

Vliv polyanilinu na tvorbu biofilmu u bakterií

Bc. Nikola Mikušová

Diplomová práce
2014

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Nikola Mikušová**
Osobní číslo: **T12412**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie a ekonomika výroby tuků, detergentů
a kosmetiky**
Forma studia: **prezenční**
Téma práce: **Vliv polyanilinu na tvorbu biofilmu u bakterií**

Zásady pro vypracování:

Teoretická část

1. Charakteristika biofilmu, jeho struktura a tvorba.
2. Struktura a formy polyanilinu.

Praktická část

1. Průkaz tvorby biofilmu u grampozitivních a gramnegativních bakterií.
2. Testování vlivu různých forem polyanilinu na schopnost tvorby biofilmu u biofilmopozitivních kmenů bakterií.
3. Diskuze výsledků a formulace závěrů práce.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. PACE, J. L., RUPP, M. E., FINCH, R. G. Biofilms, Infection and Antimicrobial Therapy. USA: CRS Press Taylor & Francis Group, 2006.
2. DAVEY, M. E., O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol. 2000, roč. 64, č. 4, s. 847-867.
3. STEJSKAL, J., SAPURNINA, I. Polyaniline: Thin films and colloidal dispersions (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry. 2005, roč. 77, č. 5, s. 815-826.
4. PROKEŠ, J, STEJSKAL, J., OMASTOVÁ, M. Polyanilin a polypyrrol ? dva představitelé vodivých polymerů. Chemické listy. 2001, roč. 95, s. 484-492.
5. HUMPOLÍČEK, P., KAŠPÁRKOVÁ, V., STEJSKAL, J., KUČEKOVÁ, Z., ŠEVČÍKOVÁ, P. Proliferace buněk na vodivém polymeru, polyanilinu. Chemické listy. 2012, roč. 106, s. 380-383.

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Iva Hauerlandová, Ph.D.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

10. února 2014

Termín odevzdání diplomové práce:

26. května 2014

Ve Zlíně dne 10. února 2014


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




Ing. Martina Černeková, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: ...MIKUŠOVÁ NIKOLA.....

Obor: ...TEVTDK.....

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně ...21.5.2014

.....


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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá přípravou mikrotitračních destiček potažených polyanilinovými filmy a sledováním adheze buněk a tvorby biofilmu vybraných kmenů biofilmopozitivních bakterií na povrch takto upravených destiček. Teoretická část je zaměřena na vlastnosti polyanilinu, tvorbu biofilmu a bakterie schopné tvořit biofilm. Praktická část zahrnuje přípravu mikrotitračních destiček s polyanilinovými filmy a sledování vlivu tohoto polymeru na tvorbu biofilmu u grampozitivních a gramnegativních bakterií.

Klíčová slova: polyanilin, biofilm, grampozitivní bakterie, gramnegativní bakterie.

ABSTRACT

This thesis work deals with the preparation of the microtiter plates covered by the polyaniline films and with the monitoring of the cell adhesion and the biofilm production by the selected strains of the biofilmpositive bacteria to the surface of this prepared plates. The theoretical part characterizes the polyaniline, the biofilm and the bacteria able to form the biofilm. The practical part consist of the microtiter plates with polyaniline films preparation and the monitoring of the influence of this polymer on the biofilm formation in grampositive bacteria and gramnegative bacteria.

Keywords: polyaniline, biofilm, grampositive bacteria, gramnegative bacteria.

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé diplomové práce, kterou byla RNDr. Iva Hauerlandová, Ph.D., za odborné vedení, poskytnuté rady, trpělivost, inspiraci a za vynaložený čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc. rovněž za poskytnuté rady a za pomoc při zpracování diplomové práce. Další mé díky patří Ing. Zdence Kucekové a laborantkám mikrobiologické laboratoře technologické fakulty při zpracování praktické části. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině, známým a hlavně mému příteli, bez jejichž podpory a pomoci bych se neobešla.

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I. TEORETICKÁ ČÁST	11
1 VODIVÉ POLYMERY	12
1.1 POLYANILIN	13
1.1.1 HISTORIE POLYANILINU.....	14
1.1.2 STRUKTURA A FORMY POLYANILINU	14
1.1.3 PŘÍPRAVA POLYANILINU.....	16
1.1.4 POLYANILINOVÉ FILMY	17
1.1.5 MECHANIZMUS TVORBY FILMŮ	17
1.1.6 VYUŽITÍ POLYANILINU	19
1.2 ANTIMIKROBNÍ ÚČINKY POLYANILINU.....	20
2 BIOFILM.....	22
2.1 HISTORIE BIOFILMU.....	22
2.2 DEFINICE A SLOŽENÍ BIOFILMU	22
2.3 STRUKTURA BIOFILMU	24
2.3.1 TRANSPORT LÁTEK V BIOFILMU.....	24
2.4 VZNIK A TVORBA BIOFILMU	26
2.5 QUORUM SENSING.....	27
2.6 UVOLŇOVÁNÍ BUNĚK Z BIOFILMU A ŠÍŘENÍ BIOFILMU	28
2.7 BIOFILMY A ANTIMIKROBNÍ LÁTKY.....	30
2.7.1 MECHANIZMY RESISTENCE BIOFILMU K ANTIMIKROBNÍM LÁTKÁM.....	30
2.8 NEGATIVNÍ A POZITIVNÍ VLIV BIOFILMU	30
2.8.1 NEGATIVNÍ VLIV BIOFILMU	30
2.8.2 POZITIVNÍ VLIV BIOFILMU	32
2.9 BIOFILM A BAKTERIE	32
2.9.1 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	33
2.9.2 <i>STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS</i>	33
2.9.3 <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i>	34
2.9.4 <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	35
2.9.5 <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	36
2.9.6 <i>ESCHERICHIA COLI</i>	36
3 CÍL PRÁCE.....	37

II. PRAKTICKÁ ČÁST	38
4 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE	39
4.1 POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE	39
4.1.1 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY	39
4.1.2 VYBRANÉ KULTURY MIKROORGANISMŮ	39
4.1.3 KULTIVAČNÍ PŮDY	40
4.1.4 TEKUTÉ ŽIVNÉ MÉDIUM.....	40
4.1.5 DEKONTAMINACE POUŽITÉHO MATERIÁLU	41
4.1.6 PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY	41
4.2 METODY	41
4.2.1 PŘÍPRAVA MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY S PANÍ FILMEM	41
4.2.2 DEPROTONACE PANÍ FILMU NA MIKROTITRAČNÍ DESTIČCE	42
4.2.3 PŘÍPRAVA PANÍ FILMŮ REPROTONOVANÝCH VYBRANÝMI KYSELINAMI.....	42
4.2.4 PŘÍPRAVA INOKULA.....	43
4.2.5 PŘÍPRAVA MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY PRO MĚŘENÍ	43
5 VÝSLEDKY	45
5.1 VLIV POLYANILINOVÝCH FILMŮ NA TVORBU BIOFILMU U BAKTERIÍ.....	45
5.1.1 VLIV PANÍ NA TVORBU BIOFILMU U BAKTERIE <i>STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS</i> CCM 4418.....	45
5.1.2 VLIV PANÍ NA TVORBU BIOFILMU U BAKTERIE <i>STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS</i> CCM 7221	47
5.1.3 VLIV PANÍ NA TVORBU BIOFILMU U BAKTERIE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> CCM 3953	48
5.1.4 VLIV PANÍ NA TVORBU BIOFILMU U BAKTERIE <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i> CCM 7000	49
5.1.5 VLIV PANÍ NA TVORBU BIOFILMU U BAKTERIE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> CCM 3955	50
5.1.6 VLIV PANÍ NA TVORBU BIOFILMU U BAKTERIE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> FT351	
5.1.7 VLIV PANÍ NA TVORBU BIOFILMU U BAKTERIE <i>ESCHERICHIA COLI</i> CCM 3988	52
5.1.8 VLIV PANÍ NA TVORBU BIOFILMU U BAKTERIE <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> CCM 4415	53
ZÁVĚR	55
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	57
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	64
SEZNAM TABULEK.....	66

ÚVOD

Polyanilin patří mezi vodivé polymery, které jsou tvořeny systémem konjugovaných dvojných vazeb. Jeho základní jednotkou je anilin a existuje v různých formách lišících se stupněm oxidace nebo protonace. Jednotlivé formy polyanilinu (např. pernigranilin, emeraldin nebo leukoemeraldin) se vyznačují odlišnými vlastnostmi - zbarvením, stabilitou i elektrickými vlastnostmi. Jeho příprava je založena na oxidaci anilinu peroxidisíranem amonným v kyselém vodném prostředí. Jednoduchost přípravy a stabilita produktu jsou jednou z příčin rostoucího zájmu o polyanilin. Atraktivní je také schopnost tohoto polymeru tvořit tenké filmy. Polyanilinovým filmem se mohou potahovat povrchy polymerů, skla, silikátů či ušlechtilých kovů. Polyanilin má široké využití v různých průmyslových odvětvích nebo v oblasti biomedicínských aplikací. Poměrně nedávno bylo zjištěno, že koloidní polyanilin může mít vliv na růst bakteriálních buněk. Cílem této práce je sledovat schopnost tvorby biofilmu u bakterií na mikrotitračních destičkách s polyanilinovými filmy.

Biofilm je výsledek adherence mikroorganismů na různé povrchy. V planktonické formě neměly bakterie tak výhodné vlastnosti a začaly tvořit tuto aktivní biologickou vrstvu. Mohou se přichytávat na podkladech ze všech možných materiálů, na nichž pak vznikají shluky mikroorganismů, které následně produkují sliz, tvořený extracelulární polymerní substancí. Tato substance poskytuje bakteriím v biofilmu ochranu a zabraňuje přístupu biocidů, toxinů a dalších antimikrobních látek a chrání je před vysycháním. Bakterie jsou tak odolnější vůči nepříznivým podmínkám a je těžké je ve formě biofilmu zlikvidovat a tak způsobují problémy v různých odvětvích průmyslu.

Biofilm má i pozitivní využití v mnoha odvětvích jako je potravinářství, např. při výrobě mléčných výrobků, obzvláště různých druhů sýrů, a při výrobě alkoholických nápojů apod. Dále se využívá při čištění vod nebo při zmírnění znečištění půd.

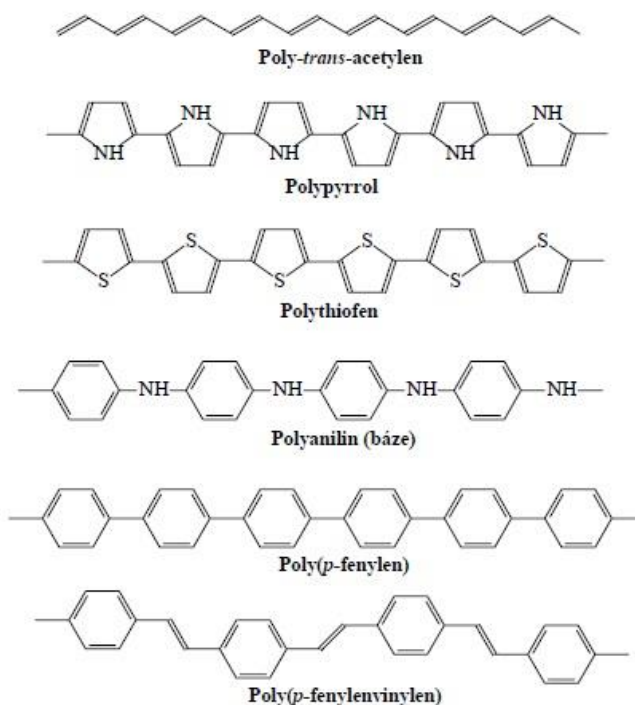
V praktické části se zabývám přípravou polyanilinových filmů, kterými byly potahovány mikrotitrační destičky, do kterých byly následně pipetovány suspenze biofilmopozitivních kmenů bakterií a byl zkoumán vliv tohoto polymeru na adhezi mikrobiálních buněk na takto modifikovaný povrch polystyrenových mikrotitračních destiček.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VODIVÉ POLYMERY

Polymery lze definovat jako přírodní nebo syntetické látky, jejichž makromolekula je tvořena z dlouhých řetězců opakujících se konstitučních jednotek. Běžné polymery, jako je například polyetylen nebo polyvinylchlorid, jsou nevodivé, a lze je využít jako výborné elektrické izolanty. Vedle nevodivých polymerů existují i polymery vodivé. Příkladem může být polyacetylen, poly-*trans*-acetylen, polythiofen, poly(*p*-fenylen), polypyrrol, poly(*p*-fenylenvinylem) nebo polyanilin (*Obr.1*). Vodivé polymery jsou tvořeny systémem konjugovaných dvojných vazeb, tzn. že v jejich struktuře se pravidelně střídají jednoduché a dvojně vazby. Vedle konjugace je dalším nezbytným předpokladem vysoké elektrické vodivosti přítomnost nositelů náboje. Tyto nosiče zprostředkovávají transport náboje po řetězci. Vznikají procesem, který je v analogii s klasickými polovodiči nazýván dopováním. U dopování anorganických a organických polovodičů je však podstatný rozdíl. U anorganických polovodičů výrazně ovlivňují elektrické vlastnosti již stopové koncentrace dopující látky, zatímco u polymerů jsou požadované koncentrace řádově vyšší. Elektrická vodivost těchto polymerů se pohybuje v rozmezí 0,01-30 S.cm⁻¹.

Strukturně nejjednodušším a také nejčastěji studovaným vodivým polymerem je polyacetylen. Při dopování polyacetylenových filmů parami jodu lze získat produkty o měrné vodivosti srovnatelné s parametry anorganických polovodičů. I přes vysokou vodivost polyacetylenu je však v současné době pozornost směřována spíše na mnohem stabilnější konjugované polymery polyanilin a polypyrrol. Možných aplikací vodivých polymerů je celá řada a pro mnohé z nich není rozhodující samotná vodivost. Obecně lze říci, že vodivé polymery v sobě spojují elektrické vlastnosti polovodičů s mechanickými a užitnými vlastnostmi polymerů. Velmi zajímavá je také schopnost těchto polymerů měnit svou strukturu, a tedy i své vlastnosti, v reakci na podmínky okolního prostředí. Významné mohou být i vlastnosti optické, biokompatibilita či biodegradace. [1], [2], [3], [4], [5]



Obr. 1. Nejdůležitější vodivé polymery a jejich strukturní vzorce. [1]

1.1 Polyanilin

Polyanilin (PANI) je jedním z nejběžnějších a nejvíce studovaných vodivých polymerů. Kromě vodivosti je polyanilin zajímavý různou morfologií vznikající v závislosti na polymeračních podmínkách. Existuje ve třech formách, tj. pernigranilin, emeraldin a leukoemeraldin. PANI má mnoho výhod, jako je snadná syntéza, nízká cena a dobrá stabilita. [6], [7]

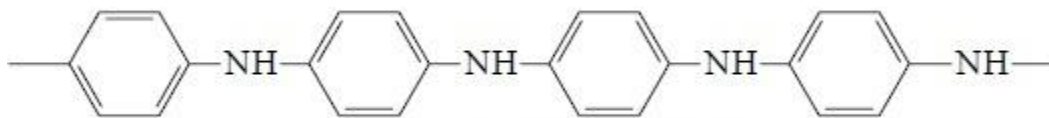
Využití PANI v biologických aplikacích je do značné míry omezeno nízkou rozpustností práškového PANI ve vodných médiích. V současné době však bylo navrženo několik možných řešení, a to jednak kopolymerizace PANI [8] nebo protonace kyselinami s delšími alkylovými řetězci, což by mohlo vést ke zvýšení jeho rozpustnosti v různých rozpouštědlech [9]. Dalším možným řešením je příprava koloidních disperzí tohoto vodivého polymeru. [10], [11], [12]

1.1.1 Historie polyanilinu

Polyanilin je pravděpodobně nejstarším syntetickým organickým polymerem. Připravuje se oxidací anilinu. Anilin byl získán jako produkt pyrolytické destilace indiga v roce 1826 německým chemikem Unverdorbenem. Při studiu chemických vlastností anilinu byly již roku 1840 popsány zelené oxidační produkty, které jsou dnes nazývány polyanilinem. V roce 1856 připravil britský chemik Perkin oxidací anilinu první syntetické průmyslově vyráběné barvivo, mauvein, které je s polyanilinem historicky i strukturně spjato. V roce 1862 britský profesor chemie Letheby při toxikologické identifikaci anilinu provedl elektrochemickou oxidaci, která vedla po alkalizaci k modrému zbarvení produktu typickému pro polyanilinovou bázi. Britští chemici Green a Woodhead v roce 1910 navrhli pro oxidační produkty anilinu strukturu oktameru; polymerní charakter produktů oxidace anilinu byla prokázána až mnohem později. Oxidační formy pojmenovali leukoemeraldin, emeraldin a pernigranilin a tyto názvy jsou dnes používány i pro odpovídající polymery. Polyanilinové řetězce jsou složeny ze stovek anilinových konstitučních jednotek a jedná se teda o plnohodnotné polymery. V Československu byly v roce 1968 syntetické postupy vedoucí k polyanilinu popsány Honzlem a spol. Rostoucí zájem o vodivé polymery se projevil až na konci 70. let 20. století poté, co byly publikovány práce o polyacetyleny. [1], [13]

