

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

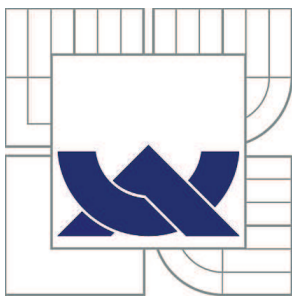
STUDIUM VLIVU VLHKOSTI NA CELKOVÝ STERILIZAČNÍ ÚČINEK
DIELEKTRICKÉHO BARIÉROVÉHO VÝBOJE

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

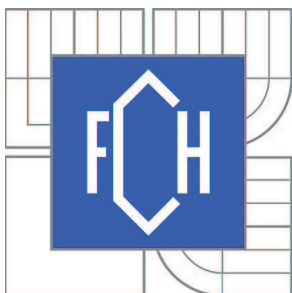
Bc. PETRA KRAMÁROVÁ

BRNO 2012



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

STUDIUM VLIVU VLHKOSTI NA CELKOVÝ STERILIZAČNÍ ÚČINEK DIELEKTRICKÉHO BARIÉROVÉHO VÝBOJE

INFLUENCE OF HUMIDITY ON TOTAL STERILISATION EFFECT OF DIELECTRIC BARRIER
DISCHARGE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

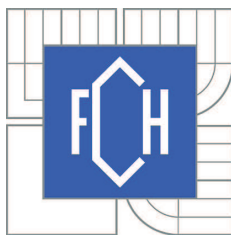
Bc. PETRA KRAMÁROVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. ZDENKA KOZÁKOVÁ, Ph.D.

BRNO 2012



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0617/2011	Akademický rok: 2011/2012
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Bc. Petra Kramářová	
Studijní program:	Spotřební chemie (N2806)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí práce	Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Studium vlivu vlhkosti na celkový sterilizační účinek dielektrického bariérového výboje

Zadání diplomové práce:

- seznámení se s experimentálním zařízením a principem dielektrického bariérového výboje
- diagnostika dielektrického bariérového výboje
- studium sterilizačních účinků dielektrického bariérového výboje na modelovém mikroorganismu při generaci v plynech bez přítomnosti vlhkosti
- studium sterilizačních účinků dielektrického bariérového výboje při generaci v plynech o různém stupni vlhkosti

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2012

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

Bc. Petra Kramářová
Student(ka)

Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Hlavním tématem této diplomové práce je studium vlivu vlhkosti na celkový sterilizační účinek dielektrického bariérového výboje. Sterilizace je proces, při kterém dochází k eliminaci všech forem života. Předložená diplomová práce se zabývá plazmovou sterilizací, což je jedna z metod, které vyhovují požadavkům na sterilizaci teplotně senzitivních materiálů a materiálů citlivých na chemické látky. Tato sterilizační metoda je účinná na široké spektrum prokaryotních i eukaryotních mikroorganismů. Působí na ně několika mechanismy založenými na účincích UV záření, aktivních částic a teploty.

Pro opracování vzorků byl použit dielektrický bariérový výboj (DBD) pracující za atmosférického tlaku. Výboj byl generován v suchém a vlhkém vzduchu. Hustoty výkonů dodávaných do plazmatu byly $2\,160\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$, $2\,279\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$, $2\,760\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ (pro suchý vzduch) a $2\,326\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$, $2\,850\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ (pro vlhký vzduch). Vlhkosti vzduchu bylo dosaženo použitím promývací láhve naplněné vodou, přes kterou vzduch proudil do DBD reaktoru. Jako modelové mikroorganismy byly použity spory plísňe *Aspergillus niger*. Nosným materiálem byl papír typu Whatman No. 1. Při srovnání vlhkého a suchého vzduchu za stejných podmínek byla prokázána vyšší sterilizační účinnost vlhkého vzduchu.

Sterilizační účinek DBD výboje generovaného ve vzduchu byl porovnán s výsledky získanými při generaci plazmatu v argonu a dusíku. Za použití stejných podmínek byl nejvyšší sterilizační účinek pozorován u argonu, poté následoval vlhký vzduch, dusík a suchý vzduch. Bylo zjištěno, že hlavním inaktivačním mechanismem DBD při daných podmínkách jsou aktivní částice. Vliv teploty na inaktivaci mikroorganismů byl zcela zanedbatelný.

Pomocí optické emisní spektroskopie (OES) byla provedena spektrální analýza plazmového výboje. Vzorky vystavené působení DBD byly analyzovány za pomoci skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Bylo sledováno poškození mikroorganismů vlivem plazmatu a účinek plazmatu na strukturu nosného materiálu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Aspergillus niger, plazmová sterilizace, dielektrický bariérový výboj, optická emisní spektroskopie, skenovací elektronová mikroskopie

ABSTRACT

The main subject of this diploma thesis is the study of the effect of humidity on the total sterilization effect of the dielectric barrier discharge. Sterilization is a process which can eliminate all forms of life. The plasma sterilization is one of the methods that are suitable for sterilization of temperature and chemical sensitive materials. This sterilization method was proved to be 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.

Dielectric barrier discharge (DBD) operating at atmospheric pressure was used for the sterilization of the samples. The discharge was generated in dry air and in humid air. The plasma power densities were $2\,160\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$, $2\,279\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ and $2\,760\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ (dry air) or $2\,326\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ and $2\,850\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ (humid air). Humidity of air was achieved using a wash bottle filled with water through which air flowed into the DBD reactor. Fungi spores of *Aspergillus niger* were used as model microorganisms. Whatman paper No. 1 was used as the carrying medium. When comparing sterilization efficiency of humid and dry air operating at the same conditions, the higher sterilization effect was observed in humid air.

The sterilization effect of the DBD generated in air was compared with results obtained during plasma generation in argon and nitrogen. At the same conditions, the highest sterilization effect was observed in argon, followed by humid air, nitrogen and dry air. It was found out that in our experimental setup the active species are probably the main inactivation mechanism. The influence of temperature on the inactivation of microorganisms was completely negligible.

The discharge parameters were studied by means of the optical emission spectroscopy (OES). Plasma treated samples were analyzed employing scanning electron microscopy (SEM). Damage of the microorganisms due to the effect of plasma as well as plasma effect on the structure of the carrying medium was evaluated.

KEYWORDS

Aspergillus niger, plasma sterilization, dielectric barrier discharge, optical emission spectroscopy, scanning electron microscopy

KRAMÁROVÁ, P. *Studium vlivu vlhkosti na celkový sterilizační účinek dielektrického bariérového výboje*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 69 s. Vedoucí diplomové 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

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí mé práce Ing. Zdence Kozákové, Ph.D. za zajímavé téma, Ing. Jitce Slámové za poskytnutí cenných rad, připomínek, trpělivost a pomoc při získávání experimentálních dat do této práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Věře Mazánkové, Ph.D. za změření emisních spekter a Ing. Martinu Zmrzlému, Ph.D. za pomoc při analýze vzorků pomocí SEM. Paní laborantce Radce Novákové velmi děkuji za technickou podporu při získávání experimentálních dat.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Mikroorganismy a prostředí	10
2.1.1	Obecné podmínky přežívání a usmrcování mikroorganismů.....	10
2.1.2	Vliv vnějšího prostředí na mikroorganismy	10
2.2	Sterilizace	14
2.2.1	Definice základních pojmů.....	14
2.2.1	Chemické sterilizační metody	14
2.2.2	Fyzikální sterilizační metody založené na působení tepla	16
2.2.3	Fyzikální sterilizační metody založené na působení záření	17
2.2.4	Sterilizace filtrací	17
2.3	Plazma	18
2.3.1	Definice a vlastnosti	18
2.3.1	Podmínky vzniku plazmatu	19
2.3.2	Druhy plazmatu	21
2.3.3	Zdroje plazmatu.....	21
2.3.4	Využití	22
2.4	Plazmová sterilizace	22
2.4.1	Historie plazmových sterilizací	22
2.4.1	Princip sterilizace plazmatem.....	23
2.4.2	Mechanismy inaktivace pomocí plazmatu	24
2.4.3	Inaktivační charakteristika	26
2.4.4	Plazmové sterilizátory	26
2.5	Dielektrický bariérový výboj.....	27
2.5.1	Princip	27
2.5.1	DBD výboj a jeho využití při sterilizaci mikroorganismů – State of Art	28
2.6	Analytické metody	33
2.6.1	Optická emisní spektroskopie	33
2.6.2	Skenovací elektronová mikroskopie	35
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
3.1	Použité přístroje a software.....	37
3.2	Experimentální zařízení.....	37
3.3	Mikrobiologické postupy	39
3.3.1	Použitý mikroorganismus.....	39
3.3.2	Živné médium	39
3.3.3	Fyziologický roztok.....	40
3.3.4	Příprava očkovací suspenze	40
3.3.5	Příprava vzorků	40
3.4	Opracování vzorků.....	40
3.5	Vyhodnocení	41
3.6	Experimentální podmínky	41

3.7	Studium vlivu UV záření a teploty.....	42
3.8	Optická emisní spektroskopie plazmatu	42
3.9	Skenovací elektronová mikroskopie	43
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	44
4.1	Diagnostika plazmatu	44
4.2	Měření teploty pomocí termočlánku	48
4.3	Vliv UV záření a teploty.....	50
4.3.1	Vliv UV záření	50
4.3.2	Vliv teploty.....	52
4.4	Opracování ve vzduchu	53
4.5	Vliv vlhkosti	55
4.6	Srovnání pracovních plynů	57
4.7	SEM	59
5	ZÁVĚR.....	62
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	64
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	69

1 ÚVOD

Mikroorganismy hrají v přírodě i v životě člověka obrovskou roli, neboť jsou jedním z hlavních činitelů ovlivňující tvorbu a zachování životního prostředí na naší planetě. Jsou schopny rozkládat organické látky, a tím vracet chemické prvky zpět do oběhu. Podílí se na „samočištění“ vodních toků, čehož se průmyslově využívá v čističkách odpadních vod. Dalším průmyslovým uplatněním je využití jejich činnosti v kvasném a mlékárenském průmyslu, ale také v průmyslu farmaceutickém při výrobě antibiotik a vitamínů. Existují však i nežádoucí mikroorganismy, které způsobují kontaminaci vody, vzduchu, potravin, medicínských nástrojů a přístrojů, dále způsobují různé nákazy a choroby, často epidemie, ale např. i zubní kaz. Negativní účinek mikroorganismů má na svědomí také rozklad textilií, papíru, kůže, dřeva, organických nátěrů a některých plastů. Proto je ve všeobecném zájmu tyto mikroorganismy ničit – sterilizovat [1, 2].

V současné době je pro samotnou sterilizaci používáno mnoho postupů a alternativ, které využívají různé fyzikální či chemické vlivy. Právě kvůli těmto použitým chemickým látkám a fyzikálním vlivům jsou však některé používané metody předurčeny pouze pro specifické použití. Omezujícím faktorem tak může být toxicita používaného sterilizačního média, vysoká sterilizační teplota či nebezpečnost ionizačního záření užívaného při sterilizačním procesu [3].

Při použití plazmatu jako sterilizačního prostředku se lze těmto negativním a nežádoucím vlivům vyhnout. Výhodami této metody tak jsou relativně nízká aplikační teplota, krátká sterilizační doba, snadná manipulovatelnost se samotným zařízením a také vyřazení přítomnosti toxických látek. V současné době se výzkumem sterilizačního účinku plazmatu a jeho využitím zabývá mnoho výzkumných týmů. Na trhu jsou již dostupné komerční plazmové sterilizátory, nejedná se však přímo o plazmovou sterilizaci jako takovou, neboť sterilizace je v tomto případě založena na působení chemických látek za nízkého tlaku a plazma slouží v tomto případě spíše k rozkladu použitých biocidních látek. Při běžné plazmové sterilizaci je mikroorganismus vystaven působení elektrického výboje v plynu nebo směsi plynů, které běžně biocidní účinky nevykazují a jsou aktivovány působením elektrického výboje a deaktivovány bezprostředně po vypnutí budícího zdroje [4, 5].

Inaktivačními mechanismy odpovědnými za sterilizační účinek dielektrického bariérového výboje jsou teplota, UV záření a reaktivní částice. Každý ze zmíněných mechanismů má prokazatelné germicidní účinky. Rozsah, s jakým se jednotlivé mechanismy podílí na inaktivaci mikroorganismů, závisí na parametrech výboje (výkon, pracovní plyn, tlak plynu, atd.) [4, 5, 6, 7].

Tato diplomová práce se zabývá studiem vlivu vlhkosti na účinky plazmové sterilizace při inaktivaci mikroorganismů, konkrétně plísně *Aspergillus niger*. Plazma bylo buzeno prostřednictvím dielektrického bariérového výboje v prostředí suchého a vlhkého vzduchu. Dielektrické bariérové výboje v sobě kombinují výhody neizotermického nízkoteplotního plazmatu a možnosti práce za atmosférických tlaků. S využitím argonu a dusíku jako pracovních plynů byly v předešlé práci [8] odděleně hodnoceny účinky UV záření, teploty a samotného plazmatu. Tato diplomová práce na předešlou práci navazuje právě měřením ve vzduchu. Dále byla provedena diagnostika plazmatu pomocí optické emisní spektroskopie a měření teploty termočlánkem. S využitím skenovací elektronové mikroskopie byly

analyzovány nepracované vzorky i vzorky vystavené působení dielektrického bariérového výboje. Byly sledovány změny mikroorganismu a poškození buněčné stěny způsobené vlivem plazmatu. Rovněž byl sledován i účinek plazmatu na strukturu nosného materiálu. V teoretické části byly popsány jednotlivé konvenční sterilizační metody, velká část byla věnována samotné plazmové sterilizaci a dielektrickému bariérovému výboji. Poslední část je věnována dvěma použitým analytickým metodám.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Mikroorganismy a prostředí

2.1.1 Obecné podmínky přežívání a usmrcování mikroorganismů

Mikroorganismy jsou v neustálém kontaktu se svým životním prostředím a působí na ně nejrůznější vnější faktory. Vliv faktorů prostředí na mikroorganismy se může projevovat příznivě i nepříznivě. Příznivě působící faktory jsou využívány tam, kde napomáhají žádoucímu urychlení růstu nebo zvýšení metabolické aktivity. Vnější faktory s nepříznivým účinkem nacházejí uplatnění hlavně v podmínkách, kde je přítomnost mikroorganismů nežádoucí nebo dokonce škodlivá [9, 10].

Mezi nepříznivě působící faktory se řadí teplota, záření, nedostatek vody a živin, nevhodné pH a další. Bez ohledu na druh nepříznivě působícího faktoru je konečný výsledek závislý na mnoha okolnostech. Pokud intenzita daného nepříznivého faktoru stoupá, mikroorganismy se nejprve přestávají množit, a teprve pak začínají postupně odumírat. První fáze bývá obvykle vratná. Druhá fáze je nevratná a vede k postupné smrti mikroorganismů. Vlivem nepříznivého činitele nejsou všechny mikrobiální buňky usmrceny náraz, odumírání probíhá podle logaritmické křivky, čili konstantní rychlostí. Až ke konci se rychlost odumírání zpomaluje, protože naživu zůstávají odolnější jedinci [11].

Obecně platí, že počet usmrcených buněk závisí nejen na intenzitě smrtícího činitele, ale i na době jeho působení, že vztah mezi počtem přežívajících buněk a dobou působení antimikrobiálních agens je logaritmický a že čas potřebný k usmrcení mikroorganismů závisí na jejich výchozím počtu. Účinnost antimikrobiálního agens je dále závislá na druhu mikroba, na ochranném vlivu prostředí a v případě chemikálií ještě na vlivu teploty [11].

2.1.2 Vliv vnějšího prostředí na mikroorganismy

Životní aktivita mikroorganismů a jejich vývoj probíhají v těsné závislosti na podmínkách vnějšího prostředí. Aby se mohly mikroorganismy rozmnožovat, musí být v prostředí jak dostatečné množství surovin pro syntézu buněčné hmoty a dostatečné množství zdroje využitelné energie, tak i vhodné fyzikální, chemické a biologické podmínky. Mikroorganismy jsou ovšem schopny se přizpůsobit vnějším podmínkám nejen změnou enzymového vybavení svých buněk, ale mohou do určité míry změnit i složení a tvar buněk, aby byly vůči existujícím nepříznivým podmínkám odolnější. Tato schopnost mikroorganismů se označuje jako adaptace k vnějšímu prostředí. Na druhou stranu však mikroorganismy mohou svou činností do určité míry měnit vnější prostředí, např. změnou pH. Všechny tyto schopnosti mikroorganismů jsou ovšem omezeny určitým limitem, za nímž dochází k zastavení růstu nebo usmrcení buňky [1].

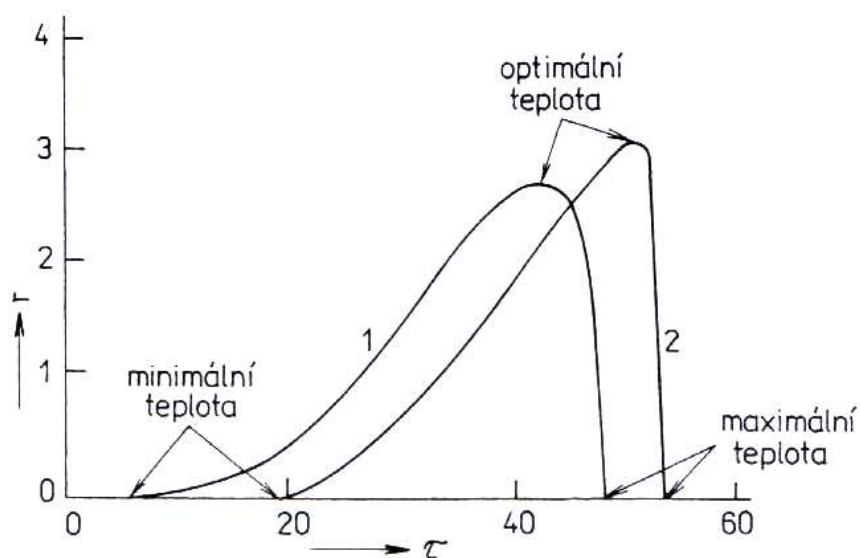
2.1.2.1 Teplota

Teplota vnějšího prostředí je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících rychlost rozmnožování i existenci buňky. U každého mikroorganismu rozeznáváme tři základní body teploty: minimální teplotu, tj. nejnižší teplotu, při níž se daný druh rozmnožuje ještě

zjistitelnou rychlostí, optimální teplotu, při níž se rozmnožuje největší rychlostí, a maximální teplotu, tj. nejvyšší teplotu, při které je ještě schopen se rozmnožovat. Optimální teplota pro rozmnožování se nemusí vždy shodovat s optimální teplotou pro ostatní životní procesy buňky [1].

Při zvýšení teploty nad optimální teplotu dochází k prudkému poklesu rychlosti rozmnožování a nakonec k jeho zastavení. Další zvýšení teploty pak vede k usmrcení buněk. Příčinou prudkého poklesu růstu při vyšších teplotách je denaturace enzymů, jež jsou pro růst nezbytné. Krátkodobé zvýšení teploty nad maximální teplotu vyvolává teplotní šok, který vede k různým výkyvům metabolismu. Přitom se syntetizují tzv. teplotně šokové proteiny (HSP), které mají pravděpodobně protistresovou funkci. Obecně platí, že jakákoli teplota vyšší než maximální růstová teplota usmrcuje mikroorganismy, pokud působí po dostatečně dlouhou dobu [1, 11].

Minimální teplota růstu je určena enzymem, jehož aktivita je nejcitlivější k nízkým teplotám. Mezi minimální a optimální teplotou dochází se stoupající teplotou ke zvýšení rychlosti všech procesů v buňce. Při maximální teplotě růstu je teplotní destrukce bílkovin tak velká, že růst přestává. Prokaryontní mikroorganismy mají hodnotu maximální teploty vyšší než eukaryota [1]. Obrázek č. 1 znázorňuje vliv teploty na rychlost rozmnožování mikroorganismů.



Obrázek č. 1: Vliv teploty na rychlost rozmnožování mikroorganismů; 1 – *Escherichia coli*, 2 – *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*; τ – teplota ($^{\circ}\text{C}$), r – počet generací/h [1]

Smrtící účinky vysokých teplot se kvantitativně vyjadřují tzv. smrtící (letální) teplotou, což je nejnižší teplota, při níž je mikroorganismus usmrcen za určitou dobu (obvykle za 10 minut) a za přísně definovaných podmínek, protože závisí nejen na druhu mikroba, ale i na jeho stavu, počtu a vlivu prostředí [1, 11].

Působení nižších teplot je složitější a obvykle není letální. Většina mikroorganismů je schopna přežít dlouhou dobu při teplotě nižší než je jejich minimální teplota růstu, pouze se

nerozmnožují. Jsou-li mikroorganismy přeneseny z optimální teploty na teplotu blízkou 0 °C, dochází k tzv. chladovému šoku, který se projevuje ztrátou životnosti části populace. Při pomalém zmrazování mikrobiálních buněk na teploty pod 0 °C se z vnitrobuněčné i mimobuněčné vody tvoří velké ledové krystaly, které buňku poškozuji. Rychlým zmrazením se usmrtí jen malý podíl populace, neboť se tvoří pouze mikrokrystalky ledu, které nemají tak škodlivé účinky [1, 9, 11].

2.1.2.2 Záření

Elektromagnetické záření absorbované buňkou vyvolává v buňce chemické změny – je zdrojem energie pro fotosyntézu, vyvolává orientovanou odpověď, ale má také mutagenní nebo letální účinek. Vlnění různých vlnových délek se značně liší svým fyziologickým účinkem na mikroorganismy [1, 12].

Vlnění nejdelších vlnových délek, tj. infračervené záření a Hertzovy vlny (rádiové vlny), pravděpodobně samy o sobě smrtící účinek na mikroorganismy nemají a působí pouze svými tepelnými účinky [1].

Viditelné světlo (380–760 nm) má různé účinky. Pro fototrofní mikroorganismy představuje zdroj energie. Fototropicky se na světle chovají plísňe, lze u nich pozorovat i sporulační zóny. Světlem může být indukována také tvorba karotenoidních barviv kvasinek. Přidají-li se do prostředí barviva (např. methylenová modř, eosin), je mikroorganismus vybuzen a fyziologické účinky světla jsou znásobeny – fotodynamický účinek. K tomuto účinku je nutná přítomnost kyslíku. Pro většinu nefotosyntetizujících mikroorganismů není světlo nutné, dokonce některé z nich může poškozovat (inhibice některých fyziologických funkcí). Většina bakterií roste rychleji ve tmě než na světle. Mechanismus působení viditelného světla, však dosud nebyl zcela objasněn [1, 9, 12, 13].

Ultrafialové (UV) záření (100–400 nm) má silné mutagenní a letální účinky na mikroorganismy. Největší mutagenní a letální účinky má UV záření o vlnové délce, jež je nejvíce absorbována nukleovými kyselinami (265 nm). Hlavní příčinou účinku UV světla na mikroorganismy je tvorba kovalentních vazeb mezi sousedními pyrimidiny nukleových kyselin. Kromě přímého účinku na nukleové kyseliny působí UV světlo také tvorbou toxických peroxidů a ozonu. Citlivost mikroorganismů k UV záření je druhově specifická. Poměrně odolné jsou spory rodů *Bacillus*, *Clostridium* a *Desulfotomaculum*, avšak ještě odolnější jsou buňky bakterií nebo kvasinek obsahující karotenoidní barviva. U mnohých mikroorganismů byl popsán snížený účinek UV záření při současném ozáření viditelným světlem. Viditelné světlo indukuje u těchto mikroorganismů tzv. fotoreparaci, tedy obranné mechanismy, které snižují následky poškození UV zářením. [1, 9].

Ionizační záření o vlnové délce kratší než 10 nm (Roentgenovo záření, γ -záření a kosmické záření) má rovněž silné mutagenní i letální účinky. Účinek těchto ionizačních záření je vyvolán jejich přímým působením na citlivé molekuly buňky (především DNA), prostřednictvím volných radikálů a oxiranů, které vznikají v důsledku těchto záření na buňku a její okolí. Účinnost těchto záření na genetický materiál spočívá především v indukci zlomů chromozomů. Jednotlivé mikroorganismy se značně liší svou citlivostí k ionizačnímu záření. Nejcitlivější jsou gramnegativní bakterie, zatímco kvasinky a plísňe jsou obvykle odolnější. Účinnost záření je silně ovlivněna vnějšími podmínkami: přítomnost vzdušného kyslíku

zvyšuje citlivost organismů, silně redukující sloučeniny (např. kyselina askorbová) naopak působí ochranně stejně tak jako zmrazené nebo vysušené prostředí [1, 9].

2.1.2.3 Vodní aktivita

Voda je nezbytnou složkou buněčné hmoty, představuje 75 až 90 % hmotnosti mikrobiálních těl. Veškeré chemické reakce v živé buňce probíhají pouze ve vodném prostředí. Protože nedisociované molekuly mohou volně difundovat cytoplazmatickou membránou mikroorganismů, musí být dostatečné množství vody obsaženo také ve vnějším prostředí, aby buňka neztratila vnitrobuněčnou vodu a možnost metabolismu [1, 11].

Potřeba vody může být u mikroorganismů kvantitativně vyjádřena rozmezím vodních aktivit prostředí, při nichž se dané mikroorganismy mohou rozmnožovat. Vodní aktivita (a_w) se matematicky vyjadřuje jako podíl tlaku vodní páry nad příslušným roztokem (P_{rozt}) vůči tlaku vodní páry nad čistou vodou (P_{voda}) za stejných podmínek.

$$a_w = \frac{P_{\text{rozt}}}{P_{\text{voda}}} \quad (1)$$

Je tedy zřejmé, že voda má $a_{\text{H}_2\text{O}} = 1$ a že se stoupající koncentrací rozpouštěných látek a s rostoucím osmotickým tlakem vodní aktivita klesá [1, 11].

Snížením vodní aktivity prostředí (sušení, odpaření, přidavek vhodných chemikálií) lze zabránit činnosti většiny mikroorganismů, toho se využívá při konzervaci některých potravin [1, 11].

