



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

STANOVENÍ VIABILITY U RHIZOBAKTERIÁLNÍCH KULTUR

DETERMINATION OF VIBALITY OF RHIZOBACTERIAL CULTURES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Lucie Svobodová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1982/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Lucie Svobodová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **prof. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Stanovení viability u rhizobakteriálních kultur

Zadání bakalářské práce:

- Literární rešerše na téma využití rhizobakterií v zemědělství a stanovení viability mikrobiálních buněk
- Výběr vhodné metody pro stanovení viability kultury rhizobakterií
- Optimalizace základních parametrů pro korektní stanovení viability
- Aplikace dané metody pro stanovení viability v reálných vzorcích bioinokulantů

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2024:

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

Lucie Svobodová
studentka

prof. Ing. Stanislav Obruča,
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 závěrečná práce je zaměřena na studium viability rhizobakterií podporující růst rostlin (PGPR). Viabilita byla stanovována u tří kmenů bakterie *Azotobacter vinelandii*, a to CCM 289, DSM 87 a DSM 720 pomocí průtokové cytometrie s fluorescenční sondou PI, SYTOXTM Blue a DAPI, a to po 120 a 72 hodinách kultivace. Byla provedena optimalizace vhodné fluorescenční sondy pro daný kmen, kdy jako nejvhodnější se jevílo použití sondy PI pro kmen CCM 289. Pro kmeny DSM 87 a DSM 720 lze použít sondy PI a SYTOXTM Blue. Pro následující experimenty byl vybrán kmen DSM 87, který byl podroben vlivu různých síťovacích činidel. Pomocí průtokového cytometru a barvení fluorescenční sondou PI byla ověřována viabilita po aplikaci roztoků chloridu vápenatého, barnatého, měďnatého, železitého, hlinitého a síranu vápenatého o koncentraci 2, dále 0,2 a 0,02 hm. % ke kultuře. Roztoky chloridu vápenatého, barnatého a síranu vápenatého neměly významný vliv na viabilitu buněk. Naopak při použití chloridu železitého byl zjištěn trend, kdy s klesající koncentrací roztoků ubývalo odumřelých buněk. Tohoto jevu bylo docíleno i při použití chloridu hlinitého a měďnatého, u kterých však použití nejkonzentrovějšího roztoku mělo za následek inaktivaci většího počtu buněk než v předchozím případě, u chloridu hlinitého došlo ke ztrátě viability většiny přítomných buněk. Viabilita byla ověřována také u buněk uvolňovaných z připravených gelů. Pro experimenty byly zvoleny roztoky výše zmíněných síťovacích činidel o koncentraci 2 hm. %, za experimentálně stanovených podmínek byla kultura podrobena gelaci. Část gelů byla následně ponechána ve fosfátovém pufru, aby došlo ke zpětnému uvolnění buněk. Pro toto snazší uvolňování byl přidán enzym algináza, jehož účinkem je rozkládání alginátu. Bylo zjištěno, že koncentrace 2 hm. % vybraných síťovacích činidel neměla vliv na viabilitu buněk, tedy že buňky uvolněné z gelu se se jevíly jako viabilní.

KLÍČOVÁ SLOVA

Alginát; *Azotobacter vinelandii*; fluorescenční sondy; PGPR; průtoková cytometrie; rhizobakterie; viabilita

ABSTRACT

This thesis focuses on the study of viability of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). Viability was determined in three strains of *Azotobacter vinelandii*, namely CCM 289, DSM 87 and DSM 720, using flow cytometry with fluorescent probe PI, SYTOX™ Blue and DAPI after 120 and 72 hours of cultivation. Optimization of the appropriate fluorescent probe for the strain was performed, with the PI probe for strain CCM 289 being the most suitable. PI and SYTOX™ Blue probes can be used for strains DSM 87 and DSM 720. For the following experiments, strain DSM 87 was selected and subjected to the influence of different crosslinking reagents. Using a flow cytometer and staining with a fluorescent PI probe, the viability was verified after application of calcium chloride, barium, copper, ferric, aluminium and calcium sulphate solutions of 2, 0.2 and 0.02 wt. % to the culture. Calcium chloride, barium and calcium sulfate solutions had no significant effect on cell viability. On the other hand, when ferric chloride was used, a trend was observed where dead cells decreased with decreasing concentration of the solutions. This effect was also achieved with aluminium and copper chloride, but the use of the most concentrated solution resulted in the inactivation of a greater number of cells than in the previous case, whereas aluminium chloride resulted in the loss of viability of most of the cells present. Viability was also verified for cells released from the prepared gels. For the experiments, solutions of the aforementioned crosslinking agents were chosen at a concentration of 2 wt.%, and the culture was subjected to gelation under the experimentally determined conditions. A portion of the gels was subsequently left in phosphate buffer to allow for the re-release of cells. To facilitate this release, the enzyme alginase was added to break down the alginate. It was found that a concentration of 2 wt % of the selected crosslinking agents did not affect cell viability, i.e., the cells released from the gel appeared to be viable.

KEYWORDS

Alginate; *Azotobacter vinelandii*; flow cytometry; fluorescent probes; PGPR; rhizobacteria; viability

SVOBODOVÁ, Lucie. *Stanovení viability u rhizobakteriálních kultur*. Brno, 2024. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156620>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Stanislav Obruča.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

Lucie Svobodová

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce panu prof. Ing. Stanislavovi Obručovi, Ph.D. za odborné vedení, konzultace, návrhy a věcné připomínky k práci. Dále bych ráda poděkovala konzultantovi Ing. Martinu Súkeníkovi za trpělivost, ochotu učit mě novým dovednostem, za lidský přístup a pomoc a podporu při práci. Poděkování patří také Mgr. Zuzaně Kroupové, a to za profesionální a lidský přístup, a také za pomoc a vysvětlení práce s průtokovým cytometrem. Chtěla bych také poděkovat rodině a přátelům za jejich neustálou podporu a povzbuzování během mého celého studia.

OBSAH

1	Úvod	8
2	Současný stav řešené problematiky	9
2.1	Rhizosféra	9
2.2	Rhizobakterie podporující růst rostlin	9
2.3	Působení PGPR.....	10
2.3.1	Produkce fytohormonů	10
2.3.2	Produkce sideroforů	11
2.3.3	Tvorba biofilmů.....	11
2.3.4	<i>Azotobacter vinelandii</i>	12
2.4	Alginátové gely.....	14
2.5	Viabilita bakterií	15
2.5.1	Plotnová metoda	16
2.5.2	Konfokální fluorescenční mikroskopie	16
2.5.3	Průtoková cytometrie	17
2.5.4	Fluorescenční sondy	19
3	Experimentální část	21
3.1	Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje	21
3.1.1	Použitý mikroorganismus.....	21
3.1.2	Použité chemikálie	21
3.1.3	Použité přístroje.....	21
3.2	Kultivace bakterií	22
3.2.1	Kultivační podmínky	22
3.2.2	Inokulační a produkční médium.....	22
3.3	Analýza vzorků bakteriálních kultur	23
3.4	Příprava vzorků k ověření viability pomocí průtokové cytometrie s fluorescenční sondou.....	23
3.5	Příprava roztoků síťovacích činidel pro využití na vybraný kmen.....	24
3.6	Příprava vzorků s přídavkem síťovacího činidla k ověření viability pomocí průtokové cytometrie s fluorescenční sondou	24
3.7	Příprava vzorků buněk uvolněných z připravených gelů k ověření viability pomocí průtokové cytometrie	24
3.7.1	Gelace buněčné kultury	24
3.7.2	Uvolňování buněk z připravených gelů	25

3.7.3	Ověření viability pomocí průtokové cytometrie s fluorescenční sondou.....	25
4	Výsledky a diskuse	26
4.1	Optimalizace fluorescenční sondy pro stanovení viability u vybraného kmene	26
4.1.1	Experimenty po 120 hodinách kultivace	26
4.1.2	Experimenty po 72 hodinách kultivace	30
4.2	Použití vybrané fluorescenční sondy na vzorky s přidavky roztoků síťovacích činidel	36
4.3	Ověření viability buněk po zgelování kultury pomocí vybraných síťovacích činidel	45
5	Závěr.....	50
6	Seznam literatury	52
7	Seznam symbolů a zkratk	58

1 ÚVOD

Rostoucí požadavky světové populace na produkci potravin je spojeno s větším zatížením zemědělských zdrojů a používáním těžkých zemědělských technik. Spolu s těmito faktory hraje v současnosti velkou roli nadužívání anorganických hnojiv a pesticidů vedoucích k negativnímu dopadu na půdu a životní prostředí [1]. Z těchto důvodů se stává prioritou hledání udržitelných a účinných zemědělských postupů. Jako slibná cesta se jeví využití rhizobakterií podporujících růst rostlin (PGPR), což jsou půdní organismy s užitečnými schopnostmi vhodnými pro řešení zmíněného současného problému. Díky vzájemně prospěšným vztahům rostlin s PGPR má využití PGPR za následek zvyšování růstu a produktivity rostlin či dokonce napomáhání odolnosti rostlin vůči různým chorobám a stresu. Využití půdních bakterií tak zmírňuje degradaci životního prostředí, které je spojováno s intenzivním využíváním zemědělských metod [2].

Inovativním způsobem aplikace PGPR do půdy k rostlinným kořenům se jeví enkapsulace rhizobakterií formou gelu. Ta je umožněna pomocí síťovacích činidel, jejichž schopností je vytvořit gel pomocí extracelulárně produkovaného polysacharidu – alginátu samotnými bakteriemi. Bakterie jsou pak z tohoto gelu uvolňovány postupně v závislosti na použitém síťovacím činidle. Důležitou vlastností síťovacího činidla je pak jeho nízká toxicita vůči rhizobakteriím.

V této bakalářské práci je pozornost zaměřena především na viabilitu buněk. První část práce je věnována teoretickému úvodu problematiky, seznámení s vybraným mikroorganismem pro tuto práci (*Azotobacter vinelandii*) a metodám, pomocí kterých lze stanovit viabilitu. Experimentální část se pak soustředí na optimalizaci vhodné fluorescenční sondy pro využití na stanovení viability, dále na aplikaci různých síťovacích činidel a zkoumání jejich vlivu právě na viabilitu, a také na viabilitu buněk, jež se postupně uvolňují z gelů vzniklých zesíťováním síťovacími činidly.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Rhizosféra

Pro různé typy organismů existují různá prostředí, ve kterých přežívají a mají svou důležitou roli. Jedním z prostředí je půda, která vytváří životní podmínky pro rostliny, houby, ale také živočichy či často opomínané, avšak podstatné, mikroorganismy. Velké množství těchto organismů se vyskytuje v oblasti rhizosféry, která jim nabízí jim potřebné podmínky a prostředí. Rhizosféra je definována jako půdní oblast, jež vyznačuje oblast povrchu a nejbližšího okolí kořenů rostlin. Některé z mikroorganismů hrají důležitou roli pro rostliny svou tvorbou fytohormonů, jež jsou důležité pro rostlinnou imunitu i růst. Jejich nedostatek by tak negativně ovlivnil flóru a následnou úrodu [3].

V prostředí rhizosféry probíhá mnoho biologických, chemických i fyzikálních procesů, které mají vliv na ekosystémy. Dochází zde k řadě složitých interakcí mezi rostlinou, půdním prostředím a půdní biotou. Na základě složitosti rhizosféry dokáže jakákoli změna vyvolat následně další řetězové reakce mezi půdou, rostlinami i půdními mikroorganismy. Rhizosféra slouží jako jakýsi základní katalyzátor pro vývoj půdy a biochemické přeměny, což přispívá k vývoji vlastnostem půdy. Změna jejích vlastností má podstatný vliv pro reakce ekosystémů na globální změny. Současné studium této sféry je nevyhnutelné kvůli aktuálním environmentálním problémům v ekosystémech po celém světě [3].

2.2 Rhizobakterie podporující růst rostlin

V současném světě s rostoucím počtem obyvatel roste poptávka po rostlinné produkci s důrazem na omezení používání chemických hnojiv. Aby bylo možné toto obyvatelstvo dostatečně nasycit, je zapotřebí najít způsob, jak zvýšit zemědělskou produktivitu, aniž by bylo nutné rozšiřovat orné půdy a používat ekologicky škodlivé agrochemikálie [1]. Používání anorganických hnojiv přináší velké obavy díky nepříznivému, škodlivému dopadu na životní prostředí. Hlavním problémem jejich používání je, že v nadměrném množství mohou prosakovat do půdy, což může způsobit její kontaminaci a kontaminaci podzemních vod. V současné době používaná NPK hnojiva jsou ta, která jsou příčinou problému. Dusík přítomný v těchto hnojivech způsobuje okyselení orné půdy, tedy snížení jejího pH. Dle provedeného výzkumu [4] bylo zjištěno, že snížení půdního pH má za následek akumulaci těžkých kovů v půdě, konkrétně tedy zvýšení koncentrace kadmia a niklu, naopak došlo k poklesu rtuti ve zkoumané půdě. Bioakumulace těžkých kovů v půdě má negativní dopad na růst plodin a na jejich výnos. Byly také provedeny studie [5], kdy ke klasickému anorganickému hnojivu bylo přidáno „zelené hnojení“ nebo statkový hnůj a daná kombinace byla aplikována na plodiny pšenice. Výsledkem studie bylo zjištění, že pěstování plodin s touto kombinací hnojiv bylo výhodnější nejen díky zvýšenému výnosu plodin, ale také došlo ke zvýšení obsahu dusíku, fosforu, draslíku a organického uhlíku v půdě, což vedlo k udržení jejího pH [6; 2]. Pojmem zelené hnojení se nazývá zaorávání zelených rostlin do půdy, které byly vypěstovány na daném pozemku za účelem obohatit danou půdu o organickou hmotu, dusík a živiny. Jedná se o zdroj živného humusu v půdě, že kterého se tvoří i humus stálý [7].

Jako jedno z alternativních řešení aktuálního problému s anorganickými hnojivy se nabízí využití rhizobakterií podporujících růst rostlin (z anglického plant-growth promoting rhizobacteria – PGPR). Jedná se o třídu bakterií, které žijí v rhizosféře a v blízkém okolí kořenů rostlin. Rhizobakterie lze obecně rozdělit do dvou hlavních skupin podle mechanismu účinku. První obsahuje rhizobakterie ovlivňující mechanismy přímo zapojené do podpory růstu rostlin, jako je regulace růstových faktorů nebo mechanismy ovlivňující metabolické procesy rostlin. Druhá pak rhizobakterie, které ovlivňují nepřímé mechanismy, kde dochází k propůjčování odolnosti vůči vnějším faktorům, jako jsou stresy biotické (stres vyvolaný patogenem, různými houbovými nebo virovými chorobami, hmyzem, hlodavci) a abiotické (stres z nedostatku či nadbytku světla, vody nebo kyslíku, stres vyvolaný vysokou nebo nízkou teplotou, mechanický stres). Mezi bakterie, které se řadí do skupiny PGPR jsou typicky zástupci rodů *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Serratia* a *Alcaligenes* [2].

2.3 Působení PGPR

PGPR působí také jako tzv. bioprotektiva. To jsou mikroorganismy, které působí jako jakýsi štít proti rostlinným patogenům a tím je chrání před nežádoucími infekcemi, tedy napomáhají při potlačování chorob rostlin. Jejich činností je produkce antibiotik, hydrolytických enzymů jako je chitináza a β -glukanáza, kyanovodíku a dále všech ostatních základních faktorů, které jsou důležité pro vyvolání systémové rezistence a zabránění patogenezí. Dále působí jako biohnojiva, což je tedy kategorie zahrnující mikroorganismy s potenciálem podpory růstu rostlin díky zvýšenému příjmu živin mechanismy, které budou zmíněny dále. Primární funkcí biohnojiv je biologická fixace dusíku a transformace esenciálních makroživin do formy, kterou jsou rostliny schopny přijímat. Jednou z jejich funkcí je působení jako biostimulátory. Dané mikroorganismy mají za příčinu především produkci rostlinných hormonů, jako jsou gibereliny, auxiny a cytokininy [2; 8].

Rhizobakterie hrají zásadní roli v udržování úrodnosti půdy. Mezi základní procesy, které rhizobakterie zprostředkovávají, patří syntéza a mineralizace půdní organické hmoty, rozklad zbytků plodin, rostlin a organických sloučenin, a také procesy jako mineralizace, fixace dusíku, rozpustnost fosfátů a další, které přispívají ke zlepšení nutriční hodnoty půdy. Fixace dusíku nabízí vysoce udržitelnou a účinnou alternativu k používání dusíkatých hnojiv v zemědělství [1]. PGPR napomáhají při syntéze určitých chemických sloučenin, které jsou zodpovědné za účinky na morfologii kořenů, jako jsou fytohormony auxin a giberilin [9].

Využití rhizobakterií se ukazuje jako potenciálně ekologicky šetrný způsob zvýšení výnosu plodin díky usnadněnému růstu rostlin. Z tohoto důvodu hrají aktuálně rhizobakterie důležitou roli v udržitelném zemědělství [2].

2.3.1 Produkce fytohormonů

Auxin je jeden z nejdůležitějších fytohormonů, který produkuje PGPR. Tento hormon se účastní tvorby kořenového systému. V malých koncentracích způsobuje prodlužování primárních kořenů, naopak ve větším množství způsobuje tvorbu kořenového vlásku

a laterální růst kořenů. Nejznámějším auxinem, který se vyskytuje v rostlinách, je kyselina indol-3-octová [2].

Gibereliny se podílí na prodlužování výhonků. Dále je vyžadován při klíčení semen, růstu listů, vývoji květů a plodů [2].

2.3.2 Produkce sideroforů

Rhizobakterie jsou dále schopné produkovat siderofory. Siderofory jsou nízkomolekulární chelátory železa, které se používají pro získávání železa z půdy, díky čemuž se železo stane využitelnějším pro rostliny. Siderofory vytvářejí s železem železito-sideroforový komplex solubilizací železa z okolního prostředí. Tento komplex se může v buňce pohybovat procesem difúze, kdy uvnitř buňky se komplex rozpadne, železo je dále využito a daný siderofor se vrací zpět na buněčný povrch [2]. Železo jako takové je pro rostliny velice důležité. Je potřebné ve fyziologických procesech rostlin jako je dýchání, fotosyntéza nebo fixace dusíku, a to jako kofaktor pro zde potřebné enzymy. Jeho nedostatek pak má za následek vážné metabolické změny, jako například nedostatečnou tvorbu chlorofylu – chlorózu listů [10].

2.3.3 Tvorba biofilmů

Půdní bakterie dokážou tvořit tzv. biofilmy. Dle definice jsou biofilmy shluky vzájemně interagujících bakterií, které jsou drženy pohromadě pomocí extracelulární polymerní látky, která je těmito bakteriemi produkována [2]. Biofilmy se vyznačují svou trojrozměrnou strukturou, protkanou vodními kanálky, které umožňují transport esenciálních živin, kyslíku a odpadních složek v celém společenství k buňkám či od buněk do okolního prostředí [11]. Mezi nejvíce zastoupené extracelulární polymerní látky (EPS) patří především neutrální nebo polyanionické polysacharidy. Ty pak umožňují sdružování dvojmocných iontů (vápník, hořčík), díky kterým se propojují polymerní vlákna a tím se zvyšuje vazebná schopnost biofilmu. Další významnou složkou EPS jsou proteiny, nejčastěji pak strukturní proteiny a enzymy. Biofilmy umožňují bakteriím provádět různé procesy, které jednotlivé buňky nemohou, což napomáhá bakteriím přežít mnoho stresových podmínek. Jednou z významných činností je pak schopnost degradace ve vodě rozpustných (proteiny, nukleové kyseliny) i nerozpustných biopolymerů (celulóza, chitin) a ostatních organických látek pomocí přítomných enzymů. Tyto enzymy se podílí také na ochraně biofilmu před působením biologicky aktivních látek [12].

Dále je také známo, že většina PGPR je schopna pomocí biofilmů přilnout k povrchu kořene, kde následně vytvoří mikrobiální společenství. To pak přináší lepší podmínky pro snazší průběh životního cyklu, a především napomáhá buňkám přetrvávat v nepříznivém prostředí, jelikož volně žijící buňky mohou být snadno odplaveny [11]. Dále pak zprostředkovávají interakce rostlina-mikroorganismus, což napomáhá k lepšímu přežití rostlin, zvyšování odolnosti vůči abiotickému stresu, stimulaci růstu rostlin a potlačování chorob [2]. Ve formě biofilmu dochází také k výraznému zvýšení odolnosti mikroorganismů vůči působení kyslíkových radikálů, fagocytóze, vlivu dezinfekčních prostředků a antibiotik, a také před konkurencí v půdě [13].

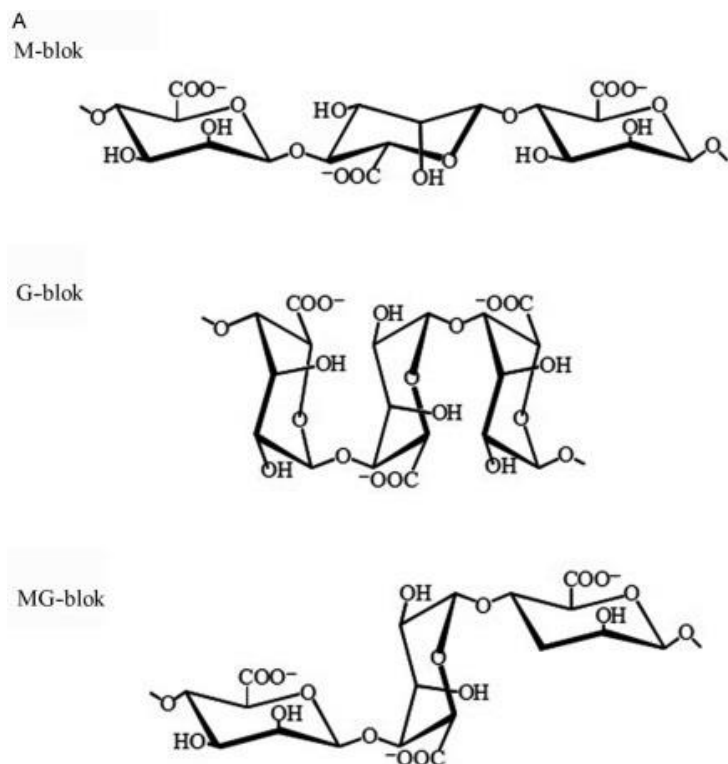
2.3.4 *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter vinelandii je gram negativní půdní bakterie, která se vyznačuje svou produkcí dvou typů biopolymerů, které vzbuzují biotechnologický zájem. Jedná se o alginát a polyhydroxyalkanoáty. Jedním z polyhydroxyalkanoátů produkovaný *Azotobacter vinelandii* je poly(3-hydroxybutyrát), který bude popsán níže. Daná rhizobakterie je dále schopna vázat dusík i v přítomnosti kyslíku o vysokých koncentracích. Dále se vyznačuje svou rychlostí respirace, která je v porovnání s jinými prokaryoty výrazně vyšší, například ve srovnání s bakterií *Escherichia coli* je rychlost respirace 10x vyšší. Na základě výše zmíněných dvou vlastností je rod *Azotobacter* široce zkoumán [14].

