

Náboj a pevnosť vonkajšej časti bunečnej steny *Thiobacillus ferrooxidans* v médiu s nízkou iónovou silou

Jiří Škvarla¹ a Daniel Kupka²

Charge and softness of the outer part of the cell wall of *Thiobacillus ferrooxidans* in the low ionic strength medium

The surface charge and surface potential are parameters influencing the microbial adhesion phenomenon through the electrostatic interaction between bacteria and substrates. The Smoluchowski equation, originally developed for estimating the above parameters from the experimentally accessible electrophoretic mobility of rigid colloid particles, is however inapplicable to the elastic bacterial cells. The problem is that the outer cell wall of bacteria is a layer with a complex polyelectrolyte structure. In this article, the Ohshima's model of the "soft" particle is applied to describe the surface electrostatics of *Thiobacillus ferrooxidans* cells by measuring their electrophoretic mobility in distilled water as a function of a (low) ionic strength and pH. In this model, the rigid core is considered to be covered with a charged impenetrable layer of polyelectrolytes. Two model parameters have been determined by the curve fitting at pH from 3.2 to 5.8, namely the number density of the dissociated groups N and the softness parameter $1/\lambda$ of the polyelectrolyte layer of the bacterium. A disagreement of the best fit parameters (evaluated by the correlation coefficient) with the analogous parameters determined for other colloids (including bacterial cells) in aqueous solutions of a high ionic strength is discussed.

Key words: zeta potential, surface electric charge, electrophoretic mobility, microbial cells, soft cell analysis, *Thiobacillus ferrooxidans*.

Úvod

Povrchový náboj bakteriálnych buniek zohráva dôležitú úlohu v ich fyziológii a prostredníctvom elektrostatickej interakcie aj v adhézii na tuhé substráty (Bayer a Slotter, 1990; James, 1991; Wilson *et al.*, 2001; van Oss, 1991). V modelových vzťahoch pre tento typ interakcie vystupuje (podobne ako pri koloidných časticiach) elektrický potenciál alebo náboj povrchu, ktorý sa vypočítava z experimentálne merateľnej elektroforetickej pohyblivosti buniek vo vonkajšom elektrickom poli, a to podľa známej Smoluchovského rovnice. Táto rovnica je platná hlavne pre koloidné objekty s ideálnym, t.j. nedeforovateľným a hladkým povrchom.

Gram-negatívne baktérie však majú elastickú štruktúrovanú vonkajšiu bunečnú membránu s určitou hrúbkou (v závislosti na iónovej sile a pH príslušného roztoku, ako aj na rôznych biologických faktoroch), ktorá je tvorená makromolekulami so zložitou priestorovou konformáciou a distribúciou iónických a hydrofóbných skupín. Je to vysoko organizovaná asymetrická dvojvrstva zložená z proteínov a fosfolipidov (vnútorná časť) a lipopolysacharidov (vonkajšia časť), pričom posledne menované pozostávajú z hydrofóbnej lipidovej zložky ("core" polysacharidy) a O-antigeneticky špecifických polysacharidov. Elektrický náboj je viazaný najmä na lipopolysacharidy a prostredníctvom ich fosforylových a karboxylových skupín má aniónický charakter. Extracelulárne polysacharidy majú tiež silne acidický charakter (Hancock, 1991; Beveridge, 1999; Yao *et al.*, 1999).

Tieto vlastnosti spôsobujú, že u baktérií je existencia ideálne tuhého povrchu (ostrého rozhrania s okolným prostredím) nereálna a využitie Smoluchovského rovnice na výpočet ich povrchového elektrostatického potenciálu alebo náboja je preto neoprávnené.

V súčasnosti sa pomerne veľká pozornosť sústreďuje na elektroforetickú teóriu "mäkkej" častice. Túto teóriu zaviedol H. Ohshima, vychádzajúc z predstavy ideálnej častice pokrytej elektricky nabitou vrstvou, ktorá má schopnosť prepúšťať ióny a molekuly vody (Ohshima, 1994; 1995; 2000; Ohshima *et al.*, 1992). Naším cieľom bolo overiť možnosť aplikácie tejto teórie pri stanovení náboja vonkajšej časti bunečnej steny *Thiobacillus ferrooxidans*.

