



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

SAMOENKAPSULACE BAKTERIÍ PODPORUJÍCÍCH RŮST ROSTLIN JAKO CESTA K NOVÉ GENERACI BIOINOKULANTŮ

SELF-ENCAPSULATION OF PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA AS A WAY
TOWARDS NEW GENERATION OF BIOINOCULANTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Dominika Gašparová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1638/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Dominika Gašparová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Samoenkapsulace bakterií podporujících růst rostlin jako cesta k nové generaci bioinokulantů

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracovat literární rešerši na téma i. moderních trendů ve vývoji bioinokulantů a ii. metod analýzy bioinokulantů z hlediska viability inkorporovaných buněk.
2. Navrhnout a připravit sadu modelových gelových matric s inkorporovanými PGPR buňkami metodou samoenkapsulace.
3. Na základě zpracované literární rešerše navrhnout a otestovat soubor analytických technik pro hodnocení viability inkorporovaných buněk.
4. Na základě získaných experimentálních dat zhodnotit potenciál využití techniky samoenkapsulace při vývoji moderních bioinokulantů.

Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2022:

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

Dominika Gašparová
studentka

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

GAŠPAROVÁ, Dominika. *Samoenkapsulace bakterií podporujících růst rostlin jako cesta k nové generaci bioinokulantů* [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-22]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139084>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petr Sedláček.

PREHLÁSENIE

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

V Brne dňa:

Dominika Gašparová

POĎAKOVANIE

Touto cestou by som chcela poďakovať Ing. Petrovi Sedláčkovi, Ph.D, za odborné rady a entuziasmus, ktorý prejavil pri riešení náročných problémov. Moja veľká vďaka patrí mojej konzultantke, Ing. Diane Černayovej, ktorá je mojím veľkým vzorom nielen po profesnej, ale aj po ľudskej stránke. Na záver patrí moja obrovská vďaka mojej rodine za ich podporu a pomoc.

ABSTRAKT

Táto bakalárska práca sa venuje rast podporujúcim rizobaktériám (PGPR), ktoré môžu byť používané ako vhodná ekologická alternatíva ku konvenčným hnojivám. Avšak väčšina dnešných postupov inkorporácie PGPR do procesu obohacovania pôdy je zložitá a finančne náročná. Siet'ovanie alginátu produkovaného PGPR ponúka novú možnosť enkapsulácie rast podporujúcich baktérií.

Cieľ tejto bakalárskej práce sa skladá z prípravy gélových matíc s inkorporovanými baktériami a následného testovania viability a kvantity uvoľnených baktérií.

Prvé experimenty boli vykonané s cieľom skúmania vlastností gélov vytvorených zosiet'ovaním kultúry baktérie - *Azotobacter vinelandii*. Príkladmi takýchto vlastností sú molekulová hmotnosť alginátu (s najväčšou molekulovou hmotnosťou kmeňa CCM 289 (329,78 ± 6,8) kDa) a jeho obsah v géli, obsah PHB (34%-44% CDW) či reologické vlastnosti (komplexný modul najpevnejšieho gélu dosiahol 13,34 kPa).

Počet baktérií bol určovaný pomocou prietokovej cytometrie, platňovej metódy a spektrofotometrie. Viabilita baktérií bola skúmaná analyzovaním intenzity fluorescencie pomocou fluorescenčných sond (propidium jodid, fluoresceín diacetát, rhodamin 123, calcein AM), pomocou platňovej metódy a krížovým rozterom. Ďalej bolo skúmané pôsobenie rôznych faktorov na pevnosť produkovaných gélov ako napríklad hodnoty pH (boli použité roztoky pufru s pH 3, 7 a 10) a prídanie špecifického alginát-rozkladajúceho enzýmu- alginázy.

Uvoľňovanie baktérií z gélov bolo sledované v priebehu siedmich dní metódami ako sú prietoková cytometria a platňová metóda. Metódou krížového rozteru bolo dokázané prežitie bakteriálnych kultúr po gelácií a bez prítomnosti dostupného uhlíkového zdroja, v rôznych prostrediach. Kyslé pH spôsobovalo najvýraznejšiu dezintegráciu gélu a pri vplyve alginázy na zosiet'ované bakteriálne gély nedochádzalo k veľkým rozdielom. Prežitie bakteriálnych kultúr v géli a ich postupné uvoľňovanie sú dôležitými zisteniami pri vývoji moderných bioinokulantov na základe tohto nového konceptu.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Azotobacter vinelandii, enkapsulácia, PGPR, alginát, prietoková cytometria, platňová metóda, spektrofotometria

ABSTRACT

This bachelor thesis focuses on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria that can be used as a suitable ecological alternative to conventional fertilizers. However, most of today's approaches to incorporating PGPR into the process of soil fertilization are convoluted and costly. Crosslinking of alginate self-produced by PGPR offers a new possibility of plant-growth-promoting bacteria encapsulation.

The aim of this thesis consists of preparing gel matrices with incorporated bacteria, followed by testing the bacteria's viability and quantity.

Firstly, experiments were carried out to determine various properties of gels produced by the chosen representative bacteria *Azotobacter vinelandii*. These properties include the molecular weight of alginate (with the highest molecular weight of strain CCM 289 (329,78± 6,8) kDa), the alginate's amount in the gel, the content of PHB (34%-44% CDW), and the gel's overall rheological properties. The complex modulus (as a representation of rheological properties) of the firmest gel reached the value of 13,34 kPa.

The bacteria content was examined by flow cytometry, the CFU method, and spectrophotometry. The viability of bacteria was determined by analyzing the fluorescence intensity via fluorescent dyes (propidium iodide, fluorescein diacetate, rhodamine 123, calcein AM), then by using the CFU method, and also via the plate method. Furthermore, the effects of various factors such as different pH levels (pH 3, 7, and 10) or adding the specific alginate-degrading enzyme alginase were also examined.

Releasing of the bacteria was observed over the course of seven days using flow cytometry and the CFU method. The plate method proved the bacteria's survival after gelation and without any source of carbon. The largest disintegration of gels occurred in acidic pH. Moreover, the effect of alginase on crosslinked bacterial gels and synthetic alginate were very similar. The survival of bacterial cultures in gel and their continuous release are significant findings in the development of novel bioinoculants based on this new concept.

KEYWORDS

Azotobacter vinelandii, encapsulation, PGPR, alginate, flow cytometry, CFU method, spectrophotometry

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČASŤ	9
2.1 RAST PODPORUJÚCE RIZOBAKTÉRIE	9
2.2 MECHANIZMY PÔSOBENIA PGPR	9
2.2.1 Priame pôsobenie rizobaktérii podporujúcich rast rastlín	10
2.2.2 Nepriame pôsobenie rizobaktérii podpodujúcich rast rastlín	11
2.3 DRUHY RIZOBAKTÉRIÍ A ICH SPÔSOBY ÚČINKU	11
2.4 AZOTOBACTER VINELANDII	12
2.5 VÝZNAMNÉ POLYMÉRY PRODUKOVANÉ MODELOVÝM ORGANIZMOM	14
2.6 ALGINÁT	14
2.6.1 Chemická podstata alginátu a jeho produkcia baktériami	14
2.6.2 Aplikácie alginátu	15
2.7 POLYHYDROXYALKANOÁTY	15
2.7.1 Chemická štruktúra polyhydroxyalkanoátov	16
2.7.2 Využitie polyhydroxyalkanoátov	16
2.8 HYDROGÉLY	17
2.9 SPÔSOBY TVORBY GÉLOV	17
2.10 ŽIADUCE VLASTNOSTI HYDROGÉLOV	18
2.11 METÓDY NA STANOVENIE POČTU BUNIEK A SLEDOVANIE ICH UVOĽŇOVANIA	19
2.11.1 Spektrofotometria	19
2.11.2 Prietoková cytometria	19
2.11.3 Platňová metóda	20
2.11.4 Krížový rozter	20
2.12 SÚČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	21
3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	22
3.1 POUŽITÉ MIKROORGANIZMY, CHEMIKÁLIE A PRÍSTROJE	22
3.1.1 Použitý mikroorganizmus	22
3.1.2 Použité chemikálie	22
3.1.3 Použité prístroje	23
3.1.4 Kultivácia baktérií	23
3.1.5 Príprava inokulačného média	23
3.1.6 Príprava produkčného média	24
3.2 URČENIE OBSAHU BIOMASY	24
3.3 URČENIE OBSAHU ALGINÁTU	24
3.4 STANOVENIE MOLEKULOVEJ HMOTNOSTI ALGINÁTU ROZMEROVO-VYLUČOVACOU CHROMATOGRAFIOU	25
3.5 STANOVENIE OBSAHU POLYHYDROXYBUTYRÁTU	25
3.6 PRÍPRAVA MAKROGÉLOV S ENKAPSULOVANÝMI BAKTÉRIAMI	25

3.7 PRÍPRAVA ROZTOKOV SIMULUJÚCICH VPLYV ROZLIČNÝCH PROSTREDÍ NA UVOĽŇOVANIE BAKTÉRII Z GÉLU	26
3.7.1 Príprava roztokov o rôznom pH	26
3.7.2 Príprava roztokov s obsahom alginázy.....	26
3.8 PRÍPRAVA AGAROVÝCH MISIEK	26
3.9 PRÍPRAVA FLUORESCENČNÝCH SOND A ICH POUŽITIE V ANALÝZE.....	27
3.9.1 Príprava vzoriek na prietokovú cytometriu	27
3.9.2 Príprava vzoriek na meranie fluorescencie na viacmódovom čítači mikrotitračných dosiek	27
3.10 MERANIE REOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ.....	28
4. VÝSLEDKY A DISKUSIA	29
4.1 CHARAKTERIZÁCIA KULTÚR.....	29
4.1.1 Produkcia alginátu.....	29
4.1.2 Produkcia PHB	30
4.1.3 Molekulová hmotnosť alginátu	30
4.1.4 Porovnanie reologických vlastností gélov získaných sieťovaním kultúr jednotlivých kmeňov	31
4.2 POČÍTAČNÉ SKÚMANIE SPRÁVANIA SA GÉLU V ROZTOKU	33
4.3 MERANIE ZAMERANÉ NA POČÍTANIE BUNIEK A URČENIE ICH VIABILITY	35
4.3.1 Počítanie buniek pomocou prietokovej cytometrie	35
4.3.2 Určenie viability baktérií uvoľnených z gélov pomocou prietokovej cytometrie	35
4.3.3 Použitie viacmódového čítača mikrotitračných dosiek.....	38
4.4 POUŽITIE KULTIVAČNÝCH METÓD	39
4.5 VPLYV RÔZNYCH FAKTOROV NA VLASTNOSTI GÉLU.....	43
4.5.1 Vplyv pH.....	43
4.5.2 Vplyv alginázy na rozklad gélu.....	44
5. ZÁVER.....	47
ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	49
ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK.....	61
PRÍLOHY	62

1. ÚVOD

Tretia agrikultúrna revolúcia, tiež známa ako Zelená revolúcia, priniesla nepochybne markantnú zmenu v produkcii plodín, vďaka zavedeniu hromadného používania pesticídov, fungicídov či anorganických hnojív. Odvrátená strana tohto pokroku je odzrkadlená v znehodnocovaní zdravia pôdy. Príkladom je kontinuálne používanie anorganických hnojív, čo spôsobuje zníženie obsahu organickej hmoty v pôde, ba dokonca je znižovaná mikrobiálna aktivita [1]. Z týchto faktorov vyplýva potreba hľadania alternatívnych ciest obohacovania pôdy o nevyhnutné živiny.

Jedným z kandidátov na riešenie daného problému je aplikácia rast podporujúcich baktérií do pôdy (PGPR). PGPR umožňujú zvýšenú úrodnosť pôdy, zároveň ju ochraňujú, a ich výhodou je to, že sú obnoviteľným zdrojom [2]. Rast podporujúce baktérie napomáhajú v regulácii nutričnej a hormonálnej rovnováhy rastlín, napomáhajú pri ochrane pred patogénmi a taktiež uľahčujú rozpúšťanie rôznych nutrientov [3]. Enkapsulácia týchto baktérií v hydrogélloch zosieťovaním je známa už dlhú dobu. Jednou z prekážok v masovom používaní tohto spôsobu obohacovania pôdy je fakt, že technológia enkapsulácie je finančne náročná.

Inovatívny postup prípravy bioinokulantov s obsahom PGPR zahŕňa sieťovanie bakteriálneho alginátu produkovaného vybranými predstaviteľmi rast podporujúcich baktérií, a teda súčasnú inkorporáciu rast podporujúcich baktérií do takejto gélovej matice. Nespornou výhodou takejto inkorporácie je zjednodušenie enkapsulácie, a tiež potenciálna nižšia cena takto enkapsulovaných mikroorganizmov, keďže je pracované s polymérmí tvorenými samotnými mikroorganizmami.

V tejto bakalárskej práci bude pozornosť upriamená práve na takéto gélové matrice s inkorporovanými baktériami, konkrétne s *Azotobacterom vinelandii*. Prvá časť tejto práce sa sústreďí na teoretický úvod k danej problematike, pričom veľmi dôležitý príspevok prináša literárna rešerš zhrňujúca skúmanie súčasného stavu riešenia danej problematiky. Kľúčovým pre túto prácu je taktiež vytvorenie gélových matric s inkorporovanými baktériami s čo najlepšimi vlastnosťami, teda budú pozorované rôzne kmene *Azotobacteria vinelandii* a aj rôzne sieťovacie činidlá. Najväčší dôraz je však kladený na navrhnutie a otestovanie analytických techník hodnotiacich viabilitu inkorporovaných buniek a ich uvoľňovanie.

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 *Rast podporujúce rizobaktérie*

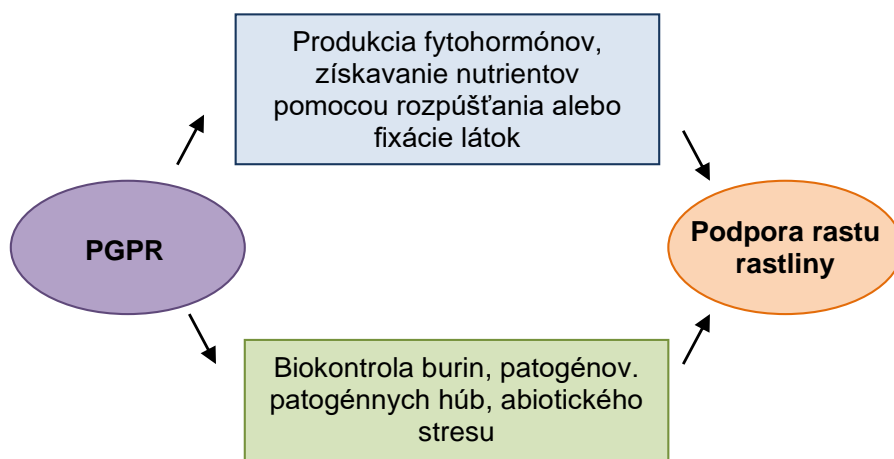
V rámci fungovania pôdneho ekosystému hrajú vzťahy medzi koreňmi rastliny a mikroorganizmami, ktoré sa vyskytujú v blízkosti koreňovej sústavy danej rastliny kľúčovú úlohu. Tieto vzťahy môžu byť prospešné, negatívne alebo neutrálne. Príkladom prospešného pôsobenia, ktorý je charakteristický pre rizobaktérie, je symbióza, konkrétne jej podkategória mutualizmus. Mutualizmus je charakterizovaný ako prospešný pre obe skupiny. V tejto práci sa zameriavame na mutualistický vzťah rizobaktérií a rastlín [2].

Dôležitým faktom je, že miera pôsobenia mikroorganizmov na rastliny sa zvyšuje vtedy, keď sa nachádzajú čo najbližšie k povrchu koreňa [3]. Vo všeobecnosti býva táto oblasť nazývaná rizosféra, i keď tento termín bol pôvodne použitý v roku 1904, nemeckým agronómom a biológom, Lorenzom Hiltnerom na opis mikroorganizmov vo vnútri a v blízkom okolí koreňa [4]. Táto definícia však už nie je aktuálna, pretože mikroorganizmy žijúce na povrchu koreňa sú podľa najnovšej literatúry označované ako tie, ktoré obývajú rizosféru, zatiaľ čo mikroorganizmy, ktoré sa vyskytujú vo vnútri koreňa sú označované ako endofyty [5].

Rast podporujúce rizobaktérie (PGPR = *plant growth-promoting rhizobacteria*), ktorými sa zaoberá táto práca, označujú baktérie, ktoré sa vyskytujú na koreni rastliny alebo v jeho okolí, a zároveň produkujú pre danú rastlinu prospešné látky [6]. Takýmito prospešnými látkami sú fytohormóny, gibberelíny, cytokiníny a mnohé iné. Bližšie sa im bude venované v nasledujúcich kapitolách. Niekedy je pojem rast podporujúce rizobaktérie (PGPR) zamieňaný s pojmom rast podporujúcich baktérií (PGPB = *plant growth-promoting bacteria*), avšak jedná sa o nadmnožinu daného termínu, pretože PGPB sú charakterizované ako baktérie, ktoré sa vyskytujú v rizosfére, endosfére alebo fylosfére a majú pozitívny vplyv na rast rastliny [7].

2.2 *Mechanizmy pôsobenia PGPR*

Vo všeobecnosti môžu rizobaktérie pôsobiť na rastlinu priamo alebo nepriamo. Rozdiel medzi týmito dvoma typmi mechanizmov nie je vždy úplne jednoznačný, ale všeobecným pravidlom je, že priame mechanizmy sa dejú vo vnútri rastliny a priamo ovplyvňujú jej metabolizmus a naopak nepriame prebiehajú mimo rastliny [8]. Príklady týchto mechanizmov sú zobrazené na obrázku 1.



Obrázok 1: Mechanizmy pôsobenia rizobaktérií [8]

2.2.1 Priame pôsobenie rizobaktérií podporujúcich rast rastlín

V prípade produkcie rastových regulátorov (fytohormónov) mikroorganizmami a ich následného poskytnutia rastline, alebo pri zvyšovaní dostupnosti nutrientov (dusík, fosfor) v pôde, hovoríme o priamom mechanizme. Príkladmi pôsobenia, pomocou ktorého sú zabezpečené nutrienty v pôde, sú fixácia vzdušného dusíka a rozpúšťanie fosforu [9]. Fixácia vzdušného dusíka je definovaná ako proces, v ktorom je atmosféricky dusík premenený na formu, ktorá je výhodná a vhodná pre rastliny. Rastliny absorbujú dusík hlavne vo forme nitrátov a amónnych iónov, ktoré im pomáhajú sprostredkovať práve rizobaktérie [10]. Tento proces je veľmi dôležitý z dôvodu, že rastliny nemôžu použiť atmosférický dusík priamo, a dusík je nevyhnutný na syntézu základných látok nutných pre život rastlín [11]. Po dusíku je druhým limitujúcim nutrientom fosfor. Ten je získavaný rozpúšťaním komplexných štruktúr fosfátov, pričom dochádza k premene organickej formy fosforu na anorganickú (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}), ktorá je pre rastliny dostupnejšia [11]. Fytohormóny, teda rastlinné hormóny, sú prirodzene sa vyskytujúce organické molekuly alebo látky, ktoré majú vplyv na fyziologické procesy (rast, regulácia veľkosti orgánov, tolerancia stresu) rastlín [12]. Produkcia prekursorov k týmto hormónom je jedným zo spôsobov, akým rizobaktérie podporujú rastliny.

Medzi fytohormóny patria auxíny, cytokiníny, giberelíny, etylén, či kyselina abscisová (ABA). Auxíny slúžia na podporu klíčenia rastliny a rastu koreňov. K rastu koreňov a súčasne k deleniu buniek a rozpínavosti listov napomáhajú cytokiníny. Hlavnou úlohou giberelínov je predĺženie výhonkov a etylén slúži napríklad na dozrievanie plodov či klíčenie semien [13]. Pre život rastlín je nevyhnutné železo, ktoré sa síce v prírode vyskytuje v hojnom množstve, avšak vo forme, ktorá je pre rastliny ťažko dostupná. Rizobaktérie tento problém riešia pomocou produkcie sideroforov, ktoré sú získané v procese premeny nerozpustných železitých iónov na rôzne železité komplexy (hydroxamáty, fenolkatecholáty, karboxyláty). Podstatné je tiež, že siderofory sú produkované len v prípade nedostupnosti železa v pôde [14].

2.2.2 Nepriame pôsobenie rizobaktérii podporujúcich rast rastlín

Nepriame mechanizmy pôsobenia zahŕňajú schopnosť rizobaktérií eliminovať škodlivé účinky patogénov na rast, čo je zahrnuté v tvorbe antibiotík, lýtických enzýmov, či dokonca v tvorbe kyanovodíku [14]. V predchádzajúcej podkapitole spomenuté siderofory pôsobia aj nepriamym mechanizmom, a to napríklad ako konkurencia patogénnym baktériám (odoberajú železo z prostredia) a taktiež v prípadoch znečistenia pôdy ťažkými kovmi (olovo, arzén, kadmium).

Odoberanie železa z prostredia znamená jeho menší prísun pre baktérie, teda aj pre patogény, čo sa odrazí v ich spomalenom až zastavenom raste. To je veľmi výhodné pre rastlinu, pretože menej patogénov vedie k jej lepšiemu a rýchlejšiemu rastu. Symbiotický vzťah rizobaktérií a rastliny je teda týmto javom pozitívne ovplyvnený [15]. Znečistenie pôd ťažkými kovmi je, žiaľ, aktuálny problém dvadsiateho prvého storočia. Ako už bolo spomenuté, niektoré rizobaktérie dokážu rásť v prostredí s obsahom ťažkých kovov, a v tomto prostredí dokážu naprávať tieto nežiaduce pomery, vďaka naviazaniu ťažkých kovov do molekuly sideroforu [16]. Kyanovodík reprezentuje látku, ktorej úlohou je biokontrola rastu buriny. Táto schopnosť je dôležitá, aby zamedzila burine rásť okolo koreňa rastliny a tým znemožnila jej rast [17].

Mechanizmus pôsobenia antibiotík môže byť ilustrovaný ako produkcia látok o malej molekulovej hmotnosti rizobaktériami, čo škodlivo pôsobí na metabolizmus patogénov. Existuje viacero variant takéhoto pôsobenia, ako je pôsobenie na bunkovú stenu, či zastavenie delenia buniek. Lýtické enzýmy, ako sú napríklad celulózy, proteázy a lipázy, majú schopnosť rozkladu bunčných stien patogénnych húb [14].

2.3 *Druhy rizobaktérií a spôsoby ich účinku*

Zloženie rizobakteriálnej populácie je ovplyvnené veľkým množstvom rôznych faktorov, ako je napríklad samotný rastlinný druh, zloženie pôdy, v ktorom sa táto populácia nachádza a v neposlednom rade sú to koreňové exudáty, ktoré sú poskytovateľmi živín bohatých na uhlík či cukry [18]. Bioinokulanty sú definované ako látky obsahujúce živé mikroorganizmy, ktoré v prípade aplikovania na rastliny (buď na ich povrch, alebo priamo do pôdy) majú schopnosť kolonizovať rizosféru alebo v prípade aplikácie na povrch, priamo vnútro rastliny [19].

Takýto spôsob obohacovania pôdy je veľmi atraktívny z dôvodu šetrnosti voči prostrediu, keďže bežné syntetické hnojivá môžu znečisťovať podzemné vody, ba dokonca aj samotnú pôdu. Výsledky štúdií potvrdzujú, že obohacovanie orných pôd rast podporujúcimi rizobaktériami zvyšuje agronomické výťažky z tejto pôdy [20]. Na trhu sa vyskytuje už zopár komerčných produktov, ktoré využívajú výhody biohnojív s obsahom PGPR. Niektoré z nich sú zobrazené v tabuľke 1 na druhej strane. Podpora rastu býva sprostredkovaná napríklad ako ochrana týchto semien proti patogénom. Druhým odporúčaným využitím je obohacovanie pôdy dusíkom či fosforom, ktoré je reprezentované napríklad rozpúšťaním a fixáciou prospešných látok. V niektorých prípadoch (napríklad pri extrémnych suchách) dokážu takéto komerčné rizobaktérie zadržovať vlahu v pôde [21].

