



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

MEZIFÁZOVÁ REOLOGIE JAKOŽTO ÚČINNÝ NÁSTROJ K POPISU MEZIFÁZOVÉHO CHOVÁNÍ BIOFILMŮ

INTERFACIAL RHEOLOGY AS THE EFFECTIVE TOOL TO DESCRIPTION OF INTERFACIAL
BEHAVIOUR OF BIOFILMS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Helena Kachlířová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1272/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Helena Kachlířová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Smilek, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Mezifázová reologie jakožto účinný nástroj k popisu mezifázového chování biofilmů

Zadání diplomové práce:

- 1) Vypracovat literární rešerši zaměřenou na popis mezifázového chování biofilmů.
- 2) Optimalizovat techniku mezifázové reologie ke studiu biofilmů.
- 3) Provést sérii měření vedoucí k popisu tvorby biofilmů na mezifázovém rozhraní.
- 4) Diskutovat naměřené výsledky a vyvozovat logické závěry.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Helena Kachlířová
student(ka)

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na optimalizaci metody mezifázové reologie pro její využití ke studiu chování mikrobiálních biofilmů na rozhraní kapalina-vzduch a jejím následném využití ke studiu tvorby biofilmu za optimálních a stresových podmínek. Pro studium tvorby biofilmu byla zvolena mikrobiální kultura Kombucha, která vytváří na mezifázovém rozhraní celulózový biofilm. K vytvoření stresových podmínek pro růst biofilmu bylo vybráno snížení koncentrace živin, změna pH a iontové síly. Dále byla zjišťována schopnost regenerace vzniklého biofilmu. Tvorba biofilmu byla pozorována ve všech případech kromě zvyšování iontové síly, kdy k tvorbě biofilmu nedošlo. Nejlépe biofilm rostl podle očekávání za optimálních podmínek, tedy při koncentraci sacharózy 100 g/l.

ABSTRACT

The aim of this diploma thesis is to optimize a method of interfacial rheology for testing the interfacial behaviour of biofilms on the liquid-air interface and after that use the method for studying the biofilm formation under optimal and stress conditions. For studying the biofilm formation, Kombucha was used. It is a microbial culture forming a cellulose biofilm on the interface. As the stress conditions, reduction of sucrose concentration, change of pH and change of ionic strength was used. Next, the ability of regeneration of biofilm formed on the interface was studied. The biofilm formation was occurred in all cases except of increasing ionic strength. As expected, the best biofilm growth was observed under optimal condition, which means a sucrose concentration 100 g/l.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mezifázová reologie, mezifázové rozhraní, mikrobiální biofilm, Kombucha, stresové podmínky

KEY WORDS

Interfacial rheology, interfacial layer, microbial biofilm, Kombucha, stress conditions

KACHLÍŘOVÁ, Helena. *Mezifázová reologie jakožto účinný nástroj k popisu mezifázového chování biofilmů*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/115213>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Jiří Smilek.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího práce a děkanem FCH VUT.

Bc. Helena Kachlířová

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu své diplomové práce Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D. za přátelský přístup, vynaložený čas, trpělivost, ochotu a rady při vypracovávání diplomové práce. Velký dík patří také mému příteli, přátelům a rodině za podporu během studia.

OBSAH

1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1 Reologie.....	8
2.1.1 Modely reologického chování.....	8
2.1.2 Neneutonské kapaliny	10
2.2 Viskoelastičita	12
2.2.1 Debořino číslo.....	12
2.2.2 Vyjádření a sledování viskoelastičity	12
2.3 Mezifázová reologie	14
2.3.1 Mezifázová smyková reologie	14
2.4 Koloidní disperze.....	16
2.4.1 Povrchové napětí.....	16
2.4.2 Emulze, pěny a jejich stabilizace	17
2.4.3 Povrchově aktivní látky	19
2.5 Bakteriální biofilmy.....	21
2.5.1 Tvorba bakteriálního biofilmu	21
2.5.2 Složení bakteriálního biofilmu.....	23
2.5.3 Kombucha	23
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	25
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	43
4.1 Použité chemikálie.....	43
4.2 Použité přístroje.....	43
4.3 Příprava vzorků.....	43
4.3.1 Hovězí sérový albumin	43
4.3.2 Kombucha	43
4.3.3 Nastavení měřicí polohy – squeeze test	44
4.3.4 Postup měření – časový test.....	45
4.3.5 Postup měření – amplitudový test.....	45
5 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	46
5.1 Hovězí sérový albumin – adsorpce na mezifázové rozhraní	46
5.1.1 Časový test	46
5.1.2 Amplitudový test.....	47
5.2 Kombucha – adsorpce na mezifázové rozhraní	47
5.2.1 Časový test	47
5.2.2 Amplitudový test.....	48
5.3 Kombucha – závislost růstu biofilmu na koncentraci sacharózy.....	49
5.3.1 Časové testy – růst biofilmu	49
5.3.2 Amplitudové testy – struktura biofilmu	55
5.4 Kombucha – závislost růstu biofilmu na iontové síle.....	58
5.4.1 Časové testy – růst biofilmu	58
5.4.2 Amplitudové testy – struktura biofilmu	60
5.5 Kombucha – závislost růstu biofilmu na pH	61

5.5.1	Časové testy – růst biofilmu	61
5.5.2	Amplitudové testy – struktura biofilmu	62
5.6	Regenerace biofilmu	64
5.7	Kombucha – pozorování růstu biofilmu	67
6	ZÁVĚR	68
7	POUŽITÁ LITERATURA.....	70

1 ÚVOD

Mezifázová reologie je metoda zaměřená na studium mechanických vlastností mezifázového rozhraní typu kapalina-kapalina a kapalina-plyn pomocí aplikované deformace. Uplatnění nachází především při studiu systémů, u kterých mezifázové rozhraní zaujímá velkou plochu, jako jsou pěny a emulze využívané zejména v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Mezifázová reologie je vhodnou metodou testování emulgátorů a pěnicích činidel z hlediska časové, teplotní nebo mechanické stability. Mezi další uplatnění patří například testování polymerů vhodných pro použití jako nosiče léčiv. Metoda nachází využití i při studiu složitých biologických systémů, jako jsou mikrobiální biofilmy, které jsou ve většině případů nežádoucí a mohou způsobovat vážné zdravotní potíže. Mezifázová reologie umožňuje studium jejich růstu za zvolených podmínek, čehož je možné využít například při hledání vhodného způsobu odstranění biofilmu.

Teoretická část práce se zabývá seznámením s klasickou reologií a popisem mezifázové smykové reologie se zaměřením na její využití a v současnosti využívané metody měření. Dále je v teoretické části uveden popis životního cyklu bakteriálních biofilmů a popis mikrobiální kultury Kombucha.

Rešeršní část je rozdělena do tří částí, přičemž první část je věnována možným využitím mezifázové reologie, druhá část je zaměřena na využití mezifázové reologie ke studiu bakteriálních biofilmů a poslední část se zabývá vlivem koncentrace živin na metabolismus mikrobiální kultury Kombucha.

Experimentální část je věnována optimalizaci mezifázové reologie pro studium chování biofilmů a následném sledování růstu biofilmu za různých stresových podmínek jako je změna koncentrace živin, iontové síly nebo pH.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Reologie

Reologie je multidisciplinární vědní obor na pomezí mechaniky, fyzikální chemie, matematiky a stavebnictví, který se zabývá studiem deformace a toku materiálů. Termín reologie pochází z řeckých slov „rheos“, což znamená „řeka“ nebo „tok“ a „logos“, což znamená „věda“. V doslovném překladu tedy pojem reologie znamená věda o toku. Reologické experimenty se ovšem neomezují pouze na tok kapalin, nedílnou součástí je též studium chování pevných látek při jejich deformaci [1; 2].

Pojem reologie, jakožto studium deformace a toku látek, byl zaveden americkým fyzikem, profesorem E. C. Binghamem ve Spojených Státech Amerických, kde byla roku 1929 založena první Společnost pro reologii. Rychlý rozvoj reologie přišel ve druhé polovině dvacátého století s hromadným používáním polymerních systémů, s čímž byly spojeny požadavky na přípravu materiálů o přesně definovaných vlastnostech [1; 2].

V rámci reologie existuje řada specializovaných podoborů, které mohou být dány například oblastí studovaných materiálů. Mezi zmiňované podobory patří:

- a) *Elementární reologie*, která se omezuje na triviální kinematické prototypy deformace (izotropní expanze, prostý smyk, jednoosé protahování) a na jejich základě klasifikuje různé typy odchylek od klasického lineárního chování (čistě viskózního nebo elastického).
- b) *Reometrie*, v níž jsou reálné materiály podrobovány toku nebo deformaci s cílem získat kvantitativní informace o reologických vlastnostech. Výsledkem jsou údaje o různých reologických funkcích.
- c) *Racionální mechanika kontinua* je odvětvím matematické fyziky.
- d) *Mechanika nenewtonských kapalin* neboli *reodynamika* studuje proudění reologicky komplexních kapalin v reálných tokových situacích.
- e) *Inženýrská reologie* neboli *reologie procesů* se zabývá deformací a tokem reologicky komplexních materiálů v technologických procesech.
- f) *Strukturní reologie* neboli *mikroreologie* využívá metody statistické fyziky k vývoji modelů pro mikrodisperzní systémy.
- g) V *průmyslové reologii* bývají popisovány reologické testy využívané pro mezioperační nebo výstupní kontrolu kvality.
- h) *Psychoreologie* usiluje o interpretaci hmatových vjemů při různých lidských činnostech [1].

2.1.1 Modely reologického chování

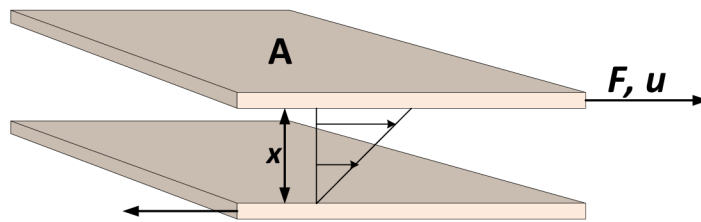
Při studiu chování materiálů, na které je vyvíjena deformace, se vždy pohybujeme mezi dvěma extrémními případy, jimiž jsou ideální kapalina s nulovou viskozitou a ideální tuhé těleso s nekonečně velkým modulem pružnosti. Avšak žádný z reálných materiálů se nechová ideálně, reálné materiály v sobě zahrnují jak viskózní, tak elastickou složku a označujeme je jako viskoelastické. To, která složka bude u daného materiálu převládat, je dáno především jeho charakterem, ale i délkou trvání a mírou namáhání daného materiálu [1; 3].

Newtonská kapalina

Ideálně viskózní kapaliny byly popsány Newtonovým zákonem a nazýváme je tedy Newtonské kapaliny. Newtonův zákon je dán následujícím vztahem:

$$\tau = \eta \frac{du}{dx} = \eta \dot{\gamma}, \quad (1)$$

kde τ je tečné napětí, η je dynamická viskozita, du/dx je vzájemná rychlost pohybu smykových rovin ve vzdálenosti dx a $\dot{\gamma}$ je rychlost smykové deformace (smyková rychlost). Na Obr. 1 jsou zobrazeny dvě planární desky, každá o ploše A vzdálené od sebe x . Horní deska se pohybuje relativní rychlostí u , poměr du/dx je pak změna rychlosti pohybu s polohou.



Obr. 1: Planparalelní desky [2]

Chování ideálně viskózní kapaliny bývá přirovnáváno k tlumiči, který můžeme zobrazit jako píst ve válci s vazkou kapalinou, jelikož rychlost vytahování pístu je úměrná působící síle. Viz Obr. 2A [4; 5].

Hookovské těleso

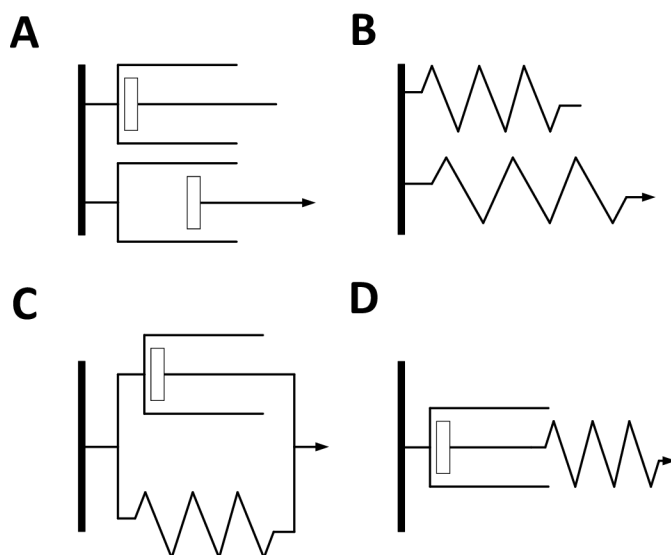
Modelem lineárně elastického chování je pružina, jejíž roztahení je úměrné působící síle. Během mechanického namáhání těleso mění svůj tvar, po jeho odstranění se vrátí do původního stavu.

Kelvinův (Voigtův) model

Tento model přibližuje chování viskoelastických pevných látek. Je sestrojen jako paralelní kombinace viskózního a elastického elementu viz Obr. 2C. Při této kombinaci jsou deformace elementů stejné a napětí se sčítají.

Maxwellův model

Maxwellův model je sestrojen jako sériová kombinace viskózního a elastického elementu. Tento model slouží k přiblížení chování viskoelastických kapalin. Při sériové kombinaci jsou napětí všech elementů stejná, deformace se ale sčítají [1; 3].



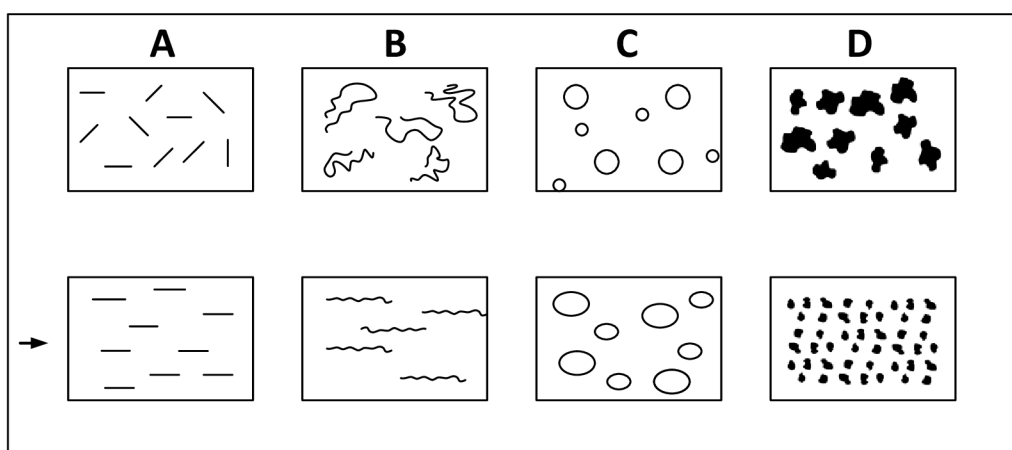
Obr. 2: Model newtonské kapaliny (A), model Hookovského tělesa (B), Kelvinův (Voigtův) model (C), Maxwellův model (D) [3]

2.1.2 Neneutonské kapaliny

Neneutonské kapaliny jsou takové kapaliny, jejichž chování se neřídí Newtonovým zákonem a jsou tudíž reologicky složitější. Patří mezi ně například roztoky a taveniny polymerů, suspenze, emulze apod. Pro neneutonské kapaliny platí obdoba Newtonova zákona:

$$\tau = \eta_{zD} \dot{\gamma}, \quad (2)$$

kde η_{zD} představuje zdánlivou viskozitu, která není látkovou konstantou, jak tomu je u newtonských kapalin, ale její hodnota se mění v závislosti na čase, rychlosti smykové deformace a tečném napětí. Některé z příčin nelineárního chování jsou naznačeny na Obr. 3.

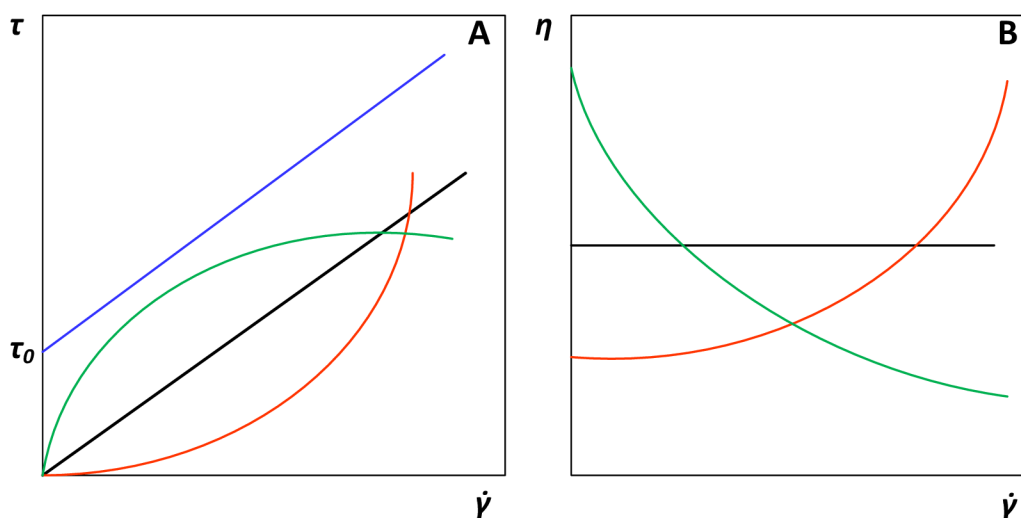


Obr. 3: Vliv toku na uspořádání částic v neneutonské kapalině. Nahoře je kapalina v klidu, dole kapalina v toku: (A) orientace, (B) napřimění, (C) deformace, (D) rozmělnění [6]

Nenewtonské kapaliny se zpravidla dělí v závislosti na dvou fyzikálních veličinách a těmi jsou rychlost smykové deformace a čas. Experimentálním stanovením funkčních závislostí zdánlivé viskozity se zabývá reometrie a viskozimetrie [6].

Podle typu závislosti zdánlivé viskozity na rychlosti smykové deformace se nenewtonské kapaliny dělí na:

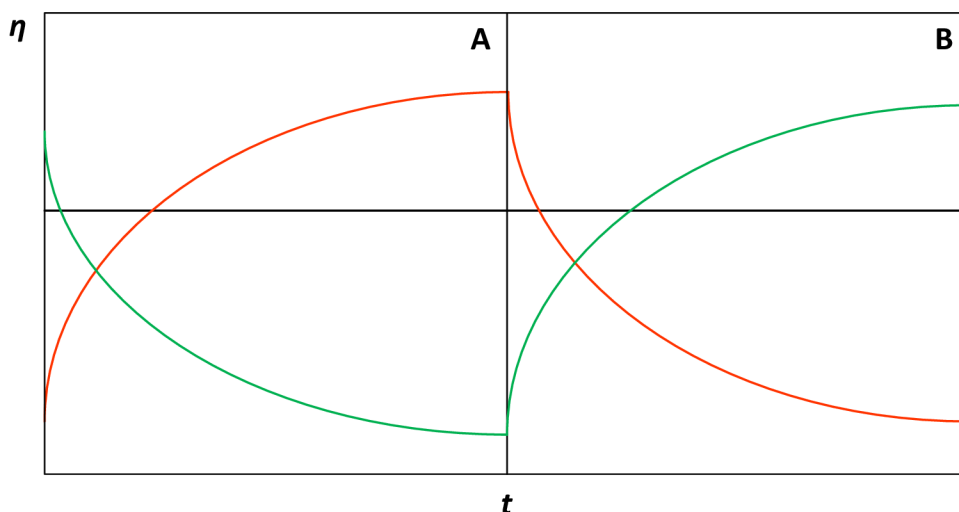
- Pseudoplastické kapaliny*, u nichž zdánlivá viskozita klesá s rostoucí rychlostí smykové deformace. Po odstranění napětí dochází k návratu na původní hodnotu zdánlivé viskozity. Pseudoplastické kapaliny můžeme dále rozdělit na pravé pseudoplastické kapaliny (jejich zdánlivá viskozita je závislá na rychlosti smykové deformace v celém jejím rozsahu) a na strukturně viskózní kapaliny (mají dvě limitní hodnoty zdánlivé viskozity). Mezi pseudoplastické kapaliny patří například roztoky a taveniny polymerů nebo některé suspenze. Z technologického hlediska je tento jev vítaný, snižuje energetickou náročnost míchání a usnadňuje následnou přepravu potrubím. Tento typ chování je u nenewtonských kapalin nejběžnější.
- Dilatantní kapaliny*, u nichž se zdánlivá viskozita zvyšuje v závislosti na rychlosti smykové deformace. Toto chování je méně časté a bývá pozorováno u některých vysoce koncentrovaných suspenzí. Dilatace je z technologického hlediska nežádoucí.
- Binghamské kapaliny*, u nichž dochází k toku až při dosažení určité hodnoty rychlosti smykové deformace. Patří sem například koncentrované průmyslové a odpadní kaly nebo kašovitě suspenze křídla a vápna [6].



Obr. 4: (A) Závislost tečného napětí na rychlosti smykové deformace, (B) závislost viskozity na rychlosti smykové deformace: newtonská kapalina (černá čára), pseudoplastická kapalina (zelená), dilatantní kapalina (červená) a binghamská kapalina (modrá) [5]

Podle časové závislosti působení napětí se nenewtonské kapaliny dělí na:

- Tixotropní*, u nichž zdánlivá viskozita klesá s prodlužující se dobou, po kterou jsou vystavovány napětí. Po odstranění napětí se hodnota zdánlivé viskozity limitně blíží původní hodnotě. Toto chování je žádoucí například u nátěrových materiálů.
- Reopektické*, u nichž dochází ke zvyšování zdánlivé viskozity s dobou působení napětí, po odeznění napětí se zdánlivá viskozita opět vrací k původní hodnotě. Toto chování není časté [6].



Obr. 5: Závislost zdánlivé viskozity pro newtonskou kapalinu (černá čára), tixotropní kapalinu (zelená čára) a reopektickou kapalinu (červená čára): (A) při působení napětí na kapalinu, (B) při odstranění napětí [5]

2.2 Viskoelasticita

Jak už bylo zmíněno, všechny reálné materiály jsou viskoelastické, obsahují v sobě tedy jak elastickou, tak viskózní složku a to, která ze složek právě převažuje, závisí na vnějších okolnostech.

2.2.1 Debořino číslo

Debořino číslo charakterizuje vnější okolnosti chování viskoelastických materiálů a je dáno podílem materiálového času T a délky trvání deformačního procesu Δt .

$$De = \frac{T}{\Delta t} . \quad (3)$$

To, že některé materiály jsou považovány za kapalné a jiné za pevné, je způsobené tím, že jsou hodnoceny běžnými lidskými měřítky časových změn během deformačních procesů, tedy v řádech vteřin až minut. Tyto změny jsou patrné na první pohled pouze u viskoelastických materiálů. Každý materiál má svůj materiálový čas, který charakterizuje paměť materiálu na svůj výchozí tvar. Pro ideálně viskózní kapalinu je $T = 0$ s a tedy i $De = 0$, oproti tomu pro ideálně elastické těleso je $T = \infty$ s tudíž i $De = \infty$. Viskoelastické materiály se pohybují mezi těmito extrémními případy, obecně platí, že materiály s nízkým Debořiným číslem vnímáme jako kapalné a materiály s vysokým De vnímáme jako pevné látky, protože časovou jednotkou pozorovatele by musely být roky nebo dokonce staletí, abychom u těchto materiálů pozorovali změnu tvaru [1].

2.2.2 Vyjádření a sledování viskoelasticity

Mezi nejčastěji používané metody sledování viskoelasticity jsou oscilační testy, které jsou využity i v této práci. Konkrétně se jedná o testy časové, amplitudové a frekvenční. Před

vysvětlením samotných testů je nejprve třeba uvést veličiny využívané k vyjádření viskoelastických vlastností studovaných materiálů. Mezi základní používané veličiny patří *elastický* a *viskózní modul*.

Elastický modul G' představuje míru deformační energie, která je uložena vzorkem během smykové deformace. Tato energie je následně po odstranění napětí využita pro úplné nebo částečné vrácení materiálu do původního stavu. Ideálně elastický materiál je schopen ukládat všechnu deformační energii a materiál se tudíž po ukončení testu vrátí do původní, nezměněné podoby. *Viskózní modul* G'' oproti tomu představuje energii, která je vzorkem spotřebována během smykové deformace a je využita ke změně struktury materiálu, pro vzorek je tudíž nevratně ztracena. Ideálně viskózní materiál tedy všechnu energii spotřebovává během deformace.

Existují další veličiny odvozené od elastického a viskózního modulu a těmi jsou *komplexní smykový modul* G^* , který je tvořen reálnou složkou, tj. elastickým modulem G' a imaginární složkou, tj. viskózním modulem G'' :

$$G^* = G' + iG'' \quad (4)$$

Další veličinou je *ztrátový úhel* $\tan \delta$:

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (5)$$

Pokud je na vzorek působeno určitou deformací, odezva závisí na charakteru vzorku. Odezva ideálně elastického materiálu je ve fázi s aplikovanou deformací a $\delta = 0^\circ$, odezva ideálně viskózního materiálu je v protifázi a $\delta = 90^\circ$. Odezva viskoelastických materiálů je tedy mezi těmito ideálními případy. Pokud je fázový posun menší než 45° , bude u vzorku převažovat elastická složka, pokud bude fázový posun větší než 45° , bude naopak převažovat viskózní složka [3; 7]

Při měření oscilačních testů jsou zmíněné veličiny měřeny v závislosti na amplitudě deformace a frekvence.

U *časového testu* bývá obvykle deformace a frekvence konstantní. Nejdůležitější sledovanou veličinou je v mém případě elastický modul G' , díky kterému je možné pozorovat změnu chování vzorku v závislosti na čase. Tímto testem je možné zjistit například informace o degradaci polymeru, kterým je daný materiál tvořen, o vypařování rozpouštědla ze vzorku nebo o případné tixotropii. V mém případě bude časový test využit ke sledování tvorby mikrobiálního biofilmu na mezifázovém rozhraní, jelikož zvyšování elastického modulu G' odpovídá zvětšování tloušťky a zvyšování pevnosti mezifázové vrstvy.

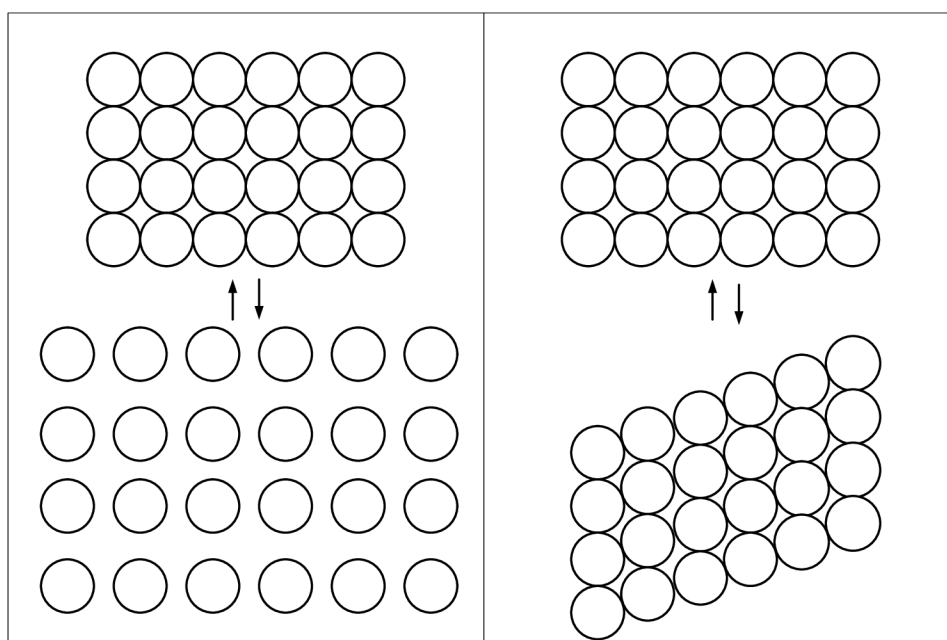
Amplitudový test je závislostí viskoelastických modulů na zvyšující se amplitudě deformace γ při konstantní frekvenci. Při nízkých hodnotách jsou oba moduly konstantní, jsou tedy nezávislé na aplikované deformaci a tuto oblast označujeme jako lineární viskoelastická oblast. V této oblasti dochází u vzorku k elastické deformaci a vzorek je tedy schopen se vracet do původního stavu. V závislosti na charakteru vzorku mohou v lineární viskoelastické oblasti nastat tři situace. V případě, že $G' > G''$, jedná se o tuhý, polotuhý nebo gelovitý vzorek, v opačném případě, tedy pokud $G' < G''$, bude se jednat o kapalný vzorek, jehož molekuly netvoří žádnou fyzikální ani chemickou síť. Poslední možností je případ, kdy $G' = G''$ a bývá označován jako „*at the gel point*“. Amplituda deformace, při níž končí lineární viskoelastická

oblast, se nazývá limitní amplituda deformace γ_L , v tomto bodě už vzorek není schopen aplikovanou deformaci kompenzovat a dochází k nevratnému porušení struktury vzorku.

Frekvenční test většinou následuje po testu amplitudovém, jelikož k jeho provedení je potřeba zjistit hodnotu limitní amplitudy deformace, ta je poté nastavena jako konstantní hodnota. Frekvenční test je tedy závislostí viskoelastických modulů na frekvenci při konstantní hodnotě deformace [3; 8; 9].

2.3 Mezifázová reologie

Mezifázová reologie je metoda zabývající se měřením viskoelastických vlastností mezifázových rozhraní dvou typů, a to kapalina-kapalina a kapalina-plyn. Na mezifázové rozhraní je možné působit dvěma typy deformací, jednou z nich je expanze/kompresce a druhou smyková deformace viz Obr. 6. Expanzi a kompresi mezifázových vrstev se zabývá dilatační mezifázová reologie, smykovou deformací se zabývá mezifázová smyková reologie, která bude využita v této diplomové práci [10].



Obr. 6: Molekuly mezifázového rozhraní při deformaci (pohled ze shora): vlevo expanze/kompresce, v pravo smyková deformace [11]

2.3.1 Mezifázová smyková reologie

Smyková reologie mezifázových vrstev na rozhraní kapalina-kapalina nebo kapalina-plyn nachází uplatnění v širokém spektru aplikací, především při studiu koloidních systémů, u kterých mezifázové rozhraní zaujímá velkou plochu, tedy zejména pěny a emulze. Tok mezifázových vrstev je možné ovlivňovat přítomností surfaktantů, proteinů, nerozpustných vrstev, lipidů, makromolekul nebo pevných částic na mezifázovém rozhraní, na které se dostanou pomocí adsorpce povrchově aktivních látek, přitažlivosti mezi jednotlivými molekulami nebo nanesením nerozpustné vrstvy na povrch subfáze. Aplikováním smykového napětí na danou vrstvu dostaneme informace o intra- i intermolekulárních interakcích na

mezifázovém rozhraní. Deformace rozhraní je zajišťována pohybem senzoru, který je umístěn na mezifázovém rozhraní [12].

