

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Živé a mrtvé bakteriální buňky – rozdíly a možnosti detekování  
Pavčina Kopecká

Bakalářská práce

2018

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Pavčina Kopecká**  
Osbobní číslo: **C15413**  
Stuđijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Stuđijní obor: **Zdravotní laborant**  
Název tématu: **Živé a mrtvé bakteriální buňky**  
Začínající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování:

1. Seznamte se s literárními prameny v dané oblasti a vypracujte referenci na dané téma. V úvodu práce se věnujte základním charakteristikám prokaryotických buněk.
2. Vysvětlete rozdílnost mezi živými a mrtvými buňkami ve vztahu k jejich stavbě, resp. k jednotlivým buněčným komponentám.
3. Z publikovaných odborných textů vypracujte referenční text o možnostech detekce živých a mrtvých bakteriálních buněk, resp. o možnostech jejich rozlišení.
4. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí č. 9/2012 Univerzity Pardubice a dále ve znění Dodatku č. 1 ke Směrnicí č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravou".

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tisková**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího bakalářské práce**

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. David Šilha, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **27. listopadu 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2018**



prof. Ing. Petr Kabeš, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čepko, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Pardubicích dne 27.6. 2018

Pavλίna Kopecká

Poděkování:

Ráda bych poděkovala panu Ing. Davidu Šilhovi, Ph.D. za odborné vedení práce a cenné rady, které mi pomohly tuto práci zkompletovat.

Také bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za trpělivost a podporu během tvorby mé práce a po celou dobu studia.

## **ANOTACE**

Práce je rozdělena do tří základních částí, ve kterých se pojednává o obecných znacích bakteriálních buněk, také o rozdílech ve stavbě živých a mrtvých buněk. Závěrem je velká část práce věnována stanovení viability bakterií pomocí základních či nově vzniklých metod.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

bakterie, živé buňky, mrtvé buňky, životaschopnost, detekce

## **TITLE**

Live and dead bacterial cells – differences and ways of detection

## **ANNOTATION**

The work is divided into three parts which describe the general characteristics of bacterial cells and differences in the construction of live and dead cells. The final part deals with the determination of the bacteria viability using traditional and new methods.

## **KEYWORDS**

bacteria, live cells, dead cells, viability, detection

# Obsah

0	Úvod .....	11
1	Bakteriální buňka.....	12
1.1	Historie .....	12
1.2	Morfologické znaky bakterie.....	13
1.2.1	Velikost, tvar a uspořádání .....	13
1.2.2	Barvení bakterií podle Grama.....	15
1.2.3	Stavba bakteriální buňky.....	16
1.3	Růst a množení bakterií .....	25
2	Rozdíly mezi živými a mrtvými buňkami .....	27
2.1	Rozdíly ve stavbě bakteriální buňky .....	27
2.2	Bakterie ve stavu VBNC .....	28
3	Možnosti Detekce živých a mrtvých buněk .....	30
3.1	Kultivace bakterií na kultivačních půdách .....	30
3.2	Fluorescenční sondy využívané při detekci.....	32
3.2.1	Fluorescenční sondy pro zjišťování integrity cytoplazmatické membrány .....	33
3.2.2	Fluorescenční sondy pro stanovení intracelulární esterázové aktivity.....	34
3.2.3	Fluorescenční sondy pro detekci transmembránového potenciálu .....	36
3.2.4	Fluorescenční sondy pro stanovení uvolněných specifických molekul či intracelulárních enzymů .....	36
3.2.5	Fluorescenční sondy pro detekci respirační aktivity buňky.....	37
3.2.6	Fluorescenční sondy pro detekci intracelulárního pH.....	38
3.3	Stanovení viability buněk pomocí fluorescenčních metod.....	38
3.3.1	Průtoková cytometrie .....	38
3.3.2	Detekce na základě fluorescenčních hydrazinů .....	41
3.4	Funkční testy .....	42

3.4.1	PCR .....	42
3.4.2	Test Bioluminiscence .....	50
3.5	Fyzikální metody .....	51
3.5.1	Analýza obrazu .....	51
3.5.2	<i>In situ</i> mikroskopie .....	51
3.5.3	Stanovení impedance .....	52
4	Závěr .....	53
5	Použitá literatura .....	54
6	Internetové odkazy obrázků .....	63



## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1	Přehled uspořádání bakterií.....	14
Obrázek 2	Přehled tvarů bakterií .....	15
Obrázek 3	Struktura prokaryotické buňky.....	17
Obrázek 4	Stavba cytoplasmatické membrány bakterie.....	18
Obrázek 5	Strukturní vzorec cholesterolu a bacteriohopanetetrolu.....	19
Obrázek 6	Struktura buněčné stěny bakterie .....	21
Obrázek 7	Umístění bičků u bakteriálních buněk .....	23
Obrázek 8	Stanovení životnosti protoplastů pomocí fluorescein diacetátu a UV záření.....	35
Obrázek 9	Schématické znázornění průtokové cytometrie .....	39
Obrázek 10	<i>Micrococcus luteus</i> a <i>Bacillus cereus</i> obarvené LIVE/DEAD® BacLight™ kitem.....	41
Obrázek 11	Schématické znázornění EMA-PCR.....	47
Obrázek 12	Kultura <i>Bacillus thuringiensis</i> obarvená barvivem SYBR Green a vystavená záření o různé vlnové délce.....	50
Obrázek 13	Porovnání mrtvých a živých buněk <i>S. typhimurium</i> epifluorescenční mikroskopií.....	52

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

<b>AFH</b>	Alexa fluor hydrazin
<b>ATP</b>	Adenosintrifosfát
<b>CARD-FISH</b>	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace s využitím sondy značené enzymem křenové peroxidázy – Catalyzed Reported Deposition FISH
<b>CFDA</b>	Karboxyfluorescein diacetátem
<b>CFU</b>	Colony-forming unit
<b>CTC</b>	5-kyano-2,3-ditolyltetrazoliumchlorid
<b>EB</b>	Ethidium bromid
<b>EMA</b>	Ethidium monoazid
<b>FDA</b>	Fluorescein diacetát
<b>FISH</b>	Fluorescein <i>in situ</i> hybridizace
<b>FITC</b>	Fluorescein isothiokyanát
<b>FSC</b>	Dopřední rozptyl – Forwar scatter
<b>G+</b>	Grampozitivní bakterie
<b>G-</b>	Gramnegativní bakterie
<b>ISM</b>	<i>In situ</i> mikroskopie
<b>LAMP</b>	Izotermická amplifikace zprostředkovaná smyčkou
<b>MMT</b>	3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5- difenyltetrazolium bromid
<b>mRNA</b>	Mediátorová ribonukleová kyselina
<b>PCR</b>	Polymerázová řetězová reakce
<b>PE</b>	Phycoerythrin
<b>PI</b>	Propidium jodid
<b>PMA</b>	Propidium monoazid
<b>PMA-DGGE</b>	Denaturační gradientová elektroforéza
<b>qPCR</b>	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
<b>rRNA</b>	Ribozomální ribonukleová kyselina
<b>RNA</b>	Ribonukleová kyselina
<b>RT-PCR</b>	Reverzní transkripční polymerázová řetězová reakce
<b>SSC</b>	Boční rozptyl – Side scatter
<b>TBC</b>	Tuberkulóza
<b>UV</b>	Ultrafialové záření
<b>VBNC</b>	Živá, ale nekultivovatelná – Viable but not cultivable

## 0 ÚVOD

Jak je již známo, bakterie jsou nejrozšířenější skupinou organismů po celém světě. Vyskytují se všude okolo nás a mohou vyvolat řadu onemocnění, proto je stanovení viability bakterií nejvíce studovaným tématem v mikrobiologii. Jejich stanovení je důležité jak z lékařského, tak ekologického hlediska. Přítomnost životaschopných bakterií rozhoduje o kvalitě pitné vody a potravy, vzniku epidemie, kvalitě dezinfekčních prostředků či uchovávání léků.

V bakteriologii je hlavním problémem schopnost detekce životaschopnosti buněk, jelikož je často obtížné rozeznat živé buňky od neživých. Existuje celá řada standardních technik, jako je kultivace bakterií na živných půdách, avšak tato technika je označována spíše za referenční metodu s nemožným okamžitým výsledkem. Proto bylo vyvinuto nespočet dalších technik, kterými lze viabilitu buněk stanovit. Mezi takové metody patří FISH, průtoková cytometrie, EMA/PMA-PCR, RT-PCR a další.

Základním rozdílem ve stavbě živé a mrtvé bakteriální buňky je poškození cytoplasmatické membrány a její zvýšená permeabilita. Na těchto základech jsou založeny metody detekce viability buněk. Využívá se mnoha druhů fluorescenčních sond se schopností pronikat přes poškozenou buněčnou membránu do intracelulárního prostoru buňky, kde se naváží na nukleové kyseliny. Nejznámějšími interkalačními barvivy jsou například propidium jodid a ethidium bromid. Tímto procesem lze tedy rozlišit živé buňky od mrtvých.

Často opomíjeným tématem jsou bakterie ve stavu VBNC. Jedná se o stav, kdy bakterie ztrácí kultivovatelnost, avšak neztrácí metabolickou aktivitu. Některé zmíněné techniky jsou schopny stav VBNC detekovat. Bakterie ve stavu VBNC jsou pro nás nebezpečné, jelikož jsou schopny resuscitace, a to jak v hostiteli, ve vodě tak v potravinách.

# 1 BAKTERIÁLNÍ BUŇKA

Bakterie patří mezi mikroorganismy, které jsou pro svoji velikost pozorovatelné pouze pod mikroskopem (Votava, 2005). Tyto jednobuněčné organismy se vyskytují v přírodě jako jednotlivé izolované buňky nebo ve shlucích a společenstvech (Julák, 2012). Bakterie se řadí mezi tzv. prokaryota, buňky primitivní s nepravým jádrem (Votava, 2005). Jejich průměry jsou v rozmezí 0,5-1  $\mu\text{m}$  a dosahují délky 3-10  $\mu\text{m}$ . Nejdelší tyčinkovité bakterie měří až 50  $\mu\text{m}$  (Görner a Valík, 2004). Bakterie jsou až stonásobně větší než viry, ale asi desetkrát menší než eukaryota (Strohl *et al.*, 2001). Do této skupiny dále spadají sinice a archaea (Votava, 2005).

Významně složitějším typem buněk jsou eukaryota, mezi které patří houby, rostliny a živočichové. Eukaryotní organismy mají složitější struktury a obsahují pravé jádro. Prokaryota se tedy od eukaryot neliší pouze jednodušší strukturou, ale také dalšími znaky jako je např. obsah DNA pouze v jednom kruhovém chromozomu, který je volně přítomen v cytoplasmě buňky a není ohraničen membránou, takže bakterie nemají buněčné jádro (Schuyler, 2001). Dále postrádají buněčné organely typické pro eukaryotní mikroorganismy, jako jsou lysozomy, mitochondrie, Golgiho aparát, endoplasmatické retikulum. Přes jednoduchost struktury bakterií jsou dobře vybaveny a schopny samostatného života. Jejich výbava jim napomáhá vyvolávat různé infekce lidí i zvířat (Robinson, 2000). Prokaryota se také vyznačují extrémní rychlostí růstu oproti eukaryotům (Prescott *et al.*, 2002).

## 1.1 Historie

Prokaryotické organismy vznikly před 3,5 miliardami let (Bednář *et al.*, 1996). Věda zkoumající bakterie se nazývá bakteriologie. O její rychlý vývoj se zasloužili někteří známí mikrobiologové (Votava, 2005).

První, kdo pravděpodobně viděl a popsal bakterie v povlaku svých zubů, díky sestrojení jednoduchého mikroskopu, byl Anton van Leeuwenhoek v roce 1676. Popsal je jako pohyblivé se malá zvířátka (Greenwood *et al.*, 1999). V roce 1760 objevil De Saussure mechanismus množení bakterií nepohlavním příčným dělením a nutnost vysoké teploty pro sterilizaci vysvětlil v roce 1877 Ferdinand Cohn, který zjistil, že některé bakterie tvoří termorezistentní spory (Votava, 2005). Louis Pasteur v roce 1857 prokázal, že kvašení je způsobováno kvasinkami a bakteriemi a předpokládal, že choroby vznikají také obdobným

způsobem (Greenwood *et al.*, 1999). V závislosti na něj navázal Joseph Lister, který nahlas vyslovil, že příčinou infekce otevřených ran jsou mikroby kolem pacienta. Byl zakladatelem antiseptiky, tj. ničení mikroorganismu na nežádoucích místech pomocí fenolu. Snížil tak počet závažných hnisavých komplikací a umožnil tak rozvoj moderní chirurgie (Votava, 2005).

Známý bakteriolog Robert Koch, který obdržel Nobelovu cenu, v roce 1877 popsal metodiku pro snadné pozorování bakterií v suchých nátěrech obarvených anilinovými barvivy. Poté v roce 1881 zavedl jednoduchou metodu pro izolaci bakterií v čisté kultuře, tzv. kultivaci, kdy na půdě vyrostou bakterie z jedné buňky a vytvoří kolonii (Greenwood *et al.*, 1999). Dále zavedl první mikrofotografie bakterií. Také prokázal *Mycobacterium tuberculosis*, původce TBC (tzv. Kochův bacil) a další původce např. antraxu a cholery. Zasloužil se především o vypracování bakteriologických postupů, tzv. Kochových postulátů. Za zakladatele české lékařské bakteriologie byl považován pražský patolog Jaroslav Hlava. Zabýval se především streptokokovými infekcemi, morem, cholerou a aktinomykózou (Votava, 2005).

## 1.2 Morfologické znaky bakterie

### 1.2.1 Velikost, tvar a uspořádání

Primárním prostředkem identifikace bakterií je především jejich morfologie (tvar, velikost a uspořádání) při pozorování ve světelném mikroskopu (Strohl *et al.*, 2001).

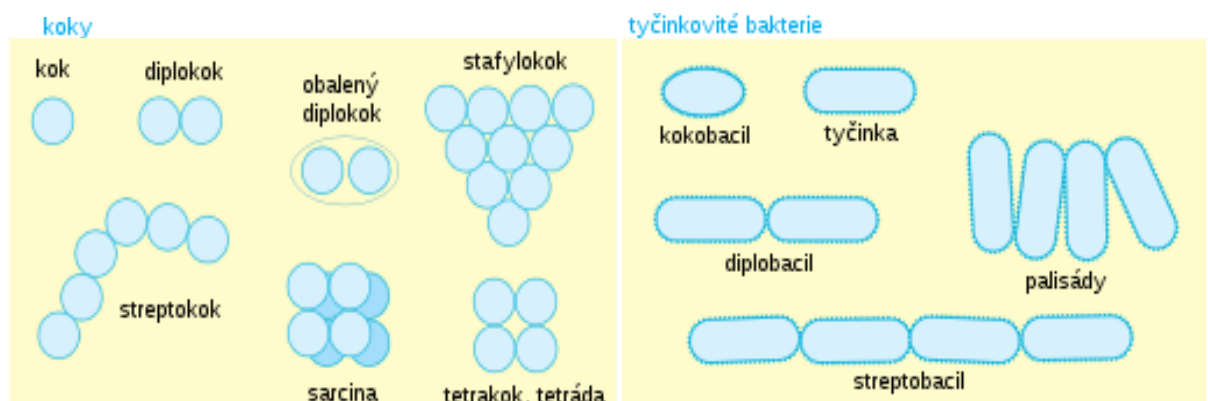
Jak již bylo zmíněno, velikost bakterií je udávána v  $\mu\text{m}$ . Většina patogenních bakterií vyrůstá v rozmezí 1 až 3  $\mu\text{m}$ . Mezi nejmenší bakterie patří mykoplazmata (0,2-0,25  $\mu\text{m}$ ), chlamydie (cca 0,3  $\mu\text{m}$ ) a rickettsie (okolo 0,5  $\mu\text{m}$ ). Dalšími drobnými patogenními bakteriemi jsou bordetelly, franciselly a hemofily, se kterými se laboratoře setkávají nejčastěji. Naopak největšími bakteriemi jsou nepatogenní spirochety měřící 60  $\mu\text{m}$  (Votava, 2005).

Bakterie mohou mít dva základní tvary, kulovité (koky) nebo častěji protáhlé (tyčinky) (Greenwood *et al.*, 2012). Koky mohou a nemusí být zcela pravidelné. Lancetovitý tvar je charakteristický pro *Streptococcus pneumoniae*, pravidelný tvar pro *Staphylococcus* a *Streptococcus pyogenes* a oploštělý tvar je typický pro *Neisseria*. Tyčinkovité bakterie pak mohou být rovné. Ty jsou typické pro většinu bakterií, jako je např. *Escherichia coli*. Krátké tyčinky jsou označovány jako kokobacily, velmi dlouhé jako vlákna (Schuyler, 2001, Votava, 2005). Prohnuté tyčinky se nazývají vibria a spirálovitě zahnuté jsou označovány jako

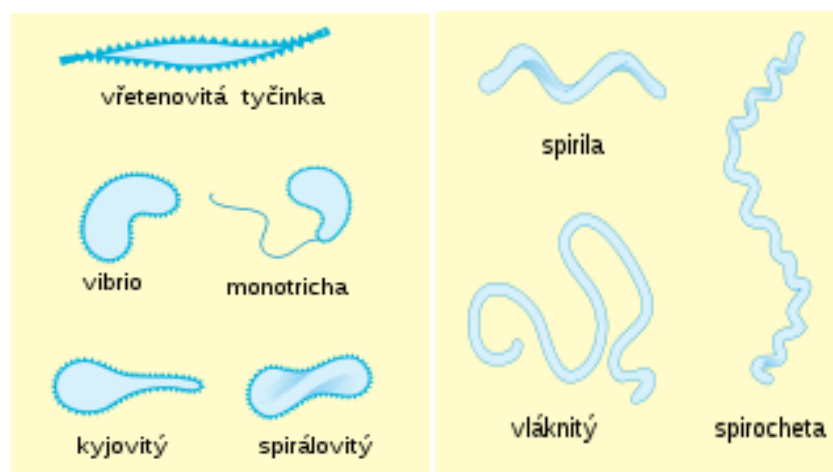
spirochety (Robinson, 2000). Tvar vláknitý se vyskytuje např. u skupiny půdních bakterií, které patří do řádu *Actinomycetales* (Šilhánková, 2002). Dalšími tvary jsou kyjovité, větvenovité, rozštěpené, pleomorfní a další. Přehled základních tvarů je zobrazen na obrázku č. 2 (Votava, 2005).

