

Povrchové a elektrokinetické vlastnosti bakterií jogurtových kultur

Bc. Jana Knébllová

Diplomová práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav biochemie a analýzy potravin
akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jana KNÉBLOVÁ**
Osobní číslo: **T08873**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Povrchové a elektrokinetické vlastnosti bakterií jogurtových kultur**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Zpracujte rešerši na zadané téma
2. Citujte použitou literaturu
3. Získané poznatky shrňte v kapitole "závěr"

II. Praktická část

1. V experimentální části popište použité metody charakterizace a metodické postupy
2. Porovnejte povrchové vlastnosti bakterií jogurtových kultur
3. Porovnejte elektrokinetické vlastnosti bakterií jogurtových kultur

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] Rosenberg M. 1981. Bacterial adherence to polystyrene: a replica method of screening for bacterial hydrophobicity. *Appl Environ Microbiol* 42(2): 375--377.

[2] van Oss CJ. 1997. Hydrophobicity and hydrophilicity of biosurfaces. *Curr Opin Coll Interf Sci* 2: 503--512.

[3] Amaral P.F.F., Lehocký M., Barros-Timmons A.M.V., Rocha-Leao M.H.M., Coelho M.A.Z., Coutinho J.A.P. 2006. Cell surface characterization of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. *Yeast* 23: 867-877.

[4] Dle doporučení vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.**
Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání diplomové práce: **4. ledna 2010**

Termín odevzdání diplomové práce: **19. května 2010**

Ve Zlíně dne 8. dubna 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně *10.5.2010*

Jana Knéblová
.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá popisem povrchových a elektrokinetických vlastností vybraných mikrobiálních systémů, které jsou přítomny v produktech mlékárenského průmyslu. Tyto mikroorganismy jsou *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

Vlastnosti těchto mikroorganismů byly studovány pomocí běžných metod sloužících k popisu povrchových a elektrokinetických vlastností. Mezi ně patří zejména studium adheze na polystyren, MATH test, MATS test a měření elektrokinetického (zeta potenciálu).

Klíčová slova: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, povrchové vlastnosti, zeta potenciál.

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on description of the surface and electrokinetic properties of selected bacterial strains which are present in milk industry products. These microorganisms are *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

Their properties were studied by using of commonly available methods for the description of surface and electrokinetic properties. Selected methods were adhesion to polystyrene substrate, MATH test, MATS test and evaluation of electrokinetic (zeta) potential.

Keywords: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, surface properties, zeta potential.

Úvodem této bakalářské práce bych ráda poděkovala všem, kteří mi poskytli informace k danému tématu. Zejména svému vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Mariánu Lehockému, Ph.D. za připomínky a cenné rady.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	12
1.1 MLÉKAŘSKÉ KULTURY	12
1.1.1 Jogurtové kultury.....	13
1.2 MLÉČNÉ KVAŠENÍ.....	13
1.2.1 Typy mléčného kvašení.....	13
1.2.1.1 Homofermentativní mléčné kvašení	13
1.2.1.2 Heterofermentativní mléčné kvašení	14
2 ZÁKLADNÍ JOGURTOVÉ KULTURY A JEJICH VLASTNOSTI	15
2.1 ČELEĎ <i>STREPTOCOCCACEAE</i>	15
2.1.1 Rod <i>Streptococcus</i>	15
2.1.1.1 <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	16
2.2 ČELEĎ <i>LACTOBACILLACEAE</i>	17
2.2.1 Rod <i>Lactobacillus</i>	17
2.2.1.1 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	18
3 POVRCHOVÉ VLASTNOSTI MIKROORGANISMŮ.....	20
3.1.1 Buněčná stěna.....	20
3.1.1.1 Buněčná stěna gram pozitivních bakterií.....	21
3.1.2 Fyzikální a chemická charakteristika bakterií	22
3.1.3 Elektrický náboj	23
3.1.4 Meziatomární interakce.....	24
3.1.4.1 Elektrostatické interakce.....	25
3.1.4.2 Van der Waalsovy interakce	25
3.1.4.3 Hydrofobní interakce	26
3.1.4.4 Vodíkové vazby	26
3.1 HYDROFOBICITA.....	27
3.1.1 Mikrobiální adheze k rozpouštědlu.....	27
3.1.2 Mikrobiální adheze k uhlovodíkům	28
3.1.3 Kontaktní úhly.....	28
3.2 ADHEZE MIKROORGANIZMŮ	29
4 ELEKTROKINETICKÉ VLASTNOSTI MIKROORGANISMŮ.....	32
4.1 ELEKTROKINETICKÉ JEVY	32
4.1.1 Elektrokinetický potenciál – zeta potenciál.....	32
4.1.1.1 Elektrická dvojvrstva	34
4.1.1.2 Modely elektrické dvojvrstvy	35
4.1.2 Elektroforéza	39
4.1.3 Elektroosmóza.....	40
4.1.4 Sedimentační potenciál	40
4.1.5 Proudový potenciál.....	41
II PRAKTICKÁ ČÁST	43

5	CÍLE PRÁCE	44
6	MATERIÁL A METODY	45
6.1	POUŽITÉ MIKROORGANISMY	45
6.2	CHEMIKÁLIE	45
6.3	PŘÍSTROJE A POMŮCKY	46
6.4	METODY	46
6.4.1	Kultivace bakteriálních buněk.....	46
6.4.1.1	Kultivační půdy.....	46
6.4.2	Přilnavost na polystyren	47
6.4.3	Mikrobiální adheze k rozpouštědлу (MATS)	48
6.4.4	Mikrobiální adheze k uhlovodíkům (MATH).....	48
6.4.5	Zeta potenciál	49
7	VÝSLEDKY A DISKUSE	50
7.1	PŘILNAVOST NA POLYSTYREN	50
7.2	MATS TEST.....	55
7.3	MATH TEST	57
7.4	MĚŘENÍ ZETA POTENCIÁLU	59
	ZÁVĚR	61
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	63
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	71
	SEZNAM OBRÁZKŮ	72
	SEZNAM TABULEK.....	73

ÚVOD

Popis povrchových a elektrokinetických vlastností mikrobiálních soustav má zásadní význam pro jejich studium z pohledu akademického i průmyslového. Vnější povrch bakterií zprostředkovává velké množství interakcí dané buňky s okolím. Mezi tyto interakce můžeme řadit ku příkladu jejich adhezenci, flokulaci, antigenicitu a nebo vázání makromolekul. Porozumění těchto komplexních funkcí vyžaduje detailní znalosti chemického složení jejich povrchu a taktéž jejich molekulární a strukturální rozložení na povrchu. Taktéž růst mikroorganismů přímo závisí na vlastnostech jejich okolí. Povrch buňky je zodpovědný za transport živin z okolí, se kterým je v neustálém kontaktu. Tento proces přichází v úvahu pro přímou absorpci hydrofobních částic na buněčnou stěnu, nebo může být zprostředkován pomocí povrchově aktivních látek, nebo-li surfaktantů.

V případě přímé adsorpce přichází v úvahu několik mechanismů, které zahrnují hydrofobní, Lewisovy, elektrostatické nebo van der Waalovy interakce.

V dostupné literatuře je poměrně rozsáhle a precizně rozpracována teorie koagulace a adsorpce. Teorie koagulace je založena na faktu, že mikroorganismy povrchově reagují nejlépe s dalšími mikroorganismy, váží se na sebe mezimolekulovými silami a tvoří shluky.

Tento jev však z průmyslového hlediska není příliš žádoucí a projevuje se trvalá snaha o stabilizaci buněčných systémů. Tato stabilita je charakterizována především lepšími povrchovými interakcemi s okolím oproti interakcím s dalšími buňkami, a tím vytvoření koloidního roztoku o vysoké stabilitě.

Tyto vlastnosti jsou závislé na mnoha faktorech. Jedním z nejzásadnějších faktorů je chemické složení roztoku, který kromě mikroorganismů tvoří buněčnou suspenzi. Tento roztok by měl vykazovat v závislosti na zvoleném mikroorganismu vhodné pH a taktéž co možná nejnižší iontovou sílu. Při vysoké iontové síle se může totiž stát, že elektrická dvojvrstva v okolí mikroorganismu bude stlačena natolik, že dochází k nežádoucí interakci buňka–buňka.

Ač to na první pohled nevypadá, elektrokinetické a fyzikálně chemické parametry povrchů spolu vzájemně výrazným způsobem souvisí a komplexním součtem těchto interakcí získáme pro dané prostředí popis adhezních vlastností mikroorganismů na zvolený substrát, který zahrnuje podíl veškerých interakcí vznikajících na povrchu buňky.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Bakterie mléčného kvašení jsou bakterie, které syntetizují z cukrů kyselinu mléčnou jako konečný metabolický produkt [1]. Jsou to především grampozitivní, anaerobní, nesporulující a acidotolerantní bakterie. Dělí se podle hlavních produktů na homofermentativní a heterofermentativní [2]. Mezi mléčné bakterie řadíme zejména rody *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* [3].

Bakterie mléčného kvašení se vyskytují volně v přírodě (např. odpadní vody, ovoce a ovocné šťávy). Jsou součástí produktů potravinářského průmyslu – mléčné a obilné výrobky, maso a rybí výrobky, pivo, nakládaná zelenina, kysané zelí a další. Vyskytují se také jako přirozená mikroflóra v ústech, intestinálním traktu mnohých živočichů včetně člověka [4].

1.1 Mlékařské kultury

Čisté mlékařské kultury (ČMK) jsou účelově zaměřené druhy specifických mikroorganismů, které vyvolávají a zajišťují správný průběh výrobního procesu k dosažení žádané jakosti hotového výrobku [5]. Mlékařské kultury (především bakterie mléčného kvašení) představují směs jednoho nebo několika kmenů mikroorganismů [6]. Jako monokultury se v mlékárenské výrobě používají mikroorganismy, které obsahují jen jeden kmen jednoho druhu mikroorganismů, popř. jestliže obsahují více kmenů jednoho druhu mikroorganismů, dále jako směsné bakteriální kultury, jestliže obsahují více druhů a kmenů bakterií, a konečně jako směsné kultury bakteriální a kvasinkové, jestliže obsahují více druhů a kmenů bakterií i kvasinek zkvašujících laktózu [7]. Některé monokultury jsou využívány k sestavování směsných kultur. Tyto směsné kultury se pak většinou nazývají podle výrobku, k jehož výrobě slouží, např. kultura jogurtová (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*), keřfírová (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus casei*, *Candida kefir*), smetanová (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetilactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*) [7].

1.1.1 Jogurtové kultury

Jogurtové kultury patří mezi termofilní bakterie mléčného kvašení (BMK), které mají pro mlékárenský průmysl dalekosáhlý význam. Umožňují výrobu fermentovaných mléčných výrobků i po ošetření mléka. Ačkoli jsou bakterie mléčného kvašení primárně využívány pro rychlou produkci kysaných potravinových výrobků, podílejí se také na vzniku příchutí, konzistence a nutriční hodnoty výrobků [5].

1.2 Mléčné kvašení

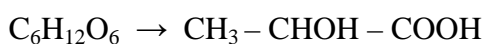
Podle produktu metabolismu rozdělujeme bakterie mléčného kvašení na homofermentativní nebo heterofermentativní.

1.2.1 Typy mléčného kvašení

1.2.1.1 Homofermentativní mléčné kvašení

Homofermentativní mléčné kvašení je proces štěpení polysacharidů na kyselinu mléčnou přes pyruvát cestou glykolýzy. Glykolýza slouží k uvolnění energie z molekul sacharidů. Glykolýzou se přeměňuje glukosa na pyruvát za současné tvorby dvou molekul adenosintrifosfátu (ATP). Za anaerobních podmínek probíhá další degradace pyruvátu jako alkoholové kvašení u kvasinek nebo redukce na kyselinu mléčnou (laktát) u mléčných bakterií [6].

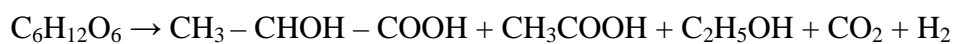
Homofermentativními mléčnými bakteriemi jsou např. *Lacococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*) [7]. Homofermentativní mléčné kvašení [8] probíhá dle rovnice:



V závislosti na stereospecificitě laktátdehydrogenázy a za přítomnosti laktátracemázy může vznikat D (-), L (+) nebo DL kyselina mléčná [9].

1.2.1.2 Heterofermentativní mléčné kvašení

Při heterofermentativním mléčném kvašení se vytváří kromě kyseliny mléčné ještě ethanol, kyselina octová a glycerol [9]. Za aerobních podmínek je pyruvát oxidován na vodu a CO₂ přes citrátový cyklus a oxidační fosforylaci. Oxidačním činidlem při glykolýze je NAD⁺. Příkladem mikroorganismů schopných heterofermentativního mléčného kvašení mohou být *Lactobacillus brevis* a *Lactobacillus fermentum* [8]. Heterofermentativní mléčné kvašení probíhá dle rovnice: [10]



2 ZÁKLADNÍ JOGURTOVÉ KULTURY A JEJICH VLASTNOSTI

2.1 Čeled' *Streptococcaceae*

Čeled' *Streptococcaceae* patří do domény *Bacteria*, kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Lactobacillales*.

Čeled' *Streptococcaceae* zahrnuje rody *Streptococcus*, *Lactococcus* a *Lactovum*.

Patří sem patogenní, saprofytické i biotechnologicky využívané druhy. Buňky jsou kulovité nebo oválné, vyskytují se po dvou nebo v řetízcích rozmanité délky. Katalázu netvoří a neredukují dusičnany na dusitany. Jsou grampozitivní, většinou fakultativně anaerobní, nepohyblivé a netvoří endospory [11]. Vzhled kolonií jednoho druhu může být ovlivněn teplotou, zdrojem dusíku i jinými látkami. Přechází od formy drsné až po formu mukoidní. Některé druhy mohou být nutričně náročné a vyžadují komplexní médium. Čeled' *Streptococcaceae* můžeme rozlišit podle sérologických hledisek na skupiny A, B, C, D, E, F, G, H, K a N. Při rozlišování rodů se především posuzuje vztah ke krevnímu barvivu [5]. Metabolismus je fermentatorní, kdy z cukrů tvoří kyselinu mléčnou, octovou, mravenčí, ethanol a CO₂ [11].

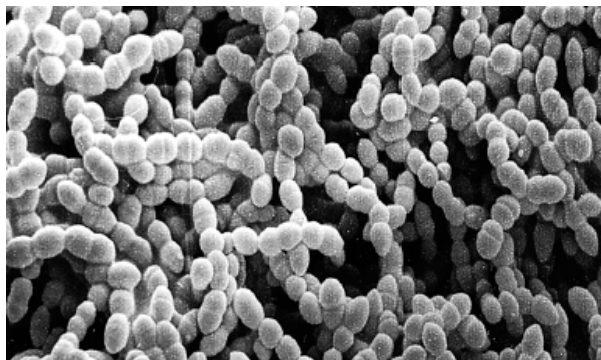
2.1.1 Rod *Streptococcus*

Buňky bakterií rodu *Streptococcus* jsou kulovité, většinou nepohyblivé a netvoří spóry. Pokud rostou v tekutém médiu, jsou uspořádané v párech, kratších či delších řetízcích. Bakterie rodu *Streptococcus* jsou homofermentativní, tzn. že fermentují sacharidy hlavně na kyselinu mléčnou. Ve vztahu ke kyslíku jsou aerobní a fakultativně anaerobní. Rostou v rozmezí teplot 25 až 45 °C s optimem 37 °C [13]. Streptokoky jsou děleny do čtyř skupin na pyogenní, orální, ostatní a anaerobní [11]. Z rodu *Streptococcus* byly v poslední době vyčleněny nehemolyzující nepatogenní druhy používané v mlékárenském průmyslu a byly zařazeny do nově vytvořeného rodu *Enterococcus* a *Lactococcus* [3]. V mlékařském průmyslu jsou používány streptokoky: *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* [3].

2.1.1.1 *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

Dříve se tento druh označoval jako *Streptococcus thermophilus*. Toto označení se doposud používá v běžném mlékárenském provozu. Dále jen *Streptococcus thermophilus*.

Streptococcus thermophilus (obr. 1.) je hlavní mlékařskou kulturou používanou při výrobě jogurtů a vysokodohříváných sýrů (eidam, ementál) [12].



Obr. 1. *Streptococcus thermophilus*, elektronový mikroskop [62]

Streptococcus thermophilus tvoří kokovité nebo oválné buňky v párech nebo různě dlouhých řetězcích. Velikost buňky se pohybuje mezi 0,7-1,0 μm . Vyskytuje se v lidských slinách, intestinálním traktu člověka a zvířat. Je katalázanegativní a oxidázanegativní. Sacharidy zkvašuje homofermentativně na pravotočivou kyselinu mléčnou. Štěpí také kasein. Jedná se o termofilní bakterii mléčného kvašení, optimální růstová teplota se pohybuje v rozpětí 37–42 °C [14]. Uplatňuje se při výrobě klasického jogurtu v kombinaci s kulturou *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* v poměru 1:2 až 2:1. Je známo, že směs obou těchto druhů mikroorganismů prokysává mléko rychleji než každý z nich sám. V jogurtové kultuře se nejdříve a poměrně rychle rozmnožují streptokoky [15]. Jejich růst stimuluje *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, který rozkladem bílkovin mléka uvolňuje aminokyseliny, důležité pro růst a rozvoj termofilních streptokoků. Nejdůležitější a nejnezbytnější je valin. *Streptococcus thermophilus* naopak vytváří kyselinu mléčnou, která snižuje pH média na optimum pro růst bakterie *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a kyselinu mravenčí ovlivňující metabolismus. Dále spotřebovává kyslík, čímž podporuje růst bifidobakterií [13].

Streptococcus thermophilus a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* jsou podle nedávných studií považovány za prospěšné bakterie (probiotika), protože prokazují zdravotní výhody lidskému organismu. Byla prokázána aktivita jogurtových bakterií v zažívacím ustrojí během gastrointestinálního průchodu a probiotický účinek [14]. Jogurt se zvýšenou odolností proti inhibičním látkám obsahuje kromě mikrobiálních složek klasického jogurtu ještě *Lactobacillus acidophilus* a *Pediococcus acidilactici* [13].

