



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

**Detekce životaschopnosti bakteriálních populací
pomocí průtokové cytometrie**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ/ ZDRAVOTNÍ
LABORANT**

Autor: Lucie Tůmová

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

České Budějovice 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou/diplomovou práci s názvem „*Detekce životaschopnosti bakteriálních populací pomocí průtokové cytometrie*“ jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne

.....

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat svému vedoucímu práce panu Ing. Pavlu Beranovi, PhD za pomoc při vypracování mé bakalářské práce, užitečné rady a odborné vedení. Dále patří velké díky Bc. Johaně Kolářové za její ochotu, rady a pomoc se samotnou analýzou. Také bych chtěla poděkovat celé Katedře genetiky a speciální produkce rostlinné za možnost zpracovávat svou práci zde.

V neposlední řadě patří obrovské díky mé rodině a přátelům za podporu, pomoc a trpělivost po dobu mého studia.

Děkuji

Detekce životaschopnosti bakteriálních populací pomocí průtokové cytometrie

Abstrakt

Tato práce se zabývá detekcí viability *Xanthomonas euvesicatoria* pomocí průtokového cytometru. Náplní této práce byla optimalizace metody a ošetření bakteriálních kultur vysokou teplotou v daných časových intervalech. Teplem ošetřené kultury byly barveny interkalačním barvivem propidium jodid, které značí permeabilizované membrány analyzovaných buněk a může poskytnout informace o počtu mrtvých (apoptických) buněk. Vyhodnocením výsledků byl potvrzen předpoklad o tom, že počet přeživších buněk se vzrůstajícím časem ošetření bude klesat. Byla použita teplota 90 °C, která se dle ostatních prací zdá být jako nejprůkaznější pro rod *Xanthomonas*. Průtoková cytometrie se osvědčila jako jednoduchá, rychlá a efektivní metoda pro detekci viability *Xanthomonas euvesicatoria*.

Klíčová slova

Ošetření vysokou teplotou, *Xanthomonas euvesicatoria*, detekce viability, propidium jodid, flow cytometrie.

Detection of bacterial population viability using flow cytometry

Abstract

This work deals with the detection of viability of *Xanthomonas euvesicatoria* using a flow cytometer. The center of this work was to optimize the method and the treatment of bacterial cultures with high temperature at given time intervals. The heat-treated cultures were dyed with an intercalating dye called propidium iodide which marks the permeabilized membranes of the cells and thus provides information on the number of dead (apoptotic) cells. The evaluation of the results confirmed the assumption that the number of surviving cells would decrease with the increasing treatment time. A temperature of 90 ° C was used, which according to other works, seems to be the most evident for the *Xanthomonas* genus. Flow cytometry has proven to be a simple, fast and efficient method for the viability detection of *Xanthomonas euvesicatoria*.

Key words

High temperature treatment, *Xanthomonas euvesicatoria*, detection of viability, propidium iodide, flow cytometry.

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Průtoková cytometrie	9
2.1	<i>Historie</i>	9
2.2	<i>Princip metody</i>	11
2.3	<i>Fluidní systém</i>	12
2.4	<i>Optický systém</i>	13
2.5	<i>Elektronický systém</i>	14
2.6	<i>Vyhodnocení získaných dat</i>	15
2.7	<i>Gateing</i>	16
2.8	<i>Fluorochromy používané v průtokové cytometrii</i>	16
2.9	<i>Využití průtokové cytometrie</i>	17
2.10	<i>Aplikace v klinické praxi</i>	18
2.11	<i>Aplikace v rostlinné biologii</i>	19
3	Rod <i>Xanthomonas</i>	20
3.1	<i>Taxonomické zařazení</i>	20
3.2	<i>Charakteristika</i>	20
3.3	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	21
3.4	<i>Rozšíření</i>	21
3.5	<i>Morfologie</i>	22
3.6	<i>Klasifikace</i>	22
3.7	<i>Xanthomonas euvesicatoria jako fytopatogen</i>	23

4	Materiál a metodika.....	25
4.1	<i>Použitý kmen bakterie</i>	25
4.2	<i>Kultivace vzorků.....</i>	25
4.3	<i>Ošetření vzorků vysokou teplotou</i>	26
4.4	<i>Příprava vzorků pro vlastní analýzu</i>	26
4.5	<i>Příprava průtokového cytometru a vlastní analýza</i>	27
5	Výsledky	28
5.1	<i>Procentuální zastoupení živých a mrtvých buněk v bakteriální populaci</i>	36
6	Diskuze	37
7	Závěr.....	39
8	Seznam použitých literárních zdrojů	40
9	Seznam použitých internetových zdrojů	44
10	Seznam zkratk.....	46

1 Úvod

Průtoková cytometrie je jedna z moderních a perspektivních metod používaná v současnosti pro výzkum v mnoha biologických oborech. Aplikace této metody je značně široká od stanovení obsahu jaderné DNA, analýzy buněčného cyklu, stanovení ploidie, studium genové exprese až po počítání a určení typu krevních elementů, detekci a charakterizaci mikroorganismů, třídění požadovaných částic a v této práci ke stanovení viability bakteriálních buněk. Proto se tato rychlá, jednoduchá a poměrně citlivá metoda používá v klinických, výzkumných či biotechnologických laboratořích.

Ve své bakalářské práci budu analyzovat permeabilitu cytoplazmatických membrán a kvalitu a množství DNA v bakteriální buňce pomocí fluorescenčního barviva propidium jodid (PI), které prochází narušenou membránou a navazuje se na nukleové kyseliny vně buňky. Po vazbě na nukleovou kyselinu dochází k posunu a zesílení intenzity fluorescence emitované v červené oblasti světla.

Pro tuto analýzu byla zvolena bakterie *Xanthomonas euvesicatoria*, známá jako fytopatogen na rajčatech a paprikách.

2 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je technologie, která se používá k analýze fyzikálních a chemických vlastností jednotlivých částic, obvykle buněk, proudících v proudu kapaliny jimiž prochází laserový svazek. Příklady měřených vlastností zahrnují relativní granularitu částic, velikost, relativní rozčlenění a intenzitu fluorescence. Tyto charakteristiky jsou určeny použitím opticko-elektronického systému, ten měří rozptyl dopadajícího laserového záření na buňky a emitaci fluorescence (Robertson, 2010).

Celkový rozsah použití průtokového cytometru je značně obsáhlý a zahrnuje například stanovení obsahu jaderné DNA (deoxyribonukleová kyselina), analýzu buněčného cyklu, určení ploidie, studium genové exprese, detekci a charakterizaci mikroorganismů, počítání a určení typu krevních buněk třídění požadovaných částic atd. (Suda, 2005).

2.1 Historie

Technologie průtokové cytometrie patří mezi mladší analytické metody. Některé principy používané v začátcích se využívají i v současných přístrojích. Prvně používaná byla při studiu bakterií a postupem času se rozšířila do dalších oborů, kde je dodnes využívána (Doležel, 1997).

Se zlepšováním techniky laserů, fluorescenčních protilátek a elektroniky se výrazně zvýšila kvalita a možnosti, které nabízí dnešní průtoková cytometrie. První informace o průtokovém cytometru pocházejí z roku 1934. Ve zmíněném přístroji byly buňky poprvé kontinuálně a jednotlivě unášeny proudem kapaliny skrze kapiláru připojenou k mikroskopickému stolečku a každá buňka byla vyhodnocována pomocí fotoelektrického aparátu (Melamed et al., 1990). Během druhé světové války vývoj průtokového cytometru pokračoval, jeho schopnosti byly využívány především při analýze bakterií (Gucker et al., 1947). V roce 1949 patentoval W. Coulter mechanismus počítající částice proudící v suspenzi přes zúžené místo, tzv. aperturu, kde docházelo k detekovatelným změnám elektrických vlastností (Melamed et al., 1990).

Všechny dnešní průtokové cytometry využívají principu laminárního proudění a mnohé z nich hydrodynamické fokusace. Tuto techniku použil již v roce 1953 Crosland-Taylor, který sestrojil komůrku pro optické počítání buněk na základě těchto principů. Buněčná suspenze byla pomalu injektována do rychleji proudící kapaliny a došlo tak k uspořádání jednotlivých buněk, které procházely jedna po druhé (Crosland – Taylor, 1953).

V dalších letech byla velká pozornost věnována vývoji buněčných sorterů. V roce 1965 vyvinul Mack Fulwyler průtokový cytometr, který se stal předchůdcem dnešních nástrojů. Zejména byl zodpovědný za vytvoření elektronického separátoru na bázi objemových buněk. Tento přístroj mohl oddělit buňky na základě elektronického objemu buňky a také použít elektrostatickou deformaci pro oddělení a třídění. To bylo nazýváno tekutým mikrofluorometrem (Fulwyler, 1965).

Další vylepšení vedly k sestrojení prvního fluorescenčního průtokového cytometru (1968 W. Gohde) a prvního FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) komerčně produkováného firmou Becton Dickinson, schopného měřit rozptyl dopadajícího záření na buňky v přímém směru, fluorescenci nad 530 nm a celkový počet buněk (Walker, 2013).

V současnosti běžně zažitý pojem "průtoková cytometrie" byl poprvé použit až v pozdních 70. letech dvacátého století na konferenci Americké inženýrské nadace v Pensacole na Floridě. Další vývoj pokračoval v laboratořích, kde docházelo k postupnému zlepšování laserů, jejich počtu při analýze, zlepšování optiky a zvyšování počtu detektorů až na dnešní velmi vysokou úroveň (Herzenberg et al. 2002, Walker, 2013).

První práce, která využívala pro tuto metodu rostlinné buňky byla zveřejněna až roku 1973, i když mechanismy průtokové cytometrie jsou známé už od roku 1934 (Heller, 1973). Toto zpožděné využití rostlinných buněk pro analýzu bylo ovlivněno komplikovaným zpracováním rostlinných vzorků. Rostlinné buňky se skládají z pevné buněčné stěny, která může obsahovat přirozené fluorochromy a vedlejší rostlinné metabolity, které mohou zkomplikovat měření (Doležel et al., 2007).

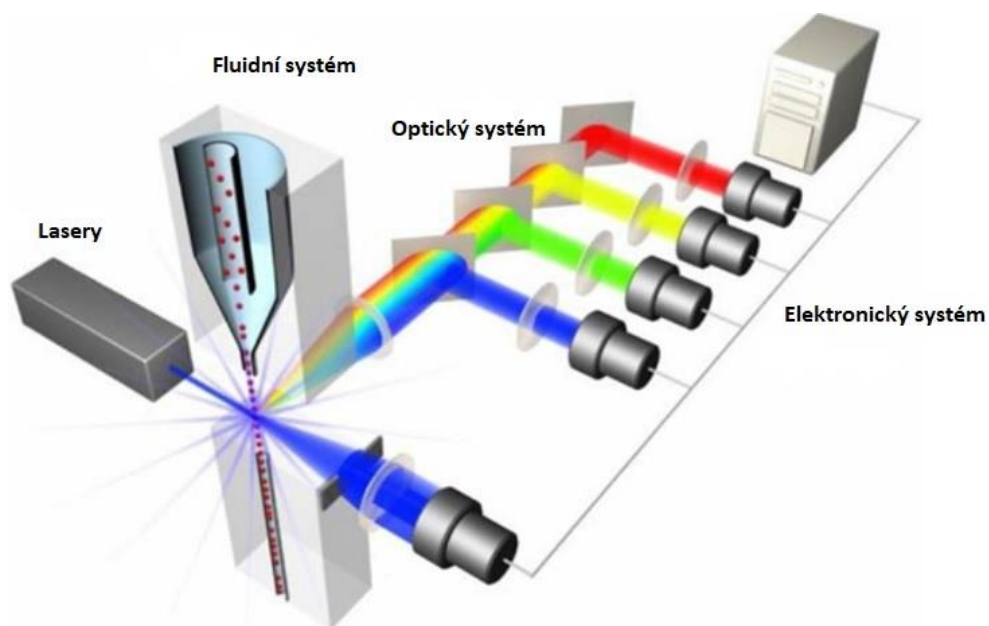
2.2 *Princip metody*

Název průtoková cytometrie vyplývá ze dvou základních charakteristik metody. Zaznamenávají se vybrané optické vlastnosti jednotlivých částic (např. buněk), z nichž nejčastější bývá intenzita fluorescence a veškerá měření se uskutečňují v pohybu. Před samotným měřením (např. obsahu jaderné DNA) se na dvoušroubovici DNA musí navázat fluorescenční barvivo (fluorochrom). Fluorescenční barvivo musí být specificky cílené na konkrétní objekt, aby nedošlo k obarvení jiných organel a ostatních částí buňky. Zároveň je důležité množství specifického barviva, to musí být přímo úměrné množství obarvené DNA (Suda, 2005).

