

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Studijní program: **Zemědělství (B4131)**

Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Detekce viability *Pseudomonas syringae* pv. *oryzae*
pomocí průtokové cytometrie**

Autor: Johana Kolářová

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

Konzultant práce: Ing. Tereza Kávová

České Budějovice

2018

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že předkládanou bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 19.4.2018

.....

Johana Kolářová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych vřele poděkovala svému vedoucímu práce panu Ing. Pavlu Beranovi, PhD. za odborné vedení, cenné rady a pomoc při vypracování mé bakalářské práce. Dále patří obrovský dík paní Ing. Tereze Kávové za odborné vedení v laboratoři, pomoc při zpracování získaných dat a celkově za ochotu, trpělivost a podporu, kterou mi nepřetržitě poskytovala a stále poskytuje. Za obrovskou pomoc při zpracování výsledků patří rovněž velký dík panu Mgr. Tomáši Tonkovi, PhD. a v neposlední řadě děkuji panu prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. za pomoc a rady, které mi poskytl během příprav a vypracování bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat své blízké rodině a všem svým nejbližším za trpělivost, podporu a pomoc, kterými mě zahrnovali během celé doby studia.

Děkuji.

KOLÁŘOVÁ J. (2018) Detekce viability *Pseudomonas syringae* pv. *oryzae* pomocí průtokové cytometrie., [Bakalářská práce] – 46 s., Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějvice, Česká republika.

Abstrakt

V rámci této práce byla pomocí průtokové cytometrie (*flow cytometry*) analyzována viabilita *Pseudomonas syringae* pv. *oryzae*. Podstatou této práce bylo ošetření bakteriálních kultur určitými vysokými teplotami v daných časových řadách. Ošetřené kultury byly barveny interkalačním barvivem propidium jodid, které slouží k flowcytometrické analýze permeability buněčných membrán a kvality a kvantity DNA. Statisticky průkazným vyhodnocením získaných dat byla potvrzena tendence poklesu zastoupení přeživších buněk v populaci v závislosti na vzrůstajícím čase ošetření. Nejprůkaznějších výsledků bylo dosaženo při ošetření teplotou 90 °C, ke které je bakterie *P. syringae* pv. *oryzae* velmi citlivá. Bylo prokázáno, že průtoková cytometrie má dostatečnou výpovědní hodnotu a je jednoduchou, rychlou a efektivní metodou pro detekci viability *P. syringae* pv. *oryzae*.

Klíčová slova: Průtoková cytometrie, ošetření vysokou teplotou, detekce viability, propidium jodid, *Pseudomonas syringae* pv. *oryzae*

KOLÁŘOVÁ J. (2018) Detection of a viability *Pseudomonas syringae* pv. *oryzae* by flow cytometry, [Bc. Thesis, in Czech] – 46 p., Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějvice, The Czech Republic.

Abstract

The viability of *Pseudomonas syringae* pv *oryzae* was analyzed by flow cytometry in this thesis. The treatment of bacterial cultures with specific high temperatures in time series was the basis of this thesis. Treated cultures were dyed intercalating dye propidium iodide. This dye serves to flowcytometric analysis of cell membranes permeability and DNA quality and quantity. Statistically evaluation of the data obtained acknowledged the tendency of decrease of number of surviving cells in the population, depending on the growing period of treatment. The most prominent results were obtained at 90 ° C. Probably *P. syringae* pv. *oryzae* is very sensitive to this temperature. These results have shown that flow cytometry is a sufficiently prominent, simple, rapid and effective method for detection the viability of *P. syringae* pv. *oryzae*.

Key words: Flow cytometry, high temperature treatment, detection of viability, propidium iodide, *Pseudomonas syrinage* pv. *oryzae*

Obsah

1. Úvod.....	5
2. Cíle bakalářské práce	7
3. Literární přehled.....	8
3.1 Rod <i>Pseudomonas</i>	8
3.1.1 Taxonomické zařazení	8
3.1.2 Obecná charakteristika	9
3.1.3 Fluorescentní druhy.....	10
3.1.4 Ne fluorescentní druhy	10
3.1.5 Využití zástupců rodu <i>Pseudomonas</i>	11
3.2 <i>Pseudomonas syringae</i>	11
3.2.1 Nukleární aktivita bakterií <i>Pseudomonas syringae</i>	12
3.2.2 Využití zástupců <i>Pseudomonas syringae</i>	13
3.2.3 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>oryzae</i>	13
3.3 Průtoková cytometrie	14
3.3.1 Historie cytometrie.....	16
3.3.2 Princip průtokové cytometrie	18
3.3.3 Komponenty průtokového cytometru	19
3.3.4 Fluorochromy používané v průtokové cytometrii.....	21
3.3.5 Detekce, zpracování signálu a interpretace dat	23
3.3.6 Aplikace průtokové cytometrie v mikrobiologii	25
4. Materiál a metodika.....	27
4.1 Použitý kmen bakterie	27
4.2 Kultivace vzorků	27
4.3 Ošetření vzorků vysokou teplotou	28
4.4 Příprava vzorků pro vlastní analýzu.....	30
4.5 Obsluha průtokového cytometru Apogee A60 Universal a vlastní analýza ...	31
5. Výsledky	32
6. Diskuze.....	40
7. Závěr	42
8. Seznam použitých literárních zdrojů.....	43
9. Seznam použitých internetových zdrojů	46

1. Úvod

Průtoková cytometrie je metoda, která slouží k analýze sledovaných optických vlastností buněk, buněčných organel či komponent v buněčné populaci. Tato metoda má široké uplatnění ve výzkumných i provozních či klinických laboratořích. Na vědeckých pracovištích je díky vysoké rychlosti analýz a tedy schopnosti zpracování velkého objemu vzorků využívána např. k rozsáhlým populačním studiím, k třídění buněk určitých vlastností nebo k detekci dosud neznámých organismů. V biotechnologické praxi je průtoková cytometrie využívána především jako prostředek kontroly kvality výroby. Díky této metodě mohou být v jednotlivých výrobních krocích detekovány nežádoucí mikroorganismy a sledován jejich počet (kontrola dodržení bezpečnostních limitů). Právě tato aplikace může být uskutečňována analýzou permeability buněčných membrán a kvality a množství DNA v buňce pomocí fluorescenčních barviv, která se váží s neporušenými molekulami nukleových kyselin. Využitím této metody pro detekci viability *Pseudomonas syringae* pv. *oryzae* se budu zabývat ve své bakalářské práci.

2. Cíle bakalářské práce

1. Optimalizace flowcytometrické analýzy životaschopnosti bakteriálních buněk pomocí interkalačního barviva propidium jodid pro zrychlení a zefektivnění procesu detekce
2. Hodnocení závislosti doby a teploty ošetřování bakteriálních buněk a procentuálního zastoupení životaschopných buněk v buněčné populaci

3. Literární přehled

3.1 Rod *Pseudomonas*

3.1.1 Taxonomické zařazení

Doména:	<i>Bacteria</i>
Oddělení:	<i>Gracilicutes</i>
Třída:	<i>Proteobacteria</i>
Podtřída:	<i>Gamma Proteobacteria</i>
Čeleď:	<i>Pseudomonadaceae</i>

Roku 1894 byl rod *Pseudomonas* popsán na základě makro a mikroskopických vlastností. První molekulární techniky určení taxonomie rodu *Pseudomonas* byly DNA + DNA hybridizace a stanovení obsahu G + C (1974). Později (1984) byly pseudomonády na základě analýzy RNA-DNA rozděleny do 5 rRNA podskupin. Nejradikálnější taxonomické změny v rámci tohoto rodu nastaly koncem 20. století, kdy pseudomonád byla homologie 16S rRNA použita jako hlavní faktor klasifikace. Práce Anzai a kol. (2000), která byla založena na osekvenování genu 16S rRNA u 128 druhů rodu *Pseudomonas*, ukázala, že ne všechny druhy patří do rodu *Pseudomonas sensu stricto* (rRNA podskupina I). Dříve se do tohoto rodu řadily i nikam nezařaditelné gramnegativní tyčinky. Tyto druhy, které nesplňovaly vlastnosti pravých pseudomonád, byly přerozděleny do podtříd Alfa, Beta a Gamma Proteobacteria, např. dříve do rodu *Pseudomonas* patřily některé nynější druhy rodu *Bulkholderia* nebo *Ralstonia* (Peix a kol., 2018).

Rod *Pseudomonas* patří do skupiny pseudomonád, kam se také řadí rody *Azobacter* a *Azomonas*. Tyto bakterie fixují vzdušný dusík. Nejsou však symbionty vyšších rostlin, jako např. *Agrobacterium* či *Rhizobium* (Bauman, 2006). Dále se do pseudomonád řadí rod *Zymomonas*. Zástupci rodu *Zymomonas* jsou fermentativní (rozkladem jednoduchých sacharidů syntetizují ethanol). V kuchyni Střední a Jižní Ameriky, Afriky a Asie nahrazují tyto bakterie roli *Saccharomyces cerevisiae* (produkce kvasnic v Evropě a Severní Americe). Jako zdroj jednoduchých cukrů pro rod *Zymomonas* se využívají mízy rostlin. Využití tohoto rodu je však rozsáhlejší.

Využívá se při výrobě mexického nápoje vyráběného z agáve pulque, při alkoholové fermentaci palmové mízy nebo šťáv cukrové třtiny. Rod *Zymomonas* se také výrazně podílí na znehodnocování džusů, ciderů nebo piva (Michael a kol., 2005).

3.1.2 Obecná charakteristika

Rod *Pseudomonas* byl popsán roku 1894 botanikem Waltrem E. Migulou. Jedná se o velmi početnou, rychle se rozrůstající (od roku 2009 bylo popsáno 90 nových druhů) a heterogenní skupinu organismů, kterou je možno fenotypově rozlišit např. na základě využívání různých zdrojů uhlíku. Z mikrobiologického hlediska není podrobně prozkoumáno velké množství různých prostředí. Z tohoto důvodu se v následujících letech předpokládá objevení nových druhů rodu *Pseudomonas* (Peix a kol., 2018).

Bakterie jsou striktně aerobní, chemoorganotrofní, gramnegativní, nesporulující tyčinky s jedním, nebo více polárně umístěnými bičíky (Kúdela a kol., 2002). U tohoto rodu může probíhat transdukce (přenos genetického materiálu mezi bakteriálními buňkami pomocí virových částic) (Michael a kol., 2005). Zástupci rodu *Pseudomonas* jsou významnými saprofyty, parazity a dekompozitory. Většina druhů je běžnými obyvateli půdy, vod, rozkládajících se organických materiálů, ale také se vyskytují v nemocnicích, na toaletách, zvlhčovačích vzduchu, respiračních a dialyzačních přístrojích apod. Některé jsou patogeny živočichů a člověka, u kterého mohou způsobovat např. záněty močových nebo dýchacích cest a záněty vnějšího ucha (*Pseudomonas aeruginosa*) (Prescott a kol., 2005). Další jsou patogeny rostlin (*Pseudomonas syringae*), nebo hub (*Pseudomonas fluorescens*). Většina fytopatogenů tvoří homologickou populaci vázanou přímo na rostlinného hostitele. Do rodu *Pseudomonas* se řadí některé neparazitické škodlivé rhizobakterie, ale i rhizobakterie pro rostlinu prospěšné (*Pseudomonas aureofaciens*). *Pseudomonas* se díky své schopnosti růst a rozkládat bílkoviny i při 4 °C výrazně podílí na kažení skladovaného (nebo nevhodně skladovaného) masa, vajec, mléčných výrobků, ovoce a zeleniny (Kúdela a kol., 2002).

Pseudomonády snadno získávají rezistenci k novým látkám. Nově nabytá multirezistence k množství antimikrobiálních látek je velkým problémem především

ve zdravotnictví (Bauman, 2006). Některé konjugativní plazmidy (konjugativní R plazmid nese informace o rezistenci) mají široký okruh příjemců, tj. jsou přenosnými do velké škály ostatních gramnegativních bakterií a tímto mechanismem se rezistence rychleji rozvíjí (Michael a kol., 2005). Všechny tyto vlastnosti (široké rozšíření, multirezistence a široký hostitelský okruh) jsou umožněny díky nízkým nutričním požadavkům a vysoké genetické a metabolické přizpůsobivosti pseudomonád (Moore a kol., 2006).

Na běžném kultivačním médiu obvykle tvoří zástupci rodu *Pseudomonas* šedobílé, průhledné kolonie. Jestliže jsou bakterie kultivovány na médiu chudém na železo, lze jednotlivé druhy rozdělit na fluorescentní a nefluorescentní podle toho, zda produkují žlutozelený difuzní pigment fluorescein (Kůdela a kol., 2002).

3.1.3 Fluorescentní druhy

Mezi fluorescentní druhy se řadí značný počet hospodářsky významných fytopatogenů. Jedním z nejvýznamnějších je *Pseudomonas syringae*, v rámci kterého je rozlišeno více než 50 patovarů, které lze rozčlenit do 9 genomových skupin (González a kol., 2000). Tento druh je většinou příčinou vzniku skvrnitostí nadzemních orgánů (*P. syringae* pv. *syringae*, pv. *tomato*, pv. *persicae* aj.) a korových nekróz (*P. syringae* pv. *persicae*, pv. *morsprunorum* aj.) (Kůdela a kol., 2002).

