Mezi metody probíhající za atmosférického tlaku patří imerzní kryofixace, při které je vzorek upevněný na kovový nosič, rychle ponořen do kapalného kryogenu. Vzorky pro tuto metodu musí být tenké, jelikož hloubka správného zmrazení je 1 až 3 μm. Další možností je sprejování suspenze vzorku do chladícího média. Tento způsob může být vylepšen proudem kryogenu nebo pohybem vzorku v kryogenu, kdy obě tato vylepšení způsobují rychlejší odvod tepla ze vzorku, jelikož dochází k menšímu ohřevu okolního média. Třetí metodou probíhající za atmosférického tlaku je mrazení pomocí kovového zrcadla, při které dochází ke styku povrchu vzorku s velmi vychlazeným kovovým předmětem, čímž dojde k zmrazení povrchu vzorku. Tato metoda je účinná do hloubky vzorku 5 až 10 μm. Poslední možností mrazení je vysokotlaké mrazení, při kterém, jak název napovídá, dochází k rychlému zmrazení vzorku pod vysokým tlakem a při velmi nízké teplotě kryogenu, konkrétně kapalného dusíku. Při těchto podmínkách dochází k výraznému zvýšení hustoty vody, což potlačuje vznik ledových krystalů, proto může mrazení probíhat pomaleji oproti metodám probíhajícím za atmosférického tlaku. Vysokotlaké mrazení je účinné do tloušťky vzorku rovné 0,2 mm [33; 48]. Další manipulace se zmrazenými vzorky musí probíhat za kryogenních teplot, proto aby nedošlo k rekrystalizaci ledu, či tvorbě exogenního ledu na povrchu [47].

Dalším krokem mrazové přípravy biologických vzorků pro cryo-SEM je lámání, které umožní odkrytí vnitřní struktury vzorku. Lámání lze provést pomocí chlazeného skalpelu nebo kryoultramikrotomem [47]. K lomu dochází v místech s nižší mechanickou pevností, u biologických vzorků je to nejčastěji podél buněčných membrán [33].

Po lámání vzorku následuje krok sublimace, který se provádí ze dvou důvodů. Prvním je sublimace exogenního ledu, který vznikl na povrchu vzorku během předchozí přípravy. Druhým důvodem je odstranění endogenního ledu po lomu vzorku, což má za následek zvýraznění vnitřní struktury. Během sublimace dochází ke kontrolovanému nárůstu teploty na určitou dobu, avšak i při této teplotě je vzorek stále hluboce zmrazen [47]. Neobsahuje-li SEM aparaturu pro kryogenní SEM, může být vzorek dále podroben lyofilizaci [33].

Pro zlepšení signálu a snížení nabíjení vzorku může být i zmrazený vzorek potažen vrstvou vodivého kovu. Pro cryo-SEM je ideální technikou naprašování, jelikož při této metodě nedochází k ohřevu vzorku. Krok pokovení vzorku je možné vynechat, je-li následně v SEM nastavena nízká hodnota proudu a napětí, která zabrání poškození vzorku [47].

Mezi nedostatky mrazové přípravy biologických vzorků patří potřeba práce s tenkými vzorky, které jsou nutné pro dosažení optimálního a rychlého zmrazení. Čím větší vzorek je, tím obtížněji dochází k vitrifikaci [47]. S tímto problémem souvisí také tvorba krystalické

formy ledu. Cílem zmrazení je přeměna kapalně vody ve vzorku na amorfni led, což je u biologických vzorků obsahujících velký podíl vody obtížnější, jelikož tento amorfni led se rychle přeměňuje na organizovanou krystalickou strukturu, která deformuje a poškozuje strukturu daného vzorku [49]. Naopak mezi výhody patří rychlost přípravy vzorků obzvláště v porovnání s chemickou metodou, která je časově náročná. A také nedochází k přidavku dalších chemikálií, které by mohly způsobit změnu nativní struktury vzorku, jako je například denaturace proteinů [33].

### 2.2.2 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Transmisní elektronová mikroskopie je prozařovací technika, která poskytuje informace z vnitřní struktury vzorku. Tloušťka připraveného vzorku se liší v závislosti na typu vzorku, ale také na energii elektronového svazku. Pro všechny vzorky však platí, že musejí být elektrontransparentní. Po dopadu elektronového svazku na vzorek dochází k elektronovému rozptylu, jenž je buď pružný nebo nepružný. Nepružný rozptyl má za následek ztrátu energie, což by v případě tlustších vzorků znamenalo absorpci elektronu [50].

Konstrukci transmisního elektronového mikroskopu lze rozdělit na tři základní části. První částí je osvětlovací systém, který se skládá z komponent, které generují svazek elektronů a dále jej fokusují na vzorek. Poté následuje systém pro manipulaci se vzorkem, který zahrnuje komponenty důležité pro správné umístění vzorku v komoře, případně i jeho natáčení. Poslední nejnižší položenou částí je zobrazovací systém sloužící k tvorbě obrazu ze signálů generovaných interakcí vzorku s elektronovým svazkem (obrázek 8) [37].

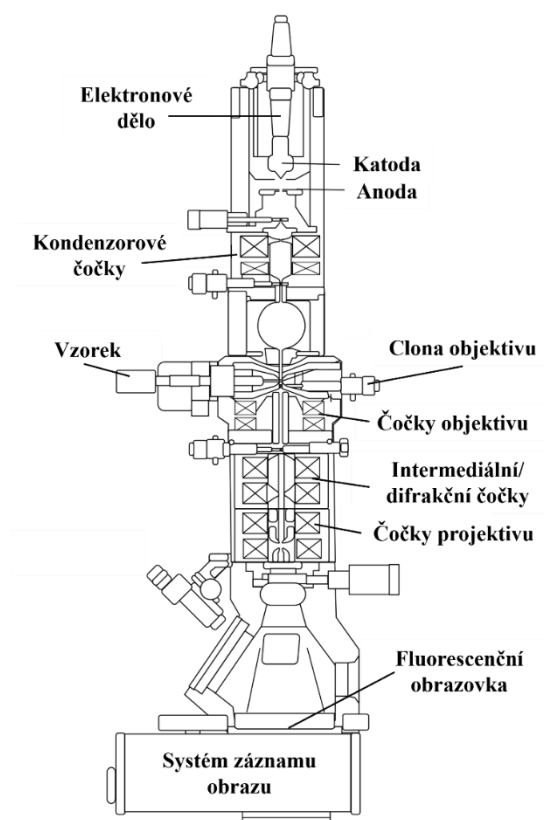
Osvětlovací systém je tvořen elektronovým dělem, které se stejně jako u SEM (kapitola 2.2.1) skládá z katody, která může být tvořena wolframovým vláknem, krystalem LaB<sub>6</sub> nebo autoemisními zdroji. Hodnota použitého urychlovacího napětí závisí na typu zkoumaného vzorku. Pro standardní materiálovou vědu je používáno napětí 100 až 400 kV, avšak pro citlivější materiály se využívá napětí nižší, které vzorek poškodí méně [51]. Obecně platí, že čím nižší urychlovací napětí, tím vyšší kontrast, avšak zároveň, tím nižší rozlišení [37]. Další částí TEM je Wehneltův válec a uzemněná anoda, jejímž středem prochází svazek elektronů [32]. Tento elektronový svazek následně pokračuje přes kondenzorové čočky, jejichž účelem je zaměření svazku na vzorek [37].

Systém pro manipulaci se vzorkem slouží ke správnému uchycení a umístění vzorku v komoře. Vzorky na kovové síťce jsou dány do speciálních držáků [32]. Držák společně se vzorkem je dán do předkomory, ze které je následně vyčerpán vzduch a při dostatečně vysokém vakuu je vzorek následně zaveden do komory. Kovová síťka se vzorkem musí být v těsném kontaktu s držákem, aby při pozorování nedocházelo k hromadění náboje a tepla na vzorku, což by mohlo způsobit vznik artefaktů obrazu nebo jeho poškození [37].

Poslední částí transmisního elektronového mikroskopu je zobrazovací systém, který slouží k tvorbě, zvětšení a zobrazení výsledného obrazu. Po interakci elektronového svazku se vzorkem, pokračují rozptýlené elektrony do objektivu, který tvoří primární obraz a jehož vysoká kvalita je zásadní pro tvorbu kvalitního obrazu. Stejně jako u kondenzorových čoček, jsou i u objektivu přidány clony, jejichž účelem je zachycení okrajových částí elektronového svazku, což má za následek zvýšení kontrastu. Dále platí, že čím větší otvor v clonách objektivu, tím menší hloubka ostrosti. V oblasti vzorku jsou také přítomny antikontaminátory,



což jsou vysoce chlazené kovy, na kterých dochází ke kondenzaci nečistot. A stejně jako u SEM je i zde přítomen stigmátor pro odstranění astigmatismu čoček. Poté pokračují elektrony do intermediální čočky, která zvětšuje vzniklý obraz. Pro další zvětšení obrazu následují projektivy [37]. Stejně jako u SEM mají i zde elektromagnetické čočky své vady, mezi které patří sférická aberace daná různým zaostřením paprsků ve středu a na okraji elektronového svazku, dále astigmatismus, který způsobuje různou sílu pole v různých směrech a poslední vadou je chromatická aberace, která je spojena s nekoherentností elektronového svazku, což má za následek snížení rozlišení [41]. Nakonec dopadají elektrony na detektor, který dříve býval ve formě fluorescenčního stínítka, jenž na povrchu obsahoval vrstvu sulfidu zinečnatého, což emitovalo viditelné záření. Dalšími využitelnými detektory jsou polovodičové detektory a CCD kamery. Avšak dnes se využívají především přímé detektory elektronů. [32]. V neposlední řadě je i zde potřeba vakuový systém [37].



Obrázek 8: Schéma zobrazující hlavní části transmisního elektronového mikroskopu [52].

### 2.2.2.1 Chemická příprava biologických vzorků pro TEM

Obdobně jako u skenovací elektronové mikroskopie (kapitola 2.2.1.1) musí být vzorky i pro transmisní elektronovou mikroskopii stabilní vůči svazku elektronů, nemagnetické a navíc dostatečně tenké, aby bylo možné detekovat prošlé elektrony. Avšak tyto podmínky biologické vzorky nesplňují, proto je nutné je upravit pro pozorování v TEM. Chemická příprava biologických vzorků zahrnuje několik kroků, mezi které patří primární fixace, sekundární fixace, dehydratace, substituce pryskyřicí a vytvrzování. Jakmile je vzorek zalitý v pryskyřici vytvrzen následuje krájení, uchycení na síťku a pozorování v TEM [32].

Prvním krokem chemické přípravy je tedy fixace, která je zde obdobná jako u chemické přípravy vzorků pro SEM (kapitola 2.2.1.1). I zde lze fixaci rozdělit na primární a sekundární. Mezi primární fixační prostředky patří opět aldehydy, především formaldehyd a glutaraldehyd. A mezi sekundární patří sloučeniny těžkých kovů, jako je oxid osmičelý, který slouží nejen k fixaci, ale také dodává vzorku požadovaný kontrast. Pro zachování nativní struktury vzorků musí být roztoky fixačních činidel připraveny ve vhodných pufrech [37]. Oproti přípravě biologických vzorků pro SEM, musí být vzorky pro TEM kompletně penetrovány fixačním činidlem. Každé fixační činidlo má různou rychlost penetrace, avšak obecně jsou požadovány vzorky do 1 mm<sup>3</sup> [33].

Dalším krokem přípravy vzorků je dehydratace, při které dochází k nahrazení vody ve vzorku vybraným dehydratačním činidlem. K tomu dochází pomocí dehydratační řady, tedy pomocí roztoků daného činidla s postupně rostoucí koncentrací, kdy na konci je veškerá voda substituována za dané činidlo [37]. Dehydratace vzorků je důležitá kvůli následnému prosycení pryskyřicí. Pokud by nebyl vzorek dostatečně dehydratován, tak i následné zalévání do pryskyřice by bylo nedokonalé, protože používané pryskyřice nejsou ve vodě rozpustné. Mezi nejčastěji používaná dehydratační činidla patří ethanol a aceton, kromě těchto lze také využít propylenoxid, methanol nebo dimethoxypropan. Při použití těchto činidel je potřeba mít na paměti jejich nedostatky, mezi které patří možná extrakce buněčných komponent, jako jsou lipidy či proteiny, toxicita, nebo smrštění vzorku [53].

Fixovaný a dehydratovaný vzorek je následně zaléván do pryskyřice, což mu dodává především pevnost a také velikost pro lepší manipulaci. Ideální pryskyřice musí být rozpustná ve zvoleném dehydratačním činidle a odolná vůči elektronovému svazku, dále by neměla způsobovat zásadní změny objemu vzorku při polymerizaci nebo extrakci buněčných komponent. Existují tři základní typy pryskyřic, kterými může být vzorek prosycen. Prvním využívaným typem jsou akrylátové pryskyřice, známé například pod obchodním názvem Lowicryl. Dnes se tyto pryskyřice využívají především pro imunocytochemii. Přičemž jejich výhodou je možná polymerizace i při teplotách pod bodem mrazu, tedy za kryogenních podmínek. Avšak mezi jejich negativa patří výrazná změna objemu při polymerizaci a také špatná stabilita vůči kyslíku i elektronovému svazku [33; 54]. Druhým typem jsou polyesterové pryskyřice známé například pod obchodním názvem Vestopal W, jedná se o průzračné kapaliny s vysokou viskozitou, které jsou rozpustné v acetonu. Výhodou je snadné kontrastování, ale při přípravě ultratenkých řezů dochází ke vzniku řady artefaktů [41]. Třetím a nejvyužívanějším typem jsou epoxidové pryskyřice. Mezi jejich výhody patří malé smrštění při polymerizaci, dobrá stabilita vůči elektronovému svazku a relativně rychlé pronikání vzorkem [41; 54]. Příkladem epoxidové pryskyřice je Epon, který se skládá z epoxidové pryskyřice, dvou druhů tvrdidel a iniciátoru. Jako tvrdidla se využívají anhydridy, přesněji anhydrid kyseliny dodecenylyntarové (DDSA) a anhydrid 1-methyl-5-norbornen-2,3-dikarboxylové kyseliny, nazývaný také jako nadic methyl anhydrid (NMA). Jejich poměr určuje výslednou tvrdost pryskyřice, převažuje-li NMA je polymer tvrdší a naopak je-li více DDSA je výsledný polymer měkký [37]. Jako iniciátor polymerizace se zde používá terciální amin odvozený od fenolu [41]. Dalším příkladem epoxidové pryskyřice je Spurr, který se skládá z diepoxidu zvaného vinylcyklohexendioxid (VCD). Jedná se o pryskyřici s nízkou viskozitou, což způsobuje snadnější průnik vzorkem, avšak je velmi citlivá na vlhkost [37]. Po přípravě pryskyřice

následuje samotné prosycení vzorku, pro které je připravena rostoucí koncentrační řada roztoků pryskyřice a rozpouštědla použitého pro dehydrataci, přičemž poslední roztok obsahuje pouze čistou pryskyřici. Následně jsou vzorky přesunuty do speciálních forem či kapsulí a nakonec dochází k polymerizaci nejčastěji pomocí zvýšené teploty, avšak pro některé pryskyřice lze využít i UV záření [41].

Vytvrzené bločky jsou vyjmuty z forem či kapsulí a následuje jejich prvotní úprava nazývaná trimování. Podstatou tohoto kroku je seříznutí přebytečné pryskyřice z bločku tak, aby při dalším krájení byl v řezu přítomen vzorek a ne jenom čistá pryskyřice. Po trimování následuje krájení ultramikrotomem, tedy příprava tenkých řezů, které jsou nutné pro pozorování v TEM. Obecně se pro krájení používají dva typy nožů, skleněný, který je sice levný, ale má velmi krátkou životnost, nebo diamantový, který je podstatně dražší, ale při správné manipulaci má velmi dlouhou životnost. Samotné krájení ultramikrotomem probíhá automaticky, kdy je nastavena rychlost krájení a tloušťka výsledného řezu. Hotové řezy jsou splavovány na vodní hladinu, ze které jsou nakonec sbírány na kovové sítky, jež mohou být například z mědi, niklu, platiny, či zlata. [41].

Obecně lze řezy rozdělit do třech skupin, tenké mající tloušťku 60 až 90 nm, poloténké s tloušťkou 100 až 120 nm a tlusté s tloušťkou 1 až 2  $\mu\text{m}$ . Poloténké a tlusté řezy se často využívají jako průzkumné řezy a jsou pozorovány pod světelným mikroskopem [37; 41]. Tloušťka řezů je zjištěna podle barev vzniklých interferencí světla mezi povrchem řezů a vodní hladinou. Barva přechází od šedé (tloušťka řezu pod 60 nm) přes stříbrnou (tloušťka kolem 70 nm), zlatou (tloušťka kolem 100 nm), fialovou (tloušťka mezi 150 a 180 nm) až po modrou, kterou mají řezy o tloušťce 190 až 240 nm [41].

Hotové řezy na sítkách bývá nutné ještě před pozorováním v TEM dále kontrastovat, protože sekundární fixace například  $\text{OsO}_4$ , která zároveň dodává vzorku kontrast, nebývá dostatečná. Kontrastování v této fázi chemické přípravy biologických vzorků se obecně dělí na pozitivní a negativní. Pozitivní barvení je technika využívající soli těžkých kovů, které se váží na buněčné komponenty, čímž jim dodávají hustotu a tím i požadovaný kontrast. Mezi nejčastěji využívaná kontrastující činidla patří uranyl acetát, který reaguje s fosfátovými a aminoskupinami, váže se tedy na nukleové kyseliny a proteiny, avšak jedná se o radioaktivní látku, přesněji o alfa zářič. Druhým často používaným činidlem je citrát olova, který reaguje se záporně nabitými komponenty vzorku. Oproti tomu při negativním barvení, využívajícím také soli těžkých kovů, dochází ke zvýšení hustoty pozadí vzorku, což má za následek tmavě zbarvené pozadí a světlý vzorek. Zde se jako kontrastující činidlo využívá uranyl acetát nebo kyselina fosfowolframová [37]. Z důvodu regulačních obtíží spojených s využíváním sloučenin obsahujících uran, jako je jejich dovoz, skladování a likvidace, jsou dnes vyvíjena kontrastující činidla na bázi lanthanoidů. Příkladem je činidlo skládající se z ytterbia ve formě trojmocného kationtu a kyseliny fosfowolframové. Ytterbium se zde využívá z důvodu výrazného rozptylu elektronů a schopnosti silně interagovat s kyselinou fosfowolframovou, která dále interaguje se vzorkem, což má za následek zvýšení kontrastu daných struktur [55].

#### 2.2.2.2 Mrazová příprava biologických vzorků pro TEM

Stejně jako u kryogenní přípravy vzorků pro skenovací elektronovou mikroskopii (kapitola 2.2.1.2) existuje také pro transmisní elektronovou mikroskopii kryogenní metoda

přípravy biologických vzorků, jejíž hlavní výhodou je pozorování nativní struktury vzorků bez přidavku jakékoliv cizorodé látky. Naopak hlavní nevýhodou je potřeba speciálního vybavení pro práci za velmi nízkých teplot [33].