Boussinesquovo číslo

Měření viskoelastických vlastností mezifázových rozhraní není náročné jen proto, že síly a točivé momenty spojené s deformací budou velmi malé, ale hlavně proto, že deformace a tok rozhraní způsobí deformaci a tok celého vzorku.

Poměr kontaktu senzoru s rozhraním a poměr reologických mezifázových vlastností k reologickým vlastnostem celku pro kontinuální smykový tok je definován jako charakteristická délka, často označovaná jako Boussinesquovo číslo. Jedná se o bezrozměrnou veličinu, definovanou následující rovnicí:

$$Bo = \frac{\eta_{rozhraní}}{\eta_{subfáze} \cdot G}, \quad (6)$$

kde Bo je bezrozměrné Boussinesquovo číslo, $\eta_{rozhraní}$ je viskozita mezifázového rozhraní, $\eta_{subfáze}$ je viskozita subfáze jako celku a G je typické měřítko senzoru související s poměrem plochy k obvodu senzoru v kontaktu s mezifázovým rozhraním. Pokud je Bo výrazně větší než 1, jsou měřeny viskoelastické vlastnosti rozhraní, pokud je Bo výrazně menší než 1, převládají vlastnosti subfází [12; 13].

Měřicí metody

Mezifázová reologie popisuje funkční závislost mezi deformací a tokem přiléhajících tekutin. Měřících technik pro měření mezifázové smykové reologie je hned několik a dělí se na přímé a nepřímé. Přímé metody měří přímo odezvu na deformaci vyvolanou senzorem, kdežto metody nepřímé sledují pomocí optických metod změnu polohy „tracer“ částice umístěné na mezifázové rozhraní. Seznam přímých i nepřímých metod je uveden v Tab. 1 [10].

Tab. 1: Přímé a nepřímé metody mezifázové smykové reologie [10]

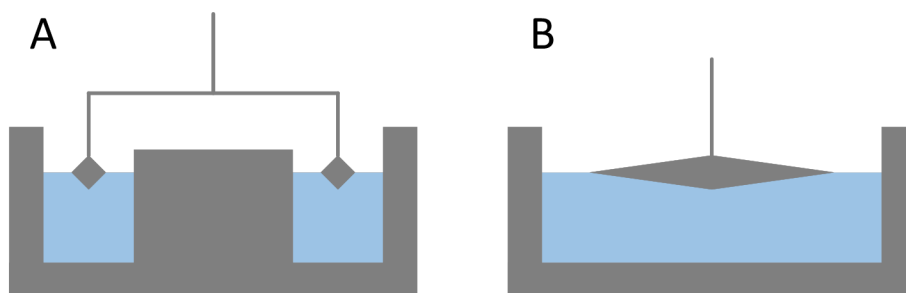
Metody přímé	Metody nepřímé
Reometr s torzním kyvadlem	Kanálový povrchový viskozimetr
Oscilující magnetická jehla	Povrchový viskozimetr s hlubinným kanálem
Klasický reometr	Povrchový viskozimetr s nádobou s rotujícím kroužkem a ostrou hranou

Nejcitlivějšími metodami jsou oscilující magnetická jehla a reometr s torzním kyvadlem, ale ani jedna z těchto metod není dostatečně citlivá pro sledování chování mezifázových vrstev tvořených níkomolekulárními surfaktanty [12].

V současné době se k přímému měření viskoelastických vlastností mezifázových rozhraní používají klasické rotační reometry. Tyto reometry musejí mít ložisko s nízkým třením. Výrobci přístrojů se při snaze minimalizovat setrvačnost snížením váhy senzoru uchýlili k použití platinového kroužku (Du Noüy Ring), původně používaného v tenziometrii. Tento senzor se ale ukázal jako nevhodný kvůli svým smáčivým vlastnostem, adhezi k jeho povrchu

a umístování na mezifázové rozhraní. Proto byl pro účely mezifázové reologie vytvořen kroužek z drátu ve tvaru kosočtverce, který by měl potlačit nevýhody kroužku Du Noüy Ring. Využívá se v kombinaci s měřicí nádobou s dvojitou stěnou (DWR – double wall ring), což umožňuje využití malého objemu vzorku k měření, mezi další výhody patří vysoké Boussinesquovo číslo. K nevýhodám patří zejména křehkost senzoru, což znemožňuje jeho použití pro velmi viskózní rozhraní.

Vedle geometrie DWR se často využívá bikonický senzor, který má oproti kroužku výhodu v přesném umístění na mezifázové rozhraní, senzor je robustní, a proto se hodí i pro měření velmi viskózních rozhraní, je tedy univerzálním senzorem. Jeho nevýhodou je několikanásobně větší objem vzorku než v případě DWR a nízké Boussinesquovo číslo [12; 13].



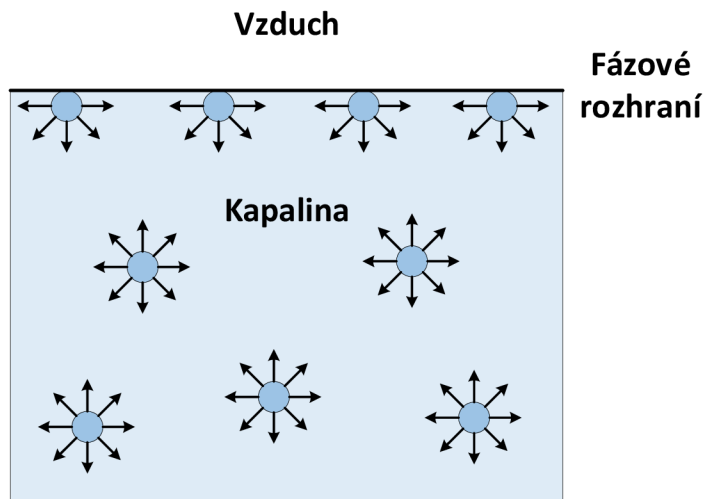
Obr. 7: (A) DWR, (B) bikonický senzor [14]

2.4 Koloidní disperze

Koloidní disperze jsou obecně soustavy jedné látky (disperzní podíl) dispergované v látce druhé (disperzní prostředí). Tyto systémy jsou termodynamicky nestabilní kvůli velkému množství povrchové volné energie. Mezifázová reologie je metoda uplatňující se na rozhraní kapalina-kapalina nebo kapalina-plyn, proto bude tato kapitola zaměřena na tyto typy rozhraní a tomu odpovídající koloidní disperze, především tedy pěny a emulze [15].

2.4.1 Povrchové napětí

Je známo, že molekuly na rozhraní se chovají jinak, než molekuly v objemu. Mezi molekulami existují přitažlivé a odpudivé síly, souhrnně označovány jako kohezní síly. Tyto síly umožňují existenci kapalného stavu. Kohezní síly je možno určit pomocí experimentu se stlačením kapaliny, jehož výsledkem je kohezní tlak. Kohezní síly jsou nižší u nepolárních kapalin, jelikož molekuly jsou drženy pohromadě převážně van der Waalsovými silami, u polárních kapalin se uplatňují i elektrostatické síly a kohezní síly jsou tedy vyšší. Na molekuly, které se nacházejí v objemu kapaliny, působí tyto síly ze všech stran, na molekuly nacházející se na rozhraní ale tyto síly ze všech stran nepůsobí, a proto vzniká povrchové/mezifázové napětí. U kapalin na rozhraní kapalina-vzduch, je možné si představit vrstvičku o tloušťce několik řad molekul (okolo 1 nm), která má mírně rozvolněnou strukturu, jelikož kohezní síly jsou v této vrstvě nižší.



Obr. 8: Přitažlivé síly mezi molekulami na rozhraní a v objemu kapaliny [16]

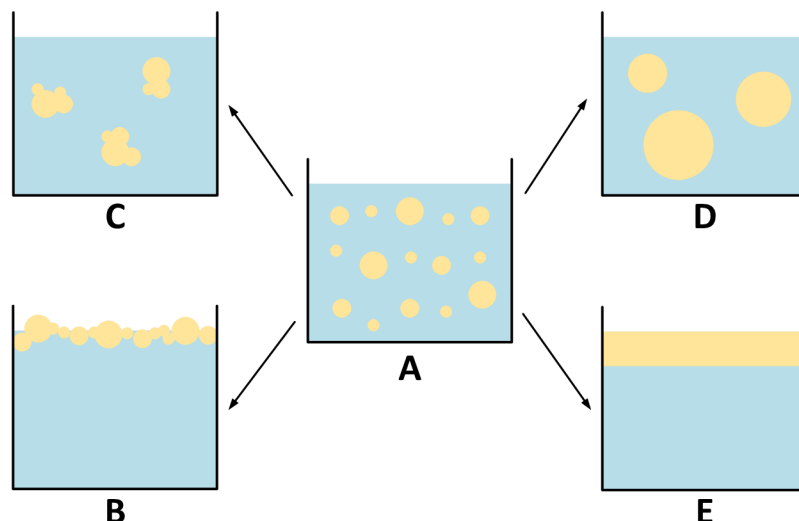
Jedná-li se o rozhraní mezi dvěma nemísitelnými kapalinami, budou síly u mezifázového rozhraní záviset především na kapalině s vyšším kohezním tlakem, kapalina s nižším kohezním tlakem bude kohezní tlak na rozhraní snižovat. Zatímco kapaliny s malým rozdílem mezi kohezními tlaky jsou mísitelné, kapaliny s velkým rozdílem mezi kohezními tlaky jsou nemísitelné [16; 17].

2.4.2 Emulze, pěny a jejich stabilizace

Emulze

Emulze jsou disperzní systémy tvořené dvěma nemísitelnými nebo omezeně mísitelnými kapalinami. Nejčastěji je k výrobě emulzí využívána vodná a olejová fáze. V závislosti na tom, která z fází tvoří disperzní podíl, a která disperzní prostředí, rozlišujeme emulze typu olej ve vodě (O/V) a voda v oleji (V/O). V současnosti se emulze dělí na makroemulze, u kterých se průměr kapiček disperzního podílu pohybuje v rozmezí 0,1 a 10 μm a mikroemulze, u nichž se průměr kapiček pohybuje mezi 0,01 a 0,1 μm . Emulze nacházejí využití například v potravinářském a farmaceutickém průmyslu, kosmetice nebo zemědělském průmyslu.

Mezi nejpodstatnější vlastnosti emulzí patří jejich stabilita. U emulzí může dojít ke třem základním jevům, a to ke krémoatění, koagulaci a koalescenci, viz Obr. 9. Krémoatění nastává v důsledku velmi rozdílných hustot fází a nemusí být doprovázeno koagulací. Koagulace nastává v důsledku kolize kapiček disperzního podílu, přičemž nedochází ke koalescenci, ale pouze ke shlukování kapiček. Koagulace potom může vyústit v koalescenci, kdy dochází ke spojení kapiček v jednu větší. Tyto jevy mohou vést k úplnému oddělení obou fází [18].



Obr. 9: Typy nestability emulzí: A) správná emulze, B) krémovatění, C) koagulace, D) koalescence, E) úplné oddělení fází [19]

Aby oddělování fází bylo co nejpomalejší, je třeba přidat další složku a tou je emulgátor. Emulgátory jsou povrchově aktivní látky, které budou podrobněji popsány v kapitole 2.4.3. Důležitými faktory stabilizace emulzí jsou:

- a) *Snížení mezifázového napětí.* Toho je nejnadhěji dosaženo přidavkem surfaktantu. Díky vyšší intenzitě Brownova pohybu (nízké molekulové hmotnosti) molekul je usnadněna tvorba emulze a zároveň je díky snížení povrchové volné energie vytvořená emulze stabilnější.
- b) *Vytvoření mechanicky pevného a elastického mezifázového filmu.* K vytvoření pevného a elastického filmu slouží převážně proteiny nebo pevné částice.
- c) *Odpuzování elektrických dvojrstev.* Tento jev nastává při použití ionických emulgátorů. Díky odpuzování stejně nabitých vrstev na mezifázových rozhraní dochází k urdžování určité vzdálenosti mezi jednotlivými kapičkami disperzního podílu.
- d) *Použití nižší koncentrace disperzního podílu.* Čím menší množství disperzního podílu, tím vzdálenější budou kapičky a tím menší pravděpodobnost koalescence.
- e) *Uniformní velikost disperzního podílu.* Větší kapičky jsou stabilnější než ty menší, proto mají menší kapičky tendenci se spojovat. V systému, kde mají kapičky stejnou velikost, je tato tendence menší.
- f) *Vysoká viskozita.* Ve vysoce viskózním systému se budou kapičky pohybovat pomaleji, proto budou i procesy krémovatění, koagulace a koalescence výrazně zpomaleny.

K vytvoření stabilních emulzí bývá využita kombinace různých faktorů. Často se využívá kombinace nízkomolekulárních surfaktantů a tvorby mechanicky pevného a elastického filmu. Ke tvorbě elastického filmu se nevyužívají pouze proteiny, v posledních letech jsou stále častěji testovány nejrůznější polysacharidy a jejich hydrofobní modifikace. Příkladem může být hydrofobně modifikovaný škrob. Při testování funkčnosti nových emulgátorů hraje významnou roli mezifázová reologie [18; 20].

Pěny

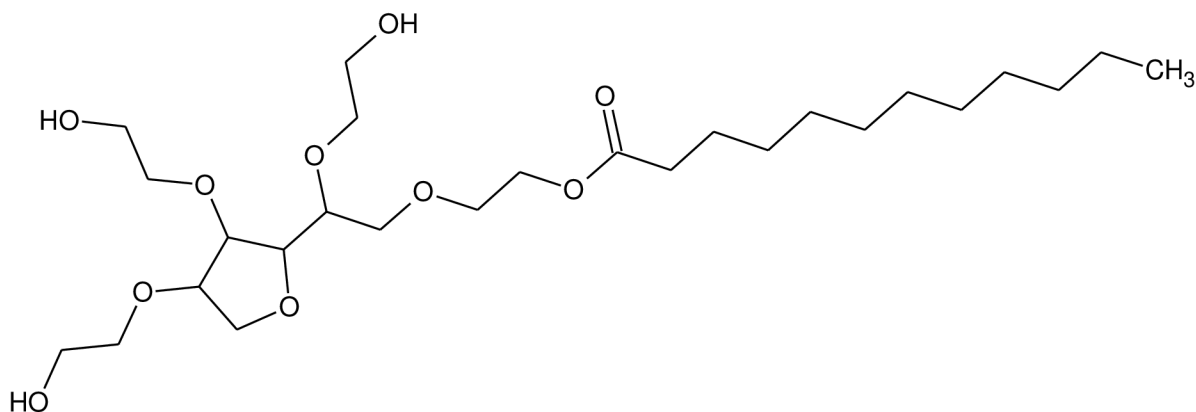
Pěna je disperzí plynu (disperzní podíl) v kapalině. Na rozdíl od emulzí, se u pěn nejčastěji vyskytují dva hraniční případy, tím prvním jsou zředěné pěny, které jsou tvořeny sférickými bublinami oddělenými od sebe tlustou vrstvou viskózní kapaliny a druhým případem jsou koncentrované pěny, jejichž převážnou část tvoří plynná fáze. V koncentrovaných pěnách mají bubliny tvar mnohostěnu a jsou od sebe odděleny pouze tenkou vrstvou kapaliny.

Stejně jako v případě emulzí je k vytvoření stabilní pěny třeba další složka, kterou je pěnicí činidlo. Často platí, že dobrý emulgátor je současně i dobrým pěnicím činidlem. U pěn nastávají dva hlavní problémy: dochází k odvodňování a tím ke ztenčování kapalného filmu mezi bublinami a tendence bublin k praskání [18].

2.4.3 Povrchově aktivní látky

Povrchově aktivní látky mohou být v závislosti na své funkci označovány různými názvy, jako například detergenty, smáčecí činidla nebo disperzní činidla. Obecně se jedná o molekuly mající hydrofobní a hydrofilní část. Díky tomu jsou molekuly přitahovány na mezifázové rozhraní oddělující vodnou a nevodnou fázi. Povrchově aktivní látky se obecně dělí do čtyř základních skupin na základě náboje povrchově aktivní části molekuly na anionické, kationické, amfoterní a neionické [18; 21].

Příkladem nízkomolekulární povrchově aktivní látky je neionický tenzid *Tween 20*, neboli polysorbát 20. Jedná se o olejovou kapalinu citronové až jantarové barvy a charakteristické vůně. Tween 20 je rozpustný ve vodě, etanolu, metanolu, etylacetátu a dioxanu, nerozpustný je naopak v minerálním oleji a petroleteru. Využití nachází například jako emulgátor, solubilizátor, stabilizátor nebo smáčedlo a používá se v potravinářském, farmaceutickém i kosmetickém průmyslu [22].



Obr. 10: Strukturální vzorec neionického surfaktantu Tween 20 [22]

Surfaktanty tvořící Langmuirovy vrstvy

Typickými surfaktanty jsou například mastné kyseliny nebo mastné alkoholy. Tyto povrchově aktivní látky se skládají z uhlovodíkového řetězce, který tvoří hydrofobní část a z polární „hlavy“ tvořící hydrofilní část, nejčastěji se jedná o karboxylovou nebo hydroxylovou funkční skupinu. Mastné kyseliny a alkoholy s krátkým uhlovodíkovým řetězcem jsou rozpustné ve vodě. S narůstající délkou uhlovodíkového řetězce se snižuje

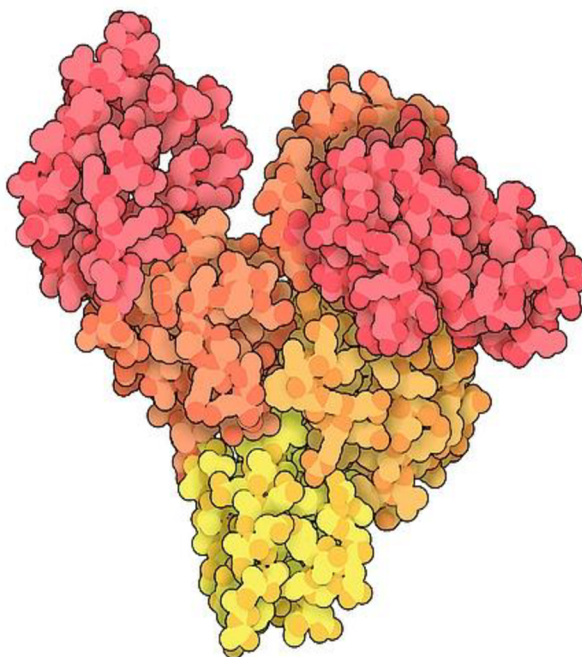
polarita molekuly a molekuly se stávají nerozpustné, na mezifázovém rozhraní potom tvoří nerozpustnou Langmuirovu monovrstvu [12; 15].

Surfaktanty tvořící Gibbsovy vrstvy

Gibbsovy vrstvy jsou tvořeny rozpustnými surfaktanty, proteiny nebo přírodními biopolymery, které samovolně adsorbují na mezifázové rozhraní. Polymery, ať už přírodní nebo syntetické vykazují povrchovou aktivitu, zejména, jsou-li jejich hydrofilní a hydrofobní části od sebe dostatečně vzdáleny. Jedná se především o roubované a blokované kopolymery.

V případě proteinů, povrchovou aktivitu vykazují převážně proteiny globulární. Povrchová aktivita je způsobena tím, že proteiny jsou tvořeny jak aminokyselinami s polárními, tak s nepolárními funkčními skupinami. Proteiny v roztoku obvykle zaujímají helikální strukturu, při adsorpci na mezifázové rozhraní ale dojde ke změně konformace – tzv. povrchové denaturaci, kdy se na rozhraní proteiny uspořádají tak, aby zaujímaly co nejméně energeticky náročnou polohu. Během povrchové denaturace dojde také ke ztrátě rozpustnosti a vytvoření gelovitěho mezifázového filmu. Na rozdíl od nízkomolekulárních surfaktantů, proteiny o tolik nesníží povrchové napětí, ale vzniklý film může vykazovat silně viskoelastické vlastnosti. Mezifázová reologie je citlivá na změny v intermolekulárních interakcích, v intramolekulární struktuře surfaktantů nebo ve složení mezifázových vrstev. Studium Gibbsových vrstev je hlavní oblastí zájmu mezifázové smykové reologie [12; 15].

Jedním z proteinů, který tvoří Gibbsovu vrstvu, je ve vodě rozpustný globulární protein hovězí sérový albumin (BSA). Tento protein je používán jako modelový protein v řadě studií. Skládá se z 583 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost se pohybuje okolo 66 400 Da. Albumin slouží jako transportní molekula pro nejrůznější látky. Molekula BSA je tvořena třemi homologními doménami I, II a III, které jsou tvořeny devíti smyčkami (L1 – L9), spojenými pomocí sedmnácti disulfidových můstků.



Obr. 11: Hovězí sérový albumin [23]

Každá z domén je tvořena dvěma poddoménami, které jsou barevně odlišeny na Obr. 11. Sekundární struktura je tvořena pouze α -helixem [23; 24].

Vrstvy tvořené pevnými částicemi

Poslední skupinou povrchově aktivních látek jsou submikronové pevné částice. Tyto částice vykazují hydrofobicitu na základě třífázového rovnovážného kontaktního úhlu na rozhraní pevná látka-vodná fáze-vzduch/olejová fáze. Částice je na základě mezifázových sil nucena zaujmout rovnovážnou pozici na mezifázovém rozhraní. Tyto vrstvy jsou součástí Pickeringových emulzí, ve kterých vrstva pevných částic mezi nemísitelnými kapalinami tvoří robustní mechanickou bariéru sloužící k ochraně kapiček emulze před koalescencí. Na rozdíl od surfaktantů, je adsorpce pevných částic na mezifázové rozhraní trvalá, k návratu částic do subfáze nedochází [12; 15].

2.5 Bakteriální biofilmy

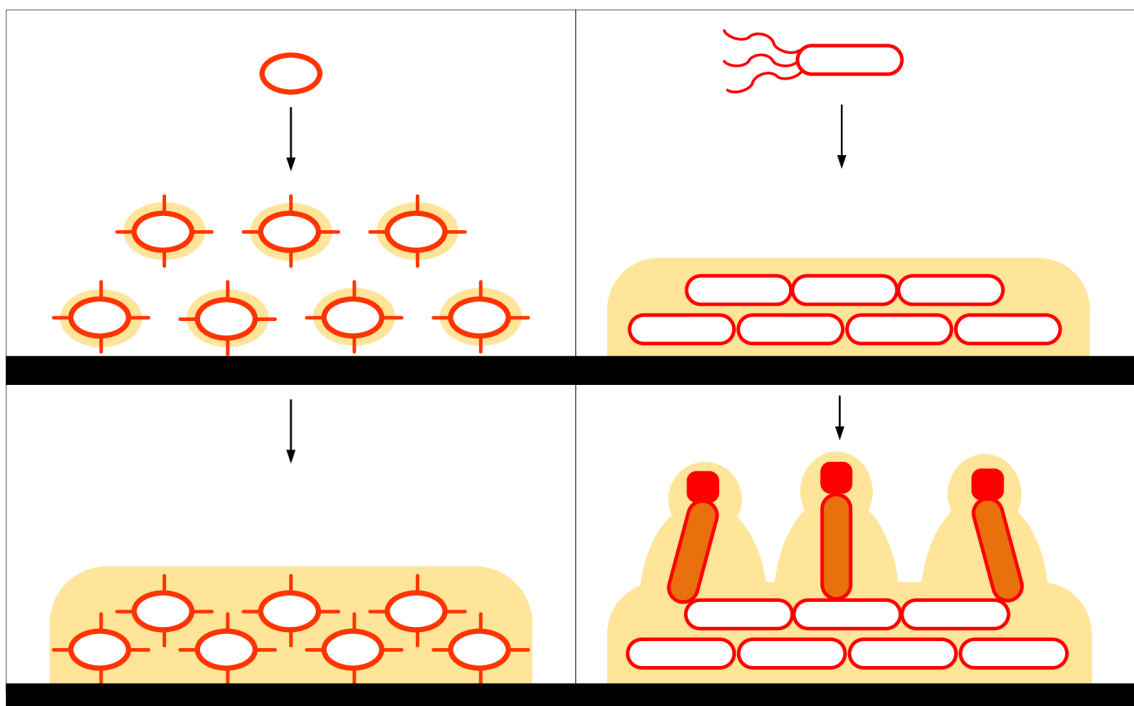
Komplexní mnohobuněčné shluky mikroorganismů, jako jsou biofilmy, jsou v přírodě všudypřítomné a nacházejí se na nejrůznějších mezifázových rozhraních, jako pevná látka-kapalina, kapalina-vzduch nebo kapalina-kapalina. Bakterie žijí převážně ve formě biofilmu, aby se chránily před nepříznivými vlivy životního prostředí, jako UV záření nebo osmotický šok. Bakteriální biofilmy podléhají několika vývojovým stádiím od adheze bakterií k povrchu nebo adsorpce na rozhraní kapalina-kapalina nebo kapalina-vzduch až po odloučení od původního rozhraní a kolonizace na rozhraní novém. Každý bakteriální kmen, podléhající tvorbě biofilmu, má svůj jedinečný postup při jeho tvorbě.

Většina biofilmů je nežádoucích, mohou se nacházet například v koupelnách, vodovodních potrubích, laboratořích, nemocnicích nebo v živém hostiteli, u kterého způsobují rozsáhlé a vážné infekce. Nejčastěji se nacházejí na rozhraní pevná látka-kapalina [25; 26].

2.5.1 Tvorba bakteriálního biofilmu

Adheze k povrchu/adsorpce na mezifázové rozhraní

Když se bakterie přiblíží k povrchu, nastane mezi bakterií a povrchem reverzibilní spojení. Pokud jsou podmínky příznivé pro tvorbu biofilmu, jednotlivé bakterie zvýší expresi adhezínů (molekul prostředkovávajících adhezi) na jejich povrch, čímž zvýší svoji lepkavost. Zvýšení lepkavosti vede ke zvýšení adherence jak mezi jednotlivými bakteriemi, tak mezi bakteriemi a vhodným povrchem. Bakterie mohou adherovat jak k povrchu, tak k již jiné adherované bakterii. Rychlost adheze může být ovlivněna rychlostí toku kapalné fáze, teplotou nebo koncentrací živin. Výhodu při adhezi mají pohyblivé druhy bakterií, u nich ale po adhezi dochází ke ztrátě schopnosti pohybu, viz Obr. 12 [25; 26].



Obr. 12: Adheze k povrchu při tvorbě bakteriálního biofilmu: nepohyblivými bakteriemi (vlevo), pohyblivými bakteriemi (vpravo) [26]

Tvorba mikrokolonie

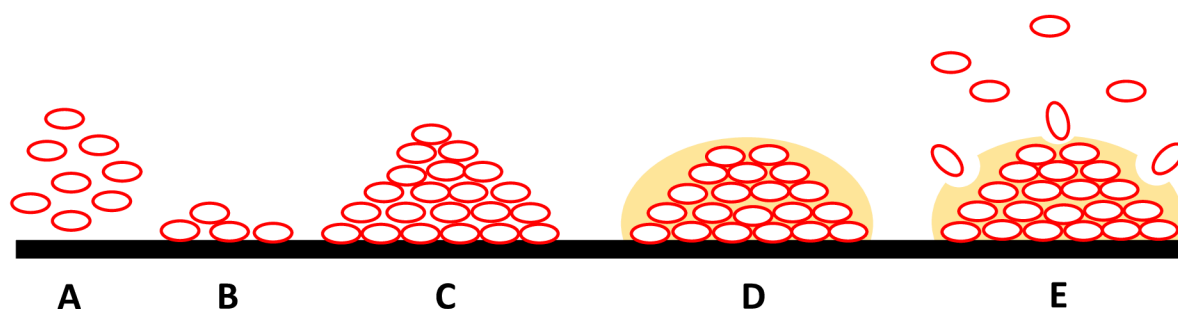
Tvorba mikrokolonie nastává, pokud je vazba bakteriálních buněk s povrchem stabilní. Následné množení bakterií je zprostředkováno chemickými signály. Pokud tyto signály překročí určitou hranici, dojde k produkci exopolysacharidů (EPS) [25].

Tvorba 3D struktury a zrání

Po vytvoření mikrokolonie dochází k expresi určitých genů souvisejících s tvorbou biofilmu. Produkty exprese těchto genů jsou důležité kvůli EPS, které jsou hlavní složkou biofilmu. Po vytvoření extracelulární matrix dochází k tvorbě kanálků vyplněných vodou, které slouží k transportu živin a odvodu odpadních látek z biofilmu [25].

Odloučení

Po vytvoření biofilmu často dochází k tomu, že bakterie přestane produkovat EPS a opustí biofilm (viz Obr. 13E), přičemž podléhá rychlému zmnožení a rozšíření v okolí biofilmu. Bakterie může biofilm opustit ze tří základních důvodů, a to z důvodu vytvoření nových bakteriálních buněk z rostoucích buněk, disperze biofilmu v důsledku toku okolní kapalné fáze a quorum sensing [25].



Obr. 13: Životní cyklus bakteriálního biofilmu: (A) přiblížení bakteri k povrchu, (B) adheze bakteri k povrchu, (C) tvorba mikrokolonie, (D) tvorba 3D struktury biofilmu, (E) odloučení bakteri z biofilmu [27]

Quorum sensing

Quorum sensing je mechanismus, díky kterému jsou bakterie schopny mezi sebou komunikovat během tvorby biofilmu. Jedná se o systém stimulace exprese určitých genů v závislosti na hustotě populace. Signální molekuly se během quorum sensing naváží na receptory nových bakterií a pomáhají v transkripci genů. Tento systém umožňuje komunikaci mezi stejnými i odlišnými bakteriálními druhy přítomnými v biofilmu, zejména při tvorbě biofilmu, nedostatku živin nebo jiných stresových podmínkách jako jsou dezinfekční prostředky nebo antibiotika [25].

2.5.2 Složení bakteriálního biofilmu

Biofilmy jsou shluky mikroorganismů produkujících extracelulární polymerní hmotu (EPS), jejíž součástí jsou proteiny, DNA, polysacharidy, RNA a voda, která tvoří hlavní část biofilmu a slouží k dodávání živin do biofilmu. Strukturu biofilmu tvoří dvě hlavní části, a to vodní kanálky pro transport živin a oblasti tvořené pouze bakteriemi [25].

Tab. 2: Chemické složení bakteriálního biofilmu [25]

Složka	Procento zastoupení v biofilmu
Mikrobiální buňky	2–5 %
DNA a RNA	<1–2 %
Polysacharidy	1–2 %
Proteiny	<1–2 %
Voda	>97 %

2.5.3 Kombucha

Kombucha neboli čajová houba je symbiotická mikrobiální kultura obsahující kvasinky a bakterie a využívá se k fermentaci slazeného černého čaje. Slovo Kombucha je odvozeno z japonských slov „Kombu“, což znamená „mořská řasa“ a „cha“, což znamená čaj. Tento nápoj by měl mít mnoho pozitivních účinků, jako antimikrobiální a antioxidační účinek, protirakovinové a protidiabetické účinky, léčebné účinky při žaludečních vředech a vysokých hladinách cholesterolu, také by měl mít pozitivní vliv při detoxikaci jater. Tyto účinky však nebyly prokázány [28; 29].