K vázání dusíku dochází pomocí kyslík-citlivému enzymu nitrogenáza i při vysokých koncentracích kyslíku. Během jeho fixace může v rhizobakteriích nastat situace vysokého obsahu kyslíku uvnitř buňky. Aby se předešlo inaktivaci nitrogenázy v důsledkem značného obsahu kyslíku, probíhá proces ochrany dýchání. Tento proces zvyšuje tempo spotřeby kyslíku v buněčném metabolismu a tím udržuje nízkou intracelulární koncentraci kyslíku a také brání zmíněné inaktivaci nitrogenázy [14].

2.3.4.1 *Alginát*

Jedním z biopolymerů, které jsou schopny bakterie rodu *Azotobacter* produkovat, je alginát. Jedná se o polysacharid, nerozvětvený kopolymer, který je u tohoto rodu tvořen extracelulárně z důvodu ochrany před škodlivými faktory prostředí. Na rozdíl od hnědých mořských řas, ve kterých se nachází jako intracelulární materiál [15]. Vedle celulózy se jedná o nejrozšířenější biopolymer na světě [16]. Významnou vlastností alginátu je jeho funkce působit jako činidlo zvyšující viskozitu a také jako činidlo gelující. Skládá se z jednotek kyseliny β -D-mannuronové a jejího epimeru α -L-kyseliny guluronové (G), které jsou navzájem spojeny 1,4-glykosidickými vazbami [17]. Alginátové molekuly mohou být uspořádány jako bloky spojených G monomerů: G–G-blok, M-monomerů: M–M-blok nebo oblastí střídajících se G a M monomerů – MG-blok. Tyto jednotlivé bloky lze vidět na Obrázek 1. Struktura G-bloků způsobuje sterické bránění. G-bloky mají dále schopnost silně vázat dvojmocné kationty, což spolu způsobuje, že G-bloky jsou tužší, silnější, křehčí a mají větší omezení v transportu rozpuštěné látky ve srovnání s M-bloky a MG-bloky. Ty jsou naopak flexibilnější a slabší [15]. Molekuly alginátu jsou biologicky odbouratelné, biokompatibilní a neimunogenní [15; 18]. Viskoziфикаční a gelující schopnost alginátů závisí na chemické struktuře, stechiometrii s chelatačním kationtem (Ca^{2+} , Ba^{2+}) [19], relativním obsahu dvou monomerů (kyselina mannuronová, kyselina guluronová), stupni acetylce jednotek kyseliny mannuronové a taky střední molekulové hmotnosti polymeru [14].



Obrázek 1: Chemické struktury mannuronátového bloku, guluronátového bloku a MG-bloku [20]

Alginát se obecně vyskytuje ve formě gelů, a to po použití síťovacího činidla obsahujícího multikovalentní kationty. Aby byly dosaženy potřebné fyzikální vlastnosti, jako jsou degradace, mechanická pevnost a tuhost a biologické vlastnosti (tím je myšleno zvýšená interakce s buňkami), vystavuje se alginát různým chemickým a fyzikálním vlivům. Přidáním kationtového poly(ethylenaminu) (PEI) dochází ke zlepšení výše zmíněných mechanických vlastností alginátového gelu. PEI zvyšuje odolnost gelů se síťovacími činidly a tím tak zlepšuje tuhost gelu. Gelování je také ovlivněno teplotou, typem a koncentrací síťujícího činidla. Například při nízkých teplotách vede k pomalejšímu síťování v důsledku snížené rychlosti difúze vápenatých iontů, což má za následek stabilizaci gelačního komplexu a tím i celého procesu. Takové gely se vyznačují lepšími mechanickými vlastnostmi [19].

Využití alginátu je široké. Uplatňuje se v biomedicínských aplikacích, kde se jako derivát v kombinaci s jinými polymery uplatňuje při dodávání léčiv s nízkou molekulovou hmotností. Využívá se při tvorbě hydrogelů na bázi alginátu, což jsou trojrozměrné zesíťované sítě složené z hydrofilních polymerů s vysokým obsahem vody [20]. Dále nachází své uplatnění ve tkáňovém inženýrství, buněčných nosičích nebo buněčné terapii, ale také v potravinářském průmyslu, kde je používán jako stabilizátor a emulgátor schopností interakce s bílkovinami, tuky a vlákninou. Alginát-pektinové směsi nalézají využití jako želírující činidla. Své využití má alginát také ve farmaceutickém průmyslu a biotechnologiích jako dentální otiskovací materiál nebo jako materiál pro krytí ran [18; 19].

Degradace alginátu je možná několika způsoby. Jednou z možností je dezintegrace alginátového materiálu pomocí výměny gelujícího vápenatého iontu za sodík, tedy náhradou vícemocných kationtů za jednomocné, nebo odstranění vápenatých iontů

komplexními anionty, jako je fosforečnan, citrát nebo laktát, které mají vysokou afinitu k iontům vápníku. Hlavní nevýhodou alginátu je jeho inertní povaha, která ho činí neadherentním k buňkám, a nedostatečná enzymatická degradabilita [15; 19]. Alginát lyázy jsou pak skupinou enzymů, které jsou schopny rozeznat alginát jako substrát. Jejich aktivita je snadno detekovatelná, jelikož jejich působením dochází ke snížení koncentrace alginátového roztoku [20].

2.3.4.2 Polyhydroxyalkanoáty

Druhým produkovaným biopolymerem je poly(3-hydroxybutyrát), jenž se řadí do skupiny polyhydroxyalkanoátů (PHA). Skupina PHA představuje typ hydrofobního, biodegradovatelného a biokompatibilního bioplastu, který skýtá potenciál ve tvorbě umělých implantátů a nových mikro/nanonosičů pro cílenou terapii v oblasti lékařství. Tyto materiály lze využít k dodávání léků, provádění regenerativní léčby a také jako alternativu k tradičním plastům [19]. Avšak kvůli své křehkosti má omezené využití v aplikacích tkáňového inženýrství [21], a proto se výzkum přesunul na zlepšení mechanických vlastností [22].

Jako aditivum byl použit chitosan, díky němuž došlo k zesíťování a tak ke zlepšení mechanické a biokompatibilní vlastnosti kopolymeru polyhydroxybutyrátu, což je ideální pro regeneraci tkání. Po přidání kolagenu došlo k vytvoření trojrozměrného scaffoldu, což se jeví jako potenciální využití pro kostní tkáň a pro regeneraci nervové tkáně [19].

P(3HB) je biopolyester tvořen intracelulárně v mikrobiálních buňkách. V dnešní době by mohl být použit jako náhrada konvenčních plastů, které pochází z petrochemického průmyslu. Tento polymer je složen z jednotek 3-hydroxybutyrátu, které byly utvořeny pomocí několika enzymatických procesů. Každá monomerní jednotka je syntetizována kondenzací dvou molekul acetyl-CoA na acetoacetyl-CoA. Tato molekula je následně redukována na 3-hydroxybutyryl-CoA za současné katalýzy oxidací jedné molekuly NADPH [14].

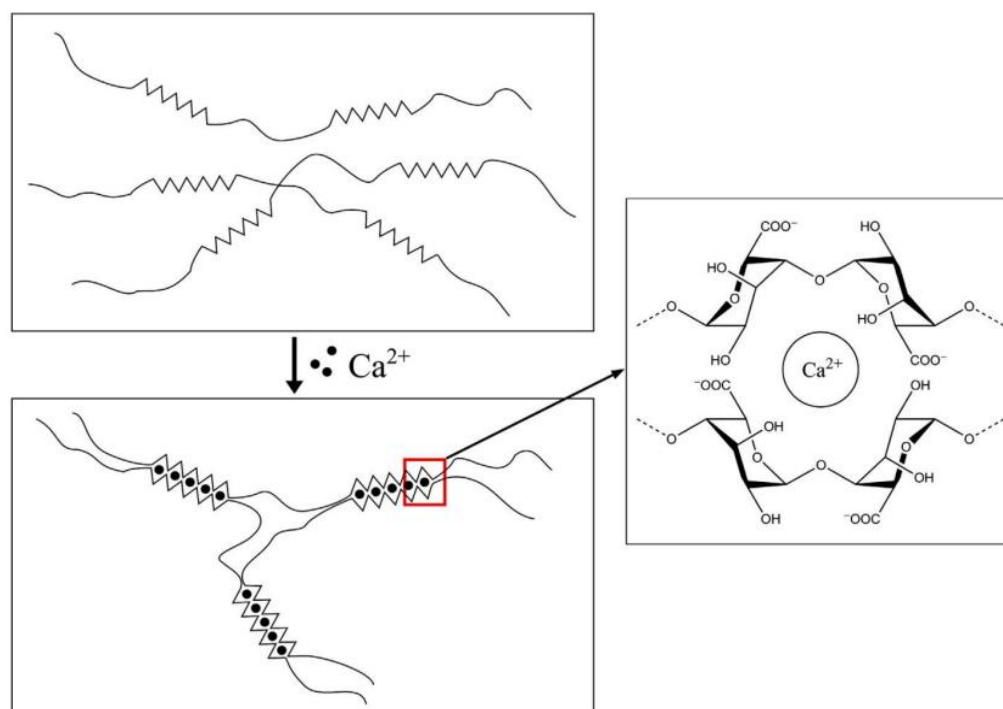
2.4 Alginátové gely

Fyzikálním nebo chemickým síťováním polymerních řetězců dochází ke snadné přípravě alginátových gelů. Jejich vlastnosti pak závisí na typu síťování a jeho hustotě a přítomnosti komplexotvorných činidel (fosfát, citrát). Proces gelování může probíhat i za mírných podmínek a bez použití toxických sloučenin, tudíž je ideální pro enkapsulaci citlivějších materiálů. Výhodou alginátu je jeho schopnost tuhnout za studena, tudíž ke tvorbě alginátových gelů není třeba konkrétních teplot. Z toho důvodu jsou alginátové gely teplotně stabilní a při zahřívání nedochází k tání [15].

Alginátové gely jsou nejčastěji připravovány iontovým síťováním s vícemocnými kationty, výjimkou jsou ionty Mg^{2+} , ty nevedou ke tvorbě trojrozměrné gelové sítě. Složení alginátu a množství přítomných G-bloků ovlivňuje vazebnou afinitu, která se také liší pro různé typy kationtů. Tato vazebná afinita ke kationtům se zvyšuje v tomto pořadí: $Mg^{2+} \ll Mn^{2+} < Zn^{2+} < Ni^{2+} < Co^{2+} < Ca^{2+} < Sr^{2+} < Ba^{2+} < Cd^{2+} < Cu^{2+} < Pb^{2+}$, kdy platí, že čím vyšší je afinita, tím dochází ke tvorbě silnějšího gelu. Nejčastěji používaný kationt ke tvorbě alginátových gelů je však vápník ve formě vápenatých iontů, i přesto, že nevytváří nejsilnější vazbu. Hlavním důvodem je, že je netoxický, snadno dostupný,

a zároveň relativně levný [15]. Ve srovnání síťování alginátu pomocí dvojmocných a trojmocných kationtů, trojmocné (např. Al^{3+} , Fe^{3+}) zesilují vazbu s biopolymerem a poskytují tak kompaktnější a silnější gelovou síť. To by mohlo být vysvětleno vazbou trojmocných kationtů se třemi karboxylovými skupinami různých alginátových řetězců současně [23].

Ke gelovatění alginátů pomocí vícemocných kationtů neboli iontovému zesílení alginátů, dochází prostřednictvím iontové výměny alginátových proti-iontů. Nejčastěji jsou to ionty sodíku nebo draslíku s vícemocnými kationty. Ty totiž umožňují vrstvení G-bloků v alginátovém polymeru, čímž dochází ke vzniku charakteristického tvaru, tzv. „egg box model“, což je zobrazeno na Obrázek 2. To znamená, že se propojí alginátové řetězce a vytvoří se trojrozměrné gelové sítě, jejichž obsah vody může být větší než 95 % [15].



Obrázek 2: Iontové zesílení alginátového roztoku vedoucí k vytvoření alginátového gelu pomocí vápenatého iontu tvořících vaječné schránky [15]

2.5 Viabilita bakterií

Životaschopnost bakterií se v současnosti označuje jako schopnost buňky růst a rozmnožovat se za definovaných podmínek prostředí. Tradiční definice životaschopných buněk říká, že jedna životaschopná buňka je schopna vyrůst a dále vytvořit kolonii buněk, kterou lze následně opticky měřit buď v kapalném nebo pevném médiu. Viabilita je tedy obecně schopnost reprodukce a následné kultivovatelnosti [24].

Ne všechny bakteriální buňky jsou ale schopny reprodukce a růstu za daných podmínek, a i přesto mohou mít vlastnosti plně funkčních životaschopných bakteriálních buněk. Na úkor tohoto faktu byl založen termín vitalita. Tento termín popisuje, do jaké míry je buňka schopna vykonávat různé aspekty metabolických, fyziologických

a genetických funkcí. Buňku tak lze popsat jako životaschopnou, avšak ne nutně jako kultivovatelnou. Popisuje také strukturální a morfologickou integritu buněk, bakterií [24].

K rozlišení výše zmíněných stavů buněk byly vyvinuty metody ke zjišťování počtu buněk. První je metoda na kultuře závislá, při které je kapalný vzorek nanášen na pevné médium, ponechán k inkubaci za definovaných podmínek času a teploty. Výsledkem je počet jednotek tvořících kolonie na mililitr kultury (CFU/ml). Metoda je využívána pro rutinní počítání buněk a identifikaci živých, životaschopných mikroorganismů v potravinářských vzorcích. Jedná se o typický příklad, kdy je životaschopnost závislá pouze na schopnosti buňky se reprodukovat, čímž vzniká patrná kolonie z jediné původní buňky [24; 25].

Jako metoda pro počítání buněk na kultuře nezávislá se považuje průtoková cytometrie. Ta používá kombinaci rozptylu světla a emitované fluorescence k detekci buněk s různými strukturními, fyziologickými či genetickými stavy [24].

2.5.1 Plotnová metoda

Plotnová metoda je označována jako kultivační nepřímá metoda, která spočívá ve stanovení počtu narostlých kolonií. Je zde však předpoklad, že každá buňka vytvoří jednu izolovanou kolonii. Tuto metodu je možné provést dvěma způsoby, a to očkováním vzorku buď přelivem nebo roztěrem [25].

Očkování přelivem probíhá tak, že nejprve dochází k nanesení vzorku na sterilní Petriho misku, která je přelita připraveným živným médiem. Očkování roztěrem pak probíhá tak, že na Petriho misku je nalito určité množství agaru a po jeho ztuhnutí je následně napipetován vzorek, který je rozetřen očkovací L-kličkou. Dané metody se uplatňují ke zjištění životaschopnosti kultur [25; 26].

Na druhé straně se při plotnové metodě využívají metody křížového roztěru. Pokud jsou v kultuře přítomny i jiné mikroorganismy, lze touto metodou izolovat požadovaný kmen bakterie. Následně je možné rozlišit různé mikroorganismy podle jejich odlišné morfologie na základě vzhledu vyrostlých kolonií. Poté je možné si odebrat buňky z kolonie, kterou bylo účelem získat, a ty je možné dále izolovat pomocí dalšího křížového roztěru. Křížový roztěr je tedy metoda, při které dochází k postupnému zředování původní kultury za účelem získání jednotlivých kolonií a následného pozorování jejich morfologie. Lze říct, že jedna kolonie je klon jedné buňky. Kultura je přenášena pomocí bakteriologické kličky ze žíhatele materiálu, která je po každém kroku očkování žíhána v plamenu, čímž dochází k usmrcení buněk a při dalším tahu po agaru jsou pak roztírány pouze buňky setřené z dané oblasti křížového roztěru na Petriho misce. Kromě kliček z žíhatele materiálu mohou být použity také jednorázové plastové sterilní kličky. Tímto roztíráním dochází ke stále menšímu množství obsažených buněk. V poslední oblasti křížového roztěru, tzv. hádku, vyrůstají již kolonie, u kterých je možné hodnotit jejich charakteristické morfologické znaky, jako je vzhled, barva nebo okraje [27; 28].

2.5.2 Konfokální fluorescenční mikroskopie

Tento typ mikroskopie se stal svou schopností poskytovat trojrozměrné snímky vzorků s vysokým rozlišením důležitým nástrojem v různých vědeckých oborech. Technika trojrozměrného zobrazování je umožněna pomocí precizní vizualizaci vnitřní struktury

buněk a tkání, pomocí po sobě následujících snímků optických řezů v různých hloubkách. V porovnání s ostatními technikami se konfokální mikroskopie pyšní možným opakovaným zobrazováním živých vzorků v průběhu času, jelikož zde nedochází k destrukci vzorku. Toho je možné využít pouze do chvíle, než dojde k vysvícení fluoroforu [29].

Principem konfokální mikroskopie je využití úzké štěrbiny k selektivnímu zachycení světla pouze z ohniskové roviny, čímž se docílí vysoké kvality obrazu. Optická konstrukce zvyšuje kontrast a rozlišení, a tak jsou vytvářeny ostré snímky vzorků [29]. Zdrojem zde bývá laser (ultrafialové, infračervené nebo viditelné spektrum), což je intenzivní bodový zdroj světla, který přes bodovou (konfokální) clonu a objektiv osvětluje preparát. Tím samým objektivem pak prochází odražené světlo (v případě fluorescenční konfokální mikroskopie pak emitované fluorescenční záření). Dalším krokem je průchod paprsků zrcadlem k bodové cloně, kde dochází k odfiltrování světla z jiných rovin a paprsky nakonec vstupují do fotonásobiče. Ve fotonásobiči dochází k zesílení signálu a k detekci signálu. Ve skenovacím zařízení jsou informace ukládány pomocí bodů o souřadnicích X-Y, jejichž pomocí je počítač schopen sestavit obraz celého preparátu. Postupnou tvorbou obrazu bod po bodu pomocí skenování dochází k vytváření velmi precizních obrazů, na rozdíl od tvorby celého obrazu najednou [30; 31]. Konfokální mikroskopie často zahrnuje i fluorescenční značení, které napomáhá vizualizaci specifických struktur ve vzorku, což umožňuje zacílit, a tak detailněji studovat jednotlivé buněčné nebo molekulární složky [29].

Konfokální fluorescenční mikroskopie nachází své uplatnění nejen v biologii, ale také v oblasti materiálové vědy. V biologii se nejvíce využívá v odvětví buněčné biologie, neurobiologie a vývojové biologie, kde dochází ke studiu buněčných struktur, organel a buněčných procesů, měření membránového potenciálu nebo intracelulárního pH. Možností studia těchto procesů je konfokální mikroskopie také využívána v biomedicinském výzkumu pro studium nemocí, buněčných interakcí a reakcí na léky schopností vizualizace a následné analýze biologických procesů na subbuněčné úrovni. V oblasti materiálových věd je uplatňována při studiu mikrostruktury a vývoji pokročilých materiálů a nanotechnologií ve vysokém rozlišení [29; 31].

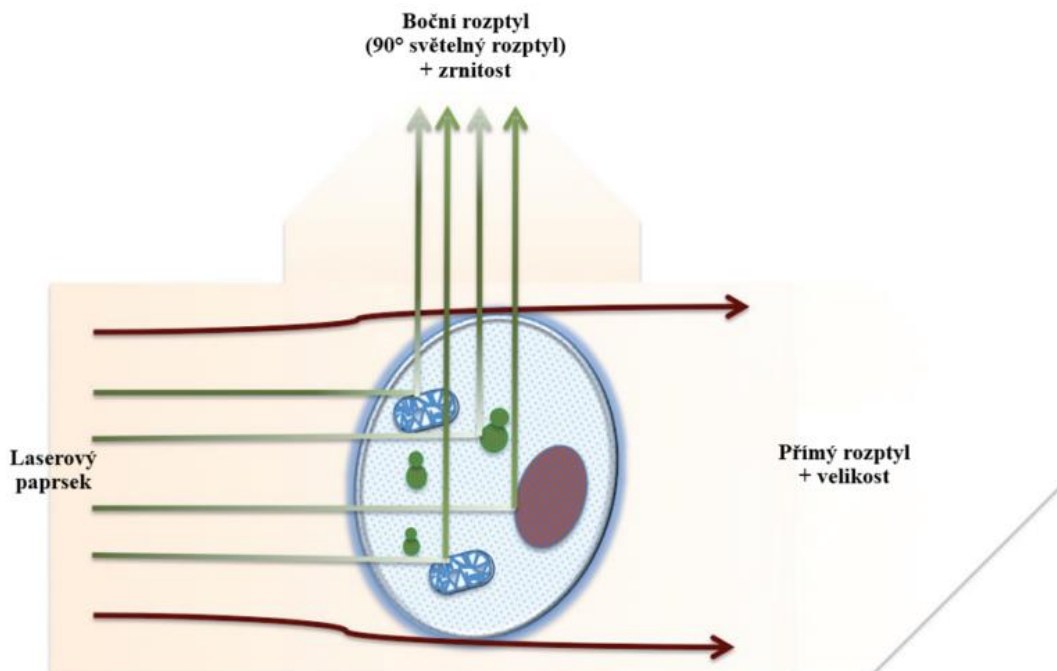
2.5.3 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je mikrobiologická technika, při které se buňky suspendují v kapalině, jež následně prochází úzkou kapilárou. Pomocí hydrodynamické fokusace následně dochází k tomu, že měřícím bodem prostupují buňky jednotlivě. Měřící bod je osvětlován zdrojem koherentního záření v podobě laseru. Tento proces umožňuje detekci a počítání buněk na základě rozptylu světla pomocí přímého a bočního rozptylu. Výsledný cytogram poskytuje informace o velikosti buněk a o jejich viabilitě [24].

