

# Antimikrobiální aktivita polymerů v koncentračním gradientu

Bc. Eva Šáchová

---

Diplomová práce  
2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Eva Šáchová**  
Osobní číslo: **T17301**  
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Inženýrství polymerů**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Antimikrobiální aktivita polymerů v koncentračním gradientu**

Zásady pro vypracování:

Antibakteriální aktivita látek je jedním z klíčových parametrů determinujících jejich využití v řadě průmyslových, biotechnologických či biomedicínských aplikacích. Většina antibakteriálních testů je přitom designována jako časově limitovaný test jedné koncentrace látek bez důrazů na vývoj interakce v čase a v postupně se zvyšující koncentraci látky. Cílem práce je proto design a reálné provedení testu antimikrobiální aktivity různých látek, včetně látek využívaných v polymerním průmyslu, a to v dlouhodobém časovém horizontu a gradientu testovaných látek.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

**SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J., RELICHOVÁ, J. et al. Genetika. Brno: Masarykova univerzita, 2009. ALBERTS B. et al. Molecular Biology of the Cell 5th ed. Garland Science. DAVID A.P. BIZIOS R. Biological Interactions on Material Surfaces. ISBN 978-0-387-98160-4**

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Zdenka Capáková, Ph.D.**  
Centrum polymerních systémů

Datum zadání diplomové práce:

**2. ledna 2019**

Termín odevzdání diplomové práce:

**14. května 2019**

Ve Zlíně dne 18. února 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*

doc. Ing. Tomáš Sedláček, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: ..... ŠACHOVÁ EVA .....

Obor: ..... IP .....

## 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 <sup>1)</sup>;
- 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 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> 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 <sup>3)</sup> 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 ..... 10. 5. 2019 .....

<sup>1)</sup> 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.

<sup>2)</sup> 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, užíje-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 vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> 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). Odpirá-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 užit 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

Antimikrobiální aktivita látek je jedním z klíčových parametrů determinujících jejich využití v řadě průmyslových, biotechnologických či biomedicínských aplikací. Většina antibakteriálních testů je přitom designována jako časově limitovaný test jedné koncentrace látek, což nepostihuje dynamiku vývoje vztahu mezi mikroorganismy a příslušným materiálem. Mikroorganismy přitom vykazují vysokou míru přizpůsobivosti např. pomocí mutací. V teoretické části diplomové práce jsou shrnuty antimikrobiální polymerní systémy, jejich vlastnosti a mechanismy působení, informace o bakteriích a biofilmu, a také je zde uveden přehled metod používaných při testování antimikrobiální aktivity látek. V experimentální části je zkoumána antimikrobiální aktivita různých látek pomocí diskové difúzní metody. Pro testování byly použity bakterie *E. coli* a *S. aureus*. Dále byla provedena série testů s cílem vyvinout opakovatelný postup přípravy experimentálního uspořádání a modifikovat tak metodu testování interakce mikroorganismus / materiál / látka v dynamických podmínkách zahrnující gradient testované látky s antimikrobiálním potenciálem v delším časovém rozmezí. V práci jsou také shrnuty výsledky mikrobiálního vývoje a adaptace na testované látky, což bylo sledováno na připraveném experimentálním zařízení.

Klíčová slova:

Polymer, antimikrobiální polymer, antimikrobiální aktivita, bakterie, biofilm.

## ABSTRACT

Antimicrobial activity of substances is one of the key parameters determining their use in many industrial, biotechnological or biomedical applications. Most antibacterial tests are designed as time-limited tests of a single concentration of substances, which does not affect the dynamics of the relationship between the microorganisms and the material. Microorganisms exhibit a high degree of adaptability, for example thanks to the mutations. Antimicrobial polymer systems, their properties, and mechanisms of action, information about bacteria and biofilm are summarized in the theoretical part of the thesis. There is also an overview of methods used in testing the antimicrobial activity of substances. In the experimental part, the antimicrobial activity of various substances is investigated using the disc diffusion method. *E. coli* and *S. aureus* were used for testing. In addition, a series of tests was carried out to develop a repeatable and valuable experimental set-up for the testing the microorganism / material / substance interaction under dynamic conditions (including the gradient of the test substance with antimicrobial potential) over a longer period of time. The work also summarizes the results of microbial development and adaptation to the test substances, which was observed on the prepared experimental device.

Keywords:

Polymer, antimicrobial polymer, antimicrobial activity, bacteria, biofilm.

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Zdence Capákové Ph.D a doc. Ing. Petru Humpolíčkovi, Ph.D. za pomoc, cenné rady, ochotu, čas, který mi věnovali, a metodické vedení této práce. Děkuji také Mgr. Janu Vajdákovi a Ing. Daniele Veselé za pomoc a spolupráci při získávání údajů pro výzkumnou část práce. Tato práce byla podpořena z projektu IGA/CPS/2019/004.

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



# OBSAH

ÚVOD.....	11
<b>I TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>12</b>
<b>1 POLYMERY.....</b>	<b>13</b>
<b>2 ANTIMIKROBIÁLNÍ POLYMERY .....</b>	<b>18</b>
2.1 POLYMERY S PASIVNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ OCHRANOU.....	19
2.2 POLYMERY S AKTIVNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ OCHRANOU.....	20
2.2.1 Polymerní biocidy .....	21
2.2.2 Biocidní polymery.....	21
2.2.3 Polymery uvolňující biocidy .....	24
2.3 ANTIMIKROBIÁLNÍ POVRCHY – ANTIBIOFOULING .....	25
2.3.1 Antiadhezivní povlaky .....	26
2.3.2 Kontaktní povrchy.....	27
2.3.3 Povrchy uvolňující biocidy .....	29
2.3.4 Topografie povrchu.....	29
<b>3 BAKTERIE.....</b>	<b>31</b>
3.1 KLASIFIKACE BAKTERIÍ .....	32
3.2 BIOFILM BAKTERIÍ.....	33
3.3 BAKTERIE POUŽITÉ V PRAKTICKÉ ČÁSTI .....	34
3.3.1 <i>Escherichia coli</i> .....	34
3.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	35
3.4 ANTIMIKROBIÁLNÍ REZISTENCE.....	36
<b>4 METODY CHARAKTERIZACE ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY.....</b>	<b>38</b>
4.1 DIFÚZNÍ DISKOVÁ METODA (KIRBY-BAUERŮV TEST).....	38
4.2 STOKESŮV TEST.....	39
4.3 DILUČNÍ METODA .....	39
4.4 E-TEST.....	40
4.5 SLEDOVÁNÍ MIKROBIÁLNÍHO VÝVOJE A ADAPTACE.....	41
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>43</b>
<b>5 MATERIÁLY A METODIKA.....</b>	<b>44</b>
5.1 KULTIVAČNÍ MÉDIUM.....	44
5.1.1 Trypton - sojový agar .....	44
5.1.2 Plate Count agar .....	44
5.1.3 Mueller Hinton agar .....	45
5.2 BAKTERIE.....	45
5.2.1 <i>Escherichia coli</i> CCM 4517 .....	45
5.2.2 <i>Escherichia coli</i> CCM 3954 .....	46
5.2.3 <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516 .....	46
5.2.4 <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022 .....	46

5.3	TESTOVANÉ LÁTKY .....	46
5.3.1	Polyethylenimin .....	46
5.3.2	Polyethylenglykol .....	47
5.3.3	Pyrol .....	47
5.3.4	Anilin.....	48
5.3.5	Antibiotikum Penicilin/Streptomycin .....	49
5.4	INOKULACE BAKTERIÍ.....	49
5.5	EXPERIMENTÁLNÍ USPOŘÁDÁNÍ.....	50
5.5.1	Difúzní disková metoda .....	50
5.5.1.1	Příprava bakteriální suspenze .....	50
5.5.1.2	Očkování Mueller Hinton agaru .....	50
5.5.1.3	Vyhodnocení šířky inhibičních zón .....	52
5.5.2	Testování mikrobiálního vývoje a adaptace.....	53
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>55</b>
6.1	VÝSLEDKY DISKOVÉ DIFÚZNÍ METODY .....	55
6.2	VÝSLEDKY MIKROBIÁLNÍHO VÝVOJE A ADAPTACE.....	67
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>79</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>81</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>91</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>93</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>96</b>

## ÚVOD

Použití biomateriálů v medicíně významně přispělo k péči o pacienty a ke zlepšení kvality života. Bylo však zjištěno, že aplikace implantovaných biomateriálů vede ke zvýšené náchylnosti k infekci. Ke vzniku infekce dochází adhezí bakterií k biomateriálu a kolonizaci sousedních tkání až po vznik bakteriálního biofilmu. Infekce je nejčastěji způsobena bakteriemi často pocházejícími od hostitele, které příležitostně vytvářejí biofilmy na implantátech. Patří sem grampozitivní bakterie jako *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis*, nebo běžné gramnegativní organismy *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* a *Proteus vulgaris*. V důsledku vznikajících infekcí jsou zkoumány stále nové biomateriály, které mají antimikrobiální vlastnosti, jako jsou antibiotické materiály a povlaky, antiadhezivní povrchy a další. Avšak infekce spojené s biologickým materiálem i nadále zůstávají hlavním nevyřešeným problémem, a to i přes dlouhodobé inovační úsilí. Dalším problémem spojeným s implantovanými zdravotnickými prostředky je rezistence mikroorganismů na antibiotické látky, která je způsobena rostoucím počtem různých druhů mikroorganismů. Ukázalo se, že mikroorganismy jsou schopny přizpůsobit se účinkům antibiotik prostřednictvím vysoce reprodukovatelných genetických změn. Většina antibakteriálních testů je však designována jako krátkodobý test jedné koncentrace látek, což nepostihuje dynamiku vývoje vztahu mezi mikroorganismy a příslušným materiálem. Vznik těchto patogenů, rezistentních vůči běžným antibiotikům, vyvolal potřebu nových antimikrobiálních látek. Antimikrobiální polymery představují třídu látek, která se stává alternativou k existujícím biocidům a v některých případech dokonce i k antibiotikům. V uplynulých letech byla vyvinuta celá řada antimikrobiálních makromolekulárních systémů, polymerů a kopolymerů, kvarternizovaných nebo funkcionalizovaných bioaktivními skupinami.

Předmětem práce bylo proto modifikovat metodu testování interakce mikroorganismus / materiál / látka v dynamických podmínkách zahrnující gradient testované polymerní látky s antimikrobiálním potenciálem v delším časovém rozmezí.

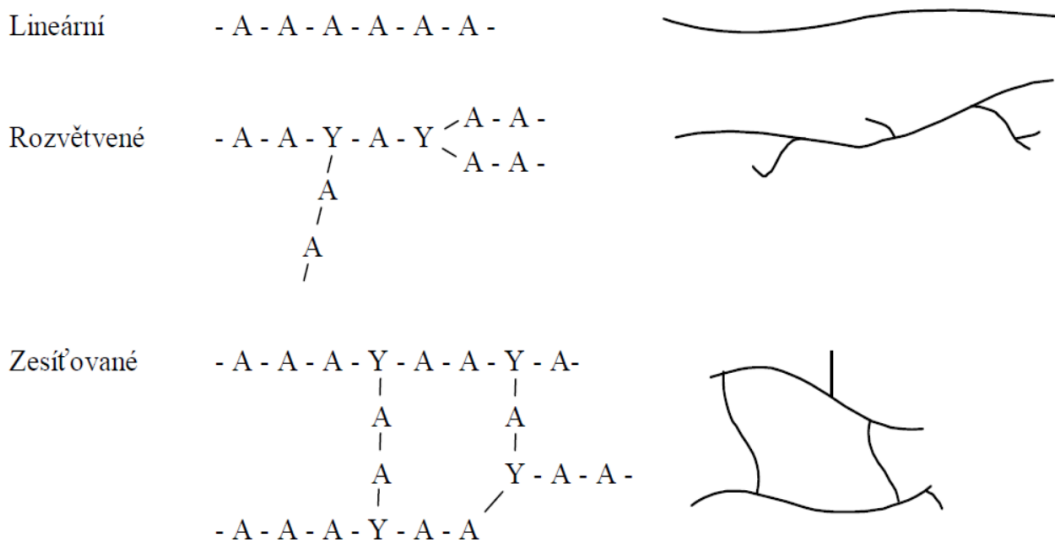
## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 POLYMERY

Slovo polymer je odvozeno od řeckých slov, poly = mnoho a mers = části nebo jednotky, z nichž každá molekula sestává z velkého počtu jednoduchých strukturních jednotek spojených pravidelným způsobem. Polymery jsou tedy obrovské molekuly nazývané makromolekuly, které vznikají spojením velkého počtu malých molekul, monomerů. Reakce, kterou se monomery spojují za vzniku polymeru, je známá jako polymerace [1].

Vznik makromolekul probíhá různými mechanismy, jako jsou polykondenzace, polymerace a polyadice [2]. Polykondenzace je reakce, kdy dochází k opakující se kondenzaci dvou a vícefunkčních monomerů. Produktem je polymer a vedlejší nízkomolekulární látka, kterou bývá zpravidla voda. Reakce probíhají nezávisle na sobě a každá z dílčích reakcí je vratná [3]. Dalším mechanismem je polymerace, při které spolu reagují monomerní jednotky obsahující alespoň jednu násobnou vazbu a vytváří makromolekulární řetězec [2]. Polyadice jsou podobné polykondenzaci, protože jsou to také stupňovité polymerační reakce, avšak bez odštěpení vedlejších produktů s nízkou molekulovou hmotností. Reakce je spíše exotermická než endotermická, a proto nemůže být zastavena. Funkční skupina jednoho monomeru musí obsahovat vodík, který se odtrhne a přesune na jiný monomer. Tyto reakce se nespouštějí spontánně a jsou pomalé [4].

Řetězce makromolekul mohou být lineární, rozvětvené nebo zesíťované, jak můžeme vidět na obrázku 1. Monomery musí být dvojfunkční (A) nebo vícefunkční (Y), aby se mohly spojovat do řetězců [3].

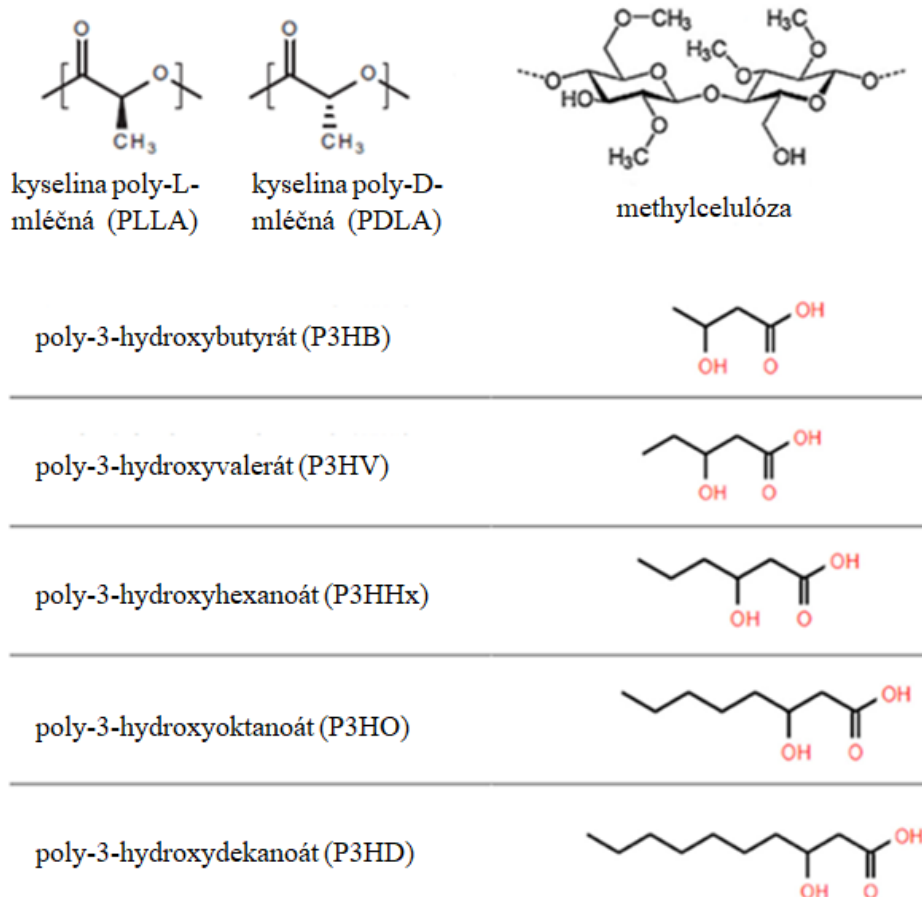


Obrázek 1 – Makromolekulární řetězce [3]

Polymery, které mají stejnou opakující se jednotku podél molekuly, jsou nazývány jako **homopolymery** a jsou nejběžnějšími polymerními materiály. Polymery se dvěma nebo více různými opakujícími se jednotkami se nazývají **kopolymery** a jsou důležité v některých technických oblastech [5]. Polymery mohou mít odlišnou chemickou strukturu, fyzikální vlastnosti, mechanické chování, tepelné charakteristiky apod. Podle těchto parametrů jsou polymery klasifikovány různými způsoby.

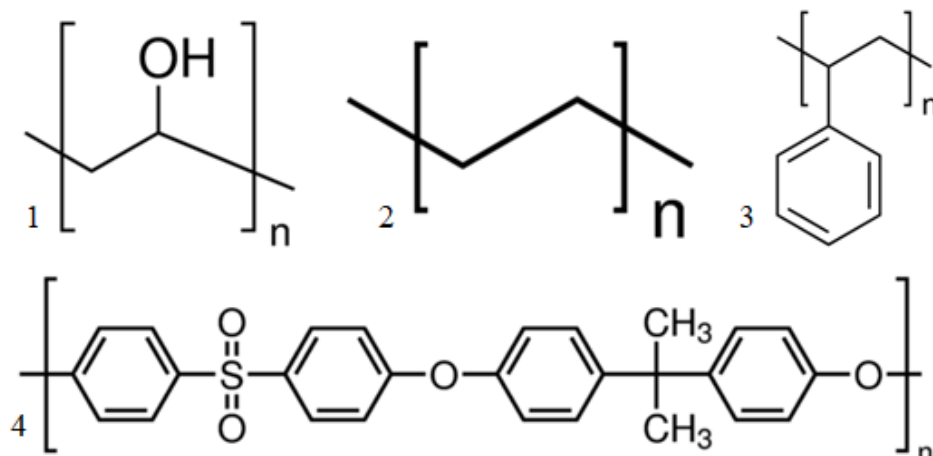
Na základě jejich výskytu v přírodě se polymery dělí na tři typy. Polymery, které se vyskytují v přírodě, se nazývají **přírodní polymery**, nebo také biopolymery [1]. Přírodní polymery, i když mohou mít složité sekvence opakujících se jednotek, mohou vykazovat fyzikální vlastnosti, které dodržují stejné fyzikální zákony jako jejich ekvivalentní syntetické polymery. Navzdory široké škále metod, které jsou k dispozici pro jejich syntézu, mohou být fyzikální charakteristiky mnoha polymerů předpovězeny rozpoznáním některých obecných vlastností jejich struktury [6]. Přírodní polymery mohou sloužit například jako nosiče bílkovin a hrají tak významnou roli v oblasti vývoje a technologie farmaceutických léčiv. Použití přírodních polymerů v systémech s řízeným uvolňováním léčiv je z důvodu přítomnosti reaktivních míst, která jsou přístupná a podporují síťování, konjugaci ligandu a další modifikace [7]. Příklady takových polymerů jsou přírodní kaučuk, přírodní hedvábí, celulóza, škrob, bílkoviny, polysacharidy.

Dalším typem jsou **semi-syntetické polymery** nebo také syntetické biopolymery. Jsou to chemicky modifikované přírodní polymery, jako je například polylaktid, polyhydroxyalkanoáty, methylcelulóza (obrázek 2) [1]. Syntetické biologicky odbouratelné polymery získané z chemických přírodních polymerů (polylaktidů) nebo mikrobiologicky (polyhydroxyalkanoátů) mají dobré mechanické vlastnosti, ale jsou drahé [8].



Obrázek 2 – Kyselina polymléčná, methylcelulóza a monomerní struktury různých polyhydroxyalkanoátů, upraveno dle [9, 10, 11]

**Syntetické polymery** jsou také známé jako umělé polymery [1]. V současné době se používají v různých aplikacích pokrývajících téměř všechny oblasti lidského života. Možnost přizpůsobení vlastností požadovaným aplikacím, je hlavní výhodou syntetických polymerů [12]. Syntetické polymery získaly využití jak pro technické, tak i lékařské aplikace. Např. polyestery a polyamidy se používají jako syntetické materiály pro šití. Syntetické polymery našly uplatnění například v biomedicině v systémech s řízeným uvolňováním léčiv, v ortodoncii, dále jako implantáty, cévní stenty, cévní a močové katétry, hemodialyzační membrány, tkáňová lepidla a tmely, kloubní protézy, kontaktní čočky [9]. Příklady takových polymerů jsou polyvinylalkohol, polyethylen, polystyren, polysulfon a podobně [1].



Obrázek 3 – 1 polyvinylalkohol, 2 polyethylen, 3 polystyren, 4 polysulfon [13]

Dále se polymery dělí na **amorfní a semikrystalické**. Amorfní polymery jsou charakterizovány nahodilými konformacemi polymerních řetězců. Řetězce jsou stočeny do tzv. statistického klubka, kde zaujímají nejnižší energii [3]. Amorfní polymery charakterizují dvě teploty. Teplota skelného přechodu a teplota tečení. Pokud je teplota polymeru pod teplotou skelného přechodu, segmenty se nepohybují a polymer je křehký. Nad touto teplotou dochází k uvolňování a pohybu segmentů a polymer je pružný a houževnatý. Pokud se teplota polymeru dostane až nad teplotu tečení, segmenty se pohybují velmi rychle a polymer teče. Na rozdíl od amorfních polymerů, semikrystalické polymery mají některé oblasti, kde jsou jejich řetězce uspořádané. Semikrystalické polymery obsahují amorfní i krystalické oblasti [14].

Podle struktury a fyzikálních vlastností se polymery dělí na **elastomery, termoplasty a reaktoplasty**. Elastomery jsou vysoce elastické polymery. Polymerní síť, je lehce deformovatelná a po odstranění napětí se vrátí do původního tvaru. Deformace makromolekul a návrat do původního tvaru, je možná pouze v případě, že segmenty řetězce jsou velmi flexibilní, což je případ nad teplotou skelného přechodu. V případě, že síťové segmenty řetězce jsou krátké, nebo v případě, že segmenty řetězce tvoří krystalické oblasti, se pružnost řetězce sníží a zvyšuje se tuhost materiálu. Do této skupiny řadíme kaučuky [4]. Termoplasty jsou při pokojové teplotě tvrdé, ale po zahřátí měknou. Lze je opakovaně tavit a zpracovávat [15]. Reaktoplasty představují jen relativně malou část polymerních materiálů. Liší se od termoplastů v jejich chemickém složení i v technologii zpracování. Významné reaktoplasty jsou například, nenasycené polyesterové pryskyřice, epoxidové pryskyřice, fenolové pryskyřice,



melaminové pryskyřice, močoviny, kyseliny akrylové a silikonové pryskyřice. Jsou používány hlavně jako výztužné plasty při výrobě průmyslových a sportovních potřeb, při výrobě letadel a v kosmonautice [4]. U těchto polymerů je změna z plastického do tuhého stavu nevratná a trvalá, protože působením zvýšené teploty dojde k chemické reakci – zesíťování [16].

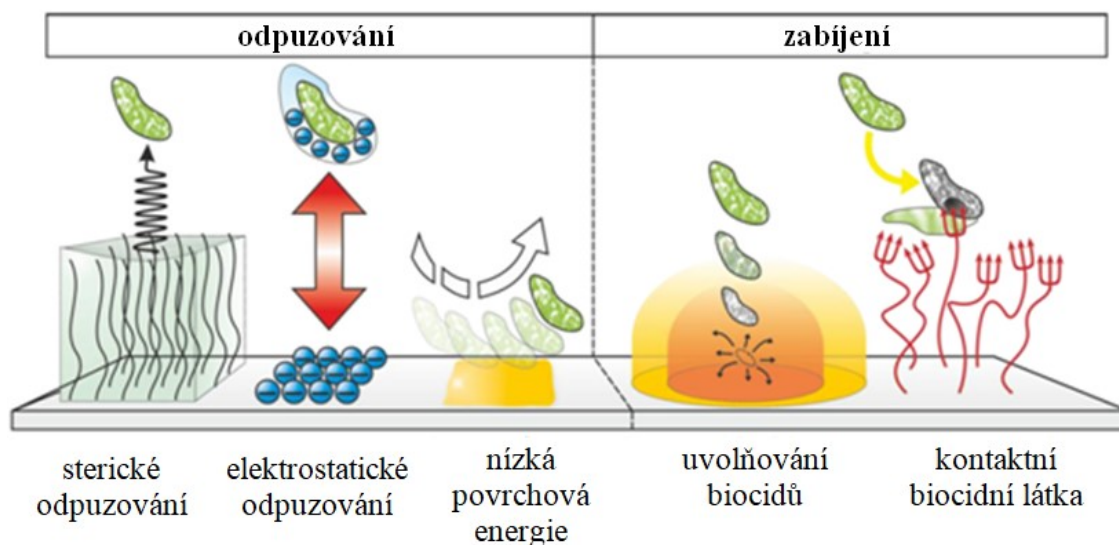
## 2 ANTIMIKROBIÁLNÍ POLYMERY

Polymery se používají po desetiletí jako náhrada kovu, skla a dřeva v mnoha aplikacích zejména pro své vynikající fyzikálně-chemické vlastnosti, a také z ekonomických důvodů. Například komerčně dostupné termoplastické polymery, jako jsou polyolefiny, jsou hydrofobní a biologicky inertní. To je činí nepostradatelnými v obalovém průmyslu, distribuci potravin a jiného zboží podléhajícího zkáze [17]. U běžných polymerů chybí ochrana proti mikrobiálnímu růstu. Tak mohou mikrobiální buňky připojené k jakémukoli umělému povrchu přežít a množit se. Zatímco počet buněk vzrůstá na povrchu, mikrobiální buňky obvykle začínají vytvářet biofilm. Takové biofilmy chrání mikrobiální buňky a ty jsou pak méně náchylné k působení antibiotik a jiných biocidů [18]. Dále mohou být antibiotické geny vyměňovány mezi bakteriemi v biofilmech, což dále zvyšuje tvorbu multirezistentních bakteriálních kmenů. Kontrola mikrobiálního růstu na povrchu je proto jedním z problémů, kterými se zabývá materiálová věda i medicína [19].

Vznik multirezistentních patogenů vůči běžným antibiotikům vyvolal potřebu nových antimikrobiálních látek [20]. Antimikrobiální polymery představují třídu dezinfekčních přípravků, které lze v některých případech použít i jako náhrady antibiotik [21]. V uplynulých letech byla vyvinuta velká skupina antimikrobiálních makromolekulárních systémů, polymerů a kopolymerů, kvarternizovaných nebo funkcionalizovaných s bioaktivními skupinami a účinně použita jako antimikrobiální činidla. Spolu s nimi byly také syntetizovány nové mírně hydrofobní polymerní struktury, které obsahují protonované primární, sekundární či terciární aminové skupiny, které vykazují relativně vyšší antimikrobiální aktivitu, často na rozdíl od jejich kvartérních analogů [20].

Použití antimikrobiálních polymerů by mohlo zvýšit účinnost některých existujících antimikrobiálních činidel, snížit zbytkovou toxicitu činidel, zvýšit jejich selektivitu, prodloužit životnost a minimalizovat environmentální problémy doprovázející běžné antimikrobiální činidla. Polymerní antimikrobiální činidla mají také tu výhodu, že jsou netěkavé a chemicky stabilní a neprostupují skrz kůži [22]. Antibakteriální polymery mají potenciál například jako povlaky pro tělesné implantáty [23], lékařské aplikace nebo zdravotnické prostředky. Jsou často vyžadovány i pro obaly potravin, systémy čištění vody nebo filtry. Mohou být také použity jako potahový materiál pro běžné předměty, jako jsou kliky, dětské hračky, mobilní telefony a počítačové klávesnice, aby se zabránilo přenosu mikrobiálních infekcí [22].

Podle mechanismu antimikrobiální aktivity se polymery dělí do dvou skupin. S pasivní nebo aktivní antimikrobiální ochranou (obrázek 4) [24].



