

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie se zaměřením na vzdělávání



Matyáš Nikel

Pevná média pro kultivaci bakterií: agar a jeho alternativy
Beyond agar: alternative solid media for cultivation of bacteria

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Jaroslav Nunvář, Ph.D.

Praha, 2025

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 4. srpna 2025

Matyáš Nikel

Poděkování

Za odborné vedení práce, za cenné informace a připomínky děkuji mému školiteli, panu RNDr. Jaroslavu Nunvářovi, Ph.D.

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá pevnými kultivačními médii využívanými v mikrobiologii, se zaměřením na agar jako standardní ztužovadlo a jeho alternativy. Popisuje fyzikálně-chemické principy gelace hydrofilních polymerů a jejich vliv na strukturu média. Hlavní část je věnována agaru, jeho historii, chemickému složení, mechanismu tvorby gelu a interakci s bakteriemi. Následuje přehled vybraných přírodních ztužovadel – želatiny, pektinu, škrobu a chitosanu – s důrazem na jejich vlastnosti a možnosti použití při kultivaci mikroorganismů. Zmíněny jsou také syntetické silikagely a komplexní přírodniny, například vaječný bílek a rostlinné zásobní orgány, které mohou sloužit jako jednoduchá pevná média. Cílem práce bylo shrnout poznatky o různých typech pevných médií, porovnat jejich vlastnosti a zhodnotit potenciál alternativních polymerů pro přípravu kultivačních substrátů.

Klíčová slova: pevná média, agar, želatina, pektin, škrob

Abstract

This bachelor thesis focuses on solid culture media used in microbiology, with emphasis on agar as the standard gelling agent and its alternatives. It describes the physicochemical principles of hydrogel formation in hydrophilic polymers and their impact on medium structure. The main part covers agar, including its history, chemical composition, gelation mechanism and interactions with bacteria. Selected natural gelling agents – gelatin, pectin, starch and chitosan – are reviewed with attention to their properties and potential use in bacterial cultivation. Synthetic silica gels and complex natural substrates such as egg white and plant storage organs are also discussed as simple solid media. The aim of the thesis was to summarize knowledge on different types of solid media, compare their characteristics and evaluate the potential of alternative polymers for culture medium preparation.

Key words: solid media, agar, gelatin, pectin, starch

Obsah

1. Úvod	1
2. Kultivace bakterií na pevných médiích	1
3. Obecná fyzikálně-chemická charakteristika ztužujících polymerů a mechanismu gelace	2
4. Agar	3
4.1 Historie zavedení agaru do bakteriologie	3
4.2 Složení a výroba agaru	3
4.3 Mechanismus gelace agaru	4
4.4 Metabolismus agaru bakteriemi	6
5. Alternativní ztužovadla	6
5.1 Želatina	7
5.2 Pektin	9
5.3 Škrob	11
5.4 Chitosan	13
6. Syntetické hydrofilní polymery – silikagely	15
7. Komplexní přírodní látky jako pevná kultivační média	15
7.1 Vaječný bílek	16
7.2 Rostlinné zásobní orgány	17
8. Závěr	19
9. Seznam literatury	19

1. Úvod

Kultivace mikroorganismů na pevných médiích je nezbytná pro izolaci čistých kultur, sledování morfologických znaků kolonií i hodnocení biochemických vlastností bakterií. Při přípravě těchto médií hrají zásadní roli ztuzující látky, z nichž se dnes nejčastěji používá agar pro svou chemickou stabilitu, vhodné teplotní vlastnosti a proto, že jej většina bakterií nemetabolizuje. Kromě něj však existuje řada přírodních i syntetických polymerů se srovnatelnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, jejichž zkoumání přináší jak pohled na historický vývoj kultivačních technik, tak možnosti přípravy alternativních médií využívajících odlišné mechanismy gelace.

Tato bakalářská práce se zaměřuje na přehled a porovnání pevných kultivačních médií, zejména na fyzikálně-chemické vlastnosti ztuzujících polymerů. Hlavní pozornost je věnována agaru jako standardnímu zástupci a dále vybraným alternativám – želatině, pektinu, škrobu, chitosanu a silikagelům. Tyto polymery byly zvoleny pro svůj historický význam, přírodní původ nebo specifické vlastnosti umožňující odlišný mechanismus tvorby gelu. Samostatná kapitola se zabývá využitím komplexních přírodnin, jako jsou vaječný bílek či rostlinné zásobní orgány, které mohou sloužit jako jednoduchá a dostupná pevná kultivační média.

Cílem práce je shrnout dostupné poznatky o fyzikálně-chemických principech tvorby pevných kultivačních médií, charakterizovat vlastnosti vybraných hydrofilních polymerů a zhodnotit jejich využitelnost pro kultivaci bakterií. Práce si klade za úkol poskytnout srovnání klasického agaru s jeho alternativami a ukázat, jak různé ztuzující látky ovlivňují výsledné médium.

2. Kultivace bakterií na pevných médiích

V tekutých médiích není prostorová separace jednotlivých buněk možná. Jejich množení se projevuje spíše celkovými makroskopickými změnami, jako je zakalení kultury, vznik sedimentu na dně či tvorba biofilmu na hladině. Tyto projevy, podmíněné jednak metabolismem mikroorganismu, jednak konkrétními kultivačními podmínkami, však neposkytují dostatečné informace o druhovém složení populace. Proto je pro účely izolace a identifikace nezbytné přeočkování na pevné médium.

Pevná kultivační média, nejčastěji na bázi agaru, umožňují separaci smíšených bakteriálních populací na jednotlivé kolonie. Při nanesení směsné kultury na povrch pevného média dochází k postupnému zředování inokula a k fyzickému oddělení jednotlivých bakteriálních buněk. Po inkubaci vyrůstají izolované kolonie, z nichž každá zpravidla pochází z jediné buňky a tvoří tak čistou kulturu jednoho druhu. Tento princip je klíčový pro následnou izolaci, identifikaci a detailní studium konkrétních mikroorganismů (*Bonnet et al., 2020).

Různé druhy bakterií na pevných médiích vytvářejí kolonie odlišného vzhledu. Liší se velikostí, tvarem, okraji, barvou i povrchovou strukturou. Morfologie kolonií patří mezi klasické fenotypové znaky využívané při charakterizaci a identifikaci bakterií. Typickým příkladem je *E. coli*, která na standardním agaru tvoří hladké, kruhové kolonie (Hasman et al., 2000). Na pevných médiích se zároveň zřetelně projevují některé fenotypové vlastnosti mikroorganismů. Patří k nim například tvorba pigmentů.

U *Staphylococcus aureus* jde o charakteristický zlatý staphyloxanthin, jenž chrání buňku před oxidativním stresem a přispívá k její virulenci (Liu et al., 2005). Další významný znak představuje hemolýza na krevním agaru, využívaná k diferenciaci streptokoků a příbuzných druhů.

Pozorování takových znaků je umožněno složením média. To často obsahuje indikátory metabolismu. Agar lze obohatit o barviva, sacharidy či krev, které mění vzhled kolonií nebo okolního agaru v závislosti na metabolických vlastnostech mikroorganismu. Krevní agar tak umožňuje odlišit bakterie podle schopnosti lyzovat erytrocyty. β -hemolýza se projeví čirou zónou kolem kolonie, α -hemolýza nazelenalým zbarvením a γ -hemolýza absencí viditelné změny (Woltjes et al., 1981). Jiným klasickým příkladem je MacConkey agar, obsahující laktózu a pH indikátor neutrální červeň. Fermentace laktózy (např. u *E. coli*) vede ke vzniku kyselin a zčervenání kolonií, zatímco nefermentující bakterie, jako *Salmonella spp.*, zůstávají bezbarvé. Krystalová violet a žlučové soli současně potlačují růst grampozitivních bakterií, čímž médium zajišťuje selektivitu pro gramnegativní enterobakterie (Park et al., 2011).

Pevná média mají zásadní význam i pro kvantifikaci životaschopných buněk pomocí tzv. viabilní početní metody. Tato metoda je založena na sériovém ředění vzorku a následném výsevu na pevné kultivační médium. Po inkubaci se kolonie spočítají s předpokladem, že každá vznikla z jediné životaschopné buňky či jejího shluku. Podle počtu kolonií a známého ředění se určí koncentrace mikroorganismů v původním vzorku, obvykle ve formě jednotek tvořících kolonie (colony forming units, CFU) na mililitr nebo gram (Meyer et al., 2023).

V tekutých médiích lze sice sledovat životaschopnost alternativními metodami, například fluorescenčními barvivy v kombinaci s průtokovou cytometrií, které rozlišují buňky podle integrity cytoplazmatické membrány. Tyto přístupy však neposuzují schopnost buněk růst a vytvářet kolonie, a výsledky se tak mohou od klasické CFU metody lišit (Berney et al., 2007).

3. Obecná fyzikálně-chemická charakteristika ztužujících polymerů a mechanismu gelace

Hydrofilní polymery jsou makromolekulární struktury nesoucí vysoký podíl polárních funkčních skupin, zpravidla hydroxylových či karboxylových. Díky nim vstupují do interakcí s vodným prostředím pomocí vodíkových můstků. V dehydratované formě se obvykle ve vodě nerozpouštějí; teprve při zahřátí k teplotám blízkým bodu varu dochází k rozrušení

intra- i intermolekulárních vodíkových vazeb a k rozpadání makromolekulárních agregátů, čímž se polymerní síť stává dispergovatelnou. Vzniklý viskózní roztok se při následném ochlazení znovu uspořádává do trojrozměrné sítě, charakterizované fyzikálně stabilní gelovou maticí. Tento proces, označovaný jako termoreverzibilní gelace, tvoří základ přípravy celé řady systémů – od želatinových a agarových gelů až po pektinové a škrobové disperze (Nordby et al., 2003).

4. Agar

4.1 Historie zavedení agaru do bakteriologie

V historii mikrobiologie se jen málokterá látka stala tak zásadní součástí výzkumu jako agar. První vědecký popis jeho využití v bakteriologii pochází z pera Roberta Kocha. V práci *Die Ätiologie der Tuberkulose*, otištěné 10. dubna 1882 v *Berliner Klinische Wochenschrift* se píše: *„Tuberkulózní bacily lze kultivovat i na jiných živných substrátech, pokud mají podobné vlastnosti jako ztuhlé krevní sérum. Například rostou na želé připraveném z agaru, které zůstává pevné při tělesné teplotě a obsahuje přídavek masového bujónu a peptonu.“* Tímto popisem Koch označil agar jako vhodnou matici pro růst *Mycobacterium tuberculosis* při teplotě lidského těla (Koch, 1882, s. 225).

