

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM STERILIZAČNÍHO ÚČINKU DIELEKTRICKÉHO
BARIÉROVÉHO VÝBOJE
NA PROKARYOTNÍ MIKROORGANISMY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

ZUZANA BITTNEROVÁ

BRNO 2009



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM STERILIZAČNÍHO ÚČINKU DIELEKTRICKÉHO BARIÉROVÉHO VÝBOJE NA PROKARYOTNÍ MIKROORGANISMY

STUDY OF STERILIZATION EFFECT OF DIELECTRIC BARRIER DISCHARGE
ON PROCARYOTIC MICROORGANISMS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

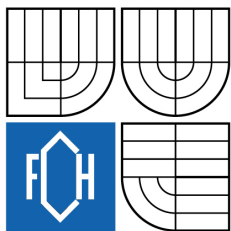
ZUZANA BITTNEROVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. ZDENKA KOZÁKOVÁ, Ph.D.

BRNO 2009



Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0341/2008** Akademický rok: **2008/2009**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Zuzana Bittnerová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)
Studijní obor: Biotechnologie (2810R001)
Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.**
Konzultanti bakalářské práce:

Název bakalářské práce:

Studium sterilizačního účinku dielektrického bariérového výboje
na prokaryotní mikroorganismy

Zadání bakalářské práce:

- popis prokaryotních mikroorganismů
- rozbor standardních sterilizačních postupů a seznámení se s principem plazmové sterilizace
- taxonomie prokaryotních mikroorganismů používaných při plazmových sterilizacích
- seznámení se s principem dielektrického bariérového výboje
- sterilizace modelových prokaryotních mikroorganismů v dielektrickém bariérovém výboji, studium vlivu délky expozice, hustoty plazmového výkonu a použitého plynu na efektivitu sterilizace

Termín odevzdání bakalářské práce: 29.5.2009

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Zuzana Bittnerová
Student(ka)

Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Předložená bakalářská práce je zaměřena na studium sterilizačního účinku dielektrického bariérového výboje na prokaryotní mikroorganismy. Sterilizace je důležitou biomedicínskou i potravinářskou technologií a plazmová sterilizace je jednou z metod, které vyhovují požadavkům na sterilizaci teplotně senzitivních materiálů a materiálů citlivým na chemické látky.

Pro opracování vzorků byl použit dielektrický bariérový výboj pracující za atmosférického tlaku. Výboj byl generován v argonu a dusíku. Jako prokaryotní mikroorganismus byla použita bakterie *Bacillus subtilis* nanesená na papíře nebo na PET fólii. Efektivita sterilizace byla posuzována podle vlivu délky expozice, hustoty plazmového výkonu a použitého plynu.

Vlivem působení DBD na vzorky obsahující *Bacillus subtilis* došlo k výraznému snížení počtu životaschopných mikroorganismů či úplné sterilitě. S prodlužující se délkou expozice klesl počet životaschopných mikroorganismů. V případě hustoty plazmového výkonu, s rostoucím výkonem rostla efektivita sterilizace a klesal čas nutný k inaktivaci mikroorganismů. Při hustotě $2,37 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-3}$ bylo sterility dosaženo po 60 s, zatímco při $1,78 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-3}$ byla nutná delší doba působení. Větší účinnosti bylo dosaženo pokud bylo plazma buzeno v argonu. Čas nutný k redukci největšího počtu mikroorganismů v argonu byl 10 s, zatímco v dusíku bylo za stejný čas dosaženo redukce pouze 50 %.

Klíčová slova

Prokaryotní mikroorganismy, plazmová sterilizace, dielektrický bariérový výboj

ABSTRACT

Presented bachelor thesis is focused on sterilization effect of dielectric barrier discharge on procaryotic microorganisms. Sterilization is important biomedical and food-industry application and plasma sterilization is one of the method, which are suitable for sterilization of heat and chemical sensitive materials.

Biologicaly contaminated samples were treated in dielectric barrier discharge operated at atmospheric pressure. The discharge was generated in argon and in nitrogen. Gram positive bacteria *Bacillus subtilis* was used as a bioindicator. Bacteria was spread onto the surface of paper and PET material. Efficiency of sterilization was evaluated according to exposure time, plasma power density and process gas.

The positive effect of DBD on inactivation of microorganism was observed. The efficiency of the plasma sterilization increases with increasing treatment time. As regards plasma power density, the higher density was used the more effective the sterilization was and time necessary for inactivation of all microorganisms was shorter. Sterility was observed within 60 s while using plasma power density $2,37 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-3}$, when using plasma power density of $1,78 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-3}$ longer treatment time is necessary. The sterilization was more effective if argon was used as a process gas. Time necessary for the most reduction of microorganisms in argon was 10 s, while using nitrogen the reduction was only 50 %.

Keywords

Procaryotic microorganisms, plasma sterilization, dielectric barrier discharge

BITTNEROVÁ, Z. *Studium sterilizačního účinku dielektrického bariérového výboje na prokaryotní mikroorganismy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 52 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucí bakalářské práce Ing. Zdence Kozákové, Ph.D a Ing. Jitce Vrajové za zajímavé téma, cenné rady a konzultace při zpracování bakalářské práce.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Popis prokaryotních mikroorganismů	10
2.1.1	Postavení bakterií v systému živé přírody.....	10
2.1.2	Rozdělení mikroorganismů podle fyziologických vlastností.....	11
2.1.3	Morfologie, cytologie a způsoby rozmnožování bakterií.....	13
2.2	Vliv vnějšího prostředí na mikroorganismy	19
2.2.1	Teplota.....	20
2.2.2	pH prostředí.....	22
2.2.3	Vodní aktivita.....	23
2.2.4	Záření	24
2.2.5	Hydrostatický tlak	24
2.2.6	Ultrazvuk.....	25
2.3	Standardní sterilizační postupy	25
2.3.1	Základní pojmy	25
2.3.2	Dekontaminační metody	25
2.4	Plazmová sterilizace	27
2.4.1	Co je to plazma.....	27
2.4.2	Zdroje plazmatu.....	28
2.4.3	Princip plazmové sterilizace.....	28
2.4.4	Mechanismy účinku sterilizace plazmatem.....	28
2.4.5	Křivka přežití.....	30
2.4.6	Různé typy výbojů a jejich využití.....	30
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
3.1	Bacillus subtilis	34
3.1.1	Taxonomické zařazení.....	34
3.1.2	Morfologie.....	35
3.1.3	Metabolismus	35
3.1.4	Význam	35
3.2	Dielektrický bariérový výboj	35
3.3	Experimentální zařízení	37
3.4	Popis experimentu	39
3.4.1	Příprava suspenze	39
3.4.2	Příprava vzorku	39
3.4.3	Opracování vzorku	40

3.4.4	Vyhodnocení	40
3.4.5	Zpracování výsledků	40
3.4.6	Optická emisní spektroskopie plazmatu.....	41
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	42
4.1	Vliv doby expozice a hustoty plazmového výkonu	42
4.2	Vliv pracovního plynu.....	43
4.3	Vliv nosného média	43
4.4	Diagnostika plazmatu	45
5	ZÁVĚR.....	47
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	49
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	52

1 ÚVOD

Sterilizace je proces, jímž se snažíme eliminovat všechny formy života tam, kde je pro nás přítomnost mikroorganismů nežádoucí. Toho lze dosáhnout fyzikálními nebo chemickými metodami. Použití těchto konvenčních sterilizačních metod však s sebou přináší jisté nevýhody, jako je toxicita používaného sterilizačního média, vysoká teplota ničící použitý materiál nebo škodlivé ionizační záření. Těmto negativům se lze vyhnout použitím plazmatu jako sterilizačního prostředku. Sterilizace za použití plazmatu s sebou nese výhody jako je krátký čas sterilizace, relativně nízká teplota a absence toxických látek.

Předmětem této práce je studium sterilizačního účinku dielektrického bariérového výboje na prokaryotní mikroorganismy. Prokaryotní organismy jsou jednobuněčné a tvoří funkčně a tvarově diferencované tkáně. Mikroorganismy dosahují velmi malých rozměrů, jejich velikost se udává v μm . Význam mikroorganismů v přírodě je obrovský, neboť se podílí na tvorbě a zachování životního prostředí. Jsou schopny rozkládat organické látky, a tím vrací prvky zpět do koloběhu. Ve vodních tocích se podílí na „samočištění“ vod, čehož se průmyslově využívá v čističkách odpadních vod. Některé mikroorganismy prodlužují trvanlivost potravin, což lidstvo využívalo již v období před naším letopočtem. Dnes se průmyslově činnost mikroorganismů využívá při výrobě fermentovaných produktů, organických kyselin, enzymů a ve farmaceutickém průmyslu při výrobě antibiotik. Činnost mikroorganismů má však i svá negativa, to se týká především patogenních mikroorganismů, které způsobují nejrůznější onemocnění a dále mikroorganismů, které způsobují rozklad potravin, textilií, papíru, kůže či dřeva. Právě tyto mikroorganismy jsou nežádoucí a jedna z možností, jak je eliminovat, je použití plazmové sterilizace.

V současné době se výzkumem sterilizačního účinku plazmatu a jeho využitím zabývá mnoho výzkumných týmů. Na trhu jsou již dostupné komerční plazmové sterilizátory (např. Sterrad, Plazlyte), avšak zde se nejedná přímo o plazmovou sterilizaci, neboť sterilizace je v tomto případě založena na působení chemických látek za nízkého tlaku a plazma slouží v tomto případě spíše k rozkladu použitých biocidních látek. Při plazmové sterilizaci je mikroorganismus vystaven působení elektrického výboje v plynu nebo směsi plynů, které běžně biocidní účinky nevykazují a jsou aktivovány působením elektrického výboje a deaktivovány bezprostředně po vypnutí budícího zdroje [8, 36]

Technologie plazmové sterilizace je testována pro využití v medicíně ke sterilizaci lékařských nástrojů a zdravotnických potřeb, především těch, které jsou vyrobeny z tepelně senzitivních materiálů, jako jsou např. kardiovaskulární cévky, pro úpravu biofunkčních materiálů, např. implantátů kostí, vazů a štěpů nebo pro léčbu chronických ran či kožních nemocí [37]. Další oblastí výzkumu je sterilizace potravin. F. Leipold ve své práci prezentuje výsledky sterilizace hroznů, aby během přepravy nebyly napadeny plísní Botrytis [19].

Cílem práce je seznámení se s dielektrickým bariérovým výbojem a principem plazmové sterilizace a jejich vliv na sterilizaci prokaryotních mikroorganismů. V první části jsou popsány prokaryotní organismy, jejich zařazení v systému živé přírody a stručný popis jednotlivých oddělení. Dále je zde zmíněno rozdělení mikroorganismů podle fyziologických vlastností, morfologie, cytologie a způsoby rozmnožování bakteriálních buněk. Popsán je rovněž vliv vnějšího prostředí na mikroorganismy, zejména vliv teploty, pH prostředí, vliv vodní aktivity, záření, hydrostatického tlaku a ultrazvuku. Ve druhé části jsou definovány pojmy jako je sterilizace, dezinfekce a dekontaminace a detailněji jsou popsány nejčastěji

používané standardní sterilizační postupy. Třetí část se zabývá samotnou plazmovou sterilizací a v krátké rešerši jsou uvedeny různé druhy výbojů a experimentů s nimi prováděnými. V experimentální části je podrobně charakterizován mikroorganismus *Bacillus subtilis*, který byl použit při experimentech, je zde rovněž popis experimentálního zařízení, princip dielektrického bariérového výboje a popis samotného provedení experimentu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Popis prokaryotních mikroorganismů

V této části bude uvedeno postavení prokaryotních mikroorganismů v systému živé přírody a stručná charakteristika jednotlivých oddělení prokaryot. Dále zde bude definováno rozdělení mikroorganismů podle fyziologických vlastností, morfologie a cytologie bakteriální buňky a vliv vnějšího prostředí na mikroorganismy.

2.1.1 Postavení bakterií v systému živé přírody

Z hlediska systému živé přírody řadíme bakterie do nadříše prvojaderní (Prokaryota), říše prvobuněční (Protozellulata), oddělení bakterie (Bacteria) [1]

Nadříše: Prvojaderní (Prokaryota)

Říše: Nebuněční (Subcellulata)

Oddělení: Praorganismy (Eobionta)

Oddělení: Viry (Vira)

Říše: Prvobuněční (Protozellulata)

Oddělení: Bakterie (Bacteria)

Oddělení: Sinice (Cyanophyta)

Oddělení: Prochlorofyty (Prochlorophyta)

Říše Subcellulata:

Eobionta

Jsou předpokládané primitivní živé soustavy, které vznikly v průběhu chemické evoluce z koacervátů. Musely se vyznačovat, byť v nedokonalé formě všemi základními znaky života; musely obsahovat nukleovou kyselinu jako nositelku dědičných vlastností, bílkoviny jako stavební a enzymatické složky, musely mít jednoduchý metabolismus, schopnost autoreprodukce a schopnost dalšího vývoje [1].

Viry

Jsou nebuněčné organismy schopné rozmnožování pouze v hostitelských buňkách. Viry jsou nitrobuněční parazité. Nemají vlastní aparát pro syntézu bílkovin a ani vlastní metabolický aparát. Viry bakterií se nazývají bakteriofágy [1].

Říše Protozellulata:

Bakterie

Jsou jednobuněčné prokaryotické organismy [2]. Po fyziologické stránce jsou nejrozmanitější skupinou mikroorganismů, neboť zahrnují zástupce lišící se vztahem ke

kyslíku, k různým zdrojům energie i svými nároky na výživu [3]. Jejich bližším popisem se budu zabývat v následujících kapitolách.

Sinice

Jsou fotolitotrofní prokaryotické organismy, které využívají při fotosyntéze vodu jako donor elektronů a na světle uvolňují kyslík. Jejich buňky jsou ohraničeny pevnou mnohvrstevnou buněčnou stěnou, jejíž základní vrstva je tvořena peptidoglykanem. Většina sinic se vyznačuje aktivním pohybem.

Sinice obsahují chlorofyl a jako jediný chlorofylový pigment a dále obsahují fykobiliproteiny (allofykosan, fykokyan a fykoerytrin) [2].

Prochlorofyty

Jsou prokaryotické, autotrofní organismy. Dosud je znám pouze jediný druh, žijící na povrchu těl mořských sumek. Stavbou buněk se podobají sinicím. V tylakoidech však obsahují chlorofyl a, chlorofyl b a karotenoidy [1].

2.1.2 Rozdělení mikroorganismů podle fyziologických vlastností

Po fyziologické stránce jsou mikroorganismy velmi rozmanité. Jednotlivé skupiny mikroorganismů se vzájemně liší svými nároky na výživu, na kyslík, i způsobem získávání potřebné energie.

2.1.2.1 Dělení mikroorganismů podle nároků na výživu

Podle nároků na výživu rozdělujeme mikroorganismy na:

a) autotrofní, kterým k výživě stačí pouze anorganické sloučeniny. Přítomnost organických sloučenin často inhibuje jejich rozmnožování. Tyto mikroorganismy jsou schopny syntetizovat všechny složky své buněčné hmoty z anorganických sloučenin. Patří sem řasy a některé bakterie

b) heterotrofní, které vyžadují přítomnost organických sloučenin v živném prostředí, ať už jako zdroj uhlíku, vodíku nebo energie. Patří sem kvasinky, plísňe a většina bakterií

Heterotrofní mikroorganismy rozdělujeme dále na:

- prototrofní, kterým stačí k výživě jednoduché organické uhlíkaté sloučeniny (např. sacharidy, ethanol, jednoduché organické kyseliny) spolu s anorganickými solemi
- auxotrofní, které kromě toho vyžadují některé složité sloučeniny (např. některé vitaminy, aminokyseliny apod.) [3]

2.1.2.2 Dělení mikroorganismů podle nároků na kyslík

Podle nároků na kyslík dělíme mikroorganismy na [3]:

a) aerobní, které vyžadují vzdušný kyslík, neboť mají vyvinutý pouze aerobní metabolismus. Patří sem např. plísňe, octové bakterie (rod *Azotobacter*), některé hnilobné bakterie a některé kvasinky

b) anaerobní, které nevyužívají volný kyslík, neboť mají pouze anaerobní metabolismus, vzdušný kyslík na ně působí inhibičně (např. u sporetvorných bakterií rodu *Clostridium*) nebo dokonce toxicky

c) mikroaerofilní, které mají anaerobní metabolismus, avšak nízké koncentrace kyslíku urychlují jejich rozmnožování. Patří se např. v přírodě velmi rozšířená skupina mléčných bakterií (rod *Lactobacillus*)

d) fakultativně anaerobní, které mají schopnost aerobního i anaerobního metabolismu, takže mohou růst za přítomnosti i nepřítomnosti vzdušného kyslíku; za aerobních podmínek se většinou rozmnožují rychleji

2.1.2.3 Dělení mikroorganismů podle způsobu získávání energie

Podle způsobu získávání energie řadíme mikroorganismy do těchto skupin:

a) fototrofní mikroorganismy, jejichž zdrojem energie je přeměna světelné energie v energii chemickou, která je pak využitelná pro životní pochody buňky. Rozeznáváme [3]:

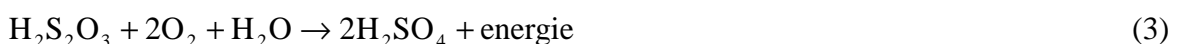
- fotolithotrofní (= fotoautotrofní) mikroorganismy, jimž vodík pro redukci oxidu uhličitého poskytují anorganické sloučeniny. Patří sem zelené sírné bakterie, obsahující pouze některý z bakteriochlorofylů (a, b, c, d) a purpurové sírné bakterie (*Chromatiaceae* a *Ectothiorhodospiraceae*), obsahující vedle některého bakteriochlorofylu ještě karotenoidní barviva

- fotoorganotrofní (= fotoheterotrofní) mikroorganismy, jimž slouží organické sloučeniny jako zdroj vodíku pro redukci oxidu uhličitého a také jako zdroj uhlíku. Patří sem nesírné purpurové bakterie (*Rhodospirillaceae*), které vedle bakteriochlorofylu obsahují ještě karotenoidní barviva [3]

b) chemotrofní mikroorganismy získávají energii oxidací chemických sloučenin. Rozdělujeme je na [3]:

- chemolithotrofní (= chemoautotrofní) mikroorganismy, získávající energii oxidací anorganických sloučenin. Jsou to většinou aerobní autotrofní bakterie. Patří sem:

- o bezbarvé sírné bakterie a vláknité sírné bakterie získávající energii oxidací síry a jejich sloučenin, především sirovodíku:



Síru, jako rezervní zdroj energie, ukládají ve formě zrníček ve svých buňkách [3].

