

Studium interakcí polyvinylpyrrolidonu s bakteriálními buňkami

Bc. Sabina Kreizlová

Diplomová práce
2017

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Sabina Kreizlová**

Osobní číslo: **T15257**

Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**

Studijní obor: **Inženýrství polymerů**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Studium interakcí polyvinylpyrrolidonu s bakteriálními buňkami**

Zásady pro vypracování:

Prostudujte danou problematiku ve vědeckých zdrojích.

Provedte pokusy sorpcí polyvinylpyrrolidonu (PVP) na buňky vybraných bakteriálních kultur, případně provedte další experimenty vlivu PVP na buňky.

Získané výsledky přehledně sepište a práci odevzdejte v písemné i elektronické podobě v určeném termínu.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Vědecká literatura zahrnutá v databázích Web of Sciences, Scopus a PubMed.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

2. ledna 2017

Termín odevzdání diplomové práce:

10. května 2017

Ve Zlíně dne 1. března 2017



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



doc. Ing. Tomáš Sedláček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Sabina Kreizlová

Obor: Polymerní materiály a technologie,
Specializace: Medicínské a farmaceutické materiály

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 užít 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, považuji 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. 2017

Kreizlová

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 nevydělečně 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 požítovat 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 užit 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 za výdělků 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 přihlídí k výši výdělků dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato práce se zabývala studiem interakcí polyvinylpyrrolidonu (PVP) s bakteriálními buňkami. Teoretická část se zabývá stručnou charakteristikou polyvinylpyrrolidonu a jeho použitím, dále je věnována krátkému vysvětlení použitých metod, jako je měření kontaktního úhlu a adsorpce. U těchto metod je také uveden příklad jejich použití s bakteriálními buňkami či PVP.

V praktické části byly z větší části prováděny pokusy adsorpce polyvinylpyrrolidonu na buňky bakteriálních kultur *Pseudomonas putida* MS2 a *Escherichia coli* CCM 3988. Zde byly použity koncentrace PVP 500, 250, 100, 50, 25 a 10 mg/l. Výsledky byly porovnány mezi sebou a to i v závislosti na použitém kultivačním médiu. Z výsledků byly vypočteny sorpční kapacity, z nichž byly následně sestrojeny adsorpční izotermy. Bylo však zjištěno, že v některých případech získané křivky nemají průběh typických adsorpčních izoterem. Výsledky tak ukazují na možnou existenci dalších dějů, které kromě adsorpce v systému buňky + PVP probíhají.

Dále byla praktická část zaměřena na zjištění povrchové energie buněk. U těchto experimentů bylo zjištěno, že výsledná povrchová energie závisí nejen na případné přítomnosti PVP v průběhu kultivace, ale také ve značné míře na připravené vrstvě buněk.

Na závěr byly provedeny pokusy respirace kultury *E. coli* CCM 3988 kultivované s PVP a bez něj. Zde byl testován vliv přídavku PVP přímo při vlastním měření respirační rychlosti. Výsledky ukázaly, že vliv PVP na respirační rychlost buněk je malý; v průběhu pokusů však bylo zjištěno, že PVP, přidaný ke kultuře při intenzivním provzdušňování, způsobuje silnou flokulaci buněčné suspenze, tedy číření suspenze a vznik vloček.

Klíčová slova: Polyvinylpyrrolidon, bakterie, adsorpce, povrchová energie, respirace

ABSTRACT

This work deals with the study of polyvinylpyrrolidone interactions with bacterial cells. The theoretical part deals with the brief characterization of PVP and its use, as well as with a brief explanation of the used methods, such as contact angle measurement and an adsorption. Several examples of these methods applied for studying bacterial cells or PVP use are included.

In practical part, several attempts of PVP adsorption onto *Pseudomonas putida* MS2 and *Escherichia coli* CCM 3988 cells were performed. Here, PVP concentrations of 500, 250, 100, 50, 25 and 10 mg/l were used. The results were compared with each other, even depending on the culture medium used. Afterwards, adsorption capacities of the cells were determined and adsorption isotherms were subsequently constructed. It is found that the shape of some isotherms significantly differed from a standard adsorption isotherms. Therefore, the results suggested that another process distinct from PVP adsorption on the cells might exist.

Further, the practical part was focused on the detection of cell surface energy. In these experiments, it was found that the resulting surface energy depends not only on the presence of PVP during cultivation, but also on the homogeneity of prepared cell layers.

Finally, specific respiration rates of *E. coli* CCM 3988 cultivated with and without PVP were measured as well as cells respiration rates with added PVP. These results showed that PVP influenced slightly on the cells respiration rate, but it was found that PVP added during aeration caused strong cell flocculation, resulted in the formation of visible cell flocs, then suspension clarification and flake formation.

Keywords: Polyvinylpyrrolidone, bacteria, adsorption, surface energy, respiration

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, za ochotu a čas, který mi věnoval, a za vlídný přístup při vedení a zpracovávání diplomové práce. Dále bych také chtěla poděkovat dalším zaměstnancům Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí Fakulty technologické, UTB ve Zlíně za ochotu a vytvoření vynikajících pracovních podmínek pro vypracování mé diplomové práce.

Na závěr bych také ráda poděkovala všem, kteří mě v průběhu studia podporovali. Zvláště rodině, která mi zajistila skvělé podmínky nejen pro studium, ale i pro zpracování diplomové práce.

„Cesta vzhůru vede přes dřinu, krev, pot a slzy.“

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

Ve Zlíně 10. 5. 2017

.....
Podpis studenta

OBSAH

ÚVOD	5
I TEORETICKÁ ČÁST	6
1 POLYVINYLPIRROLIDON (PVP)	7
1.1 TVORBA FILMU	8
1.2 POUŽITÍ	9
1.2.1 Využití ve farmaceutickém průmyslu a v medicíně.....	9
1.2.2 Adheziva	12
1.2.3 Environmentální aplikace.....	13
2 SORPCE	14
2.1 ADSORPCE.....	14
2.2 ADSORPČNÍ ROVNOVÁHA	16
2.2.1 Langmuirova adsorpční izoterma.....	16
2.2.2 Freundlichova adsorpční izoterma	18
2.3 SORPCE PVP NA CHEZACARB, REO A NA BIOLOGICKÝ AKTIVOVANÝ KAL	19
3 POVRCHOVÁ ENERGIE	20
3.1 ÚHEL SMÁČENÍ.....	20
3.2 MĚŘENÍ KONTAKTNÍCH ÚHLŮ NA BAKTERIÁLNÍM POVRCHU	23
3.2.1 Měření kontaktního úhlu na bakteriích izolovaných z pitné vody	23
3.2.2 Měření kontaktního úhlu u vláknitých bakterií z čistíren odpadních vod.....	24
3.3 MĚŘENÍ KONTAKTNÍHO ÚHLU NA POVRCHU S PVP	26
4 NÁVAZNOST NA PŘEDCHOZÍ PRÁCI	27
II PRAKTICKÁ ČÁST	28
5 MATERIÁL A METODIKA	29
5.1 SLOŽENÍ ROZTOKŮ A ŽIVNÝCH MÉDIÍ	29
5.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	31
5.3 POUŽITÉ KULTURY	32
5.4 POSTUPY POKUSŮ	32
5.4.1 Kultivace kultury MS2	32
5.4.2 Záchyt a promytí buněk kultury MS2 po kultivaci	32
5.4.3 Adsorpce PVP na buňky kultury MS2 - koncentrace 500 a 100 mg/l (A)	33
5.4.4 Kontroly A	33
5.4.5 Adsorpce PVP na buňky kultury MS2 - koncentrace 250 a 50 mg/l (B).....	34
5.4.6 Kontroly B.....	35
5.4.7 Adsorpce PVP na buňky kultury MS2 - koncentrace 25 a 10 mg/l (C).....	35
5.4.8 Kontroly C.....	36
5.4.9 Kultivace kultury MS2 na tryptonu.....	36
5.4.10 Záchyt a promytí buněk kultury MS2 rostoucí na tryptonu	36
5.4.11 Adsorpce PVP na buňky kultury MS2 rostoucí na tryptonu (koncentrace PVP 500, 250, 100, 50, 25 a 10 mg/l)	37

5.4.12	Kontroly - kultura MS2 rostoucí na tryptonu.....	38
5.4.13	Kultivace kultury <i>E. coli</i> CCM 3988	39
5.4.14	Záchyt a promytí buněk kultury <i>E. coli</i> CCM 3988.....	39
5.4.15	Adsorpce PVP na buňky kultury <i>E. coli</i> CCM 3988 (koncentrace PVP 500, 250, 100, 50, 25 a 10 mg/l)	40
5.4.16	Kontroly <i>E. coli</i> CCM 3988 (koncentrace PVP 500, 250, 100, 50, 25 a 10 mg/l)	41
5.4.17	Měření rozpuštěného organického uhlíku (DOC).....	42
5.4.18	Stanovení sušiny buněk.....	43
5.4.19	Výpočet adsorbovaného PVP pro zvolené koncentrace PVP (500, 250, 100, 50, 25 a 10 mg/l)	43
5.4.20	Příprava kultur pro měření povrchové energie buněk I.	44
5.4.21	Záchyt a promytí buněk kultury před měřením povrchové energie I.....	45
5.4.22	Příprava pro měření povrchové energie buněk kultury MS2	45
5.4.23	Příprava před měřením povrchové energie kultury <i>E. coli</i>	46
5.4.24	Záchyt a promytí buněk kultury MS2 a <i>E. coli</i> pro měření povrchové energie	46
5.4.25	Filtrace a měření povrchové energie buněk	47
5.4.26	Příprava pro měření respirace kultury <i>E. coli</i> kultivované s PVP a bez PVP	47
5.4.27	Příprava pro měření respirace kultury <i>E. coli</i> v přítomnosti PVP a bez PVP	48
5.4.28	Záchyt a promytí buněk po kultivaci, před měřením respirace.....	48
5.4.29	Měření respirace kultury <i>E. coli</i> kultivované s PVP a bez PVP	48
5.4.30	Měření respirace kultury <i>E. coli</i> v přítomnosti PVP a bez něj.....	49
6	VÝSLEDKY POKUSŮ A DISKUZE	50
6.1	POKUS ADSORPCE PVP NA BUŇKY KULTURY <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i> MS2, KULTIVOVANÉ NA N-METHYL-2-PYRROLIDONU	50
6.2	POKUS ADSORPCE PVP NA BUŇKY KULTURY MS2 ROSTOUCÍ NA TRYPTONU	55
6.3	POKUS ADSORPCE PVP NA BUŇKY KULTURY <i>E. COLI</i> CCM 3988.....	60
6.4	VÝSLEDKY MĚŘENÍ POVRCHOVÉ ENERGIE.....	65
6.4.1	Orientační pokus měření povrchové energie.....	65
6.4.2	Měření povrchové energie buněk kultury MS2, kultivované na NMP nebo na tryptonu.....	66
6.4.3	Měření povrchové energie buněk <i>E. coli</i> , kultivované na tryptonu nebo na tryptonu s PVP.....	67
6.5	RESPIRACE KULTURY <i>E. COLI</i> CCM 3988 S PVP A BEZ PVP	69
	ZÁVĚR	75
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	77
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	82
	SEZNAM OBRÁZKŮ	83
	SEZNAM TABULEK.....	84
	SEZNAM ROVNIC	85
	SEZNAM GRAFŮ	86

ÚVOD

Díky výborné kombinaci fyzikálních a chemických vlastností se stal polyvinylpyrrolidon hojně využívaným polymerem v mnoha odvětvích průmyslu. Používá se také ve farmaceutickém průmyslu např. do desinfekčních prostředků, jako pojivo tablet aj. Právě kvůli široké škále jeho využití ve farmaceutickém průmyslu je nutné zabývat se otázkou interakcí tohoto polymeru s bakteriálními buňkami, které se nachází v lidském těle či ve vodách. PVP je sice považován za biologicky inertní a netoxický, ale i přesto je dále nutné se zabývat jeho působením na bakteriální buňky.

Tato diplomová práce navazuje na bakalářskou práci, zabývající se podobnou problematikou a to studiem vlivu roztoku polyvinylpyrrolidonu na tvorbu bakteriálního biofilmu. V této předchozí práci byla vyvrácena inertnost tohoto polymeru pomocí řady pokusů v mikrotitračních destičkách s různou koncentrací PVP a mnoha bakteriálními kulturami. Výsledky ukazují určitý vliv na zvolené bakteriální kultury, který byl projeven snížením či zvýšením intenzity tvorby bakteriálního biofilmu při použití určené koncentrace PVP.

Navazující diplomová práce se tedy zabývá studiem interakcí polyvinylpyrrolidonu s bakteriálními buňkami. Tyto interakce byly prozkoumány měřením adsorpce a sestavením adsorpčních izoterem, měřením povrchové energie a měřením respirace, respektive respirační rychlosti. Pro tyto pokusy byly vybrány kultury, použité již v předchozí práci, a to kultura MS2 a *Escherichia coli* CCM 3988. Cílem této práce je tedy objasnit zatím neznámé interakce mezi bakteriálními buňkami a PVP.

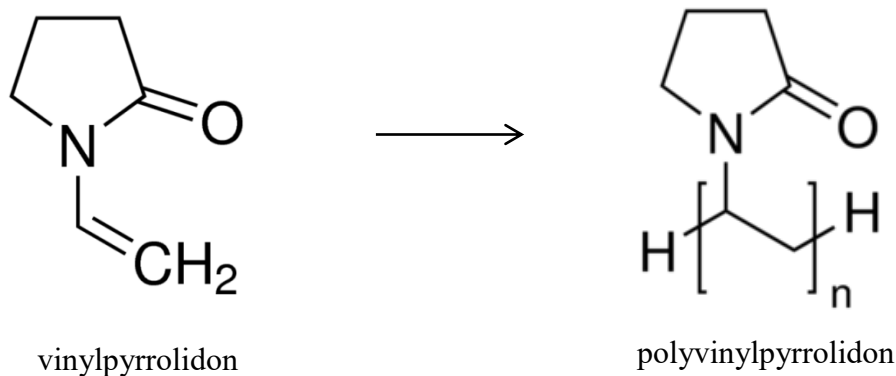
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 POLYVINYLPYRROLIDON (PVP)

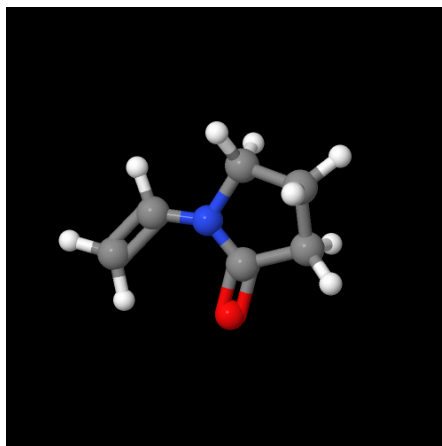
Polyvinylpyrrolidon (PVP) je bílý až nažloutlý sypký prášek, který byl poprvé vyroben díky objevu vinylpyrrolidonu, který byl získán reakcí acetylenu s pyrrolidonem. Nyní se PVP vyrábí roztokovou polymerací N-vinyl-2-pyrrolidonu a nabývá různých molekulových hmotností od 2500 po 75000 g/mol. [1,2]

Tato látka je rozpustná ve vodě a v mnoha organických rozpouštědlech (v alkoholech, fenolech, ketonech aj.), ale na druhou stranu se může v důsledku zesíťování za vyšších teplot a v kombinaci se silně zásaditými látkami stát látkou nerozpustnou. Dále je polyvinylpyrrolidon netoxický, v podstatě chemicky inertní a teplotně odolný. Vyznačuje se výbornou kombinací fyzikálních a chemických vlastností, kterých se využívá v mnoha lékařských i nelékařských aplikacích (optické a elektrické aplikace, hydroizolace, lepidla, nátěry a inkousty, vlákna a textil, environmentální aplikace, litografie a fotografie). [1,2]

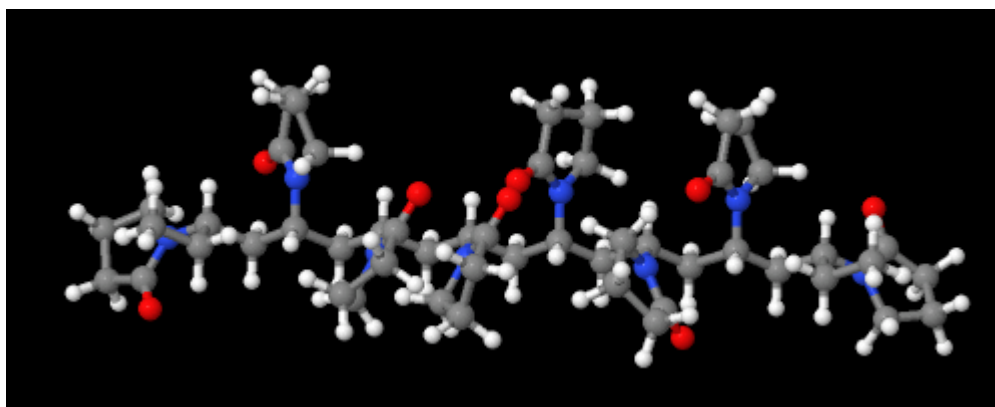
PVP snáší teplotu kolem 100°C po dobu 16 h. V případě zvýšení teploty na 150 °C se objevuje tmavnutí a ztráta rozpustnosti. V silně kyselých roztocích je PVP obvykle stálý, bez změny vzhledu nebo viskozity, a to po dobu 2 měsíců při teplotě 24 °C. [3,4]



Obrázek 1 – Polymerace vinylpyrrolidonu na polyvinylpyrrolidon [5]



Obrázek 2 – 3D struktura vinylpyrrolidonu [5]



Obrázek 3 – 3D struktura polyvinylpyrrolidonu [5]

Nejčastěji můžeme polyvinylpyrrolidon nalézt pod obchodním názvem Luvitec s označením K15, K17, K25, K30, K60 a K90, kdy K15 – K30 nalezneme ve formě bílého až nažloutlého prášku. O vodné roztoky se jedná v případě Luvitec s označením K60 a K90. Nejvíce používaný je však Luvitec K30 a K90. [3,4]

1.1 Tvorba filmu

Polyvinylpyrrolidon má schopnost tvořit film, který má lesklý a průhledný vzhled. V suchém stavu jsou filmy z PVP jasné a tvrdé. Rozpouštědla použitá na odlévání filmů v tomto případě nehrají žádnou roli, nemají vliv na vzhled filmu. Pokud však chceme snížit hydroskopičnost, lepivost nebo křehkost, můžeme použít různé typy změkčovadel, aniž by modifikovala lesk či jasnost filmu. Dokonce i vlhkost prostředí může působit jako změkčovadlo pro filmy z PVP. [6]

1.2 Použití

V případě polyvinylpyrrolidonu se jedná o látku s mimořádnou kombinací vlastností (je netoxický, chemicky stabilní, dobře rozpustný ve vodě a v mnoha organických rozpouštědlech, má afinitu ke složitým hydrofilním i hydrofobním látkám), které se využívá v mnoha aplikacích.[1, 2]

1.2.1 Využití ve farmaceutickém průmyslu a v medicíně

Nejvíce z objevu PVP těžil farmaceutický průmysl a medicína, a to díky jeho biokompatibilitě, schopnosti tvořit stabilní asociované sloučeniny a komplexy s mnoha účinnými látkami. Dalším aspektem pro aplikace polyvinylpyrrolidonu ve farmaceutickém průmyslu je jeho dobrá rozpustnost ve všech běžných rozpouštědlech, lepivost, tvorba filmu, afinita k hydrofilním a hydrofobním povrchům, vhodné vlastnosti pro zabránění shlukování nanočástic po lyofilizaci a také dostupnost PVP v různých průměrných molekulových hmotnostech. [1, 7 - 10]

Nejprve byl tento polymer využíván v období druhé světové války jako náhrada krevní plazmy. Bylo také zjištěno, že při jeho orální aplikaci byla díky jeho amfoterním vlastnostem hodnota pH v žaludku a střevech normalizována, a to adsorpcí kyselin nebo bází, vzniklých jako důsledek rozkladu potravin. [3, 11]

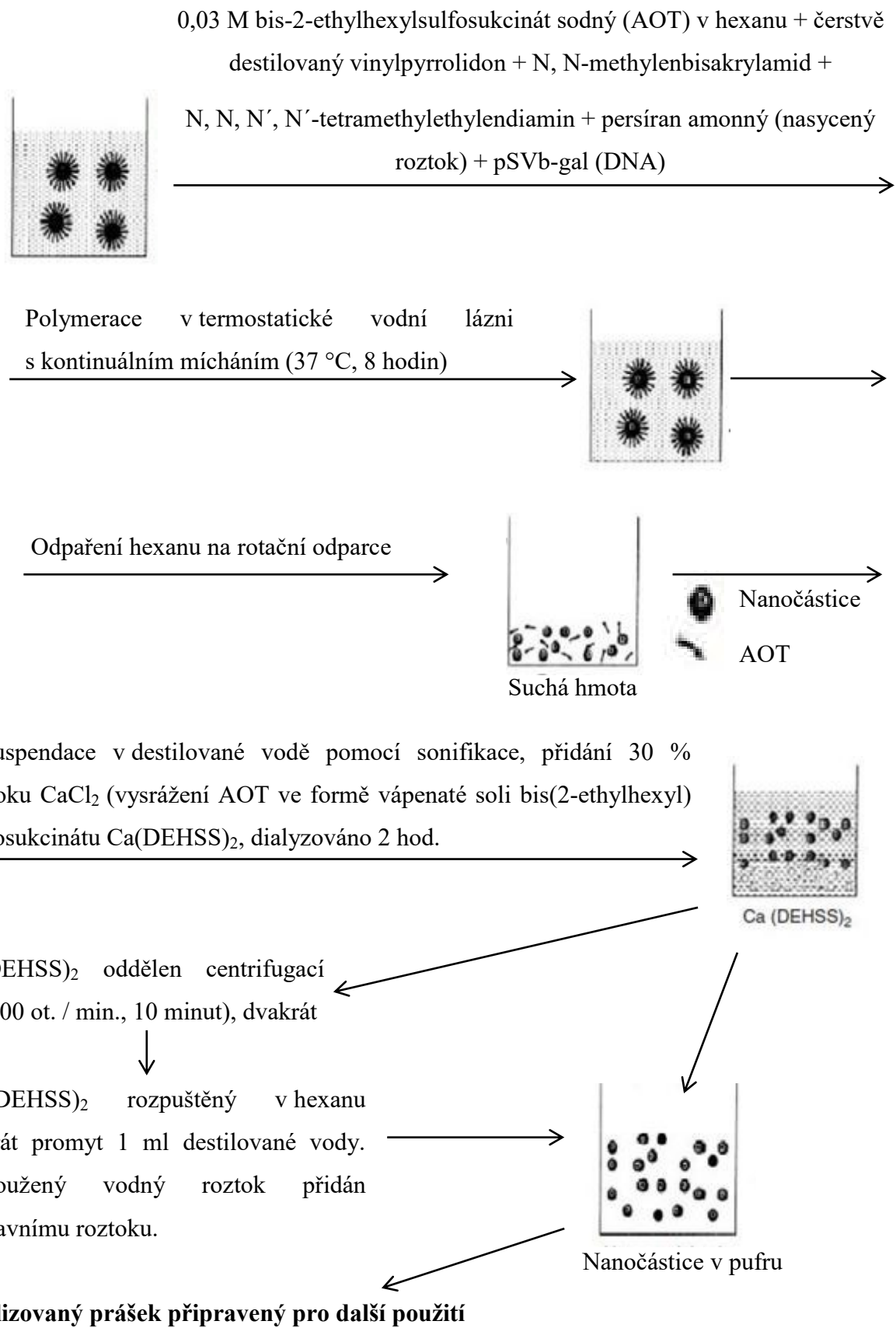
Pro odstranění toxinů a virů z krve se používá polyvinylpyrrolidon s nízkou molekulovou hmotností, jelikož vykazuje jedinečné sorpční vlastnosti, a proto je tedy základem pro činidla odstraňující toxiny a viry z krve. [11]