2.2 Čeleď *Lactobacillaceae*

Čeleď *Lactobacillaceae* řadíme do domény *Bacteria*, kmenu *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Lactobacillales*.

Čeleď *Lactobacillaceae* zahrnuje v současnosti tři rody klasických bakterií mléčného kvašení: *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*. Tato čeleď byla vyčleněna na základě sekvencování genomu pro 16S rDNA ze skupiny grampozitivních bakterií s nízkým procentuálním obsahem G + C. Jsou tvořeny pravidelnými, nesporulujícími, grampozitivními tyčinkami nebo koky. Patří sem nepigmentující, mezofilní, chemoorganotrofní druhy, které rostou pouze na kompletním médiu. [11].

2.2.1 Rod *Lactobacillus*

Do rodu *Lactobacillus* patří zejména tyto druhy: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (dříve jenom *Lactobacillus lactis*), *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum* a další druhy [12].

Buňky mají tvar pravidelných tyčinek, občas také koků. Vyskytují se jednotlivě i v řetízích, někdy tvoří vláknité formy. Jsou grampozitivní, nesporulující, fakultativně anaerobní, občas mikroaerofilní. Někteří zástupci vyžadují při izolaci anaerobní podmínky. Obecně platí, že přítomnost 5% CO₂ podporuje růst laktobacilů. Neredukují dusičnany na dusitany a netvoří indol. Optimální růstová teplota se pohybuje v rozmezí teplot 30 až 40 °C a optimální pH mezi 5,5 až 6,2 [11]. Laktobacily jsou široce rozšířené v prostředí, obzvláště v potravinách živočišného nebo rostlinného původu, v nápojích, čisté i znečištěné vodě, kysaném zelí. U člověka je můžeme izolovat např. z dutiny ústní, dásní a slin [13].

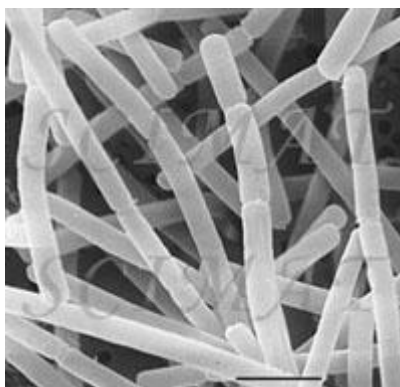
Na základě konečných produktů fermentace cukrů je můžeme rozdělit do tří skupin:

- Obligátně homofermentativní: hexózy fermentují výhradně na kyselinu mléčnou (např. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*).
- Fakultativně heterofermentativní: hexózy fermentují na kyselinu mléčnou nebo na směs kyseliny mléčné, octové, mravenčí a etanolu. Pentózy fermentují na kyselinu mléčnou a octovou (např. *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*).
- Obligátně heterofermentativní: hexózy fermentují na kyselinu mléčnou, octovou (ethanol) a CO₂. Pentózy fermentují na kyselinu mléčnou a octovou (např. *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*) [11].

2.2.1.1 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Dříve se tento druh označoval pouze jako *Lactobacillus bulgaricus* nebo *Lactobacterium bulgaricum*. Druhové jméno je odvozeno od Bulharska, odkud výroba jogurtů pochází.

Dále jen *Lactobacillus bulgaricus*. *Lactobacillus bulgaricus* (obr. 2.) je grampozitivní, termofilní tyčinka dlouhá 4–12 μm a široká 0,8–1,5 μm [12].



Obr. 2. *Lactobacillus bulgaricus*
[73]

Vyskytuje se jednotlivě, v řetězcích přecházejících někdy až do vláken. Vlivem teploty, povahy a koncentrace dusíkatých látek má tendenci měnit tvar a granulovat. V mléce tvoří zpravidla kyselinu mléčnou inaktivní, podle některých autorů však i levotočivou, popř. i pravotočivou. Dále vzniká i nepatrné množství kyseliny octové, mravenčí a jantarové. Z uhlovodíků fermentuje laktózu, glukózu a galaktózu. Roste na agarových půdách

běžných pro bakterie mléčného kvašení. Při optimální teplotě 45 až 50 °C sráží mléko, které během 3 až 4 hodin ztuhne v celé hmotě na porcelánovitou kompaktní hmotu [13].

Kmeny *Lactobacillus bulgaricus* jsou spolu s *Streptococcus thermophilus* součástí mikroflóry směsných jogurtových kultur užívaných pro různé technologie výroby jogurtů i dalších produktů. Rovněž mohou být aplikovány jako složka doplňkových kultur, které ovlivňují průběh zrání a specifické vlastnosti sýrů [12]. Na začátku zrání produkuje *Streptococcus thermophilus* růstové látky, které stimulují vývoj *Lactobacillus bulgaricus*.

Tato symbióza se projevuje příznivě i ve vlastnostech jogurtu např. tvorbou typické vůně. *Lactobacillus bulgaricus* je hlavním producentem acetaldehydu [15].

3 POVRCHOVÉ VLASTNOSTI MIKROORGANISMŮ

Definice povrchu mohou být různé. Povrch je možno chápat jako rozhraní mezi pevným objektem a jeho okolím. Při vzájemné interakci tělesa s okolím působí na jeho povrch fyzikální, chemické a jiné síly [16]. Bakteriální povrch je velmi důležitý, protože na povrchových vlastnostech buněk je závislá jednak adheze na pevné povrchy, flokulace a koagulace [17]. Změny v povrchových vlastnostech bakterií doprovázejí změny v jejich prostředích.

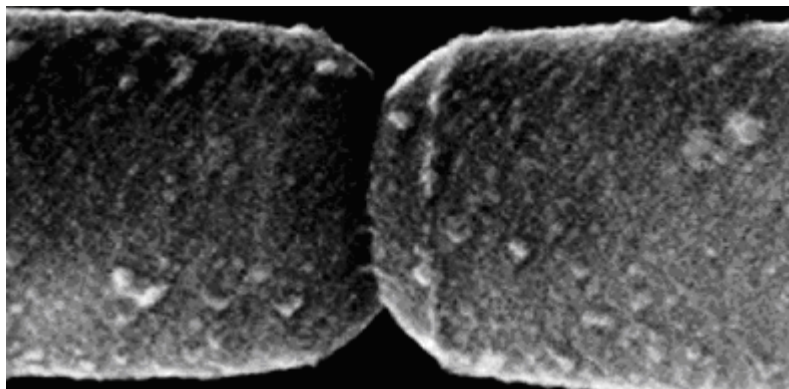
Bakteriální povrchy na rozhraní pevná látka–kapalina a plyn–kapalina mají elektrický náboj za fyziologických podmínek pH (1–3) obvykle negativní [18]. V mnoha případech je chování bakterií mléčného kvašení závislá na meziplošných procesech, tím i na povrchu buněk, fyzikálně-chemických vlastností a chemickém složení [19]. Buněčná stěna je důležitou strukturální složkou prokaryotických organismů a je nezbytná pro bakteriální přežití [20]. Hydrofobicita a elektrické vlastnosti patří k nejdůležitějším povrchovým vlastnostem, které jsou závislé na chemickém složení buněčné stěny [21].

3.1.1 Buněčná stěna

Bakteriální buňky jsou obklopeny porézní 3D makromolekulární sítí, která bývá označována jako buněčná stěna [22]. Úkolem buněčné stěny je chránit cytoplazmu a plazmatickou membránu, udržovat tvar buňky a chránit buňku proti osmotické lyzi. Uděluje také buňce chemickou odolnost, odolnost proti záření a vyschnutí. Na buněčném povrchu se mohou vyskytovat buněčné struktury jako fibrily, fimbrie nebo flagely [23].

Stavbu buněčné stěny a složení ovlivňuje typ buňky (gramnegativní, grampozitivní bakterie), ale i růstové podmínky a růstová stádia buněk [3].

3.1.1.1 Buněčná stěna grampozitivních bakterií



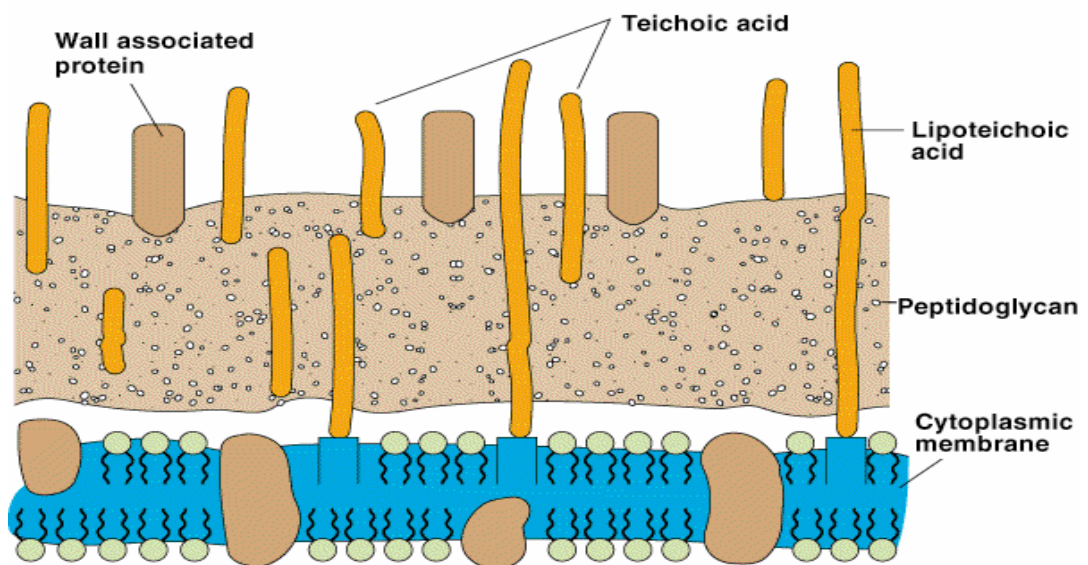
Obr. č. 3 Buněčná stěna grampozitivní bakterie [43]

U grampozitivních bakterií je buněčná stěna tvořena silnou vrstvou peptidoglykanu, kterou pronikají lineární řetězce teikoových kyselin spojené s cytoplazmatickou membránou [3]. Právě na vrstvě peptidoglykanu závisí tuhost buněčné stěny, která musí vzdorovat osmotickému tlaku [22]. Základem teikoových kyselin jsou ve vodě rozpustné lineární polymery glycerolfosfátu nebo ribitolfosfátu s glykozidicky vázanými cukry [23]. Teikoová kyselina tvoří více než 50 % suché hmotnosti buněčných stěn některých druhů [24]. Je vázána kovalentní vazbou na muramovou kyselinu [23]. Muramová síť plní funkci opěrné kostry buněčné stěny a podmiňuje její rigiditu. Na tuto kostru mohou být ukládány různé jiné látky, rozdílné u grampozitivních a u gramnegativních bakterií [9]. Funkce teikoových kyselin není dobře známa, ale nepodílejí se na pevnosti buněčné stěny. [23]. U mnohých grampozitivních bakterií prostupuje teikoová kyselina až na povrch buněk, kde je složkou specifických receptorových míst pro bakteriofágy [9]. Jejich hlavní úlohou je zřejmě vazba kationtů (teikoové kyseliny jsou negativně nabitě polymery), zejména dvojmocných (Ca^{2+} , Mg^{2+}), které jsou nepostradatelné pro integritu stěny i membrány [23]. Především hořčíkové ionty jsou důležité pro integritu membrány a pro aktivitu mnoha membránových enzymů [25].

Kromě peptidoglykanu a teikoové kyseliny se v buněčné stěně nachází i mnoho jiných makromolekul, např. (lipo-)polysacharidy, (lipo-)proteiny, enzymy aj. Na peptidoglykan jsou kromě teikoové kyseliny vázány polysacharidy složené z glukózy, galaktózy, manózy a dalších monosacharidů. Složení je specifické pro jednotlivé skupiny bakterií a je zodpovědné za antigenní vlastnosti jednotlivých skupin bakterií [23].

Většina těchto makromolekul obsahuje nabité karboxylové, fosfátové nebo aminové skupiny. Přítomnost těchto aniontových nebo kationtových skupin udává bakteriální stěně amfoterní charakter, tzn. že v závislosti na pH může mít mikroorganismus kladný, záporný nebo nulový povrchový náboj [22].

Buněčná stěna grampozitivních bakterií neobsahuje lipidy. Výjimku činí mykobakterie, korynebakterie či nokardie, které mohou obsahovat mnoho lipidů a vosků vázaných esterovými vazbami na peptidoglykan. Grampozitivní bakterie také neobsahují bílkoviny, výjimkou jsou streptokoky. Bílkoviny tvoří souvislou, kovalentně vázanou vrstvu na povrchu stěny, udělující bakterii specifické antigenní vlastnosti. U streptokoků je mezi peptidoglykanovou a povrchovou bílkovinnou vrstvou ještě jedna vrstva polysacharidová. Polysacharidová a bílkovinná vrstva je někdy považována již za další část obalu bakteriální buňky, za pouzdro, a pro svoji tenkost nazývána mikropouzdro [25].



Obr. 4. Buněčná stěna grampozitivní bakterie [43]

3.1.2 Fyzikální a chemická charakteristika bakterií

Důsledkem metabolismu mikroorganismů aktivně uvolňují protony, organické kyseliny a anorganický uhlík do jejich bezprostředního okolí. Mikroorganismy pasivně interreagují s jejich vodným prostředím [27]. Pouzdro, buněčná stěna a cytoplazmatická membrána zajišťují kontakt buňky s vnějším prostředím [26].

Některé vlastnosti, které určují výživu a energetické pochody buněk, souvisí s povrchem těchto struktur. Mezi tyto vlastnosti patří povrchové napětí, elektrický náboj, osmotické vlastnosti a acidorezistence. Povrch většiny bakterií je hydrofilní, což je zapříčiněno přítomností polárních skupin (hydroxyly, karboxyly, amino- a keto-) mající silnou afinitu k vodě. Hydrofobní, nepolární skupiny methyly jsou charakteristické pro acidorezistentní bakterie. Důležitou vlastností bakterií je specifický povrch, tj. poměr plochy k objemu. Povrchové jevy jsou charakterizovány povrchovým napětím. To je síla, která je potřebná k vytvoření nového povrchu jednotky plochy za konstantní teploty a napětím mezivrstevným. Povrchové napětí se účastní při růstu, dělení buněk, změnách permeability (tj. propustnosti) a tvorbě kolonií. Tento pojem se používá v souvislosti s prostředím na rozhraní kapalina–plyn. Přídavkem smáčedel nebo povrchově aktivních látek (saponiny, mýdla) se sníží povrchové napětí. Se stoupající teplotou povrchové napětí klesá. Naproti tomu anorganické soli zvyšují toto napětí (výjimku představují HCl, NH₄OH a HNO₃). Mezivrstevné napětí se uplatňuje na rozhraní kapalina–kapalina nebo kapalina–tuhá látka. S tím souvisí fagocytóza, která je vysvětlována jako jev mezivrstevného napětí a smáčivosti pevných povrchů. Bakterie zde vystupuje jako pevná částice, po jejímž povrchu se šíří viskózní plazma fagocytu. Významnou vlastností rozhraní dvou fází je adsorpce, tj. hromadění látky na styku dvou fází, z nichž jedna je tuhá. Adsorpce může být fyzikální díky van der Waalsovým silám. Je-li vazba pevnější, jedná se o chemickou adsorpci na základě chemických vazeb a sil [26].

3.1.3 Elektrický náboj

Povrchy buněk se skládají z různě nabitých polymerů a ve většině případů mají záporný náboj při fyziologickém pH. Složení polymerů na povrchu buňky je ovlivněn převážně buněčnými druhy a dalšími několika faktory, jako růstovými fázemi a podmínkami růstu [27]. Všechny bakteriální buňky mají tedy za normálních podmínek záporný náboj [28]. To znamená, že se v elektrickém poli pohybují k anodě [26]. Bylo prokázáno, že hustotu náboje v bakteriální stěně silně ovlivňuje její tloušťka [22]. V bakteriální buněčné stěně dominují aniontové (karboxylové, fosfátové) skupiny nad kationtovými (aminovými) skupinami. To je v souladu se zjištěním, že většina bakteriálních buněk má izoelektrický bod pod pH 4. To znamená, že většina bakterií je záporně nabitá při fyziologickém pH [22]. Tento náboj je kompenzován v první řadě protiionty, které prostupují do stěny buněk,

a v menší míře stejně nabitými ionty, které jsou z buněčné stěny vypuzovány [29]. Protiiont (v odborné literatuře nazýván jako counterion) je ion s nábojem opačného znaménka než znaménko náboje vnitřní vrstvy elektrické dvojvrstvy [30]. Míra vnější elektronegativity ovlivňuje celkovou buněčnou povrchovou polaritu a může být stanovena na základě zeta potenciálu [31]. Zeta potenciál je elektrický potenciál mezifázové sféry mezi bakteriálním povrchem a vodným prostředím. Zeta potenciál lze stanovit měřením buněčné elektroforetické pohyblivosti v elektrickém poli. [31]. Můžeme také říci, že povrchový náboj mikroorganismů je důsledkem ionizace povrchových skupin molekul buněčné membrány (tj. disociace a protonace kyselých a bazických skupin povrchových molekul). Druhý faktor, který se podílí na vzniku povrchového náboje, je adsorpce iontů z okolního roztoku [29].

Tab. 1. Přehled ionizovatelných skupin povrchových molekul buněčné stěny [74]

Rakce	Molekula	pK_a
$-\text{COOH} \Leftrightarrow -\text{COO}^- + \text{H}^+$	polysacharid	2,8
$-\text{COOH} \Leftrightarrow -\text{COO}^- + \text{H}^+$	protein, peptidoglykan	4,0 – 5,0
$-\text{NH}_3^+ \Leftrightarrow -\text{NH}_2 + \text{H}^+$	protein, peptidoglykan	9,0 – 9,8
$-\text{HPO}_4 \Leftrightarrow -\text{PO}_4^- + \text{H}^+$	teichoové kyseliny	2,1
$-\text{H}_2\text{PO}_4 \Leftrightarrow -\text{HPO}_4^- + \text{H}^+$	fosfolipidy	2,1
$-\text{HPO}_4^- \Leftrightarrow -\text{PO}_4^{2-} + \text{H}^+$	fosfolipidy	7,2

3.1.4 Meziatomární interakce

Ve strukturách živých organismů a při všech biologických dějích se uplatňují interakce. [32]. Nevazebné interakce, nebo také slabé vazby, hrají mimořádnou roli v dějích jako stabilizace prostorové struktury biopolymerů, interakce nejrůznějších molekul (enzym–substrát, enzym–efektor, receptor–hormon, antigen–protilátka apod.), při vzniku a stabilizaci nadmolekulových struktur (bílkoviny s kvarterní strukturou, multienzymové jednotky, nukleoproteiny, lipoproteiny, biologické membrány, cytoskelet, viry aj. Patří sem zejména elektrostatické interakce, vodíkové vazby, van der Waalsovy interakce a hydrofobní interakce [30]. Tyto interakce jsou dominantní na krátké vzdálenosti a jsou závislé na vlastnostech povrchu.