Teória

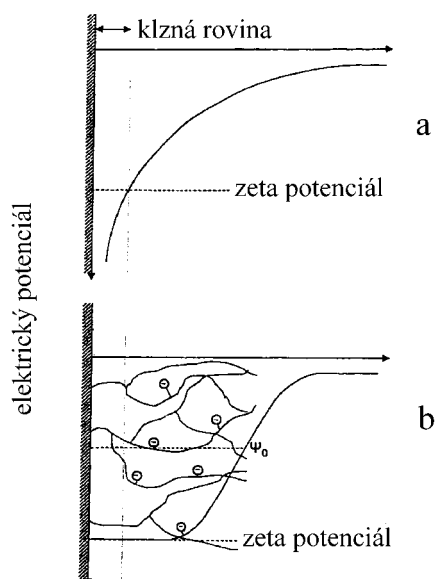
Smoluchovského rovnica vyjadruje závislosť elektroforetickej pohyblivosti μ ($\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$) tuhej dielektrickej koloidnej sférickej častice s elektrickým nábojom rovnomerne rozdeleným po povrchu (neprestupnom pre ióny elektrolytov) na jej povrchovom φ_0 alebo zeta ζ potenciále (elektrokinetický potenciál v tzv. strihovej alebo klznej rovine oddeľujúcej nepohyblivú a pohyblivú časť elektrickej dvojvrstvy častice pohybujúcej sa v elektrickom poli; vid' obr.1a):

$$\mu = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta}{\eta}, \quad (1)$$

¹ Doc. Ing. Jiří Škvarla, CSc., Katedra mineralurgie a environmentálnych technológií, Technická univerzita Košice, Park Komenského 19, 04384 Košice, Jiri.Skvarla@tuke.sk

² MVDr. Daniel Kupka, Ústav geotechniky SAV, Watsonova 45, 04353 Košice, dankup@saske.sk
(Recenzované, revidovaná verzia dodaná do 10.12.2001)

kde η je viskozita a $\varepsilon_r \varepsilon_0$ je permitivita kvapalného roztoku elektrolytu. Táto rovnica platí pre častice tenkou elektrickou dvojvrstvou, charakterizovanou bezrozmernou Debye-Hückelovou dĺžkou $\kappa a \gg 1$ (a je polomer častice) a pre malé hodnoty ζ -potenciálu.



Obr.1 Priebeh elektrického potenciálu v závislosti na vzdialenosti od povrchu tuhej častice (a) a (jadra) mäkkej častice (b). Elektrický potenciál tuhej častice klesá exponenciálne a v klznej rovine dosahuje určitú hodnotu (zeta potenciál), ktorá je menšia ako hodnota povrchového potenciálu φ_0 . Tento zeta potenciál je menší ako zeta potenciál mäkkej častice (pri nezmenenej polohe klznej roviny). Ide o dôsledok prítomnosti náboja vrstvy polymérov mäkkej častice (v tomto prípade je zeta potenciál väčší ako φ_0).

Fig.1 Course of electric potential depending on the surface distance of rigid (a) and (core) soft (b) particle. The electric potential of the rigid particle decreases exponentially and attains a certain value (zeta potential) at the slip plane, which is lower as that of the surface potential φ_0 . This zeta potential is lower than that of the soft particle (at the same slip plane). This is a consequence of the presence of the polymer layer charge of the soft particle (in this case, the zeta potential is higher than φ_0).