V současné době se PVP používá na výrobu léčiv (tablety, granule, měkké želatinové kapsle, gely, hydrogely, filmy a povlaky, prášky, sirupy), ale také pro nátěry zdravotnických prostředků, při výrobě kontaktních čoček, ve stomatologii, ortopedii a řadě dalších aplikací. [8, 9, 12 - 14]

Polyvinylpyrrolidon se využívá při výrobě mnoha druhů léků jako pomocná látka, velikost jeho částic se nachází v rozmezí 1 – 100 nm, což zaručuje bezproblémový průchod ledvinami. Pokud se podává orálně, není PVP v těle metabolizován, což vede k tomu, že vysokomolekulární složka může v organismu v malém množství zůstat. [1, 6, 7]

Jednou z nejdůležitějších složek tablet je pojivo, které umožňuje tabletě držet pohromadě, dokud se tableta nedostane do žaludku, kde se musí rychle rozpouštět nebo rozpadat a uvolňovat léčivo. I v tomto ohledu se PVP osvědčil a tato schopnost je tedy u něj prokázána. Avšak některé studie ukázaly, že polyvinylpyrrolidon může mít i opačný efekt, pokud je použit jako povlak. Povlak polyvinylpyrrolidonu totiž způsobuje zpožděné uvolňování léčiva z léku s prodlouženým účinkem, čímž umožňuje odstranění vícenásobného dávkování za den. Tohoto efektu se využívá např. u antidepresiv, kde povlak PVP způsobuje zpožděné uvolňování venlafaxinu. [14]

Zcela unikátní aplikaci PVP lze najít i v oblasti genového inženýrství, které se snaží vybrat co nejlepší materiál pro úplné nebo částečné „zapouzdření“ genů. Toto zapouzdření by mělo chránit konkrétní fragment DNA před degradací a jeho cílem by bylo tento fragment bezpečně doručit vybraným buňkám v těle. Vzhledem k tomu, že je PVP biokompatibilní, nekarcinogenní a neantigenní, byl použit pro studii nové techniky k zapouzdření DNA. Plasmidová DNA byla zapouzdřena v zesíťované nanočástici z PVP, o velikosti menší než 100 nm. Zapouzdření v zesíťovaném PVP poskytlo úplnou ochranu plasmidové DNA před působením DNázy. Způsob přípravy nanočástic, které obsahují PVP s pDNA, zahrnovalo reakci monomerů ve vodném jádru reverzních micelárních kapiček (obr. 4). Tato metoda efektivně produkuje ultra-malé velikosti nanočástic, které mají úzkou distribuci molekulových hmotností, tedy nízkou polydisperzitu. Z této studie vyplývá, že takto připravené neutrální nanočástice mají 80 % účinnost pro transfekci *in vitro* (přenos DNA do buněk), takže představuje účinný genový nosič pro terapeutické účely. Metoda je však mnohostupňová a poměrně náročná, jak je znázorněno na obr. 4. [3,15–18]



Obrázek 4 – Vývojový diagram ukazující jednotlivé kroky přípravy nanočástic PVP se zapouzdřenou pDNA prostřednictvím reverzních micel [15]

V další studii bylo zjištěno, že částice (CoFe_2O_4), potažené PVP, mají velmi vhodné vlastnosti, jako jsou biokompatibilita, magnetická a antioxidační aktivita a nízká toxicita. Magnetické vlastnosti a antioxidační působení těchto nanočástic jsou důležité pro potenciální diagnózu a léčbu rakoviny (chrání zdravé buňky před volnými radikály, které mohou přispět k mutacím buněčné DNA, které vedou ke vzniku a rozvoji rakoviny). [19]

Velký zájem je také o PVP v kombinaci s jinými monomery nebo polymery. Těchto kombinací je možné využít pro výrobu měkkých kontaktních čoček a dezinfekčních prostředků pro roztoky na kontaktní čočky, protože zde má PVP schopnost snižovat podráždění očí. Co se týká výroby kontaktních čoček, zde má PVP důležitou roli ve smáčivosti, která zvyšuje pohodlí při použití (zadržuje vlhkost a snižuje koeficient tření). [20,21]

Dále je možné také PVP využít v komplexu s jodem. Tento komplex se využívá jako desinfekční prostředek při předoperačním čištění, v antiseptických přípravcích pro ošetření ran a či v antibakteriálních mýdlech, kde plní úlohu germicidu. [12,22]

Elektrostatické rohože tvořené nanovláknem, které byly vyrobeny z polyvinylpyrrolidonu v komplexu s jodem, se používají k usnadnění hojení popálenin. Postupně se uvolňující aktivní látka (jod) snižuje množství bakteriálních buněk v ráně. Struktura rohože je také velmi důležitá, vzhledem k její vysoké pórovitosti, která ovlivňuje výtok tekutiny z rány a inhibuje exogenní invazi mikroorganismů. Komplex PVP s jodem se také používá ve směsi s jinými polymery k přípravě antimikrobiálních povlaků na zdravotnických prostředcích. [12,23,24, 25]

1.2.2 Adheziva

Již řadu let se polyvinylpyrrolidon využívá pro lepení, a to díky svým vlastnostem, jako je pružnost, pro použití při výrobě lepících tyčinek, kožních lepidel, tavných lepidel atd. Lepidla na bázi PVP mají vynikající přilnavost a vysoký stupeň počáteční přilnavosti. [26]

PVP v kombinaci s polymerovaným syrovátkovým proteinem se používá k výrobě tekutého lepidla na papír. Polyvinylpyrrolidon v něm zvyšuje viskozitu, pevnost lepení a stabilitu lepidla při skladování. [26]

Tavná lepidla na bázi PVP vykazují jedinečnou kombinaci vlastností a jsou používány v aplikacích, jako jsou pásy, štítky, obálky a známky, plastické hmoty, indikátory vlhkosti v plenách apod. Samolepicí fólie s obsahem polyvinylpyrrolidonu mají velmi dobrou přilnavost zejména na papír, sklo, kov, plasty (polypropylen, polyethylen, polyethylentereftalát, polyuretan), kůži, písek a minerály, a dokonce i textilní povrchy. [26,27]

1.2.3 Environmentální aplikace

PVP se používá při čištění a recyklaci průmyslových odpadních vod a také při přípravě filtrů k záchytu kontaminantů z vod a vzdušín. Při dekontaminaci vod polyvinylpyrrolidon působí jako činidlo odstraňující barviva a oleje z odpadních vod, a také se používá jako činidlo potřebné k odstranění ropných skvrn. [28]

Své využití našel polyvinylpyrrolidon také ve výrobě klimatizačních filtrů. Novinkou se staly PVP nanofiltry, které byly vyrobeny z polyvinylpyrrolidonu a TiO_2 pomocí nově vyvinuté upravené technologie elektrostatického zvlákňování. Slouží k odstraňování dráždivých a toxických plynů a průměrná velikost jejich pórů je 50 nm; mohou tak být použitelné nejen při filtraci vzduchu, ale i vody. [28, 29, 30]

Ve vodě rozpustné „nanofiltry“ s obsahem PVP se také používají pro záchyt nano- a mikro-aerosolů, při analýze biologického nebezpečí v jaderném průmyslu. Tam je možné tyto „filtry“ využít pro záchyt kontaminantů ze vzduchu (pro ochranu plic pracovníků před radioaktivním prachem a při ochraně motorů a jiných zařízení citlivých na prach). Tyto „nanofiltry“ se ukazují pro tento druh aplikace jako velmi vhodné, neboť si zachovávají své vlastnosti i při vlhkosti vzduchu nižší než 75 % a mohou být skladovány po dobu několika měsíců. [29, 30]

2 SORPCE

Sorpce je proces, při němž dochází k adsorpci. Jedná se o zachycení kapalné či plynné složky, neboli sorbátu na povrch pevné fáze – sorbentu. Pokud tento jev nastává díky chemickým vazebným silám, mluvíme o chemisorpci, ale v případě, kdy se jedná o pouze fyzikální vliv nevazebných interakcí, tak jej nazýváme adsorpcí. [31, 32]

Adsorpce je tedy děj, který nastává na povrchu adsorbentu, kdy adsorbent váže adsorbovanou látku Van der Waalsovými silami. Na rozdíl od adsorpce, absorpce při navázání absorbované látky s činidlem potřebuje silné chemické vazby a probíhá v celém objemu. [33]

2.1 Adsorpce

Jak již bylo řečeno, tento jev nastává na rozhraní dvou fází, projevuje se při styku plynu či kapalné látky s tuhou fází, kdy tato fáze se vyznačuje velkým specifickým povrchem. Dochází k snižování povrchového napětí kapaliny, neboť na fázovém rozhraní je koncentrace látek rozpuštěných v roztoku vždy větší. Kapalina se tedy snaží zmenšit svůj povrch a nastává snaha o vyrovnaní koncentrací a snížení koncentračního gradientu, které se projevuje difuzí. Nastává ustavení adsorpční rovnováhy, což je vyjádřeno Gibbsovou adsorpční rovnicí:

Rovnice 1 – ustavení adsorpční rovnováhy [34]

$$\Gamma = -\frac{c}{RT} \cdot \frac{d\sigma}{dc}$$

Kde:

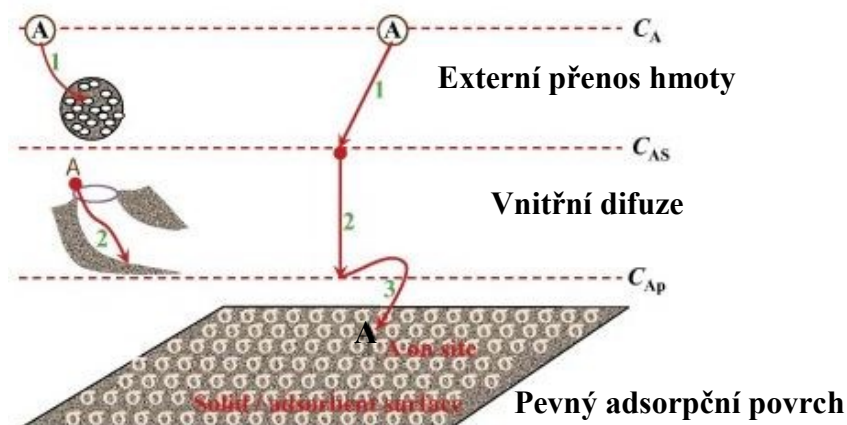
Γ – povrchová koncentrace látek [$\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$]

c – molární koncentrace [M]

R – univerzální plynová konstanta [$\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$]

T – absolutní teplota [K]

$\frac{d\sigma}{dc}$ – změna povrchového napětí připadající na nepatrný nárůst koncentrace [33, 34]



Obrázek 5 – Typické kroky adsorpce [35]

Molekula adsorbátu se přichytává na pevný povrch matrice (1), difunduje přes vnitřní póry pevné matrice a po dosažení „aktivního centra“ na pevném materiálu (2), zde se připojuje či fixuje (3). Adsorpce je tedy převedení volné molekuly adsorbátu v tekuté fázi na pevný povrch. Kinetika adsorpce je řízena jak dopravou adsorbátu na „aktivní centrum“, tak uchycením. [35]

Adsorpce je závislá jak na povaze adsorbentu, tak na povaze adsorbující se látky. Dle povahy sil, kterými jsou částice na rozhraní fází, neboli v mezifázi, vázány, rozlišujeme dva typy adsorpcí:

- **Fyzikální adsorpce** - částice jsou navzájem vázány fyzikálními silami (Van der Waalsovy síly)
 - vazba je poměrně slabá
 - rychle se ustaví adsorpční rovnováha
 - probíhá po celém povrchu
 - není specifická
 - na naadsorbované první vrstvě mohou vznikat vrstvy další
 - intenzita klesá s rostoucí teplotou [31-36]

- **Chemisorpce**
 - příčinou vzniku vazeb jsou chemické interakce
 - vazba je silná a podobná vazbám chemickým
 - specifická (vznik vazby mezi určitými molekulami)
 - k vytvoření chemické vazby je potřeba aktivační energie
 - probíhá v místech s vyšší energií (aktivní centra)
 - může vznikat pouze jedna vrstva [31-36]

2.2 Adsorpční rovnováha

Množství látky, která se naadsorbuje na povrch, závisí na povrchu adsorbentu, na parciálním tlaku adsorbující složky a také na teplotě. Ke kvantitativnímu popisu adsorpce na tuhé látky se využívají adsorpční izotermy, kde se parciální tlak nahrazuje koncentrací. Adsorpční izotermy lze získat nastavením adsorpční rychlosti jako nulové složky. [36]

2.2.1 Langmuirova adsorpční izoterma

Tato izoterma reprezentuje třídu adsorpcí, kdy aktivní centra jsou identická, tzn., že rychlostní konstanta není funkcí koncentrace či pokrytí povrchu. Je to tedy jednoduchý model jednovrstvé fyzikální adsorpce s předpokladem, že jednotlivá adsorpční místa jsou energeticky rovnocenná. Tato místa se navzájem neovlivňují a tento fakt nezávisí ani na obsazenosti míst. Tento model je dán rovnicí:

Rovnice 2 – Langmuirova adsorpční izoterma [35]

$$C_{SA} = C_{\sigma A} = C_{\sigma} \theta_A = \frac{C_{\sigma} \cdot K_A \cdot C_A}{1 + K_A \cdot C_A}$$

Kde:

C_{SA} - množství adsorbátu adsorbované jednotkou hmotnosti adsorbentu

$C_{\sigma A}$ - povrchová koncentrace aktivních center, jež jsou obsazeny molekulami adsorbátu

C_{σ} - povrchová koncentrace celkového počtu dostupných míst či aktivních center

θ_A - zlomek celkového počtu možných volných pracovních míst, která jsou obsazena

K_A - konstanta adsorpční izotermy

C_A - koncentrace adsorbátu

Rovnice 3 – Vyjádření konstanty adsorpční izotermy [35]

$$K_A = \frac{k_A}{k_{-A}}$$

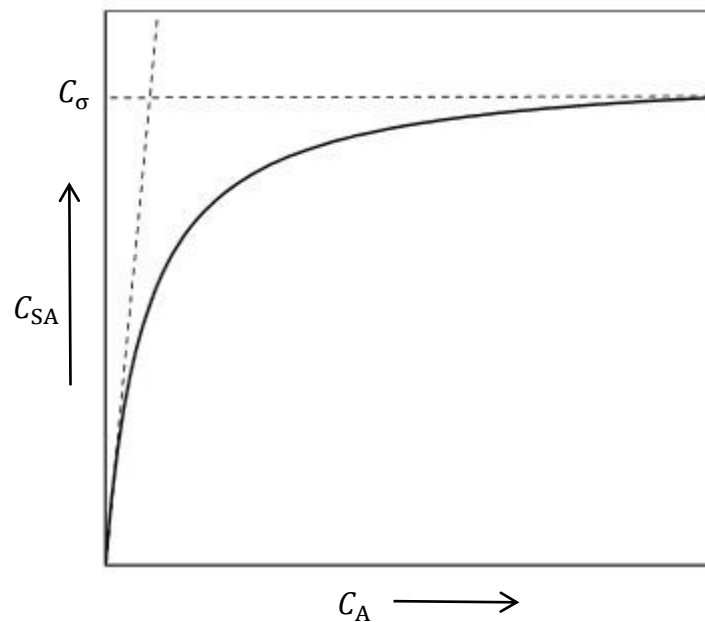
Kde:

K_A - konstanta adsorpční izotermy

k_A - rychlostní konstanta adsorpce

k_{-A} - rychlostní konstanta desorpce

Langmuirova adsorpční izoterma se řadí ke standartním nebo také ideálním adsorpčním, kdy odchylka od této izotermy se považuje za kooperativní adsorpci. Kooperativní adsorpce je adsorpce, kde adsorbovaný adsorbát má vliv na adsorpci "nových" molekul adsorbátu. Tato odchylka je modelována pomocí vícevrstvé adsorpce. [35, 36]



Obrázek 6 – Grafické znázornění Langmuirovy izotermy [32]

2.2.2 Freundlichova adsorpční izoterma

Jedná se o nejstarší analytické vyjádření závislosti rovnovážné koncentrace pevné fáze na rovnovážné koncentraci kapalná fáze:

Rovnice 4 – Freundlichova adsorpční izoterma [37]

$$q_e = k_f \cdot C_e^{\frac{1}{n}}$$

Kde:

q_e - rovnovážná koncentrace v pevné fázi

k_f - sorpční kapacita

C_e - rovnovážná koncentrace kapalná fáze

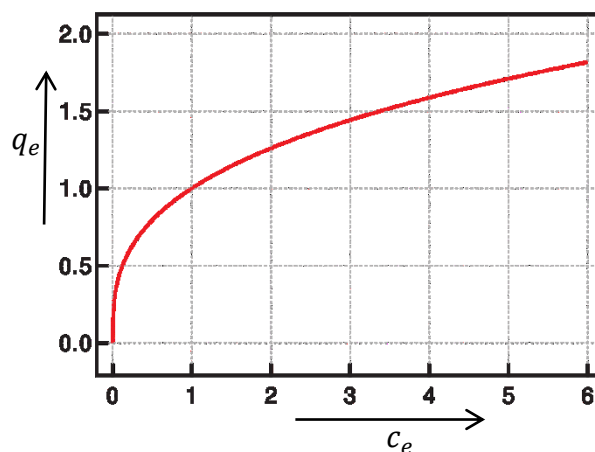
n - intenzita sorpce

Parametry tohoto modelu se odhadují pomocí počáteční koncentrace a měřené rovnovážné koncentrace. Bohužel, měření rovnovážné koncentrace může být ovlivněno mnoha faktory (např. vadné senzory, lidské chyby), což snižuje přesnost těchto odhadovaných parametrů a tedy i omezuje schopnost izotermy přesně předpovědět adsorpční kapacitu. [36, 37]

Pro zpracování experimentálních dat je vhodnější použít linearizovaný tvar rovnice k vytvoření Freundlichovy izotermy:

Rovnice 5 – linearizovaný tvar Freundlichovy izotermy [37]

$$\ln q_e = \ln k_f + \frac{1}{n} \cdot \ln c_e$$



Obrázek 7 – Freundlichova izoterma [38]

2.3 Sorpce PVP na Chezacarb, Reo a na biologický aktivovaný kal

V této práci byla studována sorpce polyvinylpyrrolidonu na Chezacarb a nepolární adsorbent Reo. V případě Chezacarb byla sorpce PVP na sorbent viditelná, naopak k sorpci PVP na nepolární Reo prakticky nedošlo. [31]

Při sorpci PVP na aktivovaný kal, což je heterogenní systém, byl použit aktivovaný kal z ČOV Zlín-Malenovice a z ČOV Slovenská Lupča. Zde byly sestrojeny adsorpční izotermy, z nichž byla viditelná převážně nízká sorpce PVP na aktivovaný kal z ČOV Zlín-Malenovice. Pokud se však v tomto případě počítala koncentrace PVP přes stanovení uhlíku, hodnoty sorpce byly vyšší. Výsledky sorpce PVP na aktivovaný kal z ČOV Slovenská Lupča byly dle autora práce diskutabilní. Pokud se jednalo o sorpci PVP do koncentrace $2\ 000\ \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$, byla sorpce zanedbatelná, od koncentrace PVP $2\ 000\ \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ do $3\ 000\ \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ sorpce pravděpodobně neprobíhala a při koncentraci PVP od $3\ 000\ \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ do $5\ 000\ \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ sorpce rostla. Tato skutečnost však nebyla objasněna. [31]

3 POVRCHOVÁ ENERGIE

Molekuly, které se nachází na povrchu kapaliny, mají odlišné vlastnosti od molekul uvnitř kapaliny. Nesou tedy větší potenciální energii, kdy povrchové vrstvě přiřazujeme energii povrchovou. Povrchová energie se projevuje povrchovým napětím, což je veličina charakterizující závislost povrchové energie kapaliny na jejím povrchu. Kapalina má snahu mít co nejmenší energii a tedy i co nejmenší povrchovou energii. [33]

3.1 Úhel smáčení

Jedná se o jednu z mála přímo měřitelných vlastností rozhraní pevná látka-kapalina-plyn. Úhel smáčení nebo také kontaktní úhel na makroskopické úrovni se měří tak, že kapka kapaliny je umístěna na povrch pevné látky. Po chvíli se ustaví rovnováha mezi těmito látkami, kterou lze popsat pomocí Youngovy rovnice:

Rovnice 6 – Youngova rovnice [40]

$$\gamma_{SL} + \gamma_{VL} \cos(\theta) = \gamma_{SV}$$

Kde:

