

## STANOVENÍ VIABILITY MIKROORGANISMŮ POMOCÍ FLUORESCENČNÍ ANALÝZY

**BARBORA BRANSKÁ, MICHAELA LINHOVÁ,  
PETRA PATÁKOVÁ, LEONA PAULOVÁ  
a KAREL MELZUCH**

*Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Vysoká škola  
chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28  
Praha 6  
karel.melzuch@vscht.cz*

Došlo 11.1.11, přijato 17.2.11.

---

Klíčová slova: fluorescenční analýza; stanovení viability  
mikroorganismů; průtoková cytometrie

---

### Obsah

1. Úvod
2. Přístrojové vybavení
  - 2.1. Průtokový cytometr
3. Fluorescenční sondy k detekci viability
  - 3.1. Integrita cytoplazmatické membrány
  - 3.2. Intracelulární aktivita esterasy
  - 3.3. Transmembránový potenciál
  - 3.4. Respirace/dehydrogenasová aktivita
  - 3.5. Intracelulární pH
4. Závěr

### 1. Úvod

Zastoupení životaschopných neboli viabilních buněk v populaci je jednou z klíčových informací využívaných k hodnocení fyziologického stavu kultury, kontrole bioproduktu či jeho řízení, hodnocení kvality biomasy, biologických rizik atd. Nejčastější a zároveň i tradiční technikou stanovení životaschopnosti je tradiční kultivace mikroorganismů na pevných médiích. Tato metodika má ale svá omezení, a to zejména časovou náročnost, která neumožňuje dostatečně rychlou zpětnou odezvu na získaný výsledek. Problematické je taktéž její využití u těžko kultivovatelných mikroorganismů, které za daných podmínek či v určitém fyziologickém stavu na povrchu pevných médií nerostou, byť mají zachovány své životní funkce. Proto byly vyvinuty alternativní postupy stanovení viability, mezi něž mimo jiné patří právě fluorescenční analýza.

Stanovení viability buněk je založeno na detekci životně důležitých funkcí, které jsou sledovány pomocí selektivního značení fluorescenčními sondami. Škála komerčně dostupných fluorescenčních sond je velmi široká

a stále se rozrůstá, i když mnohé zatím zůstávají na okraji pozornosti, jiné jsou hojně využívány. Dominantní zastoupení má na trhu firma Molecular probes (Oregon, USA), která má patentovanou celou řadu fluorescenčních sond dostupných na trhu.

### 2. Přístrojové vybavení

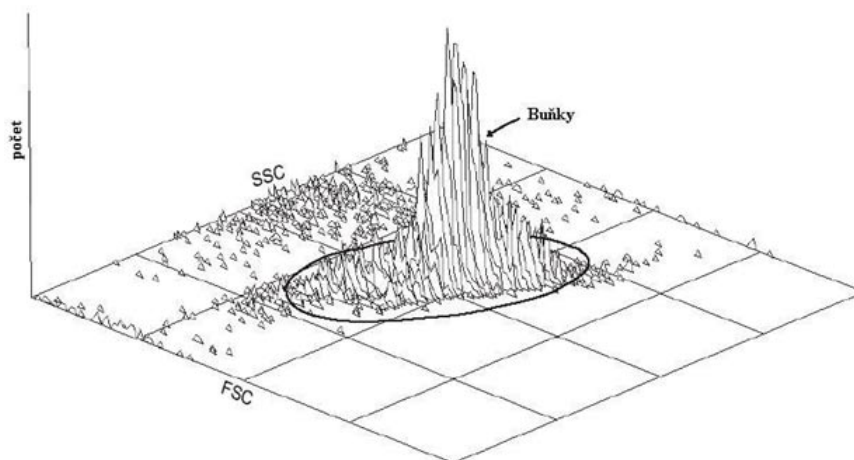
Ke sledování značených buněk je tradičně využíván fluorescenční mikroskop, který poskytuje náhled na jednotlivé buňky, počet analyzovaných částic za určitou dobu je však omezený a i s využitím analyzátorů obrazu mnohdy pracný. Fluorimetry naopak mohou měřit velký počet buněk, ale neumožňují pohled na vlastnosti konkrétní buňky. K velkému rozvoji fluorescenčního značení tak vedlo především rozšíření průtokové cytometrie, která umožňuje analýzu jednotlivých buněk rychlostí až 100 000 částic za sekundu. Většina průtokových cytometrů byla původně konstruována pro analýzu živočišných buněk, dnes jsou ale stále častěji využívány i v jiných oborech a z počtu odborných článků je zřetelná stoupající tendence mikrobiologických aplikací, které v roce 2009 tvořily již 8 % z celkového počtu publikací týkajících se průtokové cytometrie uváděných na Web of Science<sup>1</sup>.

#### 2.1. Průtokový cytometr

Průtokový cytometr je integrovaný systém využívající principů mikroskopie a citlivé detekce světelného signálu. Buňky jsou unášeny proudem nosné kapaliny do měrné cely, kde jsou analyzovány. Nejjednodušší průtokové cytometry detegují částice na základě tzv. Coulterova principu, kdy je průchod částice (buňky) měrnou celou zaznamenán jako změna elektrické vodivosti nebo rezistivity. Velikost změny je úměrná objemu procházející částice a je tedy využívána také ke stanovení jejich velikosti<sup>2</sup>.