Při průchodu částic se specificky značenou DNA a ozářením laserovým paprskem o určité vlnové délce dochází k rozptylu, kdy elektrony přecházejí na vyšší energetickou hladinu. Tento stav elektronů není stabilní a proto se vrací zpět na původní energetickou hladinu. Tím dochází k uvolnění energie ve formě světla a tepla, tento jev se nazývá fluorescence. Část energie se ztrácí ve formě tepla a proto má vyzářené světlo delší vlnovou délku než původní záření. Je důležité vhodně zvolit kombinaci filtrů pro oddělení záření a následné změření fluorescence. Od každé částice je sbírán seznam dat. Data jsou sbírána a uložena v počítači. Tato data jsou následně analyzována, aby poskytla informace o jednotlivých subpopulacích ve vzorku, nebo v případě této práce o viabilitě buněk (Shapiro 2005, Suda 2005).

Průtokový cytometr se skládá ze tří hlavních systémů:

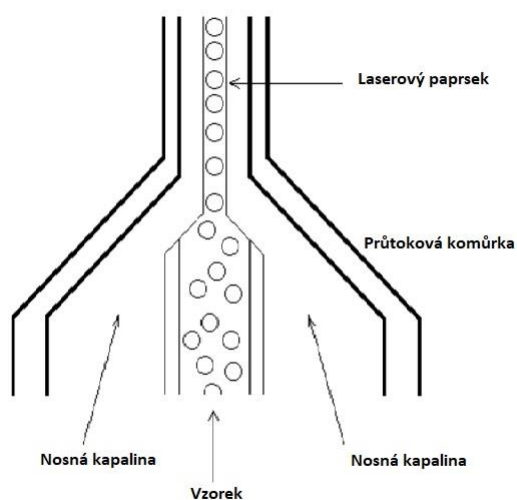
- fluidní systém, který transportuje částice proudem kapaliny k laserovému svazku.
- optický systém skládající se z laserů ozařujících částice v proudu vzorku a optických filtrů na usměrnění výsledného světelného signálu na vhodný detektor.
- elektronický systém převádí detekované světelné záření na elektrický signál, který je zpracováván počítačem (Rowley, 2012).



Obr. 1 Schéma hlavních systémů průtokového cytometru. Převzato a upraveno (Rowley, 2012).

2.3 Fluidní systém

Jedním ze základů průtokové cytometrie je schopnost měřit vlastnosti jednotlivých částic. Když je vzorek v roztoku injektován do cytometru, částice jsou náhodně rozmístěny v trojrozměrném prostoru. Částice ze vzorku musí procházet v proudu jednotlivě za sebou. Tento proces se nazývá hydrodynamická fokusace a zlepšuje účinnost měření.



Obr. 2. Hydrodynamická fokusace vzorku. Převzato a upraveno (Rowley, 2012).

V podstatě se fluidní systém skládá z centrálního kanálu, uzavřeného vnějším pláštěm, který obsahuje rychleji tekoucí tekutinu. Tímto centrálním kanálem se vstříkuje vzorek. Jak pohybuje tekutina pláštěm, vytváří masivní tahový efekt na zúžení středové komory. Tím se změní rychlost centrální tekutiny, jejíž průtoková fronta se stává parabolickou s největší rychlostí ve středu a nulovou rychlostí na stěně. Efekt vytvoří jediný soubor částic a nazývá se hydrodynamické zaostření (fokusace). Při optimálních podmínkách (laminární průtok) se tekutina v centrální komoře nesmí mísit s kapalinou pláště.

Bez hydrodynamické fokusace by se tryska přístroje zablokovala a nebylo by možné analyzovat jednotlivé buňky. (Rahman, 2014).

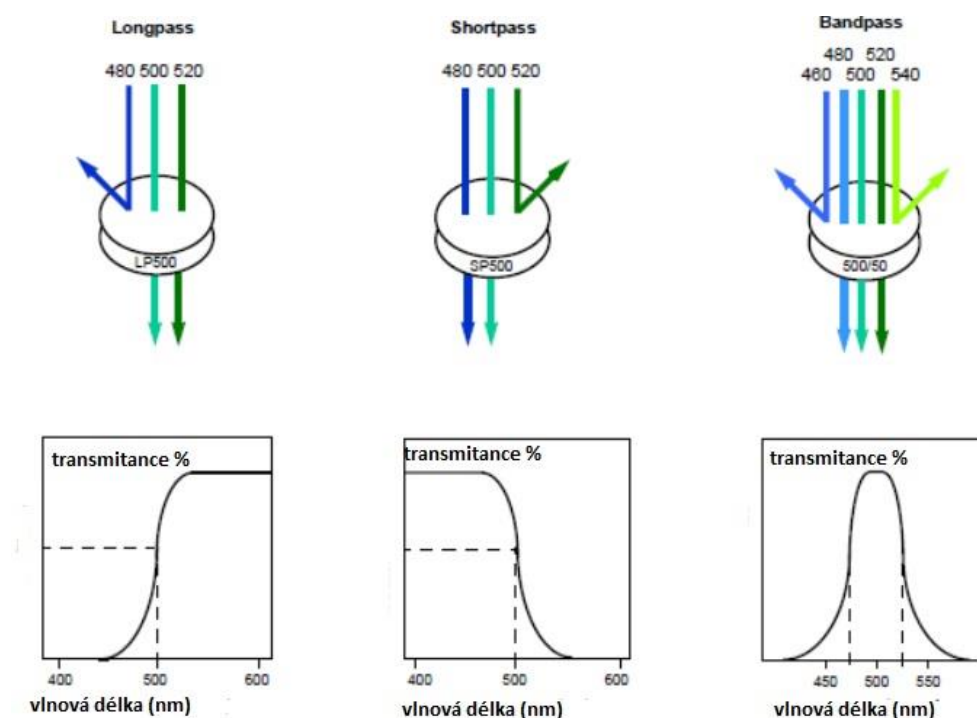
2.4 Optický systém

Po hydrodynamické fokusaci každá částice prochází jedním nebo více paprsky světla. Rozptyl světla nebo fluorescenční emise (pokud je částice označena fluorochromem) poskytuje informace o vlastnostech částic.

V moderní průtokové cytometrii se běžně jako světelné zdroje používají lasery, které vytvářejí jednu vlnovou délku světla (laserovou čáru) na jedné nebo více oddělených frekvencích (koherentní světlo). Dále je možné jako zdroj světla použít obloukové lampy, které jsou levnější než lasery a využívají barevných emisí zapáleného plynu uvnitř utěsněné trubky. To však přináší nestabilní nesoudržné světlo ze směsi vlnových délek, které vyžadují následné optické filtrování. Světlo rozptýlené ve směru dopředu, obvykle až 20° od osy laserového paprsku, je shromažďováno čočkou známou jako kanál dopředního rozptylu (FSC= forward scatter). Intenzita FSC zhruba odpovídá velikosti částic a může být také použita k rozlišování mezi mrtvými a živými buňkami. Světlo měřené zhruba pod úhlem 90° je nazýváno bočním rozptylem. Boční rozptylový kanál (SSC= side scatter) poskytuje informace o granulárním obsahu v částici. FSC i SSC jsou jedinečné pro každou částici a kombinace těchto dvou parametrů může být použita k odlišení různých typů buněk v heterogenním vzorku.

Měření fluorescence prováděné při různých vlnových délkách může poskytnout kvantitativní a kvalitativní údaje o buněčných povrchových receptorech nebo intracelulárních molekulách, značených fluorochromem, jako je DNA a cytokiny. Průtokové cytometry používají pro detekci vyzařovaného světla samostatné fluorescenční (FL-) kanály. Počet detektorů se bude lišit v závislosti na stroji a jeho výrobcí. Detektory

jsou buď křemíkové fotodiody nebo fotonásobící trubice (PMT). Křemíkové fotodiody se obvykle používají k měření dopředního rozptylu (FSC), pokud je signál silný. PMT jsou citlivějšími nástroji a jsou ideální pro měření rozptylu a fluorescence. Specificita detektorů pro konkrétní část vlnové délky je optimalizována umístěním filtrů před PMT, což umožní dopad pouze úzkého spektra vlnových délek na detektor. Tyto filtry jsou označovány jako bandpass (BP) filtry. Další používané filtry jsou shortpass (SP), filtry propouštějící vlnové délky rovné nebo kratší než specifická vlnová délka a longpass (LP), filtry které propouštějí záření s vlnovou délkou rovnou nebo delší než je specifická. Všechny tyto filtry zabraňují absorpci světla. Příkladem tohoto filtru může být tzv. dichroické zrcadlo, které pouští vlnové délky do stanovené hodnoty a vlnové délky, které jsou nad stanovené hodnoty jsou odraženy (Rahman, 2014).



Obr. 3. Tři typy filtrů používaných v průtokové cytometrii: Longpass, Shortpass, Bandpass. Převzato a upraveno (Rowley, 2012).

2.5 Elektronický systém

Funkce elektronického systému průtokového cytometru je dvojího typu: buď lze převést světelné signály na elektronické signály (napětí) nebo provádět analýzu dat. První funkce je dosažena jedním z výše uvedených dvou typů fotodetektorů.

Elektronický signál nebo napěťový impuls vzniká, když část částic/buňka vstoupí do cesty laserového paprsku a začne rozptylovat světlo nebo fluoreskuje. Toto světlo pak vstupuje do fotodetektorů (PMT nebo fotodiody) a převádí se na elektrony. Elektrony se násobí, čímž vzniká větší elektrický proud. Dále je proud zesílen a transformován do napěťového impulsu. Napěťový impuls se začíná zvyšovat jakmile buňka vstoupí do dráhy laseru. Impuls vrcholí, když je buňka ve středu paprsku a vrátí se k výchozí hodnotě poté, co buňka úplně projde. Nakonec jsou napěťové impulsy kvantifikovány signálovými procesory do číselných hodnot pro výšku, šířku a plochu impulsu. Tato data jsou pak přenesena do počítačového softwaru cytometru pro uchování a další analýzu (Rowley, 2012).

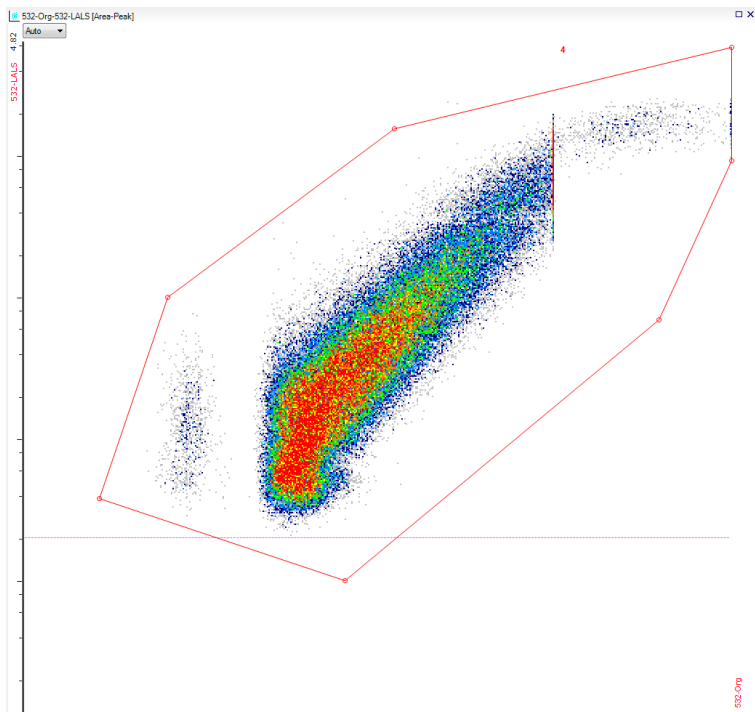
2.6 Vyhodnocení získaných dat

Jedním z hlavních výhod průtokové cytometrie je, že umožňuje výzkumníkovi měřit několik fyzikálních vlastností každé buňky v populaci. Po shromáždění a přenosu dat do digitálního formátu jsou připravena k analýze pomocí počítačového softwaru cytometru. Hloubka analýzy nashromážděných dat závisí na cílech výzkumného pracovníka a může se lišit od jednoduché morfologické klasifikace vzorku, vynesím FSC a SSC, po identifikaci více subpopulací (pomocí gatingu) ve vzorku za použití různých markerů buněčného povrchu (fluorochromů) (Rowley, 2012).