Základní princip průtokové cytometrie souvisí s rozptylem světla a fluorescenční emisí, která se vyskytuje jako světlo ze zdroje excitace, nejčastěji laserového paprsku, který dopadá na pohybující se částice. Existují dva typy průtokové cytometrie. Prvním je netřídící typ, který je schopen provádět rozptyl světla a fluorescenční emisí, druhým pak třídící typ, který má schopnost detekované částice třídít podle nastavených parametrů.

Fluorescenčně aktivované buněčné třídiče jsou průtokové cytometry, které mají schopnost třídit fluorescenčně značené buňky ze smíšené buněčné populace [32].

Klíčovými prvky průtokových cytometrů a buněčných sorterů jsou fluidní zařízení, optické komponenty (včetně laseru, excitační a sběrné optiky), detektory a počítač. Fluidní část zařízení řídí tok kapaliny obsahující částice směrem k průtokové cele, kde probíhá analýza buněk procházejících paprskem světla. Funguje na principu využití tekutiny v plášti, která bývá obvykle fyziologickým roztokem s fosfátovým pufrem a tlakové vedení suspendovaných buněk přes přístroj. Pomocí hydrodynamické fokusace je dosaženo udržováním vyššího tlaku vzorku než tlaku tekutiny v plášti, dále zarovnává buňky do jednoho fokusovaného sloupce a způsobuje rovnoměrné osvětlení vzorku. Optický systém obsahuje následně část excitační a sběrnou. V excitační části dochází pomocí čoček ke tvarování a zaostřování laserového paprsku na buňky nebo částice, přičemž při dopadu laseru na buňku dochází k rozptylu světla. Přímý a boční rozptyl pak poskytují informace o velikosti buňky a vnitřní složitosti. Přímý rozptyl je úměrný velikosti buněk a boční rozptyl, který je detekován v úhlu přibližně 90° k laserovému paprsku, pak odráží vnitřní složitost a je zásadní pro analýzu fluorescence ze značených protilátek nebo barviv. Působení přímého i bočního rozptylu si lze prohlédnout na Obrázek 3. Sběrná optika přenáší rozptýlené světlo nebo fluorescenční signál z částic do detektorů. Elektronická síť pak zachycuje signál a přeměňuje jej na digitální data odpovídající intenzitě světla. K analýze těchto dat je nezbytný počítač. Součástí sběrné optiky jsou také filtry, které umožňují, aby se k detektoru dostaly pouze specifické vlnové délky, a tím tak určují specifičnost detektoru pro fluorescenční barviva. Lze říci, že pro přesnou analýzu průtokovou cytometrií je rozhodující správný provoz fluidního systému a přesná optická konfigurace [32].



Obrázek 3: Rozptyl světla, přímý rozptyl úměrný velikosti, boční rozptyl úměrný vnitřní složitosti buňky [24]

Výsledné světelné signály jsou detektory převáděny na napětí. Na základně citlivosti se používají dva typy fotodetektorů – fotodiody (PD) a fotonásobiče (PMT). PMT jsou více citlivé ve srovnání s fotodiodami, PD detekují silnější světelné signály generované přímým rozptylem. Zatím co PMT se běžně používají k detekci slabších signálů generovaných pomocí bočního rozptylu a fluorescence. Oba typy detektorů se v průtokové cytometrii vyskytují ve formě polí [32].

Výhodou této techniky je její rychlý čas analýzy vzorku, dále pak potřebný minimální objem analyzovaného vzorku nebo schopnost zkoumat různé aspekty jako jsou životaschopnost, struktura (organely, jádra, DNA, RNA, chromozomy, hormony a obsah proteinů) a metabolismus buněk, nebo měření toku vápníku a membránových potenciálů [24; 32].

2.5.3.1 Fluorescence

Fluorescenční činidlo má řadu specifických vlnových délek, při kterých absorbuje světelnou energii. V důsledku tohoto procesu absorpce dochází k přechodu elektronu z původního stavu S_0 do vyšší energetické hladiny S_1 , označovaného jako excitovaný stav. Tento vybuzený elektron se však rychle vrátí do svého základního stavu, přičemž přebytečnou energii vydává jako foton světla [32; 33].

2.5.4 Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy, též fluorochromy, jsou v buňce schopny se navázat na organely, a tak prokázat jejich přítomnost. Používají se k identifikaci různých buněčných populací, buněčných povrchových receptorů nebo intracelulárních organel buněk, ke stanovení obsahu nukleových kyselin či k měření enzymatické aktivity nebo apoptotických buněčných populací [32; 34].

Mezi důležité vlastnosti fluorescenční sondy patří absorpční spektrum, při kterém je sonda schopna excitace, a rozsah emitovaných vlnových délek, které jsou známy jako emisní spektrum. Emisní vlnová délka jakéhokoli fluorochromu bude vždy delší než jeho excitační vlnová délka. Rozdíl mezi maximy při absorpci a emisi se nazývá Stokesův posun, ten pak určuje kvalitu fluorochromu. Platí, že čím je vyšší průměr Stokesova posunu, tím je větší vzdálenost mezi excitujícím a emitovaným zářením [32; 35].

Některé fluorochromy používané v průtokové cytometrii se používají ke kovalentnímu značení proteinů, kde je jako sonda vybírána protilátka. Mezi často používané patří fluorochromy, které se používají ke značení nukleových kyselin. Dále také dochází k vývoji tandemových barviv, které obsahují dva fluorochromy. Nejprve dochází k excitaci prvního barviva, které dosáhne své maximální absorpce. To pak předá veškerou svou energii druhému barvivu, které je umístěno v těsné blízkosti. Díky tomu je druhý fluorochrom aktivován a produkuje fluorescenční emisi. Tento jev je označován jako fluorescenční rezonanční přenos energie (FRET). Jedná se o dobrý způsob k dosažení vyššího Stokesova posunu, což zvyšuje počet barev analyzovaných z jedné vlnové délky laseru [32; 36].

Mezi nejčastěji používané fluorescenční sondy v průtokové cytometrii patří propidium jodid (PI), fluorescein diacetát (FDA) a fluorescenční sondy z rodiny SYTOX a SYTO barviv. Dalšími také používanými fluorochromy jsou pak Rhodamin nebo dipyrromethenbordifluorid (BODIPY) [32].

2.5.4.1 Propidium jodid

Propidium jodid je fluorescenční barvivo, které se váže na DNA, takže detekuje přítomnost nukleových kyselin a používá se tedy ke stanovení jejich obsahu, a detekuje přítomnost mrtvých buněk. Pokud nedojde k poškození membrány živých buněk, toto barvivo není schopné proniknout skrz. Nicméně v případě poškození membrány propouští PI volně do buněk. Svou vysokou afinitou propidium jodidu k nukleovým kyselinám dochází po navázání ke zvýšení fluorescence, a to až 40násobně. Dochází také k posunu fluorescenčního excitačního maxima o 30-40 nm do červené oblasti, což po vstupu barviva do mrtvých buněk a následné excitaci při vlnové délce 535 nm je pozorovatelné jako emitované intenzivně červené záření při vlnové délce 617 nm [37; 38].

2.5.4.2 SYTOX

Interkalační barviva řady SYTOX se jeví jako možná alternativa k propidium jodidu. Jsou k dispozici v nejrůznějších spektrálních variantách (zelená, modrá, oranžová, ...). SYTOX barviva jsou schopna dosáhnout až 500násobného zesílení fluorescence po navázání se na nukleové kyseliny. Zmíněné zesílení intenzity je považováno za vhodné především pro bakterie, u kterých díky jejich malé velikosti a nižšímu obsahu nukleových kyselin, v porovnání s kvasinkami a živočišnými buňkami, může být signál propidium jodidu nedostatečný, jsou-li použity méně citlivé přístroje [39].

2.5.4.3 Fluorescein diacetát

FDA, neboli fluorescein diacetát je fluorescenční barvivo bez náboje, které lehce prochází přes plazmatickou membránu a je rozpustné v lipidech. Jeho volná forma fluorescein je pak vysoce polární a buňky s neporušenou membránou jej nepropouští. K přeměně do této volné formy dochází po absorpci do buňky a následné hydrolýze nespecifickými intracelulárními esterázami. Pokud dojde v buňce k jeho akumulaci, dochází k měřitelné fluorescenci. Je-li však membrána poškozena, fluoresceinový iont difunduje z buňky ven, nedochází tedy ke zmiňované fluorescenci a daná buňka se považuje za neživotoschopnou. Použití tohoto barviva je užitečné pro hodnocení membránové celistvosti a intracelulární enzymatické aktivity [40; 41].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje

3.1.1 Použitý mikroorganismus

V experimentech bylo pracováno se třemi kmeny mikroorganismu *Azotobacter vinelandii*. Jednalo se o jeden kmen z české sbírky mikroorganismů *Azotobacter vinelandii* kmen D CCM 289 a o dva kmeny z německé sbírky mikroorganismů *Azotobacter vinelandii* DSM 87 a *Azotobacter vinelandii* DSM 720.

3.1.2 Použité chemikálie

4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI), Thermo Fisher Scientific (USA)

D-glukóza monohydrát, Lach-Ner (Česká republika)

Dihydrogenfosforečnan draselný, Lach-Ner (Česká republika)

Etanol, Lach-Ner (Česká republika)

Hydrogenfosforečnan disodný, Lach-Ner (Česká republika)

Chlorid barnatý, Lachema (Česká republika)

Chlorid draselný, Lach-Ner (Česká republika)

Chlorid hlinitý, Carl Roth (Německo)

Chlorid měďnatý dihydrát, FlukaTM (USA)

Chlorid sodný, Lach-Ner (Česká republika)

Chlorid vápenatý, Lach-Ner (Česká republika)

Chlorid železitý hexahydrát, PENTA chemicals unlimited (Česká republika)

Propidium jodid (PI), Thermo Fisher Scientific (USA)

Síran amonný, Lachema (Česká republika)

Síran hořečnatý heptahydrát, Lach-Ner (Česká republika)

Síran vápenatý dihydrát, PENTA chemicals unlimited (Česká republika)

SYTOXTM Blue Dead Cell Stain, Thermo Fisher Scientific (USA)

Uhličitan vápenatý, Lachema (Česká republika)

Yeast Extract Powder, HiMedia (Indie)

3.1.3 Použité přístroje

Laminární box Aura Mini, Bio Air Instruments

Magnetická míchačka MMS-3000, Biosan (Lotyšsko)

Mikrocentrifuga 1-14, SIGMA

Průtokový cytometr Aurora, Cytex Biosciences (USA)

Předvážky EW 620-3NM, Kern (Německo)

Třepačka Unimax 1010 s inkubátorem 1000, Heidolph

3.2 Kultivace bakterií

3.2.1 Kultivační podmínky

Skladování kultury probíhalo pomocí kryozkumavek, kdy do každé kryozkumavky bylo přidáno 0,5 ml 30% glycerolu a 1 ml inokula. Takto připravené kryozkumavky byly zmrazeny a uchovávány v hlubokomrazicím boxu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Kultivace bakterie *Azotobacter vinelandii* probíhala na temperované třepačce při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zvolená teplota byla vybrána z rozmezí optimálních teplot, které jsou od 25 do $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Připravené inokulační médium bylo ponecháno na třepačce při 200 otáčkách za minutu (rpm), produkční médium pak při 220 otáčkách za minutu (rpm). Odlišnost mezi médii je viditelná v tabulkách níže (viz. Tabulka 1: Složení jednoho litru inokulačního média a Tabulka 2: Složení jednoho litru produkčního média).

3.2.2 Inokulační a produkční médium

Všechny tři kmeny, které byly zvoleny pro dané experimenty, byly kultivovány ve stejném inokulačním i produkčním médiu, za stejných podmínek. Do 33 ml inokulačního média (Tabulka 1), které bylo ve 100 ml velké Erlenmayerově baňce, bylo přidáno 0,75 ml rozmražené kultury z kryozkumavky. Kultura byla inkubována v inokulačním médiu po dobu 24 h při teplotě $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně bylo 10 ml inokula ve sterilním boxu přeočkováno do Erlenmayerovy baňky o objemu 250 ml obsahující 100 ml produkčního média (Tabulka 2), kde byla v dřívějších fázích práce kultivována po dobu 96 hodin. Pro pozdější experimenty byl tento čas zkrácen na 48 hodin, bakterie byly ponechány v produkčním médiu po dobu dvou dní.

Tabulka 1: Složení jednoho litru inokulačního média

Látka	Množství [g]
Glukóza	20,0
Yeast Extract Powder	6,0
Na_2HPO_4	2,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,6
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3

Tabulka 2: Složení jednoho litru produkčního média

Látka	Množství [g]
Glukóza	20,0
Yeast Extract Powder	6,0
Na_2HPO_4	2,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,6
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3
CaCO_3	1,0

3.3 Analýza vzorků bakteriálních kultur

Pro analýzu pomocí průtokové cytometrie byly vzorky mikrobiálních kultur odebrány po 120 hodinách kultivace (od počátku kultivačního procesu). Na následující experimenty byly pak odebrány již po 72 hodinách od počátku kultivace z důvodu lepší optimalizace počátečního protokolu.

3.4 Příprava vzorků k ověření viability pomocí průtokové cytometrie s fluorescenční sondou

Po 120 hodinách kultivace (v pozdějších experimentech pak po 72 hodinách) byl z Erlenmeyerovy baňky obsahující kulturu v produkčním médiu odebrán 1 ml kultury do 2 ml Eppendorfovy mikrozkuřavky. Eppendorfovy mikrozkuřavky byly následně centrifugovány při 2656 x g (6000 rpm) po dobu 5 minut. Po skončení centrifugace byl odpipetován supernatant a přidán 1 ml fosfátového pufru (složení viz. Tabulka 3: Složení jednoho litru fosfátového pufru). Za stejných podmínek byla opět provedena centrifugace, odlit supernatant a přidán 1 ml fosfátového pufru. Daný krok byl proveden ještě jednou, aby byly vzorky dostatečně promyté.

Než se přistoupilo k samotné přípravě vzorků, bylo otestováno vhodné naředění vzorku pro průtokovou cytometrii, kdy vzorek by měl obsahovat 10^5 - 10^6 buněk/ml. Bylo odebráno 0,1 ml vzorku do Eppendorfovy mikrozkuřavky, která již obsahovala 0,9 ml fosfátového pufru. Tím se získalo 10násobné ředění. Tento krok byl opakován do 1000násobného ředění. Vzorky není třeba barvit. Jednotlivé vzorky byly zkontrolovány okometricky kvůli viditelnému zákalu. Byly proměřeny vzorky naředěné 1000x a 500x. Z objemu, ve kterém bylo naměřeno 10 000, bylo vypočítáno celkové množství buněk v 1 ml. Ředění, které obsahovalo doporučené hodnoty bylo použito v experimentu.

Po zjištění vhodného naředění vzorku byly již 3x promyté vzorky naředěny a připraveny k přidavku sondy. Při použití fluorescenčních sond DAPI a SYTOX™ Blue Dead Cell Stain k analýze byl do 1 ml vzorku přidán 1 μ l sondy. Vzorky s přidavkem fluorescenční sondy byly pak ponechány k inkubaci ve tmě, za laboratorní teploty, po dobu 5 minut. Při použití fluorescenční sondy PI byly do 1 ml vzorku přidány 4 μ l sondy a vzorky pak ponechány k inkubaci ve tmě, laboratorní teploty, po dobu 15 minut. Do každého vzorku byla přidána vždy pouze jedna fluorescenční sonda. Pro analýzu byla připravena také pozitivní a negativní kontrola, pro kterou byl postup přípravy vzorku totožný s výše zmíněným postupem, tedy odebraná kultura byla třikrát promyta. Následně byla kultura povařena ve vařící vodě po dobu 30 minut. S varem usmrcené kultury byl připraven finální vzorek o 1000násobném zředění. V případě pozitivní kontroly byla přidána fluorescenční sonda, v případě kontroly negativní, nebyla ke vzorku přidána žádná sonda. Pro analýzu byl použit program SpectroFlo, pomocí kterého byly získány výsledky. Výstupem z měření byl pak záznam, který obsahoval 10 000 zaznamenaných buněk (eventů).

Tabulka 3: Složení jednoho litru fosfátového pufru

Látka	Množství [g]
NaCl	8,000
KCl	0,200
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,144
KH ₂ PO ₄	0,240

3.5 Příprava roztoků síťovacích činidel pro využití na vybraný kmen

Pro následující experimenty byly připraveny roztoky šesti síťovacích činidel, a to roztoky chloridu vápenatého, chloridu měďnatého, chloridu barnatého, chloridu železitého, chloridu hlinitého a síranu vápenatého o koncentracích 2 hm %, 0,2 hm. % a 0,02 hm. %. Takto připravené roztoky byly použity dále u vybraného kmene.

3.6 Příprava vzorků s přidavkem síťovacího činidla k ověření viability pomocí průtokové cytometrie s fluorescenční sondou

Postup přípravy vzorků s přidavkem síťovacího činidla na analýzu pomocí průtokové cytometrie je téměř shodný s předešlým, již zmíněným postupem. Liší se pouze v bodě před výsledným ředěním vzorků na průtokový cytometr, kdy po dostatečném promytí výchozích vzorků bylo přidáno 0,5 ml fosfátového pufru a 0,5 ml síťovacího činidla o příslušné koncentraci. Takto připravené vzorky byly ponechány k inkubaci po dobu 60 minut. Následně byly vzorky centrifugovány při 2656 x g (6000 rpm) po dobu 5 minut. Po skončení centrifugace byl odpipetován supernatant a přidán 1 ml fosfátového pufru. Takto připravené a vhodně zředěné vzorky byly měřeny průtokovou cytometrie. Jako v předchozích experimentech bylo zvoleno 1000násobné ředění vzorků, ke kterým byla přidána fluorescenční sonda. Pro experimenty s přidavkem síťovacího činidla byla vybrána fluorescenční sonda PI. Po přidavku 4 µl fluorescenční sondy do 1 ml každého vzorku byly vzorky následně ponechány k inkubaci ve tmě, za laboratorní teploty, po dobu 15 minut. Paralelně s přípravou vzorků s obsahem síťovacího činidla byly připraveny také vzorky bez přidavku síťovacího činidla. Vzorky bez přidavku síťovacího činidla sloužily pro pozdější porovnání výsledků. Jako při předchozích měření byla pro analýzu připravena také pozitivní a negativní kontrola. Postup přípravy byl totožný s výše zmíněným postupem pro přípravu pozitivní a negativní kontroly. Pro analýzu byl použit program SpectroFlo, jehož pomocí byly získány výsledky analýzy.

3.7 Příprava vzorků buněk uvolněných z připravených gelů k ověření viability pomocí průtokové cytometrie

3.7.1 Gelace buněčné kultury

Gelace buněčné kultury byla provedena pomocí připravených síťovacích činidel. Jako síťovací činidla byly použity roztoky chloridu vápenatého, barnatého, měďnatého, hlinitého, železitého a síranu vápenatého o koncentraci 2 hm. %.

Do skleněných čirých vialek bylo odebráno po 5 ml kultury a přidáno 5 ml síťovacího činidla. Takto připravené gely byly ponechány ve vialkách po dobu 10 minut. Gelace byla provedena pro každé síťovací činidlo v duplikátu.

3.7.2 Uvolňování buněk z připravených gelů

Do Eppendorfovy mikrozkuřavky byl přidán 1 ml fosfátového pufru, 0,5 g připraveného gelu a 3 mg enzymu alginát lyázy. Enzym byl přidán z důvodu usnadnění buňkám se uvolnit z gelu. V Eppendorfově mikrozkuřavkách byly gely s přířavkem enzymu ponechány po dobu 60 minut.

3.7.3 Ověření viability pomocí průtokové cytometrie s fluorescenční sondou

Po 60 minutách sloužících pro uvolnění buněk kultury z gelu byly Eppendorfovy mikrozkuřavky s obsahem centrifugovány při 2656 x g (6000 rpm) po dobu 5 minut. Z odstředěného supernatantu byly následně připraveny vzorky pro analýzu pomocí průtokové cytometrie, kdy bylo odebráno 0,1 ml supernatantu do další Eppendorfovy mikrozkuřavky s 0,9 ml fosfátového pufru (desítkové ředění). Proces byl poté opakován, aby bylo dosaženo 100násobného zředění. Vzorky byly připraveny v triplikátech pro každý gel.

Spolu se vzorky obsahující uvolněné buňky z gelů připravených různými činidly byla připravena také pozitivní a negativní kontrola, jejíž postup přířavy byl totožný jako při předchozích měření.

Další kontrolou, která byla připravena, byla kontrola buněčné kultury s přířavkem enzymu alginát lyázy. Do Eppendorfovy mikrozkuřavky byl odebrán 1 ml kultury a následně přidány 3 mg zmíněného enzymu. Kultura v mikrozkuřavce s enzymem byla ponechána 60 minut. Po uplynutí doby byla kultura 3x promyta a bylo provedeno desítkové ředění až do 1000násobného, které již bylo připraveno pro přířavek sondy.

Pro analýzu byla zvolena fluorescenční sonda PI. Do každého 1 ml vzorku byly přidány 4 μ l fluorescenční sondy, vzorky byly dále ponechány k inkubaci ve tmě, za laboratorní teploty po dobu 15 minut. Jako při předchozích měření byl k ověření viability buněk použit program SpectroFlo.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Optimalizace fluorescenční sondy pro stanovení viability u vybraného kmene

Životaschopnost bakterií se obecně stanovuje pomocí plotnové metody (viz. 2.5.1), ovšem tato technika má nevýhodu v tom, že vyžaduje dlouhou inkubační dobu (24-72 hodin – v závislosti na bakteriálních kmenech) [42]. Fluorescenční techniky, jako je průtoková cytometrie s použitím specifických sond, umožňují rychlejší vyhodnocení viability mikroorganismů i stanovení počtu buněk [43; 44].

