

MASARYKOVA UNIVERZITA



PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA



**Studium sterilizace pomocí
plazmatu**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2008

Bc. Petr Smékal

Anotace

Sterilizační proces je velice důležitou biomedicínkou aplikací, která hledá stále nové možnosti provedení. Je to způsobeno požadavkem na sterilizaci různorodých materiálů, mezi které v poslední době patří teplotně a tlakově senzitivní materiály a předměty náchylné na různé chemické látky.

Tato práce se zabývá jednou z metod, která těmto omezením vyhovuje, tzv. plasmovou sterilizací za atmosférického tlaku. Byly tak zkoumány biocidní účinky na bakteriální buňky s použitím různých druhů plasmových výbojů.

Pomocí optické emisní spektroskopie byla dále provedena spektrální analýza plasmového výboje a na jejím základě byla provedena jeho charakteristika.

Klíčová slova

Sterilizační proces, plasmový výboj, biocidní účinek, optická emisní spektroskopie

Abstract

Sterilization process is one of very important biomedical application. It is still looked for a new one, because of sterilization of various materials like heat, pressure and chemical sensitive objects.

This study deals with one method, which is convenient, with plasma sterilization exactly. Biocidal effect to bacterial cells by using miscellaneous types of plasma discharges was researched.

Spectrum analysis of plasma discharge and subsequent determination of its characteristic was accomplished by optical emission spectroscopy.

Key words

Sterilization process, plasma discharge, biocidal effect, optical emission spectroscopy

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval sám s použitím uvedené literatury.

.....

Poděkování

Děkuji tímto vedoucímu své diplomové práce Mgr Pavlu Slavičkovi, PhD. a také své konzultantce Mgr. Monice Szostkové, PhD. za jejich pomoc a cenné rady udělené během realizace tohoto projektu. Dále také patří dík i ostatním spolupracovníkům z Plazmochemické laboratoře PřF MU a Ústavu experimentální biologie PřF MU za jejich ochotu a pomoc při této práci.

Obsah

KAPITOLA 1 - ÚVOD	7
1.1 ÚVOD	8
KAPITOLA 2 - TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 PLASMA JAKO FYZIKÁLNÍ POJEM	10
2.1.1 <i>Charakteristika a vlastnosti plasmatu</i>	10
2.1.2 <i>Průmyslové a biomedicínské využití plasmatu</i>	13
2.1.3 <i>Plasma a jeho využití na MU</i>	15
2.2 STERILIZACE	16
2.3 STERILIZAČNÍ METODY	18
2.3.1 <i>Chemické sterilizační metody</i>	18
2.3.2 <i>Fyzikální sterilizační metody</i>	19
2.3.3 <i>Kombinované sterilizační metody</i>	23
2.3.4 <i>Méně často používané metody</i>	24
2.4 POROVNÁNÍ RŮZNÝCH STERILIZAČNÍCH METOD	25
2.5 PLASMOVÁ STERILIZACE	27
2.5.1 <i>Počátky plasmové sterilizace</i>	28
2.6 INAKTIVAČNÍ MECHANISMY	31
2.6.1 <i>Vliv teploty na metabolickou aktivitu mikroorganismů</i>	32
2.6.2 <i>Působení UV záření</i>	33
2.6.3 <i>Volné radikály</i>	36
2.7 ADAPTACE MIKROORGANISMŮ NA STRESOVÉ PODMÍNKY	41
2.8 VÝBĚR KONTROLNÍHO MIKROORGANISMU	43
2.9 ESCHERICHIA COLI	45
2.9.1 <i>Taxonomické zařazení</i>	45
2.9.2 <i>Význam</i>	46
2.9.3 <i>Morfologie</i>	47
2.9.4 <i>Metabolismus</i>	48
2.10 OPTICKÁ DIAGNOSTIKA PLASMATU	49
2.10.1 <i>Měření teploty z rotačních čar molekulových spekter</i>	49
2.10.2 <i>Měření teploty z vibračních spekter molekul</i>	51
2.11 KOLORIMETRICKÁ ANALÝZA	52

KAPITOLA 3 - EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	53
3.1 POUŽITÁ MÉDIA, LABORATORNÍ, EXPERIMENTÁLNÍ PŘÍSTROJE A SOFTWARE	54
3.2 PŘÍPRAVA MÉDIÍ A EXPERIMENTÁLNÍHO BAKTERIÁLNÍHO VZORKU	58
3.3 VYHODNOCOVÁNÍ	60
3.3.1 <i>Kvantitativní hodnocení experimentu</i>	60
3.3.2 <i>Kvalitativní hodnocení experimentu</i>	63
3.3.3 <i>Grafické vyhodnocení dat získaných mikrobiologickým experimentem</i>	65
3.4 POPIS EXPERIMENTÁLNÍHO ZAŘÍZENÍ A EXPOZICE BAKTERIÁLNÍHO VZORKU	66
3.5 VLIV TEPLoty NA STERILIZACI EXPERIMENTÁLNÍHO VZORKU	72
3.6 VLIV PROUDU PLYNU NA ÚBYTEK CFU/ML.....	77
3.7 KOLORIMETRICKÉ STANOVENÍ ZMĚN FILTRAČNÍHO PAPÍRU	79
3.8 DŮKAZ EXISTENCE VOLNÝCH RADIKÁLŮ V PRŮBĚHU PLASMOVÉ STERILIZACE.....	81
3.9 OPTICKÁ DIAGNOSTIKA PLASMATU	85
3.9.1 <i>Výpočet teploty z rotačních čar molekulových spekter</i>	86
3.9.2 <i>Výpočet teploty z vibračních čar molekulových spekter</i>	90
3.10 VÝSLEDKY STERILIZAČNÍCH EXPERIMENTŮ	94
KAPITOLA 4 - ZÁVĚR.....	99
4.1 ZÁVĚR	100
LITERATURA	104
PUBLIKACE	111

KAPITOLA 1

ÚVOD

1.1 Úvod

Plasma jako pracovní medium je v posledních několika letech velice oblíbeným a také užitečným prostředkem v mnoha fyzikálních či chemických laboratořích. Pro použití v biofyzikální a biomedicíně praxi však bylo nutno docílit toho, aby plasmový výboj mohl být vybuzen a hlavně udržen i za atmosférického tlaku.

Jakmile bylo tohoto docíleno, objevilo se mnoho experimentálních týmů snažících se o nejrůznější využití takového plasmového výboje.

Koncem 20. století se tak objevují první zmínky o využití plasmatu jako sterilizačního média a toto využití je během dalších let více zkoumáno a popisováno.

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 degradující teplotně senzitivní materiály či nebezpečnost ionizačního záření užitého při sterilizačním procesu.

Naproti tomu, při použití plasmatu jako sterilizačního prostředku se lze těmto negativním a nežádoucím vlivům vyvarovat. Výhodami této nové sterilizační metody tak jsou relativně nízká aplikační teplota, krátká sterilizační doba stejně jako snadná manipulovatelnost se samotným zařízením a také vyřazení přítomnosti toxických látek, které se u jiných sterilizačních procesů objevují.

KAPITOLA 2

TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Plasma jako fyzikální pojem

2.1.1 Charakteristika a vlastnosti plasmatu

Během devatenáctého století použil český fyziolog Jan Evangelista Purkyně slovo řeckého původu *plasma* (v překladu tvarovaný, modelovaný), aby popsal čistou tekutinu získanou odebráním veškerých korpuskulárních složek krve [01].

Přibližně o půl století později, v roce 1922, byl tento termín použit americkým vědcem Irvingem Langmuirem pro popis media, jehož zkoumání bylo teprve v počátcích a tímto se zabývalo pouze několik málo vědeckých pracovišť. V této době se tak začíná rozvíjet nové fyzikální odvětví zvané fyzika plasmatu.

Plasma bývá popisováno jako čtvrté skupenství hmoty, následující ostatní pevné, kapalně a plynné, a to se vzrůstající energií.

V současnosti se pro definici plasmatu používá následující definice : „Plasma je kvazineutrální plyn skládající se z nabitých a neutrálních částic či volných radikálů a vykazující kolektivní chování“ [02].

Kolektivním chováním rozumíme pohyby částic plasmatu, které jsou zcela odlišné od pohybu částic neutrálního plynu. Molekuly neutrálního plynu jsou elektricky neutrální, nepůsobí na ně žádná elektromagnetická síla a působení gravitační síly je zanedbatelné. Takovéto molekuly se pohybují bezsrážkově, dokud se nesrazí s jinou molekulou, a tyto vlastní srážky dále rozhodují o pohybu částic tohoto neutrálního plynu. Působení vnější síly je tak vlastním molekulám zprostředkováno právě pomocí těchto srážek.

V plasmatu, kde jsou však přítomny nabitě částice, je zcela odlišná situace. Při svém pohybu mohou tyto nabitě částice vytvářet lokální koncentrace pozitivního nebo negativního náboje vedoucí ke vzniku elektrických polí. Tato pole tak již ovlivňují pohyb a chování dalších nabitých částic ve vzdálenějších místech. Kolektivní chování jsou tedy pohyby částic plasmatu, které nezávisí pouze na lokálních podmínkách, ale také na jeho vzdálených oblastech.

Pro kvazineutrální plasma platí, že má v dostatečně velkém objemu či časovém intervalu přibližně stejný počet kladně i záporně nabitých částic. Při popisu vlastní kvazineutrálnosti je vhodné zavést pojmy Debeyeovo stínění a Debeyeova délka λ_D .

Debeyeova délka λ_D je mírou stínící vzdálenosti neboli tloušťkou stěnové vrstvy.

Pro popis Debeyeovy délky λ_D je používán následující vztah [03]

$$\lambda_D = \left(\frac{\varepsilon_0 k T}{n_e e^2} \right)^{1/2},$$

kde ε_0 je permitivita vakua, k Boltzmanova konstanta, T je teplota, n_e hustota elektronů a e je velikost náboje elektronu.

Se vrůstající hustotou nabitých částic se tak λ_D zmenšuje, neboť v každé vrstvě plasmatu je více elektronů. Debeyeova délka λ_D také vzrůstá s rostoucím kT . Bez tepelného pohybu by se nábojový oblak zhroutil v nekonečně tenkou vrstvu.

Pro definici kvazineutrality tak platí, že je-li rozměr systému L daleko větší než λ_D , pak jakákoliv lokální koncentrace náboje nebo zavedení vnějšího potenciálu, jsou odstíněny ve vzdálenosti krátké v porovnání s L a ponechávají tak převážnou část plasmatu bez velkých elektrických potenciálů nebo polí. Plasma je tak kvazineutrální (dostatečně neutrální), aby bylo možno položit $n_i \cong n_e \cong n$, kde n_e je hustota elektronů a n je společná hustota nazvaná hustota plasmatu, ale ne natolik neutrální, aby se všechny zajímavé elektromagnetické síly ztratily.

Další podmínka pro definici plasmatu se týká vlastních srážek částic plasmatu. Má-li se plyn chovat spíše jako plasma než jako neutrální plyn, musí platit následující vztah $\omega\tau > 1$, kde ω je frekvence typických oscilací plasmatu a τ střední doba mezi srážkami s neutrálními atomy. Pokud se tedy nabitě částice slabě ionizovaného plynu srážejí s neutrálními atomy příliš často, je jejich pohyb řízen především hydrodynamickými silami nikoliv elektromagnetickými a nemůže být tedy tento ionizovaný plyn nazýván plasmatem.

