



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

STUDIUM STERILIZAČNÍCH ÚČINKŮ DIELEKTRICKÉHO BARIÉROVÉHO VÝBOJE

STUDY OF STERILIZATION EFFECTS INITIATED BY DIELECTRIC BARRIER DISCHARGE

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. JITKA SLÁMOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. FRANTIŠEK KRČMA, Ph.D.

BRNO 2013



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání dizertační práce

Číslo dizertační práce:	FCH-DIZ0068/2012	Akademický rok: 2012/2013
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Ing. Jitka Slámová	
Studijní program:	Fyzikální chemie (P1404)	
Studijní obor:	Fyzikální chemie (1404V001)	
Vedoucí práce	doc. RNDr. František Krčma, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název dizertační práce:

Studium sterilizačních účinků dielektrického bariérového výboje

Zadání dizertační práce:

Cílem dizertační práce je komparativní studium plazmové sterilizace v dielektrickém bariérovém výboji za atmosférického tlaku. Ke inaktivaci vybraných mikroorganismů bude využito různých procesních plynů i různé hustoty aplikovaného výkonu. Získané výsledky budou konfrontovány s poznatky ze soudobé literatury.

Termín odevzdání dizertační práce: 31.1.2013

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

Ing. Jitka Slámová
Student(ka)

doc. RNDr. František Krčma, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 4.12.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Předmětem dizertační práce bylo studium sterilizačních účinků dielektrického bariérového výboje pracujícího za atmosférického tlaku. Jako modelové mikroorganismy byly při studiu použity plíseň *Aspergillus niger*, grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis* a částečně také gramnegativní bakterie *Escherichia coli*. Vzorky mikroorganismů byly nanášeny na papír Whatman 1 nebo PET folii a vystaveny účinkům plazmatu. Plazma bylo generováno v prostředí argonu, dusíku, suchého a vlhkého vzduchu s frekvencí do 10 kHz a hustotou výkonu dle použitého plynu 1,2-2,9 W/cm³. Sterilizační účinky dielektrického bariérového výboje byly hodnoceny z hlediska vlivu procesního plynu, hustoty výkonu dodávaného do plazmatu, délky expoziční doby, typu mikroorganismu a materiálu nosiče. Část této studie byla zaměřena na zhodnocení příspěvku jednotlivých mechanismů (UV, teplota a reaktivní částice) k inaktivaci v jednotlivých procesních plynech a vlivu vlhkosti procesního plynu na průběh sterilizačního procesu. Plazma bylo diagnostikováno pomocí optické emisní spektroskopie, teplota byla monitorována termočlánkem. Mimoto bylo pomocí rastrovací elektronové mikroskopie zhodnoceno mechanické poškození buněčného materiálu a případný vliv plazmového opracování na nosný materiál.

Na základě dosažených výsledků lze říci, že s nárůstem expoziční doby klesal počet životaschopných mikroorganismů. Obdobně s nárůstem hustoty výkonu dodávaného do plazmatu docházelo k nárůstu rychlosti inaktivace. Při sterilizaci vzorků spor *A. niger* v plazmatu generovaném v jednotlivých procesních plynech klesaly sterilizační účinky plazmatu dle použitého plynu v pořadí argon, vlhký vzduch, dusík a suchý vzduch. Výsledky sterilizace dalších modelových mikroorganismů v prostředí argonu ukázaly, že citlivost vegetativních buněk resp. spor mikroorganismů vůči účinkům DBD klesala v pořadí: spory *A. niger*, vegetativní buňky *B. subtilis*, vegetativní buňky *E. coli* a spory *B. subtilis*. Současně porovnáním výsledků získaných při sterilizaci spor a vegetativních buněk *B. subtilis* a *A. niger* bylo zjištěno, že spory jsou výrazně odolnější vůči sterilizačním účinkům plazmatu.

Kombinací výsledků dosažených při studiu dílčích mechanismů, výsledků OES a průběhů inaktivačních křivek bylo zjištěno, že k inaktivaci významným způsobem přispívají ve všech procesních plynech reaktivní částice generované plazmatem. Dále k inaktivaci částečně přispívá UV záření, v omezené míře i teplota, přičemž význam UV záření klesal v pořadí dusík, argon, suchý vzduch a vlhký vzduch. Na základě výsledků oddělené studie bylo dále zjištěno, že příspěvek jednotlivých mechanismů, tj. UV záření, teploty a reaktivních částic se může lišit v závislosti na použitém modelovém mikroorganismu, což je dáno odlišnou citlivostí mikroorganismů vůči nepříznivým vnějším vlivům.

SEM analýza povrchu obou materiálů vystavených účinkům DBD v prostředí všech použitých plynů prokázala v případě PET folie výskyt důlkové koroze již při několika minutovém působení plazmatu, zatímco v případě papíru nebyly zaznamenány žádné viditelné změny.

KLÍČOVÁ SLOVA

Plazmová sterilizace, dielektrický bariérový výboj, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, dílčí mechanismy sterilizace, vlhkost procesního plynu

ABSTRACT

The overall goal of the presented dissertation thesis was to study the sterilization efficiency of dielectric barrier discharge operated at atmospheric pressure. The fungi *Aspergillus niger*, gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and in some experiments also gram-negative bacteria *Escherichia coli* were used as a bio-indicator enabling to evaluate the effect of plasma assisted microbial inactivation. The samples of microorganism were placed on paper Whatman 1 or PET foil and exposed to plasma. The plasma was generated in argon, nitrogen, synthetic dry/humid air with frequency up to 10 kHz and plasma power density in the range of 1,2-2,9 W/cm³ (according to the process gas). The influence of process gas, plasma power density, plasma exposition time, type of microorganism and material of the substrate on the sterilization effect of dielectric barrier discharge was evaluated. Furthermore the contribution of each single mechanism (UV radiation, temperature and reactive species) to the sterilization effect of plasma and influence of gas humidity was evaluated. The DBD was analysed by means of optical emission spectroscopy, thermocouple was used to measure temperature during a sterilization process. In order to verify the mechanical damage of the microbial cell or the substrates during the plasma process the samples were studied by scanning electron microscopy.

Generally, on the basis of experimental results, at increasing treatment times, the remaining number of spores (CFU) decreased. Similarly at increasing the plasma power input, the sterilization rate increased. When sterilising the spores of *A. niger* in plasma using different process gasses, the efficiency of plasma sterilization decreased as follows: argon, humid synthetic air, nitrogen and dry synthetic air. The results observed in argon plasma using different microorganism demonstrated that the sensitivity of vegetative cells resp. spores to DBD decreased as follows: *A. niger* spores, *B. subtilis* vegetative cells, *E. coli* vegetative cells and *B. subtilis* spores. Simultaneously results observed for sterilization of spores and vegetative cells of *B. subtilis* and *A. niger* demonstrated that the spores are generally more resistant to plasma than are the corresponding vegetative cells.

Combining the results of contribution of each single mechanism, optical emission spectroscopy and inactivation characteristic it was found out that the reactive species significantly contribute to the plasma sterilization in all process gasses. Furthermore the inactivation process can be partly assisted by UV radiation and also the temperature can contribute in limited extent to inactivation process in some gasses. The contribution of UV radiation to the plasma sterilization decreased as follows: nitrogen, argon, dry syntetic air and humid syntetic air. Moreover it was found out that the contribution of each single mechanism can be species dependent, this is due to the different response of microorganism to the unfavorable external conditions.

SEM analysis of the substrates proved the etching actions of the plasma generated in all process gasses on the surface of the PET foil. The several minute plasma exposition of the PET foil resulted in the occurrence of the „hole corrosion“ on the PET surface. Contrary to these there were no visible changes observed in the paper structure.

KEY WORDS

Plasma sterilization, dielectric barrier discharge, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, sterilization mechanism, humidity of the process gass.

SLÁMOVÁ, J. *Studium sterilizačních účinků dielektrického bariérového výboje*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013, 119 s. Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. František Krčma, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala především vedoucímu své dizertační práce doc. RNDr. Františku Krčmovi, Ph.D. za vybudování experimentálního zázemí i za cenné rady a čas věnovaný odborným konzultacím při zpracování této dizertační práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Haně Vojkovské, Ing. Zuzaně Bittnerové a Ing. Petře Kramárové, společně s nimiž jsem měřila některé zde prezentované výsledky a v jejichž závěrečných pracích se tyto výsledky vyskytují také. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za pochopení a podporu v průběhu mého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	11
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	13
2.1	Z hlediska typu mikroorganismů a jejich formy	13
2.1.1	Základní rozdíly v buněčné stavbě prokaryotních a eukaryotních mikroorganismů.....	13
2.1.2	Typy vzorků.....	16
2.1.3	Modelové mikroorganismy.....	17
2.2	Zdroje používané pro plazmovou sterilizaci	19
2.2.1	Koronový výboj	22
2.2.2	DBD výboje	23
2.2.3	Plazmové trysky, tužky.....	33
2.2.4	Mikrovlnný výboj	35
2.3	Metody vyhodnocení interakce plazmatu s buňkami	37
2.4	Kinetika inaktivace - inaktivační křivka	39
2.5	Mechanismus inaktivace	40
2.5.1	Teplota	41
2.5.2	UV záření.....	41
2.5.3	Nabité částice.....	42
2.5.4	Reaktivní částice.....	43
2.6	Aplikace.....	44
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	47
3.1	Experimentální aparatura a pracovní podmínky.....	47
3.2	Diagnostika výboje.....	49
3.2.1	Optická emisní spektroskopie.....	49
3.2.2	Teplota	49
3.3	Mikrobiologické postupy	50
3.3.1	Modelové mikroorganismy.....	50
3.3.2	Živné médium a fyziologický roztok.....	50
3.3.3	Příprava očkovací suspenze.....	50
3.3.4	Příprava vzorků.....	51
3.3.5	Sterilizace vzorků v DBD.....	53

3.3.6	Vyhodnocení.....	53
3.4	Studium jednotlivých inaktivačních mechanismů.....	54
3.4.1	Studium vlivu UV záření.....	54
3.4.2	Studium vlivu teploty	54
3.4.3	SEM.....	55
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	57
4.1	Diagnostika výboje.....	57
4.1.1	Optická emisní spektroskopie.....	57
4.1.2	Měření teploty termočlánkem.....	65
4.2	Plazmová sterilizace	66
4.2.1	Sterilizace v plazmatu buzeném v argonu a dusíku.....	67
4.2.2	Studium dílčích inaktivačních mechanismů uplatňujících se při sterilizaci v DBD	86
4.2.3	Sterilizace pomocí DBD generovaného na vzduchu, vliv vlhkosti	95
4.2.4	Vliv plazmového opracování na nosné médium.....	103
5	ZÁVĚR.....	105
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	108
7	CITOVANÁ LITERATURA	110
8	BIBLIOGRAFIE	118

1 ÚVOD

Sterilizace je proces, při kterém dochází k eliminaci všech forem života [1]. Obecně lze sterility materiálu dosáhnout chemickými (roztoky, páry) či fyzikálními postupy (teplota, radiace atd.), případně jejich kombinací [2]. Většina konvenčních sterilizačních metod je spojena s určitým stupněm poškození materiálu případně média nesoucí mikroorganismus. Tento fakt není nutno brát v potaz v případě, kdy zachování materiálu není podmínkou. Nicméně v případech, kdy je důležité, aby vlastnosti materiálů zůstaly nezměněny, je nutno hledat nové metody [3]. Dobrým příkladem může být potravinářský průmysl. Zde je tradiční sterilizační metodou sterilizace teplem. Vysoká teplota nicméně vyvolává nežádoucí vedlejší účinky s ohledem na senzory, nutriční a funkční vlastnosti potravin. Zvýšená poptávka po čerstvých potravinách připravených k okamžité spotřebě, a také využití teplotně citlivých polymerních materiálů k jejich balení, tedy zejména v posledních letech logicky vede k potřebě hledat nové alternativní sterilizační postupy [4]. Podobně je tomu také v oblasti medicíny nebo farmaceutického průmyslu, kde polymerní materiály, které není možné standardně autoklávat, nacházejí čím dál větší uplatnění (lékařské nástroje, katetry, implantáty, obaly léčiv, apod.).

Při navrhování nových sterilizačních metod je nutno vzít v potaz stávající sterilizační metody a jejich omezení. Dle prof. Moisan [5] by ideální nová sterilizační metoda měla splňovat následující podmínky: krátký procesní čas, nízké pracovní teploty, schopnost sterilizovat široké spektrum materiálů a bez škodlivého vlivu na operátora, pacienty a materiál. V publikaci nezmíněné, avšak implicitní jsou pak širokospektrální germicidní účinky nové metody.

Zajímavou alternativu představuje plazmová sterilizace. Plazma může být generováno za atmosférického tlaku a teploty blízké teplotě okolí, což tuto technologii předurčuje k ošetření teplotně citlivých materiálů nebo předmětů, které jsou navíc citlivé na vakuum, např. organické materiály, pěny, kapaliny nebo živé biologické tkáně [6].

První záznam o využití plazmatu pro inaktivaci mikroorganismů pochází již z r. 1857, kdy Siemens navrhl využít pro dezinfekci vody ozon generovaný pomocí koronového výboje [7]. Na to navázaly experimenty v 70-90 letech 20. století, které ukázaly, že plazma je schopno inaktivovat mikroorganismy s použitím všech běžných laboratorních plynů a v širokém rozpětí tlaků [5]. V posledních letech je výzkumu plazmové sterilizace věnována celosvětově značná pozornost, jak dokládá celá řada studií popisujících sterilizační účinky plazmatu. Výsledky těchto studií prokázaly germicidní účinky plazmatu na široké spektrum všech forem mikroorganismů včetně virů. Mimoto je plazma schopno účinně odstraňovat pyrogeny a toxiny z povrchu ošetřovaného materiálu. To má velký význam zejména ve zdravotnictví, kde se rezidua bílkovin, hlavně prionů stávají závažným problémem [8]. S ohledem na medicínu je také významná schopnost plazmatu účinně sterilizovat vysoce rezistentní kmeny mikroorganismů, jako jsou např. methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* nebo *Escherichia coli* O157:H7, u nichž díky zvýšené odolnosti léčba antibiotiky zpravidla selhává [9]. Plazmová sterilizace je navrhována s ohledem na využití jak pro sterilizaci neživých předmětů, tak také potravin či dokonce živých tkání, např. jako součást léčby chronických ran.

Nespornou výhodou této aplikace plazmatu jsou relativně krátké procesní časy v porovnání s konvenčními metodami, nízká teplota a nízká toxicita, neboť plyny nebo jejich směsi používané při plazmové sterilizaci nemají za normálních podmínek biocidní účinky. Ty jsou aktivovány až působením elektrického výboje a deaktivovány bezprostředně po vypnutí budícího zdroje. Je tedy patrné, že plazmové sterilizace nepředstavují z toxikologického hlediska žádný risk pro personál nebo exponovaný materiál [5; 10]. Díky tomu, že není potřebné zahřívat velký objem materiálu dlouhodobě na vysokou teplotu, je nespornou výhodou i nízká energetická náročnost.

Hlavními inaktivačními mechanismy působícími na buněčný materiál jsou UV záření, teplota a reaktivní částice generované plazmatem [3; 5; 11]. Každý ze zmíněných mechanismů má prokazatelné germicidní účinky, nicméně v plynné fázi plazmatu se vždy vyskytují v kombinaci. Synergický účinek jednotlivých mechanismů pak může významně ovlivnit výsledek inaktivačního procesu [11]. Rozsah, s jakým se jednotlivé mechanismy podílí na inaktivaci mikroorganismů, závisí na parametrech výboje (výkon, směs plynů, tlak plynu, atd.) [10].

Tato dizertační práce je zaměřena na studium sterilizačních účinků dielektrického bariérového výboje. Sterilizační účinky dielektrického bariérového výboje byly hodnoceny z hlediska vlivu procesního plynu, hustoty výkonu dodávaného do plazmatu, délky expoziční doby, typu mikroorganismu a materiálu nosiče. Část této studie byla zaměřena na zhodnocení příspěvku jednotlivých mechanismů (UV záření, teplota a reaktivní částice) k inaktivaci v jednotlivých procesních plynech a vlivu vlhkosti procesního plynu na průběh sterilizačního procesu. Plazma bylo diagnostikováno pomocí optické emisní spektroskopie, teplota byla monitorována termočlánkem. Mimoto bylo pomocí rastrovací elektronové mikroskopie zhodnoceno mechanické poškození buněčného materiálu a případný vliv plazmového opracování na nosný materiál.

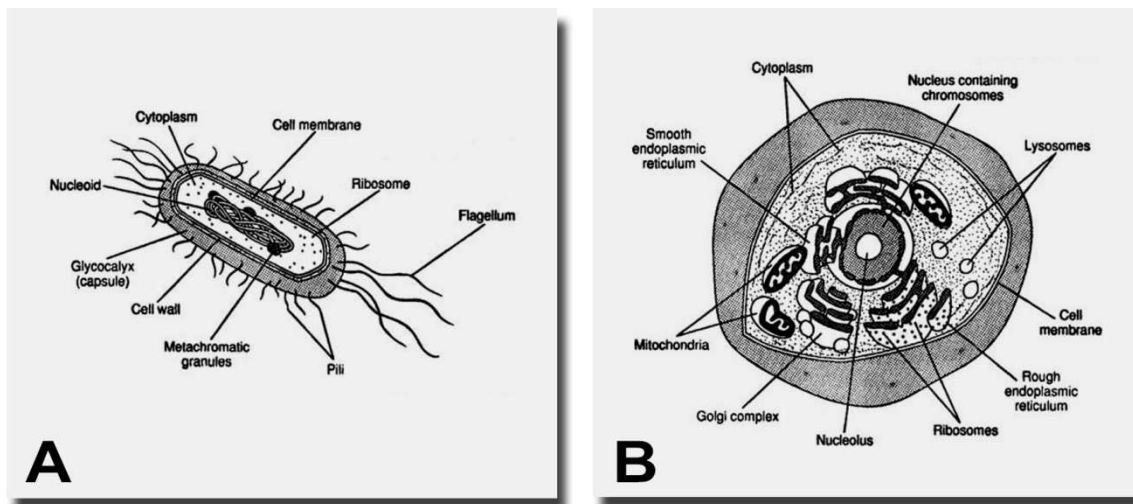
Práce je řazena následovně: V úvodní části práce je přehledně shrnut současný stav zkoumané problematiky, tj. plazmové sterilizace za atmosférického tlaku. V experimentální části jsou vysvětleny všechny metody a experimentální podmínky použité v této práci. V poslední části jsou diskutovány dosažené výsledky a porovnány s výsledky dosaženými jinými výzkumnými skupinami.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Z hlediska typu mikroorganismů a jejich formy

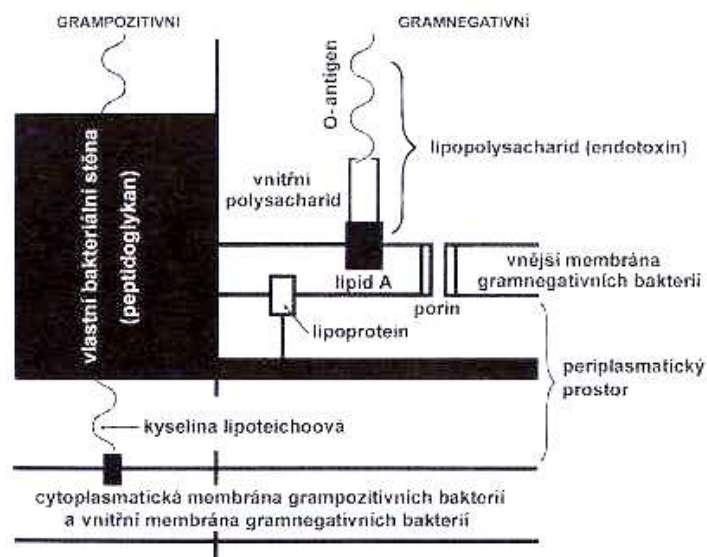
2.1.1 Základní rozdíly v buněčné stavbě prokaryotních a eukaryotních mikroorganismů

Mikroorganismy lze definovat jako jednobuněčné nebo vícebuněčné organismy mikroskopických rozměrů bez schopnosti tvořit funkčně diferencované tkáně nebo pletiva. Z cytologického hlediska lze všechny organismy rozdělit na prokaryota a eukaryota. Základní rozdíly mezi těmito skupinami je převážně v jejich morfologii viz obrázek 1 [2].



Obrázek 1 Schéma buňky A/ prokaryotické; B/ eukaryotické [12]

Prokaryotická buňka postrádá jádro a nemá membránou ohraničené orgány. Mezi prokaryota patří bakterie. Chromosomální DNA prokaryot je jednoduchá smyčka a je obsažena v nukleotidu, jaderném ekvivalentu, který je stejně jako ostatní buněčné části (ribozomy, inkluzní tělíska, vakuoly nebo granula) uložen v cytoplasmě [1]. Velké množství ribozomů (až 40 % sušiny) umožňuje bakteriím vysokou rychlost syntézy buněčné hmoty [2]. Dle složení buněčné stěny rozdělujeme bakterie na grampozitivní a gramnegativní (rozdělení dle reakce na Gramův barvicí roztok a následné moření jodovým roztokem [2]) viz obrázek 2. Hlavní složkou buněčné stěny grampozitivních bakterií je silná peptidoglykanová vrstva (cca 20 nm), která je vyplněna teichovou kyselinou. Buněčná stěna gramnegativních bakterií je stavěna daleko složitěji, i když je tenčí (cca 15 nm). Skládá se z tenké vrstvy peptidoglykanů bez teichoové kyseliny a z tzv. vnější membrány, jež obsahuje fosfolipidy, strukturní i enzymové proteiny, lipoproteiny a lipopolysacharidy [1]. Některé grampozitivní bakterie mohou na konci fáze růstu, kdy koncentrace živin v prostředí klesne pod určitou hladinu, vytvářet spory, ty se vyznačují vysokou odolností k nepříznivým podmínkám, především k vysokým teplotám a jedům. Buňka se nachází v tzv. dormantním (klidovém) stavu, má snížený obsah vody, v důsledku čehož má nízkou metabolickou aktivitu, také má nižší obsah enzymového vybavení a nízkou aktivitu enzymů. V tomto stavu mohou být bakterie vystaveny vysoce náročným a nepříznivým podmínkám, které by jinak zničily vegetativní formu buňky. Přenesením spory do vhodných podmínek dojde k přeměně spory ve vegetativní buňku. Rozměry prokaryotické buňky jsou v rozmezí 1-10 μm [2].



Obrázek 2 Schéma stavby bakteriální stěny grampozitivních a gramnegativních bakterií [1]

Eukaryotická buňka je vývojově mladší, v porovnání s buňkou prokaryotní se vyznačuje větší dokonalostí. Eukaryotní buňka obsahuje vyspělé jádro s dvojitou membránou, DNA je uložena v chromozomech tvořících komplex s bazickými bílkovinami, histony. Stejně jako jádro tak i ostatní orgány (vakuola, endoplazmatické retikulum, mitochondrie, Golgiho aparát, ribozomy) jsou vymezeny systémem biomembrán. Typický je také výskyt cytoskeletu. Rozměry prokaryotické buňky jsou 1-100 μm . Mezi eukaryota patří plísně a kvasinky. Buněčná stěna kvasinek a plísní obsahuje až 80% polysacharidů, většinou založených na bázi glukánů [2].

Rozdíly v morfologii a složení umožňují buňkám odlišně reagovat na stresové podmínky, kterým jsou vystaveny, a tak vykazovat různou citlivost vůči sterilizačním postupům. Stejně tak je tomu i v případě plazmové sterilizace. Např. E. Stoffels [6] ve své přehledové publikaci uvádí, že gram pozitivní bakterie jsou obecně vůči účinkům plazmatu odolnější než gram negativní bakterie, dále pak také uvádí, že spory jsou odolnější než vegetativní forma mikroorganismu.

K podobnému závěru dospěl také např. Akitsu a spol [13]. Při sterilizaci pomocí radiofrekvenčního (RF) výboje (27,12 MHz, 670 W, pulzní režim) ve směsi He + 0,06 % O₂ dosahovali v případě vegetativních buněk gramnegativních bakterií *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* a kvasinky *Candida albicans* redukce 6-7 log CFU (colony forming units) za 1 min. Pro dosažení stejné redukce u grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* bylo zapotřebí expoziční čas 5 min. Endospory bakterií *Bacillus atrophaeus* a *Geobacillus stearothermophilus* vyžadovaly výrazně vyšší expoziční časy (5-30 min v závislosti na použité frekvenci výboje a nosném médiu).

Obdobně Kelly-Wintenberg a kol. [14] při sterilizaci vzorků grampozitivní bakterie *Escherichia coli* a gramnegativní bakterie *Staphylococcus aureus* pomocí RF doutnavého výboje (OAugDP, 1-8 kHz, 1-6 kV) pracujícího v prostředí vzduchu zjistili, že pro dosažení stejného stupně redukce v případě *S. aureus* jako v případě *E. coli* bylo potřeba 2 x delší expoziční čas. Poměr byl stejný bez ohledu na použité nosné médium a počáteční koncentraci. Zatímco v případě vegetativních buněk dosahovali kompletní redukce 5 log CFU během

15 resp. 30 s expozice plazmatem, v případě spor *Bacillus subtilis* bylo zapotřebí pro dosažení stejné redukce až 5 minut expozice plazmatem.

Ermolaeva a kol. [9] při sterilizaci pomocí argonového hořáku (2,45 GHz, 85 W) zjistili vyšší citlivost gramnegativních bakterií vůči germicidním účinkům plazmatu v porovnání s grampozitivními. V případě gramnegativních bakterií *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia* a *Escherichia coli* dosáhli kompletní inaktivace všech životaschopných buněk 5 log CFU do 5 min expozice plazmatem. V případě grampozitivních bakterií záleželo nejen na druhu, ale také na kmeni. Nejdolnější byla bakterie *S. pyogenes*, po 5 minutách zůstalo 17 % původní koncentrace. Rozdíly mezi kmeny pozorovali na třech různých kmenech *Staphylococcus aureus*. Po 5 minutách expozice plazmatem byl dle kmene počet přeživších buněk 0-10 %. Jako jeden z důvodů rozdílné odezvy mikroorganismů autoři zmiňují rozdíly ve složení buněčné stěny, nicméně s ohledem na rozdílnost mezi kmeny také zmiňují složitější mechanismy (rozdíly ve složení lipidů a proteinů v membráně, celková odpověď mikroorganismu – stresové proteiny, apod.).

Naopak Kayes a kol. [15] při sterilizaci pomocí RF doutnavého výboje (OAUGDP, 1-8 kHz, 1-6 kV) pracujícího v prostředí vzduchu nezaznamenali rozdíly mezi grampozitivními (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) a gramnegativními bakteriemi (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Enteritidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*). Obecně, v případě vzorků exponovaných plazmatem bezprostředně po nanesení mikroorganismů na agar dosáhli největší redukci cca 3-6 log CFU při expozici plazmatem do 30 s. Tento výsledek je v rozporu s výsledky, které tato skupina prezentovala v práci Kelly-Wintenberg a spol. [14] (viz výše). Toto autoři vysvětlují zvýšením účinnosti plazmového reaktoru v důsledku úpravy vybavení a postupů, což dle autorů vedlo k nárůstu koncentrace a kvality aktivních částic v plazmatu. Ve srovnání s předchozím experimentem, také navíc používali směs tří kmenů jednoho druhu, zatímco dříve používali pouze jeden kmen. To je dle mého názoru hlavní důvod rozdílu mezi prezentovanými výsledky.

Obdobně Chiang a kol. [16] při sterilizaci gramnegativní bakterie *Escherichia coli* a grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis* pomocí plazmové trysky za atmosférického tlaku (APPJ, 30 kHz, 300 W) v prostředí vzduchu nebo kyslíku dosáhli shodně inaktivace 7 log CFU/ml během 18ti „scanů“ (celková expoziční doba 1,8 s) pro oba mikroorganismy.

Muranyi a kol. [11] použili pro sterilizaci kaskádový bariérový výboj (CDBD, 130 W; excimerová lampa – Xe + Br, 282 nm). Shodně s výše uvedenými pracemi ani tito autoři nezaznamenali rozdíly mezi grampozitivními (*Staphylococcus aureus*, *Deinococcus radiodurans*) a gramnegativními bakteriemi (*Salmonella* Mons, *Escherichia coli*), ve všech případech dosáhli redukci 6-7 log CFU během 1 s expozice plazmatem. V případě bakteriálních spor (*Bacillus atrophaeus*, *Bacillus pumilus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium sporogenes*) dosáhli při stejném expozičním čase cca o 1 log CFU nižší redukci než v případě vegetativních buněk. Jako nejdolnější vyhodnotili spory plísně *Aspergillus niger*, u nichž dosáhli redukce pouze 3 log CFU během 1 s expozice plazmatem.

Z těchto uvedených příkladů je zřejmé, že mimo buněčnou stavbu ovlivňují výsledek sterilizace i další faktory, těmi jsou např. hustota mikroorganismu a jeho forma, nosné médium, typ a parametry výboje atd. Pro úspěšné zavedení plazmové sterilizace do reálné

praxe je tedy nutno optimalizovat všechny tyto parametry tak, aby výsledkem byla širokospektrální sterilizační metoda.

Při studiu sterilizačních účinků plazmatu využívají výzkumné týmy široké spektrum mikroorganismů. Obecně lze říci, že druh použitého mikroorganismu je volen dle cílové aplikace. V případě obecného výzkumu autoři většinou volí mikroorganismy, které jsou běžně používané jako biologické indikátory pro kontrolu účinnosti sterilizace, těmi jsou např. zástupci rodu *Bacillus spp.* V případě orientace výsledného produktu na potravinářský průmysl jsou častými modelovými mikroorganismy alimentární mikroorganismy, jako jsou např. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* (Tyto mikroorganismy se dostávají s potravou do trávicího ústrojí člověka, kde dochází k jejich pomnožení a následné infekci či otravě [17]). Pro medicínské využití jsou jako modelové mikroorganismy použity původci nozokomálních nákaz (nákazy získané v souvislosti s pobytem ve zdravotnickém zařízení [1], nebo mikroorganismy kolonizující rány *Staphylococcus aureus* (MSSA – methicillin citlivý), *Candida Albicans*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa* apod. V následující části jsou zmíněny jednotlivé mikroorganismy používané pro plazmovou sterilizaci a způsob přípravy vzorků.

2.1.2 Typy vzorků

Laroussi [8] ve svém přehledovém článku rozděluje bakteriální vzorky používané pro plazmové sterilizace na planktonní vzorky a vzorky biofilmu. Stoffels [6] toto rozdělení dále specifikuje:

1. Tenké vrstvy připravené na agaru. Tyto vzorky většinou obsahují 10^5 - 10^6 CFU/cm². Vzorky jsou zpravidla tenké, k jejich inaktivaci většinou stačí sekundy.
2. Planktonní vzorky. Jedná se o kapalně vzorky s inokulovanými bakteriemi. Výsledný účinek plazmatu je silně závislý na tloušťce kapaliny. Pro redukci bakteriální populace o 2 řády (99 %) je potřeba několikaminutová expozice.
3. Biofilmy. Jedná se o společenství bakteriálních buněk, které přilnuly k povrchu či k sobě navzájem a produkují polymerní matrix, jíž jsou obaleny. Biofilmy umožňují mikroorganismům setrvat v prostředí, odolávat vysychání, UV záření, antimikrobiálním či sanitačním látkám, což je v případě patogenních mikroorganismů nežádoucí. Mikroorganismy jsou schopny tvořit biofilmy na různých površích, jako je PVC, sklo, nerezová ocel, apod. [18]. Biofilmy mohou být složeny z jednoho nebo více druhů mikrobů. Ne vždy je možné inaktivovat všechny bakterie biofilmu prostřednictvím studeného plazmatu, nicméně je možné redukovat růst biofilmu a narušit rovnováhu mezi jednotlivými druhy s použitím relativně mírných podmínek.

Plazmová sterilizace nachází uplatnění ve stále více oblastech, a jako nosiče mikroorganismů je použita celá řada dalších materiálů, nejen agar. Bakterie jsou nanášeny na sklo, nerez ocel, polymerní materiály, potraviny atd., proto lze první skupinu dále zobecnit na vrstvy mikroorganismů na nosiči. Laroussi [8] i Stoffels [6] nezahrnují do tohoto rozdělení eukaryotické buňky. Mezi eukaryota patří kromě hub také rostlinné a živočišné buňky a oba autoři hodnotí eukaryota, resp. vzorky s eukaryotními mikroorganismy, právě s ohledem na účinky plazmatu na buňky savců. Jak prokázaly studie některých autorů [6; 8; 19], správnou volbou podmínek lze docílit u eukaryotických buněk uvolnění z nosiče (tkáně) aniž by došlo

k jejímu poškození, dále pak apoptózu (sebedestrukční mechanismus buňky) nebo nekrózu (úmrť buňky v důsledku vážných poranění buňky). Toto však není předmětem této práce. Modelové eukaryotní mikroorganismy (kvasinky a plísňe) použité pro sterilizace byly popsány v jiných pracích stejně jako bakterie ve formě vrstvy nanesené na nosném médiu [11; 13; 20-26].

Sterilizaci vrstvy mikroorganismů (bakterií, plísni nebo kvasinek) na povrchu živného média (agaru) popisují [9; 15; 16; 20; 24; 25; 27], na skle [13; 20; 22; 26; 28-33], na polymerních materiálech [11; 20; 21; 23; 34-36], na potravinách [4; 37-41], nerez oceli [42; 43], a na živém modelovém organismu (krysa, myš, prase) [9; 19].

Planktonní mikroorganismy byly ošetřeny ve vodě [23] nebo v izotoniickém roztoku PBS (fosfátový pufr ve fyziologickém roztoku) [30].

Biofilmy pro plazmovou sterilizaci byly kultivovány na skle [9; 30], agaru [44] a syntetické membráně (simulace rostlinné tkáně) [45].

2.1.3 Modelové mikroorganismy

2.1.3.1 Grampozitivní bakterie

Nejpoužívanější grampozitivní bakterie jsou bakterie rodu *Bacillus*. Tyto bakterie jsou schopny vytvářet teplotně rezistentní spory, které odolávají teplotě 120 °C po dobu 30 min. [1]. Z tohoto důvodu se spory těchto bakterií využívají při zkoumání účinnosti nových sterilizačních postupů a zařízení [11; 46]. Nejvíce zastoupeným druhem je *Bacillus subtilis* [7; 11; 13; 16; 21-23; 25; 32; 33; 35; 36; 44; 47; 48]. Důvodem je, mimo jeho teplotní odolnost, také jeho podobnost s vysoce patogenním druhem *Bacillus anthracis*, který způsobuje antrax [44]. Dalším druhem je termofilní *Bacillus stearothermophilus* [13; 20; 22; 44; 49]. Některé kmeny tohoto druhu jsou schopny růst i při teplotě až 80 °C [50]. Zmínky o použití druhu *Bacillus cereus*, který je považován za potenciálního původce alimentárních onemocnění, jsou uvedeny v následujících literárních zdrojích [20; 51]. Posledním používaným druhem je *Bacillus pumilus* [20; 11], vegetativní forma i jeho spory vykazují ve srovnání s ostatními druhy rodu *Bacillus* zvýšenou odolnost vůči UV záření a H₂O₂. [46]

Druhy rodu *Staphylococcus spp.* jsou druhou nejvíce zastoupenou skupinou grampozitivních bakterií v literatuře. Zmínky o využití druhu *Staphylococcus aureus* jako biologického indikátoru při sterilizaci plazmatem jsou uvedeny v následujících literárních zdrojích [9; 11; 13; 15; 19; 20; 22-25; 30; 31]. Jedná se o oportunitní patogen způsobující nozokomální infekce (např. hnisavé infekce operačních ran, respirační infekce, močové infekce, atd.).[1] Sterilizace druhu *Staphylococcus epidermis* je popsána v následujících literárních zdrojích [9; 49]. Tento druh je stejně jako *S. aureus* původcem nozokomálních infekcí, hlavní problém způsobuje pro implantáty [52].

Sterilizaci alimentárního patogenu *Listeria monocytogenes* popisuje řada autorů [15; 34; 37; 4]. Tento potenciální patogen je schopen kontaminovat potraviny a krmiva a vyvolat u imunokompromitovaných osob tzv. listeriózu. Zvýšení výskyt této nemoci byl např. popsán v prosinci r. 2006, kdy touto nemocí onemocnělo cca 80 lidí a nemoci podlehl cca 16,3 % onemocněných. Výsledkem byl zákaz prodeje některých rizikových potravin [53; 54]. Jako nepatogenní náhradu této bakterie volí někteří autoři rod *Listeria innocua* [28; 38; 42].

Sterilizace alimentárního neurotoxického patogenu *Clostridium botulinum* a *Clostridium sporogenes* (kmen *C. botulinum* neprodukující botuloxin) byla popsána v následujícím literárním zdroji [11]. Bakterie rodu *Clostridium* vytváří tepelně odolné spory a jsou stejně jako zástupci rodu *Bacillus* využívány jako kontrolní mikroorganismy při testování nových sterilizačních postupů. *Clostridium botulinum* je také důležitým ukazatelem zdravotní bezpečnosti potravin, dle tzv. konceptu 12 D, tj. tak dimenzovaný záhřev, aby stačil zredukovat četnost případně přítomných patogenních sporulujících mikroorganismů (*Clostridium botulinum*) 10-12x. [11; 55]

Často používaným druhem je také *Deinococcus radiodurans* [20; 11; 19; 43; 49]. Tato bakterie je známá svou vysokou odolností vůči ionizujícímu záření, vysokým teplotám, reaktivním sloučeninám kyslíku a vakuu. Tato bakterie snese dávku záření až 5000 Gy bez ztráty viability (dávka 60 Gy stačí ke sterilizaci kultury *E.coli*), při dávce 15000 Gy ztrácí viabilitu 37 % populace [43].

Dalšími v literatuře zmíněnými druhy jsou pak *Enterococcus faecium* [9; 24; 49] a β -hemolytický *Streptokok skupiny A* [9; 24]. V obou případech se jedná o původce nozokomálních infekcí, zatímco *Enterococcus faecium* je typickým kolonizátorem ran [24], β -hemolytický *Streptokok skupiny A* způsobuje hnisavé infekce pooperačních ran [1; 24].

2.1.3.2 Gramnegativní bakterie

Nejčastěji používanou gramnegativní bakterií je *Escherichia coli* [7; 9; 11; 13; 15; 16; 20; 22-25; 27; 30-32; 35; 37; 39; 40; 47; 49]. Obecně *E. coli* patří k nejlépe prostudovaným mikroorganismům, jelikož je modelovým organismem pro genové a klinické studie. Její přítomnost je u člověka fyziologická pouze ve střevech jako součást střevní mikroflóry. Většina kmenů *E. coli* je nepatogenních. Patogenní kmeny jsou častými původci nozokomálních (infekce močových cest, infekce ran, atd) a alimentárních infekcí (průjemy). Z hlediska veřejného zdraví je důležitý sérotyp *E. coli* O157:H7, jelikož způsobuje smrtelné onemocnění UHS (hemolyticko-uremický syndrom). Jedná se o alimentární patogen.[1; 17]. Sterilizaci tohoto sérotypu byla zmíněna v následujících literárních pramenech [20; 15; 39].

Často používaným kontrolním organismem jsou také zástupci rodu *Salmonella spp.* Jedná se o alimentární patogeny, způsobující onemocnění salmonelóza. Onemocnění může způsobit už i 15-20 buněk. Toto množství závisí na věku a zdravotním stavu člověka a na druhu salmonely [17]. V literatuře byla popsána plazmová sterilizace sérotypu *Salmonella Enteritidis* [13; 15; 22], *Salmonella Mons* [11] a *Salmonella Typhimurium* [37; 51].

Sterilizaci rodu *Pseudomonas spp.* popsali práci následující autoři [41] a druhu *Pseudomonas aeruginosa* [20; 9; 24]. Tato bakterie se vyznačuje vysokým stupněm primární rezistence vůči antibiotikům. Je častým původcem nozokomálních infekcí (kolonizuje rány, kde vyvolává akutní infekci [24]; sepse zavedených i.v. katetrů [1], atd.). Mimo to je *Pseudomonas spp.* součástí mikroflóry potravin skladovaných při nízkých teplotách a podílí se na jejich kažení [55].

Dalšími gramnegativními bakteriemi popsanými v literatuře jsou alimentární patogeny *Shigella flexneri*, *Vibrio arahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica* [15] a původci nozokomálních infekcí *Burkholderia cenocepacia* [9], *Chromobacterium violaceum* [44], *Pantoea agglomerans* [45], *Enterobacter aerogenes*, *Neisseria sicca* a *Stenotrophomonas maltophilia* [49].

2.1.3.3 Plísně a kvasinky

Sterilizace plísně *Aspergillus niger* byla popsána v následujících pracích [11; 21; 22; 23]. *A. niger* je hojně rozšířen, dokonce se řadí k nejdůležitějším technologickým kmenům (např. výroba kyseliny citronové, glukonové, enzymů, atd.). Některé kmeny produkují mykotoxin, z toho důvodu je v současnosti považován za oportunitní patogen (způsobuje aspergilózu[2]). Jako modelový organismus se používá pro svou vysokou odolnost vůči UV-záření, která je způsobena jeho černou pigmentací [11].

Nejhojněji užívanou kvasinkou pro plazmové sterilizace je *Candida albicans* [20; 24; 25; 49]. Tento oportunitní patogen se přirozeně vyskytuje na nejrůznějších tkáních lidského těla, u imunokompromitovaných jedinců může dojít k rozvinutí infekce (kandidóza). Je původcem nozokomálních infekcí [1].

Sterilizace kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* byla popsána v následujících literárních zdrojích [20; 26; 51]. Jedná se o technologicky velice důležitou kvasinku, která se uplatňuje jako pekařská, lihovarská, vinařská či pivní kvasinka (zkvašuje cukry). S člověkem sdílí 23% genomu a obsahuje i velké množství proteinů (pro buněčný cyklus, signalizaci), které jsou s lidskými buňkami shodné [2].

Další kvasinkou popsanou v literatuře je *Mrakia frigida* [26].

2.2 Zdroje používané pro plazmovou sterilizaci

Z hlediska teplotní rovnováhy lze různé typy nízkoteplotního plazmatu rozdělit na rovnovážné (termální) a nerovnovážné (netermální, neizotermické). V případě termálního plazmatu mají všechny částice stejnou teplotu, tedy i energii. Vzhledem k vysokým teplotám tohoto typu plazmatu je přímé použití omezeno pouze na teplotně odolné materiály. Nicméně při nepřímé expozici, kdy plazma není přímo v kontaktu s materiálem, lze tento typ plazmatu použít také pro opracování teplotně citlivých materiálů, např. pro sterilizace povrchů polymerních materiálů. V případě nerovnovážného plazmatu hovoříme zvláště o teplotě elektronů a o teplotě těžkých částic (molekul, atomů, iontů). Tento typ plazmatu se většinou vyznačuje nízkými teplotami neutrálního plynu blízcími se teplotě okolního prostředí. Vzhledem k nízkým teplotám je nerovnovážné plazma vhodné pro opracování teplotně citlivých materiálů [56; 57]. Netermální plazma nachází široké uplatnění v průmyslu jako např. zdroje excimerního záření, při povrchových úpravách polymerních materiálů, nebo při biologických a chemických dekontaminacích [7].

Výzkumem sterilizačních účinků netermálního plazmatu se v posledních dvaceti letech věnuje celá řada výzkumných týmů. Sterilizace je prováděna v širokém rozpětí tlaků, s využitím různých budících zdrojů (mikrovlnné – MW, radiofrekvenční – RF, audiofrekvenční, střídavé, stejnosměrné zdroje, navíc provozované buď kontinuálně nebo pulzně [7]), v prostředí většiny laboratorních plynů [5]. Sterilizace za nízkých tlaků jsou shrnuty např. v přehledových člancích [5; 58]. Avšak vzhledem k tomu, že tato práce je věnována sterilizacím v DBD pracujícím za atmosférického tlaku, budou v následující části zmíněna pouze zařízení pracující za atmosférického tlaku. Přehled zdrojů netermálního atmosférického plazmatu využívaných pro sterilizace a medicínské aplikace poskytuje ve své přehledové publikaci Larousi [7], Moreau [59], Stoffels [6] a Ehlbeck [56]. Technické aspekty generování netermálního atmosférického plazmatu a fyzikální vlastnosti těchto výbojů byla popsána např. v přehledové práci [60].

Kromě typu zdroje je v případě plazmových opracování ještě nutno rozlišit způsob expozice, a to přímou nebo nepřímou. **Přímou expozicí** nazýváme takový způsob expozice, kdy vzorek přichází do přímého kontaktu s aktivním plazmatem. Při tomto způsobu expozice je vzorek vystaven všem sterilizačním činitelům generovaným plazmatem, ty zahrnují teplotu, nabitě částice, reaktivní neutrály a elektromagnetické záření [8]. **Nepřímou expozicí** naopak nazýváme takový způsob expozice, kdy vzorek nepřichází do přímého kontaktu s plazmatem, jinak řečeno vzorek je umístěn v určité vzdálenosti od aktivního plazmatu. Při tomto způsobu expozice na vzorek nepůsobí nabitě částice, které rekombinují ještě před dosažením povrchu vzorku. Navíc dochází také k výrazné redukci teploty a záření. To ponechává prostor radikálům s dlouhou dobou života k interakci s biologickými vzorky [8]. Nepřímá expozice je většinou upřednostňována pro *in vivo* (na živých tkáních) medicínské aplikace vzhledem k své relativní bezpečnosti. Nicméně efektivita je mnohem nižší než v případě přímé expozice [6].

Ehlbeck [56] ve své přehledové publikaci rozdělil plazmové zdroje dle exitační energie a konfigurace elektrod na koronový výboj (DC/AC), dielektrický bariérový výboj (DBD), plazma jety (APPJ) a mikrovlnný výboj (MW). Na základě tohoto rozdělení byl vytvořen i následující přehled. Souhrnný přehled zdrojů, použitých pracovních plynů a mikroorganismů je shrnut v tabulce 1.

Použitý výboj frekvence/výkon	Plyn	Mikroorganismy
Koronový výboj 10-30 kHz	Vzduch	G+ : <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus stearothermophilus</i> , <i>Deinococcus radiodurans</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus sanguinis</i> G- : <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Neisseria sicca</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Kvasinky : <i>Candida albicans</i> , <i>Sacharomyces cerevisiae</i> .
DBD 2 kHz-27,12 MHz 1,8-670 W	Vzduch, Ar, He+O ₂ , He+H ₂ O, He+N ₂ , He+vzduch, N ₂ , N ₂ -N ₂ O, O ₂	G+ : <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus stearothermophilus</i> , <i>Clostridium botulinum type A</i> , <i>sporogenes</i> , <i>Deinococcus radiodurans</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> G- : <i>Escherichia coli</i> , <i>Chromobacterium violaceum</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Salmonella Enteritidis</i> , <i>Salmonella Mons</i> , <i>Salmonella Typhimurium</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> Plísně : <i>Aspergillus niger</i> Kvasinky : <i>Candida albicans</i> , <i>Mrakia Frigida</i> , <i>Saccharomyces Cerevisae</i>
APPJ 1 kHz-27.12MHz 10-300 W	Argon, Ar+vzduch, He, N ₂ , O ₂ , vzduchu	G+ : <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , β -hemolytický <i>Streptokok skupiny A</i> G- : <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> Kvasinky : <i>Candida albicans</i>
MW 2,45 GHz 85-1700 W	Vzduch, Ar	G+ : <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> G- : <i>Escherichia coli</i> , <i>Burkholderia cenocepacia</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> Plísně : <i>Aspergillus niger</i>

Tabulka 1 Přehled plazmových zdrojů a mikroorganismů použitých při plazmových sterilizacích. G+ značí grampozitivní bakterie, G- značí gramnegativní bakterie, DBD – dielektrický bariérový výboj, APPJ – plazma jet za atmosférického tlaku, MW – mikrovlnný výboj.

2.2.1 Koronový výboj

Koronový výboj je využíván v celé řadě průmyslových aplikací, jako jsou např. povrchové úpravy textilií, rozklad VOC (volatile organic compounds – těkavé organické látky), elektrostatické odlučovače, generátory ozónu pro dezinfekci vody, apod. [60; 56].

Koronový výboj vzniká při atmosférickém tlaku. Hlavní podmínkou vzniku korony je nehomogenní elektrické pole ve výbojové dráze, které vzniká v okolí elektrod s malým poloměrem křivosti povrchu. Plazma koronového výboje tvoří obvykle velmi tenkou vrstvu kolem elektrody s malým poloměrem křivosti. Zvýšením napětí na elektrodách dojde k rozšíření plazmatu i k druhé elektrodě, nastane průraz výbojové dráhy a koronový výboj přejde v jiskru nebo oblouk [57]. Typické uspořádání elektrod je hrot-rovina, nicméně vyskytuje se také koaxiální uspořádání. Koronový výboj může být buzen se stejnosměrným nebo střídavým napětím, kde hrotová elektroda může mít kladný nebo záporný potenciál. Pro mikrobiologické aplikace je většinou využíván negativní dc výboj [56].

Machala a kol. (2009) [51] studovali inaktivační účinky tří pulzních DC výbojů (korona, přechodový jiskrový výboj a obloukový výboj) s využitím obou polarit. Pro experimenty využili uspořádání elektrod hrot-rovina, výboj byl buzen na vzduchu. Koronový výboj byl generován s napětím řádově jednotek kV, proudem cca 10 mA a frekvencí pulzů 10-30 kHz. Zvýšením napětí nad 8 kV docházelo k formování jisker. Proud v této oblasti byl limitován sériovým odporem a nízkou elektrickou kapacitou mezi elektrodami. V této oblasti se střídá pulz jisker (proud ~ 1 A) s korunou s frekvencí střídání 0,5-5 kHz. Při $R \leq 2M\Omega$, $f > 5$ kHz dochází k přechodu na kontinuální výboj s charakterem doutnavého výboje (proud 1-10 mA). Pro inaktivaci použili zástupce gramnegativní bakterie *Salmonella typhimurium*, grampozitivní *Bacillus cereus* (spory) a kvasinky *Sacharomyces cerevisiae*. Mikroorganismy byly buď naneseny na povrch pevného nosiče (papír, plast) nebo byly ošetřeny ve vodě/fyziologickém roztoku. Kapalné vzorky byly ošetřeny buď ve statickém nebo průtočném režimu, v případě průtočného režimu použili dvě konfigurace (voda tekla přes uzemněnou elektrodu, nebo protékala přes vysokonapěťovou hrotovou elektrodu). V průtočném režimu byly nejefektivněji usmrceny bakterie pomocí pozitivního jiskrového výboje, hodnota D (tj. čas potřebný k inaktivaci 90 % původní koncentraci mikroorganismů, viz kapitola 2.4) byla 3-4 s, přičemž původní koncentrace mikroorganismů byla 10^3 - 10^4 CFU/ml (Colony Forming Units – počet životaschopných mikroorganismů). Streamerová korona byla účinná při průtoku vody přes aktivní oblast koronového výboje, zde dosáhli autoři hodnot D až 0,12 s (původní koncentrace 10^6 - 10^7 CFU/ml). Při statickém módu dosahovali hodnot D 110 s při použití pozitivního jiskrového výboje resp. 529 s v případě pozitivní streamerové korony. Nízkou účinnost vysvětlují autoři malým poměrem aktivní oblasti výboje ve srovnání s objemem reaktoru a opracovávanému médiu. Při inaktivaci mikroorganismů na povrchu nosného média dosahovali při expozicích 5 min inaktivace 98,3 % v případě plastu (D - 3 min, výkon 2,1 W) resp. 85,9 % v případě papíru (D - 6 min, výkon 0,11 W). Při vyhodnocování převládajícího inaktivačního mechanismu použili kombinaci výsledků kultivace mikroorganismů, optické emisní spektroskopie (OES) a analýzy produktů peroxidace lipidů membrány mikroorganismů pomocí kyseliny thiobarbiturové tzv. TBARS test (viz kapitola 2.3). Jako hlavní mechanismus inaktivace uvedli působení radikálů a reaktivních sloučenin kyslíku [51].

Scholtz a kol. (2009) [49] studovali mikrobicidní účinky negativního DC koronového výboje pracujícího na vzduchu za atmosférického tlaku v uspořádání hrot-rovina. Napětí bylo možno měnit až do 10 kV a proud do 0,5 mA. Jako modelové mikroorganismy používali grampozitivní bakterie *Deinococcus radiodurans*, *Enterococcus faecium*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus sanguinis*, gram negativní bakterie *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Neisseria sicca*, *Stenotrophomonas maltophilia* a kvasinky *Candida albicans*. Vegetativní buňky nebo spory byly nanášeny buď na polotuhý agar nebo do vody/fyziologického roztoku. Vzorky byly umístěny na anodě a uzemněny Pt drátem. Vyhodnocovali vliv délky expozice a vzdálenosti korony od vzorku (2-10 mm). Při inaktivaci vegetativních buněk nepozorovali autoři rozdíly mezi různými typy mikroorganismů. Velikost inhibiční zóny po 16 min ošetření byla 20-63 mm². Přičemž nejcitlivější byla kvasinka *Candida albicans* a *Deinococcus radiodurans*, naopak jako nejodolnější se ukázal být *Geobacillus stearothermophilus*. Účinek na spory byl cca 2-4 x nižší než na vegetativní buňky. U planktonních vzorků (0,5 ml) dosahovali úplné inaktivace bakterií do 5 min, kvasinky byly inaktivovány až po 30 min. V případě kapalných vzorků byl patrný rozdíl gramnegativní vs. grampozitivní bakterie, zatímco v případě *E. coli* došlo k úplné inaktivaci do 2 min, v případě *S. epidermidis* bylo ke stejnému efektu potřeba expozice 4 min. Autoři v diskusi vysvětlili na základě výsledků získaných pro *Deinococcus radiodurans* zanedbatelný vliv UV záření [49].