Pre tzv. sférický polyelektrolyt (porézna nabitá sféra bez pevného jadra), v ktorom je náboj rovnomerne rozptýlený s objemovou hustotou ρ_{fix} , bola odvodená Hermans-Fujitova rovnica (neuvažujúca strihovú rovinu a teda ani ζ -potenciál):

$$\mu = \frac{\rho_{\text{fix}}}{\eta \lambda^2} \left[1 + \frac{2}{3} \left(\frac{\lambda}{\kappa} \right)^2 \frac{1 + \lambda/2\kappa}{1 + \lambda/\kappa} \right]. \quad (2)$$

V rovnici (2) je $1/\lambda$ (udaná v jednotkách dĺžky) „mäkkosť“ daného polyelektrolytu, vyjadrená jeho odporom voči prieniku okolnej kvapaliny. Tento parameter je definovaný ako pomer viskozity kvapalného roztoku η a súčiniteľa trenia polyelektrolytu γ .

$$1/\lambda = \left(\frac{\eta}{\gamma} \right)^{1/2}. \quad (3)$$

Ohshimova teória elektroforézy mäkkých častíc (t.j. tuhých častíc pokrytých polyelektrolytovou vrstvou) zjednocuje Smoluchowskeho a Hermans-Fujitovu elektroforetickú teóriu, pričom vychádza z nasledujúcich predpokladov (obr.1b):

1. kvapalina prúdiaca (pri nízkych Re číslach) cez polyelektrolytovú vrstvu je nestlačiteľná,
2. aplikované elektrické pole je pomerne slabé,
3. klzná rovina je na povrchu tuhej časti (jadra) častice,
4. ióny elektrolytu môžu prechádzať polyelektrolytovou vrstvou, ale nemôžu preniknúť do jadra častice,
5. relatívna permitivita je rovnaká vo vnútri aj mimo polyelektrolytovej vrstvy.

Ak podľa tejto teórie označíme polomer vnútorného jadra ako a a konštantnú hrúbku polyelektrolytovej vrstvy ako d (takže vonkajší polomer sférickej častice pokrytej touto vrstvou je $b = a + d$) získame jednoduchý aproximačný vzťah pre μ mäkkej sférickej častice v závislosti na váženom priemere Donnanovho potenciálu a potenciálu medzi vrstvou povrchového náboja a okolitého roztoku: ($\lambda a \gg 1$, $\kappa a \gg 1$, $\lambda d \gg 1$, $\kappa d \gg 1$):

$$\mu = \frac{2\varepsilon_0 \varepsilon_r}{3\eta} \frac{\varphi_0 / \kappa_m + \varphi_{\text{DON}} / \lambda}{1/\kappa_m + 1/\lambda} \left[1 + \frac{1}{2(1+d/a)^3} \right] + \frac{\rho_{\text{fix}}}{\eta \lambda^2}, \quad (4)$$

kde Donnanov potenciál v polyelektrolytovej vrstve je

$$\varphi_{\text{DON}} = \frac{kT}{ze} \ln \left[\frac{\rho_{\text{fix}}}{2ze n^\infty} + \sqrt{\left(\frac{\rho_{\text{fix}}}{2ze n^\infty} \right)^2 + 1} \right] \quad (5)$$

a povrchový potenciál na rozhraní danom polomerom b je

$$\varphi_0 = \frac{kT}{ze} \left\{ \ln \left[\frac{\rho_{\text{fix}}}{2zen^\infty} + \sqrt{\left(\frac{\rho_{\text{fix}}}{2zen^\infty} \right)^2 + 1} \right] + \frac{2zen^\infty}{\rho_{\text{fix}}} \left[1 - \sqrt{\left(\frac{\rho_{\text{fix}}}{2zen^\infty} \right)^2 + 1} \right] \right\}. \quad (6)$$

Tzv. efektívny Debye-Hückelov parameter polyelektrolytovej vrstvy κ_m je (uvažuje sa symetrický elektrolyt s valenciou z a rovnovážnou číselnou hustotou n^∞)

$$\kappa_m = \kappa^4 \sqrt{1 + \left(\frac{\rho_{\text{fix}}}{2zen^\infty} \right)^2}, \quad (7)$$

kde

$$\kappa = \sqrt{\frac{2n^\infty e^2 z^2}{\varepsilon_0 \varepsilon_r kT}}. \quad (8)$$

Pre nízke hodnoty povrchového potenciálu sa rovnica (4) redukuje na tvar

$$\mu = \frac{\rho_{\text{fix}}}{\eta \lambda^2} \left\{ 1 + \frac{2}{3} \left(\frac{\lambda}{\kappa} \right)^2 \frac{1 + \lambda/2\kappa}{1 + \lambda/\kappa} \left[1 + \frac{1}{2(1 + d/a)^3} \right] \right\}. \quad (9)$$