2.1.2 Průmyslové a biomedicínké využití plasmatu

V dnešní době je plasma využíváno v mnoha různorodých a průmyslových odvětvích a další využití jsou zkoumána v mnoha plasmochemických laboratořích.

Některá využití plasmatu vyžadují speciální podmínky, jako je například potřeba nízkého okolního tlaku. Pro výzkumné týmy jsou však velice zajímavé aplikace plasmatu za atmosférického tlaku. Není zde totiž potřeba zařízení pro získání nízkého tlaku, které se vyznačuje svojí finanční náročností. Tato skutečnost tak umožnila plasmovému výboji zapojit se do mnoha jiných aplikací, které do té doby nemohly být zkoumány.

Průmyslové využití plasmatu

Plasma je pro průmyslové aplikace velice častým a oblíbeným prostředkem. Využívá se zde například při výrobě integrovaných obvodů, pro nanášení tenkých vrstev nebo pro povrchovou modifikaci polymerů [04]. Další aplikace se týkají plasmového povrchového čištění či syntézy nanostruktur [05]. Plasma může být také využito pro rozklad odpadních látek a plynů (např. rozklad plynného CF_4), což může napomáhat ekologické likvidaci jinak nebezpečných odpadů [06].

Biomedicíncké využití plasmatu

Nanášení tenkých vrstev pomocí plasmatu je již delší dobu používáno, bylo tudíž jen otázkou času, kdy se toto využití objeví i na biomedicíncké půdě. Začala se tak zkoumat biokompatibilita tenkých uhlíkových filmů, které pokrývají ortopedické či kardiovaskulární implantáty. Vzhledem k vlastnostem těchto uhlíkových vrstev (tvrdost, chemická inertnost, povrchová stabilita) a možnosti vytváření požadovaných tenkých vrstev právě pomocí plasmatu by tato aplikace mohla nalézt značné využití právě v biomedicíncké [07].

Ve farmaceutickém průmyslu je plasma využíváno při sterilizaci vnitřních stran plastických lahví [08]. Ve fázi výzkumu a zkoušení jsou také aplikace jako eliminace nekrotické tkáně, sterilizace zubních kavit či použití jako chirurgického nástroje [09].

2.1.3 Plasma a jeho využití na MU

Problematika využití plasmatu v praxi je již po dlouhou dobu zkoumána také na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně.

Plasmochemická laboratoř, která je zde přítomna, tak nabízí značné možnosti využití, a to jak nízkotlakých plasmových výbojů, tak i výbojů za atmosférického tlaku. Jsou zde tak experimentálně zkoumány a popisovány plasmové výboje generované nízkofrekvenčním, vysokofrekvenčním i mikrovlnným elektromagnetickým polem.

Tato práce se zabývá využitím nízko a vysokofrekvenčního plasmatu jako sterilizačního prostředku.

Navazuje tak na bakalářské práce, které se také zabývaly plasmovou sterilizací, avšak k tomuto využívaly pouze plasmatu buzeného vysokofrekvenčním elektromagnetickým polem. Bakalářské práce „Studium sterilizace povrchu materiálu pomocí rf plazmatu“ [10] a „Sterilizace vody plazmatem“ [11] se tak staly základem pro vznik této diplomové práce.

Mimo sterilizaci pomocí vysokofrekvenčního výboje byly v Plasmochemické laboratoři MU provedeny i experimenty s bariérovým výbojem pro sterilizaci mikroskopických hub, které shrnuje bakalářská práce „Využití bariérových výbojů pro sterilizaci“ [12].

Vysokofrekvenční plasmový výboj, který je v celém svém experimentálním zařízení nazýván „plasmová tužka“, našel již i jiné biomedicíncké využití. Plasmovou tužkou jako perspektivním chirurgickým nástrojem se tak na Přírodovědecké fakultě MU zabývaly bakalářské práce „Studium účinku plazmatu na biologické tkáně“ [13] a „Užití plasmové tužky v chirurgii“ [14] a také diplomová práce „Studium účinku plasmové tužky a jejího použití jako chirurgického nástroje, diplomová práce“ [15].

2.2 Sterilizace

Mikroorganismy a jejich působení na lidskou tkáň či celý organismus představují v dnešní době velký problém a přitahují na sebe značnou pozornost, co se týče jejich inaktivace a eliminace. Jejich nebezpečím je hlavně patogenita, kterou mohou tyto organismy způsobovat. Je tedy více než zřejmé, že se tímto problémem bude zabývat nejvíce potravinářská a medicínská praxe, kde mohou mikroorganismy představovat značné nebezpečí [16].

Pro vlastní eliminaci a inaktivaci mikroorganismů je používáno tzv. dekontaminačních procesů.

Mezi tyto procesy patří asepse, desinfekce, sanitace a sterilizace [17].

Asepse – inhibice nebo destrukce mikroorganismů na povrchu živé tkáně vedoucí k prevenci proti vzniku infekce

Desinfekce – eliminace vegetativní formy potenciálně nejvíce patogenních mikroorganismů, avšak nejde o eliminaci všech mikroorganismů

Sanitace – doplňuje desinfekční proces o čištění (v opracovaném vzorku se tak nesmějí nacházet žádná cizí tělesa)

Sterilizace – eliminace všech forem života zahrnující vegetativní buňky, jejich vysoce rezistentní spory, mikroskopické houby a viry, a dále také vývojová stadia protozoí případně helmintů

Vlastní sterilizační inaktivační proces a usmrcování mikroorganismů je popisován pomocí logaritmické křivky [18]. Dle této skutečnosti je tedy zřejmé, že teoreticky není možné dosáhnout absolutní sterility, v praxi se k ní však můžeme velmi přiblížit.

Samotný pojem sterility je navzdory této skutečnosti chápán jako absolutní pojem – neexistuje tedy žádný termín jako „téměř sterilní“.

Přítom při sterilizaci jde hlavně o usmrcení a inaktivaci mikroorganismů a jejich spor, není však již podmínkou jejich odstranění z povrchu, který je sterilizován.

Pro úspěšnou sterilizaci je také neméně důležitá tzv. předsterilizační příprava. Tato kontrola zahrnuje kontrolu vlastního sterilizačního procesu i sterilizovaného objektu, záznam parametrů během sterilizace a dále kontrola účinnosti sterilizace, popřípadě také kontrola biogenní neutrality týkající se opracovávaného vzorku.

2.3 Sterilizační metody

V dnešní době existuje mnoho sterilizačních metod, které jsou založeny na nejrůznějším působení fyzikálních či chemických faktorů.

Vzhledem k těmto působícím agens jsou tak určeny pro specifické využití, které může být v určitých případech výhodou, jindy však může použití daného sterilizačního procesu značně omezovat.

Základní rozdělení dnes využívaných sterilizačních metod je na metody *Chemické*, *Fyzikální* a *Kombinované*. Mimo tyto standardní metody se také objevují metody ne příliš používané, avšak jsou stále předmětem vědeckého zkoumání.

2.3.1 Chemické sterilizační metody

Tyto metody jsou určeny pro materiály, které není možno sterilizovat fyzikálními metodami.

Sterilizace formaldehydem

Založeno na působení směsi formaldehydu s vodní párou a to při teplotě 60 – 80°C. Samotná sterilizace probíhá v podtlaku při stanovených parametrech. Vzhledem k tomu, že tato metoda probíhá v podtlaku, zavzdušnění sterilizační komory na konci každého cyklu probíhá přes antibakteriální filtr [19].

Sterilizace ethylenoxidem

Založeno na působení ethylenoxidu v podtlaku nebo přetlaku a to při teplotě 35 – 37°C při stanovených parametrech.

2.3.2 Fyzikální sterilizační metody

Sterilizace vlhkým teplem (moist heat)

Tato sterilizace je založena na zahřívání v přítomnosti vody za vzniku vodní páry.

Dané metody jsou určeny pro materiál, který je odolný proti podmínkám vlastní sterilizace (kov, sklo, porcelán, keramika, textil, guma atd.).

Sterilizace vlhkým teplem se dále rozděluje podle teploty, kterou pro svůj sterilizační proces využívá. Mezníkem pro toto rozdělování je teplota varu vody za normálních podmínek, tudíž 100°C.

▪ **Teplota pod 100°C**

- *pasterizace* – metoda založená na krátkodobém zahřívání pod bodem varu (60°C po dobu 30 min.)

- *flash metoda* – metoda podobná pasterizaci, využívající velice krátkých sterilizačních intervalů (80°C po dobu 15s)

▪ **Teplota okolo 100°C**

- *přerušovaná, frakcionovaná sterilizace* – jde o sterilizaci při teplotě 100°C (var) po dobu 30 minut v intervalech 18 – 24hod. a to tři dny po sobě. Objekt sterilizace je v mezidobí uložen při pokojové teplotě, aby termorezistentní spory, které var přežily, nemohly vyklíčit. Následný var pak tyto spory ničí jako vegetativní formy bakterií.

- *tyndalizace* – používá se pro roztoky bílkovin, které koagulují při teplotě 60°C. Sterilizační postu je obdobný jako u frakcionované sterilizace. Daný roztok je zahříván při teplotě 56 – 58°C (60 – 80°C) po 30 – 60 min. a to tři dny po sobě.

▪ **Teplota vyšší než 100°C**

- *autoklávování* – sterilizace při vysokých teplotách pod tlakem

Teplota [°C]	expozice [min]
121	15
126	10
134	3

Tab. 2.01 : Sterilizační podmínky pro autoklávování [23]

Sterilizace proudícím horkým vzduchem (dry heat)

Tato metoda je všeobecně méně účinná než sterilizace vodní párou. Je určena pro předměty z kovu, skla, porcelánu atd..

Teplota [°C]	expozice [min]
160	120
170	60
180	30

Tab. 2.02 : Pracovní podmínky pro horkovzdušnou sterilizaci [23]

Sterilizace filtrací

Tato metody jsou určeny hlavně pro odstranění mikroorganismů v případech, kdy není možno použít jiných sterilizačních metod. Vzhledem k velikosti pórů vlastních filtrů mají však tyto metody velice omezené využití [19].

Pro urychlení vlastní filtrace je možno použít podtlaku za pomoci vývěvy.

- **Azbestové Seitzovy filtry**

Jsou vyrobeny lisováním azbestu a celulózy. Filtry je nutno před vlastním použitím sterilizovat v autoklávu a to i s filtračními nálevkami.

- **Skleněné jenské filtry**

Vyrobena z borosilikátového skla ve formě porézních destiček, které se mohou používat i opakovaně. Před použitím musí být autoklávovány a po použití důkladně čištěny koncentrovanou kyselinou sírovou nebo chromsírovou.

- **Membránové ultrafiltry**

Vyrobena z nitrocelulózy s různou velikostí pórů. Před použitím se sterilizují autoklávováním nebo UV zářením a to i se speciálními kovovými nádobkami.

Radiační sterilizace

Tyto metody využívají germicidních vlastností ionizujícího a UV záření. Je tak nutné zabezpečit personál, který obsluhuje dané sterilizační zařízení, před nepříznivými účinky tohoto záření.

