

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2016

Eva Matejčíková



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK1003/2015** Akademický rok: **2015/2016**
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student(ka): **Eva Matejčíková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie (B2801)
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)
Vedoucí práce **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Využití metod fyzikálně-chemické analýzy při studiu intracelulární a extracelulární vody

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracovat literární rešerši zaměřenou na metody studia intracelulární a extracelulární vody.
2. Na základě rešerše navrhnout a realizovat sérii pilotních experimentů pro ověření využitelnosti instrumentálních technik v dispozici Centra materiálového výzkumu při studiu intracelulární a extracelulární vody.

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Eva Matejčíková
Student(ka)

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VYUŽITÍ METOD FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ ANALÝZY PŘI STUDIU INTRACELULÁRNÍ A EXTRACELULÁRNÍ VODY

UTILIZATION OF PHYSICO-CHEMICAL ANALYSIS IN STUDY ON CELLULAR WATER

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Eva Matejčíková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2016

ABSTRAKT

Táto bakalárska práca sa zaoberá štúdiom metód dostupných na fakulte chemickej VUT v Brne, ktoré je možné použiť k stanoveniu fyzikálno - chemických vlastností bunkovej vody. Hlavnou úlohou práce bolo určiť, ktoré z týchto dostupných metód sú vhodné na stanovenie fyzikálno – chemických vlastností vody vo vnútri bunky a vlastností vody vyskytujúcej sa v blízkom kontakte s povrchom bunky. Vychádzajúc z literárnej rešerše boli navrhnuté a uskutočnené série experimentov. Následne sa táto práca zaoberá optimalizáciou metód, ktoré boli určené za možné použiteľné techniky na stanovenie vlastností bunkovej vody.

ABSTRACT

The bachelor's thesis deals with the study of methods, available at the Faculty of Chemistry at Brno University of Technology, that can be used to determine physical and chemical properties of cell water. The main task of this work was to specify which of these methods are suitable to determine physical and chemical properties of water in the cell and the properties of water occurring close to the cell surface. Based on the background research the series of experiments were proposed and implemented. Subsequently, this work deals with the optimisation of methods that were defined as the applicable techniques to determine the properties of cell water.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Voda, termická analýza, bakteriálna príľnavosť, povrchové napätie

KEYWORDS

Water, thermal analysis, bacterial adhesion, surface tension

MATEJČÍKOVÁ, E. *Využití metod fyzikálně-chemické analýzy při studiu intracelulární a extracelulární vody*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 46 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemické VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

Podakovanie:

Na tomto mieste by som sa rada poďakovala Ing. Petrovi Sedláčekovi, Ph.D. za odborné vedenie pri spracovaní mojej bakalárskej práce, za poskytnuté materiály a čas venovaný pri návrhu experimentov. Ďalej by som sa rada poďakovala Ing. Jitke Krouskej, Ph.D. za pomoc pri realizácii experimentov a za čas venovaný osobným konzultáciám.

OBSAH

1.	ÚVOD	6
2.	CIELE PRÁCE.....	7
3.	TEORETICKÁ ČASŤ.....	8
3.1	Štúdium vody nachádzajúcej sa v tesnom kontakte s povrchom bunky.....	8
3.1.1	BATH.....	8
3.1.2	Metódy určené na stanovenie povrchového napätia	9
3.1.2.1	Metóda maximálneho tlaku v bubline.....	10
3.1.2.2	Du Noüyhova metóda odtrhávania prstenca	11
3.2	Štúdium intracelulárnej vody.....	12
3.2.1	Termogravimetrická analýza TGA.....	12
3.3	Baktérie.....	14
3.4	Súčasný stav riešenej problematiky.....	15
4.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	18
4.1	Použité baktérie, chemikálie a prístroje.....	18
4.1.1	Použité baktérie	18
4.1.2	Použité chemikálie	18
4.1.3	Použité prístroje.....	18
4.2	Kultivácia baktérií	18
4.3	Príprava vzoriek.....	19
4.4	Realizácia techniky BATH.....	20
4.5	Realizácia metód určených k meraniu povrchového (medzifázového) napätia	23
4.6	Realizácia štúdia intracelulárnej vody prostredníctvom techniky TGA.....	23
5.	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	25
5.1	BATH	25
5.2	Meranie povrchového napätia	29
5.3	Termogravimetrická analýza	32
6.	ZÁVER.....	36
7.	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	38
8.	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	42
9.	PRÍLOHY.....	43

1. ÚVOD

Každá jedna bunka je zo šesťdesiatich až deväťdesiatich percent tvorená vodou. Voda je nevyhnutnou súčasťou všetkých živých organizmov. Svojimi fyzikálno-chemickými vlastnosťami vytvára jedinečné prostredie pre priebeh všetkých dejov v bunke a tým pádom sa stáva základným kritériom pre život.

Základným chemickým rysom vody je lomená molekula a polarizovaná kovalentná väzba medzi atómom vodíka a atómom kyslíka. Fyzikálno-chemické vlastnosti vody akými sú napríklad povrchové napätie alebo viskozita sú dôsledkom jej špecifickej štruktúry.

Intracelulárna, vnútrobunková voda je centrom života bunky a života vôbec. Zabezpečením vodného prostredia pre priebeh reakcií v cytoplazme umožňuje realizáciu procesov metabolizmu. Ako rozpúšťadlo je zdrojom iónov potrebných pre priebeh reakcií od ktorých závisí existencia bunky.

Bakteriálne povrchy plnia rovnako podstatnú úlohu v živote bunky ako jej vnútro. Poznanie vlastností bunkového povrchu je základným pilierom pri štúdiu správania sa bunky v prostredí. Hydrofóbne vlastnosti povrchu majú významné uplatnenie v oblasti patogenicity. Práve hydrofobita popisuje schopnosť bunky prichytiť sa, priľnúť k povrchu hostiteľskej bunky, následne ju napadnúť a poškodiť.

Cieľom tejto bakalárskej práce je na základe vypracovanej literárnej rešerše zostaviť prehľad metód, ktoré je možné využiť pri štúdiu fyzikálno-chemických vlastností vody obsiahnutej vnútri bunky a vody vyskytujúcej sa v priamom kontakte s povrchom bunky.

2. CIELE PRÁCE

Cieľom práce bolo vypracovať literárnu rešers zameranú na metódy štúdia intracelulárnej a extracelulárnej vody a na základe rešerše navrhnúť a realizovať sériu pilotných experimentov pre overenie využiteľnosti inštrumentálnych techník v dispozícii Centra materiálového výskumu pri štúdiu intracelulárnej a extracelulárnej vody.

3. TEORETICKÁ ČASŤ

3.1 Štúdium vody nachádzajúcej sa v tesnom kontakte s povrchom bunky

V živote každej bunky zohráva dôležitú úlohu bunkový povrch, ktorý je tvorený cytoplazmatickou membránou a u baktérií, húb a rastlín bunkovou stenou. Hlavnou úlohou je ochrana bunky a zabezpečenie komunikácie bunky s okolím prostredníctvom proteínových kanálikov prítomných v membráne. Rozdielne koncentrácie iónov na oboch stranách membrány vytvárajú napätie označované ako membránový potenciál. Vo všeobecnosti je známe, že membrány sú elektricky polarizované a to tak, že vonkajšia časť membrány je nabitá kladne a z vnútornej strany je náboj membrány záporný.

Baktérie majú v porovnaní s ostatnými mikroorganizmami obrovský špecifický povrch. Povrchové javy sú obecne charakterizované povrchovým napätím a medzivrstvovým napätím. Povrchové napätie sa zúčastňuje pri procese rastu, tvorbe kolónií a zmenách permeability, priepustnosti. Tento pojem sa používa pri rozhraní kvapalina – plyn. Na rozhraní kvapalina – tuhá látka a kvapalina – kvapalina sa uplatňuje pojem medzivrstvové napätie. Významnou vlastnosťou rozhrania dvoch fáz je adsorpcia. Adsorpcia môže byť buď to fyzikálna založená na van der Waalových silách alebo v prípade, že je väzba pevnejšia ide o chemickú adsorpciu založenú na chemických väzbách [1].

Adsorpcia baktérií na rozhraní je kľúčovým faktorom k tvorbe biofilmu. Tvorba biofilmu zohráva dôležitú úlohu v globálnej ekológii. Baktérie sa používajú k degradácii alkánov a polycyklických aromatických zlúčenín na neškodné vedľajšie produkty. Baktérie, ktoré tvoria vodné a olejové biofilmy, majú veľmi odlišný metabolizmus, ktorý im umožňuje napríklad využívať ropu ako zdroj uhlíka a práve vytvorením biofilmu okolo olejových guľôčok zvyšujú schopnosť naviazania uhlíka. Medzi klasické prístupy, ktoré sa bežne využívajú k štúdiu príľnavosti baktérií patria technika BATH (vychádzajúca z techniky MATH) a metóda merania kontaktného uhla [2].

3.1.1 BATH

Metóda BATH (z anglického názvu *bacterial adhesion to hydrocarbons assay*) je technikou určenou k štúdiu príľnavosti bakteriálnych buniek k uhl'ovodíkom. BATH test vykonávaný v posledných dvadsiatich rokoch pozostáva z jednoduchého laboratórneho testu, kedy je koncentrácia buniek v bakteriálnej suspenzii stanovená pred a po zmiešaní s hydrofóbnou fázou. Výsledky získané viacerými vedeckými tímami vo svete nemožno celkom porovnávať nakoľko hydrofóbnosť baktérie môže ovplyvniť použitá hydrofóbná fáza, hodnota pH či iónová sila [2].

V praxi ide o pomerne jednoduchú techniku na prevedenie. Potrebné sú dve fázy a to jednu hydrofilnú a druhú hydrofóbnu. Hydrofilnú fázou môže predstavovať suspenzia buniek a hydrofóbnou fázou rôzne druhy oleja – najčastejšie však olej minerálny. Na počiatku je potrebné zmerať hodnotu optickej hustoty hydrofilnej fázy obsahujúcej bunky pomocou fotometra. Následne je potrebné zmerať hodnotu optickej hustoty po premiešaní s hydrofóbnou fázou a odstáť kvôli oddeleniu jednotlivých fáz. Zmena optickej hustoty indikuje množstvo buniek, ktoré prešlo z hydrofilnej fázy do hydrofóbnnej – čo poukazuje na hydrofóbnu repsektívu

hydrofilné vlastnosti bakteriálneho povrchu. Vo výsledku teda popisuje aké množstvo bakteriálnych buniek priľnulo k uhl'ovodíkom [3].

Priľnavosť bakteriálnych buniek v percentách možno vyčísliť pomocou nasledujúceho vzťahu (1), kde $OD_{600,0}$ predstavuje hodnotu optickej hustoty pri vlnovej dĺžke 600 nm pred premiešaním a $OD_{600,t}$ predstavuje hodnotu optickej hustoty takisto pri vlnovej dĺžke 600 nm po premiešaní a po potrebnej dobe státia t .

$$BATH(\%) = 100 \times \left(1 - \frac{OD_{600,t}}{OD_{600,0}} \right) \quad (1)$$

Švajčiarski autori P.A. Rühs, L. Böcker, R.F Inglis a P. Fischer spájajú vo svojich experimentoch techniku BATH s meraním elektroforetickej mobility kvôli vyčísleniu povrchového náboja buniek. Elektroforetickú mobilitu možno určiť pomocou laserového Dopplerovho velocimetra. Zeta potenciál ζ možno vyčísliť vo vodnom médiu s využitím Smoluchowskieskeho vzťahu (2), kde μ predstavuje elektroforetickú mobilitu, ϵ_0 permitivitu vákua, ϵ dielektrickú konštantu média a η udáva viskozitu média [2].

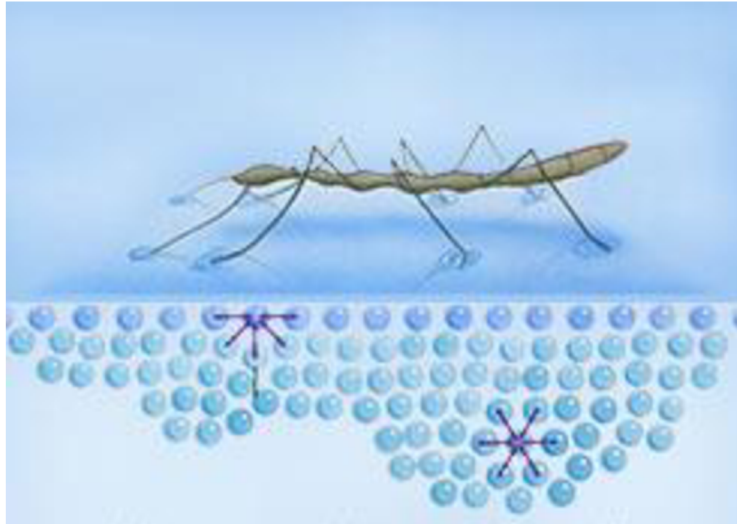
$$\zeta = \frac{\eta\mu}{\epsilon_0\epsilon} \quad (2)$$

3.1.2 Metódy určené na stanovenie povrchového napätia

Fyzikálna definícia povrchového napätia ho popisuje ako silu pôsobiacu na úsečku jednotkovej dĺžky, pričom vektor sily je rovnobežný s povrchom kvapaliny ale kolmý na úsek dĺžky na ktorý sa vzťahuje. Jednotkou povrchového napätia je Newton na meter ($N.m^{-1}$). Povrchové napätie možno vzhľadom na jeho termodynamiku definovať taktiež ako prácu pôsobiacu na jednotku plochy. Povrchové napätie teda možno udávať aj v jednotkách Joul na štvorcový meter ($J.m^{-2}$) [4]. Matematický zápis definície povrchového napätia je uvedený v nasledujúcom vzťahu, kde σ označuje povrchové napätie, premenná F povrchovú silu a premenná l dĺžku okraja povrchovej blany, na ktorý povrchová sila pôsobí kolmo v povrchu kvapaliny [4].

$$\sigma = \frac{F}{l} \quad (3)$$

Povrchové napätie je výsledkom vzájomnej interakcie prít'azlivých síl atómov alebo molekúl, z ktorých sa skladá povrchová vrstva. Povrchové napätie je efekt, kedy sa povrch kvapaliny správa ako elastická fólia a pokúša sa dosiahnuť čo možno najhladší stav s minimálnym rozpätím – povrch sa snaží dosiahnuť stav s najnižšou energiou. Obrázok vodomerky (Obr. 1) ilustruje predstavu kedy povrchové napätie spôsobuje, že sa hladina správa ako elastický film na povrchu kvapaliny. V preliačnicích je jasne vidieť ako sa elastický film prispôsobuje záťaži vyvolanej telom vodomerky [5].



Obrázok 1: Povrchové napätie kvapaliny umožňuje organizmu

Hydrometra stagnorum bezproblémový pohyb po hladine [6].

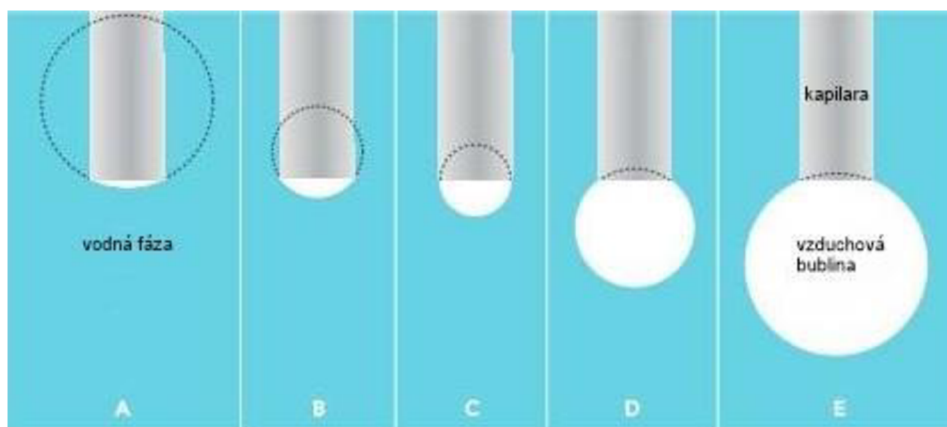
3.1.2.1 Metóda maximálneho tlaku v bubline

Bublinová tlaková tenziometria je jedinou dostupnou technikou umožňujúcou meranie dynamického povrchového napätia v krátkom časovom rozsahu. V súčasnosti má široké uplatnenie pri štúdiu rozličných dynamických povrchových javov v biologických aplikáciách alebo v oblasti priemyslu pri nanášaní, tlači alebo flotácii. Dôležitými procesmi pri technike merania maximálneho tlaku v bubline je stála kontinuálna tvorba bubliny na špičke kapiláry a stanovenie tlaku v bubline. Tlak bubliny P nadobúda maximum vtedy, kedy sa priemer bubliny rovná priemeru kapiláry. Povrchové napätie γ možno vypočítať pomocou Laplaceovej rovnice (3), kde r predstavuje známy polomer kapiláry, P tlak bubliny a f je korelačný koeficient udávaný výrobcom prístroja.

$$\gamma = f \cdot \frac{P \cdot r}{2} \quad (4)$$

Časový interval od vzniku bubliny po vytvorenie pologuľovitého tvaru bubliny sa nazýva doba života a interval od vytvoreného pologuľovitého tvaru po uniknutie bubliny sa označuje ako doba smrti. Bubliny sú generované pri rôznych frekvenciách čo umožňuje charakterizovať závislosť povrchového napätia na čase.

Nami používané zariadenie BPA – 800P je vybavené analyzátorom oscilácie prietoku plynu. Vzduch je privádzaný do systému kompresorom. Maximálny tlak možno určiť z vrcholu hodnôt grafickej závislosti vnútorného tlaku na čase. Maximálny tlak koreluje bubliny do pologuľovitého tvaru [7].



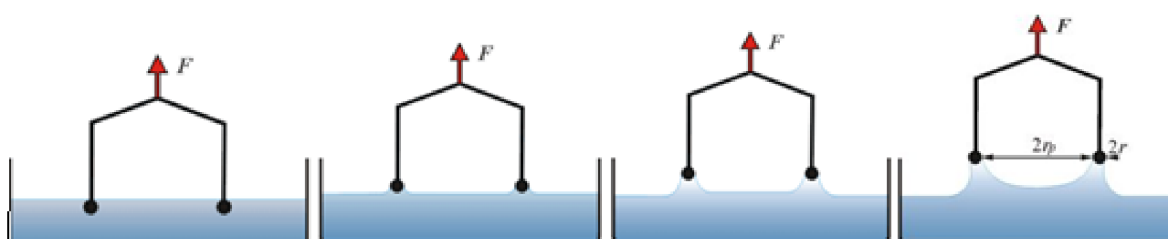
Obrázok 2: Znázornenie tvorby bubliny: polomer bubliny je v prvej časti veľký (A), potom sa postupne znižuje na minimum do stavu, kedy je polomer bubliny rovnaký ako polomer kapiláry (C) a následne sa polomer bubliny znova zväčšuje (E) [7].

