

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

Katedra veterinárních disciplín a kvality produktů

---

STUDIJNÍ PROGRAM: N401 – Zemědělské inženýrství

STUDIJNÍ OBOR: Živočišné biotechnologie

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Magnetická modifikace mikrobiálních buněk**

**(Magnetic modification of microbial cells)**

**Bc. Eva Baldíková**

**Vedoucí diplomové práce:**

Doc. Ing. Eva Samková, Ph.D.

**Konzultant:**

Prof. Ing. Ivo Šafařík, DrSc.

---

2013

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta zemědělská

Akademický rok: 2011/2012

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Eva BALDÍKOVÁ**  
Osobní číslo: **Z11684**  
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**  
Studijní obor: **Živočišné biotechnologie**  
Název tématu: **Magnetická modifikace mikrobiálních buněk**  
Zadávací katedra: **Katedra veterinárních disciplín a kvality produktů**

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

Různé typy magnetických materiálů nachází významné uplatnění v biovědách, biotechnologiích a environmentálních technologiích. Progresivní materiály mohou být připraveny také vhodnou magnetickou modifikací mikrobiálních buněk.

Cílem magisterské práce bude ověření různých postupů pro přípravu magnetických derivátů mikrobiálních buněk, a sice povrchovou modifikací buněk magnetickými kapalinami, zabudováním buněk do magnetických gelů a kovalentní imobilizací na magnetické nosiče.

Práce bude vypracována na základě pokynů uvedených na [www.zf.jcu.cz/studenti/informace-pro-studujici/](http://www.zf.jcu.cz/studenti/informace-pro-studujici/)

Rozsah grafických prací: grafy a tabulky dle vlastního uvážení

Rozsah pracovní zprávy: 25-35 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

- Safarik, I., Horská, K., Safarikova, M.: Magnetically responsive biocomposites for inorganic and organic xenobiotics removal. In: Microbial Biosorption of Metals (Kotrba, P., Mackova, M., Macek, T., Editors), Springer, 2011, pp. 301-320
- Safarik, I., Safarikova, M.: Magnetic nano- and microparticles in biotechnology. Chem. Papers 63 (2009) 497-505
- Safarik, I., Safarikova, M.: Magnetically modified microbial cells: a new type of magnetic adsorbents. China Particuology 5 (2007) 19-25
- Safarik, I., Safarikova, M.: Magnetic nanoparticles and biosciences. Monats. Chem. 133 (2002) 737-759
- Safarik, I., Safarikova, M.: Use of magnetic techniques for the isolation of cells. J. Chromatogr. B 722 (1999) 33-53
- Další relevantní literatura dostupná na [www.nh.cas.cz/people/safarik](http://www.nh.cas.cz/people/safarik)

Vedoucí diplomové práce: Ing. Eva Samková, Ph.D.

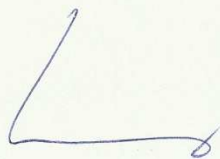
Katedra veterinárních disciplin a kvality produktů

Konzultant diplomové práce: prof. Ing. Ivo Šafařík, DrSc.

Katedra medicínské biologie

Datum zadání diplomové práce: 28. března 2012

Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2013

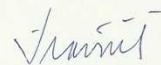


Ing. Karel Suchý, Ph.D.

proděkan pověřený vedením ZF

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studentská 13  
370 05 České Budějovice

L.S.



prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.

vedoucí katedry

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Magnetická modifikace mikrobiálních buněk“ vypracovala samostatně pouze s využitím zdrojů, které jsou uvedeny v seznamu literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 22. dubna 2013

.....

podpis

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala Prof. Ing. Ivu Šafaříkovi, DrSc. a Ing. Zdeňce Maděrové, Ph.D., za odborné vedení mé diplomové práce, ochotu a trpělivost nejen při jejím zpracování.

Děkuji také celému kolektivu Oddělení nanobiotechnologií AV ČR za cenné rady a příjemnou atmosféru v laboratoři.

V neposlední řadě děkuji také Doc. Ing. Evě Samkové, Ph.D. za umožnění výběru tématu mimo ZF JU a svým rodičům a přátelům za podporu při studiu.

## **Abstrakt**

Pekařské kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) byly magneticky modifikovány třemi různými způsoby, a sice povrchovou modifikací buněk magnetickými kapalinami, zabudováním buněk do magnetického alginátu a kovalentní imobilizací na částice magnetického chitosanu. U všech typů byla testována schopnost rozkladu  $H_2O_2$ , přičemž se ukázalo, že nejvíce peroxidu vodíku degradují buňky modifikované magnetickými kapalinami (84-95%), zatímco účinnost stejného množství buněk modifikovaných ostatními způsoby se pohybuje v daleko nižších hodnotách (40-60%).

Kovalentní imobilizací na částice magnetického chitosanu byl vytvořen zcela nový biokompozitní materiál, u něhož byla zkoušena adsorpce krystalové violeti a safraninu O. Zjistilo se, že samotný magnetický chitosan neadsorbuje žádná barviva, tudíž veškerá adsorpce připadá na imobilizované kvasinky. Maximální adsorpční kapacity byly stanoveny pomocí Langmuirovy izotermy na 69,4 mg/g pro krystalovou violet a 99,0 mg/g pro safranin O.

**Klíčová slova:** adsorbent, alginát, imobilizace, magnetická modifikace, magnetická kapalina, magnetický chitosan, magnetit, *S. cerevisiae*

## **Abstract**

Baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) were magnetically modified by three different methods, namely, surface modification by magnetic fluid, entrapment of cells into alginate and covalent immobilization on particles of magnetic chitosan. The ability of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposition was tested for all types of modification. It is apparent that the most amount of hydrogen peroxid was degraded by magnetic fluid - modified cells (84-95%), while the efficiency of cell which were modified by other methods was much lower (40-60%).

Thanks to immobilization on particles of magnetic chitosan, we made completely new type of magnetic material, which was tested for adsorption of Crystal violet and Safranin O. It was founded that magnetic chitosan adsorbs no dyes, so all adsorption belongs to immobilized yeast. The maximum adsorption capacities were determined using Langmuire isotherm at 69,4 mg/g for Crystal violet and 99,0 mg/g for Safranin O.

**Key words:** adsorbent, alginate, immobilization, magnetic chitosan, magnetic fluid, magnetic modification, magnetite, *S. cerevisiae*

# Obsah

1. ÚVOD.....	10
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	11
2.1 Nezbytné vybavení pro mag. modifikaci.....	11
2.1.1 Magnetické částice.....	11
2.1.2 Magnetické separátory .....	14
2.2 Magnetická separace .....	16
2.3 Imobilizace buněk .....	18
2.4 Magnetická modifikace .....	21
2.4.1 Vázání magnetických nano- a mikro- částic na buněčný povrch .....	21
2.4.2 Kovalentní imobilizace buněk na magnetické nosiče .....	23
2.4.3 Entrapment (uzavření, zabudování) buněk do polymeru .....	24
2.4.4 Cross-linking.....	26
2.4.5 Specifická interakce s imunomagnetickými nano- a mikro - částicemi .....	26
2.4.6 Vazba paramagnetických kationtů na buněčný povrch.....	27
2.4.7 Srážení paramagnetických složek na buněčném povrchu .....	27
2.5 Využití.....	28
2.5.1 Biosorbenty.....	28
2.5.2 Celobuněčné katalyzátory.....	37
3. MATERIÁL A METODY .....	39
3.1 Materiál.....	39
3.1.1 Použité mikroorganismy .....	39
3.1.2 Přístroje a pomůcky .....	39
3.1.3 Chemikálie.....	40
3.2 Metody.....	41
3.2.1 Příprava buněk .....	41
3.2.2 Magnetická modifikace buněk.....	41
3.2.3 Stabilita kuliček v AB médiu .....	45
3.2.4 Barvení 0,01 % methylenovou modří.....	45
3.2.5 Stanovení zbytkové koncentrace peroxidu vodíku .....	46
3.2.6 Adsorpce barviv.....	47



4. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	48
4.1 Modifikace mag. kapalinami .....	48
4.2 Zabudování do alginátu.....	49
4.3 Imobilizace na částice mag. chitosanu .....	52
4.4 Degradace H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	54
4.5 Adsorpce barviv.....	57
5. ZÁVĚR .....	61
6. LITERÁRNÍ ZDROJE.....	63
6.1 Odborné publikace.....	63
6.2 Elektronické zdroje.....	71
7. PŘÍLOHY.....	72
7.1 Seznam grafů.....	72
7.2 Seznam obrázků .....	72
7.3 Seznam tabulek.....	73
7.4 Seznam zkratek .....	74

# 1. ÚVOD

Mikrobiální buňky jako takové jsou využívány k přípravě některých pokrmů (chléb, sýr, zelí) a nápojů (pivo, víno) již po několik tisíc let. S rozvojem moderních metod a postupů, zejména v posledních 100 letech, však dochází k nárůstu počtu možných aplikací, a to v různých sférách přírodních věd, především v biotechnologiích, biochemii, medicíně a environmentální technologii. Jedním z klíčových momentů rozšíření jejich aplikací je vývoj magnetických nano- a mikromateriálů.

Spojení diamagnetických materiálů s magnetickými nano- či mikročásticemi přináší hned několik výhod. Nejenže je možné takovýto komplex selektivně a rychle oddělit od ostatních nemagnetických složek vzorku pouze využitím vnějšího magnetického pole, tedy vhodného magnetického separátoru, ale také může být využit jako kontrastní látka při zobrazení magnetickou rezonancí (MRI) či nalézt uplatnění při cílené dopravě léku na vybrané místo.

Magneticky modifikované buňky mohou být především využity ve dvou významných oblastech, a sice jako „inteligentní“ (smart) celobuněčné biokatalyzátory, nebo jako adsorbenty pro magnetickou separaci různých biologicky aktivních látek, např. lektinů nebo protilátek proti povrchovým antigenům, a hlavně organických i anorganických xenobiotik (karcinogenů, ve vodě rozpustných barviv, iontů těžkých kovů a radionuklidů), což je předurčuje k využití v bioremediačních procesech, zejména ve vodním prostředí (Safarik & Safarikova, 2007; Szablewska et al., 2010a, b).

V současné době existuje pestrá škála adsorbentů, přesto je pozornost vědců zaměřena především na ty levné a jednoduše připravitelné, což živé i mrtvé mikrobiální buňky (kvasinky, houby, bakterie a řasy) často splňují.

Cílem mé práce je zpracování literárního přehledu popisujícího problematiku přípravy a možné využití magneticky modifikovaných buněk, v experimentální části pak ověření různých postupů pro přípravu magnetických derivátů mikrobiálních buněk, a sice povrchovou modifikaci buněk magnetickými kapalinami, zabudování buněk do magnetických gelů a kovalentní imobilizaci na magnetické nosiče.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Nezbytné vybavení pro mag. modifikaci

#### 2.1.1 Magnetické částice

Magnetické nano- a mikročástice jsou středem velkého zájmu pro své potenciální využití v různých oblastech přírodních věd – medicíně, biotechnologiích či environmentálních technologiích (Safarik & Safarikova, 2009a; Pečová et al., 2011; Safarik, Horska & Safarikova, 2011). Uplatnění nacházejí zejména v (Clement et al., 2009; Safarik & Safarikova, 2009a, b; Safarik, Horska & Safarikova, 2011):

- Selektivním oddělení ze vzorku za využití vnějšího magnetického pole,
- Modifikaci diamagnetických materiálů,
- Citlivé detekci cílových biologicky aktivních sloučenin,
- Směrování magnetických částic do cílové oblasti pomocí magnetického pole,
- Udržení magnetických částic v cílové oblasti pomocí magnetického pole,
- Tvorbě tepla ve střídavém magnetickém poli (léčba rakoviny),
- Tvorbě negativního T2 kontrastu při zobrazení magnetickou rezonancí.

Velmi často se jedná o kompozitní materiály, složené z malých ferromagnetických, ferrimagnetických nebo superparamagnetických částic, které jsou rozprostřené v syntetickém polymeru (např. PVA, polystyren, polyethylenglykol), biopolymeru (např. celulóza, dextran, agaróza, alginát) nebo v anorganickém nosiči (např. oxid křemičitý), popřípadě jsou adsorbovány na vnější povrch diamagnetických částic (Safarik & Safarikova, 2009a, b; Safarik, Horska & Safarikova, 2011).

Magnetická modifikace může být provedena nejen pomocí magnetických a částic (o velikosti  $>1 \mu\text{m}$ ), nýbrž také pomocí magnetických koloidů a kapalin (10-200 nm), magnetolipozómů nebo molekulových magnetických značek (Safarik & Safarikova, 1999 a 2002a).

Nejčastěji používanými magnetickými materiály jsou práškové oxidy železa magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) a maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), dále oxid chromičitý ( $\text{CrO}_2$ ), práškové

železo, nikl a ferrity ( $\text{MeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ , kde  $\text{Me} = \text{Ni}, \text{Co}, \text{Mg}, \text{Zn}, \text{Mn} \dots$ ); v přírodních zdrojích je rovněž možno nalézt greigit ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) (Safarikova & Safarik, 1995).

Velké množství magnetických částic lze zakoupit komerčně, což často bývá velmi drahé. Využitím jednoduchých procedur a levných materiálů je možné si tyto částice připravit v každé laboratoři (Safarik et al., 2007).

### ➤ **MAGNETICKÉ A SUPERPARAMAGNETICKÉ ČÁSTICE**

Do této skupiny jsou řazeny kompozitní částice, jejichž celkové rozměry se obvykle pohybují mezi 1-5  $\mu\text{m}$  a které (resp. většina z nich) vykazují superparamagnetické vlastnosti, což znamená, že jsou magnetické v přítomnosti vnějšího magnetického pole, avšak po odebrání z tohoto prostředí mají nulové reziduální magnetické vlastnosti, díky kterým mohou být snadno suspendovány do homogenní směsi (Safarik & Safarikova, 1999 a 2002a). Superparamagnetismus je způsoben přítomností superparamagnetických nanočástic v kompozitu, které mu udělují magnetické vlastnosti. Dále jsou biokompatibilní, některé z nich biodegradovatelné a ze suspenze bývají odstraněny použitím jednoduchého magnetického separátoru (Safarikova & Safarik, 2000).

Většinou obsahují drobná zrníčka oxidů železa rovnoměrně rozprostřených v celém polymeru. V některých případech mohou být použity silanizované částice oxidů železa nebo magnetické porózní sklo (Safarik & Safarikova, 1999; Safarikova & Safarik, 2000).

### ➤ **MAGNETICKÉ KOLOIDY – KOLOIDNÍ ČÁSTICE (nanočástice)**

Velikost těchto částic se pohybuje v rozmezí 10-200 nm. Obvykle bývají složeny z polymeru (typicky dextranu, škrobu nebo proteinu) a magnetitu nebo jiných krystalků oxidů železa. Z buněčné suspenze se odstraňují použitím vysokogradentového magnetického separátoru (HGMS) (vyjma magnetických kapalin) (Safarik & Safarikova, 1999 a 2002a).

Do této skupiny jsou řazeny nejen magnetické kapaliny, koloidní roztoky magnetických nanočástic oxidů železa nebo ferritů v polární či nepolární kapalině, ale také magnetické částice z magnetotaktických bakterií (Safarik & Safarikova, 1999 a 2002a).

Nejčastěji jsou využívány při značení cílových struktur (především buněk) nebo jako biodegradovatelné nosiče pro biomedicínské využití (Safarikova & Safarik, 2000).

Chemická syntéza magnetických kapalin je založena na spolusrážení železitých a železných solí s alkalickým roztokem. Velikost a tvar vzniklých oxidů železa závisí na typu použité soli, reakční teplotě, pH, iontové síle aj. Touto metodou vznikají většinou částice s různou velikostí. Přídavek chelatujících organických aniontů (např. kyseliny citronové nebo olejové) nebo polymerů (jako je dextran, škrob či polyvinylalkohol) umožňuje dosáhnout monodisperzity nanočástic. Disperzním prostředím je nejčastěji voda, nicméně je možné použít také parafín nebo rostlinný olej (Safarikova & Safarik, 2000, Pečová et al., 2011). Při Massartově procesu přípravy vodných magnetických kapalin se nanočástice stabilizují přítomností kyseliny chloristé nebo tetramethylamonium hydroxidu (Pečová et al., 2011).

#### ➤ **MAGNETOLIPOZÓMY**

Jsou to deriváty běžných lipozómů, malých kulatých váčků obsahujících dvou či vícevrstevný komplex lipidů (Safarikova & Safarik, 2000). Připravují se zavedením koloidních magnetických částic do lipidového váčku a využití nacházejí především jako nosiče pro imobilizaci membránově vázaných enzymů nebo v transportu léčiv (Safarik & Safarikova, 1999).

#### ➤ **MOLEKULOVÉ MAGNETICKÉ ZNAČKY**

Pro magnetické značení jsou využívány lanthanoidy, ferritin a jeho magnetický derivát magnetoferritin (Safarik & Safarikova, 1999; Safarikova & Safarik, 2000; Safarik & Safarikova, 2002a).

**Lanthanoidy**, využíváno bývá zvláště erbium v podobě chloridu erbitého, a to díky vysoké afinitě k vnějšímu buněčnému povrchu a udržení vysokého atomového dipólového momentu.

**Ferritin**, rozpustný protein, který se přirozeně vyskytuje v savcích a obsahuje železo ve formě  $5 \text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ . Vhodnou úpravou je možné získat magnetoferritin, který v kavitě proteinu obsahuje superparamagnetické částice magnetitu (Safarik & Safarikova, 1999).

## 2.1.2 Magnetické separátory

V současné době existuje několik typů magnetických separátorů, jejichž výběr závisí nejen na velikosti částic, které budou separovány, ale také na celkovém objemu, ze kterého mají být odstraněny. Pro většinu z nich však platí, že jsou tvořeny velmi silnými permanentními magnety na bázi kovů vzácných zemin nebo elektromagnety (Safarik & Safarikova, 1995 a 2002a).

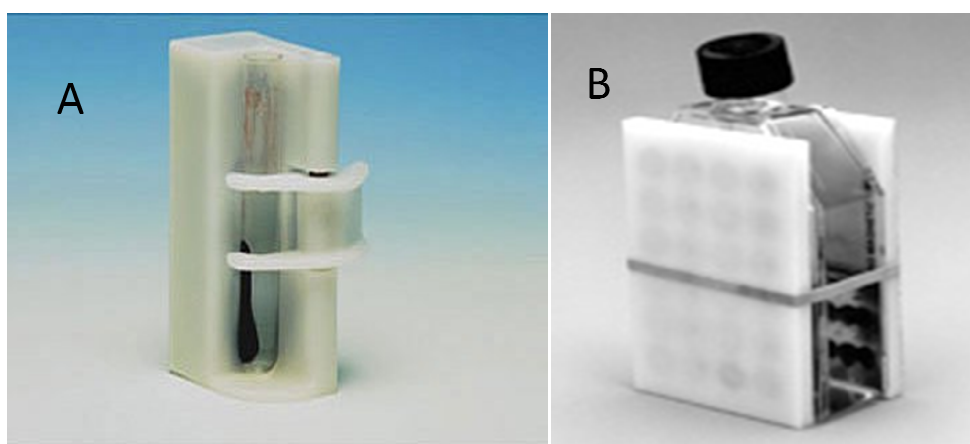
Z technologického hlediska jsou magnetické separátory rozděleny do dvou skupin, a sice na tzv. vsádkové a průtočné separátory.