Nejčastější příprava nápoje je následující: do slazeného černého čaje o koncentraci sacharózy 100 g/l je přidáno 10 až 15 % obj. již fermentovaného nápoje a biofilm. Fermentace probíhá při pokojové teplotě 7 až 12 dní [29].

Během fermentace dochází ke změně koncentrace látek obsažených v černém čaji. Jednou z nejstudovanějších skupin látek v průběhu fermentace nápoje Kombucha jsou polyfenoly. Polyfenoly mají schopnost vychytávat volné radikály a díky jejich přítomnosti jsou čaji přisuzovány antioxidační účinky. Celkové množství polyfenolů v nápoji Kombucha roste s délkou fermentace. Mezi typické polyfenoly černého čaje patří teaflavin a tearubigin, které jsou zodpovědné za jeho zbarvení. Kromě množství polyfenolů se v nápoji mění například i koncentrace kofeinu. Kofein je v průběhu fermentace spotřebováván, protože je využíván jako zdroj dusíku pro růst mikroorganismů [30].

Kromě změny koncentrace již zmíněných látek, dochází také ke změně koncentrace organických kyselin vznikajících jako produkty fermentace. Hlavními vznikajícími kyselinami jsou kyselina octová, D-glukuronová, mléčná a citronová [30].

Kvasinky

Kombucha obsahuje široké spektrum druhů kvasinek (≤ 30). Jejich zastoupení bývá odlišné v závislosti nejen na použité kultuře, ale také na délce fermentace. Ve většině případů jsou nejzastoupenějšími rody *Candida* a *Saccharomyces*. Častými druhy jsou potom *Candida stellimalicola* a *Saccharomyces cerevisiae* [29; 31].

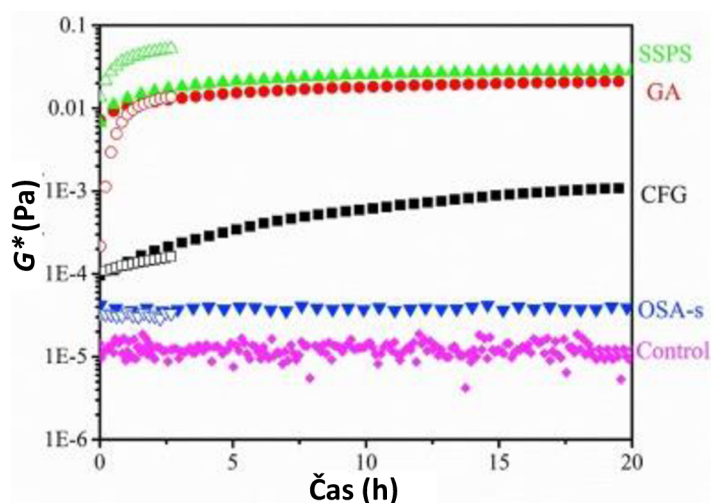
Bakterie

Stejně jako v případě kvasinek, i bakteriální zastoupení se liší kulturu od kultury, avšak spektrum druhů nacházejících se v biofilmu není zdaleka tak široké jako v případě kvasinek (≤ 10). Nejvíce zastoupené rody bakterií bývají *Acetobacter*, *Gluconobacter* a *Gluconacetobacter*, přičemž hlavní bakterií bývá nejčastěji *Acetobacter xylinum* nebo *Gluconacetobacter kombuchae* sp. Obě tyto bakterie tvoří celulósový biofilm jako sekundární metabolit během fermentace [29; 31].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

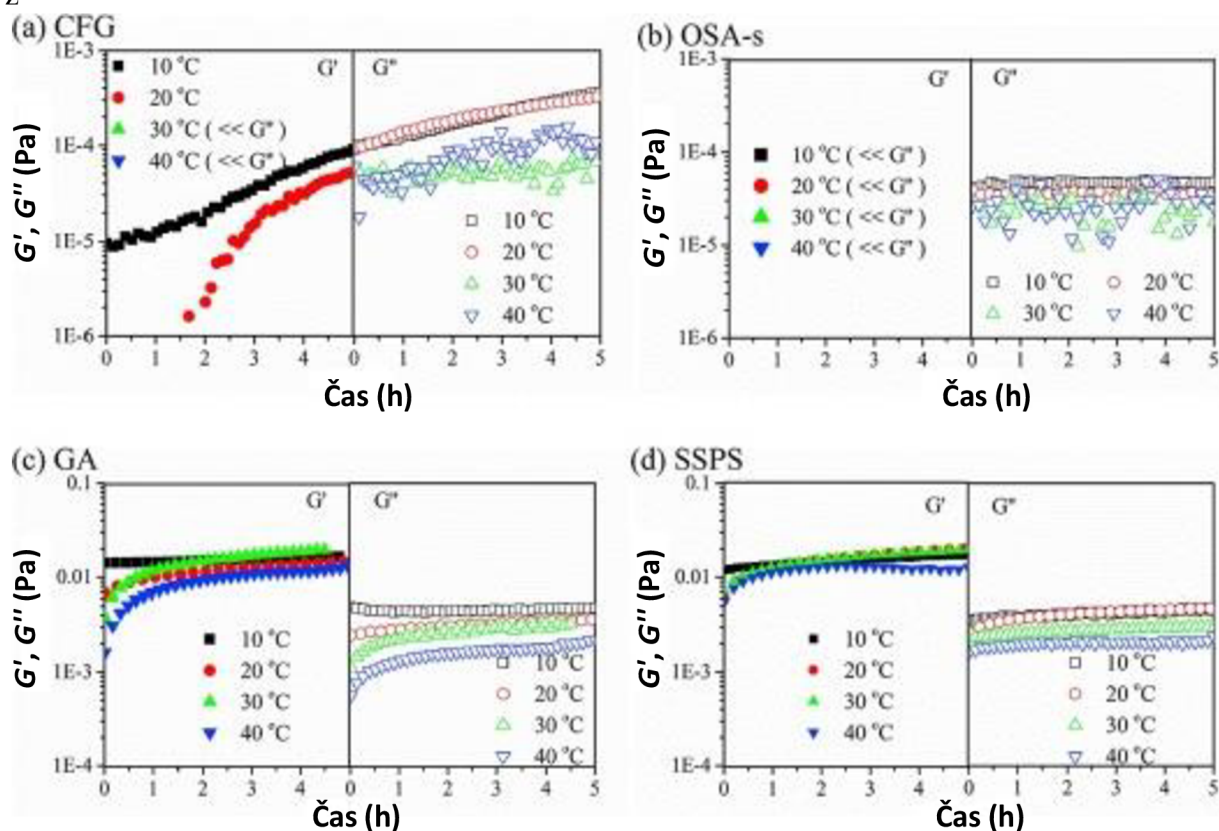
Mezifázová reologie je metoda využitelná v širokém spektru aplikací, přičemž jedním z nejčastějších využití je testování emulgátorů a stabilizačních látek pro tvorbu emulzí a pěn, ať už pro potravinářské nebo farmaceutické účely.

Autoři článku [32] se zabývali studiem čtyř potenciálních emulgátorů, které mohou být využívány v potravinářství, a to guma z kukuřičné vlákniny (CFG – corn fibre gum), hydrofobně modifikovaný škrob (OSA-s – octenyl succinate anhydride-modified starch), arabská guma (GA – gum arabic) a rozpustné sójové polysacharidy (SSPS – soybean soluble polysaccharides). Studován byl systém kapalina-kapalina, konkrétně vodný roztok emulgátoru-limonen. Vodné roztoky (1%, 5%, 10% a 15% hm.) byly připraveny mícháním daného množství emulgátoru v deionizované vodě při laboratorní teplotě. Emulgátory byly testovány několika různými metodami, jednou z nich byla mezifázová reologie s použitím přístroje AR-G2 TA Instruments s geometrií kroužku (DWR – Double Wall Ring), kdy byla studována tvorba/stárnutí mezifázového filmu a jeho mechanická a tepelná stabilita. Pro sledování tvorby/stárnutí filmu byl použit časový test (závislost viskoelastických modulů na čase) při konstantní amplitudě deformace $\gamma = 1\%$ a konstantní úhlové frekvenci $\omega = 1$ rad/s s délkou měření 20 h, přičemž byl sledován efekt koncentrace vodného roztoku emulgátoru na rychlost tvorby filmu a jeho viskoelastické vlastnosti. SSPS a GA vytvořily film s převážně elastickým charakterem, filmy tvořené CFG byly převážně viskózního charakteru a filmy tvořené OSA-s byly čistě viskózní, elastická složka zde zcela chyběla, viz Obr. 14. Tento výsledek mohl být způsoben množstvím proteinů obsažených v jednotlivých vzorcích (0,39 % pro OSA-s, 0,63 % pro CFG, 2,28 % pro GA a 5,60 % pro SSPS). U filmů s převažujícím elastickým charakterem bylo největší rigidity dosaženo při koncentraci 10 %, u koncentrace 15 % došlo k poklesu hodnot viskoelastických modulů.

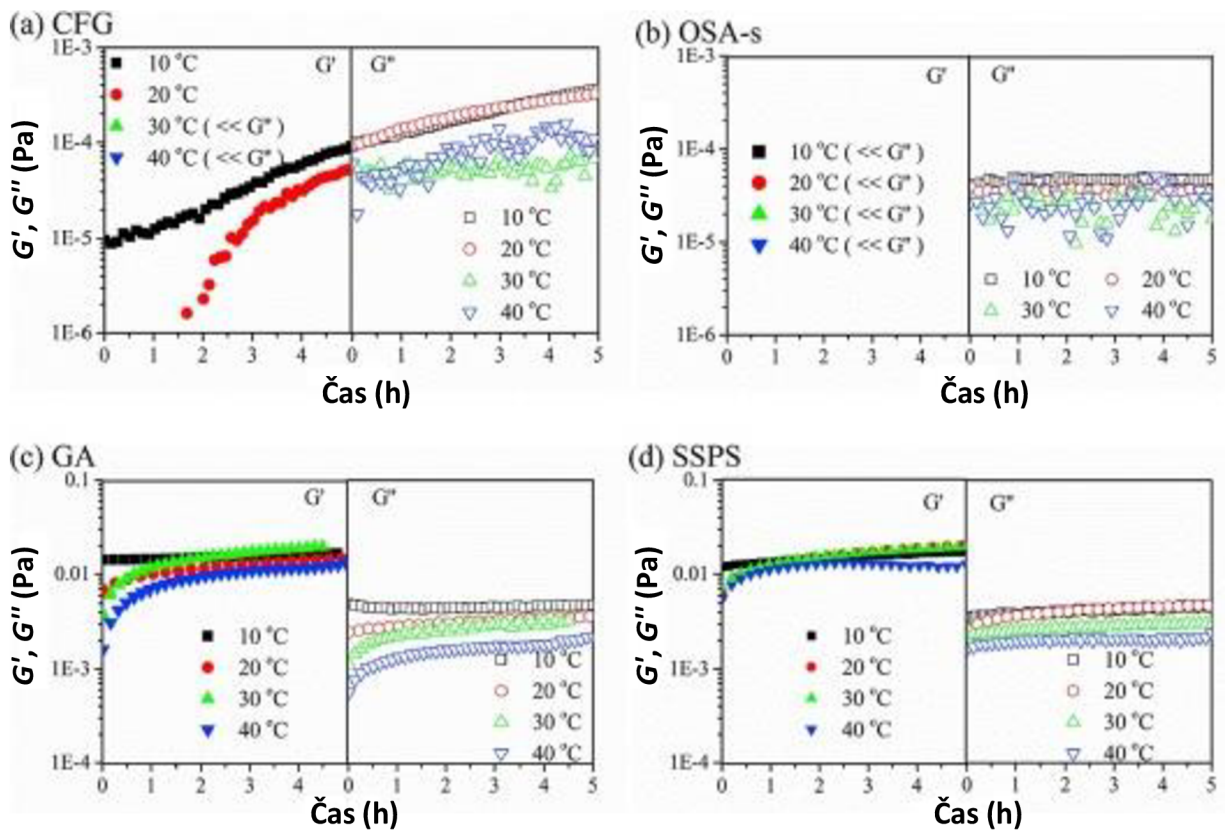


Obr. 14: Závislost komplexního modulu na čase pro koncentraci 5 % hm. Plné symboly pro rozhraní kapalina-kapalina a prázdné symboly pro rozhraní voda-vzduch. Kontrolní vzorek představuje rozhraní čistá deionizovaná voda-limonen a čistá deionizovaná voda-vzduch. [32]

Časový test byl proveden jak při laboratorní teplotě, tak při dalších zvolených teplotách: 10, 20, 30 a 40 °C. Nastavení testu bylo následující: $\gamma = 1 \%$, $\omega = 1 \text{ rad/s}$ a doba trvání 5 h. Jak je patrné z

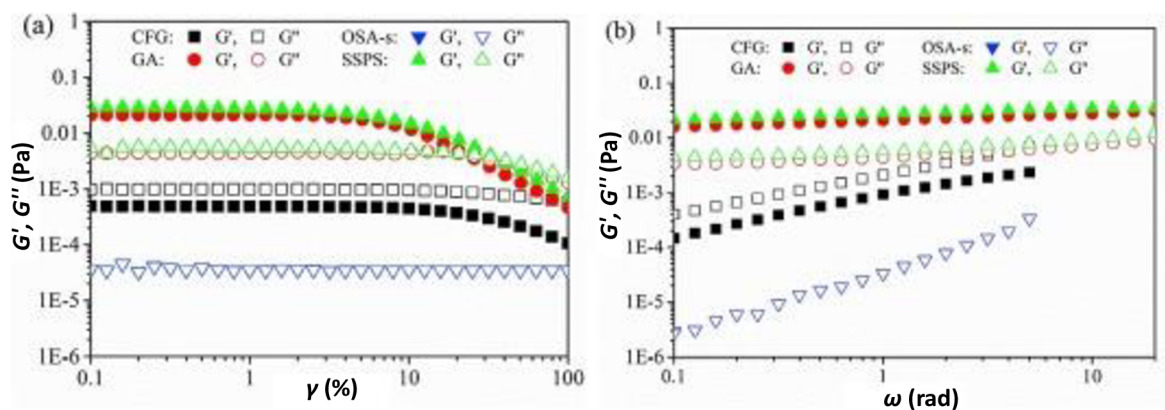


Obr. 15 Obr. 15, pro převážně elastické filmy (SSPS a GA) neměla teplota téměř vliv na elastický modul G' , nejnižších hodnot však G' dosáhl při 40 °C. Pro filmy tvořené CFG bylo G' možné detekovat jen při teplotách 10 a 20 °C, film tvořený OSA-s se opět jevil jako čistě viskózní. Na viskózní modul už teplota měla větší vliv a to takový, že s rostoucí teplotou se G'' snižoval pro všechny čtyři polysacharidy. Z grafů je také vidět, že s rostoucí teplotou se snižovala rychlost tvorby filmu.



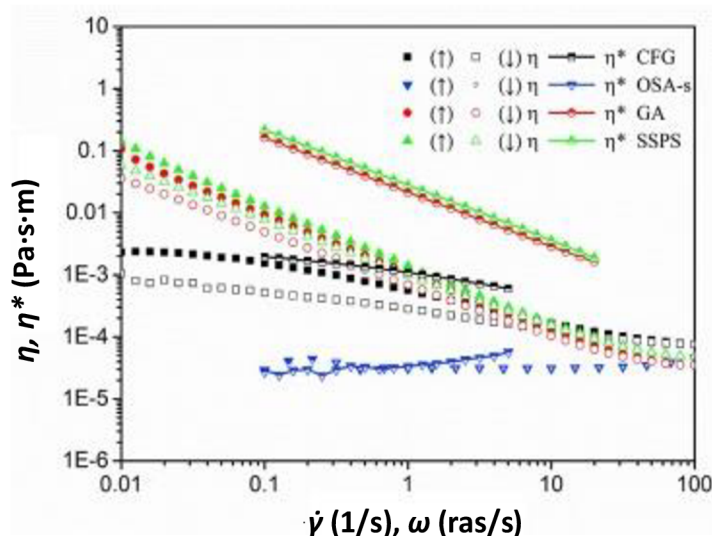
Obr. 15: Časový test při teplotách 10, 20, 30 a 40 °C pro čtyři testované polysacharidy na rozhraní kapalina-kapalina [32]

Dalšími testy byly amplitudový test provedený při konstantní úhlové frekvenci $\omega = 1$ rad/s s rostoucí amplitudou deformace $\gamma = 0,1$ až 100 % a frekvenční test s rozsahem $\omega = 0,1$ až 20 rad/s. Vzorky byly vytvořeny 24 h před provedením testů, aby bylo jisté, že filmy jsou zcela vytvořené. Amplitudové testy potvrdily převážně elastický charakter filmů tvořených SSPS a GA, převážně viskózní charakter filmu tvořeného CFG a čistě viskózní charakter filmu tvořeného OSA-s, viz Obr. 16a. Limitní amplituda deformace pro filmy tvořené SSPS a GA je $\gamma_L < 5$ %, pro film tvořený CFG je $\gamma_L \approx 10$ %. Frekvenční testy (Obr. 16b) ukázaly závislost převážně viskózních filmů na úhlové frekvenci v rozsahu 0,1 až 5 rad/s při konstantní amplitudě deformace $\gamma = 1$ %. Oba filmy s převažující elastickou složkou byly na úhlové frekvenci téměř nezávislé.



Obr. 16: (a) amplitudový test, (b) frekvenční test při $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a koncentraci 5 % hm. [32]

Dalším z reologických testů byla závislost mezifázové viskozity η na rychlosti smykové deformace. Rozsah smykové deformace byl $\dot{\gamma} = 0,01$ až $100\text{ }1/\text{s}$, $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a koncentrace 5 % hm. Filmy tvořené OSA-s vykazovaly newtonovské chování. Ostatní filmy se chovaly jako pseudoplastické kapaliny, přičemž nejmenší závislost η na $\dot{\gamma}$ vykazovaly filmy tvořené CFG. U pseudoplastických filmů se navíc projevila hystereze, tzn. při zvyšování rychlosti smykové deformace nabývala viskozita vyšších hodnot než při snižování, což znamená, že struktura zdeformovaného filmu se zcela neobnovila. Na Obr. 17 je možné vidět srovnání mezifázové viskozity a mezifázové komplexní viskozity η^* , která byla měřena při nízké amplitudě deformace. Protože pro filmy tvořené CFG, GA a SSPS je $\eta < \eta^*$, je patrné, že při vyšším namáhání dochází k deformaci mezifázových filmů.



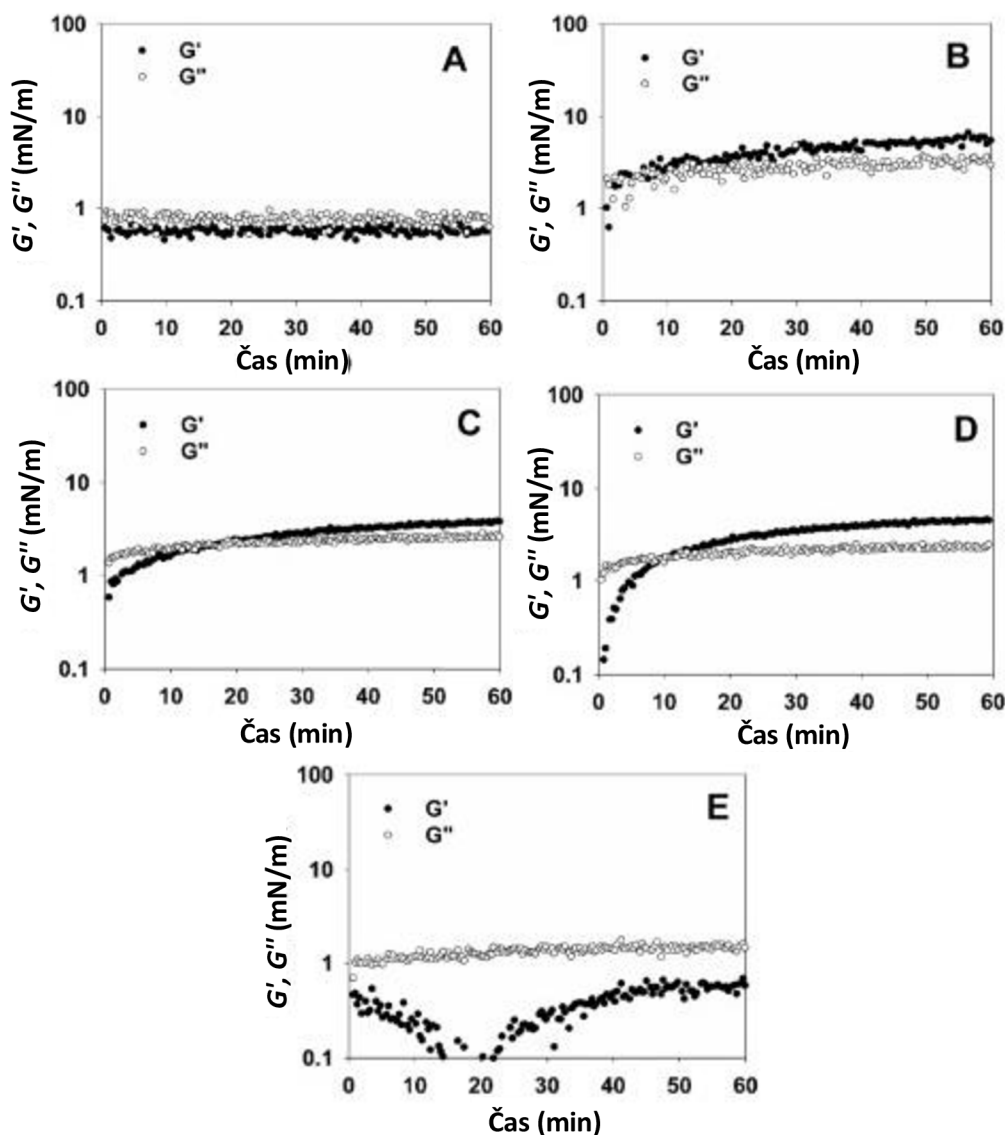
Obr. 17: Závislost mezifázové viskozity η na rychlosti smykové deformace $\dot{\gamma}$ a závislost mezifázové komplexní viskozity η^* na úhlové frekvenci ω při nízké amplitudě deformace. $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $c = 5\text{ } \%$ hm.

[32]

Posledním reologickým měřením byly creep testy. Filmy byly vystaveny pulzu točivého momentu $0,5\text{ }\mu\text{N}$ s $t_{CR} = 50\text{ s}$, poté bylo napětí odstraněno a relaxace deformace byla sledována po dobu 200 s. Měření opět probíhalo při $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $c = 5\text{ } \%$ hm. a stáří měřených filmů bylo 24 h. Film tvořený OSA-s byl velmi zdeformován a poté nedošlo k žádné relaxaci, což je typické pro čistě viskózní filmy. Typická odezva pro viskoelastické vzorky se objevila u filmu tvořeného CFG, kde po počáteční deformaci došlo k mírné relaxaci. U filmů tvořených GA a SSPS došlo pouze k velmi mírné deformaci a poté k rychlé relaxaci, což je typické pro převážně elastické filmy. Mezifázová reologie hraje při testování stability emulzí a stabilizačních schopností emulgátorů podstatnou roli, jelikož pevnost mezifázového filmu na povrchu dispergované fáze je jedním z nejpodstatnějších stabilizačních efektů.

Emulgačními schopnostmi, v tomto případě proteinů, se zabývali i autoři článku [33], kteří zkoumali mezifázové vlastnosti kaseinátu sodného, sójového proteinového izolátu (SPI), β -conglycininu (7S), redukovaného glycinu (RG) a dvou hydrolyzátů sójového proteinu. SPI a 7S byly izolovány ze sójových bobů, hydrolyzáty byly poté připraveny ze SPI. Ke stanovení molekulové hmotnosti proteinů byla použita SDS-PAGE (elektroforéza na polyakrylamidovém

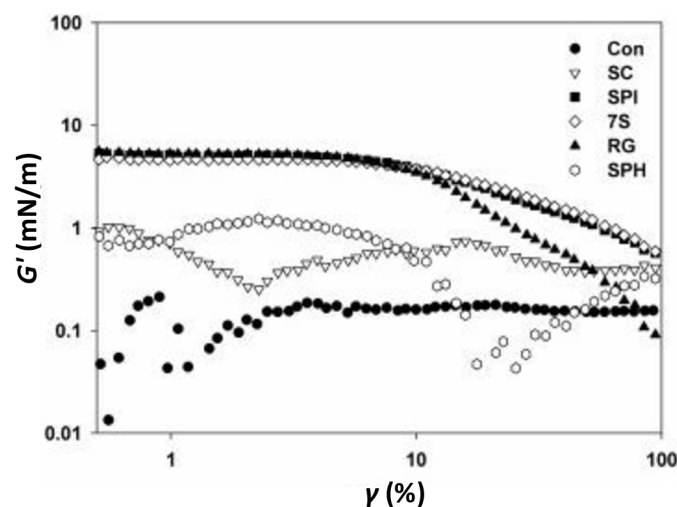
gelu s použitím dodecyl síranu sodného). Mezifázové vlastnosti jednotlivých vzorků byly zjišťovány pomocí mezifázové reologie s využitím reometru HAAKE MARS III od firmy Thermo Scientific s geometrií kroužku (Du Nouy Ring). Pro měření bylo 20 ml roztoku vzorku o hmotnostní koncentraci 0,5 % umístěno do kádinky o průměru 5 cm a kroužek byl umístěn na mezifázové rozhraní tak, aby se celým svým povrchem dotýkal hladiny. Pro lepší reprodukovatelnost měření byla udržována konstantní vzdálenost senzoru ode dna kádinky 48,723 mm. Nulová pozice byla stanovena s bikonickou geometrií, aby se zamezilo poškození kroužku. Na vodnou fázi s umístěným senzorem bylo opatrně nalito 20 ml sójového oleje. Na takto připraveném vzorku byl proveden časový test při konstantní amplitudě deformace $\gamma = 0,1 \%$ a konstantní úhlové frekvenci $\omega = 1 \text{ rad/s}$ s trváním 1 h.



Obr. 18: Závislost viskoelastických modulů na čase na rozhraní vodný roztok-olej: A) SC; B) SPI; C) 7S; D) RG; E) SPH [33]

Jak je patrné z Obr. 18, u mezifázového rozhraní tvořeného kaseinátem sodným se rovnováha ustavila téměř okamžitě a toto rozhraní bylo převážně viskózního charakteru a hodnoty G' a G'' byly nižší než u SPI, 7S a RG. Tvorba mezifázových rozhraní tvořených SPI, 7S a RG byla ve

všech třech případech obdobná, nejprve převládala viskózní složka, elastický modul se ale stále navyšoval a viskózní modul převýšil, tyto mezifázové filmy byly tedy ve výsledku převážně elastické. Zvláštní průběh tvorby mezifázového filmu vykazovalo rozhraní tvořené SPH, kdy nastal zlom elastického modulu přibližně okolo dvacáté minuty. Tento zlom naznačuje kinetickou nestabilitu vzniklého filmu. Viskózní modul po celou dobu převyšuje elastický modul, tudíž je mezifázový film tvořený SPH převážně viskózní. Dalším testem byl amplitudový test s rozsahem $\gamma = 0,01$ až 100 % a konstantní úhlovou frekvencí $\omega = 1$ rad/s. Výsledek testu vidíme na Obr. 19. Mezifázová rozhraní tvořená SPI, 7S a RG vykazovala v průběhu testu velmi podobné chování, kdy došlo k deformaci mezifázového filmu okolo 10 % amplitudy deformace. Zvláštní chování opět vykazoval mezifázový film tvořený SPH, u kterého došlo k deformaci a následně k opětovnému navyšování elastického modulu, tudíž ke zpevnování filmu.

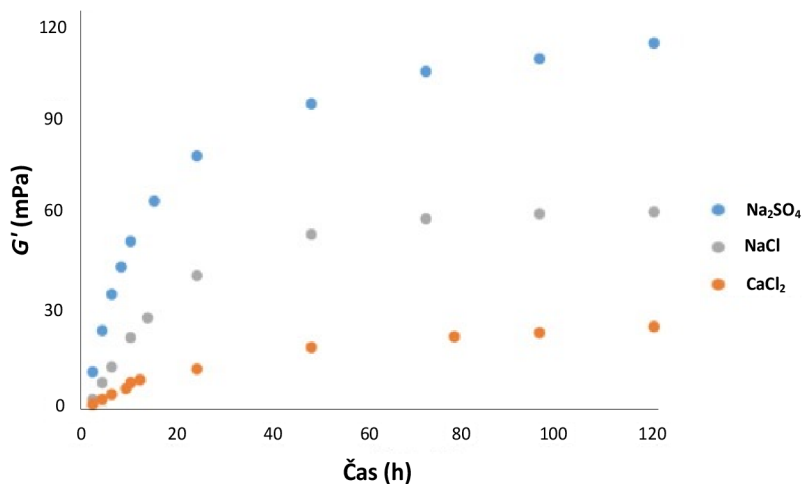


Obr. 19: Závislost elastického modulu na amplitudě deformace [33]

Po skončení amplitudového testu následoval ještě jednou časový test se stejným nastavením jako v prvním případě, čímž bylo sledováno, do jaké míry je mezifázový film schopen obnovit svoji původní strukturu. V tomto případě byla sledována závislost mezifázové komplexní viskozity na čase. Ve všech případech, kromě kaseinátu sodného, u něhož nebyla patrná žádná změna, došlo k ustavení rovnováhy ve druhém případě rychleji. Autoři došli k závěru, že globulární proteiny mají dobrou schopnost stabilizovat emulze, jelikož z velké míry adsorbují na mezifázové rozhraní, kde vytvářejí převážně elastický film.

Mezifázová reologie nachází své uplatnění například i při těžbě ropy. V současné době dochází k těžbě pomocí vrtů. Ropa je obsažena v pórech hornin jako je vápenec nebo dolomit a získává se vytlačováním z pórů pomocí jiné kapaliny. Obsah získané ropy je závislý na vlastnostech kapaliny a horniny, proto autoři článku [34] studovali efekt síranových iontů na rozhraní ropa-solný roztok pomocí mezifázové reologie, konkrétně časových testů. Použity byly čtyři různé vzorky ropy. Solné roztoky byly připraveny rozpuštěním daných množství solí (NaCl , Na_2SO_4 , NaHCO_3 , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) v deionizované vodě s různou koncentrací síranů. Na Obr. 20 jsou zobrazeny výsledky časových testů pro různé obsahy asfaltenů v ropě a různé typy iontů v solném roztoku. Podle výsledků je možné, že na mezifázovém rozhraní dochází k interakci mezi asfalteny a ionty, přičemž v případě síranových

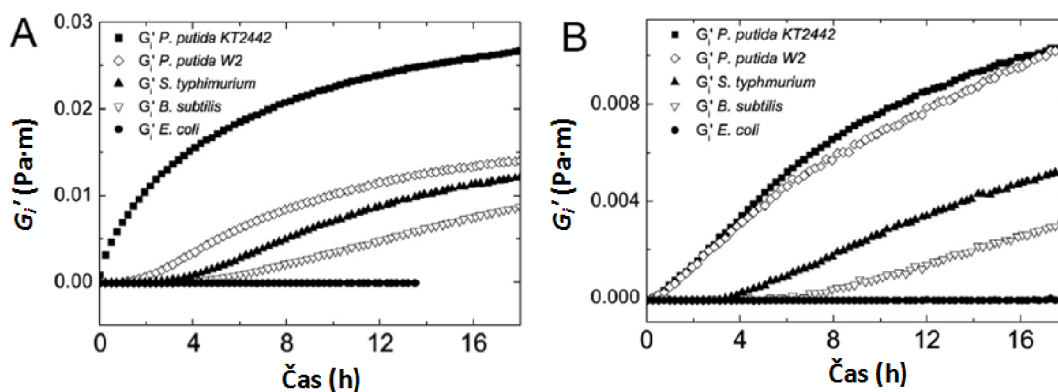
iontů došlo k výraznému nárůstu elastického modulu. Pomocí mezifázové reologie bylo zjištěno, že na vlastnosti mezifázového rozhraní má vliv kromě obsahu asfaltenu v ropě, iontové síly nebo salinity, také typ iontů v solném roztoku a důležitá je také doba kontaktu ropy se solným roztokem. Přítomnost síranových iontů v solném roztoku zvyšuje elasticitu mezifázového rozhraní a může zvýšit výtěžek ropy.



