



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 STERILIZAČNÍHO ÚČINKU DIAFRAGMOVÉHO VÝBOJE V KAPALINÁCH

STUDY OF STERILIZATION EFFECT OF DIAPHRAGM DISCHARGE IN LIQUIDS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

LENKA HLOCHOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. ZDENKA KOZÁKOVÁ, Ph.D.

BRNO 2009



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0257/2008** Akademický rok: **2008/2009**
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student(ka): **Lenka Hlochová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie (B2801)
Studijní obor: Spotřební chemie (2806R002)
Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.**
Konzultanti bakalářské práce:

Název bakalářské práce:

Studium sterilizačního účinku diafragmového výboje v kapalinách

Zadání bakalářské práce:

- seznámení se s experimentálním zařízením a s principem diafragmového výboje
- studium mikroorganismů a výběr vhodného modelového mikroorganismu
- rozbor standardních sterilizačních postupů a seznámení se s principem plazmové sterilizace
- sterilizace modelového mikroorganismu s využitím diafragmového výboje, studium vlivu délky expozice a plazmového výkonu na efektivitu sterilizace

Termín odevzdání bakalářské práce: 29.5.2009

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

Lenka Hlochová
Student(ka)

Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Hlavním cílem této bakalářské práce je studium sterilizačního účinku diafragmového výboje v kapalinách. Sterilizace je proces, při kterém dochází k eliminaci všech forem života. Obecně se sterilizace dělí na fyzikální a chemické. Plazmová sterilizace je řazena do fyzikálních metod, ačkoliv se v ní uplatňuje i působení chemických procesů. Využívá se při ní vlivů UV záření, volných radikálů a teploty.

Jako modelové mikroorganismy jsou v této práci využívány spóry plísně *Aspergillus niger* F8189 a spóry bakterie *Bacillus subtilis*. *Aspergillus niger* je vhodný mikroorganismus pro jeho odolnost vůči změnám pH, je životaschopný v širokém rozmezí hodnot pH. *Bacillus subtilis* je vybrán kvůli dobré teplotní rezistenci.

Diafragmový výboj je jedním z možných typů elektrických výbojů buzených v kapalinách. Jedná se o nízkoteplotní plazma, které je generováno pomocí vysokého stejnosměrného napětí. V plazmových kanálcích („streamerech“) vznikají různé fyzikální a chemické procesy. Mezi chemické procesy patří hlavně generace aktivních látek a částic, které iniciují chemické reakce a atakují spóry plísní a bakterií obsažených v kapalinách. Do fyzikálních procesů se řadí rázové vlny, silné elektrické pole a ultrafialové záření.

Pokusy byly prováděny v reaktoru s odděleným katodovým a anodovým prostorem. V nevodivé přepážce byla uchycena PET diafragma s otvorem velikosti špendlíkové dírky (počáteční průměr 0,4 mm). Bylo pozorováno zvětšení otvoru v důsledku degradace materiálu na hraně dírky vlivem výboje. Odbourávání spór bylo pozorováno v závislosti na čase a na výkonu. Dalšími měřenými veličinami byly pH, vodivost a teplota. Nebylo prokázáno odlišné působení v katodovém a anodovém prostoru. Hlavním činitelem odstranění spór plísně *Aspergillus niger* byla pravděpodobně teplota, protože u teplotně odolnějšího mikroorganismu *Bacillus subtilis* nebyl pozorován prokazatelný sterilizační účinek působení diafragmového výboje. Byl také proveden pokus, při kterém byl zkoumán pouze vliv teploty na spóry plísně *Aspergillus niger*. Vzorky byly umístěny v termostatu, kde byl simulován stejný teplotní nárůst jako ve výboji. Experiment měl podobný průběh jako pokus ve výboji.

KLÍČOVÁ SLOVA

sterilizace, sterilizace v plazmatu, mikroorganismus, diafragmový výboj

ABSTRACT

The main objective of this thesis is to study the sterilizing effect of diaphragm discharge in liquids. Sterilization is a process, which can eliminate all forms of life. Generally, sterilization is divided into physical and chemical methods. Plasma sterilization is ranked among physical methods although the action of chemical processes participates in the decontamination as well. Effects of UV radiation, free radicals and temperature are utilized in these methods.

Fungi spores of *Aspergillus niger* F8189 and bacteria spores of *Bacillus subtilis* are selected as model organisms. *Aspergillus niger* microorganism is suitable for its resistance to changes in pH and it is viable in a wide range of pH values. *Bacillus subtilis* is chosen because of a good heat resistance.

Diaphragm discharge is one of the possible types of electrical discharges in generated liquids. It is a low-temperature plasma, which is generated using a high DC voltage. In the created plasma streamers various physical and chemical processes rise. The chemical processes are mainly the generation of active species and particles that initiate subsequent chemical reactions and attack mould spores and bacteria in liquids. The physical processes include shock waves, strong electric field and ultraviolet radiation.

Experiments were conducted in a reactor with separate cathode and anode space. In the dielectric barrier PET diaphragm with a pin-hole (initial diameter of 0.4 mm) was attached. Enlargement of the hole was observed as a result of degradation of material at the edge of holes due to the discharge. Degradation of spores was observed, depending on the time and on the input power. Other parameters measured were pH, conductivity and temperature. Experiments did not show any difference of discharge activity in the cathode and anode area. The main factor in the removal of spores *Aspergillus niger* was probably the temperature because no demonstrable effect of sterilization by the diaphragm discharge operation had been observed when heat resistant *Bacillus subtilis* was used. Also, it was made an attempt, which has been studied only the temperature effect of the fungi spores of *Aspergillus niger*. The samples were placed in a thermoregulator, where it was simulated the same temperature increase as at the discharge. The experiment had a similar course as an attempt at the discharge.

KEYWORDS

sterilization, plasma sterilization, microorganism, diaphragm discharge

HLOCHOVÁ, L. *Studium sterilizačního účinku diafragmového výboje v kapalinách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 34 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucí mé bakalářské práce Ing. Zdence Kozákové, Ph.D. za pomoc při měření a zpracování této práce a Doc. RNDr. Františku Krčmovi, Ph.D. za umožnění měření v laboratoři plazmochemie.

OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Pojem sterilizace	8
2.2	Metody sterilizace	8
2.2.1	Chemické sterilizace	8
2.2.2	Fyzikální sterilizace	9
2.3	Sterilizace plazmatem	11
2.3.1	Plazma.....	11
2.3.2	Plazmová sterilizace.....	12
2.3.3	Inaktivační mechanismy plazmové sterilizace.....	13
2.4	Elektrické výboje v kapalinách	15
2.4.1	Diafragmový výboj	16
2.4.2	Procesy generované elektrickými výboji ve vodné fázi.....	17
2.5	Modelové mikroorganismy	19
2.5.1	Aspergillus niger	19
2.5.2	Bacillus subtilis	20
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
3.1	Mikrobiologická příprava.....	21
3.1.1	Živné médium	21
3.1.2	Příprava očkovací suspenze	21
3.2	Reaktor a zdroj napětí	22
3.3	Postup měření.....	23
3.4	Vliv teploty.....	24
4	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	25
4.1	Měřené veličiny.....	25
4.2	Vliv plazmového výkonu a doby expozice	26
4.3	Vliv teploty na průběh sterilizace	27
4.4	Vliv polarity elektrod na odbourávání mikroorganismů.....	29
5	ZÁVĚR	32
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	33

1 ÚVOD

Metody odstraňování nežádoucích mikroorganismů z prostředí jsou předmětem neustálého zkoumání. V současné době existuje řada sterilizačních metod, obecně se dělí na fyzikální a chemické. Většina sterilizačních technik je spojena s určitými škodami na materiálu nebo prostředí, ve kterém se mikroorganismy nachází. Tato situace vedla ke snaze vyvinout nový způsob, jež bude vykazovat lepší podmínky, za kterých sterilizace probíhá [1].

Plazmová sterilizace se jeví jako vhodná metoda. Výhody plazmové sterilizace spočívají hlavně v absenci vysokých aplikačních teplot, toxických a karcinogenních látek a nebezpečného gama záření [2]. Plazmovou sterilizací jako takovou se rozumí vystavení mikroorganismů účinkům elektrického výboje v prostředí plynu. Důležitou podmínkou je, že plyny nebo jejich směsi nemají za normálních podmínek biocidní účinky. Ty jsou aktivovány až působením elektrického výboje a deaktivovány bezprostředně po vypnutí budícího zdroje [3]. Inaktivačními mechanismy odpovědnými za sterilizační účinek jsou: UV záření, reaktivní částice (volné radikály) a teplota.

V této bakalářské práci se využívá plazma buzené v kapalině pomocí diafragmového výboje. Diafragmový výboj je typem elektrického výboje buzeného v kapalně fázi, kdy je mezi dvě ploché elektrody umístěna přepážka z nevodivého materiálu, ve které je vytvořena jedna špendlíková dírka. Tato dírka je jedinou spojnici anodového a katodového prostoru v reaktoru. Ve výbojových kanálcích („streamerech“), které se šíří mezi dvěma elektrodami, probíhá řada fyzikálních a chemických dějů. Ty mají za následek degradaci mikroorganismů, obsažených v kapalině. Jako modelové mikroorganismy, pro kontaminaci vody jsou používány spóry plísně *Aspergillus niger* a bakterie *Bacillus subtilis*. Je zkoumán účinek výboje na tyto mikroorganismy i vliv samotné teploty na *Aspergillus niger*. Sledovány jsou také vlivy vybraných fyzikálních veličin jako je vodivost, pH a teplota při expozici. Výsledky jsou pak porovnány z hlediska závislosti na výkonu, době expozice, teplotě a elektrodovém prostoru.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Pojem sterilizace

Sterilizace je akt nebo proces fyzikální nebo chemické povahy, který odstraňuje všechny formy života, zejména mikroorganismy, včetně vysoce rezistentních spor, mikroskopických hub, vývojových stádií protozoí, eventuálně helmitů [4, 5]. Nedílnou součástí sterilizace jsou předsterilizační příprava předmětů, kontrola sterilizačního procesu a sterilizovaného materiálu. Dále také monitorování a záznam nastavených parametrů ukazovacími a registračními přístroji zabudovanými ve sterilizátoru a kontrola účinnosti sterilizace nebiologickými a biologickými indikátory. Každý sterilizační cyklus se dokumentuje [5].

Jako sterilní lze tedy označit takové předměty a látky, na kterých byly usmrceny všechny mikroorganismy a jejich spóry a u nichž byla sterilita prokázána standardním testem. Přítomnost není podmínkou, aby usmrcené mikroby byly z předmětů odstraněny. Pokud tedy nebyl sterilní materiál správně ošetřen v předsterilizační přípravě, může obsahovat pyrogenní látky [5].

Konvenční sterilizační techniky, jako jsou ty, které používají autoklávy, pece a chemické látky (např. ethylenoxid), spoléhají na nevratné metabolické inaktivace nebo rozdělení životně důležitých prvků mikroorganismu. Plazmové sterilizace fungují odlišně. Využívají se specificky aktivní látky, jako jsou fotony s energií v UV oblasti a radikály [4].

2.2 Metody sterilizace

Základní rozdělení sterilizačních metod spočívá v jejich povaze. Ta může být fyzikální, chemická nebo kombinovaná. Fyzikální metody využívají fyzikální procesy jako teplo, záření, filtraci. Chemické metody využívají chemické látky: ethylenoxid, kyselinu peroctovou, peroxid vodíku atd. [3].

2.2.1 Chemické sterilizace

Tyto metody jsou určeny pro materiály, které není možno sterilizovat fyzikálními metodami. Sterilizace probíhá v přístrojích za stanoveného přetlaku nebo podtlaku při teplotě do 80 °C. Pracuje-li přístroj v podtlaku, zavzdušnění komory na konci sterilizačního cyklu probíhá přes antibakteriální filtr [2, 5].

2.2.1.1 Sterilizace formaldehydem

Čistý formaldehyd je za normálních podmínek bezbarvý plyn s pronikavým zápachem. Teplota varu je -19,2 °C a hustota 1400 kg · m⁻³. Za vyšších teplot (nad 150 °C) se rozkládá na kyselinu mravenčí a oxid uhelnatý. Páry jsou hořlavé a výbušné. Formaldehyd patří mezi těkavé organické látky. Je velmi dobře rozpustný ve vodě, alkoholech a dalších polárních rozpouštědlech. Protože čistý plyn snadno polymerizuje, skladuje se obvykle ve formě vodného roztoku (25 % - 56 % formaldehydu). Nejčastější koncentrace je 37 %. Může se také skladovat v pevné formě jako cyklický trimer trioxan nebo jeho polymer paraformaldehyd. Čistý plyn se z vodného roztoku nebo pevného formaldehydu získá zahřátím [6].

Sterilizace formaldehydem je založena na působení směsi formaldehydu s vodní párou a to při teplotě 60 – 80 °C. Samotná sterilizace probíhá v podtlaku při stanovených parametrech. Vzhledem k tomu, že tato metoda probíhá v podtlaku, zavzdušnění sterilizační komory na konci každého cyklu probíhá přes antibakteriální filtr [2].