### ➤ VSÁDKOVÉ SEPARÁTORY

Jedná se jednoduché, velice často využívané magnetické separátory, které jsou dostupné od řady komerčních společností.

Jak bylo zmíněno výše, při výběru je nutno hledět na typ částic, které mají být separovány i na celkový objem → při manipulaci s mikročásticemi v mikroobjemech (>5  $\mu$ l) je vhodné použít magnetický separátor typu Eppendorf, v objemech do 50 ml pak zkumavkový separátor (viz obrázek 1A) a při manipulaci s většími objemy (500 až 1000 ml) plochý magnet (viz obrázek 1B). Pro zacházení s nanočásticemi jsou dostupné kvadrupóly (QMGS) či hexapóly (HMGS) (Safarik & Safarikova, 1999; Safarikova & Safarik, 2000; Safarik & Safarikova, 2002a).

**Obrázek 1:** Zkumavkový separátor Dynal MPC-1(A) a plochý magnet BioMag flask magnet (B).



Zdroj: <http://www.invitrogen.com> a <http://www.polysciences.com> [staženo 2012-09-15]

## ➤ PRŮTOČNÉ SEPARÁTORY

Pro tento typ separátorů je charakteristický průtok kapaliny a magneticky značených struktur separačním systémem (Safarik & Safarikova, 1999; Safarikova & Safarik, 2000). Na obrázku 2 je zobrazen HGMS separátor od firmy Miltenyi Biotec.

Mezi póly silného magnetu je umístěna kolonka vyplněná ferromagnetickou maticí (ocelovou vlnou). V těsné blízkosti ocelových vláken dochází ke vzniku velmi silných lokálních gradientů magnetického pole, které umožňují zachycení velmi malých ferromagnetických a superparamagnetických částic při průtoku suspenze kolonou. Zachycené magnetické částice se z kolony vymyjí po jejím vyjmutí z magnetického pole (Safarikova & Safarik, 1995).

**Obrázek 2:** *MidiMACS™ Separator od firmy Miltenyi Biotec.*



Zdroj: <http://www.miltenyibiotec.com> [staženo 2012-09-15]

## 2.2 Magnetická separace

Magnetické částice společně s magnetickými separátory umožňují rychlou a účinnou separaci magnetických struktur přímo ze surových materiálů, jako je krev a ostatní tělní tekutiny, kostní dřev, kultivační média, ale také potraviny či odpadní vody (Safarik & Safarikova, 2002a; Szablewska et al., 2010a, b). Relativně snadno a selektivně však mohou být odstraněny i z viskózních roztoků a suspenzí, například ze slepičího bílku (Safarik & Safarikova, 2009a).

Techniky magnetické separace jsou alternativou ke konvenčním metodám, mezi něž je řazena filtrace a odstředování, oproti kterým nabízejí řadu výhod (Safarik & Safarikova, 1999 a 2002a; Safarikova & Safarik, 2000), a to:

- Izolaci přímo ze surového vzorku,
- Jednoduché a selektivní odstranění ze vzorku využitím magnetického pole,
- Čistotu a životaschopnost izolovaných buněk,
- Možnost urychlení a usnadnění mnoha separačních a purifikačních procesů.

Metody magnetické separace buněk jsou principiálně dále děleny do několika skupin, což je schematicky znázorněno na obrázku 3 (Safarik & Safarikova, 1999; Safarikova & Safarik, 2000; Safarik & Safarikova 2002a, b a 2005):

### 1) Přímá

Ligand s vhodnou afinitou je spojen s magnetickou částicí nebo magneticky modifikovaným biopolymerem a poté je tento komplex přidán přímo do vzorku obsahujícího buňky. Po navázání mohou být označené buňky odstraněny vhodným magnetickým separátorem.

### 2) Nepřímá

Cílové buňky jsou vnímavé k vhodnému primárnímu afinitnímu ligandu. Po inkubaci jsou (nadbytečné) nenavázané ligandy odstraněny promýváním. Následně jsou přidány sekundárně afinitní ligandy s afinitou k primárnímu afinitnímu ligandu. Magnetické částice se navážou na cílové buňky a následně mohou být odstraněny vhodným magnetickým separátorem.



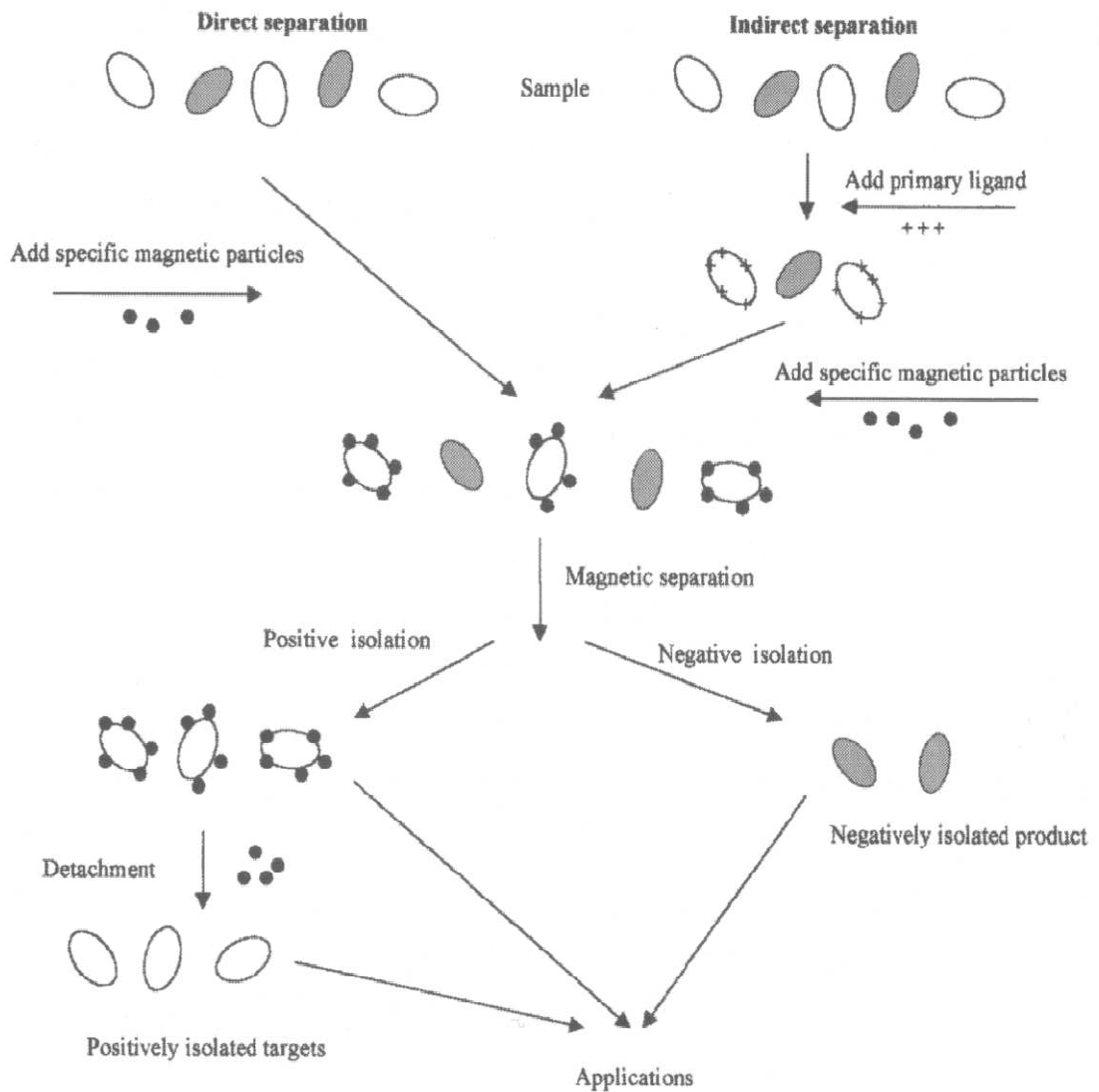
## A) Pozitivní

V případě pozitivní izolace jsou magneticky modifikovány a izolovány přímo žádané sloučeniny nebo buňky.

## B) Negativní

Cílové struktury jsou získávány odstraňováním všech kontaminujících složek. Výhoda této metody spočívá v tom, že čistící proces nezahrnuje žádný přímý kontakt s buňkami, které mají být izolovány.

**Obrázek 3:** *Schéma metod magnetické separace.*



Zdroj: (Safarikova & Safarik, 2000)

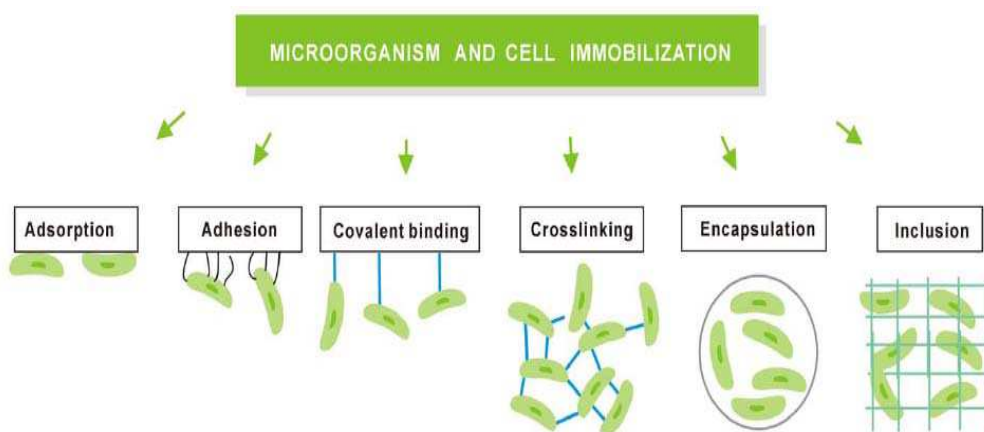
## 2.3 Imobilizace buněk

Imobilizace obecně zahrnuje techniky používané pro fyzikální nebo chemickou fixaci buněk, organel, enzymů nebo jiných proteinů na pevný povrch nebo do struktury vhodného gelu (Purkrtová, 2012), může se však také jednat o stabilizaci mikrobiálních buněk určitými činidly, kterými se dosáhne zesítnění vnitrobuněčného obsahu buněk (Mikulicová, 2009).

Mezi nesporné výhody imobilizovaných buněk patří jednodušší manipulace s mikroorganismy, snazší oddělení produktů a substrátu, možnost opakovaného použití (zpravidla drahého biologického materiálu), zlevnění výroby (odstranění kroků jako extrakce, izolace či purifikace intracelulárních enzymů) a zvýšení odolnosti biomateriálu (Chibata, Toss & Sota, 1987; Mikulicová, 2009; Kuncová & Trögl, 2011).

Imobilizovat je možné jak živé, tak mrtvé buňky. Při imobilizaci mrtvých buněk dochází ke stabilizaci vnitřní struktury buněk, současně tedy dochází k usmrcení buněk s tím, že aktivita určitého enzymu je zachována. U buněk živých se používá imobilizace na nejrůznější nosiče, jejichž polymerní charakter zlepšuje odolnost buněk proti toxickým účinkům určitých látek (Mikulicová, 2009). Alternativní metody imobilizace buněk shrnuje obrázek 4.

**Obrázek 4:** Alternativní metody imobilizace buněk.



Zdroj: Purkrtová (2011)

V současné době je dostupná pestrá škála nosičů pro imobilizované buňky, jež se liší jak v kvalitě, tak kvantitě reaktivních skupin, které jsou schopné

interagovat s buněčným povrchem (Chibata, Toss & Sota, 1987). Obecně lze tyto nosiče rozdělit na organické a anorganické, detailnější dělení je uvedeno v tabulce 1.

**Tabulka 1:** *Typy nosičů pro imobilizaci.*

ORGANICKÉ					
Polysacharidy	Agar/agaróza	Proteiny	Albumin Fibrin Kolagen	Syntetické polymery	Methakrylát
	Alginát				Polyakrylamid
	Celulóza				Polypropylen
	Chitosan				Polystyren
	Dextran				Polyuretan
	Karagenan				Polyvinylalkohol
	Xantanová guma				Polyvinylchlorid
ANORGANICKÉ					
oxidy železa, hliníku, zirkonia, křemíku a titanu; alkoxyasilany; sklo; keramika a písek;					

Zdroj: upraveno dle Chibata, Toss & Sota (1987); Mikulicová (2009); Kuncová & Trögl, (2011); Purkrťová (2012)

V experimentální části této práce jsou využívány pouze dva typy polymerů – alginát a chitosan – proto pouze u těch uvádím stručnou charakteristiku.

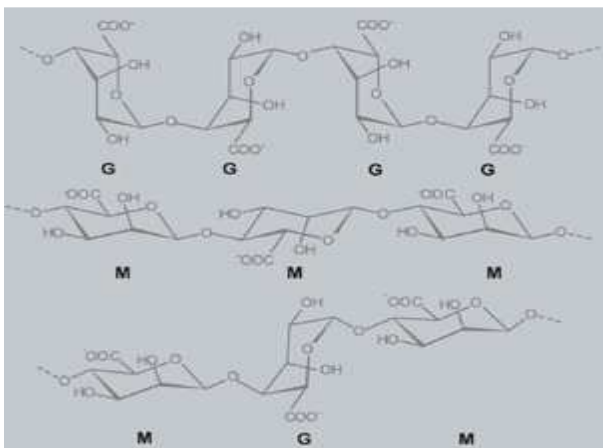
### ➤ ALGINÁT

Alginát je viskózní polysacharid, získávaný z hnědých mořských řas. Je to lineární, nevětvený polymer skládající se z jednotek  $\beta$  – D – manuronové a  $\alpha$  – L – guluronové kyseliny (viz obrázek 5), které jsou pospojovány vazbou (1→4). Obě jednotky jsou v podstatě vzájemnými epimery – po polymeraci se kyselina D – manuronová (M) enzymaticky přemění na kyselinu L – guluronovou (G) (Chibata, Toss & Sota, 1987; Mikulicová, 2009).

Obě složky jsou do struktury alginátu zabudovány ve formě bloků, takže v molekule alginátu můžeme střídavě nalézt různě velké oblasti tvořené buď molekulami M nebo G. Tato zdánlivá maličkost je pro vlastnosti, tedy použití a cenu materiálu, velice důležitá (Obruča, 2008).

Gel se formuje v přítomnosti vápenatých, strontnatých, barnatých, měďnatých nebo hlinitých kationtů ve vodném roztoku.

**Obrázek 5:** *Složení alginátu (pozn. G = guluronová kyselina, M= manuronová kyselina).*



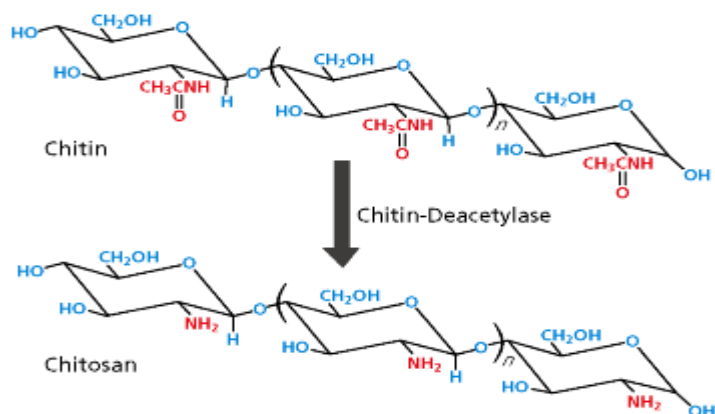
Zdroj: [www.fmcbiopolymer.com](http://www.fmcbiopolymer.com) [staženo 2012-11-25]

## ➤ CHITOSAN

Chitosan je přírodní polysacharid, který se získává deacetylací chitinu (viz obrázek 6). Jedná se o velice atraktivní biopolymer pro přípravu jak magnetických, tak nemagnetických biokompozitních materiálů (Safarik, Horska & Safarikova, 2011).

Je charakterizován několika zajímavými vlastnostmi, mezi které lze zařadit biokompatibilitu, nízkou toxicitu, biodegradovatelnost a schopnost vytvářet vlákna a filmy. Ve své molekule obsahuje aktivní aminoskupiny, které mohou interagovat s funkčními skupinami imobilizované sloučeniny (Mikulicová, 2009). Gel se formuje změnou pH (Chibata, Toss & Sota, 1987).

**Obrázek 6:** *Chemická struktura chitinu a z něho vzniklého chitosanu.*



Zdroj: [www.material.chula.ac.th](http://www.material.chula.ac.th) [staženo 2012-11-25]

## 2.4 Magnetická modifikace

Všechny buňky vyjma magnetotaktických bakterií a erytrocytů jsou diamagnetické, neboť nevykazují vlastní magnetický moment.

Magnetické buňky lze připravit několika způsoby, a to navázáním magnetických nano-či mikročástic nebo paramagnetických kationtů na buněčný povrch, kovalentní imobilizací na magnetické nosiče, uzavřením buněk (společně s magnetickými částicemi) do biokompatibilního polymeru, zesíťováním buněk v přítomnosti magnetických částic nebo srážením paramagnetických částic na buněčném povrchu (Safarik & Safarikova, 2007; Safarikova et al., 2009).

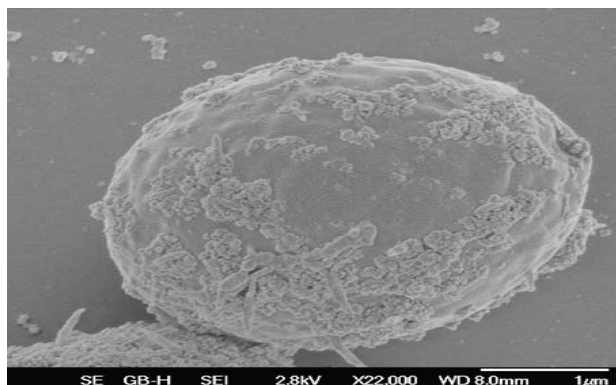
### 2.4.1 Vázání magnetických nano- a mikro- částic na buněčný povrch

Tato metoda je nejjednodušším způsobem modifikace mikrobiálních buněk. Jedná se o ošetření buněk vhodnou magnetickou kapalinou, které umožňuje přípravu magneticky vnímavých mikrobiálních buněk za současného zachování intracelulární enzymové aktivity (Safarik & Safarikova, 2007; Safarikova et al., 2009).

Příprava buněk modifikovaných magnetickou kapalinou závisí na zvoleném mikrobiálním druhu. Jiný postup je uváděn u kvasinek (různé procedury jsou však zaznamenány i v rámci skupiny – u pekařských kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, pivovarnických *S. cerevisiae* subs. *uvarum* i krmných *Kluyveromyces fragilis*), jiný u řas (*Chlorella vulgaris*) či houbových mycelií (*Aspergillus flavus*) (Safarik & Safarikova, 2009b).

