



# Studium morfológie nanovláken a jejich následná modifikace stříbrem pro aplikace v mikrobiologii

## Diplomová práce

*Studijní program:* N3106 – Textilní inženýrství  
*Studijní obor:* 3106T018 – Netkané a nanovláčenné materiály  
*Autor práce:* **Bc. Kristýna Hozdová**  
*Vedoucí práce:* Ing. Petr Mikeš, Ph.D.





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC  
Faculty of Textile Engineering



# Study of nanofibrous morphology and its subsequent silver modification for microbiology applications

Master thesis

*Study programme:* N3106 – Textile Engineering  
*Study branch:* 3106T018 – Nonwoven and Nanomaterials  
*Author:* **Bc. Kristýna Hozdová**  
*Supervisor:* Ing. Petr Mikeš, Ph.D.





## Zadání diplomové práce

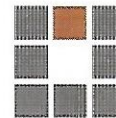
# Studium morfologie nanovláken a jejich následná modifikace stříbrem pro aplikace v mikrobiologii

*Jméno a příjmení:* **Bc. Kristýna Hozdová**  
*Osobní číslo:* T17000045  
*Studijní program:* N3106 Textilní inženýrství  
*Studijní obor:* Netkané a nanovláčenné materiály  
*Zadávající katedra:* Katedra netkaných textilií a nanovláčenných materiálů  
*Akademický rok:* **2017/2018**

### Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte rešerši na dané téma.
2. Navrhněte polymer a jeho následnou modifikaci pro přípravu nanovláčenných membrán určených pro testy na průchodnost bakterií.
3. Připravte nanovláčenné vrstvy definované v bodě č. 2 a navrhněte způsob mikrobiálního testování.
4. Vyhodnoťte výsledky vlivu navržených parametrů na průchodnost bakterií.

Rozsah grafických prací: dle potřeby dokumentace  
Rozsah pracovní zprávy: 30-40 dle potřeby  
Forma zpracování práce: tištěná/elektronická



### Seznam odborné literatury:

1. BARTOVSKÁ L., ŠÍŠKOVÁ M.: Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav. Praha: VŠCHT Praha, 2005. ISBN 80-7080-579-X.
2. ŠŇUPÁLEK J.: Úvod do makromolekulární chemie, učební text. Univerzita Pardubice, Pardubice 2003
3. KVÍTEK L., PANÁČEK A.: Základy koloidní chemie. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. 70.

Vedoucí práce: Ing. Petr Mikeš, Ph.D.  
Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů  
Datum zadání práce: 20. února 2018  
Předpokládaný termín odevzdání: 18. dubna 2019

  
Ing. Jana Drašarová, Ph.D.  
děkanka

V Liberci 20. února 2018



  
Ing. Jiří Chvojka, Ph.D.  
vedoucí katedry

## Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Diplomovou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé diplomové práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že texty tištěné verze práce a elektronické verze práce vložené do IS STAG se shodují.

15. 4. 2019

Bc. Kristýna Hozdová

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Ing. Petru Mikešovi Ph.D, za pomoc, ochotu a trpělivost při zpracování této práce. Mé poděkování patří také Mgr. Lukášovi Plíštilovi za pomoc a spolupráci při získávání výsledů a umožnění přípravě membrán ve společnosti Elmarco s.r.o., dále mnohokrát děkuji Ing. Barboře Koprivové za pomoc při různých testech a dokončovacích pracích. Velké díky patří Ing. Simoně Lencové za velmi příjemnou spolupráci na vyhodnocení mikrobiálních testů a také Ing. Věře Jenčové Ph.D. za domluvení této spolupráce s VŠCHT.

## ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit membránu z nanovláken pomocí elektrostatického zvlákňování, která by měla antimikrobiální schopnosti. Nejprve byl zvolen čistý polymer polyamid 6 pro jeho uniformitu vláken, u kterého byla zkoumána morfologie a vliv této morfologie pro průchodnost bakterií. Původním předpokladem bylo, že bakterie, které mají větší rozměry než póry v nanovlákněné membráně, touto membránou neprojdou. Vzhledem k tomu, že tato myšlenka nebyla potvrzena a bakterie membránou prošly, ikdyž jejich koncentrace ve filtrátu byla o jeden až tři řády nižší, byla navržena nová nanovlákněná membrána modifikovaná dusičnanem stříbrným pro zlepšení antimikrobiálního účinku. Připravené nanovlákněné membrány byly analyzovány na průměr vláken, prodyšnost, velikost pórů a tloušťku. Byly také provedeny testy na velikost nanočástic, mikrobiologické testy, EDX analýza pro ověření přítomnosti stříbra a také emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem pro zjištění množství stříbra v připravených membránách. Připravené membrány s dusičnanem stříbrným neprokázaly velkou účinnost při filtracích, ale prokázaly antimikrobiální aktivitu v tekutém médiu a na ztuženém médiu, kdy byly vytvořeny zóny inhibice.

**Klíčová slova:** nanovlákná, nanočástice, antimikrobiální aktivita, stříbro, dusičnan stříbrný.

## **ABSTRACT**

The aim of this thesis was to develop nanofibers membranes possessing antimicrobial properties. Polyamide 6 was chosen for its uniform fiber morphology. The effect of this morphology was examined for the penetration of bacteria. The original assumption was that bacteria that have larger dimensions than the pores in the nanofiber membrane will not pass through this membrane. Since this idea was not confirmed, although their concentration in the filtrate was one to three orders of magnitude lower, a new silver nitrate modified nanofiber membrane was designed to improve the antimicrobial effect. The prepared membranes were analyzed for breathability, nanoparticle size, pore size, microbiological tests, EDX analysis to verify the presence of silver, and inductively coupled plasma emission spectrometry to determine the amount of silver in the prepared membranes. The antimicrobial activity of nanofiber membranes with silver nitrate was demonstrated in the liquid phase on the agar growth medium, when zones of inhibition were created.

**Key words:** nanofibers, nanoparticles, antimicrobial activity, silver, silver nitrate.



## **OBSAH:**

<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>13</b>
<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>13</b>
<b>2. POLYAMIDOVÉ MEMBRÁNY .....</b>	<b>14</b>
<b>3. NANOVLÁKENNÉ VRSTVY S OBSAHEM STŘÍBRA .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1. Redukce dusičnanu stříbrného v kyselině mravenčí .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2. Dusičnan stříbrný v systému s polyamidem 6 .....</b>	<b>18</b>
<b>4. DISPERZNÍ SYSTÉMY .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1. Analytické disperze .....</b>	<b>20</b>
<b>4.2. Koloidní disperze .....</b>	<b>20</b>
<b>4.3. Hrubé disperze .....</b>	<b>21</b>
<b>5. SYNTÉZA KOLOIDNÍCH ČÁSTIC A NANOČÁSTIC STŘÍBRA .....</b>	<b>22</b>
<b>5.1. Nanočástice stříbra .....</b>	<b>22</b>
<b>5.2. Syntéza koloidních částic .....</b>	<b>22</b>
5.2.1. Dispergační metody .....	23
5.2.2. Kondenzační metody .....	23
5.2.3. Zelená syntéza a biosyntéza .....	25
<b>6. AKTIVITA NANOČÁSTIC STŘÍBRA A JEJICH VLIV NA BAKTERIE .....</b>	<b>26</b>
<b>6.1. Rozdělení bakterií podle odlišností buněčné stěny .....</b>	<b>26</b>
<b>6.2. Aktivita nanočástic ve vztahu k bakteriím .....</b>	<b>28</b>
<b>7. VEDLEJŠÍ ÚČINKY A TOXICITA NANOČÁSTIC STŘÍBRA .....</b>	<b>31</b>
<b>8. KOMBINACE STŘÍBRA S ANTIBIOTIKY .....</b>	<b>34</b>
<b>9. MECHANISMUS PUSOBENÍ STŘÍBRA NA ŽIVÉ ORGANISMY .....</b>	<b>37</b>

<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>40</b>
<b>10. VLV MORFOLOGIE POLYAMIDU A TESTY NA PRŮCHODNOST BAKTERIÍ.....</b>	<b>41</b>
10.1. Příprava roztoků:.....	41
10.2. Zvlákňování – parametry:.....	42
10.3. Charakterizace připravených vrstev .....	42
10.4. Průchodnost bakterií a antimikrobiální aktivita nanomateriálů.....	44
<b>11. POLYAMID 6 S DUSIČNANEM STRÍBRNÝM A TESTY NA ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINNOST .....</b>	<b>49</b>
11.1. Příprava roztoků.....	49
11.2. Zvlákňování – parametry:.....	50
11.3. Vlastnosti membrány: .....	50
11.4. Testování vlivu stříbra na antimikrobiální aktivitu .....	52
<b>12. STABILITA ROZTOKŮ – VLV REDUKCE DUSIČNANU STRÍBRNÉHO NA ZVLÁKŇOVÁNÍ.....</b>	<b>56</b>
12.1. Vliv stárnutí nejkonzentrovanejšího roztoku .....	59
12.2. Parametry zvlákňování:.....	61
<b>13. KONEČNÉ TESTY POLYAMIDU 6 S ANTIMIKROBIÁLNÍMI ČINIDLY A TESTY NA ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINNOST .....</b>	<b>63</b>
13.1. Příprava roztoků.....	63
13.2. Vlastnosti připravených roztoků .....	63
13.3. Parametry zvlákňování a vlastnosti nanovlákněné membrány .....	65
13.4. Velikost částic.....	67
13.5. Koncentrace stříbra v jednotlivých nano-vlákněných membránách.....	69
13.6. Analýza propustnosti a antimikrobiálních vlastností PA6 s dusičnanem stříbrným (redukované stříbro).....	70
<b>14. ZÁVĚR.....</b>	<b>74</b>
<b>15. SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK .....</b>	<b>76</b>
<b>16. SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ .....</b>	<b>77</b>
<b>17. BIBLIOGRAFIE.....</b>	<b>78</b>
<b>18. PŘÍLOHY.....</b>	<b>85</b>

## SEZNAM ZKRATEK:

TUL	Technická univerzita v Liberci
T <sub>g</sub>	Teplota skelného přechodu
Ag	Stříbro
PA6	Polyamid 6
Ag/PA6	Systém stříbra a polyamidu 6
AgNP	Nanočástice stříbra
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
G <sup>+</sup>	Grampozitivní bakterie
G <sup>-</sup>	Gramnegativní bakterie
BS	Buněčná stěna
AK	Aminokyseliny
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
LPS	Lipopolysacharidy
LC <sub>50</sub>	Koncentrace potřebná k usmrcení 50 % mikroorganismů
ER	Endoplazmatické reticulum
ROS	Reaktivní formy kyslíku
ATP	Adenosintrifosfát
PCD	Programovaná smrt buňky
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
RNA	Ribonukleová kyselina
RPM	Revolution per minutes – otáčky za minutu
p.a.	Čistota chemických látek = pro analýzu
RH	Relative humidity – relativní vlhkost
VŠCHT	Vysoká škola chemicko-technická v Praze
SEM	Skenovací (rastrovací) elektronový mikroskop
EDX	Energiově disperzní spektroskopie

OD	Optická denzita
KTJ	Kolonie tvořící jednotky
MO	Mikroorganismus
EC	<i>Escherichia coli</i>
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SE	<i>Staphylococcus epidermis</i>
BS	<i>Bacillus subtilis</i>
CAN	<i>Candida albicans</i>
McF	McFarland
TBX	Tryptonový agar
SDA	Sabouraud dextrose agar - Sabouradův agar
PCA	Plate count agar
$\sigma$	Směrodatná odchylka
$\bar{x}$	Střední hodnota
ICP-OES	Inductively coupled plasma optical emission spectrometry, neboli emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
TBX	Tryptone Bille X-glucuronide agar - Tryptonový agar
PPV	Pufrovaná peptonová voda
MEB	Malt extract broth – sladový extrakt
DLS	Dynamický rozptyl světla

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1. ÚVOD

Jedním z velice často diskutovaných témat současnosti jsou nanotechnologie a jejich využití pro zlepšení životních podmínek, například využití ve zdravotnictví, potravinářství nebo pro zlepšení ekologie a další. Mezi technologie přípravy nanovláken můžeme zařadit Nanospider<sup>TM</sup> pracující na principu elektrostatického zvlákňování. Tato technologie výroby nanovláken začala poutat pozornost hlavně kvůli schopnosti kontrolovaně produkovat vlákna o určitých parametrech.

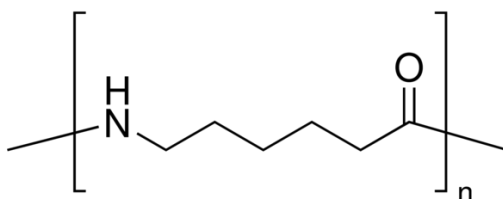
Z pohledu využití nanovláken ve zdravotnictví je jejich velkou výhodou průměr vláken, který je řádově menší než velikost samotných bakterií, kvasinek či plísní. Doposud byly zkoumány různé principy modifikací a účinných složek, které zahrnují širokou škálu jak anorganických, tak i organických bioaktivních sloučenin účinných v nanovlákněch. Snahou je rozvíjet tento multi-oborový výzkum dalším vývojem nových a účinných materiálů na bázi nanovláken a zkoumat nebo vylepšovat jejich účinky přidáním dalších činidel vhodných pro dané použití. Cílem této diplomové práce je prozkoumat morfologie a chování polymeru polyamidu 6 ve styku s mikroorganismy a modifikace tohoto polymeru vhodným antimikrobiálním činidlem pro inhibici či potlačení růstu mikroorganismů.

Připravené membrány by pak mohly být použity ve zdravotnictví, například jako součást obvazových materiálů, jelikož je koloidní stříbro vhodné pro hojení ran, lze ho přikládat na popáleniny, omrzliny, proleženiny či jinak poškozenou kůži. Díky antimikrobiálnímu účinku inhibuje bakterie, čímž brání ránu před mokváním a tím tedy urychluje regeneraci tkáně.

## 2. POLYAMIDOVÉ MEMBRÁNY

Polyamidy obecně patří mezi tzv. konstrukční plasty, používané velice často k výrobě namáhaných technických součástí. Vynikají vysokou mechanickou pevností při statickém a dynamickém namáhání, nízkým tečením i při dlouhodobém zatížení a použitelností v širokém rozsahu teplot. V současnosti se využívá řada základních druhů polyamidů. Základními vlastnostmi se podobají, liší se svým chemickým složením a způsobem výroby. Označují se čísly charakterizující počet atomů uhlíku výchozích sloučenin [1].

Nejvýznamnější a nejrozšířenější jsou polyamidy s alifatickými řetězci. Polyamidy jsou lineární polymery obsahující amidové skupiny [2]. Monomerní jednotky polyamidů jsou mezi sebou spojeny peptidickými vazbami. Polyamid 6 (jinak také nylon 6), jenž je zobrazen na Obrázek 1, se používá například pro výrobu chirurgických nití, obalových materiálů v lékařství, nebo z něho také mohou být vyrobeny umělé šlachy [3]. V této práci je polyamid 6 využit jako nanovláknenná membrána, u které byla zkoumána morfologie a její vliv na průchod bakterií a následně jako nanovláknenná membrána, do které byly zakorporovány nanočástice stříbra.



Obrázek 1: Strukturální vzorec polyamidu 6

Při elektrostatickém zvlákňování tohoto polymeru hraje velkou roli relativní vlhkost. Při vyšší vlhkosti jsou generována vlákna s menšími průměry a frakce méně stabilních krystalů ve směsi se zmenšuje. Toto zmenšování je způsobeno absorpcí vody, která působí jako změkčovadlo.

Tím dochází ke snížení teploty skelného přechodu ( $T_g$ ) polyamidu [4]. Průměry vláken jsou také samozřejmě ovlivněny použitou koncentrací roztoku nebo vzdáleností při zvlákňování.

Tento polymer byl zvolen, protože můžeme řídit jeho morfologii změnou různých parametrů a hlavně kvůli uniformitě jeho vláken.

### 3. NANOVLÁKENNÉ VRSTVY S OBSAHEM STRÍBRA

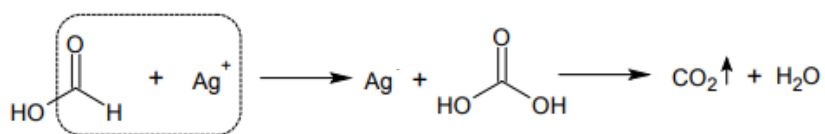
Na trhu se objevuje nesčetné množství obvazů na rány, ale žádný z nich není schopen napodobit všechny nativní rysy kůže. Až v poslední době přicházejí na trh obvazy ve formě hydrokoloidů, hydrogelů, mikro nebo nano vláken, které jsou schopny poskytnout ochranu před vnějšími chemickými a fyzikálními vlivy a hlavně před mikroorganismy. Také jsou schopny podporovat proces hojení, buněčnou adhezi, diferenciaci a proliferaci. Tato práce je zaměřena na nanovlákené membrány připravené pomocí elektrospinningu, které díky svým vlastnostem jako je vysoký poměr plochy povrchu k objemu, porozita a strukturní podobnost s extracelulární matricí kůže byly považovány za vysoce slibné pro aplikace obvazů na rány. Mimo jiné mohou být do vláken zakomponovány další látky, jako jsou růstové faktory, vitamíny, léčiva, čímž dochází rovnou i k léčení rány nebo pouze antimikrobiální látky, které chrání ránu proti mikroorganismům [5].

Antimikrobiální vlastnosti nanovláken lze zajistit přidáním různých antimikrobiálních činidel do vhodného polymeru a vytvoření různých systémů. Velmi populární je chitosan s nanočásticemi stříbra v polyvinylalkoholu [6], polyvinylidenfluoridu s obsahem stříbra pro bakteriální filtraci [7], také Ag/PA6 například při čištění vody [8] či jako filtrační membrány [9]. Takovýchto systémů už byla vyzkoušena nesčetná množství pro různé aplikace. Pro tkáňové inženýrství je vhodné volit systémy s biodegradabilními polymery, aby se vlákna časem sama rozložila a například u obvazů nepotrhlala při sundávání vytvořený strup. Polyamid v této práci byl zvolen pouze jako modelový polymer pro případné další výzkumy a zejména proto, že vytváří uniformní vlákna s malými průměry.

Tato práce se zabývá nanovláknou polyamidu 6 s nanočásticemi stříbra, které vznikly jako prekurzor z dusičnanu stříbrného díky probíhající redukci.



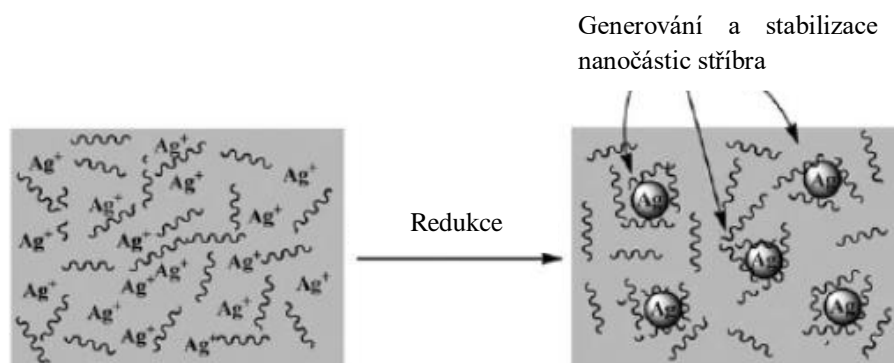
### 3.1. Redukce dusičnanu stříbrného v kyselině mravenčí



Rovnice 1: Redukce dusičnanu stříbrného v kyselině mravenčí [10]

Po přidání dusičnanu stříbrného ( $\text{AgNO}_3$ ) do roztoku kyseliny mravenčí dochází vlivem přítomné karboxylové skupiny k redukci stříbrného iontu na kovové stříbro. Současně probíhá oxidace kyseliny mravenčí na kyselinu uhličitou, která se díky své nestabilitě rozkládá na oxid uhličitý a vodu. Přítomné molekuly polyamidu 6 snižují povrchové napětí vznikajícího kovového stříbra a zabraňují tak další agregaci a tvorbě klastrů. Polyamid 6 (PA6) tedy slouží jako stabilizátor [3; 10].

Molekuly polyamidu jsou navázány na stříbrné nanočástice, a tím vytvářejí vrstvu, která zvyšuje povrchovou aktivitu částic, jak je možné vidět na Obrázek 2.

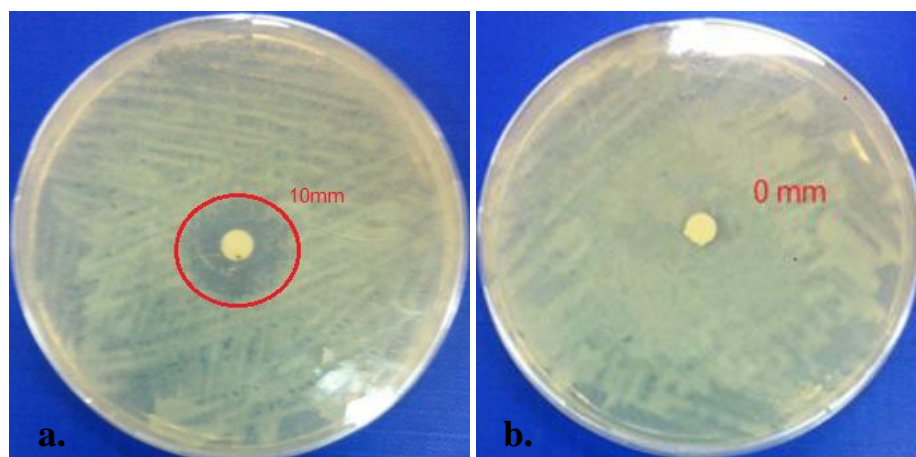


Obrázek 2: Generování a stabilizace nanočástic stříbra z dusičnanu stříbrného [10]

### 3.2. Dusičnan stříbrný v systému s polyamidem 6

Polyamid 6 tvoří spolu se stříbrem antibakteriální systém, který je schopen postupně uvolňovat stříbrné ionty. Antibakteriální nanovláčna PA6/AgNO<sub>3</sub> mohou vzniknout elektrospiningem a to tak, že do klasického polymerního roztoku polyamidu 6, který se rozpouští v kyselině mravenčí o koncentraci 25 hm%, se přidá dusičnan stříbrný a následně se zvlákní [3]. I po té co nanovláčna obsahovala navíc AgNO<sub>3</sub>, byly zachovány jejich průměry vláken 247 nm [3]. Studie Parka a kol. ukázala, že vlákna jsou rovná a že nanočástice stříbra jsou distribuovány ve vláknech [11]. Elektrospining je zde výhodný z důvodu nízkých nákladů a možné průmyslové výroby [3].

Dle mikrobiální studie převzaté od Jabur a kol. [3], bylo zjištěno, že v systému s PA6/AgNO<sub>3</sub> vznikla inhibiční zóna 10 mm na Obrázek 3a, která poukazuje na inhibici bakterie *E. Coli*, a jak je vidět na Obrázek 3b – u samotného polyamidu tato zóna chyběla [10; 3]. To vychází i ze studie Parka a kol. [11], kde byly testy provedeny u bakterií *Staphylococcus aureus* a *Klebsiella pneumoniae*.



Obrázek 3a: Polyamid 6/ AgNO<sub>3</sub>, kde se vytvořila viditelná inhibiční zóna díky přidanému antimikrobiálnímu činidlu AgNO<sub>3</sub>; 3b: Čistý polyamid 6 bez antimikrobiálního činidla, kde nevznikla žádná zóna inhibice [3]

Z testů, které byly sepsány Jaburem a kol. [3] vyplývá, že povrchové napětí, elektrická vodivost a viskozita rostou s vyšší koncentrací  $\text{AgNO}_3$ , se kterou se také zvětšují i průměry vláken a to z 139 nm, kdy byl použit pouze čistý polyamid až na 247 nm při přidání 1,2%hm.  $\text{AgNO}_3$ . Ve studii Sancak a kol. [12] měla vlákna od 174 nm do 238 nm, ale to vše závisí na zvolených okolních podmínkách, což relativně potvrzují i výsledky této práce.