2.2.1.2 Sterilizace ethylenoxidem

Ethylenoxid je za normálních podmínek bezbarvý plyn těžší než vzduch. Pod teplotou 10,7 °C se vyskytuje jako bezbarvá kapalina s hustotou 899 kg · m⁻³. Tuhne při -113 °C. Patří mezi velmi reaktivní sloučeniny a je velice dobře rozpustný ve vodě i v organických rozpouštědlech. Při vyšších koncentracích (0,9 g · m⁻³) je cítit zápach, který se podobá etheru. Patří mezi těkavé organické látky [7]. Z hlediska toxikologie je řazen mezi toxické látky s mutagenními a karcinogenními účinky [3].

Sterilizace ethylenoxidem je založena na působení ethylenoxidu v podtlaku nebo přetlaku při teplotě 37 – 55 °C při parametrech stanovených výrobcem [5].

Protože proniká většinou umělých hmot, s výhodou se jím sterilizují předměty balené v umělohmotných fóliích kombinovaných s papírem. Ethylenoxidem sterilizované předměty se však musí ponechávat někdy i mnoho dnů ve zvláštních prostorách řádně odvětrávat. Ethylenoxid účinkuje na všechny formy mikrobů. Pozoruhodná je zejména jeho schopnost ničit spóry. Používá se ke sterilizaci zdravotnických pomůcek z termolabilních umělých hmot, jemných nástrojů, šicího materiálu, textilu, kožešin a jiných porézních materiálů [8].

V praxi se používají dva základní způsoby sterilizace ethylenoxidem: sterilizátory využívající směs ethylenoxidu a inertního plynu, sterilizátory využívající čistý ethylenoxid. Sterilizátory pracující s čistým ethylenoxidem mají nižší provozní náklady a nižší termodynamický efekt na transportu sterilantu [9].

2.2.2 Fyzikální sterilizace

V praxi se z fyzikálních postupů sterilizace uplatňuje především působení tepla, záření, a filtrace.

2.2.2.1 Sterilizace vlhkým teplem (syťou vodní parou)

Tento typ sterilizace se také nazývá autoklávování. Jde o sterilizaci při vysokých teplotách pod tlakem. Teplota vodní páry stoupá téměř lineárně s jejím tlakem. Při tlaku 2 atmosfér (cca 0,2 MPa) má pára teplotu 121 °C, při tlaku 3 atmosfér zhruba 134 °C. Přístroj určený ke sterilizaci parou pod tlakem se nazývá parní sterilizátor neboli autokláv. V malých stolních autoklávech se pára vyvíjí přímo ve sterilizační komoře. Větší přístroje mají vlastní vyvíječ páry nebo jsou připojeny na parní rozvod. Pára v autoklávu proudí nejprve do pláště a poté do sterilizační komory. Sterilizační komora nesmí být ani přeplněna ani téměř prázdná, protože by nedošlo k dokonalému odvodu vzduchu a sterilizace by nebyla dostatečně spolehlivá, neboť při zvoleném tlaku by teplota v komoře nedosáhla předepsané hodnoty [8].

Autoklávovat lze kov, sklo, porcelán, obvazový materiál, bavlněné a lněné prádlo, některé roztoky a poměrně málo druhů plastů.

Použití páry za zvýšeného tlaku je z praktického hlediska nejspolehlivější a poměrně i ekonomický sterilizační postup. Při styku s chladnějšími předměty pára kondenzuje na vodu a přitom předá ohromné množství výparného tepla. To usmrtí přítomné mikroorganismy tepelnou denaturací bílkovin, rozkladem nukleových kyselin a porušením buněčných membrán [8].

Protože v případě páry se jedná o tzv. vlhké teplo, je jeho působení účinnější než v případě tepla suchého. Proto jsou předepsané expoziční doby při autoklávování daleko kratší než při horkovzdušné sterilizaci, i když se užívá nižších teplot (viz tabulka č. 1) [8].

2.2.2.2 Sterilizace horkým vzduchem

Sterilizace horkým vzduchem je všeobecně méně účinnější než sterilizace vlhkým teplem. Při horkovzdušné sterilizaci se obvykle využívá teplot mezi 160 °C až 180 °C. Mechanismem účinku horkého vzduchu je denaturace bílkovin. Prakticky všechny nesporeující mikroby jsou při 180 °C zabity do 5 minut. Viry jsou citlivější, s výjimkou viru hepatitidy B, jenž se v krvi inaktivuje při 160 °C až za 60 minut. Vůči suchému teplu jsou nejodolnější bakteriální spóry, ty nejrezistentnější se zničí při 180 °C až za 15 minut.

Výhodou sterilizace horkým vzduchem je, že přístroje k tomu využívané, tedy horkovzdušné sterilizátory, jsou poměrně levné. Nevýhodou je, že sterilizovat se takto dají jen předměty z odolných materiálů (sklo, porcelán) a termostabilních materiálů, které neobsahují vodu [8].

Tabulka č. 1: Sterilizační podmínky pro sterilizaci vlhkým vzduchem a horkovzdušnou sterilizaci [2].

Sterilizace vlhkým teplem		Sterilizace horkým vzduchem	
Teplota [°C]	Délka expozice [min]	Teplota [°C]	Délka expozice [min]
121	15	160	120
126	10	170	60
134	3	180	30

2.2.2.3 Sterilizace filtrací

Tato metoda sterilizace slouží k odstraňování bakterií z tekutin tam, kde je jiný způsob dekontaminace nevhodný. Viry procházejí většinou bakteriálních filtrů.

Podle konstrukce použitého materiálu dělíme filtry na: azbestové Seitzovy filtry lisované z azbestu a celulózy, skleněné jenské filtry z borosilikátového skla ve formě porézních destiček zatavených v nálevkách a membránové ultrafiltry z nitrocelulózy s různou velikostí pórů [2, 5, 8].

2.2.2.4 Sterilizace radiační

Tyto metody využívají vlastností ionizujícího a UV záření. Je proto nutné zabezpečit personál, který obsluhuje dané sterilizační zařízení, před nepříznivými účinky tohoto záření. Používá se při průmyslové výrobě sterilního jednorázového materiálu [2, 5]

- Ultrafialové záření – tato metoda využívá tzv. germicidní lampy generující elektromagnetické záření s vlnovou délkou okolo 265 nm, které je maximálně absorbováno nukleovými kyselinami. Poškození nukleových kyselin iniciované UV zářením spočívá v dimerizaci thyminových bází, což znemožňuje replikaci genetické informace a následně i množení organismu [2, 3].
Vzhledem k možnosti šíření elektromagnetických vln se UV záření používá ke sterilizaci vzduchu, vody a pracovních ploch [2]. Nevýhodou této metody je malá hloubka pronikání a relativně krátký dosah. Je nutné si uvědomit, že pouze dopad přímých paprsků z germicidního zářiče má biocidní účinek na mikroorganismy. Sebeměší nečistota nebo zastínění předmětu může mikroby ochránit [3].

- Ionizující záření – jeho výhoda spočívá v tom, že penetruje, avšak nezahřívá sterilizovaný předmět a nemění vlastnosti většiny sterilizovaných látek. Zdrojem gama záření v praxi je obvykle radioaktivní kobalt (^{60}Co). Gama záření se používá k průmyslové sterilizaci, čištění odpadních vod a pro sterilizaci zdravotnických produktů [1, 5]. Mezinárodně stanovená sterilizační dávka je 27 kGy (kilogray). Sterilizovat tímto způsobem nelze předměty, které přišly do styku s krví nebo biologickým materiálem s možnou kontaminací virem HIV nebo virem hepatitidy B, protože některé viry mohou dávku 27 kGy přežít.

2.3 Sterilizace plazmatem

2.3.1 Plazma

Plazma je nejrozšířenější formou hmoty ve vesmíru. Bývá také často, avšak ne zcela správně označováno jako její čtvrté skupenství [10].

Za plazma se považuje ionizovaný plyn složený z iontů, elektronů (a případně neutrálních atomů a molekul), který vzniká odtržením elektronů z elektronového obalu atomů plynu, či roztržením molekul (ionizací). V exaktní definici plazmatu jsou na ionizovaný plyn kladeny jisté doplňující požadavky. Aby byl ionizovaný plyn považován za plazma, musí vykazovat kolektivní chování a kvazineutralitu. Tím se rozumí, že plazma je schopné jako celek svými projevy generovat globální elektrická a magnetická pole a na takováto globální pole reagovat. Kvazineutralita vzniká díky přítomnosti volných nabitých částic, kdy se v objemu plazmatu vytváří prostorový náboj a elektrostatické pole, které zpětně silově působí na nabitě částice. Výsledkem je kompenzace fluktuací hustoty náboje a plazma se ve větším měřítku jeví jako elektricky neutrální. Plazma je vodivé a silně reaguje na elektrická a magnetická pole.

Většina plazmatu, se kterým je možno se setkat na Zemi za atmosférického tlaku (polární záře, blesk, oheň), má teplotu několik tisíc stupňů Celsia. Těžko se tedy dá využít pro každodenní aplikace. Koncem devadesátých let minulého století byla však vyvinuta technologie, která dokáže připravit plazma za běžného tlaku a pokojové teploty [5].

2.3.1.1 Nízkoteplotní plazma

Plazma běžně využívané pro sterilizační účely se nazývá nízkoteplotní plazma, s ohledem na teplotu plynů. Je to z toho důvodu, že těžké částice (neutrální částice a ionty) v tomto plazmatu mají výrazně nižší teplotu (obvykle až desetkrát menší) než je teplota elektronů [11]. Nízkoteplotní plazma má podíl ionizovaných částic malý – asi jen jedno procento. Teplota iontů je blízká okolní teplotě, ale rychlost pohybu elektronů odpovídá teplotám několik tisíc stupňů. Jelikož jsou málo hmotné, je vliv jejich teploty na navenek projevovanou teplotu plazmatu jako celku nízký [5]. Při tlacích pod 10 Torr (1,33 kPa) je nízkoteplotní plazma charakterizované střední energií elektronů v rozsahu 1-5 eV (1 eV = 1.6×10^{-19} J nebo 11 600 K). Proto jsou to právě elektrony, které štěpí molekuly, excitují nebo ionizují atomy a molekuly ve výboji. Výhodou nízkoteplotního plazmatu je tedy skutečnost, že není potřeba, aby těžké částice měly tak vysokou energii. Dalšími výhodami jsou i nižší energetické náklady a možnost použití skleněných a kovových výbojových komor bez vysokých nároků na chlazení [11].

2.3.2 Plazmová sterilizace

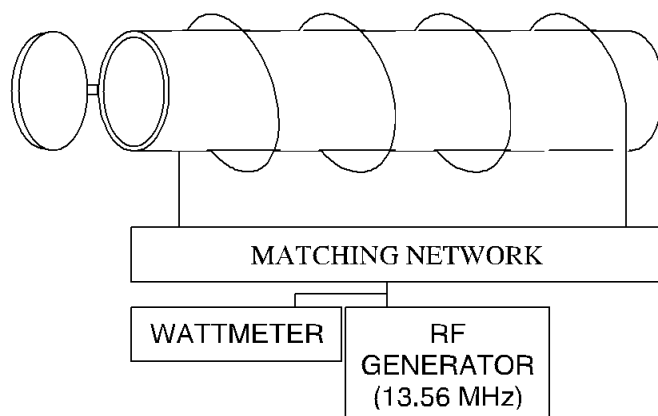
Plazmovou sterilizací jako takovou se rozumí vystavení mikroorganismů účinkům elektrického výboje v prostředí plynu. Důležitou podmínkou je, že plyny nebo jejich směsi nemají za normálních podmínek biocidní účinky. Ty jsou aktivovány až působením elektrického výboje a deaktivovány bezprostředně po vypnutí budícího zdroje [3].

Plazmová sterilizace je v poslední době velice populárním tématem mnoha prací publikovaných různými vědeckými týmy, které se zabývají problematikou využití plazmového výboje v praxi. Tato aplikace začíná mít své pevné postavení i na mezinárodních konferencích, které se zaměřují na využití plazmatu v biomedicínské praxi. Dá se tedy usuzovat, že plazma bude stále vyhledávaným prostředkem pro řešení různých vědeckých problémů. Úspěch plazmové sterilizace je hlavně v absenci vysokých aplikačních teplot, toxických a kancerogenních látek a nebezpečného gama záření. Tato fyzikální a chemická omezení, přítomná u ostatních sterilizačních metod, tak plazmovou sterilizaci staví na výhodnou pozici nové konkurenční metody, která je stále ve vývoji a může tak nabídnout mnohé výhody [2].

2.3.2.1 Stručná historie plazmové sterilizace

První zmínka o plazmatu jako o sterilizačním médiu byla v roce 1968 v patentu Menashiho [11]. Aparatura využívala RF pole k buzení argonového plazmatu za atmosférického tlaku a využívala se ke sterilizaci vnitřních povrchů ampulek. Pro tyto účely bylo RF pole generováno v nádobě pomocí drátu a cívky omotané vně lahve. Cívka sloužila jako referenční elektroda k uzavření RF pole (koronový výboj). Menashi byl schopný sterilizovat ampulky obsahující 10^6 spór v čase kratším než jedna sekunda. Bylo nezbytné, aby plazma bylo v přímém kontaktu s vnitřkem nádoby. Důvodem byl předpoklad, že biocidní účinek je způsoben intenzivním zahřátím spór v tak krátkém čase, že nedošlo k výraznému ohřevu skleněné nádoby (tento mechanismus byl později nazván mikrospalování Peoples a Anderson, 1985) [11].

Další patent Ashama a Menashiho (1972) stejně jako Bouchera a Bithella (1982) ukázaly, že elektrický výboj ve správném plynu může vést ke sterilizacím. Obrázek jedna ukazuje příklad sterilizačního prototypu popisovaného v těchto experimentech.



