



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ  
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ  
FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE  
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VYUŽITÍ POKROČILÝCH REOLOGICKÝCH METOD  
KE STUDIU BIOLOGICKÝCH SYSTÉMŮ  
UTILIZATION OF ADVANCED RHEOLOGICAL TECHNIQUES FOR THE  
STUDY OF BIOLOGICAL SYSTEMS

DIPLOMOVÁ PRÁCE  
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

Bc. Šárka Krňávková

VEDOUCÍ PRÁCE  
SUPERVISOR

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.

BRNO 2017

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP0982/2016  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Šárka Krňávková**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Smilek, Ph.D.**  
Akademický rok: 2016/17

### Název diplomové práce:

Využití pokročilých reologických metod ke studiu biologických systémů

### Zadání diplomové práce:

- 1) Vypracovat rešerši na téma využití pokročilých reologických technik ke studiu biologických systémů
- 2) Optimalizovat metodu mezifázové reologie na jednoduchých modelových systémech
- 3) Ověřit aplikovatelnost pokročilých reologických technik ke studiu biologických systémů
- 4) Zhodnotit naměřené závislosti

### Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

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

-----  
Bc. Šárka Krňávková  
student(ka)

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.  
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## ABSTRAKT

Byla zavedena a prověřena nová metoda pro měření viskoelastických vlastností na mezifázovém rozhraní zvaná mezifázová reologie. Naměřená data byla porovnána s daty naměřenými pomocí tenziometru pro modelové systémy tenzidů. Byly proměřeny tři koncentrační řady různých typů tenzidů a to konkrétně SDS (aniontový), TTAB (kationtový) a Tween (neionogenní). Z naměřených dat byl posouzen vliv struktury, kritické micelární koncentrace a náboje na viskoelastické vlastnosti mezifázového rozhraní.

Dále byla tato metoda optimalizována a použita na biologické systémy a to konkrétně na biofilmy dvou bakteriálních kmenů. Nejdříve byly zjišťovány viskoelastické vlastnosti biofilmů na agaru a dále byla studována závislost viskoelastických vlastností na teplotě.

## ABSTRACT

A new method for determining viscoelastic properties on the interfacial interface called interfacial rheology was introduced and investigated. Measured data were compared with data from tanzimeter for model system of surfactant. Three concentration range of surfactant, namely SDS (anionic), TTAB (cationic) and Tween (nonionic), were measured. From the measured data the influence of structure, critical micellar concentration and charge on the viscoelastic properties of the interfacial interface was determined.

Furthermore, this new method was used for biological systems and specifically for biofilms of two bacterial strains. First, the viscoelastic properties of biofilms on the agar were determined, and the viscoelastic properties dependence on temperature

## KLÍČOVÁ SLOVA

Mezifázová reologie, reologie, viskoelastická, tenzidy, biofilmy

## KEY WORDS

Interfacial rheology , rheology, viscoelasticity, surfactants, biofilms

KRŇÁVKOVÁ, Šárka. *Využití pokročilých reologických metod ke studiu biologických systémů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 69 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Jiří Smilek, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

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

.....  
Šárka Krňávková

*Poděkování:  
Na tomto místě bych ráda jako prvnímu  
poděkovala svému ochotnému vedoucímu  
diplomové práce Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D.  
za rady a pomoc k vypracování diplomové  
práce, za konzultace k interpretaci dat a za  
přátelský přístup. Dále bych chtěla poděkovat  
Ing. Jitce Krouské, Ph.D. za pomoc při práci  
na tenziometru a nakonec bych ráda  
poděkovala Ing. Danovi Kučerovi za vysvětlení  
přípravy biofilmů a za celkové uvedení  
pro práci s buňkami.*

# OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	8
2.1	Reologie.....	8
2.1.1	Definice a historie .....	8
2.1.2	Deformace smykem, dynamická viskozita.....	8
2.1.3	Rozdělení látek a jejich modely .....	9
2.1.4	Newtonovské a nenewtonovské kapaliny .....	12
2.1.5	Tixotropie a reopexie .....	14
2.1.6	Viskoelasticita .....	15
2.1.7	Sledování viskoelasticity.....	15
2.2	Mezifázová reologie .....	18
2.2.1	Fázové rozhraní .....	18
2.2.2	Mezifázová reologie.....	19
2.2.3	Stabilizace disperzí, mezifáze .....	22
2.3	Amfifilní molekuly .....	22
2.3.1	Dělení tenzidů .....	23
2.3.2	Micely.....	24
2.4	PHA, PHB a tvorba biofilmů.....	25
2.4.1	PHA.....	25
2.4.2	Stres buněk .....	26
2.4.3	Vznik biofilmu .....	27
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	28
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	36
4.1	Použité chemikálie.....	36
4.2	Použité přístroje .....	36
4.3	Příprava roztoků tenzidů.....	37
4.4	Příprava biofilmu .....	37
4.4.1	Příprava inokula .....	37
4.4.2	Příprava minerálního média a očkování.....	37
4.5	Nastavení měření pro mezifázovou reologii.....	38
4.5.1	Nastavení výšky měřicí geometrie .....	38

4.5.2	Nastavení testů pro roztoky tenzidů .....	40
4.6	Nastavení teplotních ramp pro měření biofilmů .....	41
4.7	Nastavení testů pro měření biofilmů.....	42
5	DISKUZE A VÝSLEDKY .....	43
5.1	Optimalizace metody mezifázové reologie (kapalina – kapalina).....	43
5.2	Optimalizace pro rozhraní kapalina - vzduch .....	46
5.2.1	Tenzidy – porovnání vlivu koncentrace .....	46
5.2.2	Tenzidy – vzájemné porovnání použitých tenzidů.....	49
5.3	Biofilmy – teplotní rampy .....	52
5.3.1	<i>Cupriavidus necator</i> H16 .....	53
5.3.2	<i>Cupriavidus necator</i> PBH <sup>4</sup> .....	55
5.4	Biofilmy - reologie .....	58
6	ZÁVĚR .....	62
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	64
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....	68

# 1 ÚVOD

Pro studium viskoelastických vlastností nejrůznějších materiálů je běžně využívaná reologie, což je obor, který se za svá dlouhá léta působení dostal snad do všech částí průmyslu. Neobejde se bez ní potravinářský průmysl, stavební průmysl, kosmetický a spotřební průmysl. Je to interdisciplinární obor zahrnující chemii, fyziku, chemické inženýrství, matematiku či materiálové vědy.

Během let, nových procesů příprav a technologických výrob bylo zjištěno, že co se mezifázového rozhraní týče, není klasická reologie nejvhodnějším nástrojem. Vznikl tak podobor klasické reologie zvaná mezifázová reologie. Principem je měření viskoelastických vlastností přímo na mezifázovém rozhraní, které je tvořeno dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi.

Zajímavým přínosem této metody je možnost sledování stability nejen emulzí nebo pěn, které se využívají ve farmacii, kosmetice nebo v potravinářství, dále pak nosičových systémů, které jsou tvořené koloidními disperzními systémy, ale také k charakterizaci biologických systémů jako jsou biofilmy různých bakteriálních kmenů.

Jelikož se jedná o poměrně novou metodu na půdě naší fakulty, je potřebná optimalizace jak metod přípravy mezifázových rozhraní, tak i měřících parametrů. Za zmínku také stojí možnost použití různých měřících senzorů, jejichž použití se liší od měřeného systému. Hlavním problémem jsou pak nízké hodnoty zaznamenávaných viskoelastických parametrů. Zatím byly měřeny jednoduché systémy, jako jsou roztoky tenzidů nebo běžně využívaných proteinů. Další měření by dále mohlo směřovat k měřením větších molekul, jako jsou například polymery, nebo různé směsi proteinů a tenzidů.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Reologie

#### 2.1.1 Definice a historie

Reologie je vědní obor na pomezí několika nadřazených vědních oborů (matematika, fyzika, stavební průmysl) a zbývá se mechanickými vlastnostmi různých typů látek při jejich namáhání, resp. při jejich deformaci. Pojem reologie vychází z řeckých slov „rheos“, který znamená řeka, tok či proudění a „logos“, věda. Je to interdisciplinární obor, zabývající se tokem materiálu, v doslovném překladu je to věda o toku. Zabývá se chováním materiálů ve vztahu k působící síle, protože všechny materiály za určitých okolností tečou, čemuž odpovídá řecké zvolání, které reologové berou jako stavební kámen svého oboru: „Panta rhei!“ Vše plyne!

Označení reologie s vymezením své působnosti na studium deformace a toku materiálu bylo zavedeno už v roce 1922 v práci E. C. Bighama s názvem *Fluidity and plasticity* [1] a vědecká komunita tento název přijala v roce 1929 při založení americké Společnosti pro reologii [2]. Zásadní impulz pro rozvoj reologie v polovině dvacátého století byl v hromadném použití viskoelastických polymerních systémů, které vycházely z požadavků na přípravu materiálů o přesně definovaných vlastnostech. Pokud například stavař potřebuje materiál, který teče, chemik ví, jakou složku přidat a matematik posléze propočítá, jak moc to materiál a následnou stavbu ovlivní. Docházelo tedy i k propojení různých oborů a použití v praxi.

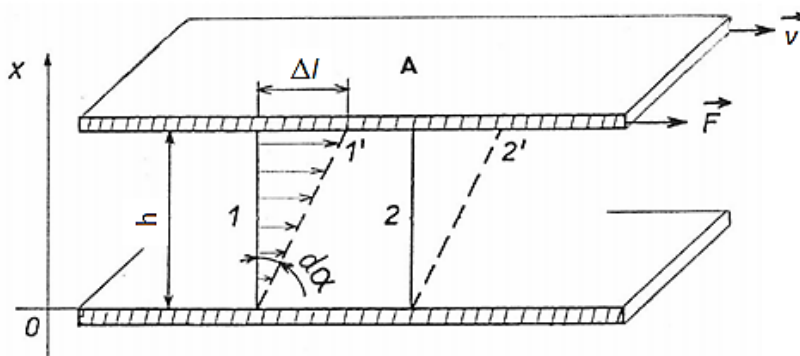
Vzhledem k interdisciplinárnímu charakteru tohoto vědního oboru jsou publikace rozptýleny v nejrůznějších časopisech s širokým zaměřením, např. na mechaniku tekutin, fyzikální chemii, chemické inženýrství, biofyziku, vědu o materiálech. Materiály, kterými se reologie zabývá, jsou především polymerní taveniny a roztoky, kapaliny biologického charakteru (krev), koloidní suspenze a emulze, které jsou původem anorganické (např. jíly, malty, betony, aj.), organické i biologické (celulózy, potraviny, mikrobiální systémy). Dalšími odvětvími, kde se reologie běžně uplatňuje, jsou také kosmetika a spotřební chemie.

Vzhledem k metodickému přístupu byly vymezeny různé disciplíny: elementární reologie (triviální prototypy deformace), reometrie (kvantitativní informace o reologických vlastnostech), racionální mechanika kontinua (vývoj a studium matematických principů pro formulování mechanických modelů), mechanika neneutronovských kapalin – reodynamika (proudění reologických komplexních kapalin v reálných situacích), inženýrská reologie (deformace a proudění materiálů v technologických procesech), mikroreologie (vývoj modelů pro mikrodisperzní materiály) i psychoreologie (reologická interpretace hmatových požitků například při jídle) [3].

#### 2.1.2 Deformace smykem, dynamická viskozita

Smyková deformace je jedním z nejjednodušších typů deformace. Znázorňována bývá modelem dvou planoparalelních desek, kde jedna se vůči druhé pohybuje při neměnné vzájemné vzdálenosti, což znázorňuje Obrázek 1. Spodní deska má nulovou smykovou rychlost, horní deska se pohybuje rychlostí  $v$  se smykovou silou  $F$ .





Obrázek 1: Model dvou rovnoběžných desek pro deformaci smykem [5]

Smykové napětí  $\tau$ , které vzniká v důsledku posouvající síly po jednotkové ploše konstantní rychlostí:

$$\tau = \frac{F}{A} [\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-2}] \quad (1)$$

Odpovědí na toto smykové napětí je pak relativní deformace  $\gamma$ :

$$\gamma = \frac{\Delta l}{h} \quad (2)$$

kde  $\Delta l$  je délka vychýlení horní desky vůči spodní a  $h$  je vzdálenost mezi deskami.

Mírou rychlosti deformace při pohybu horní desky je odpovídající smyková rychlost:

$$\dot{\gamma} = \frac{v}{h} [\text{s}^{-1}] \quad (3)$$

kde  $v$  je rychlost horní desky.

Dynamická viskozita je závislá na smykové rychlosti, resp. na smykovém napětí podle vztahu:

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} [\text{Pa}\cdot\text{s}] \quad (4)$$

Pro ideálně viskózní newtonovské kapaliny je při dostatečně nízkých smykových rychlostech dynamická viskozita materiálovou konstantou, která kompletně charakterizuje mechanické aspekty teorie a je závislá na teplotě a tlaku [3], [4].

### 2.1.3 Rozdělení látek a jejich modely

Ve většině učebnic se můžeme dočíst klasickou definici, že pojem viskozita je fyzikální veličina, která je definovaná poměrem tečného napětí a změnou smykové rychlosti, charakterizuje tím tedy vnitřní tření a je závislá například na přitažlivých silách částic, tvořících danou hmotu, na jejich tvaru či velikosti, a že pro určité látky se se změnou teploty a tlaku liší. Zde je tedy důležité definovat si rozdělení látek z reologického hlediska.

Typicky dělíme látky podle skupenství na pevné, kapalně a plynné. Toto dělení, v mnoha ohledech značně zidealizované, je charakterizované svým modelem, nicméně reologie je dále dělí podle viskózních resp. elastických vlastností:

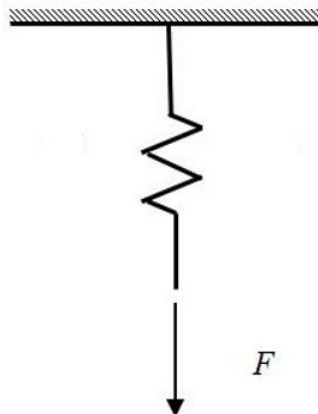
1. Tuhé těleso – těleso, které nevykazuje žádnou změnu při působení libovolně velkými silami, nevykazuje elastické ani viskózní chování
2. Ideálně pružné (Hookovo) těleso – působením vnějších sil vykazuje elastické chování, mění svůj tvar po dobu působení síly. Po ukončení působení síly se tělesa vrací do původního tvaru, přičemž nezáleží na historii namáhání. Vždy se tedy jedná o elastickou deformaci. Ideálně elastický materiál je tedy takový, u kterého nedochází k disipaci energie. Tudiž veškerá energie, která byla během namáhání použita, je systémem po ukončení namáhání zpětně využita. Modelem je pružina (Obrázek 2) a je definován vztahem:

$$\tau = G \cdot \gamma \quad (5),$$

kde  $\tau$  je tečné napětí,  $G$  je modul pružnosti ve smyku a  $\gamma$  je deformace. Hookeův vztah pro lineární pružnou deformaci pro obecný popis mechanických vlastností materiálů:

$$\sigma_{mech} = E \cdot \varepsilon \quad (6),$$

kde  $\sigma_{mech}$  je mechanické napětí,  $E$  je Youngův model pružnosti a  $\varepsilon$  je poměrná deformace.



Obrázek 2: Model pružiny [5]

3. Vazká kapalina – ideální viskózní materiál, pro který platí Newtonův zákon:

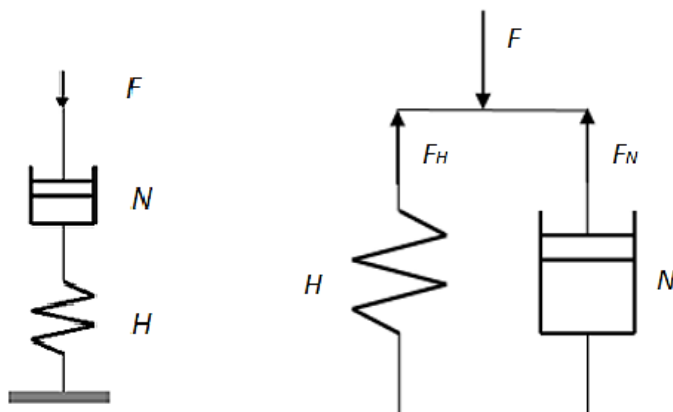
$$\tau = \eta \cdot \frac{du}{dx} = \eta \cdot D \quad (7),$$

kde  $\eta$  je dynamická viskozita,  $D$  je gradient rychlosti (rychlost deformace),  $\tau$  je tečné napětí,  $du$  je změna rychlosti toku a  $dx$  je posun souřadnice ve směru kolmém na směr proudění. Platí například pro plyny nebo velkou škálu vodných roztoků nízkomolekulárních látek. Na rozdíl od ideálně elastických materiálů, dochází u těchto materiálů k disipaci veškeré vložené energie při jejich namáhání na teplo a nedochází k zpětnému využití vložené energie po ukončení namáhání. Tím pádem je veškerá energie využita k toku.

#### 4. Nevazký plyn – ideální plyn, tepelně nevodivý

Toto jsou ideální modely sestavené pro lepší chápání materiálů. Zdá se, že vlastnosti jako viskozita a elasticita jsou striktně odděleny. Není tomu tak. Reálné materiály, které běžně ve svém životě potkáváme a využíváme, vykazují většinu kombinaci obou vlastností. V tomto případě dominující vlastnost závisí na namáhání a době, po kterou je materiál namáhání vystaven. Nelze tedy striktně dělit látky na pevné a kapalné, protože jejich vlastnosti běžně posuzujeme, když jsou ovlivněny malou vnější silou po krátkou dobu. Pokud ale na materiály vyvineme určitou sílu po specifický čas, jejich vlastnosti se rázem změní. Můžeme pozorovat chování typické pro kapaliny u látek pevných a naopak netypickou tuhost kapalin. Spojením těchto vlastností pak říkáme, že běžné materiály jsou viskoelastické, vykazují tedy viskózní či elastický charakter vždy závislející na tom, jakým podmínkám daný materiál vystavíme [5].

Pro reologický popis těchto látek je nutno zavést model, který kombinuje vlastnosti newtonovské kapaliny a elastického hookova tělesa. Tento model je tvořen pružinou s modulem pružnosti  $E$  a pístem, ve kterém je kapalina s viskozitou  $\eta$ . Pokud tyto modely zapojíme sériově za sebou, vznikne nám model Maxwellův, pokud je zapojíme paralelně, vznikne model Kelvinův.



Obrázek 3: Maxwellův a Kelvinův model viskoelastických látek [6]

V případě Maxwellova modelu jsou před začátkem experimentu obě komponenty v klidu. Pokud začneme model namáhat (deformovat), pružina se začíná protahovat až do rovnovážného stavu. Souběžně se začne pohybovat i píst a po určité době oba dva elementy vykazují stejnou deformaci, která je úměrná působící síle. Pokud tuto působící sílu odejmeme, pružina se okamžitě vrátí do svého původního stavu, ale píst zůstává stlačený (deformovaný).

Celkové smykové napětí je ve všech částech stejné:

$$\sigma = \sigma_N = \sigma_H \quad (8)$$

kde  $\sigma_N$  značí smykové napětí newtonovské kapaliny a  $\sigma_H$  smykové napětí elastického hookova tělesa.

Celková smyková rychlost se rovná součtu smykových rychlostí jednotlivých částí:

$$\dot{\gamma} = \dot{\gamma}_N + \dot{\gamma}_H \quad (9)$$

Po dosazení a zavedení tzv. relaxačního času  $\lambda = \frac{\eta}{G}$  získáme rovnici:

$$\frac{d\gamma}{dt} G = \frac{d\tau}{dt} + \frac{\tau}{\lambda} \quad (10)$$

Pro řešení této rovnice musíme definovat okrajové podmínky modelu:

v čase  $t_0 \rightarrow \sigma = 0$ , v čase  $t_1 \rightarrow \sigma = \sigma_0$  a v čase  $t_2 \rightarrow \sigma = \sigma_t$  a po zavedení do rovnice ((10)) získáme rovnici Maxwellova modelu:

$$\sigma(t) = \sigma_0 \cdot e^{-\frac{t}{\lambda}} \quad (11)$$

Napětová odezva a následná relaxace napětí se tedy nachází mezi dvěma mezními případy a to relaxační křivkou elastického tělesa a relaxační křivkou viskózní tekutiny.

U Kelvinova (Voigtova) modelu je celkové smykové napětí dáno součtem napětí v pružině a pístu:

$$\sigma = \sigma_N + \sigma_H \quad (12)$$

a smyková rychlost je ve všech částech stejná:

$$\dot{\gamma} = \dot{\gamma}_N = \dot{\gamma}_H \quad (13)$$

Rovnice tohoto modelu má pak tvar:

$$G \cdot \gamma + \eta \cdot \frac{d\gamma}{dt} = \sigma \quad (14)$$

a po dosazení okrajových podmínek, kde v čase  $t_0 \rightarrow \gamma = 0$ , v čase  $t_{1-2} \rightarrow \gamma = \gamma(t)$  a v čase  $t_2 \rightarrow \gamma = \gamma_\infty$  pak dostáváme rovnici pro Kelvinův model:

$$\gamma(t) = \gamma_\infty \cdot e^{-\frac{t}{\lambda}} \quad (15)$$

Rychlost poklesu deformace je opět určena relaxačním časem [6].

#### 2.1.4 Newtonovské a nenewtonovské kapaliny

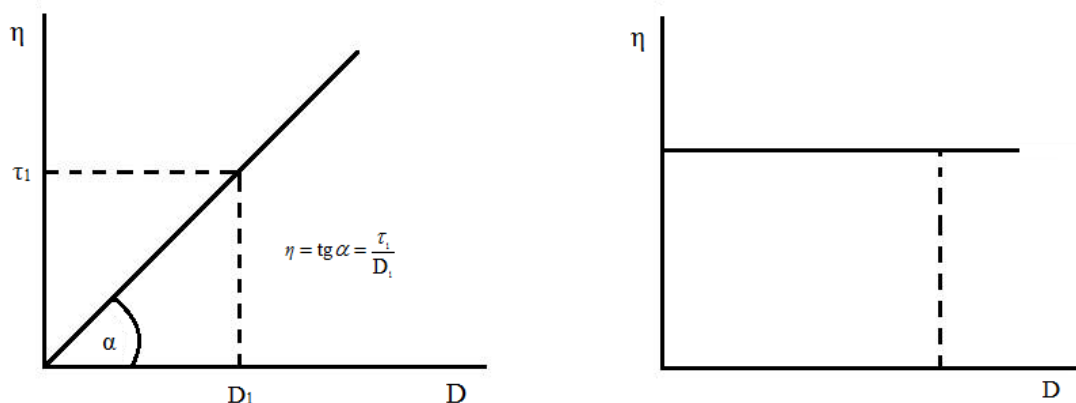
##### A) Newtonovské

Kapaliny, které se řídí Newtonovým zákonem, označujeme jako kapaliny *newtonovské*. Chování těchto kapalin za stálé teploty a tlaku se vyznačují tím, že:

- Jediné napětí, které je generované ve smykovém toku je  $\sigma$
- Viskozita je nezávislá na smykové rychlosti

- Tečné napětí roste s rostoucí smykovou rychlostí a viskozita je směrnice nárůstu této závislosti
- Viskozita je časově nezávislá

Graficky se newtonovské kapaliny dají vyjádřit pomocí tokové křivky, kdy průběh je lineární a narůstá pod úhlem  $\alpha$  nebo pomocí viskozitní křivky, která znázorňuje konstantní hodnotu viskozity nezávislou na aplikované smykové rychlosti (viz Obrázek 4).



Obrázek 4: Toková a viskozitní křivka newtonovské kapaliny [7]

## B) Neneutronovské

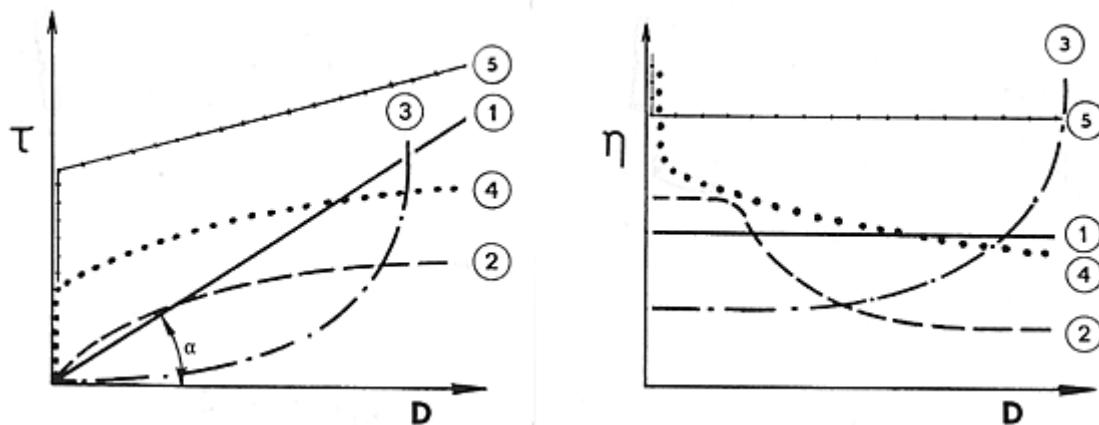
Všechny kapaliny, které nesplňují předchozí podmínky a nevykazují tak ideální tokové vlastnosti, nazýváme kapaliny neneutronovské. Běžně patrné je to například u koloidních systémů (lyofilní suspenze, emulze, polymerní roztoky), které se v závislosti na způsobu měření od newtonských kapalin liší i o několik desítek řádů, což je dáno nehomogenitou složení směsi (částice nepravidelného tvaru, dlouhé řetězce). Je to dáno tím, že závislost napětí na smykové rychlosti není lineární.