Ioanid a spol. (2012) [61] prezentovali výsledky dekontaminace papírových vzorků pocházejících z cca 200 let staré knihy pomocí koronového výboje za atmosférického tlaku (10 kHz, AC-220 V, DC-12 V). Dekontaminace v koronovém výboji probíhala ve dvou fázích – v první fázi došlo k očištění prachu a nečistot v koronovém výboji s AC 8 kV a pomocí rotačního kartáče obaleného veverčí kůží, ve druhé fázi proběhla dekontaminace v koronovém výboji s DC 8 kV. Výkon ve výboji byl 1 W. Autorům se podařilo inaktivovat původní mikroflóru papíru (směs bakterií a plísní), jejíž koncentrace se pohybovala v rozmezí 1-10² CFU/ml, během 6 min pomocí koronového výboje. Pomocí ATR-FTIR (Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací, technika zeslabené úplné reflektance) zaznamenali u vzorků exponovaných plazmatem pokles intenzity pásů O-H a C-O vazeb (odstranění nečistot). Při fyzikálně-chemické analýze papíru nezaznamenali žádné změny papíru. Kromě koronového výboje autoři používali ještě RF výboj (13,5 MHz) ve vakuu (cca 10⁻⁴ Pa) pracující ve vzduchu. Zde dosahovali inaktivaci až po 15 min [61].

2.2.2 DBD výboje

Ve srovnání s plošně malými koronovými výboji jsou dielektrické bariérové výboje ideální zdroje plazmatu pro ošetření rozsáhlých ploch. Výboj je nazýván bariérovým, pokud jsou elektrody odděleny minimálně jednou dielektrickou vrstvou. Dielektrikum vložené mezi elektrody snižuje maximální proudovou hustotu, stabilizuje výboj a umožňuje tak vytvoření neizotermického plazmatu. K zapálení bariérového výboje jsou běžně používány zdroje střídavého napětí o frekvenci několika kilohertzů a napětí několika kilovoltů. V praxi se používá celá řada uspořádání a geometrie elektrod. Podle vzájemné polohy elektrod a dielektrika lze dělit bariérové výboje na objemové a povrchové. Elektrody mohou být plošné, cylindrické, apod. Dielektrický výboj se vyskytuje ve dvou módech filamentní a homogenní výboj. Ve filamentním módu má výboj podobu velkého množství výbojových kanálů, tzv. filamentů. Každý z těchto filamentů je prostorově výrazně ohraničen, přičemž jeho průměr bývá řádově desetin milimetru a trvání od několika nanosekund po jednotky mikrosekund.

Za určitých podmínek lze získat zdánlivě homogenní difúzní mód. V tomto módu není možné přímo rozlišit jednotlivé filameny, výbojový kanál pokrývá prakticky celou plochu dielektrika. Klíčovým parametrem pro pracovní mód je použitý pracovní plyn, napětí a proud dodávaný zdrojem a konfigurace elektrod [56; 62].

Dielektrické výboje nacházejí uplatnění v celé řadě průmyslových aplikací, jako je např. generování ozónu, zobrazovací zařízení, CO₂ lasery a UV zdroje v excimerních lampách. V posledním desetiletí našli uplatnění v biologii, zejména při destrukci bakterií nebo při medicínských aplikacích. [59].

V následující části je uveden přehled prací věnujících se problematice sterilizace v DBD výbojích.

Gadri a kol. (2000) [20] využil ke sterilizaci RF doutnavý výboj (OAUGDP - one atmosphere uniform glow discharge plasma), což je zvláštní typ netermálního atmosférického bariérového plazmatu, který svou časově rozlišenou charakteristikou připomíná DC doutnavý výboj za nízkých tlaků. Frekvence buzení výboje 7 kHz, napětí 8.5 – 11 kV, jako pracovní plyn byl použit vzduch. Mikroorganismy byly vystaveny jak přímému působení plazmatu, tak i dohasínajícímu výboji. Jako bioindikátory byly použity grampozitivní bakterie (*Staphylococcus aureus*, *Deinococcus radiodurans*, *Bacillus subtilis*, spóry - *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis var niger*), gramnegativní bakterie (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*) a viry *Bacteriophage Phi X 174*. Mikroorganismy byly nanášeny na polypropylen (PP), sklo, papír, nitrocelulóзовém papíru a živné médium (agar). Inaktivaci 4-8 log CFU (původní koncentrace jednotlivých mikroorganismů byla v rozsahu 10⁴-10⁸ CFU) dosahovali v časech 22 s - 9 min dle typu mikroorganismu a nosného média. Autoři nepozorovali výrazné rozdíly grampozitivní vs. gramnegativní bakterie, obecně však kvasinky byly odolnější než bakterie a jako nejodolnější se ukázaly být viry. Vegetativní formy bakterií byly výrazně citlivější vůči účinkům plazmatu než jejich spory, hodnoty *D* v tomto případě byly 1,8-5,5 min namísto sekund. Autoři zaznamenali výrazný vliv nosného média, rychlost inaktivace klesala resp. hodnota *D* hodnota rostla v pořadí PP, sklo a agar. Např. v případě *E. coli* K12 byly tyto hodnoty *D*_{PP} - 6 s, *D*_{sklo} - 33 s a *D*_{agar} - 70 s. Mimoto testovali inaktivační mechanismy na PP vzorky balené v obalech běžně používaných při sterilizacích v medicíně. Zjistili, že pro délku inaktivace nehraje roli, jestli jsou vzorky vystaveny působení plazmatu přímo nebo zabaleny v obalech. Jako dominantní mechanismus inaktivace autoři uvedli reaktivní radikály O, vliv UV záření považují za zanedbatelný. Na základě sterilizačních účinků OAUGDP byly navrženy speciální vzduchové filtry (Volfiltry) do klimatizací a ventilačních systémů [20].

Laroussi a kol. (2002) [63] prezentovali výsledky studia vlivu nerovnovážného atmosférického plazmatu na heterotrofní pochody gram negativní bakterie *E. coli* a dále pak vliv na buněčnou morfologii gramnegativní bakterie *E. coli* a grampozitivní bakterie *B. subtilis*. Experimenty byly prováděny pomocí odporového bariérového výboje (RBD). Koncept tohoto výboje je založen na DBD konfiguraci. Avšak místo dielektrika je minimálně jedna elektroda pokryta materiálem s vysokým odporem. Odporová vrstva distribuuje zátěž, což omezuje proud výboje, a tak zabraňuje vzniku oblouku. Výhodou RBD ve srovnání s DBD je pro buzení plazmatu možnost použít DC zdroj (případně nízkofrekvenční AC zdroj s frekvencí 60 Hz). Výboj byl generován s napětím 16 kV a frekvencí 60 Hz. Jako pracovní plyn použili směs 97 % He + 3 % O₂. Pro analýzu metabolických procesů v buňce *E. coli* před a po subletální expozici plazmatem použili uhlíkový substrát Biolog GN2 (obsahuje

aminokyseliny, sacharidy a karboxylové kyseliny) nanosený na 96 jamkové mikrotitrační destičce, u cca 6 sloučenin zaznamenali změny. Pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) zaznamenali výrazné poškození integrity buněčné membrány a uvolnění buněčného obsahu do okolí v případě bakterie *E. coli* vystavené letálním účinkům RBD, u *B. subtilis* nebylo zaznamenáno žádné poškození. Tyto výsledky odpovídají teorii, že poškození buněčné membrány v důsledku nahromadění náboje se vyskytuje převážně u gramnegativních bakterií, které mají členitější povrch a menší poloměry zakřivení (nabíjecí potenciál je nepřímýsměrný čtvrtci poloměru zakřivení povrchu) [63].

Laroussi a kol (2003) [47] používali RBD výboj, 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 tohoto článku bylo ukázat, že rozpad (lýze) gramnegativních bakterií *E. coli* je výsledkem nabití (nahromadění náboje) na povrchu bakterie a následné poškození vnější buněčné membrány vlivem elektrostatických sil. Tento fenomén nebyl pozorován při inaktivaci grampozitivní bakterie *B. subtilis* (žádná morfologická změna), důvodem je dle autorů silnější ochranná vrstva [47].

Laroussi, Leipold (2004) [3] zkoumali mechanismy inaktivace mikroorganismů ve vzdáleném atmosférickém DBD výboji na vzduchu. Výkon plazmatu byl 2-15 W. Dosáhli redukce 3 log CFU za 120 s. Dle autorů hlavní podíl na inaktivaci nesly kyslíkové a dusíkové reaktivní částice jako jsou O, OH, NO₂; vliv teploty a UV záření byl v tomto případě zanedbatelný. Při porovnání dosažených výsledků za použití stejných podmínek ve vzduchu, He a He + O₂, zjistili, že inaktivace ve vzduchu probíhala několikanásobně rychleji. Jako modelový mikroorganismus zvolili spory nespecifikovaného druhu *Bacilla* [3].

Heise a kol. (2004) [21] pro sterilizaci PE vzorků kontaminovaných sporami *Bacillus subtilis* a *Aspergillus niger* využili dvě konfigurace bariérového výboje. V prvním případě se jednalo o klasický DBD s jedním dielektrikem a vzorkem umístěným na uzemněné elektrodě. Ve druhém případě použili CDBD (kaskádový dielektrický výboj), který kombinoval 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 byla umístěna excimerová lampa a ve spodní byl buzen výboj. Jako plyny použili argon, dusík a syntetický vzduch. Výboj byl buzen s frekvencí 20-50 kHz, hustota energie byla v případě DBD 7 W·cm⁻² a v případě CDBD byla 1-4 W·cm⁻². CDBD bylo mnohem efektivnější při inaktivaci mikroorganismů, autoři dosáhli redukce 4 log CFU během několika sekund. Jako hlavní inaktivační mechanismy v DBD uvedli UV záření částečně podpořené reaktivními částicemi. V případě argonu dle autorů působilo VUV (vakuové UV záření) záření emitované excimerovými molekulami Ar₂^{*} v oblasti 126 nm, v případě dusíku UVC záření z NO_γ molekulového pásu, v dusíku kromě druhého pozitivního systému dusíku nedetekovali žádné další emise záření pod 400 nm [21].

Becker a kol. (2005) [44] 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), tyto zdroje 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 spory grampozitivních bakterií *B. subtilis* a *B. stearothermophilus* a na biofilm gramnegativní bakterie *Chromobacterium violaceum*. Sterilizace jednotlivých

mikroorganismů vyžadovala cca 2 minuty, u biofilmů bylo nutné použít časy delší než 60 minut [44].

Akitsu a kol. (2005) [13] pro inaktivaci mikroorganismů použili variantu DBD – atmosférický doutnavý výboj (APG), pracující v pulzním módu. Výboj byl buzen s frekvencemi 100 kHz, 13,56 a 27,12 MHz. Jako pracovní plyn bylo použito helium s příměsí vodní páry (vznikají OH radikály) nebo stopového množství O₂ (O radikály). Autoři již v úvodu zmínili, že dominantním mechanismem inaktivace byly radikály kyslíku, které reagovaly s buněčnou stěnou mikroorganismů a interagovaly s dvojitou šroubovicí DNA, nicméně dále v textu se mechanismům inaktivace již nevěnovali. Jako bioindikátory byly použity spóry bakterií *B. atrophaeus* a *G. stearothermophilus* a vegetativní formy patogenních bakterií *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* a patogenní kvasinky *Candida albicans*. Jako nosiče použili sklo, nerez ocel a celulózu. Testy byly prováděny přímou expozicí mikrobiologických vzorků nebo expozicí skrze sterilní krycí materiál Tyvek. Maximální generace O radikálů byla dosažena při koncentraci 0,06 % O₂ v He, při tomto složení plynu byly dosaženy nejkratší časy sterilizace. V případě vegetativních buněk dosahovali redukce 6-7 log CFU za 1 min u gramnegativních bakterií a kvasinek. Pro dosažení stejné redukce u grampozitivních bakterií *S. aureus* bylo potřeba expoziční čas 5 min. Endospory bakterií vyžadovaly výrazně vyšší expoziční časy (5-30 min v závislosti na použité frekvenci a nosném médiu) [13].

Vleugels a kol. (2005) [45] použili doutnavý výboj za atmosférického tlaku (APGD, He + O₂, 0,5 W/cm³, 70 °C) s frekvencí 460 kHz k inaktivaci biofilmu gram negativní bakterie *Pantoea agglomerans*. Biofilm byl kultivován po dobu 12 nebo 24 hodin na syntetické membráně, která měla simulovat růst bakterií na rostlinných tkáních. Pro opracování použili vzdálené plazma, vzhledem k tomuto nastavení předpokládají jako hlavní inaktivační mechanismus reaktivní částice, konkrétně atomární kyslík a radikál OH. V případě 12-ti hodinové kultury dosáhli redukce 2 log CFU za 10 min a 3,5 log CFU za 60 min, u 24-ti hodinové kultury pak 1,5 log CFU za 10 i 60 min. Autoři testovali samotný vliv UV u 12-ti hodinové kultury, dosáhli inaktivace 0,8 log CFU za 60 min. Vliv plazmatu na povrch potravin testovali s ohledem na barevnou změnu a dehydrataci potravin. Pro tyto účely použili zelené, červené a žluté kápie. Jako referenční vzorky použili vzorky exponované neionizovanému plynu a vzduchu. Spektrofotometricky ani vizuálně nezaznamenali žádné změny [45].

Boudam a kol. (2006) [36] pro inaktivaci mikroorganismů použili DBD v Townsendově módu (podrobnější popis viz [64]) ve směsi N₂-N₂O. Ukázali, 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. Jak kontrolní mikroorganismus byl použit *Bacillus subtilis*. Během expozice 10 min dosáhli inaktivace 5 log CFU [36].

Ohkawa a kol. (2006) [22] navázali na práci prezentovanou Akitsu a kol. [13], pokračovali ve studiu sterilizačních účinků APG buzeného při 27,12 MHz. Výboj pracoval v pulzním módu, důvodem byla snaha kontrolovat teplotu neutrálního plynu. Jako pracovní plyn použili helium s příměsí O₂. Škálu testovaných mikroorganismů rozšířili o plíseň *Aspergillus niger*. Tento článek shrnuje experimentální výsledky při hledání optimální délky pulzu, tak aby teplota neutrálního plynu nepřesáhla 90 °C a byl zachován maximální

inaktivační účinek. Jako optimální se ukázala délka pulzů 10 μ s, při delších časech již teplota neutrálního plynu výrazně přesahovala 90 °C [22].

P. Muranyi a spol. (2007) [11] navázali na práci prezentovanou Heise a kol. [21]. Testovali inaktivační účinnost nově vyvinutého CDBD s 282 nm excimerní 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/cm². Inaktivační účinek CDBD se pro každý mikroorganismus a jeho formu lišil. Obecně lze říct, že inaktivace většiny vegetativních buněk nastala již po 1 s působení plazmatu, v případě vysoce rezistentních spor bylo potřeba výrazně delších časů. Spory plísně *Aspergillus niger* se ukázaly jako nejodolnější, což vzhledem k jejich vysoké odolnosti vůči působení UV potvrzuje dominantní roli UV záření [11].

Kayes a kol. (2007) [15] navázali na předchozí práci prezentovanou Kelly-Wintenberg a kol. [14] a Gadri a kol. [20] a studovali sterilizační účinky OAUGDP na alimentární patogeny, současně vyhodnocovali možný vliv dalších parametrů (růstové teploty, pH a stáří kultury) na celkovou inaktivaci. Jako kontrolní mikroorganismy použili gram negativní *Escherichia coli O157:H7*, *Salmonella Enteritidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri* a gram pozitivní *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*. Jako nosné médium použili agar (pH 5 nebo 7) nanesený na podložní sklíčko. Vzorky byly exponovány okamžitě po nanesení na agar nebo po 24 hodinové inkubaci při 10°C nebo 35°C. Obecně k největší redukci cca 3-6 řádů (původní koncentrace 10⁶-10⁷ CFU/ml) docházelo při expozicích 30 s v případě vzorků exponovaných ihned po inokulaci a 90 s v případě 24 hodinových kultur. Patogeny, které byly před expozicí plazmatem inkubovány po dobu 24 hodin, vykazovaly vyšší rezistenci vůči plazmové inaktivaci oproti vzorkům opracovaným bezprostředně po nanesení. Vyšší teploty inkubace vedly k vyšší rezistenci k plazmovému opracování, důvodem byl nárůst populace o cca 2-3 řády, tato nová biomasa mohla odstiňovat účinky aktivních částic plazmatu. Autoři nepozorovali výrazný rozdíl mezi gram pozitivními a gram negativními bakteriemi s výjimkou sporulující bakterie *B. cereus*, která vykazovala vyšší odolnost [15] Tento výsledek je v rozporu s výsledky, které tato skupina prezentovala v práci Kelly-Wintenberg a spol. (1998) [14].

Schwabedissen a kol. (2007) [48] prezentovali systém pro sterilizaci předmětů balených uvnitř vzduchotěsných pevných nebo pružných obalů. Pro inaktivaci používali povrchový DBD výboj. Konfigurace zařízení byla taková, že nabitě elektrody s napětím několika kHz byly nalepeny z vnější strany obalu a třetí kapacitně vázaná elektroda byla situována uvnitř balíčku. Výboj byl generován mezi vnějšími elektrodami a vnitřní elektrodou s napětím o amplitudě 4 kV a výkonem 2-4 W. Hlavním principem sterilizace/dekontaminace v této konfiguraci byl ozón, který byl generován ze vzduchu zachyceného uvnitř balení. Množství ozónu bylo závislé na typu plynu uvnitř balení, geometrii elektrody, napětí (AC/DC, frekvence, apod.) dodávaného do systému a ztrátových mechanismech (formování NO_x). Baktericidní účinky prokázali na gram pozitivní bakterii *B. subtilis* nanesené na papírových páscích uzavřených v Petriho miskách. Během 10 min dosáhli inaktivace 4 log CFU (původní koncentrace 10⁶-10⁷ CFU). Další testy provedli na balených hadičkách na dialýzu a potravinách (rajčata, jahody) [48].

Morgan a kol. (2008) [26] prezentovali výsledky sterilizace kvasinek *Saccharomyces Cerevisae* a *Mrakia Frigida* v DBD výboji (1-30 kV, 1kW výkon, frekvence 50 Hz). Výboj byl buzen v argonu nebo kyslíku. Mikroorganismy byly nanášeny na skle, počáteční koncentrace byla cca 10^4 CFU/ml pro plazmové opracování, pro sterilizaci v ozónu 10^5 CFU/ml. Autoři studovali vliv použitého plynu a proudu (0,4; 0,8 a 1,0 mA) na mikroorganismy. Pro srovnání použili ke sterilizaci také samotný ozón. Při použití O_2 dosáhli úplné inaktivace obou mikroorganismů během 10 min, zatímco v argonu potřebovali časy 15 min v případě *M. Frigida* resp. 20 min v případě *S. Cerevisae*. Za klíčový mechanismus inaktivace při použití O_2 plazmatu považují autoři O_3 , vysvětlení odůvodňují shodnými hodnotami D s hodnotami dosaženými při expozici vzorku jen O_3 . V případě argonu jako dominantní mechanismus uvádějí akumulaci náboje na povrchu buněk v důsledku dopadu nabitých částic. Elektrostatický potenciál je nepřímouměrný poloměru zakřivení povrchu, *M. Frigida* disponuje menším poloměrem buněk, tím také autoři vysvětlují lepší výsledky pro tento mikroorganismus. V obou případech také autoři zmiňují podíl leptání na inaktivaci [26].

Fridman a kol. (2008) [19] prezentovali výsledky dosažené pomocí FE-DBD výboje (floating-electrode DBD) na vzduchu. Živá tkáň/orgán byl zde použit jako druhá elektroda s plovoucím potenciálem. Hustota výkonu na povrchu byla $0,5-1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, výboj byl použit v pulzním módu s dobou pulsu 30-100 ns. Testované mikroorganismy byly směs kožní flóry získané z odumřelé kůže: *Staphylococcus*, *Streptococcus* a kvasinky. Hustota mikroorganismu se lišila dle pacienta a místa odběru vzorku od cca 10^7-10^9 CFU/ml. Přímé opracování plazmatem vedlo k redukci o cca 6 řádů do 5 s, u nepřímého opracování bylo dosaženo stejných výsledků za cca 120 s a déle. Mimo to testovali dopad (toxicitu) plazmového opracování na samotnou tkáň, jako první byla účinkům vystavena odumřelá kůže, další experimenty byly provedeny na myších SKH1 a prasatech. V případě neživé tkáně nebyla ani po 5 minutách plazmového opracování patrná žádná změna. V případě myši byla měněna hustota výkonu a délka expozice, s cílem stanovit maximální možnou dávku (výkon/čas). V případě potřeby delších expozičních časů, byla stanovena maximální expoziční dávka $0,6 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}/10 \text{ min}$, pro krátké expozice pak dávka $2,3 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}/40 \text{ s}$. Tyto výsledky byly dále testovány na prasatech. V další části tohoto přehledového článku autoři prezentovali možnosti využití netermálního plazmatu pro podporu koagulace krve, léčbu nádorových onemocnění, povrchových ran a kožních nemocí apod. U těchto aplikací také uvádli výsledky dosažené pomocí jimi navrženého FE-DBD [19].

Hong a kol. (2008) [32] prezentovali výsledky sterilizace gram negativní bakterie *E. coli* a endospor gram pozitivní bakterie *B. subtilis*. Sterilizaci realizovali v RF výboji s frekvencí 13,56 MHz a výkonem 75 W. Výboj hořel mezi dvěma elektrodami – jedna perforovaná, skrze štěrby byl přiváděn plyn mezi elektrody, druhá elektroda pokrytá dielektrikem byla uzemněná, na ní pokládali vzorek. Jako pracovní plyn používali směs helia a kyslíku (0-2 %). Mikroorganismy byly nanášeny na krycí sklíčko (10^6-10^5 CFU/ml). Vzorky exponovali přímo nebo překryté křemenným či normálním sklíčkem. Intenzitu O radikálu (777,1 nm) vyhodnocovali pomocí OES. Autoři zjistili přímou úměru mezi koncentrací O radikálu a efektivitou sterilizace. Tyto radikály hrály dle autorů při sterilizaci klíčovou roli. Maximální intenzitu tohoto radikálu získali při koncentraci 0,2 % O_2 , těmto podmínkám odpovídal nejnižší počet přeživších mikroorganismů. Pro *B. subtilis* dosáhli redukce 5 log CFU za 120 s. Když vzorky překryli křemenným sklíčkem, dosáhli za stejný čas redukce jen 1 log CFU, s normálním sklíčkem nepozorovali žádné změny. Na základě těchto výsledků mohli

předpokládat minoritní podíl UV záření a zcela zanedbatelný příspěvek teploty k celkové inaktivaci v případě spor *B. subtilis*. V případě *E. coli* prezentovali autoři výsledky při 1% koncentrace O₂ úplná redukce (6 řádů) za 60 s, 2% koncentrace O₂ úplná redukce za 120 s. Analýza morfologických změn buněk v důsledku plazmového opracování pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) ukázala těžké poškození cytoplazmatické membrány a únik chromozomu [32].

Klockow a kol. (2009) [39] využívali DBD generované na vzduchu (frekvence 60 Hz, napětí 12 kV, výkon plazmatu 40 W, expozice 5 min) ke sterilizaci špenátových listů balených v polyethylenových sáčcích. Jako bioindikátor použili gram negativní bakterii *E. coli* O157:H7 (koncentrace 7,6 log CFU/list). Hlavním inaktivačním mechanismem byl v tomto případě ozón, který byl generován po umístění vzorků mezi elektrody. Autoři hodnotili vliv použitého plynu uvnitř sáčku (vzduch, O₂), teploty (5 a 22 °C) a délky skladování (0-24 hod) na inaktivaci. Dále pak vyhodnocovali vliv opracování na kvalitu špenátových listů, resp. změnu jejich barvy. Zatímco inaktivace se zvyšovala s dobou skladování, vliv teploty byl minimální. Maximální inaktivace 5,6 log CFU dosáhli po 24 hodinách pro sáčky naplněné kyslíkem, v případě vzduchu dosáhli inaktivace jen 4 log CFU. Avšak toto bylo provázeno výrazným snížením kvality špenátových listů [39].

Song a kol (2009) [4] využívali kapacitně vázaný systém buzený v He s frekvencí 13,56 MHz k inaktivaci gram pozitivní bakterie *Listeria monocytogenes* inokulované na krájeném sýru a šunce. Studovali vliv výkonu (75-150 W), délky expozice (60, 90 a 120 s) a typu potravin na inaktivaci. Autoři zjistili, že inaktivační účinky jsou silně závislé na typu potravin, zatímco pro sýr dosahovali při expozici 120 s redukce pro jednotlivé výkony 1,7-8 log CFU (původní koncentrace 10⁸ – 10⁹ CFU/g), tak v případě šunky to bylo jen 0,25-1,73 log CFU. Horší výsledky u šunky mohou být způsobeny hrubým povrchem ve srovnání se sýrem. Mikroorganismy se tak mohly uchytit ve strukturách na povrchu a vyhnout se antimikrobiálnímu ošetření. Dále zjistili, že při skladování vzorků (1-3 týdny) docházelo k dalšímu poklesu koncentrace mikroorganismů [4].

Moon a kol. (2009) [40] patří do stejné jako skupiny jako Song [4]. V této práci využívali navržené RF zařízení k inaktivaci mikroflóry lidské tkáně a modelové tkáně vepřového masa. Při aplikaci plazmatu na živé tkáně je nutno zaručit nízký proud (maximální hodnota proudu 5-10 mA byla prokázána jako neškodná dávka s ohledem na fyziologický efekt) a nízkou teplotu plynu, tento fakt se autoři snažili při experimentech zohlednit a současně dosáhnout maximální možnou dekontaminaci. Při výkonu 100 W procházel skrze spodní elektrodu se vzorkem masa proud jen 4 mA. Účinnost RF výboje testovali na mikroflóře rukou. Během 30 s inaktivovali většinu mikroorganismů. Vzhledem ke špatné kvantifikaci účinků použili pro další experimenty vepřové maso, které má stejný odpor (2-6 MΩ) jako lidská tkáň. Maso kontaminovali bakterií *E. coli* a výsledky srovnali se sterilizací UV lampou po dobu 1 min. Původní koncentraci 6,36 log CFU/g snížili pomocí plazmatu na 5,99 log CFU/g, zatímco pomocí UV jen na 6,12 log CFU/g. Mimoto studovali autoři kolorimetrické změny masa před a po expozici plazmatem (150 W, 1 min) a tepelně opracovaný vzorek po dobu 30 s při 100 °C (srovnatelnou s teplotou plynu při 150 W). Dle autorů plazma nezpůsobovalo termální poškození živých tkání. Na inaktivaci měli pravděpodobně hlavní podíl aktivní sloučeniny kyslíku. Autoři v emisních spektrech zaznamenali silnou intenzitu OH pásu a pásu excitovaného atomu O I (777 nm), dále pak zaznamenali emisi NO_γ - UVC oblast [40].

Jung a kol. (2009) [33] patří do stejné skupiny jako Moon a kol. [40] a Song a kol. [4]. K inaktivaci bakteriálních spór gram pozitivní bakterie *B. subtilis* (2×10^6 spór/ml, sklo) využívali RF výboj v kombinaci s katalyzátorem TiO_2 . Práce byla zaměřena na vliv katalyzátoru - koncentrace (0,5-10 mg/ml) a pozice (přímý či nepřímý kontakt s mikroorganismy) a podmínek výboje (plyn, výkon, UV, teplota) na průběh inaktivace. Lepší výsledky dosahovali při použití argonu jako pracovního plynu, za 120 s dosáhli redukce 4 log CFU, zatímco v heliu za stejných podmínek jen 1 log CFU. Přítomnost katalyzátoru snížila hodnotu D o cca 40 %. Jako hlavní mechanismus inaktivace plazmatem za daných podmínek autoři uvedli reaktivní radikály kyslíku, v přítomnosti katalyzátoru zaznamenali pomocí OES nárůst intenzity OH radikálu a excitovaného atomu kyslíku. Pomocí rentgenové difrakční analýzy (XRD), UV-VIS, Ramanovy a fotoluminiscenční spektroskopie diagnostikovali zvýšenou tvorbu defektů (kyslíkových děr) uvnitř TiO_2 v důsledku aplikace plazmatu, které podporovaly tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů v systému plazma/ TiO_2 . Jako optimální koncentraci stanovili autoři hodnotu 1mg/ml, nižší nebo vyšší koncentrace vedla buď k nedostatečné produkci reaktivních radikálů kyslíku či stínění mikroorganismů katalyzátorem. Autoři dále testovali plasma fotokatalytický jev při aplikaci jen UV fotonů emitovaných plazmatem, překrytím vzorků křemenným sklíčkem, nebo jen teplotě výboje (cca 180 °C), avšak jejich dopad na mikroorganismy byl zcela zanedbatelný [33].

Cooper a kol (2009) [43] studovali mechanismus sterilizace pomocí DBD s možným využitím této technologie pro sterilizaci materiálu vesmírných lodí. Pro dekontaminaci použili DBD výboj pracující na vzduchu s hustotou výkonu 1 W/cm^2 , vzorky byly přímo vystaveny účinkům výboje. Jako bioindikátor použili extremofilní bakterie *Deinococcus radiodurans*. Tato bakterie je vysoce odolná proti ionizujícímu záření (odolává radiačním dávkám až 5000 Gy beze změny, zatímco 60 Gy sterilizuje *E.coli*), teplotním změnám, reaktivním sloučeninám kyslíku a vakuu. Bakterie byla aplikována na korozivzdornou nerezovou ocel typu 316, část vzorků byla poté vysušena a část ponechána mokrá. Při experimentech dosahovali redukce 6 log CFU po 30 minutách expozice v případě suchých vzorků a u mokrých vzorků 4 log při expozici 15 s a déle. Jako důvod vyššího účinku DBD na mokré vzorky uvedla autorka peroxidaci fosfolipidů. Při interakci plazmatu s vodou docházelo k tvorbě hydrogen peroxidů a superoxidů, které při interakci s bakteriemi vedly k peroxidaci a tak k usmrcení buněk. Pomocí SEM bylo prokázáno také výrazné poškození struktury buněk a změnu jejich morfologie vlivem plazmatu, k jejich úplnému odstranění ovšem nedošlo. Teplota vzorků při opracování nepřesahovala 30 °C [43].

Yun a kol. (2010) [34] prezentovali výsledky sterilizace bakterie *Listeria monocytogenes* inokulované na jednorázové nádoby na jídlo – plastové tácky (polystyren), alobal a papírové kelímky. Pro inaktivace používali stejné zařízení a podmínky jako Hong a kol. [32]. Studovali vliv použitého výkonu (75-150 W), expoziční doby (60-120 s) a sterilizovaného materiálu na výsledek inaktivace. Mikroorganismy byly nanášeny na nosné médium v koncentraci 10^9 CFU/ml. V případě plastových tácek došlo k úplné sterilizaci již po 90 s expozice plazmatem při použitém výkonu 150 W, v případě dalších dvou materiálů bylo při stejném výkonu dosaženo redukce jen 3 řádů v čase 120 s. Hodnoty D_{10} (čas potřebný pro redukcii populace o 90 % resp. 1 log) pro stejnou kulturu nanášenou na různé materiály ukazovaly na výrazný vliv nosného média na výsledek inaktivace, nejvyšší hodnoty byly získány pro papír, následovala hliníková fólie a plastové tácky [34].

Kim a kol. (2010) [37] prezentovali výsledky sterilizace plátků slaniny inokulované grampozitivní bakterií *Listeria monocytogenes* a gramnegativní bakterie *Escherichia coli* a *Salmonella Typhimurium*. Pro ošetření použili stejnou aparaturu jako Song a kol. [4]. Pro opracování použili výkon 75, 100, 125 W a dobu expozice 60 nebo 90 s. Jako pracovní plyn použili helium (10 lpm) nebo směs helium + kyslík (10 sccm). Zjistili, že inaktivační účinky rostou s délkou expozice a výkonem. Při výkonu 125 W a době expozice 90 s dosáhli redukce 1-2 log CFU v He, resp. 2-3 log CFU ve směsi He + O₂ (původní koncentrace 10⁷-10⁸ CFU/g). Dále vyhodnocovali vliv plazmatu na fyzikálně-chemické vlastnosti slaniny. Měřili změnu pH, koncentrace TBARS (reaktivních sloučenin kyseliny thiobarbiturové), barvy a morfologie. V případě pH, morfologie a vizuálního hodnocení barevnosti nezaznamenali žádnou změnu. Optické měření ukázalo mírný pokles světelné složky L (definuje světlost), zde autoři citovali práci jiných autorů, kteří vysvětlují pokles L složky v souvislosti se ztrátou vlhkosti [37].

Joshi a kol. (2010) patří do stejné skupiny jako Fridman a kol. [19]. Pomocí navržené FE-DBD aparatury pracující na vzduchu (hustota výkonu 0,13 W/cm²) inaktivovali původce nozokomálních infekcí. Jako modelové mikroorganismy zvolili různé kmeny grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* (MSSA - methicillin citlivý i MRSA - methicillin-rezistentní) a gramnegativní bakterie *Escherichia coli*. Pro vyhodnocení viability mikroorganismů používali plotnovou metodu, LIVE/DEAD a XTT fluorescenční metodu a barvení safraninem. Autoři testovali inaktivační účinky zařízení na všech typech vzorků - vrstva mikroorganismů povrchu skla (10⁹ CFU/ml), planktonní buňky v roztoku PBS a biofilm. Roztok mikroorganismů byl vystaven účinkům plazmatu přímo či nepřímo, kdy byla exponována jen kapalina PBS a bezprostředně poté aplikována na vzorek mikroorganismů. V případě planktonních mikroorganismů dosahovali úplné redukce při době expozice do 60 s. *E. coli* projevila malinko vyšší citlivost než *S. aureus*. V případě vrstvy mikroorganismů na skle dosáhli 100 % redukce do 120 s. Úplné redukce v případě biofilmů bylo dosaženo do 120 s. Mezi jednotlivými kmeny MRSA zaznamenali autoři rozdíly v citlivosti [30].

Leipold a kol. (2010) [42] používali DBD pro dekontaminaci rotačního kruhového nože (průměr 450 mm, rychlost 3,6 s) používaného pro krájení v masném průmyslu. Pro plazmové ošetření obou stran nože bylo DBD umístěno na obou stranách nože a nůž sloužil jako uzemněná elektroda. Rozměry elektrody byly 100 x 100 mm² a vzdálenost elektrod od nože byla 2-4 mm. Frekvence výboje byla 21.7 kHz a napětí s amplitudou 10.4 kV, což odpovídalo výkonu 0.36 kW. Pro dosažení nižších výkonů (1.8 W, 3.6 W) používali pulzní režim. Pro experimenty použili nepatogenní grampozitivní bakterií *L. innocua* jako zástupce *Listeria monocytogenes*. Při výkonu 0.36 kW dosahovali redukce 5 log během 340 s (t.j. cca 41 s přímé expozice plazmatem, vzhledem k tomu, že plocha výboje pokrývala jen 12,2 % kruhového nože). Na základě výsledků pro různé výkony a srovnáním s pracemi jiných autorů navrhli autoři jako hlavní mechanismus dekontaminace v tomto nastavení experimentu chemické reaktivní částice, v případě vyššího výkonu pak minoritní vliv elektrostatických sil [42].

Leipold a kol. (2011) [28] prezentovali výsledky sterilizace předmětů uzavřených v polyethylenových sáčcích (LDPE), jako možnou alternativu pro sterilizaci např. balených potravin. Pro dekontaminaci použili DBD výboj generovaný na vzduchu s frekvencí 25 kHz. Při koncepci tohoto experimentu sloužil DBD spíše jako generátor ozónu, neboť sáčky se vzorky byly naplněny směsí plynů 97,5 obj.% Ar, 2,5 obj.% O₂. Zjišťovali vliv použitého

výkonu (0,6, 2,55 a 9,92 W) na koncentraci ozónu. Pro další experimenty pak zvolili autoři nejvyšší výkon, při němž dosáhli maximální koncentrace ozónu 140 ppm v nejkratším čase tj. 30 s. Dále zjistili, že pokles koncentrace O₃ s časem byl vyšší při zapnutém výboji než při výboji vypnutém. Mimo O₃, měřili dále koncentraci O₂ a CO₂ při zapnutém výboji. Zatímco koncentrace O₂ po 120 s výboje začínala klesat, tak naopak koncentrace CO₂ rostla po cca 300 s výboje. Všechny tyto popsané procesy autoři vysvětlili reakcí ozónu s polymerním materiálem, případně tvorbou radikálů na povrchu polymeru např. při reakci energetických iontů Ar⁺, ty pak vstupovali do reakce s ozónem případně atomárním kyslíkem, apod. Tyto poznatky byly také potvrzeny při dekontaminaci gram pozitivní bakterie *Listeria innocua*. Bakterie byla inokulována na skleněná podložní sklíčka, ty byly uzavřena do LDPE sáčků, které byly poté naplněny uvedenou směsí plynů. Takto připravené vzorky byly vystaveny přímému účinku DBD. Během 5 min byla dosažena redukce 5 log CFU, po 15 min redukce 6 log CFU [28].

Rød a kol. (2011) [38] touto prací navázali na práci Leipold a kol. [28]. Prezentovali využití DBD výboje k dekontaminaci krájených masných výrobků určených pro okamžitou spotřebu. Pro opracování použili DBD s frekvencí 27,8 kHz. Jako bioindikátor použili gram pozitivní bakterii *Listeria innocua* (zástupce alimentární bakterie *Listeria monocytogenes*). Inokulované vzorky breasoly (sušené hovězí maso) byly uzavřeny v LLDPE (linear-low-density-polyethylene) sáčcích obsahujících 30 % kyslíku a 70 % argonu a nepřímo exponovány plazmatem při výkonech 15,5, 31 a 62 W po dobu 2-60 s. Při těchto podmínkách dosáhli redukce od 0,8-1,6 log CFU/g bez výrazného vlivu délky a intenzity opracování, původní koncentrace byla cca 6 log CFU/g. Při opakovaném opracování po dobu 20 s s 10 min přestávkami při výkonech 15,5 a 62 W dosáhli autoři po třech cyklech redukce 1,5 resp. 1,6 log CFU/g. Hlavním mechanismem zde byl pravděpodobně vzhledem ke složení plynu ozón. To také dle autorky vysvětlovalo lepší účinky při opakovaném opracování s 10 minutovými intervaly, což byla při daných podmínkách cca životnost ozónu. Mimoto sledovala autorka vliv plazmového opracování na chuť a barvu balených vzorků masa. Pro změnu chutě měřili koncentraci reaktivních sloučenin kyseliny thiobarbiturové, zde zaznamenali mírný nárůst s rostoucím výkonem a délkou expozice, nicméně hodnoty byly pod senzorickou hladinou. V případě barvy zaznamenali 40 % resp. 70 % pokles červenosti po 1 resp. 14ti dnech uložení bez ohledu na expoziční podmínky [38].

Zimmermann a kol. (2012) zkoumali baktericidní účinky studeného atmosférického plazmatu (ACP) přes různé porézní překážky (Tyvec, Kimberly-Clark Kimguard KC100, obvazová gáza a papírová obálka). Motivací bylo praktické využití této technologie při sterilizaci zabalených předmětů či krytých povrchů (rány překryté obvazem) apod., což otevírá široké pole aplikací v oblasti medicíny, osobní hygieny a potravin. Výboj byl generován na povrchu SMD (surface microdischarge electrode) pomocí AC napětí 6,3 kV, s frekvencí 6 kHz, spotřebovaný výkon byl 0,5 W·cm⁻². Jako bioindikátor použili gramnegativní bakterii *E. coli* nanesenou na agaru (9·10⁶ CFU/ml). Ukázalo se, že zkoumané textilní látky (i ty nepropustné pro bakterie) měly minimální účinek na baktericidní účinky plazmatu. Autoři dosáhli redukce mikrobiální kultury o 5-6 log CFU za 60-120 s v závislosti na materiálu, skrz který docházelo k penetraci, a vzdálenosti mikroorganismu od elektrody, ve srovnání s přímou expozicí 2 x nižší účinek. Dále umístění látky přímo na elektrodu evidentně vedlo k produkci plazmatu na povrchu textilie, takže pak nedocházelo k redukcí baktericidních účinků plazmatu. Na základě dosažených výsledků navrhli 1D analytický

model difuzního transportu částic plazmatu k sterilizovanému povrchu skrz porézní překážku [27].

2.2.3 Plazmové trysky, tužky

Dalšími často používanými zdroji jsou plazma jety pracující za atmosférického tlaku tzv. APPJ (atmospheric pressure plasma jets). Jedná se o netermální kapacitně vázané plazmové zdroje s frekvencemi 13,56 a 27,12 MHz. Většinou se skládají ze dvou elektrod v různých uspořádáních (koaxiální, prstencové, jednopólové či dvoupólové uspořádání) mezi nimiž proudí velkou rychlostí plyn. Vzdálenost elektrod je v rozsahu několika mm. Jedna z elektrod je většinou uzemněná a druhá nabitá. Volné elektrony jsou urychleny RF polem a vstupují do kolizí s molekulami okolního plynu. Tyto neelastické kolize produkují celou řadu reaktivních částic (excitované atomy a molekuly, volné radikály) které vstupují do trysky s velkou rychlostí. Reaktivní částice mohou tak reagovat s kontaminovanými povrchy umístěnými v blízkosti trysky (cm) [7]. V závislosti na použitém plynu a vzdálenosti elektrod je typické používané zápalné napětí v rozsahu 100 V-kV, a tedy spotřebovaný výkon až 500 W. Typické procesní plyny jsou vzácné plyny jako je helium nebo argon, nicméně mohou být používány i směsi jiných plynů. Teploty plynu dosahují díky vysoké rychlosti plynu a relativně malé spotřebě energie teploty kolem 350 K. APPJ mohou být použity v přímém nebo vzdáleném módu, avšak většina aplikací je v přímém módu [56]

Hlavní výhodou APPJ je jejich malý rozměr v kombinaci se schopností penetrovat do malých štěrbin. Díky těmto vlastnostem jsou vhodnou volbou při plazmových aplikacích orientovaných na komplexní geometrie (mikrostrukturní kavity, kapiláry). Malý rozměr vyfukovaného výboje je velkou výhodou pro přesné opracování citlivých míst. Z toho důvodu jsou APPJ často využívány pro biomedicínské aplikace. Na druhou stranu malý rozměr výboje představuje nevýhodu v případě velkých ploch a 3D předmětů. Pro tyto aplikace je nutno kombinovat několik zdrojů APPJ. Nevýhodou je velký průtok plynu u těchto zařízení s ohledem na používání vzácných plynů. [56]

V následujícím přehledu jsou shrnuty práce věnující se mikrobiální inaktivaci s využitím APPJ.

Brandenburg a spol. (2007) [35] použili pro inaktivaci RF netermální plazma jet s frekvencí 27,12 MHz, výkon se měnil v rozmezí 10-60 W. Výboj hořel za atmosférického tlaku v argonu. Teploty substrátu se pohybovaly dle zvoleného výkonu a průtoku plynu v rozmezí 35-95 °C. Jako bioindikátory byly použity spóry *Bacilla atrophaea* a vegetativní buňky *Escherichia coli* nanesené na PE fólii. Výboj byl analyzován OES, která prokázala přítomnost reaktivních částic kyslíku, konkrétně atomární O, OH a NO molekuly, které jsou zodpovědné za emisy 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 bakteriálních spor dosáhli redukce 4,3 log CFU/vzorek za 7 min (původní koncentrace $2 \cdot 10^6$ CFU/vzorek) a v případě vegetativních buněk *E. coli* redukce 3,8 log CFU/120 s (původní koncentrace $5 \cdot 10^5$ CFU/vzorek) [35].

Ehlbeck a spol. (2008) [23] patří do stejné skupiny jako Brandenburg a kol. [35]. Představili uspořádání APPJ k inaktivaci katetrů a 3D předmětů. RF výboj hořel s frekvencí

27,12 MHz v argonu nebo argonu s 25 % příměsí vzduchu, výkon byl 10 W. Inaktivační účinky testovali na vzorcích katetrů inokulovaných vegetativními buňkami grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus*. Redukce 5 log CFU byla dosažena v čistém argonu, při použití příměsí vzduchu pak 6 log CFU. Inaktivace byla dle autorů výsledkem společného působení excitovaných reaktivních částic, částečně asistované UV a VUV zářením, teplotou a nízkomolekulárními chemickými produkty. Dále prezentovali výsledky interakce RF plazma jetu s hydratovanými povrchy a případný vliv na mikroorganismy. Při opracování vody (1 ml) plazma jetem docházelo po určité době k poklesu pH, výsledkem čehož byl antimikrobiální účinek acidifikované vody. Pokles pH vysvětlili vznikem HNO₃ buď reakcí molekul NO₂ s radikály OH, kyselina dusičná se pak rozpouští ve vodě, případně NO₂ reaguje přímo s vodou za vzniku HNO₃ a HNO₂. Korelaci mezi acidifikací a antimikrobiálním účinkem ukázali na sporách *Bacillus atropheus*. Při pH < 5 docházelo k výraznému poklesu populace *B. atropheus* v roztoku, při pH = 2 dosáhli redukce 6 log CFU [23].

Poiata a kol. (2009) [25] používali APPJ generovaný v He s frekvencí 1,6 kHz a napětím 9 kV pro inaktivaci grampozitivní bakterie *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*; gramnegativní bakterie *E. coli* a kvasinky *Candida albicans*. Mikroorganismy na agaru (10⁸ CFU/ml bakterie a 10⁷ CFU/ml kvasinky) byly vystaveny účinkům APPJ a po inkubaci byla vyhodnocena inhibiční zóna. Autoři studovali vliv vzdálenosti mezi elektrodami (2,5 a 3,5 cm) a délky expozice (25-100 s). Nejcitlivější na plazmové opracování byla bakterie *Staphylococcus aureus*, u které autoři změřili velikost inhibiční zóny v rozmezí 5,5-16,5 cm při expozičních časech 25-100 s, dále pak následovali *E. coli* a *C. albicans* s průměrem inhibiční růstové zóny 1,5-6,5 cm, nejhorší výsledky pak vykazoval *B. subtilis* s průměrem 0-3,3 cm. Při vzdálenosti 2,5 cm a časech delších než 100 s autoři popsali tzv. saturační jev, kdy se zvyšováním délky expozice již nedocházelo k růstu inhibiční zóny, tento jev nebyl popsán pro vzdálenost 3,5 cm, kdy i nadále docházelo k růstu inhibiční zóny s růstem délky expozice. Lepší výsledky pro větší vzdálenost elektrod autoři připisují faktu, že při inaktivaci převládaly netermální procesy. OES dále prokázala přítomnost ozónu při vzdálenosti elektrod 3,5 cm, zatímco při kratší vzdálenosti nikoliv, předpokládají tedy, významný podíl ozónu při inaktivaci. Dále se již spektra nelišila. Autoři v diskusi navrhlí, že na usmrcení buněk se podílí jak fyzické poškození buněk vlivem dopadu iontů z plazmatu, tak také chemické reakce buněk s ozónem, atomárním kyslíkem apod [25].

Deng a kol. (2010) [65] využili APPJ generované v Ar nebo směsi Ar + O₂ generované s frekvencí 10-40 kHz a napětím 9,9 kV k inaktivaci pozitivní bakterie *Bacillus subtilis* nanesené na PTFE (cca 10⁶ CFU). V argonu dosáhli inaktivace 2 log CFU během 60 s, dále se již koncentrace moc neměnila. Ve směsi Ar + O₂ dosáhli za stejný čas inaktivace 4 log CFU, k úplné inaktivaci došlo při expozici 180 s. Kombinací výsledků OES, SEM, kolorimetrického stanovení uvolněného proteinu (brilantní modř coomassie, 595 nm), koncentrace MDA (malondialdehyd - konečný produkt peroxidace lipidů) a vystavení vzorků mikroorganismů odděleně teplotě (exikátor, 20-80 °C) a UV (křemenné sklo) dospěli autoři k závěru, že dominantní mechanismus inaktivace je působení nabitých částic a reaktivních sloučenin kyslíku [65].

Daschlein a kol (2010) [24] patří do stejné skupiny jako Brandenburg [35] a Ehlbeck [23]. Studovali baktericidní účinky APPJ na širokou škálu mikroorganismů *in vitro*. Motivací byla budoucí aplikace této technologie v oblasti medicíny pro ošetření chronických ran apod. Z toho důvodu pro *in vitro* model použili polotuhé médium (agar), které stejně jako prostředí

rány poskytovalo mikroorganismům dostatek vlhkosti a živin pro jejich růst a množení. Simultánní asepsi prováděli na grampozitivní bakterii - *Staphylococcus aureus* (MSSA – methicillin citlivý), *Enterococcus faecium*, β -hemolytický *Streptokok skupiny A*, gramnegativní bakterii - *Pseudomonas aeruginosa* a kvasince *Candida albicans*, které jsou velmi častými kolonizátory ran a původci infekcí. Plazma bylo generováno v argonu s napětím v rozsahu 1-5 kV a frekvencí 1,5 MHz, pro opracování použili délku trysky 7 mm (max. 12 mm) ve vzdálenosti 1 mm od vzorku, teplota plynu v tomto místě byla cca 40 °C. Při inaktivaci jednotlivých makroskopických kolonií MSSA zjistili, že po 60 s již nedochází k růstu MSSA, APPJ navíc způsobilo výrazné narušení kolonií. Pro opracování celých Petriho misek použili meandrický pohyb trysky nad miskou, vzorky byly vystaveny plazmatu po dobu 3 x 2 min, takto došlo k ošetření plochy 55 cm² za 6 min. Před ošetřením byly vzorky ponechány 60 min při 37 °C inkubovat. Při této konfiguraci dosahovali redukce 1,9-4 log CFU dle typu mikroorganismu (citlivost sestupně *P. aeruginosa*, β -hemolytický *Streptokok skupiny A*, MSSA, *C. albicans* a *E. faecium*). Jeden z důvodů rozdílu ve výsledcích pro různé mikroorganismy uvedli nepravidelnost povrchu agaru a tudíž nestejně opracování ve všech místech, také tvar a hustota kolonií vykazovali rozdíly. Při OES zaznamenali autoři vysoké intenzity OH radikálů, které navrhli jako možný inaktivační mechanismus. Záření v UVC oblasti při této konfiguraci nezaznamenali [24].

Chiang a kol. (2010) [16] prezentovali výsledky inaktivace gramnegativní bakterie *E. coli* a grampozitivní bakterie *B. subtilis* nanesené na živném médiu pomocí APPJ. Výboj byl buzen v prostředí N₂, O₂ nebo stlačeného vzduchu, sterilizace pak probíhala v dohasínajícím plazmatu plazmové trysky. Výboj byl buzen s frekvencí 30 kHz, výkon dodávaný do plazmatu byl 300 W. Vliv výboje na mikroorganismy byl studován s hlediska délky expozice, použitého plynu a vzdálenosti vzorku od zdroje plazmatu (4-20 mm). Při použití stlačeného vzduchu nebo kyslíku a vzdálenosti 20 mm od zdroje dosáhli redukce cca 7 log CFU/ml během 18ti „scanů“ (celková expoziční doba 1,8 s) pro oba mikroorganismy s tím, že účinnější z obou plynů byl vzduch. Jako hlavní inaktivační mechanismus uvedli působení ozonu, s tím že v případě vzduchu předpokládali také případný příspěvek reaktivních sloučenin dusíku např. NO₂. V dusíku bylo za stejných podmínek dosaženo redukce pouze 10-20 %. Jako hlavní mechanismus uvedli UV záření emitované NO_γ molekulovým systémem, avšak dle autorů při interakci se vzduchem docházelo k jeho výraznému útlumu. SEM analýza mikroorganismů neprokázala žádné výrazné poškození buněk, jen u *E. coli* zaznamenali autoři drobné morfologické změny. Mimo výsledky inaktivace prezentovali autoři výsledky elektrické a optické diagnostiky plazmatu (OES – UV, VIS; absorpční spektra – IR) a teplotní charakteristiku dohasínajícího výboje. Nejvyšší teploty byly naměřeny pro dusík (27-71 °C) [16].

2.2.4 Mikrovlnný výboj

Ve srovnání s DBD výboji jsou MW výboje buzeny bez elektrod. Princip buzení plazmatu spočívá v absorpci mikrovln elektrony. Ty získají dostatečnou kinetickou energii potřebnou k ionizaci těžkých částic skrze neelastické kolize. To ve výsledku vede k nárůstu koncentrace elektronů v kombinaci se zvýšením pohlcené energie [56].

Mikrovlny jsou zpravidla generovány magnetronem a jsou vedeny do reakční komory vlnovodem nebo koaxiálním kabelem. Magnetrony pracují v oblasti GHz frekvencí (obvykle 2,45 GHz). Typický spotřebovaný výkon je v rozsahu W-kW. Vlnovod je přímo spojen s rezonátorem nebo hlavicí výboje. Tato zařízení jsou speciálně navržena, aby indukovala

nejvyšší intenzity pole ve středu rezonátoru nebo ve špici výbojové hlavice. V závislosti na pohlceném MW energii se teplota neutrálního plynu pohybuje v rozsahu od pokojové teploty až několika tisíc kelvinů. Z toho důvodu je těžké tyto výboje přesně vymezit jako rovnovážné nebo nerovnovážné (přechodové plazma). Dle teplotní citlivosti materiálů lze s mikrovlnnými výboji pracovat v přímém nebo vzdáleném módu [56].

