



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# CHARAKTERIZACE PLAZMATEM AKTIVOVANÉ VODY PRO BIOMEDICÍNSKÉ APLIKACE

CHARACTERIZATION OF PLASMA ACTIVATED WATER FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kateřina Šindelková

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.

BRNO 2022

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1663/2021 Akademický rok: 2021/22  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Kateřina Šindelková**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Charakterizace plazmatem aktivované vody pro biomedicínské aplikace

### Zadání diplomové práce:

- Proveďte odbornou rešerši zaměřenou na přípravu, charakterizaci a využití plazmatem aktivované vody v bio–aplikacích.
- Připravte plazmatem aktivovanou vodu v různých plazmových systémech využívajících přímou i nepřímou interakci plazmatu v kapalině nebo s povrchem kapaliny.
- Charakterizujte plazmatem aktivovanou vodu z hlediska produkce chemicky aktivních částic (peroxid vodíku, oxidy dusíku) a fyzikálně chemických změn.
- Vyhodnoťte vliv způsobu přípravy na kvalitu plazmatem aktivované vody s ohledem na využití pro biomedicínské účely.

### Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Kateřina Šindelková  
studentka

doc. Ing. Zdenka Kozáková,  
Ph.D.  
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce si klade za cíl charakterizovat plazmatem aktivovanou vodu (PAW) připravenou v různých plazmových systémech využívajících přímou i nepřímou interakci plazmatu s kapalinou nebo jejím povrchem. Plazma bylo generováno pomocí elektrických výbojů za atmosférického tlaku. Připravená plazmatem aktivovaná voda byla studována s ohledem na její využití v biomedicínských aplikacích.

Teoretická část se zabývá plazmatem aktivovanou vodou. Nalezneme zde popis přípravy PAW, její charakterizaci z pohledu produkovaných částic nebo také její fyzikálně-chemické vlastnosti. Rovněž v této části nalezneme popis metod pro stanovení antimikrobiální aktivity anebo kolorimetrické stanovování produkovaných částic.

V experimentální části této práce nalezneme typy výbojů, které byly využívány pro přípravu PAW, a jejich vzájemné porovnání. Pro aktivaci byly zvoleny dva druhy kapaliny, a to destilovaná a kohoutková voda. Následně byly stanovovány koncentrace vybraných reaktivních částic v PAW (peroxid vodíku, dusičnany a dusitany) vygenerovaných ve třech různých plazmových systémech. Kromě porovnání produkce reaktivních částic v jednotlivých systémech byla studována i jejich časová stabilita. V průběhu času po přípravě se hodnoty koncentrací aktivních částic měnily, a to v důsledku vzájemných interakcí mezi částicemi, kdy docházelo k oxidaci dusitanů na dusičnany a také obráceně, v závislosti na typu PAW a ostatních podmínkách. Součástí práce bylo také sledování vybraných fyzikálních vlastností PAW, a to hodnota pH a měrná vodivost. Zjistilo se, že PAW si nezachovává své aktivované účinky příliš dlouho, záleží na typu přípravy a způsobu skladování. Důležitým cílem práce tak bylo nejen porovnání vhodnosti různě připravené PAW pro biomedicínské aplikace z hlediska složení, ale také z hlediska stability a optimálních skladovacích podmínek.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

plazma, plazmatem aktivovaná voda, dielektrický bariérový výboj, ozón, peroxid vodíku, dusičnany, dusitany, pH, měrná vodivost, antimikrobiální aktivita

## **ABSTRACT**

The aim of this master thesis is to characterize plasma activated water (PAW) prepared in various plasma systems using direct and indirect interaction of plasma with liquid or its surface. Plasma was generated by electric discharges at atmospheric pressure. The prepared plasma-activated water was studied with respect to its use in biomedical applications.

The theoretical part deals with plasma activated water. It contains a description of the PAW preparation, its characterization in terms of produced particles or its physico-chemical properties. Also, methods for antimicrobial activity estimation or colorimetric determination of produced particles are described in this section.

In the experimental part of this work, the types of discharges that were used for the PAW preparation and their comparison are presented. Two types of liquids were selected for the activation, namely distilled and tap water. Subsequently, concentrations of selected reactive particles in PAW (hydrogen peroxide, nitrates and nitrites) produced in three different plasma systems were determined. Besides the comparison of reactive particles production in various systems, their time stability was studied as well. Over time after the PAW preparation, the values of active particles concentrations have changed due to mutual interactions between the particles. Mainly, nitrites were oxidized to nitrates or vice versa depending on the PAW type and other conditions. Part of the work was also monitoring selected physical properties of PAW, namely pH value and specific conductivity. It has been found that PAW does not retain its activated properties for too long, depending on the type of preparation and methods of storage. Therefore, one of the important goals of this work was to determine and compare suitable storage conditions for PAW with respect to its potential biomedical applications.

## **KEYWORDS**

plasma, plasma activated water, dielectric barrier discharge, ozone, hydrogen peroxide, nitrates, nitrites, pH, specific conductivity, antimicrobial activity

ŠINDELKOVÁ, Kateřina. *Charakterizace plazmatem aktivované vody pro biomedicínské aplikace*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138496>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce doc. Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.

## **PROHLÁŠENÍ**

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

.....

podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Jako první bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce, paní doc. Ing. Zdence Kozákové, Ph.D. za trpělivost, ochotu, odborné rady a věnovaný čas při řešení této práce. Také bych chtěla poděkovat své konzultantce Ing. Ludmile Čechové a prof. RNDr. Františkovi Krčmovi, Ph.D. za pomost při měření v laboratoři. Rovněž bych ráda poděkovat své rodině za jejich obrovskou podporu během celého studia.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
2.1	Plazmatem aktivovaná voda .....	10
2.2	Příprava plazmatem aktivované vody .....	11
2.2.1	Elektrické výboje generované přímo v kapalinách .....	12
2.2.2	Elektrické výboje v kontaktu s kapalinami vhodné pro přípravu PAW .....	12
2.3	Charakterizace plazmatem aktivované vody .....	15
2.3.1	Produkované částice .....	15
2.3.2	Stabilita částic .....	15
2.3.3	Stanovení fyzikálně-chemických vlastností .....	15
2.3.4	Mechanismy a vliv PAW na živé organismy .....	17
2.4	Diagnostické a analytické metody vhodné pro charakterizaci PAW .....	18
2.4.1	Kolorimetrické stanovení peroxidu vodíku .....	18
2.4.2	Kolorimetrické stanovení oxidů dusíku .....	19
2.5	Metody pro stanovení antimikrobiální aktivity PAW .....	19
2.5.1	Difúzní metoda .....	19
2.5.2	Diluční metoda .....	20
2.6	Využití PAW v biomedicínských aplikacích .....	20
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>21</b>
3.1	Aparatura a přístroje .....	21
3.2	Chemikálie .....	22
3.2.1	Použité chemikálie na přípravu kalibračních křivek .....	22
3.2.2	Použité chemikálie na kultivaci mikroorganismů .....	22
3.3	Mikroorganismy pro stanovení antimikrobiální aktivity .....	22
3.4	Příprava kalibračních roztoků .....	23
3.4.1	Stanovení kalibračních křivek .....	23
3.5	Metodika experimentů .....	25
3.5.1	Příprava PAW pomocí DBD s tekutou elektrodou .....	25
3.5.2	Příprava PAW pomocí plazmové trysky ponořené do kapaliny .....	26
3.5.3	Příprava PAW pomocí probublávání produktů DBD výboje .....	27
3.5.4	Analytické stanovení reaktivních částic .....	28
3.5.5	Studium stability částic v PAW .....	28

3.6	Testování antimikrobiální aktivity.....	29
3.6.1	Příprava živného média a kultivace mikroorganismů.....	29
3.6.2	Testování antimikrobiální aktivity diluční metodou.....	29
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>30</b>
4.1	Kalibrační přímky.....	30
4.2	Charakterizace částic v PAW.....	31
4.3	Aktivace PAW pomocí DBD s tekutou elektrodou.....	32
4.4	Aktivace PAW pomocí AC výboje v kapalině.....	36
4.5	Aktivace PAW pomocí probublávání produktů výboje (O <sub>3</sub> ).....	39
4.6	Změny fyzikálně–chemických vlastností a jejich vliv na stabilitu PAW.....	42
4.6.1	Změna pH.....	42
4.6.2	Změna vodivosti.....	43
4.7	Testování antimikrobiální aktivity PAW.....	44
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....</b>	<b>54</b>
<b>8</b>	<b>PŘÍLOHY.....</b>	<b>55</b>
8.1	Grafy koncentrace pro aktivaci PAW pomocí DBD.....	55
8.2	Grafy koncentrace pro aktivaci PAW pomocí AC výboje v kapalině.....	60
8.3	Grafy koncentrace pro aktivaci PAW pomocí probublávání produktů výboje (O <sub>3</sub> ).....	65

# 1 ÚVOD

Plazma je označováno za čtvrté skupenství hmoty složené z kladných a záporných iontů, elektronů, neutrálních a excitovaných atomů, volných radikálů, molekul v základním a excitovaném stavu a UV fotonů. Na základě termodynamické teplotní rovnováhy jednotlivých složek rozdělujeme plazma na vysokoteplotní (s téměř stoprocentním stupněm ionizace) a nízkoteplotní (ionizováno pouze 1–10 % původních neutrálních atomů či molekul), a to dále na izotermické (stejná energie elektronů a těžkých částic) a neizotermické (výrazně vyšší energie elektronů). Nízkoteplotní plazma zpravidla nepřekračuje teploty 60 °C, s výjimkou několika typů plazmových jetů [1]. Toto tzv. studené plazma generované za atmosférických podmínek (CAP) je velmi zajímavé, protože ho lze generovat za mírných podmínek s jednoduchými zdroji plazmatu jako je korónový výboj, doutnavý výboj, dielektrický bariérový výboj a plazmové trysky [2].

Populárním tématem moderní fyziky plazmatu a lékařských věd se stává léčba pomocí studeného atmosférického plazmatu (CAP), které může být aplikováno přímo na živé tkáně, protože pracuje pod 40 °C. Plazma je atraktivní nástroj pro hojení ran a léčbu kožních onemocnění nebo zubních kazů, díky své schopnosti inaktivace bakterií a nezánětlivé modifikace tkání. Je považováno za jednu z předních technik v materiálovém inženýrství. Nové znalosti o studeném plazmatu v povrchovém inženýrství vedly k novým aplikacím biomedicínského plazmatu [3, 4]. Studené atmosférické plazma lze produkovat třemi různými přístupy. Prvním přístupem jsou přímé plazmové zdroje, hlavním představitelem je dielektrický bariérový výboj (DBD). Tyto přímé zdroje plazmatu vytvářejí relativně homogenní plazma, které obsahuje reaktivní částice. Nepřímé zdroje plazmatu vytvářejí plazma mezi dvěma elektrodami a vzniklé aktivní složky jsou přeneseny do cílené oblasti. Do těchto zdrojů mohou spadat od tenkých plazmových jehel po plazmové trysky. Posledním typem je tzv. hybridní zdroj plazmatu, který je kombinací předchozích výše zmíněných technik [4, 5].

V poslední době přitahuje interakce mezi plazmatem a kapalinou značný zájem díky jejich slibné aplikaci v biomedicíně, zemědělství a čištění odpadních vod. Je dobře známo, že po zapálení plazmatu lze na rozhraní plazma-kapalina dosáhnout velkého množství chemických reakcí produkujících četné primární a sekundární reaktivní formy kyslíku a dusíku, tzv. RONS, které tak přetvářejí obyčejnou vodu na plazmatem aktivovanou vodu (PAW). PAW se jeví jako slibná technika v dermatologii, sterilizaci a terapii rakoviny. Vzniklé RONS v PAW s dlouhou dobou života, a tudíž využitelné pro následné aplikace, zahrnují  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{ONOO}^-$  a spoustu dalších [6].

Plazmatem aktivovaná voda je tedy produktem studeného atmosférického plazmatu reagujícího s vodou. Má slibný potenciál stát se širokospektrálním biocidním prostředkem, díky bohaté diverzitě vysoce reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS). PAW má přechodnou aktivitu, kdy se PAW časem přemění zpět na vodu s původními vlastnostmi, což naznačuje, že se může stát zelenou alternativou ke konvenčním metodám chemického ošetření. Problém je ale v dosud ne zcela pochopeném mechanismu činnosti PAW a její stabilitě [7]. Plazma jako takové bylo široce zkoumáno v oblasti bakteriální inaktivace a je účinné pro sterilizaci a terapii infekčních onemocnění. Je zkoumáno i jeho účinnost jakožto



dezinfekčního prostředku pro inaktivaci proteinu S, aby se zabránilo infekci SARS-CoV-2 [8]. V kombinaci s aktivací vody představuje nový potenciál pro šetrné ošetřování biologických tkání.

Cílem této diplomové práce je poskytnout informace o přípravě, charakterizaci a využití plazmatem aktivované vody v biomedicínských aplikacích. Experimenty jsou prováděny za atmosférické tlaku na třech různých plazmových systémech využívající přímou a nepřímou interakci plazmatu s kapalinou a povrchem kapaliny. Pro aktivaci byla používána destilovaná a kohoutková voda. V práci se měření soustředilo na stanovení jak vybraných fyzikálních vlastností, tak na detekci chemické aktivace. Hlavním obsahem měření tudíž bylo stanovení koncentrací vzniklých reaktivních aktivních částic, konkrétně peroxidu vodíku, dusičnanů a dusitanů a jejich stabilita v čase po přípravě, která nám pomůže zjistit, jak dlouho si PAW uchovává své aktivované vlastnosti, pro které je připravována.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

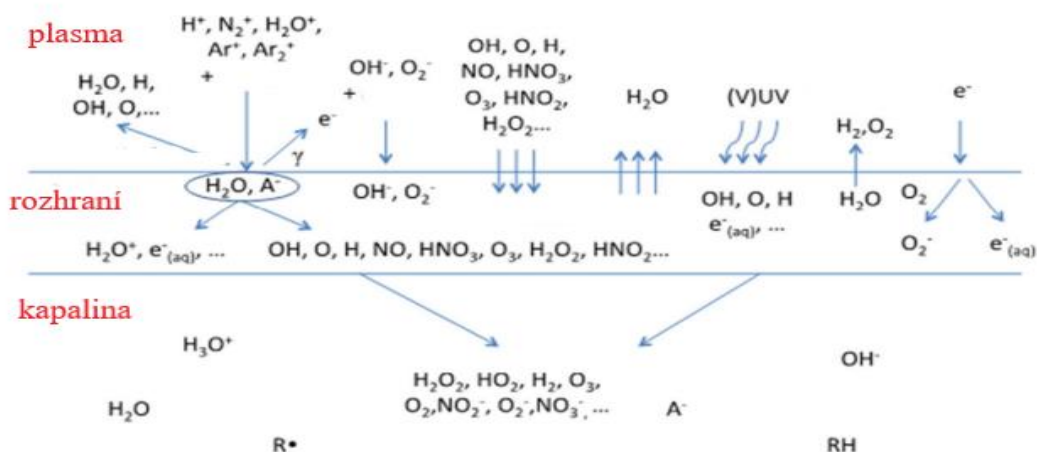
### 2.1 Plazmatem aktivovaná voda

Plazmatem aktivovaná voda – Plasma Activated Water (PAW) je voda, která byla vystavena působení plazmatu (obrázek 1). Existují dva hlavní přístupy generování PAW. První možnost zahrnuje kontakt proudícího plazmatu s vodou, zatímco v druhém případě se plazma indukuje přímo do vody [1]. Chemie a reakční procesy PAW generované nad vodní hladinou se liší od procesů PAW generovaných v přímo v kapalině. Mezi těmito systémy generování PAW je nejpoužívanější metodika plazmového výboje v kontaktu s vodou, kde je zdroj plazmatu ve formě plazmového jetu nebo dielektrického bariérového výboje (DBD). Díky těmto typům plazmatu mohou být účinně přenášeny RONS z plynného plazmatu do kapalné fáze [2].

Typ a koncentrace reaktivních látek, které jsou přítomné v PAW, závisí na plynech a kapalinách použitých k vytvoření plazmatu. V závislosti na chemickém prostředí, excitačnímu napětí a generačním režimu se mohou tvořit reaktivní formy kyslíku (ROS) a reaktivní formy dusíku (RNS), souhrnně označované pod zkratkou RONS [1]. Bylo potvrzeno, že biologická aktivita PAW přímo souvisí s chemií a relativní koncentrací složek RONS, které jsou produkovány ve vodném médiu nebo na rozhraní mezi kapalinou a plynnou fází [2].

Produkce těchto plazmatem indukovaných RONS je závislá na různých parametrech, jako jsou typy plazmového napájení, typ nosného plynu, konfigurace elektrod, použité napětí, polarita napětí, doba působení, průtok plynu, objem roztoku, vzdálenost mezi elektrodami a povrchem kapaliny apod. [2]. Mezi hlavní složky ROS patří hydroxylové radikály, peroxid vodíku, singletový kyslík, superoxidované anionty a ozon, zatímco RNS zahrnuje především dusičnany, dusitany, peroxodusitany, radikály oxidu dusnatého, amoniak a dusík. Mezi reaktivní druhy s dlouhou dobou života patří peroxid vodíku, dusičnany a dusitany [9]. PAW je univerzální médium pro biomedicínské i zemědělské aplikace. V současné době se zkoumají její aplikace pro např. kontrolu chorob rostlin, výživu rostlin, povrchovou dezinfekce, sterilizace chirurgických přístrojů, dezinfekci kůže, ošetření ran, dentální bělení, snížení infekce močového měchýře a léčbu rakoviny [10].

Bylo zjištěno, že životnost PAW je velmi odlišná, pohybuje se v rozmezí dnů po měsíce v závislosti na použitém zdroji plazmatu. Několik prací definuje životnost PAW jako dobu zachování aktivity, zatímco jiné sledují životnost různých RONS v PAW. Mezi hlavní RONS s dlouhou dobou života produkované v PAW patří  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  [11].

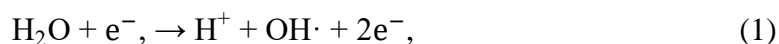


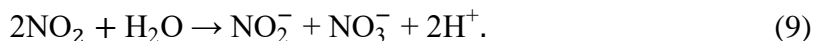
**Obrázek 1** Schématický diagram některých mechanismů pro plazma v kontaktu s vodou [12]

## 2.2 Příprava plazmatem aktivované vody

Obecně se PAW připravuje hlavně pomocí výboje atmosférického studeného plazmatu (CAP) ve třech kategoriích: i) přímý výboj v kapalině, ii) výboj v plynné fázi nad povrchem kapaliny a iii) vícefázový výboj, jako je výboj v bublinách uvnitř kapaliny nebo kontaktní aerosolový sprej nebo pěna [13]. Při přípravě PAW se mohou tvořit v závislosti na určitých vlastnostech reaktivní látky, mezi které patří reaktivní formy kyslíku (ROS) a reaktivní formy dusíku (RNS). Tyto formy se tvoří v kapalině nebo na rozhraní kapalina-plyn [1, 12].

Je zřejmé, že kromě použitých plazmových zdrojů jsou také důležité další vlastnosti, které by neměly být opomenuty: doba působení plazmatu a použitých plynů, vzdálenost mezi kapalinou a vznikajícím plazmatem, povaha elektrod apod. Například použití kyslíku, dusíku a vody jako molekul pro výrobu PAW povede k vytvoření řady primárních forem částic (včetně atomárního kyslíku, singletového kyslíku, superoxidu, ozonu, hydroxylových radikálů, excitovaného a atomového dusíku), které následně mohou pokračovat v reakci za vzniku sekundárních forem částic (peroxidu vodíku, peroxodusitanů, oxidu dusnatého, dusičnanů a dusitanových iontů). Rovnice (1) až (9) uvedené níže, představují výběr několika nejdůležitějších chemických reakcí probíhajících během generace PAW. Tyto chemické rovnice vedou k tvorbě ROS a RNS v PAW s antimikrobiální aktivitou [1].





### 2.2.1 Elektrické výboje generované přímo v kapalinách

Interakce plazma-kapalina se stávají stále důležitějším tématem v oblasti vědy a technologie plazmatu. Experimenty zabývající se interakcí plazmatu a kapalin v kontextu elektrochemie se datují do doby před více než 100 lety. Asi před 30 lety se hlavní pozornost v oblasti plazmatu v kapalinách a v kontaktu s kapalinami soustředila na elektrolýzu doutnavým výbojem a studium rozkladu dielektrických kapalin pro vysokonapěťové spínání. Po těchto pracích následoval silný důraz na environmentální výzkum využívající skutečnost, že rozhraní plazma-kapalina je bohatým zdrojem reaktivních látek jako jsou  $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{O}\cdot$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  a UV záření [12].

Díky intenzivní produkci OH radikálů se nízkoteplotní plazma generované formou elektrického výboje přímo v kapalině řadí mezi metody tzv. pokročilých oxidačních technologií (AOP). Pozornost u interakce plazma-kapalina je zaměřena zejména na fyzikální a chemické mechanismy vedoucí ke komplexní zpětné vazbě mezi plazmatem a kapalinou na rozhraní plazma-kapalina, která vede k reaktivitě v kapalině [12].

#### 2.2.1.1 Mechanismus zapálení elektrického výboje v kapalině

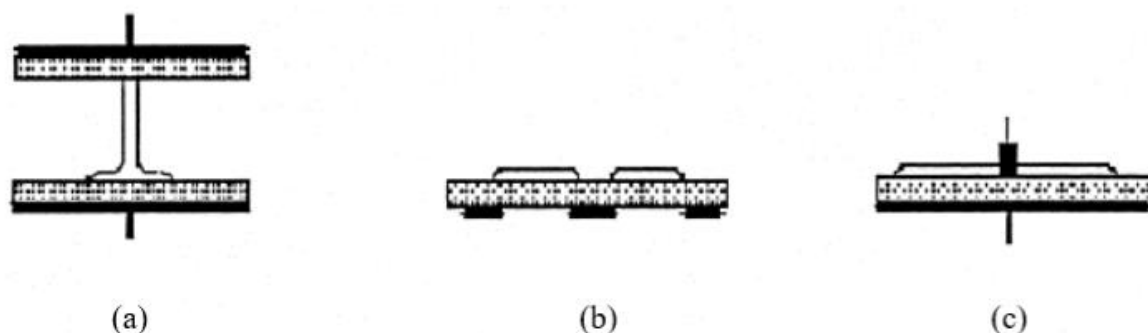
Existují dvě hlavní myšlenky ohledně iniciace elektrického výboje a šíření plazmatu v kapalinách. První teorie popisuje lavinovou generaci elektronů v kapalině přímou ionizací jejích molekul, zatímco druhá upřednostňuje teorii vzniku bublin nebo více obecně teorii mechanismu fázových změn. Elektrický průraz je obecně definován jako okamžik, když vodivý plazmový kanál tvoří elektrické spojení mezi dvěma kovovými elektrodami uvnitř kapaliny. To vede k vytvoření jiskry nebo oblouku. Typická velikost elektrického pole k průrazu voda  $1 \text{ MV}\cdot\text{cm}^{-1}$ , což je více než 30-ti násobek průrazného elektrického pole vzduchu [14]. Elektronová teorie je založena na skutečnosti, že molekuly vody jsou přímo ionizovány a disociovány aplikovaným velmi vysokým elektrickým polem a tvorba plazmatu je víceméně analogická s Townsendovou teorií elektronových lavin v plynech. Takovéto procesy jsou umožněny při generaci elektrického výboje pomocí vysokofrekvenčního vysokého napětí. Podle druhé, tepelné teorie se kapalina ohřívá procházejícím proudem, který vede k vypařování kapaliny a vzniku bublin (přesněji mikrobublin). Tyto procesy převládají při aplikaci stejnosměrného elektrického pole či střídavého vysokého napětí s nízkou frekvencí [15].

### 2.2.2 Elektrické výboje v kontaktu s kapalinami vhodné pro přípravu PAW

Pro generaci plazmatu přímo v kapalině či v kontaktu s kapalinou existuje celá řada různých elektrodových konfigurací. Elektrické výboje vhodné k přípravě plazmatem aktivované vody nalezneme i s popisem v následujících odstavcích.

### 2.2.2.1 Dielektrický bariérový výboj (DBD)

Dielektrický bariérový výboj (DBD) je typický nerovnovážný vysokotlaký střídavý plynový výboj. Tento typ výboje může nastat mezi dvěma elektrodami, z nichž alespoň jedna by měly být pokryta dielektrikem, když je na elektrody aplikováno střídavé vysoké napětí. Dielektrikum je klíčem ke správnému fungování výboje, omezuje náboj přenášený ve výboji, tj. omezuje tok proudu do systému a rozděluje výboj téměř rovnoměrně po celé ploše elektrody. Principiálně se rozlišují dvě modifikace uspořádání DBD, a to objemový (VD), kde jsou elektrody z vnějšku obou dielektrik, a povrchový výboj (SD) s elektrodami v ploše jednoho dielektrika, resp. koplanární s elektrodami uvnitř dielektrika. Schéma konfigurací je uvedeno na obrázku 2 [16]. Mezi materiál, ze kterého může být dielektrikum vyráběno, patří např. sklo, křemen, keramika, slída a oxid hlinitý [17]. DBD je vynikajícím zdrojem energetických elektronů s optimální energií 1–10 eV a vysokou hustotou [16]. Pro přípravu PAW se DBD používá v konfiguraci objemového výboje s tekutou elektrodou, kde plazma vzniká ionizací vzduchu nad vodní hladinou.



**Obrázek 2** Principiální konfigurace DBD. (a) VD; (b, c) SD [16]

Dielektrický bariérový výboj je jedním z důležitých zdrojů pro generování nerovnovážného plazmatu za atmosférického tlaku. Typickým příkladem jeho praktického uplatnění v minulém století byla komercializace výroby ozónu pro čištění a sterilizaci vzduchu [18].

### 2.2.2.2 Plazmová tryska

Plazmové trysky za atmosférického tlaku mají dlouhou historii více než 50 let. Během této doby byly vyvinuty jejich konstrukce a mechanismus generování plazmatu a přizpůsobeny různým oblastem aplikací [19]. V případě plazmových trysek za atmosférického tlaku jsou částice plazmatu přenášeny do otevřeného prostředí. Plazmové trysky lze použít pro přímé ošetření různých předmětů. Byly využity k inaktivaci bakterií, hojení ran a léčbě rakoviny. Plazmové trysky mohou pracovat se střídavým napájením kHz, mikrovlnným, vysokofrekvenčním a pulzním stejnosměrným napájením. Použitím vzácných plynů, jako je např. helium či argon, lze plazmový paprsek generovat snadněji [20].

Plazmová tryska pracující za atmosférického tlaku se skládá z křemenné trubice o vnějším a vnitřním průměru 1,5 a 1 mm a měděného drátu, který je vložen do kapiláry a slouží jako napájená elektroda. Napájená elektroda je připojena k vysokonapěťovému zdroji [11].

### 2.2.2.3 Mikrovlnný výboj

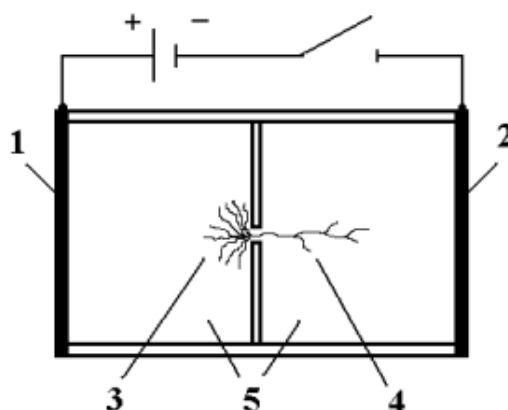
Mikrovlnné výboje jsou široce používány pro generování kvazirovnovážného a nerovnovážného plazmatu pro různé aplikace. Mikrovlnné výboje (MD) jsou elektrické výboje generované elektromagnetickými vlnami s frekvencí vyšší než 300 MHz [21]. Mikrovlnné výboje lze generovat i při vyšších tlacích, dokonce i při atmosférickém tlaku [22].

Při použití mikrovlnného výboje v konfiguraci plazmové trysky dostáváme zařízení popsané výše (2.2.2.2), jen je zde využito vysoké frekvence, řádově i jednotky GHz. Z hlediska přípravy PAW pak jde o interakci vyfukovaného plynného plazmatu s povrchem kapaliny [23].

### 2.2.2.4 Štěrbínový výboj

Štěrbínové výboje patří mezi elektrodové konfigurace umožňující generaci plazmatu přímo v kapalině. Dochází tak k přímé ionizaci molekul vody a generaci reaktivní částic s vysokým redoxním potenciálem, zejména hydroxylových radikálů a peroxidu vodíku. Můžeme odlišit modifikaci diafragmovou, kapilární či kombinaci korónového a štěrbinového výboje, která může mít podobu plazmové trysky [24].

Pro lepší pochopení tohoto typu výboje existuje analogie mezi korónovým a diafragmovým výbojem [25]. Korónové výboje jsou elektrické výboje s relativně malým výkonem, které probíhají při atmosférickém tlaku nebo v jeho blízké hodnotě. Korónový výboj je vždy generován silnými elektrickými poli spojenými s dráty o malém průměru, jehlami nebo ostrými hranami na elektrodě [26]. Diafragmový výboj vzniká v reaktoru obsahující dvě elektrody, které jsou rozděleny membránou, ve které se nachází malý otvor. V důsledku vysoké elektrického pole mezi elektrodami vzniká na tomto otvoru silné elektrické pole. Kapalina v blízkosti otvoru se zahřívá a tvoří bubliny. Názorné schéma diafragmového výboje můžeme vidět na obrázku 3 [25].