Obr. 20: Závislost elastického modulu na čase pro solné roztoky o stejné iontové síle a jiným typem iontů [34]

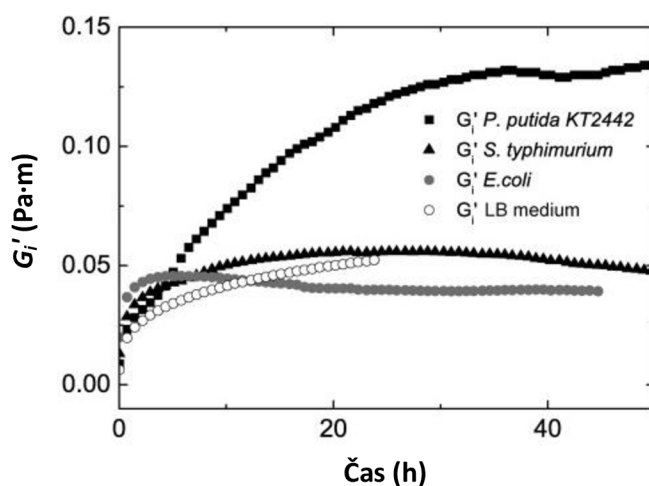
Mezifázová reologie se neomezuje pouze na adsorpci látek na úrovni molekul, ale je možné s jejím využitím pozorovat i chování některých biologických systémů, zejména bakterií, což nachází uplatnění především v potravinářském průmyslu a medicíně.

Autoři práce [35] sledovali chování pěti různých bakterií na rozhraní olej-voda. Použili následující bakterie: *P. putida* KT2442, *P. putida* W2, *S. typhimurium*, *E. coli* a *B. subtilis*. Jejich chování bylo pozorováno pomocí mezifázové reologie, tenziometrie a světelné a konfokální laserové mikroskopie. Reologické testy byly provedeny na reometrech Physica MCR300 a MCR501 s bikonickou geometrií. K pozorování adsorpce bakterií na mezifázové rozhraní byl využit časový test při konstantní frekvenci $f = 0,5$ Hz a amplitudě deformace $\gamma = 0,5$ %. Časové testy byly prováděny po dobu 18 h, přičemž byla sledována adsorpce bakterií na mezifázové rozhraní a po dobu 48 h, kdy už byla zaznamenána tvorba bakteriálního biofilmu. Kratší časové testy byly provedeny ve fosfátovém pufru, aby nedocházelo k růstu a množení bakterií, delší časové testy, při kterých docházelo k růstu bakteriálního biofilmu, byly uskutečněny s kultivačním médiem. Po dokončení každého z časových testů byl proveden amplitudový test ke zjištění strukturních vlastností mezifázového rozhraní s adsorbovanými bakteriemi, případně vzniklého biofilmu. Tyto testy byly provedeny v rozsahu amplitudy deformace $\gamma = 0,1$ až 100 % při konstantní frekvenci $f = 1$ Hz.



Obr. 21: Závislost elastického modulu G' na čase: (A) s minerální olejem, (B) s MCT olejem [35]

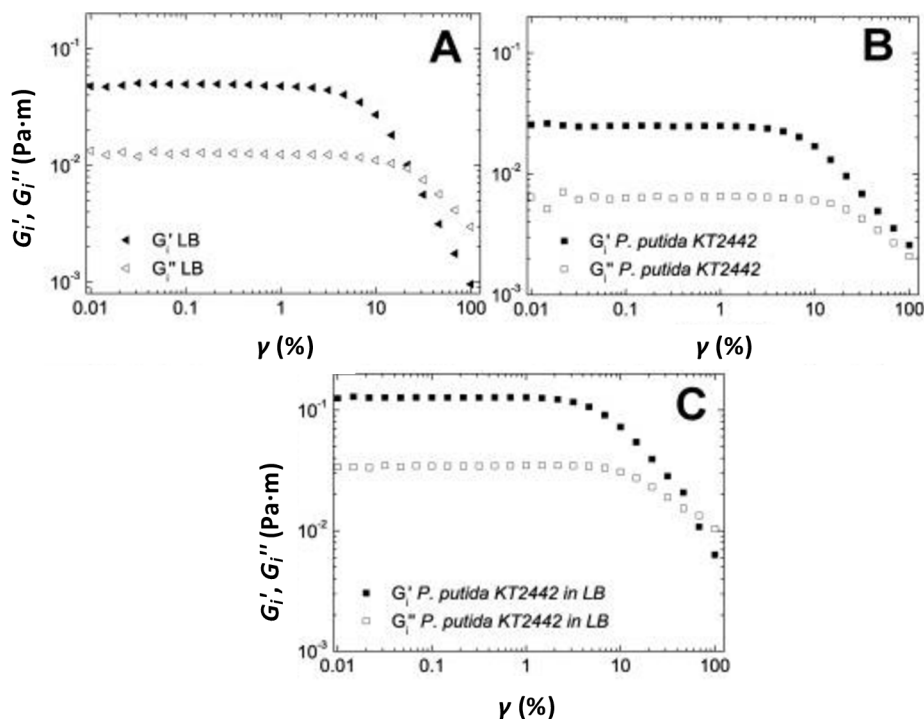
U kratších časových testů byla sledována adsorpce bakterií na mezifázové rozhraní voda-olej, přičemž vodnou fází tvořil fosfátový pufr a olejovou fází minerální olej a CMT olej (olej se středně dlouhými uhlíkovými řetězci). Srovnání adsorpce na obě rozhraní je na Obr. 21, kde je vidět, že na rozhraní nejvíce adsorbovaly *P. putida* KT2442 a *P. putida* W2, naopak u *E. coli* k adsorpci na mezifázové rozhraní nedošlo skoro vůbec. U *P. putida* KT2442 je také vidět výrazný rozdíl v adsorpci na rozhraní v případě obou olejů, kdy v případě minerálního oleje je nárůst elastického modulu téměř třikrát vyšší. Tento jev je nejspíše způsoben tím, že některé bakterie v kontaktu s dekany, které jsou v minerálním oleji obsaženy, postupně uvolňují povrchově aktivní látky. Pro studium tvorby bakteriálního biofilmu byly na základě kratšího časového testu vybrány tři bakteriální kmeny, a to *P. putida* KT2442, *S. typhimurium* a *E. coli*. Delší časové testy byly uskutečněny i se samotným kultivačním médiem (LB médiem), jehož značnou část tvoří pepton, který je povrchově aktivní. Jak je vidět na Obr. 22, nejpevnější biofilm byl vytvořen *P. putida* KT2442, na rozdíl od *E. coli*, u které k růstu biofilmu sice došlo, ale ne po celé ploše rozhraní, což bylo zjištěno mikroskopicky.



Obr. 22: Časový test na rozhraní LB medium-minerální olej [35]

Po každém z časových testů následoval amplitudový test. Na Obr. 23 jsou výsledky amplitudového testu pro samotné LB medium, *P. putida* KT2442 ve fosfátovém pufru a biofilm tvořený *P. putida* KT2442, na kterých lze vidět, že ve všech třech případech se jednalo

o viskoelastickou vrstvu převážně elastického charakteru, tudíž i samotné adsorbované bakterie (viz Obr. 23B) vytvořily na rozhraní síťovou strukturu.

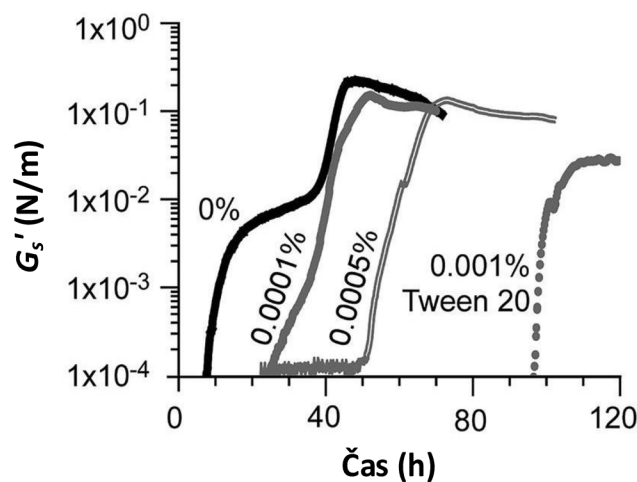


Obr. 23: Amplitudový test LB media (A), bakteriální suspenze (B), biofilmu (C) *P. putida* KT2442 na rozhraní vodná fáze-minerální olej [35]

Mezifázová reologie umožňuje lepší porozumění tvorbě bakteriálního biofilmu za různých podmínek.

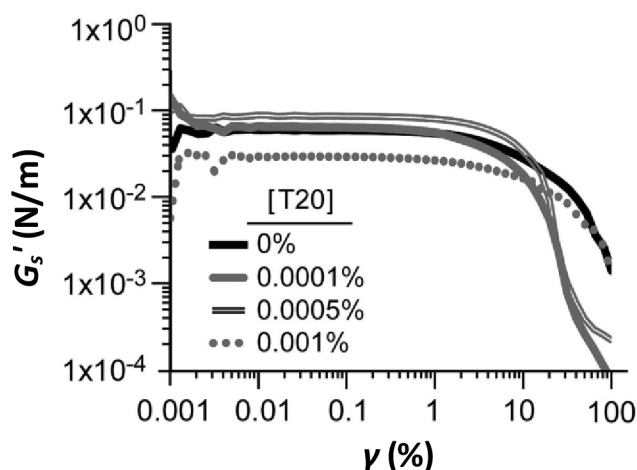
Bakteriálním biofilmem se zabývali také autoři článku [36], konkrétně vlivem tenzidu Tween 20 na růst bakteriálního biofilmu *E. Coli* UTI89 a mutantního kmene *E. Coli* UTI89 Δ cgsA kultivovaného v médiu YESCA obsahujícím kasaminokyseliny (směs aminokyselin a kaseinových hydrolyzátů). Vliv tenzidu byl studován pomocí tenziometrie za použití Wilhelmy plate metody, přičemž měření probíhalo jak v čisté vodě, tak v kultivačním médiu. Do každého vzorku bylo přidáno takové množství Tween 20, aby vznikly roztoky s výslednou koncentrací 0,0001 až 0,1 % obj. Dále byly provedeny kultivační testy, při kterých byl sledován vliv tenzidu Tween 20 na růst bakteriálního biofilmu. Pro srovnání se kultivace prováděla jak na médiu s přidaným Tween 20, tak bez něj. Byla testována adheze bakterií k PVC (polyvinylchlorid), proveden byl také Western blotting a byla použita transmisní elektronová mikroskopie. V neposlední řadě autoři využili metodu mezifázové reologie s použitím reometru AR-G2 firmy TA Instruments s geometrií kroužku s měřicí nádobou s dvojí stěnou (DWR). Pro přípravu vzorků byly bakterie kultivovány přes noc, přičemž do 4 ml kultivačního média byly naočkovány 4 μ l bakteriální kultury, tyto kultury poté byly naředěny 1:1000 kultivačním médiem s určitou koncentrací Tween 20. Časové testy byly provedeny při amplitudě deformace 1 % a frekvenci 0,5 rad/s po dobu 120 h. U vzorku, který neobsahoval Tween 20, došlo k prvnímu nárůstu elastického modulu mezi deseti až dvaceti hodinami. Test byl prováděn i s mutantním kmenem neschopným tvorby curli, což jsou extracelulární amyloidová vlákna nezbytná pro tvorbu biofilmu na rozhraní kapalina-vzduch.

První nárůst elastického modulu u mutantního kmene byl ale stejný jako v případě nemutantního kmene, z čehož je možné usuzovat, že první fáze na elastické růstové křivce biofilmu odpovídá pouze adsorpci bakterií a proteinů obsažených v kultivačním médiu na mezifázové rozhraní, navíc ke tvorbě curli dochází až v pozdějším stádiu růstu biofilmu. Co se týká vlivu koncentrace tenzidu Tween 20 na růst bakteriálního biofilmu, s rostoucí koncentrací docházelo k oddalování startu růstu, což bylo nejspíše způsobeno tím, že bakterie nebyly schopny adsorbovat na mezifázové rozhraní, jelikož malé molekuly tenzidu mezifázové rozhraní obsadily, což dokazuje i to, že u křivek časového testu pro bakterie trápené tenzidem chybí první stádium růstu, které odpovídá adsorpci a je zaznamenám až strmý nárůst elastického modulu, viz Obr. 23. U vzorků s koncentrací Tween 20 vyšší než 0,001 % obj. nedošlo k růstu biofilmu v časovém intervalu 120 h vůbec.



Obr. 24: Časový test pro růst bakteriálního biofilmu *E. coli* pro různé koncentrace tenzidu Tween 20 v kultivačním médiu [36]

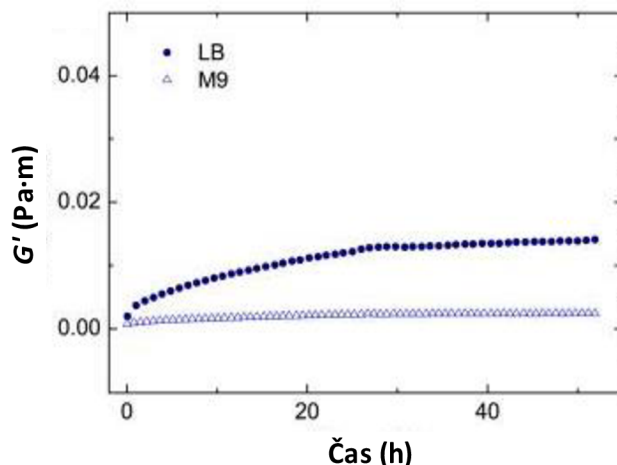
Do koncentrace 0,0005 % obj. dosahovaly bakteriální biofilmy téměř stejné maximální hodnoty elastického modulu, nad touto hodnotou docházelo k jeho snižování, protože bakteriální biofilm nebyl celistvý, ale byly v něm značné trhliny. Od koncentrace 0,001 % obj. klesl elastický modul na nulovou hodnotu. Dále byl proveden amplitudový test s rozsahem amplitudy deformace 0,001 % až 100 % při konstantní frekvenci 0,5 rad/s, kterým byla zjišťována soudržnost bakteriálního biofilmu. Výsledek testu je na Obr. 25. U všech biofilmů dochází k deformaci okolo amplitudy deformace 10 %. U biofilmu s nulovou koncentrací tenzidu docházelo k poklesu elastického modulu pozvolna, což naznačuje dobrou soudržnost biofilmu. U biofilmů s koncentracemi 0,0001 % a 0,0005 % obj. tenzidu došlo k náhlému poklesu elastického modulu. Biofilm s koncentrací 0,001 % obj. tenzidu na první pohled vykazoval podobný průběh deformace jako biofilm bez tenzidu, avšak jeho hodnota elastického modulu byla už v lineární viskoelastické oblasti nižší, což bylo způsobeno tím, že biofilm byl porušen už před samotným testem a deformace proto probíhala pozvolněji.



Obr. 25: Amplitudový test pro růst bakteriálního biofilmu *E. coli* pro různé koncentrace tenzidu Tween 20 v kultivačním médiu [36]

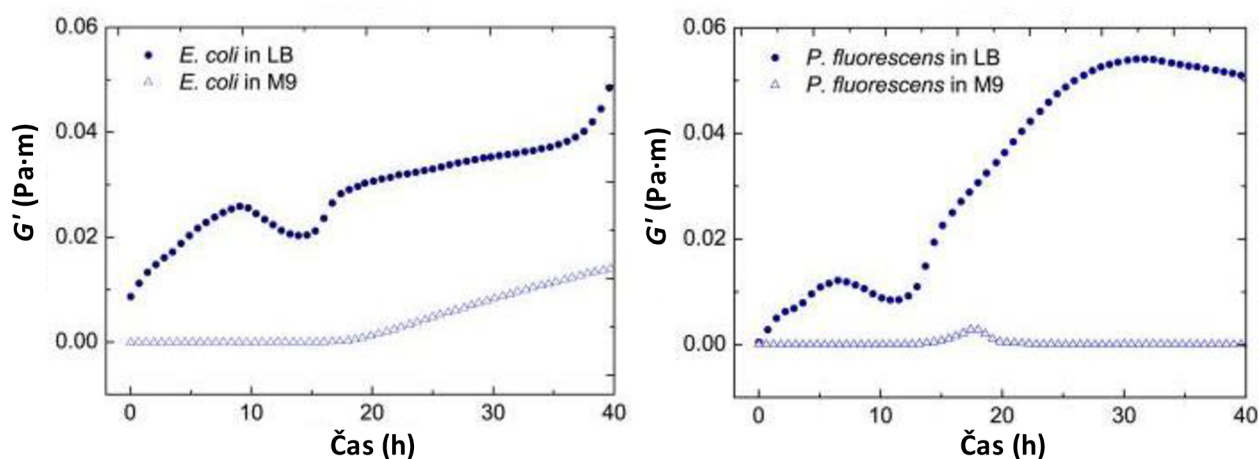
V této studii bylo prokázáno, že molekuly tenzidu s bakteriemi bojují o místo na mezifázovém rozhraní a že určitá koncentrace tenzidu Tween 20 dokáže růst bakteriálního biofilmu úplně inhibovat.

Autoři článku [37] se zabývali odlišnostmi ve tvorbě bakteriálního biofilmu bakteriálních kmenů za různých podmínek na rozhraní kapalina-vzduch. Ke studiu byly použity kmeny *E. Coli*, *P. Fluorescens* a *B. Subtilis*. Studie byla zaměřena na sledování viskoelastických vlastností bakteriálních biofilmů metodou mezifázové reologie za použití přístroje Physica MCR 501, Anton Paar vybaveným bikonickou geometrií. Další použitou metodou byla tenziometrie. Ke sledování tvorby bakteriálního biofilmu byl použit časový test s minimálním trváním 70 hodin s amplitudou deformace 0,1 % a frekvencí 1 s^{-1} . Měření se prováděla při teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$. V dalším kroku bylo připojeno zařízení umožňující simultánní kontrolu pH během reologických měření. Měřicí nádoba byla vybavena vstupním a výstupním dávkovacím otvorem, aby bylo možné vyměnit kapalinu bez porušení mezifázového rozhraní. K potvrzení naměřených hodnot autorům sloužil světelný mikroskop, kterým byl pozorován stav bakteriálního biofilmu. Jako první byl studován růst biofilmu *E. Coli* a *P. Fluorescens* v médiu na živiny bohatém a chudém. Nejprve byly měřeny viskoelastické vlastnosti samotných médií M9 (glukózové médium) a LB (médium obsahující proteiny). Výsledek byl ve shodě s očekáváním autorů, glukózové médium nevytvořilo mezifázový film, kdežto médium LB obsahující proteiny vytvořilo viskoelastický mezifázový film, typický pro proteiny, viz Obr. 26.



Obr. 26: Časový test pro čistá kultivační média M9 (glukózové médium) a LB (médium obsahující proteiny) [37]

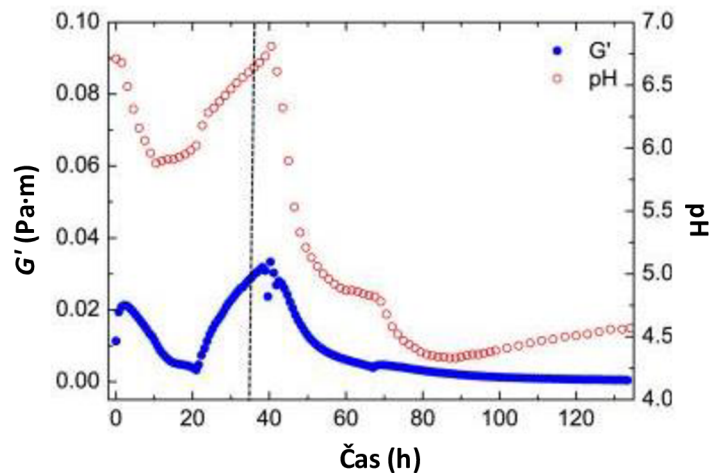
V glukózovém médiu vytvořily biofilm pouze bakterie *E. coli* a *P. fluorescens*, proto v tomto médiu nebyla provedena žádná měření s *B. subtilis*.



Obr. 27: Časový test pro *E. coli* a *P. fluorescens* v médiu LB a M9 [37]

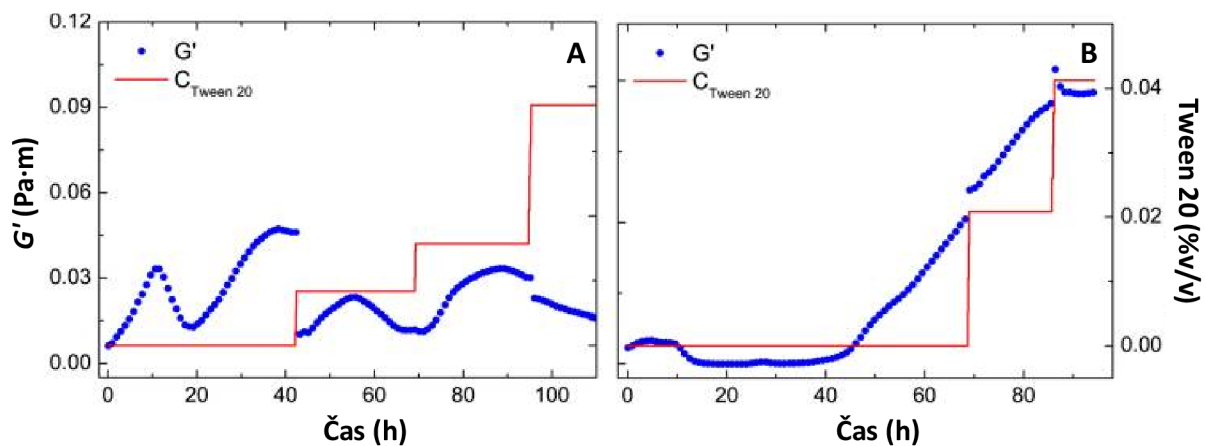
Obr. 27 ukazuje růst biofilmu *E. coli* a *P. fluorescens* v obou typech médií. V LB médiu první nárůst odpovídá adsorpci proteinů z média a bakterií na mezifázové rozhraní. Následný pokles elastického modulu byl nejspíše způsoben kyselými produkty metabolických reakcí bakterií. Následný nárůst potom představuje tvorbu samotného biofilmu. V glukózovém médiu v případě *E. coli* došlo k nárůstu elastického modulu spolu s tvorbou biofilmu, v případě *P. fluorescens* byl ale elastický modul sotva detekovatelný. Dalším testem byl opět test časový, tentokrát ale při různých teplotách. Měření probíhala při 25 °C a 30 °C. Průběh růstu biofilmu byl v obou případech velmi podobný při obou teplotách, což značí, že každý bakteriální kmen má svou charakteristickou elastickou křivku. Při teplotě 30 °C se ale elastický modul držel v nižších hodnotách a nárůst elastického modulu začal dřív, což bylo nejspíše způsobeno zrychlením bakteriálního metabolismu. Dalším krokem bylo pozorování růstu biofilmu tvořeného *B. subtilis* v LB médiu. V časovém testu byl srovnáván *B. subtilis* a jeho mutantní forma, neschopná tvorby sufaktinu. Výsledkem byla rychlá počáteční adsorpce proteinů z média i bakterií, ale u mutantního kmene téměř nedošlo k tvorbě biofilmu. To bylo potvrzeno

i při tenziometrickém měření, kdy bylo dobře vidět, že bakteriální biofilm tvořený mutantním kmenem pokrývá pouze malou část kapky, kdežto biofilm tvořený *B. subtilis* kapku pokrýl celou. Po těchto měřeních následovaly opět časové testy, tentokrát se změnou pH ve vodné fázi v průběhu testu. Hodnota pH byla upravována pomocí 0,25M HCl. V prvním kroku došlo k růstu biofilmu za normálních podmínek, po 30 h bylo upraveno pH na hodnotu 4 až 5 a byla pozorována silná závislost mezi pH a elastickým modulem. Výsledkem byl silný pokles elastického modulu u všech kmenů. Na Obr. 28 je příklad časového testu se změnou pH pro *E. coli*.



Obr. 28: Časový test pro růst biofilmu *E. coli* při snižování pH [37]

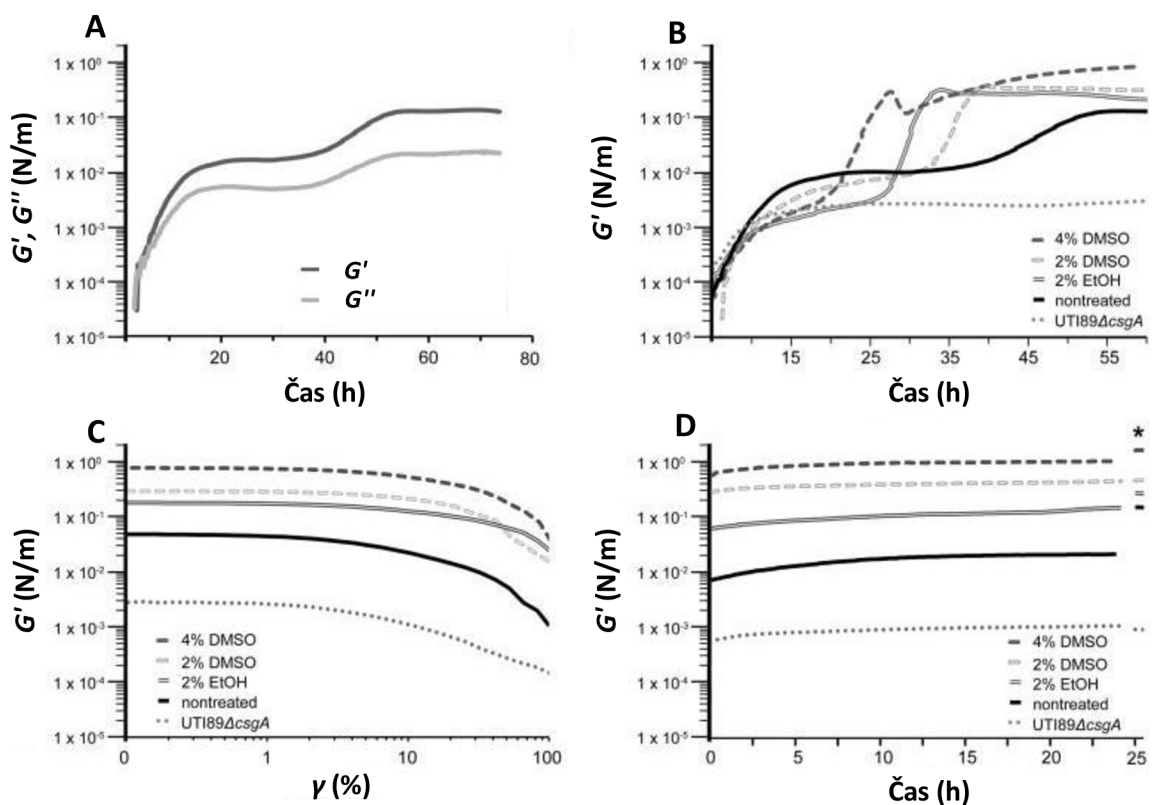
Posledním testem bylo sledování průběhu růstu biofilmu s postupným přidáváním tenzidu Tween 20 o koncentraci 1 % obj. u kmenů *P. fluorescens* a *B. subtilis*. Jak je zřejmé z Obr. 29, u *P. fluorescens* došlo k výraznému poklesu elastického modulu po prvním přidávku, oproti tomu u *B. subtilis* k žádnému zásadnímu snížení elastického modulu nedošlo.



Obr. 29: Časový test pro změnu objemové koncentrace tenzidu Tween 20: A) *P. fluorescens*; B) *B. subtilis* [37]

Podle autorů je mezifázová reologie účinná metoda ke studiu růstu bakteriálního biofilmu. Ze závislosti elastického modulu na čase je také patrné, že se nejedná pouze o prostý nárůst hmoty, ale že růst biofilmu má různá stadia. Odlišení jednotlivých fází růstu biofilmu by mohlo být užitečné při hledání optimálních podmínek jeho odstranění.

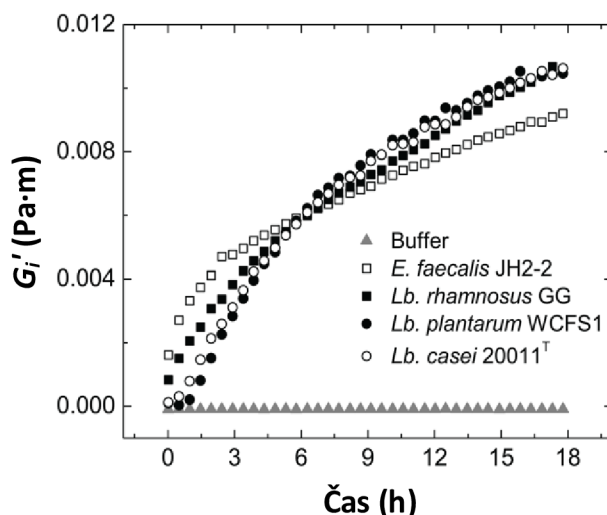
Autoři článku [38] se zaměřili na tvorbu a charakterizaci biofilmů tvořených uropatogenní *E. coli* UTI89 a mutantního kmene *E. Coli* UTI89 Δ cgsA neschopného produkce curli, což jsou extracelulární amyloidová vlákna, která jsou nezbytná pro většinu patogenních kmenů k tvorbě biofilmu na rozhraní kapalina-vzduch. Oba kmeny byly kultivovány v tekutém médiu YESCA, obsahujícím kasaminokyseliny (směs aminokyselin a kaseinových hydrolyzátů). Kultivační media byla použita čistá nebo s přidavkem 2% DMSO (dimethylsulfoxid), 4% DMSO nebo 2% etanolu, přičemž obě tato rozpouštědla by měla zvyšovat produkci curli. Růst biofilmu byl pozorován pomocí mikroskopických metod, konkrétně BAM (Brewster angle microscopy) a SEM (scanning electron microscopy) a mezifázové reologie. Reologická měření byla prováděna na rotačním reometru AR-G2 od firmy TA Instruments s použitím geometrie kroužku s měřicí nádobou s dvojitou stěnou (DWR). Na dno měřicí nádoby byla pomocí hadičky napojena stříkačka s objemem 5 ml, která doplňovala odpařený objem kultivačního média rychlostí 0,032 ml/h. Nejprve byly provedeny časové testy při konstantní frekvenci $f = 0,5$ rad/s a amplitudě smykové deformace $\gamma = 1$ %, doba trvání časových testů byla 72 h. Po uplynutí této doby následoval amplitudový test při konstantní frekvenci $f = 0,5$ rad/s s rozsahem amplitudy deformace $\gamma = 0$ až 100 %.