Jinou možností je měření světelného signálu, kdy je při průchodu částice paprskem světla analyzováno kvantum fotonů dopadajících na fotodetektor zařazený jednak ve směru původního paprsku (označovaný jako „forward scatter“ – FSC nebo „forward angle lights scatter“ – FALS) a dále pod úhlem 90° („side scatter“ – SSC, „right angle lights scatter“ – RALS). Velikost prvně jmenovaného rozptylu je úměrná velikosti procházejících částic a množství odraženého světla odpovídá naopak jejich strukturální rozmanitosti<sup>2</sup>. I když u mikroorganismů, které se velikostně pohybují na hranici rozlišovací schopnosti dnešních průtokových cytometrů, je potřeba při využití těchto signálů, jakožto obrazu morfologických parametrů určité obezřetnosti<sup>3,4</sup>. Příklad separace buněk od ostatních částic pomocí FSC a SSC signálu je znázorněn na obr. 1.

Vedle systému detekce buněk jsou fluorescenční prů-



Obr. 1. Ukázka oddělení buněk *Saccharomyces cerevisiae* od nebuňčných částic na průtokovém cytometru pomocí „forward scatter“ (FSC) a „side scatter“ (SSC) signálů

tokové cytometry vybaveny zdrojem excitace fluorochromů, kterým bývá nejčastěji argonový laser nebo rtuťová výbojka, případně jejich kombinace a detekčním systémem s předřazenými filtry a zrcadly různých spektrálních vlastností ke specifické detekci fluorescence určité vlnové délky. Podrobněji bylo o principu průtokové cytometrie pojednáno v Chemických Listech<sup>5</sup>.

### 3. Fluorescenční sondy k detekci viability

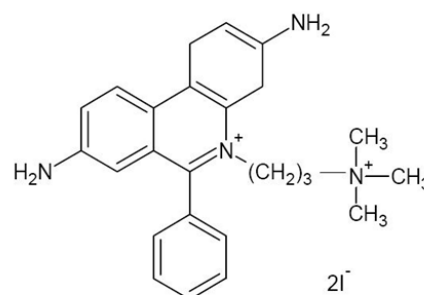
Z hlediska principu detekce viability lze fluorescenční sondy rozdělit do několika následujících skupin<sup>6</sup>: nejčastějšími jsou měření intracelulární esterasové aktivity, sledování membránové integrity a existence transmembránového potenciálu, v menší míře je pak u mikroorganismů využívána detekce respirační aktivity či měření intracelulárního pH.

#### 3.1. Integrity cytoplazmatické membrány

Stanovení viability buněk pomocí detekce membránové integrity je založeno na aplikaci látek, které za běžných podmínek neprocházejí neporušenými buněčnými membránami, případně jsou ihned vylučovány zpět do extracelulárního prostředí. Naopak, je-li cytoplazmatická membrána narušena natolik, že mohou do buňky projít, dojde k vazbě na složky buněčné hmoty a k zesílení a/nebo posunu spektra fluorescence<sup>2,7</sup>. Buňky s takto narušenými membránami či membránovými funkcemi nejsou považovány za životaschopné. Téměř výhradně se využívají látky, které se v buňce vážají na nukleové kyseliny, neboť ty se vyskytují ve všech buňkách v dostatečném množství a umožňují tak univerzální použití u většiny mikroorganismů.

Do této skupiny patří vůbec nejrozšířenější fluorescenční sonda propidium jodid (obr. 2), který je využíván v celé řadě mikrobiologických studií, jak pro detekci viability kvasinek<sup>8</sup>, tak bakterií<sup>9,10</sup>. Jde o fenantrolinové interkalační činidlo, které se váže na nukleové kyseliny a po vazbě dochází k posunu a zesílení intenzity fluorescence emitované v červené oblasti spektra.

Jako alternativa k propidium jodidu mohou být využita barviva řady SYTOX<sup>®</sup> (Molecular probes, USA). Jsou k dispozici v různých spektrálních variantách, disponují až 500-násobným zesílením fluorescence po vazbě na nukleové kyseliny<sup>11</sup> a jsou tak vhodnou volbou především pro bakterie<sup>12</sup>, kde díky jejich malé velikosti a nižšímu obsahu nukleových kyselin, v porovnání s kvasinkami a živočišnými buňkami, může být signál propidium jodidu pro některé méně citlivé přístroje nedostatečný<sup>11</sup>.



Obr. 2. Strukturální vzorec propidium jodidu

Ethidium bromid je strukturně podobný propidium jodidu, ale nese pouze jeden kladný náboj a může procházet intaktní cytoplazmatickou membránou bakterií i kvasinek, aktivní buňka je však schopná jej pumpovat opět ven<sup>3</sup> a není tak značena. Těto vlastnosti se s výhodou využívá k detekci menších poškození buněčných funkcí<sup>13,14</sup>, než je možné zachytit pomocí propidium jodidu.

