

# Vazba eukaryotických buněk na modifikovaných površích

Kristýna Janů

---

Bakalářská práce  
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2013/2014

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kristýna Janů**  
Osobní číslo: **T11444**  
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Polymerní materiály a technologie**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Vazba eukaryotických buněk na modifikovaných površích.**

Zásady pro vypracování:

Studentka se seznámí s dosud publikovanými informacemi o významu vazby buněk a tvorby biofilmu v oblasti lékařství. V teoretické části práce zpracuje informace o možnostech ovlivnění buněčné vazby pomocí modifikace povrchů. Prakticky se seznámí s prací v mikrobiologické laboratoři a laboratoři buněčných kultur a osvojí si základní techniky práce v laboratoři. V praktické části provede a vyhodnotí testy vazby buněk a tvorby biofilmu na modifikovaných polymerních površích, především pak polyanilinu.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

**Polymers for regenerative medicine. Publisher: Berlin ; New York : Springer, (2006) ISBN 3540333533.**

**Biomedical technology and devices handbook. Publisher: Boca Raton : CRC Press, (2004) ISBN 0-8493-1140-3**

**Cell Biology: A Laboratory Handbook, Four Volume Set. Publisher: Academic Press, 3 edition (July 18, 2005). ISBN-10: 0121647307.**

**Culture of Animal Cells: A manual of Basic Technique. Publisher: Wiley-Liss; 5 edition (July 29, 2005) ISBN-10: 0471453293.**

**Culture of Cells for Tissue Engineering. Publisher: Wiley-Liss; 1 edition (February 3, 2006) ISBN-10: 0471629359.**

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.**

Centrum polymerních materiálů

Datum zadání bakalářské práce:

**10. ledna 2014**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**28. května 2014**

Ve Zlíně dne 7. února 2014

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



  
Ing. Lubomír Beníček, Ph.D.  
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Jana Krstýna

Obor: Polymerní materiálová technologie

## 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 užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 18.5.2014

Jana Krstýna

<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, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či 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). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.*

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

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

## ABSTRAKT

Abstrakt česky

Práce je zaměřena na polyanilin, který je velice všestranný materiál a pro své vlastnosti by mohl být používán v různých odvětvích průmyslu. Možné použití je také v oblasti biomedicíny, proto je vhodné prozkoumat jeho chování v závislosti k tvorbě biofilmu eukaryotických buněk. V této práci bylo konkrétně zkoumáno sedm druhů plísní a sedm druhů kvasinek. Byl testován polyanilin (PANI), přesněji emeraldinová sůl, která byla následně upravena plasmou (PANI-P). Na povrch daných vzorků byla nanášena suspenze testovaných plísní a po určitých časových intervalech, celkově 46 dnech, bylo odečteno jejich přerůstání přes povrch. Následně byly porovnány výsledky mezi různými povrchy a různými druhy plísní. Pro kvasinky byly použity 96-ti jamkové mikrotitrační destičky, které byly potaženy PANI a PANI-P. Následně byly naočkovány suspenzí kvasinek a nechaly se kultivovat po dobu 48 hodin. Po uplynuté době se měřila schopnost kvasinek tvořit biofilm na daných površích. Měření probíhalo ve spektrofotometru při 595 nm, kde se měřila uvolněná krystalová violet' v 33% kyselině octové, navázána na buňky kvasinek v biofilmu. Výsledky přerůstání plísní ukázaly, že polypropylen, který byl použit jako referenční vzorek, vykazuje menší množství přerůstání povrchu mycéliem plísní oproti PANI a PANI-P a to u všech sedmi druhů. PANI a PANI-P neprokázaly vůči sobě významné rozdíly v množství přerůstání. U kvasinek byl použit jako referenční vzorek původní mikrotitrační destička, tedy polystyren. Výsledky schopnosti kvasinek tvořit biofilm byly zpracovány do grafu a vyhodnoceny T-testem, který u 4 druhů rodu *Candida* ukázal, že tvorba biofilmu byla podporována u PANI-P, u dalších 3 druhů nebyl výsledek jednoznačný.

Klíčová slova: Adheze, eukaryotické buňky, plísně, kvasinky, polyanilin, plasma

## **ABSTRACT**

Abstrakt ve světovém jazyce

The thesis is focused on polyaniline, as very versatile material applicable in many different industries including biomedicine. The information about its impact on biofilm formation is therefore very important. In this work the biofilm formation of seven species of mold and seven species of yeast were examined. Polyaniline in form of pristine emeraldine (PANI), and air plasma modified polyaniline (PANI-P), were studied. The surfaces of samples were inoculated by the suspension of the tested mold and after certain time period, the biofilm formation was detected. The yeasts were tested using 96-well microtiter plates that were coated with PANI and PANI-P. Subsequently the yeast suspensions were inoculated and allowed to cultivate for 48 hours. After the 48 hours the ability of yeast to form biofilms on the surfaces was measured using crystal violet dyeing.

The results showed that the polypropylene which was used as reference sample has a smaller surface overgrowth compared to the amount of overgrowth on PANI and PANI-P in all seven mold species. PANI and PANI-P did not show significant differences in the amount of overgrowth. In yeast, the original polystyrene microplate, was used as the reference. The results of the ability of yeast to form biofilm were processed in the graph and evaluated by T-test.

Keywords: Adhesion, eucaryotic cells, mold, yeast, polyaniline, plasma

Děkuji tímto vedoucímu mé bakalářské práce doc. Ing. Petru Humpolíčkovi, Ph.D. za pomoc, cenné rady, trpělivost a ochotu při zpracování této práce. Mé poděkování patří též doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za spolupráci při získávání údajů pro výzkumnou část práce i pomoc při zpracování výsledků a jejich diskuzi.

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



# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>1 BIOFILM</b> .....	<b>13</b>
1.1 VŠEOBECNÁ CHARAKTERISTIKA .....	13
1.2 PŘÍČINY VZNIKU BIOFILMU .....	13
1.3 VZNIK BIOFILMU .....	14
1.4 RŮST .....	14
1.5 REGULACE TVORBY BIOFILMU .....	15
1.6 VÝZNAM BIOFILMU V MEDICÍNĚ .....	15
1.6.1 Reakce hostitele na implantát .....	16
<b>2 MIKROORGANISMY TVOŘÍCÍ BIOFILMY</b> .....	<b>17</b>
2.1 PLÍSNĚ .....	17
2.1.1 Biofilm vláknitých hub (plísni) .....	17
2.1.2 Quorum sensing .....	18
2.1.3 Plísňové biofilmy ve zdravotnictví .....	18
2.2 KVASINKY .....	19
2.2.1 Biofilm kvasinek .....	19
2.2.2 Quorum sensing .....	19
2.2.3 Kvasinkové biofilmy ve zdravotnictví .....	20
2.3 MODEL BIOFILMU BAKTERIÍ, KVASINEK A VLÁKNITÝCH HUB .....	21
2.4 LÉKOVÁ REZISTENCE .....	23
2.4.1 Omezení pronikání léčiv přes matrici biofilmu .....	23
2.4.2 Pomalá rychlost růstu či omezení živin .....	24
2.4.3 Povrchově indukovaná exprese genů rezistence .....	24
2.4.4 Fyziologický stav .....	24
2.4.5 Efluxní pumpa .....	24
<b>3 PLASMA</b> .....	<b>25</b>
3.1 PLASMA VŠEOBECNĚ .....	25
3.2 VZNIK .....	25
3.3 TYPY PLASMY .....	26
3.3.1 Využívané plyny .....	28
3.4 TYPY POVRCHOVÝCH PROCESŮ PLASMOVÉ MODIFIKACE .....	28
3.4.1 Čištění povrchu .....	29
3.4.2 Aktivace .....	29
3.4.3 Plasmové síťování/polymerace .....	30
3.4.4 Leptání .....	31
3.4.5 Sterilizace - viz níže plasmová sterilizace .....	31
3.5 VYUŽITÍ PLASMY V MEDICÍNĚ .....	31
3.5.1 Povrchová úprava biomateriálů .....	31
3.5.2 Plasmová sterilizace .....	33
Sterilizace živých materiálů .....	34
Sterilizace neživých materiálů .....	34

<b>4</b>	<b>POLYANILIN .....</b>	<b>35</b>
4.1	POLYMERY .....	35
4.2	VODIVÉ POLYMERY .....	35
4.3	POLYANILIN .....	36
4.3.1	Formy polyanilinu .....	36
4.3.2	Morfologie.....	36
4.3.3	Vlastnosti a aplikace .....	37
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA .....</b>	<b>40</b>
5.1	PŘÍPRAVA POLYANILINU.....	40
5.2	ÚPRAVA POLYANILINU PLASMOU .....	40
5.3	MĚŘENÍ KONTAKTNÍHO ÚHLU METODOU SEDÍCÍ KAPKY .....	40
5.4	STANOVENÍ TVORBY BIOFILMU .....	41
5.4.1	Plísně.....	41
5.4.1.1	Očkování.....	42
5.4.2	Kvasinky .....	43
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>45</b>
6.1	VÝSLEDKY Z MĚŘENÍ KONTAKTNÍHO ÚHLU .....	45
6.2	PORŮSTÁNÍ MATERIÁLŮ MYCÉLIEM PLÍSNÍ.....	46
6.2.1	Porůstání materiálů mycéliem plísní na kompletním agaru .....	46
6.2.1.1	Aspergillus niger.....	47
6.2.1.2	Aspergillus oryzae .....	48
6.2.1.3	Gliocladium virens.....	49
6.2.1.4	Chaetomium globosum .....	50
6.2.1.5	Penicillium funiculosum .....	51
6.2.1.6	Paecilomyces variotii .....	52
6.2.1.7	Trichoderma viridae.....	53
6.2.2	Porůstání materiálů mycéliem plísní na nekompletním agaru .....	54
6.3	TVORBA BIOFILMU KVASINEK .....	56
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>60</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>62</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>69</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>71</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>72</b>
	<b>SEZNAM GRAFŮ .....</b>	<b>73</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>74</b>

## ÚVOD

Mnohé eukaryotické buňky např. jako níže uvedené kvasinky a plísně, vytvářejí mikrobiální biofilm. Tyto biofilmy způsobují problémy ve zdravotnictví i průmyslu. Některé mikroorganismy způsobují závažná onemocnění, jimž se snažíme zabránit např. zamezením adheze na daný povrch. Tento fakt lze doložit tím, že řada mikroorganismů způsobuje v těle infekci. Intenzivní zkoumání biofilmů, je také nutné z důvodu zvýšeného využívání umělých náhrad a možných infekcí spojených s jejich povrchy.

Díky tomu, že mikroorganismy tvoří biofilm, tak oproti své planktonní formě získávají určité výhody. Jsou více odolné proti nepříznivým podmínkám (např. UV záření, toxickým látkám i antibiotikům) a zvyšují tak schopnost přežití, což vede k problémům při jejich odstranění. Nejlepší řešení těchto problémů je zamezení tvorby biofilmu přímo u prvotního kroku, tedy adhezi mikrobiálních buněk na povrch.

Polyanilin, přesněji emeraldin a jeho modifikovaná forma, byly použity jako testovací povrch. Polyanilin je nízkonákladový a snadno vyrobitelný materiál, jenž by mohl mít široké uplatnění i v medicíně. Právě informace o schopnosti adheze mikroorganismů a následná tvorba biofilmu je důležitým předpokladem aplikace polyanilinu v medicíně a je předmětem této práce. Konkrétně bylo stanoveno, zda podporuje či zamezuje růst biofilmu a zda jeho úpravou v plasmě, kde změníme jeho povrchové vlastnosti, získáme odlišné výsledky. Pokud by se dokázala snížit adheze již na začátku, snížila by se tak schopnost tvorby biofilmu a následné negativní vlivy.

Cílem této práce je zjistit zda adherují kvasinky a plísně na polyanilin. A zda lze pomocí plasmové úpravy povrchu polyanilinu ovlivnit adhezi těchto mikroorganismů.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 BIOFILM

### 1.1 Všeobecná charakteristika

Definicí biofilmu je mnoho, liší se dle vědního oboru. Např. biologové jej definují jako „...aktivní biologická vrstva složená z mikroorganismů (bakterií, řas, hub, prvoků, mnohobuněčných) a jejich extracelulárních polymerních produktů, která je přichycena na povrchu nejrůznějších podkladů, které jsou v kontaktu s vodou...“ [[1], s. 13], jelikož se definice stále vyvíjí, existují novější definice, které už pojednávají i o fyziologických vlastnostech a schopnosti transkripce genů. Např. „...přisedlé společenstvo mikroorganismů, charakterizované tím, že buňky, které jsou ireverzibilně přichycené k podkladu nebo jedna k druhé, jsou zapuštěné v matrici extracelulárních polymerních látek těmito buňkami produkovaných, které dále vykazují odlišný fenotyp s ohledem na rychlost růstu a transkripci genů...“ [[1], s. 13] Přisedat na povrch a vytvářet biofilm je pro mnohé buňky, jak bakterie, plísně, kvasinky a jiné, výhodné z mnoha důvodů. Biofilm se může vyskytnout na mnoha typech povrchů [1], v dalším textu se však budeme zabývat především adhezí na polymerní povrchy. V současnosti je biofilm intenzivně zkoumán také v oblasti medicíny, kde může biofilm vyvolat závažné infekce [2]. Tento fakt je možno doložit tím, že 65 – 80 % mikroorganismů vyskytujících se v lidském těle ve formě biofilmů jsou zdrojem infekcí [3].

### 1.2 Příčiny vzniku biofilmu

Růst v biofilmu je pro mikroorganismy výhodné. Poskytuje buňkám ochranu, udržuje homeostázy, vrstva biofilmu kryje buňky od okolí [1], představuje bariéru [2]. Při tvorbě biofilmu se struktura jednotlivých buněk významně nemění, jednotlivci se uspořádají do společné struktury a projeví nové vlastnosti a fenotyp. Výrazná změna fenotypu vůči planktonní formě je zvýšená odolnost k biologickému, chemickému a fyzikálnímu namáhání [4]. Ve formě biofilmu jsou mikroorganismy odolnější např. vůči mechanickému poškození, toxickým látkám, bakteriofágům a UV záření. Lépe odolávají také působení imunitního systému či antibiotikům a obecně jsou odolnější vůči antimikrobiálním látkám. Ve formě biofilmu mají mikroorganismy vyšší metabolickou aktivitu, než planktonně žijící [2].

### 1.3 Vznik biofilmu

Vznik, vývoj a stabilizace biofilmu probíhá v několika krocích:

- 1) Nejprve dochází k transportu a adsorpci organických molekul na pevný povrch [2].
- 2) Poté k transportu a adhezi mikrobiálních buněk k pevnému povrchu, tento biofilm je tzv. primární [2]. Adheze probíhá různými typy interakcí vedoucích ke vzniku primárního a sekundárního biofilm. Upoutání (organických molekul či buněk) způsobuje snížení mezifázové energie, vzniká primární adheze, která je dána vratnými nespecifickými silami fyzikálními a chemickými. Mezi tyto síly patří van der Waalsovy síly, hydrofobní či elektrostatické interakce a vodíkové vazby [5].
- 3) Další buňky se na tento povrch primárního biofilmu mohou přichytnout a tak vzniká biofilm zvaný sekundární [2]. Sekundární adheze, je stav kdy dojde k nevrátelné adhezi, pomocí specifických vazebných interakcí např. adhesinů [5]. Po podařené adhezi k povrchu biomateriálu se aktivují geny, které produkují polysacharidy a polymery podstatné pro tvorbu biofilmu [2].
- 4) Nastává fáze růstu a vývoje biofilmu, mikroorganismy se množí. Začínají tvořit biopolymery a polysacharidy, které jsou důležité pro tvorbu biofilmu. Vytváří se také molekuly umožňující intercelulární vazby. Důležitá je také skutečnost, že některé buňky se mohou odtrhávat a vytvářet tak biofilm na jiném vhodném povrchu [1].

Tvorba biofilmu může nastat na rozhraní dvou fází pevné a plynné (např. plicní infekce), pevné a kapalně (např. kloubní implantáty), dokonce na rozhraní kapalně a plynné (např. hladina stojatých vod) [2]. Z termodynamického hlediska je adheze vznik nového rozhraní mezi povrchem substrátu a uchycující se buňkou o jednotkové ploše. Lze tedy různými metodami předpovědět, zda bude buňka interagovat s povrchem či ne. Současné metody ale neumožňují zcela vystihnout úspěch či neúspěch adheze [5].

### 1.4 Růst

Během růstu primárního biofilmu nastává prodleva, nejspíše způsobena adaptací na přisedlý povrch či fenotypovými změnami přisedlých buněk. Růstová rychlost je poměrně vysoká, ovšem postupem času se snižuje, až do doby ustálení tloušťky biofilmu. Snížení rychlosti růstu je způsobeno tím, že se do spodních vrstev nedostane substrát, a také se ve stárnoucím biofilmu zvyšuje počet odumírajících buněk. Pro růst je důležitá mezibuněčná signalizace. Při zrání (maturace) biofilmu se tvoří extracelulární polymerní matrice (EPM), jež je základní stavební složkou biofilmu a zpevňuje tak povrch. EPM se liší dle

složení a druhu přisedlých buněk, dále jeho složení ovlivňuje dané prostředí, ve kterém se biofilm nachází. Biofilm je tedy tvořen EPM a buňky. Složení EPM je z 97 % voda, organické a anorganické látky, nejvýznamnější jsou (exo)polysacharidy, které tvoří kostru celého biofilmu. Biofilm také slouží k zachytávání živin z okolí a jejich ukládání, s následným využíváním živin pro růst i v nevhodných podmínkách [2].

### 1.5 Regulace tvorby biofilmu

V biofilmu dochází ke konkurenci mezi buňkami, a tak se některé mohou odloučit a přecházet tak do suspendovaného stavu. Buňky produkují signální molekuly, které informují okolní buňky o jejich přítomnosti, a tím se stoupající hustotou populace, stoupá i koncentrace signálních molekul. Tento způsob komunikace mezi mikroorganismy se nazývá Quorum sensing (QS) a má významný vliv na tvorbu a růst biofilmu [2].

Tvorba a růst biofilmu je také ovlivněna povrchem materiálu, na který má přilnout a okolními podmínkami [6]. Povrch ovlivňuje adhezi např. svou morfologií - makro/mikro porozita, nano/mikro drsnost, fyzikálně chemickými vlastnostmi - povrchová energie, hydrofilnost / hydrofobnost, polárnost a náboje funkčních skupin. Podmínky prostředí, které ovlivňují adhezi a následný růst jsou např. elektrolyty, teplota, pH, hostitelské proteiny či adhesiny, rychlost proudící kapaliny, zdroj živin a kyslíku, a také zaleží na druhu mikroorganismu a jeho vlastnostech [7].

### 1.6 Význam biofilmu v medicíně

Mikroorganismy ve formě biofilmu mohou být příčinou řady chronických infekcí [1] např. mykózy, endokarditidy, endoftalmitidy, mykotické hepatitidy a různých kožních infekcí [8]. Kvůli odolnosti vůči některým antibiotikům a samotnému imunitnímu systému je navíc problém s léčbou těchto infekcí. V současné době jsou biofilmy intenzivně zkoumány také z důvodu zvýšeného využívání umělých náhrad a možných infekcí spojených s jejich povrchy [1].

Biofilm je však také důležitý pro lidský organismus, zejména střevní mikroflóra [1], kožní, poševní a jiné [8].

### 1.6.1 Reakce hostitele na implantát

Při vložení implantátu do těla jako první probíhá „závod o povrch“. Závod probíhá mezi buňkami hostitele a mikroorganismu, které se do těla dostaly při operaci. K infekci dochází v případě, že závod o povrch vyhraje mikroorganismus. Pokud nastává hydromechanický „klid“ lépe se uchytí mikrob, pokud ovšem dochází k „neklidu“, nastává větší šance pro buňky hostitele, neboť díky průtoku kapaliny jsou dodávány potřebné živiny a odplavovány mikroby a jejich endotoxiny. Podmínky, jež ovlivňují tento závod, většinou naštěstí přispívají k vítězství buněk hostitele. Výhodou také je, že si jedinec umí vytvořit protilátky proti antigenním strukturám biofilmu [1].



## 2 MIKROORGANISMY TVOŘÍCÍ BIOFILMY

### 2.1 Plísně

Jedná se mikroskopické vláknité eukaryotní mikroorganismy patřící do říše hub (Fungi). Vláknina neboli hyfy tvořící stélku plísní, mohou být jednobuněčná či vícebuněčná. Splet' hyf se nazývá mycelium. Rozmnožování plísní zajišťuje rozrůstání hyf či spory. Viditelně nápadité zbarvení způsobují barviva (zelená, modrozelená, hnědá, černá) [9].