Data z průtokového cytometru mohou být zaznamenána dvěma způsoby. Prvním způsobem jsou histogramy, které měří nebo porovnávají pouze jeden parametr. Dalším způsobem jsou takzvané „dot ploty“, které mohou porovnávat dva nebo tři parametry současně na dvou nebo trojrozměrném rozptylovém diagramu. Histogram typicky vykresluje intenzitu detekovanou v jediném kanálu podél jedné osy. Naproti tomu v „dot plotu“ je každá informace vykreslena jako jediný bod na rozptylovém grafu. Částice s podobnou intenzitou se shlukují ve stejné části na rozptylovém grafu. Histogramy a „dot ploty“ se vzájemně nevyklučují a většina složitějších experimentů s průtokovým cytometrem využívá více grafů k zobrazení bohatých, multiparametrických dat ve vzorku. V mnoha případech je třeba vykreslit více než tři parametry, pro tyto účely se využívá technika analýzy dat známá jako gating. Tato technika analýzy přispívá k dalšímu rozlišení a flexibilitě, což umožní analýzu téměř neomezeného množství parametrů současně v několika různých histogramech a „dot plotech“ (Robinson, 2013).

2.7 Gating

Podmnožina dat může být definována pomocí gate. Gate je číselnou nebo grafickou hranicí ohraničující charakteristické částice pro další analýzu. V následujícím grafu je možné pracovat už jen s vybranou populací buněk. Výsledkem je pak počet buněk v daném gate, který může být rovněž vyjádřen jako procento z celkového počtu měřených buněk nebo také hodnoty intenzity fluorescence, který je závislý na míře exprese daného znaku. Čím větší je exprese měřeného parametru, tím je větší množství navázané částice s fluorescenční značkou a tím je větší intenzita fluorescence. Tento parametr je značně závislý na správném nastavení průtokového cytometru (Shapiro, 2005).



Obr. 4. Již označená oblast gate ve vlastní analýze.

2.8 Fluorochromy používané v průtokové cytometrii

Existují desítky fluorescenčních molekul (fluorochromů) s potenciální aplikací v průtokové cytometrii. Aplikace fluorescenčních značek má v průtokové cytometrii široké uplatnění. Využívají se ke kvantifikaci a identifikaci odlišných populací buněk, buněčných organel a povrchových receptorů na buňkách, dále k třídění buněk, ke stanovení obsahu nukleových kyselin, k imunofenotypizaci, ve studiu apoptózy buněk či k měření aktivity enzymů (Rahman et al., 2013).

Obecně existují dvě třídy fluorochromů používané v průtokové cytometrii. Ty, které se vážou nekovalentně ke strukturám uvnitř buňky a ty, které jsou kovalentně vázány na jiné sondy, které se pak nekovalentně vážou na buněčné struktury. Tyto sondy nejčastěji představují protilátky, ale i jiné proteiny, hormony nebo dokonce mohou být značeny nukleové kyseliny (Ormerod, 2008).

Mezi nejčastěji využívané fluorochromy patří fluoresceinizothiokyanát (FITC), phycoerythrin (PE), phycoerythrin- Cyanin 5 (PE- CY5), peridinin- chlorophyl- protein complex (PerCP), Alexa fluor 488. Dále se často využívá propidium jodid, ethidium bromid, které se neselektivně vážou na dvoušroubovici nukleových kyselin, 4',6- diamidin-2-fenylindol (DAPI), Hoechst 33258, které se vážou na úseky DNA bohaté na A-T báze a dále antibiotikum chromomycin a mitramycin, ty se vážou na oblasti DNA s větším zastoupením G-C bazí (Shapiro, 2005).

Tabulka 1: Příklady používaných fluorochromů v průtokové cytometrii

Fluorochrom	Excitační vlnová délka (nm)	Emisní vlnová délka (nm)
FITC	488	530
Alexa fluor 488	495	519
PE- CY5	488	670
APC	630	661
PerCP	488	675
Propidium jodid	540	615
Ethidium jodid	530	605
DAPI	365	450
Hoechst 33258	365	465
Chromomycin	445	570
Mitramycin	445	575

(Zdroj vlastní).

2.9 Využití průtokové cytometrie

Průtoková cytometrie má uplatnění v mnoha různých oborech, ať už v biologii (molekulární biologie, zoologie, botanika aj.) tak v medicíně, kde nachází uplatnění v klinické diagnostice a to především v oborech hematologie, imunologie a onkologie. Nabízí široké množství uplatnění, jak na úrovni základní analýzy, tak na výzkumných činnostech. Pomocí průtokové cytometrie lze stanovit obsah jaderné DNA, zjišťovat

počet buněk a jejich buněčný cyklus, třídít buňky, měřit ploidií, detekovat specifické geny, měřit hromadění sekundárních metabolitů v buňce či sledovat buněčné struktury (Suda, 2005). V medicíně se hlavně využívá při diagnostice hematologických onemocnění, diagnostice patogenů v těle, a charakteristice krevních malignit (lymfomů a leukémií). Dále je nezbytný k detekci membránových, cytoplazmatických a jaderných antigenů nádorových buněk, k imunofenotypizaci, diagnostice vrozených defektů či monitorování HIV pozitivních pacientů (Marinov, 2003). Další využití průtokové cytometrie je v potravinářském průmyslu, při stanovení účinnosti konzervace potravin, kontrole životnosti kvasinek, stanovení toxicity chemických látek a posuzování antibakteriálních účinků (Diáz et al., 2010).

2.10 Aplikace v klinické praxi

Průtoková cytometrie se často používá k charakterizaci onemocnění v klinických podmínkách. Periferní krev, aspirát kostní dřeně a mozkomíšní mok patří mezi vzorky, které mohou být analyzovány pomocí průtokové cytometrie. Je důležité zmínit, že analyzovat lze pouze životaschopné buňky. Pokud vzorek neobsahuje životaschopné buňky, použití průtokové cytometrie není vhodné (Betters, 2015). Nejčastěji se průtoková cytometrie využívá pro indikaci benigních i maligních hematologických procesů. Může pomoci v několika klinických oblastech, včetně diagnózy, léčebných plánů a sledování reziduálního onemocnění či jeho relapse (Wood et al., 2007; Craig, 2008). Měření obsahu DNA bylo jedním z prvních použití cytometrie. V maligních buňkách bylo zaznamenáno 67% zvýšení obsahu DNA ve srovnání s buňkami nemaligními (Barlogie et al., 1983). Normální, zdravé buňky jsou diploidní (mají dvě kompletní sady chromozomů), zatímco maligní buňky mají nejčastěji abnormality v chromozomech, které lze kvantifikovat průtokovou cytometrií (Betters, 2015). Imunofenotypizace, metoda k určení přítomnosti klonu maligních buněk hematopoetického původu, jejich liniové příslušnosti a případně stupně diferenciace. Toto vyšetření je zaměřené především na hematologická onemocnění typu akutní a chronické leukémie, lymfoproliferace, myelodysplastického syndromu aj., v některých případech též k detekci minimální reziduální choroby u pacientů po chemoterapii či po transplantaci (Ústav klinické imunologie a alergologie, FN HK, 2019). Několik výzkumných projektů využilo průtokovou cytometrii ke zlepšení klinického porozumění a zhodnocení fyziologických účinků ošetrovatelských intervencí. Byl použit ke zhodnocení imunitní funkce geriatrických pacientů, kteří dostávali výživové doplňky před a po očkování proti chřipce (Langkamp-Henken et al., 2006).

Průtoková cytometrie byla také využita při prozkoumání imunitního stavu žen v průběhu těhotenství a po porodu (Gennaro et al., 1997).

2.11 Aplikace v rostlinné biologii

Nejčastější aplikací průtokové cytometrie v botanických studiích bývá pro odhad úrovně ploidie, stanovení velikosti genomu, detekce režimu reprodukce, sledování mikroorganismů při raných infekcích či při analýze a odlišení příbuzných druhů rostlin. Cytometrie může být použita jak při analýze jader a chromozomů, tak i při analýze buněčných organel, například protoplastů. Konkrétně u protoplastů je možné zkoumat obsah chlorofylu, velikost organely, obsah alkaloidů a celkově obsah proteinů a nukleových kyselin (DNA, RNA). Při analýze jader lze určovat celkový obsah nukleových kyselin a proteinů, dále poměr dusíkatých bází (AT-GC), délku buněčného cyklu a určení v jaké fázi buněčného cyklu se jádro nachází (Doležel et al, 2007).

3 Rod *Xanthomonas*

3.1 Taxonomické zařazení

Doména: *Bacteria*

Oddělení: *Proteobacterie*

Třída: *Gammaproteobacteria*

Podtřída: *Xanthomonadales*

Čeleď: *Xanthomonadaceae*

Rod *Xanthomonas* byl předmětem četných taxonomických a fylogenetických studií a poprvé byl popsán jako *Bacterium vesicatorium* působící jako patogen na paprikách a rajčatech v roce 1921 (Doidge, 1921). Dowson později překlasifikoval bakterii jako *Xanthomonas campestris* a navrhl rod *Xanthomonas* (Dowson, 1939). Doposud bylo rozlišeno osm druhů a více než 125 pathovarů patřící druhu *X. campestris*. Taxonomie *Xanthomonas* je založena na klasifikaci fytopatogenů a je stále intenzivně studována (Stead, 1989; Vauterin et al., 1990). Nové bakterie a bakteriální asociace jsou však rutinně objevovány. Kromě rostlinných patogenů se rozšiřuje skupina saprofytických a epifytických bakterií *Xanthomonas*. Klasifikace těchto izolátů se ukázala jako obtížná (Maes, 1993).

Xanthomonas se vyskytují po celém světě, většina z nich se nachází v tropických a subtropických oblastech. Způsobují nekrózu, cévní a parenchymatické nemoci na listech, stoncích a také na plodech. Řada rostlin napadených tímto fytopatogenem jsou ekonomicky významné, například rýže, fazole, maniok, bavlna, rajčata a také citrusy. (Mooter, 1990).

3.2 Charakteristika

Druhy *Xanthomonas* jsou gram-negativní, aerobní, tyčinkovité bakterie, které jsou známé jako běžný rostlinný patogen. Tato bakterie má na svém povrchu bičík, který ji pomáhá pohybovat se v infikované rostlině (Microbial Biorealm, 2002). Kolonie druhů *Xanthomonas* jsou obvykle mukoidní, konvexní a žluté. Většinou rostou na médiu s příměsí sacharózy a peptonu, lze také použít kvasničné dextrózové médium s příměsí

uhličitanu vápenatého. Všichni členové rodu *Xanthomonas* jsou katalázově pozitivní a oxidázově negativní (Ridge, 2014).

Genom bakterie se skládá z kruhového chromozomu asi pěti megabází. Druhy *Xanthomonas* produkují exopolysacharid zvaný xanthanová guma, která má širokou škálu průmyslových použití, včetně potravin, ropných produktů a kosmetiky (Ridge, 2014).

3.3 *Xanthomonas euvesicatoria*

Xanthomonas euvesicatoria Jones et al., 2005 (synonymum *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doige, 1921)) způsobuje bakteriální skvrnitost na paprikách a rajčatech (Sherf, 1986). V České republice a v Evropě se řadí mezi karanténní organismy (Kůdela et al., 2002). Hlavními hostiteli *Xanthomonas euvesicatoria* (Jones et al., 2005) jsou tedy rajče (*Lycopersicon* spp.) a paprika (*Capsicum* spp.).