Pro stanovení viability bakteriálních buněk bylo zprvu zapotřebí vybrat vhodnou fluorescenční sondu, tedy sondu, která nejlépe funguje a je schopna jednoznačně odlišit signál mrtvých a živých buněk. Pro experiment byly vybrány tři fluorescenční sondy, a to SYTOXTM Blue, 4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI) a propidium jodid (PI). Sondy se od sebe liší nejen vlastnostmi, ale také dobou inkubace. Pro propidium jodid je tato doba 15 minut, pro SYTOXTM Blue a DAPI pak 5 minut. Viabilita byla stanovována pomocí průtokové cytometrie, a to i přes to, že metoda průtokové cytometrie je nákladná, jak tvrdí autoři článku [45]. Servain-Viel a další však potvrzují [46], že průtoková cytometrie je vhodnou metodou pro výzkumné projekty, které se zaměřují na analýzu vlastností bakteriální populace, jako je množství, životaschopnost nebo aktivita.

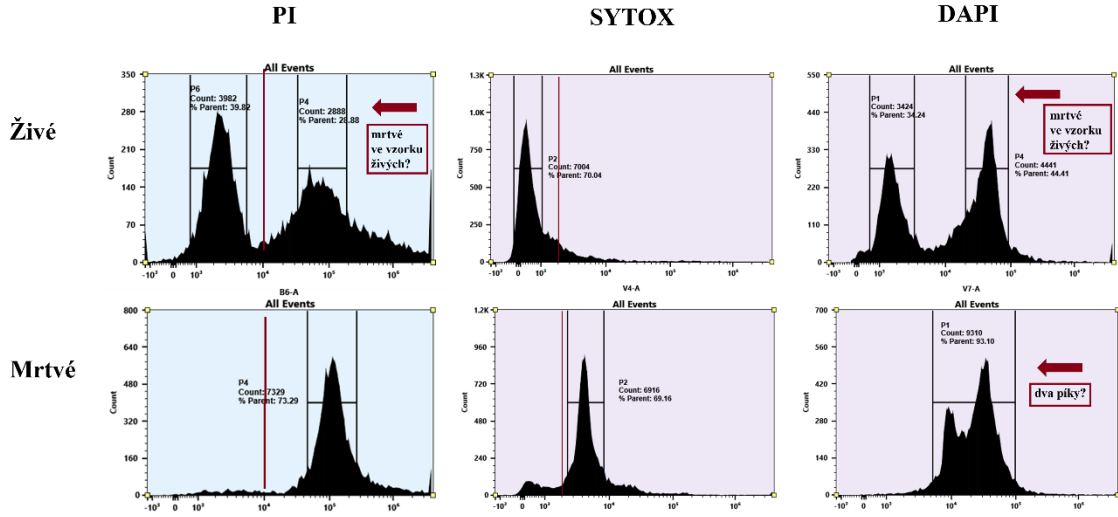
4.1.1 Experimenty po 120 hodinách kultivace

Při prvních experimentech byly sondy použity po 120 hodinách kultivace rhizobakterií. Tato doba kultivace je považována jako nevhodnější pro experimenty, při kterých dochází k zesíťování kultury a následně tvorbě nejkvalitnějšího gelu. Experimenty byly prováděny pro všechny tři vybrané kmeny bakterie *Azotobacter vinelandii*.

Výsledky, které byly získány, lze vidět na obrázcích níže (Obrázek 4-9), kde jsou zobrazeny formou histogramů i scattergramů. V horní polovině obou obrázků jsou histogramy pro kulturu označenou jako živou, tedy tu, která byla promyta pomocí fosfátového pufru, vhodně naředěna a následně obarvena pomocí dané fluorescenční sondy. Použitá fluorescenční sonda je nadeřsána v horním řádku. V dolní polovině se nachází pak výsledky pro kulturu, která byla po dobu 30 minut, a tak považována za negativní kontrolu, tedy mrtvou.

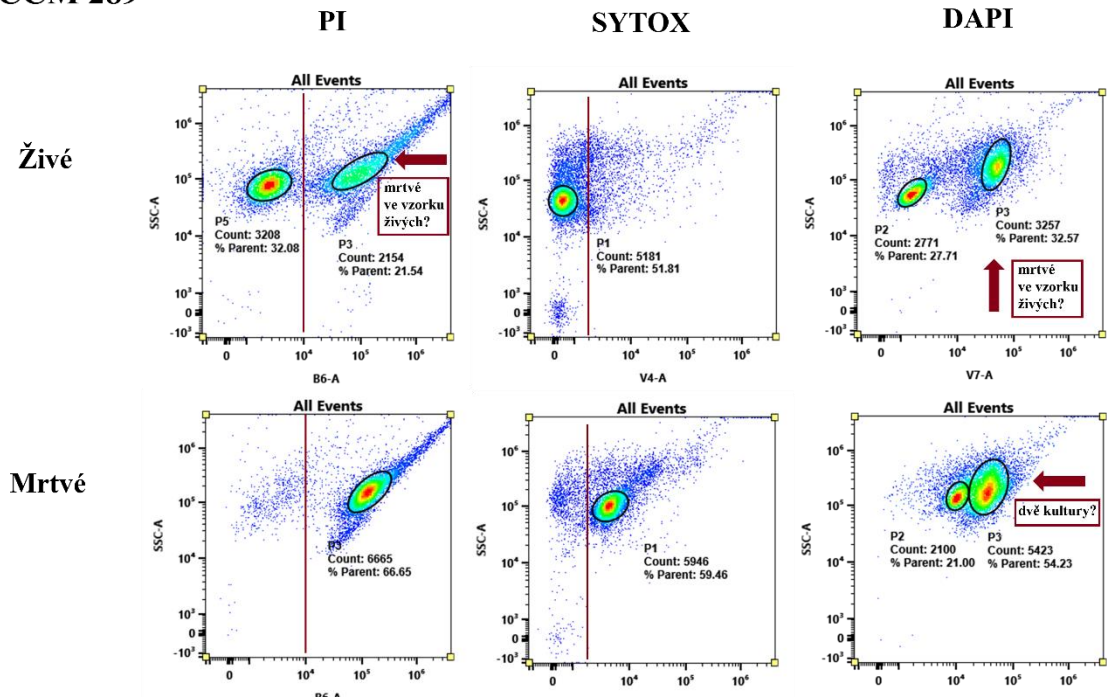
Pro kmen CCM 289 lze vidět výsledky na obrázcích níže (Obrázek 4 a Obrázek 5). V případě fluorescenčních sond PI a DAPI lze vidět, že kromě buněk považovaných za živé ve vzorku živých buněk se vyskytuje také intenzivní signál (kolem 10^5), který značí značný počet mrtvých buněk. To by mohlo být vysvětleno stářím kultury, kdy část kultury mohla již začít postupně umírat, nebo vyčerpáním uhlíkového zdroje, nahromaděním toxických produktů metabolismu, popřípadě kontaminací. Při barvení pomocí PI lze ve vzorku mrtvé kultury vidět jeden pík o vysoké intenzitě, což dle očekávání je správné, jelikož sonda vykazuje vyšší fluorescenci u mrtvých buněk. To se ovšem nedá říct o sondě DAPI, kde se objevili ve vzorku mrtvé kultury dva píky o vyšší intenzitě. Fluorescenční sonda SYTOX dokázala odlišit buňky živé i mrtvé kultury.

CCM 289



Obrázek 4: Histogram CCM 289 po 120 hodinách kultivace. Sonda PI dokázala odlišit živé i mrtvé buňky ve vzorku živých buněk, sonda SYTOX jasně rozlišila živé a mrtvé buňky, sonda DAPI vykazovala nejasné výsledky.

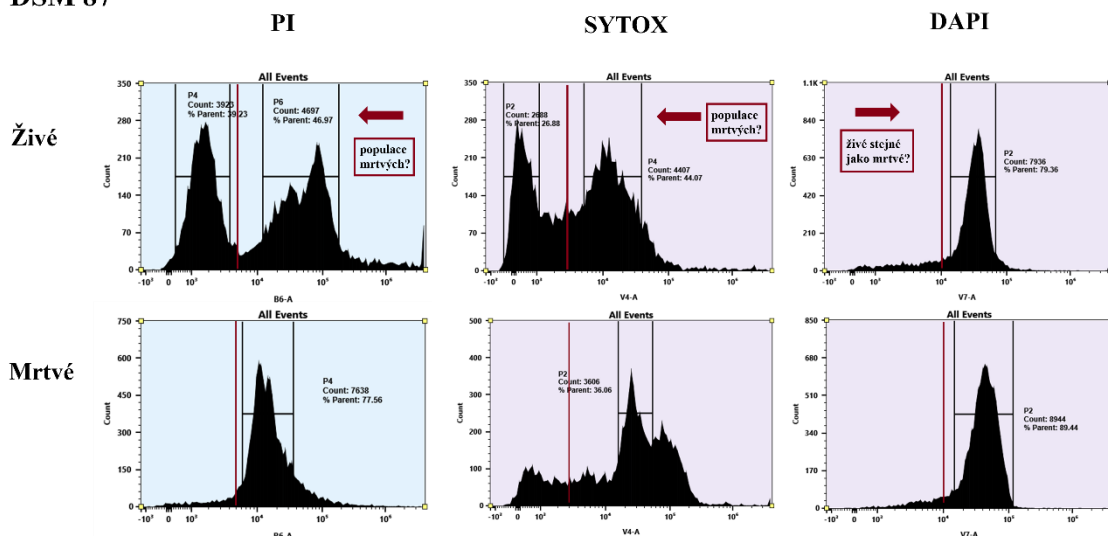
CCM 289



Obrázek 5: dot-plot CCM 289 po 120 hodinách kultivace. Sonda PI jasně rozlišila mrtvé buňky od živých, přičemž ve vzorku živých se objevily i mrtvé buňky. Sonda SYTOX odlišila od sebe mrtvé a živý stav buněk, sonda DAPI nevykazuje jednoznačné výsledky.

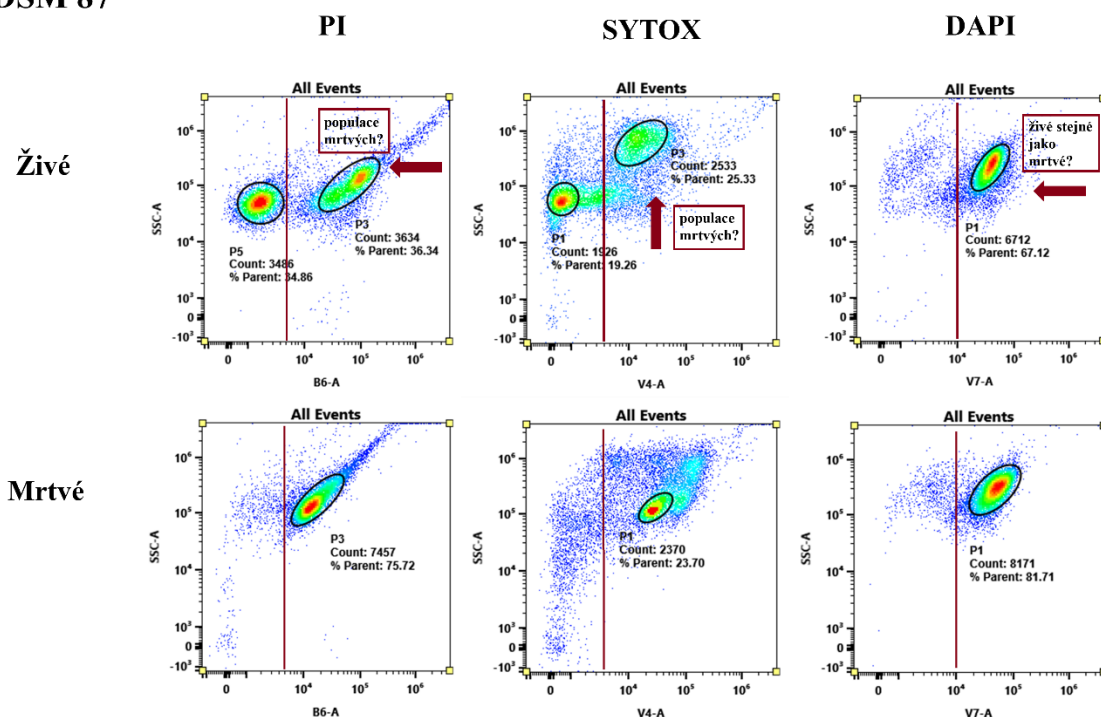
Pro kmen DSM 87 je možné výsledky vidět na následujících obrázcích (Obrázek 6 a Obrázek 7). Zde bylo dosaženo podobných výsledků pomocí sond PI a SYTOX. Ve vzorcích mrtvé kultury je viditelný předpokládaný intenzivnější signál, avšak v případě původní kultury jsou opět viditelné jak buňky živé, tak mrtvé. Tuto skutečnost lze vysvětlit stejně jako v případě kmene CCM 289, tedy že se jedná o část kultury, která již odumřela. Pomocí sondy DAPI nebylo možné rozeznat živé buňky od mrtvých, bylo dosaženo stejných výsledků pro oba typy vzorků.

DSM 87



Obrázek 6: Histogram DSM 87 po 120 hodinách kultivace. Sonda PI i SYTOX rozlišily živé a mrtvé buňky, včetně mrtvých buněk ve vzorku živých. Sonda DAPI nedokázala rozlišit mrtvé buňky od živých.

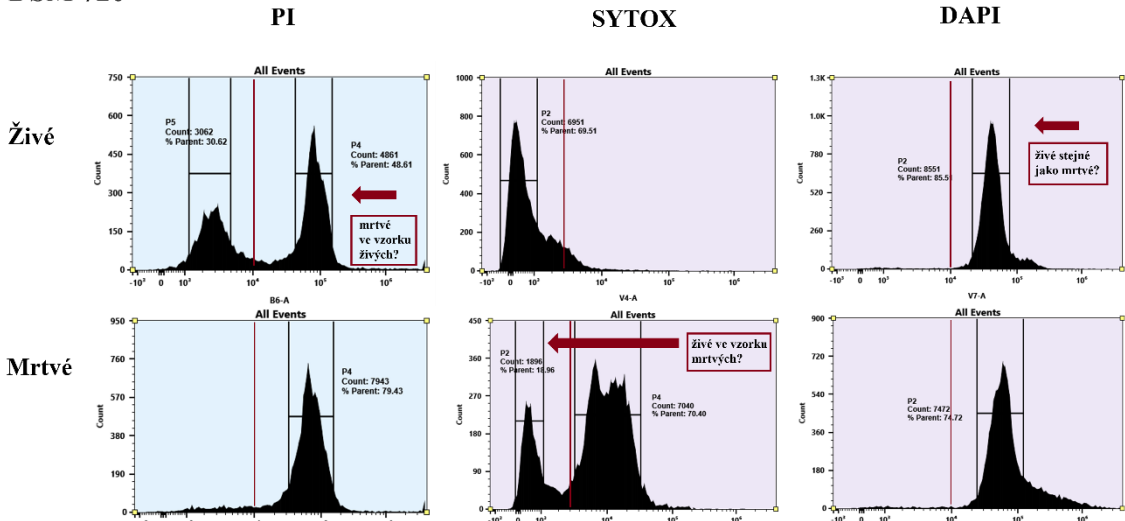
DSM 87



Obrázek 7: dot-plot DSM 87 po 120 hodinách kultivace. Sonda PI a SYTOX vykazovaly obdobné výsledky při rozlišování mrtvých buněk od živých, sonda DAPI živé a mrtvé buňky nerozlišila.

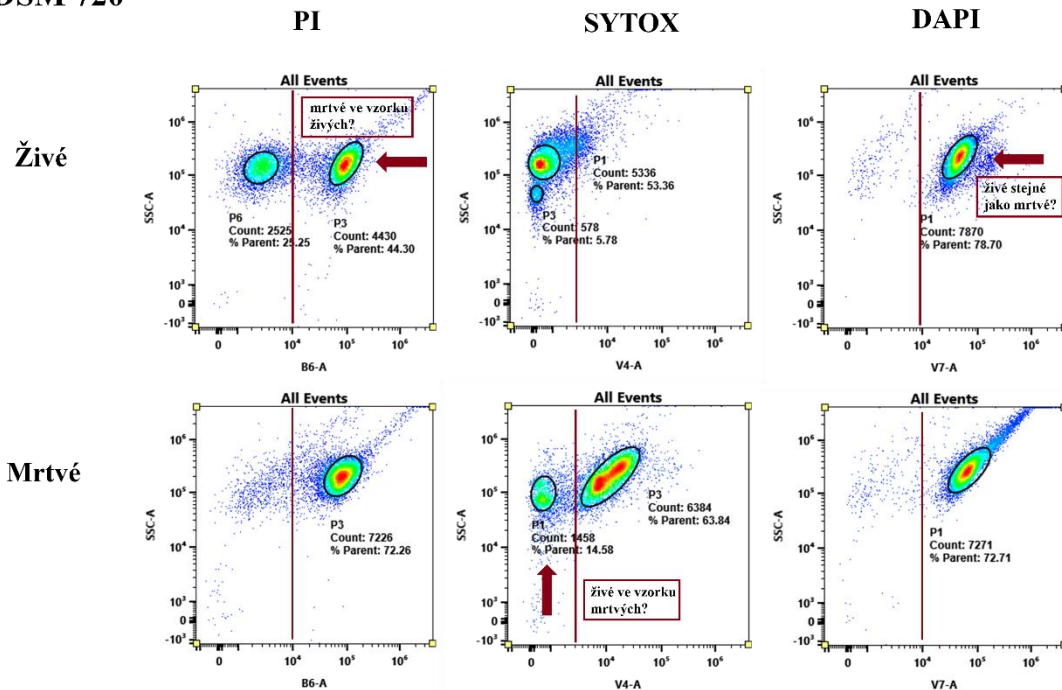
Pro kmen DSM 720 jsou výsledky vyobrazeny na obrázcích níže (Obrázek 8 a Obrázek 9). Výsledky získané sondou PI opět zobrazují větší část mrtvé kultury ve vzorku živých, což lze vysvětlit stejně jako u předchozích dvou kmenů, tedy jako úmrtí části kultury. Při použití sondy SYTOX bylo dosaženo výsledků, kdy u mrtvé kultury byla nalezena kultura živá. To by mohlo být vysvětleno tím, že sonda nefungovala se 100% účinností. Sonda DAPI se jako u kmene DSM 87 nejeví jako vhodná, a to z důvodu, že ve výsledcích nelze rozeznat, zda se jedná o živé či mrtvé buňky.

DSM 720



Obrázek 8: Histogram DSM 720 po 120 hodinách kultivace. Sonda PI jasně rozlišuje mrtvé buňky od živých, sonda SYTOX vykazovala živé buňky ve vzorku mrtvých a sonda DAPI nerozlišila stav buněk.

DSM 720



Obrázek 9: dot-plot DSM 720 po 120 hodinách kultivace. Sonda PI rozlišila mrtvé buňky od živých, sonda SYTOX rozlišila stav buněk, avšak ve vzorku mrtvých zobrazila živé buňky. Sonda DAPI od sebe nerozlišila stavy buněk.

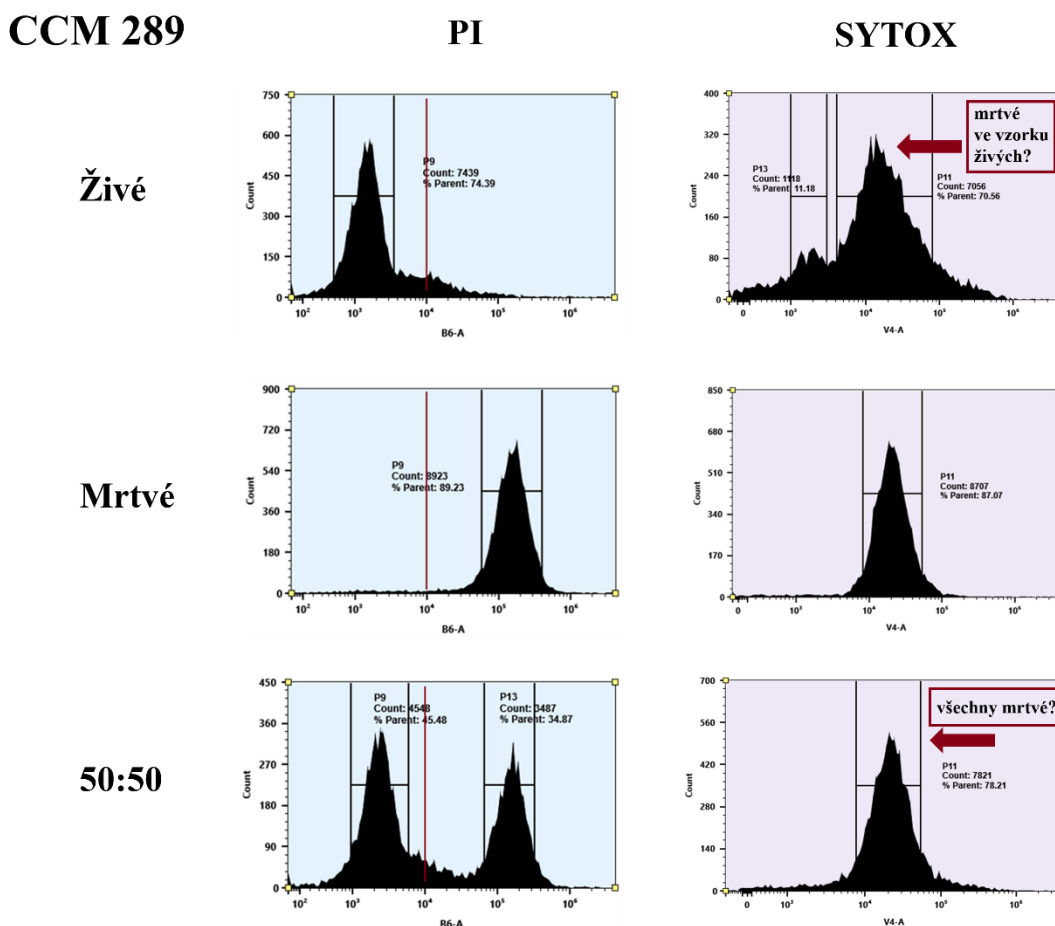
Při použití daných sond po 120. hodinách kultivace bylo zjištěno, že fluorescenční sonda DAPI se jeví jako nevhodná, a to proto, že při jejím použití nebylo možné od sebe odlišit mrtvé kultury od živých. Z tohoto důvodu byla z dalších experimentů vyřazena. Použitím fluorescenčních sond PI a SYTOX bylo zjištěno, že sondy jsou schopné rozeznat živé buňky od mrtvých. Výběr vhodné fluorescenční sondy byl tedy zúžen na PI a SYTOX, které byly použity pro následující experimenty.