Safarik & Safarikova (2007) zjistili, že nejsnazší cesta modifikace je smíchání kyselé magnetické kapaliny s pekařskými či pivovarnickými kvasinkami, které byly promývány a poté suspendovány v acetátovém pufru o pH 4,6. Ve velmi krátkém čase pak dochází k vysrážení magnetických částic na buněčný povrch. Tyto částice a jejich agregáty jsou zdokumentovány na obrázku 7.

**Obrázek 7:** Buňka *S. cerevisiae* modifikovaná magnetickou kapalinou (SEM obraz).

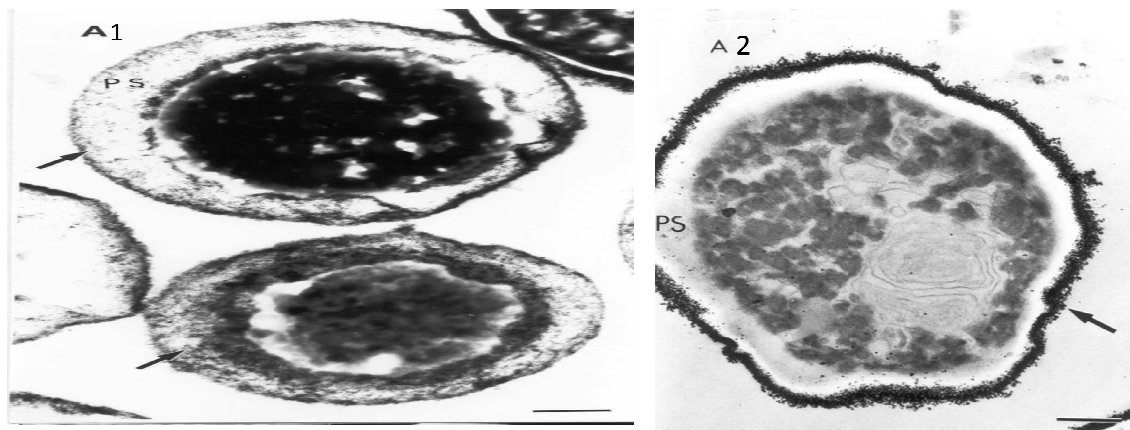


Zdroj: (Safarikova, Maderova & Safarik, 2009)

Před modifikací mikrobiálních druhů *Chlorella vulgaris* a *Kluyveromyces fragilis* byly buňky nejdříve několikrát promývány v 0,1M kyselině octové kvůli odstranění rozpustných makromolekul, které způsobují spontánní vysrážení. Teprve po promytí byla přidána magnetická kapalina (Safarik & Safarikova, 2007).

K zajímavému závěru dochází Azevedo et al. (2003), který uvádí, že magnetické částice se nedostávají až do cytoplazmy buněk, nýbrž zůstávají v plazmatické membráně (PS) (viz obrázek 8 A1), což ovšem neplatí v případě, kdy buňky nebyly před modifikací kultivovány (viz obrázek 8 A2). U takových buněk se magnetické částice nacházejí pouze na buněčné stěně. Jeho výsledek tak podporuje tvrzení, že k vytvoření slibného adsorbentu je důležitým krokem právě kultivace buněk.

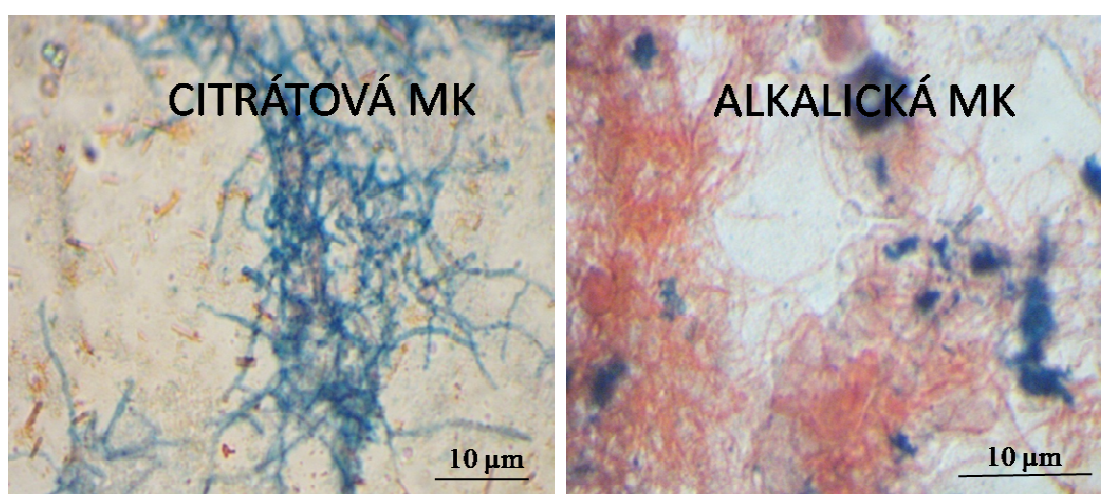
**Obrázek 8:** Začlenění magnetických částic u kultivovaných (A1) a nekultivovaných (A2) *S. cerevisiae* (TEM obraz).



Zdroj: (Azevedo et al., 2003)

Jisté odlišnosti začleňování magnetických částic do buněk jsou však patrné i při využití různých druhů magnetických kapalin. Jak je zřejmé z obrázku 9, při modifikaci streptomycet citrátovou magnetickou kapalinou dochází k navázání magnetických částic na buněčný povrch, přičemž téměř všechna vlákna jsou magnetická, zatímco modifikace alkalickou magnetickou kapalinou způsobuje vytvoření agregátů a začlenění pouze malého množství magnetických částic do buňky.

**Obrázek 9:** *Streptomycety modifikované citrátovou a alkalickou magnetickou kapalinou (MK) [Perlovo barvení].*



#### 2.4.2 Kovalentní imobilizace buněk na magnetické nosiče

Tato metoda se častěji používá k imobilizaci polymerů než samotných buněk, nicméně i takové případy jsou zaznamenány (Safarik & Safarikova, 2007). Výsledkem jsou vázané buněčné preparáty s velmi dobrými sedimentačními a hydrodynamickými vlastnostmi a obvykle s dobrým stupněm zachycené enzymové aktivity (Krumphanzl & Řeháček, 1988).

Kovalentní vázání je možné díky reaktivním skupinám na nosiči nebo prostřednictvím reaktivní vazby, která spojuje buňky a nosiče (Brodelius & Vandamme, 1987). K zavedení specifické skupiny na povrch nosiče mohou být také použita různá vazná činidla (jako aminosilan, karbodiimid, glutaraldehyd) (Krumphanzl & Řeháček, 1988; Safarik & Safarikova, 2007).

Jako nosiče lze zvolit magnetické deriváty polysacharidů (celulózu, dextran, agarózové deriváty), syntetické polymery (polyakrylamidové gely) či anorganické materiály (sklo a porézní oxid křemičitý) (Chibata, Toss & Sota, 1987). Dle

Krumphanzla a Řeháčka (1988) se však nejčastěji používají syntetické, chemicky reaktivní organické polymery či monomery typu glycidylmethakrylát (nesoucí epoxidové skupiny), methakrylaldehyd (aldehydové skupiny) a dalších syntetických polymerů.

### 2.4.3 Entrapment (uzavření, zabudování) buněk do polymeru

Jedná se nejoblíbenější metodu imobilizace mikrobiálních, rostlinných a živočišných buněk. Využít lze jak přírodní, tak syntetický polymer, nejčastěji je však používán alginát a  $\kappa$ -karagenan, a to jednak pro svou netoxicitu vůči buňce, jednak pro zachování vysoké enzymové aktivity (Chibata, Toss & Sota, 1987; Safarik & Safarikova, 2007).

Nosiče jsou dále děleny dle mechanismu, kterým je gel získán (viz tabulka 2) (Brodelius & Vandamme, 1987; Krumhanzl & Řeháček, 1988; Safarik & Safarikova, 2007). Podmínkou je formace gelu jak v přítomnosti buněk, tak magnetických materiálů.

**Tabulka 2:** *Rozdělení nosičů dle mechanismu tvorby gelu.*

Mechanismus tvorby gelu	Polymer
Precipitace (srážení)	celulóza, triacetát celulózy
Termální gelace	kolagen, želatina, agar/agaróza
Ionotropní gelace	alginát
Polymerace	polyakrylamid, polymethakrylát
Polykondenzace	polyuretan, epoxidová pryskyřice
Cross-linking (zesítnění)	proteiny

#### A) Precipitace buněk s polymery nerozpustnými ve vodě, ale rozpustnými v organických rozpouštědlech

Principem je smísení vodné suspenze buněk s polymerem (celulózou či jejím triacetátem), který je rozpuštěn ve vhodném organickém rozpouštědle a následné srážení směsi v jiném rozpouštědle, ve vodě či na vzduchu. Dle Mikulicové (2009) se jedná o metodu opouzdření (tzv. enkapsulaci), kdy obvyklým postupem vytvoření kapsule je kapání směsi polymeru, buněk a magnetických částic do roztoku, který způsobí, že polymer ztuhne, což bývá způsobeno buď změnou teploty, nebo obsahem specifických iontů v roztoku.



B) Termální gelace

Jedná se o vmíchání buněk a magnetických částic do teplého roztoku přírodního polymeru – gelu rozpustného za tepla ve vodě (zejména agaru či želatiny) – a následné ztuhnutí směsi do požadovaného tvaru.

C) Ionotropní gelace

Tento mechanismus také využívá vlastnosti termoreverzibility gelu, avšak spojený s následnou tvorbou iontové sítě. Po vmíchání buněk a magnetických částic do teplého roztoku polymeru (alginátu) se částice sráží kapáním do studené vody obsahující vápenaté soli nebo další ionty kovů (Ba, Sr, Fe, Al, K). Výsledkem je vznik sférických částic.

D) Kopolymerace - uzavření buněk do sítě vznikajících polymerů

Při uzavření buněk a magnetického materiálu do sítě vznikajícího organického polymeru se namísto hotového polymeru použije vhodný monomer a síťující komonomer, nejčastěji N-N-methylendiakrylamid (Mikulicová, 2009).

E) Komplexace - uzavření buněk dispergací převážně s přírodními materiály (např. s kolagenem)

Dispergovaná směs se lyofilizuje nebo se vylíje v tenké vrstvě např. na povrch skla a za tepla či horka se usuší. Imobilizované buněčné preparáty ve formě destiček se získají nařezáním materiálu (Krumphanzl & Řeháček, 1988).

F) Kombinace fyzikálního uzavření s chemickou stabilizací

Vnitrobuněčný obsah buněk se před uzavřením či po něm chemicky stabilizuje, např. kovalentně zesítí použitím bifunkčního nebo multifunkčního činidla, jako je např. glutaraldehyd.

#### 2.4.4 Cross-linking

Metoda je založená na zesítní individuálního obsahu buněk, a to buď pomocí bi- či multi- funkčního činidla (kovalentní zesítní), nebo flokulačními mechanismy vznikající přidáváním elektrolytů (iontové zesítní) (Chibata, Toss & Sota, 1987; Safarik & Safarikova, 2007).

Sítovacím polyfunkčním činidlem může být taková látka, jejíž reaktivní skupiny jsou schopny dostatečně rychle penetrovat do buněk a reagovat především s amino-, hydroxy-, merkapto- a jinými skupinami buněčné stěny tak, aby došlo ke kovalentnímu zesítní, které vede k chemické stabilizaci buňky proti autolýze a současně k stabilizaci a fixaci aktivity klíčového enzymu (Mikulicová, 2009). Mezi tato činidla je řazen především glutaraldehyd či 2, 4 - toluendiizokyanát.

Cross-linking však není využíván ve větší míře pro imobilizace celých buněk - většinou se kombinuje s metodou entrapmentu (Chibata, Toss & Sota, 1987). Použití této metody je totiž limitováno tím, že jednak probíhá za poměrně obtížných podmínek, jednak může docházet ke konformační změně aktivního místa enzymu, což vede k výrazné ztrátě aktivity (Brodelius & Vandamme, 1987).

#### 2.4.5 Specifická interakce s imunomagnetickými nano- a mikro - částicemi

Imunomagnetická modifikace buněk spočívá ve využití komplexu magnetické nanočástice a protilátky, díky kterému dochází k selektivnímu připojení částice na cílové buňky. Zvolit je možné jak monoklonální, tak polyklonální protilátky.

Existují dvě metody: **Přímá**, při které jsou vhodné protilátky spojeny s magnetickými částicemi a přidány přímo do vzorku; a **nepřímá**, kdy je buněčná suspenze nejdříve inkubována s primárními protilátkami, které se naváží na cílové buňky. Po inkubaci jsou nenavázané protilátky odstraněny vymytím. Dalším krokem je přidání magnetické částice se sekundárními protilátkami, která však musí umožňovat spojení s primárními protilátkami (Safarik & Safarikova, 1999; Safarikova & Safarik, 2000).

#### **2.4.6 Vazba paramagnetických kationtů na buněčný povrch**

Pro tuto metodu je charakteristické využití lanthanoidů, zejména erbia v podobě chloridu erbitého ( $\text{ErCl}_3$ ), neboť právě kationty erbia mají vysokou afinitu vůči vnějšímu buněčnému povrchu a udržují vysoký atomový magnetický dipólový moment v různých chemických strukturách (Safarik & Safarikova, 2007).

#### **2.4.7 Srážení paramagnetických složek na buněčném povrchu**

Některé mikroorganismy mohou srážet těžké kovy na svém buněčném povrchu následkem metabolismu a růstu, což jim dává schopnost akumulovat tyto kovy ve velkém množství (Safarik & Safarikova, 2007).

Příkladem mohou být mikroorganismy rostoucí na glycerol-3-fosfátu, které pak enzymaticky produkují fosfátové anionty v blízkém okolí buňky nebo kultura *Desulfovibrio* sp., jež po suspendaci v roztoku obsahujícím železné sulfáty vykazovala precipitaci paramagnetických sulfidů na buněčném povrchu. Tyto sulfidy pak účinně adsorbovaly různá organická xenobiotika, což blíže popisuje Bahaj et al. (1991).

## 2.5 Využití

### 2.5.1 Biosorbenty

Biosorpce je poměrně nová technologie, jež nachází uplatnění zejména v bioremediačních procesech. Jedná se o fyzikálně chemický děj, který zahrnuje různé typy mechanismů jako absorpci, adsorpci, iontovou výměnu či precipitaci, jež je charakteristický pro živé i mrtvé organismy, ostatní biologické materiály a jejich komponenty (Wang & Chen, 2009; Safarik, Horská & Safariková, 2011). Ač velké množství studií bylo zaměřeno na mikrobiální buňky, účinné se ukázaly také makrořasy, rostlinná a živočišná biomasa, bahno a ostatní biologické odpady (Safarik, Horská & Safariková, 2011).

Nezbytnou podmínkou biosorpce je přítomnost některých funkčních skupin (viz obrázek 10, pozn. na obrázku jsou uvedeny jen některé funkční skupiny, nejsou zahrnuty např. amido, thiol, acetamido, fenol, imidazol a řada dalších), které jsou schopné interagovat s individuálními xenobiotiky (Wang & Chen, 2009). Na druhou stranu ani přítomnost těchto skupin vždy nezaručuje použití v biosorpčních procesech, neboť se mohou vyskytnout různé sférické, konformační či jiné bariéry (Safarik, Horská & Safariková, 2011).

**Obrázek 10:** *Příklady některých funkčních skupin.*

Formula of Functional Group	Name	Class of Compounds
$R^* - O - H$	Hydroxyl	Alcohols, carbohydrates
$R - \begin{array}{c} O \\ // \\ C \\ \backslash \\ OH \end{array}$	Carboxyl	Fatty acids, proteins, organic acids
$R - \begin{array}{c} H \\   \\ C - NH_2 \\   \\ H \end{array}$	Amino	Proteins, nucleic acids
$R - \begin{array}{c} O \\ // \\ C \\ \backslash \\ O - R \end{array}$	Ester	Lipids
$R - \begin{array}{c} H \\   \\ C - SH \\   \\ H \end{array}$	Sulfhydryl	Cysteine (amino acid), proteins
$R - \begin{array}{c} O \\ // \\ C \\ \backslash \\ H \end{array}$	Carbonyl, terminal end	Aldehydes, polysaccharides
$R - \begin{array}{c} O \\    \\ C - C - \\   \quad   \end{array}$	Carbonyl, internal	Ketones, polysaccharides
$R - \begin{array}{c} O \\    \\ O - P - OH \\   \\ OH \end{array}$	Phosphate	DNA, RNA, ATP

Zdroj: (Wang & Chen, 2009)

Biosorpce představuje účinné a levné řešení při redukci environmentálního znečištění (zejména ve vodním prostředí), pocházejícího z různých odvětví průmyslu. Ročně je produkováno ohromné množství toxických, často nedegradovatelných sloučenin, přičemž nejvíce problematické se stále jeví těžké kovy a ve vodě rozpustná barviva, nicméně v posledních letech se do popředí dostávají také metabolity antibiotik či antikoncepce.

#### ➤ **BIOSORPCE BARVIV**

Je evidováno více než 100 000 komerčně dostupných barviv (Aksu, 2005; Safarik et al., 2006), ze kterých se 2-50 % se dostává do odpadních vod, kde způsobují environmentální kontaminace. Nejenže mohou být mutagenní a toxická, ale je také dokázáno, že pouze malé množství barviva (10-50 mg/l) ovlivní estetickou hodnotu vody či její průhlednost (Safarikova et al., 2005).

Tyto chemické sloučeniny jsou navíc těžko odstranitelné použitím běžných konvenčních metod, jako je koagulace, flokulace, chemická degradace, biodegradace, oxidace atd. (Safarikova et al., 2005). Odstraňování barviv (dekolorizace) je obtížná zejména proto, že existuje velké množství barviv, které jsou využívány, a které se dostávají do složek životního prostředí. Jejich struktura je značně variabilní, a proto je obtížné najít nějaký obecně použitelný adsorbent (Safarik et al., 2006).

Schopností dekolorizace/adsorpce oplývají některé druhy mikroorganismů (bakterie, huby či řasy). Rozsah adsorpce je vždy závislý na chemické struktuře a funkčních skupinách jak v molekule barviva, tak u daného mikroorganismu (Safarik, Ptackova & Safarikova, 2002). K lepší manipulaci s adsorbentem se přistoupilo k magnetické modifikaci.

V tabulce 3 je uvedena schopnost vybraných mikroorganismů adsorbovat dané barvivo, v tabulce 4 pak maximální adsorpční kapacity.