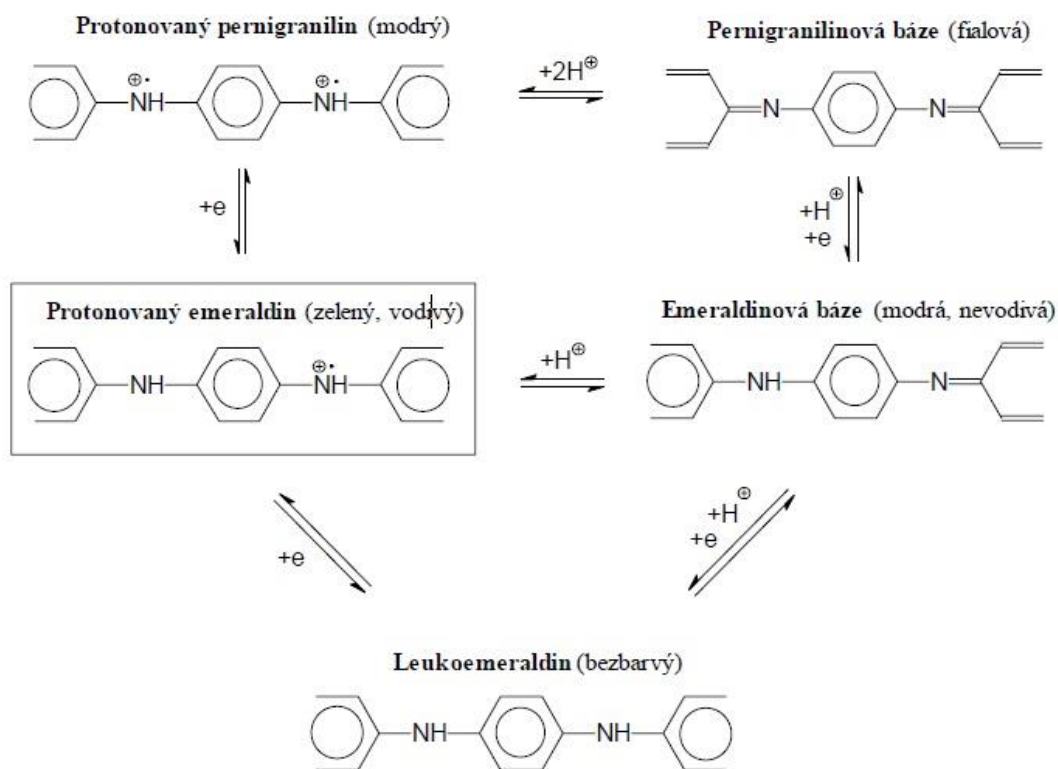
1.1.2 Struktura a formy polyanilinu

Polyanilin, jehož základní stavební jednotkou je anilin, vytváří lineární řetězce vázané přes skupinu $-NH$ (*Obr.2*). Může běžně existovat v několika formách, které se navzájem liší stupněm oxidace nebo protonace. Odebráním nebo dodáním elektronů chemickou, či elektrochemickou oxidací a redukcí lze získat formy polyanilinu s různou chemickou strukturou, stabilitou, zbarvením a elektrickými vlastnostmi. Tyto formy jsou označovány jako emeraldin, leukoemeraldin a pernigranilin. Nejběžnějšími formami jsou vodivá, zeleně zbarvená polyanilinová (emeraldinová) sůl a nevodivá, modrá báze. K přechodu mezi těmito dvěma formami dochází při pH 5 - 6 a vodivost polyanilinu tímto přechodem klesá z jednotek $S.cm^{-1}$ na $10^{-9} S.cm^{-1}$. Obě uvedené formy se liší nejen z hlediska elektrických vlastností, ale odlišují se i svým chováním při kontaktu s živými organismy, tkáněmi či jednotlivými buňkami. [1], [14], [15], [16]



Obr. 2. Strukturální vzorec polyanilinové báze. [1]

Jednotlivé formy polyanilinu jsou znázorněny na Obr. 3. Jak již bylo uvedeno výše, základní stabilní formou je zelený emeraldin, který může být oxidován na pernigranilin nebo redukován na leukoemeraldin. U emeraldinu a pernigranilinu existuje rovněž vždy protonovaná forma a odpovídající báze. [1]



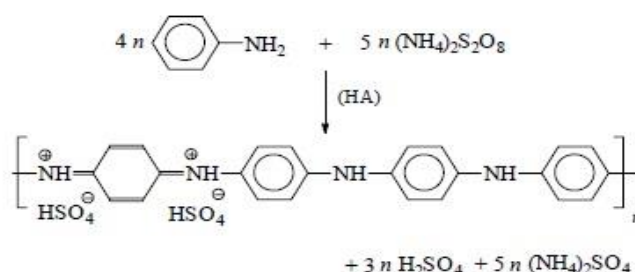
Obr. 3. Formy polyanilinu. [1]

1.1.3 Příprava polyanilinu

Polyanilin se připravuje oxidací anilinu peroxodisíranem amonným v kyselém vodném prostředí (*Obr.4*). Reakce probíhá na vzduchu v otevřené nádobě, při laboratorní teplotě, bez nutnosti zahřívání nebo míchání, s prakticky stoprocentním výtěžkem. Je exotermní a je ukončena během několika minut. Získaný produkt, polyanilin, se pak z reakční směsi oddělí filtrací. Standardní polymerace anilinu v silně kyselém prostředí poskytuje granulární strukturu. Pokud je však polymeraci provedena ve vodě nebo v mírně kyselém prostředí kyseliny octové, jsou v produktu přítomny polyanilinové nanotrubky. Jejich průměr je 100-200 nm a délka dosahuje až několik mikrometrů.

Polyanilin se standardně připravuje oxidací 0,2 M anilinu hydrochloridu pomocí 0,25 M peroxodisíranem amonným. Rozpustí se 2,59 g (20 mmol) anilinu hydrochloridu v 50 ml vody, odděleně 5,71 g (25 mmol) peroxodisíranu amonného rovněž v 50 ml vody. Následně se oba roztoky smísí. Ve směsi začnou po chvíli vznikat anilinové oligomery a směs zmodrá. Zabarvení se prohlubuje, tvoří se pernigranilinová forma polyanilinu, která začne po skončení polymerace přecházet na tmavozelený emeraldin. Polymerace proběhne při laboratorní teplotě přibližně za 10 minut a teplota reakční směsi vzroste z 20 °C na 38 °C. Sraženina polyanilinu se poté promyje zředěnou (0,2 M) kyselinou chlorovodíkovou a následně i acetonem nebo etanolem. Produkt se usuší na vzduchu. Takto připravený polyanilin (emeraldin) má vodivost 4 S.cm⁻¹.

Jestliže při oxidaci anilinu je do reakční směsi ponořen předmět, který je stály v kyselém prostředí, vytvoří se na jeho povrchu vodivý polyanilinový film o tloušťce cca 100 nm. Takto lze modifikovat prakticky libovolný povrch (sklo, textilní tkanina). [1], [6], [7], [15]

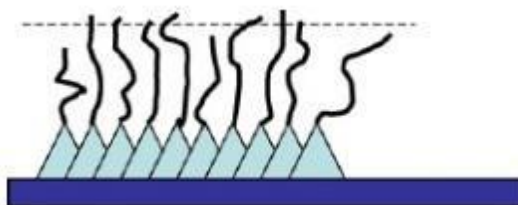


Obr. 4. Oxidace anilinu peroxodisíranem amonným v kyselém prostředí – vznik polyanilinu. [1]

1.1.4 Polyanilinové filmy

Jak již bylo uvedeno, v praxi se může jakýkoliv substrát, který je přítomný v reakční směsi anilin hydrochloridu a peroxosíranu amonného, potáhnout tenkým filmem polyanilinu (*Obr.5*). Mohou se používat povrchy různých polymerů, skla, silikátu nebo ušlechtilých kovů. Polyanilinem se potahují i další materiály, například polymerní vlákna, textil, uhlíkové nanotrubky, dřevěné piliny a další.

Povrchy upravené polyanilinem se pak mohou použít na výrobu senzorů, elektrod, dále jako vodivá výplň, katalyzátory organických reakcí a ochrana před korozi. [16], [17]

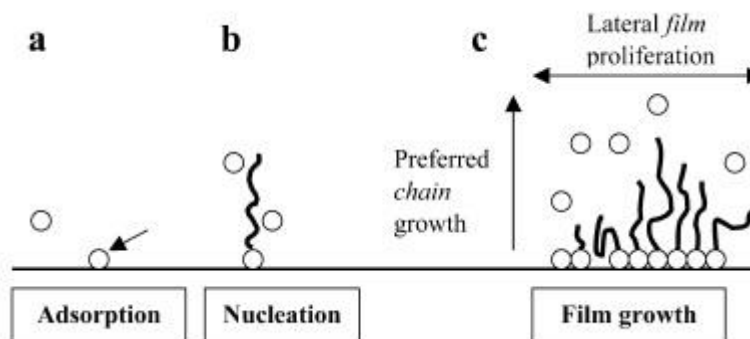


Obr. 5. Tvorba tenkých polyanilinových filmů. [18]

1.1.5 Mechanismus tvorby filmů

Oxidací anilinu v kyselém prostředí se nejprve tvoří anilinové oligomery, které jsou více hydrofobní než původní anilin a mají tendenci se separovat z vodného média, tzn. že se adsorbují na vhodný povrch, který je v kontaktu s vodnou fází. Adsorbované oligomery pak lépe a snáze zahájí růst polyanilinových řetězců. To je princip heterogenní katalýzy, u níž se předpokládá, že reaktivita adsorbovaných molekul může být zvýšena díky změně distribuce elektronové hustoty.

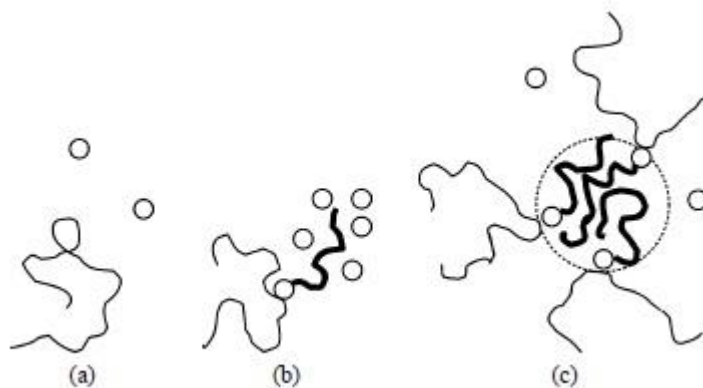
Experimentálně bylo zjištěno, že polymerace na površích předchází polymeraci, která probíhá v celém objemu reakční směsi. První polyanilinový řetězec, který se ukotví na povrchu, dále slouží jako jádro budoucího filmu. Další oligomery se adsorbují blízko tohoto jádra a stimulují růst dalších polyanilinových řetězců, které na povrchu rostou a tvoří tak film. Řetězce jsou orientovány kolmo k povrchu (*Obr.6*). [16]



Obr. 6. Model tvorby filmu: (a) anilinové oligomery (otevřené kruhy) se adsorbují na dostupném rozhraní a (b) stimulují růst polyanilinových řetězců (silná čára). Tvoří se zárodek. (c) Další polyanilinové řetězce rostou v důsledku automatického zrychlení mechanismu v blízkosti zárodku. Film se šíří po povrchu. [16]

S podobným mechanismem se lze setkat i při tvorbě koloidních částic, které jsou produktem polymerace anilinu v médiu obsahujícím stabilizátor, což je ve vodě rozpustný polymer. Na polymerní řetězec se adsorbují anilinové oligomery, které vyváří zárodek polyanilinového řetězce. Může nastat situace, že se do blízkosti rostoucí částice dostane další částice stabilizátoru a vznikne tak vnější obal, který brání agregaci částic. [19]

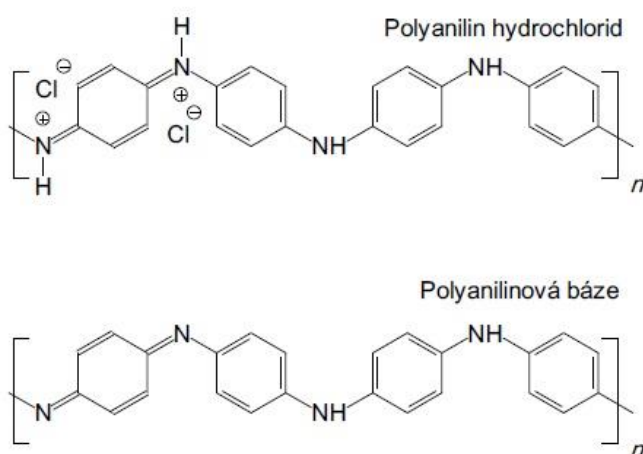
Na Obr.7 je znázorněn mechanismus tvorby koloidních disperzních částic. (a) Anilinové oligomery vznikají ve vodném reakčním médiu obsahujícím ve vodě rozpustný polymer, stérický stabilizátor (tenká čára). (b) Oligomery adsorbující se na stabilizátor stimulují růst polyanilinového řetězce (silná čára) (c) Polymerace anilinu probíhá v blízkosti již existujících polyanilinových řetězců. Polyanilinové makromolekuly ukotvené na stabilizujícím polymerním řetězci tvoří koloidní disperzní částice. [19]



Obr. 7. Tvorba koloidních disperzních částic. [19]

1.1.6 Využití polyanilinu

Polyanilin je jedním z vodivých polymerů, pro něž se hledalo využití především s ohledem na jejich schopnost reagovat změnou elektrické vodivosti na vnější stimuly. Tato schopnost vedla k aplikacím v oblasti senzorů, antikoročních nátěrů, katalýzy organických reakcí či palivových článků. Velmi zajímavé a slibné je využití polyanilinu v oblasti biomedicínských aplikací, kde se vývoj a výzkum soustřeďuje především na jeho uplatnění v regeneraci srdeční či nervové tkáně. Na Obr.8 lze vidět strukturální vzorce pro vodivou polyanilinovou sůl a nevodivou polyanilinovou bázi. [14]



Obr. 8. Vodivá polyanilinová sůl a nevodivá polyanilinová báze. [14]

Dále se využívají i optické vlastnosti vodivých polymerů, např. jejich barevnost, která souvisí se systémem konjugovaných vazeb ve vodivých polymerech. Příkladem jsou aditiva do recyklovaných plastů. Jejich zbarvení, které není přímo definovatelné, lze sjednotit přidáním vodivého, a zároveň intenzivně barevného polymeru. Změny optické absorpce polyanilinu při vloženém elektrickém potenciálu se uplatňují v zobrazovací technice, např. elektronické tapety či zobrazovací okna, která jsou schopna proměny na přání uživatele. Dále se tento princip využívá při vývoji „neviditelných“ letadel, která mohou měnit zbarvení v závislosti na pozadí, na němž se pohybují. V analytické oblasti má barevnost významnou roli při použití polymerních koloidů jako značkovacích částic při separačních experimentech. Dále byly navrženy optické senzory na bázi polyanilinu, které indukují změny kyselosti.

Redukční účinek polyanilinu může být použit pro izolaci ušlechtilých kovů z odpadních vod. Polyanilin je rovněž používán pro zvýšení katalytické účinnosti paládiových a platinových katalyzátorů při hydrogenačních reakcích. [1]

Směs PANI s nanovláknem z CuGeO_3 se používá jako skleněné karbonové elektrody modifikované materiály pro elektrochemické stanovení kyseliny benzoové v neutrálním roztoku. [20]

Díky svým příhodným vlastnostem získal PANI značnou pozornost jak na akademické půdě, tak v průmyslových odvětvích. Používá se k výrobě řady užitečných zařízení, včetně lehkých bateriových elektrod, elektromagnetických stínících zařízení, antikoročních nátěrů, senzorů, světelných diod, infračervených polarizátorů, uhlíkových nanotrubic a elektrochromových displejů. [21], [22], [23]

1.2 Antimikrobní účinky polyanilinu

K polymerům, které mají antimikrobní účinky a inhibují růst mikroorganismů, můžeme zařadit i některé druhy polymerů vodivých, ke kterým řadíme i polyanilin. Studií, zabývajících se touto problematikou, je jen malé množství. Antibakteriální účinky koloidního polyanilinu nebyly zatím v odborné literatuře podrobněji popsány. Studie se spíše zaměřují na běžný, polymerní a práškový polyanilin.

V roce 2014 byl však vydán článek, který se zabývá antibakteriálními účinky koloidních polyanilinových disperzí. Koloidní polyanilin patří mezi nejslibnější aplikované formy

vodivých polymerů. Testy antibakteriální aktivity byly prováděny na buňkách ošetřených disperzí koloidního polyanilinu. Antibakteriální účinek koloidního polyanilinu proti gram-pozitivním a gramnegativním bakteriím byl nejvýraznější u *Bacillus cereus* a *Escherichia coli*.