Prvním krokem přípravy preparátu je fixace pomocí rychlého zmrazení vzorku, jehož princip je stejný jako u cryo-SEM. Je tedy potřeba zmrazit vodu přítomnou ve vzorku do struktury amorfního ledu, jelikož při vzniku krystalů by došlo k poškození struktury preparátu. Pro kryogenní transmisní elektronovou mikroskopii, zkráceně cryo-TEM se využívají některé metody mrazení vzorků jako pro cryo-SEM, patří mezi ně imerzní kryofixace, sprejování suspenze a vysokotlaké mrazení (kapitola 2.2.1.2) [33].

Dalším krokem je krájení, ke kterému lze využít stejně jako u chemické přípravy ultramikrotom, který ale musí být opatřen speciální kryokomorou. Poté jsou řezy posbírány na síťku a stále v hluboce zmrazeném stavu přeneseny do transmisního elektronového mikroskopu také vybaveného kryokomorou a elektronovým svazkem o nízké intenzitě.

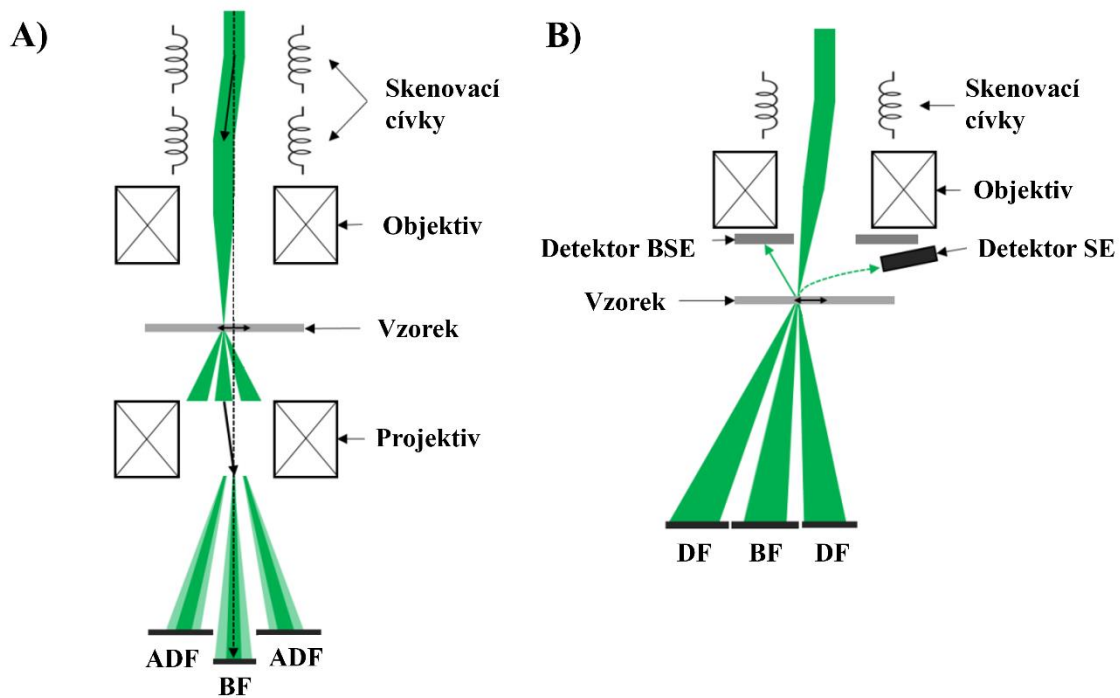
Krájení vzorku lze provést také na ultramikrotomu bez kryokomory, avšak před samotným krájením je nutné zmrazený vzorek upravit. Nejdříve je nutné provést mrazovou substituci, při které dochází v průběhu teplotního a časového programu k nahrazení vody organickým rozpouštědlem, například acetonem nebo methanolem. Prvním krokem mrazové substituce je přenesení zamrazených vzorků do komory temperované na  $-90$  až  $-80$  °C, tato teplota je udržována po dobu 2 až 4 dnů. Během této doby dochází k postupnému rozpuštění zmrzlé vody ve stále kapalném organickém rozpouštědle a zároveň dochází k difúzi vody ven ze vzorku a rozpouštědla do vzorku. Pro zvýšení kontrastu je možné do organického rozpouštědla přidat oxid osmičelý, či uranyl acetát. Následně dochází k postupnému zvyšování teploty na  $-20$  °C a dále až na  $4$  °C. Při těchto teplotách dochází k difúzi kontrastující látky do vzorku, kde reaguje se vzorkem, výsledkem čehož je redukce a ztmavnutí těchto látek. Nakonec jsou vzorky vyjmuty z komory a promyty čistým rozpouštědlem, aby došlo k vymytí nezreagované kontrastující látky [56]. Následně zalití vzorku do pryskyřice a jeho krájení je totožné s chemicky připravovanými vzorky (kapitola 2.2.2.1) [33].

### 2.2.3 Skenovací transmisní elektronová mikroskopie (STEM)

Při skenovací transmisní elektronové mikroskopii se využívá skenování vzorku bod po bodu obdobně jako u SEM. Zároveň musí být vzorek dostatečně tenký, aby jím prošly elektrony, které jsou následně detekovány, což naopak odpovídá technice TEM [57]. V dnešní době lze na trhu nalézt specializované skenovací transmisní mikroskopy, nicméně existuje také možnost přidat STEM detektor do skenovacího elektronového mikroskopu nebo zjednodušeně řečeno přidat skenovací cívkou do transmisního elektronového mikroskopu (obrázek 9) [58].

Konstrukce tedy závisí na vybraném typu mikroskopu. Avšak obecně platí, že je pomocí elektronového děla, anody a kondenzorových čoček vytvořen velmi úzký svazek elektronů, který následně prochází skenovacími cívkami, jejichž úkolem je postupně vychýlení paprsku při rastrování vzorku [32]. Pro detekci prošlých elektronů se využívají dva typy detektorů, které se vzájemně doplňují. Do detektoru světlého pole (*bright field*, BF) vstupují elektrony buď nerozptýlené, nebo rozptýlené jen pod malými úhly. Tento detektor je umístěn v ose elektronového svazku a má tvar disku. Druhým typem detektoru je detektor tmavého pole (*dark field*, DF), do kterého vstupují elektrony rozptýlené pod úhlem výrazně větším. Tento detektor

má tvar prstence, který obklopuje právě BF detektor, proto se využívá označení prstencový detektor tmavého pole (*annular dark field*, ADF) [32; 59]. Výraznou výhodou tohoto detektoru je jeho citlivost vůči protonovým číslovým jednotlivých atomů ve vzorku. Oddělení detektoru BF a DF je odlišností a výhodou oproti TEM, protože lze pořídit snímky BF a DF současně z jednoho místa na vzorku, což umožňuje získání velkého množství informací [60]. U STEM dochází ke zvětšování pomocí rastrování vzorku, nedochází tedy ke zvětšování obrazu čočkami, a proto je zde nižší množství chromatických aberací výsledného obrazu [32]. Další výhodou oproti konvenčním vysokonapěťovým TEM je možnost využití nízkého napětí pro pozorování vzorků, což má za následek zjednodušení jejich přípravy, protože není nutné kontrastovat připravené tenké řezy na sítkách těžkými kovy jako je uranyl acetát nebo citrát olova. Avšak na trhu je možné nalézt také nízkonapěťové TEM, pro které může být příprava také zjednodušena [61]. Nevýhodou skenovací transmisní elektronové mikroskopie je větší namáhání a tedy i následné poškození vzorku elektronovým svazkem, jelikož je zde vzorek rastrován bod po bodu a ne snímán jako celek [32].



Obrázek 9: Schéma konstrukce STEM v TEM (A) a schéma konstrukce STEM v SEM (B) [58].

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Použité mikroorganismy

V této diplomové práci byly použity bakterie kmene *Azotobacter vinelandii*, konkrétně se jednalo o jednoho zástupce z české sbírky mikroorganismů označeného CCM 289 a dva zástupce z německé sbírky mikroorganismů s označením DSM 87 a DSM 720.

#### 3.2 Použité chemikálie

##### Pro kultivaci a gelaci buněčných kultur

---

D-glukono- $\delta$ -lakton	Sigma-Aldrich
Dihydrát chloridu vápenatého	Lach-Ner
Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného	Lach-Ner
Glycerol	Lach-Ner
Heptahydrát síranu hořečnatého	Lach-Ner
Kvasničný extrakt	HiMedia
Kyselina jablečná	Lach-Ner
Monohydrát D-glukózy	Lach-Ner
Síran amonný	Lachema
Uhličitan vápenatý	Penta chemicals

---

##### Pro elektronovou mikroskopii

---

Aceton	VWR
Dusík, kapalný	Linde Gas
Epoxy Embedding Medium kit	Sigma-Aldrich
Ethanol	VWR
Glutaraldehyd	Electron Microscopy Sciences
Hexakynoželezitan draselný	VWR
Chloroform	VWR
Kakodylan sodný trihydrát	Sigma-Aldrich
N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Spurr's Low Viscosity Embedding kit	Electron Microscopy Sciences
Oxid osmičelý	Electron Microscopy Sciences
UA-zero	Agar Scientific

---

### 3.3 Použité přístroje

Analytické váhy	LAG Advanced VWR
Centrifuga	CompactStar CS4 VWR
Centrifuga	MiniSpin plus Eppendorf
Digitální inkubátor	INCU-Line VWR
Loading station	Leica Microsystems
Mrazová substituční jednotka	AFS2 Leica Microsystems
Skenovací elektronový mikroskop	Helios G4 HP Vybavený detektorem STEM 3+ ThermoFisher Scientific
Skenovací elektronový mikroskop	Magellan 400/L Vybavený cryo-systémem a STEM 3+ detektorem FEI Company
Transportní jednotka	Leica Microsystems
Ultramikrotom	EM UC7 Leica Microsystems
Ultrazvuková lázeň	EMMI-20HC Emag Technologies
Vakuová komora	ACE 600 Leica Microsystems
Vírový mixér	ZX3 VELP Scientifica
Zařízení pro vysokotlaké mrazení	EM ICE Leica Microsystems

### 3.4 Kultivace mikroorganismů

Všichni tři použití zástupci kmene *Azotobacter vinelandii*, tedy CCM 289, DSM 87 a DSM 720, byli skladováni při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  v cryo-zkumavkách s 30% glycerolem.

Pro kultivaci těchto bakterií bylo do 100 ml Erlenmayerovy baňky připraveno 33 ml inokulačního média (tabulka 1), tato baňka byla poté 30 minut sterilizována. Po vychlazení zpět na laboratorní teplotu byl ve sterilním boxu přidán roztok glukózy o koncentraci 5 obj.%. Následně bylo přidáno 0,75 ml suspenze dané bakterie v glycerolu ohřáté na laboratorní teplotu. Takto připravené inokulační médium bylo kultivováno na temperované třepačce při teplotě  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  a rychlosti třepání 180 ot/min. Doba kultivace se lišila v závislosti na použitém zástupci *A. vinelandii*, růst kultur se pohyboval mezi 24 až 48 hodinami.

Tabulka 1: Složení inokulačního média.

Chemikálie	Hmotnost [g]
Glukóza	20,0
Kvasničný extrakt	6,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,6
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,3

Chemikálie	Objem [ml]
Destilovaná voda	1000,0

Dalším krokem kultivace byla příprava 100 ml produkčního média do 250 ml Erlenmayerovy baňky, jehož složení uvádí tabulka 2. I zde probíhala sterilizace po dobu 30 min. Po vychladnutí zpět na laboratorní teplotu bylo přidáno 5 obj.% glukózy a 10 ml narostlého inokulačního média. Následná kultivace probíhala také na temperované třepačce při 30 °C, avšak zde byla použita rychlost 200 ot/min. Celá kultivace trvala 5 dnů.

Tabulka 2: Složení produkčního média.

Chemikálie	Hmotnost [g]
Glukóza	20,0
Kvasničný extrakt	6,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,6
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,3
CaCO <sub>3</sub>	1,0

Chemikálie	Objem [ml]
Destilovaná voda	1000,0

### 3.5 Gelace buněčných kultur

Mikrobiální kultury byly odebrány 5. den kultivace a následně byly smíchány s ekvivalentním množstvím síťovacích činidel o daných koncentracích. Mezi vybraná síťovací činidla patřil CaCl<sub>2</sub> o koncentraci 2 hm.%, kyselina jablečná o koncentraci 0,5 M a GDL o koncentraci 1 M, přičemž u druhé sady vzorků byl k GDL přidán navíc CaCO<sub>3</sub> o koncentraci 0,5 M.

### 3.6 Vysokotlaké mrazení vzorků

Před vysokotlakým mrazením bylo nejdříve nutné vzorky správně připravit. Z každé čisté kultury bylo odebráno 10 ml do centrifugační zkumavky, následně byly suspenze bakteriálních buněk centrifugovány po dobu 3 minut a rychlosti 3500 ot/min. Poté byl slit přebytečný supernatant a z každé kultury bylo odebráno 1,5 ml do mikrozkuvek Eppendorf, které byly centrifugovány po dobu 8 min a rychlosti 4000 ot/min (pro kulturu DSM 87 bylo potřeba přidat dalších 5 min při této rychlosti). Opět byl odlit nadbytečný supernatant. Oproti tomu příprava



gelových vzorků spočívala v jejich nakrájení za použití skalpelu na kousky o vhodné velikosti, přičemž následně byly použity segmenty z vnitřních částí hydrogelů.

Vysokotlaké mrazení vzorků probíhalo pomocí přístroje EM ICE při tlaku 9,2 barů. Tento přístroj byl vychlazen tekutým dusíkem a zároveň bylo vždy po mrazení vzorku zkontrolováno, že se rychlost zamrazení pohybovala okolo 300 ms. Připravené čisté kultury byly pro TEM mrazeny do pozlacených měděných nosičů o průměru 3 mm, přičemž byla použita strana o hloubce 0,2 mm, která byla navíc potažena tenkou vrstvou 1% roztoku lecitinu v chloroformu, k této straně byla přidána hladká strana dalšího nosiče jako poklička. Vzorky těchto kultur byly pro SEM mrazeny do 6 mm hliníkových nosičů. I zde byla vybrána hladká a 0,2 mm hluboká strana, avšak tentokrát bez lecitinu. Oproti tomu připravené gelové kultury byly pro SEM i TEM mrazeny do pozlacených měděných 6 mm nosičů (0,2 mm hluboká a hladká strana). Jediným rozdílem mezi nosiči pro SEM a TEM bylo potažení nosičů pro TEM tenkou vrstvou lecitinu. Každý vzorek pro TEM byl zamrazen ve 3 kopiích a pro SEM ve 2 kopiích. Takto zamrazené vzorky byly uchovávány pod příslušným označením v Dewarově nádobě s tekutým dusíkem. Přehled všech zamrazených vzorků uvádí tabulka 3. Mrazení vzorků bylo kvůli reprodukovatelnosti výsledků provedeno ve dvou opakováních, přičemž byly pro každé opakování použity čerstvé buněčné kultury.

*Tabulka 3: Přehled zamrazených vzorků pro SEM i TEM. Každý vzorek byl mrazen ve dvou opakováních z dvou různých kultivátů všech zkoumaných zástupců.*

<b>Forma</b>	<b>Zástupce <i>A. vinelandii</i></b>	<b>Sít'ovací činidlo</b>
Čisté buněčné kultury	CCM 289	-
	DSM 87	-
	DSM 720	-
Buněčné kultury se sít'ovacím činidlem	CCM 289	CaCl <sub>2</sub>
		Kyselina jablečná
		GDL
	DSM 87	CaCl <sub>2</sub>
		Kyselina jablečná
		GDL
DSM 720	CaCl <sub>2</sub>	
	Kyselina jablečná	
		GDL

### 3.7 Příprava a analýza zmrazených vzorků pomocí cryo-SEM

Před pozorováním vzorků pomocí cryo-SEM bylo provedeno mrazové lámání a sublimace již zmrazených vzorků. Veškerá následující činnost probíhala v tekutém dusíku. Zmrazené vzorky byly upevněny na specifický držák pro dva nosiče s průměrem 6 mm. Následně byl držák se vzorky přesunut do loading station, kde byly vzorky přikryty měděnou pokličkou, jenž slouží k ochraně vzorků před kontaminací námrazou při přenosu z tekutého dusíku do vakuové komory ACE 600 vychlazené tekutým dusíkem na -130 °C. Zde byly vzorky nejdříve lámány pomocí skalpelu, aby došlo k odkrytí vnitřních struktur. A poté byla spuštěna sublimace sloužící

k odstranění přebytečného exogenního a endogenního ledu, jak bylo popsáno v kapitole 2.2.1.2. Sublimace vždy trvala 7 min při teplotě  $-95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , přičemž krok ohřevu byl nastaven na  $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

Po zpětném ochlazení na  $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$  byl vzorek přenesen pomocí vychlazené transportní jednotky do cryo-SEM Magellan 400/L vychlazeného na  $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Následně byl seřízen mikroskop, což spočívalo ve vycentrování elektronového svazku, nastavení pracovní vzdálenosti na 4 mm, nastavení proudu na 13 pA a napětí na 2 kV a v neposlední řadě úpravě astigmatismu čoček. Dále byly nastaveny parametry snímání, což spočívalo v nastavení rozlišení, integrace obrazu, či spuštění korekce posunu. Tyto vlastnosti byly upravovány podle požadavků jednotlivých vzorků tak, aby byly pořízeny co nejkvalitnější snímky bez velkého množství artefaktů způsobených radiačním poškozením, jelikož byly pozorovány vzorky bez pokovení.

Avšak při pozorování některých vzorků bylo zjištěno, že sublimace ve vakuové komoře byla nedostatečná, jelikož buněčné struktury byly stále pokryty vrstvou ledu. V těchto případech byla provedena dodatečná sublimace přímo v mikroskopu, která spočívala v ohřevu držáku vzorku na  $-95\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Jakmile bylo dosaženo této teploty, začal se tento držák opět chladit na  $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Cryo-SEM analýza byla provedena ve dvou opakováních.

### 3.8 Příprava a analýza zmrazených vzorků pomocí STEM

Pro pozorování zmrazených vzorků pomocí STEM bylo nutné vzorky nejdříve připravit. Prvním krokem této přípravy byla mrazová substituce, následovaná prosycením pryskyřicí a vytvrzením. Takto připravené vzorky byly dále krájeny ultramikrotomem, splavovány na vodní hladinu a sbírány na měděné síťky, které byly následně pozorovány v mikroskopu.

Prvním krokem přípravy zamrazených vzorků pro STEM byla mrazová substituce, při které dochází v průběhu daného časového a teplotního programu k nahrazení zmrzlé vody acetonem a poté také k fixaci a kontrastování prostřednictvím  $\text{OsO}_4$ . Mrazová substituce začínala vychlazením substituční jednotky AFS2 tekutým dusíkem a přípravou roztoku  $\text{OsO}_4$  v acetonu o koncentraci 1,5 hm.%. Tento roztok byl rozpipetován do označených vialek, které byly následně vychlazeny v AFS2. Vzorky zamrazené metodou vysokotlakého mrazení byly následně přeneseny do jednotlivých vialek, přičemž musely být stále ponořeny v tekutém dusíku. Poté byl spuštěn daný program (tabulka 4), který začínal při teplotě  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ , při které dochází k nahrazení ledu acetonem, jenž je při této teplotě stále kapalný, jelikož teplota tuhnutí acetonu je  $-95\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Následně dochází k postupnému ohřevu, kdy kolem teploty  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  začíná reagovat i přítomný  $\text{OsO}_4$ . Po skončení mrazové substituce byly vzorky ponechány po dobu 1 h při laboratorní teplotě.