Koky se mohou vyskytovat jako buňky jednotlivé, ale ve většině případech jsou spojeny v charakteristické uspořádání, které jsou často užitečné při jejich identifikaci (Prescott *et al.*, 2002). Koky dělicí se stále ve stejné rovině se řadí do řetízků tvořených ze 3 až 20 koků. Řetízky ze 4 a více koků jsou speciální pro streptokoky (Votava, 2005). Dvojice koků, tzv. diplokok je typický pro neisserie (Prescott *et al.*, 2002). Spadají sem jak meningokoky, tak gonokoky mající tvar kávového zrna. Svoji oploštěnou stranou jsou k sobě těsně spojeny. Dalším diplokokem je pneumokok, který je tvořen lancetovými koky se zašpičatělými konci odvrácenými od sebe. Naopak koky dělicí se ve dvou rovinách jsou uspořádány ve čtveřicích (tetrádách) a koky dělicí se ve třech rovinách na sebe kolmých se vyznačují vznikem útvarů, tzv. sarcinů či paketů. Tyto dva druhy uspořádání tvoří zejména mikrokoky (Votava, 2005). Stafylokoky se rozdělují v náhodných rovinách a vytváří nepravidelné hrozny nebo shluky (Šilhánková, 2002).

Tyčinky jsou uspořádané většinou jednotlivě. Jen velmi vzácně je můžeme nalézt ve dvojicích, krátkými konci spojeny k sobě. Tyto diplobacily jsou příznačné např. pro moraxelly. Nejčastěji se však objevují v krátkých řetízcích (streptobacily), se kterými se setkáváme zejména u rodu *Bacillus* či *Lactobacillus*. Některé tyčinkovité bakterie vytvářejí palisádovité uspořádání, díky jejich podélnému dělení. Palisády tvoří zejména korynebakteria. Tyčinky mohou být prohnuté (vibria) či tvořit spirály (helikobaktery) až vlákna. Přehled uspořádání koků a tyčinek viz obrázek č. 1 (Votava, 2005).



**Obrázek 1** Přehled uspořádání bakterií (Převzato z: ELUC)



**Obrázek 2** Přehled tvarů bakterií (Převzato z: ELUC)

### 1.2.2 Barvení bakterií podle Grama

Gramovo barvení patří mezi důležité barvicí techniky bakterií sloužící k jejich správné identifikaci (Strohl *et al.*, 2002). Jelikož jsou bakterie velmi malé, je možné je pozorovat pouze pod mikroskopem po obarvení. Již dánský lékař Hans Christian Joachim Gram v roce 1884 objevil rozdělení bakterií do dvou skupin dle schopnosti či neschopnosti obarvených buněk uchovat si barvivo i za přítomnosti alkoholu nebo acetonu. Jedná se o skupinu grampozitivních a gramnegativních bakterií (White *et al.*, 2012).

Principem tohoto barvení je převrstvení zafixované tenké vrstvy kultury bakterií na podložním skle barvivem. A to nejprve krystalovou violetí, která je absorbována jejich buněčnou stěnou, tvořenou peptidoglykanem. Krystalová violet' buňky obarví tmavomodře až modrofialově. Poté se na sklíčko přidá Lugolův roztok, což způsobí vznik komplexu barviva s jódem. Pak se takto vytvořený preparát odbarvuje alkoholem (acetonem). Bakterie, které jsou tvořeny silnou vrstvou peptidoglykanu, si modrofialovou barvu podrží. Pod mikroskopem je tedy vidíme jako modrofialové grampozitivní buňky (G+). Zatímco buňky s tenkou vrstvou peptidoglykanu jsou rozpouštědlem zcela odbarveny, aby byly pod mikroskopem znatelné, je třeba je ještě dobarvit kontrastním barvivem, nejčastěji karbolfuchsinem. Barvivo dodá zcela odbarvené buňce červenorůžové zbarvení a jedná se pak tedy o gramnegativní bakterie (G-) (Sandle, 2016).

Podstata Gramova barvení souvisí se stavbou bakteriální stěny. Někteří tvrdí, že příčinou grampozitivity a gramnegativity je množství peptidoglykanu, jehož vrstva se při dehydrataci rozpouštědlem smrští, což zpomalí únik komplexu z grampozitivních buněk. Jiní předpokládají, že stěna grampozitivních bakterií obsahuje méně lipidů než stěna

grampozitivních bakterií. Alkohol by v ní měl vytvářet póry, kterými se vytvořený komplex lépe vyplavuje (White *et al.*, 2012).

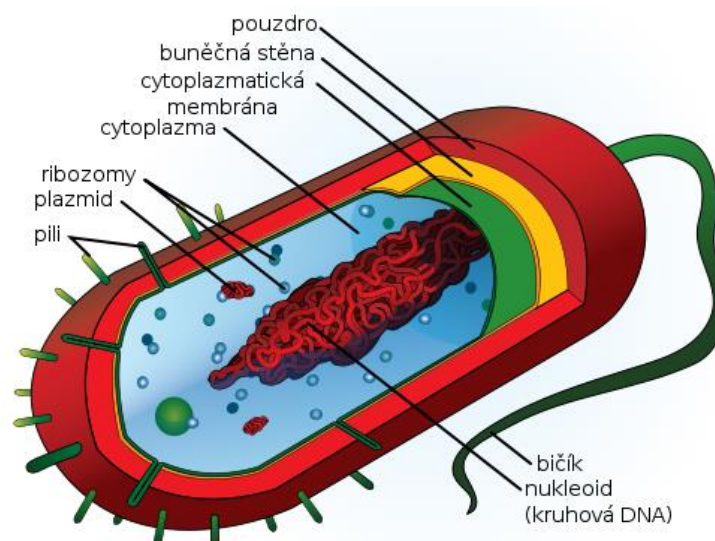
Toto barvení je důležité pro klasifikaci bakterií. Dojde k odlišení velkých skupin bakterií, jako gramnegativní a grampozitivní koky či gramnegativní nebo grampozitivní tyčinky (White *et al.*, 2012). Mezi grampozitivní koky patří např. *Staphylococcus*, *Streptococcus* a mezi grampozitivní tyčinky např. *Listeria* a *Bacillus*. Do skupiny gramnegativních koků se řadí *Neisseria*, *Moraxella* a další. Gramnegativní tyčinky jsou např. *Klebsiella*, *Salmonella* a *Proteus* (Julák, 2012).

Další skupinou jsou acidorezistentní bakterie, které obsahují ve své stěně látky voskovitého charakteru, proto nedokáží přijímat barvivo a nedají se tedy barvit běžným postupem dle Grama. Nejdůležitějším zástupcem je *Mycobacterium tuberculosis*, původce tuberkulózy (Votava, 2005).

### 1.2.3 Stavba bakteriální buňky

Prokaryotická buňka je tvořena řadou struktur (Prescott *et al.*, 2002). Kompaktní těleso živé hmoty (protoplazmy) se nazývá protoplast. Hlavní část protoplasmy je cytoplasma (Greenwood *et al.*, 1999). Ta je obklopena cytoplasmatickou membránou, na kterou dále navazuje pevná a propustná bakteriální stěna. Na tuto stěnu pak může nasedat ochranné bakteriální pouzdro nebo slizová vrstva, tzv. glykokalix. Z povrchu některých bakterií vybíhají bičíky či jiné výběžky zvané fimbrie neboli pili. V cytoplasmě se pak nachází orgány, jako jsou nukleotid (nepravé jádro), ribozomy, vakuoly, granula a inkluze. Některé bakterie (rod *Bacillus* a *Clostridium*) navíc obsahují spory. Struktura bakteriálních buněk je patrná na obrázku č. 3. (Votava, 2005, Robinson, 2000).





**Obrázek 3** Struktura prokaryotické buňky (Převzato z: ELUC)

### 1.2.3.1 Cytoplasmatická membrána

Bakteriální buňka je od zevního prostředí ohraničená elastickou cytoplasmatickou membránou, která je silná 5 až 10 nm a viditelná pouze v elektronovém mikroskopu. Je nepostradatelnou strukturou pro život bakterie. Charakteristický je pro ni model fluidní mozaiky (Prescott *et al.*, 2002).

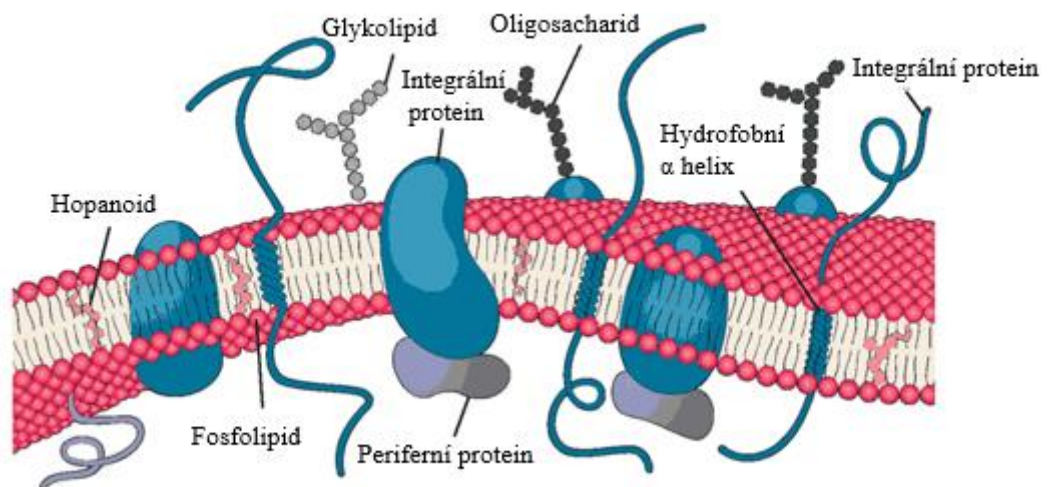
Skládá se z lipidů a proteinů, také obsahuje póry, jimiž mohou procházet pouze nízkomolekulární sloučeniny bez elektrického náboje volnou difuzí. Její lipidovou složkou pak mohou do buňky pronikat látky rozpustné v tucích nebo látky rozpouštějící tuky. Další sloučeniny se do buňky dostávají pomocí bílkovinných transportérů uložených v membráně. Lze tedy říct, že cytoplasmatická membrána je částečně permeabilní a má tedy i funkci ochrannou (White *et al.*, 2012, Šilhánková, 2002).

Amfipatické fosfolipidy obsahují polární vnější a nepolární vnitřní části. Polární, tzv. hydrofilní hlavičky interagují s vodným roztokem nacházejícím se v okolí dvojvrstvy. Nepolární, tzv. hydrofobní ocas s vodou neinteraguje a snaží se ji vytěsnit. Tím způsobí sdružení lipidů ve dvojvrstvu (Schuyler, 2001).

Jak je patrné z obrázku č. 4, uvnitř dvojvrstvy fosfolipidů leží dva druhy membránových proteinů. První skupinou jsou periferní, hydrofilní proteiny, které jsou volně připojeny k membráně a snadno se rozpouštějí ve vodných roztocích. Tvoří asi 20 až 30 % z celkového proteinu. Zbýlých 70 až 80 % tvoří druhá skupina integrálních, hydrofobních bílkovin, které jsou uloženy uvnitř vrstvy a jsou ve vodě nerozpustné. Na tyto bílkoviny pak

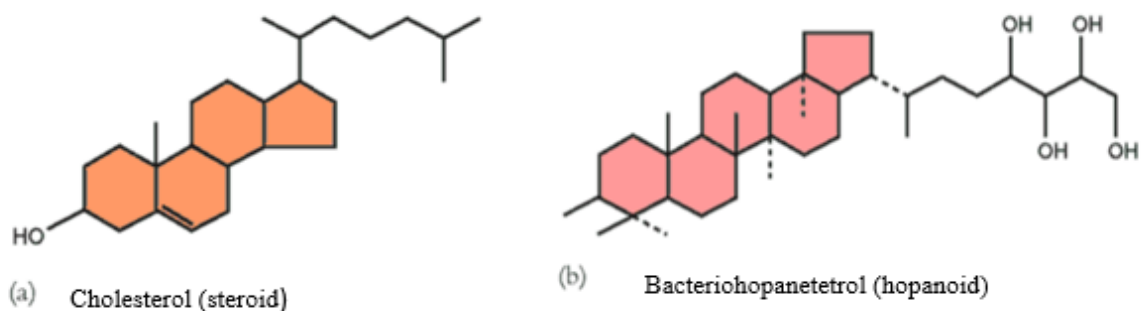
mohou nasedat oligosacharidy. Prokaryotické membrány obsahují více proteinů než membrány eukaryotické. Pravděpodobně proto, že splňují mnoho různých funkcí, které jsou u eukaryot prováděny jinými organelami, které prokaryotní buňka nevlastní (Prescott *et al.*, 2002). Bílkoviny se podílejí zejména na transportu živin do bakteriální buňky, na respiračních pochodech a to tak, že cytoplasmatická membrána nahrazuje bakteriím mitochondrie. Dále se uplatňují v syntéze některých složek nejen membrány, ale i slizové vrstvy a buněčné stěny, a také v sekreci látek (toxiny, enzymy) z buněčné cytoplasmy do zevního prostředí (White *et al.*, 2012).

Do cytoplasmy vybíhají z cytoplasmatické membrány vychlípeniny, jejichž velikost a počet se liší dle druhu bakterie. U některých jsou přítomny ve velkém počtu a u jiných je pouze jeden nebo dva. Nejčastější vychlípeninou je tzv. mesozom vyskytující se poblíž oblasti, kde se při dělení buňky tvoří přepážka. Mesozomy jsou tvořeny jedinou membránou složenou do mnoha záhybů (Šilhánková, 2002). V membráně se také zakotvuje rotor bakteriálních bičičků (Votava, 2005).



**Obrázek 4** Stavba cytoplasmatické membrány bakterie (Prescott *et al.*, 2002)

Bakteriální membrány se od eukaryotických liší také nedostatkem sterolů, zejména cholesterolu. Obsahuje ale látky podobné struktury, tzv. hopanoidy, které se starají o stabilitu membrány (viz obr. 5) (Prescott *et al.*, 2002).



**Obrázek 5** Strukturní vzorec cholesterolu (a) a bacteriohopanetetrolu (b) (Prescott *et al.*, 2002)

### 1.2.3.2 Buněčná stěna

Buněčná stěna je poměrně silná a tuhá vrstva, která obaluje a chrání cytoplasmatickou membránu a celý buněčný prostor před toxickými látkami a působením antibiotik. Je odolná vůči osmotickému tlaku a udává buňce tvar (Prescott *et al.*, 2002).

Základní složkou ve stěně je vrstva peptidoglykanu (mukopeptidu, mureinu), který se skládá z polysacharidových vláken propojených napříč krátkými peptidy (peptidovou vazbou). Obsahuje střídavě dva cukry, kyselinu N-acetylmuramovou a N-acetylglukosamin (Robinson, 2000).

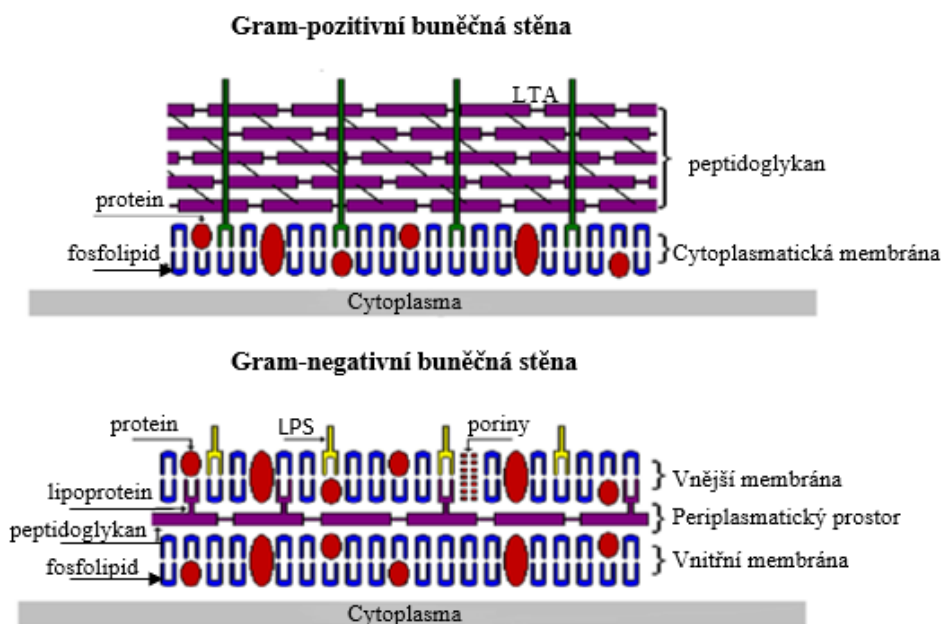
Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, bakterie se dělí do dvou skupin na základě Gramova barvení na grampozitivní a gramnegativní buňky, což souvisí s množstvím peptidoglykanu v bakteriální stěně (Prescott *et al.*, 2002).

Grampozitivní buněčná stěna je tvořena jednoduchou 15 až 30 nm tlustou mureinovou vrstvou. Polysacharidové řetězce jsou zde uloženy v mnoha vrstvách nad sebou. Vrstva peptidoglykanu je vyplněna kyselinou teichoovou, což je kyselý polysacharid skládající se z jednotek ribitolu a glycerolu (White *et al.*, 2012). Kromě této kyseliny jsou ve stěně přítomny také polysacharidy složené z monosacharidů (glukosy, galaktosy, mannosy) a jsou zodpovědné za imunochemické reakce (Šilhánková, 2002). Zbytky kyseliny N-acetylmuramové jsou téměř všechny spojeny peptidickými můstky. Díky své pevné vrstvě peptidoglykanu je grampozitivní bakterie schopna udržet vytvořený komplex jodu s krystalovou violetí a při odbarvování alkoholem zůstat modrá (White *et al.*, 2012).