▪ Ultrafialové záření

Tato metoda využívá tzv. germicidní lampy generující elektromagnetické záření s vlnovou délkou okolo 265nm, které je maximálně absorbováno nukleovými kyselinami. Vzhledem k možnosti šíření elektromagnetických vln se UV záření používá ke sterilizaci vzduchu, vody a pracovních ploch [20]. Je však nutné si uvědomit, že účinnost UV záření klesá se vzdáleností ozařovaného objektu.

▪ Ionizující záření

Metoda má svou výhodu v pronikání gama či beta záření [21] dovnitř sterilizovaného objektu, je tudíž využívána především k průmyslové sterilizaci. Zdrojem ionizujícího záření, které je zde využíváno, bývá radioaktivní kobalt ^{60}Co [22].

Sterilizace plasmatem

Tento způsob sterilizace využívá plasmatu generovaného elektromagnetickým polem (nízkofrekvenčním, vysokofrekvenčním, mikrovlnným). Jako pracovní médium jsou využívány různé plyny či jejich směsi. Podmínky a parametry pro sterilizační proces jsou určeny funkčním provedením vlastního přístroje.

Vzhledem k principům této metody, je zde kombinováno působení více faktorů a to jak fyzikálních (UV záření), tak i chemických (působení ozonu, volných radikálů). Standardně se však tato metoda zařazuje mezi fyzikální sterilizační metody.

Podrobný popis inaktivačních účinků této metody a její samotný průběh je předmětem celé této práce, podrobnější informace tedy budou uvedeny níže a to v samostatných kapitolách.

2.3.3 Kombinované sterilizační metody

Tyto sterilizační postupy kombinují výše uvedené metody, aby tak docílily dané sterilizace v co nejkratším čase.

Nejčastěji se tak kombinuje využití chemických agens za působení některého z fyzikálních faktorů. Tyto kombinované metody však již většinou potřebují speciální zařízení, nejsou tudíž v praxi příliš využívány.

Termochemické ošetření

Při použití této metody se slučuje tepelné působení za současné injektáží ethylenoxidu.

Kombinace chemického působení s radiací

Chemické látky použité při této sterilizační metodě zvyšují senzitivitu mikroorganismů k ionizujícímu záření.

Termoradiační inaktivace

Tato metoda využívá zvýšenou senzitivitu mikroorganismů vůči ionizujícímu záření při zvýšené teplotě.

2.3.4 Méně často používané metody

Inaktivace chladem (cold inactivation)

Při této metodě je použito tzv. cold shock. Jedná se o prudké zchlazení bez postupného zamrazování.

Bylo prokázáno, že inaktivace chladem je účinná pro gram-pozitivní a gram-negativní bakterie, nikoliv však pro kvasinky [23].

Využití svazku iontů dusíku N^+

Metoda využívá radiobiologického efektu iontů dusíku s energií v rozmezí 5 -20keV na buněčný genom [24].

Inaktivace využitím nízkofrekvenčního elektromagnetického pole

Tato metoda je založena na působení elektromagnetického pole s vysokou intenzitou [25]. Při aplikaci tohoto elmag. pole dochází k ireverzibilní ztrátě membránové integrity, která má za následek buněčnou smrt [26].

Působení mikrovlnného elektromagnetického pole

Bylo prokázáno, že samotné mikrovlnné elmag. pole nemá žádné germicidní účinky. Jeho bakteriální inaktivace tak není založena na vlastním působení tohoto pole, ale na zahřívání buněčné suspenze – jedná se tak o inaktivaci pomocí vysoké teploty [27].

2.4 Porovnání různých sterilizačních metod

Vzhledem k principům, na kterých jsou jednotlivé sterilizační metody založeny, není možné dané postupy sterilizace použít pro všechny požadované případy.

Při výběru sterilizační metody je tedy důležité vědět, jaká jsou omezení vyplývající vlastností sterilizovaného objektu.

Chemické sterilizační metody

Sterilizace ethylenoxidem

- *nevýhody* – nebezpečí této metody je v karcinogenitě samotného ethylenoxidu a jeho vysokou absorpcí v plastových hmotách [28], nevhodná je také nutnost použití přetlakové komory

- *výhody* – tyto metody je však vhodné použít v případech, kdy není možno použít fyzikální sterilizační metody

Fyzikální sterilizační metody

Sterilizace pomocí vysokých teplot

- *nevýhody* – tyto metody jsou velice nevhodné pro materiály, které jsou senzitivní k vysokým teplotám (látky vzniklé na bázi polymerů, např. polyuretany) [29]

- *výhody* – při použití materiálů, které nejsou teplotně senzitivní (sklo, kov, keramika atd.) je možné zvolit dlouhou aplikační dobu této metody

Sterilizace filtrací

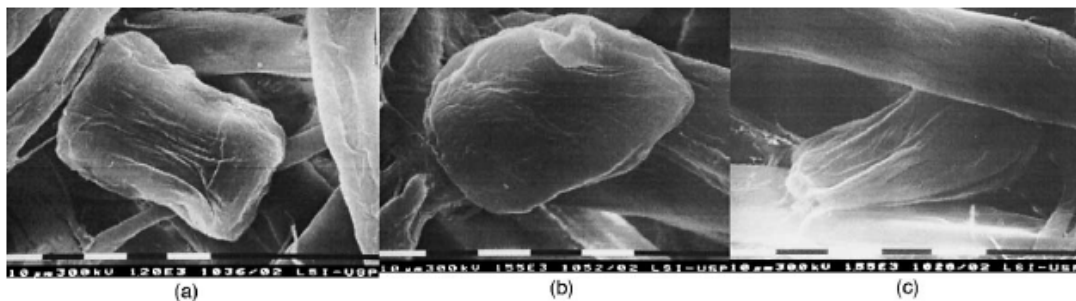
- *nevýhody* – tato metoda je značně omezena při jejím použití pro odstranění virů z tekutin (velikost póru ve filtrech stačí zamezit prostoupení pouze bakteriím)
- *výhody* – v případech, kdy víme, že je velikost mikroorganismů mnohem větší než je velikost pórů vlastních filtrů, je filtrace levnou alternativou

Radiální sterilizace (UV záření, gama záření)

- *nevýhody* – ionizující záření může pozměnit vnitřní strukturu sterilizovaného objektu během vlastního sterilizačního procesu, dále je nutno investovat do prostředků pro izolaci okolního prostředí (nebezpečí ozáření pracovníků) [30]
- *výhody* – ionizující záření postihuje hlavně nukleové kyseliny, které jsou esenciální pro život organismu [31]

Sterilizace plasmatem

- *nevýhody* – relativně nová sterilizační metoda, kterou je nutno ještě podrobně zkoumat
- *výhody* – krátká aplikační doba, nízká sterilizační teplota, použití za atmosférického tlaku a absence toxických látek [32, 33]



Obr. 2.01 : SEM snímek *B. stearothermophilus* po různém opracování
(a) 10 min. plasmové sterilizace, (b) 15 min. autoklávování, (c) bez opracování [30]

2.5 Plasmová sterilizace

Plasmová sterilizace je v poslední době velice populárním tématem mnoha prací publikovaných různými vědeckými týmy, které se zabývají problematikou využití plasmového výboje v praxi. Tato aplikace tak začíná mít své pevné postavení i na mezinárodních konferencích, které se zaměřují na využití plasmatu v biomedicíně praxi.

Podle tohoto trendu je tedy zřejmé, že plasma je ještě stále vyhledávaným prostředkem pro řešení nejrůznějších vědeckých problémů.

Germicidní účinky sterilizace, při které bylo použito plasmového výboje při pokojové teplotě a za atmosférického tlaku, byly již prokázány ve více studiích [34]. Naprostá většina těchto sterilizačních přístrojů je ještě ve fázi vývoje a vědeckého zkoumání.

Existují již sice komerčně vyráběné plasmové sterilizátory, ty však pracují s nízkotlakými výboji, a jsou tudíž nevhodné pro sterilizaci materiálů, které jsou senzitivní k prostředí s nízkým tlakem.

Úspěch plasmové sterilizace je hlavně v absenci vysokých aplikačních teplot, toxických a kancerogenních látek nebo nebezpečného gama záření. Tato fyzikální a chemická omezení, přítomná u ostatních dnes využívaných sterilizačních metod, tak plasmovou sterilizaci staví na výhodnou pozici nové konkurenční metody, která se stále ještě vyvíjí a může tak nabídnout mnohé výhody.

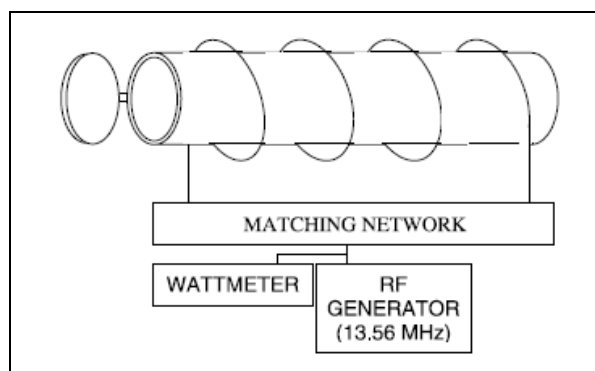
2.5.1 Počátky plasmové sterilizace

Již od prvních zmínek o plasmové sterilizaci byly řešeny otázky použití vhodné frekvence k buzení plazmatu , výběru plynu jako pracovního média a také tlaku okolí, při kterém samotná sterilizace probíhá.

Struktura zařízení a frekvence generátoru pro buzení plazmatu

První zmínka o plasmatu jako sterilizačním médiu se objevila v Menashiho patentu v roce 1968. Toto zařízení využívalo pro buzení plazmatu pulsního RF pole a argonu jako pracovního plynu. Za atmosférického tlaku byly tímto způsobem sterilizovány vnitřní povrchy skleněných lahví. Jednalo se o koronový výboj (plasma vznikalo mezi dvěma elektrodami – rovný drát uvnitř lahve jako první a cívka ovinutá vně lahve jako druhá elektroda). Tento výboj tak pokrýl celou vnitřní stranu lahve.

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 být použit ke sterilizaci.



Obr. 2.02 : Schéma jedné z prvních aparatur pro plasmovou sterilizaci, Boucher (Gut) (1980) [18]

Pro vybuzení plasmového výboje se tak začíná využívat RF pole, a to hlavně frekvence 13,56 MHz (celosvětově autorizovaná frekvence pro průmyslové, vědecké a medicínské aplikace).

Boucher (Gut) (1980) však také realizuje vybuzení a udržení plasmatu pomocí mikrovlnné frekvence 2450 MHz (frekvence používaná v mikrovlnných troubách).

Časem se objevuje mnoho dalších zařízení pro plasmovou sterilizaci. Na příklad, Tensmayer et al. (1981) využili pro sterilizaci vnitřních ploch lahví 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).

Plyn a směsi plynů jako pracovní médium

V počátcích plasmové sterilizace byly pro dané experimenty využívány inertní plyny jako argon a helium. Nicméně Ashman a Menashi (1972) začali do pracovního média přidávat halogeny (nejčastěji chlor, brom a jód), aby tak zvýšili účinnost sterilizačního procesu. Toto vedlo k dalším experimentům, a tak Boucher (Gut) (1980) začal používat aldehydy jako pracovní plyn.