Za nápadem však stála žena, jejíž jméno se do oficiálních zápisů dostalo jen okrajově. Podle dochovaných dopisů Walthera Hesse, lékaře a spolupracovníka Roberta Kocha, a archivních materiálů z Kochovy laboratoře byla autorkou myšlenky Fanny Angela Hesse, manželka Walthera Hesse. Zdrojem tohoto tvrzení je práce Arthura P. Hitchense a Morrisa C. Leikinda z roku 1939, která analyzuje původ metody na základě rodinné korespondence a laboratorních záznamů (*Hitchens & Leikind, 1938). Walther Hesse ve své metodické stati z roku 1884 v *Mitteilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte* nazývá agar „nejvhodnějším ztužovadlem“ a výslovně přičítá jeho zavedení doporučení své manželky (Hesse, 1884). Sama Fanny nikdy nic nepublikovala. Její přínos známe díky nepřímým svědectvím, ale právě ona přenesla zkušenost ze své kuchyně, kde se agar používal jako cukrářská želatina, do prostředí laboratorní vědy.

4.2 Složení a výroba agaru

Agar je produktem červených mořských řas, zejména rodů *Gelidium* a *Gracilaria*, kde funguje jako strukturální složka buněčných stěn (Ji, 1997, cit. dle Fu & Kim, 2010). Komerční výroba sestává ze sušení řas, pokračuje varem ve vodě, při němž se polysacharidy uvolní, následuje filtrace a čištění. Stěžejním krokem je oddělení dvou hlavních frakcí: agarózy a agaropektinu (*Armisen, Galatas, & Hispanagar, 2000). Typická směs obsahuje zhruba 70 %

agarózy a 30 % agaropektinu (Duckworth & Yaphe, 1971). Čistá agaróza, zbavená skupin s nábojem, zejména sulfátových, se používá především v molekulární biologii při elektroforéze.

Agaróza je lineární heteropolysacharid složený z opakujících se jednotek agarobiózy (D-galaktózy a 3,6-anhydro-L-galaktózy) propojených α -(1 $\rightarrow$ 3) a β -(1 $\rightarrow$ 4) glykosidickými vazbami. Tato struktura jí při ochlazení umožňuje vytvářet stabilní trojrozměrnou síť. Výsledný gel je termoreverzibilní. Taje při 85–90 °C a tuhne v rozmezí 35–40 °C (Ghebremedhin et al., 2021). Právě tepelná hystereze agaru umožňuje jeho použití při kultivaci bakterií v inkubačním rozmezí kolem 37 °C. Díky rozdílným teplotám tání a tuhnutí lze roztavené médium nalévat ještě za relativně vysoké teploty, aniž by začalo gelovat, a po vychladnutí zůstává pevné i při teplotě lidského těla. To umožňuje připravit Petriho misky nebo zkumavky s pevným médiem, které si během inkubace při 37 °C udrží svou strukturu.

V mikrobiologii se koncentrace agaru volí podle účelu kultivace. Pro pevná média se běžně používá 1–3 % (w/v). Pro specifické aplikace, jako je studium bakteriální motility a chemotaxe, se využívá tzv. soft agar v nižších koncentracích, typicky mezi 0,15–0,35 % (w/v), což umožňuje pohyb bakterií a tvorbu migračních prstenců (Croze et al., 2011). Vyšší koncentrace agaru, např. 5–7 % (w/v), bývají naopak využívány ke studiu vlivu struktury gelu na růst bakterií (Stecchini et al., 2001).

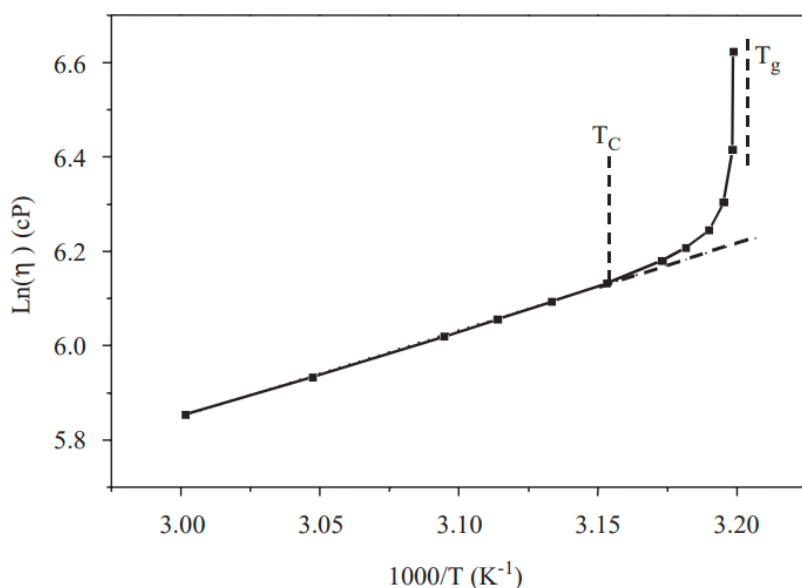
4.3 Mechanismus gelace agaru

Wang et al., (2011) uvádí, že gelace agaru probíhá ve třech navazujících fázích. V prvním kroku, po povaření roztoku, dochází k rozrušení vodíkových můstků mezi polymerními řetězci a k jejich úplné hydrataci. Řetězce se v horkém roztoku rozptýlí a vzniká homogenní tekutý sol, předstupeň gelu.

S klesající teplotou nastupuje fáze gelizační. Polymerní vlákna agaru se stáčí do levotočivých dvojítych helixů a antiparalelně se uspořádávají do trojrozměrné sítě. Kinetika tohoto procesu odpovídá Arrheniově rovnici, která popisuje, jak teplota ovlivňuje rychlost chemických a fyzikálních procesů. Aby se vazby mezi vlákny vytvořily, je potřeba určité množství energie, v tomto případě se pohybuje v rozmezí 39–74 kJ/mol. To odpovídá energii vodíkových můstků, které jsou hlavním stabilizačním prvkem držícím tuto prostorovou strukturu pohromadě.

Zároveň se při ochlazování agaru dlouhé molekuly samovolně spojují do menších shluků. Jakmile se takové shluky vytvoří, usnadňují vznik dalších, takže tento proces postupuje stále rychleji. V literatuře je tento typ samovolné agregace popisován jako autokatalytický proces. Doprovázeno je to i Ostwaldovým zráním, při kterém se malé a méně stabilní shluky postupně rozpadají a materiál z nich uvolněný se přidává k větším a pevnějším celkům. Tím se vytváří propojená prostorová síť, která způsobuje ztuhnutí roztoku. Její pevnost, vyjádřená elasticitním

modulem G' , se zvyšuje s rostoucím množstvím agaru a závisí na něm podle mocninného vztahu. Když se měří reologické vlastnosti při chlazení, viskozita u agaru typicky neroste lineárně, ale má tvar sigmoidální křivky (obrázek 1) (Lahrech et al., 2023).



Obrázek 1: Typická křivka viskozity agarového roztoku. Závislost logaritmu viskozity ($\ln \eta$) na teplotě ($1000/T$). T_c – teplota, nad níž se roztok chová jako klasická viskózní kapalina, T_g – teplota gelace, při níž viskozita roste. Převzato z (Lahrech et al., 2023).

Třetí fáze, popsaná Wangem (2011), už nové vazby nevytváří. Síť se spíše ustaluje a dochází k pomalému uvolňování molekul vody zachycených v pórech gelu. Tento proces, syneréza, vede k mírnému zmenšení objemu gelu a má nízkou energetickou náročnost (okolo 7 kJ/mol).

Výsledná gelová struktura je stabilizována především vodíkovými můstky mezi 3,6-anhydro-L-galaktózou a D-galaktózou. Rentgenová difrakce odhalila, že základní jednotkou je levotočivý dvojitý helix s periodicitou 0,95 nm (Arnott et al., 1974).

Chemická čistota a podmínky přípravy mají zásadní vliv na výsledný gel. Při dlouhodobém vystavení teplotám okolo 80 °C dochází k hydrolýze a oxidaci polysacharidů, což vede ke snížení pH, poklesu viskozity, ztrátě elasticity a oslabení pevnosti gelu. Mikroskopické a rentgenové analýzy ukazují, že „stárnoucí“ roztoky mají hrubší a méně homogenní mikrostrukturu než čerstvě zhotovené přípravky (Mao et al., 2016). Důležitým faktorem je i syneréza – postupné vypuzování volné vody – která je výraznější při nižších koncentracích agarózy a ovlivňuje dlouhodobou stabilitu média (Ghebremedhin et al., 2021). Křehkou rovnováhu mechanických vlastností může dále měnit iontová síla prostředí: přítomnost kationtů jako Li^+ či Na^+ modifikuje elasticitu a odezvu gelu na mechanické zatížení (Sacco et al., 2014).

4.4 Metabolismus agaru bakteriemi

Z nutričního hlediska je agar považován za inertní matrici. Většina laboratorních a klinických kmenů postrádá enzymy schopné štěpit jeho polysacharidové vazby. Výjimkou jsou mořské bakterie, například rody *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Agarivorans*, *Saccharophagus*, *Alteromonas*, *Shewanella* či *Zobellia galactanivorans*. Ty produkují β - a α -agarasy, které štěpí agarózu na oligo- a monomery, z nichž bakterie přímo získávají uhlík jako zdroj energie. (*Oh et al., 2005). Byly popsány i konkrétní případy, například kmeny *Shewanella algae* a *Microbulbifer elongatus* dokáží růst na médiu s agarem jako jediným zdrojem uhlíku. Jejich enzymatická aktivita byla doložena Lugolovou reakcí a detekcí redukujících cukrů (Kandasamy et al., 2020).

Dlouho převládal názor, že agar je pro mikroorganismy zcela inertní a neovlivňuje jejich růst. První publikovaná práce, která se mi podařila nalézt a která spojuje vznik peroxidu vodíku při sterilizaci agarů s fosfátovými pufrů s inhibicí bakteriálního růstu, je studie Tanaka et al. (2014). Autoři prokázali, že agar může nepřímo omezovat růst některých bakterií citlivých na přítomnost kyslíku. Následné testy odhalily, že příčina neleží v polysacharidovém skeletu agarů, ale ve vedlejších reakcích při sterilizaci. Autoklávování agarů společně s fosfátovými pufrů – tzv. PT protokol („phosphate together“) vede k tvorbě reaktivních kyslíkových forem, především peroxidu vodíku, který už v mikromolárních koncentracích významně snižuje počet získaných kolonií u obligátních anaerobů (Tanaka et al., 2014). Zavedení alternativního postupu, kdy se agar a fosfátové pufrů sterilizují zvlášť a mísí až po autoklávování (tzv. PS protokol, „phosphate separately“), přineslo zvýšení diverzity i počtu izolovaných kolonií. Další práce potvrdily přítomnost H_2O_2 v médiích připravených tradiční metodou a popsaly jeho selektivní účinek na anaerobní a obtížně kultivovatelné mikroorganismy (Kato et al., 2020). Pro běžně používané druhy – enterobakterie, stafylokoky a další modelové mikroorganismy však nebyl nikdy prokázán přímý inhibiční vliv agarů. V dobře připravených médiích zůstává agar pouze neutrálním nosičem, který neovlivňuje růst těchto kmenů. Vzácné inhibitory jsou tedy spíše odrazem sterilizační techniky než inherentní vlastností agarů.