Tabuľka 1: Komerčné hnojivá, v nich obsiahnuté kmene PGPR k nim príslušné použitia [22]

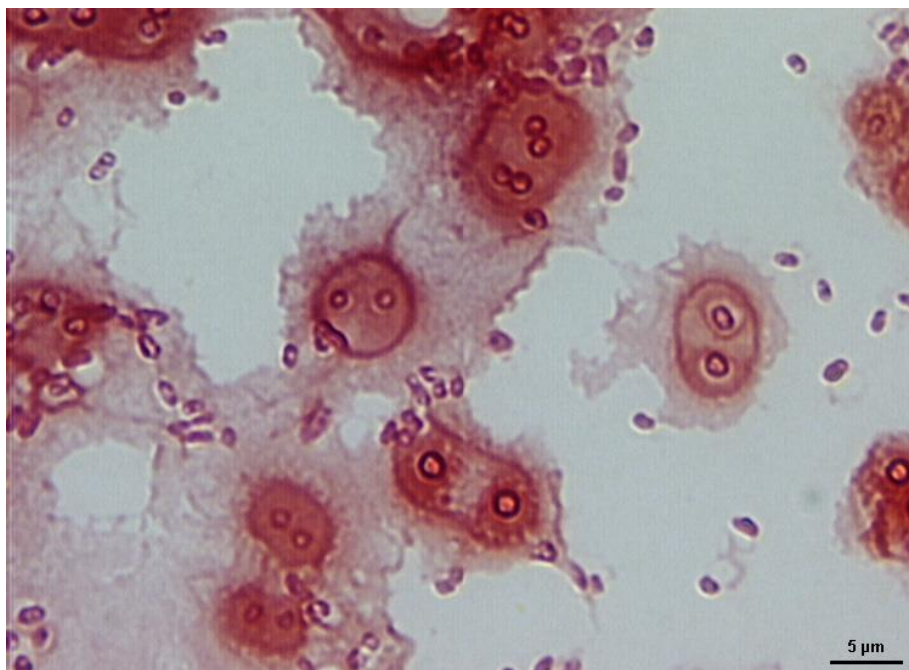
Názov komerčne používaného hnojiva	Kmeň PGPR	Odporúčané použitie
Bioboost	<i>Delfia acidovorans</i>	Urýchlenie rastu semien repky olejnej
Bioplin	<i>Azotobacter spp</i>	Obohatenie pôdy pre paradajky, slnečnice
Bioyield	<i>Bacillus spp</i>	Urýchlenie rastu semien rajčín, tabaku
Compete	<i>Bacillus, Pseudomonas</i>	Obohatenie pôdy pre trávniky
Kodiak	<i>B. subtilis</i>	Urýchlenie rastu semien ovocia a zeleniny

2.4 *Azotobacter vinelandii*

Existuje široká škála rôznych zástupcov zo skupiny PGPR (napr. *B subtilis*, *Deldia*) a jedným z nich je aj baktéria *A. vinelandii*, ktorá je používaná ako modelový organizmus v tejto bakalárskej práci. *Azotobacter vinelandii* bol pred viac ako sto rokmi charakterizovaný ako aeróbná diazotofická (dusík-fixujúci organizmus) baktéria [23].

Podľa zloženia bunkovej steny, ktorá obsahuje hlavne liposacharidy na vrchu prekryté druhou membránou, je takzvané Gramove sfarbenie ružové [24] a z toho vyplýva zaradenie týchto baktérií medzi Gram-negatívne baktérie [25]. Tvar a zároveň Gram-negatívne sfarbenie sú zobrazené na obrázku 2.

Pohyb baktériám umožňujú bičíky a patria medzi mezofilné baktérie, teda optimálne teplota pre ich optimálny rast je 20-40 °C [26]. Bunka má veľkosť 1,5-2,0 µm, je v tvare krátkych tyčínok (kokobacily), a má schopnosť tvoriť cysty ako ochranu pred nepriaznivými vplyvmi okolitého prostredia. Nepriaznivým prostredím pre túto baktériu je napríklad príliš vysoká či nízka teplota. Optimálna hodnota pH pre rast *Azotobacteria* je okolo hodnoty 7,3 a teda iná hodnota pôsobí nepriaznivo na jeho rast a prežitie [27].



Obrázok 2: *Azotobacter vinelandii* – tvar a Gram-negatívne sfarbenie [27]

Typický pre túto baktériu je obsah troch druhov nitrogenáz, enzymatických proteínových komplexov slúžiacich k fixácii atmosférického dusíku, s rôznymi kovmi v ich kofaktoroch. Molybdén a vanád sú príkladmi kovov v kofaktoroch [28]. Tieto kovy sa môžu vzájomne substituovať za účelom podpory rastu baktérie v prípadoch, ak chýba nejaký esenciálny kov alebo pri rozdielnych teplotách.

Zaujímavým faktom je, že ak rastie v pôde s nedostatkom železa, tak produkuje (okrem iného) neónovo-zelený siderofor – azotobactin [29]. Ďalšou nespornou výhodou tohto organizmu je, že pre svoj rast a iné metabolické procesy dokáže využívať veľké množstvo uhlíkových zdrojov ako napríklad alkoholy, organické kyseliny a cukry. To sa prejaví v nižších nákladoch pri produkcii v priemysle, a zároveň je to efektívnejšie aj pre samotnú baktériu, keďže môže rásť na väčšom množstve substrátov [23].

Azotobacter vinelandii okrem iného slúžil aj ako modelový organizmus na štúdium metabolických procesov v živých bunkách, predovšetkým respirácie a s tým spojeným, Krebsovým cyklom (alebo cyklus trikarboxylových kyselín), či elektrónového transportného reťazca. Rýchlosť a frekvencia dýchania sú v porovnaní s baktériou *Escherichia coli* až desaťkrát väčšie, čo môže predstavovať miernu nevýhodu pre fermentačné procesy. Niekoľko vedeckých prác potvrdilo, že pri kontrolovanom prísune kyslíka baktérii *Azotobacter* sa môžu fyzikálnochemické vlastnosti alginátu a poly(3-hydroxybutyrát) výrazne zlepšiť [30]. Okrem svojich rast podporujúcich vlastností je *Azotobacter vinelandii* tiež známy pre svoju schopnosť produkovať dva zaujímavé biopolyméry – extracelulárne produkovaný polysacharid alginát a intracelulárne akumulovaný mikrobiálny polyester polyhydroxybutyrát.

Alginát sa nachádza v okolí bunky, potom ako je vytlačený baktériou cez membránu do extracelulárneho priestoru. Tento biopolymér je tvorený kvôli svojej vynikajúcej schopnosti chrániť pred nepriaznivými vplyvmi okolia [31]. Poly(3-hydroxybutyrát) je taktiež významný

pri ochrane pred nepriaznivými vplyvmi, pretože môže slúžiť ako zdroj živín v prípade ich nedostatku [32]. Tieto dva polyméry sú priemyselne významné a preto im bude venovaná celá nasledujúca kapitola.

2.5 Významné polyméry produkované modelovým organizmom

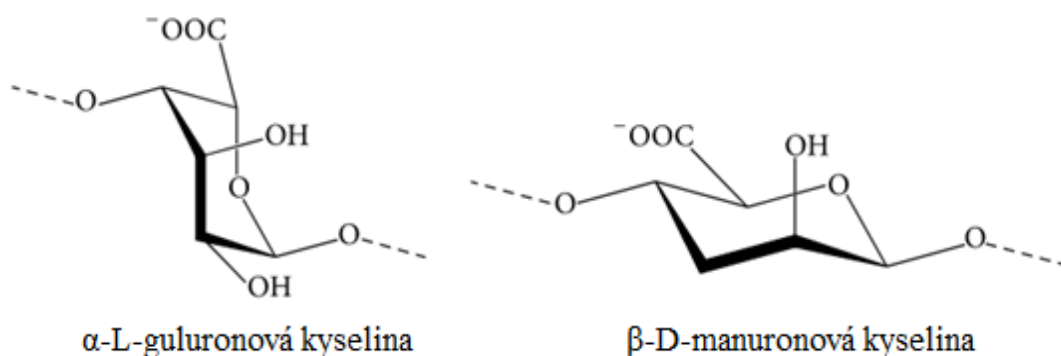
Biotechnológie sú charakterizované ako procesy zahŕňajúce použitie žijúcich systémov, teda mikroorganizmov, alebo ich častí pre vytvorenie produktov, systémov a prostredí za účelom zlepšenia kvality ľudského života. Produkty biotechnologického procesu sú reprezentované najčastejšie potravinami alebo širokou škálou chemických látok atraktívnych buď svojou bioaktivitou (napr. liečivá) alebo svojimi materiálovými vlastnosťami (napr. biopolyméry). Odpadové hospodárstvo a čistenie odpadových vôd sú príkladom využitia biotechnológií v systémoch. Využitie vytvárania prostredia je pomerne špecifické, ale novinkou je hydroponia, kde sa pestujú rastliny bez pôdy v živnom roztoku [33]. Medzi biotechnologicky významné patria baktérie rodu *Lactobacillus* zodpovedné za fermentáciu kyslých mliečnych produktov. Rod *Staphylococcus* bol objavený škótskym chemikom Alexandrom Flemingom a je dodnes používaný na výrobu penicilínu [34; 35]. Baktérie rodu *Azotobacter* nachádzajú rozsiahle využitie v rôznych biotechnológiách, pričom veľmi zaujímavým je využitie v produkcii priemyselných polymérov ako sú polyhydroxyalkanoáty a alginát.

2.6 Alginát

V osemdesiatych rokoch devätnásteho storočia bol objavený alginát škótskym chemikom E.C.C. Stanfordom pri skúmaní užitočných produktov izolovaných z chalúh [36]. Názov tohto prírodného polyméru pochádza z latinského slova „*alga*“, čo v preklade znamená morská riasa [37].

2.6.1 Chemická podstata alginátu a jeho produkcia baktériami

Z chemického hľadiska je alginát polymér, presnejšie kopolymér (polymér skladajúci sa z dvoch rôznych monomérov s rôznym usporiadaním), zložený z dvoch podjednotiek, ktorými sú kyselina β -D-manuronová a α -L-guluronová kyselina.



Obrázok 3: Štruktúra alginátu [38]

Tieto dve látky sú spojené β -1,4-glykosidickou väzbou a zároveň α -L-guluronová kyselina je epimérom β -D-manurionovej kyselina (na piatom uhlíku). Daný kopolymér má lineárny reťazec, a je to anionický polymér. Štruktúra alginátu je zobrazená na obrázku 3 [38]. Alginát je v dnešnej dobe získavaný hlavne z hnedých rias, a to z dôvodu nižších výrobných nákladov v porovnaní s bakteriálnou produkciou. Rozdiel medzi týmito dvoma spôsobmi získavania alginátu (z rias a z baktérií) spočíva v tom, že na algináte vzniknutom z baktérií je naviazaná acetylová skupina, a môže byť získaná molekula o presných parametroch, teda určitých substituentoch a dĺžke reťazca [39].

2.6.2 Aplikácie alginátu

Alginát je používaný v širokom spektre oblastí. Farmaceutický, kozmetický či potravinársky priemysel sú len niektorými príkladmi týchto oblastí [40]. Vlastnosti určujúce túto jeho všestrannosť v používaní sú napríklad biokompatibilita, netoxičita, jeho pórovitá štruktúra (ako hydrogélu) a samozrejme jeho dostupnosť a pomerne nízka cena [41].

V potravinárskom priemysle sa využívajú jeho fyzikálne-chemické vlastností na zahusťovanie, stabilizáciu, emulzifikáciu produktov ako sú napríklad rôzne omáčky, mlieka či cukríky [42]. Farmaceutické aplikácie tejto látky sú taktiež pomerne rozsiahle. Alginát je používaný na obalovanie liečiv na postupné uvoľňovanie tabliet v ľudskom tele [43]. Z hľadiska kozmetického priemyslu je alginát dôležitý vďaka svojej schopnosti zadržiavať vlhkosť a tiež pri zadržiavaní farby pri výrobe dekoratívnej kozmetiky [44].

Pre túto bakalársku prácu je najdôležitejšie využívanie alginátu ako prídavnej látky do pôdy, keďže na pôdu je práca zameraná. Presnejšie je dôležitá enkapsulácia, teda vytvorenie gélového nosiča, ktorý poskytuje ochranu a zaisťuje riadené uvoľňovanie bakteriálnych buniek, ktoré sa do pôdy aplikujú. Výhodou je, že baktéria, s ktorou bude v tejto bakalárskej práci pracované, dokáže produkovať alginát sama, z čoho vyplývajú nižšie náklady na výrobu, a zároveň nemusí byť pridávaný k baktérii pri enkapsulácii [45]. Zadržiavanie vlhkosti, alebo vody v pôde je jeden z faktorov, na ktorom závisí prežitie väčšiny rastlín. Alginát je označovaný ako superabsorbent (SAP), a teda plní funkciu zadržiavania vody v pôde, ale zároveň pomáha pri efektívnom využívaní vlhkosti.

Zaujímavé je, že tento polymér tiež ochraňuje rastliny pred patogénmi, čo bolo dokázané zníženou reprodukciou patogénnych hub po pridaní alginátu do pôdy na koreňoch zemiakov [46]. Rizobaktérie bývajú inokulované v tomto polyméri, čo je tiež veľkým benefitom pre rastliny [47].

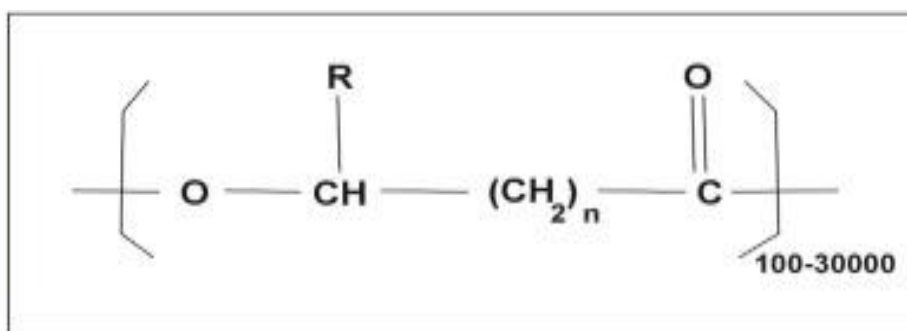
2.7 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHAs) patria medzi biomateriály, ktoré by bolo možné rozkladať v prírode, čo znamená, že by mohli nachádzať využitie ako alternatívna náhrada syntetických plastov, a tým byť pre ekosystém neškodné. V roku 1925 bol objavený poly(3-hydroxybutyrát) a tým aj skupina polyhydroxyalkanoátov, francúzskym biológom Mauricom Lemoignonom. PHAs sú uchovávané ako zdroj energie mikroorganizmov ako sú napríklad

baktérie rodu *Azotobacter*, ktoré sú schopné PHAs syntetizovať. Je to významná výhoda, pretože môžu zásoby PHAs použiť ako zdroj energie pri nedostatku uhlíkového zdroja, a pri nepriaznivých podmienkach prostredia a zvyšujú stresovú odolnosť a bunkovú robustnosť mikroorganizmu [48].

2.7.1 Chemická štruktúra polyhydroxyalkanoátov

Od objavenia PHAs bolo objavených okolo 150 druhov, ktoré sa líšia v dĺžke a vetvení reťazca. PHAs sú lineárne polyestery hydroxyalkanových kyselín. Základná štruktúra PHAs je zobrazená na obrázku 4.



Obrázok 4: Všeobecná štruktúra polyhydroxyalkanoátov [49]

Ak by bol zvyšok R nahradený metylovou skupinou a zároveň $n = 1$, výsledný polymér by niesol názov polyméru – poly(3-hydroxybutyrát). Ten patrí medzi najznámejšie zo skupiny PHAs s krátkym reťazcom [49]. Z hľadiska fyzikálnych vlastností polymérov tejto skupiny môžu byť priradené do termoplastov (po vychladnutí ich nie je možné tvarovať) a elastomérov (dobrá viskoelasticita) [50].

2.7.2 Využitie polyhydroxyalkanoátov

Vďaka biokompatibilite a biorozložiteľnosti sú PHA rozsiahlo používané v mnohých oblastiach ako napríklad v medicíne pri hojení rán, či pri výrobe rôznych kĺbových náhrad. Podobne ako alginát, môžu byť polyhydroxyalkanoáty používané ako nosiče liečivých látok [51].

Oproti konvenčným petrochemickým plastom tieto materiály neprispievajú k (v dnešnej dobe často skloňovanému) znečisteniu oceánov. V prípade, že by sa bioplast vyrobený z polyhydroxyalkanoátov dostal do morského ekosystému nenastane trvalé znečistenie tohto ekosystému, keďže sú ľahko degradovateľné na oxid uhličitý a vodu [52]. Využitie PHA ako látok podporujúcich rast v agrikultúre môže byť predstavené ako použitie polyhydroxyalkanoátov v kombinácii s rôznymi hnojivami obsahujúcimi huminové kyseliny či typické NPK zložky komerčných hnojív, pretože sú biodegradovateľné, a uvoľňovanie účinných látok do pôdy môže byť kontrolované [53].

PHA sú prepojené s ich mikrobiálnymi producentami takým spôsobom, že im pomáhajú

prežiť pri nepriaznivých podmienkach pre život. Napríklad pri nedostatku zdroja uhlíka sú polyhydroxyalkanoáty rozložené PHA depolymerázou, a z nich uvoľnený uhlík následne vstupuje do metabolických procesov (napríklad biosyntéza mastných kyselín). Dôležitými príkladmi nepriaznivých podmienok, ktorým musí rizosféra čeliť, sú sucho, znečistenie ťažkými kovmi (olovo, arzén, ortuť) či extrémne teploty (vysoké, či nízke). V spomínaných prípadoch bola preukázaná biologická výhoda – väčšia odolnosť a viabilita PHAs producentov v porovnaní s mikroorganizmami, ktoré ich neprodukurujú [54].

2.8 Hydrogély

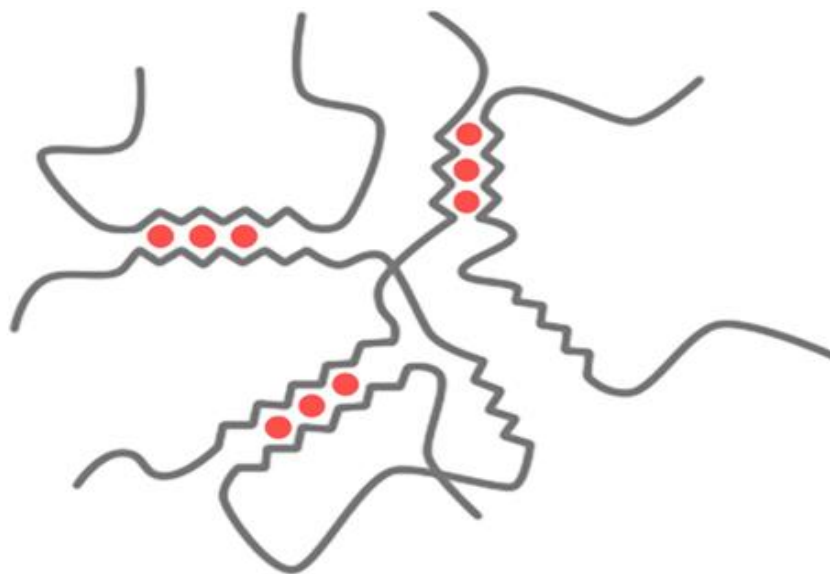
Hydrogély sú trojrozmerné sieťové štruktúry, pre ktoré je charakteristické absorbovanie a zadržiavanie vody. Množstvo vody, ktorá je zadržiavaná závisí od funkčných skupín a porozity gélu. Výhodou hydrogelov je, že sú veľmi všestrannými z hľadiska použiteľnosti. Teda je možné použiť ich farmaceutikom či kozmetikom priemysle [55].

Pôdne hydrogély (hydrogély aplikované do pôdy) sú často používané ako pomocné pôdne prostriedky ktoré zlepšujú rast rastlín priebežným a postupným poskytovaním živín a vody. Dôležitosť pomalého uvoľňovania baktérií či hnojív do pôdy spočíva v tom, že živiny a voda sú poskytované rastlinám aj za extrémnych podmienok, napríklad pri období extrémnych such.

2.9 Spôsoby tvorby gélov

Dôležitým pojmom úzko súvisiacim s témou hydrogelov je enkapsulácia, v kontextu tejto práce konkrétne enkapsulácia rast podporujúcich rizobaktérií. V princípe je enkapsulácia obalovanie aktívnej ingrediencie (v našom prípade baktérií) v konkrétnom nosiči, zabezpečujúcom ochranu, kontrolované uvoľňovanie a v špecifickom prípade enkapsulácie mikroorganizmov tiež zachovanie metabolickej aktivity a živých procesov mikrobiálnych buniek. Navyše je gélovým prostredím zaistená ochrana pred abiotickým (chemikálie) a biotickým (škodci, choroby) stresom. Existujú rôzne techniky enkapsulácie, ktoré sú založené buď na fyzikálnom, chemickom alebo fyzikálno-chemickom procese. Skupinu chemických techník enkapsulácie zastupuje polymerizácia. Extrúzia, emulgácia či sprejové sušenie predstavujú skupinu fyzikálnych techník enkapsulácie. Fyzikálno-chemickú podstatu majú koacervácia a iónová/kovalentná gelácia [56].

Iónová gelácia bude praktizovaná v experimentálnej časti tejto bakalárskej práce, preto je dôležité venovať sa tejto problematike podrobnejšie. Iónová gelácia, alebo aj iným názvom iónové sieťovanie, je pozorovaná vo vodorozpustných a elektricky nabitých polyméroch, ktorých ióny nesú opačný náboj [56]. Elektricky záporne nabitý a vo vode rozpustný alginát môže byť zosieťovaný vápenatými či inými dvojmocnými a trojmocnými kladne nabitými iónmi. Štruktúra zosieťovaného alginátu vápenatými iónmi je zobrazená na obrázku 5.



Obrázok 5: Alginát s vápenatými iónmi – vápenaté ióny znázornené červenými kruhmi a alginát šedými čiarami [57]

Chlorid vápenatý je najpoužívanejšie sieťovacie činidlo, hlavne vďaka jeho výbornej rozpustnosti vo vodných roztokoch, či biokompatibilitate s živými organizmami. Na druhú stranu, nevýhodou chloridu vápenatého je, že vzniknuté gély sú nekonzistentné a mechanicky slabé. Okrem zmieneného chloridu vápenatého môže byť použitý aj uhličitan vápenatý, ktorého výhodou naopak je, že výsledné gély vzniknuté použitím tohto činidla sú pevné a mechanicky odolné. V porovnaní s chloridom vápenatým je však uhličitan zle rozpustný vo vode, a gély vzniknuté týmto spôsobom sú náchylnejšie k starnutiu, čo je spôsobené dlhším časom gelácie [57].

Kovalentná gelácia je založená na sieťovaní roztoku kovalentným sieťovacím činidlom, napríklad karbodimidmi, ktorý spája dva reťazce polymérov kovalentnou väzbou [56; 58].

2.10 Žiaduce vlastnosti hydrogélů

Na začiatok je dôležité povedať, že ideálny hydrogél neexistuje, pretože pre každú aplikáciu hydrogélů sú vyžadované iné a špecifické vlastnosti. Podmienky, v ktorých vznikajú hydrogély, teda gély vo všeobecnosti, významne ovplyvňujú výsledné vlastnosti gélov.

Prakticky môžu byť týmito ovplyvňujúcimi faktormi teplota či dĺžka gelácie v sieťovacom činidle. Všeobecne požadovanými vlastnosťami sú dostatočná schopnosť absorpcie účinných látok, nízka cena a netoxičita pre človeka a životné prostredie [59; 60].

Pomerne veľké množstvo parametrov, ako napríklad biodegradabilita a dlhá doba životnosti, je vyžadovaných pri použití hydrogélů v pôde. Biodegradabilita bez formovania toxických látok po rozložení hydrogélů je prioritou, pretože v prípade nesplnenia tejto podmienky by bolo obohacovanie pôdy hydrogélmi kontraproduktívne. Na druhú stranu je požadovaná čo najdlhšia doba životnosti gélu a s ňou súvisiaca možnosť reverzibility botnania týchto gélov. Pojmom

reverzibilita botnania gélov je myslené, že gél po tom ako uvoľní vodu dokáže niekoľkokrát znovu nasiaknuť vodou a byť zdrojom vlhkosti v období sucha. Ďalším očakávaným parametrom je stabilita materiálových vlastností, teda gél, prípadne xerogél, by mal vydržať neznehodnotený a s rovnakými vlastnosťami ako pri vytvorení gélu, dlhšiu dobu pred samotnou aplikáciou do pôdy [61].