- o Nitrifikační bakterie (*Nitrobacteraceae*) získávají energii oxidací sloučenin dusíku. Patří sem rody *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* aj., které jsou obligátními chemolithotrofy, získávajícími energii oxidací amoniaku na dusitaný:



Dále sem patří rody *Nitrobacter*, *Nitrococcus* aj., jimž slouží jako zdroj energie oxidace dusitanů na dusičnany:



Nitrifikační bakterie hrají velmi důležitou roli v koloběhu prvků v přírodě, neboť oxidují amoniak vzniklý mikrobiálním rozkladem bílkovin a jiného organického materiálu.

o Železité bakterie (*Siderocapsaceae*) získávají energii oxidací železnatých iontů na železité.

o Bakterie využívající pouze metan a methanol (tj. rody *Methylomonas* a *Methylococcus*) – tyto bakterie jsou obvykle zařazovány mezi chemolithotrofní, neboť nejsou schopny využívat žádné další organické sloučeniny a pro syntézu své buněčné hmoty používají oxid uhličitý. Získávají energii reakcemi:



• chemoorganotrofní (= chemoheterotrofní) mikroorganismy získávají energii oxidací organických sloučenin, jichž využívají také jako zdroje uhlíku, vodíku a většinou i kyslíku k syntéze své buněčné hmoty. Patří sem kvasinky, plísně a většina bakterií [3]

2.1.3 Morfologie, cytologie a způsoby rozmnožování bakterií

2.1.3.1 Morfologie bakterií

Po fyziologické stránce jsou bakterie velmi rozmanité, po morfologické stránce nejsou mezi jednotlivými rody velké rozdíly [3] (Obrázek 1).

Co se týče tvaru, rozlišujeme:

1) Kulovité bakterie neboli koky. Bývají uspořádány různým způsobem a podle toho se rozeznávají:

- diplokoky – dvojice koků
- streptokoky – koky seskupeny řetízkovitě
- tetrakoky – čtveřice koků
- stafylokoky – hrozníčkovité uspořádání koků
- koky uspořádané do seskupení krychlovitého tvaru (tzv. balíčky)

2) Bakterie válcovitého tvaru. Bývají obvykle označovány jako tyčky nebo tyčinky, i zde se rozeznávají:

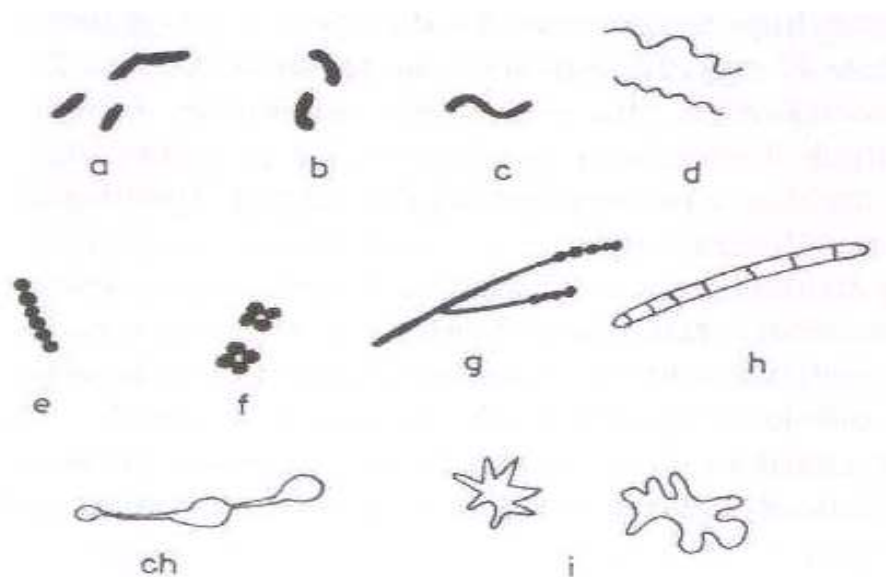
- diplobakterie – dvojice bakterií
- streptobakterie – řetízky bakterií
- palisádové seskupení bakterií

3) Zakřivené bakterie. Zde se rozeznávají:

- vibria – lehce (rohličkovitě) zakřivené tyčky
- spirily – lehce zvlněné tyčky
- spirochety – tyčky šroubovicovitého tvaru

4) Vlákňité bakterie. Jsou to bakteriální buňky ve tvaru dlouhých tenkých vláken [2]. Vlákňitý tvar bakterií, vyskytující se u řádu *Actinomycetales*, je charakterizován pravým větvením [3].

5) Větvící se bakteriální buňky. Některé bakteriální buňky se větví buď úplně (např. *Streptomyces*) nebo projevují náznaky větvení (např. mykobakterie). Úplně větvící se buňky (*Streptomyces*) vytvářejí mycélium [2].



Obrázek 1: Tvar bakteriálních buněk [3] a – rovné tyčinky, b – zakřivené tyčinky (vibria), c – spirily, d – spirochety, e – streptokoky, f – tetradky, g – mycelium se sporami (streptomycety), h – nevětvená vlákna, ch – pučící bakterie, i – bakterie s výběžky

2.1.3.2 Základní struktura mikrobiálních buněk

Mezi základní buněčné orgány prokaryot patří:

2.1.3.2.1 Buněčná stěna

Každá mikrobiální buňka je od vnějšího prostředí oddělena silnou, pevnou, většinou neohebnou strukturou, jež se nazývá buněčná stěna. Ta dává mikrobiální buňce tvar a chrání ji před mechanickými vlivy a před účinky osmotického tlaku vnějšího prostředí. V buněčné stěně jsou poměrně velké póry, kterými může volnou difuzí procházet většina chemických sloučenin. Pouze vysokomolekulární sloučeniny, jako jsou bílkoviny nebo polysacharidy, nemohou póry buněčné stěny procházet. Pevnost a neohebnost buněčné stěny bakterií je výsledkem přítomnosti vrstvy peptidoglykanů. Obsahují polysacharidová vlákna tvořená molekulami N-acetylglukosaminu a N-acetylmuramové kyseliny. Peptidoglykanová vrstva, jejíž tloušťka se u různých rodů bakterií liší, představuje vlastně jednu obrovskou molekulu. Působením enzymu lysozymu se peptidoglykany rozkládají a v izotonickém prostředí tak vzniká protoplast [3].

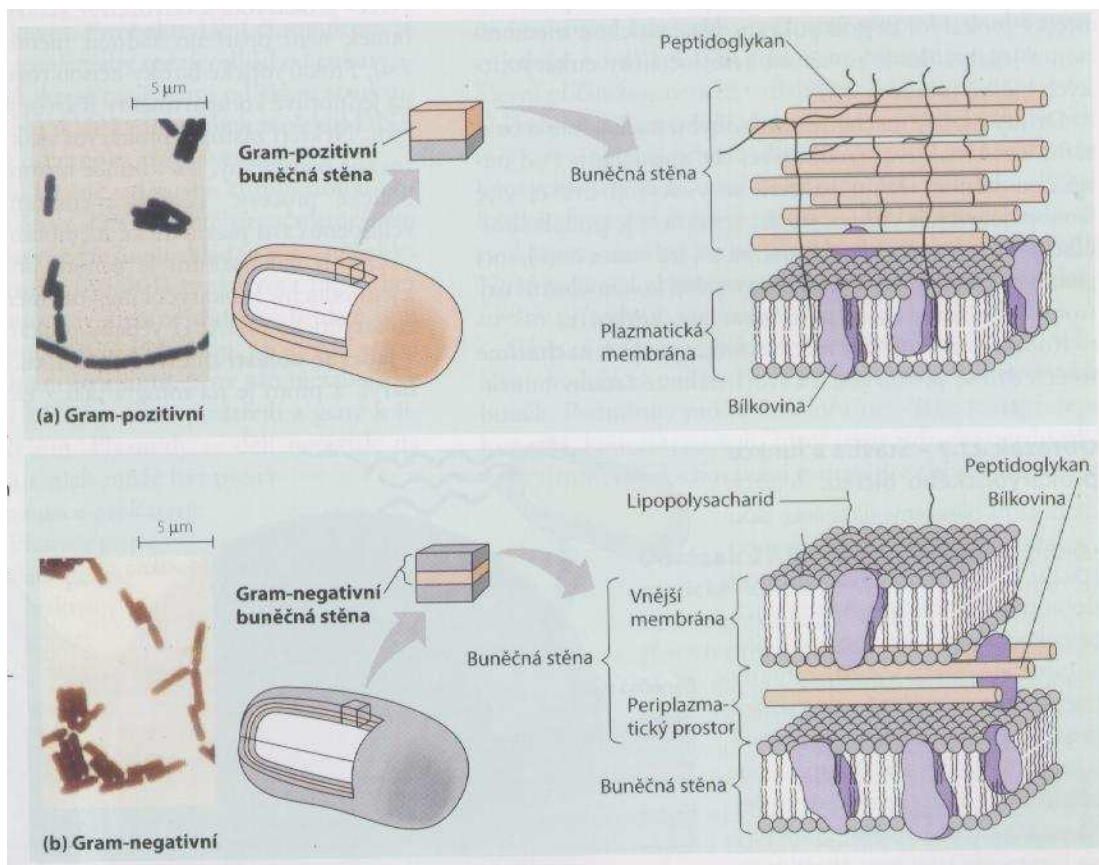
Gramova reakce

Na základě Gramovy reakce se bakterie dělí na dvě skupiny: grampozitivní a gramnegativní bakterie [2]. Jako grampozitivní se označují ty bakterie, jejichž usmrčené buňky po obarvení Gramovým barvicím roztokem a moření jodovým roztokem neztrácejí toto

barvivo působením rozpouštědel acetonu nebo ethanolu. U gramnegativních bakterií je toto barvivo z obarvených buněk uvedenými rozpouštědly vyplavováno, takže se buňky odbarví.

Hlavní složkou buněčné stěny grampozitivních bakterií je silná peptidoglykanová vrstva, která je vyplněna teichoovou kyselinou. Stěny gramnegativních bakterií teichoovou kyselinu neobsahují, což je zřejmě – spolu s poměrně tenkou vrstvou peptidoglykanu – příčinou vyplavování komplexu Gramova barviva z buňky působením acetonu nebo ethanolu. Složení buněčné stěny je znázorněno na obrázku 2.

Stěna gramnegativních bakterií se skládá z tenké vrstvy peptidoglykanů bez teichoové kyseliny a z tzv. vnější membrány, jež obsahuje fosfolipidy, strukturální i enzymové proteiny, lipoproteiny a lipopolysacharidy [3].



Obrázek 2: Struktura buněčné stěny a Gramovo barvení grampozitivních a gramnegativních bakterií [31]

2.1.3.2.2 Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmatická membrána bakterií je velmi jemná a tenká membrána (tlustá asi 7 nm) složená z fosfolipidů a proteinů. Tvoří osmotické rozhraní buňky a vnějšího prostředí. Jejimi póry mohou volnou difuzí procházet pouze nízkomolekulární sloučeniny bez elektrického náboje. Lipidovou složkou cytoplazmatické membrány mohou do buňky pronikat látky rozpustné v tucích nebo rozpouštějící tuky. Všechny ostatní látky včetně iontů kovů se dostávají do buňky pomocí zvláštních transportních mechanismů, jejichž bílkovinné nosiče jsou umístěny v cytoplazmatické membráně. Z cytoplazmatické membrány bakterií vyběhají do cytoplazmy vychlípeniny, jejichž počet a velikost jsou závislé na druhu bakterií. Zvláštním

typem těchto vychlípenin jsou mesozomy, které se vyskytují hlavně poblíž oblasti, kde se při dělení tvoří přepážka [3]

Cytoplazmatická membrána je sídlem dýchacích enzymů, systému oxidační fosforylace, enzymů syntézy a hydrolýzy fosfolipidů a konečné fáze syntézy složek buněčné stěny a pouzdrových obalů. V membráně fototrofních bakterií je přítomen také bakteriochlorofyl, nezbytný pro přeměnu světelné energie v energii chemickou, a celý systém uskutečňující tuto přeměnu [3].

2.1.3.2.3 *Cytoplazma*

Cytoplazma se skládá z buněčné šťávy, což je v podstatě vodný roztok enzymů, meziproductů metabolismu, rezervních látek, některých anorganických iontů a zrníčka nerozpuštěných rezervních látek. Jako rezervní látky jsou v cytoplazmě bakterií přítomny vedle zrníček volutinu hlavně kapičky poly- β -hydroxymásečné kyseliny. Některé bakterie obsahují jako rezervní látku polysacharid granulosu, nebo polysacharid glykogen. Největší složkou cytoplazmy je voda, která představuje 65 až 90 % obsahu buňky mikroorganismů. Obsah vody závisí nejen na druhu mikroorganismu, ale i na vnějších podmínkách. Voda je nezbytná pro uskutečnění enzymových procesů v buňce a pro základní životní projevy buňky. Snížila-li se obsah vody v cytoplazmě pod určitou hladinu, metabolismus a všechny životní projevy se zastavují, avšak nemusí dojít k smrti buňky [3].

Kromě toho obsahuje cytoplazma některých bakterií také různá barviva. Nejčastěji to jsou karotenoidní barviva, která zbarvují buňky a jejich kolonie žlutě, oranžově, růžově, případně až červeně. V buňkách některých bakterií jsou černá barviva melanoidního typu [3].

Cytoplazma obsahuje také ribozomy. Ribozomy bakterií jsou poněkud menší než ribozomy eukaryotních mikroorganismů a tvoří až 40 % sušiny cytoplazmy. Tento mimořádně vysoký obsah ribozomů, v nichž probíhá syntéza bílkovin, umožňuje obrovskou rychlost syntézy buněčné hmoty bakterií: za optimální teploty, pH a přísunu živin se buněčná hmota bakterií zdvojnásobí za 15 až 25 minut [3].

2.1.3.2.4 *Jaderný materiál*

Jaderný materiál bakterií tvoří deoxyribonukleová kyselina (DNA) umístěná přímo v cytoplazmě a doprovázená malým množstvím polyaminů. DNA bakterií tvoří chromozom, který má uzavřenou strukturu. Bakteriální chromozom je napojen na vnitřní stranu cytoplazmatické membrány, většinou prostřednictvím mesozomu. Velká řada bakterií obsahuje v buňce kromě chromozomální DNA ještě několik samostatných molekul DNA uzavřené struktury, ale mnohem nižší molekulové hmotnosti. Nazývají se plazmidy. Jejich jednu skupinu tvoří tzv. konjugativní faktory, které se uplatňují při spájení neboli konjugaci buněk [3].

2.1.3.2.5 *Orgány pohybu*

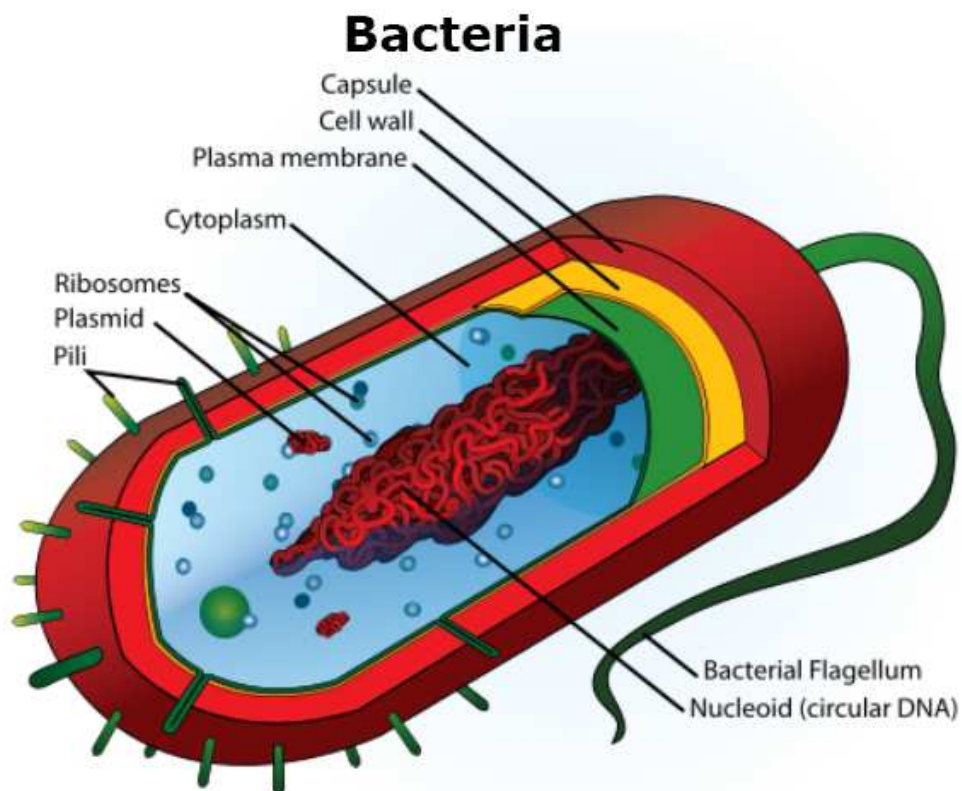
Některé tyčinkovité bakterie mají na svém povrchu jeden nebo více bičíků, jež umožňují jejich pohyb. Bičíky jsou dlouhá tenká vlákna složená z bílkoviny flagelinu. Podle počtu a umístění bičíků rozdělujeme bakterie na monotricha, která mají bičík na jednom pólu buňky, lofotricha, jež mají po svazku bičíků na jednom nebo obou pólech buňky a peritricha, u nichž je celý povrch buněk pokryt bičíky. Bakterie netvořící bičíky se nazývají atricha.

Na povrchu některých bakterií lze pozorovat zvláštní dutá vlákénka označovaná jako pili nebo fimbrie. Vyskytují se u gramnegativních bakterií, často vedle bičků [3].

2.1.3.2.6 Slizovitý obal

Některé druhy bakterií tvoří kolem svých buněk slizovitý obal z polysacharidů (nejčastěji dextranů) nebo polypeptidů. Tento obal chrání buňku proti vysychání a proti dalším nepříznivým podmínkám (zvýšené teplotě, účinkům jedů, fagocytóze apod.), není však pro život buňky nezbytně nutný.

Některé bakterie tvoří ze slizu ostře ohraničené vrstvy zvané kapsule, jiné produkují ve velkém množství volný sliz, který se difuzně zředí do růstového prostředí [3].



Obrázek 3: Schéma bakteriální buňky [20]. Capsule – pouzdro, cell wall – buněčná stěna, plasma membrane – plazmatická membrána, cytoplasm – cytoplazma, ribosomes – ribozomy, plasmid – plazmid, pili – pili, nucleoid – jaerný materiál, bacterial flagellum – bičík

2.1.3.3 Rozmnožování bakterií

Většina bakterií se rozmnožuje dělením. Dělení je charakterizováno tím, že ve střední části buňky začne z cytoplazmatické membrány vyrůstat prstencovitá vychlípenina směřující dovnitř buňky, až vytvoří přepážku rozdělující buňku na dvě zhruba stejně velké části. Přepážka se pak pokryje buněčnou stěnou, takže z původní jedné buňky vzniknou buňky dvě, jež se od sebe buď oddělí, nebo zůstanou spojeny v řetízku [3].

Jenom několik rodů bakterií (např. rod *Hyphomicrobium*) se rozmnožuje pučením. Při pučení má dceřiná buňka (pupen) zpočátku velmi malé rozměry a postupně dorůstá. S mateřskou buňkou je přitom stále spojena pouze úzkým krčkem, který je u některých druhů velmi dlouhý.

Rozdělení bakteriální buňky předchází vždy replikace chromozomální DNA [3].

