

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4131-Zemědělství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Katedra: Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Sledování životaschopnosti fytopatogenních bakterií po
ošetření nízkoteplotním plazmatem**

Autor bakalářské práce: Marta Zemanová

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

Konzultant bakalářské práce: Doc. Ing. Ivan Mráz, CSc.

České Budějovice 2014

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta zemědělská

Akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Marta ZEMANOVÁ**
Osobní číslo: **Z11343**
Studijní program: **B4131 Zemědělství**
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**
Název tématu: **Sledování životaschopnosti fytopatogenních bakterií po ošetření nízkoteplotním plazmatem**
Zadávací katedra: **Katedra rostlinné výroby a agroekologie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Obsah: Desetinné členění s uvedením stran jednotlivých kapitol bakalářské práce.

Úvod: Stručný nástin problému a aktuální situace v oblasti ošetřování bakterií nízkoteplotním plazmatem.

Literární přehled: Charakteristika a význam použitých bakteriálních druhů, obecný popis přístrojů pro vyvíjení nízkoteplotního plazmatu, princip ostatních použitých metod.

Cíl práce: Jednotlivé cíle bakalářské práce shrnuté v bodech.

Materiál a metody: Detailní popis bakteriálních kmenů (původ, kultivace, měření koncentrace), přesné hodnoty plazmování, způsob vyhodnocení získaných dat.

Výsledky a diskuze: Vyhodnocení účinku nízkoteplotního plazmatu na fytopatogenní bakterie, porovnání vlastních výsledků s literárními údaji, posouzení možností praktického uplatnění dosažených výsledků, poznatků a doporučení.

Závěr: Přehledné shrnutí nejdůležitějších poznatků, závěrů a doporučení, vyplývající z řešené problematiky.

Seznam použité literatury: V abecedním řazení podle ČSN 01 01 97 "Bibliografická citace".

Rozsah grafických prací: 5 stran
Rozsah pracovní zprávy: 30 - 40 stran
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Kaprálek F. Fyziologie bakterií. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 1986, 608s. (Vybrané kapitoly)
Kúdela V., Nováček A., Fucikovsky L. Rostlinolékařská bakteriologie. Academia Praha, 2002, 347 s.
Sedláček I. Taxonomie prokaryot. Masarykova univerzita v Brně, 2007, 270 s. (Vybrané kapitoly).
Literární rešerže z databází: AGRIS, Web of Science, Biological Abstracts a další

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Pavel Beran, Ph.D.
Katedra rostlinné výroby a agroekologie
Konzultant bakalářské práce: Ing. Ivan Mráz, CSc.
Ostatní konzultanti: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Datum zadání bakalářské práce: 7. prosince 2012
Termín odevzdání bakalářské práce: 15. dubna 2014

prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.
děkan

ČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
Strojní oddělení
Studentův 13
302 02 České Budějovice

L.S.

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 7. prosince 2013

Prohlášení

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

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

V Českých Budějovicích dne 11. 4. 2014

.....

Marta Zemanová

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu bakalářské práce Ing. Pavlu Beranovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a trpělivost při vypracovávání bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala doc. Ing. Ivanu Mrázovi, CSc., za cenné rady a připomínky.

Abstrakt

Bakalářská práce je zaměřena na sledování životaschopnosti fytopatogenních bakterií po ošetření nízkoteplotním plazmatem. K ošetření bakterií byl použit přístroj Gliding Arc. Vyhodnocení bylo prováděno pomocí chemické reagentie PrestoBlue s následným spektrofotometrickým vyhodnocením a výpočtem CFU/ml z regresní rovnice odvozené z kalibrační křivky. Byl prokázán vliv nízkoteplotního plazmatu na životaschopnost fytopatogenních bakterií. Na ošetření nízkoteplotním plazmatem byly nejcitlivější gramnegativní bakterie *Erwinia amylovora* a *Rahnella aquatilis* patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*. Nižší citlivost na ošetření nízkoteplotním plazmatem vykazovali zástupci grampozitivních bakterií. Rovněž byla navržena vhodná metodika k ošetření fytopatogenních bakterií nízkoteplotním plazmatem za atmosférického tlaku.

Klíčová slova - nízkoteplotní plazma, Gliding Arc, fytopatogenní bakterie, PrestoBlue, resazurin, počet kolonií (CFU)

Abstract

The bachelor's thesis is focused on the monitoring of phytopathogenic bacteria's viability after low-temperature plasma treatment. Gliding Arc device has been used for the plasma treatment of phytopathogenic bacteria. Evaluation was carried out using chemical reagent PrestoBlue which was followed by spectrophotometric evaluation and calculating CFU/ml from the regression equation derived from the calibration curve. The effect of the low-temperature plasma on the viability of plant pathogenic bacteria was proved. Gram-negative bacteria *Erwinia amylovora* and *Rahnella aquatilis* were the most susceptible to the plasma treatment. These phytopathogenic bacteria belong to the family *Enterobacteriaceae*. Representatives of gram-positive bacteria showed lower sensitivity to the low-temperature plasma treatment. Suitable method has also been designed for the treatment of phytopathogenic bacteria by the low-temperature plasma at atmospheric pressure.

Keywords – low-temperature plasma, Gliding Arc, phytopathogenic bacteria, PrestoBlue, resazurin, colony forming units (CFU)

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Literární přehled.....	11
2.1	Plazma.....	11
2.1.1	<i>Definice</i>	11
2.1.2	<i>Vznik</i>	11
2.1.3	<i>Druhy</i>	11
2.2	Nízkoteplotní plazma získané za sníženého tlaku.....	12
2.2.1	<i>Mikrovlnné plazma</i>	12
2.2.2	<i>Doutnavý výboj plazmatu</i>	12
2.3	Nízkoteplotní plazma získané za atmosferického tlaku	13
2.3.1	<i>Gliding Arc Discharge (GAD)</i>	13
2.3.2	<i>Korónový výboj plazmatu</i>	13
2.3.3	<i>Dielektrické bariérové plazma</i>	14
2.3.4	<i>Jiskrový výboj plazmatu</i>	14
2.3.5	<i>Obloukový výboj plazmatu</i>	14
2.4	Využití plazmatu	15
2.5	Charakteristika bakteriálních druhů	16
2.5.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	16
2.5.1.1	Hostitelé	16
2.5.1.2	Geografické rozšíření	17
2.5.1.3	Příznaky.....	17
2.5.1.4	Způsob přenosu a šíření	17
2.5.1.5	Význam	17
2.5.1.6	Ochrana	17
2.5.2	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	18
2.5.2.1	Hostitelé	18
2.5.2.2	Geografické rozšíření	19
2.5.2.3	Příznaky.....	19
2.5.2.4	Způsob přenosu a šíření	20
2.5.2.5	Význam	20
2.5.2.6	Ochrana	21
2.5.3	<i>Curtobacterium albidum</i>	21

2.5.4	<i>Erwinia amylovora</i>	21
2.5.4.1	Hostitelé	22
2.5.4.2	Geografické rozšíření	22
2.5.4.3	Symptomy	23
2.5.4.4	Způsob přenosu a šíření	23
2.5.4.5	Význam	23
2.5.4.6	Ochrana	24
2.5.5	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	24
2.5.5.1	Hostitelé	24
2.5.5.2	Geografické rozšíření	25
2.5.5.3	Příznaky.....	25
2.5.5.4	Způsob přenosu a šíření	26
2.5.5.5	Význam	26
2.5.5.6	Ochrana	26
2.5.6	<i>Rahnella aquatilis</i>	26
2.5.6.1	Výskyt	27
2.5.6.2	Geografické rozšíření	27
2.5.6.3	Význam	27
2.5.6.4	Ochrana	27
2.5.7	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	28
2.5.7.1	Hostitelé	28
2.5.7.2	Geografické rozšíření	28
2.5.7.3	Příznaky.....	29
2.5.7.4	Způsob přenosu a šíření	29
2.5.7.5	Význam	30
2.5.7.6	Ochrana	30
2.6	Použité metody.....	31
2.6.1	<i>Chemické reagentie používané k detekci životaschopných buněk</i>	31
2.6.1.1	Tetrazolium	31
2.6.1.2	Resazurin.....	31
3	Cíle práce	33
4	Materiál a metody	34
4.1	Použité bakteriální kmeny.....	34
4.2	Kultivační podmínky.....	34

4.3	Příprava bakteriálních kmenů k ošetření nízkoteplotním plazmatem.....	34
4.4	Ošetření bakteriálních kmenů nízkoteplotním plazmatem.....	35
4.5	Příprava bakteriálních kmenů k vyhodnocení.....	35
4.6	PrestoBlue	36
4.7	Vyhodnocení životaschopnosti bakteriálních kmenů.....	36
4.8	Výpočet CFU/ml	36
5	Výsledky a diskuze	37
6	Závěr.....	40
7	Seznam použité literatury.....	41
8	Tabulky	50
9	Obrázky.....	54

1 Úvod

Nízkoteplotní plazma je v současné době předmětem velkého zájmu a představuje rychle se rozvíjející technologii. Samotný výzkum nízkoteplotního plazmatu je však náročný, jelikož částice v plazmatu tvoří velice složitý systém (Aubrecht, 2003). Užívá se především v průmyslovém odvětví, méně často v biologických disciplínách. V této oblasti se nízkoteplotního plazmatu úspěšně užívá k fyzikální sterilizaci a dezinfekci některých patogenů nacházejících se v nemocničních zařízeních. V oblasti rostlinných patogenů není ošetření nízkoteplotním plazmatem téměř vůbec prozkoumáno.

Fytopatogenní bakterie způsobují velmi významné ekonomické ztráty a mnohdy bývají pro řadu zemědělců a pěstitelů likvidační. K ošetření nízkoteplotním plazmatem byly vybrány různé druhy fytopatogenních bakterií. Byli vybráni zástupci gramnegativních a grampozitivních bakterií, dále pak druhy patřící mezi fluorescentní, nepektinolytické a polyfágní bakterie. Některé z těchto fytopatogenních bakterií patří mezi karanténní organismy, jenž podléhají ohlašovací povinnosti a přísným karanténním opatřením.

V současné době pro většinu fytopatogenních bakterií neexistuje účinná biologická, chemická ani fyzikální ochrana. Ochrana proti bakteriózám je založena především na používání certifikovaného osiva a sadby, rezistentních odrůd a dezinfekci pracovních nástrojů. Chemické přípravky jsou účinné pouze krátkou dobu, mohou poškozovat životní prostředí a jejich aplikace je finančně a časově náročná stejně tak jako biologická ochrana. Fyzikální metody se v ochraně rostlin proti bakteriózám nepoužívají.

Cílem této bakalářské práce je sledování životaschopnosti fytopatogenních bakterií po ošetření nízkoteplotním plazmatem Gliding Arc s následným vyhodnocením životaschopnosti bakterií pomocí chemické reagentie PrestoBlue. Technologie nízkoteplotního plazmatu by mohla být použita jako levná fyzikální ochrana rostlin proti bakteriózám či jako součást integrované ochrany rostlin (IOR), jelikož novelizovaný zákon o rostlinolékařské péči (č. 326/2004 Sb.) nařizuje dodržovat zásady IOR od 1. 1. 2014 všem pěstitelům a zemědělcům. Tyto zásady jsou ustanovené ve vyhlášce č. 205/2012 Sb.

2 Literární přehled

2.1 Plazma

2.1.1 Definice

Plazma je neutrální (kvazineutrální) ionizovaný plyn složený z elektronů, fotonů, iontů (kladných a záporných), volných radikálů, atomů a molekul. Jednotlivé částice jsou v interakci s elektrickým polem. Elektrony a fotony se považují za lehké částice, kdežto ostatní částice za těžké. Plazma je často označováno za čtvrté skupenství hmoty (Chen, 1984; Stach, 1989).

2.1.2 Vznik

Plazma může vznikat zahříváním, buď chemicky, nebo smršťováním objektu. Chemicky plazma vzniká oxidací (hořením) nebo termojadernou syntézou. Smršťováním objektu plazma vzniká gravitací či elektrickým polem. Dále plazma vzniká různými elektrickými výboji (EV). Elektrický výboj je jev vznikající při průchodu elektrického proudu plynem (střídavý nebo stejnosměrný elektrický proud). Základem vzniku EV je interakce jednotlivých částic plazmatu s elektrickým polem (Kleczek, 1968; Stach, 1989).

2.1.3 Druhy

Podle teploty se rozlišují dvě základní kategorie plazmatu, vysokoteplotní plazma (thermal) a nízkoteplotní plazma (non-thermal, low-temperature).

Vysokoteplotní plazma (thermal) je charakteristické tím, že elektrony mají přibližně stejnou teplotu jako těžké částice. Mezi elektrony a těžkými částicemi je téměř ustanovena termodynamická rovnováha. Tato teplota může být velmi vysoká (5000-20000 K). Vysokoteplotní plazma se získává při vysokém tlaku a potřebuje značnou energii. Tento typ plazmatu se nachází ve hvězdách, v plazmatických hořácích a setkáváme se s ním v experimentech při termojaderné syntéze (Moreau a kol., 2008).

Nízkoteplotní plazma (non-thermal, low-temperature) je charakteristické tím, že teplota elektronů je mnohem vyšší než je teplota těžkých částic a vyznačuje se nízkým stupněm ionizace. Nízkoteplotní plazma se získává za sníženého nebo atmosférického tlaku a nižší energie. Nachází se např. v zářivkách, výbojkách a v elektrickém oblouku (Moreau a kol., 2008).

Dále lze plazma rozlišit podle stupně ionizace na slabě ionizované plazma a silně ionizované plazma. Koncentrace nabitých částic v slabě ionizovaném plazmatu je velmi nízká oproti koncentraci neutrálních molekul. Naopak je tomu u silně ionizovaného plazmatu, kdy koncentrace nabitých částic je vyšší než koncentrace neutrálních molekul. Stupeň ionizace určuje chování plazmatu a závisí na teplotě (Chen, 1984). V této bakalářské práci bylo použito nízkoteplotní plazma za atmosférického tlaku.