2.11 Metódy na stanovenie počtu buniek a sledovanie ich uvoľňovania

Diskusia princípu fungovania použitých metód je veľmi dôležitá, pretože porozumenie princípu umožňuje adekvátne interpretáciu získaných experimentálnych dát. Danými použitými metódami je spektrofotometria, cytometria, meranie fluorescencie na multidetekčnom analyzátore, platňová metóda.

2.11.1 Spektrofotometria

Princípom tejto metódy je absorpcia energie elektromagnetického žiarenia molekulami analyzovaných látok. Absorpčné spektrum, charakteristické pre každú látku, sa získava zo závislosti absorbovaného množstva žiarenia na vlnovej dĺžke [62]. Bouger-Lambert-Beerov zákon kvantitatívne popisuje závislosť zoslabenia žiarenia na koncentrácii absorbujúcej látky a hrúbke absorbujúceho prostredia. Pri konštantnej hrúbke absorbujúceho prostredia dochádza k poklesu žiarivého toku vstupného žiarenia s rastúcou koncentráciou absorbujúcej látky [63]. Transmitancia je vyjadrená ako pomer žiarenia, ktoré prešlo a dopadajúceho žiarenia. Absorbancia je záporný dekadický logaritmus transmitancie a je priamo úmerná koncentrácií analytu. Najzaužívanejším tvarom Bouger-Lambert-Beerovho zákona je ten, pri ktorom je absorbancia A rovná súčinu molárneho absorpčného koeficientu ε , koncentrácie analytu c a optickou dĺžkou kvety l [64].

2.11.2 Prietoková cytometria

Prietoková cytometria je analytická metóda slúžiaca na meranie a analýzu vlastností buniek. Daná metóda je veľmi všestranná a príkladmi jej použitia sú: určovanie počtu buniek, určovanie či sa jedná o živé alebo neživé bunky, stanovovanie rozloženia veľkosti a získavanie informácií o vnútornej štruktúre bunky [65; 66]. Charakteristikou tejto metódy je to, že spomenuté informácie o bunkách sú získavané pomocou rozptylu svetla a fluorescencie. Hydrodynamická fokusácia zabezpečuje pomocou veľmi tenkej kapiláry a vyššieho tlaku v prúde nosnej kvapaliny usporiadanie buniek jednej za druhou. Následne bunky prechádzajú lúčmi svetla pričom dochádza k rozptylu svetla. Podľa smeru a uhlu lomu rozlišujeme priamy rozptyl (*forward scatter* - FSC) a bočný rozptyl (*side scatter* - SSC). Priamy rozptyl poskytuje informáciu o veľkosti bunky a jedná sa o priamu úmeru, teda pri väčšej bunke je hodnota rozptylu vyššia. Informácie o vnútornej štruktúre bunky sú získavané z bočného rozptylu [67; 68]. Využívanie fluorescencie spočíva v absorpcii určitej vlnovej dĺžky svetla časticami a následnom emitovaní lúčov svetla o odlišnej vlnovej dĺžke. Na základe pomeru intenzity fluorescencie a štandardu môže byť skúmaný daný objekt [68; 69].

Fluorochrómy sú fotocitlivé látky, ktoré absorbujú energiu cez interakciu elektrónu s fotónom [70]. V metódach použitých v tejto práci je svetlo získavané z monochromatických laserov. Viabilita buniek býva zisťovaná intenzitou svetelného signálu po zafarbení vhodnou fluorescenčnou sondou. Podľa konkrétnej fluorescenčnej sondy môže byť signál pozorovaný z hľadiska bunkovej integrity, metabolickej aktivity či podľa ich replikovateľnosti buniek [71].

Calcein AM je organická heteropentacyklická zlúčenina. Ako fluorochrom môže byť použitý ako detektor viability pri väčšine eukaryotických buniek. Princíp fluorescencie spočíva v premene nefluoreskujúcej formy calceinu AM na zeleno fluoreskujúcu formu calceinu. Táto premena je spôsobená hydrolýzou acetoxymethyl esteru prostredníctvom intracelulárnych esteráz [72; 73]. Fluorescein diacetát je organická sonda detekujúca metabolickú aktivitu buniek. Daná sonda fluoreskuje na základe štiepenia fluorescein diacetátu esterázami za vzniku fluoresceinu. Pri tomto štiepení je pozorovaná zelená fluorescencia. Nevýhodou použitia tejto sondy je jej vysoká cena [74]. Propidium jodid je fluorescenčná sonda detekujúca prítomnosť nukleových kyselín. Sonda môže detekovať prítomnosť mŕtvych buniek a zároveň sa dá použiť na určenie obsahu DNA [75]. Propidium jodid sa viaže na DNA mŕtvych buniek, prechádza cez bunkovú membránu gramnegatívnych baktérií, teda aj baktérie *Azotobacter vinelandii*. Ak však nie je plazmatická membrána poškodená, fluorofor je transportovaný von. Daná sonda teda fluoreskuje pri mŕtvych bunkách a farba fluorescencia je červená [76].

Niektoré kationické fluorochromy sú rozvádzané elektroforeticky do matrixu mitochondrií ako odpoveď na elektrický potenciál vnútornej membrány. Rhodamin 123 je takou látkou, konkrétne sa táto sonda viaže na bunkové membrány. Pri zachovaní potenciálového gradientu mitochondriálnej membrány sa nefluoreskujúca forma rhodaminu 123 premení na zeleno-fluoreskujúcu formu. Detekované sú teda živé bunky [77].

2.11.3 Platňová metóda

Platňová metóda patrí medzi nepriame kultivačné metódy. Metóda spočíva v stanovení počtu narastených kolónií, za predpokladu, že každá bunka tvorí jednu izolovanú kolóniu. Jednotkou výpočtu platňovej metódy je počet životaschopných (na platniach rastúcich) buniek v 1 ml média/vzorku, takzvané *colony forming units* CFU/ml [78].

Platňová metóda môže byť uskutočnená dvoma spôsobmi. Zmiešanie vzorku s temperovaným agarom je prvý spôsob. Druhou možnosťou je pipetovanie vzorku na misku s agarom a rozotretie s L-kľučkou [78].

2.11.4 Krížový rozter

Krížový rozter je metóda postupného riedenia pôvodnej kultúry s cieľom zisku jednotlivých kolónií a tiež analýzou morfológie buniek. Kolónia mikroorganizmu je klon jednej bunky. V poslednej oblasti krížového rozteru, kde vyrastajú kolónie, môže byť hodnotený charakteristický profil, vzhľad, tvar a farbu [79; 80].

2.12 *Súčasný stav problematiky*

„Hlad a kríza začínajú neúrodnými pôdami“- To je výrok, ktorý v dnešnej dobe vedci skloňujú čoraz viac a viac. Práca profesora *Hansa Hurniho* skúma vplyv neúrodných pôd na životnú úroveň obyvateľov Etiópie a zároveň poskytuje rôzne scenáre, ktoré môžu nastať pri riešení problémov tejto krajiny [81]. Dôvodmi neúrodnosti sú suchá, nedostatočná biodiverzita a nadbytočné opotrebovanie pôdy. Riešenie daného problému musí byť komplexné a zahŕňajúce technológie zúrodňujúce pôdu.

Ako už bolo spomenuté v kapitole 2.3, je dokázané, že rizobaktérie podporujú zdravie a úrodnosť pôd. Problémom však je ich nízka schopnosť prežitia v pôde pri používaní štandardných spôsobov enkapsulácie. V tejto práci sme pracovali s gémi tvorenými priamo baktériami. Takýto spôsob je výhodný keďže je finančne nenáročný a baktérie vďaka alginátu majú väčšie predpoklady prežiť. Viabilita a počet uvoľnených buniek sú kľúčovými parametrami pre charakterizáciu takejto enkapsulácie.

V článku od *C. McGoverina a kol.* bola vyhodnocovaná prietoková cytometria na určenie viability baktérií, konkrétne druhu *Escherichia coli* [82]. V článku bola vedená diskusia o platňovej metóde, tá bola však označená ako príliš zložitá a časovo náročná na použitie napríklad pre farmaceutický priemysel. Boli určené koncentrácie detekčných limitov fluorescenčného signálu pre zmes živých a mŕtvych buniek (2,5% živých buniek). Pre počítanie buniek bol určený limit na 20% mŕtvych buniek. Význam tejto štúdie spočíva v poskytnutí univerzálneho návodu na použitie prietokovej cytometrie.

Porovnaním platňovej metódy, spektrofotometrickej metódy a prietokovej cytometrie sa zaoberal *Hongmiao Pan a kol* [83]. Z ich výsledkov sa zistilo, že najmenej presnou metódou a skúmanie baktérií bolo meranie zákalu spektrofotometricky, keďže zákal nevznikal v súlade s počtom baktérií určených cytometrom a platňovou metódou. Na určovanie počtu baktérií odporúčali autori prietokovú cytometriu kvôli jednoduchosti, rýchlosti a presnosti metódy.

3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 *Použité mikroorganizmy, chemikálie a prístroje*

3.1.1 Použitý mikroorganizmus

Modelovým mikroorganizmom bol *Azotobacter vinelandii*, konkrétne kmene z nemeckej zbierky mikroorganizmov DSMZ 87 a DSMZ 720 a kmeň z českej zbierky mikroorganizmov CCM 289. Na porovnanie bola použitá baktéria *Cupriavidus necator* H16 CCM 3726 z českej zbierky mikroorganizmov.

3.1.2 Použité chemikálie

Agar powder (HiMedia, ČR)
Alginát lyáza (Thermo Fisher Scientific, USA)
Azid sodný (Lachner, ČR)
Calcein AM (Thermo Fisher Scientific, USA)
Dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Lachner, ČR)
Dihydrogenfosforečnan draselný (Lachner, ČR)
EDTA (Lachner, ČR)
Etanol (Lachner, ČR)
Fluorescein diacetát (Thermo Fisher Scientific, USA)
Glukóza monohydrát (Lachema, ČR)
Heptahydrát síranu horečnatého
Hydrogenfosforečnan sodný
Hydroxid sodný (Lachner, ČR)
Chlorid draselný (Lachner, ČR)
Chlorid sodný (Lachner, ČR)
Chlorid vápenatý (Lachner, ČR)
Chloroform (Lachner, ČR)
Kyselina benzoová (Lachner, ČR)
Kyselina citrónová (Lachner, ČR)
Kyselina chlorovodíková (Lachner, ČR)
Kyselina sírová (Lachner, ČR)
Metanol (VWR, USA)
Nutrient broth (HiMedia, ČR)
Propidium jodid (Thermo Fisher Scientific, USA)
Rhodamin 123 (Thermo Fisher Scientific, USA)
Síran amónny (Lachner, ČR)
Uhličitan vápenatý (Chemapol, ČR)
Yeast Extract (HiMedia, ČR)

3.1.3 Použité prístroje

Biosan trepačka Vortex BV 1000-E

Centrifúga EBA Hettich

Laminárny box Aura mini, Bio Air Instruments

MALS Dawn Heleos II a dRI Optilab T-rEX, Agilent technologies, 1260 infinity, kolóna – PL aquagel-OH MIXED-M 8um 300 x 7.5 mm

Miešačka magnetická bez ohrevu MMS-300

Nanofotometer, IMPLEN pH meter, SensoDirect

pH meter pH 50+ DHS, XS Instruments

Prietokový cytometer, Apogee A50, ApogeeFlow Systems

Reometer AR G2, TA Instruments

Termoblok SBH130 Stuart

Trepačka temperovaná ES2

Váhy analytické PA224C

Váhy EW 620

Vodná lázeň BL 4/150

Vortex, Heidolph Reax TopZostava pre GC: Finnigan Trace GC Ultra, kolóna – DB-WAX 30 m/0,25 mm, FID detektor

3.1.4 Kultivácia baktérií

Kmene baktérie *A. vinelandii* 87, 720 aj 289 boli uchovávané v kryoskúmavkách s 30 % glycerolom pri teplote -80 °C.

3.1.5 Príprava inokulačného média

Inokulačné médium bolo pripravované pridaním 750 µl rozmrazenej kultúry (ohriatej na laboratórnu teplotu) do 35 ml pripraveného roztoku v 100 ml Erlenmeyerovej banke, ktorý obsahoval Nutrient Broth s peptónom o koncentrácii 25 g/l. Príprava inokulačného média bola vždy vykonávaná za sterilných podmienok v UV laminárnom boxe. Pripravené médiá boli následne premiestnené na temperované trepačky, kde bola teplota nastavená na 30°C a intenzita trepania bola zvolená na 180 rpm. Rozrastanie kultúry sa pohybovalo v rozmedzí 24–48 hodín v závislosti od použitej kultúry.

3.1.6 Príprava produkčného média

Roztok produkčného média obsahuje chemikálie zobrazené v tabuľke 2. Do 250 ml Erlenmeyerovej banky bolo pridaných 140 ml roztoku média. Experimenty boli vykonávané paralelne v dvoch opakovaniach. Následne boli médiá sterilizované po dobu 30 minút. Po ochladiení médií na laboratórnu teplotu došlo k preočkovnaniu narastenej kultúry do produkčného média v sterilnom boxe. V laminárnom boxe bola do média pridaná sterilizovaná glukóza v požadovanej koncentrácii (40 g/100ml) a 5 obj. % inokulačného média. Po preočkovaní boli médiá prenesené na trepačky, kde boli otáčky nastavené na 220 rpm

a teplota na 30 °C. Rozrastanie kultúry v produkčnom médiu bolo ukončované väčšinou na šiesty deň.

Tabuľka 3: Zloženie produkčného média

Chemikália	Obsah [g/l]
glukóza	20,0
kvasinkový extrakt	6,0
Na ₂ HPO ₄	2,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,6
CaCO ₃	1,0

V prípade potreby použitia mŕtvej kultúry boli bunky usmrtené pomocou azidu sodného alebo pomocou pôsobenia vysokej teploty a tlaku.

3.2 Určenie obsahu biomasy

Stanovenie obsahu biomasy bolo dosiahnuté odobratím 10 ml narastenej kultúry do centrifugačnej skúmavky, pričom vzorky boli odoberané paralelne. Následne došlo k centrifugácii vzoriek bakteriálnych kultúr (6000 rpm po dobu 5 minút). Po centrifugácii kultúry bol odobratý supernatant, ďalej používaný ku gravimetrickému stanoveniu alginátu. Biomasa bola premytá pomocou 10 ml destilovanej vody, a po premytí a vyliatí supernatantu bola vložená do sušiarne na 70 °C po dobu 24–72 hodín.

Po vysušení boli vzorky zvážené na analytických váhach a použité pre nadchádzajúce experimenty. Opatrením pred množením iných mikroorganizmov v tomto roztoku bolo pridanie 500 µl azidu sodného.

3.3 Určenie obsahu alginátu

Alginát bol stanovený gravimetricky vyzrážaním vychladeným 96% etanolom. Do predom zvážených skúmaviek boli pipetované 3 ml supernatantu a dvojnásobné množstvo vychladeného etanolu (4°C).

Centrifugácia bola vykonaná po dobu 15 minút pri teplote 4°C pri 4 500 rpm. Po centrifugácii došlo k vyliatiu supernatantu a premytiu scentrifugovaného alginátu v 3 ml destilovanej vody a opäť v dvojnásobnom množstve vychladeného etanolu. Etanol bol opatrne odliaty a skúmavky boli umiestnené do sušiarne, ktorá mala teplotu 70°C. Podobne ako pri biomase bola doba sušenia individuálna a záležala od hmotnosti alginátu, avšak priemerom boli dva dni. Po vysušení bol alginát zvážený a uschovaný pre ďalšie experimenty.

3.4 Stanovenie molekulovej hmotnosti alginátu rozmerovo-vylučovacou chromatografiou

Hmotnostný priemer molárnej hmotnosti alginátu (M_w) bol určený pomocou rozmerovo-vylučovacej chromatografie s detektormi rozptylu svetla z viacerých uhlov (SEC-MALS). Boli navážené 4 mg suchého alginátu. Následne bol alginát rozpustený v 1,5 ml 50 mmol/l roztoku citronanu sodného. Rozpúšťanie trvalo tri hodiny a bolo uskutočnené v temperovanom vodnom kúpeli pri teplote 60°C. Obsah vialiek bol prefiltrovaný a následne mohol byť permeát skúmaný. Meranie bolo uskutočnené za prietoku mobilnej fázy 0,6 ml/min citronanu sodného pri nástreku 50 μ l. Vzorky boli merané dvakrát.

3.5 Stanovenie obsahu polyhydroxybutyrátu

Obsah PHB sa určoval pomocou plynovej chromatografie. Z vysušenej biomasy boli navážené vzorky v rozmedzí 8–12 mg po trojiciach. K navážke biomasy bolo pridaných 1000 μ l chloroformu a následne bolo pridaných 800 μ l vnútorného štandardu (obsahujúceho kyselinu sírovú a kyselinu benzoovú v metanole). Následne boli vialky uzavreté a esterifikované v termobloku tri hodiny pri teplote 94 °C.

Druhá časť prípravy vzorky na plynovú spočívala v neutralizácii kyseliny sírovej v 500 μ l 50 mM roztoku hydroxidu sodného, kedy došlo k oddeleniu vodnej a chloroformovej fázy. Z chloroformovej fázy obsahujúcej methyl ester 3-hydroxybutyrátu bolo odobraných 50 μ l, ktoré boli následne napipetované do 900 μ l izopropylalkoholu. Takto pripravené vzorky boli merané na plynovom chromatografe s plameňovo-ionizačným detektorom.

3.6 Príprava makrogélov s enkapsulovanými baktériami

Gély boli v závislosti na type experimentu pripravované dvoma spôsobmi: sterilne v UV laminárnom boxe a nesterilne. Príprava gélov spočívala v pridaní 2–5 ml kultúry v dvojnásobnom množstve sieťovacieho činidla. Používanými sieťovacími činidlami boli roztok chloridu vápenatého (2 a 5 hm.%), kyselina citrónová (0,5 M). Optimálna doba sieťovania je 30 minút. Vzorky boli miešané na trepačkách pri frekvencii 3000 rpm pri teplote 25°C.

3.7 *Príprava roztokov simulujúcich vplyv rozličných prostredí na uvoľňovanie baktérii z gélu*

Do vialiek s rovnakým množstvom pripraveného gélu boli pridané roztoky pufru upravené korekciou pH (3, 7, 10), prípadne prídavkom enzýmu. Takto boli vytvorené rôzne prostredia, v ktorých bolo pozorované uvoľňovanie baktérii z gélu.

Množstvo pridaného roztoku bolo prispôsobené objemu vialky, a teda vždy sme pridali množstvo modelového prostredia, ktoré doplnilo objem 15 ml. V tabuľke 3 je zobrazené zloženie fosfátového pufru, často používaného ako modelové prostredie.

Tabuľka 4: Zloženie fosfátového pufru – roztok PBS

Chemikália	Obsah [g/l]
NaCl	8,00
KCl	0,20
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	0,14
KH ₂ PO ₄	0,24
H ₂ O	1000,00

3.7.1 *Príprava roztokov o rôznom pH*

Pri pozorovaní vplyvu pH na gél bola korekcia pôvodného pH fosfátového pufru uskutočnená pomocou 1 M kyseliny chlorovodíkovej a 1 M hydroxidu sodného. Pomocou tejto korekcie boli vytvorené tri roztoky s hodnotami pH: 3, 7, 10. Hodnota pH bola vždy určovaná pomocou pH metru.

3.7.2 *Príprava roztokov s obsahom alginázy*

Roztok alginázy bol pripravený pridaním 1 mg alginázy do 100 ml fosfátového pufru. Následne bolo pridaných 0,1 ml; 0,5 ml; 1 ml a 1,5 ml tohto roztoku ku gélu nachádzajúcemu sa v prostredí PBS, ktoré malo pH = 7. Pri experimente pozorujúcom gély s alginázou v čase bolo pridaných 0,5 ml roztoku alginázy.

3.8 *Príprava agarových misiek*

Roztok slúžiaci k príprave agarových misiek bol zložený z média Nutrient Broth (25 g/l) a agaru (20 g/l). Takto pripravený roztok bol sterilizovaný po dobu 30 min a ihneď po sterilizácii ešte za horúca rozlievaný do sterilných Petriho misiek. Po ochladení a stuhnutí agaru sú agarové misky pripravené na použitie.

Na stuhnuté agarové misky bolo napipetovaných 100 µl kultúry, či vzorky z uvoľňovania baktérii z gélu. Pri CFU (*colony forming units*) metóde bola kultúra niekoľko krát riedená podľa potreby a naopak pri krížovom roztere nebolo riedenie potrebné. Následne je pri CFU metóde

použitá očkovačia. hokejka na rovnomerné rozotrenie kultúry

Krížový rozter bol vykonaný sterilnou očkovacou kľučkou. Naočkované Petriho misky boli obalené obalené Parafilmom a uschované v termostate pri 30 °C. Doba rastu kultúr sa pohybovala v rozmedzí 24–48 hodín.

3.9 Príprava fluorescenčných sond a ich použitie v analýze

Na stanovenie bakteriálnych kultúr boli použité štyri fluorescenčné sondy – calcein AM, rhodamin 123 (Rh123), fluorescein diacetát (FDA) a propidium jodid. orescein diacetát bol použitý o koncentrácií 1 mg/ml a doba jeho inkubácie vo vzorke bola 30 minút. Excitačná vlnová dĺžka je určená na 585 nm a emisná na 605 nm.

Pri propidium jodide bola znovu použitá koncentrácia 1 mg/ml a doba inkubácie bola 15 minút. Excitačné a emisné vlnové dĺžky pri tejto sonde mali hodnotu 535 nm a 615 nm. Koncentrácia rhodaminu 123 bola 1 mg/ml a doba inkubácie 5 minút. Excitačná vlnová dĺžka tejto sondy je určená na 508 nm a emisná na 528 nm. Calcein AM bol pripravený o koncentrácií 1 mg/ml a doba inkubácie bola 15 minút. Excitačné a emisné vlnové dĺžky calceinu AM mali hodnotu 495 nm a 515 nm.

3.9.1 Príprava vzoriek na prietokovú cytometriu

Vzorky čistých bakteriálnych kultúr boli pred meraním (pred prídavkom sondy) pomocou prietokovej cytometrie 100× zriedené a premývané vo fosfátovom pufri. Odstredovanie bolo uskutočnené pri 6000 rpm a trvalo 20 minút.

Pomocou prietokovej cytometrie bolo počítané množstvo buniek z roztokov uvoľnených gélov a sledovaná viabilita pomocou fluorescenčných sond – calcein AM, FDA, rhodamin 123 a propidium jodid. V prípade použitia fluorescein diacetátu boli použité 2 µl sondy, pri ostatných sondách bol použitý 1 µl.

3.9.2 Príprava vzoriek na meranie fluorescencie na viacmódovom čítači mikrotitračných doštičiek

Vzorky boli pripravované na 96 jamkovú mikrotitračnú doštičku. Z každej kultúry bola zostavená kalibračná rada o riedení 10×, 20×, 50×, 70×, 100×, 150×, 200×, 500×, 700× a zároveň bola vždy pridaná čistá voda ako negatívna kontrola.

Do každej jamky bolo pridaných 100 µl skúmanej vzorky (prípadne časť kalibračnej rady) a príslušné množstvo fluorescenčnej sondy (rovnaké ako v kapitole Príprava vzoriek na prietokovú cytometriu) .

3.10 Meranie reologických vlastností

Analýza pripravených bakteriálnych gélov prebiehala na reometri metódou amplitúdového a frekvenčného testu. Meranie amplitúdovým testom prebiehalo v rozsahu amplitúdy deformácie od 0,01 % po 1000%. Frekvencia oscilácie bola nastavená na 1 Hz pri teplote merania 25 °C.

Technika nanášania vzorky bola veľmi dôležitá a cieľom bolo naniest' gél rovnomerne po celom povrchu meracej geometrie. Frekvenčný test nadväzoval na amplitúdový a vo väčšine prípadov bola amplitúda deformácie nastavená na hodnotu 1%. Rozsah frekvencií bol nastavený na 0,01 až 20 Hz .

