

Antimikrobní vlastnosti koloidního polyanilinu

Nela Maráková

Bakalářská práce
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Nela MARÁKOVÁ**
Osobní číslo: **T10168**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Antimikrobní vlastnosti koloidního polyanilinu**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. V teoretické části práce zpracujte literární rešerši na zadané téma. Charakterizujte polyanilin, popište jeho jednotlivé formy a soustředte se na koloidní formu polyanilinu. Věnujte se rovněž možnostem stanovení antimikrobních vlastností látek.

II. Praktická část

1. V praktické části studujte vliv koloidního polyanilinu na růst gramnegativních a grampozitivních bakterií. Získané výsledky vhodnou formou zpracujte, diskutujte a formulujte závěry práce.



Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] TORTORA, Gerard J, Berdell R FUNKE a Christine L CASE. Microbiology: an introduction. 9th ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, c2007, xxvi, 958 p. ISBN 08-053-4790-9.

[2] STEJSKAL, Jaroslav a Irina SAPURNINA. Polyaniline: Thin films and colloidal dispersions (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry. 2005, roč. 77, č. 5, s. 815-826. DOI: 10.1351/pac200577050815.

[3] STEJSKAL, Jaroslav a R.G. GILBERT. Polyaniline. Preparation of a Conducting Polymer (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry. 2002, č. 5, s. 857-867.

[4] HUMPOLÍČEK, Petr, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Jaroslav STEJSKAL, Zdenka KUČEKOVÁ a Petra ŠEVČÍKOVÁ. Proliferace buněk na vodivém polymeru, polyanilinu. Chemické listy. 2012, roč. 106, č. 5, s. 380-383.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce:

18. února 2013

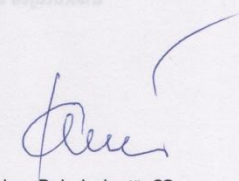
Termín odevzdání bakalářské práce:

24. května 2013

Ve Zlíně dne 18. února 2013


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. Rahula Janiš, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: ...MARÁKOVÁ NELA.....

Obor: ...T.Y.TKD.....

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, 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 ...23.5.2013...

.....
.....

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 nevdělečně 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

Bakalářská práce se zabývá problematikou antimikrobních účinků koloidního polyanilinu. Teoretická část je věnována polyanilinu, zejména popisu jeho koloidní formy, její přípravy, vlastností a použití. Práce rovněž stručně charakterizuje vybrané grampozitivní a gramnegativní bakterie. V praktické části je provedena základní charakterizace studovaného koloidu fotonovou korelační spektroskopií a UV-VIS spektroskopií a je sledován jeho vliv na růst bakterií.

Klíčová slova: polyanilin, koloidní forma polyanilinu, antimikrobní účinek, bakterie

ABSTRACT

Abstrakt ve světovém jazyce

The thesis deals with the antimicrobial effects of colloidal polyaniline. The theoretical part is devoted to polyaniline, mainly to its colloidal form, its properties and methods of preparation. The thesis also briefly describes the selected grampositive and gramnegative bacteria. In the experimental part, the basic characterization of the colloid is performed using photon correlation spectroscopy and UV-VIS spectroscopy. The effect of the colloidal polyaniline on the growth of bacteria is outlined as well.

Keywords: polyaniline, polyaniline colloidal form, antimicrobial effect, bacteria

Touhle cestou bych ráda poděkovala všem, kteří se jakkoli podíleli na sestavení této bakalářské práce. Mé poděkování patří především paní doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc., vedoucí mé bakalářské práce, za její trpělivost, odborné rady, poskytnuté materiály a vynaložený čas, který mi věnovala. Rovněž bych ráda poděkovala paní RNDr. Ivě Hauerlandové, Ph.D. za odbornou pomoc při provádění experimentů a cenné připomínky. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat i mé rodině a přátelům, bez jejichž podpory a pomoci bych se neobešla.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské 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 Struktura a formy polyanilinu	13
1.1.2 Příprava polyanilinu	15
1.2 KOLOIDNÍ FORMA POLYANILINU	16
1.2.1 Princip tvorby polyanilinových koloidů.....	16
1.2.2 Příprava koloidního polyanilinu.....	17
1.2.3 Vlastnosti a charakteristika koloidního polyanilinu.....	17
2 ANTIMIKROBNÍ LÁTKY	19
2.1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA BAKTERÍ.....	19
2.1.1 Grampozitivní bakterie.....	19
2.1.1.1 Bacillus cereus, Bacillus subtilis	19
2.1.1.2 Enterococcus faecium	19
2.1.1.3 Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis	20
2.1.2 Gramnegativní bakterie	20
2.1.2.1 Escherichia coli, Proteus vulgaris, Salmonella enterica, Serratia marcescens	20
2.1.2.2 Pseudomonas fluorescens	21
2.2 ANTIMIKROBNÍ VLASTNOSTI POLYANILINU	21
3 CÍLE PRÁCE:	22
II PRAKTICKÁ ČÁST	23
4 MATERIÁLY A METODY	24
4.1 MATERIÁL.....	24
4.1.1 Příprava koloidního polyanilinu.....	24
4.1.2 Vybrané kultury mikroorganismů	24
4.1.3 Kultivační půdy	25
4.1.4 Laboratorní sklo a plasty	25
4.1.5 Dekontaminace použitého materiálu	25
4.1.6 Použité zařízení a pomůcky	25
4.2 METODY.....	26
4.2.1 Příprava bakteriální suspenze.....	26
4.2.2 Charakterizace koloidního polyanilinu	26
4.2.2.1 Stanovení velikosti částic koloidního polyanilinu	26
4.2.2.2 UV spektrum v 1 M HCL	27
4.2.2.3 Stanovení koncentrace polyanilinu v koloidním roztoku	27
4.2.3 Antimikrobní vlastnosti koloidního polyanilinu	28
4.2.3.1 Mikrodiluční metoda.....	28
4.2.3.2 Stanovení pH bakteriální suspenze v přítomnosti polyanilinu	29
4.2.4 Průtoková cytometrie	29
5 VÝSLEDKY	30
5.1 CHARAKTERIZACE KOLOIDNÍHO POLYANILINU.....	30
5.1.1 Stanovení velikosti částic koloidního polyanilinu	30

5.1.1.2	UV spektrum v 1 M HCl.....	31
5.1.1.3	Koncentrace polyanilinu v koloidním roztoku	32
5.2	ANTIMIKROBNÍ VLASTNOSTI KOLOIDNÍHO POLYANILINU	33
5.2.1	Vliv koloidního polyanilinu na růst <i>Bacillus cereus</i> CCM 2010.....	35
5.2.2	Vliv koloidního polyanilinu na růst <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> CCM 4062	36
Obr. 13.	<i>Vliv koloidního polyanilinu na Bacillus subtilis subsp. spizizenii CCM 4062 na růst buněk po 4 hodinách kultivace.</i>	37
5.2.3	Vliv koloidního polyanilinu na růst <i>Enterococcus faecium</i>	38
5.2.4	Vliv koloidního polyanilinu na růst <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953	39
5.2.5	Vliv koloidního polyanilinu na růst <i>Staphylococcus epidermidis</i>	40
5.2.6	Vliv koloidního polyanilinu na růst <i>Escherichia coli</i> CCM 3954	42
5.2.7	Vliv koloidního polyanilinu na růst <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Enteritidis CCM 4420	43
5.2.8	Vliv koloidního polyanilinu na růst <i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> CCM 303	44
5.2.9	Vliv koloidního polyanilinu na růst <i>Pseudomonas fluorescens</i> CCM 2798.....	46
5.2.10	Vliv koloidního polyanilinu na růst <i>Proteus vulgaris</i>	47
5.2.11	Změna barvy a pH	48
5.2.12	Průtoková cytometrie	52
ZÁVĚR		54
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		56
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		59
SEZNAM OBRÁZKŮ		60
SEZNAM TABULEK		62
SEZNAM PŘÍLOH		63

ÚVOD

Vodivé polymery, jak již napovídá název, jsou látky vykazující elektrickou vodivost, která je srovnatelná s vodivostí klasických polovodičů. Rostoucí zájem o vodivé polymery se projevil až na koci sedmdesátých let dvacátého století, poté co budoucí laureáti Nobelovy ceny za chemii Alan J. Heeger, Alan G. MacDiarmid a Hideki Shirakawova publikovali své práce o polyacetyleny. Od prvotní představy o tom, že by mohly tyto materiály zastoupit kovy, bylo záhy opuštěno, protože více než samotná vodivost je zajímavější jejich schopnost měnit strukturu a vlastnosti v závislosti na podmínkách daného prostředí. Vodivé polymery jsou tedy předmětem studia makromolekulární chemie, elektrochemie, fyzikální chemie a stále více se zapisují i do povědomí biomedicíny či analytické chemie.

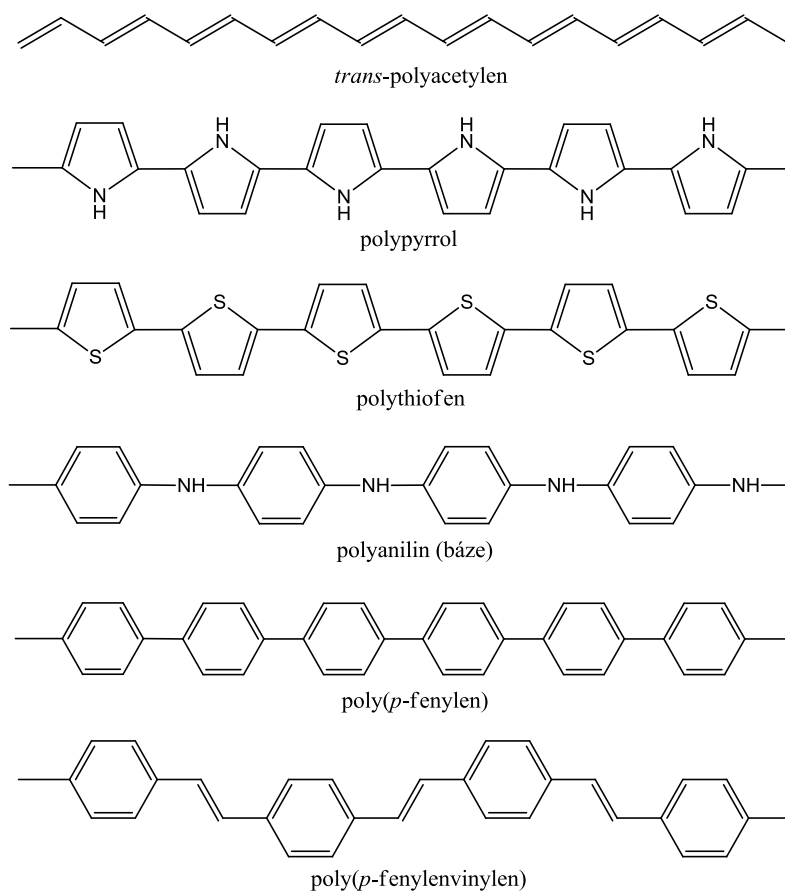
Polyanilin patří do skupiny nejčastěji studovaných vodivých polymerů. Různým stupněm oxidace, či protonace, lze získat různé formy polyanilinu lišící se vlastnostmi a strukturou. Z těchto forem je zřejmě nejzajímavější zelená, vodivá forma, tzv. emeraldinová sůl, která může přecházet na modrou, nevodivou bázi. Příprava polyanilinu není nijak složitá a pro jeho další aplikace se používají různé modifikace tohoto materiálu, buďto v podobě polyanilinových filmů nebo koloidních roztoků. Koloidní forma polyanilinu se chová jako kapalná disperze a lze s ní tedy jednoduše pracovat. I proto je možno považovat koloidní polyanilin za slibný materiál. Jeho antimikrobní vlastnosti však až doposud studovány nebyly.

Předložená bakalářská práce se zaměřuje na zjištění možných antimikrobních účinků koloidního polyanilinu a na ověření vhodnosti metody, která byla pro sledování těchto vlastností použita. Teoretická část práce se zabývá polyanilinem, zejména pak popisem koloidní formy polyanilinu, její přípravou a vlastnostmi. Jsou rovněž stručně charakterizovány vybrané baterie, vyskytující se v prostředí kolem nás. Experimentální část práce je zaměřená na základní charakterizaci koloidního polyanilinu fotonovou korelační spektroskopií a UV-VIS spektroskopií, je sledován vliv koloidu na růst bakterií a je představeno zhodnocení získaných výsledků.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VODIVÉ POLYMERY

Polymery jsou organické látky, skládající se z dlouhých řetězců opakujících se konstitučních jednotek. Běžné polymery, jsou nevodivé a používají se jako výborné elektrické izolanty. Existují však polymery, jejichž příkladem jsou polyacetylen, polypyrrol, polythiofen, polyanilin, polyfenylen či poly(*p*-fenylenvinylem) (Obr. 1), vykazující vlastní elektrickou vodivost. Umožňuje ji pravidelné střídání jednoduchých a dvojných vazeb ve struktuře polymeru, tzv. konjugace. Vedle konjugace je dalším nezbytným předpokladem



Obr. 1. Nejdůležitější vodivé polymery.

elektrické vodivosti polymerů přítomnost pohyblivých nosičů náboje, které transport po konjugovaném řetězci zprostředkovávají. V analogii s klasickými polovodiči se tento proces nazývá dopováním. Mezi dopováním anorganických a organických polovodičů je podstatný rozdíl, u anorganických polovodičů již stopové koncentrace dopující látky výrazně ovlivňují elektrické vlastnosti materiálu, u polymerů je potřeba koncentrace řádově vyšší, jednotky až desítky procent. Elektrická vodivost konjugovaných polymerů je srovnatelná

s vodivostí anorganických polovodivých materiálů, jako je např. germanium a pohybuje se na úrovni $0.01 - 30 \text{ S.cm}^{-1}$. [1, 2, 3]

Nejčastěji studovanými vodivými polymery jsou polyacetylen, polypyrrol a polyanilin. Moderní historie vodivých polymerů začíná v roce 1977, kdy japonský vědec H. Shikawara se svými studenty objevil, že halogenace *trans*-polyacetylenů zvýšila jeho měrnou vodivost o několik řádů. Polyacetylenové filmy vystavené účinku par jodu vedly k produktu o vodivosti 38 S.cm^{-1} . Později pak byly popsány orientované polymerní filmy, jejichž vodivost dosahovala řádově až 10^5 S.cm^{-1} . Přestože má polyacetylen vysokou měrnou vodivost, jeho omezená stabilita na vzduchu vedla k posunu pozornosti ve prospěch stabilnějších polymerů, polyanilinu a polypyrrolu.

Od prvotních představ o tom, že by vodivé polymery mohly zastoupit kovy, bylo záhy opuštěno. Nahradily je realističtější vize, více než samotná vodivost je zajímavější schopnost vodivých polymerů měnit svou strukturu a tedy i svou vodivost v závislosti na daném prostředí. [1, 2]

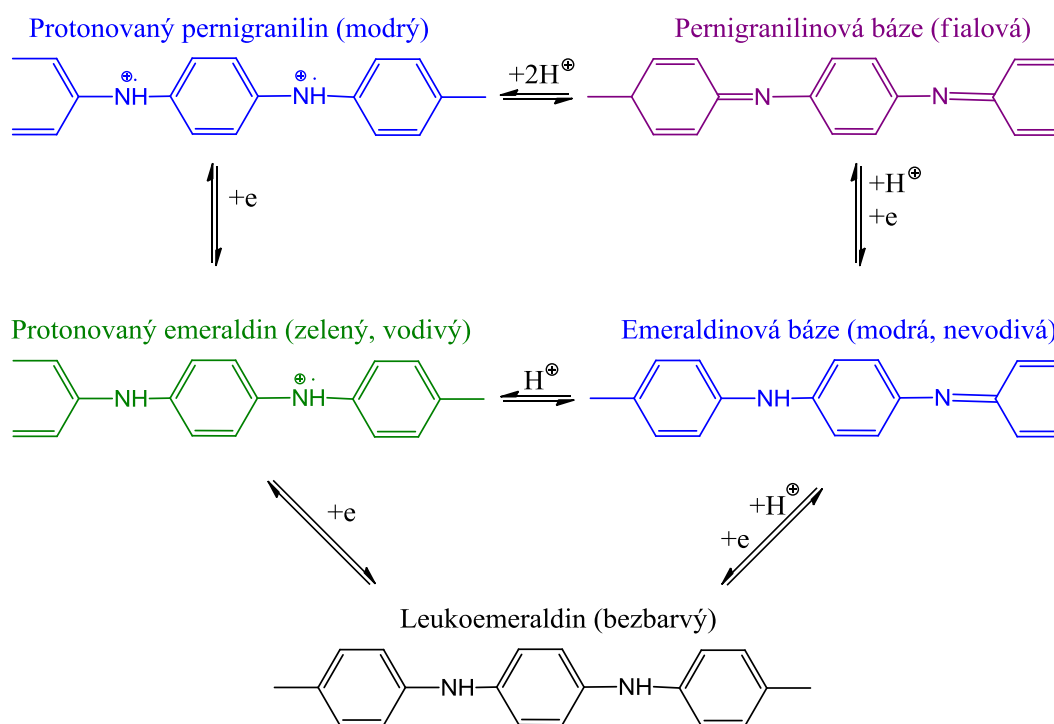
1.1 Polyanilin

Polyanilin je pravděpodobně nejstarším organickým polymerem, který byl vůbec připraven. Jeho řetězce jsou složeny z mnoha anilinových konstitučních jednotek, jedná se tedy o plnohodnotné polymery. Anilin byl jako vedlejší produkt pyrolytické destilace indiga získán v roce 1826 německým chemikem Unverdorbenem. Zelené oxidační produkty anilinu, popsal v roce 1840 J. Fritzsche. V roce 1862 britský profesor chemie H. Lethby provedl elektrochemickou oxidaci anilinu, která po alkalizaci vedla k modrému zabarvení výsledného produktu, typickému pro polyanilinovou bázi. Britští chemici Green a Woodhead navrhli pro oxidační produkty anilinu strukturu oktameru a názvy jeho jednotlivých oxidačních forem, nazývané leukoemeraldin, emeraldin a pernigranilin (Obr. 2), které jsou v současnosti používány i pro odpovídající polymery. Polymerní povaha oxidačních produktů anilinu byla prokázána o mnoho desítek let později. Syntetické postupy vedoucí k polyanilinu byly popsány v roce 1968 Hozlem a spol.. [1, 2, 3]

1.1.1 Struktura a formy polyanilinu

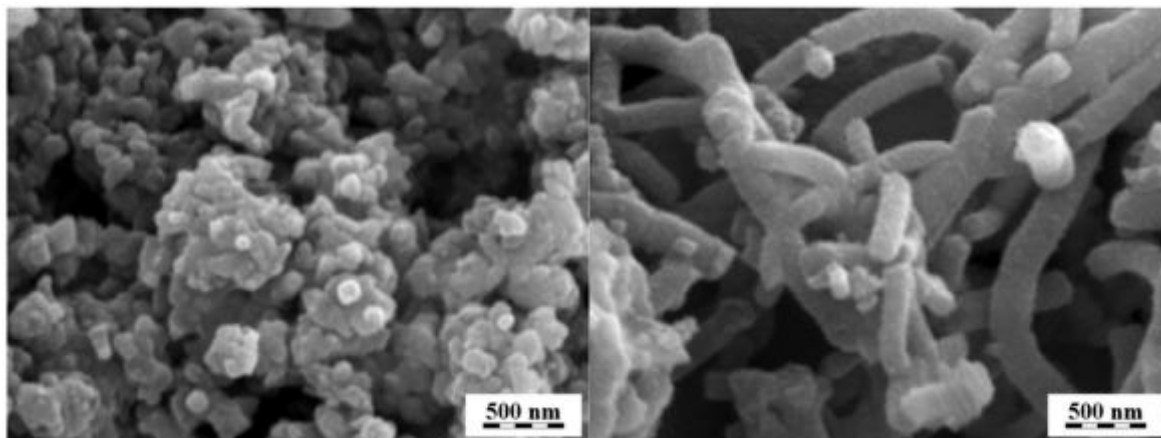
Jak už bylo uvedeno, řetězce polyanilinu jsou složeny z mnoha anilinových konstitučních jednotek. Samotný polyanilin existuje v řadě forem, které se navzájem liší svým stupněm oxidace nebo protonace (Obr. 2). Chemickou či elektrochemickou oxidací a redukcí lze

dodáváním nebo odebráním elektronů získat formy lišící se chemickou strukturou, stabilitou, zbarvením i elektrickými vlastnostmi. Nejběžnějšími formami polyanilinu jsou zeleně zbarvená vodivá polyanilinová, neboli emeraldinová sůl a nevodivá modrá báze; přechod mezi těmito formami nastává při pH 5 – 6. Vodivost polyanilinu tímto přechodem klesá o devět řádů, z jednotek $\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ na $10^{-9} \text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ a proces je vratný. Elektrická vodivost polyanilinu se dá ovlivnit dopováním, tedy použitím vhodné anorganické či organické kyseliny, nebo mechanickým namáháním polyanilinových filmů či vláken.