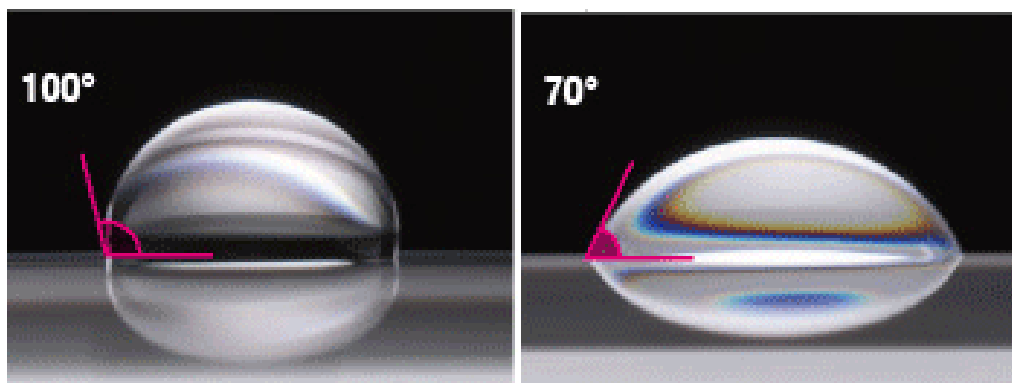
γ_{SL} - povrchové napětí mezi pevnou látkou a kapalinou

γ_{VL} - povrchové napětí mezi plynem a kapalinou

γ_{SV} - povrchové napětí mezi pevnou látkou a plynem

θ - kontaktní úhel mezi kapalinou a pevnou látkou

Úhel θ je úhel, který svírá tečna k povrchu kapky, vedená v bodě styku kapky s rozhraním (je to tedy hlavní charakteristika tvaru kapky na povrchu tuhé fáze). Hodnota tohoto úhlu je charakteristická pro smáčení povrchu. Pokud je úhel θ menší než 90° , je povrch ve styku s kapkou a je tedy smáčen (hydrofilní). Na druhou stranu pokud je úhel θ větší než 90° , povrch není smáčen a nazývá se hydrofobní. Pro měření se také používají různé kapaliny lišící se v polaritě a ty umožňují výpočet povrchové energie. [36, 39, 40]



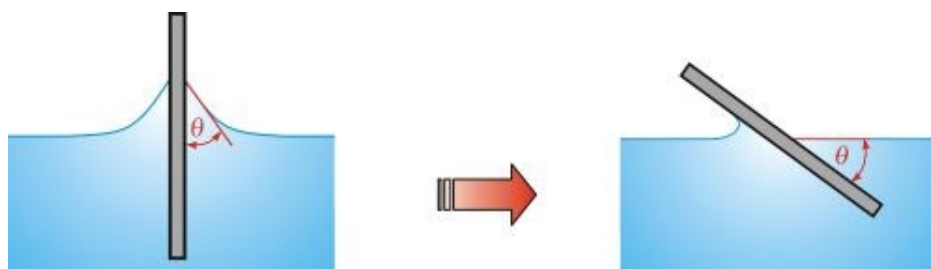
Obrázek 8 – Zobrazení úhlu smáčení (100° - hydrofobní, 70° - hydrofilní) [41]

Statická metoda přisedlé kapky (popsána výše) je přímá metoda měření kontaktního úhlu na rozhraní. Dle tohoto způsobu je kapka kapaliny umístěna na plochý povrch (pro posouzení smáčení) a úhel mezi kapalinou a povrchovou fází se měří. Tato metoda nebyla dlouho použita pro porézní látky a prášky, neboť se zde nachází vliv adsorpce kapilární vody ve tvaru kapky. Nicméně moderní metody makro videa umožnily určit tvar kapky, umístěné na povrch v kterýkoli moment, a to i v nulovém okamžiku (vliv adsorpce se stává zanedbatelným). Tímto se stala tato metoda použitelnou i pro porézní materiály a prášky. [39]

Metody pro měření úhlu smáčení:

- *Měření úhlu mezi nakloněnou deskou a vodorovným povrchem kapaliny*

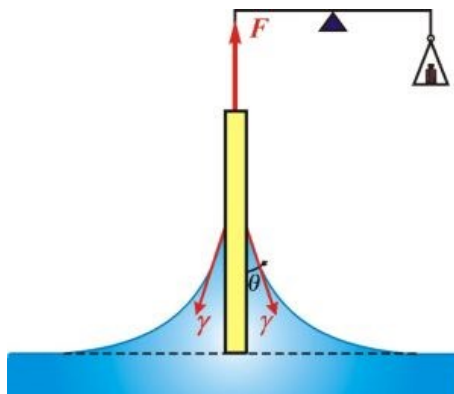
Deska ponořená do kapaliny se naklání tak dlouho, dokud povrch kapaliny není rovný v místě styku kapaliny s deskou. [36]



Obrázek 9 – Měření kontaktního úhlu mezi nakloněnou deskou a vodorovným povrchem kapaliny [42]

- *Metoda vyvažování destičky*

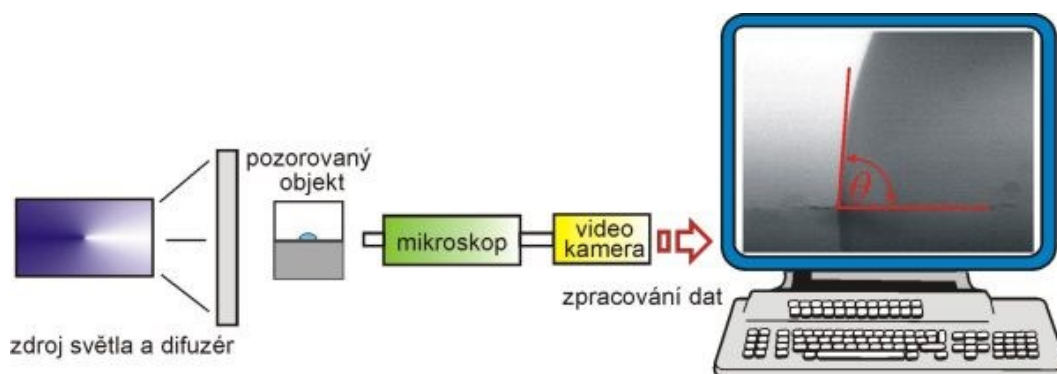
V tomto případě se měří síla, která je potřebná k vyvážení destičky nebo výška, do níž kapalina vzlíná na vertikálně vložené destičce, která je vnořena do kapaliny. [36]



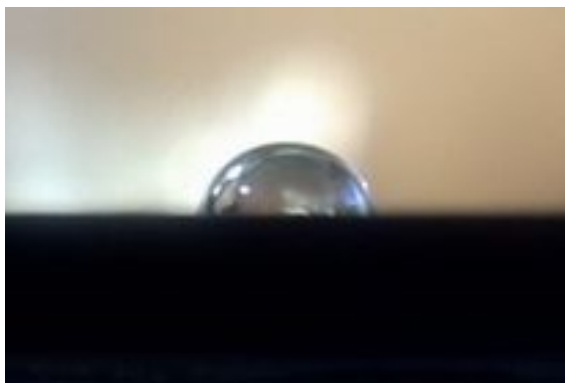
Obrázek 10 – Metoda vyvažování destičky (Wilhelmyho destičky) [43]

- *Přímé měření úhlu smáčení na kapce kapaliny, která je umístěna na rovinném povrchu pevné látky, osvětlené svazkem paprsků rovnoběžných s povrchem*

Úhel smáčení je měřen přímo mikroskopem (obsahuje goniometrickou stupnici na fotografii kapky) nebo se snímá profil kapky pomocí systému hodnocení povrchové energie tzv. See systému (kamera) a úhel smáčení je následně vyhodnocen počítačem. [36]



Obrázek 11 – Schéma uspořádání komponentů při měření úhlu smáčení [42]



Obrázek 12 – Kapka změřená pomocí See systému [44]



Obrázek 13 – See systém [45]

3.2 Měření kontaktních úhlů na bakteriálním povrchu

3.2.1 Měření kontaktního úhlu na bakteriích izolovaných z pitné vody

Nejprve byly připraveny bakteriální kultury (*Acinetobacter calcoaceticus*, *Burkholderia cepacia*, *Methylobacterium* sp., *Mycobacterium mucogenicum*, *Sphingomonas capsulata* a *Staphylococcus* sp.), které byly izolovány z pitné vody. Bakteriální buňky byly kultivovány přes noc ve 100 ml R2A média při pokojové teplotě ($23\text{ °C} \pm 2$) a míchány (150 otáček za minutu). Buňky byly sklizeny centrifugací (20 min, 13000 g) a promyty třikrát ve fyziologickém roztoku s fosfátovým pufrem (0,1 M PBS, pH 7,2), dále byly buňky resuspendovány ve sterilní vodě z vodovodu (pH $6,7 \pm 0,2$). Promyté buňky byly filtrovány přes filtr z triacetátu celulózy (průměr pórů $0,45\text{ }\mu\text{m}$), kdy hustota buněk byla 10^8 buněk na mm^2 . Takto připravené filtry byly vloženy na Petriho misky, kde byla povrchová vrstva skládající se z 1 % agaru ve vodě a 10 % glycerolu. Na závěr byly z filtrů vyřezány pásy o šířce 1 cm a na nich byly měřeny kontaktní úhly za použití metody přisedlé kapky. Tato metoda byla prováděna při teplotě místnosti $23 \pm 2\text{ °C}$, za použití tří kapalin: voda, formamid a A-bromonaftalen. Stanovení kontaktního úhlu bylo provedeno nejméně 25 krát pro každou kapalinu a každý vzorek. [46, 47]

Bylo zjištěno, že se jedná o hydrofilní povrchy, kdy povrchová energie byla u vybraných bakterií následující:

- *Acinetobacter calcoaceticus* 2,3 mJ/m²
- *Burkholderia cepacia* 0,3 mJ/m²
- *Methylobacterium* sp. 4,1 mJ/m²
- *Mycobacterium mucogenicum* 5,3 mJ/m²
- *Sphingomonas capsulata* 19 mJ/m²
- *Staphylococcus* sp. 3 mJ/m² [47]

3.2.2 Měření kontaktního úhlu u vláknitých bakterií z čistíren odpadních vod

Zde byly použity dva bakteriální kmeny a to *Gordona amarae* a *Rhodococcus erythropolis* ze sbírky kultur La Trobe University Bendigo (Austrálie). Tyto kultury byly inkubovány v médiu Bushnell-Haas, v inkubátoru při teplotě 27 °C a při 170 otáčkách za minutu. [48]

Bakteriální povrch byl připraven filtrací bakteriálních buněk přes filtry (se skleněnými vlákny nebo z acetátu celulózy) s velikostí pórů 0,45 μm. Tyto filtry byly umístěny na sklíčka, kde schly na vzduchu po dobu 30 minut nebo byly umístěny do sušárny, kde byly sušeny při teplotě 85 °C 30 minut. Kontaktní úhel byl následně změřen metodou přisedlé kapky. [46, 48]

Kontaktní úhel se používá pro prověření hydrofobicity, kdy za hydrofobní plochy jsou považovány ty plochy, kde kontaktní úhel dosahuje více než 90°. Stanovení těchto úhlů pro bakteriální povrchy komplikuje zejména heterogenita povrchu, který má být měřen (bakteriální povrchy jsou značně odlišné od ideálního molekulárně hladkého povrchu). V případě heterogenního povrchu se tak může stát, že se výsledky stanou velmi spekulativními z důvodu lišících se kontaktních úhlů. [48, 49]

Ve výše uvedené práci byly kontaktní úhly měřeny na povrchu vláknitých bakterií *R. erythropolis* a *G. amarae*. Výsledky ukázaly, že paralelní měření nebyla shodná (nastaly velké změny při opakovaných měřeních na stejném povrchu i na různých vzorcích se stejnou bakterií). Existovalo tedy významné kolísání výsledků v závislosti na tom, jak byly plochy připraveny a sušeny. Kontaktní úhly se také lišily v závislosti na tom, zda byly bakterie odebrány z filtrů ze skleněných vláken či z filtrů z acetátu celulózy, což poukazuje také na vliv filtrační plochy na měření. Nerovnoměrná vrstva buněk, která zde byla vysoce pravděpodobná, byla rovněž problematizujícím faktorem - vybrané bakterie totiž tvořily vločky, které byly překážkou pro získání jednotné, neporézní vrstvy buněk. Tato nejednotná plocha pak mohla mít za následek narušení tvaru kapky a tím tedy vznikala i nepřesnost měření. Míra sušení také zasahovala do měření kontaktního úhlu, neboť vzorky ze sušárny měly tendenci absorbovat vodu z kapiček velmi rychle, tzn., že měření bylo v tomto případě velmi obtížné. Na mokrych vzorcích se tvořily stabilnější kapky, ale měřené úhly byly velmi variabilní. [48]

Autoři však měli snahu eliminovat uvedené problémy spojené s filtrací a následným shlukováním buněk, kdy byly připraveny tzv. bakteriální „trávníky“, které byly vytvořeny tak, že bakterie *G. amarae* a *R. erythropolis* byly pěstovány na deskách z plastu či skla, ponořených do živného roztoku. I tak však nastal rozptýlený růst kolonií, proto ani tato metoda nebyla vhodná pro vybrané kultury. [48]

Tudíž, celkově z výsledků vyplývá, že metoda měření kontaktního úhlu pomocí přisedlé kapky není příliš vhodná pro stanovení vlastností povrchu, nerovnoměrně pokrytého bakteriálními buňkami. [48]

3.3 Měření kontaktního úhlu na povrchu s PVP

Membrána byla vyrobena z komerčního polyethersulfonu (PES), který již nebyl dále čištěn, a jeho molekulová hmotnost dosahovala 62 000 - 64 000 Da. Jako doplňková látka či rozpouštědlo byl použit polyvinylpyrrolidon (molekulová hmotnost 8 000 Da) a N-methylpyrrolidon (99%, molekulová hmotnost 99,13 Da). [50]

Připravené membrány obsahovaly 15 hm. % a 20 hm. % PES a v každé z nich bylo obsaženo PVP (5 hm. % až 25 hm. %). Pro porovnání byly také připraveny membrány bez PVP. Nejprve byl roztok PES nanesen licím nožem na skleněnou desku při pokojové teplotě a takto připravený film byl hned ponořen do koagulační lázně (voda z vodovodu) při teplotě 20 °C. V koagulační lázni došlo k výměně rozpouštědla a nerozpouštědla a následně k zformování membrány. Po několika minutách byl film oddělen od skleněné desky a několikrát promyt deionizovanou vodou, aby došlo k odstranění rozpouštědla. Tyto membrány byly uchovány přes noc v deionizované vodě a poté na nich proběhlo měření kontaktního úhlu. [50]

Hydrofilita povrchu membrány byla měřena na dvou membránách, kdy jedna z nich měla podíl PVP/PES 1 a druhá měla podíl PVP/PES 0,9. První membrána vykazovala hodnotu kontaktního úhlu 65,31 °a druhá 73,12°. Z těchto výsledků vyplývá, že přídavek PVP má vliv na chemické vlastnosti povrchu membrány, ve smyslu vyšší hydrofility. [50, 51, 52, 53]

4 NÁVAZNOST NA PŘEDCHOZÍ PRÁCI

Tato diplomová práce navazuje na bakalářskou práci, která se zabývala vlivem roztoku polyvinylpyrrolidonu na tvorbu bakteriálního biofilmu u zvolených druhů bakterií. Tato práce byla nejvíce zaměřena na pokusy v mikrotitračních destičkách, kde byla zjišťována intenzita tvorby biofilmu v přítomnosti PVP či bez PVP. U těchto experimentů byly použity dvě rozdílné koncentrace polyvinylpyrrolidonu v případě environmentálních kultur, u kultur farmaceutických byla použita pouze jedna koncentrace PVP. [22]

Bylo tedy zjištěno, že PVP u některých bakteriálních kultur tvorbu biofilmu zvyšuje, u některých ji naopak snižuje. Např. u kultury *Pseudomonas putida* MS2 došlo v případě koncentrace PVP 600 mg/l k průkaznému nárůstu biofilmu. V případě použití koncentrace PVP 200 mg/l však byla intenzita tvorby biofilmu snížena. Z farmaceuticky významných kultur byla vybrána kultura *E. coli* CCM 3988, u které byla použita koncentrace PVP 500 mg/l a byla zde projevována zvýšená intenzita tvorby biofilmu. V práci byl také proveden jednorázový základní pokus adsorpce PVP na buňky kultury *Pseudomonas putida* MS2 a *E. coli* CCM 3988, kde výsledky pokusů byly zcela odlišné. U kultury MS2 se projevila jistá interakce PVP s buňkami této kultury, naopak u kultury *E. coli* k adsorpci nedošlo, což ukázaly záporné hodnoty stanovení rozpuštěného organického uhlíku (DOC), jehož prostřednictvím byly koncentrace PVP po adsorpci měřeny. [22]

Z výše uvedených důvodů byly zmíněné kultury použity a více prozkoumány v této diplomové práci. Pro zjištění míry adsorpce a interakcí PVP s vybranými kulturami byly provedeny adsorpce se zvolenými koncentracemi PVP, pro sestavení adsorpčních izoterm. Byly také vybrány další metody pro lepší prozkoumání již zmíněných interakcí PVP s bakteriálními buňkami, jako je například měření povrchové energie.

Jelikož bylo v předchozí práci zjištěno, že má PVP určité biologické účinky na uvedené bakteriální kultury, byly zvoleny výše zmíněné pokusy, které měly za cíl naznačit, jak polyvinylpyrrolidon reaguje s buňkami kultury *Pseudomonas putida* MS2 a *E. coli* CCM 3988.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 MATERIÁL A METODIKA

5.1 Složení roztoků a živných médií

Minerální médium (MM)

Na přípravu 200 ml MM bylo použito:

Roztok A (KH_2PO_4 , $9,07 \text{ g.l}^{-1}$)	4 ml
Roztok B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$, $23,90 \text{ g.l}^{-1}$)	16 ml
Destilovaná voda	170 ml
Roztok stopových prvků	0,4 ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ (10 g.l^{-1})	2 ml
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ (3 g.l^{-1})	2 ml
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ (1 g.l^{-1})	2 ml
NH_4Cl (30 g.l^{-1})	2 ml
NaCl (50 g.l^{-1})	2 ml

Minerální složky byly rozmíchány v destilované vodě, sterilizovány a následně byly v některých pokusech asepticky odebrány 2 ml.

Složení roztoku stopových prvků:

$\text{MnSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,043 g
H_3BO_3	0,057 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,043 g
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$	0,037 g
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,025 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,040 g

Navážena množství solí stopových prvků byla rozpuštěna v 1000 ml destilované vody.

10 % - tní roztok N-methyl-2-pyrrolidonu (NMP) :

Do 50 ml odměrné baňky bylo naváženo 5 g NMP, následně rozpuštěno v destilované vodě a doplněno destilovanou vodou po rysku. Poté byl roztok sterilizován filtrací přes membránový filtr MILLIPORE MCE s velikostí pórů $0,22 \mu\text{m}$ do sterilní zkumavky.

Fyziologický roztok - 1000 ml:

V 1000 ml destilované vody bylo rozpuštěno 8,5 g NaCl (8,5 g/l). Roztok byl sterilizován v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

Pufrovaný fyziologický roztok (PFR) - 1000 ml:

900 ml fyziologického roztoku (8,5 g NaCl/l) bylo smícháno s 20 ml roztoku A (KH_2PO_4) a 80 ml roztoku B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$).

Roztok PVP v PFR – 1000 mg/l, 100 ml:

100 mg PVP bylo rozpuštěno v 90 ml PFR, po rozpuštění byl objem doplněn na 100 ml PFRem. Roztok byl sterilizován filtrací přes membránový filtr MILLIPORE MCE s velikostí pórů 0,22 μm .

Roztok PVP v MM – 5 g/l:

100 mg PVP bylo rozpuštěno v 20 ml MM. Roztok byl dále sterilizován filtrací přes membránový filtr MILLIPORE MCE s velikostí pórů 0,22 μm .

Zásobní roztok tryptonu – 25 g/l:

2,5 g tryptonu bylo rozpuštěno v destilované vodě a převedeno do 100 ml odměrné baňky, kde byl objem doplněn po rysku destilovanou vodou.

Roztok MMPVP:

263,2 mg PVP bylo dokonale rozpuštěno v 400 ml MM.

5.2 Použité přístroje a pomůcky

- Pipety a špičky
- Kádinky
- Kelímky
- Odměrné válce
- Odměrné baňky
- Kovové kroužky
- Přípravné děličky
- Kultivační lahve
- Petriho misky
- Filtry PRAGOPOR s velikostí pórů 0,3 μm
- Filtry MILLIPORE MCE s velikostí pórů 0,22 μm
- Kyvety
- Magnetické míchadlo
- Vzorkovnice pro stanovení DOC
- Biologický termostat nastaven na 25 °C
- Biologický termostat nastaven na 37 °C
- Laminární aseptický box TELSTAR BIO-II-A
- Laboratorní váhy
- Vratná laboratorní třepačka GFL
- Vortex
- Centrifuga Rotanta 460 R
- Magnetická míchačka
- Automatický analyzátor na měření uhlíku Shimadzu 5000A
- Sušárna
- Filtrační aparatura
- See systém od Advex Instruments ČR s modelem vyhodnocení „acid-base“
- Pro vzdušňovací motorky
- Oximetr Oxi 539
- Měřící cela pro respirace
- Fotoaparát Canon EOS 1100D
- Mikroskop OLYMPUS CX41 s fázovým kontrastem

5.3 Použité kultury

Byla použita jak kultura environmentální, tak kultura farmaceutická. Environmentální kultura byla získána z předcházejících prací mikrobiologické laboratoře ÚIOŽP FT, farmaceutická kultura byla získána z České sbírky mikroorganismů Brno (CCM). Obě kultury byly dlouhodobě uchovávány při teplotě - 80 °C.

- **Environmentální kultura:** *Pseudomonas putida* MS2 (schopná rozkladu a utilizace N-methyl pyrrolidonu), získaná a uchováváná v mikrobiologické laboratoři ÚIOŽP FT.
- **Kultura sbírková:** *Escherichia coli* CCM 3988

Kultury byly naočkovány křížovým roztěrem na univerzální agar (TYA). Kultura MS2 byla inkubována při teplotě 25 °C 48 hodin a 24 hodin, kultura *E. coli* CCM 3988 při teplotě 37 °C 24 hodin.

5.4 Postupy pokusů

5.4.1 Kultivace kultury MS2

Do vysterilizovaného minerálního média (autokláv, 121 °C, 20 minut) byly asepticky přidány 2 ml sterilního 10 % roztoku NMP (do koncentrace 1 g/l). Poté byly připraveny dvě 500 ml lahve a 100 ml odměrný válec a vše bylo vysterilizováno v autoklávu při 121°C po dobu 20 minut. Poté bylo do každé lahve přidáno 70 ml MM s NMP pomocí sterilního odměrného válce a do něj byla vyžíhanou kličkou naočkována kultura MS2, která byla kultivovaná 24 hodin. Kultivace lahví probíhala 48 hodin při 25 °C na třepačce.