4. VÝSLEDKY A DISKUSIA

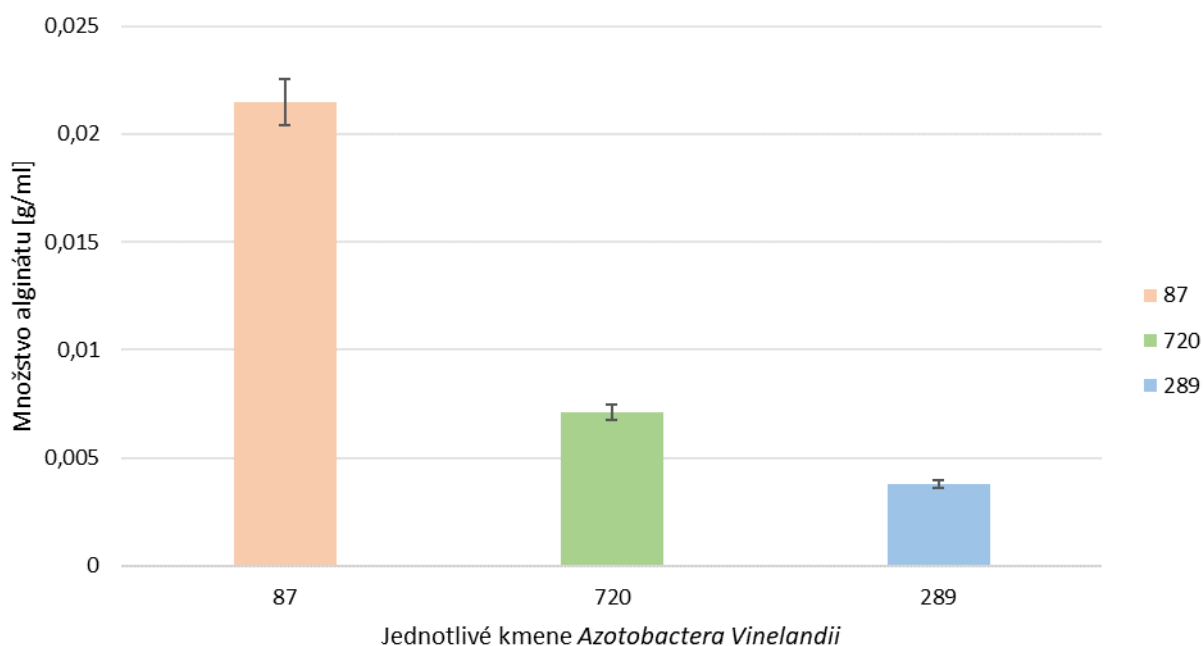
4.1 Charakterizácia kultúr

Na začiatku našej práce bolo dôležité porovnať vlastnosti použitých bakteriálnych kmeňov (*Azotobacter vinelandii* z nemeckej zbierky DSMZ 87 a DSMZ 720 a kmeň z českej zbierky mikroorganizmov CCM 289). Produkcia alginátu a produkcia PHB sú dôležitými charakteristikami danej baktérie. Skúmanie reologických vlastností gélov týchto kmeňov bolo taktiež našim cieľom v počiatkoch našich meraní.

4.1.1 Produkcia alginátu

Alginát zohráva dôležitú úlohu pri prežití baktérie v stresových podmienkach, preto môžeme vychádzať z faktu, že s narastajúcou produkciou alginátu sa zvyšuje šanca na prežitie baktérie.

Na obrázku 6 je porovnaná produkcia alginátu jednotlivých kmeňov. Jednoznačne najvýkonnejším producentom tohto biopolyméru je kmeň DSMZ 87, ktorý produkoval v priemere trojnásobné množstvo alginátu kmeňa DSMZ 720 a päťnásobné množstvo kmeňa CCM 289.



Obrázok 6: Množstvo alginátu produkované jednotlivými kmeňmi

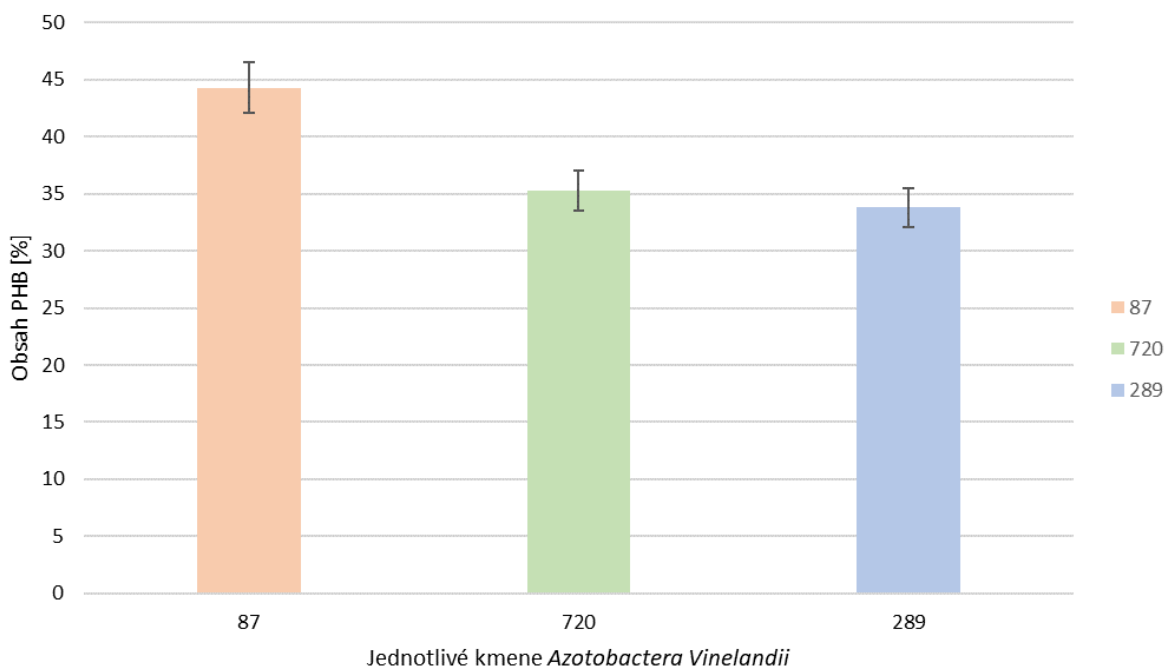
Celková produkcia *Azotobacteria vinelandii* sa pohybovala v jednotkách až desiatkach miligramov. Dôležité je tiež spomenúť, že množstvo alginátu sa mierne líšilo pri každej jednotlivej kultivácii. Rozsah hodnôt, v ktorých sa pohyboval bol pre DSMZ 87 14-28 mg/ml, pre DSMZ 720 4-12 mg/ml a pre CCM 289 3-6 mg/ml.

4.1.2 Produkcia PHB

Dôležitosť produkcie PHB bola diskutovaná v kapitole 2.7, a teda podobne ako alginát je predpokladom baktérie prežiť v nepriaznivých podmienkach. Podobne ako v predchádzajúcej kapitole boli porovnávané jednotlivé kmene. V tomto prípade však z hľadiska relatívneho obsahu PHB v bunkách. Na rozdiel od alginátu absolútne množstvo produkovaného PHA neovplyvní gelačné schopnosti kultúry, predpokladáme však, že s relatívnym obsahom PHA v bunke narastá bunková robustnosť a stresová odolnosť kultúry. Dostatočná odolnosť kultúry je pritom pri vývoji funkčných bioinokulantov jednou z kľúčových požiadaviek.

Na obrázku 7 je zobrazený priemerný percentuálny obsah PHB pre tieto kmene. Tento obsah bol určený z hmotnosti naváženého alginátu v pomere k hmotnosti PHB.

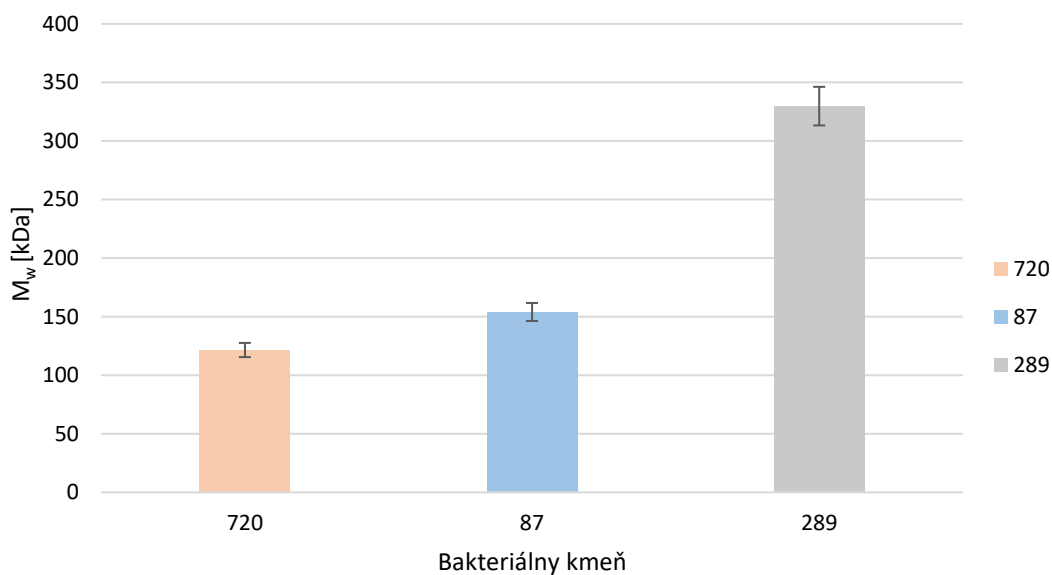
Z grafu vyplýva, že najväčšiu produkciu PHB mal opäť kmeň DSMZ 87. Tiež si však môžeme všimnúť, že v porovnaní s grafom skúmajúcim produkciu alginátu nepozorujeme také výrazné rozdiely v produkcii PHB a DSMZ 87 produkovala približne o 20% viac PHB ako ostatné kmene.



Obrázok 7: Percentuálny obsah PHB pre jednotlivé kmene

4.1.3 Molekulová hmotnosť alginátu

Kvalita gelácie môže byť ovplyvnená molekulovou hmotnosťou alginátu a preto je zaujímavé porovnanie tejto veličiny pre gély jednotlivých kultúr (DSMZ 87, DSMZ 720, CCM 289). Obrázok 8 zobrazuje porovnanie molekulovej hmotnosti jednotlivých kmeňov.



Obrázok 8: Molekulová hmotnosť alginátu jednotlivých kmeňov

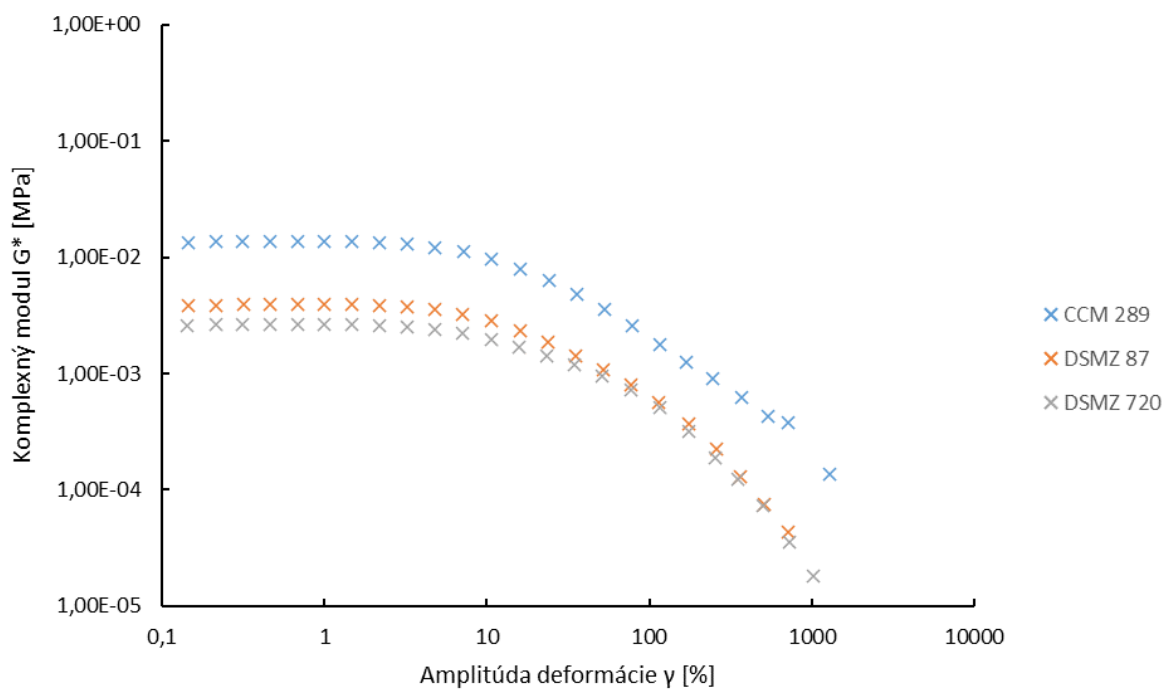
Najmenšiu molekulovú hmotnosť alginátu mal kmeň DSMZ 720 ($121,53 \pm 4,8$), ktorý aj preukazoval najhoršie gelačné vlastnosti. Kmeň DSMZ 87 má molekulovú hmotnosť alginátu ($154,65 \pm 7,9$) kDa. CCM 289 mal viac dvojnásobnú hodnotu molekulovej hmotnosti alginátu v porovnaní s kmeňom DSMZ 87 ($329,78 \pm 6,8$) kDa.

4.1.4 Porovnanie reologických vlastností gélov získaných siet'ovaním kultúr jednotlivých kmeňov

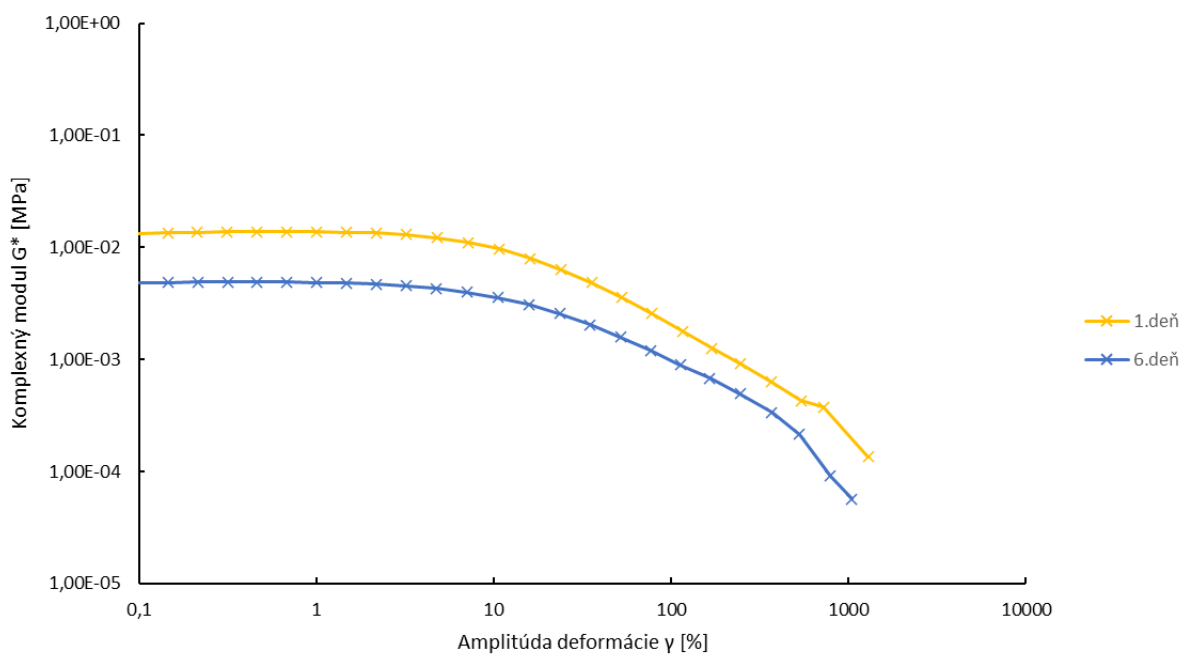
Dôležitosť skúmania reologických vlastností spočíva v dokázaní, že zosiet'ovaná kultúra má vlastnosti charakteristické pre gél. Bol zavedený komplexný modul G^* , ktorý sa skladá z reálneho, čo môže byť vratná a nevratná zložka deformácie a imaginárneho, respektíve zloženého z elastického a viskózneho modulu.

Na obrázku 9 je zobrazená závislosť komplexného modulu na amplitúde deformácie pre jednotlivé kultúry. Z grafu vyplýva, že najpevnejší bol gél vytvorený kmeňom CCM 289, čo vyplýva z hodnoty viskózneho modulu 13,34 kPa. Najmenej pevný a zároveň aj nami vizuálne najmenej stabilný gél bol gél kmeňa 720, s viskóznym modulom 2,49 kPa.

Na obrázku 10 môžeme pozorovať rozdiel medzi gélom, ktorý bol pozorovaný v prvý deň vytvorenia gélu s gélom na šiesty deň. Pri porovnaní viskózných modulov týchto gélov môžeme tvrdiť, že gél na šiesty deň mal jednoznačne menšiu hodnotu viskózneho modulu, a to 4,81 kPa v porovnaní s počátečnou hodnotou 13,34 kPa. Tento výsledok, menšia pevnosť a stabilita gélu v posledný deň uvoľňovania, bol pozorovaný aj voľným okom.



Obrázok 9: Závislosť komplexného modulu na amplitúde deformácie pre rôzne kmene



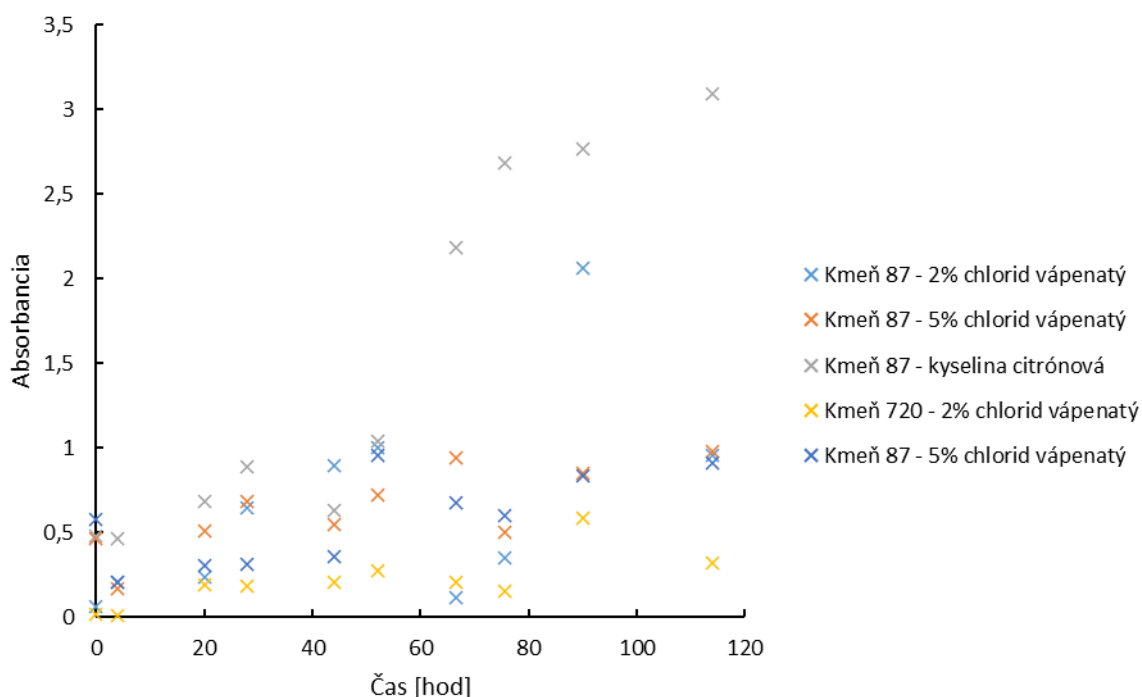
Obrázok 10: : Závislosť komplexného modulu na amplitúde deformácie. porovnanie 1. a 6. dňa

4.2 Počiatočné skúmanie správania sa gélu v roztoku

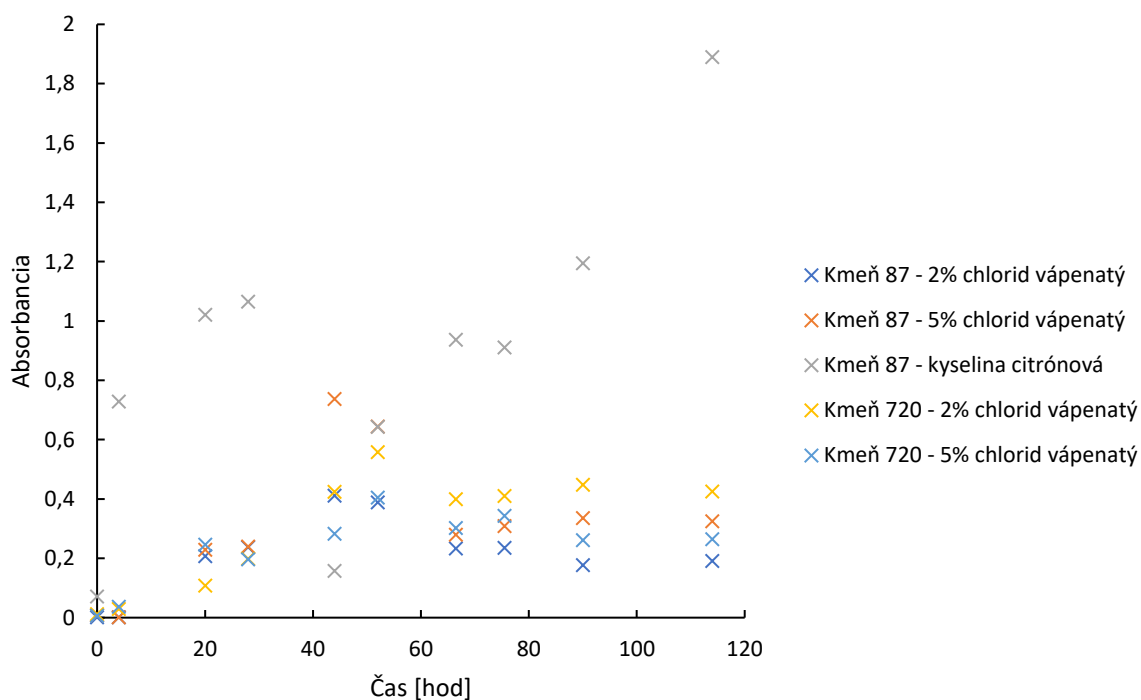
Pred samotným hľadáním a optimalizáciou metód bolo dôležité overiť, že sa baktérie uvoľňujú a zároveň nájsť najvhodnejšie sieťovacie činidlo. Prvou metódou, ktorá bola použitá je spektrofotometria, konkrétne meranie závislosti absorpcie na čase. Pokusy boli sústredené na porovnanie uvoľňovania v destilovanej vode a pufrí, a zároveň bolo porovnávané použitie dvoch rôznych sieťovacích činidiel.

Kyselina citrónová a roztok chloridu vápenatého boli vybranými zástupcami daných činidiel a to hlavne kvôli ich dostupnosti a nízkej toxicite (čo samozrejme nezávisí od koncentrácie). Roztok chloridu vápenatého bol použitý o dvoch koncentráciách - dvojpercentný a päťpercentný roztok. Porovnanie pufru a destilovanej vody bolo dôležité napríklad pre zjednodušenie odhadu vhodného riedenia roztoku, ďalej tiež na posúdenie vplyvu osmotického tlaku a botnania gélu pri uvoľňovaní enkapsulovaných baktérií. Pufor používaný počas všetkých meraní je fosfátový pufor, ktorého zloženie je uvedené v kapitole Experimentálna časť.

Na obrázkoch 11 a 12 sú zobrazené závislosti absorpcie na čase pre dané sieťovacie činidlá v pufrí a vo vode. Pri tomto pokuse boli použité dva rôzne kmene DSM 87 a DSM 720.



Obrázok 11: Závislosť absorpcie na čase - pufor



Obrázok 12: Závislosť absorbancie na čase- voda

Výsledkov, ktoré sú dôležité pre optimalizáciu metód a vyplývajú z tohto merania je niekoľko. Kyselina citrónová bola v porovnaní s chloridom vápenatým horšie sieťovacie činidlo, čo je dokázané pri uvoľňovaní v pufri aj vo vode v oboch grafoch. Absorbancia mala už v čase nula pomerne vysokú hodnotu, čo hovorí o zlej stabilite gélu géle a vyššej zakalenosti roztoku v porovnaní s chloridom vápenatým ako sieťovacím činidlom.

Z grafov tiež vyplýva, že koncentrácia chloridu vápenatého nezohráva významnú úlohu v pevnosti gélu. Teda pri päťpercentnom chloride vápenatom dochádzalo k väčšiemu rozpadu gélu, ale počiatočné hodnoty absorbancie neboli diametrálne odlišné. Kmeň 720 tvoril viac dezintegrované gély a preto nemohla byť použitá kyselina citrónová ako sieťovacie činidlo.