3.1.4 Nefluorescentní druhy

Tyto druhy jsou méně často fytopatogeny a je pro ně příznačné, že kumulují poly- β -hydroxybutyrát ve formě vnitrobuněčných inkluzí, který jim slouží jako zásobní látka. Fluorescentní druhy tuto látku ve svých buňkách nekumulují. Mezi významnější fytopatogenní nefluorescentní druh patří původce nekrózy dřeně rajčete *Pseudomonas corrugata* (Kůdela a kol., 2002).

3.1.5 Využití zástupců rodu *Pseudomonas*

Zástupci rodu *Pseudomonas* jsou ekologicky i ekonomicky významnými organismy. Díky své genetické výbavě je lze využít ke studiu a aplikaci v klinické nebo potravinářské mikrobiologii, ve fytopatologii (Peix a kol., 2018) či v biotechnologickém průmyslu k produkci průmyslově významných látek (bioplasty, algináty, nebo elastomery, ale i k výrobě regulátorů růstu rostlin, antimikrobiálních látek, enzymů nebo vitamínu B₁₂) (Widmer a kol., 1998). *Pseudomonas* a *Propionibacterium* jsou nejvíce komerčně využívané bakteriální rody pro výrobu vitamínu B₁₂, protože umí využít i malé množství kobaltu (prvek nezbytný pro syntézu vitamínu B₁₂) z živného média. Produkce je tedy méně finančně náročná (Michael a kol., 2005). Rod *Pseudomonas* se využívá i k bioremediaci, především k odstraňování ropných skvrn (Widmer a kol., 1998).

Lze jej využít v biologické ochraně rostlin proti virózám (*P. fluorescens* proti *Tobacco necrosis virus*) a houbovým onemocněním (*P. fluorescens* a *P. aureofaciens* proti původci choroby pat stébel a kořenů obilnin *Gaeumannomyces graminis*) (Kůdela a kol., 2002).

3.2 *Pseudomonas syringae*

Pseudomonas syringae je významným intercelulárním fytopatogenem. Tato bakterie byla poprvé izolována roku 1899 z infikovaného šeríku obecného (*Syringa vulgaris*) M. W. Beijerinckem a následně charakterizována a pojmenována C. J. J. van Hallem. Název bakterie je tedy spojen s rostlinou, ze které byla izolována poprvé (Hirano a kol., 2000).

Ve svém metabolismu postrádá arginin-hydrolasu a je oxidasa negativní (Michael a kol., 2005). Tyto dva znaky druh *Pseudomonas syringae* odlišují od ostatních fluorescentních druhů a lze je využít v diagnostických metodách (Hirano a kol., 2000). *Pseudomonas syringae* zahrnuje více než 50 patovarů, které byly rozděleny na základě multilokusové sekvenční typizace do 5 fylogenetických skupin (Peix a kol., 2018). Toto dělení z velké části odpovídá rozdělení patovarů tohoto druhu do původních 9 genomových skupin, které byly rozlišeny hybridizací DNA (Baltrus a kol., 2011). Patovary tohoto rodu mají široké hostitelské spektrum a napadají všechny

hlavní skupiny vyšších rostlin (González a kol., 2000) (např. pšenici - *P. syringae* pv. *atrofaciens*, kukuřici - *P. syringae* pv. *coronafaciens*, rýži - *P. syringae* pv. *oryzae*, hrách - *P. syringae* pv. *pisi*, jabloň a peckoviny - *P. syringae* pv. *syringae* aj.) (Kůdela a kol., 2002). Mnoho patovarů způsobuje skvrnitosti a nekrózy ovocných stromů a výrazně snižují jejich výnos. Patovary *P. syringae* napadají jednoleté byliny více sporadicky, ale i na nich způsobují výrazné ztráty na výnosu (Mansfield a kol., 2012). Na vzniku shodných nebo podobných příznaků se může současně podílet více patovarů (na vzniku listové skvrnitosti rajčete se podílí *P. syringae* pv. *syringae* a pv. *tomato*) (Kůdela a kol., 2002). Zároveň mohou různé kmeny jednoho patovaru infikovat různé druhy rostlin (Hirano a kol., 2000), nebo se mohou vyskytovat na povrchu rostlin, u kterých chorobu vůbec nevyvolají (Baltrus a kol., 2011). Rozdílná virulence jednotlivých patovarů a kmenů je založena na rozdílných efektech III. typu (TTE) a toxinech, které se u jednotlivých zástupců velmi liší. TTE jsou do cytoplazmy hostitele přeneseny sekrečním systémem III. typu, který je kódován hrp geny (hypersensitive response and pathogenicity). Jestliže jsou TTE rozpoznány imunitním systémem hostitele, vyvolají infekci narušením a potlačením obranyschopnosti rostlin na více úrovních (Baltrus a kol., 2011).

3.2.1 Nukleační aktivita bakterií *Pseudomonas syringae*

Za nukleačně aktivní se označují organismy (především bakterie, ale i houby, lišejníky a bezobratlí), které se podílejí na nukleaci ledu při teplotách těsně pod bodem mrazu (-2 až -5 °C) a zamezují tím podchlazování vody. Nukleačně aktivní organismy obecně přežívají lépe v oblastech, kde teploty klesají pod bod mrazu (Prescott a kol., 2005; Kůdela a kol., 2002).

Je známo více druhů bakterií, u nichž se vyskytují kmeny aktivní při nukleaci ledu. Nejvýznamnějšími jsou kmeny fytopatogenního druhu *P. syringae* a saprofytického druhu *Pantoea agglomerans*. Oba tyto druhy jsou běžnou složkou epifytické mikroflóry širokého okruhu rostlin po celém světě. Ne každá buňka daného bakteriálního druhu je schopna plnit funkci ledového jádra ve stejném čase a stejném rozmezí teplot. V populaci druhu *P. syringae* vykazuje nukleační aktivitu při - 5 °C zhruba 10 % bakteriálních buněk a při - 1,5 °C jen 1 ze 100 miliónů buněk. Schopnost bakterií iniciovat tvorbu ledu (díky přítomnosti specifického oktapeptidu na vnější

buněčné membráně) jim zřejmě usnadňuje vstup do hostitelských pletiv narušením stěn rostlinných buněk. Mrazová poškození mají většinou za následek zvýšenou intenzitu chorob. Bakterie *P. syringae* se dostávají běžně do ovzduší, kde plní funkci biotických kondenzačních jader podílejících se na vzniku oblaků a atmosférických srážek (Kůdela a kol., 2002).

3.2.2 Využití zástupců *Pseudomonas syringae*

V zemědělství (především při pěstování jahod) se využívá kmen *P. syringae* ice⁻ („ice-minus“). Tento kmen nesyntetizuje protein, který zajišťuje nukleaci ledu a využívá se tedy k ochraně rostlin proti mrazovým škodám (Bauman, 2006).

Výzkum molekulární biologie *P. syringae* umožnil nové pohledy na studium mikrobiální patogenity. Patovary *phaseolicola* a *tomato* se ukázaly jako výborné modely pro studium patogenity a reakcí rostlin na infekci. Vedle studia fytopatogenity se rozvíjí výzkum patogenity bakterií, které způsobují lidská onemocnění (Mansfield a kol., 2012).

3.2.3 *Pseudomonas syringae* pv. *oryzae*

Buňky *Pseudomonas syringae* pv. *oryzae* jsou krátké, gramnegativní tyčinky s 1 až 5 polárně umístěnými bičíky. Netvoří buněčné inkluze poly- β -hydroxybutyrátu. Na běžném kultivačním médiu tvoří bílé, vypouklé, kulaté, hladké, jasně ohraničené kolonie. V laboratorních testech vykazuje *Pseudomonas syringae* pv. *oryzae* pozitivní výsledky při oxidaci glukosy, při hydrolýze kaseinu, produkci amoniaku, při tyrosinasové a ureasové aktivitě. Negativní reakce vykazuje při oxidaci glukonátu, koagulaci mléka, deaminaci fenylalaninu a využití serinu, L-laktátu, maltosy nebo dextrosy. Objevují se však rozdílné schopnosti využívání látek i mezi kmeny tohoto patovaru, např. 50 kmenů je schopno využít pro syntézu stavebních látek L-histidin, ostatní kmeny tohoto patovaru tuto schopnost nemají (Kuwata, 1985).

Pseudomonas syringae pv. *oryzae* je původcem tzv. „Bacterial halo blight of rice“. Tato choroba se vyznačuje typickými symptomy na listové čepeli, které se objevují během fáze prvních pravých listů (2. polovina července) a mizí s vyklenutím a dozráváním laty (poslední třetina srpna). Jedná se z počátku o zelené, žluté až tmavě

hnědé léze na listech, které jsou následně obklopeny zřetelným rozsáhlým žlutým halo. Tyto léze mají kruhový nebo oválný tvar a mohou se seskupovat do větších nepravidelných skvrn, které nakonec vedou k destrukci celého listu. Kromě rostlin *Oryza sativa* je tato bakterie patogenní i pro *Hordeum vulgare*, *Avena sativa* a *Phaseolus vulgaris* a mnoho dalších u kterých vyvolává obdobné symptomy. Pouze z těchto 4 zmíněných rostlin je bakterie reizolovatelná. Na hostitelských rostlinách pro *Pseudomonas syringae* pv. *oryzae* vyvolávají tytéž symptomy i *P. syringae* pv. *atropurpurea* a pv. *coronofaciens*, které ovšem nejsou patogeny pro *Oryza sativa*. Na základě této charakteristiky byl roku 1985 pojmenován nový patovar *P. syringae* pv. *oryzae*. Bacterial halo blight of rice se vyskytuje pouze v Japonsku, konkrétně v prefektuře (základní jednotka administrativního členění Japonska) Aomori, a nezpůsobuje významnější ztráty na výnosu (Kuwata, 1985).

3.3 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je analytická a separační metoda, která umožňuje studium chemických a fyzikálních vlastností jednotlivých buněk, buněčných organel nebo jejich částí (chromozomy, fragmenty DNA atd.), ale i částic nebuněčných (viry, viroidy apod.) v populaci. Je považována za standardní metodu analýzy částic v suspenzi (Roubalová, 2012). Tato metoda je unikátní tím, že poskytuje informace o jednotlivých částicích a ne pouze o populaci jako celku. Velké množství dat získaných jednou analýzou je nutné následně statisticky vyhodnotit (Šmarda a kol., 2005). Průtoková cytometrie kombinuje výhody klasické mikroskopie, sérologických metod a technik s fluorescenčně značenými látkami k rychlé, citlivé a specifické detekci velkého množství buněk. Tato metoda se využívá především v lékařské, veterinární a obecné mikrobiologii či v experimentální biologii (Chitarra a kol., 2002). Má mnoho uplatnění při studiu buněčného cyklu (studium obsahu DNA v jednotlivých fázích buněčného cyklu), při určování ploidie, při studiu genové exprese, (Suda, 2005) velikosti a struktury buněk (míra granulace cytoplazmy), při studiu přítomnosti určitých antigenů (Šmarda a kol., 2005) nebo při detekci a kvantifikaci specifických patogenů ve vzorku, které jsou díky vysoké citlivosti průtokové cytometrie detekovatelné i v malém množství (Chitarra a kol., 2002). Tato metoda může také sloužit jako prostředek pro výběr vhodných cytotypů pro následnou experimentální

hybridizaci či polyploidizaci (Suda, 2005), nebo k dělení buněk dle určitých vlastností, např. dělení dle stupně exprese sledovaného markeru, třídění chromozomů dle jejich rozdílného tvaru a velikosti apod. Pro tento typ analýz, tzv. cell sorting, musí být cytometr opatřen frakcionačním zařízením (FACS – Fluorescence-Activated Cell Sorter) (Šmarda a kol., 2005).