4.1.2 Experimenty po 72 hodinách kultivace

Následující experimenty byly provedeny po 72 hodinách kultivace rhizobakterií. Doba kultivace byla snížena z důvodu omezení počtu odumřelých buněk. Z tohoto důvodu byla zvolena doba, kdy buňky jsou rovnoměrně narostlé a větší počty odumřelých buněk nejsou předpokládány. Experimenty byly provedeny opět pro všechny tři vybrané kmeny bakterie *Azotobacter vinelandii*.

Výsledky, které byly získány, lze vidět na obrázcích níže, kde jsou zobrazeny jak formou histogramů, tak formou cytogramů. Obrázky jsou rozděleny do dvou sloupců, kdy každý sloupec udává výsledky pro experiment s vybranou fluorescenční sondou pro dané měření, a do tří řádků značící výsledky pro živé buňky, dále pak mrtvou kulturu, která byla po dobu 30 minut povařena, a tak považována za mrtvou, a vzorky připravené z 50 % vzorku živých buněk a 50 % vzorku mrtvých buněk.

Výsledky pro kmen CCM 289 jsou viditelné na následujících obrázcích (Obrázek 10 a Obrázek 11). Pomocí fluorescenční sondy PI jsou zřetelné rozdíly živé a mrtvé kultury. Je zde viditelný rozdíl signálu mezi oběma kulturami. Naopak u fluorescenční sondy SYTOX podobných výsledků nebylo dosaženo. Fluorescenční sonda nerozeznala živou kulturu od mrtvé. To je na obrázcích patrné, kdy sonda udává stejný signál pro živé i mrtvé buňky, dokonce i ve vzorku, který byl připraven v poměru 50 % živé a 50 % mrtvé kultury.



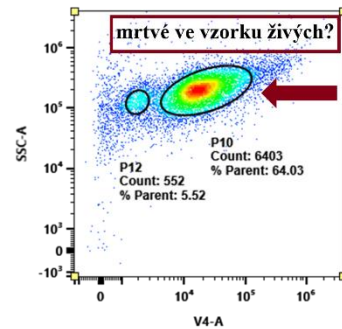
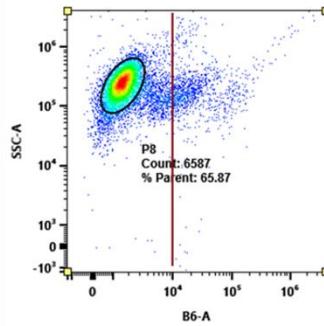
Obrázek 10: Histogram CCM 289 po 72 hodinách kultivace. Sonda PI jasně rozlišila živé buňky od mrtvých. Sonda SYTOX nejevila jasné výsledky u vzorku živých a nebyla schopna určit stav směsi živých a mrtvých buněk.

CCM 289

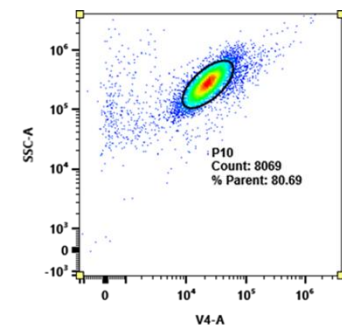
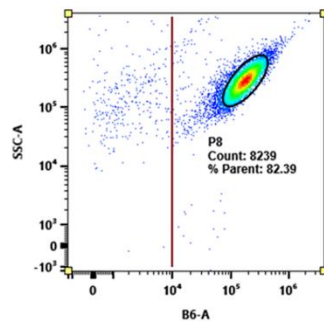
PI

SYTOX

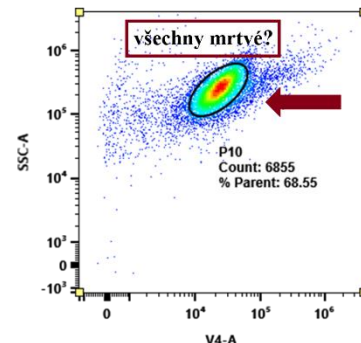
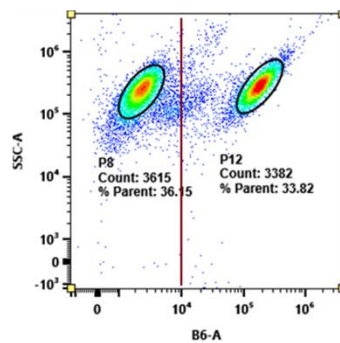
Živé



Mrtvé



50:50



Obrázek 11: dot-plot CCM 289 po 72 hodinách kultivace. Sonda PI rozlišila stav buněk, sonda SYTOX při rozlišování živých buněk nejevila jasné výsledky a u smíšeného vzorku živých a mrtvých buněk nerozlišila jejich stav.

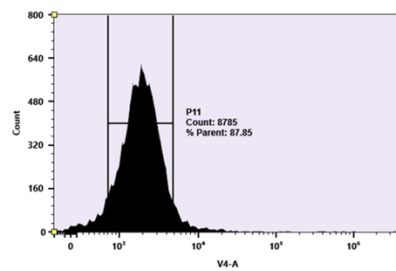
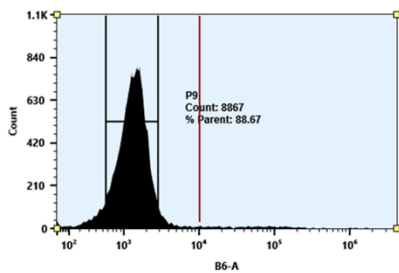
Pro kmen DSM 87 jsou níže viditelné výsledky (Obrázek 12 a Obrázek 13). Oba typy fluorescenčních sond vykazují výsledky, které odlišují mrtvé kultury od živé. Rozdílem je pak pouze intenzita signálu, které bylo dosaženo, což je vidět pomocí nižšího posunu signálu fluorescence u fluorescenčního barviva SYTOX v histogramu, oproti sondě PI, která vykazovala znatelnější rozdíl v intenzitě fluorescence mezi živými a mrtvými buňkami ve vzorku. Výsledky pro kmen DSM 720 je možné pak vidět na následujících obrázcích (Obrázek 14 a Obrázek 15). Zde je patrné, že výsledky jsou téměř shodné s výsledky, kterých bylo dosaženo u kmene DSM 87. Z toho důvodu mohou být okomentovány stejně, tedy že oba typy fluorescenčních sond jsou schopny odlišit mrtvé buňky od živých s jediným rozdílem, a to dosažených signálů fluorescence mrtvými buňkami, což je vlastností sondy SYTOX.

DSM 87

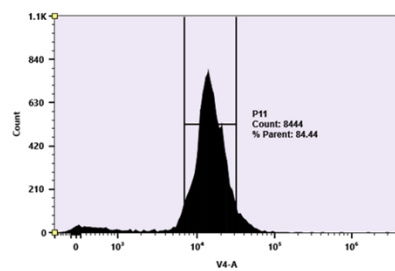
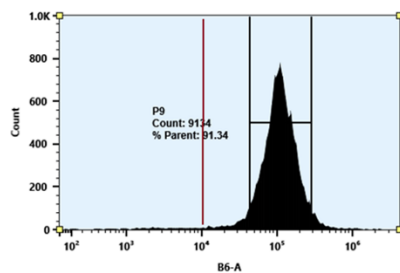
PI

SYTOX

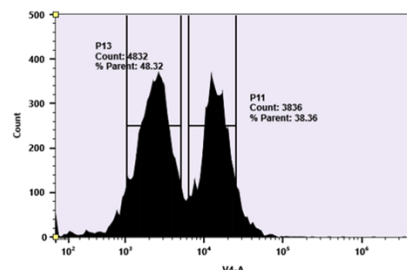
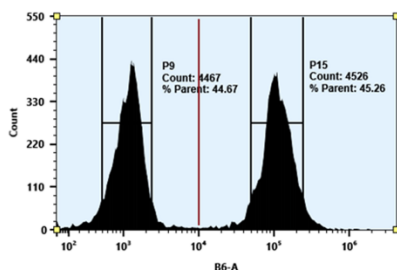
Živé



Mrtvé



50:50



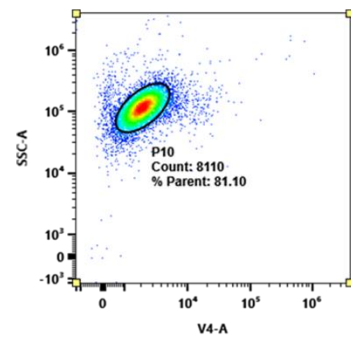
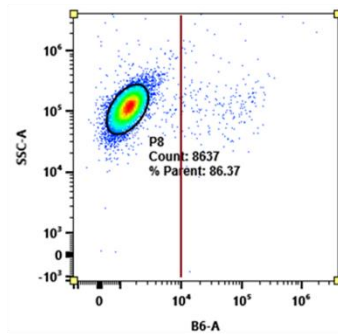
Obrázek 12: Histogram DSM 87 po 72 hodinách kultivace. Sonda PI a sonda SYTOX jasně rozlišují stav buněk, a to i ve smíšeném vzorku živých a mrtvých buněk.

DSM 87

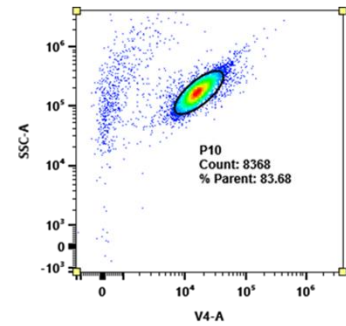
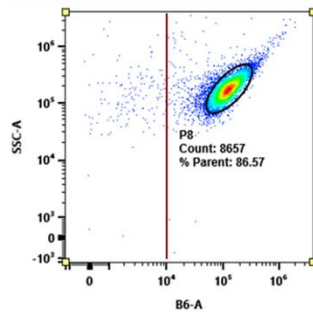
Živé

PI

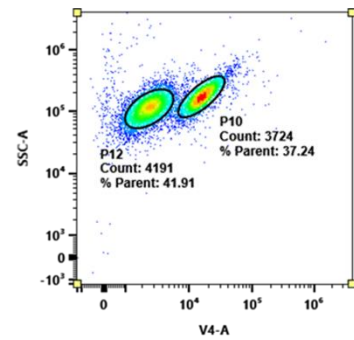
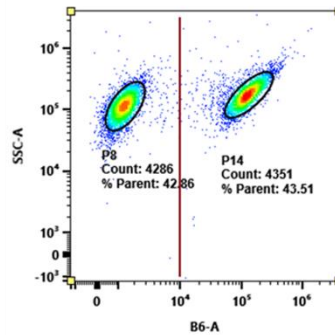
SYTOX



Mrtvé



50:50



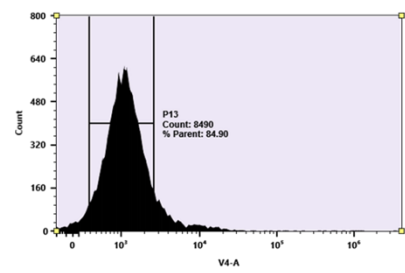
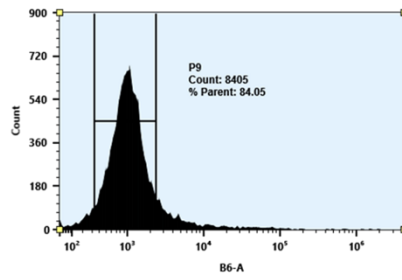
Obrázek 13: dot-plot DSM 87 po 72 hodinách kultivace. Sonda PI a sonda SYTOX rozlišily stavy buněk, i ve smíšených vzorcích živých a mrtvých buněk.

DSM 720

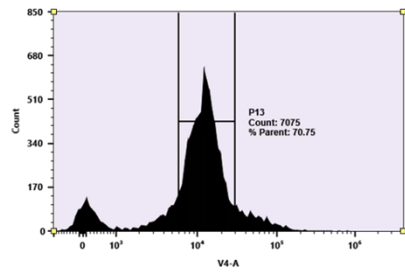
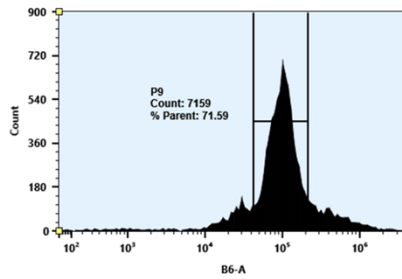
PI

SYTOX

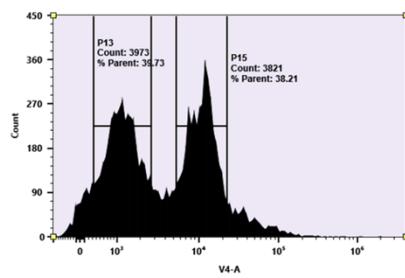
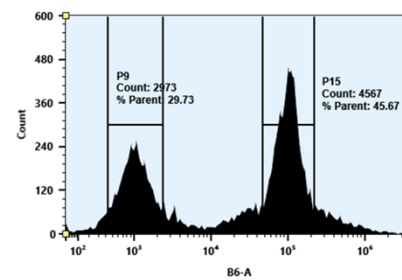
Živé



Mrtvé



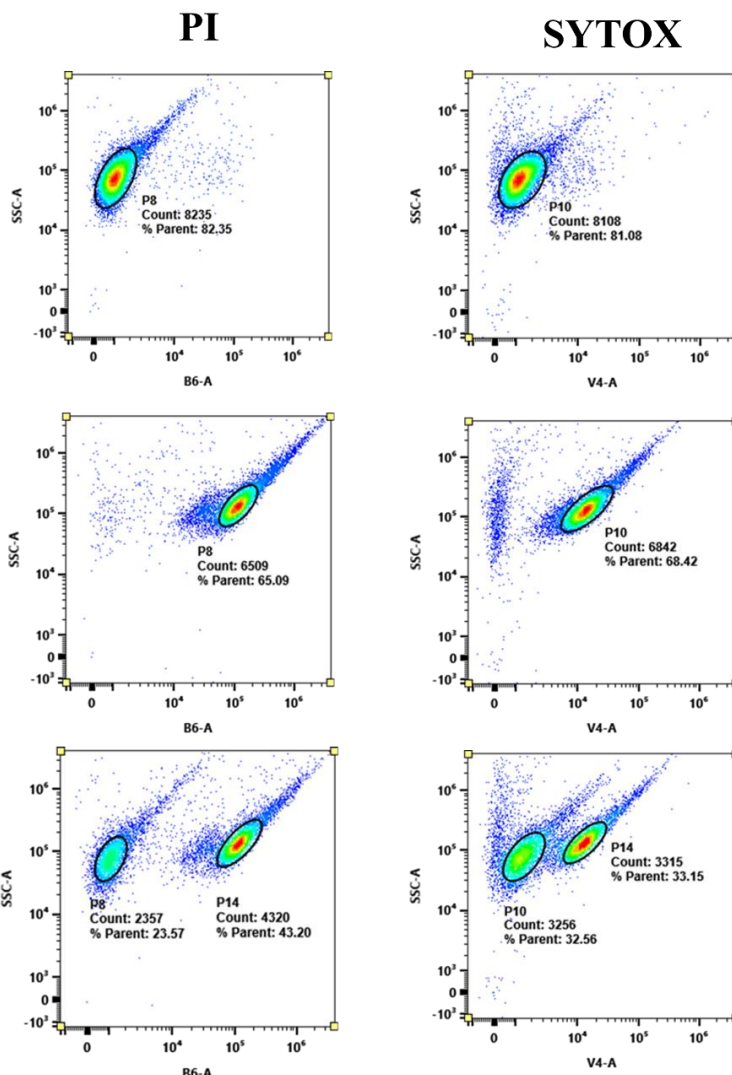
50:50



Obrázek 14: Histogram DSM 720 po 72 hodinách kultivace. Sonda PI i sonda SYTOX rozlišily ve všech vzorcích mrtvé buňky od živých.

DSM 720

Živé



Mrtvé

50:50

Obrázek 15: dot-plot DSM 720 po 72 hodinách kultivace. Oba typy sond jasně rozlišily stavy buněk, včetně vzorků připravených jako smíšené mrtvých a živých buněk.

Použitím fluorescenčních sond PI a SYTOX po 72 hodinách kultivace bylo zjištěno, že obě tyto sondy fungují pro přesné rozeznání mrtvé kultury od živé. Výjimku zde tvoří kmen CCM 289, pro který se fluorescenční barvivo SYTOX nejevilo jako vhodné, a to z důvodu, že živé buňky byly zobrazovány jako mrtvé, což barvivo PI odlišit dokázalo. U kmenů DSM 87 a DSM 720 fungovaly obě sondy bez jediných komplikací, avšak výsledky získané pomocí PI byly zřetelnější díky vyšší intenzitě signálu fluorescence mrtvých buněk, a tak pro další experiment byla vybrána právě tato sonda.

V práci Chambina a jeho týmu [42] se propidium jodid jevil taktéž jako vhodný fluorochrom pro posouzení stavu buněk. Jejich použitou kulturou byly pak bakterie *Bifidobacterium bifidum* řadící se do kmene *Actinobacteria*. Při jejich experimentech byl pro stanovení viability mimo PI použit karboxyfluorescein diacetát (cFDA), jenž je široce využíván pro hodnocení esterázové aktivity u bakterií [48]. Výzkumný tým Chambina využil tzv. dvojité barvení pomocí cFDA a PI pro snadnější rozlišení mezi aktivními a neaktivními buňkami. Tento způsob barvení při této bakalářské práci použit nebyl, ovšem jeví se jako možným vylepšením protokolu do budoucna.

4.2 Použití vybrané fluorescenční sondy na vzorky s přidavky roztoků síťovacích činidel

Účelem experimentů při stanovování viability bylo sledovat a porovnat vliv vybraných síťovacích činidel o konkrétních koncentracích na buněčnou kulturu. Pro experimenty byl zvolen pouze jeden kmen ze tří předchozích, a to kmen DSM 87. Jako síťovací činidla byly použity roztoky chloridu vápenatého, měďnatého, barnatého, železitého, hlinitého a síranu vápenatého, přičemž byly připraveny roztoky o 2, dále 0,2 a 0,02 hm. %. První tři ze zmíněných síťovacích činidel byly použity v jednom společném měření, další tři pak ve druhém, které probíhalo v jiném týdnu započaté kultivace. Pro stanovení viability byla pro analýzu zvolena fluorescenční sonda PI.

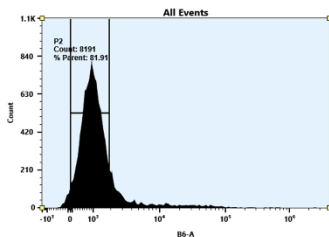
Získané výsledky z měření lze vidět na následujících obrázcích, a to formou histogramů a cytogramů. Obrázky jsou rozvrženy do dvou sloupců, kdy v prvním jsou vyobrazeny výsledky vzorků kultury bez přidavku síťovacího činidla a ve druhém pak již s daným přidavkem. V prvním sloupci se jedná o zobrazení vzorku samostatné kultury – vzorku kultury živé, dále mrtvé, která byla povařena po dobu 30 minut, a vzorku, který byl připraven z 50 % živé kultury a 50 % mrtvé kultury. Tyto výsledky lze považovat za kontrolu při porovnání stavu bakterií. Ve druhém sloupci jsou pak výsledky kultury, která byla inkubována s přidavkem činidla po promytí po dobu jedné hodiny, a to s přidavkem roztoků o koncentracích 2, dále 0,2 a 0,02 hm. %.

Výsledky získané při použití roztoků chloridu vápenatého lze následně vidět dále (Obrázek 16 a Obrázek 17). Při použití roztoků zmíněného síťovacího činidla o vybraných koncentracích je zřejmé, že chlorid vápenatý nezpůsobil úmrtí kultury, a tak viabilita nebyla zásadně ovlivněna. Paralelně byly použity i roztoky chloridu barnatého, kdy výsledky analýzy lze vidět na následující straně (Obrázek 18 a Obrázek 19), a také chloridu měďnatého s výsledky (Obrázek 20 a Obrázek 21). Roztoky chloridu barnatého neměly taktéž významný vliv na úmrtí kultury. Je z obrázků zřejmé, že kultura po použití zmíněného činidla zůstala i přes jeho toxicitu živá jako v původním vzorku. V případě použití roztoků chloridu měďnatého nebylo dosaženo stejného efektu. Roztok o nejvyšší koncentraci, tedy o koncentraci 2 hm. %, způsobil úmrtí u většiny buněk ve vzorku. Naopak roztoky s nižší koncentrací, s koncentrací 0,2 a 0,02 hm. %, nezpůsobily úmrtí buněk. Je zřejmé, že buňky po použití roztoků o dvou nižších koncentracích neměly negativní vliv na viabilitu. Nachází se zde trend, tedy s klesající koncentrací se snižuje počet odumřelých buněk.