Neneutronovské kapaliny se pak dále dělí na několik skupin. Nejběžnějším typem jsou kapaliny **pseudoplastické**, u kterých viskozita s rostoucí smykovou rychlostí klesá. Působením zvyšujícího se smykového napětí dochází k reorganizaci částic uvnitř kapaliny tak, aby se tok kapaliny usadnil. Po odeznění napětí se kapalina vrací do původního uspořádání a viskozita opět naroste na původní hodnotu (tento jev je tedy reverzibilní). Příkladem těchto látek jsou taveniny polymerů a roztoky.

Dalším typem, který se řadí do neneutronovských kapalin, jsou kapaliny **dilatantní**. U nich se, na rozdíl od předchozích látek, viskozita s rostoucí smykovou rychlostí zvyšuje. Patří sem zejména vysoce koncentrované suspenze (vlhký písek na pláži, škrob ve vodě, kaolin) a stejně jako u pseudoplastických kapalin jde o jev reverzibilní.

**Binghamské** kapaliny k tomu, aby vůbec tekly, potřebují určitou hodnotu smykové deformace, tzn., vyznačují se určitou mezí toku. Jiné označení, které se pro tento typ používá, jsou kapaliny plastické. V klidu (bez působení deformace) se mezi molekulami vytvářejí interakce a navenek se tyto látky jeví jako pevné. Po překročení meze toku se interakce mezi molekulami zruší a před tím pevná látka začíná téct (zubní pasty) [8].

Tokové a viskozitní křivky znázorňující změnu viskozity (toku) na deformaci přehledně zobrazuje Obrázek 5.



Obrázek 5: Tokové a viskozitní charakteristiky některých nenewtonských kapalin

1- newtonská kapalina, 2- strukturně viskózní kapalina, 3- dilatantní kapalina, 4- pseudoplastická kapalina s mezí toku), 5- binghamská kapalina [7]

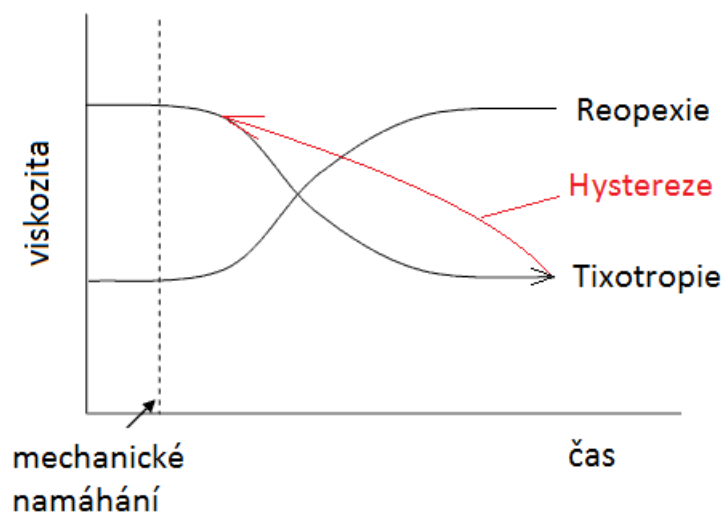
### 2.1.5 Tixotropie a reopexie

Jak už bylo zmíněno, viskozita může se změnou smykové rychlosti růst nebo klesat. Přidáme-li ale další proměnnou, čas, musíme si definovat další související pojmy.

**Tixotropie** je pozvolné snižování viskozity s časem při současném mechanickém namáhání (míchání, třepání) a za konstantní teploty, s následujícím opětovným zvýšením viskozity v případě, že systém přestaneme mechanicky namáhat. Uvedeme si to na příkladu. Pokud máme gel, je možné mechanickým namáháním zrušit interakce mezi molekulami a změnit ho zpátky v sol. Pokud však přestaneme například s intenzivním mícháním, díky Brownovu pohybu se částice začnou srážet, obnoví se původní vazby a sol se změní opět v gel s trojrozměrnou vnitřní strukturou. Přitom nemusíme s mícháním přestat úplně. Důležité je, aby mechanické namáhání bylo menší než to, které způsobilo rozrušení vazeb. Vazby jsou tedy obnovitelné, ale záleží na povaze systému, jak rychle tyto vazby obnoví (v rádech minut a někdy až měsíců).

Pokud je na začátku viskozita nízká a se zvyšující se smykovou rychlostí a dobou působení se zvyšuje, mluvíme o **reopexii**. Po ukončení namáhání se viskozita opět snižuje na původní hodnotu. Z hlediska reálných systémů jde o chování méně běžné [9].

I při skokových změnách smykové rychlosti se viskozita tixotropního i reopektického materiálu mění spojitě (viz Obrázek 6), přičemž průběh změny při zvyšování smykové rychlosti nemusí být nutně stejný jako při zpětném snižování, tj. průběhy změn viskozity se navzájem nekopírují. Jde o jev zvaný **hystereze** [3].



Obrázek 6: Změna viskozity u tixotropního a reopektického systému, hystereze

### 2.1.6 Viskoelastická

Jak už jsem zmínila v kapitole 2.1.3, reálné látky se vyznačují viskoelastickým chováním. Jsou tedy přechodem mezi ideálně elastickými (pevnými) a ideálně viskózními (kapalnými) látkami v závislosti na vnějších okolnostech. Pokud chceme posoudit míru deformace, měli bychom vědět, podle čeho tyto látky posuzovat, zda se jeví jako pevné nebo jako kapalné. Není to tak lehké, jak se na první pohled zdá, protože většina látek se za určitých okolností (smyková deformace, čas – můžeme si všimnout, že například u starých kostelních oken není tloušťka skla všude stejná, ve spodní části je více materiálu, který v průběhu desítek let „stekl“ z horní části) chová jako kapalina. Pro usnadnění se používá tzv. Debořino číslo zavedené M. Reinerem, kterého k tomu podnítil biblický zpěv prorokyně Debory „Hory tečou před Hospodinem“, kterým chtěl vyjádřit, že i skály by se při nekonečně dlouhé době pozorování jeví jako kapalina.

$$De = \frac{T}{\Delta t} \quad (16)$$

kde  $T$  je charakteristický čas materiálu (relaxační čas), který vyjadřuje schopnost molekulárního přeskupení;  $\Delta t$  je čas pozorování, po který působíme deformační silou.

Debořino číslo nabývá hodnot od nuly (pro dokonale tekoucí kapalinu) do nekonečna (pro dokonale tuhou hmotu). Pokud je relaxační čas velmi dlouhý, materiál se jeví jako pevná látka, pokud je blízký nule, materiál se jeví jako kapalina.

### 2.1.7 Sledování viskoelastické

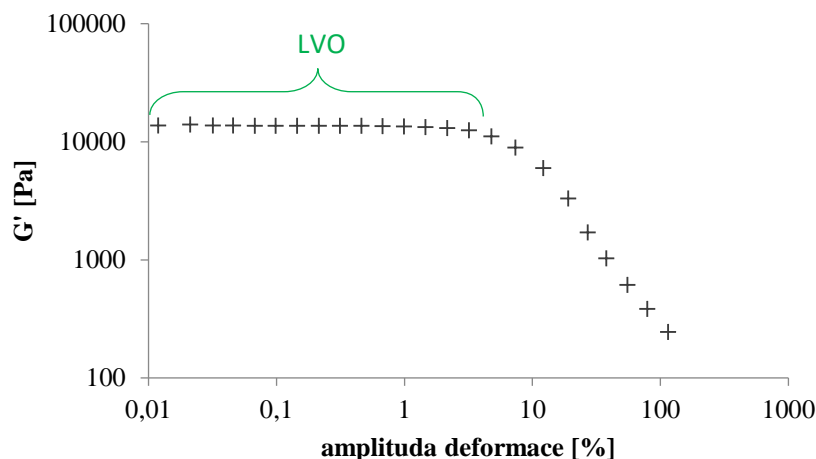
K posouzení vlastností viskoelastických materiálů existuje řada testů. Například test relaxační, u kterého se předpokládá, že před zahájením experimentu je zkoumaný materiál odpočatý, tzn., že v něm není žádné vnitřní pnutí. V čase  $t = 0$  je materiál deformován konečným smykem po neomezenou dobu. Výsledkem je relaxační modul vyjádřený vztahem:

$$G(t) = \frac{\sigma_t}{\gamma_0} \quad (17)$$

kde  $\sigma_t$  jsou napěťové odezvy materiálu a  $\gamma_0$  je amplituda kinematického vzruchu. Tento modul můžeme chápat i jako materiálovou funkci viskoelastického chování a je pro ně typický pozvolný pokles (relaxace) napětí na nulovou hodnotu [3].

Jedním z nejpoužívanějších testů jsou oscilační testy (neboli dynamické testy), které ve své práci využívám i já, a tvoří je test amplitudový a frekvenční. Principem je měření odezvy materiálů na oscilace s amplitudou deformace.

Nejprve je nutno provést amplitudový test. U toho testu je nastavena konstantní frekvence oscilací senzoru a mění se amplituda deformace čili tlak, který senzor na měřený vzorek vyvíjí. Cílem tohoto testu je stanovení LVO – lineární viskoelastické oblasti. Je to oblast, po kterou vzorek odolává působící deformaci. Tato oblast je lineární do bodu, kdy průběh závislosti například paměťového modulu na amplitudě deformace začne strmě klesat, jak ukazuje Obrázek 7. V tomto bodě materiál neodolal působící síle a dochází zde k nevratnému porušení vazeb a tudíž k poškození pevné struktury vzorku. Z této lineární oblasti se pak vybírá vhodná amplituda deformace pro druhý test. Frekvenční test je oproti předchozímu nastaven tak, že amplituda deformace je konstantní v průběhu celého měření (vybraná z předchozího měření) a mění se frekvence oscilací od největší po nejmenší v nastaveném rozsahu.



Obrázek 7: Znárodnění lineární viskoelastické oblasti

Viskoelasticita se zkoumá pomocí dynamické mechanické analýzy, při které se na materiál aplikuje oscilační síla (napětí) a měří se výsledná deformace. U čistě elastických materiálů se napětí a deformace objevují ve fázi, takže odezva jednoho se vyskytuje současně s druhým. U čistě viskózních materiálů existuje určitý fázový rozdíl mezi napětím a deformací, kde napětí zaostává o 90 stupňů (o  $\frac{\pi}{2}$ ). Viskoelastické materiály vykazují chování mezi elastickými a viskózními materiály a vykazují jisté fázové zpoždění. Napětí a výsledná deformace pak můžou být vyjádřeny následujícími vztahy:

$$\text{Deformace: } \varepsilon = \varepsilon_0 \sin(\omega t) \quad (18)$$

$$\text{Napětí: } \sigma = \sigma_0 \sin(\omega t + \delta) \quad (19)$$



a  $\omega = 2\pi f$ , kde  $f$  je frekvence oscilací a  $t$  je čas.

Odezva materiálu se zaznamenává a je vyjádřena dvěma viskoelastickými moduly:

$$\text{Paměťový: } G' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \cos \delta_{fáz} \quad (20)$$

$$\text{Ztrátový: } G'' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \sin \delta_{fáz} \quad (21)$$

kde  $\sigma_0$  a  $\varepsilon_0$  jsou amplitudy napětí a deformace a  $\delta_{fáz}$  je fázový posun mezi nimi.

Paměťový (z anglického výrazu „storage“, dále také označovaný jako soufázový) modul, s označením  $G'$  [Pa], je mírou uložení energie ve vzorku, který je namáhán. Pokud přestaneme na materiál vyvíjet deformaci, tato energie slouží k úplnému nebo částečnému návratu do původní podoby. Materiály, u kterých převládá tato složka, vykazují viskoelastické chování s převahou elasticity. Dalším modulem je ztrátový (z anglického výrazu „loss“, jinak nazývaný též mimofázový) modul, s označením  $G''$  [Pa], který je mírou energie spotřebované vzorkem po čas namáhání. Tato energie je disipována, což znamená, že materiál se do svého původního stavu nedostane a pokud převládá tato složka nad elastickou, jedná se o viskoelastický materiál s převahou viskózního charakteru. Jak už bylo zmíněno, jedná se o složky celkového chování materiálů, oba dva moduly jsou tedy součástí komplexního smykového modulu  $G^*$

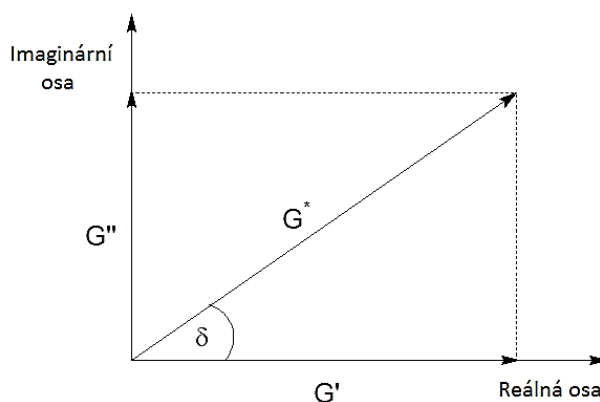
$$G^* = G' + iG'' \quad (22)$$

kde  $i^2 = -1$  a jedná se o imaginární jednotku.

Podílem viskoelastických modulů pak dostaneme ztrátový úhel, který je opět charakteristikou materiálu.

$$\text{tg} \delta = \frac{G''}{G'} \quad (23)$$

Materiály, které mají ztrátový úhel  $\text{tg} \delta$  větší než 1, se budou chovat jako kapaliny (tedy materiály, u kterých je vyšší ztrátový modul). Pokud je tento podíl menší než 1, jedná se o materiály tuhé (u kterých převládá paměťový modul).



Obrázek 8: Viskoelastické moduly [9]

## 2.2 Mezifázová reologie

### 2.2.1 Fázové rozhraní

Řada chemických, fyzikálních a biologických procesů probíhá na mezifázovém rozhraní mezi objemovými fázemi. Fáze označuje určitou část objemu systému, který zkoumáme, a vlastnosti jsou v ní neměnné nebo se mění spojitě. Mezi jednotlivými fázemi existuje hranice, které se označuje jako *mezifázové rozhraní*. Okem toto fázové rozhraní můžeme snadno pozorovat, protože vlastnosti se zde mění skokově. Pokud se však podíváme blíže, zjistíme, že toto rozhraní má určitou tloušťku a tedy i svůj vlastní objem a na tom, jaké tato vrstva bude mít vlastnosti, se podílejí obě sousedící fáze. V závislosti na skupenství fází rozdělujeme rozhraní na:

- kapalina – plyn
- kapalina – kapalina
- tuhá látka – plyn
- tuhá látka – kapalina
- tuhá látka – tuhá látka

První dvě rozhraní jsou mobilní, protože zde dochází k velkému pochybu částic. Nás nejvíce bude zajímat rozhraní kapalina – kapalina. Rozhraní mezi těmito fázemi lze označit jako homogenní (s dlouhou životností), v případě nějakých nehomogenit dochází vlivem pohybu molekul k jejich homogenizaci a ty mají tak krátkou životnost. Z termodynamického hlediska je příspěvek rozhraní nepatrný. Roste-li však plocha mezifázového rozhraní roste i podíl molekul v něm umístěných a tím tedy i celkový vliv.

To, že jsou fáze rozdělené rozhraním, neznamená, že se navzájem nemůžou ovlivnit. Naopak. I přes určitou tloušťku rozhraní se molekuly v objemových fázích ovlivňují. Pokud fáze tvoří nenabitě molekuly, uplatňují se zde tři typy interakcí: Keesomovy (mezi permanentními dipóly), Debyeovy (mezi permanentním a indukovaným dipólem) a Londonovy (mezi dvěma indukovanými dipóly) s různou mírou uplatnění. Přitažlivá energie však se vzdáleností molekul prudce klesá a to s šestou mocninou v případě Londonových sil:

$$u = -\frac{C}{r^6} \quad (24)$$

kde  $C$  je Londonova konstanta.

Pokud jsou naopak molekuly velmi blízko u sebe, nastává elektrostatická repulze – odpuzování elektronových obalů molekul.

Interakce mezi nabitými částicemi jsou vyjádřeny pomocí Coulombova zákona, kde se energie rovná první mocnině vzdálenosti a pokud nastane interakce mezi iontem dipólem, klesá tato energie se čtvrtou mocninou.

$$u = -\frac{Q^2\mu^2}{6(4\pi\epsilon\epsilon_0)^2kT} \cdot \frac{1}{r^4} \quad (25)$$

kde  $Q$  je náboj dipólu,  $\varepsilon$  je relativní permitivita,  $\varepsilon_0$  je permitivita vakua,  $k$  je Boltzmanova konstanta,  $T$  je termodynamická teplota a  $r$  je poloměr částice.

Molekuly v rozhraní také nejsou nehybné, naopak, je zde velmi intenzivní výměna molekul mezi objemovými fázemi a to v řádech asi  $10^{25}$  molekul za jedinou sekundu. Tento přenos je charakterizován prací, která souvisí s velikostí plochy rozhraní:

$$dW^S = \gamma_E \cdot dA \quad (26)$$

kde  $\gamma_E$  je konstanta úměrnosti označovaná jako volná mezifázová energie a  $A$  je plocha mezifázového rozhraní. Pro popis mobilních rozhraní se používá spíše název mezifázové (povrchové) napětí, které popisuje tečnou sílu působící na plochu rozhraní a nesmíme na něj zapomenout při počítání celkové práce, tzn. objemová práce plus povrchová:

$$dW = dW^{obj} + dW^S = -pdV + \gamma dA \quad (27)$$

kde  $p$  je tlak a  $dV$  je změna objemu.

V každém systému v přírodě dochází k procesům, které vedou ke snížení energie a tím k ustavení rovnováhy, protože nejstabilnější systém je ten s minimem energie. Tento proces může souviset se snížením plochy rozhraní nebo k adsorpci na mezifázovém rozhraní, u kterého dochází ke změně koncentrace.

Zatímco u čistých roztoků se povrchové napětí ustálí s rychle vzniklou rovnováhou, u roztoků čerstvě připravených a ustálených se povrchové napětí liší díky jevu zvaném adsorpce. Vliv rozpuštěné látky se různí (podle její povahy) a může povrchové napětí snižovat či zvyšovat. Ty, které snižují povrchové napětí, nazýváme povrchově aktivní látky. Pokud jsou molekuly povahy amfifilní, lze u nich pozorovat postupné snížení povrchového napětí a po překročení určité koncentrace dochází k jeho opětovnému nárůstu. Je to dáno tím, že se zde překročila kritická micelární koncentrace a dochází k tvorbě micel, jejichž struktura snižování povrchového napětí zastaví (viz kapitola 2.3.2).

Závislost povrchového napětí na složení roztoku nám umožní získat i informaci o množství rozpuštěné látky a to pomocí Gibbsovy adsorpční izotermy – vztah mezi chemickými potenciály složek a mezifázového napětí, kdy uvažujeme dvousložkový systém:

$$\Gamma_{2,1} = -\frac{c_2}{RT} \left( \frac{\partial \gamma}{\partial c_2} \right)_{T,p} \quad (28),$$

kde  $\Gamma_{2,1}$  je míra adsorpce složky 2 (rozdíl látkovým množstvím složky 2 v mezifázi a v objemových fázích),  $\left( \frac{\partial \gamma}{\partial} \right)_{T,p}$  je získáno z experimentálních dat,  $c_2$  je koncentrace složky 2,  $R$  je univerzální plynová konstanta a  $T$  je termodynamická teplota [11].

### 2.2.2 Mezifázová reologie

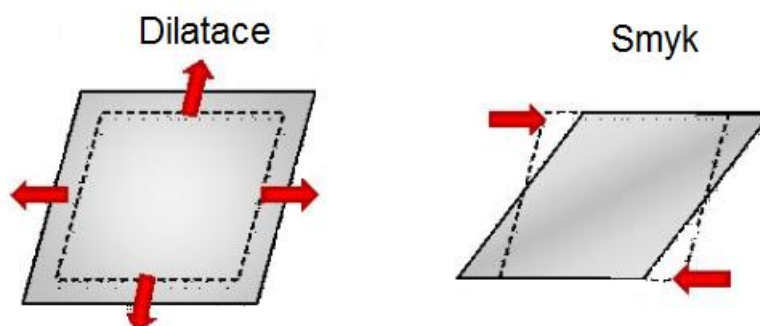
Proč vlastně studovat mezifázové rozhraní? Jak už jsem výše zmiňovala, řada fyzikálně – chemických reakcí probíhá na mezifázovém rozhraní. A to nejen v neživém světě,

ale i ve světě živém. Řada pro život nezbytných reakcí probíhá na mezifázových rozhraních v buňkách. A pro lepší znalost a pochopení těchto procesů týkajících se přežití, je důležité sestavení modelu, který tyto procesy dobře zachytí. Jeho sestavení budeme nicméně schopni až dokonalou znalostí mezifázových vlastností.

Rozdíl mezi klasickou reologií a reologií na mezifázovém rozhraní spočívá v tom, že klasická reologie měří celý systém, celou hmotu a je tedy nezávislá na rovině, ve které je měřena. Proto ji lze také nazývat jako 3D reologie. Oproti tomu, mezifázová reologie je omezena pouze na mezifázovou vrstvu, proto se jí také říká 2D reologie.

Využití mezifázové reologie bude také spočívat ve stabilizaci systémů. V dnešní době koloidní disperze reprezentují narůstající počet nosičových systémů, které jsou díky svému velkému povrchu termodynamicky nestabilní. Proto je cílem různých projektů snižování této nestability. K měření stability se využívá různých nástrojů a jedním z nich je právě mezifázová reologie. Stabilita těchto systémů je zajištěna vytvořením stabilní mezifázové vrstvy surfaktantů kolem každé dispergované částice. Můžeme také použít více surfaktantů, musíme ale myslet na to, že mechanismus stabilizace je pro každý surfaktant jiný a některé mechanismy se mohou navzájem vylučovat.

Obecně mezifázová reologie popisuje vztah mezi deformacemi mezifáze a silami, které na ni působí. Vzhledem k rozmanitosti deformací mezifázové vrstvy (smyk, exprese nebo komprese) se mezifázová reologie dělí do dvou podskupin: smyková (změny tvaru mezifázové vrstvy při neměnném rozměru plochy) a dilatační reologie (změny v rozměrech plochy mezifázové vrstvy za konstantního tvaru).



Obrázek 9: Dilatace a smyk

Mezifázová smyková viskozita je definovaná jako poměr smykového napětí a rychlostí smyku v rovině mezifáze a může být nazývána dvoudimenzionální viskozita:

$$\eta_s = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}} \quad (29)$$

Mezifázová dilatační viskozita může být definovaná jako jednotné rozšíření rozhraní konstantní rychlostí

$$\eta_d = \frac{d\gamma}{d \ln A dt} \quad (30)$$

Ustálený stav je definován jako stav, ve kterém molekuly na rozhraní jsou ve svém termodynamicky nejvýhodnějším stavu. Pokud rozhraní deformujeme, termodynamické síly mají tendenci obnovit původní stav. Nicméně za normálních okolností je obnova mezifáze pouze částečná, což znamená, že rozhraní vykazuje elastické i plastické chování. Proto i zde lze aplikovat Maxwellův a Kelvinův model. K charakterizaci mezifázového rozhraní můžeme použít všechny testy, které jsem zmiňovala výše v kapitole 2.1.6.

### **Smykové měřicí techniky**

Smykové metody měření zahrnují vyvolání smyku v adsorbovaném filmu beze změny velikosti plochy. Tyto metody poskytují informace o strukturách na rozhraní a nejčastěji se používají pro adsorpční vrstvy proteinů na povrchu nebo kombinací proteinů s nízkou molekulovou hmotností a u povrchově aktivních látek. Může být rozdělena na metody přímé a nepřímé.

Nepřímé techniky měří povrchové profily rychlosti za použití inertní viditelné částice, na jehož základě mohou být určeny smykové vlastnosti. Tyto metody jsou určeny hlavně na rozhraní kapalina – plyn. Nejčastěji používaný nepřímý viskozimetr je deep-channel surface viskozimetr, který se skládá ze dvou soustředných válců stacionárních a rotační misky naplněné vzorkem. Komora se otáčí se známou smykovou rychlostí a deformace povrchu je měřena pomocí Teflonových částic, které jsou ve vodné fázi. Primární výhodou tohoto viskozimetru je to, že může být použit i pro měření rozhraní kapalina – kapalina.

Přímé metody na rozdíl od nepřímých, stanovují smykové napětí kapalných rozhraní, která jsou stresována (deformována) kontaktem se senzorem, který tuto deformaci zaznamenává. Většina viskozimetrů v této oblasti jsou torzní kyvadlové povrchové viskozimetry, které se dále dělí na geometrii s ostrými konci, která je vhodná pro rozhraní plyn – kapalina a na ty s bikonální geometrií, které jsou vhodné na měření rozhraní kapalina – kapalina. Princip je ten, že rotační nebo oscilační těleso je spojeno s rotorem, který může detekovat točivý moment a posunutí, zatímco vzorek je ve stacionární misce.

### **Dilatační měřicí techniky**

Dilatační měřicí techniky vyvolávají velikost mezifázové plochy a současně se měří povrchové napětí, které poskytuje údaje o složení mezifázových vrstev. Takto můžeme pozorovat reologické vlastnosti, které vznikají v reakci na změnu povrchové plochy. Tyto změny jsou nejvíce patrné při tvorbě emulzí, pěny a například i u elektrostatického zvlákňování, kdy u všech případů dochází k enormnímu nárůstu plochy.

Tyto metody se používají ke zkoumání rovnováhy a dynamických vlastností jednoduchých nebo komplexních mezifázových vrstev složených z povrchově aktivních látek s nízkou molekulovou hmotností, proteinů a polymerů. Dále mohou být využity pro měření koncentrace povrchově aktivních látek, kompetitivní adsorpci a velikosti interakcí na rozhraní.

V rámci dilatačních měřících technik byly vyvinuty následující metody. Metoda tlumení kapilární vlny se používá ke zkoumání dynamických vlastností a struktury nerozpustných monovrstev nebo adsorpčních vrstev. Jako nejčastěji využívané techniky jsou oscilující kapka a bublina. Mohou být využity k měření jak rozhraní plyn – kapalina, tak i na rozhraní

kapalina – kapalina a princip spočívá buď v měření tvaru kapky/bubliny, nebo v měření kapilárního tlaku uvnitř. Technika měření kapilárního tlaku je jako jediná dilatační technika použitelná pro dvě kapaliny s malým rozdílem hustot. Principem je přímé měření rozdílů tlaků mezi dvěma fázemi oddělených sférických rozhraním kapky/bubliny.