Díky kombinaci různých typů i počtu nekovalentních interakcí může výsledná energie vazby nabývat různých hodnot, od vazeb slabých až po vazby velmi silné, energií odpovídající vazbám kovalentním [32].

3.1.4.1 Elektrostatické interakce

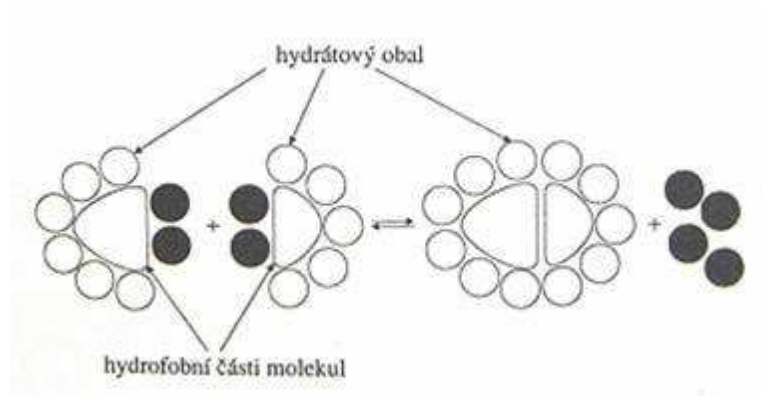
Elektrostatické interakce jsou přitažlivé (atraktivní) nebo odpudivé nekovalentní interakce nábojů nebo permanentních dipólů [30]. Řídí se Coulombovým zákonem, proto je můžeme nazývat také interakce Coulombické [34]. Jejich energie závisí na velikosti nábojů a permitivitě prostředí [30]. Elektrostatické interakce jsou poměrně silné a delšího dosahu ve srovnání s ostatními nekovalentními interakcemi [34]. Hrají významnou úlohu zejména při interakci nukleových kyselin, které nesou při fyziologickém pH záporný náboj, s basickými proteiny, ale i při vazbě nabitých substrátů do vazebného místa enzymu či při interakcích nabitých polárních hlavic fosfolipidů. Energeticky výhodná elektrostatická interakce nabitých skupin (např. postranních řetězců aminokyselin Glu, Asp, Lys a Arg) s dipóly vody je příčinou jejich hydrofilní povahy [30]. Elektrostatické interakce mohou hrát hlavní roli v soudržnosti mikroorganismů k uhlovodíkům. Na rozdíl od toho, kontaktní úhel měří povrchovou hydrofobitu bez interference elektrostatických interakcí [19].

3.1.4.2 Van der Waalsovy interakce

Van der Waalsovy síly řadíme mezi slabé interakce, a ačkoli bývají řazeny jako samostatná skupina slabých interakcí, rozumí se pod tímto termínem působení dipól – dipól, dipól–indukovaný dipól a disperzní síly [35]. Základem van der Waalsových interakcí je vzájemné ovlivňování elektronových oblaků dvou polárních (nebo nepolárních) skupin atomů. Vychýlené elektrony kolísají okolo rovnovážné polohy, čímž oscilují i vzniklé dipóly. Dipóly se vzájemně přitahují v místech, kde mají opačné náboje [36]. Van der Waalsovy interakce jsou zodpovědné za strukturu biomolekul (např. bílkovin či DNA), za strukturu komplexů enzym–substrát, ale také za průchod látek biologickou membránou. Naprosto klíčovou úlohu však tyto interakce hrají v jednom z nejvýznamnějších procesů v živé buňce – procesu rozpoznání [37].

3.1.4.3 Hydrofobní interakce

Zvláštním případem slabých vazebných interakcí jsou interakce hydrofobní. Tyto interakce se projevují v nepolárních částech molekul ve vodném prostředí, které mají tendenci se navzájem spojovat, a tím zmenšovat kontakt s polárními molekulami vody [35]. Hydrofobní interakce vedou ke shlukování nepolárních aminokyselinových zbytků, tak aby byl minimalizován jejich kontakt s vodou. Molekuly vody okolo nepolární molekuly nemohou mezi sebou tvořit vodíkové můstky tolika způsoby jako v kapalně vodě, čímž snižují entropii roztoku [38]. Hydrofobní interakce jsou rozhodujícím prvkem stabilizace trojrozměrné struktury globulárních bílkovin, ale i dihelixu DNA a biologických membrán [39]. V reakcích antigenů a protilátek patří hydrofobní interakce k nejvýznamnějším [40].



Obr. 5. Hydrofobní interakce [36]

3.1.4.4 Vodíkové vazby

Vodíková vazba je nejsilnější a také nejběžnější typ nekovalentních interakcí. Vzniká u většiny sloučenin, které obsahují atom vodíku kovalentně vázán na atom fluoru, kyslíku a dusíku, tj. na atomy prvků o vysoké elektronegativitě, obsahující volný elektronový pár [35]. Vodíková vazba je nejčastěji typu $X-H \cdots Y$, kde X a Y jsou elektronegativní atomy ($X = F, O, N$, ale i C) a Y navíc obsahuje volné elektronové páry. Kromě vodíkových vazeb $O-H \cdots O$, $N-H \cdots O$, $F-H \cdots F$, známe také vazby, kde protonovým akceptorem jsou systémy s delokalizovanými elektrony [41]. Vodíkové vazby mají velký význam pro fungování biopolymerů (např. výsledná struktura proteinů, NK) [36].

3.1 Hydrofobicita

Pojem hydrofobicita je všeobecně spjata s molekulou nebo částicí, která odpuzuje vodu, nemá náboj, je nepolární, neschopná tvořit vodíkové vazby nebo má nízkou povrchovou energii [42]. Hmoty, které jsou hydrofobní, mají malou nebo žádnou tendenci absorbovat vodu. Důležitým faktorem v adherenci a následném rozmnožování mikroorganismů na pevných površích je hydrofobicita buněčných povrchů. Na hydrofobní vlastnosti mají vliv podmínky, jako jsou například růst, pH a teplota [44]. U tzv. amfipatických molekul, které obsahují hydrofobní a hydrofilní části, dochází k tomu, že se hydrofobní části shlukují a vytvářejí micely, obklopené hydrofilními skupinami, které s vodou interagují ochotně. Hydrofobicitu molekul lze kvantifikovat měřením rozdělovacích koeficientů látek mezi vodou a s ní nemísitelné rozpouštědlo, nejčastěji 1-oktanol [39]. Chování bakterií mléčného kvašení je závislé na meziplošných procesech, a tím i na fyzikálně-chemických vlastnostech povrchu buněk. U mnoha druhů laktobacilů je S-protein, který je umístěn v nejzevnější vrstvě buněčné stěny a podílí se na adhezi. Je složen z glykoproteinů. Není známo, zda pouze rozdíly v iontové síle mohou indukovat změny hydrofobity buněčného povrchu, nebo zda blízkost hydrofilního nebo hydrofobního povrchu může vyvolat tyto změny také. Podle výzkumů H. J. Busschera vykazovaly kmeny laktobacilů vyšší počáteční rychlost usazování na hydrofobní substráty při nízké iontové síle [45].

3.1.1 Mikrobiální adheze k rozpouštědlu

Metoda mikrobiální adheze k rozpouštědlu byla inspirována metodou MATH (mikrobiální adheze k uhlovodíkům) [46]. Hydrofobita kmenů je hodnocena mikrobiální přilnavostí k rozpouštědlu. To spočívá v hodnocení buněčné afinity k nepolárnímu rozpouštědlu (hexadekanu) [47]. V testu MATS se mikrobiální afinita považuje za výsledek souhrnu elektrostatických, van der Waalsových a acidobazických interakcí. V případě nepřítomnosti elektrostatických interakcí může být rozdíl pozorovaný v mikrobiální adheze k monopolárnímu a polárnímu rozpouštědlu připisován příznivým nebo nepříznivým acidobásickým interakcím. Příznivé interakce jsou vyjádřeny prostřednictvím zvýšené mikrobiální afinity k monopolárnímu rozpouštědlu a naopak [46].

3.1.2 Mikrobiální adheze k uhlovodíkům

Test mikrobiální přilnavosti k uhlovodíkům (MATH) byl vyvinut před více než 25 lety M. Rosenbergem, pro stanovení mikrobiální buněčné povrchové hydrofobity. Test byl kritizován v důsledku zanedbání kinetických efektů [48]. Kinetický MATH test popsal H. C. van der Mei [49]. Zkouška se stala běžnou metodou pro hodnocení bakteriální adheze na uhlovodíkové fáze [19]. Zkouška je založena na tendenci některých bakterií adherovat na povrchy kapek kapalných uhlovodíků během krátké doby míchání. Bakteriální suspenze je promytá a následně promíchána v přítomnosti testovacího uhlovodíku. Následuje separace fází, která umožňuje vystoupení olejovitých kapek pokrytých buňkami. Velikost adherence je stanovena z poklesu buněčné hustoty ve spodní vodné fázi [47]. V procesu mikrobiální adheze jsou zapojeny jednak síly van der Waalsovy, elektrostatické a interakce s krátkým rozsahem [49]. Protože většina mikroorganismů je negativně nabitá při pH 7, což signalizuje, že přitažlivé van der Waalsovy síly mezi uhlovodíky a mikroorganismy musí překonat odpudivé elektrostatické interakce v zájmu dosažení povrchu uhlovodíků [50].

Kmeny, které dobře lpí na uhlovodíku, jsou považovány za „hydrofobní“ a ty kmeny, které se drží špatně, za „hydrofilní“. Adhezi k hydrofobním substrátům ovlivňuje např. pH, iontová síla, teplota, stáří buněk, růstové médium pro buňky a doba míchání [50].

Procenta adheze k uhlovodíku lze vypočítat podle vzorce:

$$\% \textit{adherence} = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \cdot 100$$

kde A = absorbance vodné fáze po míchání a A_0 = absorbance původní suspenze před mícháním [48].

3.1.3 Kontaktní úhly

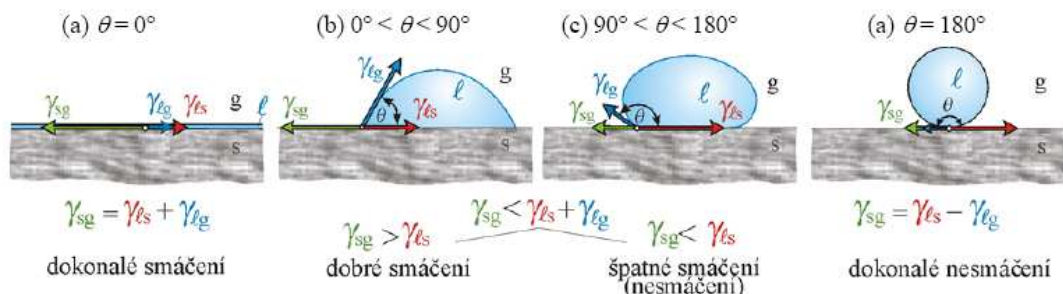
Kontaktní úhly jsou měřeny k zjištění povrchové hydrofobicity a k určení bakteriální povrchové smáčivosti [51]. Metoda spočívá v nanesení kapky vody na buňkami vytvořený film a stanovení úhlu mezi povrchem filmu a tangentou ke kapce v bodě, kde se setkávají fáze pevná látka–vzduch [42]. Kontaktní úhel je úměrný hydrofobicitě povrchu [52].

Vztah mezi úhlem smáčení θ a jednotlivými mezifázovými energiemi je dán Youngovou rovnicí:

$$\gamma_l \cdot \cos \theta = \gamma_s - \gamma_{sl}$$

kde γ_l a γ_s jsou povrchové energie kapaliny, popř. tuhé látky, γ_{sl} – mezifázová energie tuhá látka–kapalina. Úhel smáčení je jednou z mála přímo měřitelných vlastností fázového rozhraní pevná látka/kapalina/plyn [30]. θ je rovnovážný kontaktní úhel. Mikroorganismy mohou být rozděleny do tří kategorií podle klesajícího kontaktního úhlu na hydrofobní (θ větší než 90°), mírně hydrofobní (θ se pohybuje mezi 50 - 60°) a hydrofilní (θ je menší než 40°) [69].

Některé povrchy nejsou dokonale rovné. Při vyhodnocování kontaktního úhlu by měl být zohledněn i faktor drsnosti povrchu. Wenzelova a Cassieho teorie je většinou používána pro korelaci drsnosti povrchu při měření kontaktního úhlu na pevném podkladě [52].



Obr. 6. Kapka kapaliny na povrchu pevné látky [69]

Voda v prvním případě dokonale smáčí materiál či vrstvu bakterií, v druhém dobře smáčí, ve třetím případě smáčí špatně a nakonec povrch nesmáčí.

3.2 Adheze mikroorganismů

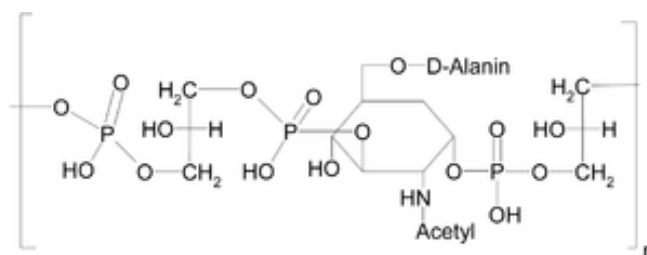
Bakteriální adheze na povrchy má velmi environmentální, lékařský a průmyslový význam [53]. Teorie bakteriální adheze jsou nastíněny na základě dvou fyzikálních přístupů: Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeekovy teorie a termodynamického přístupu.

Mikrobiální adheze k povrchu nebo rozhraní může být někdy vysvětlována pomocí Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeekovy (DLVO) teorie koloidní stability. DLVO teorie kvantitativně hodnotí celkové volné energie interakce mezi buňkou a povrchem, na základě elektrické dvojvrstvy a van der Waalovy úvahy. Ačkoli teorie DLVO byly původně vyvinuty pro inertní koloidní částice, může být tato teorie použita k kvalitativnímu popsání mikrobiální adheze [49]. Termodynamický přístup je založen na tom, že nedochází k energetickým interakcím na povrchu [54]. Přílnavost mikroorganismů na polymerní membrány v podstatě závisí na hydrofobních/hydrofilních vlastnostech obou buněk a membrán. Bylo prokázáno, že hydrofobní interakce mezi membránou a buňkami usnadňují adhezi mikroorganismů k membránovému povrchu. Bakteriální přílnavost na více hydrofobní povrch, např. polyethersulfonu nebo polysulfonu, je vyšší než na hydrofilní celulózoové membrány [55]. Složitější je adheze u biologických systémů, kdy se používán termín adherence, který je obecným popisem bakteriální adheze. Bakterie se pevně přichytí k povrchu prostřednictvím komplexních fyzikálně-chemických interakcí. Nejčastěji jsou to interakce hydrofobní a elektrostatické [51].

Busscher and Weerkamp (1987) navrhli dvoufázový mechanismus pro bakteriální adhezi. Skládá se z počátečních nescifických vzájemných ovlivňování zásluhou makroskopických vlastností povrchu, jako je náboj a volná povrchová energie. Následuje specifické vzájemné ovlivňování v těsném přiblížení [53]. Počáteční bakteriální adheze je doprovázena změnou elektrického potenciálu na povrchu. Důsledkem toho se může předpokládat, že změna elektrického potenciálu je kvůli přenosu náboje mezi bakteriemi a povrchem. Přenos je závislý na bakteriálním napětí a iontové síle. Zvláště přítomnost volných elektronů v substrátech může ovlivňovat mechanismy adheze [53]. Bakteriální adheze je velmi komplikovaným procesem, který ovlivňuje řada faktorů, včetně některých charakteristik samotných bakterií, cílový povrchový materiál a faktory prostředí. Faktor ovlivňující bakteriální adhezi je například produkce polysacharidů. To umožňuje streptokokům přilnout k nejtvrdějším povrchům. Z uhlovodíků jsou streptokoky schopné produkovat extracelulární polysacharidy, obzvláště pak sacharózy (dextrany, mutany, levany) [56]. Jeden z hlavních faktorů ovlivňující bakteriální adhezi je hydrofobicita. Hydrofobicita je závislá na druhu, stáří bakterie a struktuře bakteriálního povrchu [57]. Materiály s hydrofobními povrchy preferují bakterie s hydrofobními vlastnostmi a hydrofilní dávají přednost povrchům hydrofilním [55].

Dalším faktorem, který může ovlivnit bakteriální adhezi, je povrchový náboj bakterie. Jestliže dojde k ionizaci povrchových skupin, získá většina částic elektrický náboj ve vodném roztoku. Náboj povrchu přitahuje ionty opačného znaménka v médiu, v důsledku čehož vzniká elektrická dvojvrstva [56]. Součástí buněčné stěny grampozitivních bakterií je lipoteikoová kyselina, v důsledku které jsou buněčné stěny záporné a které jsou hlavním faktorem zodpovídajícím za hydrofobní charakter buněčného povrchu [23]. Lipoteikoové kyseliny (LTA) jsou antipatické, to znamená, že mají nepolární a polární konec [58].

Lipoteikoové kyseliny jsou obecně složeny ze dvou hlavních konstrukčních částí - glukózy nebo D-alaninu substituovaných polyglycerolfosfátem a glykolipidem. Tato struktura byla navržena Fischerem [59]. Pro vazbu teikoových kyselin k buněčným membránám je nezbytný podíl hydrofobních lipidů [60].



Obr. 7. Vzorec teikoové kyseliny z bakterií čeledi *Micrococcaceae* [75].