Mezi výhody průtokové cytometrie patří velmi jednoduchá a rychlá příprava vzorků, u které se ale musí dbát na šetrnou separaci buněk pevných tkání, u kterých by mohlo dojít ke změně nebo úplné ztrátě zkoumaných vlastností (Roubalová, 2012). Dalšími výhodami jsou nedestruktivnost metody (zkoumaný jedinec se odběrem malého množství vzorku neničí) a vysoká rychlost analýz (analýza 100 000 jader obvykle trvá přibližně 3 minuty. Nejmodernější průtokové cytometry jsou schopny zpracovat až 100 000 částic/s) (Roubalová, 2012; Suda, 2005). Díky vysoké rychlosti analýz, lze během jednoho dne studovat desítky až stovky vzorků a je tedy umožněno studium dat rozsáhlých populačních sběrů. Jednou z výhod je také vysoká přesnost metody, která však může být negativně ovlivněna odlišnou barvitelností částic daného vzorku, odlišnými vnějšími faktory nebo přístrojovou chybou (Suda, 2005). Jednou z dalších výhod průtokové cytometrie je schopnost současně shromáždit více proměnných (analyzovat více úhlů rozptýleného světla, více spektrálních složek a v ten samý čas třídit analyzované buňky do skupin). Touto multiparametrickou kapacitou se průtoková cytometrie liší od ostatních metod (Doležel a kol., 2007). Mezi další výhody této metody patří možnost analyzovat širokou škálu buněčných suspenzí, pletiv a tkání. Pozitivem metody jsou i nízké finanční náklady vynaložené na analýzu jednoho vzorku (desítky korun). Ovšem musí být brána v potaz vysoká pořizovací cena průtokového cytometru, což je i jednou z nevýhod průtokové cytometrie (Suda, 2005). Mezi další nevýhody lze zařadit preferenci čerstvého materiálu pro analýzu (ačkoliv použitím vhodných barviv a vhodného skladování lze analyzovat i několik týdnů staré vzorky). Tato preference omezuje práci v terénu, znesnadňuje uchování vzorků pro další analýzu a v důsledku může vést k malé citlivosti při třídění jedinců lišících se o méně než jeden chromozom (Doležel a kol., 2007). V takových případech lze tuto metodu použít u organismů s $2n \leq 30$, u kterých je podíl DNA připadajících na 1 chromozom dostatečně odlišitelný od celkového množství DNA (Suda, 2005).

Průtoková cytometrie má obrovský rozsah využití v rozličných oborech, protože je jednou z několika málo metod, díky které lze multiparametricky vyhodnotit malé množství vzorku v krátkém čase na úrovni jednotlivých buněk. Tyto vlastnosti spolu s analýzou všech jednotlivých buněk populace a následnou produkcí souboru dat, který velmi přesně koreluje s danými vlastnostmi buněk, jsou jedinečnými právě pro průtokovou cytometrii (Doležel a kol., 2007).

3.3.1 Historie cytometrie

První cytometry vycházely z klasických světelných mikroskopů a byly sestaveny během 30. let 20. století, kdy Torbjörn Caspersson zkonstruoval sérii mikrospektrofotometrů, na kterých analyzoval vzorky barvené klasickými histologickými metodami pro světelnou mikroskopii. Jedním z prvních pokusů byly objeveny abnormality v obsahu DNA a RNA v nádorových buňkách. Do 50. let 20. století se používaly skenovací cytometry, které se od mikrospektrofotometrů lišily menším pozorovacím polem, na kterém probíhaly analýzy menších množství vzorku, a přesnějším zaznamenáváním excitovaného světla. Zobrazení jednotlivých buněk umožnila hodnota excitace nebo absorbance. Tyto skenovací cytometry analyzovaly celé buňky. Jejich provoz byl velmi časově i finančně náročný především proto, že neexistoval žádný jiný způsob, jak získaná data uchovávat, než si poznamenat výsledky dané analýzy bezprostředně po ní a až poté mohlo následovat další měření. Do poloviny 50. let 20. století bylo zřejmé, že zhoubné buňky obsahují více DNA než buňky zdravé. Tohoto faktu se využívalo při pokusech na nově sestrojených cytometrech. V roce 1951 Mellors a Silver sestrojili nový skenovací přístroj, který měřil fluorescenci místo absorbance, avšak až během 60. let byly dostupné dostatečně výkonné počítače pro vyhodnocování cytometrických dat. Až od této doby se začíná cytometrie významněji rozvíjet (Doležel a kol., 2007).

Objevení principu průtokové cytometrie lze datovat do období po 2. světové válce, během níž Spojenecké armády hledaly způsob jak rychle a účinně detekovat bakteriální agens biologických zbraní, které byly použity ve formě aerosolu. Z tohoto důvodu Gucker a kol. (1947) sestrojili přístroj, ve kterém byl vzorek unášen proudem vzduchu do středu mohutnějšího proudu vzduchu, který procházel ohniskem mikroskopu temného pole. Procházející částice vyzařovaly náboj, jenž byl detekován.

Tento přístroj se označuje jako první průtokový cytometr, ačkoliv již v roce 1934 Moldavan navrhl podobnou metodu měření buněk, která byla založena na proudu kapaliny nikoliv vzduchu. Moldavan nebyl schopný pro tuto metodu sestrojít vhodné pracovní zařízení. Další alternativní metoda průtokové cytometrie byla objevena v roce 1956 Wallacem Coulterem. Tato metoda je založena na průchodu jednotlivých buněk vzorku malým otvorem (průměr $< 100 \mu\text{m}$), který je obklopen slaným roztokem. Po průchodu buněk otvorem se generuje napětí, které je detekováno snímačem a jeho velikost je přímo úměrná objemu buněk. Tento přístroj byl hojně využíván v laboratořích klinické biologie k analýze krevních buněk. Další rozvoj průtokové cytometrie nastal zaváděním fluorescenčních značek (akridin oranž pro značení červených a bílých krvinek), které umožňují rozlišování buněk. V roce 1965 Kamensky a kol. sestrojil průtokový cytometr, který byl založen na měření transmise viditelného světla pro určení velikosti buněk a absorbance UV světla (o vlnové délce 260 nm) pro určení obsahu DNA. Tento cytometr byl přímo spojen s počítačem a počítačovým programem, který umožnil analyzovat až 4 buněčné parametry během jednoho měření. Začátkem 70. let 20. století byl sestrojen první komerčně vyráběný průtokový cytometr Hemalog D, který umožňoval třídění leukocytů. Bylo zde využito měření 3 různých parametrů: rozptylu světla a absorbancí při různých vlnových délkách (Doležel a kol., 2007). Tyto průtokové cytometry byly příliš náročné na obsluhu a drahé, proto se využívaly především pro vědecké účely. Díky používání fluorescenčních barviv, objevu monoklonálních protilátek, jejich zavedení do praxe, rozvoji elektronové mikroskopie a zavedení metod pro přípravu vzorků buněk těžce oddělitelných z pletiv a orgánů se průtoková cytometrie začala prudce rozvíjet (Roubalová, 2012). Konkrétně pro izolaci buněčných jader z buněk rostlinných pletiv byla roku 1983 představena metoda mechanického uvolnění jader preparací v chladném hypotonickém roztoku. Buněčná jádra se díky rozdílnému osmotickému tlaku oddělí od zbylých buněčných struktur. Tyto struktury se od směsi oddělí filtrací a filtrát může být analyzován (Doležel a kol., 2007).

Velký přínos má průtoková cytometrie v cytogenetických a karyologických studiích, které se díky ní staly méně časově i finančně náročnými. Původní cytogenetické metody byly založeny na mikroskopickém pozorování obarvených chromozomů v metafázi buněčného cyklu. Mikroskopy musely být vybaveny kvalitní optikou s vysokým rozlišením. Do roku 1969 se používaly konvenční metody barvení

chromozomových preparátů (Giemsovým barvivem nebo orceinem), od roku 1970 se začaly používat enzymové barvicí techniky pruhování chromosomů, které slouží k přesné identifikaci chromosomových párů. V klinických laboratořích jsou tyto techniky bezpodmínečnou součástí každého cytogenetického vyšetření. Klasické cytogenetické metody jsou pracné a časově náročné. Dalšími metodami cytogenetiky jsou molekulární metody (např. FISH – **F**luorescence **I**n **S**itu **H**ybridization). Tyto metody umožňují studium karyotypu buněk v metafázi nebo interfázi buněčného cyklu, studium počtu a přesné struktury chromosomů, mapování genomu a přesnou lokalizaci genů (Michalová a Zemanová, 2005).

Od 90. let 20. století se v klinické cytogenetice začala používat průtoková cytometrie. Z počátku byla ve vzorcích analyzována jen DNA (celkový obsah DNA, ploidní heterogenita jedinců atd.). S objevem monoklonálních protilátek se začala rozvíjet imunofenotypizace. Díky FACS průtokovým cytometrům lze tyto poznatky využít k třídění buněčných populací, např. lišících se přítomností určitého antigenu apod. Průtoková cytometrie je účinná a rychlá metoda k analýze populace heterogenních částic. Podrobnější fenotypové analýzy jsou zatím aplikovány pouze ve výzkumu (Kovářová a Hájek, 2008). Průtokový cytometr je dnes běžným vybavením cytogenetických laboratoří. Díky velmi propracovaným počítačovým programům jsou průtokové cytometry snadné na obsluhu a poskytují stále více dat (Roubalová, 2012).

3.3.2 Princip průtokové cytometrie

Princip průtokové cytometrie spočívá v měření míry fluorescence jednotlivých buněk, jader či chromozómů, která odpovídá sledovanému znaku. Koncentrovaná buněčná suspenze se opatří fluorescenční značkou (fluorochromem), která se váže na cílovou molekulu specificky (např. pro značení dvoušroubovice nukleové kyseliny se používá *propidium jodid*). Využívá se jevu hydrodynamické isofokusace, který je založen na tom, že unášecí kapalina (destilovaná voda nebo slabý roztok solí) prochází pod velkým tlakem malým otvorem a vzorek je tryskou přepraven do středu unášecí kapaliny. Tlak proudu vzorku je menší než tlak unášecí kapaliny a tímto způsobem je zajištěno, že jednotlivá jádra vzorku prochází průtokovou komůrkou pravidelně, lineárně a kontrolovatelnou rychlostí (Doležel a kol., 2007). V průtokové komůrce jsou barvená jádra vzorku ozářena excitačním světlem (Šmarda a kol., 2005). Je-li

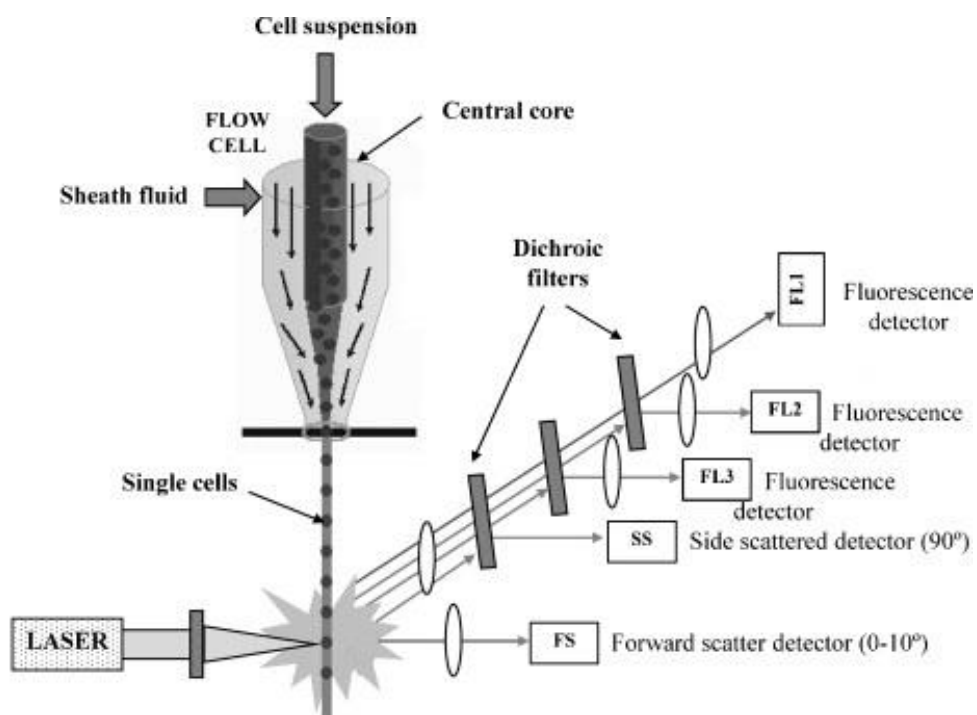
fluorochrom ozářen světlem o vhodné vlnové délce (nejčastěji se používá zdroj světla generující záření o vlnové délce 488 nm), dojde k jeho excitaci, tj. k přechodu elektronů na vyšší energetickou hladinu. Excitovaný stav je nestabilní a elektrony přechází zpět do základního stavu na energeticky nižší hladinu. Tento přechod je doprovázen uvolněním tepelné a světelné energie (fluorescence) (Suda, 2005). Vyzařované (emitované) světlo má vždy nižší energii a tedy delší vlnovou délku než světlo excitační. Rozdíl mezi vlnovou délkou excitujícího a emitovaného světla se nazývá Stokesův posun, který je definován pro každý fluorochrom (Roubalová, 2012). Emitované záření je detekováno, zaznamenáno a dle míry jeho intenzity jsou stanoveny dané vlastnosti analyzovaných jader. (Ormerod, 2008). Hodnota fluorescence se ukládá do počítačové paměti pro každou buňku zvlášť (Suda, 2005). Detekce fluorescence, až 14 fluorescenčních látek při různých vlnových délkách, umožňuje multiparametrickou analýzu a výrazně zvyšuje výkon průtokové cytometrie. Ve většině aplikací se pracuje se 4 až 8 typy fluorescence (Ormerod, 2008). Výsledky analýz mohou být ovlivněny tzv. autofluorescencí. Autofluorescence je přirozená fluorescence buněk způsobená přítomností kolagenu, elastinu, NADPH (nikotinamidadeninukleotidfosfátu), riboflavinu, aromatických aminokyselin či chlorofylu (Bio-Rad Laboratories, © 2018).