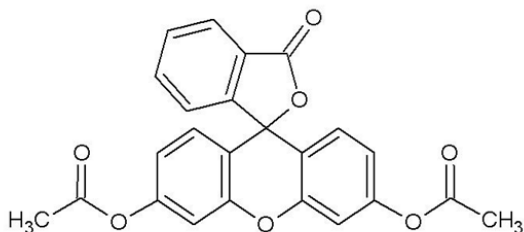
S menší frekvencí jsou pak v literatuře zmiňována cyaninová barviva monomerní (TOPRO<sup>®</sup>)<sup>15</sup> a dimerní (TOTO<sup>®</sup>)<sup>16</sup>, ethidium homodimer<sup>17</sup> a další.

Za bližší zmínku stojí také ethidium monoazid (EMA), který se po fotolýze váže na DNA kovalentně a umožňuje tak pozdější analýzu viability i ve fixovaném vzorku. Těto vlastnosti je v posledních letech využíváno zejména v kombinaci s polymerasovou řetězovou reakcí (PCR), tzv. EMA-PCR, kdy kovalentní vazba znemožní DNA amplifikaci a selektivně je amplifikována pouze DNA z viabilních buněk<sup>18</sup>.

### 3.2. Intracelulární aktivita esteras

Další možností, jak zjistit životaschopnost mikroorganismu, je sledování intracelulární enzymové aktivity. Využívají se převážně lipofilní nefluorescentní sondy schopné procházet volnou difúzí do buněk, tam jsou činností enzymů přeměněny na fluorescentní látky nesoucí náboj, díky čemuž jsou v buňce zadržovány a koncentrovány. Vedle enzymové aktivity jde tedy zároveň o stanovení membránové integrity, protože je-li cytoplazmatická membrána buňky narušena, fluorochromy jsou opět vyplavovány ven do extracelulárního prostoru. Nejběžnější jsou substráty intracelulárních esteras, které jsou ve všech žijících organismech přirozeně přítomné.

Při výběru vhodné sondy je potřeba zohlednit zejména její schopnost průniku do buněk a následnou retenci v intracelulárním prostoru. Jednou z nejstarších fluorescenčních sond pro určování viability je fluorescein diacetát (FDA)<sup>19</sup> (obr. 3), jehož difúze do buněk je rychlá, ale vznikající fluorescein bývá špatně zadržován<sup>20</sup>. Fluorescein diacetát může být nahrazen např. karboxyfluorescein diacetátem (CFDA), který vykazuje po hydrolyze lepší retenci (větší negativní náboj za fyziologického pH), ale jeho transport do buněk je výrazně pomalejší<sup>21</sup>. Snaha



Obr. 3. Strukturní vzorec fluorescein diacetátu

vyřešit problémy převážně s retencí barviva vedla k rozšíření i dalších derivátů fluoresceinu, v mikrobiologických aplikacích se využívají např. Calcein-AM<sup>22</sup> (zkratka AM značí acetoxyethyl ester), BCECF-AM<sup>23</sup> (2',7'-bis-(2-karboxyethyl)-5-(a-6)-karboxyfluorescein, acetoxyethyl ester), ChemChrome<sup>®</sup> (Chemunex, Francie)<sup>24,25</sup> a další.

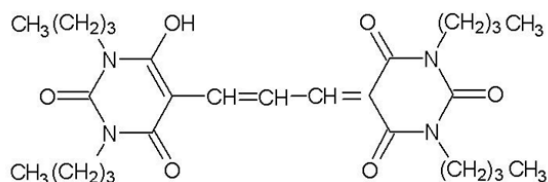
Přes velké množství nových fluorogenních substrátů se FDA<sup>19,26,27</sup> a CFDA<sup>28</sup> stále těší velké oblibě, u složitějších derivátů fluoresceinu jsou časté problémy s nízkou rozpustností látek ve vodném prostředí<sup>20</sup> a horší propustností do buněk<sup>21</sup>. U G<sup>-</sup> bakterií se dokonce uvádí, že jsou pro lipofilní fluorogenní sondy nepropustné a vyžadují permeabilizaci vnější membrány<sup>29</sup>. Mezi další omezení těchto sond patří také aktivní vylučování barviva membránovými pumpami<sup>30,31</sup> z buňky ven, proto musí být z reakčního prostředí důkladně odstraněny zdroje energie a k dalšímu zpomalení aktivního transportu se využívá nízkých teplot. Některé studie naopak doporučují využití schopnosti buněk vylučovat vzniklý fluorochrom jako vhodnější marker viability než je samotná konverze fluorochromu a jeho retence v buňce<sup>32,33</sup>. Celkové množství hydrolyzovaného fluoresceinu, tj. i extracelulární formu, lze využít k monitorování biologické aktivity složitějších mikrobiálních konsorcií<sup>26,34</sup>. V této souvislosti by s určitou opatrností měla být používána komplexní média, v nichž by mohlo docházet k abiotickému rozkladu derivátů fluoresceinu<sup>35</sup>.