Dále Boucher (Gut) (1985) objevil skutečnost, že pro inaktivaci bakteriálních spor jsou některé plyny (např. CO₂) mnohem účinnější než jiné (např. argon).

Ratner et al. (1990) také poukázali na skutečnost, že plasmová sterilizace je účinná pro většinu plynů používaných v laboratořích jako pracovní médium (O₂, N₂, vzduch, H₂, halogeny, N₂O, H₂O, H₂O₂, CO₂, SO₂, SF₆, aldehydy, organické kyseliny a další).

Tlak okolí při plasmové sterilizaci

Plasmová sterilizace byla ve svých počátcích prováděna nejvíce při třech tlakových oblastech.

Tyto oblasti byly nazvány jako nízký tlak (1 – 10 mTorr), střední tlak ($\approx 0,1 - 10$ Torr) a atmosférický tlak. Při experimentech uvedených výše byla využívána hlavně využíváno prostředí při středním tlaku. Postupem času se však ukázala velká výhoda použití sterilizace při atmosférickém tlaku (tlaková senzitivita opracovávaného předmětu atd.).

2.6 Inaktivační mechanismy

Jednotlivé sterilizační metody jsou děleny podle agens jejich působení. Je tak možné používat chemické, fyzikální či kombinované sterilizační metody. Na základě rozdílnosti těchto působících agens tak jednotlivé sterilizační metody vlastní rozdílné inaktivační mechanismy.

Sterilizace pomocí plasmatu je řazena mezi fyzikální sterilizační metody. Vzhledem k principům této metody zde však působí jak fyzikální agens, tak i agens chemické, které vznikají chemickými změnami prostředí. Vznik chemických agens je zcela závislý na fyzikálních vlastnostech plasmatu, nelze jej tedy získat právě bez přítomnosti plasmového výboje.

Mezi inaktivační mechanismy plasmové sterilizace tak lze zařadit teplotní vliv, působení UV záření, působení volných radikálů či ozonu.

Sterilizační metoda založená na působení vysokých teplot je jednou z velice rozšířených a účinných metod, avšak pro mnoho sterilizovaných vzorků naprosto nevhodnou.

Při plasmové sterilizaci, která byla během této práce zkoumána, bylo tedy nutné tepelné účinky plasmového výboje sledovat případně jej i omezit. Samotný postup monitorování a usměrňování tepelných účinků během sterilizačního procesu je uveden níže v této práci.

Princip působení dalších fyzikálních a chemických agens, které jsou při plasmové sterilizaci přítomny, je podrobně objasněn a popsán v následujících částech této práce.

2.6.1 Vliv teploty na metabolickou aktivitu mikroorganismů

Teplotní činitel je jedním z mnoha faktorů, které působí na metabolickou aktivitu mikroorganismů a na jejich rozmnožovací schopnost.

Pro každý mikroorganismus lze určit tři teplotní body :

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

Při krátkodobém zvýšení teploty nad maximální teplotu dochází ke vzniku tzv. teplotního šoku. Teplotní šok vede k metabolickým výkyvům, které by mohly mikroorganismus závažně poškodit.

Ten se proti tomuto působení brání syntézou specifických ochranných látek, mezi které patří hlavně tzv. HSPs (Heat Shock Proteins – proteiny teplotního šoku) [35].

Tyto ochranné látky se snaží poškozeným komponentám různých metabolických drah navrátit jejich původní funkci (vlivem teploty může např. docházet ke změně kvartérní struktury proteinu; HSP poté poškozený protein sbalí do jeho původní prostorové struktury).

Při delším působení vysokých teplot však již ochranné látky proti teplotnímu stresu nejsou dostatečně účinné, metabolické procesy jsou vážně narušeny a dochází tak ke smrti mikroorganismu.

Vzhledem k těmto skutečnostem je působení vysokých teplot užíváno jako účinný sterilizační prostředek.

2.6.2 Působení UV záření

Vzhledem k vysokoenergetickému charakteru plasmového výboje je během existence tohoto výboje generováno UV záření.

UV záření je elektromagnetické záření o vlnové délce 100 – 400nm, které leží mezi X-paprsky a viditelnou částí spektra.

Dále jej lze rozdělit na Vákuum UV (100 – 200nm), UV-C (200 – 280nm), UV-B (280 – 315nm) a UV-A (315 – 400nm).

Germicidní účinek UV záření se liší podle rozsahu jeho vlnové délky a jeho charakter je zcela odlišný od působení chemických agens. Ta ireverzibilně poškozují jadernou hmotu, protoplasmu, enzymy a buněčnou membránu.

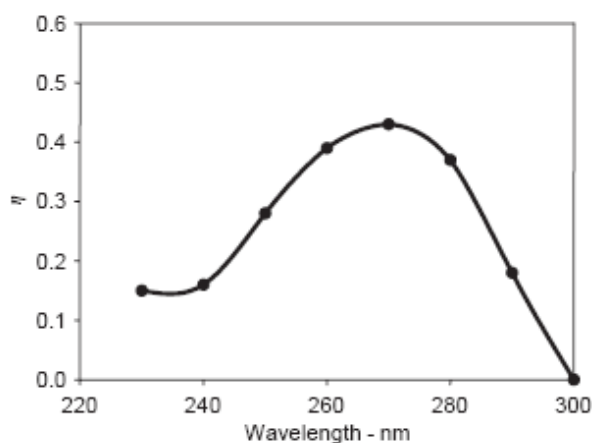
Oproti tomu, germicidní působení UV záření je založeno na fotochemickém poškození molekul nukleových kyselin (DNA/RNA) a dále proteinů, enzymů či jiných pro buňku významných biomolekul .

Kromě přímého působení na biomolekuly dává také UV záření vzniku toxických látek, jako jsou peroxidy, ozon či volné radikály, a způsobuje tak snížení odolnosti mikrobiálních buněk vůči ostatním stresovým faktorům (např. teplota, pH, obsah soli v kultivačním prostředí atd.) [36].

Germicidní účinek UV záření je také závislý na relativní vlhkosti vzduchu, teplotě, prašnosti či proudění vzduchu [37].

Vlastní poškození biomolekul je založeno na absorpci UV záření těmito biomolekulami obsaženými v buňce [38], což může vést k deformaci jejich prostorové struktury, vzniku kovalentních vazeb či změně chemického složení vlastní molekuly.

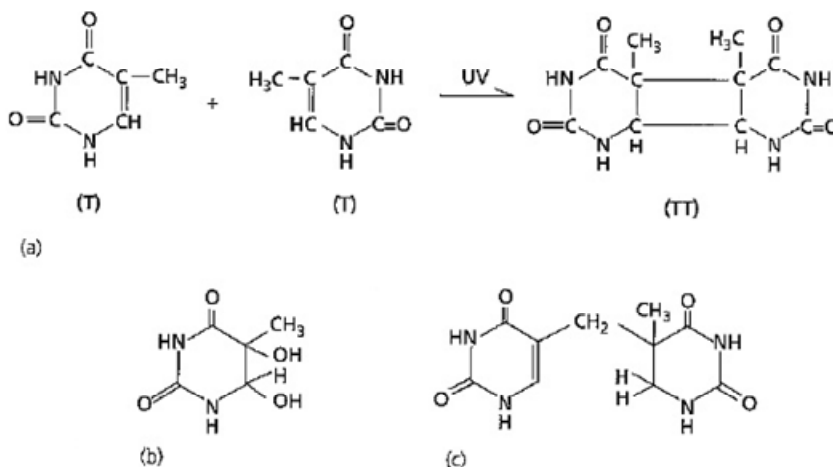
Nukleové kyseliny (DNA/RNA) absorbují UV záření při vlnové délce 240 – 280nm, nejvyšší germicidní efekt je pak pozorován při 260 – 265nm.



Obr. 2.03 : Germicidní efektivita η [$\log_{10}(N/N_0)$ na mJ/cm^2] pro *E. Coli* v závislosti na vlnové délce [20]

Důsledkem je poškození spočívající ve vzniku thyminových dimerů, které znemožňují replikaci genetické informace a následné množení mikroorganismu.

Dále může být také indukován vznik 5,6-dihydroxydihydrothyminu či 5-thyminyl-5,6-dihydrothyminu [39, 40].



Obr. 2.04 : Změny v DNA indukované UV zářením [23]

- a) vznik pyrimidinového dimeru
- b) 5,6-dihydroxydihydrothymin
- c) 5-thyminyl-5,6-dihydrothymin

Kromě nukleových kyselin jsou působením UV záření poškozovány i jiné biomolekuly.

Pro enzymy, které jsou zodpovědné za reparaci nukleových kyselin, leží maximum absorbovaného UV záření v rozmezí 280 – 290nm. Vyřazením těchto enzymů se zvyšuje senzitivita mikrobiálních organismů vůči ostatním stresovým podmínkám, které na mikroorganismus působí.

Aplikace UV záření s vlnou délkou v rozmezí 320 – 400nm způsobuje změny nenasycených mastných kyselin v buněčné membráně. To vede ke změnám permeability těchto membrán a dochází tak abnormálnímu toku iontů dovnitř či vně buňky.

2.6.3 Volné radikály

Chemické sterilizační metody jsou založeny na přímém působením chemických agens na biomolekuly. Během plasmové sterilizace vznikají excitací a disociací velmi reaktivní chemické látky zvané volné radikály.

Volné radikály jsou atomy, molekuly a ionty schopné samostatné existence, které mají ve svém elektronovém obalu jeden, popřípadě více nepárových elektronů. Z tohoto důvodu se snaží získat další elektron a doplnit tak elektronový pár pro vznik stabilní konfigurace.

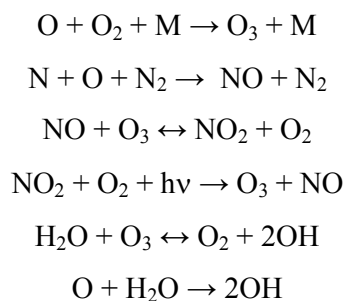
Tyto látky reagují i s ostatními biomolekulami a vytvářejí tak další volné radikály. Tento děj se pak má tendenci šířit řetězovou reakcí [41].

Volné radikály mohou chemicky napadat lipidy v lipoproteinech a buněčných membránách, nukleové kyseliny, sacharidy a polysacharidy, bílkoviny i enzymy.

Chemicky nejvýznamnějšími jsou volné radikály kyslíku a dusíku. Dalšími přeměnami z nich mohou vznikat jiné reaktivní látky, které již nemají nepárový elektron (např. peroxid vodíku, kyselina chlorná ...).

Tyto látky se společně s volnými radikály označují jako reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species, ROS) a reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species, RNS) [42].

Následují některé reakce vedoucí ke vzniku volných radikálů v plasmatu [43]:



M = katalyzátor

volný radikál	vzorec	poločas rozpadu [sec.]
hydroxylový radikál	$\cdot\text{OH}$	10^{-9}
alkoxylový radikál	$\text{RO}\cdot$	10^{-6}
kyslíkový singlet	$^1\text{O}_2$	10^{-5}
peroxynitritový anion	ONOO^-	0,05 – 1,00
peroxylový radikál	$\text{ROO}\cdot$	7
peroxid vodíku	H_2O_2	enzymatický rozklad
superoxidový anionový radikál	$\text{O}_2\cdot^-$	enzymatický rozklad

Tab. 2.03 : Obecný přehled volných radikálů [42]

Volné radikály a DNA

Dosud bylo identifikováno přibližně 100 různých defektů DNA, které jsou indukovány volnými radikály. Mezi tyto patří vznik primárních defektů, které jsou často nestabilní, a také sekundární rozkladné produkty vzniklé hydrolyzou či přesmyky.

