

## POUŽITÍ FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝCH NÁSTROJŮ PRO PREDIKCI MIKROBIÁLNÍ ADHEZE

GITA PROCHÁZKOVÁ<sup>a</sup>, VLADIMÍR JIRKŮ<sup>a</sup>,  
LIDMILA BARTOVSKÁ<sup>b</sup> a TOMÁŠ BRÁNYIK<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, <sup>b</sup> Ústav fyzikální chemie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6  
tomas.branyik@vscht.cz

Došlo 17.7.11, přijato 20.9.11.

**Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby urychleného publikování.**

Klíčová slova: adheze, biofilm, interakce, mezifázové napětí, fyzikálně-chemické přístupy

### Obsah

1. Úvod
2. Primární adheze: Fyzikálně-chemický aspekt
  - 2.1. Termodynamický přístup
  - 2.2. Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeekova teorie
  - 2.3. Rozšířená Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeekova teorie a další „doladování“ modelů
  - 2.4. Soulad mezi predikcí a experimentálními daty
3. Závěr

### 1. Úvod

Proces adheze jednobuněčného organismu k abiotickému i biotickému povrchu je základem vývoje upoutaných buněčných konsorcií, tj. buněčných kolonií/agregátů a biofilmů. Tyto mnohobuněčné celky jsou také skutečnou formou existence mikroflóry našeho životního prostředí, včetně té, která je součástí makroorganismů. V této souvislosti je proces buněčné adheze procesem fyzického upoutání individuální buňky k určitému povrchu, jehož vývoj bude (mimo jiné) určen aktuálním stavem povrchu buněčného a jeho komplementaritou k druhému povrchu, který je takto kolonizován. Z hlediska rozsahu experimentální i technologické použitelnosti přirozeně upoutaných konsorcií jednobuněčných organismů je metodologie predikce adhezenční dispozice buňky klíčovým požadavkem. Fyzikálně-chemické aspekty jejího vývoje shrnuje tento referát.

### 2. Primární adheze: Fyzikálně-chemický aspekt

V procesu upoutání buňky k povrchu jejího nosiče je rozlišován vznik tzv. kondiciované vrstvy a stav primární a sekundární adheze. Účelem upoutání je snížení mezifázové energie<sup>1</sup>. „Kondicionání“ povrchu nosiče, které determinuje jeho nový (aktuální) stav, je procesem samovolné modifikace nosiče fyzikálně-chemickými vlivy a složkami prostředí. Z tohoto hlediska může být adhezenční dispozice buňky k nativnímu a kondiciovanému povrchu odlišná<sup>2</sup>. Stav primární adheze je charakterizován interakcemi nespecifickými a vratnými<sup>1</sup>, které jsou kombinacemi nekovalentních interakcí, tj. Lifshitz-van der Waalsových (LW), elektrostatických (EL), acidobazických (AB), hydrofobních, sterických a interakcemi na bázi vodíkových můstků<sup>3</sup>. Stavem sekundární adheze je označováno dosažení nevratného upoutání buňky, které je spojováno s vývojem specifických vazebných interakcí mezi interagujícími povrchy (např. účast specifických adhezínů)<sup>1,4</sup>. Stav primární adheze (tedy i jeho fyzikálně-chemická charakteristika) bude odlišný v situaci kontaktu povrchu buněčného s povrchem abiotickým a povrchem biotickým. S použitím několika zjednodušení lze ale v charakteristice a predikci tohoto stavu použít dva základní fyzikálně-chemické přístupy.

Prvním je tzv. termodynamický přístup, který předpokládá přímý kontakt dvou povrchů za podmínek termodynamické rovnováhy a zabývá se problematikou mezifázových napětí, přičemž nezahrnuje vliv elektrostatických interakcí<sup>5,6</sup>. Druhým přístupem je tzv. teorie DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey a Overbeek) popisující interakční energie mezi povrchy na základě změny Lifshitz-van der Waalsových a elektrostatických interakcí v závislosti na separační vzdálenosti interagujících povrchů<sup>3</sup>. Oba přístupy jsou přínosné, ale nedostatečné pro popis všech aspektů adheze ve spektru taxonomické diverzity buněčných populací a diverzity nosičů. Je zřejmé, že kromě uvažovaných interakcí bude adhezenční dispozice mikrobiální buňky vždy ovlivněna aktuálním stavem kompozice a stavby buněčného povrchu a jeho interakcí s komponenty mimobuněčného prostředí.

V této souvislosti byly původní matematické modely rozšířeny, aby respektovaly vliv interakcí acidobazických, hydrofobních anebo makromolekulárních, včetně geometrie a textury zúčastněných povrchů<sup>7–9</sup>.

#### 2.1. Termodynamický přístup

V termodynamickém přístupu je adheze popsána jako vznik nového rozhraní mezi povrchem substrátu (nosiče) N a uchycujícím se mikroorganismem (buňka) B o jednotkové ploše na úkor zániku mezifázových rozhraní mikro-

organismus – okolní kapalina (vodné prostředí) V a substrát – okolní kapalina, rovněž o jednotkových plochách, jak schematicky znázorňuje obr. 1. Každé z těchto rozhraní je charakterizováno mezifázovou energií (mezifázovým napětím). Změnu Gibbsovy energie pro adhezni děj je možno vyjádřit bilancí:

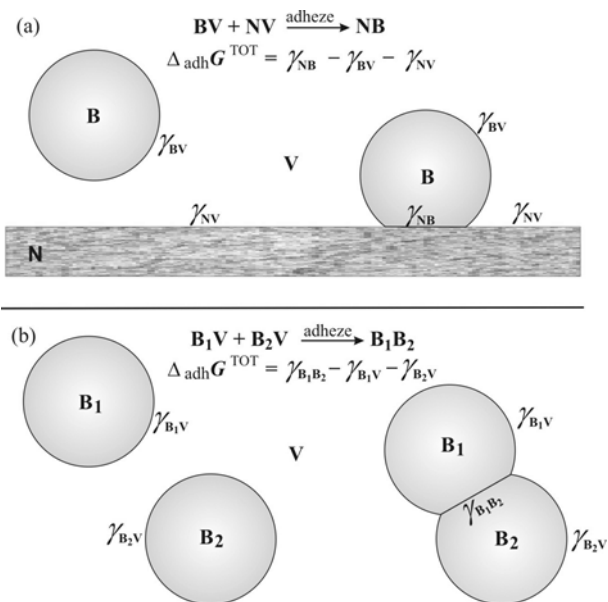
$$\Delta_{\text{adh}} G_{\text{BVN}}^{\text{tot}} = \gamma_{\text{NB}} - \gamma_{\text{NV}} - \gamma_{\text{BV}} \quad (1)$$

kde  $\Delta_{\text{adh}} G_{\text{BVN}}^{\text{tot}}$  je adhezni Gibbsova energie v systému buňka – vodné prostředí – nosič (BVN), vztažená na jednotku plochy fázového rozhraní ( $\text{mJ m}^{-2}$ ) a  $\gamma_{ij}$  jsou příslušná mezifázová napětí ( $\text{mJ m}^{-2}$ ). Výsledná hodnota adhezni (interakční) Gibbsovy energie pak umožňuje předpovědět, zda primární mikrobiální adheze bude za daných podmínek z termodynamického hlediska výhodná ( $\Delta_{\text{adh}} G_{\text{BVN}}^{\text{tot}} < 0$ ) či nikoli ( $\Delta_{\text{adh}} G_{\text{BVN}}^{\text{tot}} > 0$ ).