Obr. č.: 1: Schéma jedné z prvních aparatur pro plazmovou sterilizaci. Matching network – přizpůsobovací člen, RF generator – radiofrekvenční (RF) generátor [11].

Vzorky jsou vsunuty do komory, která je poté vyčerpána na tlak 10-40 mTorr (1-5 Pa) a následně vyplněna plynem nastaveným na požadovaný tlak, většinou 0,05 – 2 Torr (5 - 300 Pa). Výboj je pak iniciován použitím RF pole prostřednictvím cívky (nebo paralelních elektrod) lokalizovaných vně (dielektrické) komory.

Boucher také realizoval sterilizace s využitím mikrovlnného výboje (2450 MHz - frekvence používaná v mikrovlnné troubě).

První systémy citované ve vědecké literatuře byly založeny na stejném principu jako ty zmiňované v patentu. Později byly vyvinuty mnohem sofistikovanější uspořádání. Např. pro sterilizaci vnitřních částí nádob, bylo využito vnějšího mikrovlnného pole (na rozdíl od Menashiho patentu) a výboj byl iniciován pulzy laseru. Čas sterilizace - pár sekund byl popsán pro výkony 200 W (Tensmeyer et al, 1981) [11]. V počátcích plazmové sterilizace byly pro dané experimenty využívány inertní plyny jako argon a helium. Nicméně Ashman a Menashi (1972) začali do pracovního média přidávat halogeny (nejčastěji chlor, brom a jód), aby tak zvýšili účinnost sterilizačního procesu. Toto vedlo k dalším experimentům, a tak Boucher začal používat aldehydy jako pracovní plyn. Dále Boucher objevil skutečnost, že pro inaktivaci bakteriálních spor jsou některé plyny (např. CO₂) mnohem účinnější než jiné (např. argon). Ratner et al. (1990) [11] také poukázali na skutečnost, že plazmová sterilizace je účinná pro většinu plynů používaných v laboratořích jako pracovní médium (O₂, N₂, vzduch, H₂, halogeny, N₂O, H₂O, H₂O₂, CO₂, SO₂, SF₆, aldehydy, organické kyseliny a další) [11].

Plazmová sterilizace byla ve svých počátcích prováděna ve třech různých tlakových oblastech. Byly to oblasti nízkého tlaku (1 – 10 Torr), středního tlaku (0,1 – 10 Torr) a atmosférický tlak. Výše uvedené experimenty se prováděly především v prostředí středního tlaku. Postupem času se však ukázala velká výhoda použití sterilizace za atmosférického tlaku [2].

2.3.3 Inaktivační mechanismy plazmové sterilizace

Na základě rozdílné působnosti mají sterilizační metody vlastní rozdílné inaktivační mechanismy. Sterilizace pomocí plazmatu je řazena mezi fyzikální sterilizační metody. Vzhledem k principům této metody zde však působí jak fyzikální procesy, tak i chemické, které vznikají chemickými změnami prostředí. Vznik chemických činitelů je zcela závislý na fyzikálních vlastnostech plazmatu, nelze jej tedy získat právě bez přítomnosti plazmového výboje. Mezi inaktivační mechanismy plazmové sterilizace tak lze zařadit teplotní vliv, působení UV záření, působení volných radikálů či ozonu [2].

2.3.3.1 Vliv teploty

Teplotní činitel je jedním z mnoha faktorů, které působí na metabolickou aktivitu mikroorganismů a na jejich rozmnožovací schopnost. Pro každý mikroorganismus lze určit tři teplotní body:

- minimální teplota – nejnižší teplota, při které se ještě daný mikroorganismus rozmnožuje ještě zjistitelnou rychlostí
- optimální teplota – v tomto intervalu se druh rozmnožuje nejvyšší rychlostí
- maximální teplota – nejvyšší teplota, při které se mikroorganismus ještě rozmnožuje

Při krátkodobém zvýšení teploty nad maximální teplotu dochází ke vzniku tzv. teplotního šoku. Teplotní šok vede k metabolickým výkyvům, které by mohly mikroorganismus závažně poškodit. Mikroorganismus se proti působení teploty brání syntézou specifických obranných látek. Tyto ochranné látky se snaží poškozeným komponentám metabolických drah navrátit jejich původní funkci. Při delším působení vysokých teplot, již nejsou ochranné látky proti teplotnímu působení dostatečně účinné, metabolické procesy jsou vážně narušeny a dochází ke smrti mikroorganismu. Teplotní působení je tedy užíváno jako účinný sterilizační prostředek [2].

2.3.3.2 Vliv UV záření

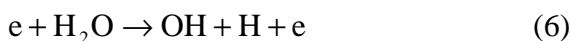
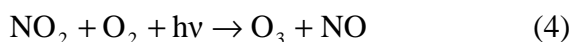
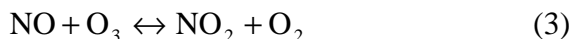
UV záření se vyskytuje v oblasti vlnových délek asi od 100 nm do 400 nm. Germicidní účinek UV záření je založen na fotochemickém poškození nukleových kyselin (DNA, RNA), proteinů, enzymů, případně jiných buněčných částí [3]. Nukleové kyseliny absorbují UV záření při vlnové délce 240 – 280 nm, nejvyšší germicidní efekt je pozorován při 260 – 265 nm. Důsledkem je poškození spočívající ve vzniku thyminových dimerů, které znemožňují replikaci genetické informace a následné rozmnožování mikroorganismů. UV záření v rozsahu 320 – 400 nm iniciuje změny nenasycených mastných kyselin v buněčné membráně, to má za důsledek změnu permeability buněčné membrány [2, 3]. Vliv UV záření na inaktivaci mikroorganismů v atmosférickém výboji však není ještě dostatečně prozkoumán, a proto není jasné stanovisko vědců, zabývajících se touto tematikou. Např. Larrousi [1] srovnal kinetiku UV záření nízkého tlaku páry rtuťové lampy s kinetikou sterilizace nízkoteplotním plazmatem za atmosférického tlaku. Dospěl k závěru, že UV v atmosférickém tlaku plazmatu nehraje významnou inaktivační roli. Toto stanovisko bylo později podpořeno prací Herrmanna et al. a dalších [1]. Naproti tomu Heise et al. tvrdí, že UV hraje významnou roli [12]. Stejně tak dospěl k závěru Boudam et al., že za určitých podmínek může mít UV dominantní vliv a volbou jiných podmínek vliv zcela zanedbatelný [13].

2.3.3.3 Vliv volných radikálů

Volné radikály jsou chemické látky, které vznikají excitací a disociací během plazmové sterilizace. Jsou to atomy, molekuly nebo ionty, mající ve svém elektronovém obalu jeden nebo více nepárových elektronů. Proto se snaží získat další elektron, vytvořit pár a stabilizovat tak svůj stav. Tyto látky reagují s dalšími biomolekulami a vytvářejí tak další volné radikály. Tento děj má pak tendenci šířit se řetězovou reakcí [2].

Volné radikály mohou chemicky napadat lipidy v lipoproteinech a buněčných membránách, nukleové kyseliny, sacharidy, polysacharidy, bílkoviny a enzymy, výsledkem tedy může být ireverzibilní poškození buněčného materiálu. Nejvýznamnějšími volnými radikály z hlediska inaktivačních procesů jsou radikály kyslíku a dusíku, např. $O\cdot$, O_2 , O_3 , $OH\cdot$, NO , NO_2 . Dalšími přeměnami z nich mohou vznikat jiné reaktivní látky, které již nemají nepárový elektron (např. kyselina chlorná, peroxid vodíku) [2, 3, 14]. Larrousi došel k závěru, že v případě nízkoteplotního atmosférického plazmatu hrají volné radikály rozhodující roli při zničení mikroorganismů a teplo spolu s UV zářením jsou vedlejšími mechanismy [14].

Příklad vybraných reakcí volných radikálů v plazmatu [14]:



Volné kyslíkové radikály způsobují peroxidaci lipidových komponent buňky. Lipidová dvojvrstva je složkou buněčné membrány, která ohraničuje buňku, chrání ji, ale zároveň umožňuje dalším látkám a iontům vnikat do buňky nebo vycházet ven z buňky. Membrána je nedílnou součástí buňky a pomáhá udržovat homeostázu. Peroxidace je proces, při kterém jsou poškozovány mastné kyseliny lipidů. Dochází k přeskupování dvojné vazby a tím následnému poškození membrány a homeostázy buňky.

Superoxid (O_2^-) působí na buňku hlavně tím, že inaktivuje enzymy, dypolymerizuje polysacharidy, redukuje cytochrom a reakcí s vodou tvoří hydroxylový radikál OH. Peroxid vodíku například inaktivuje enzymy Calvinova cyklu a ovlivňuje řadu dalších reakcí. Hydroxylový radikál poškozují DNA, degraduje proteiny aj. Dalšími radikály jsou například radikál oxidu dusnatého, který je pro buňku toxický již v mikromolárních koncentracích. Hlavním místem jeho interakce jsou proteiny nesoucí hemově vázané železo, znemožňují tak jeho redukci [15].

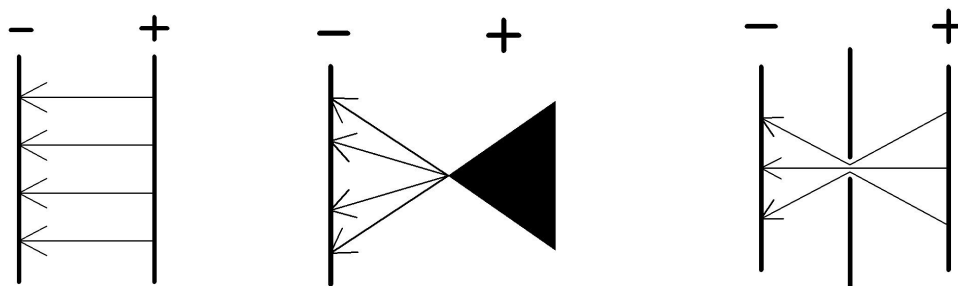
2.4 Elektrické výboje v kapalinách

Elektrický výboj v kapalině představuje komplex jevů zahrnující kombinaci různých fyzikálních a chemických procesů, které závisí na velkém počtu faktorů: vodivosti, polaritě a oxidačním stavu elektrod, vlastnostech kapaliny apod. [16]. Principem tvorby elektrických výbojů je tvoření dostatečně silného elektrického pole ve vodě ($> 1 \text{ MV/cm}$), jehož důsledkem dojde k elektrickému průrazu, tj. vzniku plazmových kanálků („streamerů“). Šířením elektrického výboje dochází vlivem srážek energetických elektronů k disociaci (event. ionizaci) molekul vody a generace chemicky vysoce aktivních hydroxylových radikálů, ozonu a peroxidu vodíku, jež jsou silnými oxidačními látkami. Elektrický výboj doprovází současně fyzikální jevy (ultrafialové záření, vysokotlaké rázové vlny, intenzivní elektrické pole), které mají silné sterilizační účinky [17].

Elektrické výboje v kapalinách mohou být realizovány v různých konfiguracích elektrod a s rozličným charakterem vstupního napětí. Používají se střídavé (AC), stejnosměrné (DC) anebo pulzní zdroje napětí. Při využití pulzního napětí se používají konfigurace hrot-hrot, koaxiální konfigurace (drát-válec, prstenec-válec), multielektrodotový systém apod. [16, 18].

Pro vytvoření elektrického pole tak silného, aby bylo možné zapálení výboje bez použití pulzního napětí, může být docíleno třemi elektrodovými konfiguracemi, jak znázorňuje obrázek č. 2. U konfigurace „rovina-rovina“ je nutné přivádět velmi vysoké napětí pro vytvoření silného elektrického pole, které je nezbytné pro zapálení výboje. Uspořádání dvou planárních elektrod se používá jen zřídka. Další dvě konfigurace „hrot-rovina“ a diafragma

s malým otvorem mají větší praktické využití, protože se elektrické pole hromadí na hraně v systému (hrot, štěrbin) a tak zapálení výboje nepotřebuje příliš vysoké hodnoty napětí [16].

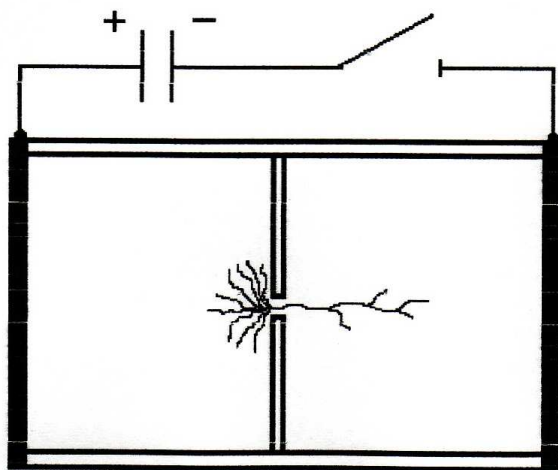


Obr. č.: 2: Typy uspořádání elektrod, zleva: dvě ploché rovinné elektrody, hrot-rovina a dielektrická diafragma s malým otvorem mezi dvěma plochými elektrodami (šipky znázorňují směr intenzity elektrického pole)[3].