Tabulka 4: Nastavení programu mrazové substituce v AFS2.

Krok	Počáteční teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Konečná teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Rychlost ohřevu [ $^{\circ}\text{C}/\text{h}$ ]	Doba setrvání [h]
1	-90	-90	0	72
2	-90	-20	5	14
3	-20	-20	0	24
4	-20	4	3	8
5	4	4	0	18

Acetonem substituované vzorky byly 3krát promyty 100% acetonem (po 15 min), kdy při druhém promývání byly vytaženy kovové nosiče. Během promývání byla připravena pryskyřice Epon potřebná k následnému prosycování. Pro tyto vzorky byla zvolena střední tvrdost výsledné pryskyřice, proto bylo smícháno 25 g média epoxidové pryskyřice Epon, 16,6 g tvrdidla DDSA, 9,7 g tvrdidla NMA a 0,77 ml akceleratoru DMP-30. Výsledná směs byla vortexována a nakonec byla pro odstranění vzduchových bublin dána do ultrazvukové lázně na 10 min. Samotné prosycování vzorků probíhalo v postupné řadě rostoucích koncentracích směsi Eponu a acetonu. Byly tedy připraveny roztoky, jejichž poměr acetonu ku Eponu byl roven 2 : 1, 1 : 1 a 1 : 2, tyto roztoky byly vždy po 1 h vyměňovány. Nakonec byly vzorky dány na 1 h do 100% pryskyřice, která byla po 1 h vyměněna opět za čistou pryskyřici. Takto připravené vzorky byly do druhého dne ponechány v exikátoru s vývěvou, proto aby došlo k odstranění co největšího množství zbývajícího acetonu a pryskyřice dokonale prosytila připravované buňky. Druhý den byly vzorky pomocí pinzety přeneseny do kónických BEEM kapslí a zalaty čistou pryskyřicí, do které byl vložen proužek papíru s označením vzorku. Nakonec byly vzorky umístěny na 48 h do inkubátoru nastaveného na 62 °C, aby došlo k jejich vytvrzení.

Po vytvrzení byly vzorky vyjmuty z BEEM kapslí a nakrájeny na ultratenké řezy o tloušťce 70 nm pomocí ultramikrotomu EM UC7 a diamantového nože. Připravené řezy z prvního opakování byly přemístěny na měděné síťky a dány do komory elektronového mikroskopu Helios G4 HP vybaveného detektorem STEM 3+, přičemž byl pozorován BF signál. Avšak druhé opakování bylo pozorováno v elektronovém mikroskopu Magellan 400/L, který byl vybaven stejným STEM 3+ a byl také pozorován BF signál. Poté byly oba mikroskopy nastaveny obdobně jako u vzorků pro cryo-SEM. Byl tedy vycentrován elektronový svazek, nastavena pracovní vzdálenost na 4 mm, proud na 13 pA, napětí na 15–18 kV a upraven astigmatismus čoček. Následně byly nastaveny parametry snímání, mezi které patří nastavení rozlišení, integrace obrazu nebo korekce posunu. Při pořizování snímků byly vyhledávány bakterie v blízkosti měděné mřížky, proto aby nedocházelo k hromadění přebytečného náboje.

### 3.9 Chemická příprava vzorků a jejich analýza pomocí STEM

Kromě kryogenních metod byla čistá buněčná kultura *A. vinelandii* CCM 289 připravena také chemickou cestou. Prvním krokem byla centrifugace této kultury stejně jako u mrazení (kapitola 3.6). Následoval krok fixace, kdy jako fixační činidlo byl vybrán roztok obsahující 2,5 % glutaraldehydu a 2 % formaldehydu. Roztok tohoto fixačního činidla byl připraven buď v 0,1 M kakodylanovém pufru nebo v 0,1 M HEPES pufru (N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina), přičemž pH obou pufrů bylo upraveno na hodnotu 7,2. Kakodylanový pufr je běžně používaný pufr v chemické přípravě vzorků pro elektronovou mikroskopii, avšak obsahuje toxický arzen, z toho důvodu byl použit také netoxický pufr s označením HEPES. Tato fixace probíhala přes noc při teplotě 4 °C. Druhý den byly všechny vzorky 3krát promyty daným pufrům, vždy po dobu 15 min.

Následovala další fixace a kontrastování vzorků pomocí 1% roztoku OsO<sub>4</sub> v odpovídajícím pufru s 1% roztokem K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]. Tento krok probíhal po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Stejně jako po první fixaci, byly vzorky i zde následně promyty pufrům, konkrétně

2krát po dobu 15 min. Poté následovalo jedno promytí destilovanou vodou a jedno promytí 20% ethanolem, vždy po dobu 15 min.

Dále bylo provedeno kontrastování celého objemu vzorku pomocí komerčně prodáváného roztoku UA-zero, který neobsahuje klasicky používaný uranyl acetát, ale je na bázi lanthanoidů, jak bylo zmíněno v kapitole 2.2.2.1. Jedná se o roztok citlivý na světlo, proto musel tento krok probíhat ve tmě a trval také 1 hodinu. Poté byly vzorky opět promyty 20% ethanolem ( $2 \times 2$  min).

Následoval proces dehydratace, který spočíval v postupném nahrazení přítomné vody ethanolem. Konkrétně byla postupně zvyšována koncentrace ethanolu od 70 %, přes 80 %, 90 % až po 100 %, každá výměna ethanolu probíhala po 15 minutách a poslední krok s čistým ethanolem byl opakován 2krát kvůli naprostému odstranění vody ze vzorků.

Dalším krokem bylo zalévání vzorku do pryskyřice, přičemž byla použita epoxidová pryskyřice Spurr. Byla tedy použita jiná pryskyřice než u mrazové přípravy, jelikož zde byl pro dehydrataci využit ethanol, který je oproti acetonu používaném při přípravě zmrazených vzorků (kapitola 3.8) méně těkavý, což by mohlo mít za následek nedokonalé prosycení pryskyřicí, z důvodu nedokonalého nahrazení ethanolu pryskyřicí. Proto byla vybrána pryskyřice Spurr, která má nižší viskozitou než Epon, což usnadnilo prosycení daných vzorků. Samotné prosycování těchto vzorků probíhalo totožně jako u vzorků zmrazených. Byly tedy připraveny roztoky s poměrem ethanolu ku Spurrův rovnému 2 : 1, 1 : 1, 1 : 2 a 100% Spurr. Každá výměna za roztok s vyšší koncentrací pryskyřice probíhala po 1 hodině, přičemž poslední krok s čistou pryskyřicí byl opakován 2krát. Takto připravené vzorky byly ponechány přes noc v exikátoru s vývěvou a následně byly druhý den dány do BEEM kapslí a vytvrzeny při teplotě 62 °C po dobu 48 h.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem této diplomové práce byla příprava a následné pozorování bakterií kmene *Azotobacter vinelandii* ve stavu co nejbližším stavu nativnímu. Kromě toho byly také zkoumány vzorky s přidavkem různých síťovacích činidel, které vedly k enkapsulaci bakterií do hydrogelu. Cílem přípravy těchto vzorků pro elektronovou mikroskopii nebyla pouze snaha o dosažení téměř nativní struktury buněk, ale také snaha o zachování struktury přítomného hydrogelu. Mezi vybrané techniky zkoumání patřila kryogenní skenovací elektronová mikroskopie a skenovací transmisní elektronová mikroskopie. U cryo-SEM byly pozorovány zamrazené vzorky bez pokovení. Pro STEM byly vzorky připraveny dvěma metodami, první spočívala v zamrazení, mrazové substituci, přičemž následná příprava probíhala dle tradičně používaných protokolů pro přípravu vzorků pro TEM. Druhou metodou byla metoda chemická, která využívala bezuranové kontrastující činidlo na bázi lanthanoidů (kapitola 3).

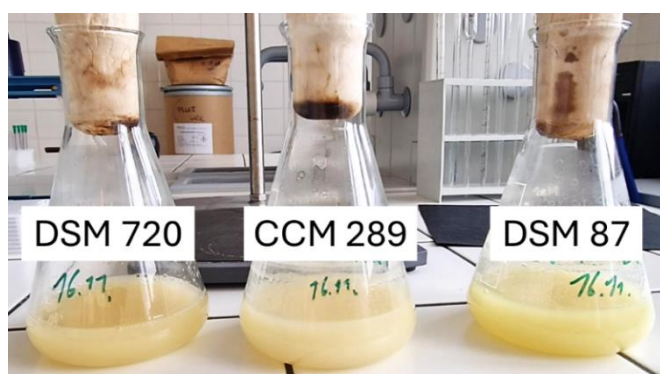
### 4.1 Analýza vzorků pomocí cryo-SEM

Jak již bylo zmíněno v kapitole 3, byly pro cryo-SEM připraveny vzorky čistých i síťovaných kultur *A. vinelandii* CCM 289, DSM 87 a DSM 720. Zmrazení vzorků po tuto analýzu je popsáno v kapitole 3.6 a jejich následné zpracování včetně nastavení mikroskopu Magellan 400/L je uvedeno v kapitole 3.7. Cryo-SEM analýza byla provedena ve dvou opakováních kvůli zajištění reprodukovatelnosti výsledků. Z pořízených snímků bylo zjištěno, že obě opakování jsou obdobná a proto byly následně ze všech cryo-SEM snímků vybrány reprezentativní snímky od každého zkoumaného zástupce tohoto druhu. Na každém snímku je v této práci v pravém dolním rohu znázorněno měřítko, jehož velikost je uvedena v popisku.

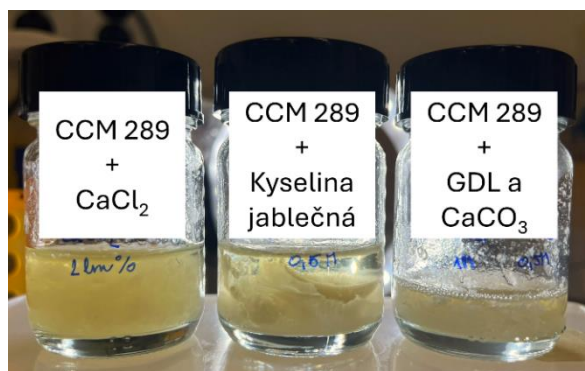
Nejdříve byly analyzovány vzorky všech tří čistých kultur *A. vinelandii*, tzn. bez přidavku síťovacího činidla (obrázek 13). Z literární rešerše bylo zjištěno, že tato bakterie tvoří za nepříznivých podmínek cysty, které se skládají z dané buňky, jež je obklopena dvouvrstevnatou kapsulí, konkrétně se jedná o vrstvy nazývané intin a exin [62; 63]. Během tvorby těchto cyst dochází ke změně tvaru z oválné buňky na buňku kulovitou a také ke zmenšení přibližně na 1,5–2  $\mu\text{m}$  z původních 2–10  $\mu\text{m}$  na délku a 1–2  $\mu\text{m}$  na šířku [16; 64; 65]. Tvorba cyst slouží k ochraně buňky před fyzikálními, či chemickými stresy, jako je například sucho nebo UV záření. Zralé cysty se tvoří po 3 až 5 dnech. Vytvořené kapsule obsahují alginát, který tato bakterie produkuje do extracelulárního prostoru [62; 63]. Konkrétně je část kapsule zvaná intin složena z 44 % sacharidů, 9,1 % proteinů, 37 % lipidů, oproti tomu exin obsahuje sacharidů jen 32 %, avšak proteinů 28 % a lipidů 30 %. Mezi sacharidy obsažené v obou vrstvách patří glukóza, manóza, xylóza nebo rhamnóza, avšak pouze exin obsahuje podle článku glukosaminy a galaktosaminy [66]. Kromě zmíněných sacharidů obsahuje intin a exin také uronové kyseliny, které v intinu představují 72 % a v exinu 40 % přítomných sacharidů. Přesněji se zde nachází kyselina manuronová, převažující v intinu, a kyselina guluronová, která naopak převažuje v exinu [67].

U zástupců *A. vinelandii* CCM 289 a DSM 87 byly pozorovány útvary kolem jednotlivých buněk, které by mohly být právě výše zmíněnou kapsulí, i proto že tyto vzorky byly připraveny pro cryo-SEM 5. den od počátku kultivace (obrázek 13 A, B, D, E; modré šipky). Avšak pro porovnání nebyly nalezeny články, které by dané vzorky zkoumaly touto metodou.

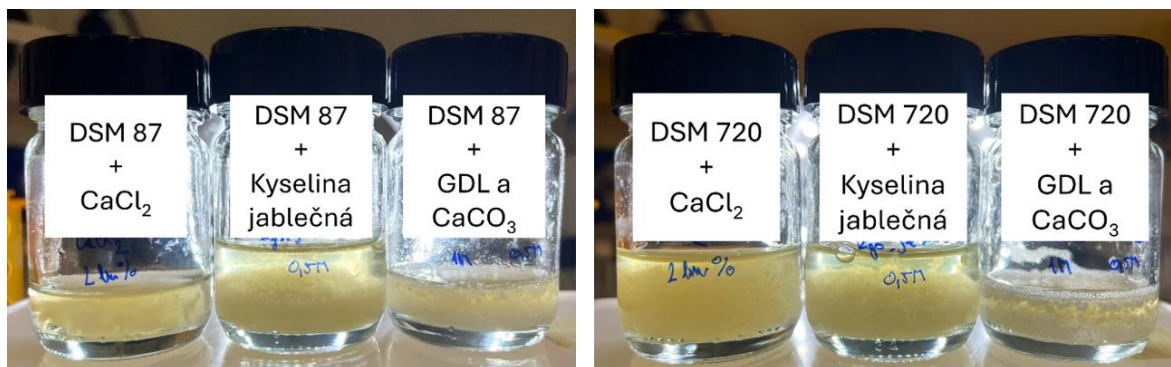
Všechny nalezené články, obsahovaly snímky bakterií připravených tradiční chemickou cestou pro TEM, i proto byly vzorky následně připraveny dalšími metodami (kapitola 4.2). Dále bylo dle předpokladu zjištěno, že se u *A. vinelandii* CCM 289 nenacházel síťovaný alginát vně těchto cyst, byl pouze v těsném okolí jednotlivých buněk (obrázek 13 A; zelená šipka). Nicméně u zástupců DSM 87 a DSM 720 byla pozorována hydrogelová síť nejen kolem buněk, ale také vně i přesto, že se jedná o vzorky, do kterých nebylo přidáno žádné síťovací činidlo (obrázek 13 B, C, E, F; žluté šipky). Tuto skutečnost je možné vysvětlit přítomností malé koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  kationtů pocházejících z produkčního média použitého při kultivaci. Avšak toto síťování bylo podstatně slabší než u vzorků s přidáním síťovacím činidlem, jelikož použité čisté kultury byly tekuté a makroskopicky homogenní, kdežto u síťovaných vzorků byl přítomen pevný a okem pozorovatelný hydrogel (obrázek 10, obrázek 11, obrázek 12). U všech tří zástupců byla při větších zvětšení potvrzena produkce zásobních PHB granulí, vyskytujících se uvnitř buněk (obrázek 13 D, E, F; červené šipky).



Obrázek 10: Fotografie všech zkoumaných čistých kultur *A. vinelandii* 5. den po kultivaci.

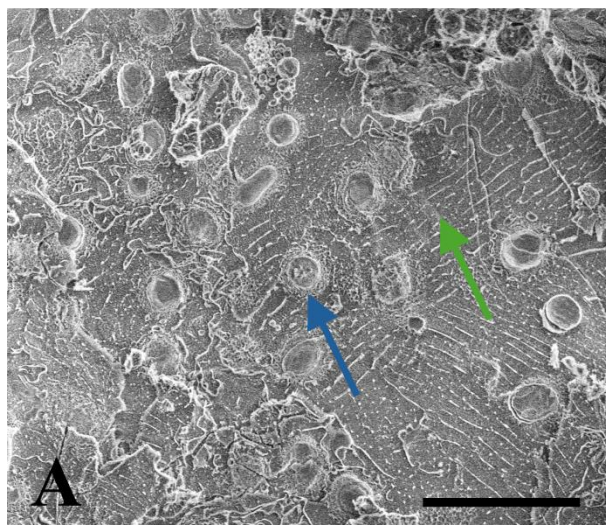


Obrázek 11: Fotografie kultury *A. vinelandii* CCM 289 síťované třemi různými činidly.

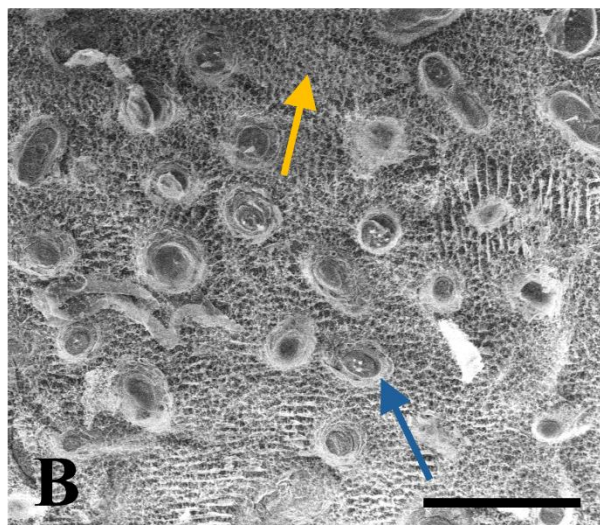


Obrázek 12: Fotografie kultury *A. vinelandii* DSM 87 (vlevo) a DSM 720 (vpravo) síťované třemi různými činidly.