Obr. 30: a) Časový test pro UTI89 bez přidavku rozpouštědel, b) srovnání časových testů pro UTI89 s přidavkem DMSO 4 a 2 %, 2% EtOH, bez rozpouštědla a UTI89 Δ cgsA bez přidavku rozpouštědla, c) amplitudové testy provedené po časových testech z důvodu deformace vzniklých biofilmů, d) pozorování regenerace biofilmů pomocí časových testů [38]

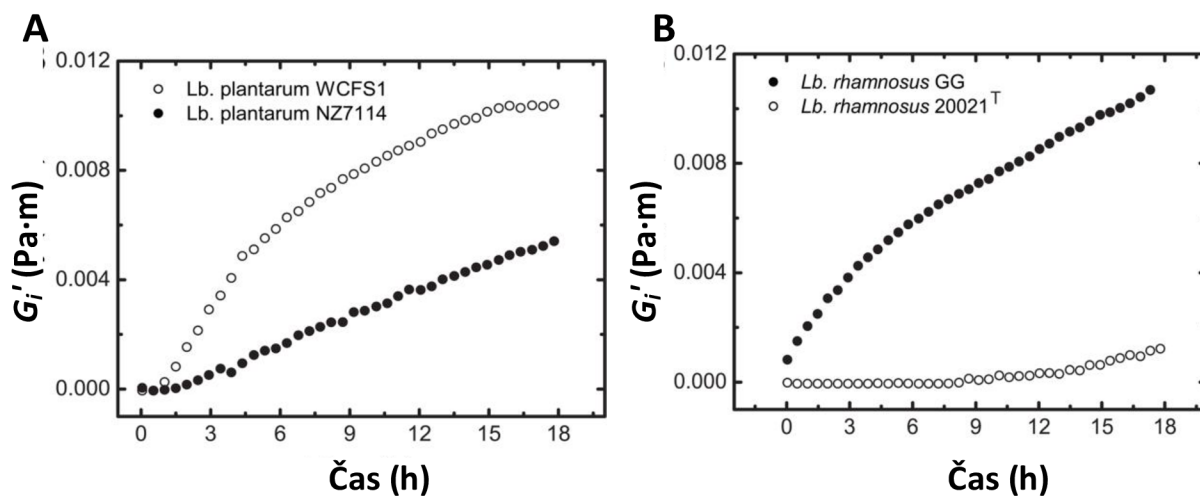
Na Obr. 30a) je vidět průběh růstu bakteriálního biofilmu tvořeného kmenem *UTI89* bez přídavku rozpouštědla. Na začátku je vidět převažující viskózní modul, jelikož bakterie ještě nestihly adsorbovat na mezifázové rozhraní, poté už po celou dobu měření převládá elastický modul. Na Obr. 30b) jsou srovnané závislosti elastického modulu (růstu biofilmu) na čase pro *UTI89* s přídavkem rozpouštědla i bez a *UTI89ΔcgsA*. Jak je z obrázku patrné, mutantní kmen neschopný tvořit curli, nevytvořil bakteriální biofilm. Dále jsou pro všechny biofilmy patrné dvě fáze obsahující rostoucí a lineární oblast, první nárůst odpovídá mezifázovému filmu, který je tvořen proteiny obsaženými v kultivačním médiu a zvyšujícímu se počtu bakterií na rozhraní, proto je tento nárůst patrný i pro mutantní kmen *UTI89ΔcgsA*. První lineární oblast naznačuje stacionární fázi bakterií – v této fázi mutantní kmen zůstává po zbytek měření. Jakmile bakterie dosáhly stacionární fáze, u vzorků s přídavkem rozpouštědla došlo k prudkému nárůstu elastického modulu, přičemž při dosažení další lineární oblasti stále nebyl vytvořen zralý biofilm, jak bylo potvrzeno mikroskopickými metodami. Biofilmy byly viditelné až po zhruba 60 hodinách. Z amplitudových testů je patrné, že biofilmy, u nichž byla tvorba curli zvyšována pomocí DMSO, byly nejpevnější a vykazovaly nejmenší pokles elastického modulu při vyšších amplitudách deformace. Po amplitudových testech následovaly opět testy časové, během kterých byla sledována schopnost regenerace. Regenerace byly schopny všechny vzorky, k nejrychlejší regeneraci ale došlo u vzorků s DMSO, čímž bylo potvrzeno, že množství amyloidových vláken, v tomto případě konkrétně curli, ovlivňuje tvorbu biofilmu i jeho regeneraci.

Autoři článku [39] studovali interakci mezi střevními mikroorganismy a jejich hostiteli. Ke studiu si vybrali dvojice kmenů *Lactobacillus plantarum* WCFS1 a mutantní kmen neschopný produkce pili *Lb. plantarum* NZ7114 a *Lb. rhamnosus* GG a mutantní kmen *Lb. rhamnosus* DSM20021, dále byly použity bakteriální kmeny *Lb. casei* DSM20011 a *Enterococcus faecalis* JH2-2. U těchto kmenů byla studována elektroforetická mobilita, hydrofobicita, jejich vliv na povrchové napětí nebo viskoelastické vlastnosti. Viskoelastické vlastnosti byly měřeny pomocí mezifázové reologie s použitím reometrů Anton Paar MCR300, MCR501 a MCR702 s využitím bikonického senzoru. U bakteriálních kmenů bylo studováno množství bakterií adsorbovaných na rozhraní vodná fáze-olej, k čemuž byl využit časový test při konstantní amplitudě deformace $\gamma = 5 \%$ a konstantní frekvenci $f = 0,5 \text{ Hz}$, doba trvání byla 18 h.



Obr. 31: Časový test pro sledování adsorpce bakterií na rozhraní pufr-vzduch [39]

Na Obr. 31 je vidět, že všechny kmeny rodu *Lactobacillus* měly podobný časový průběh adsorpce a vytvořily na mezifázovém rozhraní převážně elastickou síť, kdežto průběh adsorpce *E. faecalis* JH2-2 se lišil. Tato odlišnost je nejspíše způsobena velikostí daných bakterií, jelikož *E. faecalis* JH2-2 je rozměrově menší než kmeny rodu *Lactobacillus*, je počáteční nárůst elastického modulu strmější. Hodnota elastického modulu vypovídá o hydrofobicitě bakterií a o jejich vzájemných interakcích.



Obr. 32: Výsledky časových testů A) *Lb. plantarum* WCFS1 a NZ7114, B) *Lb. plantarum* GG a DSM2001^T [39]

Na Obr. 32 jsou srovnány výsledky časových testů mezi kmeny *Lb. plantarum* WCFS1 a *Lb. rhamnosus* GG a jejich mutantními kmeny neschopnými produkce pili a intracelulárních proteinů. Jak je vidět, u mutantních kmenů je hodnota elastického modulu podstatně nižší, což je způsobeno především menším počtem interakcí mezi bakteriemi. Střevní bakterie neustále soupeří o živiny a místo ke kolonizaci, proto je rychlá adheze bakterií na povrch výhodou a mezifázová reologie umožňuje odhadnout rychlost adsorpce a tvorbu bakteriální vrstvy na mezifázovém rozhraní.

V této práci je metoda mezifázové reologie aplikována na růst mikrobiální kultury Kombucha. Tato kultura se využívá k fermentaci slazeného čaje za vzniku stejnojmenného nápoje. Jelikož při fermentaci dochází ke spotřebě a tvorbě nejrůznějších látek, specifické spotřebě živin, změnám pH, změnám v mikrobiálním složení a změnám dalších faktorů, které mohou ovlivňovat růst biofilmu, bude tato část diplomové práce věnována poznatkům z průběhu fermentace, zejména v závislosti na zdroji uhlíkového zdroje a jeho koncentraci.

Autoři článku [40] studovali vliv koncentrace sacharózy na obsah hlavních metabolitů při fermentaci. Jako zdroj živin byla použita melasa obsahující 50,4 % sacharózy a 1,8 % dusíku. Vzorky byly připraveny tak, aby výsledné koncentrace sacharózy byly 70, 50 a 35 g/l. Množství metabolitů a sacharózy bylo stanovováno pomocí kitu Böhlinger-Mannheim test. Dále sledovali změnu pH, změnu celkové acidity a nárůst biomasy v průběhu fermentace, která trvala 14 dní. Počáteční hodnota pH byla ve všech případech blízká hodnotě 7. Zatímco u koncentrace sacharózy 70 g/l došlo ke snížení pH po třech dnech na 6,5 a po 14 dnech hodnota pH klesla na 6,3, u koncentrace 50 g/l a 35 g/l došlo během prvních tří dní k poklesu pH na hodnotu mezi 5 a 5,25 a po dvou týdnech na 4,5 pro 50 g/l a 4,3 pro 35 g/l. Co se týká metabolitů, autoři se zaměřili především na kyselinu octovou a mléčnou. Tvorba kyseliny octové byla nejmenší při koncentraci 70 g/l, po třech dnech byla koncentrace kyseliny octové 0,1 g/l a po dvou týdnech 0,19 g/l, u nižších koncentrací sacharózy byla koncentrace kyseliny octové po třech dnech 0,2 g/l, po dvou týdnech 0,63 g/l pro 50 g/l sacharózy a 0,60 g/l pro 35 g/l sacharózy. U kyseliny mléčné byl naopak největší nárůst v případě koncentrace sacharózy 70 g/l, po třech dnech byla koncentrace kyseliny mléčné 0,13 g/l, po dvou týdnech 0,33 g/l. V případě koncentrace sacharózy 50 g/l to bylo 0,12 a 0,15 g/l a v případě 35 g/l to bylo 0,06 a 0,12 g/l. Autoři se také zaměřili na spotřebu sacharózy v průběhu fermentace. Bylo zjištěno, že při koncentraci 70 g/l je spotřeba sacharózy rychlá a po 14 dnech bylo spotřebováno 97 % sacharózy, v případě koncentrací 50 g/l a 35 g/l bylo spotřebováno pouze 40 a 25 %. Co se týká přírůstku biomasy po dvou týdnech fermentace, u koncentrace 70 g/l byl celkový přírůstek biomasy 260 g, u 50 g/l 100 g a u 35 g/l 85g. Podle autorů se koncentrace 70 g/l jeví jako optimální pro fermentaci, jelikož vzniká velké množství požadované kyseliny mléčné, malé množství kyseliny octové a dochází k optimálnímu využití sacharózy v průběhu fermentace, přímá závislost mezi koncentrací sacharózy a průběhem fermentace ale zjištěna nebyla.

Při výrobě nápoje Kombucha se ve většině případů používá jako zdroj uhlíku sacharóza a jediným zdrojem dusíku jsou potom dusíkaté látky obsažené v černém čaji. Autoři článku [41] se zabývali rozdíly v produktech fermentace při využití sacharózy o koncentraci 70 g/l a tří druhů melasy o srovnatelné koncentraci sacharózy. Studován byl jak úbytek sacharózy, tak přírůstek kyseliny octové a mléčné v průběhu fermentace. Bylo také měřeno pH v závislosti na čase pro všechny zdroje uhlíku. Počáteční pokles pH byl největší při využití sacharózy jako zdroje uhlíku, kdy hodnota pH klesla během prvních tří dnů z pH 7,75 na 6,25, u vzorků melasy bylo počáteční pH nižší a během tří dnů kleslo z hodnoty 7,25 na hodnoty v rozmezí 6,25 a 6,5. Zatímco vzorek se sacharózou vykazoval exponenciální pokles pH, vzorky s melasou poté vykazovaly různé chování od prudkého poklesu pH po jeho nárůst. Co se týká produkce organických kyselin, byl rozdíl mezi zdroji uhlíku velmi markantní. V případě sacharózy došlo k dvojnásobně vyšší produkci kyseliny octové než v případě použití melasy jako zdroje uhlíku, což může být způsobeno buď tím, že některé ze složek melasy snižují aktivitu octových bakterií

nebo je vzniklá kyselina octová přeměněna na jiné sloučeniny. V případě kyseliny mléčné bylo dosaženo nejmenšího nárůstu při využití sacharózy jako zdroje, nárůst byl velmi pomalý a koncentrace po 14 dnech nepřesáhla hodnotu 0,05 g/l, zatímco v případě využití melasy byly konečné koncentrace 0,16; 0,32 a 0,40 g/l. Tento rozdíl byl nejspíše způsobený tím, že použité melasy obsahovaly i růstový faktor biotin, jelikož konečná koncentrace kyseliny mléčné za použití melasy se zvyšuje v závislosti na množství biotinu obsaženého v daném druhu melasy. Průběh spotřeby sacharózy v čase, je také odlišný v případě sacharózy a melasy. Zatímco konečná koncentrace sacharózy u melas jako zdroje uhlíku se pohybovala v rozmezí 0 až 10 g/l, konečná koncentrace sacharózy při jejím využití jako zdroj uhlíku po dvou týdnech fermentace byla asi 35 %. Jako poslední byl sledován přírůstek biomasy za 14 dní fermentace. Biofilm v případě čisté sacharózy zvýšil hmotnost o 17,1 g, zatímco v případě melas došlo k nárůstu hmotnosti o 154,8; 165,6 a 270,8 g. Tento velký rozdíl je způsobený tím, že melasa obsahuje kromě sacharózy zhruba 20 % organické složky, obsahující mimo jiné i dusík, který je v případě čisté sacharózy možné získávat pouze ze sloučenin obsažených v čaji ve velmi omezeném množství. Autoři potvrdili, že melasa může být využita jako levný zdroj uhlíku pro výrobu Kombuchy, jelikož ve finálním nápoji je obsaženo velké množství kyseliny mléčné, což je považováno za žádoucí.

Vlivem zdroje uhlíku na produkty fermentace se zabýval i autor článku [42]. Jako zdroje uhlíku byly v jeho případě využity sacharóza a laktóza o koncentraci 30, 50, 70 a 100 g/l a glukóza a fruktóza o koncentraci 50 a 150 g/l. Sledovány byly dva konkrétní produkty, a to etanol a kyselina mléčná po dobu fermentace trvající 17 dní. Zde bude popsán především vliv koncentrace sacharózy. V případě tvorby etanolu byla po prvních dvou dnech nejvyšší koncentrace ve vzorku s koncentrací sacharózy 30 g/l a činila 0,25 g/l. V ostatních vzorcích se koncentrace po dvou dnech fermentace pohybovala o řád níž. Konečné koncentrace etanolu ve vzorcích po 17 dnech (od nejnižší koncentrace sacharózy po nejvyšší) byly 4,5; 4,8; 1,0 a 0,01 g/l. Zajímavý byl také fakt, že nejvyšší koncentrace etanolu pro jednotlivé koncentrace sacharózy byly dosaženy v různých časech v průběhu fermentace, u koncentrace 30 g/l byla nejvyšší koncentrace etanolu dosažena po 17 dnech (4,5 g/l), u koncentrace 50 g/l po 10 dnech (6,3 g/l), u koncentrace 70 g/l a 100 g/l po 6 dnech (3,3 g/l a 2,2 g/l). Kromě tvorby etanolu byla sledována i tvorba kyseliny mléčné v průběhu fermentace, u které bylo dosaženo maximální koncentrace šestý den pro všechny vzorky.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Hovězí sérový albumin (Sigma Aldrich) – čistota $\geq 98\%$, č. š. SLBJ2586V

Sacharóza

Demineralizovaná voda

Kombucha (Reborn Food)

Chlorid sodný (Sigma Aldrich) – čistota $\geq 99\%$, č. š. SLBW9219

Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Penta) – čistota $\geq 99\%$, č. š. 1509230910

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Penta) – čistota $\geq 99\%$, č. š. 1601240306F

4.2 Použité přístroje

Reometr – AR-G2 Rheometer (TA) Instruments

Analytické váhy – Denver Instrument

4.3 Příprava vzorků

4.3.1 Hovězí sérový albumin

Vzorek o koncentraci $0,45 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl připraven navážením 5,9745 g BSA a rozpuštěním v 200 ml demineralizované vody za stálého míchání při laboratorní teplotě.

4.3.2 Kombucha

Živá kultura byla uchovávána v roztoku sacharózy, který byl připravován každých 10 dní následujícím způsobem: byl připraven 1 l černého čaje Assam, ve kterém bylo rozpuštěno 100 g sacharózy. Do tohoto roztoku bylo přidáno 150 ml již fermentovaného roztoku. Měření bylo vždy provedeno se vzorkem o celkovém objemu 100 ml a částí mikrobiální kultury o hmotnosti 3 až 4 g.

Růst biofilmu v závislosti na koncentraci sacharózy

Vzorky byly připraveny rozpuštěním 20, 10 a 0 g sacharózy v 200 ml černého čaje Assam. Do takto připravených roztoků bylo přidáno 30 ml již fermentového roztoku. K měření bylo odpipetováno vždy 100 ml roztoku a přidána část mikrobiální kultury Kombucha.

Růst biofilmu v závislosti na iontové síle

Nejprve byl připraven zásobní roztok o koncentraci sacharózy 100 g/l rozpuštěním 50 g sacharózy v 500 ml černého čaje. Poté byly připraveny roztoky o koncentraci NaCl 1 a 2 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rozpuštěním 5,8427 a 11,6831 g ve 100 ml zásobního roztoku. Do obou roztoků bylo přidáno 15 ml již fermentovaného roztoku. K měření bylo z takto připravených roztoků odpipetováno 100 ml do měřicí nádoby a přidána část mikrobiální kultury Kombucha.

Růst biofilmu v závislosti na pH

Roztoky o daném pH a objemu 200 ml byly připraveny podle Tab. 3 rozpuštěním daných navážek v 200 ml připraveného černého čaje Assam o koncentraci sacharózy 100 g/l. Do připravených roztoků bylo dále napipetováno 30 ml již fermentovaného roztoku. K měření bylo do měřicí nádoby napipetováno 100 ml roztoku a přidána část mikrobiální kultury Kombucha.

Tab. 3: Navážky pro přípravu roztoků o daném pH a objemu 200 ml

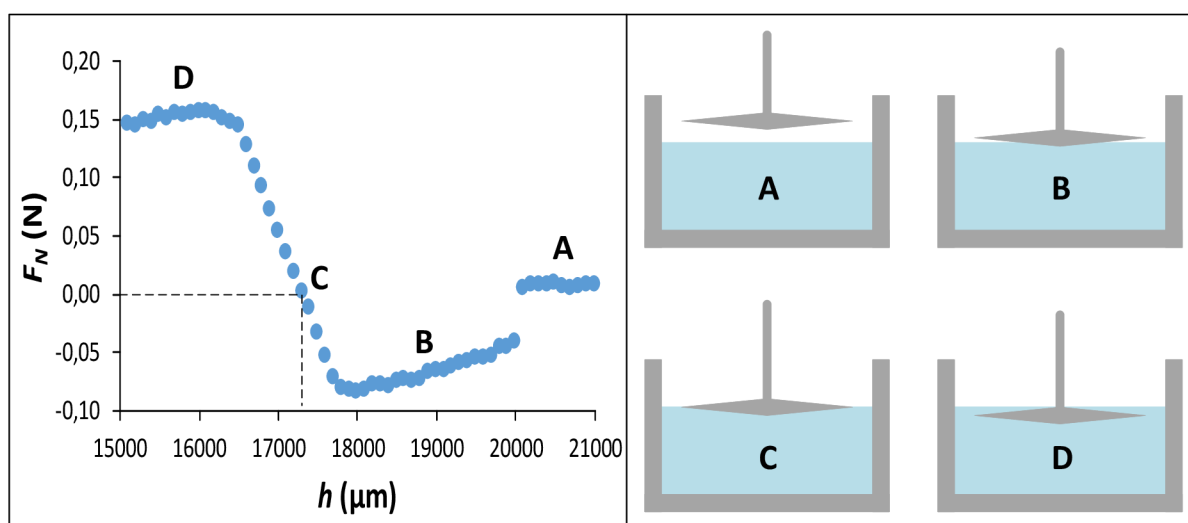
pH	3	10
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (g)	0,0005	4,0143
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (g)	3,6427	0,0028

4.3.3 Nastavení měřicí polohy – squeeze test

Před samotným hledáním měřicí polohy bylo třeba uvést do chodu reometr a počítač následujícím způsobem: nejprve byl zapnut přívod vzduchu, odšroubována černá krytka na hřídéli reometru, spuštěn reometr a počítač.

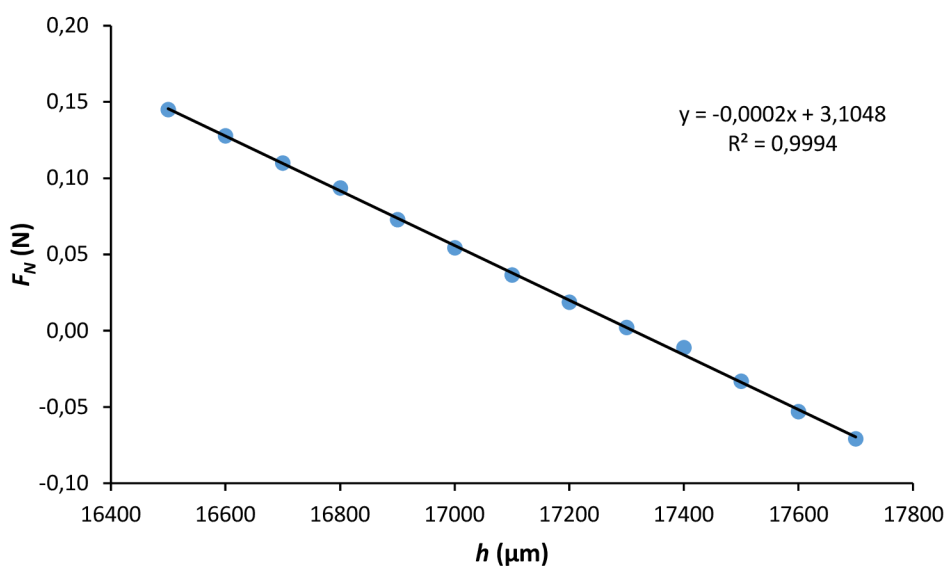
Pro sledování růstu biofilmu byl zvolen bikonický senzor. Při použití tohoto senzoru je mezifázové rozhraní hledáno pomocí squeeze testu v softwaru *Rheology Advantage*, což je závislost normálové síly na vzdálenosti senzoru ode dna měřicí nádoby (nulové polohy). Do měřicí nádoby bylo vždy napipetováno 100 ml vzorku. V případě vodného roztoku hovězího sérového albuminu byla výchozí poloha senzoru zvolena 21 000 μm . V případě vzorků kombuchy byla výchozí poloha senzoru nastavena na 21 000 až 22 000 μm , jelikož byl objem zvýšen z důvodu přítomnosti biofilmu v měřicí nádobě. Tyto hodnoty byly voleny v závislosti vzdálenosti hladiny od rysky měřicí nádoby, která se nachází ve vzdálenosti 19 500 μm ode dna nádoby. Squeeze test byl nastaven tak, aby senzor vždy klesl o 6 000 μm . Nastavení měřicí polohy proběhlo vždy přímo se vzorkem před samotným měřením.

Jako příklad uvedu nastavení měřicí polohy pro vzorek Kombuchy. U bikonického senzoru se měřicí poloha nachází v bodě, kdy je normálová síla rovna nule, viz Obr. 33.



Obr. 33: Příklad squeeze testu pro určení měřicí polohy, výsledek squeeze testu je uveden vlevo, vpravo jsou uvedeny odpovídající polohy bikonického senzoru

Přesné hodnoty koeficientů rovnice byly provedeny pomocí funkce LINREGRESE v programu MS Excel z lineární části znázorňující průchod senzoru rozhraním, viz Obr. 34.



Obr. 34: Oblast znázorňující průchod senzoru skrz mezifázové rozhraní

Výpočet hodnoty měřicí polohy byl proveden následovně:

$$x = \frac{-3,104757}{-0,00018} = 17311,64 \mu\text{m} .$$

4.3.4 Postup měření – časový test

Nastavení časového testu proběhlo v softwaru *Rheology Advantage* po nastavení měřicí polohy. Vždy byl v záložce *Oscillation procedure* vybrán *Conditioning step* pro relaxaci vzorku a *Time sweep*.

Pro vodný roztok hovězího sérového albuminu bylo zvoleno následující nastavení: doba trvání 4 h, amplituda deformace 0,1 %, frekvence 1 Hz, 30 s na bod.

Pro sledování adsorpce mikroorganismů na mezifázové rozhraní bylo zvoleno následující nastavení: doba trvání 20 h, amplituda deformace 0,1 %, frekvence 1 Hz, 5 min na bod.

Pro sledování tvorby biofilmu v závislosti na koncentraci sacharózy bylo zvoleno následující nastavení: doba trvání 72 h, amplituda deformace 0,1 %, frekvence 1 Hz, 10 min na bod. Pro sledování tvorby biofilmu v závislosti na iontové síle a pH byla z časových důvodů snížena doba trvání na 40 (1 mol·dm⁻³ roztok NaCl), 30 (2 mol·dm⁻³ roztok NaCl) a 26 h (pH 3 a pH 10). Ostatní parametry zůstaly stejné jako při sledování tvorby biofilmu v závislosti na koncentraci sacharózy.

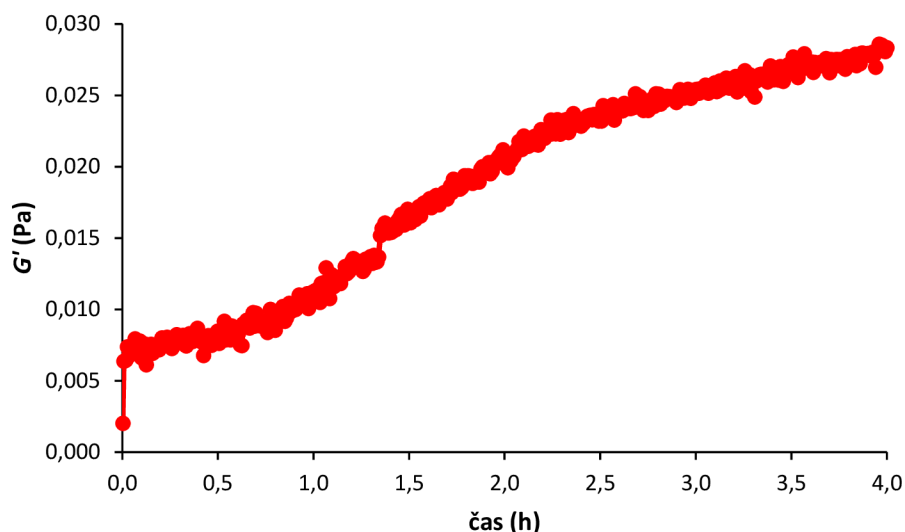
4.3.5 Postup měření – amplitudový test

Amplitudový test následoval vždy okamžitě po ukončení časového testu a jeho nastavení bylo ve všech případech stejné: rozsah amplitudy deformace 0,01 až 1000 %, frekvence 1 Hz, logaritmický mód, 6 bodů na dekádu.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Hovězí sérový albumin – adsorpce na mezifázové rozhraní

5.1.1 Časový test



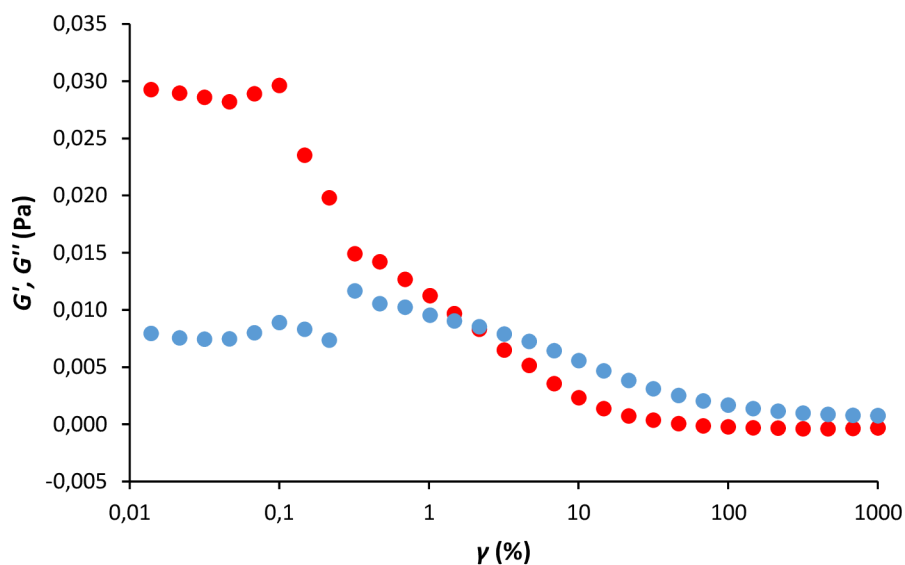
Obr. 35: Časový test znázorňující adsorpci molekul BSA na mezifázové rozhraní kapalina-vzduch pro koncentraci $0,45 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, doba trvání 4 h, $\gamma = 0,1 \%$, $f = 1 \text{ Hz}$

Hovězí sérový albumin tvoří na rozhraní kapalina-vzduch převážně elastický film. Na Obr. 35 je výsledek časového testu, vyobrazující adsorpci molekul BSA na mezifázové rozhraní po dobu 4 h. V grafu je uveden pouze elastický modul G' , protože udává množství adsorbovaných molekul a interakce mezi molekulami na mezifázovém rozhraní. Viskózní modul G'' je značně nižší, proto v grafu není uveden. Při interpretaci vzniku mezifázových filmů se v případě časových testů využívá ve většině případů pouze elastický modul, viz kapitola 3.

Během první hodiny je patrný mírný nárůst, jelikož molekula BSA je poměrně velká a difúze k mezifázovému rozhraní je proto pomalá. Mezi 1 a 2,5 h, dochází k rychlejší adsorpci, jelikož molekuly jsou již blíže povrchu a dochází ke změně prostorové konformace molekul BSA. Ke změně konformace dochází z toho důvodu, že proteiny jsou amfifilní molekuly, obsahují hydrofobní i hydrofilní části a zaujmou tedy na rozhraní takovou pozici, která je pro ně energeticky nejvýhodnější. V poslední fázi je nárůst elastického modulu mírný, protože rozhraní je již obsazeno molekulami BSA, které tvoří elastickou síť. Tento průběh adsorpce je typický pro makromolekuly, částice nebo mikroorganismy, u kterých dochází k vzájemným interakcím na mezifázovém rozhraní.