Oproti tomu gramnegativní stěna bakterie je poměrně strukturálně i chemicky složitá (White *et al.*, 2012). Skládá se z tenké vrstvy peptidoglykanu (cca 15 nm) a vnější membrány silné 7 až 8 nm (Prescott *et al.*, 2002). Zevní membrána chrání vrstvu mureinu před účinkem

lysozymu a antibiotik (Greenwood *et al.*, 2012). Membrána je složena z molekul lipopolysacharidů, lipoproteinů, fosfolipidů a proteinů. Fosfolipidy tvoří dvojitou vrstvu stejně jako v cytoplasmatické membráně a obsahují póry, které jsou vytvářeny specifickými bílkovinami, tzv. poriny zodpovídajícími za permeabilitu membrány (viz obr. 6) (White *et al.*, 2012). Lipopolysacharidy produkují endotoxin (lipid A), který může vyvolat endotoxický šok při uvolnění kyseliny do krevního oběhu (Greenwood *et al.*, 2012). Endotoxiny jsou zodpovědné za somatickou antigenní specifitu, která je označována jako antigen O. Tato specifita je založena na tom, že lipopolysacharid vyvolá v krvi syntézu specifické protilátky, což vede k imunitní odpovědi (Šilhánková, 2002). Nejhojnější membránový protein se nazývá Braunův lipoprotein, který je pevně připojený kovalentní vazbou k mureinové vrstvě a je zabudován do vnější membrány svým hydrofobním koncem (Prescott *et al.*, 2002). Jednovrstevný peptidoglykan obsahuje kyselinu diaminopimelovou a je součástí periplasmatického prostoru, který se nachází mezi vnější membránou a vrstvou peptidoglykanu (White *et al.*, 2012). V tomto prostoru se dále nacházejí enzymové bílkoviny, které štěpí či transportují živiny a některé jsou schopny inaktivace antibiotik (Prescott *et al.*, 2002). Díky své tenké vrstvě peptidoglykanu nejsou gramnegativní bakterie schopné udržet již vytvořený komplex barviva s jodem a musíme pak bakterii dobarvit kontrastním barvivem do růžového zbarvení (Sandle, 2016).

Buněčná stěna je nutná k ochraně bakterií před nežádoucím osmotickým tlakem. Bakterie žijí v hypotonickém prostředí, což znamená, že koncentrace solí je uvnitř buňky vyšší než ve vnějším prostředí. Pokud je buňka v hypotonickém prostředí, voda má snahu pronikat do buňky a vyrovnat tlak. Tomuto procesu se říká osmóza. Buňka zvětšuje svůj objem, ale nepraská, jelikož je vůči vysokým tlakům odolná. Naopak v hypertonickém prostředí by bakterie ztrácely vodu a smršťovaly by se až by došlo k jejich usmrcení. Tomuto ději se říká plazmolýza, které se využívá při konzervaci potravin (Prescott *et al.*, 2002). Jestliže dojde k porušení bakteriální stěny lysozymem, získáme útvary ohraničené cytoplasmatickou membránou. Protoplasty, které neobsahují žádné zbytky buněčné stěny, vznikají z grampozitivních bakterií. Naopak sféroplasty jsou tvořeny gramnegativními bakteriemi a obsahují zbytky buněčné stěny. Tyto útvary přežívají pouze v přiměřeně hypertonickém prostředí, poté praskají. Bakterie, které ztrácí buněčnou stěnu jsou označovány jako L-formy bakterií (Votava, 2005).



**Obrázek 6** Struktura buněčné stěny bakterie (Převzato z: Materiály do školy)

### 1.2.3.3 Fimbrie

Popisují se dvě skupiny, a to obyčejné pili (fimbrie) nebo tzv. sex pili. Fimbrie jsou velmi tenké, krátké vláskovité výběžky viditelné pouze elektronovým mikroskopem. Tvoří je speciální bílkovina pilin. Vyskytují se zejména u gramnegativních bakterií, kdy buňka může být pokryta desítkami až stovkami fimbrií (Robinson, 2000, Schuyler, 2001). Jedná se o úzké trubice složené ze šroubovice proteinových podjednotek a mají průměr 3 až 10 nm, výjimečně až několik mikrometrů (Prescott *et al.*, 2002). Slouží k adhezi a kolonizaci bakterií k mukózním povrchům hostitelské buňky. Somatické pili se chovají jako lektiny, protože jsou to bílkoviny adherující se specificky na uhlovodíkové zbytky (Walker, 1998). Pili jsou důležité faktory virulence pro několik onemocnění, zejména infekce močových, pohlavních a gastrointestinálních traktů (Proft a Baker, 2009).

Sex pili byly zatím popsány pouze u gramnegativních bakterií. Jedná se o širší a delší struktury, než jsou fimbrie. Plazmid zvaný fertilitní faktor kóduje informaci pro jejich tvorbu (White *et al.*, 2012). Z povrchu buňky vystupují pouze 1 až 10 sex pilí o průměru 9 až 10 nm (Prescott *et al.*, 2002). Slouží k přenosu DNA do recipientní, samičí buňky tzv. konjugací. Také jsou místem pro zachycení některých bakteriofágů. Dalším ne moc popisovaným druhem jsou curli pili. Jedná se o štíhlá proteinová zprohýbaná vlákna vyskytující se na povrchu některých escherichií a salmonel. Jsou spojovány s řadou

biologických procesů, jako jsou tvorba biofilmu, agregace buněk, adheze a invaze hostitelských buněk (Proft a Baker, 2009).

#### 1.2.3.4 Bičíky

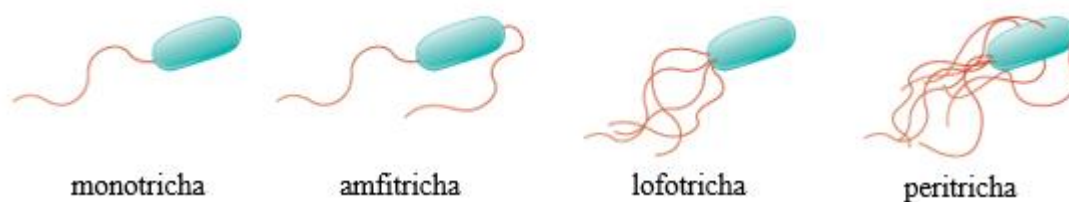
Bakteriální bičíky jsou dlouhé zvlněné vláknité útvary sloužící k pohybu buňky (Schuyler, 2001). Jsou cca 20-30 nm silné a cca 20  $\mu\text{m}$  dlouhé (White *et al.*, 2012). Jsou tak úzké, že je nelze pozorovat pod světelným mikroskopem neobarvené, proto využíváme postříbření či elektronový mikroskop (Šilhánková, 2002). Bičík obsahuje několik složek, jako jsou vlákno, kolénko a bazální tělísko. Vlákno se skládá z několika podjednotek bílkoviny zvané flagelin. U jednotlivých druhů bakterií se liší antigenost a amynokyselinové složení flagelinu. V dutém vlákně jsou podjednotky flagelinu uspořádané do spirály. Tuhé kolénko slouží ke změně směru bičíku vystupujícího z buněčné stěny o 90°. Bazální tělísko složené z několika prstenců upevňuje bičík v cytoplasmatické membráně a buněčné stěně (Robinson, 2000, Votava, 2005).

Základní rozdíl mezi G+ a G- bakterií je počet prstenců. G-bakterie obvykle mají čtyři bazální prstence. První dva jsou připojeny k vnější membráně (L-prsteneček) a peptidoglykanové vrstvě ve stěně bakterie (P-prsteneček). Další dva se dotýkají periplazmatického prostoru (S-prsteneček) a cytoplasmatické membrány (M-prsteneček). G+ bakterie mají pouze dva prstence, jeden je připojený k cytoplasmatické membráně a druhý připojený k peptidoglykanu (Geis, 2006).

Prstence, uložené v buněčné stěně jsou nepohyblivé a slouží jako stator. Prsteneček obsažený v cytoplasmatické membráně se může otáčet a způsobuje rotaci bičíku tím, že je spojen s kolénkem a vláknem. Bakterie má pak rovnoměrný pohyb a při změně rotace bičíku může dojít ke změně směru. Bičíky nejsou pro buňku nezbytné, vyskytují se jen u některých bakterií (White *et al.*, 2012).

Z obrázku č. 7 je patrné, že buňky na svém povrchu mohou vlastnit, jak jeden, tak více bičíků. Dle jejich počtu a umístění rozdělujeme bičíky na monotricha, lofotricha, peritricha a amfitricha. Monotricha mají na jednom pólu buňky pouze jeden bičík. Jako lofotricha se označují bakterie mající více bičíků umístěných na jednom pólu buňky. Amfitricha obsahují svazky bičíků na obou pólech buňky a peritricha mají celý povrch pokrytý bičíky. Bakterie bez bičíků se nazývají atricha. Dalším pohyblivým elementem jsou axiální vlákna u spirochet, které mají analogickou stavbu jako bičíky (Prescott *et al.*, 2002).

Dále se bakterie mohou pohybovat pomocí živin –chemotaxí, kyslíku – aerotaxí nebo světlem – fototaxí (Šilhánková, 2002).



**Obrázek 7** Umístění bičíků u bakteriálních buněk  
(Převzato z: Biology Libretexts – Unique Characteristics of Prokaryotic Cells)

### 1.2.3.5 Extracelulární polymery

Na povrchu buněčné stěny některých bakterií se mohou vyskytovat polymery vytvářející buď polysacharidová či polypeptidová pouzdra nebo slizovou vrstvu, která může být polysacharidová či dextranová. Slizová vrstva na rozdíl od pouzdra, které pevně lne k buněčné stěně, je tvořena volně nasedající amorfni hmotou. Pro polysacharidová pouzdra nebo slizovou vrstvu se používá souhrnný název glykokalix (White *et al.*, 2012), který chrání buňku před vysycháním, zvýšenou teplotou, účinkům jedů a fagocytózou, není ale pro buňku nezbytně nutný (Schuyler, 2001).

Na povrchu mnoha bakterií se nachází tenká vrstva glykoproteinu, zvaná S-vrstva, kterou pod elektronovým mikroskopem lze vidět jako pravidelně strukturované šestiboké dlaždičky. Z funkčního hlediska S-vrstvy se předpokládá zesílení pevnosti buněčné stěny a ochrana před fagocytózou, působením enzymů, osmotickým stresem a pH (Hall, 2009, Prescott *et al.*, 2002). Opouzdřené bakterie jsou více odolné, lépe vzdorují obranným pochodům makroorganismu, fagocytóze. Díky lepkavé slizové vrstvě vytvářejí tzv. vrstvu biofilmu, tím že adherují na různé povrchy nebo k sobě navzájem (Votava, 2005).

### 1.2.3.6 Cytoplasma a struktury v ní uložené

Cytoplasma je vodný roztok ohraničený cytoplasmatickou membránou, ve kterém jsou umístěny různé nerozpustné organely. Některé jsou pro prokaryota nezbytné, jiné se vyskytují pouze u některých druhů a rodů (Votava, 2005).

Nejdůležitější strukturou v cytoplasmě je nukleoid, ve kterém je uložen genetický materiál DNA. Na rozdíl od eukaryot se jedná o nepravé jádro, což znamená, že není

obklopeno jadernou membránou, ale obsahuje pouze jeden kruhový chromozom. Nukleoid je připojen k buněčné cytoplasmatické membráně pomocí mesozomu (Geis, 2006). Rychle rostoucí bakterie mohou obsahovat více než jeden nukleotid obsahující pouze jeden identický chromozom. Molekula DNA má jako u ostatních organismů tvar šroubovice (White *et al.*, 2012), která je tvořena dvěma řetězci propojenými vodíkovými můstky. Jedná se o polynukleotid složený ze dvou purinových bází (adenin a guanin) a dvou pyrimidinových bází (thymin a cytosin). Na báze se váže cukr deoxyribosa, čímž se vytvoří nukleosid. Jednotlivé nukleosidy jsou mezi sebou spojeny kyselinou fosforečnou (Šilhánková, 2002).

Bakterie také obsahují plazmidy, extrachromozomální části kruhové DNA, které se replikují nezávisle na chromozomu a jsou uloženy mimo nukleotid. Jedná se o struktury nesoucí geny užitečné pro přežití buňky. Jako jsou geny rezistence, které umožňují odolat antibiotikům či jedům. Dále nesou geny důležité pro schopnost produkce toxinu (Geis, 2006).

Další strukturou vyskytující se v cytoplasmě jsou ribozomy, které jsou o něco menší a mají jinou stavbu než ribozomy eukaryot. Nejdůležitější funkcí ribozomů je proteosyntéza (White *et al.*, 2012). Některé ribozomy jsou volně připojeny k cytoplasmatické membráně. Jsou tvořeny ribonukleovou kyselinou i proteinem a slouží jako místa, kde je RNA po translaci z DNA přeložena do proteinu. Ribozomy jsou složeny ze dvou složek, kterými jsou 50S a 30S podjednotky (Geis, 2006).

Některé bakterie dále obsahují inkluze glykogenu, lipidů a polyfosfátů, které slouží jako zásobárna živin nebo energie. Vodní bakterie mohou obsahovat vakuoly, které jsou naplněné plyny, čímž slouží k nadnášení buňky (Schuyler, 2001).

### **1.2.3.7 Spory**

Tvorba spor je jedním z hlavních znaků některých grampozitivních bakterií. Jedná se zejména o rody *Bacillus* a *Clostridium*, jejichž spory se často nazývají endospory, jelikož vznikají uvnitř buňky (Prescott *et al.*, 2002). Sporulace probíhá za nepříznivých podmínek, při snížené koncentraci živin či vysychání buňky (Schuyler, 2001). Jedná se o vysoce odolné útvary vůči nepříznivým teplotám, pH, vysoké vlhkosti, dezinfekčním prostředkům, záření a dalším. Sporující bakterie jsou tak schopny přežít až stovky let (Lopes, 2018). Zatímco většina vegetativních buněk je inaktivována při 400-600 MPa, tyto odolné útvary jsou zničeny až při velmi vysokých teplotách (90-110 °C) a za vysokého tlaku (500-700 MPa), tzv. autoklávováním. Tlaková odolnost spor se přičítá jejich vnitřnímu viskoznímu stavu nebo přítomností kyseliny dipikolinové, která buňky chrání vůči působení



tlaku. Čím vyšší je uvolňování této kyseliny, tím vyšší je klíčení spor. Spory jsou rychleji usmrceny při nízkém pH, ale klíčivost vyvolaná tlakem je rychlejší při neutrálním pH. Nízké teploty a extrémní hodnoty pH tedy minimalizují tlakovou klíčivost (Mur-Mur a Yuste, 2014). Příznivé fyzikální a chemické podmínky způsobí klíčení spor a návrat do vegetativního stavu (Schuyler, 2001).

Pod mikroskopem vidíme spory jako světlolomné částice nepřijímající Gramovo barvivo, proto používáme speciální techniky pro obarvení, jako je např. barvení za horka (Sandle, 2016). Každá vegetativní buňka obsahuje pouze jednu sporu (Greenwood *et al.*, 2012). Rozdílného tvaru, velikosti a uložení spor u sporujících bakterií se využívá k jejich identifikaci (Prescott *et al.*, 2002). Nejčastější je tvar oválný, pouze výjimečně kulatý. U velikosti si všímáme, zda je průměr spor větší než šířka vegetativní buňky či nikoli. Může tedy docházet k rozšíření („bubření“) buňky v místě, kde se spora nachází, pokud má velký průměr (Votava, 2005). Jestliže se spora nachází uprostřed buňky, říkáme, že je uložena centrálně, je-li na konci tak terminálně. Nejčastěji jsou ale spory uloženy mezi středem a pólem buňky, tedy subterminálně (Prescott *et al.*, 2002).

Spory jsou tvořeny čtyřmi vrstvami, kortexem, vnitřní, vnější membránou a bazální vrstvou (Lopes, 2018). Jsou obklopeny tenkou, jemnou téměř silnou blankou, tzv. exosporiem skládajícím se z několika bílkovinných vrstev. Kortex nacházející se pod exosporiem je tvořen peptidoglykanem (Prescott *et al.*, 2002). Na kortex navazuje prespora, ve které se syntetizuje kyselina dipikolinová z iontů vápníku. Tyto vrstvy jsou zodpovědné za odolnost buňky. Pokud se dostane spora do příznivých podmínek dochází k jejímu klíčení. Tento proces je velmi rychlý a začíná aktivací spory. V laboratořích se ke klíčení napomáhá zahřátím v přítomnosti vody. Aktivovaná spora začne přijímat vodu, čímž ztrácí svoji rezistenci. To se projeví pukáním obalů spor a vznikem nové vegetativní buňky (Votava, 2005).

### 1.3 Růst a množení bakterií

Růstový cyklus bakteriální buňky začíná oddělením dceřinné buňky od buňky mateřské a končí jejím rozdělením na dvě buňky. Velká část bakterií se tedy rozmnožuje dělením, kdy ve středu buňky z cytoplasmatické membrány začne vyčnívat prstencovitá vychlípenina směrem do středu bakterie. Ta vytvoří přepážku, která buňku rozdělí na dvě stejně velké části. Překážku pak pokryje buněčná stěna a z jedné buňky tak vzniknou dvě buňky dceřinné (Robinson, 2000). Když buňka dosáhne určité velikosti, dojde před samotným

dělením působením různých enzymů k replikaci, tedy ke zdvojení chromozomální DNA na dva řetězce, složené do kruhové molekuly. Každá kruhová molekula obsahuje jeden původní a druhý nově syntetizovaný řetězec. Replikace chromozomu končí syntézou terminačních bílkovin a následuje poslední perioda cyklu, tzv. perioda dělení, při které dojde k vlastnímu rozdělení buňky (Votava, 2005).

Několik málo rodů bakterií se množí pučením, při kterém má nejdříve dceřinná buňka velmi malý rozměr a postupně dorůstá. S mateřskou buňkou je stále spojena úzkým krčkem. Délka růstového cyklu bakterií je označována jako generační doba, při které dojde ke zdvojnásobení počtu bakteriálních buněk, ale také buněčné hmoty. Délka generační doby je u většiny bakterií 15 až 30 minut. Z důvodu, že se bakterie nerozmnožují stejnou rychlostí, zjišťujeme pouze průměrnou generační dobu (Šilhánková, 2002). Za ideálních podmínek dělení probíhá tzv. geometrickou řadou (Votava, 2005). Růst ustává při vyčerpání živin z média a při nahromadění metabolitů (Strohl *et al.*, 2001).

Pomocí růstové křivky lze popsat růst kultury. Tato křivka vyjadřuje závislost logaritmu počtu živých buněk na inkubační době. Křivka se skládá z lag fáze (fáze prodlevy), logaritmické fáze, stacionární fáze a fáze usmrcení (Geis, 2006). Některé bakterie mohou růst v podobě biofilmu. Jedná se o povlaky vytvářející se na povrchu různých předmětů ve vlhkém prostředí. Existuje velké množství faktorů ovlivňující množení bakterií, patří k nim zejména vlhkost, teplota, pH, hydrostatický tlak, osmotický tlak, redox potenciál a záření. Bakterie pěstujeme na různých kultivačních médiích (Schuyler, 2001). Dle vztahu bakterií ke kyslíku pak dále volíme typ inkubace. Rozlišujeme obligátně aerobní bakterie vyžadující k růstu vzdušný kyslík. Mnohé z nich jsou ale mikroaerofilní, které rostou i za sníženého parciálního tlaku vzdušného kyslíku. Pro obligátně anaerobní bakterie je vzdušný kyslík toxický, rostou tedy bez přístupu vzduchu. Fakultativně anaerobní bakterie rostou za přítomnosti i bez přítomnosti kyslíku (Görner a Valík, 2004).