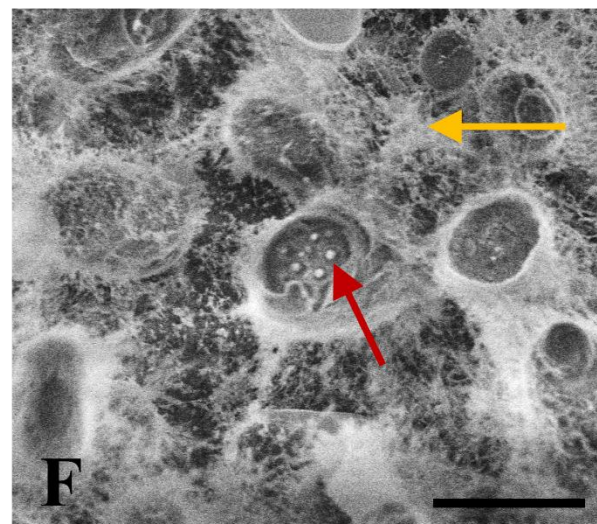
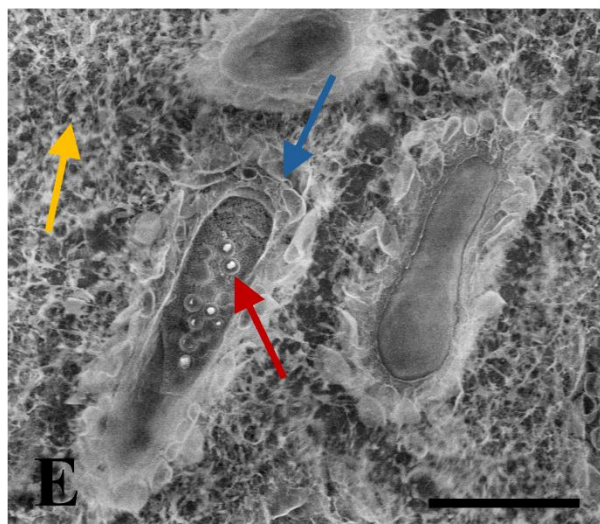
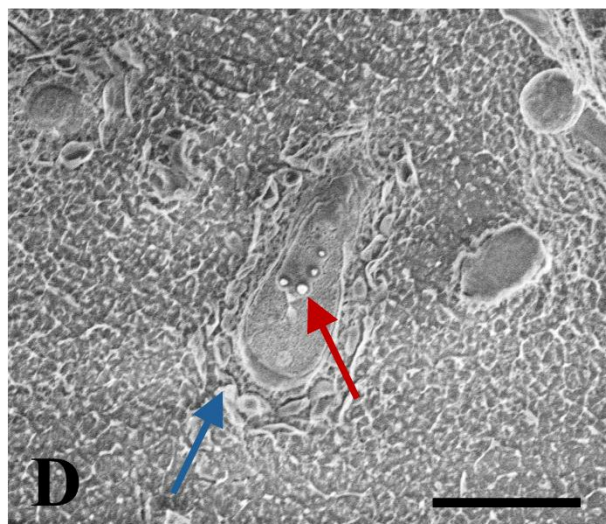
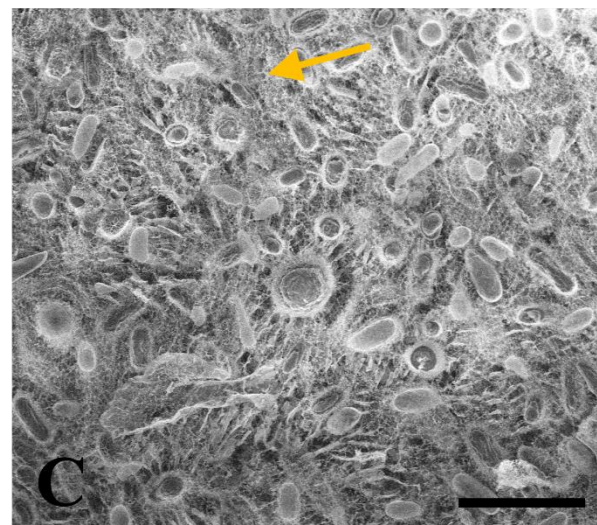
*A. vinelandii* CCM 289



*A. vinelandii* DSM 87



*A. vinelandii* DSM 720



Obrázek 13: Cryo-SEM snímky čistých kultur *Azotobacter vinelandii*. Červené šipky ukazují na PHB granule, modré šipky na kapsule, kterými jsou bakterie obaleny, zelená šipka na plochu bez hydrogelu a žluté šipky na zesíťovaný hydrogel. U snímků A, B, C je měřítko 10  $\mu\text{m}$  a u snímků D, E, F 3  $\mu\text{m}$ .

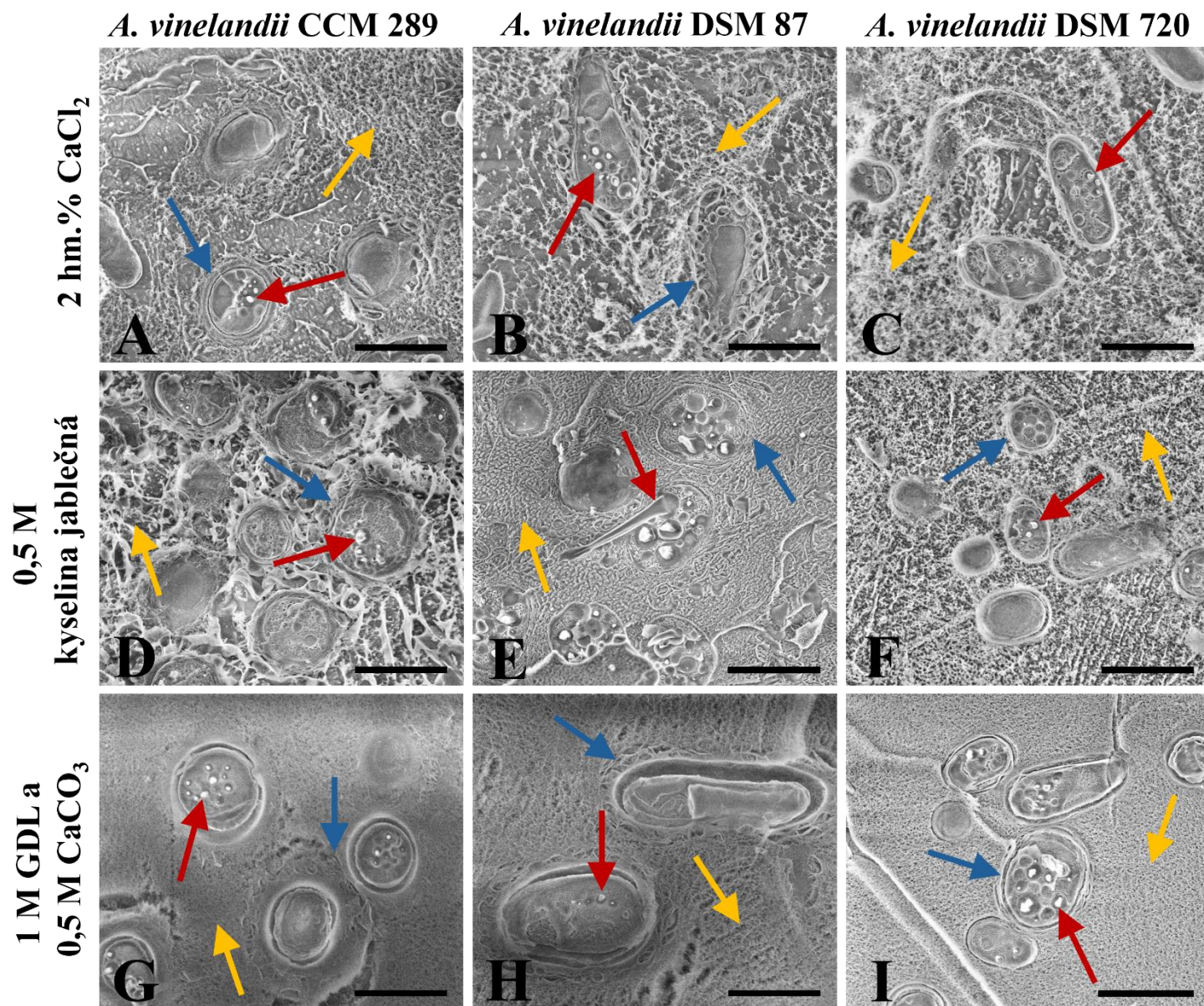
Kromě vzorků čistých kultur *A. vinelandii* byly dále pro cryo-SEM připraveny a také pozorovány vzorky s přidavkem síťovacích činidel, konkrétně s přidavkem  $\text{CaCl}_2$ , kyseliny jablečné nebo GDL s  $\text{CaCO}_3$ . Výběr z pořízených snímků znázorňuje obrázek 14. Stejně jako u čistých kultur byly i u všech vzorků se síťovacími činidly pozorovány PHB granule (obrázek 14, červené šipky). Na vybraných snímcích (obrázek 14 E, obrázek 22 v příloze) lze pozorovat PHB granule, které jsou elastické i za velmi nízkých teplot využívaných v cryo-SEM, jelikož nedošlo k jejich poškození během lámání. Dalším shodným znakem vzorků čistých kultur a vzorků s přidavkem síťovacího činidla je tvorba předpokládané kapsule okolo jednotlivých buněk, z čehož bylo usouzeno, že se nejspíše také jedná o cysty. Pouze u vzorku *A. vinelandii* DSM 720 síťovaného  $\text{CaCl}_2$  je tato kapsule méně patrná (obrázek 14 A–I, modré šipky).

Obecně lze říci, že u všech vzorků s přidavkem jakéhokoliv použitého síťovacího činidla bylo pozorováno větší množství zesíťovaného alginátu v okolí buněk než u vzorků čistých kultur (obrázek 14 A–I, žluté šipky). Struktura tohoto volného hydrogelu je obdobná u vzorků všech zkoumaných zástupců, u kterých jako síťovací činidlo byl použit  $\text{CaCl}_2$ . U kultur síťovaných kyselinou jablečnou je volný hydrogel podobný u zástupců CCM 289 a DSM 87, avšak výjimkou je zástupce DSM 87 (obrázek 14 E), u kterého došlo k příliš velké sublimaci, ale struktura hydrogelu je patrná i zde.

Struktura hydrogelu síťovaného GDL a  $\text{CaCO}_3$  je od dvou předchozích naprosto odlišná. Jedná se o hustěji síťovaný hydrogel, který kompletně obklopuje pozorované buňky (obrázek 14 G–I). Jak již bylo zmíněno v experimentální části (kapitola 3.5) byly u vzorků síťovaných prostřednictvím GDL použity dvě metody. V prvním případě byl jako síťovací činidlo použit samotný GDL, kdežto ve druhém případě byl ke GDL přidán  $\text{CaCO}_3$ . Mechanismus síťování alginátu prostřednictvím tohoto činidla je uveden v kapitole 2.1.3.1. Zjednodušeně řečeno, přidavek GDL způsobuje uvolňování  $\text{Ca}^{2+}$  kationtů z nerozpustného  $\text{CaCO}_3$ . Uhličitán vápenatý byl v prvním případě přítomen pouze v produkčním médiu, kdežto v druhém došlo navíc k jeho přidavku společně s GDL. Z této skutečnosti plyne, že ve druhém případě byla vyšší koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  kationtů schopných síťovat produkovaný extracelulární alginát. Proto lze na obrázku 15 pozorovat na snímcích A, B a C naprosto odlišné gely než na snímcích D, E a F, což odpovídá předpokladu, že gely s přidavkem  $\text{CaCO}_3$  budou mít hustší hydrogelovou síť než gely, které  $\text{Ca}^{2+}$  kationty získávají pouze z produkčního média.

Bakterie na snímcích čistých i síťovaných kultur jsou stejně staré (5 dnů). V teoretické části bylo řečeno, že se jedná o oválné až kulaté buňky s rozměry 2–10  $\mu\text{m}$  na délku a 1–2  $\mu\text{m}$  na šířku (kapitola 2.1.3). Oproti tomu zralé cysty, by měly mít kulovitý tvar a velikost 1,5–2  $\mu\text{m}$  (kapitola 3.7). Na snímcích čistých kultur (obrázek 13 A–C) lze pozorovat převážně buňky kulovitého tvaru, tedy nejspíše již ve formě cyst. Avšak je důležité nezapomínat na fakt, že se jedná pouze o dvourozměrné snímky, na kterých jsou bakterie orientovány náhodně. Na snímcích pořízených při větších zvětšení jsou přítomny nejen kulovité, ale také oválné buňky, což může značit, že proces encystace není u všech buněk dokončen. Přibližná průměrná velikost kulovitých buněk na vybraných snímcích (obrázek 13 D–F, obrázek 14 A–I a obrázek 15 A–F) se pohybuje okolo 2–3  $\mu\text{m}$  a průměrná velikost oválných buněk se na těchto snímcích pohybuje mezi 3–6  $\mu\text{m}$  na délku (byly měřeny buňky, na kterých jsou červenou šipkou znázorněny PHB granule). Tyto hodnoty odpovídají přibližně hodnotám pro velikost zralých cyst nebo vegetativních buněk, avšak je třeba je brát s rezervou kvůli různé orientaci buněk při lámání.





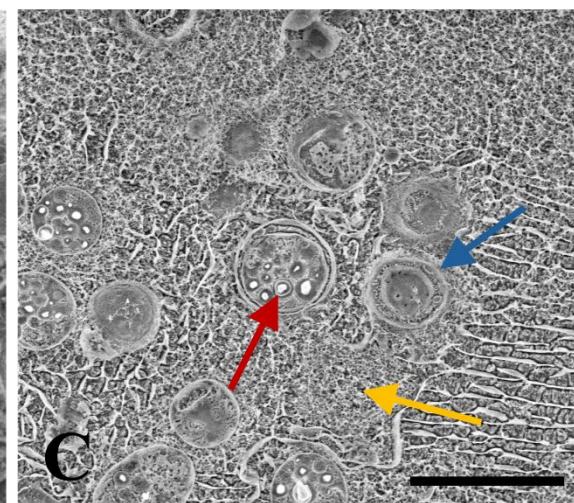
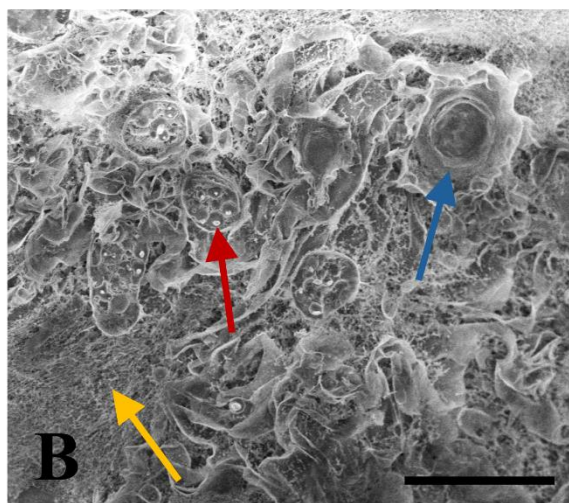
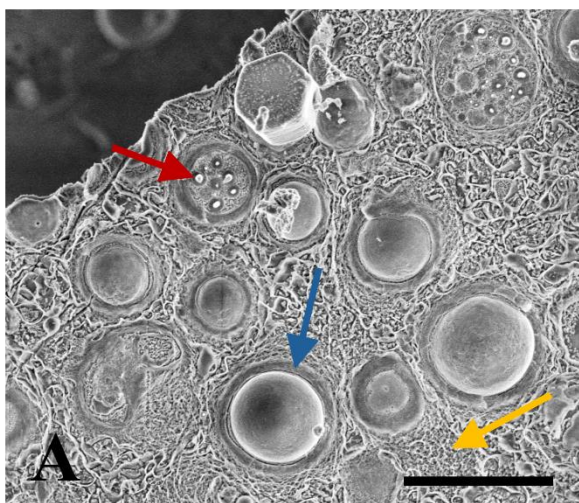
Obrázek 14: Cryo-SEM snímky zesíťovaných kultur *Azotobacter vinelandii*. Červené šipky ukazují na PHB granule, modré na kapsule obklopující bakterie a žluté na zesíťovaný hydrogel. Měřítka je u všech snímků 3  $\mu$ m.

*A. vinelandii* CCM 289

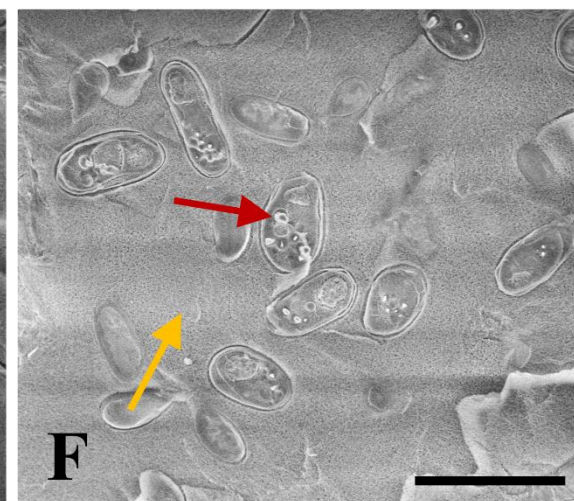
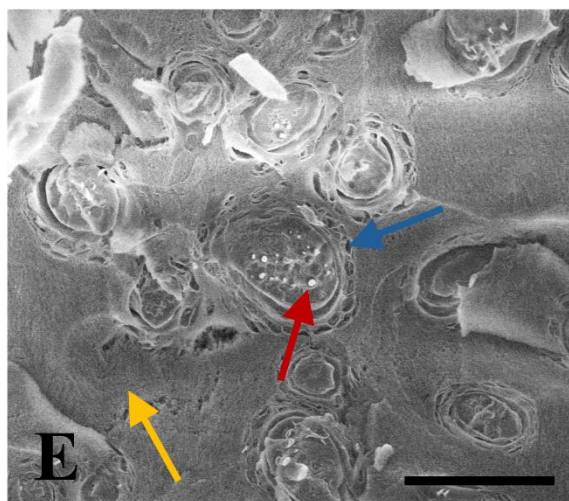
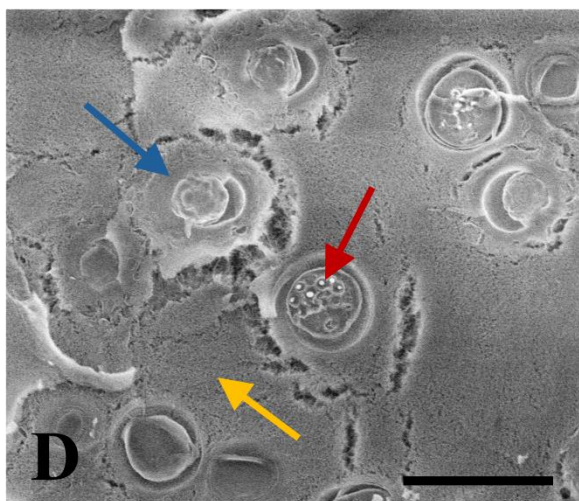
*A. vinelandii* DSM 87

*A. vinelandii* DSM 720

1 M GDL



1 M GDL a  
0,5 M CaCO<sub>3</sub>



Obrázek 15: Cryo-SEM snímky zesíťovaných kultur *Azotobacter vinelandii* pomocí činidla GDL. Červené šipky ukazují na PHB granule, modré šipky na kapsule, kterými jsou bakterie obaleny a žluté šipky na zesíťovaný hydrogel. Měřítka je u všech snímků 5  $\mu$ m.

## 4.2 Analýza vzorků pomocí STEM

Kromě kryogenní skenovací elektronové mikroskopie byly připravené vzorky analyzovány pomocí skenovací transmisní elektronové mikroskopie. Příprava vzorků pro STEM je složitější než pro cryo-SEM, jelikož jsou pozorovány ultratenké řezy vzorků substituovaných pryskyřicí.

Pro tuto práci byla jako hlavní metoda přípravy vzorků pro STEM vybrána metoda spočívající ve vysokotlakém zmrazení vzorků (kapitola 3.6) a následné mrazové substituci (kapitola 3.8). Tato metoda byla vybrána z důvodu možnosti porovnání výsledných snímků nejen s pořízenými snímky z cryo-SEM, ale také se snímky z literární rešerše, jelikož byly nalezeny články obsahující snímky této bakterie pouze z transmisního elektronového mikroskopu, které se od snímků pořízených cryo-SEM značně liší. Vzorky připravené kryogenními technikami pro STEM pocházely ze stejných buněčných kultur jako vzorky pro cryo-SEM.

Nakonec byla jako doplňující metoda STEM vybrána chemická příprava vzorků, která spočívala v chemické fixaci vzorků roztokem glutaraldehydu a paraformaldehydu a následném kontrastování roztokem UA-zero (kapitola 4.2.2). Touto metodou byla připravena pouze čistá kultura *A. vinelandii* CCM 289, která byla vybrána jako reprezentativní zástupce.