5.4.2 Záchyt a promytí buněk kultury MS2 po kultivaci

Suspenze buněk byla rozdělena do čtyř kyvet po 35 ml, tyto kyvety byly dále centrifugovány 12 minut při 4 °C, 10 000 g. Supernatant byl opatrně slit z každé kyvety a buňky byly resuspendovány v 30 ml PFR. Znovu byla provedena centrifugace (12 minut, 4 °C, 10 000 g) a supernatant byl opět opatrně slit a buňky byly resuspendovány v 30 ml PFR. Po třetí centrifugaci byl supernatant znovu opatrně slit, ale tentokrát byly buňky promyty a resuspendovány v 10 ml PFR (každá kyveta) a přelity do odměrného válce. Každá kyveta byla ještě promyta 5 ml PFR a vše bylo slito dohromady a objem byl doplněn na 70 ml PFRem. Byla tak tedy získána resuspense promytých buněk o dvojnásobné koncentraci jako po kultivaci.

5.4.3 Adsorpce PVP na buňky kultury MS2 - koncentrace 500 a 100 mg/l (A)

Do šesti předem dobře vymytých a vysušených kádinek bylo nadávkováno:

1. 10 ml promytých buněk + 10 ml roztoku PVP v PFR (koncentrace PVP 500 mg/l)
2. 10 ml promytých buněk + 10 ml roztoku PVP v PFR (koncentrace PVP 500 mg/l)
3. 10 ml promytých buněk + 2 ml roztoku PVP v PFR + 8 ml roztoku PFR (koncentrace PVP 100 mg/l)
4. 10 ml promytých buněk + 2 ml roztoku PVP v PFR + 8 ml roztoku PFR (koncentrace PVP 100 mg/l)
5. 10 ml promytých buněk + 10 ml roztoku PFR
6. 10 ml promytých buněk + 10 ml roztoku PFR

Do kádinek byla dále vložena čistá magnetická míchadla, na magnetické míchače byly směsi velmi zvolna míchány 15 minut. Poté bylo z každé kádinky odebráno 10 ml a centrifugováno 12 minut při 4 °C, 10 000 g. Supernatant se dále nesléval, ale opatrně odebíral a ředil takto:

- 1, 2: odběr 2 ml, přidáno 10 ml destilované vody (ředění 6 krát) a po promíchání byly vzorky nality do vzorkovnic pro stanovení rozpuštěného organického uhlíku (DOC).
- 3 - 6: odběr 6 ml, neředěno a nalito do vzorkovnic pro stanovení DOC.

5.4.4 Kontroly A

Kontroly byly provedeny rovněž v kádinkách, ve kterých byly níže uvedené složky dokonale promíchány:

- K1: 10 ml roztoku PFR + 10 ml roztoku PVP v PFR (koncentrace PVP 500 mg/l)
- K2: 10 ml roztoku PFR + 10 ml roztoku PVP v PFR (koncentrace PVP 500 mg/l)
- K3: 10 ml roztoku PFR + 2 ml roztoku PVP v PFR + 8 ml roztoku PFR (koncentrace PVP 100 mg/l)
- K4: 10 ml roztoku PFR + 2 ml roztoku PVP v PFR + 8 ml roztoku PFR (koncentrace PVP 100 mg/l)

Dále byly odebrány vzorky pro stanovení DOC:

K1, K2: odběr 2 ml, přidavek 10 ml destilované vody (ředění 6 krát) a po promíchání byly vzorky nality do vzorkovnic na stanovení DOC.

K3, K4: odběr 6 ml, neředěno a nalito do vzorkovnic pro stanovení DOC.

5.4.5 Adsorpce PVP na buňky kultury MS2 - koncentrace 250 a 50 mg/l (B)

Do šesti předem dobře vymytých a vysušených kádinek bylo nadávkováno:

1. 10 ml promytých buněk + 5 ml roztoku PVP v PFR + 5 ml roztoku PFR (koncentrace PVP 250 mg/l)
2. 10 ml promytých buněk + 5 ml roztoku PVP v PFR + 5 ml roztoku PFR (koncentrace PVP 250 mg/l)
3. 10 ml promytých buněk + 1 ml roztoku PVP v PFR + 9 ml roztoku PFR (koncentrace PVP 50 mg/l)
4. 10 ml promytých buněk + 1 ml roztoku PVP v PFR + 9 ml roztoku PFR (koncentrace PVP 50 mg/l)
5. 10 ml promytých buněk + 10 ml roztoku PFR
6. 10 ml promytých buněk + 10 ml roztoku PFR

Do kádinek byla dále vložena čistá magnetická míchadla, na magnetické míchače byly směsi velmi zvolna míchány 15 minut. Poté bylo z každé kádinky odebráno 10 ml a centrifugováno 12 minut při 4 °C, 10 000 g. Supernatant se dále nesléval, ale opatrně odebíral a ředil takto:

1, 2: odběr 2 ml, přidáno 6 ml destilované vody (ředění 4 krát) a po promíchání byly vzorky nality do vzorkovnic pro stanovení DOC.

3 - 6: odběr 6 ml, neředěno a nalito do vzorkovnic pro stanovení DOC.

5.4.6 Kontroly B

Kontroly byly provedeny v kádinkách, ve kterých byly níže uvedené složky dokonale promíchány:

K1: 10 ml roztoku PFR + 5 ml roztoku PVP v PFR + 5 ml roztoku PFR

(koncentrace PVP 250 mg/l)

K2: 10 ml roztoku PFR + 5 ml roztoku PVP v PFR + 5 ml roztoku PFR

(koncentrace PVP 250 mg/l)

K3: 10 ml roztoku PFR + 1 ml roztoku PVP v PFR + 9 ml roztoku PFR

(koncentrace PVP 50 mg/l)

K4: 10 ml roztoku PFR + 1 ml roztoku PVP v PFR + 9 ml roztoku PFR

(koncentrace PVP 50 mg/l)

Dále byly odebrány vzorky pro stanovení DOC:

K1, K2: odběr 2 ml, přídavek 6 ml destilované vody (ředění 4 krát) a po promíchání byly vzorky nality do vzorkovnic na stanovení DOC.

K3, K4: odběr 6 ml, neředěno a nalito do vzorkovnic pro stanovení DOC.

5.4.7 Adsorpce PVP na buňky kultury MS2 - koncentrace 25 a 10 mg/l (C)

Do šesti předem dobře vymytých a vysušených kádinek bylo nadávkováno:

1. 10 ml promytých buněk + 0,5 ml roztoku PVP v PFR + 9,5 ml roztoku PFR
(koncentrace PVP 25 mg/l)
2. 10 ml promytých buněk + 0,5 ml roztoku PVP v PFR + 9,5 ml roztoku PFR
(koncentrace PVP 25 mg/l)
3. 10 ml promytých buněk + 0,2 ml roztoku PVP v PFR + 9,8 ml roztoku PFR
(koncentrace PVP 10 mg/l)
4. 10 ml promytých buněk + 0,2 ml roztoku PVP v PFR + 9,8 ml roztoku PFR
(koncentrace PVP 10 mg/l)
5. 10 ml promytých buněk + 10 ml roztoku PFR
6. 10 ml promytých buněk + 10 ml roztoku PFR

Do kádinek byla dále vložena čistá magnetická míchadla, na magnetické míchačce byly směsi velmi zvolna míchány 15 minut. Poté bylo z každé kádinky odebráno 10 ml a centrifugováno 12 minut při 4 °C, 10 000 g. Supernatant se dále nesléval, ale opatrně odebíral po 6 ml do vzorkovnic na stanovení DOC.

5.4.8 Kontroly C

Kontroly byly provedeny v kádinkách, ve kterých byly níže uvedené složky dokonale promíchány:

K1: 10 ml roztoku PFR + 0,5 ml roztoku PVP v PFR + 9,5 ml roztoku PFR

(koncentrace PVP 25 mg/l)

K2: 10 ml roztoku PFR + 0,5 ml roztoku PVP v PFR + 9,5 ml roztoku PFR

(koncentrace PVP 25 mg/l)

K3: 10 ml roztoku PFR + 0,2 ml roztoku PVP v PFR + 9,8 ml roztoku PFR

(koncentrace PVP 10 mg/l)

K4: 10 ml roztoku PFR + 0,2 ml roztoku PVP v PFR + 9,8 ml roztoku PFR

(koncentrace PVP 10 mg/l)

Dále nebyly vzorky ředěny, ale pouze odebrány po 6 ml do vzorkovnic na stanovení DOC.

5.4.9 Kultivace kultury MS2 na tryptonu

Po přípravě MM bylo přidáno 210 mg tryptonu (koncentrace 1 g/l), takto připravené médium bylo rozplněno do dvou 500 ml lahví po 90 ml a vysterilizováno v autoklávu (121 °C, 20 minut). Poté byly lahve zaočkovány 24 hodinovou kulturou MS2 a kultivovány na třepačce při 25 °C po dobu 24 hodin.

5.4.10 Záchyt a promytí buněk kultury MS2 rostoucí na tryptonu

Suspenze buněk z lahví byla rozplněna do 6 kyvet po 30 ml a následně centrifugována (12 minut, 4 °C, 10 000 g). Supernatant byl opatrně slit a buňky byly resuspendovány v 30 ml PFR. Poté byla znovu provedena centrifugace, supernatant byl opět opatrně slit a buňky byly resuspendovány v 30 ml PFR a centrifugovány. Touto

centrifugací byly již buňky promyty, supernatant byl slit a buňky byly resuspendovány v 10 ml PFR, poté byly přelity do odměrného válce. Každá kyveta byla ještě promyta 5 ml PFR a vše bylo slito dohromady do odměrného válce, který byl následně doplněn na objem 85 ml PFR. Byla tedy získána resuspenze promytých buněk o dvojnásobné koncentraci jako po kultivaci.

5.4.11 Adsorpce PVP na buňky kultury MS2 rostoucí na tryptonu (koncentrace PVP 500, 250, 100, 50, 25 a 10 mg/l)

Do dvanácti předem dobře vymytých a vysušených kádínek bylo nadávkováno:

1. 5 ml promytých buněk + 5 ml roztoku PVP v PFR (koncentrace PVP 500 mg/l)
2. 5 ml promytých buněk + 5 ml roztoku PVP v PFR (koncentrace PVP 500 mg/l)
3. 5 ml promytých buněk + 1 ml roztoku PVP v PFR + 4 ml roztoku PFR (koncentrace PVP 100 mg/l)
4. 5 ml promytých buněk + 1 ml roztoku PVP v PFR + 4 ml roztoku PFR (koncentrace PVP 100 mg/l)
5. 5 ml promytých buněk + 5 ml roztoku PFR
6. 5 ml promytých buněk + 5 ml roztoku PFR
7. 5 ml promytých buněk + 2,5 ml roztoku PVP v PFR + 2,5 ml PFR (koncentrace PVP 250 mg/l)
8. 5 ml promytých buněk + 2,5 ml roztoku PVP v PFR + 2,5 ml PFR (koncentrace PVP 250 mg/l)
9. 10 ml promytých buněk + 1 ml roztoku PVP v PFR + 9 ml PFR (koncentrace PVP 50 mg/l)
10. 10 ml promytých buněk + 1 ml roztoku PVP v PFR + 9 ml PFR (koncentrace PVP 50 mg/l)
11. 5 ml promytých buněk + 5 ml roztoku PFR
12. 5 ml promytých buněk + 5 ml roztoku PFR
13. 10 ml promytých buněk + 0,5 ml roztoku PVP v PFR + 9,5 ml roztoku PFR (koncentrace PVP 25 mg/l)
14. 10 ml promytých buněk + 0,5 ml roztoku PVP v PFR + 9,5 ml roztoku PFR (koncentrace PVP 25 mg/l)
15. 10 ml promytých buněk + 0,2 ml roztoku PVP v PFR + 9,8 ml roztoku PFR (koncentrace PVP 10 mg/l)

16. 10 ml promytých buněk + 0,2 ml roztoku PVP v PFR + 9,8 ml roztoku PFR
(koncentrace PVP 10 mg/l)

17. 10 ml promytých buněk + 10 ml roztoku PFR

18. 10 ml promytých buněk + 10 ml roztoku PFR

Do kádinek byla poté vložena čistá magnetická míchadla, na magnetické míchače byly směsi velmi zvolna míchány 15 minut. Poté bylo z každé kádinky odebráno 10 ml a centrifugováno 12 minut při 4 °C, 10 000 g. Supernatant se dále nesléval, ale ředil takto:

1, 2: odběr 2 ml, přidáno 10 ml destilované vody (ředění 6 krát) a po promíchání bylo z roztoků odebráno 6 ml do vzorkovnic pro stanovení DOC.

7, 8: odběr 2 ml, přidáno 6 ml destilované vody (ředění 4 krát) a po promíchání bylo z roztoků odebráno 6 ml do vzorkovnic pro stanovení DOC.

3, 4, 5, 6, 9-18: neředěno, odebráno 6 ml do vzorkovnic pro stanovení DOC.

5.4.12 Kontroly - kultura MS2 rostoucí na tryptonu

Kontroly byly provedeny v kádinkách, které byly míchány 15 minut při laboratorní teplotě. Kádinky byly připraveny takto:

K1: 5 ml roztoku PFR + 5 ml roztoku PVP v PFR (koncentrace PVP 500 mg/l)

K2: 5 ml roztoku PFR + 5 ml roztoku PVP v PFR (koncentrace PVP 500 mg/l)

K3: 5 ml roztoku PFR + 1 ml roztoku PVP v PFR + 4 ml roztoku PFR
(koncentrace PVP 100 mg/l)

K4: 5 ml roztoku PFR + 1 ml roztoku PVP v PFR + 4 ml roztoku PFR
(koncentrace PVP 100 mg/l)

K7: 5 ml roztoku PFR + 2,5 ml roztoku PVP v PFR + 2,5 ml roztoku PFR
(koncentrace PVP 250 mg/l)

K8: 5 ml roztoku PFR + 2,5 ml roztoku PVP v PFR + 2,5 ml roztoku PFR
(koncentrace PVP 250 mg/l)

K9: 10 ml roztoku PFR + 1 ml roztoku PVP v PFR + 4 ml roztoku PFR
(koncentrace PVP 50 mg/l)

K10: 10 ml roztoku PFR + 1 ml roztoku PVP v PFR + 4 ml roztoku PFR
(koncentrace PVP 50 mg/l)

K13: 10 ml roztoku PFR + 0,5 ml roztoku PVP v PFR + 9,5 ml roztoku PFR
(koncentrace PVP 25 mg/l)

K14: 10 ml roztoku PFR + 0,5 ml roztoku PVP v PFR + 9,5 ml roztoku PFR
(koncentrace PVP 25 mg/l)

K15: 10 ml roztoku PFR + 0,2 ml roztoku PVP v PFR + 9,8 ml roztoku PFR
(koncentrace PVP 10 mg/l)

K16: 10 ml roztoku PFR + 0,2 ml roztoku PVP v PFR + 9,8 ml roztoku PFR
(koncentrace PVP 10 mg/l)

Poté byly odebrány vzorky pro stanovení DOC následovně:

K1, K2: odběr 2 ml, přidáno 10 ml destilované vody (ředění 6 krát) a po promíchání bylo z roztoků odebráno 6 ml do vzorkovnic pro stanovení DOC.

K7, K8: odběr 2 ml, přidáno 6 ml destilované vody (ředění 4 krát) a po promíchání bylo z roztoků odebráno 6 ml do vzorkovnic pro stanovení DOC.

K3, K4, K9, K10, K13 - K16: neředěno, odběr 6 ml do vzorkovnic pro stanovení DOC.

5.4.13 Kultivace kultury *E. coli* CCM 3988

400 ml připraveného minerálního média bylo rozděleno do 4 lahví po 75 ml, kdy do každé lahve bylo naváženo 440 mg tryptonu (koncentrace 5 g/l). Poté byly lahve vysterilizovány v autoklávu (121 °C, 20 minut) a zaočkovány 24 hodinovou kulturou *E. coli* CCM 3988. Kultivace probíhala 24 hodin na třepačce při 25 °C.

5.4.14 Záchyt a promytí buněk kultury *E. coli* CCM 3988

Suspenze buněk z každé lahve byla rozdělena do dvou kyvet po 35 ml a kyvety byly poté centrifugovány (12 minut, 4 °C, 10 000 g). Supernatant byl opatrně slit a buňky byly resuspendovány v 30 ml PFR. Poté byla znovu provedena centrifugace, supernatant byl opět opatrně slit a buňky byly resuspendovány v 30 ml PFR a centrifugovány. Touto centrifugací byly již buňky promyty, supernatant byl slit a buňky byly resuspendovány

v 10 ml PFR, poté byly přelity do odměrného válce. Každá kyveta byla ještě promyta 5 ml PFR a vše bylo slito dohromady do odměrného válce, který byl následně doplněn na objem 140 ml PFR. Byla tedy získána resuspenze promytých buněk o dvojnásobné koncentraci jako po kultivaci.

5.4.15 Adsorpce PVP na buňky kultury *E. coli* CCM 3988 (koncentrace PVP 500, 250, 100, 50, 25 a 10 mg/l)

Do osmnácti předem dobře vymytých a vysušených kádinek bylo nadávkováno:

1. 5 ml promytých buněk + 5 ml roztoku PVP v PFR (koncentrace PVP 500 mg/l)
2. 5 ml promytých buněk + 5 ml roztoku PVP v PFR (koncentrace PVP 500 mg/l)
3. 5 ml promytých buněk + 1 ml roztoku PVP v PFR + 4 ml roztoku PFR (koncentrace PVP 100 mg/l)
4. 5 ml promytých buněk + 1 ml roztoku PVP v PFR + 4 ml roztoku PFR (koncentrace PVP 100 mg/l)
5. 5 ml promytých buněk + 5 ml roztoku PFR
6. 5 ml promytých buněk + 5 ml roztoku PFR
7. 5 ml promytých buněk + 2,5 ml roztoku PVP v PFR + 2,5 ml roztoku PFR (koncentrace PVP 250 mg/l)
8. 5 ml promytých buněk + 2,5 ml roztoku PVP v PFR + 2,5 ml roztoku PFR (koncentrace PVP 250 mg/l)
9. 10 ml promytých buněk + 1 ml roztoku PVP v PFR + 9 ml roztoku PFR (koncentrace PVP 50 mg/l)
10. 10 ml promytých buněk + 1 ml roztoku PVP v PFR + 9 ml roztoku PFR (koncentrace PVP 50 mg/l)
11. 5 ml promytých buněk + 5 ml roztoku PFR
12. 5 ml promytých buněk + 5 ml roztoku PFR
13. 10 ml promytých buněk + 0,5 ml roztoku PVP v PFR + 9,5 ml roztoku PFR (koncentrace PVP 25 mg/l)
14. 10 ml promytých buněk + 0,5 ml roztoku PVP v PFR + 9,5 ml roztoku PFR (koncentrace PVP 25 mg/l)
15. 10 ml promytých buněk + 0,2 ml roztoku PVP v PFR + 9,8 ml roztoku PFR (koncentrace PVP 10 mg/l)

16. 10 ml promytých buněk + 0,2 ml roztoku PVP v PFR + 9,8 ml roztoku PFR
(koncentrace PVP 10 mg/l)

17. 10 ml promytých buněk + 10 ml roztoku PFR

18. 10 ml promytých buněk + 10 ml roztoku PFR

Do kádinek byla dále vložena čistá magnetická míchadla, na magnetické míchače byly směsi velmi zvolna míchány 15 minut. Poté bylo z každé kádinky odebráno 10 ml a centrifugováno 12 minut při 4 °C, 10 000 g. Supernatant se dále nesléval, ale opatrně odebíral do vzorkovnic na stanovení DOC takto:

1, 2: odběr 2 ml, přidáno 10 ml destilované vody (ředění 6 krát) a po promíchání bylo z roztoků odebráno 6 ml do vzorkovnic pro stanovení DOC.

7, 8: odběr 2 ml, přidáno 6 ml destilované vody (ředění 4 krát) a po promíchání bylo z roztoků odebráno 6 ml do vzorkovnic pro stanovení DOC.

3 - 6, 9 - 18 : neředěno, odebráno 6 ml do vzorkovnic pro stanovení DOC.

5.4.16 Kontroly *E. coli* CCM 3988 (koncentrace PVP 500, 250, 100, 50, 25 a 10 mg/l)

Kontroly byly provedeny v kádinkách, které byly občas promíchány během 15 minut při laboratorní teplotě. Kádinky byly připraveny takto:

K1: 5 ml roztoku PFR + 5 ml roztoku PVP v PFR (koncentrace PVP 500 mg/l)

K2: 5 ml roztoku PFR + 5 ml roztoku PVP v PFR (koncentrace PVP 500 mg/l)

K3: 5 ml roztoku PFR + 1 ml roztoku PVP v PFR + 4 ml roztoku PFR

(koncentrace PVP 100 mg/l)

K4: 5 ml roztoku PFR + 1 ml roztoku PVP v PFR + 4 ml roztoku PFR

(koncentrace PVP 100 mg/l)

K7: 5 ml roztoku PFR + 2,5 ml roztoku PVP v PFR + 2,5 ml roztoku PFR

(koncentrace PVP 250 mg/l)

K8: 5 ml roztoku PFR + 2,5 ml roztoku PVP v PFR + 2,5 ml roztoku PFR

(koncentrace PVP 250 mg/l)

K9: 10 ml roztoku PFR + 1 ml roztoku PVP v PFR + 4 ml roztoku PFR

(koncentrace PVP 50 mg/l)

K10: 10 ml roztoku PFR + 1 ml roztoku PVP v PFR + 4 ml roztoku PFR

(koncentrace PVP 50 mg/l)

K13: 10 ml roztoku PFR + 0,5 ml roztoku PVP v PFR + 9,5 ml roztoku PFR

(koncentrace PVP 25 mg/l)

K14: 10 ml roztoku PFR + 0,5 ml roztoku PVP v PFR + 9,5 ml roztoku PFR

(koncentrace PVP 25 mg/l)

K15: 10 ml roztoku PFR + 0,2 ml roztoku PVP v PFR + 9,8 ml roztoku PFR

(koncentrace PVP 10 mg/l)

K16: 10 ml roztoku PFR + 0,2 ml roztoku PVP v PFR + 9,8 ml roztoku PFR

(koncentrace PVP 10 mg/l)

Poté byly odebrány vzorky pro stanovení DOC následovně:

K1, K2: odběr 2 ml, přidáno 10 ml destilované vody (ředění 6 krát) a po promíchání bylo z roztoků odebráno 6 ml do vzorkovnic pro stanovení DOC.