5. Alternativní ztužovadla

Různé skupiny hydrofilních polymerů vykazují při ztužování vodných roztoků rozmanité fyzikálně-chemické mechanismy, které se zřetelně promítají do struktury a vlastností výsledného gelu. Snad nejvýstižnějším přirovnáním jsou dva tradiční cukrářské produkty: pudink a panna cotta. Zastupují totiž dva základní způsoby, jimiž se utváří pevná média: gelace polysacharidová (škrob, agar, pektin) a gelace proteinová (želatina, vaječný bílek).

U škrobu dochází při zahřátí a následném ochlazení k tvorbě trojrozměrné sítě tvořené amylopektinem a amylózou. Voda je v tomto systému vázána převážně fyzikálně mezi

polysacharidovými řetězci. Želatina proti tomu spoléhá na částečnou renaturaci kolagenových trojitých helixů, které se při ochlazení zpevňují slabými vodíkovými a van der Waalsovými interakcemi. Oba mechanismy, polysacharidový i proteinový, představují základní archetypy gelace využitelné i v přípravě kultivačních médií.

Výběr konkrétních hydrofilních polymerů – agaru, želatiny, pektinu, škrobu a chitosanu – vychází z jejich historického i praktického významu pro přípravu pevných médií. Agar představuje zlatý standard mikrobiologie, želatina byla jeho přímým předchůdcem a díky své proteinové povaze nabízí kontrastní mechanismus gelace. Pektin a škrob zastupují nejběžnější polysacharidové gely přírodního původu s odlišnými fyzikálně-chemickými principy tuhnutí, což umožňuje porovnat různé typy polymerních sítí. Chitosan byl zařazen pro své specifické biologické vlastnosti a potenciál v oblasti moderních biotechnologií, zatímco silikagely představují příklad syntetických systémů s možností precizního řízení struktury a difuzních vlastností.

5.1 Želatina

Želatina je proteinový hydrogel vznikající částečnou hydrolýzou kolagenu. Při zahřátí se trojitě helixy kolagenu rozvolňují a jednotlivé polypeptidové řetězce přecházejí do neuspořádané klubkovité formy (*random coil*). Flory a Weaver (1960) prokázali, že při následném ochlazení dochází k reverznímu procesu, při němž se řetězce spontánně znovu seskupují do trojitě šroubovice. Tyto vznikající helikální segmenty fungují jako fyzikální uzly (*junction zones*), které propojují molekuly do trojrozměrné sítě a vytvářejí tak pevný gel (Flory & Weaver, 1960).

Tepelnou stabilitou želatinových gelů a vlivem podmínek jejich přípravy se zabývali Vyazovkin a Dranca (2009). Pomocí diferenční skenovací kalorimetrie doložili, že aktivační energie tání není konstantní, ale během procesu se mění v důsledku postupného rozpadu síťových uzlů tvořených trojitými helixy. U gelů připravených při stálé teplotě zjistili vysoké počáteční hodnoty (cca 160–190 kJ/mol), což odpovídá kooperativnímu rozrušení několika vodíkových vazeb současně. Důležitým zjištěním bylo, že teplota gelace zásadně ovlivňuje stabilitu sítě. Tedy vyšší teploty vedly ke vzniku odolnějších gelů. Autoři také prokázali, že tání želatiny je částečně reverzibilní proces, při němž mohou uvolněné polypeptidové segmenty znovu vytvářet nové uzly. Tyto poznatky jsou významné i pro mikrobiologii, protože ukazují, že pevnost a stabilita želatinového média závisí nejen na koncentraci želatiny, ale i na teplotním režimu jeho přípravy (Vyazovkin & Dranca, 2009).

Reologická měření ukázala, že čím vyšší je koncentrace želatiny, tím pevnější a tužší gel vzniká. Tato pevnost úzce souvisí s množstvím vytvořených trojitých helixů, které při ochlazování

propojují polypeptidové řetězce do sítě. Elasticita je dána přítomností vodíkových můstků, které tyto helikální úseky drží pohromadě a tvoří z nich polotuhá vlákna spojená pružnějšími částmi řetězců. Joly-Duhamel et al. (2002) navíc zjistili, že tento vztah mezi množstvím helixů a pevností gelu platí bez ohledu na to, z jakého zdroje želatina pochází nebo jakým teplotním režimem byla připravena (Joly-Duhamel et al., 2002).

Starší reologická měření, práce autorů Gilsenan a Ross-Murphy (2000), uvádí, že teplota tání běžných komerčních želatinových gelů leží výrazně pod 35 °C. To znamená, že při inkubaci v běžném mikrobiologickém rozmezí 35–37 °C ztrácí médium svou pevnou strukturu (Gilsenan & Ross-Murphy, 2000).

Želatina v kultivačních médiích neslouží pouze jako ztužovadlo, ale i jako indikátor enzymatické aktivity některých bakterií. Úspěšnost detekce gelatinolytické aktivity mikroorganismů je značně ovlivněna zvolenou metodou. Na tuto skutečnost upozornili Pickett et al. (1991), kteří srovnávali pět různých metod testování gelatinázy. Jedním z řešení tohoto problému je použití pevných agarových médií s přídavkem želatiny, která umožňují spolehlivou detekci enzymatické aktivity i při teplotách 30–35 °C, kdy želatina v pevném médiu ztekutěla a ztratila diagnostickou hodnotu. Agar zajistí stabilitu prostředí, zatímco želatina zde slouží jako specifický substrát pro extracelulární proteázy (Pickett et al., 1991).

S týmiž principy detekce gelatinolytické aktivity pracuje Pathade et al. (2024). Autoři v ní testovali půdní izoláty z různých stanovišť. Izoláty byly inokulovány na pevná kultivační média obsahující 2 % želatiny (w/v) jako jediný proteinový substrát.

Po inkubaci při různých teplotách byly jako pozitivní označeny ty kmeny, které vytvářely kolem kolonie jasně ohraničené hydrolyzační zóny, svědčící o rozkladu želatiny enzymatickou aktivitou. V následných testech enzymatické aktivity byly purifikované enzymy testovány při různých koncentracích substrátu (0,5–4 % želatiny).

Autoři zjistili, že právě 2% koncentrace želatiny umožňuje nejspolehlivější vizuální detekci gelatinázové aktivity. Naopak vyšší koncentrace substrátu, zejména nad 4 %, vedly ke snížení pozorované aktivity. Tento jev vysvětlují jako substrátovou inhibici, kdy přílišná hustota média brání efektivní difuzi enzymu a omezuje přístup ke štěpitelným vazbám.

Nejvyšší hodnoty enzymatické aktivity byly dosaženy při teplotě 35–37 °C. Hodnoty pH se mírně lišily podle zkoumaného druhu: *Pseudomonas aeruginosa* vykazovala nejvyšší aktivitu při pH 7,0, *Bacillus subtilis* při pH 7,5 a *Aspergillus niger* při pH 6,5 (Pathade et al., 2024).

Pro mikrobiologické účely znamená použití želatiny jako pevného ztužovadla riziko degradace média samotnými mikroorganismy (viz výše). To může kvůli ztuhnutí media vést ke ztrátě prostorového uspořádání kolonií, nekontrolovatelnému rozšíření kultur a ztrátě přesnosti izolace. Řada bakterií a hub produkuje extracelulární gelatinázy, proteázy schopné hydrolyzovat

želatinový gel. Smith Jr. a Goodner (1958) prokázali, že taková degradace média vede během několika dní inkubace ke zkapalnění a ztrátě struktury, což znemožňuje spolehlivou izolaci jednotlivých kolonií. Další nevýhodou je nízká teplotní stabilita želatiny (Smith & Goodner, 1958).

5.2 Pektin

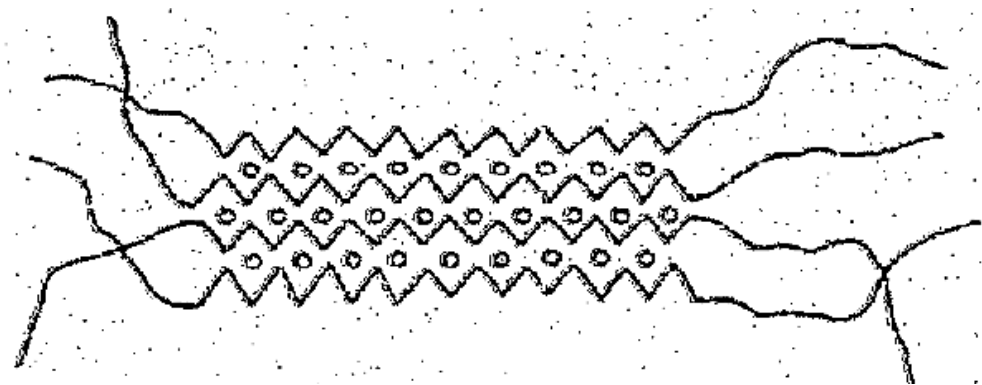
Pektin je rostlinný heteropolysacharid s hlavním řetězcem tvořeným α -(1 $\rightarrow$ 4)-vázanou kyselinou galakturonovou. Parametrem ovlivňujícím schopnost pektinu tvořit gel je stupeň methylace (degree of methylation, DM). Podle toho se pektiny dělí na vysokomethylové (HM, kde DM > 50 %) a nízkomethylové (LM, kde DM < 50 %) (*Vriesmann & de Oliveira Petkowicz, 2017).

Vysokomethylové pektiny tvoří gely obvykle při vysoké koncentraci sacharózy (nad 55 %) a nízkém pH (2,5–3,5). Kyselé prostředí zajišťuje protonaci karboxylových skupin, což snižuje odpuzivé síly mezi řetězci pektinu. V takto připraveném systému pak dochází k těsnému přiblížení polymerů a ke vzniku stabilní gelové sítě, kterou drží pohromadě především hydrofobní interakce mezi methylesterovými zbytky a vodíkovými můstky. Sacharóza v tomto procesu nepůsobí sice jako přímý síťující prvek, ale odvádí vodu od polymerních řetězců, čímž zvyšuje jejich vzájemnou afinitu (Fraeye et al., 2010).