### 4.2.1 Analýza vzorků připravených kryogenní metodou

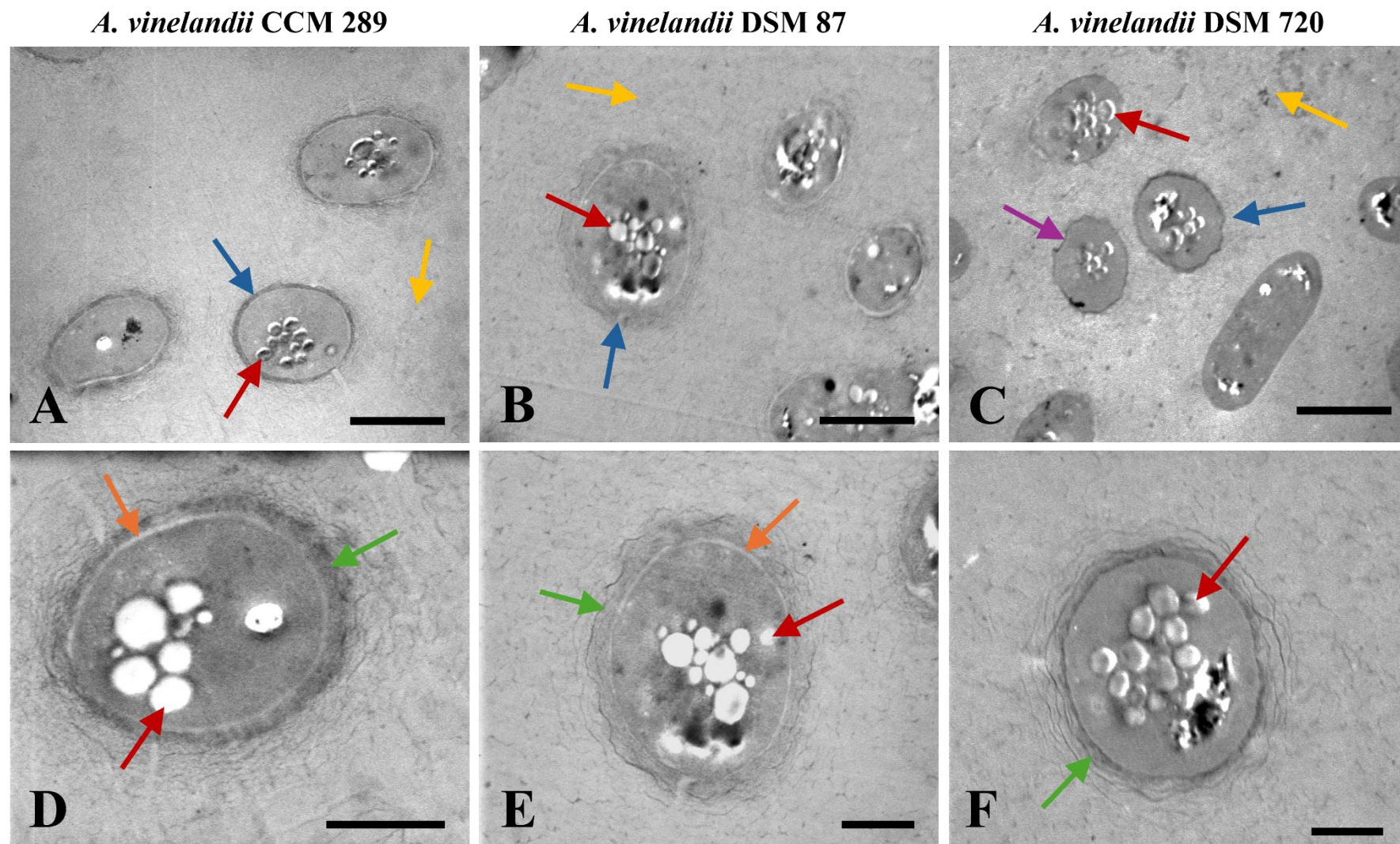
Stejně jako pro cryo-SEM byly kryogenními technikami i pro STEM připraveny vzorky čistých i síťovaných kultur *A. vinelandii* CCM 289, DSM 87 a DSM 720, přičemž jejich příprava byla provedena dle standardních protokolů (kapitola 3.8). I zde byly vzorky připraveny a pozorovány ve dvou opakováních, přičemž bylo zjištěno, že pozorované struktury jsou velmi podobné, a proto byly následně vybrány reprezentativní snímky od každé studované kultury i použitého síťovacího činidla. Na každém snímku je v pravém dolním rohu znázorněno měřítko, jehož velikost je uvedena v popisku.

Jako první byly analyzovány vzorky čistých buněčných kultur (obrázek 16). Obecně lze konstatovat, že vzorky všech zkoumaných čistých kultur byly relativně dobře prosyceny pryskyřicí, jelikož jednotlivé řezy nebyly potrhány. Na všech uvedených snímcích je možné pozorovat elektrontransparentní PHB granule, které jsou označeny červenou šipkou.

Dále byl na těchto snímcích pozorován síťovaný hydrogel, i přesto, že se jedná o kultury bez přídavku síťovacího činidla (obrázek 16 A, B, C, žluté šipky). Jak již bylo řečeno v kapitole 4.1, tento síťovaný hydrogel se zde nachází kvůli použití  $\text{CaCO}_3$  jako součásti kultivačního média, přičemž právě  $\text{Ca}^{2+}$  kationty přítomný alginát síťují. Na obrázku 16 C znázorňuje fialová šipka buňku poškozenou krystalizací. Toto poškození bylo nejspíše způsobeno při vysokotlakém mrazení, kdy došlo k tvorbě krystalického ledu namísto amorfního, což bylo s vysokou pravděpodobností zapříčiněno nedokonalým uzavřením hlubokého nosiče hladkým.

V neposlední řadě byly na těchto snímcích dobře pozorovatelné kapsule, jejichž výskyt byl u cryo-SEM pouze předpokládán (obrázek 16, modré šipky). Dle literární rešerše se kapsule skládá ze dvou vrstev, vnitřní nazývané intin a vnější nazývané exin. Obě tyto vrstvy byly pozorovány u všech zkoumaných čistých kultur. Elektrontransparentní intin znázorňuje obrázek 16 D, E, konkrétně oranžové šipky a vnější elektrondenzní exin zase obrázek 16 D, E, F, konkrétně zelené šipky. Důvod proč na obrázku 16 F není pozorován intin je nejspíše dán

stářím dané buňky, jelikož z literární rešerše bylo zjištěno, že tvorba kapsule začíná tvorbou exinu a až následně dochází k tvorbě intinu právě mezi již přítomným exinem a buněčnou stěnou bakterie [63].



Obrázek 16: STEM snímky čistých kultur *Azotobacter vinelandii* připravených kryogenní metodou. Červené šipky ukazují na PHB granule, modré šipky na kapsule obklopující bakterie, žluté šipky na zesíťovaný hydrogel, fialová šipka na bakterii poškozenou krystalizací, oranžové šipky na intin a zelené na exin. U snímků A, B, C je měřítko 2  $\mu\text{m}$  a u snímků D, E, F 1  $\mu\text{m}$ .

Vyjma čistých kultur byly pro STEM kryogenní metodou připraveny také kultury *A. vinelandii* s přidavkem síťovacích činidel, přičemž byl opět použit  $\text{CaCl}_2$ , kyselina jablečná a GDL s  $\text{CaCO}_3$ . Přehled vybraných snímků daných kultur s přidavkem síťovacích činidel znázorňuje obrázek 17. Na všech vybraných snímcích lze pozorovat uvnitř buněk zásobní PHB granule (obrázek 17, červené šipky). Prosycení PHB granulí bylo v případě zgelovaných vzorků méně kvalitní, jelikož častěji a snadněji docházelo k tvorbě trhlin v připravených ultratenkých řezech kvůli působení elektronového svazku. To bylo nejspíše způsobeno přítomností síťovaného gelu v okolí buněk, který ztěžoval, případně až znemožňoval, kompletní prosycení vzorků s bakteriemi pryskyřicí.

Tento okolní zesíťovaný alginát byl totiž podstatně hustší v porovnání se vzorky čistých buněčných kultur (obrázek 17, žluté šipky). Množství přítomného hydrogelu je dobře patrné při porovnání míst, kde se nachází hydrogel (žluté šipky, obrázek 17 a obrázek 24 v příloze) s místy, kde se nachází pouze čistá pryskyřice (zelené šipky, obrázek 17 a obrázek 24 v příloze). U bakterie *A. vinelandii* CCM 289 lze na snímcích A, D (obrázek 17) pozorovat velmi podobnou strukturu hydrogelu síťovaného  $\text{CaCl}_2$  nebo kyselinou jablečnou, avšak u GDL s  $\text{CaCO}_3$  (snímek G) lze vidět výrazně hůře prosycený hydrogel. To samé platí také pro zástupce DSM 87, u kterého jsou vzorky síťované prvními dvěma zmíněnými síťovacími činidly (snímky B, E) obdobné, avšak poslední zmíněné činidlo je výrazně odlišné (snímek H). Mezi těmito dvěma zástupci *A. vinelandii* nebyly pozorované velké rozdíly v pozorované struktuře. Oproti tomu se kultura DSM 720 (snímky C, F, I) lišila hlavně u vzorku, který byl síťován kyselinou jablečnou. U tohoto vzorku se totiž v okolí buněk nacházelo jen velmi malé množství pozorovatelného hydrogelu (snímek F).

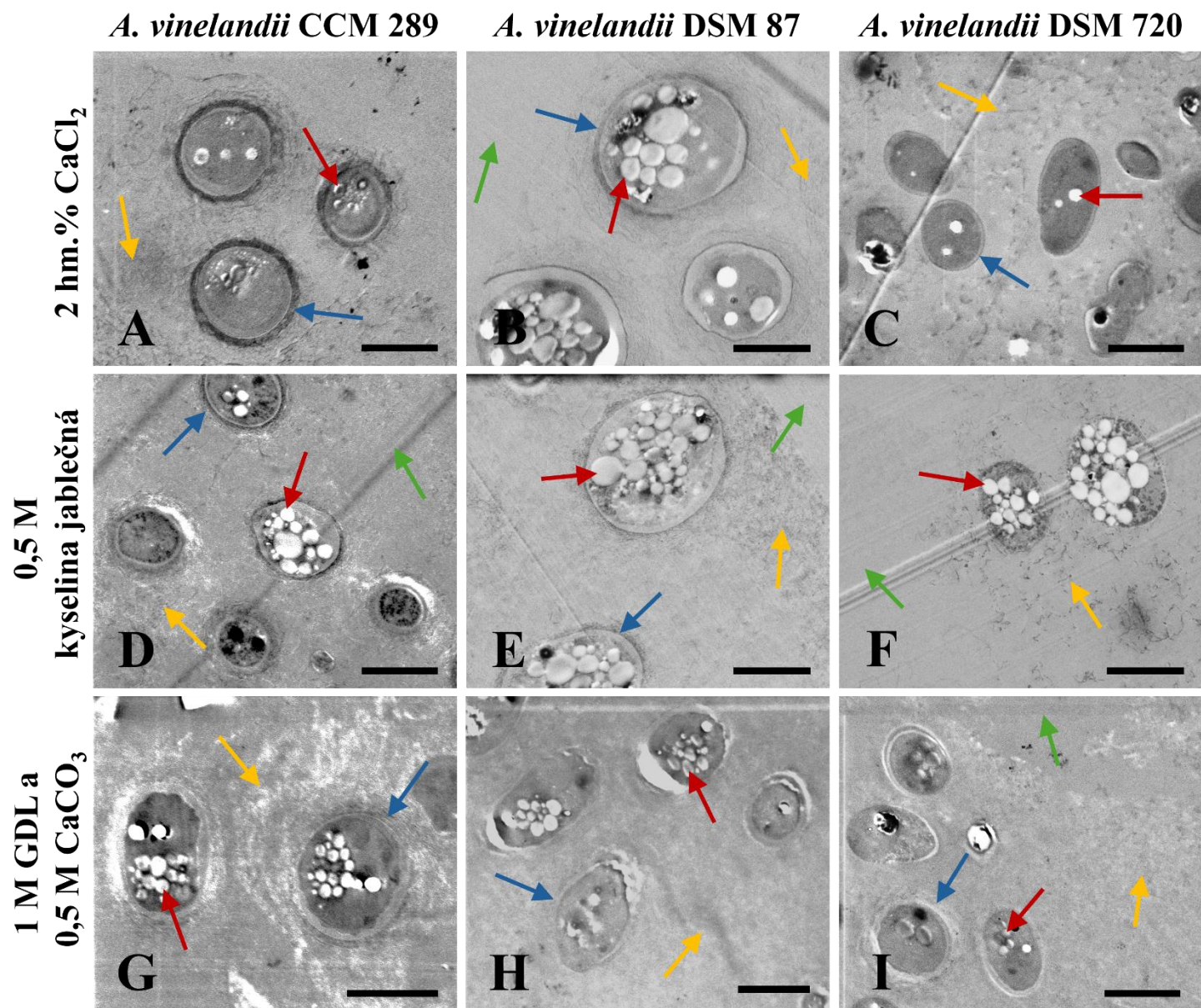
Pro vyšší kontrast přítomného hydrogelu by bylo možné v budoucnu využít kontrastující činidlo rutheniová červeň. Jedná se o kationtové činidlo používané pro zvýšení kontrastu záporně nabitých polysacharidů vně buněk [68; 69]. V této práci nebylo toto činidlo využito, jelikož byl zde použit tradičně používaný protokol pro přípravu vzorků prostřednictvím mrazové substituce.

Kromě porovnání jednotlivých síťovacích činidel lze také porovnat činidla využívající GDL, jelikož u prvního opakování byly buněčné kultury síťovány pouze GDL, avšak u druhého opakování byl ke GDL přidán  $\text{CaCO}_3$  (kapitola 3.5). Z porovnání těchto dvou opakování plynou stejné závěry jako u cryo-SEM (kapitola 4.1), kde bylo konstatováno, že činidlo s přidavkem  $\text{CaCO}_3$  tvoří výrazně hustší hydrogel, než samotný GDL. To odpovídá předpokladu, jelikož u vzorků s přidavkem  $\text{CaCO}_3$  dochází k uvolnění většího množství  $\text{Ca}^{2+}$  síťujících kationtů (obrázek 18). Na hydrogelu síťovaného prostřednictvím GDL s  $\text{CaCO}_3$  lze vidět trhliny (obrázek 18 a obrázek 23 v příloze), které jsou způsobeny nedostatečným prosycením relativně hodně viskózní pryskyřicí Epon, jež nemohla kvůli hustotě hydrogelové sítě dostatečně penetrovat celým vzorkem.

Dále lze na pořízených snímcích pozorovat ochranné kapsule obklopující jednotlivé buňky (obrázek 17, obrázek 18, modré šipky a obrázek 19, oranžové a zelené šipky). Poslední zmíněný obrázek 19 znázorňuje detailní strukturu pozorovaných buněk. Na snímcích A, B lze vidět vrstevnatou strukturu těchto kapsulí, konkrétně oranžové šipky označují elektrontransparentní intin a zelené šipky zase elektrondenzní exin. Na snímku A, lze vidět, že je samotný intin složen ze dvou vrstev, přičemž vnitřní vrstva je v literatuře označována CC2 a vnější CC1 [62; 70].

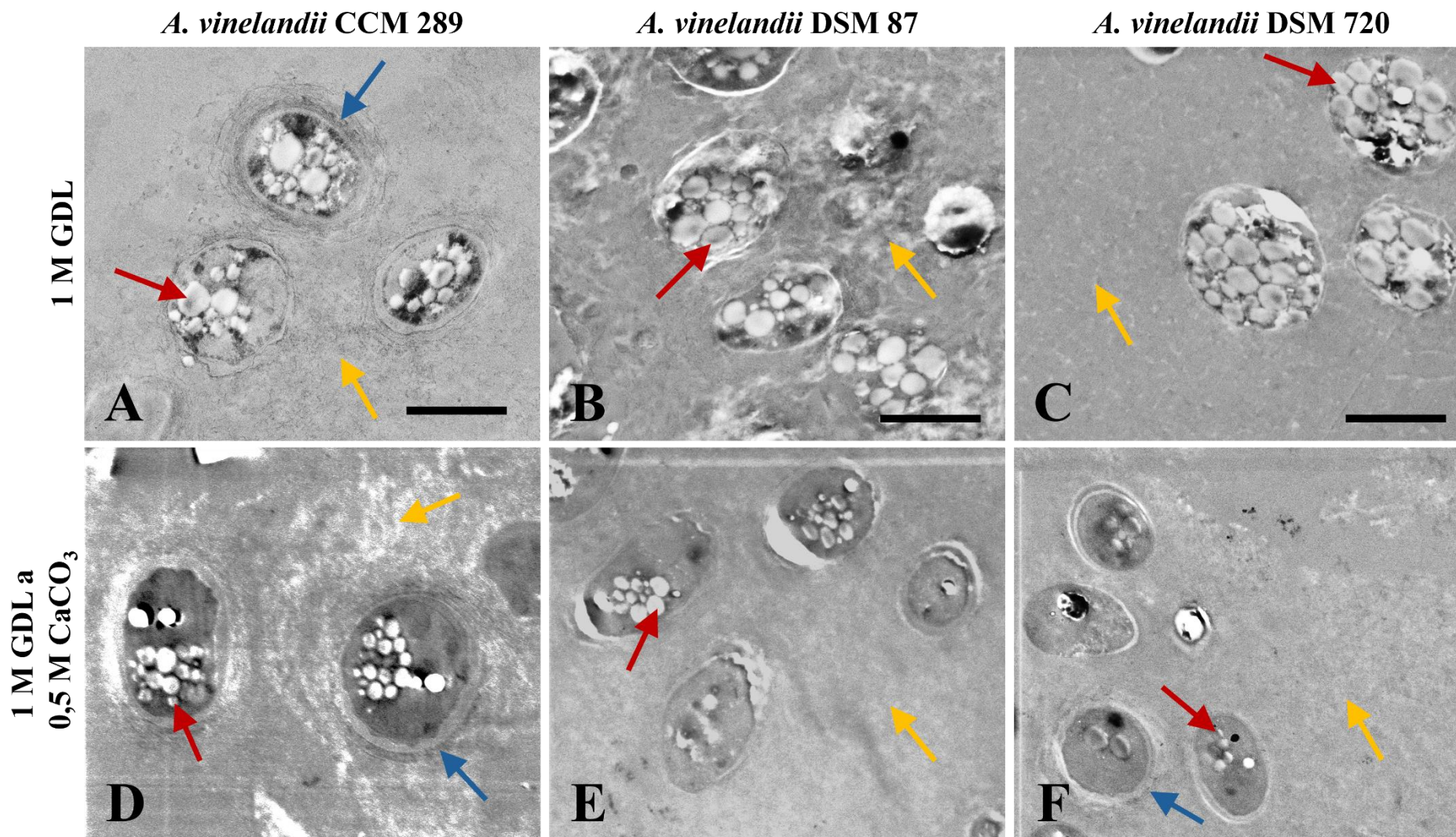
Bohužel u kultury *A. vinelandii* DSM 720 došlo během vysokotlakého mrazení ke krystalizaci vzorku, což mělo za následek poškození struktury vzorku, jak lze vidět na snímku C, fialová šipka. K této krystalizaci došlo nejspíše kvůli nedokonalému uzavření hlubokého nosiče hladkým, jelikož hydrogelové vzorky byly krájeny pouze skalpelem, kdy je obtížné přesně stanovit tloušťku řezu, která může být v závislosti na použitých nosičích maximálně 0,2 mm. Jako alternativa pro krájení hydrogelů by bylo možné využít přístroj zvaný vibratom, pro který by však musely být připraveny relativně pevné a kompaktní hydrogelové vzorky.