Elektrické výboje generované ve vodě se řadí mezi technologie AOP (tzv. Advanced Oxidation Processes), což jsou systémy, které jsou schopné degradovat i značně odolné látky z vod. Používají se vedle klasických metod čištění pitných a odpadních vod. Tyto metody jsou založeny na produkci vysoce reaktivních částic (zejména hydroxylových radikálů, dále vodíkových a kyslíkových radikálů, peroxidu vodíku, ozonu a iontů), které vykazují vysoký oxidačně-redukční potenciál a velkou reaktivitu s organickými sloučeninami, zejména aromatického charakteru [17]. Iniciují chemické reakce, působí na molekuly látek rozpuštěných v kapalině a tyto reakce způsobí následný zánik těchto molekul a vznik nových. V současnosti je zkoumáno mnoho různých metod AOP (procesy využívající peroxid vodíku, ozon, ultrafialové záření) a mezi ně patří i metoda korónového výboje generovaného ve vodě [16, 18].

2.4.1 Diafragmový výboj

Jedna z elektrodových konfigurací používaných pro korónový výboj v kapalně fázi je geometrie „pinhole“ (špendlíkové dírky), tzv. diafragmový výboj. Dříve byl tento typ výboje zkoumán jako tzv. „bezelektrodový“ výboj. Princip generace tohoto výboje je ukázán na obrázku č. 3 [16].



Obr. č.: 3: Princip generace diafragmového výboje [16].

Mezi dvěma planárními elektrodami ponořenými v kapalině je umístěna diafragma s malou dírkou. Na této štěrbině se tvoří velmi silné elektrické pole. Energie elektrického pole je koncentrována na hraně systému, a zde hranu systému tvoří štěrbinu v diafragmě. Kapalina v blízkosti štěrbinu je ohřívána a z objemu se vypařují bubliny. Při přesáhnutí určité hodnoty intenzity elektrického pole je výboj zapálen na rozhraní bublin a dojde k vytvoření výboje [16, 18].

Vysoké napětí se přivádí na jednu elektrodu, zatímco druhá je uzemněna. Reaktor má dvě oddělené části. Tyto dvě části (katodová a anodová) jsou spolu spojeny pouze otvorem v diafragmě. Plazmové kanálky, které se šíří po zapálení výboje („streamery“) mají rozdílné charakteristiky. Mají opačnou polaritu, liší se ve struktuře, tvaru, jak je viditelné na obrázku č. 5, rychlosti šíření i ve velikosti energie elektronů [16, 19].

Pozitivní plazmové kanálky („kladné streamery“) se vytváří v katodovém prostoru reaktoru. Skládají se z několika málo větví a rychlost jejich šíření je asi $10^6 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$. Negativní plazmové kanálky („záporné streamery“) tvoří hustou síť ve tvaru polokoule a šíří s mnohem pomaleji než kladné, asi $10^5 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ [18, 19].

2.4.2 Procesy generované elektrickými výboji ve vodné fázi

V plazmových kanálcích probíhají fyzikální a chemické děje. Jedná se např. o silné elektrické pole, ultrafialové záření, rázové vlny a zejména generaci chemicky aktivních látek a radikálů (H_2O_2 , H_2 , O_2 , $\text{OH}\cdot$, $\text{H}\cdot$, $\text{O}\cdot$ a $\text{HO}_2\cdot$) [16]. Aktivní látky působí na látky obsažené v kapalině a iniciují chemické reakce, které vedou k jejich změně nebo zániku.

2.4.2.1 Fyzikální procesy

V elektrických výbojích je velká část energie spotřebována na tvorbu vysokoteplotních plazmových kanálků, jež emitují světlo z široké oblasti vlnových délek včetně silného vyzařování v UV oblasti [16]. UV záření poškozuje proteiny a enzymy, zabraňuje množení bakterií a využívá se při odstraňování škodlivých mikroorganismů z vod. Proto se také můžeme pomocí elektrického výboje generovaného v kapalině zbavit nežádoucích bakterií.

Ultrafialové záření může také způsobit disociaci molekul vody a tvorbu hydroxylových radikálů [20].

Následným šířením „streamerů“ je v kapalině generována silná rázová vlna. Rázová vlna může také narušit buněčnou strukturu sinic a bakterií ve vodě. Elektrickým výbojem generovaná rázová vlna je např. používána v zařízení litotryptor určenému k likvidaci ledvinových kamenů. Základem je generátor rázové vlny, který vlnu vybudí přesně definovaným výbojem ve vodě v jednom ohnisku mimo tělo pacienta – energie rázové vlny se pak soustředí v druhém ohnisku elipsoidu, které je v těle pacienta nastaveno na povrch ledvinového kamene [20].

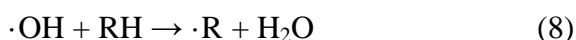
V účinnosti na mikroorganismy hrají patrně také značnou roli silná elektrická pole. Vliv elektrických polí (bez výboje) je studován samostatně. Vychází se z toho, že buněčné membrány mají vysokou permitivitu ϵ , tím se v elektrických polích polarizují a působí na ně elektrická síla. Bylo zjištěno, že při určité intenzitě pole (řádu desítek kV/cm) se v membránách vytvářejí póry („electroporation“), které se časem zacelí. Při ještě vyšších polích dochází k nevratnému roztržení membrán. Tohoto efektu se dá využít ke sterilizaci potravin (mléko, džusy), k energeticky méně náročné výrobě cukru, k účinnějšímu získávání vinného moštu apod. V medicíně se „electroporation“ využívá ke zvýšení propustnosti membrán nádorových buněk pro cytostatika [20].

2.4.2.2 Chemické procesy

Elektrické výboje buzené vysokým napětím vedou převážně k produkci různých reaktivních chemických částic. Patří mezi ně radikály ($\text{OH}\cdot$, $\text{H}\cdot$, $\text{O}\cdot$ a $\text{HO}_2\cdot$), molekuly (H_2O_2 , H_2 , O_2) a ionty (O_2^-), zpravidla navíc v excitovaných stavech. Za nejdůležitější z těchto částic jsou považovány hydroxylové a kyslíkové radikály ($\text{OH}\cdot$, $\text{O}\cdot$), ozón (O_3) a peroxid vodíku (H_2O_2), které se významně podílejí na oxidačních procesech probíhajících v kapalně fázi během výboje [16].

Částice, které řídí většinu procesů používaných při úpravě vody, jsou hydroxylové radikály. Reagují s většinou organických a velkým množstvím anorganických sloučenin. Tyto reakce mohou být rozděleny podle mechanismu do tří typů:

- odtržení atomu vodíku:



- elektrofilní adice na násobnou vazbu:



- přenos elektronu:



Odtržení atomu vodíku (první typ) nastává, když hydroxylové radikály reagují s nasycenými alifatickými uhlovodíky a alkoholy, vzniká voda a organický radikál. V případě nenasyčených uhlovodíků a aromatických sloučenin se hydroxylové radikály adují na násobné

vazby (druhý typ). Přenos elektronu (třetí typ) se uplatní, pokud je odtržení vodíku a elektrofilní adice znemožněna sterickým uspořádáním [16].

2.5 Modelové mikroorganismy

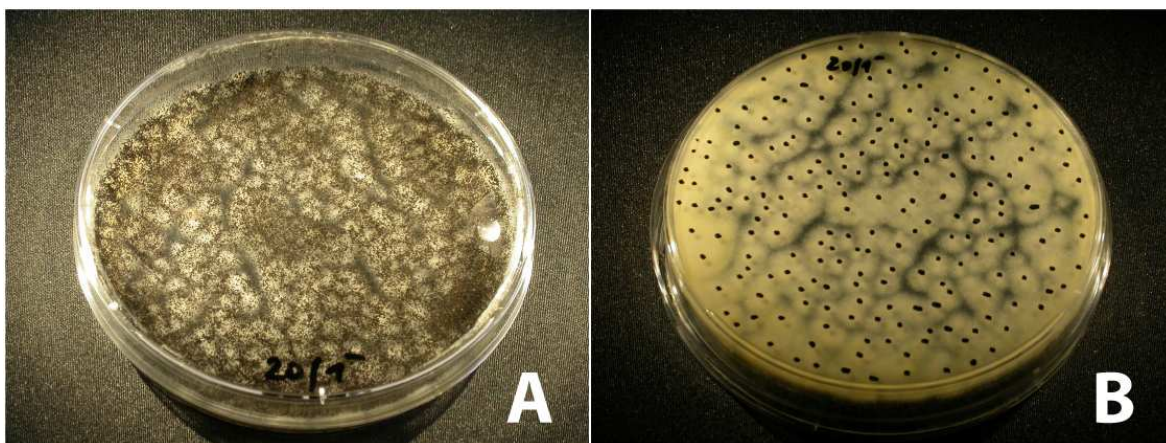
Jako modelové mikroorganismy byly použity spóry plísně *Aspergillus niger* a bakterie *Bacillus subtilis*.

2.5.1 *Aspergillus niger*

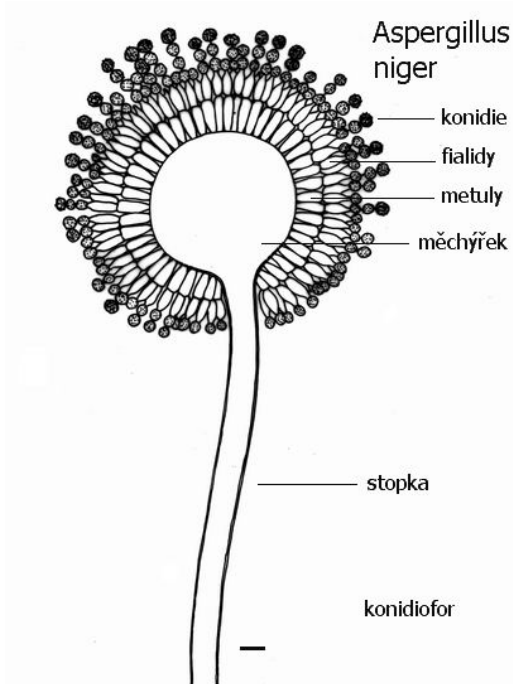
Taxonomické zařazení: *Ascomycota*, *Eurotiales*, mitosporní zástupce *Trichocomaceae*.

Aspergillus niger je vláknitý eukaryotní mikroorganismus, patří mezi nižší houby. Vlákna, ze kterých se skládá se nazývají hyfy. Navzájem propletené a rozrostlé hyfy tvoří mycelium. Rozmnožuje se nepohlavně konidii. Kolonie jsou rychle rostoucí, plně vybarvené do pěti, ale častěji již do tří dnů inkubace. Pigmentace je šedočerná, kolonie jsou hrubě zrnité. Některé kmeny produkují do agarů žlutý pigment, spodní strana kolonií je světlá nebo žlutá, což je viditelné na obrázku č. 4. Optimální teplota pro růst je okolo 35 – 37 °C, minimální 6 – 8 °C a maximální 45 – 47 °C. Je životaschopný v širokém rozmezí hodnot pH, minimální: 1,2, maximální 11 a optimální: 3 – 8 [26].

- Mikromorfologické znaky: viz obrázek č. 5. Konidiofory jsou různě dlouhé, často i 1 – 3 mm, s hladkou nezbarvenou stopkou. Měchýřek je kulovitý, obvykle cca 50 – 75 µm v průměru, pokrytý po celém povrchu vrstvou metul a fialid. Konidiální hlavice jsou paprscité. Konidie jsou kulovité nebo téměř kulovité, bradavčité, asi 3,5 – 5 µm v průměru.
- Výskyt a význam: Vyskytuje se celosvětově velmi hojně, hlavně však v teplejších oblastech, a to především na rozmanitých potravinách, jak rostlinného tak i živočišného původu. Často se vyskytuje i v xerofilních podmínkách. Dlouho byl považován za netoxinogenní, avšak v 90. letech byla u několika kmenů zjištěna produkce mykotoxinu ochratoxinu A. Často bývá izolován z klinického materiálu [21, 22].



Obr. č.: 4: A/ Kolonie plísně *Aspergillus niger*. B/ Spodní strana kolonií vzrostlých na agaru. Je patrné žluté zbarvení. (vzorek po 20 minutách výboje o výkonu 160 W, odběr od katody; doba kultivace 5 dnů)

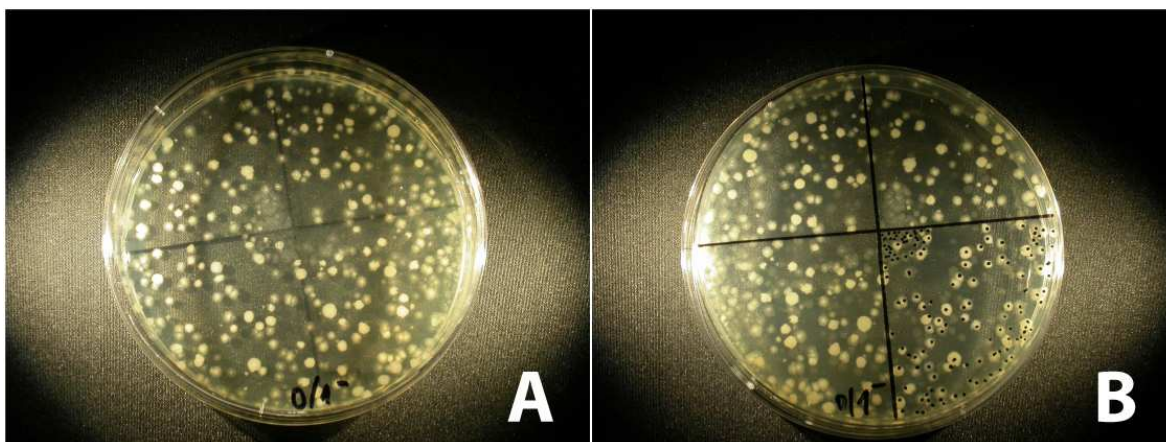


Obr. č.: 5: Nákres plísně *Aspergillus niger* [21].(zvětšeno 30x)

2.5.2 *Bacillus subtilis*

Taxonomické zařazení: *Firmicutes*, *Bacilli*, *Bacillaceae*, rod *Bacillus*

Bacillus subtilis se řadí mezi grampozitivní sporulující aerobní tyčinky. Je to bakterie s průměrem 0,5 – 1,0 μm a její délka často přesahuje 10 μm . Důležitým znakem je schopnost tvořit jednu endosporu, s průměrem obvykle menším, než je šířka bakteriální buňky. Sporulace probíhá pouze za přítomnosti kyslíku, protože sporulací získává buňka energii především oxidací zásobních lipidů z cytoplazmy. Kultivačně je tato bakterie nenáročná, snadno roste na běžných živných půdách. *Bacillus subtilis* se využívá ve farmaceutickém průmyslu jako producent antibiotik polypeptidové povahy. Byl ale také popsán jako původce ulcerací, pooperační celulitidy a zánětu plic [22].