Ak $d \ll a$ (napr. pre biologické bunky), platí aproximácia

$$\mu = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r}{\eta} \frac{\varphi_0 / \kappa_m + \varphi_{\text{DON}} / \lambda}{1/\kappa_m + 1/\lambda} + \frac{\rho_{\text{fix}}}{\eta \lambda^2}, \quad (10)$$

ktorá pre nízke potenciály prechádza na ešte jednoduchší tvar:

$$\mu = \frac{\rho_{\text{fix}}}{\eta \lambda^2} \left[1 + \left(\frac{\lambda}{\kappa} \right)^2 \frac{1 + \lambda/2\kappa}{1 + \lambda/\kappa} \right]. \quad (11)$$

V opačnom prípade, t.j. ak $d \gg a$ (opäť pre nízke potenciály), rovnica (4) sa stáva Hermans-Fujitovou rovnicou (2).

Čím väčšia je hodnota $1/\lambda$, tým menší bude trecí odpor kladený vrstvou polyelektrolytu kvapaline prúdiacej okolo častice pohybujúcej sa elektroforeticky, t.j. tým bude táto vrstva „mäkšia“, a naopak. Existujú dva limitné prípady:

1. Ak $1/\lambda \rightarrow 0$, trecie sily polymérnych segmentov voči kvapalnému prúdu sa stávajú nekonečne veľkými (v polyelektrolytovej vrstve častice pohybujúcej sa v elektrickom poli nie je žiadne prúdenie kvapaliny) a častica sa chová ako tuhá častica s polomerom b (kam sa posúva strihová rovina), a teda $\varphi_0 \rightarrow \zeta$. Pre $d \ll a$ tak rovnica (10) prechádza za predpokladu $a \equiv b$ na rovnicu Smoluchowskeho (1).
2. Ak $a \rightarrow 0$, jadro častice sa stráca a táto sa stáva sférickým polyelektrolytom. Pre nízke φ_0 sa rovnica (10) blíži rovnici Hermans-Fujitu (2), ktorá sa pre nulovú hodnotu $1/\lambda$ stáva Hückelovou rovnicou (platnou pre $\kappa a \ll 1$).

Na rozdiel od tuhých častíc, pri zvyšovaní koncentrácie elektrolytov v roztoku sa hodnota μ (a ζ -potenciálu) mäkkých častíc a sférických polyelektrolytov neblíži k nule, a to vďaka druhému členu na pravej strane rovnice (10) $\mu = \rho_{\text{fix}}/\eta \lambda^2 = -ZeN/\eta \lambda^2$ (v polyelektrolytovej vrstve sú uvažované disociované skupiny s valenciou Z , distribuované s konštantnou číselnou hustotou N). Neznáme parametre polyelektrolytovej vrstvy, t.j. hustota elektrického náboja a rezistencia prúdu kvapaliny (mäkkosť), ρ_{fix} alebo N a $1/\lambda$, môžu byť odhadnuté fitovaním experimentálnej závislosti $\mu = f(n^\infty)$.

Materiál a metódy

Thiobacillus ferrooxidans bol izolovaný z kyslých banských vôd (Rožňava). Kmeň bol kultivovaný aeróbne pri teplote 30° C v 9K kvapalnom médiu s nasledovným zložením: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3g.l⁻¹, KCl 0,1 g.l⁻¹,

K_2HPO_4 0,5 g.l⁻¹, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g.l⁻¹, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 44,2 g.l⁻¹, $Ca(NO_3)_2$ 0,01 g.l⁻¹. pH = 1,6 bolo upravené pridaním 5M H_2SO_4 . Čerstvo vyrastené bakteriálne bunky boli oddelené zachytením na membránovom filtri v skorej stacionárnej fáze. Na odstránenie zvyškov rastového média boli bunky tri-krát premyté 0,1 M HCl a potom destilovanou vodou. Ďalej boli bunky suspendované vo vodnom roztoku s rôznou hodnotou pH (H_2SO_4) tak, že ich koncentrácia bola asi 10^8 buniek/ml. Iónová sila roztoku sa pritom menila (K_2SO_4) v rozsahu od 6×10^{-5} do 6×10^{-3} M.