Zhao et al. (2020) uvádějí, že HM pektin je schopen vytvořit gel i při vyšších hodnotách pH, než je pro tento typ polymeru běžné. Ovšem pouze za přítomnosti dostatečně vysoké koncentrace sacharózy, alespoň 65 %. Ve své studii pracovali se třemi komerčními jablečnými pektiny s různým stupněm esterifikace (60,6 %, 66,1 % a 72,4 %) a prokázali vznik gelové sítě i při pH kolem 3,8. Gelace podle jejich pozorování probíhá ve dvou fázích: při zvýšené teplotě dominují hydrofobní interakce mezi methylesterovými skupinami, zatímco při ochlazení se uplatňují vodíkové můstky, které strukturu dále stabilizují (Zhao et al., 2020).

Pektin s nízkým stupněm methylace (LM pektin), vytváří gel prostřednictvím iontových vazeb, které vznikají mezi karboxylovými skupinami galakturonanového skeletu a dvoumocnými kationty, typicky Ca^{2+} .

Tento mechanismus je klasicky popisován tzv. „egg box modelem“, kde se lineární řetězce pektinu paralelně seskupují a váží ionty vápníku, jež zapadají mezi sousední polymerní vlákna jako vejce do kartonového obalu (obrázek 2). Takto uspořádané uzlové body zajišťují pružnost a mechanickou stabilitu vzniklého gelu (Grant et al., 1973).



Obrázek 2: „Egg-box model“. Lineární řetězce pektinu se paralelně seskupují a váží ionty vápníku. Převzato z (Grant et al., 1973).

Příkladem nám může být slunečnicový pektin s DM ~27 % a DAm ~10 %, jež tvoří stabilní iontové gely i při nízké koncentraci vápenatých iontů (Hua et al., 2015).

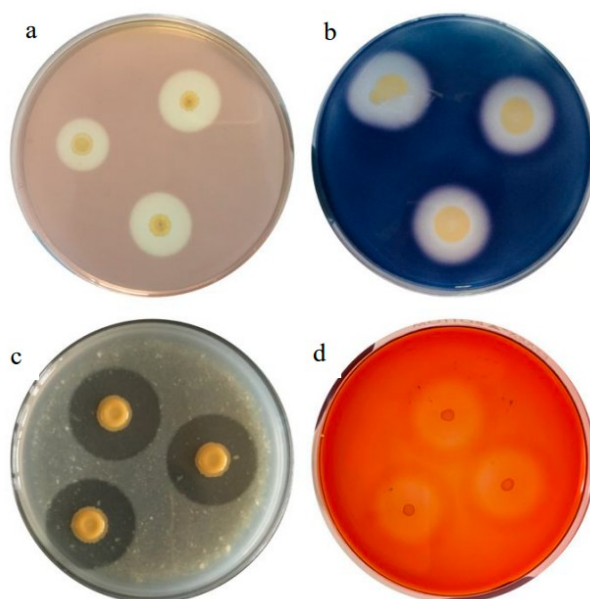
Vedle methylace ovlivňuje gelaci i amidace (DAm) a acetylce (DAc). Amidované pektiny (obvykle LM typy) mají sníženou citlivost na přebytek Ca^{2+} a tvoří měkčí, pružnější gely (Capel et al., 2005). Acetylce obvykle snižuje schopnost pektinu tvořit gel. Příkladem je pektin z cukrové řepy, který vykazuje nízký stupeň methylace (~30 %) a současně vysoký stupeň acetylce (~13 %) Pektin z cukrové řepy má kvůli tomu omezenou schopnost gelace a za běžných podmínek stabilní gel netvoří (tabulka 1) (Voragen et al., 2009).

		Zdroj pektinu				
		citrus	jablko	slunečnice	řepa	banán
Vlastnosti a parametry	DM (%)	68	69	27	30	68
	DAc (%)	1,5	3,5	0,4	13	0,5
	Gelace za přítomnosti	sacharóza	sacharóza	Ca^{2+}	/	sacharóza
	Typ pektinu HM/LM	HM	HM	LM	LM	HM

Tabulka 1: Srovnání gelovacích vlastností a chemických parametrů pektinů pocházejících z různých rostlinných zdrojů. DM (%) – stupeň methylace pektinu, DAc (%) – stupeň acetylce pektinu, Gelace za přítomnosti – Látky nebo ionty nezbytné k vytvoření gelu, HM (high methoxyl), LM (low methoxyl). Data o pektinu z citrusu převzata z (Cirimina et al., 2020) a z (Voragen et al., 2009). Data o pektinu z jablka převzata z (Canteri-Schemin et al., 2005) a z (Voragen et al., 2009). Data o pektinu ze slunečnice převzata z (Hua et al., 2015). Data o pektinu z řepy převzata z (Ohlmaier-Delgadillo et al., 2021). Data o pektinu z banánu převzata z (Mada et al., 2022).

Ačkoli přímé využití pektinu jako samostatného ztužovačla pro izolaci bakteriálních kolonií zatím popsáno nebylo, v pevných médiích se využívá. Shrestha et al. (2021) použili pevné agarové médium obohacené pektinem k izolaci pektinolytických bakterií z půdních vzorků. Aktivita enzymů byla potvrzena vznikem čirých hydrolyzačních zón kolem kolonií.

Podobně Cortes et al. (2024) připravili citrusový pektin agar pro screening mikroorganismů během fermentace kávových zrn (obrázek 2) (Cortes et al., 2024).



Obrázek 3: Enzymatická aktivita bakterií z fermentace kávy: (a) pektináza, (b) amyláza, (c) proteáza a (d) celulóza. Převzato z (Cortez et al., 2024).

5.3 Škrob

Při zahřívání škrobu ve vodném prostředí dochází k tzv. želatinaci, což je přechod z částečně uspořádané struktury do amorfního stavu. V nativním škrobu jsou polysacharidové řetězce (amylóza a amylopektin) uspořádány do granulí, které obsahují krystalické i amorfní oblasti. S rostoucí teplotou granule absorbují vodu, začínají bobtnat a krystalické domény se postupně rozpadají. Polysacharidové řetězce se uvolňují z původní struktury a přecházejí do amorfního stavu, což vede k výraznému nabobtnání granulí.

Charakteristickým znakem této změny je ztráta optického dvojlomu, tedy schopnosti granulí lámat světlo odlišně podle směru vůči jejich vnitřní uspořádané struktuře, což odráží přítomnost krystalické fáze. Když dvojlom mizí, znamená to, že vnitřní uspořádaná struktura granulí se rozpadla a krystalické domény přešly do amorfního stavu. Výsledkem je vznik viskózní disperze polysacharidových řetězců ve vodě. Jeho vlastnosti závisí na poměru amylózy a amylopektinu a také na teplotě, při které proces probíhal.

Pomocí kombinace rentgenového rozptylu s malým a širokým úhlem (Small-Angle X-ray Scattering / Wide-Angle X-ray Scattering, SAXS/WAXS) a diferenční skenovací kalorimetrie Jenkins a Donald (1998) detailně popsali, že první fáze želatinace probíhá v amorfních růstových prstencích uvnitř granule, které jako první přijímají vodu a prudce se rozpínají. Tento otok destabilizuje sousední krystalické lamely, jejichž pravidelná struktura se pak při další tepelné zátěži rozpadá. Tímto mechanismem dochází k úplnému přechodu od původní granulární a částečně krystalické organizace ke zcela amorfnímu systému (Jenkins & Donald, 1998).

Po ochlazení želatinovaného solu nastupuje proces retrogradace. Nejprve reaguje lineárně uspořádaná amyulóza, jejíž řetězce se snadno paralelně seřazují a rychle vytvářejí částečně krystalické oblasti. Teprve poté, mnohem pomaleji, se přeskupují rozvětvené řetězce amylopektinu, které v důsledku svého větvení formují spíše nepravidelné parakrystalické domény. Gudmundsson a Eliasson (1990) pomocí diferenční skenovací kalorimetrie prokázali, že rychlost a míra retrogradace přímo závisí na poměru amylózy a amylopektinu. Vyšší obsah amylózy vede k rychlejší a výraznější rekrystalizaci, což se odráží v nárůstu entalpie tání při opakovaných měřeních. Fredriksson et al. (1998) tyto výsledky potvrdili a dokázali, že retrogradace je procesem prakticky ireverzibilním; změny struktury lze odstranit jen opětovným zahřátím nad teplotu želatinace (Fredriksson et al., 1998). Retrogradace tak hraje dvojí roli. Zajišťuje dlouhodobou mechanickou stabilitu gelu, avšak současně je zodpovědná za změny jeho textury a fyzikálních vlastností při skladování.

Jednotlivé druhy nativního škrobu se však mezi sebou významně liší v závislosti na rostlině ze které byly získány, což se promítá do jejich chemického složení, struktury škrobových granulí i do fyzikálně-chemických vlastností během i po želatinaci. Podle studie Bajaj et al. (2018) obsahuje bramborový škrob přibližně 31,09 % amylózy, kukuřičný škrob 29,20 % a rýžový škrob pouhých 8,84 %, což jej řadí mezi škroby s velmi nízkým obsahem amylózy (Bajaj et al., 2018). Tato data potvrzuje i novější práce Zhang et al. (2023), která uvádí rozmezí obsahu amylózy v rýžovém škrobu mezi 10,76–11,85 % (Zhang et al., 2023).

S obsahem amylózy úzce souvisí i rozdíly ve velikosti a tvaru škrobových granulí. Bajaj et al. (2018) pozorovali největší granule u bramborového škrobu, s průměrnou velikostí 35,74 μm a vysokým podílem velkých granulí nad 10 μm (95,67 %), zatímco kukuřičný škrob vykazoval průměrnou velikost granulí 15,08 μm . Rýžový škrob měl nejmenší granule, s průměrem 5,41 μm a převahou drobných částic do 10 μm (Bajaj et al., 2018).

Stejní autoři uvádí, že želatinace u bramborového škrobu začíná při teplotě 60,45 °C a vrcholí při 66,47 °C. U kukuřičného škrobu začíná želatinace při 68,92 °C a vrcholí při 74,53 °C, zatímco rýžový škrob želatinuje mezi 64,41 °C a 70,13 °C (Bajaj et al., 2018).

Na základě výše uvedených vlastností lze jednotlivé škroby charakterizovat z hlediska jejich schopnosti vytvářet gely následovně: bramborový škrob tvoří pevné, průhledné gely s vysokou viskozitou, které jsou však náchylné k retrogradaci; kukuřičný škrob vytváří ze třech diskutovaných škrobů středně pevné gely s vyšší tepelnou stabilitou a nižší číroostí; rýžový škrob dává vzniknout měkkým, méně soudržným gelům, zvláště pokud má nízký obsah amylózy (Zhang et al., 2023). Castanha et al. (2021) navíc uvádějí, že pro vytvoření stabilního gelu je u bramborového i kukuřičného škrobu nutná koncentrace alespoň 10,7 % (w/v) (Castanha et al., 2021).