Byly také provedeny mechanické zkoušky, aby se prozkoumaly vlastnosti tahu a prodloužení membrán a bylo zjištěno, že zvýšené množství nanočástic stříbra (AgNPs) ve směsích snížilo mechanické vlastnosti membrán [12].

## 4. DISPERZNÍ SYSTÉMY

Disperzní systém tvoří také dusičnan stříbrný v polymerním roztoku polyamidu, který je obsahem této diplomové práce, proto jsou zde zmíněny disperzní soustavy, které lze třídit podle různých kritérií, jako je velikost či tvar částic, nebo podle skupenství disperzního prostředí a disperzní fáze. Velikost částic disperzní soustavy je vyjádřena tzv. stupněm disperzity, což je převrácená hodnota lineárního rozměru částice. Je-li tedy disperzní fáze rozptýlena jemněji, říkáme, že má vyšší stupeň disperzity.

Monodisperzní soustavy obsahují částice se stejnou velikostí, na rozdíl od polydisperzních, kde se velikost částic liší.

Podle velikosti dispergovaných částic lze soustavy dělit na disperze analytické, koloidní a hrubé [13].

### 4.1. Analytické disperze

Tyto částice o velikosti  $d < 10^{-9}$  m, nejsou viditelné ani v elektronovém mikroskopu, procházejí filtračním papírem i membránami, vykonávají velmi intenzivní tepelný pohyb, rychle difundují, nesedimentují ani v ultracentrifuze a vyvolávají velký osmotický tlak. Analytické disperze jsou monomolekulární a vznikají samovolným rozpouštěním na pravé roztoky nízkomolekulárních látek. Jsou stále, tvoří pouze jednu fázi, jsou vždy homogenní a nevytváří gel [14], vykazují však vysokou difúzi a osmózu [13].

### 4.2. Koloidní disperze

Jedná se o pravé roztoky látek vysokomolekulárních i nano či mikrodisperze dalších látek o velikosti v rozmezí  $10^{-9} < d < 10^{-6}$  m. Koloidní disperze nejsou viditelné v optickém mikroskopu,

ale v ultramikroskopu a elektronovém mikroskopu ano. Částice mohou být průhledné či výrazně barevné a v bočním osvětlení opaleskují (Tyndallův efekt; rozptyl světla). Intenzita tepelného pohybu roste se stupněm disperzity, tudíž je oproti analytickým disperzím slabší. Pomalu difundují, sedimentují pomalu a vyvolávají malý osmotický tlak, který naopak roste se stupněm disperzity, jelikož roste počet částic. Pro koloidní disperze je charakteristická tvorba gelů [14]. Jsou termodynamicky stále i nestálé, filtrovatelné přes ultrafiltry [13].

Stříbrné částice v této formě se zdají být silnou, antibakteriální terapií proti infekcím, proto byly vybrány jako antimikrobiální činidlo při přípravě nanovlákných membrán v této práci [15; 16].

### **4.3. Hrubé disperze**

Tyto makroheterogenní soustavy jsou viditelné pouhým okem nebo v optickém mikroskopu. Lze je dále rozdělit na mikro-hrubé disperze o velikosti mezi  $10^{-6} < d < 10^{-5}$  m a makro-hrubé disperze o velikosti  $d > 10^{-5}$  m. Neprocházejí papírem ani membránami, jsou neprůhledné a tvoří zákal. Vykonnávají velmi slabý nebo žádný tepelný pohyb, nedifundují, rychle sedimentují a nevyvolávají osmotický tlak. Částice jsou polymolekulární, vznikají z makrofází dispergováním nebo z pravých roztoků srážením na částice požadované velikosti. Hrubé disperze jsou nestálé, samovolně zanikají díky sedimentaci a koaguaci, jsou vždy heterogenní, velikost plochy fázového rozhraní je menší než u koloidních systémů. Gely vytvářejí pouze výjimečně [13; 14].

# 5. SYNTÉZA KOLOIDNÍCH ČÁSTIC A NANOČÁSTIC STŘÍBRA

Tato kapitola se věnuje nanočásticím stříbra, jejich vlastnostem, využitím a jejich syntéze.

## 5.1. Nanočástice stříbra

Typické rozměry pro nanočástice jsou v rozmezí od 1 nm do 100 nm [17; 18]. Nanočástice stříbra jsou velmi využívány ve zdravotnictví, při skladování potravin, také v oblasti životního prostředí nebo v biomedicínských aplikacích, kde jsou velmi významné pro své antibakteriální, antifungální, antivirové, protizánětlivé, protirakovinné a antiangiogenní vlastnosti [19]. Kromě toho, že má stříbro baktericidní a antimikrobiální schopnosti proti širokému spektru bakterií, má i tendenci indukovat nízkou bakteriální rezistenci a má nízkou toxicitu a minimum vedlejších účinků, proto byla snaha v této práci využít těchto vlastností a připravit antimikrobiální membránu. Baktericidní účinnost nanočástic stříbra proti bakteriím může být využita v impregnačních technikách, při uchovávání potravin, dezinfekci zdravotnických potřeb a vybavení, nebo při dekontaminaci povrchů předmětů [20].

## 5.2. Syntéza koloidních částic

Syntéza nanočástic může být provedena pomocí mnoha metod, které lze rozdělit dle principu (fyzikální, chemické a biologické) nebo typu (dispergační a kondenzační). I v mé práci je využita redukce dusičnanu stříbrného, protože dusičnan stříbrný se používá již po desetiletí a je velice důležitý pro hojení ran, protože při správné koncentraci zabije širokou škálu mikrobů a sníží bakteriální zátěž. Bakterie, o nichž je pojednáno v kapitole 6, odolávají čím dál více antibiotikům, takže je důležité najít jiné prostředky pro jejich účinnou inaktivaci [21; 22].

## 5.2.1. Dispergační metody

Pomocí těchto metod lze připravit částice koloidních rozměrů z látky makroskopických rozměrů pomocí mechanických či fyzikálně-chemických postupů, při této přípravě je nutné vynaložit práci [13].

Při fyzikálních postupech přípravy je to mechanická práce, kdy se využívají buď mlýny, nebo ultrazvuk, přičemž vznikají trhliny a dochází k rozpadu. Tohoto způsobu se využívá pouze, když dispergovaná látka má malou pevnost [13; 14].

Mezi dispergační metody řadíme například rozprašování látky v elektrickém oblouku, peptizaci a laserovou ablací. Spojením dispergačních a kondenzačních metod je využití elektrického proudu a laserového paprsku [13; 14].

Výhodami fyzikálních metod jsou rychlost a především žádné nebezpečné chemické látky. Nevýhodami jsou nízké výnosy a vysoká spotřeba energie, kontaminace rozpouštědly a nedostatek rovnoměrného rozdělení [19].

## 5.2.2. Kondenzační metody

Při využití těchto metod se snažíme z analyticky disperzních soustav připravit soustavy koloidní, kdy se vhodným zásahem do původně homogenní soustavy iniciuje vznik zárodků částic nové fáze, které postupně rostou do koloidních rozměrů [13; 23]. Kondenzace lze dosáhnout buď fyzikálními metodami nebo chemickými reakcemi [13].

Fyzikální kondenzační metody: jsou založeny na změně rozpustnosti látek. Změnou rozpouštědla, v němž má daná látka nízkou rozpustnost, lze vyvolat kondenzaci látky za vzniku koloidních částic [13].

Chemické kondenzační metody: využitím této metody můžeme získat disperzní systém z téměř všech typů chemických reakcí (srážecích,

redukčních, oxidačních, hydrolytických nebo výměnných) [14]. Nevýhodou je, že se během syntézy vyloučí příliš mnoho toxických a nebezpečných vedlejších produktů, částice nemají očekávanou čistotu [19].

Mezi chemickými metodami je nejrozšířenější příprava koloidních disperzí nanočástic stříbra chemickou redukcí [24; 25], kde například ve studii Xuan H.V. a kol. [26], byly nanočástice syntetizovány redukcí dusičnanu stříbrného za použití borohydridu sodného a škrobu, jako stabilizačního činidla, čímž vznikly nanočástice o velikosti  $8 \pm 4$  nm, které byly dispergované ve vodě. Tyto nanočástice vykazovaly silné antibakteriální účinky proti grampozitivní ( $G^+$ ) bakteriím *Escherichia coli* a gramnegativní ( $G^-$ ) *Staphylococcus aureus*. Průměrné zóny inhibice AgNPs byly 7,7 mm u bakterií *E. coli* a 7,0 mm u *S. aureus* [26].

### **5.2.2.1. Koncentrace a toxicita dusičnanu stříbrného**

Nejprve se využíval 10% roztok dusičnanu stříbrného, který byl však toxický kvůli vysoké koncentraci. Tento roztok byl nahrazen 0,5 % roztokem, který nepoškozuje epitel, působí bakteriostaticky pro některé bakterie (např.: *S.aureus*, *E.coli* či *P.aeruginosa*) a je netoxický [27]. Použití správné koncentrace dusičnanu stříbrného je velmi důležité. Při vysoké koncentraci zabíjí bakterie – indukuje u nich buněčnou smrt, a při nižších koncentracích (jako například 1 mM dusičnan stříbrný) indukuje syntézu nanočástic stříbra. Během této syntézy zůstaly bakterie naživu a po odstranění stříbra z jejich prostředí se obnovil jejich růst. Během působení 5 mM roztoku dusičnanu stříbrného na bakterie byla pozorována produkce kataláz, tvorba apoptotického těla a fragmentace DNA [28]. Přítomnost rozpuštěného dusičnanu stříbrného může zvýšit vodivost rozpouštědla [29].



K produkci stříbrných nanočástic lze využít i metody elektrolytické redukce [30], ale stále rostoucí význam začínají mít metody „zelené“ syntézy a biosyntézy nanočástic [31].

### **5.2.3. Zelená syntéza a biosyntéza**

V poslední době se zelená syntéza objevuje jako nový způsob syntézy pro výrobu koloidních AgNPs s kontrolovanou velikostí, vysokou stabilitou a zlepšenou antibakteriální aktivitou [15; 19; 32]. Existují již ověřené přípravy nanočástic stříbra a výsledkem je zjištění antibakteriálních vlastností takto připravených nanočástic. Jedná se o přípravu z rostlin, mikroskopických hub, nebo i přímo z mikroorganismů [33; 34]. Při jejich výrobě se nepoužívají žádné toxické látky, tudíž jsou šetrné k životnímu prostředí [19; 31], navíc jsou metody přípravy jednoduché, nákladově efektivní, spolehlivé a poskytují vysoké výtěžky AgNPs [19; 32].

Ve studii Sriram a kol. [35], pozorují účinnost biologicky syntetizovaných nanočástic stříbra v připraveném nanomateriálu jako protinádorového činidla pomocí buněčných linií Daltonova lymfomového ascitu *in vitro* a *in vivo*. Ve výsledku potvrzují protinádorové vlastnosti AgNPs a naznačují, že mohou být nákladově efektivní alternativou při léčení rakoviny a poruch souvisejících s angiogenezí.

## 6. AKTIVITA NANOČÁSTIC STŘÍBRA A JEJICH VLIV NA BAKTERIE

Tato kapitola rozděluje jednotlivé druhy bakterií do skupin grampozitivních a gramnegativních, které se navzájem odlišují svoji buněčnou stěnou.

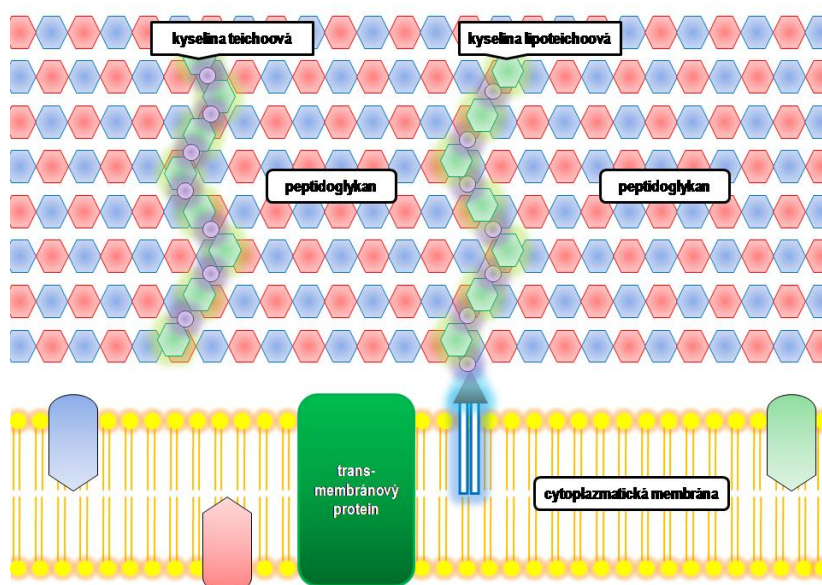
### 6.1. Rozdělení bakterií podle odlišností buněčné stěny

V průběhu evoluce se bakterie rozrůznily jak ve způsobu života, tak svojí morfologií. Velikost bakterií je velmi rozsáhlá, a to už od 2  $\mu\text{m}$  do 0,75 mm. Vlastnosti bakterií jsou přizpůsobené prostředí, ve kterém žijí. Některé žijí až při 113  $^{\circ}\text{C}$ , jiné naopak tolerují i 0  $^{\circ}\text{C}$ , a tak je to i s pH či tlakem [36].

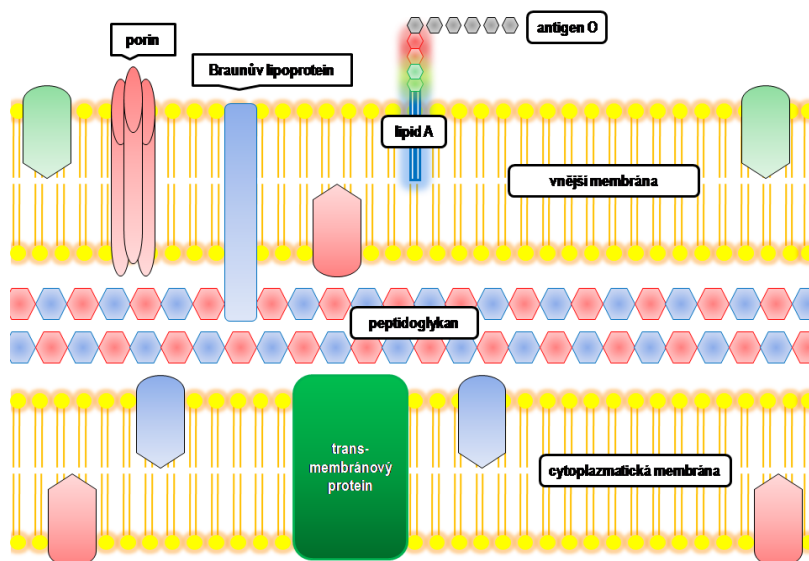
Morfologie bakterií se studuje pomocí mikroskopických metod, kdy je využíváno mnoho technik barvení pro získání určitých charakteristik. Nejvyužívanější je Gramovo barvení, které vypovídá o tvaru a především charakteru bakterie. Právě díky této metodě, jsou bakterie systematicky rozděleny na grampozitivní ( $G^+$ ) a gramnegativní bakterie ( $G^-$ ), které se od sebe liší strukturou a vlastnostmi včetně mechanismu infekce [36]. K barvení buněčné stěny (BS) se využívají anilínová barviva, krystalová violet' a safranin [37].

Fialová barva je typická pro  $G^+$  bakterie, které mají tlustou buněčnou stěnu asi 20 nm, [38] složenou z deseti či méně aminokyselin (AK) a neobsahují aromatické či sirné AK, naopak převažuje silná vrstva peptidoglykanu, ve které se barvivo drží [37] a skrze ni až na povrch pronikají lineární řetězce teichoových kyselin, což je možné vidět na obrázku 4a. Buněčná stěna většiny  $G^+$  bakterií neobsahuje lipidy ani bílkoviny [38].

Červeně se barví  $G^-$  bakterie, které mají tenčí buněčnou stěnu (asi 10 nm), přesto je složení stěn bohatší o lipidy a obsahuje až 17 AK. Buněčná stěna  $G^-$  bakterií je složená z vnější třívrstevné membrány (proteiny, lipopolysacharidy, lipoproteiny) a vnitřní tenké, pevné peptidoglykanové vrstvy, což je také možné vidět na obrázku 4b [37]. V periplasmovém prostoru mezi membránami je mnoho molekul (živin, metabolitů, enzymů), které jsou u  $G^+$  bakterií jsou vyloučeny volně do prostředí. Mezi tyto látky také patří i  $\beta$ -laktamáza štěpící penicilin a udělující bakteriím rezistenci na toto antibiotikum [38].



Obrázek 4a: Buněčná stěna  $G^+$  bakterií, kde je možné vidět silnou vrstvu peptidoglykanu na cytoplazmatické membráně, skrz níž pronikají řetězce teichoových kyselin



Obrázek 4b: Buněčná stěna  $G^-$  bakterií, kde je pouze slabá vrstva peptidoglykanu mezi vnější a cytoplazmatickou membránou a spoustu dalších jednotek – lipidy, AK, protein... [80]

## 6.2. Aktivita nanočástic ve vztahu k bakteriím

Nanočásticím stříbra se přiřazuje spíše baktericidní účinek, což je velmi vhodné pro klinické využití, kdy je lepší usmrcení mikroorganismu než pouze inhibice, kterou vykazuje účinek bakteriostatický [39].

Antimikrobiální účinek ovlivňuje velikost částic. Čím menší částice, tím vyšší antibakteriální efekt díky větší ploše [19; 34; 40; 41]. Při jejich výrobě je velmi oblíbený modifikovaný Tollensův proces, kdy se jako redukční činidlo využívají sacharidy [16; 42]. Velikost úspěšně připravených nanočástic byla 16-70 nm v závislosti na druhu sacharidu [42]. Přičemž nanočástice stříbra o velikosti 10 až 15 nm měly zvýšenou stabilitu, biokompatibilitu a zvýšenou antimikrobiální aktivitu [43; 44]. Také Xi-Feng Zhang a kol. ve studii [19] prokázali antimikrobiální aktivitu AgNPs proti *E. coli*, kdy se tyto nanočástice akumulovaly v buněčné stěně a způsobily buněčnou smrt. Menší částice měly opět vyšší účinnost, než částice větší [19]. Ve studii [16] Pánaček a kol., nanočástice stříbra redukované maltózou měly 25 nm a vykazovaly minimální inhibiční koncentraci (MIC) 1,69 – 13,5 mg/l, přičemž nanočástice o velikosti 50 nm, které byly redukovány galaktózou měly nižší aktivitu a vykazovaly více jak 54 mg/l, což potvrzuje předchozí tvrzení o závislosti velikosti nanočástic na antimikrobiální aktivitě [16].

Tvar nanočástic má také vliv na antibakteriální účinek [19; 32; 45], kdy trojhranné nanočástice se zdají být nejúčinnější [19; 46] a ve studii Pal a kol. způsobují inhibici bakteriálního růstu již při obsahu 1 µg stříbra, kulovitý tvar vykazuje inhibici růstu až při 12,5 µg stříbra a tyčinkovitý tvar dokonce až při 50 – 100 µg obsahu stříbra [47].

Antibakteriální aktivitu také mohou ovlivnit povrchové náboje AgNPs. Kladně nabitě částice jsou vhodnější pro udržení se v krevním oběhu oproti záporně nabitým částicím. Toto se dá využít například při používání protirakovinotvorných látek, neboť krevní řečiště je hlavní cesta pro tyto látky [19].

Ve studii Alwan H.A. a kol. [48], byly nanočástice syntetizovány z dusičnanu stříbrného a jejich MIC byla 5 µg/ml pro *Staphylococcus aureus* a *Yersinia spp.*, a 1 µg/ml pro *Acinetobacter spp.*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhi* a *Vibrio cholera*. Izolát *Escherichia coli* vykazoval viditelný inhibiční účinek ve srovnání s pozitivní kontrolou, ale nejvyšší studovaná koncentrace AgNPs (5 µg/ml) zcela neinhibovala růst bakterií.

V literatuře se popisuje, že gramnegativní mikroorganismy jsou více citlivé vůči nanostříbru než grampozitivní mikroorganismy [49]. Toto tvrzení potvrzuje i několik studií shrnutých v článku Dakal T.C. a kol. [32]. Dále například studie Kim a kol. ukázala, že G<sup>+</sup> bakterie (*S. aureus*, *P. aeruginosa* a *V. cholera*), jsou odolnější než gramnegativní (*E. coli* a *S. typhi*). Nicméně obě skupiny bakterií vykazovaly úplnou inhibici růstu při vyšších koncentracích AgNPs (> 75 µg/ml), [50] což potvrzuje i Shrivastava a kol., ve studii [51]. Ti prováděli experimenty gramnegativních a grampozitivních bakterií v kapalném médiu s nanočásticemi stříbra. Se zvyšující se koncentrací nanočástic docházelo k postupné inhibici bakterií *E. Coli* a koncentrace 25 µg/ml byla smrtící téměř pro všechny bakterie. Podobné výsledky byly získané pro některé další kmeny G<sup>-</sup> bakterií. Naproti tomu bylo zjištěno, že nanočástice stříbra mají menší vliv na růst gram-pozitivních bakterií. Nebylo pozorováno žádné snížení růstu bakterií, dokud koncentrace nanočástic nedosáhla 25 µg/ml, zatímco koncentrace 100 µg/ml vyvolala pouze inhibici růstu [32; 51].

Tyto studie se tedy zakládají na tom, že je antimikrobiální potenciál AgNPs ovlivněn také tloušťkou a složením buněčné stěny mikroorganismů, jak již bylo popsáno v předchozí kapitole o buněčné stěně bakterií [52]. U grampozitivních bakterií se buněčná stěna skládá z negativně nabitě peptidoglykanové vrstvy a množství peptidoglykanu je poměrně více v grampozitivních než gramnegativních bakteriích. Stručně řečeno, menší závislost grampozitivních bakterií na antibiotické terapii lze vysvětlit na základě skutečnosti, že jejich buněčná stěna je relativně

mnohem silnější než gramnegativní bakterie [52] Tlustší buněčná stěna gram-pozitivního i negativního náboje peptidoglykanu nechává stříbrné ionty přilepené na buněčnou stěnu. Z tohoto důvodu *S. aureus*,  $G^+$  bakterie, která má silnou buněčnou stěnu a více peptidoglykanových molekul, zabraňuje působení iontů stříbra [53]. Naproti tomu  $G^-$  bakterie jsou náchylnější k antimikrobiální terapii založené na AgNPs vzhledem k méně tlusté buněčné stěně a méně peptidoglykanu [54]. Navíc  $G^-$  bakterie obsahují v buněčné membráně lipopolysacharidy (LPS), které přispívají k strukturální integritě membrány a chrání membránu před chemickými útoky. Záporný náboj LPS však podporuje adhezi AgNPs a způsobuje, že bakterie jsou citlivější na antimikrobiální terapii [54].

Všechna tato dosavadní tvrzení však vyvracejí Humberto a kol. ve své studii [20], kde tvrdí, že *E. coli* a *P. aeruginosa* (zástupci  $G^-$  bakterií) byly méně náchylné na nanočástice stříbra, takže lipopolysacharid zjevně nemusí být strukturou, která způsobuje citlivost bakteriální buňky na nanočástice. Místo toho může lipopolysacharid zablokovat kladné náboje nanočástic stříbra a způsobit menší citlivost pro  $G^+$  bakterie [20].