**Obrázek 3** Zjednodušené schéma diafragmového výboje: 1) anoda; 2) katoda; 3) záporné plazmové kanály; 4) kladné plazmové kanály; 5) roztok elektrolytu [25].

## 2.3 Charakterizace plazmatem aktivované vody

### 2.3.1 Produkované částice

Reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS), které vznikají ve vodě po vystavení plazmatu, jsou považovány za klíčové složky v PAW, které jsou schopny ničit bakteriální a rakovinné buňky. Kromě vývoje aplikací pro PAW je také nutné porozumět chemii RONS. Původně vygenerované RONS interakcemi plazmatu se vzduchem v plynné fázi se následně rozpouštějí v roztoku. Úprava plazmatem navíc snižuje pH roztoku. Hlavní RONS v PAW, o kterých se předpokládá, že mají antimikrobiální účinek, jsou peroxid vodíku a dusitany. Chemie plazmatu kapaliny je ale mnohem složitější, zejména na rozhraní plazma-kapalina, kde vzniká spousta dalších vysoce reaktivních částic včetně hydroxylového radikálu, radikálu oxidu dusnatého, radikál superoxidového aniontu, hydroperoxylový radikál, radikál oxidu dusnatého, singletový kyslík a ozón [27].

### 2.3.2 Stabilita částic

U plazmatem aktivované vody se může životnost pohybovat v rámci dnů až měsíců, to záleží na použitém zdroji plazmatu. Lukes et al prokázali, že koncentrace druhů částic a jejich životnost závisí na pH upravené vody. V kyselých podmínkách byly zjištěny nižší koncentrace  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  a vyšší koncentrace  $\text{NO}_3^-$  [11].

Interakce mezi plazmatem a kapalinou je dynamický proces, proto je diagnostika obecně problémem pro chemii na bázi kapalin, obzvlášť když se jedná o radikály s krátkou životností. Mezi částice potvrzené v PAW s krátkou dobou života řadíme singletový kyslík, hydroxylové radikály, atomární kyslík, superoxidový radikál. Do dlouhověkých potom řadíme peroxid vodíku a ozón, stejně jako další sekundární produkty vznikající v kapalině jako jsou dusičnany a dusitany [2].

### 2.3.3 Stanovení fyzikálně-chemických vlastností

Plazmatem aktivovanou vodu lze připravovat v různých typech plazmových systému za odlišných podmínek jako je konfigurace elektrod, použité plyny, doba ošetření plazmatem a spousta dalších vlastností. Je tedy nezbytné definovat tyto fyzikálně chemické podmínky a vlastnosti. Mezi fyzikální změny, které mohou probíhat v roztocích, řadíme změnu pH, měrnou vodivost a teplotu. Do chemických procesů v plazmatu s elektrickým výbojem řadíme vznik vysoce reaktivních částic, které mají vysoký oxidačně redoxní potenciál [2, 28].

#### 2.3.3.1 Měrná vodivost

Vodivost je mírou schopnosti vody usnadnit tok elektrického proudu. Vodivost velmi ovlivňuje přítomnost cizích iontů ve vodě. Během plazmového ošetření vznikají látky a ionty, které se snadno rozpouštějí ve vodě, a to zapříčiňuje změnu vodivosti. Tvorba ROS a RNS během plazmové aktivace vody přispěje ke zvýšení vodivosti PAW. Obecně se specifická (měrná) vodivost neboli konduktivita měří v jednotkách mikrosiemens na centimetr. Specifická vodivost destilované vody se obvykle pohybuje v rozmezí 0,5 až 3  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  [1].

Měrná vodivost se značí  $\kappa$  a je definována jako převrácená hodnota elektrického odporu (rezistence,  $R$ ) vodiče a podílu délky a průřezu vodiče (10):

$$\kappa = \frac{1}{R} \cdot \frac{l}{S} \quad (10)$$

Vodivost se měří pomocí konduktometru, který je vybaven zařízením na kompenzaci teploty nebo přesným teploměrem. Vodivostní sonda je tvořena dvěma elektrodami ponořenými do kapaliny a pokrytými platinovou černí. Elektrody jsou chráněny skleněnou trubicí, která umožňuje dobrou výměnu mezi roztokem a elektrolytem [29, 30].

### 2.3.3.2 Stanovení pH

V chemii je pH mírou koncentrace vodíkových iontů v roztoku. Reakce, které probíhají mezi chemickými částicemi vytvořenými v plazmatu a vodě, mají za následek okyselení. U PAW se pH drasticky snižuje se zvyšující se dobou ošetření v důsledku tvorby silných kyselin [1].

Tento parametr slouží k určení kyselosti nebo zásaditosti roztoku. pH bylo původně definováno Sørensenem v roce 1909. Hodnota pH je definována jako záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových kationtů:

$$\text{pH} = -\log(a_{\text{H}_3\text{O}^+}). \quad (11)$$

Ve zředěných roztocích lze hodnotu aktivity aproximovat hodnotou koncentrace, a to pak platí:

$$\text{pH} = -\log(c_{\text{H}_3\text{O}^+}). \quad (12)$$

pH nabývá hodnot od 0 do 14. Pro roztoky, které jsou kyselé, nabývá hodnota  $\text{pH} < 7$  a pro roztoky, které jsou zásadité, nabývá hodnot  $\text{pH} > 7$ . Pro hydroxidové ionty je zavedena hodnota pOH, kde platí:

$$\text{pOH} = -\log(a_{\text{OH}^-}). \quad (13)$$

Musí být splněna následující podmínka:

$$\text{pH} + \text{pOH} = 14. \quad (14)$$

Existuje více způsobů měření pH. Pro orientační stanovení se využívají roztoky acidobazických indikátorů nebo indikátorový papírek, pro měření s vyšší přesností se používají pH metry. Potenciometrické měření pH je založeno na měření rovnovážného elektromotorického napětí galvanického článku tvořeného dvěma elektrodami ponořenými do měřeného roztoku. Podstatou této metody je velmi přesné měření elektrického potenciálu mezi měrnou (skleněnou) a referenční elektrodou. Jako referenční elektrody lze použít elektrody II. druhu. Nejčastěji se používá kalomelová nebo argentochloridová, jejichž potenciál zůstává konstantní. Druhá měrná elektroda, jejíž potenciál je funkcí aktivity vodíkových iontů, je naplněna roztokem o známé hodnotě pH, a závisí tedy na pH. Při ponoření elektrody do měřeného roztoku vzniká mezi vnější a vnitřní stranou skleněné membrány potenciálový rozdíl, jehož velikost je úměrná rozdílu pH měřeného a vnitřního roztoku. Roztok uvnitř elektrody je vždy stejný, výsledný potenciál tedy závisí pouze na hodnotě pH měřeného roztoku. Velmi často se používá kombinovaná skleněná elektroda, která obsahuje měrnou i referenční část [31–35].



### **2.3.3.3 Redoxní potenciál**

Oxidačně-redukční potenciál vyjadřuje schopnost roztoku oxidovat nebo redukovat jinou látku a závisí na koncentraci oxidačních činidel a jejich síle. Výhodou měření redoxní potenciálu vody je, že poskytuje rychlé a jednohodnotové posouzení dezinfekčního potenciálu. Tato vlastnost je považována za důležitý faktor ovlivňující mikrobiální inaktivaci, která poškozuje buněčnou membránu mikrobů a obranný mechanismus. Z ROS vytvořených v PAW se peroxid vodíku účastní hlavně redoxních reakcí, kde se může chovat jako oxidant nebo jako redukční činidlo [1].

### **2.3.3.4 Peroxid vodíku**

Peroxid vodíku je jednou z reaktivních forem kyslíku (ROS), která má mnoho funkcí v buněčných redoxních signálních drahách, a proto je využíván v oblasti lékařství a zemědělství. V oblasti medicíny hraje významnou roli u fungování imunitního systému a při šíření rakoviny. Peroxid vodíku je nejběžnější reaktivní forma s dlouhou životností. Je také považován za základní molekulu v antimikrobiálních, protirakovinných či hojivých procesech na bázi plazmatu [2].

### **2.3.3.5 Oxidy dusíku**

Existence dusičnanových a dusitanových iontů v systémech na bázi plazmatu získala značný výzkumný zájem, zejména pro jeho antibakteriální vlastnosti a jako alternativa k organickým hnojivům na podporu růstu rostlin. Z jednoho úhlu pohledu se má za to, že dusitanové a dusičnanové ionty s dlouhou životností vzniklé jako sekundární produkty v plazmatem aktivovaném roztoku mají silnou baktericidní schopnost v kyselém prostředí. Na druhé straně hrají RNS v moderním zemědělství dvě hlavní role: 1) jsou absorbovány rostlinnými enzymy jako živina, což vede ke tvorbě dusíkatých sloučenin a aminokyselin a 2) mohou řídit aspekty metabolismu a vývoje rostlin jako signální molekula. Dusitany jsou generovány v plazmatem aktivované vodě rozpuštěním  $\text{NO}_x$  generovaných z reakcí  $\text{N}_2$  a  $\text{O}_2$  v plynné fázi během výboje. Jakmile dusitany koexistují s oxidačními činidly, jako je  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{O}_3$ , budou snadno přeměněny na dusičnany [2].

### **2.3.3.6 Ozón**

Ozón, který se nachází rozpuštěný ve vodných roztocích, je považován za silné antimikrobiální oxidační činidlo. Má nejvyšší redoxní potenciál mezi typickými oxidanty, včetně chlóru, oxidu chloričitého, peroxidu vodíku a manganistanu. Ozón je částice s dlouhou životností (několik až desítky minut), po jeho vzniku v plynné fázi se může transportovat do rozhraní kapaliny nebo také je možné ozón generovat přímo v roztoku, jako v případě plazmového výboje produkovaného v bublinách obsahující  $\text{O}_2$  [2].

## **2.3.4 Mechanismy a vliv PAW na živé organismy**

V současné době se ve světě používají různé typy dezinfekčních prostředků pro různé aplikace, jako je dezinfekce povrchů, nástrojů v lékařské oblasti, dezinfekční prostředky v letadlech, umývárkách apod. Tyto dezinfekční prostředky obsahují různé škodlivé chemikálie, které poškozují náš ekosystém. Náhradou za tyto dezinfekční prostředky by mohla být plazmatem aktivovaná voda, která si v dnešní době získává významnou pozornost právě díky svému potenciálnímu využití jako dezinfekční prostředek, pesticid,

konzervační prostředek pro potraviny, ošetření rakovinných buněk, hnojivo a spoustu dalších aplikací. Tyto aplikace závisí na reaktivitě (redoxnímu potenciálu) a elektrické vodivosti PAW [36–38].

Úprava vody pomocí plazmového výboje v plynné fázi vedla ke kyselým roztokům s vynikající a širokou antibakteriální aktivitou. PAW způsobila závažná poškození membrán u bakterií a volně difundovala v extracelulární matrici, PAW také prokázala dobrou antibiofilmovou aktivitu. Reaktivita PAW je jedním z požadovaných parametrů, který odráží jeho účinnost vůči inhibici růstu patogenů [36–38].

## 2.4 Diagnostické a analytické metody vhodné pro charakterizaci PAW

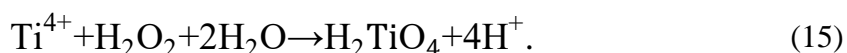
Interakce plazma-kapalina mohou zahrnovat mnoho přímých reakcí na rozhraní plyn-kapalina a nepřímé kaskádové reakce v objemové vodě, produkující média obsahující směs vysoce reaktivních látek v nepřítomnosti jakýkoliv jiných chemikálií. Vznikající RONS se dále dělí na dlouhotrvající a krátkodobé skupiny. V PAW byly potvrzeny RONS, jako je singletový kyslík, hydroxylové radikály, atomární kyslík, superoxidový radikál, které se řadí do skupiny s krátkou životností. Do druhé skupiny patří především peroxid vodíku a ozón, stejně jako sekundární druhy vznikající v kapalině jako jsou dusitany a dusičnany [2]. Je velmi důležité měřit tyto reaktivní druhy kvantitativně nebo kvalitativně, aby se prozkoumal proces a mechanismy výbojového plazmatu [28].

### 2.4.1 Kolorimetrické stanovení peroxidu vodíku

Peroxid vodíku má relativně dlouhou životnost a obvykle se detekuje přímo pomocí tradičních chemických metod, jako je jodometrická metoda, kolorimetrická metoda s draslíkem a titanem [28].

Kolorimetrie je kvantitativní chemicko-analytická optická metoda založená na platnosti Lambert-Beerova zákona. Tuto metody obecně řadíme k fotometrii. Intenzita barevnosti látky závisí na její koncentraci v roztoku. Absorbance vzorku zkoumané látky se srovnává s absorbancí standardu o známé koncentraci [39].

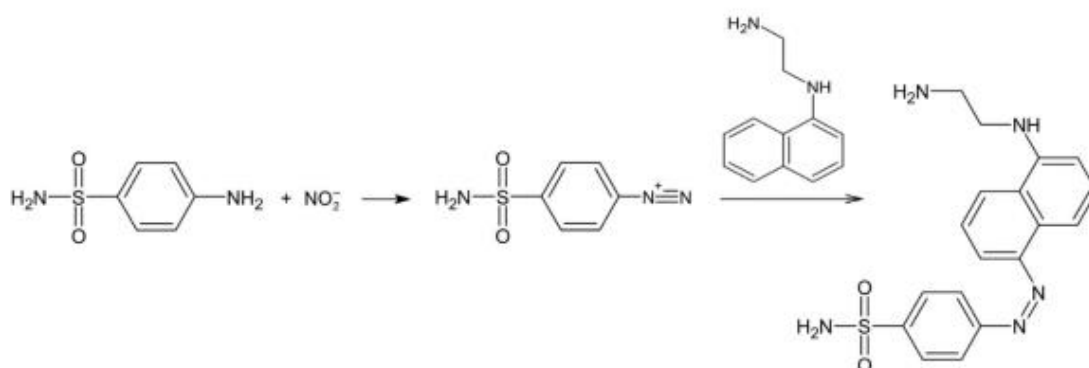
Díky elektrickým výbojům ve vodě dochází ke vzniku reaktivních forem kyslíku, resp. peroxidu vodíku, ten lze detekovat pomocí kolorimetrie. Ke stanovení se používá vysoce selektivní titanové činidlo. Titanové činidlo se skládá ze síranu titaničitého  $Ti(SO_4)_2$  rozpuštěného ve zředěné kyselině sírové. V tomto roztoku je obsažen titaničitý iont, jenž v silně kyselém prostředí selektivně reaguje s peroxidem vodíku za vzniku žlutého zbarvení. Toto zbarvení je způsobeno tvorbou komplexu kyseliny peroxotitaničité  $H_2TiO_4$ . Jeho stabilita je minimálně 6 hodin. Reakci titanového činidla s peroxidem vodíku lze popsat rovnicí:



Intenzita absorbance komplexu je přímo úměrná koncentraci peroxidu vodíku v komplexu. Absorpční maximum pro peroxid vodíku je při  $\lambda_{max} = 407 \text{ nm}$  [40].

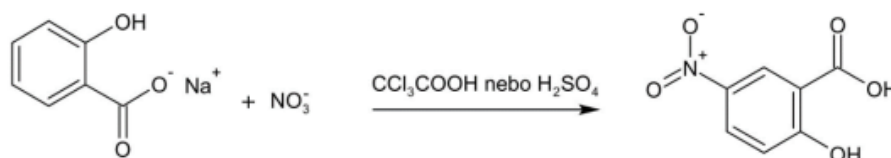
### 2.4.2 Kolorimetrické stanovení oxidů dusíku

Dusitany jsou soli kyseliny dusité  $\text{HNO}_2$ . Za nejrozšířenější metodu stanovení dusitanů můžeme považovat spektrofotometrické stanovení po diazotaci sulfanilamidu a kopulaci s N-(1-naftyl)ethylen-diaminem. Jedná se o Griessovu reakci. Metoda je založena na diazotační reakci dusitanů se sulfanilamidem v kyselém prostředí kyseliny fosforečné. Tato diazoniová sůl tvoří s dihydrochloridem N-(1-naftyl)-1,2-diaminoetanu růžové zbarvení (obrázek 4). Absorbance se měří při 540 nm [41–43].



**Obrázek 4** Reakční schéma pro stanovení dusitanů [44]

Dusičnany jsou soli kyseliny dusičné  $\text{HNO}_3$ . Analýza je založena na reakci dusičnanů se salicylanem sodným v kyselém prostředí kyseliny sírové, kde vznikají žlutě zbarvené soli kyseliny nitrosalicylové (obrázek 5). Vzniklý komplex se stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 526 nm [45, 46].



**Obrázek 5** Reakční schéma pro stanovení dusičnanů [44]

## 2.5 Metody pro stanovení antimikrobiální aktivity PAW

Testování antimikrobiální citlivosti lze použít pro objevování léku, epidemiologii a predikci terapeutického výsledku. Nejznámějšími a základními metodami pro testování antimikrobiální aktivity jsou disková difúzní metoda a metody ředění bujónu nebo agaru [47].

### 2.5.1 Difúzní metoda

Agarové diskové difúzní testování vyvinuté v roce 1940 je oficiální metodou používanou v mnoha klinických mikrobiologických laboratořích pro rutinní testování antimikrobiální citlivosti. Jedná se o jednoduchou a levnou metodu. Tento test je založený na použití disků, které obsahují roztoky testovaných látek. Agarové plotny se naočkují standardizovaným inokulem testovaného mikroorganismu. Potom se na povrch agaru umístí disky obsahující testovanou sloučeninu. Petriho misky se inkubují za vhodných podmínek. Obecně

antimikrobiální činidlo difunduje do agaru a inhibuje klíčení a růst testovaného mikroorganismu a poté se měří průměry inhibičních růstových zón. U této metody je možnost otestovat až šest látek na plotně proti jedinému mikroorganismu [47, 48].

### **2.5.2 Diluční metoda**

Při dilučních metodách se testované látky mísí s vhodným médiem, které bylo dopředu naočkováno vhodným mikroorganismem. Tato metoda může být provedena v kapalném i v pevném médiu, následný růst mikroorganismů lze měřit hned několika způsoby. U agarové diluční metody se minimální inhibiční koncentrace (MIC) definuje jako nejnižší koncentrace schopná inhibovat jakýkoliv viditelný růst plísni. U diluční metody prováděné v bujónu se využívá tvorby zákalu nebo redoxních indikátorů. Zákal lze odhadnout vizuálně nebo přesněji pomocí spektrometrických metod. Mikro nebo makroředění bujónu je jednou z nezákladnějších metod testování antimikrobiální citlivosti [47, 48].

## **2.6 Využití PAW v biomedicínských aplikacích**

Studené atmosférické plazma (CAP) je průlomová technika, která překonává limity tepelného plazmatu. Studené plazma s atmosférickým tlakem je nová technologie široce používaná v mnoha oblastech biomedicíny, také při léčbě rakoviny. Studená plazma dokáže selektivně zabít různé typy nádorových buněk, včetně rakoviny plic, leukémie, rakoviny střev, melanomu, rakoviny děložních čípků, gliomu a rakoviny slinivky atd., a velmi důležitá je i její biologická bezpečnost v klinických studiích. Rozsáhlé studie ukázaly, že akumulace reaktivních druhů kyslíku/dusíku po léčbě plazmou hraje důležitou roli při poškození rakovinných buněk, protože jsou hlavními meziprodukty regulujícími druhy buněčných signálních drah. U nádorů, které jsou hluboko v těle, nebo hematologických nádorů, jako je leukémie a mnohočetný myelom, lze přesnou injekcí aplikovat plazmou aktivovanou tekutinu, jako je PAW nebo plazmatem aktivované médium (PAM). Voda nebo médium je po určité době předem upraveno plazmovými přístroji, jako je plazmová tryska, poté PAW a PAM obsahují různé reaktivní látky, které se dají využít v biologických aplikacích [49]. Vědci uvedli, že PAW má podobné biologické účinky jako přímé ošetření plazmatem [50].

Studium plazmové medicíny, které se v současné době aktivně rozšiřuje, má multidisciplinární charakter, zahrnuje fyzikální, chemické a biologické procesy [51]. Plazmová medicína přitáhla obrovskou pozornost mnoha výzkumníků pro svůj velký potenciál v oblastech zdravotnictví, jako je sterilizace, stomatologie, léčba ran, koagulace krve a terapie rakoviny [52]. PAW se objevila jako slibná technika díky flexibilní produkci, dobré tekutosti a hojnosti RONS. ROS způsobují silný oxidační stres, zatímco RNS přispívají k vytvoření kyselého kapalného prostředí, které spojuje synergický efekt s ROS v biochemické reaktivitě. Dvojí role ROS a RNS může být využita při oxidaci lipidů, redoxních signálních drahách nebo poškození DNA, a tím ovlivnit buněčnou proliferaci, apoptózu a migraci. Současně by dávka chemických složek v PAW mohla vést k vysokému oxidačně-redukčnímu potenciálu, jehož účinek hraje kritickou roli v bakteriální inaktivaci. Proto se dospělo k závěru, že je množství RONS v PAW rozhodující při jejím využití v biomedicínských aplikacích [6, 53].

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Tato část diplomové práce se zabývá přípravou a následnou charakterizací plazmatem aktivované vody. Experimenty využívaly tři plazmové systémy: i) generaci plazmatu nad povrchem kapaliny pomocí dielektrického bariérového výboje s tekutou elektrodou, ii) generaci PAW přímo v kapalině za použití systému plazmové trysky a iii) probublávání produktů dielektrického bariérového výboje do vody. Pro výrobu plazmatem aktivované vody byla vždy použita destilovaná i kohoutková voda. Součástí diplomové práce je i antimikrobiální testování plazmatem aktivované vody.

Hlavním cílem experimentální části této diplomové práce byla analýza vzniklých chemicky aktivních částic, generovaných při přímém i nepřímém způsobu přípravy PAW. Chemicky aktivní částice, které jsem v práci stanovovala, byly peroxid vodíku a oxidy dusíku, konkrétně dusičnany a dusitany. Dále byla zkoumána stabilita chemicky aktivních částic v plazmatem aktivované vodě při různých skladovacích podmínkách a také jejich závislosti na čase. PAW byla skladována v reagenčních uzavíratelných lahvích v lednici a při pokojové teplotě, obojí ve tmě. Rovněž byly sledovány vybrané fyzikálně-chemické změny, jako jsou měrná vodivost a pH. Antimikrobiální testy byly provedeny na dvou vybraných mikroorganismech, kvasince *Candida glabrata* a bakterii *Escherichia coli*. Vhodnost připravené PAW pro další biologické aplikace byla také testována v rámci paralelně probíhající bakalářské práce zaměřené na studium vlivu plazmatem aktivované vody na klíčivost semen pšenice seté [54].

#### 3.1 Aparatura a přístroje

Plazmové systémy:

- Dielektrický bariérový výboj (DBD) s tekutou elektrodou (Laboratoř plazmových procesů FCH VUT – vlastní výroba), vysokofrekvenční zdroj napětí (Lifetech s.r.o.), spínací hodiny (Viponel)
- Plazmová tryska pro generaci plazmatu v kapalině – kombinovaný šterbinový a korónový výboj (Laboratoř plazmových procesů FCH VUT – vlastní výroba), vysokofrekvenční zdroj napětí (Lifetech s.r.o.)
- Ozonizátor (Lifetech s.r.o.), průtokoměry (Omega)

Dalšími nezbytnými přístroji k práci na experimentální části byly:

- analytické váhy (Boeco a Scaltec)
- automatické pipety (Biohit a Discovery, Německo)
- biohazardbox (model Airstream třídy II-ESCO, Biotech Česká republika)
- mikrotitrační destičky
- spektrometr Helios Omega (Unicam)
- ELISA reader BioTek ELx808 (Biotek USA)
- temperovaná třepačka Heidolph Inkubator 1 000 (Labicom, Česká republika)
- pH metr WTW inoLab
- konduktometr Greisinger GMH 3400

## 3.2 Chemikálie

### 3.2.1 Použité chemikálie na přípravu kalibračních křivek

V tabulce 1 jsou uvedeny veškeré chemikálie, se kterými bylo pracováno při přípravě kalibračních řad nezbytných k charakterizaci připravené plazmatem aktivované vody. Vždy byl připraven zásobní roztok a z něj následně koncentrační řada, která se smíchala s příslušným činidlem pro stanovení daného typu sledované reaktivní částice.

**Tabulka 1** Seznam a stručná charakteristika použitých chemikálií k přípravě kalibrací

Název	Sumární vzorec	M (g·mol <sup>-1</sup> )	Registrační číslo CAS	Výrobce
Destilovaná voda	H <sub>2</sub> O	18,03		Zdroj FCH VUT
Peroxid vodíku 30 %	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	34,02	7722-84-1	Lach-Ner, s. r. o.
Dusičnan sodný	NaNO <sub>3</sub>	85,01	7631-99-4	Lach-Ner, s. r. o.
Dusitan sodný	NaNO <sub>2</sub>	69,00	7632-00-0	Lach-Ner, s. r. o.
Titanové činidlo		159,93	123334-00-9	Sigma-Aldrich
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> činidlo				Sigma-Aldrich
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> činidlo				Sigma-Aldrich

### 3.2.2 Použité chemikálie na kultivaci mikroorganismů

Chemikálie potřebné k přípravě živných tekutých médií pro vybrané mikroorganismy, na kterých byly provedeny antimikrobiální testy pomocí diluční metody, jsou uvedeny v tabulce 2.

**Tabulka 2** Chemikálie k přípravě živných médií.

Název	Sumární vzorec	M (g·mol <sup>-1</sup> )	Registrační číslo CAS	Výrobce
D-glukosa bezvodá	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ·H <sub>2</sub> O	198,17	5996-10-1	Lach-Ner, s. r. o.
Nutrient Broth (NB)				Himedia (Indie)
Pepton aus Casein			91079-40-2	Roth (SRN)
Yeast Extrakt Powder				Himedia (Indie)

## 3.3 Mikroorganismy pro stanovení antimikrobiální aktivity

Na testování antimikrobiální aktivity byly použity mikroorganismy z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně:

- *Candida glabrata* CCM 8270
- *Escherichia coli* CCM 7395

### 3.4 Příprava kalibračních roztoků

Pro experimentální měření bylo zapotřebí naměřit kalibrační křivky pro následnou charakterizaci nově připravené plazmatem aktivované vody. V práci stanovuji obsah peroxidu vodíku, dusičnanů a dusitanů, proto jsem naměřila kalibrační křivky pro všechny tyto zmíněné chemicky aktivní částice.

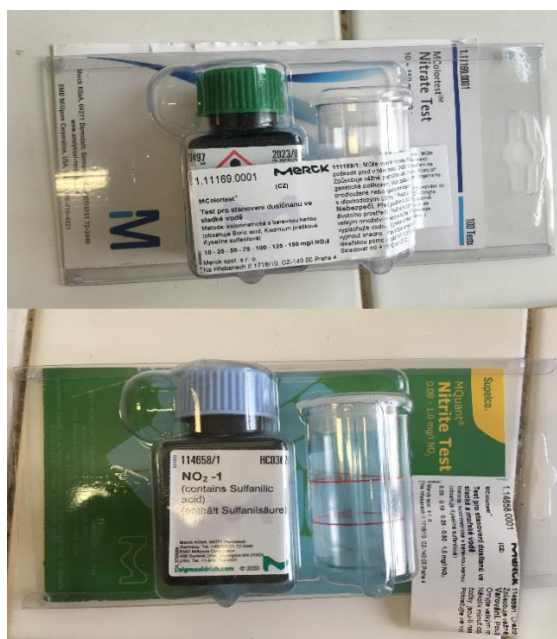
#### 3.4.1 Stanovení kalibračních křivek

Zásobní roztoky byly připravovány rozpuštěním, v případě peroxidu vodíku ředěním vypočítaného množství látky. Zásobní roztok byl připravován do litrové odměrné baňky. Navážka v případě dusičnanů byla vypočítána tak, aby zásobní roztok měl koncentraci  $100,0 \text{ mg NO}_3^- \cdot \text{l}^{-1}$  a v případě dusitanů byla z důvodu velmi malého množství navážka 10krát větší, takže byl roztok následně 10krát naředěn, čímž vznikl požadovaný zásobní roztok o koncentraci  $1,0 \text{ mg NO}_2^- \cdot \text{l}^{-1}$ . Koncentrace u zásobního roztoku peroxidu vodíku činila  $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Jednotlivá množství látek jsou uvedeny v tabulce 3. Po přípravě zásobních roztoků následovalo postupné ředění zásobního roztoku do 50 ml odměrných baněk. Koncentrační řady obsahovaly vždy deset bodů, u dusičnanů to byly koncentrace 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90 a  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Koncentrační řada u dusitanů se skládala z koncentrací 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 a  $1,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Kalibrační řada peroxidu vodíku byla 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 a  $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

**Tabulka 3** Navážky jednotlivých látek na přípravu kalibračních řad

Název látky	Množství
<b>Peroxid vodíku 30 %</b>	15,5 ml
<b>Dusičnan sodný</b>	137 mg
<b>Dusitan sodný</b>	15 mg

Po sestrojení koncentrační řady dusičnanů a dusitanů bylo z každého vzorku odebráno 5 ml, do kterého byla přidána činidla pro spektrofotometrickou analýzu. Činidla byla přidávána podle přesně daného postupu uvedeného u činidel značky Sigma-Aldrich, které jsou vidět na obrázku 6. U koncentrační řady peroxidu vodíku bylo vždy odebráno 2 ml vzorku a smíchán s 1 ml titanového činidla.