2.1.3.3.1 Konjugace u gramnegativních bakterií

K hlavním rysům sexuálního rozmnožování patří:

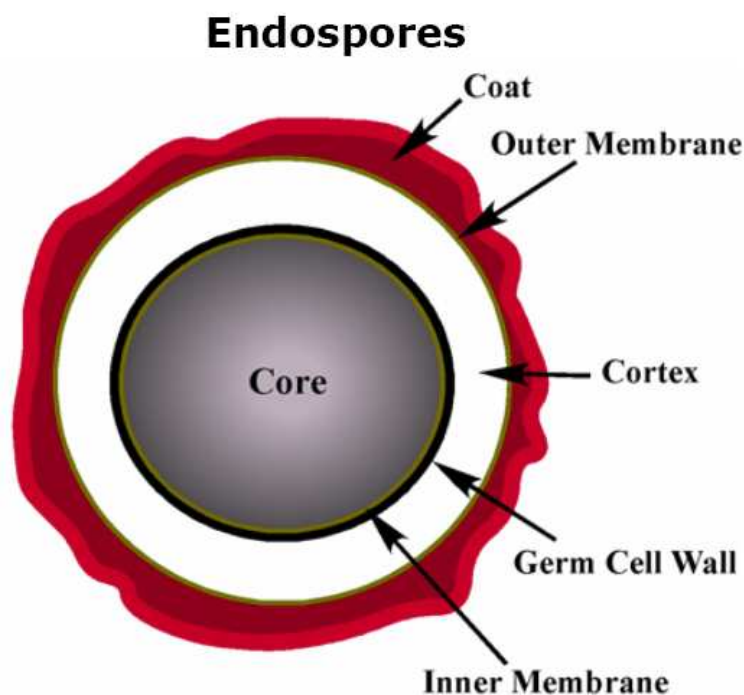
- spájení haploidních buněk za vzniku stálé diploidní populace
- redukční dělení diploidního jádra, jež umožní vznik haploidních buněk, které jsou opět schopny spájení

U bakterií tento sexuální cyklus neexistuje. V roce 1946 bylo u *Escherichia coli* zjištěno jedno stádium tohoto procesu, a to spájení buněk neboli konjugace, při níž dochází k jednosměrnému přechodu genetického materiálu z jedné buňky do druhé. Konjugace byla později zjištěna u řady gramnegativních rodů bakterií (např. u rodů *Pseudomonas*, *Salmonella* a *Proteus*) [3].

2.1.3.3.2 Spory bakterií

Uvnitř buněk některých rodů bakterií se na konci fáze růstu, kdy koncentrace živin v prostředí klesne pod určitou hladinu, vytvoří válcovité až kulovité tělíčko, které se vyznačuje vysokou odolností k nepříznivým podmínkám, především k vysokým teplotám a jedům. Toto tělíčko se nazývá spora (Obrázek 4). Spory tohoto typu se tvoří u anaerobních rodů *Clostridium* a *Desulfotomaculum*, u aerobního nebo fakultativně anaerobního rodu *Bacillus* a malých rodů *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina* a *Oscillospira*.

Spora je umístěna buď uprostřed buňky (centrálně), na konci (terminálně) nebo excentricky (subterminálně). Spory některých druhů mají větší šířku než vegetativní buňka (říkáme, že jsou zduřelé) a pak má vegetativní buňka se sporou vřetenovitý nebo paličkovitý tvar. Zduřelé spory jsou typické pro rod *Clostridium*, u něhož vřetenovitý tvar bývá označován jako klostridium a paličkovitý tvar jako plektridium. Zduřelé spory se vyskytují i u některých druhů rodu *Bacillus* [3].



Obrázek 4: Schéma bakteriální spory [20]. Coat – plášť, outer membrane - vnější membrána, cortex – kortex, germ cell wall – sporová stěna, inner membrane – vnitřní membrána

2.2 Vliv vnějšího prostředí na mikroorganismy

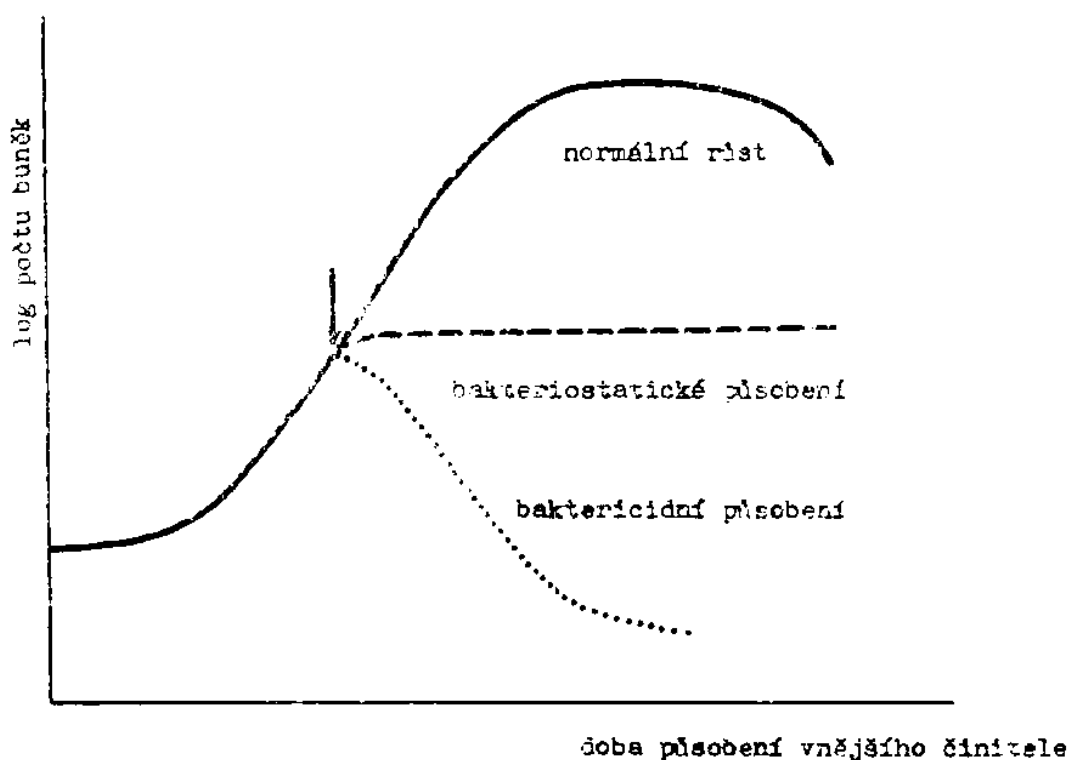
Životní činnost mikroorganismů i jejich vývoj jsou závislé na vnějším prostředí. Aby se mohly mikroorganismy rozmnožovat, musí být v prostředí jak dostatečné množství surovin pro syntézu buněčné hmoty a dostatečné množství zdroje využitelné energie, tak i vhodné fyzikální, chemické a biologické podmínky. Mikroorganismy jsou ovšem schopny se přizpůsobit vnějším podmínkám nejen změnou enzymového vybavení svých buněk, ale mohou do určité míry změnit i složení a tvar buněk, aby byly vůči existujícím nepříznivým podmínkám odolnější. Mají také schopnost měnit do určité míry vnější podmínky ve svém nejbližším okolí, např. změnou pH. [3].

Vliv faktorů vnějšího prostředí na bakterie se může projevat jak příznivě, tak i nepříznivě. Příznivě působící faktory jsou využívány především tam, kde napomáhají k žádoucímu urychlení růstu nebo zvýšení metabolické aktivity. Naproti tomu vnější faktory s nepříznivým účinkem nacházejí uplatnění především v podmínkách, kde je přítomnost bakterií nežádoucí nebo dokonce škodlivá [2]

Při sledování nepříznivého účinku faktorů na bakterie můžeme pozorovat, že některé působí bakteriostaticky, jiné baktericidně. Bakteriostatický účinek spočívá v tom, že buňky bakterií se přestanou dělit, takže jejich počet se po dobu působení daného faktoru nezvyšuje. Odstraní-li se takto působící faktor z prostředí, mohou buňky pokračovat ve svých životních projevech. V přítomnosti faktoru s účinkem baktericidním dochází současně se zastavením růstu a množení rovněž ke ztrátě životaschopnosti buněk a k jejich odumírání. Hynutí buněk nenastává přitom zpravidla najednou u celé populace, nýbrž probíhá postupně. Grafické znázornění bakteriostatického a baktericidního účinku viz. obrázek 5. Některé faktory, hlavně

chemické látky, mohou vykazovat bakteriostatický nebo baktericidní účinek v závislosti na koncentraci. V extrémně nízkých koncentracích mohou některé látky působit dokonce stimulačně [2]

Faktory vnějšího prostředí s antibakteriálním účinkem mohou být povahy fyzikální, chemické nebo biologické. Fyzikální a chemické faktory se v praxi uplatňují ponejvíce při zneškodňování bakterií buďto sterilizací nebo dezinfekcí. Při sterilizaci dochází k usmrcení všech bakterií, včetně ostatních forem živé hmoty. Cílem dezinfekce je usmrcení organismů patogenních. [2]



Obrázek 5: Bakteriocidní a bakteriostatický účinek vnějších faktorů na bakterie [2]

2.2.1 Teplota

Teplota vnějšího prostředí je jedním z hlavních faktorů, které ovlivňují rychlost rozmnožování mikroorganismů i možnost jejich života. U každého mikroorganismu rozeznáváme tři základní body teploty: minimální teplotu, tj. nejnižší teplotu, při níž se daný druh rozmnožuje ještě zjištělnou rychlostí, optimální teplotu, při níž se rozmnožuje největší rychlostí, a maximální teplotu, tj. nejvyšší teplotu, při které je schopen se ještě rozmnožovat [3].

Při zvýšení teploty nad optimální teplotu dochází k prudkému poklesu rychlosti rozmnožování a nakonec k jeho zastavení. Další zvýšení teploty pak vede dokonce k usmrcení buněk. Prudký pokles růstu při vyšších teplotách je způsoben denaturací určitých enzymů, jež jsou pro růst nezbytné. Tato denaturace je zprvu reverzibilní, avšak při vyšších teplotách se stává ireverzibilní a vede k usmrcení buňky.

Krátkodobé zvýšení teploty nad maximální teplotu vyvolává teplotní šok, který vede k různým výkyvům metabolismu [3].

2.2.1.1 Rozdělení mikroorganismů podle vztahu k teplotě

Podle vztahu k teplotě rozdělujeme mikroorganismy do tří hlavních skupin [3]:

a) psychrofilní mikroorganismy mají optimální teplotu nižší než 20 °C a rostou ještě poměrně intenzivně při teplotě 0 °C až 5 °C

Z potravinářského hlediska jsou důležité tzv. psychrotrofní mikroorganismy, tj. takové, které se rozmnožují ještě dosti rychle při teplotách 0 °C až +10 °C bez ohledu na jejich optimální teplotu; k psychrotrofním bakteriím patří hlavně příslušníci rodů *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* aj. Vyskytují se hojně v půdě a ve vodě a způsobují rozklad masa, mléčných výrobků a jiných potravin, uchovávaných při nízkých teplotách.

b) mezofilní mikroorganismy mají minimální teplotu vyšší než 5 °C a optimální teplotu nižší než 45 °C; představují většinu všech mikroorganismů

c) termofilní mikroorganismy mají optimální teplotu růstu 45 °C nebo vyšší; pro růst většiny z nich je optimální teplota 50 až 60 °C, pro některé dokonce ještě vyšší. Některé mohou růst výjimečně i při teplotě až 80 °C. Některé extrémní termofily z archaeobakterií rostou i při teplotách nad 100 °C.

Termofilní mikroorganismy se vyskytují v půdě, v kompostech, v chlévské mrvě, v uskladněném vlhkém materiálu (rašelině, seně, obilí), v bahně.

2.2.1.2 Smrtící účinky vysokých teplot

Smrtící účinky vysokých teplot se kvantitativně vyjadřují tzv. smrtící (letální) teplotou, což je nejnižší teplota, při které je organismus usmrcen během určité doby (nejčastěji 10 minut) a za přísně definovaných vnějších podmínek. Smrtící účinnost vysokých teplot závisí na druhu mikroorganismu, jeho fyziologickém stavu a koncentraci jeho buněk v prostředí, a dále na složení prostředí a jeho pH. Jednotlivé druhy se velmi liší svou termorezistencí, avšak obecně můžeme říci, že každá teplota, která je vyšší než maximální teplota růstu, je pro vegetativní buňky letální, působí-li dostatečně dlouhou dobu [3].

Všechny buňky určité populace téhož druhu nejsou za daných vnějších podmínek stejně odolné k teplotě. Stupeň jejich odolnosti závisí jednak na jejich fyziologickém stavu, jednak na jejich genovém vybavení, a proto při sledované teplotě obvykle určité procento buněk přežívá. Je-li počáteční koncentrace buněk v prostředí větší, je k jejich bezpečnému usmrcení zapotřebí vyšší teploty, což je způsobeno ochranným působením shluku buněk a větší pravděpodobností výskytu buněk s vyšší termorezistencí [3].

Jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících termorezistenci mikroorganismů je obsah vody v prostředí i buňkách, neboť v suchém prostředí jsou mikroorganismy mnohem rezistentnější k vysokým teplotám než v prostředí vlhkém. K látkám působícím ochranně patří především lipidy, bílkoviny a vyšší koncentrace sacharidů. Termorezistenci vegetativních buněk i spor silně ovlivňuje pH prostředí; obecně můžeme říci, že termorezistence je nejvyšší, je-li pH optimální pro růst daného mikroorganismu [3].

Hlavní příčinou letálních účinků vysokých teplot je pravděpodobně nevratná denaturace bílkovin a z ní plynoucí inaktivace enzymů, avšak probíhají zde pravděpodobně i jiné procesy, jako např. poškození cytoplazmatické membrány, jež vede k lyzi buněk.

Smrtících účinků vysokých teplot se v praxi využívá v širokém měřítku k sterilizaci různých předmětů, živných půd, vhodných pro pěstování mikroorganismů, a ke konzervaci potravin.

Usmrcení vegetativních forem nežádoucích mikroorganismů se dosahuje tzv. pasterací, která spočívá v jednorázovém zahřívání na teplotu do 100 °C. Při pasteraci se usmrtí všechny nesporeující patogenní mikroorganismy, jež by v potravině mohly být přítomny, a ty mikroorganismy, které zkracují údržnost dané potraviny. Pasteruje se hlavně mléko, exportní pivo, víno a ty potraviny, u nichž by vyšší teploty poškodily chuť nebo nutriční hodnotu [3].

2.2.1.3 Vliv nízkých teplot

Teploty nižší než minimální teplota růstu přežívá většina mikroorganismů poměrně dlouhou dobu. Jestliže se však intenzivně se rozmnožující buňky některých druhů bakterií přenesou z optimální teploty na teploty blízké 0 °C, dochází k tzv. chladovému šoku, který se projevuje ztrátou životnosti velkého podílu populace. Chladový šok byl pozorován u gramnegativních bakterií, u grampozitivních sporulujících bakterií a dokonce i u psychofilů. Citlivost různých druhů bakterií k chladovému šoku je však odlišná [3].

Při pomalém zmrazování mikrobiálních buněk na teploty pod 0 °C se z vnitrobuněčné i mimobuněčné vody tvoří velké krystaly ledu, které poškozují buňku a usmrcují ji.

Rychlé zmrazení buněk mikroorganismů suspendovaných v roztoku peptonu nebo bílkovin s následující sublimací vody patří k osvědčeným konzervačním postupům, neboť takto připravené tzv. lyofilizované kultury mají životnost několik let. Také ve zmrazených potravinách, které se skladují při teplotě -15 až -18 °C, přežívá většina bakterií po dobu delší než rok. Zmrazením potravin tedy dochází pouze k zastavení činnosti mikroorganismů a nikoliv k jejich usmrcení [3].

2.2.2 pH prostředí

Růst mikroorganismů i jejich biochemická činnost jsou silně ovlivněny koncentrací vodíkových iontů v prostředí. Každý mikrobiální druh se může rozmnožovat pouze v určitém rozmezí pH, viz tabulka 1. Většina bakterií roste v neutrálním nebo slabě alkalickém prostředí. Mezi bakterie přežívající extrémní pH patří střevní bakterie, neboť musí přežít velmi nízké pH žaludečních šťáv i alkalické pH žluči. Kyselé prostředí přežívají také druhy tvořící kyseliny jako hlavní produkty metabolismu (octové, mléčné nebo propionové bakterie). Při příliš nízkém pH se ovšem přestávají rozmnožovat a ustává jejich hlavní metabolická činnost. Naproti tomu hnilobné bakterie jsou velmi citlivé k nízkému pH, čehož se využívá při konzervaci potravin (marinované ryby, zelenina v kyselém nálevu nebo mléčně zkvašená zelenina) [3].

pH prostředí ovlivňuje také odolnost buněk ke zvýšeným teplotám. Jak již bylo uvedeno, je odolnost k vysokým teplotám tím menší, čím větší je odchylka od optimálního pH, což platí jak pro vegetativní buňky, tak i pro spory. U bakteriálních spor rodů *Bacillus*, *Clostridium* a *Desulfotomaculum* zabraňuje kyselé pH klíčení spor a jejich přeměně ve vegetativní formu.

Této skutečnosti se využívá u potravin sterilovaných teplem: kyselé potraviny o pH nižším než 4,0 (ovocné kompoty a šťávy a zelenina v kyselém nálevu) [3].

Tabulka 1: Minimální, optimální a maximální pH pro růst některých mikroorganismů [3]

Mikroorganismus	pH		
	minimální	optimální	maximální
Escherichia coli	4,3	6,0 – 8,0	9,5
Bacillus subtilis	4,5	6,0 – 7,5	8,5
Clostridium botulinum	4,7 – 5,0*)	6,5 – 7,2	9,0
Lactobacillus sp.	3,8 – 4,4*)	5,4 – 6,4	7,2
Thiobacillus thioparus	4,5	6,6 – 7,2	7,8 – 10,0*)
Thiobacillus thiooxidans	0,5	2,0 – 3,5	6,0
Saccharomyces cerevisiae	3,0 – 3,8*)	4,2 – 5,0	7,3 – 7,5
Aspergillus niger	1,2	3,0 – 8,0	11,0

*) Hodnoty u různých kmenů se vzájemně liší v uvedeném rozmezí

2.2.3 Vodní aktivita

Vodní aktivita (a_{H_2O} čili a_w) určitého roztoku se rovná poměru tlaku vodních par nad tímto roztokem k tlaku vodních par nad destilovanou vodou za stejných podmínek. Je tedy zřejmé, že voda má $a_w = 1$ a že se stoupající koncentrací rozpuštěných látek vodní aktivita klesá. Většina bakterií je schopna se rozmnožovat v živných prostředích o a_w v rozmezí 0,99 až 0,93. Některé bakterie se však rozmnožují pouze za nízkých vodních aktivit (0,65 až 0,63), které panují např. při vysokých koncentracích (20 až 30 %) chloridu sodného. Proto se tyto bakterie nazývají halofilní. Obvykle se jako halofilní označuje taková bakterie, která se rozmnožuje lépe při 15% a vyšší koncentraci chloridu sodného v prostředí. Rozmnožování většiny bakterií se však zastavuje, je-li v prostředí obsaženo 6 až 10 % chloridu sodného. Výjimkou jsou některé koky, označované jako halotolerantní (např. příslušníci rodů *Micrococcus* a *Staphylococcus*), které jsou schopny se rozmnožovat i při 10% koncentraci chloridu sodného [3].