## 2 ROZDÍLY MEZI ŽIVÝMI A MRTVÝMI BUŇKAMI

Obecně je živá buňka považována za otevřený systém, který je nezávisle životaschopný a organizovaný. Jak již bylo zmíněno, živé buňky jsou také schopny metabolismu a rozmnožování a jsou nositeli genetické informace.

### 2.1 Rozdíly ve stavbě bakteriální buňky

Buňky mohou být vystaveny různým stresovým vlivům, jako jsou teplo, tlak, chlad, UV záření a další. Na základě těchto vlivů může dojít k poškození stavby bakterie, konkrétně k poškození cytoplasmatické membrány, což vede i k poruše její permeability. Může také dojít ke ztrátě fosfolipidů, lipopolysacharidů, aj. V průběhu tepelného stresu je známo, že dochází k degradaci ribozomů a nukleových kyselin. DNA může být poškozena zahřátím, zmrazením a sušením. Mohlo by pak dojít ke snížení aktivity DNA ligázy, čímž by buňka nebyla schopna podstoupit efektivní replikaci DNA, což by vedlo ke smrti buňky (Stephens a Mackey, 2012).

Tlak působící na mikroorganismy ovlivňuje jejich morfologii, buněčnou stěnu, cytoplasmatickou membránu, ale také biochemické reakce a genetické mechanismy. Z morfologických změn byly zaznamenány komprese buněk s částečnou ireverzibilitou při návratu zpět do atmosférického tlaku, oddělení buněčné stěny a proteinů od cytoplasmatické membrány, tvorba vakuol v cytoplasmě a strukturální poškození jaderné membrány, mitochondrií, cytoskeletu i lysozomů. Primárním místem poškození tlakem je buněčná membrána. Jde o ovlivnění buněčné propustnosti a tím i iontové výměny. Jsou narušeny homeostatické a bariérové funkce tím, že se dojde k poškození membránových fosfolipidů. Dochází i ke snížení membránového potenciálu. Při působení vysokého tlaku (více než 500 MPa) je možné pozorovat vnitřní poškození buněk, zatímco při působení nižšího tlaku (méně než 500 MPa) dochází k běžnému narušení stěny a membrány, což vede k úniku intracelulárních složek z cytoplazmy, a naopak k pronikání extracelulárních látek do buněk. Udává se, že membrány, které obsahují vyšší množství difosfatidylglycerolu, jsou citlivější na tlak vzhledem k interakci s dvojmocnými kationty, což způsobuje tuhost membrány. Se zvyšováním tekutosti membrán klesá citlivost na tlak. Tekutost membránových fosfolipidů udržují nenasycené mastné kyseliny. Fluidita membrány se snižuje pod tlakem, což vede k funkčním poruchám asociovaných enzymů, a nakonec k reverzibilní fragmentaci

fosfolipidové dvojvrstvy a denaturaci enzymů a membránových proteinů. Nukleové kyseliny jsou vůči tlaku odolnější než proteiny. Struktura nukleových kyselin může zůstat neporušená dokonce i při tlaku 1000 MPa. Dochází také k extrémní, ale reverzibilní kondenzaci jaderného materiálu, čímž se zpomalí buněčné dělení. Jelikož jsou enzymy ovlivněny vysokým tlakem, inhibují se mechanismy replikace DNA, transkripce a translace do proteinů, jejichž syntéza je inhibována na základě disociace ribozomů z důvodu působení tlaku. Z předešlého vyplývá, že vysoký tlak zbavuje buňku životaschopnosti a buňka se tak stává mrtvou. Toho lze bezpečně využít při zpracování a konzervaci potravin (Mor-Mur a Yuste, 2014).

## 2.2 Bakterie ve stavu VBNC

Vitální stav buňky je popisován několika výrazy, mnoho studií se zabývá spoustou z nich jako je aktivita mikroorganismů, jejich kryptický růst, přímý počet životaschopných buněk, proliferační nebo vegetativní klid, vznik trpasličích buněk, reprodukční životaschopnost a další. Je třeba si uvědomit, že neexistují pouze buňky živé a neživé. Tenkou hranicí mezi těmito typy buněk jsou tzv. VBNC formy bakterií. Jedná se o bakterie, které jsou životaschopné, avšak nekultivovatelné. Z toho vyplývá, že za životaschopnou buňku označujeme bakterie schopné tvořit kolonie na kultivačních půdách, a naopak VBNC a neživotaschopné buňky nejsou schopny kultivace. Proto je třeba využít jiných typů metod stanovení (Netuschil *et al.*, 2014).

Další hypotézou je, že stav VBNC je adaptivní strategií nesporejících bakterií vůči nepříznivému prostředí (Kniel *et al.*, 2017) a jsou vysoce rezistentní ke stresům, jako je vystavení extrémní teplotě, UV záření, nízkému pH, účinkům antibiotik, těžkých kovů a dalších (Ayrapetyan and Oliver, 2016). Během přechodu na tento stav se tyčinkovité buňky zmenšují a přecházejí v malý sférický tvar. Proces diferenciací trvá dva dny až několik týdnů (Kniel *et al.*, 2017).

Pojem VBNC byl poprvé popsán v roce 1982. Bakterie ve stavu VBNC nemohou sice růst na živných půdách, avšak stále udržují metabolickou aktivitu, a dokonce jsou schopny produkce virulentních proteinů (Liu *et al.*, 2018), čímž udržují také svoji patogenitu a toxicitu. Stav VBNC může být pro buňku vratný. Reverzibilita VBNC bakterií do životaschopného stavu závisí na stupni poškození. Jakmile jsou buňky nadměrně poškozeny, nakonec zemřou (Li *et al.*, 2017). V současnosti je prokázáno, že více než 85 druhů bakterií je indukováno do stavu VBNC (Ayrapetyan a Oliver, 2016). Hovoří se zejména o *Escherichia*

*coli*, *Listeria monocytogenes* a rodech *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* a *Lactobacillus* (Li *et al.*, 2017).

Buňky ve stavu VBNC vykazují velmi nízkou, ale detekovatelnou metabolickou aktivitu ve srovnání s aktivně rostoucími buňkami. Udržují integritu svých buněčných membrán a nadále exprimují geny. Jeden z definujících rysů bakterií ve stavu VBNC je jejich schopnost tolerovat širokou škálu napětí. Studie zjistily, že stresové prostředí způsobuje disproportionaci mezi toxinem a antitoxinovými bílkovinami ovlivňující syntézu proteinů a buněčné dělení, což způsobí zastavení růstu. VBNC buňky jsou schopny resuscitace, tedy schopny opouštět klidové stádium, pokud se podmínky prostředí stanou pohostinnými. U některých bakteriálních druhů je jednoduché zvrácení stavu VBNC. Jiné druhy ale vyžadují specifické podmínky resuscitace a u některých druhů bakterií doposud nebyl zjištěn nejlepší způsob pro jejich resuscitaci (Ayrapetyan a Oliver, 2016).

Pro stanovení tohoto typu buněk, zejména pro *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus* a *Staphylococcus* se využívá např. metoda EMA nebo PMA. Pro stanovení VBNC bakterií se využívá také souprava BacLight Live/Dead nebo RT-PCR. Velmi důležitou technikou je izotermická amplifikace zprostředkovaná smyčkou (LAMP), kterou poprvé popsal Notomi v roce 2000. Izotermická aplikace zprostředkovaná smyčkou (LAMP) využívá DNA polymerázu rozpoznávající šest odlišných oblastí cílové sekvence s vysokou specifičností za izotermických podmínek. Ve srovnání s jinými metodami je LAMP výhodnější z důvodu vyšší specifičnosti, citlivosti, rychlosti a jednoduchosti. Avšak u použití LAMP existují stále nějaké nevýhody, proto se využívá kombinace LAMP, PCR a barviv, díky kterým lze stanovit a diferencovat životaschopné bakterie od mrtvých. Nejčastěji využívanými barvivy jsou opět ethidium monoazid (EMA) a propidium monoazid (PMA). Metoda je pak nazývána jako PMA/EMA-LAMP (Li *et al.*, 2017).

Je prokázáno, že bakterie ve stavu VBNC jsou nejvíce přítomny v potravinách a ve vodě. Ukázalo se, že techniky vyvinuté pro dezinfekci potravin vedou ke dřívějšímu vzniku VBNC buněk. Mezi tyto techniky se řadí užití vysokotlakého CO<sub>2</sub>, zvýšení teploty, užití konzervačních přísad a pasterizace mléka. To zvyšuje riziko pro konzumenty, jelikož tyto bakterie nejsou detekovány běžně používanými technikami. Riziko je ještě zvýšeno díky skutečnosti, že VBNC buňky mohou resuscitovat i v lidském hostiteli. Vyhledávání metod se zlepšenou detekcí vitálních, ale nekultivovatelných buněk je přínosné nejen pro veřejné zdraví, ale také pro usnadnění významných objevů v mikrobiologii (Ayrapetyan a Oliver, 2016).

### 3 MOŽNOSTI DETEKCE ŽIVÝCH A MRTVÝCH BUNĚK

Hlavním problémem v bakteriologii je schopnost detekce živé a mrtvé bakteriální buňky. Často je obtížné rozeznat, zda se jedná o buňku mrtvou nebo o buňku, která není schopná růstu díky oxidativnímu stresu nebo jiným stresovým vlivům. Aby se předešlo tomuto problému, bylo vyvinuto několik technik, které jsou schopné rozeznat a stanovit živé a mrtvé buňky (Cerf *et al.*, 2009).

Nejzákladnější technikou je kultivace mikroorganismů na pevných agarových substrátech, která představuje zejména referenční odhad počtu živých bakterií růstem kolonií na kultivační plotně. Tato technika je velmi časově náročná, neumožňuje rychlou zpětnou vazbu na získaný výsledek (Decker, 2001). Velkým problémem je také její využití u těžko kultivovatelných mikroorganismů, které za fyziologických podmínek nerostou na pevných médiích. Je zjištěno, že více než 50 % orální bakteriální flóry není kultivovatelné (Tawakoli *et al.*, 2013). Proto byly vyvinuty rychlejší a jednodušší metody založené na vylučování, vychytávání nebo metabolismu fluorescenčních barviv, které poskytují informace o životaschopnosti buněk (Davey, 2011).

Životaschopnost buněk má přímý dopad na produktivitu a kvalitu biologické produkce, ale také na výkonnost biologických systémů. Jak již bylo zmíněno pro posuzování životaschopnosti byly popsány různé testy. Metody jsou řazeny do několika kategorií – testy založené na propustnosti, funkční testy, průtoková cytometrie a fyzikální metody. Testy na základě propustnosti jsou založeny na předpokladu, že životaschopné buňky mají neporušenou cytoplasmatickou membránu, která zabraňuje propustnosti a průniku do membrány. Ve funkčních testech se zkoumá aktivita intracelulárních enzymů, hladina ATP, RNA apod. Průtokovou cytometrii lze charakterizovat jako automatizovanou mikroskopii, kterou lze získat výsledky ještě rychleji než u klasické mikroskopie (Wei a Sommer, 2009).

#### 3.1 Kultivace bakterií na kultivačních půdách

Kultivační média mají zásadní význam pro většinu mikrobiologických testů, např. pro získání čisté kultury, růst a počítání mikrobiálních buněk. Mikrobiologické kultivační médium je látka podporující růst a přežívání mikroorganismů. Aby došlo k růstu a množení bakterií *in vitro*, musí být dodrženo několik podmínek, mezi které patří dostatek vody, živin, zdrojů energie také růstových faktorů, optimální pH a teplota, vhodné složení atmosféry,

vyhovující redox potenciál i osmotický tlak (Sandle, 2016). Dále je pro růst a množení důležitá ochrana před zářením, sterilita prostředí a jeho ochrana před kontaminací. Právě kultivační média jsou vhodné pro pěstování bakterií, jelikož tyto podmínky splňují. Kultivační média jsou poté inkubována při optimální teplotě a v optimální atmosféře v termostatech či anaerostatech. Optimální teplota se liší dle druhu bakterií, nejčastější je však teplota 37 °C. Většina bakterií se množí při standardním složení atmosféry, avšak některé bakterie potřebují pro růst vyšší tensi CO<sub>2</sub> (Briggs *et al.*, 2004, Votava, 2005).

Kultivační půdy se dělí dle složení na syntetické a přirozené. Syntetická jsou sestavena z chemicky definovaných sloučenin. Jejich příkladem je např. Czapek-Doxova půda sloužící k pěstování kvasinek a plísní. Častěji užívanou půdou jsou přirozená či komplexní média, jejichž základem je živný bujon, který není chemicky definován. Dále dělíme kultivační média dle konzistence na tekuté a pevné půdy. Mezi tekuté půdy řadíme různé druhy bujonů, cukrové médium s peptonovou vodou a další. Výhodou tekutých půd je snadný přístup živin a vody k mikroorganismům, proto je možné bakterie pěstovat z malého, starého nebo poškozeného inokula. Nevýhodou těchto půd je, že růst bakterií se projeví pouze zákalem tekuté půdy ve zkumavce, což může symbolizovat i směs mikrobů. Naopak tuhé půdy se připravují ztužením bujonového základu a přidáním agaru (Votava, 2005).

Agar není považován za zdroj živin, ale pouze jako gelifikační přísada skládající se z agarosy a agaropeptinu. Jedná se o směs polysacharidů extrahovaných z rudých mořských řas zvaných agarofyty. K tomuto základu se přidává krev či prané erythrocyty. Agarová půda je poté přelita do Petriho misek v množství přibližně 25 ml nebo do zkumavek, které se ponechají v šikmé poloze a po ztuhnutí vznikne tzv. šikmý agar. Výhodou tuhých půd je možnost pěstování bakterií v podobě izolovaných kolonií. Bakteriální kolonií se rozumí skupina živých buněk vzniklá na povrchu kultivačních médií z třeba i jedné životaschopné buňky. Růst živých buněk v kolonii je pouhým okem viditelný jako útvar utvořený na povrchu média. Opakovaným přenosem buněk z kolonie na jinou Petriho misku získáme izolované kolonie, tedy čistou kulturu mikroba. Vlastnosti kolonií, jako jsou tvar, velikost, profil, okraje povrch, transparentci, barvu, změny v okolí, konzistenci a zápach nám pomáhají identifikovat o jakou bakterii se jedná (Sandle, 2016, Votava, 2005).

Další dělení půd je na základě složení a účelu na základní, obohacené, selektivní, diagnostické, selektivně diagnostické půdy k anaerobní kultivaci, půdy k antibiotickým zkouškám a ke stanovení účinných látek, půdy transportní a půdy k uchovávání kultur. Mezi základní tekuté půdy se řadí bujon a peptonová voda a mezi pevné živný agar. Některé bakterie rostou na základních půdách špatně nebo vůbec, proto využíváme obohacené půdy.

Mezi tyto půdy patří krevní, čokoládový agar a další, kdy základním obohacovadlem základu je právě krev. Za selektivní neboli pomnožovací jsou považovány půdy, na kterých vyrůstají určité druhy mikrobů a růst některých mikrobů je naopak potlačen. Tento druh půdy používáme, pokud chceme vyselektovat specifický druh bakterie. Příkladem je krevní agar s 10 % NaCl či alkalická peptonová voda (Sandle, 2016).

Diagnostické půdy slouží k průkazu některých vlastností bakteriálních buněk a tím lze diagnostikovat druh mikroba. Diagnostická půda obsahuje substrát, indikátor a živný základ. Principem těchto půd je schopnost bakterií štěpit substráty a vytvářet z nich jiné prokazatelné látky pomocí indikátoru. Klasickou diagnostickou půdou je půda cukrová, kde se zkoumá fermentace určitého sacharidu. Půdy selektivně diagnostické jsou kombinací principů selektivních a diagnostických půd. Používáme je pro diagnostiku mikroba ve směsi s velkým množstvím průvodní mikroflóry ve stolici, potravinách a klinických či pitevních materiálech. Transportní půdy mají za úkol udržet bakterie viabilní během přepravy do laboratoře a uchovat je tak ve stejném počtu, v jakém se vyskytovaly v době odběru. Půdy jsou tekuté až polotekuté obsahující místo živin látky, které omezují metabolismus. Nejznámějším transportním médiem je např. Stuartovo a Caryové-Blairovo médium (Sandle, 2016, Votava, 2005).

Po inkubaci kvantifikujeme počet vyrostlých buněk na živné půdě. Výsledek je udáván v CFU/ml. Dnes je tato metoda využívána spíše jako referenční, z důvodu její časové náročnosti. Nevýhodou je také zachycení pouze živých, nepoškozených buněk. Touto metodou nelze rozlišit živé buňky od mrtvých ani bakterie ve stavu VBNC, proto byly vyvinuty následující techniky (Kniel *et al.*, 2017).

### **3.2 Fluorescenční sondy využívané při detekci**

Na počátku 20. století byly vyvinuty různé metody detekující právě životaschopnost buněk na základě permeability a integrity cytoplasmatické membrány. Testy propustnosti lze řadit do tří skupin založených na vyloučení, pohlcení a uvolňování barviv (Wei a Sommer, 2009). Fluorescenční sondy, které využíváme v těchto metodách sloužících k detekci viability buněk lze z hlediska principu rozdělit do několika skupin týkajících se měření intracelulární esterasové aktivity, sledování membránové integrity a existence transmembránového potenciálu. V malé míře je pak u bakterií využívána detekce respirační aktivity či měření intracelulárního pH (Shapiro, 2000).



### 3.2.1 Fluorescenční sondy pro zjišťování integrity cytoplazmatické membrány

Stanovení životaschopnosti bakterií pomocí detekce membránové integrity je založeno na aplikaci látek a jejich vylučování. Tyto látky za normálních podmínek nepronikají přes neporušenou membránu nebo jsou případně ihned vylučovány do extracelulárního prostředí (Branská *et al.*, 2011). Pokud dojde k poškození buňky a případně k její smrti, může dojít k průniku molekul přes cytoplasmatickou membránu do intracelulárního prostoru buňky. Mají-li tyto molekuly navíc absorpční či fluorescenční vlastnosti, lze snadno po jejich navázání na buněčné hmoty identifikovat poškozené buňky. Takové molekuly jsou označovány jako barviva (Wei a Sommer, 2009).

Nejčastěji se využívají látky vázající se na nukleové kyseliny, jelikož se vyskytují u všech druhů mikroorganismů (Shapiro, 2000). K detekci se využívá různých druhů barviv, které prostupují přes cytoplasmatickou membránu porušené či mrtvé buňky. Mezi ně se řadí trypanová modř, která po navázání způsobí obarvení buňky. Pod mikroskopem jsou poškozené či mrtvé buňky fialově viditelné, zatímco živé zůstávají neobarvené. Podobnou technikou lze mrtvé buňky obarvit methylenovou modří či methylenovou violetí, avšak tato barviva se nejvíce využívají u detekce kvasinek (Mascotti *et al.*, 2000, Wei a Sommer, 2009).