Vzorek je pomocí průtokové cytometrie analyzován ve velmi krátkém čase (řádově několik mikrosekund na jednu buňku) (Doležel a kol., 2007). Data jsou počítačově zpracována a výsledkem je histogram, který zobrazuje relativní intenzitu fluorescence jednotlivých buněk (Šmarda a kol., 2005). Základním formátem, ve kterém se histogramy ukládají, je **Flow Cytometry Standard (.FCS)** (Doležel a kol., 2007).

3.3.3 Komponenty průtokového cytometru

Komponenty průtokového cytometru lze rozdělit do 3 systémů: fluidní systém (pracovní kapalina, průtoková komůrka), optický systém (zdroj excitačního světla, soustava filtrů a zrcadel) a elektronický a výpočetní systém (soustava fotonásobičů, zesilovačů signálu a počítačový software) (Doležel a kol., 2007). Základní součástí průtokového cytometru je průtoková komůrka, ve které se analyzované částice řadí jedna za druhou tak, aby procházely ve středovém proudu kapaliny ohniskem

excitačního světla (hydrodynamická isofokusace, viz Kapitola 2.3.2). V průtokové cytometrii se používají tři zdroje excitačního světla: lasery, LED (*Light-Emitting Diode*) a vysokotlaké rtuťové výbojky. Výsledná fluorescence je snímána optickou soustavou a pomocí fotodiod převáděna na elektrické impulzy, které jsou fotonásobiči zesíleny, digitalizovány a uchovány ve formě histogramu (Suda, 2005).



Obr. 1: Schéma průtokového cytometru (Díaz a kol, 2008)

U průtokových cytometrů s frakcionačním zařízením se každému jádru (částici) udělí elektrický náboj. Tato jádra lze jímát do oddělených zkumavek a tím je třídit. Při identifikaci částice s požadovanými vlastnostmi je sepnut piezoelektrický ventil a proud těchto částic je odkloněn a jímán mimo hlavní proud. Dalším způsobem je jímání identifikovaných částic přímo v hlavním proudu tak, že při detekci požadovaných částic je sběrná zkumavka do hlavního proudu vsunuta (Šmarda a kol., 2005). Tato aplikace průtokové cytometrie je jednou z hlavních. Používá se pro třídění různých subtypů a epitopů částic pro další biologické studie. Přesnost třídění částic závisí na jejich velikosti, rychlosti tvorby kapek vzorku a rychlosti průtoku tryskou. Ideální rychlost průtoku je 30 000 – 100 000 kapek/s, při vyšších rychlostech dochází

ke snížení přesnosti třídění vzorku a může docházet k ucpávání trysky (Rahman a kol., 2013).

3.3.4 Fluorochromy používané v průtokové cytometrii

Aplikace fluorescenčních značek v průtokové cytometrii má široké uplatnění. Používají se k identifikaci a kvantifikaci odlišných populací buněk, odlišných povrchových receptorů buněk nebo buněčných organel, k třídění buněk, imunofenotypizaci, ke stanovení obsahu nukleových kyselin, k měření enzymové aktivity nebo ve studiích apoptózy (Rahman a kol., 2013). Fluorochromy používané v průtokové cytometrii lze rozdělit do dvou skupin. Látky, které se nekovalentně váží na molekuly uvnitř buněk, a látky, které jsou kovalentně vázány k jiným sondám, které se nekovalentně váží na buněčné struktury. Takovými sondami jsou obvykle protilátky, ale mohou být značeny i proteiny, hormony nebo cDNA. Nejběžnější látkou používanou k označování proteinových sond je fluorescein isothiokyanát, který reaguje s aminoskupinami lysinových zbytků sond. Nejvýznamnější jsou tyto fluorochromy aplikovány v imunofluorescenčních metodách (Ormerod, 2008).

Určité fluorochromy mají schopnost se stechiometricky vázat na nukleové kyseliny a lze je využít pro kvantitativní analýzy. Fluorescenční značky pro značení nukleových kyselin používané v průtokové cytometrii lze rozdělit do 3 skupin. Řadí se sem látky, které se neselektivně váží na dvoušroubovici nukleových kyselin (propidium jodid, ethidium bromid), látky, které se přednostně váží k oblastem DNA bohatých na A-T báze (DAPI, Hoechst 33342) a látky, které se váží hlavně na oblasti DNA bohatých na G-C báze (antibiotika mitramycin, chromomycin a olivomycin). V analýzách se uplatňují první dvě skupiny fluorescenčních látek, které nesnižují kvalitu analýz (Suda, 2005). Většina fluorochromů je schopna barvit nukleové kyseliny fixovaných nebo permeabilizovaných buněk, ale např. Hoechst 33342 prochází cytoplazmatickou membránou životaschopných buněk a může být použit pro jejich analýzu. Nejčastěji používanou fluorescenční sloučeninou pro značení nukleových kyselin je propidium jodid. Tato sloučenina se váže nespecificky s dvoušroubovicí nukleové kyseliny. Aby výsledná data vypovídala jen o obsahu DNA, přidává se do analyzovaných vzorků RNasa. Propidium jodid je vybuzen do excitovaného stavu modrým světlem o vlnové délce 342 až 535 nm a vyzařuje světlo

červené o vlnové délce 617 nm. Pro průtokové cytometry s rtuťovými výbojkami (zdroj excitačního UV světla) se obvykle používá barvivo DAPI, které je AT selektivní a využívá se k značení DNA a k detekci ploidní variability (Ormerod, 2008).

Fluorochrom	Vazba s nukleovou kyselinou (NK)	Vlnová délka excitačního světla [nm]	Vlnová délka emitovaného světla [nm]
Propidium jodid	Neselektivní s dvoušroubovicí NK	535	617
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)	AT selektivní	372	476
Hoechst 33342	AT selektivní	395	450
Mitramycin/chromomycin	GC selektivní	445	575

Tabulka č. 1: Výběr základních fluorochromů používaných pro značení nukleových kyselin, jejich vazba s nukleovou kyselinou a maximální vlnové délky excitačního a emitovaného světla (Ormerod, 2008)

V průtokové cytometrii se mohou používat fluorescenční nanokrystaly o velikosti 10 až 20 nm. Tyto částice mají široké absorpční spektrum. Vlnová délka světla, které vyzařují, závisí na jejich velikosti. Spektrum emitovaného světla je velmi úzké, což snižuje překrývání se jednotlivých signálů a tím metodu zpřesňuje. V současné době se tato metoda využívá omezeně. Avšak její aplikace je díky zlepšujícím se technologiím vazby fluorescenčních nanokrystalů s různými sondami a snižující se ceně na vzestupu.

K třídění transfekovaných buněk (buněk, do kterých je vložena část nukleové kyseliny pomocí virionu) se používá zelený fluorescenční protein (původně izolován z medúzy *Aequorea victoria*) (Ormerod, 2008).

3.3.5 Detekce, zpracování signálu a interpretace dat

Výsledkem interakce ozářené částice s excitačním světlem je signál, jehož intenzita je detekována. Lineárně rozptýlené záření, které je zachyceno detektorem umístěným v ose dopadajícího paprsku, se nazývá **Forward SCatter (FSC)**. Intenzita tohoto signálu je dostatečně vysoká a není jí potřeba zesilovat. Tento parametr určuje velikost částic. Velikost rozptylu světla je jí přímo úměrná. Bočně rozptýlené záření, které dopadá na detektor, který je umístěný kolmo k ose dopadajícího paprsku, se označuje jako **Side SCatter (SSC)**. Tento signál má nižší intenzitu, a proto je zesilován fotonásobičem. Signál SSC vypovídá o míře granularity částice. Vynesáním signálů FSC a SSC do dvourozměrného grafu je získáván cytogram který rozděluje částice dle jejich velikosti a granularity (Roubalová, 2012). Dalším detekovaným signálem je fluorescence. Tento signál musí být zesílen a dále zpracováván (Rahman a kol., 2013).

Průtokové cytometry jsou běžně složeny z více detektorů (4 až 8) a umožňují použití více fluorochromů, což umožňuje získat více informací o jednotlivých částicích během jedné analýzy. Musí se ovšem dbát na to, aby se nepřekrývala emisní spektra použitých fluorochromů. Také je před začátkem analýzy nutné stanovit prahovou hodnotu signálu (tzv. threshold) a použít standard (Roubalová, 2012). Referenční standardy musí být použity k analýze míry zkoumaných vlastností částic a k umožnění vzájemnému porovnávání výsledků analýz zkoumaných vzorků. Hodnoty jednotlivých analýz jsou srovnávány se standardy, které mají přesně definované vlastnosti (pro analýzu obsahu DNA se používá standard s přesně definovaným množstvím DNA). Vlastnosti zkoumaného materiálu jsou určeny poměrem intenzity signálu analyzovaného vzorku a přesně definované a známé intenzity signálu použitého standardu. Aby bylo možné standardizaci správně realizovat a byla zachována linearita analýzy, neměly by se vzorek a standard výrazně odlišovat množstvím použitého materiálu, objemem vzorku a standard by měl mít podobný charakter jako zkoumaný vzorek. Používány jsou tři typy standardizace: externí, interní a endogenní. Během externí standardizace je standard analyzován odděleně jako další vzorek a následně dochází k porovnávání dat. Externí standardizace je používána pro analýzy, u kterých nejsou kladeny vysoké nároky na přesnost, např. pro analýzy DNA ploidie. Interní standardizace je charakterizována současnou analýzou standardu i vzorku, aby podmínky přípravy, barvení a hodnocení

standardu a vzorků byly identické. Interní standardizace se považuje za nejspolehlivější metodu, která může být použita pro přesné stanovení velikosti genomu (Doležel a kol., 2007). Třetím typem standardizace je endogenní standardizace. Během tohoto postupu slouží část jader analyzovaného vzorku jako standard. Tato standardizace je využívána při studiích endoploidie (porovnání hodnot intenzity signálu pro 2C DNA s ostatními signály) a analýzách ploidií částí semen (Koutecký, 2012). Dále může být využívána kombinace externí a interní standardizace, tzv. pseudo-interní standardizace. Během této standardizace je standard připravován nezávisle na zkoumaných vzorcích a je přidán k vzorku až před vlastní analýzou. Tato metoda je velmi přesná, ale kvůli používání např. barvicích roztoků s odlišným datem přípravy či odlišných postupů přípravy standardů a vzorků, není dobrým prostředkem k autentickému určení zkoumaných vlastností (Doležel a kol., 2007).

Rostlinné DNA standardy		
Druh	Odrůda	2C DNA [pg]
<i>Raphanus sativus</i>	Saxa	1.11 pg
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Stupicke polni tyckove rane	1.96 pg
<i>Glycine max</i>	Polanka	2.50 pg
<i>Zea mays</i>	CE-777	5.43 pg
<i>Pisum sativum</i>	Ctirad	9.09 pg
<i>Secale cereale</i>	Dankovske	16.19 pg
<i>Vicia faba</i>	Inovec	26.90 pg
<i>Allium cepa</i>	Alice	34.89 pg

Tabulka č. 2: Seznam používaných standardů pro určení množství DNA rostlinných buněk (Centre of Plant Structural and Functional Genomics of the Institute of Experimental Botany AS CR, 2016)

Optické signály jsou převedeny na elektrické impulzy, které jsou zobrazeny počítačovým software ve formě jedno nebo dvouparametrových cytogramů (častěji jsou využívány dvouparametrové). V těchto cytogramech je každý elektrický impulz zaznamenán jedním bodem. Většina software umožňuje zobrazení dat i

v trojrozměrném izometrickém grafu. Jedna analýza přináší informace o všech analyzovaných částicích suspenze. Každá částice poskytuje signál rozptylu FSC a SSC. Částice, které jsou označeny fluorescenční značkou, poskytují i signál intenzity fluorescence (Roubalová, 2012). Získaná data jsou statisticky vyhodnocována (Doležel a kol., 2007).

3.3.6 Aplikace průtokové cytometrie v mikrobiologii

Nejvíce zřejmou aplikací průtokové cytometrie v mikrobiologii je analýza čistých mikrobiálních kultur. Tato analýza je uplatňována především ve výzkumu (např. analýza fyziologických vlastností nekultivovatelných bakteriálních buněk). V průmyslu se analýzy čistých kultur využívají při základní kontrole (určení počtu a životaschopnosti kulturních mikroorganismů) výroby kvasnic, fermentační výroby mléčných a masných výrobků nebo produkce jedlých vakcín. Nízká životaschopnost mikroorganismů snižuje výtěžek celé výroby. Detekce všech částic může být využita i ke stanovení celkových počtů mikroorganismů v potravinách nebo vodě (např. k určení celkových počtů mikroorganismů v syrovém mléce). Dalším uplatněním je kontrola limitů pro počet nežádoucích mikroorganismů přítomných na zařízeních zpracovávajících potraviny. V řadě situací je potřeba určit procentuální zastoupení živých buněk v populaci, např. určit efektivitu dezinfekčních režimů apod. (Veal a kol., 2000).