Obr. č.: 6: A/ Kolonie bakterie *Bacillus subtilis*. B/ Spodní strana kolonií vzrostlých na agaru. (vzorek před spuštěním výboje, odběr od katody; doba kultivace 3 dny)

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V této práci se zabývám sterilizačním účinkem diafragmového výboje v plazmatu. Experiment se sestával z mikrobiologické části, kde byly připravovány suspenze spór plísní, které byly následně používány pro kontaminaci vody před spuštěním výboje. Do výbojového reaktoru byla nalita sterilizovaná voda, přidán elektrolyt a spóry plísní. Poté byl spuštěn stejnosměrný výboj přes dielektrickou diafragmu. Průběžně byly odebírány vzorky roztoku pro změření pH, vodivosti, teploty a vzorky na kultivaci mikroorganismů pro vyhodnocení účinku sterilizace. Doba kultivace byla 3-5 dnů a vyhodnocení probíhalo nepřímou kultivační metodou. Dále byl zkoumán účinek vlivu teploty na odbourávání mikroorganismů.

3.1 Mikrobiologická příprava

V první části experimentu byly připravovány roztoky spór plísně *Aspergillus niger* F8189 a bakterie *Bacillus subtilis* v mikrobiologické laboratoři.

Kultury byly získány z České sbírky mikroorganismů, Masarykovy univerzity v Brně, Přírodovědecké fakulty.

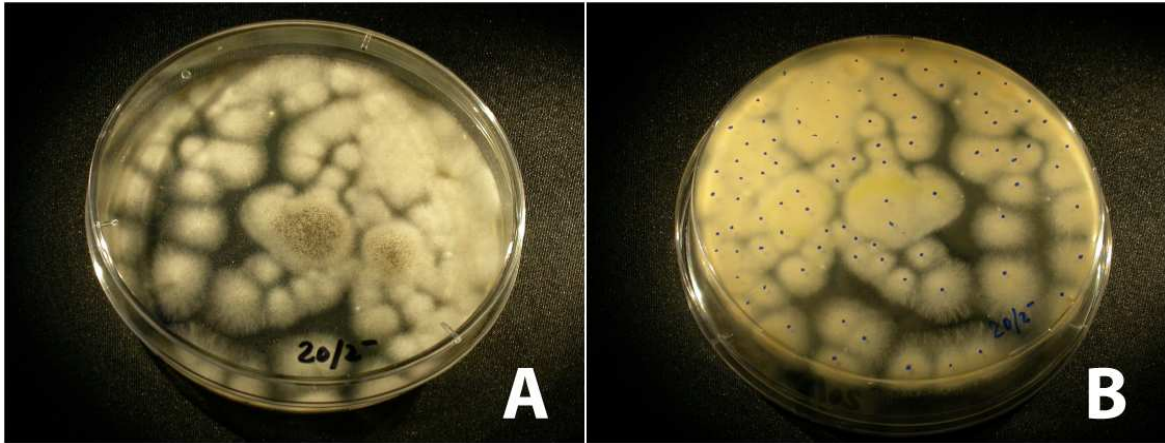
3.1.1 Živné médium

Použitá sladina byla získána z Pivovaru Starobrno a. s. Byla zředěna vodou na 7 hm. % extraktu a pH bylo upraveno na hodnotu 6,2 nasyceným roztokem Na_2CO_3 . Pro experimenty s plísní *Aspergillus niger* byly následně přidány 2 hm. % agaru (*Himedia RM 026*). Takto upravená sladina byla vysterilizována. Pro pokus s bakterií *Bacillus subtilis* bylo použito živné médium MPA 2 (4 g/ 100 ml destilované vody; *Himedia M 1269*).

3.1.2 Příprava očkovací suspenze

3.1.2.1 *Aspergillus niger*

Plíseň byla naočkována sterilní bakteriologickou kličkou na šikmý agar (sladina + agar *Himedia RM 026*), při zapáleném kahanu, v blízkosti plamene, kde se nachází sterilní zóna. Kultivace probíhala 7 dní při teplotě 25 °C. Ve zkumavce bylo vysterilizováno 5 ml destilované vody s přísadkou *Tweenu 80* (0,1 ml na 100 ml média). Povrchově aktivní látka byla přidávána kvůli zvýšení smáčivosti hydrofobních konidií a vzniku homogenní suspenze. Sterilizace byla provedena v tlakovém hrnci po dobu třiceti minut. Destilovaná voda byla nalita do zkumavky se šikmým agarem kultivované plísně. Bakteriologickou kličkou byly opatrně uvolněny spóry plísní. Očkovací suspenze byla nalita do centrifugačních uzavíratelných sterilních mikrozkuvek o objemu 2 ml. Suspenze byla třikrát centrifugována při 4 °C, 10-ti tisících otáčkách po dobu 5 minut a promyta 2 ml sterilní destilované vody. Po třech promytích byla odstředěná kapalina čirá a na dně zkumavek byly usazeny spóry plísně *Aspergillus niger*. Uvedeným postupem byl odstraněn veškerý zbytkový sladivý agar, na kterém by mohlo dojít k pozdějšímu nežádoucímu růstu plísně. Počet spór v 1 ml byl stanoven kultivační metodou (koncentrace suspenze spór byla $\pm 1 \cdot 10^7$ spór·ml⁻¹). Princip této metody spočívá v přenesení mikroorganismů na živnou půdu, kde jsou schopny rozmnožování. Zjišťuje se tedy počet živých buněk počítáním kolonií (tzv. cfu – colony forming units). (viz obr. č. 7)



Obr. č 7.: Ukázka nepřímé kultivační metody, tzn. počítání kolonií. A/ Pohled shora na Petriho misku s již vykultivovanou plísní. B/ Spodní strana Petriho misky s dobře viditelnými koloniemi. (vzorek po 20 min výboje o výkonu 175 W, odběr od katody; doba kultivace 3 dny)

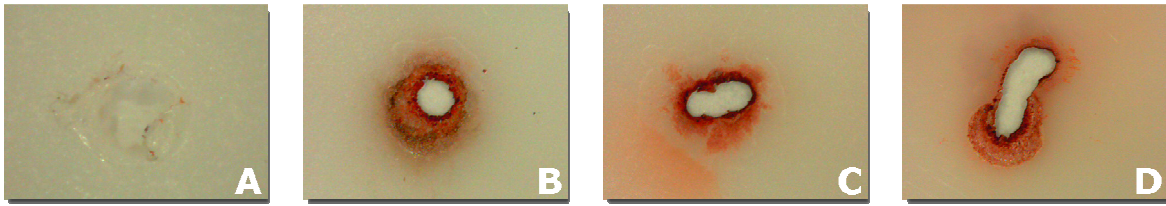
Takto ošetřené vzorky plísně *Aspergillus niger* F8189 byly již používány jako modelové mikroorganismy pro kontaminaci vody, ve které byla prováděna sterilizace.

3.1.2.2 *Bacillus subtilis*

Počáteční kultura byla kultivována 10 dní při teplotě 30 °C. Poté k ní byla do zkumavky přidána vysterilizovaná voda s přídavkem *Tweenu 80* (0,1 ml na 100 ml média). Sterilní bakteriologickou kličkou byly uvolněny spóry bakterie do roztoku. Očkovací suspenze byla nalita do sterilních mikrozkušavek o objemu 2 ml. Byla třikrát odstředěna na centrifuze po dobu 10 minut, při teplotě 20 °C a 10-ti tisících otáčkách a promyta 2 ml destilované vody. Poté byla již odstředěná kapalina čirá a na dně zkumavek zůstaly spóry *Bacillus subtilis*. Počet spór byl stejně jako u plísně stanoven kultivací. Koncentrace mikroorganismu v suspenzi byla $\pm 5 \cdot 10^7$ spór·ml⁻¹.

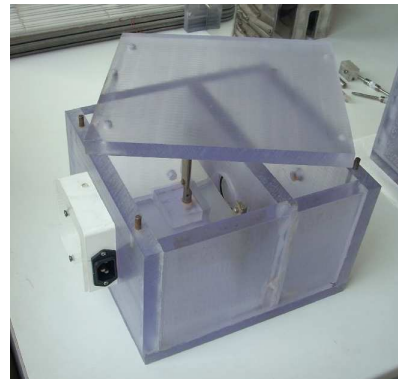
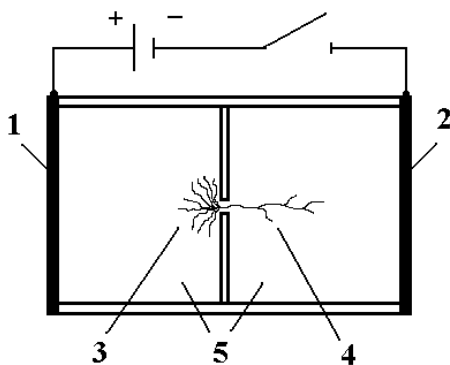
3.2 Reaktor a zdroj napětí

Reaktor byl tvořen soustavou dvou plochých elektrod oddělených přepážkou s otvorem pro dielektrickou diafragmu. Přepážka tedy oddělovala katodový a anodový prostor. Na anodu bylo přiváděno vysoké stejnosměrné napětí a katoda byla uzemněna. Elektrody byly umístěny rovnoběžně s přepážkou, 20 mm od ní. Vyrobeny byly z nerezavějící oceli a jejich rozměry byly 50 x 120 mm. Objem reaktoru byl 3 dm³ (2 dm³ zaujímal katodový prostor a 1 dm³ anodový prostor). Dielektrická diafragma byla vyrobena z polyethylentereftalátu, její tloušťka byla 0,25 mm a v ní byla dírka o průměru 0,4 mm. Vliv DC výboje na diafragmu je znázorněn na obrázku č. 8. Vlivem výboje byl původní otvor zvětšen v důsledku degradace materiálu diafragmy na hraně dírky. Zvětšení otvoru v průběhu experimentu (60 min) závisí na dodávané energii (výkonu reaktoru). Patrné jsou i kvalitativní změny na hranách diafragmy.



Obr. č. 8.: PET diafragma: A) před experimentem, s původním otvorem (0,4 mm), B) po 60 min výboje o výkonu 160 W, C) po 60 min výboje o výkonu 175 W, D) po 60 min výboje o výkonu 245 W

Elektrický zdroj dodává stejnosměrné konstantní napětí do 5 kV a proudy do 300 mA. Pro dosažení větší bezpečnosti práce byl do obvodu zařazen spínač na víku reaktoru, který odstavil přívod napětí, jakmile bylo víko zvednuto. Na obrázku č. 9 je zobrazeno schéma (vlevo) a fotografie reaktoru (vpravo).



Obr. č 9.: Vlevo: Zjednodušené schéma plazmových „streamerů“ buzených v DC diafragmovém výboji; 1 – anoda, 2 – katoda, 3 – negativní plazmatické kanálky, 4 – pozitivní plazmatické kanálky, 5 – vodivý vodný roztok [23]. Vpravo: Fotografie plazmového reaktoru [24].

3.3 Postup měření

Pro jednotlivá měření se používala sterilizovaná voda v množství 3 dm^3 . Voda byla nalita do reaktoru (2 dm^3 do katodového a 1 dm^3 do anodového prostoru), kam byl přidáván také elektrolyt NaCl, v množství 0,2 g do anodového prostoru a 0,3 g do katodového prostoru, aby bylo dosaženo vodivosti přibližně $350 - 400 \mu\text{S}$. Poté byly do reaktoru automatickou pipetou přidány spory plísně *Aspergillus niger*. K anodě 1 ml a ke katodě 2 ml, o koncentraci 10^7 spór/ml. Výsledná koncentrace byla tedy 10^4 spór·ml⁻¹. Před spuštěním pokusu byly odebrány vzorky pro kultivaci plísně do Petriho misek (dva z každého elektrodového prostoru). Injekční stříkačkou byly také odebrány vzorky pro stanovení počáteční teploty, vodivosti a pH. Víko reaktoru bylo zavřeno a tím byl spojen elektrický obvod. Napětí a proud byly nastavovány tak, aby se výkon pohyboval od 160 W do 245 W. Proud se pohyboval od 0,1 A do 0,14 A a napětí nabývalo hodnot od 1585 V do 1750 V. Délka expozice byla

60 minut, vzorky byly odebírány ve dvacetiminutovém intervalu a to z obou elektrodových prostor po dvou vzorcích roztoků spór plísní do Petriho misek, v množství 100 μ l. Dále byly odebírány vzorky injekčními stříkačkami do kádinek, pro změření hodnot teploty, vodivosti a pH.