K7, K8: odběr 2 ml, přidáno 6 ml destilované vody (ředění 4 krát) a po promíchání bylo z roztoků odebráno 6 ml do vzorkovnic pro stanovení DOC.

K3, K4, K9, K10, K13 – K16 : odběr 6ml do vzorkovnic pro stanovení DOC.

5.4.17 Měření rozpuštěného organického uhlíku (DOC)

Koncentrace DOC ve vzorcích byly měřeny na automatickém analyzátoru Shimadzu 5000A, včetně koncentrace DOC samotného PFR (neředěno, ve 2 vzorkovnicích) a roztoku PVP v PFR (10 x zředěno, 1 ml vzorku : 9 ml destilované vody). Dále byla pro kontrolu změřena i koncentrace DOC použité destilované vody.

5.4.18 Stanovení sušiny buněk

Nejprve bylo předem vysušeno a zváženo 6 porcelánových kelímků. Do tří z nich bylo napipetováno po 3 ml buněčné suspenze použité při pokusech adsorpce. Do dalších 3 kelímků bylo napipetováno po 3 ml roztoku PFR, ve kterém byly buňky suspendovány. Všechny kelímky byly nejprve odsušeny v laboratorní sušárně při teplotě cca 70 °C. Asi po 4 hodinách byly kelímky dosušeny při 105 °C nejméně 3 hodiny. Kelímky se nechaly následně zchladnout v exikátoru a poté byly zváženy.

5.4.19 Výpočet adsorbovaného PVP pro zvolené koncentrace PVP (500, 250, 100, 50, 25 a 10 mg/l)

Nejprve byla po provedené sorpci pro každou koncentraci PVP s buňkami dané kultury změřena koncentrace uhlíku pomocí DOC, z které byl následně udělán průměr z paralelních měření. Tento průměr byl dále přepočítán na dané ředění.

Dále byla od přepočtené koncentrace změřeného uhlíku pro jednotlivé koncentrace PVP s buňkami dané kultury odečtena hodnota průměrné koncentrace uhlíku buněk samotných. Následně byla tato vypočtená hodnota odečtena od kontroly, kde byla změřena koncentrace uhlíku pro danou koncentraci PVP bez buněk.

DOC (PVP bez buněk) = kontrola pro danou koncentraci PVP

DOC (PVP po sorpci) = započtené ředění buňky s PVP – započtené ředění buněk

DOC (buněk v PFR) = započtené ředění buněk

Adsorpce PVP = DOC (PVP bez buněk) - DOC (PVP po sorpci)

Výpočet adsorpční kapacity buněk byl poté pro všechny koncentrace PVP proveden vztažením adsorbovaného množství DOC na aktuální sušinu použitých buněk a přepočten na 1 g sušiny buněk. Adsorpční kapacita buněk tak byla vyjadřována v mg DOC / g sušiny buněk.

5.4.20 Příprava kultur pro měření povrchové energie buněk I.

Byly připraveny 4 lahve (500 ml) následovně:

- Láhev 1: 80 ml MM
- Láhev 2: naváženo 80 mg tryptonu a přidáno 80 ml MM, následovalo rozmíchání
- Láhev 3: naváženo 440 mg tryptonu a přidáno 80 ml MM, poté rozmícháno
- Láhev 4: naváženo 440 mg tryptonu a přidáno 80 ml MM, dále rozmícháno

Ze zbylých 80 ml MM bylo odebráno 50 ml do malé lahvičky a z posledních 30 ml byl připraven roztok PVP v MM (5 g/l). Následně byly všechny čtyři 500 ml lahve a malá lahvička s 50 ml MM vysterilizovány v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. Po sterilizaci byly lahve upraveny takto:

- Láhev 1 : asepticky přidáno 0,8 ml sterilního 10 % NMP (do koncentrace 1 g/l)
- Láhev 2: nic nepřidáno (koncentrace tryptonu 1 g/l)
- Láhev 3: asepticky odebráno 8 ml a asepticky přidáno 8 ml sterilního MM (koncentrace tryptonu 5 g/l)
- Láhev 4: asepticky odebráno 8 ml a asepticky přidáno 8 ml sterilního roztoku PVP v MM1 – koncentrace PVP v lahvi byla 500 mg/l a tryptonu 5 g/l

Poté byly lahve zaočkovány takto:

- Láhev 1 a 2: po 80 µl suspence MS2
- Láhev 3 a 4: po 80 µl suspence *E. coli* CCM 3988

Láhve s MS2 byly následně kultivovány při 25 °C na třepačce po dobu 48 hodin a lahve s *E. coli* poté 24 hodin při 25 °C .

5.4.21 Záchyt a promytí buněk kultury před měřením povrchové energie I.

Suspenze buněk z každé lahve byla rozdělena do dvou kyvet po 35 ml a centrifugována 12 minut při 4 °C, při 10 000 g. Vzniklý supernatant byl opatrně slit z každé kyvety a buňky byly resuspendovány v 30 ml sterilního fyziologického roztoku. Poté proběhla druhá centrifugace, kdy byl supernatant opět opatrně slit, a buňky byly resuspendovány v 30 ml sterilního fyziologického roztoku. Třetí centrifugací byly již buňky promyty, supernatant byl slit a buňky byly resuspendovány ve 40 ml sterilního fyziologického roztoku a následně byly stejné buňky slity do odměrného válce a doplněny sterilním fyziologickým roztokem na objem 100 ml.

5.4.22 Příprava pro měření povrchové energie buněk kultury MS2

Minerální médium (400 ml) bylo rozděleno do čtyř lahví o objemu 500 ml po 80 ml a zbylé množství MM bylo přelito do lahve o objemu 250 ml. Lahve s MM byly připraveny takto:

Lahve 1A a 1B: pouze 80 ml MM (nic nepřidáno)

Lahve 2A a 2B: předem naváženo 80 mg tryptonu a rozpuštěno v 80 ml MM

Takto připravené lahve byly vysterilizovány v autoklávu (121°C, 20 minut) spolu s lahví o objemu 250 ml s MM. Po sterilizaci bylo do lahví přidáno:

Lahve 1A a 1B: asepticky přidáno 0,8 ml sterilního 10 % NMP
(koncentrace NMP 1 g/l)

Lahve 2A a 2B: koncentrace tryptonu 1 g/l, nic nepřidáno

Následně byly lahve zaočkovány 80 µl suspenze 24 hodinové kultury MS2 a kultivovány na třepače 48 hodin při 25 °C.

5.4.23 Příprava před měřením povrchové energie kultury *E. coli*

Minerální médium (400 ml) bylo rozděleno do čtyř lahví o objemu 500 ml po 80 ml a 50 ml MM bylo přelito do lahve o objemu 250 ml. Zbylých 30 ml minerálního média bylo použito na přípravu roztoku PVP o koncentraci 5 g/l, kde bylo naváženo 100 mg PVP a následně rozpuštěno v 20 ml MM. Tento roztok byl sterilizován filtrací. Lahve s MM byly připraveny takto:

Lahve 1A a 1B: předem naváženo 440 mg tryptonu a rozpuštěno v 80 ml MM

Lahve 2A a 2B: předem naváženo 440 mg tryptonu a rozpuštěno v 80 ml MM

Takto připravené lahve byly vysterilizovány v autoklávu (121°C, 20 minut) spolu s lahví o objemu 250 ml s 50 ml MM. Po sterilizaci byly lahve upraveny následovně:

Lahve 1A a 1B: asepticky odebráno 8 ml a asepticky přidáno 8 ml sterilního minerálního média bez PVP

Lahve 2A a 2B: asepticky odebráno 8 ml a asepticky přidáno 8 ml sterilního roztoku PVP v MM (koncentrace 5 g/l)

Dále byly lahve zaočkovány 80 μ l suspenze 24 hodinové kultury *E. coli* a kultivovány na třepačce 24 hodin při 25 °C.

5.4.24 Záchyt a promytí buněk kultury MS2 a *E. coli* pro měření povrchové energie

Suspenze buněk z každé lahve byla rozdělena do dvou kyvet po 35 ml a centrifugována 12 minut při 4 °C, při 10 000 g. Vzniklý supernatant byl opatrně slit z každé kyvety a buňky byly resuspendovány v 30 ml sterilního fyziologického roztoku. Poté proběhla druhá centrifugace, kdy byl supernatant opět opatrně slit, a buňky byly resuspendovány v 30 ml sterilního fyziologického roztoku. Třetí centrifugací byly již buňky promyty, supernatant byl slit a buňky byly resuspendovány ve 30 ml sterilního fyziologického roztoku. Každá kyveta byla poté filtrována zvlášť přes vyvařený filtr.

5.4.25 Filtrace a měření povrchové energie buněk

Promyté buňky obou kultur byly filtrovány přes membránové filtry PRAGOPOR o velikosti pórů 0,3 μm . Nejprve byly tyto filtry vyvařeny a poté byly vloženy do filtrační aparatury. Do této filtrační aparatury byly nality promyté buňky (cca 30 ml), resuspendované ve sterilním fyziologickém roztoku. Dále byl spuštěn přívod vzduchu a buňky byly filtrovány za mírného podtlaku. Po ukončení filtrace (zaplnění filtru buňkami) byly filtry vloženy na Petriho misky a sušeny v sušárně při teplotě 40 °C cca 1 hodinu, při zatížení filtru čistým kovovým kroužkem, aby bylo zabráněno jeho zkroucení.

Vysušené filtry byly následně rozstříhány na tři „proužky“ a po jednom vkládány před See systém na vyhodnocení povrchové energie. Na každý „proužek“ byly nakapány tři kapky testovací kapaliny po 5 μl , kdy na každý z nich byl nakapán jeden roztok. Byly zvoleny celkem tři testovací kapaliny, a to voda, formamid a diiodomethan. Každá vytvořená kapka byla poté vyfotografována pomocí See systému, tyto kontaktní úhly byly zprůměrovány pro získání reprezentativní hodnoty a následně byla vyhodnocena volná energie povrchu substrátu "acid-base".

5.4.26 Příprava pro měření respirace kultury *E. coli* kultivované s PVP a bez PVP

Lahve před sterilizací byly připraveny následovně:

Láhev 1 a 2: 440 mg tryptonu + 80 ml MM

Láhev 3 a 4: 440 mg tryptonu + 80 ml MM

Po sterilizaci byly lahve upraveny takto:

Láhev 1 a 2: asepticky odebráno 8 ml a přidáno 8 ml sterilního MM (bez PVP)

Láhev 3 a 4: asepticky odebráno 8 ml a přidáno 8 ml sterilního roztoku PVP v MM (koncentrace 5 g/l), celková koncentrace PVP v lahvi 500 mg/l

Takto připravené lahve byly zaočkovány 80 μl suspenze *E. coli* CCM 3988 a kultivovány 24 hodin při 25 °C na třepače.

5.4.27 Příprava pro měření respirace kultury *E. coli* v přítomnosti PVP a bez PVP

Lahve před sterilizací byly připraveny následovně:

Láhev 1 a 2: 440 mg tryptonu + 80 ml MM

Láhev 3 a 4: 440 mg tryptonu + 80 ml MM

Po sterilizaci bylo z každé lahve asepticky odebráno 8 ml a přidáno 8 ml sterilního MM (bez PVP). Dále byly lahve zaočkovány 80 μ l suspenze *E. coli* CCM 3988 a kultivovány 24 hodin při 25 °C na třepačce. Kultivace probíhala bez přítomnosti PVP.

5.4.28 Záchyt a promytí buněk po kultivaci, před měřením respirace

Suspenze buněk z každé lahve byla rozdělena do dvou kyvet po 35 ml a centrifugována 12 minut při 4 °C a 10 000 g. Supernatant byl opatrně slit z každé kyvety a buňky byly resuspendovány v 30 ml PFR, poté byla znovu provedena centrifugace 12 minut při 4 °C a 10 000 g, kdy supernatant byl opět opatrně slit a buňky byly resuspendovány v 20 ml PFR. Stejně buňky byly slity dohromady a kyvety byly propláchnuty 5 ml PFR a obě vzniklé suspenze byly doplněny PFR na objem 110 ml. Dostaly jsme tedy dvě 110 ml suspenze buněk.

5.4.29 Měření respirace kultury *E. coli* kultivované s PVP a bez PVP

Do přípravné děličky bylo nadávkováno 190 ml MM, bylo zapnuto intenzivní provzdušňování, přidáno 10 ml roztoku tryptonu o koncentraci 25 g/l a 50 ml buněk *E. coli*. Takto připravená dělička se nechala 30 minut provzdušňovat a poté byla suspenze převedena do měřicí cely, kde proběhlo měření respirace. Nejprve byl proveden pokus s kulturou *E. coli*, kultivovanou bez PVP, tento pokus byl proveden dvakrát. Následně byl proveden experiment s kulturou *E. coli*, kultivovanou s PVP, také dvakrát.

Ze zbytků suspenze byla stanovena sušina buněk, kdy do devíti kelímků bylo nadávkováno:

kelímky 1- 3: po 3 ml suspenze buněk kultury *E. coli*, kultivované bez PVP

kelímky 4- 6: po 3 ml suspenze buněk kultury *E. coli*, kultivované s PVP

kelímky 7- 9: po 3 ml roztoku PFR

Takto připravené kelímky byly nejprve sušeny při cca 80 °C cca 4 hodiny a poté byly sušeny při 105 °C nejméně 3 hodiny. Následně byly kelímky vloženy do exikátoru a po zchladnutí zváženy.

5.4.30 Měření respirace kultury *E. coli* v přítomnosti PVP a bez něj

Nejprve bylo do přípravné děličky nadávkováno 190 ml MM, bylo zapnuto provzdušňování a přidáno 10 ml roztoku tryptonu o koncentraci 25 g/l a 50 ml buněk *E. coli*, kultivovaných bez PVP. Takto připravená dělička se nechala 30 minut provzdušňovat a poté byla suspenze převedena do měřicí cely, kde proběhlo měření respirace. Nejprve byl proveden pokus s kulturou *E. coli* bez PVP, tento pokus byl proveden dvakrát. Následně byl proveden experiment s kulturou *E. coli* s PVP, kdy bylo do přípravné děličky nadávkováno 190 ml MMPVP, bylo zapnuto provzdušňování a poté bylo nadávkováno 10 ml roztoku tryptonu o koncentraci 25 g/l a 50 ml buněk *E. coli*. Takto připravená dělička se nechala 30 minut provzdušňovat a poté byla suspenze převedena do měřicí cely, kde proběhlo měření respirace. Tento pokus byl proveden také dvakrát.

Ze zbytků suspenze byla stanovena sušina buněk, kdy do šesti kelímku bylo nadávkováno:

kelímky 1- 3: po 3 ml suspenze buněk kultury *E. coli*, bez PVP

kelímky 4- 6: po 3 ml PFR

Tyto kelímky byly nejprve sušeny při cca 80 °C cca 4 hodiny a poté byly sušeny při 105 °C nejméně 3 hodiny. Následně byly kelímky vloženy do exikátoru a po zchladnutí zváženy.

6 VÝSLEDKY POKUSŮ A DISKUZE

6.1 Pokus adsorpce PVP na buňky kultury *Pseudomonas putida* MS2, kultivované na N-methyl-2-pyrrolidonu

Nejprve byly zvoleny koncentrace PVP pro adsorpci na buňky kultury MS2 a to koncentrace PVP 500 mg/l, 250 mg/l, 100 mg/l, 50 mg/l, 25 mg/l a 10 mg/l.

Do předem připraveného minerálního média byl přidán roztok 10 % NMP a takto připravené médium bylo zaočkováno kulturou MS2, proběhla kultivace po dobu 48 hodin. Po kultivaci proběhl záchyt a promytí buněk s následnou adsorpcí spolu s kontrolami (A, B, C). Po adsorpci PVP a po odstředění buněk byla formou stanovení DOC zjišťována koncentrace organického uhlíku a porovnávána s koncentrací v příslušných kontrolách, kde místo byl suspenze buněk dávkován PFR. Výsledky adsorpcí a již zmíněných kontrol jsou uvedeny níže; všechna stanovení byla prováděna dvojmo.

Tabulka 1 – Výsledky DOC supernatantů po adsorpci a odstranění buněk, včetně kontrol (A)

	DOC [mg/l]	Průměr [mg/l]	Po započtení ředění [mg/l]	Koncentrace PVP při adsorpci [mg/l]
1	48,180	47,530	285,180	500
2	46,880			
K1	49,250	50,745	304,470	500
K2	52,240			
3	59,470	62,600	62,600	100
4	65,730			
K3	62,180	62,520	62,520	100
K4	62,860			
5	8,600	8,802	8,802	0
6	9,004			

1-4 - buňky MS2 + PFR+PVP o koncentraci PVP 500 a 100 mg/l; K1-K4 - PFR+PVP (kontroly k příslušné koncentraci PVP s buňkami); 5,6 – jen buňky v PFR, bez PVP

Tabulka 2 – Výsledky DOC supernatantů po adsorpci a odstranění buněk, včetně kontrol (B)

	DOC [mg/l]	Průměr [mg/l]	Po započtení ředění [mg/l]	Koncentrace PVP při adsorpci [mg/l]
1	34,320	33,930	135,720	250
2	33,540			
K1	38,560	38,565	154,260	250
K2	38,570			
3	30,220	31,960	31,960	50
4	33,700			
K3	29,480	29,580	29,580	50
K4	29,680			
5	10,010	8,132	8,132	0
6	6,253			

1-4 - buňky MS2 + PFR+PVP o koncentraci PVP 250 a 50 mg/l; K1-K4 - PFR+PVP (kontroly k příslušné koncentraci PVP s buňkami); 5,6 – jen buňky v PFR, bez PVP

Tabulka 3 – Výsledky DOC supernatantů po adsorpci a odstranění buněk, včetně kontrol (C)

	DOC [mg/l]	Průměr [mg/l]	Po započtení ředění [mg/l]	Koncentrace PVP při adsorpci [mg/l]
1	14,120	14,710	14,710	25
2	15,300			
K1	13,870	13,725	13,725	25
K2	13,580			
3	7,568	7,030	7,030	10
4	6,491			
K3	5,710	5,713	5,713	10
K4	5,716			
5	1,551	1,435	1,435	0
6	1,318			

1-4 - buňky MS2 + PFR+PVP o koncentraci PVP 25 a 10 mg/l; K1-K4 - PFR+PVP (kontroly k příslušné koncentraci PVP s buňkami); 5,6 – jen buňky v PFR, bez PVP

Tabulka 4 – Vypočtená míra adsorpce při zvolených koncentracích PVP pro kulturu MS2

Koncentrace PVP [mg/l]	500	250	100	50	25	10
DOC (PVP bez buněk) [mg/l]	304,470	154,260	62,520	29,580	13,725	5,713
DOC (PVP po sorpci) [mg/l]	276,378	127,589	53,798	23,829	13,276	5,595
DOC (buněk v PFR) [mg/l]	8,802	8,131	8,802	8,132	1,435	1,435
Adsorpce PVP [mg DOC/l]	28,092	26,672	8,722	5,752	0,450	0,118

Na závěr tohoto pokusu byla stanovena sušina buněk pro každou sérii zvlášť, výsledky jsou vidět v následující tabulce:

Tabulka 5 – Výsledky stanovení sušiny buněk pro jednotlivé série (A, B a C)

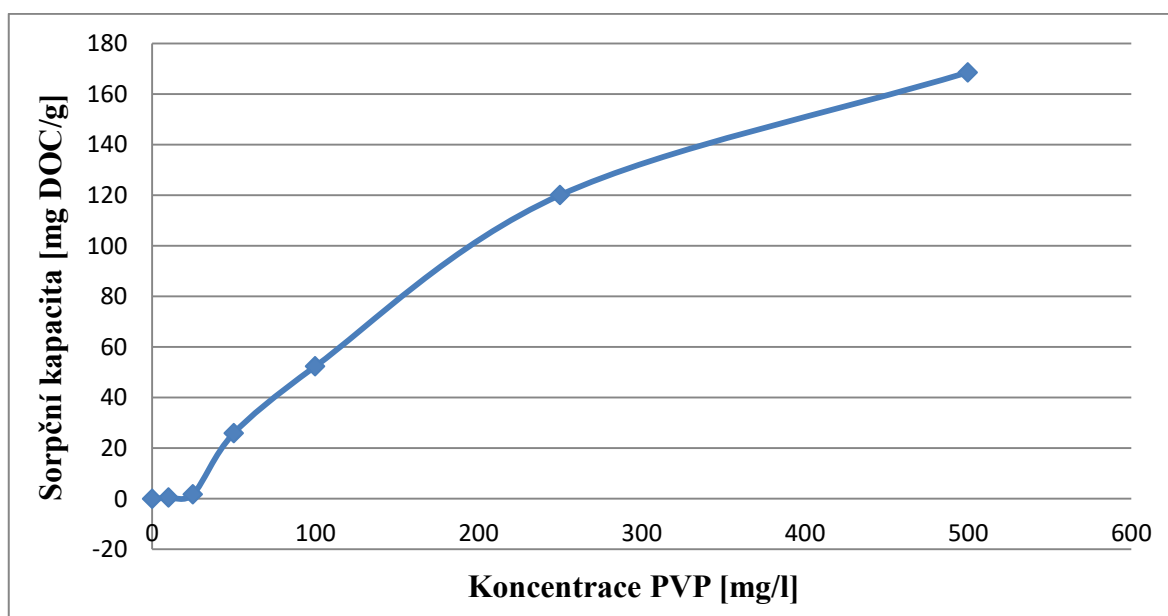
	A		B		C	
	Buňky + PFR	PFR	Buňky + PFR	PFR	Buňky + PFR	PFR
	0,0289	0,0276	0,0272	0,0273	0,0272	0,0257
	0,0260	0,0280	0,0275	0,0245	0,0269	0,0258
	0,0300	0,0263	0,0288	0,0277	0,0276	0,0256
Průměr	0,0283	0,0273	0,0272	0,0265	0,0272	0,0257
Hmotnost sušiny buněk [g /3 ml]	0,0010		0,0013		0,0015	

Sušina buněk v g byla u každého vzorku (o objemu 3 ml) přepočítána na sušinu buněk v mg/l, což je množství buněk v mg v 1 litru suspenze. Což znamená, že u série A bylo 333,3 mg/l, v sérii B 444,4 mg/l a v sérii C tedy 511,2 mg/l sušiny buněk. Z těchto výsledků byla poté zjištěna sušina buněk kultury MS2 při adsorpci. V sérii A bylo tedy 166,7 mg/l, v sérii B poté 222,2 mg/l a v sérii C 255,6 mg/l sušiny buněk.