Jak již bylo zmíněno, používaná barviva mohou mít také fluorescenční vlastnosti (Wei a Sommer, 2009). Počet fluorescenčních sond na trhu pro integritu membrány se neustále zvyšuje. Nejrozšířenější fluorescenční sondou této skupiny je propidium jodid (PI), který slouží pro detekci viability bakterií a kvasinek. Jedná se o barvivo nesoucí dva pozitivní náboje, které se vážou na nukleové kyseliny (King, 2000). Toto fenantrolinové interkalační činidlo způsobí po vazbě na nukleové kyseliny posun a zesílení intenzity fluorescence emitované v červené oblasti spektra. Propidium jodid existuje v různých spektrálních variantách, které jsou schopny zesílit fluorescenci až pětisetnásobně a jsou vhodné především pro detekci viability bakterií (Branská *et al.*, 2011). Po navázání dochází k červené fluorescenci, kdy intenzita červené fluorescence z PI je v mrtvých buňkách mnohem vyšší než v případě buněk živých. Pro detekci viability bakterií se nejčastěji využívá dvojí barvení složené ze dvou fluorescenčních barviv, SYTO 9 a PI. SYTO 9 proniká všemi bakteriálními membránami a zbarvuje buňky zeleně, zatímco PI proniká pouze membránou poškozených buněk a zbarvuje buňky červeně. Kombinací těchto barviv je tedy produkována zelená a červená fluorescence (Netuschil *et al.*, 2014).

Dalším častým ukazatelem životaschopnosti bakterií je ethidium bromid (EB). Jeho molekula je podobné struktury jako propidium jodid, ale nese pouze jeden pozitivní náboj

(Shapiro, 2000). Právě ethidium bromid je jedním z prvních zbarvovacích testů sloužících k detekci mrtvých bakterií. Molekuly EB, stejně jako molekuly PI, difundují pasivně do mrtvých buněk a interkalují přes jejich membránu do DNA a vykazují tak zvýšenou fluorescenci (Wei a Sommer, 2009). Jeho nevýhodou je pomalý prostup barviva do buňky, zvláště pokud je pH média vysoké (King, 2000). Ethidium bromid může sice procházet intaktní cytoplasmatickou membránou bakterií i kvasinek, avšak živá buňka je schopna barvivo pumpovat do extracelulárního prostředí buňky, čímž nedojde k jejímu značení tímto barvivem. Použití tohoto činidla má tedy i velkou výhodu, jelikož je pomocí něho možné detekovat i menší poškození mikroorganismů, což není možné za použití PI zachytit (Branská *et al.*, 2011). Avšak některé bezpečnostní listy několika výrobců naznačují mutagenitu tohoto barviva (Netuschil *et al.*, 2014). Jako alternativa se používá barvivo Sytox Red, které stejně jako EB proniká přes poškozenou membránu mrtvých buněk (Tawakoli *et al.*, 2013).

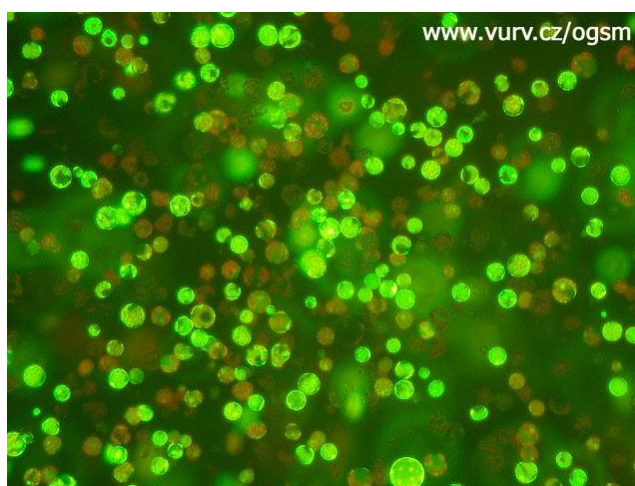
Existuje široká škála barviv na bázi fluorescence, která se liší ve své cílové oblasti a způsobu penetrace buněk (Tawakoli *et al.*, 2013) a také existuje spousta dalších činidel sloužících k detekci viability buněk, které nejsou často v literatuře zmiňované. Jedním z nich jsou dimerní cyaninová barviva, tzv. ethidium homodimer-I, II. Obě molekuly nesou čtyři pozitivní náboje. Mají podobné spektrální vlastnosti jako PI, ale mají vyšší vazebnou afinitu k nukleovým kyselinám, což znamená, že lze použít velmi malých koncentrací. Za zmínku také stojí ethidium monoazid (EMA), který nese pouze jeden pozitivní náboj (King, 2000). Po fotolýze se váže kovalentně na DNA, což nám umožňuje pozdější analýzu životaschopnosti i ve fixovaném vzorku (Inoue *et al.*, 2008). Dalšími barvivy, které se využívají na základě stejného principu jsou alcianová modř, kongo červeň, akrylová oranž, SYTOX Green a další (Wei a Sommer, 2009).

### **3.2.2 Fluorescenční sondy pro stanovení intracelulární esterázové aktivity**

Další možností, jak zjistit viabilitu bakterií, je sledování intracelulární esterázové aktivity založené na pohlcení barviva. K detekci životaschopnosti se pak tedy využívají látky, které v živých buňkách reagují s intracelulárními esterázami za vzniku fluorescenčního produktu. Ideální činidlo by mělo být lipofilní, nefluorescenční a rychle hydrolyzující (King, 2000). Látky by měly být schopné procházet volnou difúzí do buněk, kde jsou činností esteráz přeměněny na fluorescenční produkty nesoucí náboj, který způsobí zadržení a koncentrování látek uvnitř buňky. Je třeba vybrat činidla, která dobře pronikají do buněk a zároveň se v nich dobře zadržují (Branská *et al.*, 2011).

K detekci intracelulární enzymové aktivity se využívá mnoho fluorescenčních sond. K nejstarším sondám pro zjištění životaschopnosti buněk patří fluorescein diacetát (FDA) (King, 2000). Jedná se o nefluorescenční barvivo rozpustné v tucích, které se po absorpci hydrolyzuje na fluorescein pomocí nespecifických intracelulárních esteráz (Zook a Busta, 1999). Fluorescein diacetát je tedy nezbarvený prekurzor fluoresceinu, který po excitaci emituje zelené záření (viz obr. 8) při 490 nm (Tawakoli *et al.*, 2013). Běžně se používá k identifikaci savčích buněk a kvasinek. Molekula FDA difunduje do buněk, kde se štěpí buněčnou esterázou za vzniku fluorescenčního produktu fluoresceinu. Jedná se o nepropustnou a nabitou molekulu, která zůstane uvnitř životaschopných buněk zachovaná a buňky budou obarveny do zelené barvy. Z buněk, které budou poškozené či mrtvé bude docházet k úniku FDA a dojde jen ke slabé fluorescenci (Wei a Sommer, 2009). Naopak intenzivnější fluorescence bude u viabilních buněk, které budou FDA udržovat (Tawakoli *et al.*, 2013). Pro detekci životaschopných bakterií se v současné době FDA příliš nepoužívá (King, 2000). Jeho difúze do buněk je sice rychlá, avšak fluorescein získaný po jeho intercelulární hydrolýze se poměrně rychle ztrácí i ze živých bakterií (Shapiro, 2005).

Fluorescein diacetát je tedy často nahrazován např. karboxyfluorescein diacetátem (CFDA). Ten je hydrolyzován na karboxyfluorescein, který v porovnání s FDA obsahuje větší negativní náboj s lepší retencí a pomalejším vstupem do buňky. Další používanou sondou je např. calcein AM. Tato molekula je hydrolyzována na calcein a obsahuje čtyři negativní náboje, proto má ještě lepší retenci než předchozí fluorescenční sonda (King, 2000).



**Obrázek 8** Stanovení životnosti protoplastů pomocí fluorescein diacetátu a UV záření  
Červeně zbarvené protoplasty nejsou vitální  
(Převzato z: Oddělení genetiky a šlechtitelských metod)

### 3.2.3 Fluorescenční sondy pro detekci transmembránového potenciálu

Jako indikátor buněčné viability je také využíván transmembránový potenciál, který je udržován na cytoplasmatické membráně pomocí iontových pump. Transmembránový potenciál lze měřit tzv. distribučními sondami. Jedná se o lipofilní barviva procházející volně přes cytoplasmatickou membránu a hromadící se v buňce v závislosti na jejich náboji (Novo *et al.*, 1999).

Sondy pak rozdělujeme na kationické a anionické (Novo *et al.*, 1999). Typickými kationickými sondami jsou rhodamin 123 nebo cyaninová barviva, mezi které se řadí DiOC6(3) (3,3'-dihexyloxakarboocyanin jodid) a DiOC2(3) (3,3'-diethyloxakarboocyanin jodid) a další. Kationické sondy jsou akumulovány polarizovanými buňkami. Jako anionická sonda se nejčastěji využívá bis-oxonol a jeho příbuzné látky. Anionické sondy jsou akumulované depolarizovanými buňkami. Využití těchto sond je komplikované, jelikož koncentrace barviv je ovlivněna velikostí buněk, membránového potenciálu, přítomností vazebných míst, činností transmembránových pump, ale také propustností buněčného obalu (Branská *et al.*, 2011).

Stanovení membránového potenciálu slouží jako indikátor viability buněk, jelikož se v životaschopných mikroorganismech vyskytuje napříč cytoplasmatickou membránou, avšak není přítomný u buněk mrtvých. Transmembránový potenciál vzniká vytlačováním vodíkových iontů pomocí  $H^+$  ATPázy nebo řetězcem přenášejícím elektrony. Některé testy viability buněk jsou založeny na této skutečnosti. Buňky s negativním membránovým potenciálem akumulují kladně nabitá barviva (rhodamin 123) a záporně nabitá barviva jsou vyloučena (barviva oxonolové skupiny). Výsledkem je tedy zbarvení životaschopných buněk pomocí rhodaminu 123 a neživých buněk pomocí oxonolových barviv. Tato barviva jsou pomocí laseru excitována při vlnové délce cca 490 nm a vyzářují zelenou fluorescenci. Používají se jak pro stanovení bakterií, tak i kvasinek (Wei a Sommer, 2009).

### 3.2.4 Fluorescenční sondy pro stanovení uvolněných specifických molekul či intracelulárních enzymů

Uvolňování některých specifických molekul nebo intracelulárních enzymů může být také použito pro stanovení životaschopnosti buněk. U savčích buněk se hodnotí uvolňování chromidia a enzymu laktátdehydrogenázy (LDL). Pro mikrobiální buňky je stěžejní uvolňování fosfátu a minerálů, zejména draslíku a hořčíku. Dále se u stanovení

životaschopnosti buněk využívá jododeoxyuridinu, pralinu, selenomethioninu a uridinu. Měří se inkorporace jododeoxyuridinu do DNA, uridinu do RNA a pralinu nebo selenomethioninu do proteinů v buňce. Použití těchto sloučenin není problematické, protože jsou snadno začleněny do nukleových kyselin a proteinů buněk, avšak mohou být pro buňku toxické a tím mohou omezit citlivost testu. Chrom je  $\gamma$ -emitující radioizotop, který se váže těsně k intracelulárním proteinům. Proto je velmi výhodné využití měření spontánního uvolňování proteinů značených chromem (Wei a Sommer, 2009).

### 3.2.5 Fluorescenční sondy pro detekci respirační aktivity buňky

Respirační aktivitu lze detekovat pomocí indikátorů oxidativního metabolismu (Branská *et al.*, 2011). Mezi indikátory spadají tetrazoliové soli, které jsou redukovány enzymem dehydrogenázou přítomnou v systémech elektronového transportu mikroorganismů na nerozpustné formazany (Hatzinger *et al.*, 2003). Tetrazoliový test není založen na schopnosti stanovení viability buněk na základě přímého měření molekuly ATP, ale jde o stanovení aktivity enzymů podílejících se na tvorbě ATP. Právě tetrazoliová barviva se nejčastěji využívají k měření aktivity mitochondriálních reduktáz. Jedná se o barviva působící jako akceptory elektronů, která se redukují na formazanové produkty. Tyto produkty jsou snadno identifikovatelné díky speciálním optickým vlastnostem (Wei a Sommer, 2009).

Nejčastěji používanými tetrazoliovými barvivy jsou 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrotetrazolium bromid (MTT) a 5-kyano-2,3-ditolylnitrotetrazoliumchlorid (CTC) (Hatzinger *et al.*, 2003). MTT je široce využíván při hodnocení životaschopnosti savčích buněk a CTC je využíván pro stanovení životaschopnosti mikrobiálních buněk. V živých buňkách jsou barviva redukována na formazanový produkt, který silně absorbuje světlo při typické vlnové délce cca 560 nm. Tento nerozpustný fialový produkt se rozpustí např. v roztoku dimethylsulfoxid, který měříme spektrofotometrem. Výhodou využití CTC barviva je, že produkt formazanu je fluorescenční, což zvyšuje citlivost testu (Wei a Sommer, 2009). Další výhodou tohoto testu je možnost následné fixace buněk a analýzy s odstupem až několika dní. Nevýhodou by však mohl být delší časový interval nutný ke tvorbě pozorovaného krystalu formazanu, ale také značná toxicita těchto sond (Branská *et al.*, 2011).

### **3.2.6 Fluorescenční sondy pro detekci intracelulárního pH**

Živá buňka je schopna udržet konstantní vnitřní pH, proto jako další indikátor viability buněk využíváme detekci intracelulárního pH pomocí fluorescenčních sond. Tyto sondy se vyznačují pH-dependentním excitačním a emisním spektrem, kdy v určitém intervalu hodnot pH dochází ke změně intenzity či posunu jednotlivých maxim. Mezi sondy splňující tento požadavek se řadí zejména CFDA-SE, ale také fluorescein, karboxyfluorescein a jeho deriváty. Tento způsob detekce viability buněk je možný jak u bakterií, tak kvasinek, avšak v porovnání s předchozími technikami, se detekce intracelulárního pH využívá velmi zřídka (Nebe-von-Caron *et al.*, 2000).

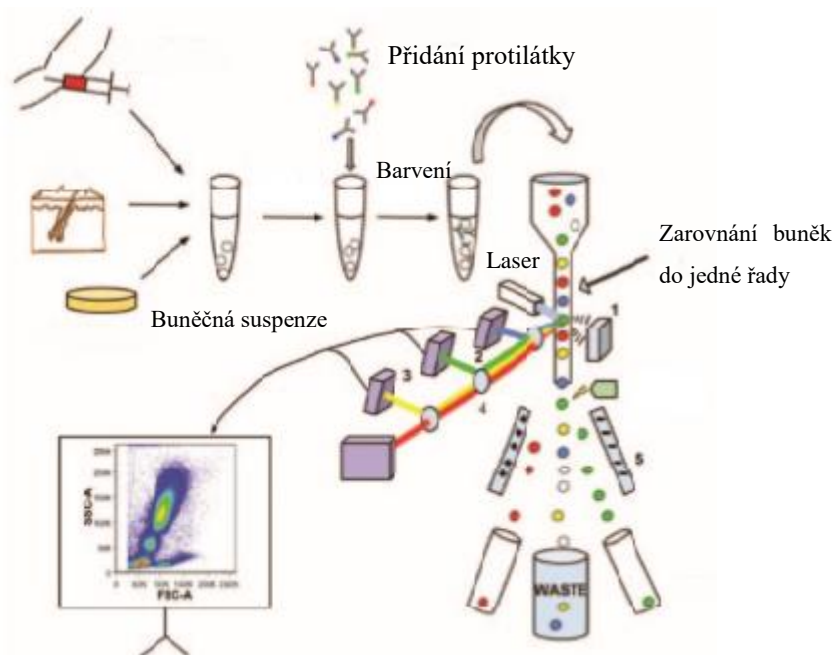
### **3.3 Stanovení viability buněk pomocí fluorescenčních metod**

Jedná se o stanovení viability mikroorganismů, které je založeno na sledování jejich životně důležitých funkcí pomocí selektivního značení komerčně dostupnými fluorescenčními sondami. Ke sledování značených buněk se využívá fluorescenční mikroskop, který dokáže stanovit pouze omezený počet částic za určitý časový interval. Dále fluorimetr, který sice umí stanovit velký počet buněk, avšak nedokáže rozlišit jejich fyziologické vlastnosti. Proto se využívá průtoková cytometrie, kterou dokážeme detekovat až 100 000 buněk za sekundu. Průtoková cytometrie využívá principů mikroskopie a citlivé detekce světelného signálu (Müller a Davey, 2009).

#### **3.3.1 Průtoková cytometrie**

Průtoková cytometrie je technologie poskytující multiparametrickou analýzu jednotlivých suspendovaných buněk nebo jiných částic s fluorescenčními barvivy v heterogenním vzorku (Ding *et al.*, 2017). Jedná se o metodu, při níž se provádí měření fyzikálních či chemických vlastností jednotlivých buněk nebo jiných částic pomocí měřicího přístroje, tzv. průtokového cytometru. Buňky procházejí měřícím přístrojem v proudovém toku a jsou jednotlivě měřeny nejčastěji na základě jejich optických vlastností. Někdy se využívá měření na základě elektrických či akustických vlastností. Průtokový cytometr je vybaven elektrickou či mechanickou jednotkou, která třídí buňky dle rozsahu naměřených hodnot (Wei a Sommer, 2009).

Průtokový cytometr se skládá ze třech hlavních částí, z fluidiky, optiky a elektroniky. Tyto části mají za úkol suspendování buněk v proudu tekutiny a poté analyzování fyzikálních a chemických vlastností buňky, které procházejí laserovým paprskem (Ding *et al.*, 2017). Nejprve dojde ke vstříknutí vzorku obsahujícího buňky do proudu tekutiny ve fluidikálním systému a k jeho následné suspendaci (Longin *et al.*, 2017). Poté buňky procházejí světelným zdrojem, kde dochází k rozptýlení světla a k vyzařování fluorescence. Vyzařované světlo je odděleno na základě různých vlnových délek (Davey, 2011). Zdrojem světla může být laser, oblouková lampa či LED diody. Nejrozšířenější je chlazený argonový laser poskytující jasný modrozelený světelný paprsek o specifické a dobře definovatelné vlnové délce (Shapiro, 2000). Buňka procházející laserovým paprskem rozptyluje světlo do všech úhlů. Můžeme tedy rozeznávat přímý rozptyl (FSC), boční rozptyl (SSC) a fluorescenci, jak je viditelné na obrázku č. 9 (Jahan-Tigh *et al.*, 2012). Vyzařované světlo je dále směřováno optickou soustavou tvořenou ze zrcadel a filtrů do detektoru, který se vyskytuje v úhlu 90° od dráhy světelného paprsku. Světlo procházející optickým systémem je zesíleno fotonásobičem a přeměněno na elektronické impulzy, které jsou zaznamenány počítačovým systémem (Longin *et al.*, 2017).