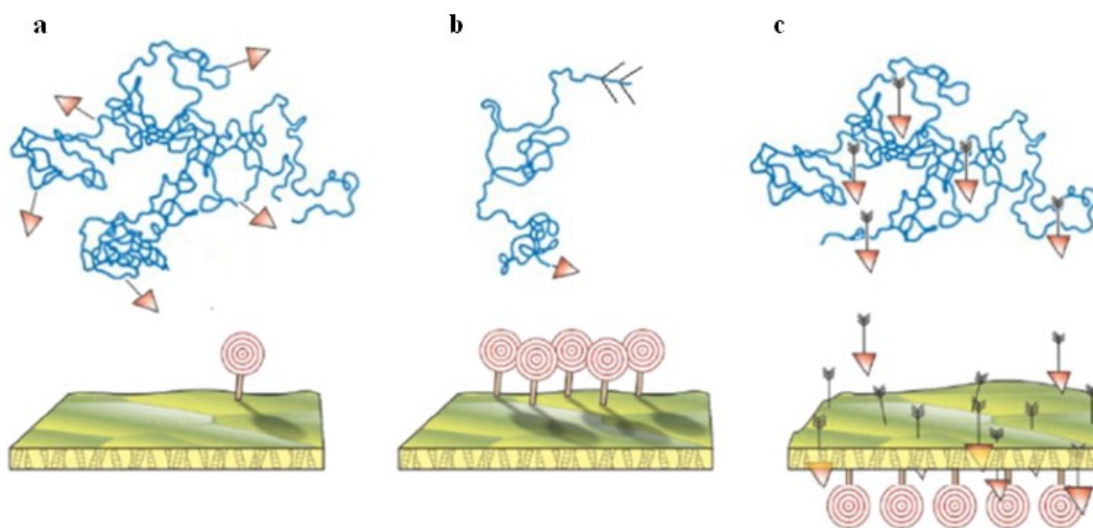
Obrázek 4 – Mechanismus antimikrobiální aktivity, upraveno dle [24]

## 2.1 Polymery s pasivní antimikrobiální ochranou

Polymerní vrstva brání adhezi bakterií tím, že snižuje adsorpci proteinů na svém povrchu, čímž bakterie odpuzuje bez toho, aby s nimi účinně interagovala [20]. Vzhledem k převážně hydrofobním a záporně nabitým vlastnostem mikrobů by pasivní polymery měly být buď hydrofilní, záporně nabitě nebo s nízkou povrchovou energií (obrázek 4) [24]. Polymery s pasivní antimikrobiální ochranou zahrnují například kluzký tekutý infuzovaný porézní povrch (SLIPS). Další příklady jsou polydimethylsiloxan, nenabitě polymery jako jsou polyethylenglykol, poly-2-methyl-2-oxazolin, polypeptoid, poly-n-vinylpyrrolidon a polydimethylakrylamid a nabitě polyamfolyty a zwitterionové polymery jako jsou fosfobetain, sulfobetain a fosfolipidové polymery [20]. Ve studii Yu a kol. byla prokázána antimikrobiální aktivita polyethylenglykolu proti *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* [25]. Kvůli vysoké mobilitě řetězců a sterickému bariérovému účinku se řadí polyethylenglykol mezi nejběžněji používané pasivní antimikrobiální materiály a výzkum ukázal, že vykazuje vysokou schopnost zabránit adhezi proteinů a buněk, čímž zabraňuje růstu mikrobů [26]. Dalším příkladem jsou polyfenoly, které jsou účinné proti parodontálním bakteriím [24].

## 2.2 Polymery s aktivní antimikrobiální ochranou

Polymery s aktivní antimikrobiální ochranou zabíjí bakterie, které přilnou k povrchu polymeru. Polymery funkcionalizované s aktivními látkami, jako jsou kationtové biocidy, antimikrobiální peptidy nebo antibiotika, mohou při kontaktu zabít bakterie [24]. Mechanismus působení aktivních polymerů závisí na aktivitě funkcionalizované skupiny, která je na něm přítomna. Například nejpoužívanější je kladně nabitý kvartérní amonium, které interaguje s buněčnou stěnou a poškozuje cytoplazmatickou membránu, což vede k úniku intracelulárních složek a následné smrti buněk. Dalšími příklady jsou polyethylenimin, polyguanidin a N-halogenamin [27]. Polyethylenimin způsobuje prasknutí bakteriální buněčné membrány elektrostatickou interakcí mezi polyethyleniminem a buněčnou membránou. Polyguanidin inhibuje růst bakterií prostřednictvím adheze a následného přerušování  $\text{Ca}^{2+}$  solných můstků nebo buněčné smrti. N-halogenamin působí inhibicí nebo inaktivací buněk působením oxidativního halogenu cíleného na thio nebo aminoskupiny buněčných receptorů [28]. Antimikrobiální aktivita polymerů je dána připojením aktivních skupin. Na základě připojení těchto skupin, je lze rozdělit na tři typy: polymerní biocidy, biocidní polymery a polymery uvolňující biocidy (obrázek 5) [24].



Obrázek 5 – Obecné mechanismy působení antimikrobiálních polymerů: (a) polymerní biocidy; (b) biocidní polymery; (c) polymery uvolňující biocidy [29]

### 2.2.1 Polymerní biocidy

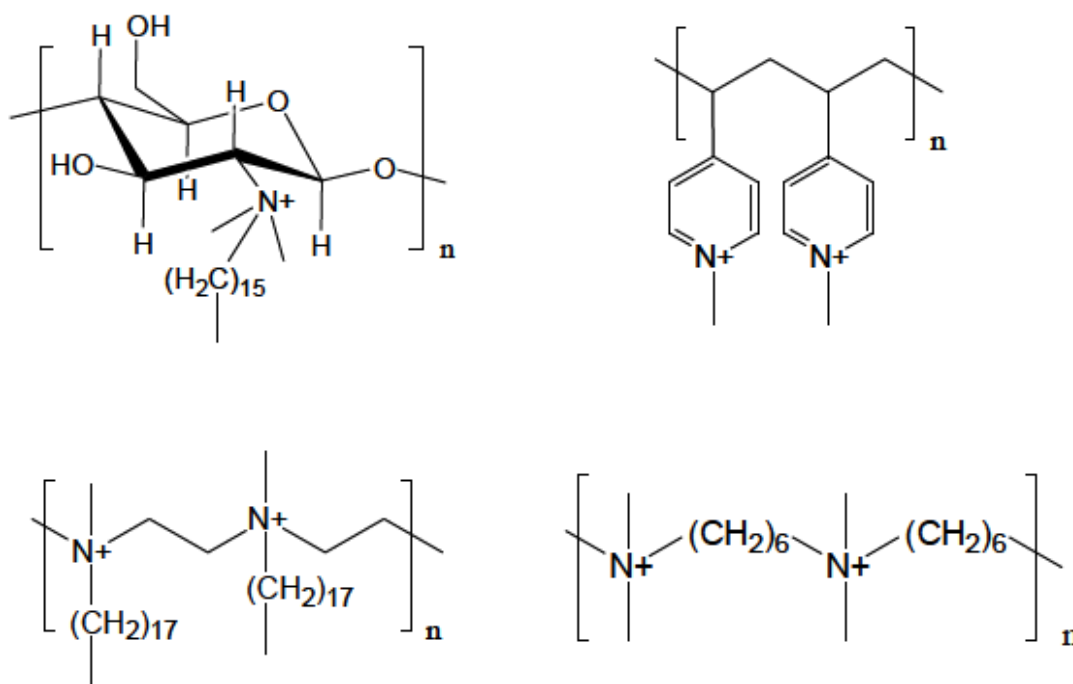
Polymerní biocidy jsou polymery, které se skládají z bioaktivních opakujících se jednotek, které působí podobně jako monomery. Polymerizační proces může buď zvýšit, nebo snížit antimikrobiální aktivitu bioaktivních funkčních skupin [24]. Například polymerace antimikrobiálního 4-vinyl-N-benzylpyridiniumchloridu a následné zesíťování vedlo k nebiocidnímu, ve vodě nerozpustnému polymeru, který pouze zachycoval mikroby, ale nezabil je. Polymerace antibiotik, která se obvykle provádí za účelem získání prodloužené aktivity a menší toxicity, je velmi citlivá na metodu testování a povahu antibiotika. Například studie Nathan a kol. ukázala, že antibiotika Penicilin V a Cephadrine nejsou aktivní, pokud jsou konjugovány s PEG-lysinem prostřednictvím hydrolyticky stabilní vazby, což naznačuje, že samotný polymer není aktivní. Avšak konjugáty vykazovaly plnou antimikrobiální aktivitu, pokud byly biocidy navzájem propojeny pomocí hydrolyticky labilní vazby, což dokázalo, že antibiotika se znovu uvolňují.

Existují i další studie, které naznačují možnost polymerace antibiotik, které si uchovávají svou aktivitu na polymerním řetězci, např. kopolymerace modifikovaného methakrylátu Norfloxacinem a PEG-methakrylátu [30]. Jiný příklad je navázání Vancomycinu na PEG-methakrylát a následná polymerizace, která vedla k tomu, že při srovnání s nemodifikovaným antibiotikem byly aktivní polymery 6x méně účinné [31]. S délkou řetězce polyethylenglykolu se aktivita snižuje. Polyethylenglykol má také negativní účinek na většinu biocidů a stejně tak i polyether, ke kterému byly připojeny kvartérní amoniové skupiny. Polymery s antimikrobiálními vedlejšími skupinami, založené na hydrofobních kvartérních amoniových funkcích, lze považovat také za polymerní biocidy [30]. Tyto materiály obvykle vykazují nižší účinnost než volné biocidní molekuly kvůli sterickým překážkám vytvořeným polymerním řetězcem [29].

### 2.2.2 Biocidní polymery

Biocidní polymery, nebo také polymery s vnitřní antimikrobiální aktivitou nevyžadují žádné bioaktivní opakující se jednotky, místo toho je antimikrobiální místo reprezentováno celou makromolekulou [32]. Důležitou vlastností mikrobiálních buněk je, že na svém povrchu nesou záporný náboj, často stabilizovaný přítomností dvojmocných kationtů  $Mg^{2+}$  a  $Ca^{2+}$ . Záporný náboj je poskytován teikoovou nebo lipoteikoovou kyselinou grampozitivních bakterií a fosfolipidy a lipopolysacharidy vnější membrány gramnegativních bakterií [33]. Biocidní

polymery jsou obvykle založeny na polykationtech, které jsou schopny narušit vnější i cytoplazmatickou membránu a umožnit lýzu buňky, což vede k jejich smrti. Zatím se jedná o jediný zavedený způsob působení polykationických antimikrobiálních polymerů, potvrzený četnými studiemi [30]. Společné kationtové skupiny nalezené v těchto polymerech jsou kvartérní amonium, kvartérní fosfonium, guanidinium nebo terciární sulfonium. Použití biocidních polymerů je velmi výhodné z hlediska konstrukce antimikrobiálních povrchů, protože do životního prostředí nejsou uvolňovány škodlivé biocidy [34]. Antimikrobiální aktivita těchto polymerů zřejmě pochází z celé molekuly. Obrázek 6 ukazuje některé příklady polymerů, které nesou kvartérní amoniovou skupinu v hlavním řetězci nebo postranním řetězci [30]. Jejich účinnost závisí také na hustotě náboje kationtových skupin [24].

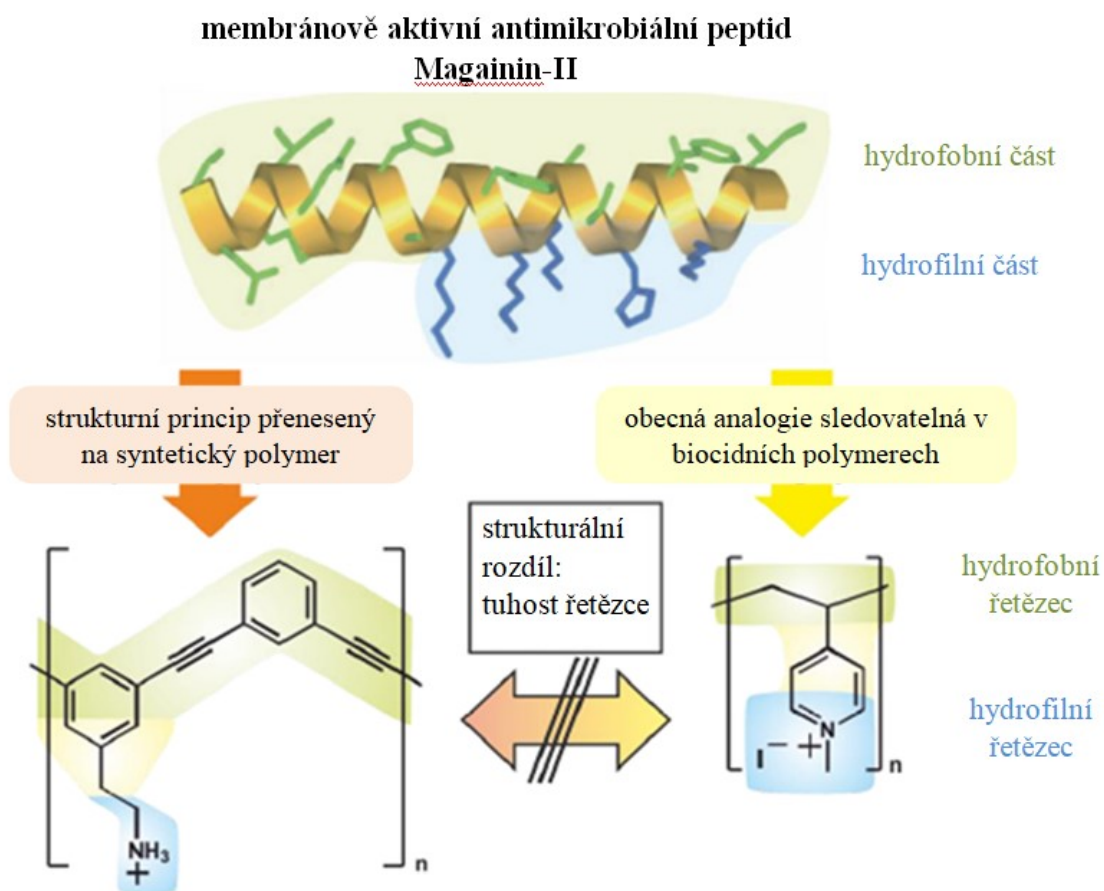


Obrázek 6 – Struktury biocidních polymerů s kvartérními amoniovými skupinami [30]

Prvním polymerem, který se stal komerčním dezinfekčním činidlem, byl polyhexamethylen biguanidinium hydrochlorid [30]. Účinný biocidní polymer působící proti *Staphylococcus aureus* byl polymethakrylát, který obsahoval chlorhexidinové boční skupiny [35]. Dalším příkladem jsou přírodní polymery, které představují důležitou třídu materiálů se zajímavými vlastnostmi, které z nich činí vhodné kandidáty v řadě aplikací, od biomedicínského pole až po obalový průmysl. Mezi známé přírodní polymery, které vykazují vlastní antimikrobiální vlastnosti, patří například chitosan. Chitosan je kationtový polysacharid získaný z alkalické deacetylace chitinu, který se v přírodě obecně nachází. Řada studií prokázala antimikrobiální

aktivitu chitosanu a jeho derivátů proti různým mikroorganismům [34]. Antimikrobiální účinnost chitosanu závisí silně na hodnotě pH. Při hodnotě pH nižší než pKa dochází k elektrostatické interakci mezi protonovanými aminoskupinami a buněčnou stěnou. Pokud je hodnota pH vyšší než hodnota pKa, antimikrobiální účinnost chitosanu je odvozena z hydrofobní interakce a chelačních účinků. Jiné přírodní antimikrobiální polymery zahrnují heparin, polylysin a gramicidin A [28].

Mezi biocidní polymery se řadí také antimikrobiální peptidy (obrázek 7). Mají pozitivně nabitě amfifilní struktury, o nichž se předpokládá, že jsou odpovědné za aktivitu antimikrobiálních peptidů. Tato amfifilní topologie se jeví jako důležitá pro narušení cytoplazmatické membrány, což vede ke smrti bakterií [36]. Kromě toho, že antimikrobiální peptidy přímo zabíjejí mikroby tím, že narušují buněčné membrány a inhibují buněčné procesy, antimikrobiální mechanismy peptidů mohou také působit imunomodulační účinky, které vedou k mikrobiálnímu odstranění skrze stimulaci hostitelské imunitní odpovědi [37].



Obrázek 7 – Membránově aktivní antimikrobiální peptid Magainin- II, upraveno dle [30]

Vedle zavedených kvartérních amoniových skupin byly popsány účinné antimikrobiální polymery s protonovanými terciárními a primárními aminoskupinami. Například polyfenylenethylen-bázové polymery, náhodná kopolymerní třída dimethylaminomethylstyrenu a oktylstyrenu, která je antimikrobiálně aktivní při protonaci terciárních aminoskupin, zatímco příslušné kvarternizované deriváty jsou méně aktivní [38]. Palermo a Kurada syntetizovali podobné kopolymery kopolymerací dimethylaminoethylakrylamidu a aminoethylakrylamidu s n-butylakrylamidem a ukázali, že tyto polymery jsou antimikrobiálně aktivní a méně toxické pro krevní buňky ve srovnání s příslušnými kvartérními amoniovými deriváty [30]. Dále byly vyvinuty polydialylamoniové soli, které obsahují buď sekundární, nebo terciární aminoskupiny [39]. Tyto polymery vykazují nadprůměrnou aktivitu proti *Staphylococcus aureus* a *Candida albicans*. Kromě lineárních polymerů byly také popsány dendritické a vysoce rozvětvené polymery, které vykazují silné antimikrobiální vlastnosti, např. kvarternizovaný polyethylenimin [40].

### 2.2.3 Polymery uvolňující biocidy

Polymery uvolňující biocidní látky nepůsobí prostřednictvím polymerního řetězce. Ten slouží pouze jako nosič pro biocidy, které jsou přeneseny do mikrobiálních buněk [30]. Takové polymery jsou obvykle neaktivnějšími systémy, protože mohou uvolňovat své biocidy blízko buňky ve vysokých lokálních koncentracích. Toxicita spojená s molekulami biocidů je vážnou nevýhodou této strategie. Navíc se jejich účinnost s časem výrazně snižuje. Při navrhování účinných antimikrobiálních polymerů není důležitý typ použitého polymerního systému, ale několik důležitých rysů, jako je netoxičita, stabilita během požadované doby skladování a za podmínek jeho cíleného použití, biocidní účinek na nejširší mikrobiální spektrum. Kromě toho by syntéza polymeru měla být jednoduchá, přímá a nenákladná [41]. Polymer uvolňující biocid může být připraven polymerací molekul uvolňujících biocidy na polymerní kostru nebo vytvořením kompozitu molekul uvolňujících polymer / biocid. Polymery vykazují antibakteriální vlastnosti prostřednictvím zabudování antibiotických a/nebo antiseptických sloučenin. Systém s řízeným uvolňováním polymerů uvolňujících biocidy má mnoho výhod, jako je udržování vysoké lokální koncentrace biocidů v blízkosti mikrobu a usnadnění dodávání biocidů s krátkým poločasem *in vivo*. Tento typ antimikrobiálního polymeru vykazuje velký potenciál pro použití v lékařském průmyslu [24].



Dále byla vyvinuta třída antimikrobiálních polymerů za použití N-halaminových skupin připojených k různým polymerním kmenům. Konstrukce těchto N-halaminů umožňuje dlouhodobé uchování aktivního chlóru, proto jsou tyto polymery silnými oxidanty. V některých případech uvolňují chlor nebo chlornan a v optimalizované formě, pokud experimentální uspořádání dovoluje takové pochopení, jsou schopny přenést aktivní chlor přímo k mikrobiálním buňkám, které je usmrcují oxidací fosfolipidů buněčné membrány. Dalším typem jsou polymery, které uvolňují oxid dusnatý. Tyto polymery obsahují diazeniumdiolátové skupiny, které jsou přidány k polymerní matici. Optimalizace těchto skupin vede k tomu, že polymery uvolňují oxid dusnatý v průběhu několika hodin. Jejich antimikrobiální účinek je z tohoto důvodu pouze krátkodobý [30]. Byly prokázány antimikrobiální vlastnosti také u polyfenolů vyskytujících se v rostlinných potravinách. Hlavními zdroji jsou čaj, káva, obiloviny, ovoce a víno. Polyfenoly jsou schopné regulovat růst ústních bakterií. Studie potvrdily jejich bakteriostatický účinek proti *Streptococcus mutans* [42]. Ve studii Vaquero a kol. byly zkoumány antimikrobiální vlastnosti čistých fenolových sloučenin a polyfenolů různých vín proti patogenům. Bylo pozorováno, že bakteriální druhy vykazují různou citlivost vůči různým koncentracím fenolových sloučenin, přičemž *Escherichia coli* byla nejcitlivější bakterií. Inhibice vzrostla s rostoucí koncentrací polyfenolů ve vínech. Vyčištěná vína byla neúčinná proti všem bakteriím, což naznačuje, že za pozorované antimikrobiální účinky odpovídají polyfenolické sloučeniny přítomné v červených vínech [43]. Schanze, Whitten a kol. navrhli kationtové konjugované polyelektrolyty založené na polymerech konjugovaných polyfenylenethinylenem, které jsou funkcionalizovány kationtovými kvartérními amoniiovými skupinami. Bylo zjištěno, že tyto polymery jsou vysoce účinné v přítomnosti světla, protože vytváří a uvolňují účinně senzibilizující singletový kyslík, ale jsou účinné i ve tmě kvůli své struktuře napodobující antimikrobiální peptidy [30].

### 2.3 Antimikrobiální povrchy – antibiofouling

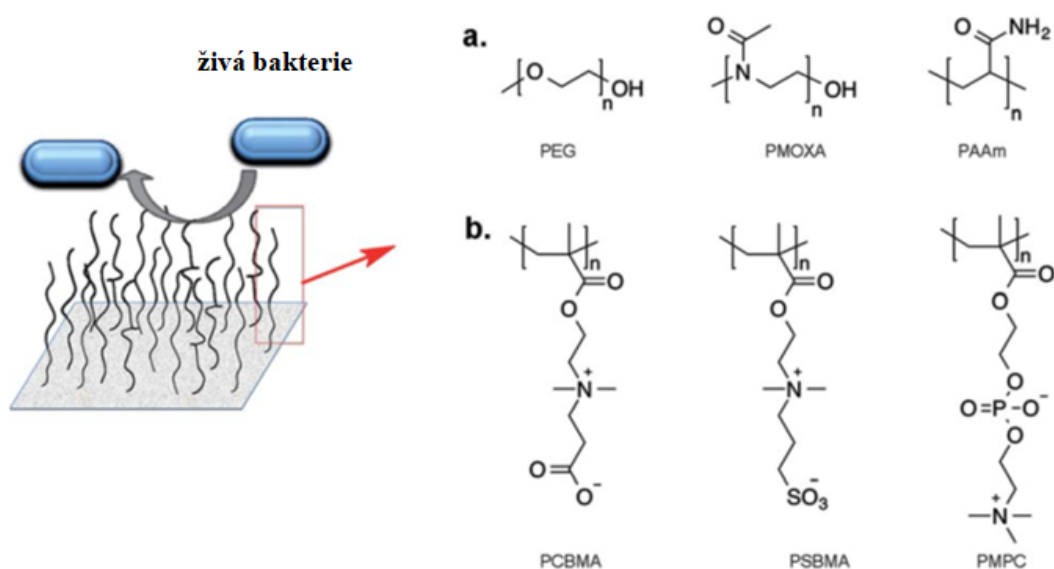
Biofouling neboli biologické znečištění je akumulace nežádoucí látky (bílkovin) nebo organismů (buněk a bakterií) na povrchu hostitelských materiálů. Adsorpce kontaminujících látek představuje riziko pro širokou škálu předmětů, jako jsou zdravotnické prostředky a membrány, může zkrátit životnost biomedicínských implantátů, modifikovat terapeutické vlastnosti implantátů či způsobit infekci pacientů [26].

Cílem antimikrobiálních povrchů je minimalizovat intermolekulární síly a interakce mezi kontaminující látkou a povrchem hostitelského substrátu, aby se adherovaná buňka snadno

uvolňovala za nízkých smykových napětí. Hydrofobní povrchy obsahující polydimethylsioxan mají dobrou schopnost zabraňovat biologickému znečištění, zatímco hydrofilní povrchy obsahující polyethylenglykol, polyvinylalkohol nebo deriváty kyseliny polyakrylové vykazují odolnost proti adsorpci proteinů a adhezi buněk [44].

### 2.3.1 Antiadhezivní povlaky

Povrchy odolné proti přilnavosti snižují adhezi bakterií na povrchy, ale nemusí je nutně zabít. Jednou z nejdůležitějších vlastností hydrofilních polymerních kartáčů je jejich biologicky neznečišťující charakter. Když proteinové molekuly nebo bakterie stlačují vrstvu hydratovaného polymerního kartáče na povrchu biomateriálu, snížení konformační entropie polymerních řetězců, stejně jako zvýšení osmotického tlaku uvnitř kartáče, je činí odolnými proti adhezi proteinů a bakterií (obrázek 8) [45].



Obrázek 8 – Hydrofilní polymerní kartáče jako antiadhezivní povlak. Některé (a) neutrální polymery a (b) zwitterionové polymery používané pro hydrofilní polymerní kartáče, upraveno dle [45]

Jedním z dobře studovaných systémů jsou kartáče z polyethylenoxidu nebo polyethylenglykolu jako neutrální hydrofilní povlaky na biomateriálech. Roosjen a kol. syntetizovali kovalentně vázané polyethylenoxidové kartáče na skle a křemičitých plochách a pozorovali pokles adheze *Staphylococci* a *Escherichia coli* o 98 % ve srovnání s nepovlakovanými po-

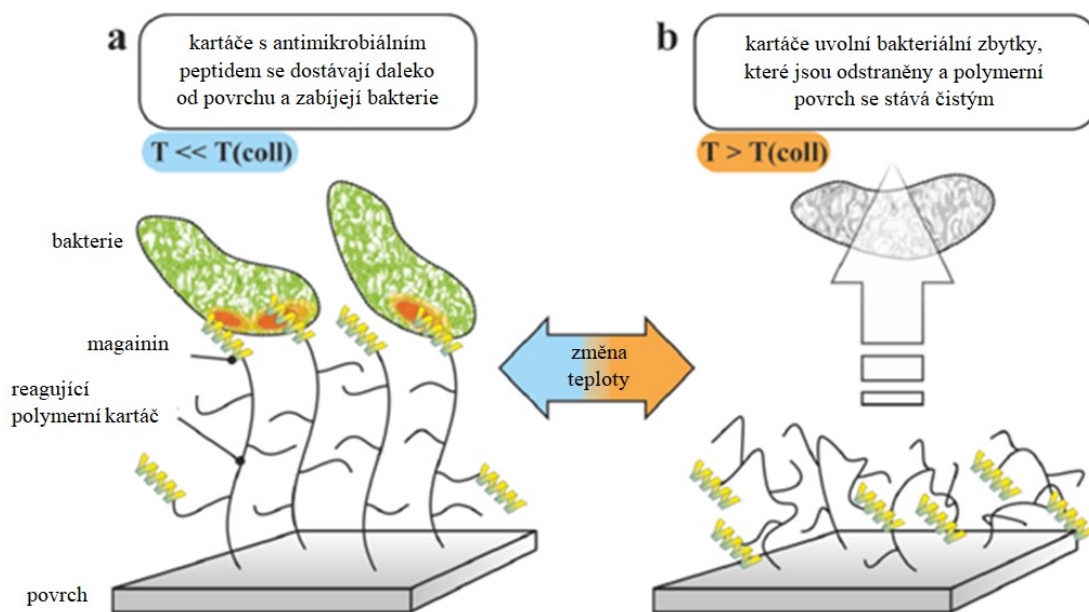
vrchy. Avšak u více hydrofobních bakterií, jako *Pseudomonas aeruginosa* a u velkých mikroorganismů, jako jsou kvasinky, byl pokles adheze menší. Pro inhibici adheze mikroorganismů s větším hydrofobním charakterem je nutno použít kartáče s vysokou molekulovou hmotností (2000 - 9800).

Dalšími příklady jsou kartáče z poly-2-alkyl-2-oxazolinu nebo z polyakrylamidu [45]. Zwitterionové polymerní kartáče mohou také zpomalit nebo dokonce předcházet adhezi mikroorganismů na povrch, protože hydratační vrstva obklopující iontový povrch zabraňuje nespecifické adsorpci proteinu. Důležitost antiadhezivních vlastností pro tvorbu biofilmu byla rovněž prokázána měřením adhezivních sil na silikonovém kaučuku pokrytém kartáčem [46]. Jedním z příkladů jsou poly N-3-sulfopropyl-N-methakryloxyethyl-N,N-dimethylamoniumbetainové kartáče, které byly testovány proti *E. coli* a *S. aureus* [45]. Další jsou polyethylenoxidové kartáče, polyvinylpyrolidonové povlaky a hydrofilní polyuretanové povlaky. Nicméně, i přes některé zřetelné chování ze zjednodušujících *in vitro* bakteriálních testů, tyto povlaky a ošetření prokázaly omezenou a kontroverzní účinnost ve studiích *in vivo* [47]. Mezi další typ antiadhezivních povlaků patří superhydrofobní povrchy, které jsou charakterizovány kontaktním úhlem vody  $> 150^\circ$  a jsou inspirovány lotosovým lístkem v přírodě, protože má hierarchickou mikro / nanostrukturu. Analýza superhydrofobních siloxanových a fluorosiloxanových povrchů ukázala minimální adsorpci bílkovin. U inherentně nanostrukturovaného hydrofilního hliníku bylo prokázáno snížení adhezivních sil, což vedlo k redukci jednotek tvořících kolonii *Staphylococcus aureus*. Tento účinek byl ještě výraznější po aplikaci hydrofobního teflonového povlaku [46].