#### 2.1.1 Biofilm vláknitých hub (plísní)

Plísně jsou velmi dobře přizpůsobeny pro růst na površích, díky absorpčnímu režimu výživy, jejich sekreci extracelulárních enzymů na trávení složitých molekul a apikálnímu růstu hyf. Vláknité houby přímo nezapadají do definic biofilmů, které spíše vycházejí z biofilmů kvasinek a bakterií. Plísně se od nich liší svými morfologickými vlastnostmi (produkce invazivních hyf a/nebo struktur, které přesahují rozhraní vzduchu; sporulace; často také pronikají do podkladů, na kterých rostou), kvůli pronikání do podkladů se vylučuje termín biofilm, neboť „film“ nepředstavuje invazivní růst, ale je zřejmé, že pro mnoho výzkumníků neznamena pojem „film“ pouhý biologický povlak. Některé definice biofilmu jsou také omezené na růst ve vodném prostředí, ale právě u plísní se předpokládá za běžné prostředí, v němž se vyskytují, prostředí s vysokou vlhkostí s hlavním vzduchovým rozhraním (tj. nenasycené prostředí). Většina vláknitých hub navíc neexistuje jako jednotlivé buňky [4].

Jelikož plísně nezapadají přímo do definic biofilmů, existují následující kritéria pro biofilm plísní:

a.) Strukturní znaky:

- Růst v komplexní organizaci, na rozdíl od izolovaně či pouze slabě asociovaných buněk v rámci jednovrstevné populace;
- Růst závislý na kontaktu s povrchem;
- Zakotvení buněk v rámci extracelulární polymerní matrix, která je jimi samotnými tvořena a sekretována [4].

b.) Pozměněná exprese genů vedoucí ke změnám ve fenotypu. Tyto změny zahrnují mj.:

- Zvýšenou toleranci k biocidním látkám;
- Změnu v produkci a sekreci enzymů a metabolitů;
- Změny ve fyziologických funkcích buňky [4].

Příklady vláknitých hub tvořící biofilmy, které splňují alespoň částečně výše uvedená kritéria: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* a *Trichoderma* [4].

### 2.1.2 Quorum sensing

Jak už bylo výše zmíněno, u některých mikroorganismů se vyskytuje regulační proces na úrovni populace tzv. quorum sensing. Dokážou tak detekovat hustotu populace, díky extracelulárním, difúzním, autoinduktivním sloučeninám, a je zřejmě nezbytný pro přežití. Dokonce i *Candida albicans* má tuto funkci. Ovšem i u některých dalších hub se vyskytuje určité množství difuzního extracelulárního signálu, který upravuje morfologii, zabraňuje klíčení spor v hustých populacích, inhibuje růst mycelia, řídí přechod z planktonní formy do přisedlé. Tyto příklady dokazují, že vláknité houby jsou schopné komunikace na úrovni populace díky difuzním extracelulárním signálům, aby tak upravovaly změny v genové expresi, morfologii a vývoji [4].

### 2.1.3 Plísňové biofilmy ve zdravotnictví

#### Rod *Aspergillus*

V dnešní době je objeveno několik set druhů těchto plísní, pro člověka je nebezpečných okolo dvaceti z nich. Způsobují různé infekce např. endokarditidu (zánět vnitřní výstelky srdce), plicní aspergilózu a jiné. Jejich produkty tzv. mykotoxiny poškozují hlavně játra a ledviny. Druhy - *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* [8].

#### Rod *Paecilomyces*

Nejčastěji je tento rod zastupován *Paecilomyces varioti*, jenž způsobuje endokarditidu, kožní infekce a jiné. *Paecilomyces lilacinus* zapříčiňuje infekci oka [8].

### **Rod *Penicillium***

Vytváří také mykotoxiny, ale ještě do nedávna byl tento rod považován za nepatogenní pro člověka. Dnes už víme, že způsobuje infekci plic, jater a kůže. Druhy - *Penicillium marneffei*, *Penicillium islandicum*, *Penicillium expansum* [8].

### **Rod *Gliocladium* a *Trichoderma***

Pro člověka je patogenita doposud diskutabilní [8].

## **2.2 Kvasinky**

Jedná se o heterotrofní eukaryotní mikroorganismy, nacházející se v říši hub (Fungi). Svou silnou a pevnou stěnou, se odlišují od ostatních eukaryot. Rozmnožují se pučením nebo dělením [10]. Tvar a velikost buněk závisí na stáří a lze ji ovlivnit i kultivačními podmínkami. Mohou vytvářet elipsoidní jednobuněčné organismy (např. rod *Schizosaccharomyces*) či protáhlé buňky, které jsou spojené v dlouhá vlákna tzv. pseudomycelium (např. rod *Candida*), mohou vzniknout i tzv. blastospory, kdy v místech pseudomycelia vytvoří krátké elipsoidní buňky [9]. Svůj tvar mohou měnit i během vývoje. Uplatňují se v průmyslu (farmaceutickém, potravinářském), vědě, medicíně a technice. Rody kvasinek, které jsou patogenní - *Candida*, *Malassezia*, *Hansenula*, *Rhodotla*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*. Způsobují např. infekce, v nejhorším případě i smrt [10].

### **2.2.1 Biofilm kvasinek**

Nejčastěji se vyskytující kvasinkou, která tvoří biofilm na lékařských implantátech je *Candida albicans* [3]. *Candida* tvoří biofilmy na přírodních površích např. zubech, ale i umělých površích např. implantátech [11] (na protetických srdečních chlopních, permanentních katétrech či kloubních náhradách-kyčle, kolena) [12]. Jelikož ve formě biofilmu jsou odolné vůči antimikrobiálním látkám, léčba někdy spočívá v odstranění infikované části [11]. Napadá také intravaskulární či močové katétry, endotracheální trubice, kardiostimulátory, zubní protézy-akrylové a silikonové hlasové protézy. Do těla se kvasinka dostává buď přímo na povrchu materiálu, z kůže pacienta či z rukou ošetřujícího lékaře [12].

### **2.2.2 Quorum sensing**

Díky mechanismu QS se zabrání zbytečnému přemnožení, a tak nenastane souboj o živiny [13]. Viz QS u plísní.

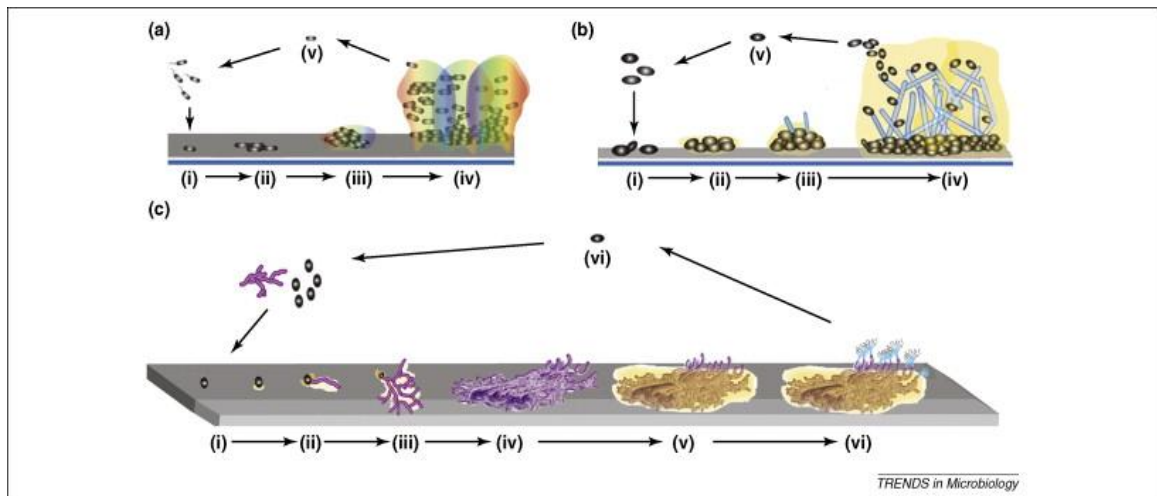
### 2.2.3 Kvasinkové biofilmy ve zdravotnictví

Tabulka 1. Tvorba biofilmu *Candida*, získané z krevního řečiště [14].

<i>Candida</i> species (number of isolates)	No. of isolates (%) with		
	High biofilm	Low biofilm	Negative
<i>C. albicans</i> (243)	11 (4.5)	87 (35.8)	145 (59.7)
Non- <i>albicans Candida</i> (150)	90 (60)	43 (28.7)	17 (11.3)
<i>C. glabrata</i> (81)	56 (69)	21 (26)	4 (5)
<i>C. parapsilosis</i> (33)	15 (45.5)	7 (21.2)	11 (33.3)
<i>C. dubliniensis</i> (14)	–	12 (85.7)	2 (14.3)
<i>C. tropicalis</i> (8)	7 (87)	1 (13)	–
<i>C. lusitaniae</i> (8)	6 (75)	2 (25)	–
<i>C. krusei</i> (5)	5 (100)	–	–
<i>C. pelliculosa</i> (1)	1 (100)	–	–
Total (393)	101 (25.7)	130 (33.1)	162 (41.2)

Ve studii publikované v roce 2012 [14] je popsán výskyt mikroorganismů rodu *Candida* v krevním řečišti, kde způsobovaly infekci. Konkrétně byly zkoumány izoláty z míst infekce a to zda tvoří biofilm. Nalezeno bylo celkem 393 rodů *Candida*, rozdělených na 243 *Candida albicans*, 81 *C. glabrata*, 33 *C. parapsilosis*, 14 *C. dubliniensis*, 8 *C. tropicalis*, 8 *C. lusitaniae*, 5 *C. krusei* a 1 *C. pelliculosa* izolátů. Tvorba biofilmu byla nejčastěji pozorována u *C. tropicalis* a *C. lusitaniae* (100 %), následně *C. glabrata* (95%), *C. dubliniensis* (85,7%) a *C. parapsilosis* (66,7 %). Různé kmeny se liší schopností tvořit biofilm. V tabulce 1. je uvedeno rozdělení izolátů podle toho, zda tvoří velké, malé či žádné množství biofilmu. 231 izolátů z 393 (58,8%) *Candida* species bylo schopno tvořit biofilm, non-*albicans* druhy *Candida* tvořily biofilm z 88,7% (133/150) a z toho velké množství biofilmu tvořilo 89% (90/101). *C. albicans* tvořily biofilm ze 40,3 % (98/243). Z tohoto vyplývá, že větší význam pro infekci má *C. non-albicans* oproti *C. albicans*, která způsobuje infekce jiným mechanismem než je tvorba biofilmu [14].

### 2.3 Model biofilmu bakterií, kvasinek a vláknitých hub



Obrázek 1. Modely vývoje biofilmu (a) bakterie, (b) kvasinky, (c) plísň [4].

Uvedený obrázek popisuje modely vývoje biofilmu u (a) bakterií (b) *Candida albicans* a jejich 5 fází: (i), adsorpce (ii) adheze, (iii) tvorba mikrokolonií, (iv) zraní biofilmu, a (v) rozptýlení. Pro vývoj biofilmu vláknitých hub (c) zahrnuje tyto fáze: (i) adsorpce, (ii) připevnění (iii) mikrokolonie I, (iv) mikrokolonií II (vývoj mycelia, vrstvení a vázání hyf), (v) vývoj zralého biofilmu, a (vi), rozptýlení nebo planktonní fáze [4].

Podrobnější popsání vývoje biofilmu u plísni (c), porovnání biofilmu plísni vůči biofilmu bakterií [4]:

#### a) Propagule adsorpce.

Tato fáze je srovnatelná s reverzibilní připevňovací fází u bakteriálních modelů. Pro vláknité houby tento krok zahrnuje depozici spor nebo jiných forem, jako jsou fragmenty či sporangia. Tento krok v podstatě zahrnuje fyzický kontakt organismu s povrchem [4].

#### b) Aktivní připevnění k povrchu.

Tato fáze je srovnatelná s pevným uchycením bakterií. U vláknitých hub to často zahrnuje sekreci adhezivních látek pro klíčení spor [4].

#### c) Tvorba mikrokolonie I.

Tato fáze je srovnatelná s prvotní fází u tvorby mikrokolonií bakterií. Počáteční fáze růstu a povrchové kolonizace v houbách zahrnují apikální prodloužení a větvení hyf. Tato etapa zahrnuje výrobu polymerní extracelulární matrix, která umožňuje růst kolonie na podkladu [4].

## d) Tvorba mikrokolonie II. neboli počáteční zrání

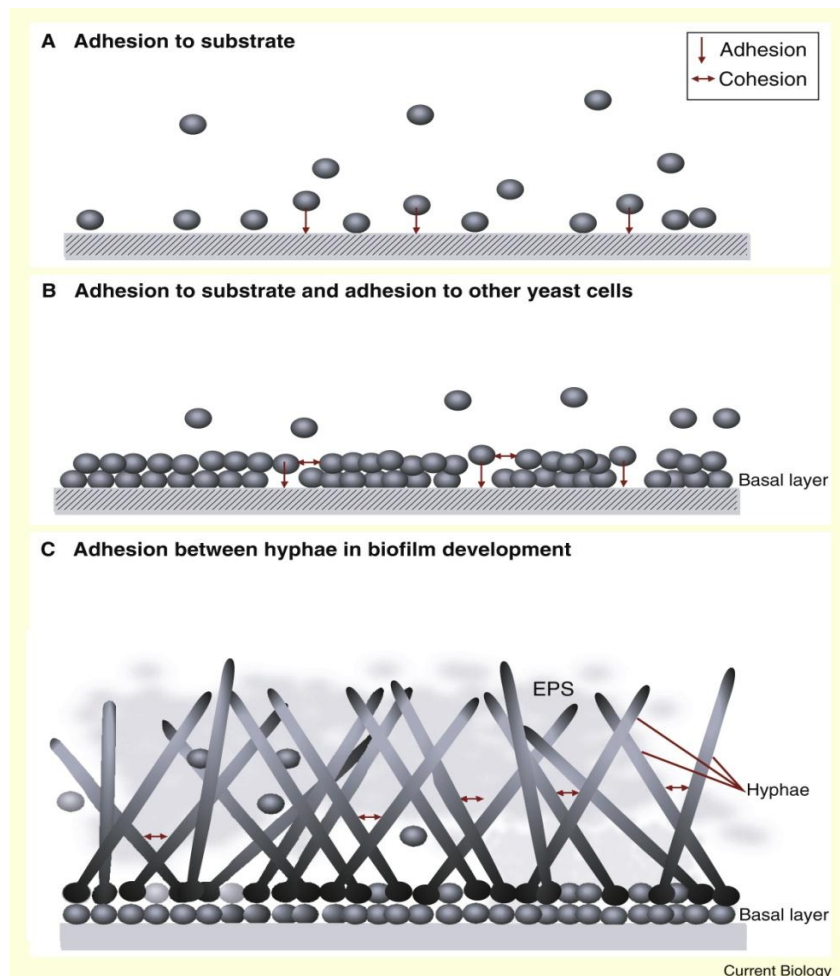
Tato fáze je také srovnatelná s pozdější fází u tvorby mikrokolonií bakterií. Jedná se o vytváření hyfových sítí nebo mycelia a hyfa-hyfa adheze. To zahrnuje vrstvení, tvorbu svazků hyf "přilepené" dohromady EPM a tvorbu vodních kanálků [4].

## e) Zrání nebo reprodukční vývoj.

Tato fáze je srovnatelná se zráním bakteriálního biofilmu. Je charakterizována tvorbou plodnic, sporogenní buňky a dalších struktur [4].

## f) Rozptýlení nebo planktonní fáze.

Také srovnatelná s fází u bakteriálního biofilmu, zahrnuje rozptýlení nebo uvolnění spor, nebo rozptýlení fragmentů biofilmu. Oddělené buňky mohou sloužit jako nové propagule k zahájení nového cyklu [4].



Obrázek 2. Úloha adheze ve vývoji biofilmu *C. albicans* [15]

*Candida albicans* tvořící biofilm byla dosud studována ve větší míře, než biofilmy jiných druhů *Candida* [16]. *C. albicans* tvoří mnohobuněčné biofilmy, které se mohou vyskytovat na různých površích, včetně hostitelských tkání, protézách (např. zubní protézy) a katétrech. Tento proces byl studován na površích *in vitro* a na žilním katetru *in vivo*. Na obrázku 2. v bodu A a bodu B se jedná o počáteční vývoj biofilmu, kde kvasinkové buňky přilnou k povrchu, vytvoří vazbu mezi sebou a vytváří tak bazální vrstvu. V bodu C jsou z bazální vrstvy tvořeny hyfy. Hyfy jsou trubicové výstupky, rozdělené do buněčných jednotek, jejich přilnavost způsobuje stabilizaci biofilmu. Z hyf se tak mohou tvořit další kvasinkové buňky [15]. Zralý biofilm vytváří směs morfologických forem, které se skládají z husté sítě kvasinek, pseudohyf a hyf v EPM [16]. Biofilm umožňuje buňkám podmanit si okolí. Pochopení mechanismu tvorby a vývoje biofilmu slouží k vývoji léčebných prostředků [15]. Tvorba a struktura biofilmů u kvasinek rodu *Candida* je ovlivněna povahou kontaktní plochy, faktory životního prostředí a morfogenezí [16].

## 2.4 Léková rezistence

Jak už bylo zmíněno výše, mikroorganismy ve formě biofilmu jsou více odolné vůči antimikrobiálním látkám. Rozdílnost odolnosti ve formě biofilmu a planktonní formě lze ukázat na následujícím příkladu. Pro snížení metabolické aktivity *C. albicans* ve formě biofilmu o 50 % je třeba pětkrát až osmkrát větší koncentrace léčiva než v planktonní formě [12]. Odolnost mikroorganismů se zvyšuje v závislosti na různých fázích tvorby biofilmu [17]. Důsledkem rezistence mikroorganismů ve formě biofilmu může být například až nutnost vyjmutí implantátu. Kvůli tomu jsou nejen vysoké náklady na léčbu, ale i zátěž pro pacienta a další komplikace [1].

Rezistence biofilmu se uskutečňuje mnoha mechanismy, které se od sebe liší v závislosti na druhu mikroorganismu v biofilmu, na použité antimikrobiální látce a na průběhu různých fází vývoje. Zde jsou uvedeny možné hypotézy mechanismu rezistence, které mohou působit jednotlivě či společně [1].

### 2.4.1 Omezení pronikání léčiv přes matici biofilmu

Pro zjištění, zda odolnost proti antimykotikům souvisí s EPM, byl například zkoumán účinek antimykotik na biofilmy, které rostly ve stálém prostředí oproti biofilmu, který rostl za mírného třepání. V důsledku třepání došlo ke zvýšení produkce EPM. Ale výsledné rozdíly nebyly velké, takže se usoudilo, že EPM může jen málo ovlivnit lékovou

rezistenci [12]. Později pak byla tato hypotéza zcela vyvrácena, na testu s *C. albicans*, kdy byla odolná ještě dříve, než se začala vytvářet EPM [11].

#### 2.4.2 Pomalá rychlost růstu či omezení živin

Pokud snížíme rychlost růstu biofilmu tím, že omezíme dostupnost živin, změní se složení povrchu buněk, které by mohly mít různou citlivost k antimykotikům. Pokus se prováděl s *C. albicans* ve formě planktonní a v biofilmu. Výsledky ukázaly, že biofilm je odolný stejně ve všech rychlostech růstu, ale planktonní forma byla více odolná při pomalém růstu. Rezistence tedy závisí na jiné funkci v režimu růstu [12].

Citlivost biofilmu i planktonní formy se zvyšuje se zvyšující se rychlostí růstu. V některých případech byla forma planktonní a biofilm v malých rychlostech růstu stejně rezistentní, ale při zvyšování rychlosti byla planktonní forma výrazně citlivější. Z toho vyplývá, že zpomalení růstu je jedním z mechanismů, které působí na rezistenci [1].

#### 2.4.3 Povrchově indukovaná exprese genů rezistence

Po připojení buněk k povrchu a vytvoření biofilmu se změní fenotyp. Začalo se tak s výzkumem genů, které se aktivují či potlačují oproti buňkám v planktonní formě. Výsledky nebyly jednoznačné [12].

#### 2.4.4 Fyziologický stav

Jak už bylo zmíněno, metabolická aktivita se zvyšuje s fází vývoje, tím i tedy odolnost [17]. Toto tvrzení potvrdil i fakt, že odstranění infikovaného ložiska z implantátu je úspěšnější pokud mikroorganismus neměl čas se vyvíjet [1].

#### 2.4.5 Efluxní pumpa

Neboli aktivní vylučování toxických látek [1]. Doposud málo prozkoumáno, ale je domněnka, že přispívá k lékové rezistenci [17].

Všechny výsledky tedy naznačují, že léková rezistence je velmi složitý proces, který nelze vysvětlit jediným molekulárním mechanismem [12]. Některé vícedruhové biofilmy tzv. smíšené mohou navíc jinak reagovat na léčiva než jednodruhové biofilmy, např. zpomalovat pronikání léčiv jako je to u *C. albicans* spolu se *Staphylococcus epidermis* [11].