## 7. VEDLEJŠÍ ÚČINKY A TOXICITA NANOČÁSTIC STŘÍBRA

Široké použití AgNPs ve spotřebitelských výrobcích, průmyslu, léčivech a lékařských vědách, včetně dermatologie, vyvolává obavy související s jeho nepříznivými účinky na životní prostředí a bezpečnost lidí – především biologickou bezpečnost a kompatibilitu [32; 55]. Stříbro je využíváno v mnoha aplikacích, které jsou v kontaktu s pokožkou a sliznicemi [56]. Nanostříbrné částice mohou být tělem zachyceny různými způsoby, zejména kůží, která je největším orgánem a prvním kontaktním povrchem pro různé nanomateriály a jiné cizí látky [55]. Neporušená kůže slouží jako silná bariéra proti absorpci stříbra, oproti slizničním povrchům a porušené kůži [56].

Elementární stříbro není toxické, ale při delším užívání sloučenin stříbra dochází k rozvoji argyrie tj. k nevratnému ukládání stříbra v orgánech, především v kůži a sliznicích, což způsobuje jejich šedé zbarvení [56; 57]. Li a kol. uvádí, že stříbro by mělo být ve své iontové formě  $\text{Ag}^+$ , aby bylo účinným antibakteriálním činidlem a že stříbro v kovové formě je spíše inertní [21]. Při hodnocení buněčné toxicity pomocí  $\text{LC}_{50}$ , což je koncentrace potřebná k usmrcení 50 % organismů bylo, zjištěno, že nanočástice stříbra byly cytotoxické až při koncentracích nad 30 mg/l, narozdíl od  $\text{AgNO}_3$ , který vykazoval cytotoxické účinky už při 1 mg/l [58]. Hadrup a spol., se ve studii [56] zabýval kritickými hodnotami stříbra v různé formě, kdy akutní lidská úmrtnost byla pozorována po potratu v intrauterinním podání 7 g dusičnanu stříbrného (64 mg stříbra/kg tělesné hmotnosti).

Jak mitochondriální stres, tak i endoplasmatický stres (ER) mají aditivní účinek na generaci reaktivních forem kyslíku (ROS) v buňce a vyvolávají buněčnou smrt, obecně označované jako cytotoxicita. Kdy mitochondriální stres vzniká díky AgNPs, které způsobují hyperoxidaci buněčných organel a narušení mitochondriální aktivity. ER stres vzniká

při reakci AgNPs s bílkovinami, které se pak nesprávně rozvíjí, což vede k rozvinutí stresu proteinové odezvy [32].

Genotoxicita vzniká díky poškození řetězce a mutace v DNA, kdy AgNPs v jádře indukují vznik oxidované báze 8-oxoguaninu [32].

Ve studii ze zdroje [59] jevílo iontové stříbro při vysokých koncentracích silný cytotoxický vliv na keratinocyty – kožní buňky. Z toho vyplývá, že pro bioaplikace stříbra není vhodné používat koncentrace vyšší než 3,7 ppm. Nanočástice Ag nejsou schopny proniknout neporušenou lidskou kůží. Penetrace tedy hrozí pouze při narušení bariérní funkce kůže [59].

Ačkoli jsou sloučeniny stříbra toxické i karcinogenní při vyšších koncentracích, jsou stále využívány pro léčení demence, malomocenství a rakoviny kůže [19]. Jejich cytotoxicita, genotoxicita a zánětlivé odpovědi v lidských buňkách [32] mohou být využity například proti rakovinotvorným buňkám [32; 35], AgNPs v rozmezí 5 - 20 nm mohou inhibovat replikaci HIV-1 [60; 61]. Velmi důležitá je velikost nanočástic i při interakci AgNPs a viru - hepatitidy B [62]. Paknejadi a spol., pozorovali různé koncentrace vodných koloidních AgNPs na lidských kožních fibroblastech a byl prokázán významný vliv koncentrace a času na snížení životaschopnosti buněk [55]. Z toho plyne že, nanočástice stříbra mohou mít cytotoxické účinky na buňky zejména při vysokých koncentracích a prodloužených dobách expozice [55].

Rozdílná aktivita AgNPs a AgNO<sub>3</sub> byla porovnávána ve studiích Falconer a spol. [63; 64], kdy byla nejprve pozorována baktericidní aktivita AgNPs a AgNO<sub>3</sub> při zánětech sliznice dutiny nosní, kde AgNPs vykazovaly sníženou baktericidní aktivitu ve srovnání s AgNO<sub>3</sub> a poté byla pozorována doba setrvání v čelní dutině u myši, kdy AgNPs vykazovaly významně nižší doby zadržení v dutině nosní. U AgNPs byly naměřeny velmi nízké hladiny stříbra v krvi, což naznačuje omezenou distribuci této formy stříbra zřejmě díky rozpouštění AgNPs na ionty stříbra. Proto AgNPs vykazují adekvátní bezpečnost díky omezené



penetraci a absorpci v nosních aplikacích, protože koncentrace stříbra v dutině nosní klesá pod minimální baktericidní koncentraci do 3 hodin [64].

Ve studii Dakal T.C. [32] uvádí, že nebyly zjištěny žádné klinicky významné metabolické, hematologické nebo urologické změny. Kromě toho nebyly zjištěny žádné morfologické změny v životně důležitých lidských orgánech, jako jsou plíce nebo srdce, stejně jako změny v plicní tvorbě ROS nebo produkci prozánětlivých cytosinů.

## 8. KOMBINACE STŘÍBRA S ANTIBIOTIKY

Na počátku 19. Století se koloidní stříbro používalo v mikrobiologii a lékařství, ale vzhledem k objevení penicilinu a také kvůli jeho nižší ceně a snadnému dávkování, bylo stříbro přesunuto do pozadí. Nadměra užívání antibiotik však přinesla riziko vytváření rezistence bakterií vůči antibiotikům, proto se opět výzkum vrací k nanočásticím stříbra, u kterých nebyla rezistence objevena [19; 20; 32]. Bakteriální rezistenci na určitá antibiotika jsou shrnuty v Tabulka 1.

Získávání rezistence na léky probíhá prostřednictvím genetických mutací, změn genetického materiálu nebo získávání cizího genetického materiálu. Vzhledem k narůstajícím dávkám antibiotických léků po mnoho let se patogeny stávají rezistentními na léky a reagují na antibiotika tím, že vytvářejí potomky, kteří nejsou náchylní k antimikrobiální léčbě. [32] Navíc stříbro je účinné na několik set původců nemocí, narozdíl od antibiotik a antimykotik, které zabírají pouze na malé množství patogenů [32; 65; 66]. Byly zjištěny čtyři mechanismy, které se týkají rezistence vůči antibiotikům u bakterií: (a) změna cílového proteinu mikrobiálního léčiva, (b) enzymatické degradace nebo inaktivace léčiva, (c) snížená propustnost membrány a (d) zvýšený výtok léku [67].

Stříbro s antibiotiky se dá kombinovat, kdy společně dosahují mnohem vyšší účinnosti [57]. Ve studii Dakal a kol., bylo shrnuto působení antibiotik v kombinaci s nanočásticemi stříbra z různých studií. Všechny studie naznačují synergický účinek AgNPs proti gram poz/neg. bakteriím v kombinaci s antibiotiky. Vedle účinnosti proti bakteriálním kmenům působí AgNPs také jako účinná, rychle působící protiplísňová činidla proti širokému spektru plísňových rodů, jako jsou *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, *Phoma* a *Trichoderma sp.* [32]. Antimikrobiální účinky proti důležitým patogenním bakteriím *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pneumoniae*, dokazují i další studie, například: Gurunathan a kol. [68] Výsledky naznačují, že kombinace antibiotik a AgNPs vykazovala významné

antimikrobiální a antibiofilmové účinky při nejnižší koncentraci antibiotik a AgNPs v porovnání pouze s AgNPs nebo se samotnými antibiotiky [68]. Ve studii Shahverdi a kol. byly hodnoceny biologicky syntetizované AgNPs v kombinaci s antibiotiky, jako je penicilin, amoxicilin, erythromycin, klindamycin a vankomycin proti bakteriím *S. aureus* a *E. coli*, účinky byly zvýšeny v přítomnosti AgNPs [45].

Na základě doposud provedených výzkumů se domníváme, že systémy se stříbrem mohou být navrženy tak, aby zvyšovaly jejich účinnost, stabilitu, specifitu, biologickou bezpečnost a biologickou kompatibilitu [32]. Nicméně, podobně jako u antibiotik, může prodloužení expozice bakterií AgNPs vést k vývoji rezistentních bakteriálních buněk. Například *E. coli*, kmen K12 MG1655 vyvinul rezistenci vůči AgNPs ve studii [69]. V budoucnu je proto nutné pečlivě zkoumat vývoj rezistence Ag v bakteriích.

**Tabulka 1: Přehled gram pozitivních a gram negativních bakterií rezistentních na antibiotika [32]**

<b>Gram pozitivní bakterie:</b>	<b>Rezistentní na:</b>	<b>Gram negativní bakterie:</b>	<b>Rezistentní na:</b>
<i>Bacillus subtilis</i>	Chloramphenicol	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenems
	Erythromycin Lincomycin		Imipenam
	Penicillin Streptomycin	<i>Escherichia Coli</i>	Ampicillin
	Tetracycline		Cephalosporins
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	$\beta$ -lactam antibiotics		Chloramphenicol Floroquinolones
	Chloramphenicol		Nalidixic acid Rifampin
	Tetracycline		Sulfamethoxazole Streptomycin
	Trimethoprim		Tetracycline
	Sulfamethoxazole	<i>Klebsiella pneumonia</i>	Carbapenems
<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomycin		Imipenam
	Gentomicin	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$\beta$ -lactams

<b>Grampozitivní bakterie:</b>	<b>Rezistentní na:</b>	<b>Gramnegativní bakterie:</b>	<b>Rezistentní na:</b>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Erythromycin		Chloramphenicol Fluroquinolones
	Gentomicin		Macrolides
	Kanamycin	<i>Salmonella typhi</i>	Novobiocin Sulfonamides Tetracycline
	Rifampin		Trimethoprim
	Streptomycin		Amoxycilin Ampicillin
	Sulfamethoxazole		Chloroamphenicol
	Tetracycline		Fluroquinolones
<i>Staphylococcus aureus</i>	Methicillin		Trimethoprim
	Vancomycin	<i>Shigella flexneri</i>	Ciprofloxacin
<i>Streptococcus pneumonia</i>	Penicillin		Nalidixic acid
	Erythromycin	<i>Vibrio cholera</i>	Fluroquinolones Tetracycline
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Erythromycin		
	Macrolides		

Za účelem aplikace léčiv na bázi nanočástic stříbra pro humánní terapeutické intervence a léčbu onemocnění musí být provedeny klinické zkoušky a vyvinuty další studie zabývající se třemi hlavními úrovněmi. Nejprve se musí syntetizovat AgNPs s jedinečnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi za použití nových postupů a technik biologického zpracování, za druhé ověřit, zda mikroorganismy vyvinou rezistenci vůči antimikrobiální terapii na bázi AgNPs, za třetí za účelem zkoumání cytotoxicity, genotoxicity a zánětlivé reakce AgNPs na lidské buňky [32].

## 9. MECHANISMUS PUSOBENÍ STŘÍBRA NA ŽIVÉ ORGANISMY

Antimikrobiální účinek AgNPs je spojen se čtyřmi dobře definovanými mechanismy:

**(1) Adheze AgNP na povrch buněčné stěny a membrány [70]:** AgNP u mikroorganismů způsobuje přilnavost nanočástic na buněčnou stěnu a membránu. Pozitivní náboj přináší elektrostatickou přitažlivost mezi AgNPs a záporně nabitou buněčnou membránou, což usnadňuje připojení AgNPs na membránu. Při takovéto interakci se projevují morfologické změny jako např. smrštění cytoplazmy a odštěpení membrány, což nakonec vede k prasknutí buněčné stěny. [32] Stříbrný kation způsobuje také PCD - programovanou smrt buňky (apoptózu), která je obvykle sledována u eukaryotických buněk, ale v poslední době byly také pozorovány PCD systémy i u bakterií [29; 28]. Jakmile se ošetří dusičnanem stříbrným bakteriální buňka, začne se permeabilizovat buněčná stěna a vytváří se apoptotické tělo. U buněk *B.licheniformis* byla apoptóza pozorována u koncentrací vyšších než 5 mM. Po rozpadnutí DNA je apoptóza ukončena [28].

**(2) Penetrací AgNP do buňky a poškozením intracelulárních struktur (mitochondrie, vakuoly, ribosomy) a biomolekuly (protein, lipidy a DNA) [70].** Nanočástice stříbra i stříbrné ionty mohou interagovat s molekulami, jež obsahují síru, kyslík nebo dusík, tím způsobí velké změny v buňce. Tyto elektrondonorové skupiny obsahující převážně síru, jsou součástí velkého množství makromolekul, jako jsou proteiny a enzymy. Tímto způsobem může dojít k poškození funkce těchto molekul, tedy inhibici proteinů a enzymů vzniklou vazbou mezi thiolovou skupinou a stříbrným iontem, čímž dochází k denaturaci proteinů a zastavení replikace DNA, inhibici buněčného dělení a v respiračním řetězci se zastaví dýchání. Jinak se dá říci, že  $\text{Ag}^+$  vstupuje do bakteriální buňky a interkaluje (vmezeří se mezi obě vlákna DNA) mezi základním párem pyrimidinu, čímž narušuje

vodíkovou vazbu mezi antiparalelními vlákny a to vede k denaturaci DNA a následné inaktivaci bakterií [21; 29; 71].

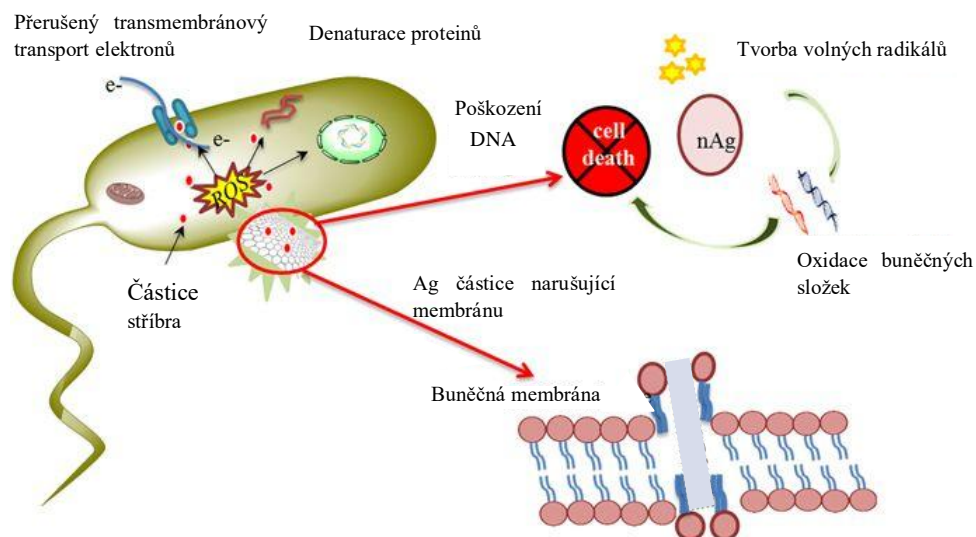
**(3) AgNP indukují buněčnou toxicitu a oxidační stres vyvolaný tvorbou reaktivních druhů kyslíku (ROS) a volných radikálů [70],** což je možné vidět na Obrázek 5. Nanočástice se mohou do buňky dostat prostou difúzí nebo endocytózou. Uvnitř buňky mohou poškozovat mitochondrie, tvořit kyslíkové radikály (ROS) a uvolňovat stříbrné ionty. Jakmile tyto ionty zablokují enzymy v respiračním řetězci: nikotinamidadenindinukleotid (NADH) dehydrogenasa II, zvýší se produkce volných radikálů (ROS – reaktivní kyslíkové částice) v bakteriální buňce a dojde k omezení tvorby adenosintrifosfátu (ATP). Oba tyto mechanismy vedou k poškození DNA. Proti těmto škodlivým účinkům existuje celá řada obranných mechanismů, například sloučeniny známe jako antioxidanty. Zvýšený výskyt ROS je označován jako oxidační stres [72].

**(4) Modulace drah přenosu signálu [70].** Přesný mechanismus působení koloidního stříbra na mikroorganismy nebyl zcela prozkoumán. Pravděpodobně se koloidní stříbro oxiduje na ionty  $\text{Ag}^+$  a přechází s krví do buněk, kde se během několika dní dostává do všech tkání a začíná působit [65].

Ničí enzymy, které jsou u jednobuněčných mikroorganismů zodpovědné za zásobování kyslíkem, čímž je přerušena dýchací řetězec a mikroorganismy během několika minut odumírají. Navíc se stříbro váže na nukleové kyseliny.  $\text{Ag}^+$  ionty tedy interagují s thiolovými skupinami proteinů, inaktivují enzymy a interagují s bakteriální stěnou, kde mění její permeabilitu, dále ovlivňují transport elektrolytů, brání replikaci DNA a tvoří reaktivní formy kyslíku [65].

Kromě těchto čtyř dobře známých mechanismů AgNPs také ovlivňují imunitní systém lidského těla. Imunitní systém poskytuje ochranu před cizími útočníky tím, že rozlišuje "vlastní" a "nevlastní" antigeny a koordinovaně vytváří dynamickou síť imunitních buněk, aby

neutralizoval "nevlastní" antigeny. AgNPs jsou rozpoznány jako "nevlastní", a proto AgNPs vyvolávají imunitní odpověď [32; 70]. Koloidní stříbro je do krevního řečiště nebo lymfatického systému přijímáno nejpozději v tenkém střevě, tudíž jsou zachovány pro život prospěšné bakterie, žijící ve střevě tlustém [65].



**Obrázek 5: Mechanismus působení nanočástic na bakteriální buňku, nanočástice stříbra přímo vstupují do buňky, indukují oxidační stres, poškozují obsah buněk a tím dochází k usmrcení buňky. [73]**

## Experimentální část

Vzhledem k vývoji nanovláken a jejich morfologické podobnosti s lidskými tkáněmi byla tato práce zaměřena na vývoj antimikrobiálních nanovláčkových membrán obsahujících stříbro v nosném polymeru polyamidu 6, který byl zvolen pouze jako model pro případné další výzkumy například s biodegradabilními polymery, které jsou pro využití v tkáňovém inženýrství vhodnější.

Experimentální část byla rozdělena do několika částí. Nejprve byly připraveny membrány čistého polyamidu s různými morfologiemi, které byly podrobeny analýze na průchodnost bakterií ve spolupráci s Vysokou školou chemicko-technologickou v Praze (VŠCHT). Na základě těchto výsledků, kdy velikost pórů moc neovlivňovala průchodnost bakterií, byly zvoleny různé koncentrace dusičnanu stříbrného jako antimikrobiálního činidla, které by mělo podpořit inhibici bakterií. Celá reakce dusičnanu stříbrného v polyamidu 6 byla již popsána v kapitole 3.1. Vzhledem ke zjištěným změnám v roztoku, při sledování jeho stability, byly nakonec provedeny ještě konečné testy pro ověření prvních antimikrobiálních výsledků.



# 10. VLIV MORFOLOGIE POLYAMIDU A TESTY NA PRŮCHODNOST BAKTERIÍ

Tato kapitola se zabývá přípravou nanovláknenných membrán z polyamidu 6, zkoumáním jejich morfologie a následou průchodností bakterií a antimikrobiální aktivitou.

## 10.1. Příprava roztoků:

Byly připraveny různé koncentrace polyamidu B-27 (BASF, Ultramid B27 E 01) rozpuštěné v kyselině mravenčí (PENTA s.r.o, čistoty "p.a.") a kyselině octové (PENTA s.r.o., čistoty "p.a.") v poměru 1:2. Roztoky byly připraveny smícháním rozpouštědel a polymerních granulí a následně zahřívány a míchány na magnetické míchače při 85 - 90 °C po dobu 6 hodin. Po vychladnutí roztoku na pokojovou teplotu byla změřena viskozita při 100 otáčkách za minutu (RPM) na viskozimetru (VISCOTESTER E, Thermo) vodivost pomocí konduktometru (SCHOTT HandyLab LF11) se sondou (Sonda DHJ s.r.o). Pro ověření reálné koncentrace byla rozpouštědla z roztoků odpařena v peci při 110 °C, 2.5 hod. Naměřené hodnoty roztoků jsou zobrazeny v Tabulka 2, ze které lze vyčíst, že při přípravě roztoku byly dodrženy správné poměry rozpouštědel vzhledem k polymeru z overené reálné koncentrace, a že viskozita roste lineárně se zvyšující se koncentrací roztoku.

Tabulka 2: Naměřené parametry roztoků,  $\bar{x}$  - střední hodnota;  $\sigma$  - směrodatná odchylka; (viskozita při 100 RPM, 22 °C)

	PA6_ 8 % roztok		PA6_ 12 % roztok		PA6_ 15 % roztok	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
Vodivost [ $\mu\text{S}/\text{cm}$ ]	145,2	0,3	197,1	0,2	196,267	0,961
Reálná konacetrace [%]	7,96	0,061	12,163	0,047	15,083	0,601
Viskozita [ $\text{mPa}\cdot\text{s}$ ]	73,167	0,04	185,2	0,458	447,167	0,351

## 10.2. Zvlákňování – parametry:

Nanovláknenné membrány byly připraveny pomocí Nanospideru NS 1S500U a klimatizace AC 1100 ve firmě Elmarco s.r.o. Membrány měly téměř totožné zvlákňovací podmínky, což bývá někdy komplikované vzhledem k okolním podmínkám. Jedinou změnou bylo použití menšího průvlaku pro málo viskózní 8 % polymerní roztok a to z 0,6 mm na 0,5 mm, aby málo koncentrovaný roztok nevytekl do retenční nádržky. Ve všech případech bylo použito napětí 60 kV na zvlákňovací elektrodě a -20 kV na elektrodě sběrné při vzdálenosti těchto elektrod 180 mm. Vlhkost (RH) při zvlákňování byla držena kolem hodnoty 40 % RH. Posun podkladu byl zvolen nejprve 10 mm/min a poté 20 mm/min pro různé tloušťky membrány.

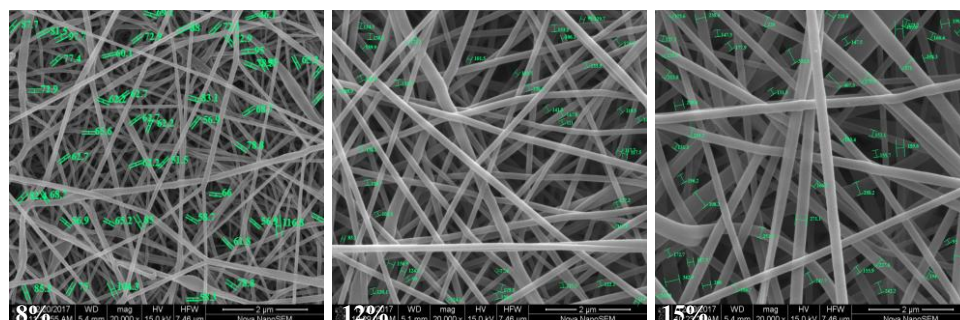
## 10.3. Charakterizace připravených vrstev

Připravené membrány na nanospideru byly vyhodnoceny a naměřené parametry byly zaznamenány v Tabulka 3. Vzorokly pro SEM snímky byly nejprve naprášeny zlatem na naprašovače (CS7620 MINI) a následně byly vloženy do elektronového mikroskopu (Nova NanoSEM 230). Průměry vláken na SEM byly měřeny pomocí počítačového programu (NIS - Elements). Bylo provedeno přibližně 50 měření na snímek, ze kterých byl následně vypočítán průměr vláken. Na Obrázek 6, lze pozorovat rozdílnou velikost průměrů vláken v závislosti na koncentraci roztoku, zvětšených 20 000 x pomocí elektronového mikroskopu. Velikost pórů byla měřena na přístroji (Capillary Flow Porometer CFP-1200 AEL), pomocí metody „bubble point“. Toto zařízení měří Bubble point pressure (zde v kPa), ale v reportu vygenerovaném počítačem se uvádí i “Bubble point pore diameter”, což je hodnota vypočtená na základě Young-Laplaceovy rovnice a odpovídá průměru největšího póru v membráně. V celé této práci je uváděna právě tato hodnota největšího póru v membráně, jelikož tato metoda není vhodná pro měření malých pórů, neboť se kapalina vytlačí z membrány a mokrá křivka ve vyhodnocujícím grafu se spojí se suchou křivkou, takže by měření nemělo adekvátní výsledek. K měření tloušťky byl použit přístroj

(Mitutoyo Corp ID-C112XB). Prodyšnost byla měřena pomocí (TEXTTEST FX 3300) a pro měření plošné hmotnosti byly využity analytické váhy (RADWAQ AS 100/C/7).