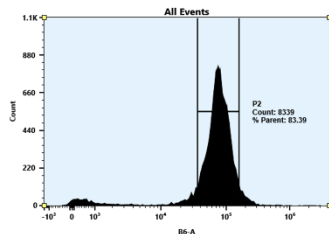
DSM 87

BEZ PŘÍDAVKU

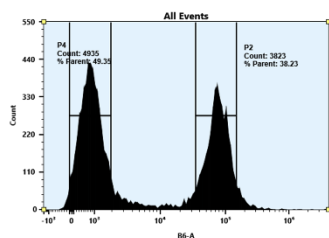
Živé



Mrtvé

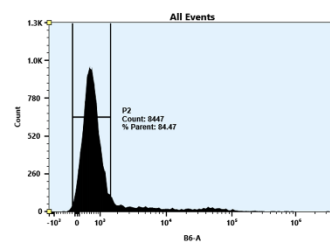


50:50

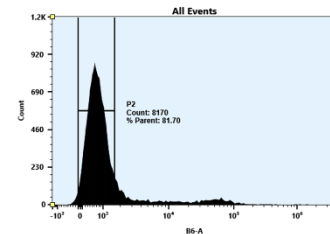


CaCl₂

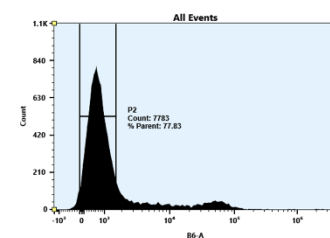
2 hm. %



0,2 hm. %



0,02 hm. %

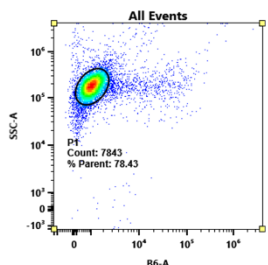


Obrázek 16: Histogram DSM 87. Přidavek roztoků sířovacího činidla chloridu vápenatého o příslušných koncentracích nezpůsobil úmrtí buněk ve vzorcích.

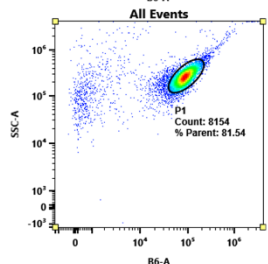
DSM 87

BEZ PŘÍDAVKU

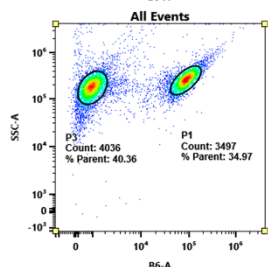
Živé



Mrtvé

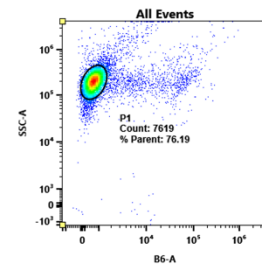


50:50

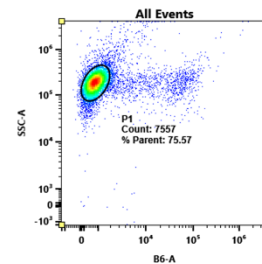


CaCl₂

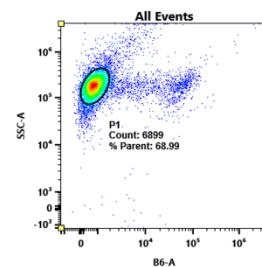
2 hm. %



0,2 hm. %



0,02 hm. %

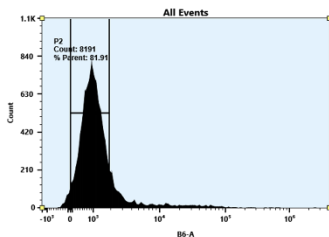


Obrázek 17: dot-plot DSM 87. Přidáním roztoků chloridu vápenatého k živým buňkám kultury nebyla ovlivněna jejich viabilita.

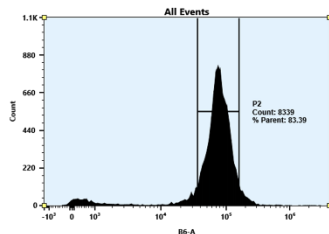
DSM 87

BEZ PŘÍDAVKU

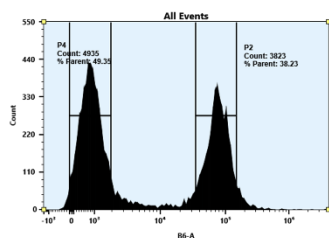
Živé



Mrtvé

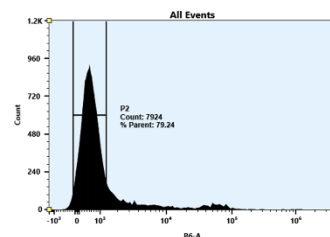


50:50

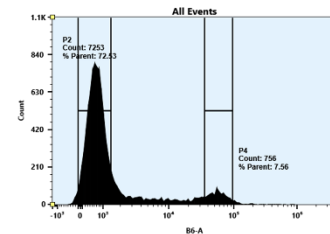


BaCl₂

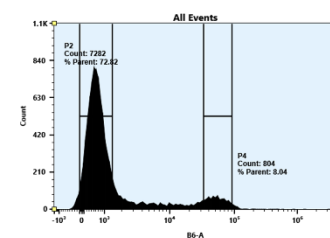
2 hm. %



0,2 hm. %



0,02 hm. %

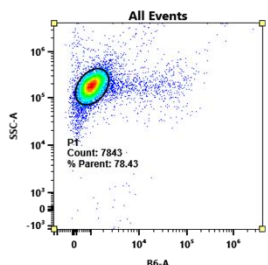


Obrázek 18: Histogram DSM 87. Přidavky roztoků chloridu barnatého neměly významný vliv na viabilitu kultury.

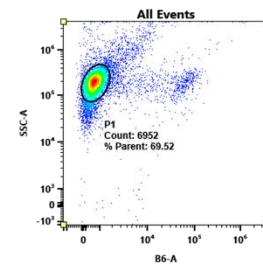
DSM 87

BEZ PŘÍDAVKU

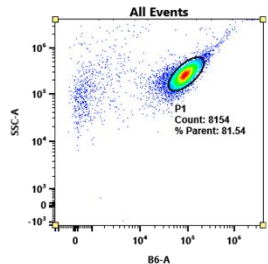
Živé



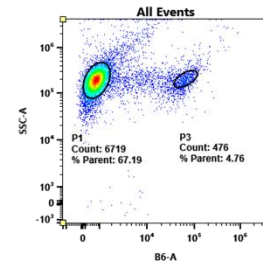
2 hm. %



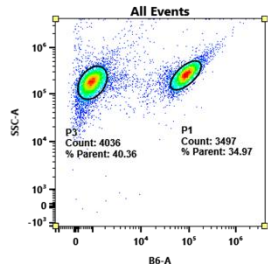
Mrtvé



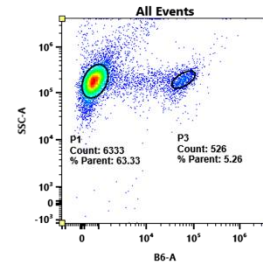
0,2 hm. %



50:50



0,02 hm. %

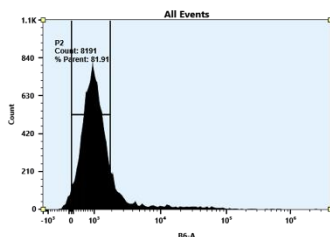


Obrázek 19: dot-plot DSM 87. Chlorid barnatý o různých koncentracích nezpůsobil významné úmrtí kultury.

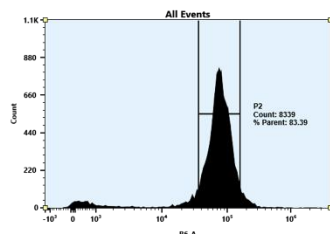
DSM 87

BEZ PŘÍDAVKU

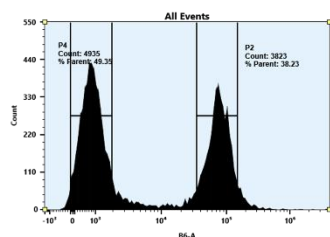
Živé



Mrtvé

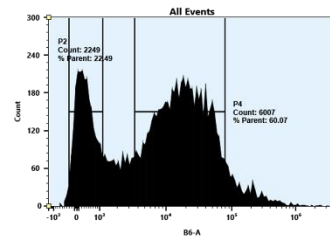


50:50

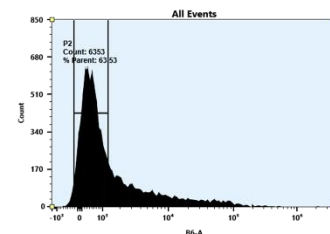


CuCl₂

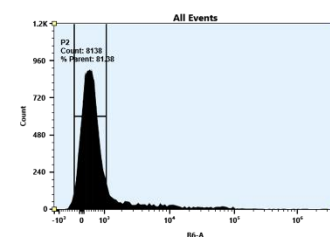
2 hm. %



0,2 hm. %



0,02 hm. %

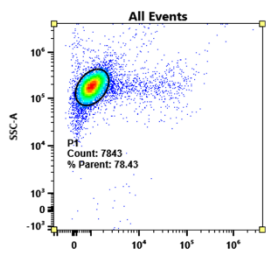


Obrázek 20: Histogram DSM 87. Přidávky chloridu měďnatého o koncentraci 2 hm. % způsobil významné ovlivnění viability a měl za následek úmrtí většiny živých buněk ve vzorku. Roztoky chloridu měďnatého o nižších koncentracích úmrtí kultury nezpůsobily.

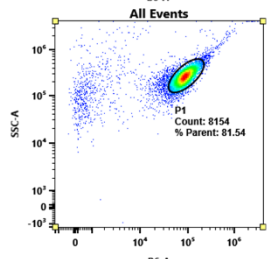
DSM 87

BEZ PŘÍDAVKU

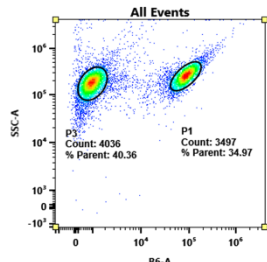
Živé



Mrtvé

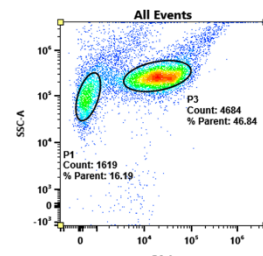


50:50

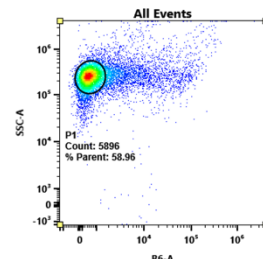


CuCl₂

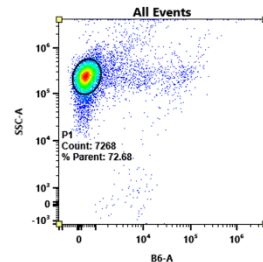
2 hm. %



0,2 hm. %



0,02 hm. %



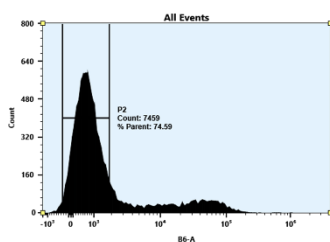
Obrázek 21: dot-plot DSM 87. Roztok chloridu měďnatého o koncentraci 2 hm. % způsobil úmrtí většiny buněk ve vzorku. Roztoky o nižších koncentracích viabilitu neovlivnily.

Při následující analýze byly použity roztoky zbylých činidel, a to chloridu železitého, chloridu hlinitého a síranu vápenatého o již zmíněných koncentracích. Výsledky z analýzy vzorků s využitím roztoků chloridu železitého si lze prohlédnout dále na stránce (Obrázek 22 a Obrázek 23). Při použití roztoku o koncentraci 2 hm. % je zřejmé, že poměrná část kultury byla tímto roztokem usmrcena, tedy viabilita kultury se pohybuje okolo 50 procent. Ovšem v blízkosti signálu fluorescence, který náleží pro mrtvé buňky, se jeví jiná kolonie buněk. To by mohlo být zapříčiněno shlukováním buněk, jejich genetických informací, obalu či buněčných organel, které mohlo být způsobeno po lýze buněk použitím daného roztoku. Naopak při použití méně koncentrovaných roztoků k usmrcení nedošlo, při použití roztoku o koncentraci 0,2 hm. % došlo k usmrcení pouze menšiny a u nejnižší koncentrace pravděpodobně k žádnému.

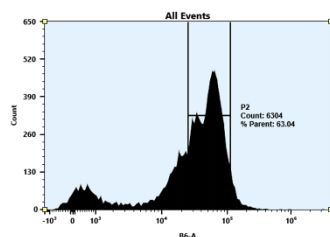
DSM 87

BEZ PŘÍDAVKU

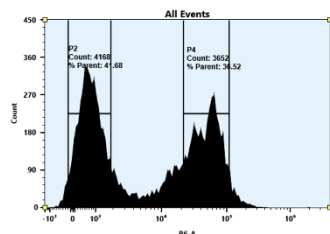
Živé



Mrtvé

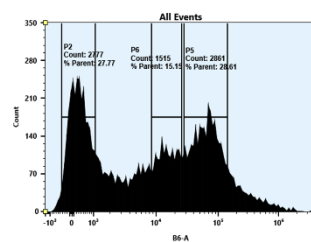


50:50

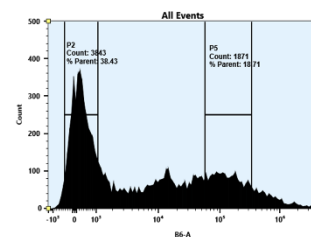


FeCl₃

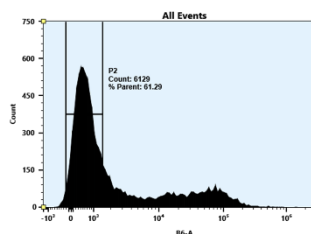
2 hm.%



0,2 hm.%



0,02 hm.%

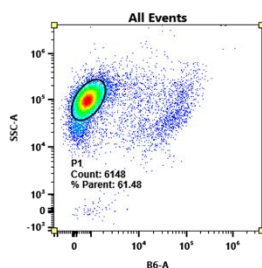


Obrázek 22: Histogram DSM 87 s přísady chloridu železitého. Roztok o koncentraci 2 hm. % měl významný vliv na viabilitu kultury. Ve vzorku se vyskytuje i nižší signál fluorescence v blízkosti signálu pro mrtvé buňky. Roztok o nižší koncentraci ovlivnil viabilitu menší měrou, o nejnižší koncentraci neměl na viabilitu vliv.

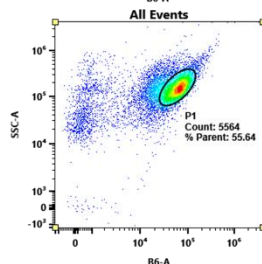
DSM 87

BEZ PŘÍDAVKU

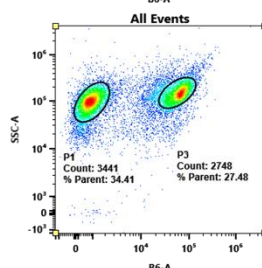
Živé



Mrtvé

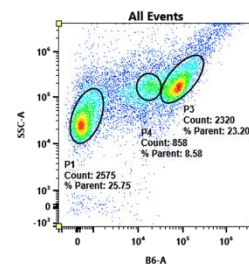


50:50

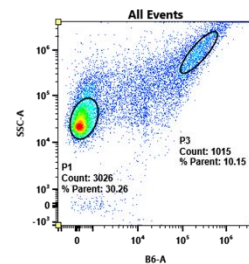


FeCl₃

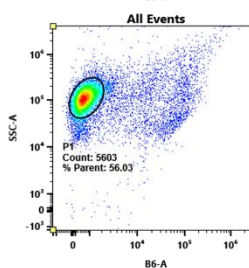
2 hm. %



0,2 hm. %



0,02 hm. %



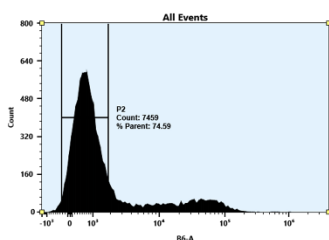
Obrázek 23: dot-plot DSM 87 s přísávkou chloridu železitého. Nejkoncentrovanější roztok měl významný vliv na viabilitu buněk ve vzorku, je patrně velký signál fluorescence v blízkosti signálu mrtvých buněk. Méně koncentrovaný roztok viabilitu téměř neovlivnil, nejméně koncentrovaný roztok viabilitu neovlivnil.

Použití chloridu hlinitého mělo významný vliv na viabilitu kultury (viz. Obrázek 24 a Obrázek 25). Roztok o koncentraci 2 hm. % měl za následek usmrcení většiny živých buněk, které se ve vzorku nacházely. Zředěnější roztok způsobil usmrcení kultury jako v předchozím případě, ovšem ne v takové míře. Je zřejmé, že většina buněk zůstala živá. Lze si ale také všimnout, že při analýze se vyskytoval signál i mimo intenzitu fluorescence, při které jsou rozeznávány živé a mrtvé buňky daného kmene. Tato skutečnost může být vysvětlena stejně jako v předchozím případě při použití roztoku chloridu železitého o koncentraci 2 hm. %, a to, že při použití činidla došlo k lýze buněk a následnému shlukování jich samotných nebo jejich částí. Roztok o nejnižší koncentraci neměl významný vliv na viabilitu buněk, tudíž lze konstatovat, že většina buněk vzorku nebyla přísávkou roztoku poznamenána a zůstala živá. Vyskytuje se zde však i část odumřelé kultury, což by mohlo být způsobeno postupným odumíráním buněk v pufru, síťovacím činidlem nebo také manipulací a procesy při promývání vzorku.

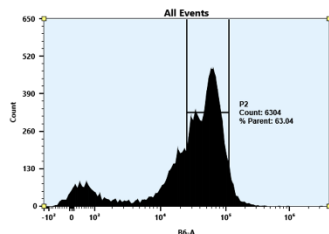
DSM 87

BEZ PŘÍDAVKU

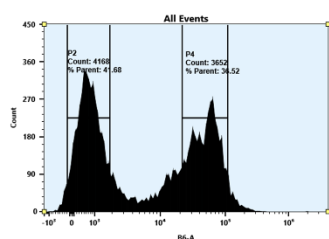
Živé



Mrtvé

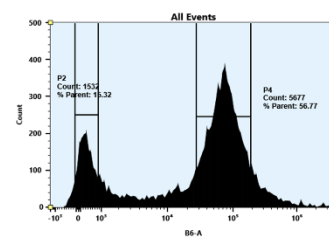


50:50

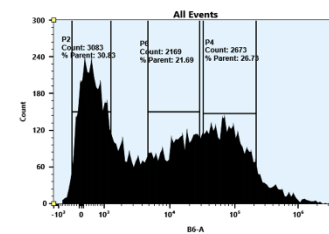


AlCl₃

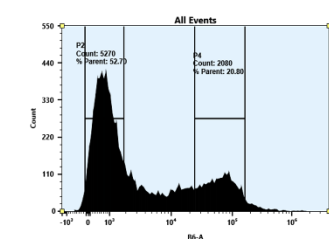
2 hm. %



0,2 hm. %



0,02 hm. %

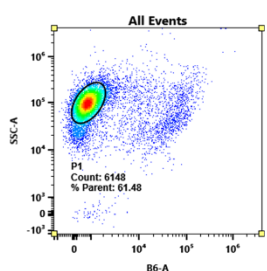


Obrázek 24: Histogram DSM 87 s přidavkem chloridu hlinitého. Nejkoncentrovanější roztok měl za následek usmrcení většiny buněk ve vzorku, Zřednější roztok ovlivnil viabilitu buněk ve znatelné míře. Byl zjištěn také značný signál fluorescence vyskytující se v blízkosti signálu připadajícím mrtvým buňkám. Nejzřednější roztok měl nízký vliv na viabilitu buněk.

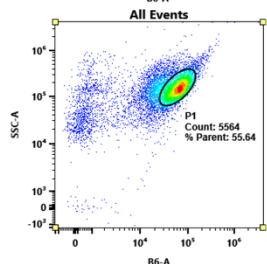
DSM 87

BEZ PŘÍDAVKU

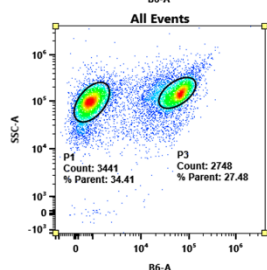
Živé



Mrtvé

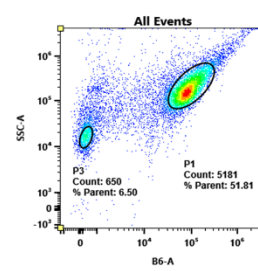


50:50

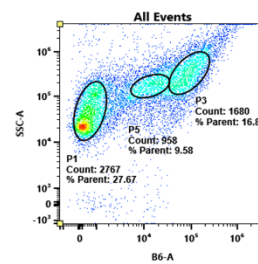


2 hm. %

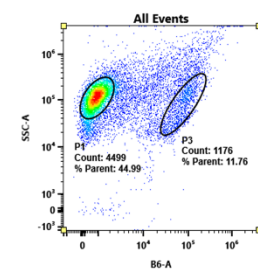
AlCl_3



0,2 hm. %



0,02 hm. %



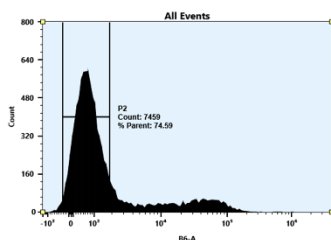
Obrázek 25: dot-plot DSM 87 s přidavkem chloridu hlinitého. Nejkoncentrovanější roztok měl cytotoxický vliv na buňky ve vzorku. Méně koncentrovaný roztok způsobil usmrcení buněk o něco menší míře, jeví se zde také další vysoký signál fluorescence v blízkosti signálu, který vykazovaly mrtvé buňky. Nejméně koncentrovaný roztok nezpůsobil značné snížení viability vzorku.