Snížení vodní aktivity prostředí, a tím zabránění činnosti mikroorganismů, lze dosáhnout dvěma základními způsoby:

- odstraněním vody sušením nebo odpařením;
- zvýšením koncentrace rozpuštěných látek v prostředí přidavkem vhodných chemikálií.

Oba způsoby i jejich kombinace se využívají pro konzervaci některých potravin od nepaměti [3].

2.2.4 Záření

Elektromagnetické vlnění různých vlnových délek se značně liší svým fyziologickým účinkem na mikroorganismy.

Vlnění o nejdelších vlnových délkách, tj. infračervené záření a Hertzovy vlny, samy o sobě pravděpodobně vlastní smrtící účinek na mikroorganismy nemají a působí pouze svými tepelnými účinky [3].

Viditelné světlo (380 až 760 nm) a někdy i část infračerveného záření (800 až 900 nm) se uplatňují především jako zdroj energie fototrofních mikroorganismů. Řada bakterií se rozmnožuje lépe za tmy než za světla, kdežto pro dobrou sporulaci některých plísní nebo jejich vybarvení je zapotřebí světlo. Také tvorba karotenoidních barviv kvasinek bakterií je indukována světlem [3].

Ultrafialové (UV) záření má silné mutagenní a letální účinky na mikroorganismy. Největší mutagenní a letální účinky má UV záření o vlnové délce, jež je nejvíce absorbována nukleovými kyselinami (265 nm). Intenzita účinku UV světla je závislá na množství pohlceného záření, jež je úměrné síle zdroje a době ozařování a klesá se čtvercem vzdálenosti od zdroje záření. Pronikavost UV záření je velmi malá, a proto se toto záření používá pouze pro sterilaci vzduchu, povrchovou sterilaci předmětů, pracovních ploch, provozního zařízení apod. [3]

Hlavní příčinou účinku UV světla na mikroorganismy je tvorba kovalentních vazeb mezi sousedními pyrimidiny nukleových kyselin. Účinnost UV světla se snižuje intenzivním osvětlením viditelným světlem o vlnové délce 360 až 500 nm buď současně s UV světlem, nebo krátce po něm (do tří hodin po ozařování), neboť se umožňuje tzv. fotoreaktivace (fotoreparace), tj. enzymové rozštěpení pyrimidinových dimérů. Kromě přímého účinku na nukleové kyseliny působí UV světlo také tvorbou toxických peroxidů a ozónu.

Mikroorganismy se vzájemně značně liší svou odolností k účinkům UV světla. Poměrně odolné jsou spory rodu *Bacillus*, *Clostridium* a *Desulfotomaculum*, avšak ještě odolnější jsou buňky bakterií nebo kvasinek, obsahující karotenoidní barviva [3].

Záření o vlnové délce kratší než 10 nm (Roentgenovo záření, γ -záření a kosmické záření) mají silné mutagenní i letální účinky. Účinek těchto ionizačních záření je vyvolán jednak jejich přímým působením na citlivé molekuly buňky (především DNA), jednak prostřednictvím volných radikálů a oxiranů, které vznikají v důsledku těchto záření na buňku a její okolí.

Jednotlivé mikroorganismy se značně liší svou citlivostí k ionizačnímu záření: nejcitlivější jsou gramnegativní bakterie, zatímco kvasinky a plísně jsou obvykle odolnější než bakterie [3].

2.2.5 Hydrostatický tlak

Mikroorganismy se většinou rozmnožují za normálního atmosférického tlaku. Zvýšením tlaku na 10-20 MPa se obvykle rozmnožování mikroorganismů zpomaluje a k zastavení rozmnožování většiny mikroorganismů dochází při tlaku 30-40 MPa. Některé bakterie jsou ovšem schopny rozmnožování i v hloubce moří, kde panuje hydrostatický tlak 60 MPa i více (tzv. barofilní nebo barotolerantní bakterie).

Předpokládá se, že vysoký tlak působí nepříznivě především na syntézu buněčné stěny. Bylo také zjištěno, že tlak 5-60 MPa způsobuje anomálie v dělení buněk (tvoří se dlouhá vlákna), neboť se zastaví replikace DNA [3].

2.2.6 Ultrazvuk

Zvukové vlny o frekvenci vyšší než 20 kHz (tzv. ultrazvuk) působí na mikroorganismy letálně tehdy, mají-li poměrně velkou intenzitu (kolem 10 W.cm^{-2}) a nízký kmitočet (kolem 20 kHz). V tomto případě jde o tzv. kavitační ultrazvuk, který působí na živé organismy tím, že v důsledku kmitání vzniká prudká pulsace buněčných membrán a plazmy. Tím se místy opakovaně silně snižuje nebo zvyšuje tlak. V místech o nízkém tlaku se tvoří trhliny, kam difundují plyny rozpuštěné v kapalině. Při náhlém stlačení těchto kavitačních bublin vzniká obrovský tlak, který porušuje buňky a usmrcuje je. Některé chemické sloučeniny se vlivem intenzivního ultrazvuku rozkládají, což může rovněž nepříznivě působit na mikroorganismy. Např. z chloridu vzniká volný chlor, který má silné antimikrobiální účinky [3].

Nekavitační ultrazvuk, tj. ultrazvuk o velmi vysoké frekvenci (kolem 1 MHz i více) a nízkém rozkmitu (o intenzitě desetin W.cm^{-2}), nemá nepříznivý vliv na biologický materiál a používá se k lékařským diagnostickým účelům [3].

2.3 Standardní sterilizační postupy

2.3.1 Základní pojmy

V úvodu budou nejprve definovány některé pojmy související s eliminací a inaktivací mikroorganismů. Jedná se o pojmy sterilizace, dezinfekce, dekontaminace. Sterilizací rozumíme eliminaci všech forem života zahrnující vegetativní buňky, jejich vysoce rezistentní spory, mikroskopické houby a viry, a dále také vývojová stádia protozoí případně helmintů (červů) [6]. Dezinfekcí se snažíme přerušit cestu šíření nákazy, jde jen o odstranění původců infekce. Sterilizační postupy jsou tedy účinnější a většinou bývají fyzikální povahy. K dezinfekci se používají vesměs postupy chemické. Některé chemické postupy jsou natolik účinné, že jejich výsledkem je praktická sterilita dezinfikovaných předmětů [4]. Tento stupeň dezinfekce se používá tehdy, když nelze předměty sterilizovat [5]. Tyto procesy se souhrnně nazývají dekontaminační procesy a liší se od sebe dosaženým stupněm čistoty. Dekontaminace je definována jako proces usmrcení anebo odstranění znečišťujících látek a mikroorganismů z ploch a předmětů včetně usmrcení mikroorganismů bez ohledu na stupeň snížení jejich počtu [6].

2.3.2 Dekontaminační metody

Základní rozdělení dnes využívaných dekontaminačních metod je na metody fyzikální (teplo, záření, filtrace), chemické (ethylenoxid, kyselina peroctová, peroxid vodíku) a kombinované. Více používané jsou metody fyzikální, ale v případě, kdy je použití fyzikálních metod nemožné, je nutno využít metody chemické. Jejich sterilizační účinky jsou totožné, ale musíme brát v úvahu případný vliv chemických prostředků [7].

Látky používané k chemickým postupům sterilizace a dezinfekce se nazývají biocidy. Podle chemické struktury se dělí do několika skupin. Různé typy mikroorganismů se liší svou citlivostí k jednotlivým skupinám biocidů. Velmi senzitivní jsou vegetativní formy kvasinek a bakterií. Velký rozdíl je v účinku na grampozitivní a gramnegativní bakterie. Gramnegativní

jsou rezistentní vůči cyklickým sloučeninám, naopak citlivé jsou na těžké kovy, alkoholy a některé organické kyseliny [5].

V této kapitole budou popsány v současnosti asi nejrozšířenější sterilizační postupy: sterilizace ethylenoxidem, sterilizace teplem a UV nebo γ -zářením.

2.3.2.1 Sterilizace ethylenoxidem

Ethylenoxid je bezbarvá prchavá jedovatá kapalina, jeho páry jsou ve směsi se vzduchem výbušné. Velice dobře se rozpouští ve vodě a rozkládá se na glykol, vodík a kyslík [4].

Jedná se o sterilant se širokospektrálním účinkem, velice účinně likviduje všechny formy mikroorganismů a spor. Biocidní aktivita ethylenoxidu je výsledkem alkylace různých chemických struktur na povrchu vegetativních buněk nebo rezistentních spor. V současné době se jedná o nejrozšířenější sterilizační postup v průmyslu, nemocniční praxi (termolabilní materiály) a v archívech [7].

Používá se ve speciálních přístrojích v přetlaku nebo v podtlaku dle použitého typu plynu. V prvním případě je použita směs ethylenoxidu s inertním plynem, ve druhém pak čistý ethylenoxid [7]. Pracovní teplota je 30-60 °C, jeho účinnost s teplotou roste [5]. Páry ethylenoxidu velmi dobře penetrují membránami většiny plastických hmot, což umožňuje sterilizaci předmětu přímo v obalech [7].

Mezi hlavní nevýhody tohoto typu sterilizace patří vysoké investiční náklady na sterilizační zařízení a časová náročnost na desorpci [7].

2.3.2.2 Sterilizace vlhkým teplem (autoklávování)

Jedná se o sterilizaci při vysokých teplotách pod tlakem. Teplota syté vodní páry roste zároveň s tlakem. Principem likvidace je to, že při styku s chladnějšími předměty pára kondenzuje na vodu a přitom předává velké množství výparného tepla. Přítomné mikroorganismy jsou usmrceny tepelnou denaturací bílkovin, rozkladem nukleových kyselin a porušením buněčných membrán. Protože se jedná o tzv. vlhké teplo, je jeho působení na mikroorganismy daleko účinnější než v případě tepla suchého [4].

2.3.2.3 Sterilizace horkým vzduchem

Při horkovzdušné sterilizaci se využívá teplot mezi 160 až 180 °C. Principem horkovzdušné sterilizace je denaturace bílkovin. Prakticky všechny nesporeující mikroby jsou při 180 °C zabity do 5 minut. Viry jsou citlivější, s výjimkou viru hepatitidy B, jenž se v krvi inaktivuje při 160 °C až za 60 minut. Vůči suchému teplu jsou nejodolnější bakteriální spory, ty nejrezistentnější se zničí při 180 °C až za 15 minut.

Nevýhodou je, že sterilizovat se takto dají jen předměty z odolných materiálů a látky neobsahující vodu – např. sklo, porcelán, tuky, oleje, vosky, glycerin. Opakovanou horkovzdušnou sterilizací ztrácejí kovové nástroje tvrdost a tupí se. Rovněž papír, vata, textil, dřevo a korek, které se sterilizují jen při 160 °C, při tomto postupu trpí a mění svůj vzhled a vlastnosti [4].

2.3.2.4 Ultrafialové záření

Princip působení ultrafialového záření byl popsán v kapitole 2.2.4.

Účinek UV záření není zcela ireverzibilní. Bylo zjištěno, že jsou-li bakterie po ozáření UV paprsky vystaveny dočasnému účinku denního světla, může řada bakterií ozáření přežít a pokračovat v růstu [2].

Zdrojem UV záření jsou tzv. germicidní zářiče. Tento způsob sterilizace lze použít k doplňkové dezinfekci či dekontaminaci. Nevýhodou je malá hloubka pronikání a tudíž nemožnost sterilizace zastíněných předmětů [4].

2.3.2.5 Ionizující záření

Ke sterilizaci se využívá pronikavého gama-záření. Jako zdroj ionizujícího záření se používá např. radioaktivní kobalt ^{60}Co .

Mezi výhody tohoto typu sterilizace patří skutečnost, že ionizující záření proniká hluboko sterilizovaným materiálem, je tedy možno sterilizovat předmět i s jeho obalem [5].

2.4 Plazmová sterilizace

2.4.1 Co je to plazma

Plazma se označuje jako čtvrté skupenství hmoty. Je to kvazineutrální plyn obsahující dostatečné množství nabitých částic, jejichž prostorový náboj vede k tzv. kolektivnímu chování [33]. Pojmem kvazineutrální označujeme takový stav, kdy se v ionizovaném plynu vyskytuje stejné množství částic nesoucí kladný i záporný náboj [5]. Kolektivním chováním označujeme vzájemné působení částic prostřednictvím makroskopických elektromagnetických polí. Jednotlivými mikroskopickými poli na sebe částice působí pouze při vzájemných srážkách. Na základě toho, zda kromě nabitých částic obsahuje plazma i neutrální molekuly a atomy, rozdělujeme plazma na slabě a silně ionizované [33].

Mezi procesy vytvářející stav plazmatu patří pružné srážky mezi částicemi i nepružné srážky, které vedou k ionizaci či disociaci částic. Tyto procesy jsou doprovázeny přenosem energie a díky nim se v plazmatu ustanoví rovnováha mezi působením přímých a inverzních procesů [34].

V plazmatu jsou elektrony urychlovány účinkem vnějšího elektrického pole a jejich energie je pomocí srážek přenášena na ostatní částice, což vede k excitaci, ionizaci nebo disociaci. Částice v metastabilních stavech mají relativně dlouhou dobu života (mikro až milisekundy), v důsledku čehož se mohou hromadit v plazmatu a následně jsou využity jako efektivní zdroj pro postupné excitační a ionizační procesy. Srážky s molekulami mohou vést ke vzniku volných radikálů, z nichž se stávají prekurzory chemických reakcí v plazmatu. Chemické reakce probíhají v plazmatu odlišně než za běžných podmínek, což je důsledkem velkého počtu energetických srážek [35].

Rozlišujeme několik typů plazmatu lišících se od sebe tím, zda se nachází v teplotní rovnováze. V rovnovážném plazmatu mají všechny částice stejnou energii i teplotu. V nerovnovážném plazmatu mají elektrony jinou teplotu než těžké částice. V jakém stavu se plazma nachází závisí především na způsobu jeho vzniku [5].

Plazma běžně používané pro sterilizační účely se nazývá nízkoteplotní (studené), s ohledem na teplotu plynů. Je to z toho důvodu, že těžké částice (neutrální částice a ionty) v tomto plazmatu mají výrazně nižší teplotu (obvykle až desetkrát menší) než je teplota elektronů [8].

2.4.2 Zdroje plazmatu

Zdroje plazmatu se liší tím, zda pracují při nízkém tlaku plynu, nebo při atmosférickém či vyšším tlaku. Plazma můžeme generovat vysokofrekvenčním elektromagnetickým polem, stejnosměrným nebo střídavým proudem. Pokud přiložíme napětí na dvě elektrody uvnitř vyčerpané skleněné trubice, dojde k doutnavému výboji a vzniku plazmatu. V plynu je vždy přítomen malý počet elektricky nabitých částic, tím dojde k zapálení výboje. Poté se vlivem urychlování mezi elektrodami a vzájemnými srážkami začne rychle zvyšovat počet nabitých částic. Bude-li se napětí na elektrodách dále zvyšovat, bude sílit ionizace a elektrony na katodě budou mít dostatečnou energii pro výstup do prostoru výboje. Tím doutnavý výboj přejde v elektrický oblouk. Dalším typem výboje je koronový nebo bariérový výboj. Oba vznikají při atmosférickém tlaku a je pro ně typická velká aktivní plocha plazmatu [5].

2.4.3 Princip plazmové sterilizace

Plazmovou sterilizací rozumíme vystavení mikroorganismů účinkům elektrického výboje v prostředí plynu. Důležitou podmínkou je, že plyny nebo jejich směsi nemají za normálních podmínek biocidní účinky. Ty jsou aktivovány až působením elektrického výboje a deaktivovány bezprostředně po vypnutí budícího zdroje [8, 36]

Plazmová sterilizace je řazena mezi fyzikální sterilizační metody. Principem této metody je působení jak fyzikálních vlivů, tak vlivů chemických, vznikajících chemickými změnami prostředí. Vznik chemických agens je zcela závislý na fyzikálních vlastnostech plazmatu, to znamená, že jej nelze získat bez přítomnosti plazmového výboje [6].

Plazmové sterilizační zařízení je takový systém, ve kterém je za inaktivaci mikroorganismů zodpovědné výhradně plazma. Sterilizovat lze přímým kontaktem s plazmatem nebo v dohasínajícím plazmatu. Dohasínající plazma obsahuje ve srovnání s výbojem relativně málo nabitých částic. Hlavní výhodou sterilizace v dohasínajícím plazmatu je především teplota. Teplota plynu ve výboji může dosahovat až několik set °C, zatímco teplota dohasínajícího plazmatu nepřesáhne 50 °C, což je důležité pro sterilizaci tepelně citlivých materiálů. Pokud však jde o dobu sterilizace, ta je mnohem kratší ve výboji než v dohasínajícím plazmatu [5].

Sterilizace při přímé expozici plazmatem nastává ve výrazně kratších časech než sterilizace v dohasínajícím výboji, nicméně sterilizace v dohasínajícím výboji je mnohem bezpečnější pro personál, jednodušší a má nižší provozní náklady. Významným nedostatkem plazmových sterilizací je jejich závislost na tloušťce vrstvy mikroorganismů určených ke sterilizaci. Důvodem je omezená hloubka penetrace UV záření [8].

2.4.4 Mechanismy účinku sterilizace plazmatem

Ke sterilizaci plazmatem dochází níže popsanými mechanismy, které definoval Moisan [8]:

- 1) Přímá destrukce genetického materiálu mikroorganismu působením UV záření. [8]

Nejvyšší účinek má UV záření v rozsahu 240-280 nm, což bylo popsáno v kapitole 2.2.4.