Karboxyfluorescein diacetát sukcinimidyl ester (CFDA-SE) je dalším fluorogenním esterem, který je ale na rozdíl od CFDA aktivní buňkou hydrolyzován na amino-reaktivní fluorofor, který se v buňce váže na proteiny za vzniku stabilní fluorescentní sloučeniny. Jeho využití ke stanovení viability bakterií je rozporuplné, Hoefel a spol.<sup>36</sup> uvádí, že na rozdíl od CFDA nebyla možná diskriminace mezi aktivními a neaktivními buňkami pro více druhů bakterií. Na druhou stranu může být vhodným nástrojem ke sledování buněčného dělení, neboť během dělení jsou předávány CF-SE značené molekuly a s každou další generací dochází ke snižování intenzity původní fluorescence<sup>37</sup>. CFDA-SE se také využívá ke stanovení intracelulárního pH<sup>38</sup>.

Kombinovaného efektu metabolické aktivity a membránové integrity využívají sondy FUN<sup>®</sup> (Molecular probes, USA) speciálně vyvinuté pro stanovení viability kvasinek a plísní. Barvivo volně prochází do buněk, které jsou značeny žlutozeleně, vlivem metabolické aktivity a při zachování membránové integrity je FUN<sup>®</sup> konvertováno na červenou či žluto-oranžovou formu lokalizovanou ve vakuolách<sup>7</sup>. Mikroskopický obraz poskytuje poměrně jednoznačné rozlišení těchto forem, nicméně u cytometrické analýzy je oddělení populací problematické<sup>39</sup>.

### 3.3. Transmembránový potenciál

Indikátorem buněčné viability je rovněž transmembránový potenciál udržovaný na cytoplazmatické membráně činností iontových pump. K měření tohoto potenciálu se



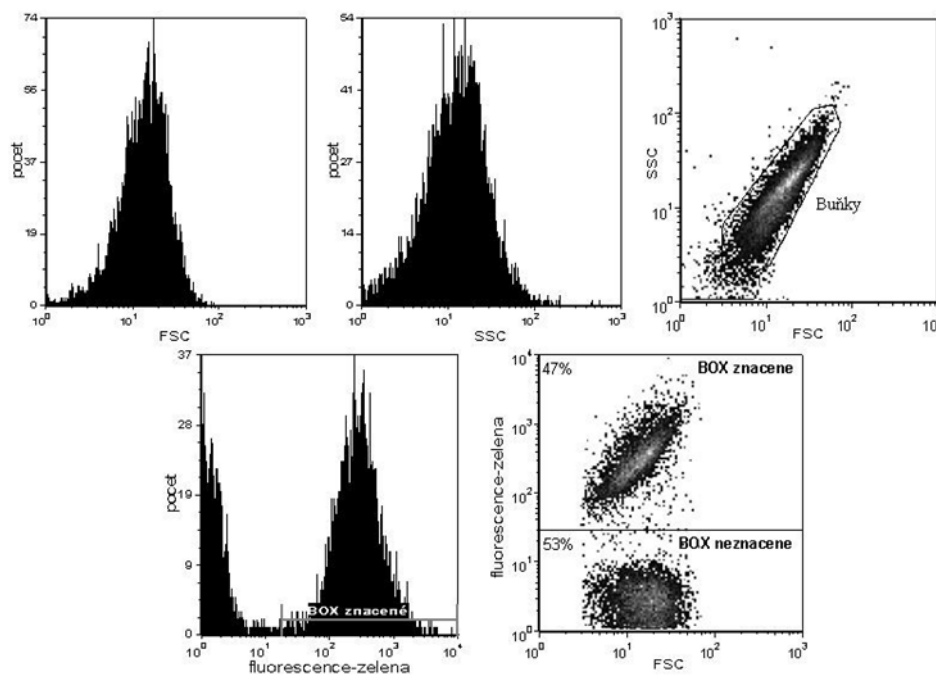
Obr. 4. Strukturální vzorec bis-oxonolu

používají tzv. „distribuční sondy“, jde o lipofilní barviva, která mohou volně procházet cytoplazmatickou membránou do buněk a hromadí se v nich závisle na jejich náboji. Rozlišujeme kationické sondy, které jsou akumulovány polarizovanými buňkami a anionické, akumulované depolarizovanými buňkami. Tradičně je jako kationická sonda využíván rhodamin 123 (cit.<sup>40</sup>), ale dnes mu konkurují zejména cyaninová barviva, sestávají ze dvou identických heterocyklických kruhů obsahujících ve své molekule vedle dusíku kyslík, síru nebo  $(C(CH_3)_2)$  skupinu a spojených methinovým můstkem<sup>41</sup>. Mezi typické zástupce patří DiOC<sub>6</sub>(3) (3,3'-dihexyloxakarbo cyanin jodid) a DiOC<sub>2</sub>(3) (3,3'-diethyloxakarbo cyanin jodid).