Tento test byl proveden pouze k ověření, že je metoda dostatečně citlivá, aby zaznamenala časový průběh změn na mezifázovém rozhraní. V rámci optimalizace metody ke studiu tvorby biofilmů byl tedy test proveden pouze jednou.

5.1.2 Amplitudový test

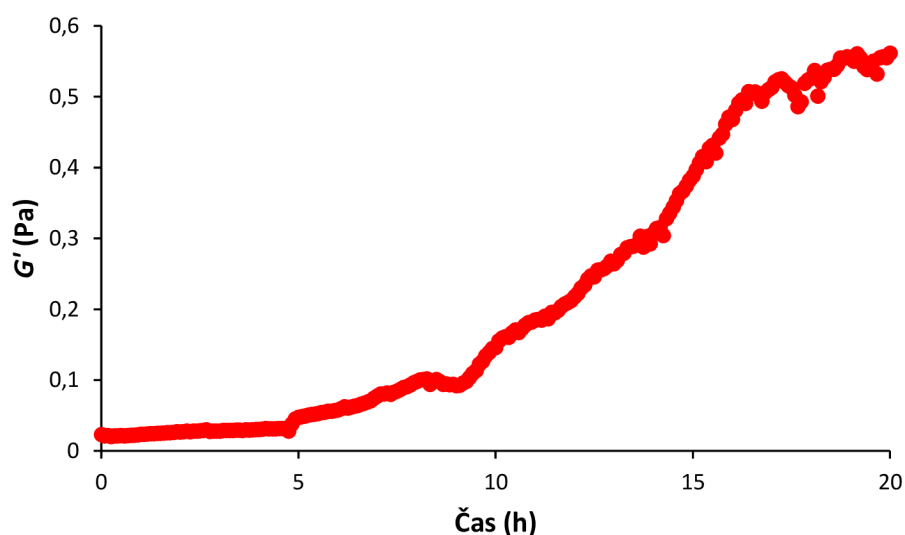


Obr. 36: Amplitudový test pro mezifázový film tvoření BSA, $f = 1$ Hz, $\gamma = 0,01$ až 1000 %

Z výsledku amplitudového testu na Obr. 36 je vidět, že hovězí sérový albumin vytvořil na mezifázovém rozhraní převážně elastický film síťové struktury, jelikož elastický modul převyšuje modul viskózní. Lineární viskoelastická oblast (LVO) značí rozsah amplitudy deformace, na kterou je mezifázový film schopen odpovědět elastickou deformací, tzn. vrací se do původního stavu a nedochází k porušení struktury, končí okolo amplitudy deformace $\gamma = 0,1$ %. Viskózní modul začíná převažovat okolo hodnoty amplitudy deformace $\gamma = 2$ %.

5.2 Kombucha – adsorpce na mezifázové rozhraní

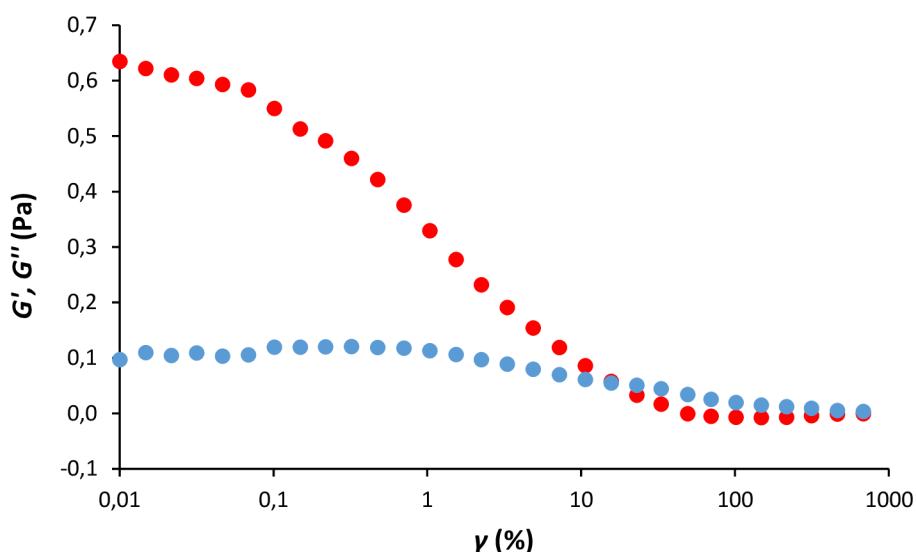
5.2.1 Časový test



Obr. 37: Časový test znázorňující adsorpci mikroorganismů na mezifázové rozhraní kapalina-vzduch pro koncentraci sacharózy 100 g/l, doba trvání 4 h, $\gamma = 0,1$ %, $f = 1$ Hz

V tomto případě se jedná o adsorpci mikroorganismů na mezifázové rozhraní kapalina-vzduch. Jak je vidět z Obr. 35 a Obr. 37, průběh adsorpce v případě BSA a mikroorganismů je podobný, ale nárůst elastického modulu v případě MO je výraznější a představuje téměř exponenciální závislost. Jedná se o 3 fáze, přičemž v první fázi dochází k difúzi mikroorganismů směrem k mezifázovému rozhraní, v tomto případě v časovém intervalu 0 až 5 hodin. V další fázi (5 až 16 hodin), došlo k prudkému nárůstu elastického modulu, protože dochází k množení MO, jejich adsorpci na rozhraní a vzájemným interakcím. V poslední fázi prudký nárůst elastického modulu ustal, což naznačuje, že mezifázové rozhraní je již obsazeno mikroorganismy.

5.2.2 Amplitudový test



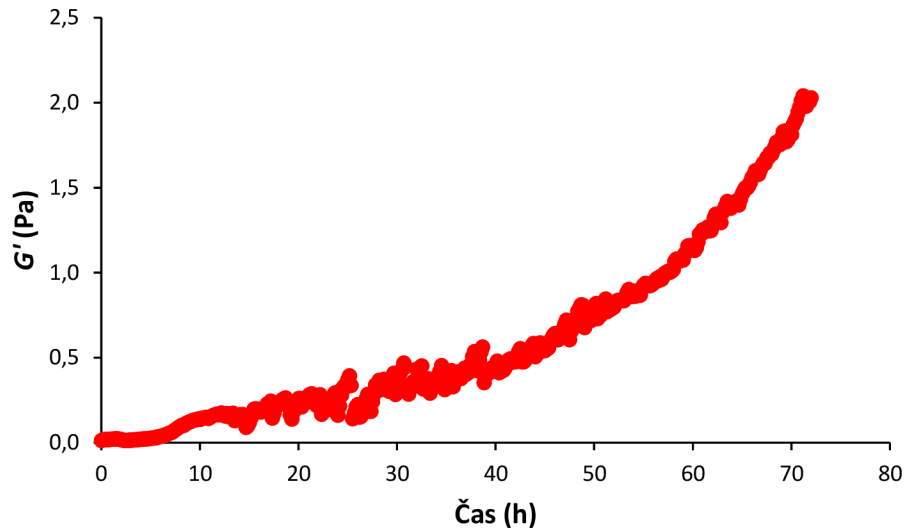
Obr. 38: Amplitudový test pro adsorbované mikroorganismy na rozhraní vodná fáze-vzduch, $f = 1$ Hz, $\gamma = 0,01$ až 1000 %

Výsledek amplitudového testu na Obr. 38 ukazuje, že adsorbované mikroorganismy na rozhraní vodná fáze-vzduch tvoří síťovou strukturu, konec LVO nastává při $\gamma = 0,06$ %, po překročení této amplitudy deformace již nadále není vzorek schopen deformaci kompenzovat a nastává trvalé porušení struktury, které je ale na rozdíl od porušení mezifázového filmu tvořeného BSA, velmi pozvolné. K překřížení modulů a tedy k získání převážně viskózního rozhraní dochází až okolo amplitudy deformace $\gamma = 15$ %.

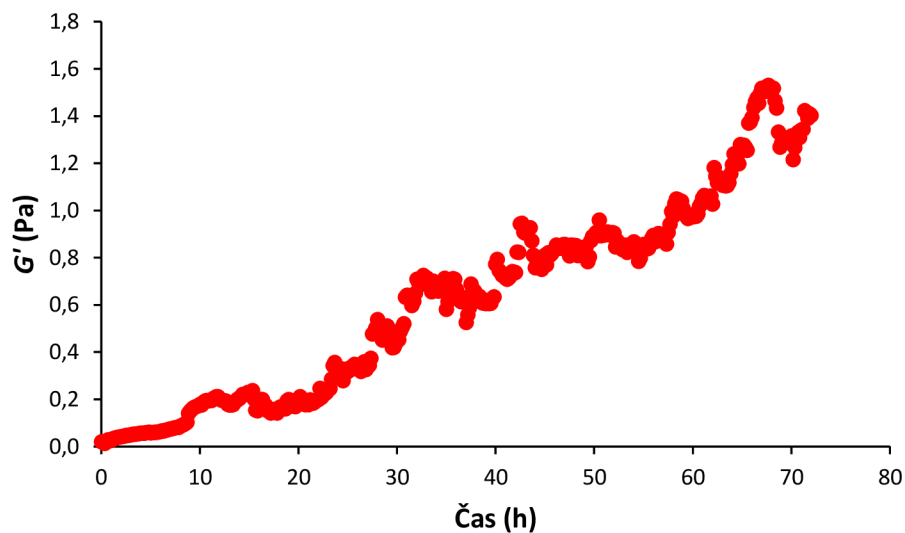
5.3 Kombucha – závislost růstu biofilmu na koncentraci sacharózy

5.3.1 Časové testy – růst biofilmu

Koncentrace sacharózy 100 g/l



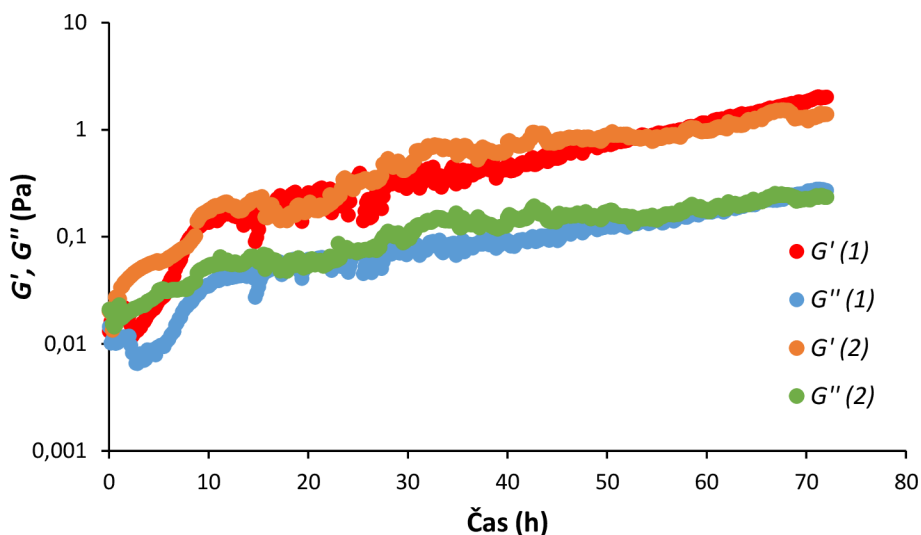
Obr. 39: Časový test – růst biofilmu při koncentraci sacharózy 100 g/l, $\gamma = 0,1 \%$, $f = 1 \text{ Hz}$
(měření č. 1)



Obr. 40: Časový test – růst biofilmu při koncentraci sacharózy 100 g/l, $\gamma = 0,1 \%$, $f = 1 \text{ Hz}$
(měření č. 2)

Na Obr. 39 a Obr. 40 jsou výsledky měření růstu mikrobiálního biofilmu bez trápení, tedy při koncentraci sacharózy 100 g/l, tato koncentrace se běžně používá při výrobě nápoje kombucha a byla proto zvolena jako výchozí. Průběh růstu je ale jiný, než u bakteriálních biofilmů v kapitole 3, který odpovídá čtyřem fázím růstu biofilmu, viz 2.5.1. Zatímco u čistě bakteriálních biofilmů jsou patrné dva rovinné úseky, které značí adsorpci na mezifázové

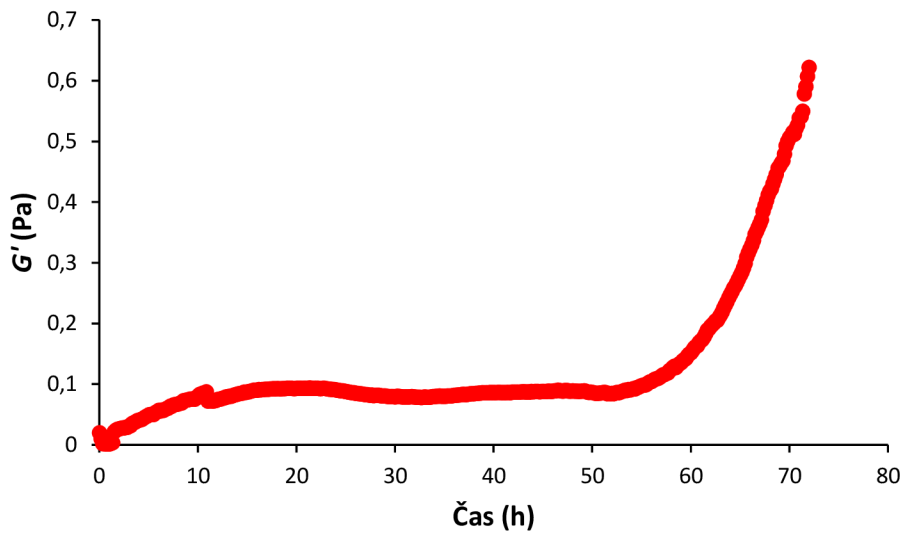
rozhraní a konec růstu biofilmu, v případě kombuchy je ve zvoleném časovém intervalu 72 h patrný pouze jeden rovinný úsek a to ten, který značí zaplnění mezifázového rozhraní mikroorganismy. Během prvních 15 až 20 hodin je patrný průběh adsorpce MO na rozhraní, srovnatelný s průběhem na Obr. 37. Po této fázi adsorpce nastává téměř exponenciální růst elastického modulu až do 72 hodiny, což znázorňuje rychlý růst pevného, elastického biofilmu.



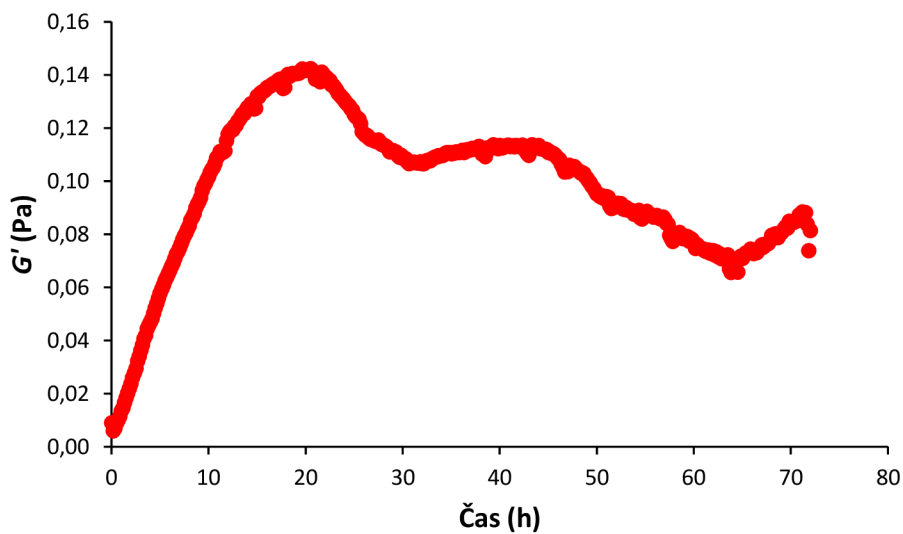
Obr. 41: Časový test – srovnání elastického a viskózního modulu pro obě měření při koncentraci sacharózy 100 g/l

Na Obr. 41 je srovnání obou měření s počáteční koncentrací sacharózy 100 g/l. Využití logaritmického měřítka umožňuje lepší srovnání průběhu růstu biofilmu. V tomto případě byl přidán i viskózní modul, který z počátku převyšoval modul elastický, ale s přibývajícím délkou měření je rozdíl mezi viskózním a elastickým modulem stále větší, což dokazuje zvyšující se elasticitu a pevnost vznikajícího biofilmu.

Koncentrace sacharózy 50 g/l



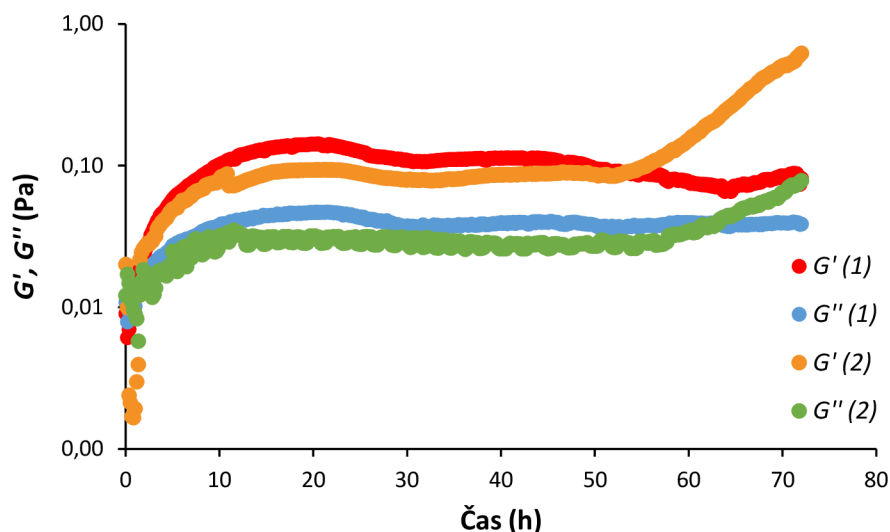
Obr. 42: Časový test pro růst biofilmu při koncentraci sacharózy 50 g/l, $\gamma = 0,1 \%$, $f = 1 \text{ Hz}$ (měření č. 1)



Obr. 43: Časový test pro růst biofilmu při koncentraci sacharózy 50 g/l, $\gamma = 0,1 \%$, $f = 1 \text{ Hz}$ (měření č. 2)

Na Obr. 42 a Obr. 43 jsou výsledky měření pro koncentraci sacharózy 50 g/l. Na první pohled se průběh elastického modulu v obou případech zdá odlišný, což způsobuje odlišné měřítko. Růst biofilmu nastal v prvním případě mezi 50 a 60 hodinou, zatímco ve druhém případě až mezi 60 a 70 hodinou, tudíž ve zbývajícím čase elastický modul nedosáhl takových hodnot jako v prvním případě. Před počátkem růstu je ale v obou případech průběh elastického modulu téměř stejný. Nejprve došlo k pozvolnému nárůstu během prvních 20 hodin, který odpovídá adsorpci mikroorganismů na mezifázové rozhraní. Průběh adsorpce je v tomto případě odlišný od předchozích případů, jelikož v tomto případě je nárůst elastického modulu lineární. Tento

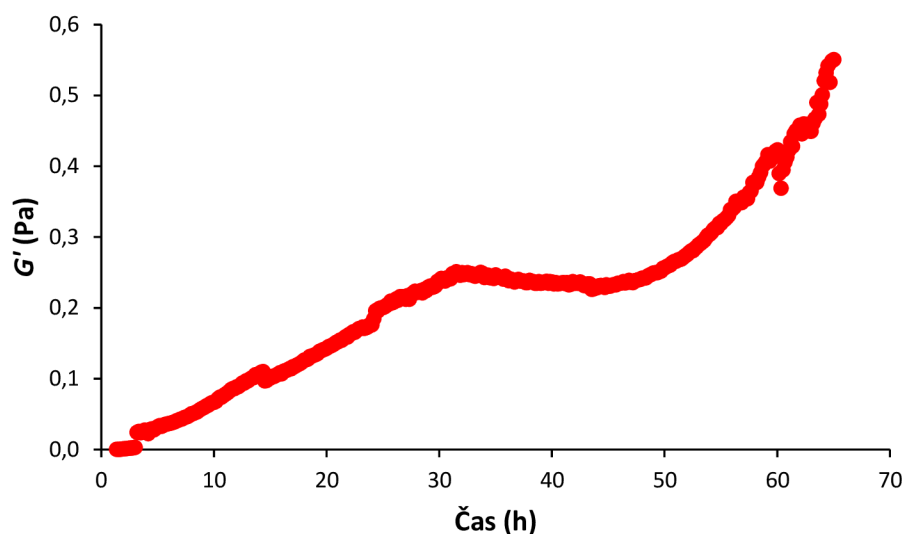
rozdíl je nejspíše způsobený pomalejším množením MO. Po první fázi dochází k mírnému poklesu elastického modulu a dlouhé stacionární fázi trvající 25 až 35 hodin, pravděpodobně kvůli nižší koncentraci sacharózy, jelikož rychlost spotřeby sacharózy se se snižující počáteční koncentrací snižuje, viz [40] a zřejmě nedochází k tak rychlému nárůstu biofilmu.



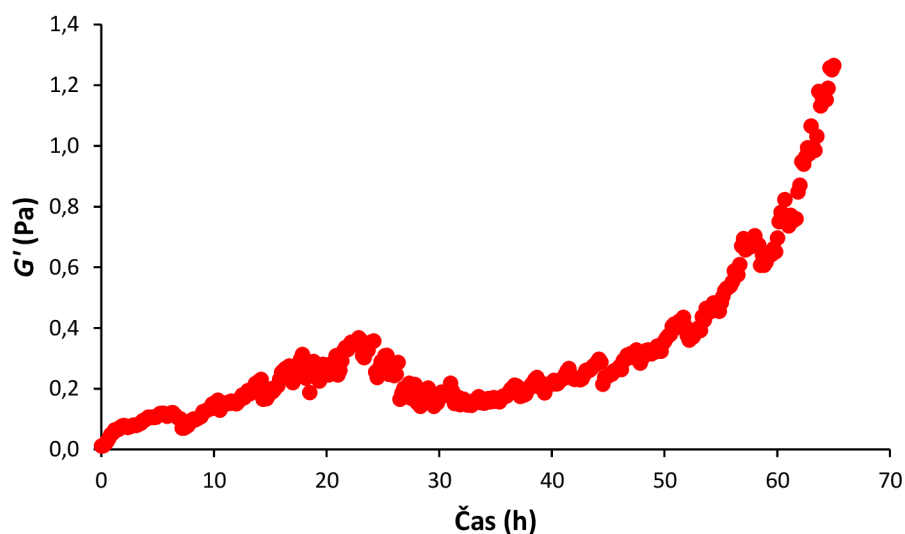
Obr. 44: Časový test – srovnání elastického a viskózního modulu pro obě měření při koncentraci sacharózy 50 g/l

Na Obr. 44 je vidět srovnání elastických a viskózních modulů pro koncentraci sacharózy 50 g/l. Na tomto grafu dobře je vidět podobné chování mezifázového rozhraní tvořeného MO. Zajímavý je zejména snižující se rozdíl mezi elastickým a viskózním modulem z prvního měření před počátkem růstu biofilmu, což značí snižování pevnosti vzniklého mezifázového filmu. Po opětovném započetí růstu elastického modulu se oba viskoelastické moduly začínají opět vzdalovat.

Koncentrace sacharózy 0 g/l



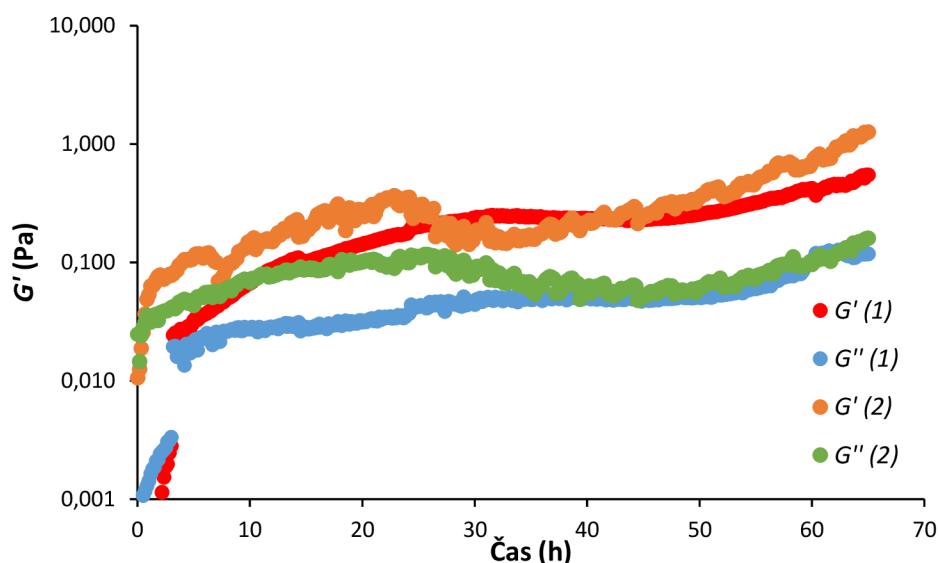
Obr. 45: Časový test pro růst biofilmu při koncentraci sacharózy 0 g/l, $\gamma = 0,1 \%$, $f = 1 \text{ Hz}$ (měření č. 1)



Obr. 46: Časový test pro růst biofilmu při koncentraci sacharózy 0 g/l, $\gamma = 0,1 \%$, $f = 1 \text{ Hz}$ (měření č. 2)

Na Obr. 45 a Obr. 46 jsou závislosti elastického modulu na čase pro koncentraci sacharózy 0 g/l. Při druhém měření došlo k jeho předčasnému ukončení, proto jsou zobrazeny výsledky obou měření pouze do 65 hodin. Jak je z grafů vidět, i v tomto případě, stejně jako v případě koncentrace sacharózy 50 g/l, je počáteční nárůst elastického modulu odpovídající adsorpci MO na mezifázové rozhraní lineární. V obou případech je přesázena doba adsorpce 20 h. Při prvním měření nastal konec adsorpce po 32 hodinách, poté nastal mírný pokles elastického modulu

následovaný jeho rychlým nárůstem. Ve druhém případě byla fáze adsorpce ukončena po 24 h, následoval značný pokles elastického modulu trvající 5 hodin a poté prudký nárůst.



Obr. 47: Časový test – srovnání elastického a viskózního modulu pro obě měření při koncentraci sacharózy 0 g/l

Na Obr. 47 je vidět srovnání viskoelastických modulů pro obě měření při koncentraci sacharózy 0 g/l. Průběh obou měření je podobný, avšak pokles i nárůst elastického modulu je ve druhém případě výraznější. V případě prvního měření se rozdíl mezi elastickým a viskózním modulem z počátku zvětšuje a poté tento rozdíl zůstává konstantní, což naznačuje, že mezifázový film nabýval na tloušťce, ale jeho struktura nebyla příliš pevná. Ve druhém případě je vidět počáteční zvětšující se rozdíl mezi oběma moduly, při poklesu elastického modulu došlo opět k přiblížení obou modulů, což značí snížení pevnosti struktury mezifázového filmu a poté se oba moduly začaly oddalovat, což značí zvyšování pevnosti struktury při růstu biofilmu.

Všechny časové testy v rámci studia vlivu koncentrace sacharózy na tvorbu biofilmu byly provedeny dvakrát vzhledem k časové náročnosti měření. Vzhledem k tomu, že se jedná o živou kulturu, nebylo možné dosáhnout při opakování testu totožného výsledku. Jednak byl pro jednotlivá měření přidáván fermentovaný roztok v různých stádiích fermentace a pokaždé byla použita jiná část biofilmu, dosažení naprosto stejných podmínek růstu proto nebylo možné. Z výsledků je ale vidět, že i přesto byl průběh růstu výrazně podobný v případě měření při stejné koncentraci sacharózy a odlišný při porovnání různých koncentrací.

Porovnání hodnot G' pro všechny koncentrace sacharózy

Tab. 4: Srovnání hodnot nejvyšších dosažených elastických modulů pro všechna měření závislosti růstu biofilmu na koncentraci sacharózy

Koncentrace sacharózy (g/l)	Nejvyšší hodnota G' po adsorpci (Pa)		Nejvyšší hodnota G' pro růst biofilmu (Pa)	
	měření č. 1	měření č. 2	měření č. 1	měření č. 2
100	0,1719	0,2369	2,0290	1,5170
50	0,0932	0,1420	0,6222	0,0879
0	0,2470	0,3603	0,5510	2,6760

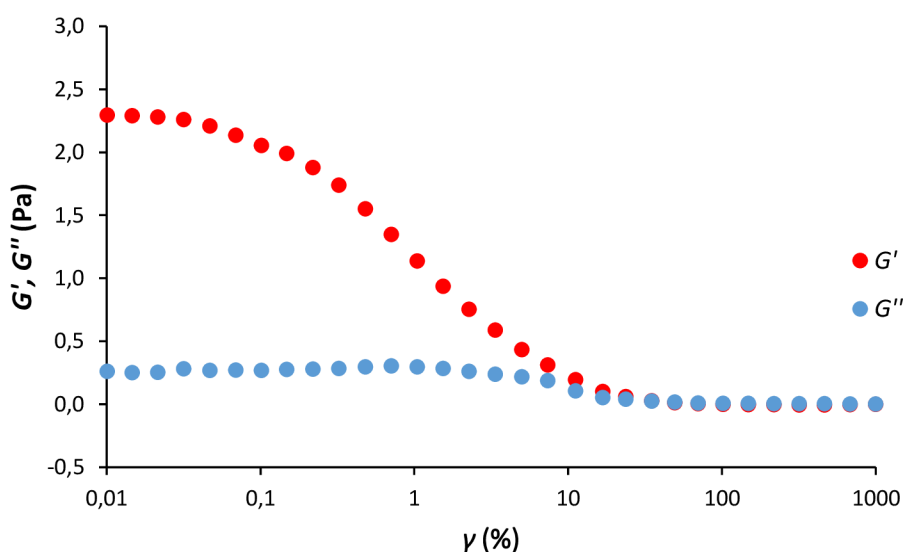
V

Tab. 4 jsou srovnané hodnoty elastických modulů po adsorpci MO na rozhraní a po nárůstu biofilmu. Pro měření č. 2 při koncentraci 0 g/l po 72 h byla použita počáteční hodnota amplitudového testu, který následoval po 72 h růstu, jelikož časový test se předčasně ukončil. Průměrně nejvyšších hodnot při adsorpci bylo dosaženo u koncentrace 0 g/l, druhých nejvyšších u koncentrace 100 g/l a nejnižších hodnot u koncentrace 50 g/l.