Mezifázová napětí vystupující v rovnici (1) však nejsou přímo experimentálně přístupná. Tento problém je možno řešit např. rozdělením celkové Gibbsovy adhezni energie i mezifázových napětí v systému BVN na dvě složky: nepolární, Lifshitz-van der Waalsovou (LW) a polární, acidobazickou (AB)<sup>10,11</sup>:

$$\Delta_{\text{adh}} G_{\text{BVN}}^{\text{tot}} = \Delta_{\text{adh}} G_{\text{BVN}}^{\text{LW}} + \Delta_{\text{adh}} G_{\text{BVN}}^{\text{AB}} \quad (2)$$

$$\gamma^{\text{tot}} = \gamma^{\text{LW}} + \gamma^{\text{AB}} \quad (3)$$



Obr. 1. Energetická bilance (a) adheze buňky (B) na pevný nosič (N), (b) mezibuněčné adheze buněk B<sub>1</sub> a B<sub>2</sub> ve vodném prostředí (V).  $\gamma_{ij}$  jsou příslušná mezifázová napětí

Pro nepolární část platí:

$$\Delta_{\text{adh}} G_{\text{BVN}}^{\text{LW}} = -2 \left( \sqrt{\gamma_{\text{N}}^{\text{LW}}} - \sqrt{\gamma_{\text{V}}^{\text{LW}}} \right) \cdot \left( \sqrt{\gamma_{\text{B}}^{\text{LW}}} - \sqrt{\gamma_{\text{V}}^{\text{LW}}} \right) \quad (4)$$

Polární složku je možno rozdělit ještě na složku elektron-akceptorovou (index  $\oplus$ ), a elektron-donorovou (index  $\ominus$ ):

$$\gamma^{\text{AB}} = 2 \sqrt{\gamma^{\oplus} \gamma^{\ominus}} \quad (5)$$

$$\Delta_{\text{adh}} G_{\text{BVN}}^{\text{AB}} = 2 \left[ \sqrt{\gamma_{\text{V}}^{\oplus}} \left( \sqrt{\gamma_{\text{B}}^{\ominus}} + \sqrt{\gamma_{\text{N}}^{\ominus}} - \sqrt{\gamma_{\text{V}}^{\ominus}} \right) + \sqrt{\gamma_{\text{V}}^{\ominus}} \left( \sqrt{\gamma_{\text{B}}^{\oplus}} + \sqrt{\gamma_{\text{N}}^{\oplus}} - \sqrt{\gamma_{\text{V}}^{\oplus}} \right) - \sqrt{\gamma_{\text{B}}^{\oplus} \gamma_{\text{N}}^{\ominus}} - \sqrt{\gamma_{\text{B}}^{\ominus} \gamma_{\text{V}}^{\oplus}} \right] \quad (6)$$

Celková adhezni energie je podle vztahu (2) dána součtem rovnic (4) a (6). Celkovou Gibbsovu energii interakce dvou stejných povrchů, tj. agregace neboli uchycení buňky (B<sub>1</sub>) na identickou či jinou buňku (B<sub>2</sub>) ve vodném prostředí (V), ( $\Delta_{\text{adh}} G_{\text{BVV}}^{\text{tot}}$ ), lze popsat obdobným vztahem<sup>12</sup>:

$$\Delta_{\text{adh}} G_{\text{BVV}}^{\text{tot}} = -2 \left( \sqrt{\gamma_{\text{B}}^{\text{LW}}} - \sqrt{\gamma_{\text{V}}^{\text{LW}}} \right)^2 - 4 \left( \sqrt{\gamma_{\text{B}}^{\oplus} \gamma_{\text{B}}^{\ominus}} + \sqrt{\gamma_{\text{V}}^{\oplus} \gamma_{\text{V}}^{\ominus}} - \sqrt{\gamma_{\text{B}}^{\oplus} \gamma_{\text{V}}^{\ominus}} - \sqrt{\gamma_{\text{V}}^{\oplus} \gamma_{\text{B}}^{\ominus}} \right) \quad (7)$$

Složky mezifázových napětí  $\gamma_{\text{N}}^{\text{LW}}$ ,  $\gamma_{\text{B}}^{\text{LW}}$ ,  $\gamma_{\text{N}}^{\ominus}$ ,  $\gamma_{\text{N}}^{\oplus}$ ,  $\gamma_{\text{B}}^{\ominus}$ ,  $\gamma_{\text{B}}^{\oplus}$ , které vystupují v rovnicích (5) a (6), resp. (7) rovněž nejsou přímo měřitelné. Mohou však být měřeny kontaktní úhly různých kapalin (index  $\ell$ ) jak na površích pevných substrátů, tak na mikrobiálních vrstvách (index  $s = \text{N}$  pro pevné substráty,  $s = \text{B}$  pro mikrobiální vrstvy). Mezi kontaktním úhlem  $\theta$ , povrchovým napětím kapaliny ( $\gamma_{\ell}$ ) a pevného povrchu ( $\gamma_s$ ) a mezifázovým napětím pevná látka-kapalina ( $\gamma_{\ell s}$ ) platí v rovnováze Youngova rovnice:

$$\gamma_{\ell} \cos \theta = \gamma_s - \gamma_{\ell s} \quad (8)$$

Vztah pro Gibbsovu adhezni energii kapaliny  $\ell$  na pevném povrchu nosiče nebo mikrobiální vrstvy ve spojení s Youngovou rovnicí (2) má pro tento případ tvar:

$$\Delta_{\text{adh}} G_{\ell s}^{\text{tot}} = \gamma_{\ell s}^{\text{tot}} - \gamma_{\ell}^{\text{tot}} - \gamma_s^{\text{tot}} = -\gamma_{\ell}^{\text{tot}} (1 + \cos \theta) \quad (9)$$