Měřeno bylo pH metrem (WTW series inolab pH 720), který zaznamenává pH a teplotu, a konduktometrem (Conductivity meter GRYP).

Vzorky roztoku spór plísní byly zpracovány v mikrobiologické laboratoři ve sterilizačním boxu. Preparáty byly přelity 10 ml živného média, vytemperovaného na cca 45 °C a dobře promíchány krouživými pohyby Petriho misek. Takto připravené vzorky byly kultivovány 3 - 5 dnů při teplotě 25 °C (*Aspergillus niger*) resp. 30 °C (*Bacillus subtilis*). Poté byly již kolonie dobře viditelné a byly vyhodnoceny nepřímou kultivační metodou tzn. odečten počet vzrostlých kolonií (colony forming units – cfu). (viz obr. č. 7)

3.4 Vliv teploty

Protože experiment probíhal bez chlazení, teplota v reaktoru rostla vlivem výboje cca o 10 °C každých 20 minut. Bylo tedy provedeno srovnávací měření jen s vlivem teploty na modelový mikroorganismus *Aspergillus niger* ve vodném roztoku. Byla použita tatáž suspenze spór jako při měření ve výboji. Vzorky byly stejně naředěny a umístěny v termostatu, kde byl simulován stejný teplotní nárůst jako ve výboji, tzn. po dvaceti minutách byla teplota zvyšována o 10 °C. Počáteční teplota byla nastavena na 25 °C, v čase 20 minut byla zvýšena na 35 °C a po 40 minutách expozice byla nastavena na 45 °C. Průběh odebírání vzorků a následná kultivace probíhala stejně jako při použití výboje.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

V této práci byla studována sterilizace pomocí diafragmového výboje v plazmatu. Zkoumán byl účinek výboje ve vodě, kontaminované mikroorganismy: závislost výkonu, doby expozice, vlivu pH, vodivosti a teploty. Jako modelové mikroorganismy byly použity spóry plísně *Aspergillus niger* a bakterie *Bacillus subtilis*. Jako elektrolyt byl přidáván chlorid sodný.

4.1 Měřené veličiny

V průběhu měření byla sledována závislost změn některých veličin na průběh experimentu. Měřeno bylo pH, teplota a vodivost v reaktoru. V tabulce č. 2 jsou uvedeny veličiny měřené za různých výkonů.

Tab. č. 2: Změna pH, teploty a vodivosti roztoku v závislosti na výkonu a čase.

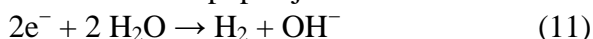
t [min]	P [W]	pH		T [°C]		G[μS]	
		katoda	anoda	katoda	anoda	katoda	anoda
t=0	160	7,2	7,0	26,8	26,9	400,0	420,0
	175	7,6	7,6	25,0	24,8	361,0	331,0
	245	7,1	7,1	24,4	25,1	371,0	350,0
t=20	160	8,9	3,4	35,4	34,8	504,0	523,0
	175	8,6	3,5	33,5	33,1	392,0	445,0
	245	8,9	3,2	37,4	38,0	506,0	585,0
t=40	160	8,8	3,1	43,6	42,9	591,0	697,0
	175	8,5	3,3	42,0	41,8	477,0	571,0
	245	8,7	3,1	48,6	47,8	616,0	796,0
t=60	160	8,8	3,1	46,0	47,3	620,0	832,0
	175	8,3	3,3	48,9	49,6	556,0	727,0
	245	8,5	3,1	53,0	53,0	655,0	916,0

Z tabulky č. 2 je patrné, jak se měnilo pH, teplota a vodivost roztoku v závislosti na čase a výkonu. Zatímco časová závislost je prokazatelná, tzn. pH s časem roste v katodovém prostoru a klesá v anodovém, vliv výkonu nebyl pozorován.

Vodivost po ošetření kapaliny výbojem v anodovém i katodovém prostoru vzrostla oproti vodivosti původního roztoku. Tento jev je způsoben vznikem radikálů a iontů. Počáteční vodivost roztoku byla nastavena okolo 350 – 400 μS, pH nastaveno nebylo, ale jeho hodnota se během výboje měnila. V anodovém prostoru bylo pH kyselé (např. při výkonu 175 W klesalo ze 7,6 až na 3,1) a v katodovém zásadité (např. při výkonu 175 W rostlo ze 7,6 na 8,6). Změna pH by se dala vysvětlit elektrolyzou, která probíhala zároveň s výbojem.

Při elektrolyze roztoku chloridu sodného putují sodné kationy směrem ke katodě a záporné chloridové ionty k anodě. Elektrolyzou samotné vody se na katodě vylučuje vodík a na anodě kyslík [18, 25].

Tvorbu vodíku popisuje katodová reakce:



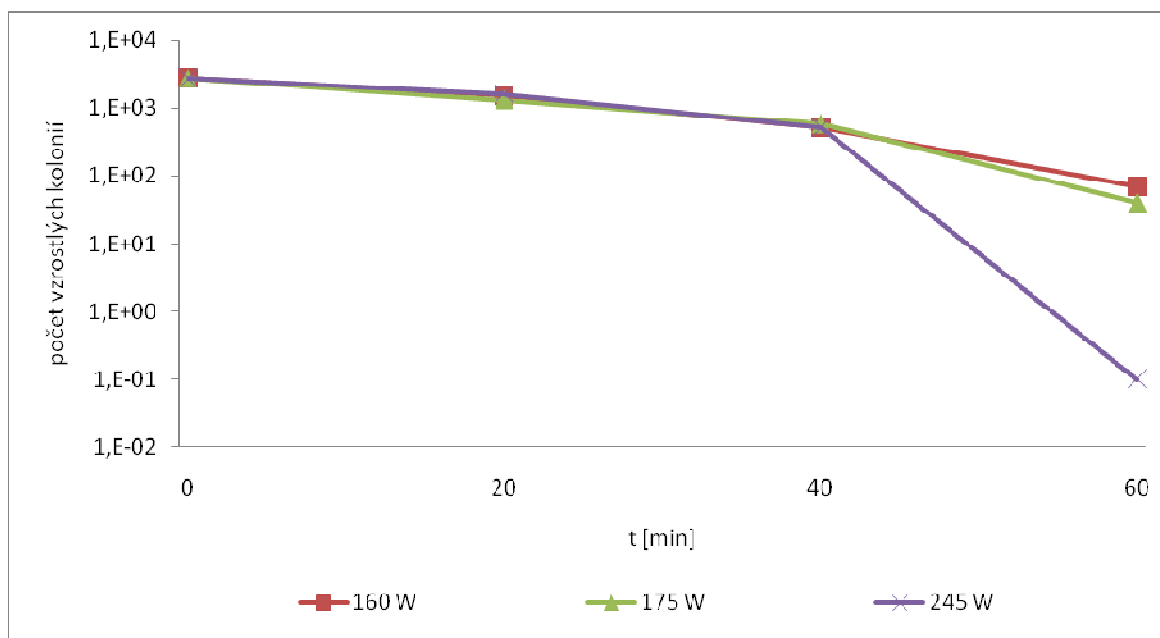
Tvorbu kyslíku popisuje anodová reakce:
 $2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$ (12)

Celkem tedy vznikají na anodě vodíkové kationy a záporné chloridové ionty – kyselina chlorovodíková a roztok je kyselý. V katodovém prostoru naproti tomu vzniklý hydroxid sodný způsobuje zásaditost roztoku. V případě neodděleného katodového a anodového prostoru by se roztok promíchal a konečné pH by bylo přibližně stejné jako na začátku měření, ale špendlíkovou dírkou v diafragmě se oddělené prostory nestihnou promíchat [18].

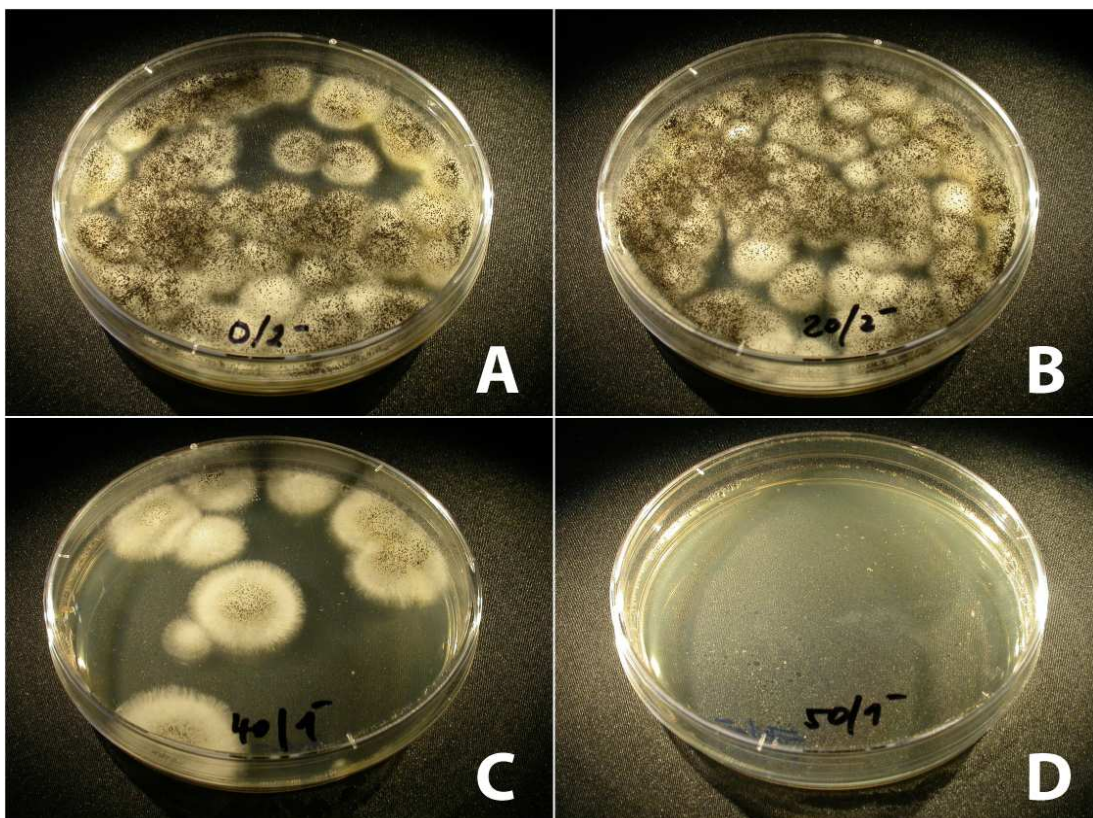
Teplota s časem rostla cca o 10 °C každých 20 minut.

4.2 Vliv plazmového výkonu a doby expozice

Měření probíhalo při výkonech 160 W, 175 W a 245 W, za použití mikroorganismu *Aspergillus niger*, přičemž koncentrace spór/ml zůstávala stejná. Jak demonstruje obrázek číslo 10, vliv výkonu na odbourávání mikroorganismů neměl velký vliv na jejich usmrcení. Jediný výkon, u kterého bylo dosaženo sterilizace byl 245 W. Mikroorganismus při něm byl zredukován o tři řády, zatímco u jiných výkonů cca o dva řády. Hlavní roli zde ale hrála především teplota, která při výkonu 245 W vzrostla na 53 °C a tudíž měla letální účinek na spóry plísně *Aspergillus niger* (viz obr. 11). Maximální možná teplota, při níž tento mikroorganismus přežívá je 45 – 47 °C [21]. S délkou expozice bylo množství životaschopných mikroorganismů redukováno. Nicméně vzhledem k faktu, že se nijak neprojevoval vliv výkonu, ale teplota stále rostla, byl blíže zkoumán vliv samotné teploty (viz kapitola 4.3).



Obr. č. 10: Srovnání experimentů s modelovým mikroorganismem *Aspergillus niger* při různých výkonech.