Jako poslední síťovací činidlo byl zvolen síran vápenatý (viz. Obrázek 26 a Obrázek 27). Při použití roztoků daného síťovacího činidla nedošlo k ovlivnění viability buněk. Z výsledků analýzy je zřejmé, že po použití roztoků bylo získáno téměř stejného výsledku jako u vzorku buněk bez přidavku činidla, jenž sloužil k porovnání viability. Lze tedy konstatovat, že síran vápenatý se nejeví jako cytotoxické síťovací činidlo. Lze si však všimnout, že byla zaznamenána také intenzita fluorescence mrtvých buněk. Jejich odumření mohlo být zapříčiněno postupným odumíráním v pufru, centrifugací, pomocí které docházelo k promytí vzorku, nebo také při kultivaci.

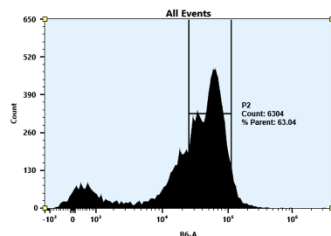
DSM 87

BEZ PŘÍDAVKU

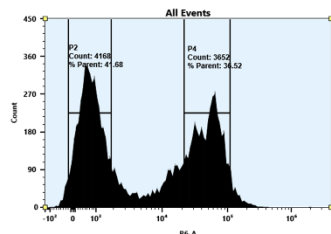
Živé



Mrtvé

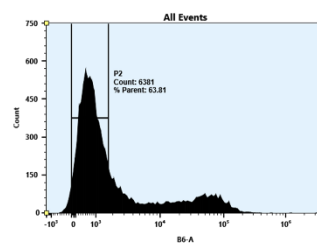


50:50

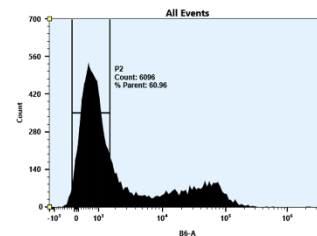


CaSO₄

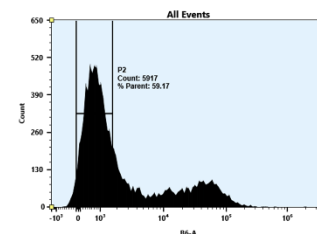
2 hm. %



0,2 hm. %



0,02 hm. %

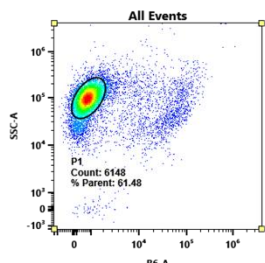


Obrázek 26: Histogram DSM 87 s přidavkem síranu vápenatého. Přidávky různých koncentrovaných roztoků činidla neměly významný vliv na změně viability buněk ve vzorku.

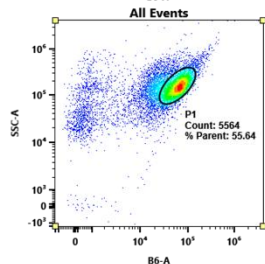
DSM 87

BEZ PŘÍDAVKU

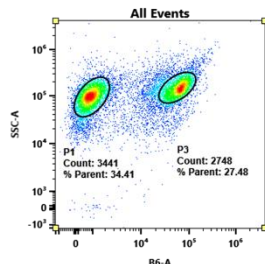
Živé



Mrtvé

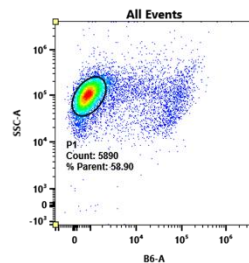


50:50

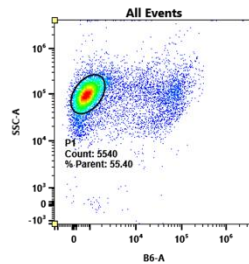


CaSO₄

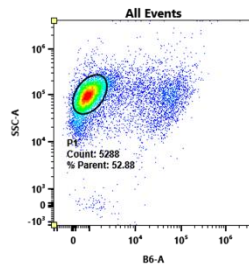
2 hm. %



0,2 hm. %

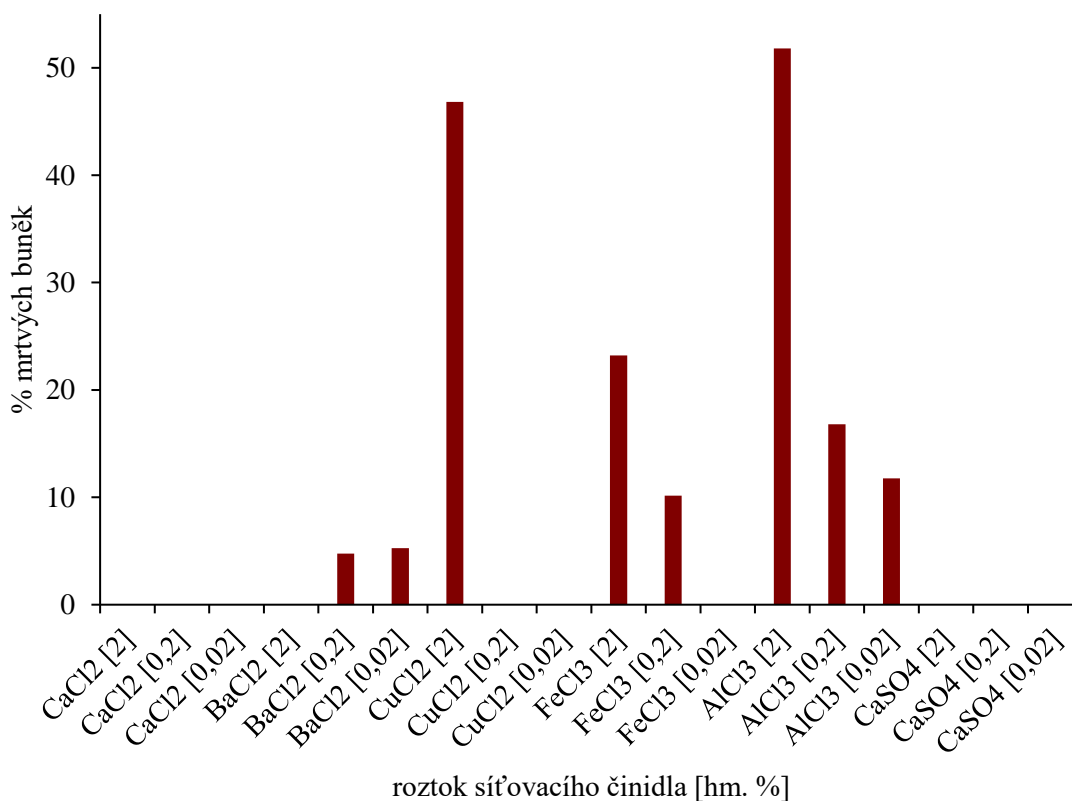


0,02 hm. %



Obrázek 27: dot-plot DSM 87 s přidavkem síranu vápenatého. Po použití roztoků nebyla významně ovlivněna viabilita buněk nacházejících se ve vzorku.

Celkové zhodnocení a porovnání vlivu síťovacích činidel na viabilitu si lze prohlédnout níže (Obrázek 28). Jedná se o sloupcový graf, kdy vertikální osa platí pro počet mrtvých buněk ve vzorku v % zaznamenaných pomocí průtokového cytometru, kdy tento počet je brán v poměru mrtvých buněk ku celkovému počtu eventů (10 000), které průtokový cytometr analyzoval. Na horizontální ose se pak nachází členění pro roztoky použitých činidel v hm. %.



Obrázek 28: Porovnání počtu odumřelých buněk s přidávkou síťovacích činidel o koncentracích 2, dále 0,2 a 0,02 hm. %

4.3 Ověření viability buněk po zgelování kultury pomocí vybraných síťovacích činidel

K zasíťování ke gelaci dochází pomocí reakce síťovacího činidla a exopolysacharidu alginátu, který je produkovaný samotnou kulturou. Pro experiment byl vybrán jeden kmen ze tří dříve použitých kmenů *Azotobacter vinelandii*, a to kmen DSM 87. Bakterie byly podrobeny gelaci pomocí síťovacích činidel, které byly použity v předchozích analýzách. Byl to roztok chloridu vápenatého, barnatého, měďnatého, železitého, hlinitého a síranu vápenatého, kdy všechny použité roztoky byly o koncentraci 2 hm. %. Jak uvádí autoři článku [47], alginátové hydrogely zesíťované vápníkem jsou již po delší dobu dobře zavedené a také komerčně dostupné. I přesto se v posledních letech věnuje věda dalším síťovacím činidlům, jako je například právě námi použitý chlorid barnatý nebo chlorid železitý, na jehož použití byl zaznamenán dramatický nárůst publikací (viz. [47]). Bylo také zjištěno, že algináty zesíťované baryem se jeví jako stabilnější ve srovnání s alginátovými hydrogely zesíťované vápníkem [48].

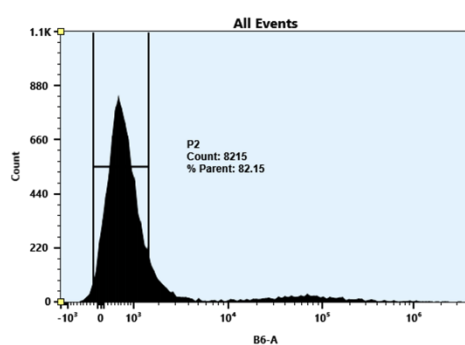
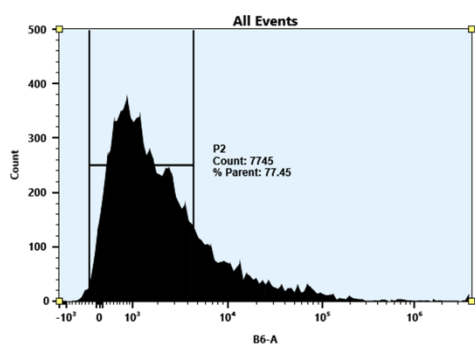
Vytvořené gely byly následně ponechány v Eppendorfově mikrozkuhavce obsahující 1 ml fosfátovém pufru po dobu 60 minut, aby byly uvolněny buňky obsažené v daném gelu. Pro snazší uvolnění byly přidány 3 mg enzymu alginát lyázy, jehož funkcí je štěpit lineární β -1,4-glykosidické vazby mezi polysacharidy tvořících alginát – β -D-mannuronátu a α -L-guluronátu. Pro ověření viability buněk byla zvolena fluorescenční sonda PI o koncentraci 1 mg/ml.

Výsledky z analýzy lze vidět na obrázcích formou scattergramů a histogramů. Obrázky jsou rozvrženy do dvou řádků a tří sloupců, kdy v první řádku jsou vyobrazeny výsledky formou scattergramů, ve druhém pak formou histogramů. Každý sloupec náleží výsledkům pro jedno síťovací činidlo použité ke gelaci. Obrázky obsahující data kontrol (Obrázek 29, Obrázek 30) jsou rozděleny do čtyř částí, ve kterých jsou obsaženy získané výsledky pro živou kulturu, mrtvou, živou s přidavkem alginázy a kulturu smíšenou, jejíž vzorek byl připraven z 50 % vzorku živých a z 50 % vzorku mrtvých buněk. Kontroly jsou považovány jako standardní stav, se kterým byly porovnávány data z analýzy buněk uvolněných z jednotlivých gelů.

DSM 87

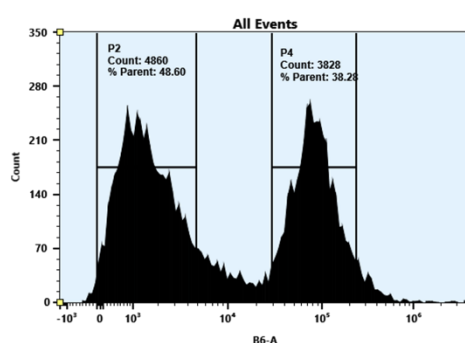
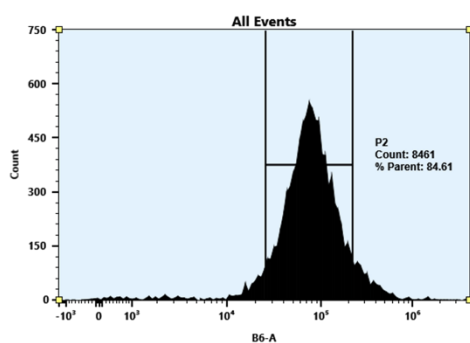
Živé

Živé s alginázou



Mrtvé

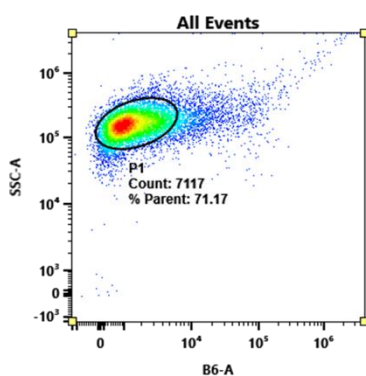
50:50



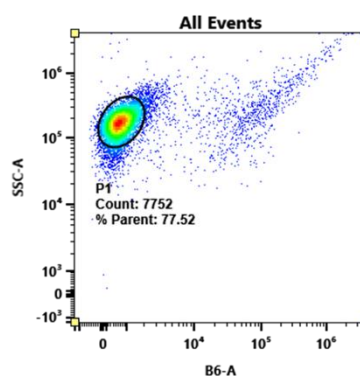
Obrázek 29: Histogram DSM 87 – kontroly, 1000násobné zředění.

DSM 87

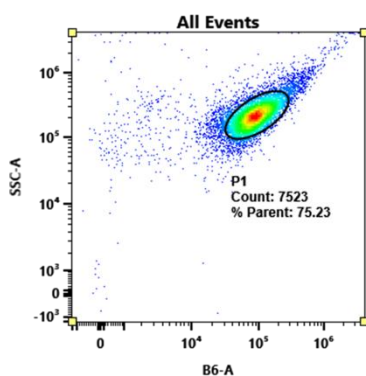
Živé



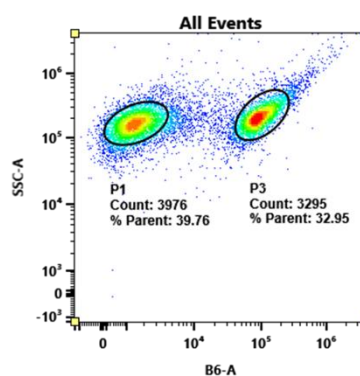
Živé s alginázou



Mrtvé



50:50

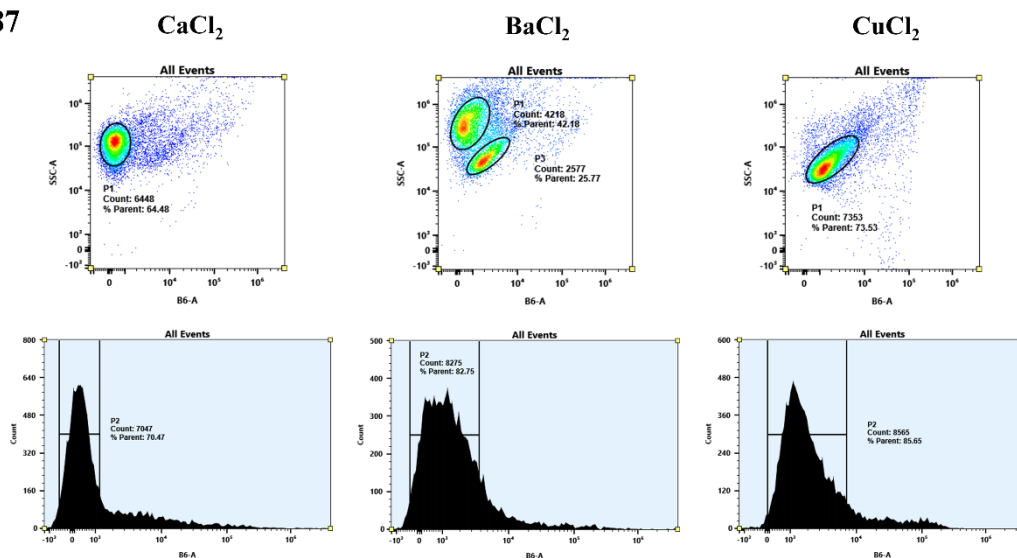


Obrázek 30: dot-plot DSM 87 – kontroly, 1000násobné zředění.

Obrázky vyskytující se níže (Obrázek 31, Obrázek 32) náleží výsledkům z analýzy vzorků, které obsahovaly uvolněné buňky z připravených gelů pomocí jednotlivých síťovacích činidel. Při použití chloridu vápenatého jako síťovacího činidla bylo pro analýzu použito 10-ti násobné zředění, jelikož při analýze vzorku o 100násobném zředění nebylo pomocí průtokového cytometru dosaženo dostatečného počtu buněk. To bylo zapříčiněno nízkým počtem uvolněných buněk z připraveného gelu, tudíž bylo zapotřebí použít méně zředěný vzorek. Z obrázků je patrné, že se ve vzorku vyskytovaly pouze živé buňky. Lze tedy konstatovat, že gelace kultury pomocí chloridu vápenatého nemá vliv na viabilitu buněk.

Pro analýzu vzorků s použitím chloridu barnatého jako síťovacího činidla bylo taktéž zapotřebí 10násobného zředění, ze stejného důvodu jako u chloridu vápenatého. Na obrázcích si lze všimnout, že síťování pomocí chloridu barnatého i chloridu měďnatého nemělo vliv na viabilitu buněk. U chloridu barnatého se ovšem vyskytuje i jiný signál, mimo signálu živých buněk. Tento jev by mohl být zapříčiněn dezintegrací různých částic použitím alginát lyázy právě s daným činidlem nebo tím, že vzorek nebyl promyt, a to za účelem, aby nedošlo k odstranění uvolněných gelů ve vzorku.

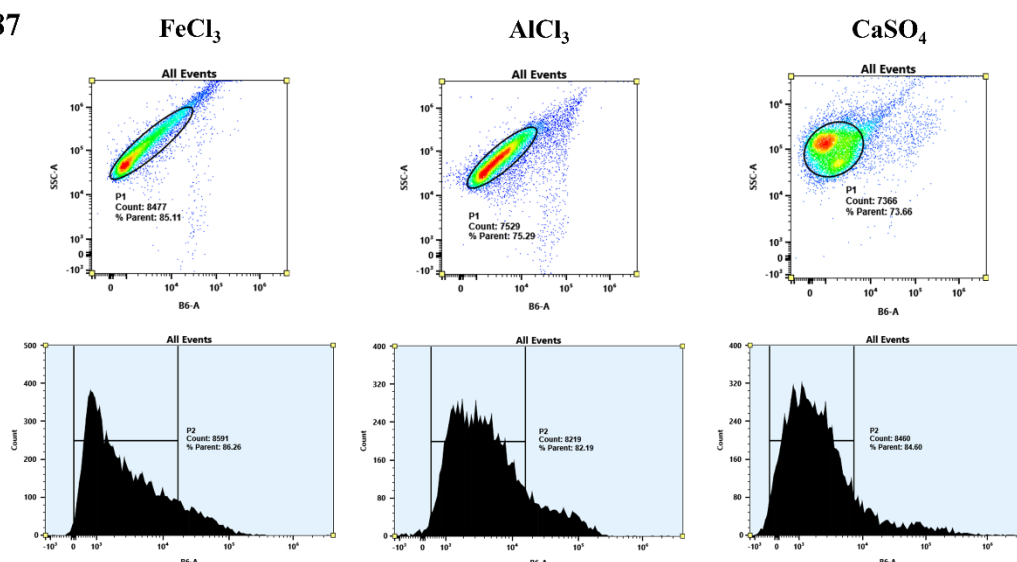
DSM 87



Obrázek 31: dot-plot a histogram DSM 87. Výsledky v prvním sloupci jsou platné pro 10násobně zředěné vzorky s použitím chloridu vápenatého jako síťovacího činidla, ve druhém pro 10násobně zředěné vzorky s použitím chloridu barnatého a ve třetím pro 100násobně zředěné vzorky s použitím chloridu měďnatého. U výsledku s použitím chloridu barnatého se vyskytuje mimo signál živých také jiný signál.

Použití chloridu železitého, chloridu hlinitého a síranu vápenatého jako síťovacího činidla bylo ve všech třech případech dosaženo obdobného výsledku. Z výsledků je zřejmé, že gelace pomocí zmíněných roztoků neměla vliv na viabilitu buněk. Lze si však všimnout, že signál náležící živým buňkám se pojí i s jiným signálem. Jako v případě použití chloridu barnatého si lze tuto skutečnost vysvětlit dezintegrací různorodých částic nebo nepromýváním vzorku. Při analýze vzorků buněk uvolněných z gelu připraveným pomocí síranu vápenatého jako síťovacího činidla bylo zapotřebí 10-ti násobného zředění, ze stejného důvodu jako při použití chloridu vápenatého a chloridu barnatého.

DSM 87



Obrázek 32: dot-plot a histogram DSM 87. Výsledky v prvním sloupci jsou platné pro 100násobně zředěné vzorky s použitím chloridu železitého jako síťovacího činidla, ve druhém pro 100násobně zředěné vzorky s použitím chloridu hlinitého a ve třetím pro 10násobně zředěné vzorky s použitím síranu vápenatého. U všech výsledků se vyskytuje problém s oddělením živých buněk od mrtvých, jelikož se nachází v jednom velkém roztaném peaku.

Zajímavým porovnáním jsou pak výsledky získané při použití roztoků chloridu měďnatého, chloridu hlinitého a chloridu železitého o koncentraci 2 hm. % jako síťovacího činidla při analýze jejich samotného vlivu na kulturu a analýze buněk po procesu gelace. Při použití zmíněných činidel bez procesu gelace došlo k usmrcení velké části buněk, naopak zesíťáváním kultury zůstaly buňky viabilní. Zachování viability buněk je způsobeno díky procesu, kdy přidáním kultury do samotného činidla dochází k okamžitému zesíťování kultury. Na povrchu vytvořeného gelu se zároveň vytvoří ochranná krusta, jenž chrání kulturu před vlivem dalšího působení činidla, a tak nedochází k jejich usmrcení.

5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na stanovení viability pomocí průtokového cytometru kmenů CCM 289, DSM 87 a DSM 720 u mikroorganismu *Azotobacter vinelandii*, a to po aplikaci síťovacích činidel i po uvolnění buněk z gelů.