Mezi povrchovým napětím kapaliny a kontaktním úhlem na jedné straně a polárními a nepolárními složkami povrchových napětí kapaliny a pevného povrchu na druhé straně pak platí Youngova-Dupréova rovnice<sup>9</sup>:

$$(1 + \cos \theta) \gamma_{\ell}^{\text{tot}} = 2 \left( \sqrt{\gamma_s^{\text{LW}} \cdot \gamma_{\ell}^{\text{LW}}} + \sqrt{\gamma_s^{\oplus} \cdot \gamma_{\ell}^{\ominus}} + \sqrt{\gamma_s^{\ominus} \cdot \gamma_{\ell}^{\oplus}} \right) \quad (10)$$

Dosažení hodnot kontaktních úhlů ( $\theta$ ) tří různých kapalin (dvou polárních, např. vody a formamidu a jedné

nepolární, např. 1-bromnaftalenu), u nichž je známa jak celková hodnota povrchového napětí ( $\gamma_{\ell}^{\text{tot}}$ ), tak hodnoty elektron-donorové ( $\gamma_{\ell}^{\ominus}$ ), elektron-akceptorové ( $\gamma_{\ell}^{\oplus}$ ) a nepolární ( $\gamma_{\ell}^{\text{LW}}$ ) složky povrchového napětí<sup>30</sup>, naměřených na souvislé vrstvě buněk (postupy přípravy lze nalézt v publikaci autorů Sharma a Rao<sup>10</sup>) do rovnice (10) vede k soustavě tří rovnic o třech neznámých,  $\sqrt{\gamma_s^{\text{LW}}}$ ,  $\sqrt{\gamma_s^{\oplus}}$  a  $\sqrt{\gamma_s^{\ominus}}$  (při výpočtech je nutné dosazovat přímo odmocniny, jelikož v některých případech mohou mít negativní hodnoty<sup>12</sup>). Její řešení poskytne hodnoty složek mezifázových napětí, potřebných pro výpočet adhezivní Gibbsovy energie.

Metoda měření kontaktních úhlů náleží mezi metody pro stanovení povrchových vlastností pevných látek, které lze použít i k charakterizaci povrchů mikrobiálních buněk<sup>13</sup>. Princip měření spočívá v umístění kapky kapaliny na studovaný povrch a snímání jejího tvaru po vytvoření dynamické rovnováhy. Tečna k průsečíku mezifází pevný povrch – vzduch, vzduch – kapalina a kapalina – pevný povrch definuje kontaktní úhel  $\theta$ , který je pak vyhodnocen z digitalizovaného snímku kapky. Výhoda této metody spočívá v její jednoduchosti. Je však nutné dbát na pečlivou přípravu vzorku, který po celou dobu měření musí zůstat čistý a rovný. Nevýhodou měření kontaktních úhlů vrstvy mikrobiálních buněk tkívá v tom, že aplikujeme makroskopickou metodu na studium povrchu mikroskopických organismů a je tedy nemožné odlišit variability buněčného povrchu na molekulární úrovni (např. lokalizovat specifické makromolekulární útvary, které se vyskytují v různé míře na buněčném povrchu)<sup>14</sup>.

Tato skutečnost může způsobit rozdíly mezi teoretickým přístupem predikce adheze a praktickými pokusy, jak bude podrobněji popsáno v následujících kapitolách.

Získané hodnoty lze použít pro predikci dispozice mikroorganismů k adhezi za daných podmínek. Je-li hodnota  $\Delta_{\text{adh}}G^{\text{tot}}$  kladná, budou ve vodném prostředí interakce mezi povrchem vrstvy buněk a nosiče s velkou pravděpodobností repulsivní a adheze mikroorganismu na daný substrát by tedy neměla být stabilní. To však platí pouze za předpokladu, že se v prostředí nevyskytují převládající elektrostatické interakce<sup>12</sup>. Záporné hodnoty  $\Delta_{\text{adh}}G^{\text{tot}}$  naopak indikují výhodné podmínky pro adhezi.

Protože termodynamický přístup používá složky mezifázových napětí vypočítané z kontaktních úhlů testovacích kapalin, zahrnuje v sobě celková Gibbsova interakční energie ( $\Delta_{\text{adh}}G^{\text{tot}}$ ) pouze příspěvek Lifschitz-van der Waalsových a acidobazických interakcí. Příspěvek elektrostatických interakcí mezi buňkou a nosičem, a také mezi buňkami navzájem, zde není uvažován, a to může vést k nesouladu výsledků tohoto modelu s výsledky reálných studií buněčné adheze na uvažovaném povrchu za daných podmínek. Chceme-li elektrostatické interakce zahrnout do naší studie predikce buněčné adheze, je potřeba použít jiný model, např. klasickou DLVO teorii anebo rozšířenou DLVO teorii (tzv. XDLVO). Zjednodušeně lze říci, že klasická DLVO teorie ukazuje, nakolik je kolize buňky

s jiným povrchem pravděpodobná, zatímco Gibbsova interakční energie ( $\Delta_{\text{adh}}G^{\text{tot}}$ ), která je získána termodynamickým přístupem, umožňuje předpovědět stabilitu případné interakce. Lze se proto domnívat, že interakce působící na větší vzdálenost (DLVO teorie) řídí rychlost buněčné adheze na podložku, zatímco interakce na krátkou vzdálenost (termodynamický přístup) určují sílu nezbytnou k uvolnění dvou již spojených povrchů. Nicméně toto zjednodušené rozdělení platí beze zbytku pouze pro částice, které jsou ideálně hladké a homogenní.

## 2.2. Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeekova teorie

DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) teorie byla původně vyvinuta pro popis interakcí mezi abiotickými lyofobními koloidy (např. polystyrenovými částicemi), avšak je široce používána i pro popis mikrobiální adheze.

Výsledná interakční energie ( $\Delta G^{\text{tot}}$ ), spojená s přiblížením buňky (B) k rovnému povrchu nosiče (N) ve vodném prostředí (V), je v DLVO teorii dána součtem jejich dvou aditivních komponent: elektrostatické (EL) a Lifschitz-van der Waalsovy interakční energie (LW), přičemž všechny tyto energie jsou funkcí vzdálenosti mezi nabitými povrchy ( $d$ )<sup>15</sup>:

$$\Delta_{\text{adh}}G^{\text{tot}}_{\text{DLVO}}(d) = \Delta G^{\text{EL}}(d) + \Delta G^{\text{LW}}(d) \quad (11)$$

Ve většině případů je odpudivý charakter elektrostatických sil ( $\Delta G^{\text{EL}}$ ) dán skutečností, že všechna mezifázová rozhraní nesou za daných podmínek určitý náboj.