Hlavní výhodou MW výbojů je nepřítomnost elektrod, výboje mají často tvar hořáku a umožňují jednoduchou manipulaci. Výboje mohou hořet jak v prostředí vzduchu, tak i různých příměsí např. vodní páry. Zařízení pracují se středními rychlostmi průtoku plynu, řádově několik slm. V závislosti na použitém plynu dochází k produkci vysokého množství reaktivních částic (např. N_xO_y , O^3 , O_2^- , OH). Dosažitelné koncentrace pro NO jsou 2750 ppm a pro ozon 400 ppm. Při snížení MW výkonu až na 85 W a méně, pracuje výboj za přibližně pokojové teploty (300 K) a může být použit k přímému opracování termolabilních materiálů. Nevýhodou MW výbojů je jejich prostorové omezení. Pro přímé opracování velkých povrchů se musí stejně jako v případě APPJ použít kombinace několika zdrojů. Případně pro tyto účely použít vzdálený mód. [56]

V následující části jsou shrnuty studie o mikrovlnných výbojích používaných pro inaktivace mikroorganismů.

Kwon-Yong Lee, Park a kol. (2004) [31] využívali mikrovlnné plazma (2,45 GHz) buzené v argonu za atmosférického tlaku. Jako kontrolní mikroorganismy používali *E. coli* a methicillin rezistivní *Staphylococcus aureus* nanesené na skle. Inaktivace 6-ti řádů dosahovali při expozici 1 s. Jako hlavní inaktivační mechanismy uvedli volné radikály, UV záření a proces odprašování [31].

B. J. Park a kol. (2007) [66] pomocí mikrovlnného výboje (2,45 GHz) buzeného v argonu za atmosférického tlaku, inaktivovali *E. coli* (publikované Lee a kol. [31]) a lipopolysacharidy, k jejichž uvolnění dochází při poškození, nebo při rozpadu buněk *E. coli*. Lipopolysacharidy jsou známy jako původci řady patogenních onemocnění. Inaktivace *E. coli* dosahovali při 1 s opracování v plazmatu, k inaktivaci lipopolysacharidů pak bylo potřeba expozice 10 s [66].

Ehlbeck a spol. (2008) [23] prezentovali výsledky sterilizace vnitřních stěn PET lahvíček pomocí mikrovlnného výboje generovaného magnetronem (frekvence 2,45 GHz, výkon 1,7 kW) na vzduchu za atmosférického tlaku. Kontaminované lahve byly opracovány plazmatem ve třech cyklech, délka jednoho cyklu 550 ms a spotřebovaná energie 300 J/cyklus. Jako modelové mikroorganismy byly použity vegetativní buňky gramnegativní bakterie *E. coli*, grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus*, spory *Bacillus atropheus* a plísně *Aspergillus niger*. Inaktivace 5 až 7 řádů v závislosti na typu mikroorganismů dosahovali při expozicích plazmatu do 1,5 s. Jako mechanismy inaktivace uvedli UV záření, nízkomolekulární chemické produkty (hlavně NO), reaktivní částice kyslíku, teplo a zbytkový plyn NO_2 (vzniká z NO a O radikálů), který při následném promytí reagoval s vodou za vzniku HNO_2 nebo HNO_3 (viz výše). Autoři dále vyhodnocovali vliv délky prodlevy mezi inaktivací a následným promytím lahvíček na výslednou inaktivaci, chtěli tak poukázat na vliv acidifikace [23].

Ermolaeva a kol (2011) [9] zkoumali baktericidní účinky argonového hořáku. MW Výboj byl buzen v argonu s frekvencí 2,45 GHz a výkonem 85 W. Pro experimenty použili gram negativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia* a *Escherichia coli*;

gram pozitivní bakterie *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* a *Enterococcus faecium*. Mikroorganismy byly ošetřeny *in vitro* (vrstva na agaru, biofilm) a *in vivo* (hostitelská tkáň kryšního modelu). Při inaktivaci vzorků nanesených na agaru reagovali gramnegativní bakterie citlivěji na plazma, kompletní inaktivace všech gram negativních bakterií dosáhli autoři do 5 min. V případě gram pozitivních bakterií záleželo nejen na druhu, ale také na kmeni. Nejedolnější byla bakterie *S. pyogenes*, po 5 minutách zůstalo 17 % původní koncentrace. Jako jeden z důvodů rozdílné odezvy mikroorganismů autoři zmínili rozdíly ve složení buněčné stěny, nicméně s ohledem na rozdílnost mezi kmeny poukazují na složitější mechanismy (rozdíly ve složení lipidů a proteinů v membráně, celková odpověď mikroorganismu – stresové proteiny, apod.). Biofilmy *P. aeruginosa* a *B. cenocepacia* vykazovaly ve srovnání s planktonními buňkami vyšší odolnost, rozhodující vliv má tloušťka biofilmu. Při *in vitro* inaktivaci byly povrchové rány krysu kontaminované bakteriemi *P. aeruginosa* a *S. aureus* po třech dnech vystaveny 5 denní léčbě, při které byly vystaveny vždy 10 min/den účinkům argonového plazmatu. Po 3 dnech aplikace plazmatu došlo k úplné eliminaci *P. aeruginosa*, *S. aureus* byl v ráně identifikován ještě 8. den. U plazmatem opracovaných vzorků probíhalo hojení rychleji, po skončení expozice se však rychlost srovnala s neopracovanými vzorky. K úplnému uzavření rány došlo 13. den jak u plazmatem ošetřených vzorků tak i u kontrolních vzorků [9].

Fröhling a kol. (2012) [41] sledovali vliv nepřímého plazmového opracování na mikrobiální populaci a kvalitu čerstvého vepřového masa. Pro experimenty použili vepřovou svalovinu, kterou opracovali 4 dny po porážce a dále skladovali 16 dní při 5 °C. Plazma bylo generováno na vzduchu pomocí mikrovlnného výboje s frekvencí 2,45 GHz a výkonem 1,2 kW. Vzorky byly exponovány 2 x 2,5 (5 s výboj, 2,5 min expozice, 5 s výboj) a 5 x 2 min, teplota vzorku nepřekročila při opracování 20 °C. Zatímco u referenčních vzorků došlo k nárůstu populace mikroorganismů z cca 2 log CFU/g až na 9,69 log CFU/g, u vzorků exponovaných plazmatem zůstala koncentrace stejná jako na počátku i po 20 dnech od porážky. Vzorky byly dominantně osídleny druhem *Pseudomonas spp.* Mimo standardní vyhodnocení plotnovou metodou, která poskytuje informace výhradně o schopnosti buňky proliferovat, použili autoři pro analýzu viability mikrobiální populace průtokovou cytometrii (sondy proprium jodid - integrita membrány, karboxyfluorescein diacetát - buněčná aktivita). Opracované vzorky vykazovaly výrazný nárůst buněk s narušenou integritou membrány, u těchto buněk nicméně zaznamenali aktivitu cholinesterázy, ta však byla výrazně nižší než u neopracovaných vzorků. Při vyhodnocení dopadu plazmového opracování zjistili autoři změny pH, barvy i reflektanční a fluorescenční intenzity aromatických aminokyselin a NADH, které byly výraznější pro delší čas opracování [41].

2.3 Metody vyhodnocení interakce plazmatu s buňkami

Ve své podstatě interakce plazmatu s mikroorganismy je velmi komplexní záležitostí. Výsledný efekt ovlivňuje celá řada faktorů jako je typ mikroorganismu, typ vzorku a nosný materiál, hustota mikroorganismu, podmínky výboje, způsob expozice (přímá/nepřímá) atd. V případě bakterií se účinky plazmatu mohou dle dávky lišit od letálních (buněčná smrt), přes subletální (bakteriostatické v důsledku lehkého poškození buňky následované zastavením buněčného cyklu) až po neletální metabolické změny [6; 8]. V případě plísní a kvasinek nebyly tyto rozdílné účinky v literatuře popsány. Pro vyhodnocení účinků plazmatu je v odborných publikacích využita celá řada metod.

Zastoupení životaschopných neboli viabilních buněk v populaci je jednou z klíčových informací využívaných k hodnocení fyziologického stavu kultury. Nejčastější technikou stanovení životaschopnosti buněk je kultivace mikroorganismů na pevných médiích [67]. V odborné literatuře se vyskytují dva typy kultivačních metod vyhodnocení. Nejjednodušší, ale nejméně přesná, metoda vyhodnocení je kultivace opracovaného vzorku a následné vizuální hodnocení. Tento postup se často používá v případě tenkých filmů mikroorganismů nanesených na agaru. V důsledku plazmového opracování dochází k inhibici růstu mikrobů, vznikají tzv. **inhibiční zóny**, jejichž rozměry jsou pak změřeny. Tento způsob vyhodnocení používají např. [9; 25; 49; 68]. Další kultivační metodou je tzv. **plotnová metoda** stanovení počtu mikrobiálních buněk. Buňky ze vzorků jsou mikrobiologickými postupu převedeny do roztoku, tyto roztoky jsou zředěny tzv. desítkovým ředěním a vysazeny na živné médium. Metoda při vyhodnocení vychází z předpokladu, že z každé vitální buňky vyroste jedna kolonie. Výsledkem je počet životaschopných buněk tzv. CFU. Tato kvantitativní metoda je nejčastěji používanou metodou při vyhodnocování inaktivačních účinků plazmatu. Hodnoty CFU jsou vynášeny v semilogaritmickém měřítku v závislosti na délce opracování, vznikají tak tzv. inaktivační charakteristiky, popisující kinetiku inaktivačního procesu viz dále. Nevýhodou těchto metod je jejich časová náročnost.

Dalším používanou metodou je stanovení viability mikroorganismů pomocí **fluorescenční analýzy**. Principem metody je detekce životně důležitých funkcí (integrita cytoplazmatické membrány, aktivita esteras, respirace, apod.), které jsou sledovány pomocí selektivního značení fluorescenčními sondami. Většinou se jedná o kombinaci sondy živých buněk (např. SYTO 9, stanovení buněčné aktivity, zelená) a sondy mrtvých buněk (např. propidium jodid, stanovení integrity cytoplazmatické membrány, červená). Výsledkem této analýzy je procentuální zastoupení živých resp. mrtvých buněk. Výhodou této metody je její rychlost ve srovnání s kultivačními metodami [67]. Fröhling [41] také ve své práci uvedl, že neschopnost buňky proliferovat ještě není ekvivalentem buněčné smrti, buňka i přes neschopnost množit se může být ještě stále metabolicky aktivní, a tak i přes zdánlivou neaktivitu (prokázanou kultivací) může způsobovat nemoci nebo zkrátit životnost potravin. Použití fluorescenčního testu viability je popsáno v následujících publikacích [9; 30; 41]. Ve všech případech byl tento test použit na diagnostiku viability bakteriálních buněk v biofilmu.

Pro zhodnocení mechanického poškození buněk je nejčastěji používaná analytická metoda **mikroskopické pozorování** pomocí rastrovacího/transmisního elektronového mikroskopu (SEM/TEM) [20; 21; 22; 29; 31; 32; 34; 36; 43; 45][7; 65; 66]. Deng a kol. [65] tuto metodu doplňují využitím **briliantní modři coomassie** k detekci uvolnění proteinu do okolí v důsledku poškození a lýze buněk. Používaný je také **TBARS test** (thiobarbituric acid reactive substances) k detekci produktů peroxidace bakteriální buněčné stěny [51]. Principem je tvorba barevných produktů vznikajících reakcí malondialdehydu (MDA) s kyselinou thiobarbiturovou (TBA). Tuto metodu navíc použili Kim a kol. [37] a Rød a kol. [38] k detekci změny chutě plazmatem ošetřených potravin. Pro změnu chutě měřili koncentraci reaktivních sloučenin kyseliny thiobarbiturové. MDA, vzniká jako sekundární produkt oxidace polynenasycených mastných kyselin působením reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) [37].

Jak již bylo v úvodu zmíněno, při interakci plazmatu s buňkou nemusí vždy dojít k jejímu usmrcení, ale může dojít pouze ke změně životních cyklů buňky. Tento jev studoval např.

Laroussi [7]. Využil uhlíkový substrát Biolog GN2, pro vyhodnocení buněčných metabolitů a spotřeby živin.

2.4 Kinetika inaktivace - inaktivační křivka

Fyzikálně-chemické procesy, které se podílejí na inaktivaci mikroorganismu, lze identifikovat analýzou inaktivační křivky [69]. Jedná se o graf závislosti logaritmu počtu životaschopných mikroorganismů (CFU – colony forming units, [počet/ml]) na délce působení inaktivačního procesu. Velmi často může být sestrojena v semilogaritmickém měřítku, CFU je na logaritmické vertikální ose a čas je na lineární horizontální ose. Jednoduchá křivka ukazuje, že vztah mezi koncentrací životaschopných buněk a času je [8]:

$$\log[N_t / N_0] = -kt, \quad (1)$$

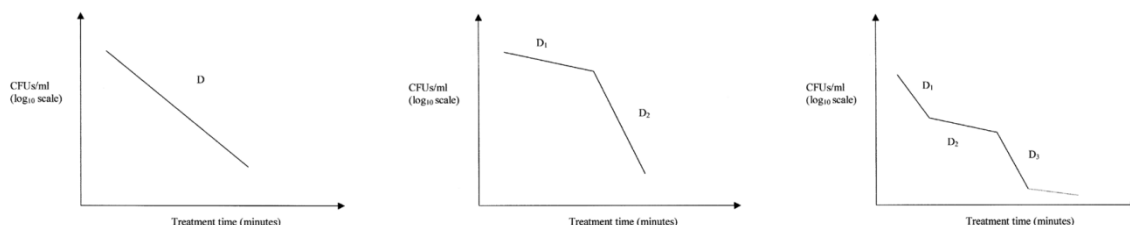
kde N_0 je počáteční koncentrace mikroorganismů, N_t je koncentrace životaschopných mikroorganismů po působení sterilizačního média po čas t , k je rychlostní konstanta inaktivace.

Často používaným parametrem je D (decimální hodnota). Hodnota D udává čas potřebný k inaktivaci 90 % původní koncentrace mikroorganismů (nebo-li čas k redukci 1 log CFU) [8],

$$D = t / (\log N_0 - \log N_t), \quad (2)$$

kde t je čas potřebný ke zničení 90% původní populace, N_0 je původní populace a N_s je životaschopná populace.

Výsledky různých skupin zabývajících se germicidními účinky studeného atmosférického plazmatu ukázaly, že inaktivační křivka může mít různý tvar (viz obrázek 3) v závislosti na typu mikroorganismu, nosném médiu a způsobu expozice (přímá, nepřímá).



Obrázek 3 Tvary inaktivační charakteristik [7]

Jednoduchou lineární křivku popsali ve své práci např. Becker a kol. [44] při inaktivaci spor bakterií *B. subtilis* a *B. stearothermophilus* pomocí mikroplazmatu ve He, He-N₂ nebo He-vzduch. Autoři výsledek připisovali dominanci jednoho mechanismu nebo spolupůsobení více mechanismů se stejnou kinetikou. V případě inaktivace biofilmu *Chromobacterium violaceum* získali křivku tvořenou dvěma lineárními částmi (tzn. dvě různé směrnice, dvě různé hodnoty D). Jednoduchý tvar křivky získali také Song a kol. [4] při sterilizaci *Listeria monocytogenes* na povrchu šunky pomocí DBD v heliu bez ohledu na použitý výkon (75, 100, 125, 150 W). Naopak při použití síry získali pro první dva výkony jednoduchou křivku a pro vyšší dva výkony získali dvousměrnovou charakteristiku. Závislost tvaru křivky na použitém proudu popsali také ve své práci Morgan a kol. [26] při inaktivaci kvasinek *Saccharomyces Cerevisiae* a *Mrakia Frigida* v DBD v argonu nebo kyslíku. Při proudech 0,8 a 1 mA získali jednoduchou křivku s jednou směrnici, zatímco při proudu 0,4 mA získali křivku

se dvěma směrnicemi. Toto vysvětlili nižší koncentrací argonových iontů a kyslíkových radikálů při nižších proudech, což vedlo k nedostatečnému leptání, a tak se aktivní částice plazmatu nedostaly k buňkám pod povrchem. Jednosměrníkovou křivku získali také Jung a spol. [33] při použití DBD výboje v kombinaci s TiO_2 k inaktivaci spor *B. subtilis*. Cooper a kol. [43] při inaktivaci bakterie *Deinococcus radiodurans* pomocí DBD na vzduchu získali jednoduchou křivku v případě suchých vzorků, v případě mokrých vzorků uvedli dvousměrníkovou charakteristiku. Laroussi a kol. [70] při studiu vlivu typu mikroorganismu (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) a nosného média (nitrocelulózný membránový filtr, agar) na inaktivaci pomocí GDAP (glow discharge at atmospheric pressure) ve směsi He + vzduch naměřili pro *E. coli* jednoduchou křivku bez ohledu na použité médium. Na druhou stranu v případě bakterie *Pseudomonas aeruginosa* získali v závislosti na nosném médiu křivku složenou ze dvou resp. tří částí. Jednosměrníková křivka byla dále popsána v pracích [32; 66; 3; 71; 72]. Křivku složenou ze dvou lineárních částí mimo již zmíněné autory popsali dále [20; 15; 21; 23; 27; 36; 42; 45; 71]. Vleugel a kol. [45] při inaktivaci biofilmu bakterie *Pantoea agglomerans* pomocí APGD v prostředí He + O_2 popsali v závislosti na stáří biofilmu (12 resp. 24 hodin) křivku složenou ze dvou resp. tří částí.

Tyto inaktivační charakteristiky ukazují, že inaktivace mikroorganismů v nerovnovážném studeném plazmatu je komplexní proces. Výsledný účinek plazmatu může ovlivnit celá řada faktorů, jako je typ mikroorganismu, koncentrace buněk, typ vzorku, typ nosného média, typ a elektrické parametry výboje, pracovní plyn, způsob expozice, přítomnost/absence UV, atd. Laroussi [8] ve své přehledové publikaci uvádí, že v případě výrazného podílu UV na inaktivaci je většinou výsledkem křivka složená ze dvou částí, kdy první část je velmi rychlá (strmý průběh křivky, nízké hodnoty D), následovaná druhou pomalejší fází. V případě, že se UV záření nepodílí na procesu inaktivace, např. ve výbojích na vzduchu, tak je většinou výsledkem jednoduchá křivka. Dále uvádí, že za určitých podmínek, lze získat i křivky s více směrnicemi. K podobným závěrům došla také ve své přehledové publikaci Stoffels [6].

V literatuře byly nicméně popsány křivky se dvěma směrnicemi jak v případě výrazného podílu UV záření na inaktivaci [21; 23; 36] tak i v případě, kdy jako dominantní činitele uvádí autoři jiný mechanismus např. radikály a reaktivní sloučeniny kyslíku, nebo akumulaci náboje [20; 15; 26; 36; 42; 43; 65]. Ve většině případů byla $D_1 < D_2$ (tzn. rychlejší první část, než druhá). Gadri a kol. [20] popsali v případě přímé expozice křivku s průběhem $D_1 > D_2$, naopak v případě nepřímé expozice křivku $D_1 < D_2$.

2.5 Mechanismus inaktivace

Z hlediska působení plazmatu na biologický materiál lze obecně vymezit 4 základní inaktivační mechanismy, které mohou způsobovat smrt nebo poranění buněk. Těmito vlivy jsou: teplota, UV záření, nabití částice a reaktivní částice. To, který mechanismus převládne, závisí na celé řadě parametrů (plyn, elektrické parametry výboje, způsob expozice - přímá/nepřímá). Studium inaktivace, konkrétně rozsahu jednotlivých mechanismů se věnuje celá řada autorů. Postupy použité pro identifikaci jednotlivých mechanismů a vyhodnocení rozsahu těchto mechanismů budou uvedeny v následujícím přehledu. Obecně však lze říci, že převážná většina autorů se shoduje na tom, že v případě nerovnovážného studeného atmosférického plazmatu jsou převládajícím inaktivačním činitelem reaktivní částice (volné radikály, metastabilní atomy a molekuly). V literatuře velmi diskutovanou problematikou je podíl UV záření na inaktivačním procesu, nicméně jen minoritní skupina autorů uvádí UV

záření jako dominantní mechanismus. V případě zanedbatelného vlivu teploty se naopak shoduje většina autorů.

2.5.1 Teplota

Vzhledem k faktu, že nerovnovážné atmosférické plazma je navrhováno jako alternativa pro sterilizaci teplotně citlivých materiálů a v případě biomedicínských aplikací ke sterilizaci živých tkání při léčbě chronických ran, měl by být vliv teploty zcela zanedbatelný. V odborných publikacích jsou popsány teploty působící na vzorek v rozsahu od laboratorní teploty až do cca 100 °C. Brandenburg a kol. [35] uvedli teploty působící na substrát v rozmezí 35-95 °C v závislosti na použitém výkonu a průtoku plynu (plazma jet, 27,12 MHz, 10-60 W, argon, délka expozice max. 7 min). Stejně tak Akitsu a kol. [13] dosahovali teploty 90 °C (APG, 27,12 MHz, 670 W, pulzní mód, He + vodní pára/O₂, délka expozice max. 5 min), Moon a kol. [40] uvedli teplotu plynu 100 °C (kapacitně vázaný systém, 13,56 MHz, 150 W, He, délka expozice 1 min). Ve většině případů autoři pro stanovení teploty využívali výpočet rotačních teplot z OES nebo měření termočlánkem. Při posuzování vlivu je nutno vzít v potaz, že na rozdíl od sterilizace horkým vzduchem, kdy na mikroorganismy působí teplota 160-180 °C po dobu 30-120 min, jsou tyto mikroorganismy vystaveny vyšším teplotám relativně krátkou dobu (řádově minuty). Navíc těmto vysokým teplotám nejsou vystaveny přímo, ale většinou dochází k nárůstu teploty v průběhu plazmového opracování. K vyhodnocení podílu teploty na inaktivaci v plazmatu jsou většinou v odborných publikacích uvedeny dva způsoby. V prvním případě je měření provedeno přímo v plazmatu, kdy jsou vzorky překryty obyčejným sklíčkem, tak dochází k odstínění jak reaktivní částice, tak i případného UV záření [32]. Dalším postupem je vystavení vzorků účinkům horkého vzduchu mimo aktivní oblast výboje např. v termostatu. [13; 22; 33; 35; 40; 65; 72]. Brandenburg a kol. [35] tímto způsobem popsali redukci spor *B. atrophaeus* 2 log CFU v důsledku teploty ve srovnání s redukcí 4,3 log CFU dosaženou v plazmatu. Moon a kol. [40] srovnáním poškození vzorků masa vystavených působení plazmatu a teploty 100 °C dospěli k závěru, že jimi navrhovaná konfigurace nezpůsobuje termální poškození živých tkání.

2.5.2 UV záření

UV záření je známo svými germicidními účinky. Letální poškození buněk způsobuje UV záření v rozsahu 200-300 nm již při dávkách několika mW/cm². Jedním z účinků UV záření na mikroorganismy je dimerizace thyminových bází DNA, což následně vede k inhibici replikace genetické informace. V závislosti na pracovním plynu generuje plazma UV záření v několika oblastech vlnových délek, to zahrnuje vakuovou oblast UV až po 380 nm, avšak dle Laroussiho [8] za atmosférického tlaku nedochází k propagaci energetických fotonů s vlnovou délkou pod 200 nm, pro sterilizace v této oblasti by bylo nutno použít vakuové aparatury. Dále pak uvedl, že v případě atmosférického plazmatu na vzduchu jsou účinky UV záření zcela zanedbatelné, UV záření je zde sice emitováno z N₂ a NO pásů, ale s nedostatečnou hustotou výkonu, která je pod 50 μW/cm². Nicméně připustil, že správnou volbou plynů, lze účinek UV optimalizovat, případně použít kombinaci plynů tvořících UV excimery a aktivního výboje. Kombinaci excimerní lampy a aktivního výboje využili při inaktivaci mikroorganismů v CDBD (kaskádovém dielektrickém výboji) Heise a kol. [21] V rozporu s Laroussim navrhli vedle podílu UV záření na inaktivaci také podíl VUV záření. Stejně tak Brandenburg a kol [35], Ehlbeck a kol. [23] (plasma jet, 27,12 MHz, Ar, Ar + vzduch) uvedli jako jeden z mechanismů inaktivace VUV a UV záření. Problematice podílu UV záření na inaktivačním procesu za atmosférického tlaku se věnovali také Boudam a kol. [36] Pro

inaktivaci mikroorganismů využívali DBD v Townsendově módu ve směsi N_2-N_2O . Ukázali, že volbou správné koncentrace N_2O v pracovním plynu lze dosáhnout takových podmínek, kdy inaktivačnímu procesu dominuje UV záření, naopak lze také dosáhnout podmínek, kdy je vliv UV záření minimální.

Přítomnost UV záření je detekována pomocí OES. Při studiu podílu UV záření na inaktivačním procesu v plazmatu jsou v literatuře popsány dva přístupy. V prvním případě jsou vzorky s mikroorganismem překryty UV transparentním filtrem a následně vystaveny účinkům plazmatu [33; 35]. Ve druhém případě je srovnán účinek UV lampy s účinkem plazmatu, působící po stejnou dobu. Vleugels a kol. [45] ke srovnání inaktivačních účinků plazmatu (APGD, 460 kHz, $0,5 \text{ W/cm}^3$, He + O_2) a UV záření použili rtuťovou UV lampu (Philips TUV 4 W-E m3D) s emisí 253,7 nm a hustotou výkonu $0,65 \text{ mW/cm}^2$ po dobu 60 min. Zatímco plazmatem dosáhli za 60 min redukce 3,5 log CFU, při expozici UV lampou byla redukce jen 0,8 log CFU. Stejně postupovali také např. Moon a kol. [40], pro inaktivaci *E. coli* na povrchu masa použili RF výboj (13,56 MHz, 150 W, He) po dobu 30 s a UV lampu (G40T10, Sankyo) po dobu 60 s, v prvním případě snížili původní koncentraci 6,36 log CFU/g na 5,99 log CFU/g, zatímco v případě UV jen na 6,12 log CFU/g.

2.5.3 Nabité částice

Mendis a kol. [73] a Laroussi a kol. [47] prokázali, že elektrostatická síla způsobená nahromaděním náboje na vnější membráně může překonat sílu vláken membrány a způsobit její prasknutí. Tato síla je proporcionální čtverci nabíjecího potenciálu Φ , a nepřímo úměrná čtverci poloměru zakřivení povrchu r . A proto, čím menší poloměr r , tím větší elektrostatické síly. Velikost nabíjecího potenciálu závisí na poměru zastoupení iontů a elektronů. A proto plyny s vyšší atomovou hmotností vedou k vyšším elektrostatickým silám.

Mendis a kol. odvodili rovnici pro prasknutí membrány [73]

$$|\Phi| > 0.2 \cdot (r \cdot \Delta)^{1/2} \cdot F_t^{1/2}, \quad (3)$$

kde r je poloměr zakřivení, Δ je tloušťka membrány a F_t je síla vláken.

Tento proces je mnohem pravděpodobnější pro gramnegativní bakteriální buňky s nerovnoměrným povrchem. Tyto nepravidlosti vytvářejí malé poloměry zakřivení, na kterých dochází k nahromadění náboje. Tuto teorii potvrdil Laroussi a kol. [47] ve svých experimentech s gramnegativní bakterií *E. coli* a grampozitivní bakterií *B. subtilis*.

Stoffels [6] nicméně poukazuje na to, že použitý model je příliš idealizovaný. Model předpokládá sférický tvarů bakterií a buněčnou smrt v důsledku mechanického poškození. V případě jiných tvarů jako je např. tyčinky nebo spirály, je vzniklý elektrostatický stress mnohem vyšší a snáze vede k prasknutí buňky. Dále poukázala na fakt, že buněčnou smrt lze docílit i bez jejího mechanického poškození. Povaha bakteriální buněčné stěny umožňuje celou řadu elektrostatických interakcí, prostřednictvím nichž je možné buňku usmrtit.

Buněčná stěna bakterií nese přirozeně negativní náboj, neboť je složena ze silně elektronegativních komponent, tyto komponenty jsou kyselina teichová vázaná na peptidoglykan (G+) a elektronegativní uhlovodíkový konec lipopolysacharidů (G-). Mikroby ponořené do polarizovatelného prostředí (např. do elektrolytu) se chovají stejně jako koloidní částice. Bakteriální povrch s negativním nábojem a pozitivním oblakem kationtů kolem něj vytvoří elektrickou dvojvrstvu. Bakterie jsou velmi citlivé na změnu jejich povrchového

náboje s ohledem na fakt, že změna naruší integritu membrány. Např. neutralizace negativního náboje vede k úniku cytoplazmy a buněčné smrti. Tyto jevy se nevyskytují u eukaryotických buněk, které navíc mají mnohem vyšší toleranci vůči elektrickému poli. Řada kapalných dezinfekčních prostředků využívá tento specifický rys k selektivnímu usmrcování bakterií bez usmrcení buňky (tyto prostředky nicméně selhávají v případě bakteriálních spor). Drastický pokles pH mikrobiálního roztoku vede také k neutralizaci. Bakterie jako negativní koloidní částice se snaží při daném pH dosáhnout vždy isoelektrický bod [6].

Stejně tak lze narušit rovnováhu bakteriálních buněk působením plazmatu. Je známo, že plazma má tendence kolem izolovaných objektů vytvářet negativní náboj. Stoffels jednoduchým výpočtem na základě kapacitance objektu a jeho povrchového potenciálu poukázala na to, že v řadě případů je tento náboj nižší než náboj, který by buňka vytvořila ve svém přirozeném prostředí (vodném roztoku). Dle Stoffels se tedy v případě interakce plazmatu s bakteriální buňkou jedná v řadě případů spíše o vybití než nabití buňky. Při interakci plazmatu s kapalnými vzorky může docházet k nabíjení roztoku, snížení pH roztoku (např. reakcí molekul NO_x s vodou), rozpouštění silně elektronegativních neutrálních sloučenin (např. ozón), které neutralizují buněčnou stěnu, apod. Všechny tyto procesy vedou k narušení rovnováhy bakterií a následně k její smrti [6].

Působení nabitých částic jako převládající mechanismus uvedli ve své práci např. Deng a kol. [65] a Morgan a kol. [26]. Zajímavé je, že Deng [65] použil jako kontrolní mikroorganismus grampozitivní bakterii *Bacillus subtilis*. K inaktivaci použil APPJ (10-40 kHz, 9,9 kV) generované v Ar nebo směsi Ar + O_2 . Poškození buněk studoval pomocí SEM a kolorimetrickým měřením s brilantní modří coomassie při 595 nm detekoval množství uvolněného proteinu z poškozených buněk. Na druhou stranu Morgan [26] popsal tento mechanismus pro kvasinky *Saccharomyces Cerevisiae* a *Mrakia Frigida* inaktivované pomocí DBD (1-30 kV, 1kW výkon, frekvence 50 Hz) buzeném v argonu.

2.5.4 Reaktivní částice

Za atmosférického tlaku jsou v nerovnovážném plazmatu tvořeny vysoce reaktivní částice zvané radikály, které vznikají jako produkty srážkových procesů v plazmatu následované např. disociačními nebo excitačními procesy [3; 10]. Tyto volné radikály, konkrétně reaktivní kyslíkové sloučeniny (ROS, např. O, OH, O_2^- , O_3 atd.), jsou považovány za hlavní plazmatem generované dezinfektanty [6]. Jedná se silná oxidační činidla, která mohou reagovat s fosfolipidy a lipoproteiny buněčných membrán, nukleovými kyselinami, sacharidy a polysacharidy, bílkovinami a enzymy, výsledkem čehož je ireverzibilní poškození buněčného materiálu. Např. v přítomnosti OH radikálu dochází k oxidaci mastných kyselin, naopak atomární O nebo metastabilní O_2 atakují proteiny. Důsledkem oxidačních procesů je změna fluidity membrány a následně změna její permeability [3; 10]. Letální účinky jsou ve velké míře připisovány chemické erozi (např. poškození buněčné stěny nebo cortexového obalu bakteriálních spor). Poškození erozí je jednodušší docílit v případě Gram negativních druhů, protože jejich buněčná stěna je zranitelnější. Nicméně rozdíly jsou jen nepatrné [72]. Největším problémem jsou spory, a to díky svému robustnímu a vysoce odolnému obalu [6].

Dominantní vliv reaktivních částic, resp. reaktivních kyslíkových sloučenin, při sterilizaci v atmosférickém netermálním plazmatu potvrzuje většina autorů [3; 13; 16; 20; 22-26; 28; 31; 32; 35; 37-40; 42; 43; 45; 48; 65]. Dle Stoffels [6] primární roli kyslíkových radikálů při inaktivaci potvrzuje také fakt, že v prostředí vzduchu nebo kyslíku probíhá inaktivace výrazně

rychleji než v případě vzácných plynů. Toto prokázal také Laroussi a Leipold [3], porovnávali účinek DBD (20 W, nepřímá expozice) generovaném v He, směsi 97 % He + 3 % O₂ a vzduchu. Pro samotné helium získali D_{He} - 20 min, v případě směsi D_{He+O₂}-10 min a pro vzduch D_{vzduch} - 20 s. Autor tento rozdíl vysvětlil přítomností chemicky reaktivních sloučenin, jako jsou NO, NO₂, O, O₃, atd. Stejně tak Deng a kol. [71] získali při inaktivaci bakterie *B. subtilis* pro směs Ar + O₂ (3.59%) o tři řády lepší výsledek ve srovnání se samotným argonem. Hong a kol.[32] ve své studii sterilizovali *E. coli* a *B. subtilis* pomocí RF výboje ve směsi helia a kyslíku (0-2 %), zjistili přímou úměru mezi koncentrací O radikálu (777,1 nm) a efektivitou sterilizace. Maximální intenzitu tohoto radikálu získali při koncentraci 0,2 % O₂. Akitsu a kol. [13] zvýšili účinek inaktivace příměsí vodní páry nebo kyslíku do helia.

Pro identifikaci reaktivních radikálů je nejčastěji používána OES. Pro vyhodnocení poškození buňky v důsledku oxidace je v literatuře popsáno využití kyseliny thiobarbiturové, tzv. TBARS test. K vyhodnocení mechanického poškození v důsledku leptání je používána SEM analýza.

2.6 Aplikace

Mimo obecný výzkum principu plazmové sterilizace, jednotlivých mechanismů a vlivu na nosné médium a případně okolí, je celá řada prací v odborné literatuře věnována konkrétním cílovým aplikacím této nové technologie. Největší uplatnění nachází plazmová sterilizace za atmosférického tlaku v oblasti potravinářského a medicínského průmyslu. V obou případech jsou patrné dva směry, tím prvním je sterilizace obalových materiálů, nástrojů a zařízení, ve druhém případě je to sterilizace balených či volných potravin, lidské tkáně, apod. Většina prací také ukazuje, že při optimálních podmínkách lze docílit požadovaného stupně inaktivace, aniž by došlo k poškození dekontaminovaného objektu.

Tradiční sterilizační metodou využívanou v potravinářském průmyslu je sterilizace teplem. Vysoká teplota nicméně vyvolává nežádoucí vedlejší účinky s ohledem na senzorycké, nutriční a funkční vlastnosti potravin. V posledních letech stoupá poptávka po čerstvých potravinách k okamžité spotřebě, současně s tím byly vyvinuty netermální metody k jejich sterilizaci, jako např. ionizující zařízení, vysoký hydrostatický tlak, pulzní elektrické pole, oscilační magnetické pole a v neposlední řadě plazma [4]. Porovnáním těchto metod s ohledem na využití v potravinářském průmyslu se věnoval např. v přehledovém článku Wan a kol [74]. Účinky plazmatu při inaktivaci alimentárních mikroorganismů byly prokázány v celé řadě prací. Vleugels a kol. (2005) [45] studovali účinky APGD v He + O₂ k inaktivaci biofilmu *Pantoea agglomerans* naneseném na syntetické membráně, která měla simulovat rostlinné tkáň. Vliv plazmatu na samotné potraviny s ohledem na barevnou změnu a obsah vody následně vyhodnotili na kapiích. Klockow a spol. (2009) [39] sterilizovali pomocí DBD na vzduchu nebo kyslíku špenátové listy balené v LDPE sáčcích. Perni a kol. (2008) [75] používali plazmovou tužku (He + O₂) ke sterilizaci oplodí manga a melounu. Noriega a kol. (2012) [76] navázal na výsledky Perniho a prezentuje sterilizaci kuřecího masa a kůže. Deng a kol. (2007) [71] prezentovali sterilizaci mandlí kontaminovaných bakterií *E. coli* pomocí DBD. Pro stejné účely použila Niemira (2012) [77] plasma jet generovaný v suchém vzduchu nebo dusíku, kromě *E. coli* použila ještě *Salmonella spp.* Song a kol. (2009) [4] pomocí RF výboje buzeného v heliu sterilizovali šunku a sýr inokulované bakterií *Listeria monocytogenes*. Na tuto práci navázal Yun a kol. (2010) [34] sterilizací jednorázových nádob na jídlo a Kim a kol. (2010) [37] sterilizací plátků slaniny, tito navíc rozšířil modelové

mikroorganismy o *Escherichia coli* a *Salmonella Typhimurium* a kromě helia použili mnohem účinnější směs helium + kyslík. Leipold a kol. (2007) [78] navrhli postup pro sterilizaci hroznů napadených šedou plísní (*Botrytis cinerea*), k tomu využili vzdálené atmosférické plazma buzené na vzduchu, plazma zde sloužilo jako generátor ozónu. Leipold a kol. (2010) [42] navrhli zařízení založené na principu DBD pro sterilizaci rotačního kruhového nože používaného pro krájení v masném průmyslu. Stejná skupina testovala účinek DBD výboje na inaktivaci breasoly kontaminované *Listeria innocua* a zabalené v v LLDPE sáčcích. Ragni a kol. (2010) [79] ke sterilizaci vajec kontaminovaných *Salmonella spp.* využili dohasínající plazma RBD generované ve vlhkém/suchém vzduchu. Fröhling a kol. (2012) [41] pomocí mikrovlnného výboje sterilizovali mikroflóru chlazené vepřové maso.

Pro medicínu představuje netermální atmosférické plazma bezesporu zajímavou technologií. Schopnost působit na širokou škálu mikroorganismů s minimálním účinkem na okolní materiál, nízká teplota, schopnost sterilizovat suché i vlhké vzorky a v neposlední řadě schopnost pronikat skrze porézní překážky byla prokázána v celé řadě prací. Akitsu a spol. (2005) [13] ukázali schopnost pulzního RF výboje účinně sterilizovat vzorky i přes Tyvec materiál, což je krycí materiál běžně užívaný pro balení předmětů určených ke sterilizaci. Podobně prokázali Zimmermann a kol. (2012) [27] baktericidní účinky povrchového mikrovýboje přes různé porézní překážky. Motivací bylo praktické využití této technologie při sterilizaci zabalených předmětů či krytých povrchů (rány překryté obvazem) apod. Schwabedissen a kol. (2007) [48] prezentovali uspořádání DBD ke sterilizaci balených hadiček pro dialýzu. Ehlbeck a kol. (2008) [23] navrhli uspořádání plazma jetů pro sterilizaci 3D objektů (např. katetrů) a MW výboj pro sterilizaci PET lahvíček pro farmaceutický průmysl. Joshi a kol. (2010) [30] využívali FE-DBD ke sterilizaci *Staphylococcus aureus* (MSSA, MRSA) a *E. coli*, kteří jsou častými kolonizátory povrchů v nemocničním prostředí (katetry, implantáty, atd), kde jsou původci nežádoucích infekcí. Další zajímavou aplikací nalézá plazmová technologie při hojení ran. Plazma zde působí jednak jako sterilizační prostředek, ale současně také podporuje klíčové procesy nezbytné pro hojení (např. proliferace fibroblastů) [8; 19]. Moon a kol. (2009) [40] studovali inaktivační účinky RF výboje a jeho vliv na exponovanou tkáň *in vitro* na neživé tkáni prasat a *in vivo* při sterilizaci mikroflóry rukou. Fridman a kol. (2009) [19] navrhli FE-DBD systém ke sterilizaci živých lidských a zvířecích tkáních. Sterilizační účinky a toxicitu plazmového ošetření na tkáň demonstrovali *in vitro* na odumřelé tkáni a *in vivo* na živých modelech myši a prasat. *In vitro* asepsi celé škály mikroorganismů na polotuhém agaru simulujícím prostředí rány popsal Daeschlein a kol. (2010) [24], pro tyto účely optimalizovali APPJ. Podobně Ermolaev a kol. (2011) [9] demonstrují inaktivační a terapeutické účinky argonového plazmového hořáku na širokou škálu mikroorganismů *in vitro* na agaru a *in vivo* na živých krysích modelech. Sladek a kol. (2005) [72] vyvinuli plazmovou jehlu pro deaktivaci dentálních bakterií, odstranění plaku a léčbu zubních kazů. Inaktivační účinky testovali *in vitro* na agaru inokulovaném bakterií *E. coli*. Mezi další aplikace plazmatu v medicíně patří např. koagulace krve, kdy nízkoteplotní plazma selektivně působí na bílkoviny v krvi, a tak katalyzuje tento proces. Schopnost plazmatu při správných podmínkách docílit uvolnění eukaryotických buněk z nosiče, aniž by došlo k jejímu poškození a následně vyvolat apoptózu, lze využít při léčbě rakoviny [6; 8; 19].

Další aplikační sférou pro plazmové sterilizace za atmosférického tlaku může být letecký a kosmický průmysl. S ohledem na toto průmyslové odvětví Cooper a kol. (2009) [43] popsali

mechanismy nezbytné pro sterilizaci a kompletní dezintegraci vysoce odolné bakterie *Deinococcus radiodurans* pomocí DBD na vzduchu. Využití plazmové sterilizace bylo popsáno také při ochraně kulturního dědictví. Ioanid a kol. (2012) [61] využívají koronový výboj za atmosférického tlaku ke sterilizaci 200 let staré knihy. Ve své předchozí práci využívali nízkotlaký RF výboj pro dekontaminaci starých fotografií. Sterilizace a ošetření historických papírových materiálů popsali již dříve Vohrer a kol. (2001) [80] a Laguardia (2005) [81], ti nicméně používali plazma pracující za nízkých tlaků.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Předmětem této práce je studium sterilizačních účinků dielektrického bariérového výboje. Pro sterilizace byl použit objemový bariérový výboj. Jako kontrolní mikroorganismy byly vybrány grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis*, gramnegativní bakterie *Escherichia coli* a zástupce plísní *Aspergillus niger*. S ohledem na sterilizační účinek byl vyhodnocen vliv pracovních podmínek (hustota výkonu, expoziční doba, pracovní plyn), druhu a koncentrace mikroorganismu, typu nosného média a jednotlivých sterilizačních mechanismů (UV, teplota, aktivní částice). Dále byla provedena základní diagnostika výboje (OES, teplota) a pomocí SEM byl zhodnocen účinek plazmatu na morfologii mikroorganismů a nosné médium. Všechny metody a postupy použité při měření jsou přehledně popsány v této kapitole.

3.1 Experimentální aparatura a pracovní podmínky

Experimentální aparatura byla vyrobena na PřFMU doc. P. St'ahalem a pro naše podmínky upravena doc. F. Krčmou. Tato aparatura je založena na principu objemového dielektrického bariérového výboje. Plazmové zařízení se skládá z regulovatelného zdroje stejnosměrného (DC) napětí, vysokofrekvenčního zdroje, vysokonapěťového (HF) transformátoru 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 90×70 mm a jejich vzdáleností. Vzdálenost elektrod lze pomocí šroubu měnit. Při experimentu byla použita vzdálenost 3 mm pro všechny plyny. Jako materiál dielektrika je použit mikanit (štípaná slída), tloušťka vrstvy je 0,5 mm. Aby bylo zabráněno kontaminaci vzorků z okolí a naopak, byla aparatura umístěna v polykarbonátovém boxu s odtahem. Plazmová aparatura je zobrazena na obrázku 4 a elektrický obvod experimentální aparatury a schéma reaktoru je znázorněn na obrázku 5.

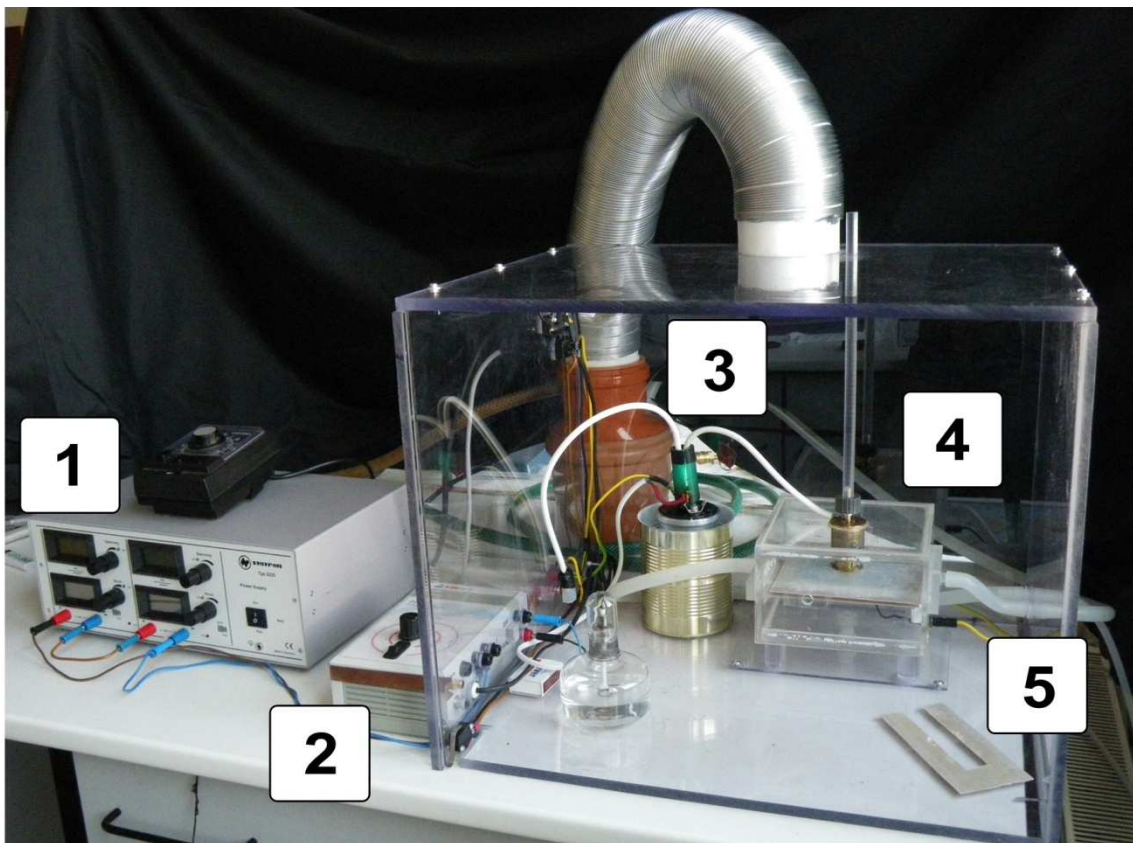
Hustota výkonu dodávaného do plazmatu byla spočítána na základě vztahu:

$$x = \frac{U \cdot I \cdot \eta}{V}, \quad (4)$$

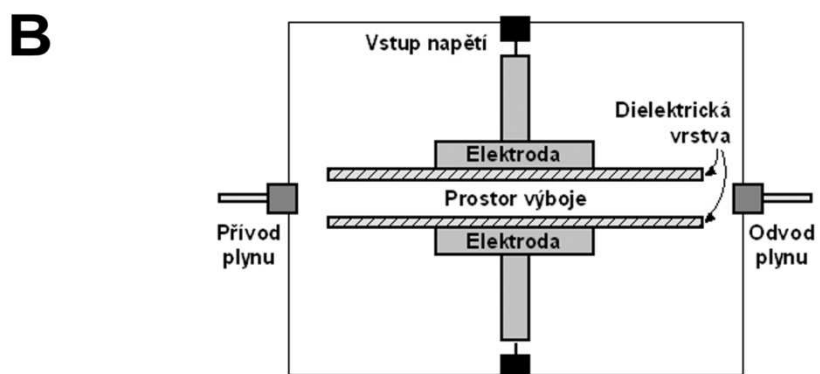
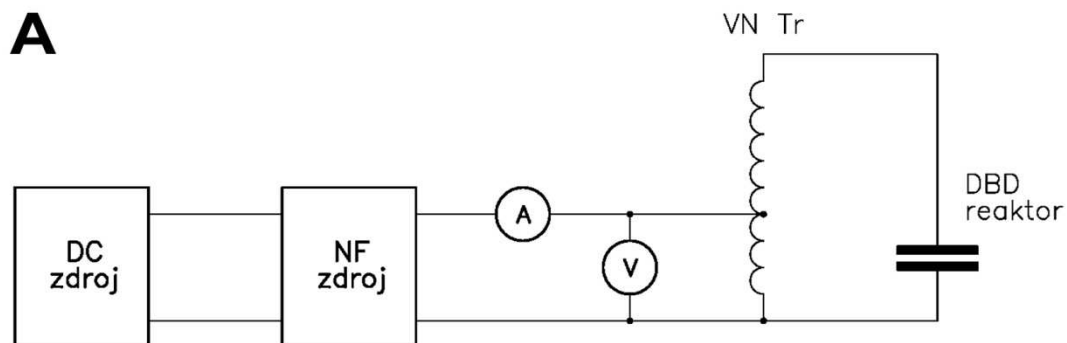
kde U značí napětí, I je proud, η značí účinnost a V je objem výboje. Objem výboje získáme z rozměrů elektrod 90×70 mm a jejich vzdálenosti 3 mm. Účinnost zařízení je 0,4 (zadáno výrobcem). Použité hustoty výkonu dodávaného do plazmatu pro jednotlivé plyny jsou shrnuty v tabulce 2.

Napětí na DC zdroji (V)	Hustota výkonu (W·cm ⁻³)			
	Ar	N ₂	vzduch	vzduch + H ₂ O
50	1,15	1,16	-	-
60	1,80	1,43	2,16	-
70	2,37	2,04	2,28	2,33
80	-	-	2,76	2,85

Tabulka 2 Přehled použitých výkonů pro jednotlivé plyny



Obrázek 4 Plazmové zařízení: 1/ regulovatelný zdroj stejnosměrného napětí; 2/ vysoko-frekvenční zdroj; 3/ vysokonapěťový (VN) transformátor; 4/ DBD reaktor; 5/ držák vzorků



Obrázek 5 A/ Schéma el. obvodu; B/ Schéma DBD reaktoru.

Jako pracovní plyn byl použit argon, dusík, suchý/vlhký vzduch. Vzduch byl smíchán z čistých laboratorních plynů 80 % N₂ + 20 % O₂. Vlhký vzduch byl připraven pomocí promývací láhve naplněné vodou, přes kterou byl plyn přiváděn do DBD reaktoru. Absolutní vlhkost takto připraveného vzduchu lze určit z tabulek. Za předpokladu, že docházelo k 100 % nasycení vzduchu, je pro laboratorní teplotu 25 °C absolutní vlhkost 23,1 g·cm⁻³ [82] Průtok plynu byl 3 l min⁻¹.

Expoziční doba byla měněna v rozsahu 0-270 s. Aby nedošlo k nežádoucímu působení teploty na sledované mikroorganismy, bylo opracování prováděno v cyklech, kdy se střídala pracovní fáze se zapnutým výbojem (max. 30 s) a fáze chlazení s výbojem vypnutým (2 min). Chlazení bylo realizováno prouděním pracovního plynu skrze komoru při vypnutém výboji.

3.2 Diagnostika výboje

3.2.1 Optická emisní spektroskopie

Plazma bylo diagnostikováno pomocí OES. Pro tyto účely byly využity přístroje Jobin-Yvon TRIAX 550 (mřížka 1200 a 3600 vrypů/mm; CCD detektor chlazený kapalným dusíkem) a Ocean Optics HR4000 (mřížka 300 a 2400 vrypů/mm). První přístroj byl použit pro diagnostiku plazmatu buzeného v argonu a dusíku. Spektrum bylo měřeno přímo pomocí optického vlákna zpevněného kovovou spirálou, které bylo prostrčeno skrz plexisklový kryt. Druhý přístroj byl použit pro diagnostiku plazmatu buzeného ve vlhkém/suchém vzduchu. Důvodem použití různých přístrojů je, že měření se vzduchem byla prováděna s cca 2 letým odstupem. V případě vzduchu bylo cílem získat spíše orientační přehled, proto byl vzhledem k jednodušší a rychlejší manipulaci zvoleny nově pořízené spektrometry Ocean Optics HR4000. Pro všechny plyny bylo změřeno přehledové spektrum v rozsahu vlnových délek 200-800 nm (mřížka 1200 resp. 300 vrypů/mm) a UV oblast t.j. 200-400 nm (mřížka 3600 resp. 2400 vrypů/mm). Všechna emisní spektra byla měřena bez vzorků.

Změření spekter bylo provedeno ve spolupráci s Mgr. Mazánkovou, Ph.D. a doc. Krčmou. Pro vyhodnocení byl použit program Spectrum Analyzer 1.6 [83]. Tento program byl také použit pro výpočet rotační a vibrační teploty. Vibrační teplota byla spočítána z relativních intenzit hlav vibračních pásů sekvence $\Delta v = -2$ přechodu N₂(C³Π_u) → N₂(B³Π_g) molekuly N₂. Rotační teplota v případě plazmatu generovaného v argonu a dusíku byla spočítána z rotačně rozlišeného spektra OH radikálu. Teplota byla určována z relativní intenzity prvních šesti rotačních čar větve Q₁ přechodu OH(A²Σ⁺) → OH(X²Π) (rotační čára 7/2 byla vynechána). V případě suchého/vlhkého vzduchu byla spočítána pouze vibrační teplota. Rotační teplota nebyla spočítána. Důvodem je, že pro výpočet rotační teploty jsou používány rotační pásy OH nebo NO systému, které ve spektru suchého ani vlhkého vzduchu nebyly na rozdíl od ostatních plynů detekovány s dostatečnou intenzitou.