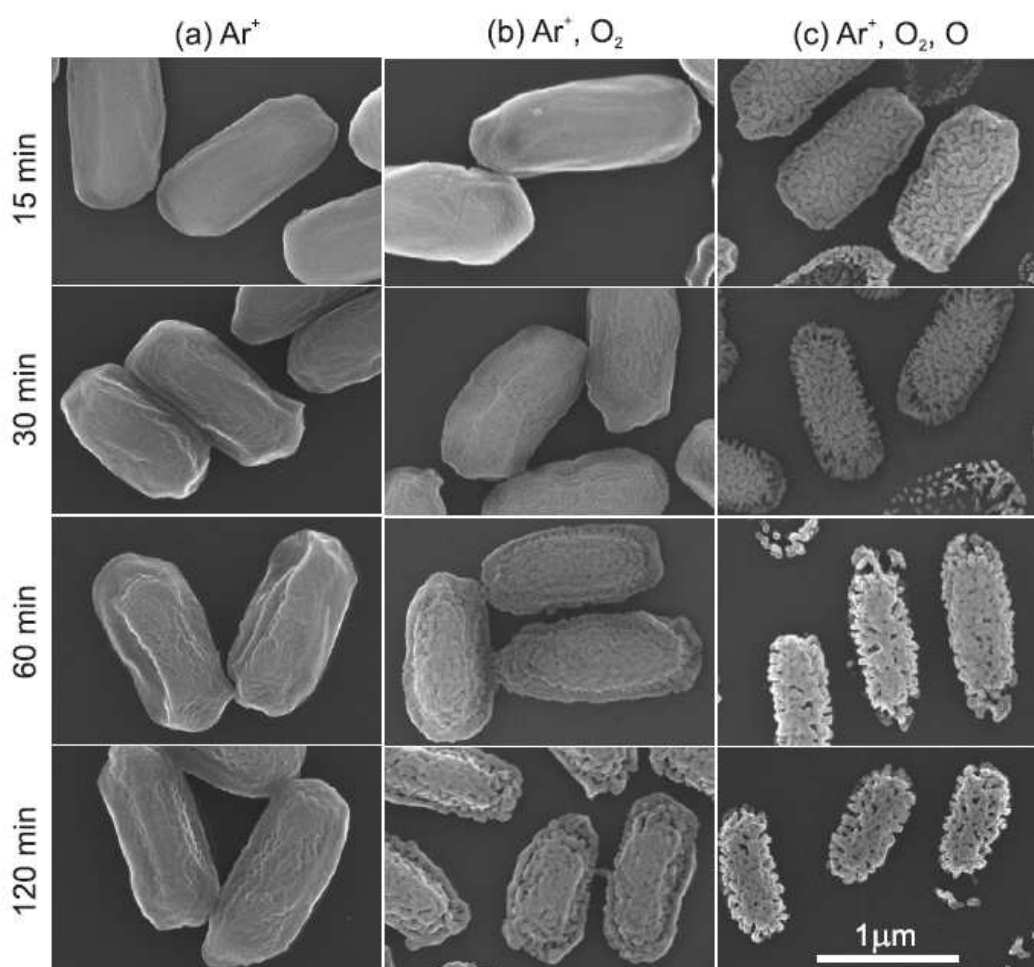
UV záření v rozsahu 320-400 nm iniciuje změny nenasycených mastných kyselin v buněčné membráně. V důsledku toho může dojít ke změně permeability buněčné membrány [6].

2) Eroze mikroorganismů, atom za atomem, vlivem vnitřní fotodesorpce

Foto-indukované desorpce je výsledkem působení UV fotonů, které po dopadu štěpí chemické vazby v materiálu mikroorganismu, což vede k formování těkavých sloučenin z atomů vlastního mikroorganismu. Těkavé meziproducty těchto nerovnovážných chemických reakcí jsou malé molekuly, např. CO a CH_x) [8].

3) Eroze mikroorganismů vlivem leptání

Leptání je výsledkem absorpce reaktivních částic z plazmatu na povrchu mikroorganismů, kde vstupují do chemických reakcí, jejichž výsledkem je formování těkavých sloučenin (spontánní leptání). Reaktivní částice mohou být atomární a molekulární radikály, např. O a OH, nebo excitované molekuly [8]. Proces leptání je znázorněn na obrázku 6.



Obrázek 6: *Bacillus atrophaeus* vystavený po dobu 15 – 120 minut za nízkého tlaku působení a) iontům argonu, b) kombinaci iontů argonu a molekul kyslíku a c) kombinaci iontů argonu, molekul kyslíku a kyslíkových atomů [18]

Boudam dodal následující mechanismy [9]:

4) Oxidaci buněčných částí (membrána, proteiny, DNA) v důsledku působení volných radikálů obsahujících O (O, OH, RO)

Difuze atomů kyslíku, obecně sloučenin, které obsahují ve své molekule kyslík skrz materiál spor, následované lokálním poškozením způsobeným pravděpodobně oxidací cytoplasmatické membrány, proteinů a DNA materiálu.

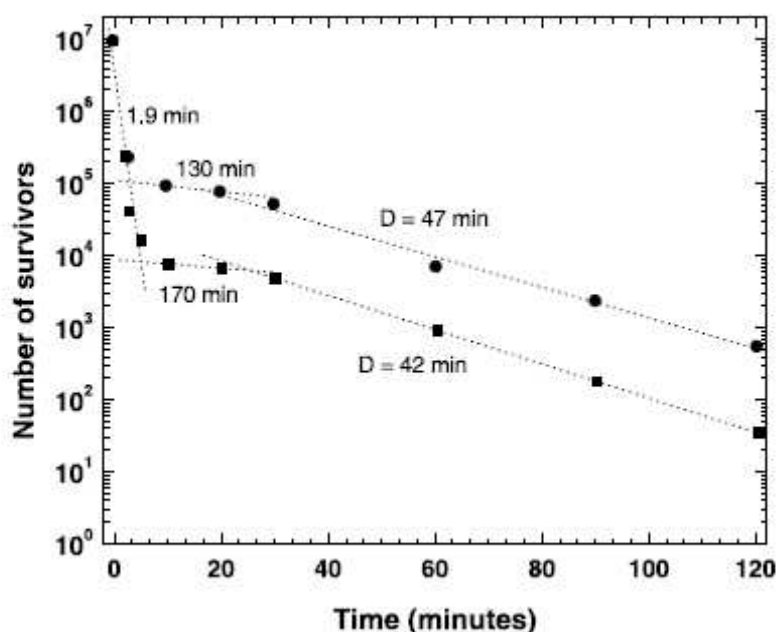
5) Lyze bakterií, jako výsledek nahromadění nabitých částic na buněčné membráně. Tento efekt je prokázán pouze pro gramnegativní vegetativní bakterie s nerovnoměrným povrchem. Tyto nepravidelnosti vytvářejí malé poloměry zakřivení, na nichž dochází k nahromadění náboje [9]. Tuto teorii potvrdil Laroussi ve svých experimentech s gramnegativní bakterií *E. coli* a grampozitivní bakterií *B. subtilis* [24].

2.4.5 Křivka přežití

Křivka přežití popisuje fyzikálně-chemické procesy, které se podílejí na plazmových sterilizacích. Je to graf logaritmu počtu přeživších mikroorganismů jako funkce délky expozice plazmatem.

Výsledkem sterilizace v konvenčních sterilizačních systémech (autokláv, EtO) je jednofázová křivka – celý proces inaktivace až po sterilizaci je exponenciální funkce času.

Naopak vystavení mikroorganismů vlivům plazmatu vede ke grafu se dvěma až třemi lineárními segmenty viz obr. 7, což vede k závěru, že počet přeživších mikroorganismů klesá v první aproximaci lineárně s časem, ale s různými časovými konstantami resp. různými kinetikami [10].



Obrázek 7: Křivka přežití spor *B. subtilis* [8]

2.4.6 Různé typy výbojů a jejich využití

Tato část je zaměřena na různé typy výbojů a jejich využití při inaktivaci mikroorganismů za atmosférického tlaku.

K. Kelly-Wintenberg a kol. (1998) - pro sterilizaci využili RF doutnavý výboj (OAUGDP - one atmosphere uniform glow discharge plasma). Jedná se o zvláštní typ netermálního atmosférického plazmatu, který svou časově rozlišenou charakteristikou připomíná DC doutnavý výboj za nízkých tlaků. Frekvence buzení výboje je 7 kHz, napětí 8,5-11 kV. Mikroorganismy byly vystaveny jak přímému působení plazmatu, tak i dohasínajícímu výboji. Jako bioindikátory byly použity bakterie (vegetativní - různé kmeny *E. coli*, *S. aureus*, *Deinococcus radiodurans*, *Bacillus subtilis*, spóry - *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis var niger*), kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*) a viry (*Bacteriophage Phi X 174*). Mikroorganismy byly nanášeny na PP, sklo a živné médium (agar). Z výsledků je patrné, že rychlost inaktivace závisí na typu mikroorganismu a vlastnostech povrchu určeného ke sterilizaci. Dominantním mechanismem při inaktivaci jsou reaktivní radikály O, vliv UV záření je zanedbatelný. Výsledkem experimentů je křivka skládající se ze dvou lineárních úseků. V případě přímého působení plazmatu je hodnota D_1 větší než hodnota D_2 , v případě dohasínajícího plazmatu je tomu opačně. Na základě sterilizačních účinků OAUGDP byly navrženy speciální vzduchové filtry (Volfiltry) do klimatizací a ventilačních systémů [22].

Hury a kol. (1998) publikovali inaktivaci spor na předmětech ponořených do argonového a kyslíkového (O_2 , CO_2 a H_2O_2) mikrovlnného plazmatu, v oblasti nízkých tlaků. Jako testovací spory byly použity spory *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilus* a *B. stearothermophilus*. Zjistili, že *B. stearothermophilus* byl mnohem jednodušeji inaktivován než zbylé tři mikroorganismy, což ukázaly shodné křivky přežití. Dále zjistili, že CO_2 a H_2O_2 výboje mají nejvyšší inaktivační rychlost argon nejnižší. Dle jejich tvrzení dochází k degradaci mikroorganismů vlivem jejich pomalého spalování kyslíkovými atomy a radikály obsahujícími kyslíkový atom. Při teplotách blízkých laboratorní teplotě je výsledkem spalování CO_2 a H_2O [8].

T. C. Montie a kol. (2000) - patří do stejné skupiny jako Kelly-Wintenberg. Při inaktivaci mikroorganismů využívali OAUGDP. Zjistili, že pro délku inaktivace nehraje roli to, zda jsou vzorky mikroorganismů nanášeny na polypropylenových nosičích vystaveny působení plazmatu přímo nebo zabaleny v obalech. Vzhledem k faktu, že neprůhledné obaly absorbují většinu UV, dospěli k závěru, že UV záření není dominantním procesem inaktivace. Domnívají se, že za inaktivaci je zodpovědná difuze reaktivních kyslíkových částic do cytoplazmatické membrány a následné nevratné poškození membrány [23].

M. Laroussi a kol. (2003) - používal RBD výboj (typ DBD, kde jeden z plátů dielektrika je nahrazen vysoce odolným materiálem), který umožňuje pracovat při nízkých frekvencích jako je 60 Hz. RBD výboj generovaný v heliu za atmosférického tlaku je zdroj nabitých částic, volných radikálů a záření (IR, VIS a UV). Hlavním cílem bylo ukázat, že lyze gramnegativních bakterií *E. coli* je výsledkem nabití (nahromadění náboje) na povrchu bakterie a následné poškození vnější buněčné membrány vlivem elektrostatických sil. Toto nebylo pozorováno při inaktivaci grampozitivní bakterie *B. subtilis*. Zde nenastala žádná morfologická změna. Důvodem je silnější ochranná vrstva [24].

Kwon-Yong Lee, Park a kol. (2004) - využívají mikrovlnné plazma (2,45 GHz) buzené v argonu za atmosférického tlaku. Jako kontrolní mikroorganismy používají *E. coli* a methicillin rezistentní *Staphylococcus aureus* nanášeny na sklo. Inaktivace 6-ti řádů dosahovali při expozici 1 s. Jako hlavní inaktivační mechanismy uvádějí volné radikály, UV záření a proces odprašování [25].

M. Laroussi, F. Leipold (2004) - zkoumali mechanismy inaktivace mikroorganismů ve vzdáleném atmosférickém DBD výboji na vzduchu. Výkon plazmatu byl 2-15 W. Dle autorů mají hlavní podíl na inaktivaci kyslíkové a dusíkové reaktivní částice jako jsou O, OH, NO₂, vliv teploty a UV záření je v tomto případě zanedbatelný. Jako modelový mikroorganismus zvolili spory neznámého druhu *Bacilla* [26].

M. Heise a kol. (2004) - pro sterilizaci PE vzorků kontaminovaných sporami *Bacillus subtilis* a *Aspergillus niger* využili dvě konfigurace bariérového výboje. V prvním případě se jedná o klasický DBD s jedním dielektrikem a vzorkem umístěným na uzemněné elektrodě. Ve druhém případě použili CDBD (kaskádový dielektrický výboj), který kombinuje účinek UV záření a dopadu reaktivních částic plazmatu. Tento typ výboje vznikl přidáním dalšího dielektrika (z křemenného skla, transparentní pro UV záření) do mezery mezi elektrodami klasického DBD. Vznikly tak dva nezávislé prostory, v horní části je umístěna excimerová lampa a ve spodní je buzen výboj. Jako plyny použili argon, dusík a syntetický vzduch. Výboj byl buzen s frekvencí 20-50 kHz. Dospěli k závěru, že CDBD je mnohem efektivnější při inaktivaci spór a navíc je šetrnější k materiálu. Při inaktivaci v DBD předpokládají jak vliv UV záření, tak i reaktivních částic [21].

Becker a kol. (2005) - používali mikroplazma (CPE – capillaries plasma electrode discharge). Jedná se o typ bariérového výboje, kde dielektrická kapilární vrstva pokrývá jednu nebo obě elektrody. Každá kapilára slouží jako plazmový zdroj (plazma jet), jsou schopné generovat plazma o vysoké intenzitě, výsledkem je homogenní plazma. Jako pracovní plyny používali He, He-N₂, He-vzduch (vlhký, suchý). Testovali inaktivační účinek mikroplazmatu na jednotlivé mikroorganismy (bakteriální spóry *B. subtilis* a *B. stearothermophilus*) a na biofilmy (vysoce organizované kolonie mikroorganismů, které se vyznačují komplexní strukturou, která dobře přilne k povrchu; projevují se vysokou odolností vůči antibiotikům, germicidnímu záření a dalším tradičním inaktivačním postupům). Výsledkem inaktivace jednotlivých mikroorganismů je jednoduchá exponenciální křivka, kterou autor přisuzuje buď dominanci jednoho typu mechanismu nebo více mechanismům se stejnou kinetikou, nicméně jednotlivé mechanismy přesně nespecifikuje. V případě biofilmů je výsledkem křivka složená ze dvou lineárních částí, ani zde autor neposkytuje vysvětlení. Sterilizace jednotlivých mikroorganismů vyžaduje přibližně 2 minuty, u biofilmů je nutné použít časy delší než 60 minut [27].

M. K. Boudam a kol. (2006) - pro inaktivaci mikroorganismů využívají DBD (v Townsendově módu) ve směsi N₂-N₂O. Zjistili, že volbou správné koncentrace N₂O v pracovním plynu lze dosáhnout takových podmínek, kdy inaktivačnímu procesu dominuje UV záření, naopak lze také dosáhnout podmínek kdy je vliv UV záření minimální. Jako kontrolní mikroorganismus byl použit *Bacillus subtilis* [9].

P. Muranyi a spol. (2007) navázali na práci Heise. Testovali inaktivační účinnost nově vyvinutého CDBD s 282 nm excimerovou lampou na širokou škálu mikroorganismů (spóry *B. atrophaeus*, *B. pumilus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium sporogenes*, konidiospóry *Aspergillus niger* a vegetativními buňkami *Salmonella Mons*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Deinococcus radiodurans*). Výboj byl buzen v prostředí laboratorního vzduchu za atmosférického tlaku, s hustotou výkonu 1,3 W.cm⁻². Inaktivační účinek CDBD se pro každý mikroorganismus a jeho formu liší. Obecně lze říct, že inaktivace většiny vegetativních buněk nastal již po 1 s působení plazmatu, v případě vysoce rezistentních spor bylo potřeba výrazně delších časů. Spory *Aspergillus niger* se ukázaly jako nejodolnější, což

vzhledem k jejich vysoké odolnosti vůči působení UV potvrzuje dominantní roli UV záření [28].

R. Brandenburg a spol. (2007) - použili pro inaktivaci netermální plazma jet s RF frekvencí 27,12 MHz, výkon se měnil v rozmezí 10-60 W. Výboj hořel za atmosférického tlaku v argonu. Jednotlivé plazma-jety lze spojovat a vytvářet tak podmínky pro opracování 3D předmětů různých tvarů. Teploty substrátu se pohybovaly dle zvoleného výkonu a průtoku plynu v rozmezí 35-95 C. Jako bioindikátory byly použity spóry *Bacillus atrophaeus* a vegetativní buňky *Escherichia coli*. Výboj byl analyzován a byla prokázána přítomnost reaktivních částic kyslíku, konkrétně atomární O, OH a NO molekuly, které jsou zodpovědné za emisi UV záření v oblasti 200-300 nm. Účinky UV záření a teploty byly studovány odděleně. Při studiu teplotní inaktivace byly vzorky vystaveny působení suchým teplem při teplotě shodné s teplotou vzorku v plazmatu. Vliv UV záření byl studován v plazmatu pomocí UV transparentního filtru z křemenného skla. Nejvyšší inaktivační účinek byl dosažen při přímé expozici plazmatem. V případě spor *Bacillus atrophaeus* byl účinek UV záření ve srovnání s plazmatem asi poloviční a vliv teploty byl zcela zanedbatelný vzhledem k vysoké odolnosti bakteriálních spor. Naopak tomu bylo u *Escherichia coli*, kde v prvních 30 s byl účinek plazmatu a tepelné sterilizace srovnatelný, nicméně s prodlužující se délkou expozice dosahovala plazma výrazně lepších sterilizačních účinků než samotná teplota. V tomto případě je vliv UV záření zanedbatelný [29].

F. Leipold (2007) – se ve svém experimentu zaměřil na sterilizaci hroznů, které jsou během přepravy napadány plísní Botrytis. Bylo použito nízkoteplotní plazma při atmosférickém tlaku a jako reaktivní částice zde byl použit ozón. Pro srovnání byl stejný pokus proveden v atmosféře SO₂, který se v současnosti ke sterilizaci hroznů využívá. Výsledky ukazují, že dostačující koncentrace ozonu je přibližně 20 ppm a výsledky jsou srovnatelné s působením SO₂. Navíc nebyla ovlivněna chuť ani vzhled hroznů [19].

Podle J. Ehlbecka a spol. (2008) je inaktivační účinek výboje prezentovaný Brandenburgem výsledkem společného působení excitovaných reaktivních částic, částečně asistované UV a VUV zářením (jako pracovní plyn byl použit argon), teplotou a nízkomolekulárními chemickými produkty. Výsledkem sterilizace je inaktivační křivka složená ze dvou lineárních částí, kde první část má strmější průběh. Přidáním vzduchu do argonu je zvýšena účinnost inaktivace, pravděpodobně díky vyšší koncentraci reaktivních kyslíkových částic. Dále prezentují výsledky sterilizace vnitřních stěn PET lahvíček pomocí mikrovlnného výboje generovaného magnetronem (frekvence 2,45 GHz, výkon 1,7 kW) na vzduchu za atmosférického tlaku. Bylo dosaženo inaktivace 5 až 7 řádů v závislosti na typu mikroorganismů při expozicích plazmatu do 1,5 s. Jako mechanismy inaktivace uvádí UV záření, nízkomolekulární chemické produkty (hlavně NO), reaktivní částice kyslíku, teplo a zbytkový plyn NO₂ (vzniká z NO a O radikálů) [30].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 *Bacillus subtilis*

Experimentální část této práce byla prováděna na mikroorganismu *Bacillus subtilis*

3.1.1 Taxonomické zařazení

Říše: Bacteria

Oddělení: Firmicutes

Třída: Bacilli

Řád: Bacillales

Čeleď: Bacillaceae

Rod: *Bacillus*

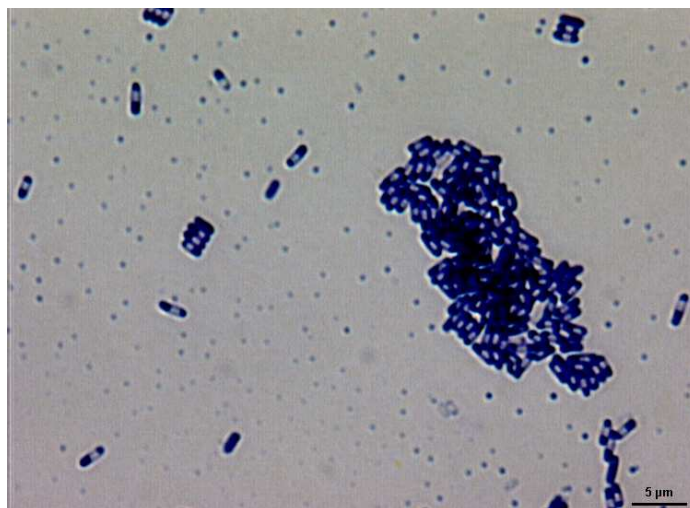
Druh: *B. subtilis*

[14]

Mezi další druhy rodu *Bacillus* patří *Bacillus polymyxa*, *Bacillus macerans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus* [3].