Na povrchu mikrobiálních buněk se nachází velké množství ionogenních (funkčních) skupin, které nesou v závislosti na pH prostředí různé náboje, přičemž celkový náboj mikrobiálního povrchu je ve většině případů za fyziologických podmínek negativní. Nabitý povrch částice (buňky/nosiče) přitahuje opačně nabité ionty okolního elektrolytu a vzniká elektrická dvojvrstva. Přibližuje-li se pak k negativně nabitému povrchu negativně nabitá buňka, dochází k elektrostatickému odpuzování v důsledku překrývání difuzních částí elektrických dvojvrstev přibližujících se povrchů<sup>16</sup>.

Iontová síla ( $I$ ) ovlivňuje tloušťku elektrické dvojvrstvy a hodnotu tzv. zeta potenciálu. S rostoucí koncentrací elektrolytu klesá efektivní tloušťka elektrické dvojvrstvy. Výsledné působení elektrostatických sil (odpuzování/přitahování) tudíž závisí na charakteru povrchového náboje interagujících povrchů i na vlastnostech elektrolytu<sup>17</sup>.

Van der Waalsovy síly ( $\Delta G^{\text{LW}}$ ) jsou pro systém BVN (nebo BVB) nejčastěji přitažlivé a jsou přímo úměrné Hamakerově konstantě ( $A$ ), jak vyplývá ze vztahů (13) a (15)<sup>18</sup>. Hamakerova konstanta charakterizuje intenzitu interakce dvou povrchů v kapalném médiu a závisí na dielektrických vlastnostech prostředí a interagujících materiálů<sup>19</sup>. Přesné hodnoty Hamakerovy konstanty pro interakci mikrobiálních buněk ve vodném prostředí nejsou známy, existují pouze možnosti pro jejich odhad. Jeden způsob je

založen na experimentech s interakcí částic s povrchovou vrstvou různých směsí polysacharidů a bílkovin ve vodném prostředí. Na základě těchto pokusů se v případě buněčné adheze doporučuje dosazovat za Hamakerovu konstantu hodnoty 0,2–1,6  $kT$  (cit.<sup>20</sup>).

Druhý způsob výpočtu Hamakerovy konstanty je kombinací termodynamického přístupu a klasické teorie DLVO<sup>1</sup>. Hamakerova konstanta je vyjádřena pomocí Lifshitz-van der Waalovy složky Gibbsovy interakční energie, dané rovnicí (4):

$$A = -12 \pi d_0^2 \Delta_{\text{adh}} G^{\text{LW}} \quad (12)$$

V tomto případě je tedy nutné pro stanovení Hamakerovy konstanty vedle měření zeta-potenciálů ( $\zeta$ ) buněk a nosiče měřit také kontaktní úhly<sup>1</sup>.

Jak již bylo zmíněno, je intenzita obou typů interakcí ( $\Delta G^{\text{EL}}$  a  $\Delta G^{\text{LW}}$ ) zahrnutých v DLVO teorii funkcí vzdálenosti oddělující povrchy ( $d$ ) a zároveň závisí i na zakřivení částic (buněk) vyjádřeném poloměrem ( $a$ ). Tvar jednotlivých výpočetních vztahů dále závisí na geometrickém uspořádání studovaného systému, tj. záleží na tom, zda jde o interakci dvou sférických částic (buňka – buňka), jako např. při ko-adhezi mikrobiálních buněk, anebo zda se jedná o interakci sférické částice s rovinným povrchem (buňka – nosič) při ulpívání mikroorganismů na pevný substrát apod. V případě systému buňka (sférická částice o poloměru  $a$ ) – nosič (rovina) je výpočet složek celkové interakční energie ( $\Delta_{\text{adh}} G_{\text{BVN}}^{\text{EL}}$  a  $\Delta_{\text{adh}} G_{\text{BVN}}^{\text{LW}}$ ) v závislosti na vzdálenosti mezi povrchy ( $d$ ) dán vztahy:

$$\Delta_{\text{adh}} G_{\text{BVN}}^{\text{EL}}(d) = -\frac{A}{6} \left[ \frac{a}{d} + \frac{a}{d+2a} + \ln \left( \frac{d}{d+2a} \right) \right] \quad (13)$$

$$\Delta_{\text{adh}} G_{\text{BVN}}^{\text{LW}}(d) = \pi \varepsilon a (\zeta_1^2 + \zeta_2^2) \cdot \left[ \frac{2\zeta_1\zeta_2}{\zeta_1^2 + \zeta_2^2} \ln \frac{1 + \exp(-\kappa d)}{1 - \exp(-\kappa d)} + \ln \{1 - \exp(-2\kappa d)\} \right] \quad (14)$$

V systému buňka (poloměr  $a_1$ ) – buňka (poloměr  $a_2$ ) pro složky celkové interakční energie ( $\Delta_{\text{adh}} G_{\text{BVB}}^{\text{EL}}$  a  $\Delta_{\text{adh}} G_{\text{BVB}}^{\text{LW}}$ ) platí<sup>1</sup>:

$$\Delta_{\text{adh}} G_{\text{BVB}}^{\text{EL}}(d) = \frac{-A a_1 a_2}{6d(a_1 + a_2)} \quad (15)$$

$$\Delta_{\text{adh}} G_{\text{BVB}}^{\text{LW}}(d) = \frac{\pi \varepsilon a_1 a_2 (\zeta_1^2 + \zeta_2^2)}{(a_1 + a_2)} \cdot \left[ \frac{2\zeta_1\zeta_2}{\zeta_1^2 + \zeta_2^2} \ln \frac{1 + \exp(-\kappa d)}{1 - \exp(-\kappa d)} + \ln \{1 - \exp(-2\kappa d)\} \right] \quad (16)$$

Z rovnic (13) a (15) je patrné, že přitažlivé van der Waalovy síly nejsou ovlivňovány iontovou silou okolního elektrolytu. Ve vztazích (14) až (16) představuje  $\kappa^{-1}$  tloušťku elektrické difuzní dvojvrstvy (Debyeova délka) a lze ji vypočítat pomocí vztahu (17) (cit.<sup>1</sup>):

$$\kappa = \left[ \frac{e^2}{\varepsilon kT} \sum_i z_i^2 n_i \right]^{1/2} \quad (17)$$