V první části práce bylo zapotřebí optimalizovat postup při stanovení viability, tedy zvolit vhodnou fluorescenční sondu, s jejíž pomocí by byly co nejjasněji odlišeny mrtvé buňky kultury od buněk živých. Nejprve tato měření probíhala po 120 hodinách kultivace, a to u všech tří kmenů. Byly použity fluorescenční sondy PI, SYTOXTM Blue a DAPI. U kmene CCM 289 fluorescenční sondy PI a SYTOXTM Blue dokázaly odlišit mrtvé buňky od buněk živých. V případě sondy DAPI nebylo ve vzorku mrtvých dosaženo jednoznačného výsledku, tudíž byla pro následující experimenty vyloučena. Pro kmene DSM 87 a DSM 720 byla sonda DAPI taktéž vyloučena, a to z důvodu, že nedokázala rozlišit stav buněk. Následující experimenty byly provedeny po 72 hodinách kultivace z důvodu snížení počtu mrtvých buněk ve vzorku. U všech tří kmenů byl stav buněk zřetelně rozlišen pomocí obou použitých sond. Rozdílem ve výsledcích při použití sond byl pak rozdíl intenzit fluorescence mrtvých a živých buněk, kdy při použití sondy PI byl větší, tudíž snadněji k rozeznání. Z tohoto důvodu se fluorescenční sonda PI jeví jako nejvhodnější.

Následující část bakalářské práce se věnovala aplikaci síťovacích činidel na odebranou kulturu kmene DSM 87 po 72 hodinách kultivace. Jako síťovací činidla byly vybrány chlorid vápenatý, barnatý, měďnatý, železitý, hlinitý a síran vápenatý. Koncentrace činidel byla pak 2, dále 0,2 a 0,02 hm. %. Chlorid vápenatý, chlorid barnatý a síran vápenatý neměly značný negativní vliv na viabilitu kultury. Použití chloridu měďnatého o koncentraci 2 hm. % měl za následek úmrtí většiny kultury, méně zředěné roztoky již na viabilitu neměly stejný vliv. U chloridu železitého měl nejkoncentrovanější roztok na viabilitu buněk významný vliv, způsobil úmrtí okolo 50 % buněk ve vzorku. Méně koncentrovaný roztok viabilitu snížil minimálně a roztok o koncentraci 0,02 hm. % stav buněk neovlivnil vůbec. Roztoky chloridu hlinitého měly za následek trend, kdy s klesající koncentrací ubýval počet odumřelých buněk. Použití nejkoncentrovanějšího roztoku mělo za následek úmrtí většiny buněk nacházejících se ve vzorku.

V poslední části této bakalářské práce byl stanovován stav buněk po uvolnění z připravených gelů. Gely byly připraveny pomocí výše zmíněných činidel, o koncentraci 2 hm. %. Bylo zjištěno, že vybraná síťovací činidla při gelaci kultury neovlivnila viabilitu kultury, tedy buňky, jež se uvolnily z gelů, se jeví jako živé.

Výzkum ukázal, že použití různých síťovacích činidel u kmene DSM 87 mělo různý vliv na viabilitu buněk. Chlorid vápenatý, chlorid barnatý a síran vápenatý neovlivnily viabilitu kultury ani při aplikaci přímo ke kultuře ani při tvorbě gelů. Zatímco chlorid měďnatý, hlinitý a železitý vykazovaly při aplikaci roztoků o vyšších koncentracích působily negativním účinkem na buněčnou viabilitu. Při gelaci se však ukázalo, že vyšší koncentrace síťovacích činidel viabilitu buněk uvolněných z gelů neovlivnila, naopak buňky zůstaly viabilní. Tato skutečnost je dána jevem, kdy po přidání kultury do síťovacího činidla se okamžitě vytvoří z kultury gel s krustou na povrchu, jenž chrání kulturu před vlivem dalšího působení činidla. Ve vnitřním prostoru vytvořeného gelu je

pak koncentrace síťovacího činidla nižší, tudíž jsou buňky více v bezpečí. Ze získaných výsledků je jasné, že budoucí výzkum by se mohl zaměřit na gelaci těchto síťovacích činidel a dále se věnovat zkoumání vlivu gelů na rostliny při jejich aplikaci do půdy a k aplikaci do blízkého okolí rostlinných kořenů. Při posledních experimentech bylo také zjištěno, že aplikace alginázy nemá negativní dopad na buňky.

6 SEZNAM LITERATURY

- [1] HASKETT, Timothy L.; TKACZ, Andrzej a POOLE, Philip S. Engineering rhizobacteria for sustainable agriculture. Online. *The ISME Journal*. 2021, roč. 15, č. 4, s. 949-964. ISSN 1751-7362. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00835-4>. [cit. 2023-11-11].
- [2] ROY, Swarnika; BHOWMIK, Suchandrima; CHOWDHURY, Ankita Dutta; DHARA, Bikram a MITRA, Arup Kumar. Plant growth-promoting rhizobacteria: an alternative for NPK fertilizers. Online. In: *Microbes and Microbial Biotechnology for Green Remediation*. Elsevier, 2022, s. 149-167. ISBN 978-0-323-90452-0. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90452-0.00007-4>. [cit. 2023-11-09].
- [3] WHITBECK, Julie L. a CARDON, Zoe G. The Rhizosphere. Online. In: *The Rhizosphere - An Ecological Perspective*. Academic Press, 2007, s. 15-19. ISBN 978-0-12-088775-0. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-088775-0.X5000-9>. [cit. 2023-11-08].
- [4] CARBONELL, Gregoria; IMPERIAL, Rosario Miralles de; TORRIJOS, Manuel; DELGADO, Mar a RODRIGUEZ, José Antonio. Effects of municipal solid waste compost and mineral fertilizer amendments on soil properties and heavy metals distribution in maize plants (*Zea mays* L.). Online. *Chemosphere*. 2011, roč. 85, č. 10, s. 1614-1623. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.08.025>. [cit. 2024-01-12].
- [5] YADUVANSHI, N. P. S. Substitution of inorganic fertilizers by organic manures and the effect on soil fertility in a rice–wheat rotation on reclaimed sodic soil in India. Online. *The Journal of Agricultural Science*. 2003, roč. 140, č. 2, s. 161-168. ISSN 0021-8596. Dostupné z: <https://doi.org/10.1017/S0021859603002934>. [cit. 2024-01-12].
- [6] VEDAMURTHY, AB; BHATTACHARYA, Sourav; DAS, Arijit a SHRUTHI, SD. Exploring nanomaterials with rhizobacteria in the current agricultural scenario. Online. In: *Advances in Nano-Fertilizers and Nano-Pesticides in Agriculture*. Woodhead Publishing, 2021, s. 487-503. ISBN 978-0-12-820092-6. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820092-6.00020-3>. [cit. 2023-11-09].
- [7] JALOTA, S.K.; VASHISHT, B.B.; SHARMA, Sandeep a KAUR, Samanpreet. Adaptation and Mitigation. Online. In: *Understanding Climate Change Impacts on Crop Productivity and Water Balance*. Elsevier, 2018, s. 183-216. ISBN 9780128095201. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809520-1.00005-7>. [cit. 2024-01-13].

- [8] MIRANSARI, Mohammad. Plant Growth Promoting Rhizobacteria. Online. *Journal of Plant Nutrition*. 2014, roč. 37, č. 14, s. 2227-2235. ISSN 0190-4167. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/01904167.2014.920384>. [cit. 2023-11-11].
- [9] SHARMA, Ishwar Prakash; CHANDRA, Satish; KUMAR, Narendra a CHANDRA, Dinesh. PGPR: Heart of Soil and Their Role in Soil Fertility. Online. In: *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture*. Springer Nature Singapore, 2017, s. 51-67. ISBN 978-981-10-5589-8. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-981-10-5589-8_3. [cit. 2023-11-09].
- [1 LÓPEZ-MILLÁN, Ana-Flor; GRUSAK, Michael A.; ABADÍA, Anunciación a
0] ABADÍA, Javier. Iron deficiency in plants: an insight from proteomic approaches. Online. *Frontiers in Plant Science*. 2013, roč. 4. ISSN 1664-462X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00254>. [cit. 2023-11-30].
- [1 WATNICK, Paula a KOLTER, Roberto. Biofilm, City of Microbes. Online. *Journal
1] of Bacteriology*. 2000, roč. 182, č. 10, s. 2675-2679. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/JB.182.10.2675-2679.2000>. [cit. 2024-01-12].
- [1 FLEMMING, Hans-Curt; NEU, Thomas R. a WOZNIAK, Daniel J. The EPS Matrix:
2] The “House of Biofilm Cells.” Online. *Journal of Bacteriology*. 2007, roč. 189, č. 22, s. 7945-7947. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/JB.00858-07>. [cit. 2024-01-12].
- [1 MAH, Thien-Fah C a O'TOOLE, George A. Mechanisms of biofilm resistance to
3] antimicrobial agents. Online. *Trends in Microbiology*. 2001, roč. 9, č. 1, s. 34-39. ISSN 0966842X. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01913-2](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01913-2). [cit. 2024-01-12].
- [1 CASTILLO, Tania; GARCÍA, Andrés; PADILLA-CÓRDOVA, Claudio; DÍAZ-
4] 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. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.08.001>. [cit. 2023-11-11].
- [1 PAQUES, Jerome P. Alginate Nanospheres Prepared by Internal or External
5] Gelation with Nanoparticles. Online. In: *Microencapsulation and Microspheres for Food Applications*. Elsevier, 2015, s. 39-55. ISBN 9780128003503. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800350-3.00004-2>. [cit. 2023-11-14].
- [1 VENKATESAN, Jayachandran; NITHYA, R.; SUDHA, Prasad N. a KIM, Se-
6] Kwon. Role of Alginate in Bone Tissue Engineering. Online. In: *Marine Carbohydrates: Fundamentals and Applications, Part B. Advances in Food and Nutrition Research*. Elsevier, 2014, s. 45-57. ISBN 9780128002681. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800268-1.00004-4>. [cit. 2023-11-14].

- [1 MORADALI, M. Fata a REHM, Bernd H. A. The Role of Alginate in Bacterial
7] Biofilm Formation. Online. In: COHEN, Ephraim a MERZENDORFER, Hans (ed.).
Extracellular Sugar-Based Biopolymers Matrices. Biologically-Inspired Systems.
Cham: Springer International Publishing, 2019, s. 517-537. ISBN 978-3-030-12918-
7. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-030-12919-4_13. [cit. 2023-11-18].
- [1 ARAVAMUDHAN, Aja; RAMOS, Daisy M.; NADA, Ahmed A. a KUMBAR,
8] Sangamesh G. Natural Polymers. Online. In: *Natural and Synthetic Biomedical
Polymers.* Elsevier, 2014, s. 67-89. ISBN 9780123969835. Dostupné z:
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396983-5.00004-1>. [cit. 2023-11-14].
- [1 PRAMANIK, Nilkamal. A tool for biomedical application: Synthesis and
9] modification of polyhydroxyalkanoates. Online. *Sustainable Chemistry and
Pharmacy.* 2023, roč. 32. ISSN 23525541. Dostupné z:
<https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101041>. [cit. 2023-11-11].
- [2 TAKESHITA, S. a ODA, T. Usefulness of Alginate Lyases Derived from Marine
0] Organisms for the Preparation of Alginate Oligomers with Various Bioactivities.
Online. In: *Marine Enzymes Biotechnology: Production and Industrial Applications,
Part II - Marine Organisms Producing Enzymes. Advances in Food and Nutrition
Research.* Elsevier, 2016, s. 137-160. ISBN 9780128047149. Dostupné z:
<https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.07.003>. [cit. 2023-11-14].
- [2 ZHAO, Kai; DENG, Ying; CHUN CHEN, Jin a CHEN, Guo-Qiang.
1] Polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds with good mechanical properties and
biocompatibility. Online. *Biomaterials.* 2003, roč. 24, č. 6, s. 1041-1045. ISSN
01429612. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00426-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00426-X). [cit. 2024-
01-21].
- [2 KAI, Dan a LOH, Xian Jun. Polyhydroxyalkanoates: Chemical Modifications
2] Toward Biomedical Applications. Online. *ACS Sustainable Chemistry &
Engineering.* 2014, roč. 2, č. 2, s. 106-119. ISSN 2168-0485. Dostupné z:
<https://doi.org/10.1021/sc400340p>. [cit. 2024-01-21].
- [2 WANG, Yan-Yan; LÜ, Lan-Xin; SHI, Jun-Cai; WANG, Hai-Feng; XIAO, Zhong-
3] Dang et al. Introducing RGD Peptides on PHBV Films through PEG-Containing
Cross-Linkers to Improve the Biocompatibility. Online. *Biomacromolecules.* 2011,
roč. 12, č. 3, s. 551-559. ISSN 1525-7797. Dostupné z:
<https://doi.org/10.1021/bm100886w>. [cit. 2024-01-18].
- [2 AGUERO, Lisette; ALPDAGTAS, Saadet; ILHAN, Elif; ZALDIVAR-SILVA,
4] Dionisio a GUNDUZ, Oguzhan. Functional role of crosslinking in alginate scaffold
for drug delivery and tissue engineering: A review. Online. *European Polymer
Journal.* 2021. ISSN 0014-3057. Dostupné z:
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110807>. [cit. 2024-05-14].

- [2] WILKINSON, Martin G. Flow cytometry as a potential method of measuring
5] bacterial viability in probiotic products: A review. Online. *Trends in Food Science & Technology*. 2018, roč. 78, s. 1-10. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.006>. [cit. 2023-11-18].
- [2] BUŇKOVÁ, Leona a DOLEŽALOVÁ, Magda. *Obecná mikrobiologie*. Zlín:
6] Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007. ISBN 978-80-7318-516-9.
- [2] KOPECKÁ, Jana a ROTKOVÁ, Gabriela. Nepřímé stanovení počtu
7] životaschopných bakterií plotnovou metodou. Online. In: *Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií*. Brno: Masarykova univerzita, 2017. ISBN 978-80-210-8788-0. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/plotnova_metoda.html. [cit. 2023-11-28].
- [2] KOPECKÁ, Jana a ROTKOVÁ, Gabriela. Metody sterilní práce, očkování a
8] uchovávání mikroorganismů. Online. In: *Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií*. Brno: Masarykova univerzita, 2017. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/steril prace_ockovani_uchovavani.html. [cit. 2023-11-28].
- [2] NĚMEC, Miroslav a MATOULKOVÁ, Dagmar. *Základy obecné mikrobiologie*.
9] Brno: Masarykova univerzita, 2015. ISBN isbn978-80-210-7923-6.
- [3] PLÁŠEK, Jaromír. Konfokální mikroskop. Online. *Vesmír*. Roč. 1995, č. 9.
0] Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/1995/cislo-9/konfokalni-mikroskop.html>. [cit. 2023-12-01].
- [3] SEDLÁŘOVÁ, M. Principy konfokální mikroskopie. Online. In: *Výukové materiály*.
1] Olomouc: Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého, 2010. Dostupné z: <http://www.botanika.upol.cz/atlas/confmicro/principles.php>. [cit. 2023-12-01].
- [3] FÖLDES-PAPP, Zeno; DEMEL, Ulrike a TILZ, Gernot P. Laser scanning confocal
2] fluorescence microscopy: an overview. Online. *International Immunopharmacology*. 2003, roč. 3, č. 13-14, s. 1715-1729. ISSN 15675769. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(03\)00140-1](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(03)00140-1). [cit. 2023-12-01].
- [3] ADAN, Aysun; ALIZADA, Günel; KIRAZ, Yağmur; BARAN, Yusuf a
3] NALBANT, Ayten. Flow cytometry: basic principles and applications. Online. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2017, roč. 37, č. 2, s. 163-176. ISSN 0738-8551. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>. [cit. 2023-11-18].
- [3] DÍAZ-GARCÍA, Marta Elena a BADÍA-LAÍÑO, Rosana. Fluorescence: Overview
4] ☆. Online. In: *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical*

- Engineering*. Elsevier, 2018, s. 309-319. ISBN 9780124095472. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.11182-5>. [cit. 2023-11-21].
- [3 DAVIES, D. Cell sorting by flow cytometry. In: *Macey MG, ed. Flow cytometry: principles and applications*.. Totowa (NJ): Humana Press, 2010, s. 257-276.
- [3 ORMEROD, M. G a NOVO, David. Chapter 3: Fluorescence and fluorochromes. In: [6] *Flow cytometry: A basic introduction*. 2009. ISBN 978-0-9559812-0-3.
- [3 LEAVESLEY, Silas J.; BRITAIN, Andrea L.; CICHON, Lauren K.; NIKOLAEV, Viacheslav O. a RICH, Thomas C. Assessing FRET using spectral techniques. Online. *Cytometry Part A*. 2013, roč. 83, č. 10, s. 898-912. ISSN 1552-4922. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22340>. [cit. 2023-11-21].
- [3 HEZEL, Marcus; EBRAHIMI, Fahim; KOCH, Marco a DEGHANI, Faramarz. [8] Propidium iodide staining: A new application in fluorescence microscopy for analysis of cytoarchitecture in adult and developing rodent brain. Online. *Micron*. 2012, roč. 43, č. 10, s. 1031-1038. ISSN 09684328. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2012.04.006>. [cit. 2023-11-25].
- [3 NIEMINEN, Anna-Liisa; GORES, Gregory J.; BOND, John M.; IMBERTI, Roberto; HERMAN, Brian et al. A novel cytotoxicity screening assay using a multiwell fluorescence scanner. Online. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1992, roč. 115, č. 2, s. 147-155. ISSN 0041008X. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(92\)90317-L](https://doi.org/10.1016/0041-008X(92)90317-L). [cit. 2023-11-25].
- [4 ROTH, B. L.; POOT, M.; YUE, S. T. a MILLARD, P. J. Bacterial viability and [0] antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain. Online. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997, roč. 63, č. 6, s. 2421-2431. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/aem.63.6.2421-2431.1997>. [cit. 2023-11-25].
- [4 TORTORELLO, M.L. TOTAL VIABLE COUNTS | Microscopy. Online. In: [1] *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier, 2014, s. 618-620. ISBN 9780123847331. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00335-9>. [cit. 2023-11-25].
- [4 JOHNSON, Simon; NGUYEN, Vy a CODER, David. Assessment of Cell Viability. [2] Online. *Current Protocols in Cytometry*. 2013, roč. 64, č. 1. ISSN 1934-9297. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0902s64>. [cit. 2023-11-25].
- [4 MARTIN-DEJARDIN, F.; EBEL, B.; LEMETAIS, G.; NGUYEN THI MINH, H.; [3] GERVAIS, P. et al. A way to follow the viability of encapsulated *Bifidobacterium bifidum* subjected to a freeze-drying process in order to target the colon: Interest of flow cytometry. Online. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013, roč.

49, č. 2, s. 166-174. ISSN 09280987. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.02.015>. [cit. 2024-05-14].

- [4 BUNTHOF, Christine J. a ABEE, Tjakko. Development of a Flow Cytometric
4] Method To Analyze Subpopulations of Bacteria in Probiotic Products and Dairy Starters. Online. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002, roč. 68, č. 6, s. 2934-2942. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.2934-2942.2002>. [cit. 2024-05-14].
- [4 RAULT, Aline; BÉAL, Catherine; GHORBAL, Sarrah; OGIER, Jean-Claude a
5] BOUIX, Marielle. Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. Online. *Cryobiology*. 2007, roč. 55, č. 1, s. 35-43. ISSN 00112240. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2007.04.005>. [cit. 2024-05-14].
- [4 WANG, Manna; ATEIA, Mohamed; HATANO, Yuta; MIYANAGA, Kazuhiko a
6] YOSHIMURA, Chihiro. Novel fluorescence-based method for rapid quantification of live bacteria in river water and treated wastewater. Online. *Environmental Science Advances*. Roč. 2022, s. 30-36. ISSN 2754-7000. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/d1va00017a>. [cit. 2024-05-14].
- [4 SERVAIN-VIEL, S.; AKNIN, Marie-Laure; DOMENICHINI, Séverine;
7] PERLEMUTER, G.; CASSARD-DOULCIER, Anne.-Marie et al. A flow cytometry method for safe detection of bacterial viability. Online. *Cytometry A*. 2024, č. 2, s. 146-156. Dostupné z: <https://doi.org/doi.org/10.1002/cyto.a.24794>. [cit. 2024-05-14].
- [4 MASSANA ROQUERO, Daniel; OTHMAN, Ali; MELMAN, Artem a KATZ,
8] Evgeny. Iron(iii)-cross-linked alginate hydrogels: a critical review. Online. *Materials Advances*. 2022, roč. 3, č. 4, s. 1849-1873. ISSN 2633-5409. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D1MA00959A>. [cit. 2024-05-14].
- [4 MØRCH, Ýrr A.; DONATI, Ivan; STRAND, Berit L. a SKJÅK-BRÆK, Gudmund.
9] Effect of Ca ²⁺ , Ba ²⁺ , and Sr ²⁺ on Alginate Microbeads. Online. *Biomacromolecules*. 2006, roč. 7, č. 5, s. 1471-1480. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/bm060010d>. [cit. 2024-05-14].

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

BODIPY	Dipyrrromethenbordifluorid
CCM	Název pro kmen bakterie <i>Azotobacter vinelandii</i>
cFDA	Karboxyfluorescein diacetát
CFU	Colony forming units – jednotky tvořící kolonie
CoA	Koenzym A
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DSM	Název pro kmen bakterie <i>Azotobacter vinelandii</i>
EPS	Extracelulární polymerní látky
FDA	Fluorescein diacetát
FRET	Fluorescenční rezonanční přenos energie
NADPH	Nikotinamidadeninukleotidfosfát v redukované formě
P(3HB)	Poly(3-hydroxybutyrát)
PD	Fotodiody
PEI	Poly(ethylenamin)
PGPR	Rhizobakterie podporující růst rostlin
pH	Záporný dekadický logaritmus H ⁺ iontů
PHA	Polyhydroxyalkanoáty
PI	Propidium jodid
PMT	Fotonásobiče
RNA	Ribonukleová kyselina