Z výše uvedených výsledků sušiny buněk při adsorpci a adsorbovaného množství PVP byla vypočítána sorpční kapacita buněk pro jednotlivé koncentrace PVP. Ze zvolených koncentrací PVP a sorpční kapacity byla poté sestrojena adsorpční izoterma.

Tabulka 6 – Vypočtená sorpční kapacita buněk kultury MS2 pěstované na NMP při jednotlivých koncentracích PVP

Koncentrace PVP [mg/l]	Sorpční kapacita [mg DOC/g]
500	168,552
250	120,022
100	52,332
50	25,882
25	1,759
10	0,462



Graf 1 – Adsorpční izoterma adsorpce PVP na buňky kultury MS2

Po sestrojení adsorpční izotermy tak bylo prokázáno, že dochází k sorpci PVP na povrch buněk kultury MS2, kultivovaných na NMP. Nejvyšší sorpční kapacita buněk byla nalezena při nejvyšší koncentraci PVP, naopak, velmi nízké hodnoty byly zaznamenány u dvou nejnižších koncentrací PVP. Sestrojená křivka má podobný charakter jako obvyklé adsorpční izotermy.

6.2 Pokus adsorpce PVP na buňky kultury MS2 rostoucí na tryptonu

V tomto případě byly použity stejné koncentrace PVP jako u předchozího pokusu adsorpce PVP na buňky kultury MS2 (viz výše) s tím rozdílem, že kultura MS2 nebyla kultivována na NMP, ale jako substrát byl použit trypton. Byla tedy provedena kultivace kultury MS2 na tryptonu, která probíhala pouze 24 hodin, vzhledem k rychlému růstu kultury na tomto substrátu. Následně pokus probíhal stejně jako v předchozím případě. Výsledky měření koncentrací rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po provedení adsorpce PVP na buňky jsou uvedeny níže:

Tabulka 7 – Výsledky stanovení DOC supernatantů, po adsorpci PVP a odstranění buněk, pro kulturu MS2 kultivovanou na tryptonu, včetně kontrol

	DOC [mg/l]	Průměr [mg/l]	Po započtení ředění [mg/l]	Koncentrace PVP při adsorpci [mg/l]
1	32,880	32,805	196,830	500
2	32,730			
K1	31,560	26,455	158,730	500
K2	21,350			
3	56,730	57,810	57,810	100
4	58,890			
K3	58,020	56,770	56,770	100
K4	55,520			
5	4,957	5,364	5,364	0
6	5,770			
7	38,780	37,965	151,860	250
8	37,150			

	DOC [mg/l]	Průměr [mg/l]	Po započtení ředění [mg/l]	Koncentrace PVP při adsorpci [mg/l]
K7	38,180	38,370	153,480	250
K8	38,560			
9	31,140	31,430	31,430	50
10	31,720			
K9	32,480	32,295	32,295	50
K10	32,110			
11	4,801	4,530	4,530	0
12	4,259			
13	8,940	10,440	10,440	25
14	11,940			
K13	10,410	9,480	9,480	25
K14	8,550			
15	4,040	4,450	4,450	10
16	4,860			
K15	3,430	3,680	3,680	10
K16	3,930			
17	1,080	1,010	1,010	0
18	0,940			

1,2 - buňky MS2 kultivované na tryptonu + PFR + PVP o koncentraci 500 mg/l; K1,K2 - PFR+PVP (kontroly ke koncentraci PVP 500 mg/l s buňkami); 3,4 - buňky MS2 kultivované na tryptonu + PFR + PVP o koncentraci 100 mg/l; K3,K4 - PFR+PVP (kontroly ke koncentraci PVP 100 mg/l s buňkami); 7,8 buňky MS2 kultivované na tryptonu + PFR + PVP o koncentraci 250 mg/l; K7,K8 - PFR+PVP (kontroly ke koncentraci PVP 250 mg/l s buňkami); 9,10 - buňky MS2 kultivované na tryptonu + PFR + PVP o koncentraci 50 mg/l; K9,K10 - PFR+PVP (kontroly ke koncentraci PVP 50 mg/l s buňkami); 13,14 - buňky MS2 kultivované na tryptonu + PFR + PVP o koncentraci 25 mg/l; K13,K14 - PFR+PVP (kontroly ke koncentraci PVP 25 mg/l s buňkami); 15,16 - buňky MS2 kultivované na tryptonu + PFR + PVP o koncentraci 10 mg/l; K15,K16 - PFR+PVP (kontroly ke koncentraci PVP 10 mg/l s buňkami); 5,6,11,12,17,18 – buňky s PFR

Tabulka 8 – Vypočtená míra adsorpce při zvolených koncentracích PVP pro kulturu MS2 rostoucí na tryptonu

Koncentrace [mg/l]	500	250	100	50	25	10
DOC (PVP bez buněk) [mg/l]	158,730	153,480	56,770	32,295	9,480	3,680
DOC (PVP po sorpci) [mg/l]	195,815	147,330	52,447	26,900	9,430	3,440
DOC (buněk v PFR) [mg/l]	1,015	4,530	5,364	4,530	1,010	1,010
Adsorpce PVP [mg DOC/l]	-37,085	6,150	4,324	5,395	0,050	0,240

Na závěr tohoto pokusu byla stanovena sušina buněk, která je vyobrazena v následující tabulce.

Tabulka 9 – Výsledky stanovení sušiny buněk kultury MS2 rostoucí na tryptonu

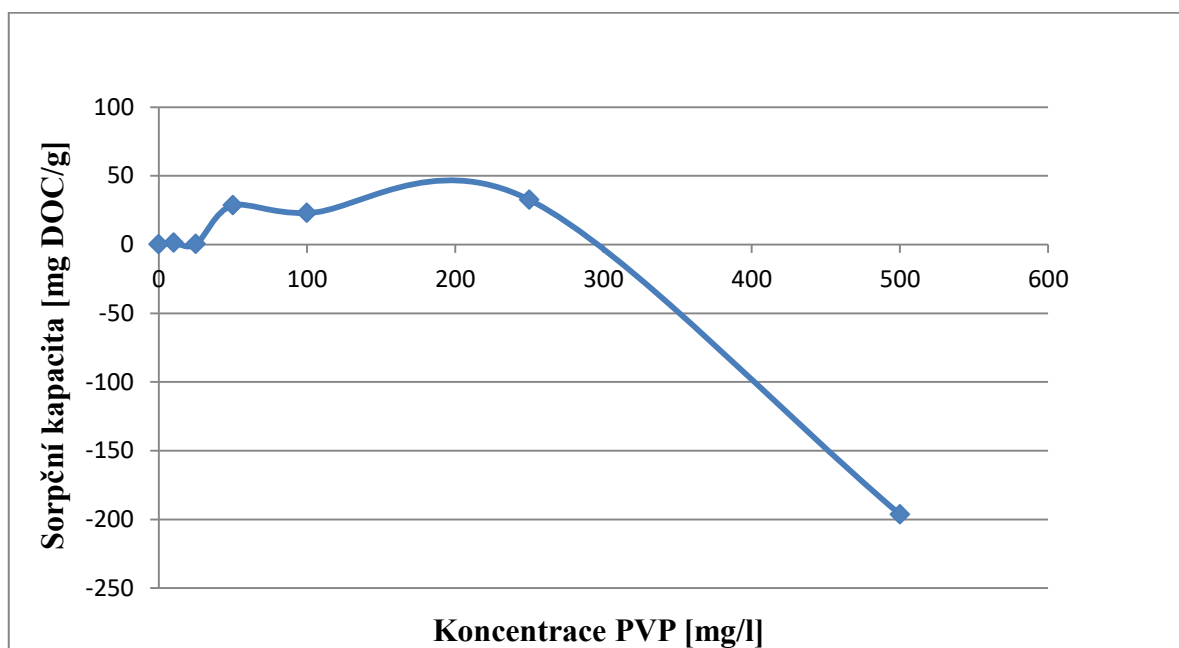
Sušina [g]	Buňky + PFR	PFR
	0,0287	0,0285
	0,0294	0,0277
	0,0289	0,0274
Průměr	0,0290	0,0279
Hmotnost sušiny buněk [g /3 ml]	0,0011	

Sušina buněk v g byla u vzorku (o objemu 3 ml) přepočítána na sušinu buněk v mg/l, což odpovídá 377,8 mg/l sušiny buněk. Poté byla vypočtena sušina buněk kultury MS2 rostoucí na tryptonu při adsorpci, jedná se o hodnotu 188,9 mg/l.

Následně byla z výše uvedených výsledků vyjádřena sorpční kapacita pro jednotlivé koncentrace PVP, tak jak již tomu bylo v předchozím pokusu, a na závěr byla sestrojena adsorpční izoterma.

Tabulka 10 – Vypočtená sorpční kapacita buněk kultury MS2 pěstované na tryptonu při jednotlivých koncentracích PVP

Koncentrace PVP [mg/l]	Sorpční kapacita [mg DOC/g]
500	-196,332
250	32,559
100	22,889
50	28,562
25	0,265
10	1,271



Graf 2 – Adsorpční izoterma adsorpce PVP na buňky kultury MS2 kultivované na tryptonu

Z grafu č. 2 je patrné, že tvar získané křivky je značně odlišný od předchozí izotermy, kdy byla kultura MS2 kultivovaná na NMP. Pouze v případě nejnižších koncentrací PVP byly získány obdobné výsledky, tzn., že zjištěná sorpční kapacita buněk byla velmi nízká. U vyšších koncentrací PVP 50 - 250 mg/l byly výsledky sorpčních kapacit mezi sebou víceméně vyrovnané, avšak značně odlišné od výsledků uvedených v grafu 1 u kultury MS2 pěstované na NMP. Koncentrace PVP 500 mg/l dokonce ukázala záporný výsledek naměřené hodnoty sorpční kapacity. Tento výsledek může být pravděpodobně způsoben uvolněním určitých organických látek z buněk a tato hodnota poté zkreslila výpočet sorpční kapacity.

Podobného efektu bylo dosaženo v takřka současně probíhajícím pokusu adsorpce na buňky *E. coli* CCM 3988, který je popsán níže. Díky tomuto výsledku bylo tedy rozhodnuto o provedení měření vlastností povrchu buněk obou kultur prostřednictvím měření povrchové energie. V každém případě výsledky pokusů adsorpce s kulturou MS2 ukázaly, že interakce mezi PVP a buňkami této kultury výrazně závisí na použitém kultivačním substrátu.

6.3 Pokus adsorpce PVP na buňky kultury *E. coli* CCM 3988

Celkový postup pokusu adsorpce PVP na buňky kultury *E. coli* byl stejný jako pokus adsorpce na buňky kultury MS2 rostoucí na tryptonu, s jediným rozdílem, a to tím, že do každé kultivační lahve bylo naváženo 440 mg tryptonu. Koncentrace tryptonu v lahvích byla tedy 5 g/l. Výsledky provedených sorpcí jsou zpracovány do tabulky 11:

Tabulka 11 – Výsledky stanovení koncentrací DOC v supernatantech po adsorpci PVP a odstranění buněk, pro kulturu E. coli CCM 3988, včetně kontrol

	DOC [mg/l]	Průměr [mg/l]	Po započtení ředění [mg/l]	Koncentrace PVP při adsorpci [mg/l]
1	43,780	43,820	262,920	500
2	43,860			
K1	35,760	36,725	36,725	500
K2	37,690			
3	60,010	64,630	64,630	100
4	69,250			
K3	10,640	11,205	11,205	100
K4	11,770			
5	12,580	11,815	11,815	0
6	11,050			
7	38,790	41,120	246,720	250
8	43,450			
K7	31,500	31,855	127,420	250
K8	32,210			

	DOC [mg/l]	Průměr [mg/l]	Po započtení ředění [mg/l]	Koncentrace PVP při adsorpci [mg/l]
9	53,490	54,630	54,630	50
10	55,770			
K9	27,720	27,990	27,990	50
K10	28,260			
11	32,610	33,990	135,960	0
12	35,370			
13	20,320	21,035	21,035	25
14	21,750			
K13	15,400	15,84	15,840	25
K14	16,28			
15	12,030	11,525	11,525	10
16	11,020			
K15	5,666	5,466	5,466	10
K16	5,266			
17	14,280	12,56	12,560	0
18	10,840			

1,2 - buňky *E. coli* + PFR + PVP o koncentraci 500 mg/l; K1,K2 - PFR+PVP (kontroly ke koncentraci PVP 500 mg/l s buňkami); 3,4 - buňky *E. coli* + PFR + PVP o koncentraci 100 mg/l; K3,K4 - PFR+PVP (kontroly ke koncentraci PVP 100 mg/l s buňkami); 7,8 - buňky *E. coli* + PFR + PVP o koncentraci 250 mg/l; K7,K8 - PFR+PVP (kontroly ke koncentraci PVP 250 mg/l s buňkami); 9,10 - buňky *E. coli* + PFR + PVP o koncentraci 50 mg/l; K9,K10 - PFR+PVP (kontroly ke koncentraci PVP 50 mg/l s buňkami); 13,14 - buňky *E. coli* + PFR + PVP o koncentraci 25 mg/l; K13,K14 - PFR+PVP (kontroly ke koncentraci PVP 25 mg/l s buňkami); 15,16 - buňky *E. coli* + PFR + PVP o koncentraci 10 mg/l; K15,K16 - PFR+PVP (kontroly ke koncentraci PVP 10 mg/l s buňkami); 5,6,11,12,17,18 – buňky s PFR

Tabulka 12 – Vypočtená míra adsorpce při zvolených koncentracích PVP pro kulturu *E. coli*

Koncentrace PVP [mg/l]	500	250	100	50	25	10
DOC (PVP bez buněk) [mg/l]	246,720	127,420	54,630	27,990	15,840	5,466
DOC (PVP po sorpci) [mg/l]	251,105	124,755	52,815	25,520	8,475	-1,035
DOC (buněk v PFR) [mg/l]	11,815	11,205	11,815	11,205	12,560	12,560
Adsorpce PVP [mg DOC/l]	-4,385	2,665	1,815	2,470	7,365	6,501

Na závěr tohoto pokusu byla stanovena sušina buněk:

Tabulka 13 – Výsledky stanovení sušiny buněk pro kultury *E. coli* CCM 3988

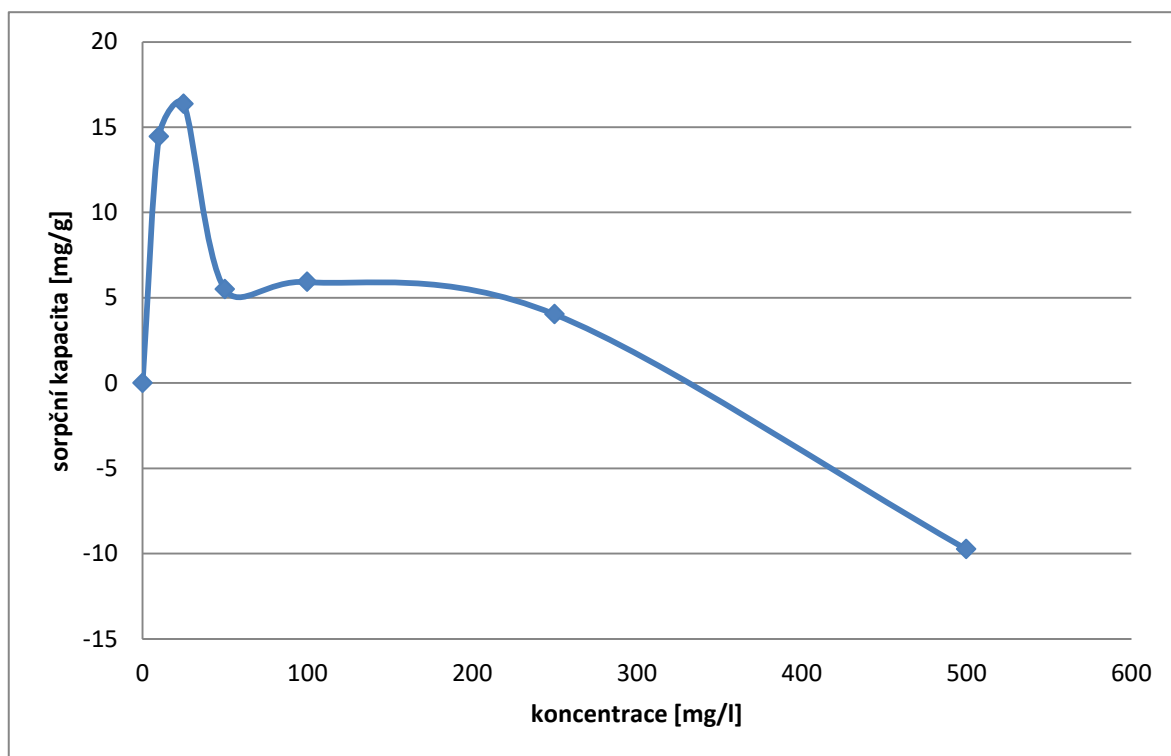
Sušina [g]	Buňky + PFR	PFR
	0,0312	0,0267
	0,0283	0,0259
	0,0277	0,0265
Průměr	0,029	0,026
Hmotnost sušiny buněk [g /3 ml]	0,0027	

Sušina buněk v g byla přepočítána na sušinu buněk v mg/l, což znamená, že v jednom litru suspenze bylo 900 mg/l buněk. Poté byla zjištěna sušina buněk kultury *E. coli* při adsorpci a to 450 mg/l.

Z výše uvedených výsledků byly na závěr vypočítány sorpční kapacity buněk a sestrojena adsorpční izoterma.

Tabulka 14 – Vypočtená sorpční kapacita buněk kultury *E. coli* pěstované na tryptonu při jednotlivých koncentracích PVP

Koncentrace PVP [mg/l]	Sorpční kapacita [mg DOC/g]
500	-9,744
250	4,033
100	5,922
50	5,489
25	16,367
10	14,447



Graf 3 – Adsorpční izoterma adsorpce PVP na buňky kultury *E. coli* CCM 3988

Jak je vidno z grafu 3, při kontaktu buněk *E. coli* s PVP dochází při nízkých koncentracích PVP k adsorpci a první tři body křivky (včetně 0) odpovídají tvaru u obvyklých adsorpčních izoterem. U vyšších koncentrací však polyvinylpyrrolidon vyvolává u buněk produkci či uvolnění určitých organických látek, které zapříčiňují zvýšení koncentrace měřeného organického uhlíku v supernatantech. Tím je i zkresleno vyhodnocení adsorpční kapacity buněk při těchto koncentracích, při nejvyšší koncentraci PVP se hodnota sorpční kapacity buněk dostává dokonce do záporných hodnot. Z tohoto i z předchozího pokusu je tedy zřejmé, že pro přesné vyhodnocení míry adsorpce PVP na buňky nepostačuje stanovení koncentrací DOC jako ukazatele koncentrace PVP v supernatantech po provedené adsorpci, ale bude nutno k tomuto účelu do budoucna použít selektivní analytické stanovení PVP a jeho koncentrací. (např. pyrolyzní plynovou chromatografií).

Protože výše vyobrazená křivka, podobně jako křivka získaná v pokusu s kulturou MS2 pěstovanou na tryptonu, nemá průběh známých adsorpčních izoterem (Langmuirova adsorpční izoterma, Freundlichova adsorpční izoterma), je možné do jisté míry tedy předpokládat, že při kontaktu PVP s buňkami *E. coli* pozorujeme zejména při vyšších koncentracích PVP soubor více interakcí (mezi buňkami a PVP), než jen pouhou adsorpci; jejich povahu však nelze z těchto měření jednoznačně usoudit. Za důležité lze však považovat to, že při nejvyšší použité koncentraci PVP byl pozorován podobný efekt jako u kultury MS2, rostoucí na tryptonu. To ukazuje, že nemusí jít o výsledek náhodný.

Vzhledem k tomu, že při nejvyšší koncentraci PVP došlo k uvolňování organických látek z buněk, bylo rozhodnuto ověřit možný toxický účinek PVP v této koncentraci na buňky uvedené kultury respiračními testy.

Navíc, pro potenciální vysvětlení jevů pozorovaných při zkouškách adsorpce u vyšších koncentrací PVP, bylo provedeno několik pokusů měření povrchové energie buněk, v závislosti na přítomnosti PVP či NMP při jejich kultivaci. Cílem bylo ověření, zda je tato metoda schopna detekovat případné změny na povrchu buněk vyvolané PVP či NMP.

6.4 Výsledky měření povrchové energie

6.4.1 Orientační pokus měření povrchové energie

Nejprve byl proveden orientační experiment s kulturou MS2 i *E. coli* CCM 3988, kdy kultura MS2 byla kultivována na NMP nebo na tryptonu po dobu 48 hodin a kultura *E. coli* byla kultivována na tryptonu s nebo bez PVP po dobu 24 hodin.

Poté byly buňky promyty, zachyceny na filtry Pragopor a sušeny na nich v sušárně cca 1 hodinu. Na závěr byla na vrstvě buněk na vysušených filtrech změřena povrchová energie pomocí See systému.

Tabulka 15 – Výsledky měření povrchové energie I.

Vzorek	Kontaktní úhel [°]	Kontaktní úhel [°]	Kontaktní úhel [°]	Povrchová energie [mJ/m ²]
	Voda	Formamid	Dijodomethan	
MS2 + NMP	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,00	53,58 ± 1,53	58,97
MS2 + trypton	0,12 ± 0,00	18,40 ± 2,55	0,11 ± 0,00	51,41
<i>E. coli</i> + trypton	0,17 ± 0,00	25,45 ± 1,77	0,11 ± 0,00	54,65
<i>E. coli</i> + trypton + PVP	0,12 ± 0,00	27,90 ± 3,24	0,02 ± 0,00	56,61

Z výsledků je vidět určitý rozdíl ve změřené povrchové energii, jak mezi oběma kulturami, tak mezi stejnou kulturou kultivovanou buď s PVP či s NMP. Lze tedy předpokládat, že by přídavek PVP nebo NMP mohl ovlivňovat hydrofilitu povrchu rostoucích buněk v tom smyslu, že ji zvyšuje. Tento pokus byl však jen orientační (bez paralelních měření), a proto byly provedeny rozsáhlejší pokusy, nejprve s kulturou MS2 a poté s kulturou *E. coli*, vždy ve více opakováních.