Obr. 2. Formy polyanilinu: základní stabilní formou polyanilinu je emeraldin, který může být oxidován na pernigranilin nebo redukován na leukoemeraldin.

Z morfologického hlediska je možno získat polyanilin v granulární podobě nebo v podobě nanotrubeček (Obr. 3). Při standardní polymeraci v silně kyselém prostředí vzniká polyanilin v granulární podobě. Pokud je polymerace provedena ve vodném nebo mírně kyselém prostředí, vznikají polyanilinové nanotrubičky. Konečná morfologie produktu tedy závisí na polymeračních podmínkách. [1, 3]



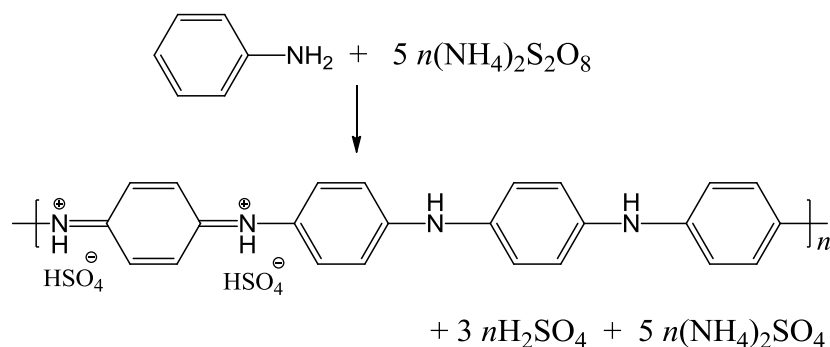
Obr. 3. Morfologie polyanilinu: granulární podoba v pravo, nanotrúbky v levo. [1]

1.1.2 Příprava polyanilinu

Polyanilin se připravuje oxidací anilinu za použití běžných chemikálií. Oxidace probíhá zpravidla peroxydvojsíranem amonným v kyselém vodném prostředí (Obr. 4). Reakce je exotermní, probíhá na vzduchu, při laboratorní teplotě a během několika minut vzniká produkt s prakticky stoprocentním výtěžkem. [1, 2]

Při praktickém provedení se rozpustí 2.59 (20 mmol) anilinu hydrochloridu v 50 ml vody, odděleně 5.71 g (25 mmol) peroxydvojsíranu amonného rovněž ve stejném množství vody a oba roztoky se smíchají. Reakční směs po chvíli postupně modrá, zbarvení se prohlubuje: tvoří se pernigranilinová forma polyanilinu, která po skončení polymerace přechází na konečný zelený emeraldin. Proces polymerace proběhne při laboratorní teplotě asi za 10 minut, přičemž teplota reakční směsi vzroste přibližně o 18 °C. Sraženina polyanilinu se odfiltruje, promyje 0.2 M kyselinou chlorovodíkovou a poté dobře acetonem nebo etanolem. Produkt se suší na vzduchu a popřípadě dosuší při 60 °C ve vakuu. Takto připravený polyanilin (emeraldin) hydrochlorid má vodivost 4 až 5 S.cm⁻¹. [1, 2]

Je-li do reakční směsi při oxidaci anilinu vložen jakýkoliv předmět (např. sklo, textilní tkanina), který je stálý v kyselém prostředí, vytvoří se na jeho povrchu vodivý polyanilinový film o tloušťce kolem 100 nm. [1]



Obr. 4. Rovnice oxidace polyanilinu.

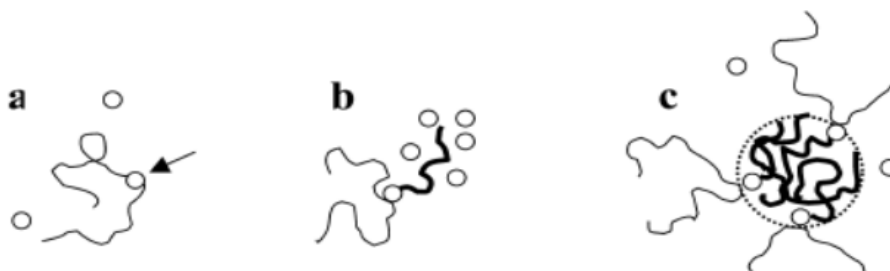
1.2 Koloidní forma polyanilinu

Vodivé polymery jsou obecně obtížně zpracovatelné materiály, jelikož se rozpouštějí pouze v koncentrovaných kyselinách. Dobrou alternativou jejich využití je tedy výroba vodných koloidních disperzí. Pokud se do polymerační směsi polyanilinu přidá polymer, rozpustný ve vodném prostředí, vznikne namísto sraženiny koloidní polyanilinová disperze. Smaragdově zelená disperze připomíná roztok a lze ji libovolně ředit. [1, 3]

1.2.1 Princip tvorby polyanilinových koloidů

Oxidací anilinu v kyselém vodném prostředí dojde jako první ke vzniku anilinových oligomerů. Oligomery jsou více hydrofobní než původní anilinové kationty. Mají tendenci oddělovat se od vodného prostředí a adsorbovat se na dostupný povrch v kontaktu s vodnou reakční směsí. Adsorbované oligomery vykazují vyšší reaktivitu a iniciují růst polyanilinových řetězců. [5]

Koloidní částice polyanilinu vznikají polymerací anilinu v prostředí s vhodným stabilizátorem, kterým je obvykle ve vodě rozpustný polymer. Výsledky studií naznačují, že roli povrchu, na který se polyanilin adsorbuje, přebírá právě polymerní stabilizátor. Anilinové oligomery se postupně adsorbují na řetězce stabilizátoru, dochází k růstu polyanilinového řetězce a k vytvoření polyanilinového jádra. Další polymerační proces pak probíhá v blízkosti jádra, kde vznikají nové oligomery a polyanilinové řetězce. Koloidní částice polyanilinu roste. [5]



Obr. 5. Vznik koloidní částice polyanilinu: a) anilinové oligomery se adsorbují na řetězce stabilizátoru, b) dochází k růstu polyanilinového řetězce a k vytvoření jádra, c) nové oligomery a polyanilinové řetězce vznikají v blízkosti jádra. Koloidní částice roste. [5]

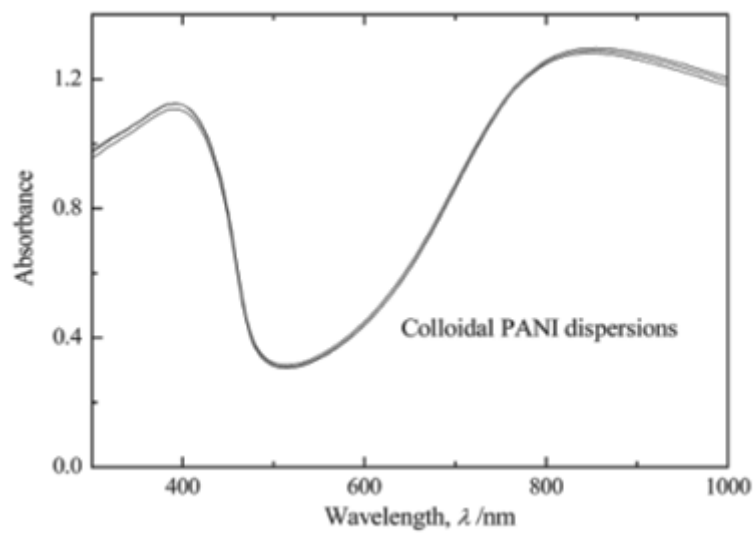
1.2.2 Příprava koloidního polyanilinu

Standardní postup pro přípravu koloidního polyanilinu je popsán v práci Stejskala a Sapuriny [5]. Metoda zahrnuje oxidaci anilin hydrochloridu peroxydvojsíranem amonným v přítomnosti stabilizátoru, poly-*N*-vinylpyrrolidonu (PVP), ve formě 2 % (hm.) vodného roztoku. [5]

Vlastní příprava koloidu probíhala tak, že byl anilin hydrochlorid rozpuštěn ve vodném roztoku PVP. Polymerace byla zahájena při laboratorní teplotě (20 °C), přidávkem vodného roztoku peroxydvojsíranu amonného k roztoku anilin hydrochloridu. Reakční směs byla krátce míchána, a poté byla ponechána v klidu polymerovat. Polymerace byla ukončena během několika minut. [5]

1.2.3 Vlastnosti a charakteristika koloidního polyanilinu

Částice koloidního polyanilinu připravené výše uvedeným postupem měly nepravidelnou morfologii s tvarem rýžového zrna a výraznou polydisperzitu ve velikosti částic. Průměrná velikost disperzních částic, měřená fotonovou korelační spektroskopii, byla 241 ± 50 nm a index polydisperzity 0.26 ± 0.12 . Optická spektra polyanilinové disperze po ředění 1M HCl jsou uvedena na Obr. 6 a dokumentují přítomnost absorpčních maxim při vlnové délce 392 a 854 nm. [5]



Obr. 6. Optická spektra koloidního polyanilinu. [5]

2 ANTIMIKROBNÍ LÁTKY

2.1 Základní charakteristika bakterií

Bakterie lze dělit dle rozdílné struktury jejich buněčné stěny do dvou základních skupin: na grampozitivní a gramnegativní. Charakter buněčné stěny je určován pomocí Gramovy reakce. Na základě této reakce se grampozitivní bakterie barví modře a gramnegativní bakterie červeně.

U grampozitivních bakterií dochází k zadržování komplexu krystalové violeti a jodidu draselného v buněčné stěně, přičemž nedochází k odbarvení organickými rozpouštědly (etanol, aceton) a po použití druhého barviva zůstávají tyto bakterie zbarveny modře. Gramnegativní bakterie komplex krystalové violeti a jodidu draselného v buněčné stěně nezadržují, dochází k jeho vymytí organickými rozpouštědly (etanol, aceton) a po použití druhého barviva se gramnegativní bakterie barví červeně. [6, 7]

Jednotlivé bakterie, které byly použity, jsou stručně charakterizovány v následující části bakalářské práce.

2.1.1 Grampozitivní bakterie

Buněčná stěna grampozitivních bakterií je silná asi 20 nm a je tvořena především peptidoglykanem. Peptidoglykanem procházejí lineární řetězce teikoových kyselin a jsou na něm navázány polysacharidy. Buněčná stěna grampozitivních bakterií neobsahuje lipidy s výjimkou mykobakterií, korynebakterií a nokardií. [6, 7]

2.1.1.1 *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*

Sporulující bakterie patřící do čeledi *Bacillaceae*. Jejich buňky mají tvar rovných tyčinek různé délky, uspořádaných buďto ve dvojicích nebo v řetězcích se zakulacenými nebo čtvercovými konci. Mohou se pohybovat pomocí peritrichálních bičků. [8]

Bacillus cereus i *Bacillus subtilis* jsou fakultativně anaerobní bakterie a jsou v prostředí široce rozšířené. *Bacillus cereus* způsobuje gastroenteritidy. *Bacillus subtilis* může způsobovat kontaminaci potravin, pro lidský organismus však není patogenní. [9, 10]

2.1.1.2 *Enterococcus faecium*

Patří do čeledi *Enterococcaceae*, tvoří sférické nebo oválné buňky vyskytující se po dvou, ve shlucích nebo v krátkých řetězcích. *Enterococcus faecium* je nepohyblivá, nesporulující,

fakultativně anaerobní bakterie. Vyskytuje se ve střevním traktu lidí i živočichů a v potravinách. Může vyvolat endokarditidu nebo respirační choroby. [8, 11]

2.1.1.3 *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis*

Bakterie patřící do čeledi *Staphylococcaceae*. Buňky mají sférický tvar a vyskytují se buď jednotlivě, po dvou nebo v tetradách. Jsou to nepohyblivé, nesporující a fakultativně anaerobní bakterie. [8]

Staphylococcus aureus se vyskytuje na kůži člověka a živočichů, je to lidský patogen vyvolávající široké spektrum onemocnění. *Staphylococcus epidermidis* je podmíněně patogenní a jeho primárním místem výskytu je lidská kůže. [8, 12, 13]

2.1.2 Gramnegativní bakterie

Buněčná stěna gramnegativních bakterií je asi o polovinu tenčí než buněčná stěna grampozitivních bakterií a je podstatně složitější. Tvoří ji tenká vrstva peptidoglykanu, nad níž je vnější membrána, složená z fosfolipidové dvojvrstvy a bílkovin. Mezi vnější membránou a peptidoglykanem se nachází tzv. periplazmatický prostor. Obsah hydrofilních proteinů porinů a lipidů v buněčné stěně zvyšuje odolnost těchto bakterií, například proti anionickým povrchově aktivním látkám. [6, 7]

2.1.2.1 *Escherichia coli, Proteus vulgaris, Salmonella enterica, Serratia marcescens*

Fakultativně anaerobní bakterie patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*. Bakterie tvoří rovné tyčky uspořádané jednotlivě nebo po dvou, které se pohybují pomocí peritrichálních bičíků. Bakterie *Escherichia coli* může být i nepohyblivá. [8]

Escherichia coli se vyskytuje v tlustém střevě člověka a teplokrevných živočichů. Je potenciálním patogenem a může vyvolat závažná onemocnění. Bakterii *Proteus Vulgaris* najdeme ve střevním traktu člověka, v půdě a znečištěné vodě. *Proteus Vulgaris* je patogenní bakterie, která zapříčiňuje infekci močových cest. *Salmonella enterica* se vyskytuje u člověka a živočichů, způsobuje především průjemové onemocnění střevního traktu. *Serratia marcescens* se nachází v půdě, vodě a na povrchu rostlin. Vyznačuje se jako oportunní patogen člověka, způsobuje infekce močových cest. [8,14,16,17, 18]

2.1.2.2 *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas fluorescens patří do čeledi *Pseudomonadaceae*. Buňky mají tvar rovných nebo nepatrně zakřivených tyček a pohybují se pomocí několika bičíků. *Pseudomonas fluorescens* je aerobní bakterie produkující fluorescein. Vyskytuje se ve vodě, půdě a potravinách. [8, 15]

2.2 Antimikrobní vlastnosti polyanilinu

Antibakteriální vlastnosti koloidního polyanilinu nebyly zatím v odborné literatuře popsány. Studie publikované na toto téma, i když jsou jen velmi řídké, se zabývají běžným, práškovým, polymerním polyanilinem.

Mezi polymery, které vykazují přirozené antibakteriální vlastnosti, patří i některé vodivé polymery. Příkladem je již uvedený polyanilin, jehož antibakteriální účinnost proti gram-pozitivním a gramnegativním bakteriím a houbám byla poprvé popsána teprve nedávno v publikacích [19, 20]. Tyto studie prokázaly antibakteriální vlastnosti polyanilinu po jeho deponování na povrch textilie, resp. polymeru, polyvinylalkoholu. Antibakteriální vlastnosti funkcionalizovaných a standardních polyanilinů byly předmětem zájmu práce Gizdavic-Nikolaidis a kol. [21]. I když všechny látky testované v této práci prokázaly antibakteriální aktivitu, ve srovnání se standardními polymery byly funkcionalizované polymery efektivnější. Antibakteriální vlastnosti polyanilinu byly prokázány nejen u samotného polymeru, ale také u jeho acetonem extrahovaných oligomerů [22]. Rovněž Humpolíček a kol. zaznamenal ve své práci významnou cytotoxicitu polyanilinové, emeraldinové soli po jejím působení na eukaryotické buňky. Ačkoli se v této posledně jmenované studii nejednalo o buňky bakterií, byl i zde prokázán negativní vliv polyanilinu na životaschopnost buněk. [23]

3 CÍLE PRÁCE:

Cíle bakalářské práce byly stanoveny následovně:

- v teoretické části zpracovat literární rešerši týkající se polyanilinu a jeho vlastností, zejména se zaměřením na formu koloidní polyanilinové disperze;
- v praktické části provést charakterizaci připraveného koloidu a ověřit, zda použitá mikrodiluční metoda je vhodnou metodikou pro stanovení vlivu koloidního polyanilinu na růst vybraných gramnegativních a grampozitivních bakterií.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 MATERIÁLY A METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Příprava koloidního polyanilinu

Vzorek byl připraven oxidací anilin hydrochloridu (0.2 M) peroxydvojsíranem amonným (0.25 M) v přítomnosti vodného roztoku poly-*N*-vinylpyrrolidonu o koncentraci 2 %. Reakce probíhala při teplotě 25 °C. Příprava byla provedena na Ústavu makromolekulární chemie, AV ČR v Praze.

4.1.2 Vybrané kultury mikroorganismů

Pro praktickou část bakalářské práce byly použity kmeny grampozitivních a gramnegativních bakterií získané ze tří různých zdrojů. Mikroorganismy označené CCM byly získány z České sbírky mikroorganismů, kmeny bez označení byly poskytnuty Ústavem fyziologie hospodářských zvířat, SAV v Košicích a Ústavem inženýrství ochrany životního prostředí FT UTB ve Zlíně.

Bacillus cereus CCM 2010

Bacillus subtilis subsp. *spizizenii* CCM 4062

Enterococcus faecium

Escherichia coli CCM 3954

Pseudomonas fluorescens CCM 2798

Proteus vulgaris

Salmonella enterica subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

Serratia marcescens subsp. *marcescens* CCM 303

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* CCM 3953

Staphylococcus epidermidis

Bakteriální kmeny byly uchovávány na Petriho miskách při teplotě 4 ± 2 °C.