Citlivost bakterií vůči koloidnímu polyanilinu je nejspíše závislá na druhu. Výsledky této studie ukázaly, že růst gramnegativní bakterie *Escherichia coli* byl nepatrně snížen z 8,6 na 8,4 log CFU/ml působením koloidního polyanilinu o koncentraci 2000 µg/ml a úplná inhibice byla pozorována při koncentraci 3500 µg/ml. *Pseudomonas aeruginosa*, která je rovněž gramnegativní, byla nejodolnější bakterií. Koloidní polyanilin v koncentraci 3500 µg/ml způsobil pokles pouze o dva řády z 8,9 na 6,9 log CFU/ml. Antibakteriální efekt byl zpozorován až v nejvyšší testované koncentraci (8500 µg/ml). U grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* byl obdobný jako u *Pseudomonas aeruginosa*, kde byla větší antimikrobní aktivita zjištěna při koncentraci 8500 µg/ml. Ale na rozdíl od *Pseudomonas aeruginosa* se u této grampozitivní bakterie prokázala inhibice i při nižší testované koncentraci koloidního polyanilinu (3500 µg/ml). Další testovaná grampozitivní bakterie *Bacillus cereus* byla zcela inhibována po použití koloidního polyanilinu při koncentraci 3500 µg/ml, obdobně jako tomu bylo u *E. coli*. [10]

V roce 2011 Gizdavic-Nikolaidis a kol. testovali vlastnosti funkcionalizovaných a standardních polyanilinů na bakteriálních buňkách. Všechny výsledky prokázaly antimikrobní účinky tohoto polymeru. Už nižší koncentrace funkcionalizovaného PANI silně inhibovaly růst divokých kmenů *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*. [24] V další práci Gizdavic-Nikolaidise a kol. (2012) byly předmětem antimikrobní vlastnosti nejen samotného polyanilinu, ale i jeho acetonem extrahovaných oligomerů, u nichž byly rovněž prokázány inhibiční účinky na gramnegativní, i grampozitivní bakterie a mikroskopické houby. [25]

2 BIOFILM

2.1 Historie biofilmu

V roce 1676 se Antony von Leeuwenhoek, nizozemský přírodovědec a průkopník mikroskopie, zabýval myšlenkou bakterií přisedlých k povrchu. Pomocí mikroskopu pozoroval buňky zubního plaku. Polovina 19. a 20. století byla považována za „zlatý věk bakteriologie“. Studovaly se však jen planktonické formy organismů. Sto let od dob Roberta Kocha a Louise Pasteura došlo ve vědě k velkým pokrokům. Dříve nikoho nenapadlo, že by bakterie mohly růst jinak, než jako volně se vznášející v tekutém prostředí nebo jako kolonie rostoucí na agaru. Až v roce 1935 Zobel jako první použil přímou mikroskopii k pozorování biofilmu u mořských bakterií. V roce 1978 přírodovědec John William Costerton upozornil na všudypřítomnost biofilmu. Přírodovědci Costerton, Stewart a Greenberg v roce 1999 prokázali účast biofilmu v perzistentních infekcích. První studie zabývající se biofilmy se objevily již asi před 30 lety. V dnešní době se biofilmem zabývá převážně lékařská mikrobiologie. [26], [27], [28]

2.2 Definice a složení biofilmu

Bakterie v přírodních populacích jeví zřetelnou tendenci přisedat k nejrůznějším povrchům. Tvoří komplikované struktury a společenstva buněk - „biofilmy“. Existence v biofilmu je pro bakterie z mnoha důvodů výhodnější a ve většině prostředí je také základním způsobem jejich přirozeného výskytu. Předpokládá se, že v přirozeném prostředí je život mikroorganismů ve formě čistých planktonických kultur spíše výjimečný, a 95 - 99 % mikroorganismů se vyskytuje ve formě biofilmů [28], [29], [30], [31]

V literatuře lze nalézt různé definice biofilmu. Jako biofilm je zpravidla označována aktivní biologická vrstva složená z mikroorganismů (bakterií, řas, hub, prvoků, mnohobuněčných) a jejich extracelulárních polymerních produktů, která je přichycena na povrchu nejrůznějších podkladů, které jsou v kontaktu s vodou. [31]

Novější definice zahrnují rovněž fyziologické vlastnosti organismů biofilmu a schopnost transkripce genů. Biofilm lze charakterizovat jako přisedlé společenstvo mikroorganismů, ve kterém jsou jednotlivé buňky přichyceny k podkladu nebo jedna k druhé, jsou obklopeny matricí extracelulárních polymerních látek produkovaných těmito buňkami, které dále vykazují odlišný fenotyp s ohledem na rychlost růstu a transkripci genů. [31]

Biofilm je možné popsat i jako výsledek adherence mikroorganismů na povrchy různého materiálu, které mohou být umělé či nativní. Biofilmy lze nalézt například na povrchu zubů, kořenech rostlin, zdravotnických pomůckách, katétrech, ve vodovodním potrubí, či na povrchu výrobních zařízení [32], [33]. Na těchto površích pak vznikají mnohvrstvé shluky mikroorganismů a mikrokolonie, které jsou obklopeny vrstvou polymerního extracelulárního materiálu a propojeny sítí kanálků. Proudění kapaliny v těchto kanálcích umožňuje efektivní transport živin a metabolickou spolupráci mezi buňkami. [29], [34]

Biofilm obsahuje přibližně 15 % buněk a 85 % extracelulární matrix, kterou tvoří především extracelulární polymerní substance (EPS). EPS je tvořena především polysacharidy, ale obsahuje i celou řadu dalších makromolekul jako jsou proteiny, nukleové kyseliny, fosfolipidy a glykoproteiny. Složení EPS je odlišné u různých druhů mikroorganismů, závisí i na stáří biofilmu a podmínkách prostředí. Pokud jde o polysacharidy, mohou být přítomny jak homopolysacharidy, tak i heteropolysacharidy založené nejčastěji na glukóze či fruktóze. Produkce heteropolysacharidů je známa například u některých bakterií mléčného kvašení. Tyto heteropolysacharidy mohou obsahovat jednotky glukózy, galaktózy, fruktózy nebo ramnózy. Polysacharidy EPS jsou také často substituovány, substituentem může být pyruvát nebo sukcinát. [26], [34], [35]

Extracelulární polymery plní celou řadu funkcí. Především se podílí na přichycení buněk k povrchu, tvorbě mikrokolonií a vzniku struktury biofilmu. Dále zajišťují ochranu buněk biofilmu před nepříznivými podmínkami prostředí. Zabraňují přístupu biocidů, toxinů a těžkých kovů a chrání buňky proti vysychání. EPS funguje také jako stabilizátor struktury biofilmu a zajišťuje výživu buněčné složky. [26], [33]

Pro biofilm má význam i tekutá fáze, která ho obklopuje. Biofilm je viskózní, elastický. V proudu tekutiny se jeho struktura chová dynamicky, vlní se. V silnějším proudu se posouvá po podložce a šíří se na neobsazená místa. Když elasticita nestačí udržet buňky pohromadě, části biofilmu se odtrhávají. Při dostatku či nadbytku živin se povrch biofilmu vyrovnává, vlnky zmizí a vytvářejí se opět při poklesu koncentrace živin.

Kapalina, která biofilm omývá zvenčí, přináší využitelné organické i anorganické látky a odnáší produkty metabolismu. Do hloubky jsou zanášeny systémem kanálků. Lze v nich pozorovat proudění, a dokonce byla změřena hydrodynamika protékající tekutiny. [36]

2.3 Struktura biofilmu

Struktura biofilmu závisí na mnoha fyzikálních i biologických faktorech, přítomnosti živin, kyslíku, pH prostředí nebo druhovém zastoupení. Tloušťka biofilmu závisí na dostupnosti živin a na tom, zda je složen z jednoho či více bakteriálních druhů. V přirozeném prostředí je společenství více druhů obvyklejší. Naměřené hodnoty tloušťky biofilmu kolísají od několika téměř do stovky mikrometrů. Biofilm není homogenní, skládá se z agregátů a četných dutin. Jsou to spleťité, vzájemně propojené kanálky rozmanitého tvaru. Pomocí mikroelektrod lze v něm měřit koncentraci kyslíku. Ta je důležitá pro společnou existenci bakterií aerobních (potřebujících kyslík) a anaerobních (žijících bez kyslíku). Koncentrace kyslíku na povrchu biofilmu je nízká, o trochu hlouběji stoupá a dále do hloubky podle očekávání klesá, takže v základní vrstvě je nulová. V různých vrstvách má biofilm různý elektrický náboj, což pomáhá transportu živin. Bakterie jsou v biofilmu rozloženy nerovnoměrně, rostou v mikrokoloniích, shlucích bakterií, které mají kuželovitý či houbovitý tvar. Mikrokolonie jsou spojeny spleťitými kanálky. Většími mikrokoloniemi kanálky procházejí. Jsou však tenčí a představují póry. Na povrchu je biofilm omýván okolní kapalinou obsahující molekuly živin. Ta proniká i do biofilmu a póry se dostává až do nitra mikrokolonií. Biofilm jediného bakteriálního druhu má jednodušší stavbu než biofilm obsahující společenství více druhů. [31], [34], [36], [37]

2.3.1 Transport látek v biofilmu

Okolní kapalina obklopující biofilm obsahující molekuly živin a dalších nezbytných organických a anorganických látek omývá povrch biofilmu a prostřednictvím kanálků a pórů v mikrokoloniích do něj vstupuje. Naopak odnáší z okolí biofilmu metabolické produkty. Z kanálků proudí kapalina póry dovnitř větších mikrokolonií a dále se již dostává pouze difuzí, avšak pouze do omezené hloubky biofilmu. S rostoucí hloubkou biofilmu dochází tak k úbytku koncentrací kyslíku a dalších životně důležitých látek.

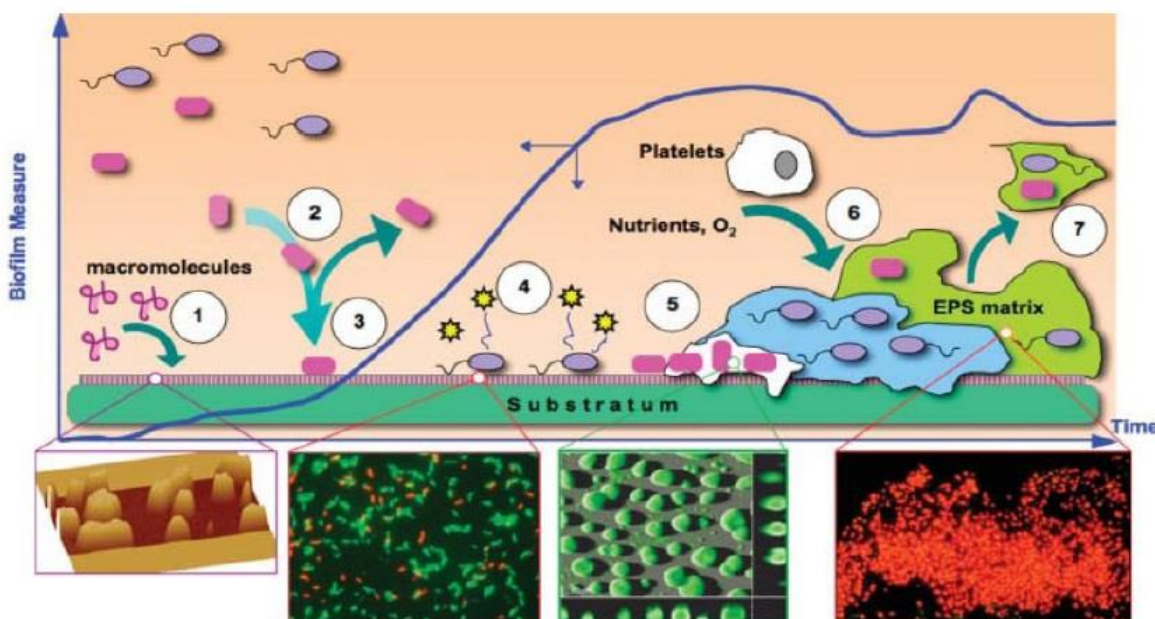
Transport látek v biofilmech je rozdělen do dvou zón: externí (z okolní kapaliny do biofilmu) a interní (uvnitř biofilmu). Efektivní difuze v biofilmech kolísá místo od místa. Je to nejpíše v důsledku heterogenní struktury biofilmu jako jsou husté shluky biofilmových mikrokolonií, které jsou obklopeny prázdným prostorem.

Relativní efektivní difuzivita vzrůstá se vzrůstající koncentrací rozpuštěných organických látek a s klesající rychlostí proudu. To znamená, že denzita biofilmů rostoucích při nízkých

koncentracích živin a vysokých proudových rychlostech (v potocích a řekách) je vyšší než denzita biofilmů v eutrofních jezerech nebo v čistírnách odpadních vod. [31]

Vývoj biofilmu lze rozdělit do několika fází (Obr.9):

1. Pro přisednutí na povrch bakterie využívají signální molekuly. Vlastnosti povrchu, na který bakterie přisedají, hrají rovněž významnou roli.
2. Při prvotní adhezenci se bakterie naváží na povrch objektu reverzibilními silami a zkoumají, zda splňuje podmínky pro přežití.
3. Pokud jsou podmínky splněny, usídlí se natrvalo a začnou vysílat *quorum sensing*.
4. Přisedlé bakterie přeprogramují své geny a tímto pak dochází ke změně fenotypu oproti volně žijícím bakteriím.
5. Bakterie produkují velké množství EPS, čímž se zpevní jejich vazba na povrch a mohou se připojit další buňky.
6. Bakterie využívají živin z okolí. Jsou přitahovány další bakterie.
7. Tvorba biofilmu se dokončuje. Části biofilmu a mikrokolonie se mohou oddělit a poté kolonizovat další povrchy. [38], [39]



Obr. 9. Fáze tvorby biofilmu. [38]

2.4 Vznik a tvorba biofilmu

Základním krokem tvorby biofilmu je prvotní adherence planktonických mikroorganismů na povrch substrátu a jejich „udržení“ po dobu dostačující k zahájení produkce složek nutných pro trvalé přichycení k povrchu. Pro adhezi je nutné, aby se mikroorganismus dostal do kritické vzdálenosti od povrchu, která je typicky menší než 1 μm . Do této vzdálenosti se může dostat například díky sedimentaci, proudění kapalného prostředí, nebo díky chemotaxi a vlastní pohyblivosti [40]

Následně závisí primární adheze na celé řadě faktorů, především na hydrofobních a elektrostatických interakcích. Důležitou roli mají také povrchové struktury buněk - bičíky, pili, proteiny či složky EPS. [40], [41]

Pevné přichycení k povrchu je dále umožněno díky tzv. adhezínům, díky kterým mohou buňky rozeznávat specifické složky povrchu, na který adherují. [41], [42]

Po úspěšné adhezi k povrchu dochází ke změnám v transkripci některých genů, především genů zodpovědných za tvorbu polysacharidů a dalších složek EPS. Díky produkci těchto látek nejsou nově vznikající dceřiné buňky uvolněny do roztoku, ale vytváří se shluky - mikrokolonie buněk. EPS udržuje bakteriální buňky v těsné blízkosti, což umožňuje jejich další interakce, vzájemnou komunikaci a tvorbu synergistických mikrokonzorcií. [33], [43], [44]

Mikrokolonie tvoří samostatná společenstva, jejichž prostředí odpovídá různým subpopulacím. Příkladem mohou být populace anaerobních mikroorganismů, které lze nalézt v hlubších vrstvách biofilmu, kde je snížená koncentrace kyslíku. [33], [45]

Důležitou strukturní charakteristikou biofilmů je přítomnost často spletených a vzájemně propojených kanálků a pórů, které jsou důležité hlavně pro přenos živin celým systémem. Během vývoje biofilmu se některé buňky z mikrokolonií na určitý impuls odlučují, přecházejí do planktonického stavu (odplouvají) a kolonizují další části povrchu. Příčinou tohoto procesu může být konkurence a neúnosnost další existence ve společenství. Z buněk vycházejí chemické signály, které umožňují buňkám zjišťovat existenci okolních buněk a tím i hustotu populace. Pokud je příliš hustá, dává signál dalším planktonicky žijícím buňkám, aby se nepřipojovaly, pokud hustota není dostatečná, tak naopak buňky jsou přitahovány. Tento jev je označován jako *quorum sensing*. [36], [46]

2.5 Quorum sensing

Některé buňky se z kolonií odlučují a přecházejí do planktonického stavu a mohou kolonizovat další části povrchu. Příčinou tohoto chování je nejspíše zvyšující se konkurence buněk v biofilmu. Vytváří chemické signály, které vycházejí z buněk a umožňují buňkám zjišťovat existenci okolních buněk v biofilmu. Tímto upozorňují okolní buňky na svou přítomnost a zabraňují tak dalšímu přehušťování populace. Produkce těchto signálních látek stoupá, pokud se zvyšuje hustota populace a ve vysokých koncentracích se hromadí v buňkách a v jejich okolí. Tento způsob vnitrobiofilmové komunikace je označován jako „*quorum sensing*“ (vnímání množství) (Obr.10). Tato bakteriální mezibuněčná komunikace slouží jako mechanismus genové regulace, kterým bakterie koordinují expresi určitých genů za přítomnosti malých signálních molekul. [31], [47]

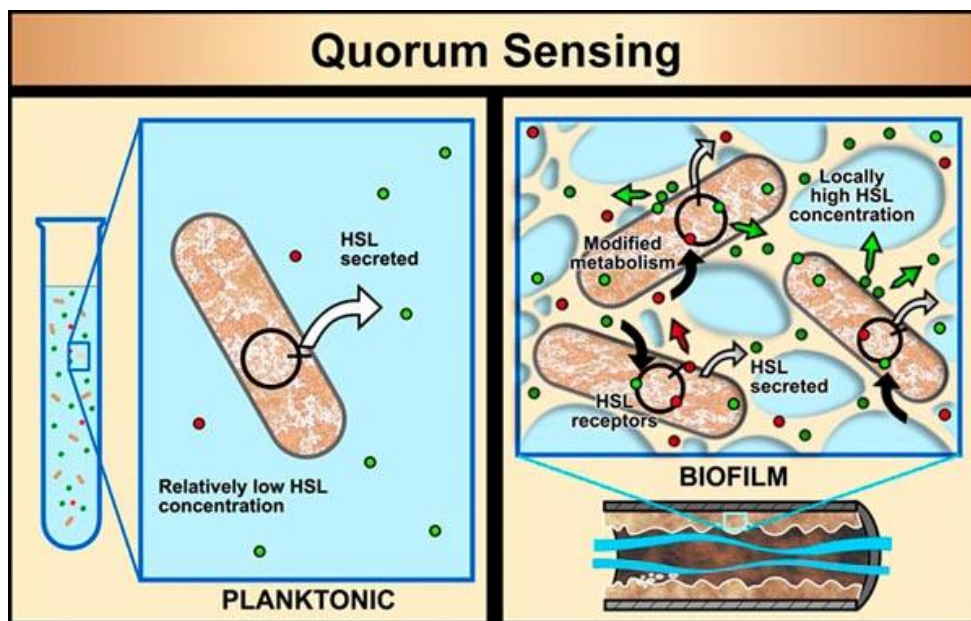
Existence mezibuněčné bakteriální komunikace byla dlouhou dobu přehlížena a bakteriální buňka byla vnímána jako soběstačné individuum neschopné tvorby skupin či vzájemné komunikace. *Quorum sensing* byl poprvé rozpoznán v sedmdesátých letech u mořské bakterie *Vibrio fischeri*, kde kontroluje luminiscenci. Bakteriální extracelulární signál, který spouští luminiscenci, je acyl-homoserin lakton.

