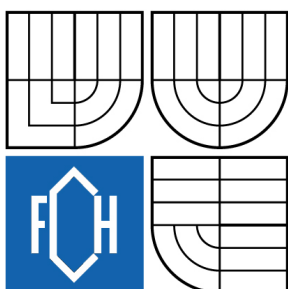


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM STERILIZAČNÍHO ÚČINKU DIELEKTRICKÉHO BARIÉROVÉHO VÝBOJE NA EUKARYOTNÍ MIKROORGANISMY

STUDY OF STERILIZATION EFFECT OF DIELECTRIC BARRIER DISCHARGE
ON EUKARYOTIC MICROORGANISMS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

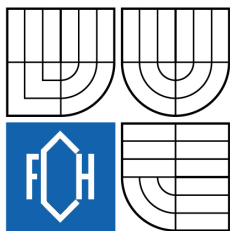
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

HANA VOJKOVSKÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. ZDENKA KOZÁKOVÁ, Ph.D.

BRNO 2009



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0379/2008	Akademický rok: 2008/2009
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Hana Vojkovská	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí bakalářské práce:	Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.	
Konzultanti bakalářské práce:		

Název bakalářské práce:

Studium sterilizačního účinku dielektrického bariérového výboje
na eukaryotní mikroorganismy

Zadání bakalářské práce:

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

Termín odevzdání bakalářské práce: 29.5.2009

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

Hana Vojkovská
Student(ka)

Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V současnosti je využívána celá řada dekontaminačních postupů k inaktivaci mikroorganismů na nejrozličnějších materiálech a předmětech. Vážným nedostatkem těchto konvenčních metod je to, že zatěžují exponovaný materiál teplem nebo chemikáliemi. Předložená bakalářská práce se zabývá plazmovou sterilizací, která je šetrnější a účinná na široké spektrum prokaryotních i eukaryotních mikroorganismů. Působí na ně několika mechanismy založenými na účincích UV-záření, aktivních částic a teploty.

V našem případě byly sledovány účinky dielektrického bariérového výboje (DBD) za atmosférického tlaku na bioindikátor *Aspergillus niger*. Výboj byl generován v dusíku a argonu. Jako nosný materiál byl použit papír a PET-fólie. Byl studován vliv různých pracovních podmínek na efektivitu sterilizace. Konkrétně šlo o vliv délky expozičního času v plazmatu, hustoty plazmového výkonu, typu pracovního plynu a nosného média. Výsledky ukázaly, že s rostoucí hustotou výkonu, případně délky expozičního času vzorků plazmatem, roste sterilizační účinek DBD. Při srovnání výsledků získaných při stejných podmínkách v dusíku a argonu byl vyšší sterilizační účinek pozorován v argonu. Doba sterilizace se pohybovala od 40 s do 150 s v závislosti na použité hustotě plazmového výkonu, plynu a nosném médiu. Dále byl prokázán vliv nosného média na efektivitu sterilizace. Ukázalo se, že v případě papíru dochází k tzv. "efektu stínění". Mikroorganismy mohou být zachyceny v pórech papíru, což může vést k zhoršení kontaktu mikroorganismu s plazmatem a následně tak snížit účinnost dekontaminačního procesu. Pórovitost papíru navíc ztěžuje uvolnění spor do roztoku, takže se z něj získá vždy méně mikroorganismů než z PET-fólie.

Pomocí optické emisní spektroskopie byla provedena spektrální analýza plazmatu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Aspergillus niger, dielektrický bariérový výboj, plazmová sterilizace

ABSTRACT

Nowadays the wide spectrum of decontamination methods are used for the inactivation of microorganism on various materials and subjects. The serious disadvantage of the conventional decontaminations methods is stressing of the exposed material by heat or chemicals. The presented bachelor thesis discusses plasma sterilization, which is more friendly and more effective on the wide spectrum of procaryotic and eucaryotic microorganisms. Basically, the main inactivation factors for cells exposed to plasma are heat, UV radiation and various reactive species

The work was focused on studying of the effect of the dielectric barrier discharge (DBD) operating at atmospheric pressure on bioindicator *Aspergillus niger*. Plasma was generated in nitrogen and argon. Paper and PET-foil wer used as the carrying medium. The influence of various working conditions on the efficiency of plasma sterilization was studied. Namely it was the influence of plasma exposition time, plasma power density, the type of operating gas and type of the medium supporting the microorganism. According to our results the efficiency of the plasma sterilization increases with increasing plasma power density, resp. the plasma exposition time. When comparing the results observed for the same conditions in argon and nitrogen the higher sterilization effect was reached in argon. The sterilization time was 40 – 120 second in dependence to plasma power density, gas and carrying medium. Furthermore the influence of the carrying medium on the sterilization efficiency was proved. It was shown, that porous materials have a "shadowing effect" for microorganisms. The microorganism may penetrate into the paper material and embed in pits and cavities. Such penetration could preclude the interaction of plasma with the microorganism, thereby decreasing the efficiency of spore inactivation. Additionally paper porosity complicates the detachment of spores into solution, so it is reached less microorganisms as from the PET-foil.

The discharge parameters were studied by means of the optical emission spectroscopy.

KEYWORDS

Aspergillus niger, dielectric barrier discharge, plasma sterilization

VOJKOVSKÁ, H. *Studium sterilizačního účinku dielektrického bariérového výboje na eukaryotní mikroorganismy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 46 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité 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 diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Děkuji vedoucí mé práce Ing. Zdence Kozákové, Ph.D. a Ing. Jitce Vraiové za zajímavé téma, konzultace při zpracování bakalářské práce a za pomoc se získáním experimentálních dat do této práce. Poděkování patří také Mgr. Janu Čechovi za zpracování emisních spekter.

OBSAH

1	Úvod	8
2	Teoretická část.....	10
2.1	Popis eukaryotních organismů	10
2.1.1	Eukaryotní mikroorganismy	10
2.1.2	Všeobecná charakteristika hub	10
2.1.3	Třídění hub	11
2.1.4	Kvasinky	11
2.1.5	Plísně	14
2.1.6	Modelové organismy	15
2.2	Mikroorganismy a prostředí.....	17
2.2.1	Obecné podmínky přežívání a usmrcování mikroorganismů	17
2.3	Standardní dekontaminační postupy	20
2.3.1	Definice pojmů	20
2.3.2	Fyzikální postupy založené na působení tepla	21
2.3.3	Fyzikální postupy sterilizace a dezinfekce založené na působení záření	23
2.3.4	Filtrace	23
2.3.5	Plazmová sterilizace	24
2.3.6	Chemické postupy sterilizace a dezinfekce	24
2.4	Plazmová sterilizace, plazma	25
2.4.1	Definice pojmů	25
2.4.2	Aplikace plazmatu	25
2.4.3	Mechanismus účinků plazmatu	26
3	Experimentální část	29
3.1	Princip dielektrického bariérového výboje	29
3.2	Použitá metoda	30
3.2.1	Experimentální zařízení	30
3.2.2	Optická emisní spektroskopie plazmatu	32
3.2.3	Použité mikroorganismy, příprava vzorků	32
3.2.4	Opracování vzorků	33
3.2.5	Způsob vyhodnocení.....	33
3.2.6	Experimentální podmínky	33

4	Výsledky a diskuze.....	35
4.1	Vliv pracovních časů a velikosti hustoty plazmového výkonu.....	35
4.2	Vliv pracovního plynu	37
4.3	Vliv nosného media	38
4.4	Vyhodnocení emisní spektroskopie	39
5	Závěr.....	42
6	Seznam použitých zdrojů	44

1 ÚVOD

Plazma, někdy též označované jako čtvrté skupenství hmoty, se stalo fenoménem 21. století. Technologie na něm založené našly široké uplatnění při obrábění materiálů, inaktivaci škodlivých látek, v automobilovém, elektrotechnickém a textilním průmyslu a v mnoha dalších oborech lidské činnosti. Tato práce je zaměřena na aplikaci, která by znamenala přínos zejména pro potravinářství a zdravotnictví. Je jí plazmová sterilizace.

Použití plazmatu jako sterilizačního prostředku se řadí k novějším metodám, které jsou předmětem zkoumání celé řady vědeckých týmů u nás i ve světě. Oproti konvenčním postupům skýtá celou řadu výhod. Je alternativou pro zničení jak vitálních buněk, tak i spor. Kromě toho umožňuje i odstranění pyrogenů a toxinů z povrchu sterilizovaných předmětů. Další nespornou výhodou je skutečnost, že aplikací metody nedochází k namáhání materiálu zvýšenou teplotou, tlakem ani chemikáliemi, což je základním nedostatkem konvenčních postupů sterilizace. Biocidní účinky trvají pouze během působení elektrického výboje a jsou deaktivovány bezprostředně po vypnutí budícího zdroje. Během působení plazmatu se tedy neuvolňují žádné toxické látky, což je velkým přínosem zejména v potravinářství a medicíně. Použití plazmové sterilizace je zároveň bezpečné i pro obsluhu přístroje.

Předměty mohou být sterilizovány přímým kontaktem s plazmatem nebo v plazmatu dohasínajícím. Hlavní výhodou používání dohasínajícího plazmatu pro sterilizační účely je především teplota. Zatímco plyn ve výboji dosahuje teploty až několika set stupňů Celsia, dohasínající plazma nepřesáhne 50°C, což hraje důležitou roli pro životnost exponovaného materiálu. Na druhou stranu je nutné užití delšího procesního času.

V současné době se metoda testuje za nejrůznějších podmínek tak, aby došlo k její optimalizaci. Plazma může být buzeno mnoha způsoby, ať už dielektrickým bariérovým výbojem (DBD) nebo mikrovlnami. Je možné použít tlaku atmosférického nebo podtlaku. Dalším důležitým aspektem jsou testy nosných materiálů. Cílem je zjistit, jaké případné účinky může plazma na exponovaný materiál mít. Tyto studie přinášejí neocenitelné informace zejména pro technologii obalů, kde by plazma mohlo hrát významnou roli při povrchové dekontaminaci.

Velice důležité je také stanovit, jakou účinnost má plazmová sterilizace na jednotlivé druhy mikroorganismů. Pro tento účel jsou využívány nejrůznější eukaryotní i prokaryotní bioindikátory, zejména bakterie, plísňe a kvasinky. Současné studie ukazují, že je metoda účinná, pokud se pro daný mikroorganismus zvolí vhodné podmínky inaktivace. Bylo zjištěno, že na mikrobiální buňky působí celá řada mechanismů, které mají synergický efekt. Obecně sem patří působení UV-záření, aktivních částic a teploty, jejíž účinky jsme se ovšem snažili eliminovat.

Ekonomická dostupnost zařízení, možnost aplikace metody za atmosférického tlaku a zkrácení pracovních časů značně zvýšily pravděpodobnost jejího uvedení do praxe. Na druhou stranu bude ještě nutný další výzkum, a to zejména v oblasti mikrobiologické, a také materiálové. Bude třeba sledovat další druhy mikroorganismů a stanovit standardní inaktivační podmínky tak, aby se dalo v praxi na účinnost metody spolehnout. Také není přesně známo, jak může plazma působit na vlastnosti materiálů, zejména při opakované expozici. Je ovšem nesporné, že plazmová sterilizace má své opodstatnění, protože proces dekontaminace nejrůznějších výrobků značně zefektivňuje.

Cílem této bakalářské práce je studium plazmové sterilizace jako nové progresivní metody v oblasti inaktivace eukaryotních mikroorganismů. Konkrétně je studováno plazma buzené

prostřednictvím dielektrického bariérového výboje a jeho dekontaminační účinky v závislosti na použitém pracovním plynu, nosném médiu a hustotě plazmového výkonu. Dále bylo provedeno porovnání plazmové sterilizace se standardními sterilizačními postupy.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Popis eukaryotních organismů

2.1.1 Eukaryotní mikroorganismy

Mikroorganismy jsou jednobuněčné nebo vícebuněčné organismy velice malých rozměrů, které nemají schopnost tvořit funkčně diferencované tkáně či pletiva. Jsou významné pro zachování koloběhu látek v přírodě, nalézají průmyslové využití, ale působí i negativně (nežádoucí rozklad materiálů, patogenita). [2]

Z cytologického hlediska je můžeme rozdělit na organismy prokaryotní (bakterie, sinice) a eukaryotní (houby, zelené řasy, prvoci). Základní rozdíly lze nalézt v rozdílné morfologii buněk, kdy vývojově mladší eukaryota dospěla k mnohem větší dokonalosti než prokaryota. Eukaryotní buňka obsahuje vyspělé jádro s dvojitou membránou, DNA je uložena v chromozomech tvořících komplex s bazickými bílkovinami, histony. V prokaryotní buňce je jaderný materiál volně uložen v cytoplazmě. V nitru eukaryotické buňky je viditelná celá řada organel, které jsou vymezeny systémem biomembrán. Typický je také výskyt cytoskeletu a ribozomů, které mohou být volné nebo vázané na některé organely. U prokaryotních buněk nic takového nepozorujeme, všechny součásti buňky se volně vznášejí v cytoplazmě. [2,4,5]

Z průmyslového hlediska mají význam mikroorganismy patřící do říše houby. [2]

2.1.2 Všeobecná charakteristika hub

Houby jsou heterotrofní, většinou aerobní organismy, jejichž tělo označujeme jako stélku. U většiny hub dochází k diferenciaci stélky na část vegetativní, která je tvořena vlákny neboli hyfami, a na část reprodukční, tvořenou rozmnožovacími orgány. Systému rozvětvených vláken se říká mycelium, které může být rozděleno přehrádkami. [7]

Na myceliu vznikají rozmnožovací orgány, a to buď pohlavní (gametangia) nebo nepohlavní (sporangia, konidiofory), které produkují tzv. spory (výtrusy) a dodávají houbám jejich typické zbarvení. V souvislosti s pohlavním procesem vznikají trvalé výtrusy, a to buď přímo na myceliu nebo v plodnici. Trvalé i nepohlavní výtrusy mají různý tvar, velikost i počet buněk, podobně jako samotné rozmnožovací orgány a plodnice. Z toho důvodu lze houby rozdělit podle morfologických znaků. [7,33]

Životní cyklus hub začíná klíčením spory ve vlákno, k čemuž dochází ve vlhkém prostředí za určité teploty. Spora se do vhodného prostředí dostává díky otřesům nebo proudění vzruchu. K vytváření rozmnožovacích orgánů a spor je zřetelnější závislost na teplotě a živinách (substrát). Způsob jejich získání se liší podle způsobu života houby. Parazitické houby získávají živiny z těl hostitelských organismů, saprofytické houby je získávají z uhynulých organických těl či organických látek. Existují i houby symbiotické, kdy může docházet k soužití např. s kořeny vyšších rostlin nebo s řasami. [7,33]

Růstu jsou schopny pouze koncové buňky vláken. Vylučují enzymy, které umožňují rozklad živin do stravitelné podoby. Někdy mohou vylučovat antibiotika či toxiny, jež brzdí nebo potlačují růst jiných organismů. [7] Všechny houby mají nepatrné až značné nároky na kyslík,

preferují kyselé prostředí s převahou sacharidů (pH 3 až 6) a jejich spory jsou oproti bakteriálním méně odolné vůči vysokým teplotám. Evidentní je jejich přizpůsobivost spíše k nižším teplotám, kdy však je pásmo vegetačních možností výrazně užší než u bakterií. [33]