Nejčastější jsou však modifikace bází DNA, které mají za následek toxický efekt spočívající v inhibici replikace DNA. Těmito inhibitory jsou např. thyminglykoly jako produkty oxidace thyminu.

Další produkty, cytosinglykoly, mohou podléhat sekundárním reakcím, jako je např. deaminace. Puriny mohou být oxidovány v místě atomů purinového kruhu za vzniku různých typů produktů.

Působením volných radikálů může docházet také k poškození struktury deoxyribózy, což má za následek odštěpení či přemístění bází a vznik abázických míst. V menším měřítku mohou vznikat mezireťezcové spoje [35].

Volné radikály a proteiny

Informací o vlivu volných radikálů na sacharidy a jeho následky je podstatně méně než údajů o působení těchto reaktivních částic na DNA, lipidy a proteiny.

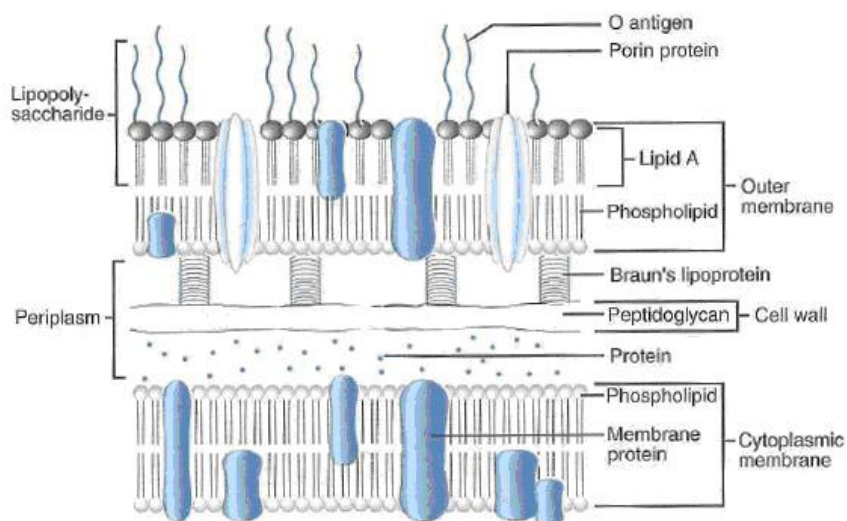
Bylo zjištěno, že volné radikály depolymerizují polysacharidy. Míra této depolymerizace je závislá na konformačním stavu molekul, zvláště jejich koncových řetězců.

Vliv volných radikálů na polysacharidové řetězce jsou nespecifické.

Volné radikály a lipidy

Kyslíkové radikály mohou poškozovat fosfolipidy i lipoproteiny buněčné membrány mikroorganismu.

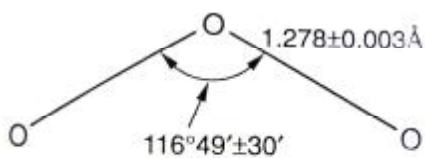
Dochází tak ke změně fluidity této membrány a buňka nemůže plně regulovat její permeabilitu. Následkem je nekontrolovatelné proudění iontů vně i dovnitř buňky, které může mít za následek smrt mikroorganismu [04].



Obr. 2.05 : Schéma buněčné membrány
Gram-negativní bakterie [56]

Volné radikály a ozon

Reakcí kyslíkového radikálu se vzdušným kyslíkem dochází ke vzniku ozonu. Tato reakce je indukována UV zářením o vlnové délce v rozsahu 200 – 360nm [44].



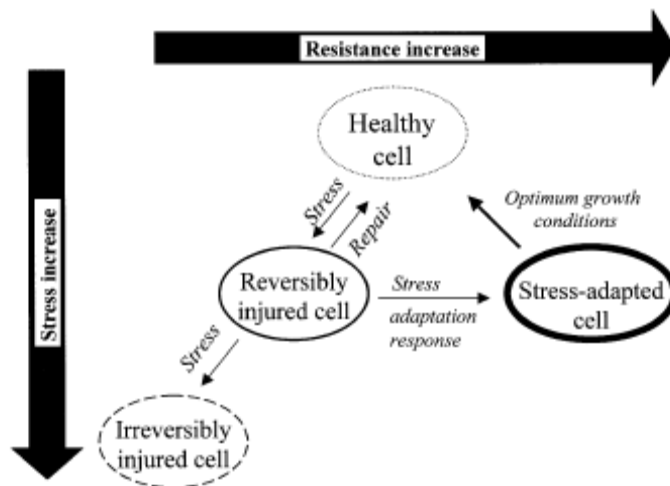
Obr. 2.06 : Molekulární struktura ozonu [44]

Kyslíkové radikály i molekuly ozonu hrají důležitou roli v inaktivační procesu bakterií způsobeném oxidací lipidů a proteinů ve vnější membráně mikroorganismu [45].

2.7 Adaptace mikroorganismů na stresové podmínky

Adaptace mikroorganismů během sterilizačního procesu představuje potenciální problém. Subletální stresové podmínky tak mohou u mikroorganismů indukovat expresi buněčného reparačního systému [31].

Typ tohoto reparačního systému závisí na vlastních stresových podmínkách.



Obr. 2.07 : Proces mikrobiální adaptace na stresové podmínky [31]

Při působení vysokých či naopak nízkých teplot (vysoko či nízkoteplotní šok) tak dochází k produkci specifických proteinů, tzv. HSPs (Heat Shock Proteins – proteiny teplotního šoku).

Při aplikaci UV záření se u těchto buněk jako reparační prvek objevuje tzv. reaktivace. Reaktivace je řízena enzymaticky a může probíhat ve tmě i za světla jako reparace za tmy (dark repair) nebo fotoreaktivace (photoreactivation) [39].

Všechny mikroorganismy však nejsou schopny této reaktivace. Jsou to mikroorganismy jako *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae*, *Diplococcus pneumoniae* a další. Jiné naopak tohoto reparačního procesu jsou schopny – např. řada enterobakterií, streptokoků, mikrokoků, sacharomycet, aerobakterů, plísní a jiných. Pro viry je schopnost reparace možná pouze v hostitelských buňkách.

Vlastní reaktivaci ovlivňují různé faktory, jako je přítomnost světla, pH, teplota, přítomnost organických látek či typ mikroorganismu.

Vzhledem k enzymatickému charakteru reaktivačního procesu je vhodné použití UV záření s takovou vlnovou délkou, která poškozují nejen nukleové kyseliny (DNA/RNA), ale i jiné biomolekuly, které jsou zodpovědné za reparační působení.

Při působení sterilizačních médií je tak nutné použít takovou sterilizační dávku, při které v mikroorganismu nedojde k aktivaci reparačních mechanismů. Dávka skládající se z vysoké intenzity a krátké expozice tak má vyšší sterilizační účinky než stejná dávka při nízké intenzitě a dlouhé expozici.

2.8 Výběr kontrolního mikroorganismu

Pro realizaci vlastních experimentů, které jsou obsaženy v této práci, bylo velice důležité nalézt vhodný kontrolní mikroorganismus.

Vědecké týmy, které se problematikou sterilizace zabývají, používají pro srovnání sterilizačních účinků různé druhy mikroorganismů, nejčastěji se však rozhodují podle toho, jak je jejich práce směřována.

Pro aplikaci sterilizace v potravinářském průmyslu je tak vhodné použití kontrolních mikroorganismů jako je *Clostridium botulinum* (konzervace potravin) nebo *Mycobacterium* (pasterizace mléka) [31].

V USA například vznikl institut EPA (American Environmental Protection Agency), který pro testování sterilizačních metod vyžaduje použití dvou druhů mikroorganismů s různými druhy metabolismu (aerobní a anaerobní) [18].

Pro srovnání účinků sterilizačních metod na různé druhy mikroorganismů tak postupně vznikají a jsou uveřejňovány data, kde experimentátoři ukazují své výsledky při použití těchto organismů [39].

Tyto údaje jsou však použitelné pouze pro porovnávání sterilizací za identických podmínek, nejsou tudíž vhodné pro ostatní metody. Ty často mají jiný inaktivační mechanismus, ke kterému mají mikroorganismy zcela rozdílnou senzitivitu, než u ostatních sterilizačních metod. Sterilizace pomocí plazmatu kombinuje několik inaktivačních mechanismů, je proto nutné získat vlastní údaje. Přesto jsou tato experimentální data velice užitečná a cenná.

<i>Bacillus anthracis</i>	1,3	<i>E. coli</i>	1,0
<i>Bacillus anthracis, spóry</i>	6,6	<i>Proteus vulgaris</i>	1,0
<i>Bacillus subtilis, spóry</i>	3,3	<i>Psuedomonas eruginosa</i>	1,6
<i>Clostridium tetanii</i>	3,3	<i>Salmonella sp</i>	1,5
<i>Clostridium botulinum</i>	1,6	<i>Salmonella yphimurium</i>	2,3
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,0	<i>Aspergillus flavus</i>	15,0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,6	<i>Aspergillus niger</i>	50,0
<i>Cyanophyta</i>	60,0	<i>Chlorella sp</i>	3,3
<i>Entamoeba histolytica</i>	12,0	<i>Paramecium</i>	30,0

Tab. 2.04 : Relativní rezistence mikroorganismů vůči UV záření,
vztaženo k *E. coli* = 1 [39]

Nakonec byl k získávání experimentálních dat, která jsou uvedena v této práci, vybrán mikroorganismus *Escherichia coli*.

Tento organismus je často využíván jako modelový a tudíž byl určen jako velice vhodný pro toto použití. Senzitivita *E. coli* vůči různým sterilizačním metodám je také publikována v mnoha pracích, které pochází od nejrůznějších vědeckých týmů.

2.9 Escherichia coli

Veškeré experimenty uvedené v této práci byly prováděny na mikroorganismu *Escherichia coli* pocházejícího z České sbírky mikroorganismů (*E. coli* CCM 3954).

2.9.1 Taxonomické zařazení

Říše : Bacteria

Oddělení : Protobacteria

Třída : Gamma Proteobacteria

Řád : Enterobacteriales

Čeleď : Enterobacteriaceae

Rod : *Escherichia*

Druh : *E. coli*

Tuto bakterii poprvé identifikoval německý pediatr Theodore Escherich v roce 1885, a to během svých studií intestinální flory.

Popsal ji jako *Bacterium coli commune*. Tento název byl užíván až do roku 1919, kdy Castella Chalmers definoval bakteriální rod *Escherichia*.

Mezi další druhy rodu *Escherichia* patří *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii* a *Escherichia vulneris* [23].

2.9.2 Význam

Po mnoho let byla tato bakterie studována a stala se tak modelem pro popis struktury, růstu i metabolismu mikroorganismů. Později se také stala velice důležitou pro experimenty s klonováním genů prokaryotických i eukaryotických buněk. Dnes je tento organismus také využíván jako indikátor pro fekální znečištění vody, jídla i životního prostředí.