Dále bylo zjištěno, že surfaktanty jako dodecylsulfát sodný a monoglyceridy působí jako účinné inhibitory retrogradace. Již nízké koncentrace těchto látek vedou k výraznému snížení entalpie rekrystalizace a omezení synerézy, čímž prodlužují stabilitu gelu (Gudmundsson & Eliasson, 1990). Persson (2005) prokázali, že surfaktanty vytvářejí stabilní komplexy s amylozovými řetězci, a tím omezují jejich přeskupování (Persson et al., 2005).

Z hlediska kultivace mikroorganismů je tento jev zásadní. Struktura gelu přímo ovlivňuje difuzi živin a metabolitů. Pokud by médium rychle rekrystalizovalo a podléhalo syneréze, jeho mechanické vlastnosti by se zhoršily a mohlo by dojít k omezení růstu buněk.

V jiných systémech, například v alginátových hydrogelech, bylo prokázáno, že přidání neiontového surfaktantu Pluronic® F68 významně neomezuje difuzi malých molekul, jako je riboflavin, a v některých případech ji dokonce zvyšuje až o 50 % (Stoppel et al., 2013). Z toho lze vyvodit, že vhodně zvolené surfaktanty mohou v hydrofilních gelech stabilizovat strukturu a pórovitost, aniž by omezovaly dostupnost živin pro mikroorganismy.

Pokusy o použití škrobu místo agaru při kultivaci bakterií se mi nepodařilo dohledat. Ačkoli škrob jako přírodní polysacharid vykazuje schopnost vytvářet gely, žádná dostupná studie nedokumentuje, že by byl použit jako jediný ztužující prvek v mikrobiologickém médiu pro růst bakterií. Našel jsem však práce, kde byl škrob úspěšně použit jako ztužovadlo v médiích pro jiné účely. Například Ebile et al. (2022) při kultivaci explantátů banánovníku nebo Onyimba et al. (2023) pro růst *A. niger* a *A. flavus* na směsi kolokáziového škrobu s agarem. Podobně Mohamed et al. (2010) testovali různě zpracované škroby v rostlinných kulturách.

5.4 Chitosan

Chitosan je kationtový polysacharid vznikající částečnou deacetylací chitinu, který tvoří základní stavební složku exoskeletů členovců a buněčných stěn některých hub (Rinaudo, 2006). Proti běžným elektricky neutrálním ztužovadlům, jako jsou agar, pektin nebo škrob, se chitosan vyznačuje kladným nábojem. Právě tato elektrostatická povaha určuje i jeho způsob gelace. Na rozdíl od většiny přírodních polymerů u chitosanu není proces tuhnutí vázán na zahřívání ochlazování, ale probíhá především díky interakci s polyanionty a změnám pH prostředí (Rhoades & Roller, 2000).

Gelace chitosanu probíhá pomocí dvou hlavních mechanismů: buď pH-závislou asociací polymerních řetězců, nebo iontovým křížovým propojením s polyanionty, jako je například tripolyfosfát sodný. V kyselém prostředí (pH <6,5) jsou aminové skupiny chitosanu protonovány, díky čemuž zůstává polymer ve vodném roztoku rozpustný a flexibilní. Jakmile dojde k neutralizaci pH nebo k přidání polyaniontů, řetězce se náhle reorganizují a vytvoří

prostorově stabilní hydrogelovou síť. Tento proces probíhá už při laboratorní teplotě a nevyžaduje žádný ohřev ani chlazení (*Berger et al., 2004).

Tato „mírná“ gelace za fyziologických podmínek stojí za širokým využitím chitosanu v biomedicině – od výroby biokompatibilních implantátů až po experimenty s náhradami očních čoček (*Berger et al., 2004).

Z mikrobiologického hlediska je však tato vlastnost problematická. Na rozdíl od agarových médií, která se během přípravy zahřívají až k bodu varu a tím se současně sterilizují, chitosan geluje již při teplotách kolem 25–37 °C. Sterilizaci je proto nutné zajistit dodatečně.

Rao a Sharma (cit. dle Jarry et al., 2001) zkoumali účinky různých sterilizačních metod na chitosanové gely. Zjistili, že všechny jimi testované metody vlastnosti gelu ovlivnily. Nejničivější dopad na gel mělo použití ethylenového oxidu nebo glutaraldehydu (Rao & Sharma, cit. dle Jarry et al., 2001).

Použití gama záření jako sterilizační metody bylo testováno Lim et al. (1998), kteří experimentálně prokázali, že ozařování chitosanu dávkami do 25 kGy způsobuje štěpení hlavního polymerního řetězce. To vedlo k výraznému poklesu molekulové hmotnosti (Lim et al., 1998).

Autoři přehledového článku Szymańska & Winnicka (2015) navrhuji, že sterilizace chitosanových gelů by se mohla řešit přípravou za aseptických podmínek (Szymańska & Winnicka (2015).

Chitosan je známý svou výraznou antimikrobiální aktivitou, která vychází z elektrostatických interakcí mezi kladně nabitými aminovými skupinami polymeru a negativně nabitými složkami bakteriální buněčné stěny. Tento účinek je obzvláště patrný u Gram negativních bakterií (*Goy et al., 2009). Přesto lze při velmi nízkých koncentracích (<0,1 % w/v) a v prostředí s pH blízkým neutrálnímu připravit chitosanové gely, které podporují růst některých acidotolerantních Gram-pozitivních druhů. Studie Kovács (2023) demonstrovala, že například *Lactobacillus plantarum* a *Bifidobacterium adolescentis* si v těchto podmínkách uchovávají životaschopnost, zatímco *E. coli* a *Salmonella enterica* vykazují výraznou inhibici (Kovács et al., 2023).

Další aplikací, jež stojí za zmínku, je kombinace chitosanu s alginátem při tvorbě kompozitních hydrogelů, které se používají k imobilizaci buněk do stabilních mikro- nebo makrokuliček. Tento systém našel uplatnění především při dlouhodobém uchovávání probiotických kultur a při jejich opakované kultivaci bez ztráty vitality (Martinsen et al., 1989). Chitosan se rozpouští v mírně kyselém prostředí a díky této vlastnosti, spolu se schopností ovlivňovat iontové interakce, může fungovat nejen jako selektivní pevné médium, ale také jako ochranná matrice pro uchování a transport bakteriálních kultur (*Goy et al., 2009).

6. Syntetické hydrofilní polymery – silikagely

Silikátové hydrogely se v experimentální mikrobiologii ukázaly jako vhodné médium pro imobilizaci buněk a jejich dlouhodobou konzervaci, nikoli však jako plnohodnotná náhrada agaru pro plošnou kultivaci bakterií (Nassif et al., 2003). Při zapouzdření do anorganické křemičité matrice zůstávají buňky životaschopné i po delší době bez přísunu živin, avšak jejich růst je výrazně omezen a neodpovídá charakteru běžných povrchových kultur (Alvarez et al., 2009).

Na rozdíl od agarových médií se kolonie v těchto gelech nešíří po povrchu, ale vznikají jako izolované mikrokolonie uzavřené v pórovité síti gelu (Coiffier et al., 2001). Mikroskopická pozorování ukazují jednotlivé buňky a malé agregáty rozmístěné uvnitř porézní struktury bez tvorby souvislého povrchového biofilmu (Nassif et al., 2003). Omezená difuze živin a metabolitů v matrici způsobuje, že růst zůstává prostorově ohraničený a výsledná morfologie více připomíná přirozené mikrohabitaty, například půdní póry, než kolonie pěstované na agaru (Alvarez et al., 2009).

Nejčastěji zkoumaným typem jsou SiO_2 hydrogely připravené ze sol–gel prekurzoru tetramethoxysilanu (TMOS). Proces gelace začíná hydrolyzou Si-OCH_3 skupin na Si-OH , které se následně kondenzují do trojrozměrné Si-O-Si sítě. Aby vznikla homogenní a biologicky šetrná matrice vhodná pro zapouzdření buněk, je nutné udržet průběh reakce v mírně kyselém až neutrálním pH (5–7). Zpomalení polymerace v tomto rozmezí pH umožňuje tvorbu gelu bez nutnosti zahřívání, což je klíčové pro zachování viability zapouzdřených mikroorganismů (*Hench & West, 1990). Vstupní sol lze navíc obohatit živným roztokem, takže výsledný hydrogel obsahuje nejen vodu, ale i základní živiny potřebné pro omezený růst zapouzdřených buněk.

Významnou vlastností křemičitých sol–gel materiálů je možnost ovlivnit jejich pórovitost a vysoký obsah vody, které umožňují difuzi malých molekul a podporují metabolickou aktivitu zapouzdřených buněk, přestože jejich množení je zpomalené nebo zcela zastavené (Coiffier et al., 2001). Bylo prokázáno, že i po jednom měsíci zůstává v takto připravené matrici životaschopných přibližně 40–50 % buněk *E. coli*, které si zachovávají metabolickou aktivitu, ačkoliv nevytvářejí kolonie odpovídající povrchovému růstu (Nassif et al., 2003). Přidání základních živin do matrice může prodloužit přežívání buněk, ale prostorový charakter růstu zůstává zachován a blíží se spíše uspořádání přirozených biofilmů než laboratorním agarovým kulturám (Alvarez et al., 2009).

7. Komplexní přírodní jako pevná kultivační média

V počátcích mikrobiologie byly jako pevná kultivační média často využívány přírodní substráty – vařené plátky brambor, sražený vaječný bílek či kousky masa. Tyto materiály umožňovaly růst bakterií a do jisté míry i izolaci jednotlivých kolonií, ačkoliv trpěly zásadními nedostatky: neprůhledností a nízkou reprodukovatelností výsledků (*Srvanthi, 2019).

Za první systematický popis použití sterilních plátek brambor vděčíme německému biologovi Josephu Schroeterovi (*Sandle, 2014). Jeho pozorování růstu kolonií na povrchu hlíz se stalo inspirací pro další vývoj kultivačních metod. Robert Koch Schroeterovu techniku převzal a dále rozšířil. Krom bramborových plátek začal experimentovat také se sraženým vaječným bílkem a škrobovou pastou, což nakonec vedlo k vývoji jeho vlastních želatinových médií.

7.1 Vaječný bílek

Vaječný bílek obsahuje přibližně 88 % vody a zhruba 11 % bílkovin. Dominantní složkou je ovalbumin, který tvoří okolo 54 % celkového proteinu a hraje zásadní roli při gelaci (*Li, 2018). Při zahřívání dochází k narušení sekundárních a terciárních struktur proteinu. Po překročení určité teplotní hranice se hydrofobní oblasti ovalbuminu exponují, dochází k agregaci proteinových molekul a tvorbě trojrozměrné sítě, která váže vodu a přeměňuje původní tekutý roztok na pevný, nevratný hydrogel (Wang et al., 2025). Z hlediska mechanismu gelace stojí za zmínku porovnání chování ovalbuminu s jinou živočišnou bílkovinou – želatinou. Ta se při zahřátí rozbálí, nicméně ke gelaci dochází až při zchlazení; vzniklý gel je reverzibilní a při opětovném zahřátí se znovu rozpouští.