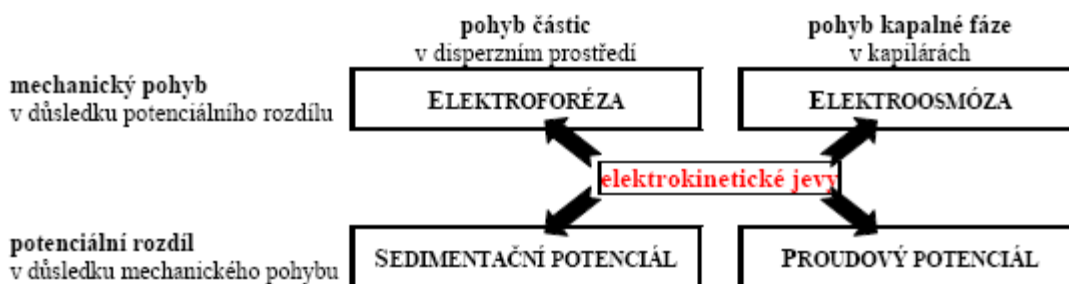
Při výrobě mléčných výrobků může být adheze mléčných bakterií na materiál první krok vedoucí k tvorbě biofilmu [19]. Biofilmy mohou být tvořeny úmyslně nebo neúmyslně a mohou být buď škodlivé (např. kontaminace, změna chuti), nebo prospěšné [61]. Bylo prokázáno, že přilnavost mikrobiálních buněk závisí na rovnováze elektrostatických a van der Waalsových interakcí a na hydrofobním charakteru dotčených ploch. To ukazuje na možný vliv příslušných zeta potenciálu a povrchové hydrofobicity [19].

4 ELEKTROKINETICKÉ VLASTNOSTI MIKROORGANISMŮ

Koloidní soustavy jsou ovlivňovány vnějším elektrickým polem. Elektrické pole způsobuje pohyb koloidních částic – elektroforéza, či disperzního prostředí – elektroosmóza. Souhrnně se tyto jevy nazývají jako elektrokinetické jevy a souvisí s existencí povrchového náboje na částicích. Tento náboj je měřen jako tzv. elektrokinetický (zeta) potenciál.

4.1 Elektrokinetické jevy

Jevy, k nimž dochází při pohybu fáze s elektrickou dvojrůstkou vůči roztoku v důsledku rozdělení elektrické dvojrůstvy a vzniku elektrokinetického potenciálu. Patří sem elektroforéza a elektroosmóza, při nichž je mechanický pohyb vyvolán elektrickým polem, dále sedimentační potenciál a proudový potenciál – to jsou elektrické potenciály, které vznikají v důsledku mechanického pohybu [30].



Obr. 8. Elektrokinetické jevy [69]

Měřitelné elektrokinetické jevy mají velký význam pro studium elektrických vlastností fázového rozhraní, v první řadě pro stanovení hodnot elektrokinetického potenciálu [63].

4.1.1 Elektrokinetický potenciál – zeta potenciál

Zeta potenciál nebo také elektrokinetický potenciál je nejpoužívanější experimentální přístup ke studiu nabitých povrchů, a to prostřednictvím elektrokinetických technik. Zeta potenciál může poskytovat velmi cenné informace o struktuře a vlastnostech elektrické dvojrůstvy [64]. Příčinou pohybu koloidních částic v elektrickém poli je elektrokinetický potenciál. Jde o potenciálový rozdíl mezi pohyblivou a fixovanou částí iontové atmosféry,

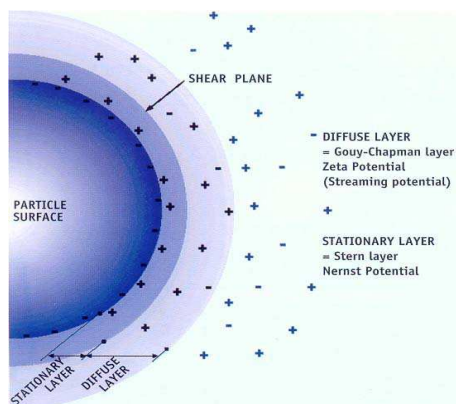
tj. mezi difuzně rozptýlenými ionty v roztoku a tenkou vrstvou protiiontů, poutanou k povrchu částice. Pohyb elektricky nabitých částic závisí na jejich velikosti, tvaru, velikosti jejich náboje a na intenzitě vloženého elektrického pole [65].

Stanovení zeta potenciálu je důležité při studiu poměrů na hranici fází. Zeta potenciál se dá spojit se stabilitou tuhých materiálů ve vodních systémech. Při relativním pohybu tuhé fáze s elektrickou dvojrstvou vůči roztoku se elektrická dvojrstva ocitne v oblasti rychlostního gradientu. Potenciál, který vzniká mezi vrstvou přiléhající k pohybující se tuhé fázi a roztokem, se nazývá elektrokinetický potenciál. Znaménko zeta potenciálu je opačné než znaménko iontů vnitřní vrstvy elektrické dvojrstvy. Charakter změny ve struktuře dvojrstvy je určen:

- vlastnostmi iontů přidaných do roztoku,
- jejich schopností vstupovat do struktury pevné fáze nebo specificky adsorbovat ve fázovém rozhraní,
- velikostí nábojů.

Velikost zeta potenciálu dává informaci o stabilitě systému. Když budou mít částice nízké hodnoty zeta potenciálu, systém je nestabilní a při dosažení koagulačního prahu začíná koagulace (vylučování vloček). Absolutní hodnoty zeta potenciálu větší než 30 mV naznačují, že je systém stabilní. Elektrokinetický potenciál nebývá vyšší než 0,1 V, je značně ovlivňován přidavkem elektrolytů, a to i v malých koncentracích. S rostoucí teplotou roste hodnota zeta potenciálu, protože roste intenzita tepelného pohybu iontů a zvyšuje se tloušťka elektrické dvojrstvy. Závislosti zeta potenciálu na teplotě je pro každý systém individuální. Hodnota pH a iontová koncentrace jsou dva hlavní faktory, které mají dopad na elektrostatické vlastnosti a zeta potenciál nabitých částic [63, 66]. Při pH rovném izoelektrickému bodu je zeta potenciál nulový. Složení roztoku determinuje hodnotu zeta potenciálu strmější a hodnota potenciálu nižší, takže stabilita koloidu je nižší [67].

4.1.1.1 Elektrická dvojvrstva



Obr. 9. Model elektrické dvojvrstvy

[33]

Elektrická dvojvrstva je útvar složený ze dvou opačně nabitých vrstev, který se vytváří při kontaktu nabitého povrchu tuhé látky s roztokem elektrolytu. Tzv. vnitřní vrstvu tvoří nabitý povrch tuhé látky, k níž jsou elektrostatickými a adsorpčními silami přitahovány ionty převážně opačného znaménka (protiionty), jejichž náboj neutralizuje náboj povrchu – tzv. vnější vrstva. Byly vytvořeny různé modely elektrické dvojvrstvy (Helmholtzův, Gouyův-Chapmanův, Sternův) pro popis tohoto uspořádání [30].

Skládá se ze dvou podvrstev, a to z plošné Sternovy vrstvy, kterou tvoří část protiiontů, vázaná na ionty první vrstvy adsorpčními a elektrostatickými silami. Tato opačně nabitá vrstva neutralizuje náboj první vrstvy zpravidla jenom částečně. Difuzní neboli Gouyho vrstvy, což je iontová atmosféra tvořená pohyblivými protiionty a ionty pocházejícími z ostatních elektrolytů přítomných v disperzním prostředí. Je rozložena v prostoru a její struktura je dána rovnováhou mezi elektrostatickými silami a tepelným pohybem iontů. Je-li povrch nabit kladně, nese Sternova vrstva záporný náboj. Gouyho vrstva je potom utvářena tak, že v těsné blízkosti Sternovy vrstvy je koncentrace anionů největší a obsah kationů minimální, ale směrem do elektroneutrální objemové fáze se obě koncentrace postupně vyrovnávají.

Čistá lokální hustota elektrického náboje je pak v blízkosti povrchu záporná a s rostoucí vzdáleností od povrchu se blíží nule. Celkový záporný náboj druhé vrstvy je dán součtem

nábojů Steinovy a difúzní vrstvy a je až na znaménko roven kladnému náboji prvé vrstvy [68].

4.1.1.2 Modely elektrické dvojvrstvy

Každý z navržených modelů se přibližuje skutečnosti do určité míry. Jejich věrohodnost je posuzována podle toho, jak dalece jsou matematické vztahy a kvalitativní závěry z modelové představy vyplývající ve shodě s experimentálními fakty [69].

4.1.1.2.1 Helmholtzův model elektrické dvojvrstvy

První teoretické představy o stavbě elektrické dvojvrstvy zformuloval r. 1879 Helmholtz, který si dvojvrstvy představoval jako dvě vrstvy nábojů opačného znaménka, rovnoměrně rozdělených po povrchu. Vzdálenost mezi oběma vrstvami je přibližně takového řádu jako průměr molekuly vody, což dovoluje přirovnat elektrickou dvojvrstvu k deskovému chladiči. Pokles potenciálu na rozhraní kov/roztok je v takovém případě lineární a náboj elektrody lze vypočítat podle vzorce pro deskový kondenzátor.

$$q = C\phi = \frac{\varepsilon}{d}\phi$$

kde $C = \frac{\varepsilon}{d}$ je kapacita plošné (povrchové) jednotky deskového kondenzátoru, ε je permitivita prostředí mezi deskami kondenzátoru, d je vzdálenost mezi deskami. Pro povrchové napětí podle Lippmannovy rovnice platí

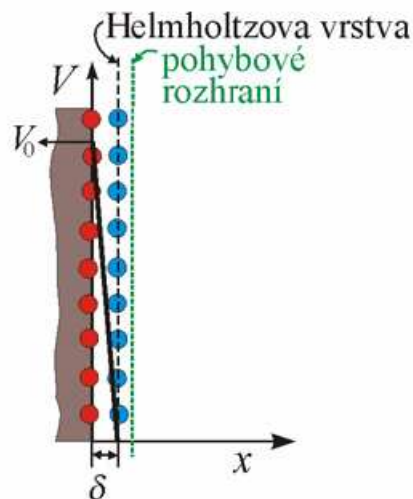
$$\gamma = -\int qd\phi = -\int \frac{\varepsilon}{d}\phi d\phi$$

$$\gamma = konst. - \frac{\varepsilon}{2d}\phi^2$$

konst. = γ_{\max}

Ze vzorce pro povrchové napětí podle Helmholtzovy teorie vyplývá, že elektrokapilární křivka by měla mít v prvním přiblížení tvar převrácené symetrické paraboly, což naoko odpovídá experimentu. Ukázalo se, že Helmholtzova teorie elektrické dvojvrstvy má celý řadu nedostatků.

Rovnice pro kapacitu deskového kondenzátoru $C = \frac{\epsilon}{d}$ předpokládá konstantní kapacitu dvojvrstvy, naproti tomu experimenty svědčí o závislosti kapacity dvojvrstvy k potenciálu elektrody, tj. $C = C(\varphi)$. Helmholtzův model nevysvětluje elektrokinetické jevy. Uvedené nedostatky souvisejí především s tím, že Helmholtzova teorie brala v úvahu pouze elektrostatické síly a ignorovala tepelný pohyb iontů [70].



Obr. 10. Helmholtzův model [69]

4.1.1.2.2 Gouyův-Chapmanův model elektrické dvojvrstvy

Teorii elektrické dvojvrstvy dále rozvinuli Gouy (1910) a nezávisle Chapman (1913).

Gouyho-Chapmanova teorie difuzní vrstvy se zabývá poklesem potenciálu v difuzní vrstvě, jejíž náboj je nesterjnoměrně, ale plynuje rozložen v prostoru. Její tvůrci vycházeli z Poissonovy elektrostatické rovnice a z Boltzmanonova zákona pro koncentraci iontů v elektrickém poli.

Koncentrace iontů ve vnější vrstvě plynule klesá se vzdáleností od nabitého povrchu. Stav této vrstvy je dán rovnováhou mezi elektrostatickými silami a tepelným pohybem iontů. Za předpokladu, že ionty jsou elektricky nabitě body bez vlastních rozměrů, vypracovali Gouy

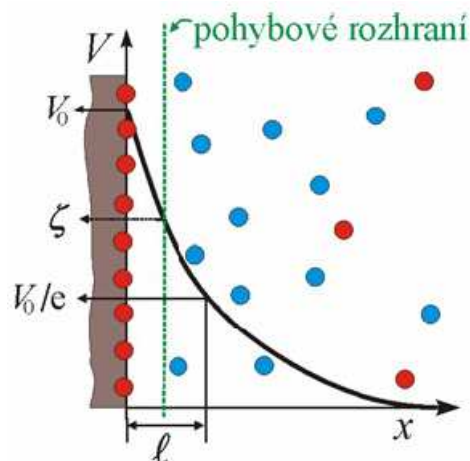
(1910) a Chapman (1913) matematickou teorii, která popisuje úbytek potenciálu a hustoty náboje v závislosti na vzdálenosti od povrchu. Pro změnu potenciálu V se vzdáleností od povrchu x plyne z jejich teorie vztah:

$$V = V_0 \cdot \exp(-x/l)$$

$$l = \left(\frac{\varepsilon_r \cdot \varepsilon_0 \cdot k_B \cdot T}{e^2 \cdot \sum (z_i^2 v_{io})} \right)^{1/2} = \frac{\textit{konst.}}{I^{1/2}}$$

Gouyova a Chapmanova teorie kvalitativní správně vykládá mnohá experimentální fakta. Při kvantitativním porovnání experimentálních výsledků s teoretickými výpočty se ukázala omezená platnost této teorie, což je důsledek jejích nedostatků. Gouyova a Chapmanova teorie považuje ionty za bodové náboje, které se mohou nekonečně blízko přiblížit k elektrodě.

Gouyova a Chapmanova teorie nevysvětluje specifickou adsorpci iontů a jevy s tím související. Při silné specifické adsorpci iontů může celkový náboj naadsorbovaných iontů překročit náboj elektrody, tehdy dojde k tzv. přebití, tj. ke změně znaménka náboje elektrody. Přebití také patří do oblasti elektrokinetických jevů (elektroforéza), když micela vlivem opačně nabitých iontů mění směr pohybu v elektrickém poli. Uvedené nedostatky Gouy a Chapmanovy teorie si vyžádaly vypracování nové teorie elektrické dvojvrstvy, která brala v úvahu i vlastní rozměry iontů a specifickou adsorpci [69,70].



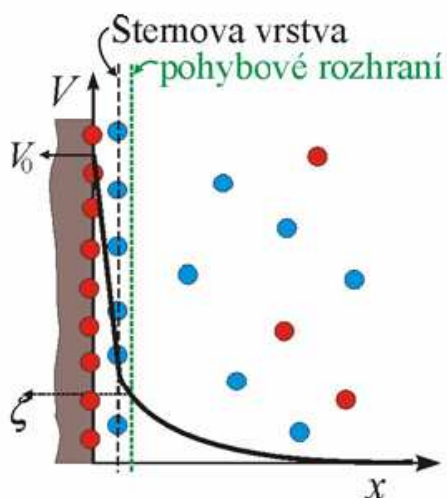
Obr. 11. Gouy-Chapmanův model
[69]

4.1.1.2.3 Sternův model elektrické dvojvrstvy

Nedostatkem Gouyovy a Chapmanovy teorie bylo, že ionty považovala za bodové náboje, které se můžou nekonečně blízko přiblížit k elektrodě. Sternův model naznačuje, že vnější vrstva elektrické dvojvrstvy se skládá z těsně přiléhající plošné vrstvy (tzv. Sternovy vrstvy). Sternova vrstva, která je tvořena ionty vázanými k vnitřní vrstvě převážně adsorpčními silami o plošné hustotě náboje σ_1 , která je zpravidla menší než plošný náboj vnitřní vrstvy σ_0 , a z difuzní vrstvy, tvořené ionty vázanými elektrostatickými silami (tato část vnější vrstvy bývá označována jako Gouyova-Chapmanova vrstva), které neutralizují zbytek náboje vnitřní vrstvy. Potenciál dvojvrstvy klesá nejprve prudce na hodnotu potenciálu Sternovy vrstvy a pak pozvolna k nule. Pro závislost poměru nábojů ve vnější a vnitřní plošné vrstvě na iontové síle roztoku I odvodil Stern za zjednodušujících předpokladů vztah (k je konstanta).

$$-\frac{\sigma_1}{\sigma_0} = \frac{\sqrt{I}}{k + \sqrt{I}}$$

Popis elektrické dvojvrstvy tímto modelem nejlépe odpovídá experimentu, zvláště při středních koncentracích elektrolytů [69,70].



Obr. 12. Sternův model elektrické dvojvrstvy [69]

4.1.2 Elektroforéza

Elektroforéza je pohyb částic s elektrickou dvojvrstvou v kapalném prostředí na základě vnějšího elektrického pole [71]. Rozdělením elektrické dvojvrstvy obklopující částici získává částice s přiléhající vrstvou náboj a v elektrickém poli se pohybuje k příslušné elektrodě. Zbytek difuzní vrstvy putuje k elektrodě opačného znaménka. Kapilární elektroforézou se dnes označuje separační metoda využívající pohyb nabitých částic, ať už malých iontů, či makromolekul (proteinů, fragmentů DNA) v elektrickém poli, a to buď přímo ve volném roztoku elektrolytu, nebo v nějakém nosném médiu, například gelu. Je-li elektrolytem nebo médiem naplněna kapilára, říká se metodě kapilární elektroforéza. Podle způsobu separace se dělí na kapilární zónovou elektroforézu, kapilární izotachoforézu a další [72].

Elektroforetické metody se tedy používají k separaci látek nesoucí elektrický náboj (ionty). Nositeli elektrického náboje jsou mimo jiné amfolyty (např. aminokyseliny). Ty získávají náboj (kladný nebo záporný) v důsledku jejich vnitřní disociace. Náboj aminokyselin ovlivňuje hodnota pH. Při vysokém pH dochází k ionizaci kyselých skupin a částice mají náboj záporný. Při nízkém pH ionizují naopak zásadité skupiny a náboj molekuly je pak kladný. V určité oblasti pH dochází u těchto látek k disociaci stejného počtu jak kyselých, tak i zásaditých skupin a celkový náboj molekuly je pak nulový. Tato hodnota pH se

nazývá izoelektrický bod pI a je charakteristickou konstantou pro každý amfolyt. Aminokyseliny jsou stavebními jednotkami bílkovin, a proto se bílkoviny chovají jako amfolyt. Bílkoviny jsou makromolekuly koloidní povahy a elektroforéza se často využívá k dělení těchto látek [65].