Různé druhy bakterií využívají k vzájemné komunikaci odlišné typy molekul, tyto signální molekuly lze rozdělit do několika tříd a bakterie mohou na každou molekulu odlišným způsobem. V některých případech může jeden druh využívat více než jeden QS systém a tedy používat větší počet signálních molekul. [48]

Gramnegativní bakterie využívají jako signální molekuly různé chemické látky, nejčastěji N-acyl-homoserin laktony, složené z mastné kyseliny a aminokyseliny serinu. U grampozitivních mikrobů jsou to obvykle krátké oligopeptidy, které lze přirovnat k feromonům či hormonům. [49]

Regulace pomocí systému *quorum sensing* je zpravidla třífázový proces. V první fázi bakterie produkují specifické signální molekuly. Tyto signální molekuly *quorum sensing* systému vznikají intracelulárně a do zevního prostředí jsou transportovány aktivně. Jiné však mohou být součástí bakteriálního povrchu nebo se mohou vyskytovat v zevním prostředí bakterie a jsou aktivovány až působením příslušného bakterií produkovaného enzymu. Ve druhé fázi dochází ke kumulaci signálních molekul v zevním prostředí okolo bakteriální buňky díky rostoucí populační hustotě bakterií, které je produkují. Ke třetí fázi dochází až při překročení prahové koncentrace signální molekuly. Tato molekula se pak naváže na

membránový receptor na povrchu bakteriální buňky a poté se aktivuje intracelulární regulační protein, který spustí fosforylační kaskádu vedoucí k expresi celé řady genů. Tímto způsobem pak mezibuněčná komunikace zprostředkovaná systémem *quorum sensing* ovlivňuje regulaci exprese faktorů virulence u celé řady patogenních bakterií. [32], [49], [50]



Obr. 10. Model quorum sensing. [51]

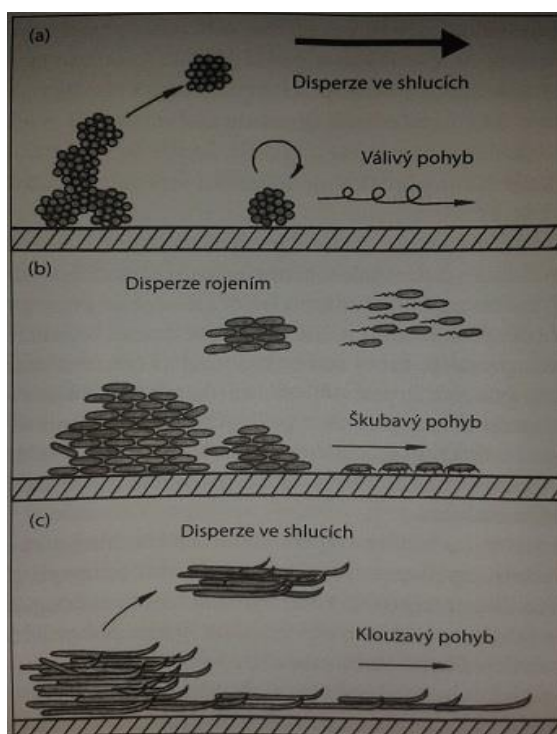
2.6 Uvolňování buněk z biofilmu a šíření biofilmu

Akumulace biofilmu na určitém povrchu je určována rovnováhou mezi procesy přichycení, růstu a odtrhávání. Nejméně prostudovaný je proces odtrhávání, kterým rozumíme uvolňování jednotlivých mikrobiálních buněk i jejich shluků z biofilmu do okolní kapaliny a jejich další šíření (disperzi). K disperzi dochází zpravidla po dosažení kritického množství buněk i masy biofilmu.

Jako faktory významné z hlediska odtrhávání buněk biofilmu jsou enzymy degradující matrici, bubliny plynů vznikajících činnostmi biofilmu, koncentrace živin a stav mikrobiálního růstu, dostupnost polyvalentních kationtů, smykové tření okolní kapaliny, kontaktní mechanický otěr, signály *quorum sensing*, aktivace lytických bakteriofágů a oxid dusnatý

(NO). Některé z těchto odtrháváních mechanismů jsou čistě fyzikální, ale jiné mohou být biologické. Z hlediska fyzikálního je nejčastějším faktorem odtrhávání působení hydraulických sil či vzájemný kontaktní otěr částic. Vysoký stupeň odtrhávání by měl vést k tvorbě silnějšího biofilmu, zatímco v podmínkách nízkého odtrhávání jsou biofilmy heterogenní, porézní a mají měkčí strukturu. Mezi biologické faktory odtrhávání patří akumulace metabolických produktů a vyčerpání metabolických substrátů. [33], [37]

Zprvu bylo odtrhávání části biofilmu považováno za pasivní chování, závislé na rychlosti proudění nebo hladovění, avšak odtrhávání může být chápáno jako strategie, kterou bakterie aktivně kolonizují nové niky ještě dříve, než se prostor a živiny stanou limitujícími. Určité bakterie mohou aktivně opouštět biofilm během procesu, který se nazývá disperze. Předpokládá se, že tento proces představuje závěrečný krok ve vývoji biofilmu, ve kterém se buňky biofilmu vracejí do planktonní fáze. Existují tři rozdílné strategie disperze: disperze vyrojením; disperze shluků a povrchová disperze. Obr.11 poukazuje na strategii disperze buněk z biofilmu. [34], [37], [52]



Obr. 11. Strategie disperze buněk z biofilmu. [31]

2.7 Biofilmy a antimikrobní látky

Mikrobiální buňky žijící ve formě biofilmu jsou mnohonásobně rezistentnější k biocidům než planktonické formy stejného kmene. [34], [53], [54]

Biofilm je pro bakterie významným faktorem umožňující přežití a množení. Z vyvrátého biofilmu se uvolňují jednotlivé buňky či mikrokolonie a ty jsou primárně zodpovědné za manifestaci onemocnění, protože vyvolávají imunitní odpověď hostitele. Při léčbě infekce antimikrobiálními látkami se daří eliminovat většinu planktonických a část biofilmových buněk, menší část buněk však přežívá i vysoké koncentrace antimikrobiálních látek. [35]

2.7.1 Mechanizmy resistance biofilmu k antimikrobním látkám

Biofilmová rezistence se projevuje mnoha mechanizmy, které se mohou lišit dle druhu mikroorganismu tvořícího biofilm a také látky, která je vůči tomuto mikroorganismu aplikovaná. Jiné mechanizmy jsou u biofilmu v počáteční fázi a jiné u plně vyvrátého a starého biofilmu.

Mezi nejvýznamnější a nejvíce prostudované mechanizmy biofilmové rezistence patří:

- fyzikální a chemické bariéry bránící penetraci látek do biofilmové vrstvy,
- snížená rychlost růstu buněk v biofilmu,
- aktivace univerzální odpovědi na stres,
- vznik určité rezistentní skupiny buněk, perzistorů,
- vznik biofilm-specifického fenotypu a exprese pravděpodobných genů rezistence.

Všechny tyto mechanizmy mohou v biofilmu působit jednotlivě, nebo se mohou vzájemně doplňovat. [36], [37]

2.8 Negativní a pozitivní vliv biofilmu

2.8.1 Negativní vliv biofilmu

V současné době představuje odstranění nežádoucího biofilmu závažný problém. V této formě jsou pak bakterie odolnější před účinky antibiotik a různých antimikrobních prostředků a způsobují celou řadu problémů lidskému imunitnímu systému, ale zvířatům, rostlinám a přírodnímu prostředí. Zároveň jsou příčinou nejrůznějších průmyslových kontami-

nací, tzv. biofoulingu (vznik povlaků bakterií na površích ponořených do nejrůznějších tekutin, včetně vody) a biokoroze, která je problémem u historických památek. Dále ucpává nádrže chladících věží, potrubí a průchodů vody, zrychluje korozi, snižuje účinnost přenosu tepla, zvyšuje riziko tzv. legionářské nemoci. [55]

Velkým problémem jsou biofilmy v medicíně. Snadno se tvoří na dlouhodobě zavedených katétrech, tracheálních cévkách a na umělých implantátech, jakou jsou umělé srdeční chlopně, kardiostimulátory, umělé kloubní náhrady a nitroděložní tělíska. Obzvláště závažné jsou infekce krevního oběhu. Nejčastějším izolátem zde bývá *Staphylococcus epidermis* a další stafylokoky. [37]

Nejnámějším mikrobiálním biofilmem vyskytujícím se v lidském těle je zubní plak. Je tvořen smíšenou populací bakterií, které jsou součástí normální mikrobiální flóry. Vytvořená vrstva biofilmu funguje jako bariéra difuze a díky ní tak dochází k nahromadění kyselých produktů metabolismu a tímto účinkem pak dochází k naleptání zubní skloviny a dentinu a začíná se tvořit zubní kaz. Mineralizací zubního plaku vzniká zubní kámen. V nejhorším stádiu může dojít k zánětlivému onemocnění – periodontitida, jejíž chronický průběh může vést k destrukci tkáně dásní a závěsného aparátu zubu. [28], [38]

Dalším negativním aspektem biofilmů je podíl na biodeteriorizaci. Je to proces rozrušování či poškozování materiálu vlivem biologických činitelů, např. bakterií, hub apod. Vlivem aktivity mikroorganismů (biodeteriorizací) dochází k nežádoucím změnám ve vlastnostech materiálů, které mohou vést k ekonomickým ztrátám či ekologickým haváriím. Mikrobiální biodeteriorizaci pak můžeme definovat jako deteriorizaci materiálů mikroorganismy. Významnou roli v těchto degradačních procesech hrají především mikrobiální biofilmy, které se vyskytují na nejrůznějších podkladech. Plasty se vyznačují různými chemickými a fyzikálními vlastnostmi. Jedná se zejména o zvýšenou trvanlivost a rezistenci ke zvětrávání, a proto i rezistenci k mikrobiální biodeteriorizaci. Polymery jsou potenciálními substráty pro heterotrofní mikroorganismy, včetně bakterií a hub. Biodegradabilita polymerů závisí na molekulové hmotnosti, čirosti a fyzikální formě. Existuje několik způsobů, jak mohou mikroorganismy poškozovat strukturu a fungování syntetických polymerů jako je fouling, degradace vyluhovatelných složek, koroze, hydratace a penetrace a následné zbarvení povrchu polymeru. [39]

2.8.2 Pozitivní vliv biofilmu

Schopnost bakterií tvořit biofilm má však i pozitivní důsledky a lze ji využít v různých oblastech lidské činnosti. Jedna z hlavních oblastí je technologie výroby potravin. Účinkem mikroorganismů získávají fermentované potraviny požadované chuťové i technologické vlastnosti. Nejznámějšími mikroorganismy, které jsou spojované s výrobou potravin a nápojů, jsou kvasinky. Důležitým oborem fermentačního průmyslu, kde se biofilmy využívají, je výroba fermentovaných mléčných produktů (převážně sýrů) a výroba alkoholických nápojů.

Biofilmy tvořené mikroorganismy, se dále využívají při čištění vod, respektive úprava podzemních vod na vodu pitnou. Dále mohou například snižovat znečištění půd. [55], [56], [57], [58]

2.9 Biofilm a bakterie

V předchozích kapitolách byl popsán význam tvorby biofilmu pro bakterie, proces jeho tvorby a jeho dopady (ať už pozitivní nebo negativní) na různé oblasti lidské činnosti. Schopnost tvorby biofilmu má celá řada bakterií a je prostudována zejména u druhů významných v klinické mikrobiologii. Kmen, který je schopen tvořit biofilm je považován za virulentnější, a to zejména z toho důvodu, že infekce biofilmopozitivními kmeny jsou perzistentní, dlouhotrvající a obtížně léčitelné. Mezi onemocnění, v jejichž patogenezi se uplatňuje tvorba biofilmu bakterií, patří například zubní kaz (viridující streptokoky), zánět středního ucha (hemofily), osteomyelitida (*Staphylococcus aureus*), záněty žlučových cest nebo zánět plic při cystické fibróze (*Pseudomonas aeruginosa*). Velmi snadno se biofilmy tvoří na površích různých pomůcek a náhrad zaváděných makroorganismů, jako jsou intravenózní katetry (*Staphylococcus epidermidis*), umělé srdeční chlopně a kloubní náhrady, močové katetry (*Escherichia coli*) a kontaktní čočky (*Pseudomonas aeruginosa*). [27], [36]

V následujícím textu je uvedena stručná charakteristika mikroorganismů, které byly použity pro praktickou část této diplomové práce.

2.9.1 *Staphylococcus aureus*

Zařazení bakterie: Doména *Bacteria*, kmen *Firmicutes*, třída *Bacilli*, řád *Bacillales*, čeleď *Staphylococcaceae*.

Patří do rodu *Staphylococcus*. Tento rod tvoří žluté až oranžové kolonie, některé kmeny však tvoří kolonie bílé, nejčastěji se vyskytuje na kůži a mukózních membránách teplokrevných zvířat a člověka (např. v nosní dutině). Rozmnožuje se i za 10%ní koncentrace chloridu sodného a je hostitelem řady bakteriofágů. Vedle aerobního procesu má i metabolismus anaerobní, takže je schopen zkvašovat cukry za tvorby kyselin. *Staphylococcus aureus* patří mezi nejdůležitější patogenní druhy, které způsobují hnisavá onemocnění na kůži (trudovitost), hnisání ran a hnisavá onemocnění poraněných kostí. Dostane-li se do potravin, produkuje tam toxiny bílkovinné povahy, které mohou způsobit vážné až smrtelné otravy. Tyto toxiny se inaktivují varem (jsou termolabilní), a proto je nebezpečí otrav hlavně u těch potravin, jež se dále tepelně nepracovávají (majonézy, saláty, zmrzliny apod.) tato bakterie se do potravin může dostat z hnisajících ložisek na ruku lidí připravujících příslušné potraviny. [59]

Biofilmy stafylokoků se vyskytují převážně na implantátech a způsobují perzistující infekce, kvůli kterým musí být implantát odstraněn. Do kontaktu s implantátem se bakterie dostávají během chirurgického zákroku nebo při pozdější bakteriémii. Buňky tak adherují na povrch materiálu za tvorby biofilmu, který je vysoce odolný vůči odstranění. [60]

Stafylokoky mohou dále přežívat pomocí biofilmu na kontaktních površích v mlékárenském a masném průmyslu, kde odolávají působení dezinfekčních látek a způsobují sekundární kontaminaci mléčných a masných produktů. [610]

2.9.2 *Staphylococcus epidermidis*

Zařazení bakterie: Doména *Bacteria*, kmen *Firmicutes*, třída *Bacilli*, řád *Bacillales*, čeleď *Staphylococcaceae*.

Staphylococcus epidermidis je nepohyblivá grampozitivní bakterie a je jedním z více než 40 druhů rodu *Staphylococcus*. Je součástí normální lidské flóry, kožní flóry, a méně často flóry sliznic. *S. epidermidis* obvykle není patogenní, u pacientů s oslabeným imunitním systémem však existuje riziko vzniku infekce. Tyto infekce jsou obvykle nozokomiální. *S. epidermidis* je zvláště nebezpečný pro jedince s katetry nebo s jinými chirurgickými im-

plantáty. *S. epidermidis* je velmi odolný mikroorganismus tvořící koky v hroznovitém uspořádání. Tvoří bílé, soudržné kolonie přibližně 1-2 mm v průměru po 24 hodinách kultivace. Tato bakterie je nehemolytická na krevním agaru, což znamená, že nerozpouští červené krvinky s následným uvolněním hemoglobinu. Je kataláza-pozitivní, koaguláza-negativní a fakultativně anaerobní. Podobně jako *Staphylococcus aureus* má buněčná stěna *Staphylococcus epidermidis* vazebný protein, který pomáhá organismu získávat železo z transferrinu. [62]

U tohoto stafylokoka byl objeven produkt, který způsobuje adhezi jednotlivých buněk sobě samým a byl nazván polysacharidový intracelulární adhezín (PIA) a je považován za jeden z hlavních faktorů ovlivňujících tvorbu biofilmu. Později byly objeveny další proteiny umožňující tvorbu biofilmu také u kmenů postrádajících gen *ica*, který podmiňuje přítomnost produkce PIA [63]. Dále se snadno váže na polystyren. [64]

Stafylokoky staví biofilmy převážně z polymeru N-acetylglukozaminu a přítomnost EPS u tvorby biofilmu u nich není podmínkou. [65]

2.9.3 *Enterococcus faecalis*

Zařazení bakterie: Doména *Bacteria*, kmen *Proteobacteria*, třída *Gammaproteobacteria*, řád *Enterobacteriales*, čeleď *Enterococcaceae*.

Enterococcus faecalis je komenzální grampozitivní bakterie obývající gastrointestinální trakt člověka a jiných savců. Stejně jako jiné druhy rodu *Enterococcus*, i *E. faecalis* může způsobit životu nebezpečné infekce u lidí a to zejména v nemocničním prostředí, kde se přirozeně vysoká míra odolnosti vůči antibiotikům podílí na jeho patogenitě. Často se nachází v kořenovém kanálku ošetřených zubů.