Bakteriální skvrnitost rajčete (*Lycopersicon* spp.) byla poprvé hlášena v Jižní Africe a USA (Doige, 1921; Gardner, 1921) a byla poprvé popsána u paprik (*Capsicum* spp.) na Floridě (Gardner, 1923). Tato choroba byla od té doby pozorována v oblastech všech kontinentů, kde se pěstuje rajče (*Lycopersicon* spp.) a paprika (*Capsicum* spp.)

3.4 Rozšíření

Bakteriální skvrnitost je hlavním problémem v tropických a subtropických oblastech, ale má široké geografické rozšíření (Jones et al., 1986; Sahin, 1996).

Evropa: častý výskyt v Řecku, Maďarsku, Itálii, Rumunsku, Rusku. Výskyt byl zaznamenán i v Rakousku, Bělorusku, České republice, Slovinsku, Španělsku.

Asie: Čína, Indie, Izrael, Japonsko, Severní a Jižní Korea, Pákistán, Filipíny, Tchaj-wan, Thajsko, Turecko.

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

Severní Amerika: Bermudy, Kanada, Mexiko, USA.

Střední a Jižní Amerika: Barbados, Kostarika, Kuba, Dominikánská republika, Salvador, Guatemala, Honduras, Nikaragua, Portoriko, Jamajka a další přilehlé ostrovy, Chile, Kolumbie, Brazílie, Venezuela.

Austrálie a Oceánie: všechny oblasti Austrálie, Nový Zéland, Fidži, Mikronésie, Palau a Tonga (Bonkowski et al., 2015).

3.5 Morfologie

Buňky mají tvar tyčinek s oblým zakončením a jejich délka je cca od 0,7 μm do 2,0 μm a šířka od 0,4 μm do 0,7 μm . Jejich pohyb je umožněn jedním bičíkem. *Xanthomonas* jsou katalázově pozitivní, neredukují dusičnany a ze sacharidů slabě produkují kyseliny (Bonkowski, 2015).

Xanthomonas jsou gram-negativní bakterie, které jsou obligátně aerobní a netvoří spory. Na masopeptonovém agaru (MPA) s glukosou vytváří žluté, mukoidní kolonie. Žluté zbarvení je způsobeno žlutými pigmenty zvanými xanthomonadiny a exopolysacharidem xanthanem (Kúdela et al., 2002).

Optimální teplota pro růst je 25 až 28 °C a pH 7,2 (Schaad, 1989; Swings, 1993; Kúdela et al., 2002).

3.6 Klasifikace

V současné době jsou *Xanthomonas*, které jsou patogenní pro rajče a papriku rozděleny do čtyř skupin. Rozlišení těchto skupin probíhala na základě amylolytických a pektolytických aktivit v pulzní gelové elektroforéze. Přesnější a podrobnější molekulárně-biologické metody umožnily klasifikaci do samostatných skupin: A (*Xanthomonas euvesicatoria*), B (*Xanthomonas vesicatoria*), C (*Xanthomonas perforans*) a D (*Xanthomonas gardeneri*) (Jones et al., 2004). *Xanthomonas* skupiny A a B se vyskytují po celém světě a jsou patogenní pro rajčata a papriky, proto se uvádějí jako nejznámější skupiny těchto patogenů. První zmínky o objevu skupiny C jsou z USA, Mexika a z pobřeží Tichého oceánu, zde byl patogen zaznamenán pouze na rajčatech, protože skupina C není patogenní pro papriky. Poslední skupina *Xanthomonas* a to skupina D, která byla detekována na rajčatech i paprikách v Kostarice, Kanadě, Brazílii, zemích bývalé Jugoslávie a také v oblastech Tichého oceánu (Jones et al., 2005).

Pro vysokou podobnost (nad 99 %) u MLST (Multilocus Sequence Typing) navrhli Young a kol. (2008) sloučit *Xanthomonas euvesicatoria* a *Xanthomonas perforans* v jednu skupinu. Další poddruhy *Xanthomonas fuscans*, *Xanthomonas citri* a *Xanthomonas axonopodis* také potvrzují vysokou shodu a měly by být přiřazeny do stejné skupiny jako *Xanthomonas perforans* a *Xanthomonas euvesicatoria*. Tato jednotná a velká skupina by se měla nazývat *Xanthomonas axonopodis* (Young et al., 2008).

3.7 *Xanthomonas euvesicatoria* jako fytopatogen

Hlavními symptomy onemocnění paprik a rajčat jsou vodnaté léze, nekrózy a chlorózy, které lze spatřit hlavně na listech, stoncích a plodech. U rajčat jsou to malé, kruhové léze o velikosti 1-5 mm. U paprik se tyto malé, kruhové léze objevují spíše na stoncích a plodech, na listech se objevují nekrotické léze různého tvaru a velikosti. U paprik a rajčat se v listech vyvíjí chloróza, která předchází epinastii listů. Následuje opad listů u paprik a celková nekróza mladých lístků rajčat (Swings, 1993).

Tento patogen vstupuje do rostlin skrze průduchy nebo oděrkami způsobenými hmyzím vpichem, mechanickými vlivy či oděrkami způsobenými větrem (Jones, 1991). Patogeny, které způsobují bakteriální skvrnitost rajčat a paprik nejlépe přežívají na semenech, rostlinných zbytcích a v rhizosféře (část půdy prorostlá kořeny jedné rostliny) jiných nehostitelských rostlin (Bashan et al., 1982 a). Patogen, který se dostane z infikovaných rostlin na osivo zde může přežít až 10 let (Bashan et al., 1982 b). Když má patogen příznivé podmínky může epifytně přežít na povrchu listů. Podle McInnes et al. (1988) je možnost přenosu patogenů i vzduchem, jelikož byl detekován ve formě aerosolů nad polem s hostitelskými rostlinami.

Vysoké teploty mezi 30 až 35 °C s velkým množstvím deště a vysokou relativní vlhkostí přispívají k rozvoji onemocnění (Bonkowski, 2015). V suchých obdobích je šíření patogenu omezeno. Ale vždy je doporučeno dodržovat hygienické zásady, používat certifikované osivo, případně přípravky s obsahem mědi (Dougherty, 1979) jelikož *Xanthomonas euvesicatoria* patří podle legislativy ČR a EU mezi karanténní organismy (EPPO/CABI, 1997).

Xanthomonas euvesicatoria je závažným onemocněním rajčat a paprik v tropických a subtropických oblastech, jelikož způsobuje značné ekonomické ztráty. Plody, které jsou

napadeny tímto patogenem již nejsou prodejné. V České republice způsobuje největší škody v oblasti Jižní Moravy (Dougherty, 1979; Bashan et al., 1985).

4 Materiál a metodika

4.1 Použitý kmen bakterie

Byl použit kmen *Xanthomonas euvesicatoria* (označení: BCCM/LMG 933) získaný z Belgické sbírky mikroorganismů (Belgian Co-ordinated collection of microorganisms).

4.2 Kultivace vzorků

Použitý kmen *Xanthomonas euvesicatoria* byl kultivován a uchováván v tekutém kultivačním médiu (C-médiu (Dreier et al., 1995) pro koryneformní bakterie) v Erlenmeyerových baňkách o objemu 150 ml.

Média byla připravena dle (Dreier a kol., 1995) pro koryneformní bakterie, jen poměr látek byl přepočten na objem 150 ml. K přípravě C-média o objemu 150 ml bylo tedy použito:

- | | |
|---------------------------|--------|
| • Trypton (pepton sojový) | 1,50 g |
| • Kvasničný autolyzát | 0,75 g |
| • Glukosa | 0,75 g |
| • NaCl | 0,75 g |

Tato směs byla následně rozpuštěna v destilované vodě a kvantitativně doplněna na objem 150 ml. Hodnota pH roztoku byla upravena na 7,2 postupným přidáváním roztoku NaOH. C-médium bylo autoklávováno při 121 °C po dobu 15 min. Použitím autoklávu došlo ke sterilizaci média.

Kultivace probíhala ve vysterilizovaných Erlenmeyerových baňkách o objemu 150 ml, které obsahovaly přibližně 50 ml C-média. Pro nárůst kultury *Xanthomonas euvesicatoria* byly bakteriální buňky ze sbírky přeneseny do C-média pomocí jednorázové bakteriologické kličky, očkování probíhalo ve flow boxu (odtahový box). Následně byly C-média s naočkovanou bakteriální kulturou umístěny na třepačku s frekvencí třepání 250 rpm, při 28 °C, což je optimální teplota pro jejich kultivaci. Kultivace probíhala po dobu 48 hodin, následně byly vzorky uchovávány v chladničce o teplotě 4°C. Před další analýzou bylo přeneseno 700 µl předešlé kultury do nových Erlenmeyerových baňek o objemu 150 ml, dodrženy byly totožné kultivační podmínky.

4.3 Ošetření vzorků vysokou teplotou

Byla připravena sada vzorků, každý vzorek obsahoval 50 μ l bakteriální suspenze, včetně pozitivní kontroly. Byla připravena i negativní kontrola, která obsahovala 500 μ l OTTO I pufru, tento vzorek nebyl ošetřen vysokou teplotou. Ostatní vzorky, kromě zmíněné negativní a pozitivní kontroly byly ošetřeny teplotou 90 °C na termobloku s frekvencí třepání 200 rpm. Tato teplota byla neoptimálnější pro ošetření bakterií a následnou analýzu průtokovým cytometrem (Kolářová, 2018). Ošetření probíhala v daných časových intervalech (viz. tabulka). Časové intervaly byly zvoleny tak, aby byly rovnoměrně zastoupeny počty živých a mrtvých buněk.

Tabulka 2: Číslo vzorku a doba ošetření.

Číslo vzorku	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
Čas (min.)	1	3	5	8	10	15	20	25	30

(Zdroj vlastní).

4.4 Příprava vzorků pro vlastní analýzu

Pro správný průběh samotné analýzy byla ošetřená bakteriální suspenze zředěna 500 μ l OTTO I pufru.

K přípravě OTTO I pufru bylo použito:

- 0,1 M monohydrát kyseliny citronové 4,2 g
- 0,5 % (v/v) Tween 20 1 ml
- Destilovaná voda 200 ml

Jak už bylo zmíněno, negativní kontrola obsahovala 500 μ l OTTO I pufru a byla barvena 350 μ l barvicího roztoku propidium jodid. Ke vzorku pozitivní kontroly s 50 μ l bakteriální suspenze bylo přidáno 500 μ l OTTO I pufru a též byla barvena 350 μ l propidium jodid barvicího roztoku. Ke každé sadě vzorku byly kontroly připravovány zvlášť.

Jako fluorescenční barvivo pro tuto analýzu byl použit propidium jodid (PI). Toto barvivo se váže neselektivně na dvoušroubovici nukleových kyselin. Aby se tímto barvivem obarvily pouze dvouvláknové DNA, byla do barvicího roztoku přidána RNasa A.

Pro přípravu barvicího roztoku propidium jodid bylo použito:

- OTTO II pufru 20 ml
- Zásobní roztok PI (1 mg/ ml) 1 ml
- Zásobní roztok RNasy A (1 mg/ml) 1 ml
- β -merkaptoethanol 40 μ l

Příprava tohoto roztoku probíhala ve flow boxu, kvůli zápachu thiolových sloučenin v β – merkaptoethanolu.

Pro přípravu OTTO II pufru bylo použito:

- 0,4 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 28,65 g

Toto množství bylo kvantitativně rozpuštěno v destilované vodě tak, aby objem roztoku byl 200 ml.

K jednotlivým vzorkům a kontrolám bylo 1-2 minuty před samotnou analýzou napipetováno 350 μ l barvicího roztoku propidium jodid.