Elektroosmózu lze ovlivnit složením roztoku, zejména přidávkou nepatrných koncentrací povrchově aktivních látek (tenzidů), které pokryjí vnitřní povrch kapiláry a změní rychlost, popřípadě i směr toku. Elektroosmotický tok sám o sobě analyzované ionty nedělí, pouze čerpá roztok elektrolytu z jedné nádoby do druhé. Elektroforéza je často využívána v lékařství i ve výzkumu (analýza a dělení směsí bílkovin, charakterizace povrchů organismů jako bakterie, viry apod.).

4.1.3 Elektroosmóza

Elektroosmóza je pohyb kapaliny v kapilárách (porézních hmotách), jejichž stěny jsou pokryty elektrickou dvojvrstvou, vyvolaný rozdílem elektrických potenciálů mezi oběma konci kapilár. Množství elektrokineticky převedené kapaliny:

$$\dot{V} = \frac{\epsilon_r \cdot \epsilon_0 \cdot \zeta \cdot I}{\eta \cdot \kappa}$$

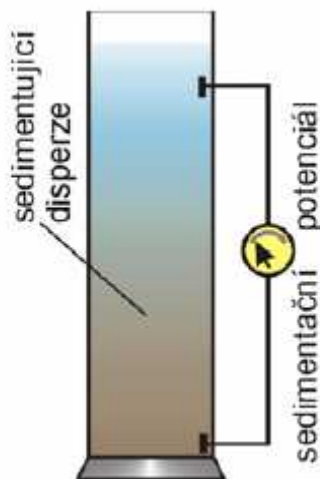
Kde je ζ -potenciál, V naměřená průtoková rychlost, I proud procházejícího mezi elektrodami, κ konduktivita kapaliny, η viskozita kapaliny. Elektroosmóza se využívá při studiu elektrických vlastností fázového rozhraní, odvodňování porézních a práškovitých hmot (např. kaolinu), vysušování vlhkého zdiva [69].

4.1.4 Sedimentační potenciál

Můžeme nazývat také Dornův potenciál. Sedimentační potenciál je elektrický potenciál, který vzniká při jednosměrném pohybu nabitých disperzních částic s elektrickou dvojvrstvou v disperzním prostředí, vyvolaném mechanickou silou. Závislost sedimentačního potenciálu závisí na:

- výškovém rozdílu
- rozměru a koncentraci částic

- rozdílu hustot částic a disperzního prostředí
- viskozitě prostředí
- permitivitě systému
- konduktivitě systému [69].



Obr. 13. Sedimentační potenciál [69]

4.1.5 Proudový potenciál

Proudový potenciál lze také označit jako potenciál proudění. Potenciální rozdíl, který se ustaví mezi konci porézní přepážky (kapiláry nebo soustavy kapilár), jestliže přepážkou protéká působením tlaku zředěný roztok elektrolytu. Vznik proudového potenciálu je jev inverzní k elektroosmóze. Velikost potenciálního rozdílu U_p je dána vztahem:

$$U_p = \frac{\varepsilon_r \cdot \varepsilon_0 \cdot \zeta \cdot \Delta p}{\eta \cdot \kappa}$$

kde Δp je rozdíl tlaků vyvolávající proudění kapaliny, ζ - elektrokinetický potenciál, κ - konduktivita a η - viskozita kapaliny, ε_r - relativní permitivita kapaliny, ε_0 - permitivita vakua.

Proudový potenciál vzniká např. při protékání přírodních vod zemskou kůrou nebo u větších vodopádů, dále se s ním setkáváme v medicíně při proudění krve v kapilárách organismů [30].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo studium a popis povrchových a elektrokinetických vlastností kmenu bakterie *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus bulgaricus*, které se hojně využívají v mlékárenském průmyslu.

Pro studium a náležitý popis těchto vlastností byly vybrány následující metody, které jsou pro tento účel použity i v dostupné literatuře týkající se předmětného studia. Mezi tyto metody patří především test adheze na polystyren, metody MATH a MATS a dále měření elektrokinetického (zeta) potenciálu.

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Použité mikroorganismy

V experimentální části této práce byl použit kmen CCDM 69 *Streptococcus thermophilus* a kmen CCDM 235 *Lactobacillus bulgaricus*.

6.2 Chemikálie

Použité chemikálie byly dodány firmou Sigma-Aldrich a byly použity již bez dalšího přečištění, a to zejména z důvodu, že jejich čistota byla poměrně vysoká, uzpůsobená nárokům pro podobný typ experimentů. Deionizovaná voda použitá ve všech experimentech byla vlastní produkce. Výčet upotřebených chemikálií pro dané metody je přehledně uveden níže.

MATS test:

Chloroform

Hexadekan

Ethylether

Hexan

Fosfátový pufr

Zeta potenciál:

KCl, KOH, HCl

MATH test:

PUM (22,2 g/l $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$; 7,26 g/l KH_2PO_4 ; 1,8 g/l H_2NCONH_2 ; 0,2 g/l,

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$)

PBS (0,98 g/l $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$; 0,68 g/l KH_2PO_4 ; 8,77 g/l NaCl)

KPi (0,98 g/l $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$; 0,68 g/l KH_2PO_4)

Toluen

Přilnavost k polystyrenu:

Fosfátový pufr

KOH

H₃PO₄

6.3 Přístroje a pomůcky

UV-VIS Spektrometr Thermo Helios Alfa

Přístroj Malvern Zetasizer 3000 HSA pro měření zeta potenciálu

Inverzní mikroskop Olympus

Digitální fotoaparát Olympus

Vortexové míchadlo, autokláv, inkubační komora, pH metr, a další, zejména spotřební pomůcky.

6.4 Metody

6.4.1 Kultivace bakteriálních buněk

6.4.1.1 Kultivační půdy

Bujon M17 pro kultivaci bakterie *Streptococcus thermophilus*

M17	3,73 g
10% roztok glukózy	1 ml
10% roztok laktózy	5 ml
voda	95 ml

Příprava bujonu:

Bylo naváženo 3,73 g půdy M17 a rozpuštěno v 95 ml vody. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Poté bylo přidáno 5 ml 10% sterilního roztoku glukózy a 1 ml 10% sterilního roztoku laktózy. Takto připravený bujon byl rozlit do zkumavek. Pomocí lžičky se asepticky vnesly lyofilizované kultury do zkumavky. Bakteriální kultury byly ponechány 24–48 hodin v termostatu při teplotě 37 °C.

Bujon MRS pro kultivaci bakterie *Lactobacillus bulgaricus*

MRS	5,52 g
voda	100 ml

Příprava bujonu:

Bylo naváženo 5,52 g půdy MRS a rozpuštěno ve 100 ml vody. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Takto připravený bujon byl rozlit do zkumavek. Pomocí lžičky se asepticky vnesly lyofilizované kultury do zkumavky. Bakteriální kultury byly ponechány 24–48 hodin v termostatu při teplotě 37 °C.

6.4.2 Přilnavost na polystyren

Test je založen na předpokladu korekce mezi hydrofobními buňkami a polystyrenem. Buňky byly promyty vodou a centrifugovány (1700 ot./min). Tento postup byl proveden 2x po sobě. Následně byla změřena absorbance při vlnové délce odpovídající hodnotě 570 nm. $A = 1,0$. Po této operaci 1 ml bakteriální suspenze při pH 3,0; 5,0; 7,0; 9,0 nalijeme doprostřed Petriho misky a ponecháme po dobu 24 hodin. Následně přebytečnou buněčnou suspenzi oddělíme a vzorek dokonale opláchneme pomocí deionizované vody umístěné v kádince o objemu 2 litry, kde je dostatečné množství deionizované vody. Tímto postupem oddělíme mikroorganismy, které na povrchu nejsou vázány mezimolekulovými silami, ale na povrch se dostaly pouze sedimentací v buněčné suspenzi. Hodnotu pH měříme pH metrem a upravujeme přikapáváním hydroxidu sodného nebo kyseliny fosforečné.

6.4.3 Mikrobiální adheze k rozpouštědlu (MATS)

Technika je založena na mikrobiální afinitě k monopolárnímu a polárnímu rozpouštědlu. Monopolární rozpouštědlo může být kyselé (akceptor elektronů) nebo zásadité (donor elektronů). Obě rozpouštědla musí mít podobné povrchové napětí (Lifshitz-van der Waals komponenty). Jako rozpouštědlo se používají páry chloroform (akceptor elektronů) a hexadekan, dále ethylether (elektronový dárce) a hexan. Výsledky jsou uvedeny jako procenta z vázaných buněk:

$$\% Adheze = 1 - A / A_0$$

kde u A_0 a A je měřena optická hustota při 570 nm vodné mikrobiální suspenze před a po promíchání. Hydrofobita je definována jako buněčné adheze na hexadekan. Elektronový donor (EDC) se získá buněčnou přilnavostí k chloroformu, od kterého je odečtena přilnavost k hexadekanu. Elektronový akceptor (EAC) je vyjádřen jako přilnavost buňky k ethyletheru minus buněčná přilnavost k hexanu. Narostené bakteriální buňky v bujonu byly promyty vodou, vortexovány a centrifugovány při 1700 ot./min. Provedené experimenty byly triplikovány a výsledná hodnota je aritmetickým průměrem naměřených hodnot.

Bakteriální buňky byly resuspendovány v 1 ml fosfátového pufru (0,1M, pH 7). Následně byla změřena optická hustota při 570 nm. Tato bakteriální suspenze (3,6 ml) byla vortexována (1500 ot./min) 50 sekund s 0,6 ml rozpouštědla – došlo ke spojení fází. Po 10 minutách se fáze rozdělily.

6.4.4 Mikrobiální adheze k uhlovodíkům (MATH)

Zkouška je založena na tendenci některých bakterií adherovat během krátké doby míchání na povrchy kapek kapalných uhlovodíků. Bakteriální buňky narostené v bujonu byly promyty vodou, vortexovány a centrifugovány při 1700 ot./min. Na tomto místě je třeba připomenout, že metoda MATH je používána standardizována po dobu více než 25 let a tvoří stabilní inventář pro popis povrchových vlastností mikrobiálních systémů.

Po oddělení vody byly buňky resuspendovány v pufru (PUM, PBS, KPi). Následně byla změřena vlnová délka bakteriální suspenze, která odpovídá hodnotě A_0 .

Tato bakteriální suspenze (4 ml) byla po dobu 10 sekund promíchána v přítomnosti toluenu (0,2 ml). Po 10 minutách došlo k rozdělení fází a byla změřena adsorbance vodné fáze. Tento postup byl opakován v 10 minutových intervalech se všemi pufrů. Výslednou hodnotou tohoto měření je R_0 , což je tzv. počáteční poměr, který je odečten ze závislosti $\log(A/A_0 \cdot 100)$ proti času míchání, což bylo postupně 10, 20, 30, 40 a 50 s. Tato hodnota tedy ve svém důsledku udává míru adheze buněk na uhlovodík použitý v experimentu. Jako uhlovodík je zpravidla používán toluen nebo hexadekan. Nicméně použití jiných uhlovodíků není vyloučeno s ohledem na podobnou polární povahu těchto organických chemikálií.

6.4.5 Zeta potenciál

Princip měření zeta potenciálu je založen na tzv. Laser-Dopplerově elektroforéze (LDE). LDE je měření pohybu koloidních částic umístěných v elektrickém poli. Měření se používá pro určení znaménka náboje na povrchu částic a dále jejich elektroforetická mobilita, která se vztahuje k povrchovému náboji a zeta potenciál.

Dalším efektem vznikajícím díky vloženému elektrickému poli je pohyb kapaliny při kontaktu se staticky nabitou pevnou fází. Tento pohyb se nazývá elektroosmóza a jeho výskyt je způsoben záporně nabitými stěnami kyvety. Naštěstí je zde v kyvetě místo, kde elektroosmotický tok rozpouštědla je nulový, a proto měřená rychlost částic je elektroforetická rychlost. Toto místo se nazývá stacionární vrstva. Zde se kříží laserové paprsky, dochází k vytváření interferenčních proužků, jejichž poloha a velikost závisí na rychlosti částic. Intenzita rozptýleného světla se snímá fotonásobičem. Množství částic v rozptylovém objemu je velké, takže statistika měření je velmi dobrá.

Zlepšení systému spočívá v modulaci jednoho paprsku pomocí pohyblivého zrcadla. Naměřená data jsou pomocí Fourierovy transformace převedena na frekvenční spektrum. Tyto frekvence jsou pak převedeny na rychlosti částic, elektroforetické mobility a konečně na zeta potenciál.

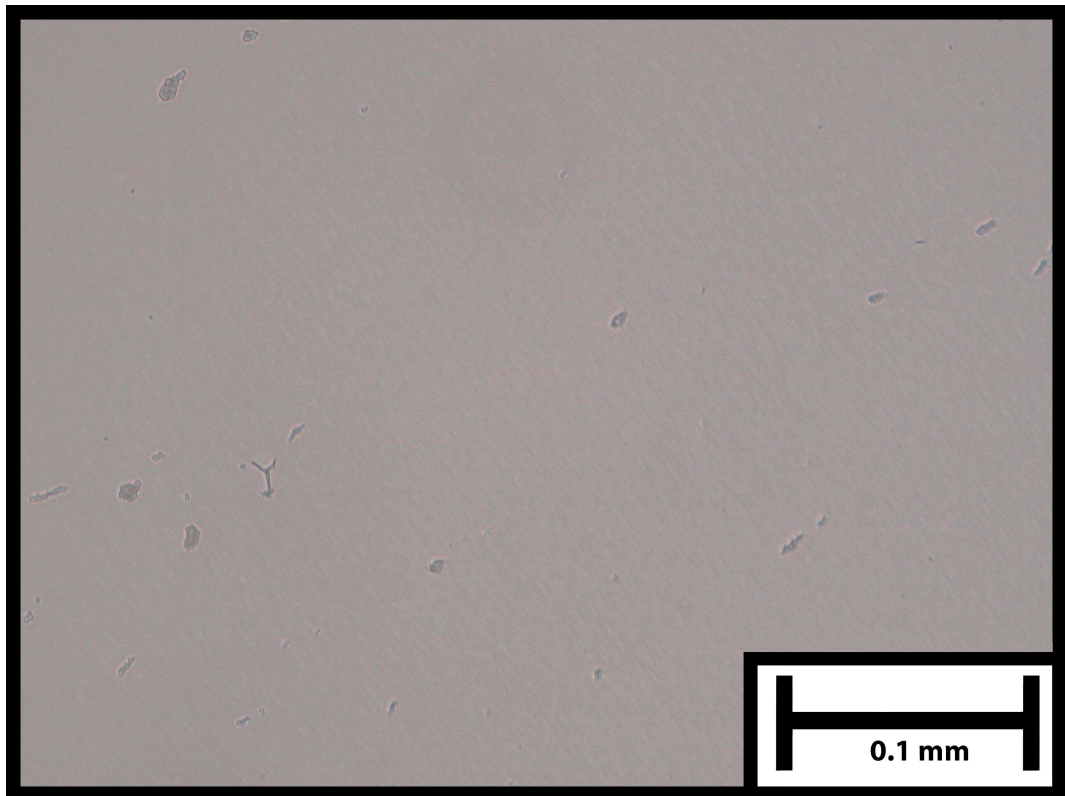
7 VÝSLEDKY A DISKUSE

7.1 Přílnavost na polystyren

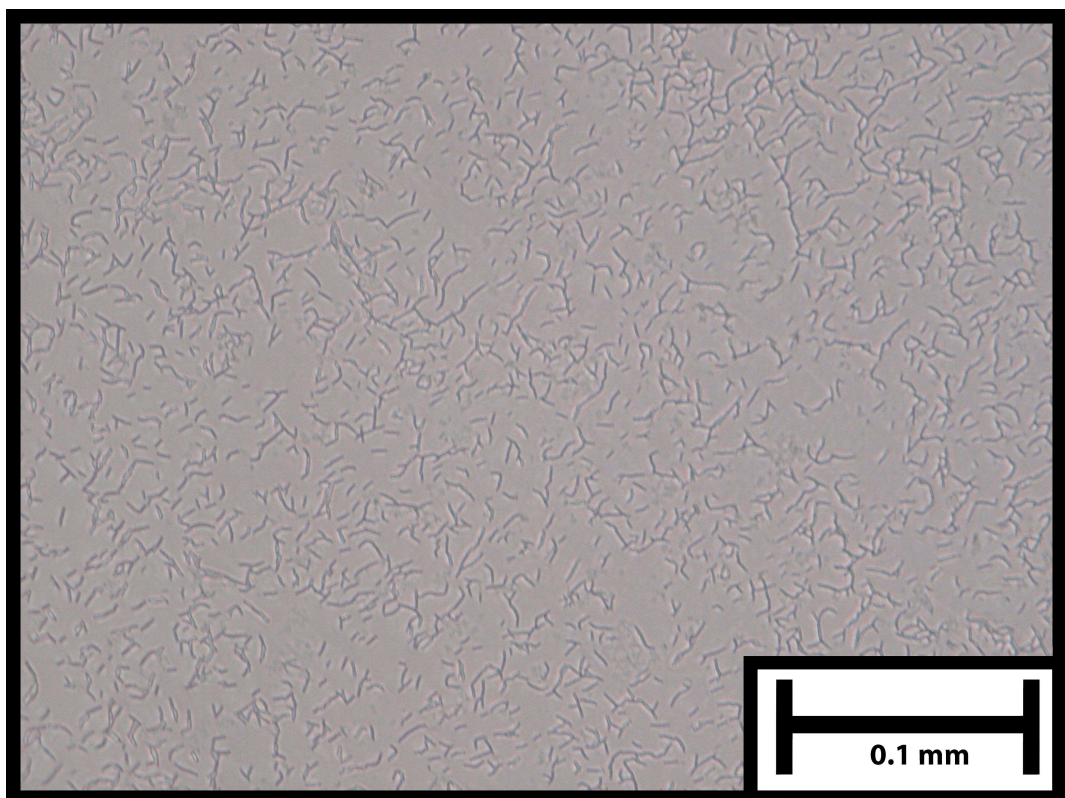
Pro studium přílnavosti na polystyrenu byly použity jako substrát Petriho misky. Tento test je založen na faktu, že závislost mezi hydrofobicitou buněk a jejich adheze k polystyrenu je ve vzájemné souvislosti. Buňky byly resuspendovány v 0,1M fosfátovém pufru a pH bylo ustáleno pomocí roztoků H_3PO_4 a KOH. Takto připravené suspenze byly aplikovány do Petriho misek. Všechny uvedené experimenty byly 3x opakovány a výsledky dosahovaly výrazné shody. Petriho misky pro experiment byly nejprve omyty dostatečným množstvím vody, dále pak roztoků kationaktivního tenzidu a dále neionogenního tenzidu. Po této operaci opět došlo k oplachu dostatečným množstvím vody a následném oplachu v deionizované vodě. Čas pro experimenty spojené s adhezí mikroorganismů byl 24 hodin. Po této době byl vzorek definovaným způsobem opláchnut a ponechán po dobu 2 hodin za laboratorních podmínek, aby došlo k vysušení Petriho misky. Následně byly Petriho misky s mikroorganismy podrobeny mikroskopickému studiu. Zvolené zvětšení na mikroskopu, které nejvíce odpovídalo povaze experimentu, bylo zvoleno 400x. Výsledné obrázky pro oba kmeny při různých pH experimentu použitých bakterií jsou uvedeny přehledně níže (obr. 14–21).