Pravdepodobne najdôležitejším faktorom získaným z tohto merania je zvyšujúca sa hodnota absorbancie pri vlnovej dĺžke 630 nm s postupujúcim časom.

Posledný aspekt, ktorý bol týmto meraním skúmaný je uvoľňovanie vo vode a v tlmivom roztoku. Z grafov vyplýva, že uvoľňovanie bolo účinnejšie pri pufri, a to môže byť konštatované vďaka vyšším hodnotám absorbancie jednotlivých vzoriek. Lepšie uvoľňovanie v pufri môže byť spôsobené tým, že fosforečnany nachádzajúce sa v pufri môžu urýchľovať daný rozpad gélu.

Problémom tejto metódy je fakt, že nevieme určiť či sa jedná len o rozpad gélu. Okrem baktérií môže byť hodnota absorbancie skreslená uvoľnenými reťazcami alginátu či nehomogenitou roztoku. Tiež nevieme určiť viabilitu uvoľnených baktérií.

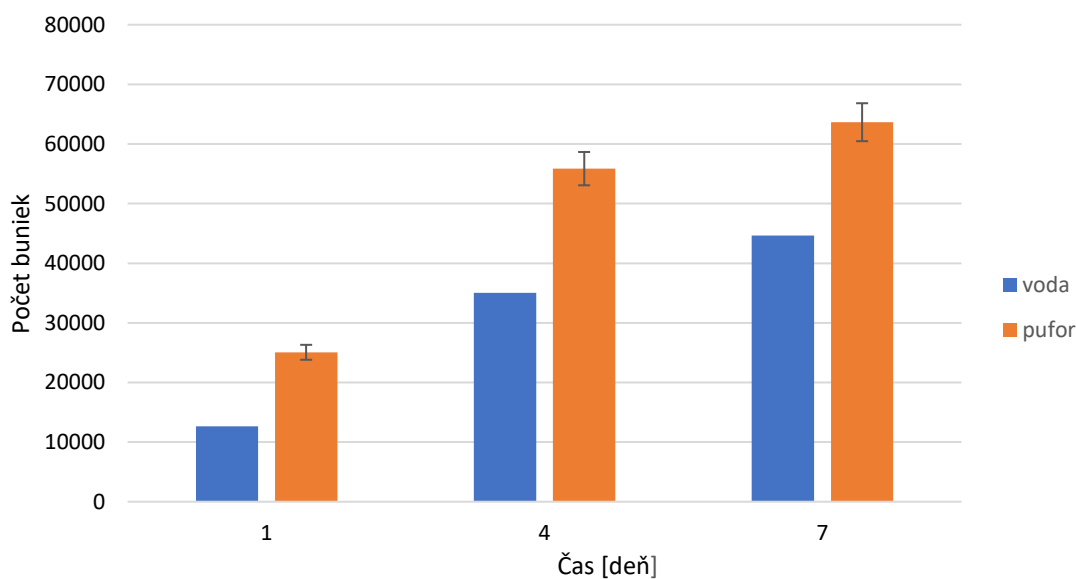
4.3 Meranie zamerané na počítanie buniek a určenie ich viability

4.3.1 Počítanie buniek pomocou prietokovej cytometrie

Prietoková cytometria je metóda, ktorá by mala byť schopná určiť množstvo uvoľnených baktérií a ich viability, preto bola zvolená na skúmanie pripravených gélov. Počet baktérií bol zisťovaný z objemu spotrebovaného roztoku, teda roztoku s uvoľnenými baktériami z gélu, prietokovým cytometrom. Pomocou množstva spotrebovanej vzorky a jej riedenia vzorky bol určený počet baktérií vo vzorke. V prípadoch veľkého počtu baktérií bolo nutné riedenie.

Na obrázku 13 je zobrazená závislosť uvoľneného počtu buniek z gélu na čase. Z týchto nameraných hodnôt vyplýva, že s narastajúcim počtom dní sa zväčšuje počet uvoľnených buniek. Zároveň môžeme pozorovať rýchlejšie uvoľňovanie buniek do fyziologického roztoku.

Výsledky počítania buniek pomocou cytometru boli v dobrej zhode s dátami získanými zo spektrofotometrie. To môže byť potvrdené porovnaním uvoľňovania vo vode a v pufrí, kde bol pozorovaný rovnaký trend a tiež so zvyšujúcim sa počtom dní sa zvyšoval počet baktérií a tiež hodnota absorbancie.

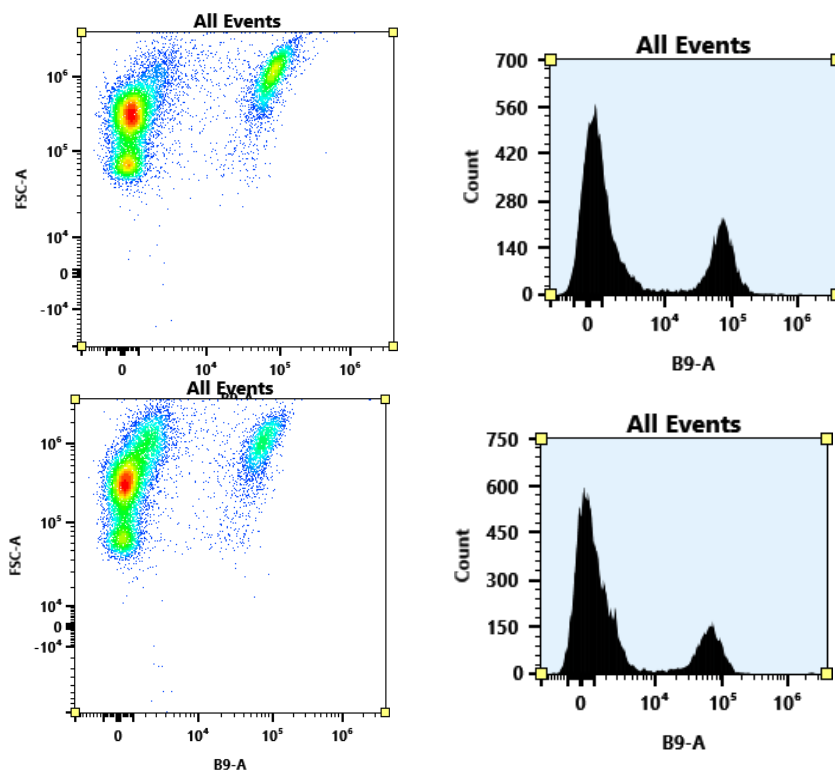


Obrázok 13: Porovnanie počtu buniek pre pufor a vodu – určené cytometricky

4.3.2 Určenie viability baktérií uvoľnených z gélov pomocou prietokovej cytometrie

Druhým problémom, ktorý ešte nebol vyriešený je zistenie odpovede na otázku viability daných baktérií. Prietoková cytometria je metóda, pri ktorej môžu byť použité fluorescenčné sondy, ktoré by nám mohli poskytnúť informáciu o viabilite buniek. Z rôznych zdrojov boli vybrané konkrétne štyri sondy – propidium jodid, fluorescein diacetát, calcein AM, rhodamin 123, ktoré interagujú s bakteriálnymi bunkami rôznymi spôsobmi.

Prvou použitou fluorescenčnou sondou bol propidium jodid. Pri použití všetkých sond pri uvoľňovaní z gélov bolo dôležité premeranie naviazania danej sondy na čistú kultúru a na mŕtvu kultúru. Pri použití tejto sondy sme nedosiahli výsledku, ktorý by bol mohol byť použitý v našom ďalšom výskume. Pri zmiešaní živej a mŕtvej kultúry boli pozorované dva píky, čo bolo pre nás pozitívnou správou. Po premeraní zafarbenej živej a mŕtvej kultúry sme však zistili, že táto sonda nie je vhodná keďže neboli pozorované takmer žiadne zmeny v umiestnení píkov. Dva píky mohli znamenať kontamináciu, a teda prítomnosť iného mikroorganizmu, alebo mohla byť sonda zle naviazaná z dôvodu prítomnosti alginátu. Dané histogramy a cytogramy sú zobrazené na obrázku 14 nižšie.

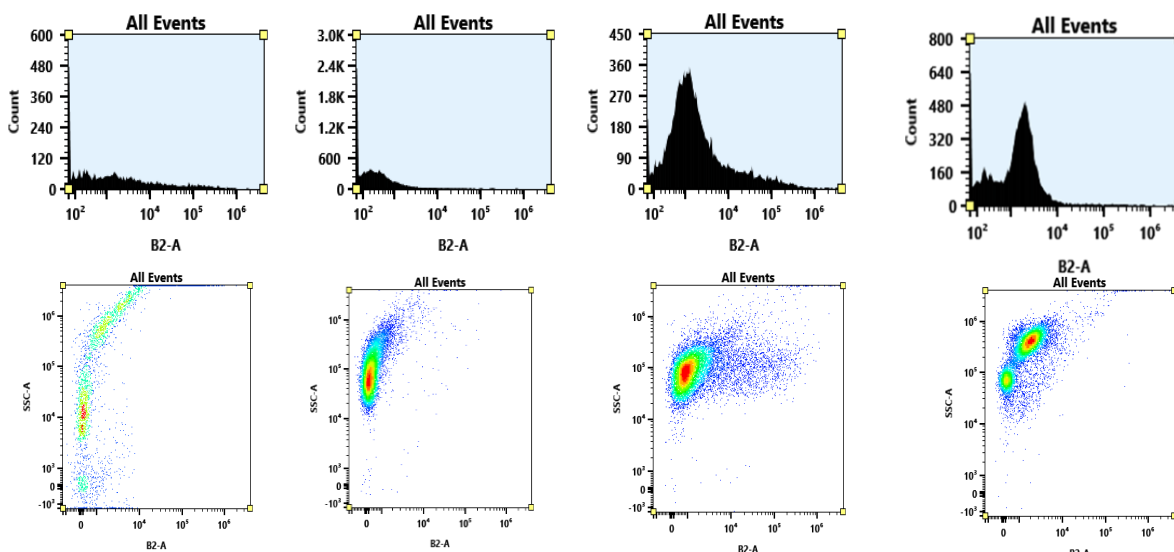


Obrázok 14: Použitie propidium jodidu horný rad živé bunky, dolný rad mŕtve

Naším podozrením bolo, že daná kultúra nie je mŕtva a teda, že naše výsledky boli skresľujúce. Meranie bolo zopakované s použitím azidu sodného, ktorý slúžil na umŕtvenie živých buniek. Výsledok bol rovnako neodpovedajúci daným vzorkám. Z tohto dôvodu nebolo s danou sondou ďalej pracované.

Fluorescein diacetát bol sondou javiacou sa najperspektívnejšie z dôvodu výsledkov kolegov z fluorescenčného mikroskopu, kde bolo predošlé pozorovanie naviazania tejto sondy na danú bakteriálnu kultúru. Fluorescenciu pri FDA vykazujú iba živé bunky.

Meranie s použitím sondy FDA nevychádzalo podľa teoretických predpokladov. Boli porovnávané rôzne koncentrácie (zriedenie 10×, 100×) tejto sondy a bol pozorovaný nárast príslušného píku živej kultúry. Pri porovnaní živých a mŕtvych buniek však bol pozorovaný len nepatrný rozdiel vo výsledkoch. Výsledky sú zobrazené na obrázku 15.



Obrázok 15: Použitie sondy FDA, prvý až tretí stĺpec je narastajúca koncentrácia sondy a štvrtý stĺpec je mŕtva kultúra

Fluorescenčná sonda calcein AM fungovala na podobnom princípe ako FDA, kedy sa mala viabilita prejavovať iba na živých bunkách, avšak pri porovnaní výsledkov z cytometrie nie je medzi mŕtvymi a živými bunkami viditeľný žiadny rozdiel. Pri porovnaní histogramov a cytogramov nie je viditeľná takmer žiadna zmena. Výsledky našich cytometrických meraní sú opäť v prílohe.

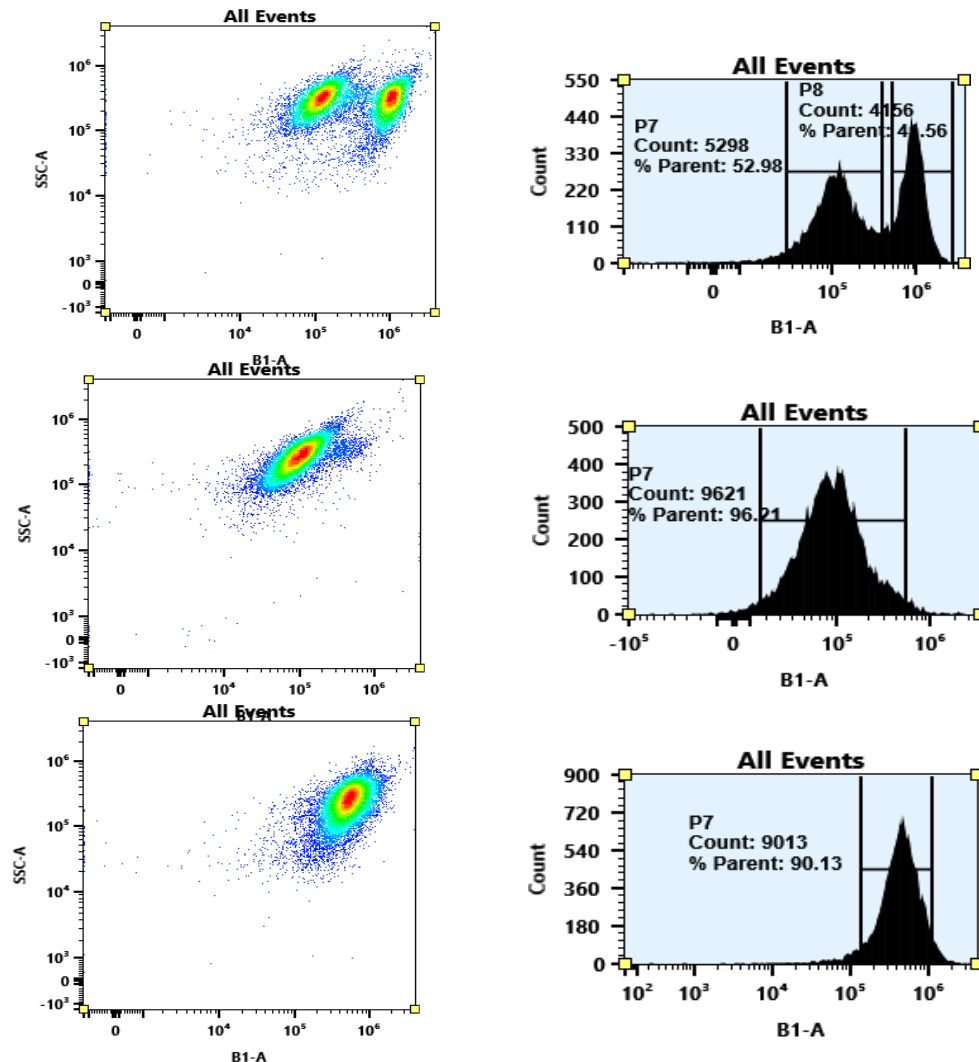
Poslednou sondou, ktorá bola testovaná je rhodamin 123. Rhodamin 123 fungoval pri niektorých vzorkách takmer ukážkovo. Na obrázku 16 môžeme pozorovať daný príklad. Pri vzorke kultúry zriedenej v pomere 1:1, živé k mŕtvym, sú pozorované dva píky a na cytograme sú viditeľné dve kolónie predstavujúce živé a mŕtve baktérie. V strednom rade sa nachádza vzorka mŕtvych baktérií a dolnom sa nachádzajú živé. Pík pri živých je veľmi ostrý. Na druhú stranu, pri mŕtvych je pozorované pomerne veľké množstvo signálu, čo nie je adekvátne, ak by táto sonda mala byť odporúčaná ako štandardizovaná metóda.

Z tohto dôvodu sme sa rozhodli použiť EDTA, ktoré by malo predstavovať ochranu pred samozhasínaním. Samozhasínanie sa deje kvôli zle priechodnej membráne Gram-negatívnych baktérií [84].

Naše pokusy však prídavok EDTA nijako neovplyvnil. Sonda rhodamin 123 môže byť teda považovaná za najúčinnjšiu sondu, ale ako už bolo spomenuté výsledky získané touto metódou nie sú vždy platné, pravdepodobne kvôli zlému prestupu sondy bunkovou stenou. Ten mohol byť spôsobený alginátom, ktorý mohol brániť prestupu svojou viskóznou štruktúrou.

Na záver tejto kapitoly sústrediac sa na použitie fluorescenčných sond je dôležité uviesť, že dané sondy boli otestované aj s inou baktériou, konkrétne s baktériou *Cupriavidus necator* H16 CCM 3726. Trendy popísané pri jednotlivých sondách boli pozorované aj pri tejto baktérii, ktorá sa však odlišovala od *Azotobacter vinelandii* tým, že neprodukovala alginát. Výnimkou bola sonda propidium jodid, pri ktorej bola pozorovaná fluorescencia pri mŕtvej kultúre

a pri živej nebol pozorovaný žiaden signál. Propidium jodid funguje ako vhodná sonda pri iných baktériách, avšak nie pri modelovom organizme *Azotobacter vinelandii*. Problémom pri naviazaní mohlo byť práve naviazanie sondy kvôli samotnému alginátu. Daný cytogram a histogram sa nachádzajú v prílohe.



Obrázok 16: Použitie rhodaminu 123 - horný rad živé mŕtve, uprostred mŕtve, spodný rad živé

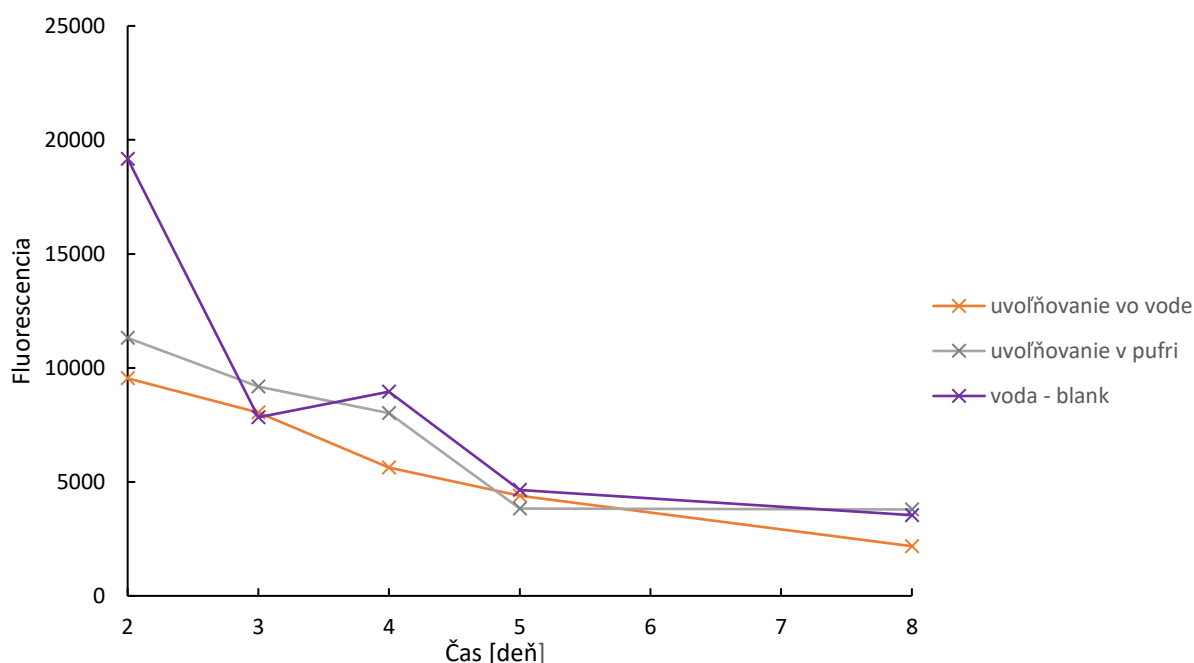
4.3.3 Použitie viacmódového čítača mikrotitračných dosiek

Na meranie intenzity fluorescence bol použitý viacmódový čítač mikrotitračných dosiek. Fluorescenčné sondy (calcein AM, rhodamin 123, propidium jodid a fluorescein diacetát) použité pre cytometriu boli použité aj pre meranie intenzity fluorescence. Pri meraní bola vždy najskôr pripravená kalibračná rada z čistej kultúry, a následne bola meraná fluorescence jednotlivých vzoriek. Rovnako boli použité rôzne koncentrácie sondy ($10\times$, $100\times$ a $1000\times$

zriedené). V tabuľke 5 je zobrazená kalibračná rada pre fluorescein diacetát. Z tabuľky 4 vyplýva, že dané hodnoty neodpovedajú kalibračnej rade. Výstupy z merania kalibračných rád nevykazujú žiadnu lineárnu závislosť medzi intenzitou fluorescencie a riedením.

Tabuľka 5: Namerané hodnoty fluorescencie kalibračnej rady pre FDA

Zriedenie	Čistá kultúra	10x	100x	1000x	20x	200x	50x	150x	500x	70x	700x	d. H ₂ O
Priemer	613	95	133	700	335	1707	512	478	995	410,5	69,5	58,5



Obrázok 17: Závislosť fluorescencie na čase

Pre potvrdenie vylúčenia metódy bola tiež zmeraná fluorescencia baktérií uvoľnených z gélov Na obrázku 17 vyššie je zobrazená závislosť fluorescencie, konkrétne pri tomto meraní bola použitá sonda rhodamin 123. Môžeme pozorovať pokles fluorescencie pri všetkých vzorkách, čo by mohlo hovoriť o tom, že dané uvoľnené baktérie boli mŕtve. Evidentným problémom je však meranie vody ako štandardu. Fluorescencia destilovanej vody mala mať minimálnu hodnotu a určite nemala predstavovať klesajúci trend danej závislosti, čo pravdepodobne poukazuje na nestabilitu sondy.

Pokusy so sondami boli opakované po príprave nových sond, čo bolo urobené kvôli podozreniu z rozpadu sondy žiarením. Rovnako boli skúšané rôzne koncentrácie daných sond, pretože mohlo dôjsť k nedostatočnému alebo nadbytočnému množstvu sondy pre danú vzorku. Obe metódy – cytometria a meranie fluorescencie na viacmódovom čítači, nie sú vhodné na zistenie viability.

4.4 Použitie kultivačných metód

Na základe predchádzajúcich experimentov, kedy sa na sledovanie baktérií použili rôzne fluorescenčné sondy, avšak nepotvrdila sa ich viabilita, boli otestované ďalšie metódy. Platňová metóda bola zvolená z dôvodu svojej ľahkej dostupnosti a nízkej ceny v porovnaní s inými metódami, napríklad v porovnaní s cytometriou.

Prvý nami stanovený cieľ bolo zvolenie správneho riedenia danej vzorky s narastajúcim časom. V tabuľke 5 sú zobrazené potrebné riedenia pre vzorky gélov. Zaujímavé zistenie bolo, že riedenia potrebné pre vzorky gélov uvoľňovaných do vody alebo do tlmivého roztoku boli, až na pár výnimiek pri jednotlivých konkrétnych meraniach, rovnaké. Ak nastala potreba riedenia, vo vode bolo väčšinou potrebné riedenie menšie o rád, teda uvoľnených baktérií bolo o rád menej.

Uvoľňovanie živých buniek prebiehalo exponenciálne, čo môžeme pozorovať v tabuľke nižšie. Pozitívnu správou teda je, že táto metóda potvrdzuje výsledky získané z dát získaných spektrofotometricky.