3.1.2.2 Du Noüyhova metóda odtrhávania prstenca

Stanovenie povrchového alebo medzifázového napätia Du Noüyovou technikou je založené na meraní maximálnej sily, ktorá je dosiahnutá tesne pred odtrhnutím prstenca od hladiny. Hĺbka ponorenia prstenca a úroveň hladiny, na ktorú vystúpi keď dôjde k maximálnemu ťahu sú nepodstatné [8].

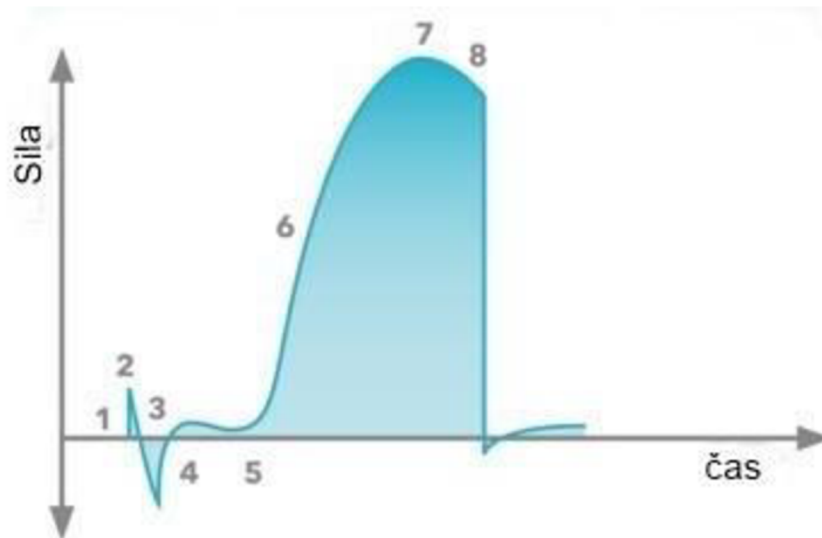
Prstenec najčastejšie z platinového drôtu musí byť dobre zmáčaný kvapalinou ($\theta = 0^\circ$). Pre povrchové (medzifázové) napätie platí nasledujúci vzťah, kde F je sila potrebná k odtrhnutiu tenkého prstenca od fázového rozhrania, r_p je polomer prstenca a Φ korekcia na kvapalinu, ktorá sa nalepí na prstenci pri odtrhnutí od hladiny. Tento koeficient je závislý na geometrii prstenca a uvádzaný v tabuľkách [9].

$$\gamma = \frac{F}{4\pi r_p} \phi \quad (5)$$



Obrázok 3: Znázornenie priebehu procesu odtrhávania prstenca [9].

Na začiatku merania je prstenec nad povrchom a pôsobiaca sila je nulová (bod 1 na Obr. 4). Po dopade prstenca na povrch dochádza k zvýšeniu kladnej hodnoty sily v dôsledku pôsobenia adhézných síl medzi prstencom a povrchom kvapaliny (bod 2). Prstenec musí byť tlačný skrz povrch kvôli napätiu čím hodnota sily nadobúda zápornú hodnotu (bod 3). Prstenec prerazí povrch a zmeraná sila je mierne kladná vzhľadom k vznášanej drôtu (body 4,5). Pri zdvíhaní prstenca cez povrch začne sila narastať (bod 6) do bodu kedy dosiahne maximum (bod 7). Po dosiahnutí maximálnej hodnoty sily dochádza k utrženiu prstenca od kvapaliny a hodnota sily klesá (bod 8) [8].



Obrázok 4: Grafická závislosť hodnoty sily na čase počas celého priebehu Du Noüyhovej metódy [8].

3.2 Štúdium intracelulárnej vody

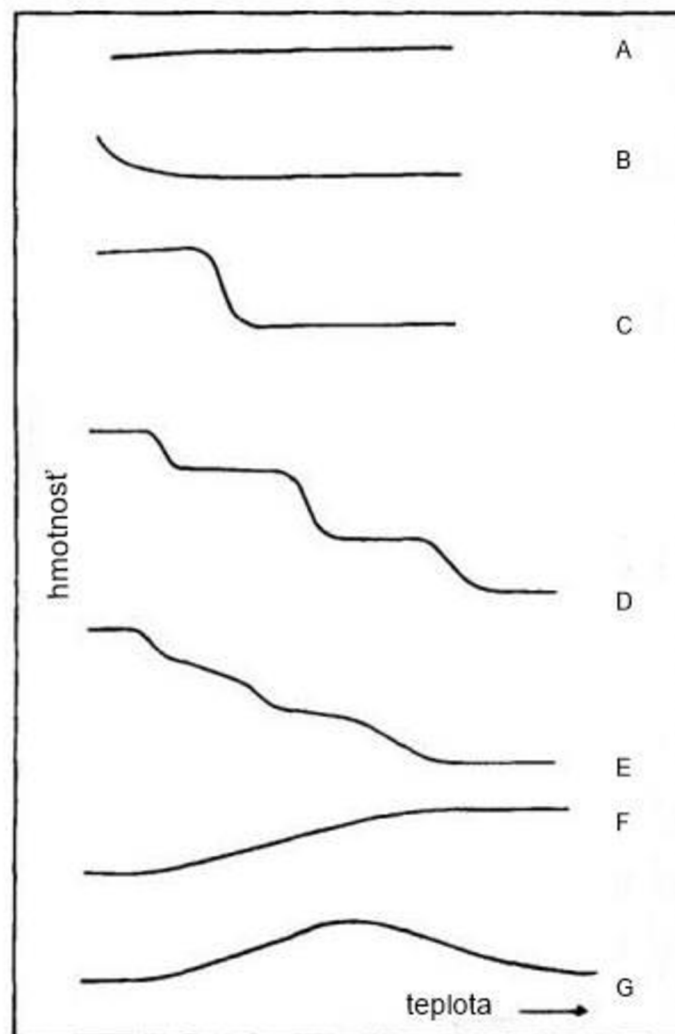
Voda je najhojnejšia molekula v bunkách, ktorá predstavuje približne 70% z celkovej bunkovej hmoty. Intracelulárna, vnútrobunková voda má špecifický význam. Má dôležité fyzikálne a chemické vlastnosti. Podstatnou vlastnosťou vody je schopnosť rozpúšťania látok, schopnosť tvoriť vodíkové väzby či jej amfoterná povaha. Molekuly vody tvoria atómy vodíka, ktoré nesú pozitívny náboj a atómy kyslíka nesúce negatívny náboj. Vzhľadom na polárnu povahu interakcií môžu molekuly vody vytvárať vodíkové väzby, ktoré majú za následok vznik anomálií vody. Metódy termickej analýzy umožňujú stanoviť akými pevnými väzbami sú pútané molekuly vody vnútri bunky.

3.2.1 Termogravimetrická analýza TGA

Termogravimetria je považovaná za základnú metódu termickej analýzy. Ide o postup, pri ktorom je sledovaná zmena hmotnosti zvolenej skúmanej vzorky vyjadrená ako funkcia času alebo teploty, pričom je skúmaná vzorka vystavovaná teplotnému programu, ktorý je pod neustálou kontrolou. Pri zahrievaní vzorky sa uvoľňujú plynné zložky čo má za následok to, že dochádza k stratám hmotnosti skúmanej vzorky. Taktiež môže dochádzať aj k javom, počas ktorých pri zahrievaní látky dochádza k reakciám s plynom a hmotnosť vzorky narastie. Podľa toho, akým spôsobom je vzorka ohrievaná je termogravimetria rozlíšená na dva typy. Pri prvom type dochádza k ohrevu vzorky pri konštantnej teplote a je teda považovaný za typ izotermický a termogravimetria je označovaná ako statická. Pri druhom type je vzorka vystavená účinkom plynule stúpajúcich alebo klesajúcich teplôt. Zmena teploty prebieha spravidla lineárne s časom [10].

Termogravimetrický experiment prebieha na termováhach. Moderné zariadenia využívajú kompenzačný princíp merania hmotnosti, kedy je vzorka po celú dobu priebehu experimentu v peci na rovnakom mieste, pričom akákoľvek zmena hmotnosti ľubovoľným smerom je mechanizmom termováh zaznamenávaná a kompenzovaná pohybom opačným smerom, ktorý vráti vzorku do pozície kde sa nachádzala pred hmotnostnou zmenou. Výsledkom merania je

termogravimetrická krivka nazvaná TG – krivka, ktorá graficky znázorňuje závislosť hmotnosti na teplote alebo závislosť hmotnosti na čase. Štandardne sa TG – krivka znázorňuje v percentách pôvodnej hmotnosti zaznamenaných na ose y v závislosti na teplote alebo času zaznamenatej na ose x. Tvar krivky je ovplyvnený rýchlosťou ohrievania. Čím vyššia je rýchlosť ohrevu, tým užší je teplotný interval počas ktorého prebieha zmena hmotnosti vo vzorke. Vysoká rýchlosť ohrevu môže spôsobiť vypustenie malých zmien na krivke, čo môže mať významný dopad pre charakterizáciu látky. Tvar TG – krivky závisí na voľbe navážky, úprave vzorky, nastavení teplotného programu a atmosfére pece. Platí, že tvar TG – krivky je pri rovnakých podmienkach pre danú látku charakteristický [11].



Obrázok 5: Štandardné typy TG – kriviek [11].

Vyššie zobrazený obrázok poukazuje na základné typy TG – kriviek pri závislosti hmotnosti na teplote. Jednotlivé krivky A – G možno interpretovať nasledujúcim spôsobom.

A – krivka popisuje dej, ktorý nie je doprevádzaný zmenou hmotnosti alebo prípad kedy v skúmanej vzorke neprebíha žiadny dej.

B – krivka popisuje dej úbytku hmotnosti, ktorý prebieha od začiatku termogravimetrickej analýzy. Tento príklad je typický pre stratu vlhkosti a desorpciu plynných látok.

C – krivka popisuje termický rozklad prebiehajúci v jedinom kroku, ktorý je ohraničený dvomi pláťmi, ktoré popisujú termicky stabilnú vychádzajúcu zlúčeninu a finálny produkt termického rozkladu.

D – krivka popisuje termický rozklad, ktorý prebieha vo viacerých krokoch, ktoré sú oddelené jednotlivými pláťmi a možno teda charakterizovať jednotlivé kroky (termicky stabilnú vychádzajúcu zlúčeninu, medziprodukty a finálny produkt termickej analýzy).

E – krivka popisuje taktiež termický rozklad prebiehajúci vo viacerých krokoch, ale tieto jednotlivé kroky nie sú oddelené pláťmi a teda nie je možné hodnotiť čiastkové úbytky hmotnosti, ale len celkový hmotnostný úbytok.

F – krivka poukazuje na dej, pri ktorom dochádza k nárastu hmotnosti – spôsobené napríklad reakciou študovanej látky s plynmi v atmosfére pece.

G – krivka popisuje prípad, kedy sa produkt oxidácie pri ďalšom zvýšení teploty rozkladá na menšie atómy [11].

Praktickým využitím termogravimetrie je analýza širokého spektra materiálov medzi ktoré patria napríklad kovy, polyméry, potraviny, kozmetika, biopolyméry alebo pôdne či geologické vzorky [12]. Vo všeobecnosti bunky obsahujú množstvo intracelulárnej vody potrebnej pre priebeh metabolických procesov. TGA dokáže popísať sušenie vlhkých vzorkov a môže tak poskytnúť informácie aj o intracelulárnej vode.

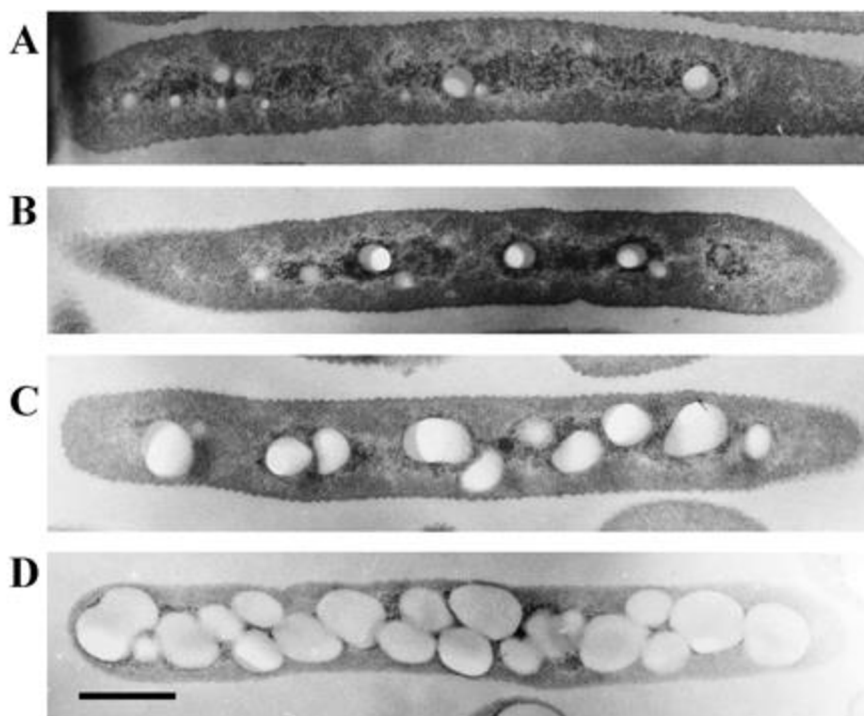
3.3 Baktérie

Pojmom baktérie je popisovaná rozsiahla skupina jednobunkových prokaryotických organizmov dosahujúcich v priemere veľkosť 0,3 – 2,0 μm . Každá jedna bakteriálna bunka je zložená z troch základných častí, pričom každá jedna plní v živote baktérie dôležitú úlohu. Úlohou cytoplazmy je okrem vyplnenia bunečného priestoru vytvoriť vhodné prostredie pre priebeh metabolických dejov. Možno ju charakterizovať ako viskóznu vysoko koncentrovanú zmes koloidných a kryštaloidných roztokov organických a anorganických látok. Voľne v cytoplazme bez ohraničenia jadrovým obalom sa nachádza jeden kruhový bakteriálny chromozóm nesúci genetickú informáciu. Ďalšími významnými inklúziami vyskytujúcimi sa v cytoplazme baktérií sú plazmidy nesúce doplnkovú genetickú informáciu napríklad pre rezistenciu voči antibiotikám alebo ribozómy, ktorých úlohou je syntéza nových polypeptidov. Tvar bunky určuje bunečná membrána, ktorá má dôležitú úlohu pri oddelení vnútorného prostredia bunky od okolia. U niektorých organizmov sa na povrchu môže vyskytovať aj bunková stena plniaca mechanickú funkciu. Funkciou membrány je regulovať látky, ktoré prechádzajú dnu alebo von z bunky prostredníctvom viacerých transportných mechanizmov [13]. S.J. Singer ponúka pohľad na membránu ako na maticu tvorenú dvojvrstvou fosfolipidov s mobilnými globulárnymi integrálnymi membránovými proteínmi a glykoproteínmi, ktoré sú vložené do fluidnej lipidovej dvojvrstvy [14].

Počas overovania účinnosti a funkčnosti jednotlivých dostupných metód boli pri našom štúdiu využívané bakteriálne bunky kmeňa *Cupriavidus necator* H16 a jeho mutanta *Cupriavidus*

necator PHB-4. Zaujímavosťou študovaného kmeňa *Cupriavidus necator* je obsiahnutie deviatich génov, ktoré sú buď známe alebo podozrivé z uvoľňovania polymérnej látky [15].

Cupriavidus necator H16 bola v minulosti označovaná taktiež ako *Wautersia eutropha* alebo *Ralstonia eutropha* [16]. Ide o gram – negatívnu chemolitoautotrofnú baktériu, ktorá počas neprítomnosti organických substrátov využíva ako zdroj uhlíka a energie CO_2 a H_2 . V súčasnosti ide o najznámejšieho výrobcu polyhydroxyalkanoátov (PHA) z uhlíkových substrátov. Táto schopnosť baktérii umožňuje degradovať aromatické zlúčeniny [17]. Bunky *Cupriavidus necator* sú tyčinkovitého tvaru a obsahujú dve membrány a dva bičíky. Optimálna teplota pre ich život je 30°C [18].



Obrázok 6: Priebeh produkcie polyméru - polyhydroxybutyrátu vnútri granúl *Cupriavidus necator* H16 v časovom období: dva a pól hodiny (A), päť hodín (B), deväť hodín (C) a dvadsaťštyri hodín [16].

3.4 Súčasný stav riešenej problematiky

Baktérie majú vo všeobecnosti schopnosť prilnúť k rôznym prirodzeným aj syntetickým povrchom čo sa v súčasnosti vo veľkej miere využíva vo viacerých odvetviach – napríklad pri sanácii pôdy, znižovaní znečistenia morí alebo pri spracovaní potravín a pitnej vody. Aby sme predišli nežiadúcim problémom spojených s bakteriálnou príľnavosťou je nevyhnutné detailnejšie pochopiť mechanizmy akými sa baktérie k povrchom prichytávajú [19].

Štúdia Mark C. M. van Loosdrehta sa zaoberala skúmaním adhézie viacerých kmeňov baktérií, ktoré sa líšili povrchovou hydrofobitou. Hydrofobita bunkovej steny bola meraná prostredníctvom metódy merania kontaktného uhla vody na bakteriálnu vrstvu na mikrofiltri. Ako pevná fáza bol použitý sulfátový polystyrén. Experimenty ukázali, že hydrofóbne bunky sa držali na povrchu vo väčšej miere než hydrofilné [20].

K metóde BATH ako technike na posúdenie hydrofilných respektíve hydrofóbných vlastností na povrchu bunky nás inšpiroval článok profesora Rosenberga venovaný dvadsiatim rokom

používania a aplikácii tejto metódy. V tomto článku sa vracal svojim výkladom k MATH technike ale zároveň popísal prevedenie metódy BATH na baktérii *Acinetobacter calcoaceticus* [21].