**Obrázek 9** Schématické znázornění průtokové cytometrie (Jahan-Tigh *et al.*, 2012)

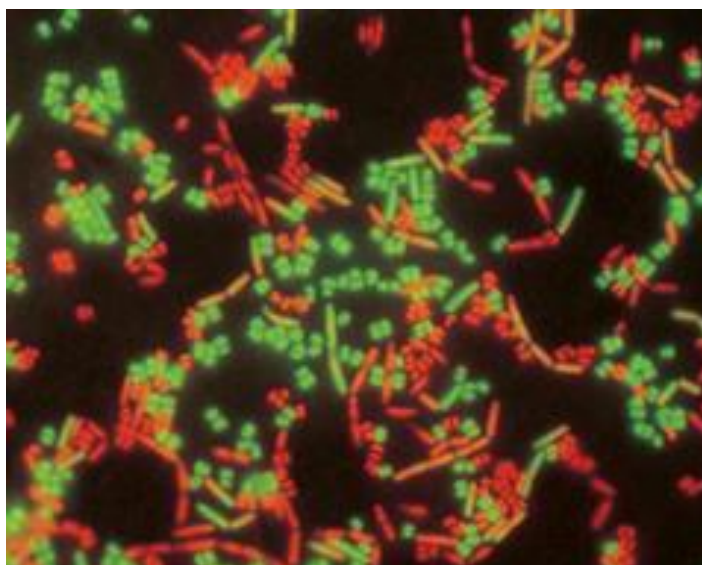
- (1) detektor dopředného rozptylu, (2) detektor bočního rozptylu, (3) detektor fluorescence, (4) filtry a zrcadla  
 (5) nabitě deformační desky

Velikost přímého rozptylu je úměrná velikosti procházejících buněk a míra bočního rozptylu světla odpovídá jejich granularitě a struktuře (Jahan-Tigh *et al.*, 2012). Fluorescence o určité vlnové délce je detekována pomocí zdroje excitace fluorochromů, kterým bývá nejčastěji argonový laser či rtuťová výbojka a detekčního systému s předřazenými filtry a zrcadly různých spektrálních vlastností (Branská *et al.*, 2011). Moderní přístroje navíc uzpůsobují měření fluorescence více detektory vykazující vlnové délky v různých spektrálních oblastech. Jsou to např. detektory pro zelenou, červenou a oranžovou fluorescenci (Wei a Sommer, 2009). Výsledkem zpracování dat je graf, tzv. histogram. Nejpoužívanějším grafem je histogram dvouparametrový, pomocí něhož jsou dvě optické vlastnosti buněk vizuálně znázorněny jako dvě datové oblasti. Na ose X je vynesena intenzita FSC a na ose Y intenzita SSC. Každá osa je také označena specifickým druhem fluorochromu, který byl použit (Jahan-Tigh *et al.*, 2012).

Průtoková cytometrie má rozsáhlé využití, mezi typické aplikace patří stanovení buněčných parametrů jako jsou měření životaschopnosti buněk či apoptózy, proliferační aktivity nebo obsahu DNA molekuly. Dále se ve velkém množství aplikuje v oblasti genetiky. Ve většině aplikací jsou vyžadována fluorescenční činidla označující stanovované buňky. Vzhledem k rozmanitosti buněčných typů je zapotřebí různých činidel pro specifické testy životaschopnosti buněk. Použití propidium jodidu a ethidium bromidu reagensů k určování životaschopnosti bakterií není příliš užitečné, tato barviva se více používají u stanovení viability savčích buněk. Bylo zjištěno, že pro detekci živých bakterií je nejvýhodnější využití činidla rhodamin 123. Vychází se ze skutečnosti, že lipofilní kationty jsou akumulovány mikrobiálními buňkami a nefluorescenční substráty jsou konvertovány na fluorescenční produkty pomocí metabolických aktivit životaschopných buněk. Ve výzkumu byly bakterie klasifikovány dle jejich specifických interakcí s fluorescenčními barvivy PI, EB a bis-oxonolem. Buňky vylučující ethidium bromid jsou klasifikovány jako metabolicky aktivní buňky. Vyloučení bis-oxonolu souvisí s buňkami bez napětí s polarizovanou buněčnou membránou. Naopak depolarizované buňky se vyznačují vychytáváním obou barviv. Permeabilizované buňky jsou identifikovány pomocí barviva propidium jodid (Wei a Sommer, 2009).

V dnešní době existuje mnoho komerčně dostupných reagenčních "kitů". Detekce viability bakterií může být provedena např. pomocí soupravy LIVE/DEAD BacLight (viz obr. 10). Tento set se skládá ze dvou barviv PI a SYTO 9. Princip detekce na základě permeability těchto barviv byl již popsán výše (Netuschil *et al.*, 2014).





**Obrázek 10** *Micrococcus luteus* a *Bacillus cereus* obarvené LIVE/DEAD® BacLight™ kitem  
Živé bakterie jsou obarveny zeleně (SYTO 9)  
Mrtvé bakterie jsou obarveny červeně (PI)  
(Převzato z: Thermo Fisher scientific: LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit Protocol)

Průtokovou cytometrií lze také detekovat apoptózu buněk. V případě použití fluorchromu PI vázajících se vysokou afinitou na DNA, můžeme apoptózu stanovit na základě výskytu sub-G1 oblasti buněčného cyklu. Další způsob je založen na dvojitěm barvení s annexinem V-FITC a PI. Základem metody je externalizace fosfatidylserinu, který je normálně přítomen na vnitřním povrchu apoptické buňky ztrácející asymetrii membránových fosfolipidů. Kromě apoptických buněk tak lze stanovit i buňky nekrotizující (Wei a Sommer, 2009).

### 3.3.2 Detekce na základě fluorescenčních hydrazinů

Poměrně novou metodou, kterou lze přesně kvantifikovat mrtvé mikrobiální buňky, je metoda využívající současně fluorescenčních hydrazinů a barviv interkalujících nukleové kyseliny. Fluorescenční hydraziny umožňují detekci buněk, které nelze pomocí běžně využívaných barviv detekovat, i přesto, že mají vysokou afinitu k takovým buňkám. Tato metoda je velkou výhodou pro stanovení bakteriální populace, která je nekultivovatelná či tvoří biofilmy. V současnosti je nejpoužitelnější metodou stanovení počtu CFU odrážející

schopnost buněk se reprodukovat. Tato metoda však není spolehlivá, jelikož některé bakterie podléhají oxidativnímu stresu, který nastává při pokovování. Dále je jako detekce životaschopných buněk užíváno fluorescenčních barviv mající vysokou afinitu k nukleovým kyselinám. Detekce pak probíhá za pomoci průtokové cytometrie či fluorescenční mikroskopie. Těmito metodami však nelze stanovit buňky, které zemřely během stacionární fáze buněčného cyklu. Kvůli tomu, že se změnila struktura nukleových kyselin je buňka špatně barvitelná. Také jimi nelze měřit buňky jejíž molekula DNA byla degradována. Proto byla vyvinuta metoda využívající barvivo Alexa Fluor hydrazin (AFH). Toto barvivo je považováno za nízkomolekulární látku, která je fluoreskující a fotostabilní. Principem je interakce hydrazinů s karbonylovými skupinami (aldehydy a ketony) proteinů, které jsou nevratně poškozené (Saint-Ruf *et al*, 2009).

### 3.4 Funkční testy

#### 3.4.1 PCR

Principem polymerázové řetězové reakce (PCR) je exponenciální zmnožení neboli amplifikace krátkých sekvencí DNA v rámci delší dvouvláknové molekuly DNA (Hunt, 2010), která spočívá v cyklickém opakování těchto kroků – denaturace, hybridizace a syntéza chybějícího komplementárního úseku DNA.

Každý druh PCR začíná tepelnou denaturací dvouvláknové DNA na dva jednoduché řetězce. Teplota potřebná k denaturaci je 95 °C. Hybridizace spočívá v ochlazení vzorku na 30 až 65 °C, při které dojde k nasednutí primerů na komplementární 3' konce amplifikované DNA. Zmíněné primery jsou synteticky připravované a složené z jednovláknových oligonukleotidů majících komplementární sekvenci k sekvencím na 3' konci obou vláken rozmnožovaného úseku (Bartůňková a Paulík, 2005). Primery neboli startéry se skládají z přibližně 20 nukleotidů (Hunt, 2010). Poslední fází PCR je syntéza chybějícího komplementárního úseku DNA, kdy pro syntézu nových vláken slouží právě primery.

V polymerázové řetězové reakci je obsažené nadbytečné množství deoxynukleotidtrifosfátů, aby bylo dostatečné množství substrátu pro syntézu nových vláken DNA (Bartůňková a Paulík, 2005). Nejčastěji užívaný enzym pro katalýzu syntézy nových vláken je DNA polymeráza, kterou získáváme izolací z bakterie *Thermus aquaticus* žijící v horkých pramenech. DNA polymeráza, označovaná jako Taq polymeráza prodlužuje vlákna

nukleové kyseliny ve směru od 5' konce ke 3' konci, směrem od obou primerů při optimální teplotě 72 °C. Jelikož je DNA polymeráza termostabilní, je aktivní i při vyšších teplotách dosahujících 95 °C, která je nutná k následné denaturaci (Hunt, 2010). Denaturace proběhne po skončení syntézy obou vláken a zahájí se tak nový cyklus. Produkty polymerázové řetězové reakce jsou označovány jako amplikony. Jedná se o úseky DNA definované délkou, jejichž velikost se pohybuje v desítkách až tisících párů bazí. Přítomnost těchto produktů v reakční směsi je prokazována stanovením jejich velikosti pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém či agarózovém gelu nebo kvantitativním měřením množství produktu PCR (Bartůňková a Paulík, 2005).

PCR amplifikuje všechny cílové DNA ve vzorku jak životaschopných, tak mrtvých buněk, proto je těžké kvantifikovat buňky ve stavu VBNC. Pro toto stanovení využíváme tedy následujících technik RT-PCR a Real-time PCR (Liu *et al.*, 2018).

#### **3.4.1.1 RT-PCR**

DNA je však vysoce stabilní molekulou i v mrtvých buňkách, proto může být i po delší době detekována pomocí klasické PCR. Z tohoto důvodu není klasická PCR příliš vhodná pro stanovení viability buněk. Naopak RNA molekula je náchylná k degradaci díky její citlivosti k hydrolýze 2-hydroxy skupiny ribosy a také je náchylná k rychlé nukleolýze buněčných ribonukleáz. Bylo tedy prokázáno, že RNA molekula je v mrtvých buňkách nestabilní a je tedy vhodná pro posouzení životaschopnosti buněk. Molekulu RNA je možné detekovat právě pomocí RT-PCR, tedy PCR s využitím reverzní transkripce (Levin *et al.*, 2008, Wei a Sommer, 2009).

Doposud bylo provedeno několik pokusů pro stanovení viability pomocí molekuly RNA. Bylo zjištěno, že při inkubaci odumřelých buněk při pokojové teplotě mohla být RNA molekula detekovatelná pouze po krátkou dobu a čas potřebný pro detekci cílové RNA musí být stanoven před samotnou analýzou neznámých vzorků. Doba inkubace se odvíjí od vyšetřovaného typu RNA. Molekula mRNA je nejméně stabilním podtypem RNA molekuly, proto je ideální pro využití v této detekci. Výběr typu cílové RNA molekuly je také na základě sekvence a délky PCR amplikonu. Tyto základní parametry slouží k prokázání vhodnosti RNA jako indikátoru živých buněk před analýzou neznámých vzorků (Vandesompele *et al.*, 2002, Wei a Sommer, 2009).

### 3.4.1.2 RT-qPCR

Jelikož běžná RT-PCR neposkytuje kvantitativní stanovení životaschopných buněk v analyzovaném vzorku, byla vyvinuta další metoda stanovující kvantitativní množství molekul RNA. Tato metoda je označována jako kvantitativní polymerázová řetězová reakce s využitím reverzní transkripce v reálném čase (RT-qPCR), díky které lze stanovit množství životaschopných buněk kvantitativně z důvodu přímé korelace mezi PCR signálem a koncentrací viabilních buněk. Výsledkem metody jsou hodnoty CT vyjadřující počet cyklů, při kterých hodnota fluorescence dosáhla prahové hodnoty. CT hodnoty silně korelují s množstvím životaschopných buněk použitými pro reakci. Hodnoty CT u qPCR však vyjadřují maximální počet předpokládaných životaschopných buněk ve vzorku než skutečnou hodnotu těchto buněk, jelikož pozitivní signál nemusí nutně uvádět životaschopnou buňku, ale může také vyjadřovat buňku, která se stala v blízké době neživou a RNA se nestihla degradovat (Levin *et al.*, 2008, Wei a Sommer, 2009).

Před použitím RT-qPCR a samotným stanovením je třeba dbát na optimalizaci izolace RNA, návrhu primeru a reakčních podmínek, tak aby bylo možné provést přesná a spolehlivá měření. Technologie real-time PCR je obecně založena na detekci fluorescenčního signálu produkovaného proporcionálně během amplifikace DNA pomocí specifických a nespecifických fluorescenčních sond. Na rozdíl od běžné polymerázové řetězové reakce, kde je analyzován až výsledný produkt po určitém počtu cyklů, je při real-time PCR zaznamenáván každý cyklus s určením čísla cyklu, při kterém stoupá intenzita emisí barviva. Právě tento cyklus je označován jako prahový a bývá určen v exponenciální části (Bustin, 2005).

Jak již bylo zmíněno, klasická PCR je pouze částečně kvantitativní metodou, jelikož ethidium bromid je detekovatelný až v konečném stupni amplifikace. Ethidium bromid je fluorescenční barvivo vázající se interpolací na dvouřetězcovou DNA mezi páry bazí. Jeho fluorescence není příliš jasná, proto se používají další barviva, mezi která patří např. SYBR Green, který je mnohem více fluoreskující než ethidium bromid a je používán především v real-time PCR. SYBER Green se váže na dvouřetězcovou DNA, nikoliv na jednovláknovou molekulu (Hunt, 2010, Levin *et al.*, 2008). Pro kvantifikaci životaschopných bakterií se u PCR v reálném čase také využívá barvivo propidium monoazidu a ethidium monoazidu vázajících se také na dvouřetězcovou molekulu nukleových kyselin (Pan a Breidt, 2007).

Výhodou je potřeba velmi malého množství mRNA, lze tedy využít buňky získané laserovou snímací mikro-disekcí, primární buňky nebo malé množství tkáně. Mezi výhodu

patří také dostupnost levných reagensů. Existuje celá řada dalších metod pro kvantifikaci mRNA, mezi které se řadí zejména northern blotting, hybridizace *in situ* a RPA testy. Northern blotting a RPA jsou považovány za standardní testy pracující velmi dobře, avšak velkou nevýhodou je potřeba velkého množství vzorku RNA. Hybridizace *in situ* je zase spíše považována za kvalitativní než kvantitativní metodu, proto došlo k vyvinutí PCR v reálném čase, která je nejcitlivější metodou a může rozlišovat blízké příbuzné mRNA a zároveň určit kvantitu ve vzorku. Další výhodou PCR v reálném čase je poměrně snadná a pohodlná obsluha ve srovnání se staršími metodami (Hunt, 2010).

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase je nově vzniklou modifikací klasické PCR a využívající se ke studiu hladin genové exprese spojením s technikou RT-PCR. Spojením těchto dvou technologií vzniká metoda zvaná RT-PCR v reálném čase (RT-qPCR), kterou jsme schopni měřit hladiny transkripční RNA. Pro tuto metodu také nejčastěji využíváme barvivo SYBR Green (Fraga *et al*, 2014).

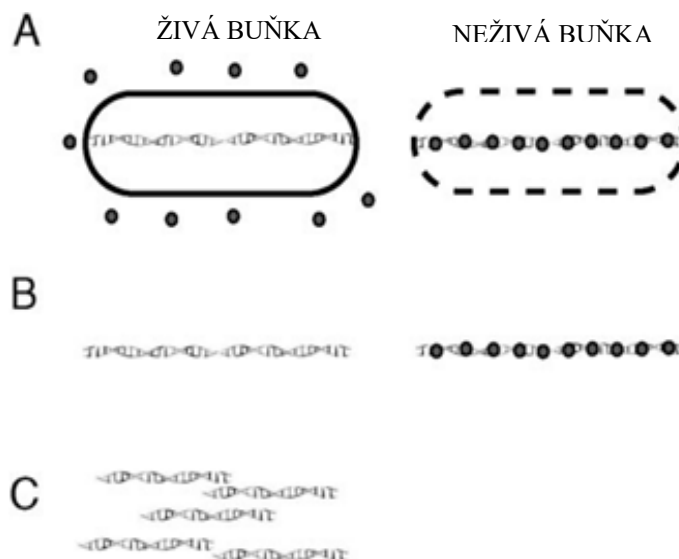
### 3.4.1.3 PMA a EMA – PCR

Nedostatek metod založených na analýze DNA se stává i nedostatkem informací o životaschopnosti buněk. Důvodem je stabilita molekuly DNA i po tom co buňky ztratily svoji životaschopnost (Nocker *et al*, 2010). To je ukázáno na příkladu, kdy pomocí PCR byla stanovena *Legionella* v horkých vodách a výsledky tohoto stanovení vyšly pozitivní, i přesto, že buňky již nebyly živé. Proto můžeme v těchto případech využívat dvou postupů PCR k detekci živých a mrtvých bakterií (Nocker a Camper, 2006). Prvním je využití barviv propidium monoazid (PMA) a ethidium monoazid (EMA) vázajících se na DNA (Cawthorn a Witthuhn, 2008). Takováto barviva do živých buněk standardně neprostupují. Diferenciace životaschopných a mrtvých bakterií se tedy získá kovalentní vazbou interkalačních barviv na nukleové kyseliny v mrtvých buňkách, tzv. fotoaktivací. Fotoaktivace PMA se pevně váže na exponovanou DNA a narušuje amplifikaci PCR (Cangelosi a Meschke, 2014). Kombinace těchto barviv a fotoaktivace způsobí eliminaci PCR signálů mrtvých buněk, zůstanou pak pouze tedy signály buněk živých. Druhým je využití tzv. RNA PCR, kdy se využívá krátkého poločasu rozpadu molekuly RNA a rychlého vymizení této molekuly z mrtvých buněk. RNA může být detekována pomocí PCR, pokud je převedena na molekulu DNA pomocí enzymu reverzní transkriptázy. Často je využívána kombinace těchto dvou postupů, tedy využití

barviv propidium monoazid (PMA) nebo ethidium monoazid (EMA) s RT-PCR, čímž vznikla metoda s názvem PMA/EMA-RT-PCR. (Nocker a Camper, 2006).