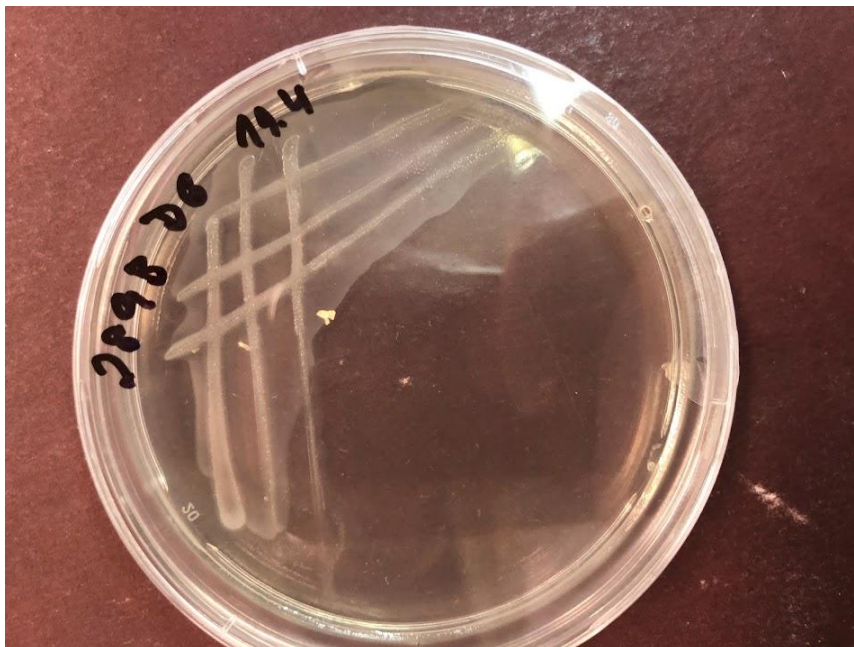
Tabuľka 6: Uvoľňovanie buniek – platňová metóda

Čas [deň]	Potrebné riedenie [násobok]
1	10
2	100
3	1 000
4	1 000
5	10 000
6	10 000
7	100 000
8	1 000 000
9	1 000 000

Vďaka agarovým miskám sme dokázali, že baktérie prežili samotnú enkapsuláciu v géli, a určitý čas sú schopné odolávať vplyvom prostredia (viď kyslejšie/zásadité pH), za čo môžu vďaka polyhydroxyalkanoátom, ktoré sú schopné akumulovať. Nevýhodou tejto metódy je, že je veľmi pracná, časovo náročná a môže byť ovplyvnená vzdušnou kontamináciou. Na obrázku 18 môžeme pozorovať ružové sfarbenie netypické pre baktériu *Azotobacter vinelandii*, teda pozorujeme kontamináciu. Sledovanie uvoľňovania bakteriálnych buniek z gélu platňovou metódou však predstavovalo problém z hľadiska odhadnutia správneho riedenia, aby počet buniek neprerastal misku a naopak, aby na agarovej miske narástli nejaké bakteriálne kolónie. Tento opakujúci sa jav mohol byť spôsobený predovšetkým samotným odberom vzorky, keďže dezintegrované časti gélu sedimentovali. Vďaka krížovému rozteru na obrázku 19 sme boli schopní dokázať, že sa jedná o *Azotobacteria vinelandii*.



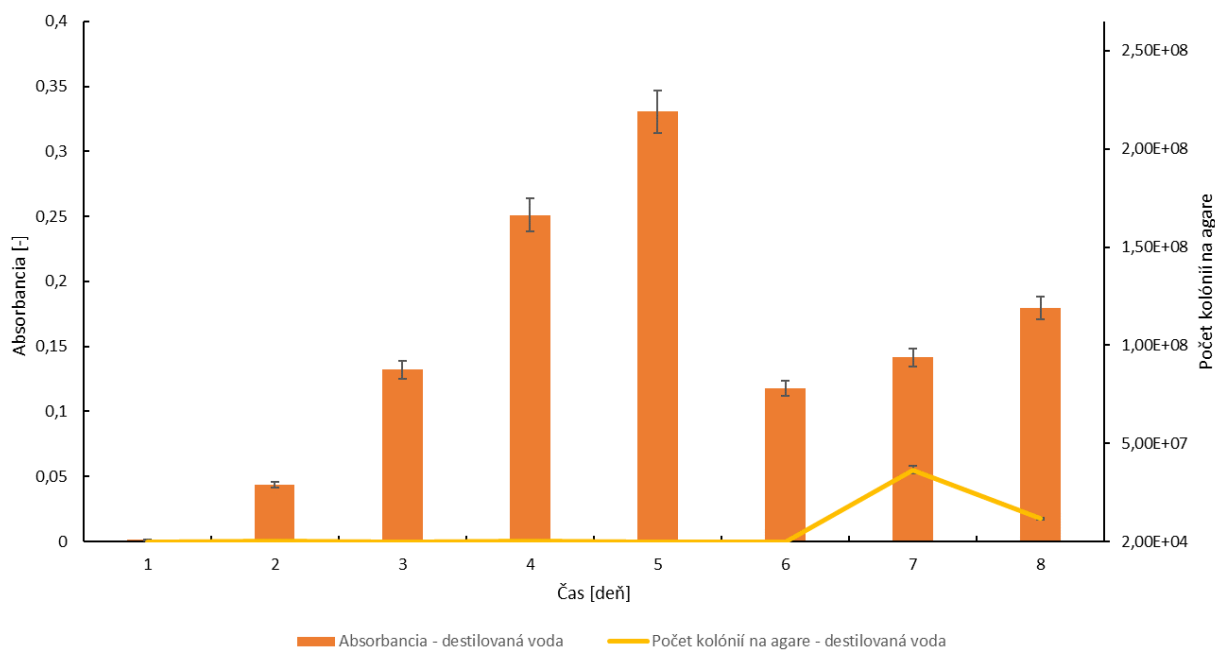
Obrázok 18: Netypické ružové sfarbenie *Azotobacteria Vinelandii* pri platňovej metóde



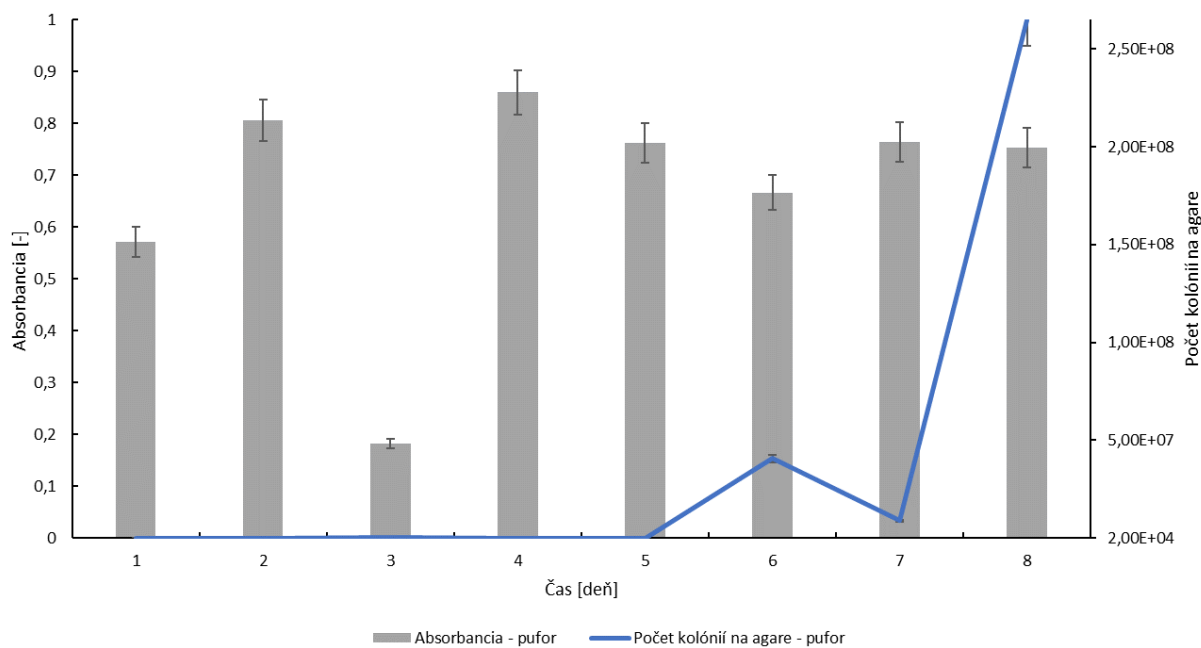
Obrázok 19: Potvrdenie viability *Azotobacteria vinelandii* krížovým rozterom

Na obrázkoch 20 a 21 je zobrazené porovnanie zmeny absorbancie roztoku a počtu kolónií narastených na agare v závislosti na čase. Môžeme pozorovať intenzívne hodnoty absorbancie hneď na začiatku merania, kde mohol byť dôvodom rozpad gélu a jeho malá stabilita. Naopak, pri CFU metóde je pozorovaný nárast v čase.

Nekonzistentnosť tohoto rastu mohla byť spôsobená napríklad nerovnomerným odberom z roztoku, v ktorom sa nachádzal gél. Zároveň môžeme pri porovnaní hodnôt absorbancie a počtu kolónií pozorovať väčšie uvoľnenie buniek v pufri. Pozitívom je však narastajúca hodnota uvoľnených živých buniek. Zaujímavé je tiež porovnanie uvoľňovania vo vode a v pufri, kde môžeme pozorovať pri oboch metódach väčšie uvoľnenie živých baktérií v pufri.



Obrázok 20: Porovnanie CFU metódy a spektrofotometrie v čase – voda



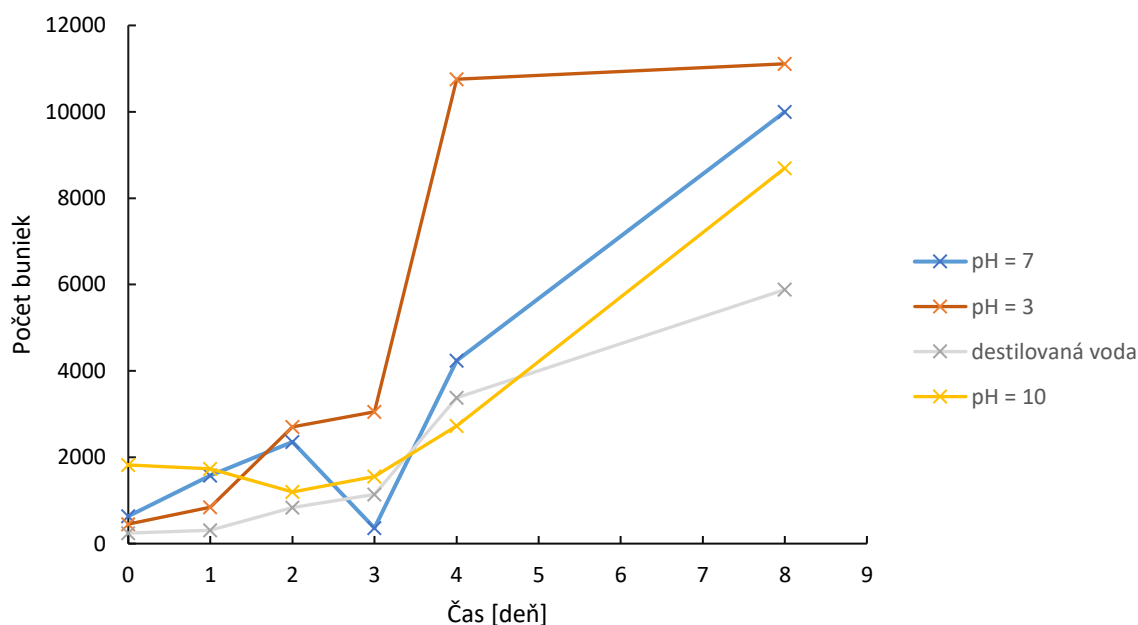
Obrázok 21: Porovnanie CFU metódy a spektrofotometrie v čase – voda

4.5 Vplyv rôznych faktorov na vlastnosti gélu

4.5.1 Vplyv pH

Bol sledovaný vplyv pH na kvalitu gélov a rýchlosť uvoľňovania buniek, a to napríklad kvôli pôde, ktorá má na rôznych lokalitách rôzne pH. Vzorky boli porovnávané dvomi metódami – absorpčné spektrá vzoriek získané spektrofotometricky a počet buniek získaných z prietokovej cytometrie. Prítomnosť živých baktérií a ich schopnosť prežitia v gélových nosičoch a zároveň aj rozdielnych prostrediach bola dokázaná použitím kultivácie na agarových miskách.

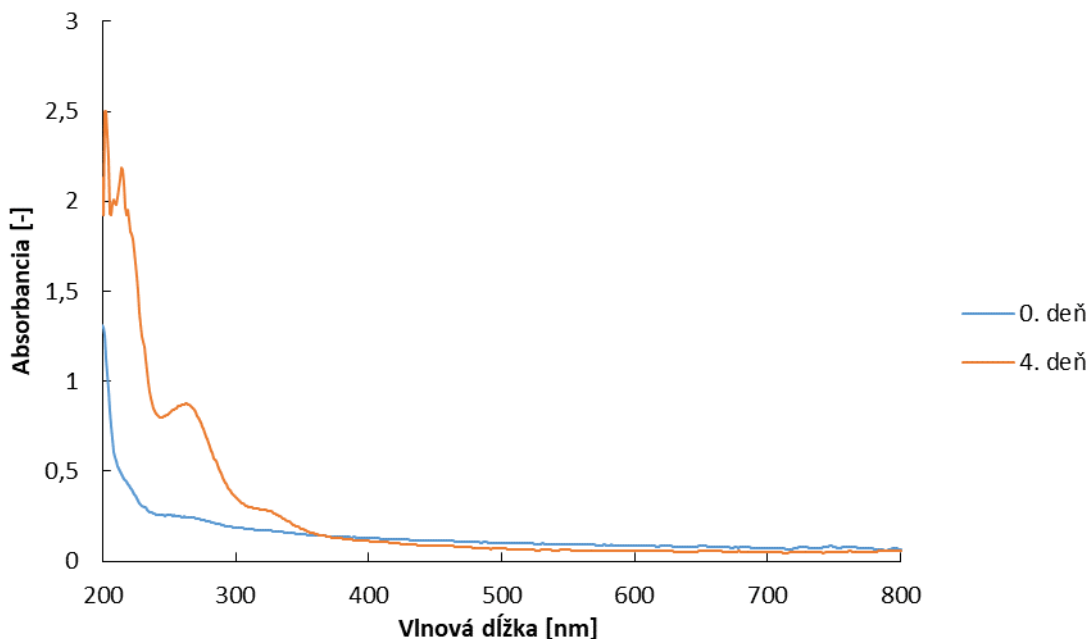
Na obrázku 22 môžeme pozorovať rôzny priebeh uvoľňovania baktérií z gélov. Z grafu vyplýva, že najmenej buniek sa uvoľnilo v destilovanej vode a najviac pri fyziologickom roztoku o pH s hodnotou 3. Bolo dokázané, že kyslé prostredie napomáha rozkladu gélu viac ako neutrálne či zásadité.



Obrázok 22: Uvoľňovanie buniek v čase – pri rôznom pH, stanovené cytometricky

Pri porovnávaní spektier získaných spektrofotometricky bol pozorovaný nárast píku v oblasti 200-300 nm, ktorý mohol predstavovať napríklad uvoľnenie alginátu. Na obrázku 23 na nasledujúcej strane je zobrazené spektrum pre vzorku uvoľňujúcu sa v pufrí o pH = 10.

Bola porovnávaná vzorka v deň prípravy gélu a v štvrtý deň. Spektrálny priebeh ostatných vzoriek bol veľmi podobný a pri každej z nich bol pozorovaný nárast píku v oblasti 200 - 300 nm. Na štvrtý deň bolo nutné vzorku riediť v pomere 1:2, teda jeden diel vzorky a dva diely fosfátového pufru. Všetky vzorky boli overované krížovým testom na agare počas nášho merania. Z výsledkov môžeme konštatovať, že uvoľnené baktérie boli živé.

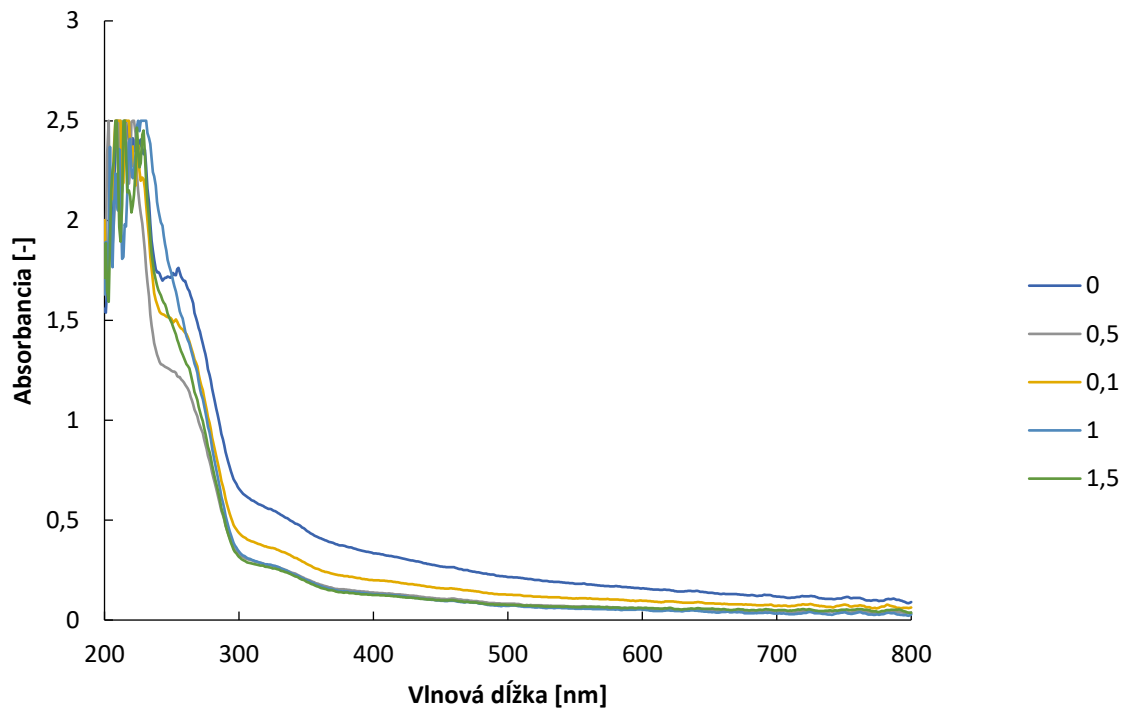


Obrázok 23: Spektrálny priebeh v čase – vzorka v pufrí o $pH = 10$

4.5.2 Vplyv alginázy na rozklad gélu

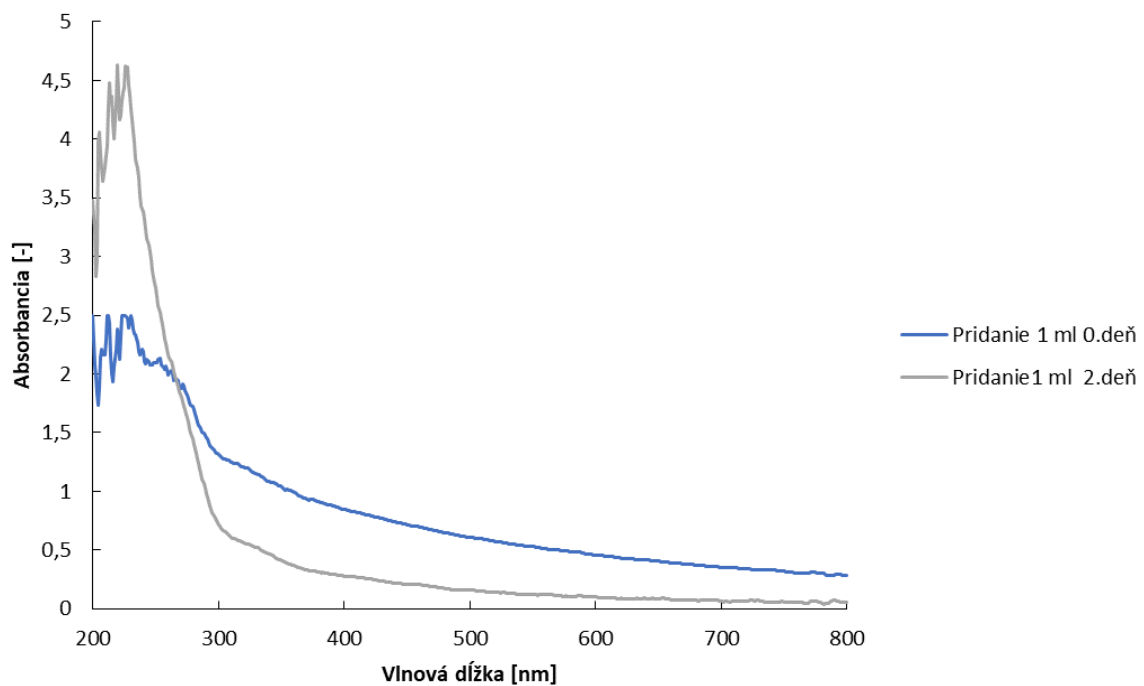
Algináza je enzým urýchľujúci chemickú degradáciu (hydrolýzu) alginátu. Pre charakteristiku nami vytvorených gélov, ich stabilitu a pevnosť je zaujímavé pozorovať vplyv alginázy. Prvý experiment bol sústredený na optimalizáciu použitia vhodnej koncentrácie enzýmu alginázy. To bolo veľmi dôležité na určenie aspoň minimálnej koncentrácie, kedy enzým vyvolá v géli nejakú zmenu.

Od pridania alginázy bolo meranie opakované vždy po tridsiatich minútach. Meranie prebehlo sedemkrát. Na grafe na obrázku 24 sú výsledky jednotlivých vzoriek. Môžeme konštatovať, že rozdiely vo vzorkách nie sú výrazné. V prítomnosti alginázy klesá intenzita rozptylu svetla a rastie intenzita rozptylu v UV oblasti. Pri porovnaní rôznych objemov bol najväčší rozptyl pre prídavok 0. Kvôli nepatrnej zmene v čase bol experiment predĺžený na dva dni. Obrázok 25 zobrazuje zmenu na druhý deň, prítomnosť alginázy nezmenila rozpad gélu na druhý deň. Nastalo uvoľnenie, vidíme takmer dvojnásobný nárast absorbancie v druhom dni. Po dvoch dňoch klesal rozptyl, rástla absorbancia v UV..



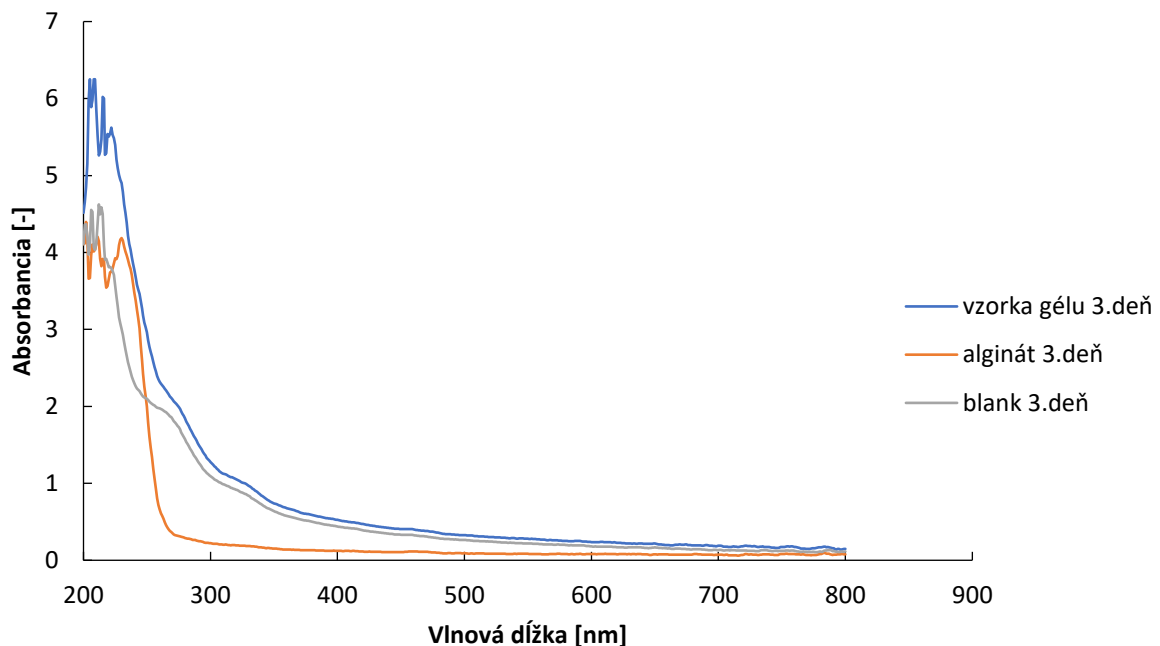
Obrázok 24: Spekrálny priebeh jednotlivých vzoriek po prvom dni

Druhý experiment skúmal rozdiel medzi rozpadom laboratórne pripraveného alginátu a nami pripravených gélov po pridaní alginázy V prvý a v druhý deň neboli pozorované veľké zmeny, spektrá môžeme pozorovať v prílohe.