O mikroskopických houbách můžeme říci, že jsou všudypřítomné. V našem životě hrají celou řadu úloh. Některé druhy jsou průmyslově využívány (výroba potravin, léčiv, chemických sloučenin, některé vlastní houby jako potravina), jiné jsou známy svou rozkladnou činností, čímž znehodnocují celou řadu materiálů. Známy jsou též houby parazitické a patogenní, byť těchto je pouze malý počet. Jejich rozšíření a význam jsou však značné. [7]

Mikroorganismy, jejichž popisem se budu dále věnovat, spadají mezi *Eumycota*, tedy vlastní houby. Jedná se o plísně (někdy též mikroskopické vláknité houby) a kvasinky. Odlišnosti najdeme jak ve struktuře buňky, tak i v její fyziologii. I z morfologického hlediska jsou tyto organismy velice odlišné. Plísně vytvářejí zpravidla souvislá mycelia nesoucí ve stadiu pokročilejší vyspělosti fruktifikační orgány, kvasinky se vyskytují jako krátké více méně samostatné buňky. Společným znakem je nepohyblivost těchto mikroorganismů. [33]

2.1.3 Třídění hub

Říše: Houby (*Fungi*)

Oddělení:

- Hlenky (*Myxomycota*)
- Chytridie (*Chytridiomycota*)
- Řasovky (*Oomycota*)
- Vlastní houby (*Eumycota*)
 - Třída: spájivé (*Zygomycetes*)
 - Třída: endomycety (*Endomycetes*)
 - Třída: vřeckovýtrusé (*Ascomycetes*)
 - Třída: stopkovýtrusé (*Basidiomycetes*)

Pomocné oddělení:

- *Fungi imperfecti* (*Deuteromycota*) [8]

2.1.4 Kvasinky

Jedná se o heterotrofní organismy s fakultativně anaerobním (popř. aerobním) metabolismem, které lze zařadit do tří skupin: *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* a *Deuteromycota* [2,6]. Obecně platí, že kvasinky jsou na vegetační podmínky náročnější než plísně. [33]

2.1.4.1 Morfologie kvasinek

Z morfologického hlediska vykazují kvasinky velkou tvarovou, velikostní či barevnou diverzitu. Obvykle jsou kvasinky kulaté nebo oválné (základním tvarem je rotační elipsoid), ale vyskytují se i druhy, které mají buňky charakteristického citronovitého, vajíčkovitého, lahvovitého či vláknitého tvaru. Dosahují velikosti 3-15 μm . [5,6]

2.1.4.2 Cytologie kvasinek

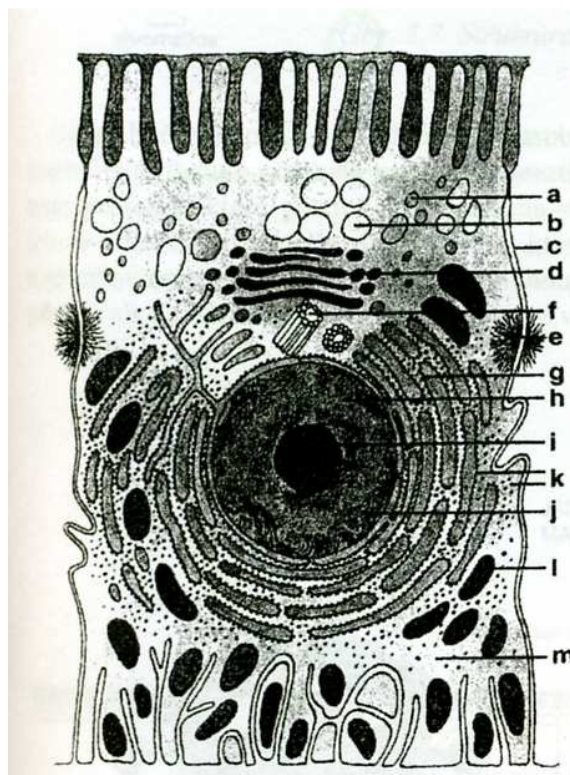
Na povrchu buňky kvasinky je pozorovatelná pevná neohebná *buněčná stěna*, která ji odděluje od vnějšího prostředí. Udává buňce tvar a chrání ji před mechanickými vlivy a osmotickým tlakem. Póry, které se ve stěně vyskytují, jsou propustné pro většinu látek, mimo vysokomolekulárních. Buněčná stěna kvasinek obsahuje až 80% polysacharidů, většinou založených na bázi glukánů. Nejznámější látkou buněčné stěny je chitin. [2,5]

Plazmatická membrána (plazmalema), která je umístěna pod buněčnou stěnou, tvoří osmotické rozhraní a má za úkol kontrolovat transport látek. Je jemná a elastická s malými póry, kterými mohou procházet nízkomolekulární sloučeniny bez elektrického náboje. Má typické fosfolipidové složení s vnořenými molekulami proteinů. Fosfolipidy mají hydrofobní a hydrofilní část, orientují se tudíž v roztoku do podoby tzv. lipidové dvojvrstvy. Bílkoviny mají funkci nosičů – zajišťují transport všech ostatních látek, které nemohou proniknout póry. [2]

Vnitřní prostředí buňky tvoří *cytoplazma*. Obsahuje 65-90% vody, organely a velké množství chemických látek (enzymy, rezervní látky – glykogen, volutin, meziprodukty metabolismu apod.). Nejnápadnější organelou je *vakuola*, která funguje jako rezervoár enzymů a látek, které se právě neúčastní metabolických přeměn. *Endoplazmatické retikulum* lze popsat jako systém dvojitých membrán, na jejichž povrchu nalezneme zrníčka polyzomů (agregáty ribozomů). Dochází zde k syntéze bílkovin, vyskytují se zde i některé enzymy a rezervní látky. *Mitochondrie* jsou velice významným sídlem metabolických procesů – dýchacího řetězce a systému oxidační fosforylace. Přítomná RNA a DNA je nositelem mimojaderné genetické informace. I zde probíhá syntéza bílkovin. Další významnou organelou je *Golgiho aparát*, jehož funkce není zcela jasná. Předpokládá se, že tento systém měchýřků má na starost transport prekurzorů buněčné stěny z cytoplazmy přes cytoplazmatickou membránu. *Ribozomy* jsou tvořeny rRNA a bílkovinami. Slouží jako hlavní centrum pro výrobu proteinů. [2]

Z kvasinek lze vyizolovat některé důležité látky. Jedná se o bílkoviny cerevizin, zymokasein a glutatiol, fosfolipidy kefalín a lecitin, dále o ergosterol a volutin. [5]

Na obrázku č. 1 jsou viditelné výše popsané organely.



Obr. 1: Živočišná buňka

a – lysozom, b – sekreční váček, c – plazmatická membrána, d – Golgiho aparát, e – desmozom, f – centriol, g – endoplazmatické retikulum, h – jádro, i – jadérko, j – chromatin, ribozomy, l – mitochondrie, m – základní cytoplazma [4]

2.1.4.3 Rozmnožování kvasinek

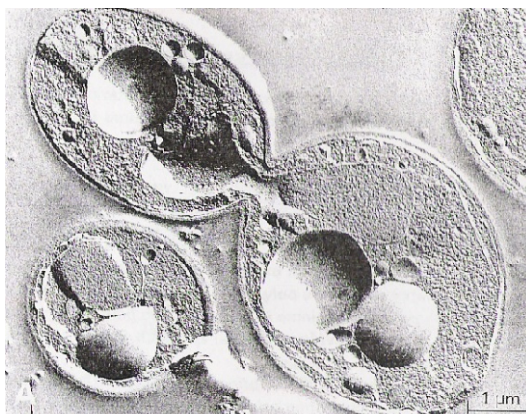
U kvasinek lze pozorovat dva typy rozmnožování, a to nepohlavní (vegetativní) a pohlavní (sexuální) rozmnožování. [6]

Většina rodů se rozmnožuje nepohlavně, a to nejčastěji pučením, kdy lze podle počtu jizev zjistit stáří mateřské buňky. [5] Méně časté je dělení a pučení na široké základně, které představuje přechod mezi oběma variantami. V důsledku pučení může vzniknout pseudomycelium nebo mycelium pravé. Pseudomycelium vzniká v případě, kdy kvasinka vytváří protáhlé buňky, které pučí pouze na pólech a zůstávají spojeny v dlouhá zaškrcovaná vlákna. V určitých místech takového pseudomycelia pak vznikají svazky kulatých až elipsoidních buněk, blastospor. Pravé mycelium vzniká příčným dělením protáhlých buněk. Svazky se zde nazývají jako blastokonidie

Blastospory i blastokonidie jsou označovány jako prvky fruktifikace. Další typy nepohlavních spor jsou balistospory, arthrospory a chlamydospory. [6]

Výsledkem rozmnožování pohlavního jsou pohlavní spory. Dělí se na endospory (askospory), které jsou typické pro většinu druhů, a exospory (bazidiospory). Právě podle typu pohlavních spor lze kvasinky rozdělit do jednotlivých skupin. [6]

Na obrázku č. 2 je vyobrazen proces pučení kvasinek.



Obr. 2: Submikroskopická struktura eukaryotní buňky (pučící kvasinková buňka) [32]

2.1.4.4 Význam kvasinek

Kvasinky mají významné sacharolytické vlastnosti, což je předurčuje pro široké využití v průmyslu. Jejich schopnost fermentace se uplatňuje při výrobě piva, vína, ethanolu či glycerolu, nepostradatelné jsou v pekárenství (kvasnice). Nejdůležitějším průmyslově využívaným druhem je *Saccharomyces cerevisiae*. Na druhou stranu působí kvasinky i negativně. Jedná se např. o nežádoucí kontaminaci v průmyslových výrobcích, kdy kvasinky negativně ovlivňují jak technologii, tak i organoleptické vlastnosti finálního výrobku. Jako příklad lze uvést tzv. křísotvorné kvasinky při výrobě vína, kvasinky zákalotvorné či sedimentující. [2,6] Rovněž nežádoucí jsou patogenní účinky některých druhů (*Candida albicans* jako původce nemocí urogenitálního traktu). [1]

2.1.5 Plísně

Plísně jsou často označovány jako mikroskopické vláknité houby. Jsou rozčleněny do čtyř skupin: *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* a *Deuteromycota*. Tyto heterotrofní organismy mají výhradně aerobní metabolismus. Vyskytují se v půdě, odkud se dostávají do okolního prostředí. Jsou častou nežádoucí kontaminací vzduchu, protože je proti účinkům UV-záření chrání různá barviva. Lze je považovat za značně adaptabilní organismy, což jim umožňuje jejich bohatý enzymatický aparát. [1,2,9]

2.1.5.1 Morfologie plísní

Plísně se vyskytují v podobě vláken (hyf). Hyfy mohou být jednobuněčné (bez přepážek) nebo vícebuněčné (septované, přehrádkované). Společně tvoří hyfy mycelium. [9]

2.1.5.2 Cytologie plísní

Cytologicky jsou plísně kvasinkám velmi podobné. Jejich buněčná stěna obsahuje také polysacharidy, ale zejména chitin, chitosan, mannany, glukany a celulosu. Díky obsaženým lipidům, bílkovinám a voskům má výrazně menší smáčitelnost než buněčná stěna kvasinek. Hlavní rezervní látkou plísní jsou lipidy. V ostatních ohledech se stavba buňky shoduje s kvasinkami. [2]

2.1.5.3 Rozmnožování plísní

Plísně potřebují pro svůj vývoj alespoň stopy kyslíku, proto se rozmnožují pouze na povrchu napadeného materiálu. Je popsáno rozmnožování nepohlavní a pohlavní. Zvláštním typem je pak rozrůstání hyf. [9]

Při nepohlavním rozmnožování vznikají nepohlavní spory, které mohou mít různý tvar a bývají jednobuněčné nebo vícebuněčné. Zajímavé je, že jeden druh plísně může tvořit různé druhy těchto spor. Mohou to být endospory (sporangiospory) nebo exospory, které dále dělíme na konidie, oidie (arthrospory), chlamydospory a blastospory. [9]

Pohlavní spory mohou vznikat dotknutím hyf (zygospory) nebo vznikají ve vřecku (askospory). Dále byly popsány bazidiospory a oospory. Opět platí, že podle pohlavního rozmnožování lze plísně rozdělit do jednotlivých skupin. [9]

2.1.5.4 Význam plísní

Plísně mají velký průmyslový význam, ale i velké množství nežádoucích účinků. Riziková je zejména tvorba mykotoxinů, které mohou způsobovat celou řadu onemocnění, alergických reakcí i otrav (např. aflatoxiny produkují některé druhy r. *Aspergillus*). Mezi velice komplikovaná plísňová onemocnění patří mykózy, způsobované r. *Fusarium*, *Curvularia*, *Aspergillus*, *Pseudoallescheria* atp. Plísně mají bohatý enzymatický aparát, a tím pádem i schopnost rozkladu širokého spektra látek. Působí nejen na biologický materiál (potravinu), ale i na papír, kůži, látky a některé plasty (např. archiválie poškozuje celé spektrum plísní, jako r. *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium* apod.). Vzhledem k všudypřítomnosti plísní a jejich nenáročnosti jsou i škody jimi způsobené citelné. [1,2,10,7]

Pozitivní je možnost využití plísní v lékařství (penicilin produkovaný *Penicillium chrysogenum*). V průmyslu se využívají při výrobě sýrů a vín (ušlechtilé kultury plísní, jako *Penicillium roqueforti*) a pro získávání enzymů (pektinasy) a široké palety kyselin (octová, itakonová, glutamová, fumarová). [2,10]

2.1.6 Modelové organismy

Pojmem modelový organismus označujeme intenzivně zkoumaný organismus, jehož zkoumání neslouží jen k poznání jeho samého, ale je systematicky používáno ke zkoumání a popisování obecnějších jevů a odvozování vlastností a vztahů platících pro jiné organismy. Aby byl použitelný pro tento účel, musí splňovat některé vlastnosti. Jde zejména o dostupnost dostatečně reprezentativních výsledků v rozumném časovém horizontu, tj. organismus má krátký

životní cyklus a větší počet potomstva. Dále je požadována ekonomická nenáročnost jeho používání a relativní jednoduchost a nevýjimečnost ve zkoumané oblasti. [11]

Bioindikátorem pak rozumíme přípravek obsahující vybraný mikroorganismus s vysokou rezistencí na jedno nebo více sterilizačních médií a jehož zničením po sterilizačním procesu je dokázáno, že sterilizace je účinná. [13]

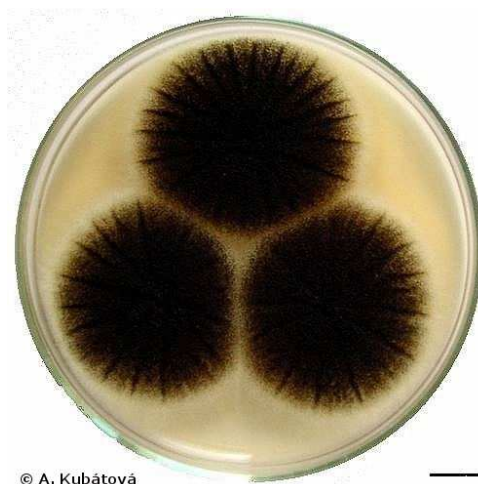
Pro plazmovou sterilizaci se užívají čtyři druhy eukaryotních organismů: *Saccharomyces cerevisiae* [16], *Candida albicans* [15,16,37], *Penicillium funiculosum* [17] a *Aspergillus niger*. [14,17,18,20,24]