Pre štúdium bunecných suspenzií je možné použiť aj techniky určené k štúdiu neživých koloidných systémov. Jednou z takýchto techník je medzifázová reológia, ktorá hovorí o tom aká je tendencia koloidných systémov sorbovať sa. Th. F. Tadros sa vo svojej rozsiahlej publikácii venuje medzifázovej reológii. Popisuje princíp tejto metódy, potrebné základné aj odvodené vzťahy ale taktiež podmienky ovplyvňujúce reológiu. Zvýšenú pozornosť venoval viskoelastickým vlastnostiam slabo vločkovaných emulzií. V závere uviedol, že viskoelastické merania môžu byť použité k štúdiu vločkovaných emulzií rovnakým spôsobom ako u suspenzií [22].

Vedecký tím zložený z Trevor Roger Garretta, Manmohan Bhakoob a Zhibing Zhanga sa zaoberal adhéziou baktérii. Tento článok poskytuje prehľad o bakteriálnej adhézii, uvádza príklady toho, akým spôsobom bakteriálna adhézia ovplyvňuje priemysel a zhŕňa metódy a prístroje používané k zlepšeniu chápania adhézných vlastností baktérií. Uvádzajú použitie konfokálnej laserovej mikroskopie, skenovacej elektrónovej mikroskopie a na záver použitie optickej mikroskopie [23].

Herbert H.P. Fang, Kwong-Yu Chan a Li-Chong Xu sa vo svojej štúdií zamerali na kvantifikáciu bakteriálnej adhézie s použitím atómovej silovej mikroskopie. Ich výsledky ukazujú, že sila adhézie medzi Si_3N_4 a bakteriálnym povrchom je v rozmedzí 3,9 – 4,3 nN [24].

Priamym meraním adhézných síl biofilmov v trubkách prostredníctvom mikromanipulácie sa zaoberali M. J. Chen, Z. Zhang T. R. Bott. Použitá sonda tvaru T bola špeciálne navrhnutá k natiahnutiu biofilmu *Pseudomonas fluorescens*. Pevnosť príľnutia medzi biofilmom a substrátom bola definovaná ako práca potrebná k odstráneniu biofilmu na jednotku plochy substrátu. Výsledky ukázali, že adhezívna sila sa zvýšila s rýchlosťou kvapaliny, v ktorej boli vypestované biofilmy, na veľkosť 0,05 až 0,2 $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$ [25].

Výskumný tím v zložení Loredana De Bartolo, Sabrina Morelli, Augustinus Baderb a Enrico Driolia viedol štúdiu s cieľom posúdiť správanie buniek v súvislosti s fyzikálno – chemickými vlastnosťami polymérnych membrán, ktoré majú byť použité v biosyntetických orgánoch. Použitými bunkami boli cicavčie bunky pečene. Fyzikálno – chemické vlastnosti membrán boli charakterizované meraním kontaktných uhlov. Výsledky získané v tejto štúdií poukazujú, že všetky skúmané membrány majú rôzne hydrofóbne respektíve hydrofilné vlastnosti. Všetky skúmané polymérne membrány majú povrchové napätie v rozmedzí od 16 do 40 $\text{MJ}\cdot\text{m}^{-2}$ [26].

Monitorovaním zmeny objemu intracelulárnej vody u perfundovaných buniek zabudovaných do vnútornej membrány gélu za použitia H-NMR spektroskopie sa zaoberal tím profesora Josefa Pfeuffera. Skúmanými bunkami boli gliómy F98, primárne astrocyty a epitelové kožné bunky. Bunky boli vystavované osmotickému stresu a bola sledovaná zmena objemu. Dokázali, že metódou 1-H NMR spektroskopie je skutočne možné sledovať zmeny objemu na čase v ráde sekúnd a možno určiť dobu naviazania intracelulárnej vody. Hodnota difúzneho koeficientu sa výrazne znížila difúziou vnútrobunkovej vody, ktorá bola použitá k detekcii intracelulárneho

signálu. Táto zložka signálu sa prejavila ako veľmi citlivá k zmenám objemu bunky a to pri napučaní aj pri zmršťovaní a taktiež je veľmi citlivá pri zmene teploty [27].

V ďalšom zaujímavom štúdiu sa tým profesora Josefa Pfeuffera zaoberal obmedzenou difúziou a výmenou intracelulárnej vody na perfundovaných gliových bunkách s cieľom získať základné poznatky o vnútrobunkovom stave v mozgu. Vychádzali z teoretického Tannerovho modelu a ako metóda bola využitá H-NMR. Záverom práce bola stanovená stredná doba zadržania vnútrobunkovej vody u gliových buniek na hodnotu 50 ms [28].

K štúdiu dynamiky intracelulárnej vody extrémne halofilného organizmu *Haloarcuła marisortui* použil tým profesora Moeava Tehei techniku QENS. V závere práce zhodnotili, že ich dáta predstavujú mimoriadne nízku mobilitu intracelulárnej vody u *H. marisortui* v porovnaní s doposiaľ študovanými bunkami súčasnosti [29].

Výskumný tím so zložením Ramachandra V. Devireddy, Debopam Raha a John C. Bischof sa zaoberal štúdiom transportu vody počas procesu mrazenia v bunčných suspenziách s využitím diferenciacnej skenovacej kalorimetrie. Ako bunčné vzorky boli použité ľudské lymfocyty. Získané dáta poukazujú na to, že počiatočná hodnota uvoľneného tepla zo vzorky obsahujúcej osmoticky aktívne bunky v médiu je vyššia než konečná hodnota uvoľneného tepla identickej vzorky osmoticky neaktívnych alebo lýzovaných buniek. Poukázali na aplikáciu tejto techniky pri posudzovaní zamrazovania alebo rozmrazovania zranení. Uviedli, že technika DSC je veľmi sľubným prístupom k meraniu transportu vody v bunčných systémoch počas zamrazovania [30].

Tým zložený zo Saravana K. Balasubramanian, Willem F. Wolkers a John C. Bischofa sa zaoberal štúdiom, ktorej cieľom bolo porovnávanie fázového stavu membrány a okolitej vody počas mrazenia u troch typov cicavčích buniek s využitím Fourierovej transformačnej infračervenej spektroskopie a kryomikroskopie. Použité bunky mali rozdielne veľkosti a biofyzikálne vlastnosti. Konkrétne išlo o bunky ľudských dermálnych fibroblastov, prasačie bunky hladkého svalstva a ľudské nádorové bunky prostaty. U všetkých buniek bola zaznamenaná zvýšená tvorba ľadu za dehydratačných podmienok. Poukazujú na skutočnosť, že lipidová hydratácia je pravdepodobne príčinou nadmerného množstva vody počas fázovej zmeny a je mechanizmom zníženia transportu vody pri teplotách pod bodom mrazu. Výsledok je obecný pre rôzne cicavčie bunky rôznej veľkosti a vlastností. Drastické zmeny v lipidovej hydratácii naznačujú možnú súvislosť zmraziť vyvolané dôsledky zranenia [31].

E. B. Alcázar, M. H. M. Rocha-Leão a J. Dweck sa zaoberali stanovením intracelulárnej vody u kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* s využitím termogravimetrie. Na záver vyslovili, že konvenčné termogravimetrické zariadenie môže byť použité pre stanovenie obsahu intracelulárnej vody u vzoriek kvasiniek s použitím oveľa menšej masy vzorky než u bežne využívaných vyspelých metód. Získané hodnoty sú v rozmedzí 65 – 69 % vztiahnuté na základ bez extracelulárnej vody [32].

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité baktérie, chemikálie a prístroje

4.1.1 Použité baktérie

- Kmeň *Cupriavidus necator* H16, ktorý pochádza z Českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity v Brne.
- Kmeň *Cupriavidus necator* PHB-4, ktorý pochádza z Leibnitz Institute DSMZ – German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Braunschweig, Nemecko.

4.1.2 Použité chemikálie

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- KH_2SO_4
- Roztok fruktózy (40g/100ml)
- Roztok stopových prvkov
- Fyziologický roztok PBS
- Nutrient Broth
- Minerálny olej
- Hexadekán
- Deionizovaná voda
- Deionizovaná voda (systém PURELAB-flex)

4.1.3 Použité prístroje

- Laminárny box aura mini (BIO AIR INSTRUMENTS s.r.l.)
- Trepáčka Unimax 1010 (Heidolph)
- Centrifuga U – 32R (BOECO)
- Spektrofotometer U – 3900H (HITACHI)
- Koloidný analyzátor Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd)
- Bublínový tenziometer BPA – 800P (KSV)
- Tenziometer Sigma 701 (KSV)
- Termogravimetrický analyzátor TGA Q5000IR

4.2 Kultivácia baktérií

Inokulačné médium bolo pripravované do sto mililitrových Erlenmeyerových baniek. Do každej Erlenmeyerovej banky bolo navážených 1,25 g média Nutrient Broth a odmeraných 50

ml deionizovanej vody. Médium bolo sterilizované v tlakovom hrnci po dobu 60 minút pri teplote 120 – 125 °C. Médium po sterilizácii bolo trikrát naočkované bakteriologickou kľučkou z agarovej platne. Zaočkované médium bolo 24 hodín kultivované na temperovanej trepačke pri teplote 30 °C a frekvencii trepania 170 rpm. Do produkčného minerálneho média sa po uplynutí 24 hodín kultivácie pridáva 5 % inokula vzťahnutých na celkový objem minerálneho média.

Produkčné minerálne médium bolo pripravené do Erlenmeyerových baniek s objemom 250 ml. Do každej Erlenmeyerovej banky bolo odmeraných 100 ml deionizovanej vody a navážené potrebné množstvo zložiek tvoriacich minerálne médium.

Tabuľka 1: Zložky tvoriace minerálne médium a ich potrebná navážka pre prípravu 100 ml produkčného média.

Látka	Navážka [g]
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	0,100
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,102
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,110
KH ₂ SO ₄	0,020

Produkčné médium bolo sterilizované rovnako ako inokulačné v tlakovom hrnci počas doby 60 minút pri teplote 120 – 125 °C. Do vysterilizovaného média bolo pridaných 5 ml roztoku fruktózy, 0,1 ml roztoku stopových prvkov a 5 ml inokulačného média kultivovaného 24 hodín. Kultivácia produkčného média prebiehala počas 72 hodín na temperovanej trepačke pri teplote 30 °C a frekvencii trepania 170 rpm.

Tabuľka 2: Zloženie roztoku stopových prvkov.

Látka	Množstvo
FeCl ₃	9,700 g
CaCl ₂	7,800 g
CuSO ₄	0,156 g
CoCl ₂	0,119 g
NiCl ₂	0,118 g
CrCl ₂	0,062 g
0,1 M HCl	1000 ml

4.3 Príprava vzoriek

Po uplynutí 72 hodín kultivácie bolo odobratých 10 ml produkčného média obsahujúceho bakteriálne bunky. Bunečný homogenát bol centrifugovaný pri teplote 20 °C a pri frekvencii otáčok 10 000 rpm po dobu piatich minút. Supernatant bol odliaty a získaný bunečný sediment bol rozsuspendovaný s prídavkom 10 ml deionizovanej vody a následne znovu centrifugovaný 5 minút pri 20 °C a pri 10 000 rpm. Supernatant bol opäť odliaty a bunečný sediment bol

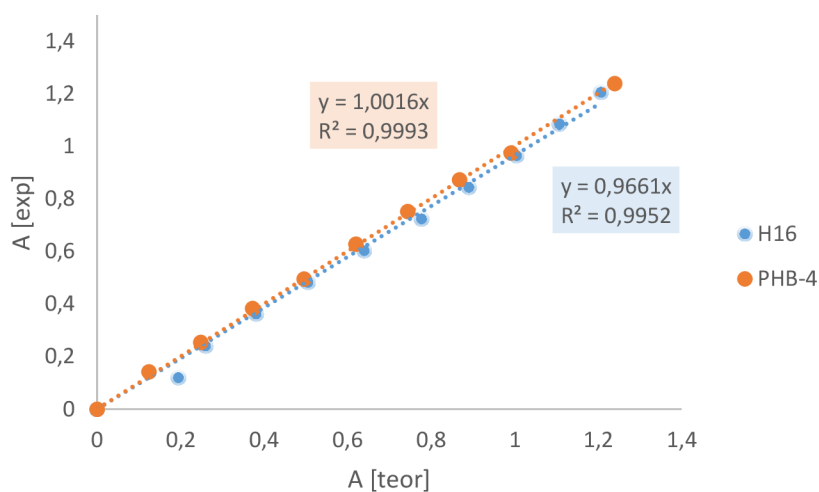
rozsuspendovaný po prídavku 2 ml deionizovanej vody a následne umiestnený do chladničky. Rozsuspendovaný bunecný sediment bol zriedený deionizovanou vodou (systému PURELAB - flex) na objem 30 ml potrebnej koncentrácie. Tento postup bol opakovaný pri príprave vzoriek použitých v technike BATH a metódach učených na meranie povrchového napätia.

Postup pri príprave vzoriek na termickú analýzu bol obdobný. Prvým krokom bolo centrifugovanie bunecného homogénátu opäť pri 20 °C a frekvencii otáčok 10 000 rpm počas piatich minút. Supernatant bol odliaty a k bunecnému sedimentu bolo pridaných 10 ml fyziologického roztoku PBS s ktorým bol sediment rozsuspendovaný. Tento krok bol presne zopakovaný ešte jeden raz. Na záver bol supernatant odliaty a bunecná zrazenina povrchovo vysušená buničinou.

4.4 Realizácia techniky BATH

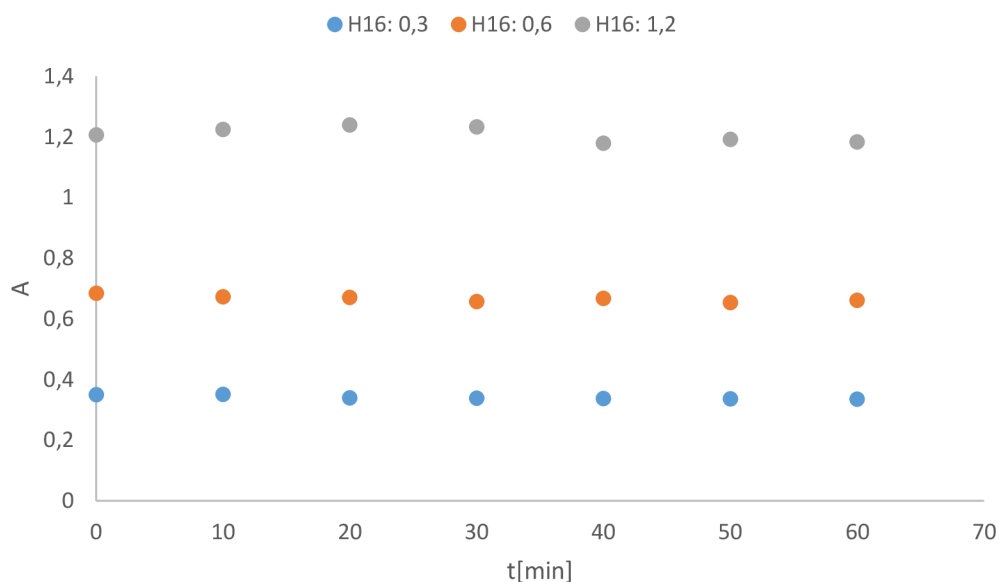
Pomocou tejto metódy boli študované povrchové vlastnosti buniek, najmä ich schopnosť prechádzať z prostredia hydrofilného (vodný roztok bakteriálnych buniek) do prostredia hydrofóbného (olej – v našom prípade hexadekán a minerálny olej).

Na začiatku realizácie experimentov bolo potrebné zistiť, či hodnota absorbancie odráža koncentráciu buniek prítomných vo vodnej fáze a tak bola zostavená kalibračná rada. Jednotlivé roztoky pripravených koncentrácií boli spektrofotometricky merané pri vlnovej dĺžke 600 nm. Zásobná vzorka suspenzie bola pripravená tak, aby jej absorbancia pri 600 nm zodpovedala 1,2. Ostatné vzorky boli pripravené presným riedením zásobného roztoku. Pre každú vzorku bola vypočítaná teoretická absorbancia na základe konkrétneho pomeru riedenia (A [teor]) a potom bola hodnota absorbancie zmeraná experimentálne (A [exp]). Po vynesení grafickej závislosti korelácie vypočítaných a nameraných hodnôt absorbancie a zobrazení rovnice spoľahlivosti nadobudol koeficient spoľahlivosti pre oba testované kmene vysokú hodnotu (vid' Obr. 7) a tak možno považovať zmenu absorbancie za veličinu priamo úmernú koncentrácii buniek v suspenzii.

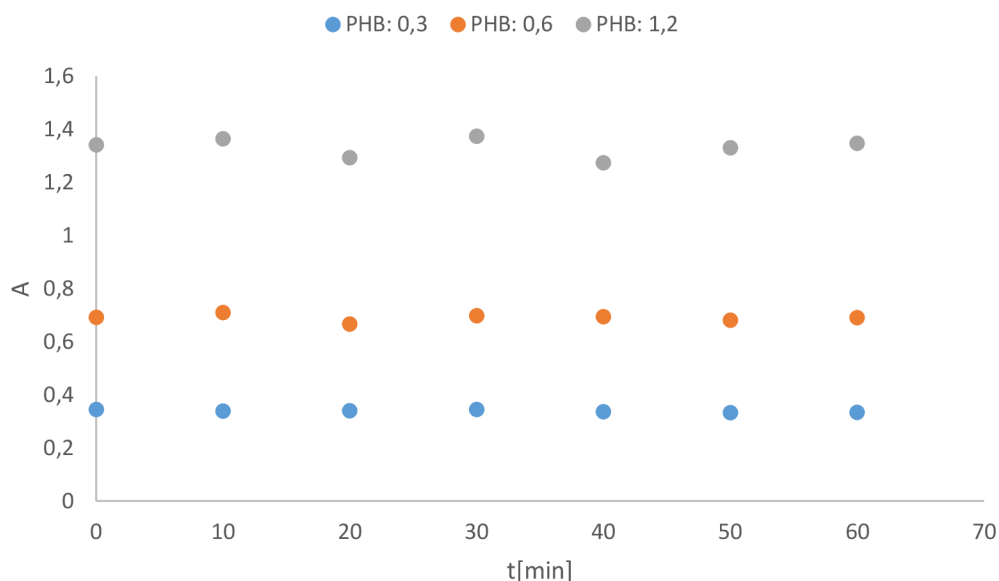


Obrázok 7: Kalibračné krivky.