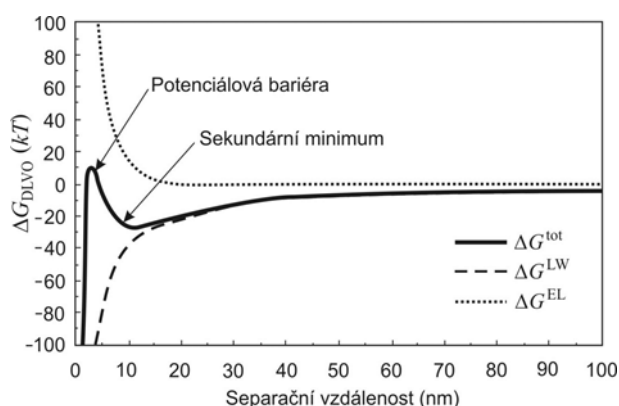
Kromě rovnic (13) až (16) existuje v literatuře celá řada matematických vyjádření DLVO teorie umožňujících výpočet interakčních energií pro různá geometrická uspořádání studovaného systému. Zejména pro částice se zakřiveným povrchem byly odvozeny různé integrační postupy. Nicméně, pro interakce koloidních částic s rozměry kvasinek v elektrolytu s iontovou silou 10–100  $\text{mmol dm}^{-3}$  lze s dostatečnou přesností použít vztahy založené na Derjaguinových aproximacích<sup>21</sup>. Celková interakční energie ( $\Delta_{\text{adh}} G^{\text{tot}}$ ) se nejčastěji udává v jednotkách  $kT$  ( $1 kT = 4,04 \cdot 10^{-21}$  J při 293 K), což umožňuje srovnání s kinetickou energií Brownova pohybu mikroorganismů (cca. 1,5  $kT$ ) jako referenční hodnotou<sup>22</sup>.

Celkový povrchový náboj biotických povrchů, včetně povrchového náboje mikroorganismů, je ve většině případů negativní. Tato skutečnost však nevylučuje možnost celkové přitažlivosti mezi povrchy, jelikož při vyšší iontové síle prostředí mohou převládat přitažlivé disperzní síly nad odpuzováním stejně nabitých difuzních dvojvrstev, jelikož je tloušťka těchto dvojvrstev v důsledku vysoké iontové síly prostředí zmenšená. Debyeova délka se při zvýšení iontové síly elektrolytu z 1  $\text{mmol dm}^{-3}$  na 500  $\text{mmol dm}^{-3}$  zmenší přibližně z 10 nm na 0,2 nm a tím se usnadní vzájemný přístup interagujících povrchů.

Na druhou stranu mohou mít vysoké hodnoty iontové síly (nad 200  $\text{mmol dm}^{-3}$ ) na adhezi i negativní účinek, a to z důvodů, které nejsou popsány DLVO teorií.

Obecně byla prokázána dobrá shoda experimentálních výsledků s DLVO teorií při nízkých koncentracích elektrolytu; při vyšších koncentracích se projevují rostoucí odchylky mezi predikcí a experimentálně zjištěnou adhezí<sup>23</sup>.

Běžná kultivační média, aplikovaná pro mikrobiologické operace, mají iontovou sílu v rozsahu 10 až 100  $\text{mmol dm}^{-3}$ . V takových prostředích mohou být buňky reverzibilně ukotveny v určité vzdálenosti od povrchu pevného substrátu v tzv. sekundárním minimu, nebo energie kolize částic může vést k překonání malé potenciálové bariéry zabraňující přímému kontaktu povrchů (obr. 2). V mnoha případech lze přechodné ukotvení v sekundárním minimu považovat za dostatečné pro úspěšnou adhezi, jelikož v této vzdálenosti (několik nm) se již mohou projevit specifické biochemické interakce vedoucí k pevné nevratné adhezí<sup>3</sup>.



Obr. 2. Závislost Gibbsovy interakční energie ( $\Delta G^{\text{tot}}$ ) a jejich složek (EL - elektrostatických sil, LW - van der Waalsových sil) na vzdálenosti mezi kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae* a plochou nosiče vypočítaná podle DLVO teorie<sup>24</sup>: poloměr buňky  $a = 3 \mu\text{m}$ , Hamakerova konstanta  $A = 0,8 \text{ kT}$ , zeta potenciál buňky  $\zeta = -12 \text{ mV}$ , zeta potenciál nosiče  $\zeta = -5 \text{ mV}$ , iontová síla roztoku  $I = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$

### 2.3. Rozšířená Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeekova teorie a další „dolaďování“ modelů

Jelikož ani termodynamický přístup ani klasická DLVO teorie nedokázaly plně vysvětlit mikrobiální adhezi, přistoupilo se k doplnění tradičních DLVO interakcí o Lewisovy acidobazické (hydrofobní/hydrofilní) interakce<sup>8,25</sup>. Celková interakční energie adheze ( $\Delta_{\text{adh}} G^{\text{tot}}$ ) v závislosti na separační vzdálenosti ( $d$ ) se v rozšířené DLVO (XDLVO) teorii pak vyjadřuje jako<sup>15</sup>:

$$\Delta_{\text{adh}} G_{\text{XDLVO}}^{\text{tot}}(d) = \Delta G^{\text{EL}}(d) + \Delta G^{\text{LW}}(d) + \Delta G^{\text{AB}}(d) \quad (18)$$

Poslední člen tohoto vztahu ( $\Delta G^{\text{AB}}$ ) zahrnuje acidobazické interakce, které jsou založeny na interakcích donorů a akceptorů elektronů a ve své podstatě přidávají do DLVO teorie jevy jako např. hydrofobní interakce, hydrofilní interakce, hydratační efekty a osmotické interakce (pro buňky je lze zanedbat). Odhaduje se, že sumární intenzita acidobazických interakcí je při blízkém kontaktu povrchů 10 až 100krát vyšší než van der Waalovy interakce. Vliv acidobazických interakcí na adhezi je tudíž podle rozšířené DLVO teorie nesmírně výrazný.

Protože se však jedná o síly relativně krátkého dosahu (méně než 5 nm), je nutný blízký kontakt povrchů k tomu, aby se výrazněji projeví. Rozšířenou DLVO teorii lze považovat za kombinaci termodynamického přístupu a klasické DLVO teorie, jelikož se do vztahu (19) dosazuje polární složka mezifázové interakční energie ( $\Delta G^{\text{AB}}$ ) získaná termodynamickým přístupem<sup>25</sup>. Pro výpočet  $\Delta G^{\text{EL}}(d)$  a  $\Delta G^{\text{LW}}(d)$  u XDLVO teorie platí vztahy (13) až (16).