E. faecalis je nepohyblivá, fakultativně anaerobní bakterie. Fermentuje glukózu bez produkce plynu a neprodukuje katalázu. Může produkovat pseudokatalázu, pokud roste na krevním agaru. Obecně lze říci, že enterokoky jsou odolnější k nepříznivým podmínkám než ostatní střevní bakterie. Odolávají i extrémnímu alkalickému pH (9,6) a vysoké koncentraci soli. Dále odolávají žlučovým solím, saponátům, těžkým kovům, etanolu, kyselinám a vysychání. Mohou růst v rozmezí od 10 °C do 45 °C a přežít při teplotě 60 °C po dobu 30 minut. [59], [66]

Jedním z hlavních faktorů virulence u *E.faecalis* je schopnost tvorby biofilmu. Biofilm vzniká na různých typech povrchů, buď biologických (živočišné tkáně) nebo nebiologických (implantáty či katetry z umělých hmot). [68]

2.9.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Zařazení bakterie: Doména *Bacteria*, kmen *Proteobacteria*, třída *Gammaproteobacteria*, řád *Pseudomonadales*, čeleď *Pseudomonadaceae*.

Tato bakterie patří do rodu *Pseudomonas*, pro který jsou charakteristické gramnegativní rovné nebo mírně zakřivené tyčky. Jsou pohyblivé jedním nebo dvěma bičíky, pouze zřídka jsou nepohyblivé. Pseudomonády jsou aerobní se striktně respiratorním typem metabolismu, kdy kyslík je konečným akceptorem elektronů. Většina druhů nevyžaduje žádné růstové faktory. *Pseudomonas aeruginosa* se vyskytuje v půdě, ve vodě, v humánním klinickém materiálu. Je příležitostně patogenní pro rostliny. Pseudomonády často produkují pigmenty – modrozelený pyocyanin, žlutozeleně fluorescentní pyoverdin, ojediněle i tmavě červený pigment. *P. aeruginosa* je všudypřítomná a schopná přežít v širokém spektru přírodních prostředí. Je známá jako lidský patogen, převážně v nemocničním prostředí. Ohroženi jsou pacienti se sníženou imunitou. Hlavní příčina úmrtí u pacientů je cystická fibróza. [59], [69], [70]

Většina pseudomonád má schopnost vytvářet biofilm, díky kterému mohou přežít např. v nádobách s amoniiovými sloučeninami, v nádobách na výrobu léčiv či na lahvích s balenou vodou. Jsou velmi odolné vůči antibiotikům a tvorba biofilmu tuto odolnost ještě zvyšuje. [27]

Pseudomonády dále osídlují zředěné roztoky dezinfekčních prostředků a přežívají i v destilované vodě. Mohou růst na zkaženém jídle, ve vršcích PET lahví nebo na mýdlových usazeninách. [71]

2.9.5 *Klebsiella pneumoniae*

Zařazení bakterie: Doména *Bacteria*, kmen *Proteobacteria*, třída *Gammaproteobacteria*, řád *Enterobacteriales*, čeleď *Enterobacteriaceae*.

Je řazena do rodu *Klebsiella*. Tvoří gramnegativní rovné tyčky, vyskytující se jednotlivě nebo po dvou, nebo v krátkých řetězcích, buňky jsou opouzdřené a nepohyblivé. Jsou fakultativně anaerobní. Optimální teplota růstu je při 37 °C a nerostou při 10 °C. K růstu nevyžadují žádné speciální růstové faktory. Klebsiely využívají citrát a glukózu jako zdroj uhlíku. *K. pneumoniae* se vyskytuje ve střevním traktu člověka a zvířat. Způsobuje infekce močových a dýchacích cest a mastitidy u zvířat. Je hlavní příčinou nozokomiálních infekcí zejména u pacientů se sníženou imunitou. [69], [72], [73]

2.9.6 *Escherichia coli*

Zařazení bakterie: Doména *Bacteria*, kmen *Proteobacteria*, třída *Gammaproteobacteria*, řád *Enterobacteriales*, čeleď *Enterobacteriaceae*.

Rod *Escherichia* obsahuje pouze jediný druh – *Escherichia coli*, který se nachází ve spodní části střevního traktu člověka a teplokrevných zvířat. Její přítomnost ve vodách nebo v potravinách je proto ukazatelem, že došlo k znečištění fekáliemi. Pravidelně se vyskytuje v potravinářských surovinách, které byly v kontaktu s hnojenou půdou. *E. coli* je pouze podmíněně patogenní (onemocnění močových cest nebo střev). Tato bakterie je nejprozkoumanějším mikrobiálním druhem, neboť slouží jako modelový organizmus pro biochemické, genetické i fyziologické studie. Je prvním bakteriálním druhem, u něhož byla pozorována konjugace buněk a výměna genetického materiálu. *E. coli* zkvašuje cukry za intenzivní tvorby kyselin a plynu. Její schopnost zkvašovat laktózu za vzniku kyselin se využívá pro její zjištění v potravinách nebo ve vodě.

Tvoří gramnegativní rovné tyčky vyskytující se jednotlivě nebo ve dvojicích. Optimální teplota růstu je 37 °C. *Escherichie* rostou na běžných půdách, biochemická aktivita je značná. Kmeny *E.coli*, které produkují enterotoxin a/nebo jiné faktory virulence, způsobují průjemová onemocnění. Tento druh je také hlavním původcem infekcí močových cest a nozokomiálních infekcí včetně septikemií a meningitid. [59], [69]

E.coli vytváří mukózní biofilm a produkuje toxiny na dně řek, jezer a v nádržích s pitnou vodou. [74]

3 CÍL PRÁCE

Cíle diplomové práce byly stanoveny následovně:

V teoretické části zpracovat literární rešerši zaměřenou na:

- charakteristiku a strukturu polyanilinu, jeho vlastnosti a možné využití
- tvorbu biofilmu u bakterií, strukturu biofilmu, jeho vlastnosti, tvorbu a význam
- bakterie se schopností tvorby biofilmu.

V praktické části byly cíle stanoveny následovně:

- připravit mikrotitrační destičky s polyanilinovými filmy
- stanovit schopnost tvorby biofilmu u vybraných grampozitivních a gramnegativních bakterií,
- testovat vliv různých forem polyanilinových filmů na schopnost tvorby biofilmu u biofilmopozitivních kmenů bakterií,
- zpracovat výsledky a formulovat závěry práce.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE

4.1 Použité materiály a chemikálie

4.1.1 Chemikálie a roztoky

- Anilin hydrochlorid (Lach-Ner)
- Peroxodisíran amonný (Lach-Ner)
- kyselina chlorovodíková (Lach-Ner)
- Hydroxid amonný (Lach-Ner)
- Kyselina kyselina 2-akrylamido-2-methylpropan-sulfonová (PAMPSA) (Sigma Aldrich)
- Kyselina sulfamová (Sigma Aldrich)
- Kyselina křemičito-wolframová (Sigma Aldrich)
- Kyselina fosfowolframová (Sigma Aldrich)
- Kyselina octová
- Roztok glukosy
- Trypton-sojový bujon s glukózou (TSB)
- Krystalická violet'
- Aceton
- Metanol
- Etanol
- Fyziologický roztok
- Destilovaná voda

4.1.2 Vybrané kultury mikroorganismů

Pro praktickou část diplomové práce byly použity kmeny grampozitivních a gramnegativních bakterií získané z České sbírky mikroorganismů (CCM) a z Fakulty technologicky UTB ve Zlíně:

- *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955
- *Pseudomonas aeruginosa* FT 3
- *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418

- *Staphylococcus epidermidis* CCM 7221
- *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953
- *Escherichia coli* CCM 3988
- *Enterococcus faecalis* CCM 7000
- *Klebsiella pneumoniae* CCM 4415

4.1.3 Kultivační půdy

Všechny bakteriální kmeny, které byly použity v experimentální části diplomové práce, byly uchovávány na masopeptonovém agaru (MPA) s glukózou (5 g/l) při teplotě 4 ± 2 °C. Kultivační médium MPA mělo následující složení:

Beef extract (HiMedia)	3,0 g
Pepton (HiMedia)	5,0 g
Agar (HiMedia).....	15,0 g
NaCl (Lach-Ner)	5,0 g
Destilovaná voda	1000 ml

4.1.4 Tekuté živné médium

Jako tekuté živné médium pro přípravu bakteriální suspenze byl použit trypton-sojový bujon s glukózou (TSB), složení na 100 ml je uvedeno níže. Připravené médium bylo následně sterilizováno filtrací.

Trypton.....	1,7 g
Sojový pepton.....	0,3 g
NaCl.....	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,25 g
Glukosa.....	0,5 g
Destilovaná voda.....	100 ml

4.1.5 Dekontaminace použitého materiálu

Veškerý materiál, který byl použit při laboratorní práci (např. plasty, sklo, mikrotitrační destičky, pipetovací špičky, Petriho misky atd.), byl dekontaminován v autoklávu při 132 °C po dobu 20 minut.

4.1.6 Přístroje, zařízení a pomůcky

- Analytické váhy Sartorius, BA 110
- Vortex Heidolph, Reax top
- Biohazard box EUROFLOW (Clean Air)
- Autokláv Varioklav H+P
- Biologický termostat Memmert INE 600
- Denzilometr McFarland (Biosan)
- Fotometr TECAN Sunrise TW/TC (TECAN)
- Automatické mikropipety (100-1000 µl, 0,5-10 µl)
- Laboratorní sklo (kádinky, zkumavky, pipety, Petriho misky, tyčinky)
- Laboratorní plasty (zkumavky, stříkačky, mikrotitrační destičky, očkovací kličky, špičky pro automatické mikropipety)
- Ostatní běžné laboratorní pomůcky a vybavení.

4.2 Metody

4.2.1 Příprava mikrotitrační destičky s PANI filmem

Polyanilinové filmy byly připraveny oxidací 0,2 M anilinu hydrochloridu 0,25 M peroxodisíranem amonným. Pro vlastní reakci bylo v kádince rozpuštěno 2,59 g (20 mmol) anilinu hydrochloridu v 50 ml vody. V druhé kádince bylo rovněž rozpuštěno 5,71 g (25 mmol)

peroxodisíranu amonného v 50 ml vody. Poté byly oba roztoky smíchány. Polymerace probíhala při laboratorní teplotě přibližně 10 minut.

Takto připravená směs obou monomerů byla automatickou pipetou napipetována po 200 μ l do každé z 96 jamek mikrotitrační destičky. Po několika minutách reakční směs zmodrala a začaly se tvořit anilinové oligomery. Vytvořila se pernigranilinová forma polyanilinu. Po skončení polymerace, přibližně za 10 minut, pernigranilinová forma přešla na konečnou, tmavě zelenou polyanilinovou (emeraldinovou) sůl, kterou byly destičky pokryty v tenkém filmu. Poté byla reakční směs z jamek mikrotitrační destičky odstraněna a jamky byly pečlivě propláchnuty 0,2 M kyselinou chlorovodíkovou a acetonem. Mikrotitrační destička byla sušena na vzduchu.

4.2.2 Deprotonace PANI filmu na mikrotitrační destičce

Před procesem deprotonace se v jamkách mikrotitrační destičky ponechala po dobu 60 minut destilovaná voda. Po uplynutí této doby byla voda vylita a do každé jamky bylo napipetovalo 150 μ l 1 M vodného roztoku hydroxidu amonného. Ten působil v destičce po dobu 12 hodin. Tmavě zelená polyanilinová, emeraldinová sůl tak byla deprotonována na polyanilinovou bázi, což se projevilo změnou barvy ze zelené na modrou. Po ukončení reakce byl hydroxid z jamek odstraněn a destička byla vysušena na vzduchu.

4.2.3 Příprava PANI filmů reprotonovaných vybranými kyselinami

Mikrotitrační destičky s filmem polyanilinové báze byly v dalším kroku reprotonovány testovanými kyselinami. K reprotonaci byly použity 4 kyseliny (viz Tab. 1).

Tab. 1. Kyseliny použité k reprotonaci a jejich koncentrace.

Kyselina	Koncentrace
PAMPSA	Neředěná
Kyselina sulfamová	1 mol/l
Kyselina křemičito-wolframová	50 %
Kyselina fosfowolframová	50 %

Do každé jamky na destičce bylo pipetováno 150 μ l roztoku příslušné kyseliny, která se ponechala působit po dobu 24 hodin. Poté byly roztoky kyseliny odpipetovány, jamky promyty methanolem a destička ponechána uschnout na vzduchu při laboratorní teplotě. Každou kyselinou byly deprotonovány filmy na dvou PANI mikrotitračních destičkách.

4.2.4 Příprava inokula

Biofilmové bakteriální kultury byly předpěstovány na masopeptonovém agaru s glukózou (kultivace 48 hodin v termostatu při teplotě 30 °C/37 °C dle nároků jednotlivých kmenů bakterií). Bakteriální suspenze byly připraveny do sterilních zkumavek zaočkováním fyziologického roztoku. Hustota suspenzí byla na denzitometru upravena tak, aby odpovídala 2. stupni McFarlandovy stupnice.

4.2.5 Příprava mikrotitrační destičky pro měření

Do jamek připravených mikrotitračních destiček s polyanilinovými filmy (bod 4.2.3) bylo pipetováno vždy 180 μ l TSB bujonu. Následně byly jamky zaočkovány 20 μ l připravené bakteriální suspenze (4.2.4), s vynecháním posledních dvou sloupců destičky. Do každého řádku byl zaočkován jeden bakteriální kmen. Takto připravené destičky byly ponechány kultivovat v termostatu po dobu 48 hodin při teplotě 30 °C/37 °C dle nároků jednotlivých kultur.

Po inkubaci byl obsah jamek vylit a jamky byly 3x promyty fyziologickým roztokem (po 250 μ l / jamku). Následně byl povrch destiček barven roztokem krystalické violeti (200 μ l / jamku) po dobu 1 minuty. Poté bylo barvivo odstraněno a destičky byly promyty 3 x destilovanou vodou a vysušeny vysoko nad plamenem nebo volně na vzduchu. Pro rozpuštění barviva pak bylo do každé jamky pipetováno 200 μ l 33% kyseliny octové, která se nechala působit 10 minut. Po uplynutí této doby byly měřeny hodnoty optické denzity při 595 nm (OD_{595}) na fotometru Sunrise TECAN.

Pro měření bylo použito 7 mikrotitračních destiček (Tab.2):

Tab. 2. Mikrotitrační destičky a jejich zkratky.

Mikrotitrační destička	Zkratka
Čistá (bez PANI) - reference	REF
PANI bez úprav	PANI
Deprotonovaný PANI	DEP
PANI modifikovaný kyselinou sulfamovou	SULF
PANI modifikovaný kyselinou křemičito-wolframovou	TUN (tungstosilicic acid)
PANI modifikovaný kyselinou fosfowolframovou	PHO (phosphotungstic acid)
PANI modifikovaný kyselinou 2-akrylamido-2-methylpropan-sulfonovou	PAM (PAMPSA)

5 VÝSLEDKY

Pro praktickou část diplomové práce byly použity polystyrenové mikrotitrační destičky s polyanilinovými filmy. PANI filmy byly různě modifikovány přímo na mikrotitračních destičkách. Byla provedena deprotonace hydroxidem amonným a modifikace kyselinou PAMPSA, kyselinou sulfamovou, kyselinou křemičito-wolframovou a kyselinou fosfowolframovou. Na takto upravených mikrotitračních destičkách s PANI filmy byla testována adheze buněk na povrch jamek u vybraných biofilmopozitivních kmenů bakterií (4 grampozitivní a 4 gramnegativní). Schopnost tvorby biofilmu na jednotlivých PANI filmech byla hodnocena pomocí modifikované Christensenovy metody. Princip metody spočívá ve schopnosti tvořit biofilmovou vrstvu na stěně kultivační nádoby. Po kultivaci za vhodných podmínek je biofilmová vrstva obarvena vhodným barvivem, nejčastěji krystalovou violetí nebo safraninem. Biofilmopozitivní kmeny vytváří na stěně zkumavky dobře patrnou obarvenou vrstvu. Metodu lze upravit pro mikrotitrační destičky. Kultivace testovaného kmene probíhá v jamce destičky, poté je obsah jamek odstraněn, destička je promyta a barvena krystalovou violetí. Ulpělé barvivo je rozpuštěno kyselinou octovou a intenzitu zabarvení je možné měřit spektrofotometricky při 595 nm. Výsledky lze vyjádřit jako hodnotu optické denzity OD, která odráží míru akumulace barviva na dně a stěnách jamky a vyjadřuje tak míru adheze buněk.

Naměřené hodnoty byly zpracovány a dále z nich byly sestrojeny sloupcové grafy, z kterých bylo vyhodnoceno, zda polyanilinové filmy brání adhezi buněk biofilmopozitivních kmenů bakterií nebo naopak nebrání.

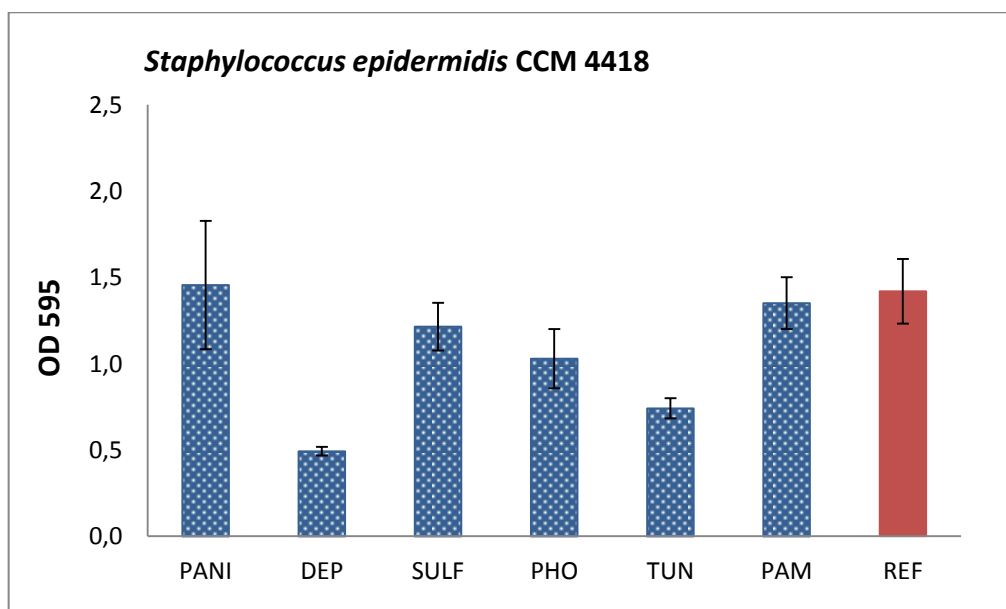
V následujících kapitolách jsou uvedeny výsledky získané pro jednotlivé biofilmopozitivní kmeny grampozitivních a gramnegativních bakterií.