### 2.3.2 Kontaktní povrchy

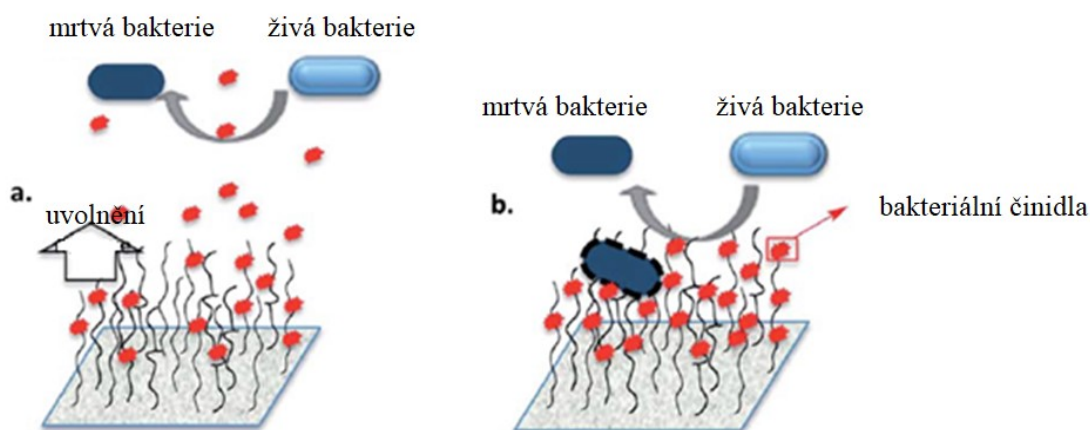
V této strategii jsou baktericidní činidla kovalentně nebo fyzikálně imobilizována na povrchu a při kontaktu způsobují smrt bakterií (obrázek 10 b). Obecně platí, že smrt bakterií je způsobena buď narušením buněčné stěny, nebo působením imobilizovaného antibakteriálního činidla s cílovou biomolekulou na povrchu bakterií [45]. Chen a kol. vytvořili antimikrobiální kontaktní povrch proti *E. coli* připojením poly-N,N-dimethyl-N-ethoxykarbonylmethyl-N-[2'-methakryloyloxyethyl]-amoniumbromidu. Neustálý kontakt s vodním prostředím vede k hydrolytickému štěpení ethylesteru. Výsledná zwitterionová skupina je biocidní a účinně odpuzuje všechny připojené mikrobiální buňky. Laloyaux a kol. představili povrch, který se skládá z povrchově připojeného magaininu na oligo(ethylenglykol)methakrylát (obrázek 9). Polymerní řetězce se protáhnou při pokojové teplotě a účinně zabijí mikrobiální

buňky. Při zahřátí nad teplotu 35 °C dochází ke kolapsu polymeru, který účinně odpuzuje připojené grampozitivní buňky. To umožňuje zabíjet nebo odpuzovat mikrobiální buňky častými změnami teploty [30].



Obrázek 9 – Koncept termorezistentních povrchů s magaininem připojeným na oligo(ethylenglykol)methakryláty, které (a) zabíjejí bakteriální buňky nebo (b) je odpuzují nad teplotou přechodu, upraveno dle [30]

Byla provedena také imobilizace povrchu antibiotiky s nízkou molekulovou hmotností, bakteriofágy, kationtovými antimikrobiálními peptidy, lysozymy, chitosanem a kvartérními amonnými polymery. Na základě studií *in vitro* a *in vivo*, imobilizace antibiotik s nízkou molekulovou hmotností, jako je penicilin, ampicilin a gentamycin, poskytla dlouhodobou antimikrobiální aktivitu a nízké riziko vedlejších účinků bez akumulace léků v tkáních [45]. Jedním z příkladů jsou kostní cementy uvolňující antibiotika, ve kterých jsou antibiotika včetně gentamicinu, tobramycinu a také vankomycinu nanášena do kompozic kostního cementu z polymethylmethakrylátu. Problémem je zde zpožděné uvolňování antibiotických činidel a z hlediska časového, poklesne koncentrace uvolňovaných antimikrobiálních činidel na neúčinnou hladinu. Taková nízká koncentrace bakteriálního činidla a/nebo gradient koncentrace může indukovat vývoj kmenů rezistentních vůči antibiotikům [47].



Obrázek 10 – Znárodnění (a) povrchů uvolňujících biocidy a (b) kontaktních krycích povlaků, kde jsou baktericidní činidla konjugována kovalentně s řetězci polymeru, upraveno dle [45]

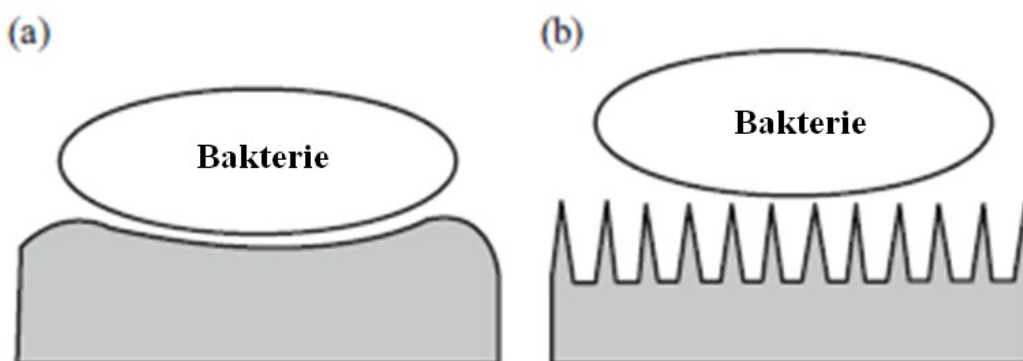
### 2.3.3 Povrchy uvolňující biocidy

Povrchy založené na polymerech uvolňujících biocidy (obrázek 10 a) často mění své povrchové vlastnosti po uvolnění biocidu. Nejvýznamnějšími příklady jsou antifoulingové barvy. Kombinují uvolňování biocidů s častým obnovováním povrchu, což odstraňuje všechny adsorbované mikroby. Takové nátěry fungují nejlépe na lodních trupech. Moderní antifoulingové barvy jsou nátěry obsahující měděné ionty, které uvolňují silně hydrofobní organoměďné estery kopolymerů kyseliny polymethakrylové. Nejdůležitějším aspektem je to, že hydrofobní povlak nebotná ve vodě a jsou hydrolyzovány pouze skupiny esterů organické mědi. Výsledný hydrofilní polymethakrylát je odstraněn a objeví se nový povrch bez kontaminace. Bohužel poměrně neškodná měď není dostačující k usmrcení všech přichycených mikrobů, a tak jsou nátěry naplněny tzv. posilovacími biocidy, kterými jsou obvykle pesticidy. Jsou stejně účinné jako povlaky na bázi tributyltinu. Ten však nepříznivě ovlivňuje životní prostředí a proto bylo jeho použití zakázáno [30].

### 2.3.4 Topografie povrchu

Mezi faktory ovlivňující přilnutí bakterií na povrch biomateriálu patří chemické složení, hydrofobicita, drsnost povrchu nebo konfigurace. V závislosti na hydrofobicitě bakterií a povrchu materiálu bakterie různě adherují na substráty s modifikovanými povrchovými vlastnostmi. Tento přístup vychází ze základního předpokladu, že modifikace povrchových vlastností materiálu (povrchová volná energie, polarita a topografie) může mít za následek

zmenšení adheze bakterií v počátečním stadiu procesu tvorby biofilmu. Modifikace povrchu může být prováděna chemickými reakčními činidly nebo aplikací vysokoenergetické elektromagnetické radiace (např. pomocí laseru, ultrafialového záření a záření gama). Další slibnou metodou je modifikace polymerních povrchů ionizovaným plynem (plazma). Pomocí plazmových procesů je možné změnit povrchovou chemickou kompozici a vlastnosti, jako je smáčivost, povrchová energie, index lomu, tvrdost, chemická inertnost a biokompatibilita [48].

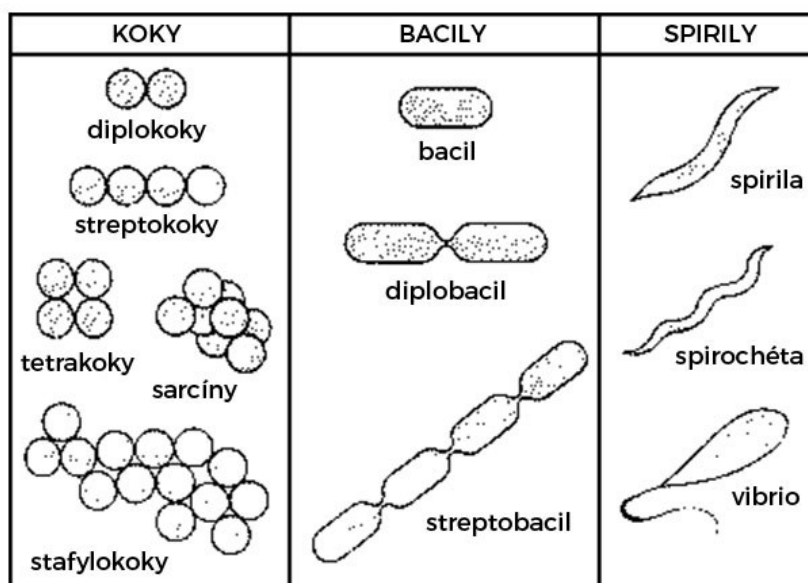


Obrázek 11 – a) mikrotopografie může podporovat adhezi bakterií, zatímco (b) nanotopografie může omezovat schopnost bakterií adherovat, upraveno dle [46]

### 3 BAKTERIE

Bakterie jsou největší skupinou živých organismů na Zemi [49]. Jsou označovány jako jednobuněčné organismy s prokaryotickým typem buňky. Díky jednoduché stavbě je usnadněna látková výměna s okolním prostředím, transport látek, metabolické reakce i reprodukce. Množení u bakterií probíhá velmi rychle a jsou tak schopny vytvářet za krátkou dobu velké populace. Díky jejich rychlému střídání se mohou adaptovat na měnící se prostředí a získat tak například odolnost vůči antibiotikům [50]. Mohou se vyskytovat buď v planktonní formě, kdy se volně pohybují, nebo jsou přisedlé k povrchu materiálu a tvoří biofilm [51]. Hlavní funkcí bakterií je tvorba biomasy tím, že metabolizují organické materiály na anorganické sloučeniny, které pak mohou být opět použity jinými organismy pro jejich růst a vývoj.

Bakteriální buňky se vyskytují v různých tvarech, typech a velikostech. Velikost je v rozmezí od 1  $\mu\text{m}$  do 5  $\mu\text{m}$  délky a 0,2  $\mu\text{m}$  až 1  $\mu\text{m}$  šířky. Tři základní typy bakterií jsou koky, bacily a spirily (obrázek 12). Koky jsou sférické nebo vejčité bakterie. Některé koky zůstanou po binárním štěpení spojeny a vznikají pak například diplokoky, streptokoky, stafylokoky. Bacily jsou tyčinkovité bakterie a stejně jako koky mohou tvořit diplobacily a streptobacily. Spirily jsou bakterie, které mají spirálovitý tvar a jsou husté a tvrdé. Tenké a pružné spirály se nazývají spirochéty. Existují také vibria, které jsou ve tvaru tyčinky s malým zakroucením [50, 52].



Obrázek 12 – Tvary bakteriálních buněk [53]

### 3.1 Klasifikace bakterií

Kromě klasifikace bakterií na základě jejich evolučních vztahů, morfologie a biochemických vlastností mohou být bakterie klasifikovány také podle jejich zdroje energie, požadavků na kyslík a teplotních preferencí.

Podle zdroje energie se dělí na autotrofní a heterotrofní bakterie. Autotrofní využívají oxid uhličitý jako zdroj uhlíku pro růst. Mezi autotrofní patří fotoautotrofy, jako jsou kyanobakterie, které získávají energii ze slunečního záření a uhlíku obsaženého v oxidu uhličitém. Chemoautotrofy získávají energii z anorganických sloučenin, jako je čpavek, sirovodík a oxid uhličitý. Chemolitotrofy jsou bakterie, které získávají energii oxidací anorganických sloučenin dusíku, síry, methanu nebo methanolu. Jsou důležité při recyklaci živin a při čištění odpadních vod. Heterotrofní bakterie získávají energii z organických sloučenin. Zástupci jsou chemoheterotrofy, které získávají energii a uhlík z organických sloučenin, rozkládají (metabolizují) organickou hmotu a jsou nezbytné pro sekundární biologické procesy.

Dále jsou klasifikovány podle toho, jak metabolizují látku. Metabolismus hmoty uvolňuje elektrony, které jsou nakonec přeneseny do konečného akceptoru elektronů. Bakterie, které potřebují kyslík, se nazývají aerobní. Ty, které kyslík nepotřebují, jsou anaerobní a podstupují anaerobní fermentaci. V tomto případě jsou konečné akceptory elektronu organické sloučeniny (alkoholy a organické kyseliny). Bakterie využívající oba typy metabolismu se nazývají fakultativně anaerobní.

Bakterie se dělí také rozděleny podle teplotních rozmezí, která jsou optimální pro jejich přežití a růst. Psychofilní bakterie rostou optimálně při teplotách od přibližně 0 do 20 °C. Meso-filní bakterie rostou nejlépe při 25 až 40 °C. Termofilní bakterie vyžadují pro optimální růst teploty 45 až 50 °C nebo i více [49].

Podle složení buněčné stěny se dělí na grampozitivní a gramnegativní bakterie. Gramovo barvení je metoda barvení bakterií, která se používá například při určení rodů bakterií. Grampozitivní bakterie se zbarvují fialově, protože mají silné buněčné stěny, které zachycují komplex krystalové violeti s jodidem draselným. Stěna se přidáním organických rozpouštědel jako je ethanol nebo aceton neodbarví. Tenké buněčné stěny gramnegativních bakterií nemohou udržet komplex krystalové violeti a přidáním ethanolu se odbarví. Pro pozorování se používá barvivo safranin, které způsobí červené zbarvení bakterií [52, 54]. Příklady gram-

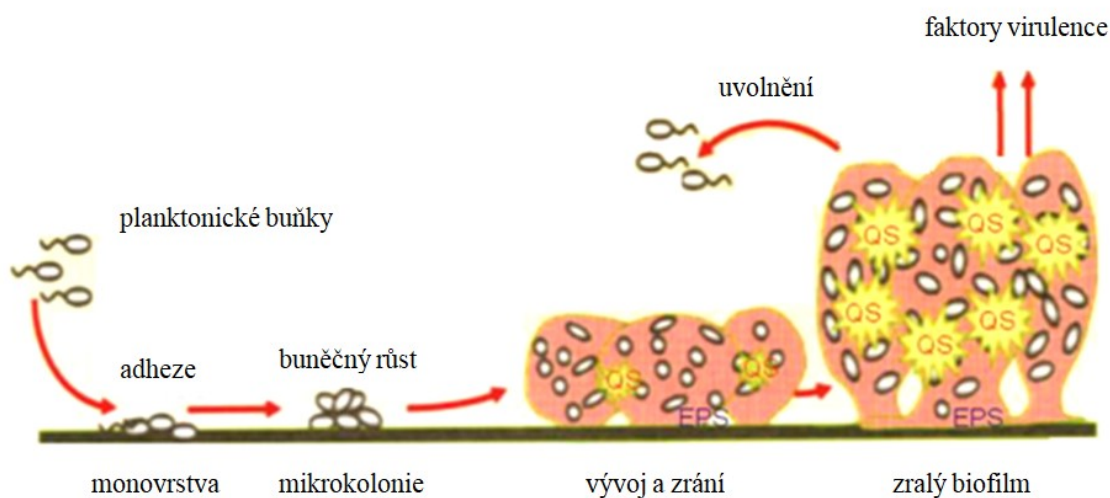


pozitivních bakterií jsou rody *Listeria*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Paenibacillus*, zatímco mezi gramnegativní bakterie patří například rody *Salmonella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* [55].

### 3.2 Biofilm bakterií

Bakterie přežívají v přírodě tak, že vytvářejí biofilmy na různých površích. Biofilm je strukturovaná komunita bakterií zabudovaných do extracelulární polymerní matrice [56] také označované jako glykokalyx. Je složena z extracelulárních látek, z komplexních polysacharidů, bílkovinných látek a glykopeptidů, lipidů, lipopolysacharidů a dalších materiálů, které slouží jako podpůrné jednotky, držící biofilm dohromady [57]. Biofilmy představují chráněný způsob růstu, který umožňuje přežití v nepřátelském prostředí. Bakteriální biofilmy jsou odolné vůči antibiotikům, dezinfekčním chemikáliím a dalším složkám vrozeného a adaptivního zánětlivého obranného systému těla. Gradienty živin a kyslíku, které se tvoří v biofilmu, mají za následek to, že buňky v různých oblastech biofilmu vykazují různé vzorce genové exprese, proto je růst biofilmu spojen se zvýšenou úrovní mutací. Bakterie v biofilmech komunikují (quorum sensing) pomocí molekul, které aktivují určité geny zodpovědné za produkci faktorů virulence.

Počáteční krok formování biofilmu (obrázek 13) zahrnuje planktonické (individuálně volně se pohybující) bakterie, které se reverzibilně připevňují k povrchu adhezním mechanismem. Bakterie jsou v této fázi stále citlivé na antibiotika, což může vysvětlit úspěšnost antibiotické profylaxe. Dalším krokem je nevratná vazba na povrch, tvorba polymerní matrice, množení bakterií a vznik mikrokolonií. V biofilmu postupně roste hustota populace, až do doby, kdy dojde k zapnutí genů, které brání zahuštění biofilmu [56]. Vývoj biofilmu a uvolňování buněk (jednotlivě nebo v klastrech) může být regulován genovou expresí závislou na hustotě obyvatelstva a řízenou pomocí molekul jako jsou acylované homoserinové laktony pro gramnegativní bakterie a specifické peptidy pro grampozitivní [57]. Uvolněné bakteriální buňky se následně mohou rozšířit na další místa a tvořit nové biofilmy [56].



Obrázek 13 – Časový průběh tvorby biofilmu *P. aeruginosa*, QS označuje komunikaci mezi buňkami a EPS je extracelulární biofilmová matrice, upraveno dle [56]

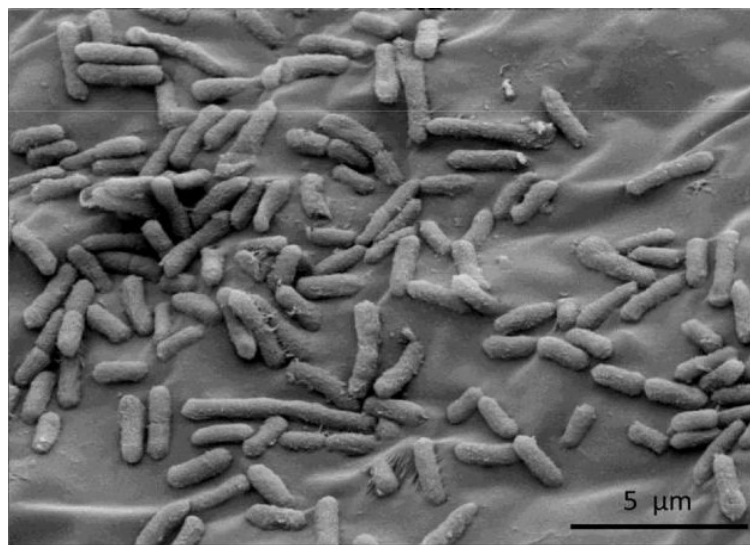
### 3.3 Bakterie použité v praktické části

#### 3.3.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* patří mezi gramnegativní fakultativně anaerobní bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*. Má tyčinkovitý tvar a běžně se vyskytuje v půdě, ve vodě a ve střevní mikroflóře člověka i jiných teplotokrevných živočichů. Pomáhá udržovat rovnováhu ve střevě, protože produkuje koliciny, které brání růstu jiných bakterií. Tvoří také některé stimulační látky a vitaminy. Zatímco mnoho kmenů je neškodných, některé kmeny mohou být patogenní a mohou vyvolávat průjemová onemocnění, infekce močových cest a nozokomiální infekce [55].

Kmeny *E. coli* jsou rozděleny na základě tří hlavních povrchových antigenů: O (somatický), H (flagelární) a K (kapsulární). Specifické typy a skupiny jsou často spojeny s určitými klinickými syndromy, a proto slouží jako identifikovatelné chromozomální markery, které korelují se specifickými faktory virulence. V současnosti existuje nejméně šest tříd bakterií *E. coli*, u nichž je známo, že způsobují gastrointestinální onemocnění přenášené potravinami u lidí. Enteropatogenní *E. coli* (EPEC) typicky souvisí s dětskými průjmy, které jsou důsledkem bakteriální adheze k epiteliálním buňkám a zničení střevních buněk. Enterotoxigenní *E. coli* (ETEC) je také spojena s dětským průjmem v rozvojových zemích, stejně jako cestovní průjmem u osob cestujících do rozvojových zemí. Kromě různých kolonizačních faktorů střev produkují kmeny ETEC tepelně stabilní a/nebo tepelně labilní enterotoxiny (podobné

toxinu cholery), které stimulují výstelku střev. To vede k nadměrné sekreci tekutin vyvolávající průjem. Enteroinvazivní *E. coli* (EIEC) napadá a následně se šíří mezi epiteliální buňky tlustého střeva a poškozují epiteliální výstelku. Důsledkem je vodnatý průjem často obsahující krev. Enteroagregativní *E. coli* (EAEC) využívá fimbrie k vázání na buňky tenkého střeva v malých shlucích. Následná produkce tepelně stabilního enterotoxinu a cytotoxinu pravděpodobně způsobuje průjem u malých dětí. Je stále častěji uznávána jako příčina perzistentních průjmů u dospělých v rozvojových i průmyslově vyspělých zemích. Enterohemoragická *E. coli* (EHEC) označovaná také jako Shiga-like toxigenní *E. coli* (STEC) vykazuje zvýšenou virulenci s potenciálně vysokou úmrtností. Infekce se projevují nástupem extrémně bolestivých břišních křečí, následným vodnatým průjmem s krví, zhoršením hemolytické anémie, trombocytopenie a selháním ledvin. Difúzně adherentní *E. coli* (DAEC), je spojena s vodnatými průjmy u malých dětí v rozvojových i rozvinutých zemích. Způsobuje také opakující se infekce močových cest. Důsledky této perzistence jsou neznámé, ale několik pozorování naznačuje potenciální roli ve vývoji chronického zánětlivého střevního onemocnění [58, 59].

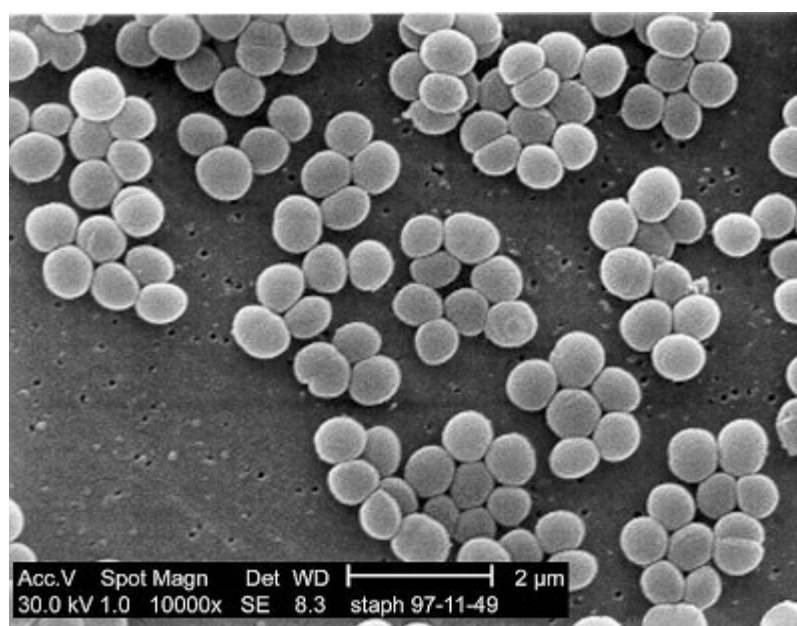


Obrázek 14 – *Escherichia coli* [60]

### 3.3.2 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* patří mezi grampozitivní bakterie kulovitěho typu. Vyskytuje se jednotlivě, nebo ve shlucích. Lze ji najít v půdě, vodě, potravinách, ale je také součástí kožní mikroflóry [55]. Přibližně 30 % lidské populace je kolonizováno *S. aureus*. Je hlavní příčinou bakterémie a infekční endokarditidy, infekcí souvisejících s osteoartikulární, kožní a měkkou tkání, a také často tvoří biofilm na površích medicínálních instrumentů. Může také

způsobovat infekce protetických zařízení, implantovatelných srdečních zařízení, intravaskulárních katétrů a dalších [61]. Stafylokoková infekce se vyskytuje nejčastěji v kůži a měkkých tkáních. Porušení kůže a mukózní obrany předurčuje k potenciálně život ohrožující invazivní stafylokokové infekci, nejčastěji se vyskytující jako infekce způsobená krví. Tyto invazivní infekce jsou stále častěji primárním důsledkem složitých lékařských postupů a terapií. Problémem infekcí je však rezistence *S. aureus*. Poprvé se rezistence projevila u několika kmenů vůči penicilinu. Kmeny *S. aureus* poté získali rezistenci na léčiva s methicilinem (MRSA), které penicilin nahradily. Kromě rezistence na antibiotika vykazují některé kmeny odolnost vůči železu, manganu, zinku a mědi [62].



Obrázek 15 – *Staphylococcus aureus* [63]

### 3.4 Antimikrobiální rezistence

Jedním z hlavních problémů způsobených biofilmy je jejich zvýšená tolerance vůči antimikrobiálním látkám, které narušují léčbu infekcí souvisejících s biofilmem v klinických podmínkách [57]. Zvýšený vývoj bakteriální rezistence na antibiotika a vysoký výskyt infekcí jsou velmi znepokojivé, jelikož mikrobiální kontaminace je závažným problémem v mnoha oblastech. Zejména se jedná o biomedicínský průmysl, systémy čištění vody, balení a skladování potravin [48]. Jedním z mechanismů rezistence biofilmů vůči antimikrobiálním činidlům je neschopnost látky proniknout do celé hloubky biofilmu, protože polymerní látky tvořící matici biofilmu, zpomalují difúzi antibiotik. Dalším mechanismem je rychlá změna mikroprostředí biofilmu, která vede k neaktivnosti antibiotik. Ve spodních vrstvách biofilmu

není kyslík a vzniká zde anaerobní prostředí. Například aminoglykosidy nejsou v anaerobním prostředí aktivní. U biofilmů může malá subpopulace bakterií reverzibilně vstoupit do pomalu rostoucího stavu. Tyto buňky se označují jako spící a jsou vysoce rezistentní vůči působení antibiotik. Biofilmy se stávají odolné nejen vůči antibiotikům, ale také odolávají imunitní odpovědi [57].

Antibiotická rezistence je problémem hlavně u implantovaných zdravotnických prostředků. Infekce je nejčastěji způsobena komenzálními bakteriemi, často pocházejícími od hostitele. Grampozitivní bakterie, včetně *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis*, se nacházejí na 90 % všech implantovaných zdravotnických prostředcích. Jiné běžné gramnegativní organismy spojené s infekcí biomateriálů zahrnují *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* a *Proteus vulgaris* [47].

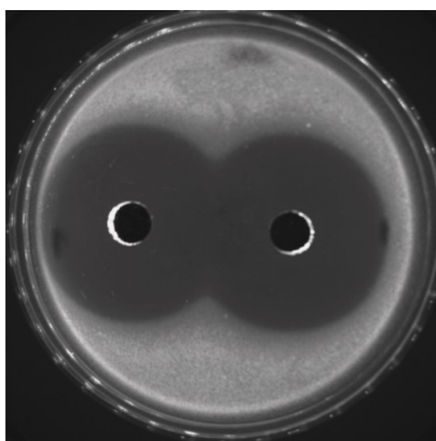
Prevenčí mohou být různá antimikrobiální činidla nebo povlaky schopné zabránit kolonizaci povrchů materiálů a tkání mikroorganismy [48]. Antimikrobiální polymery představují velmi slibnou třídu terapeutik s jedinečnými vlastnostmi pro boj s mikrobiálními infekcemi [34].

## 4 METODY CHARAKTERIZACE ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY

Zavedení nových antimikrobiálních systémů vyžaduje stanovení metod, které mohou posoudit antimikrobiální aktivitu těchto látek. Testy antimikrobiální citlivosti (AST) se rutinně používají v klinických mikrobiologických laboratořích k vyhodnocení citlivosti mikrobiálních patogenů nebo k detekci rezistence na antimikrobiální látky. Metody ATS běžně zahrnují difúzní metody, diluční metody (ředění agarů a mikrodiluce bujónů) a jejich kombinace (E-test) [64]. Nejčastěji používanou technikou je disková difúzní metoda, která poskytuje kvalitativní výsledek (zóny) na rozdíl od dilučních metod, díky kterým získáme kvantitativní výsledky [65].