Kvasinku *Saccharomyces cerevisiae* řadíme do třídy *Ascomycetes*. [10] Jedná se o technologicky velice důležitou kvasinku, která se uplatňuje jako pekařská, lihovarská, vinařská či pivní kvasinka (zkvašuje cukry). Pro využití jakožto modelového organismu má několik předpokladů. [2] Snadno se kultivuje, což je znak typický pro prokaryota. Na straně druhé se cytologicky podobá eukaryotům, tedy je podobná živočichům a rostlinám. S člověkem sdílí 23% genomu a obsahuje i velké množství proteinů (pro buněčný cyklus, signalizaci), které jsou s lidskými buňkami shodné. [12]



Obr. 3: Kolonie *Saccharomyces cerevisiae* na sladinovém agaru po 3 týdnech při 25°C [10]

Plíseň *Aspergillus niger* vytváří rychle rostoucí černé kolonie kulovitěho tvaru, na spodní straně žluté barvy. Vyskytuje se celosvětově velice hojně, hlavně však v teplých oblastech, a to především na rozmanitých potravinách rostlinného i živočišného původu. Některé kmeny produkují mykotoxin ochratoxin A. Často bývá izolován z klinického materiálu. [10] Jako modelový organismus se používá pro svou vysokou odolnost vůči UV-záření, která je způsobena právě jeho černou pigmentací. [14]



Obr. 4: Kolonie *Aspergillus niger* na CYA po 3 týdnech při 25°C [12]

Kvasince *Candida albicans* je věnována zvýšená pozornost, protože je patogenní, jak již bylo řečeno výše. Vyskytuje se přirozeně na nejrozličnějších tkáních lidského těla, k rozvinutí infekce může dojít v případě snížené imunity jedince. K její inaktivaci by bylo možné použít plazmové sterilizace. Pokusy probíhají např. při léčení špatně se hojících ran, kdy je použití plazmatu šetrnou alternativou do budoucna (efekt popsán Weltmannem). [22,34,5]

Plíseň *Penicillium funiculosum* se spolu s druhem *Aspergillus niger* často vyskytuje v knihovnách a archivech, kde společně způsobují degradaci často vzácných monografií a listin. V současnosti se používá zejména sterilizace etylenoxidem. Možnou alternativou by mohlo být i použití plazmové sterilizace, jak popsali Laguardi a Vohrer. Aplikace plazmatu umožňuje nejen inaktivaci nežádoucích mikroorganismů, ale také zpevnění textury papíru prostřednictvím nanesené vrstvy. [17,7,24]

Jak ukazují výsledky některých prací (Gadri, Muranyi), jsou jednotlivé mikroorganismy vůči plazmové sterilizaci rozdílně odolné. Zatímco inaktivace kvasinek probíhá bez větších obtíží, plíseň *Aspergillus niger* podléhá působení plazmatu až za náročnějších podmínek. Autoři označují tento druh jako doposud nejodolnější a domnívají se, že to může být způsobeno tím, že UV-záření tvoří hlavní inaktivační složku plazmatu. [14,16]

2.2 Mikroorganismy a prostředí

2.2.1 Obecné podmínky přežívání a usmrcování mikroorganismů

Životní projevy mikroorganismů, jejich rozmnožování a vývoj jsou těsně spjaty s vnějším prostředím. Aby se mohly rozmnožovat, musí být v prostředí jak dostatečné množství surovin pro syntézu buněčné hmoty a dostatek zdrojů využitelné energie, tak i vhodné fyzikální, chemické a biologické podmínky. [2]

Mikroorganismy se sice mohou vnějším podmínkám do určité míry přizpůsobit, tato schopnost je ovšem omezena určitým limitem. Znamená to, že jsou vystaveny celé řadě

nepříznivě působících faktorů, které jsou v praxi využitelné v boji proti nim. Mezi tyto vlivy patří především teplota, záření, nedostatek vody a živin, nevhodné pH a podobně. [1,2]

Pokud působíme nepříznivě na populaci mikroorganismů, dochází k jejímu postupnému odumírání. Toto probíhá podle logaritmické křivky, čili konstantní rychlostí. Až ke konci se rychlost odumírání zpomaluje, protože naživu zůstávají odolnější jedinci. Obecně platí, že počet usmrčených buněk závisí nejen na intenzitě smrtícího činitele, ale i na době jeho působení. Dále platí, že čas potřebný k usmrcení mikrobů závisí na jejich výchozím počtu. Účinnost antimikrobiálního agens dále závisí na druhu mikroba a jeho fyziologickém stavu (spory a vláknité houby jsou odolnější), na ochranném vlivu prostředí (přítomnost organických látek, pH, voda) a v případě chemikálií ještě na vlivu teploty (za vyšší teploty působí intenzivněji). Z tohoto vyplývá, že teoreticky není možné dosáhnout absolutní sterility, lze se k ní ovšem v praxi velmi přijatelně přiblížit. [1], [2]

2.2.1.1 Vliv teploty na přežívání mikroorganismů

Pro každý druh mikroorganismu můžeme stanovit určité teplotní body, které mají pro jeho život zásadní význam. Jedná se o minimální a maximální růstovou teplotu, kdy se přestávají množit, a o teplotu optimální, která je pro jejich rozmnožování nejvhodnější. Pokud teplota i jen na krátkou dobu vybočí z intervalu mezi oběma krajními body, dojde k teplotnímu šoku, který část populace nepřežije. [1,2]

Chlad působí na některé mikroorganismy nepříznivě, většina druhů je ovšem schopna přežívat teploty nižší než je minimální růstová teplota poměrně dlouhou dobu. [1,2]

Nejúčinnější je vyvolání tzv. chladového šoku nebo pomalé zmrazování. O chladovém šoku hovoříme v případě, jsou-li mikroorganismy přeneseny z optimální teploty na teplotu kolem 0°C. Dochází tak k usmrcení části populace. Podobné účinky má pomalé zmrazování, kdy se v buňkách tvoří velké krystaly ledu, jež ji poškozuji. Škodlivé je také opakované mražení a rozmrazování. Obecně však platí, že zmrazením dosáhneme zastavení činnosti mikroorganismů, nikoliv účinného usmrcení všech přítomných jedinců. [1,2]

I krátkodobé zvýšení teploty těsně nad hodnotu maximální růstové teploty vede k teplotnímu šoku. U některých mikroorganismů se tvoří tzv. teplotně šokové proteiny (HSP), které pomáhají buňce vyrovnat se s výkyvy metabolismu. Další zvyšování teploty však vede k postupnému usmrcení mikrobiálních buněk. Tyto dopady jsou způsobeny denaturací některých růstových enzymů a poškozením cytoplazmatické membrány, což vede k lýzi. Smrtící účinky vysokých teplot se kvantitativně vyjadřují tzv. smrtící (letální) teplotou, což je nejnižší teplota, při které je organismus usmrčen během určité doby za přísně definovaných podmínek. Platí tedy, že jakákoliv teplota vyšší než maximální růstová teplota, usmrcuje mikroby, pokud působí dostatečně dlouhou dobu. [1,2]

2.2.1.2 Vliv záření a vlnění na přežívání mikroorganismů

Elektromagnetické vlnění různých vlnových délek se značně liší svými fyziologickými účinky na mikroorganismy. Negativně působí zejména ionizační a UV-záření, dále pak záření viditelné. Nejcitlivější na účinky záření jsou molekuly DNA. [1,2]

UV záření má nejvýraznější smrtící účinky při vlnové délce 260 – 265 nm, kdy je nejúčinněji absorbováno právě DNA a konjugovanými vazbami bílkovin. Dochází k tvorbě kovalentních vazeb mezi sousedními pyrimidiny, vznikají také pro buňku toxické peroxidy a ozón. Účinkům UV-záření obecně odolávají lépe mikroorganismy s obsahem karotenoidních barviv. Dále platí, že bakteriální spory, kvasinky a plísňe jsou odolnější než vegetativní bakteriální buňky. [1,2]

I když je viditelné světlo důležitým zdrojem energie pro fototrofní mikroorganismy, může na mikrobiální buňky působit škodlivě. Některé buněčné složky, např. cytochromy, mohou absorbovat světelnou energii, aktivovat se a tuto energii předat molekule O_2 za vzniku singletového kyslíku 1O_2 . Jde o vysoce účinné oxidační agens, které buňku zničí. Celkový mechanismus působení viditelného světla však nebyl doposud uspokojivě objasněn. [1,2]

Ionizační záření, např. paprsky gama, má na některé mikroby poměrně silné účinky. Díky vysoké energii záření dochází k vyražení elektronů z molekul, jež ho absorbovaly, což vede k tvorbě hydroxylových ($OH\cdot$) a superoxidových ($O_2\cdot^-$) radikálů. Ionizační záření působí na citlivé molekuly také přímo. Opět platí, že plísňe a kvasinky jsou odolnější než bakterie. [1,2]

Vlnění o nejdelších vlnových délkách, tj. infračervené záření a Hertzovy vlny, samy o sobě pravděpodobně smrtící účinek na mikroorganismy nemají a působí pouze svými tepelnými účinky. [2]

Zvukové vlny o frekvenci vyšší než 20 kHz (ultrazvuk) působí na mikroorganismy letálně tehdy, mají-li poměrně velkou intenzitu (kolem $10\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$) a nízký kmitočet (kolem 20 kHz). V tomto případě jde o tzv. kavitační ultrazvuk, který působí na živé organismy tím, že v důsledku kmitání vzniká prudká pulsace buněčných membrán a cytoplazmy. Tím se místy opakovaně silně snižuje a zvyšuje tlak. V místech o nízkém tlaku se tvoří trhliny, kam difundují plyny rozpuštěné v kapalině. Při náhlém stlačení těchto kavitačních bublin vzniká obrovský tlak, který porušuje buňky a usmrcuje je. Některé chemické sloučeniny se vlivem intenzivního ultrazvuku rozkládají, což může rovněž nepříznivě působit na mikroorganismy. Nejcitlivější jsou dlouhé tyčinkovité a vláknité mikroorganismy, kdežto koky a kvasinky jsou poměrně odolné. [2]

2.2.1.3 Vliv pH prostředí na přežívání mikroorganismů

Koncentrace vodíkových iontů má na růst i činnost mikroorganismů významný vliv. Každý druh se může rozmnožovat pouze v určitém rozmezí pH, pro většinu jsou nejvhodnější hodnoty blízké neutralitě (pH 6 až 8). Nejcitlivější na dodržování optimálního rozmezí jsou kvasinky (pH 4,2 až 5,5), zatímco u většiny plísňí je tolerance daleko větší (pH 1,2 až 11,0). Extrémní pH může mikroorganismy usmrtit. Příčinou je inhibice enzymů a transportních bílkovin anebo též přímé poškození cytoplazmatické membrány. [1,2]

pH prostředí ovlivňuje také odolnost buněk ke zvýšeným teplotám. Odolnost je tím menší, čím větší je odchylka od optimálního pH. Kyselé pH zabraňuje klíčení spor některých bakterií, čehož se využívá v potravinářství. [2]

2.2.1.4 Vliv dostupnosti vody na přežívání mikroorganismů

Voda představuje nezbytnou složku mikrobiálních buněk, činí až 80% jejich živé váhy. Část vody v nitru buňky je vázána na různé buněčné struktury, volně přístupné molekuly pak slouží

jako rozpouštědlo. Účastní se mnoha biochemických reakcí a vzhledem ke své polární povaze ovlivňuje tvar a stavbu řady polymerů, zejména bílkovin. [1,2]

Stupeň dostupnosti vody se označuje jako vodní aktivita (a_w). Matematicky se vyjadřuje jako podíl tlaku vodní páry nad příslušným roztokem vůči tlaku vodní páry nad čistou vodou. Čím je vyšší koncentrace rozpuštěných látek, případně osmotický tlak, tím nižší je vodní aktivita. [2]

Pokud snížíme vodní aktivitu prostředí (vysušením, přidáním vhodných chemikálií), zabráníme činnosti většiny mikrobů. Odolné mikroorganismy jako plísně však vysušení přežijí. [1,2]

2.2.1.5 Vliv dalších faktorů vnějšího prostředí na přežívání mikroorganismů

Každé prostředí vykazuje určitý oxidoredukční potenciál, který je dán přítomností oxidačních nebo redukčních činidel. Je-li pozitivní, převládají v prostředí podmínky oxidující a bude vyhovovat aerobům, v opačném případě pak anaerobům. Mechanismus tohoto působení spočívá v regulaci funkcí některých enzymů. K nejdůležitějším oxidačním činidlům patří kyslík, dusičnany, železité ionty a peroxidy, k nejčastěji se vyskytujícím redukujícím činidlům pak železnaté ionty, vodík, sloučeniny se sulfhydrylovou skupinou nebo s reaktivními dvojnými vazbami. [1], [2]

Dalším významným faktorem je osmotický tlak, jehož se využívá při konzervaci potravin. Mikroorganismy jsou v hypotonickém prostředí chráněny pevnou buněčnou stěnou, takže nedochází k lýze, byť je koncentrace rozpuštěných látek v cytoplazmě vyšší než v roztoku. Pokud se však buňka dostane do prostředí hypertonického, dojde k plazmolýze (ztrátě vody), a tím i k zástavě množení. [1]

Je samozřejmé, že na mikrobiální buňky působí další velké množství fyzikálních činitelů, jako je např. povrchové napětí, hydrostatický tlak, elektrický proud nebo mechanické vlivy. Z hlediska dekontaminace však nejsou příliš významné, proto tuto problematiku dále nerozvádím.