Průtoková cytometrie slouží k detekci specifických typů mikroorganismů. Díky vysoké rychlosti analýzy lze tuto metodu využít pro dvě základní studie. Jsou to populační analýzy a detekce vzácných vlastností buněk. Při populačních analýzách se využívá schopnosti průtokové cytometrie roztrždit velké množství částic do podskupin. Při detekci vzácných vlastností se určí hledaná vlastnost jako pozitivní výsledek, který musí být jasně odlišitelný od ostatních vlastností jednotlivých částic vzorku. Tímto způsobem jsou detekovány specifické mikroorganismy, které mohou být značeny jednou nebo více sondami. K detekci a třídění unikátních mikroorganismů může být využíván tzv. cell sorting (viz Kapitola 2.3.3). Průtokovou cytometrií lze detekovat i viry. Je známo mnoho pokusů, ve kterých byly identifikovány buňky, které byly infikovány viry, právě průtokovou cytometrií. Tyto metody využívají změn obsahu

nukleových kyselin a exprese virových antigenů na povrchu infikovaných buněk (Veal a kol., 2000).

Aplikace průtokové cytometrie v mikrobiologii se stále více rozvíjí. Rozšiřuje se škála rozpoznávaných patogenů a zpřísňují se pravidla o mikrobiální bezpečnosti např. potravin, proto je vhodné zavedení cytometrických metod do praxe. Potravinářský a farmaceutický biotechnologický průmysl je vysoce automatizovaný a je potřeba monitorovat počty mikroorganismů v jednotlivých výrobních krocích v reálném čase. Mnoho patogenů je nedekovatelných tradičními metodami, proto se i zde uplatňují metody průtokové cytometrie (Veal a kol., 2000). Průtoková cytometrie slouží jako prostředek pro kontrolu kvality a bezpečnosti potravin. Využívá se schopnosti této metody rychle detekovat případnou kontaminaci (neznámými nebo nežádoucími mikroorganismy) surovin a konečných výrobků. Tato aplikace může sloužit i jako ukazatel účinnosti konzervačních kroků (ošetření teplem, chladem, vysokým tlakem, chloridem sodným apod.) výrob potravinářského či farmaceutického průmyslu. Je analyzován vliv jednotlivých konzervačních faktorů na životaschopnost mikroorganismů (Díaz a kol., 2010).

4. Materiál a metodika

4.1 Použitý kmen bakterie

Byl použit kmen *Pseudomonas syringae* pv. *oryzae* (označení: BCCM/LMG 10912) získaný z Belgické sbírky mikroorganismů (Belgian co-ordinated collection of microorganisms).

4.2 Kultivace vzorků

Použitý kmen *Pseudomonas syringae* pv. *oryzae* byl kultivován a uchováván v tekutém kultivačním médiu (C-médiu (Dreier a kol., 1995) pro koryneformní bakterie) v Erlenmeyerových baňkách o objemu 250 ml.

Pro přípravu 250 ml C-média (Dreier a kol., 1995) pro koryneformní bakterie bylo použito:

Pepton sojový	2,50 g
Kvasničný autolyzát	1,25 g
Glukosa	1,25 g
NaCl	1,25 g

Tato směs byla rozpuštěna v destilované vodě a roztok byl kvantitativně doplněn na objem 250 ml. Hodnota pH roztoku byla pomocí 1 M roztoku NaOH upravena na 7,2. C - médium bylo autoklávováno 15 min. při 121 °C.

Kultivace probíhala ve vysterilizovaných Erlenmeyerových baňkách o objemu 250 ml, které obsahovaly přibližně 50 ml C-média. Pro založení kultury *P. syringae* pv. *oryzae* byly jednorázovou bakteriologickou kličkou bakteriální buňky ze sbírky přeneseny do C-média. Očkování probíhalo ve flow boxu. Bakteriální kultury byly kultivovány na třepače s frekvencí třepání 250 rpm, při 25 °C, po dobu 24 hodin a následně byly uchovávány v chladničce při 4 °C. Před každou analýzou byly kultury přepasážovány přenesením 500 µl předešlé kultury do nových Erlenmeyerových baněk za dodržení totožných kultivačních podmínek.

Pro ověření flowcytometrických analýz životaschopnosti *P. syringae* pv. *oryzae* byly bakterie kultivovány na Petriho miskách na pevném Masopeptonovém

agaru s glukosou (MPAg). Tato metoda je klasickým postupem pro určení zastoupení živých a mrtvých bakteriálních buněk ve vzorku.

Pro přípravu 250 ml MPAg bylo použito:

Živný agar č.2	10,0 g
Kvasničný autolyzát	1,3 g
Glukosa	2,5 g

Tato směs byla destilovanou vodou doplněna na 250 ml. pH roztoku bylo pomocí 1M roztoku NaOH upraveno na hodnotu 7,2. Do média bylo přidáno 5,0 g agaru a médium bylo autoklávováno 15 min. při 121 °C.

Na Petriho misky s pevným MPAg bylo napipetováno 50 µl teplem ošetřených bakteriálních kultur sady vzorků č. 3 (viz Tab. č. 3). Tento objem byl bakteriologickou kličkou rovnoměrně rozetřen po Petriho misce. Kultivace probíhala v termostatu při 22 °C, 24 hod.

Následně byly vizuálně zhodnoceny počty kolonií na jednotlivých miskách. Tyto výsledky byly porovnávány, aby byly získány informace o závislosti počtu přeživších buněk v populaci, na vzrůstajícím čase ošetření teplotou. Tyto výsledky byly porovnány s výsledky analýz identických vzorků pomocí průtokového cytometru.

4.3 Ošetření vzorků vysokou teplotou

Před každou analýzou byla sada vzorků - 1 vzorek obsahoval 50 µl bakteriální kultury - ošetřena vysokou teplotou a byla utvořena časová řada tak, aby první vzorky s časem ošetření 0,5 nebo 1 min. obsahovaly 100 % živých buněk a vzorky s nejdelším časem ošetření obsahovaly 100 % mrtvých buněk. Byly optimalizovány podmínky ošetření tak, aby bylo dosaženo rovnoměrné řady zastoupení živých a mrtvých buněk. Jednotlivé vzorky byly ošetřovány za stálého třepání (s frekvencí 200 rpm) vysokou teplotou na termobloku. Sada vzorků č. 6 byla ošetřena 95 °C s frekvencí třepání 200 rpm a okamžitě poté byly vzorky přemístěny na led. Zde byly uchovány až do vlastní analýzy. Tento postup byl zaváděn pro získání průkaznějších rozdílů mezi jednotlivými vzorky. Tohoto cíle nebylo dosaženo, proto tento postup nebyl opakován.

Číslo sady vzorků	1	2	3	4	5	6
Teplota ošetření	80 °C	80 °C	85 °C	90 °C	95 °C	95 °C, led
Čas ošetření [min]	0.5	1	1	1	1	1
	1	5	3	3	3	3
	5	10	5	5	5	5
	10	15	10	8	8	8
		20	15	10	10	10
		25	20	15	15	15
			25	20	20	20
			30	25	25	25
			35	30	30	30

Tabulka č. 3: Jednotlivé sady vzorků s teplotou a časem ošetření

4.4 Příprava vzorků pro vlastní analýzu

Aby byla buněčná suspenze dostatečně zředěna a byl zajištěn správný průběh analýz, bylo k ošetřeným bakteriálním kulturám přidáno 500 μ l OTTO I pufru.

Pro přípravu OTTO I pufru bylo použito:

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

Sady vzorků č. 1 a č. 2 byly centrifugovány při maximálním výkonu centrifugy, 2 min, při pokojové teplotě. Tento krok však v porovnání s analýzou vzorků sady č. 3 významně neovlivnil výsledky, proto byl pro svou nadbytečnost vyřazen.

Jako negativní kontrola bylo použito 500 μ l teplem neošetřeného OTTO I pufru barveného 350 μ l propidium jodid barvicího roztoku. Negativní kontrola byla připravována ke každé sadě vzorků zvlášť.

Jako fluorescenční barvivo byl použit propidium jodid (PI), který se neselektivně váže na dvoušroubovici nukleových kyselin. Aby byla získána informace pouze o obsahu DNA (tzn. aby byly tímto barvivem obarveny pouze dvoušroubovice DNA a ne dvoušroubovice RNA), byla přidána RNasa A. K jednotlivým vzorkům a kontrolám bylo 1 – 2 min před každou analýzou napipetováno 350 μ l barvicího roztoku propidium jodid, vzorky byly dobře promíchány a následně analyzovány.

Pro přípravu barvicího roztoku PI bylo použito:

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

Pro přípravu OTTO II pufru bylo použito:

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

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

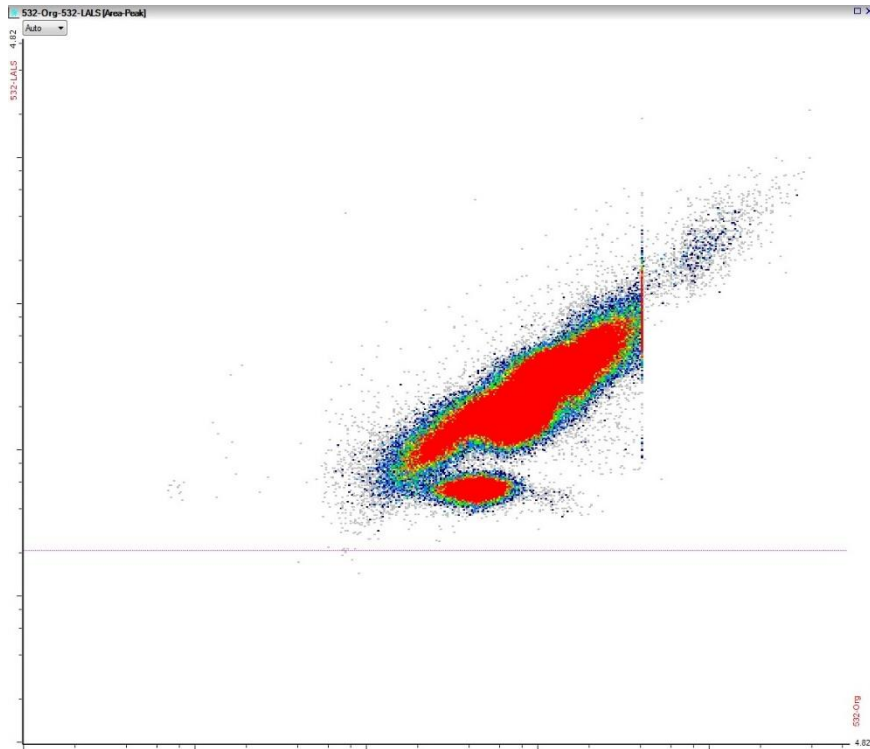
4.5 Obsluha průtokového cytometru Apogee A60 Universal a vlastní analýza

Analýzy byly prováděny na průtokovém cytometru Apogee A60 Universal. Nastavení průtokového cytometru bylo následující: průtok unášecí kapaliny byl nastaven na 4,51 $\mu\text{l}/\text{min}$ a vlnová délka excitačního světla byla 532 nm (pro FSC = LALS = Large Angle Light Scatter i SSC = SALS = Small Angle Light Scatter). Pro standardizaci vlastních analýz byl použit standard *Bellis perennis*. Cytogramy jednotlivých vzorků byly průběžně ukládány a analyzovány v tomtéž programu pomocí příkazu: Population detection menu. Touto analýzou byla získána data o procentuálním zastoupení živých (obarvených propidium jodidem) a mrtvých buněk (neobarvených propidium jodidem) v jednotlivých vzorcích.