**Obrázek 6** Sada činidel pro stanovení dusičnanů a dusitanů

Postup v případě stanovování peroxidu vodíku:

- odběr 2 ml vzorku
- přidání 1 ml titanového činidla, protřepat
- po smíchání ihned analyzovat pomocí spektrometru

Postup v případě stanovování dusičnanů:

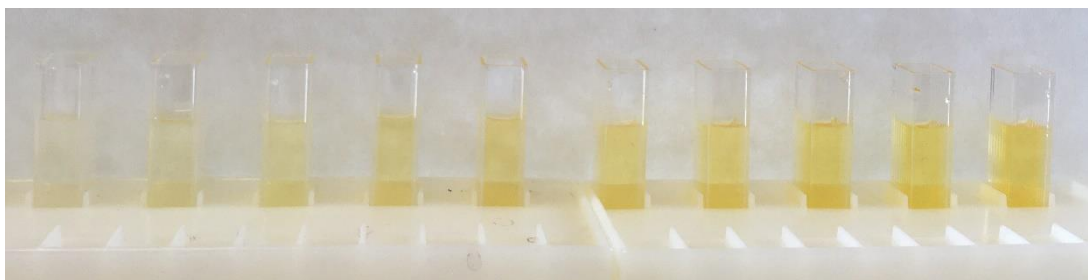
- odběr 5 ml vzorku
- přidání 2 odměrek činidla, po dobu 1 min třepat
- nechat 5 min odstát
- následně analyzovat na spektrometru

Postup v případě stanovování dusitanů:

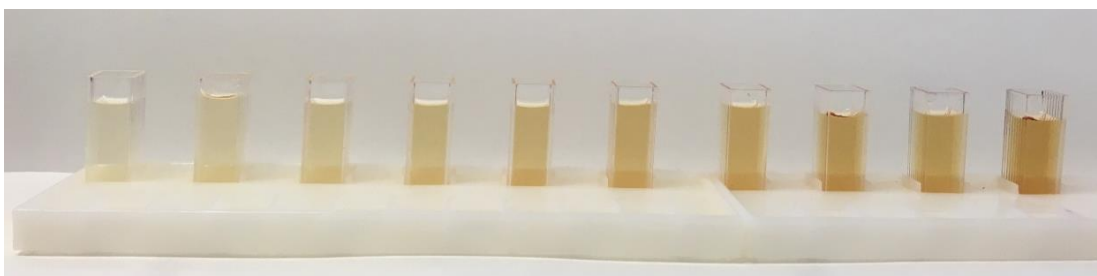
- odběr 5 ml vzorku
- přidání 1 odměrka činidla, potřepat
- nechat 5 min odstát
- poté analyzovat na spektrometru

Kalibrační řady byly měřeny pomocí UV-VIS spektrofotometrie vždy po smíchání roztoku o dané koncentraci s příslušným činidlem. U kalibračních řad bylo měřeno v širokém rozsahu absorpčního spektra 400–600 nm. U každé kalibrační řady se stanovovalo na blank, který byl vždy z destilované vody s přídavkem příslušného činidla, resp. u peroxidu vodíku 2 ml destilované vody a 1 ml titanového činidla a u dusičnanů a dusitanů 5 ml destilované vody s přídavkem činidla. Naměřená data byla zpracována do grafů pomocí programu Microsoft Excel Office 365, ze kterých byla určena maximální vlnová délka pro absorpci vzorku s daným činidlem. Kalibrační řady po smíchání s činidlem jsou vidět na obrázcích 7 až 9.

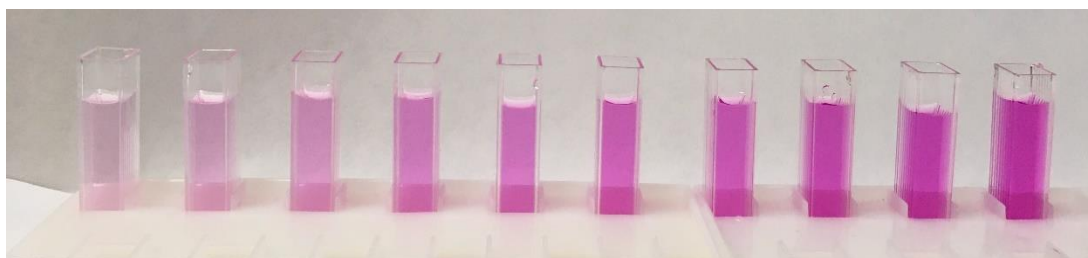




**Obrázek 7** Kalibrační řada peroxidu vodíku po smíchání s činidlem



**Obrázek 8** Kalibrační řada dusičnanů po smíchání s činidlem



**Obrázek 9** Kalibrační řada dusitanů po smíchání s činidlem

### **3.5 Metodika experimentů**

#### **3.5.1 Příprava PAW pomocí DBD s tekutou elektrodou**

Plazmatem aktivovaná voda byla připravována pomocí dielektrického bariérového výboje nad hladinou kapaliny. Aparatura k tomuto typu výboje se skládá z vysokofrekvenčního generátoru (Lifetech s.r.o.), spínacích hodin a reaktoru s Petriho miskou o objemu 75 ml. Na spínacích hodinách je nastaven interval 15–ti sekund. Celková doba ošetření plazmatem byla 2 minuty. Do Petriho misky, která je opatřena grafitovou elektrodou, je pomocí odměrného válce nalito 75 ml destilované, resp. kohoutkové vody. Petriho miska je potom položena na spodní desku DBD reaktoru a následně je přiklopena horní keramickou deskou s hliníkovou elektrodou. Mezi jednotlivými 15–ti sekundovými intervaly se musí horní elektroda otírat pomocí buničiny, aby nedocházelo ke změnám vlastností výboje v důsledku vlhkosti na elektrodě. U tohoto typu výboje vzniká plazma ionizací vzduchu v prostoru mezi vodní hladinou a horní keramickou deskou, takže se mimo jiné intenzivně generuje ozón. Fotografii aparatury nalezneme na obrázku 10.



**Obrázek 10** Systém pro přípravu PAW dielektrickým bariérovým výbojem s tekutou elektrodou. 1) spínací hodiny; 2) DBD reaktor s Petriho miskou o objemu 75 ml; 3) vysokofrekvenční zdroj napětí

### 3.5.2 Příprava PAW pomocí plazmové trysky ponořené do kapaliny

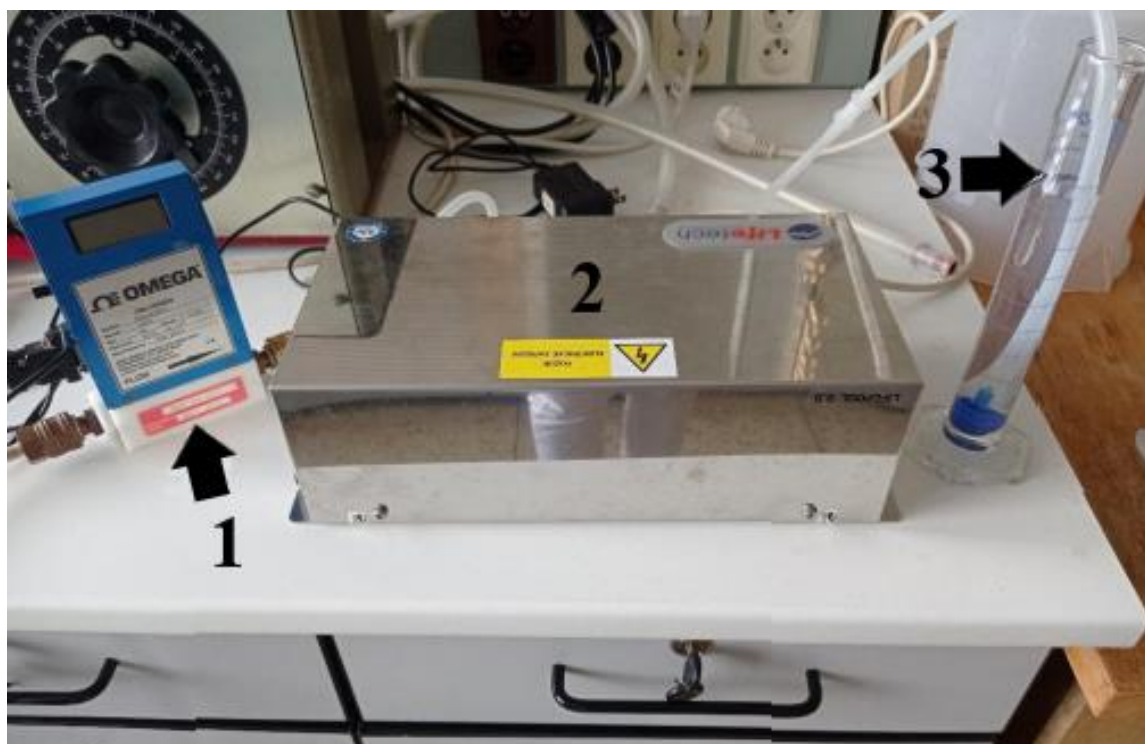
Aparatura k přípravě plazmatem aktivované vody za pomoci vysokofrekvenčního (VF) zdroje s kondenzátorem (Lifetech s.r.o.) a plazmové trysky se skládala z reaktoru, zdroje vysokého napětí a dvou elektrod. Jako reaktor byla použita kádinka obsahující destilovanou nebo kohoutkovou vodu o objemu 150 ml. Do příslušného roztoku byly ponořeny dvě elektrody. První hlavní elektrodu (plazmovou trysku) tvořil wolframový drát zasazený do keramické hlavice a skleněného držáku. Jako protielektroda sloužila plochá hliníková elektroda. Tryska byla zapojena ke zdroji střídavého napětí a hliníková elektroda byla zapojena k uzemnění. Celý reaktor se z důvodu bezpečnosti uzavíral plastovým krytem. Doba trvání výboje byla 2x1 minuta. Uspořádání aparatury je zachyceno na obrázku 11.



**Obrázek 11** Aparatura na přípravu PAW pomocí plazmové trysky ponořené do vody. 1) stojan s plazmovou tryskou ponořenou v kádince s vodou; 2) plazmová tryska; 3) hliníková elektroda; 4) kondenzátor; 5) VF zdroj střídavého napětí

### 3.5.3 Příprava PAW pomocí probublávání produktů DBD výboje

K přípravě plazmatem aktivované vody u tohoto typu výboje je zapotřebí aparatura, která se skládá ze dvou průtokoměrů, jedním protéká dusík o průtoku  $400 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  a druhým kyslík o průtoku  $100 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , poté z ozonizátoru (Lifetech s.r.o.) a ze vzduchového kamene. Vstupní ventil ozonizátoru byl pomocí silikonových hadiček napojen na oba průtokoměry, které byly připojeny k tlakovým lahvím. Výsledným smícháním obou plynů tak vznikl suchý vzduch s poměrem kyslíku ku dusíku 1:4. Na výstupní ventil ozonizátoru byla napojena teflonová hadička, na jejímž konci byl vzduchový kámen. Ten byl ponořen ke dnu odměrného válce, v němž bylo odměřeno 150 ml destilované, resp. kohoutkové vody. Po zapnutí aparatury začaly do vody probublávat produkty vznikající v ozonizátoru, především ozón. Celková doba působení plazmatu byla 2 minuty. Použitá aparatura je k vidění na obrázku 12.



**Obrázek 12** Systém k přípravě PAW probubláváním produktů dielektrického bariérového výboje do vody. 1) průtokoměr; 2) ozonizátor na principu dielektrického bariérového výboje; 3) odměrný válec se vzduchovým kamenem

### 3.5.4 Analytické stanovení reaktivních částic

U každého typu přípravy plazmatem aktivované vody byly odebírány vzorky ke stanovení vzniklých chemicky aktivních částic. Vzorky byly odebírány do zkumavek, kde byly následně smíchány s činidly a měřeny na spektrometru. Vždy, než byly vzorky proměřeny na UV-VIS spektrofotometru, byla také změřena jejich měrná vodivost a hodnota pH. V případě peroxidu vodíku byly odebírány 2 ml vzorku, u oxidů dusíku bylo odebíráno po 5 ml vzorku. Vzorky byly poté smíchány s činidly podle stejného postupu, který je uveden v kapitole 3.4.1.

Stanovení peroxidu vodíku proběhlo pomocí reakce s titanovým činidlem za vzniku komplexu kyseliny peroxotitanické, který má žluté zbarvení a lze jej stanovit při vlnové délce 407 nm. Metoda stanovení dusičnanů je založena na reakci, kde vznikají žluté soli kyseliny nitrosalicylové, které lze měřit při vlnové délce 526 nm. U dusitanů je jejich stanovení založeno na Griessově reakci. Griessovo činidlo reaguje za vzniku fialového azo produktu, který lze stanovit při vlnové délce 540 nm. Po změření absorbancí následovalo dosazení naměřených dat do rovnic kalibračních křivek, aby byla zjištěná koncentrace daných aktivních částic ve vzorku.

### 3.5.5 Studium stability částic v PAW

Součástí experimentální části bylo i zkoumání stability vzniklých aktivních částic PAW v průběhu času po přípravě. Zkoumalo se několik časových úseků. Nejprve byla změřena stabilita částic v průběhu jedné hodiny, poté následovalo měření stability po dobu 5-ti hodin, následně se zkoumala stabilita v rámci dnů, a nakonec se také měřila stabilita reaktivních částic po dobu 5-ti týdnů. Experimenty byly vždy provedeny pro destilovanou i kohoutkovou

vodu. Plazmatem aktivovaná voda byla vždy vyrobena na každém ze tří druhů systému. Protože veškeré reaktory mají objem pouze 150 ml, potřebná množství PAW byla vždy vyrobena na vícekrát a následně homogenizována smícháním, pro každý systém zvlášť, všech dávek dohromady. Vyrobena plazmatem aktivovaná voda byla skladována v uzavíratelných reagenčních lahvích v lednici a při laboratorní teplotě za tmy. Hned po přípravě PAW byla stanovena hodnota pH, vodivost a počáteční koncentrace vzniklých částic. Vzorky se poté odebíraly podle stanovených časových úseků a stanovovaly podle výše zmíněného postupu.

### 3.6 Testování antimikrobiální aktivity

Antimikrobiální aktivita připravené plazmaticky aktivované vody pomocí různých systémů byla testována na kvasinice *Candida glabrata* a na gramnegativní bakterii *Escherichia coli*. Oba mikroorganismy byly nakultivovány na tekutém živném médiu.

#### 3.6.1 Příprava živného média a kultivace mikroorganismů

Tekutá živná média byla připravena do Erlenmeyerových baněk o objemu 100 ml. Složení a potřebná množství surovin na přípravu živných médií je uvedeno v tabulce 4. Navážené množství surovin na přípravu média byla doplněna 50 ml destilované vody. Médium bylo sterilováno v tlakovém hrnci po dobu 45 min při teplotě 120 °C.

Před provedením antimikrobiálního testu bylo nejprve připraveno inokulum zaočkováním kultury do sterilního tekutého média. Mikroorganismus *Candida glabrata* se uchovává na pevné agarové plotně, proto se inokulum této kultury zaočkovává pomocí kličky z Petriho misky do připraveného tekutého živného média. Bakterie *Escherichia coli* se zaočkovává přidáním 1 ml kultury do připraveného živného média, neboť se uchovává v tekutém médiu. Po zaočkování probíhá kultivace po dobu 24 hodin na třepačce při teplotě 37 °C. Po uplynutí 24 hodin byl odebrán 1 ml inokula do nového sterilního tekutého média, se kterým byl následně proveden antimikrobiální test.

**Tabulka 4** Složení živných tekutých médií

Mikroorganismus	Složka média	množství
<i>Escherichia coli</i>	Nutrient Broth (NB)	25 mg·ml <sup>-1</sup>
	Destilovaná voda	50 ml
<i>Candida glabrata</i>	D-glukosa	20 mg·ml <sup>-1</sup>
	Pepton aus Casein	20 mg·ml <sup>-1</sup>
	Yeast Extrakt Powder	10 mg·ml <sup>-1</sup>
	Destilovaná voda	50 ml

#### 3.6.2 Testování antimikrobiální aktivity diluční metodou

Test na antimikrobiální aktivitu byl proveden na 96 jamkové mikrotitrační destičce. Do každé z jamek bylo napipetováno 50 µl vzorku PAW a 150 µl vhodného naředěného inokula. Blank byl připraven ze 150 µl kultury buněk a 50 µl destilované nebo kohoutkové vody. Antimikrobiální aktivita byla stanovena spektrofotometricky pomocí ELISA readeru při vlnové délce 630 nm v časech 0 a 24 hodin.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Prvním cílem této diplomové práce byla příprava plazmatem aktivované vody pomocí přímé i nepřímé interakce plazmatu s vodou nebo s povrchem kapaliny. Pro splnění zadání byly vybrány tři druhy přípravy PAW, a to zaprvé pomocí dielektrického bariérového výboje s tekutou elektrodou, za druhé pomocí plazmové trysky v kapalině s využitím vysokofrekvenčního zdroje napětí a posledním typem přípravy bylo probublávání produktů DBD výboje do vody, především O<sub>3</sub>. K ošetření plazmatem byla vybrána destilovaná a kohoutková voda. Připravená PAW byla poté charakterizována vybranými fyzikálně-chemickými vlastnosti, kterými jsou koncentrace peroxidu vodíku, dusičnanů a dusitanů a také stanovení hodnoty pH a měrné vodivosti.

V rámci této diplomové práce byla také zkoumána stabilita vzniklých reaktivních částic, a to vždy v závislosti na čase po přípravě a také na podmínkách skladování. Výsledky těchto měření slouží k tomu, abychom mohli zjistit, jak dlouho po přípravě si PAW uchovává své pozitivní účinky, a to i v závislosti na skladovacích podmínkách. Součástí práce byly i antimikrobiální testy. Naměřená data a výsledky byly zpracovány v programu Microsoft Excel Office 365. Veškeré výsledky měření jsou předloženy ve formě tabulek a grafů i s diskuzí.

### 4.1 Kalibrační přímky

Pro stanovení kalibračních přímek byla nejprve naměřena celá absorpční spektra pro všechny tři druhy částic. Absorpční spektrum je závislost absorbance na vlnové délce. Pro každou reakční částici se měřila koncentrační řada o 10 bodech. Po změření všech absorpčních spekter byla stanovena maximální vlnová délka, tzv. absorpční maximum, při kterém částice dosahovaly nejvyšší absorbance. Následná charakterizace vzniklých reakčních částic už poté probíhala při měření na fixní vlnové délce, absorpčním maximu, které bylo stanoveno z kalibračních spekter. Spektra byla měřena spektrofotometricky v rozsahu vlnových délek od 400 do 600 nm. Jako blank byla použita destilovaná voda s příslušným činidlem pro daný druh částice.

Z naměřených hodnot absorbance byly sestrojeny kalibrační přímky, které vyjadřují závislost absorbance na koncentraci. Abychom získali rovnici regrese, byla naměřená data proložena lineární spojnicí trendu. V níže uvedené tabulce 5 jsou uvedeny rovnice kalibračních přímek a korelační koeficienty. Také jsou v tabulce 5 uvedeny vlnové délky, při kterých probíhalo následné měření. Tyto rovnice poté byly využity ke stanovení koncentrací jednotlivých druhů částic.

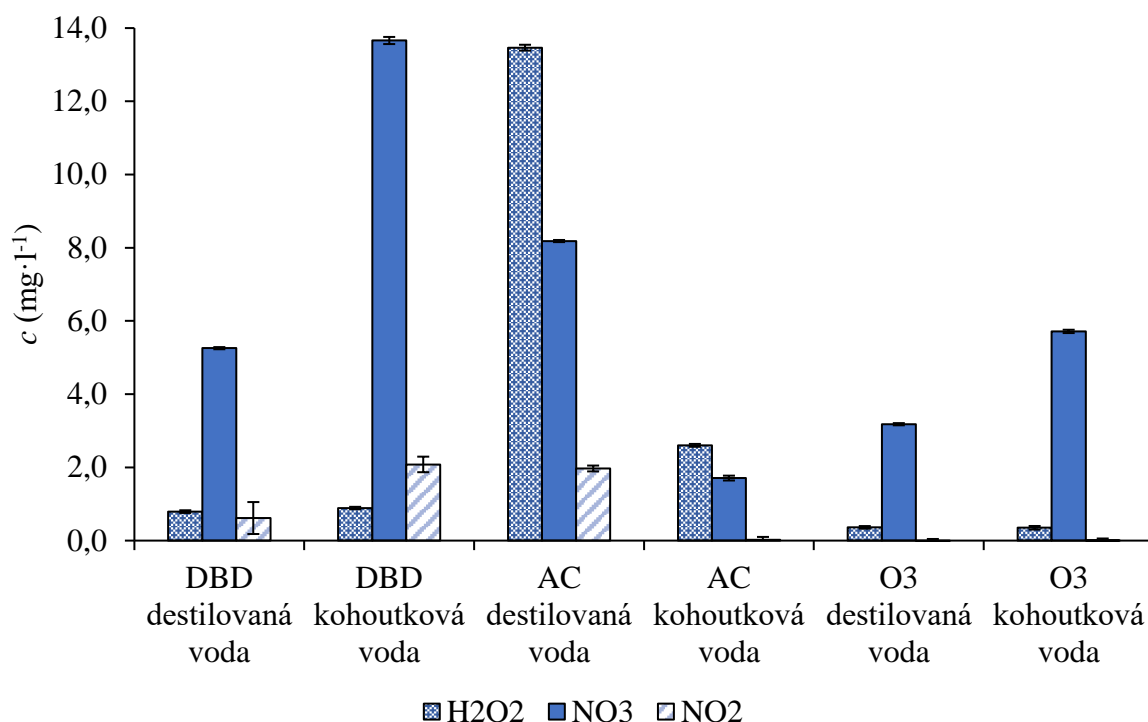
**Tabulka 5** Kalibrační přímky včetně vlnových délek pro měření koncentrací chemicky aktivních částic v PAW ( $A$  – absorbance při maximální vlnové délce,  $c$  – koncentrace v  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  pro  $\text{H}_2\text{O}_2$ , resp.  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  pro  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$ )

Aktivní částice	Rovnice kalibračních přímek	Korelační koeficient $R^2$	Vlnová délka pro maximální absorpci (nm)
<b>Peroxid vodíku</b>	$A = 0,4094c$	$R^2 = 0,9992$	407
<b>Dusičnany</b>	$A = 0,0026c$	$R^2 = 0,9973$	526
<b>Dusitany</b>	$A = 0,9191c$	$R^2 = 0,9997$	540

## 4.2 Charakterizace částic v PAW

Na níže uvedeném grafu (obrázek 13) jsou uvedeny průměrné koncentrace vzniklých reaktivních částic ve všech typech připravených PAW včetně směrodatných odchylek. Koncentrace peroxidu vodíku byla pro porovnání přepočtena z  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  na  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  vynásobením molekulovou hmotností ( $M_{\text{H}_2\text{O}_2} = 34 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Z grafu je patrné, že ve všech typech PAW jsou nejvíce zastoupeny dusičnany, kromě systému s vysokofrekvenčním zdrojem AC, zde převládá peroxid vodíku. Všechny PAW obsahují nízké koncentrace peroxidu vodíku, ale nejvíce ho nalezneme při přípravě PAW pomocí plazmové trysky s vysokofrekvenčním AC zdrojem. Dusitany se nejvíce generovaly při výrobě PAW pomocí DBD s tekutou elektrodou, větší koncentraci také najdeme u AC výboje v destilované vodě.

Aktivace všech typů PAW jak u destilované, tak i u kohoutkové vody trvala vždy 2 minuty. U způsobu přípravy pomocí DBD probíhala aktivace po 15–ti sekundových intervalech z důvodu případného osušení dielektrické desky. U plazmové trysky s AC zdrojem probíhala aktivace po 1 minutovém intervalu a u probublávání  $\text{O}_3$  a dalších produktů trvala aktivace PAW kontinuálně celé 2 minuty.



**Obrázek 13** Zastoupení jednotlivých částic ve všech typech PAW

### 4.3 Aktivace PAW pomocí DBD s tekutou elektrodou

Jako první typ přípravy PAW byl zvolen dielektrický bariérový výboj s tekutou elektrodou za atmosférického tlaku. Tento typ výboje řadíme do přímé interakce plazmatu s povrchem kapaliny, resp. destilované a kohoutkové vody. U všech typů příprav PAW byly stanoveny tři reaktivní částice, také byla zkoumána jejich stabilita v závislosti na čase, která je uvedena v grafech níže.

Vzhledem k citlivosti připravené PAW na podmínky generace byly vzorky připraveny v několika opakováních, z nichž byly spočteny průměrné hodnoty koncentrací jednotlivých částic. Tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulce 6 včetně směrodatných odchylek.

**Tabulka 6** Průměrné koncentrace vzniklých reaktivních částic v PAW připravené pomocí DBD

koncentrace částic	PAW			
	destilovaná voda		kohoutková voda	
	pokojevá teplota	lednice	pokojevá teplota	lednice
<b>Peroxid vodíku</b> (mmol·l <sup>-1</sup> )	0,022 ± 0,007	0,025 ± 0,006	0,021 ± 0,013	0,022 ± 0,010
<b>Dusičnany</b> (mg·l <sup>-1</sup> )	6,0 ± 2,0	5,0 ± 3,0	12,0 ± 6,0	15,0 ± 7,0
<b>Dusitany</b> (mg·l <sup>-1</sup> )	0,5 ± 0,2	0,7 ± 0,2	1,9 ± 0,6	2,2 ± 0,5



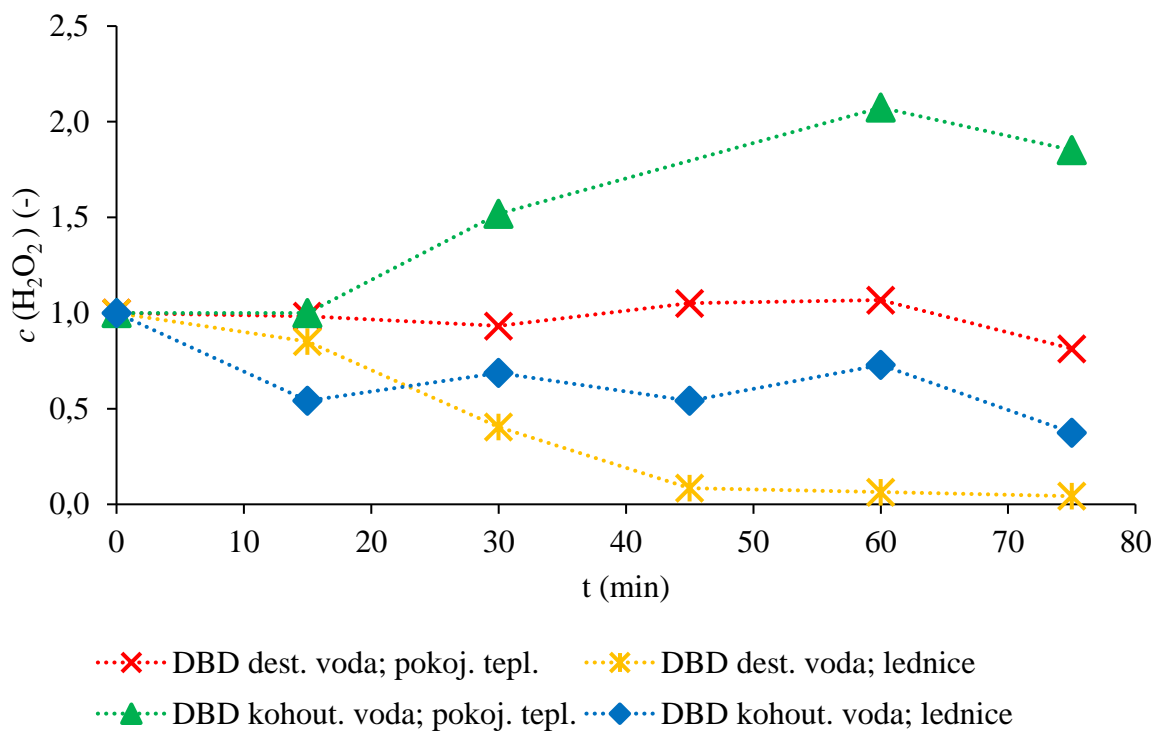
U každé přípravy PAW byla sledována koncentrace peroxidu vodíku, dusičnanů a dusitanů a také jejich stabilita v průběhu několika časových úseků. Byla sledována krátkodobá stabilita v rámci jedné hodiny po přípravě, poté změna koncentrace v průběhu 5–ti hodin od přípravy. Další charakterizace stárnutí probíhala v několika dnech a poté i v týdnech. PAW byla připravována do uzavíratelných zásobních lahví, které byly skladovány v lednici nebo při laboratorní teplotě, v obou případech za tmy. Po přípravě byla vždy stanovena počáteční koncentrace reaktivních částic, aby bylo možné sledovat změnu koncentrace v daném čase. Pro porovnání koncentrací reaktivních částic z hlediska časové stability po přípravě byly hodnoty normalizovány s ohledem na počáteční koncentraci bezprostředně po aktivaci.

Koncentrace byla vypočítána pomocí naměřené absorbance dosazené do kalibrační rovnice. U kohoutkové vody byla před aktivací plazmatem stanovena počáteční hladina koncentrace dusičnanů. Z grafů uvedených níže a poté i v příloze můžeme vidět, že se koncentrace jednotlivých částic mění. Nejistota měření se pohybuje v úrovni 1 %, tudíž není v následujících grafech patrna. Peroxid vodíku má dvojitý charakter, může se chovat jako oxidační i redukční činidlo, proto vidíme změnu koncentrací u všech částic.