2.1.2.4 Hydrostatický tlak

Mikroorganismy se většinou rozmnožují za normálního atmosférického tlaku. Zvýšením tlaku na 10 až 20 MPa dochází ke zpomalení rozmnožování a při tlaku 30 až 40 MPa se rozmnožování většiny mikroorganismů zcela zastaví. Účinky vysokých tlaků lze zmírnit zvýšením teploty. Existují však i mikroorganismy, které se vysokému hydrostatickému tlaku přizpůsobily, jedná se o tzv. barofilní nebo barotolerantní bakterie, které jsou schopny rozmnožování i v hloubce moří [1, 12].

Mechanismus nepříznivého účinku vysokých tlaků nebyl dosud objasněn. Předpokládá se, že vysoký tlak působí nepříznivě především na syntézu buněčné stěny a způsobuje anomálie v dělení buněk, neboť se zastaví replikace DNA. Pro usmrcení mikroorganismů je zapotřebí obrovského tlaku (kolem 600 až 700 MPa), přičemž doba jeho působení je uváděna v rozmezí několika minut až hodin. K působení vysokého tlaku jsou odolnější spory [1].

2.1.2.5 Ultrazvuk

Zvukové vlny o frekvenci vyšší než 20 kHz (tzv. ultrazvuk) působí na mikroorganismy letálně tehdy, mají-li poměrně velkou intenzitu (kolem $10 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-3}$) a nízký kmitočet (kolem 20 kHz). V tomto případě jde o tzv. kavitační ultrazvuk, který působí na živé organismy tím, že v důsledku kmitání vzniká prudká pulsace buněčných membrán a plazmy. Tím se opakovaně silně snižuje nebo zvyšuje tlak. V místech o nízkém tlaku se tvoří trhliny, kam difundují plyny rozpuštěné v kapalině. Při náhlém stlačení těchto kavitačních bublin vzniká

obrovský tlak, který porušuje buňky a usmrcuje je. Některé chemické sloučeniny se vlivem intenzivního ultrazvuku rozkládají, což může rovněž nepříznivě působit na mikroorganismy. K účinkům ultrazvuku jsou nejcitlivější dlouhé tyčinkovité a vláknité mikroorganismy, kdežto koky a kvasinky jsou poměrně odolné [1].

2.1.2.6 pH prostředí

Koncentrace vodíkových iontů v prostředí silně ovlivňuje růst mikroorganismů i jejich biochemickou činnost. Každý druh se může rozmnožovat pouze v určitém rozmezí pH. Pro optimální růst většiny bakterií a kvasinek je toto rozmezí poměrně úzké, zatímco u většiny plísní je podstatně širší. Extrémní pH může mikroorganismy usmrtit. Příčinou je inhibice enzymů a transportních bílkovin anebo též přímé poškození cytoplasmatické membrány. Poměrně tolerantní k extrémům pH jsou některé střevní mikroby a především plísně [1, 11].

Hodnota pH prostředí ovlivňuje také odolnost buněk ke zvýšeným teplotám. Odolnost je tím menší, čím větší je odchylka od optimálního pH [1].

2.2 Sterilizace

2.2.1 Definice základních pojmů

V úvodu budou nejprve definovány pojmy související s eliminací a inaktivací mikroorganismů z povrchu předmětů, okolního prostředí, živých tkání atd. Jedná se o pojmy sterilizace a dezinfekce. Souhrnným názvem pro oba tyto termíny je dekontaminace [11].

Dezinfekce je souborem opatření, jejichž cílem je přerušení cesty šíření nákazy, tudíž jde o odstranění původců infekce. K dezinfekci se používají vesměs postupy chemické. 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 [11].

Sterilizace je odstranění všech mikroorganismů z předmětu nebo prostředí, respektive z tělesného povrchu. Sterilizační postupy jsou tedy účinnější než postupy dezinfekční a většinou bývají fyzikální povahy [11].

2.2.1 Chemické sterilizační metody

Při sterilizaci se upřednostňují především fyzikální metody, chemická sterilizace se uplatňuje omezeně. Hlavním důvodem je problematické odstraňování reziduí, korozivní účinky, chemická reaktivita, případně jiné nepříznivé vlivy chemických látek na sterilizovaný materiál. Chemické sterilizační metody jsou určeny pro materiály, které nelze sterilizovat fyzikálními metodami, ať už z důvodů citlivosti materiálu nebo finanční nedostupnosti alternativní techniky. Sterilizačním médiem může být kapalina nebo plyn předepsaného složení a koncentrace. Při sterilizaci dochází k chemické reakci nukleofilů nebo radikálů s molekulami v buňkách. Tím dochází k denaturaci molekul [3].

2.2.1.1 Sterilizace ethylenoxidem

Ethylenoxid je za normálních podmínek bezbarvý hořlavý plyn příjemné sladké vůně, jehož páry jsou při kontaktu se vzduchem výbušné. Pod teplotou 10 °C se vyskytuje jako bezbarvá kapalina. Dobře se rozpouští ve vodě a rozkládá se na glykol, vodík a kyslík. Je to prudký protoplazmatický jed, leptá kůži a sliznice, je podmíněně mutagenní a karcinogenní [14].

Ethylenoxid je sterilant se širokospektrálním účinkem, velice účinně likviduje všechny formy mikroorganismů a spor. Patří mezi nejužívanější sterilizační postupy v průmyslu. Používá se ke sterilizaci termolabilních zdravotnických materiálů, dále ke sterilizaci porézních materiálů (molitan, peří, matrace), plastů, gumy a papíru (archívy) [1].

Sterilizace ethylenoxidem probíhá ve speciálních přístrojích. Je založena na působení ethylenoxidu v podtlaku nebo přetlaku při teplotě 37–55 °C dle použitého typu plynu. Jako sterilant lze použít směs ethylenoxidu a inertního plynu (tlak vyšší než atmosférický) nebo čistý ethylenoxid (tlak nižší než atmosférický). Platí, že čím vyšší teplota tím vyšší sterilizační účinek (kratší čas sterilizace) [15].

Předností ethylenoxidové sterilizace je vysoká difuzní rychlost a tedy dokonalá penetrace do materiálu, nezávisle na tom, zda se jedná o kompaktní či porézní materiály, což umožňuje sterilizaci předmětu přímo v obalech. Metoda je vhodná pro deaktivaci biologických bojových látek [16].

Hlavní nevýhodou ethylenoxidové sterilizace jsou vyšší investiční náklady na zřízení sterilizace, vyšší časová náročnost na desorpci a karcinogenita [16].

2.2.1.2 Sterilizace formaldehydem

Čistý formaldehyd je za normálních podmínek bezbarvý plyn se silným, dusivým zápachem. Za vyšších teplot (> 150 °C) se rozkládá na kyselinu mravenčí a oxid uhelnatý. Páry jsou hořlavé a výbušné. Formaldehyd patří mezi těkavé organické látky. Je velmi dobře rozpustný ve vodě, alkoholech a dalších polárních rozpouštědlech. Je to velmi toxická látka [17, 18].

Vysoce aktivní molekula, obsahující uhlík a kyslík spojený dvojnou vazbou, je vysoce polarizovaná a má iontový charakter. Tento faktor má za následek vysokou aktivitu. Mimo jiné tato molekula reaguje s nukleidovými kyselinami a proteiny, které jsou přítomny ve sporách a mikroorganismech [19]. Jako redukční a alkylační činidlo reaguje s citlivými skupinami na molekulách organických látek, což se projevuje výtečným mikrobicidním účinkem. Formaldehyd s jistotou ničí bakterie, spory, plísňe i viry. Působí pouze povrchově, nemá penetrační účinky. Využívá se ke sterilizaci některých nástrojů a choulostivých předmětů [11].

Sterilizace se provádí ve speciálních přístrojích za teploty 60 až 80 °C. Základní podmínkou je vytvoření homogenní směsi vodních par a par formaldehydu v koncentraci okolo 2% v prostoru sterilizační komory a jeho následná kondenzace na povrchu materiálu [16].

Předností formaldehydové sterilizace jsou nízké provozní náklady a dobrá biologická účinnost. Nevýhodou je špatná penetrace do porézních materiálů, vysoká sterilizační teplota (minimálně 50 °C) a dlouhý čas kompletního cyklu [16, 20].

2.2.2 Fyzikální sterilizační metody založené na působení tepla

V praxi je důležitá horkovzdušná sterilizace a autoklávování. Další postupy, jako pasterizace, frakcinovaná sterilizace nebo tyndalizace se sice tradičně řadí ke sterilizačním postupům, ale již nejsou dostatečně spolehlivé a proto se jimi nebudu dále v této práci zabývat [11].

2.2.2.1 Sterilizace horkým vzduchem

Při horkovzdušné sterilizaci se využívá obvykle teplot mezi 160 °C až 180 °C (viz. tabulka č. 1). Mechanismem účinku horkého vzduchu se zdá být denaturace bílkovin. Prakticky všechny nesporeující mikroby jsou při 180 °C zabity do 5 minut. Viry jsou citlivější, s výjimkou viru hepatitidy B, jenž se v krvi inaktivuje při 160 °C až za 60 minut. Vůči suchému teplu jsou nejodolnější bakteriální spory, ty nejrezistentnější se zničí při 180 °C až za 15 minut [11].

Touto metodou lze sterilizovat termostabilní látky neobsahující vodu (tuky, oleje, vosky, glycerin) a práškové materiály (talek) [11].

Výhodou sterilizace horkým vzduchem je, že přístroje k tomu užívané, tedy horkovzdušné sterilizátory, jsou poměrně levné. Nevýhodou je, že sterilizovat se takto dají jen předměty z odolných materiálů (sklo, porcelán). Kovové nástroje ztrácejí opakovanou horkovzdušnou sterilizací tvrdost a tupí se. Papír, textil, vata, dřevo, korek při tomto postupu trpí a mění svůj vzhled a vlastnosti [11].

2.2.2.2 Sterilizace vlhkým teplem

Tento typ sterilizace se nazývá také autoklávování. Jedná se o sterilizaci při vysokých teplotách pod tlakem. Teplota vodní páry stoupá téměř lineárně s jejím tlakem. Přístroj určený ke sterilizaci parou pod tlakem se nazývá parní sterilizátor neboli autokláv. Autoklávy jsou hermeticky uzavíratelné nádoby s dvojitým pláštěm, umožňující sterilizaci nasycenou vodní parou při tlaku větším než je tlak atmosférický [3, 11].

Autoklávovat lze kov, sklo, porcelán, obvazový materiál, bavlněné a lněné prádlo, některé roztoky a poměrně málo druhů plastů [11].

Použití páry za zvýšeného tlaku je z praktického hlediska nejspolehlivější a poměrně i ekonomický sterilizační postup. Při styku s chladnějšími předměty pára kondenzuje na vodu a přitom předá ohromné množství výparného tepla. To usmrtí přítomné mikroorganismy tepelnou denaturací bílkovin, rozkladem nukleových kyselin a porušením buněčných membrán [11].

Protože v případě páry se jedná o tzv. vlhké teplo, je jeho působení na mikroorganismy daleko účinnější než v případě tepla suchého [11].

2.2.3 Fyzikální sterilizační metody založené na působení záření

2.2.3.1 Ultrafialové záření (UV)

Teoreticky i experimentálně je UV záření poměrně účinné, v praxi má ale podstatná omezení. Neproniká do hloubky a na zastíněné straně předmětu se tedy nemůže uplatnit. Jeho zdrojem jsou tzv. germicidní zářiče, jejichž účinnost však s dobou používání rychle klesá. Vlnové délky germicidních UV lamp se pohybují obvykle v oblasti 210 až 310 nm. Intenzita účinku UV světla je závislá na množství pohlceného záření, jež je úměrné síle zdroje a době ozařování a klesá se čtvercem vzdálenosti od zdroje záření. Pronikavost UV záření je velmi malá, a proto se toto záření používá pouze pro sterilizaci vzduchu, povrchovou sterilizaci předmětu, pracovních ploch, provozního zařízení apod. [1, 11].

2.2.3.2 Ionizační záření

Ke sterilizaci se využívá pronikavého gama-záření například z radioizotopu ^{60}Co . Ionizačním zářením lze sterilizovat jen nepatrně kontaminované předměty, jako jsou právě vyrobené zdravotnické potřeby pro jedno použití zhotovené z některých typů pryže a plastických hmot (rozmanité kanyly, injekční stříkačky apod.), obvazy, šicí materiál, některá léčiva a transplantáty. Výhodou ionizačního záření je, že proniká jak obaly, tak sterilizovaným materiálem, ale nezahřívá sterilizovaný předmět a nemění vlastnosti většiny sterilizovaných látek [11, 21].

2.2.3.3 Infračervené záření (IR)

Infračervené záření působí baktericidně jen svým tepelným účinkem, který vzniká rozkmitáním molekul absorbující látky a dodáním vibrační a rotační energie, která se projeví zvýšením teploty absorbující látky [1, 22].

2.2.3.4 Ultrazvuk

Smrtící účinek ultrazvuku na mikroorganismy není nikdy stoprocentní. V praxi lze ale dobře využít ultrazvuku k čištění dutých nástrojů (např. jehel) před vlastní sterilizací nebo při čištění silně znečištěných skleněných předmětů [11, 22].

2.2.4 Sterilizace filtrací

Tento způsob sterilizace se používá především pro kapaliny a roztoky, které nesnášejí vliv vysoké teploty, média pro tkáňové kultury a především mnohá léčiva. Velmi rozšířené je filtrování (odstraňování) mikrobů ve vodárenství a v potravinářském průmyslu [3, 11].

Jako filtrační materiál slouží porcelán, slinuté sklo, infusoriová hlinka, umělohmotné náhražky azbestu a další. V posledních letech jsou tyto filtry nahrazovány membránové filtry, které jsou vyrobeny z nitrocelulózy a jiných syntetických materiálů. Podle konstrukce použitého materiálu dělíme filtry na azbestové Seitzovy filtry lisované z azbestu a celulózy, skleněné jenské filtry z borosilikátového skla ve formě porézních destiček zatavených v nálevkách a membránové ultrafiltry s různou velikostí pórů [11, 21].

Póry filtračních prostředků musí být dostatečně malé, aby zabránily proniknutí jednotlivých buněk bakterií a spor kontaminujících mikroorganismů. Filtrací není možné z roztoků odstranit viry. Filtrovaná tekutina se musí protlačovat přes bakteriální filtr například pomocí podtlaku v jímací nádobce [3, 11].

2.3 Plazma

Jsou známa čtyři skupenství hmoty – pevné, kapalné, plynné a plazma. Plazma představuje skupenství, ve kterém je taková teplota, při které se částice plynu pohybují tak rychle, že se začínají svými vzájemnými srážkami "rozbíjet". Štěpí se na kladně nabitá jádra a záporně nabitě elektrony [23].

2.2.1 Definice a vlastnosti

Obecně za plazma považujeme ionizovaný plyn složený z iontů, elektronů, neutrálních atomů a molekul, který vzniká ionizací, tedy odtržením elektronu z elektronového obalu atomu plynu či roztržením molekul. Plazma je vodivé a silně reaguje na elektrická a magnetická pole [24].

Jedna z dalších definic popisuje plazma jako kvazineutrální plyn obsahující dostatečné množství nabitých částic, jejichž prostorový náboj vede k tzv. kolektivnímu chování. Pojmem kvazineutrální označujeme takový stav, kdy se v ionizovaném plynu vyskytuje stejné množství částic nesoucí kladný i záporný náboj. Kolektivním chováním bývá zpravidla myšlen vztah vůči vnějším elektromagnetickým polím. Záporné částice se pohybují jedním směrem, kladné pak směrem opačným [25, 26].

Jelikož se plazma svými vlastnostmi výrazně odlišuje od pevných látek, kapalin či plynů, hovoříme o něm jako o čtvrtém skupenství hmoty.



Obrázek č. 2: Plazma jako čtvrté skupenství hmoty [27]

Mezi procesy vytvářející stav plazmatu patří pružné srážky mezi částicemi i nepružné srážky, které vedou k ionizaci či disociaci částic. Tyto procesy jsou doprovázeny přenosem energie a díky nim se v plazmatu ustanoví rovnováha mezi působením přímých a inverzních procesů. Srážky s molekulami mohou vést ke vzniku volných radikálů, z nichž se stávají prekursor chemických reakcí v plazmatu. Chemické reakce probíhají v plazmatu odlišně než za běžných podmínek, což je důsledkem velkého počtu energetických srážek [23, 28].

2.3.1 Podmínky vzniku plazmatu

Abychom mohli ionizovaný plyn nazvat plazmatem, musí splňovat čtyři podmínky [27]:

- kvazineutralita
- lineární rozměry plazmatu musí být mnohem větší než Debyeova stínící vzdálenost
- počet částic v Debyeově sféře musí být výrazně větší než 1
- plazmová frekvence musí být podstatně větší než počet srážek za sekundu

2.3.1.1 Kvazineutralita

Jednou ze základních vlastností plazmatu je tzv. kvazineutralita. Jedná se o přibližnou rovnost koncentrací kladně nabitých iontů a záporně nabitých elektronů v oblastech plazmatu, kde všechny tři lineární rozměry jsou podstatně větší než Debyeova délka. Díky přítomnosti volných nabitých částic se v objemu plazmatu vytváří prostorový náboj a elektrostatické pole, které zpětně silově působí na nabitě částice. Výsledkem je kompenzace fluktuací hustoty náboje a plazma se ve větším měřítku jeví jako elektricky neutrální [29].

2.3.1.2 Debyeova stínící délka

V plazmatu musí být hustota elektricky nabitých částic dostatečně vysoká, aby elektromagnetické interakce převládaly nad srážkami mezi neutrálními atomy a molekulami. Poté je ionizovaný plyn schopen odstínit vnější elektrická pole tak, že sám vytvoří určité prostorové náboje. Ty se brání změnám, které je vyvolaly, působí proti nim a ustavují rovnováhu. Kolem cizího elektrického náboje, který je do plazmatu vložen a vnějším zdrojem udržován, vznikne stínící prostorový náboj z nabitých částic opačného znaménka [30].

Tloušťka vrstvy je tím větší, čím vyšší je teplota nabitých částic, tedy kinetická energie, a tím menší, čím větší je jejich hustota. Kinetická energie nabitých částic způsobuje, že odstínění není dokonalé, a vně prostorového náboje není elektrické pole nulové, nýbrž se vzdáleností klesá k nule. Částice na okraji stínící vrstvy mají totiž kinetickou energii dostatečnou k tomu, aby unikly z potenciálové jámy elektrostatických sil. Vyšší teplota nabitých částic, resp. kinetická energie, tedy vede k většímu „rozmazání“ okraje stínící vrstvy a zvětšení její šířky. Jejich vyšší koncentrace naopak vede ke zvětšení elektrostatických sil a k „zaostření“ okraje prostorového náboje. Potíže s tímto „rozmazáním“ vedly k zavedení veličiny zvané Debyeova délka (λ_D), která je mírou stínící schopnosti plazmatu a je definována jako vzdálenost, ve které klesne elektrický potenciál ze své původní hodnoty φ_0 na φ_0/e [30].

Obecný vztah pro výpočet Debyeovy délky je:

$$\lambda_D = \left(\frac{\epsilon_0 k T}{N e^2} \right)^{1/2}, \quad (2)$$

kde N je hustota nabitých částic, e náboj elektronu a ϵ_0 permitivita vakua. Z rovnice vyplývá, že vzrůstá-li hustota nabitých částic, λ_D se zmenšuje, neboť v každé vrstvičce plazmatu je více elektronů. S rostoucí teplotou dochází ke zvětšení λ_D [31].

Ionizovaný plyn může být nazýván plazmatem jenom tehdy, pokud je hustota nábojů natolik vysoká, že λ_D je mnohem menší než L (rozměr systému) [31].

$$\lambda_D \ll L \quad (3)$$

2.3.1.3 Plazmatický parametr

Mechanismus Debyeova stínění platí jen v případě, je-li v nábojovém oblaku dostatek částic. Pokud se v oblasti stínící vrstvy nachází např. jen jedna nebo dvě částice, není pojem Debyeovo stínění statisticky platný. Počet částic v Debyeově sféře (koule o poloměru λ_D) je dán vzorcem[31]:

$$N_D = n \frac{4}{3} \pi \lambda_D^3 \quad (4)$$

Ionizovaný plyn může být nazýván plazmatem jenom tehdy, pokud počet částic v Debyeově sféře je mnohem větší než jedna [31].

$$N_D \gg 1 \quad (5)$$

2.3.1.4 Plazmová frekvence

Vychýlíme-li elektrony oproti iontovému pozadí, vytvoří se takové elektrické pole, které se svými účinky snaží obnovit neutralitu plazmatu. Jelikož setrvačnost nedovolí elektronům se v rovnovážné poloze zastavit, elektrony vykonávají kmitavý pohyb, který nazýváme plazmová oscilace. Úhlovou frekvencí takových kmitů je plazmová frekvence (ω_p) a vypočítá se:

$$\omega_p = \left(\frac{Ne^2}{\epsilon_0 m_e} \right)^{1/2}, \quad (6)$$

kde N je koncentrace nosičů náboje, e elementární náboj elektronu, ϵ_0 permitivita vakua a m_e hmotnost elektronu [31].

Typické oscilace plazmatu vznikají následujícím způsobem: Jsou-li elektrony v plazmatu posunuty proti homogennímu iontovému pozadí, vytvoří se elektrické pole takového směru, aby obnovilo neutralitu plazmatu přitažením elektronů do jejich původní polohy. Elektrony však v důsledku své setrvačnosti přeběhnou a oscilují kolem rovnovážné polohy s plazmovou frekvencí. Tato oscilace je tak rychlá, že masivní ionty nemají čas reagovat na oscilující pole a můžeme je považovat za pevné. Střední doba mezi srážkami je v následující rovnici:

$$\tau = (N_n \sigma v)^{-1}, \quad (7)$$

přičemž N_n je koncentrace neutrálních atomů, σ účinný srážkový průřez a v rychlost elektronů vyjádřena Maxwellovým rozdělením [32].

Součin frekvence typických oscilací plazmatu ω a střední doby mezi srážkami τ musí být větší než 1, aby se plyn choval spíše jako plazma než jako neutrální plyn [33].

$$\omega \tau > 1 \quad (8)$$

2.3.2 Druhy plazmatu

Rozlišujeme plazma nízkoteplotní a plazma vysokoteplotní. Z praktického hlediska považujeme plazma za vysokoteplotní, pokud je střední energie částic větší než 100 eV (1 eV = 11600 K), tomu odpovídá teplota větší než 1 MK. Na základě tohoto kritéria považujeme plazma v experimentech s řízenou termonukleární syntézou za vysokoteplotní a plazma používané ve výbojích a plazmových technologiích za nízkoteplotní. Nízkoteplotní plazma se dále dělí na izotermické, pro které platí, že všechny typy částic mají stejnou teplotu, a neizotermické, ve kterém teplota elektronů převažuje nad teplotou ostatních typů částic. Vznik jednoho nebo druhého druhu závisí na způsobu, jakým byla plazmatu dodávána energie. Izotermicita bývá obvykle spojena s vysokou teplotou plazmatu, není to ale podmínkou. Platí však, že neizotermické plazma v přírodě samovolně zaniká, musí se tedy udržovat uměle [27, 29, 34].

Podle stupně ionizace rozlišujeme slabě ionizované plazma a silně ionizované plazma. U slabě ionizovaného plazmatu elektrická vodivost s koncentrací nabitých částic roste, při konstantní koncentraci nabitých částic klesá elektrická vodivost se zvyšující se teplotou elektronů. Mluvíme-li o silně ionizovaném plazmatu, elektrická vodivost nezávisí na koncentraci nabitých částic a roste s kinetickou energií elektronů (teplotou elektronů) [29].

Tabulka č. 1: Rozdělení plazmatu dle teploty [27]

Nízkoteplotní plazma		Vysokoteplotní plazma
Izotermické	Neizotermické	
$T_e \approx T_i \approx T \leq 2 \cdot 10^4 \text{ K}$ ↓ stupeň ionizace 1–10 % např. obloukový plazmový výboj za atmosférického tlaku	$T_i \approx T \approx 300 \text{ K}$ $T_i \ll T_e \leq 10^5 \text{ K}$ ↓ stupeň ionizace 1–10 % např. nízkotlaký doutnavý výboj	$T_i \approx T_e \geq 10^7 \text{ K}$ ↑ stupeň ionizace (až 100 %) plazmové fúzní reakce

2.3.3 Zdroje plazmatu

Zdroje plazmatu se liší především tím, jestli pracují za nízkého tlaku plynu, nebo při atmosférickém a vyšším tlaku. Plazma lze generovat stejnosměrným i střídavým proudem, nebo i vysokofrekvenčním elektromagnetickým polem. Je-li například přiloženo napětí na dvě elektrody uvnitř vyčerpáné skleněné trubice, dojde k doutnavému výboji za vzniku plazmatu. V plynu je vždy přítomen malý počet elektricky nabitých částic, a tím dojde k zapálení výboje. Následně se začne rapidně zvyšovat počet nabitých částic vlivem jejich urychlování mezi elektrodami a jejich vzájemnými srážkami. Pokud se napětí na elektrodách bude dále zvyšovat, ionizace bude sílit a elektrony na katodě budou mít dostatečnou energii pro výstup do prostoru výboje – doutnavý výboj přejde v elektrický oblouk. Mezi další typy výboje patří například korónový nebo bariérový výboj. Oba typy vznikají při atmosférickém tlaku a jsou typické velkou aktivní plochou plazmatu [35].

2.3.4 Využití

Díky širokému spektru různých vlastností plazmatu, které jsme schopni snadno ovlivňovat vnějšími podmínkami, je i širší aplikací neobyčejně rozsáhlá. Sahá od nejjednoduššího využití plazmatu jako zdroje záření, přes řadu plazmochemických procesů vedoucích k úpravám povrchových vlastností materiálů a tvorbu materiálů zcela nových, až po termojadernou syntézu. Větší část těchto technologií v současnosti využívá plazmatu generovaného za sníženého tlaku, i když zejména v posledních letech je patrný trend k aplikaci výbojů za tlaku atmosférického, a to zejména z důvodů ekonomických [26].