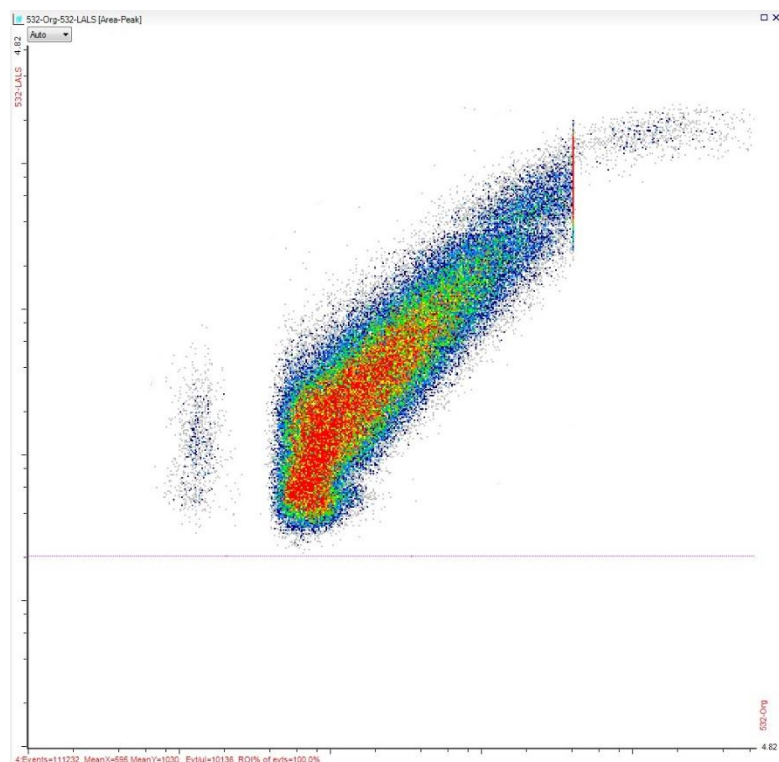
4.5 Příprava průtokového cytometru a vlastní analýza

Pro analýzu byl použit průtokový cytometr Apogee A60 Universal. Před samotnou analýzou bylo potřeba doplnit unášecí kapalinu (destilovanou vodu) a vylít odpad. Průtokový cytometr byl nastaven takto: průtok unášecí kapaliny byl nastaven na 4,51 μ l/min a vlnová délka excitačního světla byla 532 nm (pro FSC = LALS= Large Angle Light Scatter i SSC= SALS= Small Angle Light Scatter). Jako standard pro standardizaci analýz byl použit software Bellis perennis. Cytogramy u jednotlivých vzorků byly ukládány a analyzovány v tomtéž programu pomocí příkazu: Population detection menu. Tímto příkazem byly získány výsledky analýzy a procentuální zastoupení živých buněk s nenarušenou membránou, kterými propidium jodid nemohl prostoupit a obarvit jádra a buněk mrtvých, které membránu narušenou měly a propidium jodid obarvil jejich jádra.

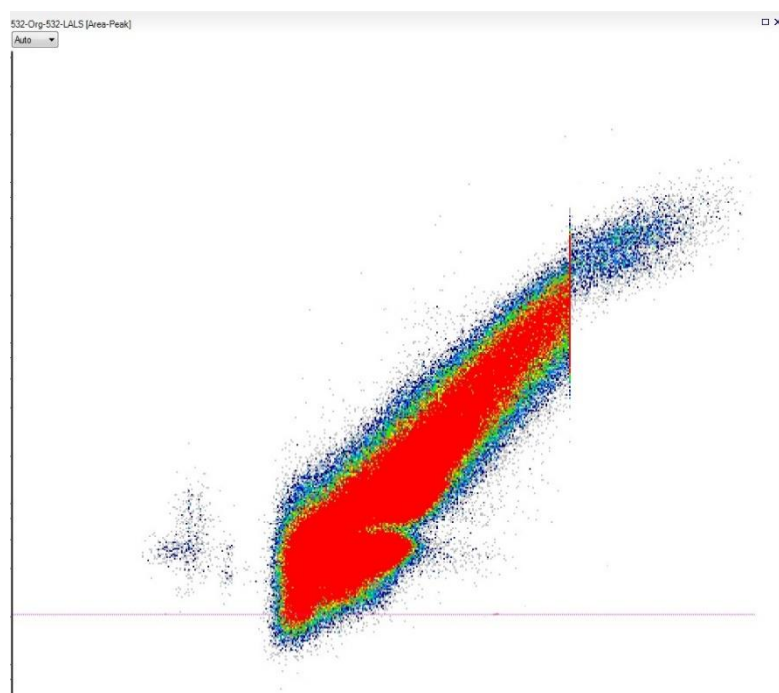
5 Výsledky

Všechny vzorky byly ošetřeny teplotou 90 °C v časových intervalech 1, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30 minut a byly hodnoceny výsledky flowcytometrické analýzy – procentuální počet živých a mrtvých buněk v jednotlivých populacích. Procentuální zastoupení živých a mrtvých buněk a jejich absolutní počty byly stanoveny v programu Apogee Histogram Software. Tato data byla zpracována v programu Microsoft Excel jako bodové grafy.

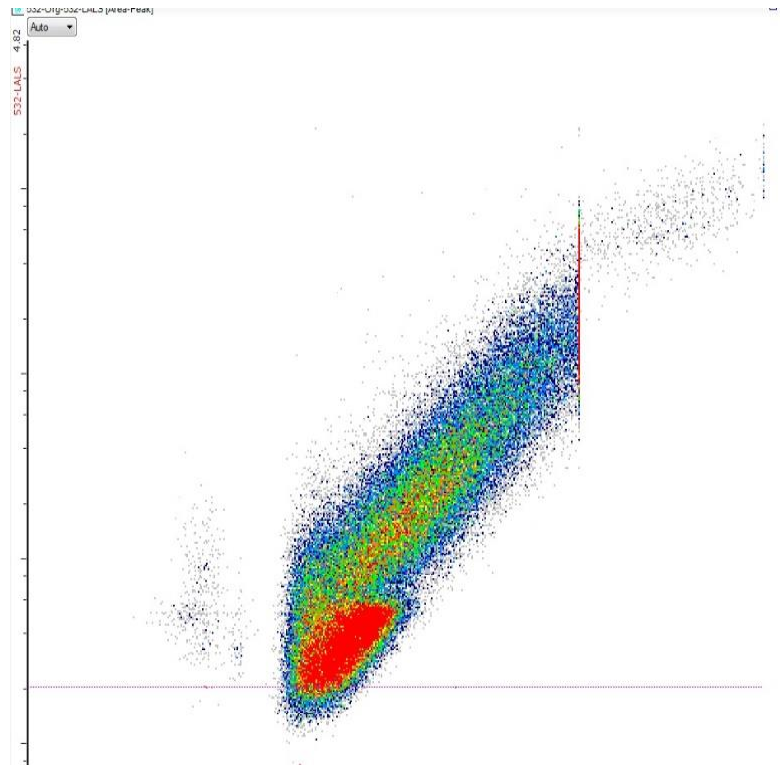
Výsledky vybraných vzorků jsou zobrazeny na Obr. 5, 6, 7, 8, 9, 10, je viditelné, že s prodlužujícím se časem ošetření počet přeživších klesá, jelikož vzrůstá rozptyl částic zobrazených v cytogramu. Měření probíhala dvakrát, pro každé měření byla zhotovena nová šarže vzorků. Každá šarže vzorků má také vlastní negativní a pozitivní kontrolu Obr. 11, 12, 13, 14. Negativní kontrola, která obsahovala pouze pufr OTTO I sloužila k ověření čistoty pufru a správnosti výsledků. Pozitivní kontrola, která obsahovala pouze bakteriální suspenzi (50 µl) neošetřenou teplem dávala představu o absolutním počtu (živých) buněk v 50 µl zmíněné suspenze a sloužila k ověření správnosti výsledků.



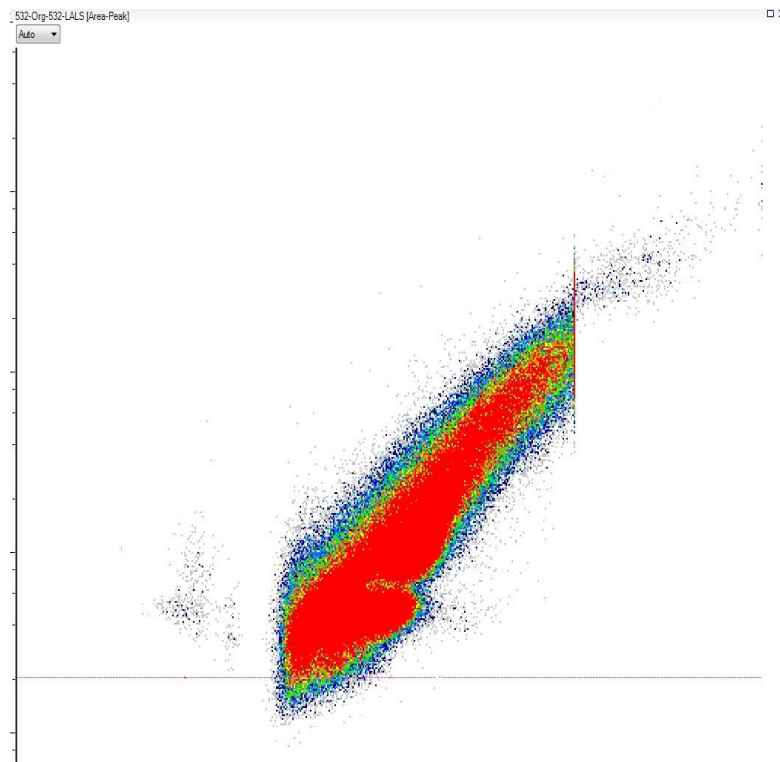
Obr.5 Cytogram zobrazující vzorek první šarže bakteriální kultury, ošetřený 90 °C, 1 min.



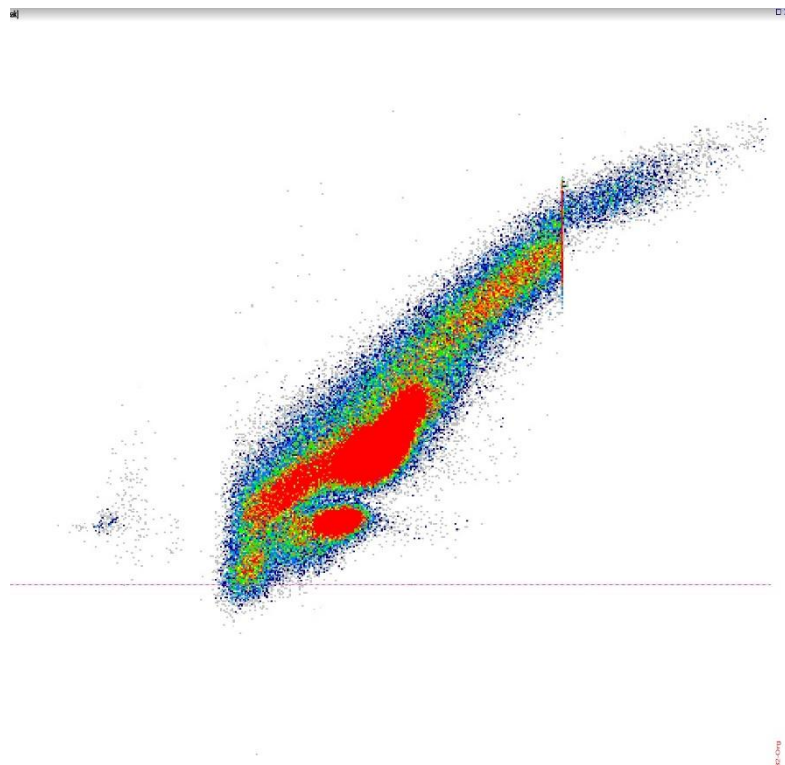
Obr.6 Cytogram zobrazující vzorek druhé šarže bakteriální kultury, ošetřený 90 °C, 1 min.