2.2 Nízkoteplotní plazma získané za sníženého tlaku

2.2.1 Mikrovlnné plazma

V mikrovlnném plazmatu je energie přenášena elektromagnetickými oscilacemi o vysoké frekvenci do reaktoru, kde se nachází plyn, jenž je ihned přeměněn v plazma (Aubrecht, 2003; Moreau a kol., 2008). Ke vzniku plazmatu se užívají různé druhy plynů (kyslík, oxid dusný, argon) (Nelson a Berger, 1989; Chau a kol., 1996; Hury a kol., 1998). Moisan a kol. (2002) uvádí, že mikrovlnné plazma je účinné pouze ve spolupráci mezi UV zářením a chemickými složkami plazmatu (Moreau a kol., 2008). První pokusy s mikrovlnným plazmatem byly prováděny na počátku 80. let 20. století (Boucher, 1980; Tensmeyer a kol., 1981).

2.2.2 Doutnavý výboj plazmatu

Doutnavý výboj vzniká ve výbojové trubici se studenou katodou. Náplň katody má nižší tlak než je atmosférický (10^2 až 10^3 Pa). Při dostatečně vysokém napětí vzniká výboj. V důsledku výboje klesne mezi elektrodami napětí, tudíž se do obvodu zapojuje rezistor. Z výbojové trubice je postupně odčerpáván vzduch a vzniká doutnavý výboj. Mezi elektrodami je napětí rozloženo nerovnoměrně (Stach, 1989).

2.3 Nízkoteplotní plazma získané za atmosférického tlaku

2.3.1 *Gliding Arc Discharge (GAD)*

GAD (klouzavý obloukový výboj) je ionizovaný plyn charakteristický poměrně vysokou hustotou plazmy, silou a provozním tlakem. Technika GAD bývá někdy označována za třetí kategorii plazmatu, protože se nachází na rozhraní vlastností nízkoteplotního plazmatu a vysokoteplotního plazmatu. Plazma je vytvářeno za podmínek atmosférického tlaku a okolní teploty. Lesueur s kolegy patentoval princip GAD v roce 1988. Tento princip dále rozvíjeli Czernichowski a kolegové (Mureau a kol., 2008).

Přístroj gliding arc se skládá ze dvou či více rozcházejících se kovových (měď, hliník) elektrod. Kovové elektrody zvyšují rozdíl potenciálu. Plyn (většinou vlhký vzduch nebo argon) je za určitého tlaku vehnán do mezery mezi elektrodami, kde klouže podél elektrod dokud nevznikne v nejužším místě obloukový klouzavý elektrický výboj, který se prodlužuje až vystoupí nad elektrody. Vzniklý výboj se ihned přeměňuje a vstupuje do nového cyklu (Obr. 1) (Moreau a kol., 2008).

Nízkoteplotní přístroj GAD se užívá především v průmyslovém odvětví. Je uzpůsoben k využití velmi vysoké elektrické energie, přičemž zde vznikají těžké reaktivní částice (radikály OH a NO) (Benstaali a kol., 1998a,b).

Gliding arc discharge se považuje za pokročilou oxidativní techniku s antimikrobiálním účinkem, jenž spočívá v poškození nukleové kyseliny mikroorganismu (Moreau a kol., 2008).

2.3.2 *Korónový výboj plazmatu*

Koróna je slabě světélkující výboj vznikající při atmosférickém tlaku. Korónový výboj vzniká v nehomogenním elektrickém poli při vysokém počátečním napětí, které většinou vzniká kolem jedné elektrody, tzv. unipolární koróna. Zde je vedení proudu vnějším okolím uskutečňováno ionty stejného náboje oproti koróně vznikající na dvou elektrodách. Ke svému vzniku koróna nepotřebuje žádný vnější zdroj nosičů náboje. Ve výbojové dráze vznikající v okolí elektrod s malým poloměrem křivosti povrchu, tj. okolo drátů vysokého napětí, hrotů, hran, jestliže intenzita elektrického pole je dostatečně silná, vznikají světelné jevy doprovázející korónu. Proud tekoucí plazmatem koróny je závislý na napětí, druhu a vlastnostech plynu mezi elektrodami (Stach, 1989; Fridman a kol., 2005; Moreau a kol., 2008).

Korónový elektrický výboj byl testován pro velké množství aplikací např., ošetření povrchů, kapalin a aerosolů (Chang a kol., 1991; Bellakhal a kol., 1997a,b).

2.3.3 Dielektrické bariérové plazma

Dielektrické bariérové plazma je založeno na výbojích v mezeře mezi dvěma elektrodami napájenými střídavým napětím. Na elektrodách je vhodná dielektrická vrstva (sklo, křemen). Ta zastaví elektrický proud a zabrání tvorbě jisker (Scholtz, 2012). Obvykle pracují při frekvencích mezi 0,05 a 500 kHz. Technologie založené na dielektrickém bariérovém plazmatu se užívají v generaci ozónu, jako UV zdroj v lampách a v biologických disciplínách jako prostředek k ničení bakterií. Tyto výboje jsou někdy nazývány tichými výboji (Fridman a kol., 2005).

2.3.4 Jiskrový výboj plazmatu

Jiskrový oblouk vzniká z korónového výboje, pokud napětí mezi elektrodami dosáhne hodnoty potřebné pro lavinovitou tepelnou ionizaci, tzv. hodnoty průrazného napětí. Jiskrový oblouk má krátkou dobu trvání a má charakter klikatých, tenkých jasně svítících a rozvětvlujících se nitek nebo kanálů. Tyto nitky či kanály vznikají buď přímo na elektrodách nebo v prostoru mezi elektrodami a mají vysokou teplotu (10^4 K) a tlak (10^7 Pa). Jedná se o nehomogenní typ výboje. Při tepelné ionizaci dochází k rozpínání plynu, kde jiskra vzniká a dochází ke vzniku různých zvukových jevů (praskání). Blesk je příkladem mohutného jiskrového výboje v přírodě. Napětí mezi mrakem a zemí dosahuje 10^9 V. V laboratorních podmínkách lze jiskrový oblouk demonstrovat Ruhmkorffovým transformátorem (Stach, 1989).

2.3.5 Obloukový výboj plazmatu

Pro obloukový výboj je charakteristická vysoká teplota katody, velká proudová hustota v okolí katody, vysoký elektrický proud (1 A až 10^5 A), nízké napětí (60 V) a intenzivní vyzařování světla při výboji. Elektrický obvod je tvořen dvěma uhlíkovitými elektrodami a sériově zapojeným rezistorem, který stabilizuje výboj. Elektrony vznikají mezi elektrodami tepelnou ionizací. Dále vznikají kladné ionty, jenž se v elektrickém poli pohybují směrem ke katodě, a tím udržují vysokou teplotu potřebnou pro vznik elektronů tepelnou ionizací. Obloukový výboj se využívá při obloukovém svařování a v tavicích pecích. Vysoké teploty elektrod při obloukovém výboji se využívají v plazmových hořácích, tzv. plazmatrony (Stach, 1989).

2.4 Využití plazmatu

Velmi významnou oblastí, kromě jiných, využívající technologie plazmatu je zdravotnictví. Pomocí plazmových technologií se připravují umělé kloubní hlavice a kloubní jamky. Na jejich povrch se nanáší speciální tvrdé vrstvy umožňující lepší srůstání přirozené kostní tkáně s umělou kloubní hlavicí a zajistit tím delší životnost umělého kloubu. Dále se plazma využívá ke sterilizaci zdravotnického materiálu a vybavení. Pomocí plazmatu se sterilizují umělohmotné hadičky pro dialýzu, kdy se současně na vnitřní stěnu dialyzačních hadiček nanese speciální vrstva zabraňující srážení krve během cirkulace hadičkou. Význam sterilizace pomocí plazmatu spočívá v možnosti sterilizace látek, které nemohou být vystaveny vysokým teplotám (Baier a kol., 1992; Moisan a kol., 2001; Lee a kol., 2006).

V medicíně se plazma využívá i ke spalování nebezpečného zdravotnického materiálu (použité jehly, obvazy apod.) v plazmových pecích (Aubrecht, 2003).

Plazmatu se využívá v kožním lékařství k léčbě a obnově kožní tkáně (Ermoleava a kol., 2011).

Nízkoteplotního plazmatu se také využívá k likvidaci různých bakteriálních druhů. Nízkoteplotní plazma efektivně ničí *Hafnia alvei* (Kamgang-Youbi a kol., 2007), *Erwinia carotovova* subsp. *atroseptica*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* a *Erwinia chrysanthemi* (Moreau a kol., 2005). Dále se využívá mikrobicidního účinku nízkoteplotního plazmatu k ničení oportunních bakterií *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes* vyskytujících se běžně v nemocničních zařízeních a způsobujících infekce ran (Yang a kol., 2009; Ermoleava a kol., 2011). Rovněž se technika nízkoteplotního plazmatu s úspěchem využívá k ničení spor bakterie *Bacillus subtilis* (Moreau a kol., 2000; Boudam a kol., 2006) a významné patogenní bakterie *Escherichia coli*, jež kontaminuje mléko, vodu a běžně se vyskytuje v nemocnicích (Ermoleava a kol., 2011; Gurol a kol., 2012).

2.5 Charakteristika bakteriálních druhů

2.5.1 *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens (Smith a Townsend 1907) Conn 1942 patří mezi gramnegativní bakterie, jejichž buněčná stěna je složena z vnější membránové vrstvy bohaté na lipidy a z tenké vnitřní vrstvy peptidoglykanů. Na rozdíl od grampozitivních bakterií neobsahují kyselinu teichoovou (Kůdela a kol., 2002).

A. tumefaciens je nesporulující, přísně (obligátně) aerobní bakterie tyčinkovitého tvaru. Pohybuje se několika bičíky umístěnými po celém obvodu buňky (peritrich). Na kultivačních půdách buňky tvoří nepigmentující, hladké, světle béžové kolonie (Collins, 2001). Optimální růstová teplota je 20-27°C (Krejzar a kol., 2012).

A. tumefaciens způsobuje nádorovitost (Smith a Townsend, 1907). *A. tumefaciens* obsahuje Ti-plasmid (tumor indukující plasmid), jenž vyvolává nádorovitost. Ti-plasmid obsahuje geny virulence. Ty jsou aktivovány pokud jsou buňky *A. tumefaciens* podrážděny fenolickými látkami rostlin. Geny virulence řídí přenos T-DNA (části Ti-plasmidu) do genomu rostliny (Kado, 1976; Nester a kol., 1984). T-DNA obsahuje dva typy genů. První z nich jsou onkogenní geny kódující enzymy zodpovědné za syntézu růstových hormonů (auxinů a cytokininů). Druhým typem jsou geny kódující syntézu opinů (specifické aminokyseliny) (Deblaere a kol., 1985; Hooykaas a Schilperoort, 1992; De la Riva a kol., 1998).

2.5.1.1 Hostitelé

A. tumefaciens má široký hostitelský okruh. Je to polyfágní bakterie napadající především dvouděložné rostliny, méně často jednoděložné (Smith a Townsend, 1907). Nejčastěji parazituje na ovocných dřevinách, především jabloních, hrušních a třešních. Dále způsobuje nádorová onemocnění u révy vinné (*Vitis vinifera*), chmele otáčivého (*Humulus lupulus*), slunečnice roční (*Helianthus annuus*), ořešáku královského (*Juglans regia*) atd. *A. tumefaciens* častěji napadá jehličnaté stromy než listnaté. Mezi hostitelské druhy patří také okrasné rostliny, např. růže, pelargonie, chryzantémy (DeCleene a DeLey, 1976; Kado, 2002).

2.5.1.2 Geografické rozšíření

A. tumefaciens vyvolává nádorovitost ve všech klimatických a půdních podmínkách celého světa (Kado, 2002).

2.5.1.3 Příznaky

Nádory jsou charakteristickým projevem onemocnění. Mohou se vyskytnout na jakékoli části postižené rostliny, především v místě roubování a na kořenech (Obr. 2). Na počátku onemocnění jsou nádory malé, kulovité s bělavým povrchem. V této fázi onemocnění připomínají spíše zhojenou tkáň. V pozdější fázi onemocnění se zvětšují, tmavnou a dřevnatí. Rostlina postupně chřadne a odumírá, což může trvat i několik let. Mezi další příznaky patří chlorotické listy a vznik sekundárních infekcí (Collins, 2001; Kado, 2002; Hudec a Gutten, 2007).

2.5.1.4 Způsob přenosu a šíření

A. tumefaciens proniká do hostitelské rostliny pouze přes poranění, nejčastěji mechanického původu. To může být způsobeno roubováním, mrazem, větrem či hmyzem. Prostřednictvím cévního systému se patogen šíří do celého těla rostliny, kde se část Ti- plasmidu začleňuje do jaderné DNA rostliny a vyvolává nádory. *A. tumefaciens* se nachází v půdách a v posklizňových zbytcích, prostřednictvím nichž se šíří a přezimuje (Kado, 2002; Kúdela a kol., 2002).

2.5.1.5 Význam

A. tumefaciens způsobuje v zahradnictví významné ekonomické ztráty. Choroba způsobuje neprodejnost výhonů z ovocných sadů a lesních školek. U révy vinné dosahují ekonomické ztráty až 50 % (Kúdela a kol., 2002; Hudec a Gutten, 2007).

2.5.1.6 Ochrana

Ochrana spočívá především v preventivních opatřeních. Nejdůležitější z nich je získání zdravého reprodukčního materiálu. Dále se před výsadbou provádí kontrola půdy na výskyt původce nádorovitosti.

Na půdách, jenž jsou kontaminovány bakterií *A. tumefaciens* se pěstují jednoděložné rostliny (kukuřice, pšenice) po dobu několika let. (Collins, 2001). Důležitá je desinfekce pracovních nástrojů před roubováním (chlornanem vápenatým) a zabránit vzniku poranění kořene a kořenového krčku (Kado, 2002; Kůdela a kol., 2002). Chemická ochrana v podobě měďnatých přípravků neposkytuje spolehlivou ochranu a je finančně náročná (Kado, 2002).

Použití nepatogenního kmene *A. tumefaciens* K84 (*Agrobacterium radiobacter*) představuje poměrně účinnou biologickou ochranu proti nádorovitosti. *A. radiobacter* produkuje bakteriocin (agrocin 84) inhibující replikaci DNA a buněčný růst. Pro komerční účely se využívá kmen K1026 získaný technologiemi genetického inženýrství (McClure, 1998; Kado, 2002).