Připravené bakteriální kultury byly stejně jako u cryo-SEM 5 dnů staré, což odpovídá předpokladu z literární rešerše, že by se měly v této době ve vzorcích vyskytovat buňky ve formě cyst. Jsou-li bakterie ve formě cyst, jejich tvar je spíše kulovitý než oválný a jejich velikost je dle rešerše 1,5–2,0  $\mu\text{m}$  [65]. Na snímcích ze STEM (obrázek 16 a obrázek 17) byly stejně jako na snímcích z cryo-SEM (kapitola 4.1) měřeny buňky, na kterých jsou červenou šipkou označeny PHB granule, avšak i zde je nutné nezapomínat na náhodou orientaci buněk při krájení. Průměrná velikost těchto bakterií byla stanovena přibližně na 1,5–3,5  $\mu\text{m}$ , což zhruba odpovídá údajům z literární rešerše. Větší velikost nebo více oválný tvar buněk je nejspíše způsoben přítomností bakterií, které se nacházejí ve dřívější fázi buněčného cyklu, v němž není proces encystace zcela dokončen. Obrázek 17 C zobrazuje příklad takové bakterie, která má stále oválný tvar a její kapsule je v této fázi cyklu velmi nevýrazná, přičemž zde úplně chybí elektrontransparentní vrstva zvaná intin.



Obrázek 17: STEM snímky zesíťovaných kultur *Azotobacter vinelandii* připravených kryogenní metodou. Červené šipky ukazují na PHB granule, modré na kapsule obklopující bakterie, žluté na zesíťovaný hydrogel a zelené na čistou pryskyřici. Měřítka je u všech snímků 2  $\mu\text{m}$ .



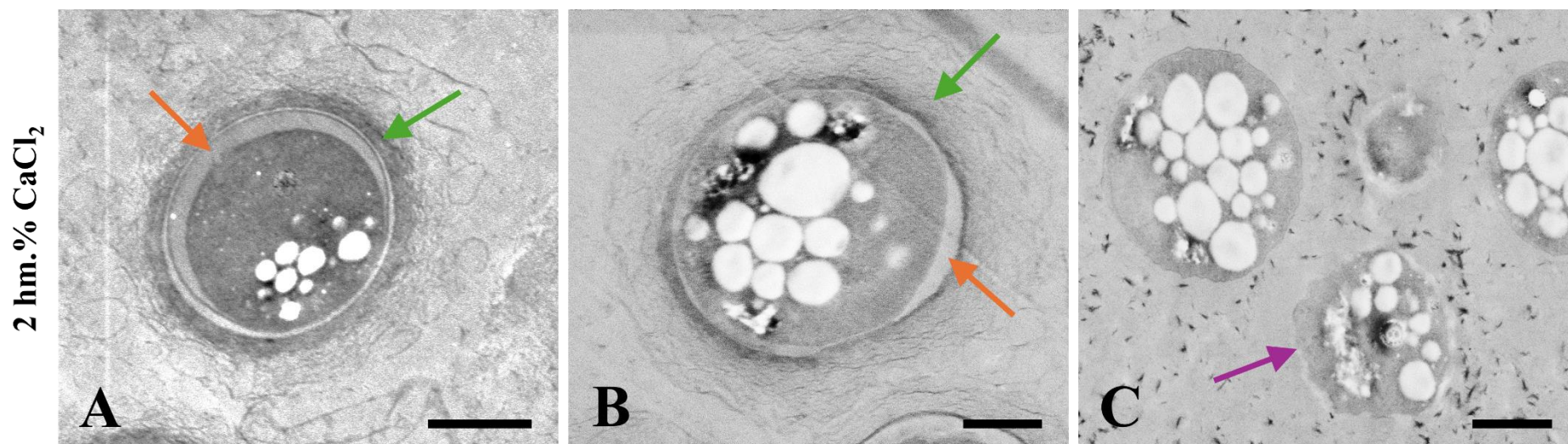


Obrázek 18: STEM snímky zesíťovaných kultur *Azotobacter vinelandii* připravených kryogenní metodou a síťovaných pomocí činidla GDL. Červené šipky ukazují na PHB granule, modré šipky na kapsule obklopující bakterie a žluté šipky na zesíťovaný hydrogel. Měřítka je u všech snímků 2  $\mu\text{m}$ .

*A. vinelandii* CCM 289

*A. vinelandii* DSM 87

*A. vinelandii* DSM 720



Obrázek 19: STEM detailní snímky kultur *Azotobacter vinelandii* připravených kryogenní metodou a sířovaných 2 hm.% CaCl<sub>2</sub>. Oranžové šipky ukazují na intin, zelené na exin a fialová na buňku poškozenou krystalizací. Měřítka je u všech snímků 1 μm.

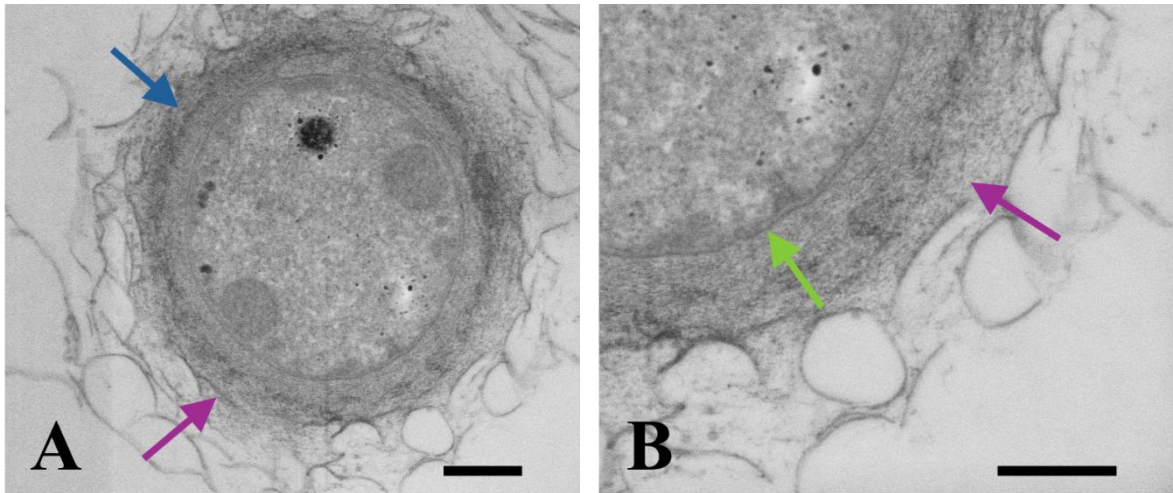
#### 4.2.2 Analýza vzorku připravených chemickou metodou

Jako doplňující metoda byla vybrána chemická příprava vzorků a jejich následné pozorování v STEM. Pro přípravu byl vybrán pouze vzorek čisté kultury *A. vinelandii* CCM 289, jakožto reprezentativní zástupce. Při této metodě byl jako fixační činidlo vybrán roztok glutaraldehydu s paraformaldehydem a jako kontrastující činidlo bez uranylový UA-zero roztok, který je dle protokolů používán s ethanolem jako dehydratačním a promývacím činidlem. Dále byly vybrány dva pufrů, první byl tradičně používaný kakodylanový pufr a druhý HEPES pufr byl vybrán jako méně pro zdraví škodlivá alternativa. V neposlední řadě byla vybrána epoxidová pryskyřice Spurr, která má oproti pryskyřici Epon nižší viskozitu, proto ji lze použít s méně těkavým ethanolem.

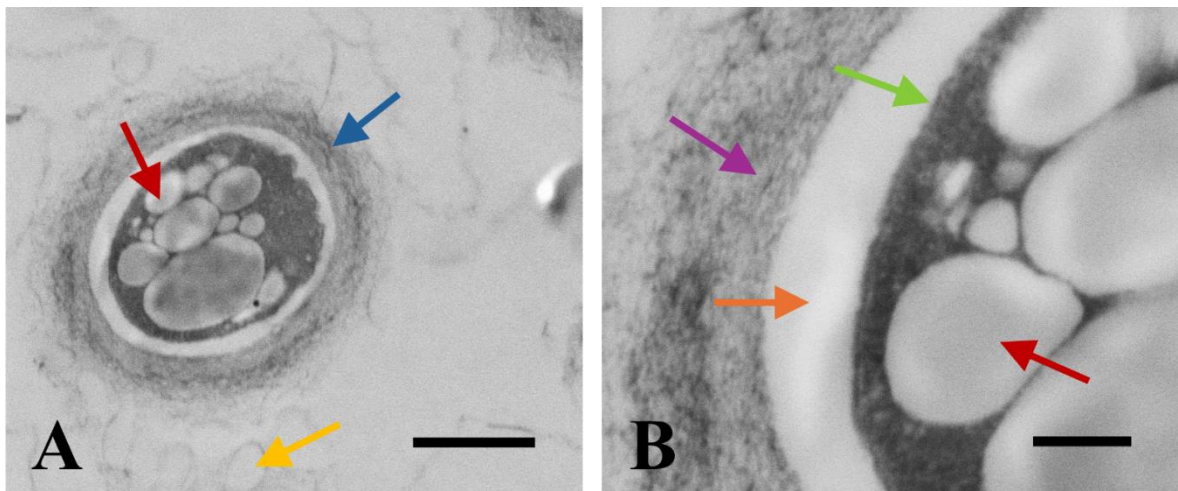
Z pořízených snímků (obrázek 20, obrázek 21) plyne, že oba použité pufrů, tedy kakodylanový i HEPES, jsou srovnatelné. Tedy, že není třeba využívat zdraví škodlivý kakodylanový pufr, když výsledné buňky, pro které byl využit HEPES pufr, jsou rovnocenné.

Rozdíl mezi těmito dvěma vzorky sice je, ale není způsobený výběrem pufru, nýbrž byly nejspíše zachyceny bakterie v rozdílné fázi buněčného cyklu. Buňka na obrázku 20 je nejspíše mladší, jelikož ještě nemá vytvořený intin, který se tvoří později než exin, jenž je označen fialovými šipkami [63]. A zároveň v této buňce nejsou pozorovány PHB granule, jejichž produkce nastává také v pozdějších fázích buněčného cyklu. Oproti tomu bakterie znázorněná na dalším snímku (obrázek 21) má již viditelně vytvořené obě vrstvy, tedy jak exin, označený fialovou šipkou, tak intin, označený šipkou oranžovou. Tyto vrstvy byly určeny podle nalezených článků [66; 70]. Zároveň bylo uvnitř této bakterie pozorováno velké množství zásobních PHB granulí.

Ve většině nalezených článků, bývá intin, stejně jako zde elektrontransparentní (obrázek 21), avšak byl nalezen článek, který jako fixační činidlo využil glutaraldehyd s Bouinovým roztokem, který se využívá pro fixaci jemných struktur a skládá se z formaldehydu, kyseliny octové a kyseliny pikrové. Po fixaci tímto činidlem byla v daném článku pozorovatelná elektrondenzní vlákenná struktura intinu [70; 71].



Obrázek 20: Detailní snímek bakterie *A. vinelandii* CCM 289 připravené chemickou cestou za použití kakodylanového pufru. Modrá šipka ukazuje na kapsuli obklopující bakterii, fialová na elektrondenzní exin a zelená na buněčnou stěnu. U snímku A je měřítko 500 nm a u snímku B 400 nm.



Obrázek 21: Detailní snímky bakterie *A. vinelandii* CCM 289 připravené chemickou cestou za použití HEPES pufru. Červené šipky ukazují na PHB granule, modrá na kapsuli obklopující bakterii, žlutá na zesíťovaný hydrogel, fialová na elektrondenzní exin a oranžová na elektrontransparentní intin. U snímku A je měřítko 500 nm a u snímku B 200 nm.

## 5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo provedení analýzy morfologie a ultrastruktury nejen čisté bakteriální kultury *Azotobacter vinelandii*, ale také hydrogelových forem vzniklých enkapsulací této bakterie do jí produkovaného extracelulárního alginátu. Pro splnění tohoto cíle byly vybrány metody elektronové mikroskopie, konkrétně byla vybrána kryogenní skenovací elektronová mikroskopie a skenovací transmisní elektronová mikroskopie, přičemž pro STEM byly vybrány dvě metody přípravy vzorků. První z nich zahrnovala vysokotlaké mrazení a mrazovou substituci přítomné vody acetonem následovanou tradičními postupy přípravy biologických vzorků pro TEM. Druhou metodou byla standardně používaná chemická metoda přípravy biologických vzorků, avšak byly využity méně zdravotně závadné alternativy kontrastujících činidel a použitého pufru.

Celkově byly analyzovány dvě skupiny vzorků. První skupinou byly čisté buněčné kultury *Azotobacter vinelandii*, přičemž byli vybráni zástupci z české a německé sbírky mikroorganismů s označením CCM 289, DSM 87 a DSM 720. Druhá skupina zahrnovala téže kultury, avšak s přidavkem různých síťovacích činidel, konkrétně s chloridem vápenatým o koncentraci 2 hm.%, 0,5 M kyselinou jablečnou nebo 1 M glukono- $\delta$ -laktone s přidavkem 0,5 M uhličitanu vápenatého. Kvůli reprodukovatelnosti byly všechny zkoumané vzorky připraveny ve dvou opakováních, které byly pro všechny vzorky velmi obdobné.

První vybranou technikou byla tedy kryogenní skenovací elektronová mikroskopie, jejímž prvním krokem bylo vysokotlaké mrazení. Mrazení čistých buněčných kultur probíhalo standardně, napipetováním suspenze na nosič. Avšak mrazení hydrogelových vzorků bylo výrazně obtížnější, jelikož neexistuje zavedený postup pro mrazení hydrogelů. Pro tuto práci byl zvolen postup krájení skalpelem, přičemž byly vzorky krájeny na co nejtenčí plátky, proto aby došlo ke správnému zmrazení. Následujícím krokem bylo mrazové lámání a substituce, což sloužilo k odkrytí vnitřních struktur vzorků. Takto připravené vzorky byly poté pozorovány v elektronovém mikroskopu Magellan 400/L vybaveném cryo-systémem.

U všech touto metodou připravených vzorků byly uvnitř bakterií pozorovány PHB granule, které, jak bylo potvrzeno, jsou elastické i za kryogenních teplot. Dalším překvapivě shodným znakem čistých i síťovaných kultur byla přítomnost hydrogelové sítě tvořené pravděpodobně alginátem vně jednotlivých buněk. Výskyt tohoto hydrogelu u čistých kultur byl vysvětlen přítomností  $\text{CaCO}_3$  v produkčním médiu použitém pro kultivaci, přičemž právě  $\text{Ca}^{2+}$  kationty alginát síťují. Avšak množství síťovaného alginátu bylo u čistých bakteriálních kultur výrazně nižší, než u enkapsulovaných kultur. Správnosti tohoto odůvodnění také odpovídá rozdíl mezi kulturami s přidavkem pouze GDL a kulturami s přidavkem GDL a  $\text{CaCO}_3$ . Kdy právě u druhých zmíněných kultur byl pozorován výrazně hustěji síťovaný hydrogel, což bylo způsobeno přítomností většího množství  $\text{Ca}^{2+}$  kationtů. V neposlední řadě byly prostřednictvím cryo-SEM pozorovány hydrogelové útvary v těsném okolí jednotlivých buněk. Podle literární rešerše bylo zjištěno, že *A. vinelandii* tvoří kapsule sloužící k ochraně před různými stresovými faktory. Avšak přítomnost těchto kapsulí nebylo možné pomocí cryo-SEM jednoznačně potvrdit, jelikož nebyla nalezena literatura obsahující snímky právě z cryo-SEM. I proto byly použity další metody pro zjištění detailnější ultrastruktury zkoumaných vzorků.

Druhou vybranou technikou byla skenovací transmisní elektronová mikroskopie. Jako hlavní metoda přípravy vzorků pro STEM byl vybrán postup spočívající ve vysokotlakém mrazení (probíhající jako u cryo-SEM) a mrazové substituci roztokem acetonu a oxidu osmičelého následované prosycováním pryskyřicí a přípravou ultratenkých řezů, které byly následně pozorovány buď v elektronovém mikroskopu Helios G4 HP nebo Magellan 400/L, přičemž oba mikroskopy byly vybaveny stejným STEM 3+ detektorem.

Výsledky z této metody odpovídají závěrům z cryo-SEM. I zde byly pozorovány elektrontransparentní PHB granule uvnitř buněk a zesíťovaný hydrogel v okolí buněk, a to jak u enkapsulovaných vzorků, tak i u vzorků čistých kultur, u kterých však byla hydrogelová síť podstatně řidší. Dále také vzorky síťované GDL s přídavkem  $\text{CaCO}_3$  měly hustší hydrogelovou síť než vzorky s přídavkem pouze GDL. V neposlední řadě byla prokázána přítomnost, u cryo-SEM pouze předpokládaných, kapsulí v těsném okolí jednotlivých bakterií. Bylo zjištěno, že se tyto kapsule skládají ze dvou vrstev, první je elektrontransparentní vrstva známá pod názvem intin, okolo které se nachází elektrondenzní vrstva zvaná exin. Tyto kapsule lze vidět na všech pořízených snímcích správně zmrazených vzorků. U nedokonale zmrazených vzorků byla poničena nativní struktura daných vzorků, jelikož v průběhu mrazení došlo k nežádoucí krystalizaci.

Jako doplňková metoda STEM byla vybrána chemická cesta přípravy čisté buněčné kultury *A. vinelandii* CCM 289. Tato bakterie byla vybrána jako reprezentativní zástupce. Vybraná metoda chemické přípravy tohoto vzorku není tradičně používána. Pro fixaci byl sice vybrán standardní roztok 2,5% glutaraldehydu a 2% formaldehydu, avšak dalším krokem bylo kontrastování bezuranylovým roztokem UA-zero. Jako pufrací roztoky byl vybrán klasicky používaný kakodylanový pufr a méně využívaný HEPES pufr, přičemž na výsledných snímcích nebyl zjištěn rozdíl vycházející z typu použitého pufru, proto lze pro další analýzy těchto vzorků používat zdraví méně škodlivý HEPES pufr. I při této metodě byla dokázána přítomnost zásobních PHB granulí a také kapsule v těsném okolí jednotlivých bakterií, která se skládá z vrstev zvaných intin a exin. Avšak u vzorku, pro který byl použit kakodylanový pufr, nebyl elektrontransparentní intin pozorován. Z literární rešerše bylo zjištěno, že se intin tvoří později než exin, tudíž přítomná bakterie byla nejspíše v dřívější fázi buněčného cyklu.