2.3 Standardní dekontaminační postupy

2.3.1 Definice pojmů

Mikroorganismy jsou všudypřítomné a pravdou je, že život na Zemi by bez nich nebyl možný. Přesto je člověk často nucen nechtěné mikroorganismy eliminovat či inaktivovat, a to z prostředí, předmětů, nejrůznějších materiálů, živých tkání apod. Činí se tak pomocí dezinfekčních, sterilizačních postupů a antimikrobiálních látek. V úvodu této kapitoly proto uvádím důležité pojmy, které s těmito postupy souvisí. Jedná se o termín dekontaminace, dezinfekce, sanitace a sterilizace. [1]

Dekontaminace je chápána jako souborný název pro všechny ostatní termíny, které se pak od sebe liší dosaženým stupněm čistoty. Definujeme ji jako proces usmrcení anebo odstranění znečišťujících látek a mikroorganismů z ploch a předmětů včetně usmrcení mikroorganismů, bez ohledu na stupeň snížení jejich počtu. [35]

Dezinfekce znamená odstranění původců infekce, jinými slovy jde o soubor opatření, jejichž cílem je přerušit cestu původce nákazy od jejího zdroje k vnímavému jedinci. Dezinfikovaný

předmět je tedy bezpečný z hlediska šíření infekce, může však obsahovat životaschopné nepatogenní organismy. Vlastní dezinfekci by měla předcházet mechanická očista předmětu, která sníží výchozí počet mikrobů a odstraní ochranné organické látky. Tomuto procesu říkáme sanitace. [1,35]

Nejvyšším stupněm dekontaminace je sterilizace. Jedná se o eliminaci všech forem života zahrnující vegetativní buňky, jejich vysoce rezistentní spory, mikroskopické houby a viry, a dále také vývojová stadia protozoí případně helmintů (červů) [1,35]. Dále existují specifické dekontaminační procesy, jako je např. konzervace obvyklá zejména v potravinářství. Tento pojem znamená udržení tkání, potravin a materiálů po požadovanou dobu v nezměněném stavu. [1]

Obecně můžeme dekontaminační postupy rozdělit na fyzikální, chemické nebo kombinované. Přitom platí, že sterilizační postupy jsou povahy převážně fyzikální, dezinfekční pak charakteru vesměs chemického. Některé chemické postupy jsou natolik účinné, že jejich výsledkem je praktická sterilita dezinfikovaných předmětů. Tyto postupy se označují termínem vyšší stupeň dezinfekce a užívají se u předmětů, které nelze podrobit sterilizaci. Důvodem bývá nejčastěji citlivost materiálu nebo finanční nedostupnost vhodné techniky. Značnou nevýhodou chemických postupů je jejich negativní vliv na obsluhu zařízení či na životní prostředí. Pravdou tedy zůstává ta skutečnost, že nejúčinnější je preventivní přístup, než snaha ničit mikroby, které již někam pronikly. [1,3]

Stupeň účinnosti jednotlivých postupů se může vyjádřit pojmy s příponami –statický a –cidní. Prvním označujeme reverzibilní zástavu množení, druhým pak usmrcení mikroorganismů. Výraz antimikrobiální potom zahrnuje obojí. [1]

2.3.2 Fyzikální postupy založené na působení tepla

Existuje celá řada postupů, které využívají účinků tepla. Je však zřejmé, že jejich použití není univerzální, ať už z důvodu náchylnosti materiálů k vysokým teplotám nebo nedostatečné účinnosti metody. Sterilizace plamenem je sice bleskově účinná, bohužel většinu sterilizovaných předmětů ničí. V praxi je důležitá horkovzdušná sterilizace a autoklávování. Další postupy, jako pasterizace, var, frakcinovaná sterilizace nebo tyndalizace se sice tradičně řadí k sterilizačním postupům, ale již nejsou dostatečně spolehlivé. Své uplatnění nalézají v některých specifických oblastech. [1,2]

2.3.2.1 Horký vzduch

Při horkovzdušné sterilizaci se využívá obvykle teplot mezi 160°C až 180°C. Výhodou je, že přístroje k tomu užívané, tedy horkovzdušné sterilátory, jsou poměrně levné. Nevýhodou je, že sterilizovat se takto dají jen předměty z odolných materiálů (sklo, porcelán). [1]

Mechanismem účinku horkého vzduchu se zdá být denaturace bílkovin. Prakticky všechny nesporeující mikroby jsou při 180°C usmrceny do 5 minut. Viry jsou citlivější, s výjimkou viru hepatitidy B, jenž se v krvi inaktivuje při 160°C až za 60 minut. Vůči suchému teplu jsou nejodolnější bakteriální spory, ty nejrezistentnější se zničí při 180°C až za 15 minut. [1]

2.3.2.2 Pára pod tlakem

Využití vlhkého tepla za zvýšeného tlaku neboli autoklávování je považováno za jednu z neúčinnějších a ekonomicky příznivých sterilizačních metod. Umožňuje ošetření širokého spektra materiálů, autoklávovat lze kov, sklo, porcelán, ob vazový materiál, bavlněné a lněné prádlo, některé roztoky a poměrně málo druhů plastů, a také gumové předměty. [1,2]

Mechanismus likvidace mikroorganismů spočívá v tom, že dostane-li se pára do styku s chladnějšími předměty, kondenzuje na vodu a současně vydá velké množství kondenzačního tepla. To usmrtí přítomné mikroorganismy tepelnou denaturací bílkovin, rozkladem nukleových kyselin a porušením buněčných membrán. Doby expozice jsou pro tento typ sterilizace o hodně kratší oproti horkovzdušné sterilizaci, i když probíhá za nižších teplot, protože se jedná o vlhké teplo, a to je mnohem účinnější na likvidaci mikroorganismů než suché teplo. [1,2] Tento trend je znázorněn v tabulce č. 1.

Tabulka 1: Sterilizační podmínky pro horkovzdušnou sterilizaci a sterilizace vlhkým teplem [3]

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

2.3.2.3 Var

Var v žádném případě nelze považovat za sterilizační postup. I když většina bakterií, virů a kvasinek bývá varem zničena během 2 minut, spory *Clostridium botulinum* a *C. tetani* mu odolávají 5 i více hodin, spory termofilních mikrobů ho přežívají úplně. Rovněž virus hepatitidy B mu může odolávat více než 30 minut. [1]

2.3.2.4 Frakcinovaná sterilizace

Ke zničení spor v termolabilních roztocích, které nelze autoklávovat, se učívá tzv. frakcinovaná sterilizace. Jedná se o trojnásobné opakované zahřívání na 30 minut při 100°C proložené inkubací při 37°C přes noc. Přepokládá se, že první zahřátí zničí vegetativní formy mikrobů, přítomné spory pak při 37°C vyklíčí, vzniklé vegetativní buňky se zlikvidují dalším zahřátím a případné zbylé spory zmizí po druhé inkubaci a třetím zahřátí. [1]

2.3.2.5 Pasterizace

Jako pasterizace se označují tepelné technologické postupy sloužící ke snížení počtu mikrobů v potravinách a nápojích (pivo, víno, mléčné výrobky). Rozeznáváme dlouhodobou pasterizaci –

půlhodinové zahřátí na zhruba 62°C, krátkodobou pasterizaci – zahřátí na 72 – 75°C po dobu 15 – 20 sekund, a mžikové zahřátí až na 85°C. [1]

2.3.2.6 Tyndalizace

Tyndalizace se užívá u extrémně termolabilních roztoků. Postup je podobný frakcinované sterilizaci, ale zahřívá se až šestkrát a na nižší teploty – i na pouhých 60°C. [1]

2.3.3 Fyzikální postupy sterilizace a dezinfekce založené na působení záření

2.3.3.1 Ultrafialové záření

Ač teoreticky a experimentálně je UV-záření poměrně účinné, s jeho praktickým uplatněním nelze příliš počítat. Neproniká totiž do hloubky a na zastíněné straně předmětů se tedy nemůže uplatnit. Jeho zdrojem jsou tzv. germicidní zářiče, jejichž účinnost však s dobou používání rychle klesá. Dosah mikrobicidního působení UV-paprsků je poměrně malý, obvykle činí 30 – 50 cm. UV-záření lze s poměrnou spolehlivostí užít k doplňkové dezinfekci či dekontaminaci relativně čistých a prázdných pracovních ploch nebo vzduchu. [1,2]

2.3.3.2 Infračervené záření

Infračervené záření působí baktericidně jen svým tepelným účinkem. Pokud dosáhneme po dobu 20 minut teploty asi 180°C, splní se parametry potřebné pro horkovzdušnou sterilizaci. [1]

2.3.3.3 Ionizační záření

K tzv. radiační sterilizaci se využívá pronikavého gama-záření například z radioizotopu ⁶⁰Co. Ionizačním zářením lze sterilizovat jen nepatrně kontaminované předměty. Výhodou je, že proniká jak obaly, tak sterilizovaným materiálem. V některých státech je povoleno použít radiace ke konzervaci a k prodloužení doby skladovatelnosti potravin. [1]

2.3.3.4 Ultrazvuk

Smrtící účinek ultrazvuku na mikroby nikdy není stoprocentní. V praxi lze ale dobře využít ultrazvuku k čištění dutých nástrojů před vlastní sterilizací. [1]

2.3.4 Filtrace

Filtrace je mnohdy vynikající způsob, jak se dají mikroby odstranit z daného prostředí. V praxi se užívá ke snížení mikrobiální kontaminace choulostivých roztoků a vzduchu. Jako filtrační materiál slouží porcelán, slinuté sklo, infusoriová hlinka, umělohmotné náhražky azbestu a další. V posledních letech jsou tyto filtry nahrazovány membránovými filtry, které jsou vyrobeny z nitrocelulóзовých a jiných syntetických materiálů. Nejspolehlivějším systémem filtrace vzduchu jsou tzv. HEPA-filtry, které jsou schopny odstranit až 99,97% částic o velikosti 0,3 μm. [1]

2.3.5 Plazmová sterilizace

Plazmovou sterilizací, kterou se zabýváme v této práci, rozumíme vystavení mikroorganismů účinkům elektrického výboje v prostředí plynu. Plyn nemá za normálních podmínek biocidní účinky, tyto jsou aktivovány až působením elektrického výboje a deaktivovány bezprostředně po vypnutí budícího zdroje. Z tohoto důvodu je tato metoda zařazena mezi postupy fyzikální, protože vznik chemických agens je zcela závislý na fyzikálních vlastnostech plazmatu. [3]

2.3.6 Chemické postupy sterilizace a dezinfekce

K chemickým postupům sterilizace a dezinfekce se užívají dezinfekční látky, tzv. biocidy. Lze je rozdělit podle chemické struktury: [1]

- oxidační činidla
- halogeny
- alkylační činidla
- cyklické sloučeniny
- alkálie a kyseliny
- sloučeniny těžkých kovů
- alkoholy
- povrchově aktivní látky
- ostatní sloučeniny a kombinované látky

Základním znakem chemických postupů je, že dochází ke specifickému účinku chemikálií na mikroorganismy v prostředí. Dochází nejčastěji k oxidaci, hydrolýze, tvorbě solí s bílkovinami, koagulaci bílkovin, poruchy membrán nebo inaktivaci enzymů. Většina antimikrobiálních látek ovšem nepůsobí úzce specificky. Některé biocidy jsou natolik účinné, že výsledkem jejich působení je prakticky sterilita. [1,2]

Jak již bylo uvedeno výše, sterilizační účinky chemických prostředků jsou totožné s účinky fyzikálních metod, nicméně je vždy nutno brát v potaz případný vliv chemických prostředků na obsluhu zařízení a celkový environmentální dopad. [3] Dalším rizikem je vznik rezistence, která hrozí v případech, kdy se používá jeden typ prostředku po delší dobu. Může k tomu dojít přijetím genetického materiálu ve formě plasmidů nebo transpozonů, nejčastěji však mutací. Proto je důležitá pravidelná kontrola účinnosti dezinfekce a obměna dezinfekčních prostředků. [1]

Sterilizace ethylenoxidem je v současnosti nejrozšířenější sterilizační metodou.

2.3.6.1 Ethylenoxid

Ethylenoxid je těkavá jedovatá kapalina s karcinogenními a mutagenními účinky. Vzhledem k tomu, že jsou jeho páry ve směsi se vzduchem výbušné, mísí se s oxidem uhličitým nebo freony. Je dobře rozpustný ve vodě, rozkládá se na glykol, vodík a kyslík. Jeho aplikace je možná pomocí speciálních přístrojů za zvýšeného tlaku či podtlaku a teplot mezi 37°C a 55°C. Vyšší teplota znamená i vyšší sterilizační účinek, což přináší významné zkrácení času sterilizace. [1,3,30]

Nespornou výhodou je možnost ošetření umělých hmot, kdy ethylenoxid těmito materiály proniká, takže je možné provést sterilizaci předmětů přímo v obalech. Problémem je, že ethylenoxidem ošetřené předměty je nutné ponechat někdy i mnoho dnů ve zvláštních prostorech řádně odvětrat. Další nevýhodou je finanční náročnost zařízení. [1,4]

Látka účinkuje na všechny formy mikrobů, naší pozornosti by neměla uniknout vynikající účinnost v likvidaci spor. Mechanismem účinku je alkylace různých chemických struktur na povrchu buněk. Používá se ke sterilizaci zdravotnických pomůcek z termolabilních umělých hmot a jemných nástrojů. [1,3]

2.4 Plazmová sterilizace, plazma

2.4.1 Definice pojmů

Plazma se označuje jako čtvrté skupenství hmoty. Jedná se o kvazineutrální plyn, který obsahuje dostatečné množství nabitých částic, jejichž prostorový náboj vede k tzv. kolektivnímu chování. Pojmem kolektivní chování označujeme vzájemné působení částic prostřednictvím makroskopických elektromagnetických polí. Jednotlivými mikroskopickými poli na sebe částice působí pouze při vzájemných srážkách. Podle toho, zda kromě nabitých částic obsahuje plazma i neutrální molekuly a atomy, rozdělujeme plazma na slabě a silně ionizované. [36]

Ke změně skupenství (fázovému přechodu) může dojít ohříváním příslušné látky na vyšší teplotu, než jsou vazebné energie jednotlivých stavů hmoty, dále působením elektrického pole nebo elektromagnetických vln. V případě plazmatu dochází k narušení atomárních vazeb a rozpadu velké části atomů na záporně nabitě elektrony a kladné ionty, a tím ke vzniku ionizovaného plynu. To znamená, že plazma obsahuje velké množství volně se pohybujících nabitých částic, ale také částice neutrální. [25]

2.4.2 Aplikace plazmatu

V moderní průmyslové praxi nalézají plazma široké spektrum možností aplikace. Jde např. o osvětlovací účely, generátory tepelné energie, obrábění materiálů, detoxikaci škodlivých látek, generaci elektromagnetických vln, spínací elektroniku, plazmové displeje, automobilový a textilní průmysl apod. Je zde využíváno typických vlastností plazmatu: vyzařování elektromagnetického vlnění, vysoká teplota, rychlý pohyb nabitých částic. [25]

Ve zdravotnictví se již dnes používá komerčních plazmových sterilizátorů (Sterrad, Plazlyte), nicméně se nejedná o plazmovou sterilizaci v pravém slova smyslu. Sterilizace v těchto přístrojích je založena na působení chemických agens za nízkých tlaků, kdy plazma slouží spíše k rozkladu použitých biocidních látek. [1,3]

Nízkoteplotní plazma se stalo novým fenoménem, jehož výzkumem se zabývá celá řada odborníků. Výzkumné týmy se jej pokoušejí aplikovat v nepřeberné řadě oborů, zejména pak v potravinářství a zdravotnictví. Jako příklad lze uvést opracování polymerních fólií, do kterých se balí některé druhy potravin [18,21], ošetření vinných hroznů proti činnosti nežádoucí mikroflóry během přepravy [26] nebo pasterizaci mandlí [23]. Pro zdravotnictví, kde může mít kontaminace patogenními organismy až fatální následky, jsou velmi důležité studie plazmové

sterilizace kardiovaskulárních cívek [20], plastových tub [20,19], filtrů do klimatizací [16] atp. Jako velice zajímavé se jeví pokusy s léčením těžce se hojících poranění. [34]

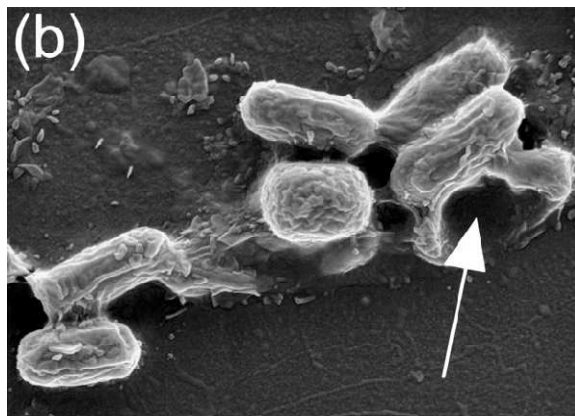
Toto plazma se využívá nejen za atmosférického tlaku [16,20,15,18,28,27,26,29,22], ale také za tlaku nízkého [21,24]. Další možností jsou různé způsoby buzení plazmatu, ať už jde o námi používaný dielektrický bariérový výboj (DBD) [18,28,14,19] nebo např. o mikrovlnně indukované plazma [29,22,21,26,20]. Lze využívat atmosféry různých plynů, a to nejčastěji argonu [18,22,29], vzduchu [18,27], dusíku [18], nebo jejich směsí. Experimentálně se pro studium účinků plazmové sterilizace používají nejčastěji materiály na bázi polymerů (PET) [14,18] nebo papír [24,17]. Některé studie však byly provedeny na skleněném materiálu [22].