Elektroforetická pohyblivosť μ buniek *Thiobacillus ferrooxidans* bola meraná čo najskôr (do 30 minút) po príprave ich suspenzií metódou elektroforetického rozptylu svetla – ELS (prístroj Zeta Plus, Brookhaven Instruments, Inc.). V tomto prístroji sa zaznamenáva Dopplerov posun (priamo úmerný μ) vo frekvencii svetla rozptýleného (pod uhlom 15°) bunkami pohybujúcimi sa vo vonkajšom elektrickom poli. ELS merania boli pri každom pH a iónovej sile opakované vždy aspoň 3 krát.

Výsledky a diskusia

Tabuľka 1 sumarizuje priemerné hodnoty elektroforetickej pohyblivosti μ meranej metódou ELS pre bunky *T. ferrooxidans* vo vodnom roztoku s tromi rôznymi iónovými silami, v závislosti od pH tohto roztoku. Uvedené sú tiež príslušné hodnoty štandardnej chyby (S.E.) a percentuálnej chyby (P.E.), automaticky vypočítavané prístrojom z nameraných hodnôt. Vidíme, že s rastom pH (a poklesom iónovej sily) tieto priemerné hodnoty kontinuálne narastajú. Ide o dôsledok postupnej ionizácie zväčša aniónických (karboxylových) funkčných skupín silne hydrofilných povrchových lipopolysacharidov (Škvarla a Kupka, 1996a;b). Izoelektrický bod bol identifikovaný pri pH \approx 3 (Škvarla a Kupka, 1996c). Treba pritom upozorniť na výrazný nárast percentuálnej chyby (nad 10 %) pri pH nižšom ako 3,5 ($I = 6 \times 10^{-5}$ M), 3,7 ($I = 3 \times 10^{-4}$ M) a 4,2 ($I = 1,5 \times 10^{-3}$ M).

Tab.1. Priemerné hodnoty elektroforetickej pohyblivosti μ pre bunky *T. ferrooxidans* vo vodnom roztoku s tromi rôznymi iónovými silami v závislosti od pH tohto roztoku a príslušné hodnoty štandardnej chyby (S.E.) a percentuálnej chyby (P.E.).

Tab.1. Average values of the electrophoretic mobility μ for cells of *T. ferrooxidans* in the aqueous solution at three different ionic strengths depending on pH of the solution and the corresponding values of the standard error (S.E.) and the percentual error (P.E.).

pH	$I = 6 \times 10^{-5}$ M			$I = 3 \times 10^{-4}$ M			$I = 1,5 \times 10^{-3}$ M		
	$\mu \times 10^{-8}$ [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	S.E. [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	P.E. [%]	$\mu \times 10^{-8}$ [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	S.E. [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	P.E. [%]	$\mu \times 10^{-8}$ [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	S.E. [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	P.E. [%]
6,6	-	-	-	-1,357	0,022	1,61	-1,021	0,060	5,9
5,8	-2,658	0,047	1,78	-1,263	0,009	0,71	-1,012	0,048	4,8
5,5	-2,518	0,031	1,25	-1,377	0,045	3,3	-1,026	0,051	5,0
4,8	-2,146	0,017	0,79	-1,235	0,053	4,3	-0,938	0,024	2,6
4,2	-1,408	0,023	1,61	-0,726	0,057	7,9	-0,683	0,078	11,4
3,9	-0,978	0,058	6,0	-0,609	0,053	8,7	-0,567	0,079	13,9
3,7	-	-	-	-0,476	0,067	14,1	-0,390	0,130	33
3,6	-0,791	0,034	4,3	-0,377	0,026	6,9	-0,300	-	-
3,5	-0,509	0,039	7,8	-0,279	0,049	17,8	-0,193	0,036	18,8
3,3	-0,256	0,098	38	-0,203	0,048	23,9	-0,153	0,089	58
3,2	-0,107	0,054	50	-0,117	0,039	33	-0,053	0,034	63

