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

EXPERIMENTÁLNÍ STUDIUM ADSORPCE BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK NA PEVNÉ POVRCHY

EXPERIMENTAL STUDY ON THE ADSORPTION OF BACTERIAL CELLS ON SOLID SURFACES

DIPLOMOVÁ PRÁCE MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE AUTHOR Bc. Kristína Kahanovská

VEDOUCÍ PRÁCE SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2018



Zadání diplomové práce

Číslo práce:	FCH-DIP1139/2017
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka:	Bc. Kristína Kahanovská
Studijní program:	Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce:	Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
Akademický rok:	2017/18

Název diplomové práce:

Experimentální studium adsorpce bakteriálních buněk na pevné povrchy

Zadání diplomové práce:

1) Zpracovat aktuální literární rešerši na zadané téma.

2) Na základě zpracované rešerše navrhnout vhodný modelový systém pro experimentální studium adsorpce bakteriálních buněk, především s ohledem na výběr mikroorganismů a sorbentů.

3) Navrhnout a optimalizovat techniku experimentálního studia adsorpce v modelovém systému.

4) Experimentálně ověřit a vyhodnotit vliv klíčových parametrů bakteriálních buněk resp. použitých sorbentů na proces adsorpce.

Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

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

Bc. Kristína Kahanovská student(ka) Ing. Petr Sedláček, Ph.D. vedoucí práce

_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc. vedoucí ústavu

_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D. děkan

V Brně dne 31.1.2018

ABSTRAKT

Kľúčovou náplňou diplomovej práce bola optimalizácia laboratórnych modelových systémov ako inovativného nástroja pre experimentálne štúdium adsorpcie bakteriálnych buniek na pevné povrchy. Pri opise živých biologických systémov je adsorpcia označovaná ako adhézia. Navrhnuté modelové systémy boli overené fyzikálne-chemickými analýzami. Rôznymi technikami boli stanovené vlastnosti použitých baktérií, konkrétne *Burkholderia cepacia* a *Bacillus megaterium*. Použité pevné povrchy po sorpcii bakteriálnych buniek *Bacillus megaterium* boli podrobené štruktúrnej a vizuálnej analýze. Aplikácia teoretického prístupu (napr. použitím rôznych fyzikálno-chemických modelov) k štúdiu adhézie mikroorganizmov na konkrétny povrch nám umožňuje predpovedať podmienky úspešnej adhézie. Výsledky práce slúžia k lepšeniu pochopeniu vzniku a vývoja biofilmu.

ABSTRACT

This diploma thesis focuses on an optimalization of simple laboratory model systems which serve as an innovative tool for an experimental study on the adsorption of bacterial cells on solid surfaces. In the description of living biological systems, an adsorption is labelled as an adhesion. Designed model systems were validated with a physical-chemical analysis. Various techniques were used to determine bacteria properties, more specifically *Burkholderia cepacia* and *Bacillus megaterium*. The solid surfaces after sorption of bacterial cells of *Bacillus megaterium* were subjected to a structural and visual analysis. Applying the theoretical approach (e.g. using different physical-chemical models) to study the adhesion of microorganisms to a particular surface allows a prediction of the conditions for a successful adhesion. The results will give us a better understanding of a formation and development of a biofilm.

KĽÚČOVÉ SLOVÁ

Bakteriálny biofilm, Burkholderia cepacia, Bacillus megaterium, adsorpcia, adhézia

KEYWORDS

Bacterial biofilm, Burkholderia cepacia, Bacillus megaterium, adsorption, adhesion

KAHANOVSKÁ, K. *Experimentální studium adsorpce bakteriálních buněk na pevné povrchy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 74 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

PREHLÁSENIE

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

podpis študenta

Na tomto mieste by som rada vyjadrila úprimné poďakovanie vedúcemu práce Ing. Petru Sedláčkovi, Ph.D., za cenné rady, pripomienky, energiu a čas, ktorý mi pri vypracovaní mojej diplomovej práce venoval. Ďalej ďakujem Ing. Evě Slaninové za pomoc a ochotu pri riešení experimentálnej časti. Zvláštne poďakovanie patrí mojej rodine, a to za ich podporu, trpezlivosť a nenahraditeľné zázemie, ktoré mi vytvorili po celú dobu môjho štúdia.

OBSAH

1	ÚVO	DD A CIELE PRÁCE	.7
2	TEO	RETICKÁ ČÁSŤ	. 8
	2.1	Bakteriálny biofilm	.8
		2.1.1 Charakteristika biofilmu	.8
		2.1.2 Biochemické zloženie biofilmov	. 8
	2.2	Vznik a vývoj biofilmu	.9
		2.2.1 Reverzibilná a ireverzibilná priľnavosť	11
		2.2.2 Termodynamický prístup	12
		2.2.3 DLVO teória	13
	2.3	Kolonizačné chovanie a bunková komunikácia v biofilme	14
	2.4	Bunkové faktory ovplyvňujúce bakteriálnu adhéziu	15
		2.4.1 Bakteriálna hydrofóbnosť	15
		2.4.2 Vplyv pH	16
		2.4.3 Bakteriálny povrchový náboj	16
		2.4.4 Reologické a adhézne vlastnosti	16
		2.4.5 Vplyv teploty	17
		2.4.6 Chemické a štruktúrne zloženie bunkového povrchu	17
	2.5	Optimálne vlastnosti povrchov	17
		2.5.1 Fyzikálne vlastnosti povrchov	18
		2.5.2 Topografické vlastnosti povrchov	18
		2.5.3 Chemické vlastnosti povrchov	19
	2.6	Modelové mikroorganizmy tvoriace biofilm	20
		2.6.1 Burkholderia cepacia	20
		2.6.2 Bacillus megaterium	21
	2.7	Význam biofilmov	21
3	SÚČ.	ASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	23
	3.1	Základné teoretické modely	23
	3.2	Metódy vhodné pre posúdenie adhézie baktérií a biofilmov	23
4	EXP	ERIMENTÁLNA ČASŤ	29
	4.1	Použité mikroorganizmy, chemikálie a prístroje	29
		4.1.1 Použité mikroorganizmy	29
		4.1.2 Použité chemikálie	29
		4.1.3 Použité prístroje	29
	4.2	Uchovávanie bakteriálnych kultúr (kultivácia na pevnom médiu)	29
	4.3	Kultivácia bakteriálnych inokul	30

4.4	Príprava bakteriálnej suspenzie buniek	.30
4.5	Príprava pufrov	31
4.6	Optimalizácia modelového systému k experimentálnemu štúdiu adsorpcie	31
	4.6.1 Stanovenie počtu buniek v roztoku použitím Bürkerovej komôrky	31
	4.6.2 Veľké centrifugačné skúmavky s podložným mikroskopickým sklíčkom	31
	4.6.3 Kužeľové Erlenmayerove banky so sklenenými guľôčkami	.32
	4.6.4 Úzke centrifugačné skúmavky so sklenenými guľôčkami	.32
	4.6.5 Optimalizácia sorpčného experimentu s použitím mikročásticových sorben	tov
	a rôzneho typu sorpčných nádob	.32
4.7	Návrh vlastného modelového systému k experimentálnemu štúdiu adsorpcie	.33
4.8	Charakterizácia hydrofilného/hydrofóbneho charakteru baktérií pomocou BATH	
testo)V	.34
4.9	Charakterizácia povrchových vlastností baktérií za použitia dynamického	
a ele	ktroforetického rozptylu svetla	.34
4.10	Charakterizácia povrchu adsorbentov pred a po adsorpcii pomocou infračervenej	
spek	troskopie	.35
4.11	Snímacia elektrónová mikroskopia	.35
VÝS	SLEDKY A DISKUSIA	36
5.1	Návrh a optimalizácia postupu štúdia bunečnej adsorpcie	.36
	5.1.1 Výber adsorbentu	. 38
	5.1.1.1 Sklenene sorpčne povrchy	.38
5 2	Vlastať ovporiment k čtúdiu odcorpoie baktoriólnych hunick	41
5.2	5.2.1 Vpluv doby experimentu	. 44
	5.2.1 V plyv doby experimentu	.43
52	5.2.2 V pryv koncentracie adsorbentu	.40 51
5.5 5.4	De drehn cižie, choraliterizácie, povrehových vlostností heltárií ze povžitie	51
5.4	Pourobnejsia charakterizacia povičnových vlastnosti bakterní za pouzítia	
rozn	tylayy'ab taabnily	52
rozp	tylových techník	52
rozp 5.5	tylových techník Štruktúrne a vizuálne potvrdenie sorpcie buniek	. 52 . 57 . 57
rozp 5.5	 tylových techník Štruktúrne a vizuálne potvrdenie sorpcie buniek 5.5.1 Štruktúrna analýza sorbentu po adsorpcii buniek 	. 52 . 57 . 57 . 57
rozp 5.5	 tylových techník Štruktúrne a vizuálne potvrdenie sorpcie buniek 5.5.1 Štruktúrna analýza sorbentu po adsorpcii buniek 5.5.2 Vizualizácia nasorbovaných buniek 	. 52 . 57 . 57 . 61
rozp 5.5 ZÁV	tylových techník Štruktúrne a vizuálne potvrdenie sorpcie buniek 5.5.1 Štruktúrna analýza sorbentu po adsorpcii buniek 5.5.2 Vizualizácia nasorbovaných buniek /ER	52 57 57 61 64
rozp 5.5 ZÁV ZOZ	tylových techník Štruktúrne a vizuálne potvrdenie sorpcie buniek 5.5.1 Štruktúrna analýza sorbentu po adsorpcii buniek 5.5.2 Vizualizácia nasorbovaných buniek /ER NAM POUŽITEJ LITERATÚRY	. 52 . 57 . 57 . 61 . 64
rozp 5.5 ZÁV ZOZ	tylových techník Štruktúrne a vizuálne potvrdenie sorpcie buniek 5.5.1 Štruktúrna analýza sorbentu po adsorpcii buniek 5.5.2 Vizualizácia nasorbovaných buniek /ER /NAM POUŽITEJ LITERATÚRY /NAM POUŽITÝCH ZKRATIEK A SYMBOLOV	. 52 . 57 . 57 . 61 . 64 . 65
	 4.7 4.8 testo 4.9 a ele 4.10 spek 4.11 VÝS 5.1 5.2 5.3 	 4.5 Friprava puriov

1 ÚVOD A CIELE PRÁCE

Pôsobenie medzimolekulových interakcií medzi molekulami a atómami viazanými na rozhraní dvoch fázy je označované ako adsorpcia. Pokiaľ dochádza k samovoľnému zvyšovaniu koncentrácie látky v oblasti rozhrania považujeme tento jav za pozitívny. Pri štúdiu živých systémov pozorujeme biochemické interakcie, kedy pôsobením príťažlivých síl medzi atómami alebo molekulami dochádza k adhézii. Práve pri opise živých biologických systémoch dochádza k tomu, že pojem adhézia je alternatívou pre adsorpciu.

Už v roku 1674 boli Antonie van Leuwenhoekom pod mikroskopom pozorované prvé baktérie, ktoré boli odobrané z povrchu ľudských zubov. V tej dobe sa to síce nevedelo, ale neskôr sa potvrdilo, že v skutočnosti bol Antonie van Leuwenhoekom charakterizovaný vôbec po prvýkrát biofilm [1]. Bakteriálny biofilm je životná forma existencie bakteriálnych buniek vyskytujúcich sa rozhraní pevného povrchu a kvapaliny. V princípe by sme mohli povedať, že bakteriálne bunky sú počas tohto procesu spájané prostredníctvom signálnych molekúl a špeciálnych povrchových štruktúr. Rozhodujúcim krokom v procese vzniku biofilmu je jeho priľnutie k povrchom a prvotné prichytenie. Následné spájanie bakteriálnych buniek počas doby zrenia, až k stavu ireverzibilného upútania buniek k povrchom. Každá z týchto fáz je vysoko regulovaný proces riadený radov faktorov a špecifický pre jednotlivé bakteriálne druhy.

Aby sme pochopili proces vzniku biofilmov musíme mať dostatočné množstvo experimentálnych nástrojov k štúdiu prvotnej a nevyhnutnej etapy vzniku, tj. adsorpcii a adhézii buniek k povrchu, na ktorom má biofilm vzniknúť. Rast biofilmu je riadený množstvom fyzikálnych, chemických a biologických dejov. Variabilita spoločenstva organizmov vyskytujúcich sa v podobe biofilmu zaujíma svoje nové miesto v širokom rozsahu v priemysle, zdravotníctve aj pri čistení odpadových vôd a preto je potrebné sa naďalej jeho charakterizáciou zaoberať a podrobiť tomu ďalší výskum.

Cieľom a hlavnou experimentálnou náplňou predloženej diplomovej práce bolo navrhnúť, otestovať a optimalizovať čo najjednoduchší a univerzálne použiteľný experimentálny aparát pre kvantifikáciu adsorpcie bakteriálnych buniek na modelový povrch a následne použiť vhodné fyzikálne-chemické metódy k charakterizácii bakteriálnych buniek z hľadiska pochopenia interakcií, ktoré sa pri procese sorpcie uplatňujú.

2 TEORETICKÁ ČÁSŤ

2.1 Bakteriálny biofilm

2.1.1 Charakteristika biofilmu

Biofilm je zložený z buniek imobilizovaných na substráte často zakotvených v organickej polymérnej matrici s mikrobiálnym pôvodom. Vo svojej publikácií *Garrett a spol.* uvádzajú ďalšie charakteristiky biofilmu. Napríklad biofilm môže byť opísaný ako mikrobiálna susedná komunita tvorená bunkami, ktoré sa pripájajú k rozhraniu vloženému do matrice polysacharidu, ktorý demonštruje zmenený fenotyp [1]. *Verter a spol.* opisujú biofilmy ako sebestačné mnohobunkové komunity, ktoré sa správajú inak ako voľne plávajúce planktonické zložky z okolia [2].

Flemming a Wingender vo svojej práci biofilm definujú ako mikrobiálne agregáty, ktoré sa zvyčajne hromadia na rozhraní pevný povrch – kvapalina a sú uzavreté v matrici vysoko hydratovaných extracelulárných polymérných látok (*extracellular polymeric substances*, tzv. EPS), ktoré tvoria ich okolie [3]. Ide prevažne o polysacharidy, proteíny, nukleové kyseliny a lipidy ale aj iné biopolyméry ako sú huminové látky, či dokonca povrchovo aktívne látky [2],[3]. Mikroorganizmy v biofilmoch predstavujú menej než 10 % suchej hmotnosti bakteriálnych buniek a viac než 90 % tvorí matrica zložená z extracelulárneho materiálu už spomínaných EPS. EPS sú produkované samotným organizmom a môžu slúžiť ako živiny. Spomínané EPS tvoria trojrozmernú súdržnú polymérnu sieť, ktorá spája a imobilizuje bunky biofilmu. Autori vo svojej práci detailne poukazujú na dôležitý význam, funkcie a vlastnosti EPS pri tvorbe biofilmu u rôznych bakteriálnych druhov [3].

Dispozíciu tvoriť mikrobiálny biofilm majú baktérie i niektoré kvasnky, najznámejšie spomeniem na tomto mieste, no existujú aj ďalšie. Patria sem gramnegatívne baktérie, ako sú *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli* a *Proteus mirabilis, Acinetobacter baumannii*. Mnohé grampozitívne baktérie, ako napr. *Staphylococcus aureus, Streptococus pneumonia, Bacillus cereus, Listeria monocytogenes* sa tiež vyznačujú týmito vlastnosťami. Schopnosť tvoriť biofilm je charakteristická aj pre kvasinky, napr. *Candida albicans* a *Candila parapsilosis* [2],[4].

2.1.2 Biochemické zloženie biofilmov

Biofilmy sa líšia vo svojej hrúbke, ktorý sa pohybuje v rozsahu od 10 do 100 µm. Ako už bolo spomenuté biofilmy sú tvorené EPS, tie sú nerozpustné a chránia vzniknuté bakteriálne spoločenstvo pred vysychaním, poškodením UV žiarením, katiónmi kovov a inými škodlivými molekulami [2]. EPS sa líšia v závislosti od dostupnosti živín, teploty a iných faktorov. Extracelulárne polymérne látky poskytujú mechanickú stabilitu biofilmu, zabezpečujú ich priľnavosť k povrchom a samotnú súdržnosť biofilmu [3].

V biofilmoch sa našli tri hlavné zložky EPS [2],[3],[5]. Za prvé sú to polysacharidy, ktoré majú významný vplyv na vlastnosti EPS [2]. Bola preukázaná prítomnosť niekoľkých homopolysacharidov ako napr. glukany, ktoré sú produkované streptokokmi a celulóza produkovaná napr. *Gluconacetobacter xylinus, Agrobacterium tumefaciens*. Avšak väčšina exopolysacharidov sú heteropolysacharidy, ktoré pozostávajú zo zmesi neutrálnych a nabitých zvyškov cukrov. Medzi tie najznámejšie patrí alginát a xantán. Existujú aj polykationtové

polysacharidy, ako je intracelulárny adhezín [3],[5]. Adhezín je typickou molekulou, ktorá baktériám umožňuje pripojenie k povrchom alebo iným baktériám [6].

Ďalšou významnou zložkou EPS sú proteíny, ako napr. albumín, fibronektin, fibrinogén, laminín či denaturovaný kolagén. Tie svojou prítomnosťou môžu podporovať alebo inhibovať adhéziu baktérií [2],[7]. Ale patria sem aj neenzýmové proteíny tzv. lektíny [3].

Medzi najznámejšie proteínové adhezíny patria *flagella*, *pili* a *fimbriae* (viď *Obrázok 1*), ktoré zohrávajú dôležitú úlohu ako nešpecifické látky podporujúce adhéziu [2]. *Flagellum*, dlhý špirálovitý prívesok, ktorý baktérií zabezpečuje predovšetkým mobilitu. *Pili* sú bakteriálne povrchové štruktúry, ktoré sú podobné *fimbriae*, ale sú typicky dlhšie [3]. U gramnegatívných baktérií sú *pili* tvorené nekovalentnou homopolymeráciou hlavných podjednotiek *pili*. Oproti tomu u grampozitívných baktérií bolo dokázané, že ich podjednotky sú viazané kovalentnou polymeráciou [8]. Ďalšími povrchovými štruktúrami nachádzajúcimi sa na povrchu bunky sú *fimbriae*, sú kratšie a rozprestierajú sa na celom povrchu buniek. *Fimbriae* a *pili* sa okrem funkcie špeciálnej pohyblivosti bakteriálnej bunky podieľajú na tvorbe biofilmu [3].



Obrázok 1: Pohybové proteínové adhezíny baktérií [9]

V posledných rokoch bola skúmaná aj extracelulárna DNA biofilmov (tzv. eDNA), ktorá je treťou zložkou EPS [2]. V závislosti od bakteriálneho druhu môže mať mriežkovitú štruktúru alebo môže tvoriť vláknitú sieť [3]. Význam eDNA pri podpore tvorby biofilmu nie je dostatočne vysvetlený. Nie je dostatočne jasné, ako eDNA interaguje s bunkami a zložkami matrice EPS. Napriek tomu je o eDNA známe, že pomáha adhézii baktérií k povrchom a zabezpečuje štruktúrnu stabilitu biofilmov, zároveň prispieva k antimikrobiálnej rezistencii [4].

2.2 Vznik a vývoj biofilmu

Pomocou mikroskopickej metódy bolo zistené, že baktérie rastú rozdielne potom, čo sa prichytia na povrch a podporia tvorbu biofilmu [3],[10]. Rast biofilmu je riadený množstvom fyzikálnych, chemických i biologických procesov. Rada mechanizmov so sebou prináša rôzne formy viazania buniek, vďaka nim dochádza k výstavbe biofilmu. *Garrett a spol.* označili pripojenie bunky k substrátu ako priľnavosť a upevnenie bunky k bunke ako súdržnosť. Ide o mechanizmy, ktoré v závere určia kohézne a tzv. lepiace vlastnosti biofilmu [1].

Tvorba biofilmu zahŕňa niekoľko krokov (viď *Obrázok 2*). Najskôr sa planktonické bunky prichytia k povrchu (zdravotníckeho zariadenia, vodovodného potrubia) v procese známom ako povrchové pripojenie (vratná adhézia). Následne vzniká tzv. nevratná adhézia (nevratné pripojenie). Za pomoci EPS dochádza k zreniu biofilmu. V tejto fáze dozrievania biofilm tvorí štruktúrovanú architektúru z buniek. Po zrení bunky opúšťajú biofilm vo fáze rozptýlenia, tzv. disperzie buniek. Každá z týchto fáz je vysoko regulovaný proces [2],[11].



Obrázok 2: Životný cyklus biofilmu: (1) transport mikroorganizmov a prvotné prichytenie, (2) nevratná adhézia, (3) tvorba primárneho biofilmu, (4) zrenie sekundárneho biofilmu, (5) disperzia buniek [2]

Vývojom modelov, ktoré by mohli slúžiť k lepšiemu pochopeniu bakteriálnych biofilmov sa vo svojej publikácií zaoberajú aj *Monds a O'Toole* [6]. Kladú dôraz na správnosť použitého modelu a jeho vysvetlenie. Hovoria o tom, že štúdie by nemali byť založené iba na vedeckom podklade – čo v rade publikácií môžeme postrehnúť. No prioritne by mali zohľadniť myšlienku vývoja biofilmu v jeho prirodzenom prostredí. Autori v publikácii [6] preto ponúkajú jeden pohľad na vývoj biofilmu, ktorý popisuje *Obrázok 3*.

Na *Obrázku 3*, môžeme vidieť znázornený vývoj bakteriálneho biofilmu v jednotlivých fázach:

a) Najskôr sa jedna bunka baktérie prichytí nezávisle na povrch. Ako môžeme vidieť, ďalšia bunka sa prichytí nezávisle na tej prvej, čo je prirodzenou odpoveďou na podmienky okolia, v ktorých sa bunky nachádzajú [6]. Podkladová vrstva, tiež označovaná ako klimatizačná je základom pre rast biofilmu na substráte [1]. Toto prichytenie na substrát poskytuje dostatočný prístup k živinám, ktoré podporia rast ďalších klonov [6].

b) V tejto fáze má každá bunka dostatočný prístup k potrebnému množstvu kyslíka a uhlíka (modrá zóna) a modré bunky sa začínajú rozkladať – produkovať EPS na povrchu substrátu [6]. Práve EPS slúžia ako "lepidlo" na udržanie buniek v komunite blízko seba a tak podporia rast [2]. Produkciou EPS je podporovaná povrchová adhézia [12]. Bunky sú v tomto štádiu v dostatočnej vzdialenosti od seba, navzájom sa neovplyvňujú a neinteragujú. Je dobré si na tomto mieste spomenúť, že rozhodnutie kolonizovať povrch nemusí byť u každej baktérie rovnaké [6].

c) V závislosti na čase bunky ďalej rastú a vrstvia sa nad sebou, vzniká mikrokolónia, ktorá je často označovaná ako primárny biofilm. Modré bunky na povrchu majú dostatočný prístup ku kyslíku a uhlíku. Metabolizmus buniek v blízkosti povrchu, na ktorom

sú naviazané obmedzuje difúziu kyslíka a uhlíka. Dochádza k tomu v dolnej časti mikrokolónie (červená zóna). Červené bunky vytvárajú fenotypovú heterogenitu, čím reagujú na lokálne zmeny [6]. Bakteriálne bunky nachádzajúce sa v matrici sú charakterizované nedostatkom Brownovho pohybu, preto sa štruktúra mikrokolónie v ďalšom kroku tvorby biofilmu zmení na hubovitý tvar [10].

d) Postupne dochádza k produkcii vyšších hladín EPS (žlté bunky) a tieto bunky podporujú rast a vytváranie makrokolónií až po samotný vznik sekundárneho biofilmu. Bunky vylučujúce EPS a bunky nachádzajúce sa v ich blízkosti podporujú vertikálny rast prostredníctvom lepšieho prístupu ku kyslíku a uhlíku. Napokon, ako bunky rastú, sú vystavené vyšším šmykovým silám (zelená zóna). Zelené bunky vytvárajú v biofilme ďalšiu homogenitu [6].

e) Zrelé makrokolónie sa spájajú a vytvárajú zrelý biofilm [6]. Takto vytvorený zrelý biofilm sa uvoľní do prostredia, aby mohlo dochádzať ku kolonizácii ďalších povrchov, ktoré doplnia cyklus rastu biofilmu [12].



Obrázok 3: Vývoj bakteriálneho biofilmu [6]

2.2.1 Reverzibilná a ireverzibilná priľnavosť

Ako už bolo uvedené vyššie, pre vznik biofilmu je dôležitá priľnavosť. V prvom kroku bakteriálnej adhézie sa bunky priblížia k povrchu pomocou Brownovho pohybu alebo za pomoci bunkových príveskov, ktoré sa nachádzajú na povrchu baktérií. Vďaka tomu je priľnutie bunky k povrchov reverzibilné. Následne bunky začnú sa navzájom medzi sebou spájať, k čomu používajú už spomenuté typické bunkové prívesky ako sú *fimriae*, *pili* a *flagella* (viď *Obrázok 1*) a produkovať EPS (proteíny, polysacharidy a eDNA). Medzi bunkou a povrchom existuje určitá energetická bariéra. Pôsobením vyšších iónových síl okolitého prostredia (vodného roztoku, v ktorom sa bunky nachádzajú) spomenutá bariéra zaniká a bakteriálne bunky tak ľahko a rýchlo dosiahnu ireverzibilnú priľnavosť [5].