2.4.3 Mechanismus účinků plazmatu

Konkrétní mechanismy zodpovědné za inaktivační účinky plazmatu lze shrnout do několika bodů: [3]

- letální poškození genetického materiálu působením UV-záření
- fotoindukovaná eroze mikroorganismů atom po atomu vlivem UV-záření
- eroze mikroorganismů atom po atomu vlivem reaktivních částic
- oxidace buněčných částí (membrány, proteiny, DNA) v důsledku působení volných radikálů obsahujících kyslík
- rozpad buněk v důsledku akumulace nabitých částic v membráně

Důsledky působení eroze jsou znázorněny na obrázku č. 5.



Obr. 5: *Bacillus subtilis* po opracování v kaskádovém dielektrickém výboji; šipka naznačuje poškozenou sporu [18]

Cílem mnoha studií je snaha izolovat tyto jednotlivé mechanismy pro jejich důkladnější výzkum, což se s výjimkou UV-záření zatím příliš nedaří. [14]

Jednotlivé mechanismy působení jsou do jisté míry závislé na charakteristice plazmatu, tzn. na velikosti napětí, použitém plynu a tlaku tohoto plynu. [14]

2.4.3.1 Letální poškození genetického materiálu působením UV-záření

Elektromagnetické záření v rozsahu vlnových délek 100-400 nm je označováno jako UV-záření. Biocidní účinek tohoto záření je založen na fotochemickém poškození nukleových kyselin (DNA a RNA), proteinů, enzymů, popřípadě dalšího buněčného materiálu. V důsledku působení UV-záření dochází k deformaci prostorové struktury biomolekul, vzniku kovalentních vazeb, případně změně chemického složení molekuly. [3,30]

Účinek UV záření se liší v závislosti na rozsahu aplikovaných vlnových délek. Nukleové kyseliny absorbují v rozsahu 240 – 280 nm, absorpčního maxima pak dosahují při 260 – 265 nm. Výsledkem je vznik thyminových dimerů, což vede k inhibici replikace genetické informace. Pokud užijeme záření v rozsahu 320 – 400 nm, dojde k iniciaci změn nenasyčených mastných kyselin v membránách, a tím ke změně permeability. [3]

2.4.3.2 Fotoindukovaná eroze mikroorganismů působením UV-záření

Fotoindukovaná eroze mikrobiálních buněk je výsledkem působení UV-fotonů, které po dopadu štěpí chemické vazby buněčného materiálu, což vede k formování těkavých sloučenin. Jedná se o meziprodukty nerovnovážných chemických reakcí (malé molekuly jako peroxid, ozon, volné radikály). [3]

2.4.3.3 Eroze mikroorganismů vlivem reaktivních částic (leptání)

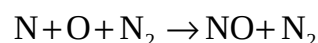
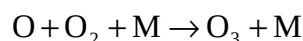
Proces leptání je způsoben absorpcí reaktivních částic plazmatu na povrchu mikrobiálních buněk, kde vstupují do chemických reakcí, vedoucích k formování těkavých sloučenin (CO₂, H₂O). Reaktivní částice mohou být atomové a molekulové radikály (atomární kyslík) a excitované molekuly v nestabilním stavu (¹O₂). [3]

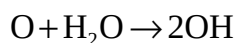
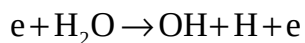
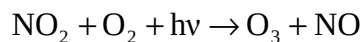
Při atmosférickém tlaku plazmatu hrají nejdůležitější inaktivační roli aktivní radikály a anionty O, OH a HO₂⁻. Tyto částice poškozují cytoplazmatickou membránu. [30]

2.4.3.4 Oxidace buněčných částí působením volných radikálů

Volné radikály jsou produkty srážkových procesů v plazmatu následovaných např. disociačními nebo excitačními procesy. Tyto atomy, molekuly nebo ionty jsou schopny samostatné existence, ve svém elektronovém obalu obsahují minimálně jeden nespárovaný elektron, z čehož vyplývá jejich vysoká reaktivita, kdy se snaží dosáhnout stabilní elektronové konfigurace. Reagují i s ostatními biomolekulami, čímž vytvářejí další volné radikály. Tento děj má pak tendenci šířit se řetězově. Volné radikály hrají důležitou roli při většině povrchových interakcí. [3,31]

Příklady reakcí, které vedou ke tvorbě radikálů ve vzduchu [3].





Z hlediska procesů inaktivace mikroorganismů jsou nejvýznamnější volné radikály kyslíku a dusíku, např. O , O_2^* , O_3 , OH^* , NO , NO_2 atd. Jedná se o silná oxidační činidla. Mohou reagovat s fosfolipidy a lipoproteiny membrán, s nukleovými kyselinami, sacharidy a polysacharidy, bílkovinami a enzymy, výsledkem čehož je nevratné poškození buněčného materiálu. [3]

Příkladem působení volných radikálů je reakce na cytoplazmatické membráně. Zde jsou mastné kyseliny fosfolipidů atakovány OH -radikálem, čímž dochází k jejich oxidaci. Naopak atomární kyslík nebo metastabilní O_2 napadají proteinovou část lipoproteinů. Důsledkem je změna fluidity membrány a následovně i změna její permeability. Dojde k nekontrolovanému proudění iontů vně i dovnitř buňky, a tím k usmrcení mikroorganismu. [3,30]

DNA, která reaguje s volnými radikály, podléhá modifikaci, výsledkem níž je většinou inhibice replikace DNA. Jedním z inhibitorů je např. thyminglykol, který vzniká oxidací thyminu volnými radikály. Volné radikály mohou způsobit dokonce poškození struktury DNA. Výsledkem pak může být např. přemístění bází v řetězci DNA, případně k jejich úplnému odštěpení. Právě modifikace bází DNA je nejčastějším druhem poškození. Dalším efektem je vznik meziřetězcových spojů. Doposud bylo popsáno přibližně 100 různých defektů DNA. [3,31]

Volné radikály působí depolymeračně na polysacharidy, kdy míra tohoto procesu je závislá na konformačním stavu molekul, zvláště pak jejich koncových řetězců. Informací o těchto reakcích však zatím nemáme dostatek. [31]

2.4.3.5 Akumulace nabitých částic na membráně

Elektrostatická síla způsobená nahromaděním náboje na vnější membráně může překonat sílu vláken membrány a způsobit její prasknutí. Tento proces je významný zejména pro inaktivaci gramnegativních bakterií, které disponují nerovnoměrným povrchem. Takový povrch umožňuje nahromadění náboje. [3,30]

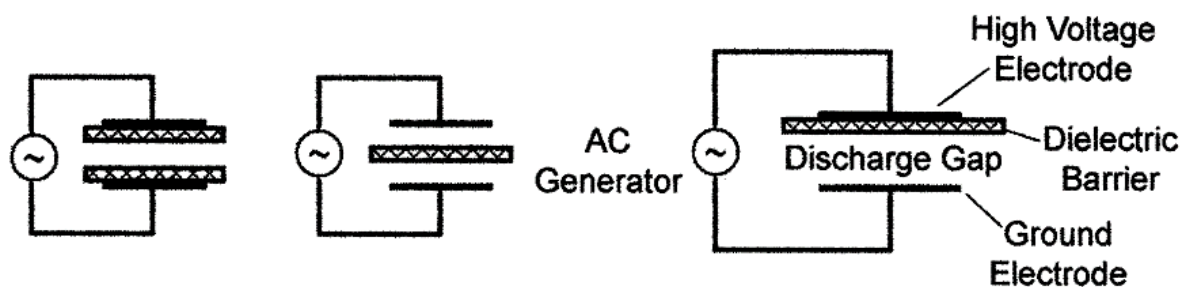
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V této části se zabývám studiem inaktivačních účinků dielektrického bariérového výboje (DBD). Metoda byla testována na experimentálním zařízení vlastní výroby, s použitím různých druhů plynů, nosných materiálů, hustot výkonů a expozičních časů. Jako bioindikátor byla zvolena plíseň *Aspergillus niger*, protože vykazuje nejvyšší odolnost vůči účinkům UV-záření, které je jedním z dekontaminačních mechanismů plazmové sterilizace. Pravdou ale je, že vědci nejsou doposud jednotní, jak velký jeho dekontaminační význam skutečně je. Heise, Lee a další mu přisuzují silné deaktivující účinky [18,22], zatímco Laroussi, Leipold a Akitsu jsou opačného názoru [15,26,27]. Účinnost dekontaminačního procesu byla stanovena pomocí nepřímé kultivační metody.

3.1 Princip dielektrického bariérového výboje

První zprávy o využití dielektrického bariérového výboje pocházejí z roku 1857, kdy Werner von Siemens zkoumal DBD jako možný zdroj ozonu. Postupně našel své uplatnění v řadě různých průmyslových aplikací, jako jsou CO₂-lasery, excimerové UV-lampy, plazmové displeje a dokonce povrchové úpravy materiálů včetně nanášení tenkých vrstev. [3,25,28]

Standardní DBD-zařízení sestává ze dvou plochých elektrod, kdy je minimálně jedna z nich vyrobena z dielektrického materiálu nebo je jím alespoň pokryta. Tyto dielektrické bariérové vrstvy mají za úkol kontrolovat distribuci náboje a energii mikrovýbojů na povrchu elektrody. Nejvhodnějšími materiály pro tento účel jsou sklo, křemičité sklo, keramické nebo polymerní materiály. Bariérový výboj zde může vznikat v širokém rozmezí tlaků, nejčastěji však při tlacích 0,1 – 1 atmosféra. Vzhledem k povaze bariérové vrstvy, tj. její nevodivosti, musí být výboj buzen střídavým napětím, obvykle v rozsahu 1 – 100 kV. Frekvence se pohybuje v rozmezí desítek Hz – MHz. Plochý vzorek (do 100 μm), který chceme opracovat, se vkládá na spodní elektrodu. Mezera mezi oběma elektrodami dosahuje zpravidla několika milimetrů a je vyplněna pracovním plynem. [3,14]



Obr. 6: Základní experimentální uspořádání dielektrických bariérových výbojů. AC generator - zdroj střídavého napětí, discharge gap - prostor mezi elektrodami, dielectric barrier - dielektrická bariéra, high voltage electrode - vysokonapěťová elektroda, ground electrode - uzemněná elektroda. [3]

Dielektrický bariérový výboj získáme, jestliže k dvojici elektrod, mezi nimiž se nachází dielektrická bariéra, připojíme vysoké střídavé napětí s amplitudou větší než je průrazné napětí plynu mezi elektrodami. Dielektrická bariéra má funkci sériově zapojeného kondenzátoru, který

omezuje elektrický proud v prostoru mezi elektrodami. Elektrický průraz v plynu způsobí lokální nabíjení bariéry, což má za následek pokles napětí v plynu. To tedy po velmi krátké době (řádově desítky nanosekund) klesne pod průrazné napětí plynu a výboj zanikne. K dalšímu výboji může dojít pouze zvýšením přiloženého napětí nebo změnou jeho polaritu, což je důvod, proč se pro napájení bariérového výboje používá střídavé napětí. [3] Vložením střídavého napětí o velikosti řádově několika kilovoltů a s frekvencí asi 10 kHz, dojde k vybuzení nízkoteplotního plazmatu. Neutrální plyn a ionty si zachovávají pokojovou teplotu, zatímco elektrony ponesou nejvíce energie. [14]

Pokud plazma budeme pozorovat důkladněji, zjistíme, že se skládá z tisíců samostatných mikrovýbojů, jejichž průměr dosahuje kolem 200 μm a doba jejich existence se počítá v nanosekundách. Pouhým okem je vidíme jako příčné čáry v jinak homogenním plazmatu. [14] Tento stav vyskytující se za atmosférického tlaku nazýváme jako filamentární mód, kdy má výboj podobu velkého množství výbojových kanálů, tzv. filamentů. Vlastnosti jednotlivých filamentů jsou dány pouze vlastnostmi použitého plynu, dielektrika a konfigurací elektrod, nezávisí tedy na charakteristikách přivedeného napětí. Velikost amplitudy však má vliv na to, kolik filamentů vznikne. Značnou nevýhodou filamentárního módu je jeho nehomogenita. [3]

Zdánlivě homogenní difúzní mód DBD lze získat nastolením určitých podmínek (plyn, frekvence, napětí, konfigurace elektrod). Nelze rozlišit jednotlivé filameny, výbojový kanál pokrývá prakticky celou plochu dielektrika. Také trvání tohoto výboje je podstatně delší, řádově jde o desítky až stovky mikrosekund. Výhodou je již zmiňovaná homogenita výboje, hlavní nevýhodou je ovšem fakt, že difúzní výboj vzniká jen v některých plynech nebo jejich směsích a jen v určitém rozsahu napětí a frekvencí. Na jeho vznik může mít také vliv prostorové uspořádání elektrod. [3]