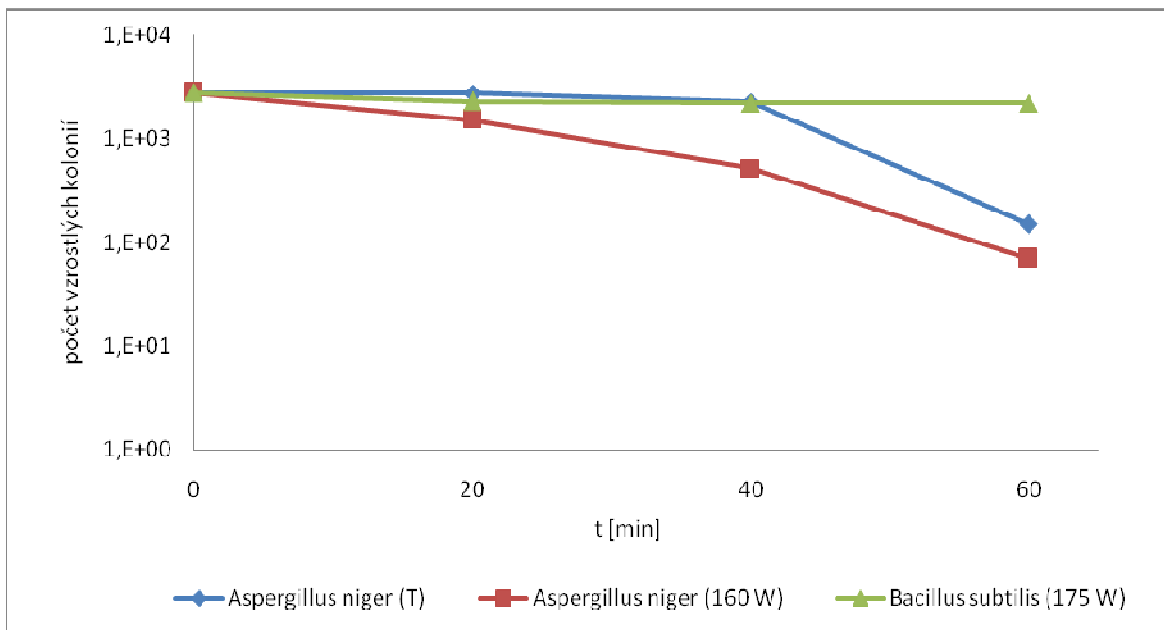
Obr. č. 11: Příklad odbourávání kolonií při výkonu 245 W. Patrné je 100% odstranění kolonií plísně *Aspergillus niger* po 60 min ve výboji. A/ před spuštěním výboje, B/ po 20 min expozice, C/ po 40 min expozice D/ po 60 min expozice (odběr od katody; doba kultivace 5 dnů)

4.3 Vliv teploty na průběh sterilizace

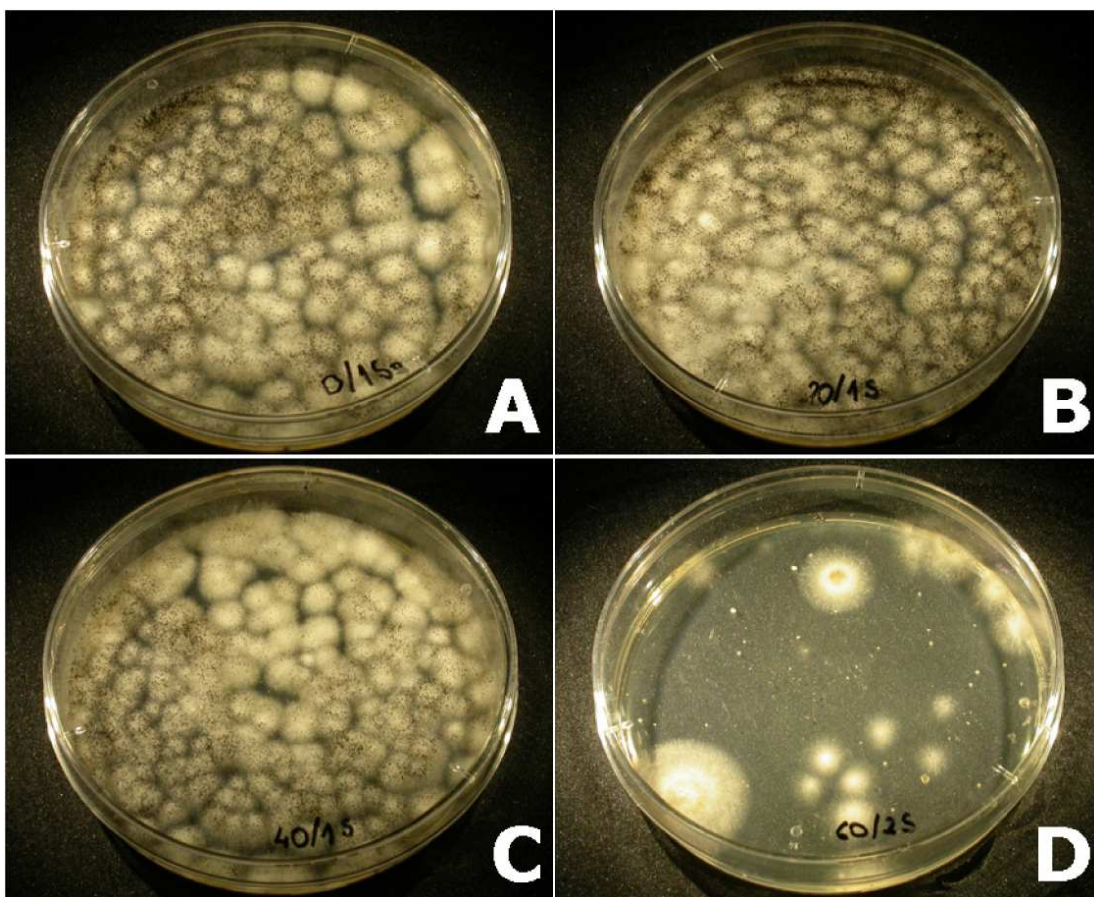
Teplota měla při experimentech se sterilizací zásadní vliv na odstraňování spór mikroorganismu *Aspergillus niger*. Za 60 min expozice vzrostla na 46 – 53 °C. Jak již bylo zmíněno dříve, takový nárůst má za následek usmrcení spór plísně *Aspergillus niger*.

Toto tvrzení dokazuje i srovnání s pokusem, kdy byla ke sterilizaci použita pouze narůstající teplota a jako modelový mikroorganismus *Aspergillus niger*. Počet vzrostlých kolonií se nijak závratně neměnil až do 40 minut doby expozice, kdy už teplota dosahovala 45 °C. (viz obr. č. 12, 13)

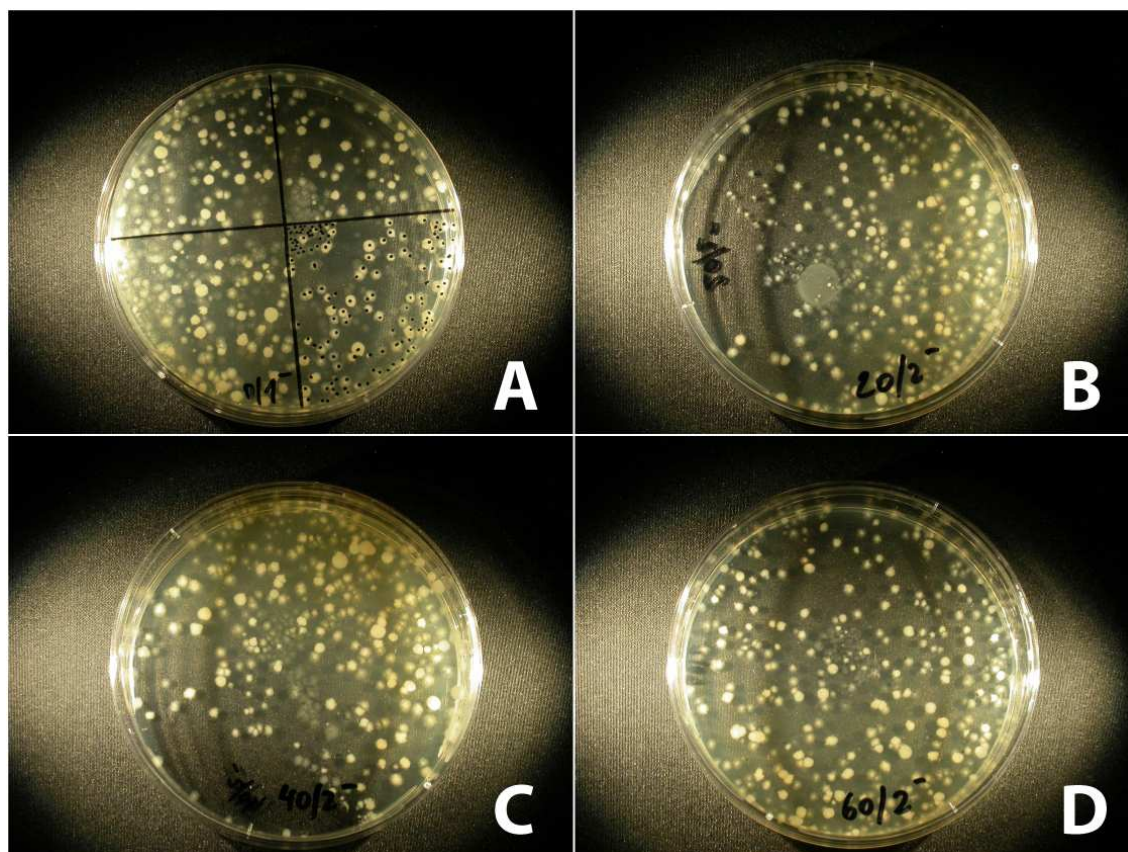
V experimentu, kdy byl použit teplotně odolnější *Bacillus subtilis* bylo dokázáno, že při 175 W téměř neměl diafragmový výboj v kapalině sterilizační účinek. (viz obr. č. 12, 14)



Obr. č. 12: Srovnání působení výboje a teploty na *Aspergillus niger* a jejich porovnání s působením výboje na *Bacillus subtilis*.



Obr. č. 13: Petriho misky s vykultivovanou plísní *Aspergillus niger*, při použití teploty jako sterilizačního média. A/ při teplotě 25 °C, před expozicí, B/ při teplotě 35 °C, po 20 min, C/ při teplotě 45 °C, po 40 min, D/ po 60 min (doba kultivace 4 dny)

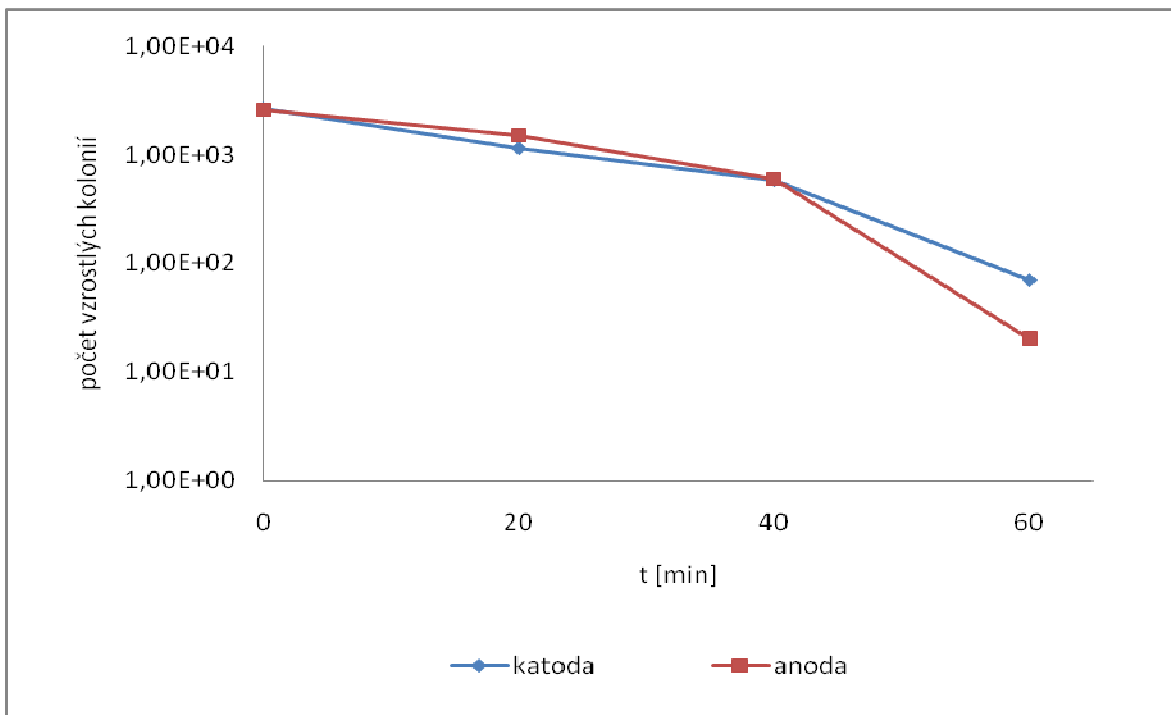


Obr. č. 14: Petriho misky s vykultivovanou bakterií *Bacillus subtilis*. A/ před zapnutím výboje, B/ po 20 min ve výboji o výkonu 175 W, C/ po 40 min ve výboji o výkonu 175 W, D/ po 60 min ve výboji o výkonu 175 W, (odběr od katody; doba kultivace 3 dny)