## 3 PLASMA

### 3.1 Plasma všeobecně

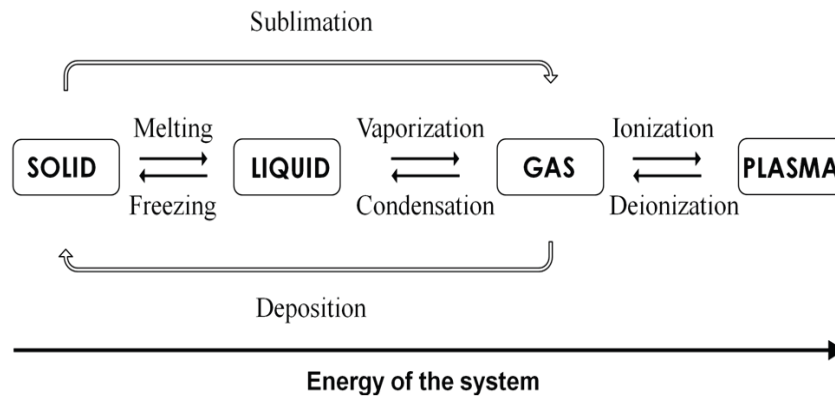
Plasma je nejvíce zastoupené skupenství ve vesmíru, tvoří čtvrté skupenství hmoty. Je např. součástí blesku. V dnešní době vzrůstá zájem o plasmovou technologii a to díky možnosti změnit vybrané vlastnosti bez ovlivnění jiných, ať už se jedná o fyzikální nebo chemické vlastnosti. V lékařství je možné plasmu využít pro desinfekci či při úpravě povrchů polymerních implantátů pro omezení tvorby biofilmu. Využití plasmy může být výhodné také z důvodů ekonomických, nebo krátké doby procesu úpravy. Plasma tak může přispět k vývoji nových biomateriálů [18]. Plasmatickou úpravou lze na povrch materiálu navázat různé chemické funkční skupiny, změnit drsnost nebo smáčivost a tím i povrchovou energii [19].

Výhody při ošetření plasmou jsou, že ovlivňuje pouze povrch materiálu, ale ne jeho celkové vlastnosti [20], např. při čištění nezanechává žádné zbytky, jak tomu může být u mokrého čištění, dokáže zcela vyčistit povrch tzv. atomically clean a nezáleží na geometrii povrchu. Reaguje s celou řadou různých materiálů, může ošetřit i komponenty z nich sestavené. Jednoduché použití a udržování, není tak potřeba různých chemických látek např. rozpouštědel. Je relativně levná a šetrná k životnímu prostředí. [21]

Hlavní nevýhodou úpravy plasmou je její trvanlivost. Funkční skupiny vytvořené plasmovým ošetřením nejsou stabilní v čase, jelikož povrch má tendenci se vracet do svého původního stavu. Může tak docházet ke ztrátě požadovaného hydrofilního/hydrofobního charakteru povrchu. Rychlost změny závisí na různých parametrech, např. stárnutí média, vlhkosti, teplotě atd. Hydrofilní prostředí udržuje hydrofilii upraveného povrchu, a pokud je prostředí hydrofobní, dochází k uvolňování polárních skupin z povrchu [22].

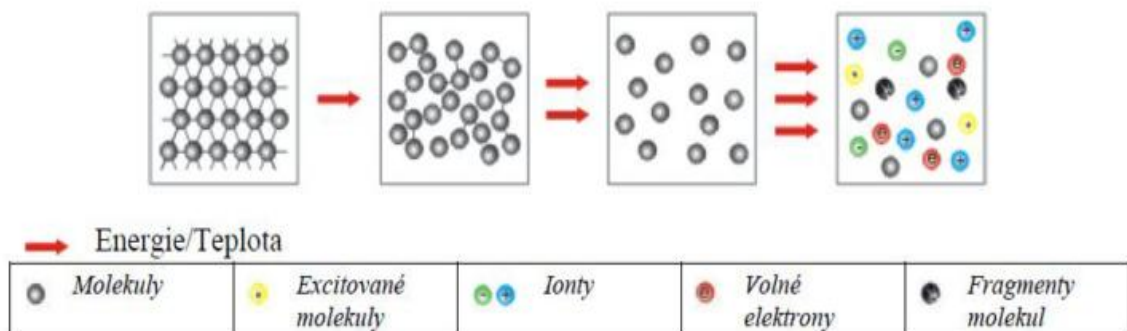
### 3.2 Vznik

Nejdříve při dostatečném dodávání tepla přechází pevný materiál z pevného stavu do roz-toku tzv. tání a se zvyšujícím teplem do stavu plynu tzv. var-vypařování, viz obrázek 3. [18].



Obrázek 3. Různé stavy hmoty [18]

Dalším dodáváním se energie zvyšuje a tak elektrony získají dostatečnou energii k oddělení z obalu atomů či molekul. Plyn se tak stává částečně nebo zcela ionizovaný tzv. plasma. Plasma obsahuje kladně a záporně nabité ionty ale také atomy a molekuly [18], obrázek 4.



Obrázek 4. Fáze vzniku plasmy [23]

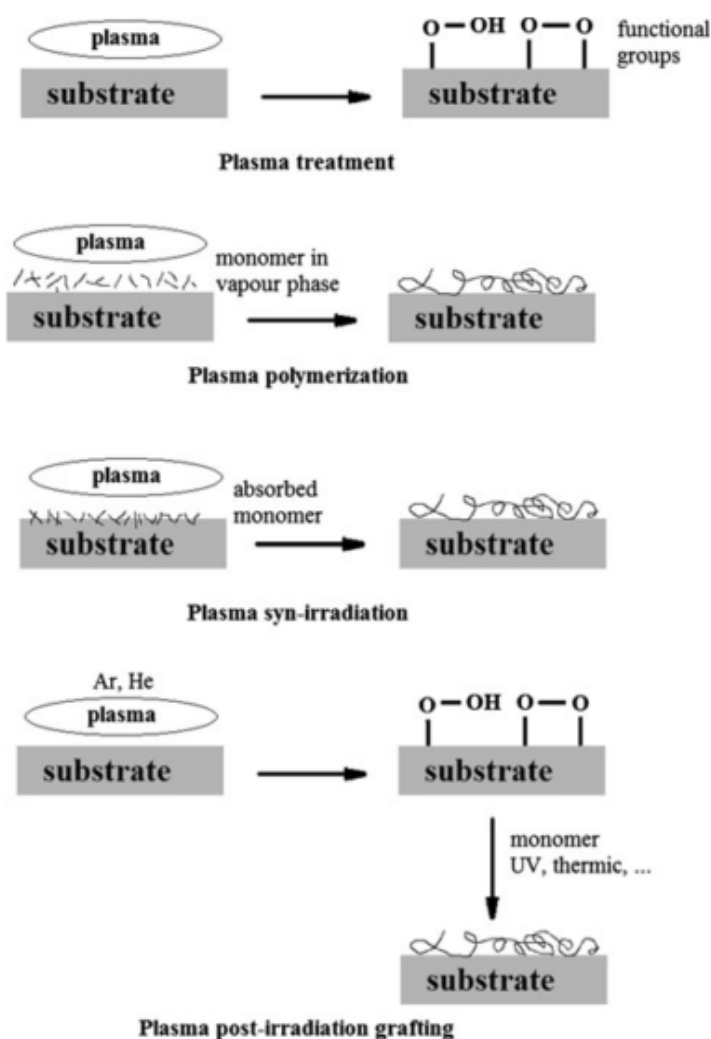
### 3.3 Typy plasmy

V závislosti na typu a množství dodané energie do plasmy se vlastnosti plasmy mění podle elektronové hustoty a teploty. Existují dvě hlavní skupiny. První je horké plasma, nazývané také téměř rovnovážné plasma [18]. Má teplotu okolo 9700°C [23]. Skládá se z vysokoteplotních částic, nacházející se v maximálním stupni ionizace, všechny částice mají srovnatelnou teplotu. Toto plasma nelze použít pro povrchovou úpravu polymerů, mohlo by totiž způsobit tepelné poškození [18].

Druhé je studené plasma, nazývané také nerovnovážné plasma [18], jeho teplota se pohybuje okolo 27-230°C [23]. Skládá se z nízkoteplotních částic a vysokoteplotních elektronů, nacházejících se v nízkém stupni ionizace. Toto plasma nezpůsobuje žádné tepelné poškození na teplotlivých materiálech, ale může způsobit chemické a fyzikální změny na povrchu [19]. Studené plasma je dále děleno na nízký tlak a atmosférický tlak

studeného plasma. Obě tyto plasma jsou základem jedné z nejvíce slibných metod vedoucí k dosažení pružnějšího, levnějšího, spolehlivějšího a kontinuálního způsobu povrchové úpravy. Plasma se nejčastěji vyrábí průchodem elektrického proudu přes plyn. Elektrická energie se obvykle dodává do systému kontinuálním způsobem, aby se zabránilo přerušení plasmového výboje. Plasmové zdroje při atmosférických tlacích jsou - radiofrekvenční výboj, korónový výboj, doutnavý výboj, dielektrický bariérový výboj, obloukový výboj, mikrovlnná plasma a jiné [18].

Při plasmových úpravách povrchu, lze použít různé techniky, jelikož obsahuje různé účinné složky, a proto bude docházet k různým interakcím mezi plasmou a povrchem. Proto musí být plasmatické parametry navrženy speciálně pro danou aplikaci [18]. Na obrázku níže jsou různé plasmové techniky, kterými lze např. ovlivnit interakci buněk s materiálem. Mnohé aplikace vyžadují prevenci proti adhezi jakéhokoliv druhu a jindy může být adheze požadována [19].



Obrázek 5. Schéma znázorňující různé plasmové modifikace [19]

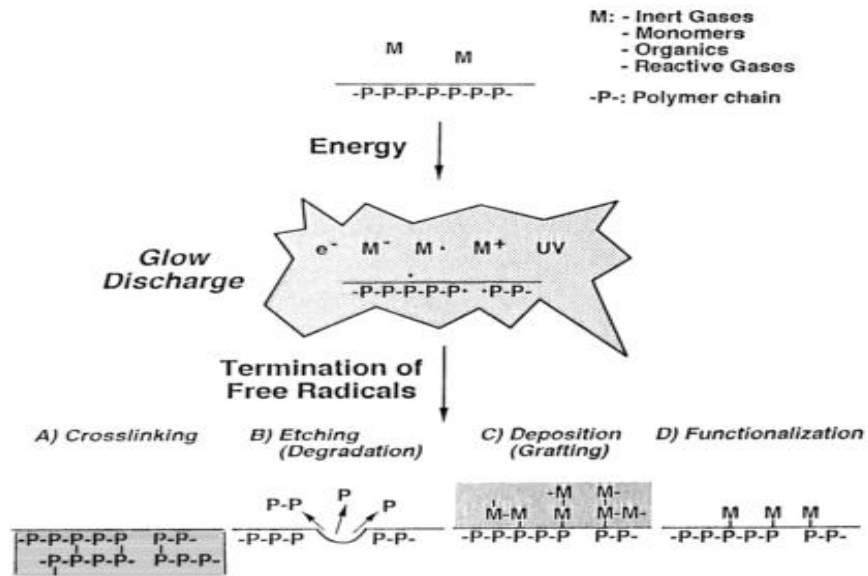
### 3.3.1 Využívané plyny

Při využívání inertních plynů jako jsou např. He, Ar, Ne je plasma kvalitní a homogenní, využívá se např. na rozprašování. Štěpí nebo navazuje vodík, vylepšuje adhezi buněk [23]. Zmíněný argon čistí, aktivuje a sterilizuje, ale využívá se i pro síťování povrchu [21]. Kyslíkaté plyny se využívají nejvíce, lze využít CO, CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> či H<sub>2</sub>O plasmu. Fyzikálně narušují povrch a vytváří karbonylové, karboxylové, hydroxylové či jiné skupiny [23]. Např. vzduch aktivuje povrch (upraví tak přilnavost a smáčivost), odstraňuje také chemické znečištění. Kyslíkové plasma také odstraňuje chemické znečištění, aktivuje a sterilizuje povrch. Kyslíkové a vzduchové plasma podporuje povrchovou oxidaci a hydroxylaci, zvyšuje tak smáčivost [21]. U dusíkatých a fluoridových plynů se nejčastěji využívá N<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, F<sub>2</sub> nebo HF plasma, které zvyšuje hydrofobitu, upravuje tím smáčivost, tiskuschopnost a biokompatibilitu. Díky uhlovodíkovým plynům např. metanu, etanu, etylénu, acetylénu a benzenu získají povrchy antireflexnost, mikrotvrdost a nepropustnost pro páry. Vytváří hydrogenované uhlíkaté filmy. Organosilikátové plyny např. silany, disilany, disiloxany, disilanazaty a disilthiany se využívají v první řadě pro plasmovou polymeraci [23].

### 3.4 Typy povrchových procesů plasmové modifikace

Při úpravě povrchových vlastností se nejvíce využívá korónový či doutnavý výboj. Úprava sahá jen do několika vrchních monomolekulárních vrstev materiálu, řádově od několika stovek nm do 10 μm [24]. Úpravou lze změnit povrchovou energii, navlhavost, potiskovatelnost, barvitelnost, omyvatelnost, přilnavost, kohezní vlastnosti, sterilitu resp. čistotu [23], drsnost/hladkost, úhel smáčivosti, hydrofobitu/hydrofilitu, funkční skupiny [19]. Podstatou této úpravy je změna chemické struktury, změna fyzikálních vlastností na povrchu [24], přidání či odebrání povrchové vrstvy nebo povrchového náboje. Výhodou je, že nepoškozuje či nemění vlastnosti v objemu materiálu, neodstraňuje větší množství materiálu z povrchu, neimplementuje do povrchu ionty či atomy a nepřenáší na povrch více jak několik monovrstev [23].

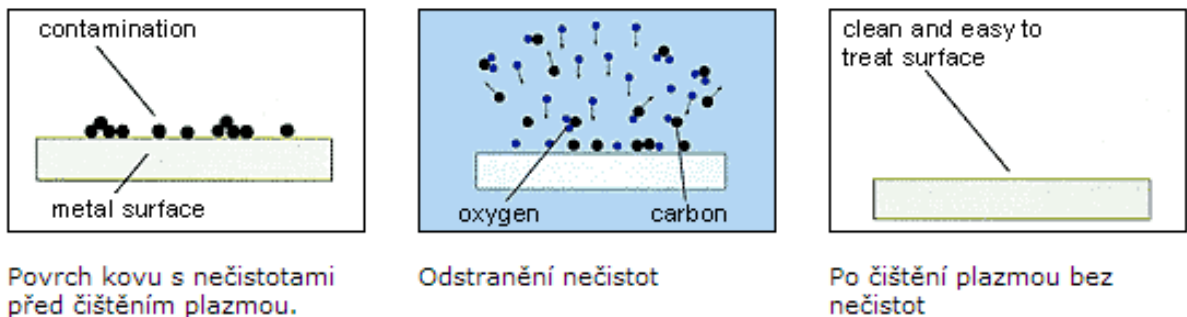
Řada plasmových procesů byla vyvinuta s cílem dosáhnout specifických povrchových vlastností biomateriálů. Povrchy přichází do styku s plasmou a děj, který tam probíhá je zobrazen na obrázku níže [24].



Obrázek 6. Schéma znázorňující různé úpravy plazmou [24]

### 3.4.1 Čištění povrchu

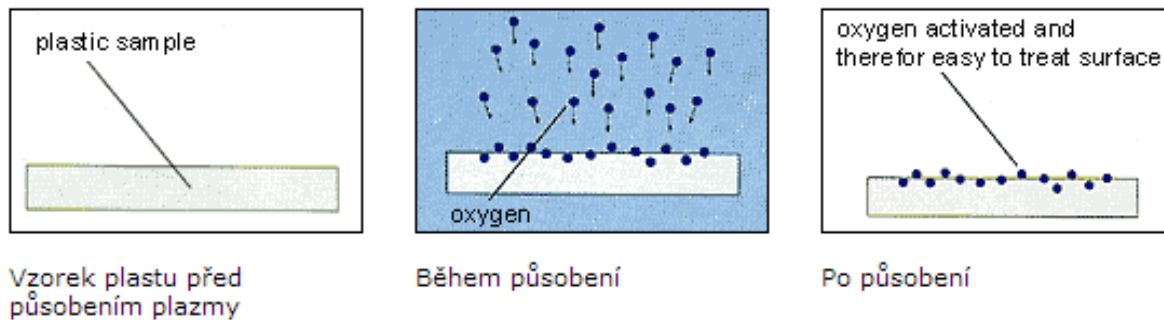
Energetickým odstřelováním povrchu elektrony a ionty se rozbijí slabé vazby. Povrch se čistí fyzicky a chemicky, v závislosti na využitém plynu [25].



Obrázek 7. Náhled průběhu čištění povrchu [25]

### 3.4.2 Aktivace

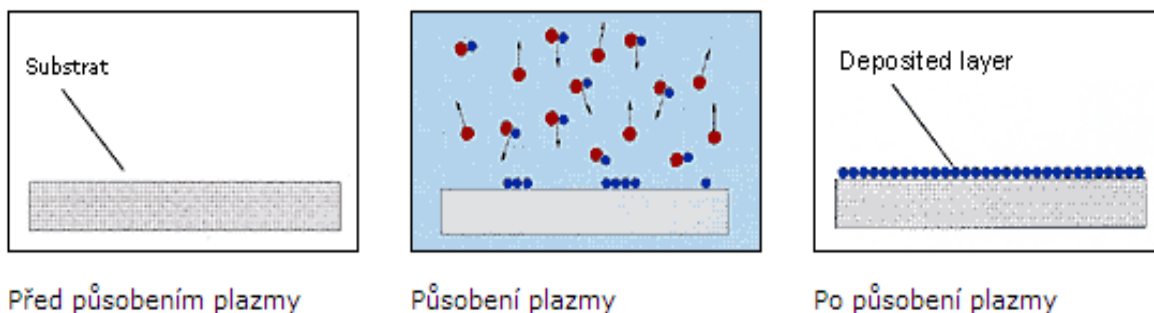
Na povrchu se vytvoří funkční skupiny pomocí plynů, které disociují a reagují s povrchem, u polymerů se jedná o nahrazení původních skupin za chemické skupiny z využití plasmy, která naruší slabé vazby a nahradí je. Tím se mění chemická aktivita a vlastnosti povrchu, zejména smáčivost a přilnavost [21].



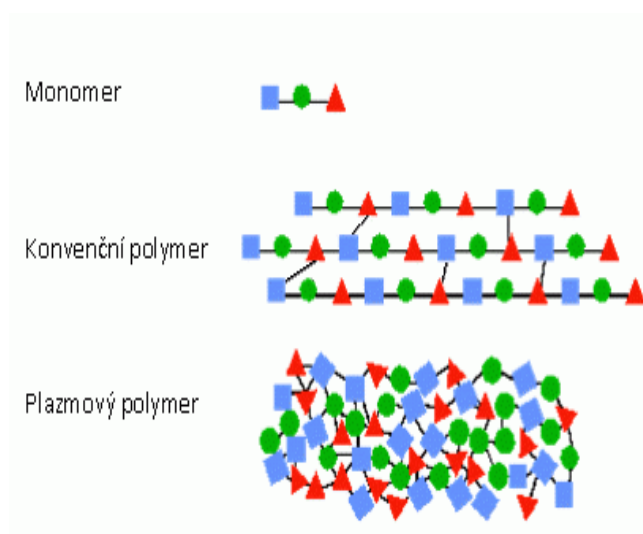
Obrázek 8. Náhled průběhu aktivace povrchu [25]

### 3.4.3 Plasmové síťování/polymerace

Jedná se o vytvoření chemických vazeb kapalného či plynného monomeru, který je do plasmového výboje vložen [19]. Pomocí plazmy lze také pokrýt povrch tenkým polymerním filmem o šířce pouze několika desítek nanometrů [26]. Tyto povlaky mají vyšší stupeň zesíťování a tím i lepší vlastnosti např. jsou více chemicky a tepelně stabilní [19]. Vzniká tedy jiná struktura oproti konvekční polymeraci [26], viz obrázek 10.



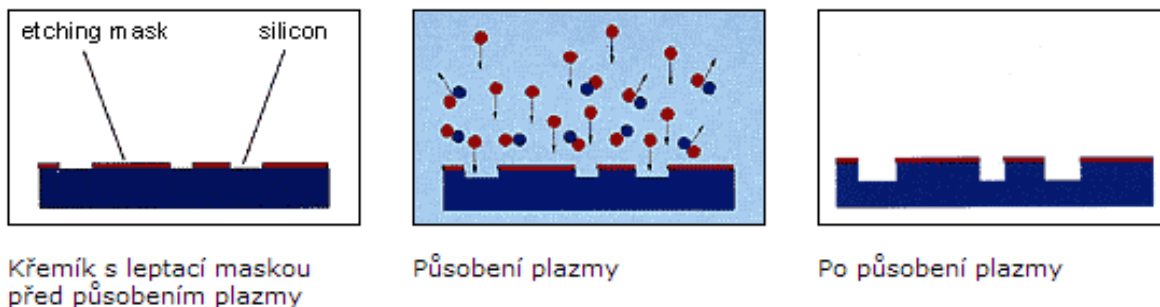
Obrázek 9. Náhled průběhu plasmové polymerace povrchu [25]



Obrázek 10. Srovnání stupně zesíťování [26]

### 3.4.4 Leptání

Materiál je za pomoci plazmy narušen a následně odstraněn, díky tomu se zvětší plocha povrchu [25].