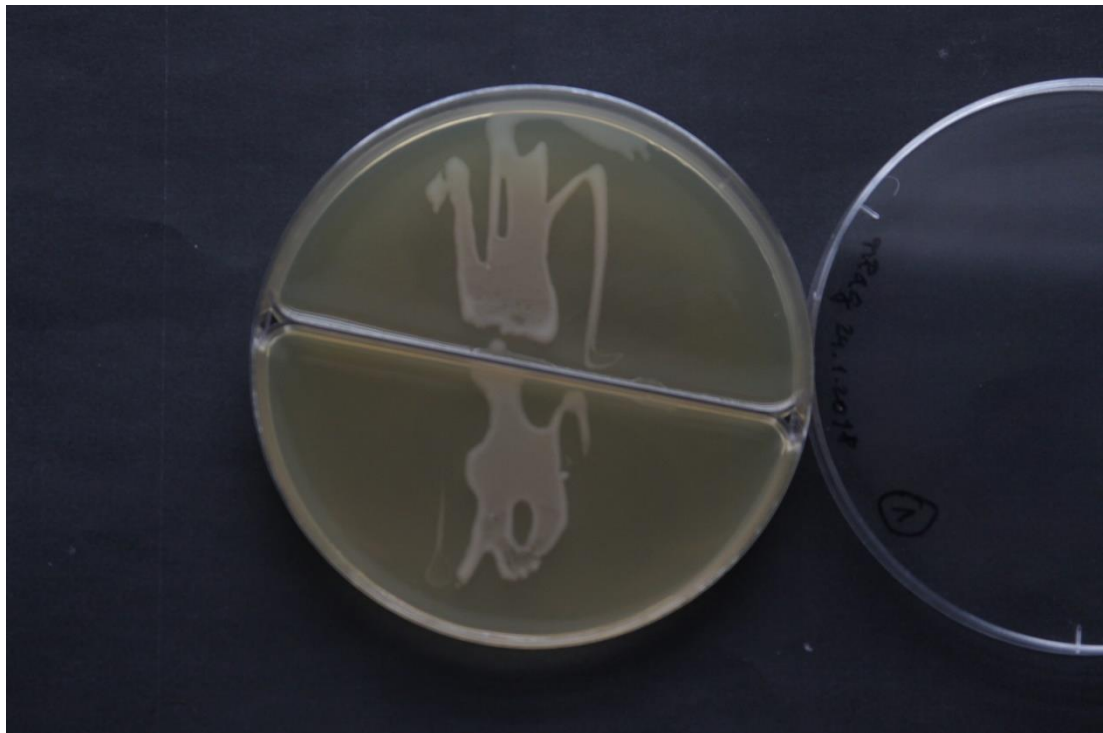
5. Výsledky

U analyzovaných vzorků byly hodnoceny výsledky flowcytometrických analýz – zastoupení živých a mrtvých buněk v jednotlivých populacích v závislosti na čase a teplotě ošetření. V programu Apogee Histogram Software byly stanoveny absolutní počty všech analyzovaných jader a procentuální zastoupení všech mrtvých a živých jader. Tato data byla statisticky vyhodnocena v programu STATISTICA. Výsledky klasické kultivační metody byly hodnoceny vizuálně.

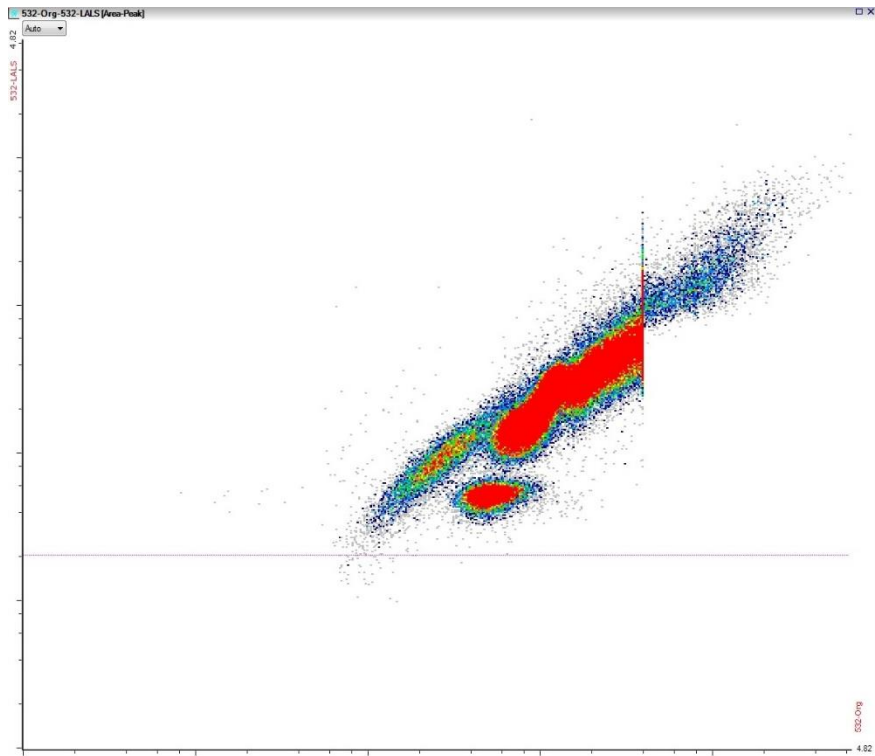
Vzorky, které byly ošetřeny teplotou 85 °C v dané časové řadě (viz Tab. č. 3), byly analyzovány průtokovou cytometrií i klasickou kultivační metodou. Signifikantní výsledky obou metod jsou zobrazeny na Obr. 2, Obr. 3, Obr. 4, Obr. 5, Obr. 6 a Obr. 7. Dle vzrůstajícího rozptylu analyzovaných částic zobrazených cytogramy a klesajícího počtu kolonií na Petriho miskách je zřejmé, že s přibývajícím časem ošetření počet přeživších jader klesá. Na Obr. 8 a Obr. 9 jsou zobrazeny výsledky negativní kontroly, kterými byla potvrzena čistota pracovního pufru OTTO I a správnost výsledků (analýza pouze bakteriální kultury *Pseudomonas syringae* pv. *oryzae*).



Obr. 2: Cytogram zobrazující vzorek bakteriální kultury ošetřený 85 °C, 1 min



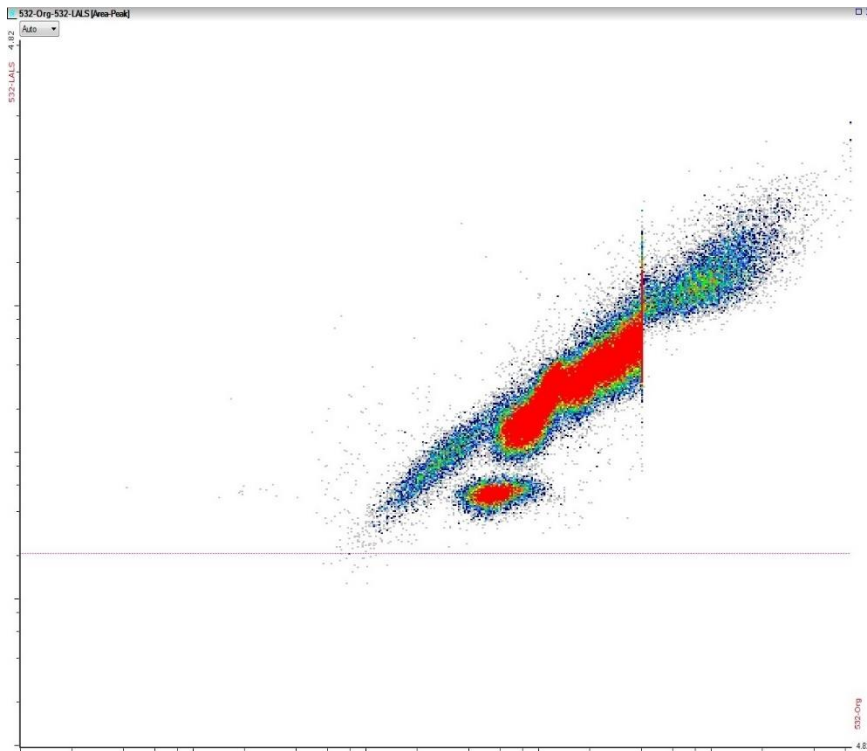
Obr. 3: Bakteriální kultura ošetřená 85 °C, 1 min kultivována na MPAg



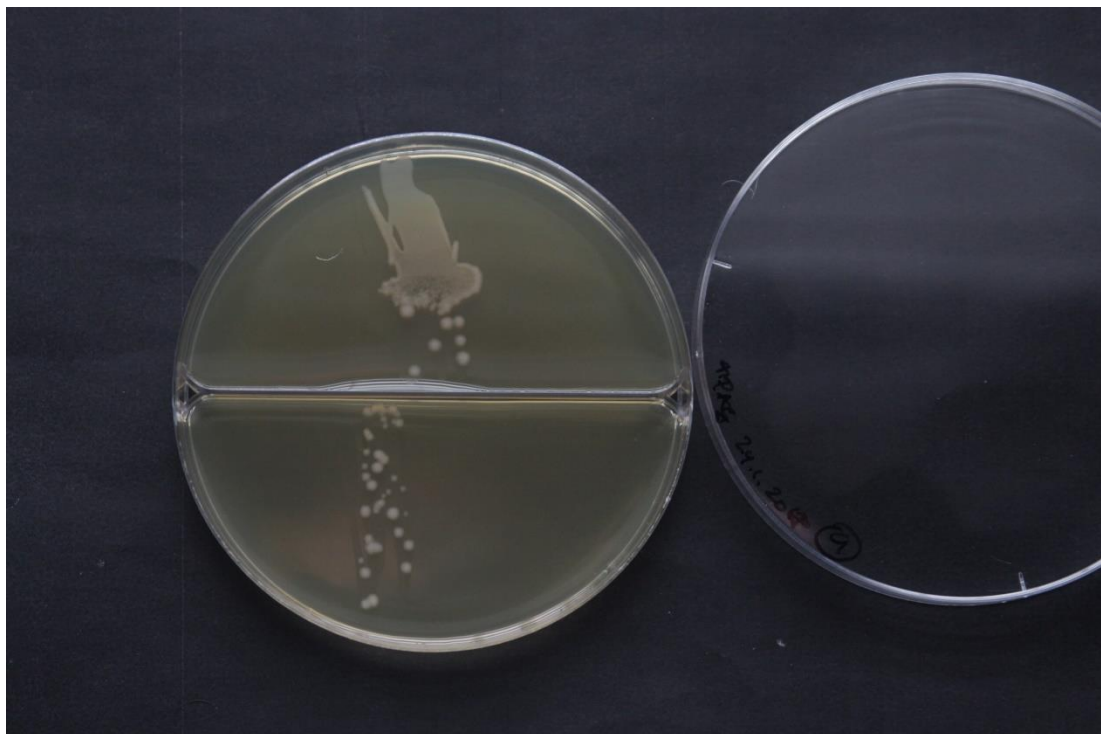
Obr. 4: Cytogram zobrazující vzorek bakteriální kultury ošetřený 85 °C, 10 min



Obr. 5: Bakteriální kultura ošetřená 85 °C, 10 min kultivována na MPAg



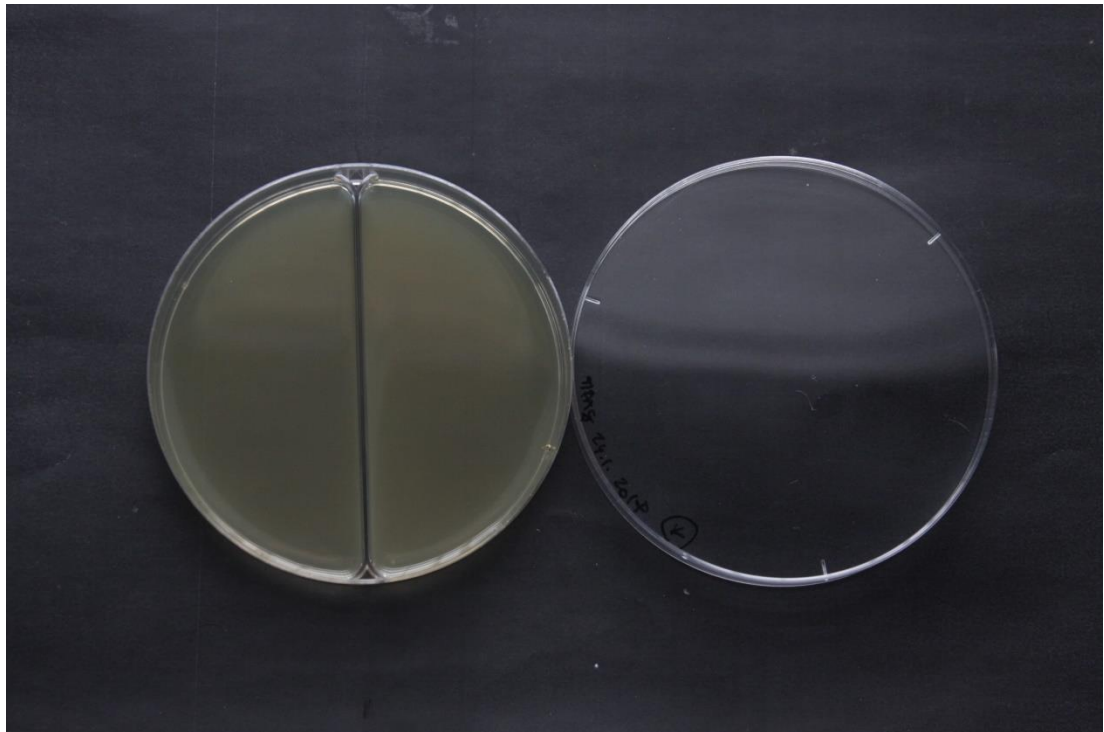
Obr. 6: Cytogram zobrazující vzorek bakteriální kultury ošetřený 85 °C, 35 min