### 2.2.3 Stabilizace disperzí, mezifáze

Vzhledem k jejich biokompatibilitě a biodegradabilitě, proteiny se běžně využívají jako povrchově aktivní látky. Při jejich adsorpci na rozhraní je jejich konformace taková, že hydrofobní části jsou v kontaktu s hydrofobním prostředím a hydrofilní části s hydrofilním prostředím. Bílkoviny tvoří imobilní viskoelastický mezifázový film s vlastnostmi, které závisejí na struktuře adsorbovaného proteinu a na interakci mezi molekulami. Mezifázové reologické parametry, jako jsou viskoelastické moduly  $G'_{\text{mezifáze}}$  a  $G''_{\text{mezifáze}}$  jsou obecně vyšší u isoelektrického bodu, tzn., že hodnota pH také ovlivňuje vlastnosti rozhraní. Vzhledem k polymerní povaze bílkovin a jejich schopnosti mít určitý náboj se předpokládá, že budou stabilizovat disperzi na základě elektrostatických a sterických sil mezi molekulami. V kontrastu s tímto tvrzením uvedl Ventureira a jeho spolupracovníci [12], který nenalezl souvislost mezi elektrostatickými silami a stabilitou a místo toho zdůraznil význam hydrofobních interakcí a vodíkových můstků.

Povrchově aktivní látky s nízkou molekulovou hmotností oproti proteinům tvoří vrstvy s nízkou viskoelasticitou a jsou účinnější při snižování dynamického povrchového napětí. Mezifázová plocha je značně zvýšena během emulzifikace nebo pění, což vede k nehomogennímu rozdělení surfaktantů na rozhraní. Změny v koncentraci povrchově aktivních látek způsobují jejich difúzi až do ustálení jednotného filmu. Mezifázové smykové vlastnosti disperzí stabilizovaných těmito látkami závisí na tom, zda jsou povrchově aktivní látky rozpustné v olejové nebo vodné fázi. Navíc stabilizace nízkomolekulárními povrchově aktivními látkami je rychlejší, než stabilizace proteiny. Vzhledem k tomu, že tyto látky vytěsní proteiny z rozhraní rychleji, používají se jako stabilizátory proteinů, aby se zabránilo biologické inaktivaci proteinů vystavených na rozhraní [13].

## 2.3 Amfifilní molekuly

Amfifilní látky vykazují dvojí afinitu, která je dána chemickým složením molekuly. Obsahuje totiž část polární, která je tvořena uhlíkem a heteroatomy, jako je dusík, kyslík, síra nebo fosfor. Druhá část je nepolární a je složena obecně z uhlovodíkového řetězce.

Polární část je typická svou afinitou pro polární rozpouštědla, jako je voda a je také označována za část hydrofilní. Naproti tomu nepolární část je afinitní pro nepolární rozpouštědla a setkáme se také s názvem hydrofobní nebo lipofilní část.



Obrázek 10: Struktura amfifilní molekuly

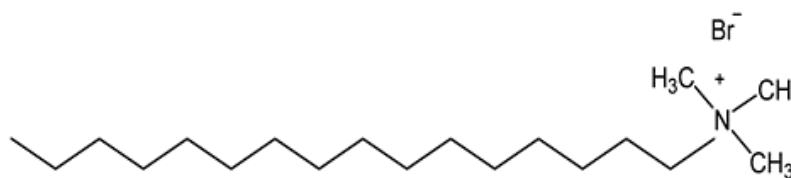
Vzhledem ke své polaritě jsou molekuly „nespokojené“ v každém rozpouštědle, protože vždy jedna část molekuly není vůči danému rozpouštědlu afinitní. Díky tomu mají právě tyto molekuly větší tendenci migrovat na mezifázové rozhraní a orientovat se tak, aby jedna část molekuly byla ve vodném rozpouštědle a druhá buď v nepolárním rozpouštědle, nebo aby mířila z vody ven (v případě mezifázového rozhraní voda – vzduch). V literatuře pak často setkáme s pojmy jako je *surfaktant* (z anglického výrazu „surface active agent“, neboli látka, která vykazuje povrchovou aktivitu), *povrchově aktivní látka* (PAL) nebo *tenzid*, což je označení pro látky, které obecně snižují povrchové napětí. Díky snížení povrchového napětí usnadňují rozpouštění a odstraňování nečistot, proto se nejčastěji používají do různých čistících a pracích prostředků.

### 2.3.1 Dělení tenzidů

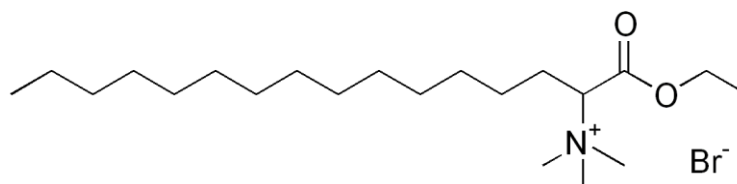
Tenzidy jsou děleny podle jejich schopnosti disociovat ve vodném prostředí

**1) Iontové (ionogenní) tenzidy** – ve vodě disociují a tím vzniká povrchově aktivní iont, který se liší svým nábojem

A) Kationové tenzidy – vznikající iont má kladný náboj. Velké zastoupení zde mají sloučeniny obsahující ve své struktuře dusík, jako soli mastných kyselin a kvartérní amoniové soli. Díky svým antistatickým účinkům se používají v řadě aviváží, kde snižují tření mezi vlákny. Mezi kationové surfaktanty patří například cetyltrimethylamonium bromid (CTAB), trimethyltetradecylamonium bromid (TTAB) nebo Septonex

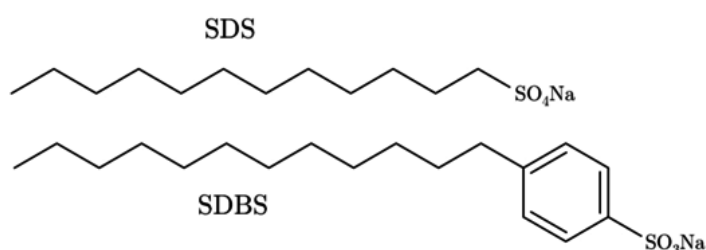


Obrázek 11: Cetyltrimethylamonium bromid [14]



Obrázek 12: Septonex [14]

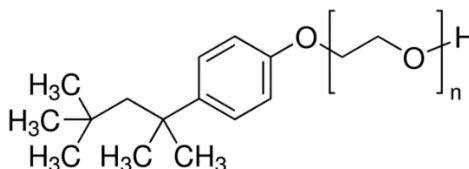
B) Aniontové tenzidy – ve vodném prostředí hydrofilní část disociuje za vzniku iontu se záporným nábojem. Je to největší skupina povrchově aktivních látek. Řadí se sem mýdla, alkylsulfáty, alkylsulfonáty, alkenylsulfonáty aj. Patří sem například dodecylsulfonát sodný (SDS), dodecylbenzensulfonát sodný (SDBS).



Obrázek 13: Dodecylsulfonát sodný a dodecylbenzensulfonát sodný [15]

C) Zwitteriontové tenzidy – vykazují jak aniontové, tak kationtové disociace a jinak se nazývají také amfoterní surfaktanty. Celkový náboj ovlivňuje pH roztoku. Pokud jsou v kyselém prostředí, projevují se jako kationtové surfaktanty, pokud jsou v zásaditém prostředí, projevují se jako aniontové. Sem se řadí hlavně syntetické produkty, jako jsou betainy a sulfobetainy a látky přírodního charakteru, například aminokyseliny a fosfolipidy.

2) **Neiontové (neionogenní) tenzidy** – ve vodném roztoku nedisociují, protože jejich hydrofilní skupina je nedisociačního typu (např. fenol, ester, ether nebo amid). Patří sem například látky komerčně označené Tween nebo Triton X-100.



Obrázek 14: Triton X-100 [15]

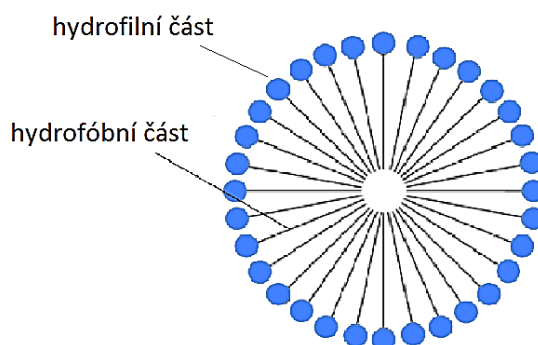
### 2.3.2 Micely

Při postupném rozpouštění tenzidu například ve vodě se snaží hydrofóbní část minimalizovat kontakt s vodným rozpouštědlem a jak jsem zmiňovala výše, dochází k migraci molekul na mezifázové rozhraní. To není nekonečně velké, proto při určité koncentraci tenzidu v roztoku dochází k nasycení povrchu mezifázového rozhraní a další molekuly se dále nemohou hromadit na rozhraní. V tomto okamžiku dochází k dosažení tzv. **kritické micelární koncentrace** (CMC).



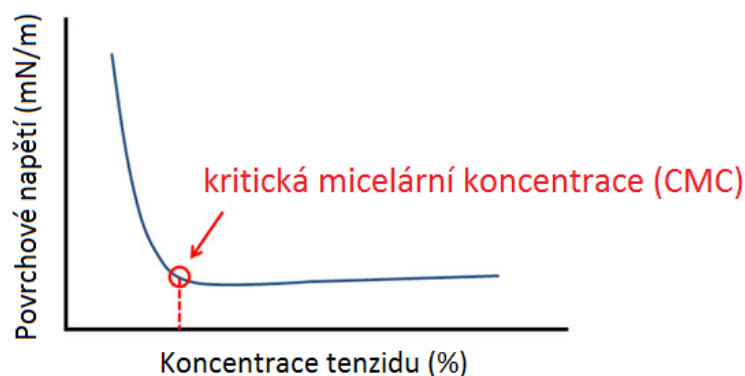
Po jejím překročení dochází k tvorbě **micel**. Micely jsou samovolně se tvořící agregáty koloidní velikosti, jejich struktura odpovídá povaze jejich molekul (Obrázek 15) a hnací silou jsou právě hydrofobní interakce mezi molekulami a rozpouštědlem. Hodnota CMC je ovlivněna jak strukturou použitého tenzidu, vlastnostmi rozpouštědla, tak i teplotou.

S tvorbou micel dále souvisí i **agregační číslo**, což je počet molekul, které tvoří danou micelu. Roste s délkou uhlovodíkového řetězce a klesá s velikostí plochy, kterou na povrchu micely zaujímá jedna polární skupina.



Obrázek 15: Struktura micely

Ke stanovení kritické micelární koncentrace se používá několik technik. Jednou z nich je například **tenziometrie**. Jde o stanovení CMC v závislosti povrchového napětí na koncentraci (Obrázek 16), ta se vynese do grafu a vypočítá se hodnota CMC.



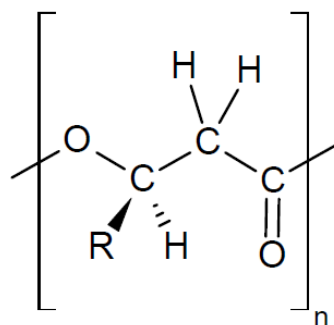
Obrázek 16: Závislost povrchového napětí na koncentraci tenzidu

## 2.4 PHA, PHB a tvorba biofilmů

### 2.4.1 PHA

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou přírodní polyestery hydroxykyselin. V závislosti na délce řetězce se dělí do dvou skupin: pokud má řetězec ve struktuře 3 – 5 atomů uhlíku, jedná se o short-chain-length a pokud má 6 – 14 atomů uhlíku nazýváme tuto skupinu medium-chain-length. Nejlépe prostudovanou podskupinou jsou pak polyhydroxybutyráty (PHB).

PHA se vyskytuje u celé škály mikroorganismů a to jak u gram-pozitivních, tak i u gram-negativních bakterií. Protože bakterie syntetizují tyto látky jako zásobní zdroj uhlíku a energie, využívají je po vypotřebování zdrojů ze substrátu [16].



Obrázek 17: Struktura PHA [16]

Strukturu PHA znázorňuje Obrázek 17 a pokud za uhlíkový zbytek R dosadíme  $\text{CH}_3$  skupinu, jedná se o PHB, systematicky poly(3-hydroxybutyrát). Je to polyester kyseliny  $\beta$  – hydroxybutanové. V rámci bakteriální buňky jde o amorfni a ve vodě rozpustnou inkluzi. Je to semikrystalický polymer s vysokou hodnotou krystalinity v rozmezí 50 % - 80 %. Díky tomu jsou křehké a tuhé. Jsou to látky biodegradabilní a biokompatibilní a z tohoto hlediska vhodné obzvláště ve zdravotnictví. Jejich většímu využití ale brání nízká tepelná odolnost. Pro zlepšení vlastností se při jejich zpracování přidávají aditiva, jako jsou plastifikátory a nukleační činidla.

Bakterie ukládají tyto látky do buněčné cytoplasmy ve formě granulí, jejichž velikost a počet se liší od způsobu kultivace a liší se také mezi bakteriálními kmeny [17].

## 2.4.2 Stres buněk

Důvodem, proč tyto bakterie syntetizují PHA je usnadnění jejich přežití při stresových podmínkách. Při zajištění vhodných podmínek (dostatek živin v médiu, dostatek využitelné energie a vhodné chemické a fyzikální podmínky) mikroorganismy mohou růst a rozmnožovat se. Pokud dojde ke změně vnějších podmínek, mikroorganismy jsou do určité míry schopny tyto změny vyrovnat například změnou enzymového vybavení, úpravou pH nebo i tvarem buňky.

Mezi stresové situace pro buňku patří zejména změna teploty. Většina mikroorganismů je vystavena teplotním výkyvům teplot, proto si vybudovaly mechanismy, které je udrží při životě. Nicméně všechny mikroorganismy mají určitou teplotní toleranci, po jejímž překročení dochází ke stresu. Dalším je osmotický stres, který významně ovlivňuje strukturu, fyziku, chemii a metabolickou aktivitu buňky. Ve chvíli, kdy se buňka dostane do koncentrovanějšího prostředí, začne voda z buňky difundovat ven. K zmírnění difúze je buňka schopna vyloučit elektrolyty a malé organické molekuly. Ethanol je inhibitor růstu a i při relativně nízkých koncentracích inhibuje buněčné dělení, rychlost růstu buněčný metabolismus, denaturuje intracelulární proteiny a snižuje i jejich aktivitu. Při vysokých koncentracích ethanolu dochází k snížení vitality buněk [18].

### 2.4.3 Vznik biofilmu

Bakteriální biofilmy jsou agregáty vzájemně na sebe působících buněk nebo buněk, které interagují s povrchem materiálu. Tento vytvořený systém má důmyslnou signalizaci mezi buňkami navzájem a dobře tak rozpoznávají změny vnějších podmínek, což přináší celou řadu výhod. Například rezistenci vůči antibiotikům nebo imunitní odpovědi hostitele, čemuž vděčí vytvořením difúzních bariér.

Základním předpokladem pro vznik biofilmu je adheze buněk k materiálu a vznik vazeb například nespecifickými reakcemi (náboj povrchu a buňky, hydrofobicita) nebo pomocí specifických vazebných míst, receptorů, které jsou přítomny na povrchu buněk. Dalším typem vazeb může být řada fyzikálně – chemických reakcí (elektrostatické interakce, sterické bránění nebo van der Waalsovy interakce).

Po prvním přichycení buňky na povrch a vytvoření vzájemné vazby začíná růst mikrokolonií do trojrozměrné struktury, která začíná zrát. Buňky mezi sebou komunikují a sdílí mezi sebou informace o stavu biofilmu pomocí malých molekul podobných hormonům, které se nazývají autoinducery, a tím umožňuje regulovat expresi genů podle vnějších podmínek. Struktura a tvar biofilmu je pak závislá na okolních podmínkách (zastoupením živin, vlastnostmi povrchu, koncentrací kyslíku, atd.) a i na vlastnostech samotného buněčného kmene.

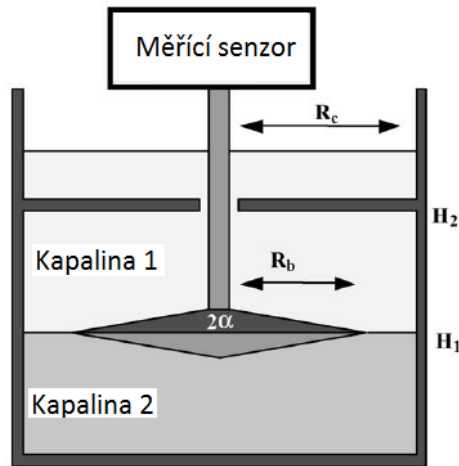
Poslední fází života biofilm je jeho disperze. Příčinou je buď samotná struktura biofilmu, nebo vlastnosti okolního prostředí a dochází k oddělení části biofilmu, který může začít růst a zrát na jiném místě. Maximální růst biofilmu je pak dán dostatkem živin a odstraňováním odpadních látek z prostředí [19].

### 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Jak už bylo řečeno výše, materiály s velkým povrhem, jako jsou například emulze, nejsou z termodynamického hlediska stálé (pokud nejsou stabilizovány přísávkem stabilizátoru). Nestabilita roste se zvyšující se energií, která je spojená s rozhráním kapalina – kapalina. Procesy, které jsou s destabilizací spojené, jsou koalescence (protržení filmu) a Ostwaldovo zrání (díky různým tlakům v kapkách). Typickým způsobem snížení těchto procesů je přidání amfifilních molekul (surfaktantů) nebo mohou být použity koloidní částice, zvané Pickeringovy stabilizátory [20]. Ty zahrnují mikro- a nanočástice vysoce zesíťovaných polymerů jako je například polymethylmethakrylát (PMMA), polystyren (PS) nebo křemíkové částice. V současné době se mezi potenciální Pickeringovy stabilizátory řadí i mikrogely. Mikrogely jsou chemicky zesíťované polymery, které mohou být rozpuštěny v rozpouštědle. Stupeň rozpuštění pak závisí na použitém rozpouštědle a hustotě zesíťování. Mikrogely mohou být vyrobeny i z termocitlivých polymerů jako je například N – isopropyl akrylamid (PNIPAM), který reverzibilně podléhá rozpouštění/smrštění při teplotách lidského těla a jsou tedy považovány za slibné v oblasti tepelně-stimulovanému podávání léčiv [21]. Autoři zde uvádějí velké využití tohoto materiálu v celé oblasti bioaplikací, jako jsou nosičové systémy, tvorba hydrogelů nebo využití monovrstev na pevných substrátech s možnou tvorbou násobných vrstev. Jako největší problém shledávají jejich neschopnost biodegradability, která by se dala odbourat kombinací s odbouratelnými materiály (kompozity). Dále jsou schopny silné adsorpce na mezifázovém rozhraní. Díky všem těmto vlastnostem jsou vhodným materiálem pro tvorbu emulzí s kontrolovatelnou stabilitou.

Byla prozkoumaná řada látek, které jsou schopné snižovat nestabilitu mezifáze, nicméně kinetika tohoto procesu není úplně zřejmá. Interakce mezi mezifázovým rozhráním a částicemi musí hrát roli. V závislosti na iontové síle jsou negativní částice adsorbovány velmi pomalu, ne-li vůbec. Dále hrají roli elektrostatické síly a smáčivost. Například částice oxidu křemičitého jsou negativně nabitě a zároveň hydrofilní a bylo zjištěno, že adsorbují na rozhraní až po jejich převedení na více hydrofobní charakter, což umožňují kationtové povrchově aktivní látky jako například CTAB, který se naváže na povrch částic [22].

V článku [23] se autoři věnovali charakterizaci malých molekul surfaktantů a stejně tak proteinů adsorbovaných na mezifázovém rozhraní. K tomu to účelu používali bikonální geometrii, jejíž schéma zachycuje Obrázek 18.



Obrázek 18: Schéma bikonální geometrie [23]

Měřeny byly různé koncentrace surfaktantů při různé objemové fázi.

Dynamické procesy zahrnující rozhraní kapalin nejsou ovlivněny pouze statickými mezifázovými vlastnostmi (jako je například rovnovážné mezifázové napětí), ale závisí také na rychlosti, kterou je rozhraní deformované. Boussinesq [24] jako první navrhol lineární model mezi mezifázovým střižným napětím a mezifázovou smykovou rychlostí dán vztahem:

$$\tau_s = [\sigma + (\eta_d + \eta_s) \operatorname{div}_s \vec{v}_s] \cdot P + 2\eta_s D_s \quad (31)$$

kde  $\sigma$  je mezifázové napětí,  $\eta_d$  je mezifázová dilatační viskozita,  $\eta_s$  je mezifázová smyková viskozita,  $\vec{v}_s$  je mezifázový vektor rychlosti,  $\operatorname{div}_s$  je mezifázový divergenční operátor,  $D_s$  je povrchová rychlost tenzoru deformace a  $P$  je projekční tenzor, který přeměňuje každý vektor do jeho součásti tangenciální k rozhraní.

Dále je definováno Boussinesqovo číslo,  $Bo$ , které je dáno poměrem:

$$Bo = \frac{\eta_s}{\eta_{bulk} \cdot R} \quad (32)$$

kde  $R$  je charakteristický poloměr geometrie. Pokud je  $Bo \gg 1$ , znamená to, že mezifázový tok není spojen s tokem v objemové fázi. V tomto případě se mohou viskózní efekty objemové fáze zanedbat a rozhraní může být považováno za izolovanou dvourozměrnou kapalinu. Pro velmi malé hodnoty, kdy  $Bo \ll 1$ , je mezifázový průtok ovlivňován průtokem z objemové fáze. Toto jsou krajní případy. Pro všechny hodnoty, ležící mezi těmito extrémy platí, že jejich příspěvek do mezifázové viskozity je relevantní.

U vlastního měření umístili autoři bikonální geometrii na mezifázové rozhraní a pro minimalizaci tvorby menisku, vyryli do stěny nádoby malou rýhu. Je nezbytné, aby disk byl umístěn vždy do stejné definované polohy, aby se zajistila opakovatelnost měření a dobrá definovatelnost výsledků. Pro vlastní měření jsou stanoveny tyto podmínky: obě používané kapaliny jsou vzájemně nemísitelné a newtonovské, distribuce rychlosti a tvar rozhraní jsou nezávislé na čase a počítá se s tím, že rozhraní je planární.

Jako příklad si autoři vybrali chování proteinu (ovalbuminu) v čase, které jsou používány v potravinářském průmyslu. Zkoumali vliv tepelného namáhání na proteiny adsorbované na mezifázovém rozhraní, a zda to lze měřit touto metodou. Řada proteinů běžně užívaných v potravinářství se může vlivem zpracování produktu rozkládat, což vede k rozkladu globulární struktury i při teplotách, které jsou nižší než je teplota denaturace daného proteinu.

Z výsledků vyplývá, že měřená mezifázová smyková viskozita nativního proteinu byla vyšší, než viskozita stejného proteinu po několika měřeních. Proteinový film je tedy citlivý i na menší deformace, což má za následek zhroucení struktury během smyku. Jakmile je ale film jednou smykově namáhán, další jeho namáhání nemá na mezifázovou viskozitu vliv, alespoň v rozmezí smykové rychlosti, která byla použita v článku. Při měření časové závislosti bylo zjištěno, že stárnutí se projevuje nejen při nízkých smykových rychlostech, ale v celém rozsahu měření, což dokazuje, že zvolená metoda je vhodná pro charakterizaci proteinů adsorbovaných na mezifázovém rozhraní.

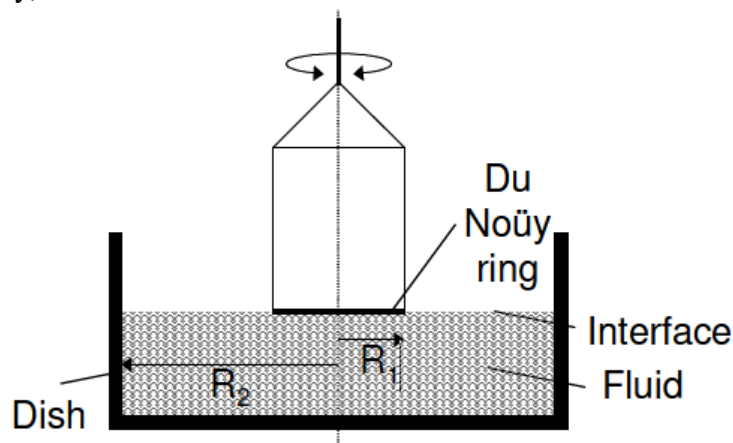
Adsorpce na mezifázi zvyšuje viskoelastické moduly v závislosti na koncentraci. Nicméně dosažení stabilní struktury na mezifázi trvá určitou dobu, protože struktura se mění v důsledku několika vlivů, jako jsou například teplota, průtok a přítomnost elektrolytů. Tyto strukturální přeskupení se pak odráží v celkovém smykovém modulu  $G^*$ . S částicemi by měl být celkový modul dost vysoký k vyvolání stability nezávisle na rychlosti formování vrstvy. Nicméně částice ukazují nepředvídatelnou formaci vrstev, zejména v kombinaci se solemi nebo surfaktanty. Proto pro uplatnění částic pro stabilizaci je nutné přijít na mikro- a makroskopické pohyby částic v emulzním systému za podmínek proudění a definovat tuto roli ve stabilizaci emulzí.