Obrázok 4: Fyzikálno-chemické interakcie, ktoré prispievajú k stabilite matrice EPS a jej základné zložky (polysacharidy, proteíny a eDNA) [3]

Primárna adhézia je charakterizovaná interakciami nešpecifickými a vratnými, ide o tzv. reverzibilný dej (viď *Obrázok 4*). Tieto interakcie sú kombináciou nekovalentných interakcií a to elektrostatických, acidobázických, Van der Waalsových, Coulombových, hydrofóbnych, stérických a interakcií na báze vodíkových mostíkov [5],[13].

Stav sekundárnej adhézie je označovaný ako nevratný stav upútania bunky, tzv. ireverzibilný dej. Dosiahnutie tohto stavu upútania bunky k povrchu je sprevádzané špecifickými väzbovými interakciami medzi interagujúcimi povrchmi [13].

Základom vývoja bunkových kolónií/agregátov a biofilmov je proces adhézie jednobunkového organizmu k abiotickému alebo biotickému povrchu [13]. Počiatočné priľnutie bakteriálnych buniek na pevný povrch vo vodných systémoch je za kontrolovaných laboratórnych podmienok všeobecne považované za podobné ako usádzanie koloidných častíc [14]. Tento stav je možné charakterizovať použitím niekoľkých zjednodušení a k predikcii tohto stavu použiť základné fyzikálno-chemické prístupy. Prvým je termodynamický prístup [13],[15] a druhým prístupom je teória Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeekova tzv. teória DLVO [5],[13],[16].

2.2.2 Termodynamický prístup

Ako bolo uvedené v predchádzajúcej kapitole k charakterizácii koloidných častíc a k charakterizácii priľnavosti bakteriálnych buniek na pevný povrch môžeme použiť tzv. termodynamický prístup [5][16]. Termodynamický prístup predpokladá priamy kontakt dvoch povrchov za podmienok termodynamickej rovnováhy. Tento prístup využíva zložky medzifázových napätí vypočítaných z kontaktných uhlov testovacích kvapalín. Výhodou tejto metódy je jednoduchosť. Nevýhoda spočíva v aplikovaní makroskopickej metódy na štúdium povrchu mikroskopických organizmov, pretože táto teória pôvodne vznikla k charakterizácii vlastností pevných látok makroskopického merítka. Týmto termodynamickým prístupom nemožné odlíšiť variabilitu bunkového povrchu na molekulárnej je teda úrovni, napr. lokalizovať špecifické makromolekulárne útvary, ktoré sa vyskytujú v rôznej miere na bunkovom povrchu [13].

Teória termodynamického prístupu uvažuje príspevok Van der Wallsových a acidobazických interakcií. Príspevok elektrostatických interakcií medzi bunkou a nosičom a navzájom medzi bunkami nie je v tomto prípade vôbec uvažovaný. Toto môže viesť k nesúladu výsledkov tohto modelu s výsledkami reálnych štúdií adhézie baktérii na uvažovanom povrchu za daných podmienok. Ak chceme, aby boli v modelovom uvažovaní

zahrnuté aj elektrostatické interakcie musíme použiť model DLVO, poprípade rozšírenej teórie DLVO (tzv. XDLVO) [13],[16].

2.2.3 DLVO teória

DLVO teória je široko používanou teóriou k popisu mikrobiálnej adhézie [5],[13],[16]. Zjednodušene by sme mohli povedať (pre ideálne hladké a homogénne častice), že klasická DLVO teória ukazuje nakoľko je kolízia buniek s iným povrchom pravdepodobná, zatiaľ čo celková Gibbsova energia, získaná termodynamickým prístupom umožňuje predpovedať stabilitu prípadnej interakcie. Môžeme sa preto domnievať, že interakcie pôsobiace na väčšie vzdialenosti (DLVO teória) riadia rýchlosť adhézie bakteriálnych buniek na podložku, zatiaľ čo interakcie na krátku vzdialenosť (termodynamický prístup) určujú silu potrebnú k uvoľneniu dvoch už spojených povrchov [13].

Na povrchu mikrobiálnych buniek sa nachádza veľké množstvo funkčných skupín, ktoré nesú v závislosti na pH prostredí rôzne náboje. Celkový náboj mikrobiálneho povrchu je za fyziologických podmienok vo väčšine prípadov negatívny. Nabitý povrch častice (bunky/nosiča) priťahuje opačne nabité ióny okolitého elektrolytu a vzniká elektrická dvojvrstva. Pokiaľ sa k negatívne nabitému povrchu priblíži negatívne nabitá bunka, dochádza k elektrostatickému odpudzovaniu v dôsledku prekrývania difúznych časti elektrických dvojvrstiev približujúcich sa povrchov. Hrúbku elektrickej dvojvrstvy ovplyvňuje iontová sila a hodnota tzv. zeta potenciálu. S rastúcou koncentráciou soli klesá efektívna hrúbka elektrostatickej dvojvrstvy [5],[13].

Skutočnosť, že náboj mikroorganizmov je vo väčšine prípadov záporný, však nevylučuje možnosť, že pri vyššej iontovej sile prostredia môžu prevládať príťažlivé disperzné sily nad odpudzovaním rovnako nabitých difúznych dvojvrstiev. Napríklad stérické efekty povrchových štruktúr sú v nesúlade s DLVO teóriou. V dôsledku vysokej iontovej sily (nad 200 mmol·dm⁻³) prostredia je hrúbka dvojvrstiev zmenšená [13].

Bežné kultivačné média, ktoré sa používajú pre mikrobiologické operácie, majú iontovú silu v rozsahu 10 až 100 mmol/dm³. Bunky môžu byť v takýchto prostrediach reverzibilne ukotvené v určitej vzdialenosti od povrchu pevného substrátu v tzv. sekundárnom minime, alebo energie kolízie častíc môžu viesť k prekonaniu malej potenciálnej bariéry zabraňujúcej priamemu kontaktu povrchu. V mnohých prípadoch je možné prechodné ukotvenie v sekundárnom minime považovať za dostatočné pre úspešnú adhéziu, keďže v tejto vzdialenosti (niekoľko nm) sa môžu prejaviť špecifické biochemické interakcie vedúce k pevnej nevratnej adhézii [13].

Všeobecne bola preukázaná dobrá zhoda experimentálnych výsledkov s DLVO teóriou pri nízkych koncentráciách elektrolytov. Pri vyšších koncentráciách sa prejavujú rastúce odchýlky medzi predikciou a experimentálne zistenou adhéziou [13].



Obrázok 5: Závislosť integračnej energie a jej zložiek na vzdialenosti medzi časticami (celková interakčná energia – plná červená krivka, príťažlivé Van der Waalsové sily – bodkovaná zelená krivka, odpudivé elektrostatické sily – modrá čiarkovaná krivka, u/k_bT – celková Gibbsova integračná energia, M₁ – primárne minimum, M₂ – sekundárne minimum, P – primárne maximum (prekonanie potenciálnej batérií), h – vzdialenosť povrchu) [17]

2.3 Kolonizačné chovanie a bunková komunikácia v biofilme

Bakteriálne bunky podstupujú širokú škálu morfologických a fyziologických zmien pri reakcii na chemické a fyzikálne zmeny v prostredí, v ktorom sa nachádzajú. Dochádza tak k regulačným a adaptačným zmenám, ktoré vyplývajú z metabolickej aktivity samotných baktérií. Dôležité je, že niektoré samoregulačné molekuly sú špecificky uvoľňované ako difúzne signály pre bunkovú komunikáciu medzi bunkami v rámci bakteriálnej populácie. V literatúre je táto schopnosť intracelulárnej bakteriálnej komunikácie opísaná ako *quorum sensing* (QS) [18].

Dôležitú úlohu v bakteriálnej komunikácii hrá spomínaný QS. Je to systém, kedy baktérie (patogénne aj nepatogénne) začnú produkovať signálne zlúčeniny [11],[19]. Tieto chemické signálne zlúčeniny nazývame autoinduktory. Hromadia sa so zvyšujúcou sa hustotou buniek a po dosiahnutí prahovej hodnoty koncentrácie nastane genová expresia [11],[20]. Baktérie sa tak môžu synchronizovať v celej populácii a správať sa ako mnohobunkový organizmus [20]. Aktivácia génov vyvolá produkciu enzýmov a môže vyvolať aj produkciu toxínov [21]. Ďalej sa QS môže prejaviť ako spúšťač infekcie, tvorby biofilmu, dokonca aj produkcie antibiotík a podporiť iné procesy [19].

Typy molekúl QS sú odlišné pre grampozitívne a gramnegatívne baktérie. Schopnosť adaptovať sa na vzniknuté okolité podmienky je uskutočnená pomocou peptidov u grampozitívných baktérií. Zvýšenie koncentrácie peptidov spôsobí, že sa naviažu na histidín kinázu (receptor nachádzajúci sa v membráne), dôjde k aktivácii tohto receptoru a spustí sa autofosforylácia. U gramnegatívných baktérií posúdenie stavu QS sprostredkúvajú N-acyl-1-homoserín-laktóny a transkripčný aktivátor cytoplazmatického autoindukčného receptora. Tieto signálne molekuly voľne difundujú dnu a von z bunky. Ich koncentrácia sa zvyšuje so zvyšujúcou hustotou buniek a umožňuje bunkám medzi sebou komunikovať [18],[20]-[22].



Obrázok 6: Bunková stena grampozitívných a gramnegatívných baktérií [23]

Všeobecne môžeme povedať, že QS ovplyvňuje gény riadiace procesy, ktoré sú pre baktérie výhodnejšie. A zároveň z toho vyplýva, že komunikácia medzi bakteriálnymi bunkami prebieha vtedy, ak sa v biofilme vyskytuje veľké množstvo buniek [22].

2.4 Bunkové faktory ovplyvňujúce bakteriálnu adhéziu

Rada faktorov molekulárnych, mechanických a topografických, ktoré prispievajú k adhézii, je komplikovaná [24] . Adhézia baktérií na povrchy materiálov je zložitý proces ovplyvnený mnohými faktormi. Sú to vlastností samotných baktérií a povrchu, zároveň sú tu zahrňované environmentálne faktory, ako je prítomnosť sérových proteínov a baktericídnych látok [25]. Tieto faktory sa môžu meniť s bakteriálnymi kmeňmi a extracelulárnym prostredím, vrátane prostredia, ktoré je okolo substrátu a podmienok rastu buniek, napr. pH, teplota, zdroj uhlíka, prietok tekutiny, zloženie živného média, rastové faktory [1],[24].

2.4.1 Bakteriálna hydrofóbnosť

Rýchla zmena environmentálnych podmienok si vyžaduje adaptívnu zmenu mikroorganizmu, ktorá zvyšuje jeho schopnosť prežiť. Prispieva k tomu aj samotná imobilizácia buniek, kde je dôležitým parametrom hydrofóbnosť povrchu buniek. *Krasowska a Sigler* vo svojej práci upozorňujú na to, že hydrofobicita povrchu buniek má rozhodujúcu úlohu pri priľnutí alebo odpojení buniek od povrchu. Každý druh baktérií má iný faktor, ktorým je zabezpečená hydrofóbnosť [26]. Hydrofóbnosť baktérií sa mení podľa bakteriálneho druhu ako už bolo spomenuté a je ovplyvnená rastovým médiom, vekom baktérií, bakteriálnou koncentráciou a povrchovou štruktúrou baktérií [25]. Platí, že viac hydrofóbne bunky priľnú silnejšie k hydrofóbným povrchom, zatiaľ čo hydrofilne bunky priľnú k hydrofilným povrchom [26].

Je známe, že niektoré hydrofóbne organizmy spôsobujú poškodenie povrchov tvorbou biofilmov, napr. na zdravotníckych zariadeniach. Na druhej strane môžu ľahko akumulovať a rozkladať organické látky z odpadov, kde sú nežiaduce kvôli svojim vlastnostiam. Napríklad kontaminanty ako je toluén, sú vysoko hydrofóbne a toxické pre bunky tým, že spôsobujú narušenie plazmatickej membrány. Hydrofóbne mikroorganizmy majú však

tendenciu rozložiť ich. Niektoré hydrofilné mikróby s nízkou hydrofóbnosťou na povrchu buniek vytvárajú odolnosť voči rozpúšťadlám modifikáciou lipopolysachodov v membráne buniek, ktoré ich chránia pred pripojením organických molekúl. Takže so zvyšujúcou sa hydrofóbnosťou buniek pozorujeme rast adhézie a agregácie buniek a súčasne dochádza k degradácií odpadov ako je fenol, pyridín a jeho deriváty, zlúčenín dusíka a fosforu alebo ťažkých kov a to prostredníctvom metabolických dráh [26].

2.4.2 Vplyv pH

To či adhézia bude alebo nebude prebiehať závisí na mnohých faktoroch a jedným z nich je pH. Jednou z najvýznamnejších vlastností baktérií je ich odolnosť voči stresovým podmienkam. Baktérie reagujú na vnútorné i vonkajšie zmeny prostredia úpravou pH. Táto ich aktivita je spojená s radou rôznych bunkových procesov. V štúdii *Garrett a spol.* je spomenuté, že postupné zvyšovanie kyslosti zvyšuje šance buniek na prežitie. To poukazuje na to, že baktérie obsahujú mechanizmy, ktoré umožňujú bakteriálnej populácii prispôsobiť sa aj malým zmenám pH v prostredí. Tiež je známe, že nie všetky druhy baktérií sú toho schopné. Optimálna hodnota pH pre výrobu polysacharidov závisí od druhu baktérií, pre väčšinu druhov je pH okolo 7 [1].

V membráne bakteriálnych buniek sa nachádza protónová pumpa. Tá prenáša protóny (H^+) z cytoplazmy a vytvára elektrochemický gradient. Tak môže dochádzať k pasívnemu prenosu H^+ v dôsledku pôsobenia sily poháňajúcej tento gradient, čo môže negatívnym spôsobom ovplyvňovať v cytoplazme reguláciu pH. Baktérie na zmeny pH vonkajšieho prostredia i cytoplazmy reagujú zvyšovaním aktivity a syntézou proteínov [1]. Ak hodnota pH klesne pod fyziologické hodnoty, bunky prestávajú rásť. To poukaze na to, že pri nízkych hodnotách pH musí existovať modifikácia bunkového metabolizmu alebo bunkových lýz, čo vedie k poklesu koncentrácie produkovaných polymérov. V prípade baktérie *Bacillus megaterium*, tak dochádza k poklesu koncentrácie poly(3-hydoroxybutyrátu) [27].

2.4.3 Bakteriálny povrchový náboj

Povrchový náboj je ďalším dôležitým fyzikálnym faktorom adhézie baktérií [25]. V závislosti na pH prostredí majú na svojom povrchu mikrobiálne bunky rôzne náboje. Väčšina častíc získava elektrický náboj vo vodnej suspenzii kvôli ionizácii svojich funkčných skupín, ktoré sú na povrchu buniek. Povrchový náboj väčšiny baktérií za fyziologických podmienok je záporný. Bolo zistené, že adhézia mnohých baktérií na rôzne pevné povrchy nebola významne ovplyvnená povrchovým nábojom baktérií [5],[13],[25].

2.4.4 Reologické a adhézne vlastnosti

Biofilmy, či už s čistou kultúrou jedného druhu baktérií alebo ako biofilmy zložené z viacerých bakteriálnych druhov tzv. zmesné sa správajú ako viskoelastické látky. Ako už bolo spomenuté vyššie v kapitolách 2.1.1 a 2.1.2, biofilmy produkujú EPS. Tie podporujú vznik vysoko hydratovaných viskoelastických gélov. To sa deje v dôsledku vzniku vodíkových väzieb, kedy biofilm získava mechanickú stabilitu. Matrica, ktorá tvorí ESP reaguje na stres aj vďaka vzniknutým vodíkovým väzbám medzi jednotlivými extracelulárnými polymérnymi látkami. V dôsledku polymérneho trenia a narušenia vodíkových väzieb sa biofilm tiež môže brániť stresu, a tak dôjde k tlmeniu viskóznych vlastností, poprípade dochádza k zarovnaniu polymérov v smere šmyku. Tieto vlastnosti sa menia v závislosti od zvýšenej teploty [1].

2.4.5 Vplyv teploty

Vlastnosti biofilmov sa menia pri ich reakcii na stresové podmienky pomocou tvorby a zmien v štruktúre EPS. Tieto vlastnosti sa menia i v závislosti na teplote. Zvýšenie teploty polysacharidov vedie k vzniku gélovej látky, ktorá postupne zvyšuje svoju pevnosť až do okamihu dosiahnutia kritického bodu. Toto správanie ovplyvňuje viskozitu polysacharidov, ktorá môže ovplyvniť priľnavosť biofilmu k povrchom [1].

Optimálna teplota pre mikroorganizmus je spojená so zvyšovaním prímu živín, čo vedie k rýchlej tvorbe biofilmu. Metabolizmus živín je priamo spojený s prítomnosťou enzýmov, tzv. enzýmovou aktivitou. Na základe tohto môžeme povedať, že tvorba biofilmu závisí na prítomnosti enzýmov. To zahŕňa aj reakčné mechanizmy, ktoré riadia vývoj mnohých fyziologických a biochemických systémov baktérií. Ako už bolo naznačené, teplota je v korelácií s reakčnou rýchlosťou enzýmov a má vplyv na vývoj bunky. Optimálna teplota vedie k zdravému rastu biofilmu a naopak teplota ďaleko od optima výrazne zvyšuje účinnosť bakteriálneho rastu, pretože dochádza k zníženiu reakčných rýchlosti enzýmov [1].

2.4.6 Chemické a štruktúrne zloženie bunkového povrchu

Extracelulárny povrch baktérií obsahuje rôzne funkčné skupiny napr. karboxylát, hydroxyl, fosfát alebo amínovú skupinu, ktoré ovplyvňujú interakcie zo substrátom. Po prekonaní elektrostatického odpudzovania, sa prednostne usporiadajú hydrofóbne funkčné skupiny na povrchu. Bolo dokázané, že odstránenie molekúl vody z blízkosti povrchu podporí hydrofóbne interakcie a zvýši úzky kontakt medzi bunkou a povrchom, čo uľahčí pripojenie baktérií na nízkoenergetické substráty. V prípade, že povrchové napätie bakteriálnej bunkovej steny je vyššie ako povrchové napätie okolitej kvapaliny zvýši sa adhézia baktérií k hydrofilným povrchom [24].

V druhej fáze adhézie medzi bakteriálnymi povrchovými štruktúrami a substrátovými povrchmi prevažujú molekulárne interakcie. To znamená, že pevnejšia adhézia baktérií je uskutočnená pomocou bakteriálnych polymérnych štruktúr. Patria sem *flagella*, *pili* a *fimbriae* (viď *Obrázok 1*). V skutočnosti by mali byť funkčnou časťou týchto bunkových štruktúr tzv. adhezíny [25]. Adhezín umožňuje baktériám pripojenie k iným baktériám alebo povrchom [6]. Baktérie môžu mať rôzne adhezíny na rôzne povrchy (rôzne receptory). Receptor je zložka (známa alebo predpokladaná) na povrchu materiálov, ktorá je viazaná aktívnym miestom adhezínu počas procesu špecifickej adhézie. Adhezíny sú preto ďalšou významnou zložkou, ktorá sa zúčastňuje na adhézii [25].

2.5 Optimálne vlastnosti povrchov

Niekoľko dôležitých činiteľov, ktoré sa zúčastňujú na procese bakteriálnej adhézie boli uvedené v predchádzajúcej kapitole. Okrem už spomínaných faktorov sa adhézie zúčastňuje i povrch, na ktorý sa bakteriálne bunky viažu [24],[25],[28]. Substrát, tiež označovaný v publikáciách ako materiál, adsorbent, či povrch je využívaný mikroorganizmami ako zdroj energie. Je to pevný povrch, ku ktorému môže mikroorganizmus priľnúť [25],[28].

Preto by sme sa mali zamyslieť nad niektorými otázkami. Ako s adhéziou súvisí povrch na ktorý sa bunky viažu? Ako ovplyvňujú chemické, fyzikálne a topografické vlastnosti povrchov vznik a tvorbu biofilmu? Detailnejšie o tom diskutujú do svojej publikácii napríklad *Renner a Weibrl.* Popisujú, že jednotlivé vlastnosti povrchov ovplyvňujú rast a vývoj

biofilmu, samotné pripojenie baktérií k substrátu [24]. Vývoj materiálov odolných voči biologickému biofilmu vyžaduje ďalšiu radu štúdií, čo je uvedené vo viacerých odborných publikáciách.

2.5.1 Fyzikálne vlastnosti povrchov

bakteriálnych Prvotné pripojenie buniek k povrchom je primárne ovplyvnené elektrostatickými príťažlivými a odpudivými interakciami. Ďalej po prekonaní týchto síl dôjde k hydrofóbnym interakciám (napr. nízka povrchová energia) a elektrostatickej interakcii (napr. náboj), ktoré spôsobia lepšie interakcie buniek na povrchu. Táto väzba bunka – povrch iniciuje génovú expresiu a reguláciu extracelulárných polymérnych sacharidov a ďalších látok, ktoré už boli spomenuté v samostatnej kapitole pri opise vzniku biofilmu (viď kapitola 2.3). Ako už bolo v tejto práci uvedené baktérie majú väčšinou záporný náboj [13], ktorý sa stanovuje meraním zeta potenciálu [24] a experimentálne výsledky sa popisujú pomocou DLVO teórie [13]. Záporne nabité baktérie sa prichytia k pozitívne nabitým povrchom a elektrostatické odpudzovanie destabilizuje bunky v kontakte s negatívne nabitými povrchmi. Počas počiatočného štádiá prichytenia tomu napomáhajú už spomenuté organely (flagely, fibrie, pili) [24].

Použitý povrch môže mať rôznu morfológiu. Povrch môže byť potiahnutý špeciálnou povrchovou vrstvou, môže byť pórovitý alebo porézny, pletený alebo dokonca podobný mriežke. Baktérie majú tendenciu prednostne priľnúť a kolonizovať porézny povrch [25].

Taktiež z meraní kontaktných uhlov je známe, že kovové povrchy majú vysokú povrchovú energiu, sú negatívne nabité a hydrofilné. Na druhú stranu polyméry sú menej elektrostaticky nabité a hydrofóbne. Napríklad polyetylén s vysokou molekulovou hmotnosťou alebo teflón, ktorý má nízku povrchovú energiu. Z toho je zrejmé, že zmáčavosť povrchu i povrchová hydrofobicita úzko súvisia a vplývajú na adhéziu [25].

Veľké množstvo baktérií je pripojených na hydrofóbne povrchy s malým alebo žiadnym povrchovým nábojom (teflón, polyetylén, polystyrén, polyetyléntereftalát). Oproti tomu menej baktérií priľne k hydrofilným kovom s pozitívnym alebo neutrálnym povrchovým nábojom a najmenej k hydrofilným negatívne nabitým substrátom (sklo, sľuda, oxidované plasty) [25].

Všeobecným pravidlom je, že baktérie prednostne kolonizujú povrchy, ktoré sú hydrofóbne, ktoré majú zdrsnené plochy, na rozdiel od hydrofilných, hladkých povrchov [24],[25]. Ako už bolo uvedené, mnoho baktérií prednostne adheruje na hydrofóbne povrchy, ale napr. ľudská baktéria *Staphylococcus epidermidis*, prednostne priľne na polárne hydrofilné substráty. Výnimkou sú fluorované povrchy, pretože počiatočná adhézia baktérií na tieto povrchy a zrenie biofilmu je oveľa nižšia v porovnaní s bežne používanými priemyselnými substrátmi ako je oceľ, sklo, polypropylén [24].

2.5.2 Topografické vlastnosti povrchov

Je známe, že drsnosť a pórovitosť povrchu má vplyv na väzbu baktérií na povrch. Konkrétne drsnosť povrchu v rozmeroch nanoskopických a mikroskopických zvyšuje priľnavosť baktérií k substrátu počas počiatočných krokov kolonizácie, pretože poskytuje väčšiu plochu povrchu pre pripojenie buniek. Cicavčie bunky sú typicky väčšie ako desať mikrometrov, ale bunky väčšiny kmeňov baktérií majú typicky priemer jeden mikrometer. Porovnaním buniek vytvárajúcich biofilm boli odvodené závery, že mechanizmus, ktorým topografické vlastnosti

povrchov ovplyvňujú bakteriálne pripojenie a rast je odlišná v prípade cicavcov a baktérií [24].

Drsnosť povrchu znižuje šmykové sily vzhľadom k tokovým vlastnostiam okolitého prostredia. Štúdia o priľnavosti baktérií k titánu, ako bežne používaného biomateriálu poukázala na dobrú priľnavosť pri drsnosti v rozmeroch nanometre [24]. Taktiež nepravidelnosť polymérných povrchov podporuje adhéziu baktérií [25]. Zároveň sa predpokladá, že na mikroskopickom povrchu dochádza k zníženiu priľnavosti baktérií k povrchu zvýši [24].