Obr. 7: Bakteriální kultura ošetřená 85 °C, 35 min kultivována na MPAg



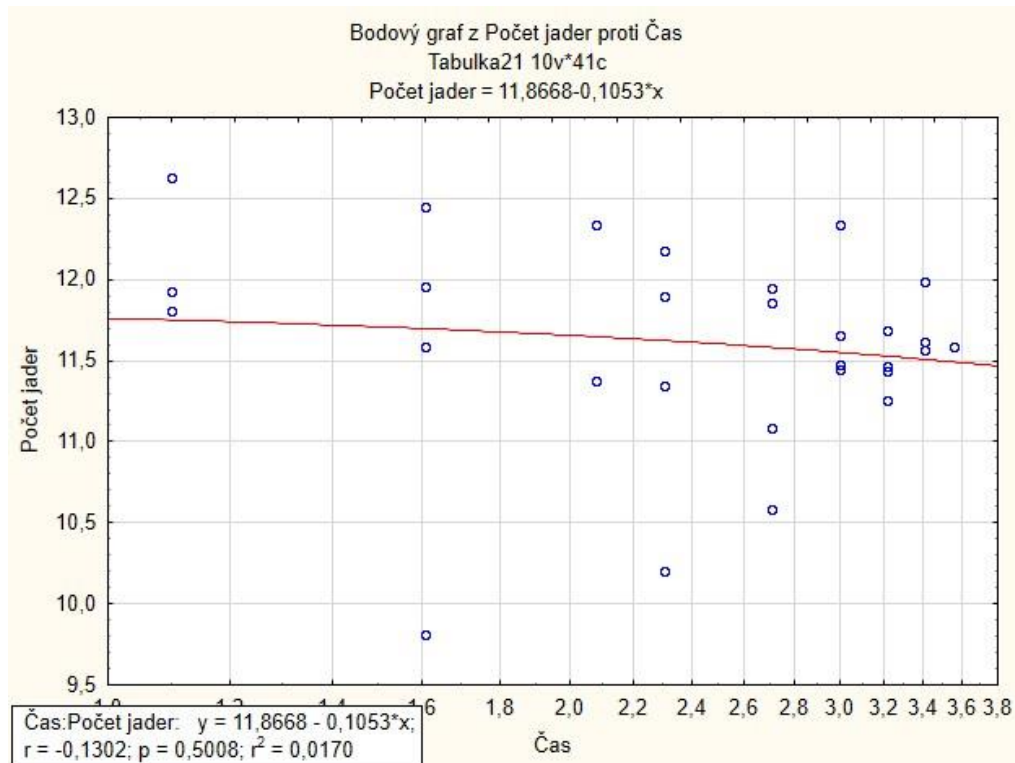
Obr. 8: Cytogram zobrazující negativní kontrolu



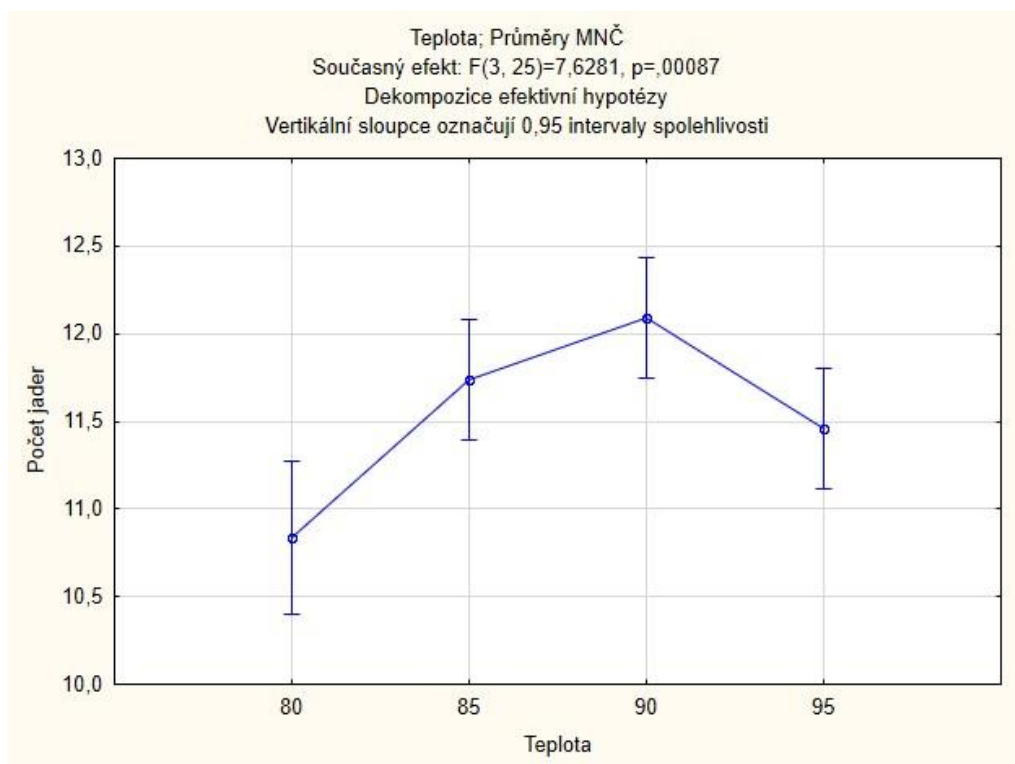
Obr. 9: Negativní kontrola kultivována na MPAg

Statisticky průkazným vyhodnocením získaných flowcytometrických dat byla potvrzena tendence poklesu zastoupení přeživších buněk (jader) v populaci s rostoucí dobou ošetření. Tato závislost je zobrazena na Obr. 10. Na uvedeném grafu je znatelný rozptyl hodnot počtu přeživších jader v jednotlivých vzorcích, který je způsoben nemožností dodržení naprosto totožné koncentrace buněk ve všech analyzovaných vzorcích, odlišnou barvitelností jednotlivých částic či přístrojovou chybou, a také zahrnutím výsledků negativních kontrol do komplexní statistické analýzy experimentu.

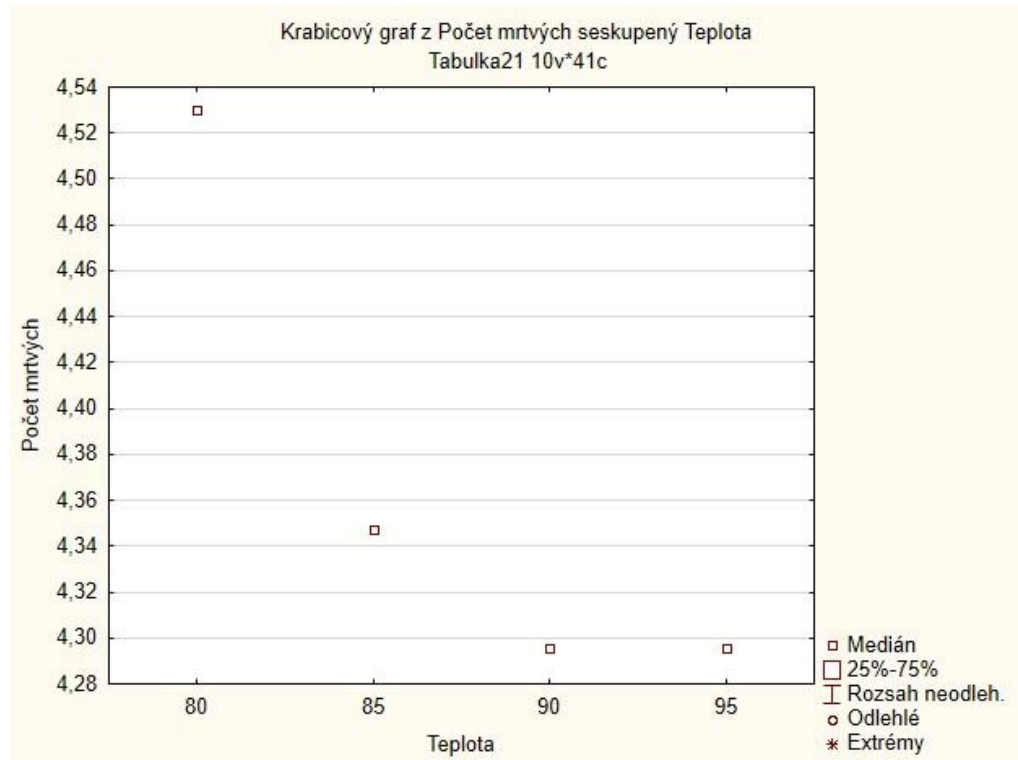
Dále byl hodnocen vliv jednotlivých teplot na průkaznost detekce viability. Na Obr. 11 je uveden vztah mezi teplotami a množstvím analyzovaných jader. Z těchto výsledků vyplývá, že při ošetření teplotou 80 °C není průtoková cytometrie dostatečně průkazná z důvodu analýzy nízkého počtu jader. Zatímco při ošetření 90 °C byla výsledná data nejprůkaznější. Tento výsledek by mohl vypovídat o největší citlivosti *P. syringae* pv. *oryzae* právě k této teplotě. Na Obr. 12 a Obr. 13 jsou uvedeny krabicové grafy závislostí počtu analyzovaných živých a mrtvých jader na teplotě. Na Obr. 12 je zobrazena závislost počtu živých jader na daných hodnotách teploty. Nejméně mrtvých buněk bylo detekováno u sady vzorků ošetřených 80 °C, naopak největší zastoupení mrtvých buněk bylo detekováno u sad vzorků ošetřených 90 a 95 °C. Tyto teploty ovlivňují daný bakteriální druh nejvíce a výsledky těchto analýz jsou nejprůkaznějšími. Na Obr. 13 je uveden vztah počtu živých buněk na daných teplotách. Tato závislost má vysokou výpovědní hodnotu, protože byly korelovány počty přeživších jader s hodnotou teploty. Tato korelace byla dále hodnocena v závislosti na analýzách jednotlivých populací. Výsledkem této statistické analýzy je opět fakt, že nejvyšší počet přeživších/nejnižší počet mrtvých jader byl detekován u sady vzorků ošetřené 80 °C.



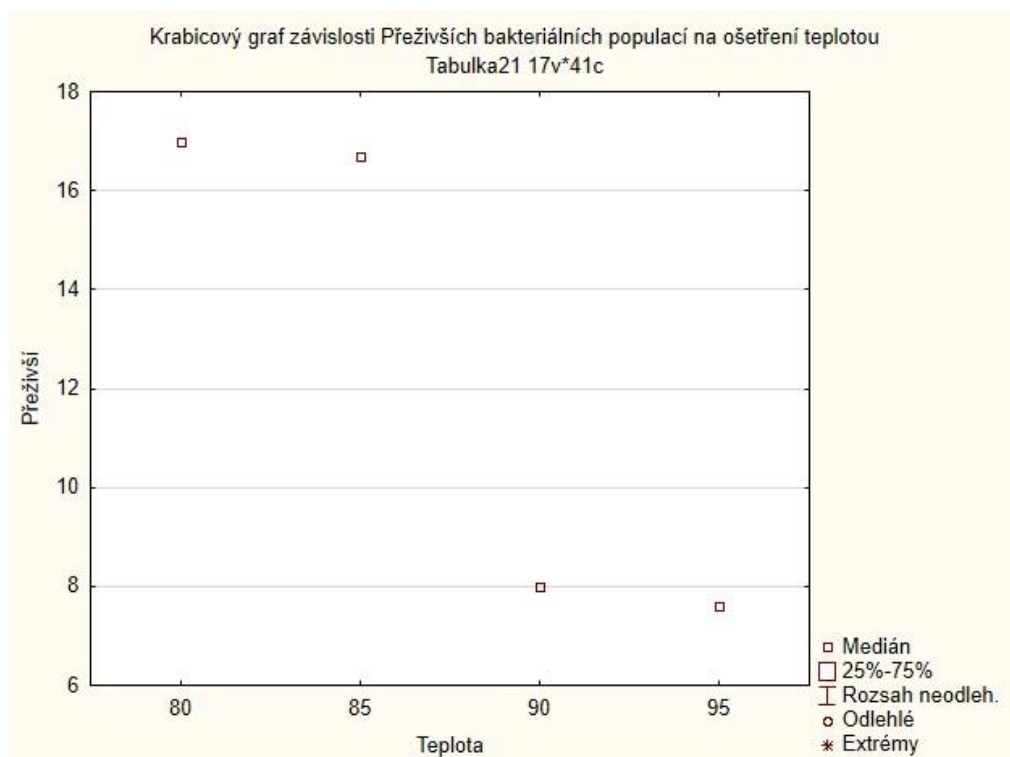
Obr. 10: Graf závislosti počtu přeživších buněk (log počtu jader) na době ošetření (log času ošetření v min.)



Obr. 11: Graf závislosti počtu analyzovaných buněk (log počtu jader) na teplotě ošetření (°C)



Obr. 12: Graf závislosti počtu mrtvých buněk (medián log počtu mrtvých jader) na teplotě ošetření (°C)



Obr. 13: Graf závislosti počtu živých buněk (medián log počtu přeživších jader) v závislosti na teplotě ošetření (°C) s ohledem na analyzované populace

6. Diskuze

Dříve byla viabilita bakteriálních buněk detekována klasickou plotnovou metodou. Tato metoda byla zdlouhavá, protože kultivace musela probíhat alespoň 24 hodin a neměla dostatečnou vypovídající hodnotu. Podmínky kultivace nemusely být zcela identické (kvantita a kvalita inokula, složení média a vnější faktory) a výsledky o počtu kolonií na jedné plotně nemusely mít dostatečnou výpovědní hodnotu.