**Tabulka 3: Magnetická modifikace pro adsorpci barviv.**

Mikroorganismus	Typ modifikace	Adsorbované barvivo	Reference
<i>Chlorella vulgaris</i>	ošetření kyselou MK	anilinová modř Bismarckova hněď Kongo červeň krystalová violeť safranin O Saturnová modř LBRR	Safarikova et al., (2008)
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	ošetření kyselou MK	krystalová violeť amidová čern 10B Kongo červeň Saturnová modř LBRR Bismarckova hněď akridinová oranž safranin O	Safarik et al, (2007)
<i>S. cerevisiae</i>	ošetření kyselou MK	anilinová modř krystalová violeť akridinová oranž safranin O malachitová zeleň	Safarik et al., (2002)
	cross-linking (GA + Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> )	methylová violeť	Tian et al., (2010)
<i>S. cerevisiae</i> subsp. <i>uvarum</i>	ošetření kyselou MK	anilinová modř Kongo červeň krystalová violeť safranin O	Safarikova et al., (2005)

**Tabulka 4: Maximální adsorpční kapacity barviv při adsorpci na magnetické deriváty buněk.**

Adsorbované barvivo	<i>C. vulgaris</i>	<i>K. fragilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i> subs. <i>uvarum</i>	
Anilinová modř	257,9		430,2	228,0	
Akridinová oranž		62,2	82,8		
Bismarckova hněd'	201,9	75,7			
Kongo červen	156,7	49,7		93,1	
Krystalová violet'	42,9	42,9	85,9	41,7	
Malachitová zeleň			19,6		
Methylová violet'					60,2
Safranin O	115,8	138,2	90,3	46,6	
Saturnová modř LBRR	24,3	33,0			
Reference	Safarikova et al., (2008)	Safarik et al., (2007)	Safarik et al., (2002)	Safarikova et al., (2005)	Tian et al., (2010)

## ➤ BIOSORPCE TĚŽKÝCH KOVŮ

Znečištění těžkými kovy představuje problém celého světa. Existují tři typy těžkých kovů, které nemohou být degradovány na neškodné produkty, díky čemuž přetrvávají v životním prostředí neomezeně (Wang & Chen, 2006; Safarik, Horská & Safarikova, 2011), a to:

- 1) Toxické kovy – Hg, Cr, Pb, Zn, Cu, Ni, Cd, As, Co, Sn;
- 2) Drahé kovy – Pd, Pt, Ag, Au, Ru;
- 3) Radionuklidy – U, Th, Ra, Am.

Jedním z nejvíce nebezpečných těžkých kovů je bez pochyby rtuť, která představuje riziko pro životní prostředí ve všech svých podobách. V tkáních vodních organismů se akumuluje ve formě chloridu rtuťnatého, který po požívání takto kontaminovaných ryb vyvolává onemocnění zvané Minamata (viz obrázek 11). Rtuť se váže na proteiny a ovlivňuje nervový systém, počátečními příznaky je necitlivost rtů a končetin, ale jak nemoc postupuje, dochází k trvalému poškození centrálního nervového systému a objevuje se ztráta koordinace, paměti, řeči, chuti a sluchu (Yavuz et al., 2006).

**Obrázek 11:** *Oběť onemocnění zvaným Minamata.*



Zdroj: [http://en.wikipedia.org/wiki/Minamata\\_disease](http://en.wikipedia.org/wiki/Minamata_disease) [staženo 2012-11-23].

Tabulka 5 uvádí vybrané mikroorganismy schopné adsorbovat určité těžké kovy, tabulka 6 pak jejich maximální adsorpční aktivity.



**Tabulka 5: Magnetická modifikace pro adsorpci těžkých kovů. (pozn. EDTAD = dianhydrid kyseliny ethylendiamintetraoctové; GA = glutaraldehyd).**

Mikroorganismus	Typ modifikace	Adsorbovaný kationt	Reference
<i>Enterobacter</i>	imobilizace s magnetitem	Ni <sup>2+</sup>	Wong & Fung (1997)
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	ošetření kyselou MK	Sr <sup>2+</sup>	Ji et al. (2010)
<i>Pseudomonas putida</i> 5-X	imobilizace s magnetitem	Cu <sup>2+</sup>	Sze et al. (1996)
			Chua et al. (1998)
			Lei et al. (2000)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	ošetření kyselou MK	U	Bai et al. (2012)
<i>S. cerevisiae</i>	imobilizace s magnetitem	Cu <sup>2+</sup>	Patzak et al. (1997)
		Cd <sup>2+</sup>	
	cross-linking (GA + Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ) + ošetření EDTAD	Ag <sup>+</sup>	Xu et al. (2011)
		Cu <sup>2+</sup>	
		Pb <sup>2+</sup>	
cross-linking (GA+Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> )	Pb <sup>2+</sup>	Zhang et al. (2011b)	
	Cd <sup>2+</sup>	Zhang et al. (2011a)	
<i>S. cerevisiae</i> subsp. <i>uvarum</i>	ošetření kyselou MK	Hg <sup>2+</sup>	Yavuz et al. (2006)
		Cu <sup>2+</sup>	
		Zn <sup>2+</sup>	
		Ni <sup>2+</sup>	
		Cu <sup>2+</sup>	Uzun et al. (2011)

**Tabulka 6:** *Max. adsorpční kapacity těžkých kovů při adsorpci na mag. deriváty buněk.*

Adsorbovaná látka	Mikroorganismus	Max. adsorpční kapacita $Q_{max}$ (mg/g)	Reference
$Al^{3+}$	<i>S. cerevisiae</i> subs. <i>uvarum</i>	4,1	Yavuz et al., (2006)
$Au^{3+}$	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	506	Song et al., (2008)
$Ca^{2+}$	<i>S. cerevisiae</i>	26,5	Xu et al., (2011)
$Cd^{2+}$	<i>S. cerevisiae</i> subs. <i>uvarum</i>	12,3	Yavuz et al., (2006)
	<i>S. cerevisiae</i>	41,0 (s EDTAD)	Xu et al., (2011) Zhang et al., (2011a, b)
		13,0 (bez EDTAD)	Zhang et al., (2011a)
$Co^{2+}$	<i>S. cerevisiae</i> subs. <i>uvarum</i>	8,2	Yavuz et al., (2006)
$Cr^{3+}$	<i>S. cerevisiae</i> subs. <i>uvarum</i>	6,2	Yavuz et al., (2006)
$Cu^{2+}$	<i>Pseudomonas putida</i>	60,5	Sze et al., (1996)
$Fe^{2+}$	<i>S. cerevisiae</i> subs. <i>uvarum</i>	5,0	Yavuz et al., (2006)
$Hg^{2+}$	<i>S. cerevisiae</i> subs. <i>uvarum</i>	76,2	Yavuz et al., (2006)
$Ni^{2+}$	<i>S. cerevisiae</i> subs. <i>uvarum</i>	14,1	Yavuz et al., (2006)
	<i>Enterobacter</i> sp.	36	Wong & Fung (1997)
$Pb^{2+}$	<i>S. cerevisiae</i>	89,2 (s EDTAD)	Xu et al., (2011) Zhang et al., (2011a, b)
		21,8 (bez EDTAD)	Zhang et al., (2011a)
$Sr^{2+}$	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	140,8	Ji et al., (2010)
<b>U</b>	<i>Rhodotorula glutinis</i>	226,0	Bai et al., (2012)
$Zn^{2+}$	<i>S. cerevisiae</i> subs. <i>uvarum</i>	11,8	Yavuz et al., (2006)

## ➤ Bisorpce dalších látek

Další magnetické modifikace mikrobiálních druhů za účelem adsorpce xenobiotik jsou uvedeny v tabulce 7.

**Tabulka 7:** *Další magnetické modifikace.*

Mikroorganismus	Typ modifikace	Účel	Reference
<i>Flavobacterium</i> (ATCC 27551)	kovalentní vazba a iontová adsorpce s Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	degradace organofosfátových triesterů	Rolatjazi et al., (2012)
<i>Pseudomonas delafieldii</i>	imobilizace do PVA s Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	desulfurizace (odsíření)	Shan et al., (2003)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> (LSSE8-1)	ošetření MK (MK modifikována amonnými soli kyseliny olejové)	desulfurizace (odsíření)	Li et al., (2009)
<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	imobilizace (adsorpce) s magnetitem	adsorpce pesticidů: lindan 2,4- dichlorophenoxyoctová k. 2,4,5- trichlorophenoxyoctová k.	MacRae (1985)
		adsorpce chlorovaných uhlovodíků: heptachlor aldrin a dieldrin α a γ- hexachlorcyklohexan	MacRae, (1986)
<i>Sphingomonas</i> sp. (XLDN2-5)	imobilizace do gelanové gumy s Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	degradace karbazolu	Wang et al. (2007)

## ➤ Magnetotaktické bakterie jako adsorbenty

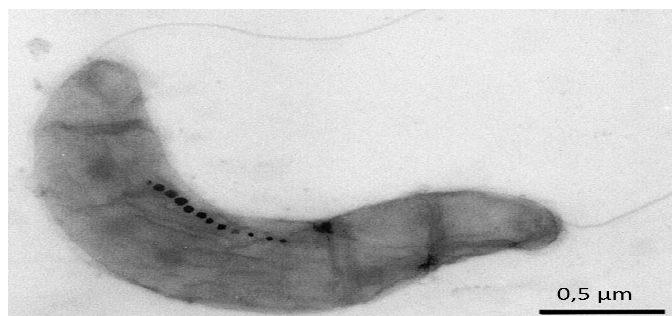
Magnetotaktické bakterie jsou vodní gramnegativní bakterie různých morfotypů (koky, tyčinky, spirily), jejichž společným znakem je přítomnost bičíků v počtu a uspořádání závislém na konkrétních fyziologických podmínkách a buněčném typu. Objeveny byly v roce 1975 a od té doby byly izolovány nejen ze sedimentů sladkovodních toků (rybníky, řeky, jezera) a mořské vody, ale také z bažin (Safarik & Safarikova, 2002 a 2009; Naresh et al, 2012;).

Jedná se o obligátně mikroaerofilní nebo anaerobní mikroorganismy, které se pasivně pohybují podél siločar magnetického pole přímým pohybem, bez zastavení a přetáčení. Tato schopnost úzce souvisí s přítomností intracelulárních magnetických minerálů vázaných v membránových strukturách zvaných magnetozómy (Čejková, 2009).

Magnetozómy obsahují anorganické krystalky magnetitu ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nebo greigitu ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ), které jsou obaleny fosfolipidovou membránou (o tloušťce 3-4 nm) a které často bývají spojovány do řetězců. Typická velikost těchto útvarů se pohybuje mezi 30-120 nm a jejich počet v buňce mezi 5-40. Vykazují vysoký stupeň jednotvárnosti tvaru, velikosti i orientace (Čejková, 2009; Safarik & Safarikova, 2009; Naresh et al, 2012, Zhou et al., 2012).

Na obrázku 12 je zobrazena magnetotaktická bakterie *Magnetospirillum magnetotacticum*, zatímco tabulka 8 shrnuje adsorpci těžkých kovů.

**Obrázek 12:** *Magnetospirillum magnetotacticum*.



Zdroj: <http://www.daviddarling.info/encyclopedia/M/magnetbac.html> [staženo 2012-06-21]

**Tabulka 8:** *Adsorpce těžkých kovů magnetotaktickými bakteriemi.*

Magnetotaktická bakterie	Adsorbovaná látka	Reference
<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>	$\text{Ag}^+$ $\text{Cu}^{2+}$	Wang et al. (2011)
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	$\text{Au}^{3+}$	Song et al. (2008)

## 2.5.2 Celobuněčné katalyzátory

Jako magnetické celobuněčné katalyzátory byly v experimentálních podmínkách použity pekařské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, jejichž modifikace proběhla za mírných podmínek tak, aby nedošlo k jejich usmrcení, a tím i ke snížení enzymatické aktivity.

Využity byly pro katalýzu peroxidu vodíku či produkci invertního cukru, za což jsou zodpovědné intracelulární enzymy – kataláza (peroxid vodíku: peroxid vodíku oxidoreduktáza – EC 1.11.1.6.) a invertáza ( $\beta$  – fruktofuranosidáza – EC 3.2.1.26). Shrnutí včetně referencí je uvedeno v tabulce 9.

**Tabulka 9:** Využití magnetických buněk jako katalyzátorů.

Mikroorganismus	Typ modifikace	Využitý enzym	EC	Reference
<i>S. cerevisiae</i>	enkapsulace do 2%	kataláza	1.11.1.6.	Safarik & Safarikova (2009b)
	alginátu sodného	invertáza	3.2.1.26.	Safarik, Sabatkova & Safarikova (2009)

Obecně lze říci, že použití celých buněk jako katalyzátorů je poměrně levné, neboť odpadají kroky jako izolace či purifikace samotných enzymů. K tvorbě účinných biokatalyzátorů se velice často využívá imobilizace do polymerních materiálů, avšak i ta je v průmyslovém měřítku limitována některými faktory, a sice (Krumphanzl & Řeháček, 1988; Mikulicová, 2009):

- Difúzí, která významně ovlivňuje reakční rychlost;
- Autolýzou buněk, díky které dochází k postupnému vyplavování klíčového enzymu, čímž klesá reakční rychlost;
- V některých případech i samotným růstem buněk, jenž mechanicky narušuje rigiditu polymerních částic.

Některé příklady průmyslových, avšak nemagnetických aplikací uvádí tabulka 10.

**Tabulka 10:** Příklady průmyslového využití imobilizovaných buněk.  
(pozn. 6-APA = 6-aminopenicilinová kyselina; GA - glutaraldehyd).

Mikroorganismus	Metoda imobilizace	Využitý enzym	Průmyslové využití
<i>Bacillus coagulans</i>	cross-linking (GA)	glukózaizomeráza	izomerace glukózy na fruktózu
<i>Bacillus</i> sp.	cross-linking (GA)	$\beta$ - galaktosidáza	hydrolýza laktózy
<i>Brevibacterium flavum</i>	entrapment do $\kappa$ -karagenanu	fumaráza	konverze fumarázy na L-jablečnou kyselinu
<i>E.coli</i>	entrapment do $\kappa$ -karagenanu	aspartáza	konverze amonného fumarátu na L-asparagovou kyselinu
	entrapment do polyakrylamidu	penicilacyláza	produkce 6-APA z penicilinu
	entrapment do glutaraldehydem zesíťované želatiny	penicilacyláza	produkce 6-APA z penicilinu
<i>Streptococcus olivaceus</i>	cross-linking (GA)	glukózaizomeráza	izomerace glukózy na fruktózu

Zdroj: upraveno dle Brodelius & Vandamme (1987)

# 3. MATERIÁL A METODY

## 3.1 Materiál

### 3.1.1 Použité mikroorganismy

K experimentům byly použity komerčně zakoupené pekařské kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) značky FALA (vyrobené v EU) a UNIFERM (pocházející z Německa).

### 3.1.2 Přístroje a pomůcky

Kromě běžného laboratorního skla byly použity následující speciální přístroje a pomůcky:

- Automatické pipety: Eppendorf Research 10 ml (Eppendorf, Německo)  
Labopette 10-100 µl (Hirschman, Německo)  
Transferpette 100-1000 µl (Brandtech, USA)  
Vitrum 0,5-5 ml (Vitrum, Česká Republika)
- Analytické váhy KERN ABT 220 – 5DM (KERN, Německo)
- Magnetické separátory: Dynal MPC®-6 optimal volume 5 - 15 ml (Dynal, Norsko)  
Dynal MPC®-1 optimal volume 5 - 50 ml (Dynal, Norsko)  
DynaMag™-15 optimal volume 1 - 15 ml (Dynal, Norsko)  
DynaMag™-50 optimal volume 5 - 50 ml (Dynal, Norsko)  
Plochý magnet The Biomag®Separator (Dynal, Norsko)
- Míchadlo Dynabeads® MX1 Mixer (Dynal, Norsko)
- Mikroskop Arsenal řada LP 3000i (Arsenal, Česká Republika)
- Odstředivka Hettich universal 320 (Hettich, Německo)
- pH metr Hanna pH 209 (Hanna, Česká Republika)
- Předvážky KERN EG 420 - 3NM (KERN, Německo)
- Rotátor Stuart SB3 (Stuart, Velká Británie)
- Termostat Memmert UFE 500 (Memmert, Německo)
- Třepačka Heidolph Unimax 1010 (Heidolph, Německo)
- Třímístné magnetické míchadlo Stuart SB 161 - 3 (Stuart, Velká Británie)
- UV/VIS Spektrofotometr Cintra 20 (GBC, Austrálie)
- Vortex Heidolph REAX top (Heidolph, Německo)

### 3.1.3 Chemikálie

- Alginát sodný (BDH Laboratory Supplies, Velká Británie)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema, Česká Republika)
- Dusičnan hlinitý (Lach - Ner, Česká Republika)
- Dusičnan strontnatý (Lachema, Česká Republika)
- Ferrokyanid draselný (Lachema, Česká Republika)
- Glutaraldehyd (Fluka, Švýcarsko)
- Hydrogenfosforečnan disodný, dodekahydrát (Lach - Ner, Česká republika)
- Hydroxid sodný (Lach - Ner, Česká Republika)
- Chlorid sodný (Lachema, Česká Republika)
- Chlorid vápenatý (Penta, Česká Republika)
- Krystalová violet (Lachema, Česká Republika)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Česká Republika)
- Kyselina sírová (Lach - Ner, Česká Republika)
- Magnetické chitosanové mikročástice připravené syntézou využívající mikrovlnné záření, průměr 50-200  $\mu\text{m}$  (Prof. Šafařík, Oddělení nanobiotechnologií (ONBT) v ČB, Ústav nanobiologie a strukturní biologie GVGZ AV ČR, Česká Republika)
- Magnetické kapaliny (ONBT, ČB, Česká Republika)
  - Alkalická (pH 14, c = 24,86 mg/ml)
  - Citrátová (pH 6,7, c = 67,55 mg/ml)
  - Kyselá (pH 1, c = 17,8 mg/ml)
- Magnetit připravený pomocí mikrovlnného záření ze síranu železnatého v alkalickém prostředí (ONBT, ČB, Česká Republika)
- Manganistan draselný (Lachema, Česká Republika)
- Methylenová modř (Lachema, Česká Republika)
- Montmorillonit K-10 (Sigma – Aldrich, Německo)
- Octan sodný (Lachema, Česká Republika)
- Peroxid vodíku (Lach - Ner, Česká Republika)
- Safranin O (Lachema, Česká Republika)
- Sacharóza (Lachema, Česká Republika)
- Síran amonný (Lachema, Česká Republika)
- Síran sodný (Lachema, Česká Republika)
- Šťavelan sodný (Lachema, Česká Republika)



## 3.2 Metody

### 3.2.1 Příprava buněk

Před vlastní magnetickou modifikací byly buňky pětkrát promyty ve fyziologickém roztoku (odstředění při 5000 rpm po dobu 3 minut).

### 3.2.2 Magnetická modifikace buněk

#### ➤ MODIFIKACE MAGNETICKÝMI KAPALINAMI

Modifikace citrátovou, kyselou (stabilizovanou kyselinou chloristou) i alkalickou (stabilizovanou tetramethylamonium hydroxidem) magnetickou kapalinou (MK) probíhala podle následujícího postupu:

- K 0,5 gramu kvasinek bylo přidáno 7 ml 1% sacharózy. Směs byla důkladně míchána na vortexu a nechána v termostatu po dobu 2 hodin při teplotě 30°C.
- Následovala centrifugace při 5000 rpm po dobu 3 minut, odstranění supernatantu, promytí buněk v pufrech (v 0,1M glycin - HCl pufru o pH 2,2 pro citrátovou MK; v 0,1M acetátovém pufru o pH 4,6 pro kyselou MK a v 0,1M glycin - NaOH o pH 9 pro zásaditou MK) a opětovná centrifugace.
- Dalším krokem bylo přidání 2 ml příslušného pufru a 0,3 ml příslušné magnetické kapaliny.
- Výsledná směs se nechala půl hodiny inkubovat na rotátoru a poté byly modifikované buňky separovány pomocí magnetického separátoru a několikrát promyty fyziologickým roztokem.
- Takto modifikované buňky se přes noc nechaly sedimentovat při 4°C v kalibrovaných zkumavkách.