Vyhodnocení a výpočet teploty byl proveden Mgr. Mazánkovou, Ph.D. a Mgr. Čechem.

3.2.2 Teplota

Teplota byla měřena pomocí termočlánu typu K. Z technických důvodů nebylo možno měřit teplotu při zapnutém výboji. Naměřená data tedy odpovídají teplotě před a bezprostředně po vypnutí budícího zdroje. Termočlánek byl při vypnutém výboji vkládán stejně jako vzorky do prostoru mezi elektrody. Při měření byl použit stejný cyklus jako

v případě měření vzorků - střídání 30 s výboje s 2 minutami chlazení. Zjištěná data byla použita při vyhodnocení vlivu teploty na inaktivaci.

3.3 Mikrobiologické postupy

3.3.1 Modelové mikroorganismy

Modelový mikroorganismus plíseň *Aspergillus niger* F8189 a grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis* CCM 1999 byly získány v České sbírce mikroorganismů Masarykovy univerzity Brno. Neznámý kmen gramnegativní bakterie *Escherichia coli* byl získán v mikrobiologické laboratoři Ústavu chemie potravin a biotechnologií FCH-VUT.

3.3.2 Živné médium a fyziologický roztok

Pro kultivaci *A. niger* byl použit sladinový agar. Pivovarská sladina (pivovar Starobrno a.s., Brno) byla zředěna destilovanou vodou na 7 °dle Ballinga. Hodnota pH byla upravena na 6,6 – 6,8 nasyceným roztokem NaHCO₃. Ke sladinovému extraktu byly přidány 2% hm. agaru Himedia RM 026. Takto připravené médium bylo nakonec vysterilizováno.

Pro kultivaci *B. subtilis* a *E. coli* bylo použito živné médium MPA2 (Himedia M 1269). Při kultivaci za cílem získání bakteriálních spor *B. subtilis* bylo při prvních experimentech použito živné médium MPA2 s přísadkou MnSO₄ (1 mg/100 ml), to pak bylo nahrazeno sporulačním médiem Himedia M 1018.

Pro ředění, viz dále, byl užit sterilní fyziologický roztok připravený z 8,5 g NaCl na 1 l deionizované vody.

3.3.3 Příprava očkovací suspenze

3.3.3.1 *Aspergillus niger*

Kultivace plísně proběhla na sladinovém agaru po dobu 7 dní při 25 °C. Do zkumavky obsahující 7 denní kulturu *Aspergillus niger* bylo nalito 5 ml fyziologického roztoku s přísadkou Tweenu 80 (0,1 ml na 100 ml média). Spory byly do roztoku opatrně uvolněny pomocí bakteriologické kličky. Takto vzniklá suspenze byla poté nalita do uzavíratelných sterilních mikrozkušavek o objemu 2 ml. Následovala trojnásobná centrifugace (5 min, 4 °C, 10 000 otáček) s promytím 2 ml sterilního fyziologického roztoku. Po třech promytích byl supernatant čirý a na dně mikrozkušavek byly usazeny spory *A. niger*. Tímto způsobem byla získána suspenze o koncentraci cca 10⁷-10⁸ spor·ml⁻¹. Suspenze byla skladována v lednici při cca 4 °C až do dalšího použití.

3.3.3.2 *Bacillus subtilis*

Pro přípravu **suspenze spor** *B. subtilis* byl použit postup popsán Betinou a kol. [84]. Kultivace probíhala na živném médiu MPA2 při 30 °C po dobu 10 dní. Do zkumavky se šikmým agarem obsahujícím 10 denní kulturu *B. subtilis* byl nalit sterilní fyziologický roztok a mikroorganismus byl do roztoku uvolněn očkovací kličkou. 1,7 ml takto připravené suspenze bylo naočkováno do 100 ml sporulačního média (Himedia M 1018). Bakterie byla kultivována při teplotě 37 °C po dobu 10 dní. Poté bylo sporulační médium slito a na dně Erlenmayerovy baňky zůstaly jen spory *B. subtilis*. Spory byly řádně promíchány a nality do uzavíratelných sterilních mikrozkušavek o objemu 2 ml. Suspenze byla dvakrát centrifugována (10000 ot/min, 20 °C, 10 minut) a promyta 2 ml sterilního fyziologického roztoku. Po dvou promytích byly mikrozkušavky 30 minut zahřívány ve vodní lázni o teplotě

65 °C, aby byly inaktivovány vegetativní buňky. Tímto způsobem byla získána suspenze o koncentraci cca 10^7 - 10^8 spor·ml⁻¹. Suspenze byla skladována v lednici při cca 4 °C až do dalšího použití.

Suspenze vegetativních buněk a spor *B. subtilis* byla získána z 10 denní kultury *B. subtilis* inokulované na MPA2 s příměsí MnSO₄ kultivované při teplotě 30 °C. Do zkumavky se šikmým agarem obsahujícím 10 denní kulturu *B. subtilis* byl nalit sterilní fyziologický roztok a mikroorganismus byl do roztoku uvolněn očkovací kličkou. Takto vzniklá suspenze byla nalita do uzavíratelných sterilních mikrozkušavek o objemu 2 ml. Suspenze byla dvakrát centrifugována (10000 ot/min, 20 °C, 10 minut) a promyta 2 ml sterilního fyziologického roztoku. Po dvou promytích byla odstředěná kapalina čirá a na dně zkumavky byly usazeny vegetativní buňky a spory. Tímto způsobem byla získána suspenze o koncentraci cca 10^7 - 10^8 buněk·ml⁻¹. Suspenze byla skladována v lednici při cca 4 °C až do dalšího použití.

3.3.3.3 *Escherichia Coli*

Suspenze vegetativních buněk *E. coli* byla připravena z 2 denní kultury, kultivované na šikmém agaru MPA2 při 37 °C. Do zkumavky byl nalit sterilní fyziologický roztok a mikroorganismus byl do roztoku uvolněn očkovací kličkou. Očkovací suspenze byla nalita do centrifugačních uzavíratelných sterilních mikrozkušavek o objemu 2 ml. Suspenze byla dvakrát centrifugována (10000 ot/min, 20 °C, 10 minut) a promyta 2 ml sterilního fyziologického roztoku. Po dvou promytích byla odstředěná kapalina čirá a na dně zkumavky byly usazeny vegetativní buňky bakterie *Escherichia coli*. Tímto způsobem byla získána suspenze o koncentraci cca 10^7 - 10^8 buněk·ml⁻¹. Suspenze byla skladována v lednici při cca 4 °C až do dalšího použití.

3.3.4 Příprava vzorků

Při experimentech byl použit typ vzorku vrstva mikroorganismu na povrchu nosiče. Mikroorganismy byly na povrch buď bodově nanášeny nebo na povrch přímo kultivovány, viz dále. Jako nosné médium byl použit filtrační papír Whatman 1 a PET fólie. Z papíru nebo PET fólie byly vyraženy disky o průměru 3 cm. Tyto disky byly následně sterilizovány. Pro sterilizaci papíru byl použit autokláv (121 °C/20 min). PET fólie byly sterilizována v roztoku ethanolu.

3.3.4.1 Vrstva vegetativních buněk/ spor na povrchu nosiče

Postup byl shodný pro *A. niger*, *B. subtilis* i *E. coli*. Do sterilních Petriho misek byly vloženy sterilní disky nosného materiálu (papír, PET). Na nosič bylo pomocí mikropipety bodově nanášeno 100 µl očkovací suspenze. Vzorky byly vysušeny za aerobních podmínek při teplotě 25 °C po dobu 24 hodin. Na obrázku 6 jsou zobrazeny vzorky plísně *A. niger*. Takto připravené vzorky byly vystaveny sterilizačním účinkům DBD.

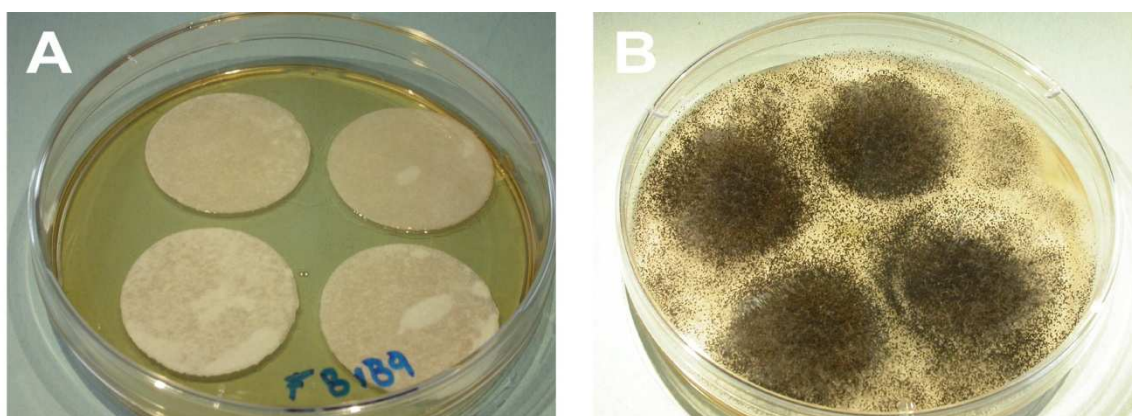


Obrázek 6 Spory plísně *A. niger* na povrchu papírového nosiče.

3.3.4.2 Růst mikroorganismů na nosiči

Při experimentech byla také snaha simulovat reálné podmínky, kdy daný mikroorganismus roste přímo na médiu. Proto byly vytvořeny vzorky, na kterých byla přímo kultivována plíseň *A. niger*. Do sterilních Petriho misek bylo nalito 10 ml sladidového agaru. Na ztuhlý agar byly rozprostřeny sterilní papírové disky, na každý disk bylo mikropipetou naneseo 100 μ l očkovací suspenze obsahující spory plísně *Aspergillus niger*. Poté byly vzorky kultivovány za aerobních podmínek při 25 °C po dobu 7 dní. Po 7 denní kultivaci (viz obrázek 7) byly vzorky vyjmuty z agarových ploten, vloženy mezi sterilní filtrační papír, aby nedošlo k jejich zkroucení a vysušeny za aerobních podmínek při 25 °C. Takto připravené vzorky byly vystaveny sterilizačním účinkům DBD.

Pro přípravu reálných vzorků bylo také testováno živné médium bez zdroje uhlíku (5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 g primárního K_2HPO_4 ; 0,25 g MgSO_4 ; kvasničný autolyzát; 500 ml H_2O ; 2 hm% agaru), kde jako zdroj uhlíku sloužil samotný papír, tak jak je tomu např. v archivech. Avšak samotná kultivace byla časově velmi náročná, trvalo minimálně 21 dní až měsíc než se na povrchu papíru objevilo vatovité mycelium a místy černé spory. Z toho důvodu, byly vzorky pro plazmovou sterilizaci kultivovány na sladidovém agaru.



Obrázek 7 Kultivace plísně *A. niger* na povrchu papírového nosiče: A/ po inokulaci; B/ vyrostlá plíseň po 7 denní kultivaci při 25 °C.

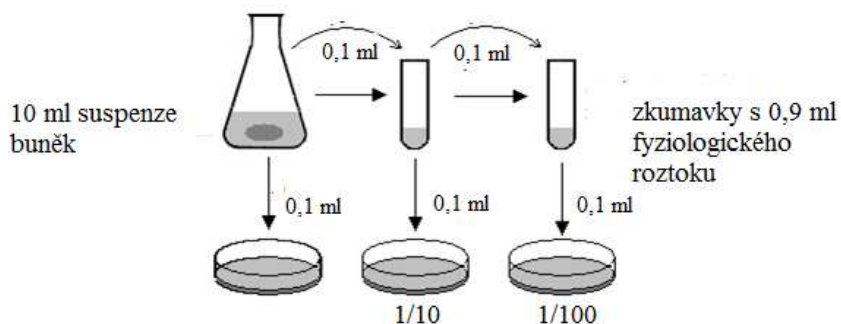
3.3.5 Sterilizace vzorků v DBD

V průběhu celého experimentu byla snaha dodržovat sterilní podmínky tak, aby nedošlo k sekundární kontaminaci vzorků, a tak k nežádoucímu zkreslení výsledků. Pro sterilizaci aparatury před započítím experimentu a po jeho skončení byl použit ethanol. Stejně tak byla ethanolem očištěna pinzeta používaná pro manipulaci se vzorky a držák vzorků. Manipulace se vzorky probíhala výhradně pod plamenem, ten byl také využíván pro sterilizaci pinzety v průběhu experimentu. Jako držák vzorků sloužila mykanitová destička ve tvaru U (viz obrázek aparatury), po stranách opatřená oboustrannou lepicí páskou tak, aby se zabránilo posunutí vzorků vlivem proudění plynu.

Vzorky kontaminované jedním z mikroorganismů byly uchyceny na držák a vloženy mezi elektrody, kde byly vystaveny účinkům DBD za různých podmínek (expoziční doba, hustota napětí, plyn). Pro každé podmínky byly paralelně opracovány 2 vzorky, měření byla opakována minimálně dvakrát, t.j. pro každé podmínky byly minimálně 4 vzorky. Po expozici plazmatem byly vzorky pod plamenem přemístěny z držáku do roztoku 10 ml sterilního fyziologického roztoku s Tweenem 80 a skleněnými kuličkami a ponechány na třepačce do druhého dne. Roztok Tweenu zvyšuje hydrofilitu spor a buněk, a tím napomáhá jejich vymývání do roztoku. Vymývání bylo navíc podpořeno třecími silami na rozhraní kuliček a vzorku.

3.3.6 Vyhodnocení

Pro kvantitativní vyhodnocení zastoupení životaschopných buněk po sterilizaci v DBD byla použita **plotnová kultivační metoda**. Metoda při vyhodnocení vychází z předpokladu, že z každé vitální buňky vyroste jedna kolonie. Aby byl možný růst jednotlivých kolonií na povrchu média, je nutné ředění suspenzí mikrobiálních buněk. Pro tyto účely byl využit koeficient ředění deset (viz obrázek 8)



Obrázek 8 Desítkové ředění suspenze mikrobiálních buněk pro kultivaci

Suspenze spor *A. niger* byly naředěny a jednotlivé zředěné vzorky byly přelivem naočkovány na sladivý agar. Vzorky byly kultivovány aerobně při 25 °C po dobu 3 dní. Poté byly spočítány kolonie na jednotlivých miskách. Kontrola byla provedena ještě po dalších dvou dnech kultivace.

Suspenze spor nebo vegetativních buněk *B. subtilis* byly naředěny a jednotlivé zředěné vzorky byly přelivem naočkovány na MPA2 agar na Petriho misky. Vzorky byly kultivovány aerobně při 30 °C po dobu 3 dní. Pátý den byla ještě provedena kontrola.

Suspenze vegetativních buněk *E. coli* byly naředěny a jednotlivé zředěné vzorky byly přelivem naočkovány na MPA2 agar na Petriho misky. Vzorky byly kultivovány aerobně při 37 °C po dobu 24 hodin. Poté byly spočteny vytvořené kolonie.

Pro konečné vyhodnocení byly vybrány plotny s počtem kolonií 20 až 200. Počet kolonií byl vyjádřen jako průměrná hodnota paralelního stanovení, násobená příslušným ředěním a vztažená na jeden mililitr objemu.

3.4 Studium jednotlivých inaktivačních mechanismů

3.4.1 Studium vlivu UV záření

Při studiu vlivu UV záření na sterilizační účinek dielektrického bariérového výboje bylo použito křemenné sklo, jímž byla část vzorků přikryta. Křemenné sklo bylo použito proto, že propouští UV záření, avšak ne reaktivní částice. Opracování vzorků probíhalo stejným způsobem, jako je uvedeno v kapitole 3.3.5. Na takto opracované vzorky tedy působilo jen UV záření a teplota, kterou nikdy nelze zcela eliminovat. Reaktivní částice se v tomto případě na deaktivaci nepodílely.

3.4.2 Studium vlivu teploty

Měření teploty termočlánkem ukázala nárůst teploty v průběhu expozice. Při expozičních časech 270 s byla teplota mezi elektrodami 60 °C při použití argonu a 71 °C při použití dusíku jako pracovního plynu, viz výsledky v kapitole 4.1.2. S časovým odstupem po tomto měření byla sterilizace prováděna ve vzduchu, teplota při expozici 240 s byla 74 °C ve vlhkém a 66 °C v suchém vzduchu. Vyšší teploty mohly přispět k inaktivaci mikroorganismů v DBD, z toho důvodu byl vliv teploty studován odděleně.

Pro studium teplotního vlivu byl použit inkubátor 1000 Heidolph Instruments. Teplota v termostatu byla regulována dle teplotního profilu získaného při měření v dusíku, kde byl zaznamenán vyšší nárůst ve srovnání s argonem. Pro studium byly použity vzorky spor *A. niger* a *B. subtilis* nanesené na papírovém nosiči. Při experimentu byla snaha se co nejvíce přiblížit podmínkám při opracování v plazmatu, kde se pravidelně střídá pracovní fáze (zapnutý výboj, 30 s) s fází chladící (vypnutý výboj, chlazení průtokem plynu, 2 min). Všechny vzorky byly v Petriho miskách vloženy do inkubátoru. Počáteční teplota byla nastavena na 36 °C. Po 30 s byla z termostatu odebrána první Petriho miska se vzorky. Vzorky byly za sterilních podmínek vloženy do roztoku 10 ml sterilního fyziologického roztoku s Tweenem 80 a skleněnými kuličkami a ponechány na třepačce do druhého dne. Dále byly zpracovány dle postupu uvedeném v kapitole 3.3.6. Ostatní Petriho misky byly ponechány v otevřeném inkubátoru další 2 minuty. Teplota v inkubátoru poklesla na 32 °C. Tato fáze má simulovat fázi chlazení při plazmovém opracování. Vzorky byly poté vyjmuty a teplota v inkubátoru zvýšena na 44 °C. Po dosažení této teploty byly vzorky vloženy zpět do inkubátoru. Tento postup se stále opakoval a poslední vzorek byl vystaven teplotě 71 °C. Tabulka 3 shrnuje teploty naměřené v DBD v dusíku a teploty naměřené v inkubátoru.

Expoziční doba [s]	Plazma N ₂		Inkubátor	
	T ₁ [°C]	T ₂ [°C]	T ₁ [°C]	T ₂ [°C]
30	25	36	36	32
60	34	44	44	40
90	38	49	49	42
120	42	54	54	46
180	48	58	58	51
210	53	63	63	55
240	57	65	65	60
270	61	71	71	-

Tabulka 3 Teploty mezi elektrodami v DBD generovaném v dusíku T_1 - teplota před spuštěním výboje, T_2 - teplota po vypnutí výboje; teploty v inkubátoru T_1 - teplota nastavená na termostatu před vložení vzorků (odpovídá teplotě T_2 naměřené mezi elektrodami DBD), T_2 - teplota naměřená vždy před nastavením následující vyšší teploty (tzn. po 2 minutách chlazení)

3.4.3 SEM

Skenovací elektronová mikroskopie byla využita při studiu vlivu plazmového opracování jak na mikroorganismy, tak i na nosný materiál (papír, PET). V případě mikroorganismů bylo cílem zjistit, jestli dochází k mechanickému poškození buněk v důsledku expozice plazmatem. Měření byla provedena několikrát v průběhu experimentu, vždy byl použit jiný přístroj. Pro studium vlivu plazmové expozice při použití dusíku nebo argonu jako nosného plynu byl použit přístroj Philips XL 30 SEM s SE detektorem. Měření bylo provedeno ve spolupráci s FSI VUT. Spory *B. subtilis* na povrchu papíru opracovaném v argonovém výboji a případný vliv expozice na morfologii papíru byly studovány ve spolupráci s ÚPT AV ČR, v.v.i. pomocí SEM Tescan Vega, který byl upraven na enviromentální rastrovací elektronový mikroskop (EREM). Vliv DBD pracujícího ve vlhkém/suchém vzduchu na spory *A. niger* nanesené na papíru a PET byl vyhodnocen pomocí přístroje JEOL JSM-7600F, tímto přístrojem disponuje FCH-ÚCHM VUT. Důvodem použití různých přístrojů je, že první SEM analýza byla provedena v březnu 2010, v té době FCH VUT ještě nedisponovala svým SEM zařízením, proto bylo využito zařízení na FSI VUT. Enviromentální rastrovací elektronový mikroskop byl použit z důvodu absence vodivé vrstvy, která může zkreslovat výsledky při studiu morfologie papíru a mikroorganismů, a také z důvodu, že tato metoda je používána pro studium vzorků živé hmoty.

Přístroj Philips XL 30 SEM s SE detektorem byl použit k analýze vzorků papíru a PET opracovaných v DBD (Ar nebo N₂, 2,56 W·cm⁻³, 240 s) a referenčních vzorků. Urychlující napětí dosahovalo hodnoty 20 kV, snímky byly pořízeny se zvětšením 1 000, 10 000 a 20 000. Vzorky o velikosti cca 0,5×0,5 cm byly před měřením pokoveny v naprašovací jednotce Polaron E5100 vodivou vrstvou na bázi Au/Pd. Měření provedl Ing. Martin Zmrzlý, Ph.D.

Přístroj SEM Tescan Vega (EREM) s ionizačním detektorem byl použit k analýze vzorků *B. subtilis* na papírovém nosiči a vzorků samotného papíru opracovaných v DBD (Ar, 2,56 W·cm⁻³, 240 s) a referenčních vzorků. Urychlovací napětí dosahovalo hodnoty 20 kV.

Zvětšení u jednotlivých snímků se lišilo, v případě snímků spor *Bacillus subtilis* bylo použito zvětšení 20 000, při analýze struktury papíru se jednalo o zvětšení 1000. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu Vega TC. Pro analýzu byly použity vzorky o velikosti cca 0,5×0,5 cm. Měření provedl RNDr. Jiří Runštuk z Ústavu přístrojové techniky Akademie věd České republiky.

Přístroj JEOL JSM-7600F byl použit k analýze vzorků plísně *A. niger* nanesené na papírovém nebo PET nosiči a k analýze samotných nosičů opracovaných v DBD (suchý/vlhký vzduch, 2,28/2,33 W·cm⁻³, 180 s) a referenčních vzorků. Urychlující napětí dosahovalo hodnoty 10 kV, snímky byly pořízeny se zvětšením 500, 2 500, 10–15 000, 25 000 a 100 000. Vzorky o velikosti cca 0,8×0,8 cm byly před měřením pokoveny v naprašovací jednotce Polaron SC 7640 vodivou vrstvou na bázi Au/Pd. Měření provedl Ing. Martin Zmrzlý, Ph.D.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Diagnostika výboje

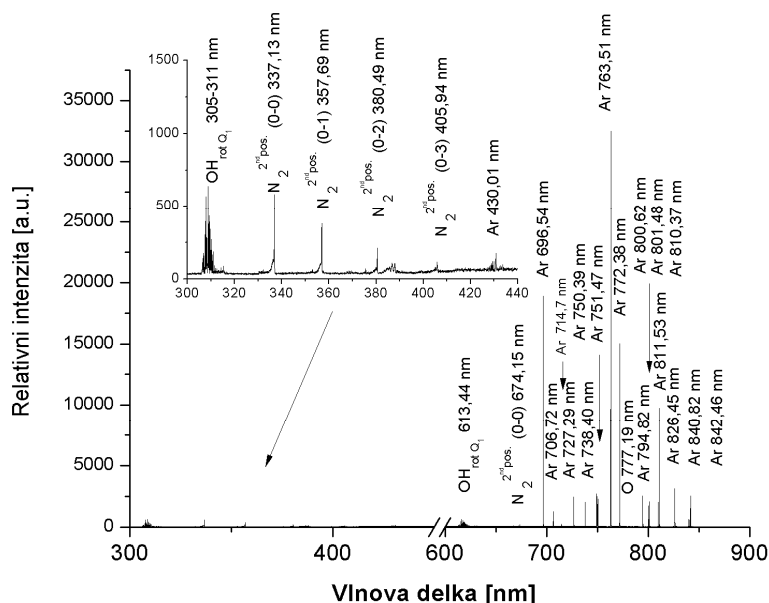
4.1.1 Optická emisní spektroskopie

4.1.1.1 Argon

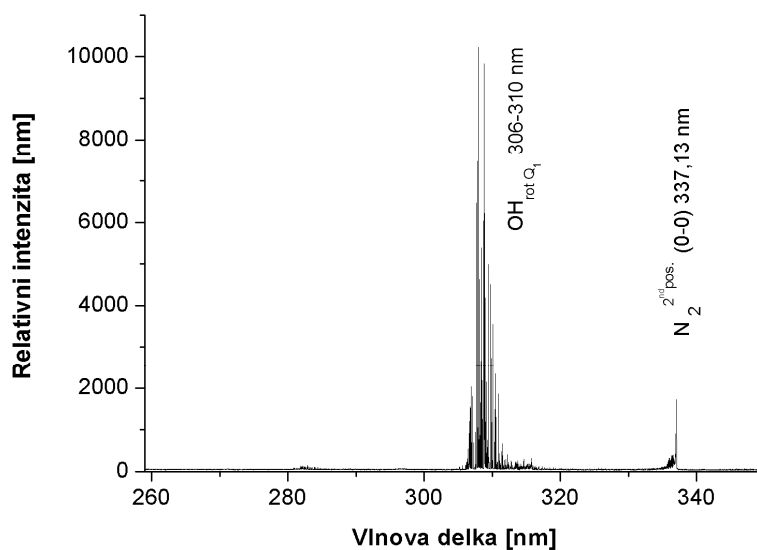
Přehledové spektrum (300-850 nm) výboje v argonu je zobrazeno na obrázku 9 a spektrum v UV oblasti (200-350 nm) na obrázku 10. Oblast vyšších vlnových délek (690-850 nm) obsahuje převážně čáry emitované atomy Ar excitovanými do stavu 4p. V nižších vlnových délkách byla zaznamenána emise Ar ze stavu 5p (430 nm). Vedle argonu byly ve spektru identifikovány pásy druhého pozitivního systému dusíku (337-406 nm). Na vlnové délce 337 nm je vidět dominantní pás 0-0, spektrum druhého řádu tohoto pásu je pak vidět na vlnové délce 674 nm. Dále byly identifikovány pásy s $\Delta v = -1$ (358 nm), $\Delta v = -2$ (380 nm) a $\Delta v = -3$ (406 nm). Velmi slabá, ale přesto detekovatelná, emise atomárního kyslíku byla zaznamenána na vlnové délce 777 nm. V oblasti vlnových délek 305-311 je patrná relativně silná emise OH radikálu. V oblasti vlnových délek 612-622 je pak vidět toto spektrum ve druhém řádu. V oblasti 200-300 nm nebyly detekovány žádné emisní čáry.

Dusík, kyslík a voda se do výboje dostávají pravděpodobně ze vzduchu v důsledku netěsností v aparatuře, případně mohou být přítomny přímo v pracovním plynu. Při experimentech byl použit plyn s čistotou 99,996%.

Rotační teplota (320 ± 10) K byla spočítána ze spektra OH radikálu. Teplota byla určována z relativní intenzity prvních šesti rotačních čar větve Q_1 ($3/2, 5/2, 9/2, 11/2, 13/2$) přechodu $OH(A^2\Sigma^+) \rightarrow OH(X^2\Pi)$; rotační čára $7/2$ byla vynechána. Vibrační teplota (1600 ± 260) K byla vypočítána z relativních intenzit hlav (0-2, 1-3 a 2-4) vibračních pásů sekvence $\Delta v = -2$ přechodu $N_2(C^3\Pi_u) \rightarrow N_2(B^3\Pi_g)$ molekuly N_2 .



Obrázek 9 Přehledové emisní spektrum DBD buzeného v argonu, použitý výkon $2,4 \text{ W/cm}^3$.



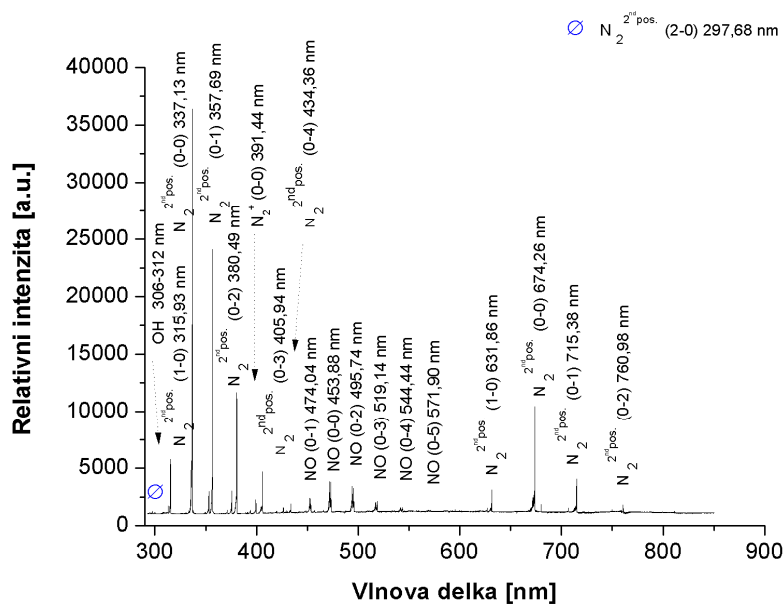
Obrázek 10 UV oblast emisního spektra DBD buzeného v argonu, použitý výkon $2,4 \text{ W/cm}^3$.

4.1.1.2 Dusík

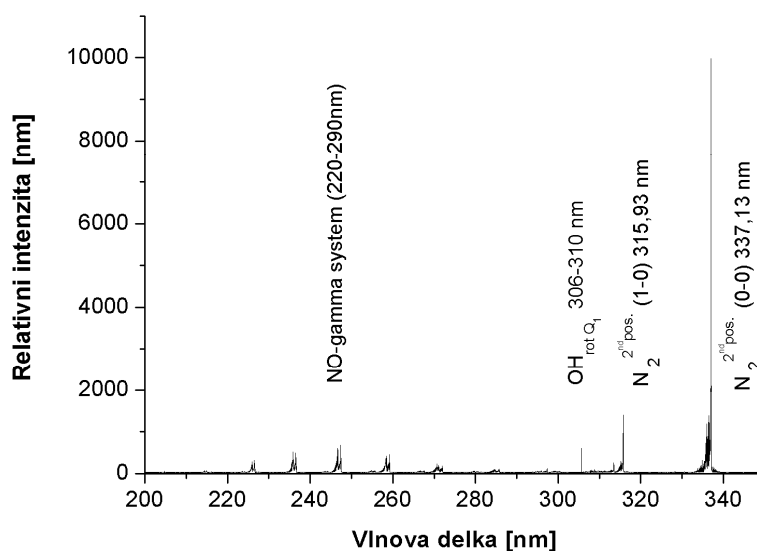
Přehledové spektrum (300-850 nm) výboje v dusíku je zobrazeno na obrázku 11 a spektrum v UV oblasti (200-350 nm) na obrázku 12. V oblasti 316-434 nm se opět vyskytují pásy druhého pozitivního systému dusíku. Dominantním pásem je pás 0-0 na vlnové délce 337 nm, druhý spektrální řád tohoto systému je vidět na vlnové délce 674 nm. Dále byly identifikovány pásy s $\Delta v = +2$ (298 nm), $\Delta v = +1$ (316 nm, 2. spektrální řád na vlnové délce 632 nm), $\Delta v = -1$ (358 nm, 2. spektrální řád - 715 nm), $\Delta v = -2$ (380 nm), $\Delta v = -3$ (406 nm) a $\Delta v = -4$ (434 nm). Na vlnové délce 391 nm byl identifikován pás 0-0 prvního negativního systému N_2^+ . Stejně jako v argonu byla i zde změřena emise radikálu OH, relativní intenzita

OH spektra je však velmi nízká. V oblasti vlnových délek 220-290 nm je vidět NO_γ systém, jeho druhý spektrální řád je pak v oblasti 470-572 nm.

Rotační teplota (510 ± 40) K byla spočítána ze spektra OH radikálu. Teplota byla určována z relativní intenzity prvních šesti rotačních čar větve Q_1 ($3/2, 5/2, 9/2, 11/2, 13/2$) přechodu $\text{OH}(A^2\Sigma^+) \rightarrow \text{OH}(X^2\Pi)$; rotační čára $7/2$ byla vynechána. Vibrační teplota (1620 ± 160) K byla vypočítána z relativních intenzit hlav (0-2, 1-3 a 2-4) vibračních pářů sekvence $\Delta v = -2$ přechodu $N_2(C^3\Pi_u) \rightarrow N_2(B^3\Pi_g)$ molekuly N_2 .



Obrázek 11 Přehledové emisní spektrum DBD buzeného v dusíku, použitý výkon 2 W/cm^3 .



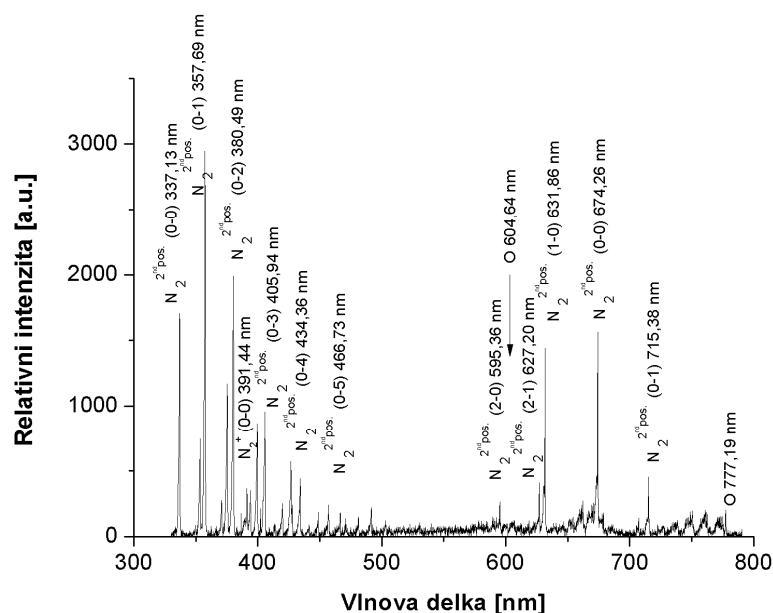
Obrázek 12 UV oblast emisního spektra DBD buzeného v dusíku, použitý výkon 2 W/cm^3 .

4.1.1.3 Suchý vzduch

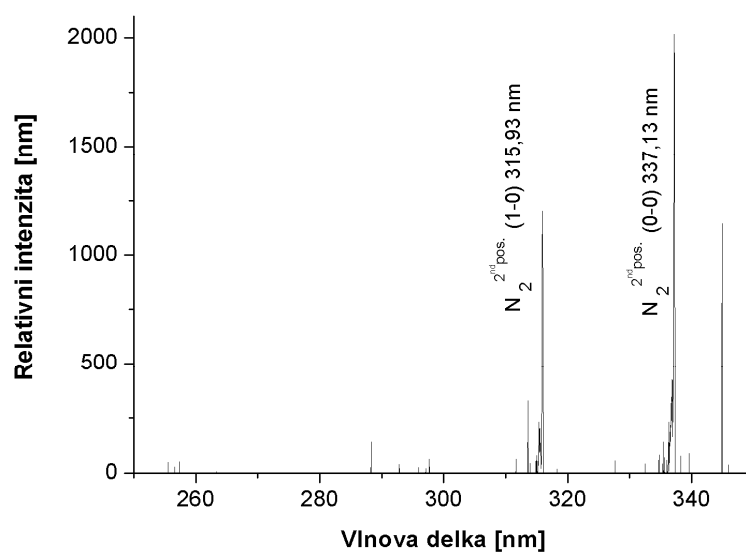
Přehledové spektrum (320-800 nm) výboje ve vzduchu je zobrazeno na obrázku 13 a spektrum v UV oblasti (250-350 nm) na obrázku 14. Stejně jako v případě dusíku byly ve spektru identifikovány převážně pásy druhého pozitivního systému dusíku v oblasti 316-467 nm. Dominantním pásem je pás 0-0 na vlnové délce 337 nm. Dále jsou vidět pásy s $\Delta v = \pm 1, -2, -3, -4$ a -5 (467 nm). Druhý spektrální řád druhého pozitivního systému dusíku je vidět v oblasti vlnových délek 590-720 nm (pásy $\Delta v = 0, \pm 1, +2$). Na vlnové délce 391 nm byl identifikován pás 0-0 prvního negativního systému N_2^+ . Mimo dusík se ve spektru vyskytují emisní čáry atomárního kyslíku (777 nm). V oblasti 200-300 nm nebylo detekováno žádné spektrum. Tento jev může být způsoben vyšší koncentrací ozónu, kdy ozon reaguje s NO za vzniku NO_2 ($NO + O_3 \leftrightarrow NO_2 + O_2$ [3]).

Absenci NO_γ systému ve spektrech vzduchu popsal také Heise a kol [21]. Dle autorů vzniká ve výboji ve vzduchu velké množství ozónu, který pohlcuje záření těchto vlnových délek. Obdobně Chiang a kol. prezentovali spektra výboje ve vzduchu bez NO_γ systému.

Rotační teplota nebyla spočítána. Vibrační teplota (2700 ± 500) K byla vypočítána z relativních intenzit hlav (0-2, 1-3 a 2-4) vibračních pásmů sekvence $\Delta v = -2$ přechodu $N_2(C^3\Pi_u) \rightarrow N_2(B^3\Pi_g)$ molekuly N_2 .



Obrázek 13 Přehledové emisní spektrum DBD buzeného v suchém vzduchu, použitý výkon $2,3 \text{ W/cm}^3$.

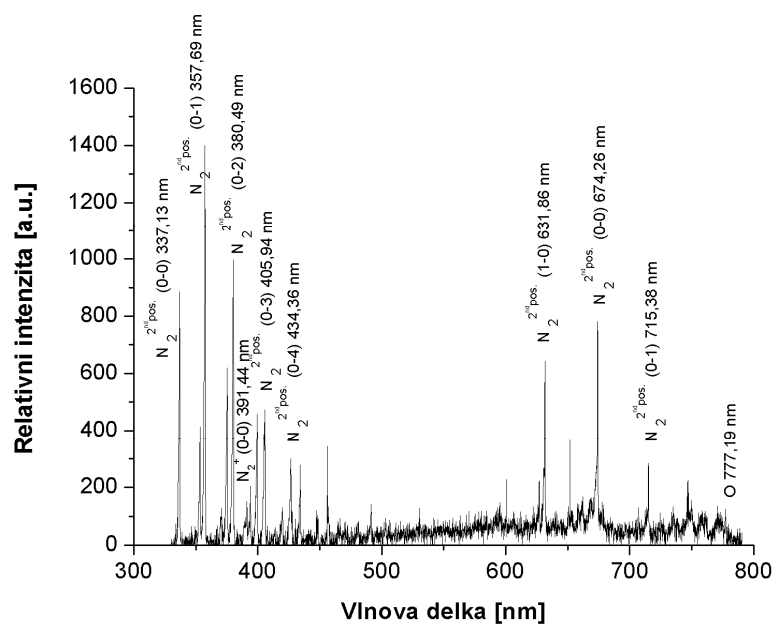


Obrázek 14 UV oblast emisního spektra DBD buzeného v suchém vzduchu, použitý výkon $2,3\text{W/cm}^3$.

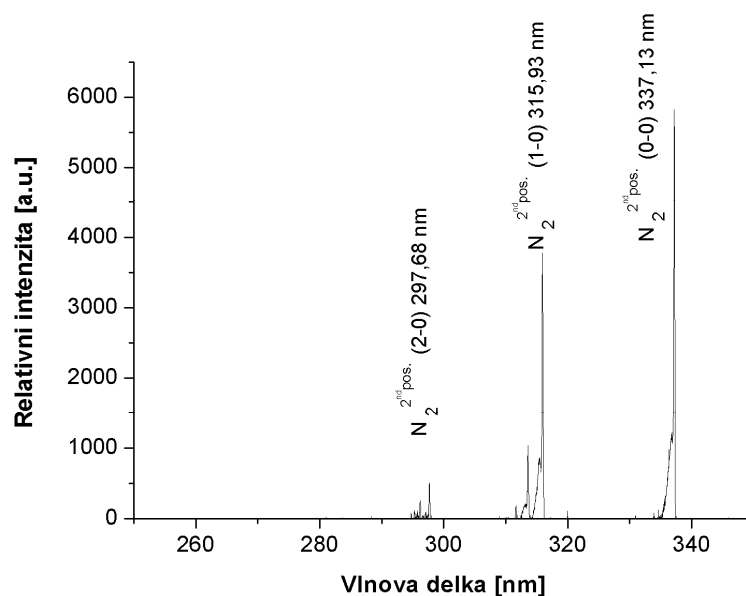
4.1.1.4 Vlhký vzduch

Přehledové spektrum (320-800 nm) výboje ve vlhkém vzduchu je zobrazeno na obrázku 15 a spektrum v UV oblasti (250-350 nm) na obrázku 16. Ve spektrech byl identifikován druhý pozitivní systém dusíku v oblasti 316-434 nm, s dominantním pásem 0-0 na vlnové délce 337 nm. Dále byly detekovány pásy $\Delta v = \pm 1, \pm 2, -3$ a -4 . Druhý spektrální řád druhého pozitivního systému dusíku je vidět v oblasti vlnových délek 620-720 nm (pásy $\Delta v = 0, \pm 1$). Na vlnové délce 391 nm byl identifikován pás 0-0 prvního negativního systému N_2^+ . Na vlnové délce 777 nm byla zaznamenána emise atomárního kyslíku.

Rotační teplota nebyla spočítána. Vibrační teplota (2600 ± 900) K byla vypočítána z relativních intenzit hlav (0-2, 1-3 a 2-4) vibračních pásů sekvence $\Delta v = -2$ přechodu $N_2(C^3\Pi_u) \rightarrow N_2(B^3\Pi_g)$ molekuly N_2 .



Obrázek 15 Přehledové emisní spektrum DBD buzeného ve vlhkém vzduchu, použitý výkon 2,3 W/cm³.

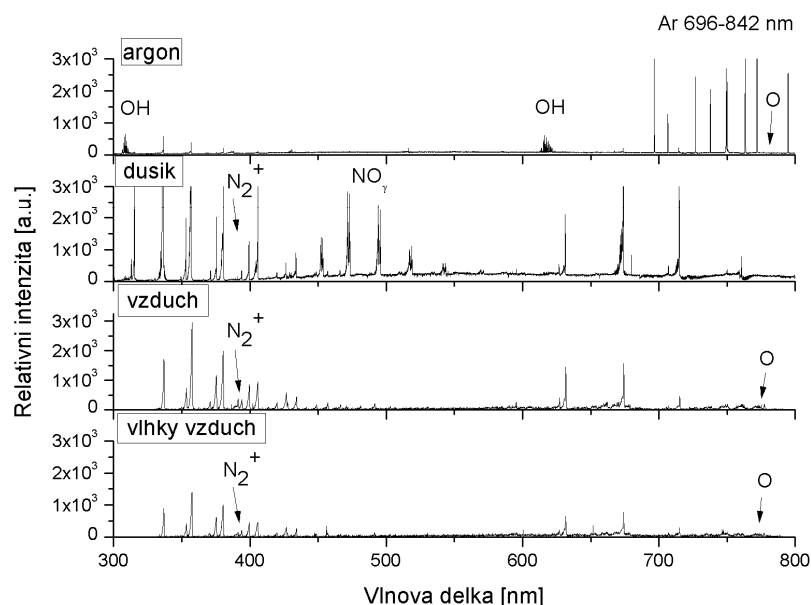


Obrázek 16 UV oblast emisního spektra DBD buzeného ve vlhkém vzduchu, použitý výkon 2,3 W/cm³.

4.1.1.5 Porovnání plynů

Ve všech výbojích byla identifikována emise druhého pozitivního systému dusíku, v argonu pak navíc argonové čáry a v ostatních plynech první negativní systém dusíku. Z hlediska antimikrobiálních účinků plazmatu je důležitá přítomnost volných radikálů kyslíku (O, OH) a dusíku (NO_γ). Kyslíkový radikál (777 nm) byl identifikován v plazmatu buzeném v argonu, suchém i vlhkém vzduchu. Porovnáním spekter (viz obrázek 17) je patrné, že nejvyšší koncentrace tohoto radikálu je v plazmatu buzeném ve vlhkém vzduchu. Atomární kyslík může přímo reagovat s buněčným materiálem, nebo vstupovat do dalších reakcí v

plazmatu, při nichž dochází např. ke vzniku ozónu. Zatímco atomární kyslík oxiduje molekuly proteinů, jejichž funkcí je kontrola toku makromolekulárních látek do/z buňky, ozón poškozují buněčné dýchání [8].

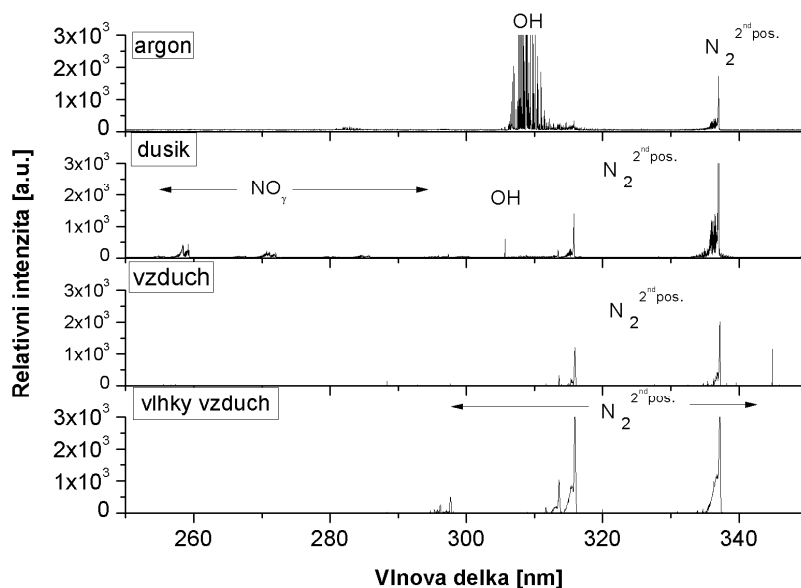


Obrázek 17 Porovnání přehledových emisních spekter DBD buzeného v Ar, N₂, suchém a vlhkém vzduchu. Ve spektrech nebyly pro přehlednost popsány pásy 2. pozitivního systému N₂. Osa y byla v případě N₂ a Ar omezena na relativní intenzitu $4 \cdot 10^3$ z původních $4 \cdot 10^4$.

OH radikál byl detekován v plazmatu buzeném v argonu a dusíku (306-311 nm). Při porovnání relativních intenzit OH čar ve spektru dusíku a argonu (viz obrázek 18) je patrné, že v plazmatu buzeném v argonu je jeho koncentrace výrazně vyšší. Relativní intenzita OH radikálu ve spektru argonu je cca 7x vyšší než ve spektru dusíku. OH radikál vzniká z molekuly vody buď elektronovou disociací a excitací, nebo jako výsledek srážkových procesů s radikály s dlouhou dobou života (např. v případě Ar plazmatu – Ar (4s)) [35]. Jak v případě argonu, tak i dusíku se voda dostává do výboje prostřednictvím vzduchu, který proniká do výboje v důsledku netěsnosti aparatury. Případně mohou být molekuly vody/vzduchu nasorbovány na površích uvnitř aparatury, nosiče vzorků, nebo jsou obsaženy přímo v pracovním plynu. Při interakci OH radikálu s buněčným materiálem jsou oxidovány mastné kyseliny, které jsou hlavní stavební komponentou fosfolipidové dvojvrstvy buněčné membrány. V důsledku oxidace dochází ke změně fluidity resp. permeability membrány [3].

Molekulový spektrální systém NO_γ (220-290 nm) byl identifikován jen ve spektru plazmatu buzeného v dusíku. NO vzniká v plazmatu chemickou konverzí N₂ a O₂ [35]. Tento proces je konkurenčním procesem reakce vzniku ozonu [42]. Schwabedissen a kol. [48] uvádí, že přidáním 0,1 % NO nebo NO₂ do komerčních ozonizátorů vede k úplné inhibici tvorby ozonu. Přítomnost NO ve spektru dusíku může být důvodem absence čar atomárního kyslíku, které byly identifikovány v ostatních plynech. Relativní intenzita tohoto systému je také ve srovnání s intenzitami čar atomárního kyslíku ve spektrech ostatních plynů výrazně vyšší. Germicidní účinky NO_γ systému spočívají ve fotochemickém poškození nukleových kyselin (DNA/RNA). UV záření v rozsahu vlnových délek 240-280 nm je absorbováno nukleovými kyselinami (absorpční maximum 260-265 nm), výsledkem je vznik thyminových

dimerů, které následně inhibují replikace genetické informace [3]. Přehled všech identifikovaných spektrálních čar a pásů je uveden v tabulce 4.



Obrázek 18 Porovnání UV oblasti emisních spekter DBD buzeného v Ar, N₂, suchém a vlhkém vzduchu. Osa y byla v případě N₂ a Ar omezena na relativní intenzitu $4 \cdot 10^3$ z původních $4 \cdot 10^4$.

Vlnová délka [nm]	Spektrální systém	Přechod	Plyn
200-300	NO γ systém	NO($A^2 \Sigma^+$) \rightarrow NO($X^2 \Pi_r$)	N ₂
300-470	2. pozitivní systém dusíku	N ₂ ($C^3 \Pi_u$) \rightarrow N ₂ ($B^3 \Pi_g$)	Ar, N ₂ , vzduch s/v
391	první negativní systém dusíku	N ₂ ⁺ ($B^2 \Sigma_u^+$) \rightarrow N ₂ ⁺ ($X^2 \Sigma_g^+$)	N ₂ , vzduch s/v
306-311	OH-radikál	OH($A^2 \Sigma^+$) \rightarrow OH($X^2 \Pi$)	Ar, N ₂
430	Ar I atomární čára	Ar(5p) \rightarrow Ar(4s)	Ar
777	O I atomární čáry	O(5p) \rightarrow O(5s)	Ar, vzduch s/v
690-850	Ar I atomární čáry	Ar(4p) \rightarrow Ar(4s)	Ar

Tabulka 4 Přehled identifikovaných spektrálních čar a pásů. Vzduch s/v – suchý/vlhký.

Na základě výsledků OES lze tedy předpokládat příspěvek reaktivních radikálů kyslíku (O, OH) k inaktivaci mikroorganismů v plazmatu buzeném ve všech 4 použitých plynech. Současně mohlo k inaktivaci přispívat také UV záření emitované druhým pozitivním systémem dusíku, přičemž jeho intenzita klesala v pořadí dusík, vzduch a argon. V případě plazmatu generovaného v dusíku se může na inaktivaci podílet také UVC záření z emise NO γ systému. V případě argonu je také nutno uvažovat možný příspěvek nabitých částic k inaktivačnímu procesu. Jak bylo zmíněno v kapitole 2.5.3 tento jev je pravděpodobnější pro plyny s vyšší atomovou hmotností. V neposlední řadě se na inaktivaci mohou podílet také metastabilní atomy a molekuly, např. v procesu leptání nebo eroze buněčného materiálu.

Z optických emisních spekter byly spočítány vibrační teploty (viz tabulka 5), rotační teplota byla spočítána pouze pro argon. Rotační a vibrační teploty jsou významnými charakteristikami plazmatu. Vibrační teplota vypovídá o úrovni excitace plazmatu. V neizotermickém plazmatu bývá zpravidla vyšší než teplota rotační. Z výsledků je tedy patrné, že použité plazma je neizotermické. Rotační teplota charakterizuje rotační rozdělení stavů molekuly. Vzhledem k velmi rychlé termalizaci rotačních stavů rotační teplota v podstatě odpovídá teplotě neutrálního plynu. V případě argonu byla rotační teplota 47 °C (320 K). Teplota byla v průběhu inaktivačního procesu měřena také termočlánkem. V případě argonu byla teplota mezi elektrodami po 270 s plazmové expozice 60 °C, což je hodnota velmi blízká hodnotě vypočítané z OES. Pro posuzování vlivu teploty na inaktivaci byly tedy použity teploty naměřené termočlánkem v prostoru elektrod (teploty byly měřeny cca ve středu mezi elektrodami, shodně s umístěním vzorku), viz kapitola 4.1.2.

Plyn	T _{rot} [K]	T _{vibr} [K]
Argon	320 ± 7	1600 ± 300
Dusík	510 ± 40	1616 ± 160
Vzduch – suchý	-	2700 ± 500
Vzduch - vlhký	-	2500 ± 900

Tabulka 5 Přehled vibračních a rotačních teplot vypočítaných z OES.

4.1.2 Měření teploty termočlánkem

Teplota je jedním z mechanismů podílejících se na inaktivaci v plazmatu, avšak s ohledem na snížení tepelné zátěže sterilizovaného materiálu je žádoucí, aby její příspěvek byl co nejnižší. Z toho důvodu bylo také opracování vzorků prováděno v cyklech (30 s zapnutý výboj, 2 min chlazení proudícím plynem). Teplota mezi elektrodami (ve středu elektrod) byla měřena termočlánkem. Měření teploty bylo prováděno ve stejných cyklech jako opracování vzorků. Tabulka 6 přehledně shrnuje naměřené teploty. První teplota (t_1) byla změřena vždy před spuštěním výboje, druhá teplota (t_2) bezprostředně po jeho vypnutí.