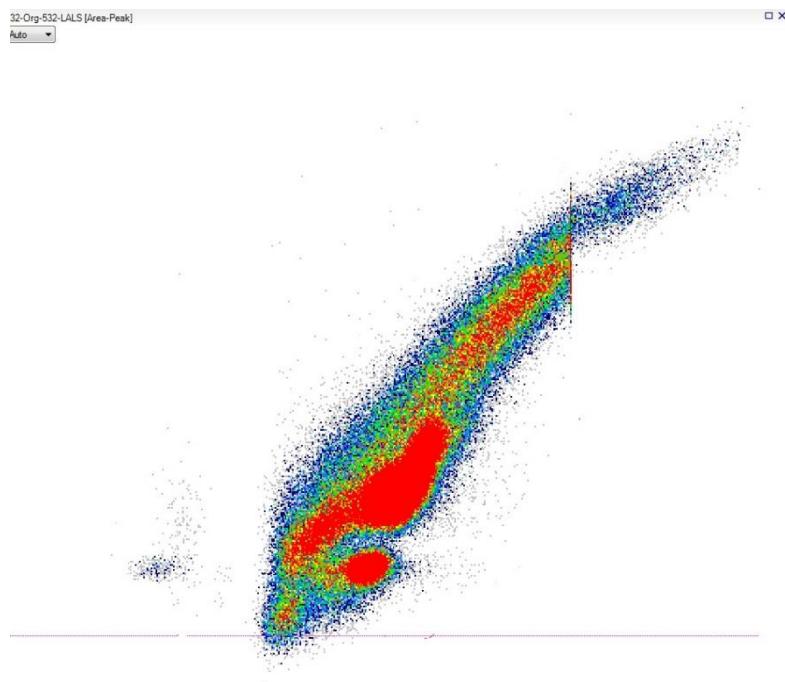
Obr.7 Cytogram zobrazující vzorek první šarže bakteriální kultury, ošetřený 90 °C, 8 min.



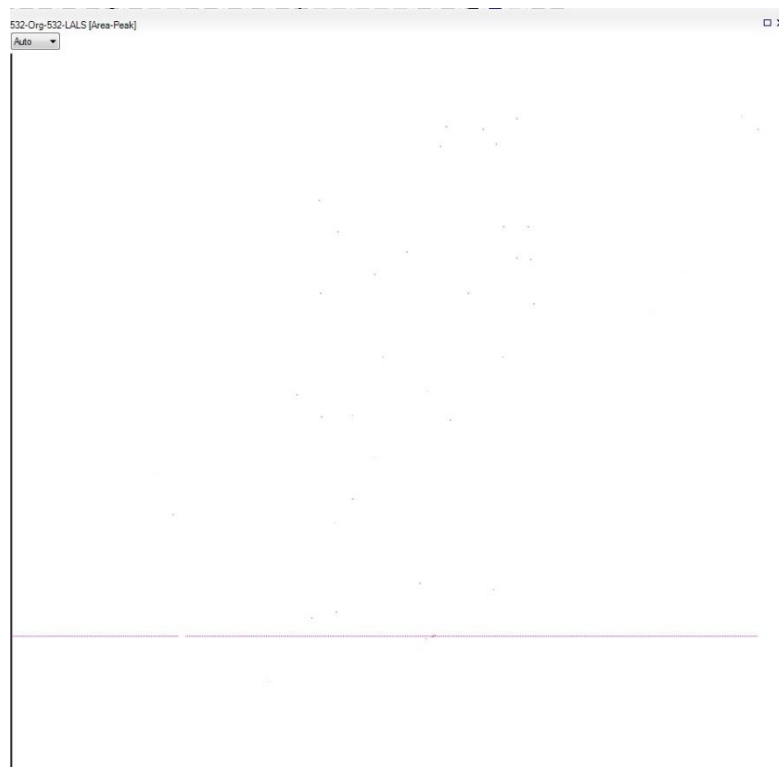
Obr.8 Cytogram zobrazující vzorek druhé šarže bakteriální kultury, ošetřený 90 °C, 8 min.



Obr.9 Cytogram zobrazující vzorek první šarže bakteriální kultury, ošetřený 90 °C, 30 min.



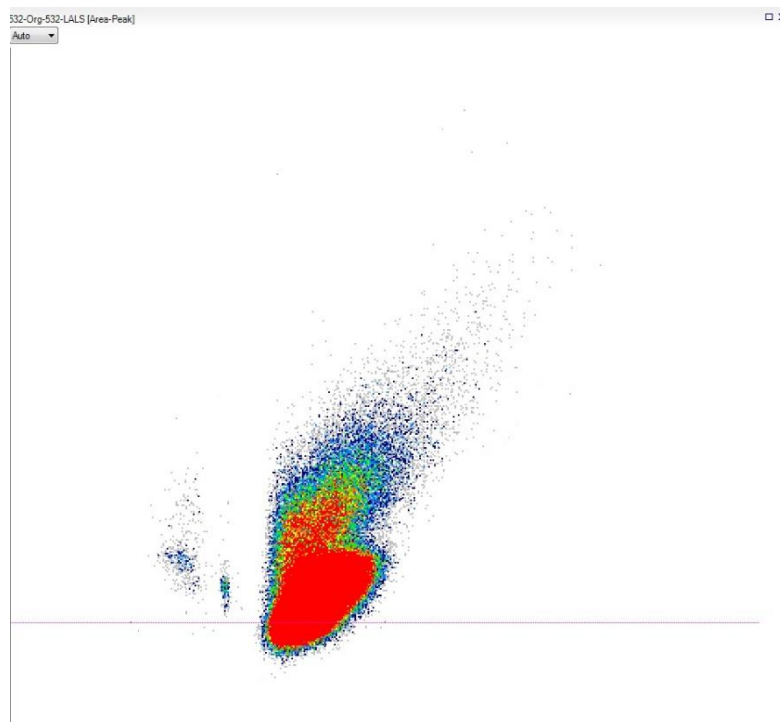
Obr.10 Cytogram zobrazující vzorek první šarže bakteriální kultury, ošetřený 90 °C, 30 min.



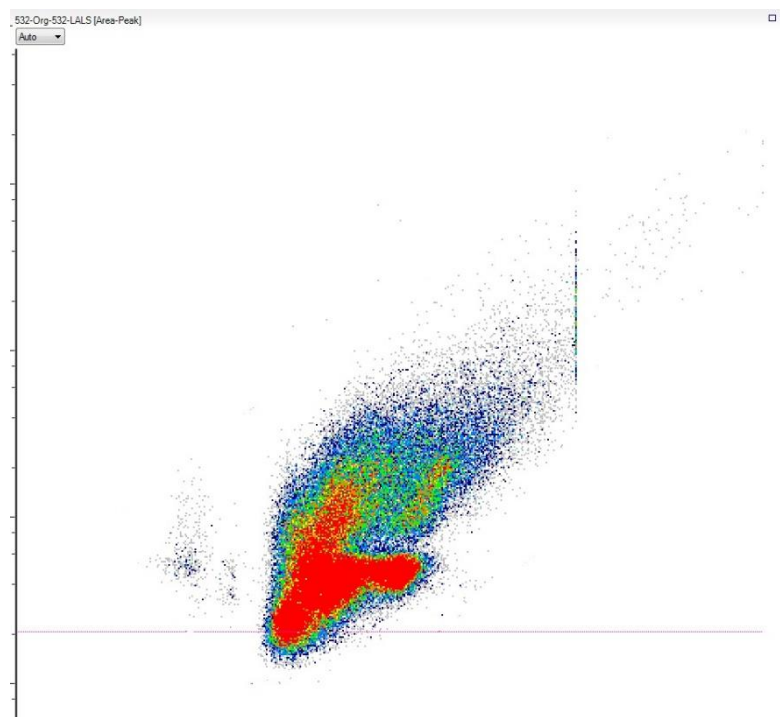
Obr.11 Cytogram zobrazující negativní kontrolu první šarže vzorků.



Obr.12 Cytogram zobrazující negativní kontrolu u druhé šarže vzorků.

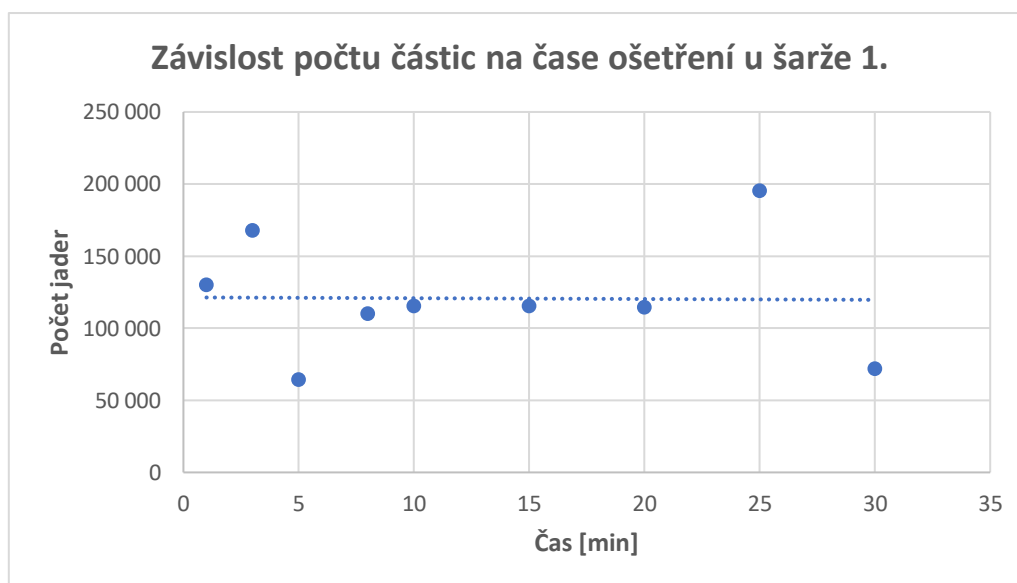


Obr.13 Cytogram zobrazující pozitivní kontrolu u první šarže vzorků.



Obr.14 Cytogram zobrazující pozitivní kontrolu u druhé šarže vzorků.

Jelikož výsledky analýzy v podobě cytogramů nemusí být zcela přehledné pro porovnání závislosti času ošetření na celkovém počtu buněk, jsou tyto výsledky doplněny o grafické znázornění (viz Obr. 15). Do grafického znázornění nejsou zahrnuty negativní a pozitivní kontroly. U negativní kontroly se čistota pracovního pufru OTTO I a správnost měření potvrdila již vizuálně v cytogramu. Totéž platí u pozitivní kontroly, kde uspořádání buněk zcela vypovídá o nenarušení populace buněk (suspenze nebyla ošetřena vysokou teplotou).

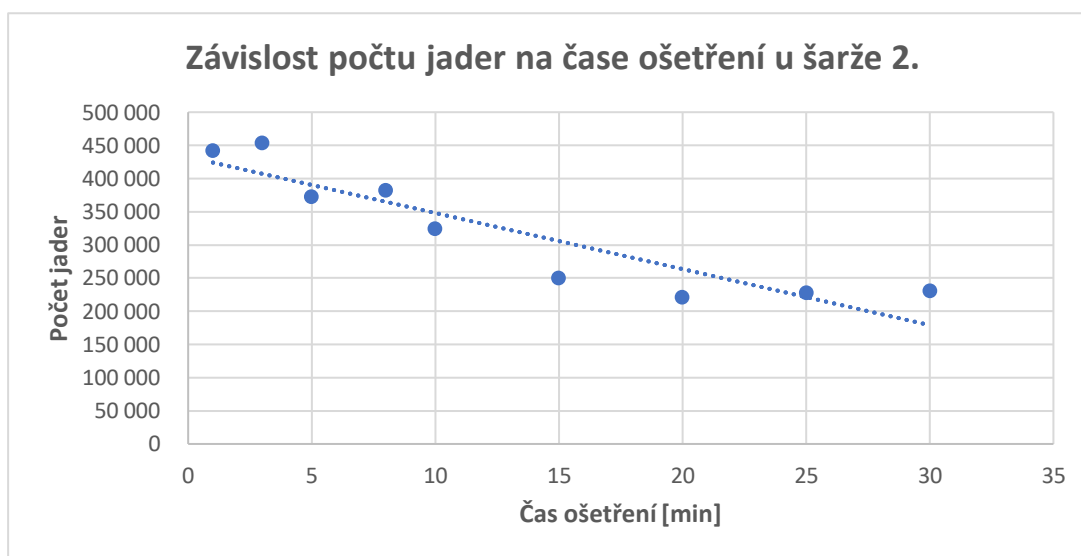


Obr. 15 Graf zobrazující závislost počtu částic na době ošetření první šarže vzorků proložený lineární spojnicí trendů.