Z anionických sond je nejčastěji citován bis-oxonol (obr. 4), pod tímto označením mohou být uváděny chemicky příbuzné látky jiných spektrálních vlastností, ale ve většině případů je takto nazýván bis-(1,3-dibutylbarbiturová kyselina) trimethin oxonol (DiBAC<sub>4</sub>(3)), který je mj. uváděn i pod zkratkou BOX (cit.<sup>7</sup>).

Využití potenciometrických sond k detekci viability je poměrně komplikované, neboť koncentrace barviva je v intracelulárním prostoru ovlivněna nejen velikostí membránového potenciálu, ale také velikostí buněk samotných, přítomností vazebných míst, činností transmembránových pump a v neposlední řadě propustností obalových vrstev, kdy u G<sup>-</sup> bakterií je toto často limitujícím faktorem<sup>3,29,42</sup>. Nový pohled na aplikaci potenciometrických sond přinesla práce Novo a spol.<sup>41</sup>, ve které se uvádí, že standardně sledovaná fluorescence cyaninových sond emitovaná v zelené oblasti spektra vykazuje u bakteriálních populací příliš velkou variabilitu a je téměř nezávislá na velikosti transmembránového potenciálu, vedle toho, poměr červené ku zelené fluorescenci citlivě reflektuje i velmi malé změny v membránovém potenciálu, je-li experiment veden v mírném přebytku barviva. I tato metoda má ale určité limitace pro G<sup>-</sup> bakterie<sup>41</sup>.

V praxi je jednodušší značení depolarizovaných buněk bis-oxonolem, kdy jsou značeny převážně metabolicky neaktivní buňky (obr. 5) a bis-oxonol je tak k detekci viability většinou druhou volbou po propidium jodidu. Zatím-



Obr. 5. Příklad výsledných histogramů a bodových diagramů pro cytometrické stanovení viability *Pichia pastoris* pomocí bis-oxonolu (BOX). Nahore jsou uvedeny histogramy „forward scatter“ (FSC) a „side scatter“ (SSC) parametrů a bodový diagram pro jejich kombinaci (v uvedeném pořadí), který je nečastěji užíván pro oddělení buněk od jiných částic. Dole jsou znázorněny dvě možnosti separace značených a neznačených buněk, vlevo na základě histogramu získaného měřením fluorescence v zelené oblasti spektra, vpravo pomocí kombinace intenzity fluorescence a signálu FSC, který odpovídá velikosti buněk

Tabulka I  
Přehled uvedených fluorescenčních sond

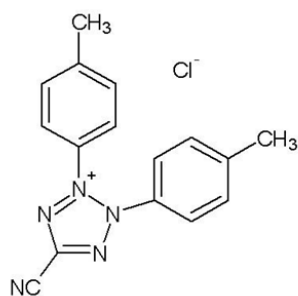
Sonda	Aplikace	Excitační/Emisní maximum [nm]
Propidium jodid	integrita cytoplazmatické membrány	536/623
Ethidium bromid	integrita cytoplazmatické membrány, funkční transmembránové pumpy	510/595
Sytox <sup>®</sup>	integrita cytoplazmatické membrány	470/480 (Blue), 504/523 (Green), 547/570 (Orange), 640/658 (Red)
TOTO <sup>®</sup>	integrita cytoplazmatické membrány	514/533 (TOTO1 <sup>®</sup> ), 642/660 (TOTO3 <sup>®</sup> )
TO-PRO <sup>®</sup>	integrita cytoplazmatické membrány	515/533 (TO-PRO1 <sup>®</sup> ), 462/661 (TO-PRO3 <sup>®</sup> )
Ethidium homodimer-1	integrita cytoplazmatické membrány	528/617
Ethidium monoazid (EMA)	integrita cytoplazmatické membrány, EMA-PCR	518/605 po fotolýze
Fluorescein diacetát	esterasová aktivita, intracelulární pH	494/521
Karboxyfluorescein diacetát	esterasová aktivita, intracelulární pH	494/518
Calcein-AM	esterasová aktivita	494/517
Bis-karboxyethyl karboxyfluorescein, acetoxymethyl ester (BCECF-AM)	esterasová aktivita, intracelulární pH	482/520
ChemChrome <sup>®</sup>	esterasová aktivita	488/520
Karboxyfluorescein diacetát sukcinimidyl ester (CFDA-SE)	esterasová aktivita, intracelulární pH	494/518
FUN <sup>®</sup>	enzymová aktivita a membránová integrita u nižších hub	482/520 (FUN1 <sup>®</sup> )
Rhodamin 123	transmembránový potenciál	507/529
Diethyloxakarboyanin jodid (DiOC <sub>2</sub> (3))	transmembránový potenciál	482/497
Dihexyloxakarboyanin jodid (DiOC <sub>6</sub> (3))	transmembránový potenciál	484/501
Bis-oxonol	transmembránový potenciál - depolarizované buňky	488/525
Kyano-di-tolyl tetrazolium chlorid (CTC)	respirace, dehydrogenasová aktivita	450/630

<sup>®</sup> – registrovaná ochranná známka

co kationické sondy se u kvasinek akumulují přednostně v mitochondriích a výsledná fluorescence je mj. odrazem mitochondriální aktivity<sup>43</sup>, výhodou bis-oxonolu je možnost univerzálního použití jak u kvasinek<sup>44</sup>, tak bakterií<sup>20,45</sup>. Beck a Huber<sup>46</sup> dokonce uvádějí, že bis-oxonol byl jako jediný ze široké škály testovaných sond schopen detegovat viabilitu u hypertermofilních mikroorganismů. Přesto nejedna publikace naznačuje, že určitá frakce buněk značená bis-oxonolem je schopná regenerace a následně proliferace<sup>14,39</sup>.