Obrázek 11. Náhled průběhu procesu leptání povrchu [25]

### 3.4.5 Sterilizace - viz níže plasmová sterilizace

## 3.5 Využití plazmy v medicíně

### 3.5.1 Povrchová úprava biomateriálů

V medicíně bylo dlouho využíváno vysoké teploty a tepla např. pro dezinfekci, hojení ran atd. Zároveň, ale působily i na okolní místa a způsobovaly poškození okolních tkání. Využitím nízkoteplotní plazmy se těmto problémům daří vyhnout, neboť studená plazma obsahuje ionty a neutrální druhy, které jsou poměrně chladné, a tak nijak neovlivní okolní místo se kterým je v kontaktu. Lze tak působit na teplo citlivé materiály, dokonce i biologické např. tkáně [18]. Pro předmět práce je však důležitější využití plazmy pro povrchovou úpravu materiálů. Na materiál, který má být zaveden do těla, jsou kladeny vysoké nároky, musí být biokompatibilní a zároveň stabilní s dlouhou životností [19]. Mnohé syntetické biomateriály, jako kovy, slitiny, polymery, keramiky a kompozity tvoří odlišné prostředí než je přirozené prostředí tvořené sousedními buňkami nebo komponenty extracelulární matrix. Proto je důležité vytvářet biomateriály s vhodnými povrchovými vlastnostmi [18]. V dalším textu se zaměříme jen na polymerní materiály. Díky plasmové úpravě lze upravit povrch tak, aby byl biokompatibilní. Dle výběru plasmového zdroje lze zavést různé funkční skupiny na povrch nebo imobilizovat různé bioaktivní molekuly, viz výše procesy plazmy. V lékařství se polymery využívají běžně pro jejich vynikající vlastnosti, jako jsou snadné zpracování, tažnost, rázové tlumení apod. [18]. Biomateriály, které by byly biokompatibilní a měly dobré mechanické vlastnosti, by byly ideální,

ale v dnešní době tyto kritéria splňuje jen málo polymerů. Proto se dnes využívá plasmu, která upraví povrch materiálu [20].

Tabulka 2. Příklady plasmou upravených materiálů a jejich aplikace [18]

Plasmou upravené materiály	Aplikace
Polyethylen	
Polypropylen	Katétry, antimikrobiální nátěry, implantáty
Polyvinylchlorid	
Polyuretany	
Polytetrafluorethylen	Implantáty, cévní štěpy
Polymethylmetakrylat	Kontaktní čočky, umělé rohovky
Polystyren	Implantáty, tkáňové kultury
Polyethylentereftalat	
Polyglykol	Stehy, podávání léků matrix

Tvorba biofilmu na materiálu je důležitá pro následnou přijatelnost organismu a pro jeho biomechanickou odpověď. Tvorba biofilmu není zapotřebí, pokud je materiál umístěn do těla jen přechodně (zubní protézy), pokud musí propustit světlo (nitrooční čočky), biofilm by neměl vzniknout v místě mechanického namáhání (tření u kloubů), jelikož by snížil mechanické vlastnosti a dobu funkčnosti. V závislosti na účelu materiálu, je bioadheze buněk podporována či naopak [27], příklady v tabulce 2.



Tabulka 3. Přehled využívaných materiálů a požadování tvorby biofilmu [27]

Application field	Material	Biofilm on substrate
Cardiology	Poly(ester terephthalate)(PET) Ti alloys	No
Ophthalmology	Poly(tetrafluoroethylene) (PTFE) Polycarbonate (PC) Poly(methyl methacrylate) (PMMA) Poly(2-hydroxyethylmethacrylate (poly(HEMA)))	No
Orthodontics	Metal Acrylic polymer Ceramics	No
Tubings (tubes, catheters)	High density polyethylene (HDPE) Poly(hexamethylenedisiloxane) (silicon) Polyamide (PA) Polyurethanes (polyethers and polyesters) (PU) PTFE	No
Bone reconstitution	Acrylic cement HDPE	Yes No
Orthopedics	Acrylic cement Silicon PU Urea	No
Dialysis	Cellulose (several grades) Poly(acrylonitrile)	No
Plastic reconstitution	Silicones	No
Analysis substrates	Polystyrene (PS) Poly(ester terephthalate)(PET)	Variable
Pancreas	Polycarbonate (PC) PTFE	No
Medical devices	Polyvinylchloride (PVC) PU	No
Tools	Metal Poly(acrylonitrile co butadiene co styrene) (ABS) PTFE	No
Sterilisation	Any type	No

### 3.5.2 Plasmová sterilizace

Sterilizace ohněm byla využívána už od pradávna, dnes se využívá plasma ve formě plynu, který dokáže sterilizovat neživé a i dokonce živé objekty. Protože působí na molekulární, až atomové úrovni dosáhne na všechny povrch, dokonce i vnitřních částí pórů. Je tedy vhodné například i pro jehly a stříkačky. Plasmová sterilizace má několik výhod oproti jiným sterilizačním metodám (teplo, chemické látky, radioaktivní záření, plyn), které způsobují tepelné, chemické či jiné poškození neživých a živých objektů. Výhody plasmové sterilizace jsou, že se jedná o bezpečnou a efektivní metodu, proces sterilizace trvá kratší dobu. Při zpracování se používá jen nízká teplota, a to vše lze uplatnit jak na živé, tak na neživé objekty [18] a neobsahuje toxické látky. Plyny či směsi plynů při plasmové

sterilizaci, které jsou za běžných podmínek nebiocidní, jsou díky působení elektrického výboje aktivovány. Po vypnutí budícího zdroje ihned deaktivovány [28].

Zajímavým využitím plasmu, jež demonstruje její široké možnosti, je využití ve stomatologii. Většina metod používaných ve stomatologii má nevýhody např. může ohřívat a zničit zdravou tkáň, má tak nežádoucí vedlejší účinky. Proto už se některé metody nahrazují plasmou, která je netoxická a nepoškozuje matrix zubu. Toto plasma dokáže zabít i *Streptococcus mutans*, jenž způsobuje zubní kaz nebo *Enterococcus faecalis*, jež je příčinou selhání kořenového kanálku. Doba léčby, oblast působení a zahřívání tkáně se minimalizovala [18].

### **Sterilizace živých materiálů**

Pro sterilizaci živých tkání existuje více druhů plasmových zařízení, např. dielektrický bariérový výboj s pohyblivou elektrodou. Touto metodou lze sterilizovat celou tkáň během několika sekund. Radiofrekvenční výboj plasma za atmosférického tlaku při průtoku helia se používá pro neškodlivou sterilizaci živých tkání. Tato plasma má schopnost zabít různé druhy bakterií: *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*, při zachování živých buněk substrátu, které by byly zahřáty do přijatelného stupně [18].

### **Sterilizace neživých materiálů**

Pro zdravotnické prostředky v nemocnicích je v dnešní době hojně využívána i plasmově sterilizační metoda. Odstranění některých látek z chirurgických nástrojů bývá velký problém, neboť některé metody by mohly způsobit velké škody na zpracovávaných předmětech. Pro každý materiál se používá nejvhodnější plasmová sterilizace, která nijak neponičí povrch a nebude tam např. docházet k degradaci polymerních řetězců a tak produkci nízkomolekulárních těkavých látek. Používá se přednostně směs Ar/O<sub>2</sub> než jiné plyny, neboť rychle odstraňuje bílkoviny a zabíjí bakteriální spory. Tato metoda je ekologická a lepší než jiné směsi, které obsahují fluor, jedná se i o bezpečnou metodu. Existuje i dvojité indukčně vázaná nízkotlaká plasma pro biomedicínské materiály. Zpracování touto metodou trvá krátkou dobu a díky nízké teplotě ji lze využít na teplo citlivé materiály, jako jsou např. vysokomolekulární polyetylen (PE) a polyvinylchlorid (PVC) [18].

## 4 POLYANILIN

### 4.1 Polymery

Jedná se o chemické látky, které mají velmi různorodé vlastnosti a využití, obsahují převážně atomy uhlíku, kyslíku a vodíku, někdy také dusíku, chloru, fluoru, síry a i křemíku [29]. Výhoda polymerů je jejich nízká cena a dostupnost, mají nízkou měrnou hmotnost, jsou snadno zpracovatelné a mají dobré vlastnosti v odolnosti proti korozi a dobré tepelně či elektricky izolační vlastnosti a další. Nevýhody jsou např. malé rozmezí tepelné použitelnosti, nízká tuhost, tvoří se elektrostatický náboj, neekonomická a často nerealizovatelné použitelnost [30].

Polymerní látky jsou složeny z velkých molekul tzv. makromolekul. Makromolekula je tvořena z mnohonásobně opakujících se konstitučních jednotek, což vyjadřuje atomy či skupinu atomů. U polymeru nezmění vlastnosti odebrání či přidání několika konstitučních jednotek. Naproti tomu u oligomeru, který se skládá jen z několika konstitučních jednotek, změním fyzikální vlastnosti. Monomer je tvořen molekulami, jež obsahují jedna či více konstitučních jednotek. Při procesu polymerace je přeměňován monomer či jeho směs na polymer [31]. Syntetické polymery dělíme na elastomery a plasty. Elastomer je velmi elastický polymer, který lze deformovat menší silou bez porušení, případná deformace je z velké části vratná. Do této skupiny patří kaučuky. Plast je tvrdý a mnohdy křehký polymer, který se při vyšší teplotě stává plastickým a tvarovatelným. Jestliže je vratná změna z plastického stavu do tuhého jedná se o termoplasty. Pokud jde o nevratnou změnu, proběhla chemická reakce, jedná se reaktoplasty. Základní typy reakce dělíme na polymeraci - radikálová, iontová, koordinační; polykondenzaci a polyadici. Způsoby výroby polymerací jsou bloková, suspenzní, emulzní a roztoková [29].

### 4.2 Vodivé polymery

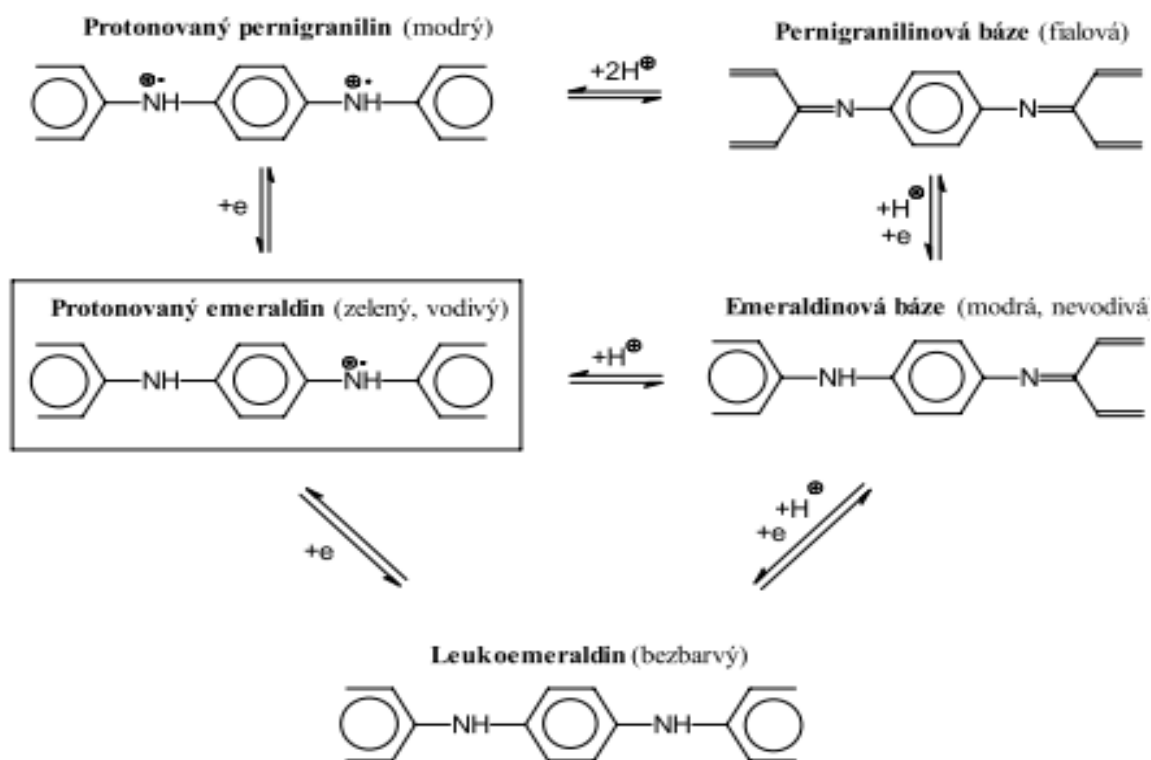
Existují polymery, které vedou elektrický proud např. polypyrrol, polyfenyl, polyacetylen a polyanilin. Jsou totiž tvořeny systémem konjugovaných dvojných vazeb, tedy střídání jednoduchých a dvojných vazeb. Nejen vazby, ale i nositelé náboje se podílejí na elektrické vodivosti. Vodivost těchto polymerů je mnohem nižší než u kovů, avšak je srovnatelná s vodivostí polovodičů z anorganického materiálu. Vodivost těchto polymerů lze měnit vnějším prostředím, proto se jedná o tzv. inteligentní polymery [32].

### 4.3 Polyanilin

Jedná se nejspíše o nejstarší syntetický polymer, který vzniká oxidací anilinu, jenž je produktem destilace indiga. Reakce probíhá v kyselém vodném prostředí, za normálních podmínek bez zahřívání a míchání. Řádově trvá několik minut, poté se produkt získá zfiltrváním. Velkou výhodou je časová stabilita produktu [32].

#### 4.3.1 Formy polyanilinu

Polyanilin (PANI) se vyskytuje ve více formách, nejběžnější forma je emeraldin, který má výrazně zelené zbarvení. Jednotlivé formy jsou uvedeny na níže uvedeném obrázku, liší se stupněm protonace či oxidace, tím se mění jeho chemická struktura, zbarvení, stabilita a elektrické vlastnosti [32].



Obrázek 12. Různé formy polyanilinu, kde emeraldin je základní stabilní forma [32]

#### 4.3.2 Morfologie

PANI může být zastoupena v různých podobách, v závislosti na organizaci nukleárních jader např. zrna, nanovlákná, nanotrubičky. Ostatní vyžadují vhodné rozhraní a zde patří koloidní nanočástice, nanokartáče, tenké vrstvy a povlaky [33]. Vodivým polyanilinovým filmem lze pokrýt jakýkoliv povrch [32]. Pevná látka ponořená do reakční směsi má výslednou strukturu podobnou kartáči, tloušťka těchto vrstev je v rozmezí od 50 do 250 nm.

Morfologii lze upravit různými faktory, např. kyselostí - pH, teplotou, mícháním, osvětlením UV či viskozitou [33].

#### **4.3.3 Vlastnosti a aplikace**

Díky své elektrické vodivosti může být využit jako vodivé pojivo, barva, jako indikátor kvůli barevné změně při různém pH, jako elektrody, kondenzátory pro uchování energie, katalyzátory, paměťové zařízení, membrány pro separaci plynů či rozpuštěných látek, i jako povlaky proti korozi. Lze také sledovat fyziologický stav pacienta díky inteligentní košili, která obsahuje mikroelektronické aplikace [34]. Některé aplikace nezávisí na elektrických vlastnostech PANI, ale na jeho elektrochemickém chování, tedy schopnosti být redukován či oxidován, využívá se toho např. při ochraně kovů proti korozi či v elektrokatalýze. U snímačů se využívá změny vodivosti při změně vnějšího prostředí. PANI je polymer paramagnetický [33].

Tabulka 4. Shrnutí vlastností a využití PANI [34]

Speciální vlastnosti	Související aplikace	Zdroj
Přirozená vodivost	Vodivé pojiva, inkoust, barva, antistatický textil, elektrostaticky výbojové materiály	[35]
Viskozita roztoku zvyšující se v elektrickém poli	Elektro-reologické materiály	[36]
Elektrická vodivost či barevné změny po vystavení kyselým, zásaditým či některým neutrálním parám či kapalinám	Toxický plynový senzor, senzor pH	[37]
Barevné změny při změně pH prostředí způsobené jeho protonací-deprotonací	Indikátor kyselosti-zásaditosti	[38]
Barevné změny v důsledku protonace-deprotonace a oxidačně-redukčních procesech	Membrány pro dělení plynů a separace neutrálních roztoků	[39]
Vysoké kapacitní hodnoty	Kondenzátor, zařízení pro skladování energie	[40]
Reakce na elektromagnetické pole v optickém režimu	Medium pro vymazatelné optické ukládání informací, nelineární optika	[41]
Převádí z vysoce propustného do téměř izolačního	Digitální paměťové zařízení	[42]
Změny deformace pod pulzním proudem	Umělý sval	[43]
Schopnost akumulovat a transformovat energii	Elektroda pro akumulátory, anoda pro mikrobiální palivové články	[44]
V závislosti na oxidačním stavu mění vlastnost elektron-akceptor či elektron-donor	P-N přechody, solární články, dioda	[45]
Změna barvy v závislosti na excitaci	Organické či polymerní světlo emitující diody	[46]

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 MATERIÁL A METODIKA

### 5.1 Příprava polyanilinu

Vzorky polyanilinových filmů (PANI) byly připraveny dle metodiky publikované v práci [47]. Do odměrné baňky bylo naváženo 2,59 g anilin hydrochloridu (AH) a doplněno ultračistou vodou do finální koncentrace 0,2 M. Do druhé odměrné baňky bylo naváženo 5,71 g amonium persulfátu (APS) a doplněno ultračistou vodou do finální koncentrace 0,25 M. Roztoky byly ponechány po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Poté bylo zkontrolováno, zda AH a APS byly dokonale rozpuštěny.

U plísni byla použita polypropylenová fólie (PP - reference), běžně zakoupitelná v papírnictví. Z fólie byly vystříženy čtverečky o velikosti 4x4 cm, část z nich byla využita na pokrytí PANI filmem. A to jejich umístěním do reakční směsi, kde se smíchaly roztoky AH a APS. Reakce probíhala po dobu 10min. při laboratorní teplotě. U kvasinek byly využity mikrotitrační destičky.

### 5.2 Úprava polyanilinu plasmou

Část PANI čtverečků byla umístěna do vysokofrekvenčního plasma reaktoru, kde probíhala reakce, při níž došlo k aktivaci povrchu. Přístroj byl nastaven na 50 W, jako využitý plyn byl použit vzduch s průtokem 10 SCCM (standardní kubický centimetr za minutu) a opracování probíhalo 1 min. jen na straně PANI filmu. Výsledkem byly vzorky polyanilinu upravené pomocí plasmy (PANI-P).

### 5.3 Měření kontaktního úhlu metodou sedící kapky

Metodou měření kontaktního úhlu pomocí sedící kapky byla měřena charakteristika pevného povrchu, na jejímž základě byla vypočítána povrchová energie. Byl měřen úhel mezi kapkou a pevným povrchem. V závislosti na použité kapalině vypovídá naměřený úhel o smáčivosti povrchu. Pomocí kamery a počítače byl snímán úhel kapky s povrchem, počítač provede výpočet povrchové energie a porovná jí i se standardními hodnotami, pro vyloučení chyb. Díky této metodě lze lépe porozumět povrchovým vlastnostem pevného materiálu a např. předpovědět jeho interakci s jinou látkou [48].

Při měření byla použita deionizovaná voda, ethylenglykol a diiodomethan, objem kapaliny byl 2 ml. Deset naměřených hodnot bylo zprůměrováno a uvedeno do tabulky.



## 5.4 Stanovení tvorby biofilmu

### 5.4.1 Plísně

Pro testování tvorby biofilmu, byly použity následující plísně získané z České sbírky mikroorganismů v Brně:

- *Aspergillus niger* CCM 8155
- *Aspergillus oryzae* F41
- *Gliocladium virens* CCM 8042
- *Chaetomium globosum* CCM 8156
- *Penicillium funiculosum* CCM 8080
- *Paecilomyces variotii* CCM F-398
- *Trichoderma viridae* F 486

Jako kultivační médium byl použit Malt Extract Broth Base (MEBB) - značka Himedia, ref M255-500G, na kterém rostou všechny uvedené plísně. Příprava tohoto média spočívala v navážení 20,0 g přípravku do 1000 ml destilované vody. Po dobu 15 minut probíhalo bobtnání. Do tohoto média byl přidán Purified agar code L28 OXOID 20 gramů, pro ztužení média.