Tabulka 3: Charakteristiky membrány,  $\bar{x}$  - střední hodnota;  $\sigma$  – směrodatná odchylka

	8% PA6			
	10mm/min		20mm/min	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
Průměr vláken [nm]	70,433	12,8	63,9	11,6
Velikost největšího póru [ $\mu\text{m}$ ]	0,264	0,003	0,307	0,006
Plošná hmotnost [ $\text{g}/\text{m}^2$ ]	3,887	0,121	2,867	0,087
Tloušťka vrstvy [mm]	0,022	0,001	0,008	0,003
Prodyšnost [ $\text{l}/\text{m}^2/\text{s}$ při 200 Pa]	4,115	0,054	6,764	0,043
	12% PA6			
	10mm/min		20 mm/min	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
Průměr vláken [nm]	159,833	26,8	161,3	29,5
Velikost největšího póru [ $\mu\text{m}$ ]	0,496	0,003	0,461	0
Plošná hmotnost [ $\text{g}/\text{m}^2$ ]	8,669	0,205	4,092	0,168
Tloušťka vrstvy [mm]	0,065	0,003	0,022	0,002
Prodyšnost [ $\text{l}/\text{m}^2/\text{s}$ při 200 Pa]	3,43	0,095	6,707	0,1
	15% PA6			
	10mm/min		20mm/min	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
Průměr vláken [nm]	210,333	90,5	213,333	70,7
Velikost největšího póru [ $\mu\text{m}$ ]	0,937	0,009	0,621	0,011
Plošná hmotnost [ $\text{g}/\text{m}^2$ ]	18,49	0,856	4,677	0,175
Tloušťka vrstvy [mm]	0,116	0,001	0,024	0,001
Prodyšnost [ $\text{l}/\text{m}^2/\text{s}$ při 200 Pa]	4,545	0,099	6,978	0,117



Obrázek 6: SEM se změřenými průměry vláken (zvětšeno 20 000x)

Jak je možné vidět z Tabulka 3, se zvětšující se koncentrací roste průměr vláken, který je závislý nejen na vlhkosti, ale i na koncentraci polymeru. Také se zvětšuje velikost pórů s rostoucí koncentrací polymeru. Plošná hmotnost závisí na rychlosti posunu podkladu a samozřejmě se zvyšuje s koncentrovanějším roztokem.

## **10.4. Průchodnost bakterií a antimikrobiální aktivita nanomateriálů**

Membrány připravené na začátku této kapitoly byly testovány na průchod bakterií skrz membránu a antimikrobiální aktivitu ve spolupráci s vysokou školou chemicko-technologickou (VŠCHT). Testy prováděla Klára Zemanová v rámci své bakalářské práce [74]. Na konec byly použity pouze 2 membrány a to: 8% PA6\_10 mm/min – dále označená jako PA6\_200 a 15% PA6\_20 mm/min – označená PA6\_500, kvůli omezeným časovým podmínkám. Tyto dvě membrány byly zvoleny na základě největšího rozdílu průměrů vláken a pórů, jejich vyhodnocení je v Tabulka 3. K tomuto antimikrobiálnímu testu byly použity různé metody, a bylo získáno mnoho výsledků, které je možné dohledat v bakalářské práci [74].

### **10.4.1. Filtrace mikroorganismů**

#### ***Filtrace pomocí hladkého filtru***

Suspenze daných mikroorganismů o optické denzitě (OD) 1 McFarland (McF) byla filtrována přes hladký filtr. Počty kolonií tvořící jednotky (KTJ) byly po  $24 \pm 2$  hodinách odečteny a počet KTJ/ml byl určen dle vzorce (1). Dosažené výsledky byly shrnuty v Tabulka 4.

$$KTJ = \frac{\Sigma C}{V \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d} [KTJ \cdot ml^{-1}] \quad (1)$$

$\Sigma C$	součet kolonií ze všech ploten vybraných pro výpočet ze dvou po sobě následujících ředění (přičemž nejméně jedna z ploten obsahuje 10 kolonií)
$V$	objem inokula v ml očkovaného v každé kapičce
$n_1$	počet kapiček vybraných k výpočtu z prvního (nižšího) zvoleného ředění
$n_2$	počet kapiček vybraných k výpočtu z druhého (vyššího) zvoleného ředění
$d$	ředicí faktor prvního (nižšího) pro výpočet zvoleného ředění (např. pro odečet 4. a 5. ředění je ředicí faktor $d = 10^{-4}$ )

Tabulka 4: Počet kolonií tvořící jednotky v suspenzi a filtrátu

Materiál PA6_500				
Číslo pokusu	I.		II.	
Mikroorganismus	Suspenze KTJ/ml	Filtrát KTJ/ml	Suspenze KTJ/ml	Filtrát KTJ/ml
<i>Escherichia coli</i>	$7,9 \cdot 10^7$	$3,9 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^8$	$5,5 \cdot 10^6$
<i>Bacillus subtilis</i>	$6,6 \cdot 10^7$	$4,0 \cdot 10^6$	$5,9 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^6$
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	$4,8 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^7$	$2,5 \cdot 10^8$	$8,3 \cdot 10^5$
<i>Candida albicans</i>	$2,1 \cdot 10^6$	$5,4 \cdot 10^5$	$3,8 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^5$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$4,5 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^5$
Materiál PA6_200				
Číslo pokusu	I.		II.	
Mikroorganismus	Suspenze KTJ/ml	Filtrát KTJ/ml	Suspenze KTJ/ml	Filtrát KTJ/ml
<i>Escherichia coli</i>	$7,2 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^8$	$8,0 \cdot 10^7$
<i>Bacillus subtilis</i>	$1,4 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^8$
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	$4,1 \cdot 10^7$	$3,3 \cdot 10^6$	$6,8 \cdot 10^7$	$6,7 \cdot 10^6$
<i>Candida albicans</i>	$2,9 \cdot 10^6$	0	$5,9 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^5$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$4,7 \cdot 10^5$	0	$6,0 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^5$

Z výsledků uvedených v Tabulka 4 vyplývá, že materiál PA6\_500 zadržuje bakterie o jeden až tři řády, kvasinky byly zadrženy maximálně o jeden řád. Materiál PA6\_200 většinou nezadržel bakterie ani o jeden řád. U kvasinek se u prvního experimentu objevila absolutní zádržnost, ale výsledek se u druhého testu nepotvrdil. S těmito materiály se pracovalo těžce, vzhledem k jejich malé tloušťce se špatně skládaly do filtru, při filtraci nedržely tvar filtru a z toho důvodu, nebyla u některých pokusů možná filtrace celého jednoho mililitru. Bylo tedy filtrováno přibližně 0,5 ml suspenze.

Při filtraci suspenze mikroorganismů pomocí nanomateriálového filtru bylo tedy zjištěno, že nanotextilie snižují počet kolonie tvořících jednotek v suspenzi mikroorganismů o jeden až tři řády, přičemž častěji byly více zadržovány kvasinky, což koresponduje s tím, že tyto buňky mají obvykle největší velikost z mikroorganismů vybraných pro analýzu (přibližně 2-20  $\mu\text{m}$ ) [75]. Vzhledem k tomu, že se jednalo o prvotní testy, je nutné testy zopakovat a ověřit výsledky.

### ***Filtrace pomocí aparatury na filtraci***

Pomocí této aparatury, sterilizované v autoklávu, byla filtrována pouze suspenze *E. coli*, která byla zvolena jako vhodný mikroorganismus pro prvotní pokus. Tato filtrace byla vyhodnocena jako méně efektivní díky tomu, že muselo být připraveno značně větší množství suspenze a také byl postup náročnější na čas, materiál a sterilizaci.

Byly provedeny celkem dvě filtrace suspenze o optické densitě 0,8 McF, během nichž bylo filtrováno 50 ml a 45 ml suspenze. Suspenze i filtrát byly zředěny a vyneseny na chromogenní médium – Tryptonový agar (TBX) - složení viz Příloha 1. Odečtené hodnoty pro jednotlivé materiály jsou shrnuty v Tabulka 5.

Tabulka 5: Počet kolonií tvořící jednotky v suspenzi a filtrátu; materiál PA6\_200

Číslo pokusu	I.		II.	
	Suspenze KTJ/ml	Filtrát KTJ/ml	Suspenze KTJ/ml	Filtrát KTJ/ml
<i>Escherichia coli</i>	$1,1 \cdot 10^8$	$6,8 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^7$

Zadržnost materiálu pro *E. coli* byla při prvním pokusu nulová a v druhém případě pouze o jeden řád, což koresponduje s výsledky filtrace pomocí hladkého filtru.

#### 10.4.2. Testování antimikrobiální aktivity nanomateriálů

##### *Průchod mikroorganismů v tekutém médiu skrz nanomateriálovou membránu*

V těchto experimentech se jako materiály absolutně zadržující kvasinky jeví PA6\_200, PA6\_500. Výsledky byly získány pouze pro *Candida albicans* a to pouze v jedné sadě testů. Experimenty nebyly provedeny vícekrát z důvodů časových a finančních (spotřeba materiálu).


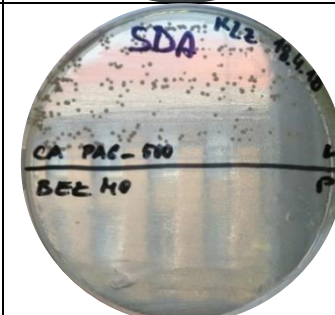
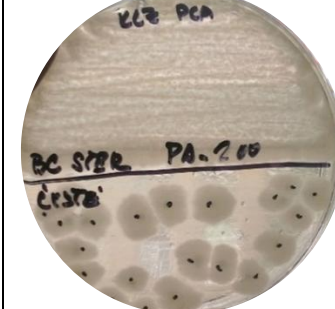
Tabulka 6: Testy propustnosti nanomateriálových membrán pro vybrané druhy mikroorganismů v tekutém médiu

Mikroorganismus	Nanomateriál	Suspenze KTJ/ml	Filtrát KTJ/ml	Stěr
<i>Escherichia coli</i>	PA6	$7,6 \cdot 10^6$	$6,0 \cdot 10^5$	ne
<i>Candida albicans</i>	PA6	$7,9 \cdot 10^6$	$6,7 \cdot 10^6$	ne
<i>Candida albicans</i>	PA6_200	$2,7 \cdot 10^2$	0	ano
<i>Candida albicans</i>	PA6_500	$4,0 \cdot 10^4$	0	ano
<i>Bacillus cereus</i>	PA6_200	$2,4 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^4$	ano

Při porovnání koncentrací mikroorganismů s výsledky stěrů v Tabulka 7 lze vidět pro materiály PA6\_200, PA6\_500, že výsledky spolu

korespondují. Stěry ze strany membrány, která byla ve styku pouze s čistým médiem, neprokázaly přítomnost mikroorganismů. Typy použitých agarů: Sabouradův agar (SDA-Sabouraud dextrose agar), což je vhodné kultivační médium pro kvasinky a Plate count agar (PCA) je vhodné kultivační médium pro bakterie, složení viz Příloha 1.

Tabulka 7: Stěry po odebrání media, agarové plotny kultivovány ve 37 °C po 24±2 hodin

Mikroorganismus	Nanomateriál	Typ agaru	Obrázek
<i>Candida albicans</i>	PA6_200	SDA	
<i>Candida albicans</i>	PA6_500	SDA	
<i>Bacillus cereus</i>	PA6_200	PCA	

Z výsledků pro nanomateriál PA6\_200 a *Bacillus cereus* je patrné zadržetí mikroorganismu o dva řády, redukce počtu KTJ je dobře vidět na výsledcích stěru z nanomateriálové membrány. Tyto experimenty také potvrdily vyšší zadržetí eukaryotických mikroorganismů, což koresponduje s jejich větší velikostí oproti mikroorganismům prokaryotickým.



## 11. Polyamid 6 s dusičnanem stříbrným a testy na antibakteriální účinnost

Tato kapitola je zaměřena na přidavek dusičnanu stříbrného do polyamidu 6 a pozorování změn jak v roztoku, tak v morfologii vláken, následné testování průchodnosti a antimikrobiální aktivity pro mikroorganismy.

### 11.1. Příprava roztoků

Nanostříbro může být zavedeno do nanovláken v různých fázích:

- (1) přimíchání předběžně připraveného nanostříbra k roztoku polymeru před zvlákňováním
- (2) syntézou nanočástic v roztoku polymeru z prekursoru
- (3) prostřednictvím *in situ*, syntéza v nanovlákněch po zvlákňování.

Přidání nanočástic zvyšuje vodivost roztoků. Ve studii [76] byly nanočástice obvykle rozloženy rovnoměrně uvnitř nanovláken nebo na povrchu.

Základní roztok polyamidu byl připraven stejným způsobem jako v předchozí části, akorát byla zvolena pouze jedna koncentrace, a to 12 % PA6-B27 (BASF, Ultramid B27 E 01) v kyselině mravenčí (PENTA s.r.o, čistoty "p.a.") a kyselině octové (PENTA s.r.o., čistoty "p.a.") v poměru 1:2. Do takto připraveného roztoku bylo po vychladnutí na pokojovou teplotu přidáváno antimikrobiální činidlo jako prekursor v různé koncentraci. Jako antimikrobiální činidlo byl zvolen dusičnan stříbrný (PENTA s.r.o. čistoty „p.a.“), který se v kyselině mravenčí redukuje na kovové stříbro. Velmi zajímavou otázkou bylo, v jaké části redukce je nejlepší stříbro zvláknit? Pro zodpovězení této otázky byly provedeny testy stability roztoku, kdy byly pozorovány redukční vlastnosti dusičnanu stříbrného v kyselině mravenčí a také vliv světla na redukci - vyhodnocení roztoku je možné vidět v kapitole 12. Z takto připravených roztoků v různé fázi redukce byly připraveny pouze krátké

membrány, ze kterých byla provedena SEM a energiově disperzní spektroskopie (EDX analýza). Z Tabulka 8 je jasné vidět, že vodivost roztoku stoupá s vyšší koncentrací stříbra.

**Tabulka 8: Parametry roztoku 12% PA6 + 0,1, 0,3, 0,5 hm% AgNO<sub>3</sub> na sušinu polymeru, kde  $\sigma$  značí směrodatnou odchylku (vodivost: 22 °C)**

Antimikrobiální látka AgNO <sub>3</sub> [hm% na sušinu polymeru]	Průměrná vodivost [ $\mu$ S/cm ]	$\sigma$	Střední hodnota reálné koncentrace [%]	$\sigma$
<b>0,1</b>	260,667	3,215	12,027	0,025
<b>0,3</b>	318,04	6,06	12,063	0,055
<b>0,5</b>	395,333	4,163	12,07	0,07

## 11.2. Zvlákňování – parametry:

Nanovlákněné membrány byly připraveny pomocí Nanospideru NS 1S500U a klimatizace AC 1100 ve firmě Elmarco s.r.o., která udržovala vlhkost mezi 33-39 %RH. Membrány měly téměř totožné zvlákňovací podmínky, kromě tedy již zmíněné vlhkosti, která nebyla možná v daný den udržet konstantní, proto jsou i mírně odlišné průměry vláken než při ostatních testech. Ve všech případech bylo použito napětí 60 kV na zvlákňovací elektrodě a -20 kV na elektrodě sběrné, při vzdálenosti elektrod 180 mm. Posun podkladu byl zvolen 9 mm/min a průvlak o velikost 0,6 mm.

## 11.3. Vlastnosti membrány:

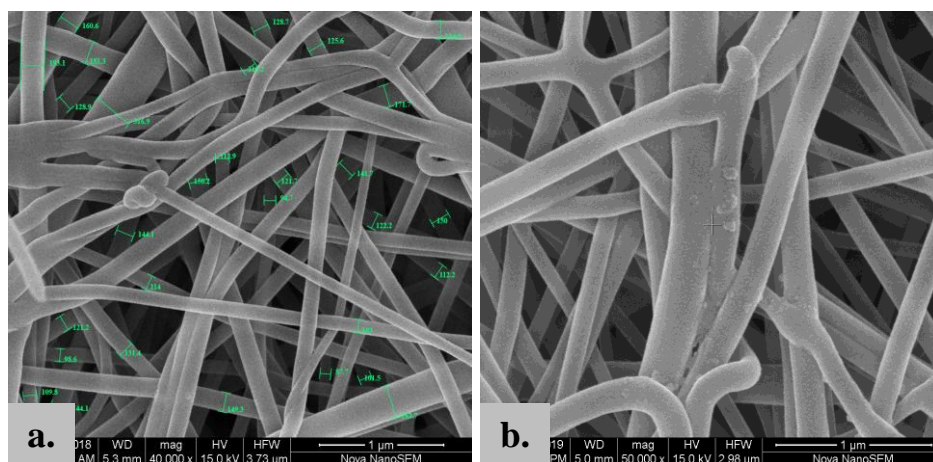
Během měření těchto parametrů bylo vždy změřeno několik hodnot, z nichž byl následně spočítán průměr a směrodatná odchylka, což bylo zaznamenáno do následující Tabulka 9. Všechny metody měření již byly popsány v kapitole 10.3.

Tabulka 9: Morfologie membrány,  $\bar{x}$  - střední hodnota;  $\sigma$  – směrodatná odchylka

12% PA6	0,1 hm% AgNO <sub>3</sub> na sušinu polymeru		0,3 hm% AgNO <sub>3</sub> na sušinu polymeru		0,5 hm% AgNO <sub>3</sub> na sušinu polymeru	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
Průměr vláken [nm]	141,83	48,1	139,18	45,8	108,43	23,7
Velikost největšího póru [ $\mu$ m]	0,573	0,006	0,541	0,001	0,549	0,025
Plošná hmotnost [g/m <sup>2</sup> ]	10,35	0,157	10,2	0,178	9,983	0,265
Tloušťka vrstvy [mm]	0,063	0,001	0,064	0,001	0,053	0,002
Prodyšnost [l/m <sup>2</sup> /s při 200 Pa]	3,459	0,18	3,459	0,156	3,492	0,229

Byla snaha připravit membrány o stejné plošné hmotnosti. Plošná hmotnost, velikost pórů, tloušťka vrstvy a prodyšnost jsou si u jednotlivých vrstev podobné. Průměr vláken však klesá s rostoucí koncentrací roztoku. Toto může souviset se samotnou koncentrací, nebo například vlhkostí při zvlákňování, či měřením samotných průměrů. EDX analýza opět prokázala přítomnost stříbra v membránách, kde ale vzhledem k použité metodě není možné zjistit množství stříbra. Tato metoda je bodová, kdy se měří množství stříbra pouze v určitých bodech a rozložení je výrazně nehomogenní a náhodné. Nicméně bylo potvrzeno, že membrány obsahují stříbro a komplexní analýza byla provedena dále v kapitole 13.5. kde byla koncentrace stanovena pomocí emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES).

SEM snímek změřených průměrů vláken je možné vidět na Obrázek 7, kde lze pozorovat drobné krystalky nejspíše stříbra. Zdali se jedná o stříbro nebo nějakou nečistotu nebylo možné ověřit, neboť výskyt krystalků je velmi náhodný.



Obrázek 7: 12% PA6 + 0,1 hm% AgNO<sub>3</sub>, a. změřené průměry, b. SEM snímek s krystalky

## 11.4. Testování vlivu stříbra na antimikrobiální aktivitu

Testy na antimikrobiální aktivitu připravených nanomateriálů byly provedeny ve spolupráci s VŠCHT. Mikrobiologickou část zpracovávala Ing. Simona Lencová. Byly testovány dvě sady materiálů 12% polyamidu PA6-B27 s různými koncentracemi AgNO<sub>3</sub>, první z nich byla sterilována pomocí UV a druhá sada pomocí Ethylenoxidu.

Použité mikroorganismy:

- *Escherichia coli* CCM 4517
- *Staphylococcus aureus* CCM 4516
- *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418
- *Bacillus subtilis* CCM 1999
- *Candida albicans* CCM 8215

Antimikrobiální efekt materiálů z obou sad byl porovnatelný, druh sterilace tedy není pro použití materiálů zásadní. První sada materiálů byla zvlákněna přibližně půl roku před testováním jejich antimikrobiálního účinku a pomocí provedených testů bylo prokázáno, že na antimikrobiální efekt to nemělo negativní vliv. Z toho lze vyvodit, že materiály jsou dlouhodobě stabilní.

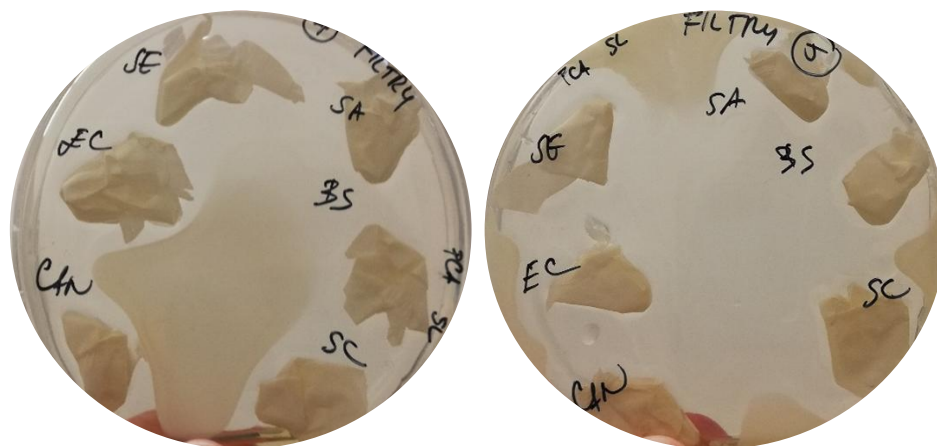
Všechny testované materiály kromě materiálu 0, jež představoval kontrolní materiál bez aktivní látky, do určité míry inhibovaly růst pěti

vybraných mikroorganismů. Došlo k nárůstu mikroorganismů (MO), ale ne na materiálech ani v jejich bezprostřední blízkosti, což je možné vidět na Obrázek 8.

Při testech zádržnosti mikroorganismů (filtrace) nedošlo k výraznému záchytu, počet mikroorganismů ve výsledném filtrátu byl přibližně stejný jako počet MO ve filtrované suspenzi. Což je možné vidět v následující Tabulka 10.