2.5.2 *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus* (Spieckermann a Kotthoff 1914) Davis et al. 1984 je grampozitivní bakterie (koryneformní bakterie), jejíž buněčná stěna je tvořena silnou vrstvou peptidoglykanů a je zde přítomna kyselina teichoová (Kůdela a kol., 2002). *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* je nesporulující, přísně (obligátně) aerobní bakterie. Tyčinky mají kyjovitý tvar a jsou nepohyblivé (atrich) (Hayward a Waterson, 1964a; Perminow a kol., 2012). Buňky se vyznačují pomalým růstem (jednotlivé kolonie jsou znatelné za 5-6 dní). Optimální růstová teplota je 21 °C. *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* je nepigmentující druh, vytvářející na vhodných kultivačních půdách (MPAg = masopeptonový agar s glukosou) bílé, hladké, okrouhlé kolonie s rovnými okraji. Specializuje se na kolonizaci pletiv vodivého systému (cév), je typickým okluzogenem (Rothwell, 1968; Van der Wolf a kol., 2005).

Bakterie *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* je v ČR a EU karanténním organismem způsobujícím bakteriální kroužkovitost bramboru (OEPP/EPPO, 1990).

2.5.2.1 Hostitelé

Přirozeným hostitelem bakterie *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* je pouze brambor hlíznatý (*Solanum tuberosum*). Cukrová řepa (*Beta vulgaris*) byla popsána

jako další přirozený hostitel, u něhož se neprojevují příznaky choroby. Tato bakterie byla prokázána v semenech cukrové řepy (Bugbe a Gudmestad 1988). Při inokulačních testech byla prokázána náchylnost k tomuto patogenu u mnoha zástupců z čeledi lilkovitých (*Solanaceae*), včetně rajčete (*Lycopersicon esculentum*) a lilku (*Solanum melongena*) (Matoušková a Táborská, 2007).

2.5.2.2 Geografické rozšíření

Evropa: Belgie, Bělorusko, Bulharsko, Česká republika (zde potvrzen roku 1996), Dánsko, Estonsko, Finsko, Francie, Holandsko, Chorvatsko, Irsko, Itálie (včetně Sardinie a Sicílie), Kypr, Litva, Lotyšsko, Maďarsko, Malta, Německo, Norsko, Polsko, Rakousko, Rusko (evropská část), Řecko, Slovensko, Španělsko (včetně Kanárských ostrovů), Švédsko, Švýcarsko, Turecko, Ukrajina, Velká Británie.

Asie: Afghánistán, Čína, Japonsko, Jižní Korea, Kambodža, Kazachstán, Kypr, Libanon, Nepál, Rusko (Sibiř), Severní Korea, Taiwan, Turecko, Uzbekistán, Vietnam.

Afrika: Alžírsko.

Severní Amerika: Mexiko, Kanada, USA.

Střední Amerika a Karibské ostrovy: Haiti, Kostarika, Panama.

Jižní Amerika: Peru, Venezuela (EPPO/CABI, 2006).

2.5.2.3 Příznaky

Na nadzemních orgánech rostlin mohou být příznaky velmi proměnlivé a většinou bývají nepatrné.

Primární příznaky se na nadzemních orgánech objevují koncem srpna či později v podobě vadnutí listů. Primární příznaky vadnutí se mohou zaměnit s příznaky plísně bramborové (*Phytophthora infestans*), verticiliového vadnutí (*Verticillium albo-atrum*), rakoviny stonku (*Thanatephorus cucumeris*) nebo uschnutí. První příznaky vadnutí se objevují na spodních listech. Okraje listů se stáčí okolo žilky nahoru. Listy jsou slabě nažloutlé a nakonec od okraje nekrotizují a vadnou (Kůdela a kol., 2002; Matoušková a Táborská, 2007).

Charakteristickým projevem onemocnění je bakteriální kroužkovitost na hlízách (Obr. 3). Na příčném řezu hlízou, v místě cévních svazků, je patrné krémově žluté až mírně hnědé zbarvení. Po stisku odtud vytéká krémovitý exudát bez zápachu. V pokročilých stádiích infekce může docházet k vnějším projevům choroby. Na povrchu hlízy, v místě cévních svazků, se objevují načervenalé jamky a praskliny. Na hlízách se příznaky objevují před nebo po sklizni. Na některých hlízách se příznaky vůbec neprojeví (Schaad, 1999; OEPP/EPPO, 2006; Matoušková a Táborská, 2007).

2.5.2.4 Způsob přenosu a šíření

Hlavním zdrojem nákazy jsou infikované hlízy, prostřednictvím nichž se *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* šíří na větší vzdálenosti. Na rozšiřování se podílejí i kontaminované sklízecí stroje a skladovací prostory. Dále se snadno šíří z infikovaných rostlin na zdravé při krájení sadbových hlíz. V České republice je krájení sadbových hlíz zakázáno, ale v USA a Kanadě je tento způsob přípravy sadby stále povolen. Tímto způsobem dochází k infikování dalších 20–30 zdravých hlíz z jedné infikované hlízy. Bakterie pronikají do rostliny přes poraněná místa a cévním systémem (především xylémem) napadají postupně celou rostlinu. Proniknutí patogena z kontaminované půdy nelze vyloučit. Bakterie *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* však nejsou schopny ve volné půdě přezimovat (Kůdela a kol., 2002; Matoušková a Táborská, 2007). Dále se může šířit z posklizňových zbytků ponechaných na poli (Steinmüller a kol., 2013) nebo pomocí hmyzích vektorů (brouky, mšicemi, křísi) (EPPO/CABI, 1996; Van der Wolf a kol., 2005).

2.5.2.5 Význam

C. michiganensis subsp. *sepedonicus* je karanténní organismus omezující vývoz sadby, a tím způsobuje významné ekonomické ztráty. Bakteriální kroužkovitost snižuje výnos o 15–40 %, výjimečně i o 50 %. Hospodářské škody jsou způsobeny nevzcháživostí rostlin, menší velikostí a počtem hlíz v trsu. Dále mohou být způsobeny výskytem hniloby v půdě a během skladování hlíz, kdy druhotně do hlíz pronikají pektinolytické bakterie rodu *Erwinia* způsobující jejich úplný rozklad. (Easton, 1979; Sletten, 1985; Kůdela a kol., 2002).

2.5.2.6 Ochrana

V současné době není známa účinná biologická, chemická ani fyzikální ochrana. Ochrana proti *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* spočívá pouze v produkci zdravé sadby. Patogen bakteriální kroužkovitosti bramboru podléhá přísným karanténním opatřením. V porostech sadbových brambor se nesmí vyskytnout žádný nemocný trs. Pokud se na pozemcích vyskytl *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* nesmí se na těchto pozemcích pěstovat brambory 2 roky. Hlízy podléhají karanténní inspekci (Nelson, 1984; Manzer a kol., 1987; Kůdela a kol., 2002).

2.5.3 *Curtobacterium albidum*

Curtobacterium albidum (Komagata a Iizuka 1964) Yamada a Komagata 1972 je grampozitivní, přísně aerobní, nesporulující a rychle rostoucí pohyblivá tyčinka. Tyčinky jsou kyjovitého tvaru a vyskytují se jednotlivě nebo ve dvojicích. Pohyb buňky je zajištěn 1-3 polárními bičíky. *C. albidum* je katalázapozitivní a oxidázanegativní. Optimální růstová teplota je 30 °C a optimální pH je 7 (Kůdela a kol., 2002). Na vhodném kultivačním médiu buňky tvoří slonovinově bílé kolonie. Bakterie *C. albidum* byla izolována z půd rýžových polí a v současné době se využívá jako genomický zdroj pro výrobu restrikčních endonukleáz *BalI* a *BamHI* (Whitman a kol., 2012).

Z důvodu nepatrné hospodářské významnosti nejsou známy podrobnější informace o této bakterii.

2.5.4 *Erwinia amylovora*

Erwinia amylovora (Burrill 1882), Winslow et al. 1920 je gramnegativní, nesporulující, krátká tyčinka se zaoblenými konci. Pohyblivost buňky je zajišťována bičíky umístěnými po celém povrchu (peritrich). Buňky jsou fakultativně aerobní s metabolismem aerobně respiračním nebo fermentačním. *E. amylovora* patří do skupiny nepektinolytických bakterií. Na kultivačním médiu (MPAg) buňky tvoří krémově bílé kolonie a na médiích bohatých na sacharosu vytváří *E. amylovora* levan (polymer fruktosy) (Geier a Geider, 1993; Kokošková a Mráz, 2008).

V ČR a EU je *E. amylovora* karanténním organismem vyvolávající bakteriální spálu růžovitých rostlin (EPPO/CABI, 1997).

2.5.4.1 Hostitelé

E. amylovora má široký okruh hostitelských rostlin. Čeleď růžovité (*Rosaceae*) patří k nejdůležitějším hostitelským druhům. *E. amylovora* napadá okrasné i ovocné druhy této čeledi. Nejvýznamnějšími hostitelskými druhy jsou: jabloň (*Malus* spp.), hrušeň (*Pyrus* spp.), hloh (*Crataegus* spp.). Dále mezi hostitelské rostliny patří: blýskalka (*Stranvaesia* spp.), hlohyně (*Pyracantha* spp.), jeřáb (*Sorbus* spp.), kdouloň (*Cynodia* spp.), kdoulovec (*Chaenomeles* spp.), mišpule (*Mespilus* spp.), muchovník (*Amelanchier* spp.), skalník (*Cotoneaster* spp.) (Van der Zwet a Keil, 1979; Sobiczewski a kol., 1997).

2.5.4.2 Geografické rozšíření

E. amylovora byla objevena roku 1780 v Severní Americe (New York) a odtud se rozšířila do celého světa.

Evropa: Belgie, Bosna a Hercegovina, Česká republika (zjištěna v Praze v roce 1986) (Kokošková a Mráz, 2008), Dánsko, Francie (kromě jihovýchodní oblasti), Chorvatsko, Irsko, Itálie, Lucembursko, Maďarsko, Makedonie, Německo, Nizozemsko, Norsko, Rakousko, Rumunsko, Řecko, Slovensko, Srbsko, Španělsko, Švédsko, Švýcarsko, Turecko (evropská část), Velká Británie.

Asie: Arménie, Ázerbájdžán, Čína, Indie, Írán, Izrael, Japonsko, Jordánsko, Korejská republika, Kypr, Libanon, Saudská Arábie, Turecko (asijská část), Vietnam.

Afrika: Egypt.

Severní Amerika: Bermudy, Kanada, Mexiko, USA.

Střední Amerika a Karibské ostrovy: Guatemala, Haiti.

Jižní Amerika: Chile, Kolumbie, Venezuela.

Austrálie: Severní Austrálie.

Oceánie: Nový Zéland (EPPO/CABI, 2007).

2.5.4.3 Symptomy

Bakteriální spála růžovitých se projevuje několika charakteristickými příznaky, z nichž nejvýznamnější je hákovité ohýbání vzrostlých vrcholů. Napadené uschlé plody a listy zůstávají na dřevinách i po opadu (Obr. 5). Dalším typickým příznakem objevujícím se za teplého a vlhkého počasí je vylučování kapek bakteriálního slizu na povrch rostlinných orgánů. Bakteriální sliz postupně zasychá a vytváří na orgánech povlak nebo jemné vláknité útvary. Na počátku onemocnění květy, plody a listy vodnatí a postupně usychají, až černají. V pozdější fázi onemocnění se infekce objevuje v korových pletivech, kde *E. amylovora* způsobuje nekrózy a jejich vodnatění (Kůdela a kol., 2002). Typické příznaky se nemusejí vůbec objevit a vzniká tzv., latentní infekce (Van Buskirk a Van der Zwet, 1984).

2.5.4.4 Způsob přenosu a šíření

Patogen bakteriální spály se nejlépe šíří za vlhkého, teplého počasí s teplotami nad 18 °C a za vhodných povětrnostních podmínek. Naopak chladné, slunečné a suché počasí vznik choroby zpomaluje, až zastavuje (Psallidas, 1990; Kůdela a kol., 2002). *E. amylovora* vstupuje do hostitelské rostliny přes přirozené otvory (průduchy, hydatodami, bliznami) nebo přes poranění, způsobené hmyzem, větrem či deštěm s kroupami. Často dochází k šíření infekce nedostatečně vydezinfikovanými pracovními nástroji při roubování. Patogen přežívá v korových pletivech, na okraji nekrotických a v hostitelských rostlinách (Beer, 1979; Van der Zwet a Keil, 1979).

2.5.4.5 Význam

E. amylovora způsobuje značné ekonomické ztráty. V důsledku poškození hlavního kořene dochází k nižší produkci ovocných dřevin nebo je výnos zcela zničen. Napadené ovocné stromy se nedají zachránit, tudíž je nutné celý ovocný sad vykácet a následně stromy spálit (Van der Zwet a Keil, 1979).

2.5.4.6 Ochrana

Nejjednodušším opatřením proti *E. amylovora* je dezinfekce pracovních nástrojů při roubování a ošetřování dřevin. Důležité je dodržovat legislativní opatření proti zavlékání této choroby (užívání certifikované sadby či odrůd vyšlechtěných na rezistenci). V chemické ochraně se používají měďnaté přípravky, které však nejsou příliš účinné. V USA se k ochraně proti spále růžovitých používá streptomycin (antibiotikum). V Evropě jsou tyto látky k ochraně rostlin zakázány. Biologická ochrana spočívá ve využití antagonistických kmenů *Pantotea agglomerans* a *Pseudomonas fluorescens* (Jones a Byrde, 1987; Ishimaru a kol., 1988; Kúdela a kol., 2002). Na ochraně proti spále růžovitých se podílejí i varovné systémy založené na sběru klimatických dat (Thomson a kol., 1982).

2.5.5 *Pseudomonas viridiflava*

Pseudomonas viridiflava (Burkholder 1930) Dowson 1939 patří mezi gramnegativní fluorescentní bakterie, jenž uvnitř buněk nehromadí poly- β -hydroxybutyrát a produkují pektinolytické enzymy (Lukezic a kol., 1983; Heydari a kol., 2012). Buňky mají tyčinkovitý tvar a pohybují se jedním či více polárními bičičky. *P. viridiflava* je nesporulující, oxidázanegativní bakterie s aerobně respiračním metabolismem. Nevykazuje arginin dehydrolasovou aktivitu a nitrátovou redukci. *P. viridiflava* dobře roste v 5 % roztoku NaCl (Jones a kol., 1984). Na živné půdě MPAg bakterie tvoří šedobílé, průhledné kolonie a na živné půdě King B tvoří fluorescentní pigment (King a kol., 1954). Pro svůj růst využívá D,L - laktát, manitol, sorbitol, glukosu a fruktosu. (Schaad a kol., 1980; 2001; Gitaitis a kol., 1997).