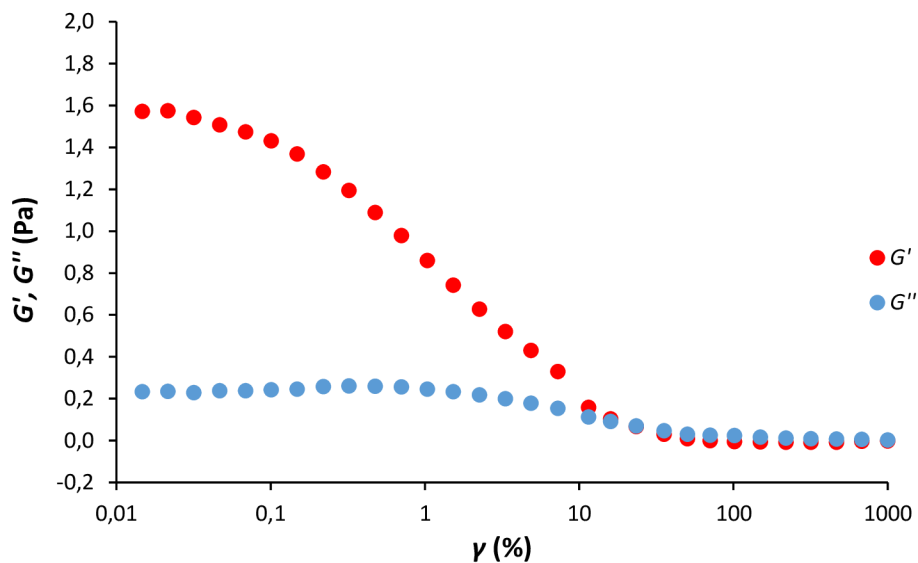
Pořadí průměrných hodnot elastického modulu na konci měření je následující v sestupném pořadí: 100 g/l, 0 g/l, 50 g/l. Nejmenší nárůst biofilmu tedy nastal při koncentraci 50 g/l. Důvod, proč u koncentrace sacharózy 0 g/l došlo k takovému nárůstu elastického modulu, by mohl být například ten, že při nízkých koncentracích sacharózy (koncentrace není úplně nulová kvůli přidavku již fermentovaného nápoje Kombucha) dochází oproti vyšším koncentracím k tvorbě velkého množství etanolu a etanol napomáhá bakteriím k tvorbě fimbrií, které jsou důležité pro růst biofilmu, zvláště na rozhraní kapalina-vzduch [38; 42].

5.3.2 Amplitudové testy – struktura biofilmu

Koncentrace sacharózy 100 g/l



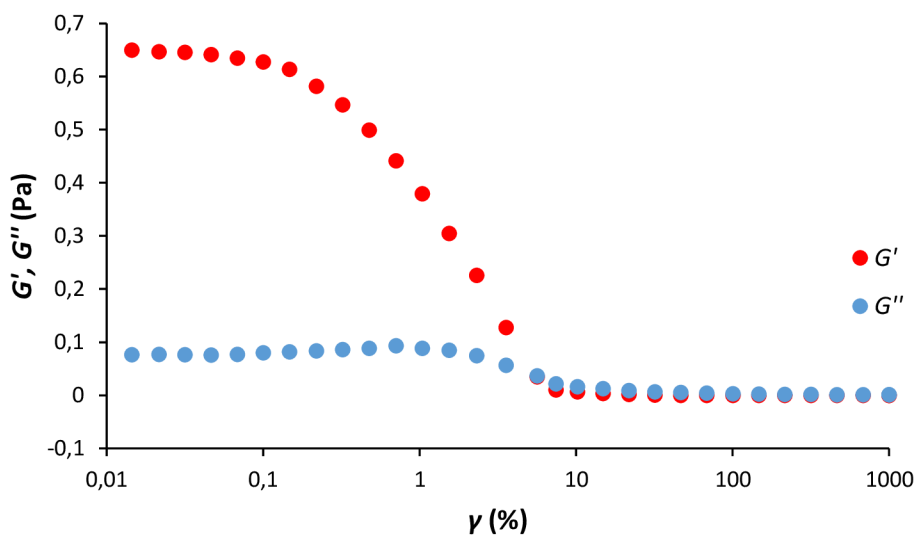
Obr. 48: Amplitudový test pro koncentraci sacharózy 100 g/l, $\gamma = 0,01-1000$ %, $f = 1$ Hz (měření č. 1)



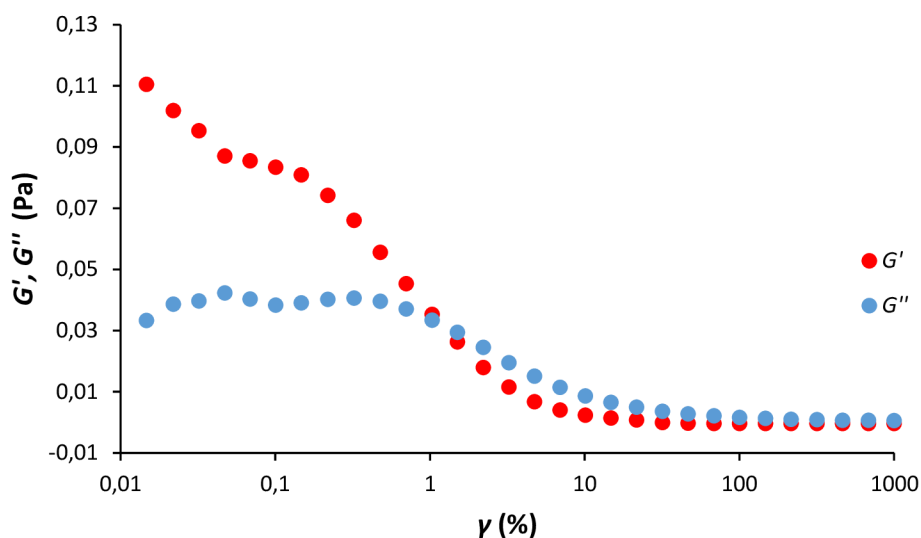
Obr. 49: Amplitudový test pro koncentraci sacharózy 100 g/l, $\gamma = 0,01-1000$ %, $f = 1$ Hz (měření č. 2)

Výsledky amplitudových testů obou měření pro vzorek s koncentrací sacharózy 100 g/l jsou na Obr. 48 a Obr. 49. Z grafů vyplývá, že po třech dnech byl na rozhraní kapalina-vzduch vytvořen pevný, elastický biofilm, jehož deformace byla z počátku elastická. Konec LVO je v obou případech těžko rozeznatelný, jelikož je průběh deformace velmi pozvolný. K překřížení elastického a viskózní modulu došlo v obou případech až okolo amplitudy deformace $\gamma = 16$ %, což dokazuje velkou pevnost a elasticitu vzniklého biofilmu.

Koncentrace sacharózy 50 g/l



Obr. 50: Amplitudový test při koncentraci sacharózy 50 g/l, $\gamma = 0,01-1000$ %, $f = 1$ Hz (měření č. 1)

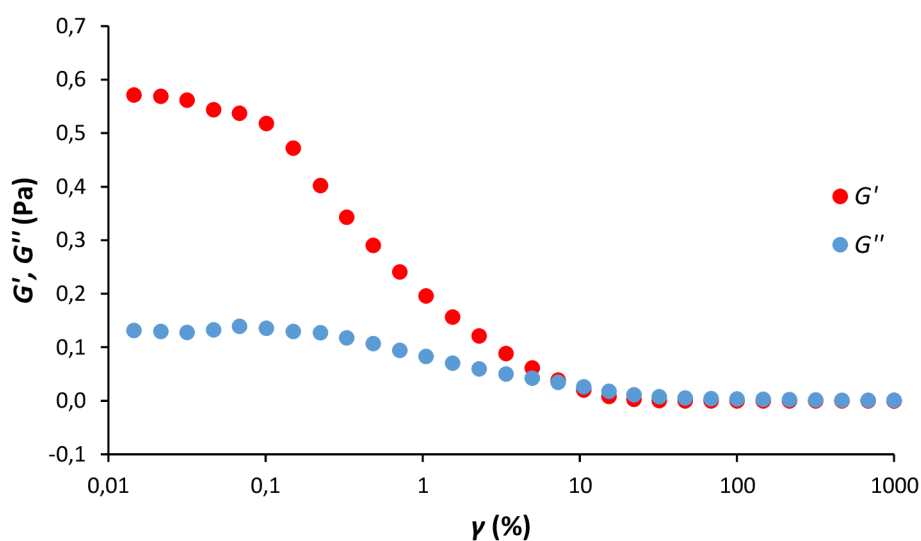


Obr. 51: Amplitudový test při koncentraci sacharózy 50 g/l, $\gamma = 0,01-1000$ %, $f = 1$ Hz (měření č. 2)

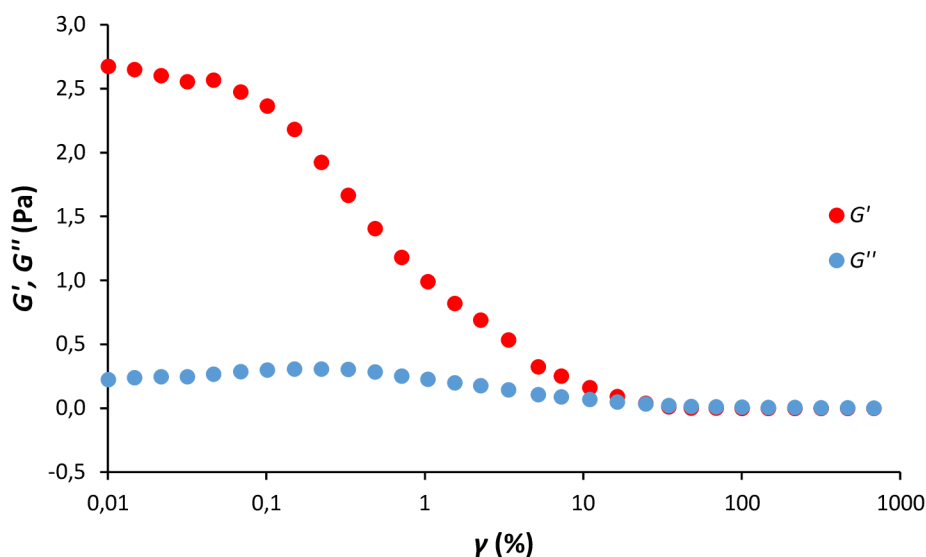
Na Obr. 50: Amplitudový test při koncentraci sacharózy 50 g/l, $\gamma = 0,01-1000$ %, $f = 1$ Hz (měření č. 1) Obr. 50 je výsledek amplitudového testu provedeného po 72 hodinách růstu biofilmu při koncentraci sacharózy 50 g/l. Konec LVO je $\gamma = 0,1$ %, poté následuje pozvolný průběh deformace. K překřížení obou modulů došlo při amplitudě deformace $\gamma = 5,6$ %. Vzniklý biofilm je tedy pevný a elastický, ale jeho struktura není tak pevná jako u biofilmů vzniklých při koncentraci sacharózy 100 g/l.

Výsledek amplitudového testu vzniklého při druhém měření při koncentraci 50 g/l je na Obr. 51. Jak je vidět z Obr. 43, k růstu biofilmu téměř nedošlo, není patrná ani LVO, tudíž ihned po začátku amplitudového testu došlo k trvalé deformaci rozhraní. K překřížení modulů došlo okolo amplitudy deformace $\gamma = 1$ %, což značí slabou strukturu mezifázového filmu.

Koncentrace sacharózy 0 g/l



Obr. 52: Amplitudový test při koncentraci sacharózy 0 g/l, $\gamma = 0,01-1000$ %, $f = 1$ Hz (měření č. 1)



Obr. 53: Amplitudový test při koncentraci sacharózy 0 g/l, $\gamma = 0,01-1000$ %, $f = 1$ Hz (měření č. 2)

Na Obr. 52 a Obr. 53 jsou výsledky amplitudových testů biofilmů po 72 hodinách růstu při koncentraci sacharózy 0 g/l. V obou případech je viditelná LVO v prvním případě končící při $\gamma = 0,1$ % a ve druhém případě při $\gamma = 0,06$ %, poté začalo docházet k trvalé deformaci biofilmů. K překřížení viskoelastických modulů došlo při amplitudě deformace $\gamma = 10,6$ % pro první měření a $\gamma = 24,7$ % pro druhé měření. Při koncentraci sacharózy 0 g/l tedy vznikly velmi pevné biofilmy, ve druhém případě pevnější než při koncentraci 100 g/l.

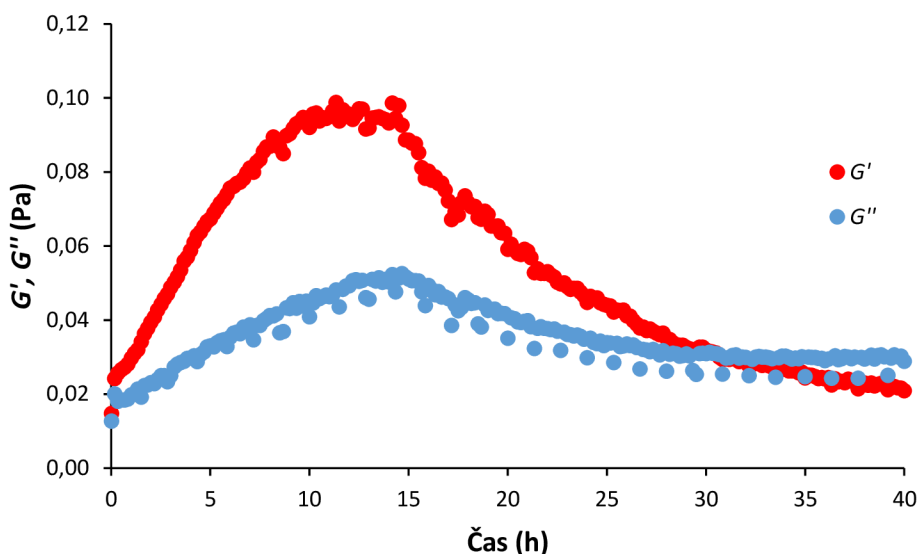
5.4 Kombucha – závislost růstu biofilmu na iontové síle

5.4.1 Časové testy – růst biofilmu

Roztok NaCl o koncentraci 0 mol·dm⁻³

Pro koncentraci 0 mol·dm⁻³ slouží výsledky časových testů z měření růstu mikrobiálního biofilmu bez stresových podmínek, tedy při koncentraci sacharózy 100 g/l.

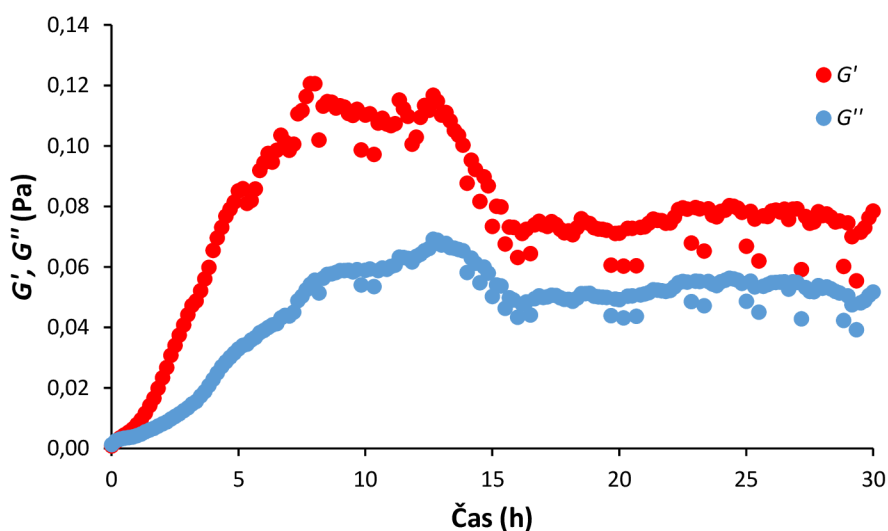
Roztok NaCl o koncentraci $1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$



Obr. 54: Časový test pro růst biofilmu při koncentraci NaCl $1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $\gamma = 0,1 \%$, $f = 1 \text{ Hz}$

Na Obr. 54 je výsledek časového testu znázorňujícího růst biofilmu při koncentraci sacharózy 100 g/l a koncentraci NaCl $1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. V tomto případě jsou v grafu uvedeny oba moduly kvůli větší názornosti snižování pevnosti rozhraní a převládání viskózní složky. Během prvních 10 hodin probíhala adsorpce MO na mezifázové rozhraní. Oproti sledování růstu biofilmu v závislosti na koncentraci sacharózy (tedy bez přídavku NaCl), je v tomto případě fáze adsorpce podstatně kratší. Během této doby došlo ke vzdalování elastického a viskózního modulu, na rozhraní tedy vznikl elastický mezifázový film. Poté se hodnota elastického modulu ustálila a od patnácté hodiny se elastický modul snižoval, z počátku prudce, poté se snižování elastického modulu zmírnilo. Od patnácté hodiny začalo docházet také k postupnému přibližování obou modulů, až nakonec okolo třicáté hodiny došlo k překřížení modulů a rozhraní nabylo převážně viskózního charakteru.

Roztok NaCl o koncentraci $2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$



Obr. 55: Časový test pro růst biofilmu při koncentraci NaCl $2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $\gamma = 0,1 \%$, $f = 1 \text{ Hz}$

Na Obr. 55 je výsledek časového testu představujícího růst biofilmu při koncentraci sacharózy 100 g/l a koncentraci NaCl 2 mol·dm⁻³. Průběh adsorpce je podobný jako v případě koncentrace NaCl 1 mol·dm⁻³. V tomto případě ale nárůst elastického modulu ustal již okolo 8 h, tedy o dvě hodiny dříve než při koncentraci NaCl 1 mol·dm⁻³. Poté došlo k ustálení elastického modulu, přičemž viskózní modul stále narůstal, což značí snižování pevnosti filmu. Okolo 13 h začaly oba moduly prudce klesat a jejich hodnoty se ustálily okolo 16 h, poté byly oba moduly téměř konstantní. Při zvyšování iontové síly pomocí NaCl pravděpodobně došlo k usmrcení mikroorganismů již během prvních několika hodin.

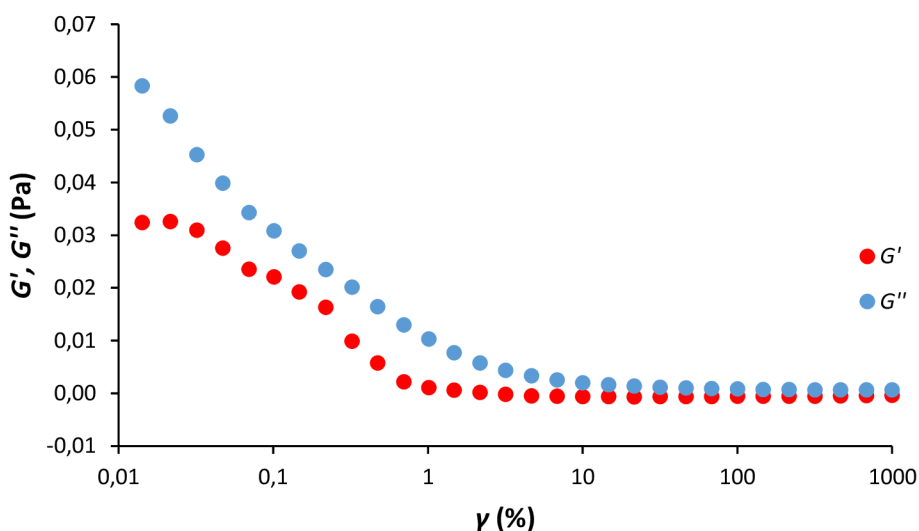
Měření při obou koncentracích bylo provedeno z časových důvodů pouze jednou.

5.4.2 Amplitudové testy – struktura biofilmu

Roztok NaCl o koncentraci 0 mol·dm⁻³

Pro koncentraci 0 mol·dm⁻³ slouží výsledky amplitudových testů z měření růstu mikrobiálního biofilmu bez stresových podmínek, tedy při koncentraci sacharózy 100 g/l.

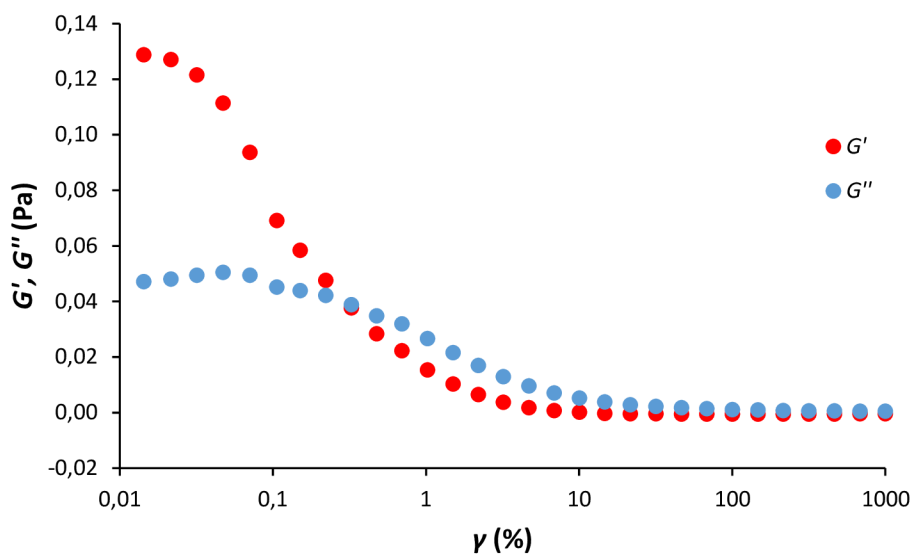
Roztok NaCl o koncentraci 1 mol·dm⁻³



Obr. 56: Amplitudový test při koncentraci NaCl 1 mol·dm⁻³, $\gamma = 0,01-1000$ %, $f = 1$ Hz

Po 40 hodinovém růstu biofilmu při koncentraci NaCl 1 mol·dm⁻³ byl proveden amplitudový test, jehož výsledek je na Obr. 56. Viskózní modul od začátku testu převyšuje elastický modul, což je typické pro kapalné rozhraní. O kapalném rozhraní svědčí i to, že oba moduly od začátku testu klesají a není zřejmá LVO, na mezifázovém rozhraní tedy nebyla vytvořena síťová struktura.

Roztok NaCl o koncentraci $2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$



Obr. 57: Amplitudový test při koncentraci $\text{NaCl } 2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $\gamma = 0,01-1000 \%$, $f = 1 \text{ Hz}$

Výsledek amplitudového testu po 30 hodinovém časovém testu při koncentraci $\text{NaCl } 2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ je na Obr. 57. Mezifázový film vzniklý během časového testu má velmi slabou strukturu. Konec LVO je okolo amplitudy deformace $\gamma = 0,02 \%$ a k překřížení obou modulů došlo při amplitudě deformace $0,3 \%$.

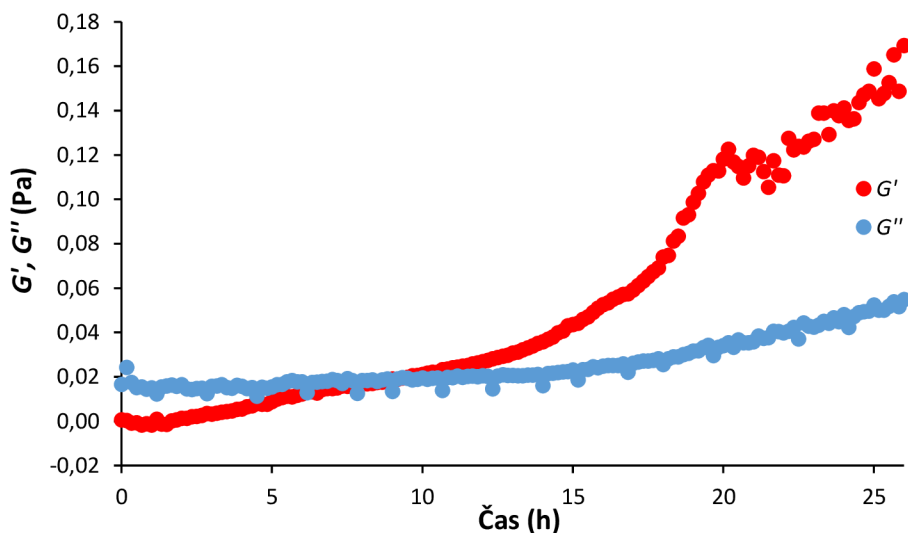
5.5 Kombucha – závislost růstu biofilmu na pH

5.5.1 Časové testy – růst biofilmu

Neutrální pH (pH 7)

Jako vzorek při neutrálním pH slouží výsledky časových testů z měření růstu mikrobiálního biofilmu bez stresových podmínek, tedy při koncentraci sacharózy 100 g/l .

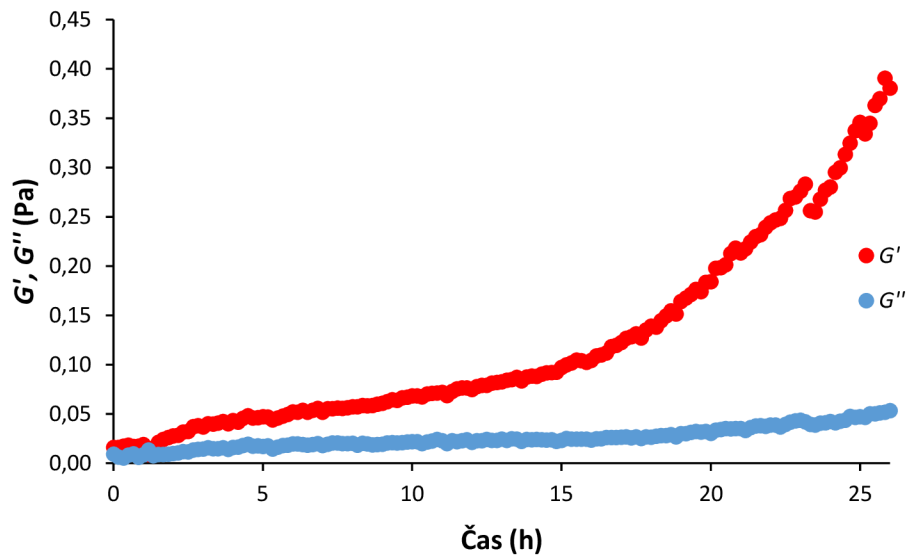
Kyselé pH (pH 3)



Obr. 58: Časový test pro růst biofilmu při pH 3, $\gamma = 0,1 \%$, $f = 1 \text{ Hz}$

Obr. 58 ukazuje vývoj mikrobiálního biofilmu v čase při kyselém pH. Jak je vidět, prvních 10 hodin bylo rozhraní převážně viskózní, poté elastický modul viskózní modul přerostl a stále se zvyšoval až do 20 hodiny, od které se nárůst zmínil. Tento průběh připomíná adsorpci při neutrálním pH, viz 5.2.1.

Bazické pH (pH 10)



Obr. 59: Časový test pro růst biofilmu při pH 10, $\gamma = 0,1 \%$, $f = 1 \text{ Hz}$

Tvorba biofilmu na mezifázovém rozhraní při zásaditém pH je zobrazena na Obr. 59. Jak je vidět, zásadité pH růst nezastavuje ani nespomaluje a maximální dosažená hodnota elastického modulu je více než dvakrát větší než v případě kyselého pH. Nárůst elastického modulu začal po necelých dvou hodinách. Do 15 hodiny je nárůst elastického modulu pozvolný, poté se nárůst začal zrychlovat. Rozdíl mezi elastickým a viskózním modulem se stále zvětšoval, což svědčí o zpevňující se struktuře vnikající na mezifázovém rozhraní.

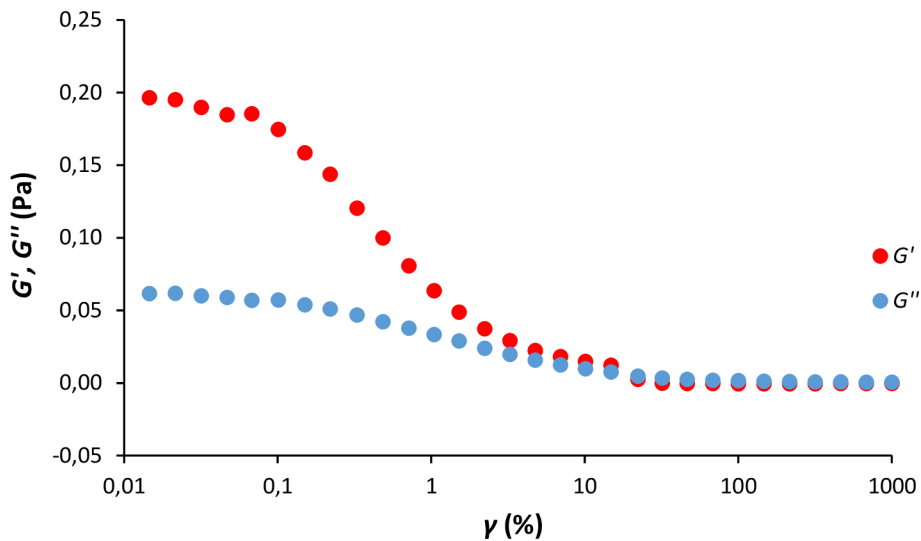
Stejně jako v případě iontové síly, měření při rozdílných hodnotách pH byla provedena z časových důvodů pouze jednou.

5.5.2 Amplitudové testy – struktura biofilmu

Neutrální pH (pH 7)

Jako vzorek při neutrálním pH slouží výsledky časových testů z měření růstu mikrobiálního biofilmu bez stresových podmínek, tedy při koncentraci sacharózy 100 g/l.

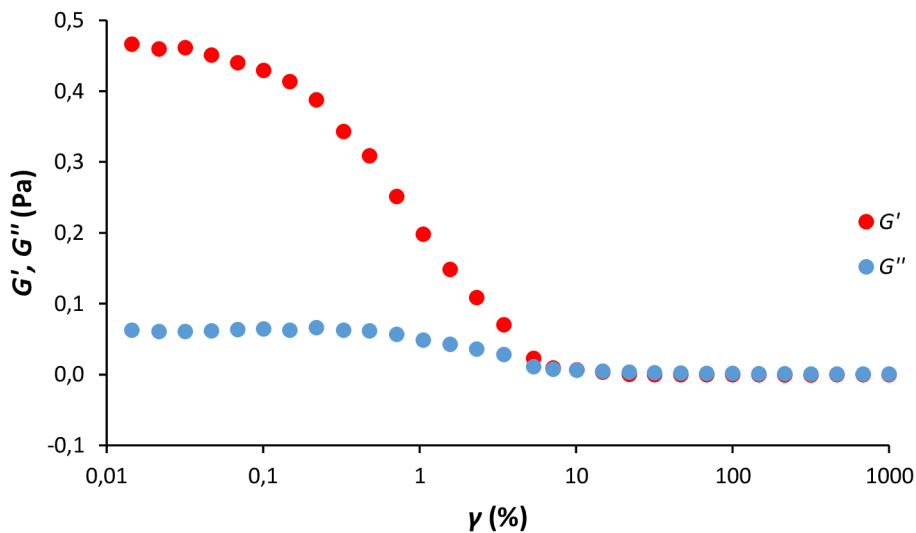
Kyselé pH (pH 3)



Obr. 60: Amplitudový test při pH 3, $\gamma = 0,01-1000$ %, $f = 1$ Hz

Amplitudový test znázorňující strukturu a pevnost filmu vzniklého během 26 h při kyselém pH na mezifázovém rozhraní, je na Obr. 60. LVO končí okolo amplitudy deformace $\gamma = 0,06$ %, následuje pozvolná deformace mezifázového filmu, přičemž k úplnému překřížení viskoelastických modulů došlo až v rozmezí amplitud deformace 15 až 22 %.