Druhou podstatnou informáciou potrebnou k tomu, aby sme mohli vôbec použiť túto techniku bolo zistiť či bunky majú tendenciu v tomto prostredí sedimentovať, prípadne s akou rýchlosťou. Tento poznatok je kľúčový pri návrhu postupu vlastného experimentu, kedy je nutné časové intervaly medzi odberom a meraním vzorky zvoliť tak, aby sa vplyv zmeny absorbancie vzorky v dôsledku sedimentácie minimalizoval. Pretože sedimentácia môže byť ovplyvnená koncentráciou buniek v suspenzii (napríklad v dôsledku ich agregácie pri vyššej koncentrácii), bol vplyv sedimentácie posúdený pre tri rôzne koncentrované suspenzie – suspenziu zásobnú ($A_{600} = 1,2$) a dve riedené suspenzie s koncentráciou polovičnou ($A_{600} = 0,6$) respektive štvrtinovou ($A_{600} = 0,3$). Ako vyplýva z grafov na Obr. 8 a 9 počas hodinového merania roztokov je vidieť z nameranej časovej závislosti absorbancie, že nedochádza k prudkej sedimentácii a že roztok s bakteriálnymi bunkami je celú hodinu prakticky stabilný u oboch bakteriálnych kmeňov.



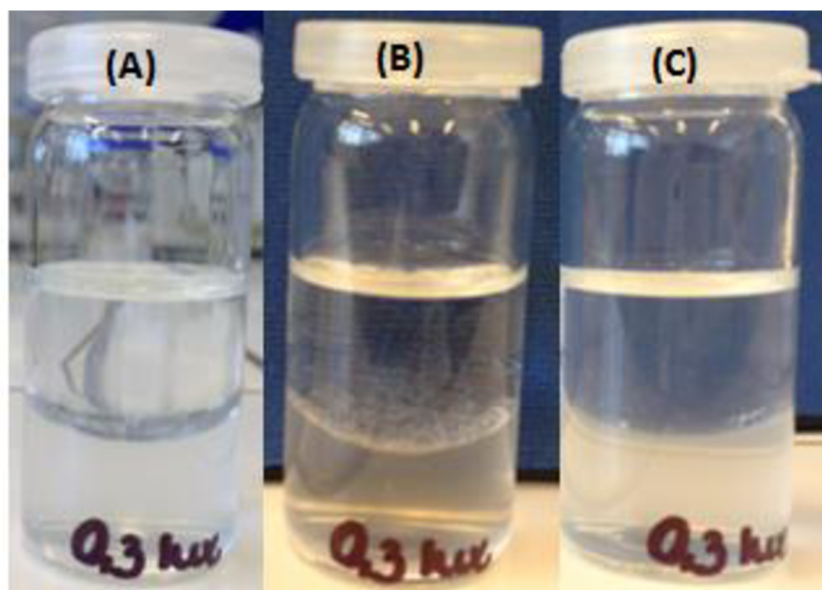
Obrázok 8: Časová závislosť absorbancie u baktérie *Cupriavidus necator* H16



Obrázok 9: Časová závislosť absorbancie u baktérie *Cupriavidus necator* PHB-4.

Po overení predpokladov, že koncentrácia je úmerná absorbancii a že nedochádza k sedimentácii buniek došlo k realizácii vlastných pilotných BATH experimentov.

Základným prvkom experimentu bola príprava vzoriek vyššie popísaným postupom a pri vlnovej dĺžke 600 nm zmeraná hodnota optickej hustoty pôvodného vodného roztoku bakteriálnych buniek na spektrofotometri. Pripravená vodná fáza buniek bola spoločne s olejovou fázou v objemovom pomere 1:1 napipetovaná do vialiek so septom. Zmes vo vialke bola vortexovaná po dobu dvoch minút, aby došlo k dôkladnému premiešaniu fází. Výsledná emulzia bola ponechaná stáť po dobu 15 minút. Po uplynutí tejto doby bola pomocou injekčnej ihly odobratá spodná vodná fáza a zmeraná jej optická hustota pri vlnovej dĺžke 600 nm. Zmenu koncentrácie roztoku bolo možné indikovať aj vizuálne. Po zmeraní absorbancií príslušných roztokov boli vodné fázy analyzované na koloidnom analyzátore. Analýza prebiehala rovnakým spôsobom pri pôvodnom vodnom roztoku a takisto pri roztoku, ktorý vznikol po premiešaní. Koloidný analyzátor bol nastavený k zmeraniu hodnôt Zeta – potenciálu a difúzneho koeficientu z ktorého počítačový program prepočtom stanovil strednú hodnotu objemovej distribúcie označovanú ako *Volume mean* – tento prepočet predpokladá guľovitý tvar buniek čo v našom prípade mohlo spôsobiť isté odchýlky nakoľko bunky *Cupriavidus necator* majú tyčinkovitý tvar.



Obrázok 10: Vo vialkách sa nachádza vodný roztok buniek *Cupriavidus necator* H16 s počítacou optickou hustotou 0,3 s pridaným množstvom hexadekánu v pomere 1:1. V (A) vialke je vidieť suspenziu pred vortexovaním, v (B) je vidieť suspenziu ihneď po dvojminútovom vortexovaní a v (C) po vortexovaní a odstáti pätnástich minút.

Všetky experimenty boli kvôli overeniu správnosti zopakované trikrát pri oboch bakteriálnych kmeňoch.

4.5 Realizácia metód určených k meraniu povrchového (medzifázového) napätia

Základným prvkom pre realizáciu experimentu bola príprava vzoriek objemu 30 ml. Vzorky bakteriálnych suspenzií boli pripravené rovnakým postupom ako pre BATH techniku. Pre meranie povrchového napätia pomocou analýzy maximálneho tlaku v bubline bol použitý prístroj BPA – 800P. Pred samotným meraním vzoriek bol v rovnako mennom programe nastavený režim merania ako štandard, ktorý mal za cieľ vyhodnotiť závislosť napätia (γ) na dobe života bubliny.

Pri meraní medzifázového napätia metódou odtrhávania prstenca boli použité tie isté vzorky, ktoré sa použili pri metóde analýzy maximálneho tlaku v bubline. Pri tomto meraní napätia zohrávala úlohu nádoba v ktorej bola umiestnená vzorka a do ktorej sa ponáral a následne pomaly odtrhával prstenec. Pri analýze všetkých vzoriek bola použitá rovnaká nádoba a rovnaký objem vzorky. Použitým zariadením bol Tenziometer Sigma 701.

Rovnako ako pri BATH technike boli študované tri rozdielne koncentrácie bakteriálnych buniek dvoch rozdielnych kmeňov v troch rozdielnych prostrediach. Všetky experimenty boli opakované kvôli overeniu presnosti trikrát.

4.6 Realizácia štúdia intracelulárnej vody prostredníctvom techniky TGA

Za účelom analýzy závislosti úbytku hmotnosti vody obsiahnutej v buncnom sedimente bola uskutočnená termogravimetrická analýza – TGA. Našou úlohou pri jej realizácii bola pedantná príprava vzorky bez prebytočnej povrchovej vody, ktorá by vyhodnotenie získaných

termogravimetrických kriviek mohla značne skomplikovať. Počas prípravy vzorky sme postupovali vyššie spomínaným postupom. Pripravené odstredené a povrchovo osušené vzorky boli odovzdané k analýze na zariadení TGA Q5000IR. Analýza prebiehala izotermálne pri troch odlišných nastavených teplotách a to pri 60, 70 a 80 °C. Analýza bola opakovaná pri každom bakteriálnom kmeni pri každej teplote dvakrát kvôli overeniu presnosti.

5. VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 BATH

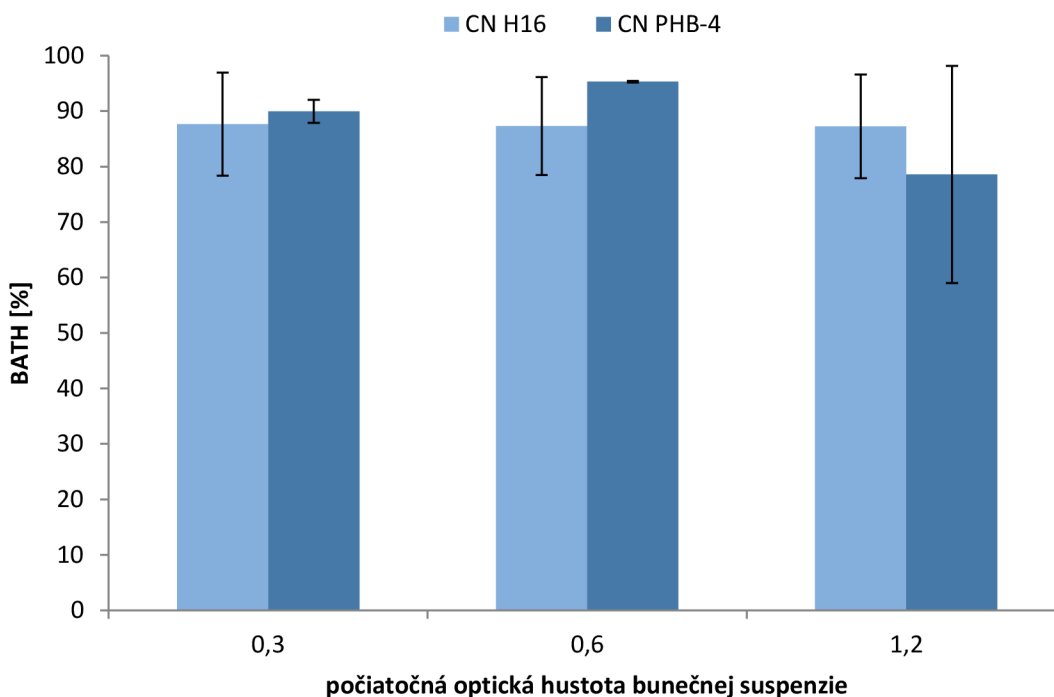
Pred realizáciou experimentov sme si dali za cieľ nájsť odpovede na nasledujúce otázky. Je možné použitím tejto techniky BATH popísať hydrofóbne respektíve hydrofilné vlastnosti bakteriálnych buniek? Sú vôbec bakteriálne bunky natoľko hydrofóbne aby prešli do olejovej fázy alebo sa sorbovali na rozhranie fáz? Pri akom type prostredia dochádza k zvýšenému prestupu buniek z hydrofilného do hydrofóbného prostredia alebo k sorbcii na rozhranie? Ktorý bakteriálny kmeň prestupuje do hydrofóbného prostredia alebo sa sorbuje vo vyššej miere?

Pri pozorovaní bakteriálnych buniek pripravených z jedného vodného buncného roztoku je vidieť, že ich správanie sa v jednotlivých prostrediach javí rozdielne. Na nasledujúcich grafoch je zobrazená závislosť BATH na koncentráciách buncného roztoku a použitom hydrofóbnom médiu. Na ose y je miera adsorpcie bakteriálnych buniek, ktorá vyjadruje percentuálne množstvo buniek prešlých z hydrofilného vodného roztoku do hydrofóbného prostredia oleja alebo sa nasorbovalo na rozhranie. Hodnoty adsorpcie či prechodu sú pomerne vysoké v oboch typoch média pri všetkých zvolených koncentráciách. Možno usúdiť, že nami použitá technika je skutočne vhodná k popisu hydrofóbných respektíve hydrofilných vlastností bakteriálnych buniek a taktiež k vyčísleniu hodnoty miery prestupu.

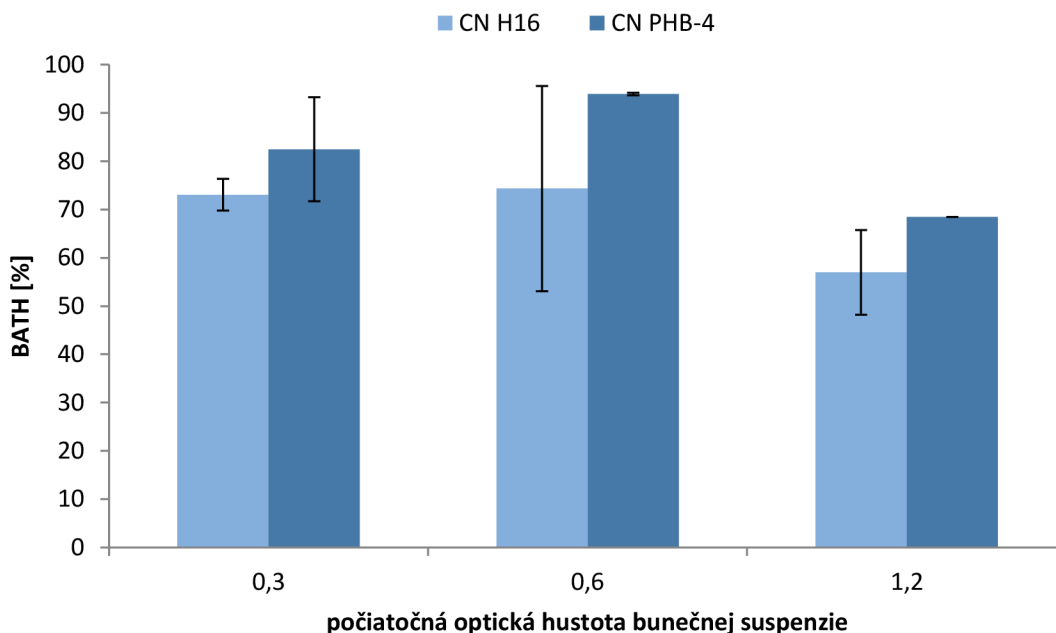
Na ose x sú znázornené tri rozdielne koncentrácie roztokov, ktoré sme si stanovili kvôli tomu, aby sme určili či je táto technika obmedzená len na určité koncentrácie buncného roztoku. Možno povedať, že v prípade vysokoúčinného činidla nie je nakoľko pri všetkých troch koncentráciách došlo k pomerne vysokému prechodu. V našom prípade sa ako vysokoúčinné médium javí minerálny olej a ako menej účinné vystupuje hexadekán. Pri menej účinnom činidle je pozorovaná určitá závislosť na koncentrácii roztoku. Pri najvyššej zvolenej počiatočnej optickej hustote buncného roztoku poklesla hodnota účinnosti média – hexadekánu o značnú mieru. V prípade minerálneho oleja pozorujeme vysokú účinnosť pri všetkých troch použitých koncentráciách. Pri prechode baktérií do hydrofóbného prostredia a ich sorbovaníu na rozhranie je teda voľba vhodného účinného nepolárneho média veľmi dôležitá.

Pri následnom pozorovaní správania sa nami študovaných bakteriálnych kmeňov v dvoch rozdielnych médiách je možné vidieť, že jednotlivé kmene sa správajú rozdielne. Bakteriálny kmeň *Cupriavidus necator* H16 javí značne vyššiu tendenciu prechádzať do oleja minerálneho pričom miera prestupu do hydrofóbného prostredia nadobúda hodnoty vyššie než 87%. V prípade hexadekánu nadobúda miera prestupu hodnoty od 56 – 75 % z ktorých vidieť, že bunky aj v tomto prostredí prejavujú svoje hydrofóbne vlastnosti hoci v nižšej miere než u účinnejšieho minerálneho prostredia. Bakteriálny kmeň *Cupriavidus necator* PHB -4 sa adsorbuje do prostredia hexadekánu výraznejšie než *Cupriavidus necator* H16 a hodnoty miery prestupu sa pohybujú v rozmedzí 68 – 94%. V prostredí minerálneho oleja je hodnota BATH 78 – 96%. Možno zhrnúť, že bakteriálny kmeň *Cupriavidus necator* H16 preferuje viac ako hydrofóbne prostredie minerálny olej a kmeň *Cupriavidus necator* PHB-4 prostredie hexadekánu. V oboch typoch média došlo k prestupu bakteriálnych buniek – bunky prejavili svoju schopnosť hydrofobicity v obidvoch prostrediach. Pri vzájomnom porovnaní

hydrofóbných vlastností bakteriálnych kmeňov možno podotknúť, že bakteriálny kmeň *Cupriavidus necator* PHB-4 javí výraznejšiu schopnosť preferovať hydrofóbne olejové prostredie.



Obrázok 11: Miera adsorpcie bakteriálnych buniek po vytrepaní do prostredia minerálneho oleja.

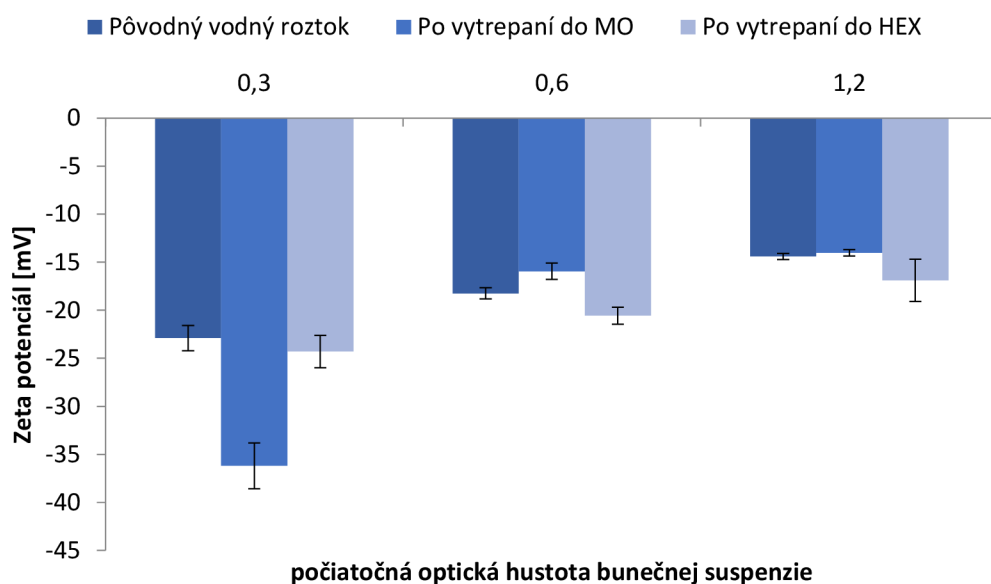


Obrázok 12: Miera adsorpcie bakteriálnych buniek po vytrepaní do prostredia hexadekánu.