Z výsledných obrázků plyne, že pro *Streptococcus thermophilus* pro pH 3 nedochází k výrazné adhezi na povrchu polystyrenového substrátu. S nárůstem pH se však schopnosti adheze výrazně zvyšují a při pH 9 je tento mikroorganismus schopen téměř úplně pokrýt povrch měřeného substrátu a dokonce tvořit i vícevrstvé buněčné systémy. Podrobnější popis kinetiky tohoto mechanismu může být vysvětlen až po konfrontaci s dalšími výsledky, zejména s výsledky měření zeta potenciálu.

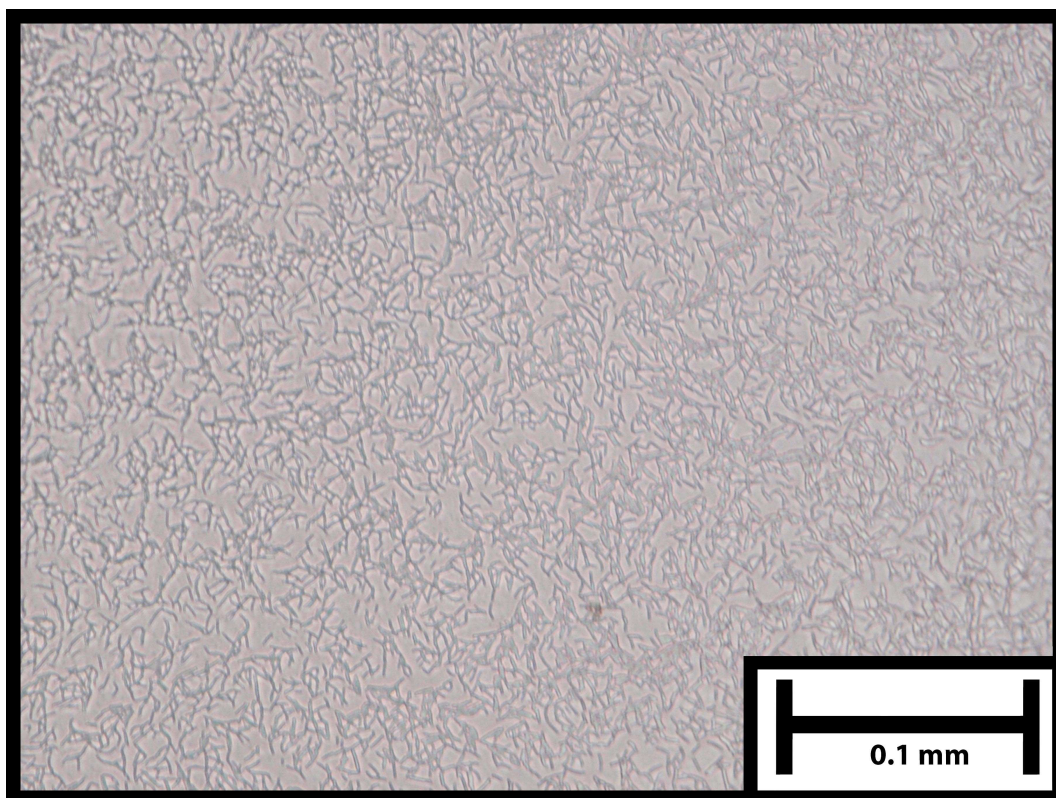
Z fotografií odpovídajících popisu výsledků pro *Lactobacillus bulgaricus* docházíme přibližně k obdobnému popisu, kdy se zvyšujícím se pH roste také adheze mikroorganismů.



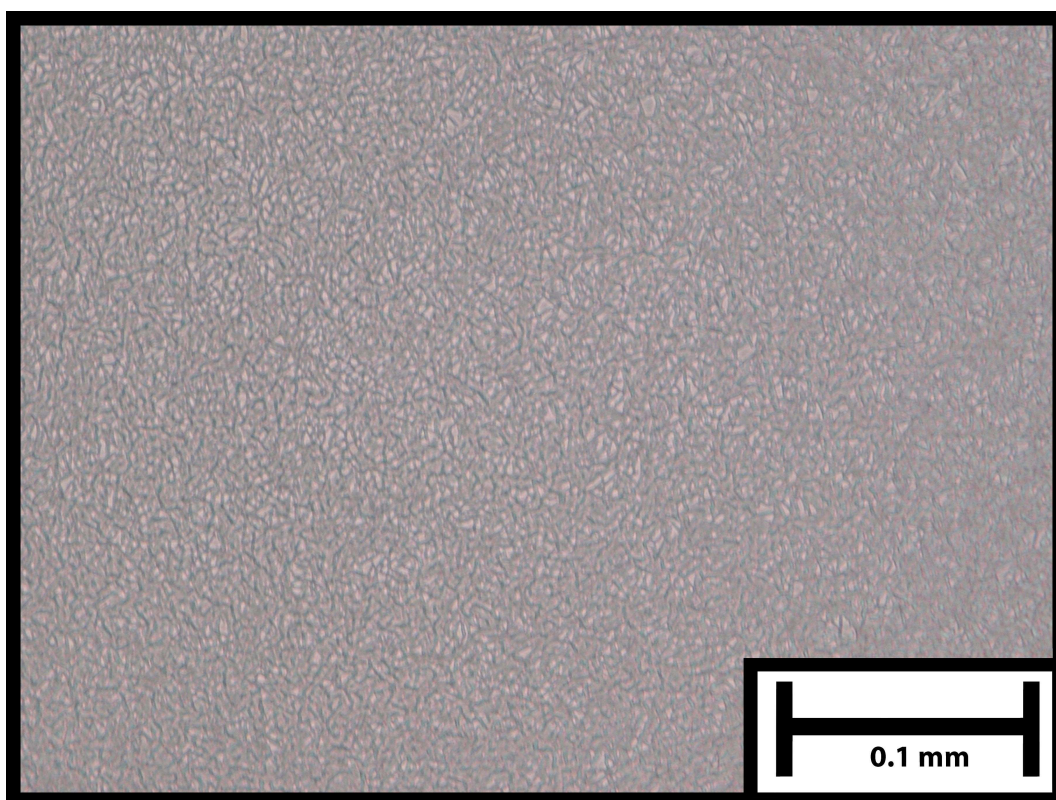
Obr. 14. Mikroskopický snímek adheze kmene *Streptococcus thermophilus* při pH 3



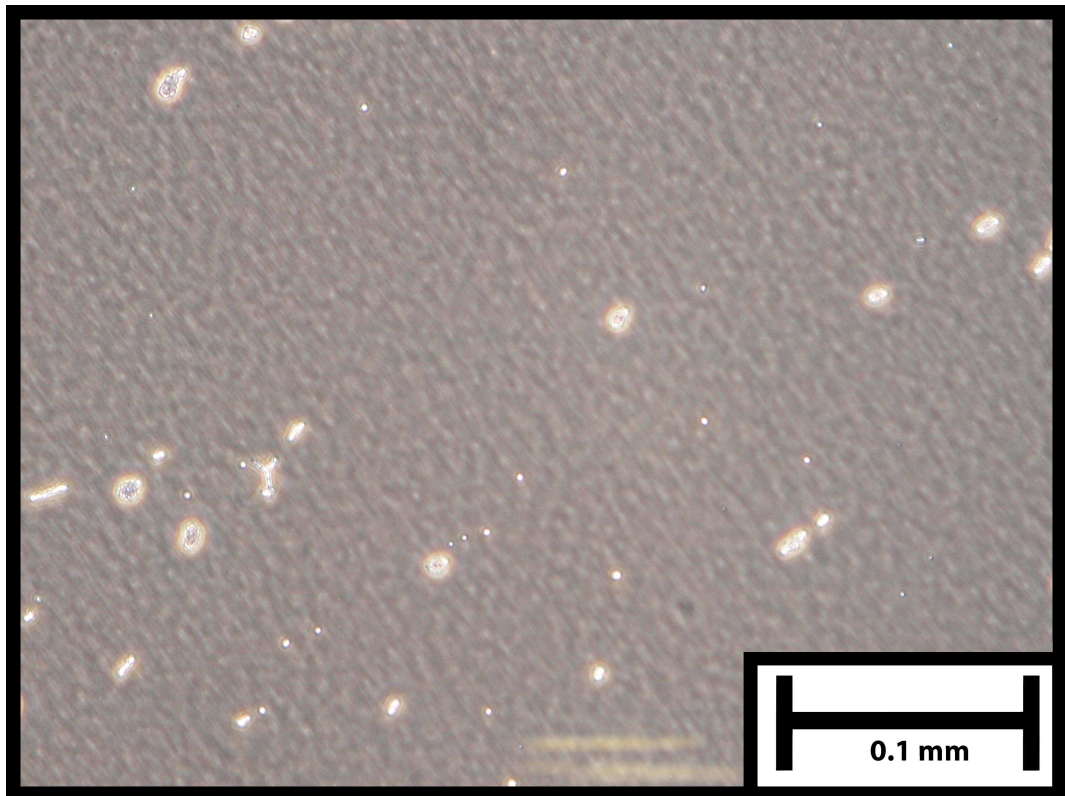
Obr. 15. Mikroskopický snímek adheze kmene *Streptococcus thermophilus* při pH 5



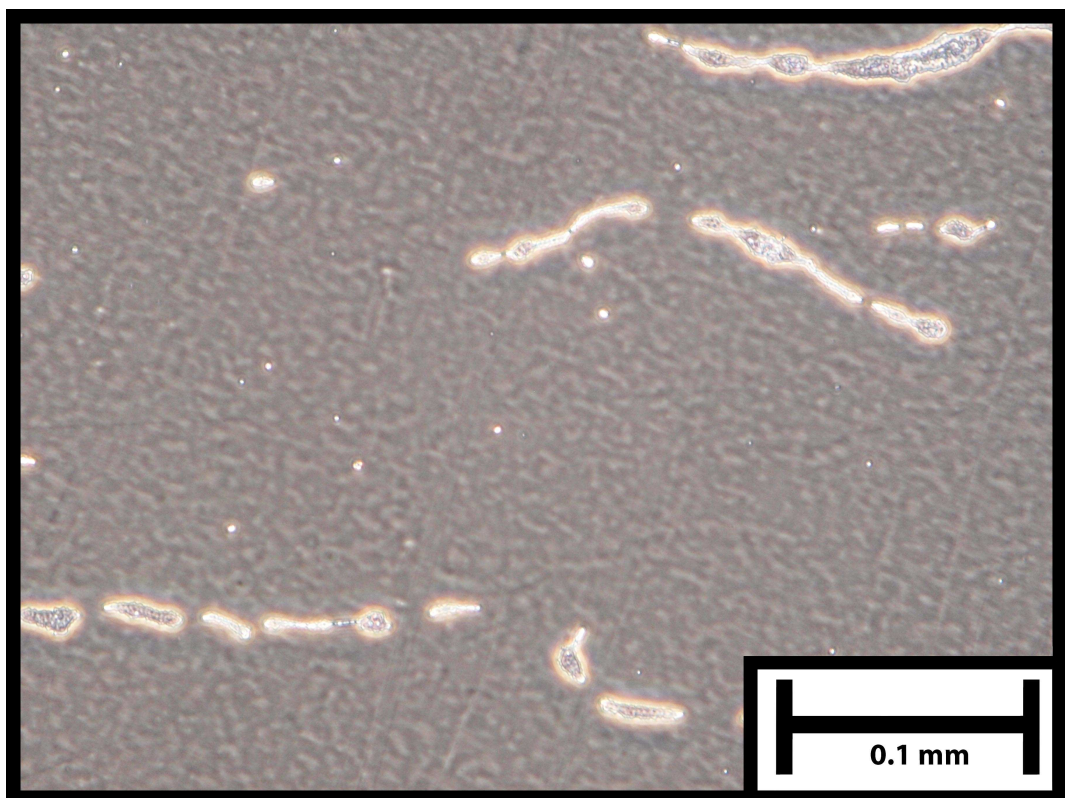
Obr. 16. Mikroskopický snímek adheze kmene *Streptococcus thermophilus* při pH 7



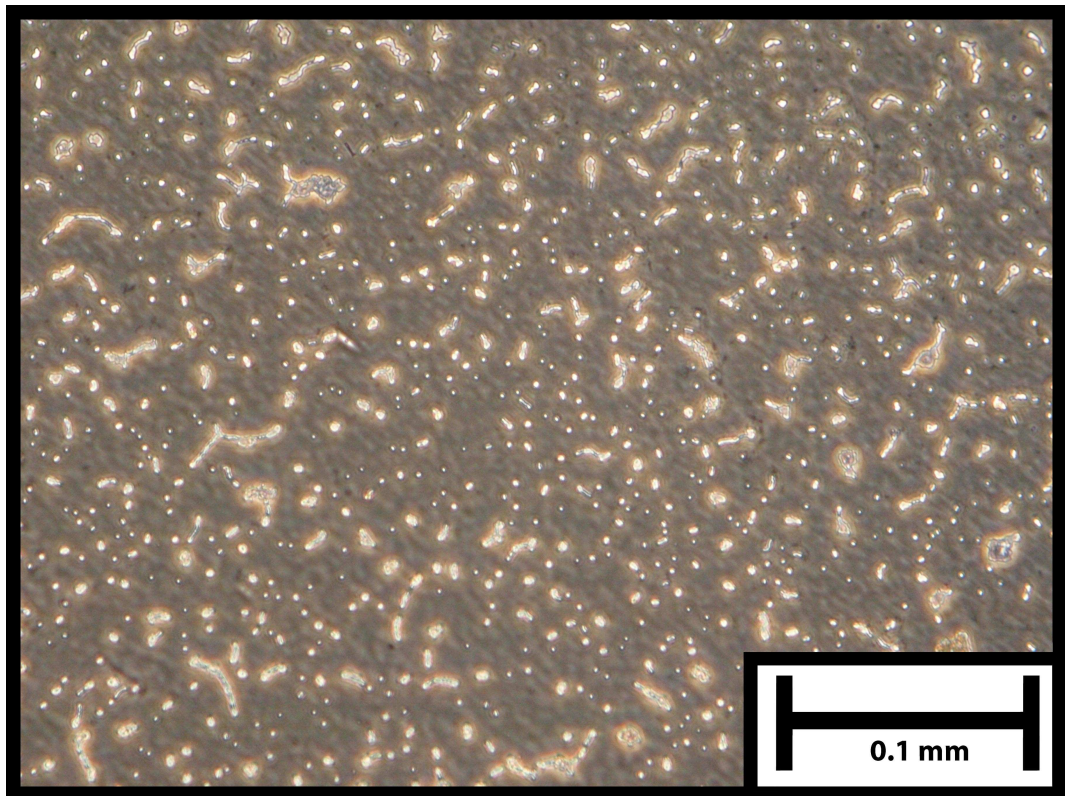
Obr. 17. Mikroskopický snímek adheze kmene *Streptococcus thermophilus* při pH 9



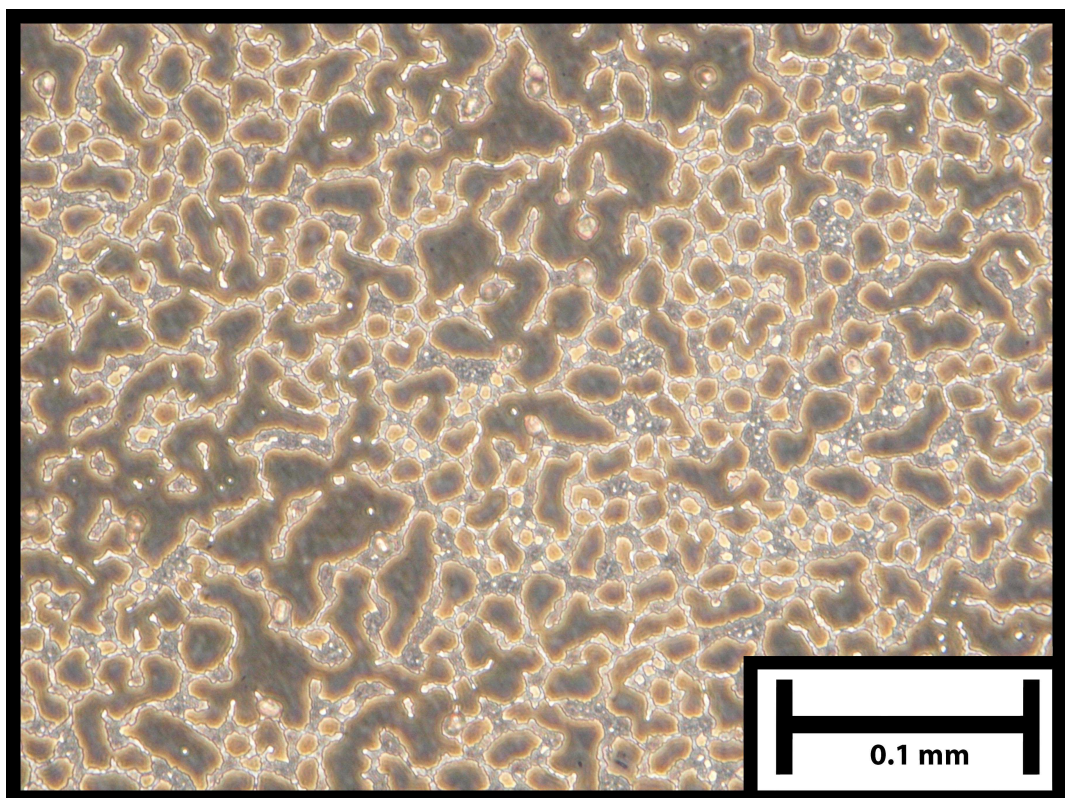
Obr. 18. Mikroskopický snímek adheze kmene *Lactobacillus bulgaricus* při pH 3