**Tabulka 10: Testy zádržnosti mikroorganismů ve filtrátu na nanovlákných membránách z 12% polyamidu 6 s daným množstvím AgNO<sub>3</sub>**

Objem filtrátů (z 1 ml filtrované suspenze)					
Materiál 12% PA6 +		0,1 hm% AgNO <sub>3</sub>	0,3 hm% AgNO <sub>3</sub>	0,5 hm% AgNO <sub>3</sub>	0 hm% (čistý PA6)
MO		V [μl]	V [μl]	V [μl]	V [μl]
<i>S. epidermidis</i>		700	600	700	700
<i>S. aureus</i>		500	600	600	650
<i>E. coli</i>		450	650	600	600
<i>B. subtilis</i>		600	700	550	600
<i>C. albicans</i>		550	700	600	500
Kvantifikace mikroorganismů ve filtrovaných suspenzích a filtrátech					
Materiál 12% PA6 +	Filtráty:	0,1 hm% AgNO <sub>3</sub>	0,3 hm% AgNO <sub>3</sub>	0,5 hm% AgNO <sub>3</sub>	0 hm% (čistý PA6)
MO	Suspense [KTJ/ml]	V [μl]	V [μl]	V [μl]	V [μl]
<i>S. epidermidis</i>	$2,8 \cdot 10^8$	$4,1 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$2,3 \cdot 10^8$	$4,3 \cdot 10^8$
<i>S. aureus</i>	$2,8 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^8$	$3,6 \cdot 10^8$	$3,7 \cdot 10^8$	$2,7 \cdot 10^8$
<i>E. coli</i>	$2,1 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$4,7 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^8$
<i>B. subtilis</i>	$9,1 \cdot 10^7$	$7,2 \cdot 10^7$	$9,5 \cdot 10^7$	$9,5 \cdot 10^7$	$7,7 \cdot 10^7$
<i>C. albicans</i>	$1,4 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$	$1,9 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^7$

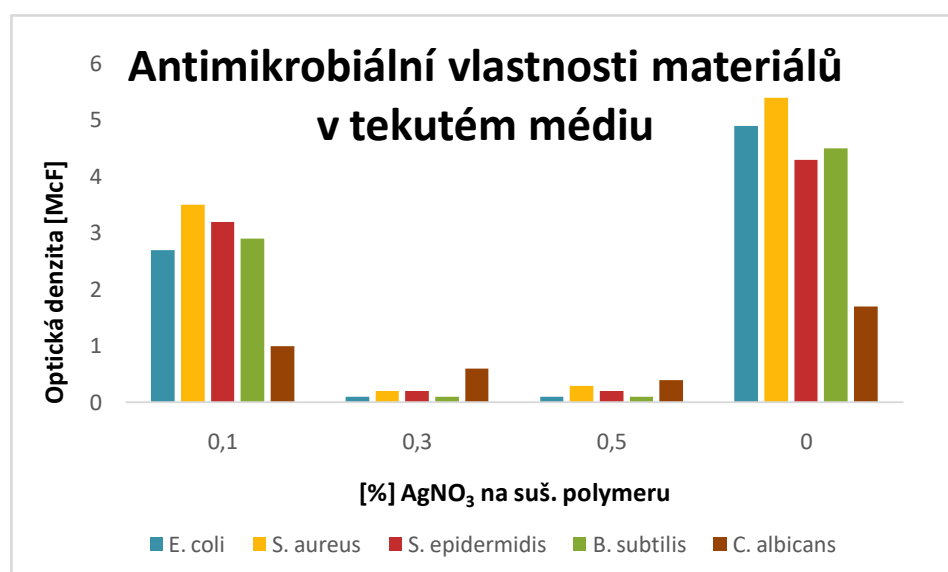


Obrázek 8: Kultivace filtrů, kde je možné vidět, že došlo k nárůstu MO, ale ne na materiálech ani v jejich bezprostřední blízkosti

### 11.4.1. Antimikrobiální vlastnosti v tekutém médiu

Výsledné optické denzity (OD) v tabulkách jsou uváděny po odečtu hodnoty pozadí média. OD = ukazatel množství přítomných mikroorganismů, je měřena na denzitometru pro odhad, kolik MO je v suspenzi/roztoku – podle ní proto je vyhodnocen efekt materiálu, když dojde ke snížení OD oproti kontrole, tak měl materiál pozitivní účinek.

Bakterie byly kultivovány v pufrované peptonové vodě (PPV) a kvasinky byly kultivovány ve sladinovém bujónu (MEB), složení těchto médií je možné dohledat v Příloha 1.



Obrázek 9: Antimikrobiální vlastnosti materiálů v tekutém médiu

Při testování antimikrobiální aktivity v tekutém médiu, kdy byla potvrzena provedenými testy antimikrobiální aktivita dusičnanu stříbrného, který zejména ve vyšší koncentraci potlačil mikrobiální růst velmi výrazně, čemuž odpovídají hodnoty v Tabulka 11. Z materiálů s dusičnanem stříbrným byl jako nejučinnější vyhodnocen materiál 3 (PA6 s 0,5 hm% AgNO<sub>3</sub> na sušinu polymeru), což vyplývá i z Obrázek 9.

**Tabulka 11: Testy antimikrobiální aktivity v tekutém médiu a odečítání optické density po kultivaci (37 °C, 24 h)**

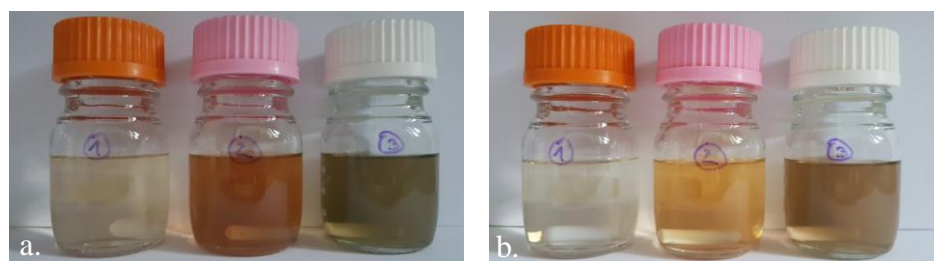
<b>Kontroly mikroorganismů (mikroorganismus bez přídavku nanomateriálu)</b>					
<b>MO</b>	<b>EC</b>	<b>SA</b>	<b>SE</b>	<b>BS</b>	<b>CAN</b>
<b>Materiál PA6 +</b>					
<b>1.</b> 0,1 hm% AgNO <sub>3</sub> na suš. polymeru	5,2	5,7	5	5	1,6
<b>2.</b> 0,3 hm% AgNO <sub>3</sub> na suš. polymeru	4,6	4,8	4,6	3,2	3
<b>3.</b> 0,5 hm% AgNO <sub>3</sub> na suš. polymeru	4,9	5	4,9	3,9	2,9
<b>Kontroly mikroorganismu (s nanomateriálem)</b>					
<b>MO</b>	<b>EC</b>	<b>SA</b>	<b>SE</b>	<b>BS</b>	<b>CAN</b>
<b>Materiál PA6 +</b>					
<b>1.</b> 0,1 hm% AgNO <sub>3</sub> na suš. polymeru	2,7	3,5	3,2	2,9	1
<b>2.</b> 0,3 hm% AgNO <sub>3</sub> na suš. polymeru	0,1	0,2	0,2	0,1	0,6
<b>3.</b> 0,5 hm% AgNO <sub>3</sub> na suš. polymeru	0,1	0,3	0,2	0,1	0,4
<b>0 – bez aktivní látky</b>	4,9	5,4	4,3	4,5	1,7
<b>Rozdíly hodnot s nanomateriály a bez nanomateriálů pro porovnní</b>					
<b>MO</b>	<b>EC</b>	<b>SA</b>	<b>SE</b>	<b>BS</b>	<b>CAN</b>
<b>Materiál PA6 +</b>					
<b>1.</b> 0,1 hm% AgNO <sub>3</sub> na suš. polymeru	-2,5	-2,2	-1,8	-2,1	-0,6
<b>2.</b> 0,3 hm% AgNO <sub>3</sub> na suš. polymeru	-5,1	-5,5	-4,8	-4,9	-1
<b>3.</b> 0,5 hm% AgNO <sub>3</sub> na suš. polymeru	-5,1	-5,4	-4,8	-4,9	-1,2
<b>0 – bez aktivní látky</b>	-0,3	-0,3	4,3	-0,5	0,1

## 12. Stabilita roztoků – vliv redukce dusičnanu stříbrného na zvlákňování

Vzhledem k zjištěným změnám v roztoku z předchozích kapitol, byla tato část věnována pozorování stabilitě roztoku. V první části byla pozorována redukce dusičnanu stříbrného na kovové stříbro v různých koncentracích během rozpouštění. Tento proces je teoreticky popsán v kapitole 3.1. V druhé části pak byla pozorována stabilita nejkonzentrovanejšího roztoku v jednotlivých dnech.

Byly připraveny roztoky polyamidu tak, že do základního roztoku 12 % PA6-B27 byl přidán dusičnan stříbrný. Takto připravené roztoky byly míchány pomocí magnetického míchadla na míchačce za konstantní teploty. Při rozpouštění hodně záleželo na velikosti míchadla a intenzitě míchání dusičnanu stříbrného. Jestliže byl dusičnan usazen na dně, rozpouštění trvalo mnohem déle a bylo potřeba jej rozmíchat tyčinkou.

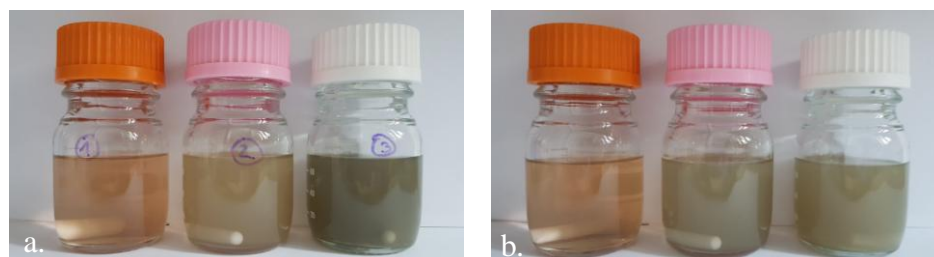
První den docházelo k rozpouštění dusičnanu, kdy nejkonzentrovanejší roztok se rozpouštěl téměř 9 hodin, současně s rozpouštěním probíhala redukce dusičnanu stříbrného, kdy ve tmě (roztoky zabalené v alobalu) byla tato redukce pomalejší než na světle, což je možné vidět na Obrázek 10 a,b.



Obrázek 10: Rozpouštění dusičnanu stříbrného po 9 h, a. na světle, b. ve tmě

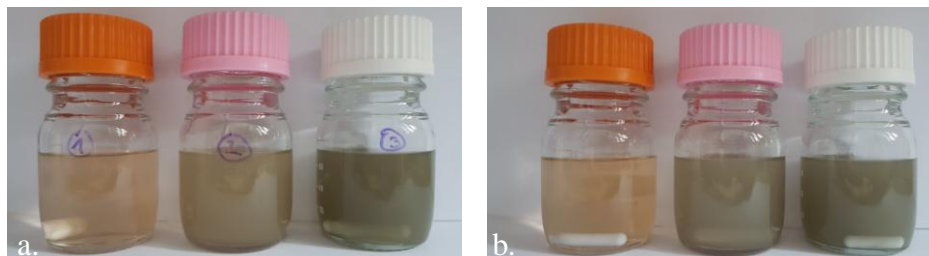


Druhý den se původně čiré zbarvení roztoku přeměňuje v roztoky zakalené díky probíhající redukci. Na světle probíhá redukce trochu rychleji a dusičnan je již zcela rozpuštěn. Ve tmě probíhá redukce pomaleji, což je zřetelné z Obrázek 11 a,b.



**Obrázek 11: Redukce dusičnanu stříbrného 2. den; a. na světle, b. ve tmě**

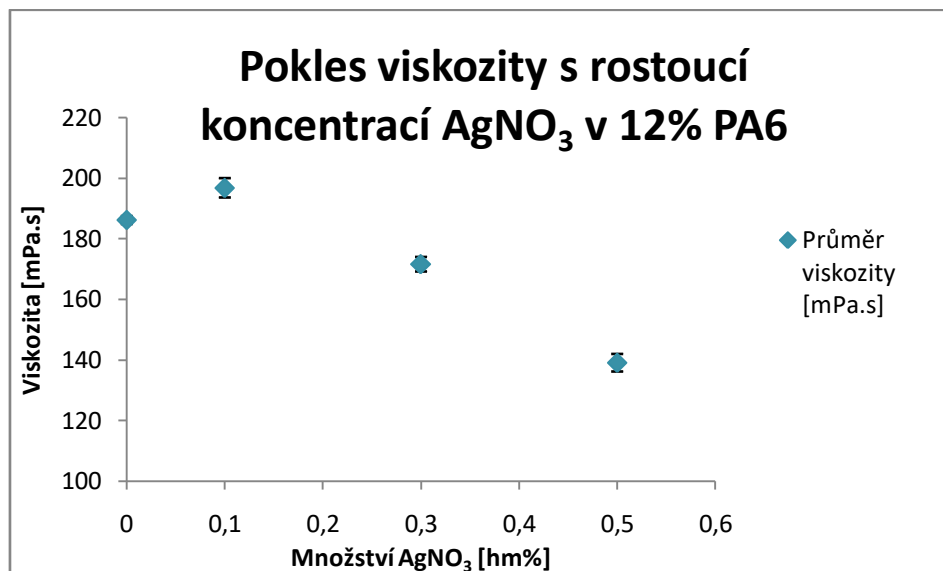
Třetí den jsou roztoky na světle téměř totožné jako den předchozí, roztoky ve tmě doredukovaly do téměř totožné podoby jako roztoky na světle. Stejně tomu tak je čtvrtý den, kdy už se barva roztoku nemění jak je zřejmé z Obrázek 12 a,b.



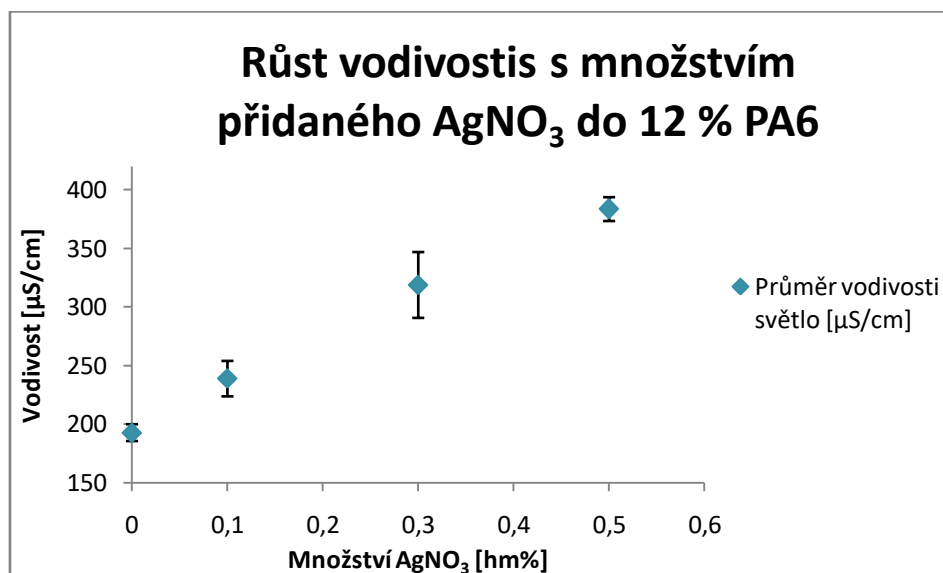
**Obrázek 12: Redukce dusičnanu stříbrného 4. den; a. na světle, b. ve tmě**

U těchto roztoků byla změřena viskozita, pomocí přístroje (FUNGILAB S.A., ALPHASERVICE), kdy bylo použito vřeteno L3. Na Obrázek 13 (Tabulka viz Příloha 2), je možné vidět, že se zvyšujícím se množstvím  $\text{AgNO}_3$  viskozita roztoku klesá, což bude podrobněji rozebráno a ověřeno v dalších testech v kapitole 13. V grafu jsou zaznamenány pouze hodnoty pro roztoky redukující za světla, neboť hodnoty jsou téměř totožné s roztoky redukující za tmy, dochází tedy k překryvu bodů, stejně tak u vodivosti. Vodivost byla měřena stejným přístrojem při laboratorní teplotě  $22\text{ }^\circ\text{C}$  a z výsledků měření vyplývá, že

u již zredukovaných roztoků se téměř nemění, roste pouze s koncentrací přidaného  $\text{AgNO}_3$ , což je možné vidět i na Obrázek 14 (Tabulka viz Příloha 2).



Obrázek 13: Pokles viskozity s rostoucí koncentrací  $\text{AgNO}_3$ , v 12% polyamidu 6 (viskozita při 100 RPM, 22,2 °C)



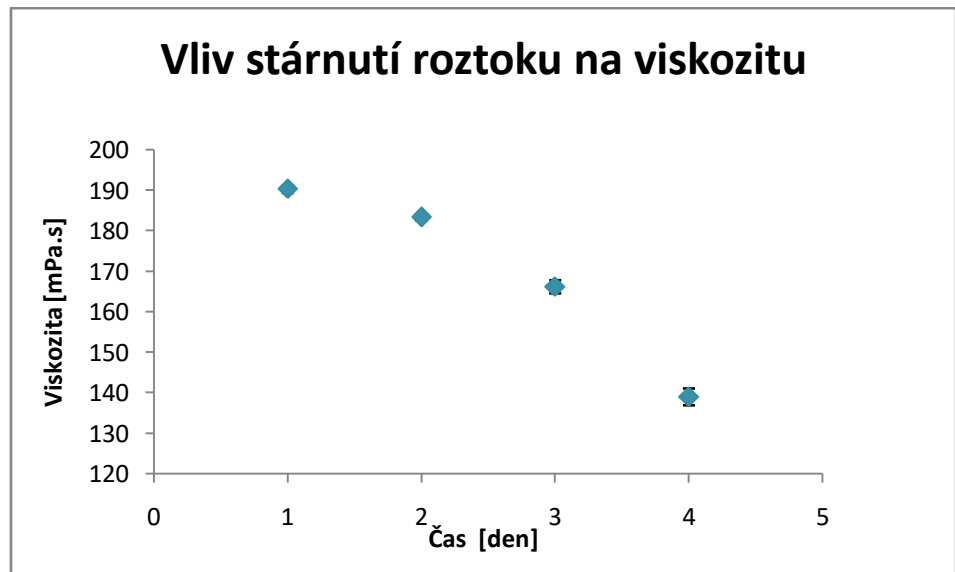
Obrázek 14: Růst vodivosti s množstvím přidaného  $\text{AgNO}_3$  do 12 % PA6 (vodivost při 22,3 °C)

## 12.1. Vliv stárnutí nejkonzentrovanejšího roztoku

Každý den byl do již připraveného čistého polyamidu přimíchán dusičnan stříbrny a následně byla pozorována stabilita těchto roztoků v závislosti na čase. Rozdíly proběhlé redukce v závislosti na dnech je možné vidět na Obrázek 15, zleva jsou 3 zredukováné roztoky a ve čtvrtém roztoku redukce teprve probíhá. Zbarvení již zredukováných roztoků je rozdílné, v nejstarším (5 dní) – tedy prvním roztoku již není tak znatelný zákal a na zakroužení se zdál být méně viskózní, což potvrdilo i měření viskozity zakreslené na Obrázek 16 (Tabulka viz Příloha 2). Vodivost jednotlivých roztoků se v závislosti na stáří téměř neměnila, o čemž vypovídá Obrázek 17 (Tabulka viz Příloha 2). Během tohoto měření bylo provedeno u každého roztoku 10 hodnot a vzhledem k použití jiné sondy, která zřejmě nebyla dobře kalibrovaná, jsou směrodatné odchylky větší než standartně.



Obrázek 15: Stárnutí roztoku v jednotlivých dnech; zleva 4 dny, 3 dny, 2 dny (zredukováné roztoky) , vpravo 1 den starý roztok (nezredukováný)



Obrázek 16: Vliv stárnutí roztoku na viskozitu  
(viskozita: 100 RPM, 22,5 °C; roztok: 12% PA6 + 0,5 hm% AgNO<sub>3</sub>)



Obrázek 17: Změny vodivosti v závislosti na stáří roztoku  
(vodivost při 22,5 °C; roztok: 12% PA6 + 0,5 hm% AgNO<sub>3</sub>)

Lze uvažovat následující důvody snížení viskozity roztoku polyamidu 6 se stříbrnými ionty:

1. Dochází ke snížení molekulové hmotnosti PA6 vlivem vzniku kyseliny dusičné. Ionty stříbra mohou být navázány na kyselinu mravenčí, protože mravenčan stříbrný není rozpustný ve

vodě. Díky tomu ionty  $\text{NO}_3^-$  mohou dávat menší množství kyseliny dusičné, která může způsobovat degradaci polymeru. Pro ověření změny molekulové hmotnosti, měla být provedena Gelová permeační chromatografie (GPC), která nemohla být uskutečněna kvůli vysokým nákladům na potřebnou látku hexafluoroisopropanol (HFIP) pro rozpuštění polyamidu 6 pro uskutečnění měření.

2. Pokud by nebylo potvrzeno snížení molekulové hmotnosti vlivem popsaným v bodě 1, je druhé možné vysvětlení takové, že v průběhu vyredukování stříbra může způsobovat změnu konformace polymerního řetězce (většího sbalení makromolekuly), což může také způsobit snížení viskozity polymerního roztoku.

## 12.2. Parametry zvlákňování:

Nanovlákněné membrány připravené na Technické univerzitě v Liberci (TUL) na starším typu Nanospideru NS 1WS500U byly zvlákňeny jako statické vzorky na modrý sbunbond, při napětí 60 kV na zvlákňovací elektrodě a -20 kV na elektrodě sběrné. Vzdálenost mezi elektrodou a podkladem byla 173 mm a vlhkost se pohybovala okolo 33 %, byl použit průvlak 0,6 mm.

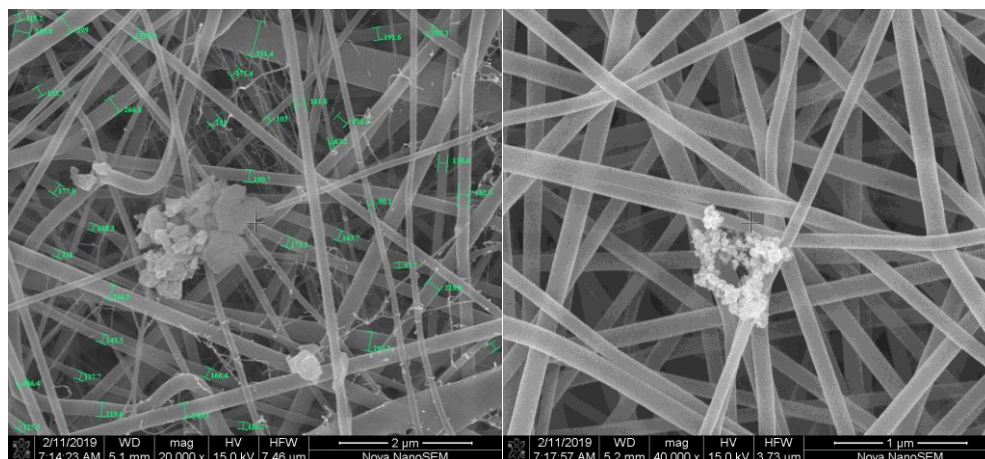
Tyto testy byly připraveny za účelem pozorování změn stáří roztoku, a jak se to promítne na snímcích SEM a EDX.