5.1 Vliv polyanilinových filmů na tvorbu biofilmu u bakterií

5.1.1 Vliv PANI na tvorbu biofilmu u bakterie *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418

Vliv polyanilinových filmů na schopnost adheze a tvorby biofilmu u grampozitivní bakterie *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 byl sledován na polystyrenových mikrotitračních destičkách s PANI filmy. Tvorba biofilmu byla sledována na šesti typech destiček

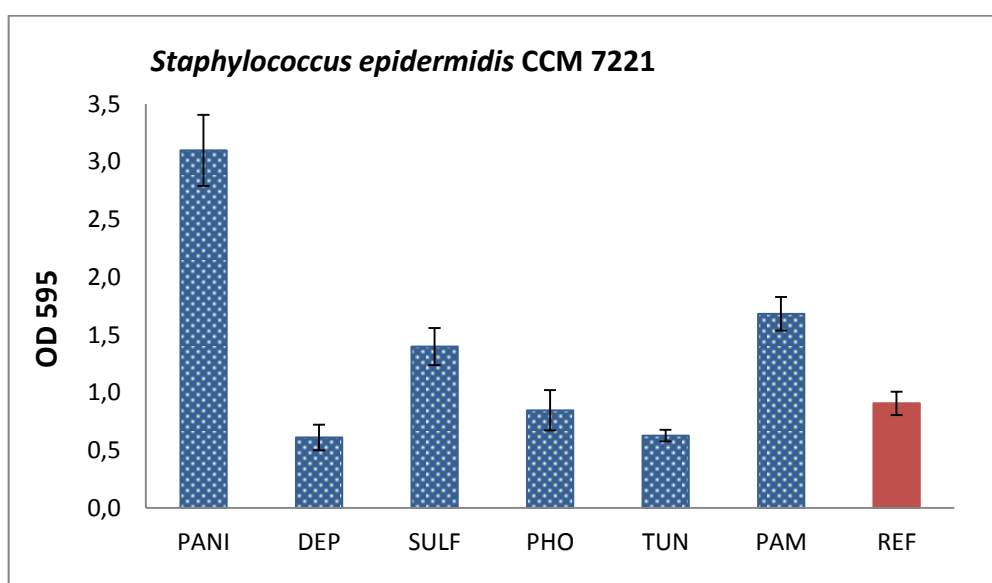
lišících se charakterem PANI filmu. Testovány byly destičky s PANI filmem a destičky s PANI filmem deprotonovaným či reprotonovaným pomocí různých kyselin. Součástí každého experimentu byl i referenční vzorek (REF), tedy polystyrenová mikrotitrační desička bez PANI filmu zaočkovaná příslušným mikroorganizmem. Z grafu na *Obr. 12* je patrné, že většina vzorků PANI je téměř shodná nebo se jen minimálně liší v porovnání s referenčním vzorkem. Největší inhibiční účinek na tvorbu biofilmu u bakterie *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 měl deprotonovaný polyanilin (DEP). Dále byly pozorovány výrazně nižší hodnoty ve srovnání s referencí u vzorku s PANI upraveným kyselinou křemičito-wolframovou (TUN, tungstosilicic acid). Vzorky s PANI upraveným kyselinou sulfamovou (SULF) a kyselinou fosfowolframovou (PHO, phosphotungstic acid) měly hodnoty OD mírně nižší než reference. Téměř srovnatelné s referenčním vzorkem byly vzorky s PANI bez úpravy (PANI) a s PANI modifikovaným kyselinou 2-akrylamido-2-methylpropan-sulfonovou (PAM), kde se hodnoty OD při 595 nm lišily jen minimálně. Rozdíly mezi hodnotami reference a hodnotami vzorků s deprotonovaným polyanilinem a s PANI upraveným kyselinou křemičito-wolframovou jsou statisticky významné, kdežto při srovnání reference se vzorkem PANI bez úpravy a s úpravou kyselinou PAMPSA jsou rozdíly statisticky nevýznamné.



*Obr. 12. Vliv PANI na tvorbu biofilmu u bakterie *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418.*

5.1.2 Vliv PANI na tvorbu biofilmu u bakterie *Staphylococcus epidermidis* CCM 7221

Vliv vzorků s různě upraveným PANI na schopnost adheze buněk a tvorby biofilmu u bakterie *Staphylococcus epidermidis* CCM 7221 můžeme pozorovat na sloupcovém grafu na Obr. 13. Při srovnání referenčního vzorku (REF) s ostatními vzorky s PANI lze konstatovat, že nejmenší inhibiční vliv na tvorbu biofilmu u této bakterie měl vzorek s PANI bez úpravy (PANI), kde jeho hodnoty OD při 595 nm byly dokonce až trojnásobně vyšší než hodnoty samotné reference. Zdá se tedy, že takto upravený povrch je náchylnější k adhezi buněk a tvorbě biofilmu tímto kmenem *Staphylococcus epidermidis* CCM 7221. Ze statického zpracování dat bylo zjištěno, že srovnání hodnot mezi referencí a tímto vzorkem je statisticky významné. Největší inhibiční vliv na tvorbu biofilmu měl vzorek s deprotonovaným PANI (DEP) a vzorek s PANI modifikovaným kyselinou křemičito-wolframovou (TUN, tungstosilicic acid). Hodnota statisticky nevýznamná byla zjištěna u reference ve srovnání se vzorkem s PANI upraveným kyselinou fosfowolframovou (PHO, phosphotungstic acid). Vzorky s PANI modifikovaným kyselinou sulfamovou (SULF) a kyselinou PAMPSA (PAM) měly mírně vyšší hodnoty OD než referenční vzorek. Inhibiční vliv nebyl zaznamenán. U obou kmenů *S. epidermidis* byl také zaznamenán rozdíl mezi vodivými formami PANI filmů a PANI bází, tedy filmem po deprotonaci (DEP). Z hlediska náboje je tento film výrazně odlišný od zbývajících pěti PANI filmů a to může ovlivňovat schopnost buněk *S. epidermidis* adherovat na povrch.

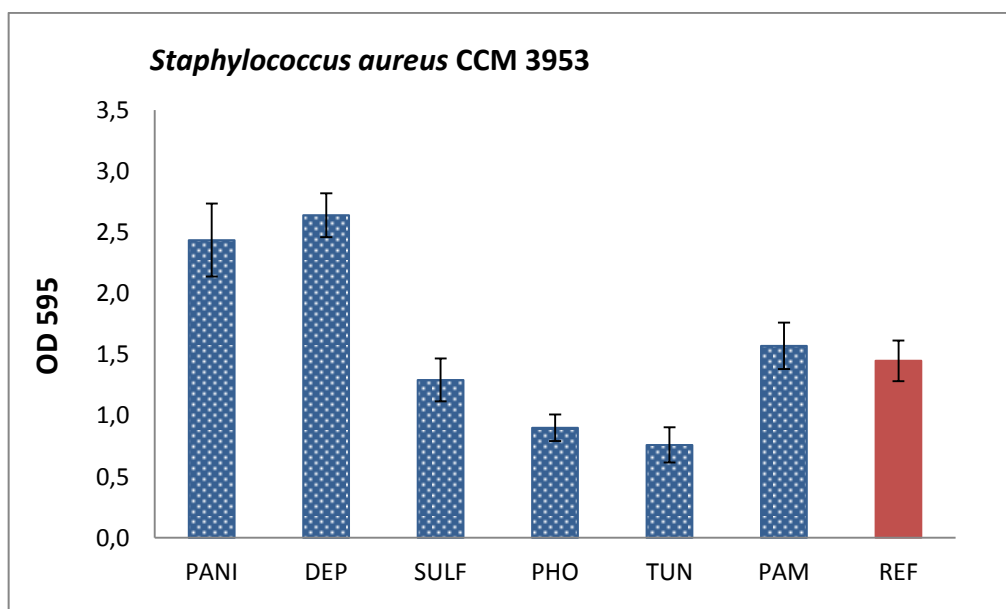


Obr. 13. Vliv PANI na tvorbu biofilmu u bakterie *Staphylococcus epidermidis* CCM 7221.

5.1.3 Vliv PANI na tvorbu biofilmu u bakterie *Staphylococcus aureus* CCM 3953

Z grafu na Obr. 14 můžeme vyčíst, jak působí vzorky s PANI na tvorbu biofilmu u bakterie *Staphylococcus aureus* CCM 3953. Největší inhibiční vliv na adhezi buněk u této grampozitivní bakterie má vzorek s PANI modifikovaným kyselinou křemičito-wolframovou (TUN, tungstosilicic acid) a následně vzorek s PANI upraveným kyselinou fosfowolframovou (PHO, phosphotungstic acid). U těchto PANI filmů byla tvorba biofilmu touto bakterií významně potlačena oproti referenčnímu vzorku.

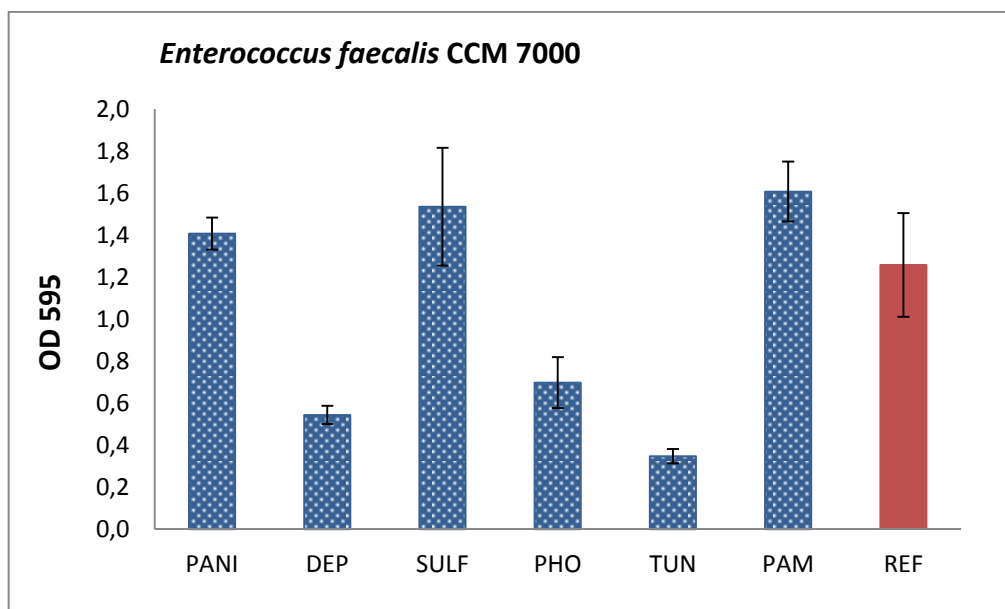
Nejmenší vliv na tvorbu biofilmu měl vzorek s PANI bez úpravy (PANI) a vzorek s deprotonovaným polyanilinem (DEP), kde oba tyto vzorky měly ve srovnání s referencí hodnotu OD téměř dvojnásobnou. Statisticky nevýznamné rozdíly byly zaznamenány při srovnání hodnot reference se vzorkem s PANI s kyselinou sulfamovou (SULF) a s kyselinou PAMPSA (PAM), kde hodnoty OD jsou přibližně stejné jako u referenčního vzorku, tudíž tvorbu biofilmu a adhezi buněk u bakterie *Staphylococcus aureus* CCM 3953 na povrch polyanilinu ovlivňují minimálně.



Obr. 14. Vliv PANI na tvorbu biofilmu u bakterie *Staphylococcus aureus* CCM 3953.

5.1.4 Vliv PANI na tvorbu biofilmu u bakterie *Enterococcus faecalis* CCM 7000

U bakterie *Enterococcus faecalis* CCM 7000 byl sledován vliv vzorků s PANI s různou úpravou na tvorbu biofilmu a adhezi buněk k povrchu polyanilinu. Z grafu na Obr. 15 lze vypozorovat, že největší inhibiční vliv na tuto biofilmopozitivní bakterii měl vzorek s deprotonovaným polyanilinem (DEP). Jeho hodnota OD byla trojnásobně nižší než u reference (REF). Vzorek s PANI modifikovaným kyselinou křemičito-wolframovou (TUN, tungstosilicic acid) a vzorek s PANI s kyselinou fosfowolframovou (PHO) měly rovněž v porovnání s referenčním vzorkem vliv na tvorbu biofilmu a inhibovaly ji. Rozdíly mezi hodnotami OD byly statisticky významné. U vzorků s PANI bez úpravy (PANI), s PANI modifikovaným kyselinou sulfamovou (SULF) a s PANI upraveným kyselinou kyselinou 2-akrylamido-2-methylpropan-sulfonovou (PAM) byly zjištěny hodnoty OD vyšší než u samotné reference. Podobný trend lze pozorovat i u ostatních testovaných grampozitivních bakterií, tedy u *S. aureus* i obou kmenů *S. epidermidis*. Tvorba biofilmu těmito mikroorganismy na destičkách PANI, SULF a PAM byla ve srovnání s neupravenou polystyrenovou destičkou (tedy s referencí) intenzivnější.



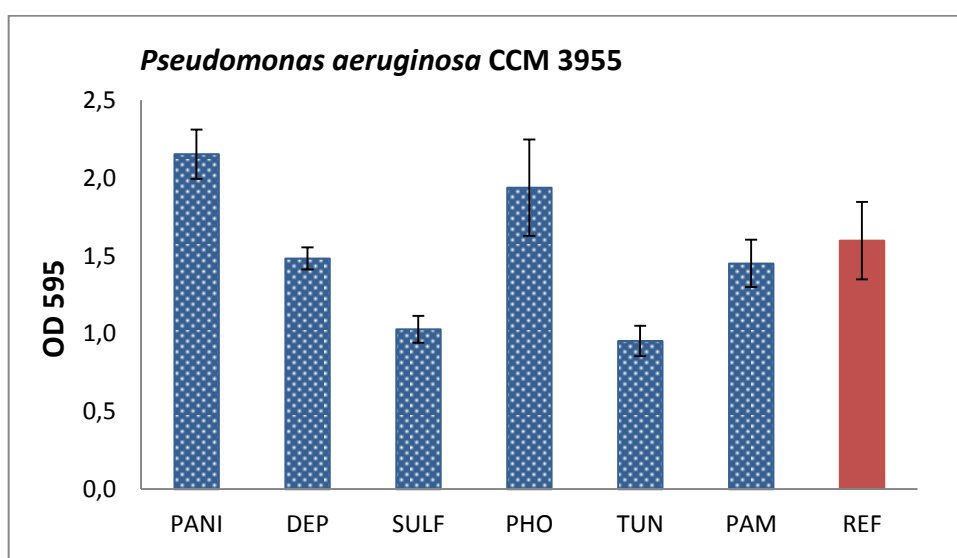
Obr. 15. Vliv PANI na tvorbu biofilmu u bakterie

Enterococcus faecalis CCM 7000.

5.1.5 Vliv PANI na tvorbu biofilmu u bakterie *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955

Kromě grampozitivních bakterií byla sledována tvorba biofilmu i u čtyř kmenů bakterií s gramnegativním typem buněčné stěny. Rozdíly ve struktuře a chemickém složení buněčné stěny u grampozitivních a gramnegativních bakterií jsou příčinou rozdílného chování k vnějšímu prostředí. Grampozitivní a gramnegativní bakterie se liší v odolnosti k pH, teplotě, vysychání a také v citlivosti k antimikrobním látkám. Je tedy možné, že by existovaly rozdíly ve schopnosti tvořit biofilm na různě upravených površích.