Díky emisi záření se stalo plazma základem pro moderní osvětlovací techniku, jejíž účinnost je podstatně vyšší než u klasických světelných zdrojů. Běžně se setkáváme se zářivkovými trubicemi a neonovými reklamami, v posledních letech pak díky miniaturizaci plazmových světelných zdrojů zaznamenávají rychlý rozvoj plazmové displeje. Významná je i generace UV záření pro využití ke sterilizaci medicínských i potravinářských objektů a vody. Samostatnou kapitolou světelných zdrojů založených na plazmatu jsou nejrozličnější typy plynových a excimerních laserů. Netermální plazma za atmosférického tlaku se využívá při čištění kouřových plynů a rozkladu organických sloučenin, jako jsou těkavé uhlovodíky a halogenidové organické sloučeniny (např. freony). Široké průmyslové uplatnění má také povrchová modifikace plazmatem. Užívá se v biotechnologickém, automobilovém, leteckém, potravinářském a elektronickém průmyslu. Dále je velmi významnou aplikací plazmové leptání. Plazmové leptání se využívá např. v mikroelektronice při výrobě integrovaných obvodů [26, 36, 37].

Z předchozího textu je tedy zřejmé, že jsme obklopeni, aniž si toho jsme vědomi, výrobky připravenými pomocí plazmochemických technologií. Některá průmyslová odvětví tyto technologie využívají částečně (např. automobilový průmysl), pro jiná je dnes výroba bez jejich využití nepředstavitelná (mikroelektronika, vysokorychlostní přenos dat). Další rozvoj těchto technologií je spojen jak s výše uvedenými oblastmi, tak i se směry dříve netušenými [26].

2.4 Plazmová sterilizace

Plazmovou sterilizací rozumíme vystavení mikroorganismů účinkům elektrického výboje v prostředí plynu. Důležitou podmínkou je, že plyny nebo jejich směsi nemají za normálních podmínek biocidní účinky. Ty jsou aktivovány až působením elektrického výboje a deaktivovány bezprostředně po vypnutí budícího zdroje [4, 5].

Výhodou plazmové sterilizace je absence toxických, karcinogenních látek a nebezpečného gama záření [4].

2.2.1 Historie plazmových sterilizací

První zmínka o plazmatu jako sterilizačním médiu byla v roce 1968 uvedena v Menashiho patentu. Pro buzení plazmatu bylo využíváno RF pole a jako pracovní plyn byl použit argon. Za atmosférického tlaku byly tímto způsobem sterilizovány vnitřní povrchy ampulek. Jednalo se o korónový výboj. Výboj byl realizován tak, že do vnitřku nádoby byla vložena jedna

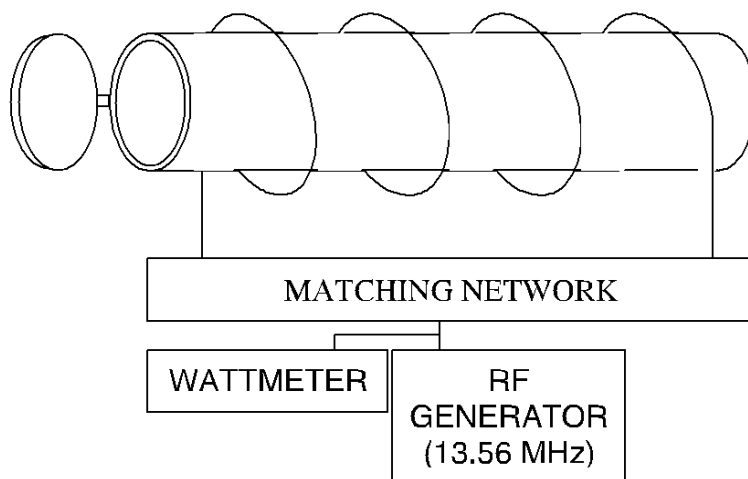
elektroda a vně omotaná cívka sloužila jako druhá elektroda. Menashi byl schopný inaktivovat koncentraci 10^6 spor v čase kratším než jedna sekunda. Bylo nezbytné, aby plazma bylo v přímém kontaktu s vnitřkem nádoby. Důvodem byl předpoklad, že biocidní účinek je způsoben intenzivním zahřátím spor v tak krátkém čase, že nedošlo k výraznému ohřevu skleněné nádoby (tento mechanismus byl později nazván mikros spalování Peeples a Anderson, 1985) [4].

S dalšími patenty přichází Ashman a Menashi (1972), Boucher (Gut) (1980) a Bithell (1982). Ukazuje se tak, že elektrický výboj ve vhodném plynu (nebo směsi plynů) může vést k inaktivaci mikroorganismů [4].

Pro vybuzení plazmového výboje se tak začíná využívat RF pole, a to hlavně frekvence 13,56 MHz (celosvětová autorizovaná frekvence pro průmyslové, vědecké a medicínské aplikace). Boucher (Gut) (1980) však také realizuje vybuzení a udržení plazmatu pomocí mikrovlnné frekvence 2450 MHz (frekvence používaná v mikrovlnných troubách) [4].

Časem se objevuje mnoho dalších zařízení pro plazmovou sterilizaci. Například Tensmayer a kolektiv (1981) využili pro sterilizaci vnitřních ploch láhví mikrovlnné pole, které však bylo aplikováno zvnějšku (na rozdíl od Menashiho systému z roku 1968, kde byl výboj buzen pomocí RF pole startovaného laserovým pulsem) [4].

Plazmové sterilizace byly ve svých počátcích prováděny ve třech různých tlakových oblastech. V oblastech nízkého tlaku (1–10 Torr), středního tlaku (0,1–10 Torr) a atmosférického tlaku. Většina počátečních experimentů se prováděla v oblasti středních tlaků. Postupem času se však ukázala velká výhoda použití sterilizace za atmosférického tlaku [4].



Obrázek č. 3: Schéma jedné z prvních aparatur pro plazmovou sterilizaci, Boucher (1980). Matching network – přizpůsobovací člen, RF generátor – radiofrekvenční generátor [4]

2.4.1 Princip sterilizace plazmatem

Plazmová sterilizace je řazena mezi fyzikální sterilizační metody. Principem této metody je působení jak fyzikálních vlivů, tak vlivů chemických, vznikajících chemickými změnami

prostředí. Vznik chemických agens je zcela závislý na fyzikálních vlastnostech plazmatu, to znamená, že jej nelze získat bez přítomnosti plazmového výboje [4].

Plazmové sterilizační zařízení je takový systém, ve kterém je výhradně plazma zodpovědné za inaktivaci mikroorganismů. Předměty mohou být sterilizovány přímým kontaktem s plazmatem nebo v dohasínajícím plazmatu. Ve srovnání s výbojem samotným obsahuje dohasínající plazma relativně málo nabitých částic, což jsou v podstatě radikály a molekuly, které byly v excitovaném stavu. Hlavní výhody používání dohasínajícího plazmatu pro sterilizační účely oproti plazmovému výboji je především teplota. Plyn ve výboji dosahuje až několik set °C, zatímco dohasínající plazma nepřesáhne 50 °C, což hraje důležitou roli při sterilizaci tepelně citlivých materiálů. Ovšem sterilizační čas je mnohem kratší ve vlastním výboji, než v jeho dohasínajícím plazmatu [4, 38].

Sterilizace při přímé expozici plazmatem nastává ve výrazně kratších časech než sterilizace v dohasínajícím výboji, nicméně sterilizace v dohasínajícím výboji je mnohem bezpečnější, jednodušší a má nižší provozní náklady. Významným nedostatkem plazmových sterilizací je jejich závislost na tloušťce vrstvy mikroorganismů určených ke sterilizaci. Důvodem je omezená hloubka penetrace UV záření [4].

2.4.2 Mechanismy inaktivace pomocí plazmatu

Konkrétní mechanismy zodpovědné za inaktivační účinky plazmatu: [4, 39]

- letální poškození genetického materiálů působením UV záření
- fotoindukovaná eroze mikroorganismů
- eroze mikroorganismů vlivem reaktivních částic (proces leptání)
- oxidace buněčných částí (membrána, proteiny, DNA) v důsledku působení volných radikálů obsahujících kyslík
- rozpad buněk v důsledku akumulace nabitých částic na membráně

Cílem mnoha studií je snaha izolovat tyto jednotlivé mechanismy pro jejich důkladnější výzkum, což se s výjimkou UV záření příliš nedaří [7].

Jednotlivé mechanismy působení jsou do jisté míry závislé na vlastnostech plazmatu (velikost napětí, použitý plyn, tlak použitého plynu) [7].

2.4.2.1 Letální poškození genetického materiálu působením UV záření

Germicidní účinek UV záření je založen na fotochemickém poškození nukleových kyselin (DNA a RNA), proteinů, enzymů, případně jiných buněčných molekul. V důsledku působení UV záření dochází k deformaci prostorové struktury biomolekul, vzniku kovalentních vazeb případně změně chemického složení molekuly. Účinek UV záření se liší v závislosti na rozsahu aplikovaných vlnových délek [5, 6].

Nukleové kyseliny absorbují UV záření v rozsahu vlnových délek 240–280 nm, absorpčního maxima dosahují při 260–265 nm. Výsledkem je vznik thyminových dimerů, které následně inhibují replikaci genetické informace. Při užití UV záření v rozsahu 320–

400 nm dojde k iniciaci změn nenasyčených mastných kyselin v buněčné membráně, výsledkem je pak změna permeability buněčné membrány. UV záření může působit také nepřímo, při fotoindukované chemické reakci vzniku např. ozónu, peroxidu nebo jiných volných radikálů [5, 6].

Vliv UV záření na inaktivaci mikroorganismů v atmosférickém výboji je předmětem neustálé diskuze.

2.4.2.2 Fotoindukovaná eroze mikroorganismů

Fotoindukovaná eroze mikroorganismů je výsledkem působení UV fotonů, které po dopadu štěpí chemické vazby buněčného materiálu, což vede k formování těkavých sloučenin z atomů vlastního mikroorganismu. Těkavé meziprodukty těchto nerovnovážných chemických reakcí jsou malé molekuly, např. peroxid, ozon, oxid uhelnatý [4].

2.4.2.3 Eroze mikroorganismů vlivem reaktivních částic (leptání)

Leptání je výsledkem absorpce reaktivních částic plazmatu na povrchu mikroorganismů, kde vstupují do chemických reakcí, které vedou k formování těkavých sloučenin (CO_2 , H_2O) [4].

2.4.2.4 Oxidace buněčných částí působením volných radikálů

Volné radikály vznikají jako produkty srážkových procesů v plazmatu následovaných např. disociačními nebo excitačními procesy. Tyto atomy, molekuly nebo ionty jsou schopny samostatné existence. Volné radikály mají ve svém elektronovém obalu minimálně jeden nespárovaný elektron, v důsledku čehož jsou vysoce reaktivní. Reagují i s ostatními biomolekulami, čímž vytvářejí další volné radikály. Tento děj má tendenci šířit se řetězově. Volné radikály hrají důležitou roli při většině povrchových interakcí [5, 6].

Z hlediska inaktivačních procesů 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, bílkoviny a enzymy, výsledkem čehož je nevratné poškození buněčného materiálu [5, 6].

2.4.2.5 Rozpad buněk akumulací nabitých částic na membráně

Elektrostatická síla způsobená nahromaděním náboje na vnější membráně může překonat sílu vláken membrány a způsobit její prasknutí. Tento proces byl prokázán především pro inaktivaci gram-negativních bakterií, které disponují nerovnoměrným povrchem. Takový povrch umožňuje nahromadění náboje. Povrch, tvar a struktura hrají v tomto elektrofyzikálním procesu lýze buněk důležitou roli. Tuto teorii potvrdil ve svých studiích Laroussi za pomoci gram-negativních bakterií *Esterichia coli* a gram-pozitivních bakterií *Bacillus subtilis* [40].

2.4.3 Inaktivační charakteristika

Inaktivační křivka zachycuje průběh přežití mikroorganismů vystavených fyzikálním nebo chemickým inaktivačním procesům. Jedná se o graf závislosti logaritmu počtu životaschopných mikroorganismů (CFU/ml) na délce působení inaktivačního procesu. Matematicky je popsána rovnicí:

$$\log \left[\frac{N_t}{N_0} \right] = -kt, \quad (9)$$

kde N_0 je počáteční koncentrace mikroorganismů, N_t je koncentrace životaschopných mikroorganismů po působení sterilizačního média za čas t a k rychlostní konstanta inaktivace [5].

K popisu účinnosti sterilizačního procesu se často používá také parametr D (decimální hodnota), který udává čas potřebný k inaktivaci původní koncentrace mikroorganismů o 90 %. Čím je D hodnota menší, tím je sterilizační zásah účinnější [5].

$$D = \frac{t}{\log N_0 - \log N_s}, \quad (10)$$

kde t je čas potřebný ke zničení 90 % původní populace, N_0 je původní populace a N_s je životaschopná populace [5].

V závislosti na typu mikroorganismu, typu nosného média a způsobu expozice se tvar inaktivační křivky mění. Výsledkem konvenčních sterilizačních metod je ve většině případů jednoduchá křivka s lineárním nebo exponenciálním průběhem, zatímco při expozici mikroorganismů plazmatem je výsledkem jednoduchá nebo častěji multisměrní křivka. To vede k závěru, že počet přeživších mikroorganismů klesá v první aproximaci exponenciálně s časem, ale s různými časovými konstantami resp. různými kinetikami [5, 38].

2.4.4 Plazmové sterilizátory

V plazmových sterilizátorech k samotné sterilizaci nedochází účinkem ionizovaných částic plazmatu, na inaktivaci se podílí pouze produkty plazmochemických procesů, ke kterým během sterilizace v plazmatu dochází. Jejich sterilizační cykly zahrnují čistě chemickou fázi [41].

Celý proces tedy probíhá následovně. Nejdříve dochází k vytvoření vakua v komoře sterilizátoru a ke snížení vnitřního tlaku. Do komory je poté vstříknut roztok peroxidu vodíku. Ten je odpařen, vzniklý oblak zahalí všechny předměty určené ke sterilizaci. Po následném snížení tlaku ve sterilizační komoře po fázi difuze se tvoří nízkoteplotní plazma, a to pomocí energie vysokofrekvenčních vln (přístroj STERRAD) nebo pomocí zdroje o frekvenci 50 Hz (přístroj HMTS). Molekuly peroxidu se po průchodu plazmatem rozbíjejí na volné radikály. Ty se slučují a reagují s molekulami živé hmoty, čímž dochází k devitalizaci mikroorganismů. Poté, kdy aktivované částice reagují s mikroorganismy nebo mezi sebou navzájem, ztrácejí svoji vysokou energii, slučují se a vzniká kyslík, vodní páry a další netoxické vedlejší produkty [42, 43].

Výhod této metody je mnoho. Sterilizace probíhá za nízké teploty, je tedy možné sterilizovat materiály, které by zvýšená teplota zničila, či nevratně poškodila. Nízkoteplotní plazma také proniká jen do velmi tenké vrstvy materiálu nástroje (do hloubky několika atomů) nedochází tak k ovlivnění celkových vlastností materiálu. V komoře je velice nízká vlhkost, což vylučuje i korozivní účinky a fyzikální změny (nástroje si zachovávají ostrost, ohebnost, optickou jasnost, schopnost tvorby elektrických výbojů apod.). Tato fyzikální a chemická omezení, přítomná u ostatních dnes využívaných sterilizačních metod, tak plazmovou sterilizaci staví na výhodnou pozici nové konkurenční metody, která se stále ještě vyvíjí a může tak nabídnout mnohé výhody [42].

Touto metodou nelze sterilizovat předměty vyrobené z látek na bázi celulózy, tekutiny, silně absorbující předměty a materiály, které silně narušují oxidační činidla [42].

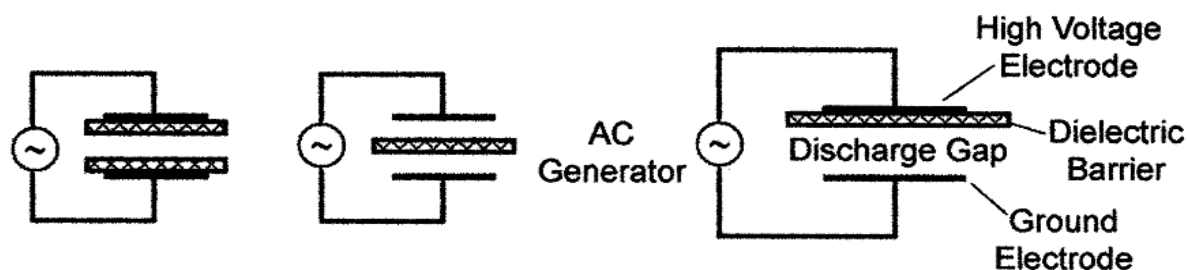
2.5 Dielektrický bariérový výboj

Dielektrický bariérový výboj byl poprvé popsán Wernerem von Siemensem v roce 1857, kdy navrhl využití DBD pro generování ozónu. V současnosti nachází DBD uplatnění nejen při syntéze ozónu, ale i v řadě dalších průmyslových aplikací, jako jsou CO₂ lasery, excimerové UV lampy, plazmové displeje, při dekontaminaci plyných škodlivin a při povrchových úpravách různých materiálů včetně nanášení tenkých vrstev [44].

2.2.1 Princip

Bariérový výboj je charakterizován přítomností jedné nebo více pevných dielektrických bariérových vrstev umístěných mezi kovovými elektrodami. Tyto dielektrické bariérové vrstvy mají za úkol kontrolovat distribuci náboje a energii mikrovýbojů na povrchu elektrody. Nejvhodnějšími materiály dielektrika jsou sklo, křemičité sklo, keramické nebo polymerní materiály. Bariérový výboj může vznikat v širokém rozmezí tlaků, nejčastěji však při tlacích 0,1–1 atmosféra. Vzhledem k přítomnosti nevodivé bariérové vrstvy je výboj buzen střídavým napětím. Napětí mezi elektrodami je obvykle v rozsahu 1–100 kV. Frekvence se pohybuje v rozmezí několika desítek Hz–MHz. Prostor mezi elektrodami dosahuje zpravidla několika desetin milimetrů až několik centimetrů v závislosti na požadované aplikaci a je vyplněn pracovním plynem [44].

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 zde slouží jako sériově připojený kondenzátor, 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 polarity, což je důvod, proč se pro napájení bariérového výboje používá střídavé napětí [44].



Obrázek č. 4: 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 [44]

Za atmosférického tlaku je výbojové plazma lokalizované v tenkých výbojových kanálech, které nazýváme mikrofilamenty. 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 [44, 45].

Za určitých podmínek (plyn, frekvence, napětí, případně konfigurace elektrod) lze získat zdánlivě homogenní difuzní mód DBD. V tomto módu není možné přímo rozlišit jednotlivé filamenty, výbojový kanál pokrývá prakticky celou plochu dielektrika. Také trvání tohoto výboje je podstatně delší, řádově desítky až stovky mikrosekund. Jednotlivé typy výboje tak lze od sebe rozlišit sledováním časového průběhu výbojového proudu. Výhodou je již zmiňovaná homogenita výboje, hlavní nevýhodou je pak fakt, že difuzní výboj vzniká jen v některých plynech nebo směsích plynů a jen v určitém rozsahu napětí a frekvencí. Na jeho vznik může mít vliv prostorové uspořádání elektrod [44, 46, 47].

U dielektrického bariérového výboje jsou možná dvě základní uspořádání elektrod – rovinné nebo prostorové. Podle orientace výbojových filamentů vůči dielektrické vrstvě pak výboje dělíme na objemové a povrchové. U objemových dielektrických bariérových výbojů jsou mikrofilamenty orientovány kolmo na rovinu dielektrika. Povrchové dielektrické bariérové výboje vytvářejí mikrofilamenty ve směru podélném s rovinou dielektrika [45].

2.5.1 DBD výboj a jeho využití při sterilizaci mikroorganismů – State of Art

V posledních dvou desetiletích se výzkumem sterilizačního účinku plazmatu a jeho využitím zabývá stále více výzkumných týmů. Tato část je věnována stručné literární rešerši vědeckých publikací, které zkoumaly účinky DBD generovaných za atmosférického tlaku a jejich využití při inaktivaci mikroorganismů.

Laroussi (2002) se ve své publikaci zaměřil na plazma buzené za atmosférického tlaku, konkrétně na korunu, difuzní DBD, odporový bariérový výboj a plazma jet. Podrobně byla rozebrána kinetika, mechanismy účinku, možnosti biomanipulace a alternativy plazmatu do budoucna. Analýzou bylo zjištěno, že hlavní roli v procesu inaktivace hrají volné radikály.

V práci byla velmi podrobně rozebrána teorie buněčné smrti. Jako nejpravděpodobnější se autorovi jeví tři smrtící mechanismy: peroxidace lipidů, oxidace proteinů a DNA [48].

Trompeter a kol. (2002) sledovali, jaké sterilizační účinky vykazuje atmosférický DBD vůči bioindikátorům *Bacillus subtilis* a *Aspergillus niger* (vysoce odolný UV záření). Jako nosný materiál bylo použito sklo, PET a PS. Pro objasnění role UV záření při inaktivačním procesu byla provedena měření se speciálními DBD v excimerních zdrojích UV světla. Nejúčinnější byly zdroje s nízkou vlnovou délkou, a tedy s vysokou energií fotonů. Bylo zjištěno, že UV záření je základním inaktivačním mechanismem u argonu a dusíku. Pro kyslík nebyly pozorovány v dané oblasti žádné emise UV záření, zásadní je zde účinek kyslíkových radikálů a ozónu. Autoři přišli na to, že změnou geometrie elektrod, volbou vhodného plynu a prací v přerušovaném módu lze zvýšit homogenitu výboje, což má přímý vliv na účinnost sterilizace. Naopak příliš vysoké dávky plazmatu měly za následek nikoliv zvýšení sterilizační účinnosti, ale spíše její stagnaci (došlo k saturaci systému) [49].

Laroussi a kol. (2003) pro svou studii použili RBD výboj (typ DBD, kde jeden z plátů dielektrika je nahrazen vysoce odolným materiálem), který umožňuje pracovat při nízkých frekvencích jako je 60 Hz. RBD výboj generovaný v He za atmosférického tlaku je zdrojem nabitých částic, volných radikálů a záření (IR, VIS a UV). Hlavním cílem práce bylo dokázat, že lýze gramnegativních bakterií *Escherichia coli* je výsledkem nabití (nahromadění náboje) na povrchu bakterie a že vlivem elektrostatických sil dochází k následnému poškození vnější buněčné membrány. Toto nebylo prokázáno při inaktivaci grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis*, u které nenastala žádná morfologická změna. Důvodem je silnější ochranná vrstva [40].

Heise a kol. (2004) porovnávali účinky DBD a CDBD (kaskádový bariérový výboj) při sterilizaci PET fólií kontaminovaných spory *Bacillus subtilis* a *Aspergillus niger*. CDBD je zařízení, které kombinuje účinek UV záření a reaktivních částic plazmatu. Tento typ výboje obsahuje další dielektrikum (křemenné sklo, transparentní pro UV záření), které se nachází v mezeře mezi elektrodami klasického DBD. Jako pracovní plyn byly za atmosférického tlaku použity Ar, N₂ a vzduch. Nejlepší účinky byly pozorovány u argonu (inaktivace o 4–5 řádů během 5 s) díky VUV záření, což je daleké UV záření (100–200 nm), vůči němuž nemají organismy vyvinuty ochranné mechanismy. U vlhkého vzduchu byl prokázán vznik hydroxylových radikálů, které mají silné oxidační účinky. Ve své studii dospěli autoři k závěru, že CDBD je mnohem efektivnější při inaktivaci spor a navíc je šetrnější k materiálu. Při inaktivaci v DBD předpokládají jak vliv UV záření, tak i reaktivních částic [50].

Laroussi a Leipold (2004) zkoumali mechanismy inaktivace mikroorganismů ve vzdáleném atmosférickém DBD na vzduchu. Jako bioindikátor byly použity spory rodu *Bacillus*. Dle autorů hlavní podíl na inaktivaci nesou kyslíkové a dusíkové reaktivní částice (O, OH, NO₂), vliv teploty a UV záření je v tomto případě zanedbatelný [6].

Choi a kol. (2005) použili pulzní dielektrický bariérový výboj generovaný za atmosférického tlaku ve vzduchu. Jako bioindikátory byly zvoleny *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* a *Pseudomonas aeruginosa*. Vyhodnocení bylo provedeno nepřímou kultivační metodou. Morfologické změny před a po vystavení účinkům plazmatu byly zjišťovány pomocí SEM. Výsledky ukazují logaritmický pokles CFU v čase. D-hodnota je 15,2 s. U *Escherichia coli* bylo 99,99% sterility dosaženo za 70 s. Sterilizační efekt rostl se

vzrůstajícím časem a byl způsoben nejen fyzikálním poškozením vlivem světelného paprsku, ale také chemickým poškozením, které mají na svědomí reaktivní částice [51].

Laroussi (2005) shrnul ve svém přehledovém článku výsledky prací, které se zabývaly mechanismy sterilizace v atmosférickém výboji. Autor zde specifikuje, že v atmosférickém plazmatu za daných podmínek je vliv UV záření zcela zanedbatelný. V případech, kde UV není dominantním mechanismem, je výsledkem většinou jednoduchá křivka s jednou směrnicí. V řadě případů však byly zaznamenány i křivky složené ze dvou lineárních oblastí, kde hodnota D první oblasti je větší než tato hodnota pro druhou oblast (při inaktivaci pomocí UV záření je tento trend opačný) [5].

Xu a kol. (2005) vytvořili dva podobné typy dielektrického bariérového výboje – PJ-1 a PJ-2. Jako modelový mikroorganismus byla použita bakterie *Escherichia coli*. Výboje byly buzeny v argonu za atmosférického tlaku. Obě aparatury jsou složeny ze dvou soustředných elektrod. Vnější elektroda je spojena s audiofrekvenčním zdrojem napětí s proměnnou frekvencí od 5 kHz do 20 kHz a vnitřní je uzemněná. Hlavní rozdíly mezi strukturami těchto dvou typů zdrojů plazmatu je povrch vnitřní elektrody a tvar vnější elektrody. PJ-2 byla vytvořena za účelem vylepšení charakteristiky plazmatu, díky možnosti použití vyššího napětí a proudu zde může být dosaženo vyšší hustoty plazmatu. Autoři dospěli k závěru, že na inaktivaci má největší vliv ozón generovaný v argonu. U PJ-2 vzniká více ozónu, proto je toto uspořádání efektivnější [52].