2.5.5.1 Hostitelé

P. viridiflava má široký hostitelský okruh (polyfág). Hlavní hostitelské druhy patří do kořenové a košťálové zeleniny. Mezi hostitelské druhy kořenové zeleniny patří mrkev (*Daucus* spp.), tuřín (*Brassica* spp.) a brambor hlíznatý (*Solanum tuberosum*). Z košťálové zeleniny je to pak květák (*Brassica oleracea*) a zelí (*Brassica* spp.). Dále mezi hostitelské rostliny patří meloun (*Citrullus* spp.),

rajče (*Solanum lycopersicum*), okurka (*Cucumis* spp.), cibule (*Allium* spp.), dýně (*Cucurbita* spp.), réva vinná (*Vitis vinifera*), hlávkový salát (*Lactuca sativa*), lupina (*Lupinus* spp.), jetel (*Triforium* spp.), vojtěška (*Medicago sativa*) hrách (*Pisum sativum*), fazol (*Phaseolus* spp.), lilek (*Solanum* spp.). *P. viridiflava* napadá i okrasné rostliny (chryzantémy) a ovocné keře (kiwi, *Actinidia deliciosa*) (Goumans a kol., 1998).

2.5.5.2 Geografické rozšíření

P. viridiflava je rozšířená po celém světě.

Evropa: Belgie, Bulharsko, Česká republika, Francie, Holandsko, Chorvatsko, Itálie, Maďarsko, Makedonie, Německo, Polsko, Portugalsko, Rusko (evropská část), Řecko, Slovensko, Španělsko, Švýcarsko, Velká Británie.

Asie: Čína, Írán, Japonsko, Jižní Korea, Jordánsko, Nepál, Saudská Arábie, Turecko.

Afrika: Alžírsko, Egypt, Keňa, Maroko, Tanzanie, Uganda.

Severní Amerika: USA.

Jižní Amerika: Argentina, Brazílie, Uruguay, Venezuela.

Austrálie a Oceánie: Nový Jižní Wales, Queensland, Nový Zéland (EPPO/CABI, 2004).

2.5.5.3 Příznaky

P. viridiflava způsobuje spálu a skvrnitost listů (Obr. 6). Dále vyvolává nekrózy stonků, listů a plodů. Při nízkých teplotách způsobuje hnilobu hlíz a kořenů. Na napadených rostlinách se objevují chlorotické léze, vodnaté léze, listové plísňe a báze stonku černá. Postupně vznikají různé malformace rostliny (Lelliot a kol., 1966; Jones a kol., 1984). Bakterie zastavuje rozvod živin do horních částí rostlinného těla. Napadené rostliny postupně vadnou a odumírají (Lukezic a kol., 1983).

2.5.5.4 Způsob přenosu a šíření

P. viridiflava epifyticky přežívá na plevelných rostlinách nebo na povrchu půdy. Patogen proniká do pletiv hostitele přes přirozené otvory (průduchy, lenticely, hydatody) nebo přes poranění vzniklá mechanicky nebo mrazem. Dále je možný přenos půdními hlísticemi (*Nematoda*). *P. viridiflava* se nejlépe šíří při vysoké vzdušné vlhkosti a při dešti (Jones a kol., 1984; Heydari a kol., 2012).

2.5.5.5 Význam

P. viridiflava způsobuje značné ekonomické ztráty na skladované zelenině a ovoci. Vysoké ztráty jsou způsobeny nedodržením vhodných skladovacích teplot pro jednotlivé druhy (poškození chlazením). Postupně dochází k poklesu nutričně vhodných látek a k senzorickému poškození (Kůdela a kol., 2002).

2.5.5.6 Ochrana

Není známa účinná fyzikální, chemická ani biologická ochrana. Účinná ochrana je založena pouze na preventivních opatřeních. Nejdůležitější z nich spočívá v zabránění srážení vodní páry na povrchu skladovaných produktů. Mezi další opatření patří odstraňování kontaminovaných rostlinných zbytků, dodržování osevních postupů, dezinfekce pracovních nástrojů, zabránění vzniku poranění a používání certifikovaného osiva a sadby (Kůdela a kol., 2002).

2.5.6 *Rahnella aquatilis*

Rahnella aquatilis Izard a kol., 1981 je gramnegativní, fakultativně aerobní bakterie patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*. Buňky mají tyčinkovitý tvar a pohybují se několika bičíky umístěnými po celém povrchu (Maraki a kol., 1994). *R. aquatilis* fixuje dusík a vytváří mnoho organických kyselin (Pintado a kol., 1999). Na živných půdách tvoří buňky šedé, hladké kolonie (Obr. 7). Optimální růst probíhá při teplotě 36 °C po dobu 48 hodin. *R. aquatilis* vykazuje různou citlivost k antibiotikům. Velmi dobře reaguje na gentamicin, pefloxacin a tobramycin,

ale vůči ampicilinu, amoxilinu a cefalotinu vykazuje rezistenci. (Maraki a kol., 1994).

2.5.6.1 Výskyt

R. aquatilis se vyskytuje v čerstvé vodě, půdě a byla zjištěna i u lidí. Izolována byla z klinických vzorků (sputa-hlenu) u pacientů s oslabenou imunitou, trpících AIDS, bronchiálním astmatem, rozedmou plic, cukrovkou a leukémií (Goubau a kol., 1988; Maraki a kol., 1994). Dále byla izolována z půd vinic (Chen a kol., 2007) a půd, kde byla pěstována sója luštinatá (*Glycine max*) a rajče jedlé (*Lycopersicon esculentum*) (El-Hendawy a kol., 2005).

2.5.6.2 Geografické rozšíření

Výskyt *R. aquatilis* byl zjištěn v Egyptě, Japonsku, Koreji, Rusko, na Ukrajině a také v USA (Brenner a kol., 1998).

2.5.6.3 Význam

Význam *R. aquatilis* je zaměřen především na klinickou oblast (infekční lékařství), kde způsobuje pooperační infekce ran (nozokominální infekce) (Goubau a kol., 1988). V zemědělství význam *R. aquatilis* spočívá ve využití v biologické ochraně rostlin. Antagonistické kmeny *Rahnella aquatilis* zabraňují vzniku bakteriální skvrnitosti rajčat způsobenou bakterií *Xanthomonas vesicatoria*. (El-Hendawy a kol., 2005). Dále potlačují vývoj nádorů u révy vinné, jež jsou vyvolávány bakteriemi rodu *Agrobacterium* (Chen a kol., 2007).

2.5.6.4 Ochrana

Ochrana spočívá v dezinfekci, sterilizaci zdravotnického materiálu a v dodržování správných postupů při převazech ran (Goubau a kol., 1988).

2.5.7 *Xanthomonas vesicatoria*

Xanthomonas vesicatoria (ex Doidge 1920) Vauterin et al. 1995 je gramnegativní, přísně aerobní, oxidativní, nesporulující bakterie. Buňky mají tyčinkovitý tvar, vyskytují se samostatně nebo ve dvojicích a pohybují se jedním polárním bičíkem (monotrich). Na živném médiu *X. vesicatoria* tvoří velké, hladké a slizovité (mukoidní) kolonie žlutého zabarvení. *X. vesicatoria* vytváří heteropolysacharid xanthan, jenž se používá v různých průmyslových odvětvích (Swings a Civerelo, 1993; Kůdela a kol., 2002).

X. vesicatoria je v ČR a EU karanténním organismem způsobující na rajčeti a paprice bakteriální skvrnitost (Sherf a MacNab, 1986).

2.5.7.1 Hostitelé

Hlavními hostitelskými rostlinami jsou rajče (*Lycopersicum* spp.) a paprika (*Capsicum* spp.). *X. vesicatoria* napadá i některé další rostliny z čeledi *Solanaceae* (lilkovité), např. durman (*Datura* spp.), tabák selský (*Nicotiana rustica*), kustovnici (*Lycium* spp.), blín (*Hyoscyamus* spp.), mochny (*Physalis* spp.) a mnoho druhů lilků (*Solanum* spp.). Patogen bakteriální skvrnitosti napadá především plevelné rostliny rodu *Solanum* (Hayward a Waterson, 1964b).

2.5.7.2 Geografické rozšíření

Evropa: Belgie, Bělorusko, Bulharsko, Česká republika, Francie, Chorvatsko, Itálii (včetně Sardinie a Sicílie), Maďarsko, Monako, Německo, Polsko, Rakousko, Rumunsko, Rusko (evropská část), Řecko, Slovensko, Slovinsko, Španělsko, Švýcarsko, Turecko (evropská část).

Asie: Čína, Filipíny, Indie, Izrael, Japonsko, Kazachstán, Severní Korea, Jižní Korea, Pákistán, Rusko (asijská část), Tchaj-wan, Thajsko, Turecko (asijská část).

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

Severní Amerika: Bermudy, Kanada, Mexiko, USA.

Střední Amerika a Karibské ostrovy: Barbados, Dominika, Dominikánská republika, Guadeloupe, Guatemala, Honduras, Jamajka, Kostarika, Kuba, Martinik, Nikaragua, Portoriko, Salvador, Svatý Kryštof a Nevis, Svatý Vincenc, Trinidad a Tobago.

Jižní Amerika: Argentina, Brazílie, Chile, Kolumbie, Paraguay, Surinam, Uruguay, Venezuela.

Austrálie a Oceánie: Nový Jižní Wales, Queensland, Tasmánie, Victoria, Západní Austrálie, Fidži, Mikronésie, Nový Zéland, Palau a Tonga (OEPP/EPPO, 1988).

2.5.7.3 Příznaky

Příznaky jsou znatelné na všech nadzemních orgánech rostliny. Nejlépe viditelné jsou na listech. Zde se objevují vodnaté skvrny s nepravidelným černým středem a žlutým ohraničením (Obr. 8). V pokročilém stádiu onemocnění se na listech objevují chlorotické léze. Listy jsou roztřepené, nekrotizují a nakonec opadávají. Na stoncích se objevují podlouhlé chlorotické léze. Na plodech rajčat a paprik se objevují vodnaté léze se zeleným halo. Vodnaté léze postupně hnědnou a nekrotizují, vytvářejí strupovitý povrch (Goode a Sasser, 1980; Kúdela a kol., 2002)

2.5.7.4 Způsob přenosu a šíření

X. vesicatoria způsobující bakteriální skvrnitost rajčete a papriky přežívá na semenech, v posklizňových zbytcích, v půdě či na kořenech nehostitelských rostlin (Bashan a kol., 1982). Patogen vstupuje do hostitelské rostliny buď přímo, přes přirozené otvory (hydatodami, průduchy) nebo nepřímo, přes poranění (vpichy po hmyzu, oděrkami způsobené větrem, deštěm, kroupami nebo oděrkami mechanicky vzniklými) (Pohronezny a kol., 1990). Primárně se patogen šíří za deště, při vysoké vzdušné vlhkosti (85 %) a při teplotách kolem 30 °C (Diab a kol., 1982a,b). Sekundárně se patogen může šířit vzdušnými proudy (McInnes a kol., 1988).

2.5.7.5 Význam

Patogen bakteriální skvrnitosti rajčete a papriky způsobuje značné ekonomické ztráty. Napadené plody jsou neprodejně. V České republice způsobuje *X. vesicatoria* velké škody na jižní Moravě. Bakteriální skvrnitost rajčete a papriky je závažným onemocněním v tropických a subtropických oblastech (Argentina, Austrálie, Egypt, Indie, Nigérie a USA) (Dougherty, 1979; Bashan a kol., 1985).

2.5.7.6 Ochrana

Ochrana proti bakteriální skvrnitosti rajčete a papriky je založena na preventivních opatřeních. Ty spočívají v užívání zdravého reprodukčního materiálu, v dodržování osevních postupů, hygienických zásad a v zabránění poranění rostliny (Goode a Sasser, 1980). V současné době se užívají odrůdy rezistentní vůči bakteriální skvrnitosti rajčete a papriky. Chemická ochrana proti patogenu bakteriální skvrnitosti spočívá ve využití měďnatých přípravků v několikadenních intervalech (Dougherty, 1979; Stall a Thayer, 1962). Biologická ochrana spočívá ve využití antagonistických kmenů bakterií *Rahnella aquatilis*, *Pseudomonas putida* a *Pseudomonas syringe* (Campbell a kol., 1998; El-Hendawy a kol., 2005).

2.6 Použité metody

2.6.1 Chemické reagentie používané k detekci životaschopných buněk

Ke zjištění životaschopnosti bakterií, kvasinek a eukaryotických buněk se používají oxidačně redukční indikátory, tetrazolium a resazurin.

2.6.1.1 Tetrazolium

Tetrazolium je modrá sloučenina, jenž se v metabolicky aktivních buňkách, za účasti dehydrogenačních enzymů, mění na formazen, různě barevnou sloučeninu (oranžová, fialová - podle užití tetrazoliové sloučeniny) (Lall a kol., 2013). K detekci životaschopných buněk se používají různé tetrazoliové sloučeniny. Nejčastěji se užívají následující: MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-3,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide], MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium], XTT [2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide] a WST-1 (Water soluble tetrazolium salts), jenž se dále dělí podle náboje.

MTT je sloučenina s kladně nabitým nábojem, jenž snadno proniká do metabolicky aktivních buněk. Zde se redukuje na fialovou sloučeninu formazen a vytváří nerozpustnou sraženinu, jenž se dále musí speciálními postupy rozpouštět.

MTS, XTT a WTS-1 jsou naopak sloučeniny se záporným nábojem. Velmi těžko pronikají do metabolicky aktivních buněk, kde se však samostatně rozpouštějí. XTT tetrazoliová sloučenina se redukuje na oranžový formazen. Často využívají akceptor elektornů, jenž přenáší elektrony z cytoplazmy nebo plazmatické membrány k usnadnění redukce tetrazolium na formazen (Riss a kol., 2013).