Štúdia *Samonin a spol.* sa zaoberala adsorpciou bakteriálnych buniek na poréznych materiáloch. V publikácií je spomenuté, že dobré adsorbenty majú špecifickú plochu väčšiu ako 0,01 m²/g. Zaujímavosťou je, že pre maximálnu adsorpciu mikrobiálnych buniek musia byť póry adsorbentov dvakrát až päťkrát väčšie než bunky baktérií [28]. Drsnosť povrchu sa zdá byť prispievateľom k adhézii, ale nie podstatne rozhodujúci faktorom pre adhéziu [29].

2.5.3 Chemické vlastnosti povrchov

Chemické vlastnosti povrchov tiež ovplyvňujú proces bunkovej imobilizácie [28]. Chemická modifikácia povrchu predstavuje dôležitú stratégiu pre reguláciu pripojenia baktérií na substráty a tvorbu biofilmu. Rozhodujúcim faktorom je, či študujeme homogénne alebo heterogénne chemické povrchy. Je veľa druhov biofilmov, ktoré bežne vznikajú v biosfére, ale práve kvôli fyzikálno-chemickým požiadavkám neboli kultivované v laboratóriách. Čo obmedzuje štúdium viacdruhových biofilmov [24].

Pokiaľ by sme rozdelili adsorbenty na organické a anorganické, mohli by sme u nich očakávať tieto vlastnosti. *Organické adsorbenty* sú chemicky stabilné a vykazujú veľkú rozmanitosť povrchových vlastností a štruktúr pórov. *Anorganické adsorbenty* sú odolné voči biologickej degradácii a je ich ľahké regenerovať. Ich nevýhodou je, že sú rozpustné v alkalických roztokoch. Povaha adsorbentov je tiež dôležitá. Existuje niekoľko hlavných skupín materiálov, ktoré sa používajú k adhézii buniek na pevné povrchy. *Prírodné anorganické adsorbenty* (kaolinit, zeolit, kremelina, piesok, kremičitany, uhličitany, fosfáty, huby), *prírodné organické adsorbenty* (chitín, chitozan, lignín, dextran, drevo, kolagén, hodváb, vlna) a poslednou skupinou sú *anorganické a uhlikaté umelé adsorbenty* (oxid kremičitý, silikagél, sklo, grafit, sadza, uhlie, tkaniny, vlákna, keramika, magnetit a rôzne materiálové kombinácie) [28].

Pri pozorovaní tvorby biofilmu a návrhu materiálov, by sme si mali uvedomiť ešte jednu skutočnosť. Tuhé materiály v rôznych prostrediach neposkytujú iba holé plochy so svojimi povrchovými vlastnosťami. Ešte pred naviazaním prvej bakteriálnej bunky sa na povrchu môžu ocitnúť rôzne organické a anorganické látky z prostredia a vytvoria tak tzv. kondicionačný biofilm. Fyzikálne - chemické vlastnosti kondicionačných biofilmov sú úplne odlišné od čistých povrchov, kde neboli vopred naviazané žiadne iné látky. Zároveň sa líšia aj interakcie mikroorganizmov s už vytvoreným kondicionačným biofilmom [5].

2.6 Modelové mikroorganizmy tvoriace biofilm

Rozhodujúcim krokom pri tvorbe biofilmu je aj výber modelového mikroorganizmu. V experimentálnej časti predloženej práce boli fyzikálno-chemickým analýzam podrobené bakteriálne kmene, s ktorými sa dlhodobo pracuje na pracovisku Fakulty chemickej VUT v Brne. Boli zvolené bakteriálne kultúry *Burkholderia cepacia* CCM 2656 a *Bacillus megaterium* CCM 2037.

2.6.1 Burkholderia cepacia

Burkholderia cepacia patrí medzi gramnegatívne baktérie so širokou metabolickou rozmanitosťou. Komplex *Burkholderia cepacia* je skupina geneticky odlišných, fenotypovo podobných druhov s obrovským metabolickým potenciálom [30]. Často sú izolované z rôznych prírodných biotopov, ako sú povrchy rastlinných koreňov, pôda a riečna voda, ale aj z mestských prostredí, ako sú detské a atletické ihriská. Okrem toho sa tiež vyskytujú u zvierat a ľudí [31].

Baktérie *Burkholderia cepacia* majú užitočné vlastnosti, pretože pôsobia ako antagonisti škodcov rastlín, vystupujú sa ako rhizobaktérie podporujúce rast rastlín a môžu zabezpečiť degradáciu toxických látok. Na rozdiel od týchto priaznivých účinkov môže tento spomínaný komplex baktérií kolonizovať alebo infikovať človeka, konkrétne pacientov s cystickou fibrózou [32].

Cystická fibróza je letálne dedičné genetické ochorenie, ktoré je spôsobené mutáciou v géne CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), kedy patogénne baktérie kompexu *Burkholderia* kolonizujú pľúca pacientov a spôsobujú chronické infekcie. Chybné proteíny CFRT v pľúcach pacientov trpiacich týmto ochorením majú tendenciu dehydratovať sliznicu, čo vykazuje ideálne prostredie pre tvorbu biofilmu [31]. Pacienti trpiaci týmto ochorením majú vrodenú rezistenciu voči mnohým bežne používaným antibiotikám [33]. Skutočná rezistencia komplexu baktérií je dôsledkom vzniku rôznych enzýmov, ktoré bránia kontaktu antibiotík s bakteriálnym bunkovým povrchom kvôli ich schopnosti tvoriť biofilm [31].



Obrázok 7: Mikroskopické snímky baktérii: A. Burkholderia cepacia B. Bacillus megaterium [34][35]

2.6.2 Bacillus megaterium

Bacillus megaterium ja grampozitívnou baktériou. Jedná sa o aeróbny druh baktérie, ktorý tvorí spóry a má tyčinkovitý tvar. Vyskytuje sa v prostredí ako je morská voda, ryžové polia, ryby alebo v sušených potravinách a v mede. Môže rásť v jednoduchých médiách na viac ako 62 uhlíkových zdrojoch z 95 testovaných, vrátane všetkých cyklických medziproduktov trikarboxylovej kyseliny, metanoátu a acetátu [34]. Počas bunečného delenia prostredníctvom organel získavajú bunky potrebnú energiu pre chemické syntézy [36].

Viaceré druhy *Bacillus* sú často izolované z biofilmov, ktoré majú škodlivé alebo priaznivé účinky v priemyselnom a prírodnom prostredí [37]. Rod *Bacillus* je dobre známy svojou schopnosťou produkovať EPS vrátane lipáz [38]. Preto sa tento druh stal dôležitým modelom pre štúdium molekulárnych metabolizmov pre tvorbu biofilmu [37].

2.7 Význam biofilmov

Bakteriálne biofilmy sú pomerne často diskutovanou problematikou v mnohých oblastiach, kde zohrávajú kľúčovú úlohu.

V mliekarenskom priemysle môže tvorba biofilmu viesť k vážnym hygienickým problémom a hospodárskym stratám znehodnotením samotnej potraviny alebo poškodením výrobného technického zariadenia. Ropný priemysel je taktiež citlivý na tvorbu biofilmov, pretože dochádza k upchaniu filtračných zariadení a znehodnotenie výstupného produktu. Mikroorganizmy v biofilmoch katalýzuju chemické a biologické reakcie spôsobujúce koróziu na kovových povrchoch v potrubiach a nádržiach [1],[39].

Z medicínskeho hľadiska sú rôzne ochorenia ako je cystická fibróza, endokarditída natívnej chlopne, zápal stredného ucha, chronická bakteriálna prostatitída [40] a ďalšie infekčné ochorenia, priamo ochorenia zubov, kože, močového traktu [41], pľúc i srdca [42] spôsobené mikroorganizmami, ktoré vytvárajú biofilm [40]. Približne 80 % všetkých nemocničných ochorení u ľudí je biofilmového pôvodu. Infekcie spojené s biofilmom predstavujú pre lekárov zložitý problém, pretože výskyt patogénov v podobe biofilmu im poskytuje do značnej miery zvýšenú toleranciu voči antibiotikám a antimikrobiálným látkam, ako aj ochranu pred imunitnou odpoveďou. To má za následok vznik už vyššie spomenutých chronických infekcií, vysokú mieru chorobnosti a úmrtnosti [43]. Varovné je nie len to, že biofilmy sú schopné odolávať antibiotikám, ale sú dostatočne veľké na to, aby porazili imunitný systém [41].

Biofilmy zohrávajú kľúčovú úlohu pri infekčných ochoreniach spojených so zdravotnou starostlivosťou. Najmä u tých, ktoré súvisia s implantáciou zdravotníckych pomôcok ako sú intravaskulárne katétre, močové katétre a ortopedické implantáty [44], kontaktné šošovky [45], kĺbové protézy a zariadenia na fixáciu zlomenín [42]. Popisu infekcií, ktoré súvisia so vznikom biofilmu na konkrétnom zariadení sa venuje publikácia *Ramasamy a spol.* [42].

Oproti týmto negatívnym vplyvom majú biofilmy aj užitočný význam a nachádzajú svoje aplikačné uplatnenie. Veľkým pozitívom oproti voľne sa vyskytujúcim bakteriálnym bunkám sú bakteriálne bunky vyskytujúce sa v spoločenstvách biofilmov odolnejšie voči antimikrobiálným látkam, ťažkým kovom a toxickým látkam [46]. Pozitívna činnosť biofilmov je dobre známa v oblasti biologického čistenia. Použitie biofilmov pripojených k inertným pevným nosičom by mohlo byť sľubnou technológiou pri čistení odpadových vôd [47]. Mikrobiálna adhézia by môže byť ďalej užitočná pri degradácii envinromentálne nebezpečných látok v pôde a biopolymérov, ako je celulóza [5]. Čoraz častejšie sa ukazuje na uplatnenie biofilmových reaktorov na výrobu jemných chemikálií ako sú biopalivá, biohydrogén alebo výroba elektriny v mikrobiálných palivových článkoch [46].

Existujú dva protichodné ciele pre kontrolu mikrobiálnej adhézie a tvorby biofilmu. Na jednej strane je to prevencia a inhibícia biofilmov, na druhej strane ich zlepšenie a propagácia [5]. Toto so sebou prináša nové výzvy v oblasti výskumu. Možnosti využitia nových metód pri meraní, vrátane zvýšenie nárokov na výsledky, sprísnenie noriem vedie k zvýšeniu produktivity a vplýva na urýchlenie pokroku v tejto oblasti.

3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

Problematike posúdenia biofilmov z viacerých pohľadov je venovaná pozornosť po celom svete už mnoho rokov. K pochopeniu vzniku biofilmu, zloženia a jeho vlastností prispievajú analytické metódy [2]. Z hľadiska rozsahu experimentálnej i technologickej použiteľnosti prirodzene upútaných bunkových kolónií/agregátov jednobunkových organizmov je metodológia predpokladu priľnavosti buniek k povrchom kľúčovou požiadavkou [13]. V snahe rozoznať baktérie tvoriace biofilm a ich extracelulárnu matrix, pri *in vitro* a *in vivo* podmienkach sa používajú komerčne dostupné metódy a prístrojové techniky [2].

3.1 Základné teoretické modely

Medzi základné prístupy, ktoré sa používajú k charakterizácii biofilmov nepochybne patrí termodynamický prístup spolu s teóriou DLVO. Pomocou nich môžeme kontrolovať a následne vysvetliť stav počiatočného priľnutia bakteriálnych buniek k pevným povrchom. Každý s týchto prístupov má svoje špecifiká (viď kapitola 2.2.2 a 2.2.3).

Príkladom použitia termodynamického prístupu pri štúdii adhézie vybraných buniek baktérií je práca Absolom a spol.. V publikácií autori popisujú experimenty riadené termodynamickým modelom. Vybrané druhy baktérií (Staphylococcus aureus. Staphylococcus epidermis, Listeria monocytogenes a dvoch kmeňov Escherichia coli) boli uvedené do kontaktu s niekoľkými povrchmi napr. teflón, polyethylén, polystyrén a iné, následne bola pozorovaná adhézia baktérií. Obrazovou analýzou určili priľnavosť buniek na jednotku povrchu. Bolo zistené, že počet baktérií podliehajúcich adhézii na jednotku plochy koreluje s termodynamickou predpoveďou, a že tieto údaje môžu byť použité k určeniu povrchového napätia rôznych bakteriálnych druhov. Povrchové napätie získané týmto spôsobom sa zhoduje s výsledkami, kedy boli použité iné metódy k posúdeniu adhézie [15].

Autori *Redman a spol.* vo svojej štúdii charakterizovali priľnavosť dobre známeho bakteriálneho kmeňa *Escherichia coli* za odpudivých elektrostatických podmienok. K adhézii bol použitý ultračistý kremenný piesok ako porézne médium na to, aby sa minimalizovali efekty heterogenity náboja. Dôraz kládli na vznik elektrostatickej dvojvrstvy a interakcie, ktoré sú spojené s prvotnou fázou adhézie buniek. Pomocou dosiahnutých experimentálnych výsledkov vo svojej práci overili, že k interpretácii výsledkov je vhodné použiť práve spomínanú DLVO teóriu [14].

Dôležité je, aby nami vytvorený model (napr. DVLO) zahŕňal také interakcie, ktoré budeme schopný použitou technikou monitorovať pri vzniku adhézie buniek. Na základe týchto predpokladov sme schopný overiť a vysvetliť experimentálne výsledky s teoretickými predpokladmi zvolených modelov [48].

3.2 Metódy vhodné pre posúdenie adhézie baktérií a biofilmov

Analýza bunkových plôch vyžaduje hneď v úvode manipuláciu s bunkami baktérií. Ale bunky môžu pri nesprávnom zachádzaní strácať svoju životaschopnosť. Výsledky štúdie *Pembrey a spol.* ilustrujú nedostatky techník, ktoré sa používajú k analýze povrchu buniek. Ako je napríklad vysokorýchlostné odstreďovanie, sušenie, lyofilizácia, zmeny použitého média. Tieto zmeny overili za použitia tzv. MATH testov (*microbial adhesion to hydrocarbons*) a stanovenia hodnôt hydrofóbnosti a zároveň stanovenia elektroforetickej

mobility. Výsledky poukazujú na to, že v niektorých prípadoch mali bunky vybraných baktérií v tejto štúdii (*Escherichia coli, Staphylococcus epidermidis, Psychrobacter sp. kmeň SW8*) zmenené fyzikálno-chemické a morfologické vlastnosti. Preto je dôležité, aby sa použili nedeštruktívne techniky, ako je napr. prietoková cytometria a mikroskopia atómarných síl [49].

Prehľad vhodných technik k štúdiu rôznych aspektov biofilmov vo svojej práci ponúkajú autori *Halan a spol.* [46], taktiež štúdia autorov *Denkhaus a spol.* [50], takisto publikácia *Neu a spol.* [51]. Kritický prehľad tradičných a špičkových metód predkladajú aj *Azeredo a spol.* vo svojej vedeckej publikácii [52].

Prehľad základných metód k charakterizácii rastu i vlastností jednotlivých zložiek matrice biofilmu, životaschopnosti bakteriálnych buniek, rôznych zariadení používaných k štúdiu biofilmov a metód vhodných k posúdeniu rozsahu a pevnosti adhézie je uvedené v *Tabuľke 1* a *Tabuľke 2*.

METÓDA	INFORMÁCIE O BIOFILME	VÝHODY	NEVÝHODY			
Techniky vhodné k charakterizácii povrchu						
SEM (Skenovacia elektrónová mikroskopia)	charakteristika vonkajšej štruktúry	- vysoké rozlíšenie	- neprístupnosť vnútornej štruktúry biofilmu			
CLSM (Konfokálna laserová skenovacia mikroskopia)	hodnotenie EPS	 monitoring štruktúry buniek in situ presnosť a jednoduchosť 	 vysoké náklady na zariadenie nemožné použiť pre hrubé biofilmy nízke rozlíšenie 			
AFM (Mikroskopia atomárných síl)	topografické a morfologické vlastnosti	 vysoké rozlíšenie schopnosť zachytiť biomolekulové správanie v reálnom čase 	 žiadne informácie zložení biofilmu môže dochádzať k dehydratácii vzorky 			
IR (Ifračervená spektroskopia)	chemické informácie	- in situ	 možná interferencia s vodou v absorpcii IR 			
RTG (Rentgenová spektroskopia)	informácie o štruktúre	- in situ - veľká hĺbková penetrácia	 vysoká technická náročnosť 			
NMR (Nukleárna magnetická rezonancia)	metabolické dráhy	- neinvazívna	 nízka citlivosť časová náročnosť 			

Tabuľka 1: Príklady najčastejšie používaných techník k charakterizácii povrchu biofilmu [46],[50],[51],[52]

Tabuľka 2: Príklady najčastejšie používaných separačných a spektrometrických techník k charakterizácii povrchu i štruktúry biofilmu [46],[50],[51],[52]

METÓDA	INFORMÁCIE O BIOFILME	VÝHODY	NEVÝHODY			
Separačné techniky						
Extrakcia	separácia EPS z buniek	 stanovenie sacharidov, proteínov 	 nízka priepustnosť lýza buniek závisí od metódy extrakcie 			
PCR techniky v kombinácii s MALDI-TOF	genetické informácie	 - in situ - potrebné malé množstvo DNA 	 nedostatok štandardov obmedzené použitie databáz vysoké prevádzkové náklady 			
CE (Kapilárna elektroforéza)	obsah a určenie sacharidov	- nízke detekčné limity	 náročná príprava vzoriek rozklad biofilmu 			
Mikrosenzory	vytvorenie a kontrola biofilmu	 chemická inertnosť stanovenie obsahu kyslíka, glukózy, vápnika, oxidov 	 krátka životnosť znížená citlivosť spôsobená rozmermi senzora 			
Spektrometrické technik	y	-				
FISH (Fluorescenčná in situ hybridizácia)	mikrobiálna aktivita	- in situ	 nežiaduce účinky fluorescenčného farbenia 			
AAS (Atómová absorpčná spektrometria)	stanovenie ťažkých kovov a živín	- nízke detekčné limity	 rozklad biofilmu časová náročnosť 			
Ďalšie techniky						
OCT (Optická koherentná tomografia)	štruktúra biofilmu	- nedeštruktívna	- potrebná kombinácia s CLSM			

Súčasne práca *Geoghegan a spol.* sa zaoberá chémiou pripojenia a adhézie mikrobiálnych buniek a fyzikou polymérov. Niekoľko metód k štúdiu interakcií počas počiatočnej mikrobiálnej adhézie ponúka prehľad *Bos a spol.*. Rada ďalších prác je venovaná už konkrétnej metóde, ktorá bola v danej štúdii použitá [53]-[60].

Je známe, že metabolickú stabilitu a ochranu pred vysychaním či iným nežiaducim chemickým i biologickým vplyvom poskytuje biofilmu jeho extracelulárna matrica. Tá je neoddeliteľnou súčasťou mikrobiálnych biofilmov a dôležitou oblasťou výskumu. Štúdia *Schlafer a spol.* poskytuje kritickú diskusiu o technikách používaných k vizualizácii rôznych matricových zlúčenín (eDNA, proteínov, amyloidov, adhezínov), na určenie koncentrácie rozpustených látok a difúznych vlastností biofilmovej matrice. Štúdia poukazuje na to, že cenným nástrojom k štúdiu biofilmovej matrice môže byť CLSM (konfokálna

laserová skenovacia mikroskopia). Tá umožňuje vizualizáciu hydratovaných zložiek matrice vzoriek v reálnom čase, zároveň zachováva trojrozmernú štruktúru biofilmu [56]. Ide o nedeštruktívnu techniku, ktorá nielen že prispela k pochopeniu matrice EPS, ale zároveň sa používa pri charakterizácii mechanizmov antimikrobiálnej rezistencie biofilmov [46].

Je známe, že prítomnosť matricových proteínov môže ovplyvňovať stabilitu biofilmov. *Romero a spol.* študovali zložky prítomné v biofilmoch *Bacillus sp. Mcn4*, ktoré boli vyvinuté na rôznych povrchoch (polyuretánová pena, bavlnené vlákna, celofánový film). Za použitia fluorescenčnej techniky bol identifikovaný jeden z matricových proteínov. Konkrétne amyloidný proteín, ktorý je zapojený do lipázovej aktivity. Biofilmové reologické správanie v zmysle viskoelastických zložiek spomenutého proteínu ponúka štruktúrne vlastnosti, ktoré umožňujú aplikáciu tohto biofilmu ako nosičového systému k imobilizácii enzýmov, a to bez akejkoľvek chemickej úpravy. Konkrétne použitím pulznej gelovej elektroforézy (PAGE) boli identifikované dva enzýmy s lipázovou aktivitou. Prítomnosť týchto extracelulárnych enzýmov ovplyvnila vznik stabilnejšieho biofilmu. Biokatalyzátory s imobilizovano lipázovou aktivitou vykazovali reziduálnu aktivitu viac ako v katalytickom cykle. Výsledky poukazujú na to, že biofilmový katalyzátor by mohol byť užitočný pre priemyselné aplikácie vo farmaceutickom a potravinárskom priemysle, pri čistení odpadových vôd a pri výrobe biopalív [37].

Bolo preukázané, že komunikácia medzi bunkami prebieha pomocou chemických signálov (indolu). Je známe, že tieto chemické signály produkované baktériami ovplyvňujú organizáciu a štruktúru biofilmu. Autormi *Kim a spol.* bolo vyvinuté mikrofluidné zariadenie na báze polydimetylsiloxanu (PDMS), pomocou ktorého je možné účinne skúmať látky, ktoré inhibujú tvorbu biofilmu patogénných baktérií, v tejto štúdii konkrétne *E.coli*. Z výsledkov vyplýva, že nevýhodou použitia tohto zariadenia je jeho jednorazové použitie. Naproti tomu výhodou je použitie malých objemov buniek oproti použitiu iných techník. Toto zariadenie by malo byť vhodné pre skúmanie účinku rozsahu koncentrácií jedného rozpustného signálu, alebo aj pri kombinácii dvoch či viacerých signálov. Zároveň umožňuje skríning zlúčenín, ktoré inhibujú tvorbu biologických biofilmov [59].

V súčasnosti sa uvažuje nad využitím mikroskopie atomárnych síl (AFM) pre biologické aplikácie. Zatiaľ čo molekulárne biologické techniky kombinované so skenovacou elektrónovou mikroskopiou (SEM) umožňujú identifikáciu a lokalizáciu povrchových zložiek sprostredkujúcich bakteriálne interakcie s použitím AFM vzniká možnosť merania a lokalizácie fyzikálnych síl, ktoré sa podieľajú na adhézii baktérií. V tejto súvislosti boli vyvinuté rôzne metódy imobilizácie baktérií na analýzu AFM. Každá z nich ponúka svoje výhody i nevýhody, čo je tiež vysvetlené v publikácii *Ubbink a spol.*. Vzhľadom na zložitosť bakteriálnej bunkovej steny a jej špecifických i nešpecifických interakcií umožňuje AMF skúmať interakcie tromi spôsobmi. Zároveň je potrebné vedieť výsledky AFM správne interpretovať. TEM (transmisná elektrónová mikroskopia) a AFM poskytujú v podstate rôzne informácie o bunkovej stene baktérií, ale navzájom sa dopĺňajú a objasňujú vlastnosti a štruktúru baktérií [55].

SEM spolu s AFM boli použité k vyhodnoteniu morfologickej progresie u klinicky významného bakteriálneho biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* v štúdii *Pereira a spol.*. AFM bola ďalej použitá k analýze adhézie v počiatočnom štádiu u biofilmu, ktorý tvorí dobre

známa baktéria *Esterichia coli* v publikácii autorov *Razatosa spol.*. Vizuálna kontrola jednotlivých fázy dozrievania biofilmu z oboch mikroskopov v prípade biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* poukázala na skutočnosť, že planktonické bakteriálne bunky neboli organizované vo viacerých bunkových vrstvách a nemali žiadne vzájomné interakcie, ani v dobe, keď sa objavili v blízkosti susedných buniek. Zároveň dokázali, že bunkové vlákna tzv. *flagella* majú veľký význam pri počiatočnom pripojení k povrchu, ako je sklo [58],[60].