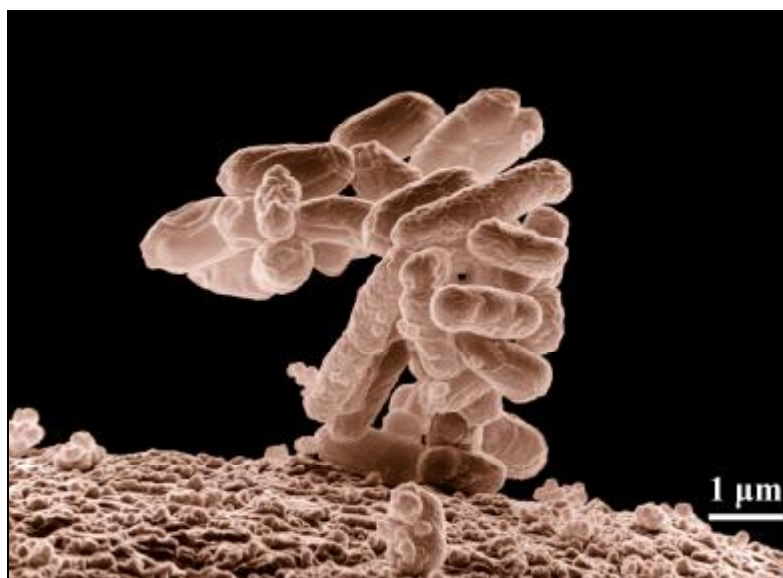


Obr. 2.08 : Křížový roztěr *E.coli* CCM 5172 na MPA [57]

E. coli je běžnou součástí lidské intestinální flory a také flory teplokrevných zvířat (savci, ptáci). Nicméně pokud se tento organismus dostane mimo intestinální trakt, může způsobit vznik různých onemocnění a zánětlivých stavů (infekce močových cest, respiračního ústrojí, záněty v hojících se ranách, otrava krve apod.)[23].

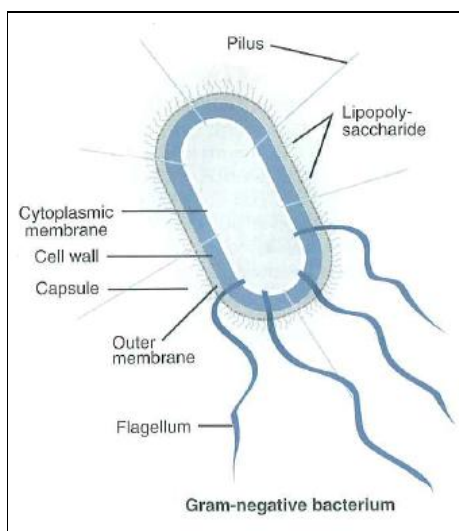
2.9.3 Morfologie

E. coli patří mezi gramnegativní bakterie tvaru rovných tyček se zaoblenými konci. Buňky dorůstají do délky 2,0 – 6,0 μm s šířkou 1,1 – 1,5 μm . Patří mezi mikroorganismy nevytvářející spory.



Obr. 2.09 : *E. Coli* - elektronový mikroskop
zvětšení 10 000x [58]

Její motilita je uskutečňována pomocí peritrocheálních flagel. Tyto proteinové struktury dosahují do vzdálenosti 15 – 20 μm od povrchu samotné buňky, a jejich vlastní průměr je 19 – 24nm [23].



Obr. 2.10 : Schéma morfologie gramnegativní bakterie [56]

2.9.4 Metabolismus

E. coli je fakultativně anaerobní organismus. Disponuje obojím druhem metabolismu, to je jak respiračním v přítomnosti kyslíku a fermentačním v případě jeho absence. Při fermentaci se vyznačuje značnou produkcí plynů. Patří mezi oxydáza-negativní a kataláza-positivní organismy. Optimální růstová teplota je 37 °C, nicméně experti určují metabolickou aktivitu mikroorganismu mezi 15 a 45 °C. Tato bakterie dobře roste na většině běžných mediích [46].

2.10 Optická diagnostika plazmatu

Optická diagnostika je jednou z hlavních a nejvíce používanějších metod pro diagnostiku plazmatu. Velkou výhodou je, že nedochází ke změnám plazmatu touto diagnostickou metodou.

Mezi tyto optické diagnostické metody patří optická emisní spektroskopie. Tato metoda využívá detekci záření, které je emitováno excitovanými částicemi plazmatu při přechodu z jedné energetické hladiny na druhou, a následné analýze takto získaných dat. Pomocí této metody lze získat různé informace o vlastnostech plazmatu, jako je jeho chemické složení, velikost rotační či vibrační teploty a jiné [47].

2.10.1 Měření teploty z rotačních čar molekulových spekter

Intenzita emisní čáry rotačního spektra je závislá na počtu molekul nabuzených do rotačního stavu, ze kterého se děje příslušné vyzáření rotačního kvanta. Dále tato intenzita závisí na stupni degenerace, na vlnové délce vyzařované čáry a schopnosti molekuly tuto čáru vyzařovat. V praxi nejpoužívanější metodou pro získání teploty z intenzit rotačních čar jednotlivých větví je metoda Ornstein-van Wijkova. Využívá se měření intenzity rotačních čar zvolené větve vibračního pásu, která však netvoří hranu vibračního pásu [48].

Pro závislost intenzity rotační čáry na teplotě máme rovnici :

$$I = C\nu^4 g_j i e^{-\frac{B'J(J+1)hc}{kT}}$$

C je konstanta pro danou větev, ν je vlnčet dané rotační čáry, g_j je statistická váha energiové hladiny, i je intenzitní faktor daného energiového přechodu, B' rotační konstanta pro horní vibrační stav a J je rotační kvantové číslo horního stavu.

Po zlogaritmování dostáváme rovnici :

$$\ln \frac{I}{Ci} = -\frac{hcB'}{kT} J'(J'+1) + konst.$$

Grafem závislosti $\lg I/Ci$ na $J'(J'+1)$ je přímka.

Lze tak získat rovnici pyrometrické přímky a následně její směrnici, která je vyjádřena vztahem :

$$\tan \alpha = -\frac{hcB'}{kT}$$

Z této směrnice již získáme rovnici pro výpočet rotační teploty :

$$T_r = \frac{hcB'}{k \tan \alpha}$$

2.10.2 Měření teploty z vibračních spekter molekul

Pro výpočet teploty se opět využívá intenzity, tentokrát však vibračního pásu, pro kterou platí vztah:

$$I_{\nu' \nu''} = konst. \nu^4 p(\nu' \nu'') e^{-\frac{E_{\nu'}}{kT}},$$

kde ν' je vibrační kvantové číslo horního stavu, ν'' je vibrační kvantové číslo dolního stavu, $p(\nu' \nu'')$ je pravděpodobnost přechodu a ν je vlnověet pásu (zpravidla vlnověet hrany pásu).

Podle Boltzmannovy statistiky je počet molekul nabuzených do určitého vibračního stavu ν úměrný $\exp(-E_{\nu}/kT)$.

Logaritmováním rovnice pro intenzitu dostaneme vztah:

$$\ln \frac{I_{\nu' \nu''}}{konst \nu^4 p(\nu' \nu'')} = -\frac{E_{\nu'}}{kT}.$$

Toto je rovnice přímky se směrnicí $-1/kT$, kde T je vibrační teplota [49].

Pro neizotermické plasma bývá vibrační teplota zpravidla vyšší než teplota rotační. Na její hodnotu má vliv stupeň ionizace plasmatu, teplota elektronů, teplota neutrálního plynu a tlak plynu. Dále také mají vliv chemické reakce, které probíhají v plasmatu.

2.11 Kolorimetrická analýza

Kolorimetrie je měřicí metoda k určování barevných vlastností pozorovaného vzorku. Každý předmět mění charakteristiku záření dopadajícího ze zdroje a odráží tak jinak spektrálně rozložené světlo [50].

Pro toto měření je důležité mít přesně definovaný zdroj elektromagnetického záření. Asociace CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) tak definovala několik druhů standardních osvětlení. Standardní osvětlení jsou odvozena od reálných zdrojů elektromagnetického záření.

Nejčastěji používané standarty jsou :

- A - žárovka s wolframovým vláknem (2856 K)
- C - Denní světlo na severní polokouli (6774 K)
- D₆₅ - Průměrné denní osvětlení v pravé poledne (6504 K)

Pro porovnávání naměřených hodnot byly dále vyvinuty různé souřadnice pro zaznamenávání barvy. Těmito stupnicemi jsou *CIE XYZ*, *CIE Yxy*, *bělost WI* a *žlutost YI*. Přitom parametry, které jsou při výpočtech těchto parametrů použity, charakterizují osvětlení vzorku a jeho odrazivost.

Parametry *bělost* a *žlutost* jsou vhodné pro měření bílých objektů a jejich degradací.

Pro tato měření se používá tzv. kolorimetru. Je to přístroj, který odražené světlo od objektu rozděluje na tři barevné filtry a reprezentuje tak souřadnice *XYZ*. Z těchto souřadnic pak již sám určí hodnoty *bělost* a *žlutost*.

KAPITOLA 3

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použitá média, laboratorní, experimentální přístroje a software

Pro uskutečnění daných experimentů bylo zapotřebí používat různá kultivační média, roztoky a laboratorní přístroje a příslušným softwarem.

Roztoky a kultivační média

MPB (masopeptonový bujón)

Nutrient Broth M002 – (HIMEDIA)

Chemické složení:

Masový pepton	5,0 g/l
Hovězí extrakt	1,5 g/l
Kvasničný extrakt	1,5 g/l
Chlorid sodný	5,0 g/l
Destilovaná voda	1,0 l
pH 7,4 ± 0,2 (při 25°C)	

MPA (masopeptonový agar)

Chemické složení:

MPB + agar RM 026 15g/l (HIMEDIA)

Fosfátový pufr

Chemické složení:

Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	1,431 g
KH ₂ PO ₄	0,549 g
Destilovaná voda	240 ml
pH 7,2	

Presence-Absence broth (MERCK)

Chemické složení:

Masový extrakt	3,0 g/l
Pepton	5,0 g/l
Laktóza	7,46 g/l
Tryptóza	9,83 g/l
Hydrogenfosforečnan didraselný	1,35 g/l
Dihydrogenfosforečnan draselný	1,35 g/l
Chlorid sodný	2,46 g/l
Laurylsíran sodný	0,05 g/l
Bromkrezolová červeň	0,0085 g/l

Laboratorní přístroje

Autokláv - AUT 26, Medicínská technika Brno
Biohazard-box - EF A4, Sholler Instruments
Analytické váhy - Sartorius excellence
Přístroj pro přípravu demineralizované vody - Demiwa 3ros
Třepačka - Water bath shaker 357, ELPAN
Termostat - RT 120, Laboratorní přístroje Praha
Centrifuga - Universal 30RF, Hettich
Spektrofotometr - Spekol 11, Carlzeiss Jena