### 4.1 Difúzní disková metoda (Kirby-Bauerův test)

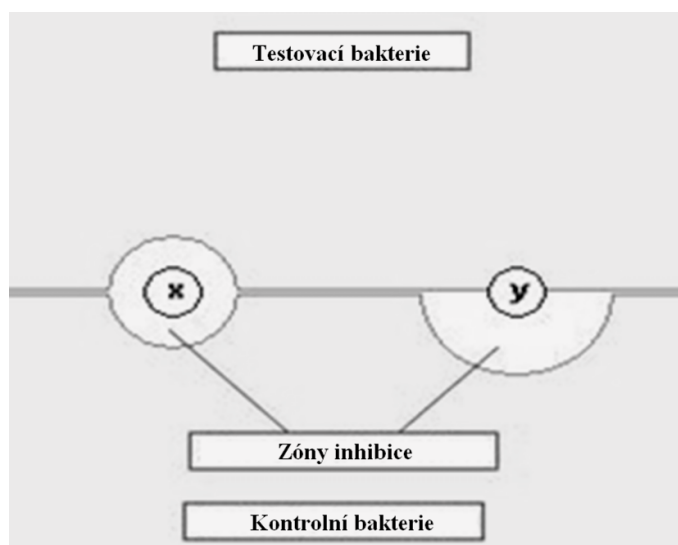
Difúzní disková metoda, běžně označována jako Kirby-Bauerův test, poskytuje kvalitativní míru účinku antimikrobiálního činidla proti baktériím. Při této zkoušce se na naočkovanou agarovou půdu umístí disk se známým množstvím antimikrobiálního činidla. Antibiotikum difunduje z disku do agarů a vzniká tak koncentrační gradient léčiva. V důsledku toho dochází ke vzniku zóny inhibice bakteriálního růstu. Velké zóny inhibice naznačují, že testovaný organismus je citlivý, zatímco malá nebo nepřítomná zóna inhibice indikuje rezistenci. Průměr inhibiční zóny se měří v mm a o citlivosti nebo rezistenci se rozhoduje podle tabulkových hodnot. Tato metoda je jednoduchá, ekonomická a existuje několik komerčně dostupných disků [64, 66].



Obrázek 16 – Difúzní disková metoda – testování antimikrobiálních vlastností antibiotika Penicilin/Streptomycin, Centrum polymerních systémů ve Zlíně

## 4.2 Stokesův test

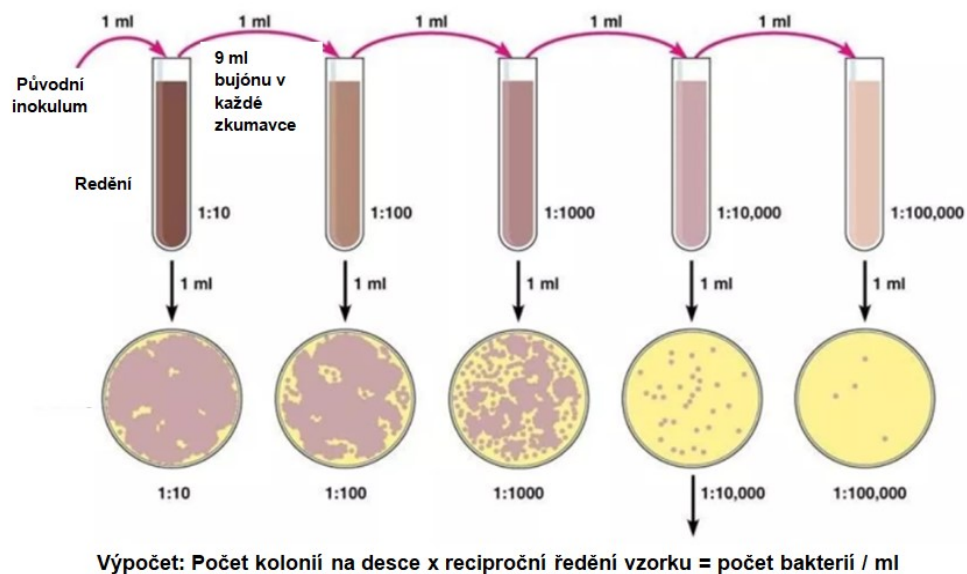
Stokesův test se liší od difúzní diskové metody v použití jak kontrolního, tak testovacího kmene na stejné desce. Stokesova disková difúzní technika není tak vysoce standardizovaná jako Kirby-Bauerova technika a je používána v laboratořích, zejména pokud nelze zaručit přesné množství antimikrobiálních látek na disku. Kontrolní bakteriální kultura je inokulována částečně na povrchu agarové desky a testovaná bakteriální suspenze je inokulována na zbylou část. Disky jsou umístěny přesně na rozhraní (obrázek 17) [66].



Obrázek 17 – Stokesův test, upraveno dle [66]

## 4.3 Diluční metoda

Tato metoda se používá pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) antimikrobiálních látek. Diluční metoda se provádí ředěním antimikrobiálních činidel buď v agarovém médiu, nebo v médiu bujónu. Ředění (obrázek 18) zahrnuje přípravu sériových roztoků antimikrobiálních činidel, které jsou naočkovány standardním počtem mikroorganismů ve zkumavkách a jsou inkubovány přes noc. Buňky se zkoumají na viditelný růst bakterií zákalem. Nejmenší koncentrace antimikrobiálního činidla, která zabraňuje vzniku zákalu, se považuje za MIC, obvykle vyjádřená v  $\mu\text{g/ml}$  nebo  $\text{mg/l}$ . Kromě stanovení MIC lze také odhadnout minimální baktericidní koncentraci (MBC). Hlavní výhodou této techniky je generování kvantitativního výsledku. Nevýhodou jsou možné chyby při přípravě roztoků antibiotik [64, 66].



Obrázek 18 – Diluční metoda, upraveno dle [67]

#### 4.4 E-test

E-test je metoda založená na difúzi kontinuálního koncentračního gradientu antimikrobiálního činidla z plastového proužku do agarů (obrázek 19). Tato nově vyvinutá *in vitro* technika byla vytvořena k překonání několika nevýhod předešlých metod a také k zachování principu metody ředění agarů, čímž vzniká přesný, reprodukovatelný referenční kvantitativní výsledek MIC [65]. Bakterie se pěstují na agarové desce a testovací plastový pásek se umístí na povrch. Následně antimikrobiální činidlo difunduje do agarů a generuje se exponenciální gradient antimikrobiální koncentrace. Po inkubaci lze MIC přímo odečíst z testovacího proužku podle pokynů výrobce, kde se eliptická zóna inhibice protíná s měřítkem MIC na pásu [64].



Obrázek 19 – E-test [66]

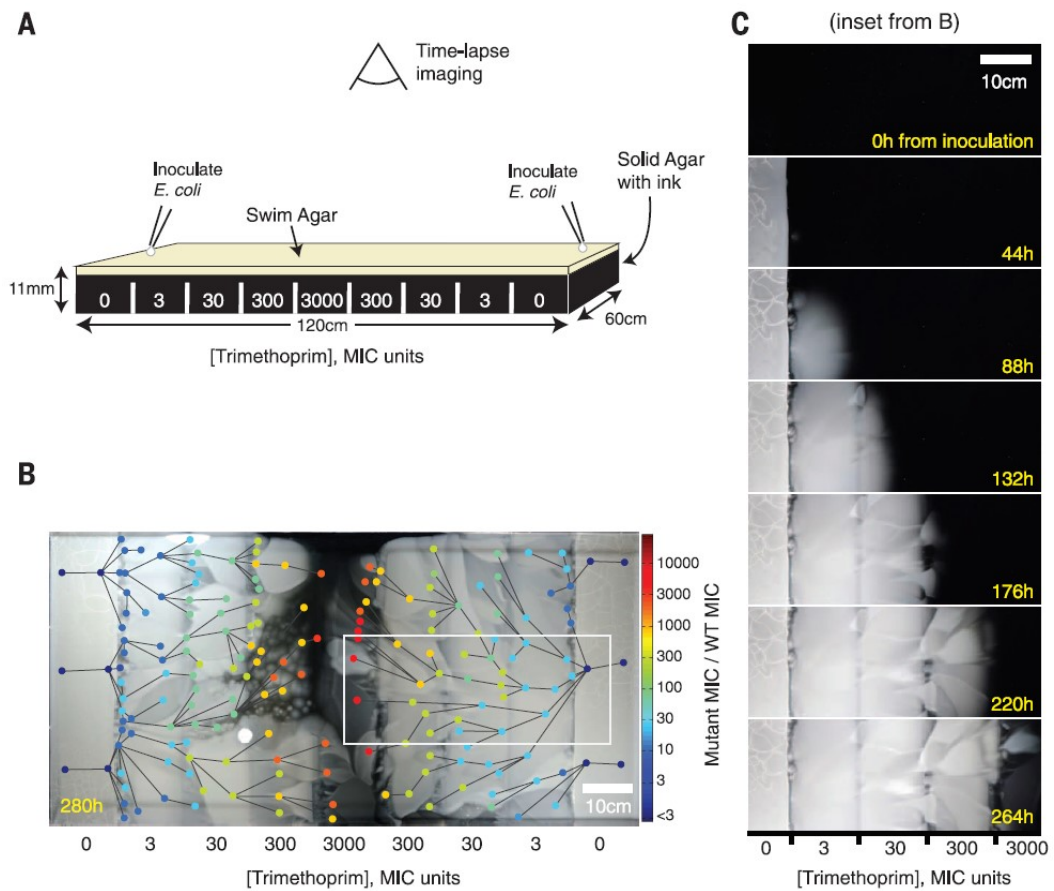


## 4.5 Sledování mikrobiálního vývoje a adaptace

Zvýšení odolnosti bakterií proti antibiotikům vedlo k řadě studií zaměřených na pochopení tohoto problému. Studie Baym a kol. uvádí experimentální zařízení pro testování chování bakterií, které umožňuje jejich migraci a adaptaci ve velkém prostorově strukturovaném prostředí (obrázek 20). Tato metoda poskytuje možnost studia mikrobiální adaptace a přímou vizualizaci evoluční dynamiky. Postupem času dochází ke vzniku rezistence a u některých linií k fenotypovým i genotypovým změnám. V přirozeném a klinickém prostředí migrují bakterie do prostorově odlišných oblastí a strukturované mikroprostředí zvyšuje míru adaptace na antibiotika prostřednictvím genetických změn.

Ve studii Baym a kol. byla proto vytvořena velká akrylátová deska o rozměrech 120 x 60 cm obsahující agar se symetrickým čtyřstupňovým gradientem postupujícím směrem dovnitř s nárůstem koncentrace antibiotik trimethoprimu (TMP) a ciprofloxacinu (CPR). Velký rozměr desky zajišťuje rozsáhlou populaci a tím míru mutací v ní a zároveň udržuje antibiotický gradient navzdory difúzi. Poté byly na jednom místě desky s nulovou koncentrací antibiotik inokulovány bakterie *E. coli*. Bakterie využívají živiny lokálně, a pak se rozšiřují chemotaxií do jiných oblastí. Protože se koncentrace antimikrobiální látky zvyšuje, dochází ke vzniku odolnějších mutantů, kteří se mohou dále rozšířit na části obsahující vyšší množství antibiotické látky. Vzhledem k tomu, že v populaci vznikají rezistentní mutanti, jejich potomci migrují do dalšího stupně koncentrace antimikrobiální látky a vyvíjejí se. Přilehlé mutantní linie navzájem soupeří o omezený prostor, což vede k tomu, že některé linie úplně blokují růst ostatních. Když odolnější linie dosáhnou další zvýšené úrovně koncentrace antibiotika, při které také nejsou schopny růst, vzniknou sekundární mutace a proces se opakuje. Nakonec bakterie dosahují a překračují nejvyšší koncentraci léčiva, což ukazuje na značný nárůst rezistence vůči antibiotiku. Fenotypizace mutantů z oblasti s nejvyšší koncentrací vykazuje faktor zvýšení MIC.

Toto experimentální zařízení není určeno k přímému simulování přirozeného nebo klinického prostředí, ale zachycuje jedinečné aspekty evoluce. Na rozdíl od krátkodobých testů, které nepostihují dynamiku vývoje vztahu mezi mikroorganismy a příslušným materiálem, umožňuje tento prostorový gradient adaptaci bakterií takovému prostředí, které při krátkodobých testech jejich růst inhibuje [68].



Obrázek 20 – Experimentální zařízení pro studium mikrobiální evoluce v prostoro­vě strukturovaném prostředí. (A) Čtyř­stupňový gradient trimethoprimu. Antibiotikum se přidává v sekcích, aby exponenciální gradient stou­pal dovnitř. (B) Deska s gradientem trimethoprimu po 12 dnech. (C) Časosběrné snímky části desky. Opakovaná mutace a selekce lze vidět v každém kroku [68].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 MATERIÁLY A METODIKA

### 5.1 Kultivační médium

Pro kultivaci bakterií byl použit Trypton – sojový agar (TSA) značky Himedia, ref. M290-500G. U provedených testů byl pro růst bakterií použit nejprve Plate Count agar (PCA) značky Himedia, ref. M091-500G, později Mueller Hinton agar (MH) značky Himedia, ref. M173-500G.

#### 5.1.1 Trypton - sojový agar

Trypton – sojový agar je univerzální médium používané pro kultivaci nutričně náročných i nenáročných mikroorganismů a pro kontrolu mikrobiálních limitů u nesterilních materiálů.

Bylo naváženo 16,0 g TSA, který byl rozpuštěn ve 400 ml destilované vody. Agar byl poté sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Konečné pH při teplotě 25 °C je  $7,3 \pm 0,2$ . Složení Trypton - sojového agaru je v tabulce 1.

*Tabulka 1 – Složení Trypton – sojového agaru*

Složení	Množství
Enzymatický hydrolyzát kaseinu	15,0 g/l
Sojový pepton	5,0 g/l
Chlorid sodný	5,0 g/l
Agar	15,0 g/l

#### 5.1.2 Plate Count agar

Plate Count agar se používá pro stanovení počtu mikroorganismů v potravinách, vodě, odpadní vodě a také na klinických vzorcích.

Bylo naváženo 9,4 g PCA, který byl rozpuštěn ve 400 ml destilované vody. Agar byl poté sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Konečné pH při teplotě 25 °C je  $7,0 \pm 0,2$ . Složení Plate Count agaru je v tabulce 2.

Tabulka 2 – Složení Plate Count agaru

Složení	Množství
Enzymatický hydrolyzát kaseinu	5,0 g/l
Kvasnicový extrakt	2,5 g/l
Glukosa	1,0 g/l
Agar	15,0 g/l

### 5.1.3 Mueller Hinton agar

Mueller Hinton agar se používá pro kultivaci patogenních druhů *Neisseria* a pro stanovení citlivosti mikroorganismů k antimikrobiálním látkám difuzní diskovou metodou.

Bylo naváženo 15,2 g MH, který byl rozpuštěn ve 400 ml destilované vody. Agar byl poté sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Konečné pH při teplotě 25 °C je  $7,3 \pm 0,1$ . Složení Mueller Hinton agaru je v tabulce 3.

Tabulka 3 – Složení Mueller Hinton agaru

Složení	Množství
Hovězí masová infuse	300,0 g/l
Kyselý hydrolyzát kaseinu	17,5 g/l
Škrob	1,5 g/l
Agar	17,0 g/l

## 5.2 Bakterie

Pro testování antimikrobiální aktivity polymerů byly použity bakterie z České sbírky mikroorganismů v Brně.

### 5.2.1 *Escherichia coli* CCM 4517

Zdrojem jsou lidské výkaly. Používá se pro stanovení antimikrobiálních činidel v pracovních kapalinách, antimikrobiálních konzervačních prostředků a očních přípravků. Patří do rizikové skupiny 2. Doporučené kultivační médium je TSA a teplota pro kultivaci 37 °C [69].

### 5.2.2 *Escherichia coli* CCM 3954

Jedná se o biofilm tvořící bakterii, jejímž zdrojem je klinický izolát. Je to mezinárodní standardní referenční kmen pro testování citlivosti na antibakteriální disk. Používá se také pro kontrolu kvality antimikrobiální citlivosti pomocí veterinárních antimikrobiálních látek. Doporučené kultivační médium je TSA a teplota pro kultivaci 37 °C [69].

### 5.2.3 *Staphylococcus aureus* CCM 4516

Zdrojem je lidská léze. Používá se pro stanovení antimikrobiálních činidel v pracovních kapalinách, antimikrobiálních konzervačních prostředků a očních přípravků, je to kontrolní kmen pro chemické dezinfekční prostředky a antiseptické zkoušky. Patří do rizikové skupiny 2. Doporučené kultivační médium je TSA a teplota pro kultivaci 37 °C [69].

### 5.2.4 *Staphylococcus aureus* CCM 2022

Je to biofilm tvořící bakterie, která se používá se pro test neomycinu v tělních tekutinách, krmivech, mléku a farmaceutických přípravcích, pro turbidimetrický test tetracyklinu, chlor-tetracyklinu a oxytetracyklinu a pro testování sterility. Patří do rizikové skupiny 2. Doporučené kultivační médium je TSA a teplota pro kultivaci 37 °C [69].

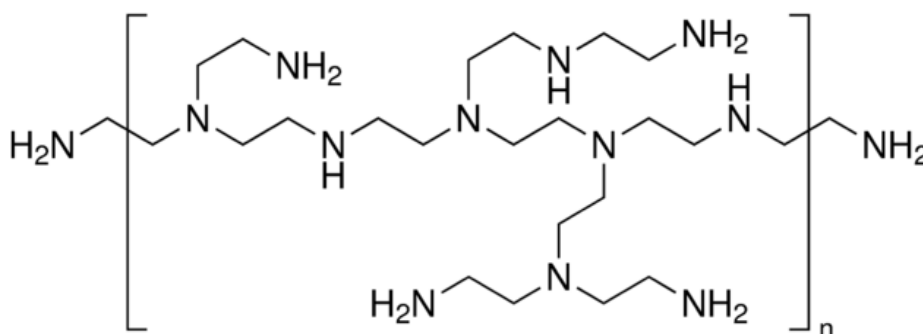
## 5.3 Testované látky

Testovací metody byly provedeny u následujících dostupných látek; rozvětveného polyethyleniminu (PEI), polyethylenglykolu s průměrnou molekulovou hmotností 400 (PEG 400), polyethylenglykolu s průměrnou molekulovou hmotností 600 (PEG 600), dále pak u monomerů vodivých polymerů anilinu a pyrolu, které se mohou v polymeru vyskytovat jako rezidua. Testy byly provedeny také u antibiotika Penicilin/Streptomycin.

### 5.3.1 Polyethylenimin

Z literatury bylo zjištěno, že PEI vykazuje antimikrobiální účinky proti *S. aureus* i *E. coli* [70]. Pro testování byl použit rozvětvený polyethylenimin značky Sigma Aldrich (kat. č. 408719) s průměrnou molekulovou hmotností 800 (obrázek 21). Používá se na detergenty, lepidla, úpravu vody, tiskařské barvy, barviva, v kosmetice a papírenském průmyslu, dále jako promotor adheze, laminovací základ, fixační činidlo, flokulant, kationtový

dispergátor, zlepšovač stability, povrchový aktivátor, chelatační činidlo, lapač aldehydů a oxidů [13].

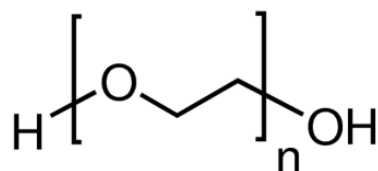


Obrázek 21 – Strukturální vzorec rozvětveného polyethyleniminu [13]

### 5.3.2 Polyethylenglykol

Polyethylenglykol je syntetický, hydrofilní, biokompatibilní polymer s širokým použitím v biomedicínských a jiných aplikacích. Často je prováděna biokonjugace s PEG, což je kovalentní konjugace s látkami jako jsou peptidy, proteiny nebo oligonukleotidy s PEG pro optimalizaci farmakokinetických vlastností. Při podávání léčiva mohou být PEG použity jako linkery pro konjugáty protilátka – lék nebo jako povrchový povlak částic pro zlepšení systémového dodávání léčiva.

Pro testování byl použit polyethylenglykol značky Sigma Aldrich (kat. č. 807485) s průměrnou molekulovou hmotností 400 a polyethylenglykol značky Sigma Aldrich (kat. č. 202401) s průměrnou molekulovou hmotností 600 [13]. Na obrázku 22 je strukturální vzorec polyethylenglykolu.



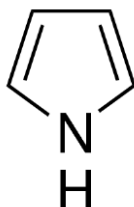
Obrázek 22 – Strukturální vzorec polyethylenglykolu [13]

### 5.3.3 Pyrol

Antibakteriální vlastnosti patří mezi nejatraktivnější vlastnosti látek modifikovaných vodivými polymery [71]. Polypyrol se řadí mezi nejvíce studované vodivé polymery. Polypyrol

má mnoho vynikajících vlastností, například dobrou *in vitro* a *in vivo* biokompatibilitu, dobrou chemickou stabilitu a přiměřeně vysokou vodivost za fyziologických podmínek. Může být snadno modifikován tak, aby byl vhodnější pro biomedicínské aplikace prostřednictvím zabudování bioaktivních molekul. Používá se v mnoha aplikacích, včetně palivových článků, ochrany proti korozi, počítačových displejů, mikrochirurgických nástrojů, biosenzorů a systémů s řízeným uvolňováním léčiv [72].

Pro testování byl použit pyrrol značky Sigma Aldrich (kat. č. 131709). Tento typ se také používá při elektropolymeraci makroporézních vodivých polymerních filmů, nebo ke studiu vazby 1,2,3-triazolu na pyrrol [13]. Strukturní vzorec pyrrolu je na obrázku 23.



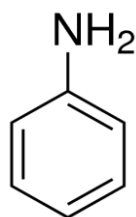
Obrázek 23 – Strukturní vzorec pyrrolu [13]

#### 5.3.4 Anilin

Druhý velmi zkoumaný vodivý polymer je polyanilin (PANI). PANI byl zkoumán pro biosenzory, neurální sondy, aplikace pro řízené uvolňování léčiv a tkáňové inženýrství [72]. Bylo zjištěno, že polyanilin vykazuje antibakteriální aktivitu v důsledku různých faktorů, jako je povrchová hydrofilita a elektrostatická adsorpce mezi polyanilinem a bakteriemi, přímý kontakt mezi materiálem a bakteriálními buňkami a přítomnost aminoskupin [71]. Také některé PANI kopolymery vykazovaly vysokou antibakteriální aktivitu, což z nich činí vynikající materiály pro použití v tkáňovém inženýrství [72].

Pro testování byl použit anilin značky Sigma Aldrich (kat. č. 242284), jehož strukturní vzorec je na obrázku 24. Je to aromatický primární amin, který může být použit jako reaktant při syntéze organických meziproductů, jako je 3-chlor-N-fenylpyridin-2-amin, (Z)-methyl 3-(fenylamino)but-2-enoát-2-jod-N-fenylbenzamid, 2,4-dichlorchinolinu a N-(2-propynyl) anilinu. Je ve vodě rozpustný a při skladování tmavne na červenohnědou barvu [13].





Obrázek 24 – Strukturální vzorec anilinu [13]

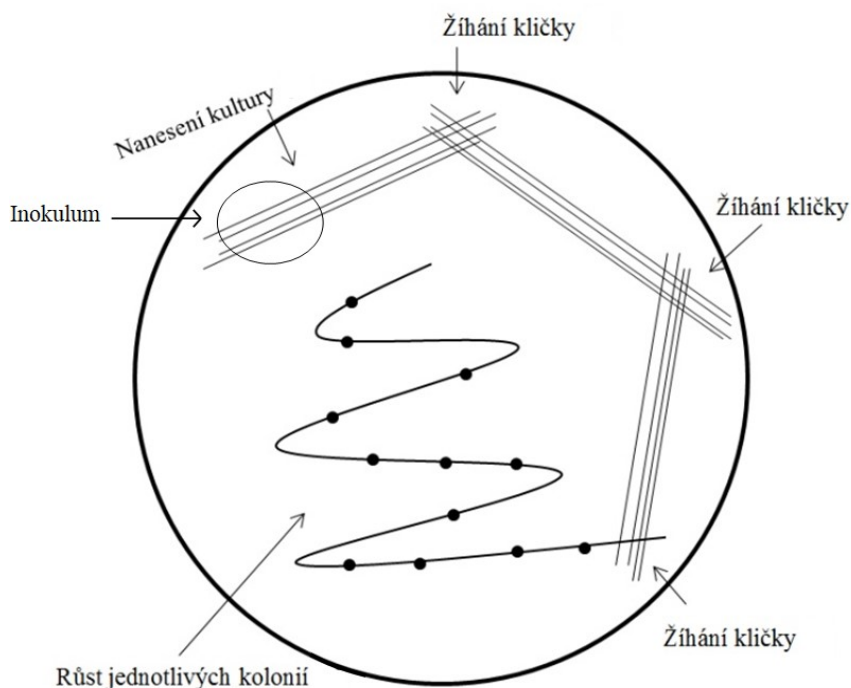
### 5.3.5 Antibiotikum Penicilin/Streptomycin

Používá se pro prevenci bakteriální kontaminace buněčných kultur v důsledku jejich účinného kombinovaného působení proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím. Penicilin je získán z plísní *Penicillium*, které působí tak, že přímo interferují s bakteriální buněčnou stěnou a nepřímo spouští uvolňování enzymů, které mění buněčnou stěnu. Streptomycin je purifikován ze *Streptomyces griseus*. Způsobuje inhibici syntézy proteinů a tím smrt citlivých bakterií [73]. Pro testování bylo použito antibiotikum Penicilin/Streptomycin značky Biosera.

## 5.4 Inokulace bakterií

K inokulaci bakterií byla použita metoda křížového roztěru. Princip spočívá v postupném ředění vzorku, kdy na konci získáme dílčí kolonie bakterií.

Na povrch kultivačního média je pomocí sterilní vyžíhané kličky přenesen vzorek, který je následně kličkou rozetřen. Poté je klička vyžíhána a tažením přes vzorek jsou rozetřeny do 3 – 4 pruhů. Znovu je klička vyžíhána a opět tažením vytvořeny další 3 – 4 pruhy přes původní. Tento krok je proveden ještě jednou a přes poslední pruhy je vyžíhanou kličkou plynulým tahem rozetřena kultura bakterií ve tvaru tzv. hádka, viz obrázek 25. Tím dojde k oddělení jednotlivých kolonií.



Obrázek 25 – Křížový roztěr, upraveno dle [74]

## 5.5 Experimentální uspořádání

Pro zjištění antimikrobiálního účinku testovaných látek byla použita difúzní disková metoda, jejíž postup je ověřený a výhodou je časová nenáročnost. Byly testovány různé koncentrace látek. Stejně koncentrace testovaných látek byly následně použity při tvoření koncentračního gradientu u testování mikrobiálního vývoje a adaptace bakterií.

### 5.5.1 Difúzní disková metoda

#### 5.5.1.1 Příprava bakteriální suspenze

Inkubace testovaných bakterií probíhala 24 h před provedením testu při teplotě 35 °C. Do zkumavky bylo nalito 5 ml sterilního fyziologického roztoku. Pomocí vyžehané kličky byly testované bakterie v množství přibližně  $10^6 - 10^8$  vpraveny do zkumavky a promíchány použitím třepačky Vortex V-1 plus. Vzniklá suspenze byla následně aplikována mikropipetou.

#### 5.5.1.2 Očkování Mueller Hinton agaru

Do středu prázdné Petriho misky byl pipetován 1 ml bakteriální suspenze. Následně byla suspenze zalita 20 ml MH agaru vytemperovaného na 48 °C. Vše bylo důkladně promícháno krouživým pohybem. Mezitím byl sterilizován korkovrt v 70 % etanolu. Do ztuhlého agaru

byly korkovrtem vyhloubeny dva kruhové otvory o průměru 9 mm. Následně byla do vzniklých otvorů pipetována jednotlivá množství testovaných látek, viz tabulka 4. S výjimkou PEI, PEG 400 a PEG 600 bylo do otvorů přímo pipetováno množství testované látky. Kvůli vysoké viskozitě PEI, PEG 400 a PEG 600 bylo dané množství těchto látek naváženo, rozpuštěno v 1 ml destilované vody a poté pipetováno do jamek 100  $\mu$ l vzniklého roztoku. Vzorky byly inkubovány po dobu 24 h při teplotě 35 °C.