2.6.1.2 Resazurin

Resazurin nebo též sodná sůl, je modrá netoxická, slabě fluorescenční sloučenina, která se v metabolicky aktivních buňkách, za účasti dehydrogenačních enzymů, mění na resorufin, růžovou silně fluorescenční sloučeninu (Obr. 9) (McNicholl a kol., 2006; Sarker a kol., 2007). Touto barevnou změnou lze rychle vizuálně odlišit životaschopné buňky.

Resorufin lze kvantitativně měřit, pomocí absorbance či fluorescence a následně stanovit životaschopnost buněk (Lall a kol., 2013). Množství resorufinu je přímo úměrné počtu životaschopných buněk ve vzorku v daném čase. Při fluorescentním stanovení jsou životaschopné buňky detekovány při použití excitační vlnové délky 530-600 nm a emisní vlnové délky 590 nm. Absorbance je detekována v rozsahu vlnových délek 570-600 nm. Velkou výhodou indikátoru resazurinu oproti tetrazoliovým látkám je větší citlivost, poměrně nízká cena a krátká inkubační doba. Rovněž jasněji stanovuje minimální inhibiční koncentraci (MIC). Nevýhodou resazurinu při fluorescentním vyhodnocení testu je možnost fluorescentního rušení z testované sloučeniny (Riss a kol., 2013).

Na této chemické látce je založen komerční výrobek PrestoBlue (Lall a kol., 2013), jenž byl použit v této bakalářské práci.

3 Cíle práce

1. Zjištění životaschopnosti fytopatogenních bakterií po ošetření nízkoteplotním plazmatem.
2. Vhodnost použití nízkoteplotního plazmatu typu Gliding Arc pro jednotlivé bakteriální druhy.
3. Navržení vhodného postupu k ošetření fytopatogenních bakterií nízkoteplotním plazmatem.

4 Materiál a metody

4.1 Použité bakteriální kmeny

K ošetření nízkoteplotním plazmatem byly použity bakteriální kmeny (Tab. č. 1) získané z Belgian Co-ordinated Collection of Microorganisms v Gentu (BCCM/LMG), Collection Francaise de Bactéries Phytopathogéenes v Beaucouzé (CFBP), České sbírky mikroorganismů v Brně (CCM) a ze sbírky mikroorganismů Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Praze Ruzyni, v.v.i. (CRI).

4.2 Kultivační podmínky

Jednotlivé bakteriální kmeny byly nejprve naočkovány na kultivační půdu MPAg (masopeptonový agar s glukosou: 40 g živného agaru č. 2; 5,2 g kvasničného autolyzátu; 10 g glukosy; 5 g agaru, doplněno destilovanou H₂O do 1 litru a 1 M NaOH upraveno pH na hodnotu 7,2) a kultivovány v termostatu při 28-29 °C po dobu 2 dnů. Pro zajištění čistoty byly opět přeočkovány z jedné kolonie na Petriho misky s MPAg a kultivovány za stejných podmínek.

Po kultivaci na Petriho miskách s MPAg byly jednotlivé bakteriální kmeny přeočkovány do tekutého C - média (10 g tryptonu; 5 g kvasničného autolyzátu; 5 g glukosy; 5 g NaCl; doplněno destilovanou H₂O do 1 litru a 1 M NaOH upraveno pH na hodnotu 7,2). Do Erlenmayerovy baňky bylo nalito 25 ml C – média, do něhož byl naočkován bakteriální kmen z Petriho misky. Erlenmayerova baňka byla umístěna na laboratorní třepačku Rotamax 120 (Heidolph Instruments, SRN) při frekvenci otáčení 100 rpm po dobu 24 hodin.

4.3 Příprava bakteriálních kmenů k ošetření nízkoteplotním plazmatem

Pro vytvoření tenké vrstvy (biofilmu) jednotlivých bakteriálních kmenů na podložní sklíčko (Obr. 10) bylo po kultivaci bakterií v C - médiu postupováno následovně. Nejprve byla narostlá bakteriální suspenze naředěna na koncentraci 1.10⁹ CFU/ml. K zjištění hustoty byl použit spektrofotometr BioMate 5 (Fisher Scientific, USA), kdy tato hodnota odpovídá optické hustotě 0,1 (OD = 0,1) při 600 nm (použita 1/2 kyveta). Poté byl 1 ml naředěné bakteriální suspenze napipetován do mikrozkušavky typu eppendorf a následně centrifugován (Universal 32 R; Hettich Lab Technology, SRN) při 15000 g po dobu 2 minut.

Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a získaný precipitát (bakteriální kultura) byl pomocí vortexu Reax top (Heidolph Instruments, SRN) resuspendován. Na podložní sklíčka bylo napipetováno 50 μ l resuspendovaného vzorku. Podložní sklíčka s jednotlivými bakteriálními kmeny byla umístěna na Heatblok Techne DRI-Block (Bibby Scientific, UK) a vysušena při 40 °C po dobu 20-30 min (kromě bakteriálního kmene *E. amylovora*, který byl vysoušen při 30 °C). Po vyschnutí C - média a vytvoření tenké vrstvy bakterií byla podložní sklíčka s bakteriálními kmeny vložena do kónických zkumavek o V = 45 ml. Současně s jednotlivými bakteriálními kmeny byla připravena (za stejných podmínek) i pozitivní kontrola (vždy 3 vzorky). Negativní kontrola byla připravena za stejných podmínek, kromě kroku umístění na Heatblok, kdy byla vysušena při 70 °C po dobu 10 min, aby došlo k usmrcení bakterie (připraveny 2 vzorky).

4.4 Ošetření bakteriálních kmenů nízkoteplotním plazmatem

Ošetřování jednotlivých bakteriálních kmenů bylo prováděno pomocí experimentálního přístroje Gliding Arc (Obr. 11) poskytnutý firmou SurfaceTreat, a.s., jehož princip je popsán v literárním přehledu (podkapitola 2.3). Obsluhu přístroje zajišťoval pan RNDr. Pavel Kříž, Ph.D. v prostorách Vědeckotechnického parku Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Jednotlivé bakteriální kmeny byly ošetřovány výbojem nízkoteplotního plazmatu (Obr. 12) v časových intervalech: 20, 40, 60, 80, 100, 120 a 160 s při pokojové teplotě ($t = 22$ °C). Vzorky byly umístěny ve vzdálenosti $d = 4$ cm od atmosferické plazmové trysky experimentálního přístroje a průtok pracovního plynu (atmosferický vzduch) byl $Q = 30$ SCFH (standardních krychlových stop za hodinu), tj. $0,85$ m³.

Výboj byl generován pomocí transformátoru vysokého napětí (10 kV/160 mA) mezi dvě nerezové elektrody, jenž byly vzdáleny 5 mm od sebe. Zdroj pracoval na frekvenci 50 Hz a přetlak vzduchu byl udržován na 600 kPa.

4.5 Příprava bakteriálních kmenů k vyhodnocení

Po ošetření bakteriálních kmenů nízkoteplotním plazmatem byla tenká vrstva na podložní sklíčku smyta 15 ml C - média a přelita do kónických zkumavek o V = 15 ml. Následně byla bakteriální suspenze centrifugována při 6000 g po dobu 10 minut.

Poté byl odstraněn supernatant a k získanému precipitátu byl napipetován 1 ml C - média. Pomocí vortexu byla bakteriální suspenze promíchána. Bakteriální suspenze o $V = 1$ ml byla přepipetována do mikrozkušavek typu eppendorf.

4.6 PrestoBlue

Ke zjištění vlivu nízkoteplotního plazmatu na životaschopnost jednotlivých bakteriálních kmenů byla použita chemická reagentie PrestoBlue (Life Technology, USA). Postupováno bylo podle přiloženého protokolu. K 1 ml bakteriální suspenze, pozitivní a negativní kontrole a Blank kontrole (C - média) bylo napipetováno 110 μ l chemické reagentie PrestoBlue. Následná inkubace bakteriálních kmenů a kontrol probíhala na Heatbloku po dobu 30 min za současného promíchávání vzorků.

4.7 Vyhodnocení životaschopnosti bakteriálních kmenů

Životaschopnost jednotlivých bakteriálních kmenů byla vyhodnocována na spektrofotometru BioMate 5 (Fisher Scientific, USA). Postupováno bylo podle protokolu Application Note: Processing Absorbance Data Obtained Using PrestoBlue™ Viability Reagent (Life Technology, USA). Výsledky byly nejprve předběžně porovnány s pozitivní a negativní kontrolou připravenou ze sklíčka (vysušená bakteriální suspenze) (Tab. č. 2) a následně byl vypočítán počet kolonií (colony forming units) (CFU/ml).

4.8 Výpočet CFU/ml

K výpočtu colony forming units (CFU/ml) byla použita regresní rovnice ($y = 6 * 10^8 * x - 2 * 10^8$) se spolehlivostí $R^2 = 0,99\%$, jenž byla odvozena z kalibrační křivky. K zjištění této regresní rovnice bylo provedeno ředění (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, a 1/64) bakteriální suspenze o počáteční koncentraci 1.10^9 CFU/ml. Poté bylo postupováno jako při přípravě bakteriálních kmenů k ošetření nízkoteplotním plazmatem (podkapitola 4.3). Následně byla tenká vrstva na podložním sklíčku smyta 15 ml C - média a další postup byl totožný s bodem příprava bakteriálních kmenů k vyhodnocení (podkapitola 4.5). K zjištění hodnot absorbance byla použita chemická reagentie PrestoBlue (Life technology, USA) s následným vyhodnocením na spektrofotometru BioMate 5 (Fisher Scientific, USA). Postupováno bylo podle přiloženého protokolu. Z naměřených hodnot absorbance (Tab. č. 3) byla sestrojena kalibrační křivka (Obr. 13).

5 Výsledky a diskuze

Cílem bakalářské práce bylo zjistit, zda ošetření nízkoteplotním plazmatem má vliv na životaschopnost fytopatogenních bakterií. Ta byla zjišťována pomocí chemické reagentie PrestoBlue s následným spektrofotometrickým vyhodnocením a výpočtem CFU/ml (Tab. č. 4) z regresní rovnice odvozené na základě kalibrační křivky (Obr. 13).

Nejcitlivěji na ošetření nízkoteplotním plazmatem reagovaly gramnegativní bakterie *Erwinia amylovora* a *Rahnella aquatilis*, jenž patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Podle studie Sung a kol. (2013) byla gramnegativní bakterie *E. coli* z čeledi *Enterobacteriaceae*, efektivně ničena po 60 s, kdy z počáteční koncentrace $4,57 \cdot 10^9$ CFU/ml přežilo 3,81 % bakterií. Tyto výsledky přibližně odpovídají našim výsledkům, jelikož *Rahnella aquatilis* byla znatelně redukována po 60 s ošetřování plazmatem, kdy z počáteční koncentrace $9,59 \cdot 10^8$ CFU/ml přežilo 2,73 % bakterií. U *E. amylovora* byl výrazný pokles životaschopných bakterií po 100 s ošetření plazmatem, kdy z počáteční koncentrace $9,86 \cdot 10^8$ CFU/ml přežilo 3,86 % bakterií a po 120 s přežilo pouze 3,01 % bakterií. Avšak dle studie Moreau a kol. (2005) jsou životaschopné pektynolitické bakterie *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *E. chrysanthemi* a *E. carotovora* subsp. *artroseptica* úspěšně ničeny až po 10 min ošetřování plazmatem. Tyto bakterie způsobují bakteriální černání stonku a měkou hnilobu hlíz bramboru (Kůdela a kol., 2002).

U gramnegativní polyfágní bakterie *Agrobacterium tumefaciens* bylo dosaženo významného snížení CFU/ml po 160 s ošetřování nízkoteplotním plazmatem, kdy z počáteční koncentrace $9,46 \cdot 10^8$ CFU/ml přežilo 4,10 % bakterií. Podobně tomu bylo i u další polyfágní bakterie *Pseudomonas viridiflava*, u níž po 160 s ošetřování nízkoteplotním plazmatem přežilo 4,58 % bakterií z počáteční koncentrace $6,64 \cdot 10^8$ CFU/ml. Příbuzná bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, dle studie Yang a kol. (2009) byla efektivně sterilizována plazmatem po 60 s, kdežto u *Pseudomonas viridiflava* po 60 s ošetřování plazmatem přežilo 13,7 % bakterií. Mohlo to být způsobeno tím, že ve studii Yang a kol. (2009) bylo použito nízkoteplotního plazmatu, u kterého byl použit jako pracovní plyn argon, kdežto v našem experimentu byl použit atmosferický vzduch.

Z gramnegativních bakterií vykazovala nejnižší citlivost k ošetření nízkoteplotním plazmatem *Xanthomonas vesicatoria* (Tab. č. 4), u které přežilo 14 % bakterií z počáteční koncentrace $9,24 \cdot 10^8$ CFU/ml po dobu 80 s ošetřování plazmatem a po 160 s ošetřování plazmatem přežilo až 43 % bakterií. Mohlo to být způsobeno nehomogenním plazmatickým výbojem Gliding Arc, ve kterém se neustále mění počet vznikajících částic a sloučenin (radikály, ozon atd.). V průběhu experimentálního pokusu nebyly přesně známy vznikající sloučeniny v tomto výboji. Tento přístroj byl odeslán na diagnostiku až po skončení experimentu.

Naopak u grampozitivních bakterií *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* a *Curtobacterium albidum* bylo ošetřování nízkoteplotním plazmatem téměř neúčinné a v jednotlivých časových intervalech proměnlivé (Tab. č. 4). U bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* bylo vysoké procento přeživších bakterií z počáteční koncentrace $8,90 \cdot 10^8$ CFU/ml, kdy po 160 s ošetřování plazmatem bylo stále živých 54 % bakterií, kdežto u bakterie *Curtobacterium albidum* bylo živých 33 % bakterií z počáteční koncentrace $9,57 \cdot 10^8$ CFU/ml po 160 s ošetřování plazmatem. Dle studie Erlomeava a kol. (2011) grampozitivní bakterie *Streptococcus pyogenes* byla odolnější s 17 % živých bakterií z počáteční koncentrace 10^5 CFU/ml po 5 min ošetřování plazmatem. Životaschopnost u další grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* byla závislá na kmeni bakterie, kdy přežilo od 0 % do 10 % bakterií z počáteční koncentrace 10^5 CFU/ml po 5 min ošetřování plazmatem. V této studii, bylo zjištěno, že citlivost grampozitivních bakterií k ošetření nízkoteplotním plazmatem závisí nejen na druhu bakterie, ale i na jejím kmeni. Dále bylo v této studii zjištěno, že gramnegativní bakterie jsou více citlivé k ošetření nízkoteplotním plazmatem než grampozitivní. Vzhledem k nízkému zastoupení grampozitivních fytopatogenních bakterií v této práci nelze tyto výsledky jednoznačně potvrdit, i když naše výsledky tomu přibližně odpovídají. Pro prokazatelné výsledky by bylo vhodné zajistit více druhů grampozitivních fytopatogenních bakterií.