Obr. 19. Mikroskopický snímek adheze kmene *Lactobacillus bulgaricus* při pH 5



Obr. 20. Mikroskopický snímek adheze kmene *Lactobacillus bulgaricus* při pH 7



Obr. 21. Mikroskopický snímek adheze kmene *Lactobacillus bulgaricus* při pH 9

7.2 MATS test

MATS test je jedním ze základních inventářů při měření povrchových vlastností mikroorganismů. Pomocí tohoto testu můžeme popsat Lewisovy acid-base interakce, tzn. elektron donor-elektron akceptorové interakce. Tato technika je založena na afinitě mikroorganismů k tzv. monopolárním a polárním rozpouštědlům. Monopolární rozpouštědlo je ve většině případů kyselé, tedy elektron akceptorové nebo zásadité elektron donorové. V každém případě tato rozpouštědla musí mít přibližně stejnou hodnotu Lifshitz-van der Waalsovy složky povrchového napětí. Buněčná suspenze byla připravena dle popisu v praktické části, která byla dodržována pro všechny experimenty. Mezi výsledné hodnoty patří především (Hyph), který je definován jako adheze buněk na hexadekan. Elektron donorové vlastnosti mikroorganismů jsou vyjádřeny pomocí hodnoty (EDC), která je získána jako rozdíl buněčné adheze na chloroform odečtené od buněčné adheze na hexadekan. Poslední charakteristikou je (EAC), která popisuje elektron akceptorový charakter mikroorganismů. Tato je dána rozdílem adheze k ethyletheru odečtené od adheze hexanu. Míru adheze měříme jako absorbanci při vlnové délce 570 nm, která přímo úměrně odpovídá schopnostem adheze. Výše uvedené parametry pro námi zkoumané substráty jsou přehledně uvedeny ve formě tabulky níže.

Z naměřených výsledků vyplývá, že hodnoty Hyph pro *Streptococcus thermophilus* nabývají hodnot 31,8 %, což je poměrně nízká hodnota a vypovídá o značné hydrofilite tohoto mikroorganismu. Tato hodnota je plně v souladu s již publikovanými výsledky jiných autorů, kde v závislosti na zdroji se tyto hodnoty pohybují okolo 30 %. Taktéž je třeba podotknout, že povrch tohoto mikroorganismu vykazuje poměrně vysoký elektron donorový charakter (EDC), který v předmětném případě činí 41,6 %. Zajímavý je taktéž poměrně výrazný elektron akceptorový charakter (EAC), který nabývá hodnot 22,9 %. Naproti tomu *Lactobacillus bulgaricus* vykazuje vyšší hodnotu Hyph, v tomto případě 36,8 %. Co se týče hodnoty EDC, která je v tomto případě 43,6 %, je možno říci, že elektron donorový charakter je přibližně stejný pro oba kmeny mikroorganismů. Výrazného rozdílu však *Lactobacillus bulgaricus* vykazuje v hodnotě EAC, kde nabývá hodnot pouze 4,3 %.

Tab. 2. Výsledné povrchové charakteristiky získané metodou MATS

mikroorganismus		MATS test		
		Hyph (%)	EDC (%)	EAC (%)
<i>Streptococcus thermophilus</i>	průměr	31,8	41,6	22,9
	sm. odch.	2,4	8,1	6,3
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	průměr	36,8	43,6	4,3
	sm. odch.	4,5	11,4	1,2

7.3 MATH test

MATH test je jednou z nejrozšířenějších metod pro studium povrchových vlastností mikroorganismů. Tato metoda spočívá v popisu mikrobiální adheze k uhlovodíkům. Tento efekt se studuje zpravidla při různých pH a z toho důvodu je buněčná suspenze vytvořena v prostředí tlumících roztoků o různém pH. V našem případě byly použity následující pufrů: KPi, u něhož pH dosahovalo hodnoty 6,9, dále pak PUM, jehož pH je 7,1, a konečně PBS s hodnotou pH 7,6. Tyto rozdílné hodnoty pH jsou dány především rozdílným složením těchto pufrů, které je popsáno v praktické části. Použitým uhlovodíkem byl v našem případě toluen, který je vedle hexadekanu nejčastěji používaný hydrofobní materiál. Výsledná průměrná hodnota byla spočítána jako aritmetický průměr deseti nezávislých měření, při kterých byl odečten parametr R_0 . Empirický a grafický postup pro získání tohoto parametru je uveden v praktické části této práce. Získané výsledky jsou udány formou tabulek, které jsou umístěny níže.

Z výsledné hodnoty R_0 pro *Streptococcus thermophilus* resuspendovaný v pufru KPi, který dosahuje hodnoty 0,336, lze usoudit, že uvedený mikroorganismus vykazuje hydrofilní charakter. To je dáno především tím, že hodnoty pod 0,4 jsou pro hydrofilní mikroorganismy charakteristické. Pro pufr PUM nabývá R_0 hodnot 0,367 pro PBS 0,405. Je tedy zřejmé, že hodnota R_0 pro tento mikroorganismus přímo souvisí s pH prostředí, ve kterém se nachází. Obecně lze tedy říct, že tato hodnota se vzrůstajícím pH vzrůstá. V případě druhého zvoleného mikroorganismu, tedy *Lactobacillus bulgaricus*, lze nalézt obdobnou závislost. Hodnoty R_0 však dosahují ještě nižších hodnot pro všechny zvolené tlumící roztoky, tedy KPi, PUM i PBS.

Tab. 3. Výsledné povrchové charakteristiky získané metodou

MATH pro Streptococcus thermophilus

pufr	KPi	PUM	PBS
měření	Ro (min ⁻¹)	Ro (min ⁻¹)	Ro (min ⁻¹)
1	0,32	0,37	0,41
2	0,34	0,38	0,43
3	0,31	0,35	0,38
4	0,36	0,39	0,41
5	0,35	0,37	0,39
6	0,32	0,35	0,40
7	0,34	0,35	0,39
8	0,35	0,38	0,41
9	0,34	0,37	0,42
10	0,33	0,36	0,41
průměr	0,336	0,367	0,405
sm. odch.	0,016	0,014	0,015

Tab. 4. Výsledné povrchové charakteristiky získané metodou

MATH pro Lactobacillus bulgaricus

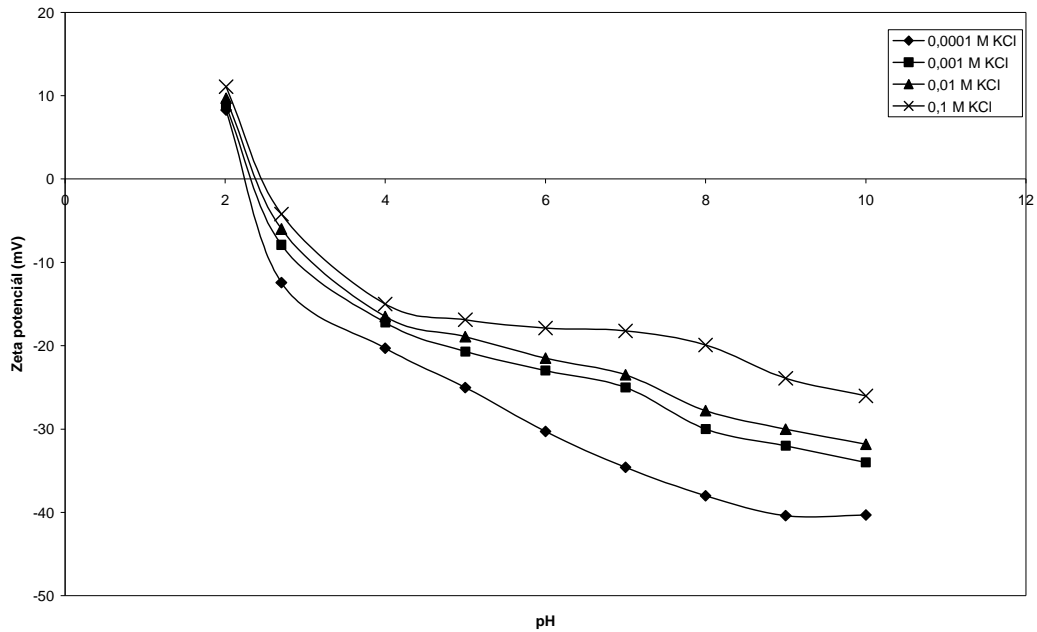
pufr	KPi	PUM	PBS
měření	Ro (min ⁻¹)	Ro (min ⁻¹)	Ro (min ⁻¹)
1	0,18	0,21	0,24
2	0,21	0,23	0,22
3	0,19	0,22	0,21
4	0,17	0,24	0,23
5	0,18	0,26	0,25
6	0,19	0,21	0,24
7	0,20	0,23	0,23
8	0,21	0,22	0,25
9	0,18	0,21	0,26
10	0,19	0,23	0,24
průměr	0,190	0,226	0,237
sm. odch.	0,013	0,016	0,015

7.4 Měření zeta potenciálu

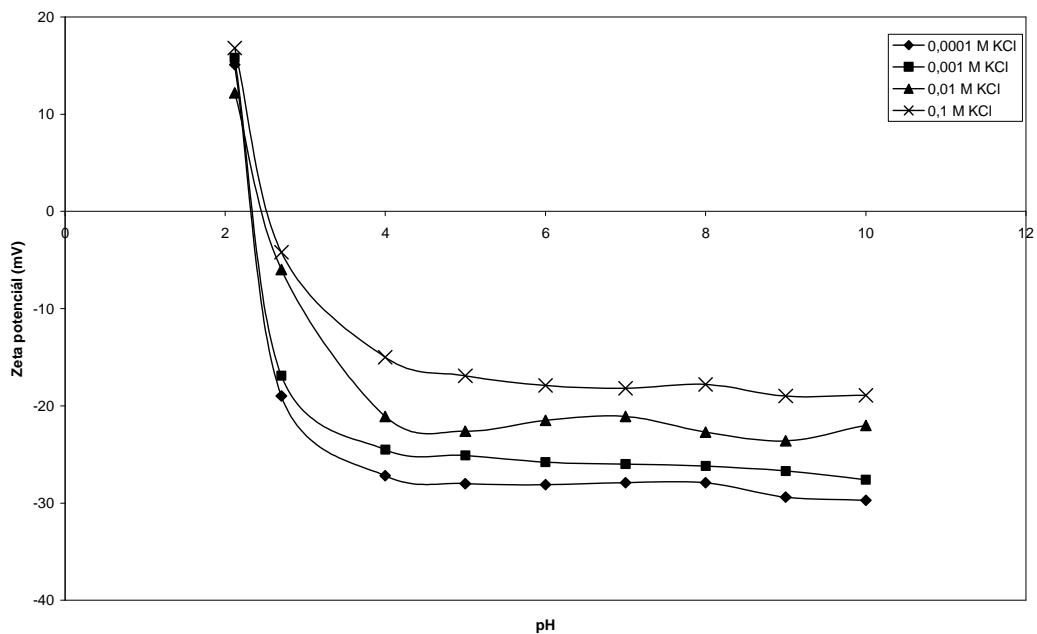
Měření elektrokinetického potenciálu, který je v literatuře často označován jako potenciál zeta, je nejčastější metodou k popisu povrchového náboje částic koloidních roztoků. Povrchový náboj je závislý především na dvou proměnných hodnotách. První z nich je pH prostředí, které povrchový náboj silně ovlivňuje. Další hodnotou je iontová síla prostředí, která má taktéž značný vliv. V našem případě byl zeta potenciál měřen pomocí přístroje Malvern Zetasizer, který pracoval na principu laser Dopplerovy elektroforézy a tento je popsán v praktické části této práce. Při našich měřeních byly hodnoty pH pro měření zvoleny přibližně 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 a iontová síla roztoku buněčné suspenze byla ustavena pomocí roztoků KCl o různé koncentraci. V našem případě konkrétně 0,1 dále 0,01, taktéž 0,001 a konečně 0,0001. Při těchto měřeních lze taktéž odečíst tzv. izoelektrický bod, který je charakterizován nulovou hodnotou zeta potenciálu vyjádřeného mV. Nedílnou úvahou při interpretaci v závislosti zeta potenciálu na pH je taktéž stabilita suspenze, která bývá vyjádřena hodnotou zeta potenciálu. Tato je však závislá na použité literatuře. Převládá však široce uznávaný názor, že stabilní koloidní roztok lze brát v úvahu tehdy, pokud hodnota zeta potenciálu nabývá hodnot vyšších než + 20mV, případně nižších než -20 mV. Jako bod nejvyšší nestability je považována nulová hodnota zeta potenciálu, tedy izoelektrický bod. Této extrémní nestability je v praxi široce využíváno, kupříkladu při čištění odpadních vod, kde je do lázně přidáváno určité množství elektrolytu, díky němuž se systém dostane do nestability a koloidní částice začnou koagulovat, což vede k vytváření shluků, které pak vlivem gravitace sedimentují na dno a jsou mechanicky odstraněny. Naměřené hodnoty jsou níže uvedeny v grafické podobě.

Z naměřených hodnot kmene *Streptococcus thermophilus* vyplývá, že izoelektrický bod se pro všechny hodnoty koncentrace KCl pohybuje v rozmezí hodnot pH přibližně 2,2–2,5. Téměř v celé oblasti pH vykazuje zeta potenciál záporných hodnot, z čehož vyplývá, že jeho povrch je záporně nabitý. Z výsledků taktéž plyne, že se zvyšující se iontovou silou klesá taktéž stabilita systému. Přibližně totéž lze říci i o mikroorganismu *Lactobacillus bulgaricus*. V případě tohoto mikroorganismu však zeta potenciál po překročení izoelektrického bodu strměji nabývá záporných hodnot. Tyto výsledky jsou v přímém souladu a potvrzují závěry získané metodou adheze na polystyren, kde zvýšená adheze byla pozorována při vyšších hodnotách pH. Jinými slovy, čím je bakteriální suspenze stabilnější z elektrokinetického hlediska, tím je sledována vyšší míra adheze na povrchu polystyrenu.

Jak již bylo vysvětleno výše, v případě nízkých hodnot pH v okolí izoelektrického bodu může docházet ke koagulaci, tedy převládá interakce buňka–buňka nad interakcí buňka–stěna.



Obr. 22. Závislost zeta potenciálu na pH pro kmen *Streptococcus thermophilus*



Obr. 23. Závislost zeta potenciálu na pH pro kmen *Lactobacillus bulgaricus*

ZÁVĚR

V této diplomové práci byly popsány povrchové a elektrokinetické vlastnosti vybraných jogurtových kultur. Tyto kultury byly jmenovitě *Lactobacillus bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*. K popisu a charakterizaci povrchových vlastností byly provedeny následující měření založené na studiu adheze na povrch polystyrenu, MATH test, MATS test a měření elektrokinetického (zeta) potenciálu.

Z výsledných obrázků získaných z pozorování adheze k polystyrenu plyne, že pro *Streptococcus thermophilus* pro pH 3 nedochází k výrazné adhezi na povrch polystyrenového substrátu. S nárůstem pH se však schopnosti adheze výrazně zvyšují a při pH 9 je tento mikroorganismus schopen téměř úplně pokrýt povrch měřeného substrátu a dokonce tvořit i vícevrstvé buněčné systémy. Z fotografií odpovídajících popisu výsledků pro *Lactobacillus bulgaricus* docházíme přibližně k obdobnému popisu, kdy se zvyšujícím se pH roste také adheze mikroorganismů.

Z naměřených výsledků MATS testu vyplývá, že hodnoty Hyph pro *Streptococcus thermophilus* nabývají hodnot 31,8 %. Povrch tohoto mikroorganismu vykazuje poměrně vysoký elektron donorový charakter (EDC), který v předmětném případě činí 41,6 %, a taktéž poměrně výrazný elektron akceptorový charakter (EAC), který nabývá hodnot 22,9 %. *Lactobacillus bulgaricus* vykazuje hodnotu Hyph 36,8 % a EDC 43,6 %. Výrazného rozdílu však *Lactobacillus bulgaricus* vykazuje v hodnotě EAC, kde nabývá hodnot pouze 4,3 %.

Z výsledné hodnoty R_0 u MATH testu pro *Streptococcus thermophilus* resuspendovaný v pufru KPi dosahuje hodnoty 0,336. Pro pufr PUM nabývá R_0 hodnot 0,367 a pro PBS 0,405. V případě mikroorganismu *Lactobacillus bulgaricus* lze nalézt obdobnou závislost. Hodnoty R_0 však dosahují ještě nižších hodnot pro všechny zvolené tlumící roztoky, tedy KPi, PUM i PBS.