Metoda využívá interkalačních barviv, která jsou přidávána k suspenzi životaschopných nebo mrtvých bakterií v různých koncentracích před izolací nukleových kyselin a samotnou PCR (Cawthorn a Witthuhn, 2008). Jak můžeme vidět na obrázku č. 11, EMA a PMA jsou barviva pronikající do buněk s poškozenou membránou. Váží se na molekulu DNA, a tak inhibují amplifikaci mrtvých bakterií a umožňují amplifikaci nenavázané DNA životaschopných buněk (Li *et al.*, 2017). PMA se využívá u velkého množství metod. Mezi ně patří např. denaturační gradientová elektroforéza (PMA-DGGE), avšak důležitější metodou je pro nás kvantitativní PCR (PMA-qPCR). PMA snadno vstupuje do buněk s porušenými membránami, tedy do buněk mrtvých a interkaluje s DNA (Nocker *et al.*, 2010). Je účinnější pro průkaz životaschopných buněk, jelikož zcela inhibuje PCR amplifikaci z buněk mrtvých, aniž by způsobil významnou inhibici amplifikace z životaschopných buněk. Je také velice účinný pro detekci viabilních buněk ve směsích s různými poměry živých a mrtvých buněk (Cawthorn a Witthuhn, 2008).

PMA/EMA-PCR je nejrozšířenější technologií pro přímou kvantifikaci buněk ve směsných vzorcích. Slouží k přímé detekci patogenů v potravinách, ale také v klinických a enviromentálních vzorcích (Rudí *et al.*, 2005). Touto metodou, jak již bylo výše zmíněno, lze stanovit i bakterie typu VBNC (Li *et al.*, 2017).



**Obrázek 11** Schématické znázornění EMA-PCR (Rudi *et al.*, 2005).

- A.....EMA se přidá k testovanému vzorku obsahujícím jak životaschopné, tak mrtvé buňky a proniká pouze do mrtvých buněk, kde se váže na DNA. Dochází ke kovalentní vazbě a k inaktivaci volného EMA.
- B.....Po purifikaci existují dvě populace DNA. DNA populace životaschopných buněk bez navázané EMA a DNA mrtvých buněk s kovalentní vazbou EMA.
- C.....Nestanovená DNA z životaschopných buněk je PCR amplifikovaná, zatímco DNA z mrtvých buněk být amplifikována nemůže.

#### 3.4.1.4 FISH

Fluorescenční *in situ* hybridizace je molekulární cytogenetická technika používaná pro fyzikální mapování sekvencí DNA na chromozomech (Stanyon, 2016). FISH lze provádět na různých cílech, včetně RNA molekul v buňkách, DNA v metafázových chromozomálních přípravcích získaných z mitotických buněk nebo DNA v interfázi jádra z buněk v nemitotických fázích buněčného cyklu. Interfázová jádra mohou být získána z kultivovaných nebo nekultivovaných buněk, tříděných buněk nebo z parafinového základu tkání (Tsuchiya, 2011). FISH využívá komplementární vazby, které se mohou vytvářet mezi jednotlivými nukleotidovými bázemi v DNA (Stanyon, 2016). Název *in situ* hybridizace (ISH) vychází z místa identifikace bakterií. Detekce tedy probíhá uvnitř mikrobiálních agregátů (Shiraishi *et al.*, 2008).

Stabilitu molekuly DNA zajišťují vodíkové můstky, které se nachází mezi jednotlivými bázemi. Pevnou vazbu vodíkových můstků s dusíkatými bázemi lze rozrušit změnou podmínek prostředí, jako je zvýšení teploty, vliv chemikálií či enzymů a tím docílit

denaturaci DNA. Pokud pominou tyto extrémní podmínky dojde k opětovnému spojení komplementárních řetězců, kdy proces tohoto spojení dvou nestejných molekul DNA je označován jako hybridizace (Wei a Sommer, 2009).

Jak již bylo zmíněno základním principem FISH je denaturace a hybridizace za použití uměle vytvořených sond značených buď inkorporací biotinu nebo digoxigeninu do sondy s následnou detekcí za použití fluorescenčně značené látky protilátky (nepřímá metoda) nebo začleněním fluorofor-konjugovaných nukleotidů (přímá metoda) (Tsuchiya, 2011). Přímá metoda je jednodušší než nepřímá, jelikož je vynecháván krok imunologické reakce (Kubota, 2013). Fluorescenční barvivo je do sondy vpraveno enzymaticky, tzv. nick-translací nebo pomocí PCR. Poté jsou jak sonda, tak cílová DNA denaturována, aby došlo k utvoření jednovláknové DNA. DNA sondy a cílová DNA se poté uvede do kontaktu a dojde k reformaci dvojitěvláknové hybridní DNA. Dále se promyje přebytečné nebo slabě navázané hybridní DNA. Ne fluorescenční sondy podstoupí další krok za použití fluorescenčních reportérových molekul či fluorescenčních protilátek k detekci značky. Signál cílového chromozomu pozorovaný pod mikroskopem umožňuje mapovat jeho fyzické umístění v genomu. DNA sondy mohou mít různé velikosti. Největší sondy jsou specifické pro celé chromozomy, pak je FISH technika označována jako "chromozomální malba" (Stanyon, 2016).

FISH využívající oligonukleotidy vázající se na intracelulární DNA, RNA nebo chromozom. Vazebná místa se nacházejí tam, kde je vykazován vysoký stupeň podobnosti sekvence. Oligonukleotidy jsou specificky a cíleně navrženy a jsou označovány fluorofory. Pokud se oligonukleotidová sonda naváže na intracelulární rRNA, může intenzita fluorescence kolerovat s viabilitou buněk. Oproti tomu metody značené protilátkou selhávají v posuzování životaschopnosti. Důvodem může být krátký poločas rozpadu rRNA v mrtvých buňkách (Manti *et al.*, 2011, Wei a Sommer, 2009). Sondy vlastní schopnost absorpce světelné energie o vlnové délce v neviditelné oblasti spektra. Avšak po pohlcení světla dochází k excitaci fluorochromu na vyšší energetické hladiny a při návratu zpět dochází k emitování světla ve viditelné oblasti. Barva absorbovaného a emitovaného světla se tedy liší (Litzman *et al.*, 2011).

Nejčastěji využívanými fluorochromy jsou fluorescein-isothiokyanát (FITC) s emitovaným světlem zelené barvy nebo phycoerythrin (PE) či rhodamin s emitovaným červeným světlem (Litzman *et al.*, 2011). Výsledným signálem FISH je fluorescence, kterou lze analyzovat fluorescenčním mikroskopem nebo průtokovou cytometrií (Wei a Sommer, 2009).

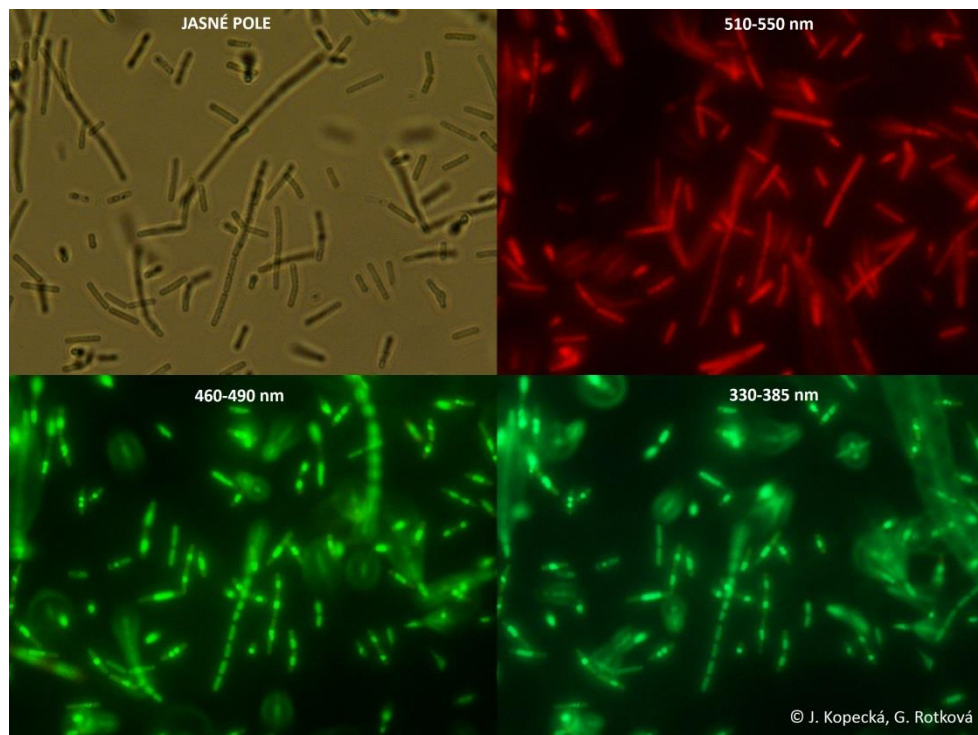


### 3.4.1.5 CARD-FISH

Speciální druh fluorescenční *in situ* hybridizace CARD-FISH (Fluorescenční *in situ* hybridizace s využitím sondy značené enzymem křenové peroxidázy) poskytuje přímou kvantifikaci živých buněk pomocí přítomnosti ribozomů. Velká část mrtvých buněk by mohla obsahovat neporušenou DNA, proto se jako marker užívá molekula RNA, která je na rozdíl od DNA více labilnější a je snadno odbouratelná z buněk, které se díky stresovým faktorům stávají neaktivní. Smrt buněk je urychlena zůstatkem méně než poloviny RNA. Neaktivní buňky mohou stále udržovat intaktní buněčnou membránu a nukleové kyseliny, jako je DNA a transferová RNA, ale rychle uvolňují své ribozomy. Studie dokazují, že bakterie s vysokým počtem ribozomů jsou viabilní a metabolicky aktivní, proto se využívá vysoce citlivé molekulární techniky zaměřené speciálně na rRNA jako ukazatele živých buněk (Schippers *et al.*, 2005).

CARD-FISH zahrnuje řadu kroků, jako jsou zabudování, permeabilizace a inaktivace endogenní peroxidázy. Užívá se kontrastních barviv, mezi které patří zejména SYBR Green II (viz obr. 12) či DAPI (Kubota, 2013). K detekci se využívá dvojice oligonukleotidových sond značených křenovou peroxidázou (HRP) a amplifikací tyramidového signálu (Pernthaler *et al.*, 2002). Citlivost FISH lze zlepšit zesílením signálu. Signál amplifikace je užitečný obzvláště pro malé a pomalu rostoucí bakteriální buňky s nízkým obsahem molekuly rRNA v buňce, kterou je jinak obtížné detekovat. CARD-FISH je založená na ukládání velkého množství značených tyraminových molekul, tedy aktivitě křenové peroxidázy, která je spojená s oligonukleotidovými sondami. Tímto způsobem se zvýší intenzita fluorescenčního signálu až dvanáctinásobně ve srovnání s použitím tradičních fluorescenčně značených sond (Dijk *et al.*, 2008).

CARD-FISH se úspěšně aplikuje na bakterie a archea v mořské vodě, v půdě, v biofilmech spojených s organickou hmotou. Celkově se ukázalo, že se jedná o velice rychlou, spolehlivou a pohodlnou metodu k detekci a kvantifikaci živých buněk (Dijk *et al.*, 2008). Technika CARD-FISH je často kombinována s PCR v reálném čase, tedy kvantitativní analýzou genů 16S ribozomální DNA, kterou určujeme podíl živých prokaryotických buněk (Schippers *et al.*, 2005).



**Obrázek 12** Kultura *Bacillus thuringiensis* obarvená barvivem SYBR Green a vystavená záření o různé vlnové délce  
(Převzato z: Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií: Přírodovědecká fakulta Masarikovy univerzity)

### 3.4.2 Test Bioluminiscence

Bioluminiscence je využívána živými organismy. Jedná se o biochemickou reakci, při které dochází k excitaci, která dále způsobí emitaci fotonů, tedy emitaci světla některými druhy živých organismů. Základem testu je stanovení intracelulární ATP. Pokud dojde k úmrtí buňky, intracelulární ATP se rychle degraduje pomocí enzymu ATPázy, čímž dochází k rychlému poklesu hladin ATP. Celý proces je popsán jako oxidace substrátu luciferinu za přítomnosti enzymu luciferázy. To vede ke vzniku oxyluciferinu, oxidu uhličitého, adenosinemonofosfátu (AMP), anorganického fosfátu a světla. Jeden foton je produkován na molekulu hydrolyzovaného ATP, z čehož vyplývá, že množství emitovaného světla je přímo úměrné množství přítomného ATP (Wei a Sommer, 2009).

## 3.5 Fyzikální metody

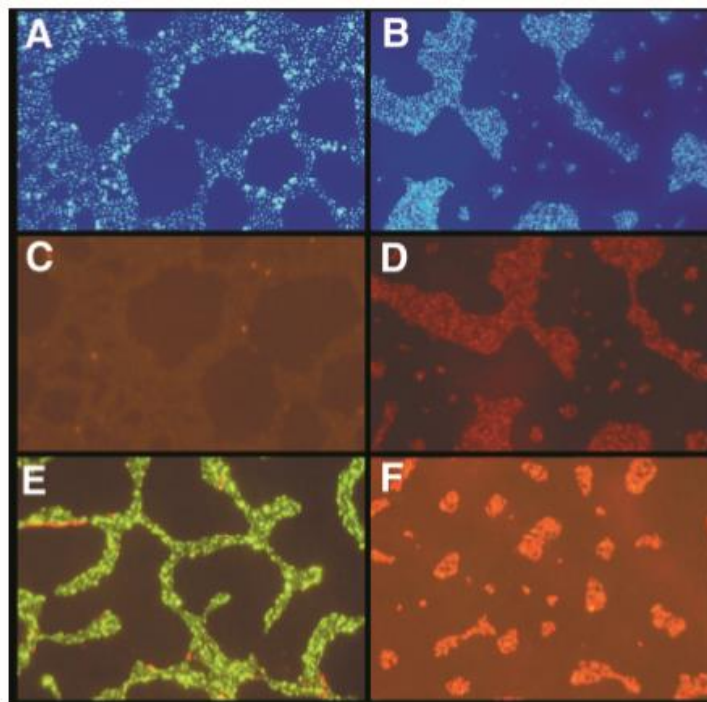
### 3.5.1 Analýza obrazu

Stanovení životaschopnosti založené na analýze obrazu se nedávno dostalo do pozornosti biotechnologů. Byla vyvinuta metoda využívající fluorescenční mikroskopii ve spojení s různými technikami. Použili nejrůznějších iterativních postupů pro výběr nejreprezentativnějších vzorků pro učení správné hranice určující rozlišení živých buněk od mrtvých. Byl sestaven systém založený na mikroskopii tmavého pole ve spojení s počítačovou technikou, který automatizuje hodnocení životaschopnosti buněk a poskytuje výsledky porovnatelné s běžně uznávanými metodami. Počítačový program dokáže měnit zvětšení obrazu dle potřeby, aniž by byla změněna jeho kvalita. Dle výzkumu živé buňky vykazují morfologicky více detailních prvků a jsou intracelulárně lépe organizované než mrtvé (Wei a Sommer, 2009).

### 3.5.2 *In situ* mikroskopie

Existuje mnoho technik (např. bioreaktor), kterými lze charakterizovat buněčné populace *ex situ*. Buňky jsou extrahovány a odebírány z původního místa a měří se pak v samostatném zařízení. Mezi fyzikální metody, kterými lze buňky měřit na jejich původním místě, patří *in situ* mikroskopie (ISM). Na bioreaktor je připevněn mikroskop, prostřednictvím kterého lze stanovit parametry buněk a tím lze monitorovat růst buněčné populace. Přístroj obsahuje sterilizovaný snímač vytvořený na základě fluorescence intracelulárního NADP(H) s miniaturizovaným a automatizovaným mechanickým vzorkovacím mechanismem pro sledování koncentrace a rozdělení buněk dle velikosti (Wei a Sommer, 2009).

Byl vytvořen epifluorescenční mikroskop se světelným zdrojem, kterým v tomto případě je impulsní dusíkový laser. Tímto senzorem však lze měřit pouze koncentrace buněk. Pro monitorování životaschopnosti buněk byla vyvinuta sonda ISM založená na mikroskopii tmavého pole. S touto sondou bylo dosaženo kontrastu a také kvality obrazu, proto je možné získat morfologické informace o intracelulární struktuře. Pomocí počítače lze rozlišit buněčné populace na živé či mrtvé buňky. Touto metodou tedy lze stanovit životaschopnost mikroorganismů, zejména kvasinek. Přehled výsledků získaných epifluorescenční mikroskopií je zobrazen na obrázku č. 13 (Wei *et al.*, 2007, Suhr *et al.*, 1995).



**Obrázek 13** Porovnání mrtvých a živých buněk *S. typhimurium* epifluorescenční mikroskopií (Nogva *et al.*, 2003)

Živé buňky obarvené A) DAPI C) EMA E) BacLight  
Mrtvé buňky obarvené B) DAPI D) EMA F) BacLight

### 3.5.3 Stanovení impedance

Do fyzikálních metod, kterými lze stanovit životaschopnost buněk dále může spadat měření impedance biologických materiálů. Jedná se o fyzikální veličinu vyjádřenou komplexním číslem, která popisuje zdánlivý odpor částice a fázového posunu napětí proti proudu, zatímco buňkou prochází střídavý proud dle určité frekvence. Impedance odpovídá vodivosti a kapacitě. Změna impedance v médiu obsahujícím buňky může odrážet změnu metabolické aktivity buněk, proto byla měření impedance využita pro kvantifikaci životaschopných mikroorganismů (Lei *et al.*, 2014, Wei a Sommer, 2009).

## 4 ZÁVĚR

V této práci byly popsány základní morfologické znaky prokaryotické buňky. Zejména její stavba, uspořádání, velikost a tvar, ale také její růst a množení.

Na základě znalosti této základní charakteristiky je možné stanovit rozdíly mezi živými a mrtvými buňkami, které jsou důležité pro detekci viability buněk. Základní rozdíl se týká stavby bakterie. Mrtvé bakterie mají poškozenou buněčnou membránu, čímž dojde ke zvýšení permeability molekul do buněk. Na tomto principu jsou nejčastěji založeny metody stanovení životaschopnosti buněk.