V práci [25] se autoři zabývali stabilizací emulzí pomocí jílových částic vzhledem k jejich širokému výskytu v přírodě a v mnoha odvětvích aplikací. Pro tvorbu rozhraní použili deionizovanou vodu a řepkový olej. Jako částice použili přírodní jílové částice a modifikované částice (surfaktant s dlouhým řetězcem). Na vortexu vytvořili emulzi olej ve vodě (W/O) a dále byla připravena stejná emulze, ovšem bez přidání částic. Z reologického hlediska byly použity dynamické oscilační testy pomocí reometru pro naměření viskoelastických modulů. Z měření je patrné, že jílové částice zlepšily stabilitu emulzí a zabránili fázové separaci, zejména pak směs obou částic, jak modifikovaných, tak i nemodifikovaných. Modifikované částice se hromadí pouze kolem rozhraní díky vysoké chemické interakci a nikdy se nedesorbuje do vodní fáze. Jak z měření klasické reologie, mezifázové reologie, tak i z optických pozorování byla zjištěna stabilizace jílu v závislosti na povrchových vlastnostech. Stabilizace modifikovaných částic závisí na koncentraci, toku olejové fáze a na vlastnostech olejové fáze (jíl se disperguje v olejové fázi).

Jak už bylo několikrát zmíněno, proteiny se také mohou adsorbovat na rozhraní a vytvořit viskoelastické filmy, které poskytují stericou a elektrostatickou repulzi a tím stabilizovat emulze. V důsledku rozdílu tlaků různě velkých dispergovaných kapiček se emulze hroutí. Adsorpce proteinů může být rozdělena do tří kroků. První krok zahrnuje difúzi proteinů a mezi-povrchové napětí a viskozita se s časem nemění. Druhým krokem je vytvoření monovrstvy proteinu, strukturní deformaci, mezifázové snížení napětí a rychlý nárůst viskozity. Posledním

krokem je mezifázová gelace, platí to zejména pro globulární bílkoviny. V tomto kroku je vytvořena násobná vrstva s mírným poklesem povrchového napětí a pomalým nárůstem viskozity.

Pro měření stability proteinů byly použity sójový protein s poměrně malou molekulovou hmotností a flexibilní strukturou,  $\beta$ -conglycinin a dva hydrolyzáty sójového proteinu. Pro tato měření byl použitý Du Noüyho kroužek, což je měřicí geometrie používaná pro měření smykové deformace. U této techniky se bere v potaz jak poloměr samotného prstenu, tak i průměr měřicí nádoby, ve které máme umístěné mezifázové rozhraní.



Obrázek 19: Schéma měření Du Noüyho prstenem [26]

Z prvního časového cyklu bylo zjištěno, že viskoelastické moduly se neměnily, což znamená, že k tvorbě rovnováhy na mezifázi došlo okamžitě, navíc ztrátový modul  $G''$  převládal. Asi 20 minut před koncem měření převládal paměťový  $G'$ , protože došlo k mezimolekulovým interakcím mezi proteiny díky hydrofobním interakcím.

Práce ukázala, že proteiny adsorbují na rozhraní ve dvou směrech. Nejdříve, pokud je struktura proteinu flexibilní (kaseinát sodný), mezifázový smykový modul je malý, ale s velkým adsorbovaným množstvím, což umožní vzniklému filmu lépe odolávat deformacím, aniž by došlo ke strukturnímu poškození. Dále pak globulární proteiny, které mají malou molekulovou hmotnost, vytvářejí vysoce viskoelastické filmy na rozhraní mezi filmy k ochraně olejové kapičky před flokulací a koalescencí. Selektivní produkt hydrolyzy obsahuje jak globulární, tak flexibilní proteiny a tím pádem vytváří silný viskoelastický film s velkým naadsorbovaným množstvím a usnadňuje tak tvorbu stabilní emulze [27].

Podobnému měření, ale s jiným proteinem, se věnuje práce [26]. Pro měření adsorpce si vybrali hovězí sérový albumin, lysozym a insulin a k měření mezifázového rozhraní opět použili Du Noüyho kroužek. Nejdříve do kádinky nalili 10 ml roztoku proteinů a na povrch této fáze byl umístěn prsten. Dále byla do kádinky přidána druhá fáze tvořená kokosovým olejem. Oscilační testy byly nastaveny na 0,1 Hz frekvence oscilací při teplotě 25 °C a amplituda deformací byla nastavena na 1 %. Tato hodnota byla zjištěna z předchozího měření lineární viskoelastické oblasti. Pro sledování viskoelastické oblasti byla vypočítána komplexní viskozita podle vzorce

$$\eta^*(\omega) = \frac{\sqrt{G'(\omega)^2 + G''(\omega)^2}}{\omega} \quad (33)$$

kde  $\omega$  je úhlová rychlost.

BSA vykazoval největší komplexní viskozitu na rozhraní než lysozym a insulin. Dále bylo ukázáno, že čím víc je protein hydrofóbní, tím víc je adsorbovaný na rozhraní. Pokud se měří plocha pokrytí, nejvíce hydrofobní je inzulin (65 % pokrytí povrchu), následovaná BSA (60 % pokrytí) a nakonec lysozym (52 % pokrytí). Hydrofobicita je závislá na náboji proteinů a na poloze tohoto náboje. Proteiny adsorbují nejvíce při jejich isoelektrickém bodě, kde elektrostatické síly dosáhnou minima. Za neutrálního pH měli BSA a inzulin různý náboj a také různé rozložení náboje na molekule. To má vliv na jeho orientaci v prostoru. Tím pádem záleží také na strukturní flexibilitě proteinů. BSA je flexibilnější a proto má větší afinitu k rozhraní.

Adsorpce proteinů a biofyzikální vlastnosti adsorbovaných proteinů jsou důležité ve vědě povrchů biomateriálů, protože adsorbovaný protein řídí biologickou odpověď na umělé materiály používané v medicíně. Různé metody charakterizace vedou k odlišným a v některých případech opačným výsledkům, jak je protein organizovaný na povrchu. Mezifázová reologie je technika, která vnímá mechanické a průtokové vlastnosti adsorbovaných vrstev. Ačkoli byla věnována spousta pozornosti běžně užívaným proteinům, jen málo prací se věnuje krevním proteinům. Jednou z nich je práce [28], která se zabývá porovnáním čtyř krevních proteinů. Jsou to albumin, IgG, fibrinogen a IgM. Jako měřicí geometrii si vybrali Du Noüyho kroužek.

Výsledky ukazují, že viskoelastické vlastnosti adsorbovaných proteinů připomínají rozsáhlé sítě s intermolekulárními interakcemi mezi molekulami. Poměr ztrátového a paměťového modulu pro roztoky purifikovaných proteinů značí relativní příspěvky viskozity a pružnosti adsorbované vrstvy, přičemž vyšší hodnoty jsou charakteristické pro viskózní roztoky, které mají nižší pružnou reakci na mechanickou deformaci. Roztoky albuminu byly jedinečné oproti zbylým třem proteinům díky tomu, že je strukturně nejmenší. Z výsledků vyplývá, že u roztoků albuminu došlo rychle k vytvoření vrstvy na mezifázovém rozhraní. Další tři proteiny oproti tomu vytvářely ne jednu, ale násobné vrstvy. Například IgM vytvořil 5 vrstev, což bylo určeno ze saturační křivky. Tyto vrstvy byly však nestabilní, nejprve vrstvy vykazovaly dobrou elastickou odpověď, ale při použití většího mechanického namáhání docházelo k jejich destabilizaci. Byl zkoumán také vliv směsi proteinů, protože krevní sérum je složeno přibližně ze 490 různých proteinů s různou koncentrací a velikostí, a to konkrétně směs IgG a albuminu. Z výsledků bylo usouzeno, že albumin se vmezeřil mezi adsorbované vrstvy vytvořené IgG. Tato směs vytváří tedy složitější uspořádání proteinových molekul než při použití čistých roztoků. Je zřejmé, že albumin se dobře koadsorbuje s většími molekulami a z grafů v práci je patrné, že snižuje elastický modul. Koadsorpce tedy nepodporuje vznik organizované viskoelastické sítě a za použitých podmínek narušuje křehkou organizaci adsorbovaných proteinů.

Autoři [29] se rozhodli měřit mezifázové rozhraní stabilizované kombinací proteinů a polysacharidů. Na rozdíl od proteinů, polysacharidy stabilizují emulzi olej ve vodě (O/V) pomocí jejich zahušťujících a gelujících vlastností k vytvoření makromolekulární bariéry ve vodném mediu mezi dispergovanými kapkami. Kombinace proteinů a polysacharidů je využívána stále častěji jako emulgátory díky spojení výhodných vlastností obou složek. Může



to být ideální stérický stabilizátor, protože se mohou pevně přichytit na rozhraní jako protein a rozpouštět se ve vodném prostředí jako polysacharid a vytvořit gelu podobnou strukturu s nábojem o definované tloušťce s polymerním řetězcem vybihající z mezifázového rozhraní. Mechanickou sílu adsorbované vrstvy ovlivňují společně elektrostatičká repulze a stérický efekt, které tvoří důležité faktory ovlivňující kinetickou stabilitu mezifázového rozhraní. Takto adsorbovaná vrstva je pak ovlivňována hodnotami pH, iontovou silou a také procesem, kterým byla emulze vytvořena.

V práci testovali autoři tři systémy. První byl tvořen proteinem albuminem (malý a kompaktní sférická struktura) v jeho nativní podobě, druhý systém obsahoval protein s vysoce methoxylovaným pektinem HMP (velká sférická a měkkící struktura) a třetí obsahoval fibrily (krátké nebo dlouhé tenké struktury). Pektin byl vybrán pro jeho široké použití v potravinářství a také, protože má negativně nabitě segmenty řetězce a náboj se mění podle stupně methylace a pH – při hodnotách pH pod 3,5 nejsou karboxylové skupiny disociovány, při hodnotách pH nad 7,4 dochází k úplné disociaci. Z měření vyplývá, že co se čistého proteinu týče, vytvářel na mezifázovém rozhraní kompaktní strukturu, protože disulfidické můstky limitují jeho konformační flexibilitu. To vede k tvorbě vrstvy s omezeným spojením mezi molekulami. Komplex s polysacharidem ale vytvořil tenčí vrstvu s více propojenou strukturou, která vede k vyšším hodnotám komplexního viskoelastického modulu. Systém tvořený lysinovými fibrilami s dlouhými řetězci měl hodnoty komplexního viskoelastického modulu až 10krát větší, než ten, který obsahoval krátké řetězce. Je nutné podotknout, že reologické vlastnosti mezifázového rozhraní stabilizovaného fibrilami nezávisí pouze na jejich délce, ale i na jejich polydisperzitě, která může zlepšit obalení na rozhraní a zlepšit odolnost proti mechanickému namáhání.

Pro porovnání dvou používaných geometrií jako je bikonální disk a Du Noüyho kroužek se rozhodli autoři článku [30]. V něm porovnávali zmíněné geometrie na pění z kávy. Rozhodli se pro to z toho důvodu, že chtěli vyzkoušet, zda mezifázová reologie je schopná změřit tvorbu a stabilitu kávy.

Umístit bikonální geometrii na mezifázové rozhraní není složité. Velmi přesně se umístí prostřednictvím normálové síly, která pomáhá detekci povrchové čisti na rozhraní. Du Noüyho kroužek byl navržen pro měření povrchového napětí mezi dvěma kapalinami nebo mezi kapalinou a vzduchem. U této metody, tenziometrie, je kroužek tažen vertikálně skrz rozhraní. Motivací pro použití kroužku u mezifázové reologie je jeho lehká geometrie s malým momentem setrvačnosti, který by umožnil měření vlastností filmu. Umístění kroužku je oproti bikonálnímu disku složitější. Dobrá opakovatelnost na rozhraní pomocí oka je téměř nemožná. Stejně jako u bikonálního disku by to bylo možné s použitím normálové síly, nicméně hodnoty naměřeného napětí jsou 10krát menší a proto slabě detekovatelné. Vzhledem k tomu, že křehký kroužek nemusí být dokonale rovnoběžný s hladinou vody a díky smáčení kroužku není možná přesná reprodukovatelnost. Pro lepší měření by bylo vhodné kroužek ponořit do objemové fáze a vytahovat nahoru. Po dosažení rozhraní je kroužek stahován zpět pomocí povrchového napětí indikované nárůstem negativní normálové síly v řádu 1 mN.

Pro obě geometrie byl zaznamenán nárůst viskoelastických modulů s rostoucí frekvencí deformace, kde dominoval ztrátový modul. Limitní frekvence je větší pro bikonální geometrii

(50 Hz) než pro Du Nouyho kroužek (5 Hz). To indikuje kompenzaci většího momentu setrvačnosti většími rozměry bikonálního disku, což znamená, že vyšší frekvence tohoto disku mohou být porovnány s kroužkem. Testy vykazují tixotropní chování kávového filmu. Ty jsou plně obnoveny po rozrušení stálým smykovým tokem. Vzájemným porovnáním bylo zjištěno, že pro měření slabých filmů je lepší používat bikonální geometrii.

Komplexní mnohobuněčné sestavy, jako jsou buněčné bakteriální biofilmy, jsou všudypřítomné a vyskytují se na řadě různých rozhraních (kapalina – pevná látka, kapalina – plyn a kapalina – kapalina). Bakterie, které žijí v biofilmu (což je jejich dominantní forma života) žijí v těchto multivrstvách, aby se chránili škodlivým vlivům okolí jako je UV záření nebo osmotický tok. Viskoelastická matrice se může skládat z extracelulární DNA, proteinů a polysacharidů. Kromě toho, bakterie jsou schopné tvořit adsorpční vrstvy nebo biofilmy uvnitř emulzních systémů. Bakterie, které tvoří vodní a olejové biofilmy, mají velmi rozmanitý metabolismus, což jim umožňuje využívat ropu jako zdroj uhlíku a vytváří film kolem kapiček oleje a tím zlepší vázání uhlíku. Biofilmy vytváří také například bakterie v trávicím traktu člověka.

Stávající techniky měření biofilmů jsou pro samotný biofilm destruktivní, proto se začala používat mezifázová reologie jako nedestruktivní metoda k charakterizaci biofilmů tvořených na rozhraní kapalina – vzduch za stálých podmínek. Tuto techniku si vybrali i autoři ve své práci [31], kde pro tvorbu biofilmů použili bakterie *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* a *Bacillus subtilis*. K měření používali smykový reometr a jako geometrii použili bikonální disk. Během měření se předpokládá, že tok na mezifázovém rozhraní je oddělen od proudu v objemové fázi, kdy je Boussinesqovo číslo  $Bo \gg 1$ . Prostřednictvím sinusových kmitů s definovanou deformací může být měřena stresová odpověď.

Pro vlastní měření byly bakterie kultivovány přímo v měřící nádobě. Během tvorby biofilmu byla zaznamenána časová závislost viskoelastických modulů při konstantní frekvenci oscilací a amplitudě deformace ( $\omega = 1 \text{ s}^{-1}$  a  $\gamma_0 = 0,1 \%$ ) pro sledování strukturních změn. Obě bakterie vykazovaly tvorbu biofilmu na mezifázovém rozhraní, protože elasticita se v průběhu času zvyšovala. V čase 15 – 20 hodin od začátku měření se elasticita mírně snížila, což bylo dáno metabolismem bakterií, které spotřebovaly glukózu přítomnou v mediu a tato teorie byla potvrzena i měřením pH. Po 20 h elasticita opět narostla a to z důvodu proteolytické aktivity, kdy bakterie vylučovaly amoniak, který způsobil nárůst hodnoty pH. Po 40 hodinách došlo k mírnému poklesu elasticity, které bylo přisouzeno životnímu cyklu biofilmu. Po této době totiž začínají bakterie hladovět, a protože není dodáno čerstvé medium, začínají degradovat vlastní biofilm. Elasticita ale nikdy neklesne na nulu díky proteinům, které se nevratně adsorbovaly na mezifázové rozhraní. V případě bakterie *B. subtilis* došlo k po 15 hodinách k nárůstu elasticity. Je to dáno tím, že vylučují surfaktin, látku, která je dobře známá jako biosurfaktant a která má antibakteriální účinky. Vylučování surfaktinu umožňuje bakterii dobře se šířit po mezifázovém rozhraní díky snížení povrchového napětí. Díky tomu bakterie vytváří silnější a tenčí biofilm.

Pro zjištění vlivu pH na biofilm byla do spodní fáze přidána kyselina chlorovodíková o koncentraci 0,25 M. Změna pH simuluje změny přírodních podmínek po utvoření biofilmu. V průběhu tvorby biofilmu dochází k přirozenému okyselení media díky metabolismu bakterií,

keré je následně vyrovnáno proteolýzou media. Nárůst pH vede k nárůstu elasticity biofilmu díky přitažlivým silám mezi molekulami proteinu. Po snížení pH na hodnotu 5, dochází ke snížení elasticity. Mezi molekulami dochází k tomu, že se sníží přitažlivost mezi molekulami přítomného proteinu a naopak převládá repulze. Hodnota pH má tedy velký vliv na elasticitu biofilmu.

Pro testování vlivu surfaktantů na biofilm byl použit Tween 20. Je to malá molekula, která se rychle adsorbuje na mezifázové rozhraní a vytváří komplex s existující proteinovou sítí. Na jednu stranu může solubilizovat protein do spodní vodní fáze, na druhou stranu může vytěsnit protein z rozhraní a efektivně snížit hodnotu povrchového napětí. Po několika přídavcích Tweenu 20 opravdu došlo k malému snížení elasticity, ale nikdy neklesla kompletně. Síť, která obsahuje mnoho dalších makromolekul, brání tomu, aby byla některá z nich odstraněna z mezifázového rozhraní. Přidání tohoto surfaktantu tedy stěží ovlivňuje elasticitu biofilmu.

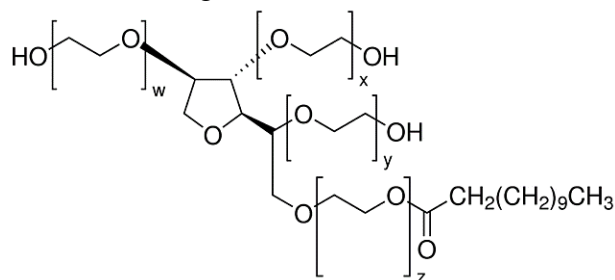
Autoři [32] pro studium bakteriálních filmů použili bakterie *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* a *Bacillus subtilis*. Ke zkoumání formování bakteriálních vrstev a biofilmů byl použit smykový reometr s bikonální geometrií. Pro měření tvorby bakteriální vrstvy byl použit časově závislý test s konstantní amplitudou deformace (0,5%) a konstantní frekvencí oscilací ( $0,5 \text{ s}^{-1}$ ). Amplituda deformace a frekvence oscilací byly nastaveny nízko, aby při sledování v průběhu času nedošlo k zničení filmu. Nejvíce elastický film tvořila bakterie *Pseudomonas putida*. Čím více elastická odpověď filmu, tím větší počet bakterií by měl být přítomen na rozhraní a tím více na sebe navzájem tedy působí. Kromě *E. coli* byly bakterie časem schopny vytvořit viskoelastický film, i když u některých to trvalo 2-3 týdny. Bakterie *E. coli* však nebyla schopna vytvořit viskoelastický film na rozhraní kapalina – olej vůbec, protože byly těžko schopné na tomto rozhraní adsorbovat. Kontrola adsorpce a tím tedy tvorba filmů je možná díky odhadu kontaminace hydrofobního rozhraní u bakterií, což je první krok k tvorbě biofilmů. Toho může být dosaženo například kontrolou pH nebo iontové síly.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

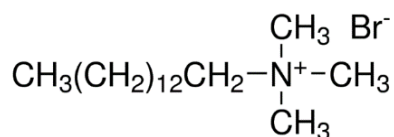
### 4.1 Použité chemikálie

Kapaliny: demineralizovaná voda (Milli-Q)  
toluen (Penta, číslo šarže: 150104)  
chloroform (Penta, číslo šarže: 2007200715)  
minerální olej

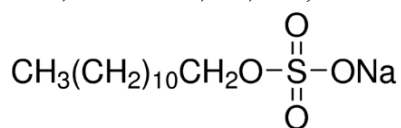
Tenzidy: Tween<sup>®</sup> 20, Sigma-Aldrich, CAS: 9002-64-5



TTAB, Fluka, >98 %, CAS: 1119-7-9-7



SDS, Lach-Ner, 26,6 %, kat. č. 30628



Bakteriální kmeny: *Cupriavidus necator* H16 (z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně)

*Cupriavidus necator* PHB<sup>-4</sup> (z Leibnitz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Braunschweig, Německo)

Pro kultivaci: Nutrient Broth, Himedia  
Agar powder, Bakteriologický, Himedia, CAS: 9002-18-0  
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , Lach-Ner, CAS: 10034-99-8, šarže: PP/2016/08960  
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ , Penta, CAS: 10028-24-7, šarže: 1904070414  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Lach-Ner, CAS: 7778-77-0, šarže: PP/2012/06960  
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , CAS: 7783-20-2

### 4.2 Použité přístroje

Reometr – ARG2 Rheometer (TA) Instruments  
DHR – Discovery Hybrid Rheometr (TA) Instruments (CMV)

Váhy Schaltec, SPB 42  
Předvážky, Kern EW 620-3NM  
Laminární box Aura mini, Bio Air Instruments (USA)  
Temperovaná třepačka, Heidolph Unimax 1010, Labicom s.r.o (ČR)  
Termostat, Biotech Julabo TW2

### 4.3 Příprava roztoků tenzidů

Pro každý používaný tenzid byla zjištěna kritická micelární koncentrace z webových stránek společnosti, ze kterých byly tenzidy zakoupeny. Následně byla sestavena koncentrační řada tenzidů, kdy se navážilo, resp. odpipetovalo (v případě tekutého zásobního roztoku Tweenu® 20) příslušné množství tenzidu a tato navážka byla rozpuštěna ve 200 ml demineralizované vody Milli-Q.

Tabulka 1: Hodnoty CMC a molekulové hmotnosti jednotlivých tenzidů [14]

Tenzid	Molekulová hmotnost [g/mol]	CMC [nmol/dm <sup>3</sup> ]
Tween® 20	1228	0,25
TTAB	336,41	4,5
SDS	288,38	8,2

Koncentrační řada pro každý tenzid byla zvolena tak, aby byly vždy dvě koncentrace pod kritickou micelární koncentrací, dvě nad kritickou micelární koncentrací a pak samotná hodnota CMC (konkrétně 0,1·CMC, 0,5·CMC, CMC, 5·CMC a 10·CMC). Tímto způsobem mělo být zjištěno, jak daná koncentrace ovlivňuje viskoelastické vlastnosti mezifázového rozhraní, zda dochází k nárůstu viskoelastických modulů a jak ovlivní vlastnosti mezifázového rozhraní přítomnost micel.

### 4.4 Příprava biofilmu

#### 4.4.1 Příprava inokula

Inokulum se pro kultivaci připravovalo do 100 ml Erlenmeyerových baněk, které obsahovaly 50 ml Nutrient Broth média (médium pro optimální růst na výživu náročnějších bakterií). Toto inokulum bylo zaočkováno bakteriologickou kličkou z agarové plotny, na které byly uchovány oživené, dříve lyofilizované kultury. Inokulum bylo ponecháno 24 hodin na temperované třepačce při 30 °C a následně jím bylo zaočkováno produkční médium.

#### 4.4.2 Příprava minerálního média a očkování

Minerální médium pro používané kmeny mělo následující složení:

Síran amonný	3 g
Dihydrogenfosforečnan draselný	1,02 g
Fosforečnan disodný (dodekahydrát)	11,1 g
Síran hořečnatý (heptahydrát)	0,2 g
Roztok stopových prvků*	1 ml

Fruktóza	20 g
Destilovaná voda	1000 ml

\*Složení roztoku stopových prvků

CaCl <sub>2</sub>	7,8 g
FeCl <sub>3</sub>	9,7 g
CuSO <sub>4</sub>	0,156 g
CoCl <sub>2</sub>	0,119 g
NiCl <sub>2</sub>	0,118 g
CrCl <sub>2</sub>	0,062 g
Destilovaná voda	1000 ml

Celkové složení živného média bylo přepočítáno na objem 100 ml a po navážení jednotlivých komponent byly složky rozpuštěny ve 100 ml destilované vody. Dále bylo připraveno minerální médium s přidavkem agarů o koncentraci 17 %. Všechny roztoky byly autoklávovány (121 °C, 20 minut). Roztoky fruktózy a stopových prvků se autoklávovaly při 115 °C po dobu 20 minut.

Po sterilaci bylo minerální médium ochlazeno na přibližnou teplotu 30 °C. Po ochlazení a sterilaci boxu UV zářením byly připraveny Petriho misky, do kterých bylo nalito horké médium s agarem, do kterého bylo přidáno 5 ml roztoku fruktózy o koncentraci 40 g/100 ml a 0,1 ml roztoku stopových prvků. Takto připravené médium se nechalo ztuhnout do následujícího dne.

Druhý den byly misky produkčního média očkované inokulem. Bylo pipetováno 0,1 ml z inokula a tento objem byl pomocí bakteriologické hokejky rozetřen po celém povrchu Petriho misky. Takto byly připraveny čtyři misky od každého bakteriálního kmene. Petriho misky byly obaleny parafilmem a ponechány v termostatu 72 hodin pro nárůst bakterií a vytvoření biofilmu.

Složení roztoku Nutrient Broth:

Hovězí extrakt	10g/l
NaCl	5 g/l
Pepton	10g/l
Agar	20g/l

## 4.5 Nastavení měření pro mezifázovou reologii

### 4.5.1 Nastavení výšky měřící geometrie

Pro měření mezifázové reologie byla použita bikonální geometrie a jako stator byla použita nádoba o objemu 226 ml. Pro zachování chemické inertnosti a pro snížení efektu menisku je nádoba vyrobena z poly(tetrafluoroethenu), PTFE, a bikonální disk z ocele s průměrem 68 mm a úhel sklonu je 10 °. Do nádoby bylo nalito vždy 100 ml demineralizované vody nebo roztoku tenzidů.