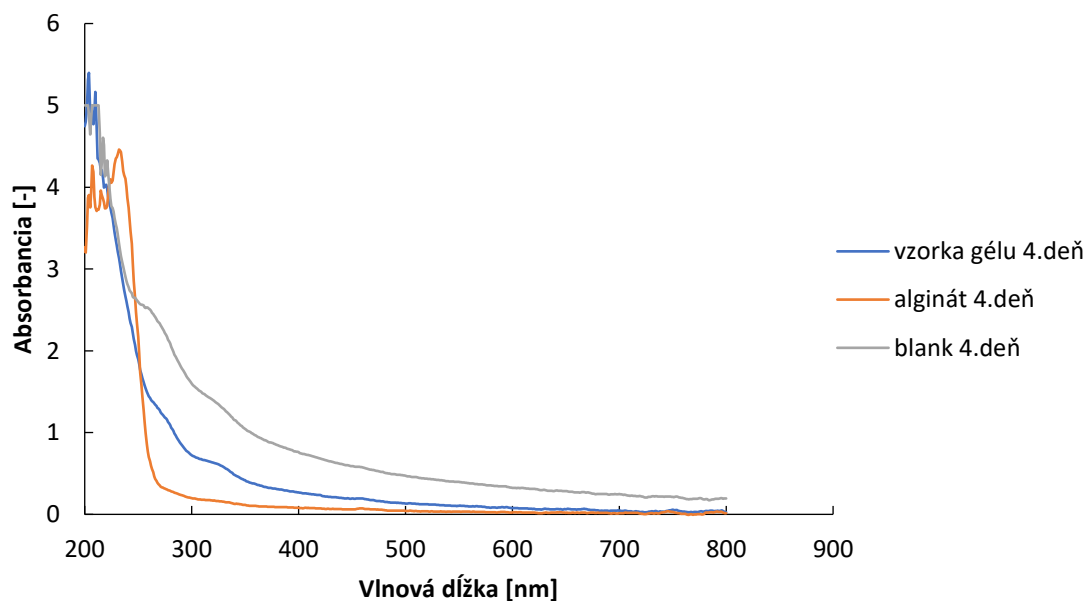
Obrázok 25: Vzorka s pridaním 1 ml roztoku alginázy na druhý deň

V tretí deň bol pozorovaný rozdiel medzi vzorkou gélu a blankom (gél vo fosfátovom pufri). Absorbancia pri 630 nm vo vzorke gélu dosahovala hodnoty vyššie ako 6, zatiaľ čo alginát a blank dosiahli maximálne hodnotu 4,5. Dané trendy sú na obrázku 26 nižšie.



Obrázok 26: Závislosť absorbancie na čase, štvrtý deň, pozorovanie vplyvu alginázy porovnanie alginátu a nami vytvoreného vzorku

Na obrázku 27 nižšie je zobrazené uvoľňovanie v posledný deň merania, teda v štvrtý deň. Blank mal v štvrtý deň väčšiu intenzitu rozptylu ako ostatné vzorky. Tieto „kvalitatívne“ zmeny (zastúpenie UV a rozptylového signálu) môžeme brať ako nepriamy dôkaz vplyvu alginázy.



Obrázok 27: Závislosť absorbancie na čase, štvrtý deň, pozorovanie vplyvu alginázy porovnanie alginátu a nami vytvoreného vzorku

5. ZÁVER

Táto bakalárska práca bola zameraná na vytvorenie gélových matíc s inkorporovanými bakteriálnymi bunkami a zároveň na optimalizáciu analytických metód skúmajúcich viabilitu a počet inkorporovaných buniek.

Prvá časť nášho výskumu bola zameraná na charakterizáciu použitých kmeňov (DSMZ 87, DSMZ 720 a CCM 289). Kmeň DSMZ 87 jednoznačne preukázal najlepšie vlastnosti týkajúce sa produkcie alginátu a tiež produkcie PHB. Pri porovnaní molekulovej hmotnosti alginátu mal však až o polovicu menšiu molekulovú hmotnosť alginát získaný z kmeňa DSMZ 87 v porovnaní s kmeňom CCM 289. Porovnaním reologických vlastností bol najpevnejší gél tvorený kmeňom CCM 289 (hodnota viskózneho modulu 13,34 kPa). Z týchto výsledkov môžeme konštatovať, že pre budúce merania je najvhodnejšie použiť kmeň 87 alebo 289. Oba preukázali vlastnosti, ktoré im môžu umožniť prežitie v pôde ochránením pred nežiaducimi vplyvmi.

Určenie trendu dezintegrácie gélov bolo ďalšou veľmi dôležitou súčasťou tejto práce. Spektrofotometricky, meraním závislosti absorbancie na čase, boli zistené hneď dva dôležité výstupy pre ďalšie merania. Prvým bol fakt, že najvhodnejším sieťovacím činidlom bol roztok chloridu vápenatého. Druhým bolo objavenie urýchlenia rozpadu gélu v prostredí pufri, čo mohlo byť spôsobené fosfátovými iónmi v pufri. Tu je dôležité zmieniť, že najvýraznejší rozpad gélu v pufri bol pozorovaný pri géli kmeňa DSMZ 720, ktorého charakteristikou bol menej stabilný a viac dezintegrovateľný gél.

Vďaka výsledkom zo spektrofotometrie a potvrdeniu schopnosti kultúr tvoriť gély započalo meranie zamerané na určenie počtu uvoľnených buniek z gélovej matice a zároveň ich viabilitu. Prietoková cytometria sa preukázala ako metóda veľmi vhodná na meranie počtu buniek, avšak nie na určovanie ich viability.

Viabilita bola meraná pomocou fluorescenčných sond (rhodaminu 123, calceinu AM, propidium jodidu a fluorescein diacetátu), podobne ako pri určovaní intenzity signálu pri viacmódovom čítači mikrotitračných doštičiek. Neuspokojivé výsledky pri použití fluorescenčných sond pravdepodobne pramenili z niekoľkých faktorov. Najpravdepodobnejším je, že alginát, kvôli tomu, že sa jedná o veľkú molekulu, pravdepodobne bránil adekvátnemu naviazaniu sondy na bunky.

Platňová metóda spolu s krížovým rozterom sa ukázali ako veľmi vhodné na určovanie viability buniek. Bolo potvrdené prežitie baktérií až na siedmy deň od zosieťovania gélu. Pri použití cytometrie na určenie celkového počtu buniek a následnom použití platňovej metódy je možné získať informácie, ktoré sú potrebné na určenie viability a počtu baktérií. Pre budúce použitie takéhoto postupu odporúčame zvoliť širší rozptyl riedení pri platňovej metóde s cieľom nájdenia presnejšej koncentrácie živých buniek.

V poslednej časti tejto bakalárskej práce bola pozornosť venovaná vplyvom rôznych faktorov na gél. Zistili sme, že rôzna hodnota pH jednoznačne ovplyvňovala rozpad gélu, pričom najvyšší rozpad bol pozorovaný v kyslom prostredí. Takáto informácia je veľmi cenná

hlavne pre budúcu aplikáciu takýchto gélových matíc do pôd.

Posledným skúmaným javom bol vplyv alginázy na bakteriálne gély v porovnaní so synteticky vytvoreným alginátom. Nepriamo sa potvrdilo, že algináza ovplyvňuje mechanizmus dezintegrácie, nepozorujeme výrazný rozptyl spôsobený uvoľnenými reťazcami alginátu, skôr sa uvoľnené reťazce prevádzajú na nízkomolekulárne produkty (absorpcia v UV). Neukázal sa zásadný vplyv alginázy na rýchlosť dezintegrácie gélu, čo pôsobí akoby bola algináza schopná degradovať len reťazce alginátu uvoľnené z gélu, nie tie, ktoré sú v zosieťovanej forme.

Pre budúce skúmanie tejto problematiky sú výsledky tejto práce kľúčové, pretože sa nám podarilo otestovať a vybrať vhodné metódy, potrebné na skúmanie viability a počtu buniek. Výsledok, ktorý je rozhodujúci pre budúcu aplikáciu samoenkapsulovaných baktérií je ich viabilita v čase, ktorú sa nám podarilo potvrdiť.

Aspekty, na ktoré by sa mal zamerať nasledujúci výskum je jednoznačne enkapsulácia rôznych kmeňov a druhov baktérií zároveň a pozorovanie ich synergického efektu na stimuláciu rastu rastlín.

ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] RAMASAMY, M., T. GEETHA a M. YUVARAJ. Role of Biofertilizers in Plant Growth and Soil Health. Nitrogen Fixation [online]. [cit. 2022-05-15]. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.87429
- [2] SMOLINSKÁ, Miroslava. EKOLÓGIA A TAXONÓMIA MIKROORGANIZMOV [online]. 1st. Bratislava, 2017 [cit. 2022-01-26]. Dostupné z: https://fns.uniba.sk/uploads/media/Ekologia_a_taxonomia_mikroorganizmov
- [3] BACKER, Rachel, J. ROKEM, Ilangumaran GAYATHRI, John LAMONT, Dana PRASLICKOVA, Emily RICCI, Sowmyalakshmi SUBRAMANIAN a Donald SMITH. *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture*. *Frontiers in Plant Science* [online]. 2018, (9), 1473 [cit. 2021-11-17]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2018.01473
- [4] HARTMANN, Anton, Michael ROTHBALLER a Michael SCHMID. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and soil* [online]. 2008, (312), 7-14 [cit. 2021-11-17]. Dostupné z: doi:10.1007/s11104-007-9514-z
- [5] GRAY, E.J. a D.L. SMITH. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions *in the plant–bacterium signaling processes*. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 2005, (37), 395-412 [cit. 2021-11-17]. ISSN 0038-0717. Dostupné z: doi:10.1016/j.soilbio.2004.08.030.
- [6] MUNEEES, a Kibret MULUGETA. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science* [online]. 2014, (26), 1-20 [cit. 2021-11-13]. ISSN 1018-3647. Dostupné z: doi:10.1016/j.jksus.2013.05.001.
- [7] AMBROSINI, Adriana a Luciane PASSAGLIA. Plant Growth–Promoting Bacteria (PGPB): Isolation and Screening of PGP Activities. *Current protocols in plant biology* [online]. 2017, (2), 190-209 [cit. 2021-11-17]. Dostupné z: doi:10.1002/pb.20054

- [8] GROVER, Minakshi, Shrey BODHANKAR, Abha SHARMA, Pushpendra SHARMA, Lata NAIN a Jyoti SINGH. PGPR Mediated Alterations in Root Traits: *Way Toward Sustainable* Crop Production [online]. 2021, 287 [cit. 2021-11-17]. ISSN 2571-581X. Dostupné z: doi:10.3389/fsufs.2020.618230
- [9] TEJADA MORAL, Manuel, Pinakin DHANDHUKIA a Dweipayan GOSWAMI. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture* [online]. 2016 [cit. 2021-11-17]. Dostupné z: doi:10.1080/23311932.2015.1127500
- [10] Nitrogen Fixation Types: Physical and Biological Nitrogen Fixation [online]. [cit. 2022-01-26]. Dostupné z: <https://www.biologydiscussion.com/nitrogen-fixation/types-nitrogen-fixation/nitrogen-fixation-types-physical-and-biological-nitrogen-fixation-with-diagram/14969>
- [11] MANOJ, Singh, Vishal TYAGI a Mona NAGARGADE. *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: A Biological Approach Toward the Production of Sustainable Agriculture. Role of Rhizospheric Microbes in Soil* [online]. 3rd. Varanasi, Uttar Pradesh, India: Springer Nature Singapore, 2018, s. 205-223 [cit. 2021-11-17]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/325134097_Plant_Growth-Promoting_Rhizobacteria_A_Biological_Approach_Toward_the_Production_of_Sustainable_Agriculture
- [12] DAVIES, Peter J. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. 1st. New York, NY, USA: Springer: Dordrecht, 1995, s. 844. ISBN 978-0-7923-2985-5.
- [13] NAEEM, Khan, Bano ASGHARI, Ali SHAHID a Md. BABAR. Crosstalk amongst phytohormones from planta and PGPR under biotic *and abiotic stresses*. *Plant Growth Regulation* [online]. 2020, 189-203 [cit. 2021-11-17]. Dostupné z: doi:10.1007/s10725-020-00571-x
- [14] RISHI, Kundan, Pan GARIMA, Jadon NITESH a Kumar PAVAN. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Mechanism and Current Prospective. *Journal of Fertilizers & Pesticides* [online]. 2015, 9 [cit. 2021-11-17]. Dostupné z: doi:10.4172/2471-2728.100015

- [15] RAJKUMAR, Mani, Noriharu AE, Majeti NARASIMHA, Vara PRASAD a Helena FREITAS. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology [online]*. 2010, 142-149 [cit. 2021-11-23]. ISSN 0167-7799. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.12.002>.
- [16] PEILI, Shi, Xing ZHUKANG, Zhang YUXIU a Chai TUAN-YAO. Effect of heavy-metal on synthesis of siderophores by *Pseudomonas aeruginosa* ZGKD3. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science [online]*. 2017, 12-103 [cit. 2021-11-23]. Dostupné z: doi:10.1088/1742-6596/52/1/012103
- [17] RIJAVEC, Tomaž a Aleš LAPANJE. *Hydrogen Cyanide in the Rhizosphere: Not Suppressing Plant Pathogens, but Rather Regulating Availability of Phosphate*. *Frontiers in Microbiology [online]*. 2016, 1785 [cit. 2021-11-17]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2016.01785
- [18] RYBOVÁ, Jitka. Vliv olovnatých iontu (běžného polutantu) na aktivitu fotosystému II sinic (potenciálních *dekontaminačních mikroorganismů*). *Praha, 2009*. Bakalárska práca. Univerzita Karlova.
- [19] HITHA, Shaji, Chandran VINAYA a Mathew LINU. Controlled Release Fertilizers for Sustainable Agriculture. *Controlled Release Fertilizers for Sustainable Agriculture [online]*. Academic Press, 2021, s. 231-245 [cit. 2021-11-24]. ISBN 9780128195550. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128195550000133>
- [20] WANG, J., R. LI a , ZHANG. Beneficial bacteria activate nutrients and promote wheat growth under conditions of reduced fertilizer application. *BMC Microbiol [online]*. 2020, 20(38) [cit. 2022-01-26]. Dostupné z: doi:10.1186/s12866-020-1708-z
- [21] ZHENG, Wenjuan, Saiqi ZENG, Harsh BAIS, Jacob LAMANNA, Daniel HUSSEY, David JACOBSON a Yan JIN. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Reduce Evaporation and Increase Soil Water Retention. *Water Resources Research [online]*. 2018, 3673-3687 [cit. 2021-11-27]. Dostupné z: doi:10.1029/2018WR022656

- [22] PODILE, A.R. a G.K. KISHORE. Plant growth-promoting rhizobacteria. Gnanamanickam S.S. (eds) *Plant-Associated Bacteria* [online]. 2007, 2007(1), 195-230 [cit. 2021-11-25]. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4020-4538-7_6
- [23] D. NOAR, Jesse a Jose BRUNO-BÁRCENA. *Azotobacter vinelandii*: the source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiology (Reading)* [online]. 2018, 421-436 [cit. 2021-11-27]. Dostupné z: doi:10.1099/mic.0.000643
- [24] SMITH, Moyra. *Gene Environment Interactions* [online]. 1st. *University of California, United States: Academic Press*, 2020 [cit. 2021-11-27]. ISBN 9780128196137. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819613-7.00007-4>.
- [25] DOMMELEN, Anne a Jos VANDERLEYDEN. *Associative Nitrogen Fixation. Biology of the Nitrogen Cycle* [online]. 1. Edinburgh: Elsevier, 2007, s. 179-192 [cit. 2021-11-27]. ISBN 9780444528575. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444528575500138>
- [26] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana. Bakterie mezofilní. In: *Encyklopedie hydrobiologie - výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2021-11-27]. Dostupné z: https://e-learning.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=B004
- [27] NĚMEC, Miroslav, Ludmila KOTOUČKOVÁ a Zdena PÁČOVÁ. *Azotobacter vinelandii*. In: *MINIATLAS MIKROORGANISMŮ* [online]. Praha: VŠCHT Praha [cit. 2021-11-27]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/azoto.htm>
- [28] MCGLYNN, Shawn, Eric BOYD, John PETERS a Victoria ORPHAN. Classifying the metal dependence of uncharacterized nitrogenases. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2013 [cit. 2022-04-05]. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2012.00419
- [29] PALANCHÉ, Tania, Sylvie BLANC, Christophe HENNARD, Mohamed ABDALLAH a Anne-Marie ALBRECHT-GARY. Bacterial iron transport: coordination properties of azotobactin, the highly fluorescent siderophore of *Azotobacter vinelandii*. *Inorganic Chemistry* [online]. 2004, 1137–1152 [cit. 2021-11-27]. Dostupné z: doi:10.1021/ic034862n

- [30] CASTILLO, Tania, Andrés GARCÍA, Claudio PADILLA-CÓRDOVA, Alvaro DÍAZ-BARRERA a Carlos PEÑA. Respiration in *Azotobacter vinelandii* and its relationship with the synthesis of biopolymers. *Electronic Journal of Biotechnology* [online]. 2020, 36-45 [cit. 2021-11-27]. ISSN 0717-3458. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejbt.2020.08.001.
- [31] PACHECO-LEYVA, Ivette, Felipe GUEVARA PEZOA a Alvaro DÍAZ-BARRERA. Alginate Biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*: Overview of Molecular Mechanisms in Connection with the Oxygen Availability. *International Journal of Polymer Science* [online]. 2016, 12 [cit. 2022-04-06]. Dostupné z: doi:10.1155/2016/2062360
- [32] SURENDRAN, Arthy, Manoj LAKSHMANAN, Chee YEE, Sulaiman AZLINAH MOHD, Thuoc DOAN VAN a Sudesh KUMAR. Can Polyhydroxyalkanoates Be Produced Efficiently From Waste Plant and Animal Oils?. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. [cit. 2022-04-06]. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2020.00169
- [33] *Definitions of biotechnology* [online]. The University of Waikato: Curious Minds, 2018 [cit. 2021-12-01]. Dostupné z: <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/1202-definitions-of-biotechnology>
- [34] *Top 10 Uses of Microbes in Biotechnology* [online]. 2020 [cit. 2022-04-08]. Dostupné z: <https://bitesizebio.com/48446/microbes-biotechnology/>
- [35] Penicillin Production through Deep-tank Fermentation [online]. 2008 [cit. 2022-04-08]. Dostupné z: <https://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/penicillin.html#:~:text=While%20the%20company%20used%20fermentation,successful%20mass%20production%20of%20penicillin.>
- [36] NUSSINOVITCH, Amos. Alginates. *Hydrocolloid Applications* [online]. 1st edition. Boston: Springer Science, 1997, s. 19-39 [cit. 2021-12-01]. ISBN 978-1-4615-6385-3. Dostupné z: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-6385-3_2#citeas

- [37] Biology Online [online]. Biology Online Editors, 2021 [cit. 2021-12-01].
Dostupné z: <https://www.biologyonline.com/dictionary/algae>
- [38] SZEKALSKA, Marta, Agata PUCHOWSKA, Emilia SZYMAŃSKA, Patrycja CIOSEK a Katarzyna WINNICKA. Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical *Applications*. In: *Hindawi [online]*. 2016 [cit. 2021-12-02]. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/ijps/2016/7697031/>
- [39] STRAATMANN, A., T. WINDHUES a W. BORCHARD. Effects of acetylation on thermodynamic properties of seaweed alginate in sodium chloride solutions. *Progress in Colloid and Polymer Science* [online]. 2004, (127), 26-30 [cit. 2021-12-02]. Dostupné z: doi:10.1007/b94247
- [40] The surprising uses of alginate [online]. 2018 [cit. 2022-04-08]. Dostupné z: <https://www.artmolds.com/alginate-uses>
- [41] JINCHEN, Sun a Tan HUAPING. Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials* [online]. 2013, 6(4), 1285–1309 [cit. 2022-04-08]. Dostupné z: doi:10.3390/ma6041285
- [42] QIN, Yimin, Guofang ZHANG a Haihua CHEN. The Applications of Alginate in Functional Food Products. *Journal of Nutrition & Food Sciences* [online]. 2020, (3), 1-9 [cit. 2021-12-05]. Dostupné z: <https://www.henrypublishinggroups.com/wp-content/uploads/2020/05/the-applications-of-alginate-in-functional-food-products.pdf>
- [43] ABASALIZADEH, Farhad, Sevil MOGHADDAM, Effat ALIZADEH, Elahe AKBARI, Elmira KASHANI, Seyyed FAZLJOU, Mohammadali TORBATI a Abolfazl AKBARZADEH. Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3D bioprinting. *Journal of Biological Engineering* [online]. 2020, 14(8) [cit. 2021-12-05]. Dostupné z: doi:10.1186/s13036-020-0227-7

- [44] VASLIAUSKAS, Remigijus. Sodium Alginate and applications: a *review*. In: Elveflow [online]. Rue de Charonne Paris: Elvesys SAS, 2020 [cit. 2021-12-05]. Dostupné z: <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/droplet-digital-microfluidics/sodium-alginate-and-applications-a-review/>
- [45] CLEMENTI, F. Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Crit Rev Biotechnol.* [online]. 1997, 17(4), 61-327 [cit. 2022-04-08]. Dostupné z: doi:10.3109/07388559709146618
- [46] PEREIRA, Leonel a João COTAS. Alginates - Recent Uses of This Natural Polymer [online]. 1st. University of Coimbra, *Portugal: Intechopen, 2020* [cit. 2021-12-05]. ISBN 978-1-83968-558-3. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/chapters/68305>
- [47] YOAV, Bashan, Juan HERNANDEZ, Luis LEYVA a Macario BACILIO. Alginate microbeads as inoculant carrier for plant growth-promoting bacteria. *Biology and Fertility of Soils* [online]. 2002, 35, 359-368 [cit. 2021-12-05]. Dostupné z: doi:10.1007/s00374-002-0481-5
- [48] GWYNNE, Jessica. Polyhydroxybutyrate. In: *Chemistry world* [online]. Royal Society of Chemistry, 2011 [cit. 2021-12-06]. Dostupné z: <https://www.chemistryworld.com/podcasts/polyhydroxybutyrate/3005910.article>
- [49] RAZA, *Zulfiqar*, Sharjeel ABID a Ibrahim BANAT. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. 2018, (126), 45-56 [cit. 2021-12-06]. ISSN 0964-8305. Dostupné z: doi:10.1016/j.ibiod.2017.10.001.
- [50] *Polyhydroxyalkanoates - PHA* [online]. *Dormagen* [cit. 2021-12-06]. Dostupné z: <https://nsb-polymers.de/en/pha-polyhydroxyalkanoate-2/>
- [51] Everything You Need to Know About PHA [online]. 2021 [cit. 2022-04-08]. Dostupné z: <https://www.creativemechanisms.com/blog/everything-you-need-to-know-about-pha-polyhydroxyalkanoates>

- [52] RAY, Subhasree a Vipin KALIA. Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Indian Journal of Microbiology [online]*. 2017, 57(3), 261–269 [cit. 2021-12-06]. Dostupné z: doi:10.1007/s12088-017-0651-7
- [53] POLTRONIERI, P. a P. KUMAR. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) in Industrial Applications. *Handbook of Ecomaterials [online]*. 2019, 2843-2872 [cit. 2021-12-06]. **Dostupné z:** doi:10.1007/978-3-319-68255-6_70
- [54] FERNANDES, Miguel, Andreia SALVADOR, Madalena ALVES a *António VICENTE*. Factors affecting polyhydroxyalkanoates biodegradation in soil. *Polymer Degradation and Stability [online]*. 2020, 182 [cit. 2021-12-06]. ISSN 0141-3910,. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2020.109408.
- [55] WANG, Wenda, Ravin NARAIN a Hongbo ZENG. *Polymer Science and Nanotechnology [online]*. Elsevier, 2020 [cit. 2021-12-09]. ISBN 9780128168066. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128168066000108>
- [56] VEJAN, Pravin, Tumirah *KHADIRAN*, Rosazlin ABDULLAH, Salmah ISMAIL a Dadrasnia AREZOO. Encapsulation of plant growth promoting Rhizobacteria—prospects and potential in agricultural sector: a review. *Journal of Plant Nutrition [online]*. 2019, (42) [cit. 2021-12-10]. ISSN 0190-4167. Dostupné z: doi:10.1080/01904167.2019.1659330
- [57] Ionic crosslinking. In: *Labster Theory [online]*. 2018 [cit. 2021-12-10]. Dostupné z: <https://theory.labster.com/ionic-crosslinking/>
- [58] ZHANG, Borui, M. ISURU, Jun KE, *Jessica L. SPARKS*, C. HARTLEY a Dominik KONKOLEWICZ. Chemically fueled covalent crosslinking of polymer materials. *Chemical Communications [online]*. 2019, 55(14), 2086-2089 [cit. 2022-04-08]. Dostupné z: doi:10.1039/C8CC09823A
- [59] OKAY, Oguz. General Properties of Hydrogels. *Hydrogel Sensors and Actuators [online]*. 1970, (6), 1-14 [cit. 2021-12-10]. ISSN 978-3-540-75644-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-540-75645-3_1