Experimentální zařízení pro vysokofrekvenční výboj

Vysokofrekvenční generátor - CESAR 1310, Dressler
Přízpusobovací člen - VM 1000 A, Dressler
Teslův transformátor - TVI 862, Tesla Rožnov
Průtokoměr - FMA-Series, Omega, max. průtok 5 l/min

Experimentální zařízení pro nízkofrekvenční výboj

Stejnoseměrný zdroj - Mesit YE 3 T (2x40 V – 4 A)
Nízkofrekvenční generátor - Lifetech
Průtokoměr - FMA-Series, Omega, max. průtok 5 l/min

Další experimentální zařízení

Spektrometr - HORIBA JOBIN-YVON FHR 1000

Spektrometr - JOBIN-YVON TRIAX 550

Termokamera - FLUKE Ti 30 Thermal imager

Multimetr - Metex M-3860 D

Kolorimetr - X-RITE 918

Software

Spektrum Analyzer 1.6 - Katedra fyzikální elektroniky, PŘF, MU Brno

LabSpec 5 - emisní spektrometrie

Spektramax for Windows 2.50 , Grams version 3.04 Level III - emisní spektrometrie

InsidelR - zpracování snímků z termokamery

3.2 Příprava médií a experimentálního bakteriálního vzorku

Příprava médií

MPB

- rozpuštění 13g média v 1 l destilované vody
- sterilizace v autoklávu po dobu 15 min při 121°C a 105 kPa

MPA

- rozpuštění 15g agaru v 1 l připraveného MPB
- sterilizace v autoklávu po dobu 15 min při 121°C a 105 kPa
- sterilní rozlití do sterilních Petriho misek
- uchovávání v chladu dnem vzhůru

Presence-Absence broth

- rozpuštění 91,5g média v 1 l demineralizované vody
- sterilizace v autoklávu po dobu 12 min při 121°C a 105 kPa

Fosfátový pufr

- sterilizace v autoklávu po dobu 20 min při 121°C a 105 kPa

Příprava bakteriálního vzorku

Pro vlastní experimenty byl použit bakteriální kmen *Escherichia coli* CCM 3954 pocházející z České sbírky mikroorganismů.

E.Coli byla přeočkována ze šikmého masopeptonového agaru (MPA) do Erlenmayerovy baňky s 50 ml masopeptonového bujonu (MPB). Tato baňka byla v termostatu kultivována při teplotě 30°C po dobu 12 hodin (tzv. over-night kultura).

Dále bylo z tohoto inokula odpipetováno po 5ml do tří Erlenmayerových baněk se 150 ml MPB. Tyto baňky byly kultivovány na třepačce s vodní lázní při teplotě 30°C po dobu 24 hodin a s amplitudou 120 rpm.

Následně byl vzorek promýván demineralizovanou vodou a centrifugován. Centrifugace byla prováděna při 6000 ot/min po dobu 15 min a při teplotě 4°C. Poté byl vzniklý supernatant odlit, doplněn demineralizovanou vodou a opět centrifugován. Tento postup byl zopakován ještě jednou.

Po posledním odlití supernatant byl získán požadovaný vzorek promytých bakteriálních buněk, který byl pomocí demineralizované vody zředěn na spektrofotometru na hodnotu zákalu 80 % (propustnost 0,20) při vlnové délce 600 nm.

Bakteriální suspenze připravená tímto způsobem byla použita v následujících experimentech.

3.3 Vyhodnocování

Proces vyhodnocování během této práce zaujímal metody kvalitativní i kvantitativní, a to podle aktuální situace a potřeby, která při experimentech nastala.

3.3.1 Kvantitativní hodnocení experimentu

Kvantitativní stanovování počtu mikrobiálních buněk je nedílnou a velice významnou součástí mnoha mikrobiologických experimentů. Výsledné hodnoty jsou zpravidla přepočítávány na objem 1ml původního vzorku, což umožňuje následné porovnávání s výsledky ostatních experimentů.

Dané metody se rozdělují na *přímé – mikroskopické* a *nepřímé – kultivační* [51].

Tyto metody mají značné výhody i nevýhody a jejich volba závisí na charakteru experimentu.

Mikroskopické stanovování počtu mikroorganismů má výhodu v rychlosti získání výsledků, zahrnují však počet živých i mrtvých buněk. Naproti tomu, kultivační metody poskytují obraz o skutečném fyziologickém stavu mikrobiologické kultury, avšak jsou nákladnější a časově náročnější.

Vzhledem k nutnosti analyzovat pouze živé mikrobiální buňky byla z kvantitativního vyhodnocovacích metod zvolena metoda *nepřímá – kultivační*.

Kultivační stanovení celkového počtu životaschopných buněk

Tato metoda vychází z obecného, empiricky ověřeného předpokladu, že z jedné životaschopné buňky vyrůstá jedna kolonie. Pojem „životaschopnost“ v tomto případě vyjadřuje schopnost buňky vytvářet na agarovém živném médiu makroskopicky viditelné kolonie.

Samotné zaočkování inokula do agarového média je prováděno nanesením 0,1 ml experimentálního vzorku a jeho následným důkladným rozetřením po celé agarové plotně.

Je také nutné suspenzi před očkováním zředit, aby na tuhém médiu vyrostly jednotlivé kolonie, které se nepřekrývají svými okraji. Při ředění se obvykle, pro snadnější výpočty, používá koeficient 10.

Pro určení optimálního konečného zředění je nutno odhadnout hustotu suspenze

- $0-10^3$ buněk/ml – bez opalescence
- 10^5 buněk/ml – lehce opaleskuje
- 10^7-10^9 buněk/ml – tvoří mléčný zákal

- závisí na tvaru a velikosti buněk

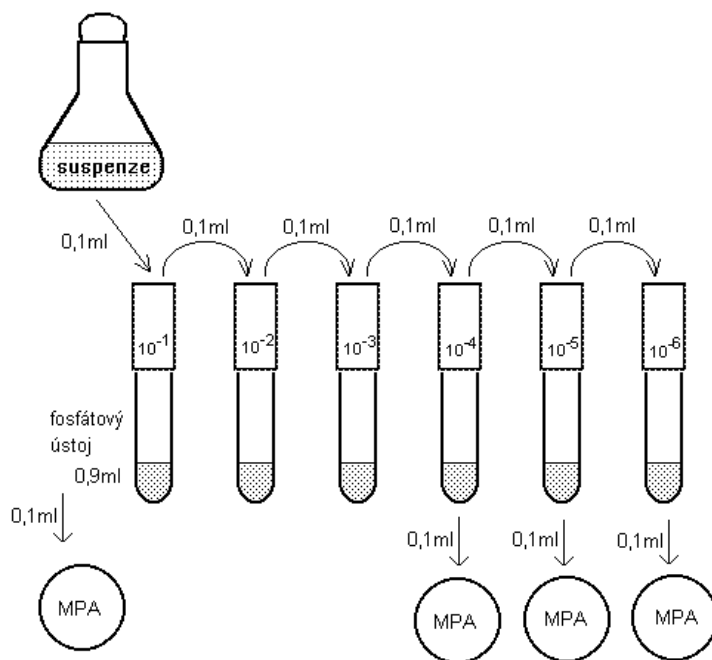
Postup :

Připravíme řadu sterilních zkumavek s fosfátovým pufrem o objemu 0,9 ml. Z experimentálního vzorku odebereme 0,1 ml suspenze a přeneseme do první zkumavky. Následně čistou pipetou zamícháme obsah první zkumavky, odebereme z ní 0,1 ml a přeneseme do druhé zkumavky. Další čistou pipetou opět promícháme obsah druhé zkumavky a odebereme 0,1 ml do třetí zkumavky.

Tento postup opakujeme až do konečného zředění. Všechny tyto kroky je nutno provádět sterilně.

Následuje očkování, které provádíme na Petriho misky s MPA. Očkujeme 0,1 ml suspenze, vždy alespoň tři misky od každého ředění, a následně roztíráme sterilní hokejkou po celém povrchu misky.

Poté Petriho misky kultivujeme v termostatu při teplotě 30°C po dobu 24 – 48 hodin, a to otočené dnem vzhůru.



Obr. 3.01 : Kultivační stanovení počtu buněk [51]

Vyhodnocení :

Ke konečnému vyhodnocení vybíráme misky s nejvhodnějším ředěním (20 – 200 kolonií na misce) a spočítáme počet kolonií na všech miskách tohoto ředění. Z takto získaných hodnot získáme vynásobením počtem ředění a deseti (pipetování 0,1 ml na misku) výsledný průměr.

Počet buněk je uváděn jako CFU/ml (Colony Form Unit / ml). Důvodem je to, že ne vždy jedna kolonie reprezentuje jednu buňku. Některé buňky mohou být dočasně spojeny a vyrůstá z nich tak pouze jedna kolonie.

Tímto způsobem byl stanovován i počet buněk v původním, neopracovaném vzorku.

Objem 0,9 ml pro kvantitativní vyhodnocení byl odebrán přímo z plného objemu opracovaného vzorku (sterilizace 20ml experimentální suspenze) nebo z objemu 50 ml vody (do které byl vložen opracovaný filtrační papír s 25 µl bakteriální suspenze a následně 5 minut vytřepáván).

3.3.2 Kvalitativní hodnocení experimentu

Tento způsob vyhodnocování je nutné použít v případě, kdy koncentrace životaschopných buněk ve vzorku dosahuje velice nízkých hodnot a není tak možno použít kultivační metodu.

Pro toto hodnocení bylo použito speciální médium, Presence Absence Broth.

V případě přítomnosti bakterie E.Coli v tomto médiu je při dodržení kultivačních podmínek změněna jeho barva z purpurové na žlutou.

Postup:

50 ml experimentálního vzorku smícháme s 50 ml připraveného sterilního média a následně kultivujeme na třepačce při teplotě 35°C po dobu 48 hodin.

Vyhodnocení :

Po 48 hodinách kontrolujeme barvu média. Pokud v experimentálním vzorku byly přítomny bakterie daného typu, došlo ke změně barvy tohoto média na žlutou. V opačném případě zůstává médium barevně nezměněno – barva je purpurová.



Obr. 3.02 : Médium s přítomností bakterie E.Coli (vlevo)
a médium se sterilní vodou (vpravo)

3.3.3 Grafické vyhodnocení dat získaných mikrobiologickým experimentem

Pro vyhodnocení mikrobiologických experimentů bylo zapotřebí použít vztahy charakterizující přežití bakteriálních mikroorganismů po aplikaci sterilizačního média.

Míra sterilizace byla tedy charakterizována pomocí dvou veličin

- *Faktoru přežití* R_f [12]
- *Letality* L [31].

Obě tyto veličiny pracují s logaritmickým vyjádřením počtu CFU/ml (v původním vzorku, opracovaném vzorku či nevyrostlých kolonií). Důvodem je velký rozdíl počtu kolonií ve vzorku před a po opracování (často několik řádů).

Vyjádření *Faktoru přežití* R_f

$$R_f = \log(N_0) - \log(N_d),$$

kde N_0 je počet CFU/ml v neopracovaném vzorku a N_d je počet nevyrostlých kolonií.

Vyjádření *Letality* L

$$L = \log(N_0) - \log(N),$$

kde N_0 je počet CFU/ml v neopracovaném vzorku a N je počet CFU/ml v opracovaném vzorku.