### 3.4. Respirace/dehydrogenasová aktivita

Schopnost respirace u aerobních mikroorganismů lze měřit pomocí indikátorů oxidativního metabolismu, jakými jsou například tetrazoliové soli. Jejich využití je poměrně oblíbené, protože není omezeno pouze na pracoviště vybavené fluorescenčními mikroskopy a průtokovými cytometry. Uvnitř buňky jsou nebarevné tetrazoliové soli redukovány za účasti dehydrogenas přítomných v elektronovém transportním systému na barevný formazan, který



Obr. 6. Strukturální vzorec kyano-di-(*p*-tolyl) tetrazolium chloridu (CTC)

Ize detegovat i běžnou světelnou mikroskopií<sup>47</sup> nebo spektrofotometricky<sup>48</sup> po extrakci z buněčné hmoty. Průtokovou cytometrií je možné potvrdit přítomnost formazanu vedle fluorescenčního signálu také ze změny FSC a SSC signálu<sup>2</sup>. Další výhodou oproti většině dříve jmenovaných sond je možnost následné fixace buněk a analýzy s odstupem několika hodin i dní. Nevýhodou je naopak delší časový interval nutný k vytvoření pozorovatelného krystalu a značná toxicita těchto sond. Nicméně Hatzinger a spol.<sup>49</sup> uvádí, že většina bakterií usmrcená působením tetrazoliových solí obsahovala viditelný krystal formazanu a naopak u bakterie *Pseudomonas fluorescens*, jejíž kultivovatelnost nebyla přítomností tetrazoliových solí ovlivněna, vytvořilo po 24 h krystal jen malé procento populace.

Tetrazoliové soli se využívají ke stanovení viability jak kvasinek<sup>47</sup>, tak aerobních<sup>50</sup> a dokonce i anaerobních bakterií<sup>51</sup>, ale fluorescenční analýza je mnohem rozšířenější pro bakterie než kvasinky. U kvasinek a plísní se jedná většinou o spektrofotometrické stanovení formazanu extrahovaného z vláknitých struktur<sup>48,52</sup>, u nichž je jiné stanovení viability poměrně komplikované. Tetrazoliových solí využívaných ke stanovení viability, redox potenciálu či respirační aktivity je celá řada, jsou označovány většinou třípísmennou zkratkou, ale ne všechny tvoří fluorescenční produkty. Ve fluorescenční analýze je nejčastěji citován CTC, tedy 5-kyano-2,3-di-(*p*-tolyl) tetrazolium chlorid (cit.<sup>53-56</sup>).

### 3.5. Intracelulární pH

Dalším významným markerem buněčné viability je schopnost „živé“ buňky udržovat si stálou hodnotu vnitřního pH. Intracelulární pH lze sledovat a měřit pomocí fluorescenčních sond, které mají pH-dependentní excitační a emisní spektrum, kdy v určitém rozmezí hodnot pH dochází ke změně intenzity a/nebo posunu jednotlivých maxim. Mezi takové sondy patří již zmiňované látky: fluorescein, karboxyfluorescein a jeho deriváty, nejčastěji CFDA-SE. Měření intracelulárního pH jako indikátoru viability mikroorganismů lze využít jak u bakterií<sup>57</sup>, tak

kvasinek<sup>58</sup>, ale oproti výše popsaným technikám je využíváno poměrně zřídka.

## 4. Závěr

Stanovení viability mikroorganismů pomocí fluorescenčního značení je stále více oblíbenou metodou zejména díky rychlosti a jednoduchosti, kterou mj. umožňuje průtoková cytometrie. Přesto, že posledních 20 let přineslo nemálo poznatků na toto téma, neutichá polemika ohledně relevance získaných výsledků a to hlavně proto, že chybí uznávaná referenční metoda stanovení životaschopnosti buněk. Kultivační technika, kdy je stanoven počet jedinců tvořících kolonie, umožňuje jen částečnou kontrolu. Jednak existuje celá řada mikroorganismů, které jsou tzv. nekultivovatelné (např. nejsou známy podmínky kultivace, netvoří na plotnách kolonie) a za druhé existují stádia, kdy buňka není schopna proliferace, ale je stále metabolicky aktivní. Určité odpovědi na otázky vztahu mezi kultivovatelností a fluorescenčním značením přináší třídíže buněk, které mohou být integrální součástí průtokových cytometrů a umožňují přenos částice definovaných spektrálních vlastností na živnou půdu, sklíčko či do roztoku pro následné zpracování<sup>2</sup>.