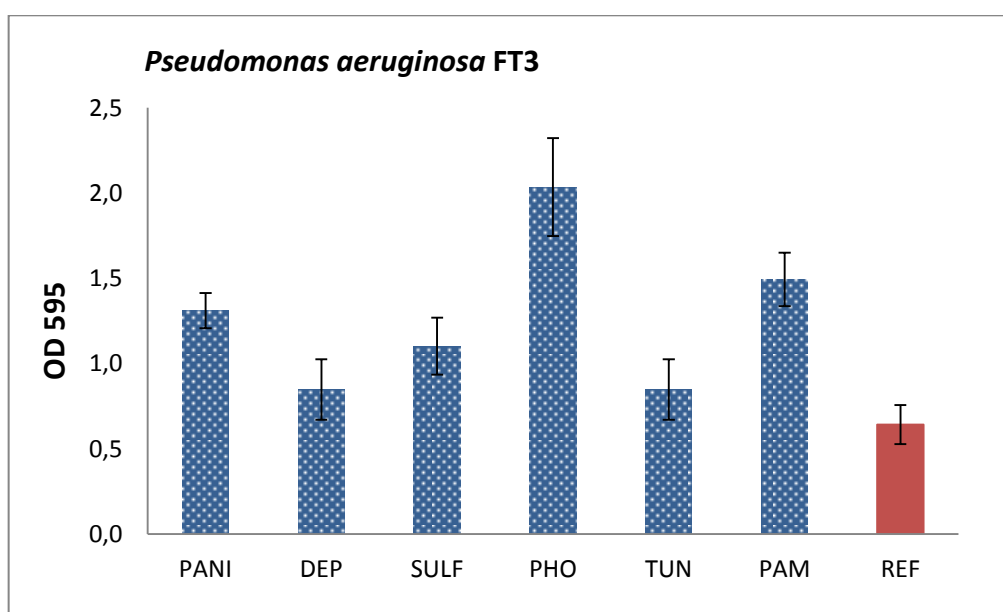
Vliv polyanilinových filmů na schopnost adheze a tvorby biofilmu u gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 byl sledován na polystyrenových mikrotitračních destičkách s PANI filmy. Z grafu na Obr. 16 můžeme vyčíst, že v porovnání s referenčním vzorkem (REF) měl největší inhibiční účinek na tvorbu biofilmu této bakterie vzorek s polyanilinem upraveným kyselinou křemičito-wolframovou (TUN). Výrazně nižší hodnoty OD byly naměřeny i u vzorku s PANI upraveným kyselinou sulfamovou (SULF). Ze statistického zpracování dat bylo zjištěno, že rozdíly hodnot mezi referencí a těmito vzorky jsou statisticky významné. Na mikrotitračních destičkách s PANI filmem bez úprav (PANI) a s PANI filmem reprotonovaným kyselinou fosfowolframovou (PHO) byly dokonce naměřeny vyšší hodnoty OD 595 než u referenčního vzorku. Na takto upravených površích je tedy schopnost adheze buněk a tvorba biofilmu u *P. aeruginosa* vyšší než u samotné reference. Deprotonovaný polyanilin a PANI upravený kyselinou PAMPSA byl srovnatelný s referencí a rozdíly mezi těmito hodnotami jsou statisticky nevýznamné.



Obr. 16. Vliv PANI na tvorbu biofilmu u bakterie *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955.

5.1.6 Vliv PANI na tvorbu biofilmu u bakterie *Pseudomonas aeruginosa* FT3

Kromě sbírkového kmene *P. aeruginosa* byl testován i divoký biofilm pozitivní kmen izolovaný z prostředí. Výsledky pro tento kmen jsou graficky znázorněny na Obr. 17. U této biofilm pozitivní bakterie nebyl prokázán inhibiční vliv u žádného ze vzorků s PANI. Nejvyšší hodnota OD byla naměřena u vzorku s PANI modifikovaným kyselinou křemičino-wolframovou (TUN). Tato hodnota byla trojnásobná oproti referenčnímu vzorku (REF). Dle statistického zpracování dat je srovnání hodnot mezi referencí a tímto vzorkem s PANI statisticky významné. U vzorků s PANI modifikovaným kyselinou 2-akrylamido-2-methylpropan-sulfonovou (PAM), s PANI bez úpravy a s polyanilinem upraveným kyselinou sulfamovou (SULF) jsou hodnoty OD rovněž vyšší než u reference. Na takto upravených površích je schopnost bakterie *Pseudomonas aeruginosa* FT3 tvořit biofilm vysoká. Mírně vyšší hodnoty ve srovnání s referencí měly vzorky s deprotonovaným polyanilinem (DEP) a s PANI modifikovaným kyselinou křemičino-wolframovou (TUN) a dle statistického hlediska jsou rozdíly statisticky nevýznamné. Ve srovnání se sbírkovým kmenem *P. aeruginosa* CCM 3955 divoký kmen FT3 lépe adheroval na modifikovaný povrch destiček a u všech vzorků byla zjištěna vyšší hodnota OD než na neupravených polystyrenových mikrotitračním destičkách.

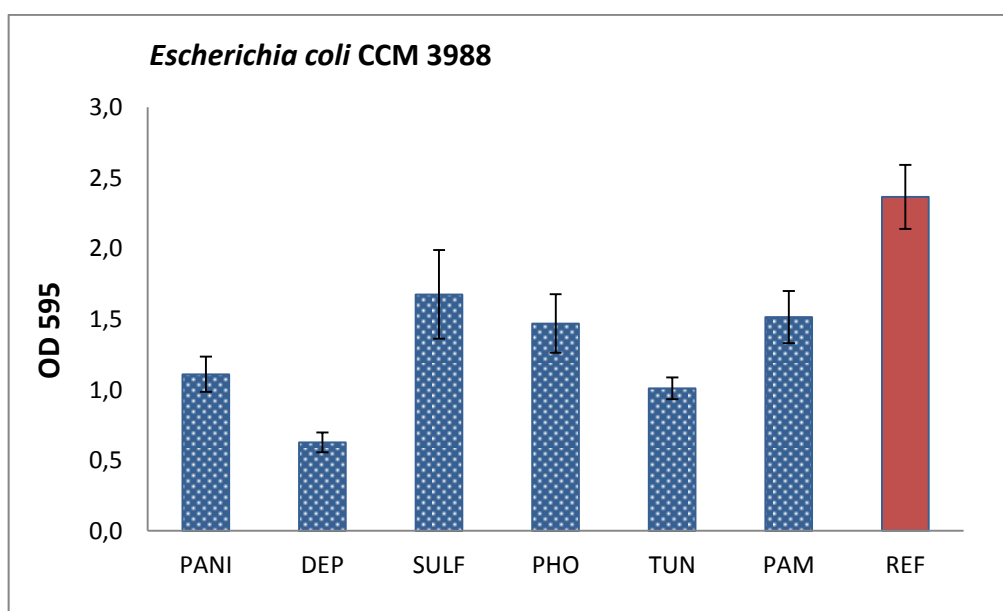


Obr. 17. Vliv PANI na tvorbu biofilmu u bakterie

Pseudomonas aeruginosa FT3.

5.1.7 Vliv PANI na tvorbu biofilmu u bakterie *Escherichia coli* CCM 3988

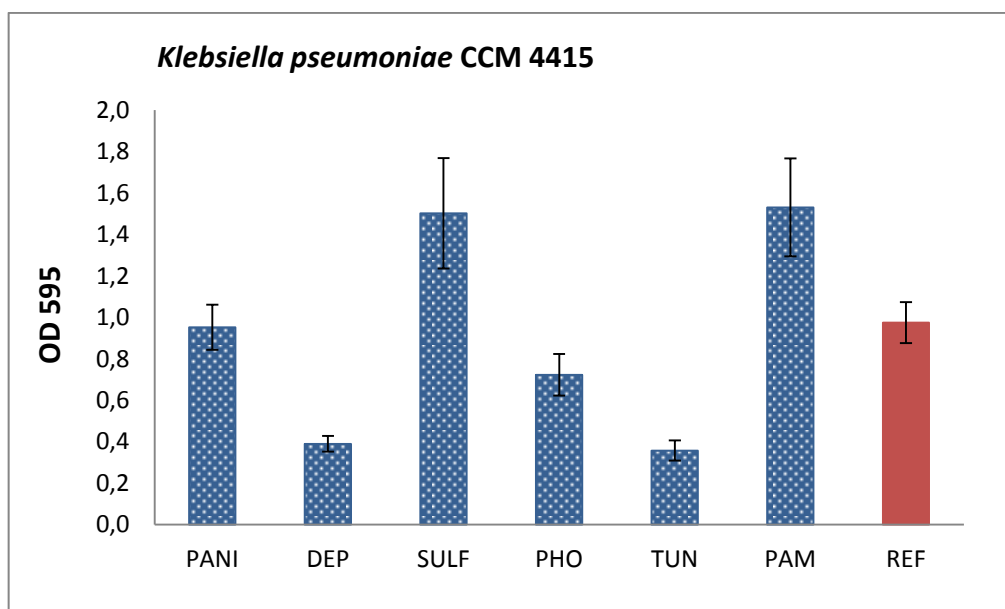
Vliv vzorků s různě upraveným PANI na schopnost adheze buněk u bakterie *Escherichia coli* CCM 3988 lze pozorovat na sloupcovém grafu na Obr. 18. Na rozdíl od předchozího grafu na Obr. 17., kde všechny vzorky měly hodnoty OD vyšší než reference (REF), lze zde pozorovat inhibiční vliv u všech vzorků s PANI filmy, tedy hodnoty OD při 595 nm jsou nižší ve srovnání s referenčním vzorkem. Největší inhibiční vliv na tvorbu biofilmu vykazuje vzorek s deprotonovaným polyanilinem (DEP). Naopak na mikrotitrační destičce s PANI filmem modifikovaným kyselinou sulfamovou (SULF) byla inhibice nejnižší při srovnání se všemi vzorky. Ze statistického zpracování dat bylo zjištěno, že srovnání hodnot mezi referencí a ostatními vzorky jsou statisticky významné, tudíž u bakterie *Escherichia coli* CCM 3988 má polyanilin ve všech úpravách významný vliv na inhibici tvorby biofilmu a adhezi buněk na povrch. U *E. coli* bylo dále zaznamenáno rozdílné chování na PANI filmech vodivých a kyselých a PANI filmu, který byl deprotonován (DEP). Zdá se, že na vodivé povrchy tato bakterie adheruje ochotněji.



Obr. 18. Vliv PANI na tvorbu biofilmu u bakterie *Escherichia coli* CCM 3988.

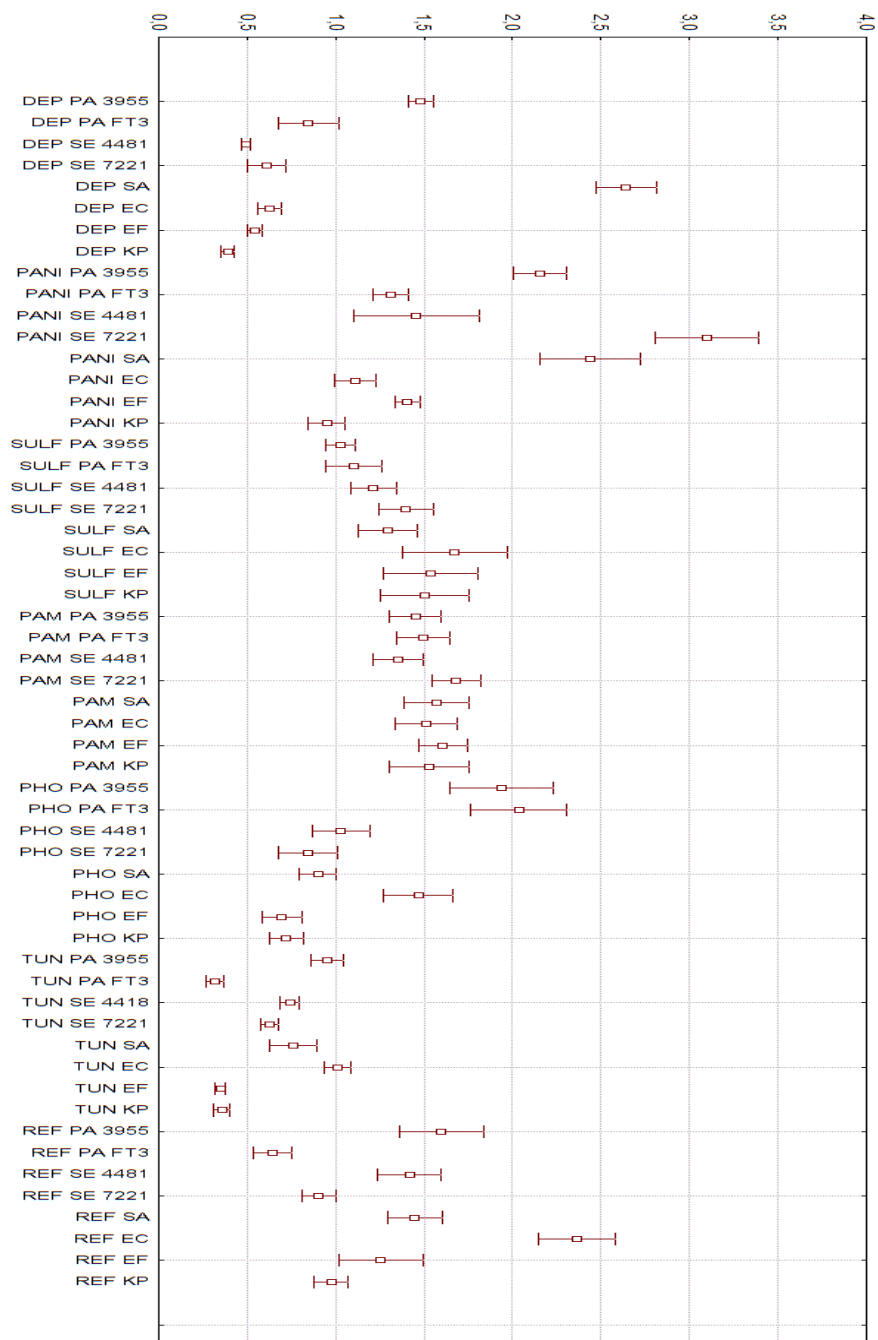
5.1.8 Vliv PANI na tvorbu biofilmu u bakterie *Klebsiella pneumoniae* CCM 4415

U bakterie *Klebsiella pneumoniae* CCM 4415 byl sledován vliv vzorků s PANI s různou úpravou na tvorbu biofilmu a adhezi buněk na povrch s PANI filmy. Na sloupcovém grafu na Obr. 19 můžeme pozorovat, že největší inhibiční vliv na tuto biofilmopozitivní bakterii měl vzorek s PANI modifikovaným kyselinou křemičino-wolframovou (TUN) a následně i vzorek s deprotonovaným polyanilinem (DEP). Mírně nižší hodnotu OD při 595 nm ve srovnání s referencí (REF) měl vzorek s PANI upraveným kyselinou fosfowolframovou (PHO). Na mikrotitračních destičkách s PANI filmem modifikovaným kyselinou sulfamovou (SULF) a PANI filmem reprotonovaným kyselinou PAMPSA (PAM) byly naměřeny vyšší hodnoty OD než u reference, tudíž na takto upravených površích je schopnost adheze buněk a tvorba biofilmu u bakterie *Klebsiella pneumoniae* CCM 4415 vyšší než u samotného referenčního vzorku. Poslední vzorek s PANI bez úpravy má hodnotu OD při 595 nm srovnatelnou s referencí, rozdíly v naměřených hodnotách jsou statisticky nevýznamné.



Obr. 19. Vliv PANI na tvorbu biofilmu u bakterie *Klebsiella pneumoniae* CCM 4415.

Souhrnné výsledky pro všechny mikroorganismy a všechny testované mikrotitrační destičky s PANI filmy je uveden na *Obr. 20*. Graf znázorňuje celkové zhodnocení vlivu všech upravených mikrotitračních destiček na tvorbu biofilmu a adhezi buněk použitých kmenů biofilmopozitivních bakterií.



Obr. 20. Vliv PANI na tvorbu biofilmu u bakterií.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo připravit mikrotitrační destičky potažené filmem polyanilinu, dále deprotonované či reprotonované kyselinami. Inhibiční účinky PANI na tvorbu biofilmu a adhezi buněk byly poté testovány na 8 vybraných kmenech grampozitivních a gramnegativních bakterií. Získané výsledky vlivu polyanilinových filmů na tvorbu biofilmu lze shrnout následovně:

- gramnegativní bakterie byly vůči inhibičním účinkům PANI odolnější a tvořily častěji a ve větším množství biofilm, než bakterie grampozitivní.
- Vzorek s polyanilinem bez úpravy (PANI) měl mírně vyšší inhibiční vliv na adhezi buněk na povrchu u gramnegativních bakterií.
- U vzorku s deprotonovaným PANI (DEP) byl zaznamenán růst biofilmu jak u grampozitivních, tak u gramnegativních bakterií přibližně ve stejné míře.
- U některých bakterií byl pozorován rozdíl ve tvorbě biofilmu u vzorků vodivých a nevodivých povrchů.
- U vzorku s PANI reprotonovaným kyselinou sulfamovou (SULF) byla pozorována nižší tvorba biofilmu u grampozitivních i u gramnegativních bakterií.
- Při pozorování adheze buněk u vzorku s PANI modifikovaným kyselinou fosfowolframovou (PHO) měly vyšší hodnotu OD ve srovnání s referenčním vzorkem bakterie gramnegativní.
- Vzorek s PANI modifikovaný kyselinou křemičino-wolframovou (TUN) měl inhibiční účinky na tvorbu biofilmu u všech bakterií s výjimkou *Pseudomonas aeruginosa* FT3, jejíž hodnota OD ve srovnání s referencí byla vyšší a buňky lépe přilnuly na povrch PANI a tvořily biofilm.
- U vzorku s PANI s kyselinou 2-akrylamido-2-methylpropan-sulfonovou (PAMPSA) byly pozorovány výrazně menší hodnoty OD při 595 nm ve srovnání s referencí pouze u gramnegativní bakterie *Escherichia coli*. Ostatní bakterie na takto upraveném povrchu měly větší schopnost adheze buněk a tvorby biofilmu.
- Největší inhibiční účinek na tvorbu biofilmu měl PANI u gramnegativní bakterie *Escherichia coli*, kde ve všech úpravách PANI byly nižší hodnoty OD než u samotná reference.
- Nejnižší inhibiční účinek PANI na adhezi buněk a následnou tvorbu biofilmu na jeho povrchu byl pozorován u gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* FT3.