Z měření zeta potenciálu suspenze kmene *Streptococcus thermophilus* vyplývá, že izoelektrický bod se pro všechny hodnoty koncentrace KCl pohybuje v rozmezí hodnot pH přibližně 2,2–2,5. Téměř v celé oblasti pH vykazuje zeta potenciál záporných hodnot, z čehož vyplývá, že jeho povrch je záporně nabitý. Z výsledků taktéž plyne, že se zvyšující se iontovou silou klesá taktéž stabilita systému. Přibližně totéž lze říci i o mikroorganismu

Lactobacillus bulgaricus. V případě tohoto mikroorganismu však zeta potenciál po překročení izoelektrického bodu strměji nabývá záporných hodnot.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] LIU, S.-Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, 83, s. 115-131.
- [2] RENAULT, P. Genetically modified lactic acid bacteria: applications to food or health and risk assessment. *Biochimie*. November 2002, 84, s. 1073-1087. ISSN 0300-9084.
- [3] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře*. Praha: SNTL, 1983. 363 s.
- [4] *Katedra botaniky* [online]. 2008 [cit. 2010-04-10]. Kultivace a očkování mikroorganismů. Dostupné z WWW: <http://botany.upol.cz/prezentace/sedlarova/Cviceni9_11.pdf>.
- [5] TEPLÝ, M., et al. *Čisté mlékařské kultury. Výroba, kontrola, použití*. Praha: SNTL, 1984. 295 s. ISBN 04-806-84.
- [6] KNĚŽ, M., et al. *Čisté mlékařské kultury a jejich použití v mlékárenském průmyslu*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1960. 270 s. ISBN 2-367.825-60.
- [7] HYLMAR, B. *Zvyšování nutričních a dietetických vlastností mléka bakteriemi mléčného kvašení*. Praha: SNTL, 1985. 141 s. ISBN 80-85126-06-2.
- [8] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., BUDÍNSKÝ, P. *Potravinářská biochemie III*. Zlín: UTB – Academia centrum, 2006. 123 s. ISBN 80-7318-396-x.
- [9] KAREL, H. *Fyziologie a biochemie bakterií*. Brno: MU (UJEP), 1979. 164 s.
- [10] *Všcht* [online]. 2007 [cit. 2010-04-18]. Příprava kysaného zelí. Dostupné z WWW: <http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/navody/oborII/zeli.pdf>.
- [11] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- [12] KLABAN, V. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 2005: Nakladatelství Galén, 2005. 654 s. ISBN 80-7262-341-9.
- [13] TEPLÝ, M., et al. *Kefír, jogurt, acidofilní a jiné kyselky*. Praha: SNTL, 1968. 185 s. ISBN 04-819-68.

- [14] MATER, D., et al. Streptococcus thermophilus and Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. *FEMS Microbiology Letters*. January 2006, 9, s. 185-187.
- [15] ŽIŽKA, B., MARTÍNKOVÁ, Z. *Mikrobiológia pre 4. ročník stredných priemyselných škôl potravinárskych, študijný obor spracovanie mlieka*. Bratislava: ALFA, 1980. 150 s. ISBN 80-05-00642-X.
- [16] HOUDKOVÁ ŠIMŮNKOVÁ, Š. *Kmm.zcu.cz* [online]. 2001 [cit. 2010-03-10]. Interakce povrchů s okolím. Dostupné z WWW: <<http://www.kmm.zcu.cz/CD/content/2.html>>.
- [17] SONOHARA, R., et al. Difference in surface properties between Escherichia coli and Staphylococcus aureus as revealed by electrophoretic mobility measurements. *Biophysical Chemistry*. 1995, 55, s. 273-277.
- [18] RAO, M., Yelloji K., et al. Electrokinetic properties of Streptococcus sanguis and Actinomyces naeslundii. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. March 1995, 4, s. 87-95.
- [19] BOONAERT, P., ROUXHET, P. Surface of Lactic Acid Bacteria: Relationships between Chemical Composition and Physicochemical Properties. *Applied and Environmental Microbiology*. June 2000, 66, s. 2548-2554. ISSN 0099-2240.
- [20] SCHÄFFER, Ch., MESSNER, P. The structure of secondary cell wall polymers: how Gram-positive bacteria stick their cell walls together. *Microbiology*. 2005, 10, s. 643-651.
- [21] VAN DER WAL, A., et al. Conductivity and Dielectric Dispersion of Gram-Positive Bacterial Cells. *Journal of Colloid and Interface Science*. February 1997, 186, s. 71-79.
- [22] VAN DER WAL, A., et al. Determination of the total charge in the cell walls of Gram-positive bacteria. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. June 1997, 9, s. 81-100.
- [23] ČECHOVÁ, L., JANALÍKOVÁ, M. *Obecná mikrobiologie*. Zlín: UTB – Academia centrum, 2007. 190 s. 978-80-7318-516-9.

- [24] *Capricornproducts* [online]. June 1989 [cit. 2010-05-15]. Lipoteichoic Acid. Dostupné z WWW: <<http://www.capricornproducts.com/corp/articles/lipoteichoicacid.pdf>>.
- [25] APRÁLEK, F. *Fyziologie bakterií*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986. 603 s.
- [26] AMBROŽOVÁ, J. *Mikrobiologie v technologii vod* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2004 [cit. 2010-04-12]. Dostupné z WWW: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/uid_isbn-80-7080-534-X/>. ISBN 80-7080-534-X.
- [27] TORIMURA, M., et al. Surface characterization and on-line activity measurements of microorganisms by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. January 1999, 1, s. 31-37.
- [28] CLAESSENS, A., et al. Acid–base activity of microorganisms. *Journal of Geochemical Exploration*. 2006, 3, s. 181-185.
- [29] MINOR, M., et al. Conductivity and Dielectric Dispersion of Gram-Positive Bacterial Cells. *Journal of Colloid and Interface Science*. February 1997, 1, s. 71-79.
- [30] BARTOVSKÁ, L., ŠIŠKOVÁ, M. *Co je co v povrchové a koloidní chemii* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2005 [cit. 2010-03-19]. Dostupné z WWW: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/motor/main.anotace.html>.
- [31] WILSONA, W., et al. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *Journal of Microbiological Methods*. 2001, 43, s. 153-164.
- [32] WILDOVÁ, M., RUMLOVÁ, M. Metody studia vzájemných interakcí proteinů. *Chem. Listy*. 2008, 102, s. 28-34.
- [33] FALKENBERG, W. *Technology* [online]. 2005 [cit. 2010-05-12]. Je měření náboje při výrobě papíru stále magií a záhadou? Dostupné z WWW: <www.pkc-tech.com/getfile.php?id=6>.

- [34] *Ústav biochemie a mikrobiologie* [online]. 2005 [cit. 2010-05-1]. Biofyzikální chemie. Dostupné z WWW: <<http://biomikro.vscht.cz/biofyzik/01-interakce-2005.pdf>>.
- [35] BOJKOVSKÝ, M. *Termodynamika* [online]. 2007 [cit. 2010-05-12]. Van der Waalsovy síly. Dostupné z WWW: <http://www.studiumchemie.cz/materialy/Martin_Bojkovsky/diplomka_www/index.html>.
- [36] FIALA, M. *IS MU* [online]. 2009 [cit. 2010-05-12]. Typy molekul, látek a jejich vazeb v organismech. Dostupné z WWW: <http://is.muni.cz/do/1499/el/estud/pdf/js09/biochem/web/pdf/typy_molekul.pdf>.
- [37] ILLNEROVÁ, H. *VŠCHT* [online]. 1998 [cit. 2010-05-2]. Denní rytmy v živé přírodě. Dostupné z WWW: <<http://teacher.vscht.cz/dokumenty/download/sbornik1998.pdf>>.
- [38] BRYNDA, E. *Nanobiotechnologie* [online]. 2006 [cit. 2010-05-4]. Integrace biologických a nebiologických systémů – nanobiotechnologie. Dostupné z WWW: <<http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/NH2006pdf/13.pdf>>.
- [39] KODÍČEK, M. *Biochemické pojmy: výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2010-03-11]. Dostupné z WWW: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es002/ebook.html?p=interakce_hydrofobni>.
- [40] *Biochemie* [online]. 2009 [cit. 2010-04-1]. Vztah antigen protilátka. Dostupné z WWW: <biochemie.upol.cz/doc/skripta/.../6_Vztah_antigen-protilatka.pdf>.
- [41] HOBZA, P. Nekovalentní interakce s přímou participací vodíku: vodíková vazba, nepravá vodíková vazba a dvouvodíková vazba. *Chem. Listy*. 2008, 102, s. 884-888.
- [42] MOZES, N., ROUXHED, P. G. Methods for measuring hydrophobicity of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. January 1987, 2, s. 99-112.
- [43] *Přírodovědecká fakulta* [online]. 2010 [cit. 2010-02-12]. Bakteriální buňka. Dostupné z WWW: <<http://web.natur.cuni.cz/~konop/Microbiology/Presentations/3%20Bunka.pdf>>.
- [44] LIU, Y., et al. Cell hydrophobicity is a triggering force of biogranulation. *Enzyme and Microbial Technology*. April 2004, 5, s. 371-379.

- [45] RODRÍGUEZ, V., et al. Role of lactobacillus cell surface hydrophobicity as probed by AFM in adhesion to surfaces at low and high ionic strength. *Colloids Surf B Biointerfaces*. March 2005, 1, s. 33-41.
- [46] BELLON-FONTAINE, M. N., RAULT, J., VAN OSS, C. J. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. July 1996, 7, s. 47-53.
- [47] KOUIDHI, B., et al. Cell surface hydrophobicity, biofilm formation, adhesives properties and molecular detection of adhesins genes in *Staphylococcus aureus* associated to dental caries. *Microb Pathog*. March 2010, 16, s. 112-119.
- [48] AMARAL, P. F., et al. Cell surface characterization of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. *Yeast*. September 2006, 12, s. 867-877.
- [49] ZOUEKI, C. W., GHOSHAL, S., TUFENKJI, N. Bacterial adhesion to hydrocarbons: Role of asphaltenes and resins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010, 8, s. 8.
- [50] BUSSCHER, H. J., VAN DE BELT-GRITTER, B., VAN DER MEI, H. C. Implications of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrophobicity 1. Zeta potentials of hydrocarbon droplets. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. November 1995, 4, s. 111-116.
- [51] POWER, L., et al. Time Lapse Confocal Microscopy Studies of Bacterial Adhesion to Self-Assembled Monolayers and Confirmation of a Novel Approach to the Thermodynamic Model. *Langmuir*. April 2007, 23, s. 5622-5629.
- [52] LAMA, C. N. C., et al. Study of the advancing and receding contact angles: liquid sorption as a cause of contact angle hysteresis. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2002, 96, s. 169-191.
- [53] POORTINGA, A. T., BOS, R., BUSSCHER, H. J. Measurement of charge transfer during bacterial adhesion to an indium tin oxide surface in a parallel plate flow chamber. *Journal of Microbiological Methods*. November 1999, 3, s. 183-189.

- [54] BOS, R., VAN DER MEI, H. C., BUSSCHER, H. J. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions-its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol Rev.* April 1999, 2, s. 179-230.
- [55] KOCHKODAN, V., et al. Adhesion of microorganisms to polymer membranes: a photobactericidal effect of surface treatment with TiO₂. *Desalination.* March 2008, 3, s. 380-385.
- [56] ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials.* April 2000, 7, s. 667-681.
- [57] VAN DER MEI, H. C., VAN DE BELT-GRITTER, B., BUSSCHER, H. J. Implications of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrophobicity 2. Adhesion mechanisms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* November 1995, 3, s. 117-126 .
- [58] *Portál 2. lékařské fakulty* [online]. 2008 [cit. 2010-04-9]. Lipidy. Dostupné z WWW: <mefanet-motol.cuni.cz/download.php?fid=168>.
- [59] SUDA, Y., et al. Cytokine-inducing glycolipids in the lipoteichoic acid fraction from *Enterococcus hirae* ATCC 9790. *FEMS Immunol Med Microbiol.* October 1995, 2, s. 97-112.
- [60] AMOROSO, A., et al. An affinity chromatographic method for the preparation of bacterial lipoteichoic acids. *Journal of Microbiological Methods.* March 1996, 1, s. 19-22.
- [61] BRYERS, J. D. Bacterial biofilms. *Current Opinion in Biotechnology.* April 1993, 2, s. 197-204.
- [62] TAMIME, A. Y., ROBINSON, R. K. *Yoghurt: science and technology* [online]. England: Woodhead Publishing Ltd, 1999 [cit. 2010-05-11]. Dostupné z WWW: <http://books.google.cz/books?id=e7PCh9APKYUC&printsec=frontcover&dq=Yoghurt+Science+and+Technology&source=bl&ots=hIg4W5w9NR&sig=7aVm810jB0sf0cqpBZ8cDut4q9c&hl=cs&ei=ssnpS-3pJMmdOJzOxJoL&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false>. ISBN 1855736764.

- [63] BARTOVSKÁ, L., ŠIŠKOVÁ, M. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2005 [cit. 2010-05-12]. Dostupné z WWW: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pages-img/087.html>. ISBN 80-7080-579-X.
- [64] LI, S., XU, R. Electrical double layers' interaction between oppositely charged particles as related to surface charge density and ionic strength. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. September 2008, 3, s. 157-161.
- [65] *Katedra fyzikální chemie* [online]. 2009 [cit. 2010-05-12]. Dělení bílkovin pomocí diskontinuální elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (PAGE). Dostupné z WWW: <<http://fch.upol.cz/skripta/zfcm/elfa/elfa.pdf>>.
- [66] LIN, D., ZHONG, L., YAO, S. Zeta potential as a diagnostic tool to evaluate the biomass electrostatic adhesion during ion-exchange expanded bed application. *Biotechnology and Bioengineering*. March 2006, 1, s. 185-191.
- [67] HÜBNER, P., et al. *Úprava vody pro průmyslové účely* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2006 [cit. 2010-03-11]. Dostupné z WWW: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-624-9/pages-img/010.html>. ISBN 80-7080-624-9.
- [68] POUCHLÝ, J. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2008 [cit. 2010-03-18]. Dostupné z WWW: <Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav>. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [69] BARTOVSKÁ, L. *VŠCHT* [online]. 2009 [cit. 2010-05-12]. Fázová rozhraní a koloidy kolem nás. Dostupné z WWW: <<http://www.vscht.cz/fch/cz/pomucky/bartovska/08-Fazova-rozhrani.pdf>>.
- [70] MARKUŠOVÁ, K., KLADEKOVÁ, D. *Ústav chemických věd* [online]. 2008 [cit. 2010-03-12]. Vybrané kapitoly z elektrochemie. Dostupné z WWW: <<http://kosice.upjs.sk/~markusk/VKE4.pdf>>.
- [71] WONG, P. K., et al. Electrokinetic Bioprocessor for Concentrating Cells and Molecules. *Anal. Chem.* 2004, 76, s. 6908-6914.
- [72] GAŠ, B. Kapilární elektroforéza. *Vesmír*. 2001, 80, s. 373.

- [73] *Magma* [online]. 2006 [cit. 2010-01-11]. *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Dostupné z WWW: <http://www.magma.ca/~pavel/science/L_bulgaricus.htm>. http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_teichoov%C3%A1
- [74] VERONIKA, J. *Použití elektromigračních separačních technik při identifikaci mikroorganismů* [online]. Brno: Přírodovědecká fakulta, 2006. 74 s. Diplomová práce. Masarykova univerzita. Dostupné z WWW: <http://is.muni.cz/th/52478/prif_m/Jalova_Veronika_-_diplomova_prace.pdf>.
- [75] Kyselina teichoov%C3%A1 In *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida): Wikipedia Foundation, 18. 11. 2008, 4. 1. 2010 [cit. 2010-05-12]. Dostupné z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_teichoov%C3%A1>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BMK	Bakterie mléčného kvašení
ČMK	Čisté mlékařské kultury
ATP	Adenosintrifosfát
Glu	Kyselina glutamová
Asp	Kyselina asparagová
Arg	Arginin
MATS	Mikrobiální adheze k rozpouštědлу
MATH	Mikrobiální adheze k uhlovodíku
DLVO	Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeekova teorie
LTA	Lipoteikoová kyselina
EAC	Elektronový akceptor
LDE	Laser Dopplerova elektroforéza
KPi	Fosfátový pufr
EDC	Elektronový donor
PBS	Fosfátový pufr s NaCl

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 . <i>Streptococcus thermophilus</i> , elektronový mikroskop [62].....	16
Obr. 2. <i>Lactobacillus bulgaricus</i> [73].....	18
Obr. č. 3 Buněčná stěna grampozitivní bakterie [43]	21
Obr. 4. Buněčná stěna grampozitivní bakterie [43]	22
Obr. 5. Hydrofobní interakce [36]	26
Obr. 6. Kapka kapaliny na povrchu pevné látky [69]	29
Obr. 7. Vzorec teikoové kyseliny z bakterií čeledi <i>Micrococcaceae</i> [75].	31
Obr. 8. Elektrokinetické jevy [69]	32
Obr. 9. Model elektrické dvojvrstvy [33]	34
Obr. 10. Helmholtzův model [69].....	36
Obr. 11. Gouy-Chapmanův model [69]	38
Obr. 12. Sternův model elektrické dvojvrstvy [69]	39
Obr. 13. Sedimentační potenciál [69]	41
Obr. 14. Mikroskopický snímek adheze kmene <i>Streptococcus thermophilus</i> při pH 3.....	51
Obr. 15. Mikroskopický snímek adheze kmene <i>Streptococcus thermophilus</i> při pH 5.....	51
Obr. 16. Mikroskopický snímek adheze kmene <i>Streptococcus thermophilus</i> při pH 7.....	52
Obr. 17. Mikroskopický snímek adheze kmene <i>Streptococcus thermophilus</i> při pH 9.....	52
Obr. 18. Mikroskopický snímek adheze kmene <i>Lactobacillus bulgaricus</i> při pH 3	53
Obr. 19. Mikroskopický snímek adheze kmene <i>Lactobacillus bulgaricus</i> při pH 5	53
Obr. 20. Mikroskopický snímek adheze kmene <i>Lactobacillus bulgaricus</i> při pH 7	54
Obr. 21. Mikroskopický snímek adheze kmene <i>Lactobacillus bulgaricus</i> při pH 9	54
Obr. 22. Závislost zeta potenciálu na pH pro kmen <i>Streptococcus thermophilus</i>	60
Obr. 23. Závislost zeta potenciálu na pH pro kmen <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	60

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Přehled ionizovatelných skupin povrchových molekul buněčné stěny [74].....	24
Tab. 2. Výsledné povrchové charakteristiky získané metodou MATS.....	56
Tab. 3. Výsledné povrchové charakteristiky získané metodou MATH pro <i>Streptococcus thermophilus</i>	58
Tab. 4. Výsledné povrchové charakteristiky získané metodou MATH pro <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	58