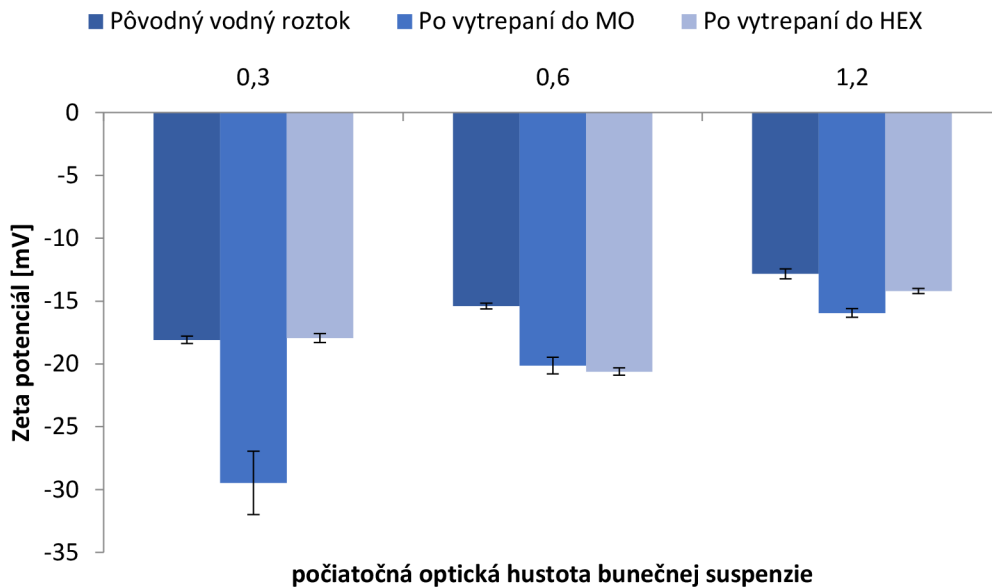
Nasledujúce dva grafy popisujú závislosť veličiny Zeta potenciálu vodnej suspenzie po BATH teste na počiatkovej koncentrácii suspenzie pred pretrepaním. Na ose y je veličina Zeta potenciál, ktorá vyjadruje číselnú hodnotu veľkosti náboja na povrchu bakteriálnych buniek vyskytujúcich sa v študovanej fáze. Hodnota náboja hovorí o tom, aké bude správanie sa jednotlivých bakteriálnych buniek v danom prostredí – popisuje akou mierou sa budú bakteriálne bunky v prostredí odpudzovať prípadne zhlukovať. Schopnosť buncenaj agregácie je veľmi podstatnou vlastnosťou napríklad pri tvorbe biofilmu na rozhraní.

Na ose x sú znázornené opäť tri rozdielne koncentrácie vodných buněčných suspenzií po vytrepaní do minerálneho oleja a hexadekánu. Z grafického vyjadrenia popisovanej závislosti je zrejmé, že veľkosť povrchového náboja buniek v prostredí pôvodného vodného roztoku klesá s narastajúcou hodnotou koncentrácie pri oboch študovaných bakteriálnych kmeňoch – čím koncentrovanejší pôvodný vodný roztok máme, tým nižšia je hodnota povrchového náboja. Možno tvrdiť, že pri koncentrácii pôvodného vodného roztoku $0,3 \text{ mol.l}^{-1}$ sú bakteriálne bunky v tomto roztoku voči agregácii najstabilnejšie. Táto závislosť je výraznejšia pri bakteriálnom kmeni *Cupriavidus necator* H16. Pri pozorovaní povrchového náboja v prípade baktérie *Cupriavidus necator* H16 možno usúdiť, že po vytrepaní do hexadekánu došlo k navýšeniu povrchového náboja. Výrazné navýšenie povrchového náboja je v prípade bakteriálneho kmeňa *Cupriavidus necator* PHB-4 zaznamenané vo vodnej suspenzii buniek po vytrepaní do minerálneho oleja. Zvýšenie hodnoty povrchového náboja spôsobí u bakteriálnych buniek zvýšenú schopnosť odpudzovať sa a tým pádom zníženú schopnosť agregovať.

Pozorovali sme dva odlišné bakteriálne kmene a ich správanie sa vo vodných suspenziách získaných po vytrepávaní do jednotlivých olejových prostredí značne líšilo. V jednom prostredí, u nami študovaných baktérií vždy rozdielnom prostredí, dochádza vždy pri všetkých troch koncentráciách k nárastu povrchového náboja a v druhom prostredí dochádza aj k nárastu aj k poklesu náboja čo v súčasnosti nie sme schopní vysvetliť.

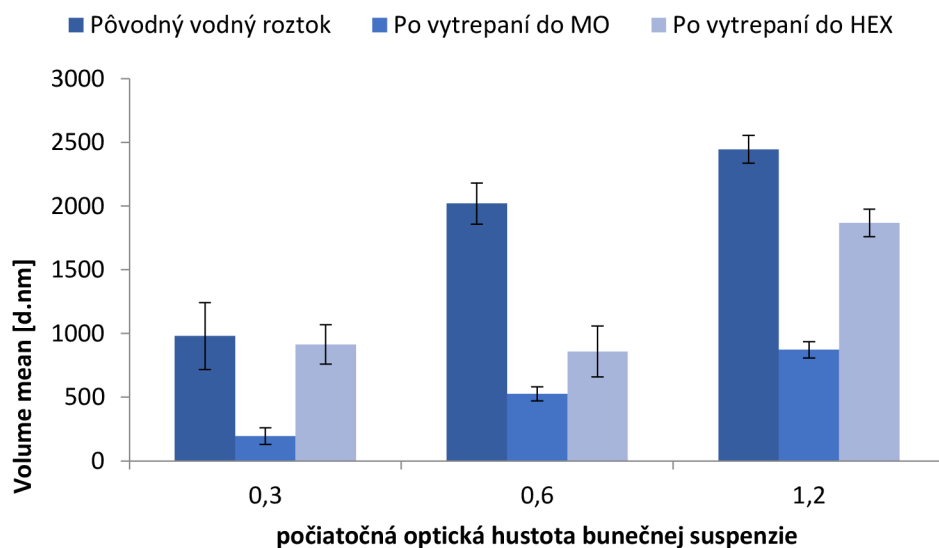


Obrázok 13: Veľkosť povrchového náboja bakteriálnych buniek *Cupriavidus necator* H16 v závislosti na počiatkovej optickej hustote pôvodnej vodnej suspenzie a po vytrepaní do hexadekánu a minerálneho oleja.

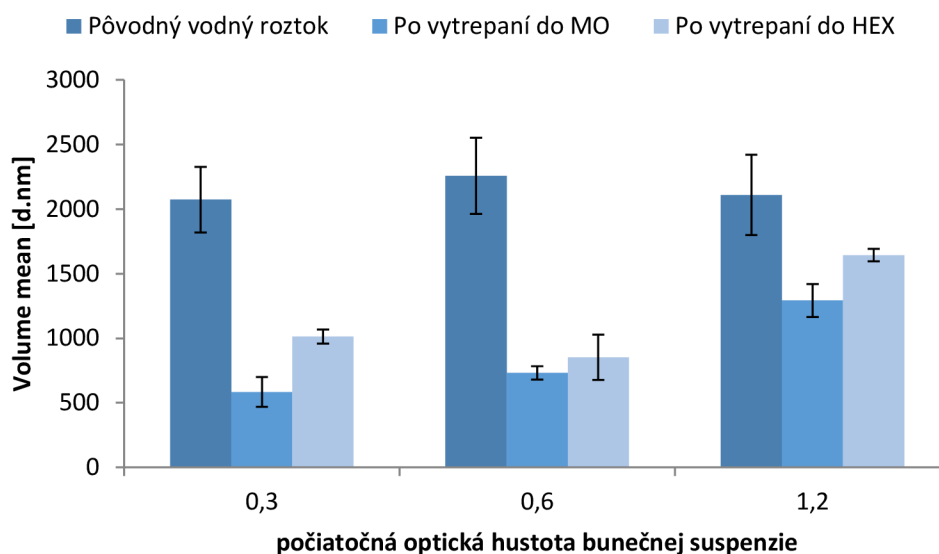


Obrázok 14: Veľkosť povrchového náboja bakteriálnych buniek *Cupriavidus necator* PHB-4 v závislosti na počiatocnej optickej hustote pôvodnej vodnej suspenzie a po vytrepaní do hexadekánu a minerálneho oleja.

Nasledujúce dva grafy popisujú závislosť veličiny, ktorá predstavuje veľkosť bakteriálnych buniek na koncentrácii a druhu použitého prostredia v ktorom sa bakteriálne bunky nachádzajú. Obidva pozorované bakteriálne kmene sa správajú zhodne. S narastajúcou koncentráciou pôvodného vodného roztoku veľkosti bakteriálnych buniek narastajú. Možno usúdiť, že dochádza k určitej agregácii. Pri vytrepávaní do hydrofóbnej fázy (hexadekánu alebo minerálneho oleja) došlo k značnému poklesu veľkosti buniek vo vodnej fáze. Tieto výsledky naznačujú, že preferenčne sa do hydrofóbného prostredia absorbujú (prípadne adsorbujú na rozhranie) najväčšie alebo agregované bunky.



Obrázok 15: Veľkosť buniek bakteriálneho kmeňa *Cupriavidus necator* H16 v závislosti na počiatocnej optickej hustote pôvodnej vodnej suspenzie a po vytrepaní do hexadekánu a minerálneho oleja.

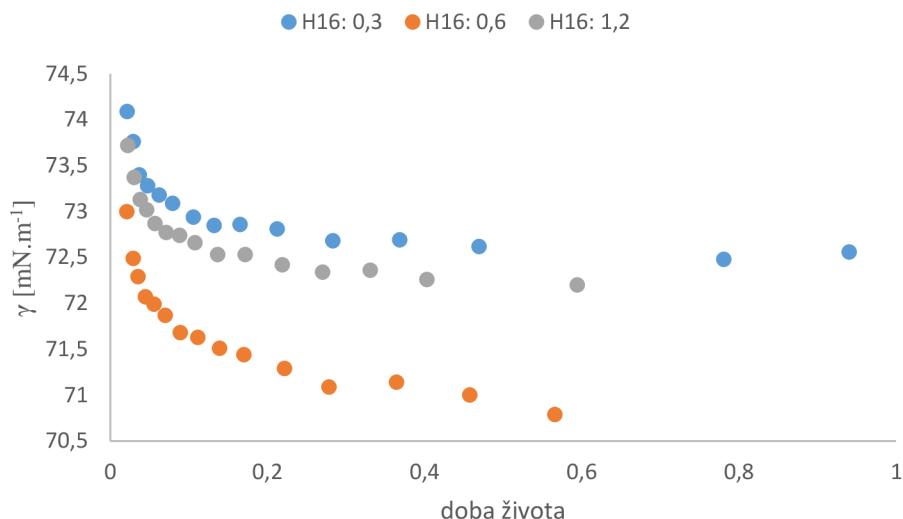


Obrázok 16: Veľkosť buniek bakteriálneho kmeňa *Cupriavidus necator* PHB-4 v závislosti na počiatkovej optickej hustote pôvodnej vodnej suspenzie a po vytrepaní do hexadekánu a minerálneho oleja.

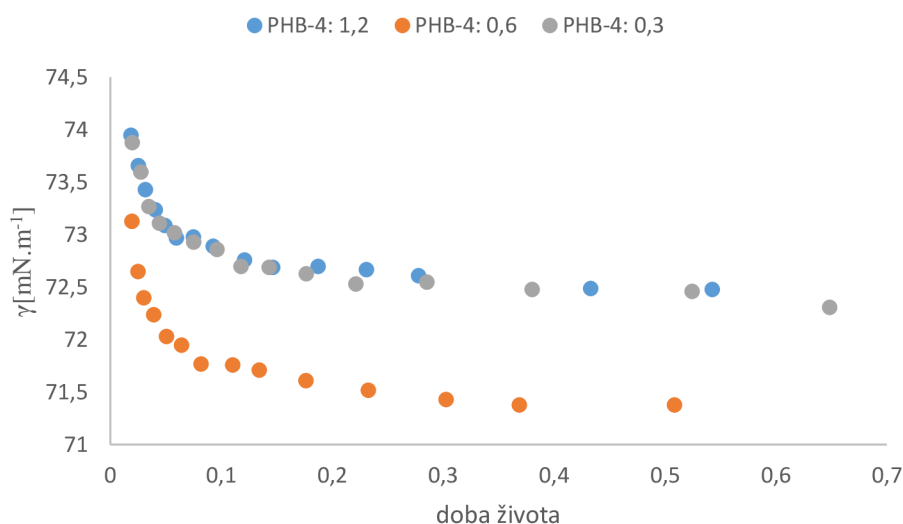
5.2 Meranie povrchového napätia

Pri stanovení napätia nás zaujímala hodnota povrchového napätia na hladine, kde by sa mohol vytvoriť biofilm a hodnota napätia na vzduchovej bubline počas sorpcie buniek a či je vôbec týmito metódami možné určiť hydrofóbne respektive hydrofilné vlastnosti porovnávaných baktérii.

Pri pozorovaní experimentov prvej techniky – BPA sorpcia buniek znižovala povrchové napätie na povrchu vzduchovej bubliny spočiatku výrazne, ale po nasorbovaní určitého množstva bakteriálnych buniek sa hodnota napätia výraznejšie nemenila. Adsorbovali sa bunky z hydrofilného vodného roztoku, ktoré preferovali hydrofóbne prostredie povrchu vzduchovej bubliny. Nasledujúce dva grafy vyjadrujú závislosť napätia γ vyjadreného na ose y na dobe života vyjadrenej na ose x u jednotlivých baktérii. Počiatkový pokles v oboch grafoch vyjadruje mieru rýchlosti adsorpcie. Je vidieť, že pri všetkých troch koncentráciach vodných suspenzií bakteriálnych buniek je rýchlosť poklesu rovnaká a k ustáleniu hodnoty povrchového napätia ďalej už prakticky nezávislej na dobe života bunky dochádza viacmenej pri rovnakých hodnotách doby života. Možno konštatovať, že koncentrácia roztoku buniek neovplyvňuje rýchlosť adsorpcie bakteriálnych buniek na hydrofóbny povrch vzduchovej bubliny.

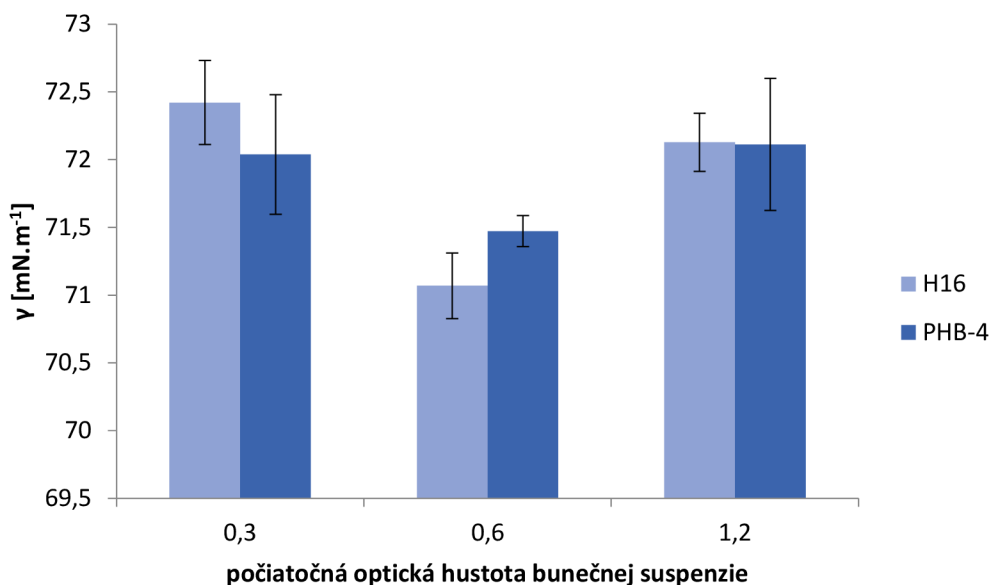


Obrázok 177: Závislosť napätia na dobe života u bakteriálneho kmeňa *Cupriavidus necator* H16.



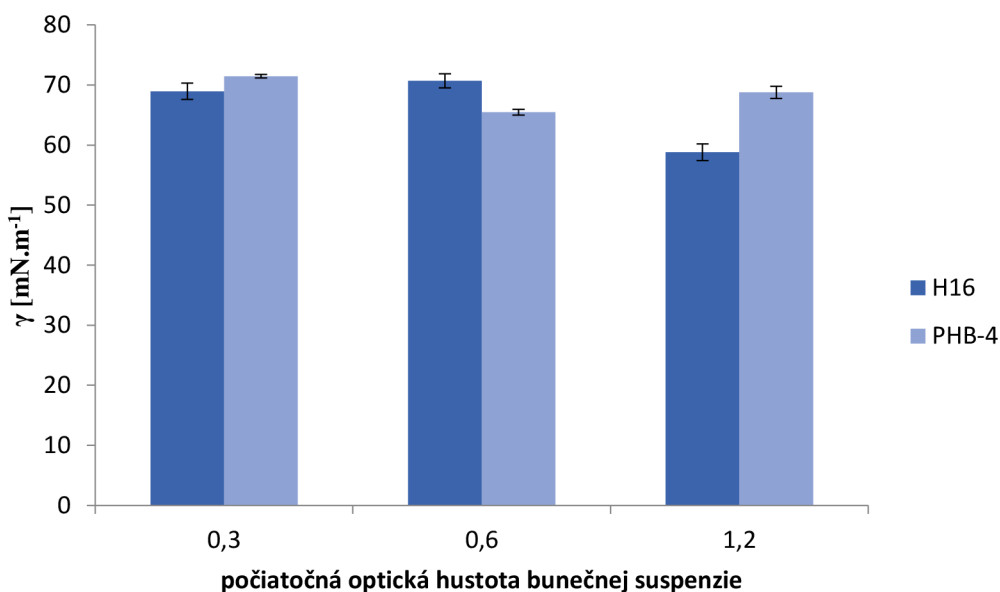
Obrázok 188: Závislosť napätia na dobe života u bakteriálneho kmeňa *Cupriavidus necator* PHB-4.

Nasledujúci graf popisuje závislosť hodnoty priemerného povrchového napätia v oblasti nezávislosti na dobe života bubliny na počiatocnej optickej hustote. Je vidieť, že najnižšiu hodnotu napätia na povrchu hydrofóbnej bubliny dosahujú u oboch bakteriálnych kmeňov bunky s počiatocnou hodnotou optickej hustoty vodného roztoku 0,6. Možno predpokladať, že bunky s hodnotou optickej hustoty pôvodného roztoku 0,6 javia najvyššiu tendenciu adsorpcie na hydrofóbny povrch a tým teda prejavujú hydrofóbnejšie vlastnosti než ďalšie dve porovnávané pôvodné optické hustoty. Adsorpcia na hydrofóbny povrch prebieha u jednotlivých kmeňov podobne. Pri hodnotách optickej hustoty 0,3 a 1,2 sa adsorbuje na povrch bubliny baktérie *Cupriavidus necator* PHB-4 o niečo viac než *Cupriavidus necator* H16, ktorý sa naopak sorboval výraznejšie pri 0,6. Možno predpokladať, že nasorbované množstvo buniek závisí na bakteriálnom kmeni a na počiatocnej optickej hustote buncenej suspenzie.