4.1.3 Kultivační půdy

Kultury bakterií byly uchovávány na masopeptonovém agaru (MPA) o složení:

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

Pro přípravu bakteriální suspenze pro vlastní experiment byl použit masopeptonový bujón (MPB) o složení:

Beef extract (HiMedia)	3,0 g
Pepton (HiMedia)	5,0 g
NaCl (Lach-Ner)	5,0 g
destilovaná voda	1000 ml

Živné půdy byly po důkladném rozpuštění sterilizovány v autoklávu při 132 °C po dobu 20 minut.

4.1.4 Laboratorní sklo a plasty

Laboratorní sklo používané pro experiment, bylo sterilizováno v autoklávu při 132 °C po dobu 20 minut nebo horkým vzduchem při teplotě 160 °C po dobu 240 minut. Laboratorní plasty používané pro experiment byly sterilizovány v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

4.1.5 Dekontaminace použitého materiálu

Veškerý materiál, který byl použit při práci v laboratořích (mikrotitrační destičky, špičky, zkumavky, Petriho misky aj.) byl dekontaminován při teplotě 132 °C po dobu 20 minut v autoklávu.

4.1.6 Použité zařízení a pomůcky

- Analytické váhy Sartorius, BA 110
- Autokláv Varioklav H+P
- Automatické mikropipety

- Biohazard box EUROFLOW (Clean Air)
- Biologický termostat Memmert INE 600
- Laboratorní sklo (kádinky, Petriho misky, zkumavky)
- Laboratorní plasty (mikrotitrační destičky, očkovací kličky, špičky pro automatické mikropipety)
- Přístroj Microplate Reader Benchmark (Bio-Rad)
- Software Microplate Manager 5.2.1. (Bio-Rad)
- Vortex Reax top (Heidolph)
- ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments)
- Spektrální fotometr photo Lab 6600 UV-VIS (WTW)
- pH-metr tester Spear (Eutech Instruments)
- průtokový cytometr BD FACSCanto II (BD Biosciences) vybavený softwarem - BD FACSDiva

4.2 Metody

4.2.1 Příprava bakteriální suspenze

Bakteriální suspenze byly připraveny do sterilních zkumavek zaočkováním 5 ml tekutého kultivačního média, MPB příslušnými kmeny bakterií, které byly odebrány z Petriho misek. Připravené suspenze byly kultivovány v termostatu při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin.

4.2.2 Charakterizace koloidního polyanilinu

4.2.2.1 Stanovení velikosti částic koloidního polyanilinu

Měření velikosti částic pomocí fotonové korelační spektroskopie (PCS) probíhalo pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). Pro měření bylo použito 5 µl vzorku koloidu v 1 ml sterilní, demineralizované vody, která byla 2x filtrována přes filtr s velikostí pórů 0.22 µm. Všechna měření velikosti částic byla prováděna při teplotě 25 °C a rozptylovém úhlu 173 °. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno softwarem použitého

přístroje a velikost částic byla vyjádřena jako z-průměr, který je také označován jako intenzitně-vážený střední průměr a je nejčastěji používanou veličinou pro vyjádření velikosti částic z PCS měření. Dále byl stanoven index polydisperzity PdI, který je vyjádřením šířky distribuce velikostí částic přítomných ve vzorku.

4.2.2.2 *UV spektrum v 1 M HCL*

Stanovení absorpčního spektra probíhalo na spektrálním fotometru photo Lab 6600 UV-VIS. Standard byl připraven přesným odpipetováním 2.996 ml 1 M HCl a 3.75 μ l koloidního roztoku polyanilinu. Absorpční spektrum standardu bylo naměřeno v rozsahu vlnových délek 200-800 nm. Poté byla odečtena hodnota vlnové délky odpovídající maximu absorbance, při které byly naměřeny hodnoty absorbancí jednotlivých roztoků koloidního polyanilinu použitých při stanovení jeho antimikrobní účinnosti, viz níže.

4.2.2.3 *Stanovení koncentrace polyanilinu v koloidním roztoku*

Metoda stanovení koncentrace polyanilinu v koloidu je popsána v publikaci Stejskala a Kratochvíla [24].

Pro vlastní stanovení byly připraveny roztoky sedmi koncentrací koloidního polyanilinu v 1 M HCl, pipetováním obou komponent, viz Tab. 2. U jednotlivých roztoků byla naměřena hodnota absorbance na spektrálním fotometru photo Lab 6600 UV-VIS při maximální vlnové délce 375 nm a vypočtena koncentrace pomocí Lambert-Beerova zákona (1). Dle tohoto zákona je hodnota absorbance A_λ při vlnové délce λ přímo úměrná látkové koncentraci c a délce optické dráhy l .

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l \quad (1)$$

Kde:

A_λ ... absorbance

ε_λ absorpční koeficient při dané vlnové délce

c koncentrace

l optická délka květy

Výpočet byl proveden na základě známé hodnoty absorpčního koeficientu publikovaného Stejskalem a Kratochvílem (31 500 $\text{cm}^2/\text{g}\cdot\text{cm}$) [24] a hodnoty absorbance A změřené pro příslušný roztok. Příklad výpočtu je uveden níže.

$$c = \frac{A_\lambda}{\varepsilon_\lambda \cdot l} = \frac{0,122}{31\,500\text{cm}^2/\text{g} \cdot 1\text{cm}} = 3,9 \cdot 10^{-6}\text{g/ml} = 3,9\ \mu\text{g/ml}$$

4.2.3 Antimikrobní vlastnosti koloidního polyanilinu

4.2.3.1 Mikrodiluční metoda

Mikrodiluční metoda je běžně používanou metodou, která byla úspěšně aplikována například pro stanovení antimikrobní účinnosti monoacylglycerolů [25, 26] Z tohoto důvodu byla tato metoda zvolena i pro stanovení antimikrobních vlastností koloidního polyanilinu.

Sledování vlivu polyanilinu na růst grampozitivních a gramnegativních bakterií probíhalo pomocí přístroje Microplate Reader Benchmark (Bio-Rad). Růst testovaných bakterií byl sledován při následujících koncentrací polyanilinu: 2.1 $\mu\text{g/ml}$, 3.9 $\mu\text{g/ml}$, 10.9 $\mu\text{g/ml}$, 20.4 $\mu\text{g/ml}$, 42.6 $\mu\text{g/ml}$, 56.8 $\mu\text{g/ml}$, 85.7 $\mu\text{g/ml}$. Kultivační média byla připravena do zkumavek dávkováním koloidního polyanilinu do příslušného množství masopeptonového bujonu (MPB). Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo napipetováno 200 μl připraveného kultivačního média a 5 μl bakteriální suspenze. Součástí mikrotitrační destičky byla jak pozitivní kontrola, tak i negativní kontrola. Pozitivní kontrolou byly vzorky čistého MPB bez polyanilinu, zaočkované bakteriální suspenzí. Jako negativní kontrola byl použit MPB s příslušnou koncentrací polyanilinu bez zaočkování bakteriální suspenzí. Růst bakterií byl vždy sledován ve dvou jamkách mikrotitrační destičky, kultivace bakterií probíhala v biologickém termostatu Memmert INE 600 při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin. V časech 0, 4, 8, a 24 hodin byly odečítány hodnoty absorbance při 655 nm (OD_{655}). Přístroj byl řízen pomocí software Microplate Manager 5.2.1. (Bio-Rad) a před každým měřením byl vzorek protřepán po dobu 10 sekund. Naměřené hodnoty absorbance byly zprůměrovány a změny růstu bakterií v prostředí koloidního polyanilinu byly hodnoceny v čase 4 a 8 hodin jako index růstu (IR). Index růstu byl stanoven podle vztahu (2) dle Blaszyk a Holley (1998):

$$IR(\%) = \frac{OD_{655} - OD_{NK}}{OD_{PK}} \quad (2)$$

kde:

IR index růstu buněk

OD_{655} ... hodnota absorbance testované kultury v médiu s příslušnou koncentrací polyanilinu

OD_{NK} absorbance negativní kontroly pro příslušnou koncentrací polyanilinu

OD_{PK} absorbance pozitivní kontroly

4.2.3.2 Stanovení pH bakteriální suspenze v přítomnosti polyanilinu

pH bylo stanoveno pomocí vpichového pH-metru tester Spear (Eutech), v každé jamce mikrotitrační destičky vždy před zahájením kultivace a po jejím ukončení. Získané hodnoty pH byly zapisovány, porovnány a byla vyhodnocena změna pH, ke které došlo v bakteriální suspenzi během kultivace.

4.2.4 Průtoková cytometrie

K rozlišení živých a mrtvých bakteriálních buněk byl použit průtokový cytometr BD FACSCanto II (BD Biosciences) vybavený vyhodnocovacím softwarem - BD FACSDiva. Měření bylo provedeno v laboratořích Vědeckotechnického parku UTB ve Zlíně.

5 VÝSLEDKY

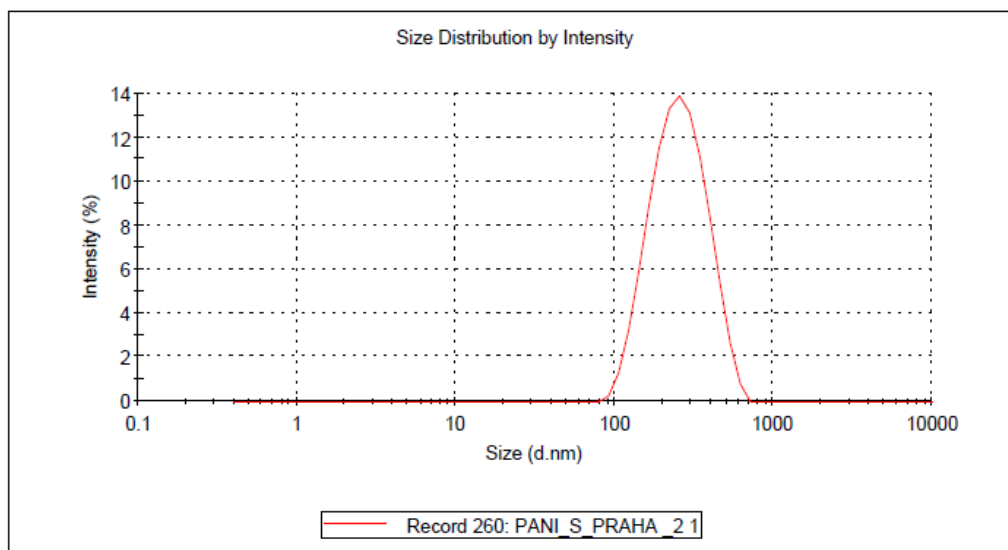
5.1 Charakterizace koloidního polyanilinu

5.1.1.1 Stanovení velikosti částic koloidního polyanilinu

Výsledky stanovení velikosti částic a indexu polydisperzity (PdI) koloidního polyanilinu jsou uvedeny v Tab. 1. Z tabulky je zřejmé, že průměrná velikost částic koloidního polyanilinu byla 226.5 ± 0.5 nm a průměrný index polydisperzity 0.145 ± 0.004 . Pro srovnání výsledků byly použity publikované údaje uvedené v práci Stejskala a Sapurniny [6], které uvádí průměrnou velikost částic 241 ± 50 nm a index polydisperzity 0.26 ± 0.116 . Je tedy zřejmé, že se průměrná velikost koloidního polyanilinu pohybuje v nm oblasti, přičemž vzorek použitý v této bakalářské práci měl nižší průměrnou velikost a užší distribuci velikosti částic. Distribuční křivka je uvedena na Obr. 7.

Tab. 1 Hodnoty velikosti částic vyjádřené jako z-průměr v nm a indexu polydisperzity a jejich směrodatné odchylky σ částic koloidního polyanilinu

vzorek	z-průměr [nm]	PdI
1	224.8	0.163
2	228.3	0.139
3	226.5	0.133
<i>průměr$\pm\sigma$</i>	<i>226.5 \pm 0.5</i>	<i>0.145 \pm 0.004</i>

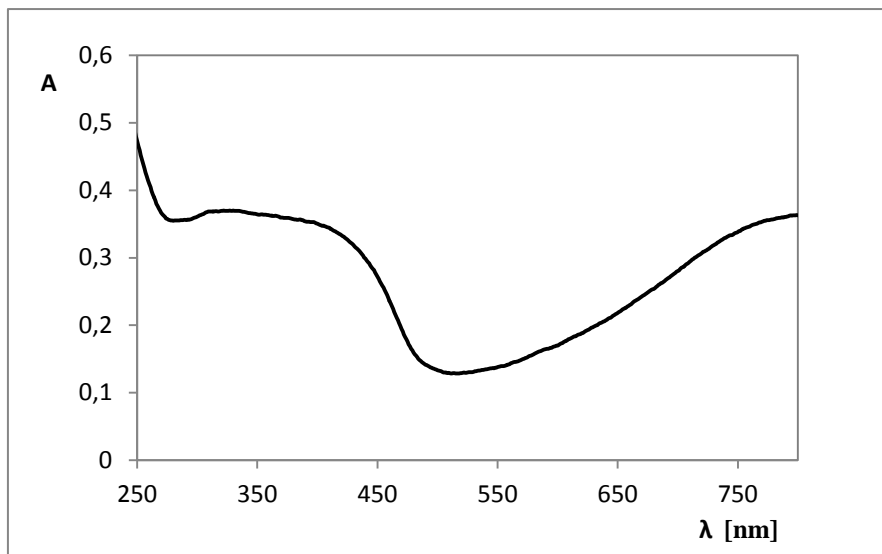


Obr. 7. Distribuce velikostí částic koloidního polyanilinu.

5.1.1.2 UV spektrum v 1 M HCl

Aby bylo možné vypočítat koncentraci polyanilinu v jednotlivých vzorcích koloidní disperze, které byly použity v experimentu, muselo být nejprve změřeno absorpční spektrum této disperze v 1 M HCl a dále odečtena vlnová délka odpovídající maximu absorpce. Zvolená vlnová délka odpovídající maximu se rovnala 375 nm.

Naměřené spektrum je uvedeno na Obr. 8. Z Obr. 8 je zřejmé, že první lokální maximum, určené ze závislosti absorpce A na vlnové délce λ se pohybovalo v rozmezí 350-400 nm. Lokální maximum uváděné v práci Stejskala a Kratochvíla [25] leží v rozmezí vlnových délek 380-420 nm. Ze srovnání těchto výsledků je patrné, že oblasti lokálních maxim jsou téměř identické. Druhý absorpční pás, který uvádí výše uvedená práce, je detekován při vlnové délce 810 nm. Jelikož v bakalářské práci byl pro stanovení absorpce použit rozsah vlnových délek do 800 nm (limit použitého spektrofotometru), nebylo toto druhé maximum zřetelně detekováno. Obr. 8 však ukazuje, že při vlnové délce 800 nm dochází k nárůstu absorpce a výskyt tohoto druhého maxima lze s velkou pravděpodobností očekávat. Dále bylo provedeno srovnání se spektry z článku Stejskala a Sapurniny [6], které dokumentují přítomnost absorpčních maxim při vlnové délce 392 a 854 nm (Obr. 6). V této práci byla analýza provedena ve větším rozsahu vlnových délek, který se pohyboval až do 1000 nm, tedy ve vyšší oblasti v porovnání s bakalářskou prací.



Obr. 8. Absorpční spektrum polyanilinové disperze v 1 M HCl.

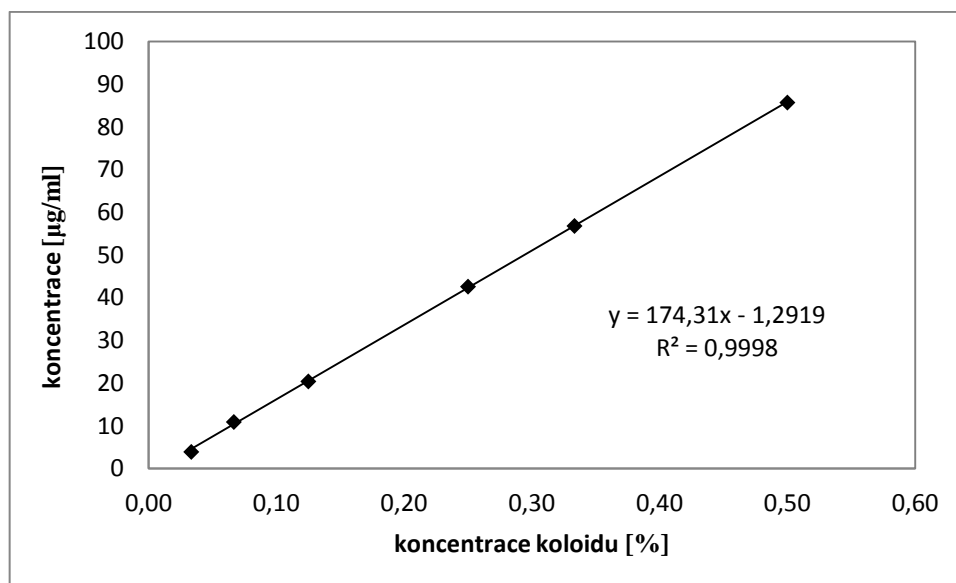
5.1.1.3 Koncentrace polyanilinu v koloidním roztoku

Koloidní disperze polyanilinu je systém, který je složen z vody, polyanilinu a polymerního stabilizátoru, poly-*N*-vinylpyrrolidonu, na který je polyanilin adsorbován. Postup pro stanovení koncentrace polyanilinu v koloidu je uveden v práci Stejskala a Kratochvíla [25] a vychází ze spektrofotometrického měření. Naměřené hodnoty absorbancí koloidních disperzí a jejich koncentrace jsou uvedeny v Tab. 2, spolu s příslušnými vypočítanými koncentracemi polyanilinu, které koloid obsahuje.

Z vypočítaných hodnot byla sestrojena kalibrační přímka pro přepočet pipetovaného objemu koloidu, respektive jeho koncentrace (v %) na obsah polyanilinu (polymeru) ve sledovaných vzorcích (Obr. 9).

Tab. 2. Hodnoty absorbancí pro vzorky koloidu, jejich koncentrace a odpovídající koncentrace polyanilinu v koloidu

Roztok	Množství koloidu [μl]	Množství 1 M HCl [ml]	Koncentrace koloidu [%]	Absorbance	Koncentrace polyanilinu [$\mu\text{g/ml}$]
1	0.5	2.9995	0.02	0.066	2.1
2	1	2.999	0.03	0.122	3.9
3	2	2.998	0.07	0.343	10.9
4	3.75	2.996	0.13	0.644	20.4
5	7.5	2.993	0.25	1.342	42.6
6	10	2.990	0.33	1.790	56.8
7	15	2.985	0.50	2.699	85.7

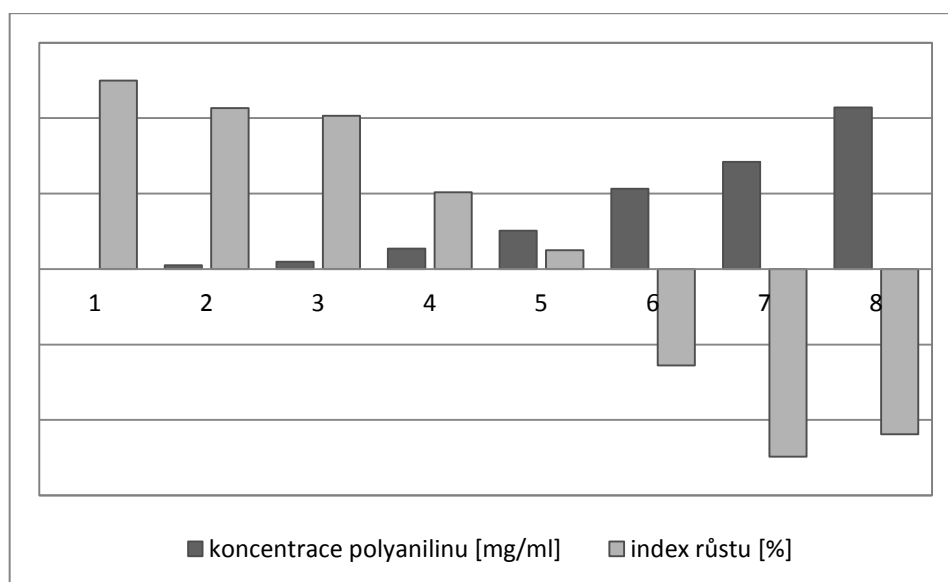


Obr. 9. Kalibrační přímka. Závislost koncentrace polyanilinu v roztoku na koncentraci koloidu.