Pre každú hodnotu pH bola závislosť $\mu = f(n^\infty)$ preložená krivkou vypočítanou použitím rovníc (4-8). Fitovanie bolo uskutočnené programom Table Curve 2D (SPSS, Inc.), poskytujúcim plné štatistické vyhodnotenie procedúry. Získané dvojice parametrov N a $1/\lambda$ sú uvedené v tabuľke 2 spolu s koeficientom determinácie r^2 . Vidíme, že tesnosť preloženia všetkých experimentálnych závislostí $\mu = f(n^\infty)$ je vynikajúca, čo vyjadruje vysoký korelačný koeficient, s hodnotou vo väčšine prípadov nad 0,99. Výnimkou je korelácia pri najnižšom pH, t.j. 3,2.

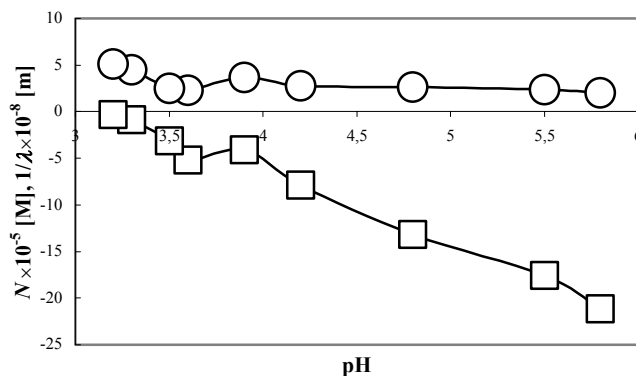
Tab.2. Hodnoty parametrov N a $1/\lambda$ s koeficientom determinácie r^2 pre sledované hodnoty pH.

Tab.2. Magnitudes of the N a $1/\lambda$ parameters with the coefficient of determination r^2 for the studied pH values.

pH	$N \times 10^{-5}$ (M)	$1/\lambda \times 10^{-8}$ (m)	r^2
5,8	-21,18	2,044	0,995
5,5	-17,56	2,366	0,999
4,8	-13,18	2,649	0,998
4,2	-7,87	2,800	0,983
3,9	-4,09	3,659	0,993
3,6	-5,23	2,292	0,999
3,5	-3,14	2,497	0,992
3,3	-0,84	4,472	0,893
3,2	-0,31	5,092	0,275

Z tabuľky 2 však hlavne vyplýva, že rast pH z hodnoty 3,2 na hodnotu 5,8 vedie k nárastu (absolútnej) hodnoty prvého fitovaného parametra N , a to zhruba o jeden rád (odzrkadľujúc tak rast podielu nabitých

karboxylových funkčných skupín, resp. jednoducho náboja vonkajšej časti bunecnej steny). Súčasne narastá aj hodnota $1/\lambda$, hoci iba dvojnásobne. Ak však vylúčime hodnoty spojené s nižšou koreláciou pri pH = 3,3 a 3,2, potom bude nárast $1/\lambda$ takmer bezvýznamný. To svedčí o minimálnom vplyve pH na modelovú rigiditu bunecnej steny *T. ferrooxidans*. Pre lepší prehľad o trende zmien oboch parametrov je na obr.2 zachytená ich závislosť na pH graficky.



Obr.2. Závislosť parametrov N a $1/\lambda$ *T. ferrooxidans* na pH.

Fig.2. Dependence of the N a $1/\lambda$ parameters of *T. ferrooxidans* on pH.

Nami zistené hodnoty parametrov sa dosť výrazne líšia od hodnôt, ktoré boli publikované inými autormi. Napríklad, Kiers et al. (2001) uvádzajú hodnoty N pre *Staphylococcus epidermidis* (v rastovom médiu o vysokej iónovej sile v rozsahu 10^{-2} až 10^{-1} M) v rozmedzí -1 až -4×10^{-2} M, t.j. hodnoty