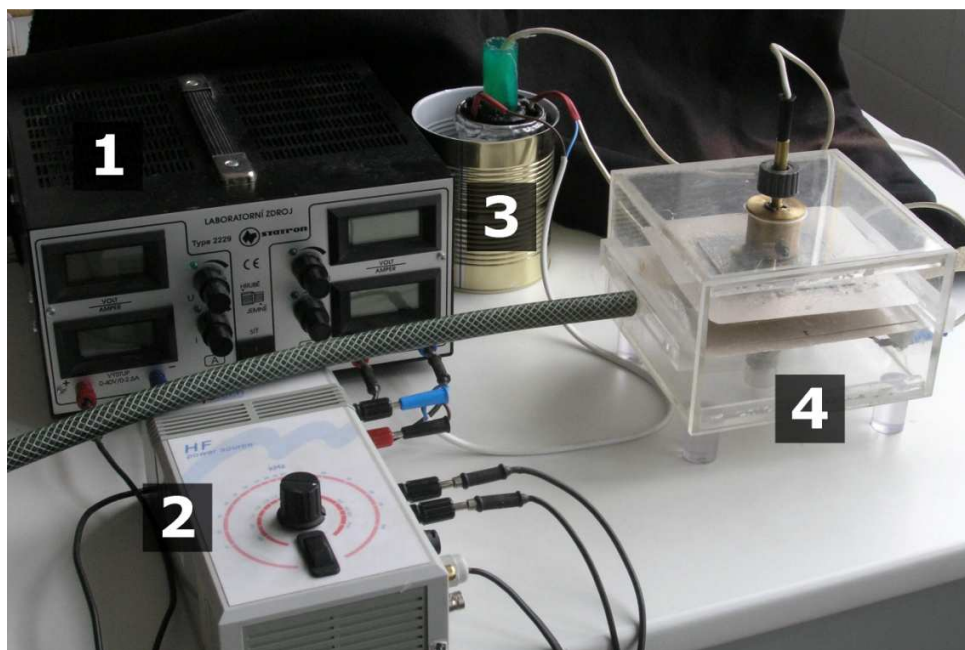
U dielektrického bariérového výboje jsou možná dvě základní uspořádání elektrod – rovinné nebo prostorové. Podle orientace výbojových filamentů vůči dielektrické vrstvě pak můžeme výboje rozdělit na objemové a povrchové. U objemových výbojů jsou výbojové mikrofilamenty orientovány kolmo na rovinu dielektrika (elektrody jsou naproti sobě). Výhodou je technická jednoduchost provedení, nízké nároky na dielektrickou pevnost bariéry a relativně velký objem vzniklého plazmatu. Nevýhodou tohoto uspořádání je nemožnost opracovávání tlustších materiálů, než je vzdálenost mezi elektrodami. Výbojové mikrofilamenty v povrchových výbojích jsou orientovány tečně k rovině dielektrika (elektrody jsou v jedné rovině). Toto uspořádání umožňuje opracovávat materiály libovolné tloušťky, ale pouze povrchově, protože tloušťka vzniklého plazmatu odpovídá tloušťce samotných mikrofilamentů (desetiny milimetru). [3]

3.2 Použitá metoda

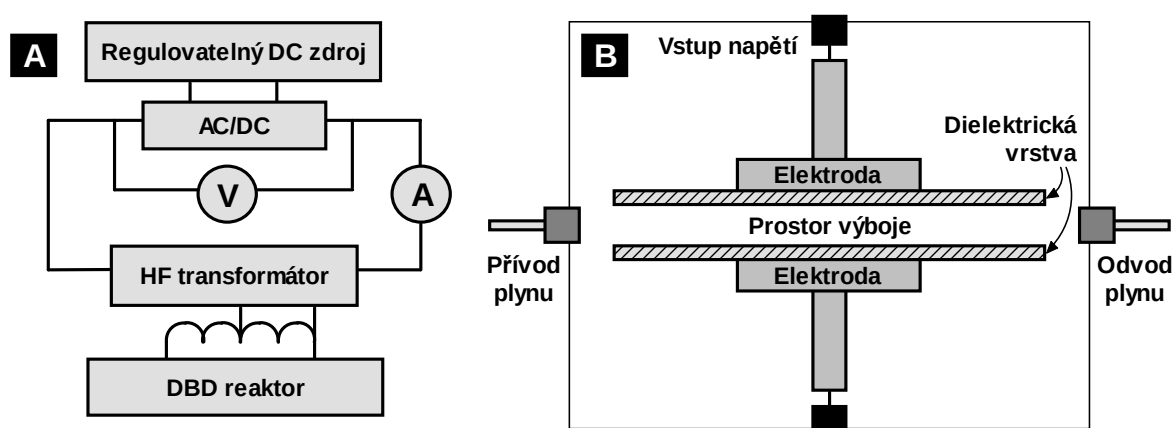
3.2.1 Experimentální zařízení

Experimentální aparatura je založena na principu objemového dielektrického bariérového výboje. Plazmové zařízení (obrázek č. 7) se skládá z regulovatelného zdroje stejnosměrného (DC) napětí, vysokofrekvenčního zdroje, vysokonapěťového (HF) autotransformátoru a samotného DBD reaktoru. Na zařízení lze připojit časovač. Výboj je generován mezi dvěma

kovovými elektrodami pokrytými dielektrickou bariérovou vrstvou. Napětí mezi elektrodami lze při daném uspořádání měnit v rozsahu 3 - 10 kV, s frekvencí do 10 kHz. Vnější rozměry DBD reaktoru jsou $120 \times 118 \times 120$ mm. Objem výboje je pak dán plochou elektrod 90×70 mm a jejich vzdáleností. Vzdálenost elektrod lze pomocí šroubu měnit v závislosti na použitém pracovním plynu např. pro dusík nebo argon je vzdálenost 3 mm. Jako materiál dielektrika je použita slída, tloušťka vrstvy je 0,5 mm. Na obrázku č. 8 je zobrazeno schéma elektrického obvodu a reaktoru. [3]



Obr. 7: Plazmové zařízení: 1 - regulovatelný zdroj stejnosměrného napětí; 2 - vysoko-frekvenční zdroj; 3 - vysokonapěťový (HF) transformátor a 4 - DBD reaktor. [3]



Obr. 8: A/ Schéma el. obvodu; B/ Schéma DBD reaktoru. [3]

3.2.2 Optická emisní spektroskopie plazmatu

Pro měření spekter byl využit přístroj Jobin-Yvon TRIAX 550 s mřížkou 1200 a 3600 vrypů/mm, vybavený CCD detektorem chlazeným dusíkem. Spektra byla měřena v dusíku a argonu v rozsahu 200 – 400 nm (UV oblast). K tomuto účelu byla využita mřížka 3600 vrypů/mm. Dále byla na mřížce 1200 vrypů měřena přehledová spektra pro oba pracovní plyny v rozmezí vlnových délek od 200 do 800 nm.

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

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

3.2.3 Použité mikroorganismy, příprava vzorků

Sledovaný bioindikátor *Aspergillus niger* F8189 byl získán v České sbírce mikroorganismů (Masarykova univerzita Brno). Kultivace proběhla na sladinném šikmém agaru (sladina a 2 hm. % agaru Himedia RM 026) po dobu 7 dní při 25°C.

Suspenze spor byla připravena nalitím cca 5 ml sterilní vody s přídavkem Tweenu 80 (0,1 ml na 100 ml média) do kultury ve zkumavce. Spory byly uvolněny do roztoku pečlivým seškrábnutím pomocí sterilní kličky.

Očkovací suspenze byla nalita do centrifugačních uzavíratelných sterilních mikrozkušavek o objemu 2 ml. Poté byla podrobena trojnásobné centrifugaci (10 000 otáček, 5 min, 4°C) a promyta 2 ml sterilní vody. Po třech promytích byla odstředěná kapalina čirá a na dně zkumavek byly usazeny spory *A. niger*. Tímto způsobem byla získána suspenze spor o koncentraci $1 \cdot 10^7$ spor·ml⁻¹.

Suspenze spor byla zředěna vodou a aplikována pomocí mikropipety (100 µl) na nosný materiál. Tímto byl sterilní papír Whatman no.1 nebo PET-fólie (průměr 3 cm) rozložený v Petriho miskách. Takto připravené vzorky byly ponechány 24 hod v termostatu při teplotě 25°C za aerobních podmínek, aby došlo k zaschnutí aplikované suspenze.



Obr. 9: Petriho miska se vzorky k opracování

3.2.4 Opracování vzorků

Aby nedošlo k sekundární kontaminaci, byl nejprve celý box dezinfikován ethanolem a používaná pinzeta pro aplikaci vzorků ještě navíc pravidelně sterilizována plamenem. Naočkováný nosný materiál byl umístěn do středu spodní elektrody, poté byl box uzavřen a nastavena požadovaná vzdálenost elektrod. Po dvou minutách, kdy došlo k dokonalému vyplnění pracovního prostoru plynem, bylo spuštěno zařízení na daný čas a při přednastavené hustotě napětí. Po expozici plazmatem byly vzorky vloženy do roztoku 10 ml sterilní vody s Tweenem 80, protřepány a ponechány na třepačce do druhého dne. Roztok nejenže zabránil sekundární kontaminaci, ale zvýšil i hydrofilitu potenciálních přeživších spor, a tím i jejich vymývání do roztoku.

3.2.5 Způsob vyhodnocení

Pro kvantitativní vyhodnocení sterilizačních účinků DBD byla využita tzv. nepřímá (kultivační) metoda stanovení počtu mikrobiálních buněk. Tato metoda vychází z předpokladu, že z každé vitální buňky vyroste jedna kolonie. K tomu, aby na povrchu živného média vyrůstaly jednotlivé kolonie, je třeba suspenze mikroorganismů ředit. Pro tyto účely byl využit koeficient ředění 10. Takto zředěné suspenze byly nanášeny na agarové plotny a kultivovány. Po určité době bylo možné stanovit počet vyrostlých kolonií, tzv. CFU (colony forming units), které by měly odpovídat počtu přeživší populace mikroorganismů.

Pro každý vzorek byly připraveny dvě mikrozkušavky s 900 µl sterilní vody a tři Petriho misky. Ze vzorku bylo odebráno 100 µl a naočkováno do Petriho misky č. 1. Další 100 µl vzorku bylo přidáno do první mikrozkušavky, promícháno a naneseno do misky č. 2. Nakonec bylo odebráno 100 µl vzorku z první mikrozkušavky, přeneseno do druhé mikrozkušavky a po promíchání zaočkováno do misky č. 3. Všechny misky se vzorky byly zaočkovány přelivem (mladinový agar) a ponechány 48 hod v termostatu. Po dvou dnech byly spočítány kolonie na jednotlivých miskách.

3.2.6 Experimentální podmínky

Opracování vzorků probíhalo za přesně definovaných podmínek, které lze charakterizovat hustotou plazmového výkonu, expozičním časem, druhem nosného materiálu a pracovního plynu. Nastavením parametrů bylo docíleno požadavku různých dávek plazmatu sledovaným vzorkům.

Hustota plazmového výkonu je charakterizována vzorcem: $x = \frac{U \cdot I \cdot \eta}{V}$, kde U znamená napětí, I je proud, η je účinnost a V je objem plazmatického výboje. Pro naše zařízení se použijí rozměry elektrod 90 x 70 mm a vzdálenost elektrod 3 mm. Účinnost zařízení je 0,4. Pro vložena napětí o velikosti 50 V, 60 V a 70 V je hustota plazmového výkonu 1 153,44 mW·cm⁻³, 1 803,17 mW·cm⁻³ a 2 562,96 mW·cm⁻³ (pro argon), 1 164,02 mW·cm⁻³, 1 434,92 mW·cm⁻³ a 2 044,44 mW·cm⁻³ (pro dusík).

Byly použity expoziční časy v rozsahu 5 – 240 sekund. Průtok pracovních plynů, argonu nebo dusíku, dosáhl 3 l·min⁻¹. Za nosný materiál byl zvolen papír a PET-fólie.

Postupně jsme proměřili sérii vzorků pro jednotlivé hustoty výkonu a pro vzrůstající doby opracování. Pro jednotlivá napětí byly odečítány i příslušné proudy, kdy tyto zůstávaly

konstantní. Abychom zabránili nežádoucímu působení tepla na sledované mikroorganismy, byla maximální doba opracování vždy 30 s. Pokračovat v měření bylo možné vždy až po jedné minutě, kdy elektrody dostatečně vychladly.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem experimentu bylo stanovit vhodné inaktivační podmínky pro bioindikátor *Aspergillus niger*. Ze získaných výsledků jsou vyvoditelné obecné zákonitosti vzhledem k tomu, jak se mění počet přeživších mikrobiálních buněk v závislosti na použité hustotě výkonu, čase, plynu a nosném materiálu.

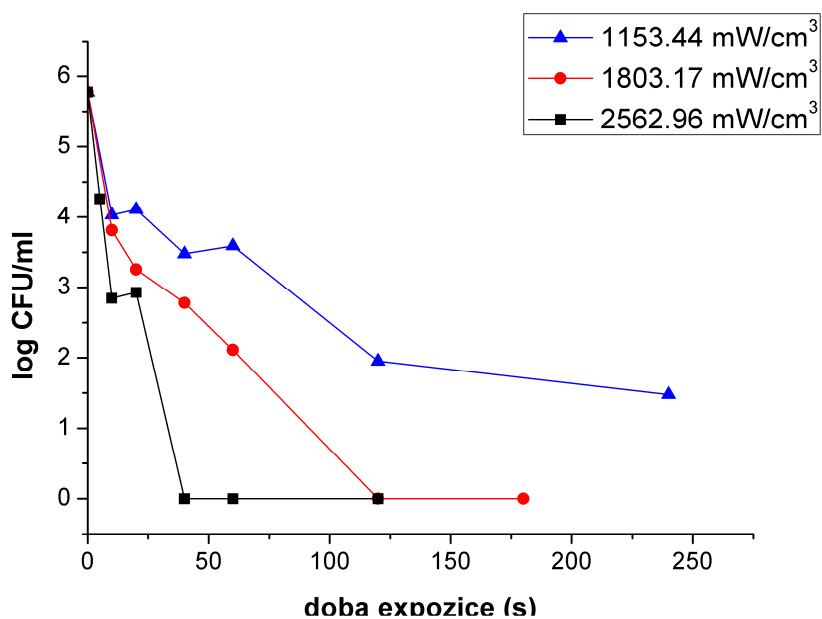
4.1 Vliv pracovních časů a velikosti hustoty plazmového výkonu

Na obrázcích č. 10 a 11 jsou znázorněny křivky přežití v závislosti na čase a na velikosti hustoty plazmového výkonu. Je evidentní, že počet přeživších spor klesá s rostoucím pracovním časem a s hustotou výkonu. Tento trend dokazuje i obrázek č. 12, kde je pozorovatelný klesající počet životaschopných mikrobiálních buněk v závislosti na rostoucím pracovním čase při různých hustotách výkonu.

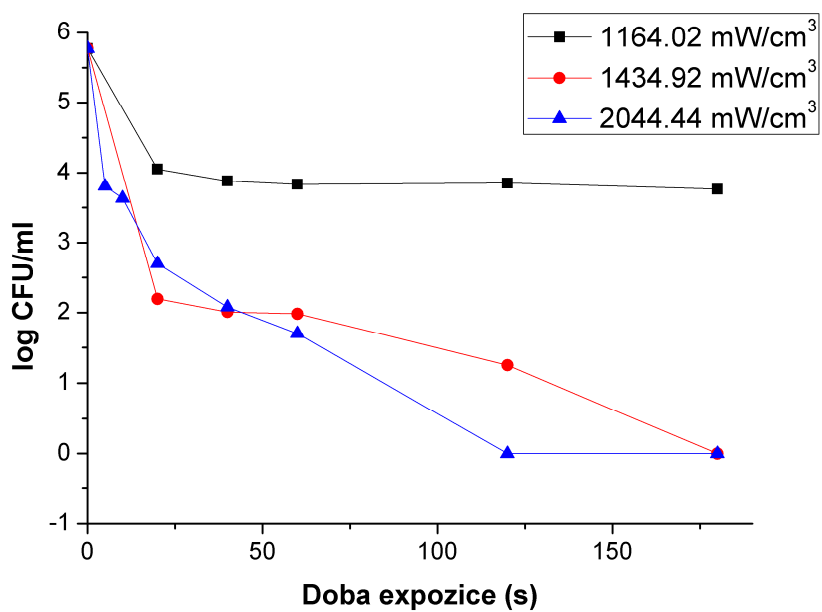
Křivky v obou případech vykazují exponenciální závislost, což odpovídá i výsledkům publikovaným Heisem [18]. Znamená to, že rychlost inaktivace klesá s rostoucím časem. Jedná se o kinetiku prvního řádu.