Rychlejší, jednodušší, levnější, efektivnější a dostatečně spolehlivou metodou detekce viability bakteriálních buněk by mohla být průtoková cytometrie, kdy je sledována permeabilita buněčných membrán, obsah a kvalita DNA. Pro tuto analýzu se používají fluorescenční značky, které se nespecificky váží s nukleovými kyselinami. Obdobně jako v práci Shi a kol. (2007) byl pro detekci mrtvých buněk použit propidium jodid.

Pseudomonas syringae pv. *oryzae* byl kultivován klasickým postupem v tekutém C-médiu 24 hodin, při 25 °C (Chitarra a kol., 2002). Vzorke bakteriálních kultur byly ošetřeny vysokými teplotami od 80 °C do 95 °C. Při obdobných experimentech mohou být ošetřovány přímo buněčné suspenze či médium, které obsahuje analyzované částice, např. mořská voda v práci Caron a Badley (1995) nebo kontaminované potraviny (konkrétně čerstvá mrkev) v práci Tamburini a kol. (2014). Vysoká teplota byla vybrána jako faktor, který usmrcuje bakteriální buňky, pro svou jednoduchost, nízkou finanční náročnost a relativní bezpečnost. Dále mohou být použity i odlišné faktory usmrcující buňky, např. v práci Mathys a kol. (2007) byla použita kombinace vysoké teploty a vysokého tlaku, dále v práci Tamburini a kol. (2014) byla použita kombinace teploty (22 nebo 35 °C) se zvýšenou koncentrací CO₂ či v práci Berney a kol. (2007) UVA záření. Ošetřená bakteriální kultura byla resuspendována v OTTO I pufru v poměru 1:10 dle protokolu BD Sciences (2002). Jednotlivé kroky postupu přípravy vzorku pro vlastní analýzu dle Khan a kol. (2010) byly zjednodušeny.

Pro správný průběh flowcytometrických analýz a pro získání relevantních výsledků je důležitým faktorem dodržení stejné koncentrace analyzovaných částic ve všech vzorcích, které musí být ve vzorku dobře resuspendovány. Dále musí být dodrženo naprosto identický postup přípravy vzorků a musí být používány

nekontaminované a nedegradované pracovní roztoky (Doležel a kol., 2007). Nejprůkaznější výsledky vypovídající o klesání zastoupení životaschopných buněk v populaci v závislosti na narůstajícím čase ošetření teplotou byly získány při ošetření vzorků 90 °C. Zřejmě jsou i bakterie *P. syringae* pv. *oryzae* k této teplotě nejcitlivější a právě v tomto případě má průtoková cytometrie nejvyšší výpovědní hodnotu. Dle práce Khan a kol. (2010) jsou příbuzné druhy *Pseudomonas aeruginosa* a *syringae* k teplotě 72 °C citlivější než *Escherichia coli* či *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. A např. dle práce Mathys a kol. (2007) grampozitivní rod *Bacillus* je nejcitlivější k teplotě 121 °C, nebo ke kombinaci vysokého tlaku 600 MPa a 77 °C. Ostatní sady námi ošetřených vzorků, které byly ošetřeny odlišnými podmínkami, nevykazují dostatečně průkaznou korelaci mezi podmínkami ošetření a zastoupením životaschopných bakteriálních buněk v populaci.

Výsledky klasické přímé metody pro detekci životaschopných buněk - plotnové kultivace vzorků ošetřených 85 °C přesně odpovídají předpokládaným výsledkům, že s narůstající dobou ošetření teplotou 85 °C počet kolonií tvořících jednotek (životaschopných buněk) ubývá. Tímto postupem bylo prokázáno, že přeživší buňky neztrácí během ošetřování teplem svou viabilitu. Obdobných výsledků bylo dosaženo v práci Horákové a kol., 2004.

7. Závěr

Cílem bakalářské práce bylo pomocí průtokové cytometrie za použití interkalačního barviva propidium jodid detekovat viabilitu *Pseudomonas syringae* pv. *oryzae*, optimalizovat tuto nově zaváděnou metodu a porovnat zastoupení živých a mrtvých bakteriálních buněk v závislosti na době a teplotě ošetření.

Byla provedena optimalizace přípravy analyzovaných vzorků. Dále byla provedena analýza série 6 sad vzorků vystavených teplotám v rozsahu 80 – 95 °C po dobu 0,5 – 30 minut. Výsledky analýz těchto sad byly následně porovnány a byly identifikovány podmínky ošetření, kdy bylo dosaženo nejprůkaznějších výsledků. Kdy tedy měla průtoková cytometrie dostatečnou výpovědní hodnotu a byla vhodnou metodou pro detekci viability.

Shrnutím vizuálně hodnocených výsledků klasické kultivační metody, primárních flowcytometrických dat a dat průkazně statisticky zpracovaných byla potvrzena tendence poklesu počtu přeživších jader ve vzorku s narůstajícím časem ošetření. Výstupem statistického zpracování dat byly také informace o míře průkaznosti metody v závislosti na teplotách ošetření. Při teplotě ošetření 90 °C bylo detekováno nejvíce mrtvých buněk. *P. syringae* pv. *oryzae* je zřejmě k této teplotě nejcitlivější. Průtoková cytometrie se při těchto podmínkách ošetření jeví jako dostatečně průkazná a vhodná metoda pro detekci viability.

V rámci této práce byla na pracovišti Katedry genetiky a speciální produkce rostlinné zaváděna nová metoda detekce viability bakteriálních druhů (model: *P. syringae* pv. *oryzae*) pomocí průtokové cytometrie, která se jeví jako dostatečně průkaznou, rychlou, jednoduchou a efektivní metodou užívanou pro tyto účely. Byly získány dostatečně průkazné výsledky pilotních pokusů, které by mohly být dále rozvíjeny (aplikací odlišných podmínek ošetření či detekcí odlišných bakteriálních druhů) v rámci mé diplomové práce či v rámci prací ostatních studentů.

8. Seznam použité literatury

- ANZAI Y., KIM H., PARK J.Y., WAKABAYASHI H. a OYAIZU H.** (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: s. 1563–1589.
- BALTRUS D.A., NISHIMURA M.T, ROMANCHUK A., CHANG J.H., MUKHTAR S.M., CHERKIS K., ROACH J., GRANT S.R., JONES C.D. a DANGLE J.D.** (2011). Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *Public Library of Science Pathogens*, 7: s. 1 - 22.
- BAUMAN R.W.** (2006). Microbiology, Alternate edition with Diseases by Body system. San Francisco, Pearson Education. 770 s.
- BERNEY M., HAMMES F., BOSSHARD F., WEILENMANN H. a EGLI T.** (2007). Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 10: s. 3283 – 3290
- CARON G.N. a BADLEY R.A.** (1995). Viability assessment of bacteria in mixed populations using flow cytometry. *Journal of Microscopy*, 179: s. 55 - 66.
- CHITARRA L.G., LANGERAK C.J., BERGERVOET J.H.W. a van den BULK R.W.** (2002). Detection of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in seed extracts of brassica sp. applying fluorescent antibodies and flow cytometry. *Cytometry*, 47: 118 - 126.
- DÍAZ M., HERRERO M., GARCÍA L.A. a QUIRÓS C.** (2010). Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, 48: s. 385 – 407.
- DOLEŽEL J., GREILHUBER J. a SUDA J.** (2007). Flow cytometry with plant cells. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 479 s.
- GONZÁLEZ A.J., LANDERAS E. a MENDOZA M.C.** (2000). Pathovars of *Pseudomonas syringae* causing Bacterial brown spot and halo blight in *Phaseolus*

vulgaris L. are distinguishable by ribotyping. *Applied and Environmental Microbiology*, 2: 850 - 854.

HIRANO S.S. a UPPER C.D. (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, s. 624–653.

HORÁKOVÁ K., GREIFOVÁ M., SEEMANNOVÁ Z., GONDOVÁ B. a WYATT G.M. (2004). A comparison of the traditional method of counting viable cells and a quick microplate method for monitoring the growth characteristics of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 38: s. 181–184.

KOVÁŘOVÁ L. a HÁJEK R. (2008). Moderní diagnostické a prognostické nástroje pro mnohočetný myelom. *Klinická onkologie*, 2: s. 186 – 274.

KŮDELA V., FUCIKOVSKY L. a NOVACKY A. (2002): Rostlinolékařská bakteriologie. Praha, Academia. 347 s.

KUWATA H. (1985). *Pseudomonas syringae* pv. *oryzae* pv. nov., casual agent of Bacterial halo blight of rice. *Japanese Journal of Phytopathology*, 2: 212-218.

MANSFIELD J., GENIN S., MAGORI S., CITOVSKY V., SRIARIYANUM M., RONALD P., DOW M., VERDIER V., BEER S. V., MACHADO M. A., TOTH I., SALMOND G. a FOSTER G.D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(6): 614 - 629.

MICHAEL T.M., MARTINKO J.H. a PARKER J. (2005). Brock biology of microorganisms. 11th edition. Upper Saddle River, Prentice Hall. 992 s.

MICHALOVÁ K. a ZEMANOVÁ Z. (2005). Klasická a molekulární cytogenetika v klinické praxi. *Klinická biochemie a metabolismus*, 13: s. 63 - 67.

KHAN M.M.T., PYLE B.H. a CAMPER A.K. (2010). Specific and rapid enumeration of viable but nonculturable and viable-culturable gram-negative bacteria by using flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 15: s. 5088–5096.

MOORE E.R.B., TINDALL B.J., MARTINS DOS SANTOS V.A.P., PIEPER D.H., RAMOS J. a PALLERONI N.J. (2006). Nonmedical: *Pseudomonas*. In: **FALKOW M.S., ROSENBERG E., SCHLEIFER K. a STACKEBRANDT**

DWORKIN E. The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria, Proteobacteria: Gamma Subclass. Singapore, Springer. s. 597 - 703.

PEIX A., RAMÍREZ-BAHENA M. a VELÁZQUEZ E. (2018). The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. *Genetics and Evolution*, 57: s. 106 - 116.

PRESCOTT L.M., HARLEY J.P., KLEIN D.A. (2005). Microbiology. 6. vydání. McGraw-Hill. 1082 s.

SHI L., GÜNTHER S., HÜBSCHMANN T., WICK L.U., HARMS H a MÜLLER S. (2007). Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. *International Society for Analytical Cytology*, 71A: s. 592 - 598.

SUDA J. (2005). Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií. *Živa*, 1: s. 46 - 48.

ŠMARDA J., DOŠKAŘ J., PANTŮČEK R., RŮŽIČKOVÁ V. a KOPTÍKOVÁ J. (2005). Metody molekulární biologie. Brno - Kraví Hora, Vydavatelství Masarykovy univerzity. 194 s.

TAMBURINI S., FOLADORI P., FERRENTINO G., SPILIMBERGO S. a JOUSSON O. (2014). Accurate flow cytometric monitoring of *Escherichia coli* subpopulations on solid food treated with high pressure carbon dioxide. *Applied Microbiology*. 2: s. 440 - 450.

VEAL D.A., DEERE D., FERRARI B., PIPER J. a ATTFIELD P.V. (2000). Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *Journal of Immunological Methods*, 243: s. 191 - 210.

WIDMER F., SEIDLER R.J., GILLEVET P.M., WATRUD L.S. a DI GIOVANNI G.D. (1998). A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. *Applied and environmental microbiology*, 7: s. 2545 - 2553.

9. Seznam použitých internetových zdrojů

KOUTECKÝ P., © 2012. Průtoková cytometrie v botanice [online] [cit. 2018-04-11]. Dostupné z: <https://www.slideserve.com/otto/pr-tokov-cytometrie-v-botanice-2-men-velikosti-genomu-rostlin-petr-kouteck-201-2>

ORMEROD M.O., © 2008. Flow Cytometry - A Basic Introduction. [online] De Novo Software. [cit. 2018-03-05]. Dostupné z: <http://flowbook.denovosoftware.com/>

RAHMAN M., LANE A., SWINDELL A. a BARTRAM S., © 2013. Introduction to flow cytometry. [online] AbD Serotec, A Bio-Rad Company. [cit. 2018-03-15]. Dostupné z: <https://www.bio-rad-antibodies.com/introduction-to-flowcytometry.html>

ROUBALOVÁ L., © 2012. Průtoková cytometrie. [online] Bulletin FONS. [cit. 2018-02-05]. Dostupné z: <http://www.bulletinfons.cz/22012/lab01.pdf>

Autofluorescence, © 2018. [online] Bio-Rad Laboratories. [cit. 2018-04-09]. Dostupné z: <https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-cytometry-autofluorescence.html>

Plant DNA Standards, © 2016. [online] Centre of Plant Structural and Functional Genomics of the Institute of Experimental Botany AS CR [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <http://olomouc.ueb.cas.cz/book/plant-dna-standards>

Bacterial Detection and Live/Dead Discrimination by Flow Cytometry, © 2002. [online] BD Biosciences. [cit. 2018-04-07]. Dostupné z: https://www.bdbiosciences.com/documents/Bacterial_Detection_Live_Death.pdf