Tabulka 4 – Množství testovaných látek difúzní diskovou metodou

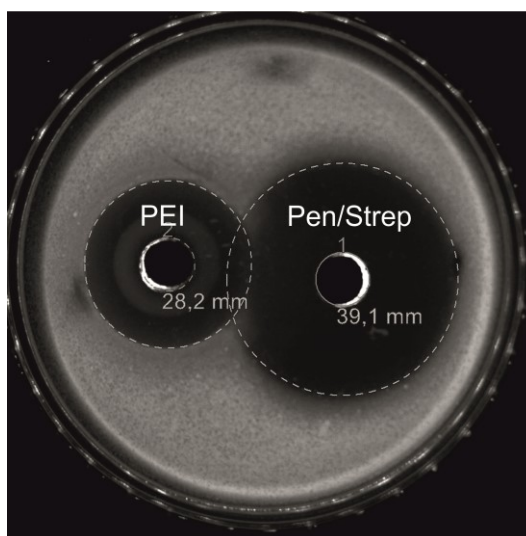
Testovaná látka	Testovaná bakterie	Množství testované látky						
		5 mg/ml	10 mg/ml	20 mg/ml	30 mg/ml	40 mg/ml	100 $\mu$ l	
Polyethylenimin	<i>E. coli</i> CCM 4517	5 mg/ml	10 mg/ml	20 mg/ml	30 mg/ml	40 mg/ml	100 $\mu$ l	
	<i>S. aureus</i> CCM 4516	5 mg/ml	10 mg/ml	20 mg/ml	30 mg/ml	40 mg/ml	100 $\mu$ l	
	<i>E. coli</i> CCM 3954	5 mg/ml	10 mg/ml	20 mg/ml	30 mg/ml	40 mg/ml		
	<i>S. aureus</i> CCM 2022	5 mg/ml	10 mg/ml	20 mg/ml	30 mg/ml	40 mg/ml		
Polyethylenglykol 400	<i>E. coli</i> CCM 4517	45 mg/ml	50 mg/ml	55 mg/ml	60 mg/ml	100 mg/ml	200 mg/ml	300 mg/ml
		400 mg/ml	500 mg/ml	700 mg/ml	900 mg/ml	1000 mg/ml	1100 mg/ml	1200 mg/ml
		1500 mg/ml	1700 mg/ml	2000 mg/ml	50 $\mu$ l	70 $\mu$ l	100 $\mu$ l	
	<i>S. aureus</i> CCM 4516	5 mg/ml	10 mg/ml	20 mg/ml	30 mg/ml	40 mg/ml	45 mg/ml	50 mg/ml
		55 mg/ml	60 mg/ml	100 mg/ml	150 mg/ml	200 mg/ml	300 mg/ml	400 mg/ml
		500 mg/ml	800 mg/ml	1000 mg/ml	50 $\mu$ l	70 $\mu$ l	100 $\mu$ l	

Polyethylenglykol 600	<i>E. coli</i> CCM 4517	50 mg/ml	100 mg/ml	200 mg/ml	300 mg/ml	400 mg/ml	500 mg/ml	600 mg/ml
		700 mg/ml	800 mg/ml	900 mg/ml	1100 mg/ml	1200 mg/ml	1500 mg/ml	1700 mg/ml
		2000 mg/ml	100 $\mu$ l					
	<i>S. aureus</i> CCM 4516	100 $\mu$ l*						
Pyrol	<i>E. coli</i> CCM 4517	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	40 $\mu$ l	100 $\mu$ l	
	<i>S. aureus</i> CCM 4516	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	40 $\mu$ l	100 $\mu$ l	
	<i>E. coli</i> CCM 3954	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	40 $\mu$ l		
	<i>S. aureus</i> CCM 2022	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	40 $\mu$ l		
Anilin	<i>E. coli</i> CCM 4517	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	40 $\mu$ l	100 $\mu$ l	
	<i>S. aureus</i> CCM 4516	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	40 $\mu$ l	100 $\mu$ l	
	<i>E. coli</i> CCM 3954	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	40 $\mu$ l		
	<i>S. aureus</i> CCM 2022	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	40 $\mu$ l		
Penicilin/ Streptomycin	<i>E. coli</i> CCM 4517	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	40 $\mu$ l	100 $\mu$ l	
	<i>S. aureus</i> CCM 4516	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	40 $\mu$ l	100 $\mu$ l	
	<i>E. coli</i> CCM 3954	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	40 $\mu$ l		
	<i>S. aureus</i> CCM 2022	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	40 $\mu$ l		

\* Nižší koncentrace nebyly testovány z důvodu neúčinnosti, vyšší by naopak musely být testovány za jiných podmínek.

### 5.5.1.3 Vyhodnocení šířky inhibičních zón

Vzniklé inhibiční zóny byly vyhodnoceny pomocí systému Scan 500 inhibiton zone reader značky Interscience. Na obrázku 22 je ukázán rozdíl účinnosti polyethyleniminu a antibiotika Penicilin/Streptomycin.



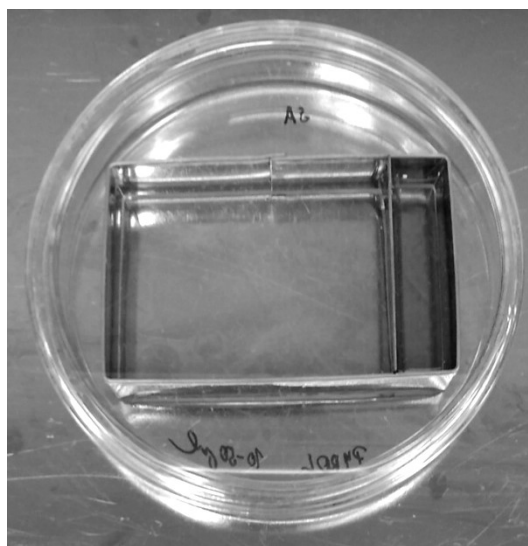
Obrázek 26 – Inhibiční zóny testovaných látek, polyethyleniminu a antibiotika Penicilin/Streptomycin

### 5.5.2 Testování mikrobiálního vývoje a adaptace

Stěžejním bodem této práce bylo navrhnout a otestovat metodu, díky které je možné sledovat vývoj a adaptaci jednotlivých bakteriálních kmenů na antimikrobiální látky. Byla zde snaha připodobnit se experimentálnímu zařízení, které popisuje studie Baym a kol.

Během navrhování testovací metody bylo nutno provést několik pokusů, než bylo vytvořeno takové experimentální zařízení, které lze použít pro sledování vývoje bakterií.

Pro vytvoření experimentálního zařízení byly použity nerezové formy o velikosti 4 x 6 cm, které byly umístěny do Petriho misky. Pomocí nerezové přepážky bylo vytvořeno 6 bloků o velikosti 1 x 4 cm přímo v Petriho misce (obrázek 27). Jako živná půda byl použit MH agar, který se používá pro stanovení citlivosti mikroorganismů k antimikrobiálním látkám diskovou difúzní metodou a umožní lepší difúzi látek. Nerezová forma i přepážka byly sterilizovány v 70 % etanolu a následně vyžihány nad kahanem. Nejprve bylo do formy nalito cca 5 ml MH agar, po ztuhnutí byla do formy umístěna sterilní vyžihaná přepážka a do vzniklého bloku byly nality 4 ml MH agar. Tak bylo postupně vytvořeno všech 6 bloků. Následně bylo na první blok s nulovou koncentrací testované látky pipetováno 100  $\mu$ l bakteriální suspenze. Na povrch zbylých bloků byla pipetována a rozetřena množství testovaných látek uvedených v tabulce 5. Všechny vzorky byly inkubovány při 37 °C v inkubátoru, ve kterém byla miska s vodou.



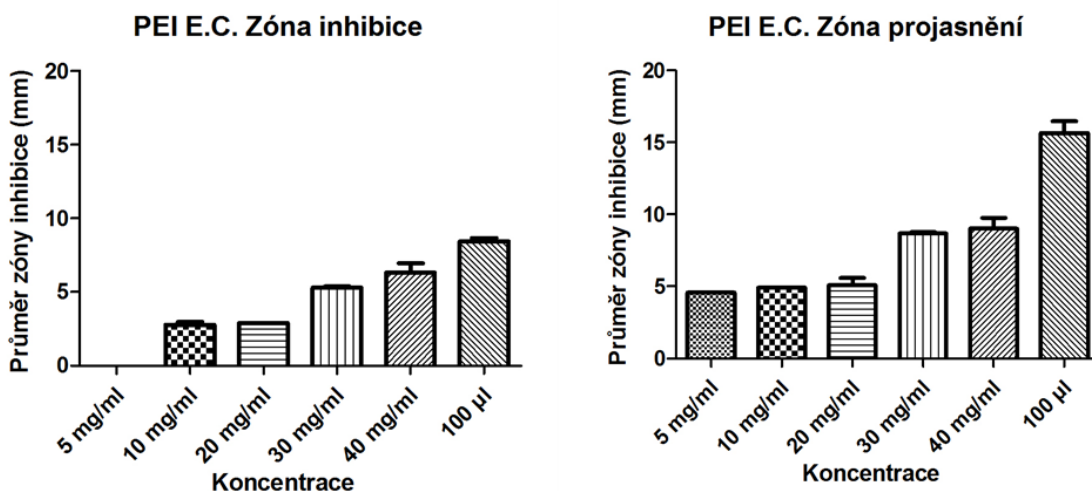
*Obrázek 27 – Ukázka přípravy experimentálního zařízení pomocí nerezové formy*

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

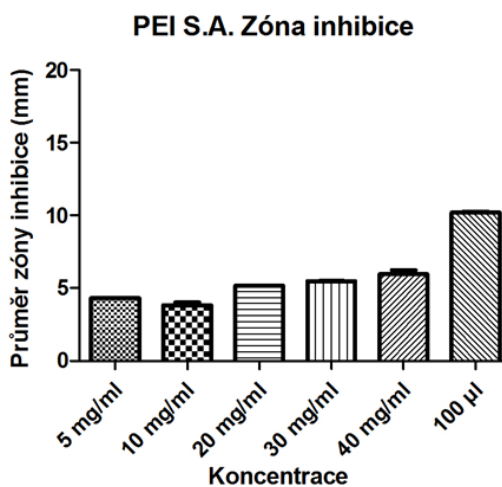
V této kapitole jsou shrnuty výsledky diskové difúzní metody a výsledky testování mikrobiálního vývoje a adaptace na testované látky.

### 6.1 Výsledky diskové difúzní metody

Následující obrázky grafů ukazují výsledky diskové difúzní metody. Svislá osa představuje průměrnou velikost inhibiční zóny v mm a vodorovná osa ukazuje jednotlivá množství testovaných látek.



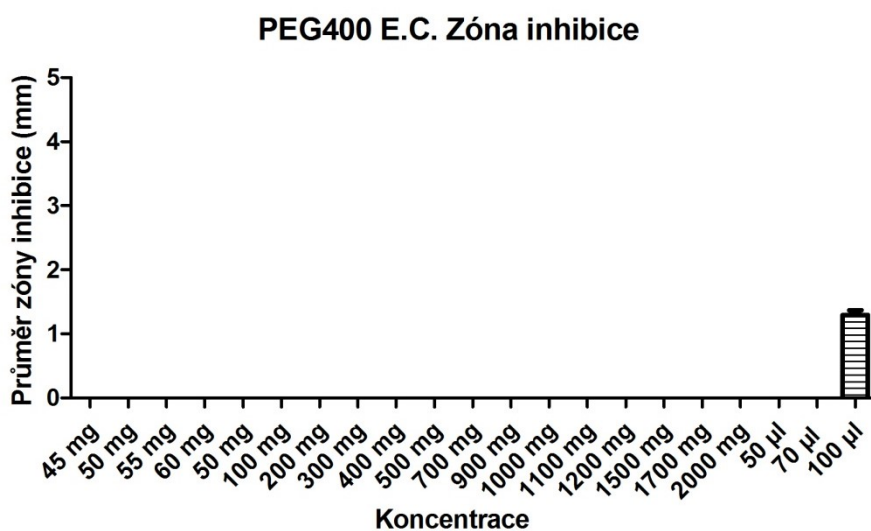
Obrázek 28 – Velikosti zón inhibice (vlevo) a projasnění (vpravo) při testování PEI proti *E. coli* CCM 4517



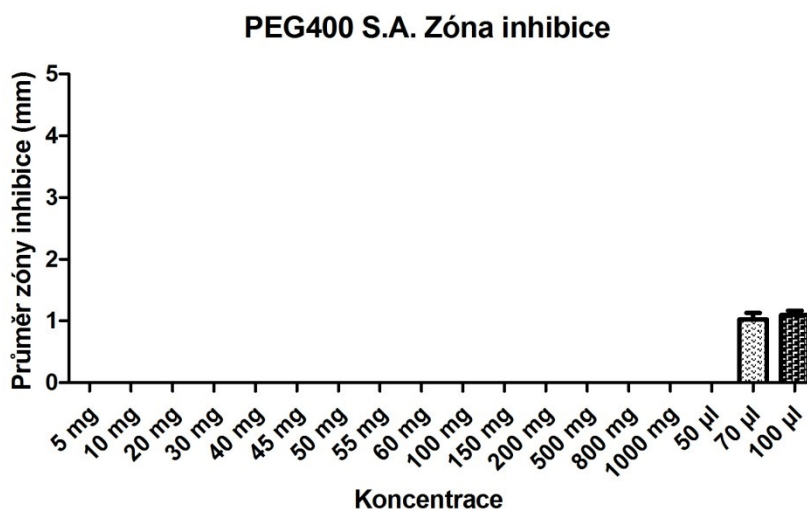
Obrázek 29 – Velikosti zón inhibice při testování PEI proti *S. aureus* CCM 4516

Obrázek 28 ukazuje účinek různých množství PEI na *E. coli* CCM 4517. Bylo zjištěno, že při nejnižším testovaném množství 5 mg/ml PEI vznikla zóna projasnění o velikosti  $(4,6 \pm 0,0)$  mm, což ukazuje pouze snížení růstu bakterií. Inhibice růstu se projevila u 10 mg/ml PEI, přičemž velikost inhibiční zóny je  $(2,8 \pm 0,2)$  mm.

Na obrázku 29 lze vidět účinek různých množství PEI na *S. aureus* CCM 4516. V tomto případě došlo k inhibici při 5 mg/ml PEI a velikost inhibiční zóny je  $(4,3 \pm 0,0)$  mm. Bylo zjištěno, že PEI vykazuje antibakteriální účinky vůči *E. coli* CCM 4517 a *S. aureus* CCM 4516.



Obrázek 30 – Velikosti zón inhibice při testování PEG 400 proti *E. coli* CCM 4517

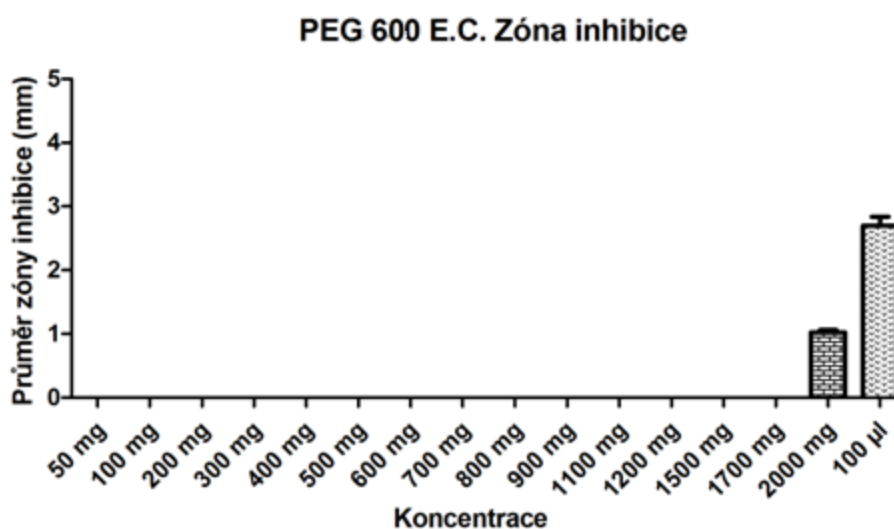


Obrázek 31 – Velikosti zón inhibice při testování PEG 400 proti *S. aureus* CCM 4516



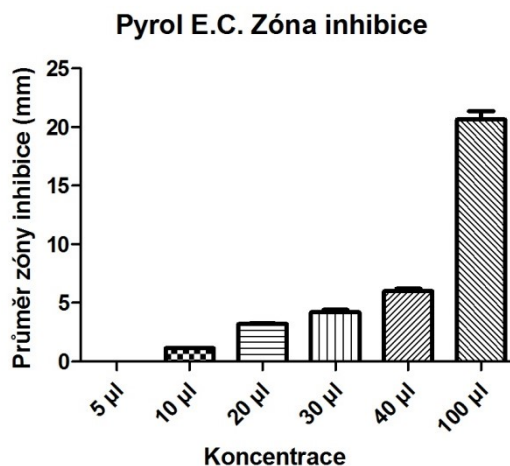
Na obrázku 30 lze vidět účinek PEG 400 na *E. coli* CCM 4517. Bylo testováno několik koncentrací, přičemž inhibiční zóna ( $1,3 \pm 0,1$ ) mm vznikla až u 100  $\mu$ l PEG 400.

Účinek PEG 400 na *S. aureus* CCM 4516 je na obrázku 31. K inhibici došlo při 70  $\mu$ l PEG 400, kde velikost inhibiční zóny je ( $1,0 \pm 0,1$ ) mm. Bylo zjištěno, že PEG 400 nemá významný antimikrobiální účinek, protože k inhibici sice došlo při vyšších koncentracích, ale velikosti inhibičních zón byly velmi malé. Jelikož 100  $\mu$ l je maximální množství, které může být pipetováno do otvorů za daných podmínek, nebyl tento polymer dále testován.

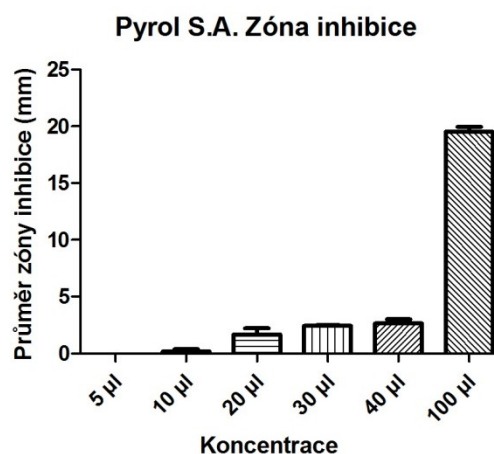


Obrázek 32 – Velikosti zón inhibice při testování PEG 600 proti *E. coli* CCM 4517

Obrázek 32 znázorňuje vliv PEG 600 na *E. coli* CCM 4517. Podobně jako u PEG 400 zde došlo k minimální inhibici při 2000 mg/ml PEG 600, kdy je velikost inhibiční zóny ( $1,0 \pm 0,0$ ) mm. Při 100  $\mu$ l PEG 600 je velikost inhibiční zóny ( $2,7 \pm 0,1$ ) mm. Byl testován také účinek PEG 600 na *S. aureus* CCM 4516, kde byla inhibiční zóna ( $0,2 \pm 0,1$ ) mm při 100  $\mu$ l PEG 600. Tento polymer nevykazoval významný antimikrobiální účinek, a proto nebyl dále testován.



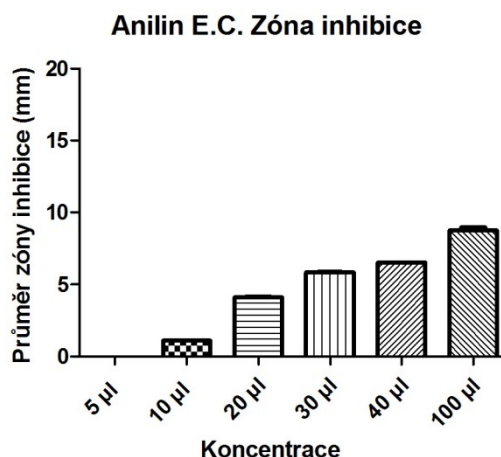
Obrázek 33 – Velikosti zón inhibice při testování pyrolu proti *E. coli* CCM 4517



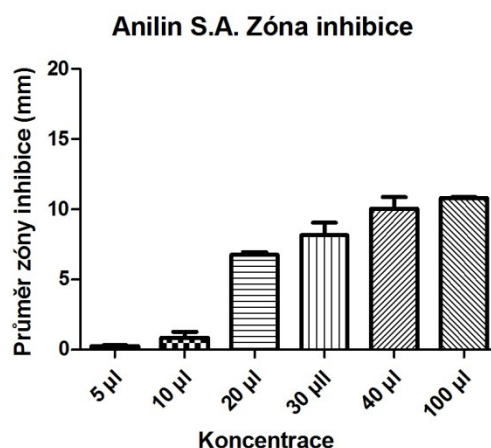
Obrázek 34 – Velikosti zón inhibice při testování pyrolu proti *S. aureus* CCM 4516

Na obrázku 33 lze vidět účinek pyrolu na *E. coli* CCM 4517. Nejnižšímu množství, při kterém došlo k inhibici, odpovídá 10 µl pyrolu, velikost inhibiční zóny je  $(1,2 \pm 0,0)$  mm.

Na obrázku 34 je účinek pyrolu na *S. aureus* CCM 4516. I zde se minimální inhibice projevila až u 10 µl pyrolu a vznikla inhibiční zóna o velikosti  $(0,2 \pm 0,2)$  mm. S rostoucím množstvím pyrolu velikost inhibičních zón roste. Bylo zjištěno, že pyrol vykazuje antibakteriální aktivitu vůči *E. coli* CCM 4517 a *S. aureus* CCM 4516.



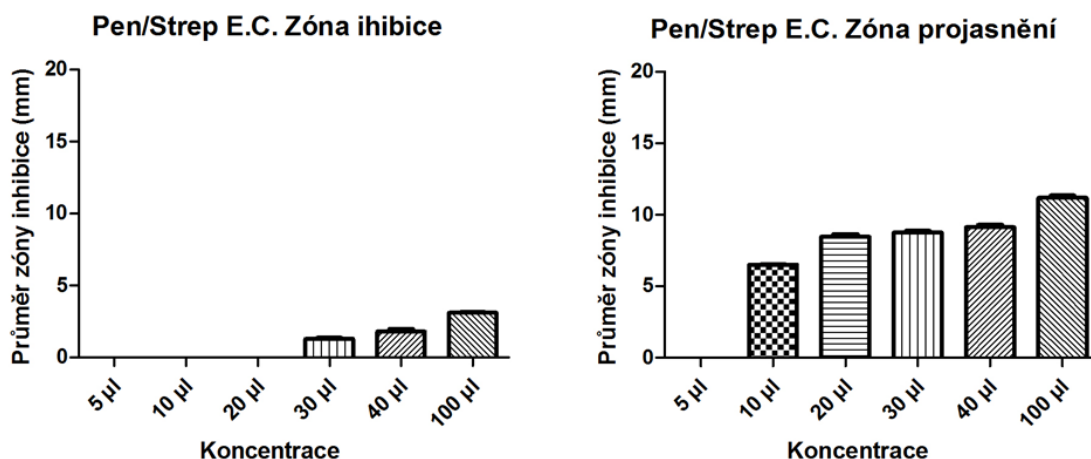
Obrázek 35 – Velikosti zón inhibice při testování anilinu proti *E. coli* CCM 4517



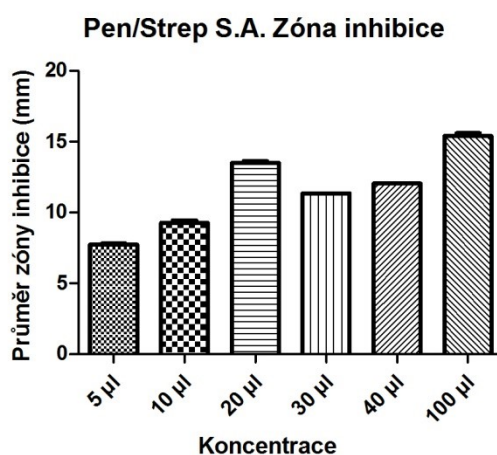
Obrázek 36 – Velikosti zón inhibice při testování anilinu proti *S. aureus* CCM 4516

Na obrázku 35 lze vidět účinek anilinu na *E. coli* CCM 4517. Inhibiční zóna o velikosti  $(1,1 \pm 0,0)$  mm vznikla u 10 µl anilinu.

V případě *S. aureus* CCM 4516 (obrázek 36) došlo k minimální inhibici již u 5 µl anilinu, kde byla velikost zóny  $(0,3 \pm 0,1)$  mm. Zajímavé také je, že velikost inhibiční zóny při 40 µl anilinu  $(10,1 \pm 0,8)$  mm je velmi podobná velikosti zóny, která vznikla při 100 µl anilinu  $(10,8 \pm 0,1)$  mm. Byla zde potvrzena antibakteriální aktivita anilinu vůči *E. coli* CCM 4517 a *S. aureus* CCM 4516.



Obrázek 37 – Velikosti zón ihibice (vlevo) a projasnění (vpravo) při testování antibiotika Penicilin/Streptomycin proti *E. coli* CCM 4517



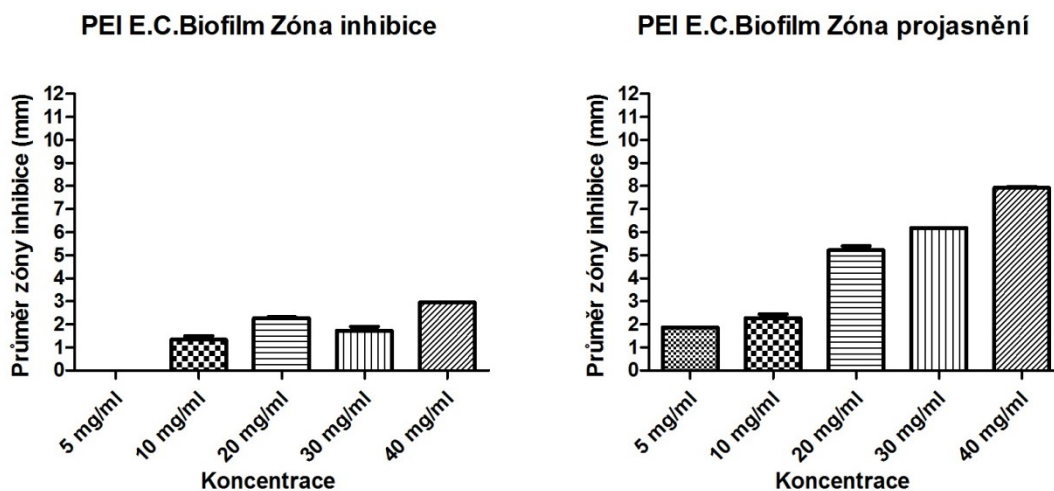
Obrázek 38 – Velikosti zón ihibice při testování antibiotika Penicilin/Streptomycin proti *S. aureus* CCM 4516

Obrázek 37 ukazuje účinek antibiotika Penicilin/Streptomycin na *E. coli* CCM 4517. Při testovaném množství 10 µl Pen/Strep došlo pouze ke snížení růstu bakterií a vzniku zóny projasnění ( $6,5 \pm 0,0$ ) mm. Inhibiční zóna o velikosti ( $1,3 \pm 0,1$ ) mm vznikla u 30 µl Pen/Strep. Inhibice růstu nebyla vysoká ani při 100 µl Pen/Strep, velikost zóny je ( $3,1 \pm 0,0$ ) mm.

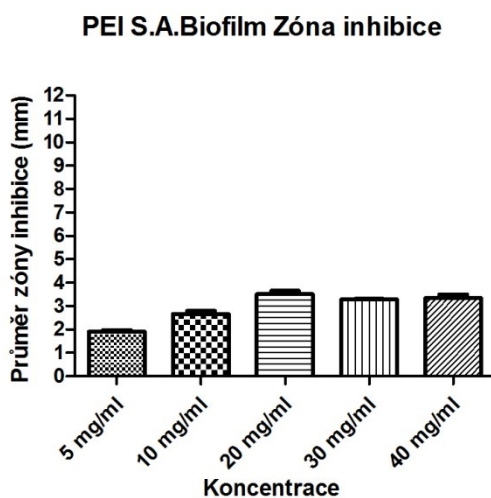
Aktivita proti *S. aureus* CCM 4516 (obrázek 38) je poměrně lepší, protože inhibiční zóna o velikosti ( $7,8 \pm 0,1$ ) mm vznikla při nejnižším testovaném množství 5 µl Pen/Strep. U 20 µl

Pen/Strep došlo ke vzniku větší inhibiční zóny, než při vyšších koncentracích testované látky. Jelikož ve všech případech velikost inhibičních zón roste se zvyšující se koncentrací testované látky, tato zjištěná hodnota je pravděpodobně nesprávná. Chyba mohla vzniknout nepřesným dávkováním agarů nebo látek.

Následující obrázky grafů ukazují výsledky diskové difúzní metody pro biofilm tvořící bakterie *E. coli* CCM 3954 a *S. aureus* CCM 2022. Očekává se, že budou tyto bakterie odolnější vůči testovaným látkám.



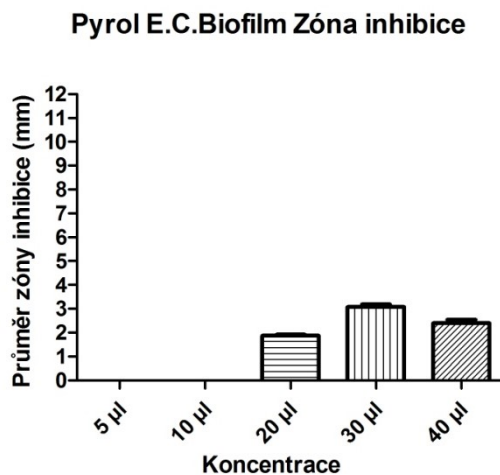
Obrázek 39 – Velikosti zón inhibice (vlevo) a projasnění (vpravo) při testování PEI proti *E. coli* CCM 3954



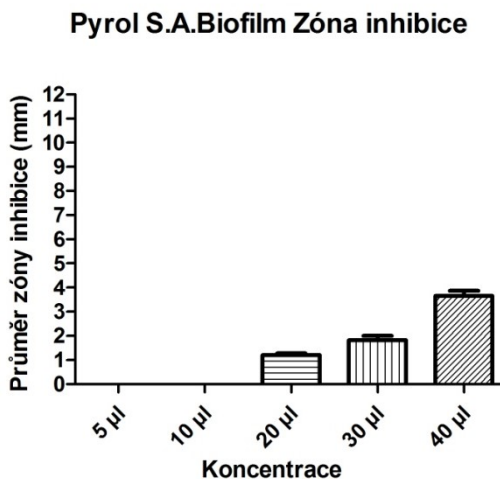
Obrázek 40 – Velikosti zón inhibice při testování PEI proti *S. aureus* CCM 2022

Obrázek 39 ukazuje účinek PEI na *E. coli* CCM 3954. Bylo zjištěno, že při nejnižším testovaném množství 5 mg/ml PEI vznikla zóna projasnění o velikosti  $(1,9 \pm 0,0)$  mm. Inhibice růstu se projevila u 10 mg/ml PEI, přičemž velikost inhibiční zóny je  $(1,3 \pm 0,2)$  mm.