Stejným způsobem byly vytvořeny další dvě paralely.

## ➤ ZABUDOVÁNÍ (ENKAPSULACE) DO ALGINÁTU

V rámci tohoto typu modifikace bylo použito pět různých způsobů přípravy alginátových kuliček, a to vždy po třech paralelách.

### **CaCl<sub>2</sub> kuličky**

K 1 gramu kvasinek bylo přidáno 0,5 ml sedlého objemu magnetitu a 2 ml 2% alginátu sodného. Poté byla směs důkladně promíchána na vortexu a pomocí pipety kapána do 5% CaCl<sub>2</sub>. Vzniklé kuličky byly v roztoku ponechány půl hodiny a následně byly několikrát promyty fyziologickým roztokem CaCl<sub>2</sub> a uchovány ve fyziologickém roztoku s přidavkem 0,5 % CaCl<sub>2</sub> při teplotě 4°C.

### **CaCl<sub>2</sub> + Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> kuličky**

Byla připravena směs obsahující 1 gram kvasinek, 0,5 ml sedlého objemu magnetitu a 2 ml 2% alginátu sodného, která byla stejně jako v předchozím případě důkladně promíchána na vortexu a kapána do 5% CaCl<sub>2</sub>, kde se nechala po dobu půl hodiny. Poté byly kuličky magneticky separovány a přeneseny do 0,3M Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, kde byly ponechány po dobu 5 minut. Následovalo promývání fyziologickým roztokem a posléze uchování magnetických kuliček ve fyziologickém roztoku s 0,5% CaCl<sub>2</sub> při 4°C.

### **Sr(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> kuličky**

Směs složená z 1 gramu kvasinek, 2 ml 4% alginátu sodného a 0,5 ml sedlého objemu magnetitu byla kapána do 2% Sr(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, kde byla ponechána po dobu 2 hodin. Kuličky byly několikrát promyty fyziologickým roztokem a následně v něm uchované při teplotě 4°C.

### **CaCl<sub>2</sub> + Montmorillonit kuličky**

K 1 gramu kvasinek bylo přidáno 0,5 ml sedlého objemu magnetitu a 2 ml 4% alginátu s přidavkem 1,25 g montmorillonitu. Směs byla kapána do 2% CaCl<sub>2</sub>, kde byla tvrzena po dobu 2 hodin. Promývání bylo realizováno fyziologickým roztokem a uchování pomocí fyziologického roztoku s přidavkem 0,5% CaCl<sub>2</sub>.

### **CaCl<sub>2</sub> 8 h kuličky**

Směs obsahující 1 gram kvasinek, 2 ml 4% alginátu sodného a 0,5 ml sedlého objemu magnetitu byla kapána do 2% CaCl<sub>2</sub>, kde se nechala po dobu 8 hodin vytvrdit. Následovalo promývání fyziologickým roztokem a uchování ve fyziologickém roztoku s přídavkem 0,5% CaCl<sub>2</sub> ve 4°C.

### **➤ IMOBILIZACE NA ČÁSTICE MAGNETICKÉHO CHITOSANU**

Imobilizace na částice magnetického chitosanu probíhala třemi různými způsoby, vždy po 12 dávkách, které tvořily tři paralely.

#### **1) S aktivací magnetického chitosanu**

- Do 15 ml plastové zkumavky s víčkem bylo přidáno 1,5 ml sedlého objemu magnetického chitosanu (přebytečná voda byla odstraněna pomocí magnetu) a 5 ml 5% glutaraldehydu.
- Směs byla důkladně promíchána na vortexu a inkubována po dobu 3 hodin na rotáru.
- Následovala separace magnetického chitosanu pomocí magnetického separátoru a důkladné promývání destilovanou vodou.
- Dalším krokem byla vlastní imobilizace buněk, kdy 1,5 ml sedlého objemu aktivovaného magnetického chitosanu bylo přeneseno do 50 ml plastových zkumavek s víčkem za současného odstranění přebytečné vody (přes magnet) a k němu bylo přidáno 1,5 gramu kvasinek a 8 ml fyziologického roztoku.
- Takto vzniklá směs byla důkladně promíchána na vortexu a točena na rotátoru po dobu 2 hodin.
- Nenavázané buňky byly slity přes magnet do předem zvážené zkumavky, centrifugovány při 5000 rpm po dobu 3 minut a posléze znovu zváženy (tento krok slouží k přibližnému určení množství navázaných buněk).
- Všechny dávky byly několikrát promyty fyziologickým roztokem a poté po čtyřech spojeny v jednu paralelu.
- Vzorek se nechal sedimentovat přes noc v kalibrovaných zkumavkách při 4°C.

## 2) **Bez aktivace, ale zesítné glutaraldehydem**

- 0,3 gramu kvasinek, 1 ml sedlého objemu magnetického chitosanu a 5 ml fyziologického roztoku bylo promícháno na vortexu a po dobu 3 hodin inkubováno na rotátoru.
- Nenavázané buňky byly odstraněny pomocí magnetického separátoru do předem zvážené zkumavky, centrifugovány při 5000 rpm po dobu 3 minut a znovu zváženy.
- Ke komplexu buněk a magnetického chitosanu bylo přidáno 5 ml 3% glutaraldehydu. Směs byla důkladně promíchána na vortexu a nechala se 2 hodiny inkubovat na rotátoru.
- Všechny dávky byly opakovaně promývány fyziologickým roztokem, po čtyřech spojeny do jedné paralely a nechaly se sedimentovat přes noc v kalibrovaných zkumavkách při 4°C.

## 3) **Bez aktivace i zesítní**

- Směs tvořená 0,3 gramy kvasinek, 0,5 ml sedlého objemu magnetického chitosanu a 5 ml fyziologického roztoku byla důkladně promíchána na vortexu a inkubována po dobu 3 hodin na rotátoru.
- Nenavázané buňky byly stejně jako v předchozích případech odstraněny pomocí magnetického separátoru do předem zvážené 50 ml plastové zkumavky s víčkem, centrifugovány při 5000 rpm po dobu 3 minut a znovu zváženy.
- Čtyři dávky byly spojeny do jedné paralely, několikrát promyty fyziologickým roztokem a nechaly se přes noc sedimentovat v kalibrovaných zkumavkách při 4°C.

### 3.2.3 Stabilita kuliček v AB médiu

#### A) Příprava AB média

Na předvážkách bylo naváženo:

2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
15,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
3g $\text{KH}_2\text{PO}_4$
3 g NaCl,

které byly rozpuštěny v jednom litru destilované vody. Poté bylo přidáno 1 ml 0,1M  $\text{CaCl}_2$ , 1 ml 1M  $\text{MgCl}_2$  a 1 ml 0,003M  $\text{FeCl}_3$ .

#### B) Stabilita

Stabilita kuliček byla testována třepáním 330 mg zabudovaných buněk v alginátu ve 25 ml AB média po dobu 4 hodin. Zákal vzniklý z uvolněných buněk byl měřen spektrofotometricky při 600 nm. Kuličky, jež udržely svůj původní tvar, byly třepány dalších 20 hodin.

### 3.2.4 Barvení 0,01 % methylenovou modří

#### 1) Příprava barviva

0,05 gramu methylenové modři bylo rozpuštěno v 5 ml 96% etanolu. Poté bylo přidáno 17 ml destilované vody. Následně byla směs řádně rozmíchána, přefiltrována a uchována v tmavé lahvi.

Dále bylo připraveno 10 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  o pH 4,6, které bylo na tuto hodnotu upravováno pomocí NaOH o  $c = 1 \text{ mol/l}$ .

Finálním krokem bylo smíchání 0,5 ml barviva s 9,5 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  o pH 4,6.

#### 2) Stanovení živých a mrtvých buněk

Na podložní sklíčko byla nanесena mikrokapička obsahující buňky modifikované magnetickou kapalinou a mikrokapička 0,01% methylenové modři. Preparát se rozetřel, překryl krycím sklíčkem a vložil pod mikroskop.

Živé (světlé) i mrtvé (modré) buňky byly počítány z osmi různých zorných polí, ze kterých byl poté vypočítán aritmetický průměr.

### 3.2.5 Stanovení zbytkové koncentrace peroxidu vodíku

Toto stanovení bylo provedeno u všech typů modifikací a vycházelo z metodiky CEFIX PEROXYGENS H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> AM-7157 z roku 2003 (viz. <http://www.cefic.org/Documents/Other/CEFIC-H2O2-7157.pdf>).

Postup byl následující:

- 1) 330 mg buněk (v případě magnetického chitosanu 65, 130, 195, 260 a 325 mg) bylo zalito 50 ml 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a třepáno po dobu 55 minut při 155 rpm.
- 2) Dalších pět minut byly magnetické buňky ponechány na plochem magnetu pro dokonalou separaci supernatantu.
- 3) Poté byly odebrány 3 ml vzorku, ke kterým bylo přidáno 57 ml destilované vody (možno zvolit i jiný objem vzorku tak, aby výsledný objem byl roven 60 ml) a 15 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (490 g/l).
- 4) Takto vzniklá směs byla titrována kapku po kapce roztokem manganistanu draselného o předem známé koncentraci (která byla stanovena pomocí šťavelanu sodného) do růžového zbarvení.

Zbytkový peroxid vodíku se pak vypočítá z následujícího vzorce:

$$w = \frac{V_2}{1000} \cdot c \cdot \frac{M_2}{2} \cdot \frac{100}{m_2}$$

Kde:  $w$  = zbytkový peroxid vodíku (v %);

$V_2$  = množství manganistanu draselného potřebného k titraci (v ml);

$c$  = koncentrace manganistanu draselného (v mol/l);

$M_2$  = molekulová hmotnost peroxidu vodíku ( $M_2 = 34,01$ );

$m_2$  = množství odpipetovaného vzorku (v ml).

### 3.2.6 Adsorpce barviv

#### 1) PŘÍPRAVA ADSORBENTU

- Adsorbent byl připraven dle postupu uvedeného v kapitole 4. 5. 3 v odstavci 3) s tím, že nebyly použity jen buňky živé, nýbrž také mrtvé, které byly získány povařením po dobu 10 minut.
- Získáním sušiny (jež byla vážena opakovaně, dokud se váha suchého materiálu neustálila a přestala klesat) bylo určeno, že 1 ml sedlého objemu je roven 0,035g.

#### 2) VLASTNÍ ADSORPCE

- 0,4 ml suspenze vytvořeného magnetického absorbentu (sedlý objem byl roven 0,1 ml) byly smíchány s vodou a barvivem (krystalová violet' a safranin O) v takovém poměru, aby celkový objem byl roven 10 ml, přičemž barvivo o koncentraci 1mg/ml bylo přidáváno v objemech 0,01 až 1,5 ml.
- Vzniklá směs byla inkubována po dobu 3 hodin na rotátoru.
- Adsorbent byl magneticky separován pomocí magnetu a čirý supernatant byl poté spektrofotometricky měřen.
- Koncentrace volného (nenavázaného) barviva ( $C_{eq}$ ) byla určena z kalibrační křivky. Množství barviva navázaného na 1 gram absorbentu ( $Q_{eq}$ ) bylo vypočítáno z následujícího vzorce:

$$Q_{eq} = \frac{(0,01 \times \text{množství vnášené barvy v mg/l} - 0,01 \times C_{eq} \text{ v mg/l})}{0,0035g}$$

## 4. VÝSLEDKY A DISKUSE

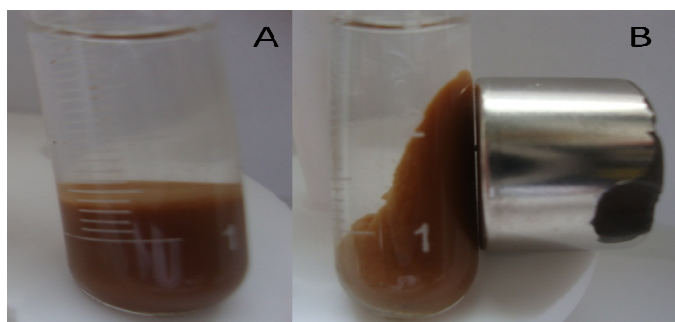
### 4.1 Modifikace mag. kapalinami

V rámci tohoto způsobu modifikace byly testovány tři různé typy magnetických kapalin, a sice citrátová, kyselá (stabilizovaná kyselinou chloristou) a alkalická (stabilizovaná tetramethylamonium hydroxidem). Zjišťovala se nejen konzistence výsledné suspenze magneticky modifikovaných buněk a její reakce na vhodný magnetický separátor, ale také úmrtnost buněk v různých časových intervalech.

Ukázalo se, že suspenze tvořená buňkami modifikovanými citrátovou či alkalickou magnetickou kapalinou má pomalejší odezvu na magnet a jejich konzistence je celkově hutnější, než je tomu u suspenze buněk modifikované kyselou magnetickou kapalinou. Ta se jeví jako nadýchaná a na magnet reaguje téměř okamžitě (cca 3 minuty).

K podobným výsledkům charakteru konzistence dochází také Safarikova, Maderova & Safarik (2009), kteří uvádějí, že k dokonalé magnetické separaci buněk modifikovaných citrátovou magnetickou kapalinou je zapotřebí přibližně třiceti minut, zatímco u suspenze s kyselou magnetickou kapalinou postačí pouze několik minut. Konzistenci buněk *S. cerevisiae* modifikovaných citrátovou magnetickou kapalinou a jejich reakci na magnet dokumentuje obrázek 13.

**Obrázek 13:** Kvasinky modifikované citrátovou magnetickou kapalinou (A) a jejich reakce na magnet (B).



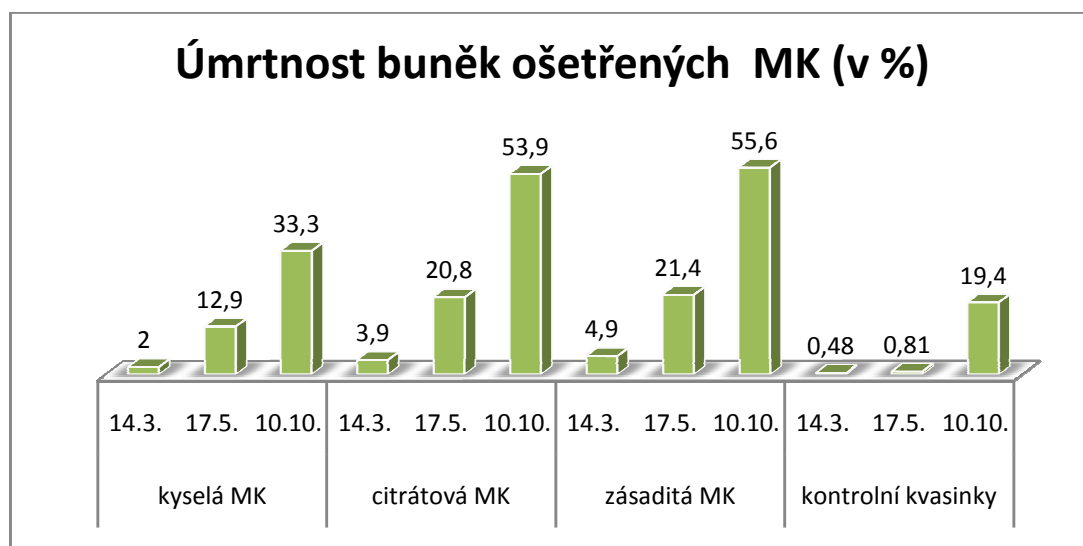
Úmrtnost buněk byla stanovována barvením 0,01% methylenovou modří, přičemž živé i mrtvé buňky byly počítány z osmi různých zorných polí, ze kterých



byl udělán aritmetický průměr. Veškeré buňky (modifikované i nemodifikované) byly skladovány ve fyziologickém roztoku při teplotě 4°C.

Bylo zjištěno, že nejnižší podíl mrtvých buněk se nachází u buněk nemodifikovaných, poté následují buňky ošetřené kyselou magnetickou kapalinou a nakonec buňky modifikované citrátovou a alkalickou magnetickou kapalinou. Z výsledků uvedených na grafu 1 lze vyvodit, že úmrtnost u čerstvě modifikovaných buněk nebude rozhodujícím kritériem při výběru vhodného typu magnetické kapaliny, neboť tyto hodnoty nepřesahují 5% hranici. Pro dlouhodobější expozici by však bylo vhodnější volit buňky modifikované kyselou magnetickou kapalinou, a to nejen pro zjištěnou nižší hodnotu úmrtnosti, ale také pro snazší manipulaci s nimi.

**Graf 1:** *Úmrtnost buněk S. cerevisiae modifikovaných různými typy magnetických kapalin.*



## 4.2 Zabudování do alginátu

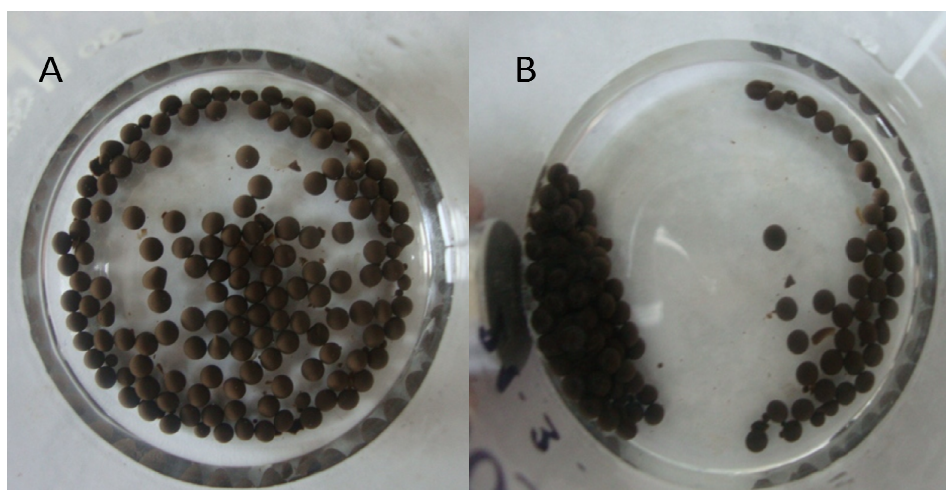
Zabudování buněk do alginátu je velice oblíbenou a hojně rozšířenou metodou imobilizace buněk, a to zejména pro svoji jednoduchost a časovou nenáročnost. Nejčastěji je využívána příprava vápenatých alginátových kuliček (tvrzených  $\text{CaCl}_2$ ), které sice poskytují širokou škálu aplikací, avšak pouze za mírných podmínek. Je prokázáno (Widerøe, & Danielsen, 2001; Mørch et al., 2006), že tyto kuličky nejsou vhodné pro dlouhodobější expozici, neboť se rozpouštějí díky výměně  $\text{Ca}^{2+}$  za  $\text{Na}^+$ , jsou křehké a nestabilní, zvláště v prostředí chelatačních činidel (zejména fosfátu a citrátu) a nesít'ujících kationtů sodných a hořečnatých. Pro

zajištění stability alginátových kuliček je nutná přítomnost  $\text{CaCl}_2$  v médiu. Proto se hledají jiná činidla, jež by vytvořila pevný a stabilní biokatzátor.