6.4.2 Měření povrchové energie buněk kultury MS2, kultivované na NMP nebo na tryptonu

Buňky byly napěstovány buď na NMP nebo tryptonu dle postupu uvedeného v metodické části, buňky byly promyty, zachyceny na filtry, usušeny a měřeny. Obě varianty byly provedeny ve čtyřech paralelních opakováních.

Tabulka 16 – Výsledky měření povrchové energie pro kulturu MS2

Vzorek	Kontaktní úhel	Kontaktní úhel	Kontaktní úhel	Povrchová energie [mJ/m ²]	Průměr povrchové energie [mJ/m ²]
	[°]	[°]	[°]		
	Voda	Formamid	Dijodomethan		
MS2 + NMP	0,03 ± 0,16	24,87 ± 0,95	35,35 ± 1,80	49,10	49,10
MS2 + NMP	BVK	BVK	BVK	NV	NV
MS2 + NMP	BVK	BVK	BVK	NV	NV
MS2 + NMP	BVK	BVK	BVK	NV	NV
MS2 + trypton	0,09 ± 0,23	25,00 ± 1,04	50,89 ± 0,78	51,46	48,69
MS2 + trypton	0,13 ± 1,00	29,31 ± 2,35	36,23 ± 2,14	45,91	
MS2 + trypton	BVK	BVK	BVK	NV	NV
MS2 + trypton	BVK	BVK	BVK	NV	NV

BVK – bez vzniku kapky; NV - nevyhodnotitelné

Bylo změřeno celkem osm vzorků, což odpovídá čtyřem vzorkům pro jednu kultivaci. Avšak, jen 3 vzorky uvedené v tabulce byly měřitelné. Ostatní vzorky měřitelné nebyly, což mohlo být způsobeno např. nerovnoměrným povrchem vrstvy buněk, která při filtraci vzniká. Z výsledků bylo patrné, že nerovnoměrný povrch buněk velmi ovlivňuje výsledky měření povrchové energie.

Výše uvedené usuzujeme z toho, že při měření vzorků bylo nakapáno větší množství kapek testovacích kapalin, avšak jen některé kapky zůstaly na filtru; jiné se např. vpily tak, že vytvořily díru ve filtračním papíře nebo zanechaly pouze skvrnu od použité kapaliny – v takových případech nebylo měření vůbec možné. Tento fakt ukazuje nevhodnost této metody pro vyhodnocení povrchové energie buněk kultury MS2.

Z tabulky 16 i z výsledků orientačního pokusu tedy vyplývá, že měření povrchové energie buněk není příliš přesné, vzhledem k určitým problémům při tvorbě kapek testovacích kapalin před vlastním měření. Z tohoto důvodu nebylo posouzení rozdílu mezi hydrofilitou buněk, kultivovaných na NMP nebo na tryptonu, možné. Přesto bylo rozhodnuto provést toto měření s buňkami kultury *E. coli*.

6.4.3 Měření povrchové energie buněk *E. coli*, kultivované na tryptonu nebo na tryptonu s PVP

Při paralelním pokusu s kulturou *E. coli* bylo rovněž změřeno celkem 8 vzorků, z toho 4 vzorky s přítomností PVP během kultivace. V následující tabulce jsou však pouze výsledky pro 6 vzorků, protože dva vzorky s PVP opět nebylo možné vyhodnotit. Vyhodnocení nebylo opět možné vzhledem k nevytvoření kapek žádné z testovacích kapalin, pravděpodobně díky nerovnoměrnému povrchu buněk, což také mohlo zkreslit níže uvedené výsledky povrchové energie.

Jako i v případě kultury MS2 byl potvrzen problém při měření povrchové energie v tom smyslu, že při použití více kapek od stejné testovací kapaliny se objevovaly rozdíly, a to jak vsáknutí do filtračního papíru s následným vytvořením díry, tak tvorba skvrny či ulpění kapky na povrchu filtru s buňkami této kultury.

Tabulka 17 – Výsledky měření povrchové energie pro kulturu *E. coli* CCM 3988

Vzorek	Kontaktní úhel [°]	Kontaktní úhel [°]	Kontaktní úhel [°]	Povrchová energie [mJ/m ²]	Průměr povrchové energie [mJ/m ²]
	Voda	Formamid	Dijodomethan		
<i>E. coli</i> + MM	0,18 ± 0,59	15,15 ± 1,97	50,25 ± 0,80	55,97	53,31
<i>E. coli</i> + MM	0,04 ± 0,60	27,46 ± 0,58	0,11 ± 0,43	56,25	
<i>E. coli</i> + MM	0,03 ± 0,44	0,09 ± 0,47	35,89 ± 3,46	56,97	
<i>E. coli</i> + MM	0,07 ± 0,77	32,63 ± 2,27	42,60 ± 2,19	44,06	
<i>E. coli</i> + PVP	0,04 ± 0,00	28,01 ± 0,75	47,90 ± 0,46	48,85	45,89
<i>E. coli</i> + PVP	0,05 ± 0,68	36,76 ± 0,98	54,28 ± 1,42	42,93	
<i>E. coli</i> + PVP	BVK	BVK	BVK	NV	NV
<i>E. coli</i> + PVP	BVK	BVK	BVK	NV	NV

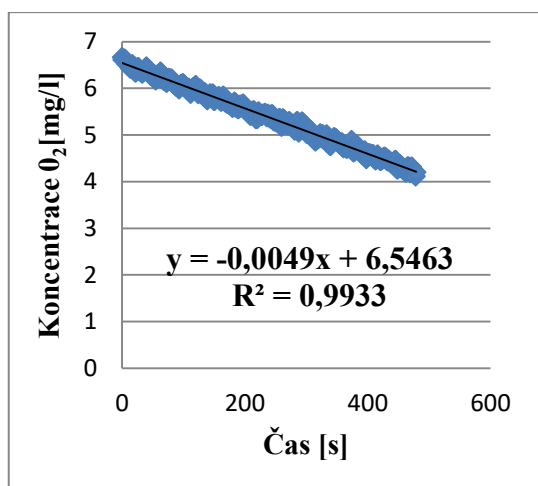
BVK – bez vzniku kapky; NV - nevyhodnotitelné

Výsledky uvedené v tabulce 17 sice naznačují mírný rozdíl mezi průměry hodnot povrchové energie buněk kultivovaných s PVP a bez něj, avšak při zohlednění prvního orientačního pokusu a při zohlednění rozdílnosti výsledků paralelních měření není možné jednoznačně posoudit vliv PVP na charakter povrchu buněk zkoumané kultury. Do jisté míry se tak podobně jako u kultury MS2 ukázal fakt, že metoda měření povrchové energie bakteriálních buněk bude muset být určitým způsobem modifikována, ve smyslu dosažení rovnoměrné vrstvy buněk před měřením. Z tohoto důvodu a vzhledem k omezeným časovým možnostem byly tyto pokusy ukončeny.

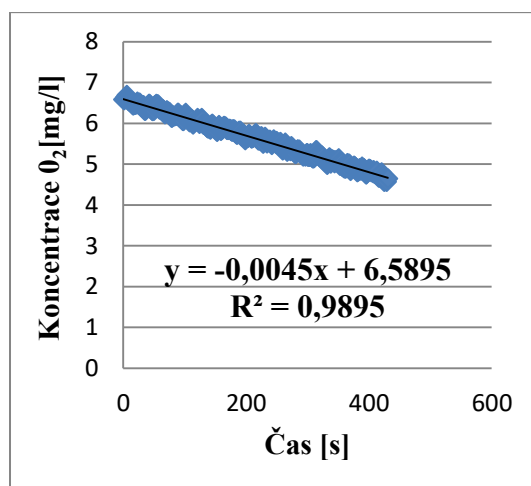
6.5 Respirace kultury *E. coli* CCM 3988 s PVP a bez PVP

Nejdříve byl proveden pokus respirace, kdy byla kultura *E. coli* CCM 3988 kultivována v přítomnosti PVP či bez PVP 24 hodin. Po kultivaci a následném záchytu a promytí buněk byla změřena respirace (viz metodická část). Tento pokus byl označen jako Pokus 1. Poté byl proveden obdobný experiment, s tím rozdílem, že buňky této kultury nebyly kultivovány s polyvinylpyrrolidonem, ale ten byl přidáván až při přípravě buněk před vlastním měřením, při provzdušňování (Pokus 2). Pro oba pokusy byla také stanovena sušina buněk. Z výsledků obou pokusů byly vytvořeny grafy, z nichž byly spočítány specifické respirační rychlosti.

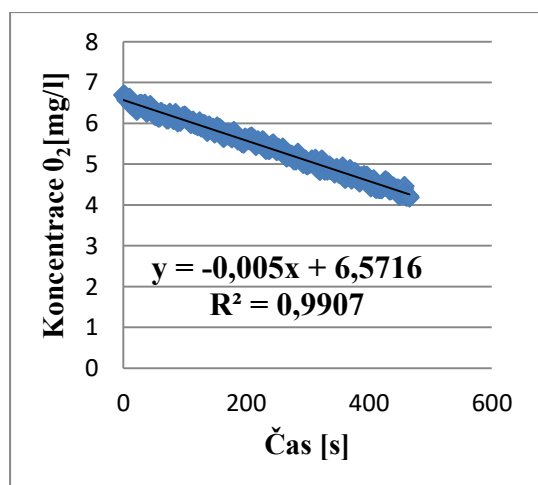
Pokus 1:



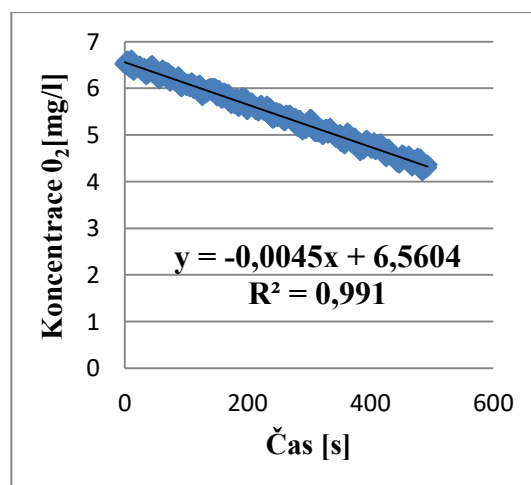
Graf 4 – Průběh respirace *E. coli* kultivované s PVP (1)



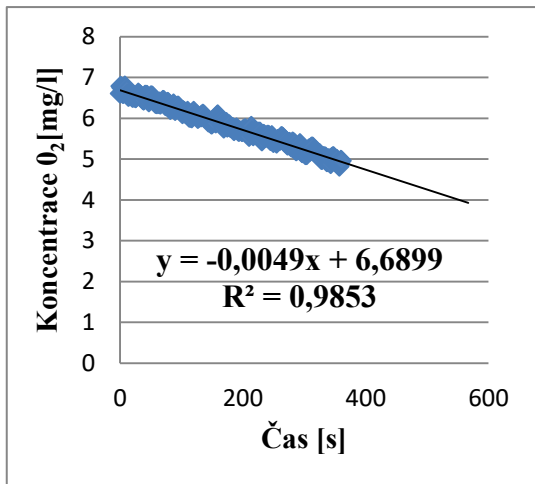
Graf 6 – Průběh respirace *E. coli* kultivované bez PVP (1)



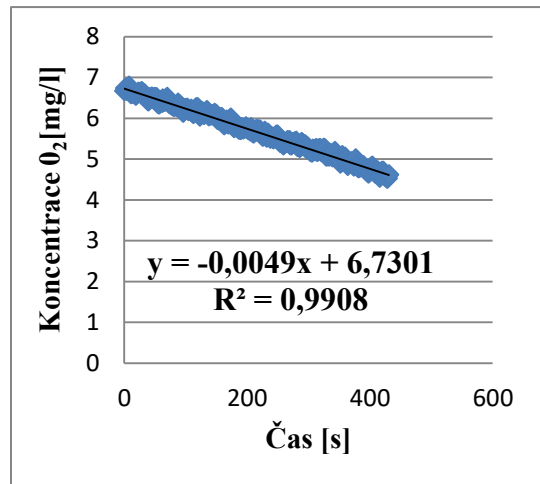
Graf 5 – Průběh respirace *E. coli* kultivované s PVP (2)



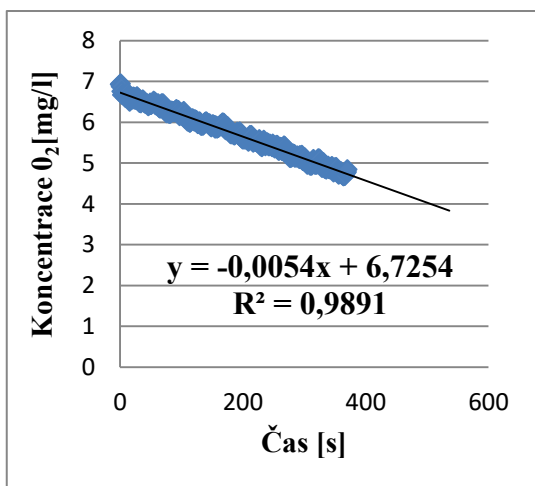
Graf 7 – Průběh respirace *E. coli* kultivované bez PVP (2)

Pokus 2:

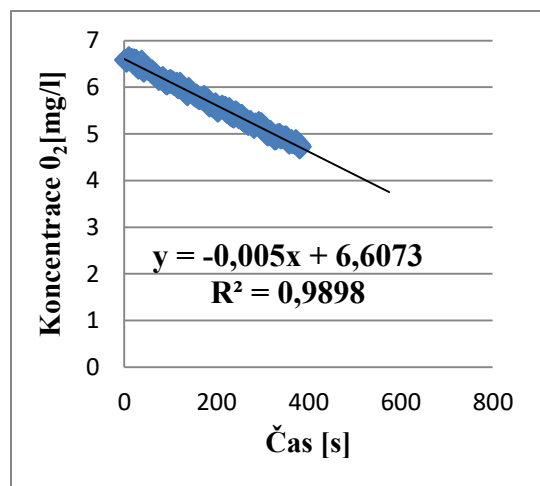
Graf 8 – Průběh respirace *E. coli* s PVP
(1)



Graf 10 – Průběh respirace *E. coli* bez PVP (1)



Graf 9 – Průběh respirace *E. coli* s PVP
(2)



Graf 11 – Průběh respirace *E. coli* bez PVP (2)

Z výše uvedených grafů byla použita směrnice přímky x (resp. její absolutní hodnota), která znázorňuje pokles koncentrace kyslíku v čase. Tato hodnota spolu se stanovenou sušinou pro daný pokus byla použita pro výpočet specifické respirační rychlosti. Pro tento výpočet však musela být hodnota poklesu koncentrace kyslíku v mg/s přepočtena na hodnotu poklesu koncentrace kyslíku v mg/hod. Tato hodnota byla poté vztažena na 1 g sušiny buněk, čímž byla získána specifická respirační rychlost pro každé měření zvlášť.

Použité sušiny a výsledné specifické respirační rychlosti jsou zobrazeny v tabulkách níže.

Tabulka 18 – Stanovení sušiny buněk kultury *E. coli* kultivované s a bez PVP (Pokus 1)

	Sušina [g]		
	Buňky + PVP + PFR	Buňky + PFR	PFR
	0,0296	0,0260	0,0265
	0,0297	0,0286	0,0269
	0,0294	0,0277	0,0234
Průměr	0,0296	0,0274	0,0256
Sušina buněk [g/l]	0,1222		
Sušina buněk s PVP [g/l]	0,1422		

Tabulka 19 – Stanovení sušiny buněk kultury *E. coli* pro měření respirace (Pokus 2)

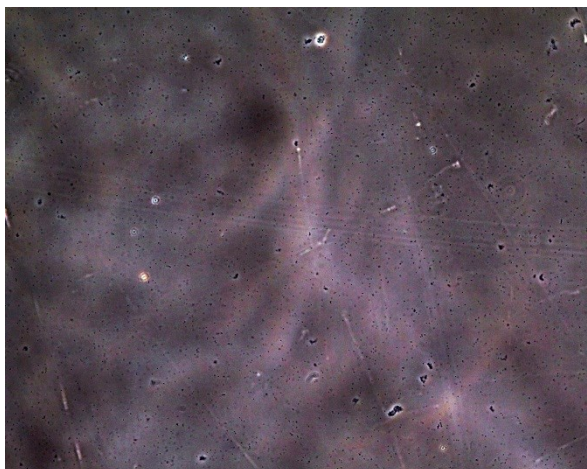
	Sušina [g]	
	Buňky + PFR	PFR
	0,0268	0,0278
	0,029	0,0276
	0,0283	0,0254
Průměr	0,0280	0,0269
Sušina buněk [g/l]	0,0733	

Tabulka 20 – Vypočtené specifické respirační rychlosti pro jednotlivá měření

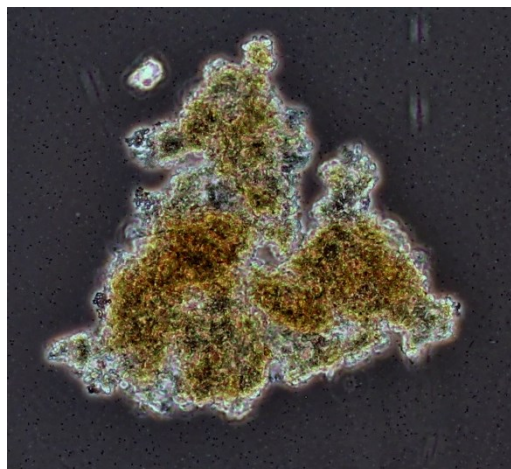
		Specifická respirační rychlost [mg O ₂ · hod ⁻¹ · g ⁻¹]	Průměr
<i>E. coli</i> kultivovaná s PVP (Pokus 1)	A	124,031	125,3
	B	126,562	
<i>E. coli</i> kultivovaná bez PVP (Pokus 1)	A	132,545	132,5
	B	132,545	
<i>E. coli</i> s PVP (Pokus 2)	A	240,545	252,8
	B	265,091	
<i>E. coli</i> bez PVP (Pokus 2)	A	240,545	243,0
	B	240,455	

V rámci pokusu 1 bylo zjištěno, že *E. coli* kultivovaná s PVP vykazuje mírně odlišné vlastnosti oproti *E. coli* kultivované bez PVP. Tyto vlastnosti byly pozorovány již při zachytu a promývání buněk, kdy *E. coli* kultivovaná s PVP při rozmíchávání netvořila shluky buněk a zcentrifugované buňky lépe ulpívaly a držely na kyvetách. Ve vlastních testech respirace vykazala kultura, kultivovaná za přítomnosti PVP, nepatrně nižší specifickou respirační rychlost.

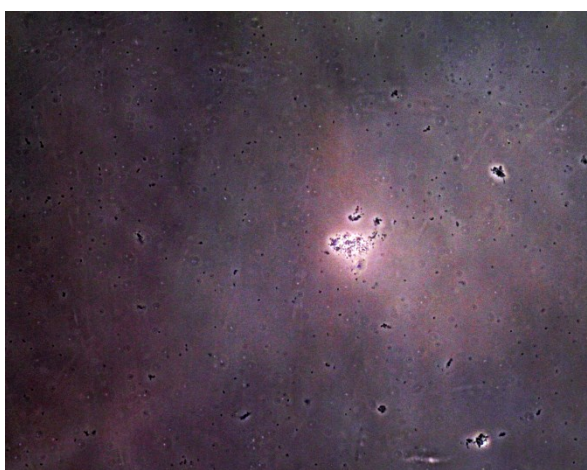
Paradoxně, v průběhu Pokusu 2, byla zjištěna vyšší specifická respirační rychlost buněk *E. coli* v těch měřeních, kdy byl PVP přítomen. Navíc, při přípravě buněk *E. coli* CCM 3988 k měření, při provzdušňování buněk s minerálním médiem a roztokem PVP, se projevila silná flokulace buněk a vznik vloček vlivem PVP. Tento jev byl poté pozorován pomocí mikroskopu a zaznamenán na fotografii. Byly také pořízeny fotografie již zmíněných vloček ve zkumavkách a také fotografie kontrolních provzdušňovaných buněk bez PVP, pro srovnání a zvýraznění pozorovaného jevu. Pořízené fotografie jsou zobrazeny níže.



Obrázek 14 – Volná suspenze buněk *E. coli* v MM bez PVP (objektiv 20x)



Obrázek 16 – Vločky z buněk *E. coli* v MM s PVP (objektiv 20x)



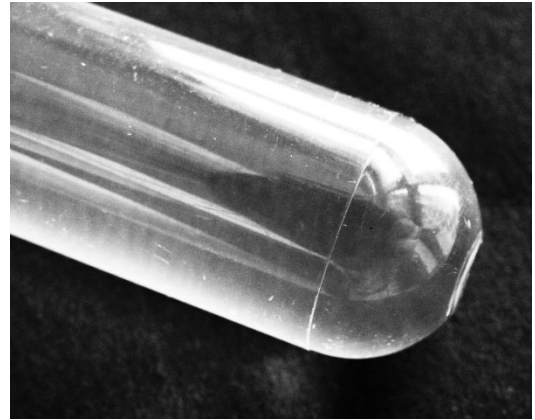
Obrázek 15 – Volná suspenze buněk *E. coli* v MM bez PVP (objektiv 40x)



Obrázek 17 – Vločky z buněk *E. coli* v MM s PVP (objektiv 40x)



Obrázek 18 – Vločky *E. coli* v MM s PVP
(po provzdušnění)



Obrázek 19 – *E. coli* v MM bez PVP
(po provzdušnění)



Obrázek 20 – Srovnání zkumavek po provzdušnění
(vpravo *E. coli* v MM s PVP, vlevo bez PVP)

Jak je vidno z fotografií, velikost vloček je závislá na podmínkách, tzn., že při intenzivním provzdušňování byly vločky rozptýleny v médiu. V klidovém stavu nastalo shlukování vloček, kdy jejich velikost byla řádově do rozměru 100 μm , a po rozmíchání nastal rozpad na menší vločky. Buňky bez přítomného PVP zůstávaly ve formě jemné suspenze.