Právě srovnání kultivovatelnosti a značení buněk jednotlivými sondami ukázalo, že mnohé jsou vhodnými ukazateli fyziologických změn, ale ne zcela vhodnými indikátory reprodukčních schopností mikroorganismů<sup>14,39</sup>, proto je k získání podrobnějších informací o fyziologickém stavu s oblibou využívána kombinace více fluorescenčních sond<sup>9,14,57</sup>.

Navíc, mikroorganismy představují strukturně i funkčně nesmírně rozmanitou skupinu a sondy, které výborně fungují u jednoho mikroorganismu, mohou selhat u jiného<sup>10</sup>. Optimalizace, ověření metodiky a správná interpretace dat je tedy nejkomplicovanější částí fluorescenční analýzy mikroorganismů. I tak má tato metoda ve spojení s průtokovou cytometrií obrovský potenciál a lze do budoucna očekávat, že se stane běžnou praxí, stejně, jako je tomu v humánní medicíně při diagnostice různých onemocnění.

*Tato práce byla realizována s finanční podporou MŠMT, výzkumný záměr MŠM6046137305.*

## LITERATURA

- Müller S., Davey H.: *Cytometry* 75A, 83 (2009).
- Shapiro H. M.: *Practical Flow Cytometry*, 3. vyd. Wiley-Liss, Inc., USA 1995.
- Shapiro H. M.: *J. Microbiol. Methods* 42, 3 (2000).
- Nebe von Caron G.: *Cytometry* 75A, 86 (2009).
- Novák J., Basařová G., Fiala J., Dostálek P.: *Chem. Listy* 102, 183 (2008).
- Breeuwer P., Abee T.: *Int. J. Food Microbiol.* 55, 193 (2000).
- Haughland P. *The Handbook-A Guide to Fluorescent*