Jednou z možností je dle Rocheforta et al. (1986) vytvrzení  $\text{CaCl}_2$  kuliček pomocí trojmocného kationtu hliníku, který nejenže zvýší pevnost gelu a stabilizuje jej v přítomnosti fosfátových médií, ale také působí vůči buňkám netoxicky. Jiné studie naznačují, že postačí zaměnit kationty vápenaté za jiné dvojmocné kationty, s ohledem na afinitu vůči alginátovému gelu, kterou lze sestupně seřadit následovně:  $\text{Pb} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Ba} > \text{Sr} > \text{Ca} > \text{Co}, \text{Ni}, \text{Zn} > \text{Mn}$  (Widerøe, & Danielsen, 2001; Mørch et al., 2006). Stejní autoři docházejí k závěru, že použitím kationtů strontnatých nebo barnatých lze získat daleko vhodnější materiály pro zabudování živých buněk, které je možné využít i v dlouhodobějších experimentech. Vždy však záleží i na samotném složení alginátu, zejména vzájemném poměru monomerů kyseliny manuronové a guluronové. Z výsledků experimentů Mørche et al. (2006) je patrné, že čím vyšší je zastoupení kyseliny guluronové, tím pozitivnější je vliv jak na permeabilitu, tak na samotnou pevnost  $\text{Sr}^{2+}$  a  $\text{Ba}^{2+}$  alginátových kuliček.

V této práci byl pozorován efekt různých kationtů a popř. přídatných látek ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  s přidavkem montmorillonitu) na stabilitu magnetických alginátových kuliček, a to jednak v „klidovém“ stavu, jednak při mechanickém zatížení. Velikost kuliček se vždy pohybovala v rozmezí 2-3 mm a jejich magnetická reakce byla testována přiložením vhodného magnetického separátoru (viz obrázek 14).

**Obrázek 14:** Magnetické alginátové kuličky [A] (tvořené směsí 1 g kvasinek, 0,5 ml sedlého objemu magnetitu a 2 ml 2% alginátu) a jejich reakce na magnet [B].



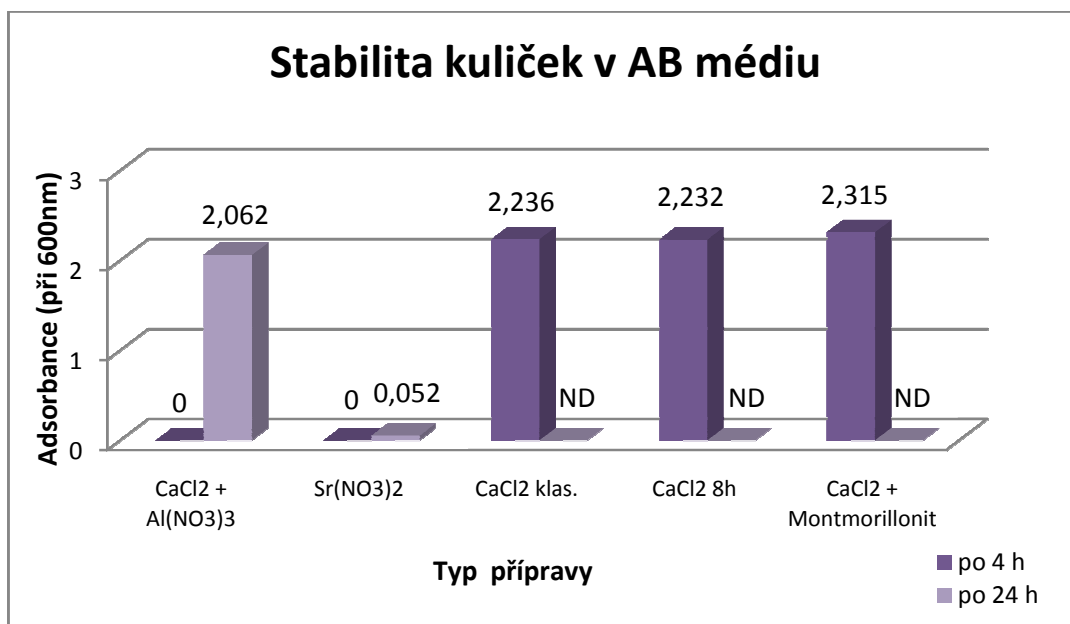
Bylo zjištěno, že bez mechanického zatížení udrží kuličky svůj původní tvar po dobu jednoho měsíce, jsou-li uchovávány při teplotě 4°C ve fyziologickém roztoku s přídavkem 0,5 %  $\text{CaCl}_2$  (v případě  $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$  kuliček pouze ve fyziologickém roztoku).

V testu mechanického zatížení byly kuličky třepány při 155 rpm po dobu 4 hodin v AB médiu, jež obsahovalo malé množství různých iontů, a poté byly magneticky separovány pomocí vhodného magnetu. Už pouhým vizuálním zhodnocením byl patrný rozpad klasických  $\text{CaCl}_2$ , osm hodin vytvrzovaných  $\text{CaCl}_2$  a  $\text{CaCl}_2$  kuliček s přídavkem montmorillonitu. Oproti tomu kuličky, jež byly tvrzené strontnatými kationty a trojmocným hliníkem, svůj tvar udržely i za těchto ztížených podmínek, a proto byly třepány dalších 20 hodin. Ukázalo se, že vytvrzením kuliček v  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  bylo docíleno pouze dočasného zvýšení pevnosti kuliček, neboť po 24 hodinovém testu došlo k jejich úplnému rozpadu, zatímco  $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$  kuličky stále držely sférický tvar. Výsledek testu po 24 hodinách třepání a výsledky absorbance supernatantů jednotlivých kuliček při 600 nm (detekce zákalu v médiu způsobená uvolněnými buňkami a příp. montmorillonitem) v AB médiu jsou uvedeny na obrázku 15 a v grafu 2.

**Obrázek 15:** Kuličky po 24 hodinách mechanického zatížení (nemagnetická verze).



**Graf 2:** *Stabilita kuliček v AB médiu (pozn. ND= neděláno).*



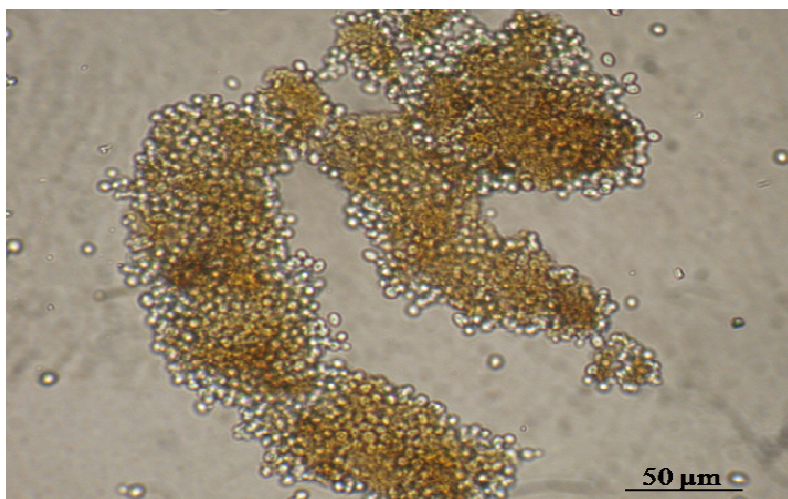
Tímto experimentem se podařilo prokázat, že samotné CaCl<sub>2</sub> kuličky jsou křehké a nestabilní, a proto zcela nevhodné nejen pro dlouhodobé experimenty, ale také pro prostředí, které je zatěžováno mechanickým stresem. Dále bylo potvrzeno, že některá činidla (v našem případě Sr<sup>2+</sup> a Al<sup>3+</sup>) opravdu mohou zvýšit celkovou pevnost kuliček, přičemž vytvrzení pomocí dvojmocného stroncia se ukázalo jako daleko efektivnější než vytvrzení pomocí trojmocného hliníku.

### 4.3 Imobilizace na částice mag. chitosanu

Imobilizace buněk *S. cerevisiae* na částice magnetického chitosanu probíhala třemi různými způsoby: aktivací magnetického chitosanu glutaraldehydem a následným přidáním buněk; smícháním buněk a mag. chitosanu, ke kterým byl poté přidán glutaraldehyd a přímou nekovalentní modifikací nevyžadující síťovací činidlo.

Ukázalo se, že všechny typy přípravy vedou k vytvoření slibného magnetického sorbentu, jehož mikroskopická podoba je zdokumentována na obrázku 16.

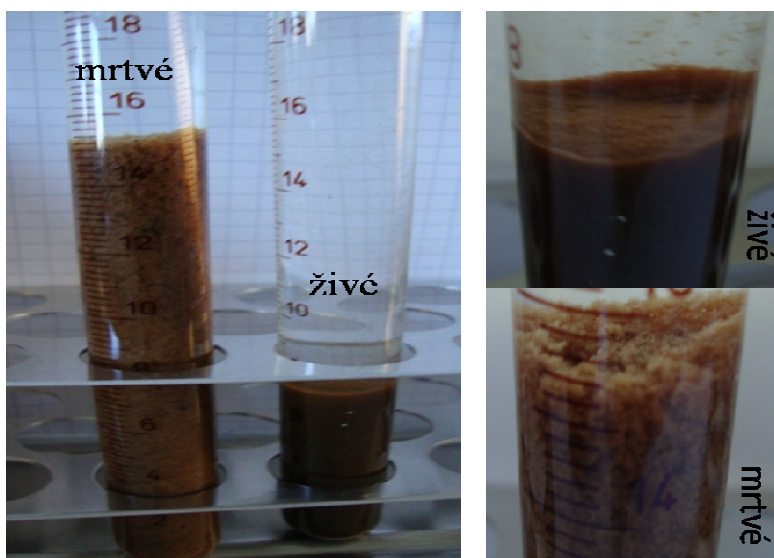
**Obrázek 16:** Kvasinky imobilizované na částice magnetického chitosanu.



Dále lze konstatovat, že vzniklé sorbenty byly totožné jak v konzistenci, tak v rychlosti reakce na magnet. Což ovšem neplatí v případě použití mrtvých buněk, kdy bylo docíleno nadýchané konzistence a ještě snazšího promývání sorbentu. Porovnání konzistencí sorbentů obsahující živé a mrtvé buňky je uvedeno na obrázku 17.

Bohužel výsledky nelze porovnat s literaturou, neboť se jedná o úplně nový biokompozitní materiál.

**Obrázek 17:** Porovnání konzistencí magnetického sorbentu tvořeného mrtvými a živými buňkami.

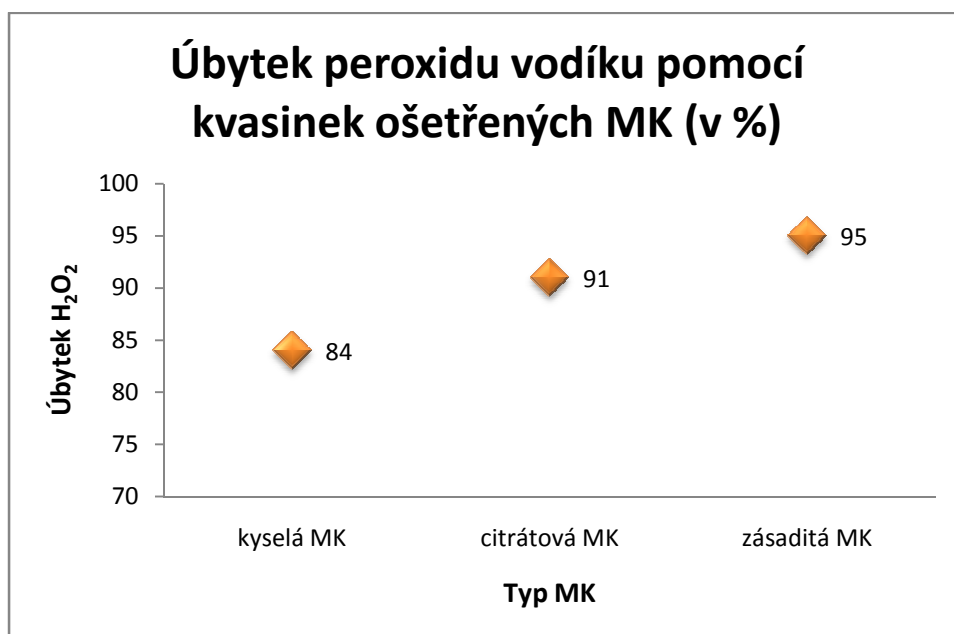


## 4.4 Degradace H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

U všech typů modifikovaných buněk byla testována schopnost degradace H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a tím vhodnost jejich využití jako potenciálních biokatalyzátorů.

Nejúčinnějším dekompozitorem se jeví buňky modifikované pomocí magnetických kapalin. Z grafu 3 je patrné, že 330 mg tímto způsobem modifikovaných buněk je schopno degradovat 84-95% peroxidu vodíku. Přibližně 10% rozdíl mezi kyselou a zbylými dvěma typy magnetických kapalin by mohl být, dle mého názoru, způsoben odlišnou konzistencí, neboť buňky ošetřené kyselou magnetickou kapalinou reagovaly na magnet podstatně rychleji, díky čemuž byl čirý supernatant získán dříve a buňky tak nemohly v roztoku dále degradovat peroxid vodíku jako ve zbylých dvou případech, kdy pětiminutové působení magnetického separátoru nebylo dostačující. Na druhou stranu i z výsledků Safarikové, Maderové & Safarika (2009) vyplývá, že modifikace buněk *S. cerevisiae* pomocí alkalické magnetické kapaliny poskytuje vyšší hodnoty degradace H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> než v případě kyselé magnetické kapaliny. S ohledem na úmrtnost modifikovaných buněk (viz sekce Modifikace magnetickými kapalinami) v dlouhodobých pokusech lze však konstatovat, že použití kyselé magnetické kapaliny je stále o něco vhodnější volbou.

**Graf 3:** *Degradace H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pomocí buněk modifikovaných magnetickými kapalinami.*



U modifikace zabudování buněk do alginátu je situace zcela odlišná. Jak se ukázalo v pokusu ověřující stabilitu kuliček, mnohé z nich nevydržely hodinové třepání v AB médiu, natož v daleko agresivnějším roztoku tvořeným 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a rozpadly se. U takovýchto vzorků nebylo možné test provádět. Hodnoty úbytku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u 330 mg enkapsulovaných buněk (viz tabulka 11) jsou daleko nižší v porovnání s modifikací pomocí magnetických kapalin, za což je nespíš zodpovědný nejen samotný alginát, nýbrž také sférický tvar a stérické zábrany, a tím snížená prostupnost H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> k jednotlivým buňkám.

**Tabulka 11:** *Úbytek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pomocí buněk S. cerevisiae zabudovaných do alginátových kuliček.*

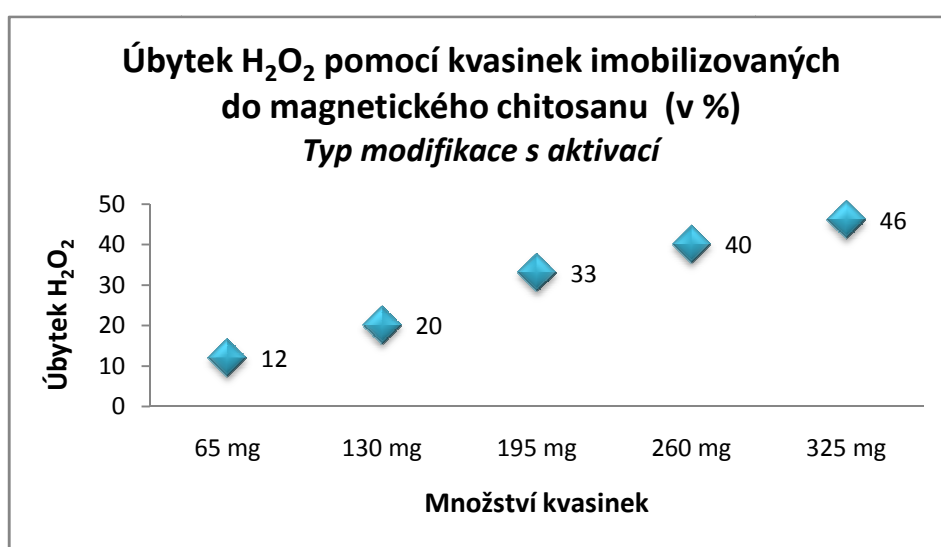
Úbytek peroxidu vodíku pomocí kvasinek zabudovaných do alginátu					
Typ přípravy	CaCl <sub>2</sub> + Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Sr(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub> klas	CaCl <sub>2</sub> 8h	CaCl <sub>2</sub> + montmorillonit
stáří kuliček					
čerstvé	51 %	55 %	nestabilní	úplný rozpad	úplný rozpad
po 50 dnech uskladnění	41 %	46 %	nestabilní	úplný rozpad	úplný rozpad

I přes nižší účinnost jsou jako biokatalyzátory preferovány magnetické imobilizované buňky, a to zejména díky snazší manipulaci s nimi i ve velkých objemech.

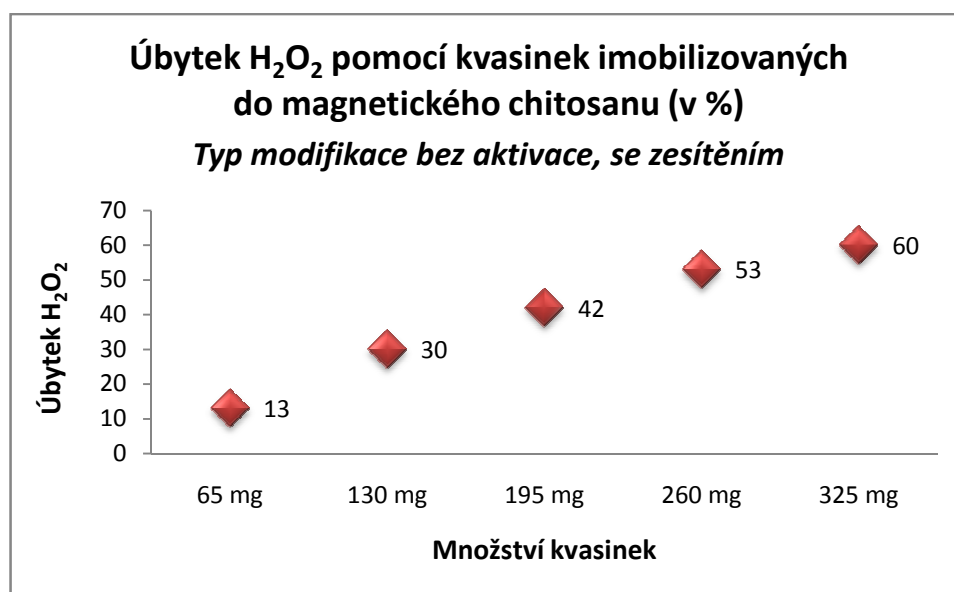
K zajímavému, i když trochu očekávanému výsledku, dochází Safarik, Sabatkova & Safarikova (2008), kteří porovnávali degradaci peroxidu vodíku u alginátových kuliček různých velikostí. Ukázalo se, že čím jsou kuličky menší, tím snazší má H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> přístup k buňkám, a tím vyšší je výsledná účinnost. V číselných hodnotách pak uvádějí, že degradace H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u kuliček o velikosti 2-3 mm se pohybuje kolem 50%, což je hodnota takřka totožná s hodnotami stejně velkých kuliček z tabulky 11, zatímco mikrokuličky (o rozměrech 50-100 μm) vykazují účinnost o více než 40 % vyšší (až 92%).