Podle Gomes & Pelegrine (2012), kteří zkoumali vliv teploty a pH na rozpustnost sušeného vaječného bílku, byla nejnižší rozpustnost zjištěna při 60 °C. Výsledky ukázaly, že teplota i pH výrazně ovlivňují vznik agregátů a snižují funkční vlastnosti bílkovin. Vyšší pH (9) může díky silnějším elektrostatickým odpuzivým silám dočasně zpomalit agregaci, avšak při vyšších teplotách dochází k denaturaci a srážení i za těchto podmínek. Naopak při nižším pH (7,5) dochází ke koagulaci rychleji (Gomes & Pelegrine, 2012).

Holme (1962) popisuje tepelnou denaturaci a agregaci čistého krystalického ovalbuminu. Na základě experimentů v pH rozmezí 5,5–8,5 prokázal, že při zahřívání dochází k rychlé denaturaci a následné agregaci bez vzniku stabilních meziproductů, což naznačuje prakticky okamžitý přechod po dosažení určité prahové teploty (cca 65 °C) (Holme, 1962).

Přestože Gomes & Pelegrine (2012) pracovali s komplexní směsí bílkovin přítomných v sušeném vaječném bílku a Holme (1962) se věnoval pouze čistému ovalbuminu, obě práce dokazují, že koagulace začíná v obdobném teplotním rozmezí. Ovalbumin tak určuje chování celého systému při zahřívání.

V práci Wasas et al. (1999) autoři ověřovali použití Dorsetova vaječného média pro dlouhodobé uchovávání životaschopnosti *Neisseria meningitidis* a *Haemophilus influenzae* typu b. Médium bylo připraveno smísením rozšlehaných slepičích vajec s fyziologickým roztokem v poměru 3:1. Směs byla následně zahřívána při 80 °C po dobu 60 minut, čímž došlo ke koagulaci proteinů, vytvoření pevného média a stejně tak sterilizaci.

Na takto připravené médium bylo inokulováno dvacet izolátů *N. meningitidis* a dvacet izolátů *H. influenzae* typu b. Výsledky ukázaly, že všechny izoláty *N. meningitidis* zůstaly na Dorsetově médiu životaschopné minimálně 21 dní a 95 % přežilo i po 32 dnech. U *H. influenzae* byly výsledky obdobně příznivé (Wasas et al., 1999).

Vaječný bílek nicméně obsahuje řadu antimikrobiálních složek, které inhibují bakteriální růst. Mezi nejvýznamnější patří lysozym, jenž narušuje buněčné stěny bakterií, ovotransferin, který váže železo a tím brání jeho využití bakteriemi, a také avidin, jenž váže biotin – důležitý růstový faktor.

Tuto problematiku zkoumali Baron et al. (2020), kteří se zaměřili na baktericidní účinek bílkovin vaječného bílku vůči *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, a to při teplotě 45 °C, odpovídající tělesné teplotě slepice během produkce vajec. Na rozdíl od Dorsetova média, které je tepelně upraveno při 80 °C a tím dochází k inaktivaci antimikrobiálních proteinů, autoři této studie pracovali s nativním, tepelně neupraveným bílkem, tedy s proteiny v jejich biologicky aktivní formě. Připravili tři typy experimentálních médií na bázi čerstvého slepičího bílku: nativní bílek (EW, z anglického egg white), filtrát bílku zbavený větších proteinů (EWF, egg white filtrate), a modelové médium (EWMM, egg white model medium), které obsahovalo 90 % proteinového filtrátu (EWF) a 10 % nativního bílku (EW). Výsledky ukázaly, že při kultivaci došlo ve všech testovaných médiích k výraznému poklesu počtu životaschopných buněk. Zajímavé však bylo, že tomu tak bylo i ve filtrátu zbaveného větších proteinů. Z toho autoři usuzují, že k inhibici růstu bakterií nedochází výhradně působením výše vypsanych proteinů (Baron et al., 2020).

7.2 Rostlinné zásobní orgány

W. H. Davis (1933) popisuje, že na počátku 20. století byly sterilní plátky vařených brambor („potato plugs“) považovány za plnohodnotné médium schopné poskytnout mikroorganismům vlhké a nutričně bohaté prostředí. Ve své práci zároveň uvádí metodiku aseptické přípravy a inokulace těchto plátků, které se vkládaly do Petriho misek (Davis, 1933).

Nutriční hodnota brambor vychází především z vysokého obsahu škrobu. Při tepelné úpravě dochází k želatinaci přítomného škrobu. Škrobová zrna bobtnají, vážou vodu a vytvářejí pevnou, pórovitou matici schopnou zadržet živiny. Díky těmto vlastnostem se brambory ukázaly jako jednoduché, improvizované pevné médium vhodné pro pozorování morfologie bakteriálních kolonií.

Morgan a Avery (1923) popsali, že sterilní kousky zeleniny, například tuřín, mrkev, červená řepa nebo sladké brambory přidané do bujónu výrazně stimulují růst pneumokoků a streptokoků. Tento efekt byl patrný i u minimálního inokula, které by v prostém bujónu růst

nezahájilo. Autoři ho přisuzovali přítomnosti termostabilních růstových faktorů v rostlinné tkáni (Morgan & Avery, 1923).

Podobný jev potvrzují i novější práce. Youssef et al. (2016) popsali tzv. plant-based culture media připravovaná z rostlinných šťáv a homogenátů, která podporovala růst bakterií rodů *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus* či *Azospirillum*. V některých případech tato média dokonce lépe odrážela diverzitu rhizobakterií než standardní živný agar (Youssef et al., 2016).

Vařená zelenina funguje jako „přírodní agar“ nejen díky svému nutričnímu obsahu, ale hlavně díky struktuře pletiva. Buněčné stěny tvořené celulózą, hemicelulózą a pektiny spolu s nabobtnalými škrobovými granulemi po tepelné úpravě vytvářejí pevnou, hydrofilní matici, která zadržuje vodu i živiny. Mechanismus je funkčně podobný agaru. Polymerní síť tvoří nosič, zatímco živiny zůstávají rozpuštěny v tekuté fázi.

Řezné plochy čerstvé zeleniny vytvářejí specifické mikroprostředí s vysokou vlhkostí a přístupem buněčných šťáv. Garrood et al. (2004) demonstrovali, že bramborové disky s čerstvě odhalenou parenchymatickou tkání podporují rychlou adhezi *Listeria monocytogenes* a *Pseudomonas fluorescens*; rovnovážného stavu adheze bylo dosaženo už během 60 minut (Garrood et al., 2004). Podobné výsledky získali Abdul-Raouf et al. (1993), kteří sledovali růst *E. coli* O157:H7 na řezných plochách mrkve a salátu a potvrdili zásadní vliv struktury pletiv i obsahu volné vody na osídlení povrchu bakteriemi (Abdul-Raouf et al., 1993).

Nemr et al. (2021) prokázali, že intaktní segmenty listů nebo kořenů vložené do polotuhého agarového roztoku vytvářejí „hostitelsky kompatibilní“ matici, která zachovává přirozené gradienty vody, plynů a difuzně přenášených látek. Tento substrát umožnil obohacení endofytů až na úroveň $>10^7$ MPN g⁻¹ (MPN = Most Probable Number, nejpravděpodobnější počet (životaschopných) bakterií) a zároveň udržel širší diverzitu izolovaných kmenů než standardní komerční média. Stěžejním faktorem bylo zachování celistvosti rostlinné tkáně. Samotný agar byl sterilizován zvlášť a rostlinné segmenty se přidávaly až po jeho ochlazení (Nemr et al., 2021).

Na tyto výsledky navázali Elsauey et al. (2022), kteří zjistili, že rozhodující není nutriční bohatost rostlinného extraktu, ale především zachování fyzikální struktury pletiva. Dokonce i při nízkých koncentracích výluhu (25–50 mL L⁻¹) z parenchymu vojtěšky či pšenice bylo možné kultivovat široké spektrum endofytů, zatímco standardní R2A agar výrazně zvýhodňoval rychle rostoucí druhy (Elsauey et al., 2022).

Nový vhled do této problematiky přinesli Kochanowski et al. (2023), kteří prokázali, že mikrostruktura a mechanické vlastnosti substrátu ovlivňují nejen adhezi, ale i biomechaniku bakteriálních kolonií. *Serratia marcescens* a *Pseudomonas aeruginosa* pěstované na agarových gelech různé tuhosti vykazovaly změny rigidity kolonie o několik řádů podle obsahu vody v médiu. Měkké, vodou přesycené podklady vedly k expanzivním a méně soudržným koloniím s volnější

extracelulární polymerní substancí, zatímco hustší substráty podporovaly kompaktní a mechanicky odolné biofilmy (Kochanowski et al., 2023).

Stejný princip lze vztáhnout i na přirozený parenchym brambor nebo řepy. Jejich vysoký obsah volné vody a pektinů vytváří pórovitou matici, která nasává buněčný exsudát a usnadňuje uchycení bakterií i expanzi kolonií podobným způsobem jako agar v nízkých koncentracích.

8. Závěr

Pevná kultivační média umožňují izolaci druhů z komplexních společenstev i jejich fenotypovou charakterizaci, a práce se proto zaměřila na fyzikálně-chemické principy jejich tvorby a možnosti využití různých hydrofilních polymerů jako alternativních ztužovadel.

Agar, jenž se stal zlatým standardem od dob Roberta Kocha, prokázal své jedinečné vlastnosti v podobě teplotní hystereze, chemické inertnosti a minimálního vlivu na růst většiny bakterií. Želatina jako historický předchůdce agaru ilustruje odlišný proteinový mechanismus gelace a zároveň ukazuje limity, které vedly k jejímu nahrazení. Pektin a škrob zastupují přírodní polysacharidové systémy, jejichž gelace je řízena odlišnými fyzikálními principy a které mohou nalézt didaktické uplatnění při demonstračních pokusech. Chitosan a silikagely představují moderní alternativy s potenciálem pro aplikace mimo klasickou mikrobiologii, zejména v oblasti biotechnologií a experimentálních modelů.

Zvláštní pozornost byla věnována i komplexním přírodninám, jako jsou vaječný bílek a rostlinné zásobní orgány, které umožňují vytvořit sterilní pevný substrát bez nutnosti přídavných polymerů. Tyto jednoduché systémy ukazují, že základní principy kultivace bakterií lze demonstrovat i mimo specializované laboratoře a otevírají prostor pro využití v domácích či školních podmínkách.