Obecně tedy lze konstatovat, že pomocí cryo-SEM byly pozorovány nejen bakterie obsahující PHB granule, ale také hydrogelová síť velmi podobná nativnímu stavu. Jedná se o metodu sice náročnou na vybavení, ale pro morfologickou analýzu velmi rychlou. Kryogenní příprava vzorků a jejich následné pozorování v STEM je oproti cryo-SEM výrazně časově náročnější, avšak je možné dosáhnout většího přiblížení a poskytuje tedy detailnější ultrastrukturní analýzu. U obou zmíněných metod byly vzorky fixovány fyzikální cestou, konkrétně zmrazením. Výhodou této metody je práce bez přídavku dalších chemikálií, které by mohly ovlivnit strukturu pozorovaných čistých i enkapsulovaných bakterií. Avšak proces mrazení musí být proveden správně, aby došlo k tvorbě pouze amorfního ledu, který neničí nativní strukturu připravovaných preparátů. U poslední v této práci použité metody byly vzorky připraveny chemickou cestou, z čehož plyne, že dochází k přídavku různých chemikálií, které mohou ovlivňovat výslednou strukturu. Jedním z nejdůležitějších parametrů přípravy je osmotická síla, jelikož používané roztoky musí být pro zkoumané buňky izotonické. Dalším problémem této metody je nutnost penetrace všech použitých fixačních, kontrastujících

a dehydratačních činidel a také pryskyřice celým objemem vzorku, což je výrazně náročnější u bakterií obalených kapsulí natož obklopených navíc síťovaným alginátem. Jelikož pokud není při každém prosycování těmito činidly a pryskyřice dosaženo maximální úrovně prosycení, dochází při následném krájení a pozorování v mikroskopu k potrhání jednotlivých řezů. Z těchto důvodů byla tato metoda pouze doplňková.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZROJŮ

- [1] GOSWAMI, Dweipayan; THAKKER, Janki; DHANDHUKIA, Pinakin a TEJADA MORAL, Manuel. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. online. 2016, roč. 2, č. 1. ISSN 2331-1932. DOI: 10.1080/23311932.2015.1127500. [cit. 2024-02-06].
- [2] VEJAN, Pravin; KHADIRAN, Tumirah; ABDULLAH, Rosazlin a AHMAD, Noraini. Controlled release fertilizer: A review on developments, applications and potential in agriculture. online. *Journal of Controlled Release*. 2021, roč. 339, s. 321-334. ISSN 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.10.003. [cit. 2024-02-06].
- [3] BHATTACHARYYA, Chandrima; ROY, Rupsa; TRIBEDI, Prosun; GHOSH, Anupama a GHOSH, Abhrajyoti. Biofertilizers as substitute to commercial agrochemicals. In: PRASAD, Majeti. *Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation: Pesticides and Chemical Fertilizers*. 1st Edition. Elsevier Inc. All, 2020, s. 263-290. ISBN 9780081030189.
- [4] BERGES, John a MULHOLLAND, Margaret. Enzymes and Nitrogen Cycling. online. *Nitrogen in the Marine Environment*. 2008, s. 1385-1444. ISBN 9780123725226. DOI: 10.1016/B978-0-12-372522-6.00032-3. [cit. 2024-02-12].
- [5] NOAR, Jesse a BRUNO-BÁRCENA, Jose. Azotobacter vinelandii: the source of 100 years of discoveries and many more to come. online. *Microbiology*. 2018, roč. 164, č. 4, s. 421-436. ISSN 1350-0872. DOI: 10.1099/mic.0.000643. [cit. 2024-02-16].
- [6] OTEINO, Nicholas; LALLY, Richard; KIWANUKA, Samuel; LLOYD, Andrew; RYAN, David et al. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic Pseudomonas isolates. online. *Frontiers in Microbiology*. 2015, roč. 6. ISSN 1664-302X. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00745. [cit. 2024-02-12].
- [7] LELAPALLI, Srilakshmi; BASKAR, Samundeeshwari; JACOB, Sharon a PARANTHAMAN, Sripriya. Characterization of phosphate solubilizing plant growth promoting rhizobacterium Lysinibacillus pakistanensis strain PCPSMR15 isolated from Oryza sativa. online. *Current Research in Microbial Sciences*. 2021, roč. 2. ISSN 26665174. DOI: 10.1016/j.crmicr.2021.100080. [cit. 2024-02-12].
- [8] SARDANS, Jordi a PEÑUELAS, Josep. Potassium Control of Plant Functions: Ecological and Agricultural Implications. online. *Plants*. 2021, roč. 10, č. 2. ISSN 2223-7747. DOI: 10.3390/plants10020419. [cit. 2024-02-08].
- [9] ARORA, Naveen a VERMA, Maya. Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophore produced by bacteria. online. *3 Biotech*. 2017, roč. 7, č. 6. ISSN 2190-572X. DOI: 10.1007/s13205-017-1008-y. [cit. 2024-02-12].



- [10] KOPECKÁ, Jana a ROTKOVÁ, Gabriela. *Bakteriociny*. online. In: Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií. Ústav experimentální biologie, oddělení mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, 2017. Dostupné z: [https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni\\_mikrobiologie/web/pages/bakteriociny.html](https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/bakteriociny.html). [cit. 2024-02-11].
- [11] HAMID, Rifat; KHAN, MinhajA; AHMAD, Mahboob; AHMAD, MalikMobeen; ABDIN, MalikZainul et al. Chitinases: An update. online. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*. 2013, roč. 5, č. 1. ISSN 0975-7406. DOI: 10.4103/0975-7406.106559. [cit. 2024-02-12].
- [12] HABTE-TSION, Habte-Michael a KUMAR, Vikas. Nonstarch polysaccharide enzymes—general aspects. online. In: *Enzymes in Human and Animal Nutrition*. Elsevier, 2018, s. 183-209. ISBN 9780128054192. DOI: 10.1016/B978-0-12-805419-2.00009-5. [cit. 2024-02-12].
- [13] IQBAL, Noushina; KHAN, Nafees; FERRANTE, Antonio; TRIVELLINI, Alice; FRANCINI, Alessandra et al. Ethylene Role in Plant Growth, Development and Senescence: Interaction with Other Phytohormones. online. *Frontiers in Plant Science*. 2017, roč. 08. ISSN 1664-462X. DOI: 10.3389/fpls.2017.00475. [cit. 2024-02-11].
- [14] NASEEM, Hafsa; AHSAN, Muhammad; SHAHID, Muhammad a KHAN, Naeem. Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance. online. *Journal of Basic Microbiology*. 2018, roč. 58, č. 12, s. 1009-1022. ISSN 0233-111X. DOI: 10.1002/jobm.201800309. [cit. 2024-02-11].
- [15] MORCILLO, Rafael a MANZANERA, Maximino. The Effects of Plant-Associated Bacterial Exopolysaccharides on Plant Abiotic Stress Tolerance. online. *Metabolites*. 2021, roč. 11, č. 6. ISSN 2218-1989. DOI: 10.3390/metabo11060337. [cit. 2024-02-11].
- [16] SUMBUL, Aisha; ANSARI, Rizwan; RIZVI, Rose a MAHMOOD, Irshad. Azotobacter: A potential bio-fertilizer for soil and plant health management. online. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2020, roč. 27, č. 12, s. 3634-3640. ISSN 1319562X. DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.08.004. [cit. 2024-02-16].
- [17] KOPECKÁ, Jana a ROTKOVÁ, gabriela. *Gramovo barvení, negativní barvení, nativní preparát*. online. In: Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií. 2017. Dostupné z: [https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni\\_mikrobiologie/web/pages/gramovo\\_barveni.html](https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/gramovo_barveni.html). [cit. 2024-02-16].
- [18] CASTILLO, Tania; GARCÍA, Andrés; PADILLA-CÓRDOVA, Claudio; DÍAZ-BARRERA, Alvaro a PEÑA, Carlos. Respiration in *Azotobacter vinelandii* and its relationship with the synthesis of biopolymers. online. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2020, roč. 48, s. 36-45. ISSN 07173458. DOI: 10.1016/j.ejbt.2020.08.001. [cit. 2024-02-16].

- [19] YONEYAMA, Fuminori; YAMAMOTO, Mayumi; HASHIMOTO, Wataru a MURATA, Kousaku. Production of polyhydroxybutyrate and alginate from glycerol by *Azotobacter vinelandii* under nitrogen-free conditions. online. *Bioengineered*. 2015, roč. 6, č. 4, s. 209-217. ISSN 2165-5979. DOI: 10.1080/21655979.2015.1040209. [cit. 2024-02-16].
- [20] VAN DOMMELEN, Anne a VANDERLEYDEN, Jos. Associative Nitrogen Fixation. online. In: *Biology of the Nitrogen Cycle*. Elsevier, 2007, s. 179-192. ISBN 9780444528575. DOI: 10.1016/B978-044452857-5.50013-8. [cit. 2024-02-16].
- [21] WICHARD, Thomas; BELLENGER, Jean-Philippe; MOREL, François a KRAEPIEL, Anne. Role of the Siderophore Azotobactin in the Bacterial Acquisition of Nitrogenase Metal Cofactors. online. 2009, roč. 43, č. 19, s. 7218-7224. ISSN 0013-936X. DOI: 10.1021/es8037214. [cit. 2024-02-16].
- [22] GALINDO, Enrique; PEÑA, Carlos; NÚÑEZ, Cinthia; SEGURA, Daniel a ESPÍN, Guadalupe. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. online. *Microbial Cell Factories*. 2007, roč. 6, č. 1. ISSN 14752859. DOI: 10.1186/1475-2859-6-7. [cit. 2024-02-17].
- [23] LEE, Kuen a MOONEY, David. Alginate: properties and biomedical applications: Properties and biomedical applications. online. *Progress in Polymer Science*. 2012, roč. 37, č. 1, s. 106-126. ISSN 00796700. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003. [cit. 2024-02-17].
- [24] PACHECO-LEYVA, Ivette; GUEVARA PEZOA, Felipe a DÍAZ-BARRERA, Alvaro. Alginate Biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*: Overview of Molecular Mechanisms in Connection with the Oxygen Availability. online. *International Journal of Polymer Science*. 2016, roč. 2016, s. 1-12. ISSN 1687-9422. DOI: 10.1155/2016/2062360. [cit. 2024-02-17].
- [25] HU, Chuhuan; LU, Wei; MATA, Analucia; NISHINARI, Katsuyoshi a FANG, Yapeng. Ions-induced gelation of alginate: Mechanisms and applications. online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021, roč. 177, s. 578-588. ISSN 01418130. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.086. [cit. 2024-02-19].
- [26] RADOSAVLJEVIĆ, Miloš; LEVIĆ, Steva; PEJIN, Jelena; MOJOVIĆ, Ljiljana a NEDOVIĆ, Viktor. Encapsulation technology of lactic acid bacteria in food fermentation. online. *Lactic Acid Bacteria in Food Biotechnology*. 2022, s. 319-347. ISBN 9780323898751. DOI: 10.1016/B978-0-323-89875-1.00015-8. [cit. 2024-02-19].
- [27] BUKHARI, Nur; RAWI, Nurul; HASSAN, Nur; SAHARUDIN, Nur a KASSIM, Mohamad. Seaweed polysaccharide nanocomposite films: A review. online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023, roč. 245. ISSN 01418130. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125486. [cit. 2024-02-19].

- [28] MOHANRASU, K.; GURU RAJ RAO, R.; ANANTHI, V.; SIVAPRAKASH, G.; DINESH, G.H. et al. Microbial bio-based polymer nanocomposite for food industry applications. online. *Handbook of Microbial Nanotechnology*. 2022, s. 331-354. ISBN 9780128234266. DOI: 10.1016/B978-0-12-823426-6.00012-7. [cit. 2024-02-21].
- [29] MCADAM, Blaithín; BRENNAN FOURNET, Margaret; MCDONALD, Paul a MOJICEVIC, Marija. Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Factors Impacting Its Chemical and Mechanical Characteristics. online. *Polymers*. 2020, roč. 12, č. 12. ISSN 2073-4360. DOI: 10.3390/polym12122908. [cit. 2024-02-21].
- [30] USHANI, U.; SUMAYYA, A.R.; ARCHANA, G.; RAJESH BANU, J. a DAI, Jinjin. Enzymes/biocatalysts and bioreactors for valorization of food wastes. online. *Food Waste to Valuable Resources*. 2020, s. 211-233. ISBN 9780128183533. DOI: 10.1016/B978-0-12-818353-3.00010-9. [cit. 2024-02-21].
- [31] YOSHIDA, Nobuhiro; TAKASE, Ryuichi; SUGAHARA, Yoshimi; NAMBU, Yuko a HASHIMOTO, Wataru. Direct production of polyhydroxybutyrate and alginate from crude glycerol by *Azotobacter vinelandii* using atmospheric nitrogen. online. *Scientific Reports*. 2022, roč. 12, č. 1. ISSN 2045-2322. DOI: 10.1038/s41598-022-11728-1. [cit. 2024-02-16].
- [32] WILLIAMS, David a CARTER, C. *Transmission electron microscopy: a textbook for materials science*. 2nd Edition. New York: Springer, 2009. ISBN 978-0-387-76502-0.
- [33] NEBESÁŘOVÁ, Jana. *Elektronová mikroskopie pro biology*. online. České Budějovice, Biology Centre CAS, 2001. Dostupné z: <http://lembook.paru.cas.cz/>. [cit. 2023-11-19].
- [34] INKSON, B.J. Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. online. *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*. 2016, s. 17-43. ISBN 9780081000403. DOI: 10.1016/B978-0-08-100040-3.00002-X. [cit. 2023-10-28].
- [35] DARREL, Henry. *Electron-Sample Interactions*. online. In: THE SCIENCE EDUCATION RESOURCE CENTER. Geochemical Instrumentation and Analysis. October 20, 2023. Dostupné z: <https://serc.carleton.edu/17272>. [cit. 2023-10-28].
- [36] NEBRASKA CENTER FOR MATERIALS AND NANOSCIENCE, UNIVERSITY OF NEBRASKA–LINCOLN. *Specimen Interaction*. online. In: NEBRASKA CENTER FOR MATERIALS AND NANOSCIENCE, UNIVERSITY OF NEBRASKA–LINCOLN. Electron nanoscopy instrumentation facility. 2023. Dostupné z: <https://ncmn.unl.edu/enif/microscopy/interact.shtml>. [cit. 2023-10-28].
- [37] BOZZOLA, John a RUSSEL, Lonnie. *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*. 2. Carbondale, Illinois: Jones and Bartlett Publishers, 1998. ISBN 0-7637-0192-0.

- [38] RAVAL, Nidhi; MAHESHWARI, Rahul; KALYANE, Dnyaneshwar; YOUNGREN-ORTIZ, Susanne; CHOUGULE, Mahavir et al. Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. *Basic Fundamentals of Drug Delivery*. 2019, s. 369-400. ISBN 9780128179093. DOI: 10.1016/B978-0-12-817909-3.00010-8.
- [39] ECKERTOVIÁ, Ludmila a FRANK, Luděk. *Metody analýzy povrchů: Elektronová mikroskopie a difrakce*. 1. Akademie věd České republiky, 1996. ISBN 80-200-0329-0.
- [40] GOLDSTEIN, Joseph; NEWBURY, Dale; JOY, David; LYMAN, Charles; ECHLIN, Partick et al. *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. online. Third. New York: Springer Science & Business Media, 2012. ISBN 978-1-4615-0215-9. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=wq7eBwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false>. [cit. 2023-11-04].
- [41] KALINA, Tomáš a POKORNÝ, Vladimír. *Základy elektronové mikroskopie pro biologi*. První. Univerzita Karlova v Praze: Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1979.
- [42] KRISHNAN, Kannan M. *Principles of Materials Characterization and Metrology*. online. First. Oxford University Press, 2021. ISBN 0198830254. DOI: 10.1093/oso/9780198830252.003.0010. [cit. 2023-11-02].
- [43] POTTER, U.J. a LOVE, G. MICROSCOPY | Scanning Electron Microscopy. online. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 1999, s. 1397-1406. ISBN 9780122270703. DOI: 10.1006/rwfm.1999.1070. [cit. 2023-11-15].
- [44] CHAPMAN, James; SULLIVAN, Timothy a REGAN, Fiona. *Nanoparticles in Anti-Microbial Materials: Use and Characterisation*. 23. Royal Society of Chemistry, 2012. ISBN 978-1-84973-159-1.
- [45] KIERNAN, John A. Formaldehyde, Formalin, Paraformaldehyde And Glutaraldehyde: What They Are And What They Do. online. *Microscopy Today*. 2000, roč. 8, č. 1, s. 8-13. ISSN 2150-3583. DOI: 10.1017/S1551929500057060. [cit. 2023-11-15].
- [46] GOLDSTEIN, Joseph; NEWBURY, Dale; ECHLIN, Patrick; JOY, David a FIORI, Charles. Coating Techniques for SEM and Microanalysis. online. In: *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. Boston, MA: Springer US, 1981, s. 461-494. ISBN 978-1-4613-3275-6. DOI: 10.1007/978-1-4613-3273-2\_10. [cit. 2023-11-15].
- [47] WIGHTMAN, Raymond. An Overview of Cryo-Scanning Electron Microscopy Techniques for Plant Imaging. online. *Plants*. 2022, roč. 11, č. 9. ISSN 2223-7747. DOI: 10.3390/plants11091113. [cit. 2023-11-19].
- [48] GRAHAM, Bill; AUSTIN, Jotham; KAECH, Andres a HEUSER, John. Freezing Techniques: History, Comparisons, and Applications. online. *Microscopy Today*. 2008, roč. 16, č. 5, s. 12-17. ISSN 2150-3583. DOI: 10.1017/S1551929500061708. [cit. 2024-01-24].

- [49] ECHLIN, Patrick. *Handbook of Sample Preparation for Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. 1. vydání. Springer New York, NY, 2009. ISBN 978-0-387-85730-5.
- [50] GALE, W. a TOTEMEIER, T. 10 Metallography. online. In: *Smithells Metals Reference Book*. 8th Edition. Butterworth-Heinemann, 2004, s. 10-1-10-87. ISBN 978-0-08-051730-8. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780750675093500130>. [cit. 2023-12-02].
- [51] KARLÍK, Miroslav. *Úvod do transmisní elektronové mikroskopie*. Praha: České vysoké učení technické v Praze, 2011. ISBN 978-80-01-04729-3.
- [52] PARK, Tyler Drue. *Characterization of InGaAs Quantum Dot Chains*. Theses and Dissertations. Provo, Utah, USA: Brigham Young University, Physical and Mathematical Sciences; Physics and Astronomy, 2013.
- [53] STADTLÄNDER, Christian T K-H. Dehydration and Rehydration Issues in Biological Tissue Processing for Electron Microscopy. online. *Microscopy Today*. 2005, roč. 13, č. 1, s. 32-35. ISSN 2150-3583. DOI: 10.1017/S1551929500050847. [cit. 2024-01-23].
- [54] ELECTRON MICROSCOPY SCIENCES. *Providing Solutions: TEM Embedding Resins*. Hatfield, Pennsylvania: Kirsch Notes, Technical Tips and Recommended Articles, 2018. Dostupné z: [https://www.emsdiasum.com/docs/technical/providing\\_solutions/KN\\_ProvidSolut\\_EmbedResins.pdf](https://www.emsdiasum.com/docs/technical/providing_solutions/KN_ProvidSolut_EmbedResins.pdf). [cit. 23. 1. 2024].
- [55] MOSCARDINI, Aldo; DI PIETRO, Sebastiano; SIGNORE, Giovanni; PARLANTI, Paola; SANTI, Melissa et al. Uranium-free X solution: a new generation contrast agent for biological samples ultrastructure. online. *Scientific Reports*. 2020, roč. 10, č. 1. ISSN 2045-2322. DOI: 10.1038/s41598-020-68405-4. [cit. 2024-01-25].
- [56] GIDDINGS, Thomas; O'TOOLE, Eileen; MORPHEW, Mary; MASTRONARDE, David; MCINTOSH, J.Richard et al. Using rapid freeze and freeze-substitution for the preparation of yeast cells for electron microscopy and three-dimensional analysis. online. *Centrosomes and Spindle Pole Bodies*. Methods in Cell Biology. 2001, s. 27-42. ISBN 9780125441704. DOI: 10.1016/S0091-679X(01)67003-1. [cit. 2024-01-22].
- [57] 8.3.E Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM). In: CREIGHTON, Thomas. *Physical and Chemical Basis of Molecular Biology*. 1st. Helvetian Press, 2010, s. 193-195. ISBN 978-0-9564781-0-8.
- [58] SCHWEIZER, Peter. *Manipulation of individual defects in 2D and layered materials*. Dissertation. Erlangen, Deutschland: Friedrich-Alexander-Universität Technische Fakultät, 2019.