Následně byla provedena sterilizace v autoklávu při 115 °C po dobu 10 min. Ihned probíhalo chlazení na 45-50 °C a před přelíváním do Petriho misek se kultivační médium dobře promíchalo. V uvedené tabulce je přesné složení agarů.

Tabulka 5. Složení MEBB

Složení	Gramů/litr
Sladový extract	17
Mykologický pepton	3
Agar	20
Konečné pH (při 25 °C)	5,4 ± 0,2

#### 5.4.1.1 Očkování

Všechny čtverečky (reference - PP, PANI, plasmou upravený polyaniline - PANI-P) byly před pokládáním na MEBB v Petriho miskách sterilizovány, aby případné nečistoty neovlivňovaly výsledek měření. Sterilizace probíhala 2 x 30 min. v 80 °C, teplota byla volena tak, aby daný polymer nebyl degradován účinkem vysoké teploty. Poté pro každou plíseň byly čtverečky reference, PANI a PANI-P umístěny opatrně na MEBB v Petriho misce, tak aby nebyl PANI film poškozen. Vyžíhanou kličkou byly vždy odebrány spory předem nakultivovaného druhu plísně a suspendovány ve zkumavce ve 3 ml sterilního fyziologického roztoku (do zakalení). Z takto připravených zkumavek se suspenzemi spor plísní bylo sterilní vatovou tyčinkou potřeno okolí čtverečku a na povrch čtverečku bylo napipetováno po kapkách 150  $\mu$ l suspenze. Takto připravené Petriho misky byly umístěny do inkubačního boxu pro kultivaci, při teplotě 25°C.

#### Odečet přerůstání a odebrání suspenze

Po 6 dnech kultivace bylo odečteno a zapsáno přerůstání plísní přes pokusné čtverečky a vyjádřeno jako procenta povrchu přerostlého plísní. Uvedeného napipetovaného množství suspenze na povrchu čtverečků bylo příliš mnoho pro růst plísní, které vyžadují jen vlhké prostředí. Proto bylo přebytečné množství suspenze opatrně odsáto sterilní vatovou tyčinkou. Poté odečet přerůstání probíhal po 13., 20., 35., 41. a 46. dnu.

#### Srovnání s nekompletním agarem

Plísně, které po odečtení výsledků vykazovaly největší nárůst (*G. virens* CCM 8042, *P. variotii* CCM F398, *A. oryzae* F41), byly testovány na stejném materiálu (reference, PANI, PANI-P pro každou plíseň), ale na tzv. ochuzeném agaru. Složení tohoto nekompletního agaru ve 1000 ml je shrnuto v následující tabulce.

Tabulka 6. Složení nekompletního agaru

Látka	Množství	Látka	Množství
NaNO <sub>3</sub>	1 g	FeSO <sub>4</sub>	0,01 g
NH <sub>4</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1 g	Sojový pepton	0,1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g	Agar	18 g
KCl	0,5 g	Roztok stopových prvků	1 ml
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,5 g	Destilovaná voda	1000 ml

#### 5.4.2 Kvasinky

Pro stanovení tvorby biofilmu byly využity následující kvasinky: *Candida albicans* CCM 8215; *Candida albicans* CCM 8275; *Candida parapsilosis* CCM 8260; *Candida parapsilosis* CCM 8276 (vše z České sbírky mikroorganismů v Brně); *Saccharomyces cerevisiae* a dvě neurčené kvasinky (označené B/B a B/Č) získané z květního nektaru bezu černého, ze sbírky ÚIOŽP FT. Kvasinky byly kultivovány v Sabouraudově bujonu (SB). SB se skládá ze 4 g glukosy, 1 g tryptonu, 10 mg chloramfenikolu a 100 ml destilované vody.

Pro měření schopnosti růstu biofilmu kvasinek, byly použity 96 jamkové mikrotitrační destičky. Pro referenci byly použity neupravené destičky, jež jsou z tkáňového polystyrenu - PS. Část destiček byla pokryta tenkou vrstvou PANI, obdobným způsobem jako pokrývání referenčních čtverečků u plísní. Z takto potažených destiček byla část následovně upravena plasmou, opět obdobným způsobem jako u plísní.

#### Očkování

Do referenčních, PANI a PANI-P destiček bylo dávkováno do každé jamky po 180 µl sterilního SB. Do zkumavek se sterilním fyziologickým roztokem, byly setřeny vyžíhanou kličkou kultivované kvasinky, tímto byly připraveny suspenze biofilmových kultur, které měly hustotu odpovídající 2. stupni McFarlandovy stupnice. Tato suspenze byla dávkována k již nadávkovanému SB po 20 µl do každé jamky. Podle obrázku uvedeného níže lze vidět, že každá kvasinka byla naočkována do 12 jamek destičky reference, PANI a PANI-P.

Inkubace probíhala 48 hodin při 30 - 37 °C v klidu.

### Polystyrene

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	◐	◑	◑	○	○	◐	◑	◑	◑	○	○
C	○	◐	◑	◑	○	○	◐	◑	◑	◑	○	○
D	○	◐	◑	◑	○	○	◐	◑	◑	◑	○	○
E	○	◐	◑	◑	○	○	◐	◑	◑	◑	○	○
F	○	◐	◑	◑	○	○	◐	◑	◑	◑	○	○
G	○	◐	◑	◑	○	○	◐	◑	◑	◑	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

C.a. C.a. C.p. C.p.  
8215 8275 8260 8276

Obrázek 13. Příklad očkování mikrotitrační destičky

### Vyhodnocení schopnosti tvorby biofilmu

Kvasinky byly na jednotlivých filmech kultivovány po dobu 48 hodin. Všechn obsah jamek byl po kultivaci vylit, a jamky byly 3 x promyty fyziologickým roztokem po 250  $\mu$ l, při promývání se destičky důkladně protřepávaly. Po důkladném opláchnutí se jamky barvily krystalickou violetí (roztokem pro Gramovo barvení) objemem 200  $\mu$ l a nechaly se stát 1 min. Promytí destiček od krystalové violeti spočívalo v opláchnutí destilovanou vodou, 3 x po 250  $\mu$ l, aby se odstranila krystalová violet', která nebyla navázána na buňky biofilmu kvasinek. Následovalo sušení vysoko nad plamenem. Pro rozpuštění zachyceného barviva na buňkách biofilmu byla využita 33% kyselina octová. Destičky byly ponechány působení kyseliny octové po dobu w10 minut. Absorbance roztoku byla poté měřena ve spektrofotometru TECAN při 595 nm.

Paralelně ke všem pokusům byla celá procedura provedena v sadě porovnávacích jamek v původních destičkách, v destičkách s PANI a destičkách s PANI-P, a to bez zaočkování. Získané hodnoty byly odečítány od naměřených hodnot tvorby biofilmu jednotlivými druhy kvasinek. Důvodem bylo odečtení abiotického procesu (případné uvolnění barevných složek při použití různých povrchů - PS, PANI a PANI-P).

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1 Výsledky z měření kontaktního úhlu

Tabulka 7. Výsledky z měření kontaktního úhlu

Vzorek	Komponenty povrchové energie (mN/m)		
	$\gamma^{\text{tot}}$	$\gamma^{\text{LW}}$	$\gamma^{\text{AB}}$
Polypropylene	29,20	28,63	0,56
PANI	45,73	40,54	5,19
PANI-P	38,02	32,99	5,03

Poznámka:  $\gamma^{\text{tot}}$  vyjadřuje celkovou povrchovou energii,  $\gamma^{\text{LW}}$  část disperzní a  $\gamma^{\text{AB}}$  je část polární. Polypropylene - reference, PANI - polyanilin, PANI-P - polyanilin upravený plasmou.

V tabulce 7. jsou uvedené naměřené hodnoty povrchové energie. U polypropylenu naměřená hodnota celkové povrchové energie ( $\gamma^{\text{tot}}$ ) je 29,2 mN/m, jenž odpovídá tabulkové hodnotě. Polyanilinový film na polypropylenu má celkovou povrchovou energii ( $\gamma^{\text{tot}}$ ) 45,73 mN/m, vypovídá to o vrstvě PANI. Upravený polyanilin plasmou má hodnotu nižší,  $\gamma^{\text{tot}}$  38,02 mN/m. Tento výsledek odpovídá poklesu disperzní části celkové povrchové energie ( $\gamma^{\text{LW}}$ ) z 40,54 mN/m na 32,99 mN/m. Ovšem polární část zůstala téměř nezměněna 5,19 mN/m u PANI a 5,03 mN/m u PANI-P.

## 6.2 Porůstání materiálů mycéliem plísní

### 6.2.1 Porůstání materiálů mycéliem plísní na kompletním agaru

Tabulka 8. Míra přerůstání povrchů různými plísněmi v procentech povrchu, při použití kompletního živného agaru MEBB

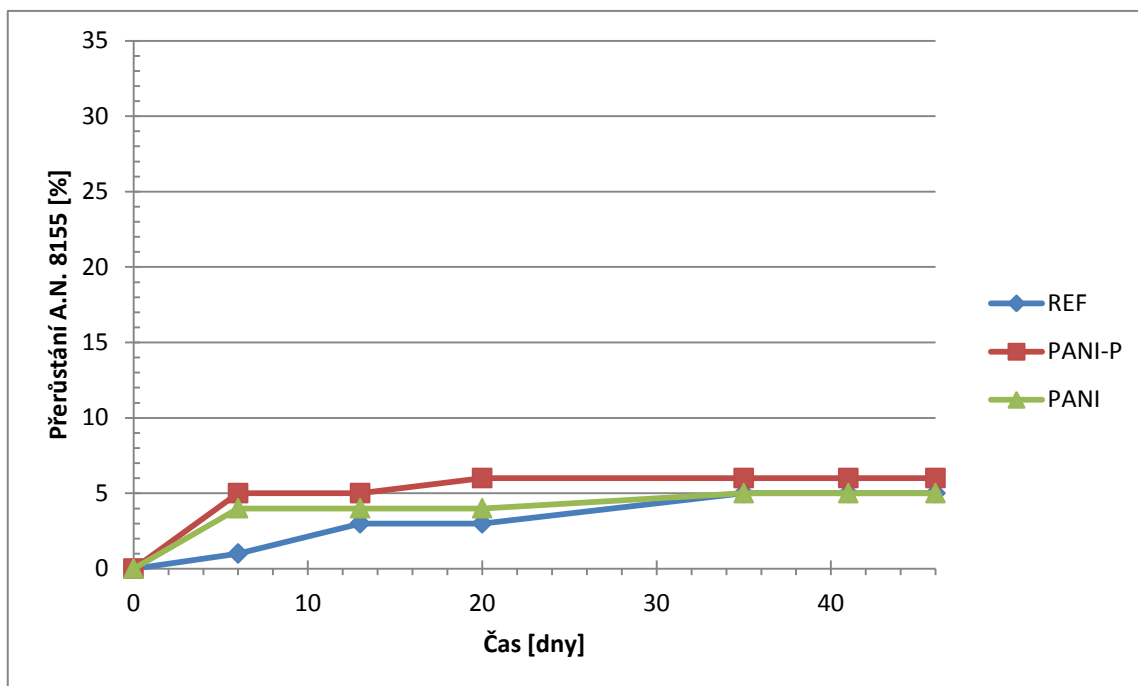
	Čas [dny]	0	6	13	20	35	41	46
<i>A. niger</i>	Reference	0	1	3	3	5	5	5
	PANI	0	4	4	4	5	5	5
	PANI-P	0	5	5	6	6	6	6
<i>A. oryzae</i>	Reference	0	5	10	10	10	10	10
	PANI	0	25	30	35	35	35	35
	PANI-P	0	20	30	30	30	35	35
<i>G. virens</i>	Reference	0	10	10	10	65	65	65
	PANI	0	40	45	45	60	90	90
	PANI-P	0	25	25	25	80	90	90
<i>Ch. globosum</i>	Reference	0	5	8	10	10	12	12
	PANI	0	20	20	20	20	20	20
	PANI-P	0	25	25	25	25	25	25
<i>P. funiculosum</i>	Reference	0	5	6	6	8	8	8
	PANI	0	8	10	15	15	15	15
	PANI-P	0	18	18	18	20	23	23
<i>P. variotii</i>	Reference	0	0,3	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5
	PANI	0	60	65	65	75	80	80
	PANI-P	0	55	55	60	60	60	60
<i>T. viridae</i>	Reference	0	0,3	0,3	0,3	0,5	0,5	0,5
	PANI	0	0,5	0,5	0,5	2	3	4
	PANI-P	0	0,2	0,2	0,2	3	3	3

Poznámka: Reference - polypropylen, PANI - polyanilin, PANI-P - polyanilin upravený plasmou

V tabulce 8. jsou srovnány hodnoty přerůstání plísní na třech typech povrchů (referenční PP, PANI, PANI-P), při kultivaci na bohaté živné půdě. Hodnoty přerůstání jsou odečítány po určitých časových intervalech do 46. dne. Můžeme zde vidět, že nejmenší míra přerůstání je u *T. viriade* a naopak největší míra přerůstání u *G. virens*. Rozdíly mezi mírou přerůstání na různých površích jsou znatelné, avšak u *P. variotti* jsou významné. Hodnoty se od sebe velice liší, srovnáním hodnoty 0,5 % na referenci ku 80 % na PANI. Největší nárůst po šesti dnech je viditelný u *P. variotti*, kde byl pozorován nárůst až 60 %. *G. virens* jednoznačně nejlépe přerůstal referenci a to až z 65 %, druhá nejvyšší hodnota pro referenci byla u *Ch. globosum* jenž přerůstala z 12 %. Pro názornost jsou výsledky prezentovány také v podobě grafů č. 1 až č. 7. Fotografie srovnání přerůstání různých povrchů plísněmi jsou uvedeny v příloze PI a PII.

### 6.2.1.1 *Aspergillus niger*

Graf 1. Přerůstání *Aspergillus niger* CCM 8155 vyjádřeno v procentech povrchu

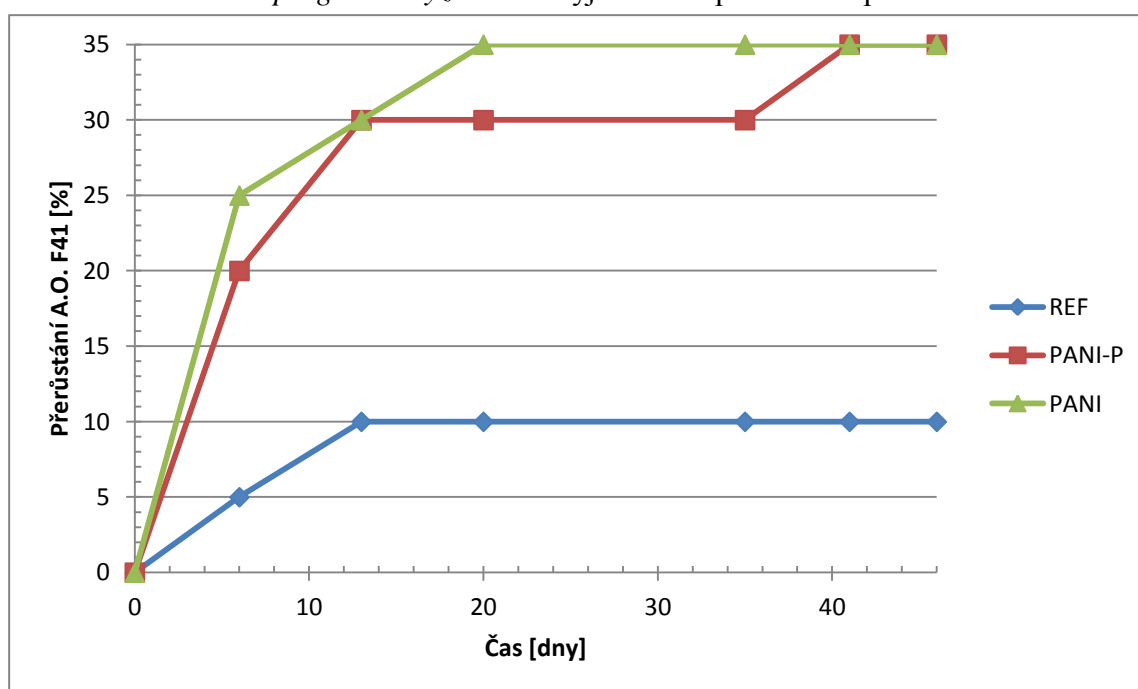


Poznámka: REF - reference polypropylen; PANI - polyaniline; PANI-P - polyaniline upravený plasmou)

Na grafu 1. lze velmi dobře vidět, že biofilm plísně *A. niger* nepřesáhl hodnotu 6%. Počáteční hodnoty přerůstání jsou málo rozdílné, největší skok přerůstání nastal u PANI a PANI-P 6. den a u reference až 13. den. Hodnoty u PANI-P se ustálily 20. den, ale u reference a PANI až 35. den. Konečná míra přerůstání se vůči sobě významně neliší a nelze tedy jednoznačně určit jaký povrch plíseň *A. niger* preferuje.

### 6.2.1.2 *Aspergillus oryzae*

Graf 2. Přerůstání *Aspergillus oryzae* F 41 vyjádřeno v procentech povrchu

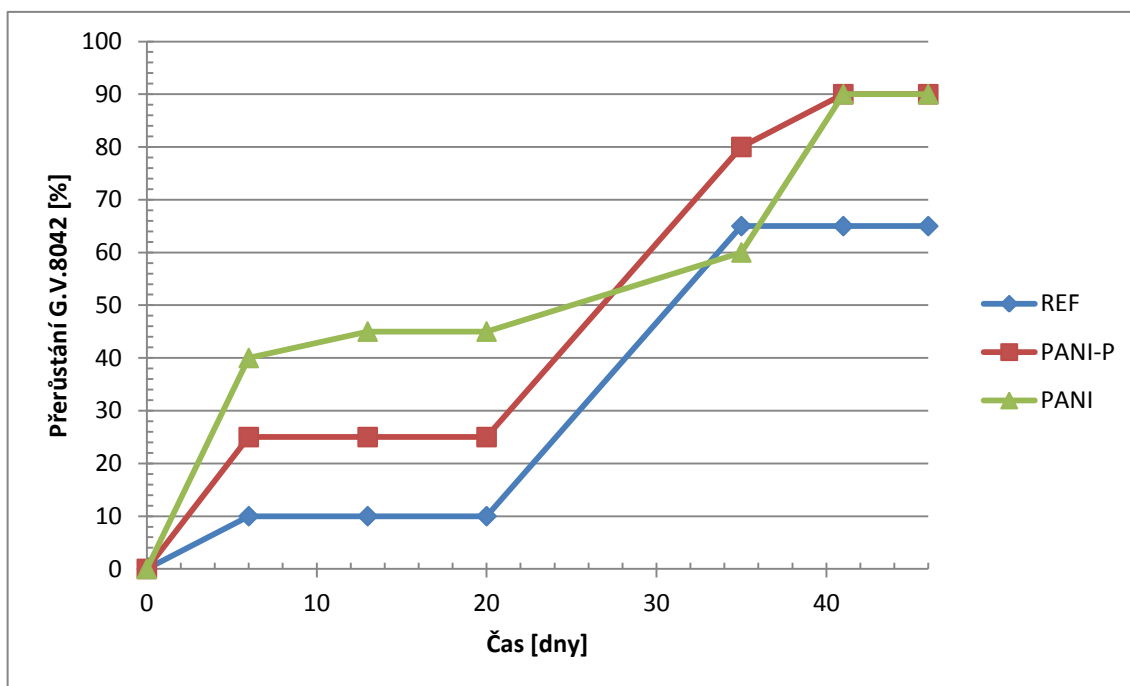


Poznámka: REF - reference polypropylen; PANI - polyaniline; PANI-P - polyaniline upravený plasmou)

Na grafu 2. je zobrazeno přerůstání plísně *A. oryzae*. Míra přerůstání je o něco vyšší oproti *A. niger*. Přerůstání zde dosahuje až 35% povrchu. Již při počátečním odečtu jsou znatelné rozdíly v přerůstání. Na referenci bylo přerůstání jen 5 % např. oproti 20 % u PANI-P. Ustálení hodnot u reference bylo již 13. den, PANI 20. den, ale PANI-P až 41. den. PANI a PANI-P mají stejné konečné hodnoty 35 %, ale průběhem se liší, tyto hodnoty jsou různé od referenční hodnoty, která má jen 10 % oproti 35 %. *A. oryzae* přerůstá všechny tři typy povrchů, ovšem spíše preferuje povrch PANI a PANI-P.

Lze říci, že tato plíseň o něco lépe roste na hydrofilnějších površích, i když rozdíl v přerůstání není razantní.