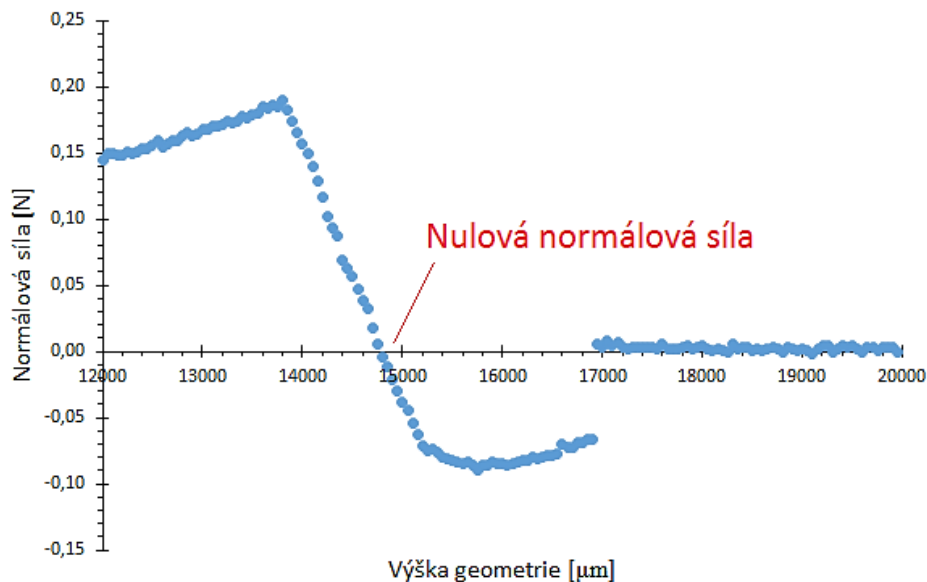
Pro nalezení správné polohy měřící geometrie se používá Squeeze/Pull off test. Před jeho nastavením se musíme ujistit, že v relaxačním kroku (Conditioning step) je vypnuta kontrola

teplotního režimu, vzhledem k tomu, že v případě stanovování mezifázových viskoelastických vlastností reometr neumožňuje definované kontrolování teploty.

Vlastní nastavení testu bylo následující: rychlost klesání geometrie bylo nastaveno na 20  $\mu\text{m/s}$  se zpožděním v jednotlivém kroku 1 s a vzdálenost, kterou geometrie urazila, byla nastavena na 8 000  $\mu\text{m}$ . Dále byla zvolena možnost komprese (aby bylo zajištěno, že měřící geometrie bude klesat).

Po nalití příslušné kapaliny do měřící nádoby byla výška geometrie manuálně nastavena tak aby v případě tohoto experimentu senzor pocházel následujícími vrstvami: Objem jedné kapaliny, mezifázové rozhraní kapalina-kapalina, objem druhé kapaliny vytvářející emulzi. Před zpuštění testu byla nastavena normálová síla působící na geometrii na nulovou hodnotu (aby nedocházelo k ovlivnění výsledků, protože jinak by byla celá závislost posunuta k vyšším, resp. k nižším hodnotám a rozhraní by se reálně nenacházelo v místě, kde závislost prochází nulou).

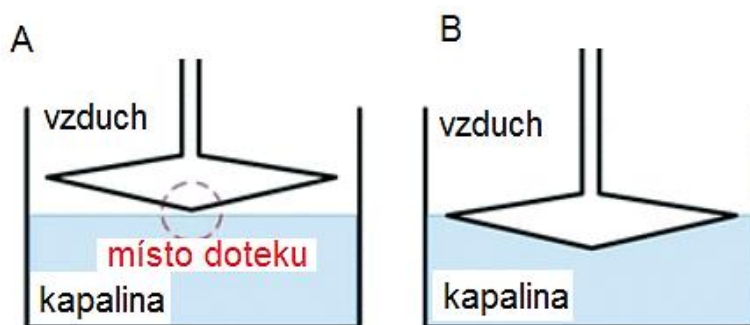
Po ukončení testu byl vynesena graf závislosti normálové síly na výšce měřící geometrie (Obrázek 20).



Obrázek 20: Závislost normálové síly na poloze senzoru od dna nádoby pro zjištění měřící polohy

Díváme-li se na závislost zprava doleva, z průběhu závislosti normálové síly na výšce měřící geometrie je patrný prudký pokles normálové síly k záporným hodnotám. V této výšce došlo k doteku bikonálního disku a mezifázového rozhraní vzduch – kapalina (Obrázek 21, A) a dochází k mírnému odporu rozhraní vůči měřící geometrii. Do této doby měřící geometrie procházela vrstvou vzduchu. Dále dochází k nárůstu normálové síly, protože průchodem měřící geometrie skrze mezifázové rozhraní dochází k dalšímu odporu rozhraní vůči geometrii vlivem povrchového napětí kapaliny. V místě, kde průběh závislosti normálové síly na výšce geometrie protíná nulu, leží měřící geometrie přesně na mezifázovém rozhraní a protichůdné síly se vyrovnají (Obrázek 21, B). Pokud se měřící geometrie dále snižuje, povrchové napětí kapaliny brání měřící geometrii v průchodu, a tudíž musí narůst síla, která tlačí geometrii konstantní rychlostí dolů. V průběhu závislost pak dochází k dalšímu bodu zlomu, kdy normálová síla

začíná opět klesat. V tomto bodě měřící geometrie překonala vliv povrchového napětí kapaliny a dále prochází jen objemovou fází.



Obrázek 21: Poloha senzoru

Je nutné dodržovat stanovený objem, tak, aby nebylo nutné stále hledat pozici rozhraní manuálně. Při změně objemu měřeného roztoku je nutné znova provést Squeeze/Pull off test. Experimentálně bylo zjištěno, že přidáme-li 1 ml kapaliny, změní se změřená pozice rozhraní zhruba o 275  $\mu\text{m}$ , proto se tato hodnota přičítá k hodnotě stanovení z grafu.

Po manuálním nastavení měřící geometrie lze přidat druhou kapalinu s menší hustotou a spustit oscilační nebo tokové testy.

#### 4.5.2 Nastavení testů pro roztoky tenzidů

Prvním testem, kterému bylo mezifázové rozhraní podrobena, byl test amplitudový deformační. Patří mezi dynamické oscilační testy. Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.1.6, při tomto testu se nastavuje stálá frekvence oscilací a mění se amplituda deformace, která na rozhraní působí. Cílem je získání LVO a z té poté vybrat vhodnou hodnotu amplitudy deformace pro další oscilační testy – frekvenční test. Nastavení bylo následující: amplituda deformace byla nastavena na rozmezí od 0,6 – 6000 %, frekvence oscilací byla nastavena na konstantní hodnotu 1 Hz, počet bodů na dekádu bylo zaznamenáváno 6 a všechna měření byla prováděna při laboratorní teplotě, tj. při teplotě 25 °C. Výstupem jsou závislosti fundamentálních viskoelastických parametrů  $G'$  a  $G''$  – paměťový a ztrátový modul v závislosti na amplitudě deformace). Tyto závislosti jsou uvedeny v kapitole Diskuze a výsledky, konkrétně pak v kapitole 5.2.1.

Dalším oscilačním testem byl test frekvence oscilací. Pro ten byla vybrána amplituda deformace na hodnotu 0,6 %, frekvence byla nastavena na rozmezí 0,01 – 100 Hz, bylo zaznamenáváno 6 bodů na dekádu a všechna měření byla opět měřena při teplotě 25 °C. I z tohoto testu jsou výstupem paměťový a ztrátový modul v závislosti na frekvenci oscilací.

Posledním testem bylo zjištění viskozity mezifázového rozhraní. Název toho testu je Flow steady state step a na rozdíl od předchozích oscilačních testů, kde se zaznamenávají viskoelastické moduly v závislosti na amplitudě deformace, resp. na frekvenci oscilací, se u tohoto testu zaznamenává závislost viskozity na použité smykové rychlosti (zde se tedy jedná o tokové testy, ne oscilační a výsledkem je toková křivka). Smyková rychlost byla nastavena



na rozmezí 0,1 – 1000 [1/s]. Maximální odchylka třech po sobě následujících bodů při jedné smykové rychlosti byla nastavena na hodnotu 5 %. Počet bodů na dekádu bylo 6.

#### 4.6 Nastavení teplotních ramp pro měření biofilmů

Motivace pro tento typ testu je odpověď bakterií na změnu teploty. Jak již bylo řečeno, k měření byly používány dva bakteriální kmeny. Jeden bakteriální kmen tvořící polymer PHB a druhý bakteriální kmen, který tento polymer tvořit neumí. Při tomto testu budou porovnávány jednotlivé viskoelastické vlastnosti v závislosti na působící nízké teploty. Předpokladem je, že bakteriální kmen tvořící polymer PHB by měl být proti mrazu odolnější, než bakteriální kmen, který PHB netvoří. Zároveň celková hodnota viskoelastických modulů by měla být pro kmen H16 (tvořící PHB) vyšší než pro kmen PHB<sup>-4</sup> (netvořící PHB) už díky přítomnosti polymeru.

Pro tato měření byly kultivovány biofilmy obou používaných bakteriálních kmenů podle kapitoly 4.4. Kolonie bakterií, které vyrostly na minerálním médiu, byly naneseny na měřící senzor tak, že z agaru bylo pomocí špachtle naneseno malé množství biofilmu, které bylo rovnoměrně rozprostřeno jak na měřící senzor, tak i na měřící desku. Výška měřící geometrie byla nastavena na 100  $\mu\text{m}$  vzhledem k různým velikostem bakteriálních buněk (*Cupriavidus necator* dosahuje délky zhruba 25  $\mu\text{m}$ ) a vzhledem k tomu, že se jedná o buněčné kolonie. Nejedná se zde tedy o mezifázovou reologii, ale jde o klasické reologické měření.

Pro zjištění viskoelastických vlastností biofilmu, byly měřeny teplotní rampy, kdy teplotní rozsah byl zvolen od 2,5 °C až do teploty -12,5 °C. Pro zajištění dostatečné teploty jak měřící desky, tak hlavně měřeného vzorku, byly nastaveny mezi jednotlivými teplotními rampami relaxační kroky, aby bylo zajištěno dostatečné prohřátí, resp. promrznutí vzorku. Amplituda deformace byla zvolena na 0,5 % z předchozích zkušeností a s respektem k biologickému původu vzorku (tak, aby nedošlo k destrukci buněčné struktury). Frekvence oscilací byla fixně stanovena na 1 Hz. Jako senzor byla použita ocelová geometrie typu deska/deska s průměrem 20 mm.

Konkrétní nastavení testů bylo následující:

Conditioning step: 2,5 °C po dobu tří minut

1. rampa: teplotní rozsah: 2,5 °C  $\rightarrow$  -12,5 °C,  $\gamma = 0,5 \%$ ,  $f = 1 \text{ Hz}$

Conditioning step: -12,5 °C po dobu tří minut

2. rampa: teplotní rozsah: -12,5 °C  $\rightarrow$  2,5 °C,  $\gamma = 0,5 \%$ ,  $f = 1 \text{ Hz}$

Conditioning step: 2,5 °C po dobu tří minut

3. rampa: teplotní rozsah: 2,5 °C  $\rightarrow$  -12,5 °C,  $\gamma = 0,5 \%$ ,  $f = 1 \text{ Hz}$

Conditioning step: -12,5 °C po dobu tří minut

4. rampa: teplotní rozsah: -12,5 °C  $\rightarrow$  2,5 °C,  $\gamma = 0,5 \%$ ,  $f = 1 \text{ Hz}$

Pro tato měření byl použit Discovery Hybrid Rheometr od firmy TA Instruments z Centra materiálového výzkumu díky lepší teplotě měřící desky a citlivějšímu záznamu.

#### 4.7 Nastavení testů pro měření biofilmů

Na naší fakultě už několik let probíhá projekt spojený s využitím bakterií k přeměně použitého oleje na využitelný odbouratelný plast. Vlastnosti bakteriálního kmene, který tento polymer produkuje, jsou známé z literárních rešerší a také z bohatých zkušeností spojených s prací s tímto bakteriálním kmenem. Nicméně mechanické vlastnosti těchto bakterií nebyly ještě zcela prozkoumány, proto se další část mé práce zabývá zjištěním viskoelastických vlastností biofilmů tvořených bakteriemi H16. Pro srovnání výsledků byl měřen i biofilm bakteriálního kmene netvořícího polymer PHB.

Pro tato měření byly biofilmy opět kultivovány podle kapitoly 4.4 na Petriho miskách, protože kultivace na pevném médiu je jednodušší než kultivace v kapalném médiu a pokud bychom chtěli i zde použít mezifázovou reologii způsobem, kterým bylo doposud měřeno, musely by se bakteriální kmeny kultivovat přímo v měřicí nádobě, což by bylo obtížné. Na pevném médiu se tak vytvořila fáze agaru, na kterém ležela vrstva biofilmu. Pomocí skalpelu byla z misky vyříznuta část vzorku, velikostně odpovídající průměru používaného senzoru a tento vzorek byl přenesen na měřicí desku. Výška senzoru byla manuálně nastavena tak, aby se senzor dotýkal povrchu vzorku a zároveň aby nedošlo k mechanickému poškození vzorku.

Jako senzor byla opět použita ocelová geometrie typu deska/deska s průměrem 40 mm. Před každým měřením byl vzorek temperován na 25 °C po dobu tří minut. Nastavení oscilačních testů bylo následující: pro měření amplitudy deformace bylo nastaveno rozmezí 0,01 – 1 000 %. Frekvence oscilací byla nastavena na neměnnou hodnotu 1 Hz. Počet bodů na dekádu bylo zaznamenáváno 6 a všechna měření byla prováděna při laboratorní teplotě, tj. při teplotě 25 °C. Výstupem toho testu je závislost fundamentálních viskoelastických parametrů, tj. paměťového a ztrátového modulu  $G'$  a  $G''$  na amplitudě deformace. Pro měření frekvence oscilací bylo nastaveno rozmezí frekvence 0,01 – 20 Hz a amplituda deformace byla zvolena z předchozího testu na hodnotu 0,5 %. Počet bodů na dekádu bylo zaznamenáváno 6 a všechna měření byla prováděna při laboratorní teplotě. Výstupem toho měření je závislost paměťového a ztrátového modulu na frekvenci oscilací. Pro tento tyto vzorky byl měřen i tokový test Flow steady state. Smyková rychlost byla nastavena na rozmezí 0,1 – 1000 [1/s]. Maximální odchylka třech po sobě následujících bodů při jedné smykové rychlosti byla nastavena na hodnotu 5%. Počet bodů na dekádu bylo zaznamenáváno 6, měření bylo prováděno při 25 °C. Výstupem toho měření je toková křivka závislosti viskozity na smykové rychlosti.

## 5 DISKUZE A VÝSLEDKY

### 5.1 Optimalizace metody mezifázové reologie (kapalina – kapalina)

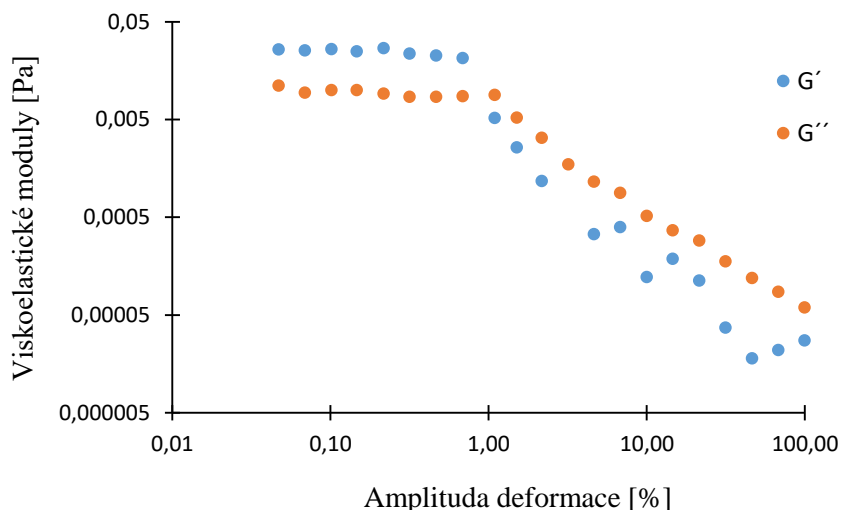
Pro vytvoření mezifázového rozhraní jsme nejprve zvolili dvě vzájemně nemísitelné kapaliny. Vzhledem k hustotě vody ( $\rho = 0,998 \text{ g/cm}^3$  [33]) jsme použili kapalinu s menší hustotou než je voda a to toluen s hustotou  $\rho = 0,8669 \text{ g/cm}^3$  [33] a chloroform s hustotou  $\rho = 1,48 \text{ g/cm}^3$  [33], který je se svou hustotou těžší než voda. K těmto měřením byl jako senzor používán Du Noüyho kroužek z platiny a iridia. Do skleněné měřicí nádoby bylo nalito 50 ml kapaliny s větší hustotou a výška měřicího senzoru byla nastavena manuálně tak, aby senzor ležel na rozhraní kapaliny a vzduchu. Pro tento senzor bohužel nelze použít Squeeze/Pull off test jako v případě bikonální geometrie, protože používaný reometr není tak citlivý, aby zaznamenal nárůst normálové síly při průchodu senzoru rozhraním.

Nejdříve byl testován vliv objemu lehčí kapaliny na výsledné viskoelastické vlastnosti. Na hladinu těžší kapaliny (vody), kde byl umístěn měřicí senzor, se kapátkem nanasla souvislá tenká vrstva lehčí kapaliny (toluenu) tak, aby v této vrstvě nebyly bubliny a vytvořila se vrstva zhruba 1 mm široká pomocí kapátka o objemu 10 ml. Pro takto připravené mezifázové rozhraní byly měřeny oscilační testy, jejichž nastavení je uvedeno v kapitole 4.5.2.

Dalším experimentem byla příprava mezifázového rozhraní tak, že poměr obou nemísitelných kapalin byl stejný. Do skleněné měřicí nádoby bylo nalito 20 ml vody, na hladinu byl manuálně umístěn měřicí senzor a poté bylo přidáno 20 ml toluenu a pro tento systém byly měřeny oscilační testy. Z výsledků měření vyplynulo, že větší objem kapaliny s nižší hustotou nepříznivě ovlivňuje výsledky měření a pro další měření bude menší objem lehčí fáze vhodnější.

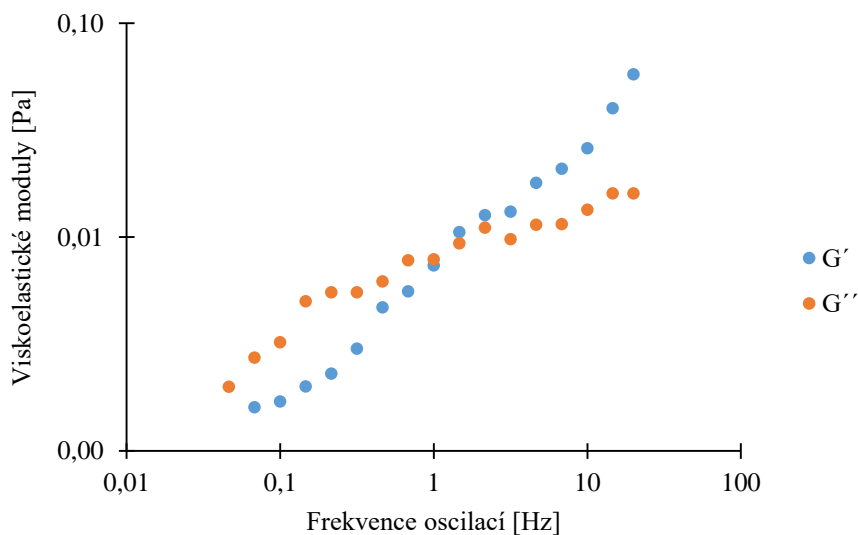
Dalším experimentem byl vliv teploty na mezifázové rozhraní. Pomocí vodní lázně byly obě nemísitelné kapaliny zahřáty na požadovanou teplotu, bylo připraveno mezifázové rozhraní s umístěným měřicím senzorem a byly zpuštěny oscilační testy. Nicméně vzhledem k nedostatečné teplotě měřicí nádoby nedošlo k ustálení teploty na požadovanou hodnotu. Během měření klesla teplota obou měřených kapalin na laboratorní teplotu a nemohl být tak studován vliv vyšší teploty na viskoelastické vlastnosti rozhraní. Pro zajištění teploty byla měřicí nádoba vložena do větší kádinky s horkou vodou, ale ani toto řešení nebylo pro ustálení teploty na požadovanou hodnotu vhodné. Pro studování vlivu teploty na viskoelastické vlastnosti by proto bylo vhodné použití dvou nádob s vnější vyhřívanou cirkulací vody.

Po optimalizaci přípravy mezifázového rozhraní byl studován vliv různých nemísitelných kapalin na viskoelastické vlastnosti jimi vytvořených mezifázových rozhraní. Jak již bylo zmíněno výše, nejprve bylo připraveno rozhraní demineralizovaná voda – toluen a pro srovnání výsledků také rozhraní demineralizovaná voda – chloroform.



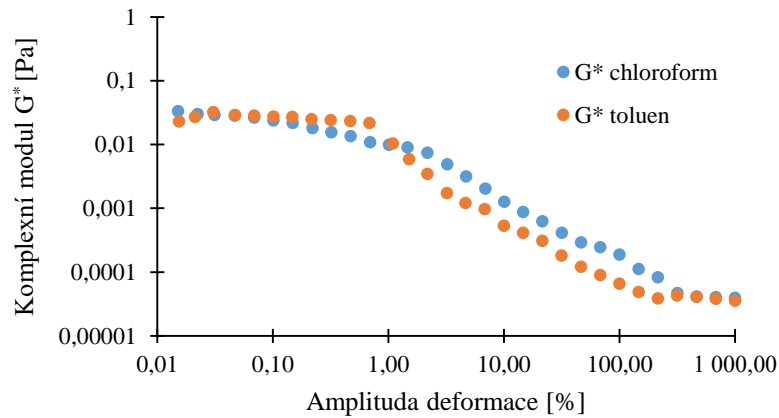
Obrázek 22: Graf závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace pro rozhraní voda – toluen

Obrázek 22 zobrazuje závislost viskoelastických modulů na amplitudě deformace. Při aplikované amplitudě deformace v rozmezí 0,05 – 1 % vykazuje mezifázové rozhraní toluen – voda viskoelastický charakter s převahou elasticity. Tím pádem se v tomto rozmezí amplitudy deformace chová elasticky. Je to oblast nazývaná jako lineární viskoelastická oblast (LVO). Z této oblasti byla vybrána vhodná amplituda deformace pro frekvenční testy a to konkrétně hodnota 0,6 % amplitudy deformace. Po překročení 1 %-tní amplitudy deformace docházelo k nevratné deformaci mezifázového rozhraní, což se v závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace projevilo tím, že docházelo k poklesu obou modulů a navíc ztrátový modul převyšoval paměťový. To znamená, že mezifázové rozhraní reagovalo na použitou deformaci viskózně.



Obrázek 23: Graf závislosti viskoelastických modulů na frekvenci oscilací pro rozhraní voda – toluen

Ze závislosti viskoelastických modulů na frekvenci oscilací je patrný cross – point při frekvenci oscilací odpovídající hodnotě 1 Hz. Při nižších frekvencích oscilací mezifázové rozhraní vykazuje viskoelastický charakter s převahou ztrátového modulu  $G''$ . Při vyšších frekvencích oscilací než 1 Hz paměťový modul  $G'$  převyšuje modul ztrátový a proto mezifázové rozhraní vykazuje viskoelastické chování s převahou elasticity.

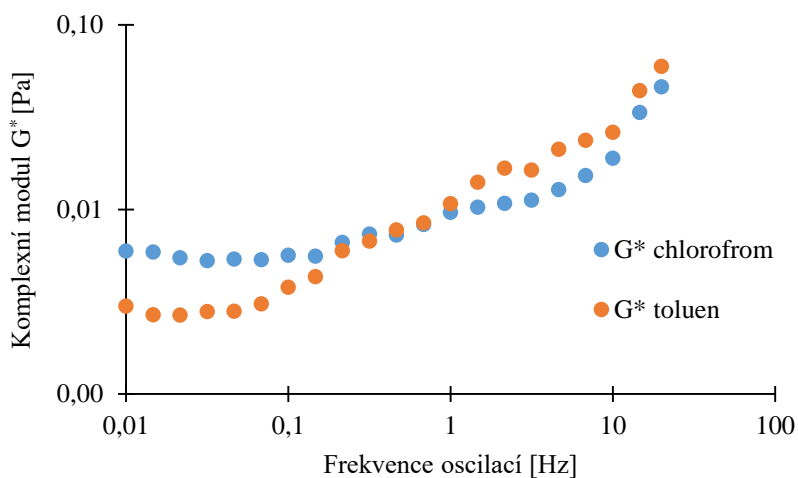


Obrázek 24: Srovnání komplexních modulů pro obě používané kapaliny (závislost komplexního modulu na amplitudě deformace)

Obrázek 24 zobrazuje závislost komplexního modulu na amplitudě deformací. Komplexní modul je zde použit pro přehlednost grafů. Je dán vztahem:

$$G^* = \sqrt{G'^2 + G''^2} \quad (34)$$

Toluen vykazuje menší změnu komplexního modulu při nižších hodnotách amplitudy deformace a v rozmezí aplikované amplitudy deformace 0,1 – 1 % je průběh lineární a jeho odezva tedy vykazuje viskoelastický charakter s převahou elasticity. Je to dáno nejspíše tím, že ve své struktuře toluen obsahuje benzenové jádro, molekula je oproti chloroformu strukturně větší a dá se tedy očekávat, že bude lépe odolávat mechanickému namáhání.



Obrázek 25: Závislost komplexního modulu na frekvenci oscilací pro obě používané kapaliny

Z průběhu grafu na Obrázek 25 je patrné, že při nízkých hodnotách frekvence oscilací je průběh lineární do hodnoty 0,1 Hz a se zvyšující se frekvencí oscilací dochází k mírnému nárůstu komplexních modulů pro obě používané kapaliny.