čas* [s]	argon		dusík		suchý vzduch		vlhký vzduch	
	2,6 W/cm ³		2 W/cm ³		2,3 W/cm ³		2,3 W/cm ³	
	t ₁ [°C]	t ₂ [°C]	t ₁ [°C]	t ₂ [°C]	t ₁ [°C]	t ₂ [°C]	t ₁ [°C]	t ₂ [°C]
30	28	36	25	36	33	38	35	42
60	32	40	34	44	37	46	40	49
90	36	44	38	49	-	-	-	-
120	39	46	42	54	42	55	44	61
150	41	48	46	54	-	-	-	-
180	42	49	48	58	49	61	54	65
210	45	53	53	63				
240	48	56	57	65	55	66	63	74
270	52	60	61	71	-	-	-	-

Tabulka 6 Teploty naměřené mezi elektrodami DBD výboje buzeného v argonu, dusíku, suchém a vlhkém vzduchu. První teplota (t_1) byla změřena vždy před spuštěním výboje, druhá teplota (t_2) bezprostředně po jeho vypnutí.

* Čas odpovídá celkové expoziční době, po kterou byly vzorky vystaveny účinkům DBD (2 minuty chlazení mezi jednotlivými pracovními částmi nejsou do tohoto času zahrnuty.)

V případě plazmatu buzeného v argonu docházelo v průběhu pracovní fáze výboje k nárůstu teploty průměrně o 8 °C/30 s. Proudící plyn poté prostor mezi elektrodami ochladil průměrně o 5 °C/2 min. Při nejdelším použitém expozičním čase 270 s dosahovala teplota mezi elektrodami až 60°C. V případě plazmatu buzeného v dusíku docházelo při pracovní fázi průměrně k nárůstu teploty o 10 °C/30 s. Při chlazení pracovním plynem pak docházelo k poklesu teploty průměrně o 6 °C/2 min. Při expozičním čase 270 s byl vzorek s mikroorganismy vystaven teplotám až 71 °C. Vzorky opracované v dusíku po dobu 270 s byly tedy vystaveny o 9 °C vyšší teplotě než v případě argonu. Vyšší ohřev ve výboji generovaném v dusíku by mohl pravděpodobně souviset s větším počtem stupňů volnosti dusíku oproti argonu. Dusík je možné tepelně snadno excitovat, a proto lépe přenáší tepelnou energii. Naopak v argonu existuje elektronová excitace.

S časovým odstupem byla prováděna sterilizace ve výboji buzeném v suchém/vlhkém vzduchu, současně byly měřeny také teploty, jimiž byly vzorky v tomto prostředí vystaveny. Průměrný nárůst teploty v suchém vzduchu v průběhu pracovní fáze byl 10 °C/30 s a v případě vlhkého vzduchu 11 °C/30 s. Při expozičních nebyly použity všechny expoziční časy jako v případě argonu a dusíku, z toho důvodu není možné vyhodnotit teplotní pokles v důsledku průchodu plynu při vypnutém výboji. Při maximální délce expozice 240 s dosahovala teplota mezi elektrodami při použití suchého vzduchu jako pracovního plynu 66 °C a v případě vlhkého vzduchu 74 °C. Při stejném expozičním čase byla v argonovém plazmatu teplota 56 °C a v dusíkovém plazmatu 65 °C. Avšak vzhledem k rozdílům v počáteční teplotě je obtížné tyto hodnoty porovnat. Mnohem ilustrativnější je porovnání plynů na základě teplotních nárůstů v průběhu pracovní fáze. Nejvyšší průměrný teplotní nárůst byl zaznamenán v případě vlhkého vzduchu (11 °C/30 s), dále suchý vzduch a dusík (10 °C/30 s) a nejnižší teplotní nárůst byl naměřen v případě argonu (8 °C/30 s).

Teplotní nároky modelových mikroorganismů použitých v této studii jsou v případě vegetativních buněk *Aspergillus niger* 6-45 °C [85], *Escherichia coli* 4-50 °C [86] a 8-53 °C *Bacillus subtilis* [87; 88]. Spory *A. niger* odolávají teplotám do cca 60 °C [89] a *B. subtilis* do 120 °C [90]. Porovnáním maximálních hodnot teploty tolerovaných mikroorganismy a teplot naměřených v prostoru mezi elektrodami je patrné, že s výjimkou spor *B. subtilis* byly tyto teploty v řadě případů přesahovány, a proto nelze vliv teploty na inaktivaci zcela vyloučit. Na druhou stranu je nutno vzít v potaz fakt, že mikroorganismy těmto teplotám byly vystaveny jen velmi krátkou dobu. Např. k inaktivaci spor *A. niger* je potřeba působení teploty cca 60 °C po dobu minimálně 15 min a více v závislosti na koncentraci mikrobiální kultury [85]. Je také známo, že krátkodobé zvýšení teploty nad maximální teplotu vyvolává teplotní šok, který vede k různým výkyvům metabolismu, nikoliv však k buněčné smrti [2].

4.2 Plazmová sterilizace

Jak již bylo zmíněno několikrát v předchozím textu, sterilizace v plazmatu je velmi komplexní proces, na jehož průběh má vliv celá řada faktorů, jako jsou hustota výkonu dodávaného do plazmatu, pracovní plyn, druh mikroorganismu, typ vzorku, hustota buněk, v případě vrstvy buněk na nosiči ovlivňuje průběh inaktivace také materiál nosiče, atd. V této studii jsem se snažila zhodnotit vliv výše uvedených faktorů a nalézt optimální podmínky pro inaktivaci tak, aby bylo možno tyto podmínky použít pokud možno pro co nejširší spektrum mikroorganismů.

V počátku měření byla snaha se co nejvíce přiblížit reálným podmínkám, kdy mikroorganismus roste přímo na nosiči, jako je tomu např. v archivech, knihovnách apod. Z toho důvodu byly použity vzorky plísně *A. niger* kultivované přímo na papírovém nosiči. Na vzorcích byl studován vliv hustoty výkonu v plazmatu buzeném v dusíku (viz kapitola 4.2.1.1). Avšak s ohledem na možné srovnání sterilizačních účinků DBD s výsledky jiných laboratoří, byly vzorky porostlé plísní nahrazeny vzorky, na něž byly přímo nanášeny pouze spory plísně *A. niger*. Experimenty byly navíc rozšířeny také o vegetativní buňky grampozitivní bakterie *B. subtilis*. Pomocí těchto dvou mikroorganismů byl studován vliv hustoty výkonu dodávaného do plazmatu, vliv pracovního plynu (argonu, dusíku) a vliv nosného média (papír, PET) na průběh sterilizace (viz kapitola 4.2.1). Současně byl pomocí SEM analýzy zhodnocen vliv plazmového opracování na nosné médium (viz kapitola 4.2.4). Na základě výsledků získaných při hodnocení vlivu nosného média na inaktivaci, byl změněn postup uvolňování buněk z papírových nosičů. Do fyziologického roztoku byly přidány skleněné kuličky, které napomáhaly uvolnění buněk do roztoku. Vzhledem k vyšší odolnosti bakteriálních spor vůči nepříznivým podmínkám, byly vegetativní buňky *B. subtilis* nahrazeny spori. Na sporách bakterie byly ověřeny podmínky, které byly v případě vegetativních buněk vyhodnoceny jako optimální (viz kapitola 4.2.1.3). Tyto podmínky pak byly také použity pro oddělené studium jednotlivých mechanismů působících při sterilizaci v plazmatu, jmenovitě studium inaktivace teplem a UV zářením (viz kapitola 4.2.2). Pro oddělené studium jednotlivých mechanismů byly použity spory plísně *A. niger* a spory bakterie *B. subtilis*. Pomocí enviromentální SEM analýzy byl na vzorcích papíru se spori *B. subtilis* vystavených účinkům plazmatu buzeného v argonu zhodnocen případný příspěvek nabitých částic a leptání k celkové inaktivaci (viz kapitola 4.2.2.2). Nejlepší výsledky byly pro oba druhy mikroorganismů dosaženy v plazmatu buzeném v argonu, tyto podmínky byly ověřeny na gramnegativní bakterii *E. coli* (viz kapitola 4.2.1.5). Jako poslední byla provedena studie sterilizačních účinků plazmatu buzeného ve vzduchu na plíseň *A. niger* a případný vliv vlhkosti na výsledek sterilizace (viz kapitola 4.2.3). I v tomto případě byla provedena SEM analýza vzorků mikroorganismů a materiálů exponovaných plazmatem (viz kapitola 4.2.3.2 a kapitola 4.2.4).

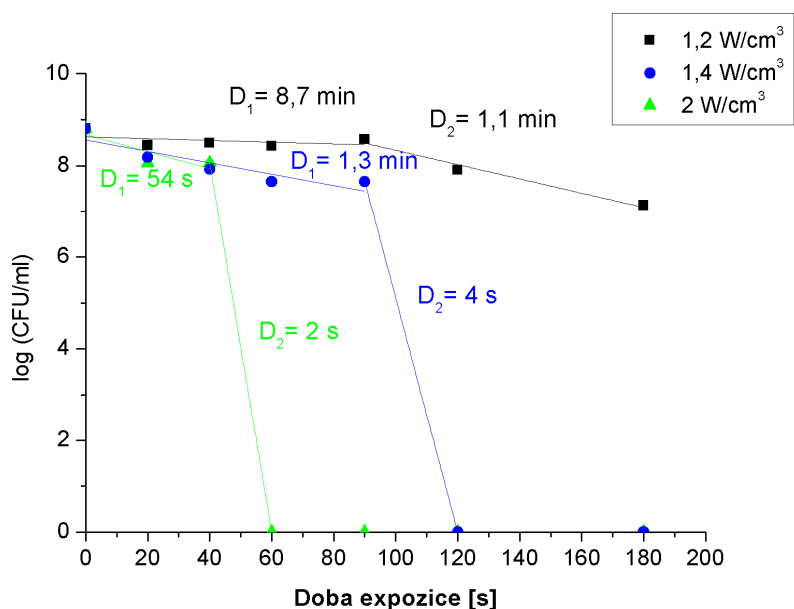
Prezentované výsledky jsou strukturované ve shodě s časovým průběhem experimentu.

4.2.1 Sterilizace v plazmatu buzeném v argonu a dusíku

Vliv hustoty výkonu dodávaného do plazmatu na inaktivaci byl studován s použitím 7-denní kultury a spor plísně *Aspergillus niger* a vegetativních buněk bakterie *Bacillus subtilis*. Jako pracovní plyny byly použity dusík a argon. V případě dusíku byly použity hustoty výkonu 1,2; 1,4 s 2 W/cm³, v argonu byly použity hustoty výkonu 1,2; 1,8 a 2,4 W/cm³. Z výsledků byly sestaveny inaktivační křivky, jedná se o logaritmus počtu života schopných mikroorganismů (CFU/ml) v závislosti na čase. Vzhledem k tomu, že log 0 neexistuje, byla v případě, kdy na misce nebyla identifikována žádná kolonie, tj. CFU/ml = 0, nula nahrazena číslem 1. Jak bylo zmíněno v kapitole 2.4, výsledkem inaktivačních procesů v plazmatu jsou jednoduché nebo multisměrné křivky, které lze popsat kinetickou rovnicí 1. řádu. Logaritmičné hodnoty počtu životaschopných mikroorganismů byly vynášeny jako jednotlivé body, lineární úseky byly následně proloženy regresní přímkou, z regresní přímky byly spočítány *D* hodnoty dle vztahu uvedeného v kapitole 2.4 jako převrácená hodnota směrnice regresní přímky.

4.2.1.1 Dusík

Inaktivační křivka 7-denní kultury plísně *A. niger* zobrazující závislost sterilizačních účinků DBD pracujícího v dusíku na hustotě výkonu a době expozice je uvedena na obrázku 19.



Obrázek 19 Vliv hustoty výkonu a doby expozice na vzorky 7-denní kultury *Aspergillus niger* nanesené na papíru; N_2 plazma.

Ve všech případech byla získána inaktivační křivka se dvěma směrnici, kdy hodnota $D_1 > D_2$. Obě hodnoty D_1 i D_2 klesají s nárůstem hustoty výkonu dodávaného do plazmatu, a tedy rychlost inaktivace roste s růstem aplikované energie. Zatímco při použití hustoty výkonu $1,2 W/cm^3$ je hodnota $D_1 = 8,7$ min a $D_2 = 1,1$ min, v případě nejvyšší hustoty výkonu $2 W/cm^3$ jsou tyto hodnoty již jen 54 s resp. 2 s. Tomu také odpovídala rychlost inaktivace pro různé výkony. Při nejnižším výkonu, t.j. $1,2 W/cm^3$, docházelo v první „pomalejší“ fázi k inaktivaci cca 0,3 log CFU/ml během 90 s expozice plazmatem, poté následovala „rychlejší“ fáze, kdy bylo během dalších 90 s expozice (t.j. celkový expoziční čas 180 s) zredukováno 1,5 log CFU/ml. Celková dosažená redukce po 180 s expozice plazmatem byla tedy cca 1,8 log CFU/ml. Při použití hustoty výkonu $1,4 W/cm^3$ bylo dosaženo během první fáze redukce cca 1 log CFU/ml při expozici 90 s, ve druhé fázi došlo během následujících 30 s k inaktivaci 8 log CFU/ml. Celková dosažená redukce byla 9 log CFU/ml během 120 s expozice plazmatem. Pro nejvyšší výkon bylo v první fázi dosaženo redukce cca 0,8 log CFU/ml za 40 s, zatímco ve druhé fázi došlo k úplné redukci během dalších 20 s. Celková dosažená redukce byla 9 log CFU/ml během 60 s expozice plazmatem. Je také nutno uvést, že počáteční koncentrace a tedy i ostatní uvedené koncentrace neodpovídají zcela přesně skutečné koncentraci na povrchu papíru. Při vymývání bylo patrné, že řada spor zůstala zachycena na povrchu papíru, a tak nedošlo k jejich kompletnímu vymytí do roztoku.

Dle výsledků OES, viz kapitola 4.1.1.2, mohou v N_2 působit jak reaktivní sloučeniny kyslíku, tak také UV záření a případně i teplota.

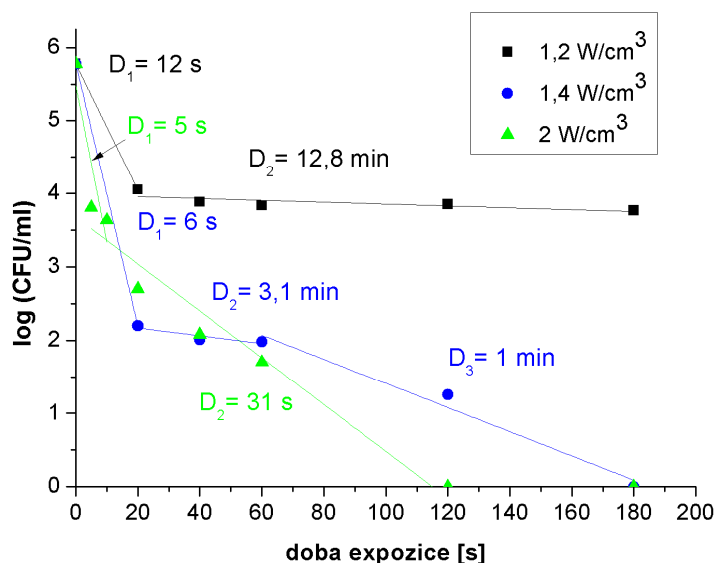
Studie jednotlivých mechanismů, podrobněji viz kapitola 4.2.2.1, ukázala v případě spor *A. niger* cca 10 % podíl UV záření na celkové inaktivaci v N_2 plazmatu, zatímco vliv teploty

byl zcela zanedbatelný. Avšak u vzorků 7-denní kultury, které jsou tvořeny jak vegetativními buňkami, tak také sporama, lze předpokládat vliv UV vyšší, neboť vegetativní buňky postrádají černou pigmentaci, která zajišťuje sporám jejich vysokou odolnost vůči účinkům UV záření. Nárůst rychlosti inaktivace při zvýšení hustoty výkonu je pravděpodobně v důsledku nárůstu koncentrace OH radikálu a molekul NO, generujících silné UV záření. Porovnáním emisních spekter, naměřených ve výboji s vyšším a nižším plazmovým výkonem, byly u vyššího výkonu zjištěny vyšší intenzity emisních čar a pásů.

Podobný průběh křivek popsali ve své práci např. Gadri a kol. [20] při použití přímé expozice plazmatem (nepřímá expozice měla opačný průběh $D_1 < D_2$). K inaktivaci použili RF doutnavý výboj (OAUGDP, 7 kHz, 8.5 – 11 kV) pracující na vzduchu. Hodnota D_1 byla od 5 s – 5,5 min a hodnota D_2 byla od 2-30 s dle typu mikroorganismu a použitého nosného média. Montie a kol. [91] patřící do stejné skupiny ve své publikaci uvedli, že hodnota D_1 je závislá na typu mikroorganismu a D_2 na typu nosného média. Dvoufázový průběh inaktivace pak vysvětluje následovně: v první fázi reagují aktivní částice plazmatu s vnější buněčnou membránou, v okamžiku, kdy dojde k jejímu poškození, následuje rychlá druhá fáze, která vede k usmrcení buňky. Tato skupina použila vrstvu mikroorganismu nanesenou na nosiči, přičemž koncentrace mikroorganismů byla 10^3 - 10^8 CFU/ml. Avšak v mém případě byly použity vzorky, kde kultivace probíhala přímo na nosiči. Na povrchu nosiče se tedy nacházela hustá vrstva plísně *A. niger*, součástí této vrstvy bylo jak mycelium (podhoubí), tak také vláknité rozmnožovací útvary (konidiofory, délka 1-3 mm [85]) s konidiálními hlavicemi obsahujícími spory. Tato hustá a nesouměrná vrstva pravděpodobně bránila přístupu aktivních částic plazmatu a případně UV záření k mase buněk pod povrchem. Plazma tedy působilo jen na buňky umístěné na povrchu a celková dosažená redukce byla proto velmi nízká. Jakmile byly z povrchu odstraněny buňky, které chránily objem buněk pod povrchem, následovala druhá rychlá fáze.

Inaktivační křivka spor plísně *A. niger* zobrazující závislost inaktivace na hustotě výkonu a době expozice v plazmatu buzeném v dusíku je na obrázku 20. V případě spor plísně byly získány křivky se dvěma směnicemi pro výkon 1,2 a 2 W/cm³ resp. se třemi směnicemi pro výkon 1,4 W/cm³. Porovnáním křivek naměřených pro výkon 1,2 a 1,4 W/cm³ je zřejmé, že tyto křivky mají velmi podobný průběh a při dostatečně dlouhých expozičních časech by i křivka odpovídající výkonu 1,2 W/cm³ byla definována třemi směnicemi. Inaktivační křivky spor plísně vykazují opačný průběh než křivky naměřené pro 7-denní kulturu. Z obrázku je patrné, že nejvyšší redukce životaschopných buněk 2-4 log CFU/ml byla dosažena během prvních 20 s. Tomu také odpovídají hodnoty $D_1 = 12$ s (1,2 W/cm³), 6 s (1,4 W/cm³) a 5 s (2 W/cm³). Tato rychlá fáze byla poté vystřídána druhou pomalejší fází, kdy pro nižší dva výkony byl průběh téměř konstantní s hodnotami $D_2 = 12,8$ min (1,2 W/cm³) a 3,1 min (1,4 W/cm³) a tedy zvýšený expoziční doby nevyvolávalo žádné nebo vyvolávalo jen nepatrné změny v počtu životaschopných buněk. V případě nejvyššího výkonu docházelo jen k malému zpomalení inaktivačního procesu s hodnotou $D_2 = 31$ s. Obecně lze tedy říci, že s nárůstem hustoty výkonu a doby expozice roste inaktivační účinek plazmatu. Porovnáním D hodnot pro jednotlivé výkony je patrné, že s rostoucím výkonem tyto hodnoty klesají, a tedy rychlost inaktivace v plazmatu roste. Tomu také odpovídají výsledky redukce životaschopných buněk. Pro výkon 2 W/cm³ bylo dosaženo redukce cca 6 log CFU/ml během 120 s, zatímco při použití výkonu 1,4 W/cm³ bylo pro dosažení stejného účinku potřeba až 180 s. V případě

nejnižšího výkonu byla dosažena redukce 2 log CFU/ml během 20 s expozice, tato hodnota se s rostoucí dobou expozice již významněji neměnila.



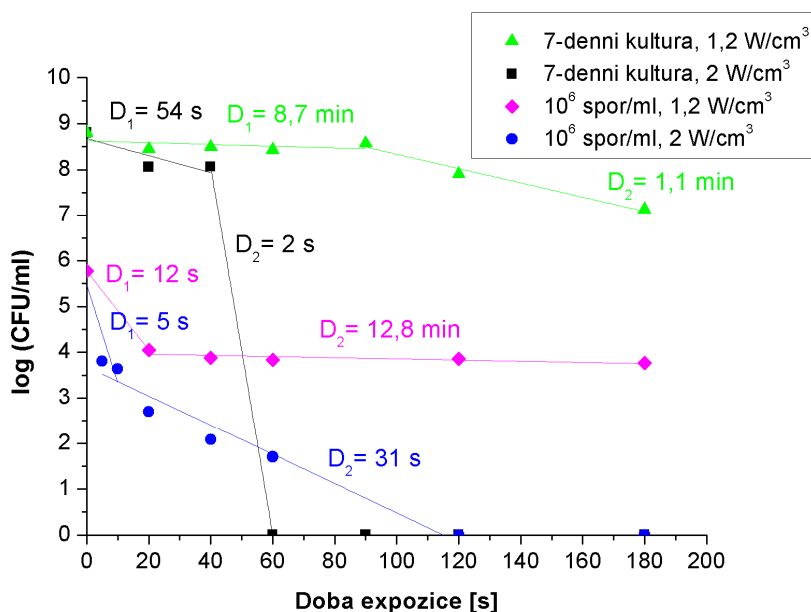
Obrázek 20 Vliv hustoty výkonu a doby expozice na spory *Aspergillus niger* nanesené na papíru; N_2 plazma.

Podobnou křivku jako byla naměřena pro výkon $1,2 \text{ W/cm}^3$ popsali také Heise a kol. [21] při inaktivaci spor *Aspergillus niger* pomocí DBD buzeního v dusíku (frekvence 20-50 kHz, hustota výkonu 7 W/cm^2). V první fázi dosáhli redukci 1 log CFU během 5 s, poté došlo k výraznému zpomalení a pro dosažení stejné redukce bylo potřeba dalších 20 s. Tento jev popisují jako stav „nasyčení“, kdy dochází k nepatrným nebo žádným změnám v počtu životaschopných buněk. Pravděpodobnou příčinou byl dle autorů tzv. efekt stínění vyvolaný vzájemným překrytím buněk, kdy buňky na povrchu chránily buňky uložené ve spodních vrstvách. Jako dominantní mechanismus uvedli UV záření, proto také v případě *A. niger*, který se vyznačuje vysokou odolností vůči UV záření byla výsledná redukce 2 log CFU tak nízká. Výsledky porovnali se spory *B. subtilis*, kdy za stejný čas dosáhli redukce 4 log CFU. Tyto výsledky jsou ve shodě s tvrzením Laroussiho [8], že v případě, kdy se UV záření významně podílí na inaktivačním procesu případně je převládajícím mechanismem, inaktivační křivka se v první fázi vyznačuje strmým průběhem (nízká hodnota D), tato fáze je následovaná druhou pomalejší fází. Avšak stejný průběh inaktivační křivky získali také autoři, kteří jako hlavní inaktivační mechanismus uvádí reaktivní sloučeniny kyslíku a vliv UV vyhodnotili spíše jako minoritní např. Gadri a kol. [20], Kayes a kol. [15], Deng a kol. [65], Zimmermann a kol. [27], Morgan a kol. [26], Laroussi a kol. [70].

V mém případě byl podíl UV záření na inaktivaci v N_2 plazmatu v případě spor *A. niger* cca 10 %, viz kapitola 4.2.2.1. Zpomalení ve druhé části křivky bylo, dle mého názoru, v důsledku efektu stínění, popsaného v práci Heise a kol. [21]. Spory *Aspergillus niger* byly nanášeny na papír bodově pomocí mikropipety, vznikaly tak vícevrstvé shluky buněk na povrchu, které se vzájemně překrývaly. Stínění mohlo být také podpořeno pórovitou strukturou papíru, kdy buňky zachyceny v pórech materiálu byly chráněny před účinky plazmatu. Papír Whatman 1 má výrobcem definovanou velikost póru, těmi mohou procházet částice do průměru $11 \mu\text{m}$ [92]. Rozměry kulovité spory *A. niger* jsou $3,5\text{-}5 \mu\text{m}$ (průměr)

[85]. Tyto rozměry jsou výrazně menší než póry papíru a spory se mohly dostávat do těchto pórů, kde pak zůstávaly zachyceny. Efekt stínění se výrazněji projevoval při nižší hustotě výkonu (1,2 a 1,4 W/cm³), při níž byla pravděpodobně koncentrace NO molekul a OH radikálu nižší, a odstranění těchto „překážek“ trvalo tedy déle. Tomu odpovídají D_2 hodnoty 12,8 min resp. 3,1 min. Jakmile byly z povrchu odstraněny buňky bránící kontaktu plazmatu s buňkami pod povrchem, došlo opět k nárůstu rychlosti inaktivace. To vysvětluje výskyt třetího úseku inaktivační křivky s $D_3 = 1$ min odpovídající hustotě výkonu 1,4 W/cm³. Méně výrazně se účinky stínění projevíly při použití nejvyšší hustoty výkonu 2 W/cm³, kdy bylo pravděpodobně generováno dostatečné množství částic.

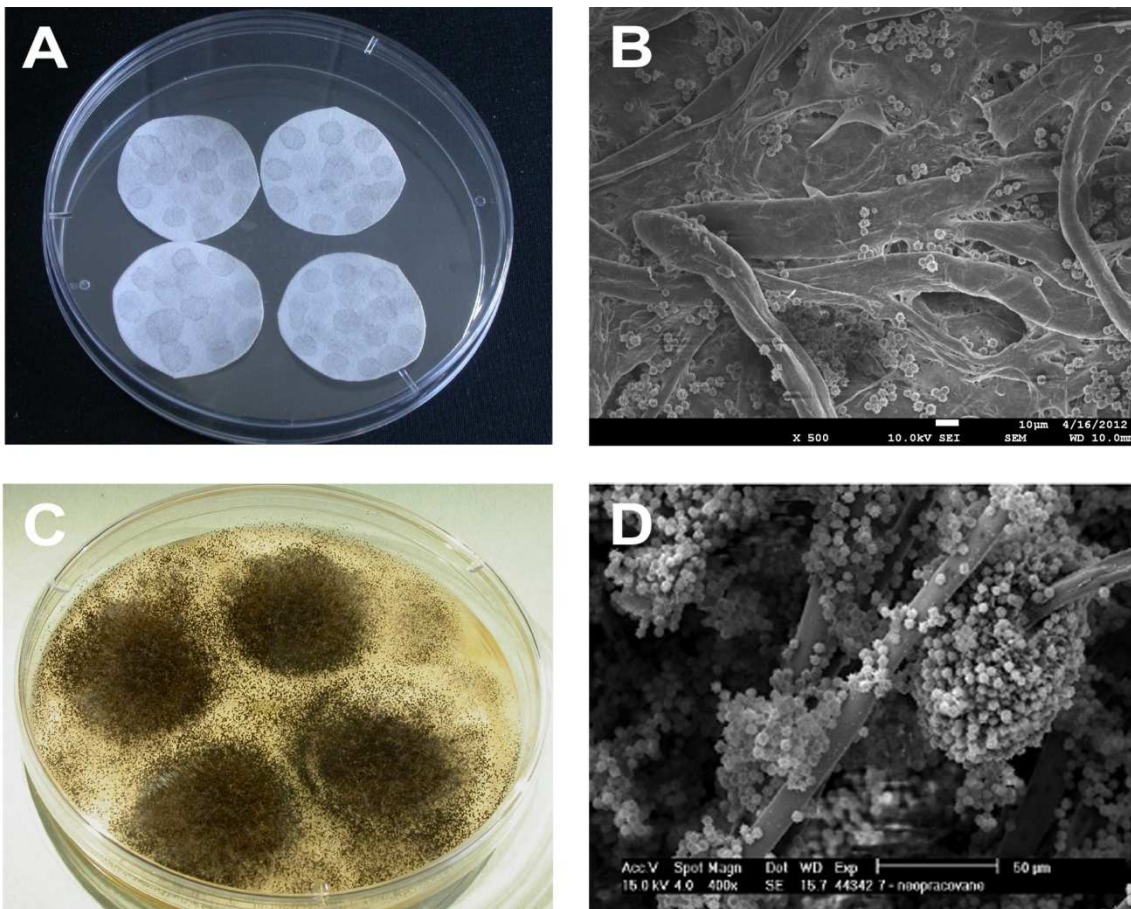
Porovnání výsledků dosažených při inaktivaci 7 denní kultury a spor plísně *Aspergillus niger* je na obrázku 21. Pro porovnání byl použit výkon 1,2 a 2 W/cm³. Ve všech případech byla získána inaktivační křivka se dvěma směnicemi, ale různými průběhy. Zatímco v případě 7-denní kultury je $D_1 > D_2$, tj. první pomalá fáze, kdy dochází k minimálním nebo žádným změnám, je následována druhou rychlejší fází, při které docházelo k výraznější redukci počtu životaschopných mikroorganismů. V případě spor nanesených na povrchu je tento trend opačný, tj. $D_1 < D_2$, a tedy rychlost první fáze byla vyšší než rychlost druhé fáze. Zajímavé je porovnání D_1 hodnoty 7-denní kultury s hodnotou D_2 v případě spor. Pro výkon 1,2 W/cm³ je $D_{1,7\text{ dni}} = 8,7$ min a $D_{2,\text{spory}} = 12,8$ min a pro výkon 2 W/cm³ je $D_{1,7\text{ dni}} = 54$ s a $D_{2,\text{spory}} = 31$ s. Stejně tak lze provést porovnání pro hodnoty D_2 7-denní kultury a hodnoty D_1 spor. Podobnost hodnot ukazuje, že při inaktivaci těchto dvou typů vzorků probíhají stejné procesy, pouze v převráceném pořadí.



Obrázek 21 Srovnání výsledků 7-denní kultury a spor *Aspergillus niger* nanesené na papír, N_2 plazma, hustota výkonu 1,2 a 2 W/cm³.

Rozdíly byly dány rozdílnou hustotou mikroorganismů na povrchu papíru, viz obrázek 22. V obou případech byla při přípravě vzorků nanesena na povrch papíru suspenze spor o koncentraci cca $1 \cdot 10^7$ spor·ml⁻¹, avšak v průběhu 7-denní kultivace došlo k nárůstu mikroorganismů, a tak k několikanásobnému zvýšení masы na povrchu papíru. Povrch papíru byl pokryt vrstvou mycelia, z něhož vyrůstaly konidiofory nesoucí spory. Výška této vrstvy

byla před vysušením cca 2-3 mm. Vložením mezi filtrační papír při vysoušení, došlo k jejímu snížení na cca 0,5-1 mm. Účinkům plazmatu bylo tedy vystaveno jen relativně malé množství buněk na povrchu, zatímco většina zůstala ukryta v masě pod povrchem. Nízká redukce životaschopných mikroorganismů a malá rychlost inaktivace při krátkých expozičních časech tedy odpovídají inaktivaci buněk na povrchu. Jakmile byly tyto buňky odstraněny z povrchu a plazma mohlo aktivně působit na ostatní buňky, došlo k rapidnímu nárůstu rychlosti inaktivace. Naopak tomu bylo v případě spor na povrchu papíru. Vícevrstvé aglomeráty nevytvářely tak hustou síť a účinkům plazmatu bylo na počátku tedy vystaveno větší množství buněk, z toho vyplývá také vyšší rychlost inaktivace. Ve druhé fázi procesu při delší expoziční době byly inaktivovány buňky ve spodních vrstvách nebo buňky zachycené v pórech materiálu. Na obrázku 22 je vidět, že v pórech papíru bylo zachyceno velké množství buněk.



Obrázek 22 A/ vzorky - spory plísně *A. niger* na papíru; B/ SEM snímek spor plísně *A. niger* na papíru (Ing. Zmrzlý, Ph.D.; FCH-VUT); C/ vzorky - 7-denní kultury plísně *A. niger*; D/ SEM snímek 7-denní kultury plísně *A. niger* (Ing. Janová, FSI-VUT).

V případě výkonu $1,2 \text{ W/cm}^3$ byla dosažena celková redukce 2 log CFU pro oba typy vzorků. Při použití výkonu 2 W/cm^3 bylo u 7-denní kultury dosažena redukce 9 log CFU/60 s a v případě spor 6 log CFU/120 s. Rychlejší inaktivace 7-denní kultury nastala také při použití středního výkonu $1,4 \text{ W/cm}^3$ (neuveďeno na obrázku). Tento jev byl pravděpodobně způsoben tím, že vzorky se spory plísně byly ve všech vrstvách tvořeny jen spory, zatímco vzorky 7-denní kultury *A. niger* byly tvořeny jak vegetativními buňkami tak také spory. Spory *A. niger*, jak již bylo dříve zmíněno, se díky své černé pigmentaci vyznačují

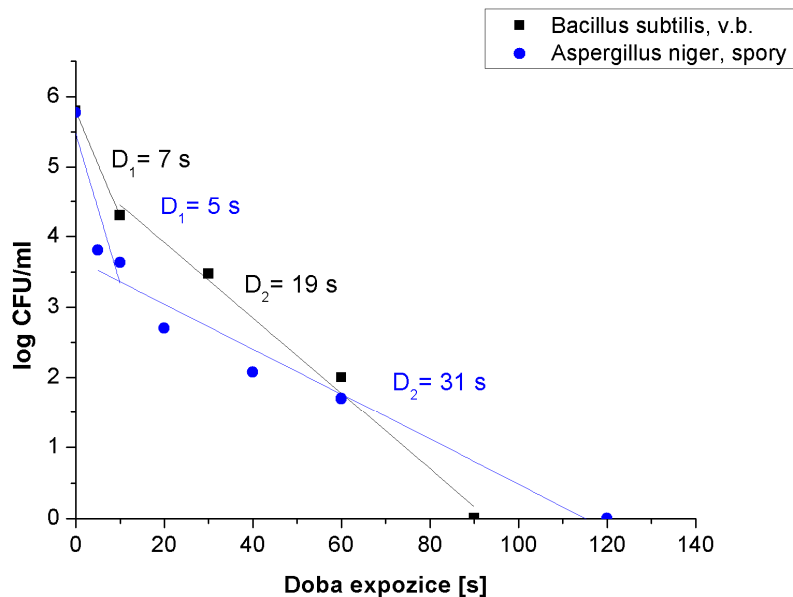
vysokou odolností vůči UV záření a jsou schopny odolávat teplotám do cca 60 °C. Na druhou stranu vegetativní buňky této plísně snášejí teploty jen do cca 45-47 °C a postrádají černou pigmentaci. Je tedy pravděpodobné, že inaktivace těchto buněk, které se vyskytují u povrchu papíru pod vrstvou spor, bude probíhat rychleji než by probíhala inaktivace spor.

Účinky plazmové sterilizace na vzorky mikroorganismů před a po 24 hodinové inkubaci (při 10 °C resp. 35 °C) prezentovali také Kayes a kol. [15]. Ke sterilizaci používali RF-doutnavý výboj s frekvencí 7 kHz a napětím 8.5 – 11 kV. Obecně zaznamenali vyšší rezistenci vůči plazmatu u mikroorganismů po 24 hodinové inkubaci než u vzorků exponovaných přímo. V případě vyšších teplot inkubace tento jev vysvětlili nárůstem populace mikroorganismů o cca 2-3 řády, tato nová biomasa mohla dle autorů odstiňovat účinky aktivních částic plazmatu. V tomto případě bylo potřeba k inaktivaci vzorků po inkubaci delších expozičních časů než při inaktivaci vzorků exponovaných přímo. Nárůst expoziční doby s nárůstem koncentrace mikroorganismů popsali také Ohkawa a kol. [22]. Pro inaktivaci používali RF doutnavý výboj v pulzním módu buzený ve směsi He + O₂ (0,06 %) s frekvencí 27,12 MHz a výkonem 670 W. Např. v případě spor *Bacillus atrophaeus* (*subtilis*) potřebovali k inaktivaci vzorků s koncentrací $\leq 2,7 \cdot 10^4$ CFU expoziční čas 5 min, zatímco pro koncentraci $5,4 \cdot 10^5$ to bylo již 20 min.

Tyto výsledky jsou v protikladu k mnou prezentovaným výsledkům. Nicméně oba autoři při svých studiích používali vzorky, které byly kontaminované vždy jen jedním typem buněk tzn. jen spory nebo jen vegetativními buňkami. Zatímco v mém případě se u vzorků 7-denní kultury *A. niger* vyskytují jak vegetativní buňky tak také spory, které jsou UV a teplotně odolné.

S ohledem na dosažené výsledky v případě plísně *A. niger*, byly vegetativní buňky bakterie *B. subtilis* nanesené na papíře exponovány účinkům plazmatu generovanému v dusíku již jen při hustotě výkonu 2 W/cm³. Dosažené výsledky byly porovnány s výsledky inaktivace spor *A. niger* (viz obrázek 23).

Výsledkem inaktivace vegetativních buněk *B. subtilis* je křivka složená ze dvou fází s velmi podobným průběhem jako křivka inaktivace spor plísně *A. niger*. První rychlá fáze, při níž dochází v obou případech k redukci cca 2 log CFU/ml za 10 s, je vystřídána pomalejší fází, kdy dochází k redukci zbytku mikroorganismů, tedy cca 4 log CFU/ml za 80 s v případě vegetativních buněk *B. subtilis* resp. 110 s v případě spor *A. niger*. Kompletní redukce životaschopných buněk tedy nastává v případě vegetativních buněk *B. subtilis* během 90 s expozice plazmatem, zatímco v případě spor *A. niger* je potřeba expoziční čas 120 s. Ze srovnání hodnot D_1 a D_2 je patrné, že rozdíl v rychlosti mezi rychlejší a pomalejší fází byl minimální. Delší časy potřebné k inaktivaci spor *A. niger* jsou zcela očekávané. Výsledky (uvedené dále v kapitole 4.2.2.1), prokázaly dle typu mikroorganismu 11-30 % podíl UV záření na inaktivačním procesu v N₂ plazmatu. Spory *A. niger* se vyznačují vysokou odolností vůči UV záření, proto lze celkově očekávat vyšší odolnost vůči inaktivaci v N₂ plazmatu ve srovnání s vegetativními buňkami *B. subtilis*.

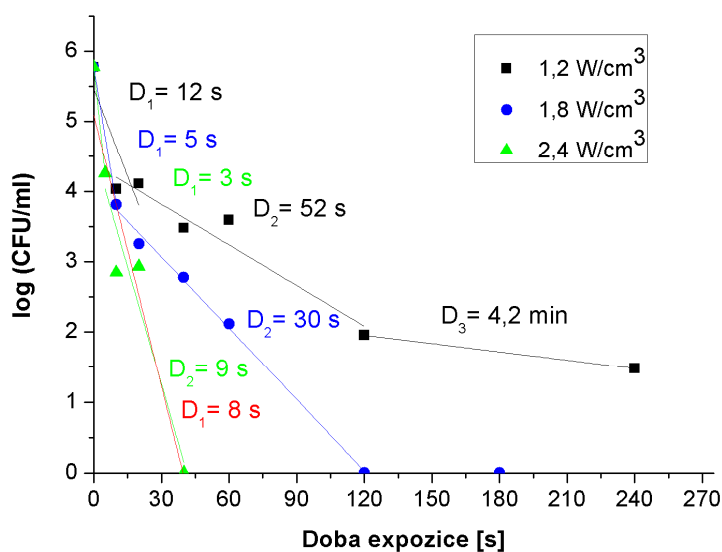


Obrázek 23 Porovnání účinků N_2 plazmatu pro vegetativní buňky *B. subtilis* a spory *A. niger*, hustota výkonu 2 W/cm^3 .

K podobným závěrům došli také ve své práci Heise a kol. [21] při srovnání účinků DBD generovaného v dusíku na spory *A. niger* a spory *B. subtilis*. V případě spor *B. subtilis* dosáhli redukce cca 4 log CFU za 10 s, zatímco při stejném expozičním čase v případě spor *A. niger* dosáhli redukce jen 2 log CFU.

4.2.1.2 Argon

Inaktivační křivky spor *A. niger* zobrazující závislost redukce počtu životaschopných buněk na hustotě výkonu dodávaného do Ar plazmatu a na době expozice jsou vidět na obrázku 24. Obecně lze říci, že s nárůstem doby expozice klesá počet životaschopných buněk cca lineárně v logaritmickém měřítku, tj. řídí se kinetikou 1. řádu. Rychlost inaktivace roste s nárůstem hustoty výkonu dodávaného do plazmatu. Zatímco při hustotě výkonu $1,2 \text{ W/cm}^3$ bylo potřeba k redukci 5 log CFU expoziční dobu 240 s, při hustotě výkonu $1,8 \text{ W/cm}^3$ resp. $2,4 \text{ W/cm}^3$ bylo dosaženo redukce cca 6 log CFU za 120 s resp. 40 s. Tomu také odpovídají hodnoty $D_1 = 12, 5$ a 3 s (řazeno od nejnižšího výkonu) a hodnoty $D_2 = 52, 30$ a 9 s.



Obrázek 24 Vliv hustoty výkonu a doby expozice na spory *Aspergillus niger* nanesené na papíru; Ar plazma.

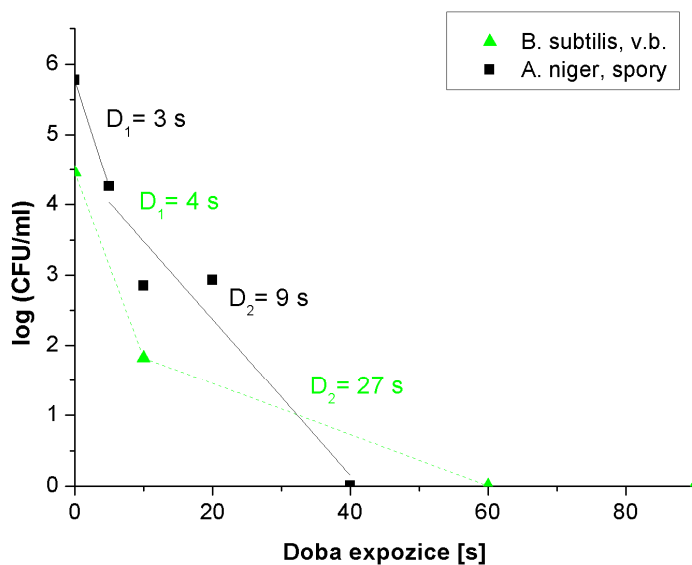
Z obrázku 24 je patrné, že s rostoucí hustotou výkonu klesá počet úseků inaktivační křivky, a tedy klesá počet fází inaktivačního procesu s různými rychlostmi. Zatímco inaktivační křivka naměřená pro nejnižší hustotu výkonu $1,2 W/cm^3$ je tvořena třemi lineárními úseky, křivky odpovídající inaktivaci s použitím hustoty výkonu $1,8$ a $2,4 W/cm^3$ jsou tvořeny již jen dvěma úseky. Nicméně v případě nejvyšší hustoty výkonu jsou rozdíly mezi hodnotami D_1 a D_2 tak malé, že by tento inaktivační proces bylo možné charakterizovat i jednoduchou inaktivační křivkou s jednou směrnici (viz červená přímka na obrázku). Ve všech případech byly získány křivky s hodnotami $D_1 < D_2$ a v případě nejnižší hustoty výkonu ještě $D_2 < D_3$, tj. s nárůstem doby expozice dochází ke zpomalení inaktivačního procesu, i když s ohledem na malé rozdíly mezi hodnotami D_1 a D_2 lze říci, že toto zpomalení bylo jen nepatrné. V průběhu rychlé fáze byla ve všech případech dosažena redukce cca 2 log CFU během prvních 5-10 s expozice plazmatem, poté došlo ke zpomalení procesu. Lze tedy předpokládat, že vysoká rychlost v první fázi odpovídá inaktivaci buněk na povrchu vzorku, teprve pak byly inaktivovány buňky pod povrchem, v důsledku čehož docházelo ke zpomalení procesu. V případě nejnižší hustoty výkonu byl průběh třetí fáze inaktivační křivky téměř konstantní a během 120 s expozice došlo k redukci životaschopných buněk jen o cca 0,5 log CFU, tomu také odpovídá hodnota $D_3 = 4,2$ min. Výrazné zpomalení bylo pravděpodobně zapříčiněno stíněním v důsledku výskytu vícevrstvých struktur spor *A. niger* na povrchu papíru a také v důsledku zachycení spor v porech papíru. Při této hustotě výkonu není zřejmě koncentrace aktivních částic Ar plazmatu, podílejících se na inaktivačním procesu, dostatečně vysoká, aby došlo k odstranění buněk bránících v přístupu plazmatu k buňkám ukrytým pod povrchem. Tento jev byl popsán také při sterilizaci v N_2 plazmatu. Porovnáním emisních spekter, naměřených ve výboji s vyšším a nižším plazmovým výkonem, byly u vyššího výkonu zjištěny vyšší intenzity emisních čar a tedy vyšší koncentrace daných částic.

Nárůst počtu lineárních úseků inaktivační křivky v důsledku snížení hustoty výkonu resp. proudu získali také Morgan a kol. [26]. Při sterilizaci kvasinek *Saccharomyces Cerevisiae* a *Mrakia Frigida* v DBD výboji (1-30 kV, 1 kW výkon, frekvence 50 Hz) generovaném

v argonu nebo kyslíku získali pro proudy 0,8 a 1 mA lineární křivku s jednou směrnici, zatímco pro proud 0,4 mA získali inaktivační křivku složenou ze dvou lineárních úseků s odlišnými směrnici. I v jejich případě byla hodnota $D_1 < D_2$. Tento jev vysvětlili nižší koncentrací argonových iontů a kyslíkových radikálů při nižších proudcích, což vedlo k nedostatečnému leptání, a tak se aktivní částice plazmatu nedostaly k buňkám pod povrchem.

Při sledování vlivu hustoty výkonu a doby expozice na vegetativní buňky *B. subtilis* byly získány obdobné závislosti (obrázek neuveden) jako v případě spor *A. niger*, tj. nárůst doby expozice a hustoty výkonu vedl k nárůstu inaktivačních účinků DBD. V případě nejvyšší používané hustoty výkonu 2.4 W/cm^3 bylo dosaženo kompletní redukce $4,5 \text{ log CFU}$ během 60 s. Za stejnou expoziční dobu bylo při nižších hustotách výkonu dosaženo redukce jen $1,5 \text{ log CFU}$ ($1,8 \text{ W/cm}^3$) resp. $0,5 \text{ log CFU}$ ($1,2 \text{ W/cm}^3$).

Výsledky získané při použití nejvyšší hustoty výkonu $2,4 \text{ W/cm}^3$ pro vegetativní buňky *B. subtilis* a spory *A. niger* jsou porovnány na obrázku 25. V obou případech byly získány inaktivační křivky se dvěma úseky s velmi podobným průběhem. Hodnoty D_1 obou mikroorganismů jsou téměř totožné. Hodnota D_2 je v případě *B. subtilis* 3 x vyšší než hodnota získaná pro *A. niger*. Tomu také odpovídá výsledná rychlejší inaktivace spor *A. niger* i přesto, že jejich počáteční koncentrace byla cca 10x vyšší než u vzorků *B. subtilis*. Kompletní redukce této plísně t.j. cca 6 log CFU byla dosažena během 40 s expozice plazmatem, zatímco pro kompletní redukci *B. subtilis* bylo potřeba expoziční čas 60 s. Na druhou stranu při použití dusíku jako pracovního plynu byly získány opačné výsledky (viz obrázek 23), tj. redukce vegetativních buněk *B. subtilis* proběhla rychleji než redukce spor *A. niger*. Pravděpodobně tedy při sterilizaci v Ar plazmatu převládají jiné mechanismy než v N_2 plazmatu. Pomocí OES, viz 4.1.1.1, byla detekována přítomnost O a OH radikálů. Relativní intenzita pásů OH radikálu byla cca 7 x vyšší v argonu než v dusíku. Lze tedy předpokládat vyšší podíl těchto reaktivních sloučenin kyslíku na inaktivaci ve srovnání z dusíkem.



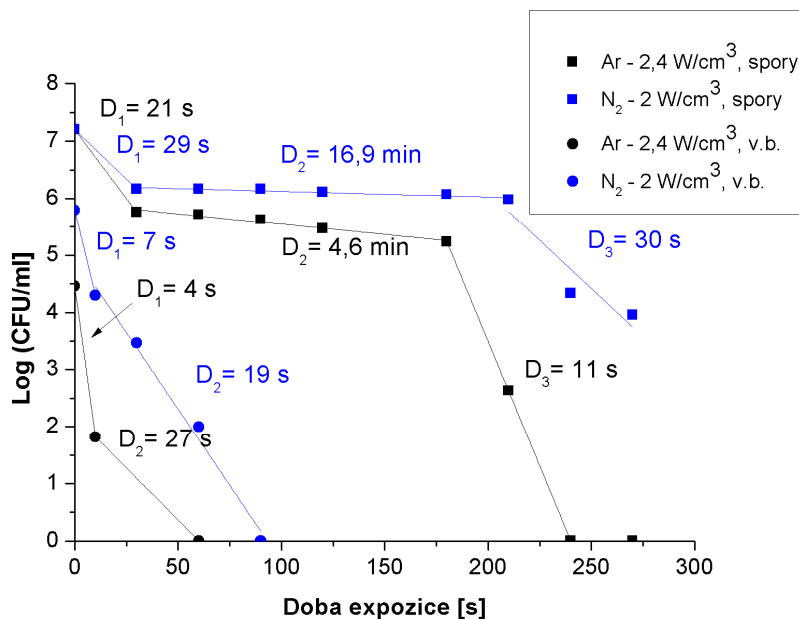
Obrázek 25 Porovnání účinků Ar plazmatu pro vegetativní buňky *B. subtilis* a spory *A. niger*, hustota výkonu $2,4 \text{ W/cm}^3$.

Podobné výsledky prezentovali také Heise a kol. [21] při srovnání účinků DBD (frekvence 20-50 kHz, hustota výkonu 7 W/cm^2) generovaném v argonu na spory *A. niger* a spory *B. subtilis*. V případě spor *B. subtilis* dosáhli redukce cca 4 log CFU za 5 s, zatímco při stejném expozičním čase dosáhli v případě spor *A. niger* redukce 5 log CFU (počáteční koncentrace obou mikroorganismů byla cca 10^6). Stejně jako já používali jak Ar tak i N_2 a shodně s mými výsledky dosáhli lepší inaktivaci v případě Ar plazmatu. Dle autorů to bylo pravděpodobně dílem působení vakuového UV záření v oblasti 126 nm emitovaného excimerními molekulami Ar_2^* . K tomuto závěru došli na základě výsledků OES, kde detekovali ArO^* excimer na vlnové délce 308 nm vznikající při interakci Ar plazmatu s nečistotami kyslíku. Příspěvek Ar_2^* excimeru k inaktivaci v plazmatu generovaném v argonu popsali také Ehlbeck a kol. [23] (plazma jet, 27,12 MHz, 10 W).

4.2.1.3 Inaktivace spor *B. subtilis*

Jak již bylo zmíněno v úvodu této kapitoly, vegetativní buňky *B. subtilis* byly nahrazeny sporami této bakterie. Spory se na rozdíl od vegetativních buněk vyznačují vyšší odolností vůči nepříznivým podmínkám. Jsou schopny odolávat teplotám $120 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 30 min [90], zatímco teplotní maximum vegetativních buněk je $53 \text{ }^\circ\text{C}$ [87]. Spory rodu *Bacillus* jsou v závislosti na druhu schopné odolovat cca 10-100 x vyšším dávkám UV záření než jejich odpovídající vegetativní buňky [93].

Spory *B. subtilis* nanesené na papírovém nosiči byly exponovány Ar plazmatem s hustotou výkonu $2,4 \text{ W/cm}^3$ a N_2 plazmatem s hustotou výkonu 2 W/cm^3 . Tyto podmínky byly na základě výsledků dosažených při sterilizaci spor plísně *A. niger* a vegetativních buněk *B. subtilis* vyhodnoceny jako neúčinnější. Na obrázku 26 jsou zobrazeny naměřené inaktivační křivky spor *B. subtilis*, pro srovnání jsou zde také uvedeny inaktivační křivky vegetativních buněk.



Obrázek 26 Porovnání citlivosti spor a vegetativních buněk *B. subtilis* k sterilizačním účinkům DBD generovaného v Ar nebo N_2 .

Výsledkem inaktivace spor *B. subtilis* byly jak v argonu tak také v dusíku křivky složené ze tří lineárních úseků, kdy hodnoty $D_1 < D_2 > D_3$. A tedy první rychlá fáze, při které došlo k inaktivaci cca 1 log CFU během 30 s expozice plazmatem, byla vystřídána pomalou fází s téměř konstantním průběhem křivky. V této fázi byl zredukován počet životaschopných mikroorganismů o pouhých 0,5 log v argonu resp. 0,2 log v dusíku během 150 s expozice plazmatem. Poté následovala třetí fáze, rychlost inaktivace v této fázi procesu byla srovnatelná s rychlostí první fáze, v případě argonu byla dokonce vyšší. Během 60 s expozice plazmatem byla dosažena redukce 5 log CFU v případě argonu resp. 2 log CFU v případě dusíku. Celková redukce spor *B. subtilis* byla tedy v případě argonu 7,2 log CFU při expozici 240 s a cca 3 log CFU při expozici 270 s.