Výsledky jsem doplnila o koeficient spolehlivosti. V případě šarže 1 vyšel 0,0002, po převedení na procenta je spolehlivost 0,02 %. Tato hodnota je velice nízká a proto bude slabá závislost mezi proměnnými daty. Sklon regresní přímky je -56,6, jelikož je tato hodnota záporná indikuje nepřímou úměru mezi proměnnými daty. A veličiny na ose x, y se vyvíjejí protisměrně, proto bude přímka klesající.

Bohužel výsledky této šarže vzorků nejsou zcela zdařilé. I přes dodržení pracovního postupu a správného nastavení parametrů v průtokového cytometru, jsou hodnoty jednotlivých vzorků rozptýlené. Rozptyl hodnot může být způsoben nemožností dodržet naprosto identické koncentrace bakteriálních buněk ve všech analyzovaných vzorcích, dalším důvodem může být odlišná barvitelnost jednotlivých částic ve vzorku. Velkou roli při vzniku rozptýlených hodnot může mít i lidský faktor. Rozptýlení hodnot může být způsobeno například nepřesným pipetováním v prvotní fázi přípravy vzorků, dále

nezachováním přesného času barvení interkalačním barvivem propidium jodid. Dalším důvodem vzniku těchto nepřesností by mohly být vzniklé technické problémy při samotné analýze průtokovým cytometrem, ten nebyl pravidelně používán k analýze, proto jeho nastartování a příprava byla komplikovanější. V průběhu analýzy také došlo k ucpání jehly, která nasává vzorek, analýza proto musela být pozastavena a problém vyřešen. Největší chybu bych ovšem přisoudila tomu, že jsem flowcytometrickou analýzu prováděla poprvé a je zde viditelná neobratnost v analytickém měření. Proto jsem tuto analýzu provedla ještě jednou a snažila se vyvarovat podobným chybám.



Obr. 16 Graf zobrazující závislost počtu jader na době ošetření u druhé šarže vzorků proložen lineární spojnici trendů.

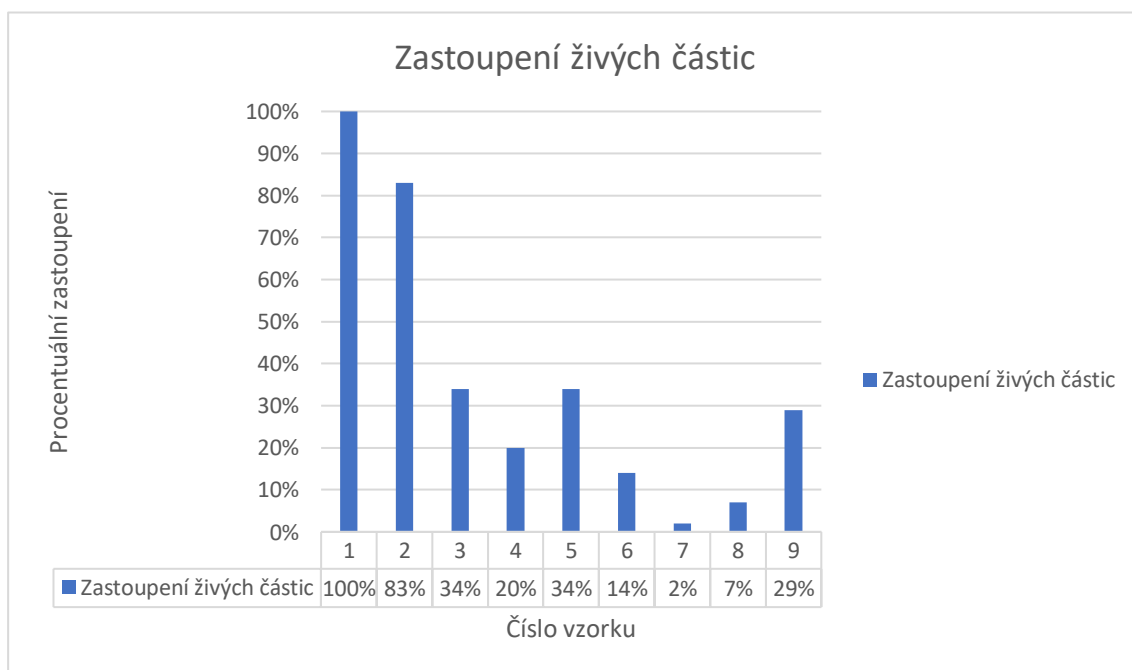
Podle vynesných hodnot v bodovém grafu, je zřejmé, že předpoklad o klesajícím počtu částic v závislosti na době ošetření je viditelnější u druhé šarže vzorků, tedy v Obr. 16. Zde je viditelná tendence klesajícího počtu částic v závislosti na době ošetření bakteriálních kultur, tento předpoklad je potvrzen sklonem regresivní přímky. Sklon je $-8451,2$, opět je hodnota záporná a vztah proměnných dat je nepřímá úměra. Hodnoty na ose x, y jsou proměnné a přímka je klesající. Jsou patrné velké rozdíly mezi sklonem u první šarže vzorků a u druhé šarže, to je způsobeno tím, že úhel, který svírá přímka s osou x je podstatně větší (počty buněk v průběhu času tedy klesají). Každá šarže má přímku (spojnici trendů) naprosto odlišnou a tím i odlišný úhel s osou x, proto jsou hodnoty sklonu u obou šarží tak rozdílné.

V programu Excel byla vypočtena spolehlivost trendů, což je matematická předpověď pro budoucí vývoj na základě vývoje minulého. V tomto případě je koeficient

spolehlivosti 0,8401, což je velmi dobrý výsledek, který ukazuje na silnou závislost mezi proměnnými daty. Obecně se dá říct, že čím více se koeficient blíží k hodnotě 1, tím je výsledek spolehlivější. Koeficient spolehlivosti je 84 %.

5.1 Procentuální zastoupení živých a mrtvých buněk v bakteriální populaci

Jako jeden z cílů mé bakalářské práce je porovnat procentuální zastoupení životaschopných buněk v bakteriální populaci. Pro toto porovnání jsem použila výsledky z druhé šarže vzorků. Po prvním ošetření teplotou a to po dobu 1 minuty se populace živých buněk nemění, u druhé šarže vzorků vyšlo, že je zachováno 100 % živé populace. U ošetření po dobu 3 minut už procento přeživších buněk pomalu začíná klesat, ale jako zlomový čas bych vyzdvihla 5 minut, kdy se počet živých buněk v populaci dostává pod polovinu, konkrétně na hodnotu 34 %. Další velký pokles životaschopných buněk je pozorovatelný u vzorku č. 6, který byl vystaven teplotě 90 °C po dobu 15 minut. Počet životaschopných buněk v tomto vzorku klesl na 14 %. Dále procento životaschopných buněk lineárně klesá. Nejnižší procentuální zastoupení životaschopných buněk by mělo být ve vzorku č. 9, který byl ošetřen po dobu 30 minut. Tento předpoklad se nenaplnil a počet životaschopných buněk narostl na 29 %, to mohlo být způsobeno odlišnou barvitelností jednotlivých částic ve vzorku. Procentuální zastoupení životaschopných buněk v jednotlivých vzorcích druhé šarže je vyneseno v Obr. 17.



Obr. 17 Graf procentuálního zastoupení živých buněk v bakteriální populaci. Druhá šarže vzorků.

6 Diskuze

Přesné stanovení živých, mrtvých a celkový počet bakterií je důležité v mnoha případech mikrobiologické aplikace. Životaschopnost bakterií je synonymem schopnosti tvořit kolonie na pevném růstovém médiu a proliferovat v tekutých, živných médiích. Tyto klasické plotnové metody jsou časově náročné a celkově nemají dostatečně vypovídající hodnotu. Neposkytují výsledky v reálném čase nebo včasné informace, které jsou potřebné v aplikacích například u průmyslové výroby. Problematické je taktéž její využití u těžko kultivovatelných bakterií, které za daných podmínek či v určitém fyziologickém stavu na povrchu pevných médií nenarostou.

Jako vhodné řešení se jeví průtoková cytometrie, která je rychlou, citlivou, jednoduchou metodou pro stanovení životaschopných bakterií ve vzorku v reálném čase. Při průtokové cytometrii je sledována permeabilita cytoplazmatických membrán buňky a také obsah a kvalita její DNA. Ke stanovení viability buněk se používá značení fluorescenčními sondami a značkami. V této práci byl použit jako fluorescenční barvivo propidium jodid (PI), stejně jako v práci Shi a kol. (2007), kde byl PI použit pro detekci mrtvých buněk.

Dle práce Wei a Sommer (2009) není použití barviva propidium jodid či ethidium bromid příliš užitečné pro určování životaschopnosti bakteriálních buněk, ale hodí se spíše pro určování viability savčích buněk. Zároveň v jejich výzkumu byly bakterie rozděleny dle jejich specifických reakcí s fluorescenčními barvivy propidium jodid (PI), ethidium bromid (EB) a bis-oxonolem. Ukázalo se, že permeabilizované buňky jsou identifikovány pomocí barviva propidium jodid.

V této práci byly použity bakteriální buňky, které byly následně značeny propidium jodid, ale zdá se, že díky ošetření vysokou teplotou a tím způsobeným rozvlněním membrán, bylo fluorescenční barvivo propidium jodid zvoleno správně. I přes doporučení, že barvivo propidium jodid není užitečné pro určování životaschopnosti bakteriálních buněk dle Wei a Sommer (2009) se výsledky analýzy zdají být zdařilé.

V současné době se stávají populárními mezi výzkumníky komerčně dostupné reagenční sady, jako je například souprava LIVE/DEAD BacLight, která byla použita v práci Berney et al. (2007). Souprava se skládá ze dvou barviv, propidium jodidu (PI) a SYTO9, které obarví nukleové kyseliny. Zelená fluorescenční SYTO9 je schopna vstoupit do všech buněk a je použita pro stanovení celkového počtu buněk, zatímco červená

fluorescenční PI vstupuje pouze do buněk s poškozenou cytoplazmatickou membránou. Bylo také prokázáno, že barvení LIVE/DEAD funguje nejen s eukaryotickými bakteriemi, ale také s archaea a kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*). Tato reagenční souprava se zdá být jako ideální řešení pro detekci životaschopnosti bakterií, avšak má i své nedostatky. Jako hlavní nedostatek jsou zmiňovány mezilehlé stavy, kde nejsou ani „živé“ ani „mrtvé“ populace. To může vést k obtížím při interpretaci výsledků a může být kritické třeba u rozhodování o účinnosti metod desinfekce. Použití komerční soupravy LIVE/DEAD by mohlo být vhodné a zajímavé téma na další bakalářskou/ diplomovou práci.

Všechny vzorky použité pro analýzu byly ošetřeny teplotou 90°C. Ošetření vysokou teplotou bylo zvoleno pro její dostupnost, nízkou finanční náročnost, jednoduchost a relativní bezpečnost při práci. Ošetřit bakteriální kultury a usmrtit je, jde různými způsoby a je možné použít různé faktory či jejich kombinaci. Tamburini et al. (2014) použil ve své práci kombinaci teploty (22 °C a 35 °C) se zvýšenou koncentrací oxidu uhličitého, Song et al., (2019) použil kombinaci UV-LED různých vlnových délek k inaktivaci mikroorganismů ve vodě. Často se také používá vysokotlaký oxid uhličitý jako jedna z metod antibakteriálního ošetření, tento způsob využil VO et al. (2015) ve svém výzkumu.

Dle Doležel a kol., (2007) je důležité pro správný průběh flowcytometrické analýzy a získání odpovídajících výsledků dodržení stejné koncentrace analyzovaných částic v jednotlivých vzorcích. Také je zapotřebí dodržet naprosto identický postup při přípravě vzorků a musí být použity nedegradované a nekontaminované pracovní roztoky.