- [60] ZHOURIAN, Mehr a K. KABIRI. SUPERABSORBENT POLYMER MATERIALS: A REVIEW. *IRANIAN POLYMER JOURNAL* [online]. 2008, 17(6), 447-451 [cit. 2021-12-10]. Dostupné z: <https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=109597>.
- [61] ENAS, M. Ahmed. Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research* [online]. 2015, (6), 105-121 [cit. 2021-12-10]. ISSN 2090-1232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jare.2013.07.006
- [62] TOM, Justin. UV-Vis Spectroscopy: Principle, Strengths and Limitations and Applications. In: *Technology Networks* [online]. 2022 [cit. 2022-04-25]. Dostupné z: <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/uv-vis-spectroscopy-principle-strengths-and-limitations-and-applications-349865>
- [63] SKOOG, Douglas, *Donald WEST*, F HOLLER a Stanley CROUCH. Analytické chemie. 9. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019. ISBN 978-80-7592-043-0.
- [64] ZÁRUBA, Kamil. Analytická chemie [online]. 1st. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016 [cit. 2022-04-25]. ISBN 978-80-7080-951-8. Dostupné z: https://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/publikace?uid=uid_isbn-978-80-7080-951-8
- [65] KUSSICK, Steven J. Flow Cytometric Principles in Hematopathology. *Hematopathology* [online]. Elsevier, 2018, 686-711 [cit. 2022-05-03]. ISSN 9780323479134. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-47913-4.00023-9.
- [66] MCKINNON, Katherine M. *Flow Cytometry: An Overview*. Current protocols in immunology [online]. 2018, (120) [cit. 2022-05-03]. Dostupné z: doi:10.1002/cpim.40
- [67] Nanocollect: How Does Flow Cytometry Work? [online]. San Diego, California, 2020 [cit. 2022-05-03]. Dostupné z: <https://nanocollect.com/blog/how-does-flow-cytometry-work/>

- [68] ADAN, Aysun, Günel ALIZADA, Yağmur KIRAZ, Yusuf BARAN a Ayten NALBANT. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology* [online]. 2017, **37**(2), 163-176 [cit. 2022-05-03]. Dostupné z: doi:10.3109/07388551.2015.1128876
- [69] Technology networks Cell Science: What Is Flow Cytometry? [online]. 2020 [cit. 2022-05-03]. Dostupné z: <https://www.technologynetworks.com/cell-science/articles/what-is-flow-cytometry-343977>
- [70] TARIO, , a P.K. WALLACE. Reagents and Cell Staining for Immunophenotyping by Flow Cytometry. *Pathobiology of Human Disease* [online]. Academic Press, 2014, 3678-3701 [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-386456-7.07104-5.
- [71] Understanding Fluorochromes for Flow *Cytometry*. In: FluoroFinder [online]. 2019 [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: <https://fluorofinder.com/newsletter-understanding-fluorochromes-for-flow-cytometry/>
- [72] *Calcein AM*. In: PubChem [online]. [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Calcein-AM>
- [73] ThermoFisher Scientific [online]. [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C1430>
- [74] FDA [Fluorescein diacetate] *CAS 596-09-8*. In: AAT Bioquest [online]. [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: <https://www.aatbio.com/products/fda-fluorescein-diacetate-cas-596-09-8>
- [75] Propidium iodide. In: PubChem [online]. [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propidium-iodide>

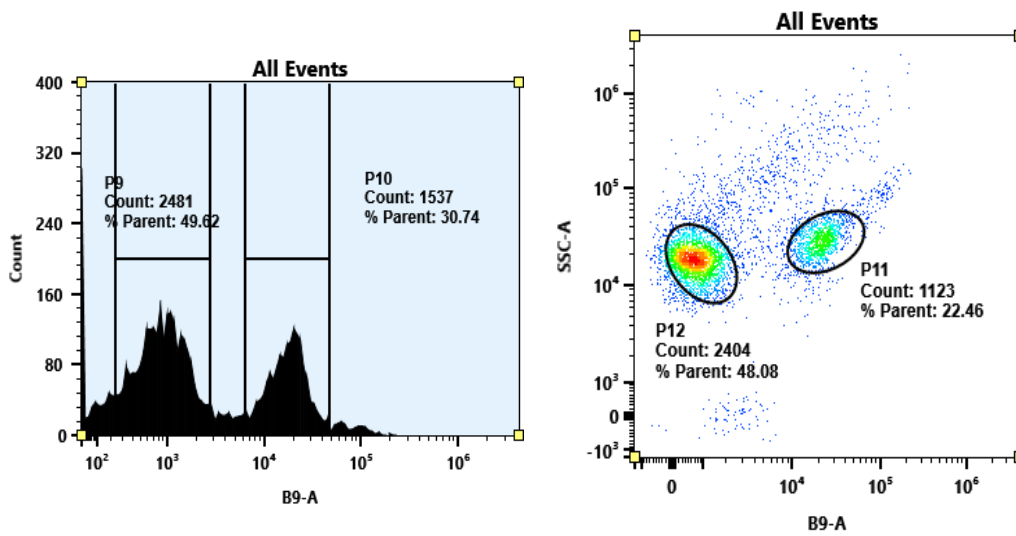
- [76] HEZEL, M, F EBRAHIMI, M KOCH a F DEHGHANI. Propidium iodide staining: a new application in fluorescence microscopy for analysis of cytoarchitecture in adult and developing rodent brain. *Micron [online]*. 2012, 43(10), 1031-1038 [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: doi:10.1016/j.micron.2012.04.006.
- [77] BARACCA, Alessandra, Gianluca SGARBI, Giancarlo SOLAINI a Giorgio LENAZ. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics [online]*. 2003, 137-146 [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: doi:10.1016/S0005-2728(03)00110-5.
- [78] KOPECKÁ, Jana a Gabriela ROTKOVÁ. *Nepřímé stanovení počtu životaschopných bakterií plotnovou metodou*. Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2017 [cit. 2022-05-02]. ISBN 978-80-210-8788-0. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/index.html
- [79] ČECHOVÁ, Leona a Magda JANALÍKOVÁ. *Obecná mikrobiologie*. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007. ISBN 978-80-7318-516-9.
- [80] KOPECKÁ, Jana a Gabriela ROTKOVÁ. *Metody sterilní práce, očkování a uchovávání mikroorganismů*. Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2017 [cit. 2022-05-03]. ISBN 978-80-210-8788-0. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/steril_prace_ockovani_uchovavani.html
- [81] HURNI, Hans. Land degradation, famine, and land resource scenarios in Ethiopia. *World soil erosion and conservatio [online]*. 1993, 27-61 [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/279605109_Land_degradation_famine_and_land_resource_scenarios_in_Ethiopia
- [82] OU, F, C MCGOVERIN, S SWIFT a F VANHOLSBECK. Absolute bacterial cell enumeration using flow cytometry. *Appl Microbiol. [online]*. 2017, 123(2), 464-477 [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: doi:10.1111/jam.13508

- [83] HONGMIAO, Pan, Zhang *YONGBIN*, He GUI-XIN, Katagori NAMRATA a Chen HUIZHONG. A comparison of conventional methods for the quantification of bacterial cells after exposure to metal oxide nanoparticles. *BMC Microbiol.* [online]. 2014, (14) [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: doi:10.1186/s12866-014-0222-6
- [84] KAPRELYANTS, A.S. a D.B. KELL. Rapid assessment of bacterial viability and vitality by rhodamine 123 and flow cytometry. *Journal of Applied Bacteriology* [online]. 1992, 410-422 [cit. 2022-04-30]. Dostupné z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.654.7527&rep=rep1&type=pdf>
- [85] *Azotobacter vinelandii*. In: *Miniatlas mikroorganismu* [online]. [cit. 2022-05-03]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/azoto.htm>

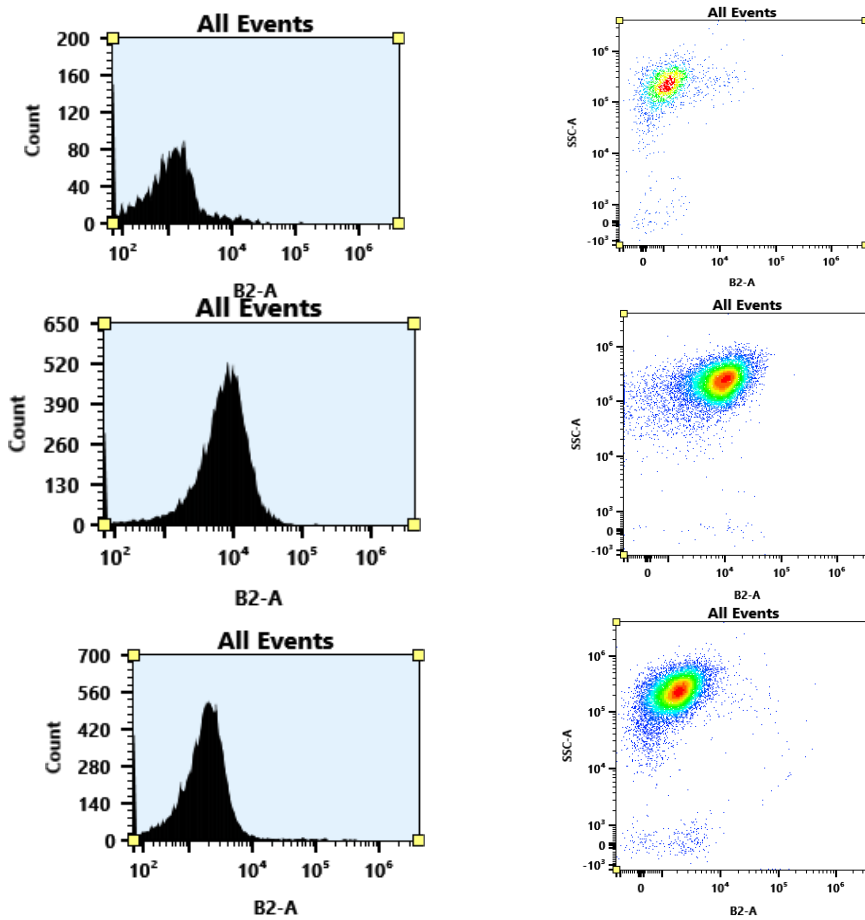
ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK

- CFU – colony forming units – bunky formujúce kolónie
- CWW – Cell dry weight – suchá hmotnosť buniek
- Da – Dalton
- G – Kyselina α -L-gulurónová
- G*- Komplexný modul
- GC – Plynová chromatografia
- Hz – Hertz
- M – Kyselina β -D-mannurónová
- M_w – Hmotnostne stredná molekulová hmotnosť
- MALS – Multiangle light scattering – viacuhlový rozptyl svetla
- pH – Záporný dekadický logaritmus H^+ iónov
- PHA – Polyhydroxyalkanoát
- PHB Polyhydroxybutyrát
- RPM – rounds per minute – počet otáčok za minútu
- UV/VIS – Spektrofotometria v ultrafialovej a viditeľnej oblasti

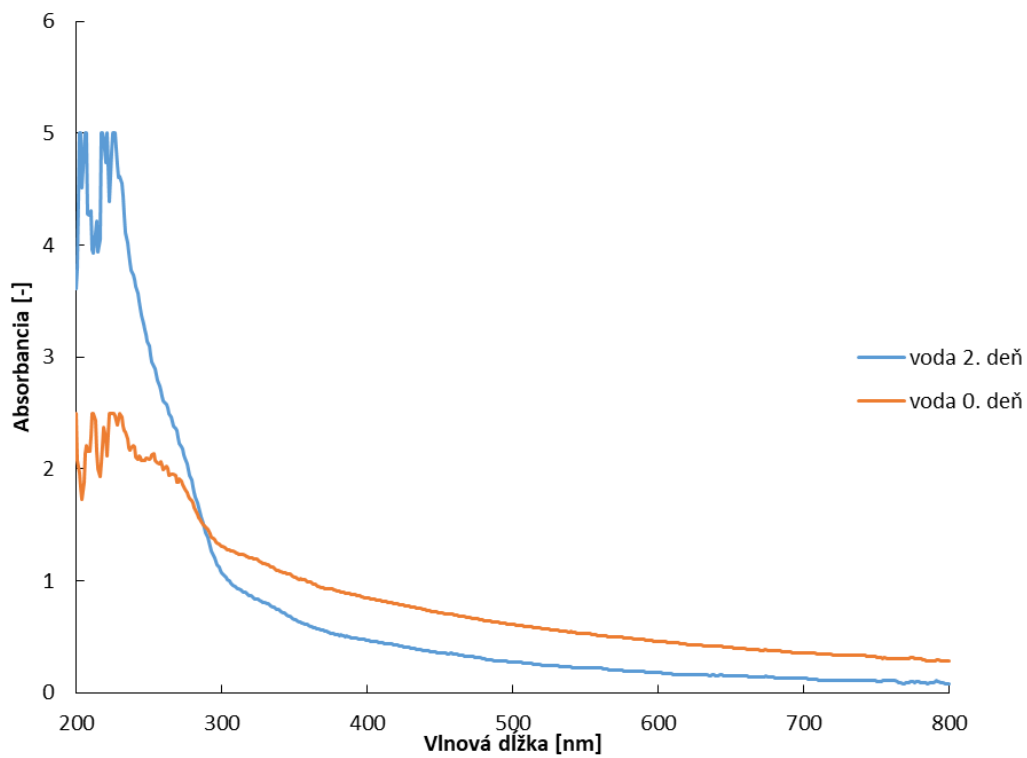
PRÍLOHY



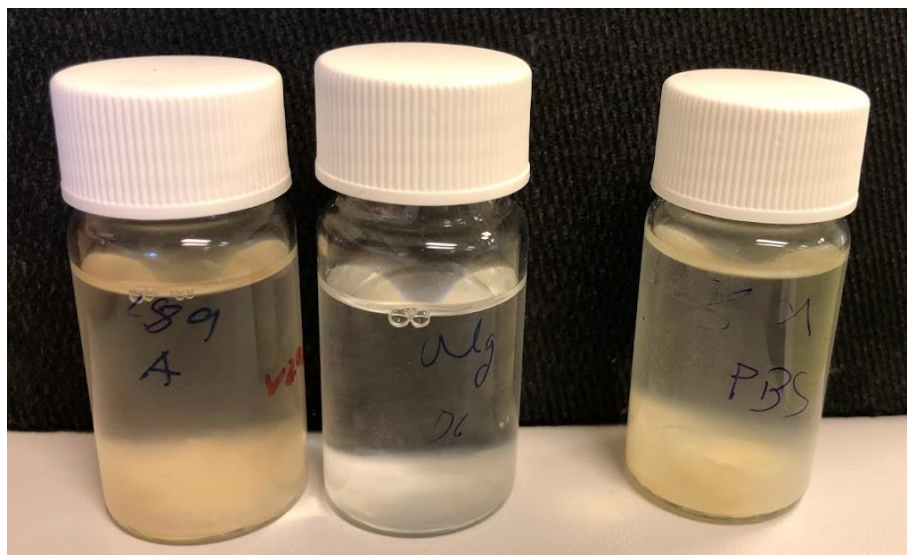
Obrázok 28: Histogram a cytogram kultury v pomere 1:1 (živé:mŕtve) nafarbenej propidium jodidom



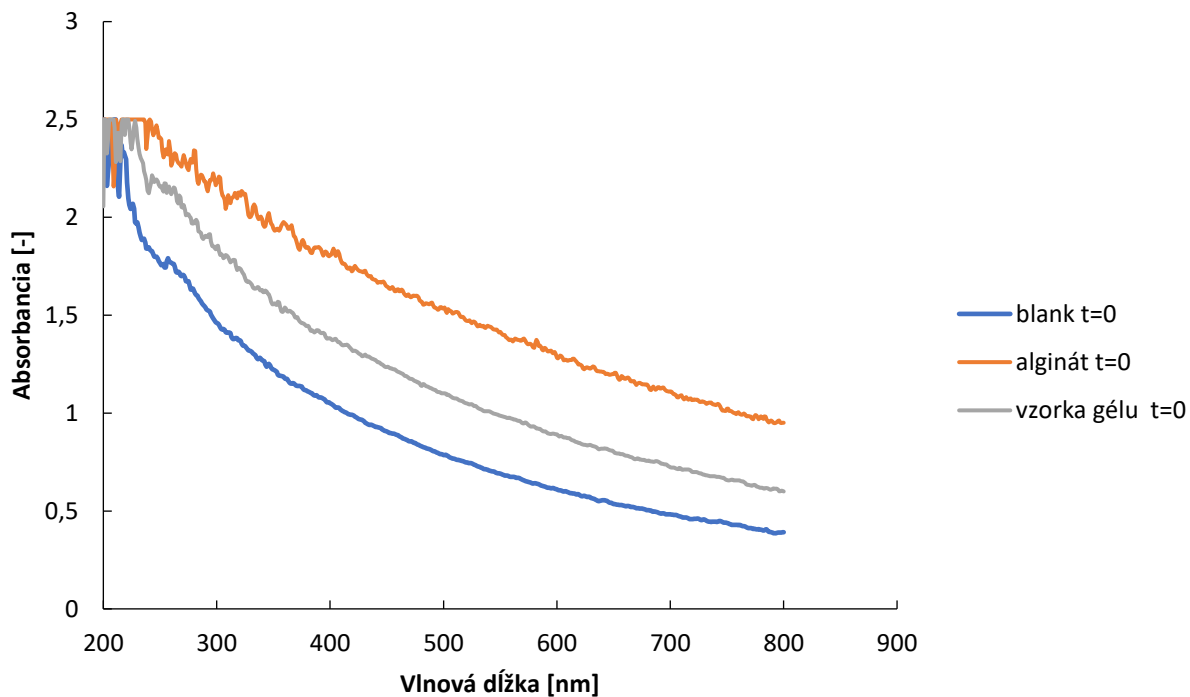
Obrázok 29: Zafarbenie pomocou Calceinu – horný rad živé, uprostred mŕtve a dolný rad pomer 1:1 (živé:mŕtve)



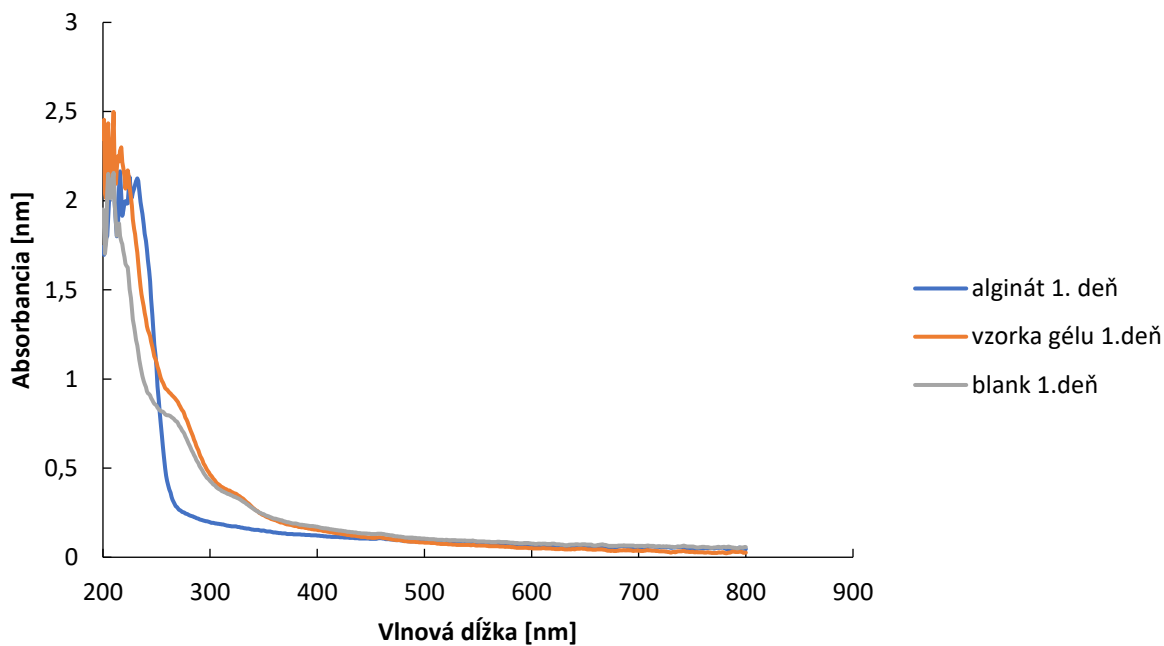
Obrázok 30: Uvoľňovanie vo vode bez pridania alginázy



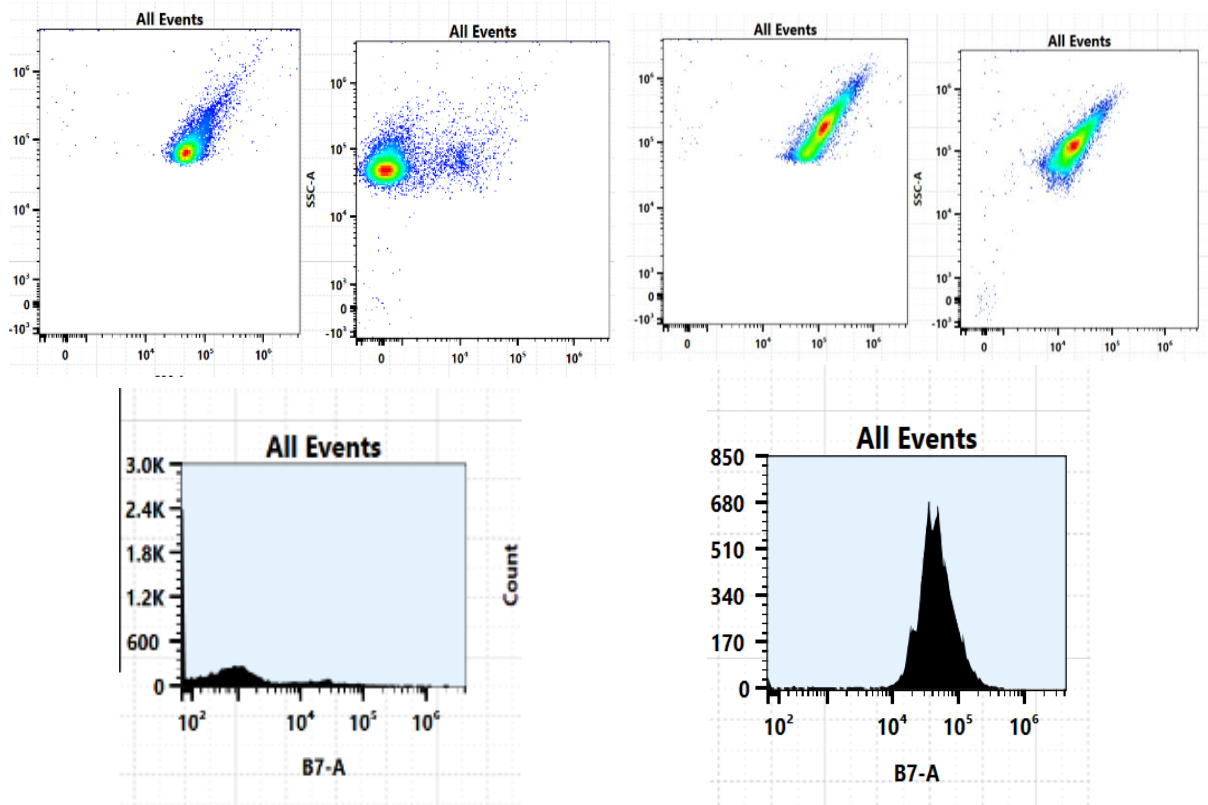
Obrázok 31: Porovnanie nami pripraveného gélu, alginátu a blanku bez pridania alginázy (zľava nami pripravený gél, alginát, blank)



Obrázok 32: Vplyv alginázy na alginát a nami vytvorená gél, v čase 0



Obrázok 33: Vplyv alginázy na alginát a nami vytvorený gél v druhom dni



Obrázok 34: Naľavo živé bunky, napravo mŕtve – *Cupriavidus necator* H16 - zafarbené propidium jodidom