9. Seznam literatury

Abdul-Raouf, U. M., Beuchat, L. R., & Ammar, M. S. (1993). Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(7), 1999–2006. <https://doi.org/10.1128/aem.59.7.1999-2006.1993>.

Alvarez, G. S., Foglia, M. L., Copello, G. J., Desimone, M. F., & Diaz, L. E. (2009). Effect of various parameters on viability and growth of bacteria immobilized in sol–gel-derived silica matrices. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(4), 639–646. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1783-9>.

*Armisen, R.; Galatas, F.; Hispanagar, S.A. Agar. In *Handbook of Hydrocolloids*; Phillips, G.O., Williams, P.A., Eds.; Woodhead Publishing Ltd.: Cambridge, UK, 2000; pp. 21–40.

Arnott, S., Fulmer, A., Scott, W. E., Dea, I. C. M., Moorhouse, R., & Rees, D. A. (1974). The agarose double helix and its function in agarose gel structure. *Journal of Molecular Biology*, 90(2), 269–284. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(74\)90372-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(74)90372-6).

Bajaj, S. R., Dhanapal, S., Sagar, A., Gaurav, A., & Gangwar, S. (2018). Structural, morphological, functional and digestibility properties of starches from cereals, tubers and legumes: a comparative study. *Journal of Food Science and Technology*, 55(9):3799–3808. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3342-4>.

Baron, F., Cochet, M.-F., Alabdeh, M., Guérin-Dubiard, C., Gautier, M., Nau, F., Andrews, S. C., Bonnassie, S., & Jan, S. (2020). Egg-white proteins have a minor impact on the bactericidal action of egg white toward *Salmonella Enteritidis* at 45 °C. *Frontiers in Microbiology*, 11, 584986. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.584986>.

*Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., & Gurny, R. (2004). Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1), 35–52. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00161-9](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00161-9).

Berney, M., Hammes, F., Bosshard, F., Weilenmann, H.-U., & Egli, T. (2007). Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight kit in combination with flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(10), 3283–3290. <https://doi.org/10.1128/AEM.02750-06>.

*Bonnet, M., Lagier, J. C., Raoult, D., & Khelaifia, S. (2020). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: The evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes and New Infections*, 34, 100622. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100622>.

Canteri-Schemin, M. H., Fertonani, H. C. R., Waszczyński, N., & Wosiacki, G. (2005). Extraction of pectin from apple pomace. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(2), 259–266. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000200013>.

Capel, F., Nicolai, T., Durand, D., Boulenguer, P., & Langendorff, V. (2005). Influence of chain length and polymer concentration on the gelation of (amidated) low-methoxyl pectin induced by calcium. *Biomacromolecules*, 6(6), 2954–2960. <https://doi.org/10.1021/bm0501858>.

Castanha, N., Rojas, M. L., & Augusto, P. E. D. (2021). An insight into the pasting properties and gel strength of starches from different sources: Effect of starch concentration. *Scientia Agropecuaria*, 12(2), 203–212. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.023>.

Ciriminna, R., Fidalgo, A., Delisi, R., Tamburino, A., Carnaroglio, D., Cravotto, G., Ilharco, L. M., & Pagliaro, M. (2020). Controlling the degree of esterification of citrus pectin for demanding applications by selection of the source. *ACS Omega*, 5(24), 14120–14125. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01109>.

Coiffier, A., Coradin, T., Roux, C., Bouvet, O. M. M., & Livage, J. (2001). Sol–gel encapsulation of bacteria: A comparison between alkoxide and aqueous routes. *Journal of Materials Chemistry*, 11(8), 2039–2044. <https://doi.org/10.1039/b101308o>.

Cortes, A. D., Baldomero, J. R. N., & Baltazar, M. D. (2024). Molecular identification of indigenous pectinolytic bacteria characterized for starter culture in coffee fermentation. *Beverage Plant Research*, 4, e026. <https://doi.org/10.48130/bpr-0024-0015>.

Croze, O. A., Ferguson, G. P., Cates, M. E., & Poon, W. C. K. (2011). Migration of chemotactic bacteria in soft agar: role of gel concentration. *arXiv preprint arXiv:1101.5063v2*. <https://doi.org/10.48550/arXiv.1101.5063>.

Davis, W. H. (1933). Potato plugs as culture media. *Journal of Bacteriology*, 1(3), 397–400. <https://doi.org/10.1128/jb.1.3.397-400.1933>.

Dranca, I., & Vyazovkin, S. (2009). Thermal stability of gelatin gels: Effect of preparation conditions on the activation energy barrier to melting. *Polymer*, 50(21), 4859–4867. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2009.06.070>.

Duckworth, M., & Yaphe, W. (1971). The structure of agar: Part I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 16(1), 189–197. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)86113-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)86113-3).

Ebile, P. A., Opata, J., & Hegele, S. (2022). Evaluating suitable low-cost agar substitutes, clarity, stability, and toxicity for resource-poor countries' tissue culture media. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 58, 989–1001. <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10285-6>.

Elsawey, H., Patz, S., Nemr, R. A., Sarhan, M. S., Hamza, M. A., Youssef, H. H., Abdelfadeel, M. R., Daanaa, H.-S. A., El-Tahan, M., Abbas, M., Fayez, M., Witzel, K., Ruppel, S., & Hegazi, N. A. (2020). Plant broth- (not bovine-) based culture media provide the most compatible vegan nutrition for in vitro culturing and in situ probing of plant microbiota. *Diversity*, 12(11), 418. <https://doi.org/10.3390/d12110418>.

Flory, P. J., & Weaver, E. S. (1960). Helix $\rightleftharpoons$ Coil transitions in dilute aqueous collagen solutions. *Journal of the American Chemical Society*, 82(18), 4518–4525.

Fraeye, I., Colle, I., Vandevenne, E., Duvetter, T., Van Buggenhout, S., Moldenaers, P., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2010). Influence of pectin structure on texture of pectin–calcium gels. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(3), 401–409. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.08.015>.

Fredriksson, H., Silverio, J., Andemon, R., Eliasson, A.-C., & Aman, P. (1998). The influence of amylose and amylopectin characteristics on gelatinization and retrogradation properties of different starches. *Carbohydrate Polymers*, 35(2–3), 119–134. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(97\)00247-6](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(97)00247-6).

*Fu, X. T., & Kim, S. M. (2010). Agarase: Review of major sources, categories, purification method, enzyme characteristics and applications. *Marine Drugs*, 8(1), 200–218. <https://doi.org/10.3390/md8010200>.

Garrood, M. J., Wilson, P. D. G., & Brocklehurst, T. F. (2004). Modeling the rate of attachment of *Listeria monocytogenes*, *Pantoea agglomerans*, and *Pseudomonas fluorescens* to potato tissue. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3558–3565. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3558-3565.2004>.

Ghebremedhin, M., Seiffert, S., & Vilgis, T. A. (2021). Physics of agarose fluid gels: Rheological properties and microstructure. *Current Research in Food Science*, 4, 436–448. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.06.003>.

Gilsenan, P. M., & Ross Murphy, S. B. (2000). Rheological characterisation of gelatins from mammalian and marine sources. *Food Hydrocolloids*, 14(3), 191–195. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(99\)00050-8](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(99)00050-8).

Gomes, M. T. M. S., & Pelegriane, D. H. G. (2012). Solubility of egg white proteins: Effect of pH and temperature. *International Journal of Food Engineering*, 8(3), Article 35. <https://doi.org/10.1515/1556-3758.2847>.

*Goy, R. C., Britto, D. de, & Assis, O. B. G. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 19(3), 241–247. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282009000300013>.

Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C., & Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Letters*, 32(1), 195–198. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(73\)80770-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(73)80770-7).

Gudmundsson, M., & Eliasson, A.-C. (1990). Retrogradation of amylopectin and the effects of amylose and added surfactants/emulsifiers. *Carbohydrate Polymers*, 13(3), 295–315. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(90\)90061-V](https://doi.org/10.1016/0144-8617(90)90061-V).

Hasman, H., Schembri, M. A., & Klemm, P. (2000). Antigen 43 and type 1 fimbriae determine colony morphology of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 182(4), 1089–1095. <https://doi.org/10.1128/JB.182.4.1089-1095.2000>.

*Hench, L. L., & West, J. K. (1990). The sol–gel process. *Chemical Reviews*, 90(1), 33–72. <https://doi.org/10.1021/cr00099a003>.

Hesse, W. (1884). Ueber quantitative Bestimmung der in der Luft enthaltenen Mikroorganismen. *Mitteilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte*, 2, 182–207. <https://digi-hub.de/viewer/fullscreen/1504089803336/194/>.

*Hitchens, A. P., & Leikind, M. C. (1938). The introduction of agar-agar into bacteriology. *Journal of Bacteriology*, 36(4), 485–493. <https://doi.org/10.1128/jb.37.5.485-493.1939>.

Holme, J. (1962). The thermal denaturation and aggregation of ovalbumin. *Journal of Biological Chemistry*, 237(3), 781–789.

Hua, X., Wang, K., Yang, R., Kang, J., & Zhang, J. (2015). Rheological properties of natural low-methoxyl pectin extracted from sunflower head. *Food Hydrocolloids*, 44, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.026>.

*Jarry, C., Chaput, C., Chenite, A., Renaud, M.-A., Buschmann, M., & Leroux, J.-C. (2001). Effects of steam sterilization on thermogelling chitosan-based gels. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 58(1), 127–135. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(2001\)58:1<127::aid-jbm190>3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/1097-4636(2001)58:1<127::aid-jbm190>3.0.co;2-g).

Jenkins, P. J., & Donald, A. M. (1998). Gelatinisation of starch: A combined SAXS/WAXS/DSC and SANS study. *Carbohydrate Research*, 308(1–2), 133–147. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00079-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00079-2).

Joly-Duhamel, C., Hellio, D., Ajdari, A., & Djabourov, M. (2002). All gelatin networks: 2. The master curve for elasticity. *Langmuir*, 18(19), 7158–7166. <https://doi.org/10.1021/la020190m>.

Kandasamy, K. P., Subramanian, R. K., Srinivasan, R., Ragunath, S., Balaji, G., Gracy, M., & Latha, K. (2020). *Shewanella* algae and *Microbulbifer elongatus* from marine macro-algae – isolation and characterization of agar-hydrolysing bacteria. *Access Microbiology*, 2, 000170. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000170>.