Tabulka 12: Vyhodnocené průměry vláken a EDX analýza u jednotlivých snímků

Vzorek	Stáří roztoku: 0,5 hm% AgNO <sub>3</sub> v 12 % PA6	Průměry vláken [nm]	Směrodatná odchylka
0-čistý PA6	-	147,567	31,6
3	4 dny	133,233	22,9
4	3 dny	159,567	39,8
5	2 dny	166,267	36,6
6	1 den	155,033	48,2
7	8 dní	164,333	41,7

SEM snímky byly připraveny na stejném přístroji (Nova NanoSEM 230). Průměry vláken na snímcích byly měřeny pomocí počítačového programu (NIS – Elements) pro měření průměru nanovláken. Bylo provedeno přibližně 50 měření vláken na několika snímcích, ze kterých byl následně vypočítán průměr a směrodatná odchylka, zaznamenané v Tabulka 12. Na Obrázek 18 lze pozorovat nanovlákná, na nichž jsou vidět útvary, které představují kovové stříbro, které se v roztoku vyredukovalo z dusičnanu stříbrného. Tuto domněnku však nebylo možné ověřit z časové a finanční náročnosti. Průměr vláken závisí na aktuální vlhkosti při zvlákňování, která nebyla vzhledem k okolním podmínkám konstantní u všech provedených testů.

Energiově disperzní spektroskopie analýza (EDX) byla provedena pomocí (Bruker nano XFlash Detektoru). Stejně jako v kapitole 11 analýza prokázala přítomnost stříbra v membránách, kde ale vzhledem k použité metodě není možné zjistit množství stříbra, protože metoda je bodová, kdy se měří množství stříbra pouze v určitých bodech a rozložení je výrazně nehomogenní.



Obrázek 18: SEM snímky se změřenými průměry vláken a s viditelnými krystalky

## **13. Konečné testy polyamidu 6 s antimikrobiálními činidly a testy na antimikrobiální účinnost**

Tyto testy byly provedeny pro ověření antimikrobiální aktivity membrán z důvodu pozorování změn probíhajících v roztoku v předchozí kapitole.

### **13.1. Příprava roztoků**

Základní roztok polyamidu byl připraven stejným způsobem jako v předchozích kapitolách 11 a 12, byla zvolena pouze jedna koncentrace, a to 12 % PA6-B27 v kyselině mravenčí a kyselině octové v poměru 1:2. Do takto připraveného roztoku bylo po vychladnutí na pokojovou teplotu přidáváno antimikrobiální činidlo jako prekurzor v různé koncentraci. Za antimikrobiální činidlo byl zvolen dusičnan stříbrný, který se v kyselině mravenčí redukuje na kovové stříbro, což je popsáno v kapitole 3.1.

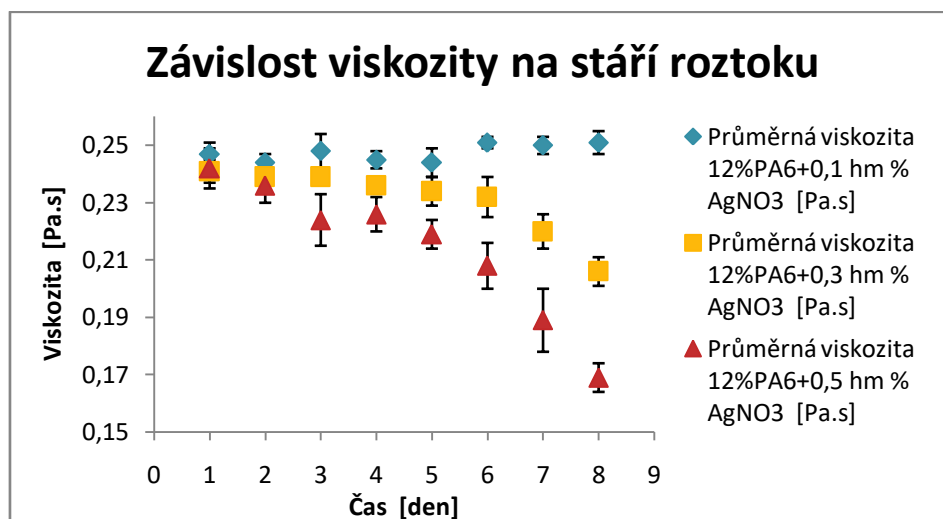
Jedinou změnou byla delší redukce dusičnanu stříbrného v polymerním roztoku. Při tomto pokusu byl použit dusičnan stříbrný (SIGMA-ALDRICH "p.a."). Tento nový dusičnan byl krystalický a vzhledem se odlišoval od původního dusičnanu, který byl použit v kapitolách 11 a 12, který byl ve formě jemnějšího prášku.

Velmi zajímavou otázkou bylo, v jaké části redukce je nejlepší stříbro zvláknit? Byly proto provedeny testy stability roztoku a pozorovány redukční vlastnosti dusičnanu stříbrného v kyselině mravenčí a také vliv světla na redukci - vyhodnocení roztoku je možné vidět v kapitole 12.

### **13.2. Vlastnosti připravených roztoků**

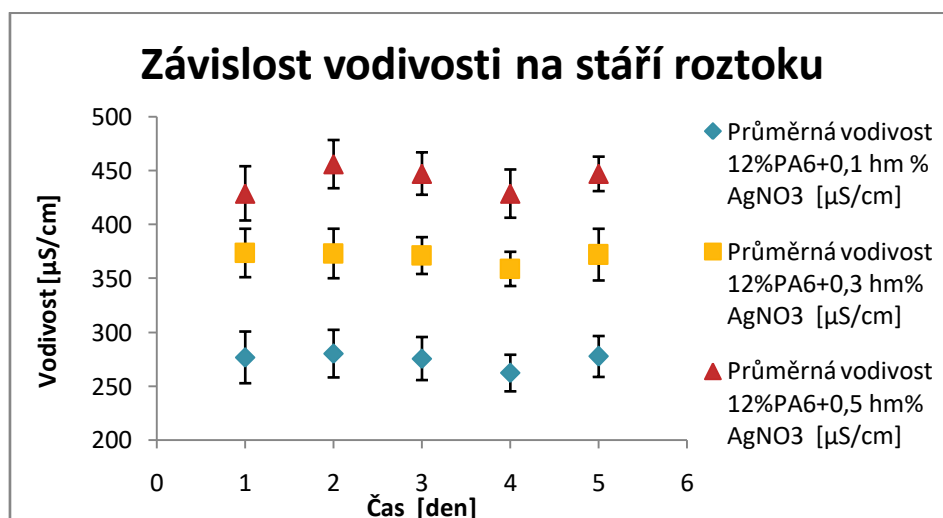
Z níže uvedených grafů vyplývá, že na viskozitu roztoku má velký vliv jeho stáří. Čím více  $\text{AgNO}_3$  roztok obsahuje, tím dochází k většímu

poklesu viskozity v jednotlivých dnech, což již bylo rozebráno v předchozí kapitole 12 a dosvědčuje to i následující Obrázek 19 (Tabulka viz Příloha 2).



Obrázek 19: Závislost viskozity na stáří roztoku  
(viskozita: 100 RPM, 22 °C; roztok: 12% PA6 + 0,5 hm% AgNO<sub>3</sub>)

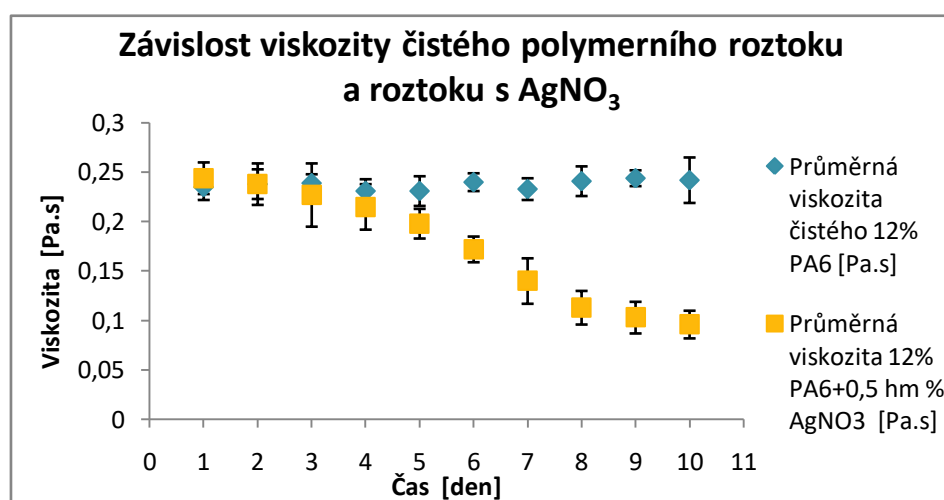
Vodivost zůstává v závislosti na dnech téměř konstantní, což je možné vidět v následujícím Obrázek 20 (Tabulka viz Příloha 2).



Obrázek 20: Závislost vodivosti na stáří roztoku  
(vodivost při 22,1 °C; roztok: 12% PA6 + 0,5 hm% AgNO<sub>3</sub>)



Pro potvrzení úvahy o poklesu molekulové hmotnosti v kapitole 12.1 byly provedeny ještě další testy na srovnání čistého polyamidu a polyamidu s  $\text{AgNO}_3$ . Viskozity byly měřeny na spolehlivém viskotesteru (Haake 550), z čehož vychází následující Obrázek 21 (Tabulka viz Příloha 2), kdy je vidět, že viskozita čistého polyamidu 6 zůstává téměř konstantní, ale viskozita polymerního roztoku s přidávkou dusičnanu stříbrného velice prudce klesá v závislosti na jednotlivých dnech.



Obrázek 21: Závislost viskozity čistého polymerního roztoku a roztoku s  $\text{AgNO}_3$  (viskozita při 100 RPM, 22 °C)

### 13.3. Parametry zvláknování a vlastnosti nanovlákné membrány

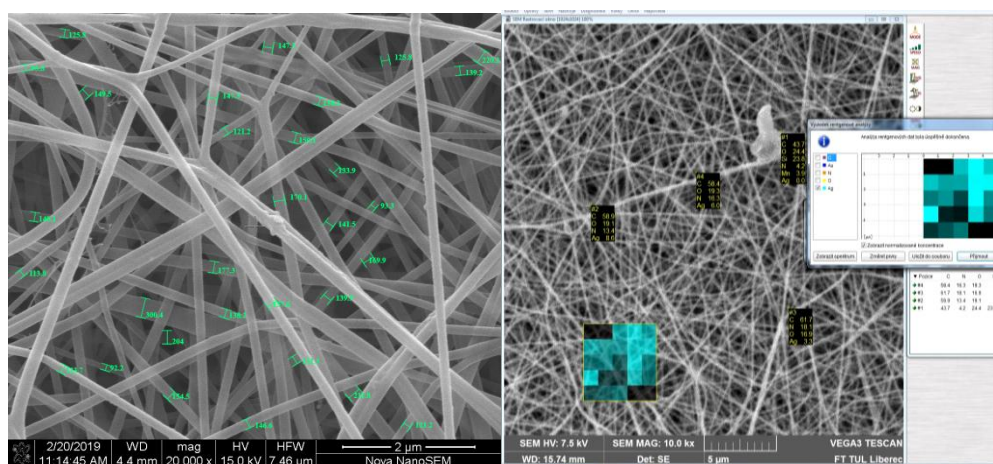
Všechny vzorky byly připraveny téměř při stejných podmínkách, kromě vzorku 0, kde nebylo možné nastavit vyšší vlhkost z důvodu dalších výzkumných prací. Tato nižší vlhkost (27 %RH) se odrazila na průměru vláken čistého polyamidu, což je možné vidět v Tabulka 13, kdy průměr vláken čistého polyamidu je mnohem vyšší, než ostatní vlákna s dusičnanem stříbrným. Ostatní vzorky byly zvlákněny při vlhkosti 32 %RH, nastaveném napětí 60/-20 kV, při vzdálenosti 180 mm/min s průvlakem 0,6 mm a rychlostí posunu podkladu 9 mm/min.

Během vyhodnocování vzorků bylo stejně jako při předchozích měření vždy změřeno několik hodnot, z nichž byla následně spočítána střední hodnota a směrodatná odchylka, které jsou zaznamenané v Tabulka 13.

Tabulka 13: Konečné vlastnosti membrány, kde  $\bar{x}$  značí střední hodnotu a  $\sigma$  značí směrodatnou odchylku

hm% AgNO <sub>3</sub> na sušinu polymeru PA6	0		0,1		0,3		0,5	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>Průměr vláken [nm]</b>	151,7	41,5	122,5	24,5	120,1	21,5	140,7	41,3
<b>Velikost největšího póru [μm]</b>	74,6	0,11	93,66	0,265	86,63	0,233	83,27	0,248
<b>Plošná hmotnost [g/m<sup>2</sup>]</b>	12,71	0,265	10,59	0,294	9,27	0,279	9,29	0,153
<b>Tloušťka vrstvy [mm]</b>	0,085	0,001	0,069	0,002	0,065	0,002	0,059	0,001
<b>Prodyšnost [l/m<sup>2</sup>/s při 200 Pa]</b>	3,76	0,126	3,534	0,226	4,246	0,208	4,578	0,172

EDX analýza byla provedena pomocí detektoru Bruker nano XFlash Detektor, a tato analýza opět prokázala přítomnost stříbra v membránách, kde ale vzhledem k použité metodě není možné zjistit množství stříbra, protože metoda je bodová, kdy se měří množství stříbra pouze v určitých bodech a rozložení je výrazně nehomogenní, což už bylo několikrát vysvětleno v předchozích kapitolách. Pro uvedení příkladu jsou na Obrázek 22 zobrazeny SEM snímky společně s EDX analýzou. Pro ověření koncentrace stříbra v membráně byla následně provedena analýza - emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem viz. kapitola 13.5.



Obrázek 22: SEM a EDX analýza vzorku 12% PA6 + 0,5 hm% AgNO<sub>3</sub> na sušinu polymeru PA6

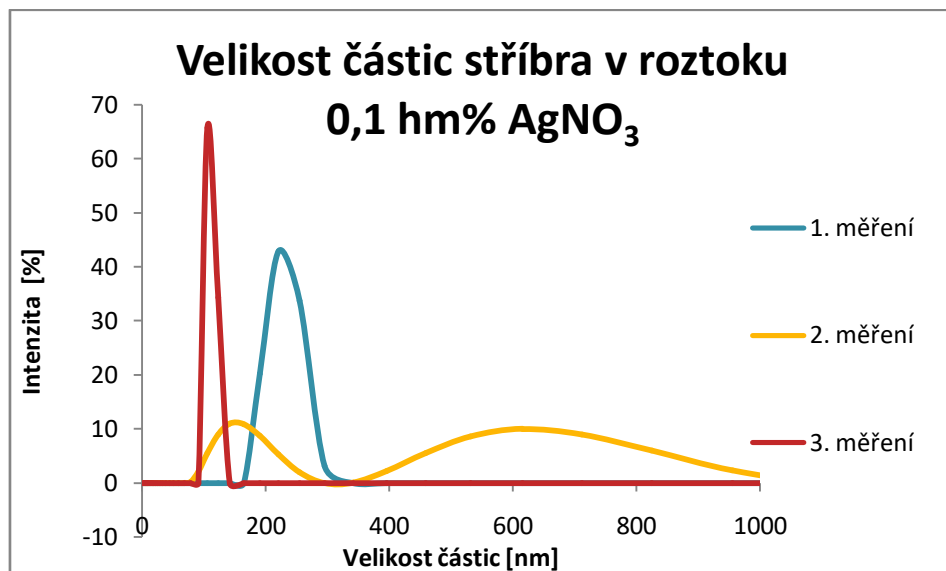
### 13.4. Velikost částic

Při měření velikosti částic na přístroji Zetasizer Nano ZS (ZEN3601), byla využita metoda dynamického rozptylu světla (DLS). Vzorky byly do přístroje umisťovány v podobě disperzí ve čtvercových kyvetách. V metodě byly zadány parametry jak disperzního prostředí, tak i měřených částic. Fyzikálními parametry potom byly refrakční index a absorpční koeficient jak částice, tak i disperzního prostředí. Dále byla v metodě zadána teplota, při které měření probíhá a případně množství opakování měření. Z principu metody není možné měřit příliš velké částice, které agregují. Jakmile částice začnou agregovat a sedimentovat, tak jsou tyto částice vyřazeny z měření a přístroj si jich nevšímá.

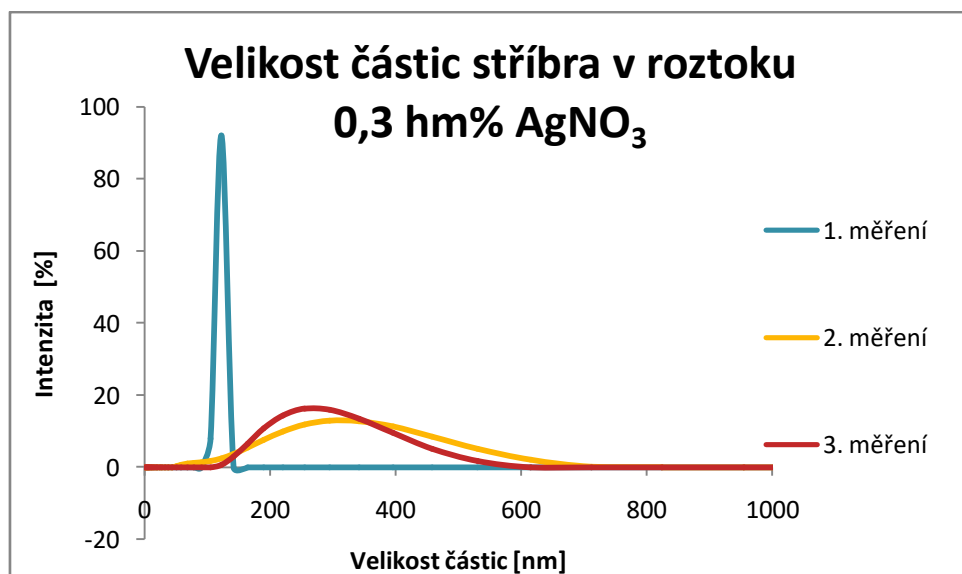
Byly použity roztoky bez polymeru, pouze dusičnan stříbrný o různé koncentraci – 0,1 hm%, 0,3 hm% a 0,5 hm% na hmotnost polymeru (jako v celé práci) smíchány s kyselinou mravenčí a octovou v poměru 1:2. Roztoky byly připraveny 2 dny před samotným testováním, aby mohla proběhnout redukce dusičnanu stříbrného.

Pro každý vzorek (= koncentraci) byly provedeny 3 měření. Z následujících Obrázek 23 – 25 vyplývá, že velikost částic se pohybuje v rozmezí 100 – 1000 nm. Největší zastoupení však mají částice o velikosti přibližně 100 nm, které se ukazují vždy během prvního měření a to z důvodu největší homogenity roztoku. V následujících

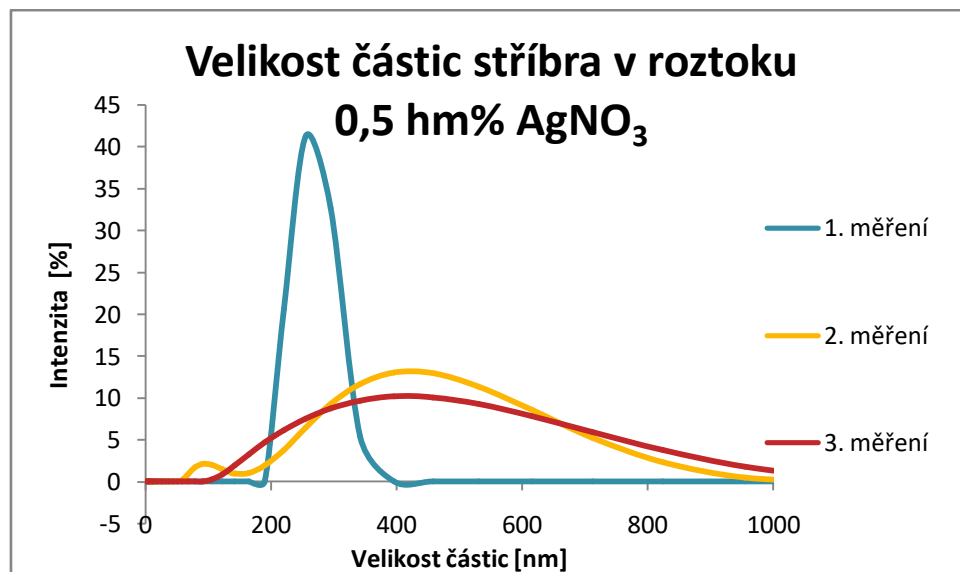
měřeních dochází k agregaci částic, roztoky již nejsou tak homogenní a vyskytují se v nich různě veliké shluky. K tomu dochází u všech tří koncentrací roztoku, jak je možné pozorovat z následujících grafů.



Obrázek 23: Velikost částic stříbra v roztoku 0,1 hm% AgNO<sub>3</sub>



Obrázek 24: Velikost částic stříbra v roztoku 0,3 hm% AgNO<sub>3</sub>



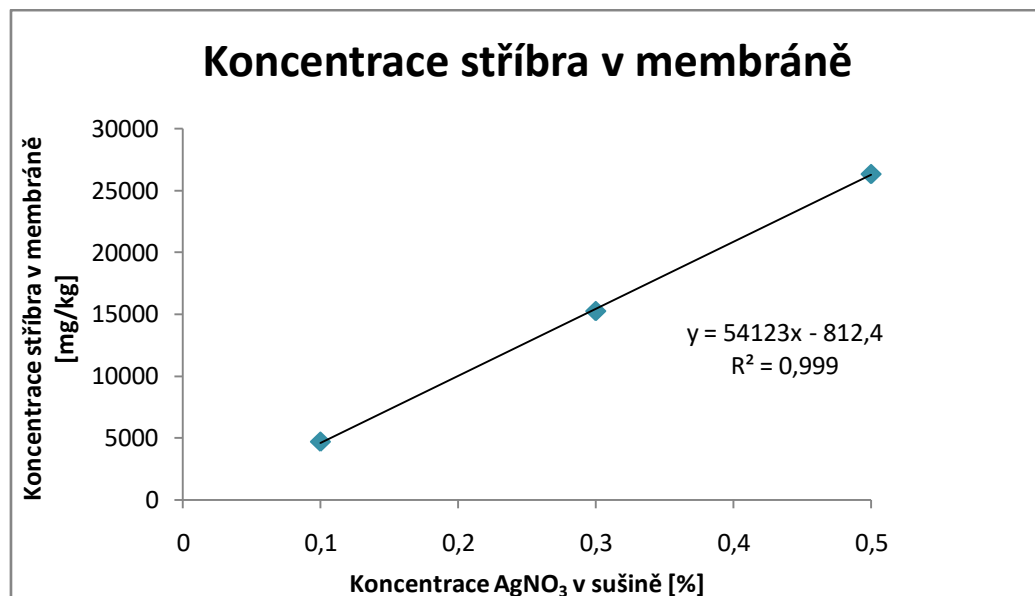
Obrázek 25: Velikost částic stříbra v roztoku 0,5 hm% AgNO<sub>3</sub>

### 13.5. Koncentrace stříbra v jednotlivých nano- vláknenných membránách

Koncentrace byla stanovena analytickou technikou ICP-OES - *Inductively coupled plasma optical emission spectrometry*, neboli emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, která slouží ke stanovení obsahu stopových i významných koncentrací jednotlivých prvků v analyzovaném vzorku.

Vzorky byly připravovány tak, že byly nejprve naváženy (cca půlka vzorku) a následně rozpuštěny v kyselině dusičné a poté analyzovány. Analýza byla prováděna na Oddělení nanomateriálů v přírodních vědách na TUL.

Výsledky těchto testů jsou prezentovány v následujícím grafu, kde lze pozorovat celkem lineární nárůst stříbra v membránách v závislosti na koncentraci. Pro vzorek č.1 (0,1 % AgNO<sub>3</sub>) vyšlo: 4 688 mg/kg, vzorek č.2 (0,3 % AgNO<sub>3</sub>): 15 248 mg/kg a vzorek č.3 (0,5 % AgNO<sub>3</sub>): 26 337 mg/kg.