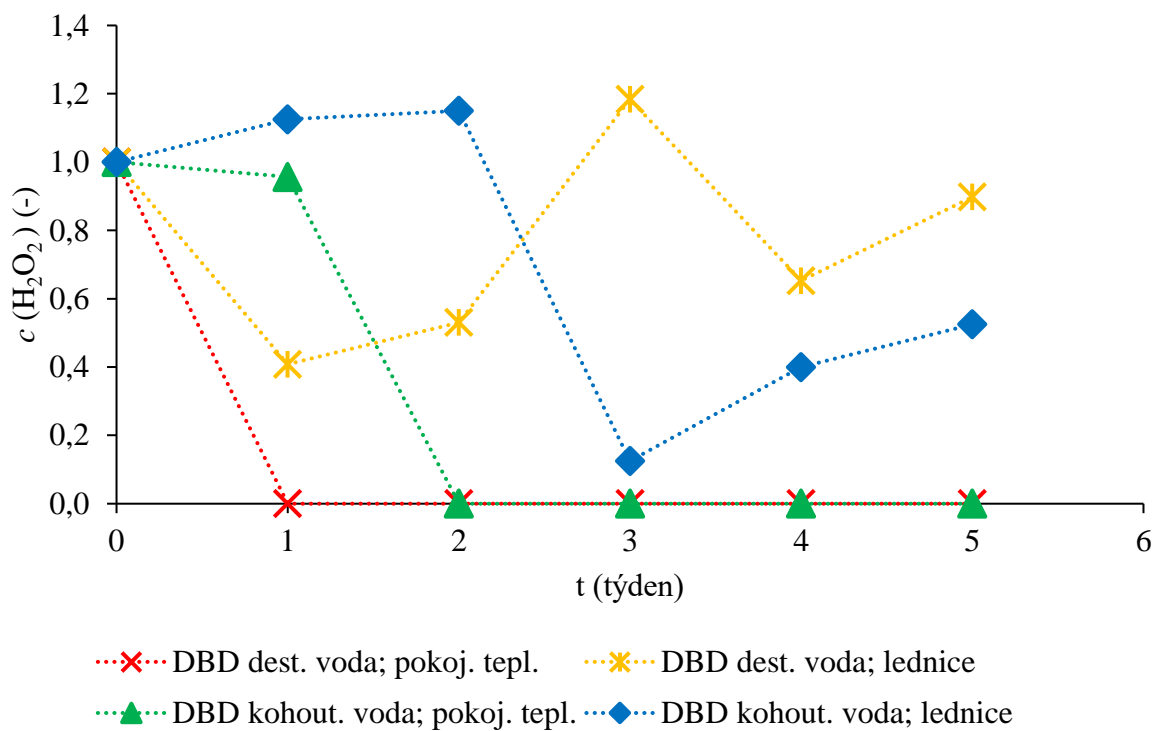
Byl porovnáván vliv skladovacích podmínek na změnu koncentrace v obou případech použité vody. Jak je patrné z grafu (obrázek 14), v průběhu první hodiny po přípravě pomocí DBD s tekutou elektrodou se koncentrace peroxidu vodíku značně mění. To může být způsobeno ještě dobíhajícími ději, které vznikají při výboji. Ale můžeme říct, že v průběhu první hodiny v několika případech koncentrace peroxidu vodíku výrazně klesá u skladování PAW z destilované vody v lednici, naopak roste u PAW z kohoutkové vody při pokojové teplotě. Po aktivaci pomocí tohoto plazmového systému se peroxid vodíku zcela rozloží za pokojové teploty skladování do dvou týdnů (obrázek 15), zatímco při uchovávání v lednici je přítomen ještě po 5 týdnech od výroby, a to jak v destilované, tak v kohoutkové PAW.

Koncentrace vyprodukovaných dusičnanů se nejprve v krátkodobém časovém horizontu nemění (obrázek 27 v příloze), v delším časovém horizontu ale klesá (obrázek 16) a to dokonce u destilované vody až k hodnotě 0 po necelém týdnu, následně ale opět vzrůstá a PAW si udrží jejich koncentraci i po 5 týdnech. Z grafu (obrázek 17) je patrné, že pro zachování koncentrace dusitanů v kohoutkové vodě je vhodné připravenou PAW skladovat nikoliv v lednici, ale při pokojové teplotě. I přes to koncentrace dusitanů klesá, ale pouze mírně, a po 5 týdnech je stále přítomno přes 50 % původní koncentrace.

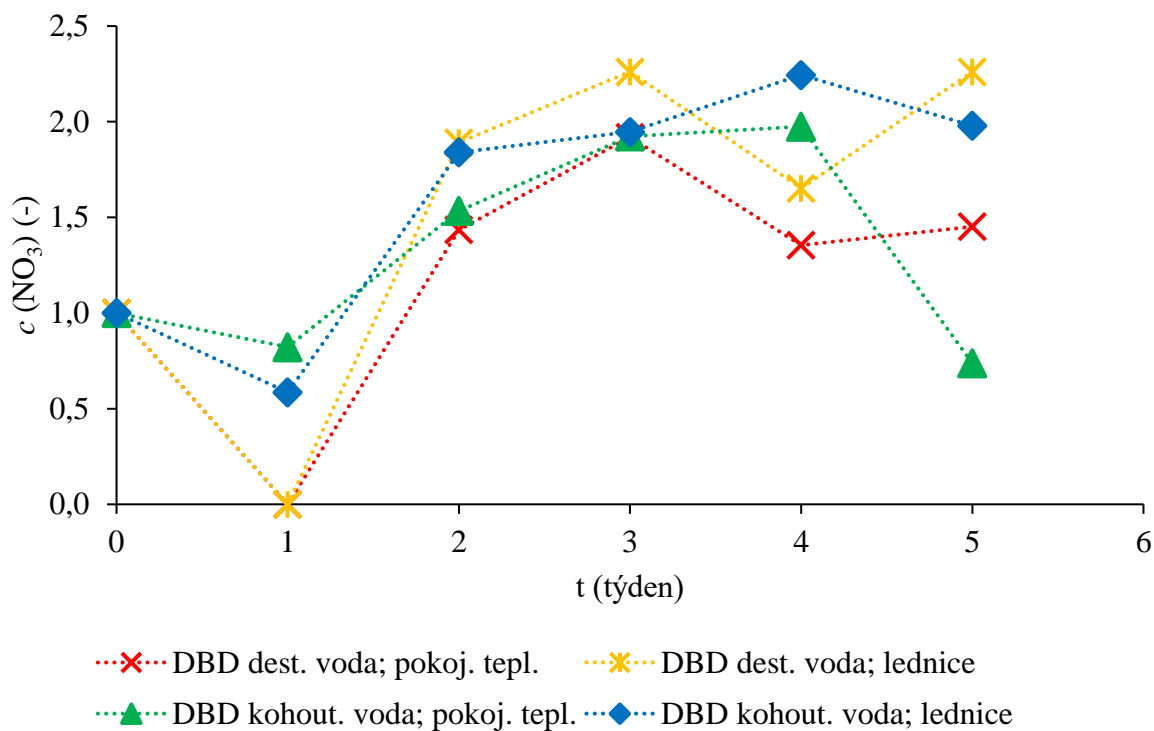
Na závěr této kapitoly je pro lepší porovnání vložen graf (obrázek 18), kde jsou sledovány koncentrace jednotlivých reaktivních částic u jednoho typu vody a při jednom druhu skladování. Jedná se o PAW připravenou pomocí DBD s tekutou elektrodou z destilované vody skladovanou v lednici. Z grafu je patrné, že se koncentrace všech tří částic mění. Nejpodstatnější změna je u dusičnanů, kde vidíme růst koncentrace oproti ostatním druhům částic, jejichž koncentrace mírně klesá a i po 5 týdnech je stále na více než 50 % původní hodnoty.



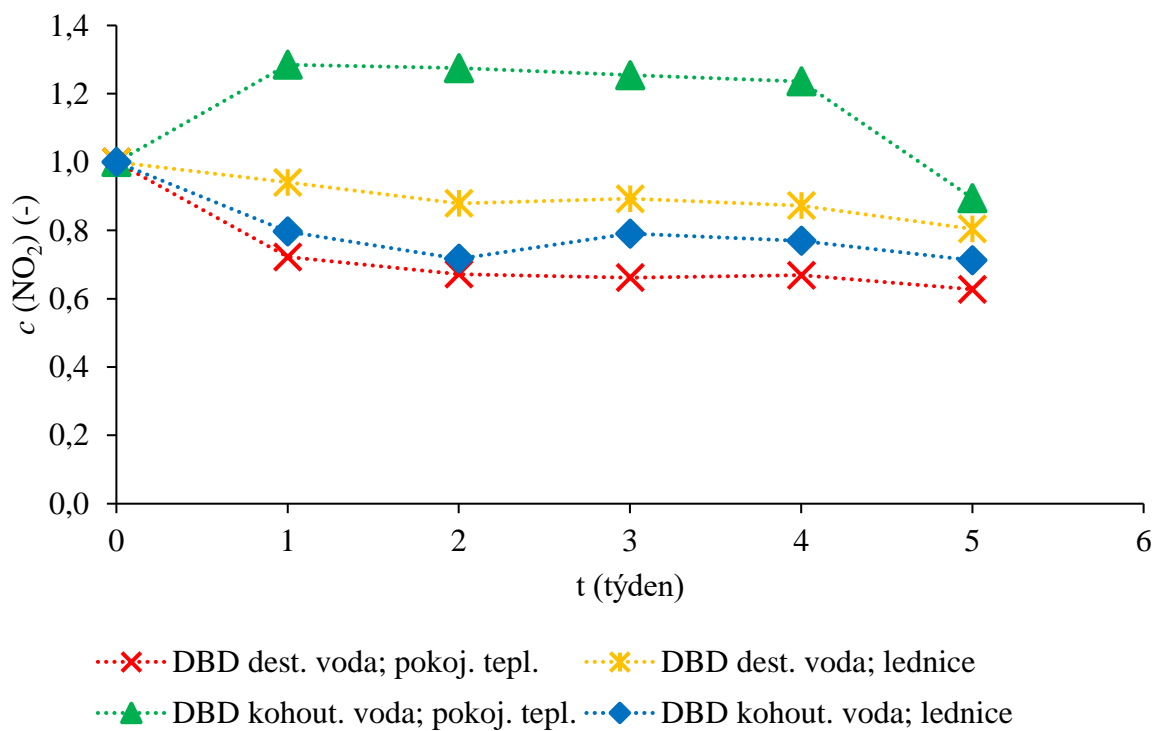
**Obrázek 14** Porovnání krátkodobé změny koncentrace peroxidu vodíku v PAW připravené pomocí DBD



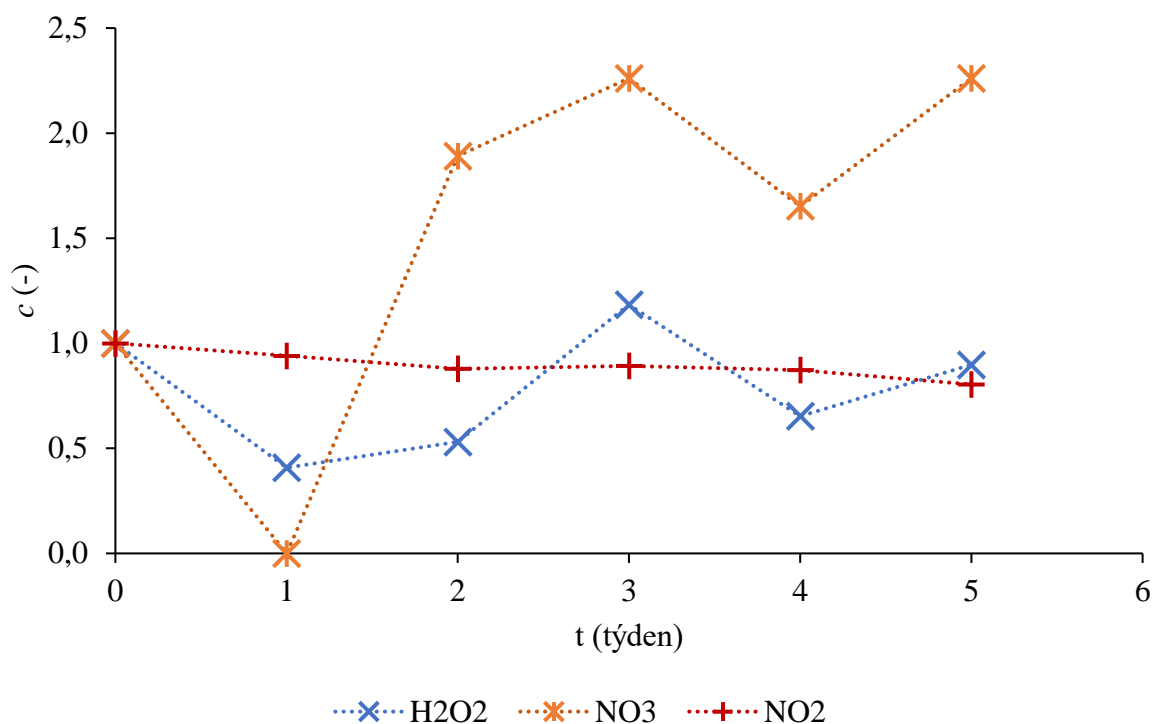
**Obrázek 15** Změna koncentrace peroxidu vodíku v PAW připravené pomocí DBD v průběhu několika týdnů



**Obrázek 16** Změna koncentrace dusičnanů v PAW připravené pomocí DBD v průběhu několika týdnů



**Obrázek 17** Změna koncentrace dusitanů v PAW připravené pomocí DBD v průběhu několika týdnů



**Obrázek 18** Porovnání všech reaktivních částic vyrobených pomocí DBD s tekutou elektrodou v dlouhodobém měřítku pro destilovanou vodu skladovanou v lednici

#### 4.4 Aktivace PAW pomocí AC výboje v kapalině

Druhým typem výboje byla plazmová tryska s vysokofrekvenčním zdrojem napětí ponořená do vody. Při tomto typu výboje dochází k přímé interakci plazmatu v kapalině, protože plazmová tryska je přímo ponořená do kapaliny. Aktivace probíhala na destilované i kohoutkové vodě, ošetření plazmatem trvalo celkově 2 minuty. Výboj trval vždy minutu, poté se kapalina zamíchala a následovala další minuta ošetřování plazmatem. Průměrné počáteční koncentrace vzniklých aktivních částic jsou shrnuty do tabulky 7.

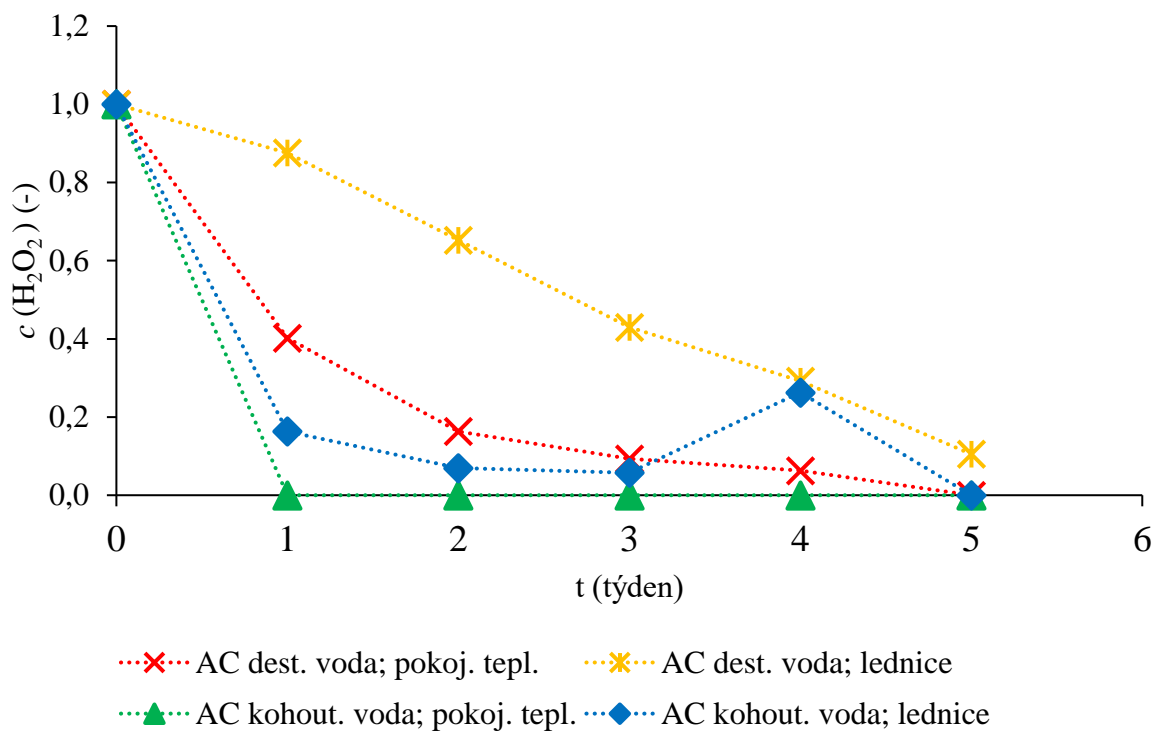
**Tabulka 7** Průměrné počáteční koncentrace aktivních částic po přípravě PAW

koncentrace částic	PAW			
	destilovaná voda		kohoutková voda	
	pokojová teplota	lednice	pokojová teplota	lednice
<b>Peroxid vodíku</b> (mmol·l <sup>-1</sup> )	0,40 ± 0,05	0,39 ± 0,04	0,06 ± 0,07	0,04 ± 0,02
<b>Dusičnany</b> (mg·l <sup>-1</sup> )	9,0 ± 4,0	8,0 ± 2,0	1,0 ± 4,0	2,0 ± 3,0
<b>Dusitany</b> (mg·l <sup>-1</sup> )	2,0 ± 0,2	2,09 ± 0,11	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,01

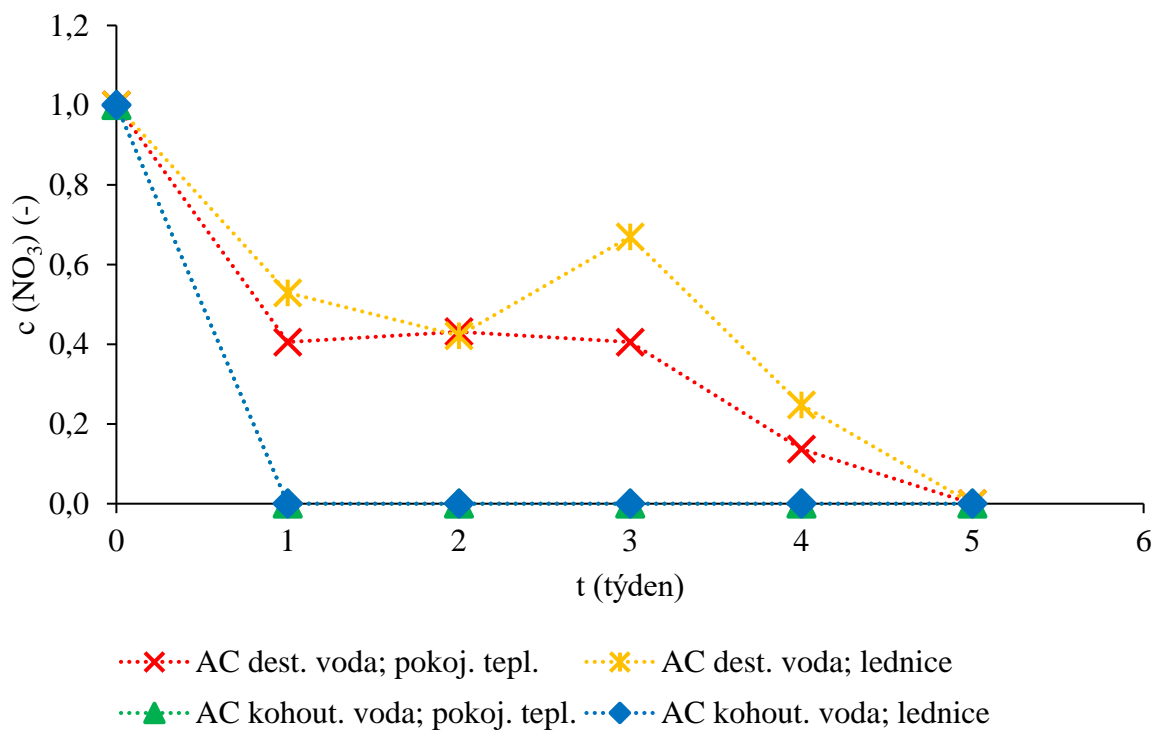
U AC výboje ve vodě jsou poměrně hojně zastoupeny všechny typy sledovaných aktivních částic, aspoň tedy u destilované vody. V kohoutkové vodě jsou koncentrace o dost nižší, je to pravděpodobně způsobeno obtížnějším zapálením výboje. Když porovnáme tento typ výboje s předchozím DBD, dojdeme k závěru, že u tohoto typu výboje je dominantnější koncentrace peroxidu vodíku, a to u destilované i kohoutkové vody. Co se týče koncentrace dusičnanů, tak i v tomto případě nalezneme u destilované vody vyšší koncentraci. U kohoutkové vody nalezneme po aktivaci PAW více dusičnanů u DBD. Při srovnání dusitanů znovu dojdeme k závěru, že je to obdobně jako případě dusičnanů. Stanovení koncentrací a stabilit reaktivních částic v grafickém znázornění i s detailnějším popisem jsou uvedeny v příloze.

Peroxid vodíku z hlediska krátkodobého pozorování výrazně nemění svoji koncentraci bez ohledu na druh vody nebo typ skladování. Změna nastává až u druhé týdne od výroby, kdy už u kohoutkové vody není přítomen ani v lednici nebo při pokojové teplotě. Dusičnany oproti tomu drží svoji koncentraci pouze v destilované vodě, ale jen po dobu jednoho týdne. Dusitany jsou přítomny v PAW z destilované vody po dobu několika dní bez ohledu na typ skladování, potom se jejich přítomnost ztrácí. V kohoutkové vodě tyto částice najdeme i po 5-ti týdnech od aktivace. V několika případech je koncentrace některých částic v kohoutkové vodě pod mezí detekce.

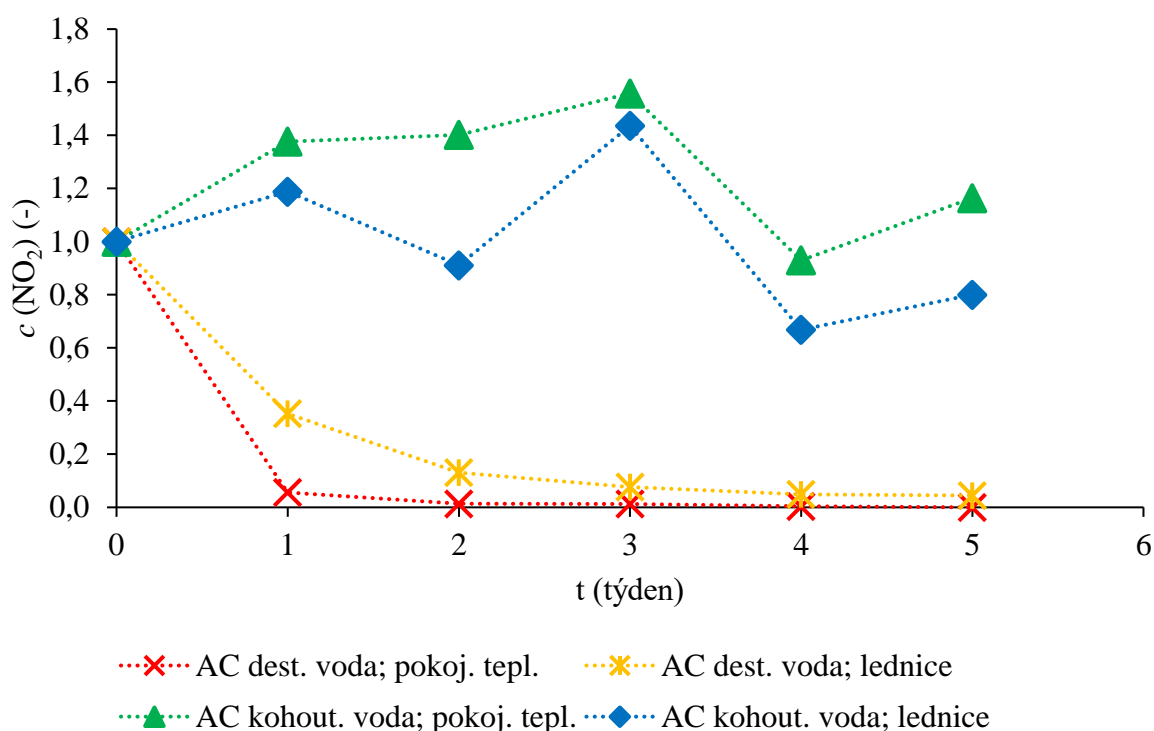
Plazmatem aktivovaná voda z tohoto typu plazmového systému není příliš vhodná na dlouhodobé skladování (obrázek 19 a 20). Většina částic nebyla přítomna v PAW už po 1 týdnu bez ohledu na typ skladování. Jedinou výjimku tvoří PAW z kohoutkové vody, která si uchovala koncentraci dusitanů po celou dobu experimentu (obrázek 21). Když to porovnáme se systémem DBD s tekutou elektrodou, tak zde byly všechny částice přítomny po celý experiment v závislosti na druhu PAW a skladování. Lze tedy říci, že PAW připravená výbojem v kapalině produkuje zvýšené množství reaktivních částic, ale není z dlouhodobého hlediska stabilní, je tedy potřeba ji aplikovat v co nejkratším čase po přípravě (v řádu hodin).



**Obrázek 19** Dlouhodobá stabilita peroxidu vodíku v PAW připravené v systému AC výboje v kapalině



**Obrázek 20** Dlouhodobá stabilita dusičnanů v PAW připravené v systému AC výboje v kapalině



**Obrázek 21** Dlouhodobá stabilita dusitanů v PAW připravené v systému AC výboje v kapalině

#### 4.5 Aktivace PAW pomocí probublávání produktů výboje ( $O_3$ )

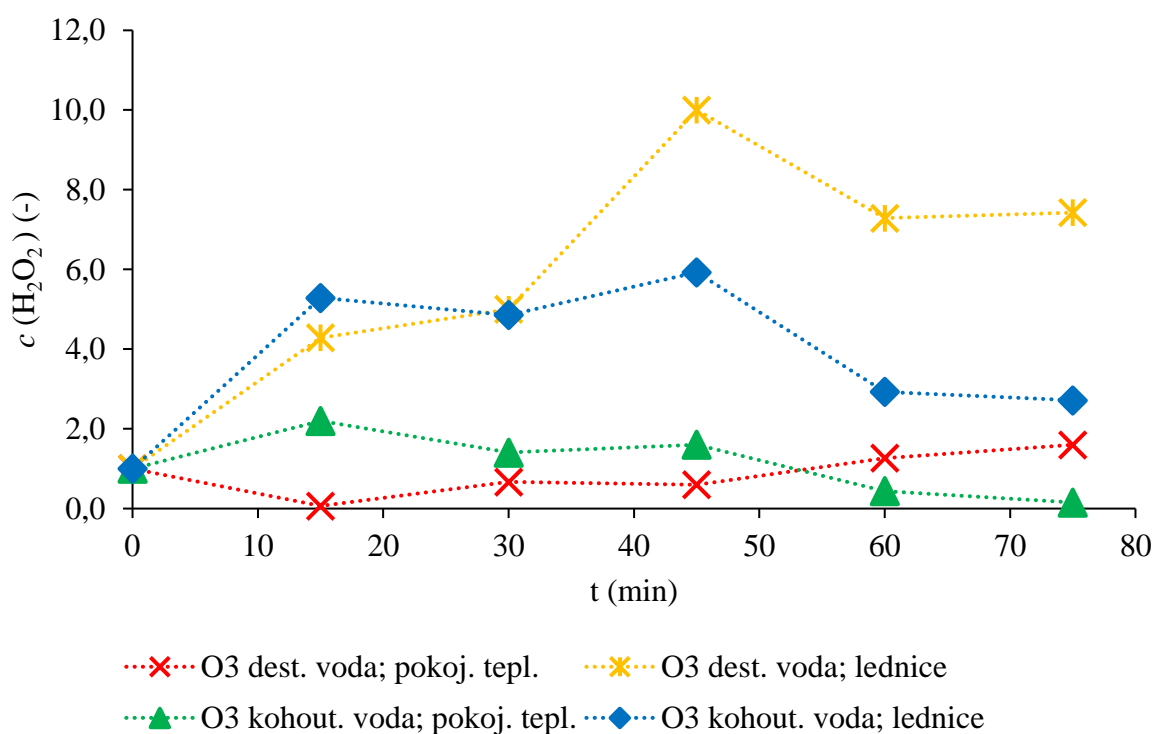
Posledním typem výboje je probublávání plynných produktů vzniklých ve výboji v ozonizátoru ze směsi dusíku a kyslíku do kapaliny. V tomto případě plazma není v kontaktu s kapalinou. Plazmatem aktivovaná voda byla vyráběna z destilované i kohoutkové vody. Délka výboje trvala 2 minuty bez přerušení. Pro porovnání byly i u tohoto výboje shrnuty počáteční koncentrace aktivních částic. Hodnoty nalezneme v tabulce 8.