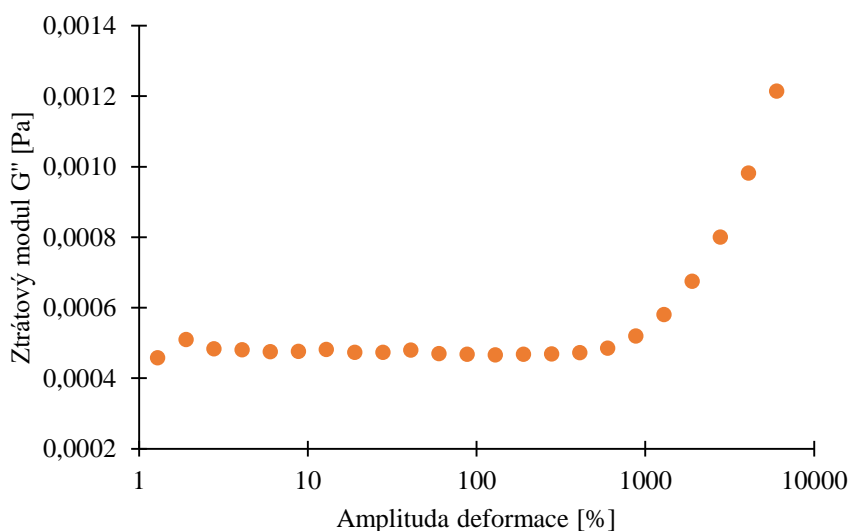
## 5.2 Optimalizace pro rozhraní kapalina - vzduch

### 5.2.1 Tenzidy – porovnání vlivu koncentrace

Při zavádění nové metody je potřeba tuto metodu vyzkoušet na jednoduchých modelových systémech, u kterých víme, jak by se měly chovat a porovnáním předpokladu s výsledky pak můžeme vyhodnotit, do jaké míry se náš předpoklad naplnil. K tomuto účelu jsme si vybrali tři tenzidy, se kterými máme na fakultě již bohaté zkušenosti.

Pro sledování vlivu koncentrace tenzidů na viskoelastické vlastnosti mezifázového rozhraní byla pro každý tenzid sestavena koncentrační řada tak, aby koncentrace tenzidů byla pod kritickou micelární koncentrací, samotná hodnota kritické micelární koncentrace a koncentrace vyšší než CMC. Vypočítané navážky všech tenzidů byly rozpuštěny v příslušném objemu demineralizované vody a tento roztok byl použit jako první objemová fáze. Druhou objemovou fází tvořil vzduch, jednalo se tedy o mezifázové rozhraní typu kapalina – vzduch.

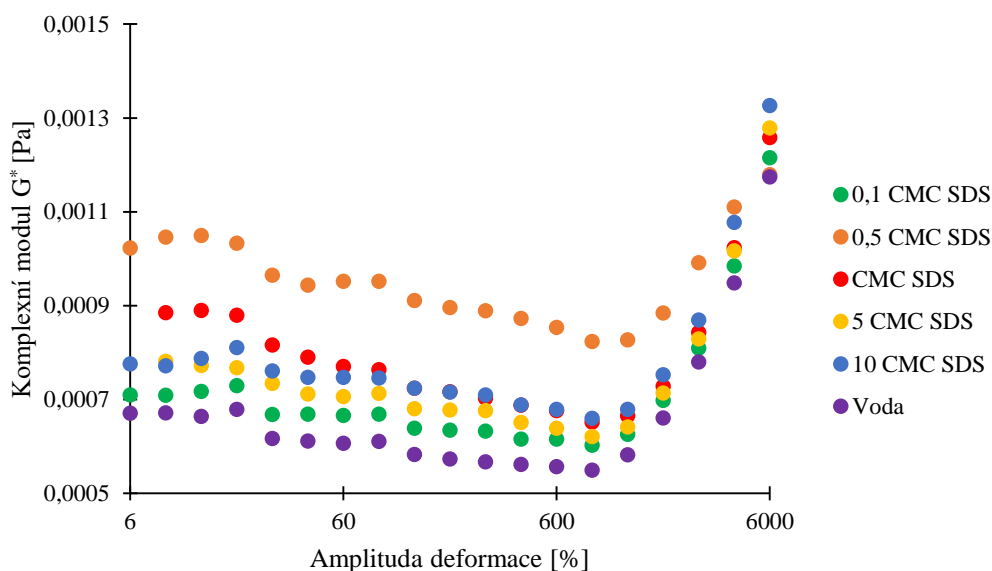
Jako příklad jsou zobrazeny závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace pro koncentrační řadu SDS.



Obrázek 26: Závislost ztrátového modulu na amplitudě deformace pro 0,1 CMC SDS

Z průběhu Obrázek 26 je patrné, že v celém rozsahu použité deformace se projevuje pouze ztrátový modul. Takovýto průběh závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformací byl naměřen pro všechny zkoumané koncentrace (viz Obrázek 27). Hodnoty ztrátového modulu se pro použitou amplitudu deformace v rozmezí 1 – 500 % se nemění a průběh je v tomto rozmezí lineární. Po překročení 500 %-tní hodnoty amplitudy deformace dochází k nárůstu ztrátového modulu. Mezifázové rozhraní má tedy v použitém rozmezí amplitudy deformace viskózní charakter.

Předpoklad byl, že s rostoucí koncentrací tenzidů na mezifázovém rozhraní by mělo dojít k snižování viskoelastivity, protože přítomnost tenzidů snižuje povrchové napětí. Snižování viskoelastivity probíhá do doby, kdy se koncentrace tenzidů na povrchu rovná kritické micelární koncentraci. V tomto bodě dojde k vytvoření micel, ale na mezifázovém rozhraní zůstanou i volné molekuly tenzidů. Po překročení CMC by k dalšímu snižování viskoelastivity docházet nemělo.



Obrázek 27: Závislost komplexních modulů na amplitudě deformace pro koncentrační řadu SDS

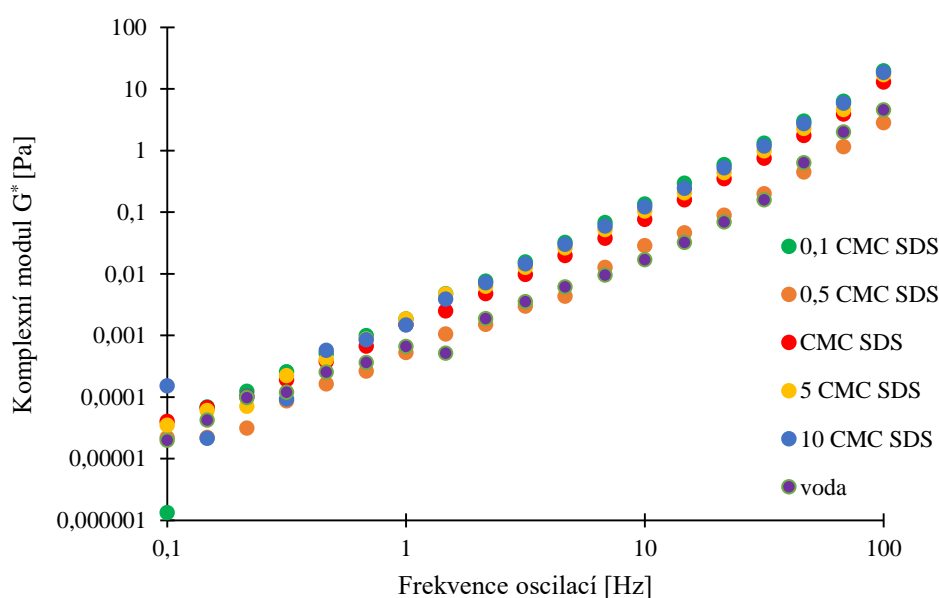
Z průběhu grafu závislosti komplexních modulů na použité amplitudě deformace pro koncentrační řadu tenzidu SDS je patrný lineární průběh pro aplikovanou amplitudu deformace v rozmezí 6 – 600 %. Po překročení 600 %-tní amplitudy deformace následuje nárůst hodnot komplexních modulů u všech použitých koncentrací SDS. Je to dáno převahou ztrátového modulu  $G''$  nad paměťovým  $G'$ .

První předpoklad se nenaplnil, protože všechny použité koncentrace tenzidu SDS vykazují vyšší hodnoty komplexních modulů, než jaký vykazuje voda. U koncentrace  $0,5 \cdot \text{CMC}$  SDS dokonce hodnota komplexního modulu nabývá nejvyšších hodnot. Pro tyto výsledky jsou možné dvě vysvětlení. Buď se jedná o chybu měření, nebo samotná přítomnost molekul na rozhraní zvyšuje viskoelastické moduly neohledě na jejich účinek (a to snižování povrchového napětí). Po překročení kritické micelární koncentrace pak nejsou mezi studovanými koncentracemi patrné velké rozdíly. Může to být způsobeno špatnou citlivostí přístroje (protože malé molekuly, jako jsou tenzidy, mají velmi nízké hodnoty viskoelastických modulů a proto je těžké je měřit [34], ale dají se zvýšit například přidáním dodekanolu ve směsi s SDS, kdy při hodnotách koncentrace kolem CMC povrchová vrstva obsahuje jednu molekulu dodekanolu na molekulu SDS [35]) nebo tím, že micely vytvořily bariéru mezi objemovou fází a mezifázovým rozhraním a volné molekuly tenzidu se tak nemohly na rozhraní adsorbovat a zůstaly proto v objemové fázi.

Tabulka 2: Komplexní moduly jednotlivých koncentrací SDS pro jednu vybranou amplitudu deformace (88 % z LVO)

Koncentrace SDS [M]	Komplexní modul [mPa]
0,1 CMC	0,669
0,5 CMC	0,952
CMC	0,763
5 CMC	0,713
10 CMC	0,746

Tabulka 2 ukazuje trend závislosti komplexního modulu na koncentraci SDS. Z ní vyplývá, že těsně před kritickou micelární koncentrací je komplexní modul nejvyšší a po vytvoření micel k výraznější změně komplexních modulů nedochází, což podporuje předchozí dedukci, že po překročení CMC by nemělo docházet k výrazné změně viskoelastických vlastností.

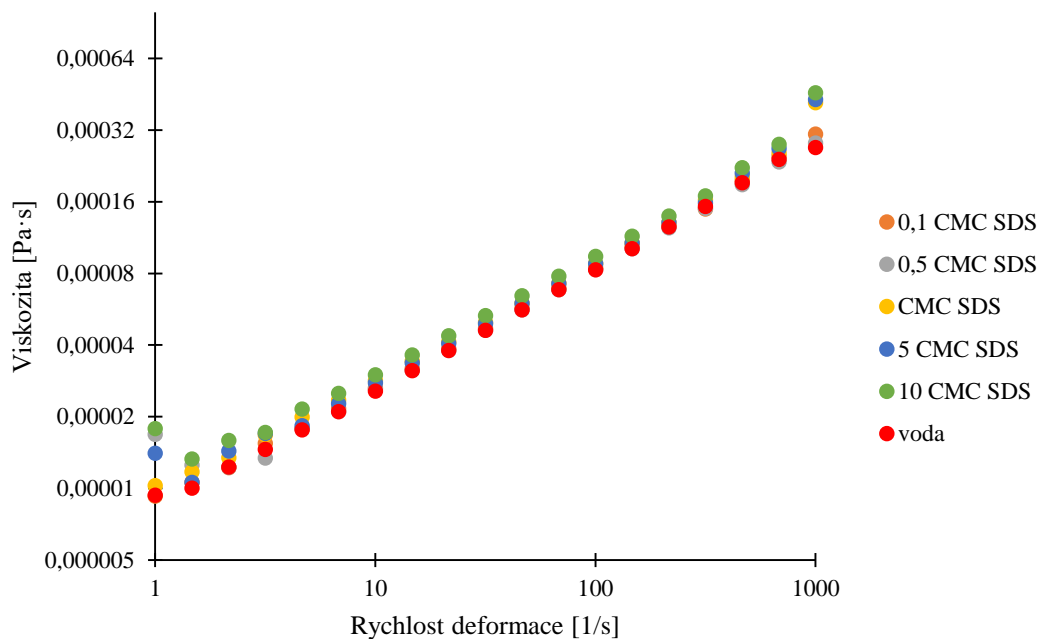


Obrázek 28: Závislost komplexního modulu na frekvenci oscilací

Komplexní moduly všech použitých koncentrací vykazují lineární nárůst napříč celým použitým rozmezím frekvencí oscilací.

Předpokládá se, že vzrůstající závislost komplexních modulů na frekvenci oscilací je dáno dvěma procesy na rozhraní. Jedním z nich je výměna tenzidu mezi objemovou fází a rozhraním a druhým je konformační změna tenzidu. Při aplikaci určitého namáhání (zde frekvence oscilací) se mohou molekuly rozpouštět do objemové fáze a obnoví se rovnovážný stav na rozhraní. Při nízkých frekvencích oscilací je dostatek času k pro dosažení rovnováhy. Při vyšších frekvencích však není dostatek času k ustálení rovnováhy. Komplexní moduly jsou vyšší, protože adsorbovaná vrstva tenzidů je chová jako nerozpustná monovrstva. Proto se komplexní moduly s rostoucí frekvencí oscilací zvyšují [36].



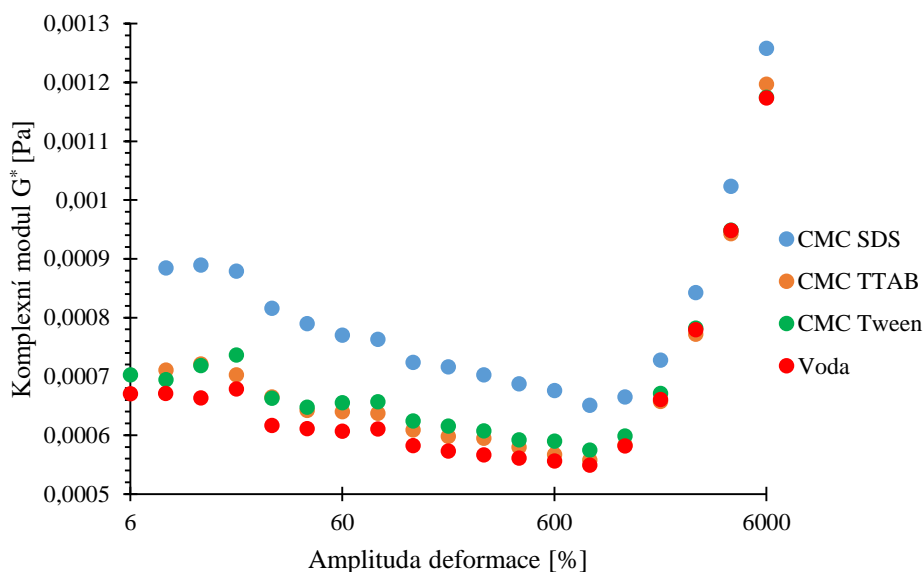


Obrázek 29: Závislost viskozity na rychlosti deformace pro koncentrační řadu SDS

Na Obrázek 29 je vynesena toková křivka závislosti viskozity na rychlosti působící deformace. Z té vyplývá, že co se tokových vlastností týče, přítomností tenzidů nedochází k ovlivnění viskozity a nedochází tedy k žádné změně oproti vodě. Přítomnost molekul tedy nemá vliv na výslednou viskozitu mezifázového rozhraní.

### 5.2.2 Tenzidy – vzájemné porovnání použitých tenzidů

Další aspekt, který dále ovlivňuje viskoelastické vlastnosti mimo koncentrace tenzidů je samotná struktura a chování tenzidu. Pro posouzení vlivu náboje tenzidu na viskoelastické vlastnosti mezifázového rozhraní byly vybrány tři tenzidy – kationtový TTAB, aniontový SDS a neionogenní Tween.

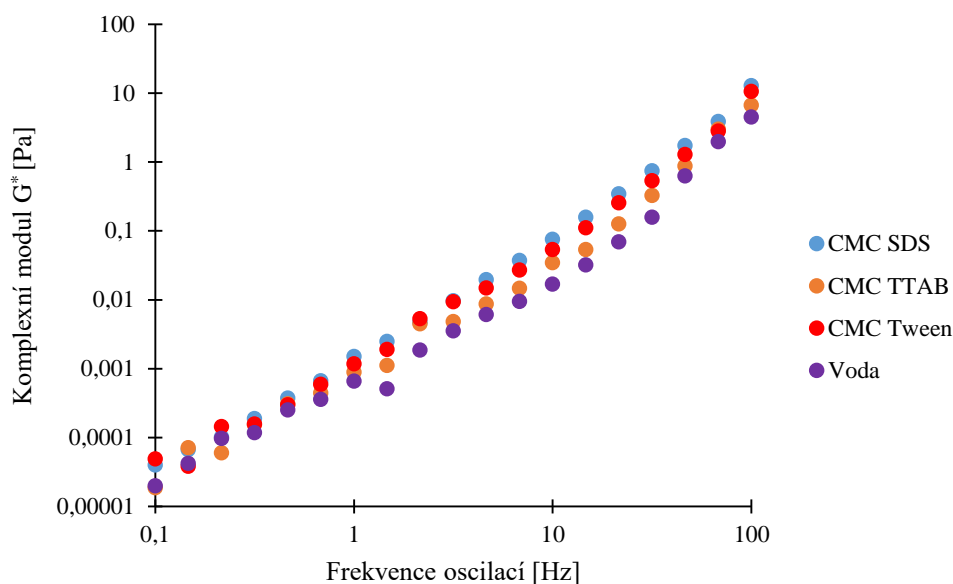


Obrázek 30: Závislost komplexního modulu na amplitudě deformace pro různé tenzidy

Ze závislosti uvedené na Obrázek 30 vyplývá, že kationtový TTAB a neionogenní Tween se svými hodnotami komplexních modulů od samotné demineralizované vody příliš nelišily. Nárůst hodnoty  $G^*$  je patrný pouze u aniontového tenzidu SDS. Může to být dáno tím, že strukturně se jedná o malou molekulu a její adsorpce na povrch je tedy rychlejší než u složitějších struktur. Pro další měření by bylo vhodné použít více záporně nabitých tenzidů pro posouzení vlivu negativního náboje na viskoelastické vlastnosti.

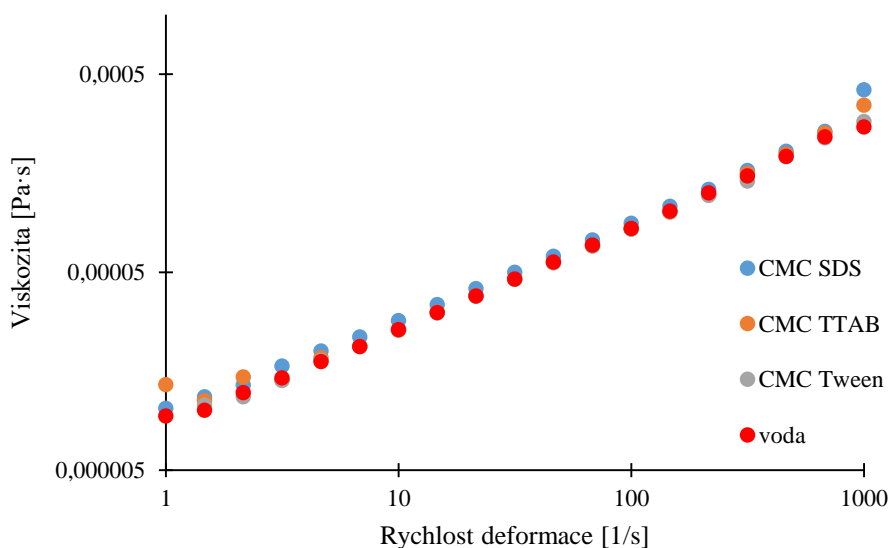
Pokud ale vytvoříme směs dvou opačně nabitých tenzidů, vytvoří struktury podobné fosfolipidům. Jejich polární skupina je složena ze dvou opačně nabitých skupin, které nejsou kovalentně vázány. Kromě toho snížení povrchového napětí směsi je větší, než při jejich působení odděleně. To je způsobeno silně přitažlivými elektrostatickými interakcemi mezi molekulami. Při měření viskoelastických vlastností bylo zjištěno, že při nízkých frekvencích oscilací je viskoelastické chování charakterizováno převahou ztrátového modulu. Při frekvenci oscilací, jejíž hodnota se rovná  $0,1 \text{ s}^{-1}$ , došlo ke cross – pointu, kdy paměťový modul převládal nad ztrátovým a toto rozhraní tedy vykazovalo elastické chování [37].

Podle [38] závisí viskoelastické chování mezifázového rozhraní pouze na tom, zda jsou tenzidy rozpuštěny ve vodné nebo v olejové fázi.



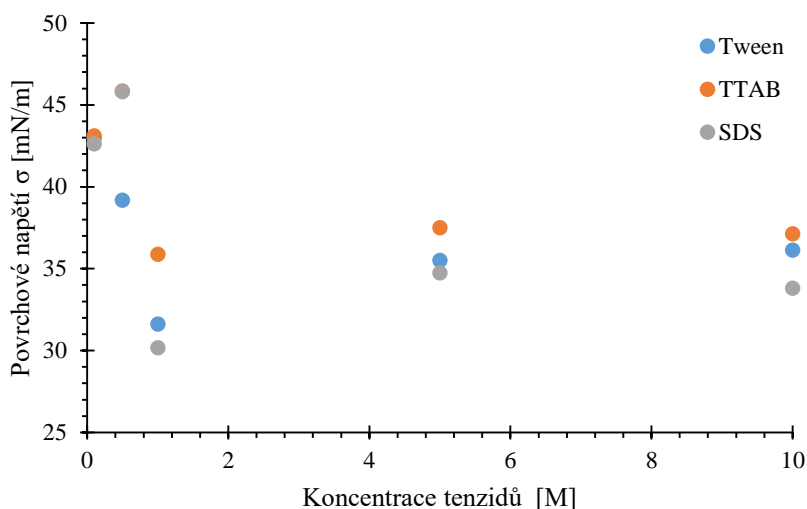
Obrázek 31: Závislost komplexního modulu na frekvenci oscilací pro různé tenzidy

Ze závislosti komplexních modulů na frekvenci oscilací opět nejsou patrné větší rozdíly hodnot oproti demineralizované vodě. Při nižších frekvencích oscilací je průběh všech závislostí totožný, k menším rozdílům dochází po překročení frekvence oscilací s hodnotou 1 Hz stejně jako na Obrázek 29.



Obrázek 32: Závislost viskozity na rychlosti deformace pro CMC použitých tenzidů

Ze závislosti viskozity na rychlosti deformace vyplývá, že hodnoty viskozity jsou pro každý tenzid stejné a s vodou prakticky totožné. Navíc vzhledem k nízkým hodnotám viskozity se pohybujeme na mezi detekce přístroje. Ani přítomnost tenzidů s různým náboj nemá tedy na výslednou viskozitu mezifázového rozhraní vliv.



Obrázek 33: Závislost povrchového napětí na koncentraci tenzidů

Z tenziometrie, kde graf závislosti povrchového napětí na koncentraci tenzidu je znázorněn na Obrázek 33, je patrné, že ani u této metody nedochází k velkým rozdílům naměřených hodnot. Největší rozptyl je patrný u nízkých koncentrací. Jelikož povrchové napětí vody je 72,75 mN/m vidíme značné snížení po přidání tenzidů. Nejpatrnější je to u SDS, kdy došlo ke snížení povrchového napětí až na hodnotu 30,169 mN/m a to při kritické micelární koncentraci ( $8,2 \cdot 10^{-3}$  M), což je nejnižší mezi porovnávanými tenzidy (zároveň u všech došlo ke snížení  $\sigma$ ). Pokud tyto výsledky srovnáme s grafem na Obrázek 30, vidíme nárůst komplexního modulu v závislosti na amplitudě deformace. Z těchto dat se dá usuzovat, že přidání anionického tenzidu zvyšuje hodnotu ztrátového modulu a více snižuje hodnotu povrchového napětí v porovnání s ostatními tenzidy. Naopak pokud bylo přidáno 0,5 CMC SDS a TTAB, je hodnota nejvyšší a to 45,82 mN/m, resp 45,85 mN/m.

### 5.3 Biofilmy – teplotní rampy

V 19. století britský přírodovědec Charles Darwin založil evoluční biologii. V ní je hlavním hybatelem evolučního vývoje organismů mimo jiné přírodní výběr, jejímž základní zákon zní: silnější vyhrává. Ve světě bakterií by se dalo říct, že lépe geneticky vybavený vyhrává. Neboli větší šanci na přežití má ta bakterie, která se dokáže lépe a rychleji přizpůsobit vnějším podmínkám a hlavně jejich změně. Při změně vnějších podmínek dochází ke stresu bakterií, a pokud se bakterie nedokážou přizpůsobit, jednotlivé buňky a celé kolonie zanikají. Proto si bakterie během svého vývoje vyvinuly řadu mechanismů, kterými odolávají stresu. Jedním z nich je například výroba látek, které v případě stresu slouží jako zásobní látky, ze kterých bakterie dokáže uvolnit energii potřebnou k vlastnímu přežití. Někdy už samotná přítomnost těchto látek poskytuje buňkám výhodu oproti jiným buňkám, které tyto látky syntetizovat neumí.