5.2 Antimikrobní vlastnosti koloidního polyanilinu

Vliv polyanilinu na růst bakterií byl testován na vybraných pěti gramnegativních a pěti grampozitivních bakteriích. Nárůst bakterií byl měřen v tekutém médiu spektrofotometric-

ky (UV-VIS) při vlnové délce 655 nm. V souvislosti se skutečností, že hodnoty absorbance měřené UV-VIS by se měly nacházet v oblasti platnosti Lambert-Beerova zákona, byla nejprve zvolena vhodná koncentrace koloidu. Vyšší koncentrace koloidního polyanilinu nebyly, vzhledem k jeho zelenému zbarvení, touto metodou měřitelné. Z naměřených hodnot absorbancí byl vypočítán index růstu. Během kultivace bylo pozorováno, že dochází ke změně původně zelené barvy bakteriální suspenze v přítomnosti polyanilinového koloidu (důvody změny pH jsou diskutovány v níže). Tato změna barvy byla pozorována především u vyšších koncentrací polyanilinu a způsobovala nesprávné výsledky při odečtu kontrolního vzorku, který představoval roztok koloidního polyanilinu v médiu bez přítomnosti bakterií. U tohoto roztoku samozřejmě ke změně barvy nedocházelo. Když byla odečtena absorbance kontrolního roztoku od hodnoty absorbance naměřené pro bakteriální suspenzi se stejnou koncentrací polyanilinu jako v kontrolním vzorku, výsledné hodnoty absorbance byly záporné. Tuto skutečnost ilustruje Obr. 10, na kterém lze pozorovat ztatečný pokles indexu růstu (vyjádřeného v %) do záporných hodnot, v závislosti na stoupající koncentraci polyanilinu u bakterie *Escherichia coli* CCM 3954.



Obr. 10. Index růstu bakterie *Escherichia coli* CCM 3954 v závislosti na zvyšující se koncentraci polyanilinu.

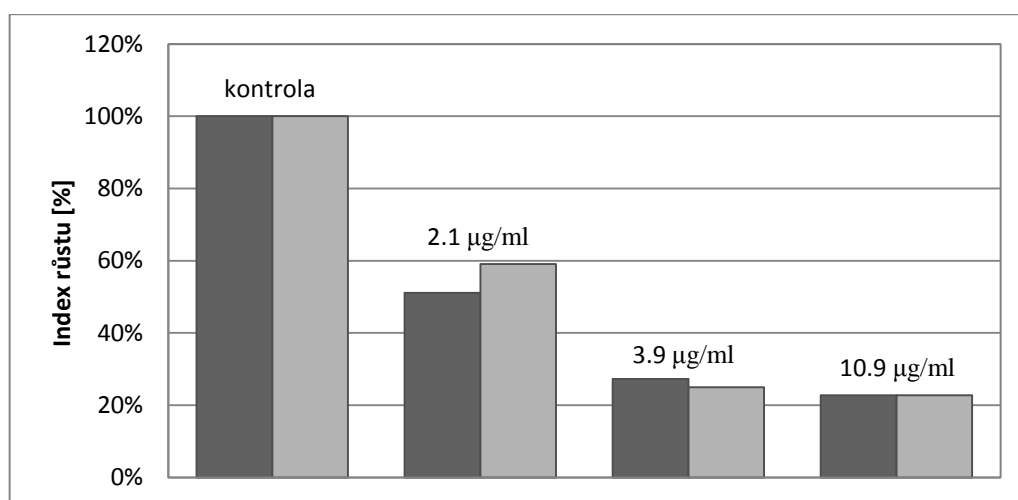
U nejnižších koncentrací polyanilinu ke změně barvy bakteriální suspenze nedocházelo, odečet kontrolního vzorku byl bezproblémový a výsledky lze považovat za hodnověrné.

Na základě výše uvedených údajů byly pro grafické vyhodnocení antimikrobních účinků polyanilinu, které je představeno v další části práce, použity u všech bakterií pouze první tři hodnoty indexu růstu, které vychází z hodnot absorbancí vzorků, kde nedocházelo ke změně barvy a tedy ke zkreslení výsledků.

5.2.1 Vliv koloidního polyanilinu na růst *Bacillus cereus* CCM 2010

Účinek koloidního polyanilinu na růst *Bacillus cereus* CCM 2010, obdobně jako u všech následujících bakterií, byl sledován za použití následujících koncentrací polyanilinu: 2.1, 3.9, 10.9, 20.4, 42.6, 56.8 a 85.7 $\mu\text{g/ml}$. Pro grafické vyhodnocení výsledků antimikrobních účinků polyanilinu byly však zvoleny pouze první tři koncentrace polyanilinu. Z důvodu změny barvy suspenze byly výsledky u vyšších koncentrací chybné, a proto nebyly dále diskutovány.

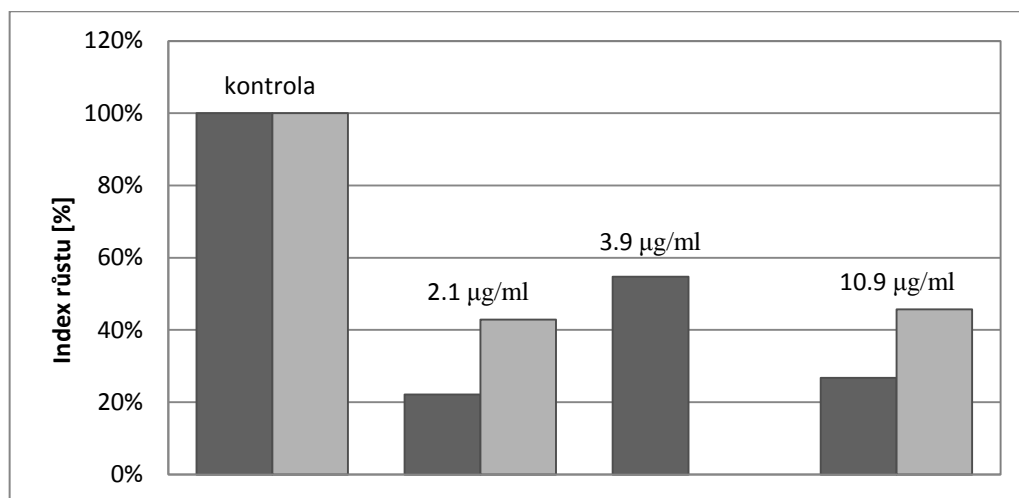
Po 4 hodinách kultivace byl zaznamenán pokles růstu *Bacillus cereus* CCM 2010 ve všech použitých koncentracích polyanilinu. U nejnižší koncentrace polyanilinu došlo k redukci buněk ca o 50 % a se zvyšující se koncentrací polyanilinu došlo k dalšímu poklesu růstu buněk zhruba na 23 %. Nejlepší inhibiční efekt byl dosažen při koncentraci 3.9 a 10.9 $\mu\text{g/ml}$.



Obr. 11. Vliv koloidního polyanilinu na *Bacillus cereus* CCM 2010 na růst buněk po 4 hodinách kultivace.

Vliv polyanilinu na růst *Bacillus cereus* CCM 2010 po 8 hodinách kultivace je graficky znázorněn na Obr. 12. Inhibiční účinek na růst buněk měly všechny zvolené koncentrace polyanilinu, nejlepších výsledků bylo dosaženo při koncentraci 2.1 a 10.4 $\mu\text{g/ml}$. Zde došlo

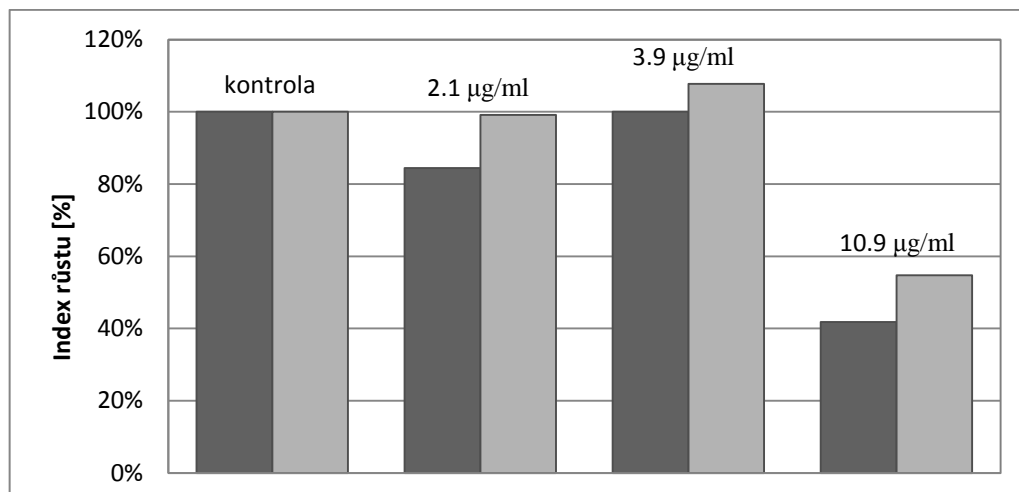
k poklesu indexu růstu celkově asi na 34 %. V koncentraci 3.9 $\mu\text{g/ml}$ došlo k poklesu růstu buněk na 55%.



Obr. 12. Vliv koloidního polyanilinu na *Bacillus cereus* CCM 2010 na růst buněk po 8 hodinách kultivace. (pozn. pro koncentraci 3.9 $\mu\text{g/ml}$ nebylo provedeno druhé měření)

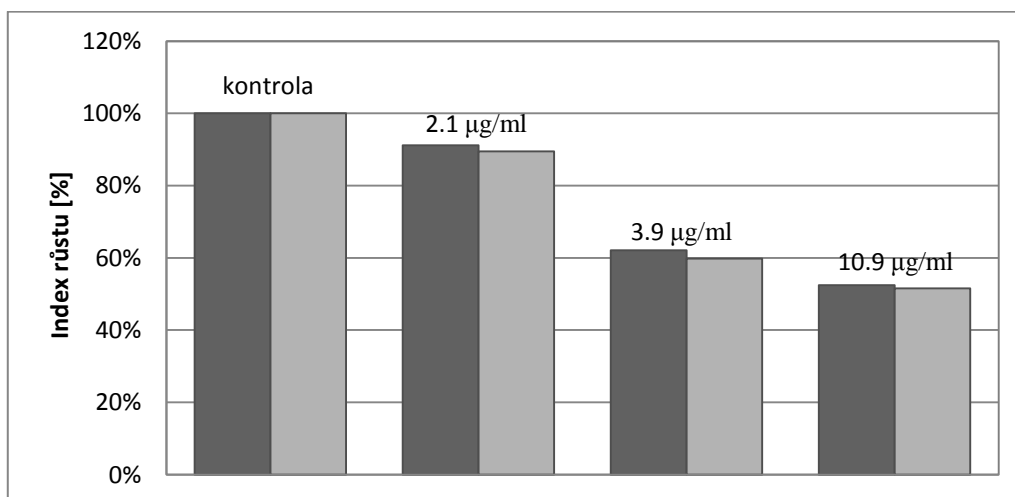
5.2.2 Vliv koloidního polyanilinu na růst *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062

Pro sledování inhibičních účinků koloidního polyanilinu byly zvoleny stejné koncentrace jako u *Bacillus cereus* CCM 2010. Z Obr. 13 je zřejmé, že po 4 hodinách kultivace nastal u nejvyšší koncentrace polyanilinu pokles indexu růstu buněk zhruba na 50 %. V případě dvou nižších koncentrací byl inhibiční účinek srovnatelný a zanedbatelný. Index růstu se v tomto případě pohyboval na úrovni indexu růstu kontrolního vzorku. Nejlepších inhibičních výsledků bylo pro tento kmen bakterií dosaženo v koncentraci 10.9 $\mu\text{g/ml}$.



Obr. 13. Vliv koloidního polyanilinu na *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062 na růst buněk po 4 hodinách kultivace.

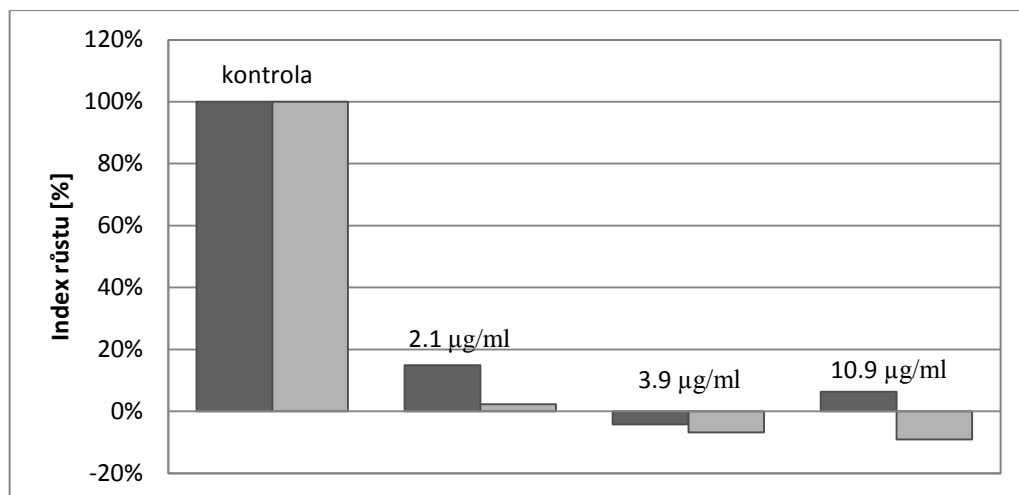
Vliv polyanilinu na růst buněk *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062 po 8 hodinách je možno pozorovat na Obr. 14. U testovaných vzorků nastal nejvyšší inhibiční účinek při koncentraci 10.9 µg/ml, kde byl zaznamenán pokles indexu růstu na 52 %. U nižší koncentrace 3.9 µg/ml byla pozorována redukce buněk na 60 % a v nejnižší koncentraci pouze na 90 %.



Obr. 14. Vliv koloidního polyanilinu na *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062 na růst buněk po 8 hodinách kultivace.

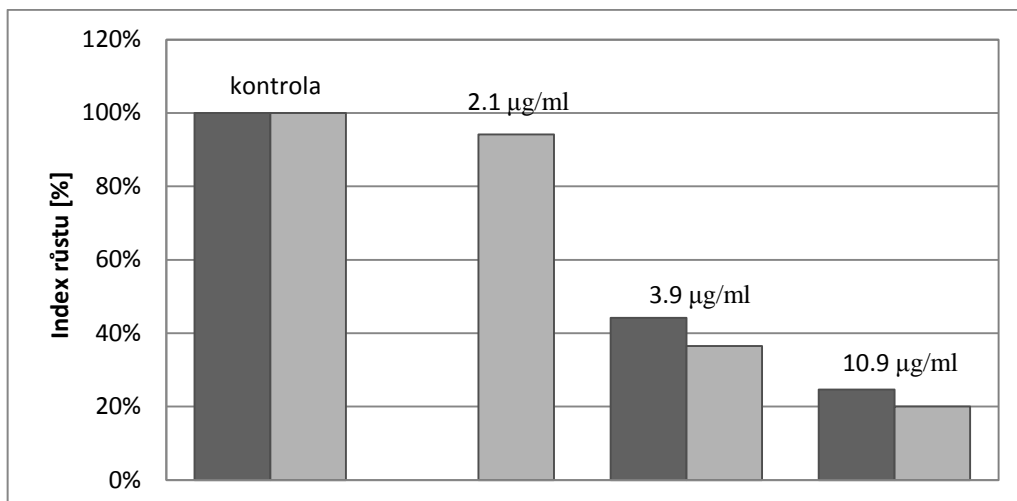
5.2.3 Vliv koloidního polyanilinu na růst *Enterococcus faecium*

Na Obr. 9 je prezentováno působení testovaného polyanilinu na růst buněk *Enterococcus faecium* po 4 hodinové kultivaci při 30 °C. Koloidní polyanilin měl na růst *Enterococcus faecium* velmi dobrý až úplný inhibiční účinek. K malému nárůstu buněk došlo po 4 hodinách kultivace u nejnižší použité koncentrace. U dalších dvou koncentrací byl nárůst buněk zanedbatelný nebo žádný.



Obr. 15. Vliv koloidního polyanilinu na *Enterococcus faecium* na růst buněk po 4 hodinách kultivace.

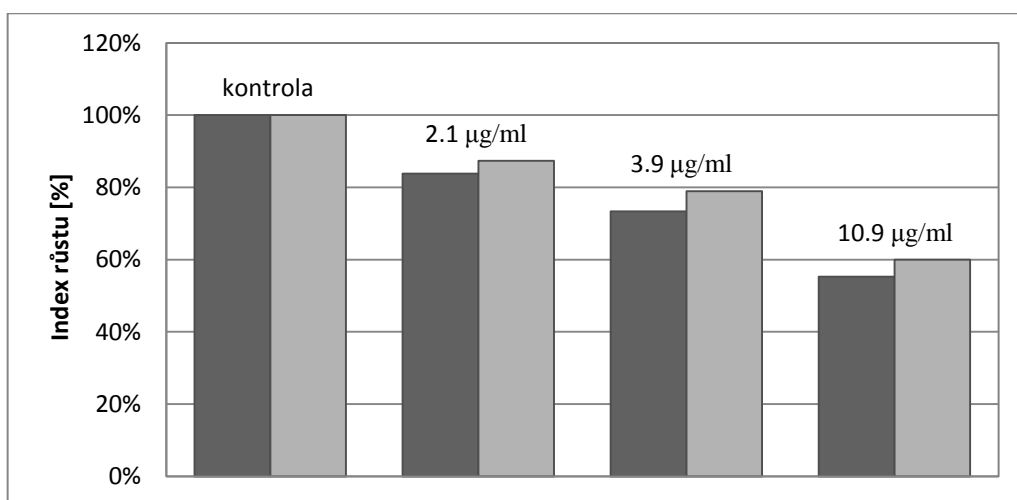
Inhibiční účinky růstu vůči *Enterococcus faecium* byly stanoveny také po 8 hodinách kultivace. Z grafu je patrné, že se stoupající koncentrací polyanilinu roste jeho inhibiční účinnost vůči danému kmenu bakterie. Nejlepší inhibiční účinek na růst buněk vykazovala koncentrace 10.9 µg/ml, tady došlo k poklesu indexu růstu až na cca 23 %. U zbylých koncentrací byl zaznamenán indexu růstu zhruba 40 % a 90 %.