Je známe, že prítomnosť pevného nosiča je nevyhnutná pre tvorbu biofilmu. Hydrofóbne materiály priťahujú hydrofóbne baktérie, ktoré sú sorbované nešpecifickými interakciami. Na druhej strane sú bunky mikroorganizmov schopné silnejšieho kontaktu s polárnymi skupinami na polárnom povrchu v porovnaní s hydrofóbnym povrchom, a to zvyšuje šance na adhéziu baktérií. Cieľom štúdie Sfaelou a spol. bolo zistiť, či prítomnosť polárnych povrchových skupín má za následok väčšie množstvá produkovaného biofilmu a lepší výkon reaktora pri čistení odpadových vôd. Štúdiu uskutočnili na dvoch nosičoch (polyetylénu (PE) a polyvinylalkoholu (PVA)) s rozdielom – OH skupín prítomných na ich povrchu. OH skupiny prítomné na povrchu PVA nosiča zvyšujú jeho hydrofilný charakter oproti PE. K analýze vzniknutého biofilmu použili rýchle a pomerne jednoduché metódy: absorpčnú a difúznu spektroskopiu (DR) a potenciometrickú hmotnostnú titráciu (PMT) a UV-VIS spektrometer, ktorý sa môže použiť na pozorovanie tvorby biofilmu. Technológia PMT môže byť použitá ako doplnková k iným technikám, aby poskytla informácie o charakteristikách biofilmu, ako je povaha biofilmu a množstvo H⁺ spotrebovaného biofilmom. Autori v závere práce podali dôkaz o tom, že prítomnosť iného nosiča v reaktore nezmenila povahu samotného biofilmu. Zároveň je zrejme, že polárne skupiny nosiča menia len množstvo, nie acidobazické správanie biofilmov. Avšak množstvo vytvoreného biofilmu bola vyššia, keď boli na nosiči prítomné polárne skupiny na povrchu v porovnaní s hydrofóbnym povrchom [47].

Kawabata a spol. vo svojej práci preukázali, že zosieťovaný polyvinylpyridinium halogenid má schopnosť odstrániť baktérie z vody. K štúdiu boli vybrané niektoré živice, ako model pevného materiálu. Experimentálne výsledky tejto publikácie ukázali, že adsorpcia baktérií (*Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Streptococcus faecalis, Staphylococcus aureus a Pseudomonas aeruginosa*) na iontomeničové živice sa prejavuje reverzibilne, oproti tomu baktérie zachytené na polyvinylpyridinium halogenid sa prichytili ireverzibilne. V spomenutej práci sa za pomerne krátky čas (1 h) podarilo eliminovať 97 až 100 % životaschopných baktérií, ak bol v kolóne použitý poly(N-benzyl-4-vinylpyridiniumbromid). Použitie živice má niektoré výhody. Živica zvyčajne vo vode nereaguje s organickými nečistotami. Zároveň je schopná odstrániť nie len živé bunky baktérií, ale z výsledkov práce je zrejmé, že kvalita upravenej vody mala lepšiu kvalitu oproti tomu, kedy bola použitá dezinfekcia. Na druhej strane odstránenie baktérií bolo pomalé a nebolo možné opakované použitie živice [61].

V inej štúdii bakteriálneho biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* na dvoch povrchoch (sklo, polypropylén) autori *Pereira a spol.* vyhodnocovali štúdia zrelosti biofilmu pomocou metódy MALDI-TOF MS. Konkrétne sa zamerali na posúdenie faktu, či sme schopný odlíšiť jednotlivé etapy vývoja biofilmu. Zároveň svoju pozornosť upriamili na fenotypové rozdiely

pri pestovaní biofilmov na rôznych podkladoch. Došli k výsledkom, že baktérie sú schopné kolonizovať rôzne povrchy rozdielnou rýchlosťou. Zatiaľ, čo 12-dňový biofilm pestovaný na skle bol podobný nezrelým biofilmom, biofilm pestovaný na plaste rýchlejšie dozrel. S najväčšou pravdepodobnosťou k tomu došlo, pretože biofilm pestovaný na plaste bol už v štádiu disperznej fáze. Použitá metóda sa ukázala dostatočne citlivá pre rozlíšenie rôznych štádií biofilmu. Konkrétne pre fenotypové zmeny v progresii biofilmu. Zároveň dokáže odhaliť niektoré charakteristiky súvisiace s povrchom, na ktorom boli baktérie pestované. Štúdia tiež objasnila skutočnosť, že MALDI-TOF MS sa ukazuje ako sľubný nástroj pre klinické diagnostické spracovanie tvorby a kontroly biofilmov [58].

Bolo dokázané, že podmienky okolitého prostredia majú vplyv na adhéziu baktérií. Tento stav baktérií v rôznych prostrediach môžeme určiť použitím klasických a pomerne dobre dostupných techník. Napríklad meranie zeta potenciálu poskytuje údaje o celkovom náboji bakteriálneho povrchu. Ďalej dynamický rozptyl svetla slúži k poznatkom štúdia kinetiky bakteriálnej adhézie [55]. K vysvetleniu trendov povrchových vlastností adhézie viacerých druhov baktérií Li a spol. použili aj namerané hodnoty kontaktných uhlov, povrchovej energie alebo zeta potenciálov. Ich závery sa zakladali na adsorpcii baktérií na jednom povrchu v roztokoch o rôznej iontovej sile. Z výsledkov je zrejme, že vzniknutá iontová sila dobre koreluje s elektrostatickým nábojom pre akýkoľvek špecifický stav povrchu baktérií. Avšak celková povrchová energia poskytuje oveľa lepší predpoklad adhézie na rôzne povrchy [29]. Okrem meraní kontaktných uhlov sú pomerne dostupné ďalšie techniky ako je elektroforetická mobilita na meranie elektrostatických interakcií alebo tzv. BATH testy (bacterial adhesion to hydrocarbons). V prípade BATH testov sa po zmiešaní bakteriálnych buniek s hydrofóbnou fázou meria adsorpcia (koncentrácia) baktérií pred a po zmiešaní. To poskytuje percento baktérií, ktoré priľnú k uhľovodíkovej fáze, čím sa dosiahne relatívna hydrofóbnosť. Práca autorov Rühs a spol. poukazuje na to, že bakteriálna adsorpcia na rozhraniach môže byť z hľadiska kinetiky nedeštruktívne skúmaná pomocou tenziometrie a medzifázovej reológie. V danej štúdiu u viacerých bakteriálnych kmeňov bolo skúmané adsorpčné správanie nerastúcich (stacionárnych) bakteriálnych suspenzií buniek [62].

Niektoré vedecké publikácie uvedené v tejto kapitole a zároveň poznatky so spracovania celej teoretickej časti sa stali inšpiráciou pre experimentálnu časť predloženej diplomovej práce.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Pri riešení experimentálnej časti diplomovej práce bol kľúčovým krokom výber modelového organizmu a výber adsorbentov. Ďalej bola potrebná optimalizácia krokov súvisiaca s tvorbou biofilmu a samotné aplikovanie vybraných fyzikálne-chemických techník k jeho charakterizácii samotnej adsorpcie. Všetky tieto experimentálne aspekty sú zhrnuté v nasledujúcej kapitole.

4.1 Použité mikroorganizmy, chemikálie a prístroje

4.1.1 Použité mikroorganizmy

Počas experimentálnej časti boli ako modelové mikroorganizmy použité baktérií, ktoré pochádzali z Českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity v Brne. Konkrétne kmene *Burkholderia cepacia* CCM 2656 a *Bacillus megaterium* CCM 2037.

4.1.2 Použité chemikálie

- Amberlite XAD-4, (Sigma Aldrich Inc.)
- Amberlite IRA-900 chloride form, (Sigma Aldrich Inc.)
- Chlorid sodný, (Sigma Aldrich Inc.)
- Chlorid draselný, (Sigma Aldrich Inc.)
- Deionizovaná voda
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnan disodný, (Sigma Aldrich Inc.)
- Dihydrogenfosforečnan draselný, (Sigma Aldrich Inc.)
- Hexadekan, (Sigma Aldrich Inc.)
- Kyselina chlorovodíková 35%
- Minerálny olej, (Sigma Aldrich Inc.)
- Nutrient Broth (Himedia)
- Supelite DAX-8, (Sigma Aldrich Inc.)

4.1.3 Použité prístroje

- Analytické váhy, Boeco
- Centrifúga Boeco U-32R, Hettich Zentrifugen
- Koloidný analyzátor Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd
- Laminárny box Aura mini, Bioair Instruments
- Mikroskop Intra mirro
- Programovateľný rotátor typ Multi Bio RS-24
- FTIR spektrofotometr Nicolet iS50
- Skenovací elektrónový mikroskop ZEISS EVO-LS 10
- Temperovaná trepačka Heidolph 1000, Labicom s.r.o
- Thermo Helios Delta VIS spektrometer
- Vakuová sušiareň, Memmert
- Vortex TK3S, Kartell spa

4.2 Uchovávanie bakteriálnych kultúr (kultivácia na pevnom médiu)

Lyofilizované baktérie *Burkholderia cepacia* CCM 2656 a lyofilizované kmene baktérie *Bacillus megaterium* CCM 2037 boli oživené a následne naočkované na pripravené média s prídavkom agaru pre zaistenie tuhosti.

Zloženie pevného NB (Nutrient Broth) média pre Burkholderia cepacia:

- Beef extract 10 g
- Pepton 10 g
- NaCl 5 g
- Agar Powder 2 g
- Destilovaná voda 1000 ml

Zloženie pevného média pre Bacillus megaterium:

- Beef extract 3 g
- Pepton 5 g
- $MgSO_4 \cdot H_2O$ 0,01 g
- Agar Powder 20 g
- Destilovaná voda 1000 ml

Takto pripravené médiá boli sterilizované po dobu 60 minút v tlakovom hrnci s uzavretým ventilom (*Burkholderia cepacia*) a otvoreným ventilom (*Bacillus megaterium*). Po miernom ochladení médií bol vo vysterilizovanom laminárnom boxe naliaty potrebný počet sterilných Petriho misiek. Po zatuhnutí pripravených médií boli jednotlivé kultúry zaočkované krížový rozterom.

Zaočkované misky boli následne kultivované v termostate pri 30 °C po dobu 24 h. Po náraste kolónií boli bakteriálne kultúry uchovávané pri teplote 4 °C a v intervale približne 30 dní boli pravidelne preočkovávané na nové Petriho misky. Pevné média boli pripravované k uchovávaniu kultúr pre ďalšiu prácu.

4.3 Kultivácia bakteriálnych inokul

Pre kultiváciu inokul *Burkholderia cepacia* a *Bacillus megaterium* boli pripravené kvapalné média o zložení uvedenom v predchádzajúcej kapitole 4.2 (bez prídavku agaru). Ku kultivácii boli používané Erlenmeyerove banky o objeme 100 ml s 50 ml príslušného média. Pripravené média boli sterilizované v tlakovom hrnci s uzavretým ventilom (*Burkholderia cepacia*) a otvoreným ventilom (*Bacillus megaterium*) po dobu 60 minút.

Po sterilizácií a následnom ochladení Erlenmeyrových baniek na laboratórnu teplotu boli v sterilnom laminárnom boxe pomocou bakteriologickej kľučky na trikrát očkované z agarovej platne mikroorganizmy *Burkholderia cepacia* a *Bacillus megaterium*. Pripravené inokulá boli kultivované 24 h na temperovanej trepačke Heidolph 1000 pri frekvencii 180 rpm a pri teplote 30 °C.

4.4 Príprava bakteriálnej suspenzie buniek

Pripravené inokulá bakteriálnych kmeňov *Burkholderia cepacia* a *Bacillus megaterium* boli po 24 h kultivácii použité k príprave bakteriálnej suspenzie. Do 14 ml centrifugačných skúmavok bolo pomocou automatickej pipety napipetované 10 ml pripraveného kvapalného inokula. Takto pripravené skúmavky boli centrifugačne odstredené (5 000 rpm, 5 min, 20 °C). Následne bol supernatant zliaty, pričom bunky boli rozsuspendované v 2 ml fyziologického roztoku PBS alebo v 2 ml destilovanej vody. Bakteriálne suspenzie boli takto riedené na požadovanú optickú hustotu meraním absorbancie pri vlnovej dĺžke 600 nm za použitia Thermo Helios Delta VIS spektrometra. Detaily riedení sú opísané v kapitolách nižšie pri postupoch popisujúcich konkrétny modelový systém.

4.5 Príprava pufrov

K príprave bakteriálnej suspenzie kmeňov *Burkholderia cepacia* bol po 24 h kultivácii baktérií použitý fosfátovo pufrovaný fyziologický roztok (PBS), ako už bolo vyššie spomenuté. Jeho zloženie je uvedené nižšie.

Zloženie fosfátového pufru (PBS):

- NaCl 8 g
- KCl 0,2 g
- KH₂PO₄ 0,24 g
- $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ 2,89 g
- Destilovaná voda 1000 ml

4.6 Optimalizácia modelového systému k experimentálnemu štúdiu adsorpcie

K optimalizácii vlastného experimentu boli použité bakteriálne bunky *Burkholderia cepacia* pripravených suspenzií, podľa návodu uvedeného vyššie (viď kapitola 4.4). Suspenzie bakteriálnych buniek v pufre alebo v destilovanej vode boli pripravené o požadovanej optickej hustote pri vlnovej dĺžke 600 nm za použitia Thermo Helios Delta VIS spectrometra (viď detaily pri opise konkrétneho modelového systému).

Jedným z cieľov experimentu bol výber vhodnej laboratórnej nádoby (hydrofilného a hydrofóbneho povrchu) a zároveň výber pevného povrchu (adsorbentu). Preto bola pripravená suspenzia buniek o požadovanej koncentrácii pridaná do rôznej laboratórnej nádoby s odlišným pevným povrchom a následne bola realizovaná štúdia adsorpcie na použitom modelovom systéme (viď detaily pri opise konkrétneho modelového systému).

4.6.1 Stanovenie počtu buniek v roztoku použitím Bürkerovej komôrky

Priamou metódou bol stanovený celkový počet mikrobiálnych buniek v 1 ml pripravených inokul baktérií *Burkholderia cepacia* a *Bacillus megaterium*. Pripravené inokulum, bolo pomocou PBS riedené na optickú hustotu 1. Pod mikroskopom Intra mirro za použitia Bürkerovej komôrky bol spočítaný počet buniek a následne vypočítaný podľa vzťahu, pomocou ktorého sa počet buniek stanovuje touto priamou metódou. Počítanie buniek v jednotlivých štvorcoch boli prevedené pri zväčšení 40x rovnaký postupom.

4.6.2 Veľké centrifugačné skúmavky s podložným mikroskopickým sklíčkom

Do 50 ml centrifugačných skúmavok bolo na tesno vložené podložné mikroskopické sklíčko o rozmeroch 76 x 26 mm. Následne boli nachystané vzorky rozsuspendovaných baktérií *Burkholderia cepacia* podľa návodu uvedeného v kapitole 4.4, tie boli riedené PBS na optickú hustotu 1,085 a 0,533. Následne bolo pipetované 35 ml pripravených vzoriek rozsuspendovaných baktérií o zvolenej optickej hustote do pripravených centrifugačných skúmavok. Objem bakteriálnej suspenzie bol zvolený tak, aby podložné mikroskopické sklo bolo úplne zaliate suspenziou buniek.

Takto pripravené skúmavky boli zašraubované a následne horizontálne uložené do pripravenej polystyrenovej nádoby. Polystyrenová nádoba spolu zo vzorkami bola vložená do temperovanej trepačky Heidolph 1000 po dobu 1 hodinu, pri teplote 30 °C a pri 170 rpm. Po hodine boli vzorky vybrané z trepačky. Následne boli vzorky bakteriálnej suspenzie odpipetované z centrifugačných skúmavok do plastových semi-mikro kyviet o objeme 2 ml a pri vlnovej dĺžke 600 nm bola stanovená ich optická hustota.

4.6.3 Kužeľové Erlenmayerove banky so sklenenými guľôčkami

Do 25 ml kužeľových baniek bolo vážené 4,5 g sklenených guľôčok o priemere 1,5 mm. Následne boli nachystané vzorky rozsuspendovaných baktérií *Burkholderia cepacia*, podľa návodu uvedeného v kapitole 4.4. Tie boli pomocou PBS riedené na optickú hustotu 1,712; 1,142 a 0,572. Následne do pripravených Erlenmayerových baniek boli pomocou automatickej pipety o objeme 6 ml napipetované vzorky rozsuspendovaných baktérií. Hrdlo skúmavky bolo prekryté alobalom.

Pripravené vzorky boli ponechané 1 h pri teplote 30 °C a 170 rpm na temperovanej trepačke Heidolph 1000. Po hodine boli Erlenmayerové banky zo vzorkami vybrané z trepačky. Následne boli vzorky bakteriálnej suspenzie odpipetované z Erlenmayerových baniek do semi-mikro plastových kyviet o objeme 2 ml a pri vlnovej dĺžke 600 nm bola stanovená ich optická hustota.

4.6.4 Úzke centrifugačné skúmavky so sklenenými guľôčkami

Boli použité 15 ml úzke centrifugačné skúmavky, do ktorých bolo navážené 2 g sklenených guľôčok o priemere 1,5 mm. Následne boli nachystané vzorky rozsuspendovaných baktérií *Burkholderia cepacia*, podľa návodu uvedeného v kapitole 4.4. Pomocou PBS boli suspenzie buniek riedené na optickú hustotu 2,008; 1,780; 1,204; 1,093; 0,688 a 0,264. Do pripravených centrifugačných skúmavok boli pridané nachystané vzorky. Objem vzorky bol vždy doplnený do plna tak, aby roztok zo skúmavky pretiekol. Následne boli skúmavky zazátkované. Takto pripravené vzorky boli ponechané 1 h pri 30 °C v termostate, uložené v programovateľnom rotátore. Rotátor bol nastavený na rotačný (vertikálny) pohyb pri 10 rpm, počas 1 h. Po 5 min od výberu vzoriek z termostatu boli vzorky bakteriálnej suspenzie odpipetované z centrifugačných skúmavok do plastových semi-mikro kyviet o objeme 2 ml. Následne bola pri vlnovej dĺžke 600 nm stanovená ich optická hustota.

4.6.5 Optimalizácia sorpčného experimentu s použitím mikročásticových sorbentov a rôzneho typu sorpčných nádob

Pre tieto experimenty boli nachystané vzorky rozsuspendovaných baktérií *Burkholderia cepacia*, podľa postupu tak, ako je to uvedené v kapitole 4.4. Pomocou PBS boli suspenzie buniek riedené na optickú hustotu 1. Do pripravených úzkych centrifugačných skúmavok bolo navážené 0,10 g adsorbentov (Amberlite XAD-4, Supelite DAX-8, Amberlite IRA-900), ako je uvedené v *Tabuľke 3* nižšie.

Následne bol do skúmavky s adsorbentom pridaný objem pripravenej vzorky bakteriálnej suspenzie. Objem vzorky bol vždy doplnený v skúmavkách do plna. Tak, aby roztok zo skúmavky pretiekol a skúmavky boli potom zazátkované.

Tabuľka 3: Podmienky prípravy vzoriek k optimalizačnému	ı kroku hydrofóbneho/hydrofilného) použitej
nádoby k adsorpcii buniek na pevný povrch (adsorbent)	

Navážka adsorbentu [g]	0,10	
Objem bakteriálnej suspenzie / destilovanej vody [ml]	15 ml	
Čas experimentu [hod]	1	
Použité 15 ml skúmavky (úzke)	sklenené/ plastové	
Riedenie bakteriálnej suspenzie	PBS	

Kvôli vylúčeniu adsorpcie buniek na stene použitej plastovej skúmavky sa robil kontrolný test. Preto boli pripravené čisté skúmavky, do ktorých bola pridaná suspenzia pripravených buniek bez adsorbentov. Vzorky boli opäť naliate do plna tak, aby roztok zo skúmavky pretiekol a skúmavky boli potom zazátkované.

Zároveň bolo potrebné overiť, či sa neuvoľňujú nejaké častice z použitých adsorbentov počas adsorpcie. Preto bolo do ďalších skúmavok navážené 0,10 g adsorbentov (Amberlite XAD-4, Supelite DAX-8, Amberlite IRA-900) a pridaná destilovaná voda. Destilovaná voda bola vždy doplnená v skúmavkách do plna, tak aby roztok zo skúmavky pretiekol a skúmavky boli potom zazátkované.

Rovnakým postupom boli pripravené sklenené skúmavky so vzorkami bakteriálnej suspenzie, vzorkami bakteriálnej suspenzie a adsorbentov, zároveň destilovanej vody a adsorbentov, podľa podmienok, ako je uvedené v Tabuľke 3. Takto pripravené vzorky boli ponechané 1 h pri 30 °C v termostate (vakuová sušiareň, Memmert), uložené v programovateľnom rotátore (programovateľný rotátor typ Multi Bio RS-24). Rotátor bol nastavený na rotačný (vertikálny) pohyb pri 10 rpm, 1 h. Po 5 min od výberu vzoriek z termostatu boli vzorky bakteriálnej suspenzie odpipetované z centrifugačných skúmavok do plastových semi-mikro kyviet o objeme 2 ml a pri vlnovej dĺžke 600 nm stanovená ich optická hustota.

4.7 Návrh vlastného modelového systému k experimentálnemu štúdiu adsorpcie

Najskôr boli nachystané vzorky rozsuspendovaných baktérií *Burkholderia cepacia* a *Bacillus megaterium*, podľa postupu uvedeného v kapitole 4.4.

Navážka adsorbentu [g]	2	2	2	2	
Objem bakteriálnej suspenzie / destilovanej vody [ml]	15	15	15	15	
Koncentrácia adsorbentu [g/ml]	0,133	0,133	0,133	0,133	
Čas experimentu [hod]	1	2	5	24	
Použité 15 ml skúmavky	sklenené				
Riedenie bakteriálnej suspenzie		destilovaná	voda		

Tabuľka 4: Podmienky prípravy vzoriek k štúdiu adsorpcie (zmena doby experimentu)

Všetky vzorky bakteriálnych suspenzií boli riedené pomocou destilovanej vody na optickú hustotu 1. Do pripravených úzkych 15 ml sklenených skúmavok bolo navážené požadované množstvo adsorbentov a skúmavky boli doplnené na konkrétny objem ako je uvedené v *Tabuľke 4* a *Tabuľke 5*.

Tabuľka 5: Podmienky prípravy vzoriek k štúdiu adsorpcie (zmena koncentrácie adsorbentov)

Navážka adsorbentu [g]	1	2	3	5	
Objem bakteriálnej suspenzie / destilovanej vody [ml]	15	15	10	10	
Koncentrácia adsorbentu [g/ml]	0,067	0,133	0,300	0,500	
Čas experimentu [hod]	2	2	2	2	
Použité 15 ml skúmavky	sklenené				
Riedenie bakteriálnej suspenzie		destilovaná	i voda		

Všetky úzke sklenené skúmavky spolu so vzorkami bakteriálnej suspenzie, vzorkami bakteriálnej suspenzie a adsorbentov (Amberlite XAD-4, Supelite DAX-8, Amberlite IRA-900), zároveň destilovanej vody a adsorbentov boli pripravené podľa postupu uvedeného v kapitole 4.4. Každé meranie bolo trikrát zopakované, výsledky meraní sú uvedené v kapitole 5.

4.8 Charakterizácia hydrofilného/hydrofóbneho charakteru baktérií pomocou BATH testov

Najprv boli pripravené vzorky baktérií *Burkholderia cepacia* a *Bacillus megaterium* pre realizáciu BATH testov. Cieľom týchto testov bolo poskytnúť podrobnejšie vlastnosti hydrofilného/hydrofóbneho charakteru baktérií. Ako hydrofóbna fáza bol zvolený minerálny olej a hexadekan.

Z pripraveného tekutého média z Erlenmayerových baniek bolo odpipetované potrebné množstvo média a následne boli bunky centrifugačne odstredené (5 000 rpm, 5 min, 20 °C). Následne bol supernatant zliaty, pričom bunky boli rozsuspendované v 2 ml destilovanej vody. Jednotlivé vzorky boli pripravené riedením zásobného roztoku na optickú hustotu 1, pri vlnovej dĺžke 600 nm.

Extrakčný experiment bol realizovaný nasledujúcim spôsobom. Do pripravených vialiek bol napipetovaný roztok bakteriálnej suspenzie o optickej hustote 1 a pridaná organická fáza v pomere 1:1. Uzavreté vialky boli po dobu 2 minút vortexované (použitím prístroja Vortex TK3S) a ponechané 15 minút k ustáleniu vodnej a organickej fáze. Následne bola pomocou injekčnej striekačky odobraná vodná fáza a premeraná jej optická hustota. Rozdiel koncentrácií bakteriálnych buniek vo vodnej fáze pred a po zmiešaní s hydrofóbnou fázou bolo možné pozorovať aj vizuálne. Každé meranie bolo zopakované trikrát, výsledky meraní boli graficky spracované. Súčastne pre odobranú vodnú fázu bol pomocou DLS a ELS meraná distribúcia veľkosti častíc a zeta potenciálu.

4.9 Charakterizácia povrchových vlastností baktérií za použitia dynamického a elektroforetického rozptylu svetla

K stanoveniu distribúcie veľkosti častíc bola použitá metóda dynamického rozptylu svetla (DLS). K meraniu bol použitý Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Metódou elektroforetického rozptylu svetla (ELS) bol zároveň nameraný zeta potenciál. Meranie oboch metód bolo prevedené pri meraní pH vzorku (od 5 do 1, s krokom 0,5). Hodnota pH bola meraná riadeným prídavkom kyseliny HCl o koncentrácii 0,1 M prostredníctvom automatického titrátora (Malvern Instruments).