Pozorujeme-li inaktivační charakteristiku v argonu, vidíme, že k snížení kontaminace o pět řádů je třeba rozdílných časů pro jednotlivé hustoty výkonu. Například pro hustotu výkonu $2\,562,96\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ je potřeba expozičního času 40 s, zatímco pro hustotu výkonu $1\,803,96\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ 120 s. Při použití nejnižšího výkonu t.j. $1\,153,44\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ bylo po 240 s dosaženo redukce počtu mikroorganismů jen o 3 – 4 řády.

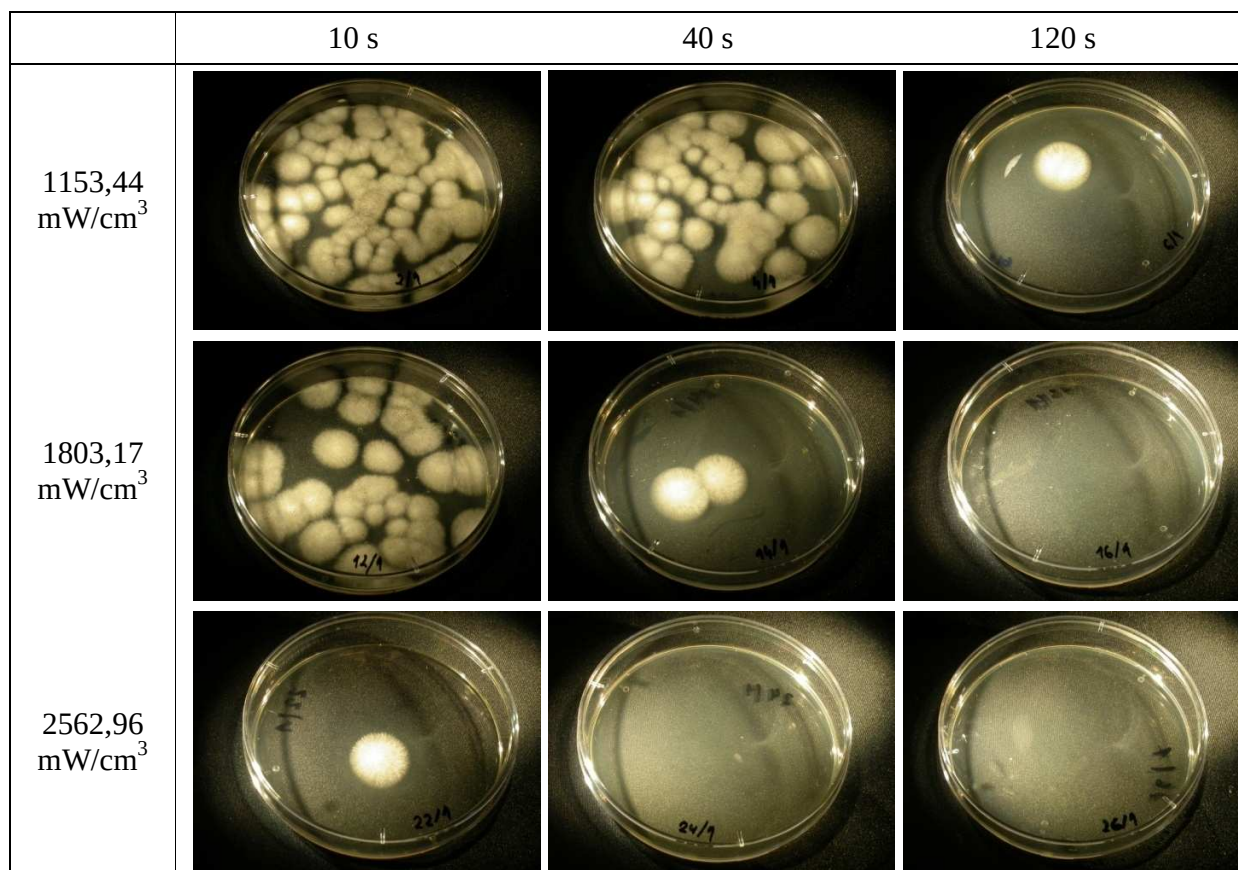
V případě dusíku platí, že při hustotě výkonu $2\,044,44\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ byl pro úplnou inaktivaci potřeba expoziční čas 80 s, zatímco pro hodnotu $1\,434,92\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ 150 s. Pro nejnižší výkon $1\,164,02\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ se podaří snížit kontaminaci dokonce o pouhý 1 – 2 řády, poté zůstává křivka konstantní. Z toho plyne, že jednotlivá plynná média nejsou stejně účinná.



Obr. 10: Křivka přežití v závislosti na čase a na použité hustotě plazmového výkonu pro argon



Obr. 11: Křivka přežití v závislosti na čase a na použité hustotě plazmového výkonu pro dusík



Obr. 12: Porovnání přeživších kolonií v čase za použití různé hustoty plazmového výkonu v argonu

4.2 Vliv pracovního plynu

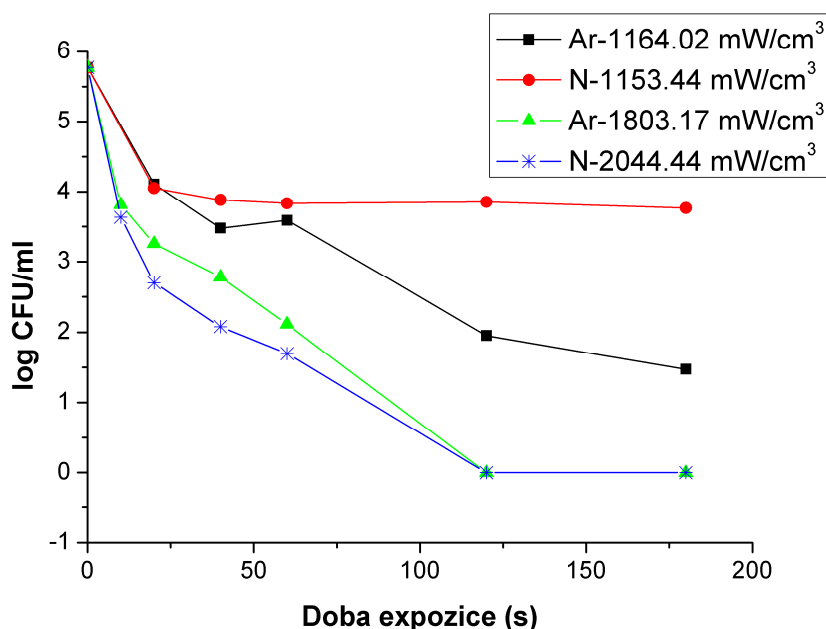
Účinnost jednotlivých typů plynů se vzájemně liší, což je dáno jejich složením. Působením plazmatu se uvolňují volné radikály, které mají negativní účinky na živé organismy, jak již bylo řečeno výše.

Na obrázku č. 13 je znázorněno působení dvou pracovních plynů, argonu a dusíku. Porovnáním blízkých výkonů pro oba plyny získáme zajímavé výsledky. Je evidentní, že argon má vysoké inaktivační účinky i pro nižší hustoty výkonu. Při výkonu 1 164,02 mW·cm⁻³ dojde k snížení mikrobiální kontaminace o 4 – 5 řádů za 160 s. Dusík při hustotě výkonu 1 153,44 mW·cm⁻³ snižuje kontaminaci pouze o 2 – 3 řády, přičemž průběh křivky zůstává po počátečním snížení konstantní. Pokud dojde v případě dusíku k zvýšení hustoty výkonu, vykazuje i on silnější inaktivační účinky. Při hustotě výkonu 2 044,44 mW·cm⁻³ dojde k redukci o 5 řádů v čase 80 s. Argon snižuje mikrobiální kontaminaci o 5 řádů při hustotě výkonu 1 803,17 mW·cm⁻³ v čase 100 s.

Zajímavé je také pozorovat průběh křivek. Křivka pro argon i dusík vykazuje podobný průběh, jaký byl popsán Heisem [18], vyjadřuje exponenciální úbytek životaschopných buněk. Typ křivky závisí na druhu mikroorganismu, živném mediu a na způsobu opracování. [38]

U obou plynů se na inaktivaci podílelo UV záření a reaktivní částice. V našem případě to byly zejména volné radikály kyslíku a dusíku a radikály OH, viz spektra kapitola 4.4. Přítomnost UV záření v oblasti 220 – 290 nm byla pozorována u dusíku – emise NO γ molekulového pásu. V případě argonu není kvůli útlumu intenzity NO znatelné, ale i přes tento útlum jsou znatelné velmi intenzivní OH pásy. Vysoká intenzita OH může vysvětlovat vyšší účinnost argonu jako pracovního plynu. Jak již bylo popsáno v teorii, tato reaktivní částice se může výrazným způsobem podílet na oxidaci a leptání buněčných částí.

Vyšší efektivitu argonu popsal ve své práci také Heise [18]. Vysvětloval ji přítomností ArO* ve spektru při vlnové délce 308 nm, nicméně toto nebylo v našem spektru zaznamenáno.



Obr. 13: Srovnání účinnosti argonu a dusíku

4.3 Vliv nosného media

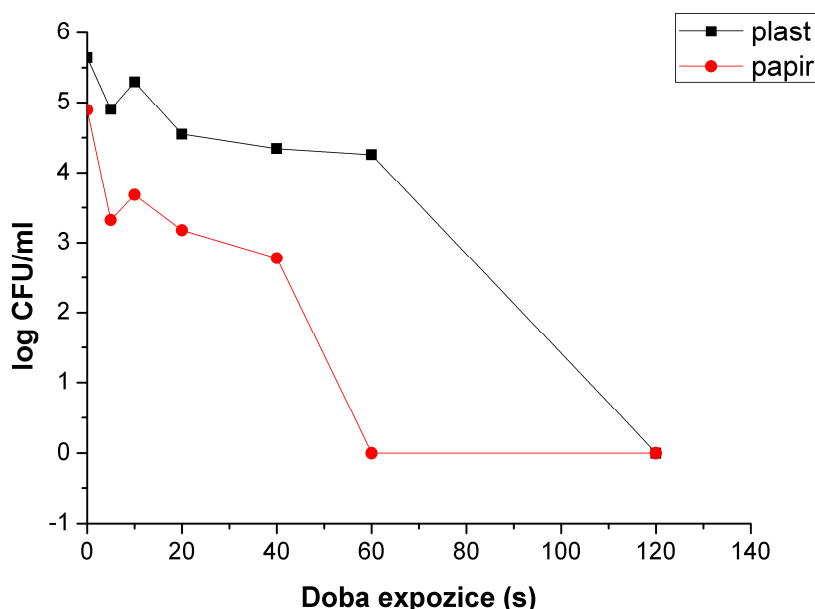
Nosný materiál hraje při sledování účinnosti plazmové sterilizace zásadní roli. Je třeba si uvědomit, že se jednotlivé druhy materiálů liší svými vlastnostmi, a tím pádem na ně působí plazma odlišným způsobem. Navíc mohou některé z nich mít pro mikroorganismy ochranný efekt (efekt stínění), což má na účinnost dekontaminačního zákroku zásadní vliv.

Při pokusu byla použita dvě nosná media, a to papír a polymer (PET). Papír je oproti PET-fólii značně pórovitý, takže poskytuje mikroorganismům ochranu. Polymer se svým hladkým celistvým povrchem toto neumožňuje. I pro tuto výjimečnou vlastnost je nejpoužívanějším

obalovým materiálem v průmyslu. Do budoucna bude vhodné zjistit, do jaké míry jsou jeho charakteristické vlastnosti po opracování plazmatem zachovány. [14]

Pokud porovnáváme obsah spor nanesených na materiál a obsah spor v referenčních vzorcích zjišťujeme, že se hodnoty liší o jeden řád. Znamená to, že i když původní suspenze obsahovala $1 \cdot 10^7$ spor·ml⁻¹, došlo k úbytku populace během sušení v termostatu.

Na obrázku č. 14 je znázorněna křivka přežití pro tytéž časy a shodnou hustotu výkonu v argonu, ovšem s použitím dvou různých nosných medií, papíru a PET-fólie. Je evidentní, že mikrobiální kontaminace na polymeru je minimálně o jeden řád vyšší, a že dekontaminace probíhá pozvolně. Naopak papír má pro mikroorganismy silný ochranný efekt. Do očkovací suspenze se ani po dlouhodobějším vytřepávání neuvolní všechny mikrobiální buňky, takže papír navenek vykazuje nižší stupeň zamoření. Pokud se pro opracování nezvolí dostatečně dlouhé expoziční časy a hustoty výkonu, lze předpokládat, že v pórech zůstanou životaschopné mikrobiální buňky.



Obr. 14: Srovnání účinků plazmové sterilizace za užití různých nosných médií

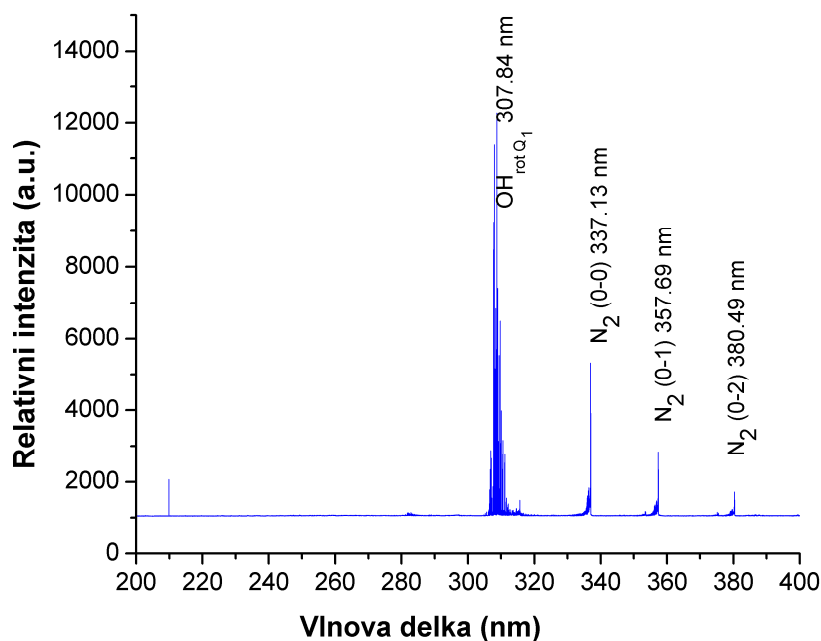
4.4 Vyhodnocení emisní spektroskopie

Na obrázcích č. 15 a 16 jsou znázorněna emisní spektra vybuzená pro oba použité plyny, argon a dusík. Pomocí těchto spekter lze vysvětlit dekontaminační účinky obou plynových médií.