**Tabulka 8** Průměrné hodnoty koncentrací bezprostředně po aktivaci plazmatem

koncentrace částic	PAW			
	destilovaná voda		kohoutková voda	
	pokojevá teplota	lednice	pokojevá teplota	lednice
<b>Peroxid vodíku</b> ( $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	$0,01 \pm 0,02$	$0,01 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,02$	$0,01 \pm 0,01$
<b>Dusičnany</b> ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )	$3,0 \pm 2,0$	$4,0 \pm 1,0$	$6,0 \pm 4,0$	$6,0 \pm 2,0$
<b>Dusitany</b> ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )	pod mezí detekce	pod mezí detekce	$0,003 \pm 0,02$	pod mezí detekce

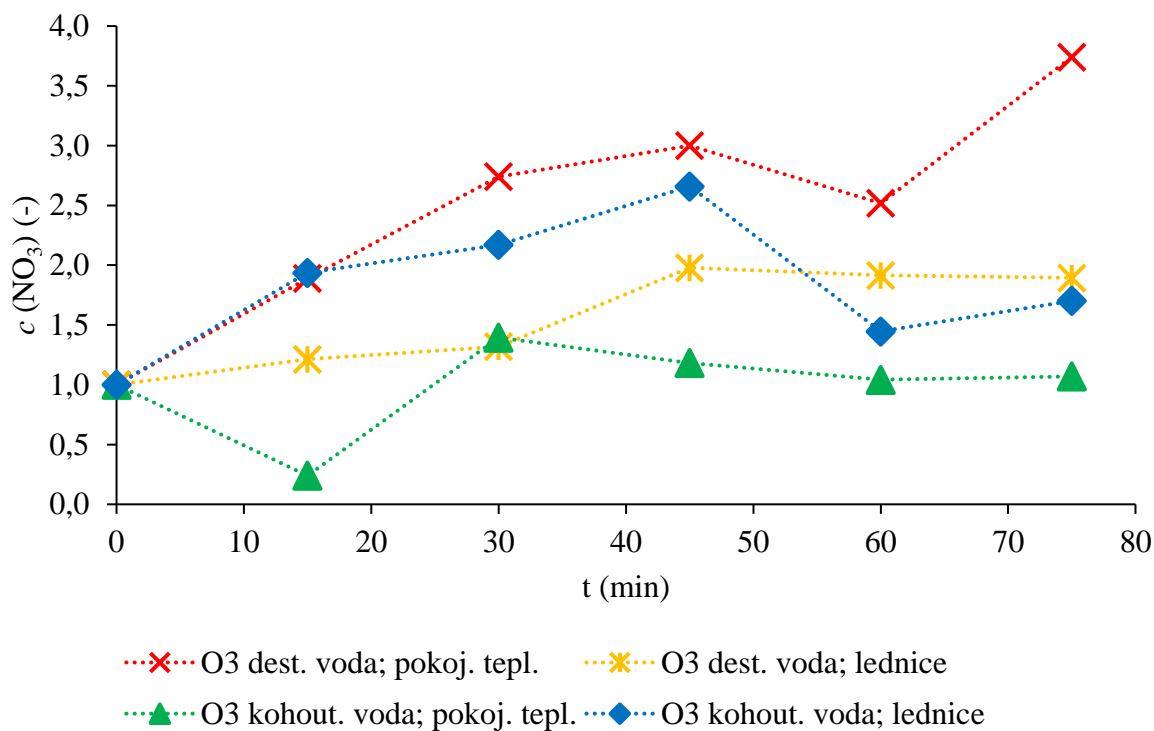
Z naměřených hodnot hned poznáme, že oproti předchozím typům výboje zde nevznikají všechny druhy částic. Také je vidět, že zde vznikají reaktivní částice v podstatně nižších koncentracích oproti DBD a AC. Detailnější grafický vývoj koncentrací v závislosti na čase a teplotě skladování je uveden v příloze.

Nejzajímavější vývoj koncentrací u všech částic je v průběhu prvních pár hodin po aktivaci, kde díky dobíhajícím reakcím rozpuštěných produktů koncentrace roste (obrázek 22 a 23). Pro generaci dusitanů toto není vhodný plazmový systém, protože se žádné dusitany nevygenerovaly a ani následně nedogenerovaly, neboť jejich koncentrace byla pod mezí detekce. Naopak dusičnany se objevují v PAW ještě po dobu 3 týdnů (obrázek 24). Pokud budeme PAW z destilované vody skladovat v lednici, zajistíme si tak přítomnost peroxidu vodíku i po 5–ti týdnech od výroby (obrázek 44 a 45 v příloze).

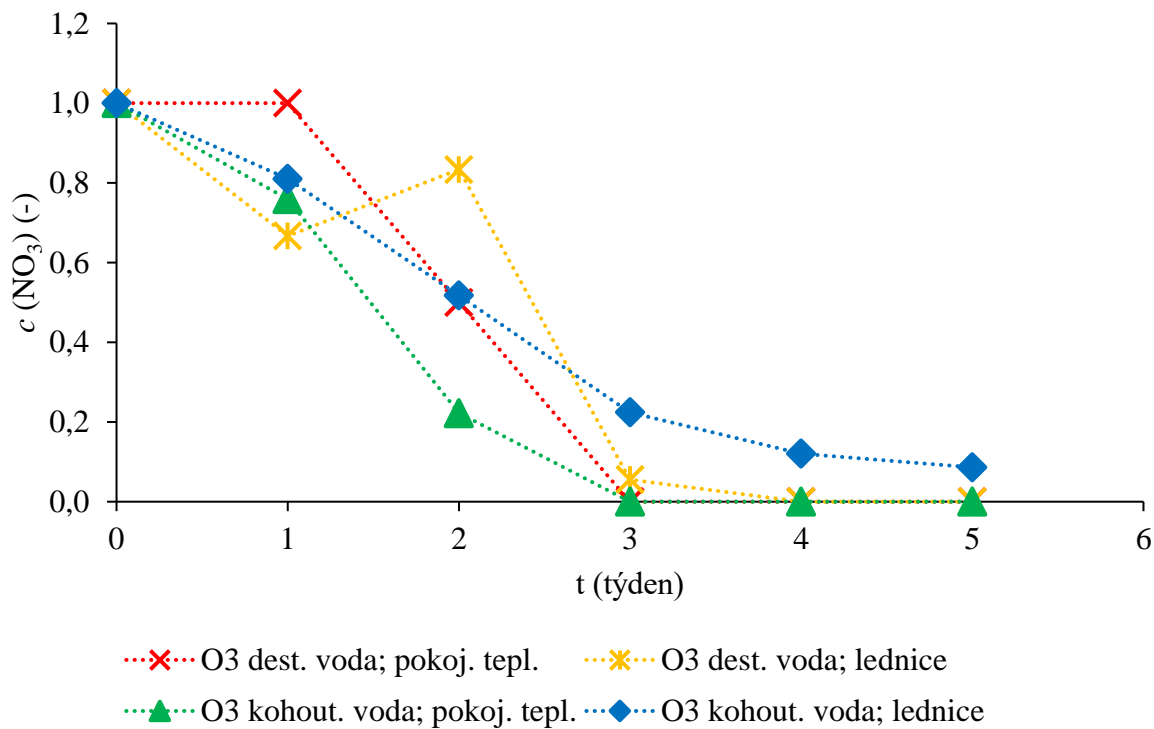


**Obrázek 22** Koncentrace peroxidu vodíku v PAW připravené probubláváním produktů výboje v průběhu první hodiny od přípravy





**Obrázek 23** Koncentrace dusičnanů v PAW připravené probubláváním produktů výboje v průběhu první hodiny od přípravy



**Obrázek 24** Dlouhodobá stabilita dusičnanů v PAW připravené probubláváním produktů výboje

## 4.6 Změny fyzikálně–chemických vlastností a jejich vliv na stabilitu PAW

### 4.6.1 Změna pH

Aktivací PAW se hodnota pH změnila, a to v závislosti na typu systému. Počáteční hodnoty pH před ošetřením plazmatem jsou uvedeny v tabulce 9. Obecně hodnota pH klesala, a to nejvíce u destilované vody u všech tří systémů, nejmenší změna nastala u probublávání O<sub>3</sub> a dalších produktů. U kohoutkové vody nejsou tak výrazné změny v hodnotách pH, pouze u probublávání O<sub>3</sub> a dalších produktů se hodnota pH mírně zvýšila, jinak zůstávala okolo počáteční hodnoty. Změna pH byla také sledována v průběhu všech nastavených časových intervalů. Průměrné hodnoty pH po aktivaci nalezneme v tabulce 10.

**Tabulka 9** Počáteční hodnoty pH před aktivací plazmatem

	pH
<b>Destilovaná voda</b>	8,77 ± 0,02
<b>Kohoutková voda</b>	7,88 ± 0,07

**Tabulka 10** Průměrné hodnoty pH bezprostředně po aktivaci PAW

hodnota pH	PAW			
	destilovaná voda		kohoutková voda	
	pokojevá teplota	lednice	pokojevá teplota	lednice
<b>DBD</b>	4,7 ± 0,4	5,1 ± 1,1	7,9 ± 0,2	7,9 ± 0,3
<b>AC</b>	4,6 ± 0,1	4,7 ± 0,3	8,0 ± 0,1	7,9 ± 0,3
<b>O<sub>3</sub></b>	5,8 ± 0,1	5,7 ± 0,8	8,7 ± 0,1	8,1 ± 0,5

U aktivace PAW pomocí DBD s tekutou elektrodou byly při dlouhodobém zkoumání zaznamenány výraznější změny v hodnotách pH u PAW připravené z destilované vody. Nárůst hodnot pH při skladování po dobu 5–ti týdnů byl v průměru o 17 % u aktivace destilované vody. U kohoutkové vody byl při skladování při pokojové teplotě zaznamenán mírný nárůst o 11 %. U druhé kohoutkové vody skladované v lednici hodnoty pH poklesy o 8 %. Oproti tomu v průběhu první hodiny je patrný mírný růst u aktivace kohoutkové vody v průměru o 8 %. U aktivace destilované vody můžeme pozorovat mírný pokles, a to v průměru o téměř 10 %. V hodinovém horizontu jsou zaznamenány nárůsty hodnot pH u kohoutkové vody, také v průměru o necelých 10 % a u destilované vody nejsou zaznamenány významnější změny. Dá se tedy říci, že pH PAW z destilované vody skladované v lednici nejprve ještě klesá, pak se nemění a následně v horizontu týdnů roste. Zatímco při pokojové teplotě u kohoutkové vody pH roste, u skladování v lednici se pH nejprve navyšuje a potom klesá.

U druhé přípravy PAW pomocí plazmové trysky v kapalině se zdrojem AC byly v průběhu první hodiny zaznamenány změny hodnot pH pouze u aktivace kohoutkové vody, v průměru o 8 % vzrostly. V rámci několika hodin nebyly v případě aktivace destilované vody opět zaznamenány změny, u druhé vody vzrostly hodnoty pH téměř o 7 %. Při měření stability v horizontu dnů byly poprvé viděny změny hodnot pH u destilované vody, při skladování

v lednici byl zaznamenán růst hodnot o 50 % a při pokojové teplotě se pH změnilo o 6 % směrem k zásaditější oblasti. U kohoutkové vody v rámci dnů se výrazně změnilo pH pouze při skladování v lednici, a to směrem ke kyselější oblasti. Z dlouhodobého hlediska se opakují stejné trendy při změně hodnot pH jako v případě předchozího měření.

U posledního typu přípravy PAW při aktivaci v destilované vodě ještě přibližně hodinu dobíhají reakce rozpuštěného ozónu a dalších produktů výboje, proto je zaznamenán pokles pH o 12 %, následně ale při skladování hodnota pH roste, a to v průběhu týdnů o 36 %. U kohoutkové vody nejsou výrazné změny pH.

#### 4.6.2 Změna vodivosti

Po aktivaci je vidět u všech systémů zvýšení vodivosti, což je zapříčiněno disociací a ionizací molekul vody, díky které dochází k produkci iontů a jiných částic. Pro přehlednost jsou v tabulce 11 uvedeny hodnoty měrné vodivosti před aktivací plazmatem. Do následující tabulky 12 byly vypočítány průměrné hodnoty měrné vodivosti ihned po aktivaci vody pomocí plazmatu. Na první pohled je vidět rozdíl mezi destilovanou a kohoutkovou vodou. Destilovaná voda po aktivaci plazmatem má hodnotu vodivosti řádově jen v desítkách  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ , oproti tomu kohoutková voda se pohybuje už řádu stovek  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Když porovnáme hodnotu vodivosti před a po aktivaci plazmatem, vidíme, že se v závislosti na systému mění. U všech systému vidíme nárůst vodivosti, největší je ale zaznamenán u DBD s tekutou elektrodou u destilované i kohoutkové vody.

**Tabulka 11** Hodnoty měrné vodivosti před aktivací plazmatem

	$G (\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1})$
<b>Destilovaná voda</b>	$1,17 \pm 0,05$
<b>Kohoutková voda</b>	$462,0 \pm 2,0$

**Tabulka 12** Průměrné hodnoty měrné vodivosti u všech typů výboje bezprostředně po přípravě PAW

$G (\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1})$	PAW			
	destilovaná voda		kohoutková voda	
	pokojová teplota	lednice	pokojová teplota	lednice
<b>DBD</b>	$29 \pm 14$	$24 \pm 10$	$510 \pm 40$	$510 \pm 40$
<b>AC</b>	$29 \pm 3$	$30 \pm 5$	$480 \pm 40$	$490 \pm 30$
<b>O<sub>3</sub></b>	$12 \pm 8$	$13 \pm 8$	$490 \pm 30$	$480 \pm 30$

V systému DBD s tekutou elektrodou se hodnota měrné vodivosti aktivací zvýšila, ale během následného skladování nedocházelo k její výrazné změně. Změna je pozorována pouze u systému probublávání produktů výboje, kdy po ukončení aktivace probíhají reakce rozpuštěných produktů ještě přibližně další hodinu, což je pozorováno nárůstem hodnot vodivosti, která souvisí i se změnou pH výše. Disociace iontů při pokojové teplotě je vyšší, proto u destilované vody je vidět nárůst hodnot měrné vodivosti až na dvojnásobek hodnoty

měrné vodivosti bezprostředně po aktivaci. V lednici u destilované vody je naopak vidět mírný pokles. U kohoutkové vody nejsou zaznamenány žádné změny.

#### 4.7 Testování antimikrobiální aktivity PAW

Antimikrobiální aktivita byla sledována na dvou zástupcích, a to na kvasince *Candida glabrata* a bakterii *Escherichia coli*. Pro stanovení antimikrobiální citlivosti byla využita bujónová diluční metoda. Hodnotil se nárůst kultury v mikrotitrační destičce, takzvaná změna zákalu po 24 hodinách. V tabulce 13 jsou uvedeny znaky představující daná procenta antimikrobiálního účinku.

**Tabulka 13** Vysvětlené znaky pro antimikrobiální účinek

inhibiční účinek (%)	0	0–2,5	2,5–5,5	5,5–100
znak	-	+	++	+++

V tabulce 14 jsou znázorněny výsledky antimikrobiálních testů na kvasince *Candida glabrata* a na gramnegativní bakterii *Escherichia coli*. U kvasinky *C. glabrata* můžeme vidět pouze u dvou typů PAW větší citlivost na vzniklé reaktivní částice, jejíž koncentrace nalezneme v tabulce 15. V obou případech se jedná o PAW připravenou z destilované vody. Největší inhibiční účinnost u těchto dvou typů PAW je pravděpodobně způsobena nižším pH a vyšší koncentrací dusičnanů.

Při stanovování antimikrobiální aktivity na *E. coli* byla prokázána větší antibakteriální aktivita než v případě výše zmíněné kvasinky. V tabulce 14 můžeme vidět, že se inhibiční účinnost kromě dvou případů pohybovala od 2,5 až 5,5 %. Celkově můžeme říct, že všechny připravené druhy PAW vykazovaly minimální antimikrobiální aktivitu.

Protože je zaznamenán minimální antimikrobiální efekt, můžeme předpokládat, že v případě menší koncentrace mikroorganismů, by se mohla účinnost PAW zvýšit. Tudíž výhledově by se PAW mohla využívat jako druhý stupeň pro ošetření proti nižší koncentraci mikroorganismů, ideálně např. v kombinaci s přímým ošetřením plazmatem.

**Tabulka 14** Antimikrobiální účinek pro různé druhy připravené PAW (+ = 0 až 2,5 %, ++ představuje 2,5 až 5,5 %)

		<i>Candida glabrata</i>	<i>Escherichia coli</i>
<b>DBD</b>	destilovaná voda	++	++
	kohoutková voda	+	++
<b>AC</b>	destilovaná voda	+	+
	kohoutková voda	+	++
<b>O<sub>3</sub></b>	destilovaná voda	++	+
	kohoutková voda	+	++

**Tabulka 15** Charakterizace připravených PAW na antimikrobiální testy

		$c_{H_2O_2}$ (mmol·l <sup>-1</sup> )	$c_{NO_3}$ (mg·l <sup>-1</sup> )	$c_{NO_2}$ (mg·l <sup>-1</sup> )	pH	<i>G</i> (μS·cm <sup>-1</sup> )
<b>DBD</b>	destilovaná voda	0,02	3,65	0,50	5,3	21
	kohoutková voda	0,04	7,12	2,67	7,8	494
<b>AC</b>	destilovaná voda	0,44	7,21	1,58	5,4	25
	kohoutková voda	0,05	0,00	0,03	7,8	486
<b>O<sub>3</sub></b>	destilovaná voda	0,00	5,48	0,01	6,4	24
	kohoutková voda	0,00	0,00	0,01	7,7	476

## 5 ZÁVĚR

Hlavním cílem této diplomové práce byla příprava a charakterizace plazmatem aktivované vody. Aktivace plazmatem aktivované vody probíhala ve třech typech zařízení. Jako první byl využit dielektrický bariérový výboj za atmosférického tlaku ve vzduchu nad povrchem vody. Druhým typem výboje byla plazmové tryska ve vodě s vysokofrekvenčním zdrojem napětí. A poslední typ přípravy byl pomocí probublávání produktů výboje, zejména ozónu do roztoku. V práci tedy byla použita přímá i nepřímá interakce plazmatu s kapalinou nebo jejím povrchem.

V experimentální části diplomové práce jsou konkrétně popsány jednotlivé experimenty. K ošetření plazmatem byly zvoleny dva druhy kapaliny, a to destilovaná a kohoutková voda. Vybrány byly z důvodu porovnání jejich chování v jednotlivých typech příprav a v čase a také pro svou dobrou dostupnost. Čas generace plazmatem aktivované vody byl u všech systémů shodný, lišil se jen v jednotlivých intervalech ošetření plazmatem. Celkový čas tedy byl 2 minuty. Cílem bylo porovnání získaných koncentrací vzniklých aktivních částic u všech druhů PAW. Stanovovaly se koncentrace tří druhů částic: peroxidu vodíku, dusičnanů a dusitanů. Součástí měření bylo také prostudování vlivu skladovacích podmínek na chování reaktivních částic v PAW. Také byly sledovány fyzikálně-chemické vlastnosti, hodnota pH a měrná vodivost, a jejich vliv na stabilitu částic v čase. V diplomové práci lze nalézt i měření antimikrobiální aktivity PAW.

Koncentrace sledovaných reaktivních částic byla stanovována spektrofotometricky s využitím selektivních kolorimetrických činidel. Pro kalibrační přímku a následné stanovení koncentrace peroxidu vodíku příslušným činidlem byla zvolena vlnová délka 407 nm. Při měření absorpčního spektra dusičnanů byla hodnota vhodné vlnové délky 526 nm, u dusitanů bylo 540 nm.

Měření stability jednotlivých částic pro všechny plazmové systémy probíhalo v několika časových úsecích. Krátkodobá stability byla měřena průběhu první hodiny po vygenerování po 15–ti minutových intervalech. Středně dlouhá aktivita zahrnovala stabilitu v rámci 5–ti hodin od vzniku částic a také stabilitu po dobu 4 dní po aktivaci. Sledována byla i dlouhodobá stabilita, a to v rámci 5–ti týdnů od přípravy PAW. Byly také sledovány vlivy jednotlivých skladovacích podmínek. Uchovávání při laboratorní teplotě a v lednici, obojí za tmy.

Koncentrace peroxidu vodíku, dusičnanů a dusitanů v PAW připravené v různých systémech se značně lišily. Podle naměřených dat se nejvíce částic generovalo u plazmové trysky ponořené do kapaliny s vysokofrekvenčním zdrojem napětí. U všech reaktivních částic docházelo v průběhu času ke změnám koncentrací. Obecně došlo v rámci všech systému k poklesu koncentrace reaktivních částic. U jednotlivých systémů se ale vývoj reaktivních částic měnil odlišně. Z toho jde vyvodit, že pro generaci PAW záleží na typu přípravy. U DBD generujícím plazma ve vzduchu nad vodní hladinou byly hojně zastoupeny oxidy dusíku a jen nízká koncentrace peroxidu vodíku. U posledního typu aktivace probubláváním produktů výboje do vody bylo poměrně nízké zastoupení všech druhů částic bezprostředně po aktivaci, ale se zřejmým zvyšováním jejich koncentrace ještě po dobu jedné hodiny po ukončení probublávání v důsledku pomalejšího rozpouštění produktů.

Pokud se na to podíváme detailněji, tak v krátkodobém horizontu času se koncentrace peroxidu vodíku výrazněji měnila pouze u systému probublávání ozónem, kde ještě pravděpodobně dobíhala reakce, proto zde vidíme mírný nárůst hodnot peroxidu vodíku. V rámci hodin narůstala koncentrace peroxidu vodíku více u kohoutkové vody v systémech DBD a plazmové trysky s AC. U posledního systému vidíme průběžný nárůst  $H_2O_2$  u všech druhů PAW. U sledování stability v horizontu dnů už je vidět, jak koncentrace peroxidu vodíku klesá k minimu, až na jednu výjimku, a tou je u kohoutková voda uchovávaná v lednici připravena pomocí ozónu. Tam i po 4 dnech vidíme vyšší koncentraci než na počátku. U dlouhodobé stability peroxidu vodíku vidíme, že po 5–ti týdnech od aktivace nalezneme peroxid vodíku pouze v systému DBD.

Koncentrace dusičnanů je v čase velmi proměnlivá, protože přítomnost peroxidu vodíku, který má oxidačně-redukční charakter, vede k tomu, že dusičnany jsou redukovány na dusitany a obráceně. Ale opět zde můžeme konstatovat, že po 5–ti týdnech po aktivaci nalezneme dusičnany pouze u DBD. Ve všech ostatních případech nebyly dusičnany naměřeny.

Dusitany se téměř nevyskytovaly u třetího typu aktivace PAW pomocí probublávání, v obou případech vod. Dusitany si v průběhu několika hodin po přípravě PAW v některých případech zachovávaly svou počáteční koncentraci. Nebylo tomu tak ale u většiny PAW připravených z kohoutkové vody, kde koncentrace v průběhu času stoupala nezávisle na podmínkách skladování. Zmiňovaný vývoj je vidět u plazmové trysky s AC zdrojem z dlouhodobějšího hlediska. Je zřejmé, že zde probíhá redukce dusičnanů na dusitany.

Průběh změn koncentrací aktivních částic v PAW zatím nelze zobecnit, protože zatím není znám detailní mechanismus a důvod jejich chování. Je zde mnoho faktorů, které mohou hodnoty koncentrací ovlivnit. Také se v této práci sledovaly vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti, měrná vodivost a hodnota pH. V průběhu působení plazmatu se tyto dvě vlastnosti mění: zatímco vodivost roste ve všech použitých systémech, pH se snižuje u DBD a AC trysky ve vodě, ale mírně roste u systému s probubláváním produktů výboje. V práci je také zaznamenáno, jestli se po aktivaci plazmatem tyto vlastnosti mění se změnou koncentrace reakčních částic. Ve většině případů se hodnota pH mění pouze do 10 %. Pouze u plazmové trysky v horizontu dnů je zaznamenán nárůst pH o 50 % u destilované vody skladované v lednici. Měrná vodivost se v průběhu času po přípravě již příliš neměnila.

Součástí diplomové práce bylo i testování antimikrobiální aktivity PAW. Pro stanovení antimikrobiální citlivosti byla použita bujónová diluční metoda na dvou typech mikroorganismů. U kvasinky *Candida glabrata* byla zaznamenána větší citlivost na PAW pouze v případě DBD a probublávání ozónu, v obou případech z destilované vody. U gramnegativní bakterie *Escherichia coli* byla vyhodnocena větší inhibiční účinnost oproti kvasince *C. glabrata*. Antimikrobiální aktivita u *E. coli* se pohybovala od 2,5 do 5,5 %. Pro antimikrobiální účinek jsou nejvíce důležité hlavně dusitany a pak peroxid vodíku, takže na základě koncentrací u jednotlivých druhů uchování lze vybrat nejvhodnější typ skladování. Jako nevhodnější se jeví AC plazmová tryska ve vodě, ale při okamžitém použití (v řádu hodin).

Díky antimikrobiálním účinkům má plazmatem aktivovaná voda vysoký potenciál pro využití v medicíně, při sterilizaci ran nebo nástrojů. Lze ji využít i v zemědělství, kde díky přítomnosti oxidů dusíku může být využita na podporu růstu rostlin. Jelikož práce prokázala jen mírný antibakteriální účinek na vybrané mikroorganismy, a to u plazmatem aktivované vody připravené ve všech systémech, dalším předmětem výzkumu do budoucna může být detailnější zkoumání antimikrobiální aktivity (např. snížením počáteční koncentrace mikroorganismů), změna a porovnávání podmínek při přípravě plazmatem aktivované vody nebo kombinace přímého ošetření plazmatem s následnou aplikací plazmatem aktivované vody.



## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] THIRUMDAS, Rohit, Anjinelyulu KOTHAKOTA, Uday ANNAPURE, Kaliramesh SILIVERU, Renald BLUNDELL, Ruben GATT a Vasilis P. VALDRAMIDIS. *Plasma activated water (PAW): Chemistry, physico-chemical properties, applications in food and agriculture*. 2018, **77**, 21-31. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2018.05.007
- [2] ZHOU, Renwu, Rusen ZHOU, Peiyu WANG, et al. Plasma-activated water: generation, origin of reactive species and biological applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2020, **53**(30). ISSN 0022-3727. Dostupné z: doi:10.1088/1361-6463/ab81cf
- [3] STOFFELS, Eva, Yukinori SAKIYAMA a David B. GRAVES. Cold Atmospheric Plasma: Charged Species and Their Interactions With Cells and Tissues. *IEEE Transactions on Plasma Science*. 2008, **36**(4), 1441-1457. ISSN 0093-3813. Dostupné z: doi:10.1109/TPS.2008.2001084
- [4] ISBARY, Georg, Tetsuji SHIMIZU, Yang-Fang LI, Wilhelm STOLZ, Hubertus M THOMAS, Gregor E MORFILL a Julia L ZIMMERMANN. Cold atmospheric plasma devices for medical issues. *Expert Review of Medical Devices*. 2014, **10**(3), 367-377. ISSN 1743-4440. Dostupné z: doi:10.1586/erd.13.4
- [5] ISBARY, G., J.L. ZIMMERMANN, T. SHIMIZU, et al. Non-thermal plasma—More than five years of clinical experience. *Clinical Plasma Medicine*. 2013, **1**(1), 19-23. ISSN 22128166. Dostupné z: doi:10.1016/j.cpme.2012.11.001
- [6] PANG, Bolun, Zhijie LIU, Huaiyan ZHANG, Sitao WANG, Yuting GAO, Dehui XU, Dingxin LIU a Michael G. KONG. Investigation of the chemical characteristics and anticancer effect of plasma-activated water: The effect of liquid temperature. *Plasma Processes and Polymers*. 2022, **19**(1). ISSN 1612-8850. Dostupné z: doi:10.1002/ppap.202100079
- [7] ZHOU, Renwu, Rusen ZHOU, Karthika PRASAD, Zhi FANG, Robert SPEIGHT, Kateryna BAZAKA a Kostya (Ken) OSTRIKOV. Cold atmospheric plasma activated water as a prospective disinfectant: the crucial role of peroxyxynitrite. *Green Chemistry*. 2018, **20**(23), 5276-5284. ISSN 1463-9262. Dostupné z: doi:10.1039/C8GC02800A
- [8] GUO, Li, Zhiqian YAO, Lu YANG, et al. Plasma-activated water: An alternative disinfectant for S protein inactivation to prevent SARS-CoV-2 infection. *Chemical Engineering Journal*. 2021, **421**. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2020.127742
- [9] GUO, Dingmeng, Hongxia LIU, Lei ZHOU, Jinzhao XIE a Chi HE. Plasma-activated water production and its application in agriculture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2021, **101**(12), 4891-4899. ISSN 0022-5142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.11258
- [10] HOEBEN, W. F. L. M., P. P. VAN OOIJ, D. C. SCHRAM, T. HUISKAMP, A. J. M. PEMEN a P. LUKEŠ. On the Possibilities of Straightforward Characterization of Plasma Activated Water. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*. 2019, **39**(3), 597-626. ISSN 0272-4324. Dostupné z: doi:10.1007/s11090-019-09976-7

- [11] KUTASI, Kinga, Dean POPOVIĆ, Nikša KRSTULOVIĆ a Slobodan MILOŠEVIĆ. Tuning the composition of plasma-activated water by a surface-wave microwave discharge and a kHz plasma jet. *Plasma Sources Science and Technology*. 2019, **28**(9). ISSN 1361-6595. Dostupné z: doi:10.1088/1361-6595/ab3c2f
- [12] BRUGGEMAN, P J, M J KUSHNER, B R LOCKE, et al. Plasma–liquid interactions: a review and roadmap. *Plasma Sources Science and Technology*. 2016, **25**(5). ISSN 1361-6595. Dostupné z: doi:10.1088/0963-0252/25/5/05300
- [13] XIANG, Qisen, Liumin FAN, Yunfei LI, Shanshan DONG, Ke LI a Yanhong BAI. A review on recent advances in plasma-activated water for food safety: current applications and future trends. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2022, **62**(8), 2250-2268. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2020.1852173
- [14] BRUGGEMAN, Peter a Christophe LEYS. Non-thermal plasmas in and in contact with liquids. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2009, **42**(5). ISSN 0022-3727. Dostupné z: doi:10.1088/0022-3727/42/5/053001
- [15] KOZÁKOVÁ, Zdenka, František KRČMA, Michal VAŠÍČEK, Lucie HLAVATÁ a Lenka HLOCHOVÁ. Generation of dc pin-hole discharges in liquids: comparison of discharge breakdown in diaphragm and capillary configuration. *The European Physical Journal D*. 2015, **69**(4). ISSN 1434-6060. Dostupné z: doi:10.1140/epjd/e2015-50331-6
- [16] XU, Xueji. Dielectric barrier discharge — properties and applications. *Thin Solid Films*. 2001, **390**(1-2), 237-242. ISSN 00406090. Dostupné z: doi:10.1016/S0040-6090(01)00956-7
- [17] *Chemical Engineering Journal*. 236. 2014. ISSN 13858947. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1385894713012941>
- [18] WOO SEOK KANG, JIN MYUNG PARK, YONGHO KIM a SANG HEE HONG. Numerical study on influences of barrier arrangements on dielectric barrier discharge characteristics. *IEEE Transactions on Plasma Science*. 2003, **31**(4), 504-510. ISSN 0093-3813. Dostupné z: doi:10.1109/TPS.2003.815469
- [19] WINTER, J, R BRANDENBURG a K-D WELTMANN. Atmospheric pressure plasma jets: an overview of devices and new directions. *Plasma Sources Science and Technology*. 2015, **24**(6). ISSN 0963-0252. Dostupné z: doi:10.1088/0963-0252/24/6/064001
- [20] FEIZOLLAHI, Ehsan, N.N. MISRA a M. S. ROOPESH. Factors influencing the antimicrobial efficacy of Dielectric Barrier Discharge (DBD) Atmospheric Cold Plasma (ACP) in food processing applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2021, **61**(4), 666-689. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2020.1743967
- [21] LEBEDEV, Yu A. Microwave discharges: generation and diagnostics. *Journal of Physics: Conference Series*. 2010, **257**. ISSN 1742-6596. Dostupné z: doi:10.1088/1742-6596/257/1/012016

- [22] CONRADS, H a M SCHMIDT. Plasma generation and plasma sources. *Plasma Sources Science and Technology*. 2000, **9**(4), 441-454. ISSN 0963-0252. Dostupné z: doi:10.1088/0963-0252/9/4/301
- [23] BOGDANOV, Todor, Ivan TSONEV, Plamena MARINOVA, et al. Microwave Plasma Torch Generated in Argon for Small Berries Surface Treatment. *Applied Sciences*. 2018, **8**(10). ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app8101870
- [24] KRČMA, F, Z KOZÁKOVÁ, V MAZÁNKOVÁ, J HORÁK, L DOSTÁL, B OBRADOVIĆ, A NIKIFOROV a T BELMONTE. Characterization of novel pin-hole based plasma source for generation of discharge in liquids supplied by DC non-pulsing voltage. *Plasma Sources Science and Technology*. 2018, **27**(6). ISSN 1361-6595. Dostupné z: doi:10.1088/1361-6595/aac521
- [25] KRCMA, Frantisek, Zdenka STARA a Jana PROCHAZKOVA. Diaphragm discharge in liquids: Fundamentals and applications. *Journal of Physics: Conference Series*. 2010, **207**. ISSN 1742-6596. Dostupné z: doi:10.1088/1742-6596/207/1/012010
- [26] CHANG, J.-S., P.A. LAWLESS a T. YAMAMOTO. Corona discharge processes. *IEEE Transactions on Plasma Science*. **19**(6), 1152-1166. ISSN 00933813. Dostupné z: doi:10.1109/27.125038
- [27] OH, Jun-Seok, Endre J. SZILI, Kotaro OGAWA, Robert D. SHORT, Masafumi ITO, Hiroshi FURUTA a Akimitsu HATTA. UV-vis spectroscopy study of plasma-activated water: Dependence of the chemical composition on plasma exposure time and treatment distance. *Japanese Journal of Applied Physics*. 2018, **57**(1). ISSN 0021-4922. Dostupné z: doi:10.7567/JJAP.57.0102B9
- [28] CAO, Yang, Guangzhou QU, Tengfei LI, Nan JIANG a Tiecheng WANG. Review on reactive species in water treatment using electrical discharge plasma: formation, measurement, mechanisms and mass transfer. *Plasma Science and Technology*. 2018, **20**(10). ISSN 1009-0630. Dostupné z: doi:10.1088/2058-6272/aacff4
- [29] KONDUKTOMETRIE. *Multimediální učebnice "Výpočty z elektroanalytických metod"* [online]. [cit. 2022-04-08]. Dostupné z: <https://ach.upol.cz/ucebnice2/kond.htm>
- [30] Měrná elektrická vodivost. *Český lékopis 1997* [online]. [cit. 2022-04-08]. Dostupné z: [http://www.lekopis.cz/Kap\\_2\\_2\\_38.htm](http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_38.htm)
- [31] RONDININI, Sandra. pH measurements in non-aqueous and aqueous-organic solvents - definition of standard procedures. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2002, **374**(5), 813-816. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-002-1455-z
- [32] pH. *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2022-04-08]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/pH>
- [33] PROTOLYTICKÉ ROVNOVÁHY. *Multimediální učebnice "Příklady z analytické chemie"* [online]. [cit. 2022-04-08]. Dostupné z: <https://ach.upol.cz/ucebnice/protolyty.htm>
- [34] Průvodce měření pH v laboratořích [online]. In: . [cit. 2022-04-08]. Dostupné z: [https://www.chromservis.eu/images/pdf/chromservis\\_pruvodce-mereni\\_CZ.pdf](https://www.chromservis.eu/images/pdf/chromservis_pruvodce-mereni_CZ.pdf)
- [35] Měření pH. WikiSkripta [online]. [cit. 2021-04-08]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/M%C4%9B%C5%99en%C3%AD\\_pH](https://www.wikiskripta.eu/w/M%C4%9B%C5%99en%C3%AD_pH)

- [36] CHEN, Tung-Po, Junfeng LIANG a Tsan-Liang SU. Plasma-activated water: antibacterial activity and artifacts?. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018, **25**(27), 26699-26706. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-017-9169-0
- [37] RATHORE, Vikas, Divyesh PATEL, Shital BUTANI a Sudhir Kumar NEMA. Investigation of Physicochemical Properties of Plasma Activated Water and its Bactericidal Efficacy. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*. 2021, **41**(3), 871-902. ISSN 0272-4324. Dostupné z: doi:10.1007/s11090-021-10161-y
- [38] RATHORE, Vikas a Sudhir Kumar NEMA. Optimization of process parameters to generate plasma activated water and study of physicochemical properties of plasma activated solutions at optimum condition. *Journal of Applied Physics*. 2021, **129**(8). ISSN 0021-8979. Dostupné z: doi:10.1063/5.0033848
- [39] Kolorimetrie. *Velký lékařský slovník* [online]. [cit. 2022-04-11]. Dostupné z: <https://lekarske.slovniky.cz/pojem/kolorimetrie>
- [40] EISENBERG, George. *Colorimetric Determination of Hydrogen Peroxide*. 1943, **15**(5), 327-328. ISSN 0096-4484. Dostupné z: doi:10.1021/i560117a011
- [41] TSIKAS, Dimitrios. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B*. 2007, **851**(1-2), 51-70. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2006.07.054
- [42] KUPKOVÁ, Zdeňka a L BENEŠ. Chemické vlastnosti, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého. *Chemické listy* [online]. 2004, **98**(3), 116-122 [cit. 2022-04-11]. ISSN 0009-2770.
- [43] LENGHARTOVÁ, Katarína, Lukáš LAUKO a Ernest BEINROHR. Analytické metódy na stanovenie dusitanov. *Chemické listy* [online]. 2015, **109**(3), 191-197 [cit. 2022-04-11]. ISSN 0009-2770
- [44] *Příprava plazmatem aktivované vody a její charakterizace*. 2022. Návod k úloze. Fakulta chemická VUT v Brně.
- [45] BARTOŠOVÁ, Alica, Anna MICHALÍKOVÁ, Maroš SIROTIK a Maroš SOLDÁN. Comparison of Two Spectrophotometric Techniques for Nutrients Analyses in Water Samples. *Research Papers Faculty of Materials Science and Technology Slovak University of Technology*. 2013, **20**(32). ISSN 1338-0532. Dostupné z: doi:10.2478/v10186-012-0002-9
- [46] MONTEIRO, M.I.C., F.N. FERREIRA, N.M.M. DE OLIVEIRA a A.K. ÁVILA. Simplified version of the sodium salicylate method for analysis of nitrate in drinking waters. *Analytica Chimica Acta*. 2003, **477**(1), 125-129. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/S0003-2670(02)01395-8
- [47] BALOUIRI, Mounyr, Moulay SADIKI a Saad Koraichi IBNSOUDA. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016, **6**(2), 71-79. ISSN 20951779. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005
- [48] SCORZONI, Liliana, Tatiane BENADUCCI, Ana Marisa Fusco ALMEIDA, Dulce Helena Siqueira SILVA, Vanderlan da Silva BOLZANI a Maria José Soares Mendes GIANINNI. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2007, **38**(3), 391-397. ISSN 1517-8382. Dostupné z: doi:10.1590/S1517-83822007000300001

- [49] XU, Dehui, Qingjie CUI, Yujing XU, et al. Systemic study on the safety of immunodeficient nude mice treated by atmospheric plasma-activated water. *Plasma Science and Technology*. 2018, **20**(4). ISSN 1009-0630. Dostupné z: doi:10.1088/2058-6272/aa9842
- [50] XU, Dehui, Shuai WANG, Bing LI, et al. Effects of Plasma-Activated Water on Skin Wound Healing in Mice. *Microorganisms*. 2020, **8**(7). ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms8071091
- [51] BABAEVA, Natalia Yu. a George V. NAIDIS. Modeling of Plasmas for Biomedicine. *Trends in Biotechnology*. 2018, **36**(6), 603-614. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2017.06.017
- [52] MA, Mingyu, Yanzhe ZHANG, Yang LV a Fusheng SUN. The key reactive species in the bactericidal process of plasma activated water. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2020, **53**(18). ISSN 0022-3727. Dostupné z: doi:10.1088/1361-6463/ab703a
- [53] LIU, Zhijie, Sitao WANG, Bolun PANG, Huaiyan ZHANG, Yuting GAO, Dehui XU a Michael G KONG. The impact of surface-to-volume ratio on the plasma activated water characteristics and its anticancer effect. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2021, **54**(21). ISSN 0022-3727. Dostupné z: doi:10.1088/1361-6463/abe78f
- [54] VOZÁR, Tomáš. *Studium vlivu plazmatem aktivované vody na klíčivost semen*. 2022. Bakalářská práce. Fakulta chemická VUT v Brně.

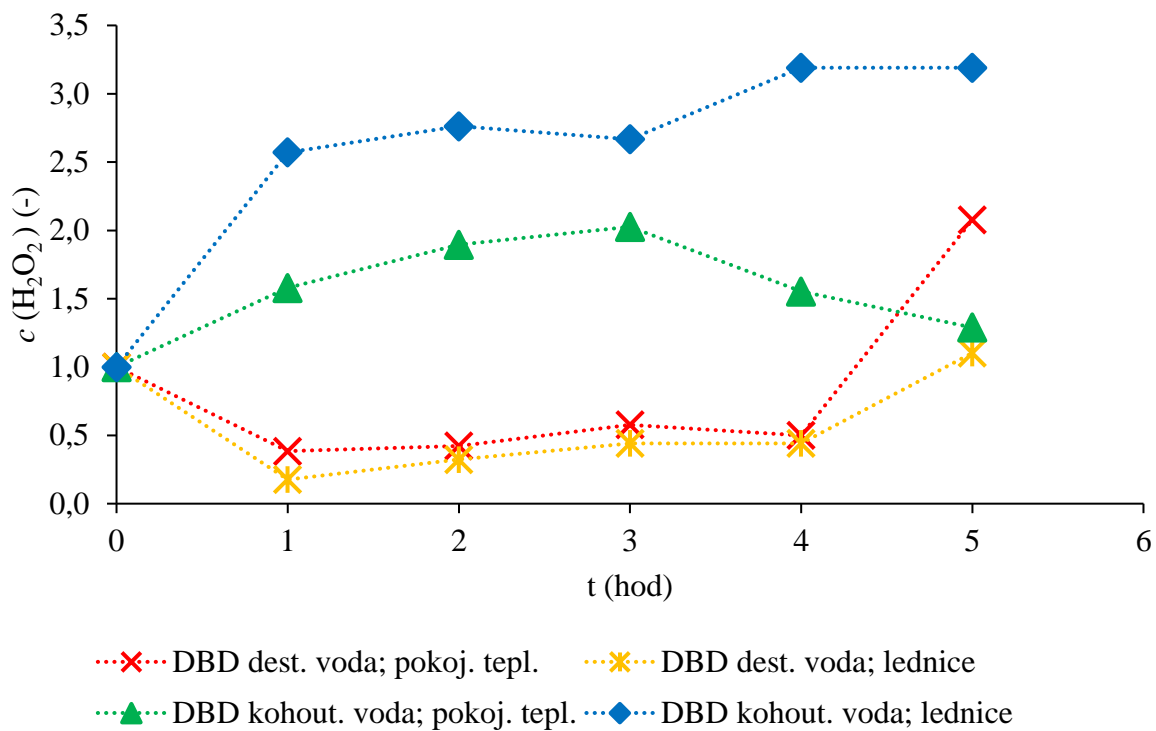
## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

<i>A</i>	Absorbance
AC	Střídavé napětí
AOP	Advanced oxidation processes – pokročilé oxidační procesy
<i>c</i>	Koncentrace
CAP	Cold atmospheric plasma – studené atmosférické plazma
DBD	Dielektrický bariérový výboj
DC	Stejnoseměrné napětí
$\kappa$	Měrná vodivost
<i>l</i>	Délka, tloušťka kyvety
$\lambda$	Vlnové délka
MD	Mikrovlnný výboj
MIC	Minimum inhibitory concentration – minimální inhibiční koncentrace
PAW	Plasma Activated Water – plazmatem aktivovaná voda
PAM	Plasma Activated Medium – plazmatem aktivované médium
<i>R</i>	Elektrický odpor
$\rho$	Měrný odpor
ROS	Reactive Oxygen Species – reaktivní kyslíkové částice
RNS	Reactive Nitrogen Species – reaktivní formy dusíku
RONS	Reactive Oxygen/Nitrogen Species – reaktivní částice kyslíku a dusíku
<i>S</i>	Průřez
SD	Povrchový výboj
UV	Ultrafialové záření
VD	Objemový výboj
VF	Vysokofrekvenční zdroj
VIS	Viditelné záření

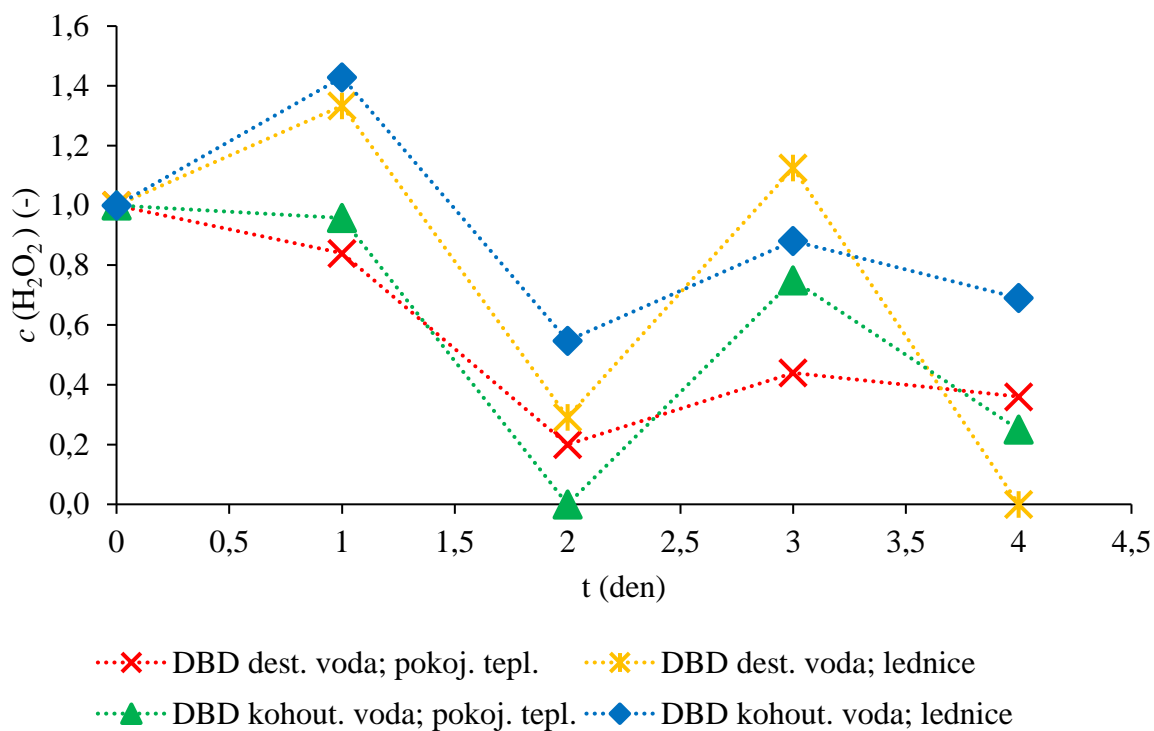
## 8 PŘÍLOHY

V příloze se nacházejí grafická znázornění průběhů změn koncentrací v čase po přípravě pro veškeré částice u všech typů výbojů.

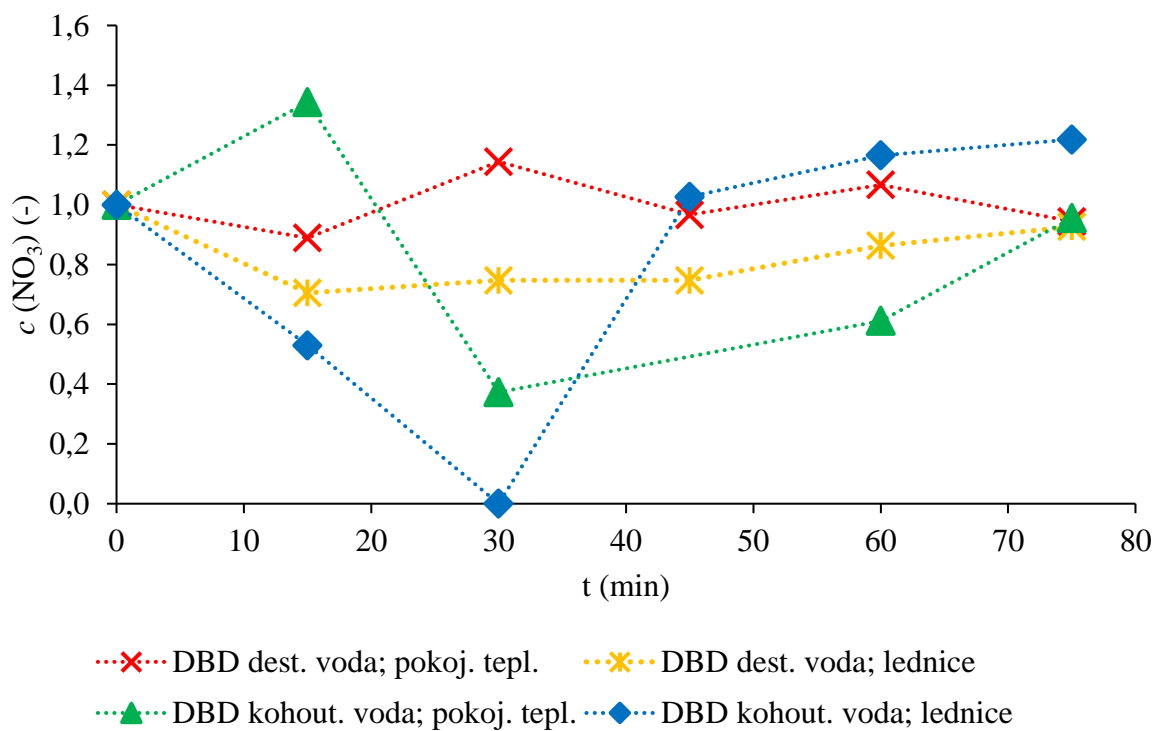
### 8.1 Grafy koncentrace pro aktivaci PAW pomocí DBD



**Obrázek 25** Změna koncentrace peroxidu vodíku v průběhu několika hodin od přípravy PAW pomocí DBD

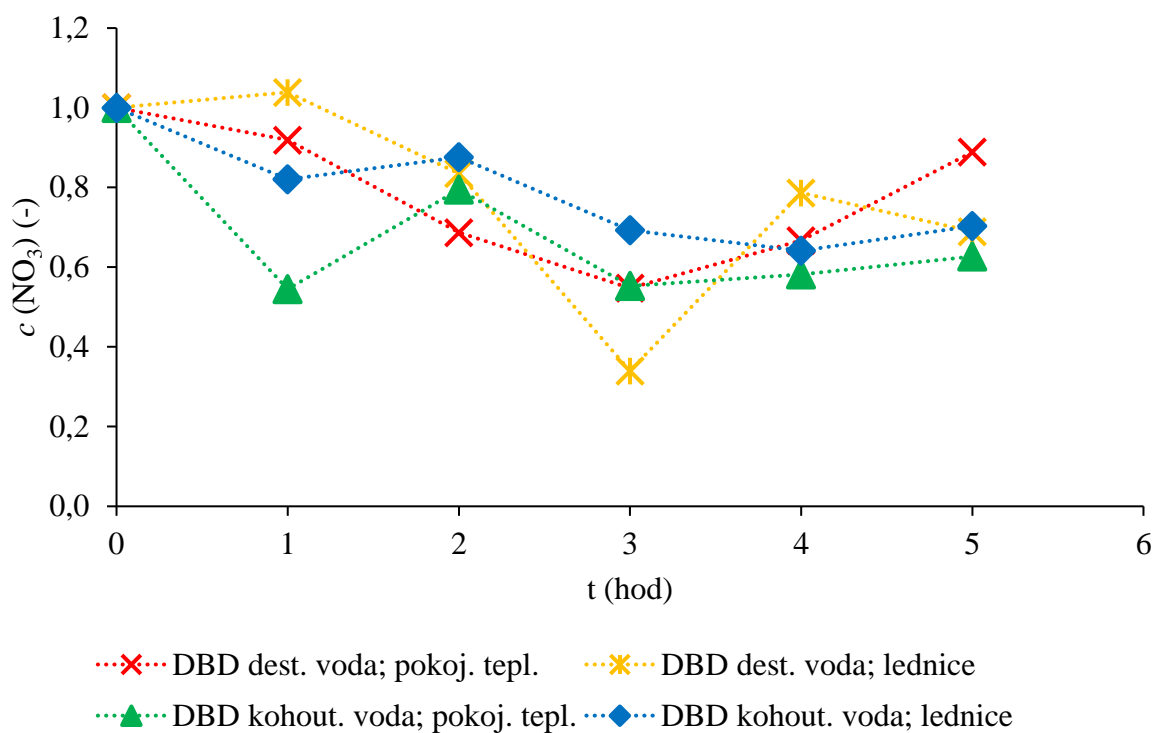


**Obrázek 26** Změna koncentrace peroxidu vodíku v průběhu několika dní od přípravy PAW pomocí DBD

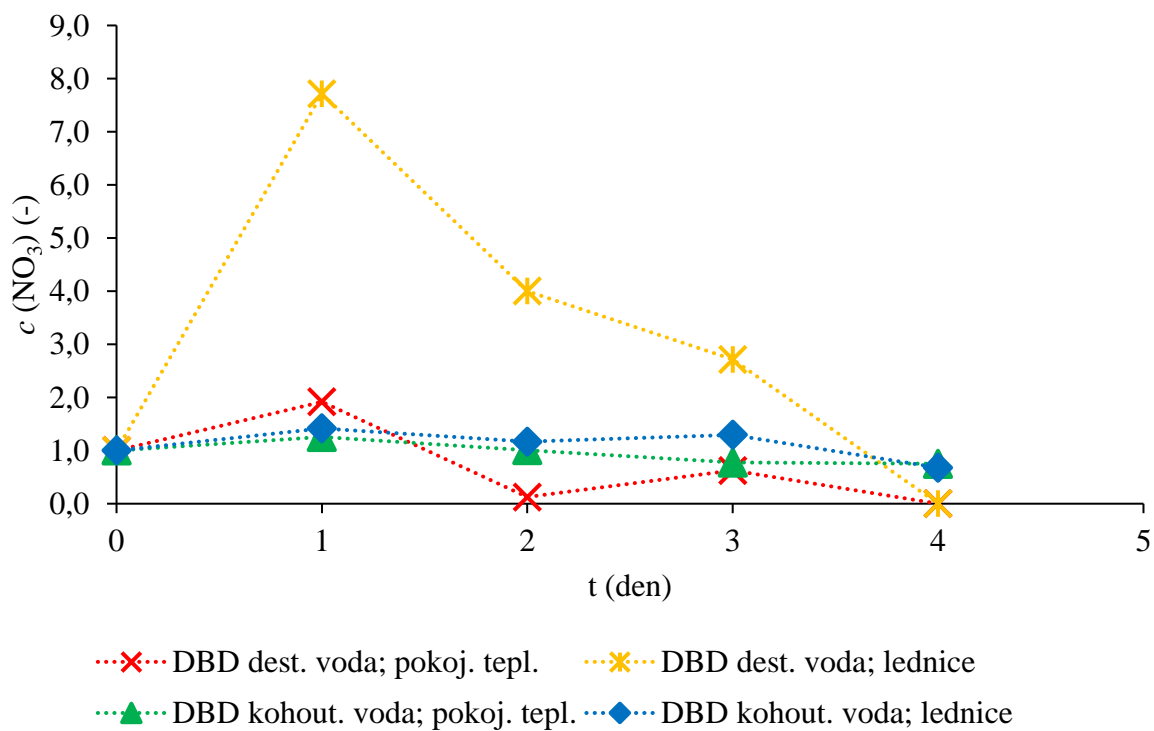


**Obrázek 27** Změna koncentrace dusičnanů v první hodině po přípravě PAW pomocí DBD

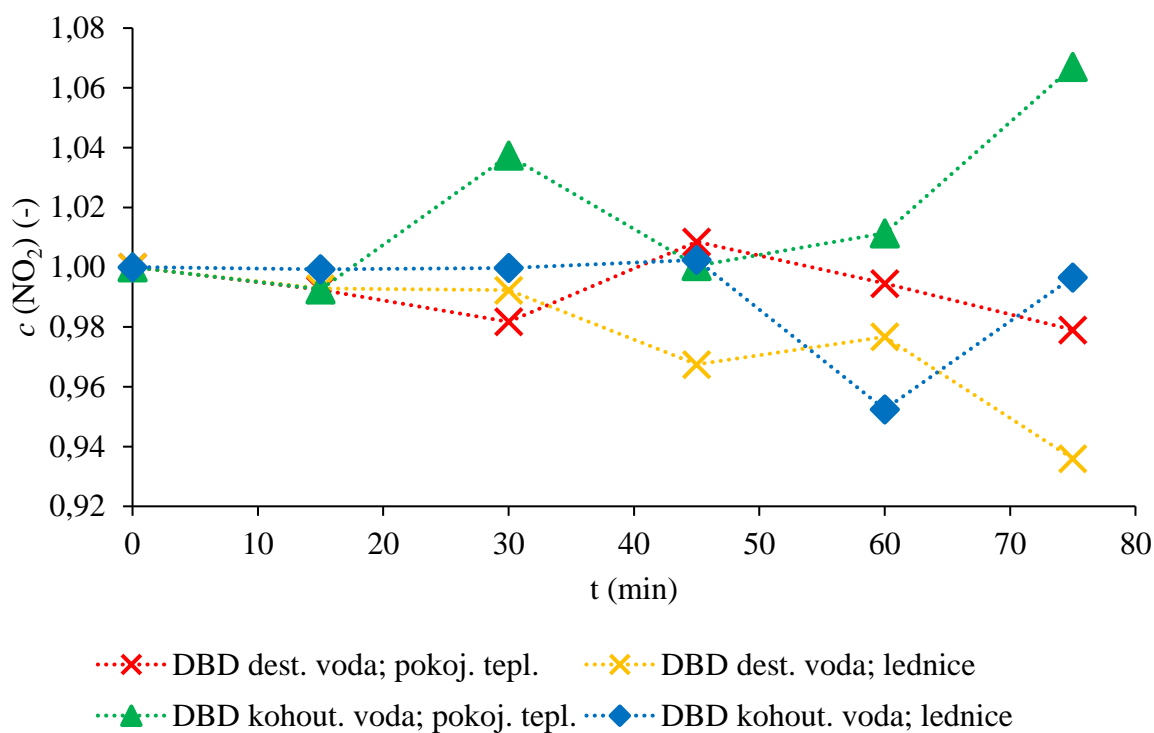




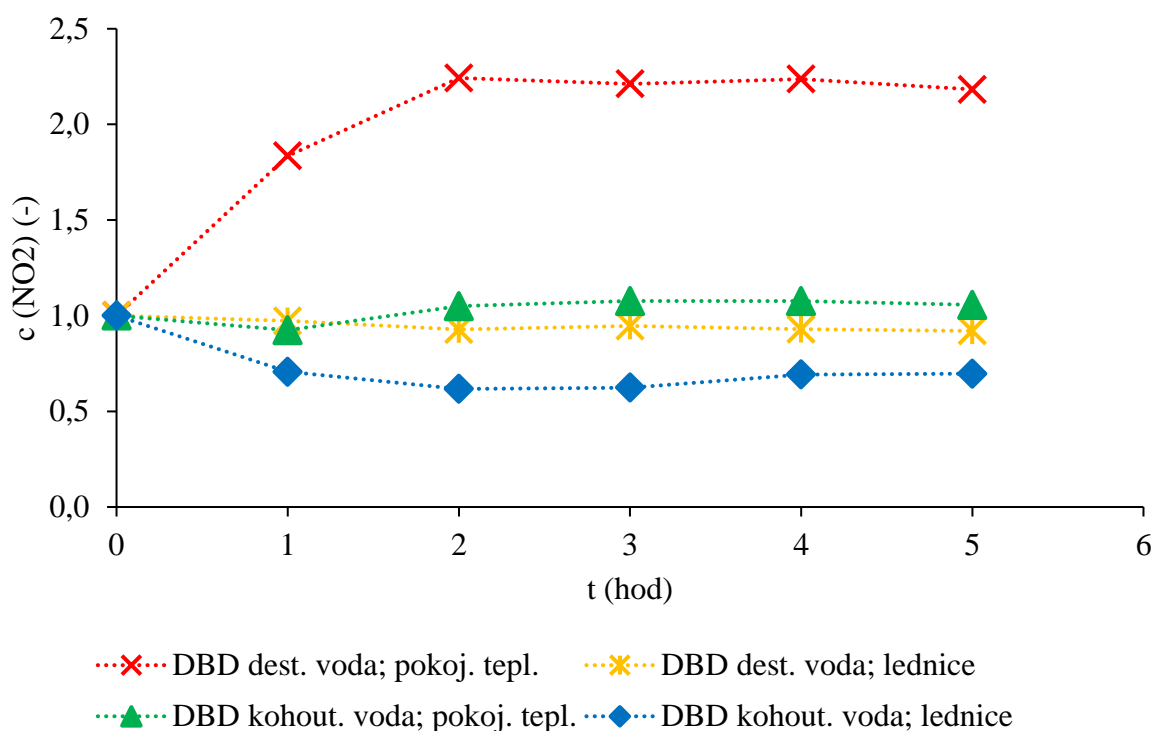
**Obrázek 28** Změna koncentrace dusičnanů v průběhu několika hodin po přípravě PAW pomocí DBD