- Kato, S., Terashima, M., Yama, A., Sato, M., Kitagawa, W., Kawasaki, K., & Kamagata, Y. (2020). Improved isolation of uncultured anaerobic bacteria using medium prepared with separate sterilization of agar and phosphate. *Microbes and Environments*, 35(1), ME19060. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME19060>.
- Koch, R. (1882). Die Ätiologie der Tuberkulose. *Berliner Klinische Wochenschrift*, 19, 221–230. <https://archive.org/details/koch1882>.
- Kochanowski, J. A., Carroll, B., Asp, M. E., Kaputa, E. C., & Patteson, A. E. (2024). Bacteria colonies modify their shear and compressive mechanical properties in response to different growth substrates. *ACS Applied Bio Materials*, 7(1), 130–140. <https://doi.org/10.1021/acsabm.3c00907>.
- Kovács, R., Erdélyi, L., Fenyvesi, F., Balla, N., Kovács, F., Vámosi, G., Klusóczy, Á., Gyöngyösi, A., Bácskay, I., Vecsernyés, M., & Váradi, J. (2023). Concentration-dependent antibacterial activity of chitosan on *Lactobacillus plantarum*. *Pharmaceutics*, 15(1), 18. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010018>.
- Lahrech, K., Sharma, S., & Sangwan, P. (2023). An insight into the role of agar as a gelling agent in microbiological media: Composition, chemistry, and applications. *Current Microbiology*, 80(7), 227. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03325-2>.
- *Li, X. (2018). Functional Properties and Extraction Techniques of Chicken Egg White Proteins. *Food Hydrocolloids*, 82, 329–337. 4. <https://doi.org/10.3390/foods11162434>.
- Lim, L.-Y., Khor, E., & Koo, O. (1998). γ irradiation of chitosan. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 43(3), 282–290. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199823\)43:3<282::AID-JBM9>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199823)43:3<282::AID-JBM9>3.0.CO;2-J).
- Liu, G. Y., Essex, A., Buchanan, J. T., Datta, V., Hoffman, H. M., Bastian, J. F., Fierer, J., & Nizet, V. (2005). *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *Journal of Experimental Medicine*, 202(2), 209–215. <https://doi.org/10.1084/jem.20050846>.
- Mada, T., Duraisamy, R., & Guesh, F. (2022). Optimization and characterization of pectin extracted from banana and papaya mixed peels using response surface methodology. *Food Science & Nutrition*, 10(3), 1222–1238. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2754>.
- Mao, B., Bentaleb, A., Louerat, F., Divoux, T., & Snabre, P. (2016). Overcooked agar solutions: Impact on the structural and mechanical properties of agar gels. *arXiv preprint*. <https://doi.org/10.48550/arXiv.1603.00778>.
- Meyer, C. T., Lynch, G. K., Stamo, D. F., Miller, E. J., Chatterjee, A., & Kralj, J. M. (2023). A high-throughput and low-waste viability assay for microbes. *Nature Microbiology*, 8(12), 2304–2314. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01513-9>.
- Mohamed, M. A. H., Alsadon, A. A., & Al Mohaidib, M. S. (2010). Corn and potato starch as an agar alternative for *Solanum tuberosum* micropropagation. *African Journal of Biotechnology*, 9(1), 12–16. <http://www.academicjournals.org/AJB>.
- Morgan, H. J., & Avery, O. T. (1923). Studies on bacterial nutrition: Effect of plant tissue upon growth of pneumococcus and streptococcus. *Journal of Experimental Medicine*, 37(2), 207–220. <https://doi.org/10.1084/jem.38.2.207>.

Nassif, N., Roux, C., Coradin, T., Rager, M.-N., Bouvet, O. M. M., & Livage, J. (2003). A sol–gel matrix to preserve the viability of encapsulated bacteria. *Journal of Materials Chemistry*, 13(1), 203–208. <https://doi.org/10.1039/b210167j>.

Nemr, R. A., Patz, S., Abdelwakeel, S. M., Khalil, M., Ben Djadid, A., Abdelfadeel, M. R., ... & Hegazi, N. A. (2021). Culture media based on leaf strips/root segments create compatible host/organ setup for in vitro cultivation of plant microbiota. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 660790. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.660790>.

Nordby, M. H., Kjøniksen, A.-L., Nyström, B., & Roots, J. (2003). Thermoreversible gelation of aqueous mixtures of pectin and chitosan: Rheology. *Biomacromolecules*, 4(2), 337–343. <https://doi.org/10.1021/bm020107+>.

*Oh, C., Nikapitiya, C., Lee, Y., Whang, I., Kang, D.-H., Heo, S.-J., Choi, Y.-U., & Lee, J. (2010). Molecular cloning, characterization and enzymatic properties of a novel β -agarase from a marine isolate *Pseudoalteromonas* sp. AG52. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 876–889. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400005>.

Ohlmaier-Delgadillo, F., Carvajal-Millan, E., López-Franco, Y. L., Islas-Osuna, M. A., Lara-Espinoza, C., Marquez-Escalante, J. A., Sanchez-Villegas, J. A., & Rascon-Chu, A. (2021). Ferulated pectins from sugar beet bioethanol solids: Extraction, macromolecular characteristics, and enzymatic gelling properties. *Sustainability*, 13(19), 10723. <https://doi.org/10.3390/su131910723>.

Onyimba, I. A., Dashen, M. M., Odu, C. E., Nnebechukwu, I. A., Njoku, A. I., Job, M. O., Dakiyes, E., Ngene, A. C., & Egbere, O. J. (2023). Evaluation of partial substitution of cocoyam starch as alternative gelling agent in culture media for cultivation of fungi. *Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology*, 9(1), 20–27. <https://doi.org/10.9734/AJB2T/2023/v9i1175>.

Park, S.-H., Ryu, S., & Kang, D.-H. (2011). Improved selective and differential medium for isolation of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(1), 405–408. <https://doi.org/10.1128/JCM.01359-10>.

Pathade, A., Kadole, S. R., & Jadhav, A. (2024). Isolation and characterization of gelatinase enzyme-producing microorganisms from soil for industrial applications. *Bulletin of Pure and Applied Sciences – Zoology*, 43B(1s), 461–474.

Persson, K., Mira, I., & Eliasson, A.-C. (2005). Effect of surfactant structure on the pasting properties of wheat flour and starch suspensions. *Cereal Chemistry*, 82(1), 44–52. <https://doi.org/10.1094/CC-82-0044>.

Pickett, M. J., Greenwood, J. R., & Harvey, S. M. (1991). Tests for detecting degradation of gelatin: Comparison of five methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(10), 2322–2325. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.10.2322-2325.1991>.

Rhoades, J., & Roller, S. (2000). Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 80–86. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.1.80-86.2000>.

*Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>.

Sacco, P., Piazza, F., Marsich, E., Abrami, M., Grassi, M., & Donati, I. (2024). Ionic strength impacts the physical properties of agarose hydrogels. *Gels*, 10(2), 94. <https://doi.org/10.3390/gels10020094>.

*Sandle, T. (2014). The early use of potato slices as culture media in microbiology. *European Pharmaceutical Review*, 19(3), 82–85. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.26709.73441>.

Shrestha, S., Khatiwada, J. R., Zhang, X., Chio, C., Kognou, A. L. M., Chen, F., Han, S., Chen, X., & Qin, W. (2021). Screening and molecular identification of novel pectinolytic bacteria from forest soil. *Fermentation*, 7(1), 40. <https://doi.org/10.3390/fermentation7010040>.

Smith, H. L., & Goodner, K. (1958). Detection of bacterial gelatinases by gelatin-agar plate methods. *Journal of Bacteriology*, 76(4), 662–665. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.76.6.662-665.1958>.

*Sravanthi, L. (2019). Natural culture media for microbial growth. *International Journal of Microbiology Research*, 11(4), 112–118. <https://doi.org/10.7759/cureus.72955>.

Stecchini, M. L., Del Torre, M., Donda, S., Maltini, E., & Pacor, S. (2001). Influence of agar content on the growth parameters of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 64(1–2), 81–88. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00436-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00436-0).

Stoppel, R., Meier, C., & Ghosh, R. (2013). Engineering functional materials based on bacterial cellulose and other polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(3), 961–971. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.07.009>.

Szymańska, E., & Winnicka, K. (2015). Stability of chitosan—A challenge for pharmaceutical and biomedical applications. *Marine Drugs*, 13(4), 1819–1846. <https://doi.org/10.3390/md13041819>.

Tanaka, T., Kawasaki, K., Daimon, S., Kitagawa, W., Yamamoto, K., Tamaki, H., Tanaka, M., Nakatsu, C. H., & Kamagata, Y. (2014). A hidden pitfall in the preparation of agar media undermines microorganism cultivability. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(24), 7659–7666. <https://doi.org/10.1128/AEM.02741-14>.

Voragen, A. G. J., Coenen, G.-J., Verhoef, R. P., & Schols, H. A. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, 20(2), 263–275. <https://doi.org/10.1007/s11224-009-9442-z>.

*Vriesmann, L. C., & de Oliveira Petkowicz, C. L. (2017). Cacao pod husks as a source of low-methoxyl, highly acetylated pectins able to gel in acidic media. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101, 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.082>.

Wang, L., Li, R., Lv, S., Liu, Y., Fang, S., Zang, J., Qing, M., & Chi, Y. (2025). The thermodynamic and gelation properties of ovalbumin and lysozyme. *Gels*, 11(6), 470. <https://doi.org/10.3390/gels11060470>.

Wang, Y. Z., Zhang, X. F., & Zhang, J. X. (2011). New insight into kinetics behavior of the structural formation process in agar gelation. *New Journal of Physics*, 13(12), 125003. <https://doi.org/10.1007/s00397-012-0658-2>.

Wasas, A. D., Huebner, R. E., & Klugman, K. P. (1999). Use of Dorset egg medium for maintenance and transport of *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* type b. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 2045–2046. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.6.2045-2046.1999>.

Woltjes, J., Legdeur-Velthuis, H., & de Graaff, J. (1981). Detection and characterization of hemolysin production in *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity*, 31(3), 850–855. <https://doi.org/10.1128/iai.31.3.850-855.1981>.

Youssef, H. H., Hamza, M. A., Fayez, M., Mourad, E. F., Saleh, M. Y., Sarhan, M. S., ... Hegazi, N. A. (2016). Plant-based culture media: Efficiently support culturing rhizobacteria and correctly mirror their in-situ diversity. *Journal of Advanced Research*, 7(3), 305–316. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2015.07.005>.

Zhang, C., Xue, W., Li, T., & Wang, L. (2023). Understanding the relationship between the molecular structure and physicochemical properties of soft rice starch. *Foods*, 12(19), 3611. <https://doi.org/10.3390/foods12193611>.

Zhao, X., Zhou, Y., Liu, J., Chen, J., Ye, F., & Zhao, G. (2020). Effects of sucrose on the structure formation in high-methoxyl apple pectin systems without acidifier. *Food Hydrocolloids*, 105, 105783. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105783>.