Boudam a kol. (2006) použili DBD v tzv. Townsendově módu. Jako pracovní plyn byla zvolena směs N_2 - N_2O za atmosférického tlaku. Po 10 min opracování v plazmatu dosáhli inaktivace o více jak 5 řádů. Zjistili, že volbou správné koncentrace N_2O v pracovním plynu lze dosáhnout takových podmínek, kdy inaktivačnímu procesu dominuje UV záření, naopak lze také dosáhnout podmínek kdy je vliv UV záření minimální. Jako bioindikátor byl použit *Bacillus subtilis* [39].

Fridman a kol. (2007) srovnávali účinky přímého a nepřímého působení plazmatu generovaného za atmosférického tlaku. Při studiích byla použita stejná DBD aparatura, pracovním plynem byl vzduch. Jelikož se autoři zabývají sterilizací lidské a zvířecí kůže napadené mikroorganismy, byly vzorky bakterií získány z kůže mrtvých lidí. Ve vzorcích byly obsaženy bakterie rodu *Staphylococcus*, *Streptococcus* a kvasinky rodu *Candida*. Vzorky na Petriho misce byly vystaveny působení plazmatu, poté byly na 24 hodin umístěny do termostatu nastaveného na 37 °C. Při studii nepřímého působení plazmatu byla nad Petriho misku umístěna mřížka, tak aby vstup plynu do reakčního prostoru byl nad touto mřížkou. Plazma, které přicházelo přímo do styku s bakteriemi, vykazovalo mnohem větší sterilizační účinky než při nepřímém kontaktu. Sterility bylo dosaženo po 15 s přímého působení. Naproti tomu u nepřímého působení bylo k dosažení sterility zapotřebí vystavení účinkům plazmatu po dobu 5 minut. Při přímém působení přicházejí nabitě částice přímo do kontaktu s bakteriemi, což způsobuje rychlejší inaktivaci než v případě nepřímého působení, kde působí dohasínající plazma. Autoři usuzují, že hlavní roli při inaktivaci hrají nabitě částice, ale v případě inaktivace není zanedbatelné ani působení UV záření [53].

Muranyi a kol. (2007) navázali na práci Heiseho studiem inaktivační účinnosti nově vyvinutého CDBD na širokou škálu mikroorganismů (*Salmonella Mons*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus atrophaeus*, *Aspergillus niger* a *Clostridium botulinum*).

Výboj byl buzen v prostředí vzduchu za atmosférického tlaku. Mikroorganismy nanesené na PET fólie, byly inaktivovány v čase 1–5 s, a to o 5 až 6,6 řádů. Spory *Aspergillus niger* se ukázaly jako nejodolnější, což podporuje teorii o dominantním účinku UV záření v tomto typu výboje [7].

Eto a kol. (2008) pomocí lineárního dielektrického bariérového výboje, buzeného za atmosférického tlaku ve vzduchu, sterilizovali tenké plastové trubky obsahující spory mikroorganismu *Geobacillus stearothermophilus*. Spory byly inaktivovány při pokojové teplotě během 12 minut. Hlavní roli při inaktivaci hrají UV záření 2. pozitivního systému molekuly N₂ (297, 313, 315, 337 a 357 nm), OH radikály, vzniklý O₃ nebo jejich synergický efekt. Rovněž berou autoři na vědomí, že na inaktivaci se mohla podílet i emise NO_γ molekulového pásu (nad 280 nm), při které dochází k nejvyšší absorpci DNA, ta však nebyla zcela prokazatelná. Dle autorů může být tato technika využita ke sterilizaci lékařských nástrojů [54].

Hong a kol. (2008) použili k inaktivaci *Escherichia coli* a spor *Bacillus subtilis* radiofrekvenční DBD generovaný za atmosférického tlaku, pracovním plynem bylo He s příměsí O₂. Jedním z cílů studie bylo zjistit optimální koncentraci O₂ ve směsi plynů, při které bude dosaženo nejlepších sterilizačních účinků. Nejvyšší míra inaktivace byla dosažena při koncentraci O₂ 0,2%, kdy došlo během 24 s k desetinásobnému snížení počtu mikroorganismů, úplné sterility bylo dosaženo během 120 s. U této koncentrace byl zjištěn i nejvyšší počet kyslíkových radikálů, proto autoři usoudili, že právě tyto radikály jsou zodpovědné za inaktivační účinek. V této studii bylo rovněž zjištěno, že použití příliš vysoké koncentrace O₂ může plazma destabilizovat, tím dochází ke snížení počtu kyslíkových radikálů a sterilizace se stává neefektivní. K pozorování morfologických změn byl použit transmisní elektronový mikroskop [55].

Shi a kol. (2008) popsali závislost účinnosti DBD pracujícího za atmosférického tlaku ve vztahu ke vzdálenosti elektrod. Při inaktivaci kvasinky *Candida albicans*, která byla nanesená na skle, bylo prokázáno, že 3 mm pracovní prostor umožňuje rychlejší inaktivaci (redukce nad 5 řádů za 20 s) než 4 nebo 5 mm (redukce nad 5 řádů za 25 s). Účinnost metody byla prokázána TEM snímky a analýzou bílkovin, K⁺ a nukleových kyselin v extracelulárním prostoru (spektrofotometricky). UV záření se zde ukázalo jako bezvýznamné, největší roli při inaktivaci sehrály nabitě a reaktivní částice. Autoři se domnívají, že ty mohly způsobit prasknutí vnější membrány, poškození DNA nebo změny enzymatických aktivit, což vedlo k buněčné smrti [56].

Deng a kol. (2010) se ve své práci zabývali roli teploty, UV záření, nabitých částic a reaktivních částic při inaktivaci mikroorganismů. Experiment byl uspořádán jako DBD plasma jet. Bioindikátorem byl *Bacillus subtilis*. Jako pracovní plyn byl použit Ar a Ar + O₂ za atmosférického tlaku. Vyhodnocení bylo provedeno několika metodami: nepřímou kultivační metodou, měřením optických emisních spekter, množstvím proteinů v suspenzi, kdy proteiny vytváří barevný komplex s barvivem Coomassie brilliant blue, množstvím produkovaného MDA (jeden z konečných produktů peroxidace lipidů) a vliv působení plazmatu na morfologii mikroorganismů byl zkoumán pomocí SEM. Při zkoumání vlivu teploty na inaktivaci mikroorganismů byly vzorky vystaveny působení vysokých teplot, role UV byla zkoumána za použití křemenného sklíčka, kterým byly vzorky při působení plazmatu

překryty. Zatímco UV záření křemenným sklíčkem proniká, radikály a nabité částice nikoli. Větší míra inaktivace byla dosažena při použití směsi Ar + O₂. Během 60 s se počet mikroorganismů snížil o 4 řády, zatímco při použití samotného Ar došlo za stejnou dobu ke snížení o 2 řády. K celkové inaktivaci došlo ve směsi Ar + O₂ za 180 s. Analýza OES prokázala přítomnost O₃, který hraje při inaktivaci mikroorganismů důležitou roli. Autoři dospěli k závěru, že teplota a UV záření nejsou při inaktivaci dominantní. Hlavní roli hraje synergický efekt nabitých a reaktivních částic [57].

Kostov a kol. (2010) vystavili vzorky *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*, umístěné na Petriho miskách, působení DBD buzeného za atmosférického tlaku ve vzduchu. Po opracování byly Petriho misky inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin, poté byly spočteny kolonie. I přes nízký plazmový výkon (1 W) došlo k inaktivaci mikroorganismů do 20 minut. Ke zjištění efektu působení plazmatu na bakteriální buňku bylo použito SEM. Ze snímků je patrné, že u grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* dochází k poškození struktury, což vede k prasknutí stěny a vylití cytoplazmy. Gramnegativní *Escherichia coli* má tenčí stěnu, a proto je mnohem citlivější vůči nabitým částicím a radikálům. Během studie byly bakterie vystaveny přímému působení plazmatu, došlo k leptání reaktivními částicemi kyslíku a dusíku i k fyzikálnímu ničení, které bylo způsobeno nabitými částicemi [58].

Leipold a kol. (2010) ve své práci studovali účinnost dekontaminace pomocí DBD u rotujících nožů používaných v masném průmyslu. Zde je častým problémem možná kontaminace bakterií *Listeria monocytogenes*. V rámci experimentu byly nože kontaminovány nepatogenní *Listeria innocua* a vystaveny DBD, který byl buzen za atmosférického tlaku ve vzduchu. Během 240 s bylo dosaženo redukce o 5 řádů. Autoři usuzují, že je možno tuto techniku využívat během procesu krájení a tím zabránit křížové kontaminaci [59].

Poiata a kol. (2010) srovnávali účinnost DBD generovaného za atmosférického tlaku v He v závislosti na různém čase působení plazmatu (25 s, 50 s, 75 s a 100 s) a na různých vzdálenostech elektrod (2,5 cm a 3,5 cm). Testovanými mikroorganismy byly grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus*, gramnegativní *Escherichia coli* a kvasinka *Candida albicans*. K diagnostice plazmatu byla použita optická emisní spektroskopie. Vyhodnocení efektivity sterilizace bylo provedeno pomocí inhibičních zón. I když se bakterie *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus* řadí obě mezi grampozitivní, vykazují jinou citlivost vůči sterilizačním účinkům. U *Staphylococcus aureus* byly inhibiční zóny 4–5 krát větší než u *Bacillus subtilis*. Při vzdálenosti elektrod 3,5 cm docházelo ke vzniku ozónu, což může být příčinou větších inhibičních zón v porovnání s výsledky, které byly získány při vzdálenosti 2,5 cm. Autoři dospěli k názoru, že pro inaktivaci mikroorganismů je důležité jak fyzikální poškození způsobené ionty, tak chemické poškození, které má na svědomí ozón, atomární kyslík atd. V úvahu musí být brána také možnost perforace buněčné stěny zapříčiněná současným působením atomů a iontů a příspěvek elektrostatických sil, které akumulací nabitých částic způsobují destabilizaci buněčné stěny. Důsledkem toho může docházet k pronikání ozónu a atomárního kyslíku a následné oxidaci proteinů a DNA [60].

2.6 Analytické metody

V této práci byla použita metoda optické emisní spektroskopie (OES) a skenovací elektronová mikroskopie (SEM). Díky OES byla provedena diagnostika výboje, pomocí metody SEM bylo sledováno poškození buněčné stěny mikroorganismu vlivem působení plazmatu a účinek plazmatu na strukturu nosného materiálu.

2.2.1 Optická emisní spektroskopie

2.6.1.1 Základní princip a popis metody

Optická emisní spektroskopie (OES) je základní metodou diagnostiky plazmatu. Jedná se o fyzikální analytickou metodu sloužící ke kvalitativnímu a kvantitativnímu určení složení analyzovaného vzorku pomocí záření, které je emitováno jeho částicemi (atomy, ionty, molekuly). Aby vzorek vysílal záření, musí se atomy prvku převést do excitovaného stavu dodáním energie. Předností OES je značná univerzálnost pro nejrůznější typy plazmatu, navíc nijak neovlivňuje vlastní plazma. Spektroskopicky lze určit složení plazmatu, jeho teplotu i rozdělení energií [61, 62].

Vysílané záření je polychromatické a nespojité. Výsledkem je spektrum vlnových délek, resp. frekvencí, které jsou charakteristické pro daný prvek nebo částici. Kvalitativní analýza vzorku je založena na přítomnosti těchto charakteristických frekvencí (vlnových délek), kvantitativní složení vychází z poměru intenzit spektrálních čar [61].

Optické spektrum vzniká přechody valenčních elektronů ze stavu excitovaného do stavu s nižší energií, případně až do základní energetické hladiny. Tyto přechody jsou omezeny výběrovými pravidly, na jejichž základě pak mluvíme o povolených a zakázaných přechodech. S rostoucím počtem valenčních elektronů vzrůstá počet přechodů a také vzájemné ovlivňování elektrických a magnetických polí elektronů a atomových jader. Výsledné spektrum je pak podstatně složitější [61].

Intenzita spektrální čáry je tok záření dané vlnové délky a souvisí s pravděpodobností elektronových přechodů. Zakázané přechody mají nízkou pravděpodobnost, zatímco povolené přechody mají pravděpodobnost vysokou. Intenzita spektrální čáry je ovlivněna i koncentrací molekul v excitovaném stavu – čím je vyšší, tím je i čára intenzivnější. Nejintenzivnější čáry vznikají přechodem na základní hladinu z nejbližších vyšších hladin, z nichž může elektron přejít jednoznačně jen na hladinu základní. Tyto čáry se nazývají rezonanční. Doba života excitovaných stavů je v tomto případě v řádu 10^{-8} s. V případě zakázaných přechodů setrvává elektron na vyšší, tzv. metastabilní hladině po dobu několika ms až minut [61].

Při přechodu vybuzeného elektronu na některou nižší energetickou hladinu se vyzáří přebytečná energie ve formě světelného kvanta:

$$\Delta E = h\nu, \quad (11)$$

kde ΔE je rozdíl příslušných energetických hladin, ν frekvence a h Planckova konstanta ($h = 6,626 \cdot 10^{-34}$ J·s) [61].

2.6.1.2 Interpretace spekter

Ze spekter atomárních čar lze získat informaci o elektronové teplotě plazmatu a z profilu jednotlivých spektrálních čar je možno stanovit i teplotu neutrálního plynu. K měření profilu spektrálních čar je nezbytné použít spektrometr s vysokým rozlišením (minimálně setiny nm). Určování složení plazmatu z molekulárních spekter je poměrně obtížné, protože se jednotlivé pásy rozkládají v širokém rozmezí vlnových délek a překrývají se jak vzájemně, tak i s atomárními spektry. Molekulární spektroskopie se zabývá zkoumáním spekter jen dvouatomových molekul a je využívána pro stanovení rotačních a vibračních teplot a rozdělení energie v plazmatu [62].

Rotační teplota charakterizuje rotační rozdělení stavů molekuly. Vzhledem k velmi rychlé termalizaci rotačních stavů rotační teplota v podstatě odpovídá teplotě neutrálního plynu. Počet molekul nabuzených do jednotlivých rotačních stavů v rámci jedné vibrační hladiny konkrétního elektronového stavu lze popsat podle Boltzmannova rozdělení:

$$N(J) \approx e^{\frac{F_J hc}{k T_R}}, \quad (12)$$

kde T_R je rotační teplota, F_J hodnota rotačního termu, k Boltzmannova konstanta a J představuje daný rotační stav [62].

Vibrační teplota charakterizuje vibrační rozdělení stavů molekuly. V neizotermickém plazmatu bývá zpravidla vyšší než teplota rotační a menší než teplota elektronová. Na hodnotu vibrační teploty má vliv stupeň ionizace plazmatu, teplota elektronů a teplota a tlak neutrálního plynu. Na hodnotu vibrační teploty mají rovněž vliv chemické reakce, které v plazmatu probíhají. V neizotermickém plazmatu je vhodnější se omezit pouze na stanovení relativních vibračních populací jednotlivých vibračních hladin:

$$N_{v,rel} = \frac{I_{v'v''}}{v^4 A(v'v'')}, \quad (13)$$

kde $I_{v'v''}$ je intenzita vibračního pásu, v' a v'' jsou vibrační kvantová čísla horního, resp. dolního stavu, $A(v'v'')$ je pravděpodobnost přechodu a v je vlnčet pásu [62].

2.6.1.3 Instrumentace

Pro potřeby diagnostiky plazmatu musí být zabezpečeno dostatečné rozlišení, např. pro rozlišení rotační struktury musí být v řádu setin nm. K rozkladu světla se obvykle užívá optických mřížek s hustotou minimálně 300 čar/mm (pro přehledová spektra). Mřížky s hustotou do 1 200 čar/mm jsou obvykle vyráběny klasicky (rytím), větší hustoty jsou dosahovány u holografických mřížek (běžně až 5 400 čar/mm) [62].

Všechny spektrometry jsou vybaveny vstupní štěrbínou, která slouží k nastavení výsledné rozlišovací schopnosti přístroje, částečně se jí dá regulovat i intenzita světla vstupujícího do spektrometru. Polychromatické záření prošlé štěrbínou je prostorově rozloženo monochromátorem, což je zaostřovací systém skládající se ze zrcadel a difrakční rovinné mřížky. Monochromátor fokusuje záření na detektor, kde dochází k převodu optického signálu na elektrický. Jako detektory jsou užívány fotonásobiče nebo CCD prvky. Při použití

fotonásobičů je nutné ještě zařadit výstupní šterbinu, která vybírá velmi úzký spektrální interval dopadající na vlastní detektor. Díky tomu je dosaženo většího rozlišení než u CCD detektorů, ale není možné najednou zaznamenat celý úsek spektra. V případě fotonásobiče i CCD detektoru se výsledné spektrum zaznamenává do počítače [61, 62].

2.6.2 Skenovací elektronová mikroskopie

2.6.2.1 Základní princip a popis metody

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM), často též označována jako rastrovací nebo řádkovací elektronová mikroskopie, se využívá k analýze povrchů zkoumaných objektů při velkém zvětšení. Jak je patrné z názvu, paprsek elektronů v preparátové komoře mikroskopu řádkuje (skenuje) malou plošku na povrchu vzorku. Při interakci koncentrovaného svazku urychlených elektronů s atomy preparátu nastává řada jevů, jejichž důsledkem je vznik signálů, které se detekují a některé používají k tvorbě obrazu [63].

Primární elektrony jsou uvolňovány elektronovou tryskou, urychleny a po průchodu tubusem mikroskopu dopadají na vzorek. V důsledku interakce primárních elektronů s atomy preparátu vznikají sekundární a zpětně odražené elektrony. Sekundární elektrony se od primárních elektronů liší svojí energií, která je velmi nízká. Energie zpětně odražených elektronů je srovnatelná s energií primárních elektronů. Při dopadu elektronů na preparát se může uvolnit elektron a dojít k přechodu některého elektronu z vyšší energetické hladiny do vakance. Při tomto přechodu se uvolní kvantum energie ve formě sekundárních elektronů, rentgenového záření, fotonů světla (katodoluminiscence) a nezářivých přechodů fotonů (teplo) [63, 64].

K zobrazení topografie vzorku se využívají elektrony sekundární. Zpětně odražené elektrony jsou velmi citlivé na změny atomového čísla, a proto se používají k získání informací o prvkovém složení preparátu, stejně jako rentgenové záření. Výhodou SEM je velká hloubka ostroty, plastické zobrazení a také velké rozlišovací schopnosti (zvětšení až 100 000x) [63].

2.6.2.2 Instrumentace

Každá optická soustava elektronového mikroskopu je složena ze dvou základních částí – osvětlovacího a zobrazovacího systému, které lze dále rozdělit na jednotlivé části. Osvětlovací systém se skládá z elektronové trysky a kondenzoru. Zobrazovací systém je tvořen vychylovacími cívkami, objektivem, detektory a obrazovkou [64].

K emisi elektronů lze využít dva druhy zdrojů – termoemisní a autoemisní. U termoemisního zdroje (wolframové vlákno, krystal LaB_6) dochází k emisi elektronů na základě zahřátí vlákna v důsledku průchodu elektrického proudu. V případě autoemisního zdroje jsou elektrony emitovány studeným wolframovým vláknem vyleptaným do hrotu [64].

Elektronový svazek je potřeba během průchodu optickou soustavou fokusovat. K tomuto účelu se používá elektrické nebo magnetické pole. Každé pole má rozdílné fyzikální vlastnosti a vyvolává jiné změny v pohybu jím procházejících elektronů. Nejčastěji je využíváno elektromagnetických čoček, které jsou odpovědné za zaostření a zvětšení obrazu [65].

Zobrazovací systém formuje svazek elektronů s požadovanými parametry a zajišťuje osvětlení povrchu preparátu rastrovacím způsobem. Svazek primárních elektronů je vychylován ve dvou na sebe kolmých osách pomocí vychylovacích cívek. Nejdůležitější částí zobrazovací soustavy SEM je objektiv, na jeho vlastnostech závisí dosažitelná rozlišovací schopnost [65].

Detektory slouží k zachycení signálů, pocházejících z interakcí elektronového svazku se zkoumaným preparátem. Pomocí těchto signálů je pak interpretován výsledný obraz. K detekci sekundárních a zpětně odražených elektronů slouží scintilační detektor a fotonásobič [65].

Součástí skenovacího elektronového mikroskopu je také vakuový systém, který má za úkol udržovat vakuum uvnitř mikroskopu na požadované provozní hodnotě, která je zpravidla určena typem katody [65].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

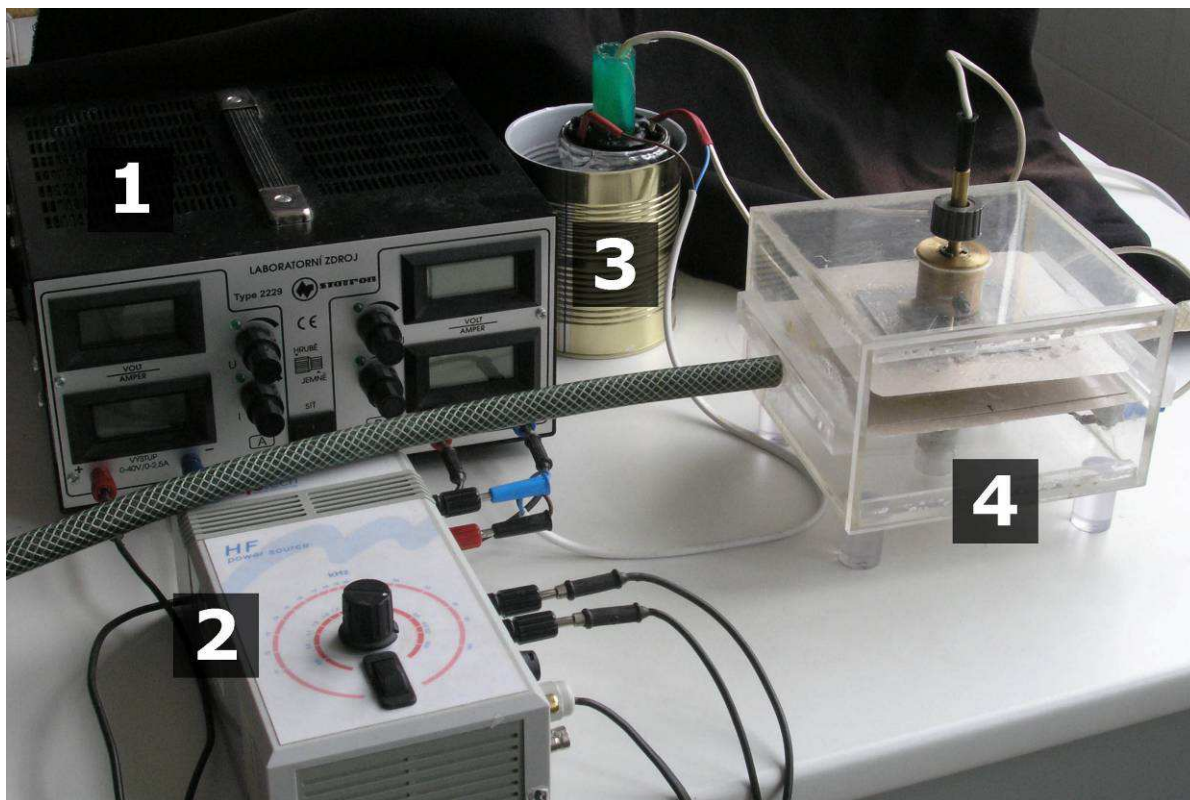
V experimentální části diplomové práce se zabývám studiem vlivu vlhkosti na celkový sterilizační účinek dielektrického bariérového výboje (DBD). Metoda byla testována na experimentálním zařízení pracujícím za atmosférického tlaku. Pracovním plynem byl suchý a vlhký vzduch. Byly použity různé hustoty výkonu a expoziční časy. Nosným materiálem byl papír typu Whatman No. 1. Jako modelové mikroorganismy byly zvoleny spory plísň *Aspergillus niger*. Za přítomnosti výboje buzeného v argonu a dusíku byla provedena studie inaktivačních účinků teploty a UV záření. Účinnost sterilizačních procesů byla stanovena nepřímou kultivační metodou. Pomocí OES byla provedena diagnostika plazmatu, SEM snímky posloužily k posouzení míry poškození mikroorganismu a nosného materiálu plazmatem.