Mezi další principy, sloužící pro detekci viability, patří intracelulární aktivita esteráz, transmembránový potenciál a další. Tyto principy využívají fluorescenčních sond, díky kterým lze živé a neživé buňky od sebe rozlišit. Existuje celá řada interkalačních barviv, avšak já bych ráda vyzdvihla zejména barviva propidium jodid a SYTO 9, kdy kombinace těchto barev tvoří soupravu označovanou jako BacLight, která je komerčně dostupná od několika dodavatelů. Při použití těchto sond je výsledkem červená (PI) a zelená (SYTO 9) fluorescence na základě, které jsme schopni kvantifikovat živé buňky. Výhodou tohoto setu je i schopnost stanovení bakterií ve stavu VBNC, což mnoho technik neumí.

Dále jsem se věnovala principům dostupných metod, díky kterým lze stanovit viabilitu buněk. Bylo prokázáno, že metoda PCR není příliš vhodnou metodou pro rozlišení živých a mrtvých buněk, z důvodu velké stability molekuly DNA, proto bych ráda zmínila EMA/PMA-PCR, která je kombinací metody PCR s interkalačními barvivy prostupujícími membránou buněk a vázající se na molekulu RNA, která je v porovnání s molekulou DNA méně stabilní. Jedná se o barviva propidium a ethidium monoazid, kdy PMA prostupuje mrtvými buňkami a EMA živými i mrtvými. Na základě tohoto principu lze kvantifikovat obě skupiny buněk.

Jsem si jistá, že v blízké době bude vyvíjeno spoustu dalších nových technik, které budou v této problematice více propracované a budeme díky nim dosahovat ještě lepších výsledků.

## 5 POUŽITÁ LITERATURA

- 1 **AYRAPETYAN, M., OLIVER, J. D.** The viable but non-culturable state and its relevance in food safety. *Current Opinion in Food Science*. 2016, 8, 127-133.
- 2 **BARTUŇKOVÁ, J., PAULÍK, M.** Vyšetřovací metody v imunologii. Praha, Grada, 2005, 1. vyd. ISBN 80-247-0691-1.
- 3 **BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J.** Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. Praha, Marvil, 1996, 2. vyd., 35-60. ISBN neuvedeno.
- 4 **BUSTIN, S. A.** Real-time PCR: Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics. 2005, 10, 1, 117-1125.
- 5 **BRANSKÁ, B., LINHOVÁ, M., PATÁKOVÁ, P., PAULOVÁ L., MELZUCH, K.** Stanovení viability mikroorganismů pomocí fluorescenční Analýzy. *Chemické listy*. 2011, 105, 586-593.
- 6 **BRIGGS, D. E., BOULTON, Ch. A., BROOKES, P. A. a STEVENS, R.** Brewing Science and Practice: Microbiological Media and the Cultivation of Micro-Organisms. 2004.
- 7 **CANGELOSI, G. A., MESCHKE, J. S.** Dead or alive: Molecular assessment of microbial viability. *Applied and environmental mikrobiology*. 2014, 80, 19, 5884-5891.
- 8 **CAWTHORN, D.-M., WITTHUHN, R. C.** Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide. *Journal of Applied Microbiology*. 2008, 105, 4, 1178-1185.
- 9 **CERF, A., CAU, J.-Ch., VIEU, Ch., DAGUE, E.** Nanomechanical Properties of Dead or Alive Single: Patterned Bacteria. 2009, 25, 10, 5731-5736.

- 10 **DAVEY, H. M.** Life, Death, and In-Between: Meanings and Methods in Microbiology. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, 77, 16, 5571-5576.
- 11 **DECKER, E.-M.** The ability of direct fluorescence-based, two-colour assays to detect different physiological states of oral streptococci. *Letters in Applied Microbiology*. 2001, 33, 3, 188-192.
- 12 **DIJK, J. A., BREUGELMANS, P., PHIPIPS, J., HAEST, P. J., SMOLDERS, E., SPRINGAEL, D.** Catalyzed reporter deposition-fluorescent *in situ* hybridization (CARD-FISH) detection of *Dehalococcoides*. *Journal of Microbiological Methods*. 2008, 73, 2, 142-147.
- 13 **DING, M., KASPERSSON, K., MURRAY, D., BARDELLE, C.** High-throughput flow cytometry for drug discovery: principles, applications, and case studies. *Drug Discovery Today*. 2017, 22, 12, 1844-1850.
- 14 **FRAGA, D., MEULIA, T., FENSTER, S.** Real-Time PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. 2014, 8, 1, 10.3.1-10.3.40.
- 15 **GEIS, P. A.** *Cosmetic microbiology: A practical approach*. New York, Taylor and Francis, 2006, 2. vyd. ISBN 0-8493-1453-4.
- 16 **GÖRNER, F., VALÍK, E.** *Aplikovaná mikrobiológia požívateľín: Princípy mikrobiológie požívateľín, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho pôvodu, ktorých zárodoky sú prenášané požívateľinami*. Bratislava, Malé centrum, 2004, 1. vyd., 31-32. ISBN 80-967064-9-7.
- 17 **GREENWOOD, D., SLACK, R. C. B., PEUTHERER, J. F., SCHINDLER, J.** *Lékařská mikrobiologie: Přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Praha, Grada, 1999, 23-58. ISBN 80-7169-365-0.

- 18 **GREENWOOD, D.** Medical microbiology: a guide to microbial infections: pathogenesis, immunity, laboratory investigation and control. Edinburgh, Churchill Livingstone, 2012, 20. vyd. ISBN 978-0-7020-4089-4.
- 19 **HALL, S. R.** Biotemplating-Complex Structures from Natural Materials: Viruses and Bacteria. Hackensack, Imperial College Press, 2009, 153-173. ISBN 978-1-61344-083-4.
- 20 **HATZINGER, P. B., PALMER, P., SMITH, R. L., PENARRIETA, C. T., YOSHINARI, T.** Applicability of tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity and viability of groundwater bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 2003, 52, 1, 47-58.
- 21 **HUNT, M.** Real time PCR. *Microbiology and Immunology: Board of Trustees of the University of South Carolina*. 2010, 907-914.
- 22 **INOUE, D., TSUTSUI, H., YAMAZAKI, Y., SEI, K., SODA, S., FUJITA, M., IKE, M.** Application of real-time polymerase chain reaction (PCR) coupled with ethidium monoazide treatment for selective quantification of viable bacteria in aquatic environment. *Water Science & Technology*. 2008, 58, 5, 1107.
- 23 **JAHAN-TIGH, R. R., RYAN, C., OBERMOSER, G., SCHWARZENBERGER, K.** Flow Cytometry. *Journal of Investigative Dermatology*. 2012, 132, 10, 1-6.
- 24 **JULÁK, J.** Klinicky významné bakterie. Praha, Triton, 2012, 13-15. ISBN 978-80-7387-588-6.
- 25 **KING, M. A.** Detection of dead cells and measurement of cell killing by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*. 2000, 243, 1-2, 155-166.
- 26 **KNIEL, M. K., MONTVILLE, K. E., THOMAS, J.** Food Microbiology: Introduction. American Society for Microbiology (ASM). 2017,4. vyd., 13-36.



- 27 **KUBOTA, K.** CARD-FISH for Environmental Microorganisms: Technical Advancement and Future Applications. *Microbes and Environments*. 2013, 28, 1, 3-12.
- 28 **LEI, K. F., WU, M.-H., HSU, Ch.-W., CHEN, Y.-D.** Real-time and non-invasive impedimetric monitoring of cell proliferation and chemosensitivity in a perfusion 3D cell culture microfluidic chip. *Biosensors and Bioelectronics*. 2014, 51, 16-21.
- 29 **LEVIN, R. E., SUN, D.-W.** DNA-based technique: Polymerase chain reaction (PCR). *Modern Techniques for Food Authentication*. Amsterdam, Elsevier/Academic Press, 2008, 411-476. ISBN: 978-0-12-374085-4.
- 30 **LI, Y., YANG, L., FU, J., YAN, M., CHEN, D., ZHANG, L.** The novel loop-mediated isothermal amplification based confirmation methodology on the bacteria in Viable but Non-Culturable (VBNC) state. *Microbial Pathogenesis*. 2017, 111, 280-284.
- 31 **LIU, Y., ZHONG, Q., WANG, J., LEI, S.** Enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in VBNC state by PMA-combined real-time quantitative PCR coupled with confirmation of respiratory activity. *Food Control*. 2018, 91, 85-91.
- 32 **LONGIN, C., PETITGONNET, C., GUILLOUX-BENATIER, M., ROUSSEAUX, S., ALEXANDRE, H.** Application of flow cytometry to wine microorganisms. *Food Microbiology*. 2017, 62, 221-231.
- 33 **LOPES, R. P., MOTA, M. J., GOMES, A. M., DELGADILLO, I., SARAIVA, J. A.** Application of High Pressure with Homogenization, Temperature, Carbon Dioxide, and Cold Plasma for the Inactivation of Bacterial Spores: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2018, 17, 3, 532-555.
- 34 **MANTI, A., BOI, P., AMALFITANO, S., PUDDU, A., PAPA, S.** Experimental improvements in combining CARD-FISH and flow cytometry for bacterial cell quantification. *Journal of Microbiological Methods*. 2011, 87, 3, 309-315.

- 35 **MASCOTTI, K., MCCULLOUGH, J., BURGER, S. R.** HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. *Transfusion*. 2000, 40, 6, 693-696.
- 36 **MOR-MUR, M., ESCRIBU, R., YUSTE, J.** Microbiological Aspects of High-Pressure Processing. *Emerging Technologies for Food Processing*. Elsevier, 2014, 77-90. ISBN 9780-1241-14791.
- 37 **MÜLLER, S., DAVEY, H.** Recent advances in the analysis of individual microbial cells. *Cytometry. Part A*. 2009, 75A, 2, 83-85.
- 38 **NEBE-VON-CARON, G., STEPHENS, P. J., HEWITT, C. J., POWELL, J. R., BADLEY, R. A.** Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Microbiological Methods*. 2000, 42, 1, 97-114.
- 39 **NETUSCHIL, L., AUSCHILL, T. M., SCULEAN, A., ARWEILER, N. B.** Confusion over live/dead stainings for the detection of vital microorganisms in oral biofilms-which stain is suitable? *BMC Oral Health*. 2014, 14, 1, 2-12.
- 40 **NOCKER, A., CAMPER, A. K.** Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, 72, 3, 1997-2004.
- 41 **NOCKER, A., RICHTER-HEITMANN, T., MONTIJN, R., SCHUREN, F., KORT, R.** Discrimination between live and dead cells in bacterial communities from environmental water samples analyzed by 454 pyrosequencing. *International Microbiology*. 2010, 13, 2, 59-65.
- 42 **NOGVA, H. K., DRØMTORP, S. M., NISSEN, H., RUDI, K.** Ethidium Monoazide for DNA-Based Differentiation of Viable and Dead Bacteria by 5'-nuclease PCR. *BioTechniques*. 2003, 34, 4, 804-813.

- 43 **NOVO, D., PERLMUTTER, N. G., HUNT, R. H., SHAPIRO, H. M.** Accurate flow cytometric membrane potential measurement in bacteria using diethyloxycarbocyanine and a ratiometric technique. *Cytometry*. 1999, 35, 1, 55-63.
- 44 **PAN, Y., BREIDT, F.** Enumeration of Viable *Listeria monocytogenes* Cells by Real-Time PCR with Propidium Monoazide and Ethidium Monoazide in the Presence of Dead Cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, 73, 24, 8028-8031.
- 45 **PERNTHALER, R., AMANN, J., PERNTHALER, A.** Fluorescence *in situ* hybridization and catalysed reporter deposition for the identification of marine bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*. 2002, 68, 6, 3094–3101.
- 46 **PRESCOTT, L. M., HARLEY, J. P., KLEIN, D. A.** Prokaryotic Cell Structure and Function. *Microbiology*. London, McGraw-Hill Companies, 2002, 5. vyd., 41-73.
- 47 **PROFT, T., BAKER, E. N.** Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria-structure, assembly and their role in disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009, 66, 4, 613-635.
- 48 **ROBINSON, R. K.** Bacteria: The bacterial cell. *Encyclopedia of Food Microbiology*. San Diego, Academic Press, 2000, 1-3, 158-168. ISBN 978-0-08-052359-0.
- 49 **RUDI, K., MOEN, B., DROMTORP, S. M., HOLCK, A. L.** Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, 71, 2, 1018-1024.
- 50 **SAINT-RUF, C., CORDIER, C., MEGRET, J., MATIC, I.** Reliable Detection of Dead Microbial Cells by Using Fluorescent Hydrazides. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010, 76, 5, 1674-1678.
- 51 **SANDLE, T.** Pharmaceutical Microbiology-Essentials for Quality Assurance and Quality Control: Bacterial Spore Stain. 2016, 103-113. ISBN 978-0-08-100044-1.

- 52 **SANDLE, T.** Pharmaceutical Microbiology-Essentials for Quality Assurance and Quality Control: A Short History of Culture Media. Pharmaceutical Microbiology. Elsevier, 2016, 47-61. ISBN 978-0-08-100044-1.
- 53 **SHAPIRO, H. M.** Microbial analysis at the single-cell level: tasks and techniques. Journal of Microbiological Methods. 2000, 42, 1, 3-16.
- 54 **SHAPIRO, H. M.** Practical flow cytometry. John Wiley and Sons, 2005, 4. vyd. ISBN 0-471-41125-6.
- 55 **SHIRAISHI, F., ZIPPEL, B., NEU, T. R., GERNOT, A.** *In situ* detection of bacteria in calcified biofilms using FISH and CARD-FISH. Journal of Microbiological Methods. 2008, 75, 1, 103-108.
- 56 **SCHIPPERS, A., NERETIN, L. N., KALLMEYER J., FERDELMAN, T. G., CRAGG, B. A., PARKES, R. J., JORGENSEN, B. B.** Prokaryotic cells of the deep sub-seafloor biosphere identified as living bacteria. Nature. 2005, 433, 7028, 858-861.
- 57 **SCHUYLER, R. G.** Wastewater biology: Bacteria. Alexandria, VA, Water Environment Federation, 2001, 2. vyd., 27-38. ISBN 978-1-57278-167-2.
- 58 **STANYON, R.** Fluorescence *in situ* Hybridization. The International Encyclopedia of Primatology. Hoboken, NJ, USA, John Wiley and Sons, 2016, 1-2. ISBN 9781-1191-79313.
- 59 **STEPHENS, P.J., MACKEY, B.M.** Recovery of Stressed Microorganism: Royal Society of Chemistry. 2012, 3. vyd., 39-65. ISBN 978-1-62198-128-2.
- 60 **STROHL, W. A., ROUSE, H., FISHER, B. D.** Microbiology. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2001. ISBN 0-397-51568-5.
- 61 **SUHR, H., WEHNERT, G., SCHNEIDER, K., BITTNER, C., SCHOLZ, T., GEISLER, P., JÄHNE, B., SCHEPER, T.** *In situ* microscopy for on-line characterization of cell-populations in bioreactors, including cell-concentration

- measurements by depth from focus. *Biotechnology and Bioengineering*. 1995, 47, 1, 106-116.
- 62 **ŠILHÁNKOVÁ, L.** Mikrobiologie pro potravináře a biotechnolog. Praha, Academia, 2002, 3. vyd., 29-56. ISBN 978-80-200-1703-1.
- 63 **TAWAKOLI, P. N., AL-AHMAD, A., HOTH-HANNIG, W., HANNIG, M., HANNIG, C.** Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm. *Clinical Oral Investigations*. 2013, 17, 3, 841-850.
- 64 **TSUCHIYA, K. D.** Fluorescence *In Situ* Hybridization. *Clinics in Laboratory Medicine*. 2011, 31, 4, 525-542.
- 65 **VOTAVA, M.** Lékařská mikrobiologie obecná. Brno, Neptun, 2005, 2. vyd., 35-79. ISBN 80-86850-00-5.
- 66 **WALKER, T. S.** Microbiology. Philadelphia, Saunders, 1998, 2-75. ISBN 0-7216-4641-7.
- 67 **WEI, N., FRIEHS, K., YOU, J., FLASCHEL, E., NATTKEMPER, T. W.** *In situ* dark field microscopy for on-line monitoring of yeast cultures. *Biotechnology Letters*. 2007, 29, 3, 373-378.
- 68 **VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN F., POPPE, B., VAN ROY N., DE PAEPE A., SPELEMAN, F.** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 2002, 3, 7, 1-12.
- 69 **WEI, N., SOMMER, B.** Cell Viability, Measurement. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*. Hoboken, NJ, USA, John Wiley and Sons, 2009, 1-7, 1474-1480. ISBN 9780-4717-99306.

70 **WHITE, D. D., CLAY, F. J.** Physiology and Biochemistry of Prokaryotes: Structure and Function. Oxford University Press., 2012, 4. vyd., 1-54. ISBN 978-1-62870-157-9.

71 **ZOOK, C. D., BUSTA, F. F.** Microscopy. Total Viable Counts. 1999, 2176-2180

## 6 INTERNETOVÉ ODKAZY OBRÁZKŮ

- 1 In: **ELUC** [online]. [cit. 2018-06-06].  
Dostupné z: <https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/21>
- 2 In: **Materiály do školy** [online]. [cit. 2018-06-06].  
Dostupné z: <http://www.materialy-do-skoly.cz/maturitni-otazky/biologie/houby/>
- 3 In: **Biology Libretexts: Unique Characteristics of Prokaryotic Cells** [online]. [cit. 2018-06-06].  
Dostupné z: [https://bio.libretexts.org/TextMaps/Microbiology/Book%3A\\_Microbiology\\_\(OpenStax\)/03%3A\\_The\\_Cell/3.3%3A\\_Unique\\_Characteristics\\_of\\_Prokaryotic\\_Cells](https://bio.libretexts.org/TextMaps/Microbiology/Book%3A_Microbiology_(OpenStax)/03%3A_The_Cell/3.3%3A_Unique_Characteristics_of_Prokaryotic_Cells)
- 4 In: **Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií: Přírodovědecká fakulta Masarikovy univerzity** [online]. [cit. 2018-06-19].  
Dostupné z: [https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni\\_mikrobiologie/web/pages/fluorescence.html](https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/fluorescence.html)
- 5 In: **Thermo Fisher scientific: LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit Protocol** [online]. [cit. 2018-06-19].  
Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/live-dead-baclight-bacterial-viability-protocol.html>
- 6 In: **Oddělení genetiky a šlechtitelských metod** [online]. [cit. 2018-06-19].  
Dostupné z: <https://www.vurv.cz/ogsm/fot2.htm#nogo>