o zhruba dva rády vyššie ako nami zistené hodnoty pre *T. ferrooxidans* pri najvyššom pH. Podobne je to u *herichia coli* a *Staphylococcus aureus* (Sonohara et al., 1995), alebo *Nitrosomonas europaea*, *Nitrobacter winogradskyi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* a *Pseudomonas aeruginosa* (Hayashi et al., 2001). Dôvod tohto veľkého rozdielu (podstatne nižší náboj *T. ferrooxidans*, dokonca pri výrazne nižších iónových silách) nám zatiaľ nie je celkom známy. Podobne, pokiaľ ide o parameter $1/\lambda$, spomínaní autori zistili jeho hodnoty na úrovni niekoľkých nanometrov, čo je asi o jeden rád menej ako naše hodnoty (cca 20 nm). To by znamenalo, že vonkajšia časť bunecnej steny *T. ferrooxidans* je značne otvorenejšia a „elektroforeticky“ (a zrejme aj mechanizmy) mäkkšia než u spomínaných kmeňov (v prostredí s vysokou iónovou silou), takže tu môžeme predpokladať ľahšie prúdenie vodného média v priebehu elektroforézy. To môže byť iba následok podstatne nižšej iónovej sily v našom prípade, keďže povrchové polyelektrolytové štruktúry by mali byť viac rozvinuté, a teda voľnejšie. Musíme však pripomenúť, že nami sledovaný rozsah (pomerne nízkej) iónovej sily bol širší, takže presnosť našich parametrov by mala byť väčšia (žiaľ, uvedené práce neuvádzajú štatistické vyhodnotenie ich fitovacej procedúry).

Ho et al. (1996) však zistili, že uvedená teoretická analýza výrazne nadhodnocuje elektroforetickú pohyblivosť častíc latexu meranú experimentálne pri nízkych iónových silách (pri vysokých I bola korelácia výborná), poukazujúc na nehomogénnu distribúciu funkčných skupín v povrchovej vrstve. Keďže my sme sa obmedzili iba na nižšie iónové sily, fitovaním elektroforetických mobilit pre vyššie iónové sily by zrejme náš parameter N nadobudol vyššie hodnoty. Súčasne by zrejme došlo aj ku zmene (poklesu) parametra $1/\lambda$. Podobne, Sonohara et al. (1995) konštatovali zlú koreláciu (predikciu vyšších hodnôt μ) experimentov s Ohshimovou teóriou pre baktérie pri $I < 0,05$ M. Vysvetlením bola čiastočná neutralizácia negatívnych nábojov acidických skupín LPS a kyseliny teichoovej bázickými skupinami proteínov a peptidov nachádzajúcimi sa hlbšie v povrchovej vrstve.

Záver

Aplikovaním Ohshimovej analýzy mäkkých častíc boli stanovené parametre N a $1/\lambda$ pre bunky *Thiobacillus ferrooxidans* v prostredí s nízkou iónovou silou. Ich hodnoty sa výrazne líšia od hodnôt publikovaných pre koloidné častice aj bakteriálne bunky pri vysokých iónových silách. Dôvodom tohto rozdielu môže byť vrstevnatá štruktúra vonkajšej časti bunecnej membrány baktérií, spôsobujúca rôznu hustotu náboja a súčasne kvapalného prúdu v nej - hlavne pri nízkej iónovej sile. Preto, pre úplné potvrdenie platnosti danej teórie bude potrebné využiť model zohľadňujúci tento multivrstvový charakter, prípadne tyčinkovitý tvar buniek (Ohshima, 1997a; 1997b; 2001; Hsu a Fan, 1995).

Podakovanie: Autori ďakujú Slovenskej grantovej agentúre VEGA za finančnú podporu uvedenej práce prostredníctvom grantu G-2/2107/22.

Literatúra

BAYER, M.E., SLOYER JR., J.L.: The electrophoretic mobility of gram-negative and gram-positive bacteria: an electrokinetic analysis. *J. Gener. Microbiol.* **136**, 867-874 (1990).