3.1 Použité přístroje a software

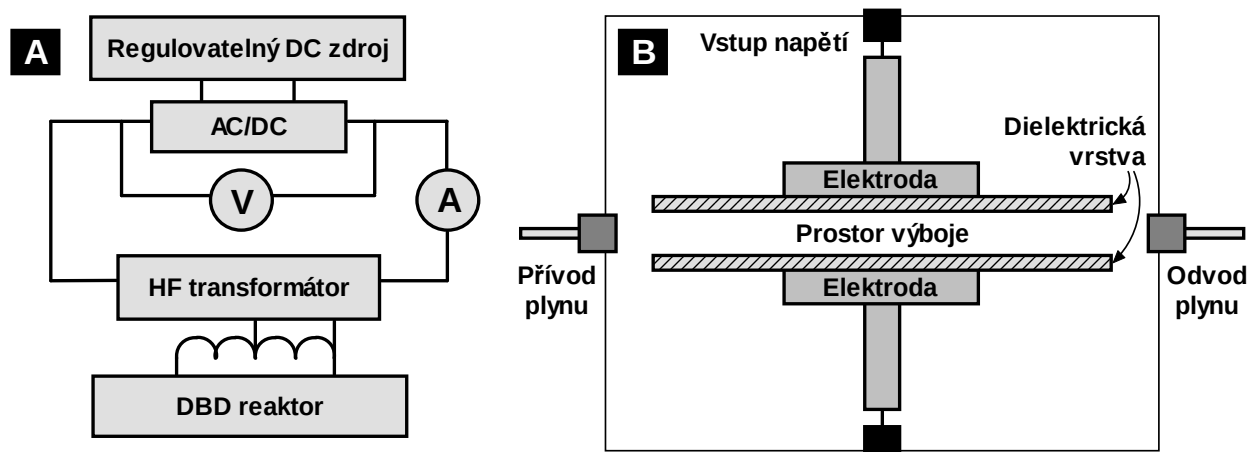
- Laminární box – Aura mini – Bioair a EuroElone Division
- Třepačka typu „vortex“ – REAX top – Heidolph
- DBD aparatura
- Termočlánek
- Termostat – Inkubator 1 000 – Heidolph Instruments – Vitrium
- Spektrometr – Ocean Optics HR4000 (rozsah vlnových délek 250–350 nm)
- Spektrometr – Ocean Optics HR4000 (rozsah vlnových délek 200–1 100 nm)
- Spektrometr – Jobin-Yvon TRIAX 550 (rozsah vlnových délek 300–800 nm)
- Software na zpracování spektrálních čar – Spectrum Analyzer 1.6
- Vakuová naprašovačka – Polaron SC 7640
- Skenovací elektronový mikroskop – JEOL JSM-7600F

3.2 Experimentální zařízení

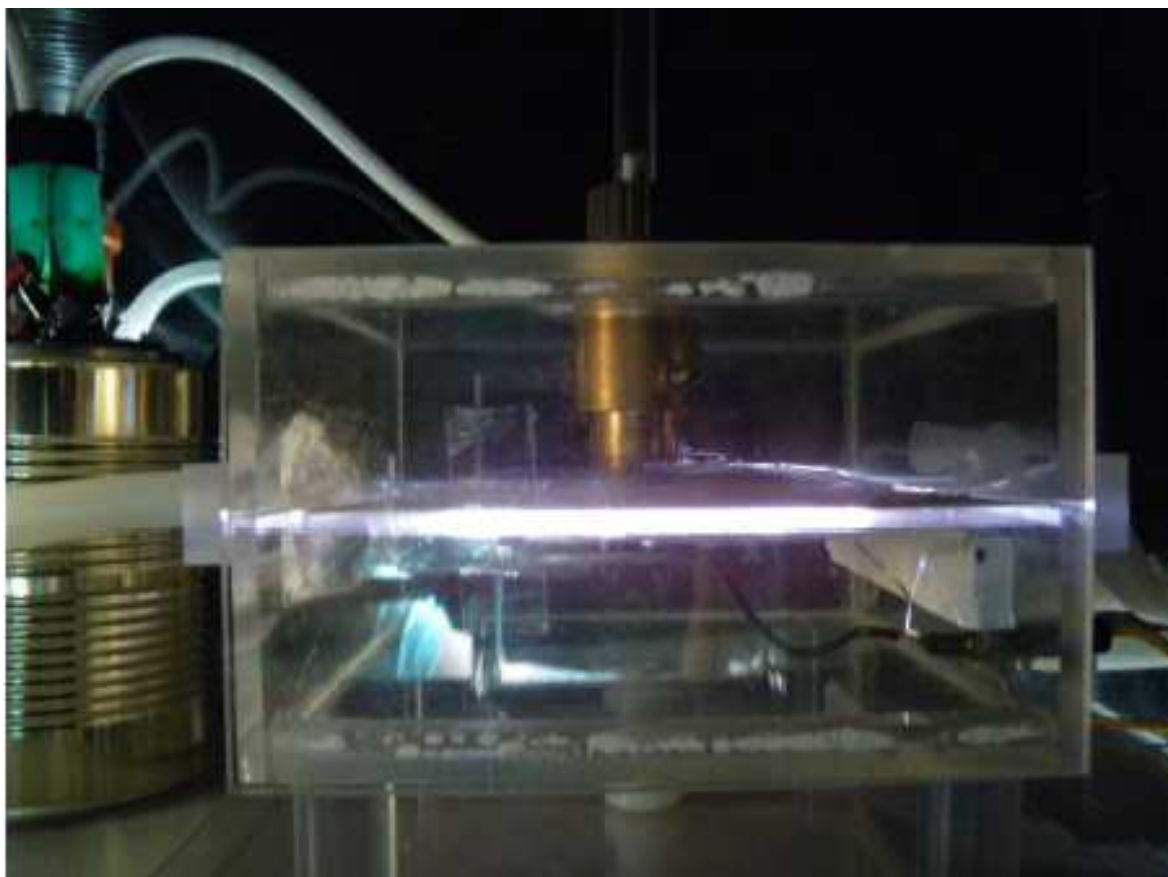
Experimentální aparatura je založena na principu objemového dielektrického bariérového výboje. Plazmové zařízení (obrázek č. 5) se skládá z regulovatelného zdroje stejnosměrného (DC) napětí, vysokofrekvenčního zdroje, vysokonapětového (HF) autotransformátoru a samotného DBD reaktoru. Výboj je generován mezi dvěma kovovými elektrodami pokrytými dielektrickou bariérovou vrstvou. Napětí mezi elektrodami lze při daném uspořádání měnit v rozsahu 3–10 kV, s frekvencí do 10 kHz. Vnější rozměry DBD reaktoru jsou 120 × 118 × 120 mm. Objem výboje je pak dán plochou elektrod 90 × 70 mm a jejich vzdáleností. Vzdálenost elektrod lze pomocí šroubu měnit v závislosti na použitém pracovním plynu např. vzduch je vzdálenost 3 mm. Jako materiál dielektrika je použit mikanit (štípaná slída), tloušťka vrstvy je 0,5 mm. Na obrázku č. 6 je zobrazeno schéma elektrického obvodu a reaktoru.



Obrázek č. 5: Plazmové zařízení: 1) regulovatelný zdroj stejnosměrného napětí; 2) vysoko-frekvenční zdroj; 3) vysokonapěťový (HF) transformátor a 4) DBD reaktor



Obrázek č. 6: A) Schéma el. obvodu; B) Schéma DBD reaktoru



Obrázek č. 7: *Plazmový DBD reaktor s objemovým výbojem*

3.3 Mikrobiologické postupy

3.3.1 Použitý mikroorganismus

Jako modelové mikroorganismy byly zvoleny spory plísně *Aspergillus niger* F8189, které byly získány z České sbírky mikroorganismů, Masarykovy univerzity v Brně. Kultivace proběhla na šikmém sladínovém agaru (sladina a 2 hm. % agaru Himedia RM 026) v termostatu při 25 °C po dobu 10 dní.

3.3.2 Živné médium

Plísně byly kultivovány na sladínovém agaru. Pro přípravu sladínového agaru byla použita pivovarská sladina (z pivovaru Starobrno, a.s Brno). Ta byla zředěna na 7 ° dle Ballinga destilovanou vodou. Hodnota pH byla upravena na pH 6,6–6,8 nasyceným roztokem NaHCO_3 . Ke sladínovému extraktu byly přidány 2 hm. % agaru Himedia RM 026. Takto upravená sladina byla sterilizována.

3.3.3 Fyziologický roztok

Při ředění byl vždy použit sterilní fyziologický roztok (8,5 g NaCl v 1 l deionizované vody).

3.3.4 Příprava očkovací suspenze

Pro přípravu očkovací suspenze byla použita 10 denní kultura *Aspergillus niger* na šikmém sladinovém agaru. Do kultury ve zkumavce bylo nalito cca 5 ml sterilního fyziologického roztoku s přídavkem Tweenu 80 (0,1 ml na 100 ml média). Seškrábnutím pomocí bakteriologické kličky byly spory opatrně uvolněny do roztoku. Tato suspenze buněk byla nalita do sterilních centrifugačních uzavíratelných sterilních mikrozkušavek o objemu 2 ml. Poté byla třikrát centrifugována (4 °C, 10 000 otáček, 5 min) a promyta 2 ml sterilního fyziologického roztoku. Po třech promytích byla usazenina spor doplněna fyziologickým roztokem s přídavkem Tweenu, vznikla tak suspenze o koncentraci $1 \cdot 10^7$ až $1 \cdot 10^8$ spor $\cdot$ ml⁻¹. Takto připravená suspenze mikroorganismů byla skladována až do jejího použití v lednici.

3.3.5 Příprava vzorků

Do sterilních Petriho misek byly vloženy sterilní disky papíru o průměru 3 cm (papír typu Whatman No. 1.). Na vzorky papíru bylo nanášeno 100 μ l očkovací suspenze. Takto připravené vzorky byly ponechány po dobu 24 hod v termostatu při teplotě 25 °C, aby došlo k vysušení vzorků.



Obrázek č. 8: Petriho miska s připravenými vzorky

3.4 Opracování vzorků

Kontaminované vzorky papíru byly vystaveny účinkům dielektrického bariérového výboje za atmosférického tlaku buzeného ve vzduchu. Aby nedošlo k sekundární kontaminaci, byl nejprve celý box dezinfikován ethanolem a pinzeta používaná pro aplikaci vzorků byla ještě

navíc pravidelně sterilizována plamenem. Vzorek byl umístěn do středu mezi elektrody pomocí speciálního držáku. Ten byl vyroben z mikanitu a pokryt oboustrannou lepicí páskou tak, aby se zabránilo posunutí vzorků vlivem proudu plynu. Po nastavení požadované vzdálenosti elektrod (3 mm) byl box uzavřen. Objem reaktoru má cca. 3 l, proto bylo potřeba, počkat 2 minuty než došlo k naplnění aparatury pracovním plynem. Poté bylo spuštěno zařízení na daný čas, při přednastaveném napětí 60, 70, 80 V a frekvenci, která byla nastavována tak, abychom dosáhli maximálního proudu. Postupně byly proměřeny série vzorků při daných expozičních časech. V průběhu měření byly odečítány proudy, které zůstávaly konstantní. Po expozici plazmatem byly vzorky vloženy do 10 ml fyziologického roztoku s Tweenem 80, protřepány a ponechány na třepačce do druhého dne, aby došlo k vymytí spor ze vzorku.

3.5 Vyhodnocení

Pro kvantitativní vyhodnocení sterilizačních účinků DBD bylo využito nepřímého stanovení počtu mikrobiálních buněk plotnovou zředovací metodou. Principem této metody je počítání kolonií vyrostlých na agarových plotnách. Byla zpracována série ředěných vzorků tak, aby celkový počet vyrostlých kolonií na plotně s průměrem 9 cm byl po naočkování v rozmezí od 20 do 200 (300). Metoda vychází z předpokladu, že z jedné životaschopné buňky vyrůstá jedna kolonie. Pro tyto účely byl využit koeficient ředění 10. K ředění byl použit sterilní fyziologický roztok s přísadkou Tweenu. Takto zředěná suspenze byla naočkována přelivem na sterilní Petriho misky. Po určité době bylo možné stanovit počet vyrostlých kolonií, tzv. CFU (colony forming unit), které by měly odpovídat počtu přeživší populace mikroorganismů [3, 66].

Pro každý vzorek byly připraveny 2 uzavíratelné sterilní mikrozkušavky s 900 µl sterilní vody a tři Petriho misky. V mikrobiologickém boxu bylo ze vzorku odebráno 100 µl a naočkováno pod plamenem do Petriho misky č. 1. Další 100 µl vzorku bylo přidáno do první mikrozkušavky, promícháno a pod plamenem vneseno do Petriho misky č. 2. Poté bylo odebráno 100 µl vzorku z první mikrozkušavky, přeneseno do druhé mikrozkušavky a po promíchání naočkováno pod plamenem do Petriho misky č. 3. Všechny misky se vzorky byly pod plamenem zality sterilním sladidlovým agarem. Po rozlití byl sladidlový agar ještě krouživým pohybem promíchán se vzorkem v misce. Jakmile média ztuhly, byly misky uloženy do termostatu (25 °C). Počet kolonií byl pro lepší čitelnost spočítán po 3 dnech kultivace, poté byly kolonie ještě dva nebo tři dny kontrolovány.

Pro vyhodnocení byly vybrány plotny s počtem kolonií 20–200 (300). Počet kolonií na plotně (průměrná hodnota z paralelních ploten) byl násoben příslušným ředěním a vyjadřován jako počet kolonií na jeden mililitr.

3.6 Experimentální podmínky

Opracování vzorků probíhalo za přesně definovaných podmínek, které lze charakterizovat hustotou plazmového výkonu, expozičním časem a druhem pracovního plynu. Jednotlivé parametry bylo možno postupně měnit a sledovat tak jejich vliv na celkový sterilizační účinek DBD.

Hustota plazmového výkonu je charakterizována vzorcem:

$$x = \frac{UI\eta}{V}, \quad (14)$$

kde U znamená napětí, I je proud, η je účinnost a V je objem plazmatického výboje. Pro naše zařízení se používají rozměry elektrod 90 x 70 mm a vzdálenost elektrod 3 mm. Účinnost zařízení je 0,4. Pro vložení napětí o velikosti 60, 70 a 80 V je hustota plazmového výkonu 2 160 mW·cm⁻³, 2 279 mW·cm⁻³ a 2 760 mW·cm⁻³ (suchý vzduch), 2 326 mW·cm⁻³ a 2 850 mW·cm⁻³ (vlhký vzduch). Pro studii vlivu teploty a UV záření bylo zvoleno napětí 70 V a hustoty plazmového výkonu 2 563 mW·cm⁻³ (argon) a 2 044 mW·cm⁻³ (dusík).

Každá série vzorků byla opracovávána v časech 5, 10, 20, 40, 60, 120, 180 a 240 sekund. Vzorky byly po dobu 30 s vystaveny účinkům DBD, poté byl výboj vypnut. Výboj byl vypnut na cca. 2 min, kdy docházelo k ochlazování elektrod pracovním plynem, tímto byl eliminován vliv teploty. Průtok pracovního plynu, kterým byl suchý vzduch, vlhký vzduch, argon a dusík dosáhl 3 l·min⁻¹. Nosným materiálem byl papír typu Whatman No. 1.

Při studii vlhkosti bylo jako první provedeno měření s použitím suchého vzduchu. Poté následovalo měření s vlhkým vzduchem. Vlhký vzduch byl získán pomocí promývací láhve naplněné vodou, přes kterou plyn proudil do DBD reaktoru.

3.7 Studium vlivu UV záření a teploty

Studium vlivu UV záření a teploty bylo provedeno v předešlé práci (viz. [8]) pomocí DBD buzeného v argonu (2 563 mW·cm⁻³) a dusíku (2 044 mW·cm⁻³). Na měření v argonu a dusíku navazuje tato práce měřením sterilizačních účinků DBD ve vzduchu (suchý/vlhký).

Vliv UV záření v kombinaci s teplotou byl studován v plazmatu pomocí křemenného skla, jímž byla část vzorku zakryta. Křemenné sklo propouští pouze UV záření a teplo, avšak ne reaktivní částice. Z tohoto důvodu bylo zvoleno při této studii. Opracování vzorků probíhalo stejným způsobem, jako je uvedeno v kapitole 2.4 (zvolené napětí 70 V). Na takto opracované vzorky tedy působilo jen UV záření a teplota, kterou nikdy nelze zcela eliminovat. Pro srovnání byla část vzorku ponechána volně, a tudíž vystavena přímým účinkům výboje.

Při studii teplotní inaktivace byla pomocí termočlánku proměřena teplota působící mezi elektrodami. Postupovalo se stejným způsobem jako při opracovávání vzorků, s tím rozdílem, že byla změřena vždy teplota před spuštěním zařízení (teplota 1) a po ukončení působení dielektrického bariérového výboje (teplota 2). Mezi elektrody nebyly vkládány vzorky, ale termočlánek. Výboj byl spuštěn vždy na 30 s, poté následovala 2 min pauza. Celkem bylo proměřeno 6 dvojic teplot při výboji generovaném v argonu a 6 dvojic při výboji generovaném v dusíku. Poté byly v termostatu vzorky vystaveny teplotě shodné s teplotou naměřenou mezi elektrodami při použití dusíku jako pracovního plynu, jelikož dusík vykazoval vyšší nárůst teplot než argon.

3.8 Optická emisní spektroskopie plazmatu

Při měření spekter vzduchu byly využity přístroje Ocean Optics HR4000 (250–350 nm) a Ocean Optics HR4000 (200–1 100 nm). Spektra argonu a dusíku byla měřena pomocí

přístroje Jobin-Yvon TRIAX 550. Všechny použité přístroje byly vybaveny CCD detektorem. Použité mřížky byly 600, 1 200, 2 400 a 3 600 vrypů/mm. Spektra UV oblasti byla měřena v rozsahu 250–350 nm (vzduch) a 200–350 nm (argon, dusík). Pro tento účel byla využita mřížka 2 400 vrypů/mm (vzduch) a 3 600 vrypů/mm (argon, dusík). Na mřížce 600 vrypů/mm byla měřena přehledová spektra vzduchu (330–790 nm) a na mřížce 1 200 vrypů/mm přehledová spektra argonu a dusíku (200–800 nm).

Pomocí optické emisní spektroskopie byla provedena diagnostika DBD. Spektra vzduchu, argonu a dusíku byla měřena pomocí optického vlákna zpevněného kovovou spirálou, které bylo prostrčeno skrz plexisklový kryt.

Spektra byla změřena Mgr. Věrou Mazánkovou, Ph.D. Vyhodnocení spekter bylo provedeno za použití programu Spectrum Analyzer 1.6.

3.9 Skenovací elektronová mikroskopie

Pomocí skenovací elektronové mikroskopie byla sledována míra poškození mikroorganismu vystaveného působení DBD a účinek plazmatu na strukturu nosného materiálu. Pro pořízení snímku byl využit přístroj JEOL JSM-7600F. Vodivá vrstva na bázi Au/Pd byla na vzorky nanášena pomocí přístroje Polaron SC 7640. Urychlující napětí dosahovalo 10 kV, snímky byly pořízeny se zvětšením 500, 2 500, 10–15 000, 25 000 a 100 000.

K analýze byly použity vzorky *Aspergillus niger* nanášené na filtračním papíře Whatman No. 1 a PET. Byl analyzován neopracovaný vzorek a vzorek vystavený účinkům DBD po dobu 180 s, výboj byl buzen ve vlhkém a suchém vzduchu. Ze vzorku byl vystřižen čtverec o rozměrech přibližně 0,8×0,8 cm, ten byl upevněn oboustranně lepicí páskou na hliníkový váleček o průměru cca. 1 cm. Po potažení vzorku vrstvou zlata v naprašovacím zařízení byl pozorován vliv působení plazmatu na spory *Aspergillus niger* i vliv na nosný materiál.

Pořízení snímku provedl Ing. Martin Zmrzlý, Ph.D.

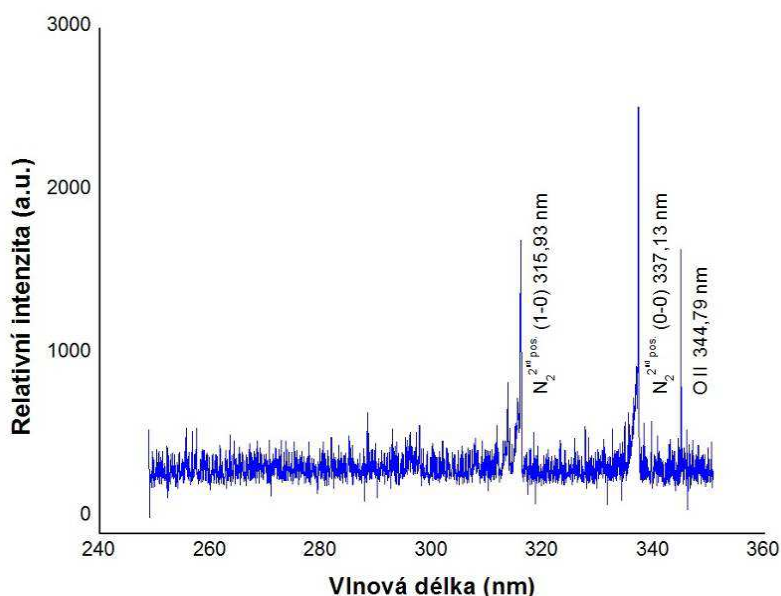
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem této diplomové práce bylo studium sterilizačních účinků dielektrického bariérového výboje na modelovém mikroorganismu (*Aspergillus niger*) při generaci v plynech bez přítomnosti vlhkosti (vzduch, argon, dusík) a s přítomností vlhkosti (vlhký vzduch). Získané výsledky byly shrnuty do následujících grafů a tabulek.

4.1 Diagnostika plazmatu

Pomocí optické emisní spektroskopie byla provedena diagnostika DBD buzeného v suchém vzduchu, vlhkém vzduchu, dusíku a argonu. Spektra UV oblasti byla měřena v rozsahu 250–350 nm (vzduch) a 200–350 nm (argon, dusík), přehledová spektra pak v rozmezí 330–790 nm pro vzduch a 200–800 nm pro argon a dusík. Na základě získaných spekter byl zhodnocen vliv jednotlivých agens (aktivní částice – např. přítomnost OH, O radikálu; UV záření – přítomnost NO systému, teplota) na celkový sterilizační účinek DBD. Spektra byla vyhodnocena pomocí programu Spectrum Analyzer 1.6. Výsledky spekter jsou uvedeny v tabulkách č. 2 a 3.

Volné radikály (např. O, N₂, O₃, OH^{*}, NO, NO₂) mají v procesu sterilizace plazmatem zásadní roli. Vzhledem k jejich vysoké reaktivitě jsou nepostradatelným sterilizačním činitelem účastnícím se mnoha chemických reakcí, které vedou ke změně či úplné ztrátě funkčnosti důležitých biomolekul. Přítomnost těchto chemických agens v plazmovém výboji byla ověřena právě pomocí optické emisní spektroskopie.

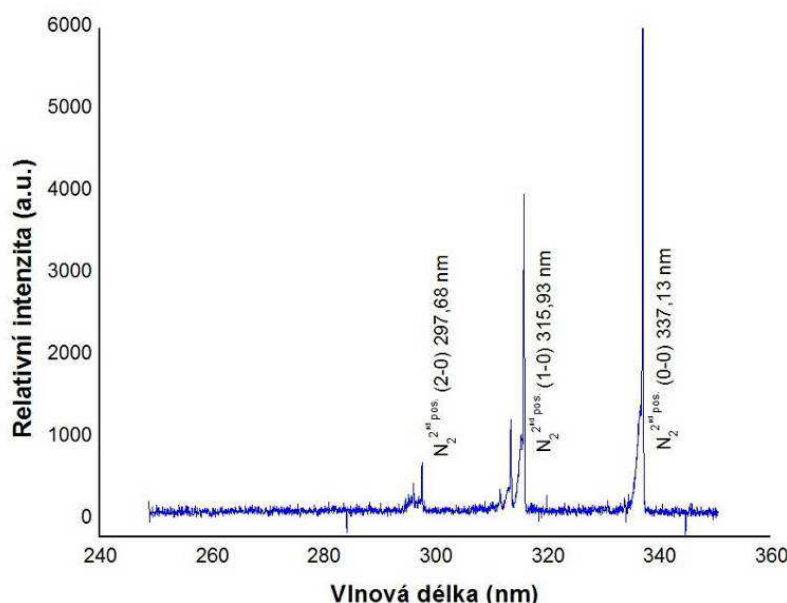


Obrázek č. 9: Optické emisní spektrum výboje buzeného v suchém vzduchu (250–350 nm)

Obrázek č. 9 znázorňuje emisní spektrum výboje buzeného v suchém vzduchu (2 760 mW·cm⁻³), které bylo měřeno v rozsahu 250–350 nm. V emisním spektru byl

identifikován druhý pozitivní systém dusíku (315 a 337 nm) a čára atomárního kyslíku (344 nm). Na přehledovém spektru (viz. tabulka č. 2) byly identifikovány další čáry atomárního kyslíku (399 a 715 nm) a druhého pozitivního systému dusíku (357, 380 a 405 nm), dále zde byly objeveny atomární čáry dusíku v oblasti 632 a 674 nm. Ačkoliv byla předpokládána i přítomnost OH-systému a NO γ -systému, nepodařilo se je detekovat. Snížení intenzity NO γ -systému může být způsobeno díky tvorbě O $_3$, který může absorbovat záření při této vlnové délce [50].

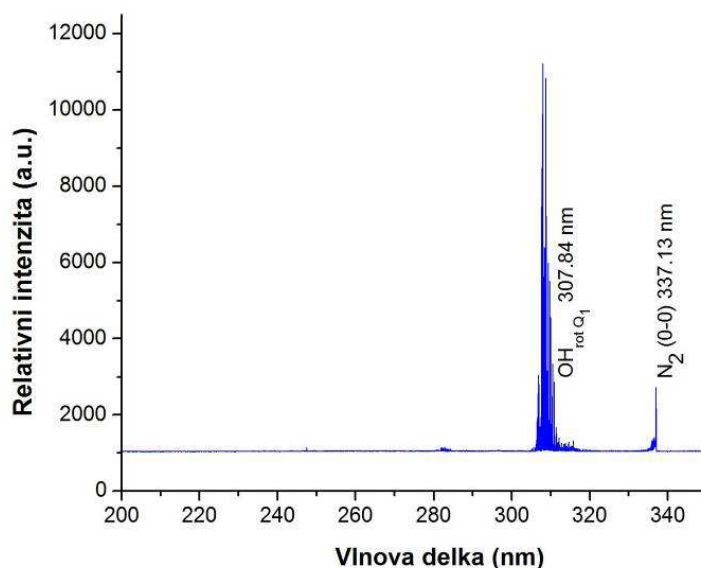
Pomocí OES bylo změřeno i spektrum výboje buzeného v suchém vzduchu při použití nižšího plazmového výkonu (2 279 mW·cm $^{-3}$). Zde byly oproti spektru výboje s vyšším výkonem, zjištěny nižší intenzity jednotlivých emisních čar.



Obrázek č. 10: Optické emisní spektrum výboje buzeného ve vlhkém vzduchu (250–350 nm)

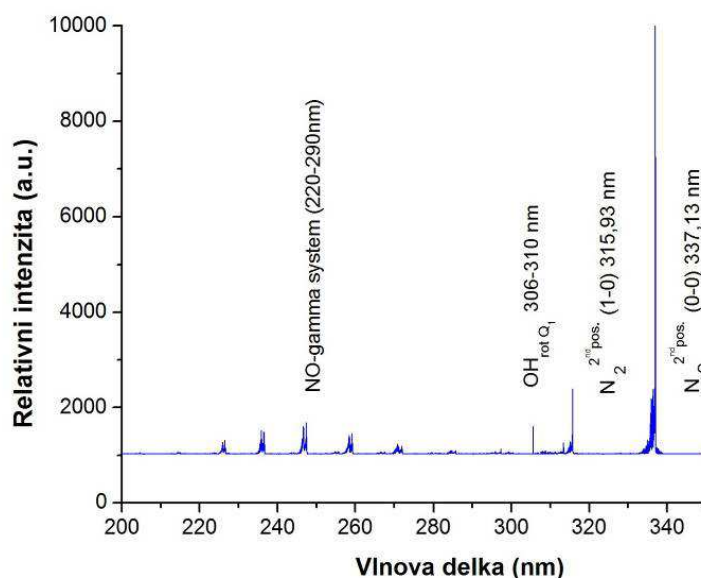
Na obrázku č. 10 je emisní spektrum výboje buzeného ve vlhkém vzduchu (2 850 mW·cm $^{-3}$). Shodně, jako ve spektru suchého vzduchu, byl i zde přítomen druhý pozitivní systém dusíku (315 a 337 nm), jeho intenzity však na rozdíl od suchého vzduchu dosahovaly mnohem vyšších hodnot, navíc zde byla objevena emise v oblasti 297 nm. Další emise druhého pozitivního systému dusíku (357, 380 a 405 nm) byly identifikovány v přehledovém spektru (viz. tabulka č. 2), kde byly nalezeny i čáry atomárního dusíku (438, 632, 652 a 674 nm) a čáry atomárního kyslíku (399, 421 a 715 nm). Rovněž ani zde nebyla zaznamenána přítomnost OH-systému a NO γ -systému.