Obrázek 8: Křížový roztěr *B. subtilis* [15]



Obrázek 9: Gramovo barvení [15]

3.1.2 Morfologie

Bacillus subtilis patří mezi grampozitivní bakterie, buňky mají tvar tyčinek a jsou uspořádány v řetězcích. Velikost buněk se pohybuje 2-3 μm do délky a 0,7-0,8 μm do šířky. Spory jsou oválného tvaru, nezduřující buňku [15]. Endospory rodu *Bacillus* se vyznačují vysokou termorezistencí [3].

3.1.3 Metabolismus

Bacillus subtilis je aerobní, chemoorganotrofní mikroorganismus [15]. Produkuje několik polypeptidových antibiotik [3]. Patří mezi kataláza pozitivní, lecitináza negativní, tvoří acetoin, netvoří arginin dihydrolázu, hydrolyzuje želatinu, škrob a eskulin, redukuje nitráty. Optimální růstová teplota je 30 °C. Roste při 50 °C, nicméně při 55 °C již neroste [15].

3.1.4 Význam

Bacillus subtilis je v přírodě nejrozšířenější [3]. Vyskytuje se v půdě a vodě [15]. V pekárenském průmyslu je hlavní příčinou nitkovitosti chleba. Bakteriální amylázy získané z *B. subtilis* se uplatňují v pivovarství a v textilním průmyslu, proteinázy se používají do pracích prostředků [16].

Bacillus subtilis byla první grampozitivní bakterie, u které byl rozluštěn genetický kód. Ačkoliv není považována za patogenní pro člověka, může kontaminovat jídlo a ve vzácných případech může způsobit otravu [17].

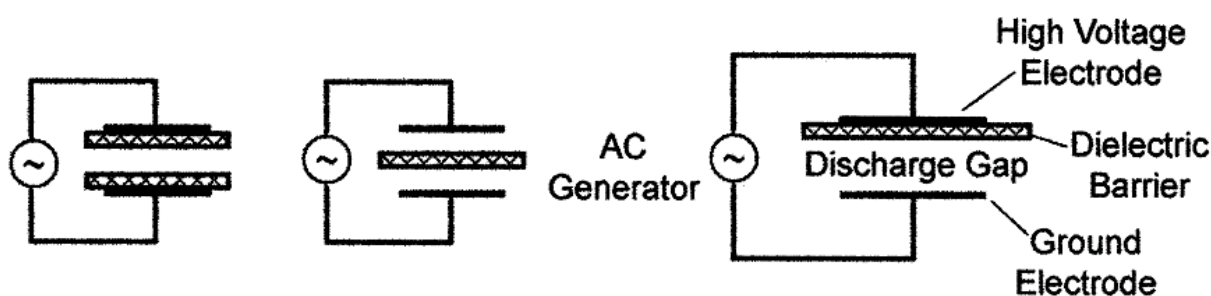
Spory jsou běžně používány jako testovací spory v H₂O₂ nebo při UV dekontaminaci. Předpokládá se jejich rezistence vůči oxidačním činidlům nebo prostředí a vysoká termorezistence [21, 3].

3.2 Dielektrický bariérový výboj

První výzkum byl zaměřen na využití DBD pro generování ozónu. Postupem času však našel DBD výboj uplatnění také při řadě dalších průmyslových aplikací, např. CO₂ lasery,

excimerní UV lampy, rozklad VOC, plazmové displeje, ale také při povrchových úpravách materiálů včetně nanášení tenkých vrstev [11].

Pro bariérový výboj je typická přítomností jedné nebo více pevných dielektrických bariérových vrstev umístěných mezi kovovými elektrodami (viz obrázek č.10). Dielektrická bariéra kontroluje distribuci náboje a energii mikrovýbojů na povrchu elektrody. Jako materiál pro dielektrikum se nejčastěji používá sklo, křemičité sklo, keramické nebo polymerní materiály. Bariérový výboj může vznikat v širokém rozmezí tlaků, nejčastěji však při tlacích 0,1-1 atmosféra. Z důvodu přítomnosti nevodivé bariérové vrstvy je výboj buzen střídavým napětím. Napětí mezi elektrodami je obvykle v rozsahu 1-100 kV. Frekvence se pohybuje v intervalu desítek Hz - MHz. Prostor mezi elektrodami se většinou pohybuje v rozmezí několika desetin mm až k několika cm v závislosti na požadované aplikaci [11].



Obrázek 10: Základní experimentální uspořádání dielektrických bariérových výbojů [11]. AC generator - zdroj střídavého napětí, discharge gap - prostor mezi elektrodami, dielectric barrier - dielektrická bariéra, high voltage electrode - vysokonapěťová elektroda, ground electrode - uzemněná elektroda

Jestliže k dvojici elektrod, mezi nimiž se nachází dielektrická bariéra, připojíme vysoké střídavé napětí s amplitudou větší než je průrazné napětí plynu mezi elektrodami získáme dielektrický bariérový výboj. V tomto případě slouží dielektrická bariéra jako sériově připojený kondenzátor omezující elektrický proud v prostoru mezi elektrodami. Elektrický průraz v plynu způsobí lokální nabíjení bariéry, jehož následkem je pokles napětí v plynu. To po velmi krátké době (řádově desítky nanosekund) klesne pod průrazné napětí plynu a výboj zanikne. K dalšímu výboji může dojít pouze zvýšením přiloženého napětí nebo změnou jeho polarity. Z tohoto důvodu se pro napájení bariérového výboje používá střídavé napětí [11].

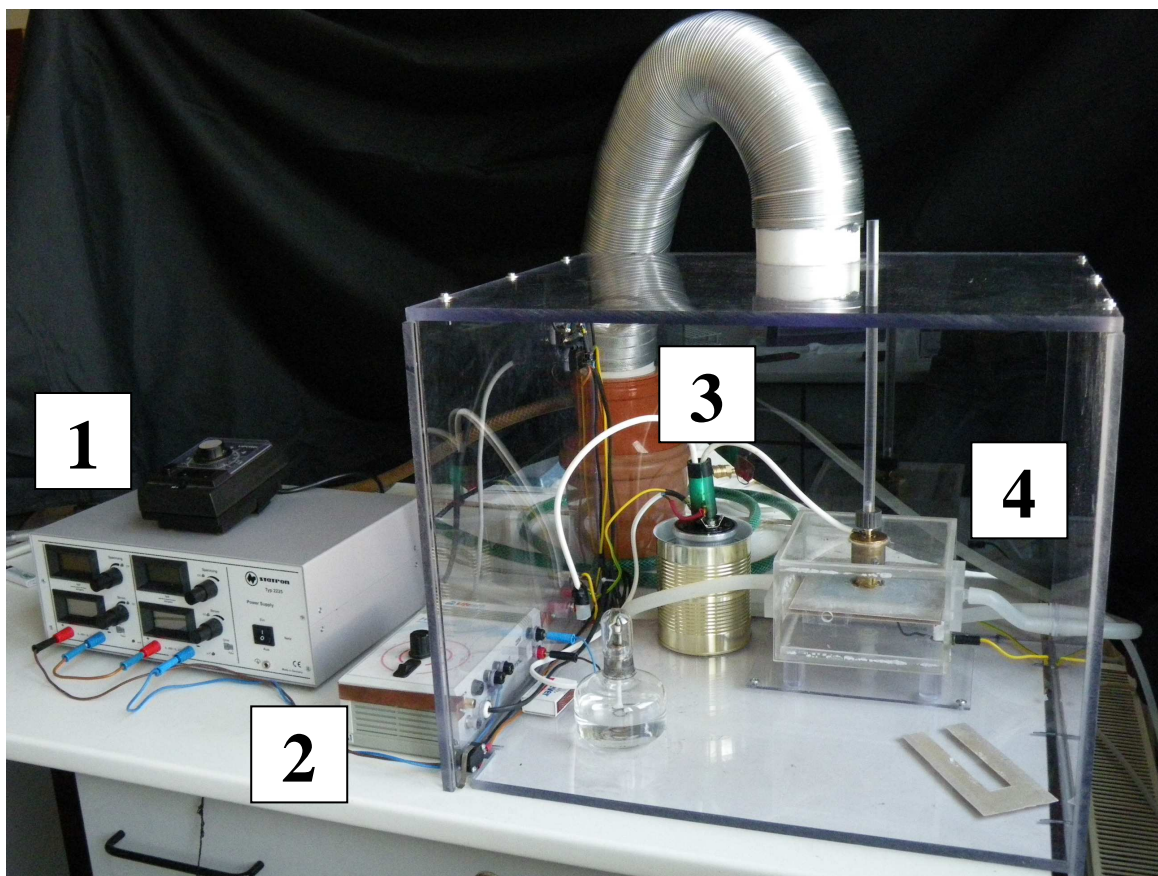
Za atmosférického tlaku se DBD většinou vyskytuje v tzv. filamentárním módu. To znamená, že výboj má podobu velkého množství výbojových kanálů, tzv. filamentů. Každý z filamentů je prostorově výrazně ohraničen, jeho průměr bývá řádově desítky milimetru a trvání od několika nanosekund po jednotky mikrosekund [11]. Vlastnosti jednoho filamentu příliš nezávisí na vlastnostech přivedeného napětí (amplituda, frekvence). Odvíjejí se od vlastností použitého plynu, dielektrika a konfigurací elektrod. Velikost amplitudy napětí ovlivňuje pouze množství vznikajících filamentů. Nezávislost vlastností filamentů na vlastnostech elektrického pole přestává platit, jestliže doba nárůstu napětí je srovnatelná s dobou trvání filamentu. Velkou nevýhodou filamentárního módu je jeho nehomogenita, proto je využitelnost filamentárního výboje omezena na procesy s nižšími nároky na homogenitu výboje [12].

Při určitých podmínkách (plyn, frekvence, napětí, případně konfigurace elektrod) lze získat zdánlivě homogenní difúzní mód DBD [11]. V tomto módu nelze přímo rozlišit jednotlivé filamenty, výbojový kanál pokrývá prakticky celou plochu dielektrika. Trvání tohoto výboje je také mnohem delší, řádově desítky až stovky mikrosekund. Budeme-li tedy sledovat časový průběh výbojového proudu, můžeme tak od sebe odlišit jednotlivé typy výboje. Výhodou je již zmiňovaná homogenita výboje, hlavní nevýhodou je to, že difúzní výboj vzniká jen v některých plynech nebo směsích plynů a jen v určitém rozsahu napětí a frekvencí. Na jeho vznik může mít rovněž vliv prostorové uspořádání elektrod [12].

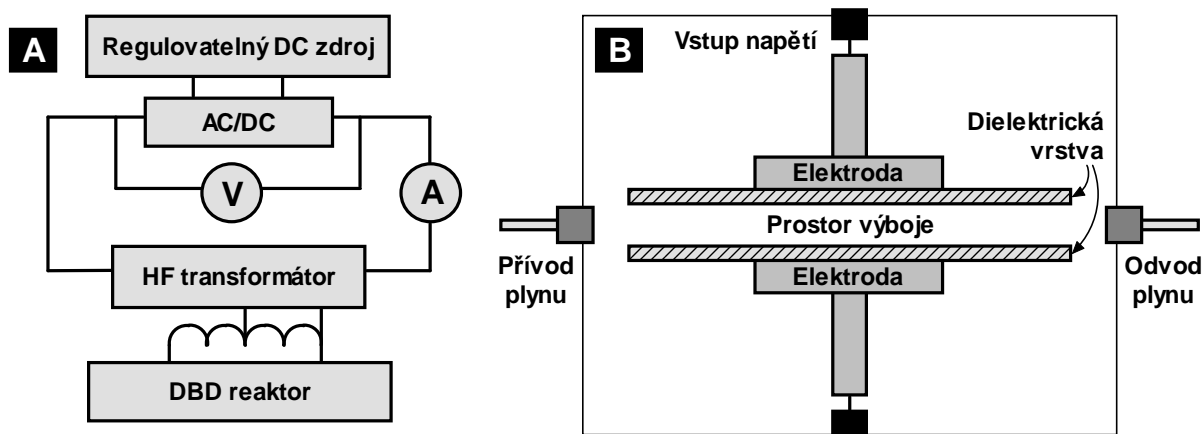
U dielektrického bariérového výboje jsou dvě základní uspořádání elektrod – rovinné nebo prostorové. Výboje můžeme rozdělit na objemové a povrchové, toto dělení je podle orientace výbojových filamentů vůči dielektrické vrstvě. Jsou-li výbojové mikrofilamenty orientovány kolmo na rovinu dielektrika (elektrody jsou naproti sobě), hovoříme o objemovém výboji. Výhodou je technická jednoduchost provedení, relativně velký objem vzniklého plazmatu a nízké nároky na dielektrickou pevnost bariéry. Nevýhodou tohoto uspořádání je nemožnost opracovávání materiálů tlustších, než je vzdálenost mezi elektrodami. V povrchových výbojích jsou výbojové mikrofilamenty orientovány tečně k rovině dielektrika (elektrody jsou v jedné rovině). Toto uspořádání umožňuje opracovávat materiály o libovolné tloušťce, ale pouze povrchově, protože tloušťka vzniklého plazmatu odpovídá tloušťce samotných mikrofilamentů (desetiny milimetru) [13].

3.3 Experimentální zařízení

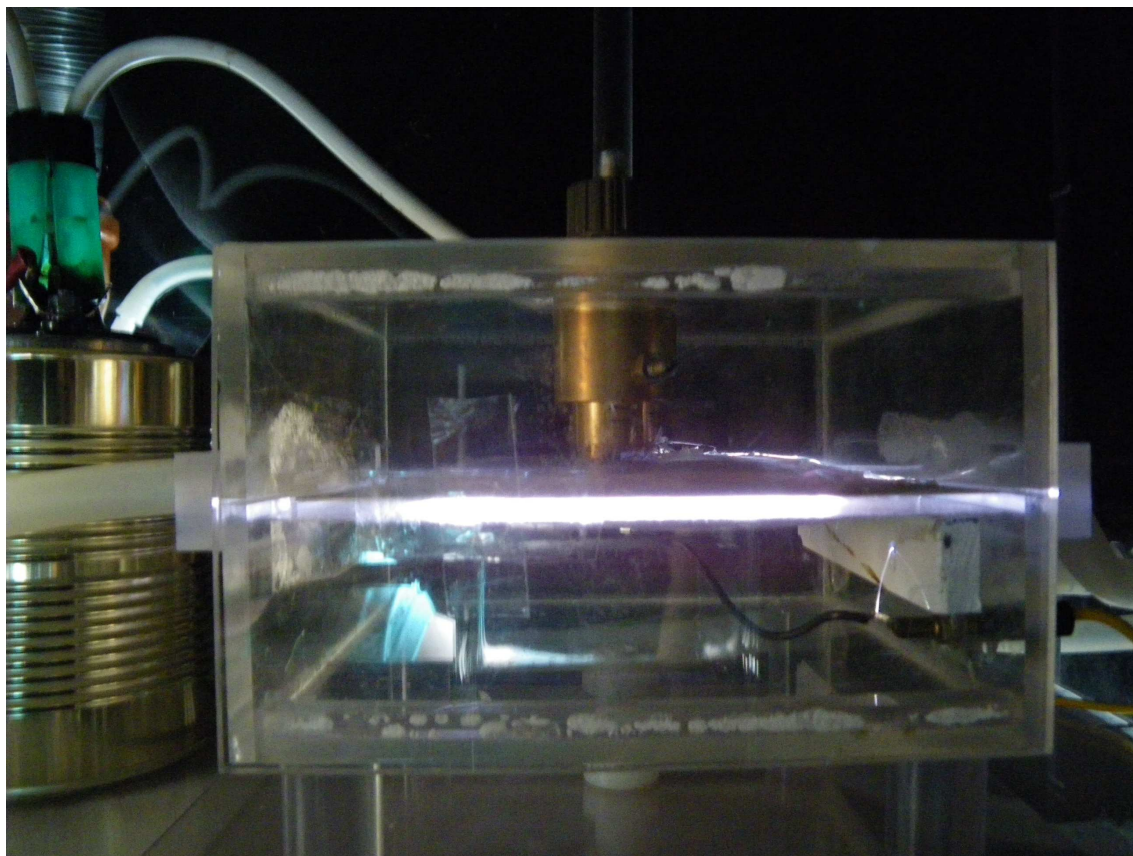
Experimentální aparatura je založena na principu objemového dielektrického bariérového výboje. Plazmové zařízení (obrázek č. 11) se skládá z regulovatelného zdroje stejnosměrného (DC) napětí, vysokofrekvenčního zdroje, vysokonapěťového (HF) autotransformátoru a samotného DBD reaktoru. Výboj je generován mezi dvěma kovovými elektrodami pokrytými dielektrickou bariérovou vrstvou. Napětí mezi elektrodami lze při daném uspořádání měnit v rozsahu 3-10 kV, s frekvencí do 10 kHz. Vnější rozměry DBD reaktoru jsou 120×118×120 mm. Objem výboje je pak dán plochou elektrod 90x70 mm a jejich vzdáleností. Vzdálenost elektrod lze pomocí šroubu měnit. Při experimentu byla použita vzdálenost 3 mm pro argon i pro dusík. Jako materiál dielektrika je použita slída, tloušťka vrstvy je 0,5 mm. Na obrázku č. 12 je zobrazeno schéma elektrického obvodu a reaktoru.



Obrázek 11: Plazmové zařízení: 1/ regulovatelný zdroj stejnosměrného napětí; 2/ vysoko-frekvenční zdroj; 3/ vysokonapěťový (HF) transformátor a 4/ DBD reaktor



Obrázek 12: A/ Schéma el. obvodu; B/ Schéma DBD reaktoru



Obrázek 13: Plazmový DBD reaktor s objemovým výbojem

3.4 Popis experimentu

3.4.1 Příprava suspenze

Na živné médium MPA2 (Himedia M 1269) byl naočkován *Bacillus subtilis*. Do živného média byl přidán síran manganatý v množství 1 g/10 ml, který podporuje sporulaci. *Bacillus* byl kultivován 10 dní při teplotě 30 °C. Poté byla připravena očkovací suspenze. Do zkumavky se šikmým agarem, na němž byla bakterie kultivována, byla nalita sterilní destilovaná voda a mikroorganismus byl do vody uvolněn očkovací kličkou. Očkovací suspenze byla nalita do centrifugačních uzavíratelných sterilních mikrozskumavek o objemu 2 ml. Suspenze byla dvakrát centrifugována (10000 ot/min, 20 °C, 10 minut) a promyta 2 ml sterilní destilované vody. Po dvou promytích byla odstředěná kapalina čirá a na dně zkumavky byly usazeny spory a vitální buňky bakterie *B. subtilis*.