Na obrázku 40 lze vidět účinek PEI na *S. aureus* CCM 2022. V tomto případě došlo k inhibici při 5 mg/ml PEI a vzniku inhibiční zóny o velikosti  $(1,9 \pm 0,1)$  mm.

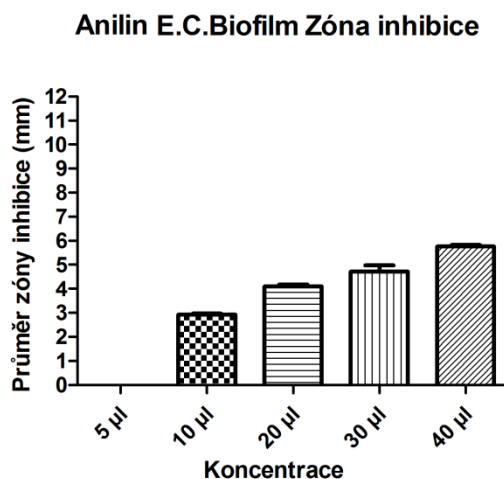


Obrázek 41 – Velikosti zón inhibice při testování pyrolu proti *E. coli* CCM 3954

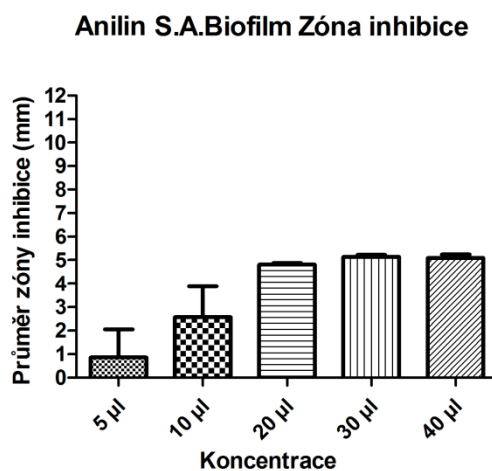


Obrázek 42 – Velikosti zón inhibice při testování pyrolu proti *S. aureus* CCM 2022

Na obrázku 41 lze vidět účinek pyrolu na *E. coli* CCM 3954. K inhibici došlo při 20 µl pyrolu, kde je velikost inhibiční zóny  $(1,9 \pm 0,0)$  mm. Účinek pyrolu na *S. aureus* CCM 2022 ukazuje obrázek 42. I zde se inhibice projevila až u 20 µl pyrolu a vznikla inhibiční zóna o velikosti  $(1,2 \pm 0,1)$  mm.



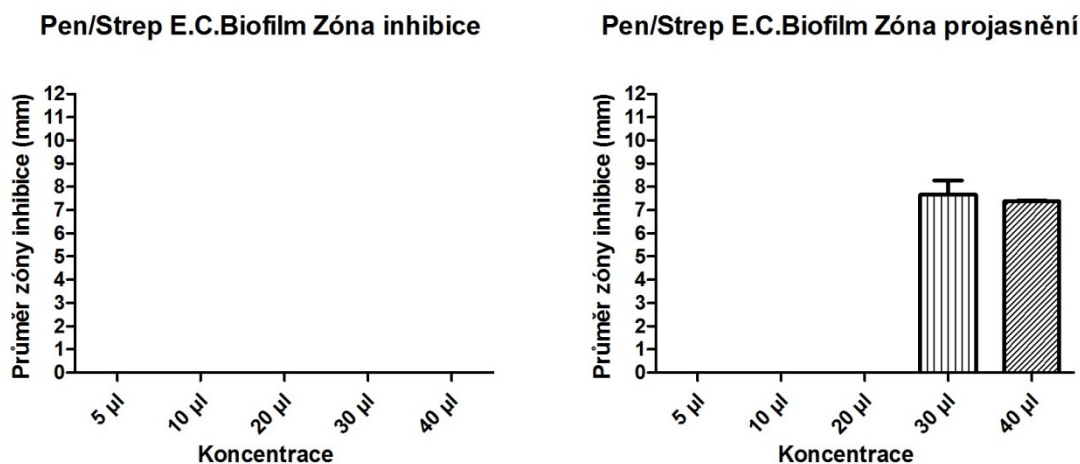
Obrázek 43 – Velikosti zón inhibice při testování anilinu proti *E. coli* CCM 3954



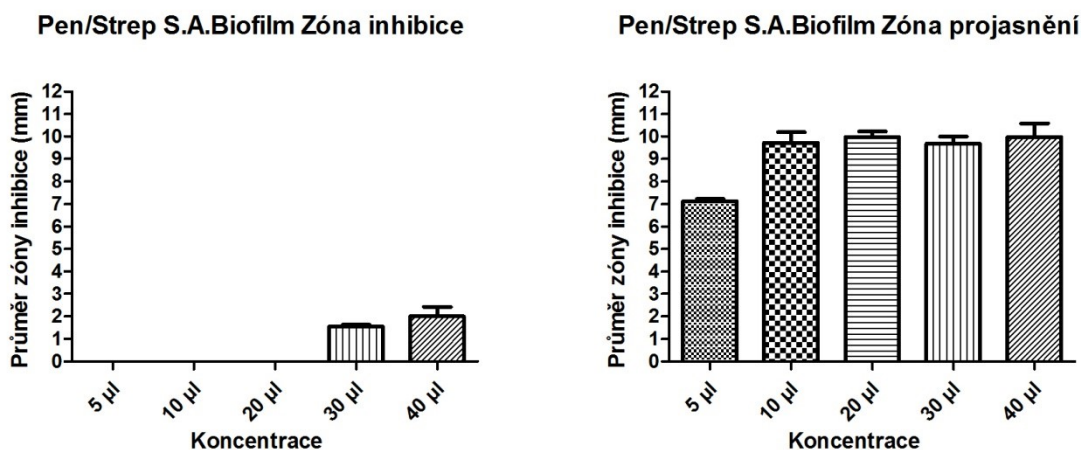
Obrázek 44 – Velikosti zón inhibice při testování anilinu proti *S. aureus* CCM 2022

Na obrázku 43 lze vidět účinek anilinu na *E. coli* CCM 3954. Inhibiční zóna o velikosti ( $2,9 \pm 0,0$ ) mm vznikla u 10 µl anilinu.

V případě *S. aureus* CCM 2022 (obrázek 44) došlo k inhibici již u 5 µl anilinu, kde byla velikost zóny ( $0,9 \pm 1,2$ ) mm, tento výsledek je však zatížen velkou odchylkou. Velikosti inhibičních zón u 30, 40 a 50 µl anilinu se pohybují kolem ( $5,0 \pm 0,1$ ) mm.



Obrázek 45 – Velikosti zón inhibice (vlevo) a projasnění (vpravo) při testování antibiotika Penicilin/Streptomycin proti *E. coli* CCM 3954



Obrázek 46 – Velikosti zón inhibice (vlevo) a projasnění (vpravo) při testování antibiotika Penicilin/Streptomycin proti *S. aureus* CCM 2022

Obrázek 45 ukazuje účinek antibiotika Penicilin/Streptomycin na *E. coli* CCM 3954. Žádná z testovaných koncentrací neměla inhibiční účinek, došlo pouze ke snížení růstu a vzniku zóny projasnění o velikosti  $(7,7 \pm 0,6)$  mm u 30 µl Pen/Strep a  $(7,4 \pm 0,0)$  mm u 40 µl Pen/Strep.

Antimikrobiální aktivita proti *S. aureus* CCM 2022 (obrázek 46) je poměrně lepší, protože zde došlo ke vzniku inhibiční zóny o velikosti  $(1,6 \pm 0,1)$  mm při 30 µl Pen/Strep. Zóna projasnění o velikosti  $(7,1 \pm 0,1)$  mm vznikla při 5 µl Pen/Strep.



Po porovnání výsledků účinku PEI na biofilm netvořící a biofilm tvořící bakterie bylo zjištěno, že u biofilm tvořících bakterií vznikly menší zóny inhibice, což se očekávalo. U obou kmenů *E. coli* při 5 mg/ml PEI došlo pouze ke vzniku zóny projasnění a samotná inhibice růstu se projevila až u 10 mg/ml PEI. V případě obou kmenů *S. aureus* došlo k inhibici již při 5 mg/ml PEI.

Antimikrobiální aktivita PEG 400 a PEG 600 se projevila v minimální míře až při vysokých koncentracích. Testování vyšších koncentrací by muselo probíhat za jiných podmínek, proto v této práci PEG nebyl dále zkoumán.

Dále byly testovány monomery pyrol a anilin, které mohou v polymerech zůstat jako rezidua. U obou byla prokázána antibakteriální aktivita vůči všem testovaným kmenům. V případě pyrolu došlo k inhibici u biofilm netvořících bakterií při 10  $\mu$ l pyrolu na rozdíl od biofilm tvořících, kde se inhibice projevila při 20  $\mu$ l pyrolu. Bylo také zjištěno, že pyrol má lepší antimikrobiální účinky na *E. coli*. U anilinu je tomu naopak, protože působí účinněji proti *S. aureus*, protože došlo k inhibici již při 5  $\mu$ l anilinu, na rozdíl od kmenů *E. coli*, u kterých se inhibice projevila při 10  $\mu$ l anilinu.

Antibiotikum Penicilin/Streptomycin se ukázalo jako více účinné proti kmenům *S. aureus*. U *S. aureus* CCM 4516 došlo k inhibici již při 5  $\mu$ l Pen/Strep, kdežto u *E. coli* CCM 4517 se inhibice projevila až při 30  $\mu$ l Pen/Strep. Z obrázku 45 je patrné, že žádná z testovaných koncentrací neměla inhibiční účinek na *E. coli* CCM 3954.

Antimikrobiální aktivita lineárních (L) a rozvětvených (B) PEI s rozsahem molekulových hmotností 500 – 12000 je popsána ve studii Gibney a kol. V této studii byly stanoveny minimální inhibiční koncentrace polymerů nezbytné pro úplnou inhibici růstu bakterií za standardních testovacích podmínek. Roztoky B-PEI byly připraveny pouze pomocí pufru (0,01 % kyseliny octové a směsi kyseliny octové a 5 % ethanolu) a L-PEI byly nejprve rozpuštěny v ethanolu a dvakrát zředěny 0,01 % kyselinou octovou. Tyto zásobní roztoky byly smíchány s bakteriálním roztokem v médiu MH pro stanovení MIC. Pro B-PEI s molekulovou hmotností 600 byla MIC (500  $\mu$ g/ml) proti *E. coli*. Nejnižší hodnota MIC (250  $\mu$ g/ml) proti *E. coli* byla zaznamenána u B-PEI s molekulovou hmotností 1800 zatímco B-PEI s molekulovou hmotností 10000 nevykazoval žádnou antimikrobiální aktivitu (MIC > 1000  $\mu$ g/ml). Zvýšení molekulové hmotnosti tedy nezvyšuje antibakteriální aktivitu. Při testování aktivity proti *S. aureus* byly hodnoty MIC B-PEI (16 – 31  $\mu$ g/ml) [70].

Lze vidět, že pro inhibici stačilo velmi malé množství polymeru. Inhibice mohla být z části také způsobena přidavkem ethanolu a kyselin obsažených v pufru, kdežto v našem experimentu byl PEI smíchán pouze s destilovanou vodou. Rozdílnost výsledků může být způsobena také výběrem různých testovaných kmenů. Antimikrobiální účinek PEI proti biofilm tvořícím bakteriím *E. coli* a *S. aureus* byl prokázán ve studii Barros a kol. Byly provedeny testy adheze a biofilmu a stanovena MIC PEI. Testované koncentrace se pohybovaly v rozmezí od 3200 do 6,25 mg/l PEI. MIC PEI pro bakterie byla 400 mg/l. Bylo také zjištěno, že u všech kmenů došlo k adhezi na povrch, nicméně tato adheze byla významně snížena v přítomnosti všech testovaných koncentrací PEI. Objevy této studie potvrdily antimikrobiální aktivitu PEI a lze ho považovat za zajímavou sloučeninu pro endodontickou léčbu [75].

Ve studii Nalawade a kol. byla již zkoumána antimikrobiální aktivita polyethylenglykolu. Bylo zjištěno, že polyethylenglykol s molekulovou hmotností 1000 je nejúčinnější baktericidní činidlo proti *S. mutans* a *E. coli*, protože vykazoval baktericidní aktivitu již při 25 % koncentraci, kdežto PEG 400 vykazoval podobnou baktericidní aktivitu pouze při 100 % koncentraci proti všem vybraným organismům. Proti *S. aureus* vykazoval aktivitu PEG 1000 pouze při 100 % koncentraci. Antimikrobiální aktivita PEG 1000 může souviset s hydrofilní vlastností PEG. Odstranění vody pravděpodobně neumožňuje mikrobiální růst, protože určité množství vody je nezbytné pro množení a vývoj mikroorganismů [76]. Ve studii Carreira a kol. lze najít, že PEG 1000 byl schopen eliminovat 100 % testovaných mikroorganismů s MIC 40 %. Avšak po snížení oběmu PEG 1000 pod 30 %, některé mikroorganismy byly schopny růstu, zejména *C. albicans* a *C. tropicalis* [77].

Antimikrobiální aktivita PEG 400 byla studována již v roce 1982 ve studii Vaamonde a kol., kde byl zkoumán účinek PEG proti kmenu *S. aureus* ATCC 6538. Získané výsledky ukázaly, že polyethylenglykoly s molekulovou hmotností 200 a 400 mají inhibiční účinek na růst této bakterie [78]. O PEG 400 se zajímali také ve studii Chirife a kol. v roce 1983, kde bylo zjištěno, že koncentrované roztoky PEG 400 mají významnou antibakteriální účinnost proti různým patogenním bakteriím, včetně *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E.coli* a *S. aureus*. PEG byl přidán k BHI (kultivační médium Brain Heart Infusion) před sterilizací. Po rozpuštění PEG 400 se hodnota pH upravila na 7,0 přidavkem 8N kyseliny chlorovodíkové. Koncentrace PEG 400 v médiu byla upravena na 1,6 g PEG 400 na 1 g vody, v některých experimentech byla použita koncentrace 4,8 g PEG 400 na 1 g vody. Není však jisté, zda antimikrobiální účinek vychází přímo z PEG 400 nebo je způsoben například přidavkem kyseliny

chlorovodíkové [79]. Novější studie Gomes a kol. (2002) naopak antimikrobiální účinky PEG 400 vyvrací [80].

Nedohledala jsem studie týkající se testování antimikrobiální aktivity pyrolu a anilinu. Byly však testovány antimikrobiální účinky polypyrolu a polyanilinu. Ve studii Maráková a kol. byla zkoumána antibakteriální aktivita bavlněných textilií potažených vodivými polymery s nanosenými částicemi stříbra. Lze konstatovat, že zatímco antibakteriální aktivita bavlny potažené samotným polypyrolem je uspokojivá, bavlna obsahující pouze polyanilin vykazuje nedostatečnou antibakteriální aktivitu. Výsledky testů ukázaly, že čistá bavlna neměla žádnou antibakteriální aktivitu. Ve srovnání s tímto referentem vykazovala bavlna potažená polypyrolem dobrý antibakteriální účinek vzhledem k *S. aureus*. Antibakteriální aktivita tohoto vzorku proti gramnegativním *E. coli* byla také dobrá [81].

Ve studii Kuceková a kol. byla zkoumána citlivost bakterií proti koloidnímu polyanilinu. Výsledky ukázaly, že u gramnegativní *E. coli* byla úplná inhibice pozorována při koncentraci 3500 g/ml. U grampozitivní *S. aureus* byl antibakteriální účinek poprvé pozorován při nejvyšší testované koncentraci 8 500 g/ml [82].

Studie Shi a kol. popisuje vynikající antibakteriální účinnost polyanilinu (PANI) proti mikroorganismům *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Výsledkem tohoto výzkumu je, že vodivé PANI a jeho kompozity / směsi jsou užitečné jako nový typ antibakteriálního čidla a multifunkčního materiálu pro zlepšení lidského zdraví a životního prostředí [83]. Studie Dhivya a kol. se zabývá antimikrobiálními vlastnostmi různě upravených PANI (kyselinou pikrovou, kyselinou 3,5-dinitrobenzoovou a kyselinou chlorovodíkovou) proti gramnegativním, grampozitivním bakteriím a houbám *Candida albicans*. Antimikrobiální aktivita byla hodnocena metodou difúze agarové jamky. Výsledky testů ukázaly, že upravené PANI zvýšily antimikrobiální účinnost ve srovnání s polyanilinovou emeraldinovou bází. Bylo zjištěno, že PANI-3,5-dinitrobenzoát vykazuje dvojnásobně nižší antibakteriální aktivitu ve srovnání s kyselinou 3,5-dinitrobenzoovou. PANI vykazovaly zónu inhibičního průměru 14 – 24 mm na gramnegativní a grampozitivní bakterie, a proto mohou být PANI syntetizované v této práci považovány za silné antibakteriální látky [84].

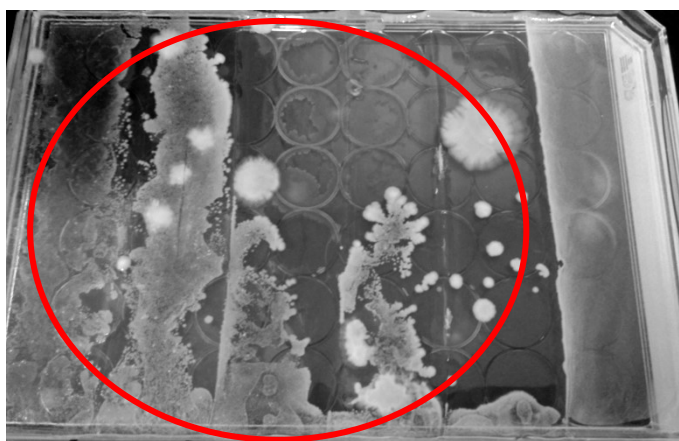
## 6.2 Výsledky mikrobiálního vývoje a adaptace

V prvním experimentu byl použit PCA, který byl nalit do víčka kultivační destičky. Po ztuhnutí z něj byly vyřezány obdélníky, které byly následně umístěny vedle sebe do nového

víčka. Bakteriální kmeny byly očkované na povrch prvního bloku, vzorek byl přikryt druhým víčkem a inkubován při 37 °C v inkubátoru. V tomto případě bohužel nedošlo k přerůstání přes jednotlivé bloky, protože zřejmě bloky na sebe úplně nedoléhaly.

Pro další pokusy bylo vyrobeno gumové těsnění z EPDM, které bylo sterilizováno 96 % etanolem. Víčka mikrotitračních destiček byla také sterilizována 96 % etanolem a UV zářením v laminárním boxu Alpina po dobu 30 minut. Na víčku byly vyznačeny úseky široké 2 cm, pomocí těsnění byly jednotlivé části odděleny a byl do nich postupně nalit PCA (5 ml). Bakteriální kmeny byly očkované na povrch prvního bloku, vzorek byl přikryt druhým víčkem a zabalen do alobalu, kvůli udržení vlhkosti vzorku a inkubován při 37 °C v inkubátoru. Přerůstání nebylo možné sledovat z důvodu kontaminace po celé ploše vzorku.

U dalších pokusů bylo snahou předejít kontaminaci a to zabalením vzorku do polyethylenové folie, což mělo stejný efekt jako při použití alobalu. Poté byl použit polyethylenový uzavíratelný pytlík. V tomto případě bylo přerůstání bakterií přes bloky minimální, navíc opět došlo ke kontaminaci nejprve při okrajích, poté bodově po celé ploše, viz obrázek 47.

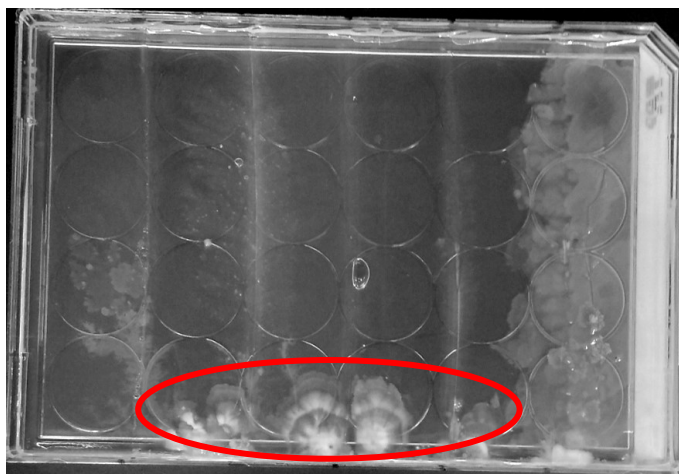


Obrázek 47 – Testování přerůstání *S. aureus* přes vytvořené zóny PCA. Červeně je označena oblast vzniku sekundární kontaminace.

Vzniklá kontaminace mohla být způsobena právě balením vzorku, proto v dalších experimentech vzorky baleny nebyly. Místo toho byla do inkubátoru umístěna miska s destilovanou vodou pro udržení vlhkosti.

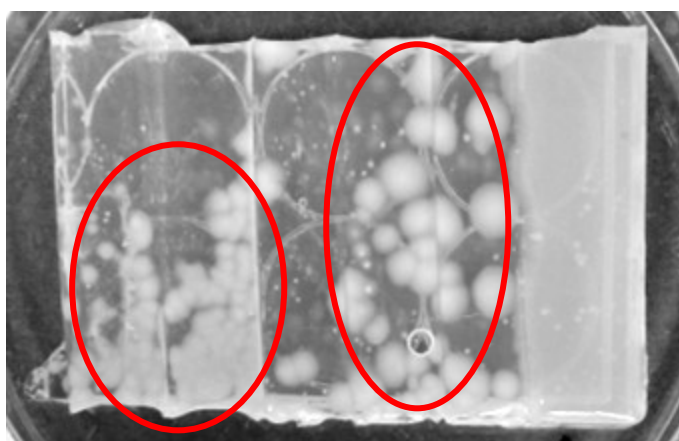
Další experimenty zahrnovaly použití dostupných testovaných látek. Na jednotlivé bloky agarů byla pipetována zvolená množství antibiotik Penicilin/Streptomycin (2,5 – 30)  $\mu\text{l}$  a (30 – 500)  $\mu\text{l}$  (obrázek 48), polyethyleniminu (30 – 500) mg a anilinu (30 – 500) mg, tak aby byl vytvořen koncentrační gradient. V případě anilinu a polyethyleniminu se kontaminace

neobjevila. U vzorku s nižším obsahem antibiotik byla kontaminace výraznější než u vzorku s obsahem většího množství antibiotik.



Obrázek 48 – Testování antibiotika Pen/Strep působícího na *E. coli* CCM 451. Červeně je označena oblast vzniku sekundární kontaminace.

Kontaminace mohla na vzorcích vzniknout z důvodu nedostatečné těsnosti víček. Proto byly v dalším kroku jednotlivé bloky přeneseny z víčka kultivační destičky do Petriho misky, která je uzpůsobena pro bakteriální růst. Nicméně přenášení agaru z víčka do Petriho misky bylo nešikovné. Bohužel i u tohoto postupu se v některých případech opět objevila kontaminace, viz obrázek 49. Ta mohla být způsobena nedostatečně sterilním víčkem nebo těsněním z EPDM.



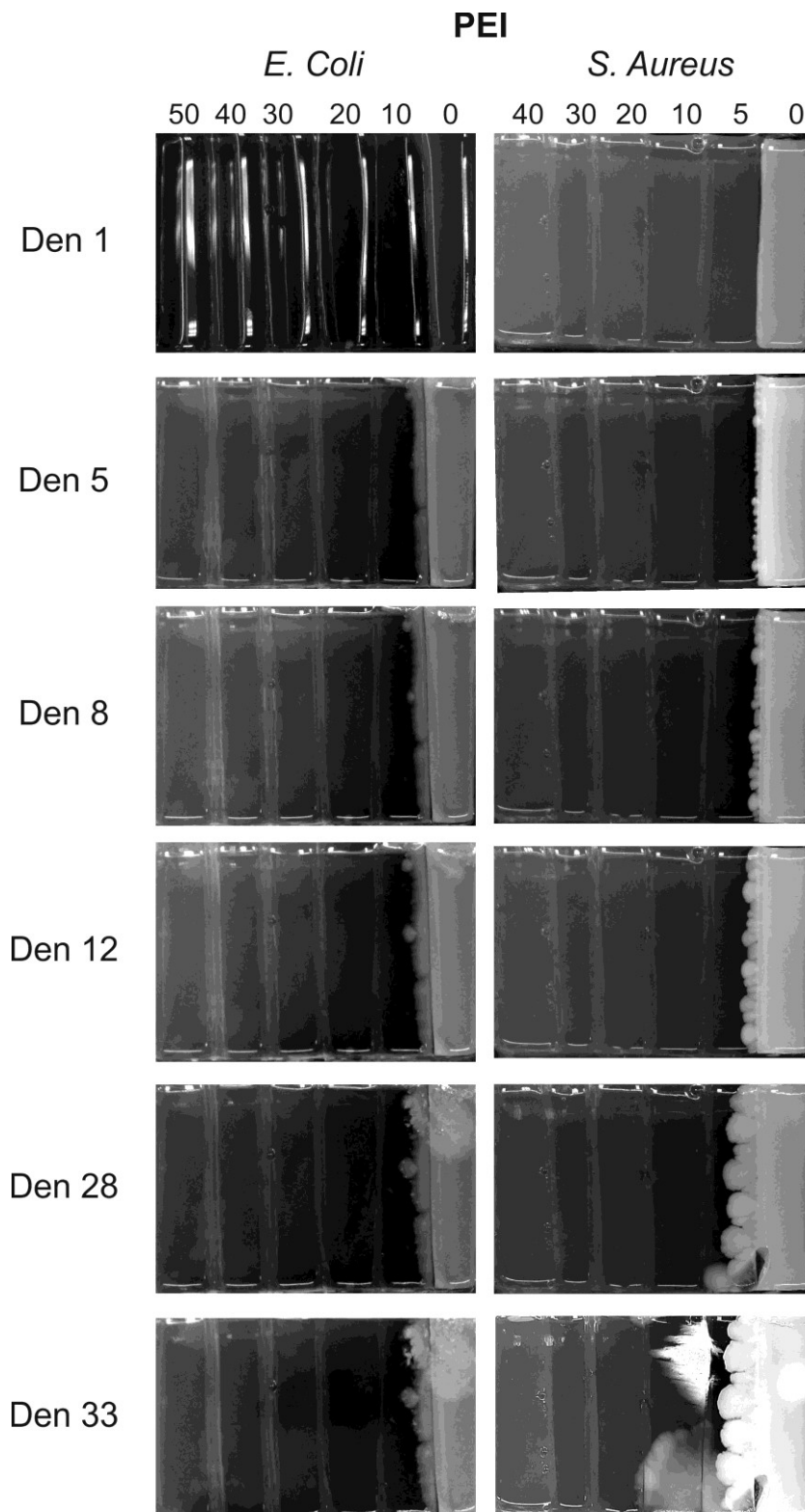
Obrázek 49 – Testování koncentrací (10, 20, 30, 40, 50)  $\mu\text{l}$  antibiotika Pen/Strep působících na *E. coli* CCM 4517. Červeně je označena oblast vzniku sekundární kontaminace.

Na základě výsledků výše uvedených experimentů bylo použito finální experimentální zařízení, viz kapitola 5.5.2. Následující výsledky se vztahují k použité metodě, která je v této kapitole popsána.