Podle studie Moreau a kol. (2007) je citlivost fytopatogenních bakterií kmenu *Erwinia* spp. k ošetření nízkoteplotním plazmatem typu Gliding Arc velmi variabilní, což odpovídá i výsledkům v této bakalářské práci a lze toto zjištění aplikovat na všechny fytopatogenní bakterie, jenž byly použity v této bakalářské práci.

Hlavní příčinou ve variabilitě životaschopnosti bakterií v jednotlivých časových intervalech mohou být nejasné interakce plazmatu s okolními pevnými látkami, kdy dochází ke změnám stavu částic a tudíž ke změně energie. Nelze tak zajistit stejné podmínky plazmového výboje při každém ošetření jednotlivých bakteriálních druhů. V tomto ohledu by se jako vhodnější jevil plazmový výboj, který je generován za vakua, kde jsou v průběhu plazmování stabilnější podmínky. Tento typ přístroje však nebyl během našeho experimentu k dispozici.

6 Závěr

1. Byl prokázán vliv nízkoteplotního plazmatu typu Gliding Arc na životaschopnost vybraných fytopatogenních bakterií.
2. Citlivěji na ošetření nízkoteplotním plazmatem reagovaly gramnegativní bakterie na rozdíl od grampozitivních. Nelze to však potvrdit jednoznačně, z důvodu malého počtu zastoupených grampozitivních bakterií. Z gramnegativních bakterií nejlépe na ošetření nízkoteplotním plazmatem reagovaly *Rahnella aquatilis* a *Erwinia amylovora*, jenž se řadí do stejné čeledi *Enterobacteriaceae*. Dále velmi dobře na ošetření plazmatem reagovaly polyfágní bakterie *Agrobacterium tumefaciens* a *Pseudomonas viridiflava*. Nejnižší citlivost na ošetření nízkoteplotním plazmatem z gramnegativních bakterií vykazovala *Xanthomonas vesicatoria*.
3. Byla navržena vhodná metodika k ošetření fytopatogenních bakterií nízkoteplotním plazmatem. Dalším předmětem výzkumu by mohlo být zjišťování životaschopnosti fytopatogenních bakterií s použitím různých pracovních plynů pro výboj plazmatu či jiné druhy plazmatu. Dále lze užít různé chemické reagenty pro detekci životaschopných buněk a jejich vzájemné porovnávání.

7 Seznam použité literatury

Aubrecht, V. (2003) Technické aplikace plazmatu. Brno: Vitium. 25 s.
ISBN 80-214-2517-2.

Baier, R. E., Carter J. M., Sorenson, S. E., Meyer, A. E., McGowan, B. D.

a Kasprzak, S. A. (1992) Radiofrequency gas plasma (glos discharge) disinfection of dental operative instruments, including handpieces. *J. Oral Implant.* 18 (3), 236-242.

Bashan, Y., Azaizeh, M., Diab, S., Yunis, H. a Okon, Y. (1985) Crop loss of pepper plants artificially infected with *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in relation to symptom expression. *Crop Prot.* 4, 77-84.

Bashan, Y., Diab, S. a Okon, Y. (1982) Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper seeds and roots, in symptomless and dry leaves in non-host plants and in the soil. *Plant and Soil* 68 (2), 161-170.

Bellakhal, N., Draou, K., Cheron, B. G. a Brisset, J. L. (1997a) Protective films formed on copper by oxygen plasma treatment. *J. Electroanal. Chem.* 431, 297-299.

Bellakhal, N., Draou, K. a Brisset, J. L. (1997b) Electrochemical investigation of copper oxide films formed by oxygen plasma treatment. *J. Appl. Electrochem.* 27, 414-421.

Benstaali, B., Moussa, D., Addou, A., Brisset, J. L. (1998a) Plasma treatment of aqueous solutes: some chemical properties of gliding arc in humid air. *Eur. Phys. J. Appl.* 4, 171-179.

Benstaali, B., Moussa, D., Sauvage, L., Addou, A., Cheron, B. G., Brisset, J. L. (1998b) Interaction between plasma and aqueous solutes. In: The proceedings of the international Symposium on High Pressure, Low temperature plasma chemistry. *Hakone VI*, Cork, Ireland 148-152.

Beer, S. V. (1979) Fireblight inoculum: sources and dissemination. *Bull. OEPP/EPPO Bulletin* 9, 13-25.

Boudam, M. K., Moisan, M., Saoudi, B., Popovici, C., Gherardi, N. a Massines, F. (2006) Bacterial spores inactivation by atmospheric-pressure plasmas in the presence or absence of UV photons obtained with the same gas mixture. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 39, 3494-3507.

Boucher, R. M. (1980) Seeded gas plasma sterilization method. US Patent 407286.

- Brenner, D. J., Muller, H. E., Steigerwalt, A. G., Whitney, A. M., O'Hara, C. M. a Kampf, P.** (1998) Two new *Rahnella* genomospecies that cannot be phenotypically differentiated from *Rahnella aquatilis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 141-149.
- Bugbee, W. M. a Gudmestad, N. C.** (1988) The recovery of *Corynebacterium sepedonicum* from sugarbeet seed. *Phytopathology* 78, 205-208.
- Campbell, L., Moss, B. J., Dianese, A. a Wilson, M.** (1998) The good, the bad, and the ugly: biocontrol of bacterial spot of tomato. Highlights of Agricultural Research. *Ala. Agric. Exp. St.* 45 (2), 8-10.
- Collins, A.** NC State University. *Agrobacterium tumefaciens* [online]. 2001 [cit. 1. 3. 2014]. Dostupné z: <http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Agrobacterium/Alyssa_Collins_profile.htm>.
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M. a Leemans, J.** (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* 13, 4777-4788.
- DeCleene, M. a DeLey, J.** (1976) The host range of crown gall. *Bot. Rev.* 42, 389-466
- De la Riva, G. A., Cabrera, J. G., Padrón, R. V. a Pardo, C. A.** The *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer to plant cell. *Elektron. J. Biotechno.* [online]. 1998, 3 [cit. 18. 2. 2014]. Dostupné z: <<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol1/issue3/full/1/bip/#91>>.
- Diab, S., Bashan, Y., Okon, Y. a Henis, Y.** (1982a) Effects of relative humidity on bacterial scab caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on pepper. *Phytopathology* 72, 1257-1260.
- Diab, S., Bashan, Y. a Okon, Y.** (1982b) Studies on infection with *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial scab of pepper in Israel. *Phytoparasitica* 10, 183-191.
- Dougherty, D. E.** (1979) Yield reduction in tomato caused by bacterial spot and disease control with copper sprays. *P. Fl. St. Hortic. Soc.* 91, 291-293.
- Easton, G. D.** (1979) The biology and epidemiology of potato ring rot. *Am. Potato J.* 56, 459-460.

- El-Hendawy, H. H., Osman, M. E. a Sorour, N. M.** (2005) Biological control of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by *Rahnella aquatilis*. *Microbiol. Res.* 160 (4), 343-352.
- EPPO/CABI** (1996) *Leptinotarsa decemlineata*. In: Quarantine pests for Europe. Vydání 2. Publikováno Smith, I. M., McNamara, D. G., Scott, P. R. a Holderness, M. *CAB International*, Wallingford, UK.
- EPPO/CABI** (1997) *Erwinia amylovora*. In: Quarantine pests for Europe. Vydání 2. Publikováno Smith J. M., McNamara D. G., Scott P. R. a Holderness, M., 1001 - 1007. *CAB International*, Wallingford, UK.
- EPPO/CABI** (2004) *Pseudomonas viridiflava*. Distribution maps of plant diseases No. 917. *CAB International*, Wallingford, UK.
- EPPO/CABI** (2006) *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. distribution maps of plant diseases No. 20. *CAB International*, Wallingford, UK.
- EPPO/CABI** (2007) *Erwinia amylovora*. Distribution Maps of Plant Diseases No. October. *CAB International*, Wallingford, UK.
- Ermolaeva, S. A., Varfolomeev, F., Chernukha M. Yu., Yurov, D. S., Vasiliev, M. M., Kaminskaya, A. A., Moisenovich, M. M., Romanova, J. M., Murashev, A. N., Selezneva, I. I., Shimizu, T., Sysolyatina, E. V., Shaginyan, I. A., Petrov, O. F., Mayevsky, E. I., Fortov, V. E., Morfill, G. E., Naroditsky, B. S. a Gintsburg, A. L.** (2011) Bactericidal effects of non-thermal argon plasma *in vitro*, in biofilms and in the animal model of infected wounds. *J. Med. Microbiol.* 60, 75-83.
- Fridman, A., Chirokov, A. a Gutsol, A.** (2005) Non-thermal atmospheric pressure discharges. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 38 (2), R01.
- Geier, G., Geider, K.** (1993): Characterization and influence on virulence of the levansucrose gene from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 42, 387-404.
- Gitaitis, R., Sumner, D., Gay, D., Smittle, D., McDonald, G., Maw, B., Johnson, W. C., III, Tollner, B. a Hung Y.** (1997) Bacterial streak and bulb rot of onion: I. A diagnostic medium for the semiselective isolation and enumeration of *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Dis.* 81 (8), 897- 900.
- Goode, M. J. a Sasser, M.** (1980) Prevention - the key to controlling bacterial speck and bacterial speck of tomato. *Plant Dis.* 64, 831-834.

- Goubau, P., Van Aelst, F., Verhaegen, J. a Boogaerts, M.** (1988). Septicaemia caused by *Rahnella aquatilis* in an immunocompromised patient. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 7 (5), 697-699.
- Goumans, D. E. a Chatzaki, A. K.** (1998) Characterization and host range evaluation of *Pseudomonas viridiflava* from melon, blite, tomato, chrysanthemum and eggplant. *Eur. J. Plant Pathol.* 104, 181-188.
- Gurol, C., Ekinci, F. Y., Aslan, N. a Korachi, M.** (2012) Low Temperature Plasma for decontamination of *E. coli* in milk. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 1-5.
- Hayward, A. C. a Waterston, J. M.** (1964a) *Corynebacterium sepedonicum*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. *CAB International*, Wallingford, UK.
- Hayward, A. C. a Waterston, J. M.** (1964b) *Xanthomonas vesicatoria*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. *CAB International*, Wallingford, UK.
- Heydari, A, Khodakaramian, G. a Doostmorad, Z.** (2012) Charakterizion of *Pseudomonas viridiflava* causing alfalfa root rot disease in Hamedan Province of Iran. *J. Plant Pathol. Microbiol.* 3 (5), 2157-2162.
- Hooykas, P. J. J. a Shilperoort, R. A.** (1992) *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol. Biol.* 19, 15-38.
- Hudec, K. a Gutten, J.** (2007) Encyklopedie chorob a škůdců. Nespecifické choroby a škůdci rostlin. Vydání 1. Brno: Cumputer Press. 248 s. ISBN: 987-80-251-1768-2.
- Hury, S., Vidal, D. R., Desor, F., Pelletier, J. a Lagarde, T.** (1998) A parametric study of the destruction efficiency of *Bacillus* spores in low pressure oxygen-based plasmas. *Lett. in Appl. Microbiol.* 26, 417-421.
- Chang, J. S., Lawless, P. A. a Yamamoto, T.** (1991) Corona discharge processes. *IEE Trans. Plasma Sci.* 19 (6), 1152-1165.
- Chau, T. T., Kao, K. C., Blank, G. a Madrid, F.** (1996) Microwave plasmas for low-temperature dry sterilization. *Biomaterials* 17, 1273-1277.
- Chen, F. F.** (1984) Úvod do fyziky plazmatu. Vydání 1. Praha: Academia. 328 s.
- Chen, F., Guo, Y. B., Wang, J. H., Li, J. Y. a Wang, H. M.** (2007) Biological control of grape crown gall by *Rahnella aquatilis* HX2. *Plant Dis.* 91 (8), 957-963.
- Ishimaru, C. A., Klos, E. J. a Brubaker, R. R.** (1988) Multiple antibiotic production by *Erwinia herbicola*. *Phytopathology* 78 (6), 746-750.
- Jones, J. B., Jones, J. P., McCarter, S. M. a Stall, R. E.** (1984) *Pseudomonas viridiflava*: causal agent of bacterial leaf blight of tomato. *Plant Dis.* 68, 341-342.