Inaktivační křivky naměřené v dusíku a argonu mají velmi podobný trend, a také velmi blízké hodnoty D_1 a D_3 . Markantní rozdíl byl zaznamenán pouze v případě D_2 hodnoty, charakterizující rychlost procesu v pomalé fázi. Zatímco při inaktivaci v argonu byla naměřena hodnota $D_2 = 4,6$ min, pro dusík byla $D_2 = 16,9$ min. Lze tedy předpokládat, že vysoká rychlost v první fázi odpovídala inaktivaci buněk na povrchu vzorku, teprve pak byly inaktivovány buňky pod povrchem, v důsledku čehož docházelo ke zpomalení procesu. Jakmile byly z povrchu odstraněny buňky zamezující přístup aktivních složek plazmatu k biomase pod povrchem, došlo opět k nárůstu rychlosti. Výrazné zpomalení v případě dusíku naznačuje, že eroze buněk z povrchu probíhala pravděpodobně mnohem účinněji v argonu díky vysoce energetickým argonovým iontům. Ve spektrech argonu (viz kapitola 4.1.1.1) byl navíc detekován OH systém a atomární kyslík, které mohly také přispívat k leptání a erozi buněk z povrchu. OH systém byl detekován také v případě výboje v dusíku, ale jeho intenzita byla cca 7 x nižší, mimoto byl ve spektrech dusíku detekován NO_γ systém. Nižší účinky dusíku mohly být také způsobeny nižší hustotou použitého výkonu a tedy nižší koncentrací aktivních částic v plazmatu podílejících se na inaktivaci. Avšak při srovnání účinků Ar a N_2 plazmatu při stejné hustotě výkonu $1,2 \text{ W/cm}^3$ na spory plísňe *A. niger*, viz Tabulka 7, je i zde patrná výrazně vyšší účinnost Ar plazmatu.

Porovnáním výsledků dosažených při sterilizaci vegetativních buněk a spor bakterie *B. subtilis*, je patrné, že spory vykazovaly výrazně vyšší odolnost vůči účinkům DBD. Zatímco pro úplnou redukci vegetativních buněk, tj. cca 5 log CFU v případě argonu resp. 6 log CFU v případě dusíku, bylo potřeba expoziční časy 60 s resp. 90 s, pro dosažení stejného stupně redukce bylo v případě spor vystavených účinkům Ar plazmatu potřeba cca 3,5 x vyšší expoziční čas. V případě spor exponovaných N_2 plazmatem bylo ve srovnání s vegetativními buňkami potřeba 3x delší expoziční čas pro dosažení polovičního stupně redukce, tj. 3 log CFU. Porovnání výsledků naměřených pro vegetativní buňky a spory může být do jisté míry zkresleno rozdílnými počátečními koncentracemi vzorků, které jsou 1-3 log CFU. Jak bylo popsáno výše (kapitola 4.2.1.1), rozdílná hustota mikroorganismů může výrazně ovlivňovat průběh a rychlost inaktivace. Při uvolňování spor byly pro zvýšení účinnosti uvolňování buněk do roztoku při vyhodnocování vzorků navíc do fyziologického roztoku přidány skleněné kuličky (viz vysvětlení v kapitole 0).

Vyšší rezistivitu spor *B. subtilis* ve srovnání s vegetativními buňkami prezentovali také Gadri a kol. [20]. Při inaktivaci v RF výboji generovaném na vzduchu dosáhli pro vegetativní buňky na skle redukce 3 log CFU během 60 s (původní koncentrace 10^4 CFU), zatímco v případě bakteriálních spor na papírovém nosiči dosáhli redukce 4 log CFU (původní koncentrace 10^6 CFU) během 2,4 min expozice plazmatem. Shodně s mými výsledky, i tito

autoři zaznamenali výrazný rozdíl hodnot D odpovídajících „pomalé fázi“. Pro spory uvedli hodnotu $D_1 = 5,5$ min a pro vegetativní buňky $D_1 = 13$ s. Hodnoty D_2 charakterizující „rychlejší fázi“ byly pro obě formy bakterie téměř totožné, v případě spor bylo $D_2 = 13$ s a v případě vegetativních buněk $D_2 = 10$ s. Stejně jako v mém případě, budou i v případě této studie uvedené rozdíly mezi jednotlivými formami buněk ovlivněny různými počátečními koncentracemi a odlišnými materiály, na nichž byly buňky naneseny. Rozdílnou citlivost vegetativních buněk a spor bakterie *Geobacillus stearothermophilus* (rod *Bacillus*) popsali také Scholtz a kol. [49]. Při sterilizaci pomocí negativního DC koronového výboje generovaného na vzduchu (hrot-rovina, napětí do 10 kV, proud do 0,5 mA) zjistili, že inaktivační účinek byl na spory cca 2-4 x nižší než na vegetativní buňky.

4.2.1.4 Porovnání účinků Ar vs. N₂ plazma

V předchozích kapitolách byly diskutovány dílčí výsledky vlivu hustoty výkonu a doby expozice při sterilizaci pomocí DBD výboje generovaného v dusíku a argonu. Tyto výsledky jsou přehledně shrnuty v tabulce 7. Vzhledem k tomu, že většina experimentů byla prováděna převážně se sporami plísně *A. niger*, jsou prezentovány při všech použitých hustotách výkonu pouze výsledky naměřené pro tento modelový mikroorganismus. V případě 7-denní kultury *A. niger*, vegetativních buněk a spor *B. subtilis* jsou pro srovnání uvedeny jen výsledky získané při nejvyšších hustotách výkonu, při nichž byla se sporami *A. niger* nejrychleji dosažena kompletní redukce životaschopných buněk.

Hustota výkonu Ar/N ₂ [W/cm ³]	Argon				Dusík			
	D ₁ [s]	D ₂ [s]	D ₃ [s]	Redukce log CFU	D ₁ [s]	D ₂ [s]	D ₃ [s]	Redukce log CFU
<i>A.niger</i> , s. – 1,2/1,2	12	52	252	3,8/120 s	12	768	-	1,9/120 s
<i>A.niger</i> , s. – 1,8/1,4	5	30	-	5,8/120 s	6	186	60	4,5/120 s
<i>A.niger</i> , s. – 2,4/2	3	9	-	5,8/40 s	5	31	-	5,8/120 s
<i>A.niger</i> , 7d. – 2,4/2	-	-	-	-	54	2	-	8,8/60 s
<i>B.subtilis</i> ,v.b. – 2,4/2	4	27	-	4,5/60 s	7	19	-	5,9/90 s
<i>B.subtilis</i> ,s. – 2,4/2	21	276	11	1,73/120 s	29	1014	30	1,1/120 s

Tabulka 7 Srovnání výsledků sterilizace v Ar a N₂ plazmatu. D – decimální hodnota (čas potřebný ke snížení počtu původní populace mikroorganismů o 90 %, tj. o 1 log CFU); s – spory, 7d. – 7 denní kultura, v.b. – vegetativní buňky.

Pro oba plyny platí, že s nárůstem hustoty výkonu roste rychlost inaktivace, současně také klesá počet lineárních úseků inaktivační křivky s různými směrnici resp. hodnotami D . Zatímco při hustotách výkonu 1,2 W/cm³ je inaktivační proces charakterizován křivkou se třemi úseky (v případě dusíku jsou popsány jen dva, ale při dostatečně dlouhých expozičních časech, lze očekávat výskyt třetího úseku), v případě nejvyšší hustoty výkonu 2 W/cm³ resp. 2,4 W/cm³ jsou to již jen dva úseky. Je tedy patrné, že rozdíly v rychlostech mezi jednotlivými fázemi se snižují. Zatímco v případě nižších hustot výkonu byl po určité době dosažen tzv. stav saturace (viz kapitola 4.2.1.1) charakterizovaný velmi vysokými hodnotami D , při vyšších hustotách výkonu byl tento jev téměř nulový, přičemž v argonu se stav saturace projevil v menší míře. Popsaný jev je dobře patrný na hodnotách D_2 získaných při inaktivaci v dusíku, viz tabulka 7.

Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, nárůst rychlosti inaktivace s nárůstem hustoty výkonu je dán vyšší koncentrací aktivních částic v plazmatu podílejících se na inaktivaci, což bylo možno pozorovat na zvýšení intenzit spektrálních čar a pásů při OES. Výše popsany saturační jevy, který je provázen výrazným zpomalením inaktivace a který byl pozorován převážně v dusíku, naznačuje, že eroze buněk z povrchu probíhá pravděpodobně mnohem účinněji v argonu díky vysoce energetickým argonovým iontům. K erozi mohou navíc také přispívat radikály OH a O detekované ve spektrech argonu.

Porovnáním výsledků dosažených pro *A. niger* v argonu a dusíku při stejné hustotě výkonu $1,2 \text{ W/cm}^3$ je patrné, že rychlejší inaktivace byla dosažena v argonu, kde bylo během 120 s expozice plazmatem snížen počet životaschopných buněk o cca 4 log CFU. Oproti tomu v dusíku bylo při stejném expozičním čase dosaženo redukce životaschopných buněk jen o 2 log CFU. Zajímavé je porovnání výsledků získaných při inaktivaci vegetativních buněk a spor obou sledovaných mikroorganismů. Při expozici vzorků N_2 plazmatem projevovaly nejvyšší citlivost vůči sterilizačním účinkům vzorky 7-denní kultury *A. niger*, dále klesala citlivost v pořadí vegetativní buňky *B. subtilis*, spory *A. niger* a spory *B. subtilis*, viz tabulka 7. Při expozici Ar plazmatem naopak projevovaly vyšší citlivost spory *A. niger* v porovnání s vegetativními buňkami *B. subtilis*. Nejvyšší rezistivitu i v tomto případě vykazovaly bakteriální spory, přičemž citlivost modelových vzorků vůči UV záření klesá v pořadí vegetativní buňky *B. subtilis*, spory *B. subtilis* a spory *A. niger* [93; 94]. Citlivost vegetativních buněk *A. niger* se mi bohužel nepodařilo najít v dostupné literatuře. Vyšší citlivost vegetativních buněk *B. subtilis* vůči účinkům N_2 plazmatu v porovnání s citlivostí spor *A. niger*, a opačný trend v argonu naznačují, významnější podíl UV záření na inaktivaci v dusíku, zatímco v případě argonu se zřejmě uplatňují také jiné mechanismy. Toto je zcela ve shodě s výsledky OES, kdy ve spektrech dusíku byl v oblasti vlnových délek (220–290) nm identifikován NO_γ molekulový systém, zatímco ve spektrech argonu nikoliv. UV záření v celém rozsahu poškozují molekuly DNA, nicméně nejefektivnější je záření UVC (200–280 nm), které je cca 300 x účinnější než UVB (280–315 nm) resp. UVA (315–400 nm) [93]. V případě spor *B. subtilis* tyto výsledky odpovídají také výsledkům dosaženým při oddělené studii vlivu UV při inaktivaci v N_2 a Ar plazmatu (viz kapitoly 4.2.2.1 a 4.2.2.2.). V případě dusíku byl zjištěn cca 30 % podíl UV záření na inaktivaci a v argonu pak cca 15 %. Naopak pro spory *A. niger* byl zjištěn nepatrně nižší příspěvek UV záření při sterilizaci v prostředí dusíku, a to 10 % v porovnání s argonem, kde příspěvek činil 15%.

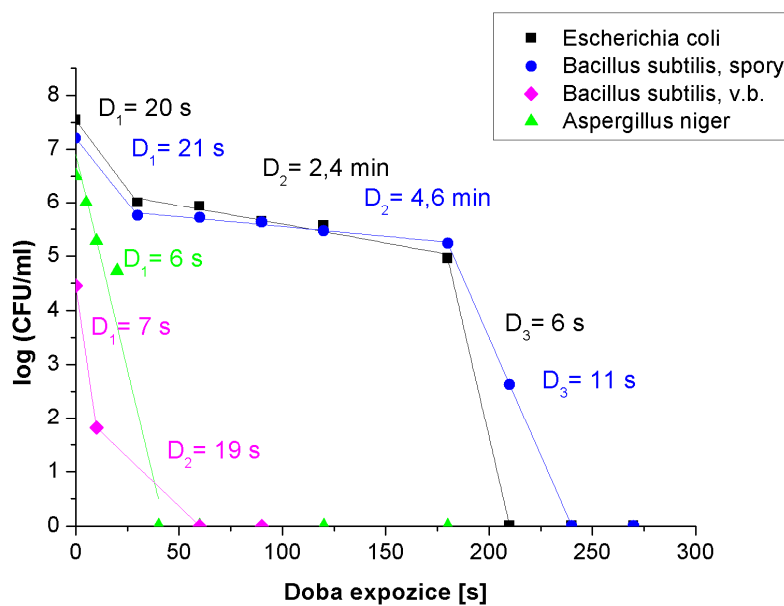
Pravděpodobně se tedy na inaktivaci musely podílet i systémy identifikované v oblasti UVA a UVB, tj. OH radikály a druhý pozitivní systém dusíku, ať již přímo, či nepřímo při fotoindukovaných chemických reakcích vzniku např. ozónu, peroxidu, případně jiných volných radikálů.

Rozdíly v citlivosti *B. subtilis* a *A. niger* vůči sterilizačním účinkům plazmatu generovaného v argonu a dusíku popsali také Heise a kol [21]. Při expozici spor *B. subtilis* N_2 plazmatu dosáhli lepších účinků ve srovnání s *A. niger*, v případě Ar tomu bylo naopak. Jako dominantní mechanismus při inaktivaci v N_2 plazmatu uvedli UV záření z NO_γ molekulového pásu. V případě argonu pak vakuové UV záření v oblasti 126 nm emitované excimerními molekulami Ar_2^* . Jako další mechanismus zmiňují působení reaktivních částic. Jejich výsledky inaktivace jsou velmi podobné mým výsledkům, s tím rozdílem, že v mém případě byly rozdíly v citlivosti *B. subtilis* detekovány v případě vegetativních buněk, zatímco bakteriální spory vykazovaly v obou plynech ve srovnání s ostatními vzorky nejvyšší

odolnost. Zřejmě tedy hustota výkonu UV záření byla výrazně nižší a převládaly jiné mechanismy. Např. Morgan a kol. [26] na základě svých výsledků při inaktivaci kvasinek pomocí DBD (1-30 kV, 1kW výkon, frekvence 50 Hz) generovaného v argonu vyhodnotili jako dominantní mechanismus akumulaci náboje na povrchu buněk v důsledku dopadu nabitých částic. Jako další mechanismus uvedli leptání argonovými ionty. Na rozdíl od této skupiny výsledky mé studie neprokázaly poškození buněk v důsledku akumulace náboje. Pomocí SEM analýzy byly detekovány jen drobné morfologické změny povrchu (nerovnosti, vypoukliny, viz kapitola 4.2.2.2), inaktivační příspěvek leptání povrchu.

4.2.1.5 Porovnání účinků Ar plazmatu na různé druhy mikroorganismů

Předchozí výsledky prokázaly vysoké germicidní účinky plazmatu generovaného v argonu bez ohledu na použitý mikroorganismus a jeho formu. Nejvyšší germicidní účinky argonu v porovnání s dusíkem byly dosaženy jak v případě gram pozitivní bakterie *B. subtilis*, tak také plísně *A. niger*. V obou případech byly účinkům vystaveny jak vegetativní buňky, tak také klidové formy těchto mikroorganismů, tzv. spory. Tyto podmínky byly tedy dále verifikovány použitím gram negativní bakterie *E. coli*. Výsledné inaktivační křivky jednotlivých mikroorganismů jsou shrnuty na obrázku 27. Na obrázku 28 na konci této kapitoly jsou navíc zobrazeny výsledky kultivace jednotlivých mikroorganismů.



Obrázek 27 Sterilizační účinky DBD buzeného v argonu s hustotou výkonu $2,4 \text{ W/cm}^3$ na různé druhy mikroorganismů.

Z obrázku je patrné, že citlivost vegetativních buněk resp. spor mikroorganismů vůči účinkům DBD v prostředí argonu klesá v pořadí: spory *A. niger*, vegetativní buňky *B. subtilis*, vegetativní buňky *E. coli* a spory *B. subtilis*. Úměrně odolnosti jednotlivých mikroorganismů dochází k prodloužení doby expozice potřebné k dosažení kompletní redukce počtu životaschopných mikroorganismů, a tedy klesá rychlost inaktivace. Zatímco v případě nejcitlivějších spor *A.niger* byla dosažena kompletní redukce počtu životaschopných mikroorganismů, tj. 6,5-7,5 log CFU, po 40 s expozice plazmatem, v případě nejodolnějších spor *B. subtilis* bylo potřeba pro dosažení stejného účinku až 5 x delší expoziční doby. Při porovnání vegetativních buněk a spor *B. subtilis* je patrné, že spory jsou výrazně odolnější.

Pro jejich kompletní inaktivaci bylo potřeba 4 x delších expozičních časů než pro inaktivaci jim odpovídajících vegetativních buněk. Avšak tento poměr může být zkreslen odlišnými počátečními koncentracemi.

Vysoké germicidní účinky argonového plazmatu jsou s velkou pravděpodobností výsledkem působení aktivních částic plazmatu, konkrétně OH radikálů, atomárního O a Ar iontů. Jistým podílem přispívalo pak UVB (OH systém) a UVA (druhý pozitivní systém dusíku) záření a teplota (viz kapitola 4.2.2.2). Tomu také odpovídají výsledky inaktivace jednotlivých mikroorganismů.

UV citlivost vegetativních buněk mikroorganismů a jim odpovídajících spor klesá v pořadí: spory *A. niger*, spory *B. subtilis*, vegetativní buňky *E. coli* a vegetativní buňky *B. subtilis* [93; 94; 95]. Současně citlivost vůči vysoké teplotě klesá v pořadí spory *B. subtilis*, spory *A. niger*, vegetativní buňky *B. subtilis* a *E. coli* [85; 86; 89; 90]. Je tedy patrné, že zatímco vysoce UV odolné a teplotně odolné spory *A. niger* vykazují nejvyšší citlivost vůči argonovému plazmatu, při inaktivaci musí převládat jiné mechanismy než teplota a UV záření. Spory *A. niger* se obecně vyznačují citlivostí vůči oxidačním činidlům [96], což by mohlo vysvětlovat jejich zvýšenou citlivost k účinkům argonového plazmatu. Obdobně by se dalo usuzovat z výsledků dosažených pro vegetativní buňky *E. coli*, které jsou vůči UV záření a teplotě relativně citlivé.

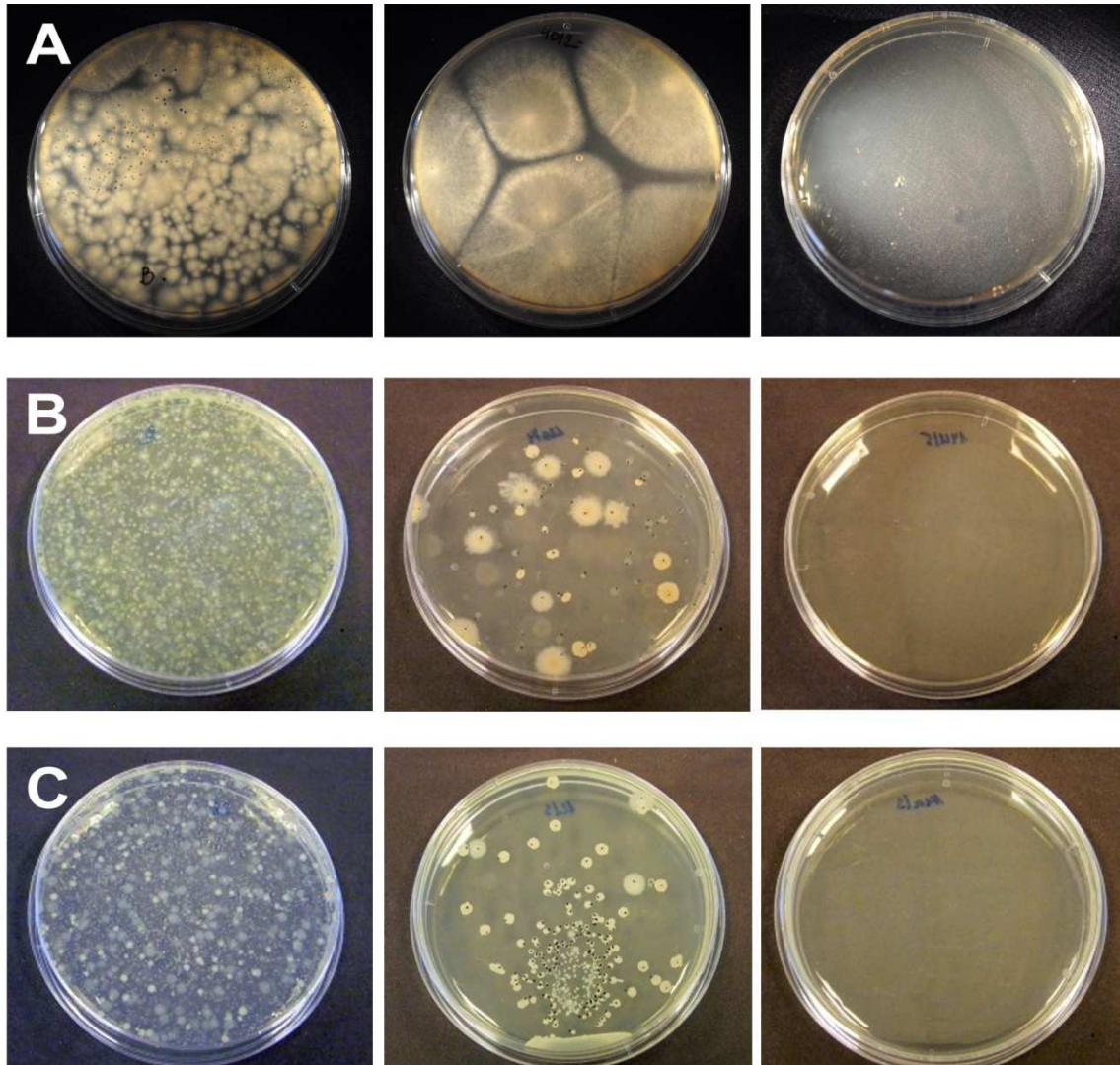
Rozdíly v citlivosti vegetativních buněk *E. coli* a spor *B. subtilis* vůči germicidním účinkům argonového plazmatu prezentovali také Brandenburg a kol. [35] při sterilizaci pomocí APPJ (27,12 MHz, 10-60 W). V případě *E. coli* dosáhli kompletní redukce vitálních buněk (4 log CFU) během 120 s expozice Ar plazmatem, pro dosažení stejných účinků v případě spor *B. subtilis* potřebovali cca 3 x delší expoziční časy. Jako inaktivační mechanismy působící v argonovém plazmatu uvedli působení excitovaných reaktivních částic, UV záření a teplotu. Ze stejné skupiny Ehlbeck [23] pak ještě doplnil tyto mechanismy o VUV záření z emise excimerních molekul Ar₂*.

Vyšší citlivost spor *A. niger* vůči účinkům argonového plazmatu v porovnání se sporami *B. subtilis* popsali také Heise a kol. [21]. Autoři germicidní účinky DBD generovaného v argonu vysvětlili působením VUV záření, konkrétně Ar₂* excimeru (126 nm). Jako další mechanismus působící při inaktivaci pak zmínili reaktivní částice. Na druhou stranu ti samí autoři při použití dusíku jako procesního plynu zaznamenali vyšší citlivost spor *B. subtilis* vůči sterilizačním účinkům plazmatu v porovnání se sporami *A. niger*, což je zcela opačný výsledek než byl zaznamenán v mém případě, viz kapitola 4.2.1.1.

Je tedy patrné, že porovnání výsledků s jinými autory je obtížné. Mimo elektrické charakteristiky a uspořádání výboje, může výsledky výrazně ovlivnit také čistota plynů a výrazné rozdíly mohou být také dle použitého kmene jednotlivých druhů mikroorganismů, neboť i ty se liší citlivostí vůči nepříznivým vlivům. Např. Muranyi a kol. [96] při zhodnocení vlivu vlhkosti v syntetickém vzduchu na sterilizaci spor *B. subtilis* pomocí CDBD, zjistili pokles účinků s nárůstem vlhkosti. Tyto výsledky jsou zcela v protikladu k výsledkům popsaných jinými skupinami. Autoři tento rozdíl vysvětlili použitím kmene *B. subtilis*, který se vyznačuje vysokou odolností vůči oxidaci.

Obecně lze říci, že spory jsou vůči účinkům plazmatu odolnější než jim odpovídající vegetativní formy. Konkrétní rozdíly pak navíc závisí i na zvoleném kmeni. Tomu také odpovídají výsledky prezentované např. Gadri a kol [20]. Při sterilizaci s využitím APGD

(7 kHz, 8.5 – 11 kV) v prostředí vzduchu potřebovali cca 2,4 x delší expoziční časy v případě spor *B. subtilis* než jim odpovídajících vegetativních buněk. S ohledem na fakt, že porovnávané buňky byly naneseny na různých nosičích, skutečný rozdíl bude pravděpodobně o něco nižší. Shodně Scholz a kol. [49] při sterilizaci bakterie *Geobacillus stearothermophilus* pomocí negativního DC koronového výboje generovaného na vzduchu (hrot-rovina, napětí do 10 kV, proud do 0,5 mA) zjistili, že inaktivační účinek byl na spory cca 2-4 x nižší než na vegetativní buňky.

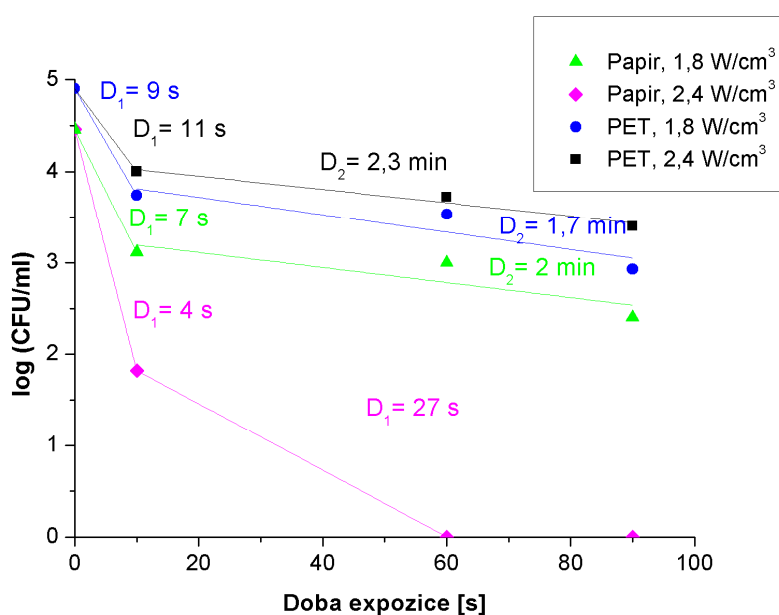


Obrázek 28 Výsledky kultivace po opracování Ar plazmatem s hustotou výkonu $2,4 \text{ W/cm}^3$:
 A/ *Aspergillus niger*, expoziční časy 0, 20 a 40 s
 B/ *Bacillus subtilis*, expoziční časy 0, 120 a 240 s
 C/ *Escherichia coli*, expoziční časy 0, 120 a 210 s

4.2.1.6 Vliv nosného média

Výsledek inaktivace může být významně ovlivněn materiálem nosiče. Je třeba si uvědomit, že se jednotlivé druhy materiálů liší svými vlastnostmi, a tím pádem na ně působí plazma odlišným způsobem. Materiály, jako jsou papír nebo textilie, většinou disponují členitým nepravidelným povrchem a pórovitou strukturou. Mikroorganismy tak mohou zůstat zachyceny v nerovnostech na povrchu nebo v pórech uvnitř materiálu, a tak být chráněny před inaktivačními účinky plazmatu. Moisan a spol. [69] zmiňují ve své přehledové publikaci jako jednu z hlavních nevýhod plazmové sterilizace vliv aktuální „tloušťky“ inaktivovaných mikroorganismů a fakt, že jakýkoliv materiál překrývající mikroorganismy, včetně obalů, zpomaluje tento proces. Na druhou stranu např. polymerní materiály disponují, ve srovnání s předchozími, hladkým celistvým povrchem, který neposkytuje mikroorganismům žádnou ochranu před účinky plazmatu. Z toho důvodu byl studován vliv materiálu nosiče na celkovou inaktivaci v DBD. Při experimentech byl použit papír Whatman 1 a PET fólie, oba materiály byly vždy paralelně vystaveny účinkům DBD. Testy byly prováděny v argonu s použitím spor *A. niger* a vegetativních buněk *B. subtilis*.

Výsledky inaktivace vegetativních buněk *B. subtilis* na papírových a PET nosičích jsou zobrazeny na obrázku 29.

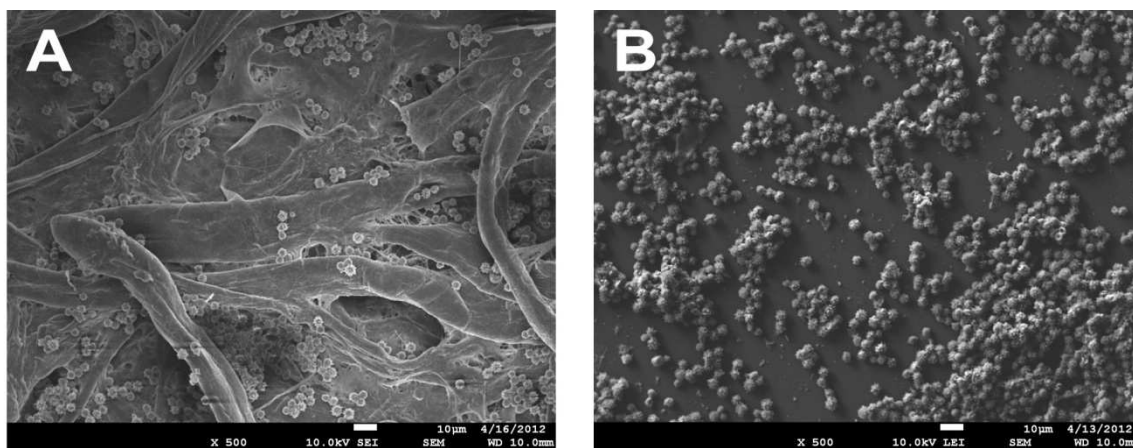


Obrázek 29 Vliv materiálu nosiče na průběh inaktivace vegetativních buněk *B. subtilis*, Ar plazma.

Z porovnání křivek jednotlivých materiálů opracovaných při stejné hustotě výkonu je na první pohled patrný velmi podobný průběh křivek, v případě nižší hustoty výkonu je trend obou křivek téměř identický. Tomu také odpovídají velmi malé rozdíly hodnot D charakterizujících jednotlivé fáze procesu. Obecně lze říci, že výsledná koncentrace životaschopných buněk je v případě papírových nosičů nižší než v případě PET. Při použití hustoty výkonu $2,6 W/cm^3$ bylo na papíru dosaženo úplné redukce počtu životaschopných mikroorganismů, tj. $4,5 \log CFU$, během 60 s expozice. Při stejné expoziční době bylo na PET nosiči snížen počet vitálních mikroorganismů jen na $4 \log CFU$. V případě hustoty

výkonu $1,8 \text{ W/cm}^3$ byl během 90 s snížen počet životaschopných mikroorganismů na $2,5 \cdot 10^2$ CFU/ml v případě papíru resp. $2,9 \cdot 10^3$ CFU/ml v případě PET. Podobné výsledky byly získány také v případě spor *A. niger*. Tyto výsledky jsou zcela v rozporu z očekávanými výsledky odhadovanými na základě rozdílů ve struktuře materiálu, a také s výsledky prezentovanými jinými autory (viz dále), avšak jejich původ lze jednoduše vysvětlit.

Při srovnání dosaženého stupně redukce pro nižší výkon, tj. $1,8 \text{ W/cm}^3$ je patrné, že pro oba materiály bylo dosaženo stejné redukce cca 2 log CFU. Také, jak již bylo zmíněno, průběhy obou křivek a hodnoty D jsou téměř identické. Jediný rozdíl je v počáteční koncentraci mikroorganismů na povrchu vzorků, a to i přestože v obou případech byla pro přípravu použita stejná suspenze s koncentrací $5 \cdot 10^7$ CFU/ml. Nicméně koncentrace vyhodnocená kultivací z referenčních vzorků obou materiálů, tj. vzorků, které byly vystaveny všem postupům kromě plazmové sterilizace, byla cca 10^4 CFU/ml. Rozdíl mezi materiály byl pak cca 0,5 log CFU/ml. V případě spor plísně *A. niger* byl rozdíl koncentrací buněk na materiálech cca 1 log CFU/ml. Je tedy zřejmé, že v průběhu manipulace se vzorky před a po plazmovém opracování došlo k jistým úbytkům koncentrace. Ty mohou být způsobeny např. v důsledku sušení vzorků před expozicí, v případě PET docházelo při aplikaci suspenze také v důsledku hladkého nesmáčivého povrchu ke stékání kapaliny z povrchu. Avšak nejvyšší ztráty jsou pravděpodobně při procesu vymývání buněk z nosičů po expozici plazmatem zpět do fyziologického roztoku. Při tomto procesu se nejvíce projevila rozdílná struktura obou materiálů. V případě papíru mohly zůstat buňky zachyceny v členité struktuře papíru a ani dlouhodobé vytřepávání nevedlo k jejich kompletnímu vyplavení do fyziologického roztoku, z toho pak plyne rozdíl v koncentracích referenčních vzorků. Naopak hladký celistvý povrch neposkytuje mikroorganismům žádnou ochranu a jejich vymytí do fyziologického roztoku by tedy nemělo nic bránit. Popsané rozdíly mezi vzorky mikroorganismů, konkrétně spor *A. niger*, nanesených na PET a papíru jsou dobře viditelné na SEM snímcích na obrázku 30.



Obrázek 30 SEM snímky spor vzorků *A. niger* na: A/ papíru, B/ na PET.

Papír Whatman 1 má výrobcem definovanou velikost póru, těmi mohou procházet částice do průměru $11 \mu\text{m}$ [92]. Rozměry bakteriální buňky *B. subtilis* jsou $2\text{-}3 \times 0,7\text{-}0,8 \mu\text{m}$ (délka \times šířka) [97] a rozměry spory *A. niger* jsou $3,5\text{-}5 \mu\text{m}$ (průměr) [85]. Tyto rozměry jsou výrazně menší než póry papíru a buňky se mohou dostávat do těchto pór, kde pak zůstávají zachyceny. Ačkoliv se tedy papír na základě výsledků kultivace jeví jako sterilní, lze předpokládat, že v pórech mohou být ještě stále přítomny vitální buňky. Pokud se pro opracování nezvolí dostatečně dlouhé expoziční časy a hustoty výkonu, lze předpokládat, že v pórech zůstanou životaschopné mikrobiální buňky. Na základě těchto výsledků byl následně upraven postup

uvolňování buněk z pevných nosičů do fyziologického roztoku. Ke vzorkům byly přidány skleněné kuličky, které napomáhaly vymývání buněk do fyziologického roztoku, a tak došlo ke zvýšení výtěžku tohoto procesu.

Výsledky inaktivace v případě PET folie, mohly být také ovlivněny postupem nanášení suspenze buněk na povrch PET folie. Vzhledem k hladkému nesmáčivému povrchu folie bylo velmi obtížné bodovým nanášením kapek suspenze s mikroorganismy docílit rovnoměrného rozmístění mikroorganismů na povrchu nosiče. Při aplikaci docházelo ke shlukování kapek suspenze s buňkami mikroorganismu, a tak pravděpodobně vznikaly na povrchu vícevrstvé struktury buněk, které vzájemným překryvem odštiňovaly účinky plazmatu a ve výsledku pak zpomalovaly průběh inaktivace. Zatímco tedy buňky na povrchu papíru byly pravděpodobně chráněny před účinky plazmatu strukturou materiálu, v případě PET byly buňky stíněny díky vícevrstevným shlukům buněk na povrchu folie, ve výsledku tedy bylo nutné působení stejných mechanismů k inaktivaci, což by vysvětlovalo podobnost inaktivačních křivek mikroorganismů na obou materiálech.

Vliv materiálu nosiče na průběh inaktivace popsali také např. Gadri a kol. [20]. Na rozdíl od svých výsledků zjistili výrazný vliv nosného média na rychlost inaktivace. Při expozici *E. coli* nanesené na polypropylen (PP), skle a agaru účinkům RF doutnavého výboje (OAugDP, 7 kHz, 8.5 – 11 kV) ve vzduchu, naměřili nárůst hodnot D . Nejrychleji proběhla inaktivace na PP ($D_I = 6$ s), následovaná inaktivací na skle ($D_I = 33$ s) a agaru ($D_I = 70$ s). Dle autorů mohly dosažený řád redukce ovlivnit chemické podmínky buňky na daném povrchu, její orientace a míra expozice povrchu. Výrazný vliv materiálu nosiče na průběh inaktivace popsali také Yun a kol. [34]. Při sterilizaci v RF výboji generovaném v heliu (13,56 MHz, 75-150 W) naměřili pro bakterii *Listeria monocytogenes* nanesené na jednorázové nádoby na jídlo pokles hodnoty D resp. nárůst rychlosti inaktivace v pořadí materiálů papír, alobal a polystyren. Tato skupina v práci Song a kol. [4] dále prezentovala při použití identického zařízení také sterilizaci potravin a vliv typu potraviny na výsledek inaktivace. Shodně s předchozími výsledky získali lepší výsledky pro sýr, který disponoval hladkým povrchem ($D = 17,27$ s), než pro šunku s hrubým povrchem ($D = 63,67$ s).

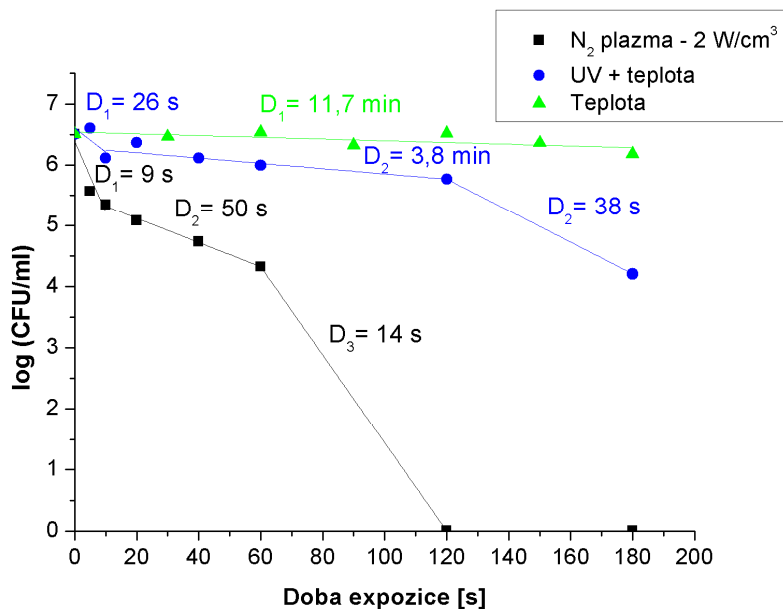
4.2.2 Studium dílčích inaktivačních mechanismů uplatňujících se při sterilizaci v DBD

Kombinací výsledků OES a výsledků dosažených při sterilizaci v N_2 a Ar plazmatu a porovnáním závěrů s literaturou lze přibližně odhadnout mechanismy působící při inaktivaci, avšak tyto závěry je nutno verifikovat. Z toho důvodu byl vyhodnocen příspěvek jednotlivých mechanismů (teplota, UV, reaktivní částice) působících v Ar a N_2 plazmatu odděleně. Studie byla provedena na sporách *A. niger* a *B. subtilis*. Zatímco spory *A. niger* vykazují vyšší odolnost vůči účinkům UV záření, spory *B. subtilis* se naopak vyznačují vyšší odolností vůči vysokým teplotám. Vzorky mikroorganismů byly exponovány plazmatem při nejvyšších hustotách výkonu, tj. 2 W/cm^3 v dusíku resp. $2,4 \text{ W/cm}^3$ v argonu. Podílu UV záření na inaktivaci byl měřen přímo ve výboji s využitím křemenného sklíčka. To odstínilo vliv reaktivních částic, avšak při daném uspořádání experimentu nebylo možno vyloučit vliv teploty. Teplotní podíl na inaktivaci byl studován v termostatu (inkubátoru), dle teplotního profilu naměřeného v N_2 plazmatu, u něhož byl naměřen vyšší nárůst teploty ($10 \text{ }^\circ\text{C}/30 \text{ s}$), viz kapitola 4.1.2. Poškození buněk působením nabitých částic, byl sledován pomocí EREM, avšak jen u vzorků opracovaných v Ar plazmatu, kde je pravděpodobnost tohoto procesu výrazně vyšší. Dle teorie prezentované Laroussi a spol. [47] je velikost nabíjecího potenciálu

závislá na poměru zastoupení iontů a elektronů, plyny s vyšší atomovou hmotností tedy vedou k vyšším elektrostatickým silám.

4.2.2.1 Dusík

Výsledky studie dílčích mechanismů při sterilizaci v N_2 plazmatu s využitím spor *A. niger* jsou shrnuty na obrázku 31.



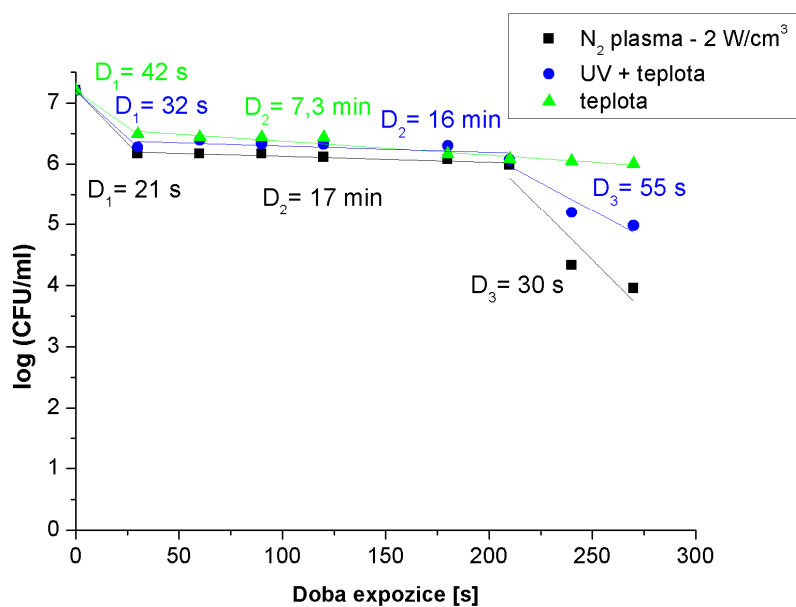
Obrázek 31 Porovnání sterilizační účinnosti teploty, UV záření a N_2 - plazmatu při sterilizaci spor plísně *A. niger*.

Na první pohled je zcela evidentní, že nejvyšší účinek byl dosažen při přímé expozici plazmatem, kdy byly vzorky vystaveny společnému vlivu všech mechanismů, tj. teplotě, UV záření a reaktivním částicím. Během 120 s expozice plazmatem bylo dosaženo kompletní redukce 6,5 log CFU, zatímco v případě paralelně opracovaných vzorků, překrytých křemenným sklíčkem, byla dosažena redukce pouhých 0,7 log CFU. Díky křemennému sklíčku byl odstíněn vliv reaktivních částic, a tedy dosažená redukce odpovídala pouze působení teploty a UV záření. Při působení pouze teploty na vzorky *A. niger* v termostatu nebyla během 120 s expozice detekována žádná změna v počtu životaschopných mikroorganismů. V průběhu procesu byly spory plísně vystaveny postupně účinkům teplot 25-54 °C ve shodě s průběhy uvedenými v Tabulka 3 v kapitole 3.4.2. Nepatrný úbytek počtu životaschopných mikroorganismů o cca 0,3 log CFU byl zaznamenán teprve při expozičním čase 180 s, kdy byla maximální dosažená teplota v N_2 výboji 58 °C. Avšak v případě spor *A. niger* byla dosažena redukce v plazmatu již při 120 s, je tedy patrné, že vliv teploty byl v tomto případě zcela zanedbatelný. Proto i výsledek dosažený při inaktivaci přes křemenné sklíčko lze přičítat pouze vlivu UV záření. V případě vyšších expozičních dob, např. při použití nižších výkonů, je nutno nicméně počítat s jistým teplotním příspěvkem, i když jen minoritním, viz výsledek při 180 s působení teploty. Ve výsledku byl tedy podíl jednotlivých mechanismů na sterilizaci spor *A. niger* v N_2 plazmatu následující: 10 % UV záření a 90 % reaktivní částice.

Tomuto závěru odpovídají také průběhy inaktivačních křivek. Zatímco v případě teploty byla získána jednoduchá křivka, charakterizovaná relativně vysokou hodnotou D , tj. velmi

malou rychlostí inaktivace, v případě UV záření a plazmatu byly získány křivky s velmi podobným průběhem. Obě tyto křivky jsou tvořeny třemi lineárními úseky, s hodnotami $D_1 < D_2 > D_3$. S tím, že hodnoty $D_{1,3}$ odpovídající inaktivaci v plazmatu jsou cca 3 x nižší než jim odpovídající hodnoty získané při působení jen UV záření. Je tedy patrné, že k inaktivaci plazmatem přispívaly také jiné mechanismy. Vyšší rozdíl byl získán v případě hodnot D_2 , které charakterizují zpomalení reakce v důsledku již dříve popsaného efektu stínění. Jak UV záření, tak také plazma mají omezenou hloubku penetrace, a tedy jakýkoliv materiál překrývající mikroorganismy, zpomaluje proces inaktivace. Z průběhu křivek je však evidentní, že působením reaktivních částic plazmatu (teplota byla vyloučena) docházelo k mnohem účinnějšímu odstranění buněk z povrchu.

Výsledky redukce životaschopných buněk při expozici spor *B. subtilis* plazmatu, UV a teplotě jsou zobrazeny na obrázku 32.



Obrázek 32 Porovnání sterilizační účinnosti teploty, UV záření a N_2 - plazmatu při sterilizaci spor bakterie *B. subtilis*.

I v případě bakteriálních spor byly kombinované účinky jednotlivých mechanismů v plazmatu výrazně efektivnější než jejich samostatné působení. Při působení plazmatu bylo dosaženo redukce 3,2 log CFU po 270 s, zatímco v případě paralelně opracovaných vzorků, překrytých křemenným sklíčkem byla dosažena redukce pouhých 2,2 log CFU. Při tomto expozičním čase bylo dosaženo v termostatu redukce 1,2 log CFU. V průběhu procesu byly bakteriální spory vystaveny postupně účinkům teplot 25-71 °C, avšak k největšímu poklesu došlo paradoxně v průběhu prvních 30 s, kdy byly vzorky vystaveny maximálně teplotám do 36 °C. Na základě tohoto vývoje, by se dalo předpokládat, že v suspenzi spor se vyskytovaly zbytky vegetativních buněk, které byly usmrceny v důsledku nárůstu teplot. Avšak teplotní tolerance vegetativních buněk *B. subtilis* je až do 53 °C, což výrazně přesahuje maximální použitou teplotu při 30 s expozice. Navíc bakteriální suspenze byly při přípravě zahřívány 30 min ve vodní lázni o teplotě 65 °C, aby došlo právě k inaktivaci vegetativních buněk (viz postup v kapitole 3.3.3.2). Další možností je, že v průběhu plazmového opracování mohly být inaktivovány spory narušené v průběhu přípravy a manipulace se vzorky. Jestliže dosažená redukce při expozičním čase 270 s kombinací UV a teploty byla 2,2 log a působením jen

teploty 1,2 log CFU, lze předpokládat, že po odečtu teplotního vlivu bylo působením UV záření usmrceno cca 1 log CFU. Jsem si vědoma toho, že toto je velmi zjednodušené, neboť na některé buňky mohla působit právě kombinace teploty a UV, zatímco samotné by tyto sterilanty dosáhly menších účinkům, nicméně pro hrubý odhad příspěvku jednotlivých mechanismů je to dostačující. Ve výsledku byl tedy podíl jednotlivých mechanismů na sterilizaci bakteriálních spor v plazmatu následující: 30 % UV záření, 40 % teplota a 30 % reaktivní částice.

Tomuto závěru, stejně jako v předchozím případě, odpovídají také velmi podobné průběhy inaktivačních křivek teploty, UV v kombinaci s teplotou a plazmatu. Téměř shodné D_1 a D_2 hodnoty, charakterizující rychlost sterilizace vzorků v plazmatu s hodnotami naměřenými u paralelně opracovaných vzorků přes křemenné sklíčko, dokonce naznačují, že při kratších expozičních časech převládají právě tyto dva mechanismy. Teprve ve třetí fázi procesu došlo v případě plazmatu cca k zdvojnásobení rychlosti inaktivace v porovnání s rychlostí dosaženou společným působením UV a teploty. Zvýšení rychlosti lze pravděpodobně přičíst působení reaktivních částic.

Dosažené výsledky jsou zcela ve shodě s výsledky OES (viz kapitola 4.1.1.2). Na základě přítomnosti NO_γ molekulového systému v UVC oblasti, lze očekávat příspěvek tohoto záření k inaktivaci. Dále byla v UV oblasti detekována slabá emise OH radikálu a částečně do UV oblasti zasahovala také emise 2. pozitivního systému dusíku. I tyto systémy mohly částečně přispívat k účinkům UV záření, i když, jak již bylo zmíněno v kapitole 4.2.1.4, jsou účinky těchto složek UV několikanásobně nižší než účinky záření v oblasti UVC. Nižší podíl UV záření na inaktivaci spor *A. niger* (cca 10 %) ve srovnání s *B. subtilis* (30 %) je dán rozdílnou citlivostí mikrobiálních buněk vůči germicidním účinkům tohoto záření. Např. dle výsledků projektu AiF [94] byly spory *B. subtilis* vystavené dávkám UV záření s hustotou výkonu 70 mW/cm^2 cca 3 x citlivější než spory *A. niger*. Avšak tento poměr závisí na zvoleném kmeni a nelze jej zobecňovat, faktem však zůstává, že spory *B. subtilis* vykazují vyšší citlivost vůči UV záření než spory *A. niger*. Prokázaný příspěvek reaktivních částic při inaktivaci v N_2 plazmatu byl s nejvyšší pravděpodobností výsledkem společného působení OH radikálu a vysoce energetického N_2^+ iontu, jehož slabá emise byla také identifikována ve spektrech. OH radikál může poškozovat buňky oxidací, případně stejně jako N_2^+ iont mechanicky leptáním buněk a jejich erozí z povrchu.

Překvapujícím výsledkem byl relativně vysoký podíl teploty na inaktivaci spor *B. subtilis*. Tyto spory jsou schopné odolávat teplotám až 120 °C, nicméně k nejvyššímu poklesu o 0,7 log CFU došlo již při teplotě 36 °C, při dalším zvyšování teploty až na 71 °C došlo k další redukci počtu vitálních buněk již jen 0,5 log CFU. Spory plísně *A. niger*, které se vyznačují odolností k zvýšeným teplotám do cca 60 °C, byly během 120 s expozice vystaveny teplotám v rozsahu 25-54 °C. Tyto teploty jsou stále ještě nižší než maximální tolerovaná teplota, tomu také odpovídá nulový podíl teploty na inaktivaci.

Využití N_2 plazmatu ke sterilizaci prezentovali také již několikrát zmiňovaný Heise a kol. [21]. Jako hlavní působící mechanismus při inaktivaci v DBD generovaném v dusíku uvedli UV záření. K tomuto závěru došli na základě identifikace NO_γ molekulového pásu v emisním spektru dusíku a na základě výsledků sterilizace spor *B. subtilis* a *A. niger*. Při expozici na UV záření citlivějších spor *B. subtilis* N_2 plazmatem dosáhli lepších účinků ve srovnání s *A. niger*. V případě spor *B. subtilis* dosáhli redukce cca 4 log CFU za 10 s, zatímco při stejném

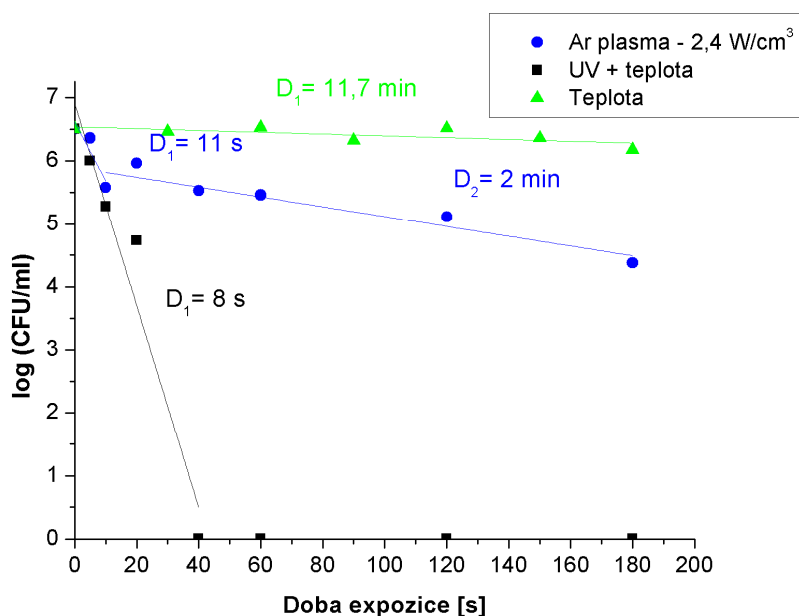
expozičním čase v případě spor *A. niger* dosáhlí redukce jen 2 log CFU. Jako další možný mechanismus pak uvádí působení reaktivních částic.