Také v případě vlhkého vzduchu bylo změřeno spektrum výboje s nižším plazmovým výkonem (2 326 mW·cm $^{-3}$). I zde byly, ve srovnání se spektrem výboje s vyšším výkonem, zaznamenány nižší intenzity emisních čar.



Obrázek č. 11: Optické emisní spektrum výboje buzeného v argonu (200–350 nm)

Na obrázku č. 11 je znázorněno emisní spektrum výboje buzeného v argonu ($2\,563\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$), které bylo měřeno v rozsahu 200–350 nm. Spektrum argonu má silné emise kolem 308 nm, což je způsobeno přítomností OH-systému. Dále lze identifikovat druhý pozitivní systém dusíku (337, 357 a 380 nm). V přehledovém spektru (viz. tabulka č. 3) byl objeven CN-systém (385–389 nm), argonové čáry (oblast nad 690 nm) a čáry atomárního kyslíku (777 nm). Ačkoliv byla předpokládána i přítomnost NO γ -systému, nepodařilo se ho detekovat.



Obrázek č. 12: Optické emisní spektrum výboje buzeného v dusíku (200–350 nm)

Obrázek č. 12 znázorňuje emisní spektrum výboje buzeného v dusíku ($2\,044\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$). Na tomto spektru byl identifikován, shodně jako na spektru argonu, OH-systém v oblasti 306–310 nm. V rozmezí 220–290 nm byla objevena emise NO γ molekulového pásu, čímž byla prokázána přítomnost UV záření a jeho možný podíl na inaktivačním procesu. Tento jev byl způsoben stopami kyslíku, které mohly být důsledkem nečistot v pracovním plynu, ale vliv na jejich vznik mohla mít i netěsnost aparatury. S používanou konfigurací nebylo možno docílit úplné těsnosti. Na emisním spektru se vyskytuje také druhý pozitivní systém dusíku (315, 337, 357 a 380 nm).

Všechny identifikované systémy a příslušné vlnové délky byly shrnuty do tabulky č. 2 a 3.

Na základě výsledků měření sterilizace bylo zjištěno, že argon dosahuje lepších inaktivačních účinků než vzduch a dusík. OES nám umožnila tyto výsledky interpretovat. I když nebyly ve spektru výboje buzeného v argonu identifikovány čáry NO (UV oblast 200–300 nm, kde je absorpce DNA nejvyšší), bylo při použití argonu jako pracovního plynu dosaženo sterilizace rychleji, díky přítomnosti radikálu OH. OH-systém byl identifikován také v dusíku, ale v argonu byla jeho intenzita mnohem vyšší. V případě suchého ani vlhkého vzduchu nebyla přítomnost OH-systému zjištěna, zde měla pravděpodobně na sterilizaci největší vliv přítomnost volných radikálů O, N a tvořící se O₃. Ten vzniká ve dvou krocích. Nejdříve dochází k disociaci molekuly kyslíku za vzniku radikálu (jeho přítomnost je indikována čarami O), ten následovně reaguje s jinou molekulou kyslíku za přítomnosti další částice, která má funkci katalyzátoru.

Tabulka č. 2: Přehled systémů identifikovaných v suchém a vlhkém vzduchu

Vlnová délka [nm]	Suchý vzduch	Vlhký vzduch
297	—	N ₂ -2. pozitivní systém (pás 2 – 0)
315	N ₂ -2. pozitivní systém (pás 1 – 0)	N ₂ -2. pozitivní systém (pás 1 – 0)
337	N ₂ -2. pozitivní systém (pás 0 – 0)	N ₂ -2. pozitivní systém (pás 0 – 0)
344	čáry O II	—
357	N ₂ -2. pozitivní systém (pás 0 – 1)	N ₂ -2. pozitivní systém (pás 0 – 1)
380	N ₂ -2. pozitivní systém (pás 0 – 2)	N ₂ -2. pozitivní systém (pás 0 – 2)
399	čáry O	čáry O
405	N ₂ -2. pozitivní systém (pás 0 – 3)	N ₂ -2. pozitivní systém (pás 0 – 3)
421	—	čáry O
438	—	čáry N
632	čáry N	čáry N
652	—	čáry N
674	čáry N	čáry N
715	čáry O	čáry O

Tabulka č. 3: Přehled systémů identifikovaných v argonu a dusíku

Vlnová délka [nm]	Argon	Dusík
220–290	—	NO γ -systém
306–310	OH-systém	OH-systém
315	—	N ₂ -2. pozitivní systém (pás 1 – 0)
337	N ₂ -2. pozitivní systém (pás 0 – 0)	N ₂ -2. pozitivní systém (pás 0 – 0)
357	N ₂ -2. pozitivní systém (pás 0 – 1)	N ₂ -2. pozitivní systém (pás 0 – 1)
380	N ₂ -2. pozitivní systém (pás 0 – 2)	N ₂ -2. pozitivní systém (pás 0 – 2)
385–389	CN-systém	—
690	Ar čáry	—
777	čáry O	—

Výsledky sterilizace v argonu a dusíku byly srovnatelné s výsledky uveřejněnými v práci [67], bylo tedy možno použít výsledků rotačních a vibračních teplot z této práce (tabulka č. 4). Spektra suchého i vlhkého vzduchu byla měřena spektrometrem s rozsahem mřížky, který neumožnil rozlišit rotační a vibrační struktury, proto nebyly tyto teploty u vzduchu spočítány.

Tabulka č. 4: Rotační a vibrační teploty pro argon a dusík [67]

Plyn – hustota výkonu	T _{rot} [K]	T _{vibr} [K]
Argon – 2 563 mW·cm ⁻³	290 ± 10	1 650 ± 500
Dusík – 2 044 mW·cm ⁻³	570 ± 110	1 580 ± 150

4.2 Měření teploty pomocí termočlánku

Cílem tohoto měření bylo zjištění teplotních poměrů v použitém DBD. Teplota působící mezi elektrodami byla proměřena pomocí termočlánku. Z technických důvodů nebylo však možné měřit teplotu přímo při zapnutém výboji. Změřené hodnoty tak odpovídají teplotám před zapnutím (teplota 1) a bezprostředně po vypnutí budícího zdroje (teplota 2). Výsledky jsou přehledně uvedeny v tabulce č. 5 a 6.

Při užití suchého vzduchu jako pracovního plynu dochází během 30 s k ohřevu o 6–13 °C. Při chladnutí dochází v prostoru mezi elektrodami k poklesu teploty o 1–6 °C. Vzorky opracovávané po nejkratší dobu byly vystaveny teplotě 32–38 °C, zatímco při 180 s dosahovaly hodnot 49–61 °C. Při nejvyšším expozičním čase byly naměřeny teploty 56–66 °C.

Ve vlhkém vzduchu dochází po 30 s k ohřevu o 6–16 °C. Při chladnutí se teplota snižuje o 2–7 °C. Na vzorky opracovávané po dobu 30 s působila teplota 36–42 °C, 180 s expozice vedla k vystavení vzorků teplotám 54–65 °C. Při nejdelším působení plazmatu (240 s) byla zjištěna teplota 63–74 °C.

V suchém vzduchu dochází k menšímu ohřevu než ve vlhkém vzduchu.

Tabulka č. 5: *Teploty mezi elektrodami při výboji generovaném v suchém a vlhkém vzduchu*

Číslo měření	Čas [s]	Suchý vzduch		Vlhký vzduch	
		Teplota 1 [°C]	Teplota 2 [°C]	Teplota 1 [°C]	Teplota 2 [°C]
1	30	31,7	38,1	35,7	41,9
2	60	36,9	45,6	40,1	48,8
3	120	41,7	54,6	44,2	60,6
4	180	48,6	60,5	54,1	65,4
5	240	55,8	66,0	63,2	73,8

Z naměřených hodnot je patrné, že při použití dusíku jako pracovního plynu dochází během 30 s k ohřevu o 8–12 °C. Při chladnutí se prostor mezi elektrodami ochladí asi o 2–8 °C. Vzorky opracovávané 30 s byly vystaveny teplotě 25–36 °C, zatímco při delším působení plazmatu např. 180 s působí na vzorky již teplota 48–58 °C.

Při použití argonu dochází během 30 s k ohřevu o 7–8 °C. Při chladnutí se prostor mezi elektrodami ochladí asi o 4–6 °C. Vzorky opracovávané 30 s byly vystaveny teplotě 28–36 °C, při 180 s působila na vzorky teplota 42–49 °C.

V argonu dochází k menšímu ohřevu než v dusíku (viz. tabulka č 6), to lze také podpořit výsledky rotačních teplot. Z důvodu většího nárůstu teploty u dusíku byly použity tyto hodnoty pro další měření (viz. kapitola 4.4).

Tabulka č. 6: *Teploty působící mezi elektrodami při výboji generovaném v argonu a dusíku*

Číslo měření	Čas [s]	Argon		Dusík	
		Teplota 1 [°C]	Teplota 2 [°C]	Teplota 1 [°C]	Teplota 2 [°C]
1	30	28,1	36,2	25,3	35,9
2	60	32,2	39,8	33,5	44,1
3	90	36,1	44,4	38,4	48,5
4	120	38,9	46,0	41,6	53,8
5	150	40,7	47,8	45,8	53,7
6	180	42,3	49,0	47,8	57,7

Srovnáním výsledků, naměřených za použití jednotlivých pracovních plynů, bylo zjištěno, že k nejvyššímu ohřevu dochází u vlhkého vzduchu, následuje suchý vzduch a dusík. Nejnižšího ohřevu bylo dosaženo u argonu. U tohoto plynu dochází během 30 s k ohřevu maximálně o 8 °C, zatímco u vlhkého vzduchu může vzrůst teplota až o 16 °C, u suchého vzduchu o 13 °C a u dusíku o 12 °C. Při 180 s expozici byla u vlhkého vzduchu naměřena teplota, která dosahovala až 65 °C, což byla teplota o 16 °C vyšší než u argonu, o 7 °C vyšší než u dusíku a o 4 °C vyšší než u suchého vzduchu.

4.3 Vliv UV záření a teploty

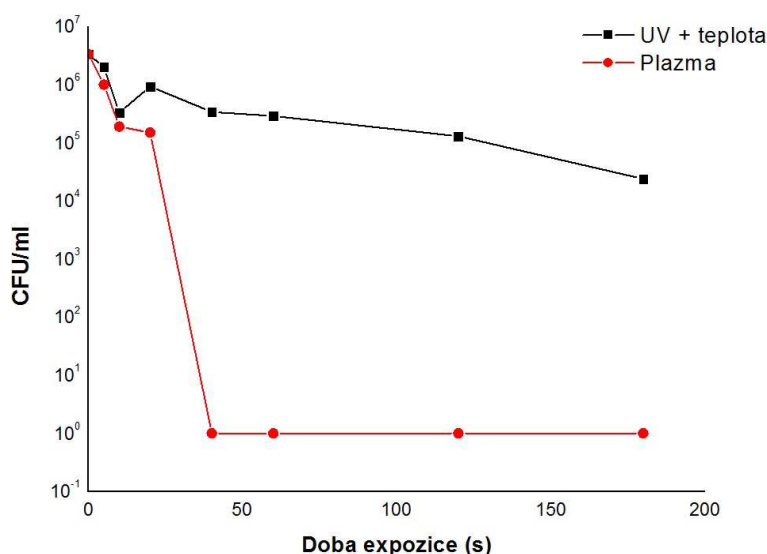
V předešlé práci [8] byl studován vliv teploty a UV záření na celkový sterilizační účinek dielektrického bariérového výboje. DBD byl buzen v argonu ($2\,563\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$) a dusíku ($2\,044\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$). Největšího sterilizačního účinku bylo dosaženo u plazmatu. Co se týče pracovních plynů, vyšší inaktivační účinek vykazoval argon. Na tyto výsledky jsme navázali v diplomové práci měřením ve vzduchu (suchý/vlhký). Výsledky získané při měření v předešlé práci byly srovnány s nově získanými daty, proto jsou zde uvedeny.

4.3.1 Vliv UV záření

Vliv UV záření a teploty (tu nelze ve výboji eliminovat) byl studován v plazmatu pomocí křemenného skla propouštějícího toto záření. Nebylo možno použít obyčejné sklo, jelikož pohlcuje jen UV záření o vlnové délce pod 320 nm , na rozdíl od toho křemenné sklo propouští celou krátkovlnnou oblast UV. Užití UV filtrů popsali ve svých studiích mnozí autoři, např. Trompeter, Brandenburg, Sato [49, 68, 69].

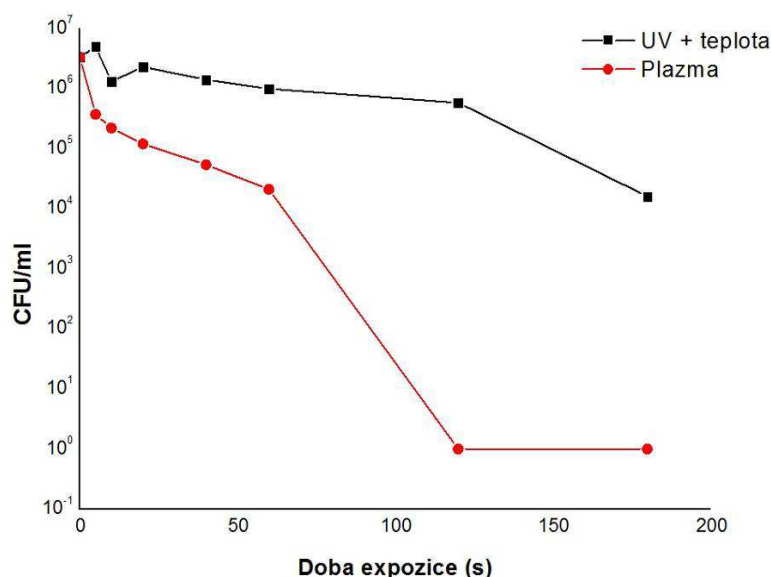
Opracování vzorků probíhalo obdobným způsobem a za stejných experimentálních podmínek jako při opracovávání plazmatem, jen s tím rozdílem, že při opracování byla část vzorků zakryta křemenným sklem a část ponechána volně. Vzorky zakryté křemenným sklíčkem tak byly ušetřeny působení aktivních částic, podléhaly jen účinkům UV záření a teploty, kterou nelze nikdy zcela eliminovat.

Na obrázku č. 13 je znázorněno srovnání účinků plazmatu a UV záření v kombinaci s teplotou při výboji generovaném v argonu ($2\,563\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$). Z grafu je patrné, že dielektrický bariérový výboj pronikající přes křemenné sklíčko měl mnohem nižší sterilizační účinek než výboj působící přímo na vzorek, jelikož na vzorky bez sklíčka působily kromě UV záření a teploty i aktivní částice. Při přímé expozici plazmatu bylo dosaženo redukce 7 řádů již za 40 s , zatímco za stejnou dobu bylo při působení UV a teploty dosaženo redukce jen o 1 řád. Po 180 s opracovávání pod sklem jsme se finálně dopracovali k redukci o necelé 2 řády.



Obrázek č. 13: Srovnání sterilizačních účinků plazmatu a UV záření v kombinaci s teplotou při výboji generovaném v argonu ($2\,563\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$)

Obrázek č. 14 je grafickým srovnáním sterilizačních účinků plazmatu a UV záření v kombinaci s teplotou při výboji generovaném v dusíku ($2\,044\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$). Shodně jako v případě argonu bylo prokázáno, že vyšší sterilizační účinek vykazuje plazmový výboj. Při přímé expozici plazmatu bylo dosaženo redukce 7 řádů za 120 s, zatímco za stejnou dobu bylo při působení UV a teploty dosaženo redukce asi o 1 řád. Po 180 s opracovávání pod sklem bylo dosaženo redukce mikroorganismů o 2 řády.



Obrázek č. 14: Srovnání sterilizačních účinků plazmatu a UV záření v kombinaci s teplotou při výboji generovaném v dusíku ($2\,044\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$)

Jedním z důvodů nízkého účinku UV záření na spory plísně *Aspergillus niger*, je jeho vysoká odolnost vůči UV, díky jeho černé pigmentaci. Mikroorganismy se vzájemně značně liší svou odolností k účinkům UV světla, proto by bylo vhodné vyzkoušet tento vliv i na dalších mikroorganismech, které vykazují nižší odolnost vůči UV záření.

Při srovnání výsledků (obrázek č. 13 a 14) získaných při stejných podmínkách v argonu a dusíku byl vyšší sterilizační účinek pozorován v argonu. Při přímé expozici plazmatu s argonem, jako pracovním plynem, bylo dosaženo redukce 7 řádů již za 40 s, zatímco s dusíkem bylo této redukce dosaženo až za 120 s. Při působení UV záření v kombinaci s teplotou došlo při 180 s k redukci o 2 řády u obou pracovních plynů.

Z výsledků vyplývá, že UV záření a teplota se na procesu inaktivace podílí jen velmi malou měrou. Ke stejným výsledkům dospěli také např. Laroussi, Leipold nebo Deng [5, 6, 57]. Větší efektivity sterilizace bylo dosaženo přímo v plazmatu, kde navíc působí reaktivní částice. Ty by tedy mohly být hlavním mechanismem podílejícím se na inaktivaci mikroorganismů. Reaktivní částice se adsorbují na povrch mikroorganismů a dochází k leptání povrchu. Leptání bylo zkoumáno pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Volné radikály obsahující kyslík způsobují oxidaci buněčných částí jako je cytoplazmatická membrána, proteiny a DNA [4, 39].

4.3.2 Vliv teploty

Separace inaktivačního vlivu teploty od vlivu ostatních agens bylo dosaženo simulací podmínek výboje v termostatu.

Jelikož v argonu dochází k menšímu ohřevu než v dusíku (viz. tabulka č. 7), což lze také podpořit výsledky rotačních teplot (bylo zjištěno, že v případě argonu jako pracovního plynu lze vliv teploty, vzhledem k její nízké hodnotě, na inaktivaci mikroorganismů zanedbat), byly v tomto měření použity teploty naměřené mezi elektrodami při použití dusíku jako pracovního plynu.

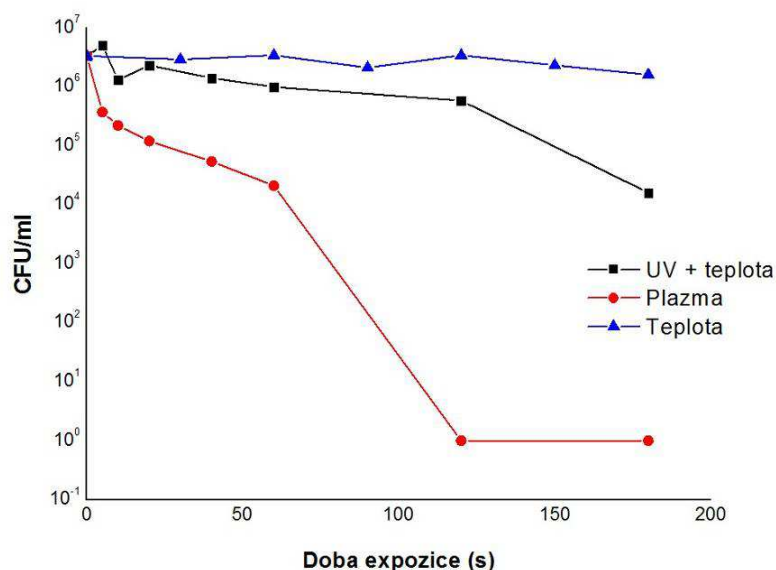
Pro přípravu vzorků byl použit stejný postup přípravy jako u vzorků opracovávaných v plazmatu. Vzorky byly umístěny v termostatu, kde byly vystaveny teplotě, která byla naměřena mezi elektrodami DBD při použití dusíku jako pracovního plynu. Počáteční teplota byla nastavena na 36 °C. Po 30 s byla z termostatu odebrána první Petriho miska se vzorky. Ostatní Petriho misky se vzorky byly odebrány po 2 minutách. Po odebrání vzorků byla naměřena teplota 32 °C (teplota se snížila po otevření termostatu). Poté byl termostat nastaven na teplotu 44 °C. Po dosažení této teploty byly vzorky vloženy zpět do termostatu. Postup byl stále stejný. Poslední vzorek byl vystaven teplotě 58 °C. Takto získané výsledky byly srovnány s výsledky dosaženými při přímé expozici plazmatem.

Tabulka č. 7: *Teploty shodné s teplotami naměřenými ve výboji generovaném v dusíku a teploty získané při měření v termostatu. Teplota 1 – teplota nastavená na termostatu, Teplota 2 – teplota získaná vždy před nastavením další teploty naměřené mezi elektrodami*

Číslo měření	Čas [s]	Teplota 1 [°C]	Teplota 2 [°C]
1	30	36	32
2	60	44	40
3	90	49	42
4	120	53	46
5	150	54	48
6	180	58	—

Na obrázku č. 15 je znázorněno srovnání sterilizačních účinků plazmatu, UV záření v kombinaci s teplotou (nelze ji eliminovat) a teploty samotné. Z grafu je patrné, že největšího sterilizačního účinku bylo dosaženo u plazmatu, jelikož při plazmovém výboji působí na mikroorganismy kromě UV záření a teploty i aktivní částice. Naopak nejmenší sterilizační účinek, ne-li téměř žádný, byl pozorován při teplotní inaktivaci. Což mohlo být způsobeno tím, že *Aspergillus niger* je schopen přežít teploty 45–47 °C [12]. I když byly tyto teploty překročeny, byla doba vystavení mikroorganismu účinkům vyšších teplot natolik krátká, že neměla žádný vliv na inaktivaci. Běžně je horkovzdušná sterilizace prováděna při teplotách 160–180 °C v časovém rozmezí 30 až 120 min. V tomto případě byl tedy vliv teploty zcela zanedbatelný. Při přímé expozici plazmatu bylo dosaženo redukce 7 řádů za 120 s, zatímco za stejnou dobu bylo při působení UV a teploty dosaženo redukce o 1 řád, vlivem teploty bylo dosaženo redukce jen o méně než 1/2 řádu. Při působení UV v kombinaci s teplotou bylo po

180 s dosaženo redukce o 2 řády, při působení jen samotné teploty bylo dosaženo redukce o 1/2 řádu.

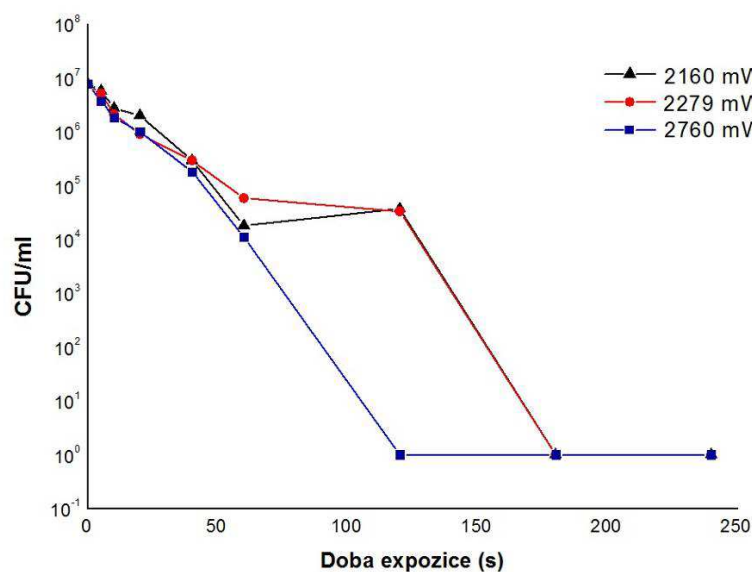


Obrázek č. 15: Srovnání sterilizačních účinků plazmatu, UV záření v kombinaci s teplotou a teploty (výboj generován v dusíku; 2 044 mW·cm⁻³)

4.4 Opracování ve vzduchu

Vzorky spor plísně *Aspergillus niger* byly vystaveny účinkům působení výboje buzeného ve vzduchu. Byly použity tři hustoty plazmového výkonu 2 160 mW·cm⁻³, 2 279 mW·cm⁻³ a 2 760 mW·cm⁻³. Vzorky byly opracovávány v časech od 0 do 240 s.

Z obrázku č. 16, na němž jsou zobrazeny inaktivační křivky v závislosti na čase a na velikosti hustoty plazmového výkonu, je patrný úbytek CFU v čase. Patrný je rovněž vliv hustoty plazmového výkonu na efektivitu sterilizace. Při použití nejnižší hustoty výkonu 2 160 mW·cm⁻³ bylo dosaženo redukce 7 řádů za 180 s. Za 180 s bylo dosaženo sterility také u výkonu 2 279 mW·cm⁻³. Z hlediska efektivity je nejvhodnější hustota výkonu 2 760 mW·cm⁻³, při níž byly všechny mikroorganismy usmrceny za 120 s. Za stejnou dobu bylo u výkonů 2 160 mW·cm⁻³ a 2 279 mW·cm⁻³ dosaženo redukce jen o 2,5 řádu, avšak po dalších 60 s expozice již došlo, u těchto dvou výkonů, k redukci o 4,5 řádu. Důvodem vyšší účinnosti sterilizace při použití vyššího plazmového výkonu může být vznik většího množství aktivních částic, které mají hlavní podíl na procesu inaktivace. Porovnáním emisních spekter, naměřených ve výboji s vyšším a nižším plazmovým výkonem, byly u vyššího výkonu zjištěny vyšší intenzity emisních čar.