- Jones, D. R. a Byrde, R. J. W.** (1987) Chemical control of fireblight on cider apple. *Acta Hortic.* 217, 235-238.
- Kado, C. I.** (1976) The tumor-inducing substance of *Agrobacterium tumefaciens*. *Annu. Ref. Phytopathol.* 14, 265-308.
- Kado, C. I.** *The Plant Health Instructor*. Crown gall [online]. 2002 [cit. 3. 2. 2014]. Dostupné z: <<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Pages/CrownGall.aspx>>.
- Kamgang-Youbi, G., Herry, J. M., Bellon-Fontaine, M. N., Brisset, J. L. a Doubla, N. M.** (2007) Evidence of temporal postdischarge decontamination of bacteria by gliding electric discharges: application to *Hafnia alvei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4791-4796.
- King, E. O., Ward, M. K. a Raney, D. E.** (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* 44, 301-307.
- Kleczek, J.** (1968) Plazma ve vesmíru a laboratoři. Praha: Academia. 330 s.
- Kokošková, B. a Mráz, I.** (2008) Diagnostický protokol pro *Erwinia amylovora*, původce spály růžovitých rostlin. Metodika pro praxi. Praha-Ruzyně: VÚRV, v.v.i. 27s. ISBN978-80-87011-935.
- Krejzar, V., Pánková, I., Kůdela, V. a Ackermann, P.** (2012) Metodika testování množitelského materiálu révy na přítomnost bakterií rodu *Agrobacterium* a ledově nukleárně aktivních bakterií rodu *Pseudomonas* v xylémové tekutině. Metodika pro praxi. Praha-Ruzyně: VÚRV, v.v.i. 12 s. ISBN: 987-80-7427-128-1.
- Kůdela, V., Novacky, A. a Fucikovsky, L.** (2002) Rostlinolékařská bakteriologie. Vydání 1. Praha: Academia. 374 s. ISBN 80-200-0899-3.
- Lall, N., Henley-Smith, C. J., De Canha, M. N., Oosthuizen, C. B. a Berrington, D.** (2013) Viability reagent, PrestoBlue, in comparasion other available reagens, utilized in cytotoxicity and antimicrobial. *Int. J. Microbiol.* 2013, 1-5.
- Lee, K., Paek, K., Ju, W. a Lee, Y.** (2006) Sterilization of bacteria, yeast and bacterial endospores by atmospheric-pressure cold plasma using helium and oxygen. *J. Microbiol.* 44, 269-275.
- Lelliot, R. A., Billing, E. a Hayward, A. C.** (1966) A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *pseudomonads*. *J. Appl. Bacteriol.* 29, 470-489.
- Lukezic, F. L., Lech, K. T. a Levine, R. G.** (1983) *Pseudomonas viridiflava* associated with root and crown rot of alfalfa and wilt of birdsfoot trefoil. *Plant Dis.* 67, 808-811.

- Manzer, F. E., Gudmestad, N. C. a Nelson, G. A.** (1987) Factors affecting infection, disease development and symptom expression of bacterial ring rot. *Am. Potato J.* 64, 641-676.
- Maraki, S., Samonis, G., Marnelakis, E. a Tselentis, Y.** (1994) Surgical wound infection caused by *Rahnella aquatilis*. *J. Clin. Microbiol.* 32 (11), 2707-2708.
- Matoušková, H. a Táborská, M.** Bakteriální kroužkovitost bramboru. *Ministerstvo zemědělství, Státní rostlinolékařská správa* [online] 2007 [cit. 25. 2. 2014]. Dostupné z:
<http://eagri.cz/public/web/file/58328/Krouzkovitost_bramboru_web.pdf>.
- McClure, N. C., Ahmadi, A. R. a Clare, B. G.** (1998) Construction of a range of derivatives of the biological control strain *Agrobacterium rhizogenes* K84: a study of factors involved in biological control of crown gall disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (10), 3977-3982.
- McInnes, T. B., Gitaitis, R. D., McCarter, S. M., Jaworski, C. A. a Phatak, S. C.** (1988) Airborne dispersal of bacteria in tomato and pepper transplant fields. *Plant Dis.* 72, 575-579.
- McNicholl, B. P., McGrath, J. W. a Quit, J. P.** (2006) Development and application of a resazurin-based biomass activity test for activated sludge plant management. *Water Res.* 41, 127-133.
- Moisan, M., Barbeau, J., Moreau, S., Pelletier, J., Tabrizian, M. a Ohia, L. H.** (2001) Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *Int. J. Pharm.* 226 (1-2), 1-21.
- Moisan, M., Barbeau, J., Crevier, M. C., Pelletier, J., Philip, N. a Saoudi, B.** (2002) Plasma sterilization. Methods and mechanisms. *Pure Appl. Chem.* 74, 349-358.
- Moreau, S., Moisan, M., Tabrizian, M., Barbeau, J., Pelletier, J. a Ricard, A.** (2000) Using the flowing afterglow of plasma to inactivate *Bacillus subtilis* spores: influence of the operating conditions. *J. Appl. Phys.* 88, 1166-1174.
- Moreau, M., Feuilleley, M. G. J., Orange, N. a Brisset J. L.** (2005) Lethal effect of the gliding arc discharges on *Erwinia* spp. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1039-1046.
- Moreau, M., Feuilleley, M. G. J., Veron, W., Meylheuc, T., Chevalier, S., Brisset, J. L. a Orange, N.** (2007) Gliding arc discharge in the potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*: Mechanismus of lethal action and effect on membrane-associated molecules. *Appl. Envr. Microbiol.* 73 (18), 5904-5910.

- Moreau, M., Orange, N. a Feuilloy, M. G. J.** (2008) Non – thermal plasma technologies: New tools for bio – decontamination. *Biotechnol. Adv.* 26, 610-617.
- Nelson, G. A.** (1984) Survival of *Corynebacterium sepedonicum* in potato stems and on surfaces held at freezing and above-freezing temperatures. *Am. Potato J.* 62, 23-28.
- Nelson, C. L. a Berger, T. J.** (1989) Inactivation of microorganisms by oxygen gas plasma. *Curr. Microbiol.* 18, 275-276.
- Nester, E. W., Gordon, M. P., Amasino, R. M. a Yanofsky, M. F.** (1984) Crown gall: a molecular and physiological analysis. *Annu. Rev. Plant Phys.* 35, 387-413.
- OEPP/EPPO** (1990) Quarantine procedures No. 25, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* - inspection and test methods. *Bull. OEPP/EPPO Bulletin* 20, 235-254.
- OEPP/EPPO** (1988) Data sheets on quarantine organisms No. 157, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Bull. OEPP/EPPO Bulletin* 18, 521-526.
- OEPP/EPPO** (2006) *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Bull. EPPO/OEPP Bulletin* 36, 99-109.
- Perminow, J. I. S., Akselsen, I. L. W., Borowski, E., Ruden, O. a Gross, W.** (2012) Potato ring rot in Norway: occurrence and control. *Potato Res.* 55, 241-247.
- Pintado, M. E., Pintado, A. I. E. a Mašata, F. X.** (1999) Fate of nitrogen during metabolism of whey lactose by *Rahnella aquatilis*. *J. Dairy Sci.* 82 (11), 2315-2326.
- Pohronezny, K., Moss, M. A., Dankers, W. a Schenk, J.** (1990) Dispersal and management of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* during thinning of direct-seeded tomato. *Plant Dis.* 74, 800-805.
- Psallidas, P. G.** (1990) Fireblight of pomaceous trees in Greece - Evolution of the disease and characteristics of the pathogen *Erwinia amylovora*. *Acta Hortic.* 273, 25-32.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Benink, H. A., Worzella, T. J. a Minor, L.** Cell viability assays. *Assay Guidance Manual. NCBI* [online]. 2013 [cit. 14. 1. 2014]. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>>.
- Rothwell, A.** (1968) Bacterial cancer of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*. (Smith) Jensen. *Rhod. Agric. J.* 1871, 75-78.
- Sarker, S. D., Nahar, L. a Kumarasamy, Y.** (2007) Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its

application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 42, 321-342

Sherf, A. F. a McNab, A. A. (1986) Vegetable diseases and their control. Vydání 2. New York: Wiley. 728 s. ISBN: 0-471-05860-2.

Schaad, N. W. (1980) Laboratory guide for plant pathogenic bacteria. *Am. Phyt. Soc.* St. Paul.

Schaad, N. W. (1999) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. *Plant Dis.* 83 (12), 1095–1100.

Schaad, N. W., Jones, J. B. a Chun, W. (2001) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. *American Phythopatological Society Press*, Minnesota.

Scholtz, V. Nízokoteplotná plazma I: Čo je to. *Aidebaren bulletin* [online]. 2012, 22 [cit. 27. 2. 2014]. Dostupné z: <http://www.aldebaran.cz/bulletin/2012_22_pla.php>.

Sletten, A. (1985) The effect of *Corynebacterium sepedonicum* on symptoms and yield of four potato cultivars. *Potato Res.* 28, 27-33.

Smith, E. F. a Townsend, C. O. (1907) A Plant-tumor of bacterial origin. *Science* 25, 671-673.

Sobiczewski, P., Deckers, T. a Pulawska J. (1997) FireBlight (*Erwinia amylovora*). Some aspects of epidemiology and control. *Res. Inst. Pomology and Floriculture*, Skierniewice, Poland, 71.

Stach, V. (1989) Plazma – čtvrté skupenství hmoty. Vydání 1. Praha: Státní pedagogické nakladatelství. 96 s.

Stall, R. E. a Thayer, P. L. (1962) Streptomycin resistance of bacterial spot pathogen and control with streptomycin. *Plant Dis. Rep.* 46, 389-393.

Steinmüller, S., Müller, P., Bandte, M. a Büttner, C. (2013) Risk of dissemination of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* with potato waste. *Eur. J. Plant Pathol.* 137, 573-584.

Sung, S. J., Huh, J. B., Yun, M. J., Chang, B. M. W., Jeong, Ch. M. a Jeon, Y. Ch. (2013) Sterilization effect of atmospheric pressure non-thermal air plasma on dental instruments. *J. Adv. Prosthodont.* 5, 2-8.

Swings, J. G. a Civerelo, E. L. (1993) *Xanthomonas*. Vydání 1. Londýn: Chabman and Hall. 399 s. ISBN: 0-412-43420-2.

- Van Buskirk, P. D. a Van der Zwet, T.** (1984) Detection of endophytic and epiphytic *Erwinia amylovora* in various pear and apple tissues. *Acta Hort.* 151, 69-75.
- Van der Wolf, J. M., Elphinstone, J. G., Stead, J. M., Metzler, M., Müller, P., Hukkanen, A. a Karjalainen, R.** (2005) Epidemiology of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in relation to control of bacterial ring rot. *Plant Research International B. V., Wageningen* [online] 2005, 95 [cit. 2. 3. 2013] Dostupné z: <<http://edepot.wur.nl/39352>>.
- Van der Zwet, T. a Keil, H. L.** (1979) Fireblight: a bacterial disease of rosaceous plants. *USDA Agriculture Handbook 510*, Washington DC, USA.
- Tensmeyer, L. G., Wright, P. E., Fegenbush, D. O. a Snapp, S. W.** (1981) Sterilization of glass containers by laser initiated plasma. *J. Parent. Sci. Technol.* 35, 93-96.
- Thomson, S. V., Schroth, M. N., Moller, W. J. a Reid, M. D.** (1982) A forecasting model for fireblight of pear. *Plant Dis.* 66, 576-577.
- Whitman, W. B., Parte, A., Goodfellow, M., Kampfer, P., Busse, H. J., Trujillo, M. E., Ludwig, W. a Suzuki, K.** (2012) *Bergey's Manual of Systematic Bacterology*. Vydání 5. ISBN: 987-0-387-95043-3.
- Yang, L., Chen, J. a Gao, J.** (2009) Low temperature argon plasma sterilization effect on *Pseudomonas aeruginosa* and its mechanisms. *J. Electrostat.* 67, 646-651.

8 Tabulky

Tab. č. 1: Seznam použitých bakteriálních kmenů k ošetření nízkoteplotním plazmatem.

Název bakterie	Sbírkové číslo
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	CCM 2835
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	CRI 1835/98
<i>Curtobacterium albidum</i>	CCM 2296
<i>Erwinia amylovora</i>	CCM 1133
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	BCCM/LMG 2352
<i>Rahnella aquatilis</i>	CCM 4086
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	CFBP 2537

BCCM/LMG = Belgian Co-ordinated Collection of Microorganisms, CFBP = Collection Francaise de Bacteriés Phytophatogéenes, CCM = Česká sbírka mikroorganismů v Brně, CRI = sbírka mikroorganismů Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Praze-Ruzyni, v.v.i.

Tab. č. 2: Hodnoty absorbance v jednotlivých časových intervalech po ošetření bakteriálních kmenů nízkoteplotním plazmatem.

Bakteriální kmen	20 s	40 s	60 s	80 s	100 s	120 s	160 s	K-N	K-P
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	0,690	0,940	0,596	0,635	0,582	0,571	0,398	0,245	1,907
<i>Clavibacter. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	0,787	1,618	1,807	1,555	1,398	1,889	1,137	0,480	1,817
<i>Curtobacterium albidum</i>	1,868	1,866	0,479	1,155	1,908	1,431	0,868	0,734	1,928
<i>Erwinia amylovora</i>	1,820	0,547	0,427	0,551	0,397	0,383	0,402	0,332	1,977
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	1,246	0,768	0,485	0,433	0,533	0,401	0,384	0,724	1,440
<i>Rahnella aquatilis</i>	0,576	0,404	0,377	0,372	0,455	0,432	0,366	0,357	1,932
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	0,831	0,690	0,796	0,551	0,576	0,564	0,997	0,411	1,873

K - N = kontrola negativní, K - P = kontrola pozitivní

Výsledky jsou vyjádřeny jako směrodatná odchylka (S.D.) \pm 0,05.

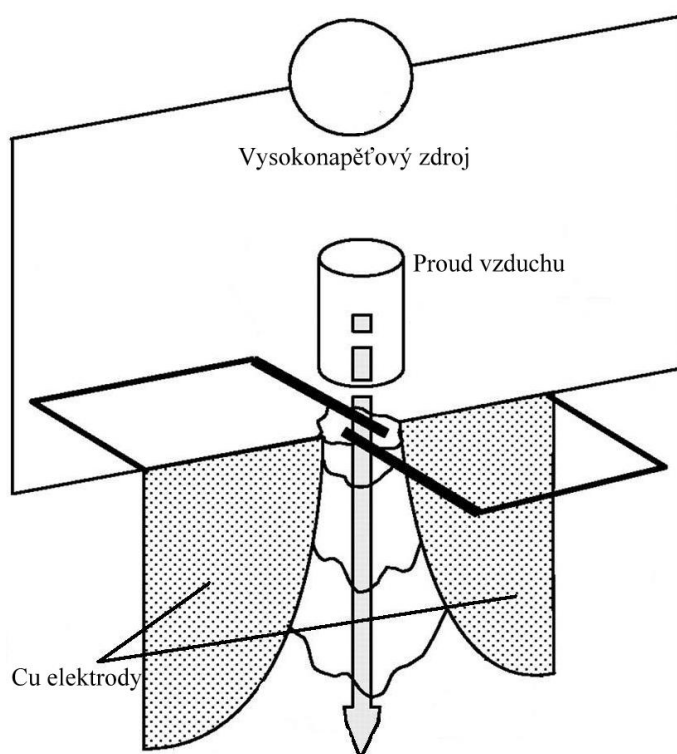
Tab. č. 3: Absorbance a koncentrace bakteriální suspenze v závislosti na ředění.