Imobilizace na magnetický chitosan poskytuje také zajímavé výsledky. Ukazuje se, že přímý typ modifikace (bez aktivace i zesítní) není pro degradaci peroxidu vodíku vhodný, neboť během reakce s ním dochází k uvolňování buněk do roztoku. Tím bylo zjištěno, že nezbytným krokem k vytvoření stabilního biokatalyzátoru je zesítní buněk vhodným činidlem. Výsledky degradace  $H_2O_2$  pomocí kvasinek kovalentně imobilizovaných na magnetický chitosan jsou uvedené na grafech 4 a 5.

**Graf 4:** Degradace  $H_2O_2$  pomocí kovalentně imobilizovaných buněk na mag. chitosan (s aktivací).



**Graf 5:** Degradace  $H_2O_2$  pomocí buněk imobilizovaných na mag. chitosan (bez aktivace, se zesítním).





Z experimentu vyplývá, že je důležité nejen samotné přidání síťovacího činidla, ale také jeho vhodné zařazení, neboť, jak je patrné, i takto malý detail má poměrně velký vliv na výslednou hodnotu degradace  $H_2O_2$ . Lze tedy konstatovat, že smíchání buněk a mag. chitosanu a jejich následné zesítnění glutaraldehydem vede k vytvoření daleko efektivnějšího biokatalyzátoru než v případě aktivace magnetického chitosanu, ke kterému jsou posléze přidány buňky.

## 4.5 Adsorpce barviv

Zcela nově vytvořený biokompozitní materiál, složený z buněk *S. cerevisiae* a magnetického chitosanu, posléze zesítněný 3% glutaraldehydem, byl testován jako potenciální sorbent pro krystalovou violeť a safranin O.

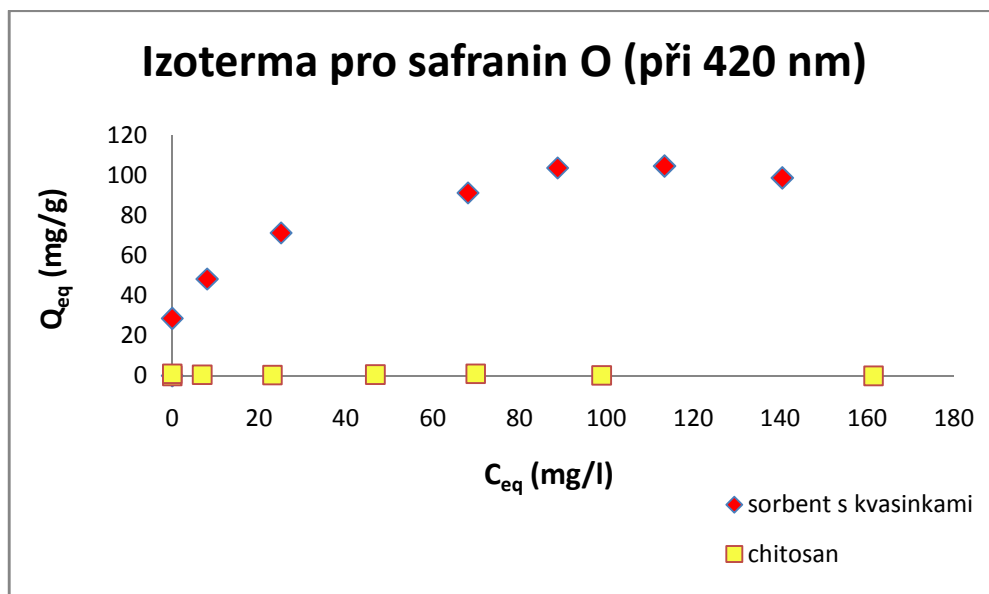
Na rozdíl od výsledků z publikace Safarika, Ptackové & Safarikové (2002), nebylo prokázáno, že by mrtvé buňky významným způsobem navyšovaly maximální adsorpční kapacity, přesto byly pro experiment vybrány, a to z důvodu snazší manipulace s nimi.

Z výsledků různých prací zabývajících se adsorpcí barviv [např. Safarik, Ptackova & Safarikova (2002); Safarikova et al. (2005) či Safarik et al. (2007)] byla převzata také doba točení sorbentu na rotátoru, neboť bylo prokázáno, že tři hodiny plně postačují k dosažení adsorpční rovnováhy.

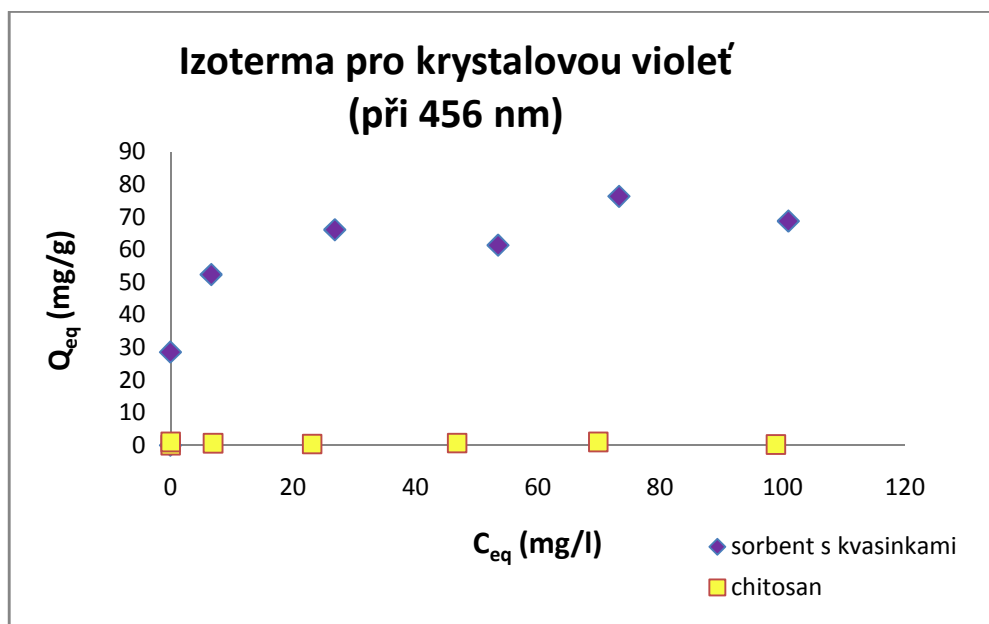
Pro sorbenty obou barviv byly sestaveny izotermy, které jsou uvedené na grafech 6 a 7. Testována byla také sorpce samotného magnetického chitosanu, u které se zjistilo, že je nulová. Sorbují tedy pouze imobilizované kvasinky.

Sorpci barviv pomocí nemodifikovaného magnetického chitosanu testoval Safarik (1995), který stanovil maximální adsorpční kapacity na 0,125 mg/g pro krystalovou violeť a 0,416 mg/g pro safranin O. Jak je patrné, i sorpční schopnosti nemodifikovaného magnetického chitosanu jsou velice nízké.

**Graf 6:** *Adsorpční izoterma nového sorbentu (složeného z kvasinek kovalentně imobilizovaných na částice magnetického chitosanu) pro safranin O.*



**Graf 7:** *Adsorpční izoterma nového sorbentu (složeného z kvasinek kovalentně imobilizovaných na částice magnetického chitosanu) pro krystalovou violet.*



Pro zjištění maximálních adsorpčních kapacit ( $Q_{\max}$ ) byly využity linearizace izoterem, které v obou případech vykazují typický Langmuirový tvar (viz grafy 8 a 9). Výpočet vychází z následujícího vzorce:

$$C_{\text{eq}}/Q_{\text{eq}} = 1/b \cdot Q_{\text{max}} + C_{\text{eq}}/Q_{\text{max}}$$

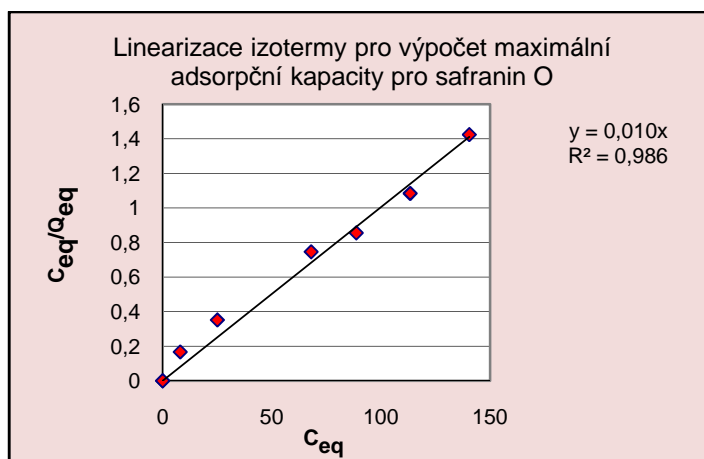
Kde:  $Q_{\text{eq}}$  = množství naadsorbovaného barviva (v mg/g);

$C_{\text{eq}}$  = koncentrace volného barviva (v mg/l);

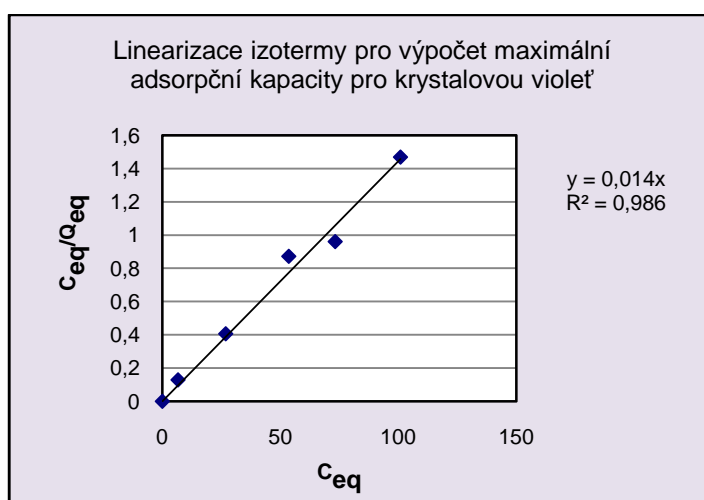
$Q_{\text{max}}$  = maximální adsorpční kapacita (v mg/g);

$b$  = konstanta (v l/mg).

**Graf 8:** Linearizace izotermy pro výpočet  $Q_{\max}$  pro safranin O.



**Graf 9:** Linearizace izotermy pro výpočet  $Q_{\max}$  pro krystalovou violet.



Zjištěné maximální adsorpční kapacity shrnuje tabulka 12.

**Tabulka 12:**  $Q_{max}$  pro jednotlivá barviva.

Barvivo	$Q_{max}$
Krystalová violet'	69,4 mg/g
Safranin O	99,0 mg/g

Z výsledků experimentu lze vyvodit, že modifikace buněk *S. cerevisiae* pomocí magnetického chitosanu vede k vytvoření magnetického materiálu, který by mohl být úspěšně využíván jako adsorbent pro různá barviva.

Zjištěná hodnota  $Q_{max}$  pro safranin O je srovnatelná s výsledky publikovanými Safarikem, Ptackovou & Safarikovou (2002), kteří uvádějí 90,3 mg/g, maximální adsorpční kapacita pro krystalovou violet' se však různí, a to téměř o 20 mg/g, neboť autoři deklarují 85,9 mg/g. Tyto rozdíly by mohly být, dle mého názoru, způsobené např. použitím kvasinek různých výrobců, a rovněž také samotnou různorodostí typů porovnávaných sorbentů.

## 5. ZÁVĚR

Magneticky modifikované buňky jsou ceněny především pro své magnetické vlastnosti, díky kterým mohou být snadno a efektivně odstraněny z libovolného prostředí pomocí vhodného magnetického separátoru, za současného urychlení a usnadnění mnoha separačních a purifikačních procesů.

Jednoduchými způsoby jsou získávány levné magnetické deriváty, které nacházejí široké uplatnění v různých oblastech přírodních věd. Využívány jsou nejen jako absorbenty nejrůznějších xenobiotik (zejména barviv a těžkých kov), léčiv či proteinů, ale také mohou sloužit jako celobuněčné biokatalyzátory.

Cílem této diplomové práce bylo ověření různých postupů pro přípravu magnetických derivátů mikrobiálních buněk, a sice povrchovou modifikaci buněk magnetickými kapalinami, zabudování buněk do magnetických gelů a kovalentní imobilizaci na magnetické nosiče.

Ukázalo se, že všechny výše uvedené postupy v kombinaci s buňkami *S. cerevisiae* vedou k vytvoření slibného magnetického materiálu, jenž by mohl být účinně využit pro rozklad  $H_2O_2$ . Nejvyššího procentuálního úbytku peroxidu vodíku (84-95%) bylo dosaženo u buněk modifikovaných magnetickými kapalinami, avšak v praxi jsou upřednostňovány buňky imobilizované do magnetického gelu, a to i přes nižší hodnoty degradace (50-55%). Tato preference úzce souvisí s jednodušší manipulací s mikroorganismy, zejména ve větších objemech.

U alginátových kuliček byla dále hodnocena jejich stabilita při mechanickém zatížení. Bylo zjištěno, že nejčastěji používané vápenaté alginátové kuličky (vytvrzené  $CaCl_2$ ) jsou velice křehké a nestabilní, a proto zcela nevhodné nejen pro dlouhodobé experimenty, ale také pro prostředí, které se vyznačuje mechanickým stresem. Dále se ukázalo, že přidáním některých kationtů, trojmocného hliníku či dvojmocného stroncia, lze vytvořit daleko pevnější a stabilnější biokatalyzátor.

Kovalentní imobilizací buněk na magnetický chitosan byl vytvořen zcela nový biokompozitní materiál, u kterého byla testována schopnost adsorpce nejčastějších průmyslových barviv, a sice krystalové violeti a safraninu O. Bylo prokázáno, že samotný magnetický chitosan neadsorbuje žádná barviva, tudíž veškerá sorpce připadá na imobilizované kvasinky. Maximální adsorpční kapacity byly stanoveny na 69,4 mg/g pro krystalovou violet' a 99,0 mg/g pro safranin O, což

lze považovat za hodnoty, které odpovídají publikovaným údajům adsorpce kvasinek.

Nejvíce studií je zaměřeno právě na rozvoj nejrůznějších adsorbentů, využitelných v bioremediačních procesech (zejména ve vodních systémech), což je aktuálním tématem více než 20 let. Málokterá z publikací se však dostatečně zabývá problematikou nechtěného výskytu metabolitů léčiv, především antikoncepce a antibiotik, a jejich odstraňování. Právě tato skupina xenobiotik by měla být, dle mého názoru, do budoucna lépe studována.

# 6. LITERÁRNÍ ZDROJE

## 6.1 Odborné publikace

1. AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. *Process Biochemistry*. 2005, 40, p. 997-1026. ISSN: 0032-9592.
2. AL-SARAJ, M., ABDEL-LATIF, M. S., EL-NAHAL, I., BARAKA, R. Bioaccumulation of some hazardous metals by sol – gel entrapped microorganisms. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 1999, Vol. 248, Issues 2-3, p.137–140. ISSN: 0022-3093.
3. AZEVEDO, R. B., SILVA, L. P., LEMOS, A.P.C., BÁO, S.N., LACAYA, Z.G.M., SAFARIK, I., SAFARIKOVA, M., MORAIS, P.C. Morphological Study of *Saccharomyces Cerevisiae* Cells Treated With Magnetic Fluid. *IEEE Transactions on Magnetics*. 2003, Vol. 39, No. 5, p. 2660 – 2662. ISSN: 0018-9464.
4. BAHAJ, A. S., ELLWOOD, D. C., WATSON, J. H. P. Extraction of heavy metals using microorganisms and high gradient magnetic separation. *IEEE Transactions on Magnetics*. 1991, 27, p. 5371-5374. ISSN: 0018-9464.
5. BAI, J., WU, X., FANGLI, F., TIAN, W., YIN, X., ZHAO, L, FAN, F., LI, Z., TIAN, L., QIN, Z., GUO, J. Biosorption of uranium by magnetically modified *Rhodotorula glutinis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2012, 51, p. 382-387. ISSN: 0141-0229.
6. BRODELIUS, P., VANDAMME, E. J. Immobilized cell systems. In *Biotech vol 7a: enzyme technology* (Kennedy, J. F., Editor), Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1987. p. 405 – 464. ISBN: 0-89573-047-2.

7. CHIBATA, I., TOSS, T., SATO, T. Application of immobilized biocatalysts in pharmaceutical and chemical industries. In *Biotech vol 7a: enzyme technology* (Kennedy, J. F., Editor), Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1987. p. 653 – 684. ISBN: 0-89573-047-2.
8. CHUA, H., WONG, P. K., YU, P. H. F., LI, X. Z. The removal and recovery of copper (II) ions from wastewater by magnetite immobilized cells of *Pseudomonas putida* 5-X. *Water Science and Technology*. 1998, Vol. 38, Issues 4-5, p. 315-322. ISSN: 0273-1223.
9. CLEMENT, H. J., EBERBECK, D., GELBRICH, T., HERGT, R., MÜLLER, R., WOTSCHADLO, J., ZEISBERGER, M. Ferrofluids of magnetic multicore nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2009, 321, p. 1501-1504. ISSN: 0304-8853
10. JI, Y. Q., HU, Y. T., TIAN, Q., SHAO, X. Z., SAFARIKOVA, M., SAFARIK, I. Biosorption of Stroncium Ions by Magnetically Modified Yeast Cells. *Separation Science and Technology*. 2010, 45, p. 1499-1504. ISSN: 0149-6395.
11. KAPOOR, A., VIRARAGHAVAN, T., CULLIMORE, D. R. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*. 1999, Vol. 70, Issue 1, p. 95-104. ISSN: 0960-8524.
12. KRUMPHANZL, VĀ., ŘEHÁČEK, Z. *Mikrobiální technologie: buňka a techniky jejího využití*. 1. vyd. Praha: Academia Praha, 1988. 364 s.
13. KUNCOVÁ, G., TRÖGL, J. Mikroorganismy imobilizované uvnitř anorganických nosičů. *Chemické listy*. 2001, 105, s. 830 – 838. ISSN: 1213 – 7103.
14. LEI, W., CHUA, H., LO, W. H., YU, P. H. F., ZHAO, Y. G., WONG, P. K. A Novel Magnetite-Immobilized Cell Process for Heavy Metal Removal from Industrial Effluent. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2000, Vol. 84-86, p. 1113-1126. ISSN: 0273-2289.