Obrázok 19: Závislosť napätia na počiatkovej optickej hustote bunečnej suspenzie u oboch bakteriálnych kmeňov.

Využitím metódy odtrhnutia prstenca sme sa pokúsili stanoviť napätia na povrchu vodného roztoku buniek. Povrchové napätie je výsledkom vzájomnej interakcie príťažlivých síl bakteriálnych buniek, ktoré tvoria povrchovú vrstvu. Povrchové napätie je efekt, kedy sa povrch pokúša dosiahnuť stav s najnižšou energiou. Maximálnu hodnotu povrchového napätia pozorujeme v prípade *Cupriavidus necator* PHB-4 pri počiatkovej optickej hustote bunečnej suspenzie 0,3 a v prípade *Cupriavidus necator* H16 pri hodnote 0,6. Čím je nižšia hodnota povrchového napätia, tým silnejšie sú jednotlivé interakcie pôsobiace na bakteriálne bunky v povrchovej vrstve.

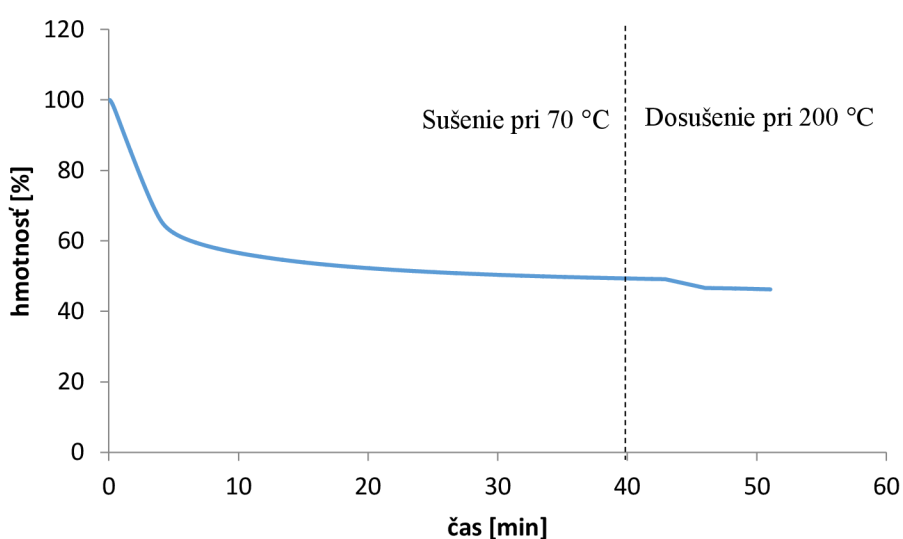


Obrázok 19: Závislosť napätia na počiatkovej optickej hustote získaná metódou odtrhávania prstenca.

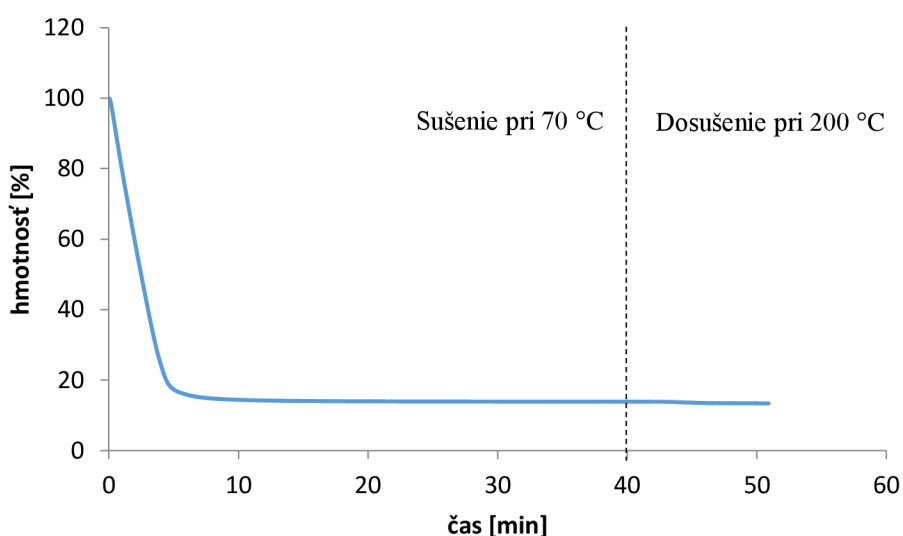
5.3 Termogravimetrická analýza

Širokospektrálne využitie termogravimetrie nám vnuklo otázku, či je možné prostredníctvom termogravimetrickej analýzy popísať správanie sa vody vnútri bakteriálnych buniek alebo vody vyskytujúcej sa v tesnom kontakte s povrchom bunky. Je možné porovnať viazanie, správanie sa vody u dvoch odlišných typov bakteriálnych buniek?

Nasledujúce dva grafy popisujú závislosť hmotnosti vyjadrenej na ose y na čase vyjadrenom na ose x . Obidva grafy sú získané z merania pri kontinuálnom ohreve vzduchom na teplotu 70°C . Vo všeobecnosti sa takéto krivky označujú ako sušiacie krivky. Znázorňujú priebeh ubúdania hmotnosti s časom. Prudký pokles na začiatku grafu poukazuje na najvyššiu rýchlosť sušenia. Rýchlosť sušenia vyjadruje dotyčnica ku grafu. Pokles, odskok na konci sušiackej krivky (čas > 40 min) znamená dodatočné vysušenie pri teplote 200°C .



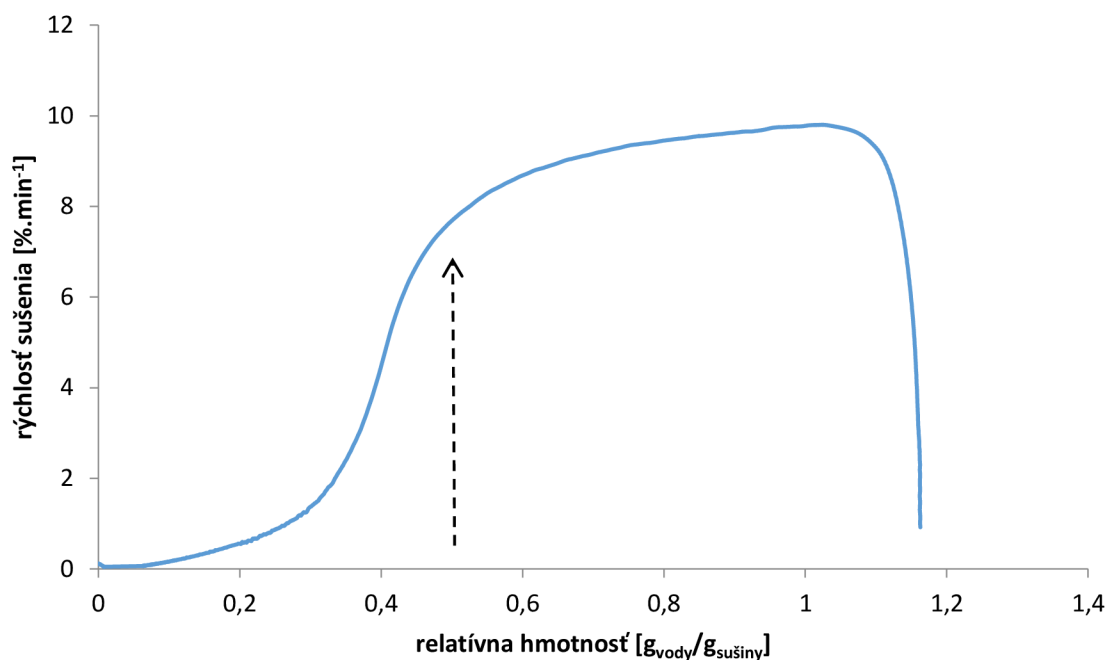
Obrázok 20: Sušiacia krivka *Cupriavidus necator* H16 pri teplote 70°C .



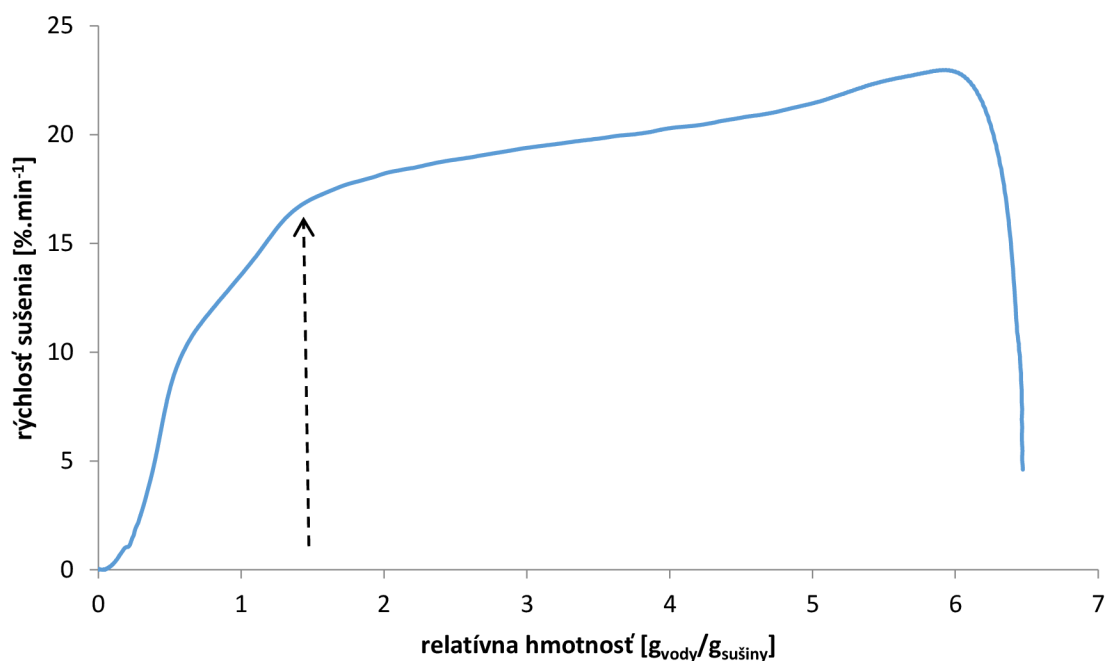
Obrázok 21: Sušiacia krivka *Cupriavidus necator* PHB-4 pri teplote 70°C .

Z porovnania priebehu sušiacich kriviek u oboch bakteriálnych kmeňov je možné vidieť, že v prípade *Cupriavidus necator* PHB-4 je počiatkový pokles krivky značne strmší z čoho vyplýva, že rýchlosť sušenia je v prípade *Cupriavidus necator* PHB-4 vyššia než u *Cupriavidus necator* H16. Pri analýze je potrebné mať na pamäti, že v priebehu tohto sušiaceho procesu sa zo vzorky odstraňuje voda, ktorej relatívny obsah je v oboch vzorkách rôzny (v dôsledku výskytu PHB vo vzorke kmeňa *Cupriavidus necator* H16). Týmto rozdielom je následne zaťažená aj okamžitá zmena relatívnej hmotnosti vzorky, preto bez korekcie na relatívnu hmotnosť vody vo vzorke nie je možné rýchlosti sušenia medzi oboma kmeňmi priamo porovnávať.

Z tohoto dôvodu boli sušiacie krivky vynášané vo forme doporučenej E. B. Alcázarom a kol. v referencii [32]. Na základe znalosti celkového obsahu vody v bunkách (vypočítanej z reziduálnej hmotnosti vzorky po dosušení pri 200 °C) bol stanovený aktuálny obsah vody vzťahnutý na jednotkovú hmotnosť sušiny a bola graficky vynesena rýchlosť sušenia (časová derivácia relatívnej hmotnosti vzorky) na tomto relatívnom obsahu vody (v $g_{\text{vody}}/g_{\text{sušiny}}$). Príklad takto vynesenej závislosti je uvedený na Obr. 23 a 24 (sušenie pri 70 °C). Nasledujúce dve závislosti popíšeme smerom zprava do ľava (v smere klesajúceho relatívneho obsahu vody vo vzorke). Záverečná lineárna časť priamky popisuje nahrievanie prístroja. Rýchlosť sušenia v čase rastie s ustáľovaním konštantnej teploty sušenia. Následne začína dochádzať k úbytku hmotnosti všetkej vody, ktorá je nejak spojená s povrchom bunky až pokiaľ sa krivka nedostane do bodu prechodu. Od bodu prechodu pozorujeme úbytok hmotnosti vo vnútrobunecnej vode, ktorá je ťažšie prístupná a pokles krivky je výrazne strmší (čo charakterizuje pokles rýchlosti sušenia v čase). Bod prechodu bol zostrojený pomocou programu OriginPro 7.5 ako prienik dvoch lineárnych úsečiek. Jedna úsečka predstavuje dotyčnicu k poklesu hmotnosti povrchovej vody a druhá úsečka dotyčnicu k poklesu hmotnosti vo vnútri – bod prechodu poskytuje informáciu o tom, koľko intracelulárnej vody je obsiahnutej v bunke.



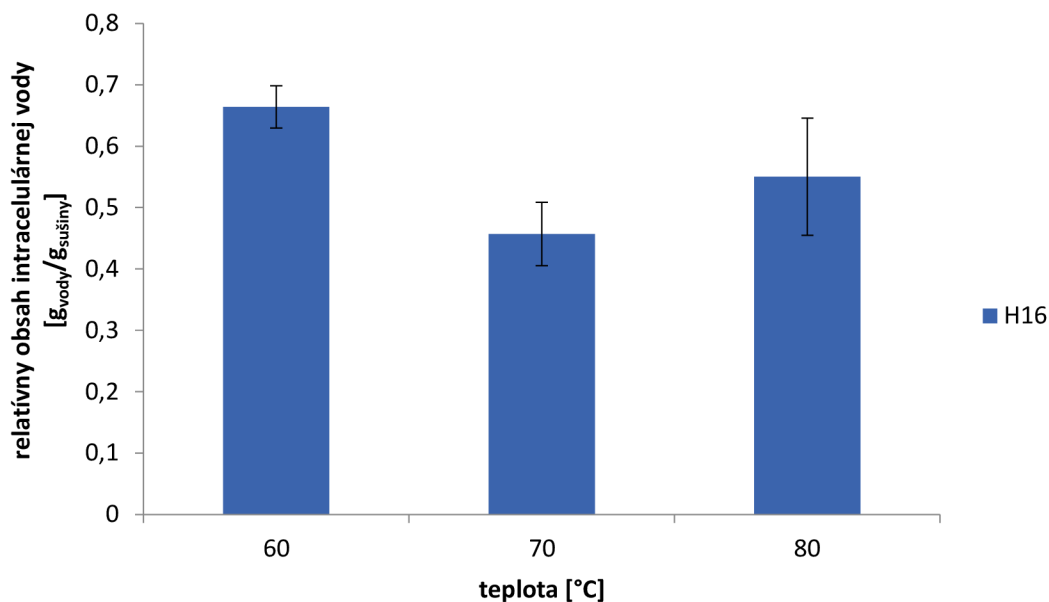
Obrázok 223: Závislosť rýchlosti sušenia vzorky *Cupriavidus necator* H16 na relatívnom obsahu vody vo vzorke. Sušenie prebiehalo pri 70 °C. Šípkou je označený bod prechodu medzi sušením intracelulárnej a extracelulárnej vody.



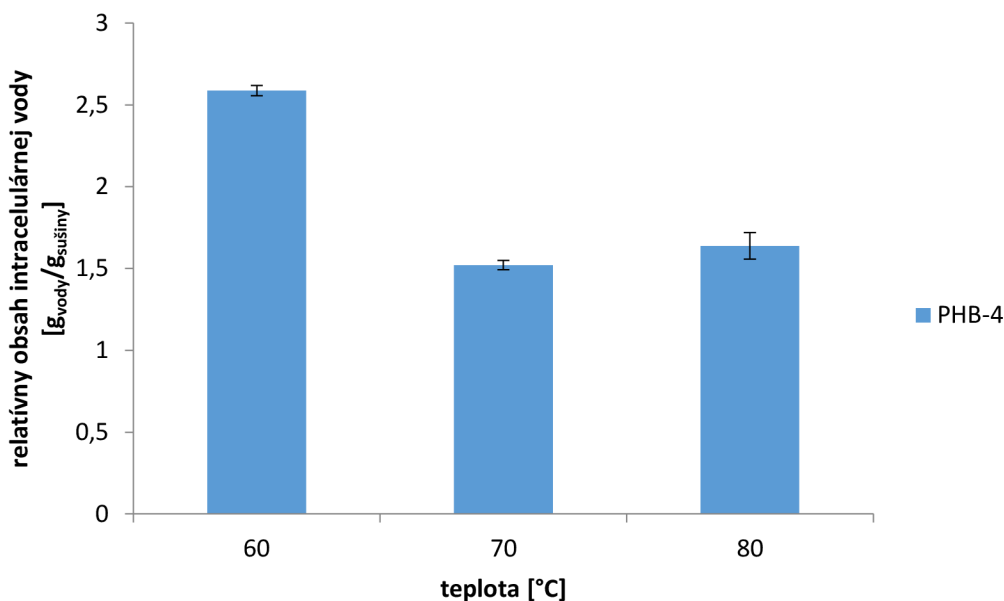
Obrázok 234: Závislosť rýchlosti sušenia vzorky u *Cupriavidus necator* PHB-4 na relatívnom obsahu vody vo vzorke. Sušenie prebiehalo pri 70 °C. Šípkou je označený bod prechodu medzi sušením intracelulárnej a extracelulárnej vody.

Pri porovnaní vyššie uvedených dvoch grafických závislostí je vidieť, že bakteriálny kmeň *Cupriavidus necator* PHB-4 obsahuje viac vody vo vnútri bunky než *Cupriavidus necator* H16 nakoľko obsahuje vo svojej cytoplazme menej sušiny. *Cupriavidus necator* H16 obsahuje

granule produkujúce polymér a suchá hmotnosť sušiny je teda o niečo vyššia než u *Cupriavidus necator* PHB-4.