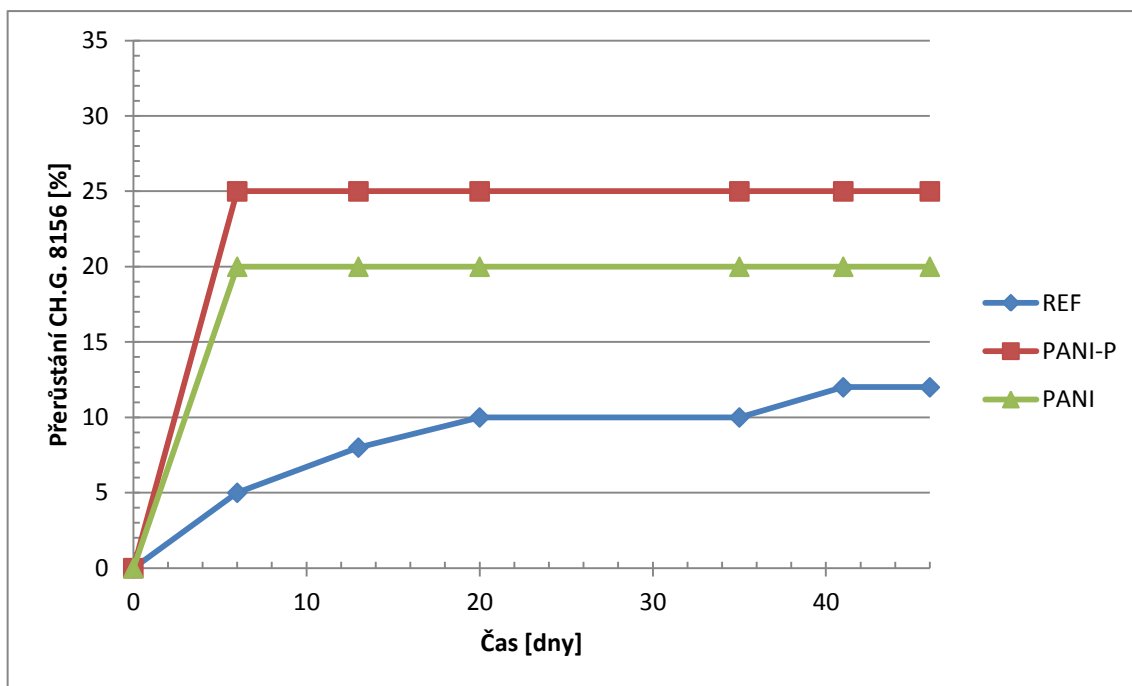


6.2.1.3 *Gliocladium virens*Graf 3. Přerůstání *Gliocladium virens* CCM 8042 vyjádřeno v procentech povrchu

Poznámka: REF - reference polypropylen; PANI - polyaniline; PANI-P (polyaniline upravený plasmou)

Z grafu je patrné, že míra přerůstání *G. virens* dosahuje nejvyšších hodnot, ze všech ostatních plísní (graf 3.) Tvorba biofilmu u *G. Virens* dosahuje až 90 % povrchu. Plíseň by daný povrch přerostla úplně celý, pokud by na místech, které nejsou přerostlé, nebyla velká vlhkost, která bránila úplnému pokrytí. Již při prvním odečtu se hodnoty liší, nejvíce ze začátku přerůstala plíseň na PANI. U reference je viditelný značný skokový nárůst z hodnoty 10 % na 65 % v 35. dnu, tato hodnota se zde ustálila. PANI-P měla také skokový nárůst, ale již 20. den, z hodnoty 25 % na 80 %, poté se hodnota změnila jen o 10 % na 90 %. V průběhu tvorby biofilmu na PANI nenastala taková razantní změna růstu, hodnota přerůstání již na počátku byla 40 %, na konci měření měla až 90 %, nárůst byl postupný. PANI a PANI-P měly různý průběh přerůstání, ale na konci měření měly obě 90 %.

*G. virens* přerůstala všechny tři typy povrchů, ale nejvíce přerůstala PANI a PANI-P.

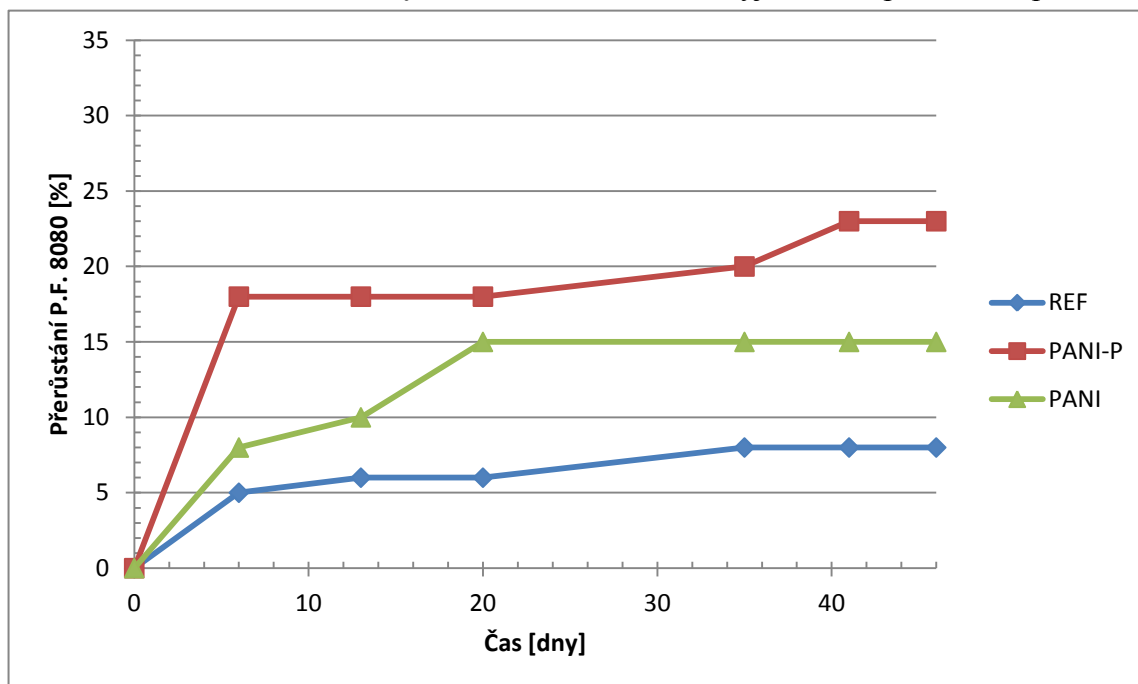
6.2.1.4 *Chaetomium globosum*Graf 4. Přerůstání *Chaetomium globosum* CCM 8156 vyjádřeno v procentech povrchu

Poznámka: REF - reference polypropylen; PANI - polyaniline; PANI-P - polyaniline upravený plasmou)

Na grafu 4. je patrné, že míra přerůstání *Ch. globosum* dosahuje nejvýše 25 %. Přerůstání u typu povrchu reference je pozvolné, a končí na hranici 12 %, což je skoro poloviční hodnota oproti PANI-P. Je zajímavé, že se nárůst hodnot u PANI a PANI-P se již po 6. dni nezměnil, a byl stejný až do konce měření. Konečné hodnoty u PANI jsou 20 % a u PANI-P 25 %, liší se tedy pouze o 5 %. Plíseň *Ch. globosum* mírně přerůstala všechny tři typy povrchů, nelze tedy jednoznačně říci, který povrch je vhodnější.

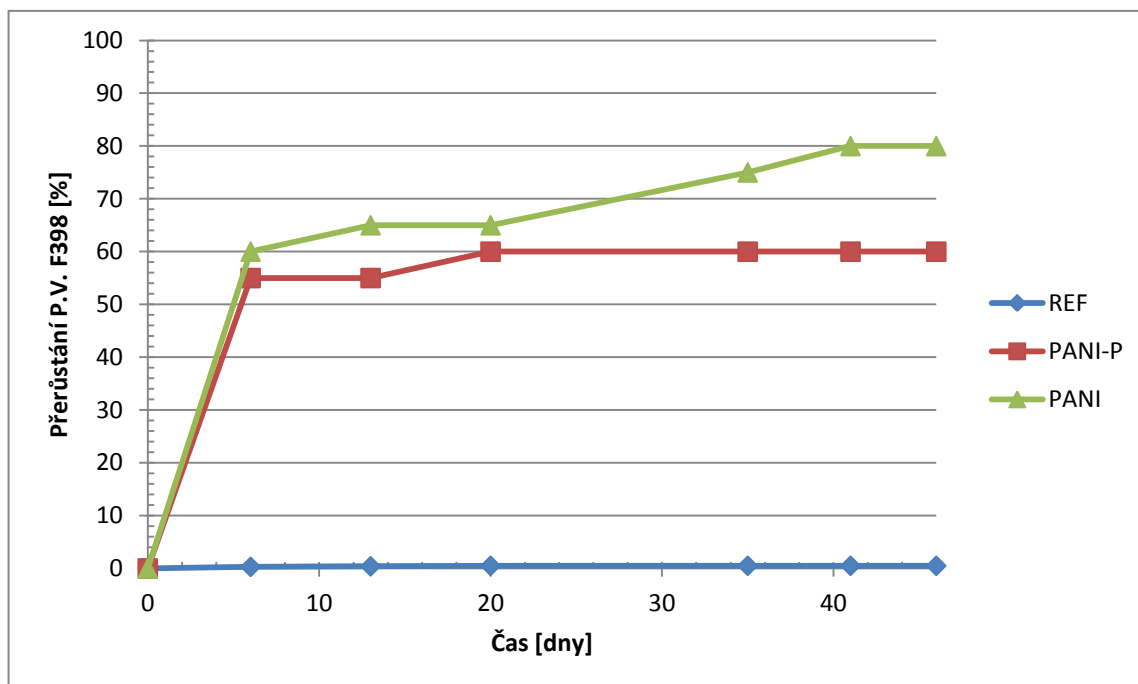
### 6.2.1.5 *Penicillium funiculosum*

Graf 5. Přerůstání *Penicillium funiculosum* CCM 8080 vyjádřeno v procentech povrchu



Poznámka: REF - reference polypropylen; PANI - polyaniline; PANI-P - polyaniline upravený plasmou)

Také u grafu 5. jsou hodnoty poměrně nízké, nepřesáhly hodnotu 23 %. Hodnoty jsou již od počátku odlišné až do konce měření. Nejvíce přerůstala povrch PANI-P, nejméně referenci (jen 8 %). Největší nárůst u PANI-P byl hned po 6 dnech, poté se hodnota zvětšila z 18 % jen na 23%. Konečné hodnoty jsou vůči sobě rozdílné. Hodnoty u PANI se ustálily již 20. den, u reference 35. den a u PANI-P až 41. den.

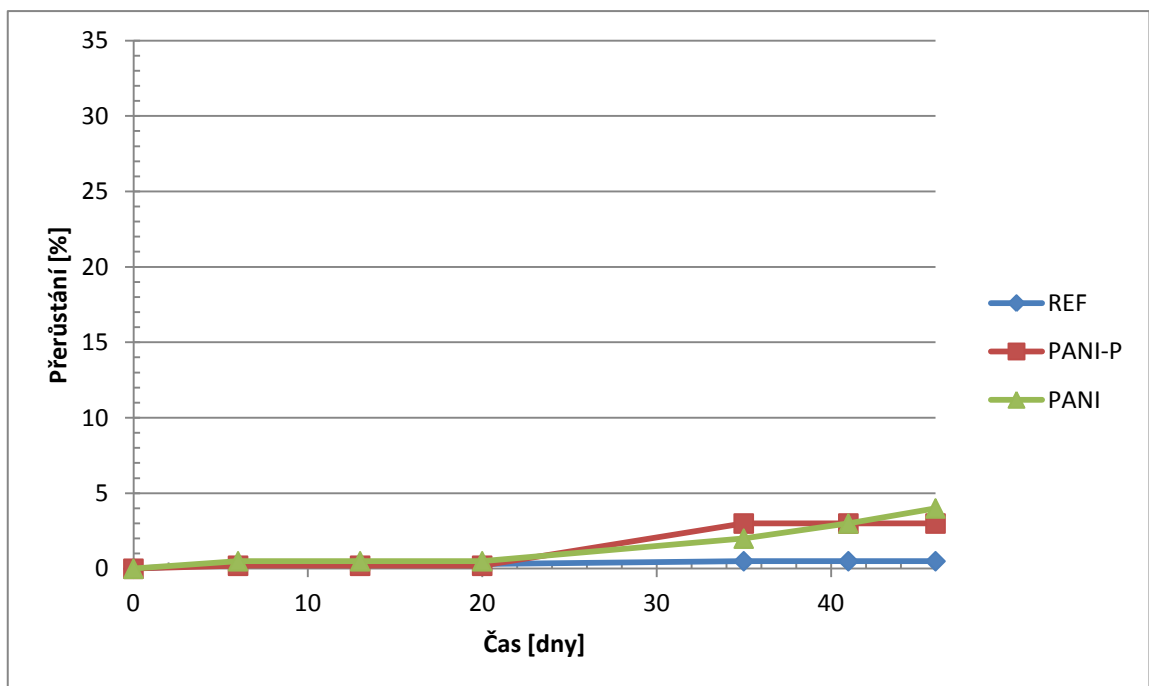
6.2.1.6 *Paecilomyces variotii*Graf 6. Přerůstání *Paecilomyces variotii* CCM F-398 vyjádřeno v procentech povrchu

Poznámka: REF - reference polypropylen; PANI - polyaniline; PANI-P - polyaniline upravený plasmou)

Graf 6. je ukázkový příklad, jak se hodnoty od sebe mohou lišit v závislosti na různých typech povrchů. Zde je vidět znatelný rozdíl mezi referencí a PANI a PANI-P. Referenční hodnoty dosahují pouze max. 0,5 %, zatímco u PANI 80 % a PANI-P 60 %. Na počátku přerůstání u reference je nárůst na 0,3 % a konečná hodnota, která se ustálila 35. den na 0,5 %. U PANI a PANI-P je již na počátku vidět skokový nárůst hodnot na 60 % a 55 %. U PANI se hodnoty průběžně měnily, až se ustálily 41. den na 80 %. U PANI-P se hodnoty ustálily již 20. den na 60 %. Na tomto grafu lze jednoznačně demonstrovat, že plíseň *P. variotii* preferuje spíše povrch typu PANI a PANI-P, které jsou hydrofilní.

### 6.2.1.7 *Trichoderma viridae*

Graf 7. Přerůstání *Trichoderma viridae* F 486 vyjádřeno v procentech povrchu



Poznámka: REF - reference polypropylen; PANI - polyaniline; PANI-P - polyaniline upravený plasmou)

U *T. viridae* jsou hodnoty míry přerůstání nejen nízké, ale také mezi nimi není skoro žádný rozdíl. Hodnoty dosahují u reference jen 0,5%, u PANI 4 % a u PANI-P 3%. Hodnoty u reference a PANI-P se ustálily 35. den, ale u PANI se hodnoty měnily až do konce měření.

### 6.2.2 Porůstání materiálů mycéliem plísní na nekompletním agaru

Tabulka 9. Míra přerůstání povrchů různými plísněmi v procentech povrchu, při použití nekompletním agaru

	Čas [dny]	0	6	13	20	27
<i>A. oryzae</i>	Reference	0	0	0	0	0
	PANI	0	0	1	1	1
	PANI-P	0	0	1	1	1
<i>G. virens</i>	Reference	0	0	0	0	0
	PANI	0	0	0	0	1
	PANI-P	0	0	2	2	2,5
<i>P. variotii</i>	Reference	0	0	0	0	0
	PANI	0	0	0	0	0
	PANI-P	0	0	0	0	0

Poznámka: Reference - polypropylen, PANI - polyanilin, PANI-P - polyanilin upravený plasmou

Pro měření míry přerůstání na nekompletním agaru byly vybrány tři plísně - *G. virens*, *A. oryzae* a *P. variotii*, které ze všech sedmi plísní testovaných na bohatém živném agaru rostly nejvíce. Jak lze vidět v tabulce 9. míra přerůstání po uplynulých 27 dnech kultivace dosáhla nejvyšší hodnoty 2,5 % u *G. virens* na PANI-P a *P. variotii* nerostla na žádném povrchu. Výsledky z tohoto měření na nekompletním agaru dokazují, že si plísně nebraly potřebné živiny z povrchu materiálu, ale pouze z živného agaru. Lze tedy říci, že v případě přerůstání povrchu reference, PANI a PANI-P zde použitými plísněmi, výrazně záleží na okolním zdroji živin.

Celkové přerůstání mycélií plísní přes povrch tří použitých materiálů se liší svými výsledky. Nejnižší celkové přerůstání bylo u všech sedmi plísní na referenci, jehož povrch je hydrofobní. Hydrofobita byla zřejmá nejen již při nanášení suspenze, kde kapka držela tvar na referenci a na PANI a PANI-P se kapka rozplývala. Ale především pomocí měření kontaktního úhlu viz tabulka 7, výsledky uvedené v tabulce nám napomáhají charakterizovat povrch. U reference celková povrchová energie nabývá hodnoty 29,20 mN/m, a z toho vyplývá, že se jedná o hydrofobní povrch. U PANI byla celková povrchová energie 45,73 mN/m a u PANI-P 38,02 mN/m, jejich povrch je tedy hydrofilní. Rozsah přerůstání

reference bylo řádově jen do 12 %, krom jediné plísně *G. virens*, kde hodnota dosáhla až 65 %.

U některých plísní, lze vidět prodlevu v růstu. Způsobuje to nejspíše potřebná doba k adaptaci či fenotypové změny přisedlých buněk. Postupem času se i snižuje růstová rychlost až do doby ustálení tloušťky biofilmu [2]. Ve studii Binkaškiene (2013) [49] bylo testováno několik druhů plísní na povrchu polyanilinu. Testována byla i *Trichoderma*, kde výsledky tvorby biofilmu do 32. dne byly nulové, malý nárůst se vyskytl až 56. den, zřejmě tato plíseň potřebuje delší dobu na adaptaci. Ostatní plísně tento povrch zdárně přerůstaly.

U PANI byly hodnoty celkově vysoké a nelišily se význačně od hodnot PANI-P. Tento povrch plísně preferovaly. Z toho vyplývá, že interakce mezi plísní a povrchem, značně ovlivňují povrchové vlastnosti materiálu, tedy zde převážně hydrofobní interakce, které zamezují přerůstání. Podle Binkaškiene (2009) [50] jenž testoval *A. niger* na PANI, zjistil, že tato plíseň preferuje spíše hydrofilní povrch. K hydrofilnímu povrchu přispívá i plíseň samotná, jelikož mezi metabolickými produkty jsou organické kyseliny, především kyselina šťavelová, která zvyšuje hydrofilnost povrchu, a tak i míru přerůstání. Jeho produkce závisí nejen na konkrétní plísni, ale také na okolním prostředí, jako je podklad a přístupnost živin. Tento fakt byl potvrzen i tím, že různé podklady byly testovány na nekompletním agaru, a výsledky prokázaly, že si plísně berou živiny jen z živného agaru a ne podkladu. Proto při nedostatku živin z okolí, plísně povrch nemohly přerůstat. U Binkaškiene (2009) [50] bylo zjištěno, že plísně a jejich produkty ovlivňují povrch materiálu (morfologicky, chemicky i elektrochemicky), u PANI způsobují oxidaci povrchu. Struktura biofilmu má velký význam pro pochopení elektrochemického chování povrchu. Konečné výsledky, lze porovnat s výsledky přerůstání povrchu bakteriemi, jelikož jsou více prozkoumány. Např. ve studii Prabhakar [51] byla zjišťována biokompatibilita bakterií s PANI filmem na polyuretanu (PANI+PU) a kombinací s nanočásticemi stříbra (PANI+PU+NP), jež mají antibakteriální charakter. Jak se předpokládalo, největší vliv na tvorbu biofilmu měly nanočástice stříbra. Největší nárůst byl na čistém PU. Testování potvrdilo, že velký vliv na tvorbu biofilmu má hydrofobita povrchu. Jelikož zkoumané bakterie preferovaly hydrofobní povrch, nejvíce rostly na čistém PU, méně rostly na PANI+PU, jelikož tento povrch je hydrofilní. Nejméně rostly, jak bylo zmíněno, na PANI+PU+PN, tento povrch byl nejen hydrofilní, ale taky obsahoval antibakteriální nanočástice. Z tohoto vyplývá, že pokud bychom chtěli ovlivnit adhezi biofilmu

na daném povrchu, musíme brát zřetel, s jakým mikroorganismem bude v kontaktu, a podle toho přidat např. nanočástice stříbra do směsi či potáhnout povrch filmem jako např. u PU s filmem PANI.

### 6.3 Tvorba biofilmu kvasinek

Jak již bylo zmíněno v metodice, každá kvasinka byla celkově naočkována do 12 jamek. Hodnoty měření tvorby biofilmu byly zprůměrovány a jsou uvedeny v tabulce 10.

Tabulka 10. Stanovení průkazných rozdílů mezi tvorbou biofilmu na různých površích při absorbanci 595 nm.