Obrázek č. 16: Inaktivační křivka v závislosti na čase a použité hustotě plazmového výkonu pro suchý vzduch

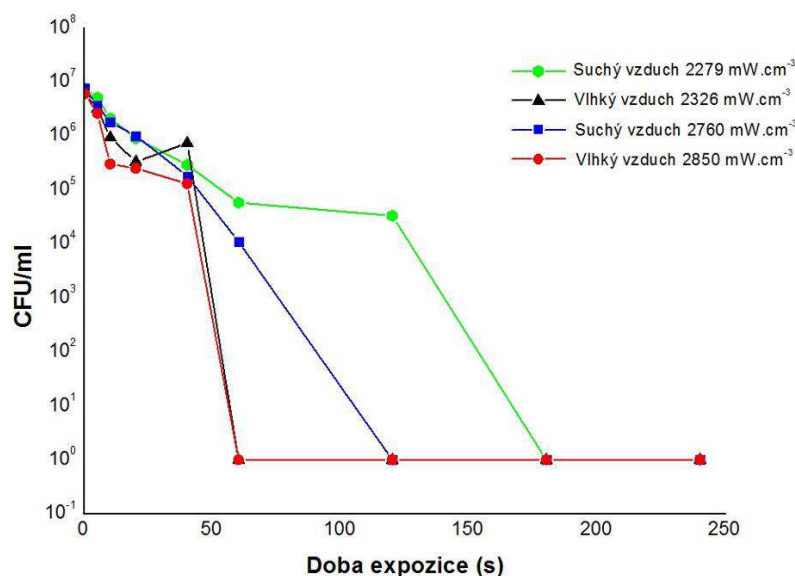
V první fázi sterilizačního procesu je počet životaschopných mikroorganismů redukován pomaleji, což je pravděpodobně způsobeno vlivem stínění, které vzniká buďto existencí více vrstev buněk a aglomerátů nebo vlastnostmi materiálu. Efekt stínění vede ke snížení penetrace aktivních částic k buněčným částem, mikroorganismy tak mají zvýšenou ochranu a jsou vůči účinkům plazmatu odolnější. Ve svých pracích se efektem stínění zabývali např. Heise a Schneider [50, 70]. V našem případě byl efekt stínění způsoben už při samotném nanášení spor, kdy byly spory na materiál naneseny pipetou (viz. obr. 8). Toto bodové nanášení nevede ke vzniku homogenní vrstvy buněk, ale aglomerátů, které vykazují vyšší odolnost vůči sterilizačnímu zásahu. Efekt stínění byl ještě zintenzivněn použitím papíru jako nosného media, v jehož pórech docházelo k zadržování spor, které byly takto uchráněny před vlivem plazmatu.

Hlavní roli při inaktivaci mikroorganismu pomocí DBD buzeného ve vzduchu hrají aktivní částice. Pomocí OES byla stanovena přítomnost volných radikálů kyslíku a dusíku (O, N₂). I když nebyla ve spektru vzduchu, vlivem velkého šumu, zaznamenána žádná emise NO-systému, není zcela vyloučen ani vliv UV záření. Navíc zde může docházet ke snížení intenzity tohoto systému díky tvorbě O₃, který může absorbovat záření při této vlnové délce. K tomuto závěru dospěl Heise ve své práci [50]. Heise zkoumal sterilizační účinky plazmatu, generovaného ve vzduchu, argonu a dusíku, na sporách plísně *Aspergillus niger* a bakterii *Bacillus subtilis*. U spor plísně *Aspergillus niger* dosáhl ve vzduchu během 24 s redukce 4 řádů, u rodu *Bacillus subtilis* došlo za tento čas ke snížení mikroorganismů jen o 1 řád. S použitím vzduchu jako pracovního plynu se mu nepodařilo dosáhnout sterility ani u jednoho typu mikroorganismu [50]. Sterilizaci mikroorganismů za použití vzduchu jako nosného plynu se zabývali také Choi a Efremov, oba potvrdili dobré inaktivační vlastnosti tohoto plynu [51, 71].

4.5 Vliv vlhkosti

Při studiu vlivu vlhkosti byly vzorky opracovávány v DBD generovaném ve vlhkém vzduchu. Vlhký vzduch je směs suchého vzduchu a určitého množství vody ve formě syté či přehřáté vodní páry. V našem experimentu byl vlhký vzduch získán pomocí promývací láhve naplněné vodou, přes kterou plyn proudil do DBD reaktoru. Z technických důvodů nebylo možné změřit stupeň vlhkosti použitého plynu. Dle tabulkových hodnot má vlhkost při teplotě 25 °C (laboratorní teplota) hodnotu $23,1 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ [72]. Vlhkost je závislá na teplotě. Teploty působící mezi elektrodami DBD buzeného ve vlhkém vzduchu byly proměřeny pomocí termočlánku (viz. kapitola 4.2). Ve vlhkém vzduchu docházelo k většímu ohřevu než u suchého vzduchu (tabulka č. 5).

Obrázek č. 17 srovnává sterilizační účinky vlhkého a suchého vzduchu. Pro lepší srovnání byly použity blízké hodnoty plazmových výkonů. Je evidentní, že vlhký vzduch má vysoké inaktivační účinky i pro nižší hustoty výkonu. Při výkonu $2\,326 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ došlo ke snížení mikrobiální kontaminace o 7 řádů za 60 s. Suchý vzduch při hustotě plazmového výkonu $2\,279 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ dosahuje za tento čas redukce 2 řádů, k úplné sterilizaci dochází po 180 s. Pokud dojde v případě suchého vzduchu ke zvýšení hustoty výkonu, vykazuje i on silnější inaktivační účinky. Při hustotě výkonu $2\,760 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ dojde k redukci o 7 řádů v čase 120 s. U vlhkého vzduchu a hustotě výkonu $2\,850 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ bylo sterility dosaženo, shodně jako v případě nižšího výkonu, za 60 s. U vlhkého vzduchu nehraje výkon žádnou roli, aspoň dle námi dosažených výsledků.

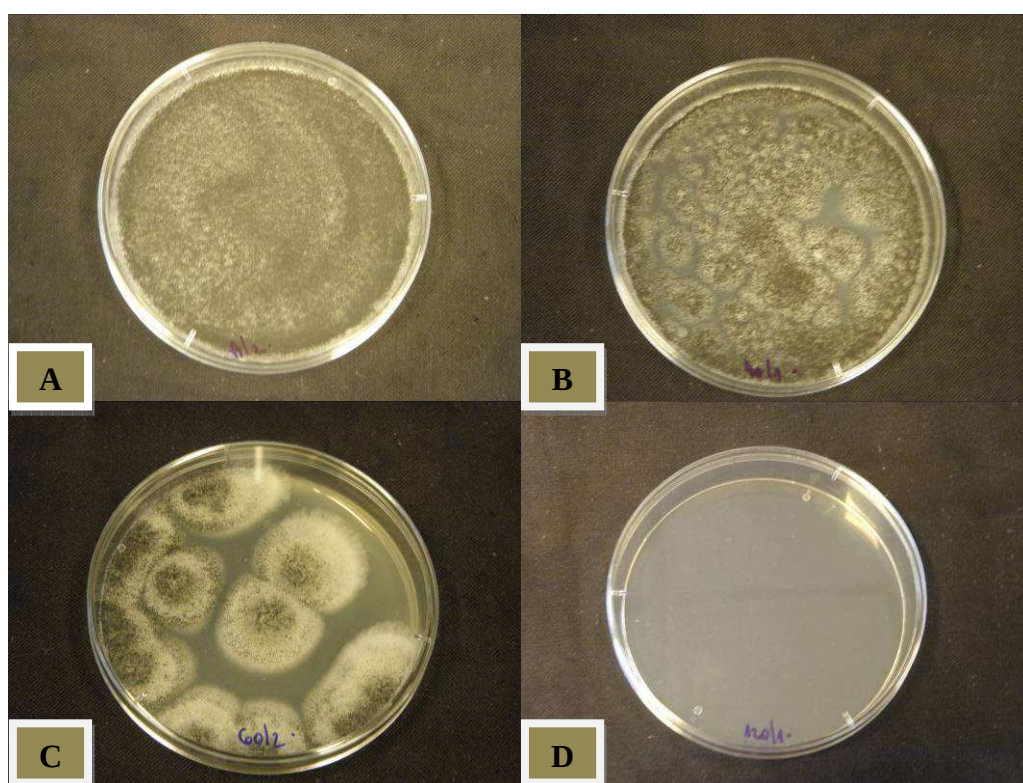


Obrázek č. 17: Srovnání sterilizačních účinků vlhkého vzduchu ($2\,326 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$, $2\,850 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$) a suchého vzduchu ($2\,279 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$, $2\,760 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$)

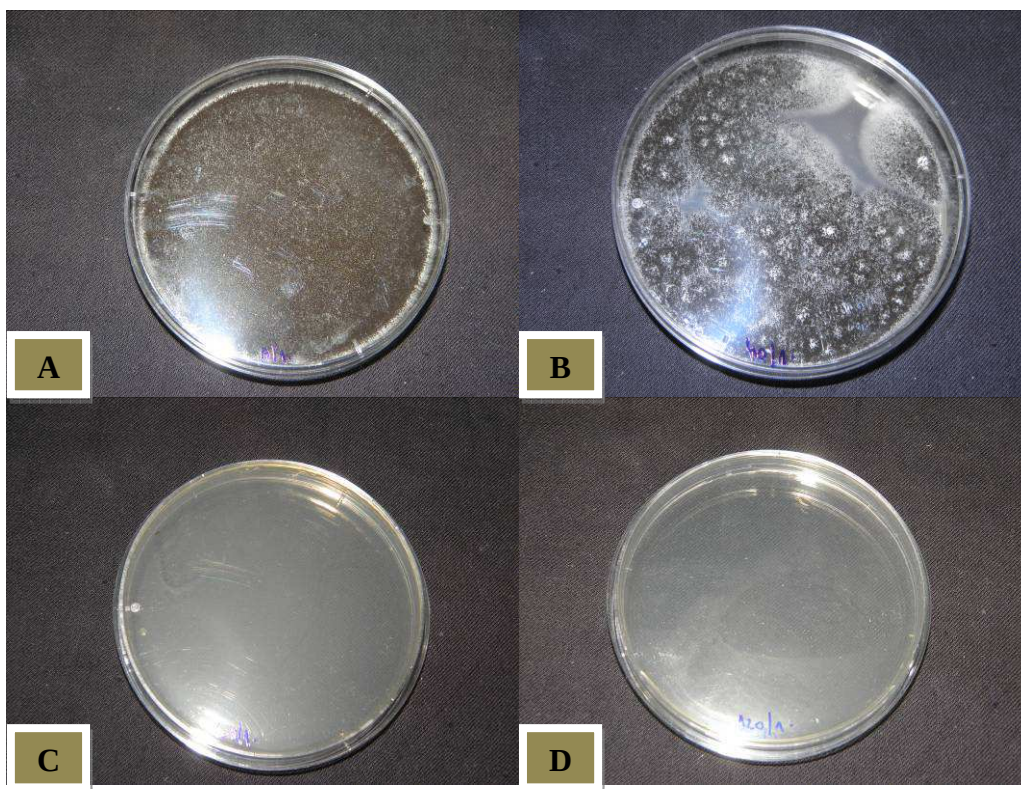
Vyššího sterilizačního účinku bylo dosaženo u vlhkého vzduchu. Pomocí optické emisní spektroskopie byla zjištěna přítomnost druhého pozitivního systému dusíku (pás 2 – 0) v oblasti 297 nm, který nebyl při analýze suchého vzduchu nalezen. Také intenzity jednotlivých druhů pozitivního systému dusíku byly mnohem vyšší než u suchého vzduchu.

Díky přítomné vlhkosti byl posílen účinek aktivních částic. Nejvyšší sterilizační účinek je obecně prisuzován OH-systému (309 nm), nicméně v našem případě k žádné emisi v této oblasti nedocházelo, OH-systém nebyl identifikován. Ke stejnému výsledku při analýze spekter dospěl také Kikuchi, který rovněž prokázal u vlhkého vzduchu vyšší intenzity druhého pozitivního systému dusíku a očekával přítomnost OH-systému, ale pomocí OES se mu žádnou emisi nepodařilo zaznamenat [73]. Kikuchi studoval sterilizační účinek DBD na mikroorganismu *Bacillus atrophaeus* při generaci ve vzduchu o různém stupni vlhkosti. Zjistil, že i malé zvýšení vlhkosti má dramatický vliv na účinnost sterilizace, jelikož s rostoucím stupněm vlhkosti roste i inaktivační účinek aktivních částic [73].

Obrázky č. 18 a 19 slouží k porovnání přeživších kolonií *Aspergillus niger*, které byly vystaveny působení DBD buzeného v suchém a vlhkém vzduchu po dobu 0, 40, 60 a 120 s.



Obrázek č. 18: Porovnání přeživších kolonií *Aspergillus niger* v časech (výboj generován v suchém vzduchu, $2\,760\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$): A) 0 s, nepočitatelné množství CFU; B) 40 s, 67 CFU; C) 60 s, 11 CFU; D) 120 s, 0 CFU



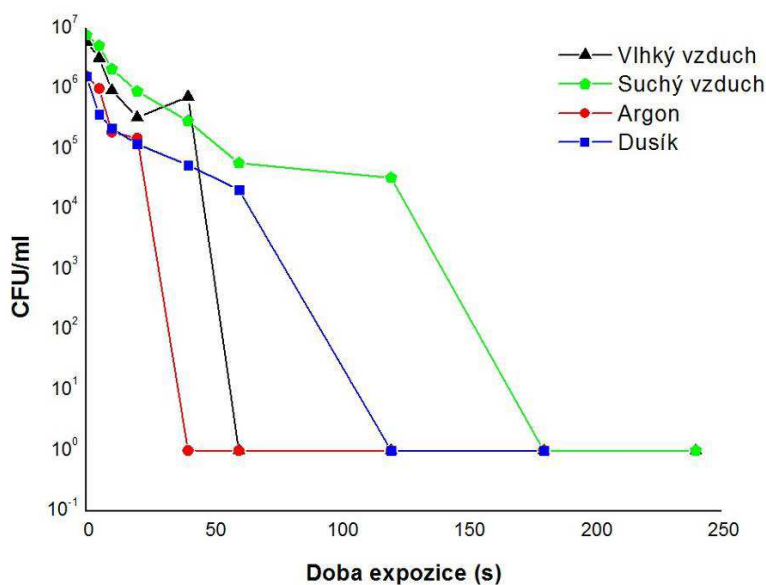
Obrázek č. 19: Porovnání přeživších kolonií *Aspergillus niger* v časech (výboj generován ve vlhkém vzduchu, $2\,850\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$): A) 0 s, nepočitatelné množství CFU; B) 40 s, 71 CFU; C) 60 s, 0 CFU; D) 120 s, 0 CFU

4.6 Srovnání pracovních plynů

V předchozí práci [8] byly zkoumány sterilizační účinky výboje buzeného v argonu a dusíku. Tato diplomová práce na předešlou práci navazuje měřením ve vzduchu. Srovnání dosažených výsledků pro jednotlivé pracovní plyny je zobrazeno na obrázku č. 20. Až na zvolený pracovní plyn byly vzorky opracovávány za stejných experimentálních podmínek. Všechny vzorky byly opracovávány v časech 5, 10, 20, 40, 60, 120 a 180 s, jen v případě vzduchu se expoziční čas zvýšil ještě o dalších 60 s. Vzdálenost mezi elektrodami byla 3 mm, vložené napětí 70 V, právě při použití tohoto napětí bylo v předešlých měřeních s argonem a dusíkem dosahováno nejlepších sterilizačních účinků (viz. [8, 67]). Aby byly výsledky srovnatelné, bylo toto napětí použito i v případě vzduchu. Použité hustoty výkonů byly $2\,279\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ (pro suchý vzduch), $2\,326\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ (pro vlhký vzduch), $2\,563\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ (pro argon) a $2\,044\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ (pro dusík).

Z grafu je patrné, že největšího inaktivačního účinku bylo dosaženo při použití argonu jako pracovního plynu, kdy došlo k úplné sterilizaci již za 40 s. V tomto čase bylo u vlhkého vzduchu dosaženo redukce pouze o 1,5 řádů, u dusíku se počet mikroorganismů snížil o 2 řády a v případě suchého vzduchu byla zaznamenána redukce o 1 řád. U vlhkého vzduchu došlo k inaktivaci o 7 řádů za 60 s. V případě dusíku bylo dosaženo sterility po 120 s. U suchého vzduchu byl zaznamenán nejnižší sterilizační účinek, inaktivace o 7 řádů bylo dosaženo až po 180 s. Jak již bylo zmíněno v kapitole 4.3. Heise se věnoval sterilizačním

účinkům plazmatu buzeného v argonu, dusíku a vzduchu [50]. Dosahoval různých výsledků pro různé mikroorganismy. Při inaktivaci bakterie *Bacillus subtilis* klesal sterilizační účinek v řadě argon, dusík a vzduch, k úplné sterilizaci tohoto mikroorganismu nedošlo v uvedeném experimentu nikdy. V případě spor plísně *Aspergillus niger* byl nejlepší sterilizační účinek zaznamenán v argonu, kdy došlo k úplné inaktivaci mikroorganismů, poté následoval dusík a vzduch. Autor také uvádí, že vlhký vzduch by mohl mít lepší inaktivační účinky než vzduch suchý [50]. Zatímco u nás převládají aktivní částice, Heise prokázal ve svém výboji výrazný vliv UV záření.



Obrázek č. 20: Srovnání sterilizačních účinků vlhkého vzduchu ($2\,326\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$), suchého vzduchu ($2\,279\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$), argonu ($2\,563\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$) a dusíku ($2\,044\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$)

To že argon dosahuje lepších sterilizačních účinků než vzduch a dusík bylo vysvětleno i pomocí výsledků získaných při OES. Na inaktivaci v argonu se podílely především OH radikály. Ve spektru argonu byly identifikovány silné emise kolem 308 nm. OH-systém byl identifikován také ve spektru dusíku, jeho intenzita však nebyla tak velká. V případě vlhkého a suchého vzduchu nebyla přítomnost OH radikálů zjištěna, byly zde ale identifikovány radikály atomárního kyslíku, které hrají při inaktivaci rovněž velkou roli, stejně tak vznikající O_3 .

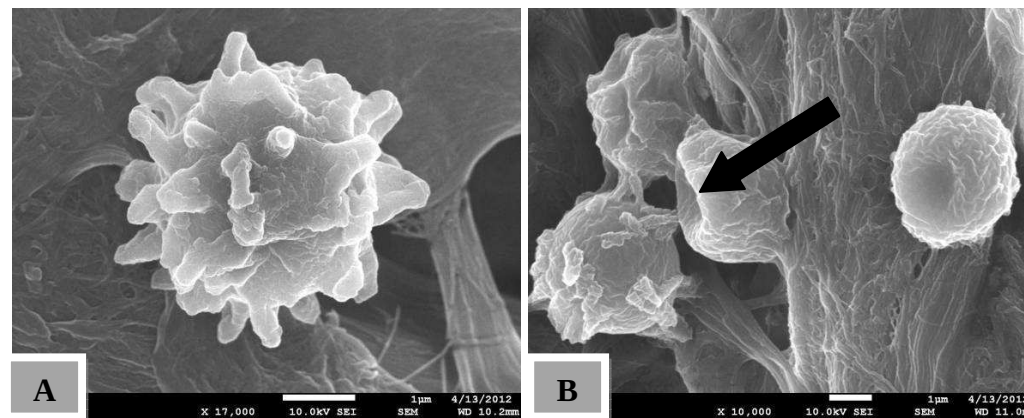
Zajímavá je podobnost inaktivačních křivek suchého vzduchu s dusíkem a vlhkého vzduchu s argonem. Podobnost křivek by mohla ukazovat na podobné procesy probíhající během sterilizace. Ve spektru dusíku byla objevena emise pásu NO, která poukazuje na přítomnost UVC záření, avšak konkrétní měření ukázaly, že je vliv UV záření na inaktivaci velmi malý. Přesto však můžeme předpokládat, že v dusíku má na inaktivaci vliv z části i UV záření. I když v suchém vzduchu nebyly emise systému NO identifikovány, což mohlo být způsobeno vzniklým šumem, může hrát i v případě suchého vzduchu při inaktivaci menší roli UV záření. U vlhkého vzduchu stejně tak jako u argonu mají na inaktivaci vliv především aktivní částice.

4.7 SEM

Pomocí skenovací elektronové mikroskopie byla sledována míra poškození modelového mikroorganismu *Aspergillus niger* vystaveného působení DBD a účinek plazmatu na strukturu nosného materiálu.

Při studiu vlivu plazmatu na spory *Aspergillus niger* byl použit vzorek, který účinkům plazmatu vystaven nebyl, obsahoval tedy nepoškozené spory. Druhý vzorek byl vystaven účinkům plazmatu po dobu 180 s, tedy po dobu, kdy již byly všechny mikroorganismy inaktivovány, spory tedy byly vlivem účinků plazmatu poškozeny. Nosným materiálem byl papír Whatman No. 1 a PET. Výboj byl buzen v suchém a vlhkém vzduchu.

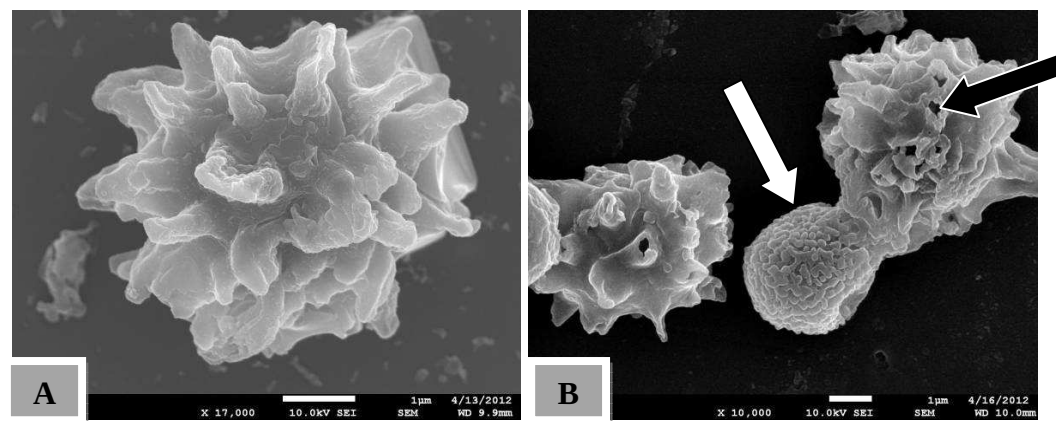
Obrázek č. 21 srovnává spory plísně, které nebyly vystaveny účinkům plazmatu se sporami vystavenými působení DBD po dobu 180 s, jako nosný materiál sloužil papír. Spora, jež nebyla účinkům plazmatu vystavena, byla pokryta bradavčitými konidiemi. Po vystavení spory účinkům DBD byly tyto bradavčité výstupky odstraněny, dále byly na buněčné stěně patrné nerovnosti a vypoukliny. Toto ovšem neodpovídá výsledku, který byl očekáván na základě studií jiných autorů. Na snímcích, které ve své práci zveřejnil např. Raballand je poškození buněčné stěny plísně *Aspergillus niger* více patrné [74]. To však může být zapříčiněno tím, že autor použil jako pracovní plyn argon a argon s příměsí kyslíku, který vykazuje větší inaktivační účinek, dalším z důvodů může být použití plastového nosného média (absence ochranného efektu) nebo vyššího expozičního času (60 min) a také to, že autor pracuje s nízkotlakým výbojem. Při opracovávání spor na papíru nebylo pozorováno protržení buněčné stěny, je tedy možné, že pórovitost papíru může vůči mikroorganismům vykazovat ochranný efekt. Mikroorganismus může být vlivem pórovitosti papíru zachycen uvnitř materiálu, čímž dochází k omezení kontaktu spor s plazmatem, výsledkem čehož je nižší účinek plazmové sterilizace.



Obrázek č. 21: Spory *Aspergillus niger*: A) před vystavením účinkům DBD, B) po 180 s působení výboje generovaného v suchém vzduchu; nosný materiál papír Whatman No. 1

Obrázek č. 22 srovnává spory plísně, která nebyla vystavena účinkům plazmatu se sporou vystavenou působení DBD po dobu 180 s, v tomto případě jako nosný materiál sloužil PET. Po vystavení spory účinkům DBD bylo u některých buněk rovněž patrné odstranění bradavčitých výstupků, u dalších buněk už však bylo patrné i narušení buněčné stěny. Díky

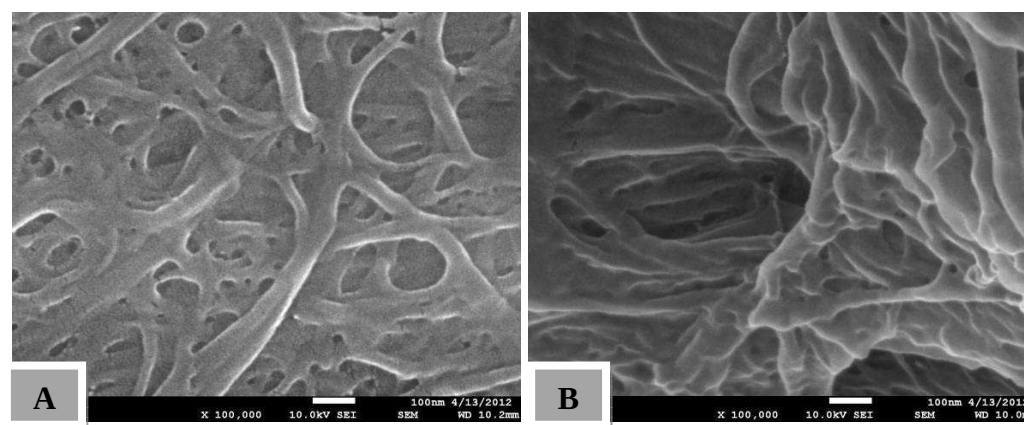
hladkému celistvému povrchu PET není mikroorganismům umožněno schovat se před působením výboje.