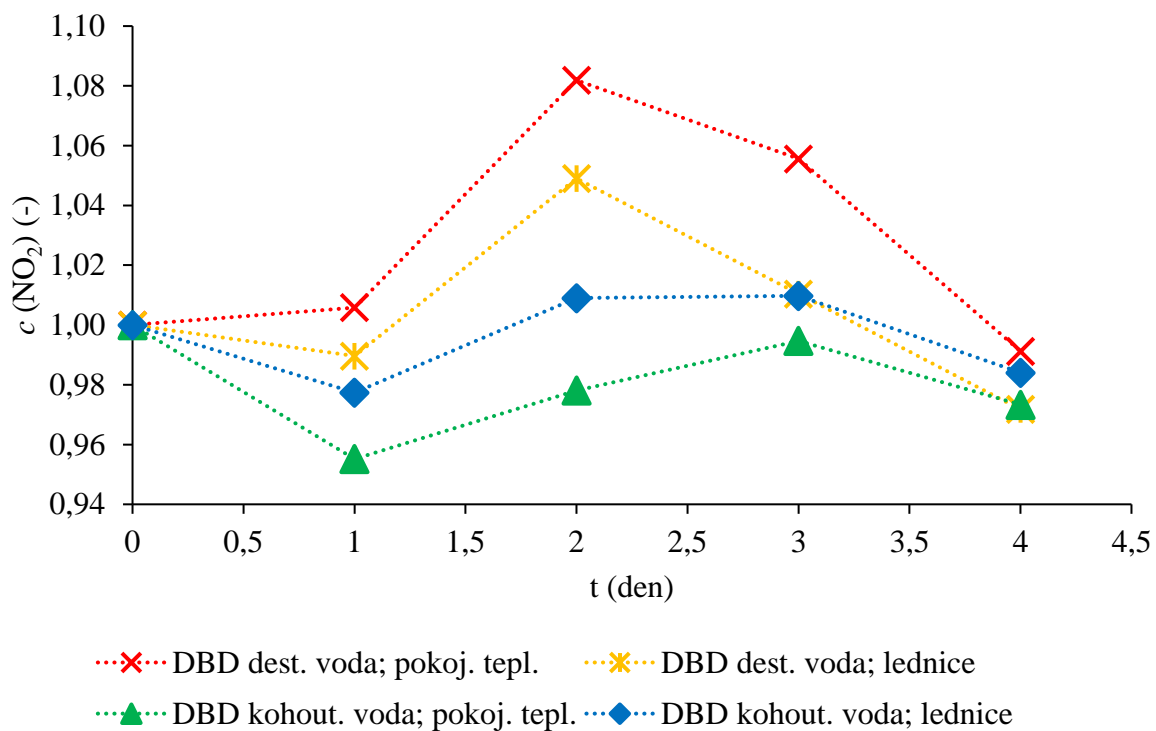
**Obrázek 29** Změna koncentrace dusičnanů v průběhu několika dní po přípravě PAW pomocí DBD



**Obrázek 30** Změna koncentrace dusitanů v krátkém čase po přípravě PAW pomocí DBD

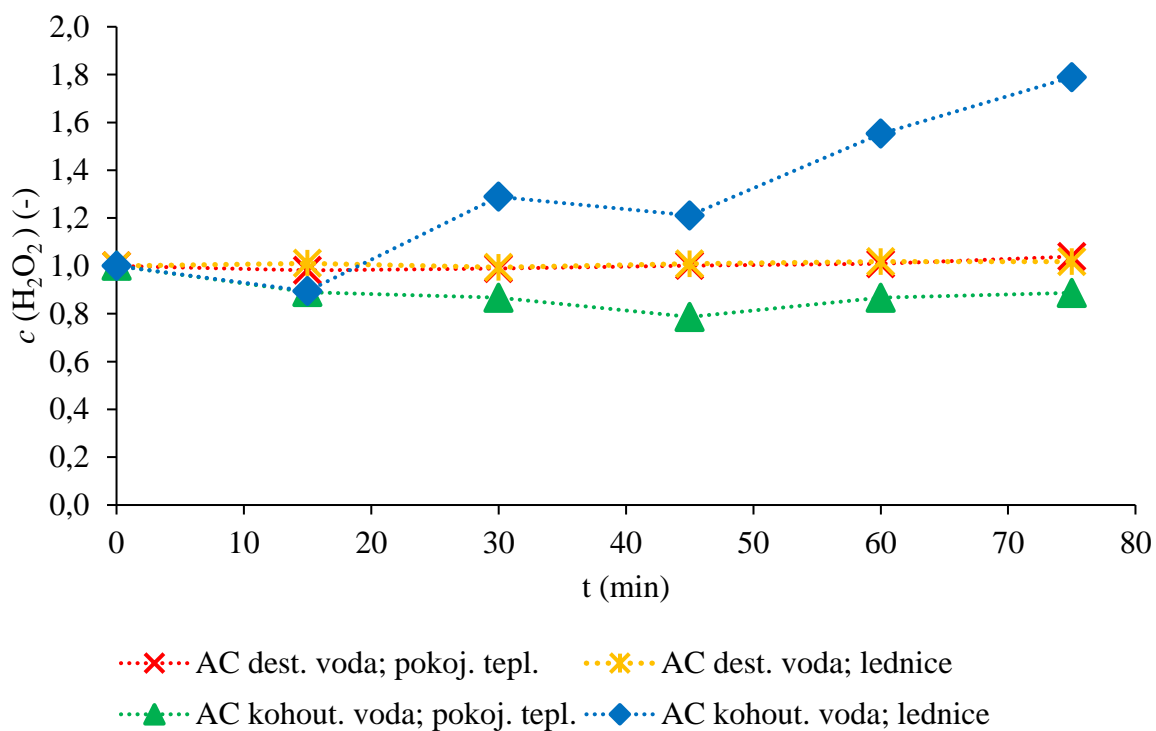


**Obrázek 31** Změna koncentrace dusitanů v průběhu několika hodin po přípravě PAW pomocí DBD

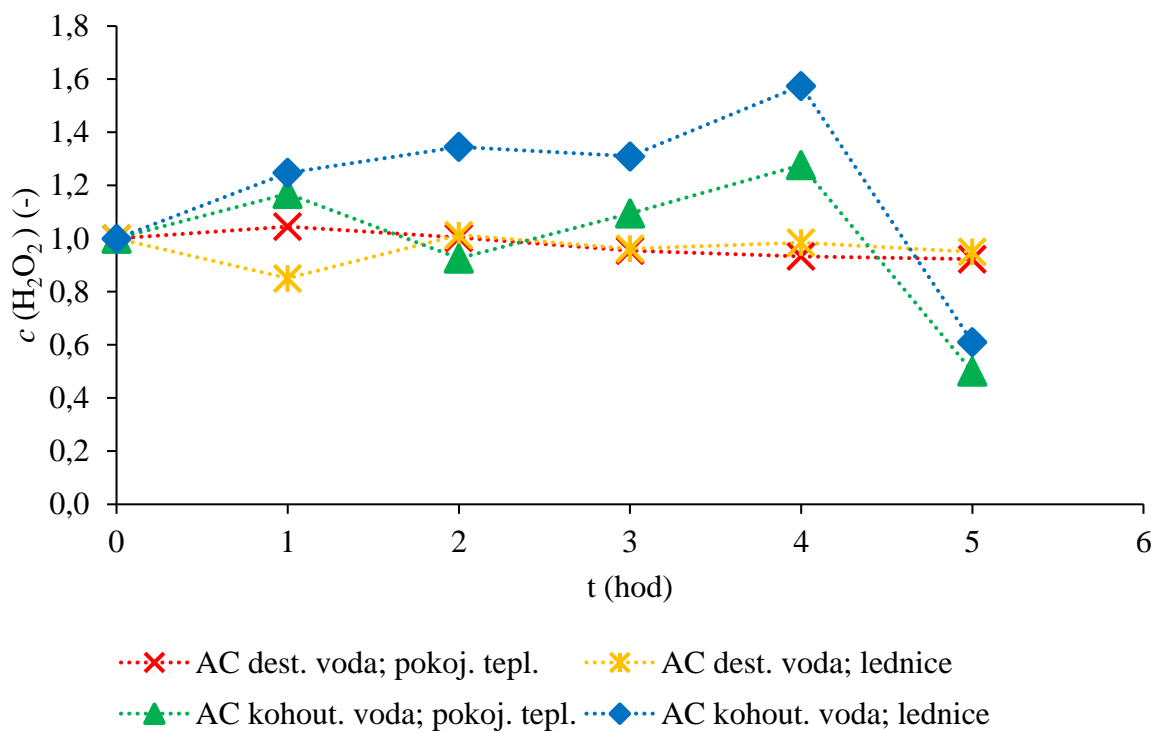


**Obrázek 32** Změna koncentrace dusitanů v průběhu několika dní po přípravě PAW pomocí DBD

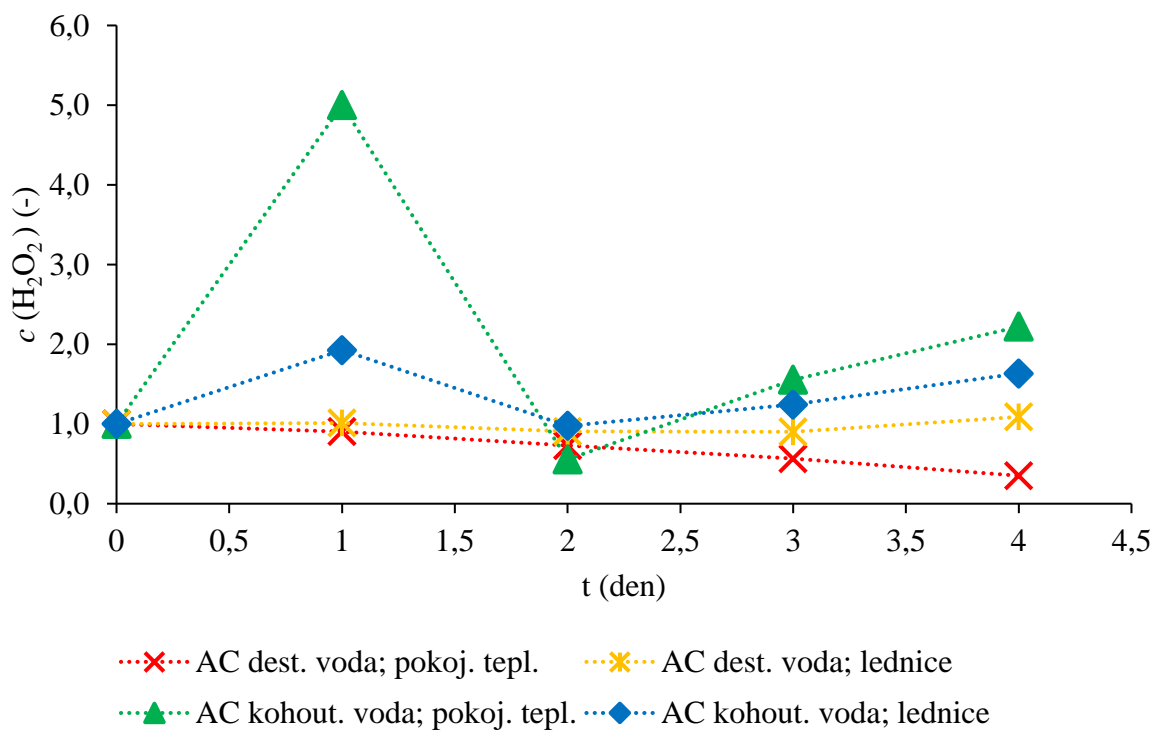
## 8.2 Grafy koncentrace pro aktivaci PAW pomocí AC výboje v kapalině



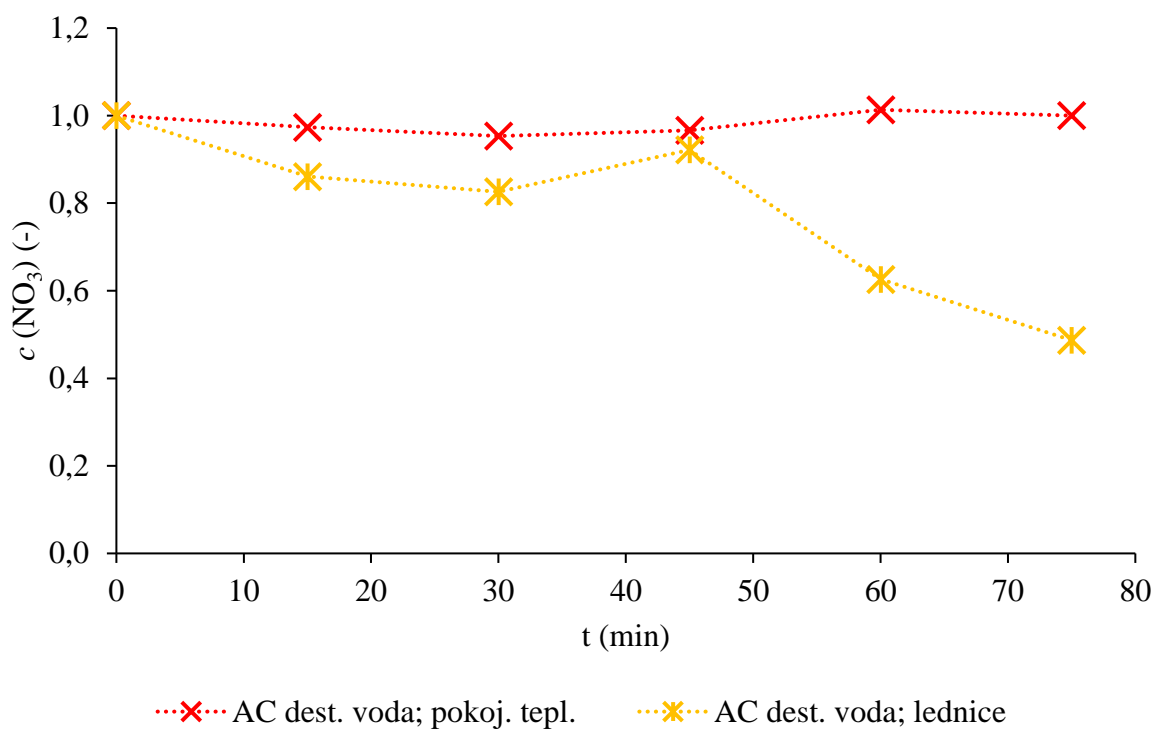
**Obrázek 33** Změna koncentrace peroxidu vodíku v průběhu první hodiny po přípravě PAW pomocí AC výboje v kapalině



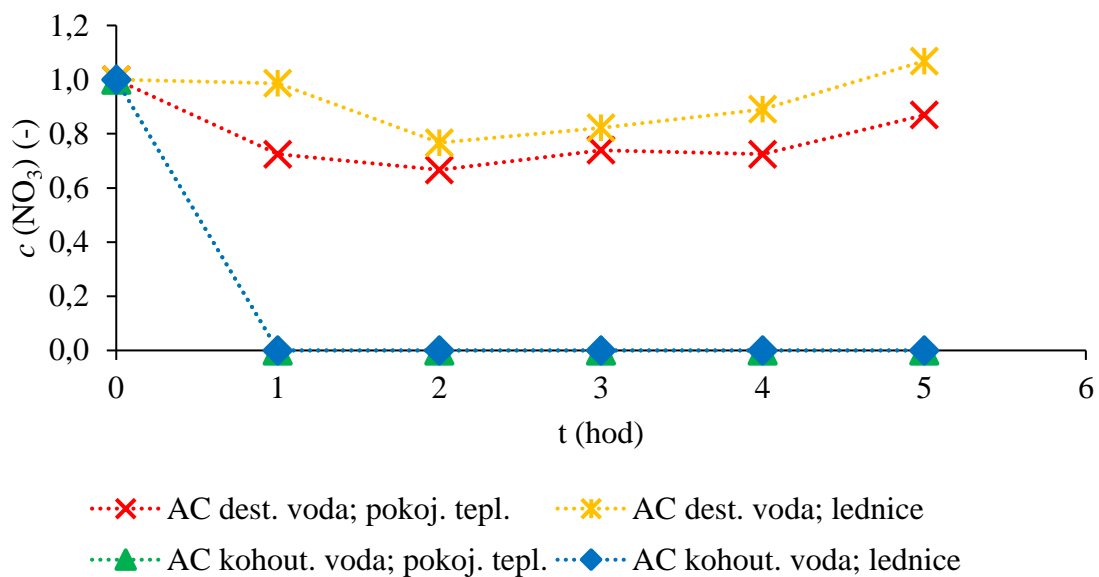
**Obrázek 34** Změna koncentrace peroxidu vodíku v průběhu několika hodin po přípravě PAW pomocí AC výboje v kapalině



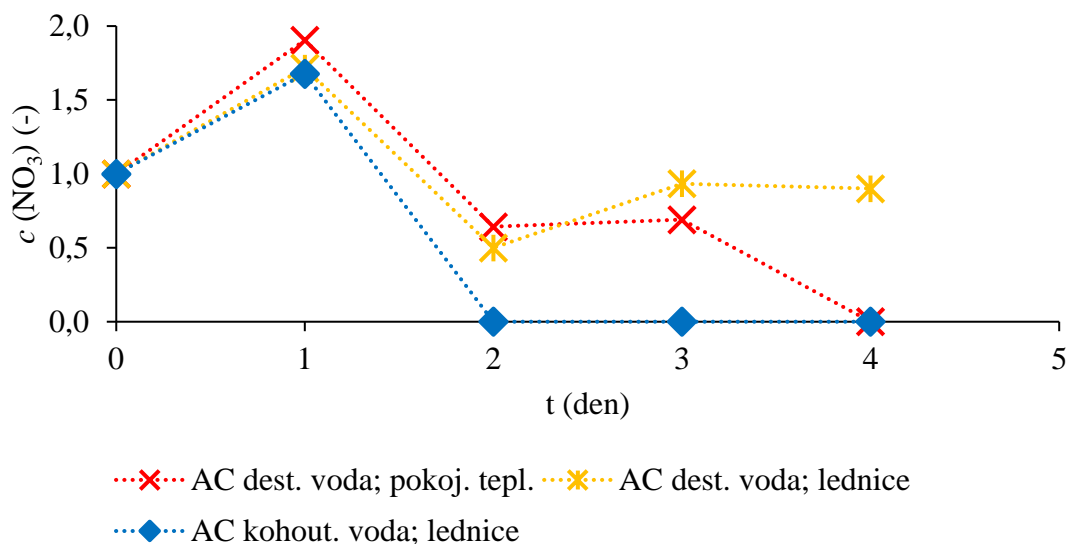
**Obrázek 35** Změna koncentrace peroxidu vodíku v průběhu několika dní po přípravě PAW pomocí AC výboje v kapalině



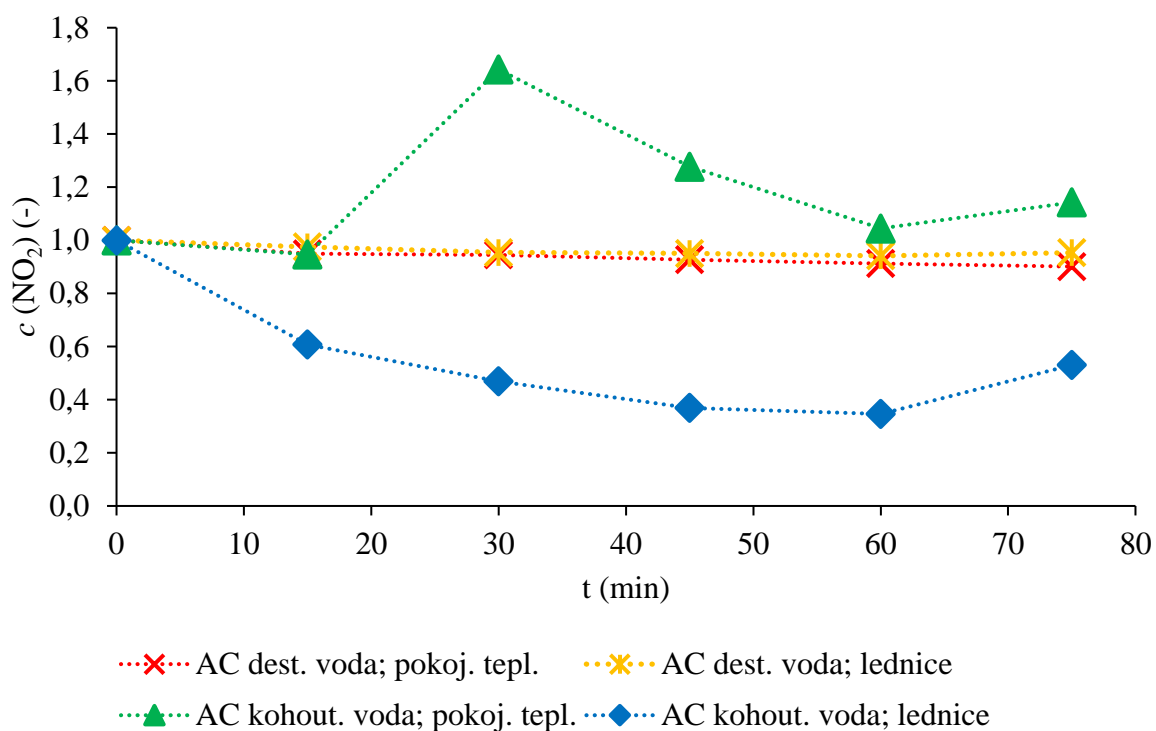
**Obrázek 36** Změna koncentrace dusičnanů v krátkodobém měřítku po přípravě PAW pomocí AC výboje v kapalině



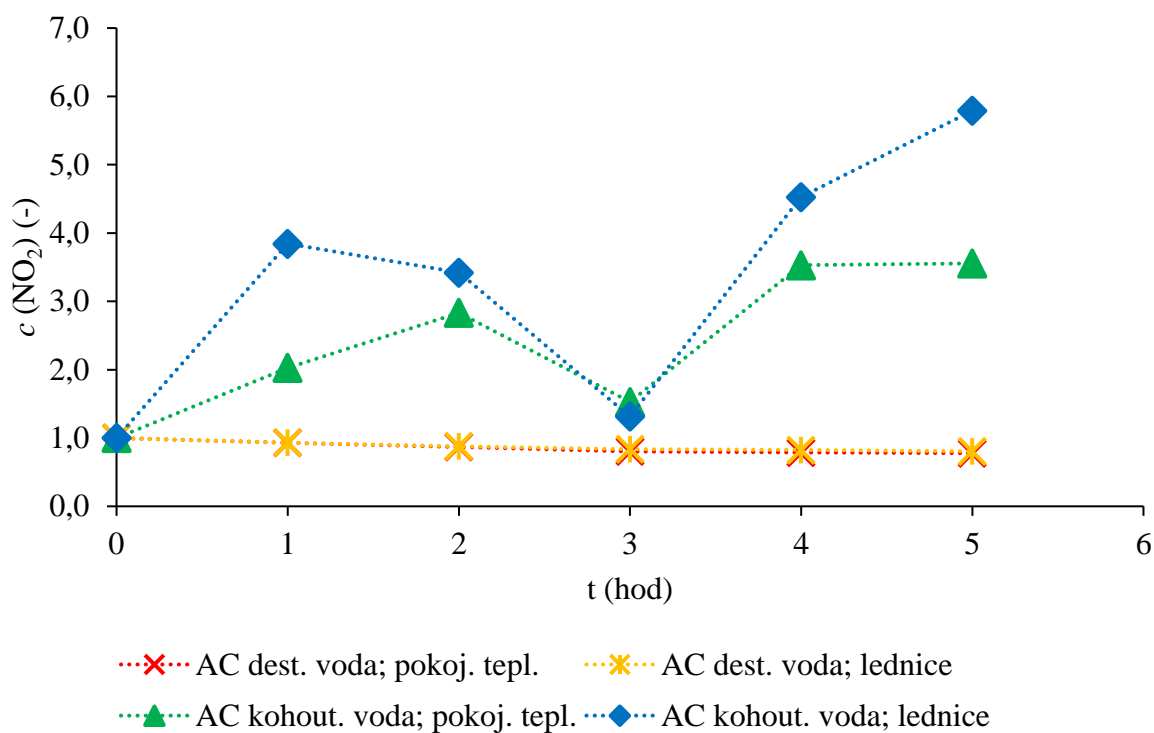
**Obrázek 37** Změna koncentrace dusičnanů v průběhu několika hodin po přípravě PAW pomocí AC výboje v kapalině



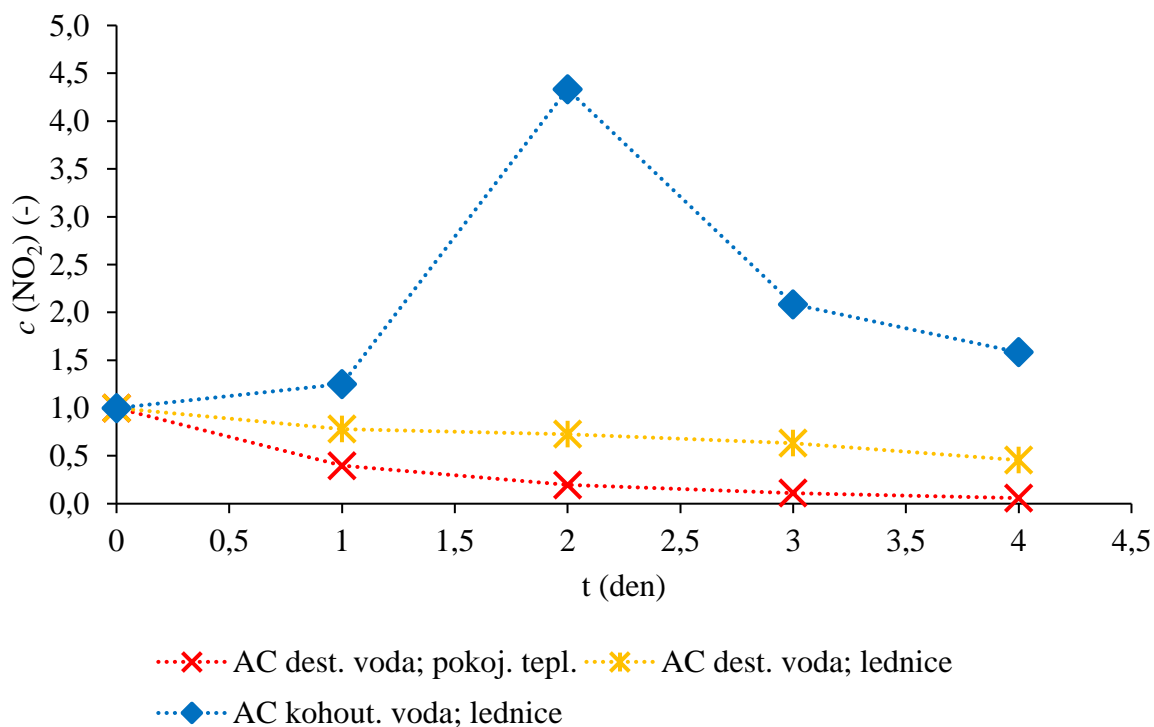
**Obrázek 38** Změna koncentrace dusičnanů v průběhu několika dní po přípravě PAW pomocí AC výboje v kapalině