Všechny hodnoty OD při 595 nm vzorků PANI ve všech úpravách byly vyšší než vzorek referenční a tato bakterie tvořila na každém povrchu větší vrstvu biofilmu než tomu bylo u ostatních biofilmopozitivních bakterií.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [11] STEJSKAL, Jaroslav: *Polyanilin-vodivý polymer* [online]. [cit. 2013-10-27]. Dostupné z: <http://archiv.otevrenaveda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/NH2006pdf/16.pdf>
- [2] PROKOPOVÁ, Irena. *Makromolekulární chemie*. 2. vyd. Praha: VŠCHT v Praze, 2007. ISBN 978-80-7080-622-3.
- [3] BALINT, Richard, Nigel J. CASSIDY a Sarah H. CARTMELL. (2014) *Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering*. p. 1-13.
- [4] DENG, Hua, L., LIN, M. JI. (2014) *Progress on the morphological control of conductive network in conductive polymer composites and the use as electroactive multifunctional materials*. 39, p. 627-655.
- [5] PROKEŠ, Jan, J., STEJSKAL, M., OMASTOVÁ. *Polyanilin a polypyrrol – dva představitelé vodivých polymerů*. *Chemické listy* 95, s.484-492, Praha: Česká společnost chemická, 2001. ISSN 0009-2770.
- [6] EXNEROVÁ, Milena, V., KAŠPÁRKOVÁ, P., HUMPOLÍČEK. *Úprava vodivého polymeru, polyanilinu, pro biomedicínální aplikace*. *Chemické listy* 106, s.554-567, 2012.
- [7] EXNEROVÁ, Milena, Z., ROZLÍVKOVÁ, J., STEJSKAL. *Nové materiálu na bázi karbonizace polyanilinu*. *Chemické listy* 104, s.511-536, 2010.
- [8] BERGERON, J. Y., L. H., DAO. (1992) *Electrical and physical properties of new electrically conducting quasicomposites. Poly(aniline-co-N-butylaniline) copolymers*. *Macromolecules*, 25 (13), p. 3332-3337.
- [9] GUAY, J., PAYNTER, R., L. H., DAO. (1990) *Synthesis and characterization of poly(diarylamines): a new class of electrochromic conducting polymers*. *Macromolecules*, 23 (15), p. 3598-3605.
- [10] KUČEKOVÁ, Zdenka, P., HUMPOLÍČEK, V., KAŠPÁRKOVÁ, T., PERECKO, M., LEHOCKÝ, I., HAUERLANDOVÁ, P., SÁHA, J., STEJSKAL. (2014) *Colloidal polyaniline dispersions: Antibacterial activity, cytotoxicity and neutrophil oxidative burst*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 116, p. 411-417.

- [11] STEJSKAL, J., P., KRATOCHVÍL. (1992) *Polyaniline dispersions: preparation of spherical particles and their light-scattering characterization. Polymer, 33 (22), p. 4857-4858.*
- [12] INNIS, P. C., I. D., NORRIS, L. A. P., KANE-MAGUIRE, G. G., WALLACE. (1998). *Electrochemical formation of chiral polyaniline colloids codoped with (+)- or (-)-10-camphorsulfonic acid and polystyrene sulfonate. Macromolecules, 31 (19), p. 6521-6528.*
- [13] *Vodivé polymery* [online]. [cit. 2013-11-21]. Dostupné z: <http://www.vesmir.cz/clanek/vodive-polymery>
- [14] HUMPOLÍČEK, Petr, V., KAŠPÁRKOVÁ, J., STEJSKAL. *Proliferace buněk na vodivém polymeru, polyanilinu. Chemické listy 106, s.380-383, 2012.*
- [15] BLÁHA, M., M., VARGA, J., PROKEŠ. (2013) *Effects of the polymerization temperature on the structure, morphology and conductivity of polyaniline prepared with ammonium peroxodisulfate. Polymer, 49, p. 3904-3911.*
- [16] STEJSKAL, J., I., SAPURINA. (2005) *Polyaniline: thin films and colloidal dispersions. Pura Appl. Chem. 77 (5), p. 815-826.*
- [17] GEETHALAKSHMI, D., N., MUTHUKUMARASAMY. (2014) *Effect of dopant concentration on the properties of HCl-doped PANI thin films prepared at different temperatures. Optik 125, p. 1307-1310.*
- [18] STEJSKAL, J., I., SAPURINA. (2010) *Polyaniline nanostructures and the role of aniline oligomers in their formation. Progress in Polymer Science 35, p. 1420-1481.*
- [19] STEJSKAL, Jaroslav, I., SAPURINA. (2004) *On the origin of colloidal particles in the dispersion polymerization of aniline. Journal of Colloid and Interface Science 274, p. 489-495.*
- [20] PEI, L.Z., Z.Y., CAI. (2014) *Electrochemical behaviours of benzoic acid at polyaniline/CuGeO₃ nanowire modified glassy carbon electrode. Measurement 53, p. 62-70.*
- [21] OUEINY, Cynthia, S., BERLIOZ. (2014) *Carbon nanotube – polyaniline composites. Polymer 39, p. 707-748.*

- [22] KHANAM, Zakia, N.A., SA'DON, F., ADAM. (2014) *Synthesis and characterization of a novel paramagnetic polyaniline composite with uniformly distributed metallic nanoparticles sandwiched between polymer matrices. Synthetic Metals* 192, p. 1-9.
- [23] SIVA, T., K., KAMARAJ. (2014) *Epoxy curing by polyaniline (PANI) – Characterization and self-healing evaluation. Progress in Organic Coatings* 77, p. 1095-1103.
- [24] GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, Marija. R., J. R., BENNETT, S., SWIFT. (2011) *Broad spectrum antimicrobial activity of functionalized polyanilines. Acta biomaterialia* 7, p. 4204-4209.
- [25] GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, Marija. R., J. R., BENNETT, S., SWIFT. (2012) *Characterization and antimicrobial efficacy of acetone extracted aniline oligomers. Synthetic Metals* 7, p. 1114-1119.
- [26] VU, B., CHEN, M., CRAWFORD, R. J., IVANOVA, E. P. (2009) *Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. Molecules*, 14, p. 2535-2554.
- [27] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun, 2001, 247 s. ISBN 80-902-8962-2.
- [28] *Biofilm* [online]. [cit. 2014-04-18]. Dostupné z: <http://3pol.cz/633-biofilm-dr-jekyll-anebo-mr-hyde>
- [29] DAVEY, M.E., G. A., O'Toole. (2000): *Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, p. 847–867.
- [30] NIKOLAEV Y.A., V. K., PLAKUNOV. (2007): *Biofilm—“City of Microbes” or an Analogue of Multicellular Organisms?. Microbiology.* 76, p. 125–138.
- [31] RULÍK, Martin. *Mikrobiální biofilmy*. 1. vyd. Univerzita Palackého v Olomouci, 2011, 447 s. ISBN 978-80-244-2747-8.
- [32] MOLOBELA, I. P., F. M., ILUNGA. (2012). *Impact of bacterial biofilms: the importance of quantitative biofilm studies. Annals of Microbiology*, 62, p. 461-467.
- [33] COSTERTON, J. W., Z., LEWANDOWSKI. (1995) *Microbial biofilms. Annu. Rev. Microbiol.* 49, p. 711-745
- [34] DONLAN, R. M., J. W., COSTERTON. (2002). *Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev.* 15, p. 167-193.

- [35] CZACZYK, K., K., MYSZKA. *Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation (2007)*. *Polish J. of Environ. Stud.* 16, 6, p. 799-806.
- [36] SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiální biofilm* [online]. [cit. 2013-12-2]. Dostupné z: <http://www.vesmir.cz/clanek/mikrobialni-biofilm>
- [37] HALL-STOODLEY, L., J. W., COSTERTON, P., STOODLEY. (2004) *Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases*. *Nature*, 2, p. 95-108.
- [38] BRYERS, James D. *Medical biofilms. Biotechnology and Bioengineering: detection, prevention, and control*. vol. 100, issue 1, s. 1-18. DOI: 10.1002/bit.21838.
- [39] COSTERTON, J. W.. (1999) *Introduction to biofilm*. *International Journal of Anti-microbial Agents* 11, p. 217-221. str. 217-218
- [40] KJELLEBERG, S., M., GIVSKOV. *The biofilm mode of life: Mechanisms and adaptations*. (2007). *Horizon Scientific Press*, 248 stran. Norfolk, UK. ISBN 978-1-904933-33-5
- [41] ROMEO, T. (2008). *Bacterial biofilms*. 306 stran. Springer, Heidelberg, Germany. ISBN 978-3-540-75417-6.
- [42] STOODLEY, P., K., SAUER, D. G., DAVIES, J. W., COSTERTON. *Biofilms as complex differentiated communities*. *Ann. Rev. Microbiol.* 2002, 56, s. 187-209.
- [43] O'TOOLE, G. O., H. B., KAPLAN, R., KOLTER. (2000). *Biofilm formation as microbial development*. *Ann. Rev. Microbiol.* 54, p. 49-79.
- [44] FLEMMING, H. C., J., WINGENDER. (2010). *The biofilm matrix*. *Nature Reviews Microbiology*, 8, p. 623-633.
- [45] LAWRENCE, J. R., G. D. W., SWERHONE, U., KUHLCHE, T. R., NEU. (2007). *In situ evidence for microdomains in the polymer matrix of bacterial microcolonies*. *Canadian Journal of Microbiology*, 53, p. 450-458.
- [46] PAREDES, Jacobo, S., BECERRO, S., ARANA. (2014) *Label-free interdigitated microelectrode based biosensors for bacterial biofilm growth monitoring using Petri dishes*. *Journal of Microbiological Methods* 100, p. 77-83.
- [47] KJELLEBERG, S., S., MOLIN. (2002) *Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms?* *Curr. Opin. Microbiol.* 5, p. 254-258.

- [48] *Quorum sensing* [online]. [cit. 2014-02-05]. Dostupné z: http://biomikro.vscht.cz/vyuka/bm/Quorum_sensing.pdf
- [49] BLANA, A. Vasiliki, G.-J. E., NICHAS. (2014) *Presence of quorum sensing signal molecules in minced beef stored under various temperature and packaging conditions. International Journal of Food Microbiology* 173, p. 1-8.
- [50] DEFOIRDT, Tom, G., BRACKMAN, T., COENYE. (2013) *Quorum sensing inhibitors: how strong is the evidence?. Trends of Microbiology* 21 (12), p. 619-624.
- [51] EIN, Anttu. *Quorum sensing* [online]. [cit. 2013-12-21]. Dostupné z: <http://techhydra.com/tech-news/science/chemistry/quorum-sensing-bacterial-communication-in-chemical-signals/>
- [52] SAUER, K., A. K., CAMPER, G. D., EHRLICH, J. W., COSTERTON, D. G., DAVIES. (2002) *Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm. J. Bacteriol.* 184, p. 1140–1154.
- [53] STEWART, P. S., J. W., COSTERTON. (2001) *Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet*; 358; 9276, p. 135-138.
- [54] HOLÁ, V., F., RŮŽIČKA, M., VOTAVA. (2004) *Rozdíly v citlivosti k antibiotikům u biofilm pozitivních a biofilm negativních kmenů Staphylococcus epidermidis izolovaných z hemokultur. Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.;* 53; 2, p. 66-69.
- [55] MIKULÁŠEK, Jan. *Problematika tvorby biofilmů a možnosti jejich odstraňování/využití.* Univerzita Pardubice, 2009.
- [56] PURKRTOVÁ, S., T., PILCHOVÁ, J., ĎURIŠOVÁ. (2009) *Podmínky tvorby biofilmu u Listeria monocytogenes. Mlékařské listy,* 112, s. 12-15
- [57] *Svět mikroorganismů* [online]. [cit. 2014-03-05]. Dostupné z: <http://www.eufic.org/article/cs/page/FTARCHIVE/artid/svet-mikroorganismu/>
- [58] DUBÁNEK, Václav. *Podzemní vody* [online]. [cit. 2014-03-05]. Dostupné z: <http://www.smv.cz/res/data/014/001650.pdf>
- [59] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře.* 1. vyd. Praha: STNL, 1983, 363 s.
- [60] MONTANARO, L., P., SPEZIALE, D., CAMPOCCIA, S., RAVAIOLI, I., CANGINI, G., PIETROCOLA, S., GIANNINI, C. R., ARCIOLA. (2011) *Scenery of Staphylococcus implant infections in orthopedics. Future Microbiology,* 6, p. 1329-1349.

- [61] SHARMA, M., S. K., ANAND. *Characterization of constitutive mikroflóra of biofilms in dairy processing lines. Food microbiol.* 2002, č. 19, s. 627-636. ISSN 0956-7135.
- [62] *Staphylococcus epidermidis* [online]. [cit. 2013-12-03]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_epidermidis
- [63] SADOVSKAYA, I., E., VINOGRADOV, S., FLAHAUT, G., KOGAN, S., JABBOURI. (2005) *Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, Staphylococcus epidermidis RP62A. Infection and Immunity*, 73, p. 3007-3017.
- [64] KLOOS, W. E., K. H., SCHLEIFER. *Staphylococcus. Genus. IV.* 1986, č. 2, s. 1013-1035. ISSN 1573-8388.
- [65] O'GARA J., H., HUMPHREYS. (2001) *Staphylococcus epidermidis biofilms: Importance and implications. J Med Microbiol* 50, p. 582–587.
- [66] *Enterococcus faecalis* [online]. [cit. 2014-12-03]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Enterococcus_faecalis
- [67] SIDDIQUI, S. H., K. H., AWAN. (2013) *Bactericidal efficacy of photodynamic therapy against Enterococcus faecalis in infected root canals: A systematic literature review. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 10, p. 632-643.
- [68] FISHER K., C., PHILLIPS. (2009) *The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. Microbiol.* 155, p. 1749-1757.
- [69] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot.* 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007, 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- [70] DUCHESNE, Rachel, V., OXARAN, N., ORANGE. (2013) *A proteomic approach of SigX function in Pseudomonas aeruginosa outer membrane composition. Journal of Proteomics* 94, p. 451-459.
- [71] MADIGAN, M. T., J. M., MARTINKO, P. V., DUNLAP, D. P. CLARK. (2009) *Brock biology of microorganisms.* Pearson/Benjamin Cummings. San Francisco, 12th ed., 1061 p.

- [72] FAUCHEUX, SARAH, S., LAUDI, T., BUSCH. (2013) *Rapid emergence of secondary resistance to gentamicin and colistin following selective digestive decontamination in patients with KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae: a single-centre experience. International Journal of Antimicrobial Agents* 42, p. 565-570.
- [73] SUN, WEI-SHENG W., W.-J., SYU, W.-L., HO. (2014) *SitA contributes to the virulence of Klebsiella pneumoniae in a mouse infection model. Microbes and Infection* 16, p. 161-170.
- [74] TAULO, S., A., WETLESEN, R. K., ABRAHAMSEN, J. A., NARVHUS, R., MKAKOSYA. *Quantification and variability of Escherichia coli and Staphylococcus aureus cross-contamination during service and consumption of cooked thick porridge in Lungwena rural households. Food Control.* 2009, č. 20, s. 1158-1166. ISSN 0956-7135.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

PANI	Polyanilin
EPS	Extracelulární polymerní substance
PIA	Polysacharidový intracelulární adhezin
MPA	Masopeptonový agar
NaCl	Chlorid sodný
TSB	Trypton-sojový bujon s glukosou
K ₂ HPO ₄	Hydrogenfosforečnan draselný
OD	Optická hustota
PAMPSA	Kyselina 2-akrylamido-2-methylpropan-sulfonová
SULF	Kyselina sulfamová
TUN	Kyselina křemičito-wolframová
PHO	Kyselina fosfowolframová

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. <i>Nejdůležitější vodivé polymery a jejich strukturní vzorce.</i>	13
Obr. 2. <i>Strukturní vzorec polyanilinové báze.</i>	15
Obr. 3. <i>Formy polyanilinu.</i>	15
Obr. 4. <i>Oxidace anilinu peroxodisíranem amonným v kyselém prostředí – vznik polyanilinu.</i>	16
Obr. 5. <i>Tvorba tenkých polyanilinových filmů.</i>	17
Obr. 6. <i>Model tvorby filmu: (a) anilinové oligomery (otevřené kruhy) se adsorbují na dostupném rozhraní a (b) stimulují růst polyanilinových řetězců (silná čára). Tvoří se zárodek. (c) Další polyanilinové řetězce rostou v důsledku automatického zrychlení mechanismu v blízkosti zárodku. Film se šíří po povrchu.</i>	18
Obr. 7. <i>Tvorba koloidních disperzních částic.</i>	19
Obr. 8. <i>Vodivá polyanilinová sůl a nevodivá polyanilinová báze.</i>	19
Obr. 9. <i>Fáze tvorby biofilmu.</i>	25
Obr. 10. <i>Model quorum sensing.</i>	28
Obr. 11. <i>Strategie disperze buněk z biofilmu.</i>	29
Obr. 12. <i>Vliv PANI na tvorbu biofilmu u bakterie Staphylococcus epidermidis CCM 4418.</i>	46
Obr. 13. <i>Vliv PANI na tvorbu biofilmu u bakterie Staphylococcus epidermidis CCM 7221.</i>	47
Obr. 14. <i>Vliv PANI na tvorbu biofilmu u bakterie Staphylococcus aureus CCM 3953.</i>	48
Obr. 15. <i>Vliv PANI na tvorbu biofilmu u bakterie Enterococcus faecalis CCM 7000.</i>	49
Obr. 16. <i>Vliv PANI na tvorbu biofilmu u bakterie Pseudomonas aeruginosa CCM 3955.</i>	50
Obr. 17. <i>Vliv PANI na tvorbu biofilmu u bakterie Pseudomonas aeruginosa FT3.</i>	51
Obr. 18. <i>Vliv PANI na tvorbu biofilmu u bakterie Escherichia coli CCM 3988.</i>	52
Obr. 19. <i>Vliv PANI na tvorbu biofilmu u bakterie Klebsiella pneumoniae CCM 4415.</i>	53
Obr. 20. <i>Vliv PANI na tvorbu biofilmu u bakterií.</i>	54

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Kyseliny použité k reprotonaci a jejich koncentrace.</i>	42
<i>Tab. 2. Mikrotitrační destičky a jejich zkratky.</i>	44