3.4.2 Příprava vzorku

Do sterilních Petriho misek byly vloženy sterilní disky papíru o průměru 3 cm (papír Whatman 1) případně PET fólie. Na vzorky papíru bylo napipetováno 100 µl očkovací suspenze. Vzorky byly vysušeny při teplotě 25 °C po dobu 24 hodin.

3.4.3 Opracování vzorku

Výše uvedeným způsobem připravené vzorky byly vystaveny účinkům dielektrického bariérového výboje buzeného v argonu nebo dusíku. Vzorek byl umístěn do středu mezi elektrody, prostor reaktoru byl uzavřen po dobu 2 minut, aby byl dostatečně promyt pracovním plynem. Poté byl vzorek vystaven působení výboje. Aby byl eliminován vliv teploty, byly vzorky opracovávány po dobu 30 s a poté následovala 60 s pauza. V průběhu experimentu byl sledován vliv doby expozice, hustoty plazmového výkonu a typu použitého plynu na sterilizační účinek. Pro opracování byly použity časy 0, 5, 10, 30, 50, 60, 90 a 120 s a hustoty plazmového výkonu $1,27 \text{ W.cm}^{-3}$, $1,78 \text{ W.cm}^{-3}$ a $2,37 \text{ W.cm}^{-3}$.

3.4.4 Vyhodnocení

Po opracování byl vzorek vložen do reagenční lahve obsahující 10 ml sterilní vody a Tween 80. Vzorky byly přes noc umístěny na třepačku, kde došlo k vymytí spor ze vzorku. Suspenze spor byla naředěna a jednotlivé zředěné vzorky byly přelivem naočkovány na agar na Petriho misky. Petriho misky byly kultivovány v termostatu po dobu 3 dní při teplotě $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Poté byly spočteny vytvořené kolonie mikroorganismu.

3.4.5 Zpracování výsledků

Ze získaných hodnot počtu mikroorganismů byla spočtena koncentrace mikroorganismu ve výchozím vzorku. U získaných výsledků byl hodnocen vliv použitého plynu na účinnost sterilizace, vliv použitého výkonu na účinnost a byla porovnána účinnost sterilizace na papíře a na PET folii.

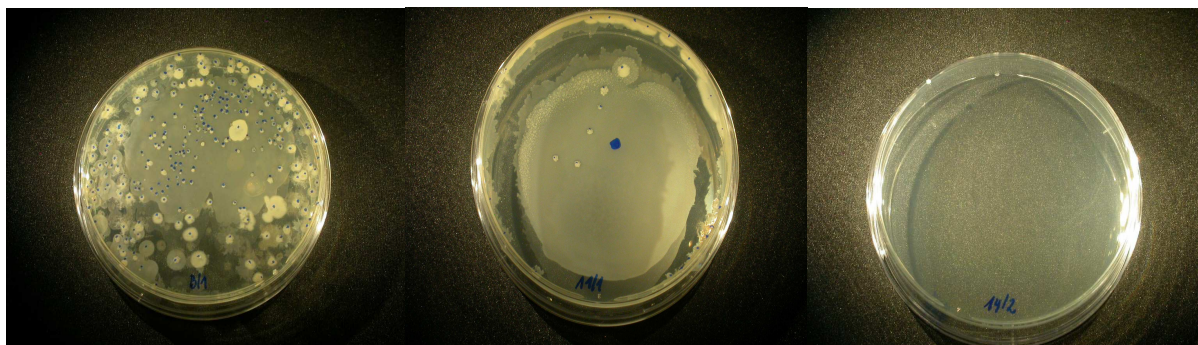
Původní počet bakterií *B. subtilis* byl $5,07 \cdot 10^7$ CFU/ml.

Dielektrický bariérový výboj byl diagnostikován pomocí optické emisní spektroskopie.

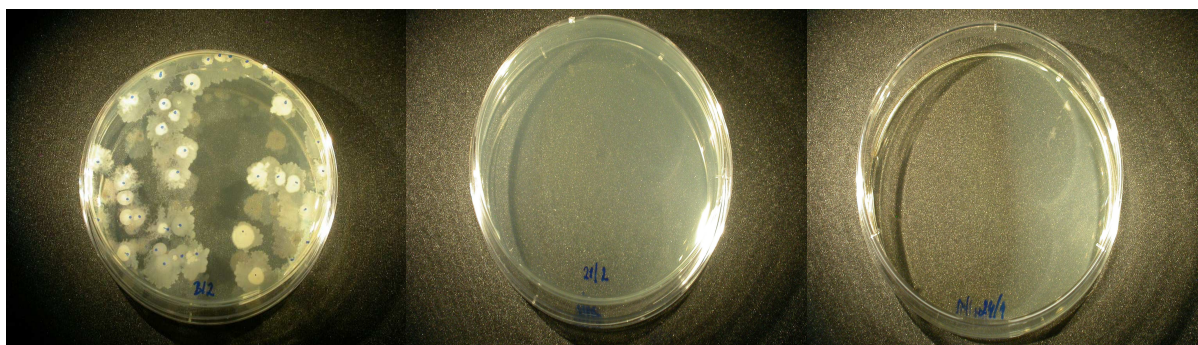
Následující obrázky znázorňují vliv použitého hustoty plazmového výkonu a času působení na efektivitu sterilizace:



Obrázek 14: Počet kolonií *B. subtilis* při vystavení plazmatu o hustotě $1,27 \text{ W.cm}^{-3}$ v argonu, délka opracování 0, 10 a 90 s



Obrázek 15: Počet kolonií *B. subtilis* při vystavení plazmatu o hustotě $1,78 \text{ W.cm}^{-3}$ v argonu, délka opracování 0, 10 a 90 s



Obrázek 16: Počet kolonií *B. subtilis* při vystavení plazmatu o hustotě $2,37 \text{ W.cm}^{-3}$ v argonu, délka opracování 0, 10 a 90 s

Na výše uvedených fotografiích je patrný rozdíl vzorku nevystaveného působení plazmatu, vzorku po určité době působení a vzorku, u něhož bylo dosaženo sterility. Vliv doby působení a hustoty výkonu bude diskutován dále.

3.4.6 Optická emisní spektroskopie plazmatu

Při měření spekter byl využit přístroj Jobin-Yvon TRIAX 550 s mřížkou 1200 a 3600 vrypů/mm, vybavený CCD detektorem chlazeným dusíkem. Měření spekter bylo provedeno v dusíku a argonu v rozsahu 200-400 nm (UV oblast). Pro tento účel byla využita mřížka 3600 vrypů/mm. Na mřížce 1200 vrypů byla měřena přehledová spektra pro oba pracovní plyny v rozmezí vlnových délek od 200 do 800 nm.

Spektrum dusíku bylo měřeno přímo, to znamená, že křemenné optické vlákno bylo prostrčeno skrz plexisklový kryt. Takto bohužel nebylo možné měřit spektra argonu, ta byla měřena přes křemenné okénko a mezi okénkem a vláknem byla prostrčena trubička cca 20 cm dlouhá.

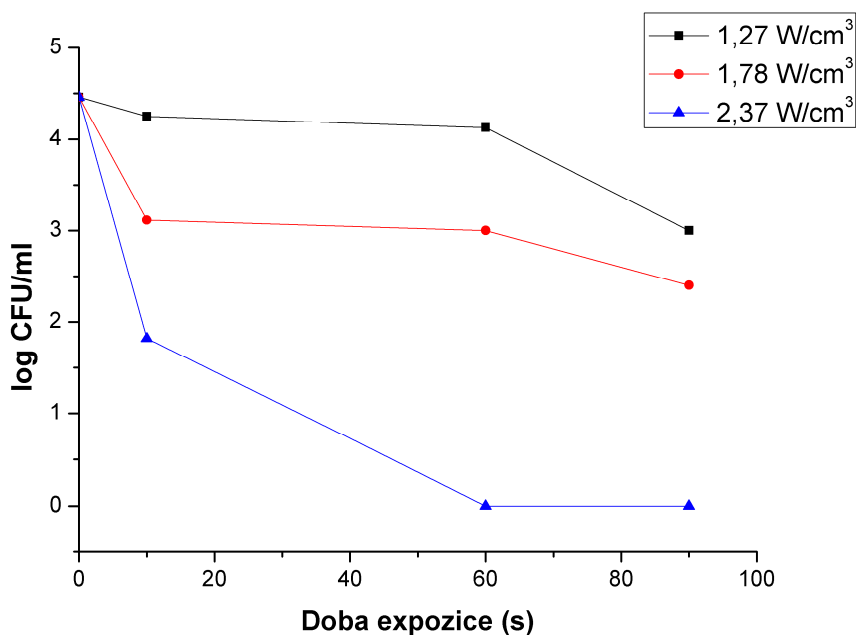
Zpracování spekter provedl Mgr. Jan Čech za použití programu Spectrum Analyzer 1.6. Tento program také umožnil výpočet rotačních a vibračních teplot pro oba pracovní plyny.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem bakalářské práce bylo studium sterilizačního účinku dielektrického bariérového výboje na prokaryotní mikroorganismy. Efektivita sterilizace byla posuzována podle vlivu délky expozice, hustoty plazmového výkonu a použitého plynu. Získané výsledky byly shrnuty do následujících grafů.

4.1 Vliv doby expozice a hustoty plazmového výkonu

Obrázek 17 je grafickým znázorněním vlivu použité hustoty výkonu na efektivitu sterilizace. Graf byl zpracován pro sterilizaci s použitím argonu. Z výše uvedené závislosti je patrné, že hustota výkonu ovlivňuje efektivitu sterilizace. Při hustotě $1,27 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-3}$ je inaktivace mikroorganismů pozvolná. V průběhu prvních 60 s vykazuje křivka téměř konstantní průběh. Během 90 s působení bylo dosaženo redukce o jeden řád. Byla-li sterilizace prováděna při $1,78 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-3}$, bylo dosaženo úbytku o jeden řád, ale již po čase 60 s a počet přeživších mikroorganismů v jednotlivých časech se snižoval rychleji, což lze vyčíst z průběhu křivky. Nejrychlejšího úbytku mikroorganismů bylo dosaženo během prvních 10 s působení. Z hlediska efektivity je nejvhodnější hustota výboje $2,37 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-3}$, při níž byly všechny mikroorganismy usmrceny za 60 s. Za 10 s byl počet mikroorganismů redukován o tři řády, což se na křivce projevuje prudkým poklesem. Podobný tvar křivky naměřil ve své studii Heise [21].



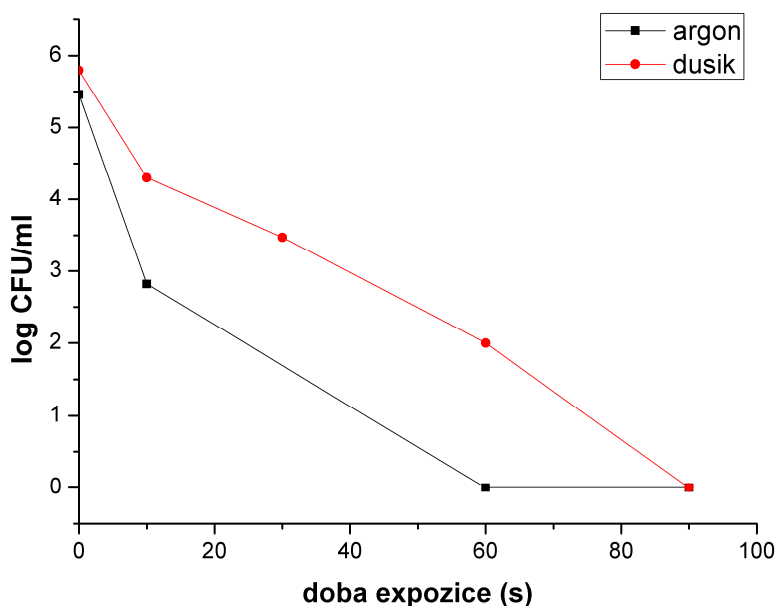
Obrázek 17: Grafické znázornění vlivu hustoty výkonu na účinnost sterilizace

4.2 Vliv pracovního plynu

Obrázek 18 srovnává účinnost sterilizace s ohledem na použitý plyn. Z grafu je patrné, že na účinnost sterilizace má použitý plyn vliv. V obou případech byla použita stejná hustota výkonu $2,37 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-3}$. Při sterilizaci v argonu bylo úplné inaktivace všech mikroorganismů dosaženo po 60 s, pro dusík je tento čas o třetinu delší, mikroorganismy byly inaktivovány až po vystavení účinkům plazmatu po dobu 90 s. V případě argonu došlo k největšímu úbytku počtu mikroorganismů během prvních 10 s, a to o tři řády. Pro dusík vykazuje křivka téměř lineární průběh.

Vysvětlení větší účinnosti argonu lze najít ve spektrech. Ve spektru dusíku je v oblasti 200-300 nm oblast NO a v oblasti 306-310 nm byl identifikován OH systém. V případě argonu není kvůli útlumu intenzity NO znatelné, ale i přes tento útlum jsou znatelné velmi intenzivní OH pásy. Přesto, že nebylo v argonu prokázáno NO, může být efektivita argonu výrazně vyšší než u dusíku vzhledem k vysoké intenzitě OH. Jak již bylo popsáno v teorii, tato reaktivní částice se může výrazným způsobem podílet na oxidaci a leptání buněčných částí.

Vyšší efektivitu argonu popsal ve své práci také Heise [21]. Vysvětloval ji přítomností ArO^* ve spektru při vlnové délce 308 nm, nicméně toto nebylo v našem spektru zaznamenáno.



Obrázek 18: Srovnání účinnosti sterilizace v dusíku a argonu při použití stejné hustoty výboje $2,37 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-3}$

4.3 Vliv nosného média

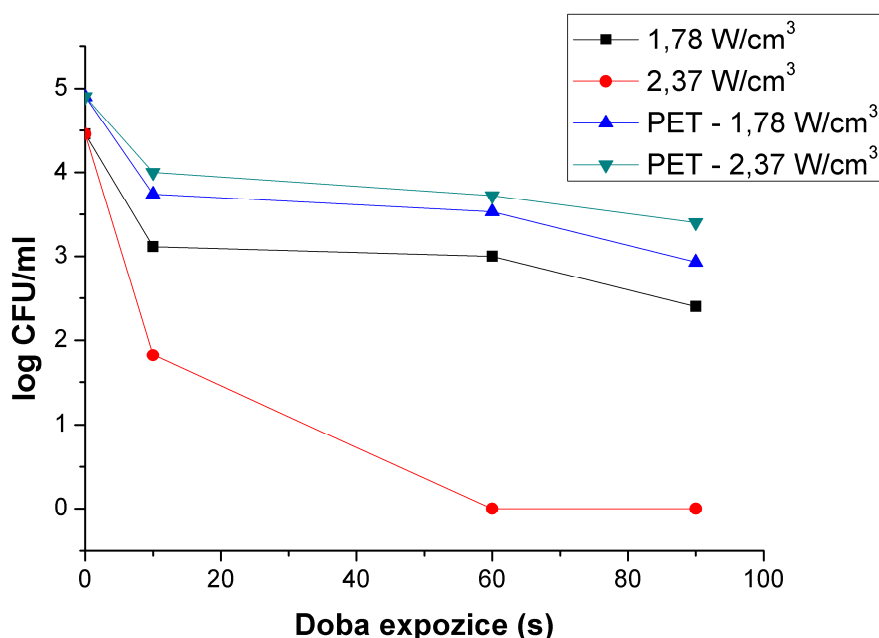
V této části byl studován vliv nosného média na efektivitu sterilizace v DBD. Pro tyto účely byly použity dvě nosné média – papír a PET fólie. Na média byla nanášena suspenze mikroorganismů, jejíž koncentrace byla cca. $5,07\cdot 10^7 \text{ CFU/ml}$. Vzorky byly poté sušeny při

30 °C po dobu 24 hodin. Z referenčních (neopracovaných) vzorků byly mikroorganismy uvolněny do roztoku vody s Tweenem. Z papíru bylo uvolněno $1,6 \cdot 10^4$ CFU/ml a z PET fólie $2,9 \cdot 10^4$ CFU/ml. Z folie se tedy uvolnilo téměř dvakrát větší množství mikroorganismů než z papíru. I přesto je rozdíl mezi původní koncentrací a uvolněným množstvím tři řády. Tento rozdíl může být způsoben postupem přípravy vzorků, hlavně pak jejich vysoušením. Rozdíl mezi koncentrací suspenze mikroorganismů získané z PET fólie a papíru je pravděpodobně způsoben pórovitostí papíru. Bakterie mohou být při nanášení na papír zachyceny uvnitř v pórech papíru, a při uvolňování mikroorganismů ze papíru do vody, má výsledná suspenze nižší koncentraci. PET folie na rozdíl od filtračního papíru žádné póry neobsahuje, spory bakterií nemají být kde zadržovány a tudíž dojde k jejich vyplavení.

Výsledky sterilizace *Bacilla subtilis* naneseného na papír a PET fólii, lze porovnat na obrázku 20. Pro experimenty byla použita hustota výkonu $2,37 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-3}$ a argon jako nosný plyn. Z grafu je patrné, že při stejných podmínkách je u papíru dosažena sterilita t.j. snížení množství mikroorganismů o cca 4 řády po 60 s, zatímco v případě PET fólie byla po 90 s dosažena redukce pouze o 1 řád. Ačkoliv se papír navenek jeví jako sterilní, lze předpokládat, že v pórech mohou být ještě stále přítomny vitální buňky.

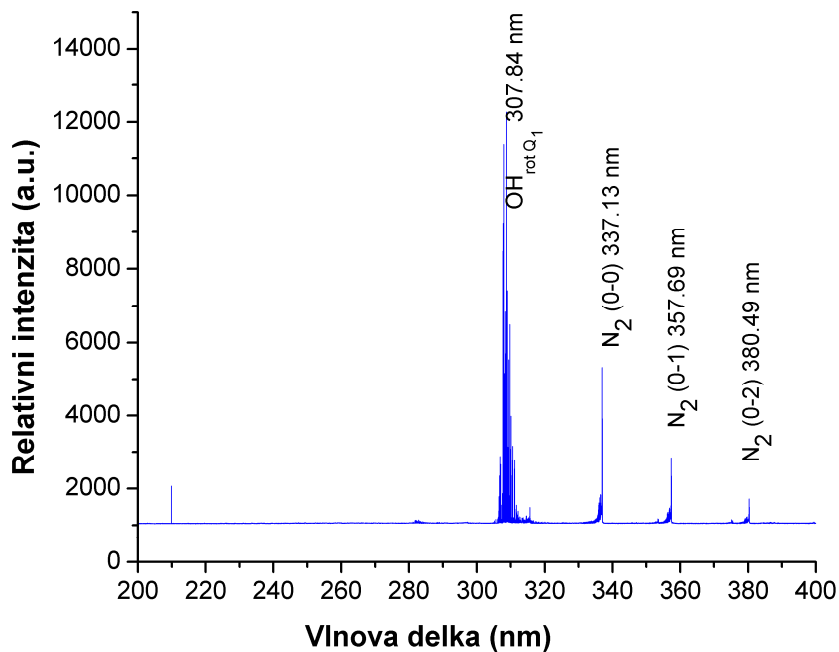
Pórovitost papíru může mít také vliv na celkový průběh plazmové sterilizace. Již dříve byl autory popsán tzv. efekt stínění [21, 28, 36]. Kdy mikroorganismy zachyceny v pórech materiálu, případně mikroorganismy neuspořádaně umístěné na povrchu, tak že se navzájem překrývají, jsou chráněny před účinky plazmatu, které proniká pouze do malé hloubky.