Vzorky rozsuspendovaných baktérií *Burkholderia cepacia* a *Bacillus megaterium* boli okrem už spomenutej titrácie, podrobené aj meraniu distribúcie veľkosti častíc a zeta potenciálu. Tie boli pripravené podľa postupu uvedeného v kapitole 4.4, rozsuspendované v destilovanej vode a pomocou UV-VIS spektrometra pripravené na merateľnú optickú hustotu 1, pri vlnovej dĺžke 600 nm.

4.10 Charakterizácia povrchu adsorbentov pred a po adsorpcii pomocou infračervenej spektroskopie

K analýze pripravených vzoriek bol použitý FTIR spektrofotometer Nicolet iS50 s jednoodrazovým diamantovým ATR nástavcom. Po zmeraní pozadia bolo na diamantový kryštál ATR nástavca nanesené potrebné množstvo vysušenej vzorky adsorbentu. Bola meraná absorbancia v závislosti na vlnočte v spektrálnom rozsahu od 4000 do 400 cm⁻¹, získané spektrum bolo stanovené ako priemer 32 skenov.

K meraniu boli pripravené vzorky adsorbentov (Amberlite XAD-4, Supelite DAX-8, Amberlite IRA-900) podľa postupu uvedeného v kapitole 4.10 a to o koncentrácii adsorbentu 0,067 g/ml, detaily sú uvedené v Tabuľke č. 5. Takto pripravené vzorky boli ponechané 2 h pri 30 °C v termostate, uložené v programovateľnom rotátore. Rotátor bol nastavený na rotačný (vertikálny) pohyb pri 10 rpm, 1 h. Takto pripravené vzorky boli vybraté z rotátora a zo skúmavok bolo odpipetované 8 ml destilovanej vody/bakteriálnej suspenzie. Zvyšok obsahu skúmavky spolu so adsorbentom bolo zliate na čisté Petriho misky. Následne boli pripravené vzorky ponechané v termostate 96 h pri 50 °C. Zároveň boli vysušeniu pridané vzorky čistých adsorbentov (viď *Obrázok 8*). Rovnakým spôsobom boli pripravené vzorky pre *Burkholderia cepacia* a *Bacillus megaterium*.

4.11 Snímacia elektrónová mikroskopia

Tie isté vzorky, ktoré boli použité pre FTIR spektroskopické zobrazenie, boli následne použité aj k analýze snímaciu elektrónovú mikroskopiu (SEM). Príprava vzoriek je preto už uvedená v kapitole 4.10.

Samotná analýza vzoriek bola prevádzaná pomocou skenovacieho elektrónového mikroskopu ZEISS EVO-LS 10. Zobrazovanie prebehlo v móde SE1 a snímky boli prevádzané v móde s urýchľovacím napätím 10 kV. Ostatné detaily zobrazenia vzoriek pomocou tejto techniky sú uvedené na snímkach v kapitole 5.



Obrázok 8: Adsorbenty Amberlite XAD-4, Supelite DAX-8, Amberlite IRA-900 pripravené na Petriho miskách pred vložením do sušiarne

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Návrh a optimalizácia postupu štúdia bunečnej adsorpcie

Pri optimalizácii jednotlivých krokov a realizácii experimentálnej časti tejto práce boli použité poznatky z jej teoretickej časti.

Jedným z kľúčových krokov pri riešení experimentálnej časti diplomovej práce bol výber modelového mikroorganizmu. K štúdiu adsorpčných vlastností modelových baktérií boli použité medicínsky reprezentatívne kmene baktérií. *Burkholderia cepacia*, ako zástupca gramnegatívného kmeňa baktérií a zároveň bol vybraný zástupca grampozitívných baktérií, konkrétne *Bacillus megaterium*. Inokulá spomínaných baktérií boli pripravené podľa postupov uvedených v kapitole 4. Z baktériami sa pracovalo po 24 h kultivácii v kvapalnom médiu. A to preto, aby bolo zabezpečené to, že sa baktérie budú nachádzať v exponenciálnej fáze rastovej krivky, kedy v médiu dochádza k deleniu baktérií a ich počet rovnomerne logaritmicky rastie. Zo spomenutých baktérií bol vybraný jeden zástupca (*Burkholderia cepacia*), s ktorým sa pracovalo pri optimalizácii postupu štúdia bunečnej adsorpcie. Zároveň bol pri optimalizácii zohľadnený výber adsorbentu, nádoby i samotného prostredia pre adsorpciu.

K analýze bunkových vlastností bolo dôležité vybrať takú metódu, ktorou by sme boli schopný monitorovať priebeh bunečnej adsorpcie. Ako vyplýva z kapitoly 3, k tomuto účelu sa používajú aj nedeštruktívne techniky ako je prietoková cytometria alebo mikroskopia atomárnych síl. V tejto práci bola k posúdeniu adsorpcie zvolená UV-VIS spektorfotometria ako prostriedok sledovania zmien koncentrácie v bunkovej suspenzii. UV-VIS spektrofotometer patrí dnes k bežnému laboratórnemu vybaveniu, ktoré sa používa pri štúdiu biologických systémov [63].



Obrázok 9: Grafická závislosť experimentálnych hodnôt optických hustôt na teoretických hodnotách pre bunky baktérie Burkholderia cepacia
Bolo potrebné preveriť, či je UV-VIS spektrofotometria vhodná k stanoveniu percentuálneho úbytku baktérií v roztoku. Najskôr bolo potrebné overiť, či je optická hustota (OD) bakteriálnej suspenzie priamo úmerná koncentrácii bakteriálnych buniek vo vzorke. Jednotlivé vzorky boli pripravené postupným riedením zásobného roztoku o optickej hustote 1,2 pri vlnovej dĺžke 600 nm. Na základe použitého riedenia bola pre všetky vzorky vypočítaná teoretická hodnota optickej hustoty OD_(teo) a zároveň premeraná experimentálna hodnota optickej hustoty OD_(exp) jednotlivých vzoriek. Bola stanovená grafická závislosť experimentálnych hodnôt optických hustôt na teoretických hodnotách optických hustôt (viď *Obrázok 9*), regresný koeficient spoľahlivosti danej krivky pre bunky baktérie *Burkholderia cepacia* má vysokú hodnotu. Z toho vyplýva, že stanovenie optickej hustoty suspenzie bakteriálnych buniek je priamo úmerné koncentrácii týchto buniek v roztoku. Preto je možné OD považovať za vhodný parameter pre stanovenie koncentrácie buniek.

Nasledujúcim meraním bolo stanovené, či bakteriálne bunky vo vzorke sedimentujú. A pokiaľ áno, tak akou rýchlosťou. Ak by sedimentácia buniek bola rýchla, mohlo by to ovplyvniť hodnotu optickej hustoty jednotlivých vzoriek a dochádzalo by tak k chybám merania pri stanovení množstva buniek v roztoku.



Obrázok 10: Grafické zobrazenie percentuálneho úbytku baktérií z roztoku v závislosti na čase pre bakteriálne bunky Burkholderia cepacia po sorpčnom experimente

Preto po uskutočnení sorpčného experimentu bola stanovená sedimentácia bakteriálnych buniek *Burkholderia cepacia* meraním OD _{PO(Kont.B)} v závislosti na čase (viď *Obrázok 10*). Počas 5 minút bol pozorovaný iba 5 % úbytok baktérií z roztoku. Týmto bolo potvrdené, že pri rýchlom meraní (do 5 min) po ukončení sorpčného experimentu nebudú výsledky sorpčného experimentu zaťažené výraznou chybou spôsobenou sedimentáciou buniek.

Nakoniec bol v rámci optimalizácie metódy stanovenia koncentrácie buniek v disperzii priamou metódou použitím Bürkerovej komôrky stanovený celkový počet mikrobiálnych buniek v 1 ml pripravených disperzii baktérií *Burkholderia cepacia* a *Bacillus megaterium* o optickej hustote 1.

V 1 ml bakteriálnej disperzie *Burkholderia cepacia* sa nachádzalo $8,8\cdot10^7$ buniek a v bakteriálnej disperzii *Bacillus megaterium* bol stanovený celkový počet buniek 7,7 $\cdot10^7$. Množstvo buniek prítomných v 1 ml disperzie sa rádovo nelíši, takže sorpčné experimenty môžeme prevádzať pomocou UV-VIS spektorfotometrie o rovnakej optickej hustote pre obe baktérie. Práve jedným z faktorov, ktorý môže mať vplyv na hydrofóbnosť baktérií je bakteriálna koncentrácia. Tento vplyv hydrofóbnosti baktérií na priľnutie baktérií k povrchom bol ďalej overovaný inými technikami (prevádzaním BATH testov).

5.1.1 Výber adsorbentu

5.1.1.1 Sklenené sorpčné povrchy

Po výbere baktérií a overení, že OD je vhodným parametrom k stanoveniu koncentrácie buniek v roztoku bol následne ďalším kľúčovým krokom k štúdiu bunkovej adsorpcie výber modelového pevného povrchu. Prvým použitým adsorbentom bolo sklo o rôznej adsorpčnej ploche a tvare. Sklo je univerzálny hydrofilný sorbent, dôležitý nie len z hľadiska aplikačného (vhodný ako nádoba pre kultiváciu mikroorganizmov). Dôležitosť spomínaného sorbentu je významná aj v kontexte jeho úlohy pri tvorbe biofilmu, konkrétne z dôvodu výskytu biofilmu aj na sklenených povrchoch. Pretože sklo sa používa nie len ako sanitárny materiál, ale aj domáce nádoby a povrchy sú často sklenené a môže na ich dochádzať v adhézií baktérií z okolitého prostredia. V tejto práci k štúdiu adsorpcie na sklenený pevný povrch bolo zvolené podložné mikroskopické sklíčko a sklenené guľôčky.

Zaujímalo nás, ako sa menia OD roztokov bakteriálnej suspenzie vo vybraných modelových systémoch (viď *Obrázok 11*). Spektrofotometrickým meraním bola stanovená OD pri vlnovej dĺžke 600 nm. Bola stanovená OD pôvodného roztoku bakteriálnej suspenzie pred uskutočnením experimentu (OD $_{PRED(B)}$). Zároveň OD bakteriálnej suspenzie po adhézii s konkrétnym modelovým adsorbentom (OD $_{PO(B+A)}$). V tomto optimalizačnom kroku boli spomínané zmeny optických hustôt roztokov bakteriálnej suspenzie vo vybraných modelových systémoch navzájom porovnané. Bol vypočítaný percentuálny nárast respektíve pokles optických hustôt po sorpčnom experimente. Výsledky sú zobrazené v *Tabuľke 6*, kde záporné hodnoty (zelené) indukujú pokles OD a kladné hodnoty (červené) znamenajú, že došlo k zvýšeniu OD.



Obrázok 11: Optimalizačné modelové systémy k experimentálnemu štúdiu adsorpcie bakteriálneho kmeňa Burkholderia cepacia na rôznych povrchoch (A: Kužeľové Erlenmayerove banky so sklenenými guľôčkami, B: Veľké centrifugačné skúmavky s podložným mikroskopickým sklíčkom, C: Úzke centrifugačné skúmavky so sklenenými guľôčkami)

	NÁDOBA	ADSORBENT	OD	OD	Rozdiel OD
			PRED (B)	PO (B+A)	PRED (B)
			[-]	[-]	a PO (B+A)
Exp.	50 ml veľká plastová	podložné	1,085	1,107	2 %
č. 1	centrifugačná skúmavka	mikroskopické	0,533	0,566	3 %
		sklíčko			
Exp.	15 ml úzka plastová	sklenené guľôčky	2,008	2,044	4 %
č. 2	centrifugačná skúmavka		1,780	1,871	9 %
			1,204	1,574	37 %
			1,093	1,222	13 %
			0,535	0,504	-3 %
			0,144	0,156	1 %
Exp.	25 ml sklenená kužeľová	sklenené guľôčky	1,712	1,627	-9 %
č. 3	Erlenmayerová banka		1,142	1,020	-12 %
			0,572	0,488	-8 %

Tabuľka 6: Výsledky meraní OD pre použité optimalizačné modelové systémy s optimalizačným krokom pre výber nádoby a adsorbentu k adsorpcii

V experimente č. 1, bolo zvolené ako sklenený adsorbent podložné mikroskopické sklíčko. Hlavne z dôvodu jeho veľkej plochy a kvôli predpokladanej možnej vizualizácii buniek na tomto povrchu napríklad pomocou mikroskopickej analýzy. Z výsledkov uvedených v Tabulke 6, pre exp. č. 1 je zrejme, že pri použití modelového systému veľkých 50 ml plastových centrifugačných skúmavok s podložným mikroskopickým sklíčkom došlo k nárastu optickej hustoty OD PO(B+A) oproti hodnotám OD PRED(B). Počas experimentu bolo voľným okom vidieť, že dochádza k agregácii buniek v roztoku. S týmto modelovým systémom (viď Obrázok 11) sa d'alej nepracovalo. Pretože z výsledkov vyplýva, že pravdepodobne nedochádzalo k viazaniu bakteriálnych buniek na povrch plastovej nádoby, ani na povrch podložného sklíčka; respektíve, že pri meraní optickej hustoty boli prejavy tejto väzby kompenzované až prevýšeným nárastom OD v dôsledku agregácie buniek v roztoku.

Na základe poznatkov z teoretickej časti práce, bolo ako ďalší adsorbent zvolené sklo v podobe hydrofilných sklenených guľôčok. Oproti podložnému mikroskopickému sklíčku majú guľôčky väčší merný povrch. Ich povrch môžeme meniť zvýšením alebo znížením navážky. Na druhú stranu použitie guľôčok má aj jednu nevýhodu v zrovnaní s podložným mikroskopickým sklíčkom a tou je komplikovaná vizualizácia adhézie buniek na tomto povrchu.

Pre exp. č. 2 (viď *Obrázok 11*) boli použité úzke 15 ml plastové centrifugačné skúmavky so sklenenými guľôčkami, kedy po hodinovom experimente došlo k nárastu hodnôt OD $_{PO(B+A)}$. Oproti tomu, keď pre exp. č. 3 boli použité kužeľové Erlenmayerove banky so sklenenými guľôčkami (viď *Obrázok 11*), vtedy po hodinovom experimente došlo k poklesu optickej hustoty OD $_{PO(B+A)}$. Výsledky percentuálneho nárastu/poklesu OD sú uvedené v *Tabuľke 6*. Pravdepodobne sú tieto výsledky ovplyvnené pomerom adsorbentu (sklenené guľôčky)/roztok bakteriálnej suspenzie. Pretože v exp. č. 2 to bolo 4,5 g/6 ml

a v exp. č. 3 bol tento pomer 2 g/15 ml. To, že pozorovateľný pokles OD v dôsledku sorpcie nastal pri použití kužeľových Erlenmayerových baniek so sklenenými guľôčkami (exp. č. 3) je dané tým, že koncentrácia použitého sorbentu bola až päťkrát vyššia oproti exp. č. 2.

Z teoretických poznatkov je zrejme, že dôležitou charakteristickou vlastnosť povrchov, ktorá ovplyvňuje priľnutie buniek je ich morfológia. Z výsledkov predchádzajúcich optimalizačných experimentov vyplynulo, že bakteriálne bunky *Burkholderia cepacia* nechceli priľnúť na hladný sklenený povrch. Z uvedených dôvodov boli pre ďalšie experimenty vybrané iné adsorbenty (mikročásticové sorbenty), a to jednak kvôli ich malým rozmerom spojeným s výrazne vyšším merným povrchom a zároveň pretože baktérie majú všeobecne tendenciu ľahšie priľnúť a kolonizovať porézne povrchy, ktoré tieto mikročasticové sorbenty poskytujú.

Pre ďalšie experimenty sme zároveň vychádzali z týchto poznatkov a preto po porovnaní výsledkov zmien percentuálneho nárastu/poklesu OD modelového systému 15 ml úzke centrifugačné skúmavky so sklenenými guľôčkami uvedených v *Tabuľke 6*, bola k ďalšiemu štúdiu vybraná vhodná koncentrácia bakteriálnej suspenzie. Najväčší rozdiel po porovnaní hodnôt optickej hustoty OD _{PRED(B)} a OD _{PO(B+A)} bol pre pôvodnú optickú hustotu 1,204 a 1,093. Pre výber vhodnej OD pre ďalšie experimenty bol urobený kompromis medzi percentuálnym úbytkom OD pri sorpcii (OD _{PRED(B)} a OD _{PO(B+A)}), tak aby obe boli v rozsahu merateľnosti použitého spektrometru. Preto sa ďalej pracovalo s pripravenou bakteriálnou suspenziou o optickej hustote 1.

Pri optimalizácii jednotlivých krokov a realizácii experimentálnej časti tejto práce boli použité poznatky z teoretickej časti a to aj pri výbere vhodného prostredia pre rozsupendovanie buniek. Ako bolo vysvetlené vyššie, pri realizácii ďalších experimentov boli pripravované roztoky bakteriálnej suspenzie o optickej hustote 1. Najskôr boli pripravené suspenzie bakteriálnych buniek Burkholderia cepacia, kedy bolo použité k príprave suspenzií PBS, ktorého pH bolo 7,4. Ako môžeme vidieť v Tabuľke 6 z výsledkov nameraných hodnôt absorbancií je za použitia uvedených modelových systémov zrejme, že nedochádzalo k adsorpcii buniek na vybrané povrchy (sklenené guľôčky, podložné mikroskopické sklíčko) z dôvodov uvedených vyššie. Preto bol zohľadnený výber použitého disperzného prostredia bunkovej suspenzie.

V dôsledku prítomnosti funkčných skupín na povrchu bakteriálnej bunky, v závislosti na pH prostredí získajú bunky baktérií na svojom povrchu rôzny náboj. Nabitý povrch častice (bunky/adsorbentu) priťahuje opačne nabité ióny okolitého elektrolytu a vzniká elektrostatická dvojvrstva. Pokiaľ sa k negatívne nabitému adsorbentu priblíži negatívne nabitá bunka (pričom baktérie majú vo väčšine prípadov záporný náboj) v dôsledku prekrývania difúznych častí elektrických dvojvrstiev približujúcich sa povrchov dochádza k elektrostatickému odpudzovaniu. Hrúbku vzniknutej elektrostatickej dvojvrstvy ovplyvňuje iontová sila (ktorú vieme ovplyvniť napr. zmenou pufru) a hodnota tzv. zeta potenciálu [13]. Záporný náboj môžu získať napr. sklenené povrchy disociáciou povrchových – OH skupín. Pre ďalšie adsorpčné experimenty však boli použité mikročásticové sorbenty, a to charakteru hydrofóbneho resp. hydrofilného s kladným povrchovým nábojom (viď ďalej). Voľba týchto adsorbentov vychádzala z predpokladu, že tendencia buniek sorbovať sa na testovaných povrchoch bude tým väčšia, čím viacej bude podporený jeden z dvoch hlavných typov

príťažlivých interakcií medzi opačnými nábojmi (záporným nábojom povrchu buniek a kladným povrchom sorbentu), resp. Van der Waalsovými interakciami podporenými hydrofóbnym efektom. Oba typy príťažlivých interakcií budú silne závisieť na iontovej sile roztoku; je známe, že prítomnosť nízkomolekulárných solí negatívne ovplyvňuje ako elektrostatické interakcie, tak tiež interakcie spojené s hydrofóbnym efektom.

Je známe, že pre väčšinu baktérií je optimálna hodnota pH 7 [1]. Preto bola pre ďalšie pripravené vzorky k rozuspendovaniu bakteriálnych buniek *Burkholderia cepacia* použitá destilovaná voda. Destilovaná voda má pH 7 a oproti PBS neobsahuje žiadne minerálne látky, teda nie sú prítomné ióny. Táto zmena postupu bola zvolená na základe predpokladu, že zmenou použitého PBS za destilovanú vodu docielime efektívnejšiu sorpciu z dôvodov uvedených v predchádzajúcom odstavci.

5.1.1.2 Mikročásticové polymérne adsorbenty

Z výsledkov (viď kapitola 5.1.1.1) vyplynulo, že použité makrosorbenty ako je podložné mikroskopické sklíčka a sklenené guľôčky nie sú vhodné pre modelové systémy. Ako už bolo spomenuté, práve kvôli snahe zväčšiť merný povrch boli vybrané mikročásticové adsorbenty. Zároveň z už uvedených dôvodov boli v nasledujúcich experimentoch bakteriálne bunky rozsuspendované v destilovanej vode a k ďalším experimentom pripravené o optickej hustote 1.

V *Tabuľke* 7 sú uvedené vlastnosti použitých pevných povrchov pri realizácii nasledujúcich experimentov. Jedná sa o ióntomeničové živice, ktoré majú rozdielnu chemickú štruktúru. Boli vybrané hydrofóbne adsorbenty Amberlite XAD-4 a Supelite DAX-8 o rozdielnej mernej ploche. Zároveň jeden adsorbent Amberlite IRA-900, ktorý sa vyznačuje hydrofilným charakterom a kladným nábojom na povrchu. Inšpiráciou k výberu zvolených pevných polymérných povrchov (Amberlite XAD-4, Supelite DAX-8, Amberlite IRA-900) pre tento experiment bola práca autorov *Kawabata a spol. (1983)* [61].

Adsorbenty	Plocha povrchu	Veľkosť častíc	Charakteristika	
Ambarlita VAD 4*	$> 750 m^2/a$	20 60 mash	Styrén-divinylbenzén	
Allibernite AAD-4	\geq 730 m/g	20 = 00 mesn	(makroretikulárny)	
Supplite DAV 9*	$140 m^{2}/c$	40 60 m ash	Ester polyakrylovej kyseliny	
Superite DAX-8	140 m /g	40 - 60 mesn	(mikroretikulárny)	
	_		Styrén-divinylbenzén,	
A metric $\mathbf{D} \wedge 000^{**}$		(50 8 <u>20</u>	povrchovo modifikovaný	
Ambernie IKA-900		650 – 820 μm	skupinami N ⁺ (CH ₃) ₃ Cl ⁻	
			(makroretikulárny)	
* hydrofóbny, ** hydrofilný				

Tabuľka 7: Tabuľka použitých mikročásticových adsorbentov k adsorpcii a ich základné vlastnosti

vplyv samotné pril'nutie alebo odpojenie Je známe, na baktérií má že nie len na hydrofóbnosť baktérií, ale aj hydrofóbne či hydrofilné vlastnosti všetkých typov prítomných povrchov. To znamená, že môže prednostne dochádzať k adsorpcii buniek na steny nádoby a nie na samotný adsorbent. Túto obavu zvyšovala i nejednoznačnosť predchádzajúcich výsledkov (viď Tabuľka 6).



Obrázok 12: Sklené skúmavky uložené v programovateľnom rotátore typu Multi Bio RS-24 počas prevádzania sorpčného experimentu (vľavo), 15 ml úzka plastová centrifugačná skúmavka (stred) a 15 ml úzka sklenená skúmavka (vpravo) s naváženými adsorbentov Amberlite XAD-4, Supelite DAX-8, Amberlite IRA-900

Preto bola v ďalších experimentoch meraná OD bakteriálnej suspenzie bez pridania adsorbentu, ktorá bola ponechaná pri rovnakých laboratórnych podmienkach, ako bakteriálna suspenzia s konkrétnym modelovým adsorbentom a následne bola premeraná jej zmena optickej hustoty (OD $_{PO(Kont.B)}$). Kontrolný test, teda meranie hodnôt OD $_{PO(Kont.B)}$ bolo zavedené z dôvodu, aby sa vylúčila možnosť, že k adhézii buniek dochádza prednostne na stene nádoby. Zároveň bol sorpčný experiment prevádzaný paralelne v plastových a sklenených skúmavkách ako modelovom predstaviteľovi nádob s hydrofóbnym resp. hydrofilným povrchom.

	NÁDOBA	ADSORBENT	OD	OD	OD	Rozdiel OD	Rozdiel OD
			PRED	РО	PO (Kont.B)	PRED (B)	PRED (B)
			(B)	(B + A)	[-]	a PO (B+A)	a PO (Kont.B)
			[-]	[-]			
Exp.	15 ml úzka	Amberlite	1,083	1,039	0,969	-4 %	-11 %
č. 4	plastová	XAD-4					
	centrifugačná	Supelite	1,083	0,988	0,992	-10 %	-9 %
	skúmavka	DAX-8					
		Amberlite	1,083	0,990	0,991	-9 %	-9 %
		IRA-900					
Exp.	15 ml úzka	Amberlite	1,083	1,006	1,016	-8 %	-7 %
č. 5	sklenená	XAD-4					
	skúmavka	Supelite	1,083	1,005	1,033	-8 %	-5 %
		DAX-8					
		Amberlite	1,083	1,001	1,028	-8 %	-5 %
		IRA-900					

Tabuľka 8: Výsledky meraní OD pre použité modelové systémy pri optimalizácii vplyvu adsorpcie buniek na steny použitej nádoby

V *Tabuľke* 8 sú uvedené hodnoty OD _{PO(Kont.B)}, OD _{PRED(B)} a OD _{PO(Kont.B)} pre plastové skúmavky i sklenené skúmavky. Pri adsorpcii bakteriálnych buniek *Burkholderia cepacia* o rovnakej počiatočnej optickej hustote OD _{PRED(B)}. A pre obe experimenty boli použité

baktérie z tých istých zdrojových inokul. Následne boli vypočítané rozdiely OD po sorpčnom procese a pred ním. Záporné hodnoty uvedené v tabuľke zelenou vyjadrujú percentuálny úbytok baktérií z roztoku.