Obr. 16. Vliv koloidního polyanilinu na *Enterococcus faecium* na růst buněk po 8 hodinách kultivace. (pozn. pro koncentraci 2.1 µg/ml nebylo provedeno druhé měření)

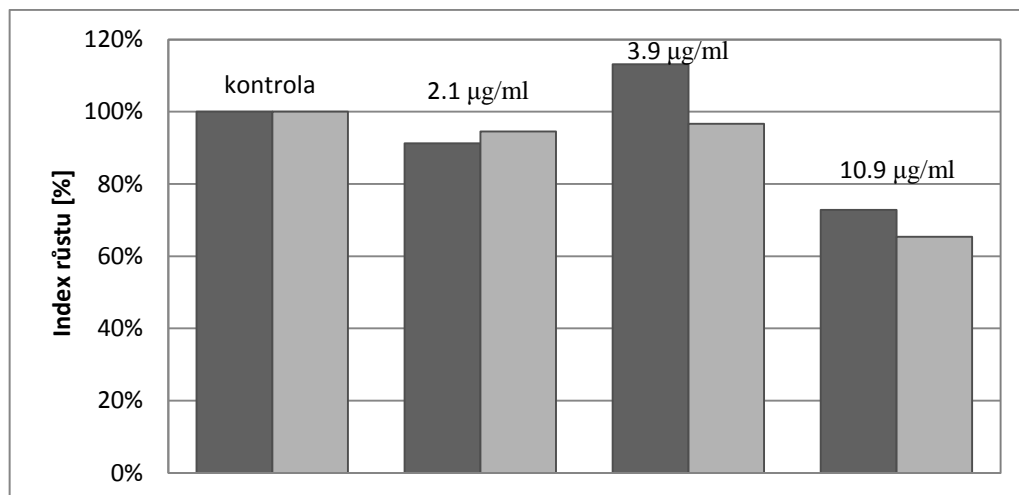
5.2.4 Vliv koloidního polyanilinu na růst *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953

Na Obr. 17, kde je ilustrován vliv koloidního polyanilinu na *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 je vidět, že se zvyšující koncentrací polyanilinu index růstu klesá. Postupně došlo k poklesu buněk v médiu na zhruba 85, 75 a 58 %.



Obr. 17. Vliv koloidního polyanilinu na *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 na růst buněk po 4 hodinách kultivace.

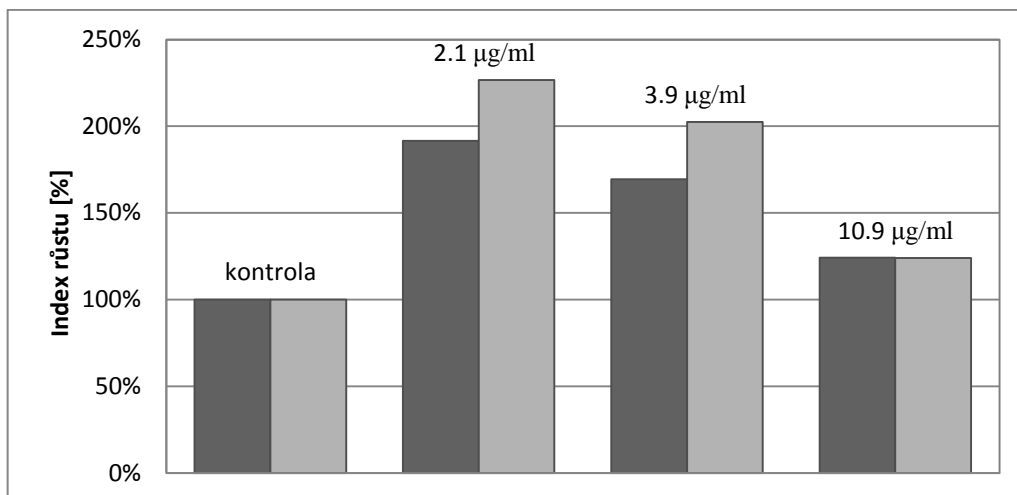
Testování citlivosti bakterie *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 na polyanilin po 8 hodinách je graficky uvedeno na Obr. 18. Na tuto bakterii neměla přítomnost polyanilinu při koncentraci 2.1 µg/ml a 3.9 µg/ml skoro žádný nebo spíše stimulační vliv. Znatelný pokles indexu růstu nastal při koncentraci 10.9 µg/ml, kde byla stanovena nejnižší hodnota indexu růstu 65 %.



Obr. 18. Vliv koloidního polyanilinu na *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 na růst buněk po 8 hodinách kultivace.

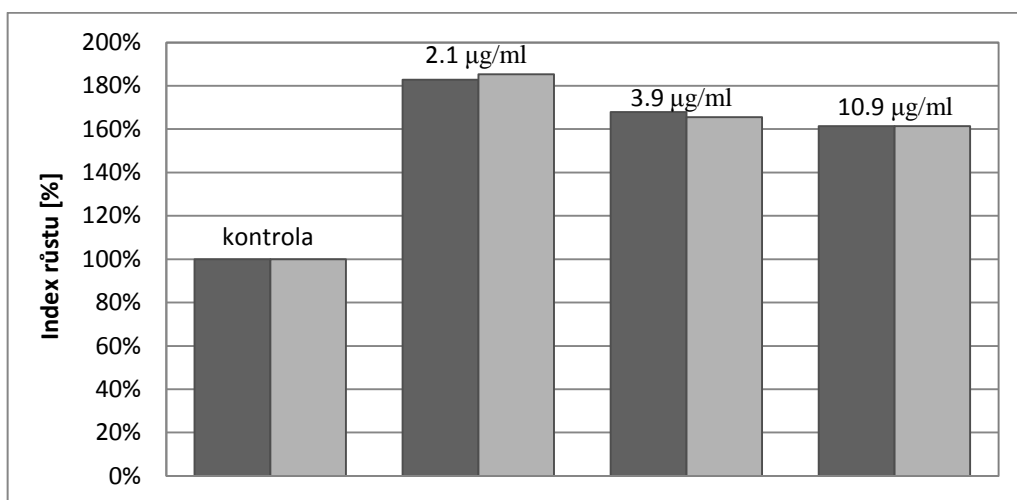
5.2.5 Vliv koloidního polyanilinu na růst *Staphylococcus epidermidis*

U poslední testované grampozitivní bakterie *Staphylococcus epidermidis* lze po 4 hodinách kultivace pozorovat rapidní narůst buněk v přítomnosti polyanilinu, oproti kontrole viz Obr 19. Polyanilin tedy růst buněk jednoznačně podporuje a nevykazuje žádný inhibiční účinek.



Obr. 19. Vliv koloidního polyanilinu na *Staphylococcus epidermidis* na růst buněk po 4 hodinách kultivace.

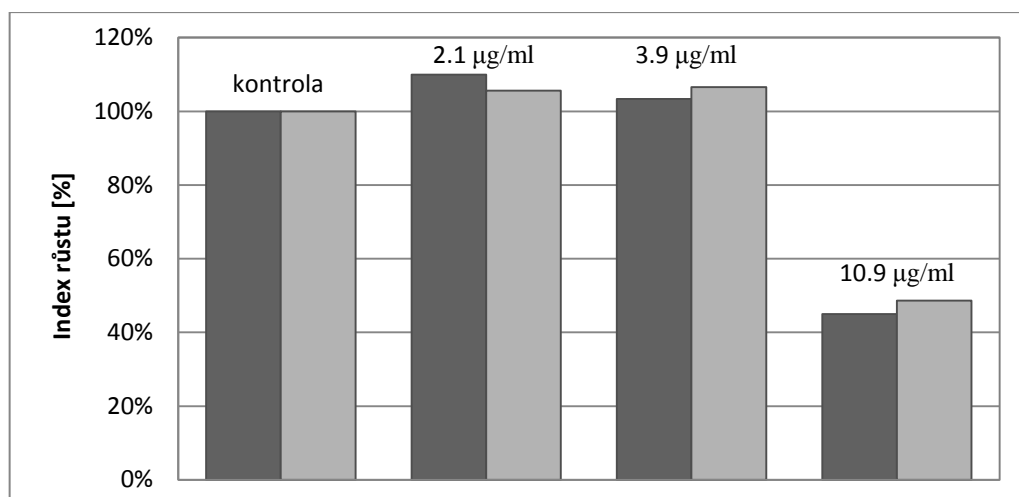
Účinek koloidního polyanilinu na růst bakterie *Staphylococcus epidermidis* byl po 8 hodinách kultivace obdobný jako po 4 hodinové kultivaci. U všech použitých koncentrací polyanilinu byl pozorován nárůst hodnot indexu růstu vzhledem ke kontrole viz Obr 19. V tomto případě, obdobně jako po čtyřhodinové kultivaci, polyanilin nevykazoval na růst buněk v médiu žádný inhibiční účinek, naopak měl na přítomnou bakterii vliv stimulační.



Obr. 20. Vliv koloidního polyanilinu na *Staphylococcus epidermidis* na růst buněk po 8 hodinách kultivace.

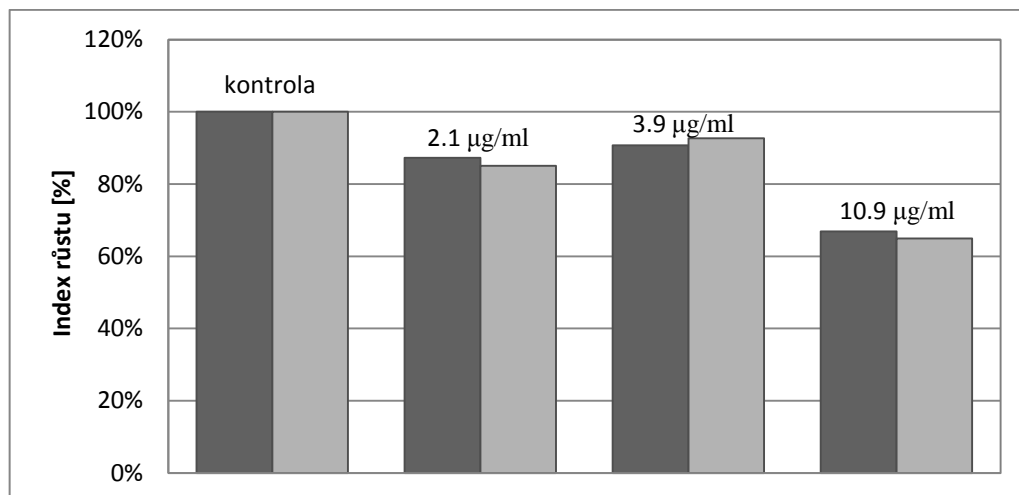
5.2.6 Vliv koloidního polyanilinu na růst *Escherichia coli* CCM 3954

Z grafického znázornění na Obr. 21, lze říci, že po 4 hodinách kultivace vykazovala inhibiční účinek na tuto gramnegativní bakterii pouze nejvyšší koncentrace polyanilinu, u které index růstu klesl na cca 46 %. Ve zbylých dvou koncentracích došlo ke zvýšení nárůstu buněk, který byl v porovnání s kontrolou asi o 10 % vyšší. U těchto koncentrací došlo tedy naopak k podpoře růstu buněk.



Obr. 21. Vliv koloidního polyanilinu na *Escherichia coli* CCM 3954 na růst buněk po 4 hodinách kultivace.

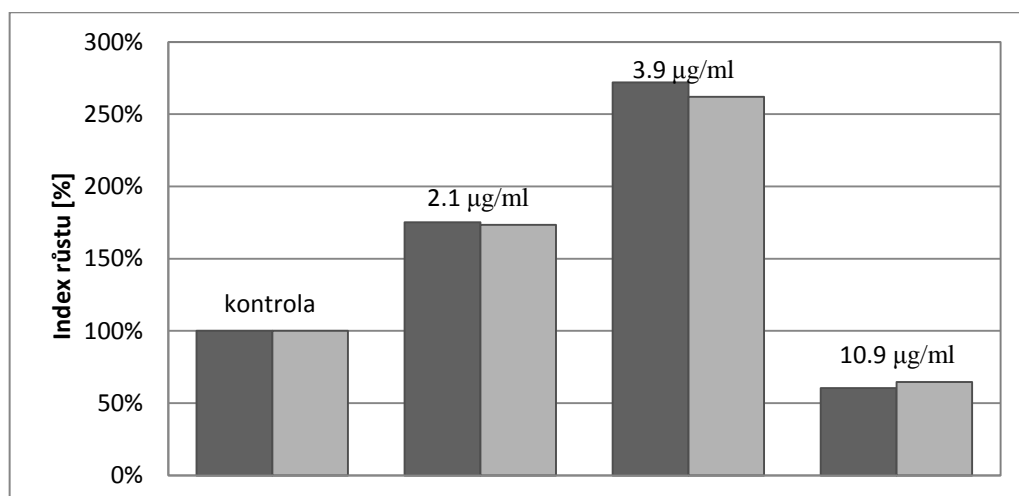
Po 8 hodinách kultivace byl nejvyšší inhibiční účinek polyanilinu na *Escherichia coli* CCM 3954 zaznamenán při koncentraci 10.9 µg/ml. V této koncentraci byl růst buněk redukován na 65 %. U zbylých dvou koncentrací pak hodnota indexu růstu neklesla pod 80 %.



Obr. 22. Vliv koloidního polyanilinu na *Escherichia coli* CCM 3954 na růst buněk po 8 hodinách kultivace.

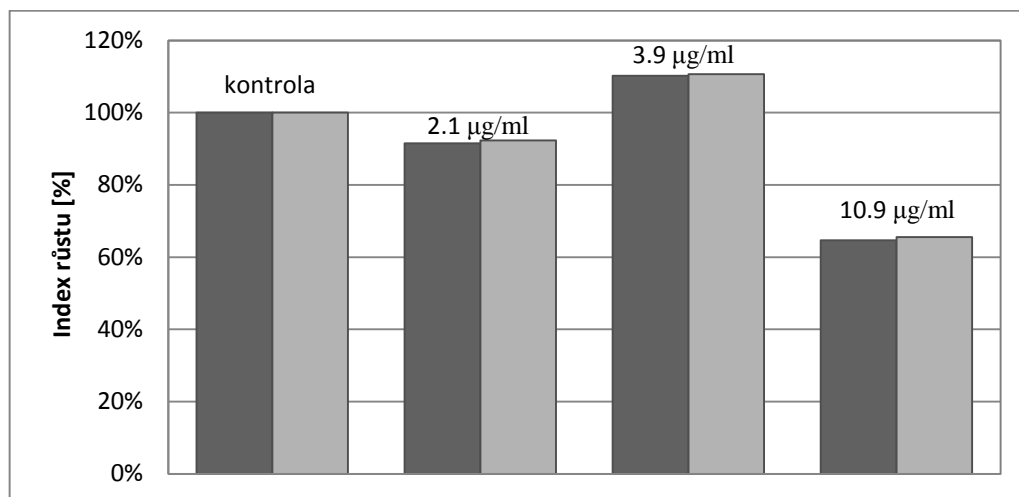
5.2.7 Vliv koloidního polyanilinu na růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

Další bakterie, na které byly testovány inhibiční účinky polyanilinu byla *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420. Po 4 hodinách kultivace byl v případě prvních dvou koncentrací polyanilinu pozorován u této bakterie signifikantní nárůst buněk. Opět lze říci, že měl polyanilin v těchto dvou koncentracích na růst buněk pozitivní vliv. Inhibičního účinku bylo dosaženo až při koncentraci 10.9 µg/ml, zde došlo k poklesu indexu růstu na 65 %.



Obr. 23. Vliv koloidního polyanilinu na *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 na růst buněk po 4 hodinách kultivace.

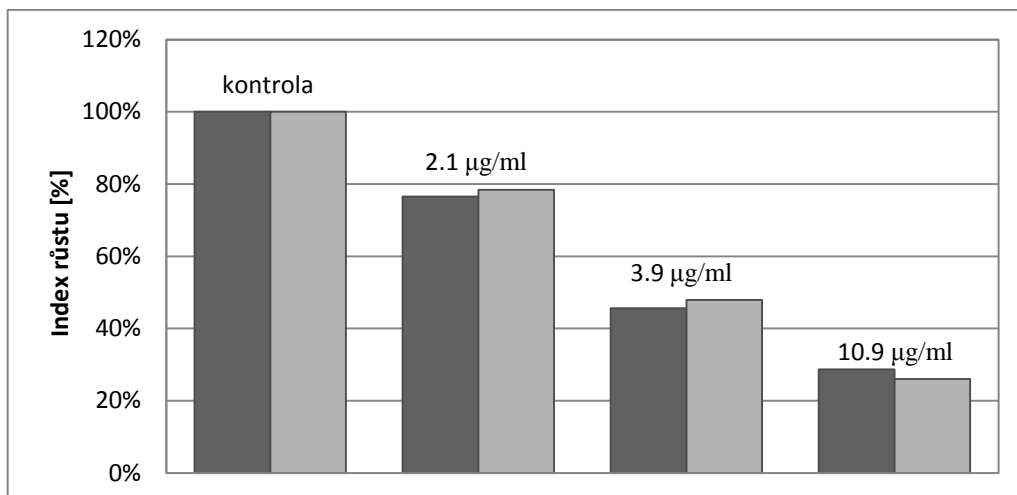
Výsledky stanovení inhibičních účinků polyanilinu na *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 po 8 hodinách kultivace jsou znázorněny na Obr. 24. Výraznější inhibiční efekt byl pozorován, obdobně jako v případě čtyřhodinové kultivace při koncentraci 10.9 µg/ml, kde bylo zaznamenáno snížení růstu na 68 %.



Obr. 24. Vliv koloidního polyanilinu na *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 na růst buněk po 8 hodinách kultivace.

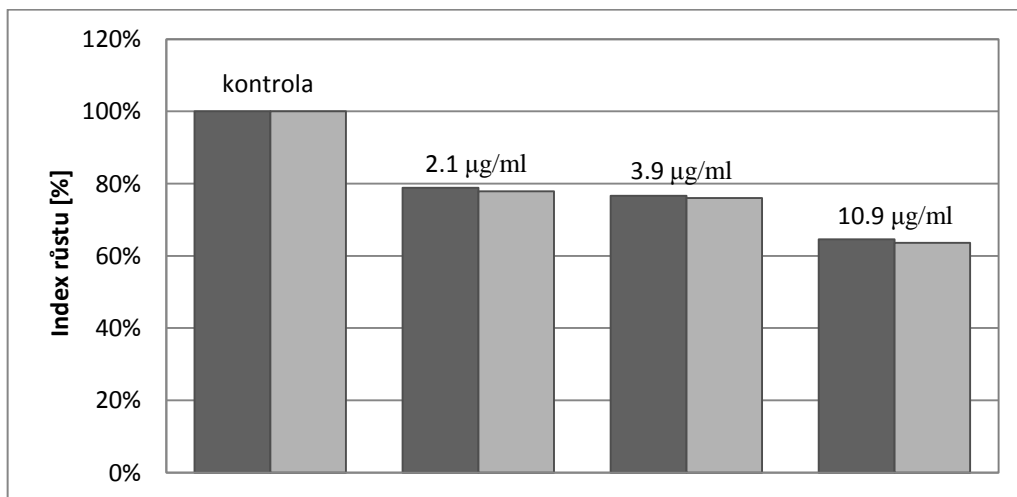
5.2.8 Vliv koloidního polyanilinu na růst *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303

Inhibiční účinky koloidního polyanilinu na růst *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303 jsou prezentovány po 4 hodinách kultivace na Obr. 25. Z grafu je patrné, že s rostoucí koncentrací polyanilinu docházelo i ke zvyšování inhibičního účinku k dané bakterii. Významný inhibičních účinků bylo dosaženo při koncentraci 10.9 µg/ml, kde došlo k poklesu indexu růstu na rozmezí 26-29 %.