- Probes and Labeling Technologies. Molecular Probes. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook.html>, staženo 14.6.2010
8. Hohenblum H., Borth N., Mattanovich D.: *J. Biotechnol.* *102*, 281 (2003).
  9. Hewitt C. J., Nebe-Von Caron G., Axelsson B., McFarlane C. M., Nienow A. W.: *Biotechnol. Bioeng.* *70*, 381 (2000).
  10. Shi L., Günther S., Hübschmann T., Wick L. Y., Harms H., Müller S.: *Cytometry 71A*, 592 (2007).
  11. Roth B. L., Poot M., Yue S. T., Millard P. J.: *Appl. Environ. Microbiol.* *63*, 2421 (1997).
  12. Lebaron P., Catala P., Parthuisot N.: *Appl. Environ. Microbiol.* *64*, 2697 (1998).
  13. Jernaes M. W., Steen H. B.: *Cytometry 17A*, 302 (1994).
  14. Nebe-von Caron G., Stephens P. J., Badley R. A.: *J. Appl. Microbiol.* *84*, 988 (1998).
  15. Cotroneo N., Harris R., Perlmutter N., Beveridge T., Silverman J. A.: *Antimicrob. Agents Ch.* *52*, 2223 (2008).
  16. Bunthof C. J., van Schalkwijk S., Meijer W., Abee T., Hugenholtz J.: *Appl. Environ. Microbiol.* *67*, 4264 (2001).
  17. Kaneshiro E. S., Wyder M. A., Yi-Ping Wu, Cushion M. T.: *J. Microbiol. Methods 17*, 1 (1993).
  18. Inoue D., Tsutsui H., Yamazaki Y., Sei K., Soda S., Fujita M., Ike M.: *Water Sci. Technol.* *58*, 1107 (2008).
  19. Rotman B., Papermaster B. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* *55*, 134 (1966).
  20. Jepras R. I., Carter J., Pearson S. C., Paul F. E., Wilkinson M. J.: *Appl. Environ. Microbiol.* *61*, 2696 (1995).
  21. Breeuwer P., Drocourt J. L., Bunschoten N., Zwietering M. H., Rombouts F. M., Abee T.: *Appl. Environ. Microbiol.* *61*, 1614 (1995).
  22. Comas-Riu J., Vives-Rego J.: *J. Microbiol. Methods 34*, 215 (1999).
  23. Gaines S., James T. C., Folan M., Baird A. W., O'Farrelly C.: *J. Microbiol. Methods 54*, 315 (2003).
  24. Parthuisot N., Catala P., Lemarchand K., Baudart J., Lebaron P.: *J. Appl. Microbiol.* *89*, 370 (2000).
  25. Herrero M., Quirós C., García L. A., Díaz M.: *Appl. Environ. Microbiol.* *72*, 6725 (2006).
  26. Battin T. J.: *Sci. Total Environ.* *198*, 51 (1997).
  27. Malacrino P., Zapparoli G., Torriani S., Dellaglio F.: *J. Microbiol. Methods 45*, 127 (2001).
  28. Bouchez J. C., Cornu M., Danzart M., Leveau J. Y., Duchiron F., Bouix M.: *Biotechnol. Bioeng.* *86*, 520 (2004).
  29. Joux F., Lebaron P.: *Microbes Infect.* *2*, 1523 (2000).
  30. Molenaar D., Bolhuis H., Abee T., Poolman B., Konings W. N.: *J. Bacteriol.* *174*, 3118 (1992).
  31. Yang H. C., Mikami Y., Imai T., Taguchi H., Nishimura K., Miyaji M., Branchini M. L. M.: *Mycoses 44*, 368 (2001).
  32. Bunthof C. J., van den Braak S., Breeuwer P., Rombouts F. M., Abee T.: *Appl. Environ. Microbiol.* *65*, 3681 (1999).
  33. Ananta E., Heinz V., Knorr D.: *Food Microbiol.* *21*, 567 (2004).
  34. Schnuerer J., Rosswall T.: *Appl. Environ. Microbiol.* *43*, 1256 (1982).
  35. Clarke J. M., Gillings M. R., Altavilla N., Beattie A. J.: *J. Microbiol. Methods 46*, 261 (2001).
  36. Hoefel D., Grooby W. L., Monis P. T., Andrews S., Saint C. P.: *J. Microbiol. Methods 52*, 379 (2003).
  37. Ueckert J. E., Nebe von-Caron G., Bos A. P., ter Steeg P. F.: *Lett. Appl. Microbiol.* *25*, 295 (1997).
  38. Hornbæk T., Nielsen A. K., Dynesen J., Jakobsen M.: *FEMS Microbiol. Lett.* *236*, 145 (2004).
  39. Deere D., Shen J., Vesey G., Bell P., Bissinger P., Veal D.: *Yeast 14*, 147 (1998).
  40. Kaprelyants A. S., Kell D. B.: *J. Appl. Bacteriol.* *72*, 410 (1992).
  41. Novo D., Perlmutter N. G., Hunt R. H., Shapiro H. M.: *Cytometry 35*, 55 (1999).
  42. Comas-Riu J., Rius N.: *J. Ind. Microbiol. Biot.* *36*, 999 (2009).
  43. Porro D., Smeraldi C., Martegani E., Ranzi B. M., Alberghina L.: *Biotechnol. Progr.* *10*, 193 (1994).
  44. Boyd A. R., Gunasekera T. S., Attfeld P. V., Simic K., Vincent S. F., Veal D. A.: *FEMS Yeast Res.* *3*, 11 (2003).
  45. Ben Amor K., Breeuwer P., Verbaarschot P., Rombouts F. M., Akkermans A. D. L., De Vos W. M., Abee T.: *Appl. Environ. Microbiol.* *68*, 5209 (2002).
  46. Beck P., Huber R.: *FEMS Microbiol. Lett.* *148*, 11 (1997).
  47. Trevors J. T., Merrick R. L., Russell I., Stewart G. G.: *Biotechnol. Lett.* *5*, 131 (1983).
  48. Meshulam T., Levitz S. M., Christin L., Diamond R. D.: *J. Infect. Dis.* *172*, 1153 (1995).
  49. Hatzinger P. B., Palmer P., Smith R. L., Penarrieta C. T., Yoshinari T.: *J. Microbiol. Methods 52*, 47 (2003).
  50. Créach V., Baudoux A. C., Bertru G., Le Rouzic B.: *J. Microbiol. Methods 52*, 19 (2003).
  51. Walsh S., Lappin-Scott H. M., Stockdale H., Herbert B. N.: *J. Microbiol. Methods 24*, 1 (1995).
  52. Levitz S. M., Diamond R. D.: *J. Infect. Dis.* *152*, 938 (1985).
  53. López-Amorós R., Comas J., García M. T., Vives-Rego J.: *FEMS Microbiol. Ecol.* *27*, 33 (1998).
  54. Gruden C. L., Khijniak A., Adriaens P.: *J. Microbiol. Methods 55*, 865 (2003).
  55. Gunasekera T. S., Veal D. A., Attfeld P. V.: *Int. J. Food Microbiol.* *85*, 269 (2003).
  56. Whiteley A. S., Griffiths R. I., Bailey M. J.: *J. Microbiol. Methods 54*, 257 (2003).
  57. Nebe-von-Caron G., Stephens P. J., Hewitt C. J., Powell J. R., Badley R. A.: *J. Microbiol. Methods 42*, 97 (2000).

**B. Branská, M. Linhová, P. Patáková, L. Paulová, and K. Melzoch** (*Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Fluorescence Analysis as a Tool for Determination of Viability of Microorganisms**

Fluorescence analysis brings a new insight into cell viability assay, which is based on selective staining of cell attributes and functions. A wide variety of fluorescent probes are now available. The most frequently employed methods for detection of the viability are markers of membrane integrity, intracellular esterase activity, the existence of transmembrane potential, respiration activity and maintenance of intracellular pH. Although in many microbial strains the use of a single fluorescent probe is sufficient for determination of whether the cell is dead or alive, a combination of two or more stains is recommended for better understanding of cell physiology and its changes. An increasing number of publications indicates that the fluorescence staining together with flow cytometry, which enables rapid and precise analysis of thousands of cells within seconds, can serve as a powerful tool for the determination of the microbial culture viability and heterogeneity.