Obrázek 26: Koncentrace stříbra v membráně

### 13.6. Analýza propustnosti a antimikrobiálních vlastností PA6 s dusičnanem stříbrným (redukované stříbro)

Výsledky provedených analýz jsou podobné, jako výsledky testů předchozích materiálů s AgNO<sub>3</sub> uvedených v kapitole 7.4., kde jsou uvedeny i použité kmeny MO a bližší vysvětlení k některým pojům. Všechny testované materiály kromě materiálu 0, jež představoval kontrolní materiál bez aktivní látky, do určité míry inhibovaly růst pěti vybraných mikroorganismů. Při testech zádržnosti mikroorganismů (filtrace) opět nedošlo k výraznému zachytu u žádného ze vzorků, počet mikroorganismů ve výsledném filtrátu byl přibližně stejný jako počet MO ve filtrované suspenzi.

#### *Antimikrobiální vlastnosti na ztuženém médiu*

Nárůstu pod nanomateriálem

- 24h suspenze MO o optické denzitě 1 McFarland (odpovídá přibližně  $1 \cdot 10^8$  KTJ/ml)
- Roztěr suspenze kličkou ve vodorovných pruzích na povrch Mueller Hinton agaru (5 na každý agar, vždy jeden MO na jeden agar) – složení viz Příloha 1

- Položení nanomateriálu (čtverec o velikosti 5x5 cm) na povrch
- Kultivace 24 h, 37 °C
- Odečet výsledků – zóny projasnění v mm v následující Tabulka 14

**Tabulka 14: Zóny inhibice růstu mikroorganismu za přítomnosti materiálu s antimikrobiální látkou**

<b>1. měření</b>					
<b>MO</b>	<b>SE</b>	<b>SA</b>	<b>EC</b>	<b>BS</b>	<b>CA</b>
<b>Materiál</b>	<b>[mm]</b>	<b>[mm]</b>	<b>[mm]</b>	<b>[mm]</b>	<b>[mm]</b>
<b>0 - kontrola</b>	-	-	-	-	-
<b>1. 0,1 hm% AgNO<sub>3</sub> na suš.polymeru</b>	0	0	0	0	0
<b>2. 0,3 hm% AgNO<sub>3</sub> na suš.polymeru</b>	2	0	0	1	1
<b>3. 0,5 hm% AgNO<sub>3</sub> na suš.polymeru</b>	1	1	0	2	2
<b>2. měření</b>					
<b>MO</b>	<b>SE</b>	<b>SA</b>	<b>EC</b>	<b>BS</b>	<b>CA</b>
<b>Materiál</b>	<b>[mm]</b>	<b>[mm]</b>	<b>[mm]</b>	<b>[mm]</b>	<b>[mm]</b>
<b>0 - kontrola</b>	-	-	-	-	-
<b>1. 0,1 hm% AgNO<sub>3</sub> na suš.polymeru</b>	0	0	0	0	0
<b>2. 0,3 hm% AgNO<sub>3</sub> na suš.polymeru</b>	2	1	0	1	1
<b>3. 0,5 hm% AgNO<sub>3</sub> na suš.polymeru</b>	1	2	0	2	2
<b>3. měření</b>					
<b>MO</b>	<b>SE</b>	<b>SA</b>	<b>EC</b>	<b>BS</b>	<b>CA</b>
<b>Materiál</b>	<b>[mm]</b>	<b>[mm]</b>	<b>[mm]</b>	<b>[mm]</b>	<b>[mm]</b>
<b>0 - kontrola</b>	-	-	-	-	-
<b>1. 0,1 hm% AgNO<sub>3</sub> na suš.polymeru</b>	1	0,5	1	0	0
<b>2. 0,3 hm% AgNO<sub>3</sub> na suš.polymeru</b>	2	2	1	1	1
<b>3. 0,5 hm% AgNO<sub>3</sub> na suš.polymeru</b>	0,5	0	0,5	0	0,5

Díky výsledkům testů na ztuženém médiu materiálu 0 lze soudit, že nedochází k inhibici mikrobiálního růstu pouze vytvořením pro růst nepříznivých podmínek (materiály nezabraňují průniku vzduchu a nevytvářejí tak anaerobní podmínky růstu), ale na základě přítomnosti antimikrobiálních látek ve struktuře polyamidu, jež jsou přítomny ve všech ostatních vzorcích materiálů. Zóny odečtené z Tabulka 14 vypovídají o vyšší antimikrobiální aktivitě v případě materiálů

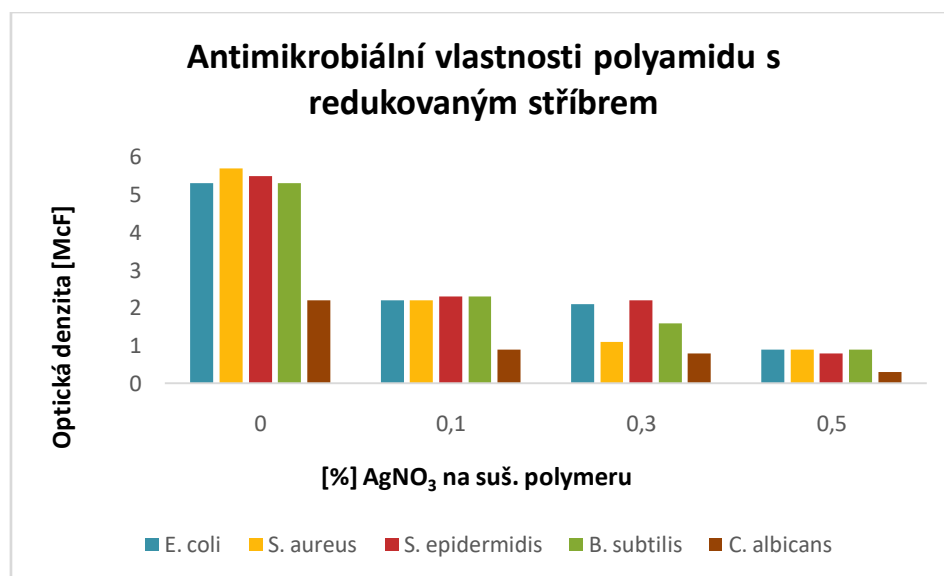
2 (0,3 hm% AgNO<sub>3</sub> na sušinu polymeru ) a 3 (0,5 hm% AgNO<sub>3</sub> na sušinu polymeru).

### ***Antimikrobiální vlastnosti v tekutém médiu***

- 24h suspenze MO o přibližné koncentraci  $1 \cdot 10^1 - 1 \cdot 10^2$  KTJ/ml
- Vložení nanomateriálu (čtverec o velikosti 5x5 cm) do zkumavky s 9 ml suspenze o přibližné koncentraci  $1 \cdot 10^1 - 1 \cdot 10^2$  KTJ/ml
- Kultivace 24 h, 37 °C
- Odečet výsledků – měření zákalu oproti kontrole – suspenzi MO bez přídavku nanomateriálu
- Výsledné optické denzity v tabulkách uváděny po odečtu hodnoty pozadí média

Bakterie byly kultivovány v pufrované peptonové vodě (PPV) a kvasinky ve sladidlovém bujónu (MEB), jejich složení je možné dohledat v Příloha 1.

I v provedených testech v tekutém médiu byla potvrzena největší antimikrobiální aktivita právě u nanomateriálu 3, který obsahoval nejvíce dusičnanu stříbrného, což je zjevné z Tabulka 15 a vypovídá o tom i následující Obrázek 27.



Obrázek 27: Antimikrobiální vlastnosti polyamidu s redukováným stříbrem



**Tabulka 15: Testy antimikrobiální aktivity v tekutém médiu a odečítání optické hustoty po kultivaci (37 °C, 24 h)**

<b>Kontroly MO (mikroorganismus bez přídavku nanomateriálu)</b>					
<b>Experiment</b>	<b>EC</b>	<b>SA</b>	<b>SE</b>	<b>BS</b>	<b>CAN</b>
<b>1.</b> 0,1 hm% AgNO <sub>3</sub> na suš.polymeru	7,4	6,9	7,4	7,2	2,5
<b>2.</b> 0,3 hm% AgNO <sub>3</sub> na suš.polymeru	7	6	6,5	6,2	3,1
<b>3.</b> 0,5 hm% AgNO <sub>3</sub> na suš.polymeru	5,4	4,7	4,3	4,1	3,3
<b>Kontroly MO (s nanomateriálem)</b>					
<b>MO</b>	<b>EC</b>	<b>SA</b>	<b>SE</b>	<b>BS</b>	<b>CAN</b>
<b>Materiál PA6 +</b>					
<b>0 – bez aktivní látky</b>	5,3	5,7	5,5	5,3	2,2
<b>1.</b> 0,1 hm% AgNO <sub>3</sub> na suš.polymeru	2,2	2,2	2,3	2,3	0,9
<b>2.</b> 0,3 hm% AgNO <sub>3</sub> na suš.polymeru	2,1	1,1	2,2	1,6	0,8
<b>3.</b> 0,5 hm% AgNO <sub>3</sub> na suš.polymeru	0,9	0,9	0,8	0,9	0,3
<b>Rozdíly hodnot s nanomateriály a bez nanomateriálů pro porovnní</b>					
<b>MO</b>	<b>EC</b>	<b>SA</b>	<b>SE</b>	<b>BS</b>	<b>CAN</b>
<b>Materiál PA6 +</b>					
<b>0 – bez aktivní látky</b>	0	0	0	0	0
<b>1.</b> 0,1 hm% AgNO <sub>3</sub> na suš.polymeru	-3,1	-3,5	-3,2	-3	-1,3
<b>2.</b> 0,3 hm% AgNO <sub>3</sub> na suš.polymeru	-3,2	-4,6	-3,3	-3,7	-1,4
<b>3.</b> 0,5 hm% AgNO <sub>3</sub> na suš.polymeru	-4,4	-4,8	-4,7	-4,4	-1,9

Provedenými testy byla potvrzena antimikrobiální aktivita dusičnanu stříbrného, který zejména ve vyšší koncentraci též potlačil mikrobiální růst velmi výrazně. Z materiálů s dusičnanem stříbrným byl jako nejúčinnější vyhodnocen materiál 3 – PA6 s AgNO<sub>3</sub> - 0,5 hm% na sušinu polymeru. Oproti předchozím testovaným materiálům, v nichž nebylo použito redukované stříbro, nedošlo k výraznému rozdílu v antimikrobiálním účinku.

## 14. ZÁVĚR

Tato diplomová práce se věnuje přípravě nanovlákných membrán s antimikrobiálními účinky vhodnými k použití například v lékařství, při filtracích či dalších aplikacích.

U připravených membrán byla vyhodnocena morfologie a její vliv na průchod bakterií. Zároveň byly modifikovány dusičnanem stříbrným pro lepší antimikrobiální aktivitu.

Vzhledem k tomu, že se pohybujeme v rozmezí nanometrů, byl předpoklad takový, že bakterie, které jsou řádově větší než velikost pórů, by neměly těmito materiály projít.

V prvních testech čistého polyamidu 6 byl prokázán účinek nanovlákných membrán při filtraci bakterií a kvasinek, kdy došlo k jejich mírnému záchytu a počet kolonií tvořících jednotek v jednom mililitru se snížil o jeden až tři řády. V dalších dvou testech za přítomnosti dusičnanu stříbrného však nebyla prokázána významná účinnost na průchod bakterií, což mohlo být způsobeno například poškozenou membránou. Tyto rozporuplné výsledky bude nutné zopakovat.

Při prvotních testech průchodu mikroorganismů v tekutém médiu skrz nanovláknou membránu z čistého polyamidu 6 se jako materiály absolutně zadržující kvasinky jevíly materiály PA6\_200 i PA6\_500. Z výsledků pro PA6\_200 a *Bacillus cereus* je patrné zadržení mikroorganismu o dva řády. Tyto experimenty také potvrdily vyšší zadržení eukaryotických mikroorganismů, což koresponduje s jejich větší velikostí oproti mikroorganismům prokaryotickým.

Modifikované membrány dusičnanem stříbrným při testech průchodu mikroorganismů v tekutém médiu skrz nanovláknou membránu prokázaly antimikrobiální aktivitu dusičnanu stříbrného, který zejména ve vyšší koncentraci potlačil mikrobiální růst velmi výrazně. Vliv redukce dusičnanu stříbrného v roztoku při opakovaných testech

neměl téměř žádný vliv a výsledky opakovaných testů se shodovaly. V obou testech vyšel nejlépe materiál 3 – 12% PA6 s 0,5 hm% AgNO<sub>3</sub> na sušinu polymeru.

Testy na ztuženém médiu byly provedeny pouze pro membrány po redukci dusičnanu stříbrného a také u nich byla prokázána antimikrobiální aktivita a to vytvořením inhibičních zón kolem materiálů. Čím větší koncentrace stříbra, tím větší antimikrobiální aktivita. Stejně jako u testů v tekutém médiu vyšel nejlépe materiál 3 – 12% PA6 s 0,5 hm% AgNO<sub>3</sub> na sušinu polymeru.

Nakonec byla pozorována stabilita roztoků s dusičnanem stříbrným a bylo zjištěno, že viskozita u roztoků obsahujících dusičnan stříbrný se snižovala s každým příchodem dnem a to zřejmě díky snižování molekulové hmotnosti PA6 vlivem vzniku kyseliny dusičné. Ionty stříbra byly nejspíše navázány na kyselinu mravenčí, kde vznikal mravenčan stříbrný, který není rozpustný ve vodě. Díky tomu ionty NO<sub>3</sub><sup>-</sup> mohly dávat menší množství kyseliny dusičné, která mohla způsobovat degradaci polymeru. Zajímavý byl také pokles viskozity v jednotlivých dnech v závislosti na koncentraci, čím více iontů stříbra roztok obsahovat, tím větší pokles viskozity byl. Vodivost se držela téměř na konstantních hodnotách.

## 15. SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1: Přehled grampozitivních a gramnegativních bakterií rezistentních na antibiotika [32] .....	35
Tabulka 2: Naměřené parametry roztoků, $\bar{x}$ - střední hodnota; $\sigma$ – směrodatná odchylka; (viskozita: 100 RPM, 22 °C) .....	41
Tabulka 3: Charakteristiky membrány, $\bar{x}$ - střední hodnota; $\sigma$ – směrodatná odchylka .....	43
Tabulka 4: Počet kolonií tvořící jednotky v suspenzi a filtrátu.....	45
Tabulka 5: Počet kolonií tvořící jednotky v suspenzi a filtrátu; materiál PA6_200.....	47
Tabulka 6: Testy propustnosti nanomateriálových membrán pro vybrané druhy mikroorganismů v tekutém médiu .....	47
Tabulka 7: Stěry po odebrání media, agarové plotny kultivovány ve 37 °C po 24±2 hodin.....	48
Tabulka 8: Parametry roztoku 12% PA6 + 0,1, 0,3, 0,5 hm% AgNO <sub>3</sub> na sušinu polymeru, kde $\sigma$ značí směrodatnou odchylku .....	50
Tabulka 9: Morfologie membrány, $\bar{x}$ -stř. hodnota; $\sigma$ –směr.odchylka .....	51
Tabulka 10: Testy zádržnosti mikroorganismů ve filtrátu na nanovláken-ných membránách z 12% PA6 s daným množstvím AgNO <sub>3</sub> .....	53
Tabulka 11: Testy antimikrobiální aktivity v tekutém médiu a odečítání optické denzity po kultivaci (37 °C, 24 h).....	55
Tabulka 12: Vyhodnocené průměry vláken a EDX analýza.....	61
Tabulka 13: Konečné vlastnosti membrány, kde $\bar{x}$ značí střední hodnotu a $\sigma$ značí směrodatnou odchylku .....	66
Tabulka 14: Zóny inhibice růstu mikroorganismu za přítomnosti materiálu s antimikrobiální látkou.....	71
Tabulka 15: Testy antimikrobiální aktivity v tekutém médiu a odečítání optické denzity po kultivaci (37 °C, 24 h).....	73

## 16. SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Strukturální vzorec polyamidu 6	14
Obrázek 2: Generování a stabilizace nanočástic stříbra z dusičnanu stříbrného	17
Obrázek 3a: Polyamid 6/ AgNO <sub>3</sub> , kde se vytvořila viditelná inhibiční zóna díky přidanému antimikrobiálnímu činidlu AgNO <sub>3</sub> ; 3b: Čistý polyamid 6 bez antimikrobiálního činidla, kde nevznikla žádná zóna inhibice [3]	18
Obrázek 4a: Buněčná stěna bakterií	27
Obrázek 5: Mechanismus působení nanočástic na bakteriální buňku, nanočástice stříbra přímo vstupují do buňky, indukují oxidační stres, poškozují obsah buněk a tím dochází k usmrcení buňky. [73]	39
Obrázek 6: SEM se změřenými průměry vláken (zvětšeno 20 000x)	43
Obrázek 7: 0,1 hm% AgNO <sub>3</sub> , a. změřené průměry, b. SEM snímek s krystalky	52
Obrázek 8: Kultivace filtrů, kde je možné vidět, že došlo k nárůstu MO, ale ne na materiálech ani v jejich bezprostřední blízkosti	54
Obrázek 9: Antimikrobiální vlastnosti materiálů v tekutém médiu	54
Obrázek 10: Rozpouštění dusičnanu stříbrného po 9 h, a. na světle, b. ve tmě	56
Obrázek 11: Redukce dusičnanu stříbrného 2. den; a. na světle, b. ve tmě	57
Obrázek 12: Redukce dusičnanu stříbrného 4. den; a. na světle, b. ve tmě	57
Obrázek 13: Pokles viskozity s rostoucí koncentrací AgNO <sub>3</sub>	58
Obrázek 14: Růst vodivosti s množstvím přidaného AgNO <sub>3</sub> do 12 % PA6	58
Obrázek 15: Stárnutí roztoku v jednotlivých dnech; zleva 4 dny, 3 dny, 2 dny (zredukované roztoky) , vpravo 1 den starý roztok (nezredukovaný)	59
Obrázek 16: Vliv stárnutí roztoku na viskozitu	60
Obrázek 17: Změny vodivosti v závislosti na stáří roztoku	60
Obrázek 18: SEM snímky s viditelnými krystalky	62
Obrázek 19: Závislost viskozity na stáří roztoku	64
Obrázek 20: Závislost vodivosti na stáří roztoku	64
Obrázek 21: Závislost viskozity čistého polymerního roztoku a roztoku s AgNO <sub>3</sub> (viskozita při 100 RPM, 22 °C)	65
Obrázek 22: SEM a EDX analýza vzorku 0,5 hm% AgNO <sub>3</sub>	67
Obrázek 23: Velikost částic stříbra v roztoku 0,1 hm% AgNO <sub>3</sub>	68
Obrázek 24: Velikost částic stříbra v roztoku 0,3 hm% AgNO <sub>3</sub>	68
Obrázek 25: Velikost částic stříbra v roztoku 0,5 hm% AgNO <sub>3</sub>	69
Obrázek 26: Koncentrace stříbra v membráně	70
Obrázek 27: Antimikrobiální vlastnosti polyamidu s redukovaným stříbrem	72

## 17. BIBLIOGRAFIE

1. VESELÝ, Karel. *Plasty a kaučuk*. Praha: SNTL, 1981.
2. MLEZIVA, Josef a Jaromír ŠŇUPÁREK. *Polymery: výroba, struktura, vlastnosti a použití*. 2. přeprac. vyd. Praha: Sobotáles, 2000, 537. ISBN 8085920727.
3. JABUR, A.R. ABBAS, L.K. MOOSA, S.J. *Antibacterial Activity of Electrospun Silver Nitrate / Nylon 6 Polymeric*. Iraq: Al-Khwarizmi Engineering Journal. 2017, 13(1).
4. DE VRIEZE, Sander. Bert DE SCHOENMAKER. Özgür CEYLAN. Jara DEPUYDT, Lieve VAN LANDUYT, Hubert RAHIER, Guy VAN ASSCHE a Karen DE CLERCK. *Morphologic study of steady state electrospun polyamide 6 nanofibres*. Journal of Applied Polymer Science. 2011, 119(5), 2984-2990. ISSN 00218995.
5. MIGUEL, Sónia P., Rosa S. SEQUEIRA, André F. MOREIRA, Cátia S.D. CABRAL, António G. MENDONÇA, Paula FERREIRA a Ilídio J. CORREIA. *An overview of electrospun membranes loaded with bioactive molecules for improving the wound healing process*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2019, 139, 1-22. ISSN 09396411.
6. LIU, Yanan, Yang LIU, Nina LIAO, Fuhai CUI, Mira PARK a Hak-Yong KIM. *Fabrication and durable antibacterial properties of electrospun chitosan nanofibers with silver nanoparticles*. International Journal of Biological Macromolecules. 2015, 79, 638. ISSN 01418130.
7. FELIX SWAMIDOSS, V., Mohan BANGARU, Gobi NALATHAMBI, Dharmalingam SANGEETHA a Arun Karthick SELVAM. *Silver-incorporated poly vinylidene fluoride nanofibers for bacterial filtration*. Aerosol Science and Technology. 2018, 53(2), 196-206. ISSN 0278-6826.
8. KANG, Weimin, Jingge JU, Huihui ZHAO, Zongjie LI, Xiaomin MA a Bowen CHENG. *Characterization and antibacterial properties of Ag NPs doped nylon 6 tree-like nanofiber membrane prepared by one-step electrospinning*. Fibers and Polymers. 2016, 17(12), 2006-2013. ISSN 1229-9197.
9. HONG, Hu Fan a Sunghoon JEONG. *Effect of Nano Sized Silver on Electrospun Nylon-6 Fiber*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology. 2011, 11(1), 372-376. ISSN 1533-4880.
10. SHI, Quan, Narendiran VITCHULI, Joshua NOWAK, et al. *One-step synthesis of silver nanoparticle-filled nylon 6 nanofibers and their antibacterial properties*. Journal of Materials Chemistry. 2011, 21(28), 10330-10335. ISSN 0959-9428.

11. PARK, Suk-Woo, Hyun-Su BAE, Zhi-Cai XING, Oh Hyeong KWON, Man-Woo HUH a Inn-Kyu KANG. *Preparation and properties of silver-containing nylon 6 nanofibers formed by electrospinning*. Journal of Applied Polymer Science. 2009, 112(4), 2320-2326. ISSN 00218995.
12. SANCAK, E., OZEN, M.S., ERDEM, R.b, et al. *PA6/silver blends: Investigation of mechanical and electromagnetic shielding behaviour of electrospun nanofibers*. Turkey : Ege Universitesi, 2018, 28(3), 229-235.
13. KVÍTEK, Libor a Aleš PANÁČEK. *Základy koloidní chemie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. ISBN 978-80-244-1669-4.
14. BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Praha: VŠCHT Praha, 2005. ISBN 80-7080-579-X.
15. DEHNAVI, Arefeh Sadat, Ahmadreza RAISI a Abdolreza AROUJALIAN. *Control Size and Stability of Colloidal Silver Nanoparticles with Antibacterial Activity Prepared by a Green Synthesis Method*. Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry. 2013, 43(5), 543-551. ISSN 1553-3174.
16. PANÁČEK, Aleš, KVÍTEK, Libor, PRUCEK, Robert, et al. *Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity*. J Phys Chem B 2006; 16248–16253, 110.
17. ŠRÁMEK, Jaromír. *Nanotechnologie v medicíně*. Brno: Masarykova univerzita, 2009, 15.
18. HÁJKOVÁ, Zdeňka a Petr ŠMEJKAL. *Nanotechnologie pro život (projekt 5P – program pro pedagogy přírodovědných předmětů)*. 2010, Praha, 52.
19. ZHANG, Xi-Feng, Zhi-Guo LIU, Wei SHEN a Sangiliyandi GURUNATHAN. *Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches*. International Journal of Molecular Sciences. 2016, 17(9). ISSN 1422-0067.
20. LARA, Humberto H., Nilda V. AYALA-NÚÑEZ, Liliana del Carmen IXTEPAN TURRENT a Cristina RODRÍGUEZ PADILLA. *Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2010, 26(4), 615-621. ISSN 0959-3993.
21. LI, R.; CHEN, J.; CESARION, T.C., et al. *Synergistic reaction of silver nitrate, silver nanoparticles, and methylene blue against bacteria*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2016, 48(113), 13612-13617.
22. SIM, Wilson, Ross BARNARD, M.A.T. BLASKOVICH a Zyta ZIORA. *Antimicrobial Silver in Medicinal and Consumer Applications: A Patent Review of the Past Decade (2007–2017)*. Antibiotic. 2018, 7(4). ISSN 2079-6382.
23. ŠČUKIN, E. D., PERCOV, A. V., AMELINOVÁ, E. A. *Koloidní chemie*. vyd. 1. Praha: Academia, 1990.