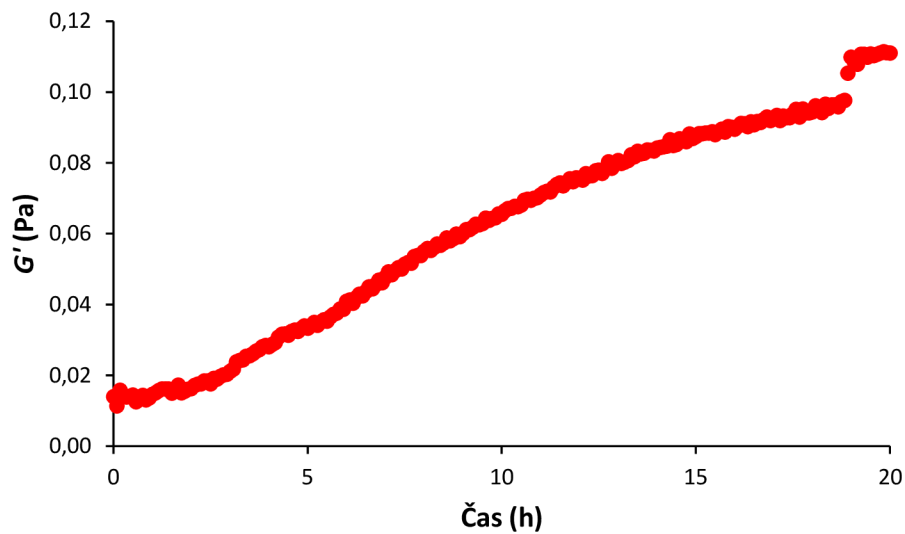
Bazické pH (pH 10)



Obr. 61: Amplitudový test při pH 10, $\gamma = 0,01-1000$ %, $f = 1$ Hz

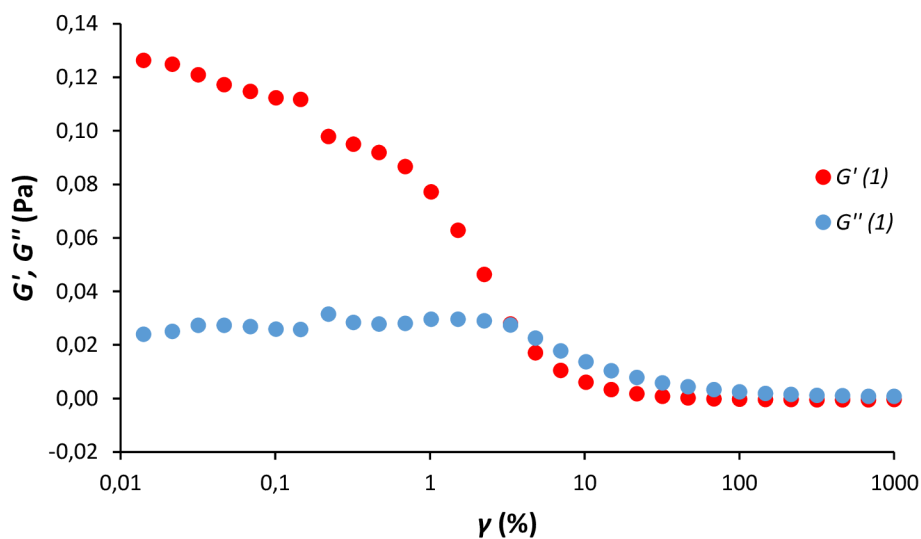
Pevnou strukturu vzniklého filmu na mezifázovém rozhraní při zásaditém pH potvrzuje i amplitudový test, jehož výsledek je na Obr. 61. Limitní amplituda deformace se pohybuje okolo hodnoty $\gamma = 0,1$ % a překřížení modulů došlo přibližně při $\gamma = 7$ %.

5.6 Regenerace biofilmu

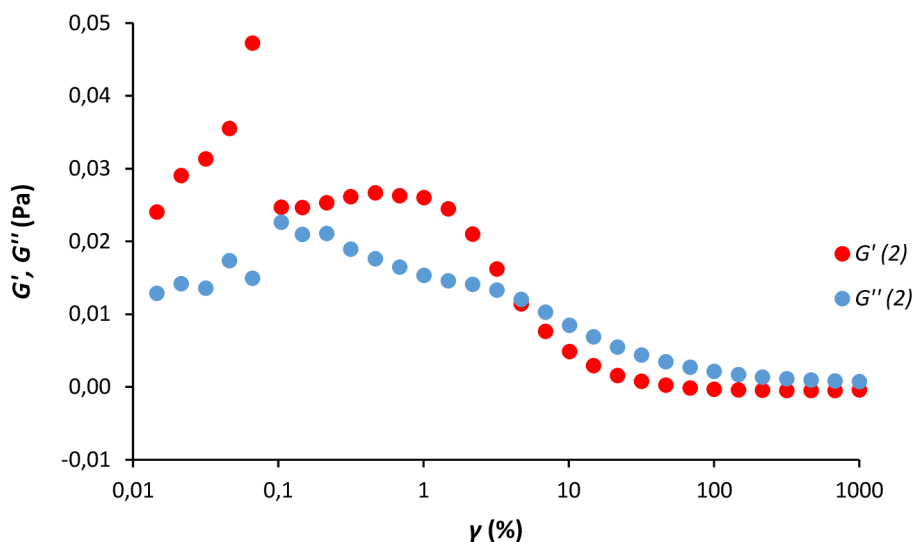


Obr. 62: Časový test – adsorpce MO na mezifázové rozhraní koncentraci sacharózy 100 g/l, $\gamma = 0,1 \%$, $f = 1 \text{ Hz}$

Na Obr. 62 je časový test znázorňující adsorpci MO na mezifázové rozhraní při koncentraci sacharózy 100 g/l. Délka trvání testu byla 20 h. Nejprve je vidět mírný nárůst elastického modulu, poté se rychlost růstu elastického modulu zvětšuje a v posledních hodinách opět ustává. Průběh adsorpce byl již popsán v podkapitole 5.2.1.

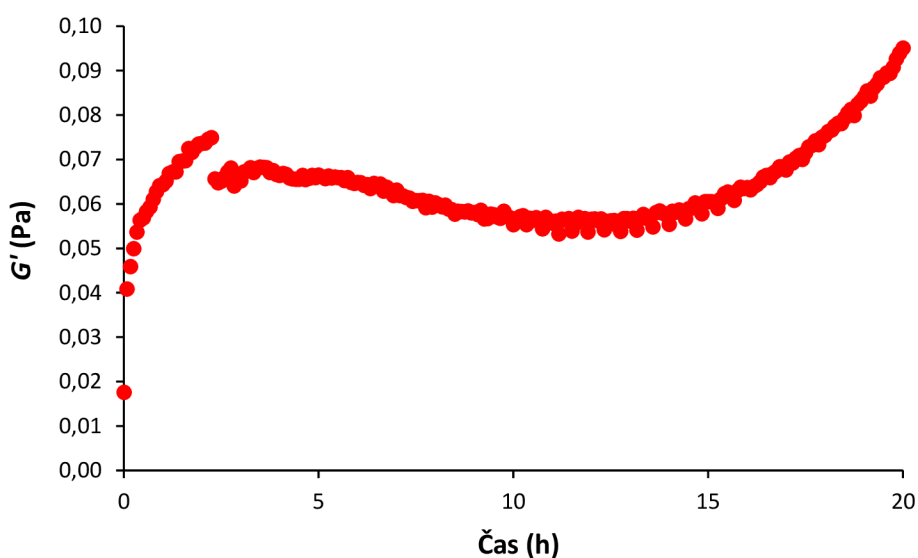


Obr. 63: Amplitudový test při koncentraci sacharózy 100 g/l, $\gamma = 0,01-1000 \%$, $f = 1 \text{ Hz}$ (deformace rozhraní č. 1)



Obr. 64: Amplitudový test při koncentraci sacharózy 100 g/l, $\gamma = 0,01-1000$ %, $f = 1$ Hz (deformace rozhraní č. 2)

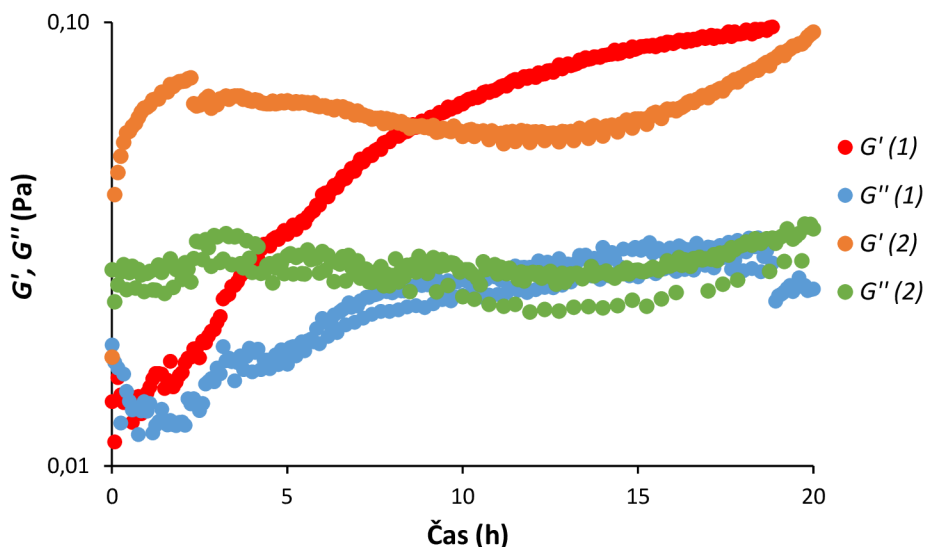
Na Obr. 63 a Obr. 64 jsou zobrazeny výsledky dvou po sobě jdoucích amplitudových testů. První byl určen k deformaci filmu vzniklého na rozhraní během dvacetihodinového časového testu. Druhý test vypovídá o schopnosti zdeformovaného rozhraní reagovat na snížení amplitudy deformace, kdy při nízkých amplitudách deformace v rozmezí 0,01–0,1 % dochází k nárůstu elastického modulu a záhy k jeho poklesu a nevratné deformaci. Hodnoty elastického a viskózního modulu se ve druhém amplitudovém testu nijak výrazně neliší a elastický modul se pohybuje v mnohem nižších hodnotách než při prvním amplitudovém testu, což dokazuje, že mezifázové rozhraní je nevratně zdeformováno.



Obr. 65: Časový test – regenerace mezifázového rozhraní po předchozí deformaci, koncentrace sacharózy 100 g/l, $\gamma = 0,1$ %, $f = 1$ Hz

Po deformaci rozhraní byl opět proveden dvacetihodinový časový test, na kterém byla pozorována schopnost regenerace deformovaného mezifázového rozhraní. Z počátku je

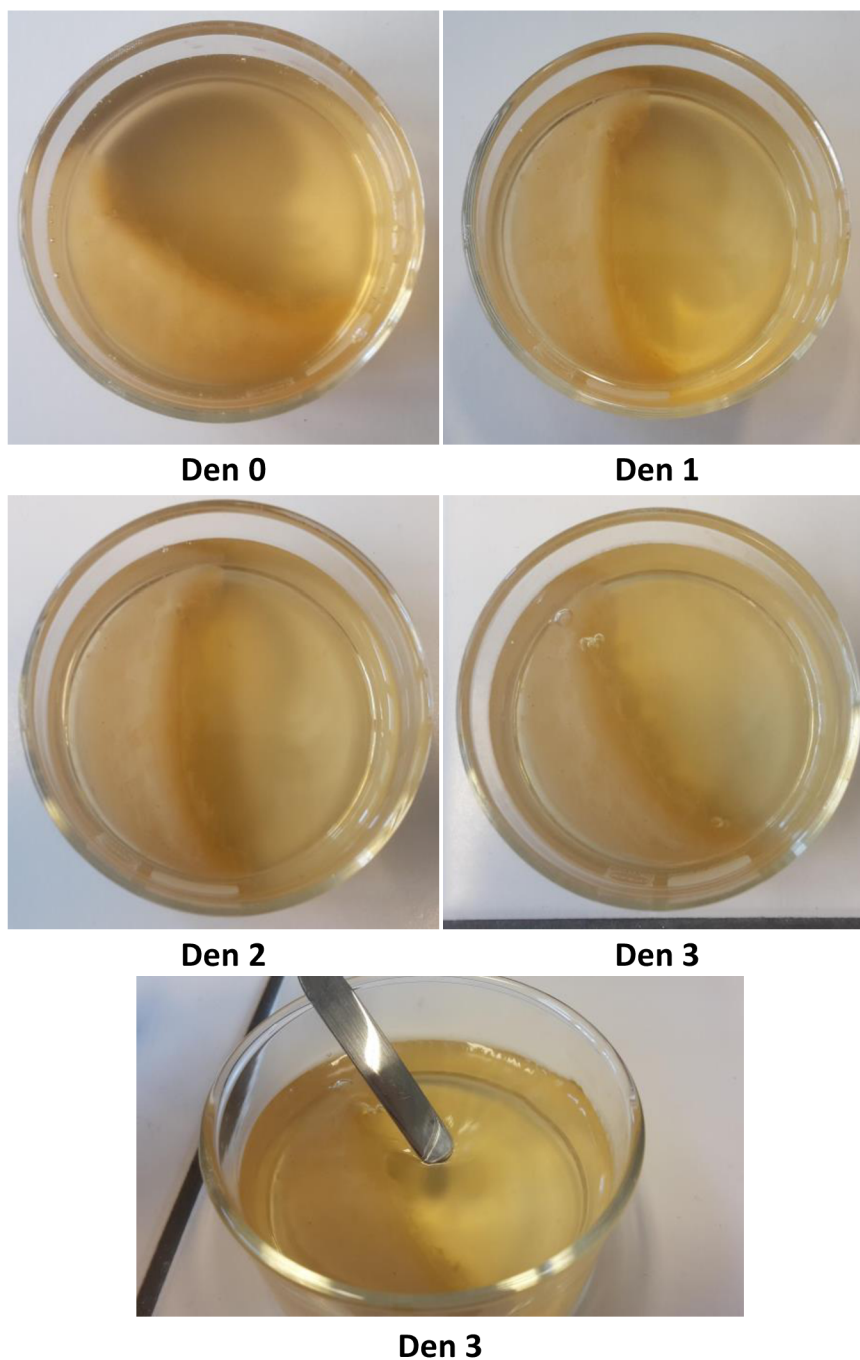
viditelný průdký nárůst elastického modulu. To znamená, že MO při deformaci zůstaly poblíž rozhraní a jejich adsorpce je rychlejší než na počátku, kdy difundovaly na rozhraní z celého objemu. Po počáteční rychlé adsorpci se ale elastický modul ustálil a mírně klesl. Poté začal opět rychle narůstat, což může být způsobeno množením MO a jejich vzájemnými interakcemi.



Obr. 66: Srovnání viskózních a elastických modulů časových testů před a po deformaci rozhraní

Na Obr. 66 jsou srovnány oba časové testy včetně viskózních modulů. U časového testu před deformací je vidět, jak se elastický a viskózní modul vzájemně vzdalují a tudíž stále více a více převládá elastická složka. U časového testu po deformaci je téměř po celou dobu rozdíl mezi moduly konstantní, u konečného růstu elastického modulu se moduly začínají více vzdalovat, což značí zvyšující se pevnost mezifázového filmu. Konečné hodnoty elastických a viskózních modulů před a po deformaci jsou velmi podobné, tudíž je rozhraní schopné po deformaci regenerovat a navrátit se do původního stavu.

5.7 Kombucha – pozorování růstu biofilmu



Obr. 67: Pozorování růstu biofilmu v průběhu 72 h

Na Obr. 67 jsou fotografie zachycující vzorek o koncentraci sacharózy 100 g/l v průběhu 3 dnů, focený po 24 h. Jak je vidět, po třech dnech se na rozhraní vytvořil pevný, elastický film. Na obrázku je také patrná změna barvy roztoku, která se po třech dnech jeví světlejší. To je pravděpodobně způsobeno snížením koncentrace tearubiginu, který je zodpovědný za barvu černého čaje, viz 2.5.3.

6 ZÁVĚR

Hlavním úkolem této diplomové práce bylo optimalizovat a následně využít metodu mezifázové reologie pro studium tvorby a chování mikrobiálního biofilmu při optimálních i stresových podmínkách na mezifázovém rozhraní typu kapalina-plyn s využitím bikonického senzoru. Tento senzor je díky své robustnosti vhodný pro převážně elastická rozhraní s pevnou strukturou, jeho hlavní výhodou je určování měřicí polohy pomocí závislosti normálové síly na vzdálenosti senzoru ode dna měřicí nádoby (squeeze test), díky čemuž je minimalizována chyba ze strany operátora při umístění senzoru.

Ke studiu biofilmů byly využity dva oscilační testy, konkrétně časový test, díky kterému je možné pozorovat změnu viskoelastických modulů v čase a amplitudový test, který nám dává informace o struktuře filmu vzniklého na mezifázovém rozhraní. Oba testy byly nejprve vyzkoušeny na vodném roztoku hovězího sérového albuminu, jelikož globulární proteiny tvoří na mezifázovém rozhraní elastický film se síťovou strukturou, což bylo během měření potvrzeno. Během časového testu došlo k výraznému nárůstu elastického modulu, jehož průběh odpovídal narůstajícímu počtu molekul adsorbovaných na mezifázové rozhraní a tvorbě síťové struktury, která byla posléze potvrzena amplitudovým testem.

Po proběhnutí oscilačních testů s hovězím sérovým albuminem se přešlo k hlavní náplni diplomové práce, a to ke sledování tvorby mikrobiálního biofilmu s využitím mikrobiální kultury Kombucha při různých stresových podmínkách. Prvním krokem bylo pozorování adsorpce mikroorganismů na mezifázové rozhraní po dobu 20 hodin. Během této doby došlo k zaplnění mezifázového rozhraní mikroorganismy a k jejich vzájemným interakcím, což bylo potvrzeno následným amplitudovým testem.

Jako první stresový faktor byla vybrána změna koncentrace sacharózy v živném médiu tvořeném slazeným černým čajem. Časové testy trvaly 72 h. Za optimální byla považována koncentrace 100 g/l, při níž bylo dosaženo nejlepšího průběhu růstu biofilmu s dobře viditelnou fází adsorpce a následnou tvorbou biofilmu. Průběh tvorby biofilmu při koncentraci sacharózy 100 g/l byl zachycen i na fotografiích, kde je po 72 hodinách viditelný elastický biofilm. Jako stresové podmínky byly zvoleny koncentrace sacharózy 50 g/l a 0 g/l, u obou koncentrací byl průběh růstu odlišný, k nejmenšímu nárůstu elastického modulu a tedy i biofilmu došlo při koncentraci sacharózy 50 g/l. Při koncentraci sacharózy 0 g/l došlo k výraznému nárůstu elastického modulu, což bylo nejspíše způsobeno zvýšenou tvorbou etanolu, jelikož etanol podporuje tvorbu biofilmu a interakce mezi bakteriemi. K největší tvorbě etanolu během prvních dní by mělo docházet právě u vzorků s nejnižší koncentrací sacharózy. Přímý vztah mezi koncentrací sacharózy a růstem biofilmu během měření nebyl zjištěn.

Dále byl studován vliv iontové síly na růst biofilmu. V tomto případě byly zvoleny kratší časové testy. Iontová síla byla upravována přidávkem NaCl o výsledných koncentracích 1 a 2 mol·dm⁻³ do živného média o koncentraci sacharózy 100 g/l. V obou případech sice došlo k počátečnímu nárůstu elastického modulu odpovídajícímu adsorpci mikroorganismů na rozhraní, doba adsorpce byla ale zhruba o polovinu kratší než v ostatních případech a následně došlo k výraznému poklesu elastického modulu. V případě koncentrace NaCl 1 mol·dm⁻³ dokonce viskózní modul přerostl modul elastický a vzniklo převážně viskózní rozhraní.

Přídavkem velkého množství NaCl došlo nejspíše k usmrcení mikroorganismů a k neschopnosti jejich vzájemných interakcí.

Jako poslední ze stresových faktorů byl zvolen vliv pH. Optimální pH, tedy pH slazeného černého čaje se pohybuje okolo 7. Jako stresové bylo potom zvoleno pH 3 a 10. V obou případech došlo k růstu elastického modulu, při pH 10 dokonce k velmi výraznému nárůstu. Tento výsledek byl v rozporu s očekáváním, jelikož v případě bakteriálních biofilmů by mělo snížení pH značně zpomalit tvorbu biofilmu, pro Kombuchu tedy změna pH nepředstavovala překážku při růstu.

Mimo sledování vlivu stresových podmínek na růst biofilmu byla testována i schopnost regenerace mezifázového rozhraní zdeformovaného po fázi adsorpce mikroorganismů. Sledování adsorpce a regenerace bylo provedeno pomocí 20 hodinových časových testů, deformace byla provedena pomocí dvou po sobě jdoucích amplitudových testů, přičemž první sloužil k deformaci a druhý k ověření, že rozhraní bylo skutečně zdeformováno. Bylo zjištěno, že zdeformované rozhraní je schopno regenerovat, jelikož bylo dosaženo téměř stejné konečné hodnoty elastického modulu při obou časových testech.

Mezifázová reologie s využitím bikonického senzoru se osvědčila jako velmi účinná metoda při studiu tvorby mikrobiálních biofilmů a sledování vlivu různých stresových faktorů na jejich mezifázové chování. Jelikož na rozhraní kapalina-kapalina a kapalina-plyn tvoří biofilm převážně patogenní bakterie, může být mezifázová reologie přínosnou metodou v oblasti potravinářského průmyslu a medicíny, kde mikrobiální biofilmy představují závažný problém. Mezifázová reologie umožňuje pozorování tvorby biofilmu v čase a jeho reakci na změnu prostředí, čehož je možné využít při hledání vhodných způsobů jejich likvidace.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] WEIN, Ondřej. *Úvod do reologie*. 1. vyd. Brno: Fakulta chemická VUT, 1996, 84 s.
- [2] BARNES, H.A. *An introduction to rheology*. Amsterdam: Elsevier, 1998. ISBN 0444874690.
- [3] MEZGER, Thomas. *The Rheology Handbook: For users of rotational and oscillatory rheometers*. Hannover: Curt R. Vincentz Verlag, 2002. ISBN 3878707452.
- [4] HOLUBOVÁ, Renata. *Základy reologie a reometrie kapalin* [online]. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-4178-8.
- [5] *Reologie* [online]. b.r. Dostupné z: http://ufmi.ft.utb.cz/texty/kzm/KZM_03.pdf
- [6] *Základy reologie a reometrie kapalin* [online]. b.r. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/podzim2014/C5160/um/2457585/2457594/Reologie_a_reometrie_kapalin.pdf
- [7] WEITZ, David, Hans WYSS a Ryan LARSEN. Oscillatory Rheology: Measuring the Viscoelastic Behaviour of Soft Materials. *G.I.T Laboratory Journal* [online]. 2007, **3**(4), 68-70.
- [8] SCHRAMM, Gebhard. *A Practical Approach to Rheology and Rheometry*. Haake, 1994.
- [9] Understanding Rheology of Structured Fluids. *TA Instruments* [online]. b.r. Dostupné také z: http://www.tainstruments.com/pdf/literature/AAN016_V1_U_StructFluids.pdf
- [10] MILLER, Reinhard, James FERRI, Aliyar JAVADI, Jürgen KRÄGEL, Nenad MUCIC a Rainer WÜSTNECK. Rheology of interfacial layers. *Colloid and Polymer Science* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2010, **288**(9), 937-950. DOI: 10.1007/s00396-010-2227-5.
- [11] WARBURTON, Brian. Interfacial rheology. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* [online]. Elsevier Ltd, 1996, **1**(4), 481-486. DOI: 10.1016/S1359-0294(96)80116-6.
- [12] KRÄGEL, Jürgen a Svetlana DERKATCH. Interfacial shear rheology. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* [online]. 2010, **15**(4), 246-255. DOI: 10.1016/j.cocis.2010.02.001. ISSN 13590294.
- [13] *Interfacial Rheology System* [online]. Anton Paar, b.r.
- [14] *Interfacial Rheology: Accessories* [online]. In: . TA Instruments, b.r.
- [15] EDWARDS, David, Howard. BRENNER a D. WASAN. *Interfacial transport processes and rheology*. Boston: Butterworth-Heinemann, 1991. ISBN 0750691859.

- [16] BIRDI, K. *Handbook of surface and colloid chemistry*. 3. CRC Press/Taylor & Francis, 2009. ISBN 978-0-8493-7327-5.
- [17] WICHTERLE, Kamil. *Povrchové/mezifázové napětí v hydrostatice a hydrodynamice*. Vyd. 1. Praha: Procesní inženýrství, 1997. MAPRINT. ISBN 8086059243.
- [18] SHAW, Duncan. *Introduction to Colloid and Surface Chemistry*. 4th Ed. New York: Butterworth Heinemann, 1992, 306 s. ISBN 0750611820.
- [19] BARKAT ALI KHAN, . Basics of pharmaceutical emulsions: A review. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* [online]. 2011, **5**(25). DOI: 10.5897/AJPP11.698.
- [20] ETTELAIE, Rammile, Adem ZENGİN a Sergey LISHCHUK. Novel food grade dispersants: Review of recent progress. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* [online]. 2017, **28**, 46-55. DOI: 10.1016/j.cocis.2017.03.004.
- [21] ŠMIDRKAL, Jan. TENZIDY A DETERGENTY DNES. *Chemické Listy* [online]. 1999, (93), 421-427.
- [22] Polysorbate 20. *National Center for Biotechnology Information: PubChem Database* [online]. b.r. Dostupné také z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tween_20#section=Top
- [23] Bovine Serum Albumin. *Sigma Aldrich* [online]. b.r. Dostupné také z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a9647?lang=en®ion=CZ>
- [24] BOURASSA, P., C. KANAKIS, P. TARANTILIS, M. POLLISSIOU a H. TAJMIR-RIAAHI. Resveratrol, Genistein, and Curcumin Bind Bovine Serum Albumin †. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2010, **114**(9), 3348-3354. DOI: 10.1021/jp9115996. ISSN 1520-6106.
- [25] MUHSIN, Jamal, Tasneem UFAQ, Hussain TAHIR a Andleeb SAADIA. Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections. *Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015, **4**(3). ISSN 2320-3528.
- [26] ROMEO, Tony, ed., Tony ROMEO. *Bacterial Biofilms* [online]. Springer Berlin Heidelberg, 2008. Current Topics in Microbiology and Immunology. ISBN 978-3-540-75417-6.
- [27] SANTOS, André, Anna GALDINO, Thaís MELLO, Livia RAMOS, Marta BRANQUINHA, Ana BOLOGNESE, José COLUMBANO NETO a Maryam ROUSBARY. What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective!. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* [online]. 2018, **113**(9). DOI: 10.1590/0074-02760180212. ISSN 1678-8060.
- [28] AMARASINGHE, Hashani, Nimsha WEERAKKODY a Viduranga WAISUNDARA. Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha “Tea

- Fungus” during extended periods of fermentation. *Food Science & Nutrition* [online]. 2018, **6**(3), 659-665. DOI: 10.1002/fsn3.605. ISSN 20487177.
- [29] CHAKRAVORTY, Somnath, Semantee BHATTACHARYA, Antonis CHATZINOTAS, Writachit CHAKRABORTY, Debanjana BHATTACHARYA a Ratan GACHHUI. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2016, **220**, 63-72. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015.
- [30] JAYABALAN, R., S. MARIMUTHU a K. SWAMINATHAN. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry* [online]. 2007, **102**(1), 392-398. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.05.032.
- [31] JAYABALAN, Rasu, Radomir MALBAŠA, Eva LONČAR, Jasmina VITAS a Muthuswamy SATHISHKUMAR. A Review on Kombucha Tea-Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2014, **13**(4), 538-550. DOI: 10.1111/1541-4337.12073.
- [32] JIN, Qiangwei, Xiaobei LI, Zhixiang CAI, Fei ZHANG, Madhav YADAV a Hongbin ZHANG. A comparison of corn fiber gum, hydrophobically modified starch, gum arabic and soybean soluble polysaccharide: Interfacial dynamics, viscoelastic response at oil/water interfaces and emulsion stabilization mechanisms. *Food Hydrocolloids* [online]. Elsevier Ltd, 2017. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2017.03.005. ISSN 0268-005X.
- [33] LI, Weiwei, Yaosong WANG, Haibo ZHAO, Zhiyong HE, Maomao ZENG, Fang QIN a Jie CHEN. Improvement of emulsifying properties of soy protein through selective hydrolysis: Interfacial shear rheology of adsorption layer. *Food Hydrocolloids* [online]. Elsevier Ltd, 2016, **60**, 453-460. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2016.04.019.
- [34] GARCIA-OLVERA, Griselda a Vladimir ALVARADO. Interfacial rheological insights of sulfate-enriched smart-water at low and high-salinity in carbonates. *Fuel* [online]. 2017, **207**, 402-412. DOI: 10.1016/j.fuel.2017.06.094.
- [35] 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]. Elsevier B.V, 2014, **117**, 174-184. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.02.023.
- [36] WU, Cynthia, Ji LIM, Gerald FULLER a Lynette CEGELSKI. Disruption of Escherichia coli Amyloid-Integrated Biofilm Formation at the Air–Liquid Interface by a Polysorbate Surfactant. *Langmuir* [online]. 2013, **29**(3), 920-926. DOI: 10.1021/la304710k.
- [37] RUEHS, Patrick, Lukas BONI, Gerald FULLER, R INGLIS, Peter FISCHER a Patrick RUEHS. In-Situ Quantification of the Interfacial Rheological Response of Bacterial Biofilms to Environmental Stimuli: e78524. *PLoS ONE* [online]. 2013, **8**(11). DOI: 10.1371/journal.pone.0078524.

- [38] WU, Cynthia, Ji Youn LIM, Gerald G. FULLER a Lynette CEGELSKI. Quantitative Analysis of Amyloid-Integrated Biofilms Formed by Uropathogenic *Escherichia coli* at the Air-Liquid Interface. *Biophysical Journal* [online]. 2012, **103**(3), 464-471. DOI: 10.1016/j.bpj.2012.06.049.
- [39] DE WOUTERS, Tomas, Christoph JANS, Tobias NIEDERBERGER, Peter FISCHER, Patrick RÜHS a Etienne DAGUE. Adhesion Potential of Intestinal Microbes Predicted by Physico-Chemical Characterization Methods. *PLOS ONE* [online]. 2015, **10**(8). DOI: 10.1371/journal.pone.0136437.
- [40] MALBAŠA, R., E. LONČAR, M. DJURIĆ a I. DOŠENOVIĆ. Effect of sucrose concentration on the products of Kombucha fermentation on molasses. *Food Chemistry* [online]. 2008, **108**(3), 926-932. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.11.069.
- [41] MALBAŠA, R., E. LONČAR a M. DJURIĆ. Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. *Food Chemistry* [online]. 2008, **106**(3), 1039-1045. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.07.020.
- [42] REISS, Jürgen. Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* [online]. 1994, **198**(3), 258-261. DOI: 10.1007/BF01192606.