Výpočet  $\Delta G^{\text{AB}}(d)$  pro systém buňka (poloměr  $a$ ) – nosič (rovina) v závislosti na vzdálenosti mezi povrchy ( $d$ ) je dán vztahem (19). Vztah (20) popisuje podobný výpočet pro systém adheze dvou buněk o poloměru ( $a$ ) v závislosti na vzdálenosti mezi povrchy ( $d$ ) (cit.<sup>12</sup>):

$$\Delta G_{\text{BVN}}^{\text{AB}}(d) = 2 \pi a \lambda \Delta G^{\text{AB}} \exp[(d_0 - d)/\lambda] \quad (19)$$

$$\Delta G_{\text{BVB}}^{\text{AB}}(d) = \pi a \lambda \Delta G^{\text{AB}} \exp[(d_0 - d)/\lambda] \quad (20)$$

Ve vztazích (17) a (18) se objevuje tzv. rovnovážná vzdálenost (nejbližší možný kontakt povrchů)  $d_0 = 0,158 \pm 0,009 \text{ nm}$  a korelační délka molekul v kapalném médiu<sup>1,26</sup> ( $\lambda$ ), která se pohybuje v závislosti na převažující acidobazické interakci (hydrofilní odpuzování nebo hydrofobní přitažlivost) v rozmezí 0,6 až 13 nm.

Klasická i rozšířená DLVO teorie pro koloidní systémy vycházejí z předpokladu, že k interakcím dochází mezi dokonale hladkými, rigidními a co do povrchových vlastností homogenními částicemi. V reálném světě, a zejména v případě adheze buněk, ovšem tyto počáteční podmínky neplatí, což v mnoha případech omezuje platnost tohoto modelu, nebo komplikuje jeho interpretaci. Například, přestože je celkový povrchový náboj většiny buněk negativní, neměl by se v některých případech zanedbávat význam lokálních pozitivních nábojů v procesu adheze<sup>27</sup>. Rovněž v případě interakce pivovarských kvasinek s povrchem částic upraveného mláta se lze domnívat, že jedním z mechanismů stabilní adheze buněk na nosič mohou být interakce v důsledku lokálních hydrofobních extrémů na povrchu nosiče<sup>24</sup>. Značná rozmanitost experimentálních pozorování vede k soustavné tvorbě nových matematických modelů snažících se doplnit již existující a tím lépe vystihnout průběh adheze v reálných systémech. Jelikož ovšem zatím neexistuje ucelený model pro předpověď interakčních energií platný pro všechny adhezni mechanismy, je při výběru výpočetního modelu nutné znát, nebo alespoň vhodně odhadnout dílčí proces (řídící jev), který v daném systému nejvíce ovlivňuje adhezi.

Značný vliv na průběh adheze má drsnost interagujících povrchů. Porovnání matematických modelů adheze pro dokonale hladké povrchy s experimentálními výsledky reálných vzorků ukázalo, že se rozdílly zvětšovaly s rostoucí drsností interagujících povrchů. Bylo zjištěno, že při větší separační vzdálenosti povrchové nerovnosti sice zvyšují elektrostatické odpuzování, při malých vzdálenostech však zvyšují intenzitu přitažlivých sil (van der Waals) a dramaticky snižují potenciálovou bariéru mezi povrchy. Zmenšení této energetické překážky zabraňující adhezi vedlo k výraznějšímu ulpívání částic, než to předpovídaly modely pro dokonale hladké povrchy. Matematické modely následně odvozené pro zakřivené a nedokonale hladké povrchy jsou přinejmenším v kvalitativní shodě s pozorovanými jevy pro reálné (neidealizované) systémy<sup>28–30</sup>.

V případě, že jsou na povrchu interagujících ploch přítomny „mobilní“ makromolekuly, mohou ovlivňovat adhezi na dlouhou vzdálenost buď interakcí vzájemnou, nebo s rozpouštědlem, či přímo s povrchem nosiče/buňky<sup>9</sup>. Přitažlivé adhezivní síly vznikající interakcí polymerních struktur na povrchu buněk lze rozdělit na specifické interakce mezi komplementárními částmi molekul polymerů, a na nespecifickou chemickou adsorpci. Nespecifické tzv. sterické interakce povrchových polymerních struktur mohou během přibližování buněk vést ke koncentraci polymeru a tudíž k osmotickému tlaku v překrývajících se vrstvách a ke vzniku odpuzivých sil. V případě, že je vrstva polymerů hustá, dochází k osmotickým a entalpiickým efektům odpuzování již při větších separačních vzdálenostech<sup>16</sup>. Model popisující tuto situaci je založen na rozšířené DLVO teorii, která je doplněná o interakce povrchových lipopolysacharidů G<sup>-</sup> bakterií<sup>7</sup>. K tomuto typu interakcí může docházet mezi povrchovými strukturami buněk, např. vzájemné působení glykosylovaných mannoproteinů buněčných stěn *Saccharomyces cerevisiae*, anebo mohou do těchto interakcí vstupovat i povrchy, u nichž došlo k adhezi makromolekul z kapalného prostředí (polysacharidy, proteiny, lipopolysacharidy atd.). Obecně lze říci, že spolehlivé zahrnutí sterických interakcí do matematických modelů adheze je náročný problém, jehož komplexnost se ještě zvyšuje v případě přítomnosti elektrického náboje na povrchových strukturách<sup>31</sup>.

Jak již bylo zmíněno, buňky zachycené v sekundárním minimu mohou vytvářet stabilní adhezivní interakce pomocí makromolekul, mezi něž patří i kvasničné lektiny glykoproteinového charakteru (adhesiny). Zejména při vyšších iontových silách elektrolytů, kdy dochází ke stlačování elektrických dvojrůstek, jsou makromolekuly schopny vytvořit vazby (specifické nebo nespecifické) přemostěním vzdáleností mezi částicemi v sekundárním minimu, což vede k nevratné adhezi<sup>22</sup>. Tyto lokální variace povrchových vlastností buněk nemohou být zachyceny metodou měření kontaktních úhlů. Důsledkem toho je, že adheze buněk prostřednictvím adhesinů by ve skutečnosti mohla být energeticky výhodnější, než bylo předpovězeno pomocí XDLVO teorie<sup>4,14</sup>.