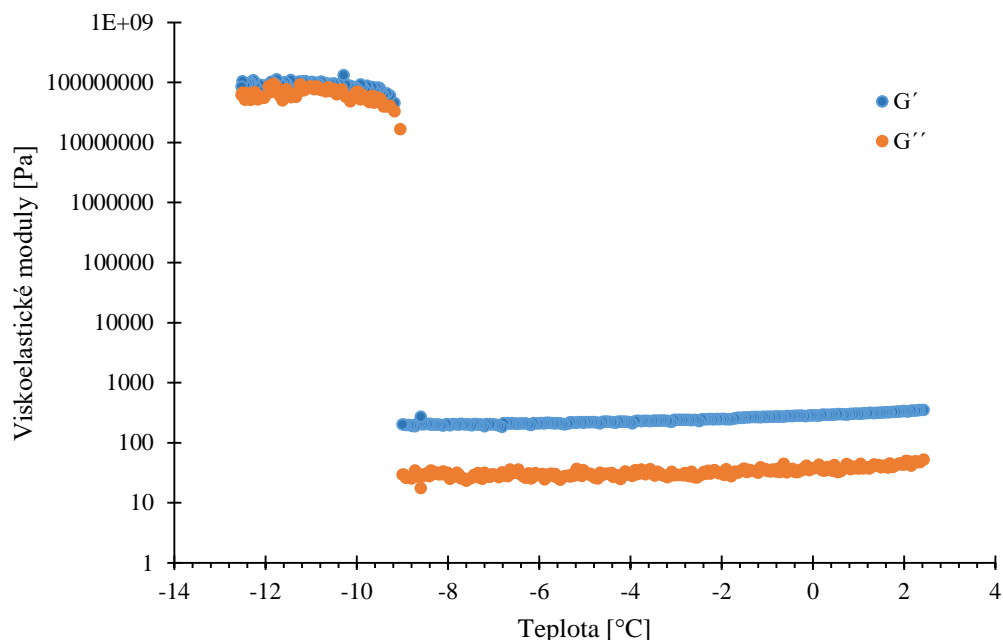
Cílem tohoto měření bylo ověřit viskoelastické vlastnosti dvou bakteriálních kmenů v závislosti na působícím stresu a to konkrétně na teplotním šoku. Předpokladem je, že bakterie schopné tvořit polymer PHB odolají mrazu lépe, než bakterie, které tento polymer nejsou

schopny syntetizovat a dále, že dojde k menším strukturním poškozením uvnitř buňky a že buňka po odeznění stresu dokáže obnovit své životní pochody a bude schopna další existence.

Zmrazení způsobuje tvorbu ledových krystalů v buňkách, které jednak zvětšují svůj objem, ale také mají ostré hrany, díky kterým trhají buněčné struktury. Dále dochází k vymrzání vody z cytoplasmy, což způsobuje velmi rychlé zahuštění buněčného roztoku, který může mít nakonec tak vysokou koncentraci, že je pro samotnou buňku toxický [39].

### 5.3.1 *Cupriavidus necator* H16

Z předchozích měření, uskutečňovaných na půdě naší fakulty, byly patrné nárůsty viskoelastických modulů při působícím mrazu u měřených kmenů bakterií. Měření se tedy opakovalo pro potvrzení předchozích měření. Jako první byl zkoumán bakteriální kmen, který produkuje granule obsahující polymer PHB (bakteriální kmen s označením H16). Testem byly teplotní rampy, kdy docházelo k postupnému snižování teploty až do  $-12,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

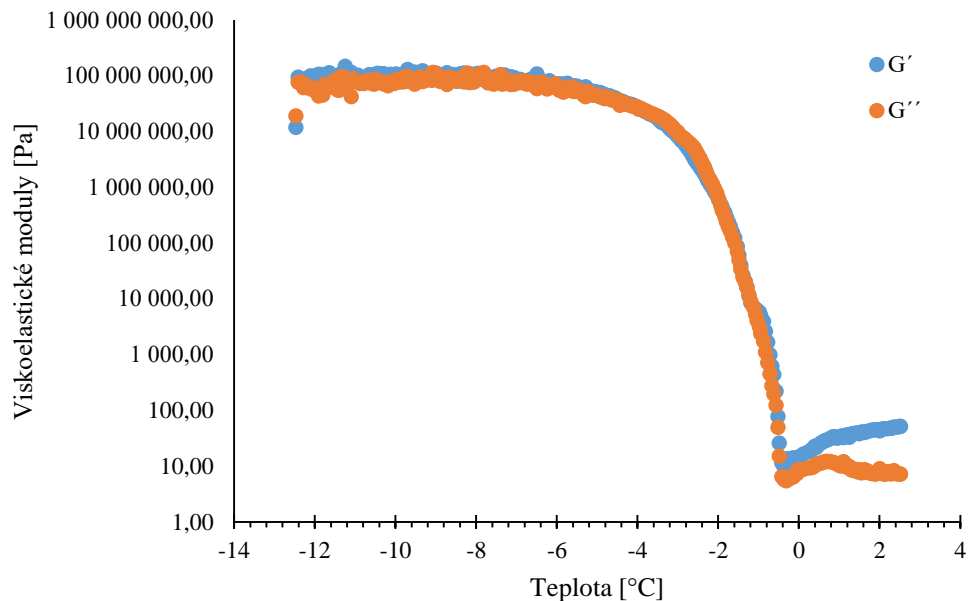


Obrázek 34: Graf závislosti viskoelastických modulů na teplotě pro H16

Prvním testem bylo postupné snižování teploty. Ze závislosti viskoelastických modulů na teplotě vidíme, že bakterie vykazuje viskoelastické chování s převanou elasticitou, tj. paměťový modul převažuje nad ztrátovým. Průběh závislosti je stálý až do teploty  $-9\text{ }^{\circ}\text{C}$ , kdy dochází k rapidnímu nárůstu viskoelastických modulů vlivem ztuhnutí obsahu buňky. Pokud by vnitřní struktura byla tvořena pouze vodou, k mrznutí by docházelo při vyšších teplotách (kolem  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  nebo  $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Bakterie tedy odolává teplotnímu stresu. Může to být způsobeno už vlastní přítomností granulí, které obsahují PHB jehož vlastnosti se od vody liší. Pokud bychom chtěli stanovit přímo teplotu tuhnutí PHB, museli bychom ho z buněk izolovat, protože buňka v teplotním stresu spouští mechanismy, díky kterým syntetizovaný PHB odbourává, což jí poskytuje výhodu proti buňkám, které tento polymer neprodukují, a buňka tedy déle přežívá ve stresových podmínkách.

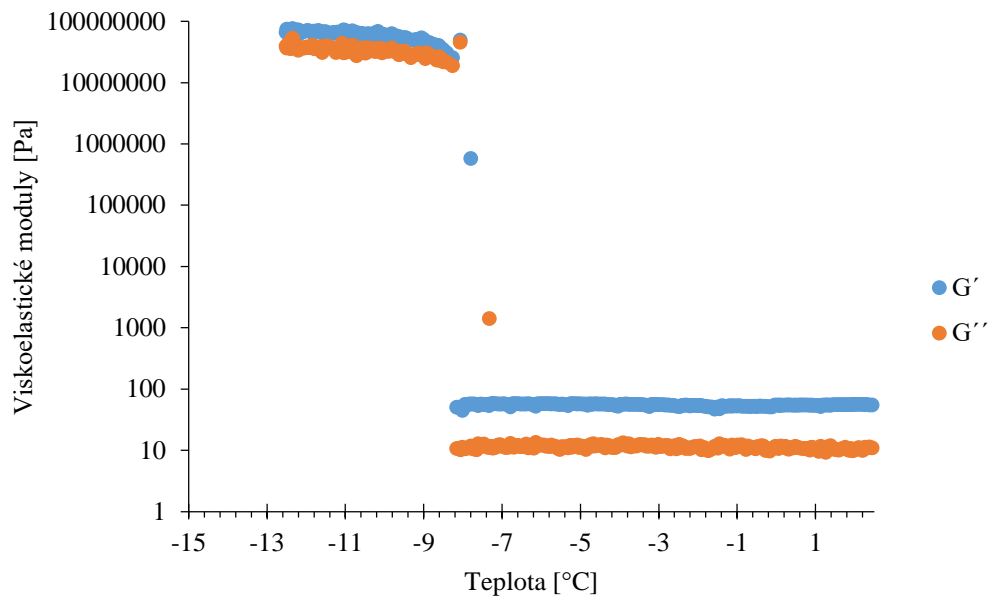
Protože byly bakterie kultivovány 72 hodin, došlo k značné syntéze granulí (konkrétně asi 65 % buňky je tvořeno granulemi s polymerem PHB). Pro porovnání jak moc ovlivňuje množství granulí s PHB teplotu tuhnutí bakterie by bylo vhodné měřit tento bakteriální kmen během růstové i stacionární fáze buněk. Přesná koncentrace PHB by pak mohla být stanovena fluorescenčně, průtokovou cytometrií nebo pomocí cryoSEM zobrazovací metody.

Vyšší elastický modul v lineární oblasti naznačuje přítomnost granulí, díky kterým bakterie vykazují elastickou odpověď na působící deformaci. Po zmrznutí vzorku se hodnoty ztrátového a paměťového modulu vzájemně neliší.



Obrázek 35: Graf závislosti viskoelastických modulů na teplotě pro H16

Při zvyšování teploty z -12,5 °C docházelo k rozmrazování vzorku a opětovnému snížení viskoelastických modulů při teplotě -4 °C. Snižování viskoelastických modulů pokračovalo do teploty -0,5 °C, kde došlo ke zlomu a nárůstu viskoelastických modulů. Po překročení této teploty vzorek vykazoval viskoelastické chování s převahou paměťového modulu, i když hodnoty jsou nižší v porovnání s předchozím měřením. V tomto bodě tedy došlo k rozmrznutí vzorku.

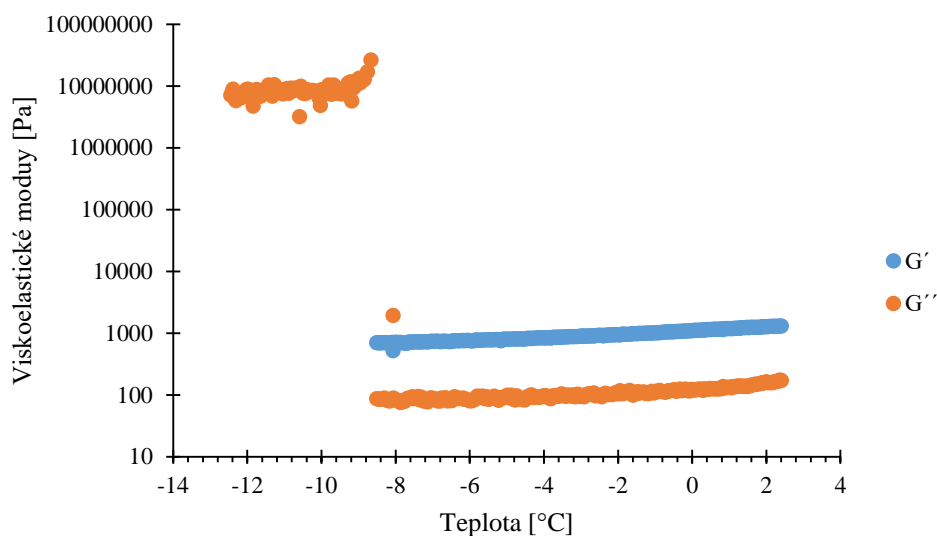


Obrázek 36: Graf závislosti viskoelastických modulů na teplotě pro H16, druhé mražení

Při opětovném snižování teploty vidíme skoro totožný průběh jako na Obrázek 34, kdy paměťový modul převažoval nad ztrátovým, ale k mrznutí vzorku dochází už kolem teploty - 8,5 °C. Může to být dáno buď spotřebou PHB buněk, jeho degradací, nebo došlo k usmrcení buněk, které dále nejsou schopny odolávat teplotnímu stresu. Po opětovném nárůstu teploty došlo k rozmrazení opět kolem -0,5 °C.

### 5.3.2 *Cupriavidus necator* PBH<sup>4</sup>

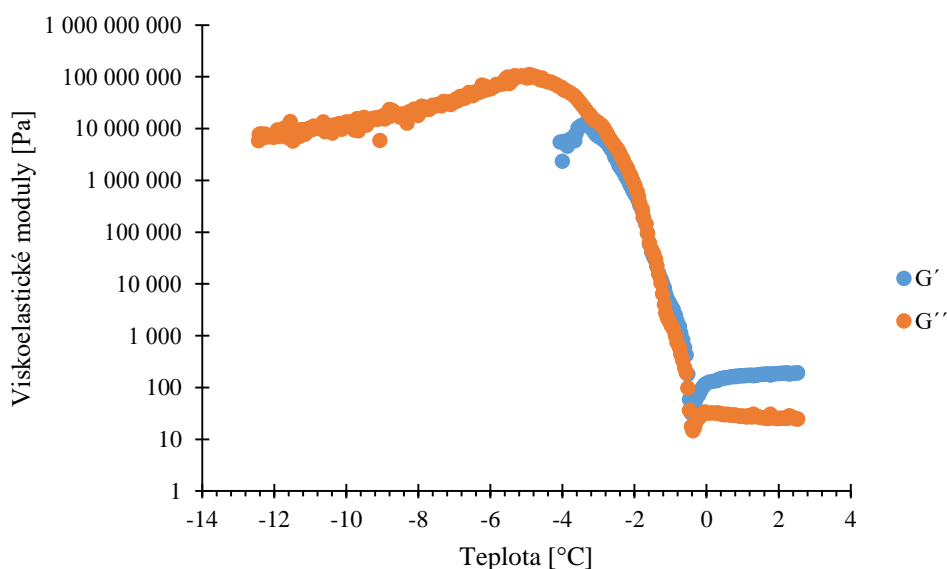
Následující měření bylo pro druhý bakteriální kmen, který netvoří polymer PHB. Tento kmen tedy z evolučního hlediska není tak dobře vybavený k odolávání změn vnějších podmínek. Ve své struktuře navíc obsahuje mnohem větší množství vody přítomné v cytoplasmě, protože vnitřní prostor neobsahuje granule. Vlivem mrazu tedy dochází k větším strukturním poškozením prostřednictvím nárůstu krystalů vody.



Obrázek 37: Závislost viskoelastických modulů na teplotě pro PHB<sup>4</sup> (mrznutí)

Ze závislosti viskoelastických modulů na teplotě pro druhý zkoumaný bakteriální kmen jsou patrné vyšší hodnoty modulů oproti H16, přičemž paměťový dosahuje hodnot až kolem 1000 Pa. K prudkému nárůstu viskoelastických modulů dochází kolem teploty -8,5 °C a po mrznutí u tohoto kmene dochází k poklesu paměťového modulu až k záporným hodnotám. Na Obrázek 37 v rozmezí teplot -12,5 °C až -8,5 °C lze tedy vidět pouze nárůst ztrátového modulu.

Paměťový modul je zřejmě odpovědí pouze vnitřních organel a vnější buněčné stěny bakterií, kdy vlivem teplotního stresu dochází k postupnému zužování buněčné stěny bakterií a k následnému vzniku mikrotrhlin a mikrootvorů vlivem zatuhnutí lipidů [40].

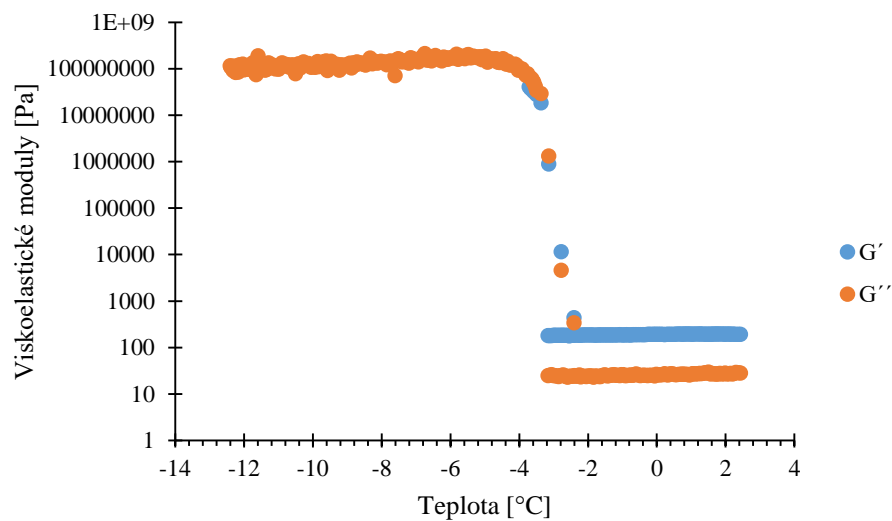


Obrázek 38: Závislost viskoelastických modulů na teplotě pro PHB<sup>4</sup> (tání)

Při snižování teploty, kdy dochází k postupnému tání vzorku, lze z Obrázek 38 vyčíst, že hodnoty paměťového modulu kolem teploty -4 °C vzrostly. Tento nárůst paměťového modulu je následovaný lineárním poklesem tohoto modulu, který kopíruje průběh ztrátového modulu.

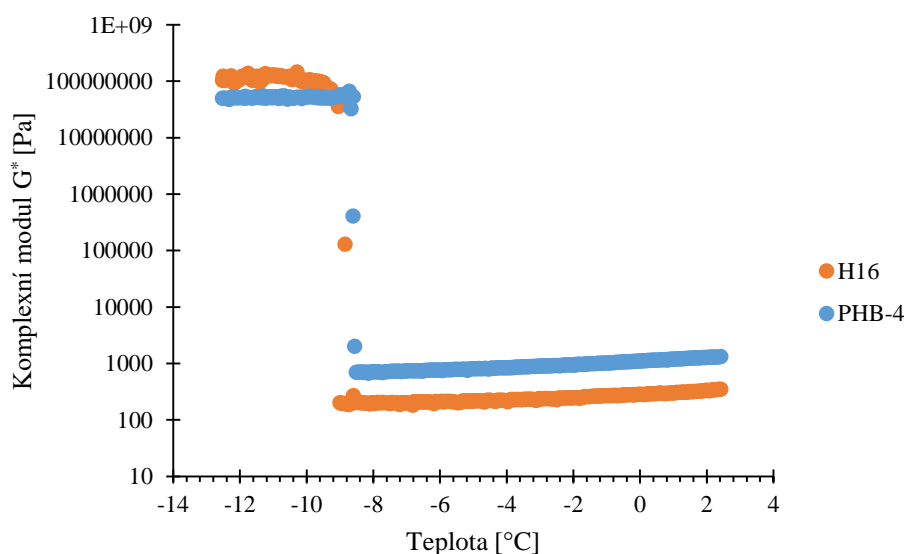


Při teplotě  $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$  dochází k rozmrazení vzorku a systém se vrací do původní podoby, tj. že dochází k viskoelastické odpovědi vzorku s převahou paměťového modulu.



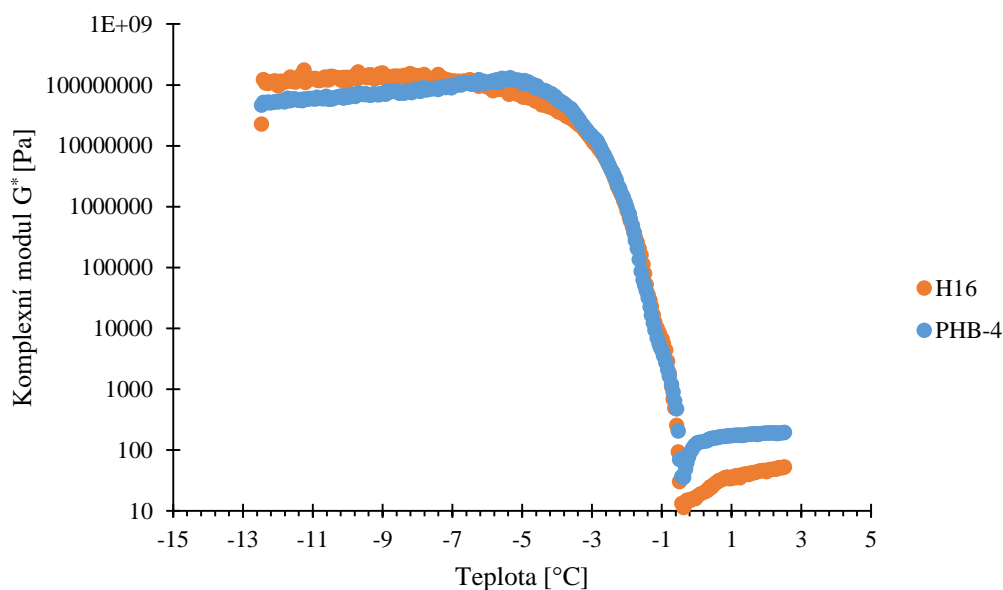
Obrázek 39: Závislost viskoelastických modulů na teplotě pro PHB<sup>-4</sup> (mrznutí)

Při opětovném mrazení vzorku dochází ke skokovému nárůstu viskoelastických modulů už při teplotě  $-3,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , což je vyšší teplota než při prvním zmrazení. Došlo nejspíše k mechanickému poškození buněčné stěny a organel působící deformací. K poškození mohlo také dojít krystaly vody vytvořenými po zmrznutí vodné složky bakterií. Při tání také docházelo k vzniku zvýšené vlhkosti na topné desce a po mrznutí i tato voda mohla přispět k poškození buněk. Nakolik jsou tyto buňky dále životaschopné, se z tohoto testu nedá určit. Strukturní poškození bakterií po těchto testech by se dala zobrazit například skenovacím elektronovým mikroskopem (Cro-SEM) nebo transmisní elektronovou mikroskopií (TEM), kde bychom díky dobrým zobrazovacím schopnostem viděli míru poškození vnitřních struktur buněk.



Obrázek 40: Porovnání závislosti komplexních modulů na teplotě pro jednotlivé bakterie (mrznutí)

Srovnáme-li závislost komplexních modulů na teplotě pro oba používané bakteriální kmeny, vidíme, že větších hodnot komplexního modulu dosahoval kmen PHB<sup>-4</sup>. K rapidnímu nárůstu komplexních modulů docházelo pro kmen H16 při nižších teplotách, než pro kmen PHB<sup>-4</sup>.



Obrázek 41: Porovnání závislosti komplexních modulů na teplotě pro jednotlivé bakterie (tání)

Obrázek 41 ukazuje závislost komplexních modulů na teplotě při postupném zvyšování teploty. Průběh grafu se u obou používaných bakteriálních kmenů nemění. Po překročení teploty tání dochází k opětovnému převýšení komplexního modulu u kmene PHB<sup>-4</sup> oproti kmenu H16. Co se táče tání, mezi studovanými bakteriálními kmeny není velký rozdíl.

Na základě výsledků je tedy patrné, že obsah PHB v buňkách má spojitost se schopností buněk odolávat teplotnímu stresu. Při 72hodinové kultivaci buněk docházelo k nárůstu granulí a tím k redukování obsahu vody v cytoplasmě bakterií. Tento jev následně zabránil krystalům vody k zničení vnitřní struktury bakterií, které vedou k smrti buněk.

## 5.4 Biofilmy - reologie

Poslední částí práce bylo určení viskoelastických vlastností bakteriálních kmenů *Cupriavidus necator*. Jak jsem již zmínila v kapitole 4.7, na naší fakultě probíhá velký projekt spojený s prací s měřeními bakteriálními kmeny a jejich využití pro metabolickou přeměnu použitého oleje na biodegradabilní polymer PHB.

Pro tento typ měření byla použita klasická reologie a nastavení jak oscilačních, tak tokových testů, bylo uvedeno také v kapitole 4.7. Protože měřený vzorek měl několik fází, dá se i toto měření považovat za mezifázovou reologii na rozhraní agar – biofilm a naměřené výsledky se dají výpočtem převést na viskoelastické vlastnosti na mezifázovém rozhraní. Výpočet pro zjištění ztrátového modulu na mezifázovém rozhraní je následující:

$$G'_{\text{rozhraní}} = G'_{\text{celkové}} - \frac{G'_{\text{složka A}} + G'_{\text{složka B}}}{2} \quad (35)$$

kde  $G'_{\text{celkové}}$  je celkový naměřený ztrátový modul obou fází,  $G'_{\text{složka A}}$  je ztrátový modul první fáze a  $G'_{\text{složka B}}$  je ztrátový modul druhé fáze.