**Obrázek 39** Změna koncentrace dusitanů v krátkodobém měřítku po přípravě PAW pomocí AC výboje v kapalině



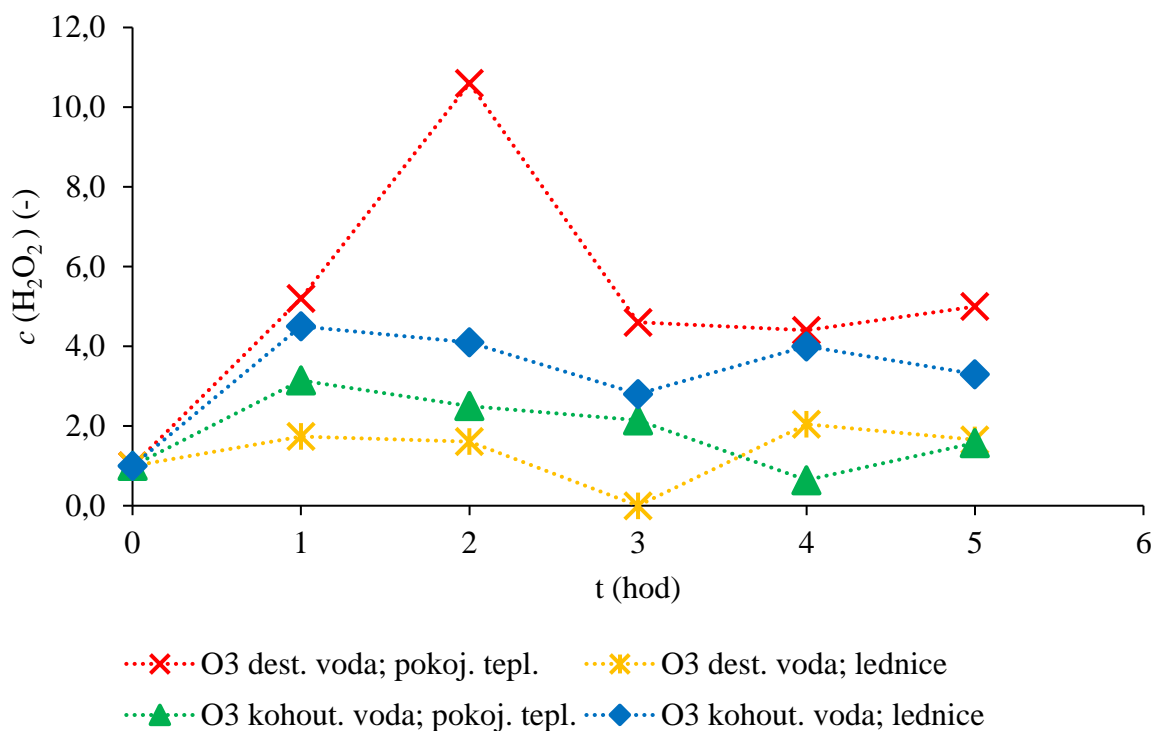
**Obrázek 40** Změna koncentrace dusitanů v průběhu několika hodin po přípravě pomocí AC výboje v kapalině



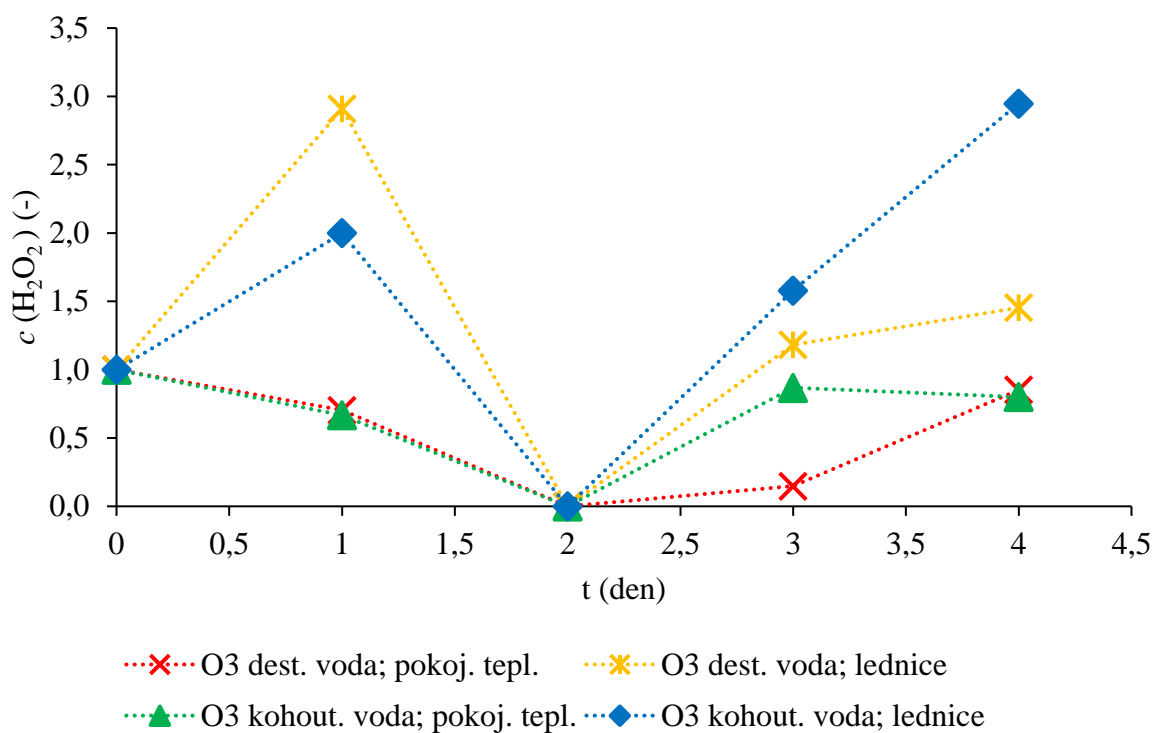
**Obrázek 41** Změna koncentrace dusitanů v průběhu několika dní po přípravě PAW pomocí AC výboje v kapalině



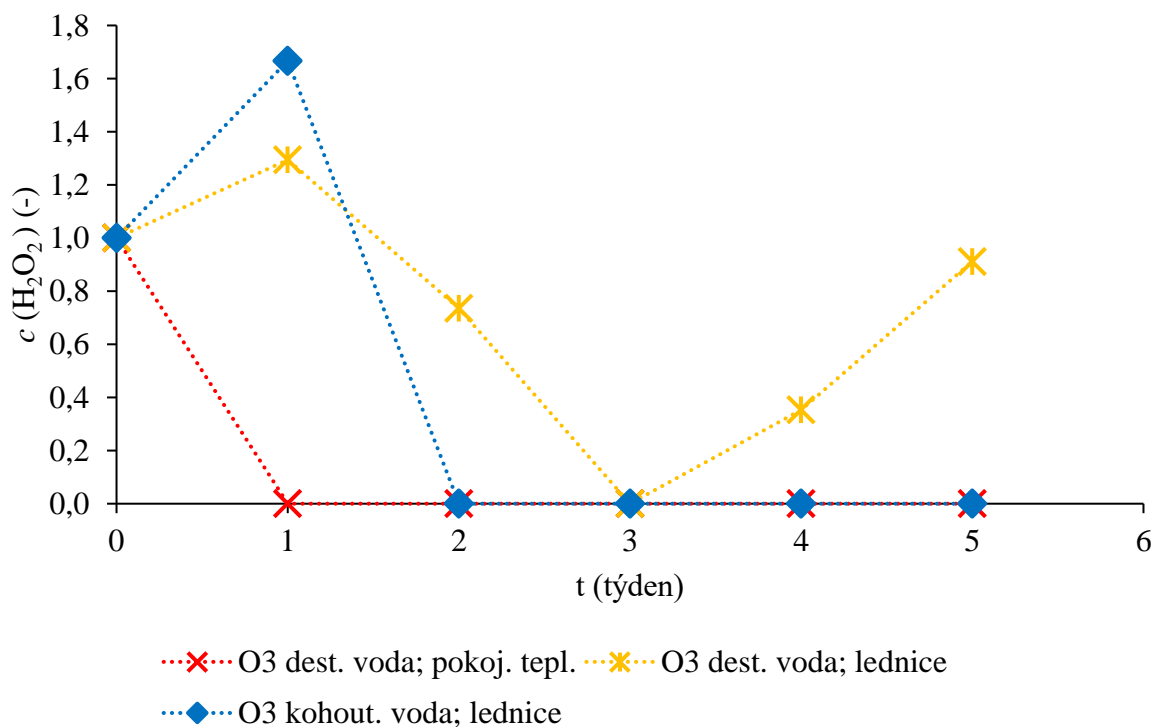
### 8.3 Grafy koncentrace pro aktivaci PAW pomocí probublávání produktů výboje (O<sub>3</sub>)



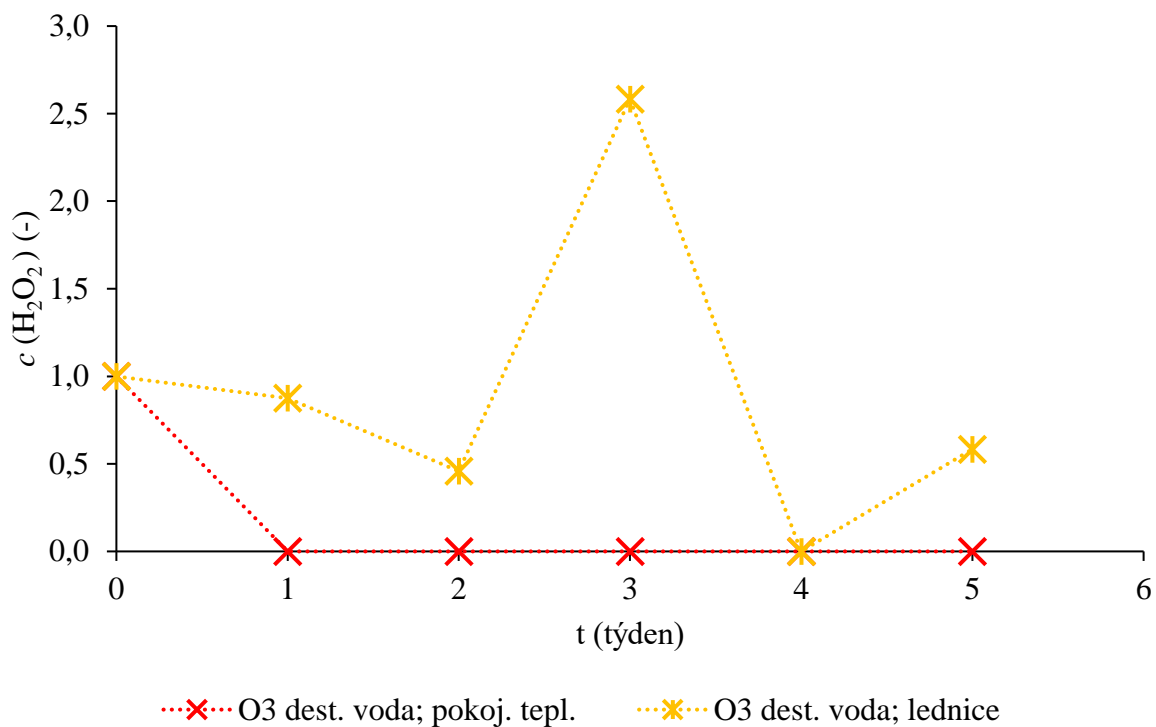
**Obrázek 42** Změna koncentrace peroxidu vodíku v průběhu několika hodin po přípravě PAW pomocí probublávání produktů výboje



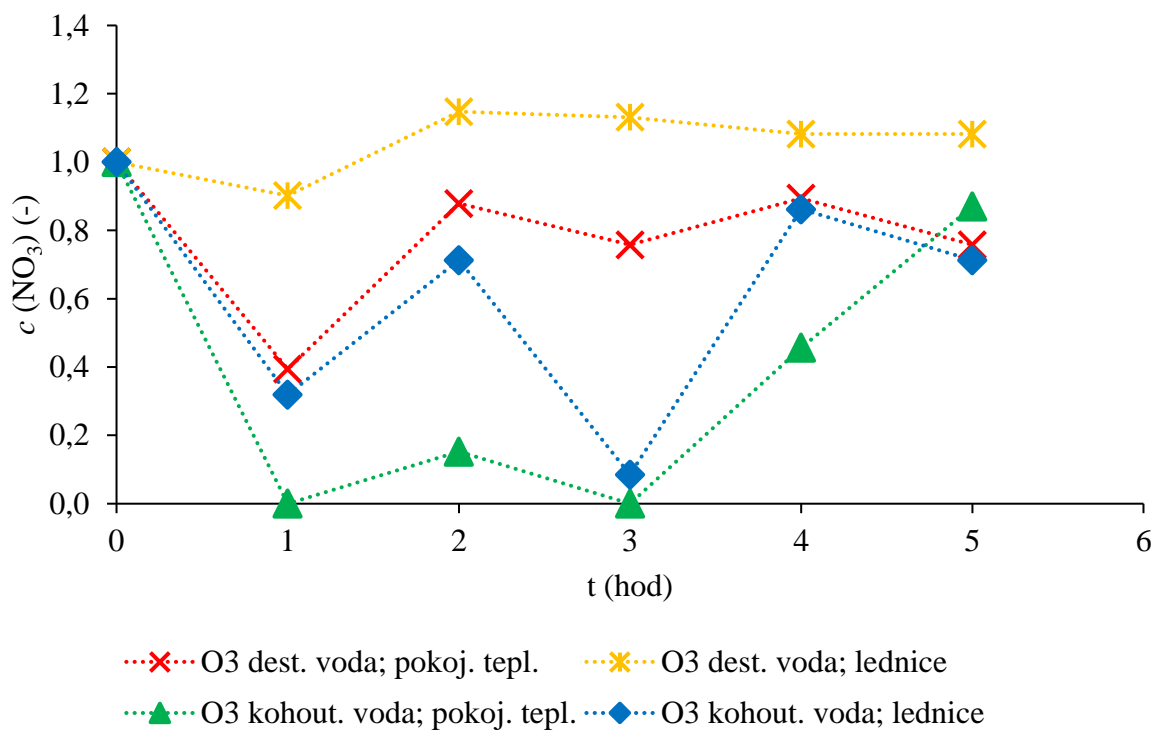
**Obrázek 43** Změna koncentrace peroxidu vodíku v průběhu několika dní po přípravě PAW pomocí probublávání produktů výboje



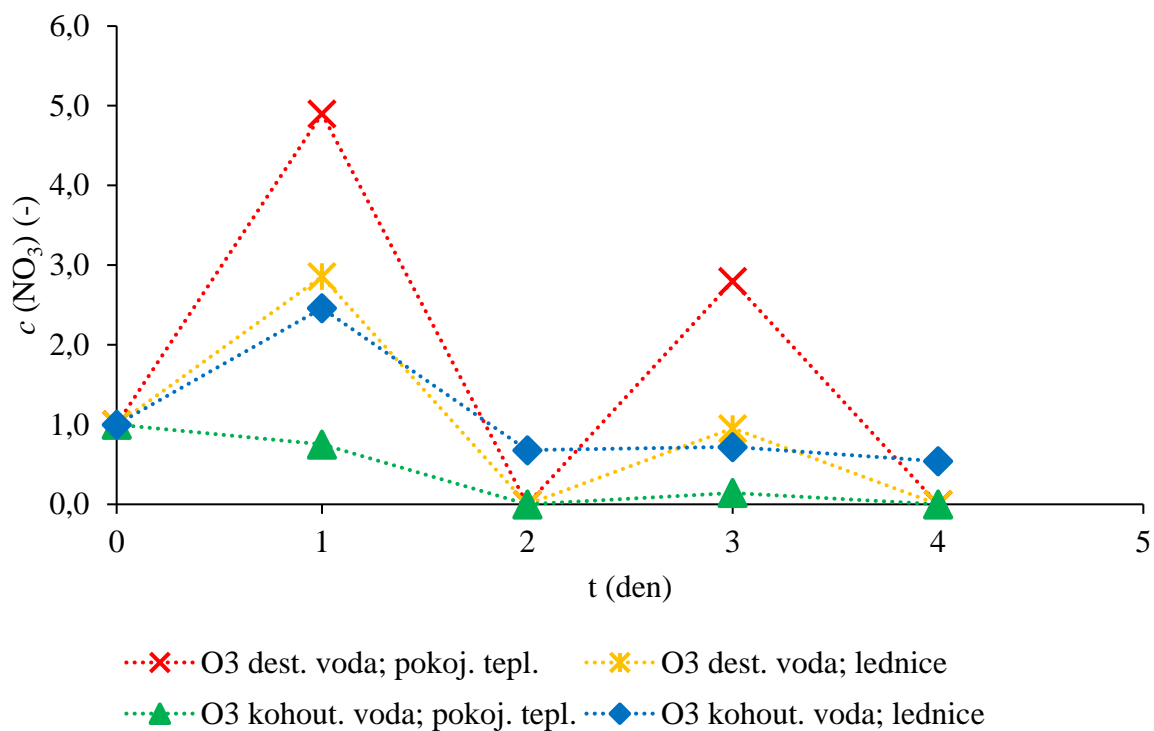
**Obrázek 44** Změna koncentrace peroxidu vodíku v průběhu několika týdnů po přípravě PAW pomocí probublávání produktů výboje



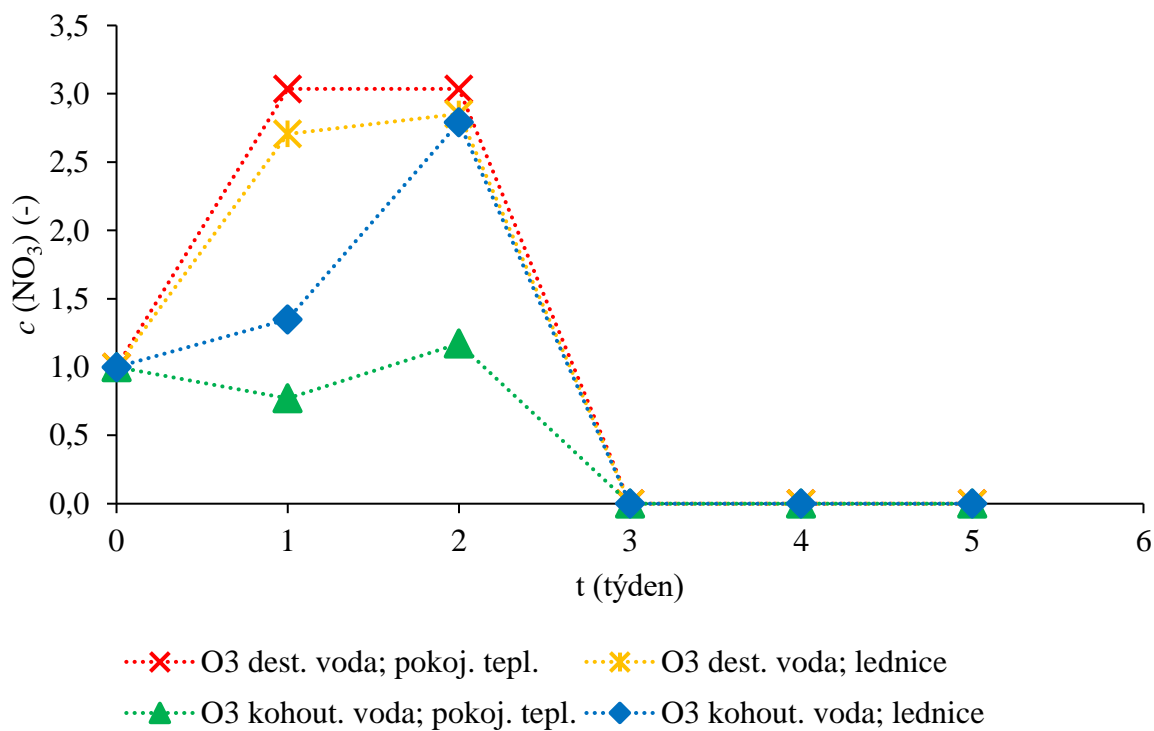
**Obrázek 45** Změna koncentrace peroxidu vodíku v průběhu několika týdnů po přípravě PAW pomocí produktů výroby s jiným typem probublávání



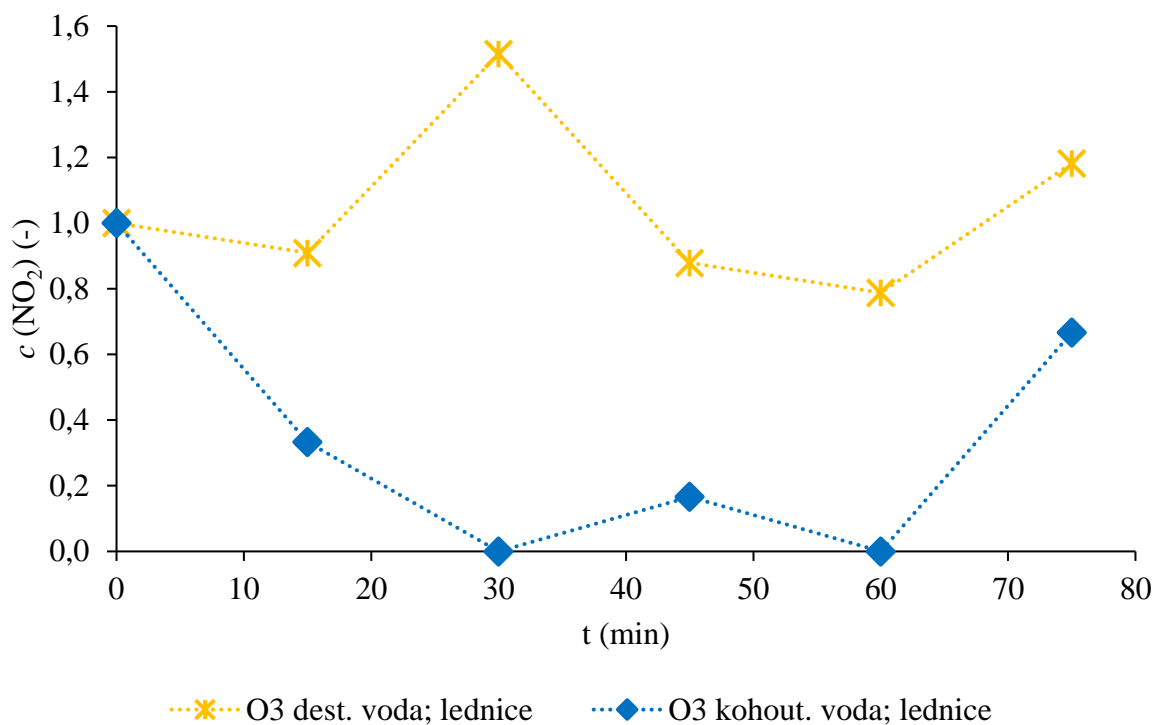
**Obrázek 46** Změna koncentrace dusičnanů v průběhu několika hodin po přípravě PAW pomocí probublávání produktů výroby



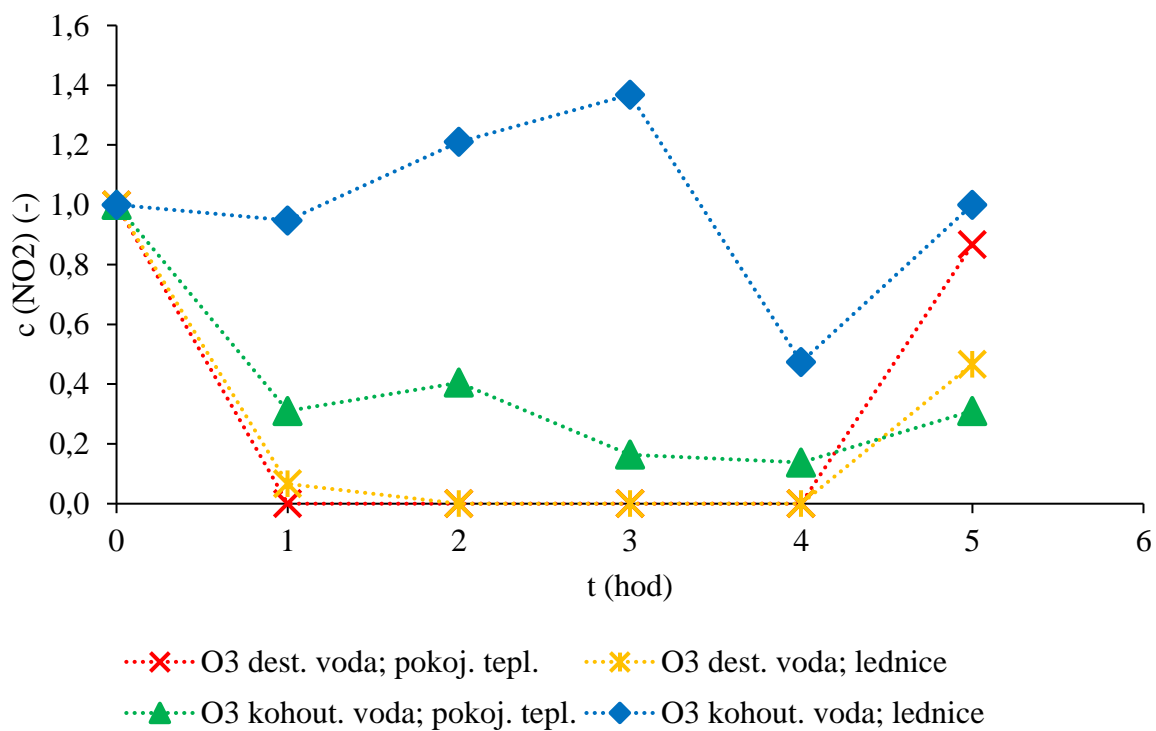
**Obrázek 47** Změna koncentrace dusičnanů v průběhu několika dní po přípravě PAW pomocí probublávání produktů výboje



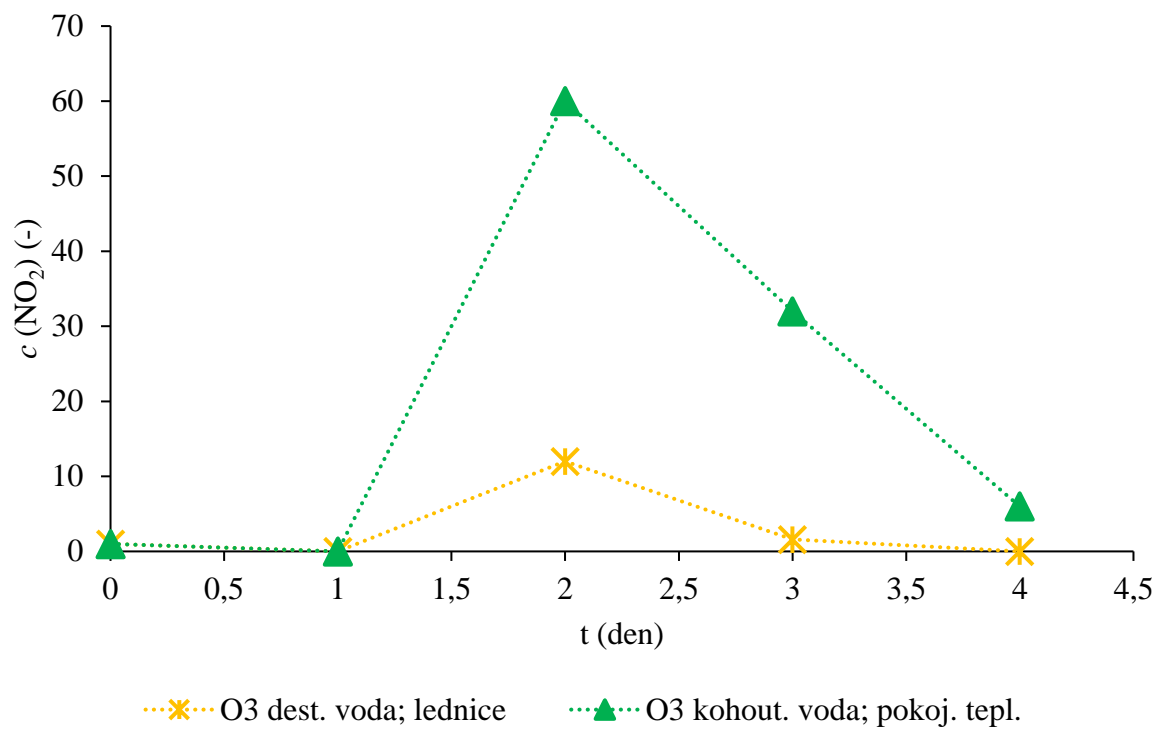
**Obrázek 48** Změna koncentrace dusičnanů v průběhu několika týdnů po přípravě PAW pomocí probublávání produktů výboje



**Obrázek 49** Změna koncentrace dusitanů v průběhu první hodiny po přípravě PAW pomocí probublávání produktů výboje



**Obrázek 50** Změna koncentrace dusitanů v průběhu několik hodin po přípravě PAW pomocí probublávání produktů výboje



**Obrázek 51** Změna koncentrace dusitanů v průběhu několika dní po přípravě PAW pomocí probublávání produktů výboje