Tabulka 5 – Shrnutí výsledků přerůstání bakterií přes koncentrační gradient

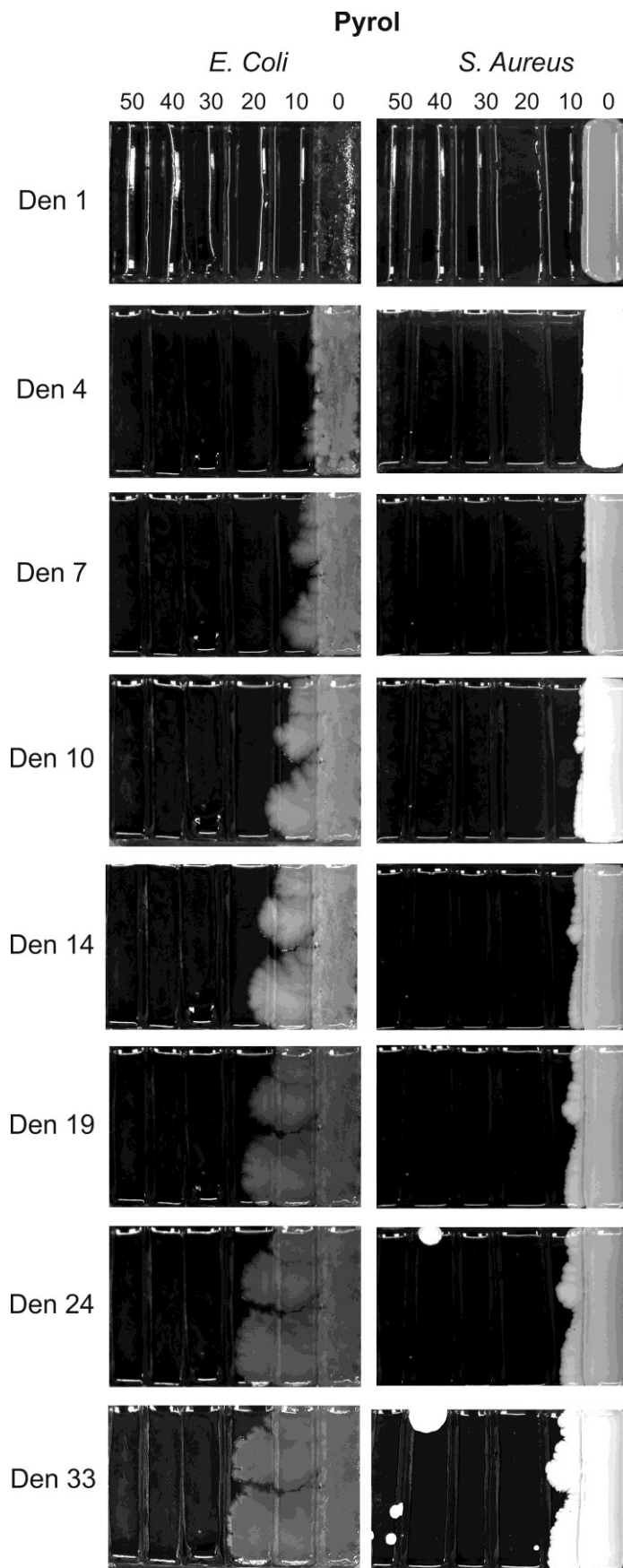
Testovaná látka	Testovaná bakterie	1. zóna	2. zóna	3. zóna	4. zóna	5. zóna	Výsledek
PEI	<i>E. coli</i> CCM 4517	10 mg/ml	20 mg/ml	30 mg/ml	40 mg/ml	50 mg/ml	Od 5. dne přerůstání. 33. den přes ½ 1. zóny.
	<i>S. aureus</i> CCM 4516	5 mg/ml	10 mg/ml	20 mg/ml	30 mg/ml	40 mg/ml	Od 5. dne přerůstání, 28. den kontaminováno při manipulaci. 33. den přes ¾ 1. zóny.
	<i>E. coli</i> CCM 3954	5 mg/ml	10 mg/ml	20 mg/ml	30 mg/ml	40 mg/ml	1. den přes 1. zónu, kon- taminace ve 3. zóně. 20. den přes ½ 2. zóny.
	<i>S. aureus</i> CCM 2022	5 mg/ml	10 mg/ml	20 mg/ml	30 mg/ml	40 mg/ml	1. den přes 1. zónu. Od 2. dne přerůstání 2. zóny.
Pyrol	<i>E. coli</i> CCM 4517	10 µl	20 µl	30 µl	40 µl	50 µl	Od 4. dne přerůstání. 10. den přes 1. zónu. 24. den přes 2. zónu. Do 3. zóny nepřeroste ani po 33 dnech.
	<i>S. aureus</i> CCM 4516	10 µl	20 µl	30 µl	40 µl	50 µl	Od 7. dne přerůstání. 33. den lokálně přes 1. zónu.
	<i>E. coli</i> CCM 3954	20 µl	30 µl	40 µl	50 µl	60 µl	Populace výrazně nepřerůstá do 1. zóny.
	<i>S. aureus</i> CCM 2022	20 µl	30 µl	40 µl	50 µl	60 µl	Od 13. dne přerůstání.
Anilin	<i>E. coli</i> CCM 4517	10 µl	20 µl	30 µl	40 µl	50 µl	Od 1. dne ústup, kvůli difúzi testované látky do zóny s nulovou koncentrací látky.
	<i>S. aureus</i> CCM 4516	5 µl	10 µl	20 µl	30 µl	40 µl	Od 15. dne, pravděpodobně vlivem difúze testované látky, vznik mutovaných bakterií v zóně bez testované látky. Od 28. dne přerůstání.
	<i>E. coli</i> CCM 3954	10 µl	20 µl	30 µl	40 µl	50 µl	Populace nepřerůstá do 1. zóny ani po 20 dnech.
	<i>S. aureus</i> CCM 2022	5 µl	10 µl	20 µl	30 µl	40 µl	Od 20. dne přerůstání.
Pen/Strep	<i>E. coli</i> CCM 4517	10 µl	20 µl	30 µl	40 µl	50 µl	Od 2. dne přerůstání.

							2. den přes $\frac{1}{2}$ 1. zóny, kontaminace. 7. den přes $\frac{3}{4}$ 1. zóny.
	<i>S. aureus</i> CCM 4516	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	40 $\mu$ l	1. den přes 1. zónu, kontaminace ve 3. a 5. zóně. Od 2. dne přerůstání 2. zóny. 20. den přes $\frac{1}{4}$ 1. zóny.
	<i>E. coli</i> CCM 3954	40 $\mu$ l	50 $\mu$ l	60 $\mu$ l	70 $\mu$ l	80 $\mu$ l	Od 1. dne přerůstání. 11. den přes 1. zónu. Do 2. zóny nepřeroste ani po 20 dnech.
	<i>S. aureus</i> CCM 2022	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	40 $\mu$ l	Od 1. dne přerůstání. 20. den lokálně přes 1. zónu.

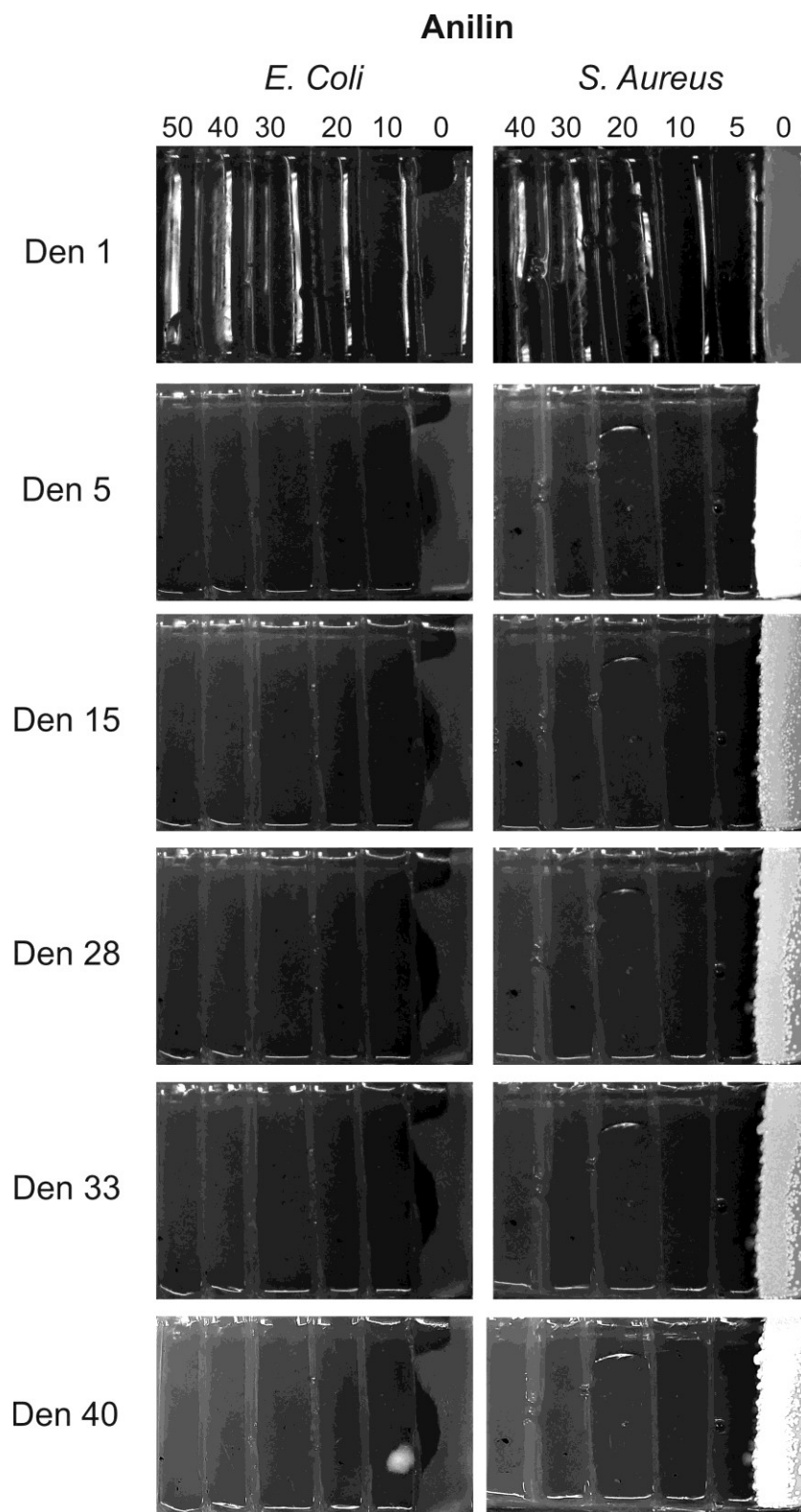


Obrázek 50 – Experimentální zařízení s koncentračním gradientem PEI působícího na *E. coli* CCM 4517 a *S. aureus* CCM 4516 (množství PEI v mg/ml)

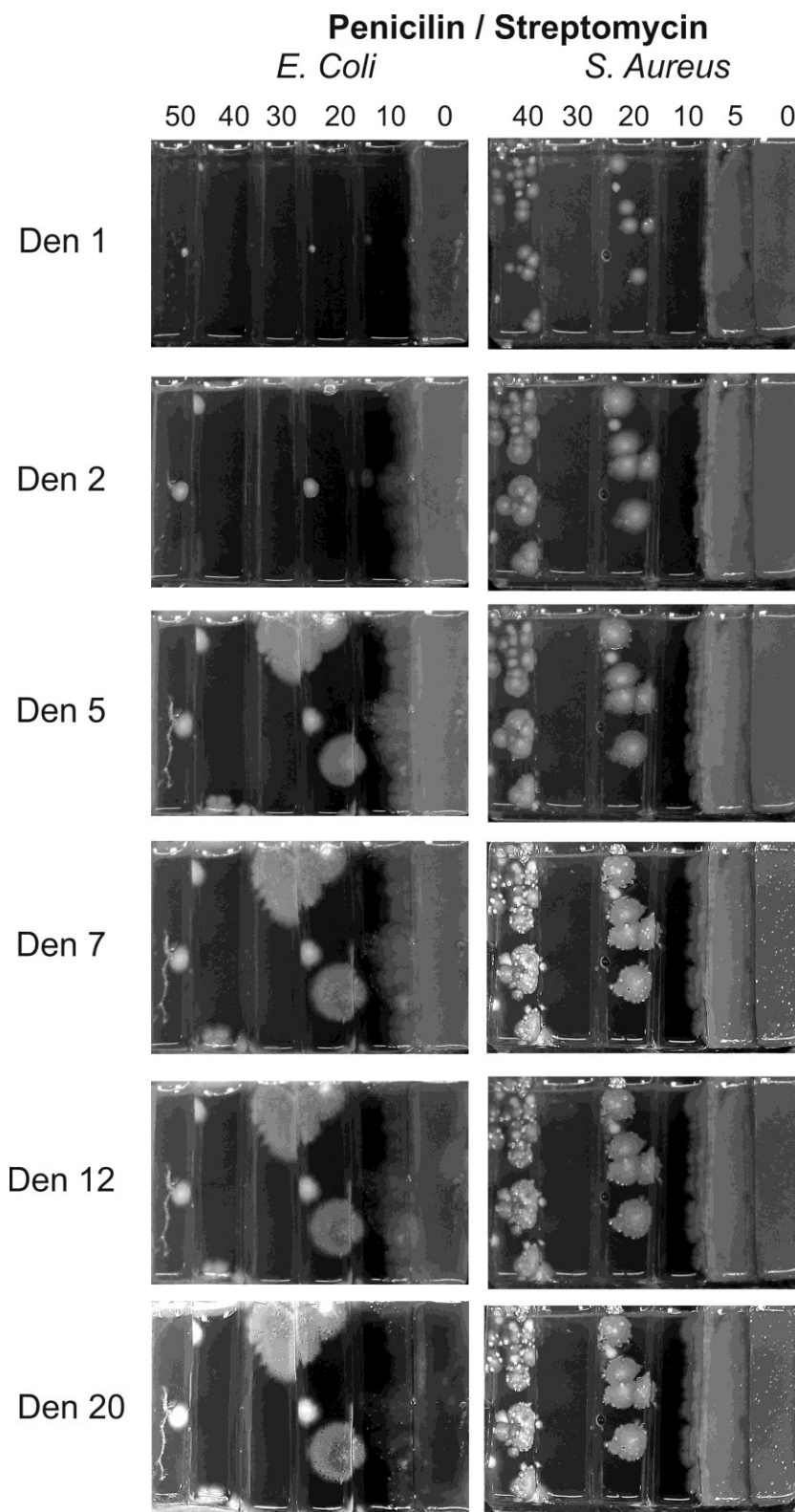




Obrázek 51 – Experimentální zařízení s koncentračním gradientem pyrolytu působícího na *E. coli* CCM 4517 a *S. aureus* CCM 4516 (množství pyrolytu v μl)



Obrázek 52 – Experimentální zařízení s koncentračním gradientem anilinu působícího na *E. coli* CCM 4517 a *S. aureus* CCM 4516 (množství anilinu v µl)



Obrázek 53 – Experimentální zařízení s koncentračním gradientem antibiotika Penicilin/Streptomycin působícího na *E. coli* CCM 4517 a *S. aureus* CCM 4516 (množství Pen/Strep v  $\mu$ l)

Na obrázku 50 je zobrazeno experimentální zařízení, na kterém byla testována různá množství PEI působící na bakterie *E. coli* CCM 4517 a *S. aureus* CCM 4516. *E. coli* od 5. dne začala přerůstat 1. zónu, na kterou bylo aplikováno 10 mg/ml PEI. 8. den pravděpodobně došlo ke vzniku mutantních bakterií, které se dále vyvíjely až do konce experimentu. Experiment byl sledován 33 dní, ale tato doba nestačila pro přerostení *E. coli* přes 1. zónu. Po 33 dnech narostla populace přes polovinu 1. zóny. V případě *S. aureus* došlo k přerůstání také 5. den. I zde nejspíš vznikly bakterie, které se dokázaly přizpůsobit prostředí obsahující testovanou látku a postupně přerůstaly 1. zónu, na kterou bylo aplikováno 5 mg/ml PEI. Bohužel 28. den došlo při manipulaci se vzorkem k jeho kontaminaci, což ale nemělo nijak zásadní vliv na sledování růstu. Po 33 dnech populace přerostla  $\frac{3}{4}$  1. zóny. Bylo zjištěno, že 10 mg/ml PEI není dostatečné množství, které by inhibovalo růst testované *E. coli*, stejně tak nestačí 5 mg/ml PEI pro inhibici růstu *S. aureus*.

Obrázek 51 ukazuje experimentální zařízení, na kterém byla testována různá množství pyrolu působící na bakterie *E. coli* CCM 4517 a *S. aureus* CCM 4516. U *E. coli* dochází k přerůstání po 4 dnech od začátku experimentu. Přerůstání je zde poměrně rychlé a 10. den se populace dostala přes 1. zónu, na kterou bylo aplikováno 10  $\mu$ l pyrolu. Další hranice dosáhla 24. den, kdy přerostla 2. zónu, na kterou bylo aplikováno 20  $\mu$ l pyrolu. Poté se růst a tvorba mutantních bakterií zastavila a ani po 33 dnech nedošlo k přerůstání do 3. zóny s obsahem pyrolu 30  $\mu$ l. U *S. aureus* byl vývoj pomalejší, přerůstání do 1. zóny začalo 7. den. Po 33 dnech populace lokálně přerostla přes 1. zónu, na kterou bylo aplikováno 10  $\mu$ l pyrolu. Bylo zjištěno, že 10  $\mu$ l pyrolu není dostatečné množství pro inhibici růstu *S. aureus* a ani 20  $\mu$ l pyrolu nezpůsobí inhibici růstu *E. coli*. Přestože, nedošlo u *E. coli* k přerůstání do 3. zóny, na kterou bylo aplikováno 30  $\mu$ l pyrolu, nelze jednoznačně říci, zda toto množství růst inhibuje, nebo jen bakterie neměly dostatek času přizpůsobit se novému prostředí.

Na obrázku 52 je zobrazeno experimentální zařízení, na kterém byla testována různá množství anilinu působící na bakterie *E. coli* CCM 4517 a *S. aureus* CCM 4516. V případě *E. coli* došlo pravděpodobně k difúzi anilinu z 1. zóny do bloku s nulovou koncentrací testované látky. V důsledku toho populace od 1. dne ustupuje. U *S. aureus* od 15. dne dochází zřejmě ke vzniku mutovaných bakterií, kterým je díky mutaci umožněn růst i v prostředí obsahující antimikrobiální látku. Růst těchto bakterií směřuje od rozhraní do míst s nulovou koncentrací anilinu, což může být důsledek difúze antimikrobiální látky agarem. První známky přerůstání do 1. zóny, kde bylo aplikováno 5  $\mu$ l anilinu, se objevují od 28. dne.

Obrázek 53 představuje experimentální zařízení, na kterém byla testována různá množství antibiotika Penicilin/Streptomycin působící na bakterie *E. coli* CCM 4517 a *S. aureus* CCM 4516. V případě *E. coli* došlo k přerůstání do 1. zóny 2. den. Bohužel se zde také objevila kontaminace. 7. den dosáhla *E. coli* poloviny 1. zóny obsahující 10  $\mu$ l Pen/Strep. V následujících dnech, došlo k postupnému úbytku bakterií. Není však jasné, zda je tento jev způsoben přítomností antibiotika, které v agaru difunduje, nebo vlivem kontaminujících mikroorganismů, které mohly testované bakterie zahubit. Je také zajímavé, že se kontaminace vyskytla v místech, s vyšším obsahem antibiotika, což značí, že vůči těmto mikroorganismům Penicilin/Streptomycin nevykazuje antimikrobiální aktivitu. Populace *S. aureus* přerostla 1. zónu s obsahem 5  $\mu$ l Pen/Strep hned 1. den. Zároveň se také opět objevila kontaminace ve 3. a 5. zóně. Od 2. dne populace přerůstala do 2. zóny, na kterou bylo aplikováno 10  $\mu$ l Pen/Strep. Po 20 dnech dosáhla populace *S. aureus*  $\frac{1}{4}$  2. zóny. Bylo zjištěno, že 10  $\mu$ l Pen/Strep není dostatečné množství, které by inhibovalo růst *E. coli* nebo *S. aureus*.

Po porovnání výsledků testovaných látek vykazoval nejlepší inhibiční účinky anilin, u kterého v případě *E. coli* došlo dokonce k ústupu a u *S. aureus* bylo přerůstání po 40 dnech minimální. V přítomnosti pyrolu se naopak *E. coli* i *S. aureus* velmi rychle přizpůsobily změně prostředí. *S. aureus* vykazoval rychlé přerůstání také v přítomnosti PEI. Dalším zjištěným poznatkem je vznik kontaminace na vzorcích obsahujících antibiotikum. Přesto, že práce i manipulace se všemi vzorky probíhala za stejných podmínek, u ostatních testovaných látek se kontaminace neprojevila vůbec anebo až po několika dnech trvání experimentu. Je tedy možné, že látky PEI, anilin a pyrol vykazovaly antimikrobiální aktivitu proti mikroorganismům, které sekundární kontaminaci způsobily u vzorků testovaných na antibiotikum.

Testování mikrobiálního vývoje a adaptace bylo provedeno také u biofilm tvořících bakterií *E. coli* CCM 3954 a *S. aureus* CCM 2022. V případě testování účinku PEI na *E. coli* CCM 3954 populace přerostla do  $\frac{1}{2}$  zóny s obsahem 10 mg/ml PEI za 20 dní. Zatímco u biofilm netvořící *E. coli* CCM 4517 bylo dosaženo stejné vzdálenosti až po 33 dnech. V případě *S. aureus* CCM 2022 došlo k přerostení 1. zóny s 5 mg/ml PEI již po jednom dni, na rozdíl od biofilm netvořícího *S. aureus* CCM 4516, kde k přerostení 1. zóny nedošlo ani po 33 dnech. Při testování aktivity pyrolu na *E. coli* CCM 3954 k přerůstání během 20 dní vůbec nedošlo a u *S. aureus* CCM 2022 bylo minimální přerůstání až od 13. dne. V případě anilinu tomu bylo podobně, kdy *E. coli* CCM 3954 nezačala přerůstat do 1. zóny ani po 20 dnech a u *S. aureus* CCM 2022 bylo minimální přerůstání od 20. dne. Dalo by se říci, že anilin významně působí proti *E. coli*, protože po 20 dnech sledování experimentu nedošlo ani u jedné z těchto

testovaných bakterií k přerůstání do zóny s testovanou látkou. U Pen/Strep došlo v případě *E. coli* CCM 3954 po 11 dnech k přerostení zóny s obsahem 40  $\mu$ l Pen/Strep. Do zóny s vyšší koncentrací však populace nepřerostla ani po 20 dnech. Populace *S. aureus* CCM 2022 přerostla po 20 dnech pouze zónu s obsahem 5  $\mu$ l Pen/Strep a to jen v určitých místech.

Výsledky testování antimikrobiální aktivity vybraných látek na biofilm tvořící bakterie nejsou plně prokazatelné, protože z časových důvodů byly tyto experimenty provedeny pouze jednou.

## ZÁVĚR

Zvýšená rezistence mikroorganismů proti antibiotickým látkám vyvolala potřebu nových antimikrobiálních látek, které jsou zkoumány v mnoha studiích. Objevilo se již několik prací týkajících se syntézy nových antimikrobiálních makromolekulárních systémů a zkoumání jejich biologické aktivity. Ve většině případů je však antimikrobiální aktivita materiálů studována pomocí krátkodobých testů, které nepostihují dynamiku vývoje vztahu mezi mikroorganismy a příslušným materiálem či látkou. Bylo zjištěno, že mikroorganismy vykazují vysokou míru přizpůsobivosti např. pomocí mutací, tudíž je třeba zaměřit se na pochopení této problematiky.

Cílem práce bylo modifikovat metodu testování interakce mikroorganismus / materiál / látka v dynamických podmínkách zahrnujících gradient testované polymerní látky s antimikrobiálním potenciálem v delším časovém rozmezí. Byla provedena série experimentů, díky kterým se podařilo ustanovit postup testování a vyvinout experimentální zařízení, které poskytuje možnost studia mikrobiální adaptace a evoluční dynamiky.

Pro zjištění antimikrobiálního účinku dostupných testovaných látek byla použita disková difúzní metoda. Po porovnání výsledků účinku PEI na biofilm netvořící a biofilm tvořící bakterie bylo zjištěno, že u biofilm tvořících bakterií vznikly menší zóny inhibice, což se očekávalo. U obou kmenů *E. coli* při 5 mg/ml PEI došlo pouze ke vzniku zóny projasnění a samotná inhibice růstu se projevila až u 10 mg/ml PEI. V případě obou kmenů *S. aureus* došlo k inhibici již při 5 mg/ml. Antimikrobiální aktivita PEG 400 a PEG 600 se projevila v minimální míře. Dále byly testovány monomery pyrolu a anilin, které mohou v polymerech zůstat jako rezidua. U obou byla prokázána antibakteriální aktivita vůči všem testovaným kmenům. V případě pyrolu došlo k inhibici u biofilm netvořících bakterií při 10 µl pyrolu na rozdíl od biofilm tvořících, kde se inhibice projevila při 20 µl pyrolu. Bylo také zjištěno, že pyrol má lepší antimikrobiální účinky na *E. coli*. Anilin naopak působil účinněji na kmeny *S. aureus*. Antibiotikum Penicilin/Streptomycin se ukázalo jako více účinné proti kmenům *S. aureus*. Na *E. coli* CCM 3954 neměla žádná z testovaných koncentrací antibiotika Penicilin/Streptomycin inhibiční účinek.

Dále byly provedeny testy mikrobiálního vývoje a adaptace na různé koncentrace testovaných látek s použitím experimentálního zařízení. Z testovaných látek vykazoval nejlepší inhibiční účinky anilin, u kterého v případě *E. coli* došlo dokonce k ústupu a u *S. aureus* bylo přerůstání po 40 dnech minimální. V přítomnosti pyrolu se naopak oba typy bakterií

velmi rychle přizpůsobily změně prostředí. Populace *S. aureus* vykazovala rychlé přerůstání také v přítomnosti PEI. Přesto, že práce i manipulace se všemi vzorky probíhala za stejných podmínek, u ostatních testovaných látek se kontaminace neprojevila vůbec anebo až po několika dnech trvání experimentu. Je tedy možné, že látky PEI, anilin a pyrol vykazovaly antimikrobiální aktivitu proti mikroorganismům, které sekundární kontaminaci způsobily u vzorků testovaných na antibiotikum.

Testování mikrobiálního vývoje a adaptace bylo provedeno také u biofilm tvořících bakterií *E. coli* CCM 3954 a *S. aureus* CCM 2022. Bylo zjištěno, že biofilm tvořící bakterie jsou vůči působení PEI odolnější než biofilm netvořící. Při testování aktivity pyrolu na *E. coli* CCM 3954 k přerůstání vůbec nedošlo a u *S. aureus* CCM 2022 bylo minimální přerůstání až od 13. dne. V případě anilinu tomu bylo podobně, *E. coli* CCM 3954 nezačala přerůstat vůbec a u *S. aureus* CCM 2022 bylo přerůstání minimální. Dalo by se říci, že anilin významně působí proti *E. coli*, protože po 20 dnech sledování experimentu nedošlo ani u jedné z těchto testovaných bakterií k přerůstání do zóny s testovanou látkou.

Během navrhování testovací metody bylo nutno provést několik pokusů, než bylo vytvořeno takové experimentální zařízení, které by umožnilo sledování vývoje bakterií. Přestože ani poslední postup nebyl ideální, byly získány výše zmíněné výsledky. Ověření stoprocentní pravdivosti těchto výsledků vyžaduje další testování.