Obr. 25. Vliv koloidního polyanilinu na *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303 na růst buněk po 4 hodinách kultivace.

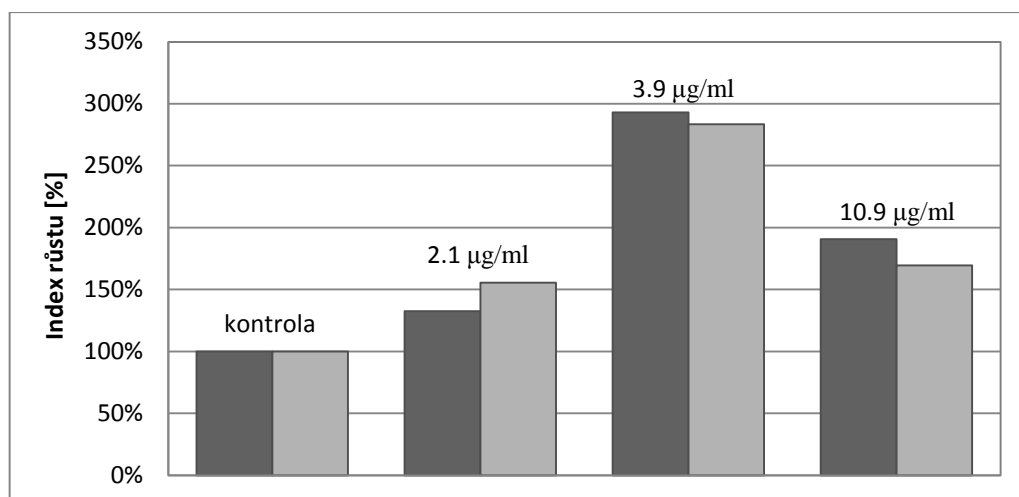
Inhibiční vliv koloidního polyanilinu po 8 hodinách kultivace je vyjádřený jako index růstu na Obr. 26. U žádné z použitých koncentrací polyanilinu nebyly zaznamenány výrazné inhibiční účinky na růst bakterií *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303, k redukci hustoty bakteriální suspenze došlo i v případě nejvyšší koncentrace polyanilinu pouze na 64 %.



Obr. 26. Vliv koloidního polyanilinu na *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303 na růst buněk po 8 hodinách kultivace.

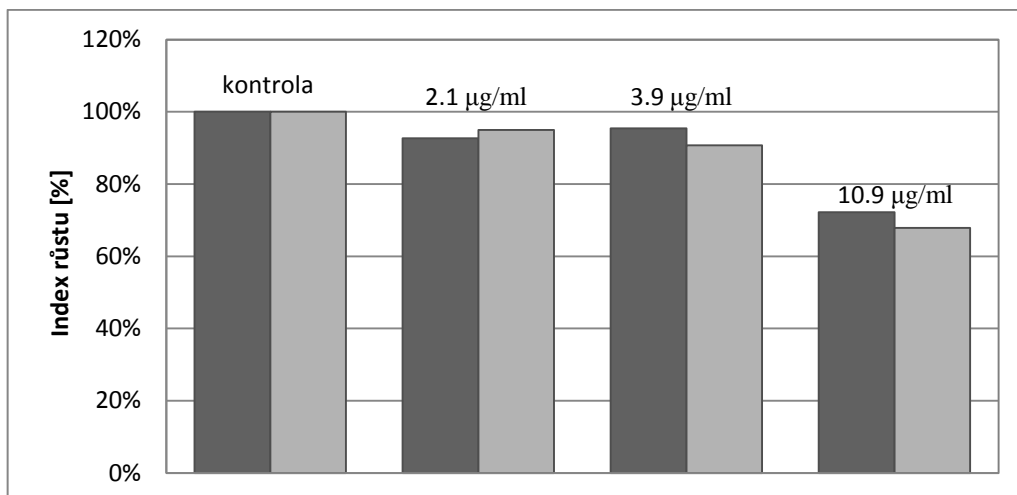
5.2.9 Vliv koloidního polyanilinu na růst *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798

Pro stanovení účinků testovaného koloidního polyanilinu na růst buněk *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798 byla zvolena stejná škála koncentrací jako u předchozích bakterií. U bakterie *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798, lze po 4 hodinách kultivace pozorovat signifikantní nárůst indexu růstu, oproti kontrole. Na růst tohoto kmenu bakterií má polyanilin opět stimulační vliv.



Obr. 27. Vliv koloidního polyanilinu na *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798 na růst buněk po 4 hodinách kultivace.

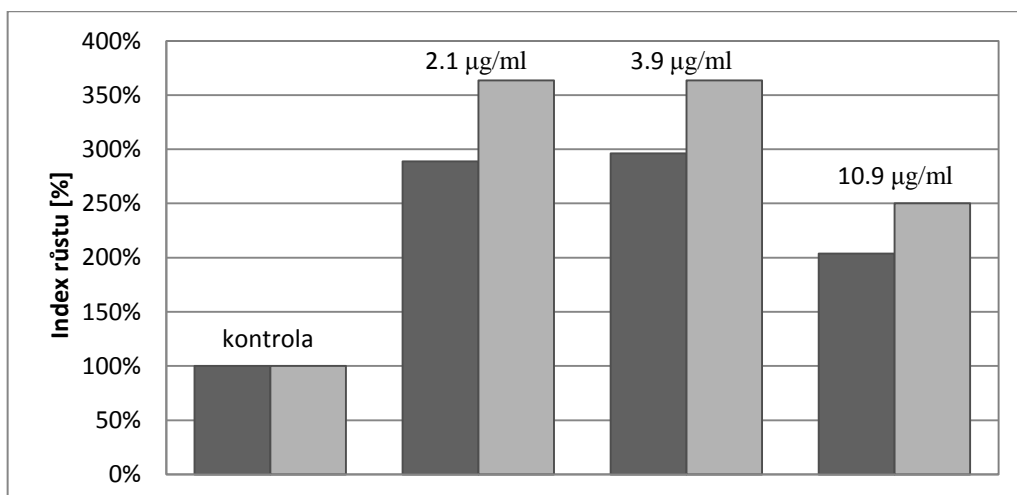
Na Obr. 28. můžeme pozorovat jaký vliv má polyanilin na růst gramnegativní bakterie *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798 po 8 hodinách kultivace. Zde u žádné z použitých koncentrací polyanilinu nebyly sledovány výrazné inhibiční účinky bránící růstu bakterie. Hodnoty indexu růstu klesly nejvýše na 68 %.



Obr. 28. Vliv koloidního polyanilinu na *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798 na růst buněk po 8 hodinách kultivace.

5.2.10 Vliv koloidního polyanilinu na růst *Proteus vulgaris*

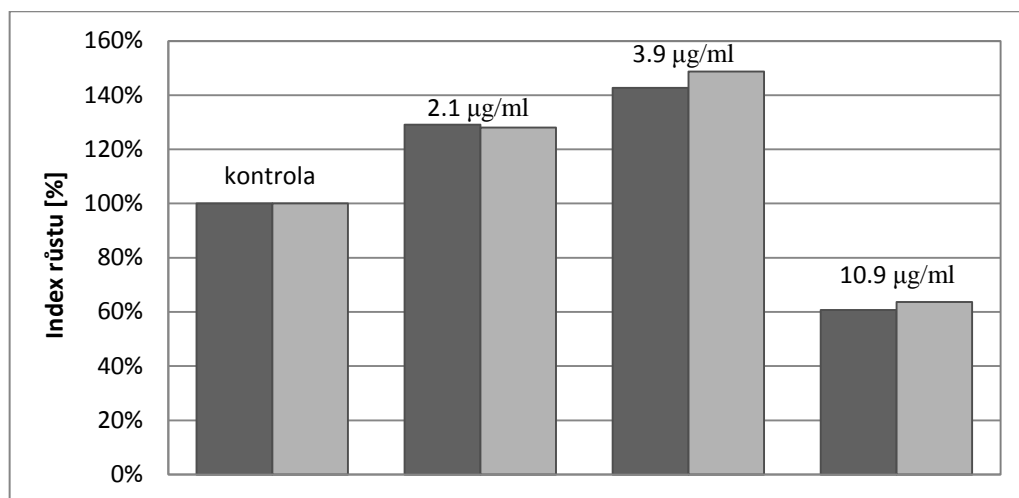
Stejně jako například u bakterie *Pseudomonas fluorescens* byl po 4 hodinách kultivace pozorován rapidní nárůst hodnot indexu růstu bakteriální suspenze *Proteus vulgaris*. Polyanilin by pro tento kmen bakterie spíše přínosný nežli, škodlivý a pro růst buněk vytvořil příznivé podmínky, viz Obr 29.



Obr. 29. Vliv koloidního polyanilinu na *Proteus vulgaris* na růst buněk po 4 hodinách kultivace.

Ovlivnění růstu buněk *Proteus vulgaris* polyanilinem je zobrazeno na Obr. 30. Po 8 hodinách kultivace, lze pozorovat, že u prvních dvou koncentrací polyanilinu došlo k patrnému

k růstu buněk v médiu. A zároveň u nejvyšší použité koncentrace byl růst buněk *Proteus vulgaris* redukován na 63 %.



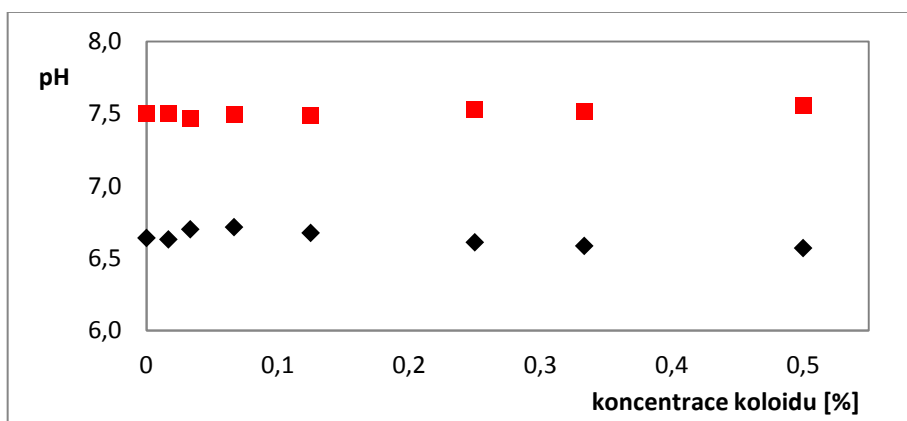
Obr. 30. Vliv koloidního polyanilinu na *Proteus vulgaris* na růst buněk po 8 hodinách kultivace.

Výše uvedené výsledky ukazují, že pokud dochází k částečné inhibici růstu bakterií působením polyanilinu, je většina bakteriálních kmenů nejlépe inhibována jeho nejvyšší studovanou koncentrací. Ta působí například částečnou inhibici růstu u bakterie *Enterococcus faecium*, kde redukuje růst buněk nejprve zcela a po delší kultivaci na 23 %. Naopak u některých bakterií je jejich růst přítomností polyanilinu spíše podporován. Příkladem je *Staphylococcus epidermidis* CCM 2798, u kterého nedošlo k poklesu hodnot růstu oproti kontrole ani po 8 hodinách kultivace.

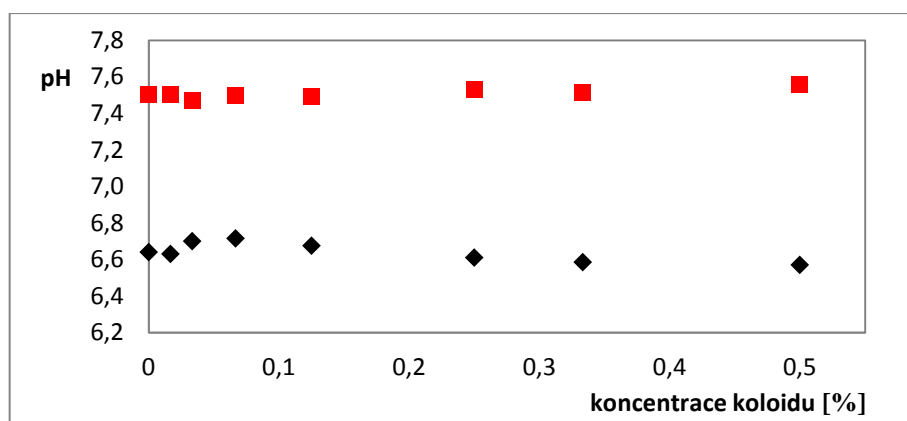
5.2.11 Změna barvy a pH

V průběhu testu antimikrobních vlastností bylo vizuálně pozorováno, že dochází k postupné změně barvy kultivačního média s polyanilinem v přítomnosti gram pozitivních i gram negativních bakterií. Jelikož je známo, že barva polyanilinu souvisí s jeho formou a závisí na pH, bylo přistoupeno k měření pH v mikrobiální suspenzi za přítomnosti i absence polyanilinu, a to před a po kultivaci buněk. Jak je v teoretické části bakalářské práce uvedeno, při změně pH z kyselé do zásadité oblasti dochází u polyanilinu k deprotonaci, kdy zelená vodivá forma polyanilinu přechází na formu modrou, která je nevodivá. Tato deprotonace by mohla nastat buď působením kultivačního média s neutrálním pH nebo působením vlastní bakteriální suspenze, jejíž pH se může během kultivace buněk měnit. Experi-

mentálně bylo zjištěno, že během kultivace skutečně dochází u všech mikroorganismů k nárůstu hodnoty pH a jako příklad byly vybrány dvě bakterie, *Escherichia coli* CCM 3954 a *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953. U gramnegativní bakterie *Escherichia coli* byla průměrná hodnota pH před kultivací 6.87 a po kultivaci se posunula na 8.19, tedy do oblasti zásadité (Obr. 31). U grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* byl pozorován obdobný efekt, a to vzrůst průměrné hodnoty pH z 6.64 na 7.51 během kultivace (Obr. 32). Naměřené hodnoty pH a jejich průměry pro jednotlivé suspenze bakterií, před a po kultivaci, jsou uvedeny v Příloze I-X této práce. Z obrázků je zároveň patrné, že změna pH je konstantní, není ovlivněna koncentrací polyanilinu v bakteriální suspenzi a je tedy výsledkem nárůstu bakteriálních buněk v médiu.

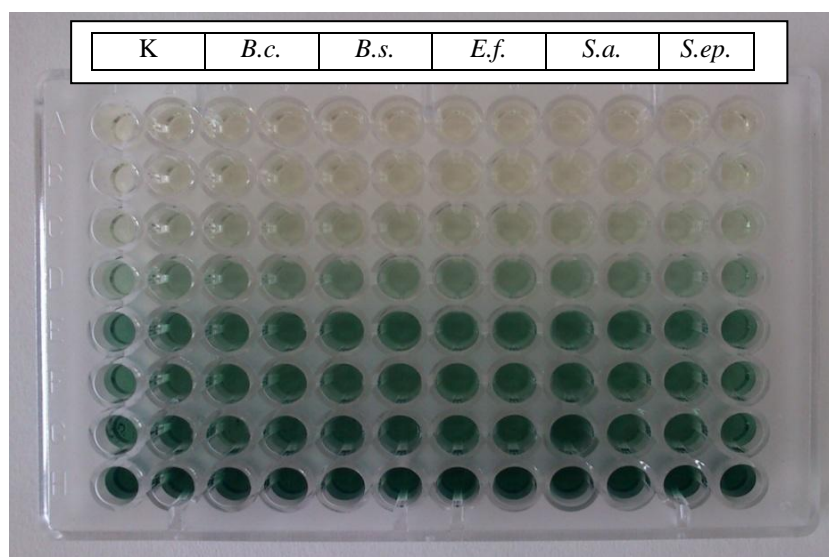


Obr. 31. *Escherichia coli*, hodnoty pH před kultivací jsou zobrazeny černě, hodnoty pH po kultivaci u jednotlivých roztoků jsou zobrazeny červeně.

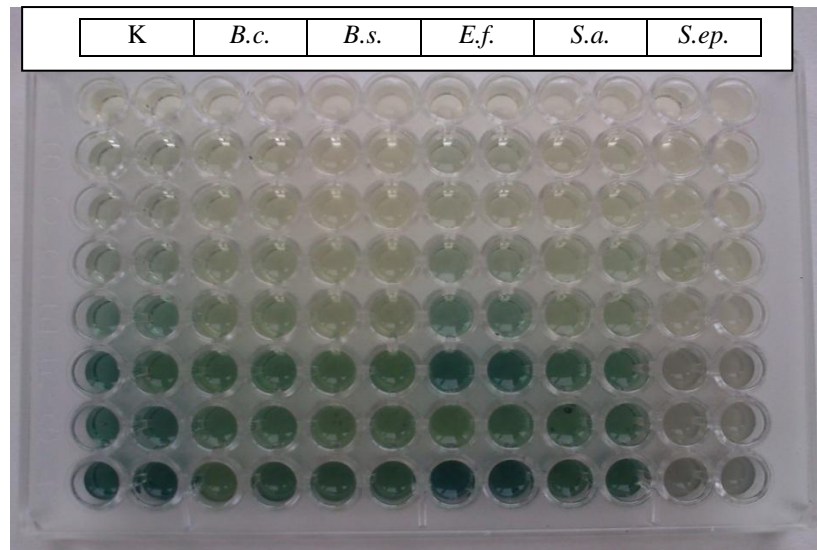


Obr. 32. *Staphylococcus aureus*, hodnoty pH před kultivací jsou zobrazeny černě, hodnoty pH po kultivaci u jednotlivých roztoků jsou zobrazeny červeně.