#### 2.4. Soulad mezi predikcí a experimentálními daty

Ze srovnání různých verzí DLVO teorie s výsledky adhezivních pokusů vyplývá, že kvalitativní popis pozorování a předpověď adheze různých povrchů jsou do značné míry spolehlivé. Shoda mezi modelem chování buněk jako koloidních částic a experimentem se navíc zvyšuje se stupněm zjednodušení interagujících soustav, např. interakce buněk s hladkým a homogenním povrchem (sklo, plasty)<sup>32,33</sup>. V těchto případech je rozšířená DLVO teorie schopna vysvětlit i řídicí děj buněčné adheze. Například v případě polystyrenových kopolymerů se ukázalo, že řídicím dějem není odpuzování elektrických dvojrůstek, ale hydrofobní acidobazické interakce<sup>34</sup>.

Další podmínkou při výběru některého z fyzikálně-

chemických nástrojů pro předpověď buněčné adheze je znalost a zahrnutí řídicího jevu pro daný systém do bilance interakčních energií. K jeho identifikaci v průběhu adheze ovšem může posloužit právě neshoda mezi modelem a skutečností<sup>33,35,36</sup>. DLVO model například správně rozlišil mezibuněčnou interakční ochotu flokulujícího a neflokulujícího kmene kvasinek *S. cerevisiae*. Nicméně adhezivní síla mezi buňkami byla ve skutečnosti až 2000krát větší, než předpovídaly pouze fyzikálně-chemické interakce. Z toho bylo možné usoudit, že řídicím dějem flokulace jsou specifické interakce biologického charakteru<sup>37</sup>.

Tradiční DLVO teorie byla rovněž použita pro předpověď resp. vysvětlení procesů probíhajících během adheze a flokulace kvasinek *S. cerevisiae* v procesu vytváření multicelulárního mikrobiálního společenství. Experimentální výsledky potvrzují, že DLVO teorie kvalitativně správně předpovídá možnost ulpívání a flokulace použitého kmene pivovarských kvasinek<sup>24</sup>. Nicméně kvantitativní spolehlivost těchto předpovědí je diskutabilní a při jejich interpretaci je potřeba si uvědomit, že teoretické předpovědi adheze pracují s řadou zjednodušujících předpokladů. Výsledky výpočtů mají proto zejména srovnávací význam<sup>24,38</sup>.

Některé kvantitativní nedostatky fyzikálně-chemických teorií aplikovaných na živé buňky pomáhá překlenout vývoj metodik přímého měření intenzity interakčních sil (např. mikroskopie atomárních sil, optické metody na principu evanescentní vlny). Ověření DLVO teorie a její předpovědi byla provedena např. optickou metodou měření interakčních sil (evanescentní vlna) v případě adheze kvasinek *Candida albicans*. Výsledky ukazují, že DLVO teorie spolehlivě vystihuje interakci buňka – nosič (hladké podložní sklíčko) v prostředí s nízkou koncentrací elektrolytu ( $\leq 0,23 \text{ mmol dm}^{-3}$  NaCl), kdy separaci buněk od nosiče ovlivňuje v převážné míře odpuzivý efekt difuzní elektrické dvojrůstvy. Při vyšší iontové síle prostředí, kdy se při bližším kontaktu povrchů začnou projevovat interakce nezahrnuté v DLVO teorii (např. sterické efekty povrchových struktur), tato teorie podhodnocuje průběh interakční energie v závislosti na separační vzdálenosti povrchů<sup>23</sup>. Jiné výsledky, získané s použitím mikroskopie atomárních sil, naznačují, že při procesu uvolňování buněk dochází k jejich značné deformaci a tzv. odlupování povrchových struktur. Tato zjištění potvrzují podle autorů roli specifických interakcí při buněčné adhezi, kterou nelze vysvětlit pouze hydrofobicitou a DLVO teorií. Experimentální pozorování odhalilo rovněž význam dalších biologických činitelů na průběh adheze, např. vliv růstové fáze buněk a doby kontaktu povrchů<sup>39</sup>. Adheze buněk na povrchy je také závislá na historii buněk, jak dokazuje rozdílná adheze rehydratovaných sušených kvasinek a kvasinek izolovaných z růstového média<sup>33</sup>. Úspěšná aplikace modelů chování koloidních částic na reálné biologické systémy je proto závislá na vhodné volbě modelu pro daný systém, reprodukovatelnosti experimentálních podmínek a na složitosti interagujícího systému resp. počtu zjednodušujících předpokladů pro něj vymezených.

**Závěr**

Aplikace teoretického přístupu (tj. využití různých fyzikálně-chemických modelů) pro studium adheze mikroorganismů na určitý povrch umožňují předpovědět podmínky (ne)úspěšné adheze a tím významně přispět ke studiu buněčné adheze, a dále vzniku a vývoje biofilmu. Je však nutné neopomenout skutečnost, že všechny výše zmíněné modely jsou spojené s řadou zjednodušení, které neumožňují dokonale vystihnout reálný studovaný systém za všech okolností.

*Tato práce vznikla za finanční podpory GA ČR (P503/10/1270) a účelové podpory na specifický vysokolekolský výzkum (MŠMT č.21/2011).*

## Seznam symbolů a zkratek

$a$	poloměr částice (m)
$A$	Hamakerova konstanta (J nebo $kT$ , kdy $1 kT = 4,04 \cdot 10^{-21}$ J při 293 K)
$d$	vzdálenost mezi povrchy částic (m)
$d_0$	nejbližší možný kontakt povrchů ( $0,158 \pm 0,009$ nm)
$e$	elementární náboj ( $1,602 176 53 \cdot 10^{-19}$ C)
$G$	interakční energie mezi povrchy (J nebo $kT$ )
$\Delta G$	volná Gibbsova interakční energie ( $J m^{-2}$ )
$I$	iontová síla roztoku ( $mol dm^{-3}$ )
$k$	Boltzmannova konstanta ( $1,38 \cdot 10^{-23}$ J K <sup>-1</sup> )
$n_i$	počet iontů v jednotce objemu
$T$	termodynamická teplota (K)
$z_i$	náboj (valence) přítomných iontů
$\gamma$	povrchové napětí ( $J m^{-2}$ )
$\varepsilon$	permitivita prostředí / daného materiálu
$\varepsilon_0$	permitivita vakua ( $8,8542 \cdot 10^{-12}$ F m <sup>-1</sup> )
$\varepsilon_r$	relativní permitivita
$\zeta$	zeta potenciál (V)
$\theta$	hodnota kontaktního úhlu testovací kapaliny na studovaném povrchu (°)
$\kappa^{-1}$	Debyeova délka (m)
$\lambda$	korelační délka molekul v kapalném médiu (nm)
1, 2	index rozlišující interakci dvou různých povrchů
AB	polární interakce (Lewisovy acidobazické síly)
B	buňka
BVB	systém buňka – voda – buňka
BVN	systém buňka – voda – nosič
DLVO	Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeekova teorie
XDLVO	rozšířená Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeekova teorie
EL	elektrostatické síly
$\ell$	kapalina pro měření kontaktních úhlů
LW	nepolární interakce (Lifshitz-van der Waalsovy síly)