ZÁVĚR

Diplomová práce byla věnována studiu interakcí polyvinylpyrrolidonu (PVP) s bakteriálními buňkami. Nejvíce byla tato práce zaměřena na adsorpci PVP na buňky bakteriálních kultur *Pseudomonas putida* MS2 a *Escherichia coli* CCM 3988. Z těchto pokusů byl zjištěn fakt, že v případě kultury MS2 existuje výrazný rozdíl mezi výslednými adsorpčními izotermami, a to v závislosti na kultivačním substrátu. Pokud byl jako růstový substrát použit N-methyl pyrrolidon (NMP), sestavená křivka vykazovala podobnost s obvyklými adsorpčními izotermami. Při použití tryptonu jako růstového substrátu se adsorpční izoterma velmi lišila, při testech adsorpce nejvyšší koncentrace PVP 500 mg/l byla dokonce zjištěna záporná hodnota adsorpční kapacity buněk. Toto však bylo dáno jednak použitím měření koncentrací rozpuštěného organického uhlíku (DOC) jako ukazatele koncentrací PVP, jednak výsledky ukázaly, že působením PVP pravděpodobně dochází k uvolnění určitých organických látek z buněk. V případě adsorpční izoterm, získané s buňkami *E. coli*, došlo k obdobnému efektu jako u kultury MS2 rostoucí na tryptonu. Zde byl u prvních tří bodů křivky zaznamenán průběh obvyklé adsorpční izoterm, avšak u vyšších koncentrací PVP nastalo rovněž uvolnění určitých organických látek z buněk a jako u kultury MS2 rostoucí na tryptonu, při použití nejvyšší koncentrace PVP dosáhla adsorpční kapacita buněk záporné hodnoty. Tato podobnost ukazuje, že výsledek nemusí být náhodný. Z výše uvedeného lze tak uzavřít, že jednak pro adsorpční experimenty tohoto typu bude nutné použít selektivní analytické stanovení PVP a jeho koncentrací a také, že při kontaktu PVP s buňkami *Ps. putida* MS2 i *E. coli* CCM 3988 lze zejména při vyšších koncentracích PVP oprávněně předpokládat existenci více interakcí mezi buňkami a polymerem, než jen jeho sorpci na buňky. Povahu takových interakcí však nelze z provedených měření odhadnout.

Pro potenciální vysvětlení výše uvedených jevů bylo provedeno měření povrchové energie buněk, které však díky problémovému průběhu tvorby buněčných vrstev očekávané výsledky nepřineslo. Bylo tak především poukázáno na potřebu zdokonalení této metody pro použití u bakteriálních kultur.

Vzhledem k tomu, že při adsorpčních testech bylo při nejvyšších koncentracích PVP zaznamenáno uvolnění organických látek z buněk kultury *E. coli*, byly pro ověření případné toxicity polymeru provedeny respirační testy, s koncentrací PVP 500 mg/l.

Kultura byla nejprve kultivovaná s PVP i bez něj, s následným měřením rychlosti respirace bez přítomnosti PVP; zde *E. coli* kultivovaná s PVP vykazovala nepatrně nižší respirační rychlosti. V druhém pokusu, kdy byla kultura kultivovaná bez PVP a byly porovnávány respirace v přítomnosti PVP a bez něj, byla paradoxně zjištěna mírně vyšší respirační rychlost u buněk s přítomným PVP. V tomto případě se také při provzdušňování buněk projevila vlivem přítomného PVP jejich silná flokulace se vznikem vloček.

Celkově práce ukázala, že existují komplikované interakce mezi buňkami zvolených kultur a PVP, pro jejichž objasnění by bylo nutné provést další, avšak náročnější měření. Celkově však byl potvrzen jistý biologický účinek PVP na buňky těchto kultur, který byl zjištěn v předchozí bakalářské práci.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] N. A. Rangel-Vázquez, F. R. Félix, B. - S. Gregorí - Valdés, „Chapter 4: Polyvinylpyrrolidone (PVP)“, v *Computational Chemistry Applied in the Analyses of Chitosan/Polyvinylpyrrolidone/Mimosa Tenuiflora*, 1. Vyd., New York: Science Publishing Group, s. 55–64, 2014, ISBN 978-1-940366-00-5.
- [2] H.- J. Endres, A. Siebert-Raths, „Manufacture and Chemical Structure of Biopolymers“, *Eng. Biopolym.*, s. 71–148, 2011.
- [3] B. V. Robinson, „PVP - a critical review of the kinetics and toxicology of polyvinylpyrrolidone (povidone)“, Chelsea, Lewis Publishers, 1990, ISBN 0873712889.
- [4] V. Bühler, „Polyvinylpyrrolidone Excipients for Pharmaceuticals, Povidone, Crospovidone and Copovidone“, New York: Springer, 2005, ISBN 3540234128.
- [5] Dostupné z: <http://pslc.ws/mactest/nvp.htm>
- [6] J. A. Schwartz, C. I. Contescu, K. Putyera, „Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology“, Marcell Dekker Publishing , vyd. 2, 2004.
- [7] V. Bühler, „Kollidon® Polyvinylpyrrolidone excipients for the pharmaceutical industry“, roč. 9, BASF - The Chemical Company, Ludwigshafen, Německo, 2008.
- [8] M. Yang a kol., „Effects of polyvinylpyrrolidone both as a binder and pore-former on the release of sparingly water-soluble topiramate from ethylcellulose coated pellets“, *Int. J. Pharm.*, roč. 465, č. 1–2, s. 187–196, 2014.
- [9] A. Saxena, S. Mozumdar, A. K. Johri, „Ultra-low sized cross-linked polyvinylpyrrolidone nanoparticles as non-viral vectors for in vivo gene delivery“, *Biomaterials*, roč. 27, č. 32, s. 5596–5602, 2006.
- [10] P. Jain, A. K. Banga, „Induction and inhibition of crystallization in drug-in-adhesive-type transdermal patches“, *Pharm. Res.*, roč. 30, č. 2, s. 562–571, 2013.
- [11] M. Teodorescu, M. Bercea, „Poly (vinylpyrrolidone) – A Versatile Polymer for Biomedical and Beyond Medical Applications Poly(vinylpyrrolidone)“, roč. 2559, 2015.

- [12] D. S. Jones, J. Djokic, a S. P. Gorman, „The resistance of polyvinylpyrrolidone-Iodine-poly(ϵ -caprolactone) blends to adherence of Escherichia coli“, *Biomaterials*, roč. 26, č. 14, s. 2013–2020, 2005.
- [13] H. A. Abd El-Rehim, E. S. A. Hegazy, A. A. Hamed, a A. E. Swilem, „Controlling the size and swellability of stimuli-responsive polyvinylpyrrolidone-poly(acrylic acid) nanogels synthesized by gamma radiation-induced template polymerization“, *Eur. Polym. J.*, roč. 49, č. 3, s. 601–612, 2013.
- [14] H. A. Patel, S. Shah, D. O. Shah, P. A. Joshi, „Sustained release of venlafaxine from venlafaxine-montmorillonite-polyvinylpyrrolidone composites“, *Appl. Clay Sci.*, roč. 51, č. 1–2, s. 126–130, 2011.
- [15] A. Saxena, S. Mozumdar, A. K. Johri, „Ultra-low sized cross-linked polyvinylpyrrolidone nanoparticles as non-viral vectors for in vivo gene delivery“, *Biomaterials*, roč. 27, č. 32, s. 5596–5602, 2006.
- [16] D. J. Bharali, S. K. Sahoo, S. Mozumdar, A. Maitra, „Cross-linked polyvinylpyrrolidone nanoparticles: A potential carrier for hydrophilic drugs“, *J. Colloid Interface Sci.*, roč. 258, č. 2, s. 415–423, 2003.
- [17] M. Morille, C. Passirani, A. Vonarbourg, A. Clavreul, J. P. Benoit, „Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer“, *Biomaterials*, roč. 29, č. 24–25, s. 3477–3496, 2008.
- [18] F. Meng, W. E. Hennink, Z. Zhong, „Reduction-sensitive polymers and bioconjugates for biomedical applications“, *Biomaterials*, roč. 30, č. 12, s. 2180–2198, 2009.
- [19] C. I. Covaliu a kol., „Core-shell hybrid nanomaterials based on CoFe_2O_4 particles coated with PVP or PEG biopolymers for applications in biomedicine“, *Powder Technol.*, roč. 237, s. 415–426, 2013.
- [20] K. Halake a kol., „Recent application developments of water-soluble synthetic polymers“, *J. Ind. Eng. Chem.*, roč. 20, č. 6, s. 3913–3918, 2014.
- [21] F. Yañez, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo, „Macromolecule release and smoothness of semi-interpenetrating PVP-pHEMA networks for comfortable soft contact lenses“, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, roč. 69, č. 3, s. 1094–1103, 2008.

- [22] S. Helešicová, „Studium vlivu roztoků polyvinylpyrrolidonu na tvorbu bakteriálního biofilmu“, *Bakalářská práce*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2015.
- [23] I. Sebe a kol., „Polymer structure and antimicrobial activity of polyvinylpyrrolidone-based iodine nanofibers prepared with high-speed rotary spinning technique“, *Int. J. Pharm.*, roč. 458, č. 1, s. 99–103, 2013.
- [24] D. S. Jones, J. Djokic, C. P. McCoy, S. P. Gorman, „Poly(ϵ -caprolactone) and poly(ϵ -caprolactone)-polyvinylpyrrolidone-iodine blends as ureteral biomaterials: Characterisation of mechanical and surface properties, degradation and resistance to encrustation in vitro“, *Biomaterials*, roč. 23, č. 23, s. 4449–4458, 2002.
- [25] A. Aytimur, I. Uslu, „Production and Characterization of Poly(vinylalcohol)/ Poly(vinylpyrrolidone) Iodine / Poly (ethylene glycol) Electrospun Fibers with (Hydroxypropyl) methyl Cellulose and Aloe Vera as Promising Material for Wound Dressing“, *J. Appl. Polym. Sci.*, roč. 124, s. 3520–3524, 2012.
- [26] G. Wang, T. Zhang, S. Ahmad, J. Cheng, M. Guo, „Physicochemical and adhesive properties, microstructure and storage stability of whey protein-based paper glue“, *Int. J. Adhes. Adhes.*, roč. 41, s. 198–205, 2013.
- [27] S. Banerjee, P. Chattopadhyay, A. Ghosh, P. Datta, V. Veer, „Aspect of adhesives in transdermal drug delivery systems“, *Int. J. Adhes. Adhes.*, roč. 50, s. 70–84, 2014.
- [28] M. A. Ahmed, R. M. Khafagy, S. T. Bishay, N. M. Saleh, „Effective dye removal and water purification using the electric and magnetic $Zn_{0.5}Co_{0.5}Al_{0.5}Fe_{1.46}La_{0.04}O_4$ /polymer core-shell nanocomposites“, *J. Alloys Compd.*, roč. 578, s. 121–131, 2013.
- [29] V. N. Morozov, A. Y. Mikheev, „Water-soluble polyvinylpyrrolidone nanofilters manufactured by electrospray-neutralization technique“, *J. Memb. Sci.*, roč. 403–404, s. 110–120, 2012.
- [30] M. B. Kaynar, R. DelPercio, E. Yassitepe, S. Ozcan, S. I. Shah, „Solvent free fabrication of nanoporous TiO_2 filters using organic-inorganic nanocomposites“, *Powder Technol.*, roč. 233, s. 331–334, 2013.
- [31] S. Klívar, „Možnosti sorpce PVP na biologické kaly“, *Diplomová práce*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010.

- [32] A. Lázníčková, V. Kubíček, „*Základy fyzikální chemie: vybrané kapitoly pro posluchače Farmaceutické fakulty*“, 3. vyd., V Praze: Karolinum, 2014, ISBN 978-802-4627-915.
- [33] J. Rosina, H. Kolářová, J. Stanek, „*Biofyzika pro studenty zdravotnických oborů*“, Praha: Grada, 2006, ISBN 978-802-4713-830.
- [34] J. Beneš, D. Jiráček, F. Vitek, „*Základy lékařské fyziky*“, 4. vyd., V Praze: Univerzita Karlova, Karolinum, 2015, ISBN 978-802-4626-451.
- [35] S. Liu, „Journal of Colloid and Interface Science Cooperative adsorption on solid surfaces“, *J. Colloid Interface Sci.*, roč. 450, s. 224–238, 2015.
- [36] L. Bartovská, M. Šišková, „*Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*“, [online], Verze 1.0., Praha: VŠCHT Praha, 2005, [cit. 2017-02-13], dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pages-img/, ISBN 80-7080-579-X.
- [37] M. N. Nounou, H. N. Nounou, „Multiscale estimation of the Freundlich adsorption isotherm“, *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, roč. 7, č. 3, s. 509–518, 2010.
- [38] Dostupné z: File:Freundlich_sorption_isotherm.svg
- [39] V. A. Kholodov, N. V Yaroslavtseva, M. A. Yashin a kol., „Contact Angles of Wetting and Water Stability of Soil Structure“, *Eurasian Soil Sci.*, roč. 48, č. 6, s. 693–701, 2015. *evier*, roč. 55, s. 758–764, 2015.
- [40] D. J. Król, A. Wymysłowski, K. N. Allaf, „Microelectronics Reliability Adhesion work analysis through molecular modeling and wetting angle measurement“, *Elsevier*, roč. 55, s. 758–764, 2015.
- [41] Dostupné z: <http://www.adhesiveandglue.com/contact-angle.html>
- [42] Dostupné z:
http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/hesla/mereni_uhlu_smaceni.html
- [43] Dostupné z:
http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/hesla/metody.vyvazovani_desky.html

- [44] Dostupné z:
<http://www.surface-treat.cz/?q=en/wettability-3d>
- [45] Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/mereni-kontaktneho-uhlu-sedici-kapky-jako-metoda-charakterizace-povrchu>
- [46] H. J. Busscher, A. H. Weerkamp, H. C. V. A. N. D. E. R. Mei, A. W. J. V. A. N. Pelt, „Measurement of the Surface Free Energy of Bacterial Cell Surfaces and Its Relevance for Adhesion“, *Appl. Environ. Microbiol.*, roč. 48, č. 5, s. 980–983, 1984.
- [47] C. Simo, M. Joa, „Adhesion and biofilm formation on polystyrene by drinking water-isolated bacteria“, *Antonie Van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, roč. 98, č. 3, s. 317–329, 2010.
- [48] J. Heard, B. B. Johnson, J. D. Wells, M. J. Angove, „Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Measuring „ hydrophobicity“ of filamentous bacteria found in wastewater treatment plants“, *Elsevier*, roč. 72, s. 289–294, 2009.
- [49] R. J. Hunter, „*Foundations of Colloid Science*“, 2 edice, Oxford, New York, 2001.
- [50] S. A. Al Malek, M. N. A. Seman, D. Johnson, N. Hilal, „Formation and characterization of polyethersulfone membranes using different concentrations of polyvinylpyrrolidone“, *DES*, roč. 288, s. 31–39, 2012.
- [51] K. Grundke, S. Michel, G. Knispel, A. Grundler, „Wettability of silicone and polyether impression materials: Characterization by surface tension and contact angle measurements“, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, roč. 317, s. 598–609, 2008.
- [52] A. Al-amoudi, P. Williams, A. S. Al-hobaib, R. W. Lovitt, „Cleaning results of new and fouled nanofiltration membrane characterized by contact angle, updated DSPM, flux and salts rejection“, *Appl. Surf. Sci.*, roč. 254, s. 3983–3992, 2008.
- [53] W. Zhao a kol., „Modification of polyethersulfone membrane by blending semi-interpenetrating network polymeric nanoparticles“, *J. Memb. Sci.*, roč. 369, č. 1–2, s. 258–266, 2011.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AOT	Bis-2-ethylhexylsulfosukcinát sodný
CaCl ₂	Chlorid vápenatý
Ca(DEHSS) ₂	Vápenatá sůl bis (2-ethylhexyl)sulfosukcinátu
CCM	Česká sbírka mikroorganismů Brno
CoFe ₂ O ₄	Nanočástice kobaltového feritu
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DOC	Rozpuštěný organický uhlík
FT	Fakulta technologická
MM	Minerální médium
MMPVP	Polyvinylpyrrolidon v minerálním médiu
NMP	N-methyl-2-pyrrolidon
pDNA	Plasmidová DNA
PES	Polyethersulfon
PFR	Pufrovaný fyziologický roztok
pSVb-gal	Reporterový gen
PVP	Polyvinylpyrrolidon
TiO ₂	Oxid titaničitý
See systém	Systém hodnocení povrchové energie
TYA	Univerzální tryptický agar s kvasničným extraktem
UIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1 – Polymerace vinylpyrrolidonu na polyvinylpyrrolidon [5]</i>	7
<i>Obrázek 2 – 3D struktura vinylpyrrolidonu [5]</i>	8
<i>Obrázek 3 – 3D struktura polyvinylpyrrolidonu [5]</i>	8
<i>Obrázek 4 – Vývojový diagram ukazující jednotlivé kroky přípravy nanočástic PVP se zapouzdřenou pDNA prostřednictvím reverzních micel [15]</i>	11
<i>Obrázek 5 – Typické kroky adsorpce [35]</i>	15
<i>Obrázek 6 – Grafické znázornění Langmuirovy izotermy [32]</i>	17
<i>Obrázek 7 – Freundlichova izoterma [38]</i>	18
<i>Obrázek 8 – Zobrazení úhlu smáčení (100°- hydrofobní, 70°- hydrofilní) [41]</i>	21
<i>Obrázek 9 – Měření kontaktního úhlu mezi nakloněnou deskou a vodorovným povrchem kapaliny [42]</i>	21
<i>Obrázek 10 – Metoda vyvažování destičky (Wilhelmyho destičky) [43]</i>	22
<i>Obrázek 11 – Schéma uspořádání komponentů při měření úhlu smáčení [42]</i>	22
<i>Obrázek 12 – Kapka změřená pomocí See systému [44]</i>	23
<i>Obrázek 13 – See systém [45]</i>	23
<i>Obrázek 14 – Volná suspenze buněk</i>	73
<i>Obrázek 15 – Volná suspenze buněk</i>	73
<i>Obrázek 16 – Vločky z buněk E. coli v MM s PVP (objektiv 20x)</i>	73
<i>Obrázek 17 – Vločky z buněk E. coli v MM s PVP (objektiv 40x)</i>	73
<i>Obrázek 18 – Vločky E. coli v MM s PVP (po provzdušnění)</i>	74
<i>Obrázek 19 – E. coli v MM bez PVP (po provzdušnění)</i>	74
<i>Obrázek 20 – Srovnání zkumavek po provzdušnění</i>	74

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1 – Výsledky DOC supernatantů po adsorpci a odstranění buněk, včetně kontrol (A)</i>	50
<i>Tabulka 2 – Výsledky DOC supernatantů po adsorpci a odstranění buněk, včetně kontrol (B)</i>	51
<i>Tabulka 3 – Výsledky DOC supernatantů po adsorpci a odstranění buněk, včetně kontrol (C)</i>	52
<i>Tabulka 4 – Vypočtená míra adsorpce při zvolených koncentracích PVP pro kulturu MS2</i>	52
<i>Tabulka 5 – Výsledky stanovení sušiny buněk pro jednotlivé série (A, B a C)</i>	53
<i>Tabulka 6 – Vypočtená sorpční kapacita buněk kultury MS2 pěstované na NMP při jednotlivých koncentracích PVP</i>	54
<i>Tabulka 7 – Výsledky stanovení DOC supernatantů, po adsorpci PVP a odstranění buněk, pro kulturu MS2 kultivanou na tryptonu, včetně kontrol</i>	55
<i>Tabulka 8 – Vypočtená míra adsorpce při zvolených koncentracích PVP pro kulturu MS2 rostoucí na tryptonu</i>	57
<i>Tabulka 9 – Výsledky stanovení sušiny buněk kultury MS2 rostoucí na tryptonu</i>	57
<i>Tabulka 10 – Vypočtená sorpční kapacita buněk kultury MS2 pěstované na tryptonu při jednotlivých koncentracích PVP</i>	58
<i>Tabulka 11 – Výsledky stanovení koncentrací DOC v supernatantech po adsorpci PVP</i>	60
<i>Tabulka 12 – Vypočtená míra adsorpce při zvolených koncentracích PVP pro kulturu E. coli</i>	62
<i>Tabulka 13 – Výsledky stanovení sušiny buněk pro kultury E. coli CCM 3988</i>	62
<i>Tabulka 14 – Vypočtená sorpční kapacita buněk kultury E. coli pěstované na tryptonu při jednotlivých koncentracích PVP</i>	63
<i>Tabulka 15 – Výsledky měření povrchové energie I.</i>	65
<i>Tabulka 16 – Výsledky měření povrchové energie pro kulturu MS2</i>	66
<i>Tabulka 17 – Výsledky měření povrchové energie pro kulturu E. coli CCM 3988</i>	68
<i>Tabulka 18 – Stanovení sušiny buněk kultury E. coli kultivané s a bez PVP (Pokus 1)</i>	71
<i>Tabulka 19 – Stanovení sušiny buněk kultury E. coli pro měření respirace (Pokus 2)</i>	71
<i>Tabulka 20 – Vypočtené specifické respirační rychlosti pro jednotlivá měření</i>	72

SEZNAM ROVNIC

<i>Rovnice 1 – ustavení adsorpční rovnováhy [34]</i>	14
<i>Rovnice 2 – Langmuirova adsorpční izoterma [35]</i>	16
<i>Rovnice 3 – Vyjádření konstanty adsorpční izotermy [35]</i>	17
<i>Rovnice 4 – Freundlichova adsorpční izoterma [37]</i>	18
<i>Rovnice 5 – linearizovaný tvar Freundlichovy izotermy [37]</i>	18
<i>Rovnice 6 – Youngova rovnice [40]</i>	20

SEZNAM GRAFŮ

<i>Graf 1 – Adsorpční izoterma adsorpce PVP na buňky kultury MS2</i>	<i>54</i>
<i>Graf 2 – Adsorpční izoterma adsorpce PVP na buňky kultury MS2 kultivované na tryptonu</i>	<i>58</i>
<i>Graf 3 – Adsorpční izoterma adsorpce PVP na buňky kultury E. coli CCM 3988</i>	<i>63</i>
<i>Graf 4 – Průběh respirace E. coli kultivované s PVP (1).....</i>	<i>69</i>
<i>Graf 5 – Průběh respirace E. coli kultivované s PVP (2).....</i>	<i>69</i>
<i>Graf 6 – Průběh respirace E. coli kultivované bez PVP (1).....</i>	<i>69</i>
<i>Graf 7 – Průběh respirace E. coli kultivované bez PVP (2).....</i>	<i>69</i>
<i>Graf 8 – Průběh respirace E. coli s PVP (1)</i>	<i>70</i>
<i>Graf 9 – Průběh respirace E. coli s PVP (2)</i>	<i>70</i>
<i>Graf 10 – Průběh respirace E. coli bez PVP (1)</i>	<i>70</i>
<i>Graf 11 – Průběh respirace E. coli bez PVP (2)</i>	<i>70</i>