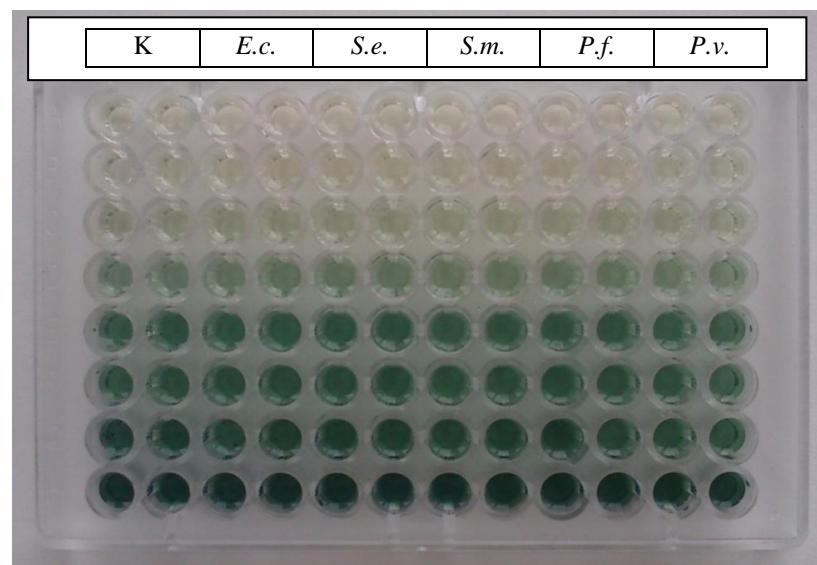
Barevná změna bakteriální suspenze je dokumentována na Obr. 33-36. Po 24 hodinách kultivace byly změny barvy bakteriální suspenze s polyanilinem, v porovnání se situací před kultivací a negativní kontrolou, u které ke změně barvy nedocházelo, jasně viditelné. Docházelo k zesvětlení, popř. k úplnému odbarvení původně zelené disperze, a to vlivem změny pH způsobené růstem/metabolickými produkty přítomných bakterií. Deprotonace, tedy změna barvy polyanilinu vlivem změny pH, je proces postupný a po 4 a 8 hodinách, kdy byly odečítány hodnoty absorbance pro stanovení antimikrobní účinnosti, nebyla tato změna tak patrná. Z důvodů nebezpečí kontaminace však byly fotografie na Obr. 33 až 36 pořízeny po 24 hodinách.



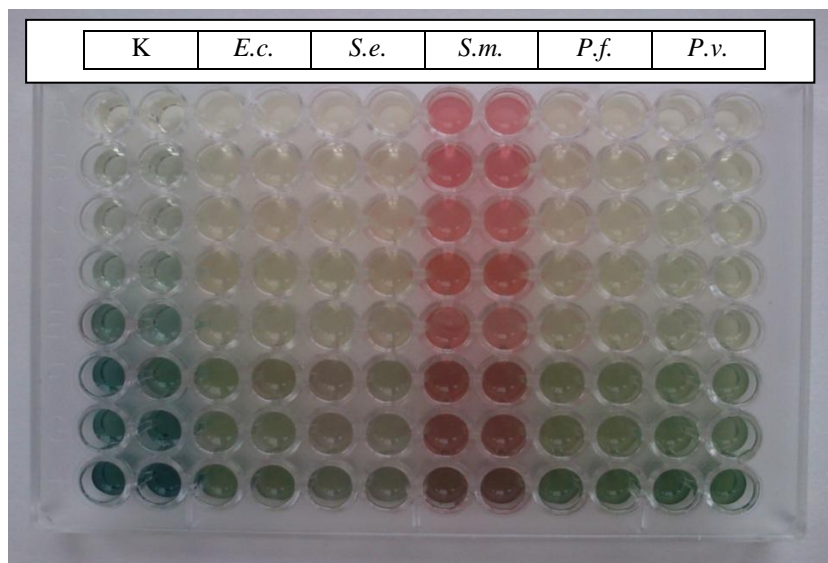
Obr. 33. Mikrotitrační destička zaočkována grampozitivními bakteriemi před kultivací. Význam zkratk v obrázku: K – kontrola, B.c. – *Bacillus cereus*, B.s. – *Bacillus subtilis*, E.f. – *Enterococcus faecium*, S.a. – *Staphylococcus aureus*, S.ep. – *Staphylococcus epidermidis*



Obr. 34. Mikrotitrační destička zaočkována grampozitivními bakteriemi po 24 hodinové inkubaci. Na obrázku je vidět barevná změna kultivačních médií s polyanilinem, způsobená přítomností bakterií. Význam zkratk, viz Obr. 33.



Obr. 35. Mikrotitrační destička zaočkována gramnegativními bakteriemi před kultivací. Význam zkratk v obrázku: K – kontrola, E.c. – *Escherichia coli*, S.e. – *Salmonella enterica*, S.m. – *Serratia marcescens*, P.f. – *Pseudomonas fluorescens*, P.v. – *Proteus vulgaris*

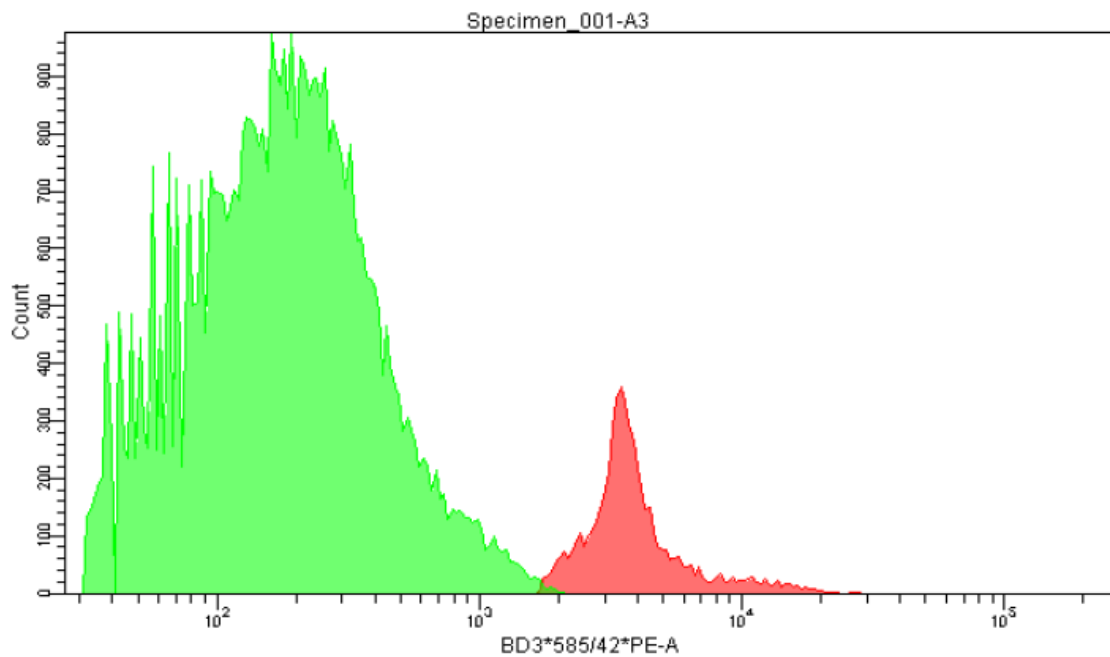


Obr. 36. Mikrotitrační destička zaočkována grampozitivními bakteriemi po 24 hodinové inkubaci. Na obrázku je znatelná barevná změna kultivačních médií s polyanilinem, která byla způsobena přítomností bakterií. Význam zkratk, viz Obr. 36.

Diskutovaná změna barvy roztoků polyanilinu způsobená změnou pH vyvolanou přítomností bakterií je hlavním důvodem, proč nelze absorpcí roztoků spolehlivě odečíst. Z tohoto důvodu nemá použitá mikrodiluční metoda jednoznačnou vypovídací schopnost o antimikrobní účinnosti koloidního polyanilinu, i když indikuje, že polyanilin v testovaných koncentracích jistou účinnost vykazuje. Z tohoto důvodu byla provedena analýza bakteriálních suspenzí kultivovaných v přítomnosti polyanilinu pomocí metody průtokové cytometrie.

5.2.12 Průtoková cytometrie

Testování antimikrobního efektu bylo dále doplněno analýzou vzorků pomocí průtokové cytometrie provedenou na průtokovém cytometru BD FACSCanto II (BD Biosciences). Tato metoda je schopná rozlišit živé a mrtvé buňky. Jako příklad jsou uvedeny výsledky pro *Escherichia coli* CCM 3954 (Obr. 37), která byla před stanovením inkubována 24 hodin v kultivačním médiu s příslušnou koncentrací polyanilinu. Na Obr. 37 je patrná přítomnost dvou populací bakteriálních buněk, z nichž první populaci tvoří buňky živé a druhou populaci tvoří buňky mrtvé. Je tedy zřejmé, že ne všechny bakteriální buňky byly usmrceny, čímž je opět potvrzeno, že v těchto koncentracích má přítomný polyanilin pouze bakteriostatické účinky.



Obr. 37. Bakterie *Escherichia coli* histogram. Zelená oblast zobrazuje přítomnost živých buněk, červená oblast zobrazuje přítomnost mrtvých buněk po inkubaci v přítomnosti polyanilinu.

ZÁVĚR

Cílem předložené bakalářské práce bylo provést charakterizaci koloidní disperze polyanilinu a ověřit, zda je mikrodiluční metoda vhodnou metodikou pro stanovení vlivu tohoto koloidu na růst gramnegativních a grampozitivních bakterií.

V teoretické části práce byl nejprve představen polyanilin, u kterého byla podrobněji popsána jeho koloidní forma. V další části byla charakterizována skupina vybraných grampozitivních a gramnegativních bakterií a byly shrnuty antimikrobní vlastnosti polyanilinu v jeho běžné, práškové formě.

V praktické části byla nejprve provedena základní charakterizace koloidního polyanilinu pomocí fotonové korelační spektroskopie (PCS) a UV spektroskopie. Průměrná velikost disperzních částic koloidu určená pomocí PCS byla 225 ± 0.5 nm a tyto částice měly úzkou distribuci velikostí s indexem polydisperzity 0.145 ± 0.004 . Stanovené UV-VIS spektrum odpovídalo spektrům publikovaným v literatuře a vykazovalo dvě charakteristické maxima, z nichž první bylo detekováno v oblasti 350-400 nm a druhé v oblasti 800 nm.

Na základě Lambert-Beerova zákona byla rovněž stanovena koncentrace polyanilinu v koloidu a byla sestrojena kalibrační přímka pro přepočítání pipetovaného objemu koloidu (resp. jeho koncentrace) na koncentraci polymerního polyanilinu. Vytvořená kalibrační přímka může být k tomuto účelu použita i při další práci.

Vzhledem k spektroskopickému stanovení, které mikrodiluční metoda využívá pro detekci růstu bakteriálních buněk, byl pro ověření antimikrobních účinků studovaného vzorku použit pouze limitovaný rozsah koncentrací polyanilinu od 2.1 µg/ml do 85.6 g/ml.

Během experimentálních prací bylo zjištěno, že v přítomnosti bakteriální suspenze dochází ke změně barvy polyanilinového koloidu. Tu lze vysvětlit zvýšením hodnoty pH bakteriální suspenze, ke kterému dochází během kultivace. Změna barvy polyanilinu je důvodem, proč nelze zcela správně odečíst hodnoty absorbance a náležitě provést mikrodiluční metodu. Přesto výsledky sledování antimikrobní účinnosti polyanilinové disperze ukazují, že v testovaném rozsahu koncentrací mají vzorky antimikrobní účinky, které jsou však pouze bakteriostatické, nikoliv bakteriocidní. Tuto skutečnost potvrdila i průtoková cytometrie, kde je vedle populace živých buněk zřetelně vidět i populace buněk mrtvých.

Závěrem lze konstatovat, že testovaná mikrodiluční metoda není vhodnou metodou pro stanovení antimikrobních vlastností polyanilinu. Rovněž bylo zjištěno, že v použitých koncentracích působí polyanilin pouze bakteriostaticky, nikoliv bakteriocidně.

Pro jednoznačné stanovení antimikrobních účinků polyanilinové disperze je tedy zapotřebí provést další experimenty, kde budou jednak použity vyšší koncentrace polyanilinu a jednak bude aplikována i jiná metoda, která nebude ovlivněna změnou barvy polyanilinové disperze, například metoda difuzní.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] STEJSKAL, Jaroslav. Polyanilin: vodivý polymer. *Otevřená věda* [online]. [cit. 2012.12.08] Dostupné z: <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/NH2006pdf/16.pdf>
- [2] PROKEŠ, Jan, Jaroslav STEJSKAL, Mária OMASTOVÁ. Polyanilin a polypyrrol – dva představitelé vodivých polymerů. *Chemické listy*. 2001, roč. 95, s. 484-492. ISSN: 0009-2770.
- [3] PROKEŠ, Jan, Stanislav NEŠPŮREK, Jaroslav STEJSKAL. Vodivé polymery: Inteligentní materiály pro nové století. *Vesmír*. 2001, roč. 80, s. 35-38.
- [4] HUMPOLÍČEK, Petr, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Jaroslav STEJSKAL, Zdenka KUČEKOVÁ a Petra ŠEVČÍKOVÁ. Proliferace buněk na vodivém polymeru, polyanilinu. *Chemické listy*. 2012, roč. 106, s. 380-383. ISSN: 0009-2770.
- [5] STEJSKAL, Jaroslav a Irina SAPURNINA. Polyaniline: Thin films and colloidal dispersions (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*. 2005, roč. 77, č. 5, s. 815-826. DOI: 10.1351/pac200577050815.
- [6] BUŇKOVÁ, Leona a Magda DOLEŽALOVÁ. *Obecná mikrobiologie*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007, s. 190. ISBN 978 – 80 – 7318 – 516 – 9.
- [7] RŮŽIČKA, Jan. *Mikrobiologie pro technology životního prostředí*. Brno, Zlín: VUT v Brně, Zlíně, 1999, 124 s. ISBN 80-214-1374-3.
- [8] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007, 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- [9] Miniatlask mikroorganismů. *Bacillus cereus* [online]. [cit. 2013-03-21]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/bac-cer.htm>
- [10] Miniatlask mikroorganismů. *Bacillus subtilis* [online]. [cit. 2013-03-21]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/bac-sub.htm>
- [11] Miniatlask mikroorganismů. *Enterococcus faecium* [online]. [cit. 2013-03-21]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/ent-fm.htm>
- [12] Miniatlask mikroorganismů. *Staphylococcus aureus* [online]. [cit. 2013-03-21]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/staph-au.htm>

- [13] MiniAtlas mikroorganismů. *Staphylococcus epidermidis* [online]. [cit. 2013-03-21]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniAtlas/staph-epi.htm>
- [14] MiniAtlas mikroorganismů. *Escherichia coli* [online]. [cit. 2013-03-21]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniAtlas/esch.htm>
- [15] MiniAtlas mikroorganismů. *Proteus vulgaris* [online]. [cit. 2013-03-21]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniAtlas/prot.htm>
- [16] MiniAtlas mikroorganismů. *Pseudomonas fluorescens* [online]. [cit. 2013-03-21]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniAtlas/pseu.htm>
- [17] MiniAtlas mikroorganismů. *Salmonella enterica* [online]. [cit. 2013-03-21]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniAtlas/salm.htm>
- [18] MiniAtlas mikroorganismů. *Serratia marcescens* [online]. [cit. 2013-03-21]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniAtlas/serr.htm>
- [19] SESHADRI, D. T., N.T. BHAT. Use of polyaniline as an antimicrobial agent in textiles. *Indian Journal of Fibre & Textile Research*. (2005), roč. 30, s. 204–206. WOS:000230542900014.
- [20] SHI, N. L., X. M. GUO, H. M. JING, J. GONG, C. SUN a K. YANG. Antibacterial effect of the conducting polyaniline. *Journal of Materials Science and Technology*. 2006, roč. 22, s. 289–290. WOS:000238133800001.
- [21] GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, M. R., J. R. BENNETT, S. SWIFT, A. J. EASTEAL, a M. AMBROSE. Broad spectrum antimicrobial activity of functionalized polyanilines. *Acta Biomaterialia*. 2011, roč. 7, s. 4204–4209. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.07.018.
- [22] GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, M. R., J. R. BENNETT, Z. ZUJOVIC, S. SWIFT S a G. A. BROWMAKER. Characterization and antimicrobial efficacy of acetone extracted aniline. *Synthetic Metals*. 2012, roč. 162, s. 1114–1119. DOI: 10.1016/j.synthmet.2011.04.031.
- [23] HUMPOLÍČEK, Petr, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Zdenka KUČEKOVÁ, Petra ŠEVČÍKOVÁ a Jaroslav STEJSKAL. Antibacterial properties of polyaniline-silver films. V tisku *Chemical Papers*. DOI: 10.2478/s11696-013-0385-x.

- [24] STEJSKAL, Jaroslav, P. KRATOCHVÍL, N. RDHAKRISHNAN. Polyaniline dispersions 2. UV-Vis absorption spectra. *Synthetic Metals*. 1993, roč. 61, s. 225-231. ISSN: 0379-6779.
- [25] Buňková, Leona et. al. Comparison of antibacterial effect of seven 1-monoglycerides on food-borne pathogens or spoilage bacteria. *Acta Veterinaria*. 2011, roč. 80, s. 29-39. DOI: 10.2754/avb201180010029.
- [26] KŘÍŽOVÁ, P. *Příprava stabilních mikroemulzí 1-monoacylglycerolů a antimikrobiálními účinky*. Zlín, 2011. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Technologická fakulta, Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky. Vedoucí práce doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HCl	kyselina chlorovodíková.
MPA	masopeptonový agar.
MPB	masopeptonový bujón.
PCS	fotonová korelační spektroskopie.
PCA	Plate count agar.
MAG	monoacylglycerol
PVP	polyvinylpyrolidon
B.c.	<i>Bacillus cereus</i>
B.s.	<i>Bacillus cereus</i>
E.f	<i>Enterococcus faecium</i>
P.f.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
P.v.	<i>Proteus vulgaris</i>
S.e.	<i>Salmonella enterica</i>
S.m.	<i>Serratia marcescens</i>
S.a.	<i>Staphylococcus aureus</i>
S.ep.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Nejdůležitější vodivé polymery</i>	12
<i>Obr. 2. Formy polyanilinu: základní stabilní formou polyanilinu je emeraldin, který může být oxidován na pernigranilin nebo redukován na leukoemeraldin.</i>	14
<i>Obr. 3. Morfologie polyanilinu: granulární podoba v pravo, nanotrubky v levo. [1]</i>	15
<i>Obr. 4. Rovnice oxidace polyanilinu</i>	16
<i>Obr. 5. Vznik koloidní částice polyanilinu: a) anilinové oligomery se adsorbují na řetězce stabilizátoru, b) dochází k růstu polyanilinového řetězce a k vytvoření jádra, c) nové oligomery a polyanilinové řetězce vznikají v blízkosti jádra. Koloidní částice roste. [5]</i>	17
<i>Obr. 6. Optická spektra koloidního polyanilinu. [5]</i>	18
<i>Obr. 7. Distribuce velikostí částic koloidního polyanilinu</i>	31
<i>Obr. 8. Absorpční spektrum polyanilinové disperze v 1 M HCl</i>	32
<i>Obr. 9. Kalibrační přímka. Závislost koncentrace polyanilinu v roztoku</i>	33
<i>Obr. 10. Index růstu bakterie Escherichia coli CCM 3954 v závislosti na zvyšující se koncentraci polyanilinu</i>	34
<i>Obr. 11. Vliv koloidního polyanilinu na Bacillus cereus CCM 2010 na růst</i>	35
<i>Obr. 12. Vliv koloidního polyanilinu na Bacillus cereus CCM 2010 na růst buněk po 8 hodinách kultivace. (pozn. pro koncentraci 3.9 µg/ml nebylo provedeno druhé měření)</i>	36
<i>Obr. 13. Vliv koloidního polyanilinu na Bacillus subtilis subsp. spizizenii CCM 4062 na růst buněk po 4 hodinách kultivace.</i>	37
<i>Obr. 14. Vliv koloidního polyanilinu na Bacillus subtilis subsp. spizizenii CCM 4062 na růst buněk po 8 hodinách kultivace.</i>	37
<i>Obr. 15. Vliv koloidního polyanilinu na Enterococcus faecium na růst buněk</i>	38
<i>Obr. 16. Vliv koloidního polyanilinu na Enterococcus faecium na růst buněk po 8 hodinách kultivace. (pozn. pro koncentraci 2.1 µg/ml nebylo provedeno druhé měření)</i>	39
<i>Obr. 17. Vliv koloidního polyanilinu na Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	39
<i>Obr. 18. Vliv koloidního polyanilinu na Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	40
<i>Obr. 19. Vliv koloidního polyanilinu na Staphylococcus epidermidis na růst buněk po 4 hodinách kultivace.</i>	41
<i>Obr. 20. Vliv koloidního polyanilinu na Staphylococcus epidermidis na růst</i>	41