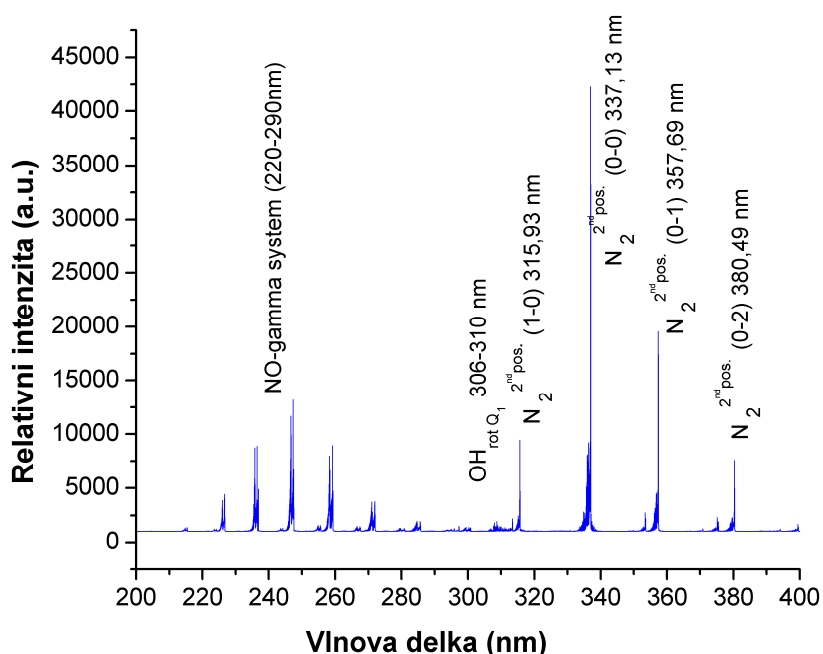
Spektrum argonu má silné emise kolem 308 nm, což je způsobeno existencí OH-systému. Dále je pozorovatelný druhý systém dusíku (337 nm, 357 nm a 380 nm) a v rozmezí vlnových délek 385 – 389 nm pak CN-systém. V přehledovém spektru byly dále viditelné argonové čáry (oblast nad 690 nm) a čáry atomárního kyslíku (777 nm). Ačkoliv byla předpokládána i přítomnost NO-systému, nepodařilo se ho detekovat.

Spektrum dusíku vykazuje, podobně jako spektrum argonu, OH-systém v oblasti 306 – 310 nm. Dále byl detekován druhý pozitivní systém dusíku. V rozmezí 220 – 290 nm je pozorovatelná emise NO γ molekulového pásu, čímž je prokázána přítomnost UV-záření. Tento jev je způsoben stopami kyslíku v měřeném plynu.

Při srovnání obou spekter je také evidentní, že intenzita OH-systému u argonu je výrazně vyšší než v případě dusíku. Tato skutečnost podporuje již dřívější tvrzení, že argon vykazuje výraznější inaktivační účinky. Podobné pozorování bylo popsáno i jinými autory.



Obr. 15: Emisí spektrum výboje buzeného v argonu



Obr. 16: Emisní spektrum výboje buzeného v dusíku

Rotační a vibrační teploty jsou významnými charakteristikami plazmatu. Vibrační teploty vypovídají o úrovni excitace plazmatu. V neizotermickém plazmatu bývá zpravidla vyšší než teplota rotační. Z výsledků je tedy patrné, že použité plazma je neizotermické.

Rotační teplota poskytuje informaci o přítomnosti těžkých částic v hořícím plazmatu a koresponduje s teplotou neutrálního plynu. Pomocí rotačních teplot lze tudíž určit, zda měla zvýšená teplota vliv na inaktivaci mikroorganismů. Jak ukazuje tabulka č. 2, rotační teploty pro argon jsou nízké, tudíž lze považovat vliv teploty za zanedbatelný. V případě plazmatu generovaného v dusíku však mohlo mít zvýšení teploty vliv na inaktivaci přítomných mikroorganismů.

Tabulka 2: Rotační a vibrační teploty pro argon a dusík

Plyn – Hustota výkon	T _{rot} [K]	T _{vibr} [K]
Dusík – 2 044,44 mW/cm ³	570 ± 110	1580 ± 150
Argon – 2 562,96 mW/cm ³	290 ± 10	1650 ± 500

5 ZÁVĚR

V experimentální části bylo ukázáno, že plazmová sterilizace za normálního tlaku je pro dekontaminaci běžných materiálů vhodná. Tento poznatek je důležitý pro další uplatnění této metody, a to zejména v technologii obalových materiálů a ve zdravotnictví, kde jsou používány termosenzibilní materiály. Námi sledovaná metoda nejenže je velice šetrná, ale také rychlá a ekonomicky výhodná.

Užití plazmové sterilizace lze očekávat zejména v oblastech, kde je v současnosti velice problematické užití běžných dekontaminačních postupů. Tyto přinášejí zvýšené namáhání materiálu teplotou, tlakem nebo chemikáliemi, což v případě užití plazmatu nehrozí. Jako příklad lze uvést šetrnou sterilizaci náchylných surovin (koření) nebo zdravotnického materiálu (cévky, tuby). Za zmínku stojí také povrchové ošetření obalových materiálů potravin, které by vedlo k zefektivnění celé technologie.

Účinky plazmatu byly sledovány na bioindikátoru *Aspergillus niger*. Tento mikroorganismus vykazuje zvýšenou odolnost vůči UV-záření, které je jednou ze složek inaktivačního procesu. K inaktivaci mikrobiálních buněk tedy dochází synergickým efektem několika mechanismů, které jsou závislé na zvolených podmínkách opracování. Bylo zjištěno, že účinnost metody roste mimo jiné se zvýšením hustoty výkonu a pracovního času. Na efektivitu dekontaminačního procesu má dále vliv volba nosného média a pracovního plynu.

Pokud jde o vliv výkonu, bylo zjištěno, že dekontaminační křivky vykazují exponenciální závislost. Pro snížení kontaminace o 5 řádů bylo potřeba rozdílných časů, a to v závislosti na hustotě výkonu. Například pro argon při hustotě výkonu $2\,562,96\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ má pracovní čas hodnotu 40 s, zatímco pro hustotu výkonu $1\,803,96\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ 120 s. Je tedy evidentní, že vyšší hustoty výkonů vedou i k rychlejší inaktivaci mikrobiální populace.

Plynné médium má na účinnost inaktivace také zásadní vliv. Je to dáno tím, že jednotlivé plyny se liší složením, a tudíž v nich při opracování probíhají i rozdílné reakce. Pokud provedeme srovnání argonu a dusíku zjistíme, že argon je účinnější. Jako příklad můžeme uvést expoziční časy nutné pro snížení populace mikroorganismů o 5 řádů. Zatímco v argonu je potřeba expozičního času 90 s, v dusíku je to již hodnota 150 s.

Při experimentech jsme se přesvědčili i o rozdílných vlastnostech jednotlivých nosných médií. Při porovnání papíru a polymeru (PET) bylo prokázáno, že má papír pro mikroorganismy výrazný ochranný efekt. Nejenže na něm zdánlivě dochází k rychlejší inaktivaci, ale ani po intenzivním vytřepávání není možné uvolnit všechny přítomné spory. Polymer tuto tendenci nemá, což je dáno jeho hladkým nepórovitým povrchem. Pokud tedy probíhá inaktivace na tomto nosném médiu, je sice její průběh pomalejší, ale dojde k skutečnému usmrcení většiny přítomných spor.

Pro názornější sledování a pro pochopení dějů v plazmatu byla provedena optická emisní spektroskopie. Bylo prokázáno, že se na inaktivaci mikroorganismů podílí reaktivní částice, a to radikály dusíku, kyslíku a OH-radikály. Jejich intenzita je vyšší v argonu, proto má tento pracovní plyn i vyšší dekontaminační účinnost. Vliv UV-záření byl prokázán pouze v dusíku. U argonu se nepodařilo změřit spektrum pod 300 nm, tudíž nebylo UV-záření detekovatelné. Porovnáním rotačních a vibračních teplot bylo dále zjištěno, že teplota mohla mít na inaktivaci mikroorganismů vliv pouze v případě dusíku.

Do budoucna bude nutné sledovat jednotlivé druhy mikroorganismů a stanovit standardní podmínky pro jejich inaktivaci, stejně jako případné účinky plazmatu na opracovávaný materiál. Je však nesporné, že plazmová sterilizace skýtá oproti běžným metodám celou řadu výhod, a je jen otázkou času, kdy se značně využít ve větším měřítku.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. vyd. Brno: Neptun, 2005. 351 s. ISBN 80-86850-00-5.
- [2] Šilhánková L., in: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2. vyd. Praha: Victoria Publishing, a.s., 1995. 361 s. ISBN 80-85605-71-6.
- [3] VRAJOVÁ, Jitka. *Studium sterilizačních účinků dielektrického bariérového výboje*. [s.l.], 2008. 31 s. Pojednání k dizertační práci.
- [4] HRSTKA, Miroslav. *Obecná biologie*. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2005. 112 s. ISBN 80-214-3057-5
- [5] NĚMEC, Miroslav, HORÁKOVÁ, Dana. *Základy mikrobiologie pro učitelské studium*. Brno: Masarykova univerzita v Brně, Fakulta přírodovědecká, 2002. 230 s.
- [6] VÍTOVÁ, Eva. *Sledování morfologických znaků kvasinek* [online]. [2008] [cit. 2009-04-06]. Dostupný z WWW: <<https://www.vutbr.cz/elearning/mod/resource/view.php?id=56580>>.
- [7] SKORKOVSKÝ, Bohuslav, et al. *Mikroorganismy jako původci degradace archiválií*. [s.l.] : TEPS, 1981. 106 s.
- [8] BRABCOVÁ, Blažena. *Sylabus předmětu Základy systému a fylogeneze nižších rostlin a hub* [online]. 2006 [cit. 2009-02-09]. Dostupný z WWW: <http://www.ped.muni.cz/wbio/studium/stud_mat/Bra-mat/sylprnr.pdf>.
- [9] VÍTOVÁ, Eva. *Sledování morfologických znaků plísní* [online]. [2008] [cit. 2009-04-06]. Dostupný z WWW: <<https://www.vutbr.cz/elearning/mod/resource/view.php?id=56582>>.
- [10] NĚMEC, Miroslav, et al. *Miniatlas mikroorganismů* [online]. 2006 [cit. 2009-02-09]. Dostupný z WWW: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/mikr.htm>>.
- [11] *Modelový organismus* [online]. 2008 [cit. 2009-02-14]. Dostupný z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Modelový_organismus>.
- [12] *Saccharomyces cerevisiae* [online]. 2008 [cit. 2009-02-14]. Dostupný z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae>.
- [13] KOMÁREK, Lubomír, et al. *Standardní metodika "Biologické indikátory pro kontrolu účinnosti sterilizačních přístrojů"*. Praha: Státní zdravotní ústav, 1994. 15 s. ISSN 0862-5956

- [14] MURANYI, P., WUNDERLICH, J., HEISE, M. . Sterilization efficiency of a cascaded dielectric barrier discharge. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2007 [cit. 2009-02-14].
- [15] AKITSU, Tetsuya, et al. Plasma sterilization using glow discharge at atmospheric prssure. *Surface and Coatings Technology* [online]. 2004 [cit. 2009-02-15].
- [16] GADRI, Rami Ben, et al. Sterilization and plasma processing of room temperature surfaces with a one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP). *Surface and Coatings Technology* [online]. 2000 [cit. 2009-02-15].
- [17] LAGUARDIA, L., et al. Investigation of the effects of plasma treatments on biodeteriorated ancient paper. *Applied Surface Science* [online]. 2005 [cit. 2009-02-15].
- [18] HEISE, M., et al. Sterilization of Polymer Foils with Dielectric Barrier Discharges at Atmospheric Pressure. *Plasmas and Polymers* [online]. 2004 [cit. 2009-02-15].
- [19] ETO, Hiroyuki, et al. Low-Temperature Internal Sterilization of Medical Platic Tubes Using a Linear Dielectric Barrier Discharge. *Plasma Processes and Polymers* [online]. 2008 [cit. 2009-02-15].
- [20] EHLBECK, J., et al. Plamose - antimicrobial effects of modular atmospheric plasma sources. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* [online]. 2008 [cit. 2009-02-15].
- [21] SCHNEIDER, J., et al. Investigation of the practicability of low-pressure microwave plasmas in the sterilisation of food packaging materials at industrial level. *Surface and Coatings Technology* [online]. 2005 [cit. 2009-02-15].
- [22] LEE, K., et al. Sterilization of Escherichia coli and MRSA using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure. *Surface and Coatings Technology* [online]. 2004 [cit. 2009-02-17].
- [23] DENG, Shaobo, et al. Inactivation of Escherichia coli on Almonds Using Nonthermal Plasma. *Journal of Food Science* [online]. 2007 [cit. 2009-02-15].
- [24] VOHRER, U., et al. Plasma treatment - an increasing technology for paper restoration?. *Surface and Coatings Technology* [online]. 2001 [cit. 2009-02-15].
- [25] AUBRECHT, V. *Fyzika a diagnostika plazmatu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, [200-]. 117 s.
- [26] LEIPOLD, F. Inactivation of microorganisms by means of low temperature atmospheric pressure plasmas. *28th ICPIG* [online]. 2007 [cit. 2009-02-17].

- [27] LAROUSSE, M., LEIPOLD, F. Evaluation of role of reactive species, heat and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *International Journal of Mass Spectrometry* [online]. 2004 [cit. 2009-02-17].
- [28] XU, L., et al. Experimental study and sterilizing application of atmospheric pressure plasmas. *Thin Solid Films* [online]. 2005 [cit. 2009-02-17].
- [29] PARK, B. J. , et al. Escherichia coli sterilization and lipopolysaccharide inactivation using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure . *Surface and Coatings Technology* [online]. 2006 [cit. 2009-02-17].
- [30] CHALUPOVÁ, Lenka. *Nové způsoby sterilizace zdravotnického materiálu s přihlédnutím na plazmovou sterilizaci*. Brno, 2007. 46 s. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity na Ústavu fyzikální elektroniky. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Jan Janča, DrSc.
- [31] Smékal, P.: *Studium sterilizace pomocí plazmatu*. Brno, 2008, 111 s. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity na Ústavu fyzikální elektroniky. Vedoucí diplomové práce Mgr. Pavel Slaviček, Ph.D.
- [32] NEČAS, Oldřich. *Obecná biologie*. Most: H & H, 2000. 463 s.
- [33] ŠIMKO, Peter. *Mikrobní činitelé rozkladu potravin a obrana proti nim* [online]. [2008] [cit. 2009-03-01]. Dostupný z WWW: <https://smetana.fch.vutbr.cz/r_studenti/4.rocnik/UHPBT/Principy uchovavani potravin/>.
- [34] WELTMANN, K.-D., et al. Atmospheric pressure plasmas for biomedical applications. *The Second Central European Symposium on Plasma Chemistry* [online]. 2008 [cit. 2009-04-06].
- [35] Předpis č. 258/2000 Sb. - *Zákon o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů*, zdroj: SBÍRKA ZÁKONŮ ročník 2000, částka 74, ze dne 11.08.2000.
- [36] MAZÁNKOVÁ, Věra. *Plazma dohasínajících dusíkových výbojů*. [s.l.], 2006. 29 s. Pojednání k dizertační práci.
- [37] SHI, X.-M., et al. Research on the Inactivation Effect of Low-Temperature Plasma on Candida Albicans. *IEEE Transactions on Plasma Science* [online]. 2008 [cit. 2009-04-06].
- [38] VRAJOVÁ, Jitka, et al. Removal of Paper Microbial Contamination by Atmospheric Pressure DBD Discharge. *Eur. Phys. J. D* [online]. 2009 [cit. 2009-04-19].