Ředění [bakteriální suspenze/C - médium]	Koncentrace (mol/l)	Absorbance
1/2	$1 \cdot 10^9$	1,870
1/4	$5 \cdot 10^8$	1,014
1/8	$2,50 \cdot 10^8$	0,765
1/16	$1,25 \cdot 10^8$	0,461
1/32	$6,25 \cdot 10^7$	0,365
1/64	$3,13 \cdot 10^7$	0,343

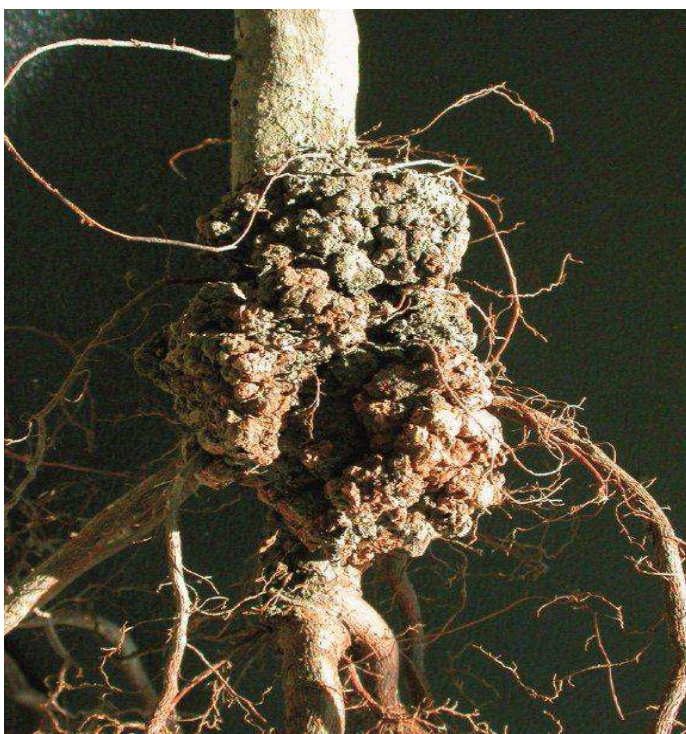
Tab. č. 4: Efekt Gliding Arc plazmatu na životaschopnost bakteriálních kmenů (CFU/ml) v jednotlivých časových intervalech [s].

Bakteriální kmen	Počáteční koncentrace [CFU/ml]	CFU/ml						
		20 s	40 s	60 s	80 s	100 s	120 s	160 s
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	$9,46 \cdot 10^8$	$2,14 \cdot 10^8$	$3,64 \cdot 10^8$	$1,58 \cdot 10^8$	$1,81 \cdot 10^8$	$1,49 \cdot 10^8$	$1,43 \cdot 10^8$	$3,88 \cdot 10^7$
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	$8,90 \cdot 10^8$	$2,72 \cdot 10^8$	$7,71 \cdot 10^8$	$8,84 \cdot 10^8$	$7,33 \cdot 10^8$	$6,39 \cdot 10^8$	$9,33 \cdot 10^8$	$4,82 \cdot 10^8$
<i>Curtobacterium albidum</i>	$9,57 \cdot 10^8$	$9,21 \cdot 10^8$	$9,20 \cdot 10^8$	$8,74 \cdot 10^7$	$4,93 \cdot 10^8$	$9,45 \cdot 10^8$	$6,59 \cdot 10^8$	$3,21 \cdot 10^8$
<i>Erwinia amylovora</i>	$9,86 \cdot 10^8$	$8,92 \cdot 10^8$	$1,28 \cdot 10^8$	$5,62 \cdot 10^7$	$1,31 \cdot 10^8$	$3,82 \cdot 10^7$	$2,98 \cdot 10^7$	$4,12 \cdot 10^7$
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	$6,64 \cdot 10^8$	$5,48 \cdot 10^8$	$2,61 \cdot 10^8$	$9,10 \cdot 10^7$	$5,98 \cdot 10^7$	$1,20 \cdot 10^8$	$4,06 \cdot 10^7$	$3,04 \cdot 10^8$
<i>Rahnella aquatilis</i>	$9,59 \cdot 10^8$	$1,46 \cdot 10^8$	$4,24 \cdot 10^7$	$2,62 \cdot 10^7$	$2,32 \cdot 10^7$	$7,30 \cdot 10^7$	$5,92 \cdot 10^7$	$1,96 \cdot 10^7$
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	$9,24 \cdot 10^8$	$2,99 \cdot 10^8$	$2,14 \cdot 10^8$	$2,78 \cdot 10^8$	$1,31 \cdot 10^8$	$1,44 \cdot 10^8$	$1,38 \cdot 10^8$	$3,98 \cdot 10^8$

9 Obrázky



Obr. 1: Schéma přístroje Gliding Arc
(převzato a upraveno dle Moisan a kol. 2007).
(<http://aem.asm.org/content/73/18/5904/F1.large.jpg>)



Obr. 2: Příznak nádorovitosti na révě vinné v místě
podnožového řízku vyvolaný *Agrobacterium tumefaciens*.
(<http://www.ekovin.cz/uploads/choroby/255-2.jpg>)



Obr. 3: Příklad bakteriální kroužkovitosti bramboru způsobený *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.
(http://www.eppo.int/QUARANTINE/bacteria/Clavibacter_m_sepedonicus/CORBSE_02.jpg)



Obr. 4: Bakteriální kolonie *Curtobacterium albidum* na Petriho misce.
(<http://www.jcm.riken.go.jp/JCM/img/JCM13471A.jpg>)



Obr. 5: Příznaky spály růžovitých na jabloni způsobené *Erwinia amylovora*.
(http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Apple_tree_with_fire_blight.jpg)



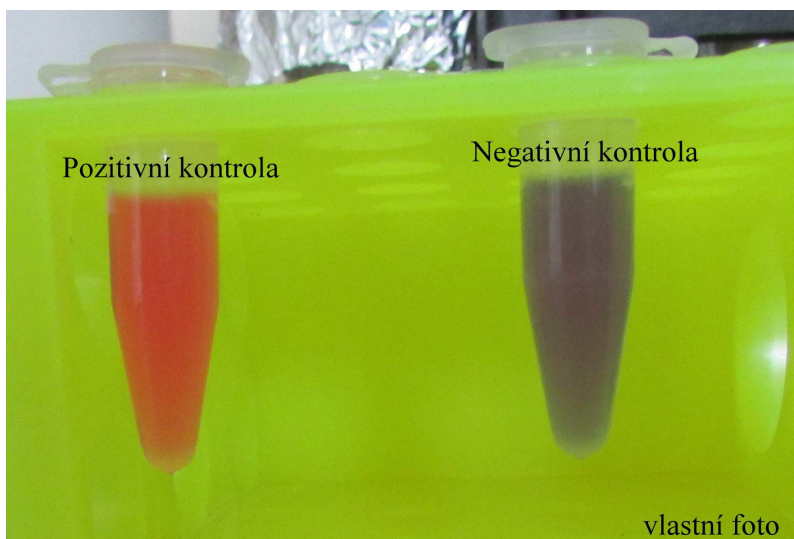
Obr. 6: Příznaky bakteriální skvrnitosti na listu cibule způsobené *Pseudomonas viridiflava*.
(<http://www.forestryimages.org/images/768x512/5472698.jpg>)



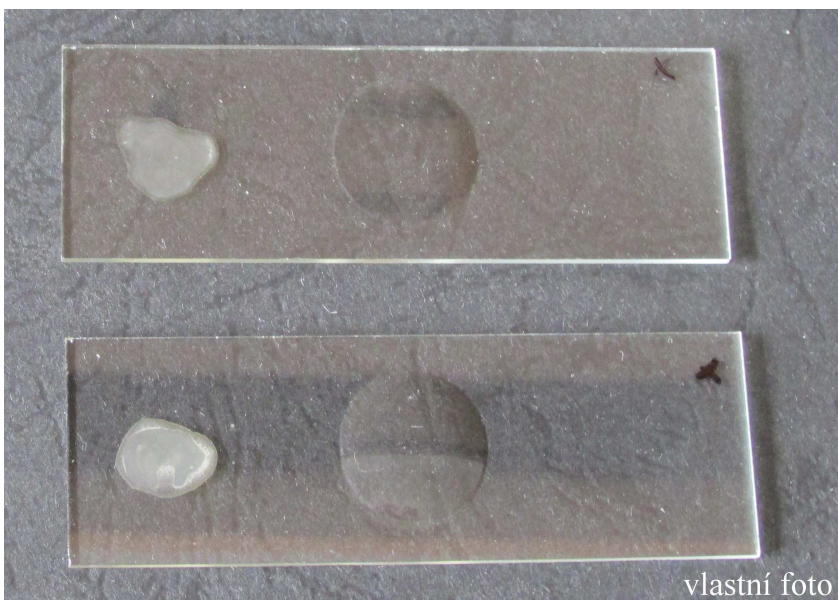
Obr. 7: Bakteriální kolonie *Rahnella aquatilis* na Petriho misce.
(http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/20050104/8c229e2058b343afb03caccec3db5234/6617_lores.jpg)



Obr. 8: Příznaky bakteriální skvrnitosti na listu rajčete způsobené *Xanthomonas vesicatoria*.
(<http://www.forestryimages.org/images/768x512/5260029.jpg>)



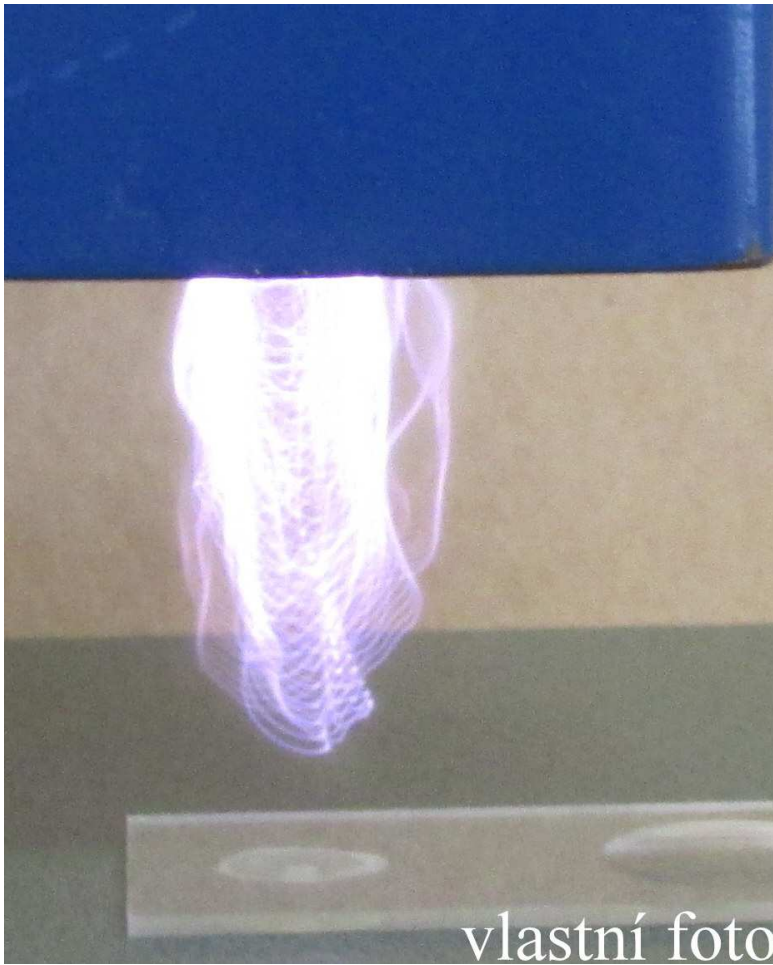
Obr. 9: Redukce resazurinu (negativní kontrola) na resorufin (pozitivní kontrola).



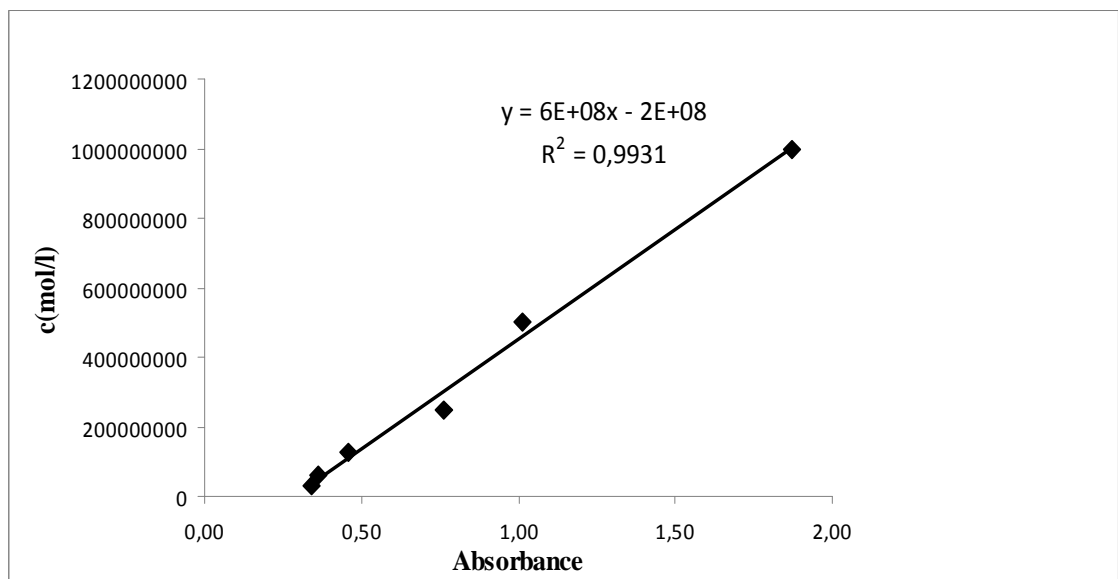
Obr. 10: Tenká vrstva bakterie na podložním sklíčku.



Obr. 11: Příklad Gliding Arc.
(<http://www.surface-treat.com/?q=system/files/atmosfericka-tryska.jpg>)



Obr. 12: Detail plazmového výboje.



Obr.13: Kalibrační křivka.