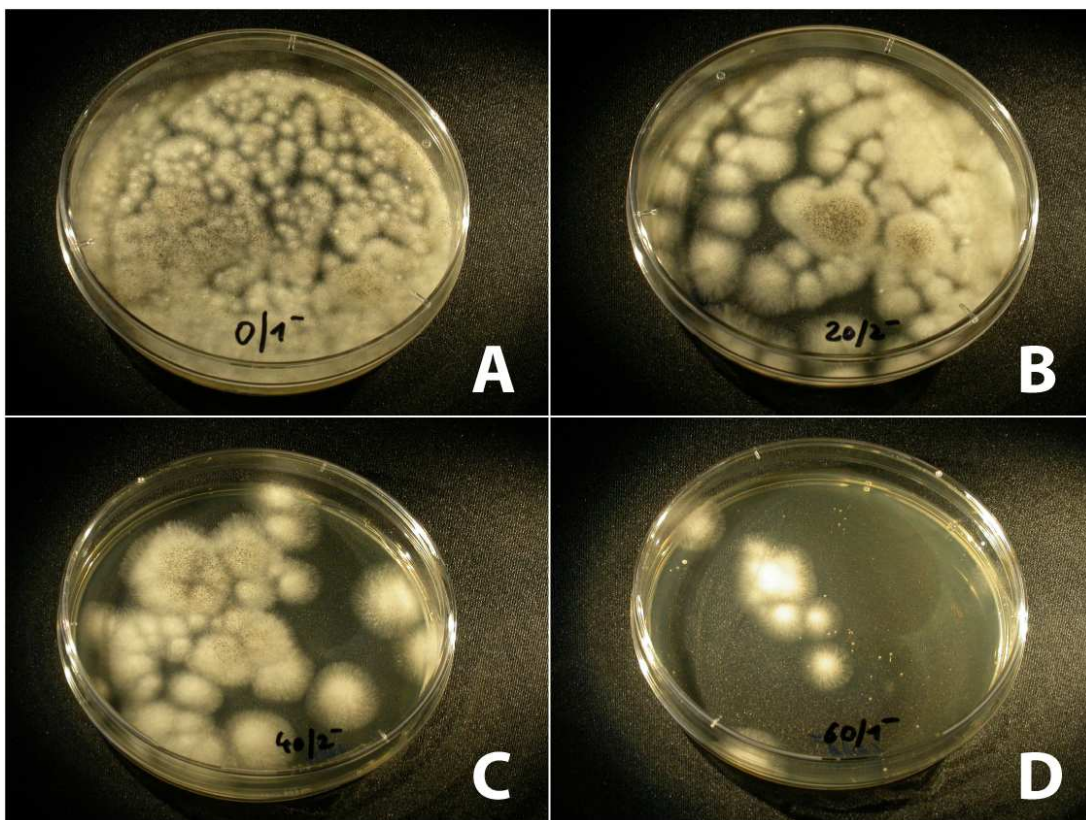
4.4 Vliv polarity elektrod na odbourávání mikroorganismů

V bakalářské práci J. Pajurkové [18] byl prokázán odlišný průběh odbourávání organických barviv v katodovém a anodovém prostoru reaktoru. V katodovém prostoru se barviva odbourávala pomaleji a jejich konečná koncentrace byla přibližně 90 %. V anodovém prostoru se barviva rozkládala lépe a rychleji a jejich koncentrace se snížila o 60 až 70 % [18]. Na základě těchto zjištění byl zkoumán vliv polarity elektrod i na odstraňování mikroorganismů z kapaliny.

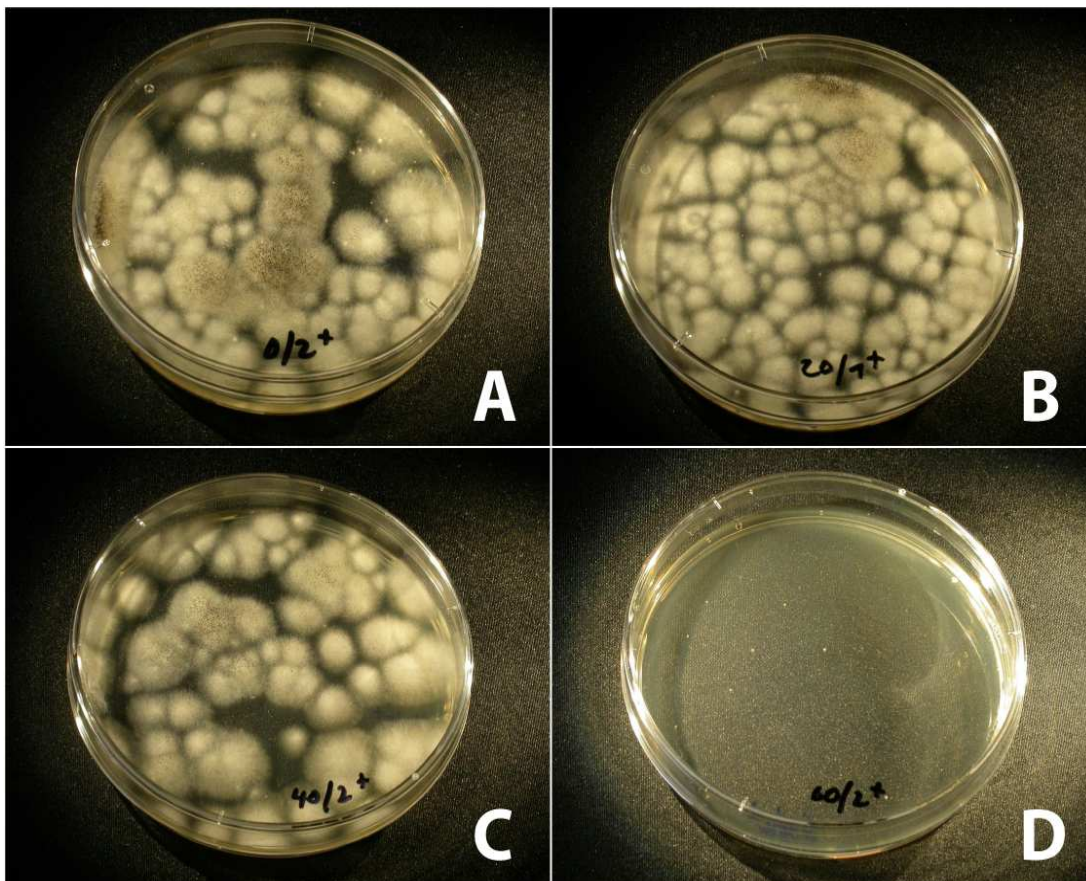
Polarita elektrod však nemá výrazný vliv na odbourávání mikroorganismů z roztoku. Nebylo prokázáno odlišné působení výboje v katodovém a anodovém prostoru. To je znázorněno na obrázku číslo 15, kde je patrný téměř totožný průběh experimentu v obou elektrodozých prostorech. Koncentrace mikroorganismů byla v obou výbojových prostorech na počátku měření $\pm 10^4$ spór·ml⁻¹. Po 60 minutách doby expozice koncentrace mikroorganismů v obou prostorech shodně klesly o cca 2 řády (viz obr. 16, 17). Spóry plísni byly odbourány z 97 % u katody a z 99 % u anody. Rozdílné působení v elektrodozých prostorech není tedy patrné.



Obr. č. 15: Znárodnění vlivu polarity elektrod na účinek odbourávání mikroorganismů. (měření při výkonu 175 W a použití mikroorganismu *Aspergillus niger*).



Obr. č. 16: Petriho misky s vykultivovanou plísní *Aspergillus niger*. A/ před zapnutím výboje, B/ po 20 min ve výboji o výkonu 175 W, C/ po 40 min ve výboji o výkonu 175 W, D/ po 60 min ve výboji o výkonu 175 W, (odběr od katody; doba kultivace 3 dny)



Obr. č. 17: Petriho misky s vykultivovanou plísní *Aspergillus niger*. A/ před zapnutím výboje, B/ po 20 min ve výboji o výkonu 175 W, C/ po 40 min ve výboji o výkonu 175 W, D/ po 60 min ve výboji o výkonu 175 W, (odběr od anody; doba kultivace 3 dny)

5 ZÁVĚR

Předmětem této bakalářské práce bylo studium sterilizačního účinku diafragmového výboje v kapalinách. Ke kontaminaci vody byly používány spóry plísně *Aspergillus niger* a bakterie *Bacillus subtilis*. Jako elektrolyt byl přidán chlorid sodný. Vodivost byla na začátku experimentu nastavena okolo 350 – 400 μS .

Studován byl vliv výkonu na sterilizační účinek diafragmového výboje. Měření probíhala při výkonech 160 W, 175 W a 245 W. V průběhu experimentů sice bylo dosaženo i stoprocentního odstranění plísně *Aspergillus niger* z roztoku (při výkonu 245 W). Toto ale bylo způsobeno vlivem narůstající teploty, nikoliv působením výboje. Teplota dosahovala po 60 min expozice až 53 °C, což má letální vliv na spóry plísně *Aspergillus niger*.

Proto byl proveden pokus jen s teplotou, kdy byl v termostatu simulován stejný teplotní růst jako ve výboji. Měření bylo dokázáno velké působení teploty na mikroorganismus. Po 40 min expozice, kdy byla teplota již na hodnotě 45 °C, byl pozorován rapidní pokles počtu kolonií *Aspergillus niger*.

Pokus s teplotně odolnějším mikroorganismem *Bacillus subtilis* potvrdil jen velmi omezenou účinnost diafragmového výboje jako sterilizační techniky za podmínek, jaké byly použity v tomto experimentu. Zde nebyl pozorován téměř žádný pokles počtu kolonií v průběhu experimentu.

Na základě bakalářské práce J. Pajurkové [18] byl sledován průběh sterilizace v katodovém a anodovém prostoru. Zatímco na odbourávání barviv měla polarita elektrod prokazatelný vliv, na odstraňování mikroorganismů vliv nebyl prokázán. V obou prostorech byl průběh experimentu téměř totožný.

Výsledky, kterých bylo dosaženo, mohou být způsobeny uspořádáním experimentálního zařízení. Absence chlazení a míchání kapaliny během expozice může hrát hlavní roli neprokázaného sterilizačního účinku diafragmového výboje. Tyto nedostatky budou odstraněny a další výzkum v této oblasti bude tématem diplomové práce.

Naměřená data k této bakalářské práci byla prezentována na konferenci v Liptovském Jánu na Slovensku, 17. – 22. ledna 2009 (17th Symposium on Application of Plasma Processes).

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. Laroussi, M.: *Plasma – Based Sterilization*, Electrical and Computer Engineering Department, Old Dominion University, Norfolk VA 23529
2. Smékal P.: *Studium sterilizace pomocí plazmatu*, Diplomová práce, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno 2008. Vedoucí diplomové práce Mgr. Pavel Slavíček, Ph.D.
3. Vrajová, J.: *Studium sterilizačních účinků dielektrického bariérového výboje*, Pojednání k dizertační práci, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Brno 2008
4. Moisan M. et al.: *Plasma sterilization. Methods and mechanisms*. Pure and Applied Chemistry, IUPAC 2002
5. Bruchanov M.: *Plazmová sterilizace*, Fyzikální metody v medicíně II., 2005
6. Dostupné z: <http://www.irz.cz/repository/latky/formaldehyd.pdf> (15. 4. 2009)
7. Dostupné z: <http://www.irz.cz/repository/latky/ethylenoxid.pdf> (15. 4. 2009)
8. Votava M.: *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přepracované vyd. Brno: Neptun, 2005. 351 s. ISBN 80-86850-00-5.
9. Svoboda K., Kráčmar M., Vančura J.: *Dezinfekce a sterilizace ve zdravotnických zařízeních*. Ústav pro další vzdělávání středních zdravotnických pracovníků, 1972.
10. Dostupné z: <http://www.otevrena-veda.cz/ov/index.php?site=ufp> (12. 4. 2009)
11. Moisan, M., Barbeau, J., Moreau, S., Pelletier, J., Tabrizian, M., Yahia, L. H.: *Low Temperature sterilization using gas plasma: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms*. International Journal of Pharmaceutics, 2001, vol. 226, 1-21. ISSN 0378-5173
12. Heise, M., Neff, W., Franken, O., Muranyi, P., Wunderlich, J.: *Sterilization of Polymer Foils with Dielectric Barrier Discharges at Atmospheric Pressure*. Plasmas and Polymers, Vol. 9, No. 1, March 2004
13. 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 (August 2006) 3494-3507
14. Laroussi, M., Leipold, F.: *Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure*. International Journal of Mass Spectrometry, 2004, vol. 233, 81-86. ISSN 1387-3806

15. Andersová, M.: *Studium sterilizace kapaliny pomocí rf plazmatu*, Bakalářská práce, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno 2007, vedoucí bakalářské práce Mgr. Monika Szostková Ph.D.
16. Stará, Z.: *Studium chemických procesů v elektrických výbojích v kapalinách, Pojednání k dizertační práci*, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Brno 2004
17. Lukeš, P.: *Elektrické výboje ve vodě*. CHEMagazín, Číslo 2, Ročník XVIII, 2008
18. Pajurková, J. *Studium vlivu struktury organických barviv na jejich rozklad v diafragmovém výboji*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 33 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Zdenka Stará, Ph.D.
19. Kuzhekin I.P.: *Corona Electrodeless Discharge in Water, Ninth International Symposium on High Voltage Engineering*, Austria, August 28 - September 1, 1995
20. Dostupné z:
<http://www.otevrena-veda.cz/ov/users/Image/default/C1Kurzy/NH2006pdf/8.pdf>
(25. 4. 2009)
21. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/asp-fu.htm>
(16. 4. 2009)
22. Votava M. a kol.: *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1. vyd. Brno: Neptun, 2003. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
23. Stará, Z., Krčma, F., Nejezchleb, M., Skalný, J. D.: *J. Adv. Oxid. Technol.*, 11 (2008) 155.
24. Vrajová, J.: *Plasma based decontamination of water by means of diaphragm discharge*, 17th Symposium on Application of Plasma, Liptovský Ján, Slovensko 2009
25. Pauling L.: *General Chemistry*, Dover Publications, Inc., New York 1988
26. Šilhánková, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Academia, 2002, 364 s., ISBN: 80-200-1024-6