Obrázok 245: Závislosť relatívneho obsahu intracelulárnej vody na teplote sušenia u *Cupriavidus necator* H16.



Obrázok 256: Závislosť relatívneho obsahu intracelulárnej vody na teplote sušenia u *Cupriavidus necator* PHB-4.

Možno usúdiť, že metóda je na štúdium bunečnej vody vhodná. Čo sa týka závislosti na podmienkach, tak záleží na nastavených teplotných programeoch, ale nezáleží na množstve pôvodnej vzorky nakoľko sledujeme relatívnu zmenu hmotnosti. Taktiež možno túto metódu použiť pre posúdenie množstva vody viazanej na povrch alebo vnútro bunky u rozdielnych kmeňov baktérií.

6. ZÁVER

Táto bakalárska práca je zameraná na využitie metód fyzikálno – chemickej analýzy použiteľných k získaniu informácií o vode viazanej priamo vnútri bakteriálnych buniek alebo o vode, ktorá sa vyskytuje v tesnom kontakte s ich povrchom. Na základe vypracovanej literárnej rešerše a dostupného prístrojového vybavenia fakulty chemickej bolo vybratých päť metód, ktoré by nám teoreticky mohli dopomôcť k získaniu požadovaných informácií. Pri experimentoch boli používané bakteriálne bunky *Cupriavidus necator* PHB-4 a *Cupriavidus necator* H16.

Prvá metóda, ktorou sme sa zaoberali bola technika BATH. Zaujímalo nás najmä či je možné pomocou tejto techniky popísať hydrofóbne respektíve hydrofilné vlastnosti bakteriálnych buniek a či sú vôbec bakteriálne bunky natoľko hydrofóbne aby prešli do olejovej fázy alebo sa sorbovali na rozhranie fáz. Realizácia tohoto testu spočívala vo vytrepávaní buniek z hydrofilnej vodnej fázy do hydrofóbnej olejovej fázy. Správanie buniek - ich prechod prípadne sorbcia na rozhranie boli pozorované spektrofotometricky. Získané hodnoty adsorpcie či prechodu sú pomerne vysoké v oboch typoch média pri všetkých zvolených koncentráciách. Možno usúdiť, že nami použitá technika je skutočne vhodná k popisu hydrofóbných respektíve hydrofilných vlastností bakteriálnych buniek a taktiež k vyčísleniu hodnoty miery prestupu. Keďže sme zistili, že je metóda vhodná položili sme si ďalšie otázky – pri akom type prostredia dochádza k zvýšenému prestupu buniek z hydrofilného do hydrofóbného prostredia alebo k sorbcii na rozhranie a ktorý bakteriálny kmeň prestupuje do hydrofóbného prostredia alebo sa sorbuje vo vyššej miere.

Pri pozorovaní správania sa bakteriálnych kmeňov v dvoch rozdielnych médiách bolo pozorované, že v oboch typoch média došlo k prestupu bakteriálnych buniek – bunky prejavili svoju schopnosť hydrofobicity. Pri vzájomnom porovnaní hydrofóbných vlastností bakteriálnych kmeňov možno povedať, že bakteriálny kmeň *Cupriavidus necator* PHB-4 javí výraznejšiu schopnosť preferovať hydrofóbne olejové prostredie. Bakteriálny kmeň *Cupriavidus necator* H16 prejavuje vyššiu tendenciu prechádzať do oleja minerálneho – miera prestupu do hydrofóbného prostredia nadobúda hodnoty vyššie než 87% a v prípade hexadekánu nadobúda hodnoty od 56 – 75 %. Bakteriálny kmeň *Cupriavidus necator* PHB-4 sa adsorbuje do prostredia hexadekánu výraznejšie a hodnoty miery prestupu sa pohybujú v rozmedzí 68 – 94% a v prostredí minerálneho oleja 78 – 96%. Bakteriálny kmeň *Cupriavidus necator* H16 preferuje ako hydrofóbne prostredie minerálny olej a kmeň *Cupriavidus necator* PHB-4 prostredie hexadekánu. Zaujímalo nás, či je táto technika obmedzená len na určité koncentrácie buncného roztoku. Pracovali sme s tromi rozdielnymi počiatočnými hustotami buncnej suspenzie. V prípade vysokoúčinného činidla – minerálny olej nie je nakoľko pri všetkých troch koncentráciách došlo k pomerne vysokému prechodu. Pri menej účinnom činidle – hexadekan je pozorovaná určitá závislosť na koncentrácii roztoku. Pri najvyššej zvolenej počiatočnej optickej hustote buncného roztoku poklesla hodnota účinnosti média – hexadekánu o značnú mieru. Pri prechode baktérií do hydrofóbného prostredia a ich sorbovaní na rozhranie je voľba vhodného účinného nepolárneho média veľmi dôležitá.

Kvôli schopnosti agregácie sme zamerali na meranie povrchového náboja. Zvýšenie hodnoty povrchového náboja spôsobí u buniek zvýšenú schopnosť odpudzovať sa a tým zníženú schopnosť agregovať. V našom pozorovaní sa v jednom prostredí, u študovaných baktérií vždy rozdielnom, dochádza vždy pri všetkých troch koncentráciách k nárastu povrchového náboja a v druhom prostredí dochádza aj k nárastu aj k poklesu náboja čo v súčasnosti nie sme schopní vysvetliť.

Zaujímalo nás taktiež čo sa deje s veľkosťou buniek pri rozdielnych pôvodných koncentráciách vodnej suspenzie a či sa veľkosť buniek po vytrepaní do hydrofóbného prostredia mení. Zistili sme, že s narastajúcou koncentráciou pôvodného vodného roztoku veľkosti bakteriálnych buniek narastajú – predpokladáme určitú agregáciu. Pri vytrepávaní do hydrofóbnej fázy (hexadekánu alebo minerálneho oleja) došlo k poklesu veľkosti buniek vo vodnej fáze – tieto výsledky naznačujú, že preferenčne sa do hydrofóbného prostredia absorbujú (prípadne adsorbujú na rozhranie) najväčšie alebo agregované bunky.

Ďalšími zvolenými metódami boli metódy merania povrchového a medzifázového napätia technikami – analýzy maximálneho tlaku v bubline a merania napätia technikou odtrhávania prstenca. Pri stanovení napätia sme zistili, že pri všetkých troch koncentráciách vodných suspenzií buniek je rýchlosť poklesu rovnaká a k ustáleniu hodnoty povrchového napätia ďalej už prakticky nezávislej na dobe života bunky dochádza viacmenej pri rovnakých hodnotách doby života – koncentrácia roztoku buniek neovplyvňuje rýchlosť adsorpcie buniek na hydrofóbný povrch vzduchovej bubliny. Pri hodnotách optickej hustoty 0,3 a 1,2 počiatočnej suspenzie sa adsorbujú na povrch bubliny baktérie *Cupriavidus necator* PHB-4 viac než *Cupriavidus necator* H16, ktorý sa sorboval výraznejšie pri 0,6 – nasorbované množstvo buniek závisí na bakteriálnom kmeni a na počiatočnej optickej hustote buncenej suspenzie. Pomocou odtrhávania prstenca sme maximálnu hodnotu povrchového napätia namerali v prípade *Cupriavidus necator* PHB-4 pri počiatočnej optickej hustote buncenej suspenzie 0,3 a v prípade *Cupriavidus necator* H16 pri hodnote 0,6. Čím je nižšia hodnota povrchového napätia, tým silnejšie sú jednotlivé interakcie pôsobiace na bakteriálne bunky v povrchovej vrstve.

Ďalšou metódou bola termogravimetrická analýza, ktorú sme zvolili najmä za účelom stanovenia intracelulárnej vody. Zo záznamu TG – kriviek sme spozorovali, že bakteriálny kmeň *Cupriavidus necator* PHB-4 obsahuje viac vody vo vnútri bunky než *Cupriavidus necator* H16 nakoľko obsahuje vo svojej cytoplazme menej sušiny (CN H16 obsahuje granule produkujúce polymér a suchá hmotnosť sušiny je teda o niečo vyššia). Pri nižších teplotách je možné určiť body prechodu a určiť tak jednotlivé množstvá intracelulárnej a vonkajšej vody. Pri realizácii analýzy závisí na nastavených teplotných programoch a nezávisí na množstve pôvodnej vzorky – sledujeme relatívnu zmenu hmotnosti. Túto metódu možno použiť pre posúdenie množstva vody viazanej na povrch alebo vnútro bunky u rozdielnych kmeňov baktérií.

Na záver možno podotknúť, že všetky štyri nami zvolené techniky je možné použiť k stanoveniu vlastností vody. Prvé tri metódy - BATH, metóda analýzy maximálneho tlaku v bubline a odtrhávanie prstenca poslúžili k popisu hydrofilných respektive hydrofóbných vlastností a interakcií pôsobiacich v povrchovej vrstve. Štvrtá technika TGA poskytla informácie o množstve vody v bunke a o jej naviazaní.

7. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] AMBROŽOVÁ, Jana. Mikrobiologie v technologii. 2nd. Praha: VŠCHT Praha, 2008. ISBN 978-80-7080-676-0.
- [2] RÜHS, P.A., L. BÖCKER, R.F. INGLIS a P. FISCHER. Studying bacterial hydrophobicity and biofilm formation at liquid–liquid interfaces through interfacial rheology and pendant drop tensiometry. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2014, 117, 174-184 [cit. 2016-04-30]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.02.023. ISSN 09277765. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776514000903>
- [3] *Oil and Petrochemical Pollution* [online]. 1985, 2(3) [cit. 2016-04-30]. ISSN 01437127. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143712785901784>
- [4] SVOBODA, Emanuel. Přehled středoškolské fyziky. 4. PROMETHEUS, 2006. ISBN 978-80-7196-307-3.
- [5] Povrchové napätie. Wikipédia [online]. [cit. 2016-05-01]. Dostupné z: https://sk.wikipedia.org/wiki/Povrchov%C3%A9_nap%C3%A4tie
- [6] GOHAD, Neha. Surface Tension Meaning and Practical Applications. In: BUZZLE [online]. [cit. 2016-04-30]. Dostupné z: <http://www.buzzle.com/articles/surface-tension-meaning-and-practical-applications.html>
- [7] Bubble pressure tensiometry for pharmaceutical applications: APPLICATION NOTE 5. In: Biolin Scientific [online]. [cit. 2016-04-15]. Dostupné z: http://www.biolinscientific.com/zafepress.php?url=%2Fpdf%2FAttension%2FApplication%20Notes%2FAT_AN_5_bpapharma.pdf
- [8] Surface Tension. Biolin Scientific [online]. [cit. 2016-05-01]. Dostupné z: <http://www.biolinscientific.com/attension/applications/?card=AA17>
- [9] doc. Ing. Lída Bartovská, CSc. a doc. Ing. Marie Šišková, CSc. Co je co v povrchové a koloidní chemii [online]. 1. 2005 [cit. 2016-04-15]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/hesla/metody.odtrhavaci_metody.html
- [10] ING. DULEBOVÁ, Ludmila, PhD. TERMICKÁ ANALÝZA POLYMÉRNÝCH KOMPOZITOV: THERMAL ANALYSES OF POLYMER COMPOSITES [online]. 2013, , 130 - 133 [cit. 2016-05-01]. Dostupné z: <https://www.sjf.tuke.sk/transferinovacii/pages/archiv/transfer/26-2013/pdf/130-134.pdf>
- [11] ŠTARHA, Pavel a Zdeněk TRÁVNIČEK. Termická analýza [online]. Olomouc, 2011 [cit. 2016-01-06]. Dostupné z: http://agch.upol.cz/userfiles/file/pdf/Termicka_analyza.pdf
- [12] KUČERÍK, Jiří. Termická analýza – termogravimetrie (TGA) [online]. 2011 [cit. 2016-05-01]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/kucerik-1>

- [13] BUC, Milan. Základná a klinická imunológia. Bratislava: Veda, 2012. ISBN 978-80-224-1235-3.
- [14] NICOLSON, Garth L. The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40years. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 2014, 1838(6), 1451-1466 [cit. 2016-05-10]. DOI: 10.1016/j.bbamem.2013.10.019. ISSN 00052736. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273613003933>
- [15] ARIKAWA, Hisashi, Shunsuke SATO, Tetsuya FUJIKI a Keiji MATSUMOTO. A study on the relation between poly(3-hydroxybutyrate) depolymerases or oligomer hydrolases and molecular weight of polyhydroxyalkanoates accumulating in *Cupriavidus necator H16* [online]. [cit. 2016-05-09]. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.04.004. ISBN 10.1016/j.jbiotec.2016.04.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165616301766>
- [16] TIAN, Jiamin, Anthony J. SINSKEY a JoAnne STUBBE. *Kinetic Studies of Polyhydroxybutyrate Granule Formation in Wautersia eutropha H16 by Transmission Electron Microscopy* [online]. [cit. 2016-05-09]. DOI: 10.1128/JB.187.11.3814-3824.2005. Dostupné z: <http://jb.asm.org/content/187/11/3814.full>
- [17] PARK, Jong, Tae KIM a Sang LEE. Genome-scale reconstruction and in silico analysis of the *Ralstonia eutropha* H16 for polyhydroxyalkanoate synthesis, lithoautotrophic growth, and 2-methyl citric acid production. *BMC Systems Biology*[online]. 2011, 5(1), 101- [cit. 2016-05-09]. DOI: 10.1186/1752-0509-5-101. ISSN 1752-0509. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1752-0509/5/101>
- [18] POHLMANN, Anne, Wolfgang Florian FRICKE, Frank REINECKE, et al. Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *BMC Systems Biology* [online]. 2011, 5(1), 101- [cit. 2016-05-09]. DOI: 10.1038/nbt1244. ISBN 10.1038/nbt1244. ISSN 1752-0509. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nbt1244>
- [19] CHEN, Y., H. J. BUSSCHER, H. C. VAN DER MEI a W. NORDE. Statistical Analysis of Long- and Short-Range Forces Involved in Bacterial Adhesion to Substratum Surfaces as Measured Using Atomic Force Microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2011, 77(15), 5065-5070 [cit. 2016-05-10]. DOI: 10.1128/AEM.00502-11. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.00502-11>
- [20] VAN LOOSDRECHT, MARK C. M., JOHANNES LYKLEMA, WILLEM NORDE, GOSSE SCHRAA a ALEXANDER J. B. ZEHNDER. The Role of Bacterial Cell Wall Hydrophobicity in Adhesion. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. 1987, (8). Dostupné také z: <http://aem.asm.org/content/53/8/1893.full.pdf>
- [21] ROSENBERG, Mel. Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. *FEMS Microbiology Letters*. 2006, 262(2), 129-134. DOI: 10.1111/j.1574-

6968.2006.00291.x. ISSN 03781097. Dostupné také z:
<http://femsle.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1111/j.1574-6968.2006.00291.x>

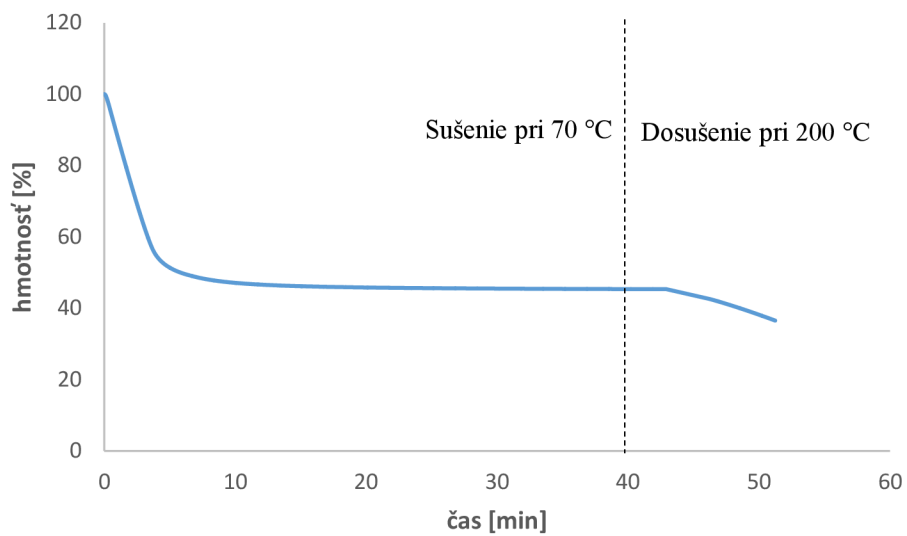
- [22] TADROS, Th.F. Fundamental principles of emulsion rheology and their applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 1994, 91, 39-55 [cit. 2016-05-11]. DOI: 10.1016/0927-7757(93)02709-N. ISSN 09277757. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/092777579302709N>
- [23] GARRETT, Trevor Roger, Manmohan BHAKOO a Zhibing ZHANG. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science* [online]. 2008, 18(9), 1049-1056 [cit. 2016-05-11]. DOI: 10.1016/j.pnsc.2008.04.001. ISBN 10.1016/j.pnsc.2008.04.001. ISSN 10020071. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1002007108002049>
- [24] FANG, Herbert H.P, Kwong-Yu CHAN a Li-Chong XU. Quantification of bacterial adhesion forces using atomic force microscopy (AFM). *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2000, 40(1), 89-97 [cit. 2016-05-11]. DOI: 10.1016/S0167-7012(99)00137-2. ISSN 01677012. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701299001372>
- [25] CHEN, M.J., Z. ZHANG a T.R. BOTT. Direct measurement of the adhesive strength of biofilms in pipes by micromanipulation. *Biotechnology Techniques* [online]. Kluwer Academic Publishers, 1998, 12(12), 875-880 [cit. 2016-05-11]. DOI: 10.1023/A:1008805326385. Dostupné z:
<http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1008805326385>
- [26] DE BARTOLO, Loredana, Sabrina MORELLI, Augustinus BADER a Enrico DRIOLI. Evaluation of cell behaviour related to physico-chemical properties of polymeric membranes to be used in bioartificial organs. *Biomaterials* [online]. 2002,23(12), 2485-2497 [cit. 2016-05-11]. DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00383-0. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961201003830>
- [27] PFEUFFER, Josef, Ulrich FLOEGEL, Dieter LEIBFRITZ a . Monitoring of cell volume and water exchange time in perfused cells by diffusion-weighted ¹H NMR spectroscopy. *NMR IN BIOMEDICINE: NMR Biomed* 11. 1997. Dostupné také z:
[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1099-1492\(199802\)11:1%3C11::AID-NBM498%3E3.0.CO;2-E/epdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1099-1492(199802)11:1%3C11::AID-NBM498%3E3.0.CO;2-E/epdf)
- [28] PFEUFFER, Josef, Ulrich FLOEGEL, Wolfgang DREHER a Dieter LEIBFRITZ. Restricted diffusion and exchange of intracellular water: theoretical modelling and diffusion time dependence of ¹H NMR measurements on perfused glial cells. *NMR IN BIOMEDICINE: NMR Biomed* 11. 1998.