Bolo zistené, že k menším zmenám v rozdieloch OD _{PRED(B)} a OD _{PO(Kont.B)} po adhézii buniek na použitý pevný povrch, dochádza pri použití sklenených skúmavok oproti plastovým centrifugačným skúmavkám. A zároveň percentuálny úbytok baktérií z roztoku vychádza pre všetky použité mikroadsorbenty s menšími odchýlkami pri použití sklenených skúmavok. Z toho vyplýva, že ďalšie experimenty adsorpcie bakteriálnych buniek na pevných povrchoch sa budú prevádzať v sklenených skúmavkách, kedy dochádza k zanedbateľnej adsorpcii bakteriálnych buniek na steny skúmavok. Zároveň bolo toto zistenie zaujímavou predikciou, ktorá naznačovala dôležitý vplyv hydrofóbnych interakcií pri sorpcii použitých bakteriálnych buniek.

Výber vhodného adsorbentu k adsorpcii buniek na jeho povrch je jedným z kľúčových cieľov experimentálnej časti tejto práce. Od sklenených makrosorbentov sme prešli k používaniu polymérných mikrosorbentov. No pri optimalizácii vplyvu adsorpcie buniek na steny použitej nádoby po 1 h experimente bolo možné voľným okom v skúmavkách pozorovať, že častice použitým adsorbentom voľne plavú na povrchu bakteriálnej suspenzie a v prípade adsorbentu Supelite DAX-8 sa nejaké častice mohli uvoľniť a plavú priamo v roztoku. To by mohlo ovplyvňovať meranie OD po sorpčnom experimente, preto nás zaujímalo, či odber vzoriek pre meranie OD bude závisieť na časovom oneskorení medzi odberom suspenzie po sorpčnom experimente a meraním OD.

Bol navrhnutý experiment, ktorého cieľom bolo overiť, či voľba sorbentu ovplyvňuje prípadné zmeny optickej hustoty disperzie v čase, a to či už nepriamo v dôsledku pokračujúcej adsorpcie buniek na neodstránených časticiach sorbentu, alebo priamym vplyvom sorbentu na optickú hustotu (napr. v dôsledku agregácie a sedimentácie častíc, ktoré po odstránení sorbentu plávali na hladine, alebo napr. uvoľňovaním polymérnych reťazcov z častíc sorbentu). Preto boli merané OD $_{PO(B+A)}$ po sorpčnom experimente v závislosti na čase.



Obrázok 13: Grafické zobrazenie závislosti optickej hustoty OD PO(B+A) na čase pre použité adsorbenty

Z grafickej závislosti optickej hustoty na čase (viď *Obrázok 13*) je poznať, že záleží na tom, na aký adsorbent sa bakteriálne bunky budú viazať. Voľným okom bolo pozorovateľné zakalenie roztoku pred meraním OD $_{PO(B+A)}$ pri 600 nm, v tomto poradí Amberlite IRA-900 > Amberlite XAD-4 > Supelite DAX-8. V sklenených skúmavkách bolo vidieť, že nie všetky častice sa usadili po 5 min (čas oddelenia sedimentu od kvapalnej disperzie buniek, v grafe 13 predstavuje čas t=0) na dne skúmavky, ale niektoré častice adsorbentov voľne plávali v roztoku, poprípade ostávali na hladine bakteriálnej suspenzie. Hlavne u bakteriálnej suspenzie, ktorá bola vystavená adsorpcii na povrch Superlite DAX-8 bolo vidieť, že malé uvoľnené práškové častice voľne plavú v roztoku.

Aj z *Obrázka 13* môže usúdiť, že pre adsorbent Supelite DAX-8 má sedimentácia v závislosti na čase najväčšie rozdiely oproti ostatným adsorbentom. Je to zrejme spôsobené tým, že bakteriálne bunky sa naviažu na neodstránené častice Supelite DAX-8.

Z týchto výsledkov pre ďalšie merania vyplýva, že odber vzoriek bakteriálnych suspenzií pre meranie optických hustôt je potrebné realizovať vždy 5 min (t = 0) po uskutočnení sorpčného experimentu. Z dôvodu sorpcie buniek na použitý adsorbent je potrebné pridať kontrolný test, pre vylúčenie možného uvoľňovania častíc z použitých adsorbentov. To znamená, že je potrebné tým istým sorpčným podmienkam (časovým i navážkam) vystaviť sklenené skúmavky s modelovým adsorbentov v prostredí destilovanej vody. A stanoviť hodnotu optickej hustoty ako (OD $_{PO(DV+A)}$). A súčasne zohľadniť tieto namerané OD pri výpočte percentuálneho úbytku baktérií z roztoku.

Po optimalizácii všetkých parametrov, ktoré by mohli ovplyvňovať sorpčné procesy bol pre vlastný experiment vybraný najvhodnejší modelový systém. Ako nádoba bola zvolená sklenená 15 ml skúmavka. Ako modelový pevný povrch boli vybrané mikroadsorbenty Amberlite XAD-4, Supelite DAX-8, Amberlite IRA-900. Po realizácií optimalizačných krokov so zástupcom baktérií *Burkholderia cepacia*, bola už následne uvažovaná realizácia sorpčných experimentov súčasne s ďalším bakteriálnym kmeňom a to konkrétne s baktériou *Bacillus megaterium*. Po uskutočnení sorpčných experimentov na modelových systémoch bola vybraná pre realizáciu experimentov hodnota optickej hustoty bakteriálnej suspenzie o OD rovná 1. Rovnako pre baktérie *Burkholderia cepacia* a *Bacillus megaterium*, keďže počet buniek v pripravených disperziách o optickej hustote 1 bol približne rovnaký.

5.2 Vlastný experiment k štúdiu adsorpcie bakteriálnych buniek

V predloženej diplomovej práci boli k štúdiu adsorpčných schopností modelových baktérií použité *Burkholderia cepacia*, ako zástupca gramnegatívného kmeňa baktérií a zároveň bol vybraný zástupca grampozitívných baktérií *Bacillus megaterium*.

Na základe výsledkov morfologickej a fyzikálne-chemickej charakterizácie pevných povrchov i bakteriálnych buniek boli ďalej realizované sorpčné experimenty a to v kontexte kľúčovej úlohy procesu adhézie/adsorpcie bakteriálnych buniek pri tvorbe biofilmu.

Spektrofotometrickým meraním boli stanovené zmeny optických hustôt OD _{PRED(B)}, OD _{PO(B+A)}, OD _{PO(Kont.B)}. Výsledky merania časovej závislosti optickej hustoty bakteriálnych buniek *Burkholderia cepacia* po adsorpcii na pevných povrchov (Amberlite XAD-4, Supelite DAX-8, Amberlite IRA-900) (viď *Obrázok 13*) poukázali na skutočnosť, že po sorpčnom experimente môže dochádzať k uvoľňovaniu častíc z použitých adsorbentov, čo je nežiadúcim javom. Aby sme kvalitatívne zhodnotili schopnosť ióntomeničových živíc v procese sorpcie

bol stanovený percentuálny úbytok zákalu v zdrojovej suspenzii pri 600 nm, v grafickom spracovaní uvádzaný ako percentuálny úbytok baktérií z roztoku podľa nasledujúceho vzťahu:

% úbytok baktérií z roztoku=
$$\frac{OD_{PO(KontB)} - (OD_{PO(B+A)} - OD_{PO(DV+A)})}{OD_{PO(KontB)}}$$
(1)

Dôvodom toho bolo, že pri ďalších sorpčných experimentoch boli pripravené skúmavky za rovnakých podmienok ako bakteriálne suspenzie s konkrétnym modelovým adsorbentom (merané ako (OD $_{PO(B+A)}$), s tým rozdielom, že namiesto suspenzie bakteriálnych buniek bola použitá destilovaná voda. A následne bola stanovená hodnota optickej hustoty destilovanej vody a adsorbentu ako (OD $_{PO(DV+A)}$). A preto bol k stanoveniu percentuálneho úbytku zákalu baktérií použitý vzťah uvedený v rovnici 1.

5.2.1 Vplyv doby experimentu

Jedným z kľúčových experimentálnych krokov bolo stanovenie percentuálného úbytoku baktérií z roztoku v závislosti na čase pre baktérie *Burkholderia cepacia* a *Bacillus megaterium*. Podľa rovnice 1 uvedenej v kapitole 5.2.1, bol vypočítaný percentuálny úbytok baktérií z roztoku v závislosti na čase. Výsledky meraní boli graficky spracované.

Z grafickej závislosti na *Obrázku 14* je možné u bakteriálnych buniek pozorovať trend postupného rastu percentuálneho úbytku baktérií *Burkholderia cepacia* z roztoku v porovnaní s rastúcim časom, pri ktorom boli sorpčné experimenty realizované. Je pravdepodobné, že čím väčší je percentuálny úbytok baktérií z roztoku, tým väčšie množstvo bakteriálnych buniek sa bude viazať na pevný povrch. Uvedené experimenty boli realizované s cieľom o dosiahnutie najlepšej sorpčnej účinnosti a pre *Burkholderia cepacia* tieto experimenty potvrdili pôvodný predpoklad, že doba sorpčného experimentu túto účinnosť pre všetky použité sorbenty zvyšuje.



Obrázok 14: Grafické zobrazenie percentuálneho úbytku baktérií Burkholderia cepacia z roztoku v závislosti na čase

Po uskutočnení meraní 1 h a 2 h sorpcie došlo k zvýšeniu adsorbovaného množstva bakteriálnych buniek na pevný povrch, ale stále nebola dosiahnutá maximálna sorpčná účinnosť a preto bola následne realizovaná 5 h a 24 h sorpcia. Po 24 h sorpcii bolo v skúmavkách voľným okom viditeľné, že použité adsorbenty sa usadili na dno skúmavky a neplávali v roztoku biofilmových bakteriálnych buniek, oproti tomu ako to bolo viditeľne pozorované pri realizácii 1 h a 2 h sorpcii. U bakteriálnych buniek Burkholderia cepacia bol najväčší percentuálny úbytok baktérií z roztoku po 24 h sorpcii. Najvyššiu sorpčnú účinnosť až 58 % dosiahli bunky s Supelite DAX-8. Ďalej 53 % mali bakteriálne bunky po sorpcii s Amberlite IRA-900, ale na základe vysokej hodnoty chybovej úsečky je zrejme, že bola do výsledkov zanesená väčšia chyba merania. No napriek tejto odchýlke nie je narušený trend postupného rastu percentuálneho úbytku baktérií Burkholderia cepacia z roztoku v porovnaní s rastúcim časom pre spomínaný adsorbent. Schopnosť najmenšej iba 28 % sorpčnej účinnosti mali bakteriálne bunky Burkholderia cepacia po 24 h sorpčnom experimente s adsorbentom Amberlite XAD-4.

Obrázok 15 zobrazuje výsledky percentuálneho úbytku baktérií *Bacillus megaterium* z roztoku vzhľadom na rastúci čas experimentu. U bakteriálnych buniek *Bacillus megaterium* môžeme pozorovať trend postupného klesania hodnôt percentuálneho úbytku baktérií v závislosti na rastúcom časte pre Supelite DAX-8, Amberlite IRA-900. Oproti tomu nedochádzalo k nejakým výrazným zmenám pre Amberlite XAD-4 a preto je možné pozorovať zmeny percentuálneho úbytku baktérií z roztoku v rozsahu 6 – 8 %.



Obrázok 15: Grafické zobrazenie percentuálneho úbytku baktérií Bacillus megaterium z roztoku v závislosti na čase

Zakalenie roztoku pozorované voľným okom po 24 h bolo výrazne v tomto poradí pre jednotlivé povrchy Amberlite XAD-4 > Amberlite IRA-900 > Supelite DAX-8. V porovnaní s grafickým zobrazením (*viď Obrázok 15*) môžeme usúdiť, čím menej bol roztok

bakteriálnej suspenzie baktérií zakalený, tým bola dosiahnutá lepšia adsorpcia buniek baktérií na daný povrch.

Porovnaním sorpčných experimentov pre Bacillus megaterium je zrejme, že u adsorbentu Supelite DAX-8 sa preukázal až 91 % úbytok bakteriálnych buniek z roztoku už po 1 h sorpcii. Z toho vyplýva, že najviac buniek Bacillus megaterium sa viazalo na povrch Supelite DAX-8 za 1 h, v porovnaní so zväčšujúcou sa do dobou experimentu a zároveň aj v porovnaní s ostatnými pevnými povrchmi. Pre povrch hydrofilného adsorbentu Amberlite IRA-900 sa percentuálny úbytok bakteriálnych buniek z roztoku pohyboval v rozsahu 43 – 50 % pri 1 – 5 h sorpcii. Po 24 h, len veľmi málo klesla sorpčná účinnosť na hodnotu 37 %. Tieto výsledky pre baktériu Bacillus megaterium sú výrazne odlišné oproti výsledkom Burkholderia cepacia (viď Obrázok 14). Tento neočakávaný časový trend je pravdepodobne spôsobený zmenou fyziologického stavu použitého bakteriálneho kmeňa v priebehu experimentu. Počas experimentov po 24 h bolo cítiť zo skúmavok výrazný zápach bakteriálnych suspenzií. Je preto možné, že v priebehu experimentu dochádzalo k zmene stavu bakteriálnych buniek, pri ktorom optická hustota roztoku prestávala byť jednoznačným parametrom koncentrácie. Napr. lýza buniek môže byť spojená s uvoľňovaním obsahu cytoplazmy do okolitého prostredia a s tým spojeným zvyšovaním OD. Toto možné vysvetlenie by bolo vhodné overiť napr. sledovaním vability buniek v priebehu sorpčného experimentu. Takýto experiment však presahoval rámec plánovanej experimentálnej náplne predloženej diplomovej práce.

V tejto časti diplomovej práce bolo overené, že u buniek Burkholderia cepacia dochádza k lepšej adhézii na pevné povrchy až po 24 h, v porovnaní s výsledkami, kedy u Bacillus megaterium bola najvyššia sorpčná účinnosť dosiahnutá už po 1 h sorpcii. V oboch prípadoch najviac bakteriálnych buniek adsorbovalo na pevný povrch hydrofóbneho mikroretikulárného adsorbentu Supelite DAX-8. Pravdepodobne k tomu dochádzalo vďaka topografickým vlastnostiam spomínaného povrchu, pretože sa skôr jedná o skôr hladký a mikroporézny povrch. Z teoretickej časti práce vyplynulo, že by na neho mali baktérie prednostne priľnúť a kolonizovať, oproti ostatným adsorbentom. Ako najmenej vhodným pevným povrchom k adsorpcii buniek Burkholderia cepacia a Bacillus megaterium bol Amberlite XAD-4. Spomínaný Amberlite XAD-4 je tiež hydrofóbny, ale je makroporézny a má väčší merný povrch, čo môže byť rozhodujúcim faktorom, prečo na neho baktérie sorbovali najmenej v porovnaní s ostanými poréznymi adsorbentmi. Jediným použitým adsorbentom s hydrofilným povrchom bol makroretikulárny adsorbent Amberlite IRA-900, ktorý má na svojom povrchu kladný náboj, takže mal by ochotne interagovať s vodou. Ak uvažuje, že bakteriálne bunky majú záporný náboj, tak pôsobením elektrostatických síl by sa mali navzájom viazať so spomínaným adsorbentom. U ostatných sorbentov by kľúčovú hnaciu silu sorpcie mohol predstavovať hydrofóbny efekt. Tu je však treba mať na pamäti, že pri použití hydrofóbnych sorbentov vo vodnom prostredí môže tiež dochádzať k agregácií samotných častíc sorbentu, čo môže nepriaznivo ovplyvňovať priebeh a efektivitu sorpčného experimentu. Porovnaním adsorbentov o rovnakom chemickom základe Amberlite XAD-4 a Amberlite IRA-900 (so substituovaným kladným nábojom na povrchu), ktoré boli makroporézne môžeme usúdiť, že lepšiu schopnosť buniek prichytiť sa na povrch vykazoval hydrofilny Amberlite IRA-900 v porovnaní s hydrofóbnym Amberlite XAD-4. Z toho

vyplýva, že hydrofobicita a pórovitosť použitého povrchu vplýva na adhéziu bakteriálnych buniek.

5.2.2 Vplyv koncentrácie adsorbentu

V kapitole 5.2.1 bol diskutovaný percentuálny úbytok baktérií Burkholderia cepacia a Bacillus megaterium z roztoku v závislosti na čase. Na základe výsledkov zo spomínanej kapitoly bola realizovaná rada ďalších experimentov. Najvyššia sorpčná účinnosť baktérií Burkholderia cepacia v závislosti na čase bola dosiahnutá po 2 h a 5 h sorpcii (vid' Obrázok 14), oproti tomu baktérie Bacillus megaterium závislosti na čase dosiahli najvyššiu účinnosť sorpcie po 1 h a 2 h experimente (viď Obrázok 15). Z uvedených dôvodov a grafických výsledkov uvedených v kapitole 5.2.1 najvvššej sorpčnej účinnosti pre spomínané baktérie bol pre ďalšie experimenty vybraný kompromis medzi časmi. Preto nasledujúce sorpčné experimenty trvali 2 h, ale menila sa koncentrácia použitého adsorbentu. Následne bol stanovený percentuálny úbytok baktérií z roztoku v závislosti na zmene koncentrácie použitého adsorbentu pre baktérie Burkholderia cepacia a Bacillus megaterium. Domnievali sme sa, že s narastajúcou koncentráciou použitého adsorbentu bude sorpčná účinnosť rásť. Predpokladali sme, že čím viacej častíc bude v roztoku prítomných, tým väčší merný povrch budú mať a bude dochádzať k vyššej sorpčnej účinnosti na použitý adsorbent.



Obrázok 16: Grafické zobrazenie percentuálneho úbytku baktérií Burkholderia cepacia z roztoku v závislosti na zmene koncentrácie adsorbentu

Výsledky na *Obrázku 16* poukazujú na to, že u adsorbentu Amberlite XAD-4 dochádzalo k miernemu zníženiu percentuálneho úbytku baktérií z roztoku v závislosti na rastúcej zmene koncentrácie použitého adsorbentu. Najvyššie (maximálne) hodnoty boli dosiahnuté pri 0,067 a 0,133 g/ml koncentrácii adsorbentu a to v rozsahu 19 - 32 %. So zvyšujúcou koncentráciou adsorbentu (0,300 a 0,500 g/ml) dochádzalo k tomu, že sa na povrch takmer nesorbovali žiadne bunky a počas sorpčného experimentu dochádzalo k agregácii adsorbentu Amberlite XAD-4.

Supelite DAX-8 nevykazoval žiaden trend a hodnoty percentuálneho úbytku baktérií z roztoku boli rôzne s meniacou sa koncentráciou adsorbentu. Po zohľadnení chýb meraní zobrazených aj graficky, by sme mohli usúdiť, že bakteriálne bunky *Burkholderia cepacia* sa najlepšie viazali na spomínaný povrch po 2 h sorpcii, kedy bola koncentrácia adsorbentu 0,133 g/ml, kedy dosiahla najvyššiu hodnotu 50 %. Z výsledkov pre tento adsorbent je zrejme, že pri koncentrácii 0,500 g/ml sme nedosiahli takmer žiadnu sopčnú účinnosť, naopak pri tak vysokej koncentrácii adsorbentu dochádzalo k jeho agregácii, ešte pred tým, než stihli bakteriálne bunky priľnúť na povrch.

Hydrofilny Amberlite IRA-900 dosiahol po 2 h sorpcii najväčší 43 % úbytok bakteriálnych buniek z roztoku, pri koncentrácia adsorbentu 0,500 g/ml. Jedine tento hydrofilny adsorbent potvrdil náš predpoklad, že s narastajúcou koncentráciou použitého adsorbentu bude sorpčná účinnosť rásť. Rovnaký trend, kedy dochádzalo k nárastu percentuálneho úbytku baktérií z roztoku u Amberlite IRA-900 bolo dosiahnuté aj po vyhodnotení percentuálneho úbytku bakteriálnych buniek *Burkholderia cepacia* z roztoku v porovnaní s rastúcim časom, kedy spomínaný Amberlite IRA-900 nadobúdal tiež výrazný rast v závislosti na meniacom sa čase (viď *Obrázok 14*).

Z výsledkov pre bakteriálne bunky *Burkholderia cepacia* môžeme usúdiť, že pri sorpcii bakteriálnych buniek na hydrofóbne povrchy dochádza k agregácii použitých hydrofóbnych adsorbentov čo negatívne ovplyvňuje naviazanie samotných buniek na ich povrch. Úplne inak sa bude chovať hydrofilný adsorbent, ktorého častice sa v dôsledku sústavného povrchového náboja budú vo vodnej disperzii odpudzovať. To predstavuje možné vysvetlenie faktu, že pre hydrofilné kladne nabitý adsorbent Amberlite IRA-900, bola so zvyšujúcou koncentráciou použitého adsorbentu dosiahnutá zvyšovaná účinnosť sorpčného procesu.

Výstup meraní percentuálneho úbytku baktérií z roztoku v závislosti na rastúcej zmene koncentrácie použitého adsorbentu po 2 h u druhej použitej baktérie *Bacillus megaterium* bol tiež graficky spracovaný, ako môžeme vidieť výsledky sú na *Obrázku 16*. Tak, ako bolo uvedené v predchádzajúcom odstavci, že najvhodnejším povrchom bol adsorbent Amberlite IRA-900 pre bunky *Burkholderia cepacia*, oproti tomu výrazne vyšší, až 97 % úbytok baktérií z roztoku bol stanovený pre Amberlite IRA-900 pri rovnakej koncentrácii (0,500 g/ml) spomenutého adsorbentu pre *Bacillus megaterium* (viď *Obrázok 17*).



Obrázok 17: Grafické zobrazenie percentuálneho úbytku baktérií Bacillus megaterium z roztoku v závislosti na zmene koncentrácii adsorbentu

Pre Supelite DAX-8 a Amberlite IRA-900 môžeme pozorovať trend postupného nárastu hodnôt percentuálneho úbytku baktérií v závislosti na rastúcej koncentrácii adsorbentov. Pre adsorbenty Supelite DAX-8 a Amberlite IRA-900 sa potvrdil predpoklad, že s narastajúcou koncentráciou použitého adsorbentu bude sorpčná účinnosť rásť. To znamená, že ak dochádzalo k nejakej agregácii častíc hydrofóbneho sorbentu Supelite DAX-8 v roztoku, tak negatívny efekt na priebeh a efektivitu sorpcie *Bacillus megaterium* nebol ani z ďaleka tak výrazný ako tomu bolo v prípade predchádzajúcej baktérie *Burkholderia cepacia*.

Oproti tomu, po sorpčnom experimente buniek baktérií *Bacillus megaterium* na adsorbent Amberlite XAD-4 nedochádzalo k nejakým výrazným zmenám percentuálneho úbytku baktérií z roztoku v závislosti na rastúcej zmene koncentrácie spomínaného adsorbentu. A namerané hodnoty sa pohybovali v rozsahu 8 – 15 %. Aj na *Obrázku 15* je vidieť, že hodnoty percentuálneho úbytku baktérií *Bacillus megaterium* z roztoku na čase sa vôbec nemenili pre spomenutý pevný povrch.

To či dochádzalo k samotnej agregácii samotných adsorbentov alebo k spájaniu adsorbentov po naviazaní bakteriálnych buniek na ich povrch (tým, že začnú produkovať EPS) sa môžeme na základe prevedených experimentov iba domnievať. Bolo by zaujímavé v prípade nadväzujúcej experimentálnej štúdii pomocou napr. metód koloidnej analýzy (DLS, sedimentačná analýza a pod.) overiť, ako častice vo vodnom prostredí agregujú v závislosti na ich koncentrácii a čase.

5.3 Charakterizácia hydrofobicity baktérií pomocou BATH testov

Vieme, že primárna adhézia je charakterizovaná interakciami nešpecifickými a vratnými. Je známe, že medzi tieto interakcie patria aj hydrofóbne interakcie [13]. Hydrofobicita je vzťahovaná k určitým typom modelov, ktorých všeobecným rysom je vyššia usporiadanosť molekúl vody v okolí rozpustenej látky. Hydrofóbny efekt umožňuje nepolárnym molekulám zhlukovať sa vo vodnom roztoku pomocou rôznych termodynamických príspevkov. Z entalpického hľadiska ide o príspevok Van der Waalsových síl, ale prevláda efekt entropický. Pri hydrofóbnom efekte rastie celková entropia, pretože v oblasti hydrofóbných skupín sa musia molekuly vody oddeliť od nepolárnych molekúl späť do vodného prostredia [63].

Pre porovnanie hydrofóbnych vlastností bakteriálnych buniek *Burkholderia cepacia* a *Bacillus megaterium* odobratých po 24 h kultivácii z Erlenmayerových baniek boli použité BATH testy. Bol porovnaný vplyv vybraných hydrofóbnych fázy, pre tieto testy boli v práci použité hexadekan a minerálny olej.