Mikroorganismu	Povrchová úprava		
	REFERENCE	PANI	PANI-P
<i>C. a. 8215</i>	- 0,0116 ± 0,0048	- 0,0636 ± 0,0143	0,1320 ± 0,0380
<i>C. a. 8275</i>	0,0341 ± 0,0138	- 0,0685 ± 0,0124	0,1268 ± 0,0256
<i>C. p. 8260</i>	- 0,0048 ± 0,0072	- 0,758 ± 0,0072	0,0812 ± 0,0110
<i>C. p. 8276</i>	- 0,0103 ± 0,0038	- 0,0808 ± 0,0057	0,0746 ± 0,0091
<i>Yeast</i> <sup>1</sup>	0,1579 ± 0,0305	0,0989 ± 0,0163	0,1197 ± 0,0144
<i>Yeast</i> <sup>2</sup>	0,0889 ± 0,0343 <sup>A</sup>	0,1042 ± 0,0428 <sup>B</sup>	0,0790 ± 0,0278 <sup>C</sup>
<i>S. c.</i>	0,1184 ± 0,0194 <sup>A</sup>	0,1448 ± 0,0356 <sup>A</sup>	0,1323 ± 0,0205 <sup>B</sup>

Poznámka: Rozdílné indexy v rámci řádků (<sup>A</sup>; <sup>B</sup>; <sup>C</sup>) odpovídají neprůkazným rozdílům mezi povrchem. Reference - polystyren, PANI - polyanilin, PANI-P - polyanilin upravený plasmou. *C.a.* - *Candida albicans*, *C.p.* - *Candida parapsolosis*, *Yeast*<sup>1</sup> - B/B, *Yeast*<sup>2</sup> - B/Č, *S.c.* - *Saccharomyces cerevisia*.

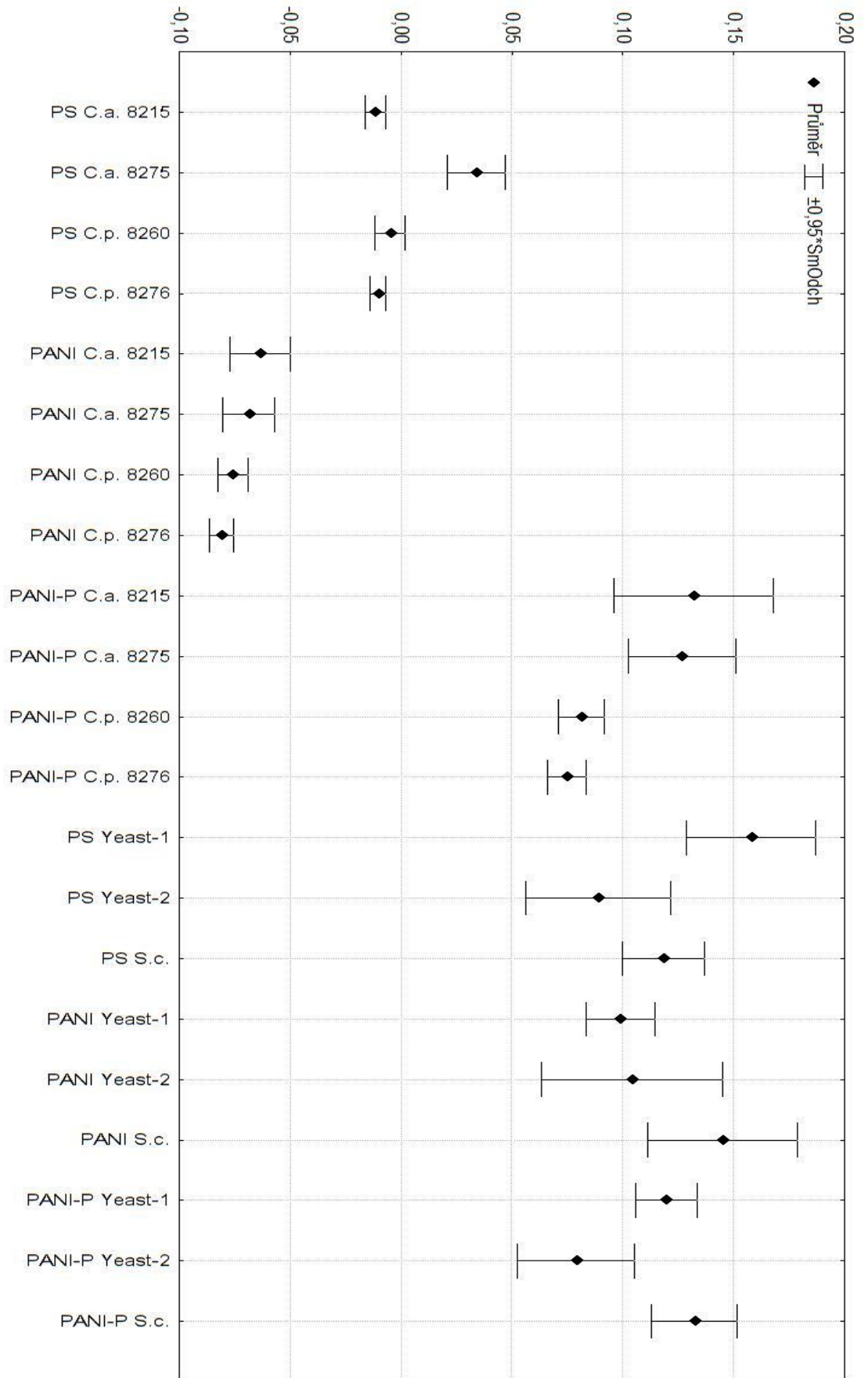
V tabulce 10. jsou srovnány průměrné hodnoty změřené absorbance tvorby biofilmu kvasinek a jejich směrodatné odchylky. Srovnání průkaznosti rozdílů mezi průměry pomocí T-testu prokázalo velké množství průkazných rozdílů. Z tohoto důvodu jsou v tabulce, oproti zvyklostem, pomocí rozdílných indexů v rámci řádků označeny průměrné hodnoty, mezi kterými nebyl potvrzen statisticky průkazný rozdíl. Pomocí tabulky lze odvodit rozdílnost výsledků, kde se srovnávaly povrchy kvasinek (referencí x PANI, PANI x PANI-P, referencí x PANI-P). Výsledky u *Yeast*<sup>2</sup> ukazují neprůkazné rozdíly mezi všemi třemi



možnými srovnáními. U *S. c.* jsou neprůkazné rozdíly mezi referencí a PANI-P , a PANI s PANI-P. Mezi ostatními kvasinkami je rozdílná tvorba biofilmu dle daného povrchu.

Záporné hodnoty při měření nastaly z důvodu špatného uvolnění krystalové violeti do kyseliny octové při měření absorbance.

Graf 8. Znázornění schopnosti tvorby biofilmu kvasinek



Poznámka ke grafu 8. : PS - polystyren - reference, PANI - polyanilin, PANI-P - polyanilin upravený plasmou, *C. a. 8215* - *Candida albicans* CCM 8215, *C. a. 8275* - *Candida albicans* CCM 8275, *C. p. 8260* - *Candida parapsilosis* CCM 8260, *C. p. 8276* - *Candida parapsilosis* CCM 8276, *Yeast*<sup>1</sup> - B/B, *Yeast*<sup>2</sup> - B/Č, *S. c.* - *Saccharomyces cerevisia*.

V grafu 8. je u *C. albicans* i *C. parapsilosis* viditelná, i když relativně slabá tvorba biofilmu na povrchu typu PANI-P. Na původních destičkách z PS tvořila biofilm jen *C. a. 8275*, i když jen zanedbatelně. PANI neporůstala ani jedna kultura rodu *Candida*, avšak PANI-P porůstaly všechny čtyři, ačkoliv jen minimálně. V porovnání s jinými mikroorganismy, je taková tvorba biofilmu minimální, jelikož některé bakterie mohou tvořit biofilmy až do absorbance 0,5 - 1,0, ojediněle i více. Zde by se tedy dalo říci, že použité kultury rodu *Candida* tvoří biofilm jen na PANI upraveném plasmou. Dále jsou uvedeny kvasinky (*Yeast* a *S. c.*), které se schopností růstu na studovaných površích oproti výše uvedeným kulturám rodu *Candida* velmi liší. Jsou schopny porůstat všechny tři typy povrchů, i když jsou tyto hodnoty, v porovnání s jinými mikroorganismy, také minimální. U těchto kvasinek, nelze přesně říci, který povrch jim vyhovuje.

Shrnutí výsledků tvorby biofilmu kvasinek, nám značí, že nelze přesně určit, jaký povrch kvasinky preferují. Je důležité upozornit na již zmíněnou věc, že některé kvasinky sice rostly na všech površích, ale jejich růst byl minimální. Kvasinky *Candida* rostly jen na PANI-P, ovšem kvasinky *S.c.* a kvasinky B/B a B/Č rostly na všech třech typech, a nelze přesně říci na kterém povrchu lépe rostou, výsledky nebyly výrazně rozdílné. Ve studii Estivill [52] bylo zkoumáno 84 kmenů *Candida* spp. (23 *C. albicans*, 23 *C. parapsilosis*, 16 *C. tropicalis*, 17 *C. glabrata* a 5 *C. kruse*) na třech typech materiálů, jež jsou používány ve zdravotnických zařízeních. Testoval se polyvinylchlorid (PVC), polyuretan (PU) a teflon. Např. *C. parapsilosis* rostla značně na všech třech typech povrchů.

Ve studii Jia [53] byly zkoumány antimikrobiální účinky PANI v kombinaci s nanočásticemi stříbra. Byl očekáván synergický účinek, který se potvrdil, a mohl být způsoben změnou struktury a morfologií PANI či Ag. Tento antimikrobiální účinek působil právě na kvasinky.

## ZÁVĚR

Všeobecně se eukaryotické buňky různých druhů mikroorganismů liší svými povrchovými vlastnostmi. Zda-li budou tyto buňky tvořit biofilm, závisí na mnoha faktorech nejen na jejich povrchové struktuře a následných interakcích (fyzikálních, chemických), ale také na povrchu materiálu a celkových podmínkách prostředí, v němž vyskytují. Některé tyto podmínky lze upravit tak, abychom zamezili/podpořili tvorbu biofilmu.

Biofilm je odolnější oproti planktonní formě, proto je důležité zabránit jeho tvorbě na zdravotnických prostředcích. Řada mikroorganismů způsobuje v těle různé infekce, a jsou ve formě biofilmu odolné vůči antibiotikům, antimykotikům i vůči imunitnímu systému, což vede k problému s jejich léčbou. Biofilmy jsou zkoumány i z důvodu rozšířeného využívání umělých náhrad, kde biofilm může způsobovat značné problémy.

Polyanilin je nízkonákladový materiál, který je snadno vyrobiteľný, i když těžko rozpustný. Tento materiál má zajímavé vlastnosti, a to nejen díky své vodivosti, a mohl by být více využit v medicíně. Důležité ovšem je zjistit jeho případnou biokompatibilitu.

Z uvedených výsledků porůstání povrchu testovaných materiálů mycéliem plísni lze říci, že všech sedm použitých druhů plísni preferuje PANI povrch i jeho plasmou modifikovanou formu, oproti referenčnímu povrchu z polypropylenu. Je to způsobeno tím, že mycélia těchto plísni rostou lépe na hydrofilním povrchu, jenž PANI a PANI-P podle výsledků z měření kontaktního úhlu mají. Na hydrofobním povrchu PP rostly jen minimálně. Celkově největší nárůst prokázala kultura *G. virens* a nejmenší *T. viridae*. Z tohoto shrnutí vyplývá, že růst plísni je velmi ovlivňován povrchovými vlastnostmi podkladu a druhem mikroorganismu. Rozdíly v přerůstání PANI a PANI-P plísňovými kulturami nebyly zaznamenány, nejspíše to bylo způsobeno tím, že se po úpravě plasmou téměř nezměnila polární část PANI, i když se snížila disperzní část. Porůstání povrchů s PANI a PANI-P mycéliem plísni bylo také podmíněno přítomností bohatého (kompletního) živného agarů v okolí pokusných materiálů, neboť při použití nekompletního (chudého) živného agarů bylo porůstání plochy všech povrchů minimální. PANI a PANI-P tak lze charakterizovat jako inertní, nikoliv živný podkladový materiál pro použité druhy vláknitých plísni.

Bylo také testováno sedm kultur kvasinek. *Candida albicans* a *Candida parapsilosis* tvořily slabý biofilm pouze na PANI-P. Lze tak říci, že použité kultury rodu *Candida* preferovaly upravený povrch PANI, u něž se úpravou změnila disperzní část. Kvasinky z květního nektaru černého bezu a *Saccharomyces cerevisiae* rostly na všech třech typech

povrchů, i když tvorba biofilmu byla také slabá. Kvasinka B/B rostla nejvíce na polystyrenu, a u B/Č a *S. cerevisiae* nelze jednoznačně určit, který povrch preferují.

Tato studie pomohla rozšířit znalosti o adhezi plísni a kvasinek na polyanilinových filmech.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] RULÍK, M. a kol. *Mikrobiální biofilmy*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, 2011, 447 s. ISBN 978-802-4427-478.
- [2] RULÍK, M. a V. HOLÁ. Mikrobiální biofilmy: 1. Všudypřítomný a přitom málo známý fenomén. *Živa* [online]. 2012, č. 3, s. 104–106 [cit. 2013-10-8]. Dostupné z: <http://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/mikrobialni-biofilmy-1-vsudypritomny-a-pritom-malo.pdf>
- [3] BONHOMME, J. a C. D'ENFERT. *Candida albicans* biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 2013, r. 16, č. 4, s. 398–403 [cit. 2013-11-07]. DOI: 10.1016/j.mib.2013.03.007. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S1369527413000398?np=y4>
- [4] HARDING, M. W. a kol. Can filamentous fungi form biofilms?. *Trends in Microbiology* [online]. 2009, r. 17, č. 11, s. 475–480 [cit. 2014-01-22]. DOI: 10.1016/j.tim.2009.08.007. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S0966842X09001723>
- [5] PROCHÁZKOVÁ, G. a kol. Použití fyzikálně-chemických nástrojů pro predikci mikrobiální adheze [online]. *Chem. listy* 105, 2011, s. 856–863 [cit. 2014-01-21]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011\\_11\\_856-863.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_11_856-863.pdf)
- [6] RENNER, L. D. a D. B. WEIBEL. Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bulletin* [online]. 2011, r. 36, č. 5, s. 347–355 [cit. 2014-03-23]. DOI: 10.1557/mrs.2011.65. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3224470/>
- [7] CAMPOCCIA, D., L. MONTANARO a C. R. ARCIOLA. A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials* [online]. 2013, r. 34, č. 34, s. 8533–8554 [cit. 2014-02-07]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.07.089. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S0142961213009174>
- [8] VOTAVA, M a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Dotisk 2006. Brno: Neptun, 2003, 495 s. ISBN 80-902-8966-5.

- [9] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [10] KOPECKÁ, J., D. MATOULKOVÁ a M. NĚMEC. Kvasinky a jejich využití. *Kvasný průmysl* [online]. 2012, r. 58, č. 11–12, s. 326–335 [cit. 2014-02-03]. Dostupné z: [www.kvasnyprumysl.cz/download.php?clanek=370](http://www.kvasnyprumysl.cz/download.php?clanek=370)
- [11] BLANKENSHIP, J. R. a A. P. MITCHELL. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 2006, r. 9, č. 6, s. 588–594 [cit. 2014-02-04]. DOI: 10.1016/j.mib.2006.10.003. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S136952740600155X>
- [12] DOUGLAS, L. J. Candida biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology* [online]. 2003, r. 11, č. 1, s. 30–36 [cit. 2014-02-04]. DOI: 10.1016/S0966-842X(02)00002-1. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S0966842X02000021>
- [13] RAMAGE, G. a kol. Candida Biofilms: an Update. *Eukaryotic Cell* [online]. 2005-04-08, r. 4, č. 4, s. 633–638 [cit. 2014-02-12]. DOI: 10.1128/EC.4.4.633-638.2005. Dostupné z: <http://ec.asm.org/content/4/4/633>
- [14] PANNANUSORN, S., V. FERNANDEZ a U. RÖMLING. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of Candida species causing bloodstream infection. *Mycoses* [online]. 2013, r. 56, č. 3, s. 264–272 [cit. 2013-11-07]. DOI: 10.1111/myc.12014. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/myc.12014>
- [15] SOLL, D. R. Candida Biofilms: Is Adhesion Sexy?. *Current Biology* [online]. 2008, r. 18, č. 16, s. 717–720 [cit. 2014-02-08]. DOI: 10.1016/j.cub.2008.07.014. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S0960982208008798>
- [16] KOJIC, E. M. a R. O. DAROUICHE. Candida Infections of Medical Devices. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2004, r. 17, č. 2, s. 255–267 [cit. 2014-02-12]. DOI: 10.1128/CMR.17.2.255-267.2004. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.17.2.255-267.2004>

- [17] MUKHERJEE, P. a J. CHANDRA. Candida biofilm resistance. *Drug Resistance Updates* [online]. 2004, r. 7, č. 4-5, s. 301–309 [cit. 2014-02-08]. DOI: 10.1016/j.drug.2004.09.002. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S136876460400069X>
- [18] CHERUTHAZHEKATT, S. a kol. Gas plasmas and plasma modified materials in medicine. *Journal of Applied Biomedicine* [online]. 2010, r. 8, č. 2, s. 55–66 [cit. 2013-07-10]. DOI: 10.2478/v10136-009-0013-9. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S1214021X14600107>
- [19] JACOBS, T. a kol. Plasma Surface Modification of Biomedical Polymers: Influence on Cell-Material Interaction. *Plasma Chemistry and Plasma Processing* [online]. 2012, r. 32, č. 5, s. 1039–1073 [cit. 2013-06-27]. DOI: 10.1007/s11090-012-9394-8.
- [20] CHU, P. K. a kol. Plasma-surface modification of biomaterials. *Materials Science and Engineering: R: Reports* [online]. 2002, r. 36, č. 5-6, s. 143–206 [cit. 2014-03-08]. DOI: 10.1016/S0927-796X(02)00004-9. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S0927796X02000049>
- [21] *Harrick Plasma* [online]. 2013 [cit. 2014-03-08]. Dostupné z: <http://www.harrickplasma.com/>
- [22] VESEL, A. a M. MOZETIC. Surface modification and ageing of PMMA polymer by oxygen plasma treatment. *Vacuum* [online]. 2012, r. 86, č. 6, s. 634–637 [cit. 2014-03-08]. DOI: 10.1016/j.vacuum.2011.07.005. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S0042207X11002430>
- [23] HUDEČEK, O. a T. SEDLÁČEK. Povrchové úpravy plastových výrobků plazmou. In: *Plastikářský klastr* [online]. [cit. 2014-03-08]. Dostupné z: [http://www.plastr.cz/files/new35/144-Povrchove\\_upravy\\_plastovych\\_vyrobku\\_plazmou.pdf](http://www.plastr.cz/files/new35/144-Povrchove_upravy_plastovych_vyrobku_plazmou.pdf)
- [24] LOH, I.-H. Plasma Surface Modification In Biomedical Applications. *AST TECHNICAL JOURNAL* [online]. 6 s. [cit. 2014-03-08]. Dostupné z: <http://www.astp.com/PDFs/PSBiomed.pdf>



- [25] *Diener electronic: Plasma-Surface-Technology* [online]. ©2009 Diener electronic GmbH + Co. KG [cit. 2014-03-08]. Dostupné z: <http://www.plasma.de/cz/index.html>
- [26] PROCHÁZKA, M. Plazmová polymerizace. *Chempoint: Vědci pro průmysl a praxi* [online]. 2011 [cit. 2014-03-23]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/plazmova-polymerizace>
- [27] PONCIN-EPAILLARD, F. a G. LEGEAY. Surface engineering of biomaterials with plasma techniques. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn* [online]. 2003, roč. 14, č. 10, s. 1005–1028 [cit. 2013-10-28].
- [28] BITTNEROVÁ, Z. Plazmová sterilizace: perspektivní dekontaminační metoda. *Chempoint: Vědci pro průmysl a praxi* [online]. 2011 [cit. 2014-03-23]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/plazmova-sterilizace>
- [29] DUCHÁČEK, V. *Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2006. 278 s. ISBN 80-7080-617-6.
- [30] STOKLASA, K. Makromolekulární chemie II: Polymerní materiály. [přednášky] 2013-2014, Zlín
- [31] PROKOPOVÁ, I. *Makromolekulární chemie*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2007. 207 s. ISBN 978-80-7080-662-3. Dostupné z: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/uid\\_isbn-978-80-7080-662-3/anotace/](http://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/uid_isbn-978-80-7080-662-3/anotace/)
- [32] STEJSKAL, J. Polyanilin: vodivý polymer. *Otevřená věda* [online]. [cit. 2014-11-21]. Dostupné z: <http://archiv.otevrenaveda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/NH2006pdf/16.pdf>
- [33] STEJSKAL, J., I. SAPURINA a M. TRCHOVÁ. Polyaniline nanostructures and the role of aniline oligomers in their formation. *Progress in Polymer Science* [online]. 2010, r. 35, č. 12, s. 1420–1481 [cit. 2014-02-08]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2010.07.006. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S0079670010000705>
- [34] BHADRA, S. a kol. Progress in preparation, processing and applications of polyaniline. *Progress in Polymer Science* [online]. 2009, r. 34, č. 8, s. 783–810 [cit. 2014-03-08]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2009.04.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670009000355>