- [29] TEHEI, Moeava, Bruno FRANZETTI, Kathleen WOOD, Frank GABEL, Elisa FABIANI, Marion JASNIN, Michaela ZAMPONI, Dieter OESTERHELT, Giuseppe ZACCAI, et al. Neutron scattering reveals extremely slow cell water in a Dead Sea organism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2007, 104(3), 766-771 [cit. 2016-01-08]. DOI: 10.1073/pnas.0601639104. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.0601639104>
- [30] DEVIREDDY, Ramachandra V., Debopam RAHA a John C. BISCHOF. Measurement of Water Transport during Freezing in Cell Suspensions Using a Differential Scanning Calorimeter. *Cryobiology* [online]. 1998, 36(2), 124-155 [cit. 2016-05-10]. DOI: 10.1006/cryo.1997.2071. ISSN 00112240. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001122409792071X>
- [31] BALASUBRAMANIAN, Saravana K., Willem F. WOLKERS a John C. BISCHOF. Membrane hydration correlates to cellular biophysics during freezing in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2009, 1788(5), 945-953. DOI: 10.1016/j.bbamem.2009.02.009. ISSN 00052736. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273609000418>
- [32] ALCÁZAR, E. B., M. H. M. ROCHA-LEÃO a J. DWECK. YEAST INTRACELLULAR WATER DETERMINATION BY THERMOGRAVIMETRY. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2000, 59, 643-648.

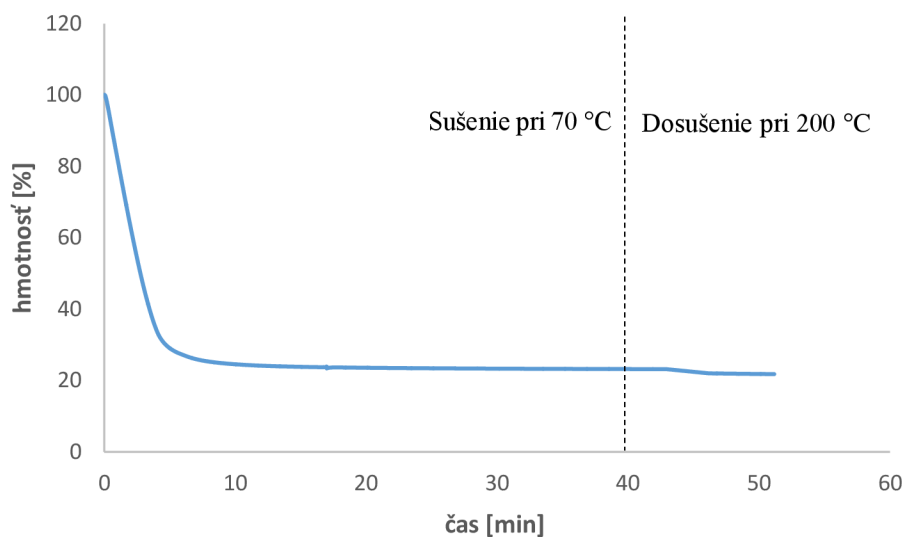
8. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

BATH	príľnavosť baktérií k uhl'ovodíkom (z <i>angl.bacterial adhesion to hydrocarbons</i>)
BPA	bublinová tenziometria
CN	označenie pre bakteriálny kmeň <i>Cupriavidus necator</i>
DSC	diferenčná kompenzačná kalorimetria
HEX	hexadekán
H – NMR	nukleárna magnetická rezonancia
MATH	mikrobiálna príľnavosť k uhl'ovodíkom (z <i>angl.microbial adhesion to hydrocarbons</i>)
MO	minerálny olej
PHA	polyhydroxyalkanoát
PHB	polyhydroxybutyrát
QENS	kvázielastický rozptyl neutrónov
TGA	termogravimetrická analýza

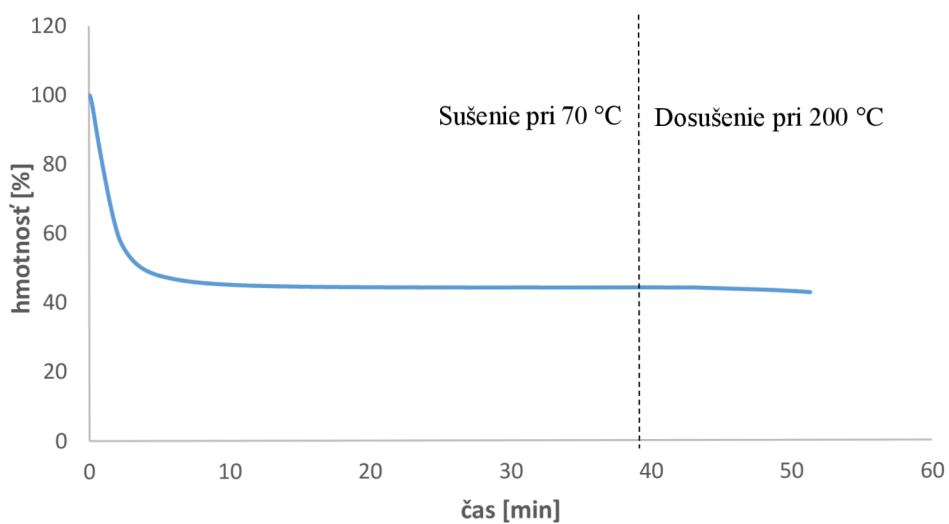
9. PRÍLOHY



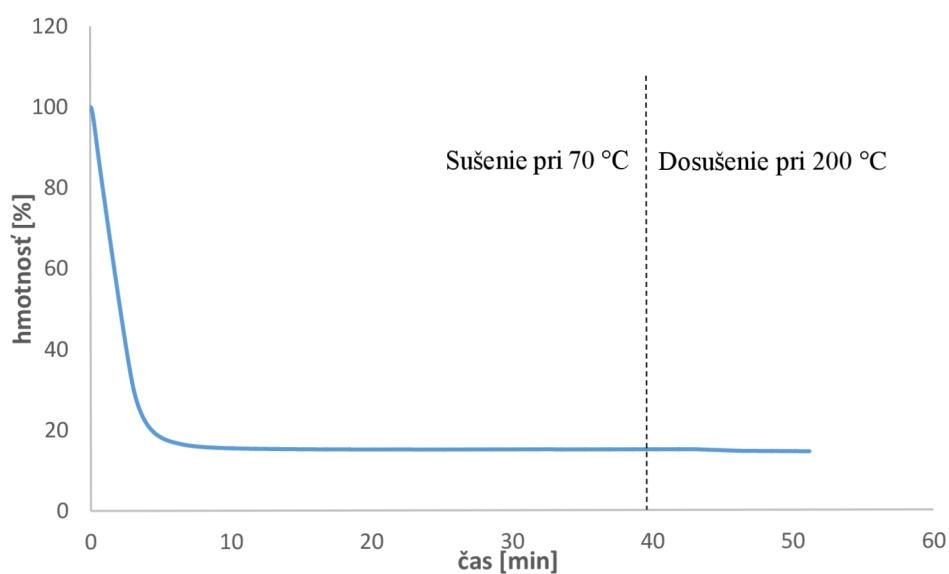
Obrázok 26: Sušiacia krivka *Cupriavidus necator* H16 pri teplote 60 °C.



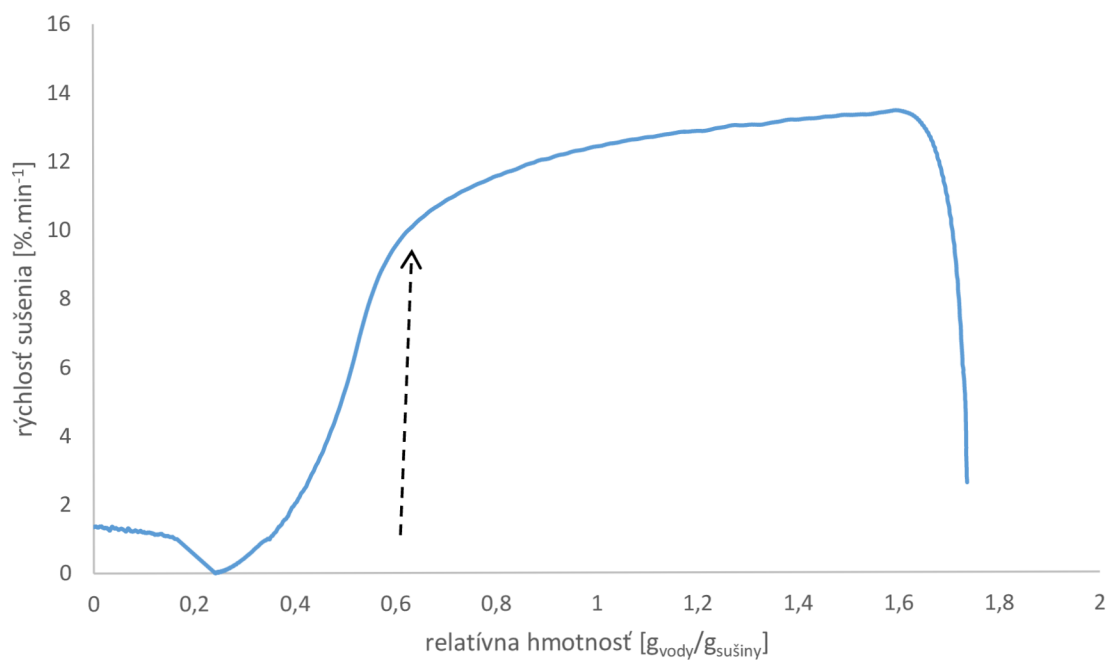
Obrázok 27: Sušiacia krivka *Cupriavidus necator* PHB-4 pri teplote 60 °C.



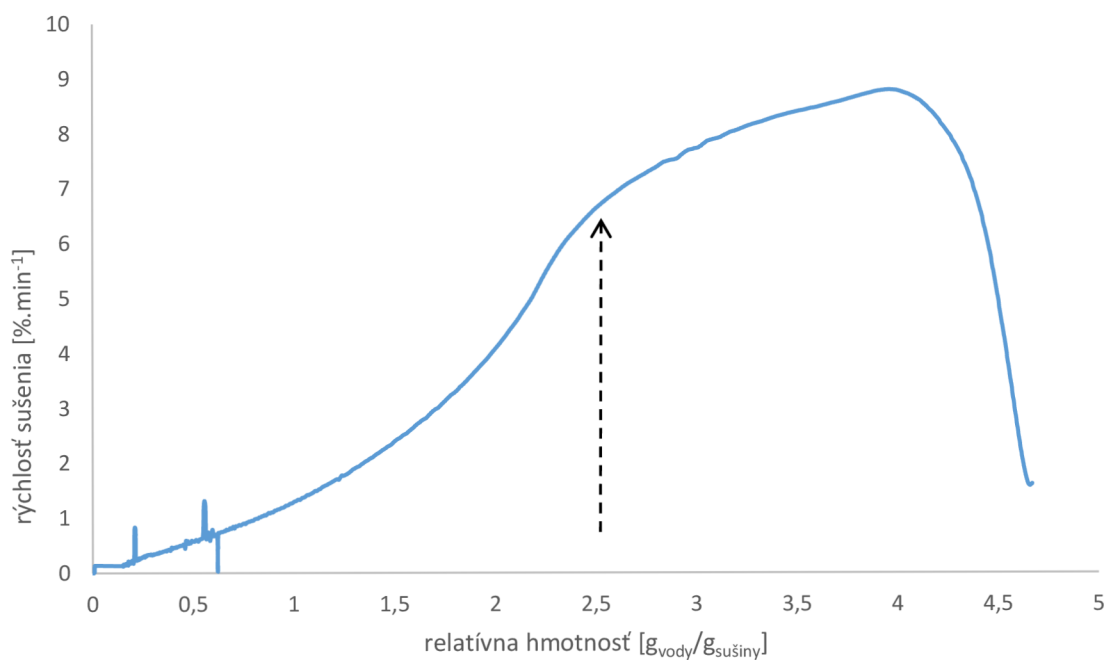
Obrázok 28: Sušiacia krivka *Cupriavidus necator* H16 pri teplote 80 °C.



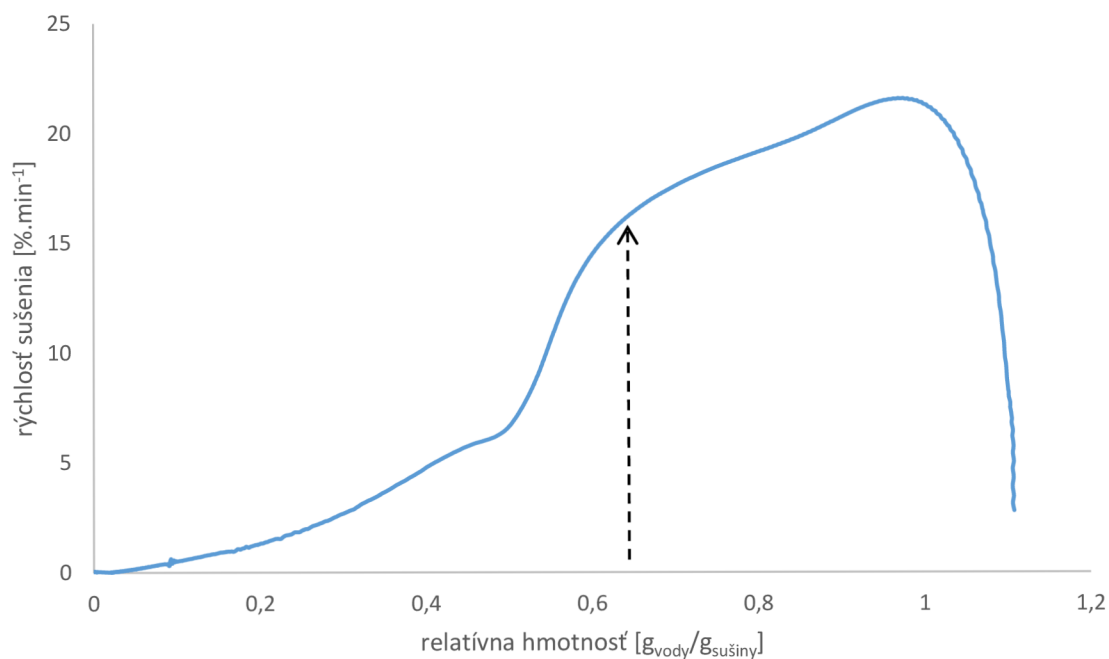
Obrázok 29: Sušiacia krivka *Cupriavidus necator* PHB-4 pri teplote 80 °C.



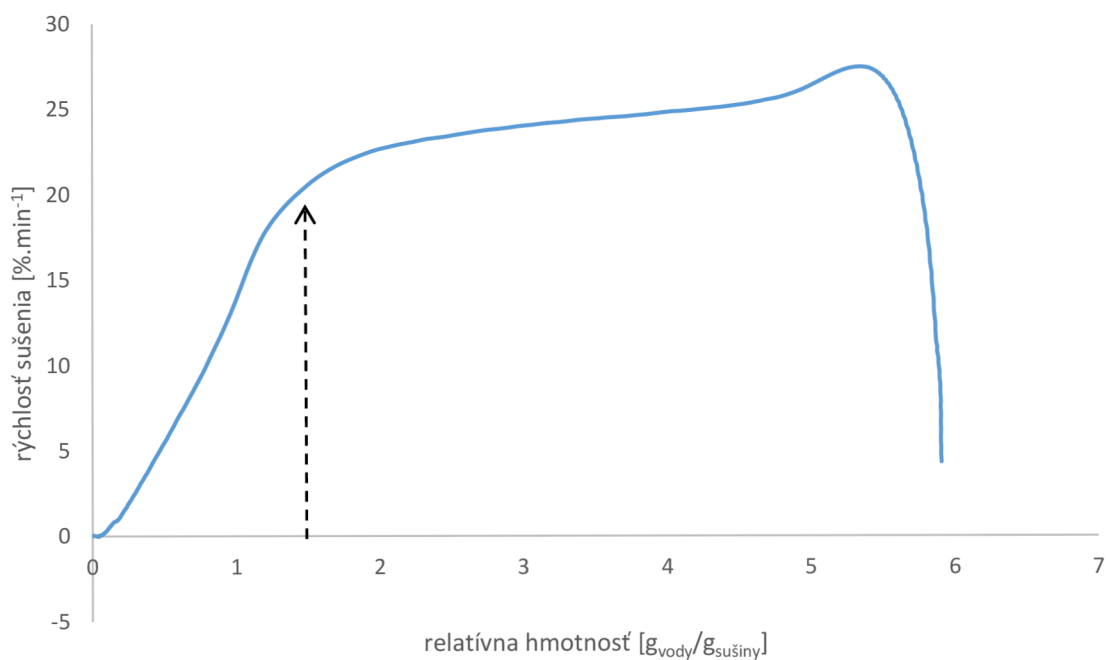
Obrázok 30: Závislosť rýchlosti sušenia vzorky *Cupriavidus necator* H16 na relatívnom obsahu vody vo vzorke. Sušenie prebiehalo pri 60 °C. Šípkou je označený bod prechodu medzi sušením intracelulárnej a extracelulárnej vody.



Obrázok 312: Závislosť rýchlosti sušenia vzorky *Cupriavidus necator* PHB-4 na relatívnom obsahu vody vo vzorke. Sušenie prebiehalo pri 60 °C. Šípkou je označený bod prechodu medzi sušením intracelulárnej a extracelulárnej vody.



Obrázok 32: Závislosť rýchlosti sušenia vzorky *Cupriavidus necator* H16 na relatívnom obsahu vody vo vzorke. Sušenie prebiehalo pri 80 °C. Šípkou je označený bod prechodu medzi sušením intracelulárnej a extracelulárnej vody.



Obrázok 33: Závislosť rýchlosti sušenia vzorky *Cupriavidus necator* PHB-4 na relatívnom obsahu vody vo vzorke. Sušenie prebiehalo pri 80 °C. Šípkou je označený bod prechodu medzi sušením intracelulárnej a extracelulárnej vody.