BATH % bolo vypočítané podľa nasledujúceho vzťahu [62], kde $OD_{600,0}$ je optická hustota suspenzie buniek pred zmiešaním s hydrofóbnou fázou $OD_{600,t}$ je hodnota optickej hustoty suspenzie buniek po zmiešaní s hydrofóbnou fázou, ktoré sú stanovené pri vlnovej dĺžke 600 nm.

$$BATH(\%) = 100 \times \left(1 - \frac{OD_{600,t}}{OD_{600,0}}\right)$$
(2)

K vyhodnoteniu rozdielov týchto vlastností boli vynesené grafické závislosti, percentuálneho množstva buniek, ktoré prešli do hydrofóbnej fáze, na hodnotách počiatočných optických hustôt meraných vzoriek, viď *Obrázok 18*.



Obrázok 18: Zobrazenie grafickej závislosti množstva buniek, ktoré prešli do hydrofóbnej fáze minerálneho oleja u baktérií Burkholderia cepacia a Bacillus megaterium (pri optickej hustote 1)

Množstvo buniek *Burkholderia cepacia* a *Bacillus megaterium*, ktoré adsorbovali na fázové rozhranie, prípadne prešli do hydrofóbnej fáze bolo výrazne odlišné pre hexadekan a minerálny olej. Hodnoty percentuálneho prestupu buniek *Burkholderia cepacia* a *Bacillus megaterium* vyšli u hexadekanu záporné a preto nie sú zobrazené graficky. Pravdepodovne k tomu došlo v dôsledku emulgacie hexadekanu do vodnej fáze. V minerálnom oleji bol percentuálny prestup buniek baktérie *Burkholderia cepacia* 11 % a u baktérie *Bacillus megaterium* nastal 21 % percentuálny prestup buniek.

Z teoretických poznatkov je zrejme, že hydrofóbnosť baktérií mení v závislosti na kmeni baktérií. V tejto práci bolo experimentálne overené, že *Burkholderia cepacia* má menej hydrofóbny charakter v porovnaní s *Bacillus megaterium. Bacillus megaterium* má tendenciu lepšie odtieniť agregáciu samotných častíc mikroadosrbentov Amberlite XAD-4, Amberlite IRA-900 a Supelite DAX-8, z toho dôvodu, že sa nám na ne ľahko viaže. Z poznatkov teoretickej časti plynie, že k tomu zrejme prispievajú povrchové štruktúry ako napr. *pili*, ktoré sú po rozprestreté po celom povrchu grampozitívnej bunky a sú tvorené kovalentnými podjednotkami. Spájanie častíc bude zároveň podporené produkciou EPS samotnej baktérie [8]. V závislosti na počte prítomných povrchových štruktúr a EPS môžu byť elektrostatické interakcie slabšie a prevládnu Van der Waalsove sily, ktoré môžu byť viacnásobne pevnejšie. Súlad výsledkov testov hydrofóbnosti s výsledkami adsorpčných experimentov znovu potvrdili predpoklad, že nemôžeme hydrofóbne vlastnosti baktérií pri posudzovaní adhézie zanedbávať.

5.4 Podrobnejšia charakterizácia povrchových vlastností baktérií za použitia rozptylových techník

K charakterizácii povrchových vlastností suspenzie bakteriálnych buniek v tejto práci boli aplikované techniky, už spomenuté techniky DLS a ELS. V suspenzii pripravených bakteriálnych buniek bola stanovená distribúcia veľkosti častíc pomocou dynamického rozptylu svetla (DLS), zároveň pomocou elektroforetického rozptylu svetla (ELS) bola stanovená hodnota zeta potenciálu (ZP). Za použitia automatického titrátora (súčasť prístroja Zetasizer Nano ZS) bolo realizované meranie suspenzie buniek pri premenlivej hodnote pH. Boli testované oba typy buniek použitých pre predchádzajúce sorpčné experimenty, bunky *Burkholderia cepacia* aj *Bacillus megaterium*.

Kombinácia spomenutých metód bola použitá k stanoveniu izoelektrického bodu buniek, tj. hodnoty pH, kedy membrány bakteriálnych buniek budú vykazovať nulový efektívny náboj. Ako je vidieť na *Obrázku 19*, hodnotu izoelektrického bodu bakteriálnej suspenzie *Burkholderia cepacia* nebolo možné stanoviť. Počas prevádzania kontinuálnej titrácie (od hodnoty pH cca 7 do 1), došlo po dosiahnutí pH poslednej nameranej hodnoty 3,86 k rastu pH roztoku, napriek tomu, že titrátor kontinuálne prepočítaval a pridával ďalšie množstvo použitej 1 M HCl. Práve spomenutá hodnota pH 3,86 je na *Obrázku 19* vyznačená modrou farbou. Hodnota pH roztoku od 2,7 vzrástla na pH 6,64 a následne bola titrácia ukončená. *Obrázok 19* poukazuje na to, že pri meniacom sa pH sa celkový náboj bakteriálneho povrchu *Burkholderia cepacia* menil málo v závislosti na zmene pH, oproti tomu dochádzalo k zmene distribúcie veľkosti častíc veľmi výrazne.

Je pravdepodobné, že hodnota pH klesla pod fyziologicky prijateľné hodnoty pre bakteriálne bunky *Burkholderia cepacia* - čo viedlo k modifikácii bunkového

metabolizmu alebo lýze buniek. Následne mohlo dôjsť až k smrti buniek, v dôsledku rozpadu vonkajšej bunkovej steny, čo viedlo k zmene pH študovanej disperzie. Priemerná veľkosť častíc sa v prípade *Burkholderia cepacia* v celom rozsahu testovaných pH nemenila, čo naznačuje, že zmena pH nepodporuje ani nenarušuje prípadnú agregáciu buniek v disperzii.



Obrázok 19: Stanovenie izoelektrického bodu a výsledky agregácie buniek Burkholderia cepacia

Ďalej boli uskutočnené rovnaké merania aj pre bakteriálnu suspenziu *Bacillus megaterium*. Ako je vidieť na *Obrázku 20* hodnota izoelektrického bodu sa rovná 1,87. *Bacillus megaterium* ochotnejšie reaguje na zmeny pH oproti *Burkholderia cepacia*. Môžeme predpokladať, že zmeny pH v okolí buniek *Bacillus megaterium* by nemali ovplyvňovať ich produkciu polysacharidov a narúšať rozličné metabolické procesy, ktoré v bunkách prebiehajú.

Z klesajúcou hodnotou pH dochádzalo k miernemu nárastu zeta potenciálu a priemerná veľkosť častíc v systéme približne od pH 5 začala klesať. To by malo znamenať, že pri znížení pH sa jednotlivé bunky uvoľňujú z agregátov, v ktorých sa vo vodnom prostredí vyskytujú pri neutrálnom pH. Taktiež tento výsledok bol ovplyvnený už niekoľkokrát spomínanou hydrofobicitou buniek *Bacillus megaterium*.

Je však potrebné mať na pamäti, že táto metóda je nevhodná pre určenie absolútnej veľkosti buniek. Pretože priamym výstupom z meraní použitím prístroja Zetasizer Nano ZS nie je veľkosť častíc, ale difúzny koeficient. Ten sa pomocou modelov prepočítava, výstupumoje veľkosť buniek prepočítaná na guľovité častice. Z teoretickej časti práce je známe, že tvar použitých baktérií *Burkholderia cepacia* aj *Bacillus megaterium* je tyčinkovitý. Preto absolútne veľkosti častíc nemusia odpovedať realite, ale nás zaujíma zmena veľkosti častíc, ktorá nastala.



Obrázok 20: Stanovenie izoelektrického bodu a výsledky agregácie buniek Bacillus megaterium

Prvotné pripojenie bakteriálnych buniek k povrchom je primárne ovplyvnené elektrostatickými príťažlivými a odpudivými silami [13]. Energia elektrostatickej interakcie závisí na veľkosti náboja a permitivite prostredia [63]. Na povrchu baktérií sa nachádza veľké množstvo funkčných skupín a vďaka ich ionizácii na povrchu buniek vzniká náboj. Ako už bolo v teoretickej časti tejto práci uvedené, baktérie majú väčšinou záporný náboj, ktorý sa stanovuje meraním zeta potenciálu. Experimentálne výsledky sa popisujú pomocou DLVO teórie, ktorá zohľadňuje príspevok elektrostatických interakcií medzi bunkou a povrchom.

K charakterizácii suspenzie bakteriálnych buniek v tejto práci boli aplikované techniky, ktoré sa používajú k analýze koloidných systémov. V suspenzii pripravených bakteriálnych buniek bola stanovená distribúcia veľkosti častíc (tzv. *Z-priemer*) pomocou dynamického rozptylu svetla (DLS), zároveň pomocou elektroforetického rozptylu svetla (ELS) bola stanovená hodnota zeta potenciálu (ZP).

Pomocou BATH testov bolo experimentálne overené, že Burkholderia cepacia má menší hydrofóbny charakter v porovnaní s Bacillus megaterium. Bacillus megaterium sa ochotnejšie viazal aj na použité porézne adsorbenty.

Pomocou DLS u vzoriek zmiešaných z hydrofóbnou fázou (viď *Obrázok 21*) bol stanovený a graficky vyhodnotený celkový náboj bakteriálneho povrchu tzv. ZP. Preto bola pre porovnanie výsledkov vynesená grafická závislosť zeta potenciálu na optickej hustote jednotlivých vzoriek.



Obrázok 21: Porovnanie grafickej závislosti Z-priemeru suspenzii buniek pred a po zmiešaní s hydrofóbnou fázou pre baktérie Burkholderia cepacia (vpravo hore)a Bacillus megaterium (vľavo hore) a grafickej závislosti zeta potenciálu na suspenzii buniek pred a po zmiešaní s hydrofóbnou fázou pre baktérie Burkholderia cepacia (vpravo dole) a Bacillus megaterium (vľavo dole)

Pre pripravenú suspenziu buniek *Burkholderia cepacia* bola nameraná hodnota zeta potenciálu – 37 mV, pre *Bacillus megaterium* – 23 mV. Pre bunky oboch baktérií nadobudol zeta potenciál záporne hodnoty. Čo súhlasí s teoretickým poznatkom, ako je známe, že väčšina baktérií má za fyziologických podmienok záporný náboj. Ako môžeme vidieť v porovnaní týchto hodnôt s hodnotami ZP vo vodnej fáze po zmiešaní s hydrofóbnou fázou mali tendenciu klesať u baktérie *Burkholderia cepacia* a naopak rásť pre *Bacillus megaterium*. Ak sú baktérie veľmi negatívne nabité, je menej pravdepodobné, že adsorbujú na hydrofóbne rozhranie [62]. Toto tvrdenie súhlasí s experimentálnymi výsledkami, pretože pomocou DLS a ELS bolo u baktérie *Burkholderia cepacia* dokázané, že má väčší ZP a pomocou BATH testov, bolo overené, že *Burkholderia cepacia* je menej hydrofóbna.

Pre sústavy zo ZP v intervale nameraných hodnôt $\pm 30 \text{ mV}$ platí, že nie sú koloidne stabilné a majú tendenciu agregovať. Koagulácia častíc je ovplyvnená predovšetkým pH pridaného elektrolytu. Bunky oboch baktérií sa teda budú zhlukovať, môžu tak tvoriť mikrokolónie a následne biofilm. Zároveň, na základe toho, že rozdiely nameraných ZP sú pomerne malé, môžeme na základe poznatkov z teoretickej časti o bakteriálnej adhézii a povrchovom náboji baktérií predpokladať, že adsorpcia baktérií na pevné povrchy nebude výrazne ovplyvnená nábojom baktérií.

Rovnakým spôsobom bola sledovaná veľkosť buniek, ktoré ostali vo vodnej fáze a porovnaná s veľkosť ou buniek obsadených vo vzorke pred zmiešaním s hydrofóbnou fázou u oboch študovaných baktérií. Pre zrovnanie jednotlivých hodnôt bola vynesená grafická závislosť *Z-priemer* na počiatočnej hustote bakteriálnych vzoriek (viď *Obrázok 21*).

Z grafických závislostí *Z-priemeru* suspenzii buniek pred a po zmiešaní s hydrofóbnou fázou pre baktérie *Burkholderia cepacia* a *Bacillus megaterium* je možné pozorovať výraznú

zmenu veľkosti distribúcie častíc pri porovnaní baktérií navzájom. Hodnoty *Z-priemeru* pre bunky *Burkholderia cepacia* vo vodnej fáze po zmiešaní s hexadekanom sa nejako výrazne nelíši od hodnôt *Z-priemeru* pre bunky vo vodnej fáze pred zmiešaním s hexadekanom. Hodnoty *Z-priemeru* sú po zmiešaní len o niečo väčšie pre minerálny olej oproti hexadekanu. Rozdiel veľkosti distribúcie častíc u baktérie *Bacillus megaterium* po zmiešaní s hydrofóbnou fázou vzrástol, o výrazne viac v prípade, ak bol ako hydrofóbna fáza použitý minerálny olej.

Distribúcia veľkosti častíc je u baktérie *Bacillus megaterium* vyššia, preto sa ochotnejšie pomocou povrchových prívestkov mohli bunky spájať medzi sebou, produkovať EPS a viazať sa na povrch poréznych mikroadsorbentov počas sorpčných procesov ďaleko ochotnejšie v porovnaní s *Burkholderia cepacia*. Tieto výsledky vyplývajú aj z meraní uvedených v kapitolách 5.2 až 5.3.

5.5 Štruktúrne a vizuálne potvrdenie sorpcie buniek

5.5.1 Štruktúrna analýza sorbentu po adsorpcii buniek

K charakterizácií zmien na povrchu vybraných adsorbentov (Amberlite XAD-4, Supelite DAX-8, Amberlite IRA-900) po adsorpcii bakteriálnych buniek (*Burkholderia cepacia* a *Bacillus megaterium*) na už spomenuté druhy adsorbentov, podľa experimentálnych podmienok uvedených v kapitole 4.11 bola použitá infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou (FTIR). K vyhodnoteniu vzoriek bakteriálnych buniek *Burkholderia cepacia* a *Bacillus megaterium* boli použité infračervené spektrá, kde je zobrazená absorbancia v rozsahu o vlnočte 4 000 – 400 cm⁻¹.

Po uskutočnení sorpčných experimentov baktérií *Burkholderia cepacia* a *Bacillus megaterium* s adsorbentmi Amberlite XAD-4, Supelite DAX-8 a Amberlite IRA-900 boli následne adsorbenty vložené na Petriho misky a umiestnené do termostatu. Súčasne na Petriho misky boli k sušeniu pripravené čisté vzorky adsorbentov, ktoré sa k sorpčným procesom použili. Po 96 h boli z termostatu vybrané a následne analyzované pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie.

K štruktúrnemu potvrdeniu adsorpcie bakteriálnych buniek na povrchu adsorbentov bola použitá kvalitatívna metóda. Spektrum adsorbentu Amberlite XAD-4 je na *Obrázku 22*. V spektre sú viditeľné zmeny, spôsobené naviazaním bakteriálnych buniek na porézny povrch adsorbentu, makroretikularného styrén-divynilbenzénu s hydrofóbnym povrchom.

Hlavným absorpčným pásom je oblasť $2000 - 800 \text{ cm}^{-1}$, ktorá zodpovedá charakteristickému spektru pre divinylbenzén. Výsledky ukazujú aj na prítomnosť C-H väzieb divinylbenzénu. V spektre sú vidieť pásy C–H väzby aromatických zlúčenín, pre ktoré je charakteristická oblasť v rozpätí $3100 - 3000 \text{ cm}^{-1}$, takže sa dajú ľahko odlíšiť od vytvorených alifatických C–H skupín, ktoré sa vyskytujú v oblasti pod 3 000 cm⁻¹ a ich prítomnosť mohla byť spôsobená vlhkosťou vzoriek.

Spektrum čistého adsorbentu Amberlite XAD-4 je podobné spektru adsorbentu, na ktorý sa sorpčne naviazala *Burkholderia cepacia*. U spektra adsorbentu Amberlite XAD-4 s *Bacillus megaterium* je vidieť dva najsilnejšie pásy, ktoré sú charakteristické pre esterovú väzbu –CO–O–C. Výrazný absorbčný pás pri vlnovom čísle 1 730 cm⁻¹ odpovedá valenčnej vibrácii esterovej skupiny C=O, pre ktorú je charakteristická oblasť 1 750 až 1 730 cm⁻¹. Prítomnosť esterovej väzby potvrdzuje aj absorbčný pás pozorovaný pri 1 125 cm⁻¹, jedná sa o absorpčný pás C–O väzby (1 300 až 1 100 cm⁻¹).

Ďalším použitým hydrofóbnym adsorbentom, ktorý bol podrobený sorpčným experimentom bol mikroretikulárny ester polyakrylovej kyseliny Supelite DAX-8. Z dôvodu, že štruktúra adsorbentu je ester, môžeme už u kontroly (čistý adsorbent) vidieť najintenzívnejšie pásy pre esterové väzby, absorbčný pás 1 740 cm⁻¹ pre C=O väzbu a absorpčný pás 1 125 cm⁻¹ charakteristický pre C–O väzbu. Porovnaním spektier po uskutočnení sorpčných experimentov baktérie *Burkholderia cepacia* a *Bacillus megaterium* s adsorbentom Supelite DAX-8 si môžeme všimnúť rozdielnu intenzitu pásov charakterizujúcich prítomnosť esterovej väzby (viď *Obrázok 23*). Najmenšia intenzita spomínaných absorpčných pásov u *Bacillus megaterium* by mohla naznačovať, že práve naviazaním bakteriálnych buniek na tento adsorbent počas sorpčného procesu došlo k viditeľnému zníženiu intenzity pásov charakterizujúcich esterovú väzbu. Bakteriálne bunky

Bacillus megaterium d'aleko ochotnejšie adsorbovali na povrch spomenutého adsorbentu oproti bunkám *Burkholderia cepacia*.



Obrázok 22: ATR-FTIR spektrum Amberlite XAD-4



Obrázok 23: ATR-FTIR spektrum Supelite DAX-8

Na Obrázku 24 vidíme spektrum povrchu adsorbentu IRA-900, Amberlite makroretikulárného styrén-divinylbenzénu, ktorého povrch je modifikovaný skupinami N⁺(CH₃)₃Cl⁻. Povrchová štruktúra čistého adsorbentu je viditeľná aj na spektre. V spektre je badateľný absorpčný pás pri vlnovom čísle 1 640 cm⁻¹. Ten pás je spôsobený valenčnou vibráciou väzby N-H v spojení s valenčnou vibráciou väzby C-N (1 560 - 1530 cm⁻¹). Vibrácie skupiny C-H aromatických zlúčenín sa vyskytujú v rozmedzí 3 100 - 3 000 cm⁻¹. Prítomnosť absorbčného pásu 3 300 - 3700 cm⁻¹ mohla byť spôsobená vlhkosť ou adsorbentu. Porovnaním spektier po uskutočnení sorpčných experimentov baktérie Burkholderia cepacia a Bacillus megaterium s adsorbentom Amberlite IRA-900 si môžeme všimnúť prítomnosť intenzívných pásov charakterizujúcich prítomnosť esterovej skupiny C=O, ktorá sa vyskytuje v rozmedzí 1 750 až 1 730 cm⁻¹. Tieto spektrá sú špecifické hlavnými adsorpčnými pásmi amidov, výraznými absorbčnými pásmi sú Amid I a Amid II. Absorpčný pás Amidu I $(1 660 \text{ cm}^{-1})$ je spojený s valenčnými vibráciami karbonylových pozdĺž skupín polypeptidového reťazca a je najužitočnejším pri analýze sekundárnej štruktúry proteínov pomocou infračervenej spektroskopie. Pri vlnovom čísle 1 540 cm⁻¹ bol pozorovaný absorbčný pás Amidu II, ktorý je spôsobený valenčnou vibráciou väzby N-H v spojení s valenčnou vibráciou C–N väzby (1536 - 1544 cm⁻¹).



Obrázok 24: ATR-FTIR spektrum Amberlite IRA-900



Obrázok 25: Odčítané ATR-FTIR spektrum adsorbentov po sorpcii s Bacillus megaterium

Ďalej boli odčítané spektrá kontrol od spektier po sorpčnom experimente, vďaka čomu je na *Obrázok 25* lepšie vidieť štruktúrne zmeny po naviazaní baktérií *Burkholderia cepacia* a *Bacillus megaterium* na porézne adsorbenty Amberlite XAD-4, Supelite DAX-8 a Amberlite IRA-900. Hlavné absorbčné pásy Amidu I, Amidu II a Amidu III potvrdili prítomnosť peptidovej väzby a absorpčný pás C=O skupín prítomnosť esterovej väzby.

Prítomnosť polyesterovej väzby v spektrách potvrdzuje prítomnosť polyhydroxyalkanoátov, ktoré sú syntetizované mnohými baktériami a skladované ako materiál energetickej rezervy v bunkovej cytoplazme ako vo vode nerozpustné granule [64]. Aj baktériami Burkholderia cepacia a Bacillus megaterium sú produkované polyhydroxyalkanoáty [27],[65]. V jadre granúl polyhydroxyalkanoátov sa nachádza polyester. Jadro granúl je obklopené fosfolipidovou vrstvou, v ktorej sa nachádzajú alebo sú na jej povrchu naviazané proteíny [64]. Vieme, že intracelulárna bakteriálna komunikácia buniek tzv. QS prebieha pomocou signálnych molekúl, ktoré sú odlišné pre grampozitívne a gramnegatívne baktérie. Vo vhodnom prostredí (napr. i vodnom prostredí počas sorpčných experimentov v tejto práci) sa bunky adaptujú na okolité prostredie pomocou QS. So zvyšujúcou hustotou bakteriálnych buniek dochádza k zvýšenej produkcii QS, čo umožní komunikovať bunkám lepšie medzi sebou a to sa môže prejaviť tvorbou biofilmu (viď kapitola 2.3).

Štruktúrnou analýzou adsorpcie bakteriálnych buniek na povrchu adsorbentov sme pozorovali pomocou infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou. Vyššiu intenzitu charakteristických absorbčných pásov bolo vidieť pre *Bacillus megaterium* a preto k vizualizácii prítomnosti nasorbovaných buniek na povrchu adsorbentu použili skenovaciu elektrónovú mikroskopiu.

5.5.2 Vizualizácia nasorbovaných buniek

Pomocou SEM boli zobrazené tie isté vzorky, ktoré boli použité k analýze pomocou FTIR. V tejto kapitole sú prezentované snímky zhotovené pomocou SEM.

Na *Obrázku 26* a *Obrázku 27* môžeme vidieť porovnané snímky všetkých adsorbentov pred a po sorpčnom experimente s baktériou *Bacillus megaterium*. Pri porovnaní snímok môžeme pozorovať výrazne zmeny v počte naviazaných buniek na adsorbenty.

Najmenej buniek *Bacillus megaterium* je naviazaných na hydrofóbny povrch adsorbentu AmberliteXAD-4 v porovnaní s ďalším hydrofóbnym adsorbentom Supelite DAX-8, ktorý má päťkrát menšiu adsorpčnú plochu oproti AmberliteXAD-4. Na *Obrázku 26 (B1)* je dokonca vidieť biele miesta, pravdepodobne ide o štruktúru adsorbentu Supelite DAX-8 v jeho práškovej forme. Kde spomínané biele štruktúry poukazujú na možnosť vytváranie zhlukov samotného adsorbentu počas sorpčného procesu. Týmto môžeme poukázať na skutočnosť, že nie len rozmer pevného povrchu rozhoduje o adhézii baktérií na jeho povrch, ale samotné chemické a topografické, štruktúrne vlastnosti použitého pevného povrchu.

Ďalej je na snímkach zobrazený makroporézny adsorbent Amberlite IRA-900, ktorý mal po sorpčnom experimente s baktériou *Bacillus megaterium* najvyšší počet naviazaných buniek (viď *Obrázok 27(F2)*). A ďalšia detailná snímka spomínanej baktérie zobrazenej na povrchu adsorbentu Amberlite IRA-900 je zobrazená v kapitole 9.

Použitie tejto techniky k analýze povrchovej vonkajšej štruktúry naviazaným buniek baktérie *Bacillus megaterium* na povrchy adsorbentov Amberlite XAD-4, Supelite DAX-8 a Amberlite IRA-900 po sorpčnom procese sa ukázalo vhodné. Niektoré zaujímavé snímkyzhotovené pomocou SEM sú súčasťou kapitoly 9.

Skenovacia elektrónová mikroskopia je schopná zobraziť povrchovú štruktúru aj adsorbentov o mikro rozmeroch a to vo vysokom rozlíšení. Preto je vhodnou technikou k zobrazeniu povrchovej štruktúry použitých pevných povrchov a dokázania prítomnosti skúmanej baktérie na pevnom povrchu po sorpčných procesoch dokonca v 3D. Pomocou SEM mikroskopie tak bolo potvrdené, že aj po osušení adsorbentu zostáva jeho povrch pokrytý nasorbovanými bakteriálnymi bunkami. Táto metóda tak môže byť v kombinácii s kvantitatívnym popisom sorpčného experimentu predstavovať cenný nástroj pre popis morfológie vrstvy nasorbovaných buniek, čo predstavuje kľúčovú informáciu pri popise adsorpcie buniek ako prvotného stupňa vzniku buniek.