- [35] ROTH, S. a W. GRAUPNER. Conductive polymers: Evaluation of industrial applications. *Synthetic Metals* [online]. 1993, r. 57, č. 1, s. 3623–3631 [cit. 2014-03-08]. DOI: 10.1016/0379-6779(93)90487-H. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/037967799390487H>
- [36] LEE, I.S., M. S. CHO a H. J. CHOI. Preparation of polyaniline coated poly(methyl methacrylate) microsphere by graft polymerization and its electrorheology. *Polymer* [online]. 2005, r. 46, č. 4, s. 1317–1321 [cit. 2014-03-08]. DOI: 10.1016/j.polymer.2004.11.068. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386104011759>
- [37] MUTHUKUMAR, C., S. D. KESARKAR a D. N. SRIVASTAVA. Conductometric mercury [II] sensor based on polyaniline–cryptand-222 hybrid. *Journal of Electroanalytical Chemistry* [online]. 2007, r. 602, č. 2, s. 172–180 [cit. 2014-03-08]. DOI: 10.1016/j.jelechem.2006.12.015. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022072806007066>
- [38] SYED, A. A. a M. K. DINESAN. Polyaniline: Reaction stoichiometry and use as an ion-exchange polymer and acid/base indicator. *Synthetic Metals* [online]. 1990, r. 36, č. 2, s. 209–215 [cit. 2014-03-08]. DOI: 10.1016/0379-6779(90)90053-N. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/037967799090053N>
- [39] PILE, D. L. a A. C. HILLIER. Electrochemically modulated transport through a conducting polymer membrane. *Journal of Membrane Science* [online]. 2002, r. 208, č. 1-2, s. 119–131 [cit. 2014-03-08]. DOI: 10.1016/S0376-7388(02)00204-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738802002041>
- [40] LU, J. a kol. High dielectric constant polyaniline/epoxy composites via in situ polymerization for embedded capacitor applications. *Polymer* [online]. 2007, r. 48, č. 6, s. 1510–1516 [cit. 2014-03-08]. DOI: 10.1016/j.polymer.2007.01.057. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386107000778>
- [41] MCCALL, R. P. a kol. Photoinduced absorption and erasable optical information storage in polyanilines. *Synthetic Metals* [online]. 1991, r. 41, č. 3, s. 1329–1332 [cit. 2014-03-08]. DOI: 10.1016/0379-6779(91)91618-K. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/037967799191618K>
- [42] TSENG, R. J. a kol. Polyaniline Nanofiber/Gold Nanoparticle Nonvolatile Memory. *Nano Letters* [online]. 2005, r. 5, č. 6, s. 1077–1080 [cit. 2014-03-08]. DOI: 10.1021/nl050587l. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl050587l>

- [43] KANETO, K. a kol. “Artificial muscle”: Electromechanical actuators using polyaniline films. *Synthetic Metals* [online]. 1995, r. 71, č. 1–3, s. 2211–2212 [cit. 2014-03-08]. DOI: 10.1016/0379-6779(94)03226-V. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/037967799403226V>
- [44] QIAO, Y. a kol. Carbon nanotube/polyaniline composite as anode material for microbial fuel cells. *Journal of Power Sources* [online]. 2007, r. 170, č. 1, s. 79–84 [cit. 2014-03-08]. DOI: 10.1016/j.jpowsour.2007.03.048. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378775307006349>
- [45] ZHAO, Ch. a kol. A novel all-plastic diode based upon pure polyaniline material. *Microelectronics Journal* [online]. 2007, r. 38, č. 3, s. 316–320 [cit. 2014-03-08]. DOI: 10.1016/j.mejo.2007.01.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002626920700033X>
- [46] CHEN, S.-A. a kol. White-light emission from electroluminescence diode with polyaniline as the emitting layer. *Synthetic Metals* [online]. 1996, r. 82, č. 3, s. 207–210 [cit. 2014-03-08]. DOI: 10.1016/S0379-6779(96)03790-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379677996037903>
- [47] STEJSKAL, J. a I. SAPURINA. Polyaniline: Thin films and colloidal dispersions (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* [online]. 2005, r. 77, č. 5, s. 815–826 [cit. 2014-03-08]. DOI: 10.1351/pac200577050815. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/pac.2005.77.issue-5/pac200577050815/pac200577050815.xml>
- [48] KEDROŇOVÁ, E. Měření kontaktního úhlu sedící kapky jako metoda charakterizace povrchu. In: *Chempoint: Vědci pro průmysl a praxi* [online]. 2012 [cit. 2014-03-23]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/mereni-kontaktneho-uhlu-sedici-kapky-jako-metoda-charakterizace-povrchu>
- [49] BINKAUSKIENE, E., A. LUGAUSKAS a V. BUKAUSKAS. The mycological effect on morphological, electrochemical and redox properties of the polyaniline surface. *Surface and Interface Analysis* [online]. 2013, r. 45, č. 11–12, s. 1792–1798 [cit. 2014-04-18]. DOI: 10.1002/sia.5324. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/sia.5324>

- [50] BINKAUSKIENĖ, E., V. JASULAITIENĖ a A. LUGAUSKAS. Effect of *Aspergillus niger* Tiegh. L-10 on the physical and chemical properties of a polyaniline coating in the growth substrate. *Synthetic Metals* [online]. 2009, r. 159, č. 13, s. 1365–1368 [cit. 2014-04-14]. DOI: 10.1016/j.synthmet.2009.03.011. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379677909001556>
- [51] PRABHAKAR, P. K. a kol. Biocompatibility studies on polyaniline and polyaniline–silver nanoparticle coated polyurethane composite. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2011, r. 86, č. 1, s. 146–153 [cit. 2014-04-18]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.03.033. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776511001809>
- [52] ESTIVILL, D. a kol. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2011, r. 86, č. 2, s. 238–242 [cit. 2014-05-08]. DOI: 10.1016/j.mimet.2011.05.019. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701211002090>
- [53] JIA, Q. a kol. Synergistic antimicrobial effects of polyaniline combined with silver nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2012, r. 125, č. 5, s. 3560–3566 [cit. 2014-04-18]. DOI: 10.1002/app.36257. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.36257>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i> CCM 8155
<i>A. oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i> F 41
AH	Anilin hydrochlorid
APS	Amonium persulfát
B/B	Neurčená kvasinka z nektaru černého bezu
B/Č	Neurčená kvasinka z nektaru černého bezu
<i>C.a.</i> 8215	<i>Candida albicans</i> CCM 8215
<i>C.a.</i> 8275	<i>Candida albicans</i> CCM 8275
<i>C.p.</i> 8260	<i>Candidaparapsilosis</i> CCM 8260
<i>C.p.</i> 8276	<i>Candidaparapsilosis</i> CCM 8276
EPM	Extracelulární polymerní matrice
FeSO <sub>4</sub>	Síran železnatý
FT	Fakulta technologická
<i>G. virens</i>	<i>Gliocladium virens</i> CCM 8042
<i>Ch. globosum</i>	<i>Chaetomium globosum</i> CCM 8156
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Hydrogenfosforečnan draselný
KCl	Chlorid draselný
MEBB	Malt Extract Broth Base
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	Síran hořečnatý heptahydrát
NaNO <sub>3</sub>	Dusičnan sodný
NH <sub>4</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Síran amonný
<i>P. funiculosum</i>	<i>Penicillium funiculosum</i> CCM 8080
<i>P. variotii</i>	<i>Paecilomyces variotii</i> CCM F-398
PANI	Polyanilin
PANI+PU	Polyanilin na polyuretanu

---

PANI+PU+NP	Polyanilin na polyuretanu v kombinaci s nanočásticemi stříbra
PANI-P	Polyanilin upravený plasmou
PE	Polyethylen
PP	Polypropylen
PS	Polystyren
PU	Polyuretan
PVC	Polyvinylchlorid
QS	Quorum sensing
REF	Reference
<i>S. c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SB	Sabouraudův bujónu
SCCM	Standardní kubický centimetr za minutu
<i>T. viridae</i>	<i>Trichoderma viridae</i> F 486
ÚIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
Yeast <sup>1</sup>	Neurčená kvasinka z nektaru černého bezu B/B
Yeast <sup>2</sup>	Neurčená kvasinka z nektaru černého bezu B/Č
$\gamma^{AB}$	Polární část
$\gamma^{LW}$	Disperzní část
$\gamma^{tot}$	Celková povrchová energie

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1. Modely vývoje biofilmu (a) bakterie, (b) kvasinky, (c) plísně [4].....	21
Obrázek 2. Úloha adheze ve vývoji biofilmu <i>C. albicans</i> [15].....	22
Obrázek 3. Různé stavy hmoty [18] .....	26
Obrázek 4. Fáze vzniku plasmy [23] .....	26
Obrázek 5. Schéma znázorňující různé plasmové modifikace [19].....	27
Obrázek 6. Schéma znázorňující různé úpravy plasmou [24] .....	29
Obrázek 7. Náhled průběhu čištění povrchu [25] .....	29
Obrázek 8. Náhled průběhu aktivace povrchu [25] .....	30
Obrázek 9. Náhled průběhu plasmové polymerace povrchu [25] .....	30
Obrázek 10. Srovnání stupně zesíťování [26].....	30
Obrázek 11. Náhled průběhu procesu leptání povrchu [25] .....	31
Obrázek 12. Různé formy polyanilinu, kde emeraldin je základní stabilní forma [32] .....	36
Obrázek 13. Příklad očkování mikrotitrační destičky .....	44

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1. Tvorba biofilmu <i>Candida</i> , získané z krevního řečiště [14]. .....	20
Tabulka 2. Příklady plasmou upravených materiálů a jejich aplikace [18].....	32
Tabulka 3. Přehled využívaných materiálů a požadování tvorby biofilmu [27] .....	33
Tabulka 4. Shrnutí vlastností a využití PANI [34] .....	38
Tabulka 5. Složení MEBB .....	41
Tabulka 6. Složení nekompletního agaru .....	43
Tabulka 7. Výsledky z měření kontaktního úhlu .....	45
Tabulka 8. Míra přerůstání povrchů různými plísněmi v procentech povrchu, při použití kompletního živného agaru MEBB.....	46
Tabulka 9. Míra přerůstání povrchů různými plísněmi v procentech povrchu, při použití nekompletním agaru.....	54
Tabulka 10. Stanovení průkazných rozdílů mezi tvorbou biofilmu na různých povrchích při absorpenci 595 nm. ....	56



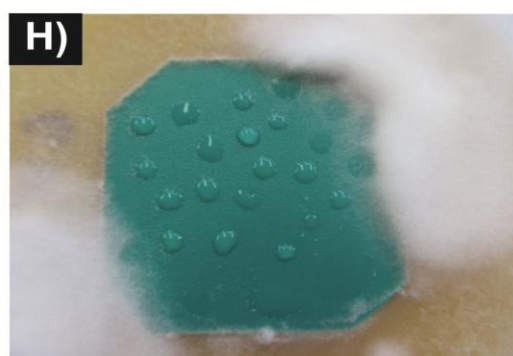
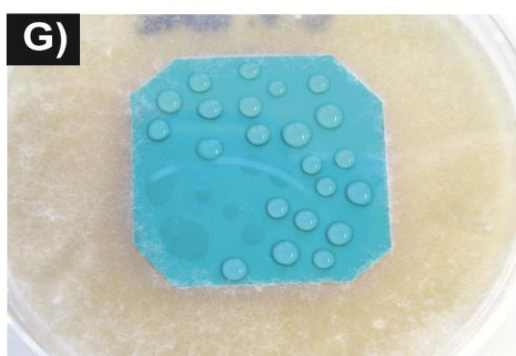
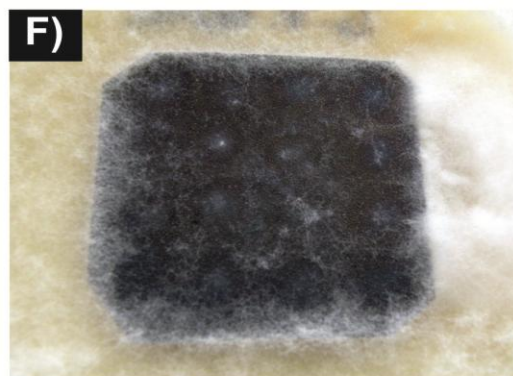
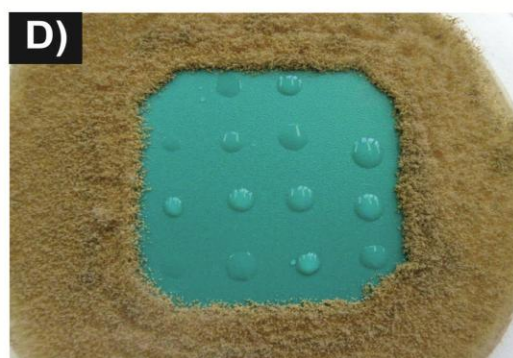
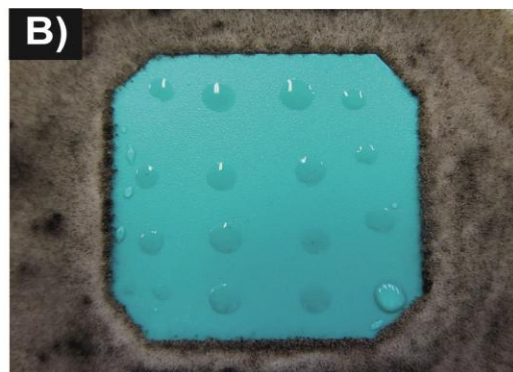
**SEZNAM GRAFŮ**

Graf 1. Přerůstání <i>Aspergillus niger</i> CCM 8155 vyjádřeno v procentech povrchu.....	47
Graf 2. Přerůstání <i>Aspergillus oryzae</i> F 41 vyjádřeno v procentech povrchu .....	48
Graf 3. Přerůstání <i>Gliocladium virens</i> CCM 8042 vyjádřeno v procentech povrchu.....	49
Graf 4. Přerůstání <i>Chaetomium globosum</i> CCM 8156 vyjádřeno v procentech povrchu.....	50
Graf 5. Přerůstání <i>Penicillium funiculosum</i> CCM 8080 vyjádřeno v procentech povrchu.....	51
Graf 6. Přerůstání <i>Paecilomyces variotii</i> CCM F-398 vyjádřeno v procentech povrchu.....	52
Graf 7. Přerůstání <i>Trichoderma viridae</i> F 486 vyjádřeno v procentech povrchu.....	53
Graf 8. Znázornění schopnosti tvorby biofilmu kvasinek .....	58

## SEZNAM PŘÍLOH

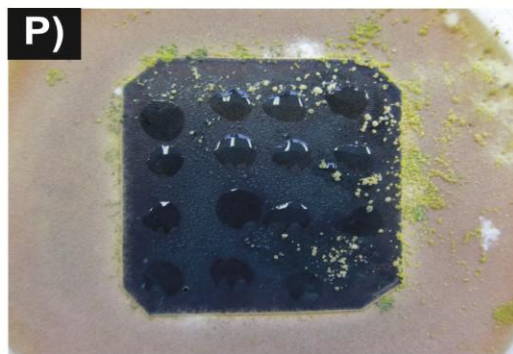
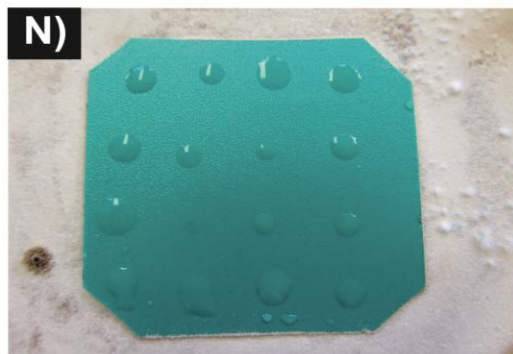
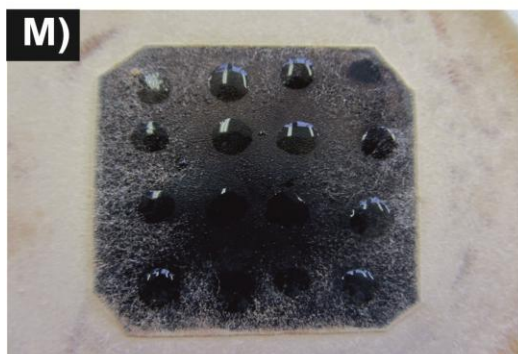
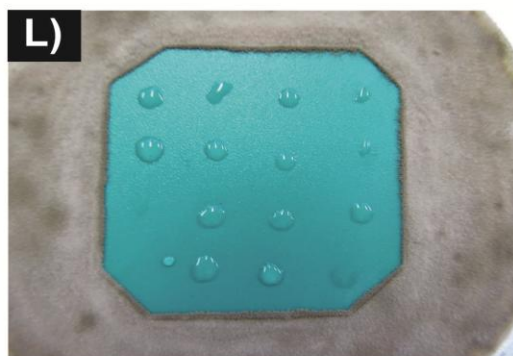
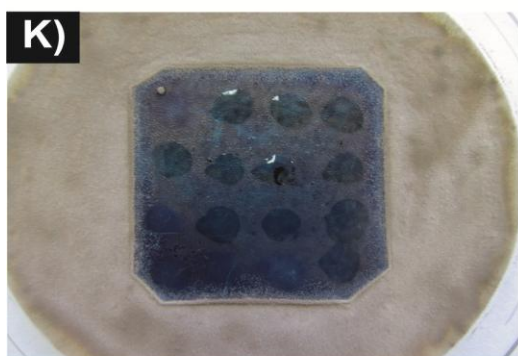
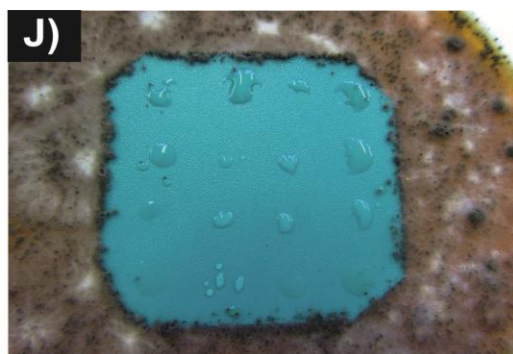
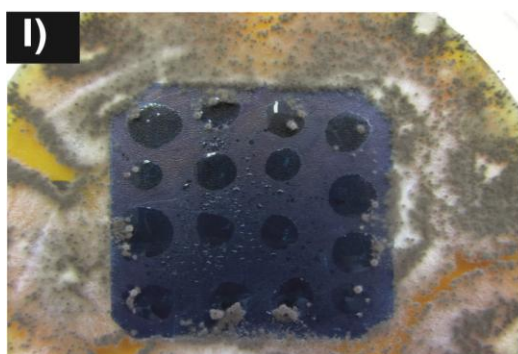
- P I                      Fotografie srovnání přerůstání různých povrchů plísněmi
- P II                      Fotografie srovnání přerůstání různých povrchů plísněmi

**PŘÍLOHA PI: FOTOGRAFIE SROVNÁNÍ PŘERŮSTÁNÍ  
RŮZNÝCH POVRCHŮ PLÍSNĚMI**



Příloha PI zobrazuje rozdíly přerůstání plísní na různých površích. Fotografie A) a B) zobrazuje rozdíly přerůstání *Aspergillus niger* na referenci 6. a 46. den., nárůst byl z 1 % pouze na 5%. Na fotografii C) je *Aspergillus oryzae* na PANI a D) na referenci 46. den, u nichž je rozdíl přerůstání viditelný. Fotografie E) a F) zobrazuje *Gliocladium virens* na PANI-P 6. a 46. den. Zde bylo přerůstání značné, až 90 %. Na fotografiích G) a H) lze vidět *Gliocladium virens* na referenci 6. a 46. den.

**PŘÍLOHA PII: FOTOGRAFIE SROVNÁNÍ PŘERŮSTÁNÍ  
RŮZNÝCH POVRCHŮ PLÍSNĚMI**



Příloha II znázorňuje rozdíly v míře přerůstání plísní na různých površích. *Chaetomium globosum* je zobrazena na fotografii I) na PANI-P a J) na referenci 46. den, kde se hodnoty přerůstání liší téměř o polovinu. *Penicillium funiculosum* je na fotografii K) na PANI-P a L) na referenci 46. den, hodnoty se význačně neliší. *Paecilomyces variotii* je na fotografii M.) na PANI a N.) na referenci 46. den, na PANI přerůstání dosahuje hodnoty 60%, ale na referenci pouhých 0,5 %. *Trichoderma viridae* je zobrazena na PANI na O.) 6. den a na P.) 46. den.