Výsledky flowcytometrické analýzy potvrdily, že procento přeživších buněk s prodlužující se dobou ošetření klesá.

7 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo detekovat viabilitu bakteriální populace *Xanthomonas euvesicatoria* pomocí metody průtokové cytometrie s využitím interkalačního barviva propidium jodid, dále tuto metodu optimalizovat a vyhodnotit zastoupení živých a mrtvých buněk v závislosti na době ošetření vysokou teplotou.

Postup pro přípravu analyzovaných vzorků byl optimalizován. Dále byla provedena analýza dvou šarží zhotovených vzorků vystavených teplotě 90° po dobu 1–30 minut. Výsledky analýz těchto dvou šarží vzorků byly porovnány a následně byl potvrzen předpoklad, že s prodlužující se dobou ošetření bude klesat procentuální zastoupení živých buněk v populaci. Průtoková cytometrie se zdá být jako dostatečně citlivá, průkazná a vhodná metoda pro detekci viability.

Téma detekce viability bakteriálních populací pomocí průtokové cytometrie je široké téma, které by mohlo být dále rozvíjeno a výsledky analýzy zdokonalovány. Vhodnou aplikací by mohlo být využití některého z mnoha nabízených komerčních souprav či odlišné faktory pro usmrcení bakterií (vysoký tlak, UV záření).

8 Seznam použitých literárních zdrojů

1. BARLOGIE B., RABER M. N., SCHUMANN J., et al., 1983, Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer research*. 43, 3982-3997.
2. BASHAN Y., 1982, Long-Term Survival of *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Tomato and Pepper Seeds. *Phytopathology*. 72(9), 1143-1144.
3. BASHAN Y., DIAB S., OKON Y., 1982, Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper seeds and roots in symptomless and dry leaves in non-host plants and in the soil. *Plant and Soil*. 68, 161-170.
4. BETTERS D. M., 2015, Use of Flow Cytometry in Clinical Practice. *Journal of the advanced practitioner in oncology*. 6, 435-440.
5. CRAIG F. E., a FOON K.A., 2008, Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 111(8), 3941-3967.
6. CROSLAND-TAYLOR P.J., 1953, A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube. *Nature*. 171, 37-38.
7. DÍAZ M., HERRERO M., GARCÍA L.A., QUIRÓS C., 2010, Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*. 48, 385-407.
8. DOIGE E.M., 1921, A tomato canker. *Annals of Applied Biology*. 7(4), 407-430.
9. DOLEŽEL J., 1997, Analýza a třídění chromozomů rostlin pomocí průtokové cytometrie. *Biologické listy*. 62(2), 131-136.
10. DOLEŽEL J., GREILHUBER J., SUDA J., 2007, Flow cytometry with plant cells. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 41-65.
11. DOUGHERTY D., 1979, Yield reduction in tomato caused by bacterial spot and disease control with copper sprays. *Florida State Horticultural Society*. 91, 291-293.

12. DOWSON W. J.,1939, On the systematic position and generic names of the gram negative bacterial plant pathogens. *Zentbl Bakteriolog.* 100, 177-193.
13. EPPO/CABI, 1997, Quarantine Pests for Europe. 2., Smith, I. M., McNamara, D. G., Scott, P. R., Holderness, M. CABI International. Wallingford, UK.
14. FULWYLER M.J.,1965, Electronic Separation of Biological Cells by Volume. *SCIENCE.* 150, 910-911.
15. GARDNER M.W., KENDRICK J.B., 1923, Bacterial spot of tomato and pepper. *Phytopathology.* 13, 307-315.
16. GARDNER M.W., KENDRICK J.B.,1921, Bacterial spot of tomato. *Journal of Agricultural Research.* 21, 123-156.
17. GENNARO S., FEHDER W., GALLAGHER P., MILLER S., DOUGLAS S.D., CAMPBELL D.E., 1997, Lymphocyte, monocyte, and natural killer cell reference ranges in postpartal women. *Clinical and diagnostic laboratory immunology.* 4(2), 195-201.
18. GUCKER F.T., O'KONSKI CH. T., PICKARD H.B., PITTS J.N., 1947, A Photoelectronic Counter for Colloidal Particles 1. *Journal of the American Chemical Society.* 69(10), 2422-2431.
19. HERZENBERG L.A., PARKS D., SAHAF B., PEREZ O.,ROEDERER M., et al., 2002, The History and Future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and Flow Cytometry: A View from Stanford. *Clinical Chemistry.* 48(10), 1819-1827.
20. JONES J.B., 1986, Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida on Tomato Crop Residue, Weeds, Seeds, and Volunteer Tomato Plants. *Phytopathology.* 76(4), 430-434.
21. JONES J.B., LACY G.H., BOUZAR H., MINSAVAGE G.V., STALL R.E., SCHAAD N.W., 2005, Bacterial spot – Worlwide Distribution Importance and Review. *Acta Horticulturae.* 695, 27-34.
22. JONES J.B., LACY G.H., BOUZAR H., STALL R.E., SCHAAD N.W., 2004, Reclassification of the *Xanthomonads* Associated with Bacterial Spot Disease of Tomato and Pepper. *Systematic and Applied Microbiology.* 27(6), 755-762.

23. JONES T. M., 1991, Ethical Decision Making by Individuals in Organizations: An Issue-Contingent Model. *The Academy of Management Review*. 16(2), 366-395.
24. KOLÁŘOVÁ J., 2018, Detekce viability *Pseudomonas syringae* pv. *oryzae* pomocí průtokové cytometrie. [Bakalářská práce] – 46 s., Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice, Česká republika.
25. KŮDELA V., FUCIKOVSKY L. a NOVACKY A., 2002, Rostlinolékařská bakteriologie. Praha, Academia. 347.
26. LANGKAMP-HENKEN B., WOOD S.M., HERLINGER-GARCIA K.A., et al., 2006, Nutritional Formula Improved Immune Profiles of Seniors Living in Nursing Homes. *Journal of the American Geriatrics Society*. 54(12), 1861-1870.
27. MAES, M., 1993, Fast classification of plant-associated bacteria in the *Xanthomonas* genus. *FEMS Microbiology Letters*. 113, 161-166.
28. MARINOV I., 2003, *Průtoková cytometrie v klinické hematologii: [minimum pro praxi]*. Praha. Triton. Levou zadní. ISBN 80-725-4415-2.
29. MCINNES T. B., GITAITIS R. D., MCCARTER S. M., JAWORSKI C. A., PHATAK S. C., 1988, Airborne dispersal of bacteria in tomato and pepper transplant fields. *Plant Disease*, 72, 575–579.
30. SAHIN F., 1996, Characterization of Ohio Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant Disease*. 80 (7), 773.
31. SHAPIRO H. M., 2005, *Practical Flow Cytometry*. 4. John Wiley. ISBN 9780471434030.
32. SCHAAD N.W, STALL R.E., 1989, *Xanthomonas. Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 81-94.
33. SONG K., TAGHIPOUR F., MOHSENI M., 2019, Microorganisms inactivation by wavelength combinations of ultraviolet light-emitting diodes (UV-LEDs). *Science of The Total Environment*. 665, 1103-1110.

34. STEAD D.E., 1989, Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars of cereals and grasses by fatty acid profiling. *EPPO Bull.* 19, 57-68.
35. SUDA J., 2005, Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií. *Živa.* 1, 46- 48.
36. SWINGS, J. G., CIVEROLO E.L., 1993, *Xanthomonas*. New York. ISBN 04- 124-3420-2.
37. VAN DEN MOOTER M., SWINGS J., 1990, Numerical Analysis of 295 Phenotypic Features of 266 *Xanthomonas* Strains and Related Strains and an Improved Taxonomy of the Genus. *International Journal of Systematic Bacteriology* . 40(4), 348-369.
38. VAUTERIN L., SWINGS J., KERSTERS K., 1990, Towards an improved taxonomy of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 3, 312-316.
39. VO H. T., IMAI T., HO T. T., DANG T.T., HOANG S. A., 2015, Potential application of high pressure carbon dioxide in treated wastewater and water disinfection. *Journal of Environmental Sciences*. 36, 38-47.
40. WEI N., SOMMER B., 2009, Cell Viability, Measurement. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*. Hoboken, NJ, USA, John Wiley and Sons. 1474- 1480. ISBN 9780-4717-99306.
41. WOOD B.L., ARROZ M., BARNETT D., et al., 2007, Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 72B, 14-22.
42. YOUNG J.M., PARK D.C., SHEARMAN H.M., FARGIER E., 2008, A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and Applied Microbiology*. 31(5), 366-377.

9 Seznam použitých internetových zdrojů

43. Bacterial Detection and Live/Dead Discrimination by Flow Cytometry, © 2002, [online]. BD Biosciences. [cit. 2019-04-13] Dostupné z: https://www.bdbiosciences.com/documents/Bacterial_Detection_Live_Deafdf
44. BONKOWSKI J., BACHELINE J., BAYO D., © 2015, *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* [online]. Center for Invasive Species and Ecosystem Health at the University of Georgia. [cit. 2019-04-25] Dostupné z: https://wiki.bugwood.org/Xanthomonas_campestris_pv_vesicatoria
45. Buněčná imunita a imunofenotypizace ©, 2019, Fakultní nemocnice Hradec Králové [online]. FN HK. [cit. 2019-04-13] Dostupné z: <https://www.fnhk.cz/ukia/seznam-metod/vysetreni-bunecne-imunity>
46. MICROBIAL BIOREALM, © 2002. *Xanthomonas* [online]. *MicrobeWiki*. [cit. 2019-03-28] Dostupné z: <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Xanthomonas>
47. ORMEROD M.O., © 2008. Flow Cytometry-A Basic Introduction [online]. De Novo Software. [cit. 2019-04-20] Dostupné z: <http://flowbook.denovosoftware.com/>
48. RAHMAN M., LANE A., SWINDELL A. a BARTRAM S., © 2013, Introduction to flow cytometry [online]. AbD Serotec, A Bio-Rad Company. [cit. 2019-04-13] Dostupné z: <https://www.bio-rad-antibodies.com/introduction-to-flowcytometry.html>
49. RIDGE G., MUNSTER M., © 2014, *Xanthomonas* species (Bacterial leaf spot on ornamentals) [online]. *Center for Invasive Species and Ecosystem Health at the University of Georgia*. [cit. 2019-04-10] Dostupné z: [https://wiki.bugwood.org/Xanthomonas_species_\(Bacterial_leaf_spot_on_ornamentals\)](https://wiki.bugwood.org/Xanthomonas_species_(Bacterial_leaf_spot_on_ornamentals))
50. ROBERTSON S., © 2018, What is Flow Cytometry? [online]. Medical News. AZoNetwork. [cit. 2019-03-28] Dostupné z: <https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Flow-Cytometry.aspx>

51. ROBINSON R., PELLENZ S., © 2013, What is flow cytometry (FACS analysis)? [online]. *Antibodies*. [cit. 2019-03-28] Dostupné z: <https://www.antibodies-online.com/resources/17/1247/what-is-flow-cytometry-facs-analysis/>
52. ROWLEY T., © 2012, Flow cytometry-A Survey and the Basic [online]. *Material Methods*. [cit. 2019-03-29] Dostupné z: <https://www.labome.com/method/Flow-Cytometry-A-Survey-and-the-Basics.html>
53. WALKER R., © 2013, Evolution Flow: The Historical Background of Flow Cytometry [online]. *Bitesize Bio*. [cit. 2019-03-28] Dostupné z: <https://bitesizebio.com/13693/historical-background-of-flow-cytometry/>

10 Seznam zkratek

FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
FSC	Forward Scatter
SSC	Side Scatter
BP	Bandpass filtry
SP	Shortpass filtry
LP	Longpass filtry
FITC	Fluoresceinnizothiokyanát
PE	Phycoerythrin
PE-CY5	Phycoerythrin – Cyanin 5
PerCP	Peridinin – chlorophyl- protein complex
DAPI	4',6- diamidin-2 – fenyloindol
MPA	Masopeptonový agar
MLST	Multilocus sequence typing
RNA	Ribonukleová kyselina
LALS	Large Angle Light Scatter
SALS	Small Angle Light Scatter
PI	Propidium jodid
EB	Ethidium bromid