Obrázok 26: Snímky adsorbentov pred (1) a po sorpčnom experimente (2) baktérie Bacillus megaterium na povrchu Amberlite XAD-4 (A) Supelite DAX-8 (B) Amberlite IRA-900 (C)



Obrázok 27: Detailnejšie snímky povrchu adsorbentov pred (1) a po sorpčnom experimente (2) baktérie Bacillus megaterium. s Amberlite XAD-4 (D) Supelite DAX-8 (E) Amberlite IRA-900 (F)

6 ZÁVER

Cieľom diplomovej práce bolo navrhnúť vhodný modelový systém pre experimentálne štúdium adsorpcie bakteriálnych buniek, najmä s ohľadom na výber mikroorganizmu a adsorbentu. Popis adsorpcie bakteriálnych buniek je významný v kontexte úlohy tohto procesu pre vysvetlenie tvorby biofilmov na pevných povrchoch.

Prvá časť experimentálnej práce sa zameriava na optimalizáciu návrhu modelového systému k štúdiu adsorpcie bakteriálnych buniek *Burkholderia cepacia* na pevné povrchy. V práci sú podrobne diskutované vplyvy chemických, fyzikálnych a materiálových parametrov, ktoré ovplyvňujú adhéziu buniek na zvolený modelový pevný povrch. Počas realizácie experimentov boli postupne jednotlivé nežiaduce vplyvy odstránené a následne bol navrhnutý vhodný modelový systém pre experimentálne štúdium adsorpcie bakteriálnych kmeňov *Burkholderia cepacia* a *Bacillus megaterium*. Súčasne pomocou zvolených testov a fyzikálne-chemických metód boli charakterizované vlastnosti vybraných kmeňov baktérií z hľadiska pochopenia interakcií, ktoré ovplyvňujú priebeh sorpčného deja.

Bol potvrdený značný vplyv experimentálnych podmienok (výber a navážka adsorbentu, pH prostredia pre bakteriálne bunky, výber použitej nádoby pre sorpčný experiment, kontaktný čas) na sorpčný proces v závislosti na použitom bakteriálnom kmeni. Je možné tvrdiť, že sa podarilo zostaviť vhodný modelový systém, opísať a overiť teoretické predpoklady vplyvu použitého adsorbentu na sorpčný proces. Vybrané bakteriálne kmene oboch baktérií prednostne sorbovali na porézne mikrosorbenty (Amberlite XAD-4, Supelite DAX-8, Amberlite IRA-900) oproti makrosorbentom (podložné mikroskopické sklíčko, sklenené guľôčky). Použitie mikrosorbentov preukázalo úspešnú účinnosť sorpčné procesu za zvolených experimentálnych podmienok, ktorá sa v závislosti na použitom mikrosorbente a baktérii menila. Bolo preukázané, že hydrofóbny efekt by mal predstavovať hnaciu silu celého sorpčného procesu. Vyskytli sa však nejasnosti pri vysvetlení možnej agregácie samotných častíc mikrosorbentov počas sorpčného procesu. Keďže toto overenie bolo už nad rámec časových možností pri realizácii predloženej práce, bolo by zaujímavé toto tvrdenie agregácie častí vo vodnom prostredí vyvrátiť resp. potvrdiť. Docielili by sme tak vyššiu účinnosť procesu. K tomu účelu by mohli byť použité metódy koloidnej analýzy napríklad DLS alebo sedimentačná analýza.

K dôkazu sorpcie buniek baktérie *Bacillus megaterium* na povrch mikrosorbentov boli použité sorbenty podrobené štruktúrnej analýze povrchu pomocou FTIR a zobrazené pomocou SEM. Zároveň bola preukázaná prítomnosť polyhydroxyalkanoátov, ktoré by mohli byť jedným z kľúčových parametrov, ktoré sa podieľajú na tvorbe biofilmu. Preto by bolo zaujímavé pre ďalšie štúdium bakteriálneho biofilmu použiť MALDI-TOF alebo prietokovú cytometriu.

7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- GARRETT, Trevor Roger, Manmohan BHAKOO a Zhibing ZHANG. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces [online]. 2008, 1049-1056 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/j.pnsc.2008.04.001. ISBN 10.1016/j.pnsc.2008.04.001. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1002007108002049
- [2] VERTES, Akos, Victoria HITCHINS a K. Scott PHILLIPS. Analytical Challenges of Microbial Biofilms on Medical Devices [online]. 2012, 3858–3866 [cit. 2018-03-25].
 DOI: 10.1021/ac2029997. ISBN 10.1021/ac2029997. Dostupné z: http://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac2029997
- FLEMMING, Hans-Curt a Jost WINGENDER. *The biofilm matrix* [online]. 2010, 623–633 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1038/nrmicro2415. ISBN 10.1038/nrmicro2415. Dostupné z: <u>http://www.nature.com/articles/nrmicro2415</u>
- [4] OKSHEVSKY, Mira a Rikke Louise MEYER. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms [online]. 2015, 341-352 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.3109/1040841X.2013.841639. ISBN 10.3109/1040841X.2013.841639. Dostupné z: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1040841X.2013.841639
- [5] HORI, Katsutoshi a Shinya MATSUMOTO. Bacterial adhesion: From mechanism to control [online]. 2010, 424-434 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/j.bej.2009.11.014.
 ISBN 10.1016/j.bej.2009.11.014. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X09003465
- [6] MONDS, Russell D. a George A. O'TOOLE. *The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review*[online]. 2009, 73–87 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/j.tim.2008.11.001. ISBN 10.1016/j.tim.2008.11.001. Dostupné z: <u>http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X09000055</u>
- [7] KATSIKOGIANNI, M a YF MISSIRLIS. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions [online]. 2004, 37-57 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.22203/eCM.v008a05. ISBN 10.22203/eCM.v008a05. Dostupné z: http://ecmjournal.org/journal/papers/vol008/pdf/v008a05.
- [8] PROFT, T. a E. N. BAKER. *Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria structure, assembly and their role in disease* [online]. 2008, 613-635 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1007/s00018-008-8477-4. ISBN 10.1007/s00018-008-8477-4. Dostupné z: <u>http://link.springer.com/10.1007/s00018-008-8477-4</u>
- [9] Cell-Surface Appendages of a Bacterial Cell. In: *Easy biology class* [online]. [cit. 2018-05-01]. Dostupné z: <u>http://www.easybiologyclass.com/difference-between-pili-and-flagella-of-bacteria-a-comparison-table/</u>
- [10] COSTERTON, J. Introduction to biofilm [online]. 1999, 59717 -3980 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/S0924-8579(99)00018-7. ISBN 10.1016/S0924-8579(99)00018-7. Dostupné z: <u>http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857999000187</u>
- [11] TOYOFUKU, Masanori, Tomohiro INABA, Tatsunori KIYOKAWA, Nozomu OBANA, Yutaka YAWATA a Nobuhiko NOMURA. *Environmental factors that shape biofilm formation* [online]. 2015, 1-6 [cit. 2018-03-25]. DOI:

10.1080/09168451.2015.1058701. ISBN 10.1080/09168451.2015.1058701. Dostupné z: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09168451.2015.1058701

- ROSCHE, Bettina, Xuan Zhong LI, Bernhard HAUER, Andreas SCHMID a Katja [12] BUEHLER. Microbial biofilms: a concept for industrial catalysis? [online]. 2009, 2018-03-25]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2009.08.001. 636-643 [cit. ISBN 10.1016/j.tibtech.2009.08.001. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779909001565
- [13] PROCHÁZKOVÁ Gita, Vladimír JIRKU, BARTOVSKÁ Lidmila a Tomáš BRÁNYIK. Použití fyzikálně-chemických nástrojů pro predikci mikrobiální adheze [online]. Chem. Listy, 2011, 115(11) [cit. 2018-03-25]. ISSN 0009-2770. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_11_856-863.pdf
- [14] REDMAN, Jeremy A., Sharon L. WALKER a Menachem ELIMELECH. Bacterial Adhesion and Transport in Porous Media: Role of the Secondary Energy Minimum [online]. 2004, 1777-1785 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1021/es0348871. ISBN 10.1021/es0348871. Dostupné z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es0348871
- ABSOLOM, Darryl R., Francis V. LAMBERTI, Zdenka POLICOVA, Walter [15] ZINGG, Carel J. VAN OSS, a A. Wilhelm NEUMANN. Surface thermodynamics of 90-97 [cit. bacterial adhesion. [online]. 1983, 2018-03-25]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/16782931_Surface_thermodynamics_of_bac terial adhesion
- HERMANSSON, Malte. The DLVO theory in microbial adhesion [online]. 1999, [16] 10.1016/S0927-7765(99)00029-6. 105-119 [cit. 2018-03-25]. DOI: **ISBN** 10.1016/S0927-7765(99)00029-6. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776599000296
- [17] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVA. Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav [online]. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, s. 162-167 [cit. 2018-03-25]. ISBN 80-7080-579-x. Dostupné 2005, Z: http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pages-pdf/163.html
- WITHERS, Helen, Simon SWIFT a Paul WILLIAMS. Quorum sensing as an integral [18] component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria [online]. 2001, , 2018-03-25]. 10.1016/S1369-5274(00)00187-9. 186-193 [cit. DOI: ISBN 10.1016/S1369-5274(00)00187-9. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527400001879
- [19] Hossein, Fatene MORADI a spol. *Quorum Sensing* SAGHI in Bacterial Pathogenesis [online]. 2015, 004-009 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.17352/2455-5363.000002. ISBN 10.17352/2455-5363.000002. Dostupné z: http://www.peertechz.com/Infectious-Diseases/GJIDCR-1-102.php
- [20] WATERS, Christopher M. a Bonnie L. BASSLER. QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria [online]. 2005, 8544-1014 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001. ISBN 10.1146/annurev.cellbio.21.012704 .131001. Dostupné z:

http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001

- [21] HØIBY, Niels, Thomas BJARNSHOLT, Michael GIVSKOV, Søren MOLIN a Oana CIOFU. Antibiotic resistance of bacterial biofilms [online]. 2010, 322-332 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011. ISBN 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857910000099
- [22] RUTHERFORD, S. T. a B. L. BASSLER. Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control [online]. 2012, 1-26 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1101/cshperspect.a012427. ISBN 10.1101/cshperspect.a012427. Dostupné z: http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a012427
- [23] Differences between Gram Positive and Gram Negative Bacteria. In: Microbioology Notes [online]. 2015 [cit. 2018-04-09]. Dostupné z: <u>https://microbiologyinfo.com/differences-between-gram-positive-and-gram-negative-bacteria/</u>
- [24] RENNER, Lars D. a Douglas B. WEIBEL. Physicochemical regulation of biofilm formation [online]. 2011, 347–355 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1557/mrs.2011.65. ISBN 10.1557/mrs.2011.65. Dostupné z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0883769411000650
- [25] AN, Yuehuei H. a J. FRIEDMAN. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces [online]. 1998, 43(3), 338-348 [cit. 2018-03-25]. Dostupné z: <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9730073</u>
- [26] KRASOWSKA, Anna a Karel SIGLER. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? [online]. 2014, 1-7 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00112. ISBN 10.3389/fcimb.2014.00112. Dostupné z: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2014.00112/abstract
- [27] FACCIN, Débora Jung Luvizetto, Mariana Pacheco CORRÊA, Rosane RECH, Marco Antônio Záchia AYUB, Argimiro Resende SECCHI a Nilo Sérgio Medeiros CARDOZO. *Modeling P(3HB) production by Bacillus megaterium* [online]. 2011 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1002/jctb.2713. ISBN 10.1002/jctb.2713. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.2713.
- [28] SAMONIN, V. V. a E. E. ELIKOVA. A study of the adsorption of bacterial cells on porous materials [online]. 2001, 696–701 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1007/s11021-005-0011-1. ISBN 10.1007/s11021-005-0011-1. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s11021-005-0011-1
- [29] LI, Baikun a Bruce E LOGAN. Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces [online]. 2004, 81-90 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2004.05.006. ISBN 10.1016/j.colsurfb.2004.05.006. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092777650400133X
- [30] RYALL, Ben, Xiaoyun LEE, James E.A. ZLOSNIK, Saiko HOSHINOA a Huw D WILLIAMS. Bacteria of the Burkholderia cepacia complex are cyanogenic under biofilm and colonial growth conditions [online]. 2008 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1186/1471-2180-8-108. ISBN 10.1186/1471-2180-8-108. Dostupné z: http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-8-108

- [31] SHOMMU, Nusrat S., Hans J. VOGEL a Douglas G. STOREY. Potential of metabolomics to reveal Burkholderia cepacia complex pathogenesis and antibiotic resistance [online]. 2015, 277-86 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00668. ISBN 10.3389/fmicb.2015.00668. Dostupné z: http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.00668/abstract
- [32] CHIARINI, Luigi, Annamaria BEVIVINO, Claudia DALMASTRI, Silvia TABACCHIONI a Paolo VISCA. Burkholderia cepacia complex species: health hazards and biotechnological potential [online]. 2006, 277-86 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/j.tim.2006.04.006. ISBN 10.1016/j.tim.2006.04.006. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X06000990
- [33] VAN ACKER, Heleen, Andrea SASS, Silvia BAZZINI, et al. Biofilm-Grown Burkholderia cepacia Complex Cells Survive Antibiotic Treatment by Avoiding Production of Reactive Oxygen Species[online]. 2013 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1371/journal.pone.0058943. ISBN 10.1371/journal.pone.0058943. Dostupné z: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0058943
- [34] VARY, Patricia S., Rebekka BIEDENDIECK, Tobias FUERCH, Friedhelm MEINHARDT, Manfred ROHDE, Wolf-Dieter DECKWER a Dieter JAHN. Bacillus megaterium—from simple soil bacterium to industrial protein production host [online]. 2007, 957-67 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1007/s00253-007-1089-3. ISBN 10.1007/s00253-007-1089-3. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s00253-007-1089-3
- [35] Genome Portal. *Burkholderia Cepacia* [online]. 2004 [cit. 2018-03-25]. Dostupné z: https://genome.jgi.doe.gov/portal/bur94/bur94.home.html
- [36] BERGERSEN, F. J. A Probable Growth Cycle in Bacillus megaterium [online]. 1953, 26-29 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1099/00221287-9-1-26. ISBN 10.1099/00221287-9-1-26.
 Lostupné z: http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-9-1-26
- [37] ROMERO, C.M., P.V. MARTORELL, A. Gómez LÓPEZ, C.G. Nieto PEÑALVER, S. CHAVES a M. MECHETTI. Architecture and physicochemical characterization of Bacillus biofilm as a potential enzyme immobilization factory [online]. 2017, 246-255
 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.11.057. ISBN 10.1016/j.colsurfb.2017.11.057. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776517307981
- [38] ROY CHOWDHURY, Sougata, Ratan KUMAR BASAK, Ramkrishna SEN a Basudam ADHIKARI. Production of extracellular polysaccharide by Bacillus megaterium RB-05 using jute as substrate [online]. 2011, 6629-32 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.03.099. ISBN 10.1016/j.biortech.2011.03.099. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852411004585
- [39] SATPATHY, Soumya, Sudip Kumar SEN, Smaranika PATTANAIK a Sangeeta RAUT. *Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination* [online].
 2016, 56-66 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/j.bcab.2016.05.002. ISBN 10.1016/j.bcab.2016.05.002. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878818116300937

- [40] SRIVASTAVA, Shilpi a Atul BHARGAVA. *Biofilms and human health*[online].
 2016, 1-22 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1007/s10529-015-1960-8. ISBN 10.1007/s10529-015-1960-8. Dostupné z: <u>http://link.springer.com/10.1007/s10529-015-1960-8</u>
- [41] NAIK, Kshipra, Pallavee SRIVASTAVA, Ketaki DESHMUKH, M MONSOOR S a Meenal KOWSHIK. Nanomaterial-Based Approaches for Prevention of Biofilm-Associated Infections on Medical Devices and Implants [online]. 2015, 10108–10119
 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1166/jnn.2015.11688. ISBN 10.1166/jnn.2015.11688. Dostupné z: <u>https://www.researchgate.net/publication/290978594_Nanomaterial-Based_Approaches_for_Prevention_of_Biofilm-</u> Associated_Infections_on_Medical_Devices_and_Implants
- [42] RAMASAMY, Mohankandhasamy a Jintae LEE. Recent Nanotechnology Approaches for Prevention and Treatment of Biofilm-Associated Infections on Medical Devices [online]. 2016, 17 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1155/2016/1851242. ISBN 10.1155/2016/1851242. Dostupné z: https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/1851242/
- [43] FLEMING, Derek a Kendra RUMBAUGH. Approaches to Dispersing Medical Biofilms [online]. 2017 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.3390/microorganisms5020015. ISBN 10.3390/microorganisms5020015. Dostupné z: <u>http://www.mdpi.com/2076-2607/5/2/15</u>
- [44] FRANCOLINI, Iolanda a Gianfranco DONELLI. Prevention and control of biofilmbased medical-device-related infections[online]. 2010, 227-38 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2010.00665.x. ISBN 10.1111/j.1574-695X.2010.00665.x. Dostupné z: <u>https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2010.00665.x</u>
- [45] QU, Wenwen, Henk J. BUSSCHER, Johanna M.M. HOOYMANS a Henny C. VAN DER MEI. Surface thermodynamics and adhesion forces governing bacterial transmission in contact lens related microbial keratitis [online]. 2011, 430-436 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/j.jcis.2011.03.062. ISBN 10.1016/j.jcis.2011.03.062. Dostupné z: <u>http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979711003602</u>
- [46] HALAN, Babu, Katja BUEHLER a Andreas SCHMID. *Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses* [online]. 2016, 453-465 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.05.003. ISBN 10.1016/j.tibtech.2012.05.003. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779912000741
- [47] SFAELOU, Stavroula, Hrissi K. KARAPANAGIOTI a John VAKROS. Studying the Formation of Biofilms on Supports with Different Polarity and Their Efficiency to Treat Wastewater [online]. 2015 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1155/2015/734384. ISBN 10.1155/2015/734384. Dostupné z: http://www.hindawi.com/journals/jchem/2015/734384/
- [48] ONG, Yea-Ling, Anneta RAZATOS, George GEORGIOU a Mukul M. SHARMA. Adhesion Forces between E. c oli Bacteria and Biomaterial Surfaces [online]. 1999, 2719-2725 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1021/la981104e. ISBN 10.1021/la981104e. Dostupné z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la981104e

- [49] PEMBREY, Richard S., Kevin C. MARSHALL a René P. SCHNEIDER. Cell Surface Analysis Techniques: What Do Cell Preparation Protocols Do to Cell Surface Properties? [online]. 1999, 65(7), 2877-2894 [cit. 2018-03-25]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91432/
- [50] DENKHAUS, Evelin, Stefan MEISEN, Ursula **TELGHEDER** a Jost WINGENDER. Chemical and physical methods for characterisation of biofilms [online]. 2007, 1-27 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1007/s00604-006-0688-5. **ISBN** 10.1007/s00604-006-0688-5. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s00604-006-0688-5
- [51] NEU, Thomas R. a John R. LAWRENCE. Innovative techniques, sensors, and approaches for imaging biofilms at different scales[online]. 2015, 419-20 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/j.tim.2014.12.010. ISBN 10.1016/j.tim.2014.12.010. Dostupné z: <u>http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X14002674</u>
- [52] AZEREDO, Joana, Nuno F. AZEVEDO, Romain BRIANDET, et al. *Critical review* on biofilm methods [online]. 2016, 1549-7828 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1080/1040841X.2016.1208146. ISBN 10.1080/1040841X.2016.1208146. Dostupné z: <u>https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1040841X.2016.1208146</u>
- [53] GEOGHEGAN, Mark, Johanna S. ANDREWS, Catherine A. BIGGS, et al. *The polymer physics and chemistry of microbial cell attachment and adhesion* [online].
 2007 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1039/b717046g. ISBN 10.1039/b717046g. Dostupné z: http://xlink.rsc.org/?DOI=b717046g
- [54] BOS, Rolf, Henny C. VAN DER MEI a Henk J. BUSSCHER. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions its mechanisms and methods for study [online]. 1999, 179-230 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1999.tb00396.x. ISBN 10.1111/j.1574-6976.1999.tb00396.x. Dostupné z: https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00396.x
- [55] UBBINK, Job a Prisca SCHÄR-ZAMMARETTI. Probing bacterial interactions: integrated approaches combining atomic force microscopy, electron microscopy and biophysical techniques[online]. 2005, 293-320 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/j.micron.2004.11.005. ISBN 10.1016/j.micron.2004.11.005. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968432805000077
- [56] SCHLAFER, Sebastian a Rikke L. MEYER. Confocal microscopy imaging of the biofilm matrix [online]. 2016, 50-59 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.03.002. ISBN 10.1016/j.mimet.2016.03.002. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701216300367
- [57] LIN, Nancy J. Biofilm over teeth and restorations: What do we need to know? [online]. 2017, 667-680 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/j.dental.2017.03.003. ISBN 10.1016/j.dental.2017.03.003. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0109564117300738
- [58] PEREIRA, Flávio D.E.S., Cínthia C. BONATTO, Cláudio A.P. LOPES, Alex L. PEREIRA a Luciano P. SILVA. Use of MALDI-TOF mass spectrometry to analyze the molecular profile of Pseudomonas aeruginosa biofilms grown on glass and plastic

surfaces [online]. 2015, 32-37 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/j.micpath.2015.07.005. ISBN 10.1016/j.micpath.2015.07.005. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401015001059

- [59] KIM, Jeongyun, Manjunath HEGDE, Sun Ho KIM, Thomas K. WOOD a Arul JAYARAMAN. A microfluidic device for high throughput bacterial biofilm studies [online]. 2012, 1157-63 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1039/C2LC20800H. ISBN 10.1039/c2lc20800h. Dostupné z: <u>http://xlink.rsc.org/?DOI=c2lc20800h</u>
- [60] RAZATOS, A., Y.-L. ONG, M. M. SHARMA a G. GEORGIOU. Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy [online].
 1998 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1073/pnas.95.19.11059. ISBN 10.1073/pnas.95.19.11059. Dostupné z: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.95.19.11059
- [61] KAWABATA, N., T. HAYASHI a T. MATSUMOTO. Removal of bacteria from water by adhesion to cross-linked poly(vinylpyridinium halide). [online]. 1983, 2005, 203–210 [cit. 2018-04-13]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC239289/
- [62] 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 [online]. 2014 [cit. 2018-04-11]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.02.023. ISBN 10.1016/j.colsurfb.2014.02.023. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776514000903
- [63] KODÍČEK, Milan a Vladimír KARPENKO. *Biofyzikální chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1997. ISBN 80-7080-273-1
- [64] MERRICK, J. M. Biopolymers: Polyesters I: Biological Systems and Biotechnological Production. Weinheim: Wiley-VCH, 2002, s. 105-122. ISBN 3-527-30224-7.
- [65] KESHAVARZ, Tajalli a Ipsita ROY. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda [online]. [cit. 2018-05-04]. DOI: 10.1016/j.mib.2010.02.006. ISBN 10.1016/j.mib.2010.02.006. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527410000275

8 ZOZNAM POUŽITÝCH ZKRATIEK A SYMBOLOV

AAS	Atomová absorbčná spektrometria
AFM	Mikroskopia atomárných síl
BATH	Bacterial adhesion to hydrocarbons
CE	Frakcionácia tokom v poli
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CL	Plynová chromatografia
CLSM	Konfokálna laserová skenovacia mikroskopia
DLS	Dynamický rozptyl svetla
DLVO	Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeekova teória
ELS	Elektroforetický rozptyl svetla
EPS	Extracelulárne polymérne látky
FFF	Kvapalinová chromatografia
FISH	Fluorescenčná in situ hybridizácia
GC	Mikrosenzory
h	Hodina
IR	Ifračervená spektroskopia
MALDI-TOF	Kapilárna elektroforéza
MATH	Microbial adhesion to hydrocarbons
min	Minúta
NMR	Nukleárna magnetická rezonancia
OCT	Optická koherentná tomografia
PCR	Polymerázová reťazová reakcia
PDMS	Polydimetylsiloxan
QS	Quorum sensing
RTG	Rentgenová spektroskopia
SEM	Snímacia elektronová mikroskopia
XDLVO	Rozšírená Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeekova teória
ZP	Zeta potenciál
9 PRÍLOHY



Príloha 1: Snímka baktérie Bacillus megaterium po sorpčnom experimente s mikroadsorbentom Amberlite IRA-900 naviazaná na jeho povrchu (zväčšenie 10 000x)



Príloha 2: Snímka baktérie Bacillus megaterium po sorpčnom experimente s mikroadsorbentom Amberlite IRA-900 naviazaná na jeho povrchu (zväčšenie 500x)



Príloha 3: Snímka baktérie Bacillus megaterium po sorpčnom experimente s mikroadsorbentom Amberlite XAD-4



Príloha 4: Snímka baktérie Bacillus megaterium po sorpčnom experimente s mikroadsorbentom Supelite DAX-8