24. KHOLOUD, M. M. et al. *Synthesis and applications of silver nanoparticles*. Arabian Journal of Chemistry, 2010, 3(3), 135-140.
25. HORVATH, Helmuth. *Gustav Mie and the scattering and absorption of light by particles: Historic developments and basics*. Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer. 2009, 110(11), 787-799. ISSN 00224073.
26. XUAN HOA VU, THI THANH TRA DUONG, et al. *Synthesis and study of silver nanoparticles for antibacterial activity against Escherichia coli and Staphylococcus aureus*. Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology. 2018, 9(2).
27. GALLAGHER, James J., Ludwik K. BRANSKI, Natalie WILLIAMS-BOUYER, Cynthia VILLARREAL a David N. HERNDON. *Treatment of infection in burns*. Total Burn Care. Elsevier, 2012, 137-156. ISBN: 9781437727869.
28. PANDIAN, S.R.K., DEEPAK, V., et al. *Mechanism of bactericidal activity of Silver Nitrate – a concentration dependent bi-functional molecule*. Brazilian Journal of Microbiology. 2010, 41(3).
29. KHALIL A.K., FOUAD H., ELSARNAGAWY T., ALMAJHDI F.N. *Preparation and Characterization of Electrospun PLGA/silver Composite Nanofibers for Biomedical Applications*. International Journal of Electrochemical science. 2013, 3483 - 3493.
30. HASELL, Tom, Jixin YANG, Wenxin WANG, Paul D. BROWN a Steven M. HOWDLE. *A facile synthetic route to aqueous dispersions of silver nanoparticles*. Materials Letters . 2007, 61(27), 4906-4910. ISSN 0167577X.
31. KRISHNARAJ, C., E.G. JAGAN, S. RAJASEKAR, P. SELVAKUMAR, P.T. KALAICHELVAN a N. MOHAN. *Synthesis of silver nanoparticles using Acalypha indica leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2010, 76(1), 50-56. ISSN 09277765.
32. DAKAL, Tikam Chand, Anu KUMAR, Rita S. MAJUMDAR a Vinod YADAV. *Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles*. Frontiers in Microbiology. 2016, 7. ISSN 1664-302X.
33. SERALATHANA, Janani, STEVENSON, Priscilla, et al. *Spectroscopy investigation on chemo-catalytic, free radical scavenging and bactericidal properties of biogenic silver nanoparticles synthesized using Salicornia brachiata aqueous extract*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2014, 118(24),349-355.
34. NARAGINTI, Saraschandra a A. SIVAKUMAR. *Eco-friendly synthesis of silver and gold nanoparticles with enhanced bactericidal activity and study of silver catalyzed reduction of 4-nitrophenol*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2014, 128, 357-362. ISSN13861425.



35. SRIRAM, M.I., KANTH, S.B.M., KALISHWARDAL, K., GURUNATHAN, S. *Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton's lymphoma ascites tumor model*. International Journal of Nanomedicine. 2010, 5(1), 753-762.
36. SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada Publishing a.s., 2010, 17. ISBN 8024731703
37. AMBROŽOVÁ J. *Mikrobiologie v technologii vod*. Praha : VŠCHT, 2004. ISBN 80-7080-534-X.
38. BEDNÁŘ M., FRAŇKOVÁ V., SCHINDLER J., SOUČEK A., VÁVRA J.. *Lékařská mikrobiologie*. Praha : Marvil, s.r.o., 1996, 50-53. ISBN 9788023802979.
39. FRENCH, G. L. *Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections--the potential role of daptomycin*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2006, 58(6), 1107-1117. ISSN 0305-7453.
40. MORONES, Jose Ruben, Jose Luis ELECHIGUERRA, Alejandra CAMACHO, Katherine HOLT, Juan B KOURI, Jose Tapia RAMÍREZ a Miguel Jose YACAMAN. *The bactericidal effect of silver nanoparticles*. Nanotechnology. 2005, 16(10), 2346-2353. ISSN 0957-4484.
41. BAKER C., PRADHAN A., PAKSTIS L., et al. *Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology. 2005, 244–249, 5.
42. MICHALCOVÁ, Alena, Larissa MACHADO, Ivo MAREK, Marek MARTINEC, Marcela SLUKOVÁ a Dalibor VOJTĚCH. *Properties of Ag nanoparticles prepared by modified Tollens' process with the use of different saccharide types*. Journal of Physics and Chemistry of Solids. 2018, 113, 125-133. ISSN 00223697.
43. KIM S. H., LEE H. S., RYU D. S., ChOI S. J., LEE D. S. *Antibacterial Activity of Silver-nanoparticles Against Staphylococcus aureus and Escherichia coli*. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 2011, 39, 77–85.
44. YACAMÁN, M. José, J. A. ASCENCIO, H. B. LIU a J. GARDEA-TORRESDEY. *Structure shape and stability of nanometric sized particles*. Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures. 2001, 19(4). ISSN 0734211X.
45. SHAHVERDI A.R., FAKHIMI A., SHAHVERDI H.R., MINAIAN S. *Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against Staphylococcus aureus and Escherichia coli*. Nanomedicine. 2007, 3(2),168–171.
46. CHEN, Sihai a David L. CARROLL. *Synthesis and Characterization of Truncated Triangular Silver Nanoplates*. Nano Letters. 2002, 2(9), 1003-1007. ISSN 1530-6984.

47. PAL, S., Y. K. TAK a J. M. SONG. *Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology. 2007, 73(6), 1712.
48. ALWAN, H.A., KARAM, M.A., HASHIM, H.O., HUSSEIN, F.H.. *Synthesis and antibacterial activities of silver nanoparticles*. Asian Journal of Chemistry. 2019, 31(1), 56-60.
49. TAMBOLI, D.P. a LEE, D.S. *Mechanistic antimicrobial approach of extracellularly synthesized silver nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria*. Journal of Hazardous Materials. 2013, 260, 878-884.
50. KIM J. S., KUK E., YU K. N., KIM J. H., PARK S. J., LEE H. J., et al. *Antimicrobial effects of silver nanoparticles*. Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med. 2007, 3, 95–101.
51. SHRIVASTAVA S, BERA T, ROY A, SINGH G, RAMACHANDRARAO P, DASH D. *Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles*. Nanotechnology 18, 2007, 1–9.
52. RAI, M.K., S.D. DESHMUKH, A.P. INGLE a A.K. GADE. *Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria*. Journal of Applied Microbiology. 2012, 112(5), 841-852. ISSN 13645072.
53. FENG, Q. L., WU, J., CHEN, G. Q., CUI, F. Z., KIM, T. N., a KIM, J. O. *A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus*. J. Biomed. Mater. Res. 2010, 52, 662–668.
54. PAL, S., TAK, Y. K., SONG, J. M. (2007). *Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology. 27, 1712–1720.
55. PAKNEJADI, M., BAYAT, M., et al. *Concentration- and time-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles on normal human skin fibroblast cell line*. Iranian Red Crescent Medical Journal. 2018, 20(10).
56. HADRUP, Niels, Anoop K. SHARMA a Katrin LOESCHNER. *Toxicity of silver ions, metallic silver, and silver nanoparticle materials after in vivo dermal and mucosal surface exposure: A review*. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2018, 98, 257-267. ISSN 02732300.
57. DĚDKOVÁ K. *Studium antibakteriální a antivirotické aktivity*. Palackého Universita, Diplomová práce, Olomouc, 2011.
58. VEČEŘOVÁ, Renata. *Koloidní stříbro a jeho biologická aktivita*. Olomouc: Ústav mikrobiologie LF UP v Olomouci, 2016.
59. PIVODOVÁ, V. *Cytotoxicita vzorků stříbra a nanozlata. Studium vlivu stříbra a nanozlata na experimentální model zánětu*. Dizertační práce, Olomouc 2013.

60. SUN R. W., CHEN R., CHUNG N. P., HO C. M., LIN C. L., CHE C. M. *Silver nanoparticles fabricated in Hepes buffer exhibit cytoprotective activities toward HIV-1 infected cells*. Chemical Communications. 2005, 40, 5059–5061.
61. SUGANYA K. S. U., GOVINDARAJU K., KUMAR V. G., DHAS T. S., KARTHICK V., SINGARAVELU G., et al. *Size controlled biogenic silver nanoparticles as antibacterial agent against isolates from HIV infected patients*. Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 2015, 144, 266–272.
62. LU L., SUN R. W., CHEN R., HUI C. K., HO C. M., LUK J. M., et al. *Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication*. Antiviral therapy. 2008, 13, 253–262.
63. FALCONER, Jonathan L., Jeremiah A. ALT a David W. GRAINGER. *Comparing ex vivo and in vitro translocation of silver nanoparticles and ions through human nasal epithelium*. Biomaterials. 2018, 171, 97-106. ISSN 01429612.
64. FALCONER J.L., GRAINGER D.W. *In vivo comparisons of silver nanoparticle and silver ion transport after intranasal delivery in mice*. Journal of Controlled Release. 2018, 269, 1-9.
65. PIES J. *Immun mit kolloidalem Silber: Wirkung, Anwendung, Erfahrungen*, Kindle Edition, Deutschland, 2012, ISBN: 978-3-86731-117-5.
66. MALARKODI, C., S. RAJESHKUMAR, K. PAULKUMAR, G. Gnana JOBITHA, M. VANAJA a G. ANNADURAI. *Biosynthesis of semiconductor nanoparticles by using sulfur reducing bacteria Serratia nematodiphila*. Advances in nano research. 2013, 1(2), 83-91. ISSN 2287-237X.
67. KUMAR S., MUKHERJEE M. M., VARELA M. F. *Modulation of bacterial multidrug resistance efflux pumps of the major facilitator superfamily*. International Journal of Bacteriology 2013.
68. GURUNATHAN, Sangiliyandi, Jae Woong HAN, Deug-Nam KWON a Jin-Hoi KIM. *Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria*. Nanoscale Research Letters. 2014, 9(1).
69. GRAVES, Joseph L., Mehrdad TAJKARIMI, Quincy CUNNINGHAM, Adero CAMPBELL, Herve NONGA, Scott H. HARRISON a Jeffrey E. BARRICK. *Rapid evolution of silver nanoparticle resistance in Escherinca in Escherichia coli*. 2015, 6. ISSN 1664-8021.
70. TIAN J., WONG K. K., HO C. M., LOK C. N., YU W. Y., CHE C. M., et al. *Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing*. Chem. Med. Chem. 2007, 2, 129–136.
71. MESSNER, K. R., J. A. IMLAY. *The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain*

and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 1999, 274, 10119–10128.

72. McSHAN D, RAY PC, Yu H. *Molecular Toxicity Mechanism of Nanosilver*. Journal of food and drug analysis. 2014, 22(1), 116-127.

73. PRASHAD K., LEKSHMI G. S., et al. *Synergic bactericidal effects of reduced graphene oxide and silver nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria*, Scientific report, 2017.

74. ZEMANOVÁ K., *Propustnost nanotextilií pro vybrané druhy mikroorganismů*. Bakalářská práce, VŠCHT Praha, 2018.

75. NEUPAURENOVÁ K.. *Využití kvasinek v potravinářském průmyslu*. Bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. 2012.

76. GAO Y., TRUONG B.Y., ZHU Y., KYRATZIS I.L.. *Electrospun antibacterial nanofibers: Production, activity, and in vivo applications*. *Electrospun antibacterial nanofibers: Production, activity, and in vivo applications*. Journal of Applied Polymer, 2014, 131, 40797.

77. Gate2Biotech - *vše o českých biotechnologiích na jednom místě*. Jihočeská agentura pro podporu inovačního podnikání o.p.s., 2006 - 2018. [cit. 12.02.2019] ISSN 1802-2685  
Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/dictionary.php?word=413>.

78. KVÍTEK, Libor ; PANÁČEK, Aleš. *Základy koloidní chemie*. Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. 70.

79. FISCHER, Oldřich. *Fyzikální chemie: (termodynamika, elektrochemie, kinetika, koloidní soustavy)*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1984.

80. *Mikrobiologie ONLINE - Kultivační půdy a biochemická diagnostika bakteriálních druhů*, [cit. 12.02.2019]  
Dostupné z: <http://mikrobiologie.xf.cz/files/atb-bunecna-stena.doc.html>.

## 18. PŘÍLOHY

### PŘÍLOHA 1 - Kultivační média

**PCA** (Plate count agar), HIMedia, Indie

Složení základní půdy ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ): enzymatický hydrolyzát kaseinu (5), kvasniční extrakt (2,5), dextróza(1), agar (15).

Příprava: 23,5 g sušeného média rozpustit v 1 l destilované vody, autoklávovat při 121 °C. Poté nechat vytemperovat ve vodní lázni na teplotu 45-50 °C a následně rozlít do sterilních Petriho misek.

**Tryptonový agar** (TBX-Tryptone Bille X-glucuronide agar), Merck, Německo

Složení základní půdy ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ): Pepton (20), Bile soli No. 3 1.5; 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-glukuronová kyselina (BCIG) cyklohexyl-amoniová sůl (0,075), Agar-agar (10)

Příprava: 31,6 g sušeného média rozpustit v 1 l destilované vody, autoklávovat při 121 °C po dobu 15 min. Poté nechat vytemperovat ve vodní lázni na teplotu 45-50 °C a následně rozlít po 12-15 ml do sterilních Petriho misek.

**Pufrovaná peptonová voda** (PPV-Buffered peptone water), HIMedia, Indie

Složení základní půdy ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ): pepticky štěpená zvířecí tkáň (10), chlorid sodný (5)

Příprava: 15 g sušeného média rozpustit v 1 l destilované vody, autoklávovat při 121 °C po dobu 15 min.

**Sladový extract** (MEB-Malt extractbroth), Oxoid, Anglie

Složení základní půdy ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ): Sladový extrakt (17), mykologický pepton (3)

Příprava: 20 g sušeného média rozpustit v 1 l destilované vody, autoklávovat při 121 °C po dobu 15 min.

**Krevní agar** Biopro, Česká Republika

Složení základní půdy ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ): Směs peptonů (23), Škrob (1), Chlorid sodný (5), Agar (10), Beraní krev 50 ml (5 %)

**Sabouradův agar** (SDA-Sabouraud dextrose agar), HIMedia, Indie

Složení základní půdy ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ): Směs peptonu a tryptonu (1:1) (10), Dextróza (40), Agar (15)

Příprava: 65 g sušeného média rozpustit v 1 l destilované vody, autoklávovat při 121 °C po dobu 15 min. Poté nechat vytemperovat ve vodní lázni na teplotu 45-50 °C a následně rozlít po cca 20 ml do sterilních Petriho misek.

## PŘÍLOHA 2 – Tabulky

**TABULKA K: Obrázek 13: Pokles viskozity s rostoucí koncentrací AgNO<sub>3</sub> v 12 % polyamidu 6 (viskozita při 100 RPM, 22,2 °C)**

Množství AgNO <sub>3</sub> v 12 % PA6	0 hm%	0,1 hm%	0,3 hm%	0,5 hm%	0,1 hm%	0,3 hm%	0,5 hm%
	čistý PA6	1 světlo	2 světlo	3 světlo	1 tma	2 tma	3 tma
<b>Viskozita [mPa.s]</b>	185,8	196,2	172,5	138,4	196,6	170,3	138,1
	186	196,7	171,2	139,7	199,5	169,8	140,3
	185,1	197,1	171,3	141,9	200,1	170,9	139,9
	187,7	196,2	170,1	136,7	199,9	172,3	140,2
	185,3	197	171,2	138,1	199,7	172,6	137,9
	187,1	197,2	172,6	137,1	199,6	171,3	138,1
	186,3	197,4	172,3	141,6	198,3	171,4	139,7
<b>Průměr [mPa.s]</b>	<b>186,18</b>	<b>196,82</b>	<b>171,6</b>	<b>139,07</b>	<b>199,1</b>	<b>171,22</b>	<b>139,17</b>
<b>Směrodatná odchylka [%]</b>	<b>0,939</b>	<b>0,479</b>	<b>0,909</b>	<b>2,069</b>	<b>1,245</b>	<b>1,006</b>	<b>1,084</b>

**TABULKA K: Obrázek 14: Růst vodivosti s množstvím přidaného AgNO<sub>3</sub> do 12 % PA6 (vodivost při 22,3 °C)**

Množství AgNO <sub>3</sub> v 12 % PA6	0 hm%	0,1 hm%	0,3 hm%	0,5 hm%	0,1 hm%	0,3 hm%	0,5 hm%
	čistý PA6	1 světlo	2 světlo	3 světlo	1 tma	2 tma	3 tma
<b>Vodivost [μS/cm]</b>	191	234	345	408	212	337	401
	188,3	230	302	387	213	294	388
	184	245	321	371	249	297	396
	201	238	308	366	230	361	375
	199	247	318	386	229	319	384
<b>Průměr vodivosti [μS/cm]</b>	<b>192,66</b>	<b>238,8</b>	<b>318,8</b>	<b>383,6</b>	<b>226,6</b>	<b>321,6</b>	<b>388,8</b>
<b>Směrodatná odchylka [%]</b>	<b>7,185</b>	<b>7,190</b>	<b>16,513</b>	<b>16,441</b>	<b>15,142</b>	<b>28,121</b>	<b>10,183</b>

**TABULKA K: Obrázek 16: Vliv stárnutí roztoku na viskozitu (viskozita: 100 RPM, 22,5 °C; roztok: 12% PA6 + 0,5 hm% AgNO<sub>3</sub>)**

<b>Stáří roztoku 12 % PA6 +0,5 % AgNO<sub>3</sub> na sušinu polymeru</b>	<b>4 dny</b>	<b>3 dny</b>	<b>2 dny</b>	<b>1 den</b>	<b>čistý 12 % PA6</b>
<b>Viskozita [mPa.s]</b>	138,4	164,3	183,8	191,7	185,8
	139,7	164	184,6	191,6	186
	141,9	166,2	182,6	190	185,1
	136,7	167,4	183	190,1	187,7
	138,1	168,3	182,4	189,7	185,3
	137,1	167,4	183,1	189,4	187,1
	141,6	166,2	184,2	189,9	186,3
<b>Průměr viskozity [mPa.s]</b>	<b>139,071</b>	<b>166,257</b>	<b>183,386</b>	<b>190,343</b>	<b>186,186</b>
<b>Směrodatná odchylka [%]</b>	<b>2,0694</b>	<b>1,6185</b>	<b>0,829</b>	<b>0,922</b>	<b>0,939</b>

**TABULKA K: Obrázek 17: Změny vodivosti v závislosti na stáří roztoku (vodivost při 22,5 °C; roztok: 12% PA6 + 0,5 hm% AgNO<sub>3</sub>)**

<b>Stáří roztoku 12 % PA6+0,5 % AgNO<sub>3</sub> na sušinu polymeru</b>	<b>4 dny</b>	<b>3 dny</b>	<b>2 dny</b>	<b>1 den</b>	<b>čistý 12 % PA6</b>
<b>Vodivost [μS/cm]</b>	408	414	404	383	191
	387	366	382	384	188,3
	371	375	385	397	184
	366	382	396	376	201
	386	389	378	391	199
<b>Průměr vodivosti [μS/cm]</b>	<b>383,6</b>	<b>385,2</b>	<b>389</b>	<b>386,2</b>	<b>192,66</b>
<b>Směrodatná odchylka [%]</b>	<b>16,441</b>	<b>18,213</b>	<b>10,724</b>	<b>8,044</b>	<b>7,185</b>



**TABULKA K: Obrázek 19: Závislost viskozity na stáří roztoku (viskozita: 100 RPM, 22 °C; roztok: 12% PA6 + 0,5 hm% AgNO<sub>3</sub>); kde  $\bar{x}$  značí střední hodnotu a  $\sigma$  značí směrodatnou odchylku**

Den	12 % PA6+0,1 hm % AgNO <sub>3</sub>		12 % PA6+0,3 hm % AgNO <sub>3</sub>		12 % PA6+0,5 hm % AgNO <sub>3</sub>	
	$\bar{x}$ viskozity [Pa.s]	$\sigma$ [%]	$\bar{x}$ viskozity [Pa.s]	$\sigma$ [%]	$\bar{x}$ viskozity [Pa.s]	$\sigma$ [%]
1.	-	-	-	-	-	-
2.	0,247	0,001	0,241	0,001	0,242	0,012
3.	0,244	0,002	0,239	0,003	0,236	0,003
4.	0,248	0,006	0,239	0,001	0,224	0,022
5.	0,245	0,002	0,236	0,001	0,226	0,006
6.	0,244	0,001	0,234	0,003	0,219	0,005
7.	0,251	0,002	0,232	0,002	0,208	0,002
8.	0,25	0,001	0,22	0,001	0,189	0,001
9.	0,251	0,001	0,206	0,005	0,169	0,005

**TABULKA K: Obrázek 20: Závislost vodivosti na stáří roztoku (vodivost při 22,1 °C; roztok: 12% PA6 + 0,5 hm% AgNO<sub>3</sub>); kde  $\bar{x}$  značí střední hodnotu a  $\sigma$  značí směrodatnou odchylku**

Den	12 % PA6+0,1 hm % AgNO <sub>3</sub> [Pa.s]		12 % PA6+0,3 hm % AgNO <sub>3</sub> [Pa.s]		12 % PA6+0,5 hm % AgNO <sub>3</sub> [Pa.s]	
	$\bar{x}$ vodivosti [ $\mu$ S/cm]	$\sigma$ [%]	$\bar{x}$ vodivosti [ $\mu$ S/cm]	$\sigma$ [%]	$\bar{x}$ vodivosti [ $\mu$ S/cm]	$\sigma$ [%]
1.	276,8	2	373,767	0,252	429,146	0,136
2.	280,3	1,732	373,303	0,095	456,301	0,206
3.	275,732	0,348	371,355	0,039	447,53	0,3
4.	262,267	1,629	358,974	0,371	428,91	0,185
5.	277,64	0,177	372,233	0,208	447,23	0,092

**TABULKA K: Obrázek 21: Závislost viskozity čistého polymerního roztoku a roztoku s AgNO<sub>3</sub> (viskozita při 100 RPM, 22 °C)**

Den	Čistý 12% PA6		12% PA6 + 0,5 hm % AgNO <sub>3</sub>	
	$\bar{x}$ viskozity [Pa.s]	$\sigma$ [%]	$\bar{x}$ viskozity [Pa.s]	$\sigma$ [%]
1.	0,235	0,005	0,244	0,006
2.	0,238	0,005	0,238	0,021
3.	0,239	0,001	0,227	0,002
4.	0,231	0,01	0,215	0,004
5.	0,231	0,015	0,198	0,005
6.	0,24	0,009	0,172	0,003
7.	0,233	0,01	0,14	0,003
8.	0,241	0,015	0,113	0,007
9.	0,244	0,008	0,103	0,006
10.	0,242	0,023	0,096	0,004