15. LI, Y. G., GAO, H. S., LI, W. L., XING, J. M., LIU, H. Z. In situ magnetic separation and immobilization of dibenzothiophene-desulfurizing bacteria. *Bioresource Technology*. 2009, 100 (21), p. 5092-5096. ISSN: 0960-8524.
16. MacRAY, I. C. Removal of pesticides in water by microbial cells adsorbed to magnetite. *Water Research*. 1985, 19, p. 825-830. ISSN: 0043-1354.
17. MacRAY, I. C. Removal of chlorinated hydrocarbons from water and wastewater by bacterial cells adsorbed to magnetite. *Water Research*. 1986, 20, p. 1149-1152. ISSN: 0043-1354.
18. MIKULICOVÁ, P. *Imobilizované mikroorganismy: příprava a použití*: Bakalářská práce. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2009. 68 s. Vedoucí práce: prof. RNDr. Igor Kučera, DrSc.
19. MØRCH, A., DONATI, I., STRAND, B. L., K-BRAEK, G. S. Effect of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  and  $\text{Sr}^{2+}$  on Alginate Microbeads. *Biomacromolecules*. 2006, 7, p. 1471-1480. ISSN: 1526-4602.
20. MOSINIEWICZ – SZABLEWSKA, E., SAFARIKOVA, M., SAFARIK, I. *Magnetically modified biological materials as perspective adsorbents for large – scale magnetic separation processes*. In *Applied Physics in the 21 st Century (Horizons in World Physics, Volume 266)* (Valencia, R. P., Ed), Nova Publishers, 2010a, p. 301 – 318. ISBN: 978-160876-074-9.
21. MOSINIEWICZ – SZABLEWSKA, E., SAFARIKOVA, M., SAFARIK, I. Magnetic studies of ferrofluid – modified microbial cells. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2010b, Vol. 10, p. 2531 – 2536. ISSN: 1533-4880.
22. NARESH, M., DAS, S., MISHRA, P., MITTAL, A. The Chemical Formula of a Magnetotactic Bacterium. *Biotechnology and Bioengineering*. 2012, Vol. 109, No. 5. P. 1205 – 1216. ISSN: 1097-0290.

23. PATZAK, M., DOSTALEK, P., FOGARTY, R. V., SAFARIK, I., TOBIN, J. M. Development of magnetic biosorbents for metal uptake. *Biotechnology Techniques*. 1997, Vol. 11, No. 7, p. 483-487. ISSN: 1573-6784.
24. PEČOVÁ, M., ZAJONCOVÁ, L., POLÁKOVÁ, K., ČUDA, J., ŠAFARÍKOVÁ, M., ŠEBELA, M., ŠAFARÍK, I. Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich využití v biochemii a biotechnologii. *Chemické listy*. 2011, 105, p. 524-530. ISSN: 1213 – 7103.
25. PENG, Q., LIU, L., ZENG, G., XU, W., YANG, CH., ZHANG, J. Biosorption of copper (II) by immobilizing *Saccharomyces cerevisiae* on the surface of chitosan-coated magnetic nanoparticles from aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*. 2010, 177, p. 676-682. ISSN: 0304-3894.
26. ROBATJAZI, S. M., SHOJAOSADATI, S. A., KHALILZADEH, R., FARAHANI, E. V. Immobilization of magnetic modified *Flavobacterium* ATCC 27551 using magnetic field and evaluation of the enzyme stability of immobilized bacteria. *Bioresource Technology*. 2012, 104, p. 6-11. ISSN: 0960-8524.
27. ROCHEFORT, W. E., REHG, T., CHAU, P. C. Trivalent cation stabilization of alginate gel for cell immobilization. *Biotechnology Letters*. 1986, Vol. 8, No. 2, p. 115-120. ISSN: 1573-6776.
28. SAFARIK, I. Removal of organic polycyclic compounds from water solutions with a magnetic chitosan based sorbent bearing copper phtalocyanine dye. *Water Resources*, 1995, Vol. 29, No. 1, p. 101-105. ISSN: 0097-8078.
29. SAFARIK, I., HORSKA, K., SAFARIKOVA, M. Magnetically responsive biocomposites for inorganic and organic xenobiotics removal. In *Microbial Biosorption of Metals* (Kotrba, P., Macková, M., Macek, T., Editors), 1. Ed. Springer, 2011, p. 301 – 320. ISBN: 978-94-007-0442-8.

30. SAFARIK, I., PTACKOVA, L., SAFARIKOVA, M. Adsorption of dyes on magnetically labeled baker's yeast cells. *European Cells and Materials*. 2002, Vol. 3, Suppl. 2, p. 52-55. ISSN: 1473-2262.
31. SAFARIK, I., REGO, L. F. T., BOROVSKA, M., MOSINIEWICZ – SZABLEWSKA, E., WEYDA, F., SAFARIKOVA, M. New magnetically responsive yeast – based biosorbent for the efficient removal of water – soluble dyes. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007, 40, p. 1551 – 1556. ISSN: 0141-0229.
32. SAFARIK, I., SABATKOVA, Z., SAFARIKOVA, M. Invert sugar formation with *Saccharomyces cerevisiae* cells encapsulated in magnetically responsive alginate microparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2009, 321, p. 1478-1481. ISSN: 0304-8853.
33. SAFARIK, I., SABATKOVA, Z., SAFARIKOVA, M. Hydrogen Peroxide Removal with Magnetically Responsive *Saccharomyces cerevisiae* Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, 56, p. 7925-7928. ISSN: 0021-8561.
34. SAFARIK, I., SAFARIKOVA, M. *Cells: Isolation: Magnetic techniques*. In Encyclopedia of Separation Science (Wilson I. D., Aldar, T. R., Poole, C. F., Cool, M., Eds.), London: Academic Press Ltd, 2002a. p. 2260 – 2267. ISSN: 0141-0229.
35. SAFARIK, I., SAFARIKOVA, M. Magnetically modified microbial cells: a new type of magnetic adsorbents. *China Particuology*. 2007, 5, p. 19-25. ISSN: 1672 - 2515.
36. SAFARIK, I., SAFARIKOVA, M. Magnetic nano- and microparticles in biotechnology. *Chemical Papers*. 2009a, 63 (5), p. 497 – 505. ISSN: 1336-9075.
37. SAFARIK, I., SAFARIKOVA, M. *Magnetic nanobiocomposites and their possible applications*. In Sborník konference NANOCON 2009 (kolektiv autorů). 1. Vyd. Ostrava: TANGER, 2009b. ISBN: 978-80-87294-12-3.

38. SAFARIK, I., SAFARIKOVA, M. Magnetic nanoparticles and biosciences. *Monatshefte für Chemie*. 2002b, 133, p. 737 – 759. ISSN: 1434-4475.
39. SAFARIK, I., SAFARIKOVA, M. Use of magnetic techniques for the isolation cells. *Journal of Chromatography B*. 1999, 722, p. 33-53. ISSN: 1570-0232.
40. SAFARIK, I., SAFARIKOVA, M., FORSYTHE, S. The application of magnetic separations in applied mikrobiology. *Journal of Applied Bacteriology*. 1995. 78, p. 575–585. ISSN: 1365-2672.
41. SAFARIKOVA, M., MADEROVA, Z., SAFARIK, I. Ferrofluid modified *Saccharomyces cerevisiae* cells for biocatalysis. *Food Research International*. 2009, 42, p. 521 – 524. ISSN: 0963-9969.
42. SAFARIKOVA, M., PONA, B. M. R., MOSINIEWICZ – SZABLEWSKA, E., WEYDA, F., SAFARIK, I. Dye adsorption on magnetically modified *Chlorella vulgaris* cells. *Fresenius Environmental Bulletin*. 2008. Vol. 17, No. 4. p. 486-492. ISSN: 1018-4619.
43. SAFARIKOVA, M., PTACKOVA, L., KIBRIKOVA, I., SAFARIK, I. Biosorption of water-soluble dyes on magnetically modified *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *uvarum* cells. *Chemosphere*. 2005, 59, p. 831-835. ISSN: 0045-6535.
44. SAFARIKOVA, M., SAFARIK, I. Magnetické separace v přírodních vědách a biotechnologiích. *Chemické listy*. 1995, 89, s. 280 – 287. ISSN: 1213-7103.
45. SAFARIKOVA, M., SAFARIK, I. The application of magnetic techniques in biosciences. *Magnetic and Electrical Separation*. 2000, Vol. 10, p. 223 – 252. ISSN: 1055-6915.

46. SHAN, G. B., XING, J. M., LUO, M., F., LIU, H. Z., CHEN, J. Y. Immobilization of *Pseudomonas delafieldii* with magnetic polyvinyl alcohol bead and its application in biodesulfurization. *Biotechnology Letters*, 2003, 25, p. 1977-1987. ISSN: 1573-6776.
47. SONG, H. P., LI, X. G., SUN, J. S., XU, S. M., HAN, X. Application of a magnetotactic bacterium, *Stenotrophomonas* sp., to the removal of Au (III) from contaminated wastewater with a magnetic separator. *Chemosphere*, 2008, 72, p. 616-621. ISSN: 0045-6535.
48. SZE, K. F., LU, Y. J., WONG, P. K. Removal and recovery of copper ion ( $\text{Cu}^{2+}$ ) from electroplating effluent by a bioreactor containing magnetite-immobilized of *Pseudomonas putida* X5. *Resources, Conservation and Recycling*, 1996, 18, p. 175-193. ISSN: 0921-3449.
49. TIAN, Y., JI, C., ZHAO, M., XU, M., ZHANG, Y., WANG, R. Preparation and characterization of baker's yeast modified by nano- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ : Application of biosorption of methyl violet in aqueous solution. *Chemical Engineering Journal*, 2010, 165, p. 474-481. ISSN: 1385-8947.
50. UZUN, L., SAGLAM, N., SAFARIKOVA, M., SAFARIK, I., DENIZLI, A. Copper biosorption on magnetically modified yeast cells under magnetic field. *Separation Science and Technology*. 2011, 46, p. 1045-1051. ISSN: 0149-6395.
51. WANG, J., CHEN, C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*. 2009, 27, p. 195-226. ISSN: 0734-9750.
52. WANG, J., CHEN, C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Biotechnology Advances*. 2006, 24, p. 427-541. ISSN: 0734-9750.
53. WANG, X., GAI, Z., YU, B., FENG, J., XU, CH., YUAN, Y., LIN, Z., XU, P. Degradation of Carbazole by Microbial Cells immobilized in Magnetic Gellan Gum Gel Beads. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, Vol. 73, No. 20, p. 6421-6428. ISSN: 0099-2240.

54. WANG, Y., GAO, H., SUN, J., LI, J., SU, X., JI, Y., GONG, C. Selective reinforced competitive biosorption of Ag (I) and Cu (II) on *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Desalination*. 2011, Vol. 270, Issues 1-3, p. 258-263. ISSN: 0011-9164.
55. WIDERØE, H., DANIELSEN, S. Evaluation of the use of Sr<sup>2+</sup> in alginate immobilization of cells. *Naturwissenschaften*. 2001, 88, p. 224-228. ISSN: 1432-1904.
56. WONG, P. K., FUNG, K. Y. Removal and recovery of nickel ion (Ni<sup>2+</sup>) from aqueous solution by magnetite-immobilized cells of *Enterobacter*. *Enzyme and Microbial Technology*. 1997, 56, p. 135-143. ISSN: 0141-0229.
57. XU, M., ZHANG, Y, ZHANG, Z., SHEN, Y., ZHAO, M., PAN, G. Study on the adsorption of Ca<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> by magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> yeast treated with EDTA diandhydride. *Chemical Engineering Journal*. 2011, 168, p. 737-745. ISSN: 1385-8947.
58. YAVUZ, H. DENIZLI, A., GÜNGÜNES, H., SAFARIKOVA, M., SAFARIK, I. Biosorption of mercury on magnetically modified yeast cells. *Separation and Purification Technology*. 2006, 52, p. 253-260. ISSN: 1383-5866.
59. ZHANG, Y., LIU, W., ZHANG, L., WANG, M., ZHAO, M. Application of bifunctional *Saccharomyces cerevisiae* to remove lead (II) and cadmium (II) in aqueous solution. *Applied Surface Science*, 2011a, 257, p. 9809-9816. ISSN: 0169-4332.
60. ZHANG, Y., ZHU, J., ZHANG, Z., XU, M., ZHAO, M. Syntesis of EDTAD-modified magnetic baker's yeast biomass for Pb<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> adsorption. *Desalination*, 2011b, 278, p. 42-49. ISSN: 0011-9164.

61. ZHOU, W., ZHANG, Y., DING, X., LIU, Y., SHEN, F., ZHANG, X., DENG, S., XIAO, H., YANG, G., PENG, H. Magnetotactic bacteria: promising biosorbents for heavy metals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 95, p. 1097-1104. ISSN: 1432-0614.

## 6.2 Elektronické zdroje

1. ČEJKOVÁ, A. *Fyziologie průmyslových mikroorganismů*. Vytvořeno 2009, změněno červen 2012 [cit. 2012-06-20]. 31s. Dostupné z WWW: <http://www.vscht.cz/kch/download/sylaby/fpm-bak.pdf>
2. OBRUČA, S. Alginát - organické zlato. In *BIOTecho: české biotechnologické noviny*. 2004, číslo 4, s. 1 [cit. 2012-09-14]. Dokument dostupný z WWW: [http://www.gate2biotech.com/files/clanky\\_clanky/biotech\\_cerven2008\\_109.pdf](http://www.gate2biotech.com/files/clanky_clanky/biotech_cerven2008_109.pdf)
3. PURKRTOVÁ, Z. *Imobilizace: pokus o přehled v oblasti enzymů a buněk*. Květen 2012 [cit. 2012-09-14]. 83s. Dostupné z WWW: [http://biomikro.vscht.cz/vyuka/ib/9\\_prednaska2012.pdf](http://biomikro.vscht.cz/vyuka/ib/9_prednaska2012.pdf)

# 7. PŘÍLOHY

## 7.1 Seznam grafů

<b>Graf 1:</b> Úmrtnost buněk <i>S. cerevisiae</i> modifikovaných různými typy mag. kapalin. ....	49
<b>Graf 2:</b> Stabilita kuliček v AB médiu.....	52
<b>Graf 3:</b> Degradace H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> pomocí buněk modifikovaných mag. kapalinami. ....	54
<b>Graf 4:</b> Degradace H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> pomocí kovalentně imobilizovaných buněk na mag. chitosan (s aktivací).....	56
<b>Graf 5:</b> Degradace H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> pomocí buněk imobilizovaných na mag. chitosan (bez aktivace, se zesíťením. ....	56
<b>Graf 6:</b> Adsorpční izoterma nového sorbentu (složeného z kvasinek kovalentně imobilizovaných na částice magnetického chitosanu) pro safranin O. ....	58
<b>Graf 7:</b> Adsorpční izoterma nového sorbentu (složeného z kvasinek kovalentně imobilizovaných na částice magnetického chitosanu) pro krystalovou violet'. ....	58
<b>Graf 8:</b> Linearizace izotermy pro výpočet Q <sub>max</sub> pro safranin O.....	59
<b>Graf 9:</b> Linearizace izotermy pro výpočet Q <sub>max</sub> pro krystalovou violet'. ....	59

## 7.2 Seznam obrázků

<b>Obrázek 1:</b> Zkumavkový separátor Dynal MPC-1(A) a plochý magnet BioMag flask magnet (B).....	14
<b>Obrázek 2:</b> MidiMACS™ Separator od firmy Miltenyi Biotec. ....	15
<b>Obrázek 3:</b> Schéma metod magnetické separace.....	17
<b>Obrázek 4:</b> Alternativní metody imobilizace buněk.....	18
<b>Obrázek 5:</b> Složení alginátu.....	20
<b>Obrázek 6:</b> Chemická struktura chitinu a z něho vzniklého chitosanu.....	20
<b>Obrázek 7:</b> Buňky <i>S. cerevisiae</i> modifikované magnetickou kapalinou. ....	22
<b>Obrázek 8:</b> Začlenění magnetických částic u kultivovaných (A1) a nekultivovaných (A2) <i>S. cerevisiae</i> (TEM obraz). ....	22
<b>Obrázek 9:</b> Streptomycey modifikované citrátovou a alkalickou magnetickou kapalinou (MK).....	23
<b>Obrázek 10:</b> Příklady některých funkčních skupin.....	28



<b>Obrázek 11:</b> Oběť onemocnění zvaným Minamata.....	32
<b>Obrázek 12:</b> <i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> . ....	36
<b>Obrázek 13:</b> Kvasinky modifikované citrátovou magnetickou kapalinou (A) a jejich reakce na magnet (B). ....	48
<b>Obrázek 14:</b> Magnetické alginátové kuličky[A] a jejich reakce na magnet [B]. ....	50
<b>Obrázek 15:</b> Kuličky po 24 hodinách mechanického zatížení (nemag. verze). ....	51
<b>Obrázek 16:</b> Kvasinky imobilizované na částice magnetického chitosanu.....	53
<b>Obrázek 17:</b> Porovnání konzistencí magnetického sorbentu tvořeného mrtvými a živými buňkami. ....	53

### 7.3 Seznam tabulek

<b>Tabulka 1:</b> Typy nosičů pro imobilizaci.....	19
<b>Tabulka 2:</b> Rozdělení nosičů dle mechanismu tvorby gelu.....	24
<b>Tabulka 3:</b> Magnetická modifikace pro adsorpci barviv. ....	30
<b>Tabulka 4:</b> Maximální adsorpční kapacity barviv. ....	31
<b>Tabulka 5:</b> Magnetická modifikace pro adsorpci těžkých kovů.....	33
<b>Tabulka 6:</b> Maximální adsorpční kapacity těžkých kovů. ....	34
<b>Tabulka 7:</b> Další magnetické modifikace. ....	35
<b>Tabulka 8:</b> Adsorpce těžkých kovů magnetotaktickými bakteriemi. ....	36
<b>Tabulka 9:</b> Využití magnetických buněk jako katalyzátorů. ....	37
<b>Tabulka 10:</b> Příklady průmyslového využití imobilizovaných buněk.....	38
<b>Tabulka 11:</b> Úbytek $H_2O_2$ pomocí buněk <i>S. cerevisiae</i> zabudovaných do alginátových kuliček. ....	55
<b>Tabulka 12:</b> $Q_{max}$ pro jednotlivá barviva. ....	60

## 7.4 Seznam zkratek

**6-APA** = 6 - aminopenicilinová kyselina

$C_{eq}$  = koncentrace volného barviva (v mg/l)

**ČB** = České Budějovice

**EDTAD** = dianhydrid kyseliny ethylendiamintetraoctové

**G** = kyselina guluronová

**GA** = glutaraldehyd

**HGMS** = high gradient magnetic separator – vysokogradientový mag. separátor

**HMGS** = hexapole magnetic gradient separátor – hexapól

**M** = kyselina manuronová

**MK** = magnetická kapalina

**ONBT** = Oddělení nanobiotechnologií v ČB, Ústav nanobiologie a strukturní biologie GVGZ AV ČR, Česká republika

$Q_{eq}$  = množství naadsorbovaného barviva (v mg/g)

**QMGS** = quadrapole magnetic gradient separator - kvadrupól

**SEM** = skenovací elektronový mikroskop

**TEM** = transmisní elektronový mikroskop