Obr. 21. Vliv koloidního polyanilinu na <i>Escherichia coli</i> CCM 3954 na růst	42
Obr. 22. Vliv koloidního polyanilinu na <i>Escherichia coli</i> CCM 3954 na růst	43
Obr. 23. Vliv koloidního polyanilinu na <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	43
Obr. 24. Vliv koloidního polyanilinu na <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	44
Obr. 25. Vliv koloidního polyanilinu na <i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	45
Obr. 26. Vliv koloidního polyanilinu na <i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	45
Obr. 27. Vliv koloidního polyanilinu na <i>Pseudomonas fluorescens</i> CCM 2798 na růst buněk po 4 hodinách kultivace.	46
Obr. 28. Vliv koloidního polyanilinu na <i>Pseudomonas fluorescens</i> CCM 2798	47
Obr. 29. Vliv koloidního polyanilinu na <i>Proteus vulgaris</i> na růst buněk	47
Obr. 30. Vliv koloidního polyanilinu na <i>Proteus vulgaris</i> na růst buněk	48
Obr. 31. <i>Escherichia coli</i> , hodnoty pH před kultivací jsou zobrazeny černě,	49
Obr. 32. <i>Staphylococcus aureus</i> , hodnoty pH před kultivací jsou zobrazeny	49
Obr. 33. Mikrotitrační destička zaočkována grampozitivními bakteriemi před kultivací. Význam zkratk v obrázku: K – kontrola, B.c. – <i>Bacillus cereus</i> , B.s. – <i>Bacillus subtilis</i> , E.f. – <i>Enterococcus faecium</i> , S.a. – <i>Staphylococcus aureus</i> , S.ep. – <i>Staphylococcus epidermidis</i>	50
Obr. 34. Mikrotitrační destička zaočkována grampozitivními bakteriemi po 24 hodinové inkubaci. Na obrázku je vidět barevná změna kultivačních médií s polyanilinem, způsobená přítomností bakterií. Význam zkratk, viz Obr.33.	50
Obr. 35. Mikrotitrační destička zaočkována gramnegativními bakteriemi před kultivací. Význam zkratk v obrázku: K – kontrola, E.c. – <i>Escherichia coli</i> , S.e. – <i>Salmonella enterica</i> , S.m. – <i>Serratia marcescens</i> , P.f. – <i>Pseudomonas fluorescens</i> , P.v. – <i>Proteus vulgaris</i>	51
Obr. 36. Mikrotitrační destička zaočkována grampozitivními bakteriemi po 24 hodinové inkubaci. Na obrázku je znatelná barevná změna kultivačních médií s polyanilinem, která byla způsobena přítomností bakterií. Význam zkratk, viz Obr. 36.	52
Obr. 37. Bakterie <i>Escherichia coli</i> histogram. Zelená oblast zobrazuje přítomnost živých buněk, červená oblast zobrazuje přítomnost mrtvých buněk po inkubaci v přítomnosti polyanilinu.	53

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Hodnoty velikosti částic vyjádřené jako z-průměr v nm a indexu polydisperzity a jejich směrodatné odchylky σ částic koloidního polyanilinu.....	30
Tab. 2. Hodnoty absorbancí pro vzorky koloidu, jejich koncentrace a odpovídající koncentrace polyanilinu v koloidu.....	33

SEZNAM PŘÍLOH

PI: Zaznamenané změny pH u *Bacillus cereus* CCM 2010

PI A: Naměřené hodnoty při prvním měření *Bacillus cereus* CCM 2010

<i>C_{polyanilinu}</i> [μg/ml]	Před kultivací			Po 24 hodinové kultivaci		
	pH ₁	pH ₂	průměr	pH ₁	pH ₂	průměr
0	6.80	6.78	6.79	7.28	7.33	7.31
2.1	6.85	6.85	6.85	7.30	7.44	7.37
3.9	6.91	6.88	6.90	7.31	7.34	7.33
10.9	6.88	6.85	6.87	7.28	7.30	7.29
20.4	6.89	6.85	6.87	7.26	7.35	7.31
42.6	6.85	6.82	6.84	7.27	7.31	7.29
56.8	6.95	6.94	6.95	7.25	7.33	7.29
85.7	6.91	6.94	6.93	7.21	7.26	7.24

PI B: Naměřené hodnoty při druhém měření *Bacillus cereus* CCM 2010

<i>C_{polyanilinu}</i> [μg/ml]	Před kultivací			Po 24 hodinové kultivaci		
	pH ₁	pH ₂	průměr	pH ₁	pH ₂	průměr
0	6.64	6.58	6.61	7.06	7.22	7.14
2.1	6.69	6.68	6.69	6.91	7.05	6.98
3.9	6.70	6.67	6.69	6.77	6.94	6.86
10.9	6.69	6.69	6.69	6.85	7.05	6.95
20.4	6.65	6.63	6.64	6.90	7.09	7.00
42.6	6.59	6.53	6.56	6.92	6.99	6.96
56.8	6.53	6.53	6.53	6.97	7.02	7.00
85.7	6.58	6.55	6.57	7.27	7.15	7.21

PII: Zaznamenané změny pH u *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062

PII A: Naměřené hodnoty při prvním měření *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062

<i>C</i> _{polyanilinu} [μg/ml]	Před kultivací			Po 24 hodinové kultivaci		
	pH ₁	pH ₂	průměr	pH ₁	pH ₂	průměr
0	6.85	6.90	6.88	8.08	8.10	8.09
2.1	6.93	6.95	6.94	8.02	7.99	8.01
3.9	6.85	6.91	6.88	8.01	8.05	8.03
10.9	6.86	6.86	6.86	7.41	8.00	7.71
20.4	6.87	6.85	6.86	7.99	8.02	8.01
42.6	6.80	6.83	6.82	7.36	8.02	7.69
56.8	6.87	6.83	6.85	7.96	7.97	7.97
85.7	6.81	6.81	6.81	7.73	7.78	7.76

PII B: Naměřené hodnoty při prvním měření *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062

<i>C</i> _{polyanilinu} [μg/ml]	Před kultivací			Po 24 hodinové kultivaci		
	pH ₁	pH ₂	průměr	pH ₁	pH ₂	průměr
0	6.69	6.62	6.66	8.14	8.13	8.14
2.1	6.62	6.64	6.63	8.02	8.09	8.06
3.9	6.78	6.73	6.76	7.95	8.05	8.00
10.9	6.77	6.73	6.75	8.06	8.02	8.04
20.4	6.70	6.69	6.70	8.06	8.09	8.08
42.6	6.65	6.63	6.64	7.85	7.89	7.87
56.8	6.59	6.56	6.58	8.05	8.02	8.04
85.7	6.20	6.60	6.40	7.87	8.06	7.97

PIII: Zaznamenané změny pH u *Enterococcus faecium* CCM

<i>C</i> _{polyanilinu} [μg/ml]	Před kultivací			Po 24 hodinové kultivaci		
	pH ₁	pH ₂	průměr	pH ₁	pH ₂	průměr
0	6.61	6.61	6.61	7.23	7.10	7.17
2.1	6.67	6.67	6.67	7.21	7.07	7.14
3.9	6.71	6.70	6.71	7.12	7.03	7.08
10.9	6.72	6.69	6.71	7.12	7.00	7.06
20.4	6.71	6.68	6.70	7.05	6.95	7.00
42.6	6.64	6.61	6.63	7.08	6.98	7.03
56.8	6.59	6.53	6.56	7.73	7.31	7.52
85.7	6.59	6.58	6.59	7.11	7.05	7.08

PIV: Zaznamenané změny pH u *Escherichia coli* CCM 3954

PIV A: Naměřené hodnoty při prvním měření *Escherichia coli* CCM 3954

$c_{\text{polyanilinu}}$ [$\mu\text{g/ml}$]	Před kultivací			Po 24 hodinové kultivaci		
	pH ₁	pH ₂	průměr	pH ₁	pH ₂	průměr
0	6.81	6.79	6.80	8.06	8.10	8.08
2.1	6.92	6.85	6.89	8.02	8.03	8.03
3.9	7.01	7.05	7.03	8.06	8.08	8.07
10.9	6.86	6.82	6.84	8.04	8.13	8.09
20.4	6.86	6.87	6.87	8.14	8.17	8.16
42.6	6.89	6.89	6.89	8.14	8.14	8.14
56.8	6.92	6.86	6.89	8.16	8.26	8.21
85.7	6.87	6.81	6.84	8.15	8.14	8.15

PIV B: Naměřené hodnoty při prvním měření *Escherichia coli* CCM 3954

$c_{\text{polyanilinu}}$ [$\mu\text{g/ml}$]	Před kultivací			Po 24 hodinové kultivaci		
	pH ₁	pH ₂	průměr	pH ₁	pH ₂	průměr
0	6.82	6.83	6.83	8.16	8.21	8.19
2.1	6.93	6.91	6.92	8.22	8.24	8.23
3.9	6.87	6.86	6.87	8.19	8.16	8.18
10.9	6.88	6.89	6.89	8.14	8.20	8.17
20.4	6.84	6.85	6.85	8.16	8.22	8.19
42.6	6.85	6.85	6.85	8.17	8.19	8.18
56.8	6.86	6.88	6.87	8.17	8.24	8.21
85.7	6.91	6.89	6.90	8.20	8.21	8.21

PV: Zaznamenané změny pH u *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798

PV A: Naměřené hodnoty při prvním měření *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798

$c_{\text{polyanilinu}}$ [$\mu\text{g/ml}$]	Před kultivací			Po 24 hodinové kultivaci		
	pH ₁	pH ₂	průměr	pH ₁	pH ₂	průměr
0	6.91	6.89	6.90	8.19	8.25	8.22
2.1	6.91	6.91	6.91	8.28	8.19	8.24
3.9	7.01	7.04	7.03	8.24	8.22	8.23
10.9	6.91	6.88	6.90	8.27	8.31	8.29
20.4	6.87	6.85	6.86	8.25	8.22	8.24
42.6	6.84	6.84	6.84	8.27	8.25	8.26
56.8	6.82	6.84	6.83	8.25	8.28	8.27
85.7	6.80	6.78	6.79	8.26	8.26	8.26

PV B: Naměřené hodnoty při prvním měření *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798

C_{polyanilinu} [μg/ml]	Před kultivací			Po 24 hodinové kultivaci		
	pH₁	pH₂	průměr	pH₁	pH₂	průměr
0	6.91	6.91	6.91	8.25	8.27	8.26
2.1	6.89	6.90	6.90	8.21	8.19	8.20
3.9	6.87	6.87	6.87	8.19	8.19	8.19
10.9	6.88	6.86	6.87	8.17	8.20	8.19
20.4	6.92	6.89	6.91	8.18	8.18	8.18
42.6	6.82	6.84	6.83	8.19	8.16	8.18
56.8	6.85	6.84	6.85	8.21	8.19	8.20
85.7	6.92	6.91	6.92	8.22	8.23	8.23

PVI: Zaznamenané změny pH u *Proteus vulgaris* CCM**PVI A: Naměřené hodnoty při prvním měření *Proteus vulgaris* CCM**

C_{polyanilinu} [μg/ml]	Před kultivací			Po 24 hodinové kultivaci		
	pH₁	pH₂	průměr	pH₁	pH₂	průměr
0	6.81	6.77	6.79	8.10	8.11	8.11
2.1	6.85	6.80	6.83	7.93	7.96	7.95
3.9	6.96	6.95	6.96	7.92	7.94	7.93
10.9	6.89	6.89	6.89	7.98	8.19	8.09
20.4	6.89	6.87	6.88	8.19	8.13	8.16
42.6	6.82	6.85	6.84	8.23	8.17	8.20
56.8	6.81	6.81	6.81	8.25	8.25	8.25
85.7	6.82	6.88	6.85	8.26	8.25	8.26

PVI B: Naměřené hodnoty při prvním měření *Proteus vulgaris* CCM

C_{polyanilinu} [μg/ml]	Před kultivací			Po 24 hodinové kultivaci		
	pH₁	pH₂	průměr	pH₁	pH₂	průměr
0	6.87	6.89	6.88	7.87	7.81	7.84
2.1	6.84	6.79	6.82	7.72	7.90	7.81
3.9	6.85	6.83	6.84	7.78	7.74	7.76
10.9	6.89	6.93	6.91	7.73	7.72	7.73
20.4	6.82	6.87	6.85	7.73	7.71	7.72
42.6	6.87	6.88	6.88	7.68	7.71	7.70
56.8	6.92	6.91	6.92	7.78	7.69	7.74
85.7	6.87	6.85	6.86	7.72	7.73	7.73

PVII: Zaznamenané změny pH u *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

PVII A: Naměřené hodnoty při prvním měření *Salmonella enterica* subsp. ser. Enteritidis CCM 4420

C_{polyanilinu} [μg/ml]	Před kultivací			Po 24 hodinové kultivaci		
	pH₁	pH₂	průměr	pH₁	pH₂	průměr
0	6.89	6.84	6.87	8.32	8.38	8.35
2.1	6.88	6.88	6.88	8.30	8.36	8.33
3.9	6.98	7.02	7.00	8.25	8.24	8.25
10.9	6.89	6.90	6.90	8.25	8.24	8.25
20.4	6.97	9.90	8.44	8.22	8.28	8.25
42.6	6.89	6.88	6.89	8.24	8.30	8.27
56.8	6.85	6.85	6.85	8.26	8.34	8.30
85.7	6.88	6.81	6.85	8.22	8.36	8.29

PVII B: Naměřené hodnoty při prvním měření *Salmonella enterica* subsp. ser. Enteritidis CCM 4420

C_{polyanilinu} [μg/ml]	Před kultivací			Po 24 hodinové kultivaci		
	pH₁	pH₂	průměr	pH₁	pH₂	průměr
0	6.88	6.84	6.86	8.23	8.23	8.23
2.1	6.83	6.91	6.87	8.11	8.20	8.16
3.9	6.92	6.64	6.78	8.03	8.06	8.05
10.9	6.92	6.96	6.94	7.90	8.03	7.97
20.4	6.95	6.89	6.92	8.02	7.99	8.01
42.6	6.87	6.91	6.89	8.05	8.11	8.08
56.8	6.98	7.01	7.00	8.05	8.05	8.05
85.7	6.95	6.97	6.96	7.95	8.03	7.99

PVIII: Zaznamenané změny pH u *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303

PVIII A: Naměřené hodnoty při prvním měření *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303

C_{polyanilinu} [μg/ml]	Před kultivací			Po 24 hodinové kultivaci		
	pH₁	pH₂	průměr	pH₁	pH₂	průměr
0	6.88	6.86	6.87	8.37	8.37	8.37
2.1	6.85	6.88	6.87	8.37	8.37	8.37
3.9	6.93	6.98	6.96	8.35	8.39	8.37
10.9	6.87	6.91	6.89	8.37	8.36	8.37
20.4	6.90	6.89	6.90	8.39	8.38	8.39
42.6	6.82	6.88	6.85	8.36	8.40	8.38
56.8	6.84	6.86	6.85	8.37	8.41	8.39
85.7	6.86	6.84	6.85	8.35	8.39	8.37

PVIII A: Naměřené hodnoty při prvním měření *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303

C_{polyanilinu} [μg/ml]	Před kultivací			Po 24 hodinové kultivaci		
	pH₁	pH₂	průměr	pH₁	pH₂	průměr
0	6.84	6.87	6.86	8.24	8.26	8.25
2.1	6.91	6.89	6.90	8.22	8.24	8.23
3.9	6.87	6.86	6.87	8.21	8.21	8.21
10.9	6.80	6.85	6.83	8.22	8.28	8.25
20.4	6.90	6.93	6.92	8.20	8.22	8.21
42.6	6.85	6.85	6.85	8.23	8.23	8.23
56.8	6.83	6.81	6.82	8.24	8.23	8.24
85.7	6.85	6.91	6.88	8.25	8.24	8.25

PIX: Zaznamenané změny pH u *Staphylococcus epidermidis* CCM

C_{polyanilinu} [μg/ml]	Před kultivací			Po 24 hodinové kultivaci		
	pH₁	pH₂	průměr	pH₁	pH₂	průměr
0	6.69	6.67	6.68	7.90	8.36	8.13
2.1	6.70	6.71	6.71	8.38	8.44	8.41
3.9	6.69	6.71	6.70	8.38	8.45	8.42
10.9	6.71	6.71	6.71	8.38	8.43	8.41
20.4	6.71	6.71	6.71	8.34	8.44	8.39
42.6	6.65	6.64	6.65	8.38	8.44	8.41
56.8	6.60	6.59	6.60	8.40	8.44	8.42
85.7	6.61	6.60	6.61	8.42	8.45	8.44

**PX: Zaznamenané změny pH u *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*
CCM 3953**

**PX A: Naměřené hodnoty při prvním měření *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*
CCM 3953**

C_{polyanilinu} [μg/ml]	Před kultivací			Po 24 hodinové kultivaci		
	pH₁	pH₂	průměr	pH₁	pH₂	průměr
0	6.83	6.81	6.82	7.28	7.03	7.16
2.1	6.83	6.86	6.85	7.23	7.01	7.12
3.9	6.89	6.87	6.88	7.28	7.00	7.14
10.9	6.85	6.88	6.87	7.15	6.96	7.06
20.4	6.87	6.87	6.87	7.12	6.99	7.06
42.6	6.88	6.82	6.85	7.13	6.94	7.04
56.8	6.84	6.86	6.85	7.08	6.92	7.00
85.7	6.83	6.85	6.84	7.03	6.91	6.97

**PX A: Naměřené hodnoty při prvním měření *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*
CCM 3953**

C_{polyanilinu} [μg/ml]	Před kultivací			Po 24 hodinové kultivaci		
	pH₁	pH₂	průměr	pH₁	pH₂	průměr
0	6.65	6.63	6.64	7.44	7.56	7.50
2.1	6.63	6.63	6.63	7.36	7.64	7.50
3.9	6.71	6.69	6.70	7.28	7.66	7.47
10.9	6.72	6.71	6.72	7.39	7.60	7.50
20.4	6.68	6.67	6.68	7.28	7.70	7.49
42.6	6.61	6.61	6.61	7.32	7.74	7.53
56.8	6.58	6.59	6.59	7.31	7.72	7.52
85.7	6.57	6.57	6.57	7.41	7.71	7.56