UV jako hlavní inaktivační mechanismus při sterilizaci pomocí APPJ generovaného v dusíku prezentovali také Chiang a kol. [16]. V emisních spektrech N_2 výboje identifikovali NO_γ molekulový pás, avšak vzhledem k umístění vzorku ve vzdálenosti cca 20 mm od ústí trysky docházelo k snížení účinku, a tedy výsledná redukce životaschopných buněk *E. coli* a *B. subtilis* byla pouhých 10-20 %.

DBD výboj generovaný ve směsi N_2 - N_2O (0-1000 ppm) používali také Boudam a kol. [36] při sterilizaci spor *B. subtilis*. Změnou koncentrace N_2O ve směsi se snažili docílit maximální intenzity UV záření, nicméně i v případě samotného N_2 byla intenzita dostatečně vysoká. Autoři uvedli, že v případě, že je intenzita UV dostatečně vysoká, pak při inaktivačním procesu dominuje vliv UV fotonů, zatímco při absenci UV záření dochází k inaktivaci v důsledku působení reaktivních částic. Dále uvedli, že i v případě, kdy procesu dominuje UV záření, působí reaktivní částice kyslíku na povrch spor skrze leptání.

4.2.2.2 Argon

Výsledky získané při studiu dílčích mechanismů působících při sterilizaci vzorků spor plísně *A. niger* v argonovém plazmatu jsou shrnuty na obrázku 33. V případě argonu byl vyhodnocen pouze vliv UV záření v kombinaci s teplotou, kterou nelze při zvoleném postupu eliminovat, avšak teplotní vliv jako takový vyhodnocen nebyl. Vzhledem k tomu, že v argonu docházelo k nižšímu nárůstu teplot ve srovnání s dusíkem, průměrně o 2 °C/30 s, nebyl vyhodnocován vliv teploty v případě argonu odděleně, ale pro přibližný odhad možného příspěvku teploty k inaktivaci byly použity výsledky inaktivace naměřené v termostatu dle teplotního profilu N_2 plazmatu.



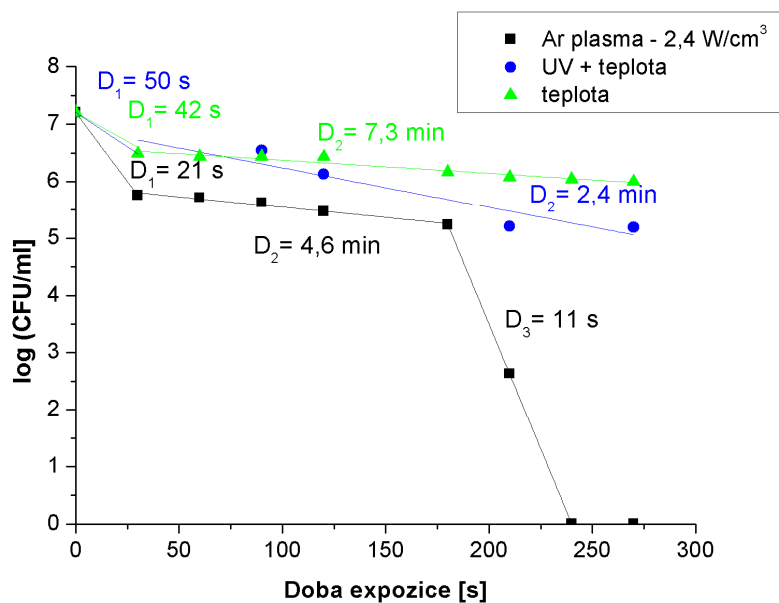
Obrázek 33 Porovnání sterilizační účinnosti teploty, UV záření a Ar - plazmatu při sterilizaci spor plísně *A. niger*.

Stejně jako v dusíku i v případě argonu byl výsledek plazmatu výrazně vyšší než při působení pouze UV záření generovaného Ar plazmatem. Při působení plazmatu na vzorky

spor plísně bylo dosaženo kompletní redukce 6,5 log CFU během 40 s, zatímco u paralelně opracovaných vzorků přes křemenné sklíčko byla za stejný čas dosažena redukce počtu vitálních mikroorganismů jen 1 log CFU, a tedy podíl UV záření při inaktivaci činil cca 15 %. Při delších expozičních časech tento podíl může být nicméně výrazně vyšší, např. při expozičních časech 180 s bylo jen působením UV dosaženo redukce 2 log CFU. To může být případ např. nižších hustot výkonu, u nichž je rychlost inaktivace nižší vzhledem k nižší koncentraci aktivních částic v plazmatu. Nicméně ze stejného důvodu bude pravděpodobně nižší i intenzita UV záření, a tedy nižší i jeho inaktivační účinek. Vliv teploty je stejně jako v případě dusíku zcela zanedbatelný. Při expozici vzorku po dobu 40 s Ar plazmatem, kdy došlo k úplné redukci vitálních buněk, působila na vzorky maximální teplota 40 °C (teplota naměřená po 60 s, viz Tabulka 6), při stejném čase byla v N₂ plazmatu teplota maximálně 44 °C. Měření v termostatu dle teplotního profilu naměřeného v N₂ plazmatu neukázala žádnou změnu počtu vitálních mikroorganismů, což lze naprosto bez problémů aplikovat také na argon. Ve výsledku byl tedy podíl jednotlivých mechanismů na sterilizaci spor *A. niger* v N₂ plazmatu následující: 15 % UV záření a 85 % reaktivní částice.

Při porovnání průběhu křivek je patrný podobný počáteční trend inaktivační křivky plazmatu a UV záření. Rychlosti inaktivace u obou byla v této části procesu téměř totožná, lze tedy předpokládat, že při krátkých expozičních časech dominovalo procesu inaktivace UV záření. V případě působení samotného UV záření generovaného plazmatem, došlo po 20 s expozice ke zpomalení procesu, pravděpodobně v důsledku již popsaného efektu stínění. Naopak v případě působení Ar-plazmatu, zůstala rychlost konstantní. Lze tedy očekávat příspěvek jiného mechanismu k procesu inaktivace, tím byly reaktivních částice. Společným působením reaktivních částic a UV záření docházelo k dostatečně rychlé inaktivaci a odstranění buněk z povrchu biomasy, aniž by došlo ke zpomalení procesu inaktivace v důsledku stínění, jak tomu bylo v případě samotného UV záření.

Výsledky získané při použití *B. subtilis* jsou shrnuty na obrázku 34.



Obrázek 34 Porovnání sterilizační účinnosti teploty, UV záření a Ar - plazmatu při sterilizaci spor bakterie *B. subtilis*.

Při působení plazmatu, a tedy společném působení všech mechanismů, došlo k úplné redukci vitálních buněk, tj. 7,2 log CFU během 240 s expozice vzorků. V případě paralelně opracovaných vzorků překrytých křemenným sklíčkem, a tedy vystavených jen kombinaci UV a teploty, bylo za stejný čas dosaženo redukce jen 2 log CFU. Pro odhad teplotního podílu byly opět použity výsledky získané při vystavení spor *B. subtilis* v termostatu teplotám dle teplot zjištěných v N₂ plazmatu. Největší redukce vitálních buněk 0,7 log byla působením teploty dosažena v průběhu prvních 30 s. Při těchto expozičních časech byla v argonu naměřena teplota mezi elektrodami 36 °C a v dusíku rovněž tak. Při expozici 240 s, kdy nastala kompletní redukce, byly vzorky v argonu vystaveny teplotám 25-56 °C. V dusíku byla podobná teplota (58 °C) naměřena při 180 s. Při této teplotě byla v termostatu dosažena redukce 1 log.

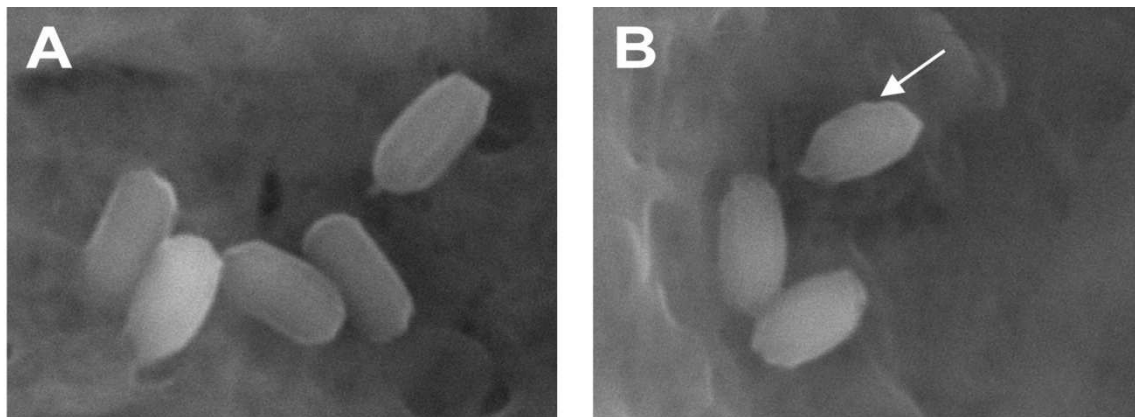
Jestliže dosažená redukce při expozičním čase 240 s byla při společném působení UV záření a teploty 2 log CFU a působením samotné teploty 1 log CFU, lze tedy předpokládat, že po odečtu teplotního vlivu bylo působením jen UV záření usmrceno cca 1 log CFU. Ve výsledku byl tedy podíl jednotlivých mechanismů na sterilizaci bakteriálních spor v plazmatu následující: 14 % UV záření, 14 % teplota a 72 % reaktivní částice.

Všechny tři inaktivační křivky, tj. křivka odpovídající působení teploty, spolupůsobení teploty s UV zářením a plazmatu vykazují podobný trend při expozicích do 180 s, přičemž při expozici do 30 s je v případě křivek teploty a kombinace teploty s UV zářením téměř totožný. Lze tedy předpokládat, že v průběhu prvních 30 s je paradoxně převládajícím mechanismem teplota. S ohledem na to, že při nárůstu doby expozice, byly další změny počtu vitálních buněk v důsledku působení teploty již jen minimální, lze předpokládat, jak již bylo naznačeno v případě dusíku, že jsou pravděpodobně redukovány zbytkové vegetativní buňky, případně spory, které byly nějakým způsobem poškozeny v průběhu přípravy a manipulace se vzorky. Na druhou stranu, strmější křivka v případě plazmatu a také cca 2 x nižší hodnota D , naznačují příspěvek jiného mechanismu mimo teplotu a UV, tím byly pravděpodobně reaktivní částice, konkrétně volné radikály kyslíku (O, OH) a vysoce energetické ionty argonu, viz dále. Ve všech případech byla první rychlá fáze vystřídána druhou, výrazně pomalejší fází. Nejvyšší zpomalení bylo zaznamenáno v případě teploty, avšak to lze s ohledem na vysokou teplotní odolnost bakteriálních spor očekávat. Tento pomalý průběh, také podporuje dříve zmíněnou hypotézu, že v počátku procesu byly inaktivovány pravděpodobně vegetativní buňky nebo spory poškozené v průběhu procesu přípravy a manipulace, avšak v případě zdravých bakteriálních spor nebyla dosažena dostatečná teplota pro jejich usmrcení, z toho důvodu došlo k výraznému zpomalení procesu. Naopak v případě kombinace UV záření a teploty resp. plazmatu lze předpokládat, že zpomalení nastalo v důsledku stínění masy buněk pod povrchem buňkami na povrchu. Jak již bylo zmíněno dříve, UV záření i plazma mají omezenou hloubku penetrace a jakákoliv překážka mezi buňkami a sterilantem vede ke zpomalení sterilizačního procesu.

Překvapivě pokles rychlosti inaktivačního procesu v případě kombinovaných účinků UV záření a teploty byl cca poloviční ve srovnání s plazmatem. K částečnému zkreslení výsledků mohlo dojít při vyhodnocení. Počty životaschopných mikroorganismů zjištěné kultivací pro expoziční časy 30 a 90 s jsou téměř totožné. Při následujícím vyšší expozičním čase došlo k poklesu počtu vitálních buněk o 0,5 log CFU. Pravděpodobně by tedy bylo možné inaktivační křivku interpretovat 3 úseky místo zde prezentovaných dvou, v tom případě by hodnota $D_2 = 17,6$ min a $D_3 = 2,1$ min.

Odstranění buněk z povrchu vede opět k nárůstu rychlosti inaktivace, viz třetí úsek křivky shrnující výsledky inaktivace v plazmatu. Výskyt třetí fáze v plazmatu naznačuje, že tyto procesy probíhají mnohem efektivněji v plazmatu díky přítomnosti reaktivních částic. Reaktivní částice mohou působit jak chemickými reakcemi s buněčným materiálem, tak také mechanicky leptáním povrchu buněk, nebo jejich erozí z povrchu. Boudam a kol. [36] na základě studia vlivu UV záření na průběh sterilizace spor *B. subtilis* v N_2-NO_2 uvedli, že v případě společného působení UV záření a sloučenin kyslíku, se také s větší mírou, díky příspěvku UV fotonů, uplatňuje proces leptání.

Mechanické poškození bakteriálních spor bylo vyhodnoceno pomocí enviromentálního rastrovacího elektronového mikroskopu (EREM), jímž disponuje Ústav přístrojové techniky akademie věd ČR. Při studii byly porovnány referenční vzorky spor *B. subtilis* nanesené na papíru se vzorky exponovanými Ar plazmatem s hustotou výkonu $2,4 \text{ W/cm}^3$ a expoziční doba 240 s, což je doba při níž došlo k úplné redukci počtu životaschopných mikroorganismů. Výsledky jsou shrnuty na obrázku 35.



Obrázek 35 SEM snímky spor *Bacillus subtilis*: A/ před vystavení účinkům DBD; B/ po 240 s působení výboje generovaného v argonu.

Na obrázku je vidět, že spory, jež nebyly vystaveny účinkům plazmatu, mají hladkou buněčnou stěnu bez známek poškození. V případě spor vystavených účinkům DBD jsou patrné drobné změny. Buněčná stěna těchto spor není zcela hladká, ale vyskytují se na ní nerovnosti a vypoukliny. Podobné změny na povrchu spor *B. subtilis* zaznamenaly také např. Boudam a kol. [36] při použití DBD ve směsi N_2-NO_2 . Tento jev vysvětlili společným působením volných radikálů kyslíku a UV fotonů v procesu leptání. Naopak znatelné poškození bakteriálních spor *B. subtilis* je patrné na výsledcích SEM analýzy prezentované Heise a kol. [21], při použití kaskádového bariérového výboje (CDBD, kombinace excimerní lampy s DBD výbojem, frekvence 20-50 kHz, hustota výkonu $1-4 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$) generovaného v prostředí kyslíku nebo argonu. Dle autorů bylo mechanické poškození buněk výsledkem přímého působení plazmatu (oxidací, nabitými částicemi, apod.). Podobně Deng a kol. [71] při sterilizaci *B. subtilis* pomocí APPJ generovaného v Ar nebo Ar + O_2 (10-40 kHz; 9,9 kV) popsali prasknutí buněk a únik cytoplazmy do okolí. Mechanické poškození buněk bylo dle autorů s ohledem na další výsledky dílem působení nabitých částic. Avšak v mém případě nebyly na snímcích patrné žádné prasklé buňky, jen již zmíněné změny morfologie povrchu. Tyto změny lze tedy pravděpodobně přičíst spíše podílu leptání reaktivními částicemi, případně UV fotony, než působení nabitých částic.

Výsledky optické emisní spektroskopie prokázaly přítomnost jak UV záření, tak také reaktivních kyslíkových radikálů OH a O. Avšak ve srovnání s dusíkem nebylo zaznamenáno UV záření v UVC oblasti, pouze v oblastech nad 300 nm z emise druhého pozitivního systému dusíku a OH radikálu, přičemž intenzita záření OH byla cca 7 x vyšší než byla zaznamenána v dusíku. V případě obou mikroorganismů byl zaznamenán cca 15 % podíl UV záření na inaktivaci. Pravděpodobně se tedy na inaktivaci musely podílet i systémy identifikované v oblasti UVA a UVB, tj. OH radikály a druhý pozitivní systém, ať již přímo, či nepřímo při fotoindukovaných chemických reakcích vzniku např. ozónu, peroxidu, případně jiných volných radikálů [3]. Při sterilizaci spor *B. subtilis* byl dle očekávání zaznamenán vyšší podíl UV na inaktivaci v případě N₂ plazmatu (30 %) v porovnání s Ar plazmatem (14 %). Naproti tomu v případě spor *A. niger* byl v obou případech zaznamenán téměř totožný 15% příspěvek UV záření k inaktivaci v plazmatu. A současně stejný příspěvek UV záření v Ar plazmatu při inaktivaci UV citlivějších spor *B. subtilis* a UV odolnějších spor *A. niger*. Tento vývoj naznačuje, že při sterilizaci v argonu působilo pravděpodobně UV záření na mikroorganismy nepřímo.

Volné radikály kyslíku identifikované ve spektrech (O, OH) mohly k celkové inaktivaci přispívat jak oxidací buněčného materiálu, tak také leptáním, případně mohly vstupovat do dalších reakcí. Ve spektrech byly dále identifikovány čáry argonu, lze tedy předpokládat, že tyto vysoce energetické atomy přispívají k procesu leptání, jež bylo zaznamenáno pomocí EREM v případě spor *B. subtilis*.

Argon jako pracovní plyn používali také Heise a kol. [21] při sterilizaci spor *A. niger* a *B. subtilis* pomocí DBD (frekvence 20-50 kHz, hustota výkonu 7 W/cm²). Shodně s mými výsledky, spory *A. niger* vyhodnotili jako citlivější vůči germicidním účinkům DBD generovaného v argonu. Dle autorů je to pravděpodobně dílem působení vakuového UV záření v oblasti 126 nm emitované excimerními molekulami Ar₂*. K tomuto závěru došli na základě výsledků OES, kde detekovali ArO* excimer na vlnové délce 308 nm vznikající při interakci Ar plazmatu s nečistotami kyslíku.

Brandenburg a kol. [35] používali plazma generované v argonu (APPJ - plazma jet, 27,12 MHz, 10 W) ke sterilizaci spor *B. subtilis* a vegetativních buněk *E. coli*. Pomocí OES zjistili, mimo argon a dusík, přítomnost jak volných radikálů (O, OH) tak také NO_γ molekulového pásu s emisí v UVC oblasti. Obecně zjistili vyšší citlivost vegetativních buněk *E. coli* v porovnání se spory *B. subtilis* vůči germicidním účinkům APPJ v prostředí argonu. Při oddělené studii příspěvku UV záření a teploty k inaktivaci zjistili, dle očekávání, vyšší příspěvek teploty při redukci vegetativních buněk *E. coli* ve srovnání s vysoce teplotně odolnými spory *B. subtilis*. V případě bakteriálních spor zjistili nulový příspěvek teploty. Vyhodnocení teplotního vlivu prováděli v termostatu. Bakteriální buňky byly vystaveny účinkům nejvyšší naměřené teploty na vzorku při působení APPJ, která byla 95 °C. Naopak zcela proti očekávání zjistili rovnocenný podíl UV záření na inaktivaci obou mikroorganismů, ačkoliv lze předpokládat, že spory *B. subtilis* vykazují obecně vyšší odolnost ve srovnání s vegetativními buňkami. Příspěvek UV vyhodnocovali přímo ve výboji, překrytím vzorků křemenným sklíčkem. Ze stejné skupiny Ehlbeck a kol.[23] vysvětlil obdobnou citlivost spor *B. subtilis* jako vegetativních buněk *E. coli*, stejně jako Heise a kol. [21], působením VUV záření, konkrétně Ar₂* excimeru. Jako další mechanismy uvádí působení excitovaných reaktivních částic s částečným příspěvkem UV záření, teploty a nízkomolekulárních chemických produktů.

Deng a kol.[65] používali taktéž APPJ (10-40 kHz, 9,9 kV) generovaný v Ar nebo Ar + O₂ ke sterilizaci *B. subtilis*. Kombinací výsledků působení jen teploty (exikátor, 20-80 °C) a UV (křemenné sklo) s výsledky OES, SEM, kolorimetrickým stanovením koncentrace uvolněného proteinu v důsledku prasknutí buněk a koncentrace MDA dospěli k závěru, že dominantním mechanismem v případě čistého argonu je působení nabitých částic, částečně asistované působením reaktivních sloučenin kyslíku.

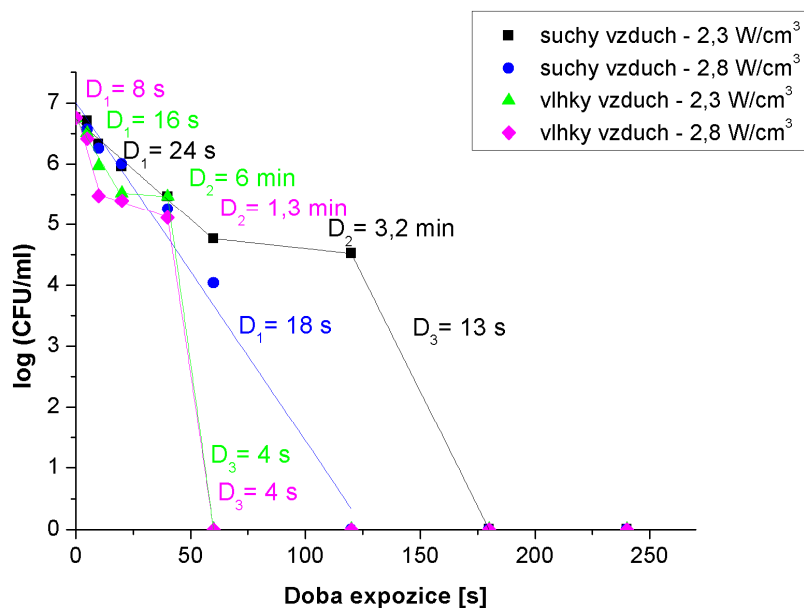
Obdobně Morgan a kol.[26] při sterilizaci kvasinek *Saccharomyces Cerevisae* a *Mrakia Frigida* v DBD výboji (1-30 kV, 1 kW výkon, frekvence 50 Hz) generovaném v argonu jako dominantní mechanismus uvedli akumulaci náboje na povrchu buněk v důsledku dopadu nabitých částic. Mimo to dle autorů přispívalo k inaktivaci částečně také leptání vysoce energetickými ionty argonu. V tomto případě se však jedná spíše o předpoklady, autoři neuvedli ani výsledky OES ani SEM pozorování. Svou teorii vysvětlují porovnáním výsledků získaných při sterilizaci dvou rodů kvasinek, přičemž v případě kvasinky, která disponuje menší velikostí buněk, získali lepší výsledky. A na základě teorie vlivu nabitých částic na mikroorganismy prezentované Laroussi a kol. [47], že elektrostatický potenciál je nepřímýměrny poloměru zakřivení povrchu, dospěli k výše uvedenému závěru.

4.2.3 Sterilizace pomocí DBD generovaného na vzduchu, vliv vlhkosti

4.2.3.1 Zhodnocení vlivu vlhkosti

Velmi často používaným pracovním plynem je také vzduch [3; 11; 16; 20; 21; 30; 39; 41-43; 96]. Jeho nespornou výhodou je jeho všudypřítomnost, což lze velmi dobře využít v průmyslových aplikacích, kde je důležité z hlediska konkurenceschopnosti dané metody brát v potaz provozní náklady. Navíc jak uvedli Laroussi a Leipold [3] plazma generované ve vzduchu je výborný zdroj reaktivních sloučenin kyslíku a dusíku, jako jsou atomární kyslík, ozon, OH, NO, NO₂, atd. Současně také ukázali na vzorcích spor *B. subtilis*, že díky přítomnosti těchto reaktivních sloučenin je rychlost inaktivace v DBD (2-15 W) generovaném ve vzduchu několikanásobně rychlejší než v prostředí vzácných plynů, konkrétně při experimentech použili He a směs He + O₂. Na druhou stranu, již častokrát zmiňovaný Heise a kol. [21], získali při inaktivaci spor *B. subtilis* výrazně lepší výsledky v případě DBD (frekvence 20-50 kHz, hustota výkonu 7 W/cm²) generovaného v argonu než za stejných podmínek ve vzduchu. Stejně tak i v případě spor *A. niger*, i když v tomto případě byla účinnost vzduchu vyšší než v případě bakteriálních spor. Nicméně tato skupina jako hlavní inaktivační mechanismus uvádí UV záření částečně asistované reaktivními částicemi.

V mé studii byl použit suchý a vlhký syntetický vzduch, s cílem zhodnotit inaktivační účinky DBD generovaného ve vzduchu a případný vliv vlhkosti na průběh inaktivace. Výboj byl generován s hustotou výkonu 2,3 a 2,8 W/cm³. Vzduch byl připraven smícháním laboratorních plynů, prouděním tohoto vzduchu přes promývací lahev naplněnou vodou byl získán vlhký vzduch. Germicidní účinky vzduchu byly testovány na sporách plísně *A. niger*. Inaktivační křivky charakterizující průběh sterilizace v suchém resp. vlhkém vzduchu jsou shrnuty na obrázku 36. Hodnoty *D* a stupeň dosažené redukce jsou shrnuty v tabulce 8.



Obrázek 36 Vliv vlhkosti vzduchu na inaktivaci spor *A. niger*

Hustota výkonu [W/cm ³]	Suchý vzduch				Vlhký vzduch			
	D_1 [s]	D_2 [s]	D_3 [s]	Redukce log CFU	D_1 [s]	D_2 [s]	D_3 [s]	Redukce log CFU
2,3	24	192	13	6,8/180 s	16	360	4	6,8/60 s
2,8	18	-	-	6,8/120 s	8	78	4	6,8/60 s

Tabulka 8 Porovnání inaktivačních účinků DBD v suchém a vlhkém vzduchu na spory *A. niger*.

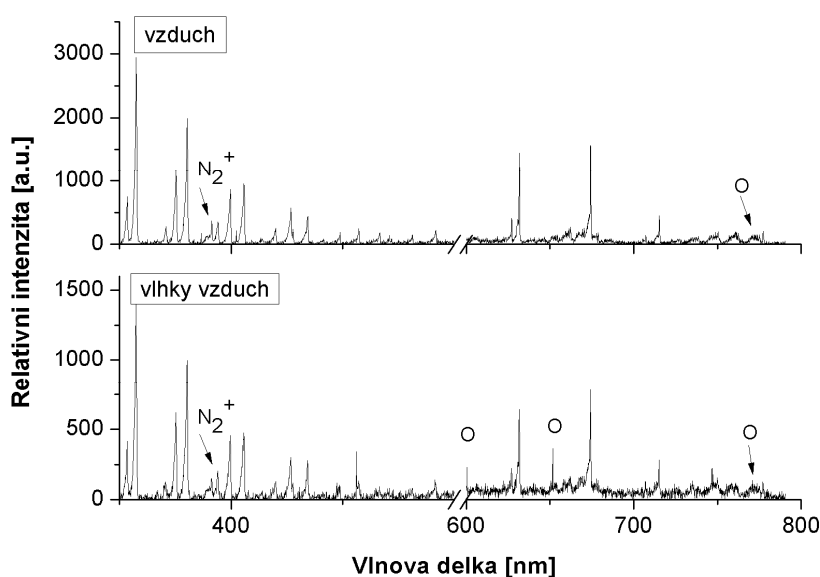
Z obrázku je patrné, že při zvýšení vlhkosti v pracovním plynu dochází k nárůstu rychlosti inaktivace. Zatímco při hustotě výkonu 2,3 W/cm³ resp. 2,8 W/cm³ bylo v případě vlhkého vzduchu dosaženo redukce 6,8 log CFU po 60 s expozice plazmatem, v případě suchého vzduchu bylo potřeba 2x resp. 3x delší expoziční čas při hustotě výkonu 2,8 W/cm³ resp. 2,3 W/cm³.

Zajímavý je také výsledek vlivu hustoty výkonu na inaktivaci. V případě suchého vzduchu vedl nárůst hustoty výkonu k nárůstu rychlosti inaktivace, a tedy pro dosažení kompletní redukce při použití nižšího výkonu 2,3 W/cm³ bylo potřeba o 60 s delší expoziční čas než v případě hustoty výkonu 2,8 W/cm³. Výrazný rozdíl lze pozorovat také ve tvaru inaktivační křivky. Pro nižší výkon byla získána křivka se třemi úseky a hodnotami $D_1 < D_2 > D_3$, téměř identický průběh křivek byl naměřen pro obě hustoty výkonu také v případě vlhkého vzduchu. Oproti tomu, křivka charakterizující průběh inaktivace v suchém vzduchu při vyšším výkonu je jednoduchá lineární závislost s jednou směrnici, resp. hodnotou D . To by mohlo naznačovat, že koncentrace aktivních částic byla dostatečně vysoká a díky tomu probíhala inaktivace a odstraňování buněk z povrchu s dostatečnou rychlostí, a tak nedocházelo k zpomalení procesu v důsledku stínění. Avšak velká podobnost ostatních křivek tuto teorii spíše vyvrací. Jedná se tedy spíše o nějakou systematickou chybu v průběhu měření, jiné vysvětlení pro tento rozdíl bohužel nemám.

Na druhou stranu v případě vlhkého vzduchu byla bez ohledu na použitou hustotu výkonu dosažena kompletní redukce počtu životaschopných mikroorganismů při stejných expozičních časech. Výrazné rozdíly mezi jednotlivými výkony v případě vlhkého vzduchu lze zaznamenat pouze v hodnotách D_2 , popisujících snížení rychlosti inaktivačního procesu pravděpodobně v důsledku stínění. Zatímco při nižším výkonu je $D_2 = 6$ min, v případě vyšší hustoty výkonu je tato hodnota $D_2 = 1,3$ min. Tyto výsledky naznačují, že inaktivace a odstranění buněk z povrchu probíhalo mnohem účinněji při vyšších hustotách výkonu. Jak již bylo zmíněno dříve, vyšší účinnost sterilizace při použití vyššího výkonu může být v důsledku větší koncentrace částic podílejících se na inaktivačním procesu. Tomu také odpovídá skutečnost, že při porovnání emisních spekter naměřených ve výboji s vyšší a nižší hustotou výkonu, byly u vyššího výkonu zjištěny vyšší intenzity emisních čar a pásů.

Při analýze mechanismů působících při inaktivaci v plazmatu buzeném ve vzduchu se většina autorů shoduje na převládající roli radikálů a reaktivních sloučenin kyslíku. Germicidní účinky jsou připisovány jak chemickému působení těchto částic, tak také mechanickému poškození buněčného materiálu v důsledku eroze. Jen minoritní část autorů, např. již často zmiňovaný Heise a kol. [21], nebo ze stejné skupiny Muranyi [11], vyhodnotili významnější podíl UV záření na inaktivaci při výbojích ve vzduchu. V případě vlhkého vzduchu je pak dominantní vliv připisován působení OH radikálu. Ten je generován z molekul vody srážkovými procesy v plazmatu, případně Kikuchi a spol. [98] navrhuji jako další možný sterilant ozon, viz dále.

V mém případě při porovnání dosažených výsledků sterilizace s emisními spektry suchého a vlhkého vzduchu, lze alespoň částečně odhadnout působící mechanismy. V obou spektrech suchého i vlhkého vzduchu byl zaznamenán druhý pozitivní systém dusíku. Lze tedy očekávat jistý příspěvek UV záření, i když v případě UV odolných spor *A. niger*, tento příspěvek bude zřejmě minimální. Při porovnání relativních intenzit druhého pozitivního systému dusíku (viz obrázku 37), je patrné, že s nárůstem vlhkosti v pracovním plynu docházelo ke snížení intenzity emisních čar, lze tedy očekávat, že v případě vlhkého vzduchu bude příspěvek UV ještě nižší. V obou spektrech byly detekovány čáry atomárního kyslíku, přičemž vyšší koncentrace těchto částic byla zaznamenána v případě vlhkého vzduchu. Zcela v rozporu s očekáváním, nebyl ve spektrech vlhkého vzduchu identifikován OH systém. Pravděpodobně se tedy na inaktivaci podílely volné radikály kyslíku. Ty mohly reagovat buď přímo s buněčným materiálem, nebo vstupovat do dalších reakcí v plazmatu, při nichž dochází např. ke vzniku ozonu. Vyšší relativní intenzita atomárního kyslíku ve spektrech vlhkého vzduchu, a tedy jeho vyšší koncentrace v pracovním plynu, vysvětluje vyšší účinky vlhkého vzduchu. Absenci OH radikálu ve spektrech vlhkého vzduchu popsali také Kikuchi a kol. [98] nebo Hähnel a kol. [99], nicméně i přesto navrhli jako dominantní mechanismus inaktivace ve vlhkém vzduchu tento radikál. Kikuchi a kol. [98] jako další možný sterilant navrhli ozon. Dle Stoffels [6] je letální účinek reaktivních sloučenin kyslíku také z velké části připisován chemické erozi. Pomocí SEM analýzy (viz kapitola 4.2.3.2) bylo prokázáno významné poškození spor plísně. Rozsah poškození buněk byl v případě suchého i vlhkého vzduchu přibližně podobný, naopak byly zaznamenány významné rozdíly v poškození dle materiálu nosiče. K mechanickému poškození mohly přispívat také vysoce energetické N_2^+ ionty identifikované ve spektrech obou plynů.



Obrázek 37 Porovnání emisních spekter DBD buzeného v suchém a vlhkém vzduchu. Ve spektrech nebyly pro přehlednost popsány pásy 2. pozitivního systému N_2 .

Pro zhodnocení případného vlivu teploty lze použít dříve prezentovaná data naměřená při oddělené studii vlivu teploty v N_2 plazmatu a porovnat tyto výsledky s teplotami naměřenými termočlánkem (viz tabulka 6). Nejvyšší teplotní nárůst byl zaznamenán v případě vlhkého vzduchu a to $11\text{ }^\circ\text{C}/30\text{ s}$, avšak kompletní redukce životaschopných mikroorganismů bylo dosaženo po 60 s, kdy byla maximální naměřená teplota mezi elektrodami $49\text{ }^\circ\text{C}$. Tato teplota je ještě o cca $10\text{ }^\circ\text{C}$ nižší než teplotní maximum spor *A. niger*. V suchém vzduchu byl zaznamenán stejný nárůst teploty jako v případě dusíku, a tedy $10\text{ }^\circ\text{C}/30\text{ s}$. Při nižším výkonu bylo dosaženo kompletní redukce za 180 s. Vzorokly byly při těchto časech vystaveny maximálním teplotám $61\text{ }^\circ\text{C}$, tato teplota mírně převyšuje teplotní maximum spor *A. niger*. V případě dusíku byl při expozičním čase 180 s, čemuž odpovídala teplota $58\text{ }^\circ\text{C}$, zaznamenán mírný pokles počtu životaschopných mikroorganismů o cca 0,3 log CFU. Zatímco ve vlhkém vzduchu díky vysoké rychlosti sterilizace lze s největší pravděpodobností vliv teploty zanedbat, v případě suchého vzduchu je pravděpodobné, že při delších expozičních časech by mohla k inaktivaci, i když jen zcela minimálně, přispívat také teplota.

K závěru, že vliv vlhkosti v procesním plynu má výrazný vliv na rychlost sterilizačního procesu v plazmatu dospěli také Muranyi a kol. [96]. Na vzorcích spor *A. niger* a *B. subtilis* nanesených na PET studovali vliv relativní vlhkosti (0-80 %) vzduchu vzniklého smícháním laboratorních plynů na průběh sterilizace v kaskádovém bariérovém výboji (CDBD, 170 W; excimerová lampa – Xe + Br, 282 nm). Při relativní vlhkosti 70 % dosáhli v případě spor *A. niger* vyšší účinnosti o cca 2 log CFU. Tento jev byl patrnější při delších expozičních časech. Naopak v případě *B. subtilis* dosáhli při vysokých relativních vlhkostech mírného zhoršení výsledků inaktivace. Autoři dospěli k závěru, že nárůst inaktivačních účinků s nárůstem vlhkosti plynu v plazmatu byl převážně spojen se vznikem OH radikálů rozkladem molekuly vody srážkovými procesy v plazmatu. OH radikály jsou silně elektronegativní, z toho důvodu jsou silnými oxidačními činidly. Mohou tedy oxidací přímo poškozovat mikrobiální buňky nebo vstupovat do dalších reakcí např. vzniku peroxidů. Avšak tyto závěry nepodkládají výsledky OES. Odlišné reakce obou mikroorganismů byly pravděpodobně dány

odlišnými mechanismy inaktivace. Zatímco nárůst vlhkosti vzduchu poskytl optimální podmínky pro inaktivaci vůči oxidaci citlivých spor plísně *A. niger*, naopak tento jev zpomalil inaktivaci spor *B. subtilis*, v jejichž případě ke sterilizaci přispívalo převážně UV záření.

V protikladu k tomuto výsledku Hähnel a kol. [99] při sterilizaci spor *B. atrophaeus* pomocí DBD (10 kV, 2 kHz, pulzní režim, hustota 54 mW/cm²) popsali nárůst rychlosti inaktivace s nárůstem relativní vlhkosti (0-70 %). I přes opačný trend pro tentýž mikroorganismus *B. atrophaeus* (dříve *B. subtilis*) autoři, shodně s předchozími, tento jev vysvětlují vznikem OH radikálu. Dle autorů koncentrace OH radikálu roste s nárůstem relativní vlhkosti, naopak koncentrace ozonu, atomárního kyslíku a NOS (nitrogen oxide species) klesají. Avšak emisní spektrum OH radikálu autor ve spektrech neidentifikoval, což vysvětluje nízkou hustotou výkonu. Na prezentovaných spektrech je patrný pokles intenzity druhého pozitivního systému dusíku s nárůstem vlhkosti.

Nárůst inaktivačních účinků DBD (1 kHz, napětí 2,5 kV) s nárůstem vlhkosti (30-99 %) při konstantní teplotě 50 °C v případě spor *B. atrophaeus* prezentovali také Kikuchi a spol.[98]. Při použití relativní vlhkosti 75 % dosáhli cca 10 x vyšší účinek než při 60 %. Nárůst účinků připisují působení OH radikálu nebo ozonu. Avšak stejně jako Hähnel a kol. [99] emisní čáry OH radikálu ve spektrech neidentifikovali. Také ve spektrech zaznamenali pokles intenzity druhého pozitivního systému dusíku s nárůstem vlhkosti.

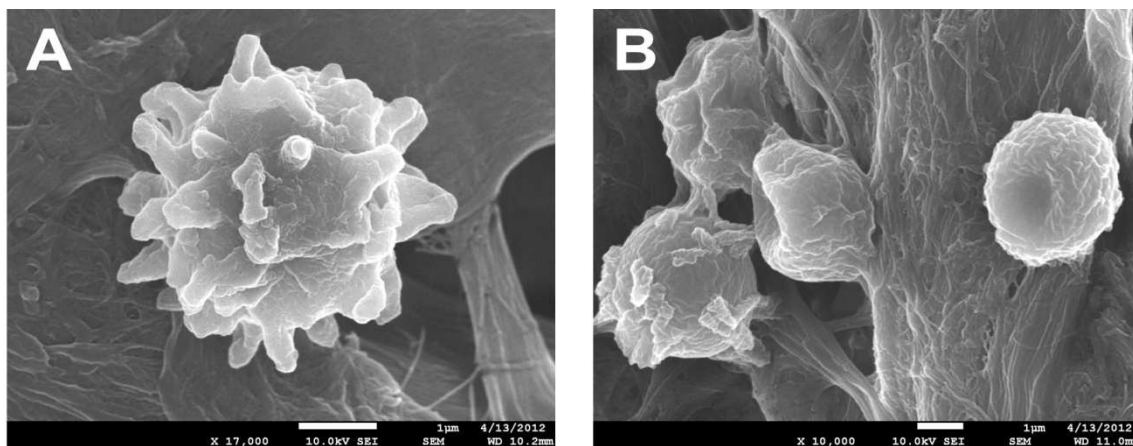
Eto a kol. [100] při sterilizaci vzorků spor *Geobacillus stearothermophilus* balených v Tyvec materiálu pomocí DBD (2,5 kV, 5 kHz) dosáhli kompletní redukce 6 log CFU při použití okolního vzduchu s relativní vlhkosti 64,4 % cca 4-5 x rychleji v porovnání se vzduchem, který byl vytvořen smícháním laboratorních plynů (20 % O₂ + 80 % N₂). Jako hlavní inaktivační mechanismus v případě vzduchu uvedli ozon a UV záření emitované druhým pozitivním systémem dusíku, ve vlhkém vzduchu pak OH radikál.

Z uvedených příkladů je patrné, že nárůst vlhkosti vzduchu vede k nárůstu inaktivačních účinků. Autoři shodně tento jev vysvětlují nárůstem koncentrace OH radikálu, přestože jej v emisních spektrech nezaznamenali. Současně také autoři popsali pokles intenzity UV záření resp. druhého pozitivního systému dusíku s nárůstem relativní vlhkosti v plynu. Mé výsledky jsou zcela ve shodě s výsledky prezentovanými ostatními autory. S nárůstem vlhkosti vzduchu došlo ke zkrácení expoziční doby potřebné k úplné inaktivaci ze 120 s na 60 s. Ani v mém případě nebyly ve spektrech identifikovány emisní pásy OH radikálu (viz výsledky OES v části 4.1.1.). A také shodně s výsledky prezentovanými Kikuchi a kol. [98], a Hähnel a kol. [99] i v mém případě docházelo ke snížení intenzity druhého pozitivního systému s nárůstem vlhkosti (viz Obrázek 37). Pod 300 nm nebyl ve spektrech identifikován žádný systém, je tedy patrné, že záření v oblastech UVC v případě vzduchu nepřispívalo k inaktivaci.

4.2.3.2 Vyhodnocení vlivu eroze při sterilizaci v suchém/vlhkém vzduchu

Jak již bylo zmíněno dříve, mikrobiální buňky mohou být poškozeny mechanicky v důsledku eroze reaktivními sloučeninami kyslíku, případně také vysoce energetických iontů N₂⁺. Mechanické poškození spor *A. niger* v důsledku plazmového opracování a zhodnocení vlivu vlhkosti vzduchu bylo provedeno pomocí SEM analýzy (VUT Brno, fakulta chemická, Ing. Zmrzlý, PhD.). Při analýze byly porovnány referenční vzorky spor *A. niger*, jež nebyly vystaveny účinkům plazmatu, se vzorky exponovanými sterilizačním účinkům plazmatu v prostředí suchého a vlhkého vzduchu po dobu 180 s. Při této expoziční době bylo dosaženo redukce i při nejnižších výkonech. Vzorky plísně byly naneseny na papír a PET.

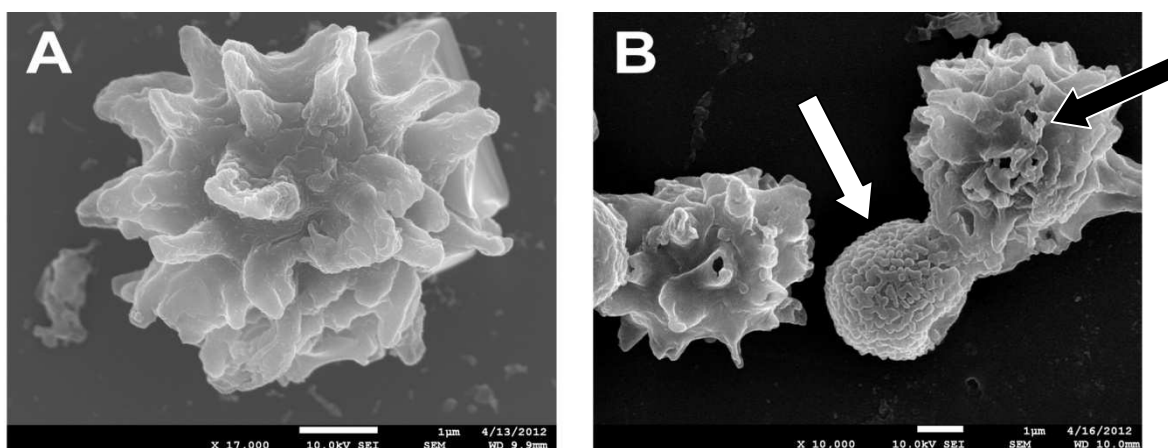
SEM snímky spor *A. niger* na papíru jsou porovnány na obrázku 38. Na povrchu spory, jež nebyla vystavena účinkům DBD, se rovnoměrně po celém povrchu vyskytovaly vláknité útvary zvané pili (fimbrie). Z obrázku je patrné, že v důsledku působení DBD docházelo k poškození těchto útvarů, resp. lze pozorovat jejich úplné odstranění. Dále lze pozorovat různé nerovnosti na povrchu a deformace tvaru buňky. Nicméně i přes tyto změny nebylo pozorováno prasknutí nebo perforace obalu spory.



Obrázek 38 SEM snímek vzorků spor *A. niger* na papíře: A/ Referenční vzorek; B/ Vzorky po 180 s expoziční DBD v suchém vzduchu, hustota výkonu $2,8 \text{ W/cm}^3$.

Podobné změny bylo možno pozorovat také v případě spor nanesených na PET, jak je ukázáno na obrázku 39. Navíc v případě těchto vzorků se objevily také perforace v obalu spory. Je tedy možné, že v důsledku členité struktury papíru, kdy spory plísně mohly být zachyceny v pórech papíru nebo nerovnostech na povrchu, byl částečně snížen erozivní účinek plazmatu.

Mezi vzorky opracovanými v suchém a vlhkém vzduchu nebyl pozorován, žádný výrazný rozdíl.



Obrázek 39 SEM snímek vzorků spor *A. niger* na PET: A/ Referenční vzorek; B/ Vzorky po 180 s expoziční DBD v suchém vzduchu, hustota výkonu $2,8 \text{ W/cm}^3$. Bílá šipka označuje sporu bez fimbrií, černá šipka označuje perforaci buňky.

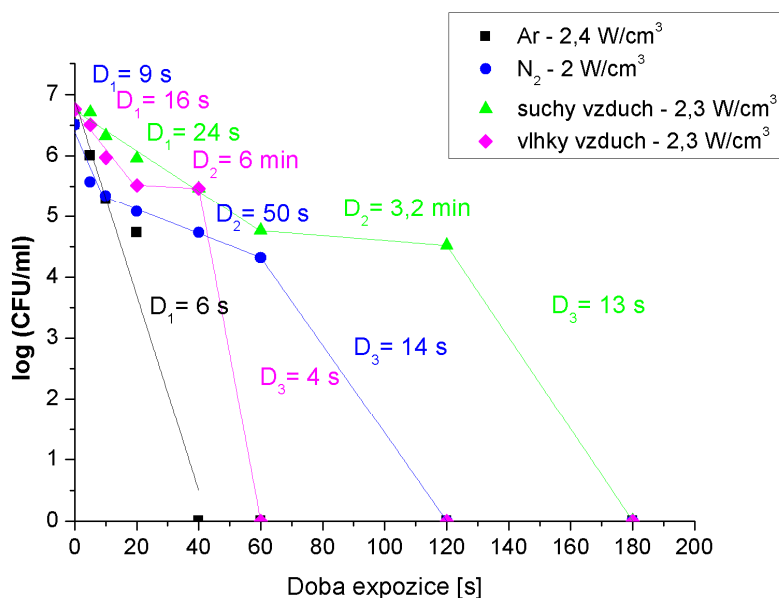
Podobný rozsah poškození spor plísně *A. niger* prezentovali také Raballand a kol. [101] při studiu mechanismu sterilizace plazmatem v prostředí argonu nebo kyslíku. Spory plísně na povrchu skla vystavili odděleně účinkům definovaného proudu Ar^+ , O , O_2 a jejich kombinací.

SEM analýzou dospěli k závěru, že při expozici vzorků spor *A. niger* odděleným účinkům Ar^+ , O, O_2 docházelo jen k nepatrnému leptání. Naopak společné působení argonových iontů s O_2 molekulami nebo O atomy vedlo k účinnému leptání a perforaci obalu spor. Kombinací zmíněných mechanismů získali obdobné výsledky, jako byly prezentovány výše. V jejich případě však docházelo mnohem výrazněji k perforaci obalu spor.

4.2.3.3 Porovnání sterilizačních účinků jednotlivých plynů na spory *A. niger*

V předchozích kapitolách byly prezentovány výsledky sterilizace pomocí DBD generovaného v prostředí argonu, dusíku, suchého a vlhkého vzduchu. Ve všech případech byly prokázány germicidní účinky plazmatu. Na základě průběhů inaktivačních křivek, výsledků OES a oddělených studií vlivu teploty, UV záření a SEM analýzy byly diskutovány pravděpodobné mechanismy podílející se na inaktivaci v jednotlivých plynech. Na základě výsledků oddělené studie bylo také zjištěno, že příspěvek jednotlivých mechanismů je ovlivněn mimo jiné volbou modelového mikroorganismu, což je dáno odlišnou citlivostí mikroorganismů vůči nepříznivým vnějším vlivům.

Pro porovnání germicidních účinků jednotlivých procesních plynů byly použity výsledky získané při sterilizaci vzorků spor *A. niger* nanesených na papíru (viz obrázek 40). Plazma bylo ve všech plynech generováno s konstantním napětím na zdroji 70 V. Z obrázku je patrné, že germicidní účinky procesních plynů klesají v pořadí argon, vlhký vzduch, dusík a suchý vzduch. Zatímco v případě Ar plazmatu bylo k dosažení kompletní redukce počtu vitálních buněk, tj. redukcí 6-7 log CFU, potřeba expoziční dobu 40 s, v případě ostatních plynů postupně rychlost inaktivace klesala. Ve vlhkém vzduchu byla dosažena kompletní redukce po 60 s expozice plazmatem, v dusíku po 120 s a v suchém vzduchu byla potřeba až 180 s.



Obrázek 40 Srovnání sterilizačních účinků DBD na spory plísně *A. niger* v prostředí různých pracovních plynů.

Vysoké germicidní účinky argonového plazmatu jsou s velkou pravděpodobností výsledkem působení aktivních částic plazmatu, konkrétně OH radikálů, atomárního O a Ar iontů. Jistým podílem přispívalo pak UVB (OH systém) a UVA (druhý pozitivní systém dusíku) záření a teplota. V případě dusíku se na inaktivaci velkou měrou podílelo UVC (NO_γ

system) záření, pravděpodobně také s příspěvkem UVB (OH systém) a UVA (druhý pozitivní systém dusíku) záření. Shodně s argonem i zde byly převládajícím mechanismem aktivní částice plazmatu, konkrétně OH radikály a pravděpodobně také N_2^+ ionty.

Z výsledků optické emisní spektroskopie (viz obrázek 17) je patrné, že intenzita druhého pozitivního systému dusíku klesala s nárůstem koncentrace kyslíku v plynu a současně s nárůstem vlhkosti, v pořadí dusík, suchý vzduch a vlhký vzduch. A tedy současně ve stejném pořadí klesal příspěvek UVA záření emitovaného tímto systémem k celkové inaktivaci plazmatu v prostředí těchto plynů. Na druhou stranu, jak již bylo zmíněno dříve, vzduch je výborným zdrojem reaktivních sloučenin kyslíku a dusíku, jako jsou atomární kyslík, ozon, OH, NO, NO₂, atd. Relativně vysoké inaktivační účinky plazmatu buzeného v suchém/vlhkém vzduchu, nízká intenzita UV záření a současně výskyt atomárního kyslíku ve spektrech suchého i vlhkého vzduchu naznačují, že převažujícím mechanismem byly právě reaktivní sloučeniny kyslíku. Rozdíly mezi vlhkým a suchým vzduchem jsou pak dány vyšší koncentrací reaktivní sloučeniny kyslíku ve vlhkém vzduchu, jak dokládají vyšší intenzity atomárního kyslíku ve spektrech.

Shodně s mými výsledky, Heise a kol. [21] dosáhli nejvyššího inaktivačního účinku při sterilizaci spor *A. niger* pomocí DBD (20-50 kHz, 7 W·cm⁻²) v prostředí argonu. Avšak na rozdíl od mých výsledků, v jejich případě klesal inaktivační účinek dalších plynů v pořadí vzduch, dusík. Zatímco v argonu dosáhli redukce 5 log CFU po 5 s expozice, v případě dusíku dosáhli za stejnou dobu 2 log CFU a v případě vzduchu pak 1 log CFU. Rozdíl je pravděpodobně způsoben tím, že v mém případě přispíval k inaktivaci také OH systém, zatímco autoři tento systém ve spektrech neidentifikovali. Při použití vzorků spor *B. subtilis* získali lepší výsledky v případě dusíku v porovnání se vzduchem. Jako hlavní inaktivační mechanismy v argonu uvádí VUV záření, v dusíku UVC záření z NO_γ molekulového systému a v případě vzduchu navrhuje vedle UV záření také příspěvek oxidace.

Eto a kol.[100] při sterilizaci spor *Geobacillus stearothermophilus* zabalené v Tyvec materiálu pomocí DBD (2,5 kV, 5 kHz) naopak zjistili, že germicidní účinky plazmatu se zvyšují dle procesního plynu v pořadí dusík, syntetický vzduch a okolní vzduch s vlhkostí 64,4%. Jako hlavní mechanismus inaktivace v dusíku uvádí UV záření emitované druhým pozitivním systémem dusíku. Shodně s mými výsledky i v jejich případě klesala intenzita druhého pozitivního systému s nárůstem koncentrace kyslíku a vlhkosti. V případě vzduchu tedy jako hlavní inaktivační mechanismus uvedli ozon a částečný příspěvek UV záření a pro vlhký vzduch pak navrhli OH radikál.