V neposlední řadě mohla být účinnost sterilizace ovlivněna také tím, že při nanášení vzorků na PET fólii nebylo vlivem vlastností materiálu dosaženo rovnoměrného rozmístění suspenze na povrchu folie.



Obrázek 19: Grafické znázornění vlivu nosného média na sterilizaci

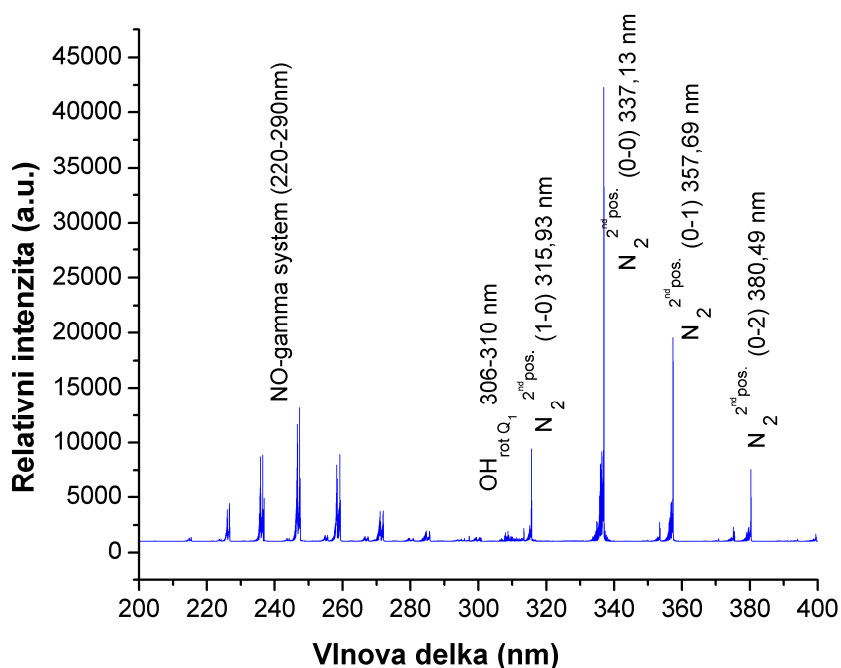
4.4 Diagnostika plazmatu



Obrázek 20: Emisní spektrum výboje buzeného v argonu

Ze spektra na obrázku 20 byl identifikován OH systém (307 nm) a druhý pozitivní systém dusíku (337, 357, 380 nm), dále pak náznak CN systému (385-389 nm). Přehledové spektrum navíc ukázalo argonové čáry v oblasti nad 690 nm a čáry atomárního kyslíku (777 nm).

Vlivem měření přes trubičku došlo k značnému útlumu intenzit a to zejména v části spektra pod 300 nm. Patrně z toho důvodu nebyl detekován NO systém, ačkoli mohl být přítomen.



Obrázek 21: Emisní spektrum výboje buzeného v dusíku

Na spektru na obrázku 21 byl identifikován OH systém (306-310 nm) a druhý pozitivní systém dusíku. Vzhledem k obsahu kyslíkových nečistot, spektrum v oblasti 220-290 nm ukazuje emisi $\text{NO}\gamma$ molekulového pásu, tedy prokazuje přítomnost UV záření a jeho možný podíl na inaktivačním procesu. Spektrum v oblasti nad 400 nm bylo již tvořeno pouze artefakty druhého spektrálního řádu.

Program použitý pro analýzu spekter umožnil výpočet rotačních a vibračních teplot pro aby pracovní plyny. Získané teploty jsou shrnuty v tabulce 2.

Uvedená rotační teplota aproximuje těžké částice, obsažené ve výboji. Rotační teplota přibližně odpovídá teplotě neutrálního plynu. Z naměřených hodnot je patrné, že v případě argonu jako pracovního plynu lze vliv teploty na inaktivaci mikroorganismů vyloučit. Zatímco v dusíku může teplota přispět k inaktivaci mikroorganismů. Vibrační teplota poskytuje informaci o úrovni excitace plazmatu. V neizotermickém plazmatu bývá zpravidla vyšší než teplota rotační. Z výsledků je tedy patrné, že použité plazma je neizotermické.

Tabulka 2: Rotační a vibrační teploty pro jednotlivé plyny

Plyn	T_{rot} [K]	T_{vibr} [K]
Dusík – 2,37 W/cm ³	570 ± 110	1580 ± 150
Argon – 2,37 mW/cm ³	290 ± 10	1650 ± 500

5 ZÁVĚR

Cílem předložené bakalářské práce bylo studium sterilizačního účinku dielektrického bariérového výboje na prokaryotní mikroorganismy. Pozornost byla zaměřena na vliv délky expozice, vliv hustoty plazmového výboje a použitého plynu na efektivitu sterilizace.

Teoretická část je věnována popisu prokaryotních mikroorganismů a vlivu vnějšího prostředí na mikroorganismy. Dále jsou zde rozebrány standardní sterilizační postupy, jejich výhody a nevýhody a plazmová sterilizace.

Experimentální část je věnována popisu mikroorganismu použitého při experimentech a principu dielektrického bariérového výboje. Výsledky experimentů lze hodnotit z několika hledisek. Při experimentech byl eliminován vliv teploty tím, že při působení výboje déle než 30 s následovala pauza.

Při srovnávání efektivitu sterilizace s ohledem na použitou hustotu plazmového výkonu dospějeme k závěru, že čím vyšší hustota byla použita, tím byla sterilizace efektivnější. Při hustotě plazmového výkonu $1,27 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-3}$ klesal počet přeživších spor jen velmi pozvolna a během 90 s vystavení účinkům výboje došlo k redukci počtu mikroorganismů pouze o jeden řád. U hustoty $1,78 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-3}$ má inaktivace rychlejší průběh, počet přeživších spor klesá výrazněji než u nižšího výkonu, což dokazuje i strmější průběh křivky, převážně během prvních 10 s. Redukce počtu mikroorganismů o jeden řád bylo dosaženo již za 60 s. Dle experimentálních výsledků se jako nejvhodnější hustota pro plazmovou sterilizaci jeví $2,37 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-3}$. K usmrcení všech mikroorganismů bylo nutné 60 s působení výboje. Za 10 s byl počet mikroorganismů snížen o tři řády, na průběhu křivky se tato skutečnost projeví prudkým poklesem. Celkově je průběh křivky pro tuto hustotu mnohem strmější než tomu bylo u předešlých dvou hustot.

Porovnáme-li vliv použitého plynu na efektivitu sterilizace, z experimentálních dat je zřejmé, že účinnějším plynem je argon, u něhož nastala inaktivace mikroorganismů za mnohem kratší dobu než tomu bylo v případě dusíku při použití stejného výkonu. Vysvětlení větší účinnosti argonu lze najít ve spektrech. Ve spektru dusíku je v oblasti 200-300 nm oblast NO a v oblasti 306-310 nm byl identifikován OH systém. V případě argonu není kvůli útlumu intenzity NO znatelné, ale i přes tento útlum jsou znatelné velmi intenzivní OH. Přesto, že nebylo v argonu prokázáno NO, může být efektivita argonu výrazně vyšší než u dusíku vzhledem k vysoké intenzitě OH. Jak již bylo popsáno v teorii, tato reaktivní částice se může výrazným způsobem podílet na oxidaci a leptání buněčných částí.

Další skutečnost, která ovlivňuje účinnost sterilizace je použité médium, na něž byl mikroorganismus nanášen. Srovnáme-li výsledky při použití papíru a PET folie za stejných podmínek, dospějeme k závěru, že při stejné počáteční koncentraci mikroorganismu bylo dosaženo různých výsledků. Větší účinnost byla dosažena za použití filtračního papíru jako media. To může být dané skutečností, že papír obsahuje póry, v nichž mohou být spory bakterií zadržovány. PET folie na rozdíl od filtračního papíru žádné póry neobsahuje, spory bakterií nemají být kde zadržovány a tudíž dojde k jejich vyplavení. Koncentrace spor v suspenzi, která byla nanášena jak na papír, tak na PET folii byla $5,07\cdot 10^7$ CFU/ml. Z neopracovaných vzorků se uvolnilo $1,6\cdot 10^4$ CFU/ml v případě papíru a $2,9\cdot 10^4$ CFU/ml u PET folie. Z folie se tedy uvolnilo téměř dvakrát větší množství mikroorganismů než s papíru. I přesto je rozdíl mezi původní koncentrací a uvolněným množstvím tři řády. Rozdíl může být dán také použitou metodou, konkrétně vysoušením vzorků. V neposlední řadě

mohla být účinnost sterilizace ovlivněna také tím, že při nanášení vzorků na PET folii nebylo vlivem vlastností materiálu dosaženo rovnoměrného rozmístění suspenze na povrchu folie.

Z výsledků výše uvedených experimentů je patrné, že plazma je při vhodně zvolených podmínkách efektivní metoda sterilizace. Mezi bezesporu největší přednosti plazmové sterilizace patří absence toxických prvků, bezpečná obsluha a krátké časy nutné ke sterilizaci. Sterilizace plazmatem se rovněž jeví perspektivní pro sterilizaci materiálů citlivých na teplo, uplatnění lze hledat i ve zdravotnictví. Vzhledem k tomu, že nízkoteplotní plazma proniká pouze do hloubky několika atomů, nehrozí při jeho použití poškození materiálu, jako je tomu např. při sterilizaci gama zářením.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. Jelínek, J., Zicháček, V.: *Biologie pro gymnázia*. 5. vyd. Olomouc : Nakladatelství Olomouc, 2002. 574 s. ISBN 80-7182-089-X.
2. Rosypal, S., Hodák, K., Nermut, M.: *Biologie bakterií*. 1. vyd. Praha : Státní pedagogické nakladatelství, 1966. 239 s, il.
3. Šilhánková, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2. vyd. Praha : Victoria Publishing, a.s., 1995. 361 s. ISBN 80-85605-71-6.
4. Votava, M.: *Lékařská mikrobiologie obecná*. 1. vyd. Brno: Neptun, 2001. 247 s. ISBN 80-902896-2-2
5. Chalupová, L.: *Nové způsoby sterilizace zdravotnického materiálu s přihlédnutím na plazmovou sterilizaci*. Brno, 2007, 46 s. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Jan Janča, DrSc.
6. Smékal, P.: *Studium sterilizace pomocí plazmatu*. Brno, 2008, 111 s. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity na Ústavu fyzikální elektroniky. Vedoucí diplomové práce Mgr. Pavel Slavíček, Ph.D.
7. Hubáček, Z.: Praktické uplatnění a kontrola účinnosti sterilizace etylenoxidem. *Nové Vademecum sterilizace*, 2005, Č. 3, s. 6–9.
8. Moisan, M., Barbeau, J., Moreau, S., Pelletier, J., Tabrizian, M., Yahia, L. H.: Low Temperature sterilization using gas plasma: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, vol. 226, 1-21. ISSN 0378-5173.
9. Boudam, M. K., Moisan, M., Saoudi, B., Popovici, C., Gherardi, N., Massines, F.: Bacterial spore inactivation by atmospheric-pressure plasmas in the presence or absence of UV photons as obtained with the same gas mixture. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2006, vol. 39, 3494-3507. ISSN 0022-3727
10. Moisan, M., Barbeau, J., Crevier, M.C., Pelletier, J., Philip, N., Saoudi, B.: Plasma sterilization. Methods and mechanisms. *Pure and Applied Chemistry*, 2002, vol. 74, 349-358. ISSN 0033-4545
11. Kogelschatz, U.: Dielectric-barrier Discharges: Their History, Discharge Physics, and Industrial Applications. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 2003, vol. 13, no. 1, 1-46. ISSN 0272-4324.
12. Kloc, P.: *Modelování bariérových výbojů za atmosférického tlaku*. Brno, 2008, 51 s. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity na Ústavu fyzikální elektroniky. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. David Trunec, CSc.
13. Procházka, V.: *Studium a příprava vodních filtrů na bázi chitosanu pro odstraňování těžkých kovů*. Brno, 2008, 38 s. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity na Ústavu fyzikální elektroniky. Vedoucí diplomové práce RNDr. Jozef Ráhel, Ph.D.
14. BioLib [online]. 2009 [cit. 2009-03-15]. Dostupný z [www: <http://www.biolib.cz/cz/taxonposition/id127721/>](http://www.biolib.cz/cz/taxonposition/id127721/).

15. MiniAtlas mikroorganismů [online]. 2009 [cit. 2009-03-15]. Dostupný z [www: <http://www.sci.muni.cz/mikrob/MiniAtlas/bac-sub.htm>](http://www.sci.muni.cz/mikrob/MiniAtlas/bac-sub.htm).
16. Vis [online]. 2009 [cit. 2009-03-15]. Dostupný z [www: <http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=92213>](http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=92213).
17. Bacillus subtilis [online]. 2009 [cit. 2009-03-15]. Dostupný z [www: <http://www.thelabrat.com/restriction/sources/Bacillussubtilis.shtml>](http://www.thelabrat.com/restriction/sources/Bacillussubtilis.shtml).
18. Raballand, V., Benedikt, J., Wunderlich, J., von Keudel, A.: *Inactivation of Bacillus atrophaeus and of Aspergillus niger usin beams of argon ions, of oxygen molecules and of oxygen atoms* [online]. [cit. 2009-03-15]. Dostupné na [www: http://www.iop.org/EJ/abstract/0022-3727/41/11/115207/](http://www.iop.org/EJ/abstract/0022-3727/41/11/115207/)
19. Leipold, F.: Inactivation of microorganisms by means of low temperature atmospheric pressure plasma. In *28th ICPIG*, Praha, 15. – 20. července 2007 [online]. 2007 [cit 2009-03-15].
20. Kutasi, K.: *Plasma sterilization: the applicability of discharge and post-discharge plasmas for medical sterilization*. 17th Symposium on Application of Plasma Processes Visegrad Workshop on Research of Plasma Physics, Liptovský Ján, 2009.
21. Heise, M., Neff, W., Franken, O., Muranyi, P., Wunderlich, J.: Sterilization of Polymer Foils with Dielectric Barrier Discharges at Atmospheric Pressure. *Plasmas and Polymers*, 2004, vol. 9, no. 1, 23-33. ISSN 1084-0184.
22. Kelly-Wintenberg, K., Montie, T.C., Brickman, C., Roth, J.R., Carr, A.K., Sorge, K. et al.: Room temperature sterilization of surfaces and fabrics with a one atmosphere uniform glow discharge plasma. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1998, vol. 20, 69-74. ISSN 1367-5435.
23. Montie, T.C., Kelly-Wintenberg, K., Roth, J.R.: An overview of research using the one atmospheric pressure uniform glow discharge plasma (OAPUGDP) for sterilization of surfaces and materials. *IEEE transactions on plasma science*, 2000, vol. 28, no. 1, 41-50. ISSN 0093-3813.
24. Laroussi, M., Mendis, D.A., Rosenberg, M.: Plasma interaction with microbes. *New Journal of Physics*, 2003, vol. 5, 41.1-41.10. ISSN 1367-2630.
25. Lee, K. Y., Park, B. J. , Lee, D. H., Lee I. S., Hyun, S. O. , Chung, K. H., Parkt, J. C.: Sterilization of Escherichia coli and MRSA using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure. *Surface & Coatings Technology*, 2005, vol. 193, 35–38. ISSN 0257-8972.
26. Laroussi, M., Leipold, F.: Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2004, vol. 233, 81-86. ISSN 1387-3806.
27. Becker, K., Koutsospyros, A., S-M Yin, Christodoulatos, C., Abramzon, N., Joaquin, J.C., Brelles-Marino, G.: Environmental and biological applications of microplasmas. *Plasma Physics and Controlled Fusion*, 2005, vol. 47, 513-523. ISSN 0741-3335.
28. Muranyi, P., Wunderlich, J., Heise, M.: Sterilization efficiency of a cascade barrier discharge. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, vol. 103, 1535-1544. ISSN 1364-5072.

29. Brandenburg, R., Ehlbeck, J., Stieber, M., Woedtke, T. V., Zeymer, J., Schlüter, O., Weltmann, K. D.: Antimicrobial Treatment of Heat Sensitive Materials by Means of Atmospheric Pressure Rf-Driven Plasma Jet. *Contribution to Plasma Physics*, 2007, vol. 47, no. 1-2, 72-79. ISSN 0863-1042.
30. Ehlbeck, J., Brandenburg, R., Woedtke, T., Krohman, U., Weltman K. D.: PLASMOSE-antimicrobial effects of modular atmospheric plasma sources. *GMS Krankenhausehygiene Interdisziplinär*, 2008, vol. 3(1), 1-12. ISSN 1863-5245.
31. Leipold, F.: Inactivation of microorganisms by means of low temperature atmospheric pressure plasma. In *28th ICPIG*, Praha, 15. – 20. července 2007 [online]. 2007 [cit. 2009-03-15].
32. Campbell, Neil A. *Biologie* / vyd. 1. Brno : Computer Press, 2006. 1332 s. : il. ISBN 80-251-1178-4.
33. Kracík, J., Tobiáš, J.: *Fyzika plazmatu*. 1. vyd. Praha: Academia, 1966. 260 s.
34. Stach, V.: *Plazma - čtvrté skupenství hmoty*. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1988. 96 s. (Maják)
35. *Techniques and applications of plasma chemistry*. edited by John R. Hollahan, Alexis T. Bell. New York, 1974. viii, 403 s. (A Wiley-Interscience publication) ISBN 0471406287.
36. Laroussi, M.: Low Temperature Plasma-Based Sterilization: Overview and State of the Art. *Plasma Process and Polymers*, 2005, vol. 2, 391-400
37. Weltman, K. D.: *Atmospheric Pressure Plasmas for Biomedical*. 2nd Central European Symposium on Plasma Chemistry, Brno, 2008.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

a_w , a_{H_2O} – vodní aktivita

CDBD – kaskádový dielektrický bariérový výboj

CPE – capillaries plasma electrode discharge

CFU – colony forming units – kolonie tvořící jednotku

DBD – dielektrický bariérový výboj

DC – stejnosměrné napětí

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EtO - ethylenoxid

HF – vysokonapěťový

IR – infračervené

MPA – masopeptonový agar

OAUGDP – one atmosphere uniform glow discharge plasma

PE – polyethylen

PET – polyethylenterftalát

RDB – odborový bariérový výboj

RF – radiofrekvenční

UV – ultrafialové

VIS – viditelné

VOC – těkavé organické sloučeniny

VUV – vacuum UV