**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] YOUNG, Robert a P. LOVELL. *Introduction to Polymers*. 3. Boca Raton: CRC Press, 2011. ISBN 978-0849339295.
- [2] KUČERA, Miloslav. *Vznik makromolekul I.: Obecné poznatky o zákonitostech tvorby polymerů*. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 2003, 172 s. ISBN 80-214-2127-4.
- [3] STOKLASA, Karel. *Makromolekulární chemie I*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická ve Zlíně, 2005, 106 s.
- [4] EHRENSTEIN, Gottfried. *Polymeric Materials: Structure – Properties – Applications*. 1. Munich: Carl Hanser Verlag, 2001, 292 s. ISBN 978-3-446-21461-3.
- [5] BUGGY, M. *Polymeric Materials. Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*. Elsevier, 2016. DOI: 10.1016/B978-0-12-803581-8.04104-7.
- [6] CLAVIER, Ron. *Characterization and Analysis of Polymers*. United States: John Wiley & Sons, 2008, 977 s. ISBN 978-0-470-23300-9.
- [7] HAMID AKASH, Muhammad, Kanwal REHMAN a Shuqing CHEN. Natural and Synthetic Polymers as Drug Carriers for Delivery of Therapeutic Proteins. *Polymer Reviews*. 2015, **55**(3), 371 – 406. DOI: 10.1080/15583724.2014.995806.
- [8] ROGOVINA, S. Biodegradable Polymer Composites Based on Synthetic and Natural Polymers of Various Classes. *Polymer Science Series C*. 2016, **58**(1), 62 – 73. DOI: 10.1134/S1811238216010100.
- [9] MAITZ, M.F. Applications of Synthetic Polymers in Clinical Medicine. *Biosurface and Biotribology*. 2015, **1**(3), 161 – 176. DOI: 10.1016/j.bsbt.2015.08.002.
- [10] FADEEVA, Inna, Elena TROFIMCHUK, Sergey DEDUSHENKO, Alexander FOMIN, Galina DAVYDOVA, Irina SELEZNEVA, Yuri PERFILIEV a Sergey BARINOV. Methylcellulose Films Partially Crosslinked by Iron Compounds for Medical Applications. *Materials Today Communications*. 2019, **18**, 54 – 59. DOI: 10.1016/j.mtcomm.2018.10.008.
- [11] SANHUEZA, Claudia, Francisca ACEVEDO, Sebastian ROCHA, Pamela VILLEGAS, Michael SEEGER a Rodrigo NAVIA. Polyhydroxyalkanoates as

- Biomaterial for Electrospun Scaffolds. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019, **124**, 102 – 110. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.068
- [12] PODZIMEK, Stepan. Synthetic Polymers. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier, 2017. DOI: 10.1016/B978-0-12-409547-2.14226-X.
- [13] In: *Sigma Aldrich* [online]. [cit. 2019-02-10]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>
- [14] GILES, Harold, John WAGNER a Eldridge MOUNT. *Extrusion – The Definitive Processing Guide and Handbook*. William Andrew Publishing/Plastics Design Library, 2005. ISBN 978-0-8155-1473-2.
- [15] ROBERTS, John a Marjorie CASERIO. *Basic principles of organic chemistry*. 2., Menlo Park, Calif.: W. A. Benjamin, 1977. ISBN 08-053-8329-8.
- [16] DUCHÁČEK, Vratislav. *Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2006. ISBN 80-708-0617-6.
- [17] SEDLARIK, Vladimír. Antimicrobial Modifications of Polymers. *Biodegradation - Life of Science*. InTech, 2013. DOI: 10.5772/56222.
- [18] MAH, Thien-Fah, Betsey PITTS, Brett PELLOCK, Graham WALKER, Philip STEWART a George O'TOOLE. A Genetic Basis for *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Antibiotic Resistance. *Nature*. 2003, **426**(6964), 306 – 310. DOI: 10.1038/nature02122.
- [19] KLEIN, Eili, David SMITH a Ramanan LAXMINARAYAN. Hospitalizations and Deaths Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999 – 2005. *Emerging Infectious Diseases*. 2007, **13**(12), 1840 – 1846. DOI: 10.3201/eid1312.070629.
- [20] ARORA, Ankita a Abhijit MISHRA. Antibacterial Polymers – A Mini Review. *Materials Today: Proceedings*. 2018, **5**(9), 17156 – 17161. DOI: 10.1016/j.matpr.2018.04.124.
- [21] MILOVIĆ, Nebojša, Jun WANG, Kim LEWIS a Alexander KLIBANOV. Immobilized N-alkylated Polyethylenimine Avidly Kills Bacteria by Rupturing Cell Membranes

- with No Resistance Developed. *Biotechnology and Bioengineering*. 2005, **90**(6), 715-722. DOI: 10.1002/bit.20454.
- [22] KENAWY, El-Refai, Abd EL-SHANSHOURY, Nihal OMAR SHAKER, Baheya EL-SADEK, Abeer KHATTAB a Badr ISMAIL BADR. Biocidal Polymers: Synthesis, Antimicrobial Activity, and Possible Toxicity of Poly (hydroxystyrene-co-methylmethacrylate) Derivatives. *Journal of Applied Polymer Science*. 2011, **120**(5), 2734-2742. DOI: 10.1002/app.33046.
- [23] SONG, Airong, Stephen WALKER, Kathlyn PARKER a Nicole SAMPSON. Antibacterial Studies of Cationic Polymers with Alternating, Random, and Uniform Backbones. *ACS Chemical Biology*. 2011, **6**(6), 590-599. DOI: 10.1021/cb100413w.
- [24] HUANG, Keng-Shiang, Chih-Hui YANG, Shu-Ling HUANG, Cheng-You CHEN, Yuan-Yi LU a Yung-Sheng LIN. Recent Advances in Antimicrobial Polymers: A Mini-Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016, **17**(9). DOI: 10.3390/ijms17091578.
- [25] YU, Kai, Yan MEI, Narges HADJESFANDIARI a Jayachandran KIZHAKKEDATHU. Engineering Biomaterials Surfaces to Modulate the Host Response. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014, **124**, 69 – 79. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.08.009.
- [26] ZHANG, Hongbin a Mu CHIAO. Anti-fouling Coatings of Poly(dimethylsiloxane) Devices for Biological and Biomedical Applications. *Journal of Medical and Biological Engineering*. 2015, **35**(2), 143-155. DOI: 10.1007/s40846-015-0029-4.
- [27] XUE, Yan, Huining XIAO a Yi ZHANG. Antimicrobial Polymeric Materials with Quaternary Ammonium and Phosphonium Salts. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015, **16**(2), 3626-3655. DOI: 10.3390/ijms16023626.
- [28] JAIN, Anjali, L. DUVVURI, Shady FARAH, Nurit BEYTH, Abraham DOMB a Wahid KHAN. Antimicrobial Polymers. *Advanced Healthcare Materials*. 2014, **3**(12), 1969 – 1985. DOI: 10.1002/adhm.201400418.

- [29] BARZIC, Andreea a Silvia IOAN. Antibacterial Drugs — From Basic Concepts to Complex Therapeutic Mechanisms of Polymer Systems. *Concepts, Compounds and the Alternatives of Antibacterials*. InTech, 2015. DOI: 10.5772/60755.
- [30] SIEDENBIEDEL, Felix a Joerg TILLER. Antimicrobial Polymers in Solution and on Surfaces: Overview and Functional Principles. *Polymers*. 2012, **4**(1), 46 – 71. DOI: 10.3390/polym4010046.
- [31] LAWSON, McKinley, Richard SHOEMAKER, Kevin HOTH, Christopher BOWMAN a Kristi ANSETH. Polymerizable Vancomycin Derivatives for Bactericidal Biomaterial Surface Modification: Structure – Function Evaluation. *Biomacromolecules*. 2009, **10**(8), 2221 – 2234. DOI: 10.1021/bm900410a.
- [32] DEKA, Smriti, Ashwani SHARMA a Pradeep KUMAR. Cationic Polymers and their Self-Assembly for Antibacterial Applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2015, **15**(13), 1179 – 1195. DOI: 10.2174/1568026615666150330110602.
- [33] TIMOFEEVA, Larisa a Natalia KLESHCHEVA. Antimicrobial Polymers: Mechanism of Action, Factors of Activity, and Applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, **89**(3), 475 – 492. DOI: 10.1007/s00253-010-2920-9.
- [34] SANTOS, Madson, Ana FONSECA, Patrícia MENDONÇA, Rita BRANCO, Arménio SERRA, Paula MORAIS a Jorge COELHO. Recent Developments in Antimicrobial Polymers: A Review. *Materials*. 2016, **9**(7). DOI: 10.3390/ma9070599.
- [35] IKEDA, T, H HIRAYAMA, H YAMAGUCHI, S TAZUKE a M WATANABE. Polycationic Biocides with Pendant Active Groups: Molecular Weight Dependence of Antibacterial Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1986, **30**(1), 132-136. DOI: 10.1128/AAC.30.1.132.
- [36] TEW, Gregory, Richard SCOTT, Michael KLEIN a William DEGRADO. De Novo Design of Antimicrobial Polymers, Foldamers, and Small Molecules: From Discovery to Practical Applications. *Accounts of Chemical Research*. 2010, **43**(1), 30 – 39. DOI: 10.1021/ar900036b.
- [37] STREMPPEL, Nikola, Janine STREHMEL a Joerg OVERHAGE. Potential Application of Antimicrobial Peptides in the Treatment of Bacterial Biofilm Infections. *Current*

- Pharmaceutical Design*. 2014, **21**(1), 67 – 84. DOI: 10.2174/1381612820666140905124312. .
- [38] GELMAN, Michael, Bernard WEISBLUM, David LYNN a Samuel GELLMAN. Biocidal Activity of Polystyrenes That Are Cationic by Virtue of Protonation. *Organic Letters*. 2004, **6**(4), 557 – 560. DOI: 10.1021/ol036341.
- [39] TIMOFEEVA, Larisa, Natalia KLESHCHEVA, Antonina MOROZ a Lyubov DIDENKO. Secondary and Tertiary Polydiallylammonium Salts: Novel Polymers with High Antimicrobial Activity. *Biomacromolecules*. 2009, **10**(11), 2976 – 2986. DOI: 10.1021/bm900435v.
- [40] PASQUIER, Nicolas, Helmut KEUL, Elisabeth HEINE, Martin MOELLER, Borislav ANGELOV, Sebastian LINSER a Regine WILLUMEIT. Amphiphilic Branched Polymers as Antimicrobial Agents. *Macromolecular Bioscience*. 2008, **8**(10), 903 – 915. DOI: 10.1002/mabi.200800121.
- [41] KENAWY, El-Refaie, S. WORLEY a Roy BROUGHTON. The Chemistry and Applications of Antimicrobial Polymers: A State of the Art Review. *Biomacromolecules*. 2007, **8**(5), 1359 – 1384. DOI: 10.1021/bm061150q.
- [42] FERRAZZANO, Gianmaria, Lia ROBERTO, Ivana AMATO, Tiziana CANTILE, Giancarla SANGIANANTONI a Aniello INGENITO. Antimicrobial Properties of Green Tea Extract Against Cariogenic Microflora: An In Vivo Study. *Journal of Medicinal Food*. 2011, **14**(9). DOI: 10.1089/jmf.2010.0196. .
- [43] VAQUERO, M.J., M.R. ALBERTO a M.C. DE NADRA. Antibacterial Effect of Phenolic Compounds from Different Wines. *Food Control*. 2007, **18**(2), 93 – 101. DOI: 10.1016/j.foodcont.2005.08.010.
- [44] KRISHNAN, Sitaraman, Craig WEINMAN a Christopher OBER. Advances in Polymers for Anti-biofouling Surfaces. *Journal of Materials Chemistry*. 2008, **18**(29), 3405 – 3413. DOI: 10.1039/b801491d.
- [45] HADJESFANDIARI, Narges, Kai YU, Yan MEI a Jayachandran KIZHAKKEDATHU. Polymer Brush-Based Approaches for the Development of

- Infection – Resistant Surfaces. *Journal of Materials Chemistry B*. 2014, **2**(31). DOI: 10.1039/C4TB00550C.
- [46] ADLHART, C., J. VERRAN, N.F. AZEVEDO, H. OLMEZ, M.M. KEINÄNEN-TOIVOLA, I. GOUVEIA, L.F. MELO a F. CRIJNS. Surface Modifications for Antimicrobial Effects in the Healthcare Setting: A Critical Overview. *Journal of Hospital Infection*. 2018, **99**(3), 239 – 249. DOI: 10.1016/j.jhin.2018.01.018.
- [47] MORIARTY, T., Sebastian ZAAT a H. BUSSCHER. *Biomaterials associated infection: immunological aspects and antimicrobial strategies*. 1. New York: Springer, 2013, 566 s. ISBN 978-1-4614-1030-0.
- [48] ARMENTANO, Ilaria, Carla ARCIOLA, Elena FORTUNATI et al. The Interaction of Bacteria with Engineered Nanostructured Polymeric Materials: A Review. *The Scientific World Journal*. 2014, **2014**, 18 s. DOI: 10.1155/2014/410423
- [49] SCHUYLER, Ronald. *Wastewater biology*. 2. Alexandria, VA: Water Environment Federation, 2001, 285 s. Special publication (Water Environment Federation). ISBN 978-157-2781-672.
- [50] MIŠURCOVÁ, Ladislava. *Základy biologie*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická ve Zlíně. Zlín, 2012, 168 s. ISBN 978-80-7454-156-8.
- [51] GARRETT, Trevor, Manmohan BHAKOO a Zhibing ZHANG. Bacterial Adhesion and Biofilms on Surfaces. *Progress in Natural Science*. 2008, **18**(9), 1049 – 1056. DOI: 10.1016/j.pnsc.2008.04.001.
- [52] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana. *Mikrobiologie v technologii vod*. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2004. ISBN 80-708-0534-X.
- [53] *Biopedia.sk* [online]. 2019 [cit. 2019-03-03]. Dostupné z: <https://biopedia.sk/virusy-a-bakterie/bakterie-odhalenie-sveta-mikroorganizmov>
- [54] ČECHOVÁ, Leona a Magda JANALÍKOVÁ. *Obecná mikrobiologie*. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007. ISBN 978-80-7318-516-9.
- [55] NĚMEC, Miroslav a Dagmar MATOULKOVÁ. *Základy obecné mikrobiologie*. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2015, 256 s. ISBN 978-80-210-7923-6.

- [56] HØIBY, Niels, Oana CIOFU, Helle JOHANSEN et al. The Clinical Impact of Bacterial Biofilms. *International Journal of Oral Science*. 2011, **3**(2), 55 – 65. DOI: 10.4248/IJOS11026.
- [57] SATPATHY, Soumya, Sudip SEN, Smaranika PATTANAIK a Sangeeta RAUT. Review On Bacterial Biofilm: An Universal Cause of Contamination. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2016, **7**, 56 – 66. DOI: 10.1016/j.bcab.2016.05.002
- [58] JAFARI, A., M.M. ASLANI a S. BOUZARI. Escherichia coli: A Brief Review of Diarrheagenic Pathotypes and Their Role in Diarrheal Diseases in Iran. *Iranian Journal of Microbiology*. 2012, **4**(3), 102 – 117.
- [59] DONNELLY, Catherine, ed. *Cheese and microbes*. 1. Washington, DC: ASM Press, 2014. ISBN 978-1-55581-859-3.
- [60] VILA, J., E. SÁEZ-LÓPEZ, J. JOHNSON et al. Escherichia coli: an Old Friend with New Tidings. *FEMS Microbiology Reviews*. 2016, **40**(4), 437 – 463. DOI: 10.1093/femsre/fuw005. ISSN 1574-6976.
- [61] TONG, Steven, Joshua DAVIS, Emily EICHENBERGER, Thomas HOLLAND a Vance FOWLER. Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015, **28**(3), 603 – 661. DOI: 10.1128/CMR.00134-14. .
- [62] MYLES, Ian a Sandip DATTA. Staphylococcus aureus: An Introduction. *Seminars in Immunopathology*. 2012, **34**(2), 181 – 184. DOI: 10.1007/s00281-011-0301-9.
- [63] Staphylococcus Under the Microscope. In: *Microscopeworld* [online]. [cit. 2019-03-08]. Dostupné z: <http://blog.microscopeworld.com/2014/01/staphylococcus-under-microscope.html>
- [64] MUÑOZ-BONILLA, Alexandra, María CERRADA a Marta FERNÁNDEZ-GARCÍA. CHAPTER 1. Introduction to Antimicrobial Polymeric Materials. *Polymeric Materials with Antimicrobial Activity*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2013, 1 – 21. Polymer Chemistry Series. DOI: 10.1039/9781782624998-00001.

- [65] SANCHEZ, Martha a Ronald JONES. E Test, an Antimicrobial Susceptibility Testing Method with Broad Clinical and Epidemiologic Application. *Antimicrobial Newsletter*. 1992, **8**(1), 1 – 7. DOI: 10.1016/0738-1751(92)90015-3.
- [66] BAGUL, Uddhav a Sivakumar SIVAGURUNATHAN. Antibiotic Susceptibility Testing: A Review on Current Practices. *International Journal of Pharmacy*. 2016, **6**(3), 11 – 17. ISSN 2249-1848.
- [67] Pour plate Method: Principle, Procedure, Uses, and (Dis) Advantages. In: *Microbeonline* [online]. [cit. 2019-03-13]. Dostupné z: <https://microbeonline.com/pour-plate-method-principle-procedure-uses-dis-advantages/>
- [68] BAYM, M., T. LIEBERMAN, E. KELSIC, R. CHAIT, R. GROSS, I. YELIN a R. KISHONY. Spatiotemporal Microbial Evolution on Antibiotic Landscapes. *Science*. 2016, **353**(6304), 1147 – 1151. DOI: 10.1126/science.aag0822. ISSN 0036-8075. Dostupné také z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.aag0822>
- [69] *Czech Collection of Microorganisms* [online]. [cit. 07.04.2019]. Dostupné z: <http://www.sci.muni.cz/ccm/>
- [70] GIBNEY, Katherine, Iva SOVADINOVA, Analette LOPEZ, Michael URBAN, Zachary RIDGWAY, Gregory CAPUTO a Kenichi KURODA. Poly(ethylene imine) as Antimicrobial Agents with Selective Activity. *Macromolecular Bioscience*. 2012, **12**(9), 1279 – 1289. DOI: 10.1002/mabi.201200052.
- [71] SHUBBA, L., M. KALPANA a P. RAO. Synthesis, Characterization by AC Conduction and Antibacterial Properties of Polyaniline Fibers. *Scholars Research Library*. 2016, **8**(1), 214 – 219. ISSN 0975-507.
- [72] BALINT, Richard, Nigel CASSIDY a Sarah CARTMELL. Conductive Polymers: Towards a Smart Biomaterial for Tissue Engineering. *Acta Biomaterialia*. 2014, **10**(6), 2341 – 2353. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.02.015.
- [73] Gibco™ Penicillin-Streptomycin. *Fischer Scientific: Lab Equipment and Supplies* [online]. [cit. 2019-04-16]. Dostupné z: <https://www.fishersci.ca/shop/products/gibco-penicillin-streptomycin-10-000-u-ml-3/p-4918413>



- [74] KOPECKÁ, Jana a Gabriela ROTKOVÁ. *Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií* [online]. Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, 2017 [cit. 2019-04-14]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/do/sci/UEBBiol/um/comcmb/pages/steril\\_prace\\_ockovani\\_uchovavani.html](https://is.muni.cz/do/sci/UEBBiol/um/comcmb/pages/steril_prace_ockovani_uchovavani.html)
- [75] BARROS, Joana, Ana DIAS, Miguel RODRIGUES, Cidália PINA-VAZ, Maria LOPES a Irene PINA-VAZ. *The Journal of Contemporary Dental Practice*. 2015, **16**. DOI: 10.5005/jp-journals-10024-1701.
- [76] NALAWADE, TriveniMohan, SumaH. SOGI a Kishore BHAT. Bactericidal Activity of Propylene Glycol, Glycerine, Polyethylene Glycol 400, and Polyethylene Glycol 1000 Against Selected Microorganisms. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*. 2015, **5**(2). DOI: 10.4103/2231-0762.155736.
- [77] CARREIRA, Cláudia, Silvana SANTOS, Antônio JORGE a José LAGE-MARQUES. Antimicrobial Effect of Intracanal Substances. *Journal of Applied Oral Science*. 2007, **15**(5), 453 – 458. DOI: 10.1590/S1678-77572007000500015.
- [78] VAAMONDE, GRACIELA, JORGE CHIRIFE a OSVALDO SCORZA. An Examination of the Minimal Water Activity for *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P Growth in Laboratory Media Adjusted with Less Conventional Solutes. *Journal of Food Science*. 1982, **47**(4), 1259 – 1262. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1982.tb07661.x.
- [79] CHIRIFE, Jorge, León HERSZAGE, Arabella JOSEPH, Juan BOZZINI, Nélida LEARDINI a Elisa KOHN. In Vitro Antibacterial Activity of Concentrated Polyethylene Glycol 400 Solutions. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. 1983, **24**(3), 409 – 412.
- [80] GOMES, Brenda, Caio FERRAZ, Morgana VIANNA, Pedro ROSALEN, Alexandre ZAIA, Fabricio TEIXEIRA a Francisco SOUZA-FILHO. In Vitro Antimicrobial Activity of Calcium Hydroxide Pastes and Their Vehicles Against Selected Microorganisms. *Brazilian Dental Journal*. 2002, **13**(3), 155 – 161. DOI: 10.1590/S0103-64402002000300002. ISSN 0103-6440.
- [81] MARÁKOVÁ, Nela, Petr HUMPOLÍČEK, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Zdenka CAPÁKOVÁ, Lenka MARTINKOVÁ, Patrycja BOBER, Miroslava TRCHOVÁ a

- Jaroslav STEJSKAL. Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of Cotton Fabric Coated With Conducting Polymers, Polyaniline or Polypyrrole, and with Deposited Silver Nanoparticles. *Applied Surface Science*. 2017, **396**, 169 – 176. DOI: 10.1016/j.apsusc.2016.11.024.
- [82] KUČEKOVÁ, Zdenka, Petr HUMPOLICEK, Vera KASPARKOVÁ, Tomas PERECKO, Marián LEHOČKÝ, Iva HAUERLANDOVÁ, Petr SÁHA a Jaroslav STEJSKAL. Colloidal Polyaniline Dispersions: Antibacterial Activity, Cytotoxicity and Neutrophil Oxidative Burst. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014, **116**, 411 – 417. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.01.027.
- [83] SHI, NL, XM GUO, HM JING, Jianzhou GONG, Cantan SUN a K. YANG. Antibacterial Effect of the Conducting Polyaniline. *Journal of Materials Science and Technology*. 2006, **22**(3), 289 – 290.
- [84] DHIVYA, C., S. VANDARKUZHALI a N. RADHA. Antimicrobial Activities of Nanostructured Polyanilines Doped with Aromatic Nitro Compounds. *Arabian Journal of Chemistry*. 2015. DOI: 10.1016/j.arabjc.2015.12.005.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

AST	Testy antimikrobiální citlivosti
BHI	Kultivační médium Brain Heart Infusion
B-PEI	Rozvětvený polyethylenimin
CCM	Česká sbírka mikroorganismů v Brně
CPR	Ciprofloxacin
DAEC	Difúzně adherentní <i>E. coli</i>
E. C.	<i>E. coli</i> CCM 4517
E. C. Biofilm	<i>E. coli</i> CCM 3954
EAEC	Enteroadgregativní <i>E. coli</i>
EHEC	Enterohemoragická <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvazivní <i>E. coli</i>
EPDM	Ethylenpropylendienový kaučuk
EPEC	Enteropatogenní <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoxigenní <i>E. coli</i>
L-PEI	Lineární polyethylenimin
MBC	Minimální baktericidní koncentrace
MH	Mueller Hinton agar
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MRSA	Methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
PANI	Polyanilin
PCA	Plate Count agar
PEG 1000	Polyethylenglykol s průměrnou molekulovou hmotností 1000
PEG 400	Polyethylenglykol s průměrnou molekulovou hmotností 400
PEG 600	Polyethylenglykol s průměrnou molekulovou hmotností 600

---

PEI	Polyethylenimin
Pen/Strep	Antibiotikum Penicilin/Streptomycin
S. A.	<i>S. aureus</i> CCM 4516
S. A. Biofilm	<i>S. aureus</i> CCM 2022
STEC	Shiga-like toxigenní <i>E. coli</i>
TMP	Trimethoprim
TSA	Trypton – sojový agar

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 – Makromolekulární řetězce [3] .....	13
Obrázek 2 – Kyselina polymléčná, methylcelulóza a monomerní struktury různých polyhydroxyalkanoátů, upraveno dle [9, 10, 11].....	15
Obrázek 3 – 1 polyvinylalkohol, 2 polyethylen, 3 polystyren, 4 polysulfon [13] .....	16
Obrázek 4 – Mechanismus antimikrobiální aktivity, upraveno dle [24] .....	19
Obrázek 5 – Obecné mechanismy působení antimikrobiálních polymerů: (a) polymerní biocidy; b) biocidní polymery; (c) polymery uvolňující biocidy [29] .....	20
Obrázek 6 – Struktury biocidních polymerů s kvartérními amoniiovými skupinami [30] .....	22
Obrázek 7 – Membránově aktivní antimikrobiální peptid Magainin- I, upraveno dle [30] .....	23
Obrázek 8 – Hydrofilní polymerní kartáče jako antiadhezivní povlak. Zástupce (a) neutrálních polymerů a (b) zwitterionové polymery používané pro hydrofilní polymerní kartáče, upraveno dle [45].....	26
Obrázek 9 – Koncept termorezistentních povrchů s magaininem připojeným na oligo(ethylenglykol)methakryláty, které (a) zabíjejí bakteriální buňky nebo (b) je odpuzují nad teplotou přechodu, upraveno dle [30].....	28
Obrázek 10 – Znázornění (a) povrchů uvolňující biocidy a (b) kontaktních krycích povlaků, kde jsou baktericidní činidla konjugována kovalentně s řetězci polymeru, upraveno dle [45] .....	29
Obrázek 11 – a) mikrotopografie může podporovat adhezi bakterií, zatímco (b) nanotopografie může omezovat schopnost bakterií adherovat, upraveno dle [46] .....	30
Obrázek 12 – Tvary bakteriálních buněk [53] .....	31
Obrázek 13 – Časový průběh tvorby biofilmu <i>P. aeruginosa</i> QS označuje komunikaci mezi buňkami a EPS je extracelulární biofilmová matrice, upraveno dle [56].	34
Obrázek 14 – <i>Escherichia coli</i> [60].....	35
Obrázek 15 – <i>Staphylococcus aureus</i> [63].....	36
Obrázek 16 – Difúzní disková metoda – testování antimikrobiálních vlastností antibiotika Penicilin/streptomycin, Centrum polymerních systémů ve Zlíně ...	38
Obrázek 17 – Stokesův test, upraveno dle [66] .....	39
Obrázek 18 – Diluční metoda, upraveno dle [67].....	40

Obrázek 19 – E test [66] .....	40
Obrázek 20 – Experimentální zařízení pro studium mikrobiální evoluce v prostorově strukturovaném prostředí. (A) Čtyřstupňový gradient trimethoprimu. Antibiotikum se přidává v sekcích, aby exponenciální gradient stoupal dovnitř. (B) Deska s gradientem trimethoprimu po 12 dnech. (C) Časosběrné snímky části desky. Opakovaná mutace a selekce lze vidět v každém kroku [68]......	42
Obrázek 21 – Strukturní vzorec rozvětveného polyethyleniminu [13].....	47
Obrázek 22 – Strukturní vzorec polyethylenglykolu [13] .....	47
Obrázek 23 – Strukturní vzorec pyrolu [13].....	48
Obrázek 24 – Strukturní vzorec anilinu [13] .....	49
Obrázek 25 – Křížový roztěr, upraveno dle [74].....	50
Obrázek 26 – Inhibiční zóny testovaných látek, polyethyleniminu a antibiotika Penicilin/Streptomycinu .....	53
Obrázek 27 – Ukázka přípravy experimentálního zařízení pomocí nerezové formy .	54
Obrázek 28 – Velikosti zón inhibice (vlevo) a projasnění (vpravo) při testování PEI proti E. coli CCM 4517 .....	55
Obrázek 29 – Velikosti zón inhibice při testování PEI proti S. aureus CCM 4516....	55
Obrázek 30 – Velikosti zón inhibice při testování PEG 400 proti E. coli CCM 4517 .....	56
Obrázek 31 – Velikosti zón inhibice při testování PEG 400 proti S. aureus CCM 4516 .....	56
Obrázek 32 – Velikosti zón inhibice při testování PEG 600 proti E. coli CCM 4517 .....	57
Obrázek 33 – Velikosti zón inhibice při testování pyrolu proti E. coli CCM 4517 ...	58
Obrázek 34 – Velikosti zón inhibice při testování pyrolu proti S. aureus CCM 4516.....	58
Obrázek 35 – Velikosti zón inhibice při testování anilinu proti E. coli CCM 4517...	59
Obrázek 36 – Velikosti zón inhibice při testování anilinu proti S. aureus CCM 4516.....	59
Obrázek 37 – Velikosti zón inhibice (vlevo) a projasnění (vpravo) při testování antibiotika Penicilin/Streptomycin proti E. coli CCM 4517 .....	60
Obrázek 38 – Velikosti zón inhibice při testování antibiotika Penicilin/Streptomycin proti S. aureus CCM 4516.....	60

Obrázek 39 – Velikosti zón inhibice (vlevo) a projasnění (vpravo) při testování PEI proti <i>E. coli</i> CCM 3954 .....	61
Obrázek 40 – Velikosti zón inhibice při testování PEI proti <i>S. aureus</i> CCM 2022....	61
Obrázek 41 – Velikosti zón inhibice při testování pyrolu proti <i>E. coli</i> CCM 3954 ...	62
Obrázek 42 – Velikosti zón inhibice při testování pyrolu proti <i>S. aureus</i> CCM 2022 .....	62
Obrázek 43 – Velikosti zón inhibice při testování anilinu proti <i>E. coli</i> CCM 3954...63	
Obrázek 44 – Velikosti zón inhibice při testování anilinu proti <i>S. aureus</i> CCM 2022 .....	63
Obrázek 45 – Velikosti zón inhibice (vlevo) a projasnění (vpravo) při testování antibiotika Penicilin/Streptomycin proti <i>E. coli</i> CCM 3954 .....	64
Obrázek 46 – Velikosti zón inhibice (vlevo) a projasnění (vpravo) při testování antibiotika Penicilin/Streptomycin proti <i>S. aureus</i> CCM 2022 .....	64
Obrázek 47 – Testování přerůstání <i>S. aureus</i> přes vytvořené zóny PCA. Červeně je označena oblast vzniku sekundární kontaminace.....	68
Obrázek 48 – Testování antibiotika Pen/Strep působícího na <i>E. coli</i> CCM 451. Červeně je označena oblast vzniku sekundární kontaminace. ....	69
Obrázek 49 – Testování koncentrací (10, 20, 30, 40, 50)μl antibiotika Pen/Strep působících na <i>E. coli</i> CCM 4517. Červeně je označena oblast vzniku sekundární kontaminace.....	69
Obrázek 50 – Experimentální zařízení s koncentračním gradientem PEI působícího na <i>E. coli</i> CCM 4517 a <i>S. aureus</i> CCM 4516 (množství PEI v mg/ml).....	72
Obrázek 51 – Experimentální zařízení s koncentračním gradientem pyrolu působícího na <i>E. coli</i> CCM 4517 a <i>S. aureus</i> CCM 4516 (množství pyrolu v μl) .....	73
Obrázek 52 – Experimentální zařízení s koncentračním gradientem anilinu působícího na <i>E. coli</i> CCM 4517 a <i>S. aureus</i> CCM 4516 (množství anilinu v μl).....	74
Obrázek 53 – Experimentální zařízení s koncentračním gradientem antibiotika Penicilin/Streptomycin působícího na <i>E. coli</i> CCM 4517 a <i>S. aureus</i> CCM 4516 (množství Pen/Strep v μl).....	75

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 – Složení Trypton – sojového agaru .....	44
Tabulka 2 – Složení Plate Count agaru .....	45
Tabulka 3 – Složení Mueller Hinton agaru .....	45
Tabulka 4 – Množství testovaných látek difuzní diskovou metodou .....	51
Tabulka 5 – Shrnutí výsledků přerůstání bakterií přes koncentrační gradient .....	70