N	nosič
tot	celková hodnota veličiny
V	voda

## LITERATURA

1. Bos R., Van der Mei H. C., Busscher H. J.: *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 179 (1999).
2. Dunne W. M., Jr.: *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 155 (2002).
3. Hermansson M.: *Colloids Surf., B* 14, 105 (1999).
4. Verstrepen K. J., Klis F. M.: *Mol. Microbiol.* 60, 5 (2006).
5. Absolom D. R., Lamberti F. V., Policova Z., Zingg W., Van Oss C. J., Neumann A. W. A.: *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 90 (1983).
6. Bellon-Fontaine M., Mozes N., Van der Mei H., Sjollema J., Cerf O., Rouxhet P., Busscher H.: *Cell Biochem. Biophys.* 17, 93 (1990).
7. Jucker B. A., Zehnder A. J. B., Harms H.: *Environ. Sci. Technol.* 32, 2909 (1998).
8. Van Oss C. J., Good R. J., Chaudhury M. K.: *J. Colloid Interface Sci.* 111, 378 (1986).
9. Ma H., Dickinson R. B.: *J. Theor. Biol.* 226, 237 (2004).
10. Sharma P. K., Hanumantha Rao K.: *Adv. Colloid Interface Sci.* 98, 341 (2002).
11. Skvarla J.: *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 89, 2913 (1993).
12. Van Oss C. J.: *J. Mol. Recognit.* 16, 177 (2003).
13. Henriques M., Gasparetto K., Azeredo J., Oliveira R.: *Biotechnol. Lett.* 24, 1111 (2002).
14. Kurec M., Brányik T.: *Colloids Surf., B* 84, 491 (2011).
15. Bayoudh S., Othmane A., Mora L., Ben Ouada H.: *Colloids Surf., B* 73, 1 (2009).
16. Myers D.: *Surfaces, Interfaces and Colloids: Principles and Applications, Second Edition*, kap. 10. Wiley, New York 1999.
17. James A. M., v knize: *Microbial Cell Surface Analysis: Structural and Physicochemical Methods* (Mozes N., Handley P. S., Busscher H. J., Rouxhet P. G., ed.), kap. 3. Wiley, New York 1991.
18. Israelashvili J. N.: *Intramolecular and Surface Forces*. Elsevier, Amsterdam 2010.
19. Morrison I. D., Ross S., v knize: *Colloidal dispersions, Suspensions, emulsions and Foams*, kap. 18. Wiley, New York 2002.
20. Nir S.: *Prog. Surf. Sci.* 8, 1 (1977).
21. Bhattacharjee S., Ko C.-H., Elimelech M.: *Langmuir* 14, 3365 (1998).
22. Boonaert C. J.-P., Dupont-Gillain C. C., Dengis P. B., Dufrene Y. F., Rouxhet P. G., v knize: *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation* (Flickinger M. C., Drew S. W., ed.), str. 532. Wiley, New York 1999.
23. Sharp J. M., Dickinson R. B.: *Langmuir* 21, 8198 (2005).

24. Brányik T., Vicente A., Oliveira R., Teixeira J.: *Biotechnol. Bioeng.* 88, 84 (2004).
25. Van Oss C. J.: *Colloids Surf., B* 5, 91 (1995).
26. Van Oss C. J.: *J. Mol. Recognit.* 3, 128 (1990).
27. Walz J. Y.: *Adv. Colloid Interface Sci.* 74, 119 (1998).
28. Suresh L., Walz J. Y.: *J. Colloid Interface Sci.* 183, 199 (1996).
29. Suresh L., Walz J. Y.: *J. Colloid Interface Sci.* 196, 177 (1997).
30. Adamczyk Z., v knize: *Particles at Interfaces: Interactions, Deposition, Structure*, kap. 2. Elsevier, Amsterdam 2006.
31. Oliveira R.: *Exp. Therm. Fluid Sci.* 14, 316 (1997).
32. Mercier-Bonin M., Ouazzani K., Schmitz P., Lorthois S.: *J. Colloid Interface Sci.* 271, 342 (2004).
33. Guillemot G., Vaca-Medina G., Martin-Yken H., Vernhet A., Schmitz P., Mercier-Bonin M.: *Colloids Surf., B* 49, 126 (2006).
34. Kang S., Choi H.: *Colloids Surf., B* 46, 70 (2005).
35. Wang S., Guillen G., Hoek E. M.: *Environ. Sci. Technol.* 39, 6461 (2005).
36. Gotzinger M., Weigl B., Peukert W., Sommer K.: *Colloids Surf., B* 55, 44 (2007).
37. Van Hamersveld E. H., Van Loosdrecht M. C. M., Luyben K. C. A. M.: *Colloids Surf., B* 2, 165 (1994).
38. Chang Y.-I., Shih L.-H., Chen S.-W.: *Colloids Surf., B* 44, 6 (2005).
39. Bowen W. R., Lovitt R. W., Wright C. J.: *J. Colloid Interface Sci.* 237, 54 (2001).

**G. Procházková<sup>a</sup>, V. Jirků<sup>a</sup>, L. Bartovská<sup>b</sup>, and T. Brányik<sup>a</sup>** (<sup>a</sup>*Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering,* <sup>b</sup>*Department of Physical Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic*):  
**Using Physico-Chemical Approaches to Predict Microbial Adhesion**

Microbial adhesion to solid surfaces has either important applications (immobilization) or negative (cause of illnesses, biofouling etc.) implications. This review summarizes the theoretical models that are able to predict quantitatively the cell adhesion to solid particles, based on physicochemical properties of the interacting surfaces, such as the thermodynamic balance of interaction energies, classical DLVO and extended DLVO (XDLVO) theory. It deals with their principles, advantages, limitations and (dis)agreements between model predictions and adhesion experiments.

## SACHARIDY

Miloslav Černý  
Tomáš Trnka  
Miloš Buděšinský



Edice Chemických listů  
ČSCH  
2010

**V prodejně v NTK:**

**Univerzitní knihkupectví  
odborné literatury ČVUT  
Technická 6  
160 80 Praha 6**

**je k dispozici učebnice:**

**Miloslav Černý, Tomáš Trnka, Miloš Buděšinský  
Sacharidy**

**Vydavatelství ČSCH v edici Chemické listy  
Praha, 2010, 178 stran, cena 350 Kč  
ISBN 978-80-86238-81-4.**