- BEVERIDGE, T.J.: Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **181**, 4725-4733 (1999).
- HANCOCK, I.C.: Microbial cell surface architecture, pp. 21-60 in N. Mozes, P.S. Handley, H.J. Busscher, P.G. Rouxhet (Eds): *Microbial Cell Surface Analysis. Structural and Physicochemical Methods*. VCH Publishers Inc., New York, 1991.
- HAYASHI, H., TSUNEDA, S., HIRATA, A., SASAKI, H.: Soft particle analysis of bacterial cells and its interpretation of cell adhesion behaviors in terms of DLVO theory. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*. **22**, 149-157 (2001).
- HO, C.C., KONDO, T., MURAMATSU, N., OHSHIMA, H.: Surface structure of natural rubber latex particles from electrophoretic mobility data. *J. Colloid Interface Sci.* **178**, 442-445 (1996).
- HSU, J.-P., FAN, Y.-P.: Electrophoretic mobility of a particle coated with a charged membrane: Effects of fixed charge and dielectric constant distributions. *J. Colloid Interface Sci.* **172**, 230-241 (1995).
- JAMES, A.M.: Charge properties of microbial cell surfaces, pp. 221-262 in N. Mozes, P.S. Handley, H.J. Busscher, P.G. Rouxhet (Eds): *Microbial Cell Surface Analysis. Structural and Physicochemical Methods*. VCH Publishers Inc., New York, 1991.
- KIERS, P.J.M., BOS, R., van der MEI, H.C., BUSSCHER, H.J.: The electrophoretic softness of the surface of *Staphylococcus epidermidis* cells grown in a liquid medium and on a solid agar. *Microbiology*, **147**, 757-762 (2001).
- OHSHIMA, H.: Electrophoretic mobility of soft particles. *J. Colloid Interface Sci.* **163**, 474-483 (1994).
- OHSHIMA, H.: Electrophoretic mobility of soft particles. *Electrophoresis*. **16**, 1360-1363 (1995).
- OHSHIMA, H.: Electrophoretic mobility of a polyelectrolyte-adsorbed particle: Effect of segment density distribution. *J. Colloid Interface Sci.* **185**, 269-273 (1997a).
- OHSHIMA, H.: Electrophoretic mobility of cylindrical soft particles. *Colloid Polym. Sci.* **275**, 480-485 (1997b).
- OHSHIMA, H.: On the general expression for the electrophoretic mobility of a soft particle. *J. Colloid Interface Sci.* **228**, 190-193 (2000).
- OHSHIMA, H.: On the electrophoretic mobility of a cylindrical soft particle. *Colloid Polym. Sci.* **279**, 88-91 (2001).
- OHSHIMA, H., NAKAMURA, M., KONDO, T.: Electrophoretic mobility of colloidal particles coated with a layer of adsorbed polymers. *Colloid Polym. Sci.* **270**, 873-877 (1992).
- ŠKVARLA, J., KUPKA, D.: The study of electrokinetics of Thiobacillus ferrooxidans by electrophoretic light scattering. *Mineralia Slovaca*. **28**, 395-398 (1996a).
- ŠKVARLA, J., KUPKA, D.: Determination of the isoelectric point of Thiobacillus ferrooxidans, pp.75-76 in: Mini-Symposium on Biosorption & Microbial Degradations. Prague, 1996b.
- ŠKVARLA, J., KUPKA, D.: A comparative electrophoretic light scattering study of various strains of Thiobacillus ferrooxidans. *Biotechnology Techniques*. **10**, 911-916 (1996c).
- SONOHARA, R., MURAMATSU, N., OHSHIMA, H., KONDO, T.: Difference in surface properties between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* as revealed by electrophoretic mobility measurements. *Biophysical Chemistry*. **55**, 273-277 (1995).
- VAN, OSS, C.J.: The forces involved in bioadhesion to flat surfaces and particles - their determination and relative roles. *Biofouling*. **4**, 25-35 (1991).
- WILSON, W.W., WADE, M.M., HOLMAN, S.C., CHAMPLIN, F.R.: Status of methods for assessing bacterial cell wall surface charge properties based on zeta potential measurements. *J. Microbiol. Meth.* **43**, 153-164 (2001).
- YAO, X., JERICHO, M., PINK, D., BEVERIDGE, T.: Thickness and elasticity of gram-negative murein sacculi measured by atomic force microscopy. *J. Bacteriol.* **181**, 6865-6875 (1999).