- [59] PENNYCOOK, Stephen a NELLIST, Peter. *Scanning Transmission Electron Microscopy: Imaging and Analysis*. Springer Science & Business Media, 2011. ISBN 1441972005.
- [60] WANG, Zhong a LEE, Jean. 9.5 Scanning Transmission Electron Microscopy. In: KOHLI, Rajiv a MITTAL, K.L. *Developments in Surface Contamination and Cleaning*. 2nd. Elsevier Inc. All, 2016, s. 425-430. ISBN 978-0-323-29960-2.
- [61] MRAZOVA, Katerina; BACOVSKY, Jaromir; SEDRLOVA, Zuzana; SLANINOVA, Eva; OBRUCA, Stanislav et al. Uranyl-Less Low Voltage Transmission Electron Microscopy: A Powerful Tool for Ultrastructural Studying of Cyanobacterial Cells. online. *Microorganisms*. 2023, roč. 11, č. 4. ISSN 2076-2607. DOI: 10.3390/microorganisms11040888. [cit. 2023-12-29].
- [62] KOPECKÁ, Jana a ROTKOVÁ, Gabriela. *Pozorování bakteriálních endospor a jejich barvení, negativní barvení*. online. In: Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií. 2017. Dostupné z: [https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni\\_mikrobiologie/web/pages/bakterialni\\_endospory.html](https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/bakterialni_endospory.html). [cit. 2024-03-26].
- [63] MORENO, Soledad; NÁJERA, Rebeca; GUZMÁN, Josefina; SOBERÓN-CHÁVEZ, Gloria a ESPÍN, Guadalupe. Role of Alternative  $\zeta$  Factor AlgU in Encystment of *Azotobacter vinelandii*. online. *Journal of Bacteriology*. 1998, roč. 180, č. 10, s. 2766-2769. ISSN 0021-9193. DOI: 10.1128/JB.180.10.2766-2769.1998. [cit. 2024-03-26].
- [64] STEIGEDAL, Magnus. *The Azotobacter vinelandii mannuronan C5-epimerases: their biological functions and new tools useful for their future in vivo biotechnological application*. Dissertation. Trondheim: Department of Biotechnology, Faculty of Natural Science and Technology, Norwegian University of Science and Technology., 2006.
- [65] SADOFF, H L. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. online. *Bacteriological Reviews*. 1975, roč. 39, č. 4, s. 516-539. ISSN 0005-3678. DOI: 10.1128/br.39.4.516-539.1975. [cit. 2024-03-26].
- [66] LIN, L. a SADOFF, H. Chemical Composition of *Azotobacter vinelandii* Cysts. online. *Journal of Bacteriology*. 1969, roč. 100, č. 1, s. 480-486. ISSN 0021-9193. DOI: 10.1128/jb.100.1.480-486.1969. [cit. 2024-03-26].
- [67] PAGE, W a SADOFF, H. Relationship between calcium and uroinic acids in the encystment of *Azotobacter vinelandii*. online. *Journal of Bacteriology*. 1975, roč. 122, č. 1, s. 145-151. ISSN 0021-9193. DOI: 10.1128/jb.122.1.145-151.1975. [cit. 2024-04-07].
- [68] WALLER, Lashanda; FOX, Nyssa; FOX, Karen; FOX, Alvin a PRICE, Robert. Ruthenium red staining for ultrastructural visualization of a glycoprotein layer surrounding the spore of *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis*. online. *Journal of Microbiological Methods*. 2004, roč. 58, č. 1, s. 23-30. ISSN 01677012. DOI: 10.1016/j.mimet.2004.02.012. [cit. 2024-04-11].

- [69] PATE, Jack a ORDAL, Erling. THE FINE STRUCTURE OF CHONDROCOCCUS COLUMNARIS. online. *The Journal of Cell Biology*. 1967, roč. 35, č. 1, s. 37-51. ISSN 1540-8140. DOI: 10.1083/jcb.35.1.37. [cit. 2024-04-11].
- [70] VELA, G.; CAGLE, G. a HOLMGREN, P. Ultrastructure of *Azotobacter vinelandii*. online. *Journal of Bacteriology*. 1970, roč. 104, č. 2, s. 933-939. ISSN 0021-9193. DOI: 10.1128/jb.104.2.933-939.1970. [cit. 2024-04-11].
- [71] CARL ROTH INTERNATIONAL. Safety data sheet: Bouin's fixative, ready-to-use, for histology. online. In: CARL ROTH INTERNATIONAL. Dostupné z: <https://www.carlroth.com/medias/SDB-6482-GB-EN.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wzNzAzMzZ8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oMDQvaDMwLzkxMDM2MDY0NDgxNTgucGRmfGIwZml2MmWY2MDI0OTM4Nm4ZTFhZDVkZmVlZmQ3YTRkYjlmNTVkdGZkdzZDkzMzMzZWVmNWM5OWVkbmFjYjJmZGU>. [cit. 2024-04-11].

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

### 7.1 Seznam použitých zkratek

<i>A. vinelandii</i>	<i>Azotobacter vinelandii</i>
ACC	1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina
ADF	prstencový detektor tmavého pole
AE	Augerovy elektrony
ATP	adenosintrifosfát
BF	detektor světlého pole
BSE	zpětně odražené elektrony
CoA	koenzym A
cryo-SEM	kryogenní skenovací elektronová mikroskopie
cryo-TEM	kryogenní transmisní elektronová mikroskopie
DDSA	anhydrid kyseliny dodecenylijantarové
DF	detektor tmavého pole
EDS	energiově disperzní spektroskopie
EPS	extracelulární polysacharidy
G	$\alpha$ -L-guluronová kyselina
GDL	D-glukono- $\delta$ -lakton
GDP	guanosindifosfát
GMD, AlgD	enzym GDP-manózádehydrogenáza
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina
IAA	indol-3-octová kyselina
ISR	indukovaná systémová rezistence
M	$\beta$ -D-manurová kyselina
MP, Alg8	enzym manuronátová polymeráza
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NMA	anhydrid 1-methyl-5-norbornen-2,3-dikarboxylové kyseliny
PGPB	bakterie podporující růst rostlin
PGPM	mikroorganismy podporující růst rostlin
PGPR	rhizobakterie podporující růst rostlin
PHA	polyhydroxyalkanoáty
PHB	poly-3-hydroxybutyrát
phbA	enzym $\beta$ -ketothioláza
phbB	enzym acetoacetyl-CoA-reduktáza



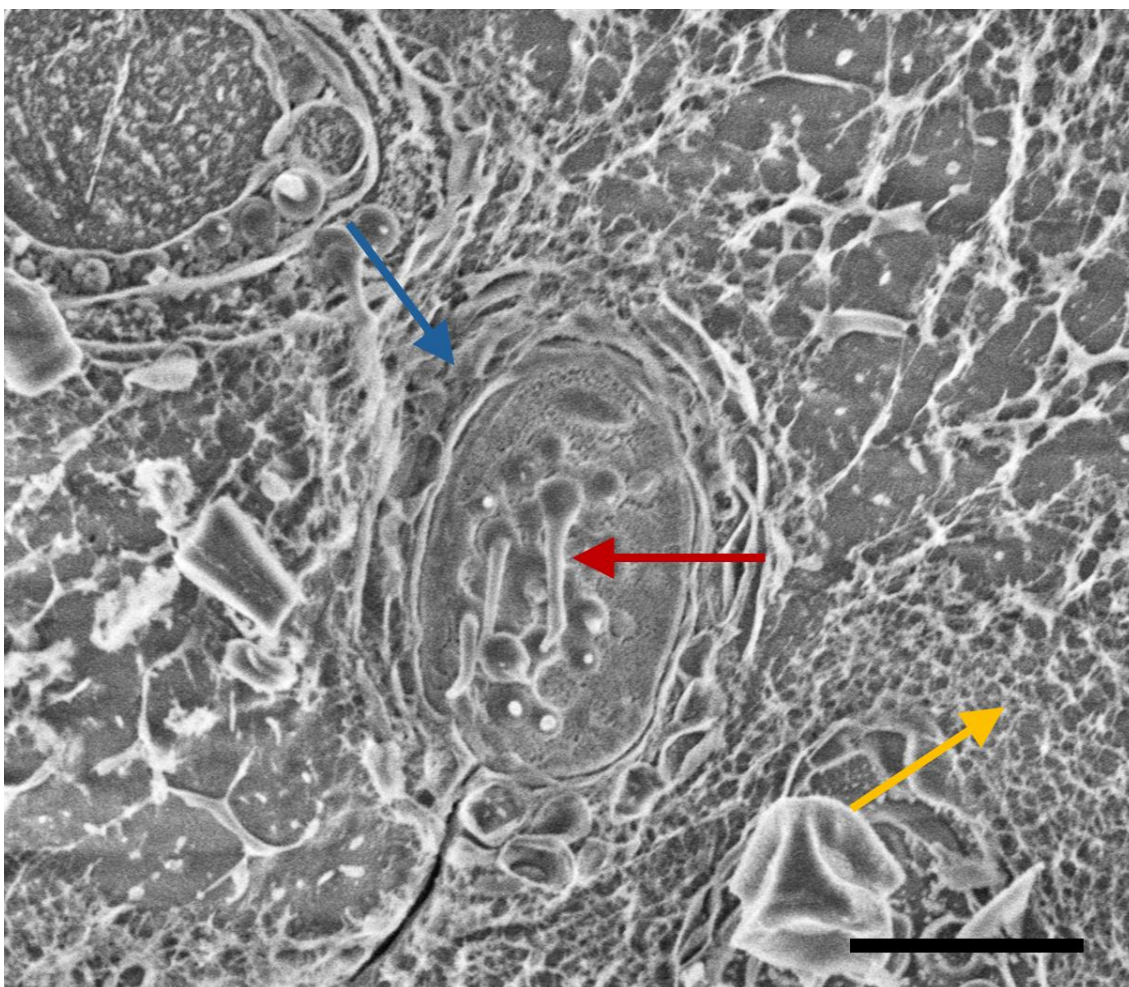
phbC	enzym PHB-syntáza
PMI-GMP, AlgA	enzym fosfomanózaizomeráza
PMM, AlgC	enzym fosfomanomutáza
SE	sekundární elektrony
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
STEM	skenovací transmisní elektronová mikroskopie
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
VCD	vinylcyklohexendioxid

## 7.2 Seznam použitých symbolů

$\alpha$	úhel mezi vektorem rychlosti a vektorem magnetické indukce pole [°]
$\alpha'$	poloviční aparturní úhel čočky [°]
$\vec{B}$	vektor magnetické indukce pole [ $\text{kg}\cdot\text{s}^{-2}\cdot\text{A}^{-1}$ ]
$e$	náboj elektronu [ $\text{A}\cdot\text{s}$ ]
$\vec{F}$	síla působící na elektron v magnetickém poli [ $\text{kg}\cdot\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$ ]
$\hbar$	Planckova konstanta [ $\text{J}\cdot\text{s}$ ]
$\lambda$	vlnová délka [nm]
$m_e$	hmotnost elektronu [kg]
$n$	index lomu [–]
$U$	napětí [ $\text{m}^2\cdot\text{kg}\cdot\text{s}^{-3}\cdot\text{A}^{-1}$ ]
$v$	rychlost elektronu [ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ]
$\vec{v}$	vektor rychlosti elektronu [ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ]

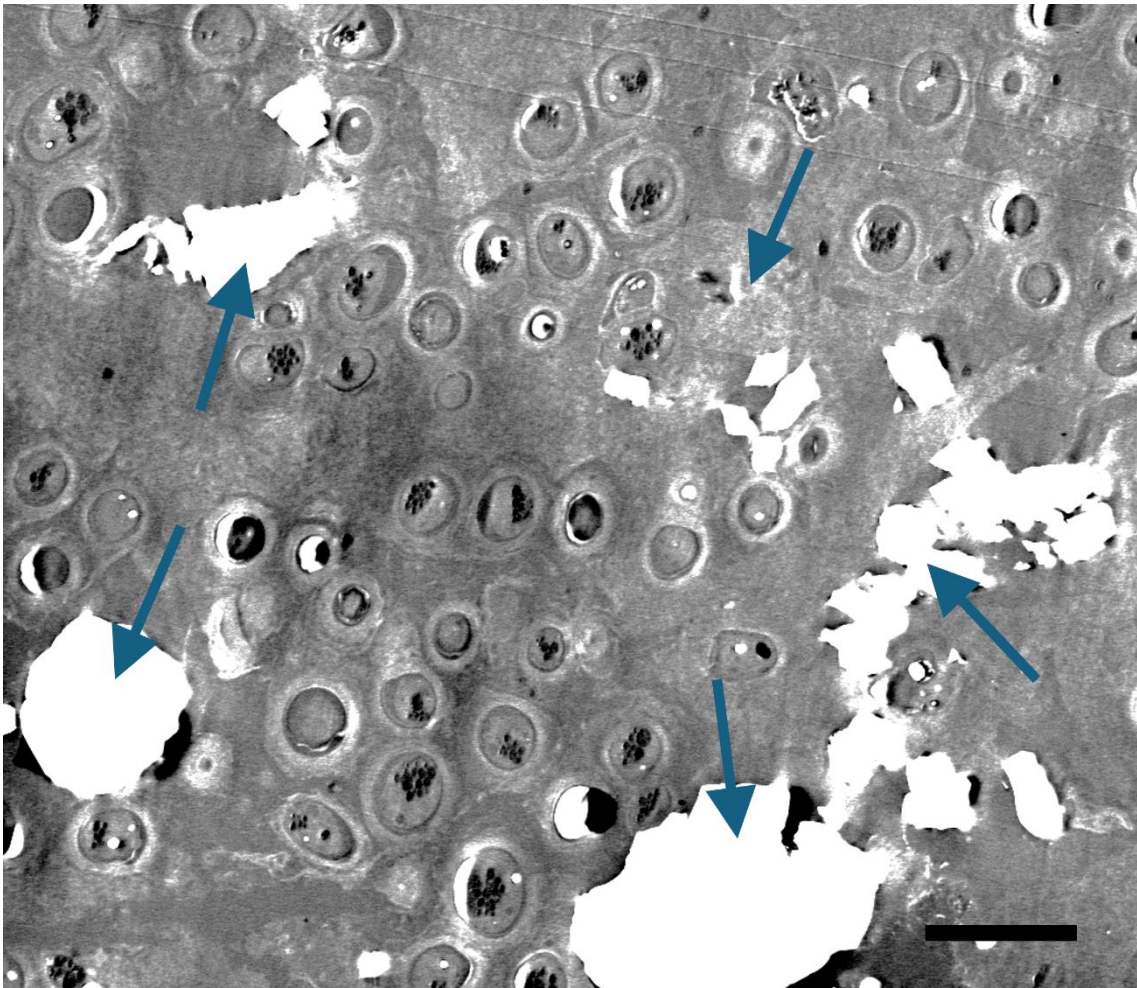
## 8 PŘÍLOHY

### 8.1 Analýza vzorků pomocí cryo-SEM

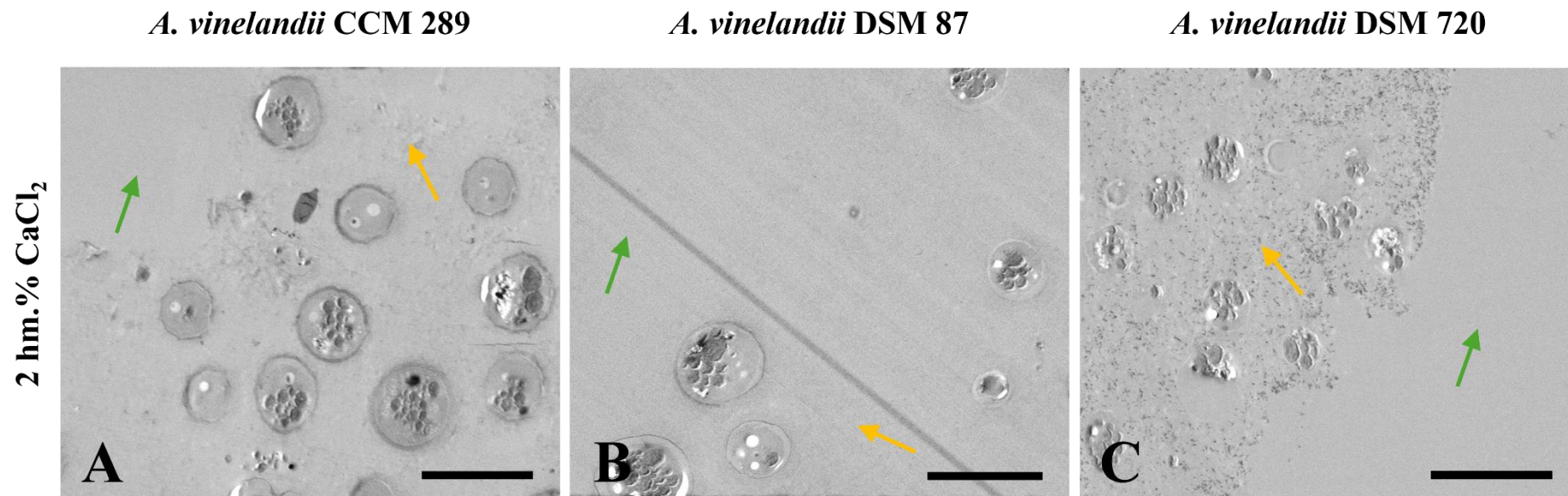


Obrázek 22: Cryo-SEM snímek bakterie *Azotobacter vinelandii* DSM 87 síťované  $\text{CaCl}_2$ . Červená šipka ukazuje na PHB granule, modrá na kapsuli obklopující bakterii a žlutá na zesíťovaný hydrogel. Měřítko je  $2 \mu\text{m}$ .

## 8.2 Analýza vzorků připravených kryogenní metodou pomocí STEM



Obrázek 23: STEM snímek kultur *A. vinelandii* CCM 289 s přidavkem sířovacího činidla obsahujícího GDL a  $\text{CaCO}_3$  připravených kryogenní metodou. Modré šipky ukazují na trhliny. Měřítko je 5  $\mu\text{m}$ .



Obrázek 24: STEM snímky pro porovnání kultur *A. vinelandii* síťovaných CaCl<sub>2</sub> a připravených kryogenní metodou. Zelené šipky ukazují na čistou pryskyřici a žluté šipky na zesíťovaný hydrogel. Měřítka je 5  $\mu$ m.