Obrázek č. 22: Spory *Aspergillus niger*: A) před vystavením účinkům DBD, B) po 180 s působení výboje generovaného v suchém vzduchu; nosný materiál PET; bílá šipka – buňka bez konidií, černá šipka – protržení buňky

Snímky SEM jsou důkazem poškození buněčné stěny plísně *Aspergillus niger*, které je zapříčiněno působením reaktivních částic generovaných v plazmatu. Důsledkem jejich působení je leptání buněčné stěny mikroorganismu. Rozdíl mezi poškozením mikroorganismu, způsobeném při opracovávání ve výboji buzeném v suchém vzduchu a při použití výboje buzeného ve vlhkém vzduchu, nebyl zaznamenán. V obou případech bylo poškození buněk srovnatelné.

Při studiu vlivu DBD na nosný materiál byla analyzována struktura filtračního papíru Whatman No. 1 a polymeru (PET), na kterých byly naneseny vzorky (viz. obr. 23 a 24). U papíru, jenž nebyl vystaven působení DBD, jsou ve struktuře patrná hladká vlákna celulózy. Při sledování struktury papíru, který byl podroben účinkům plazmatu po dobu 180 s, nejsou na vláknech patrné žádné změny. Plazma evidentně nijak nenarušuje strukturu papíru. K tomuto výsledku dospěli také Laguardia a Vohrer, kteří se zabývají potenciálním využitím plazmové sterilizace při péči o archiválie [75, 76].

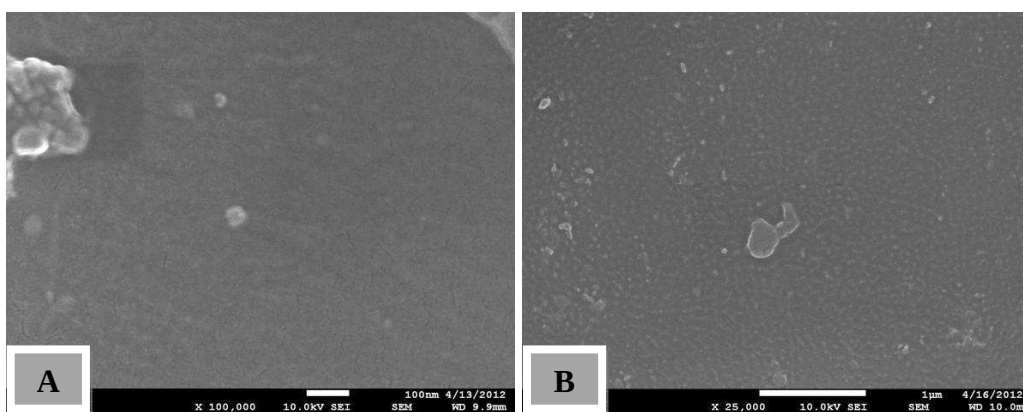


Obrázek č. 23: Struktura papíru: A) před působením DBD, B) po vystavení účinkům plazmatu buzeného v suchém vzduchu po dobu 180 s

Obrázek č. 23 dokládá, že působení výboje buzeného v suchém vzduchu v našem experimentu nemá na strukturu papíru žádné destruktivní účinky. To že nemá působení plazmatu na vlastnosti papíru žádný vliv, bychom však mohli s jistotou říct až po provedení dalších testů (testy mechanických a optických vlastností papíru) a vystavení papíru podmínkám umělého stárnutí.

Z obrázku č. 24 je patrné, že polymer, který nebyl vystaven účinkům plazmatu, měl hladký celistvý povrch. U polymeru, který byl po dobu 180 s opracováván v DBD, byla na povrchu viditelná přítomnost drobných důlků. Gadri píše ve své práci, že DBD může na povrchu polymerů způsobovat tzv. důlkovou korozi [77]. Tato koroze byla prokázána i v našem případě.

U vzorků polymeru opracovávaných v DBD buzeném v suchém vzduchu bylo sledováno stejné poškození nosného média jako u vzorků podrobených působení DBD, který byl generován ve vzduchu vlhkém. V případě poškození nosného materiálu (PET) plazmatem, tedy nehrála vlhkost žádnou roli.



Obrázek č. 24: *Struktura PET folie: A) před působením DBD, B) po vystavení účinkům plazmatu buzeného v suchém vzduchu po dobu 180 s*

5 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo studium vlivu vlhkosti na celkový sterilizační účinek dielektrického bariérového výboje. Byly studovány sterilizační účinky DBD na modelovém mikroorganismu při generaci v plynech bez přítomnosti vlhkosti (suchý vzduch, argon, dusík) a s přítomností vlhkosti (vlhký vzduch). Zvoleným modelovým mikroorganismem byly spory plísně *Aspergillus niger*. Tento mikroorganismus vykazuje zvýšenou odolnost vůči UV záření, které je jednou ze složek inaktivačního procesu. Dalšími složkami jsou aktivní částice a teplota. Studium inaktivačních účinků teploty a UV záření bylo provedeno pomocí výboje buzeného v argonu a dusíku.

Teoretická část je věnována rozboru standardních sterilizačních postupů, plazmové sterilizaci a plazmatu. Dále je zde popsán princip dielektrického bariérového výboje a jeho využití při sterilizaci mikroorganismů. Rovněž jsou zde popsány analytické metody používané k vyhodnocení experimentů, tedy optická emisní spektroskopie a skenovací elektronová mikroskopie.

Experimentální část popisuje experimentální zařízení, veškeré námi používané mikrobiologické postupy a postup při opracovávání vzorků.

V této práci byl pro opracování vzorků použit dielektrický bariérový výboj pracující za atmosférického tlaku. Výboj byl generován v suchém a vlhkém vzduchu. Hustota výkonu dodávaného do plazmatu byla $2\,160\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$, $2\,279\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ a $2\,760\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ pro suchý vzduch a $2\,326\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ a $2\,850\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ pro vlhký vzduch. Nosným materiálem byl papír typu Whatman No. 1. Každá série vzorků byla opracovávána vždy v časech od 5 do 240 s. Při studii vlhkosti bylo jako první provedeno měření s použitím suchého vzduchu. U nejnižší hustoty výkonu $2\,160\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ bylo dosaženo redukce 7 řádů za 180 s. Za 180 s bylo dosaženo sterility také u výkonu $2\,279\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$. Z hlediska efektivity je nejvhodnější hustota výkonu $2\,760\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$, při níž byly všechny mikroorganismy usmrceny za 120 s. Za stejnou dobu bylo u výkonů $2\,160\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ a $2\,279\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ dosaženo redukce jen o 2,5 řádu.

Při studii vlivu vlhkosti byly vzorky opracovávány v DBD generovaném ve vlhkém vzduchu. Vlhký vzduch byl získán pomocí promývací láhve naplněné vodou, přes kterou plyn proudil do DBD reaktoru. Při srovnání sterilizačních účinků vlhkého a suchého vzduchu bylo evidentní, že vlhký vzduch má vysoké inaktivační účinky i pro nižší hustoty výkonu. Při výkonu $2\,326\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ došlo ke snížení počtu spor *Aspergillus niger* o 7 řádů za 60 s. Suchý vzduch při hustotě plazmového výkonu $2\,279\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ dosahuje za tento čas redukce 2 řádů, k úplné sterilizaci dochází po 180 s. V případě suchého vzduchu a vyšší hustoty výkonu $2\,760\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ dojde k redukci o 7 řádů v čase 120 s. U vlhkého vzduchu a hustotě výkonu $2\,850\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$ bylo sterility dosaženo, shodně jako v případě nižšího výkonu, za 60 s. Dle našich výsledků byl vyšší sterilizační účinek prokázán u vlhkého vzduchu.

V předchozí práci [8] byl studován vliv teploty a UV záření na celkový sterilizační účinek dielektrického bariérového výboje. DBD byl buzen v argonu ($2\,563\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$) a dusíku ($2\,044\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-3}$). Největšího sterilizačního účinku bylo dosaženo u plazmatu, jelikož při plazmovém výboji působí na mikroorganismy kromě UV záření a teploty i aktivní částice. Naopak nejmenší sterilizační účinek, ne-li téměř žádný, byl pozorován při teplotní inaktivaci. Co se týče pracovních plynů, vyšší inaktivační účinek vykazoval argon. Na tyto výsledky

jsme navázali v diplomové práci měřením ve vzduchu (suchý/vlhký). Srovnáním dosažených výsledků pro jednotlivé pracovní plyny bylo zjištěno, že největšího inaktivačního účinku bylo dosaženo při použití argonu, kdy došlo k úplné sterilizaci již za 40 s. V tomto čase bylo u vlhkého vzduchu dosaženo redukce pouze o 1,5 řádů, u dusíku se počet mikroorganismů snížil o 2 řády a v případě suchého vzduchu byla zaznamenána redukce o 1 řád. U vlhkého vzduchu došlo k inaktivaci o 7 řádů za 60 s. V případě dusíku bylo dosaženo sterility po 120 s. U suchého vzduchu byl zaznamenán nejnižší sterilizační účinek, úplné sterility bylo dosaženo až po 180 s.

Pro lepší pochopení dějů probíhajících ve výboji byla provedena diagnostika plazmatu s použitím optické emisní spektroskopie. Pomocí OES byla ve vzduchu stanovena přítomnost volných radikálů kyslíku a dusíku (O , N_2). Ačkoliv byla předpokládána i přítomnost OH-systému a $NO\gamma$ -systému, nepodařilo se je detekovat. Ve spektru argonu byly identifikovány radikály dusíku, kyslíku a OH-systém. OH-systém a radikály dusíku byly identifikovány také ve spektru dusíku, kde se navíc nacházely i čáry UV oblasti (200–300 nm).

Pomocí termočlánku byly zjištěny teplotních poměry v použitém DBD. Srovnáním výsledků, naměřených za použití jednotlivých pracovních plynů, bylo zjištěno, že k nejvyššímu ohřevu dochází u vlhkého vzduchu, následuje suchý vzduch a dusík. Nejnižšího ohřevu bylo dosaženo u argonu.

Pomocí skenovací elektronové mikroskopie byl sledován vliv působení plazmatu na buněčnou stěnu spor *Aspergillus niger* i na nosný materiál (papír, PET). Byly srovnány vzorky, které nebyly vystaveny účinkům plazmatu a vzorky opracováváné DBD výbojem (generace v suchém i vlhkém vzduchu) po dobu 180 s. Snímky SEM jsou důkazem poškození buněčné stěny plísně *Aspergillus niger*, které je zapříčiněno působením reaktivních částic generovaných v plazmatu. Při studiu vlivu DBD na nosný materiál byla analyzována struktura filtračního papíru Whatman No. 1 a polymeru (PET), na kterých byly naneseny vzorky. V případě papíru nebyly po expozici plazmatem zaznamenány žádné změny. Plazma evidentně nijak nenarušuje strukturu papíru. To že nemá působení plazmatu na vlastnosti papíru žádný vliv, bychom však mohli s jistotou říct až po provedení dalších testů a vystavení papíru podmínkám umělého stárnutí. U polymeru, který byl po dobu 180 s opracováván v DBD, byla na povrchu zaznamenána tzv. důlková koroze.

Z výsledků je patrné, že plazmová sterilizace za atmosférického tlaku je účinnou alternativou pro sterilizaci běžných materiálů.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. Šilhánková, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vyd. Praha: Academia, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
2. Machala, Z.: Plazma a živé organizmy. *Československý časopis pro fyziku*, 2009, roč. 59, č. 6, s. 370–376. ISSN 0009-0700.
3. Veselá, M.: *Praktikum z obecné mikrobiologie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, 2004, 100 s. ISBN 80-214-2567-9.
4. Moisan, M., et al.: Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, vol. 226, pp. 1–21. ISSN 0378-5173.
5. Laroussi, M.: Low temperature plasma-based sterilization: overview and state-of-the-art. *Plasma Processes and Polymers*, 2005, vol. 2, pp. 391–400. ISSN 16128850.
6. Laroussi, M., Leipold, F.: Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2004, vol. 233, pp. 81–86. ISSN 1387-3806.
7. Muranyi, P., et al.: Sterilization efficiency of a cascaded dielectric barrier discharge. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, vol. 103, pp. 1535–1544. ISSN 1364-5072.
8. Kramářová, P.: *Studium vlivu teploty a UV záření na celkový sterilizační účinek dielektrického bariérového výboje*. Brno, 2010, 44 s. Bakalářská práce na Chemické fakultě Vysokého učení technického v Brně na Ústavu fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí bakalářské práce Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.
9. Fyziologie mikroorganismů [online]. 2008 [cit. 9. 2. 2012]. Dostupné z: <<http://fzp.ujep.cz/~trogl/6Fyziologie.pdf>>.
10. Rosypal, S., Nermut, M., Hoďák, K.: *Biologie bakterií*. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1966, 239 s.
11. Votava, M.: *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přepracované vyd. Brno: Neptun, 2005, 347 s. ISBN 80-86850-00-5.
12. Projekt OP RLZ Opatření 3.3-0212: 2007. Distanční text. Potravinářská mikrobiologie II – Vnější faktory a jejich vliv na jakost potravin. Praha: CEPAC MORAVA, 2007. 77 s.
13. Ambrožová, J.: *Mikrobiologie v technologii vod*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2004. 244 s. ISBN 80-7080-534-X.
14. Vacík, J.: *Přehled středoškolské chemie*. 3. vyd. Praha: SPN akciová společnost, 1995. 365 s. ISBN 80-85937-08-5.
15. Hubáček, Z.: Praktické uplatnění a kontrola účinnosti sterilizace etylenoxidem. *Nové Vademecum sterilizace*, 2005, Č. 3, s. 6–9.
16. Hubáček, Z.: Fyzikální aspekty chemické sterilizace. *Nové Vademecum sterilizace*, 2006, Č. 2, s. 10–13.

17. Formaldehyd [online]. 2008 [cit. 10. 2. 2010]. Dostupné z: <<http://www.irz.cz/latky/formaldehyd>>.
18. Úskalí používání formaldehydu ve zdravotnických zařízeních. *Nemocniční speciál*, 2007, Č. 9, s. 1.
19. Ramon, J. P.: Formaldehydový sterilizátor Matachana 130 LF. *Nové Vademecum sterilizace*, 2006, Č. 2, s. 8.
20. Křivonoska, P.: Bezpečná a spolehlivá sterilizace formaldehydem. *Nové Vademecum sterilizace*, 2009, Č. 3, s. 10–12.
21. Bruchanov, M.: *Plazmová sterilizace*, Fyzikální metody v medicíně II., 2005.
22. Rosina, J., Kolářová, H., Stanek, J.: *Biofyzika pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2006, 232 s. ISBN 80-247-1383-7.
23. Stach, V.: *Plazma – čtvrté skupenství hmoty*. 1.vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1989, 96 s.
24. Nízkoteplotní plazmová sterilizace – revoluční technologie. *Nemocniční speciál*, 2007, Č. 1, s. 1.
25. Kracík, J., Tobíáš, J.: *Fyzika plazmatu*. 1. vyd. Praha: Akademia, 1966, 260 s.
26. Krčma, F.: Plazma za sníženého tlaku, vlastnosti a aplikace. *Zpravodaj České vakuové společnosti*, 2006, Č. 1-2, s. 2–6.
27. Kozáková, Z.: *Plazmochemie I*, výukový materiál Ústavu fyzikální a spotřební chemie Fakulty chemické VUT v Brně, 2009.
28. Hollahan, J. R., Alexis, T.: *Techniques and Applications of Plasma Chemistry*. New York: A Wiley-Interscience publication, 1974. 403 p. ISBN 0-471-40628-7.
29. Martišoviš, V.: *Základy fyziky plazmatu*. 1. vyd. Bratislava: Univerzita Komenského, 2006, 189 s. ISBN 80-223-1983-X
30. Libra, M., Kluiber, Z.: Plazma je všude kolem nás. *Světlo časopis pro světelnou techniku a osvětlování* [online]. 2001, [cit. 21. 2. 2012]. Dostupné z: <http://www.odbornecasopisy.cz/index.php?id_document=22863>.
31. Chen, F.: *Úvod do fyziky plazmatu*. 1. vyd. .Praha: Academia, 1984, 328 s.
32. Plško, E., Kanický, V., Toman, J. a kol.: *Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem*. 1. vyd. Český Těšín: 2 THETA, 1994, 230 s.
33. Bittencourt, J. A.: *Fundamentals of Plasma Physics*. 3rd ed. New York: Springer, 2004, 678 p. ISBN 0-387-20975-1.
34. Úvod do fyziky plazmatu [online]. 1999 [cit. 15. 2. 2010]. Dostupné z: <<http://atrey.karlin.mff.cuni.cz/~marble/d/?p=0>>.
35. Aubrecht, V.: *Technické aplikace plazmatu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, 2003, 25 s. ISBN 80-214-2517-2.

36. Zajíčková, L.: *PECVD a opracování povrchu materiálů v nízkotlakých výbojích*, oficiální výukový materiál Katedry fyzikální elektroniky Přírodovědecké fakulty MU v Brně, 2003.
37. Kříha, V., Pekárek, S., Hanitz, F., Bálek, R.: *Netermální plazmatické metody rozkladu škodlivin*, vědecká práce Katedry fyziky Elektrotechnické fakulty ČVUT v Praze, 2000.
38. Moisan, M., et al.: Plasma sterilization: Methods and mechanisms. *Pure and Applied Chemistry*, 2002, vol. 74, pp. 349–358. ISSN 0033-4545
39. Boudam, M., et al.: Bacterial spore inactivation by atmospheric-pressure plasmas in the presence or absence of UV photons as obtained with the same gas mixture. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2006, vol. 39, pp. 3494–3507. ISSN 0022-3727.
40. Laroussi, M., Mendis, D. A., Rosenberg, M.: Plasma interaction with microbes. *New Journal of Physics*, 2003, vol. 5, pp. 41.1–41.10. ISSN 1367-2630.
41. Lerouge, S., Wertheimer, M. R., Yahia L'H.: Plasma sterilization: A Review of parameters, mechanisms, and limitations. *Plasmas and Polymers*, 2001, vol. 6, pp. 175–188. ISSN 0900-0175.
42. Čavojská, V.: *Princip plazmové sterilizace* [online]. 2007 [cit. 25. 2. 2010]. Dostupné z: <<http://www.steripak.cz/cs/pristroje/princip-plazmove-sterilizace.html>>.
43. Sterrad [online]. 2010 [cit. 26. 2. 2010]. Dostupné z: <http://www.aspj.com/About_A-SP/>.
44. Kogelschatz, U.: Dielectric-barrier discharges: their history, discharge physics, and industrial applications. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 2003, vol. 23, no. 1, pp. 1–46. ISSN 0272-4324.
45. Xueji, X.: Dielectric barrier discharge – properties and applications. *Thin Solid Films*, 2001, vol. 390, pp. 237–247. ISSN 0040-6090.
46. Wagner, H. E., et al.: The barrier discharge: basic properties and applications to surface treatment. *Vacuum*, 2003, vol. 71, pp. 417–436. ISSN 0042-207X.
47. Kogelschatz, U., et al.: Dielectric-barrier discharges. Principle and applications *Journal de Physique*, 1997, vol. 7, pp. C4.47–C4.66. ISSN 1155-4339.
48. Laroussi, M.: Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: review, analysis, and prospects. *Transactions on Plasma Science*, 2002, vol. 30, pp. 1409–1415. ISSN 0093-3813.
49. Trompeter, F. J., et al.: Reduction of *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger* spores using nonthermal atmospheric gas discharges. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 2002, vol. 30, pp. 1416–1423. ISSN 0093-3813.
50. Heise, M., et al.: Sterilization of polymer foils with dielectric barrier discharges at atmospheric pressure. *Plasmas and Polymers*, 2004, vol. 9, pp. 23–33. ISSN 1084-0184.
51. Choi, J. H., et al.: Analysis of sterilization effect by pulsed dielectric barrier discharge. *Journal of Electrostatics*, 2005, vol. 64, pp. 17–22. ISSN 0304-3886.
52. Xu, L., et al.: Experimental study and sterilizing application of atmospheric pressure plasmas. *Thin Solid Films*, 2005, 506–507, pp. 400–403. ISSN 0040-6090.

53. Fridman, G., et al.: Comparison of direct and indirect effects of non-thermal atmospheric-pressure plasma on bacteria. *Plasma Processes and Polymers*, 2007, vol. 4, pp. 370–375. ISSN 1612-8869.
54. Eto, H., et al.: Low-temperature internal sterilization of medical plastic tubes using a linear dielectric barrier discharge. *Plasma Processes and Polymers*, 2008, vol. 5, pp. 269–274. ISSN 1612-8869.
55. Hong, Y. F., et al.: Sterilization effect of atmospheric plasma on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* endospores. *Letters in Applied Microbiology*, 2008, vol. 48, pp. 498–503. ISSN 0266-8254.
56. Shi, X. M., et al.: Research on the inactivation effect of low-temperature plasma on *Candida albicans*. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 2008, vol. 36, pp. 33–37. ISSN 0093-3813.
57. Deng, S., et al.: *Bacillus subtilis* devitalization mechanism of atmosphere pressure plasma jet. *Current Applied Physics*, 2010, vol. 10, pp. 1164–1168. ISSN 1567-1739.
58. Kostov, K. G., et al.: Bacterial sterilization by a dielectric barrier discharge (DBD) in air. *Surface and Coatings Technology*, 2010, vol. 204, pp. 2954–2959. ISSN 0257-8972.
59. Leipold, F., et al.: Decontamination of a rotating cutting tool during operation by means of atmospheric pressure plasmas. *Food Control*, 2010, vol. 21, pp. 1194–1198. ISSN 0956-7135.
60. Poiata, A., et al.: Microorganism response to atmospheric pressure helium plasma DBD treatment. *Journal of Electrostatics*, 2010, vol. 68, pp. 128–131. ISSN 0304-3886.
61. Stužka, V.: *Analytická atomová optická spektrometrie*. 2. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, 2000, 81 s. ISBN 80-244-0206-8.
62. Krčma, F.: *Optická emisní spektroskopie plazmatu*, výukový materiál Ústavu fyzikální a spotřební chemie Fakulty chemické VUT v Brně, 2007.
63. Juračka, P. J., Nebesařová, J.: *Moderní zobrazovací metody v biologii*. Ostrava: Ostravská Univerzita, 2010, 18 s.
64. Šafářová, K.: *Skenovací (rastrovací) elektronová mikroskopie* [online]. 2009 [cit. 2. 3. 2012]. Dostupné z: < http://nanosystemy.upol.cz/upload/18/safarova_sem.pdf >.
65. Havlíček P.: *Design elektronového mikroskopu*. Brno, 2011, 85 s. Diplomová práce na Fakultě strojního inženýrství Vysokého učení technického v Brně na Ústavu konstruování. Vedoucí diplomové práce doc. akad. soch. Miroslav Zvonek, Art. D.
66. Betina, V. a kol.: *Mikrobiologické laboratorne metody*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1988, 544 s.
67. Vojkovská, H.: *Studium sterilizačního účinku dielektrického barierového výboje na eukaryotní mikroorganismy*. Brno, 2009, 46 s. Bakalářská práce na Chemické fakultě Vysokého učení technického v Brně na Ústavu chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí bakalářské práce Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.

68. Brandenburg, R., et al.: Antimicrobial treatment of heat sensitive materials by means of atmospheric pressure Rf-driven plasma jet. *Contributions to Plasma Physics*, 2007, vol. 47, pp. 72–79. ISSN 0863-1042.
69. Sato, T., et al.: Generation and transport mechanisms of chemical species by a post-discharge flow for inactivation of bacteria. *New Journal of Physics*, 2009, vol. 11, pp. 1–12. ISSN 1367-2630.
70. Schneider, J., et al.: Investigation of the practicability of low-pressure microwave plasmas in the sterilisation of food packaging materials at industrial level. *Surface a Coatings Technology*, 2005, vol. 200, pp. 962–966. ISSN 0257-8972.
71. Efremov, N. M., et al.: Action of a self-sustained glow discharge in atmospheric pressure air on biological objects. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 2000, vol. 28, pp. 238–241. ISSN 0093-3813.
72. Měření vlhkosti vzduchu [online]. 2006 [cit. 30. 4. 2012]. Dostupné z: <<http://www.micro.feld.cvut.cz/home/X34SES/cviceni/Navody%20na%20cviceni/07.Mereni%20vlhkosti.pdf>>.
73. Kikuchi, Y., et al.: *Dependence of sterilization efficiency on humidity in atmospheric humid air plasmas* [online]. 2009 [cit. 30. 4. 2012]. Dostupné z: <<http://www.mkbe.elec.keio.ac.jp/spp27/abstract/P2-40.pdf>>.
74. Raballand, V., et al.: Inactivation of *Bacillus atrophaeus* and of *Aspergillus niger* using beams of argon ions, of oxygen molecules and of oxygen atoms. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2008, vol. 41, pp. 1–8. ISSN 0022-3727.
75. Laguardia, L., et al.: Investigation of the effects of plasma treatments on biodeteriorated ancient paper. *Applied Surface Science*, 2005, vol. 252, pp. 1159–1166. ISSN 0169-4332.
76. Vohrer, U., et al.: Plasma treatment – an increasing technology for paper restoration?. *Surface and Coatings Technology*, 2001, 142–144, pp. 1069–1073. ISSN 0257-8972.
77. Gadri, R. B., et al.: Sterilization and plasma processing of room temperature surfaces with a one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP). *Surface a Coatings Technology*, 2000, vol. 131, pp. 528–542. ISSN 0257-8972.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AC – střídavý proud

CCD – charge-coupled device – zařízení s vázanými náboji

CDBD – cascaded dielectric barrier discharge – kaskádový bariérový výboj

CFU – colony forming unit – počet životaschopných mikroorganismů v určitém objemu

DBD – dielectric barrier discharge – dielektrický bariérový výboj

DC – stejnosměrný proud

DNA – deoxyribonukleová kyselina

HF – vysoká frekvence

HSP – heat shock proteins – teplotně šokové proteiny

IR – infračervené záření

MDA – malondialdehyd

OES – optická emisní spektroskopie

PET – polyethylentereftalát

PS – polystyren

RBD – resistive barrier discharge – odporový bariérový výboj

RF – radiofrekvenční

RNA – ribonukleová kyselina

SEM – skenovací elektronová mikroskopie

TEM – transmisní elektronová mikroskopie

UV – ultrafialové

VIS – viditelné světlo

VUV – vakuové UV