Shodně Chiang a kol. [16] při sterilizaci gram negativní bakterie *E. coli* a gram pozitivní bakterie *B. subtilis* pomocí APPJ dosáhli lepších výsledků inaktivace v prostředí vzduchu než v prostředí dusíku. Jako hlavní inaktivační mechanismus v případě vzduchu uvedli ozón a předpokládali také případný příspěvek reaktivních sloučenin dusíku např. NO₂. V případě dusíku jako hlavní mechanismus uvedli UV záření emitované NO_γ molekulovým systémem, avšak dle autorů při interakci se vzduchem docházelo k jeho výraznému útlumu.

Je tedy patrné, že při posouzení germicidních účinků jednotlivých plynů může výsledky mimo jiné také výrazně ovlivňovat čistota procesních plynů a volba modelového mikroorganismu. Zatímco např. vůči oxidaci citlivé spory *A. niger* budou projevovat vyšší citlivost vůči reaktivním sloučeninám kyslíku, např. v mém případě vůči OH radikálu v dusíku. Naopak tyto spory budou díky své černé pigmentaci projevovat nižší citlivost vůči

UV záření, jako tomu bylo např. výsledků dosažených Heise a kol. [21] při sterilizaci v DBD generovaném v dusíku. Důležitý je nejen druh mikroorganismu, ale rozdíly mohou být detekovány také mezi jednotlivými kmeny stejného druhu, neboť i ty se liší citlivostí vůči nepříznivým vlivům. Např. Muranyi a kol. [96] při zhodnocení vlivu vlhkosti v syntetickém vzduchu na sterilizaci spor *B. subtilis* pomocí CDBD, zjistili pokles účinků s nárůstem vlhkosti. Tyto výsledky jsou zcela v protikladu k výsledkům popsáných jinými skupinami. Autoři tento rozdíl vysvětlili použitím kmene *B. subtilis*, který se vyznačuje vysokou odolností vůči oxidaci.

4.2.4 Vliv plazmového opracování na nosné médium

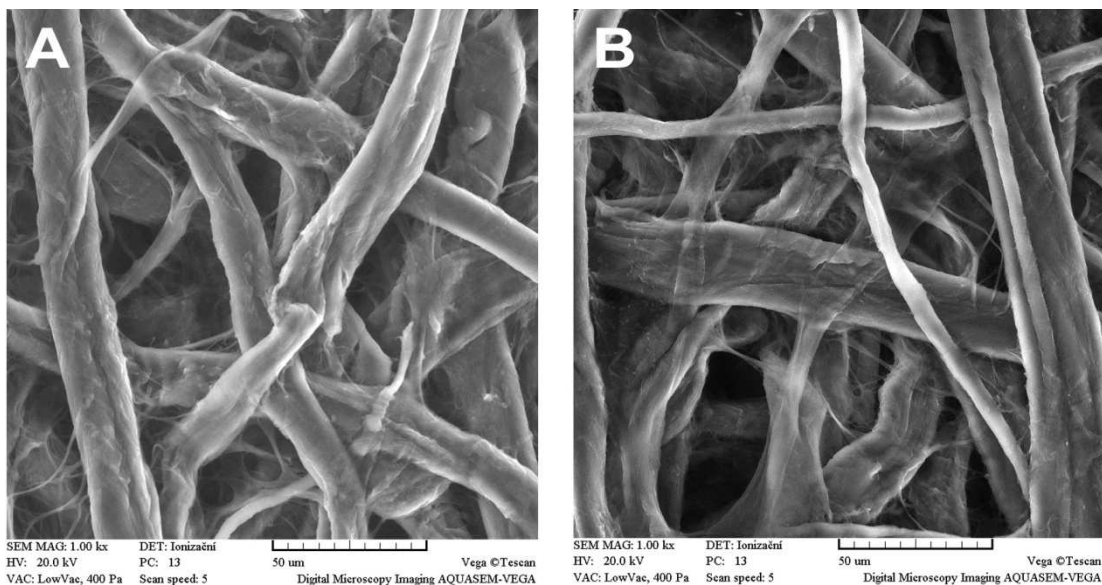
V průběhu plazmové sterilizace jsou účinkům aktivních složek plazmatu vystaveny nejen samotné mikroorganismy, ale také nosný materiál. Např. Vohrer a kol. [80] uvedli, že plazma generované v kyslíku způsobuje leptání polymerních a celulozových substrátů. S ohledem na fakt, že plazmová sterilizace je navrhována jako šetrná alternativní metoda pro sterilizaci materiálů citlivých na teplotu, a také jako netoxická alternativa pro sterilizaci potravin, asepti tkání, atd., je nutné při studiu vhodných podmínek zohlednit také případný vliv plazmového opracování na nosný materiál. V ideálním případě by tedy měly být nalezeny takové podmínky, při nichž je dosažen požadovaný stupeň sterilizace, avšak při nichž současně dochází k minimálním změnám materiálu.

Při vyhodnocení podílu leptání a případného vlivu nabitých částic na mikroorganismy na povrchu nosičů, byl současně vyhodnocen také případný vliv plazmového opracování na morfologii nosičů. Vzorok papíru a PET byly vystaveny účinkům plazmatu generovaného v argonu, dusíku, suchém/vlhkém vzduchu při konstantním napětí 70 V. Odpovídající hustoty výkonu lze nalézt v Tabulka 2. V případě prvních dvou plynů byla použita expoziční doba 240 s, při níž došlo v argonu ke kompletní redukci spor *B. subtilis*. V případě vzduchu byla použita expoziční doba 180 s, kdy byla v případě suchého vzduchu dosažena kompletní redukce.

4.2.4.1 Papír

Na obrázku 41 jsou porovnány SEM snímky struktury papíru Whatman 1 před a po 240 s expozice Ar plazmatem při hustotě výkonu $2,4 \text{ W/cm}^3$. Ve struktuře obou vzorků jsou patrná hladká neporušená vlákna celulozy. Je tedy patrné, že z hlediska struktury papíru nedochází při expozici plazmatem k žádným změnám. Avšak na základě tohoto výsledku ještě nelze zcela vyloučit případný vliv plazmatu na papírový materiál. Aby bylo možné zcela vyloučit případný vliv plazmatu, bylo by nutno provést další testy, které se běžně používají k vyhodnocení vlastností papíru jako jsou např. testy mechanickým vlastností (stanovení pevnosti v dotržení dle ISO 1974, stanovení odolnosti v přehýbání dle ISO 5626, atd), chemických vlastností (pH vodného výluhu ISO 6588), vlivu stárnutí (ISO 5630/1-3), apod. To však není předmětem této práce.

Stejné výsledky byly získány také v případě expozice vzorků papíru plazmatem v prostředí dusíku a vzduchu.

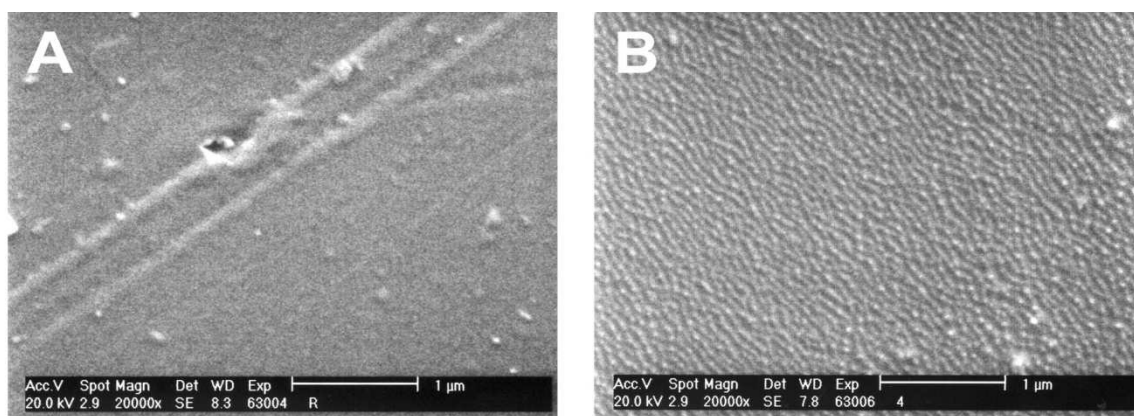


Obrázek 41 SEM snímky struktury papíru: A/ před působením DBD; B/ po vystavení účinkům plazmatu buzeného v argonu po dobu 240 s.

4.2.4.2 PET

Na Obrázek 42 jsou porovnány SEM snímky PET folie před a po 240 s expozici Ar plazmatem při hustotě výkonu $2,4 \text{ W/cm}^3$. Referenční vzorky měly hladký povrch. Naopak na povrchu vzorků vystavených účinkům DBD lze pozorovat malé důlky. Tento jev byl obzvlášť patrný v případě, kdy byly vzorky vystaveny účinkům plazmatu po delší dobu. Tyto důlky jsou pravděpodobně výsledkem dopadu streamerů hořících v DBD výboji. V těchto místech dochází k výrazným změnám elektrického pole, což může mít vliv na strukturu materiálu.

Stejné výsledky byly získány také v případě expozice vzorků PET plazmatem v prostředí dusíku a vzduchu.



Obrázek 42 SEM snímky PET fólie: A/ před působením DBD; B/ po vystavení účinkům plazmatu buzeného v argonu po dobu 240 s.

Podobné snímky, jako jsou na obrázku, prezentovali ve své práci také Liu a kol. [97]. Při přímé expozici PTFE účinkům RF plazmatu (13,56 MHz, 100 W) v prostředí kyslíku. Naopak při expozici dohasínajícím výbojem získali hladký povrch zcela srovnatelný s referenčním vzorkem. Vznik důlkové koroze vysvětlili leptáním povrchu v důsledku dopadu nabitých částic. Výskyt důlkové koroze na povrchu polymerních materiálů v důsledku expozice DBD popsali také Gadri a kol. [20].

5 ZÁVĚR

V dizertační práci byly prezentovány výsledky sterilizace pomocí dielektrického bariérového výboje (DBD) v prostředí argonu, dusíku a suchého/vlhkého vzduchu. Jako modelové mikroorganismy byly použity vzorky plísně *Aspergillus niger* (spory, vegetativní buňky), grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis* (spory, vegetativní buňky) a částečně také gramnegativní bakterie *Escherichia coli* (vegetativní buňky) nanesené na povrchu pevného nosiče, jímž byl papír Whatman 1 a PET folie.

Sterilizační účinky DBD byly hodnoceny z hlediska vlivu procesního plynu, hustoty výkonu dodávaného do plazmatu, délky expoziční doby, typu mikroorganismu a materiálu nosiče. Synergický účinek UV záření, teploty a reaktivních částic plazmatu byl detailněji zhodnocen v plazmatu generovaném v argonu a dusíku. Při sterilizaci s použitím vzduchu byl hodnocen případný vliv vlhkosti na průběh sterilizačního procesu. Plazma bylo diagnostikováno pomocí optické emisní spektroskopie a termočlánkem byla měřena teplota mezi elektrodami.

Fyziologický stav mikrobiálních buněk po expozici plazmatem byl hodnocen pomocí plotnové kulturační metody. Tato kvantitativní metoda poskytuje informace o zastoupení životaschopných buněk v populaci. Z výsledků byly sestaveny inaktivační křivky a vypočteny D hodnoty, tj. čas potřebný k inaktivaci 90 % původní koncentrace mikroorganismů.

Mechanické poškození mikrobiálních buněk a vliv plazmového opracování na nosný materiál byly zhodnoceny pomocí rastrovací elektronové mikroskopie a enviromentální rastrovací elektronové mikroskopie.

Na sporách plísně *A. niger* byly ověřeny germicidní účinky plazmatu v prostředí všech čtyř plynů. Obecně lze říci, že s nárůstem expoziční doby klesal počet životaschopných mikroorganismů. Ve všech případech, s výjimkou Ar plazmatu s nejvyšší hustotou výkonu, byly získány křivky složené ze dvou až tří lineárních úseků. V případě nejvyšší hustoty výkonu v argonu byla získána jednoduchá křivka.

Vyšší počet úseků inaktivační křivky naznačuje, že inaktivace v plazmatu probíhala v různých fázích s odlišnou rychlostí. Ve všech případech docházelo v počátku opracování k strmému poklesu počtu životaschopných mikroorganismů, poté docházelo ke zpomalení procesu. Tento jev byl zapříčiněn faktem, že na povrchu nosiče se nacházely vícevrstvé shluky buněk, kdy buňky v horních vrstvách chránily masu buněk ukrytou pod nimi. Tento jev byl navíc podpořen v případě papíru existencí pórů a členitou strukturou povrchu. Spory tedy mohly být zachyceny v porech nebo nerovnostech povrchu a být tak částečně chráněny před účinky aktivních složek plazmatu. Poté, co byly odstraněny překážky z povrchu bránící přístupu plazmatu k masě buněk pod povrchem, došlo opět k nárůstu inaktivační rychlosti. Výrazněji se zpomalení v průběhu procesu projevovalo při použití nižších hustot výkonu, kdy pravděpodobně koncentrace aktivních složek plazmatu podílejících se na inaktivaci a leptání povrchu nebyla dostatečně vysoká, a odstranění těchto „překážek“ trvalo tedy déle.

Obecně s nárůstem hustoty výkonu docházelo k nárůstu rychlosti inaktivace. Tomu také odpovídá dosažený stupeň redukce v jednotlivých plynech. Při sterilizaci v Ar plazmatu bylo při hustotách výkonu 1,2-2,4 W/cm³ dosaženo redukce 2-6 log CFU za 40 s, v N₂ plazmatu bylo při hustotách výkonu 1,2-2 W/cm³ a shodně v suchém vzduchu při hustotách výkonu 2,3-2,8 W/cm³ dosaženo redukce 2-6 log CFU za 120 s. Výjimkou byl vlhký vzduch, kdy

bylo při hustotách výkonu 2,3 a 2,8 W/cm³ dosaženo kompletní redukce 6 log CFU během 60 s bez ohledu na použitou hustotu výkonu.

Při sterilizaci vzorků spor *A. niger* v plazmatu generovaném v jednotlivých procesních plynech klesaly sterilizační účinky plazmatu dle použitého plynu v pořadí argon, vlhký vzduch, dusík a suchý vzduch. Porovnáním výsledků inaktivace dosažených v jednotlivých plynech při hustotě výkonu dodávaného do plazmatu 2-2,3 W/cm³, bylo zjištěno, že zatímco v případě argonu bylo k dosažení kompletní redukce počtu vitálních buněk, tj. redukci 6-7 log CFU, potřeba expoziční dobu 40 s, v případě ostatních plynů postupně rychlost inaktivace klesala. Ve vlhkém vzduchu byla dosažena kompletní redukce po 60 s expozice plazmatem, v dusíku po 120 s a v suchém vzduchu bylo potřeba až 180 s.

Vysoké germicidní účinky argonového plazmatu byly s velkou pravděpodobností výsledkem působení aktivních částic plazmatu, konkrétně OH radikálů, atomárního O a Ar atomů, případně i iontů. Jistým podílem přispívalo pak UVB (OH systém) a UVA (druhý pozitivní systém dusíku) záření a teplota. V případě dusíku se na inaktivaci velkou měrou podílelo UVC (NO_γ systém) záření, pravděpodobně také s příspěvkem UVB (OH systém) a UVA (druhý pozitivní systém dusíku) záření. Shodně s argonem i zde byly převládajícím mechanismem aktivní částice plazmatu, konkrétně OH radikály a pravděpodobně také N₂⁺ ionty. Opět i zde byl zjištěn jistý vliv teploty. V případě vzduchu bylo zjištěno, že v porovnání s dusíkem došlo v důsledku vysoké koncentrace kyslíku k snížení intenzity UV záření emitovaného druhým pozitivním systémem dusíku, v případě vlhkého vzduchu došlo k ještě většímu poklesu intenzity. Nicméně na základě relativně vysoké sterilizační účinnosti a přítomnosti atomárního kyslíku v emisních spektrech vzduchu lze usuzovat, že úměrně poklesu příspěvku UVA záření k inaktivaci roste příspěvek reaktivních sloučenin kyslíku. Shodně s dusíkem i ve vzduchu mohly k inaktivaci přispívat také N₂⁺ ionty. Rozdíly mezi vlhkým a suchým vzduchem pak byly dány vyšší koncentrací reaktivních sloučenin kyslíku ve vlhkém vzduchu.

Na základě výsledků oddělené studie bylo zjištěno, že příspěvek jednotlivých mechanismů, tj. UV záření, teploty a reaktivních částic se může lišit v závislosti na použitém modelovém mikroorganismu, což je dáno odlišnou citlivostí mikroorganismů vůči nepříznivým vnějším vlivům. Zatímco tedy při sterilizaci spor plísně *A. niger*, které se vyznačují vysokou odolností vůči účinkům UV záření, byl při sterilizaci v N₂ plazmatu zjištěn 10 % podíl UV záření na inaktivaci, v případě spor *B. subtilis* byl tento příspěvek až 30 %.

Je obecně známým faktem, že mikroorganismy se liší v citlivosti vůči různým sterilizačním médiím. Z toho důvodu byly germicidní účinky argonu ověřeny na dalších modelových mikroorganismech, a to grampozitivní bakterii *B. subtilis* (spory, vegetativní buňky) a gramnegativní bakterii *E. coli*. Bylo zjištěno, že citlivost vegetativních buněk resp. spor mikroorganismů vůči účinkům DBD v prostředí argonu klesá v pořadí: spory *A. niger*, vegetativní buňky *B. subtilis*, vegetativní buňky *E. coli* a spory *B. subtilis*. Zatímco v případě nejcitlivějších spor *A. niger* byla dosažena kompletní redukce počtu životaschopných mikroorganismů, tj. 6,5-7,5 log CFU, po 40 s expozice plazmatem, v případě nejodolnějších spor *B. subtilis* bylo potřeba pro dosažení stejného účinku až 5 x delší expoziční doby. Současně porovnáním výsledků získaným při sterilizaci spor a vegetativních buněk *B. subtilis* bylo zjištěno, že spory jsou výrazně odolnější vůči sterilizačním účinkům plazmatu. Pro jejich kompletní inaktivaci bylo potřeba 4 x delších expozičních časů než pro inaktivaci jim

odpovídajících vegetativních buněk. Avšak tento poměr může být zkreslen odlišnými počátečními koncentracemi mikroorganismů.

Obdobné rozdíly mezi sporami a vegetativními buňkami byly získány také v případě plísně *A. niger*. S cílem přiblížit se reálným podmínkám, byly účinkům plazmatu vystaveny vzorky 7-denní kultury plísně *A. niger*, jež vyrostla přímo na papírovém nosiči. Na vzorcích se tedy vyskytovaly jak spory tak také jim odpovídající vegetativní buňky. Při použití nejvyššího výkonu v dusíku (2 W/cm^3) bylo u 7-denní kultury dosažena kompletní redukce (9 log CFU) za 60 s expozice plazmatem, zatímco pro dosažení kompletní redukce (6 log CFU) v případě spor bylo potřeba 2 x delší expoziční čas.

Při zhodnocení vlivu nosného média na průběh sterilizace byly pro papír i PET zaznamenány velmi podobné průběhy inaktivačních křivek, jediný rozdíl byl v rychlosti těchto procesů. Na papírových nosičích bylo, zcela proti očekávání, dosaženo kompletní redukce při kratších expozičních časech než v případě PET folie. Tyto rozdíly jsou dány odlišnou strukturou obou materiálů. Papír disponuje členitou strukturou a buňky mikroorganismu se mohou dostávat dovnitř materiálu. Tyto buňky jsou do jisté míry chráněny před sterilizačními účinky plazmatu a současně mohou při vymývání do roztoku, v průběhu procesu vyhodnocení, zůstat zachyceny uvnitř materiálu, což způsobuje zkreslení výsledků. Ačkoliv se tedy papír na základě výsledků kultivace jeví jako sterilní, lze předpokládat, že v pórech mohou být ještě stále přítomny vitální buňky. Pokud se pro opracování nezvolí dostatečně dlouhé expoziční časy a hustoty výkonu, lze předpokládat, že v pórech zůstanou životaschopné mikrobiální buňky. V případě PET folie s hladkým povrchem tento problém nenastával.

SEM analýza povrchu obou materiálů vystavených účinkům DBD v prostředí všech použitých plynů prokázala v případě PET folie výskyt důlkové koroze již při několika minutovém působení plazmatu, zatímco v případě papíru nebyly zaznamenány žádné změny. Avšak teprve podrobná analýza vlastností obou materiálů by mohla potvrdit, či vyloučit případné chemické, fyzikální a mechanické změny vlastností.

Z výsledků práce je patrné, že sterilizace pomocí DBD generovaného v prostředí argonu, dusíku, suchého a vlhkého vzduchu je účinnou sterilizační metodou, kterou lze využít jak pro sterilizaci vegetativních buněk, tak také jim odpovídajících vůči teplotě a UV záření odolných spor. Nicméně z výsledků je také patrné, že výsledky mohou být výrazně ovlivněny materiálem předmětu, určeného ke sterilizaci. Z toho důvodu je nutno podmínky procesu optimalizovat vždy s ohledem na konkrétní aplikaci. Do budoucna bude nutno také podrobně prostudovat vliv použitého dielektrického bariérového výboje na jednotlivé sterilizované materiály.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AC – střídavého napětí

APPJ – plazmová tryska pracující za atmosférického tlaku

APG/APGD/OAUGDP – atmosférický doutnavý výboj

ATR-FTIR – Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací, technika zeslabené úplné reflektance

CD – stejnosměrné napětí

CDBD – kaskádový dielektrický bariérový výboj

CFU – počet životaschopných buněk

CPE – výboj s kapilárními elektrodami

D – decimální hodnota (čas potřebný k inaktivaci 90 % původní koncentraci mikroorganismů)

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EREM – enviromentální rastrovací elektronová mikroskopie

FE-DBD – dielektrický bariérový výboj s plovoucím potenciálem

G+ – grampozitivní bakterie

G- – gramnegativní bakterie

in vitro – „ve skle“, práce s organizmy a jejich částmi v umělých podmínkách laboratoře

in vivo – kultivace ve tkáni, nebo v pletivech či hostitelském organismu

IR – infračervené záření

LDPE – nízko hustotní polyethylen

LLDPE – lineární nízko-hustotní polyetylen

LIVE/DEAD fluorescenční metoda – test viability mikroorganismů, využívá kombinace dvou fluorescenčních barviv SYTO 9 a propidium jodidu (PI)

MDA – malondialdehyd

MSSA – methicillin citlivý *Staphylococcus aureus*

MW – mikrovlnný

PBS – stabilizačním roztoku fosfátového pufru

PE – polyethylen

PET - Polyethylentereftalát

PP – polypropylen

PTFE – polytetrafluorethylen

RBD – odporový bariérový výboj

RF – radiofrekvenční

SEM – rastrovací elektronová mikroskopie

SMD – elektroda povrchového mikrovýboje (surface microdischarge electrode)

TBARS – reaktivních sloučenin kyseliny thiobarbiturové

TEM – transmisní elektronová mikroskopie

UV – ultrafialové záření

UVA – ultrafialové záření v oblasti vlnových délek 315-400 nm

UVB – ultrafialové záření v oblasti vlnových délek 280-315 nm

UVC – ultrafialové záření v oblasti vlnových délek 200-280 nm

VIS – viditelná oblast světla

VUV – vakuové ultrafialové záření v oblasti vlnových délek pod 200 nm

VOC – Volatile Organic Compounds, těkavé organické látky

XRD analýza – Rentgenová difrakční analýza

XTT fluorescenční analýza – test viability mikroorganismů pomocí tetrazoliové soli

7 CITOVANÁ LITERATURA

1. **Votava, M.** *Lékařská mikrobiologie obecná*. 1.vyd. Brno : Neptun, 2001. str. 247. ISBN 80-902896-2-2.
2. **Šilhánková, L.** *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2.vyd. Praha : Victoria Publishing, a.s., 1995. str. 361. ISBN 80-85605-71-6.
3. **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*. 233, 2004, stránky 81-86.
4. **Song, H.P., Kim, B., Choe, J.H., Jung, S., Moon, S.Y., Choe, W., Jo, Ch.** Evaluation of atmospheric pressure plasma to improve the safety of sliced cheese and ham inoculated by 3-strain cocktail *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*. 26, 2009, stránky 432-436.
5. **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*. 226, 2001, stránky 1-21.
6. **Stoffels E., Sakiyama Y., Graves D. B.** Cold Atmospheric Plasma: Charged Species and Their Interactions With Cells and Tissues. *IEEE Transactions on Plasma Science*. 36, 2008, Sv. 4, stránky 1441-1457.
7. **Laroussi, M.** Nonthermal Decontamination of Biological Media by Atmospheric-Pressure Plasmas: Review, Analysis, and Prospects. *IEEE Transactions on Plasma Science*. 30, 2002, Sv. 4, stránky 1409-1415.
8. **Laroussi, M.** Low-Temperature Plasmas for Medicine? *IEEE Transactions on Plasma Science*. 37, 2009, Sv. 6, stránky 714-725.
9. **Ermolaeva, S. A., Varfolomeev, A. F., Chernukha, M.Y. , Yurov, D. S., Vasiliev, M. M., Kaminskaya, A.A., Moisenovich, M. M., Romanova, J. M., Murashev, A. N., Selezneva, I. I., Shimizu, T., Sysolyatina, E. V., Shaginyan, I. A., Petrov, O. F., Mayevsky, E.** Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds. *Journal of Medical Microbiology*, 2011 vol. 60, no. 1, 75-83, DOI 10.1099/jmm.0.020263-0. 60, 2011, Sv. 1, stránky 75-83.
10. **Laroussi, M.** Low Temperature Plasma-Based Sterilization: Overview and State of the Art. *Plasma Process and Polymers*. 2, 2005, stránky 391-400.
11. **Muranyi, P., Wunderlich, J., Heise, M.** Sterilization efficiency of a cascade barrier discharge. *Journal of Applied Microbiology*. 103, 2007, stránky 1535-1544.
12. CliffsNotes.com. Introduction to Prokaryotes, Eukaryotes. [Online] [Citace: 25. říjen 2012.] http://www.cliffsnotes.com/study_guide/topicArticleId-8524,articleId-8415.html.
13. **Akitsu, T., Ohkawa, H., Tsuji, M., Kimura, H., Kogoma, M.** Plasma sterilization using glow discharge at atmospheric pressure. *Surface & Coatings Technology*. 193, 2005, stránky 29-34.
14. **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*. 20, 1998, stránky 69-74.

15. **Kayes, M. K., Critzer, F. J., Kelly-Wintenberg, K., Roth, J. R., Montie, T. C., Golden, D. A.** Inactivation of Foodborne Pathogens Using a One Atmosphere Uniform Glow Discharge Plasma. *Foodborne Pathogens and Disease*. 4, 2006, Sv. 1, stránky 50-59.

16. **Chiang M.H., Wu J.Y., Li Y.H., Wu J.S., Chen S.H., Chang C.L.** Inactivation of E.coli and B. subtilis by a parallel-plate dielectric barrier discharge jet. *Surface & Coatings Technology*. 204, 2010, stránky 3729-3737.

17. **Bartošová L., Hanulíková A.** Mikrobiální původci alimentárních onemocnění. *Státní zemědělská a potravinářská inspekce*. [Online] 27. srpen 2012. [Citace: 4. listopad 2012.] <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?prn=1&baf=0&nid=&doctype=ART&docid=1000167&chnum=1&inqResults=11319&hl=>.

18. **Cwíková, Olga.** Problematika vzniku mikrobiálních filmů. *ChemPoint*. [Online] 14. červen 2012. <http://www.chempoint.cz/problematika-vzniku-mikrobiálních-biofilmů>.

19. **Fridman, G., Friedman, G., Gutsol, A., Shekhter A. B., Vasilets, V. N., Fridman, A.** Applied Plasma Medicine. *Plasma Processes and Polymers*. 5, 2008, stránky 503-533.

20. **Gadri, R. B., Roth, R., Montie, T. C., Kelly-Wintenberg, K., Tsaie, P. P.-Y., Helfritch, J., Feldman, P., Sherman, D. M., Karakaya, F., Chen, Z.** Sterilization and plasma processing of room temperature surfaces with a one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP). *Surface and Coatings Technology*. 131, 2000, stránky 528-542.

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*. 9, 2004, Sv. 1, stránky 23-33.

22. **Ohkawa, H., Akitsu, T., Tsuji, M., Kimura, H., Kogoma, M., Fukushima, K.** Pulsed-modulated, high-frequency plasma sterilization at atmospheric-pressure. *Surface & Coatings Technology*. 200, 2006, stránky 5829-5835.

23. **Ehlbeck, J., Brandenburg, R., Woedtke, T., Krohman, U., Weltman K. D.** PLASMOSE-antimicrobial effects of modular atmospheric plasma sources. *GMS Krankenhausehygiene Interdisziplinär*. 3, 2008, Sv. 1, stránky 1-12.

24. **Daeschlein, G., Woedtke, T., Kindel, E., Brandenburg, R., Weltmann, K. D., Jünger M.** Antibacterial Activity of an Atmospheric Pressure Plasma Jet Against Relevant Wound Pathogens in vitro on a Simulated Wound Environment. *Plasma Processes and Polymers*. 7, 2010, stránky 224–230.

25. **Poiata, A., Motrescu, I., Nastuta, A., Creanga, D.E., Popa, G.** Microorganism response to atmospheric pressure helium plasma DBD treatment. *Journal of Electrostatics*. 68, 2010, stránky 128-131.

26. **Morgan, N. N., Elsabbagh, M. A., Desoky, S., Garamoon, A. A.** Morgan N.N., Elsabbagh M.A., Desoky S., Garamoon A.A. (2008) - Deactivation of yeast by dielectric barrier discharge. *The European Physical Journal Applied Physics*. 46, 2008, Sv. 31001, stránky 1-7.

27. **Zimmermann, J. L., Shimizu, T., Boxhammer, V., Morfill, G. E.** Disinfection Through Different Textiles Using Low-Temperature Atmospheric Pressure Plasma. *Plasma Processes and Polymers*. 9, 2012, stránky 792–798.
28. **Leipold, F., Schultz-Jensen, N., Kusano, Y., Bindslev, H., Jacobsen, T.** Decontamination of objects in a sealed container by means of atmospheric pressure plasmas. *Food Control*. 22, 2011, stránky 1296-1301.
29. **Ekem, N., Akan, T., Akgun, Y., Kiremitci, A., Pat, S., Musa, G.** Sterilization of *Staphylococcus aureus* by atmospheric pressure pulsed plasma. *Surface & Coatings Technology*. 201, 2006, stránky 993-997.
30. **Joshi S. G., Paff M., Friedman G., Fridman G., Fridman A., Brooks A. D.** Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in planktonic form and biofilms: A biocidal efficacy study of nonthermal dielectric-barrier discharge plasma. *American Journal of Infection Control*. 38, 2010, Sv. 4.
31. **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*. 193, 2005, stránky 35–38.
32. **Hong, Y.F., Kang, J.G., Lee, H.Y., Uhm, H.S., Moon, E., Park, Y.H.** Sterilization effect of atmospheric plasma on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* endospores. *Letters in Applied Microbiology*. 48, 2009, stránky 33-37.
33. **Jung, H., Kim, D. B., Gweon, B., Moon, S. Y., Choe W.** Enhanced inactivation of bacterial spores by atmospheric pressure plasma with catalyst TiO₂. *Applied Catalysis B: Environmental*. 93, 2010, stránky 212-216.
34. **Yun, H., Kim, B., Jung, S., Kruk, Z. A., Kim, D. B., Choe, W., Jo, Ch.** Inactivation of *Listeria monocytogenes* inoculated on disposable plastic tray, aluminum foil, and paper cup by atmospheric pressure plasma. *Food Control*. 21, 2010, stránky 1182–1186.
35. **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*. 47, 2007, Sv. 1-2, stránky 72-79.
36. **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*. 39, 2006, stránky 3494-3507.
37. **Kim, B., Yun, H., Jung, S., Jung, Y., Jung, H., Choe, W., Jo, Ch.** Effect of atmospheric pressure plasma on inactivation of pathogens inoculated onto bacon using two different gas compositions. *Food Microbiology*. 28, 2011, stránky 9-13.
38. **Rød S. R., Hansen F., Leipold F., Knøchel S.** Cold atmospheric pressure plasma treatment of ready-to-eat meat: Inactivation of *Listeria innocua* and changes in product quality. *Food Microbiology*. 30, 2012, stránky 233-238.

39. **Klockow, P.A., Keener, K.M.** Safety and quality assessment of packaged spinach treated with a novel ozone-generation system. *LWT - Food Science and Technology*. 42, 2009, stránky 1047–1053.
40. **Moon, S. Y., Kim, D. B., Gweon, B., Choe, W., Song, H. P., Jo, Ch.** Feasibility study of the sterilization of pork and human skin surfaces by atmospheric pressure plasmas. *Thin Solid Films*. 517, 2009, stránky 4272–4275.
41. **Fröhling, A., Durek, J., Schnabel, U., Ehlbeck, J., Bolling, J., Schlüter, O.** Indirect plasma treatment of fresh pork: Decontamination efficiency and effects on quality attributes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2012.
42. **Leipold, F., Kusano, Y., Hansen, F., Jacobsen, T.** Decontamination of a rotating cutting tool during operation by means of atmospheric pressure plasmas. *Food Control*. 21, 2010, stránky 1194–1198.
43. **Cooper M., Fridman G., Staack D., Gutsol A.F., Vasilets V.N., Anandan S., Cho Y.I., Fridman A., Tsapin A.** Dekontaminace povrchů od extremofilních mikroorganismů pomocí netermálního atmosférického plazmatu. *IEEE Transactions on Plasma Science*. 37, 2009, Sv. 6, stránky 866-871.
44. **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*. 47, 2005, stránky 513-523.
45. **Vleugels M., Shama, G., Deng, X. T., Greenacre, E., Brocklehurst, T., Kong, M. G.** Atmospheric Plasma Inactivation of Biofilm-Forming Bacteria for Food Safety Control. *IEEE TRANSACTIONS ON PLASMA SCIENCE*. 33, 2005, Sv. 2, stránky 824-828.
46. **Gioia J, Yerrapragada S, Qin X, Jiang H, Igboeli OC, et al.** Paradoxical DNA Repair and Peroxide Resistance Gene Conservation in *Bacillus pumilus* SAFR-032. *PLoS ONE*. 2, 2007, Sv. 9, str. e928.
47. **Laroussi, M., Mendis, D.A., Rosenberg, M.** Plasma interaction with microbes. *New Journal of Physics*. 5, 2003, stránky 41.1-41.10.
48. **Schwabedissen A., Łacinski P., Chen X., Engemann J.** PlasmaLabel – a New Method to Disinfect Goods Inside a Closed Package Using Dielectric Barrier Discharges. *Contribution to Plasma Physics*. 47, 2007, Sv. 7, stránky 551-558.
49. **Scholtz, V., Julák, J., Kříha, V.** The microbicidal Effect of Low-Temperature Plasma Generated by Corona Discharge: Comparison of Various Microorganisms on an Agar Surface or in Aqueous Suspension. *Plasma Processes and Polymers*. 7, 2010, stránky 237-243.
50. **Šupinová, Petra.** Využití mikroorganismů při zpracování odpadních materiálů na žádané metabolity. *ChemPoint*. [Online] 7. duben 2011. <http://www.chempoint.cz/vyuziti-mikroorganismu-pri-zpracovani-odpadnich-materialu-na-zadane-metabolity>.
51. **Machala Z., Jedlovský, I., Chládková, L., Pongráč, L., Giertl, D., Janda, M., Šikurová, L., Polčic, P.** DC discharge in atmospheric air for bio-decontamination - spectroscopic methods for mechanism identification. *The European Physical Journal D*. 2009, str. 10.

52. **Lewis, R.** Implant Bacteria, Beware: Researchers Create Nano-sized Assassins. *Brown University*. [Online] 25. červen 2009. [Citace: 1. listopad 2012.] <http://news.brown.edu/pressreleases/2009/06/biotechnology>.
53. LISTERIÓZA - CO VŠECHNO BYCHOM O NÍ MĚLI VĚDĚT. *Krajská Hygienická stanice Královehradeckého kraje*. [Online] 2007. [Citace: 1. listopad 2012.] www.khskk.cz/khsdata/epi/clanky/listerioza.pdf.
54. **Vít, M., Olejník, R. a kol.** Předběžná zpráva o výskytu listeriózy v České republice. *Zprávy CEM*. 16, 2007, Sv. 1, stránky 26-28.
55. Vliv vnějších faktorů na mikroorganismy v potravinách. *Primat*. [Online] 28. srpen 2011. [Citace: 1. listopad 2012.] <http://www.primat.cz/cuni-lfhk/predmety/potravinarska-mikrobiologie-q12871/vliv-vnejsich-faktoru-na-mikroorganismy-v-potravinach-m90329/nelzestahnout/>.
56. **Ehlebeck, J., Schnabel, U., Polak, M., Winter, J., von Woedtke T., Brandenburg, R.** Low temperature atmospheric pressure plasmas sources for microbial decontamination. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 44, 2011, str. 013002 (18pp).
57. **Aubrecht, V. a Gross, B.** *Fyzika a diagnostika plazmatu*. 2007. str. 57.
58. **Rossi, F., Kylian, O., Hasiwa, M.** Decontamination of Surfaces by Low Pressure Plasma Discharges. *Plasma Processes and Polymers*. 3, 2006, stránky 431–442.
59. **Moreau, M., Orange, N., Feuilleley, M.G.J.** Non-thermal plasma technologies: New tools for bio-decontamination. *Biotechnology Advances*. 26, 2008, stránky 610-617.
60. **Fridman, A., Chirokov, A., Gutsol A.** Non-thermal atmospheric pressure discharges. *JOURNAL OF PHYSICS D: APPLIED PHYSICS*. 38, 2005, stránky R1–R24.
61. **Ioanid, E.G., a další.** Comparative study on decontamination treatment of paper-based materials in corona discharge and HF cold plasma. *The European Physical Journal Applied Physics*. 58, 2012, Sv. 1, str. 10803 (8 pages).
62. **Kogelschatz, U.** Dielectric-barrier Discharges: Their History, Discharge Physics, and Industrial Applications. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*. 13, 2003, Sv. 1, stránky 1-46.
63. **Laroussi M., Richardson J.P., Dobbs F.C.** Effects of nonequilibrium atmospheric pressure plasmas on the heterotrophic pathways of bacteria and on their cell morphology. *Applied Physics Letters*. 81, 2002, Sv. 4, stránky 772-774.
64. **Massines, F., Gherardi, N., Naudé, N., Ségur, P.** Glow and Townsend dielectric barrier discharge in various atmosphere. *Plasma Physics and Controlled Fusion*. 47, 2005, stránky B577–B588.
65. **Deng, S., Cheng, Ch., Ni, G., Meng, Y., Chen, H.** Bacillus subtilis devitalization mechanism of atmosphere pressure plasma jet. *Current Applied Physics*. 10, 2010, stránky 1164–1168.
66. **Park, B.J., Takatori, K., Lee, M. H., Han, D. W., Woo, Y. I., Son, H. J., Kim, J. K., Chung, K. H., Hyun, S. O., Park, J. Ch.** Escherichia coli sterilization and lipopolysaccharide inactivation using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure. *Surface & Coatings Technology*. 201, 2007, stránky 5738-5741.

67. **Branská, B., Linhová, M., Patáková, P., Paulová, L., Melzoch, K.** Stanovení viability mikroorganismů pomocí fluorescenční analýzy. *Chemické listy*. 105, 2011, stránky 586-593 .
68. **Shimizu, T., Steffes, B., Pompl, R., Jamitzky, F., Bunk, W., Ramrath, K. a kol.** Characterization of Microwave Plasma Torch for Decontamination. *Plasma Processes and Polymers*. 5, 2008, stránky 557-582.
69. **Moisan, M., Barbeau, J., Crevier, M.C., Pelletier, J., Philip, N., Saoudi, B.** Plasma sterilization. Methods and mechanisms. *Pure and Applied Chemistry*. 74, 2002, stránky 349-358.
70. **Laroussi, M., Alexeff, I., Kang, W.L.** Biological Decontamination by Nonthermal Plasmas. *IEEE TRANSACTIONS ON PLASMA SCIENCE*. 28, 2000, Sv. 1, stránky 184-188.
71. **Deng, S., Ruan, R., Kyoonmok, Ch., Huang, G., Lin, X., Chen, P.** Inactivation of Escherichia coli on Almonds using Nonthermal Plasma. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE*. 72, 2007, Sv. 2, stránky M62-M66.
72. **Sladek, R.E.J., Stoffels, E.** Deactivation of Escherichia coli by the plasma needle. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 38, 2005, stránky 1716-1721.
73. **Mendis, D.A., Rosenberg, M., Azam, F.** A note on the possible electrostatic disruption of bacteria. *IEEE transactions on plasma science, 2000, vol. 28, 1304-1306. ISSN 0093-3813*. 28, 2000, stránky 1304-1306.
74. **Wan, J., Coventry, J., Swiergon, P., Sanguansri, P., Versteeg, C.** Advances in innovative processing technologies for microbial inactivation and inhancement of food safety. *Trends in Food Science & Technology*. 20, 2009, stránky 414-424.
75. **Perni, S, Liu, D.W., Shama, G a Kong, M.G.** Cold atmospheric plasma decontamination of the pericarps of fruit. *Journal of Food Protection*. 71, 2008, Sv. 2, stránky 302-308.
76. **Noriega, E., Shama, G., Laca, A., Díaz, M., Kong, M.G.** Cold atmospheric gas plasma disinfection of chicken meat and chicken skin. *Food Microbiology*. 28, 2011, stránky 1293-1300.
77. **Niemira, B.A.** Cold Plasma Reduction of Salmonella and Escherichia coli O157:H7 on Almonds Using Ambient Pressure Gases. *Journal of Food Science*. 77, 2012, Sv. 3, stránky M171-M175.
78. *Inactivation of micro organisms by means of low temperature atmospheric.* **Leipold, F.** Praha : 28th International Conference on Phenomena in Ionized Gases, 2007. ISBN 978-80-87026-01-4.
79. **Ragni, L., Berardinelli, A., Vannini, L., Montanari, Ch., Sirri, F.** Non-thermal atmospheric gas plasma device for surface decontamination of shell eggs. *Journal of Food Engineering*. 100, 2012, stránky 125–132.
80. **Vohrer, U., Trick, I., Bernhardt, J., Oehr, C., Brunner, H.** Plasma treatment - an increasing technology for paper restoration? *Surface and Coatings Technology*. 142-144, 2001, stránky 1069-1073.
81. **Laguardia, L., Vassallo, E., Cappitelli, F., Mesto, E., Cremona, A., Sorlini C., Bonizzoni, G.** Investigation of the effects of plasma treatments on biodeteriorated ancient paper. *Applied Surface Science*. 252, 2005, stránky 1159-1166.

82. Měření vlhkosti vzduchu. [Online] [Citace: 15. listopad 2012.] <http://www.micro.feld.cvut.cz/home/X34SES/cviceni/Navody%20na%20cviceni/07.Mereni%20vlhkosti.pdf>.
83. **Navrátil, Z., Trunec, D., Smíd, R., Lazar, L.** A software for optical emission spectroscopy. *Czechoslovak Journal of Physics*. 56, 2006, str. B944.
84. **Betina, V. a kol.** *Mikrobiologické laboratorné metody*. Bratislava : Alfa, 1987.
85. **Kubátová, A.** *Aspergillus niger*. *Miniatlas mikroorganismů*. [Online] [Citace: 12. prosinec 2012.] <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/asp-ni.htm>.
86. Bacteria on Cutting Boards. *National Food Safety Database*. [Online] University of Florida. [Citace: 12. prosinec 2012.] <http://fyys.ifas.ufl.edu/foodsafety/HTML/il114.htm>.
87. **Němec, M., Kotoučková, L., Páčová, Z.** *Bacillus subtilis*. *Miniatlas mikroorganismů*. [Online] [Citace: 12. prosinec 2012.] <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/bac-sub.htm>.
88. **Pelczar, M. J. a kol.** *Microbiolog: An Application Based Approach*. New Delhi : Tata McGraw Hill. ISBN-10: 0070151474.
89. **Fujikawa, H., Itoh, T.** Tailing of Thermal Inactivation Curve of *Aspergillus niger* Spores. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 1996, Sv. 10, stránky 3745–3749.
90. **Janštová, B., Lukášová, J.** Heat Resistance of *Bacillus* spp. Spores isolated from Cow's Milk and Farm Environment. *ACTA VET. BRNO*. 70, 2001, stránky 179–184.
91. **Montie, T.C., Kelly-Wintenberg, K., Roth, J.R.** An Overview of Research Using the One Atmosphere Uniform Glow Discharge Plasma (OAUGDP) for Sterilization of Surfaces and Materials. *IEEE TRANSACTIONS ON PLASMA SCIENCE*. 28, 2000, Sv. 1.
92. Qualitative Filter Papers - Standard Grades. *Whatman*. [Online] General Electric Company, 2011. [Citace: 12. prosinec 2012.] <http://www.whatman.com/QualitativeFilterPapersStandardGrades.aspx>.
93. **Nicholson, W.L., Schuerger, A.C.** The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: considerations for Earth-to-Mars transport by natural processes and human spaceflight. *Mutation Research*. 571, 2005, stránky 249–264.
94. Investigation on how to optimize the disinfection of packaging material surfaces by ultraviolet irradiation. [Online] prosinec 1999. [Citace: 20. prosinec 2012.] ftp://ftp.softronics.ch/Entkeimung%20--%20Disinfection/Allgemeine%20Informationen%20-%20General%20Information/Fraunhofer%20Report%201999%20Part%20C_komplett%20E.pdf.
95. **Hospes, M.** 458375: Photo-inactivation of bacteria with UV and blue light. *Digital Academic Repository*. [Online] 2012. [Citace: 20. prosinec 2012.] <http://dare.uva.nl/document/458375>.
96. **Muranyi, P., Wunderlich, J., Heise, M.** Influence of relative gas humidity on the inactivation efficiency of a low temperature gas plasma. *Journal of Applied Microbiology*. 104, 2008, stránky 1659–1666.

97. **Němec, M., Kotoučková, L., Páčová, Z.** Escherichia coli. *Miniatlas mikroorganismů*. [Online] Vysoká škola chemicko-technologická. [Citace: 12. prosinec 2012.] <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/esch.htm>.
98. **Kikuchi, Y., Fukumoto, N., Nagata, M.** Dependence of sterilization efficiency on humidity in atmospheric humid air plasmas. *SPP27*. [Online] [Citace: 20. prosinec 2012.] <http://www.mkbe.elec.keio.ac.jp/spp27/abstract/P2-40.pdf>.
99. **Hahnel, M., von Woedtke, T., Weltmann, K.D.** Influence of the Air Humidity on the Reduction of Bacillus Spores in a Defined Environment at Atmospheric Pressure Using a Dielectric Barrier Surface Discharge. *Plasma Processes and Polymers*. 7, 2012, stránky 244-249.
100. **Eto, H., Ono, Y., Ogino, A., Nagatsu, M.** Low-temperature sterilization of wrapped materials using flexible sheet-type dielectric barrier discharge. *Applied Physics Letters*. 93, 2008.
101. **Raballand, V., Benedikt, J., Wunderlich, J., von Keudell, A.** Inactivation of Bacillus atrophaeus and of Aspergillus niger using beams of argon ions, of oxygen molecules and of oxygen atoms. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 41, 2008, str. 115207 (8pp).
102. **Liu, H., Zhang, H., Chen, J.** Surface analysis of long-distance oxygen plasma sterilized PTFE film. *Applied Surface Science*. 255, 2009, stránky 8115–8121.

8 BIBLIOGRAFIE

Časopisecké publikace

Vojkovská, H., Slámová, J., Kozáková, Z., Krčma, F.: Study of Sterilization Effect of Dielectric Barrier Discharge on Eucaryotic Microorganisms. *Publications of the Astronomical Observatory of Belgrade*, 2010, roč. 89, č. 1, s. 331-334. ISSN: 0373- 3742.

Slámová, J., Chalupová, L., Novotný, O., Čech, J., Krčma, F., Sťahel, P.: Removal of Paper Microbial Contamination by Atmospheric Pressure DBD Discharge. *European Physical Journal D*, 2009, roč. 54, č. 1, s. 233-238. ISSN: 1434- 6060.

Vrajová, J., Chalupová, L., Krčma, F., Sťahel, P.: Sterilization by Atmospheric Pressure DBD. *Chemické listy*, 2008, roč. 102, č. 16, s. s1445 (s1449 s.) ISSN: 1213- 7103.

Klučáková M., Krčma F., Vrajová J.: „Plazmochemická úprava huminových kyselin a jejich komplexů., *Chemické listy*, 100 (8), 592 (2006). ISSN 0009-2770.

Knížní publikace

Krčma, F., Sázavská, V., Zemánek, N., Příkryl, R., Řádková, L., Fojtíková, P., Janová, D., Kozák, O., Slámová, J.: RF Pulsed Discharge for the Metallic Corrosion Removal. In *Plasma for Environmental Applications*. xx. Sofia: St. Kliment Ochridsky University, 2010. s. 39-42. ISBN: 978-954-9401-41- 7.

Účast na mezinárodních konferencích a sjezdech

Bittnerová, Z., Vojkovská, H., Slámová, J., Kozáková, Z., Mazánková, V., Krčma, F., Runštuk, J., Neděla, V.: Studium sterilizačního účinku dielektrického bariérového výboje na prokaryotní mikroorganismy. XV. *Setkání biochemiků a molekulárních biologů: Sborník příspěvků*. Brno: Masarykova univerzita, 2011. s. 59-59. ISBN: 978-80-210-5594- 0.

Slámová, J., Vojkovská, H., Bittnerová, Z., Kozáková, Z., Mazánková, V., Krčma, F., Runštuk, J., Neděla, V.: Study of Sterilization Effect of Dielectric Barriere Discharge. In *Proceedings of XIX Symposium on Physics of Switching Arc*. Brno: 2011. s. 319-322. ISBN: 978-80-214-4293- 1.

Slámová, J., Vojkovská, H., Kozáková, Z., Krčma, F.: Study of sterilization effect of dielectric barrier discharge on eucaryotic microorganisms. *Potential and Applications of Surface Nanotreatment of Polymers and Glass. Book of Extended Abstracts*. 1. vyd. Brno : Masarykova univerzita, 2012. 127 s. ISBN 978-80-210-5979-5.

Krčma, F., Sázavská, V., Zemánek, N., Řádková, L., Fojtíková, P., Příkryl, R., Kozák, O., Janová, D., Slámová, J.: Reduction of Corrosion Layers in Low Temperature Plasma. In *Proceedings of XVIIIth Symposium on Physics of Switching Arc*. Brno: FEKT VUT, 2009. s. 60-69. ISBN: 978-80-214-3793- 7.

Slámová, J., Kozáková, Z., Hlochová, L., Krčma, F.: Plasma Based Decontamination of Water by Means of Diaphragm Discharge. In *Proceedings of 17th Symposium on Application of Plasma Processes*. Bratislava: UK Bratislava, 2009. s. 261-262. ISBN: 978-80-89186-45- 7.

Vrajová, J., Šoural, I., Krčma, F., Novotný, O., Sťahel, P.: Removal of Paper Microbial Contamination by Means of Dielectric Barrier Discharge. *IEEE CONFERENCE RECORD - ABSTRACTS*, 2008, roč. 2008, č. ICOPS, s. 294-294. ISSN: 0730- 9244.

Vrajová, J., Novotný, O., Chalupová, L.; Krčma, F.; Sťahel, P.: Utilisation of Atmospheric Pressure Dielectric Barrier Discharge for Paper Sterilization. *In Proceedings of HAKONE XI*. Oleron Island: 2008. s. 545-549.

Vrajová, J., Chalupová, L., Krčma, F., SŤAHEL, P.: Sterilization by Atmospheric Pressure DBD. *In 2nd Central European Symposium on Plasma Chemistry - Book of Extended Abstracts*. Brno: MU Brno, 2008. s. 150-151.

Vrajová, J., Novotný, O., Krčma, F., Sťahel, P.: Removal of Paper Microbial Contamination by Atmospheric Pressure DBD Discharge. *In 23rd Symposium on Plasma Physics and Technology - Book of Abstracts*. Praha: AV ČR, 2008. s. 176-177. ISBN: 978-80-01-04030-0.

Vrajová, J., Krčma, F., Sťahel, P., Čech, J., Novotný, O., Buršíková, V: Plasma Based Removal of Microbial Contamination of Paper. *In Proceedings of ISPC XVIII*. Kjoto: 2007. s. 27P- 121 (s.)ISBN: 978-4-9903773-3- 5.

Vrajová, J., Rašková, Z., Prudíková, I., Krčma, F: Utilization of Atmospheric Pressure Discharges for Paper Sterilization. *In Proceedings of 16th SAPP*. Bratislava: UK Bratislava, 2007. s. 277-278. ISBN: 978-80-89186-13- 6.

Vrajová, J., Krčma, F., Strýhal, Z.: Influence of the Atmospheric Air Plasma on the Surface Energy of Paper. *In Proceedings of 23rd Summer School and International Symposium on the Physics of Ionized Gases*. Beograd: Institute of Physics, 2006. s. 471-474. ISBN: 86-82441-18- 7.

Vrajová, J., Krčma, F.: Plasmachemical Modification of Paper. *In Proceedings of Week of Doctoral Students, Part II*. Praha: Matfyzpress, 2006. s. 162-166. ISBN: 80-86732-85- 1.

Vrajová, J., Krčma, F., Sťahel, P., Čech, J., Novotný, O., Buršíková, V: Plasma Based Removal of Microbial Contamination of Paper. *In ISPC XVIII - book of abstracts*. Kjoto: 2007. s. 689-689. ISBN: 978-4-9903773-2- 8.