Tím stejným vztahem se dá vypočítat i paměťový modul mezifázového rozhraní:

$$G''_{\text{rozhraní}} = G''_{\text{celkové}} - \frac{G''_{\text{složka A}} + G''_{\text{složka B}}}{2} \quad (36)$$

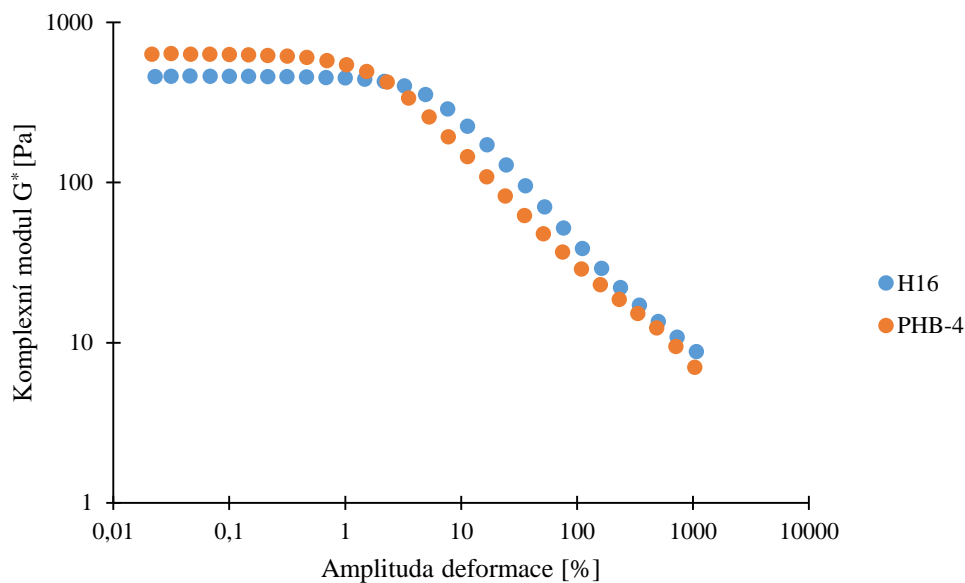
Komplexní modul mezifázového rozhraní je pak dán vztahem:

$$G^*_{\text{rozhraní}} = \sqrt{G'_{\text{rozhraní}}^2 + G''_{\text{rozhraní}}^2} \quad (37)$$

Tabulka 3: Ukázka hodnot pro mezifázové rozhraní

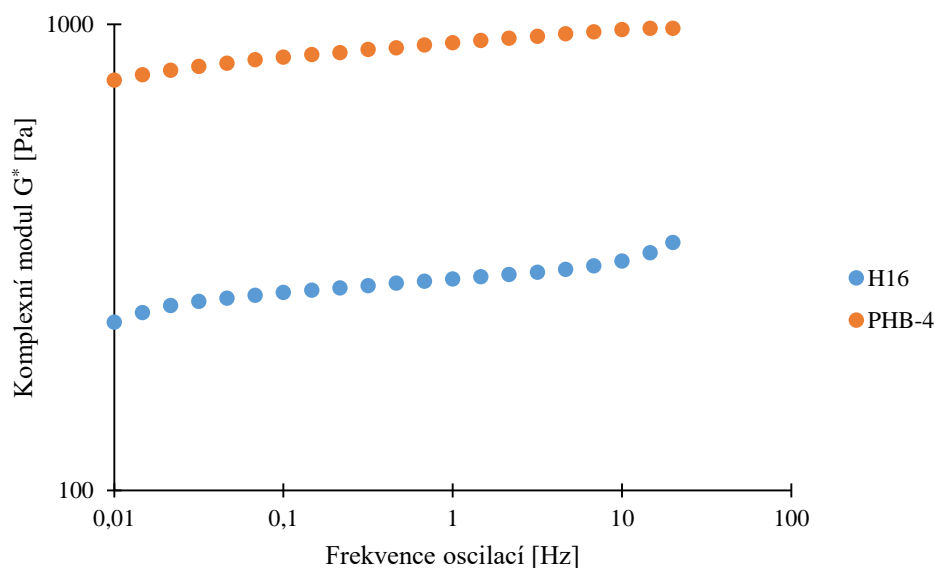
PHB <sup>-4</sup> + agar		Agar		PHB <sup>-4</sup>		Mezifázové rozhraní		
G' [Pa]	G'' [Pa]	G' [Pa]	G'' [Pa]	G' [Pa]	G'' [Pa]	G' [Pa]	G'' [Pa]	G* [Pa]
1219	106,9	510,9	15,54	708,1	91,36	609,5	53,45	612
1278	97,23	514,1	22,84	763,9	74,39	639	48,615	641
1263	93,33	513,5	24,81	749,5	68,52	631,5	46,665	633
1275	88,7	512,6	24,5	762,4	64,2	637,5	44,35	639
1264	86,31	514,1	24,25	749,9	62,06	632	43,155	633,5
1264	84,9	512,2	23,28	751,8	61,62	632	42,45	633,5
1260	90,56	512	23,52	748	67,04	630	45,28	631,5
1255	87,49	510,8	23,72	744,2	63,77	627,5	43,745	629
1244	88,1	510,7	23,73	733,3	64,37	622	44,05	623,5
1231	100	510,1	24,17	720,9	75,83	615,5	50	617,5
1204	115,5	509	25,42	695	90,08	602	57,75	605
1149	141,4	506,6	26,95	642,4	114,45	574,5	70,7	578,5
1072	183,2	501,9	29,71	570,1	153,49	536	91,6	544
955,2	253,8	491,7	32,67	463,5	221,13	477,6	126,9	494,2
781,7	336,8	481,5	36,98	300,2	299,82	390,85	168,4	425,55
559,8	380	462,9	43,06	96,9	336,94	279,9	190	338,3
357	370,6	435,5	49,89	-78,5	320,71	178,5	185,3	257,3
222,8	315,7	401,5	63,75	-178,7	251,95	111,4	157,85	193,2
135,1	257,6	323,2	119,1	-188,1	138,5	67,55	128,8	145,45
79,48	202,3	199,9	172,1	-120,42	30,2	39,74	101,15	108,7
46,31	158,2	126,4	163,6	-80,09	-5,4	23,155	79,1	82,4
26,06	122	81,83	141,7	-55,77	-19,7	13,03	61	62,4
14,33	94,65	52,65	117,2	-38,32	-22,55	7,165	47,325	47,865
7,549	73,55	33,73	94,98	-26,181	-21,43	3,7745	36,775	36,965
3,748	57,79	21,87	76,71	-18,122	-18,92	1,874	28,895	28,955
1,783	46,19	14,37	61,97	-12,587	-15,78	0,8915	23,095	23,11
0,7454	37,26	9,373	50,38	-8,6276	-13,12	0,3727	18,63	18,635
0,344	30,51	5,926	42,2	-5,582	-11,69	0,172	15,255	15,255
0,1693	24,78	3,478	35,73	-3,3087	-10,95	0,08465	12,39	12,39
0,05747	18,98	2,011	30,11	-1,95353	-11,13	0,028735	9,49	9,49
0,05154	14,09	0,9588	2,011	-0,90726	-9,63	0,02577	7,045	7,045

Po vypočítání viskoelastických parametrů mezifázového rozhraní byla vynesena následující závislost:



Obrázek 42.: Závislost komplexních modulů na amplitudě deformace

Ze závislosti komplexních modulů na amplitudě deformace vidíme v rozsahu aplikované amplitudy deformace v rozmezí 0,01 – 1 % lineární průběh závislosti pro oba bakteriální kmeny, linearita bakteriálního kmene H16 pak pokračuje dále až do hodnoty asi 5 % aplikované amplitudy deformace. V tomto rozmezí dochází k viskoelastickému chování obou bakteriálních kmenů s převahou paměťového modulu nad ztrátovým. Oba bakteriální kmeny tedy v tomto rozmezí vykazují elastický charakter. Po překročení 1 %-tní amplitudy deformace (pro H16 resp. 5 %-tní amplitudy deformace) dochází k postupnému poklesu komplexních modulů obou bakteriálních kmenů a dochází zde tedy k převaze ztrátového modulu nad paměťovým a k nevratné deformaci mezifázového rozhraní. Porovnáme-li hodnoty komplexních modulů mezi měřenými bakteriálními kmeny, pro kmen PHB<sup>-4</sup> za stejných podmínek (72hodinová kultivace na minerálním médiu a nastavené podmínky měření) dosahuje komplexní modul vyšších hodnot. Míra elasticity je zde tedy větší v porovnání s bakteriálním kmenem H16. Naopak porovnáme-li odolnost mezifázového rozhraní na působící amplitudu deformace, kmen H16 aplikované amplitudě deformace odolá lépe než kmen PHB<sup>-4</sup>.



Obrázek 43: Závislost komplexního modulu na frekvenci oscilací

Ze závislosti komplexních modulů na frekvenci oscilací uvedenou na Obrázek 43 vyplývá, že v rozsahu aplikované frekvence oscilací nedochází k mechanickému poškození ani u jednoho z měřených bakteriálních kmenů a hodnoty komplexního modulu kmene PHB<sup>-4</sup> jsou vyšší než hodnoty kmene H16. V celém rozsahu frekvence oscilací kmeny vykazují viskoelastické chování s převahou paměťového modulu nad ztrátovým (tedy s převahou elasticity).

Vyšší hodnota komplexního modulu kmene PHB<sup>-4</sup> oproti kmenu H16 naznačuje lepší mechanickou odolnost vůči nízkým amplitudám deformace. Vzhledem k tomu, že vyšší hodnoty komplexního modulu kmene PHB<sup>-4</sup> oproti kmenu H16 se projevuje u všech předchozích typů používaných testů, naznačuje to, že granule PHB uvnitř buněk nezvyšují mechanickou odolnost buněk při nízkých amplitudách deformace ani v rozsahu používané frekvence oscilací. Naopak při zvyšování aplikované amplitudy deformace se jeví jako výhoda, protože buňky díky nim lépe odolávají mechanickému namáhání.

## 6 ZÁVĚR

V rámci diplomové práce byla zavedena poměrně nová metoda na fakultě a to mezifázová reologie. Nejdříve byla nutná optimalizace metody jak z hlediska přípravy rozhraní, práce s měřicími senzory, tak i z hlediska nastavení vlastní oscilačních a tokových testů.

Při přípravě mezifázových rozhraní typu kapalina – kapalina se nejlépe osvědčila tenká vrstva kapaliny s nižší hustotou rozprostřená na kapalině s větší hustotou. Při použití stejných objemů obou měřených kapalin docházelo k velkému ovlivnění mezifázového rozhraní a zaznamenání výsledků nebylo tak přesné, jak při různém objemu.

Porovnány byly i různé typy měřících senzorů a to bikonální geometrie a Du Noüyho kroužek. Druhý zmíněný senzor je vhodný pro velmi viskózní roztoky a jeho uplatnění se nachází hlavně v tenziometrii. Velkou nevýhodou je jeho křehká konstrukce a to hlavně tenký drátek tvořící samotný kroužek. Při neodborném zacházení dochází k jeho zkřivení a deformaci a takto zdeformovaný pak dobře nedoléhá na rozhraní a nelze jím spolehlivě měřit. Při opakovaném měření se kroužek opaluje nad kahanem pro zajištění čistoty senzoru a i tato manipulace, navíc pokud se s kroužkem neotáčí při samotném opalování, má za následek namáhání materiálu kroužku a jeho deformaci. Další nevýhodou je špatné určení mezifázového rozhraní, protože se zde nedá použít žádný test. Umístění geometrie na rozhraní se provádí manuálně kvůli nedostatečné citlivosti přístroje na změnu normálové síly. Pro zajištění dobré opakovatelnosti tento způsob není vhodný, protože zde hraje velkou roli uhel pozorování a rozlišovací schopnosti každého uživatele mohou být také odlišné. Pro moje další měření jsem si zvolila geometrii bikonální, protože je oproti kroužku mechanicky odolnější a poskytuje lepší záznamy z měření. Výška měřící geometrie se dá snadno určit z Squeeze/Pull off testu, který zaznamenává závislosti normálové síly na výšce geometrie. Toto stanovení mezifázového rozhraní je přesné a poskytuje dobrou opakovatelnost. Nevýhodou je ale velká měřicí nádoba, která je náročná na množství používaného vzorku. Už samotná velikost geometrie nedovoluje měření malých objemů vzorku.

Optimalizace měření spočívala také v použití různých kapalin pro vytvoření mezifázového rozhraní. Při výběru kapalin musíme vzít v potaz to, jak silné vazby mezi sebou obě kapaliny vytvoří. Pokud zvolíme například rozhraní dvou nepolárních látek, molekuly mezi sebou nebudou vzájemně moc interagovat. Zvolíme-li ale rozhraní nepolární kapalina (voda) a polární kapalina (toluen, chloroform), molekuly obou kapalin mezi sebou vytvoří vazby, které hrají svou roli ve výsledných viskoelastických vlastnostech rozhraní. Čím větší rozdíl polarity obou kapalin, tím silnější vazby a tím pádem mechanicky odolnější rozhraní. Samotná struktura molekul je ale také důležitá. Pokud jsou přítomné větší a odolnější struktury, jako je například benzenové jádro s konjugovaným typem vazeb, je tato struktura mechanicky odolnější vůči namáhání.

Dále optimalizována by měla být i možnost teploty mezifázového rozhraní. Teplota bude mít jistě vliv na viskoelastické vlastnosti mezifázového rozhraní už jen proto, že vliv difúze zde bude značný díky většímu pohybu molekul.

Metoda mezifázové reologie byla testována na roztocích tří na fakultě běžně využívaných tenzidů – dva ionogenní a jeden neionogenní tenzid. Testován byl vliv koncentrace jednotlivých tenzidů a porovnány byly i samotné tenzidy mezi sebou. Jelikož tenzidy jsou velmi malé molekuly, které adsorbují na povrch, jejich měření je velmi obtížné zvláště u přístroje,

který už nemá dostatečnou citlivost vlivem jeho opotřebením. Z výsledků nicméně vyplývá, že při nízkých koncentracích tenzidů je mechanická odolnost mezifázového rozhraní slabší. Je to nejspíše způsobeno malým počtem molekul adsorbovaných na mezifázovém rozhraní i faktem, že samotná přítomnost molekul snižuje povrchové napětí rozhraní. Čím větší je koncentrace molekul na mezifázovém rozhraní, tím větší mechanickou odolnost rozhraní vykazuje. Po překročení kritické micelární koncentrace pak dochází k opětovnému snížení viskoelastických parametrů mezifázového rozhraní, což je dáno tím, že vytvořené micely klesly pod úroveň mezifázového rozhraní a tím se snížil i počet molekul přítomných na rozhraní. Určitý počet volných molekul tenzidu zde ale zůstalo. Při zvyšování koncentrace tenzidu ale k postupnému zvyšování viskoelastických parametrů nedocházelo, jak by se dalo předpokládat. Může za to nejspíše bariéra micel, která bránila opětovnému adsorbování dalších molekul tenzidů z objemové fáze, ve které byly rozpuštěny. Vzájemným porovnáním všech používaných tenzidů bylo zjištěno, že nejlepší mechanickou odolnost vůči namáhání vykazoval SDS. Může to být způsobeno tím, že jde strukturně o nejmenší molekulu, která rychleji adsorbovala na mezifázové rozhraní. Dále to může být spojeno s afinitou molekuly. Pokud je povaha molekul spíše hydrofobního charakteru, budou mít molekuly větší tendenci shromažďovat se na mezifázovém rozhraní, aby docházelo k co nemenšímu styku s hydrofilním prostředím. Naopak pokud bude povaha molekuly spíše hydrofilní, nebudou mít molekuly tenzidu snahu vymezit se kontaktu s prostředím a jejich adsorpce na povrch nebude tak intenzivní.

Další částí mé práce bylo zjistit viskoelastické chování biofilmů vytvořených z dvou bakteriálních kmenů *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* PHB<sup>4</sup>. Rozdílem mezi oběma měřenými bakteriálními kmeny je schopnost resp. neschopnost ve své buněčné struktuře syntetizovat polymer PHB. Prvním testem byly teplotní rampy, kdy oba měřené bakteriální kmeny byly vystaveny teplotnímu šoku a to mrazení. Rozdíl teplot tuhnutí, kdy docházelo k rapidnímu nárůstu viskoelastických modulů, byly při prvním cyklu srovnatelné. Rozdíl však nastal při opakovaném zmrazení vzorku. Bakteriální kmen H16, který má schopnost syntézy polymeru PHB, vykazoval lepší teplotní odolnost i při druhém cyklu mrazení. U bakteriálního kmene PHB<sup>4</sup>, který nedokáže syntetizovat polymer PHB, docházelo k nárůstu viskoelastických modulů při vyšších teplotách, tzn., že docházelo rychleji k tuhnutí vzorku. Přítomnost polymeru PHB tedy dává buňkám evoluční výhodu, protože lépe snášejí teplotní šok způsobený mrazem. Druhá část práce s biofilmy se týkala zjištění jejich viskoelastických vlastností pomocí klasické reologie a převedení naměřených výsledků na výsledky mezifázové reologie. Z těchto výsledků je patrné, že vyšší hodnoty viskoelastických modulů vykazoval bakteriální kmen PHB<sup>4</sup> při nižších amplitudách deformací nebo aplikované frekvenci oscilací. Při zvyšování amplitudy deformace se ale jevil jako odolnější bakteriální kmen H16.

Mezifázová reologie se jeví jako zajímavá metoda pro zjišťování viskoelastických vlastností na mezifázovém rozhraní. Nicméně je ještě potřeba několik optimalizací k jejímu běžnému užívání. Zkušenosti získané při měření této práce povedou k rozvoji této metody na naší fakultě a k jejímu širšímu uplatnění.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1 BIGHAM E. C.: *Fluidity and Plasticity*. McGraw-Hill, N.Y. 1922
- 2 The Society of Rheology Home Page.
- 3 WEIN Ondřej: *Úvod do reologie*. Malé Centrum, 1996, 1. vydání, 84 stran
- 4 COLEMAN B. D., H. Markovitz, W. Noll: *Viscometric Flows of Non – Newtonian Fluids*. Springer, Berli 1966
- 5 BARNES, Howard A., J. F. HUTTON a Kenneth. WALTERS. *An introduction to rheology. New York: Distributors for the U.S. and Canada*, Elsevier Science Pub. Co., 1989. Rheology series, 3. ISBN 0444871403.
- 6 ĎOUBAL S. et al.: *Mechanical behavior of viscoelastic*. Karolinum, Praha, 2011
- 7 JANALÍK, J.: *Viskozita tekutin a její měření*. 2010, VŠBTU, fakulta strojní Ostrava
- 8 SCHRAM, Gebhard Author. *A practical approach to rheology and rheometry*. Německo: Gebrueder HAAKE GmbH, 1994, 290 s.
- 9 ATKINS, P., Julio DE PAULA: *Fyzikální chemie*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2013, s. 915, ISBN 978-80-7080-830-6.
- 10 MEZGER, Thomas G. *The rheology handbook: for users of rotational and oscillatory rheometers*. 3rd rev. ed. Hanover, Germany: Vincentz Network, 2011. ISBN 978-386-6308-640.
- 11 BARTOVSKÁ, Lidmila. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 5. přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005, 244 s. ISBN 80-708-0579-X.
- 12 VENTUREIRA, Jorge L., Agustín J. BOLONTRADE, Francisco SPERONI, et al. *Interfacial and emulsifying properties of amaranth (Amaranthus hypochondriacus) protein isolates under different conditions of pH*. *LWT. Food Science and Technology*, 2012, 45(1), DOI: 10.1016/j.lwt.2011.07.024. ISSN 00236438.
- 13 WALKER G.M.: *Yeast – Physiology and Biotechnology*, John Willey & Sons Ltd. Chichester, 1998. ISBN 978-0-471-96446-9
- 14 *Sigma-Aldrich*. [cit. 2017-04-28].
- 15 Chemnet. [cit. 2017-04-27].
- 16 KUČERA, Dan: *Studium zapojení polyhydroxyalkanoátů do stresové odpovědi mikroorganismů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013, 54s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Stanislav Obruča, Ph. D.
- 17 HABLOT, Elodie, Perrine BORDES, Eric POLLET a Luc AVÉROUS. *Thermal and thermo-mechanical degradation of poly(3-hydroxybutyrate)-based multiphase systems*.



- Polymer Degradation and Stability. 2008, 93(2): 413-421. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.018.
- 18 MARLES-WRIGHT, Jon a Richard J LEWIS. *Stress responses of bacteria. Current Opinion in Structural Biology*. 2007, roč. 17, č. 6, s. 755-760. DOI: 10.1016/j.sbi.2007.08.004
- 19 RENDUELES, Olaya a Jean-Marc GHIGO. *Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors*. FEMS Microbiology Reviews. 2012, roč. 36, č. 5, s. 972–989. ISSN 1574-6976. doi 10.1111/j.1574-6976.2012.00328.x.
- 20 PICKERING, Spencer Umfreville. *CXCVI.—Emulsions*. J. Chem. Soc., Trans . 1907, 91, 2001-2021 [cit. 2017-02-11]. DOI: 10.1039/CT9079102001.
- 21 GUAN, Ying a Yongjun ZHANG. *PNIPAM microgels for biomedical applications: from dispersed particles to 3D assemblies*. Soft Matter [online]. 2011, 7(14), 6375- [cit. 2017-02-11]. DOI: 10.1039/c0sm01541e
- 22 PELIPENKO, Jan, Julijana KRISTL, Romana ROŠIĆ, Saša BAUMGARTNER a Petra KOCBEK. *Interfacial rheology: An overview of measuring techniques and its role in dispersions and electrospinning*. Acta Pharmaceutica. 2012-01-1, 62(2), - [cit. 2017-02-06]. DOI: 10.2478/v10007-012-0018-x.
- 23 BALDURSDOTTIR, Stefania G., Maria Stoier FULLERTON, Signe Hougaard NIELSEN a Lene JORGENSEN. *Adsorption of proteins at the oil/water interface—Observation of protein adsorption by interfacial shear stress measurements*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2010, 79(1), 41-46 [cit. 2017-02-11]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.03.020.
- 24 Boussinesq MJ: *Sur l'existence d'une viscosité superficielle, dans la mince couche de transition séparant un liquide d'un autre fluide contigu*. Annales de chimie et de physique 29 (1913) 349-357.
- 25 HONG, Joung Sook a Peter FISCHER. *Bulk and interfacial rheology of emulsions stabilized with clay particles*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2016, 508, 316-326 [cit. 2017-02-11]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2016.08.040.
- 26 COSTELLO B., Peter Hodder, Aly Franck: *Use of the Du Noüy Ring with a Rotational Rheometer to Measure Interfacial Rheological Properties*, Annual transaction of the nordic rheology society, vol. 14, 2006
- 27 LI, Weiwei, Yaosong WANG, Haibo ZHAO, Zhiyong HE, Maomao ZENG, Fang QIN a Jie CHEN. *Improvement of emulsifying properties of soy protein through selective hydrolysis: Interfacial shear rheology of adsorption layer*. Food Hydrocolloids. 2016, 60, 453-460 [cit. 2017-02-11]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2016.04.019.

- 28 ARIOLA, Florly S., Anandi KRISHNAN a Erwin A. VOGLER. *Interfacial rheology of blood proteins adsorbed to the aqueous-buffer/air interface*. *Biomaterials*. 2006, 27(18), 3404-3412 [cit. 2017-04-13]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.005.
- 29 HUMBLET-HUA, Nam-Phuong K., Erik VAN DER LINDEN a Leonard M. C. SAGIS. *Surface rheological properties of liquid–liquid interfaces stabilized by protein fibrillar aggregates and protein–polysaccharide complexes*. *Soft Matter*. 2013, 9(7), 2154- [cit. 2017-04-14]. DOI: 10.1039/c2sm26627j.
- 30 HEYER Patrick, Jörg Läger, *Interfacial Shear Rheology of Films Formed by Coffee*, Annual transactions of the nordic rheology society. 2008
- 31 HOFFMANN, Ingo, Bela FARAGO, Ralf SCHWEINS, Peter FALUS, Melissa SHARP, Sylvain PRÉVOST a Michael GRADZIELSKI. *On the mesoscopic origins of high viscosities in some polyelectrolyte-surfactant mixtures*. *The Journal of Chemical Physics*. 2015, 143(7), 074902- [cit. 2017-04-27]. DOI: 10.1063/1.4928583
- 32 RÜHS A. Patrick, Lukas Böni, Gerald G. Fuller, R. Fredrik Inglis, Peter Fischer, *Interfacial Rheology of Bacterial Biofilms*, Annual transactions of the nordic rheology society, vol. 21, 2013
- 33 VŠCHT: Ústav chemického inženýrství. [cit. 2017-04-25]
- 34 ERNI Philipp, Peter Fischer and Erich J. Windhab, *Rheology of surfactant assemblies at the air/liquid and liquid/liquid interface*, 3rd International Symposium on Food Rheology and Structure, 2003
- 35 KARBASCHI, M., M. Lofti, J. Kragel, A. Javadi, D. Bastani a R. Miller. *Rheology of interfacial layers*. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2014, 19(6), 514-519 [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1016/j.cocis.2014.08.003
- 36 LANGEVIN, D. *Surface shear rheology of monolayers at the surface of water*. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2014, 207, 121-130 [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1016/j.cis.2013.10.030
- 37 PANG, Jinyu, Sujun DU, Runtian CHANG, Qiang PEI a Dongxia CUI. *Interfacial Rheology of Mixed Surfactants at the Oil/Water Interface*. *Journal of Surfactants and Detergents*. 2015, 18(5), 747-753 [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1007/s11743-015-1715-5.
- 38 ARRIAGA, Laura R., Dharmesh VARADE, David CARRIERE, Wiebke DRENCKHAN a Dominique LANGEVIN. *Adsorption, Organization, and Rheology of Catanionic Layers at the Air/Water Interface*. *Langmuir*. 2013, 29(10), 3214-3222 [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1021/la304868n
- 39 TABATABAIE, F. a A. MORTAZAVI. *Studying the Effects of Heat and Cold Shock on Cell wall Microstructure and Survival of Some LAB in Milk*. *World Applied Sciences Journal*. 2008, vol. 4, issue 2, s. 191-194.

40 MÖBIUS, D. a Reinhard. MILLER. *Proteins at liquid interfaces*. New York: Elsevier, 1998. ISBN 044482944X.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

Symbol/zkratka	Význam
$v$	rychlost
$F$	smyková síla
$\tau$	smykové napětí
$A$	plocha
$\gamma$	deformace
$\Delta l$	vychýlení desky
$h$	vzdálenost
$\dot{\gamma}$	smyková rychlost
$\eta$	dynamická viskozita
$G$	modul pružnosti v tahu
$\sigma_{\text{mech}}$	mechanické napětí
$\sigma$	smykové napětí
$E$	Youngův modul pružnosti
$\varepsilon$	poměrná deformace
$D$	gradient rychlosti
$du$	změna rychlosti toku
$dx$	posun souřadnice ve směru kolmém na směr proudění
$\sigma_N$	smykové napětí newtonovské kapaliny
$\sigma_H$	smykové napětí elastického hookova tělesa
$\lambda$	relaxační čas
$De$	Debořino číslo
$T$	charakteristický čas materiálu
$\Delta t$	čas pozorování
$\sigma_t$	napět'ové odezvy materiálu
$\gamma_0$	amplituda kinematického vzruchu
LVO	lineární viskoelastická oblast
$G'$	paměťový viskoelastický modul
$G''$	ztrátový viskoelastický modul
$G^*$	komplexní smykový modul
$i$	imaginární jednotka
$\delta$	ztrátový úhel
$u$	přitažlivá energie mezi nenabitými molekulami
$C$	Londonova konstanta
$Q$	náboj dipólu
$\varepsilon$	relativní permitivita
$\varepsilon_0$	permitivita vakua
$k$ je	Boltzmanova konstanta
$T$	termodynamická teplota
$r$	poloměr
$\gamma_E$	volná mezifázová energie
$p$	tlak

$dV$	změna objemu
$\Gamma_{2,1}$	míra adsorpce složky 2
$c_2$	koncentrace složky 2
R	univerzální plynová konstanta
$\eta_d$	mezifázová dilatační viskozita
$\eta_s$	mezifázová smyková viskozita
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
TTAB	trimethyltetradecylamonium bromid
SDS	dodecylsulfonát sodný
SDBS	dodecylbenzensulfonát sodný
CMC	kritická micelární koncentrace
PHA	polyhydroxyalkanoáty
PHB	polyhydroxybutyráty
Bo	Boussinesqovo číslo
$\omega$	úhlová rychlost
H16	bakteriální kmen <i>Cupriavidus necator</i> H16
PHB <sup>-4</sup>	bakteriální kmen <i>Cupriavidus necator</i> PHB <sup>-4</sup>
$\rho$	hustota