3.4 Popis experimentálního zařízení a expozice bakteriálního vzorku

Pro experimenty, které jsou uvedeny v této práci, byla použita zařízení pro vysokofrekvenční a nízkofrekvenční plasmový výboj.

Zařízení pro vysokofrekvenční výboj bylo použito pro sterilizaci bakteriálního vzorku o objemu 25 μ l na filtračním papíru a pro sterilizaci vzorku o objemu 20ml v laboratorní baňce. Nízkofrekvenčního výboje bylo použito pouze pro expozici vzorku s objemem 25 μ l na filtračním papíru.

Zařízení pro vysokofrekvenční plasmový výboj

Toto experimentální zařízení je složeno z vysokofrekvenčního generátoru CESAR 1310, který pracuje s frekvencí 13,56 MHz, z přizpůsobovacího členu WM 1000 A, a dále mosazné elektrody s křemennou kapilárou. Elektroda s kapilárou jsou uchyceny na teflonové trubičce, která tak umožňuje snazší manipulaci s tímto zařízením. Přizpůsobovací člen, skládající se z kondensátorů a cívek, je po připojení ke generátoru plně automatizován a je tak schopen měnit velikost odraženého výkonu na nejnižší možnou hodnotu. Jako pracovní plyn byl použit argon a hodnota jeho průtoku byla nastavována na požadovanou hodnotu pomocí průtokoměru Omega FMA-A2408.



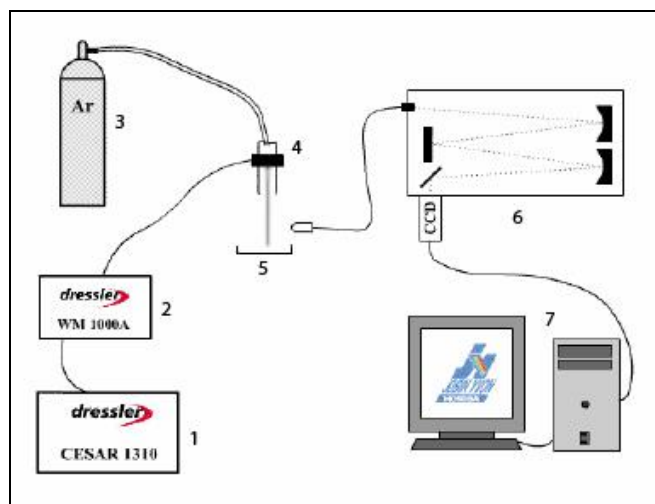
Obr. 3.03 : 1-vysokofrekvenční generátor, 2-přizpůsobovací člen, 3-průtokoměr, 4-elektroda s křemennou kapilárou

Zařízení pro nízkofrekvenční plasmový výboj

Zařízení je složeno ze stejnosměrného zdroje Mesit YE 3 T (2x40 V – 4 A), ke kterému je připojen nízkofrekvenční generátor Lifetech, a dále z mosazné elektrody s křemennou kapilárou. Pracovní frekvence se pohybovala okolo 10 kHz. Jako pracovní plyn zde byl použit argon a hodnota jeho průtoku byla nastavována pomocí průtokoměru Omega FMA-A2408.

Spektrální analýza plasmového výboje

Při měření optických emisních spekter plasmového výboje (vysokofrekvenčního či nízkofrekvenčního) byly pro zjištění intenzit použity spektrometry HORIBA JOBIN-YVON FHR 1000 se CCD detektorem a JOBIN-YVON TRIAX 550. Takto získaná data byla dále počítačově zpracována a vyhodnocována.



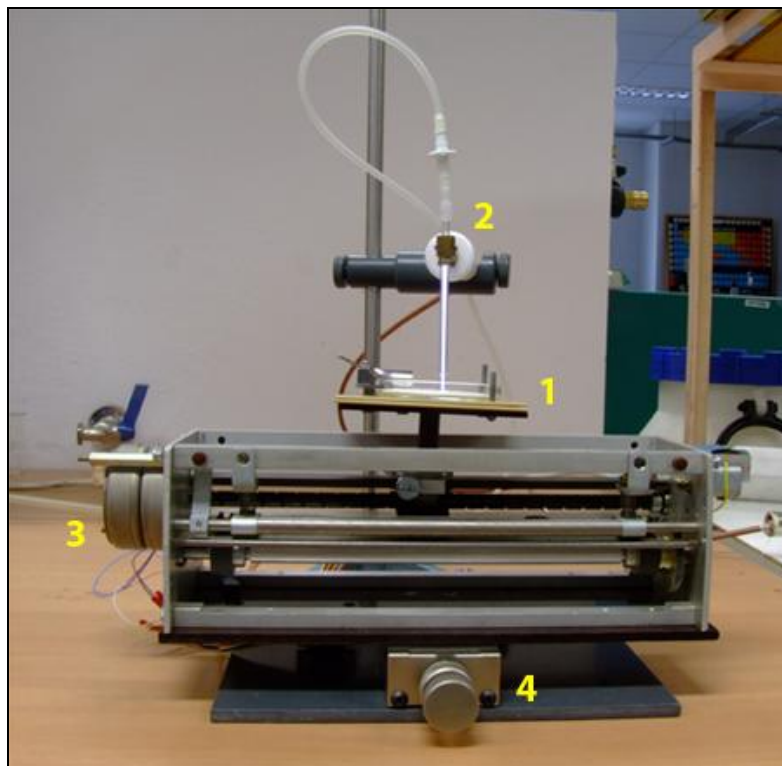
Obr. 3.04 : 1-vysokofrekvenční generátor, 2-přizpůsobovací člen,
3-pracovní plyn, 4-vf výboj, 5-Petriho miska se vzorkem,
6-spektrometr se CCD detektorem, 7-počítačové zpracování emisních spekter

Expozice bakteriálního vzorku

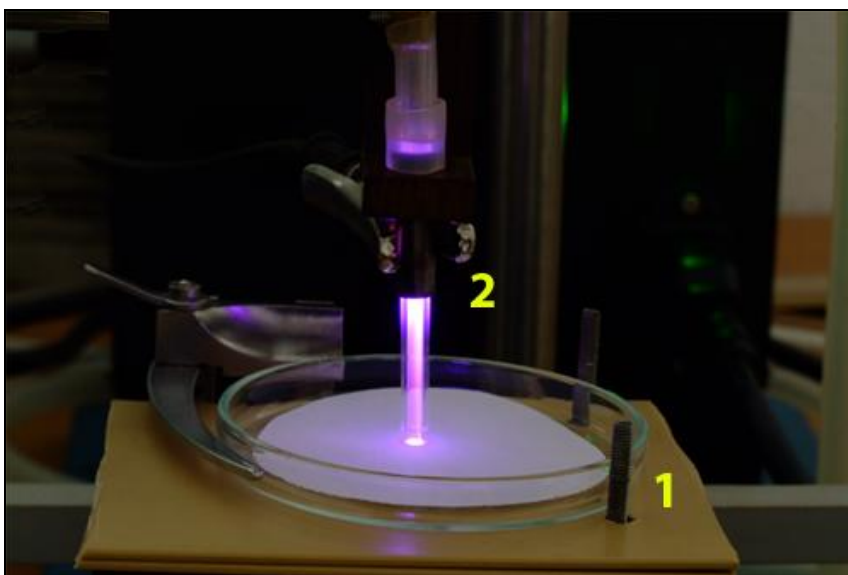
Při sterilizaci bakteriálního vzorku o objemu $25\mu\text{l}$ na filtračním papíru bylo použito zařízení pro vysokofrekvenční i nízkofrekvenční výboj.

Tento filtrační papír byl umístěn na Petriho misce a vzdálenost mezi koncem kapiláry a povrchem filtračního papíru byla 2 mm.

Petriho miska byla umístěna na zařízení opatřené krokovým elektromotorkem (pohyb Petriho misky ve směru osy x) a posuvným mikrometrovým šroubem (pohyb misky ve směru osy y). Rychlost pohybu ve směru osy x byla $12,5\text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ a pohyb ve směru osy y byl uskutečněn manuálně vždy po 1 mm.



Obr. 3.05 : 1-Petriho miska se vzorkem, 2-vf výboj, 3-elektromotorek, 4-mikrometrový šroub

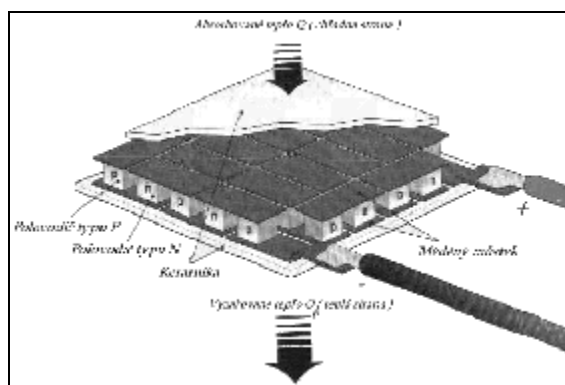


Obr. 3.06 : 1-Petriho miska se vzorkem, 2-nf výboj

Při sterilizaci bakteriální suspenze o objemu 20ml v laboratorní baňce byl použit vysokofrekvenční plasmový výboj.

Laboratorní baňka byla umístěna na chladícím zařízení složeném z chladiče s ventilátorem a Peltierova článku. Tento článek se skládá ze dvou různých polovodičových těles (polovodič typu P a polovodič typu N) a ze spojovacího můstku. Pracuje na základě tzv. Peltierova jevu, kdy při průchodu elektrického proudu jedna strana článku teplo z okolí absorbuje (Peltierovo chlazení) a druhá teplo vyzařuje (Peltierův ohřev) [52].

Peltierova článku zde tedy bylo využito k chlazení bakteriální suspenze při sterilizačním procesu.



Obr. 3.07 : Schéma Peltierova článku



Obr. 3.08 : 1- vf výboj, 2-bakteriální suspenze, 3-Peltierův článek, 4-chladič s ventilátorem

3.5 Vliv teploty na sterilizaci experimentálního vzorku

Při plasmové sterilizaci bylo nutné omezit teplotní vlivy na úroveň, kdy již nepřispívaly k dalším sterilizačním faktorům působení plasmového výboje. Teplotní sterilizace, založená na konformační a následně i funkční změně pro mikroorganismus důležitých biomolekul, je jednou z fyzikálních sterilizačních metod.

Plasmová sterilizace je však založená na působení jiných fyzikálních agens, tudíž byly tyto teplotní vlivy během sterilizačního procesu pečlivě kontrolovány.

Požadavkem přitom bylo, aby teplota sterilizačního prostředí (kapalinový objem, filtrační papír) nepřesáhla 50°C.

Pro kontrolu teploty byl během sterilizace kapaliny pomocí vysokofrekvenčního výboje použit termočlánek typu K a multimetr Metex M-3860 D.

Jako monitorovací zařízení během sterilizace filtračního papíru s naneseným vzorkem pomocí nízkofrekvenčního a vysokofrekvenčního výboje byla použita termokamera FLUKE Ti 30 Thermal imager.

Termočlánek jako monitorovací zařízení

Teplota kapalinového objemu během sterilizačního procesu byla měřena pomocí termočlátku typu K a multimetru Metex, a to ihned po dané aplikační době, kdy byl vysokofrekvenční plasmový výboj použit.

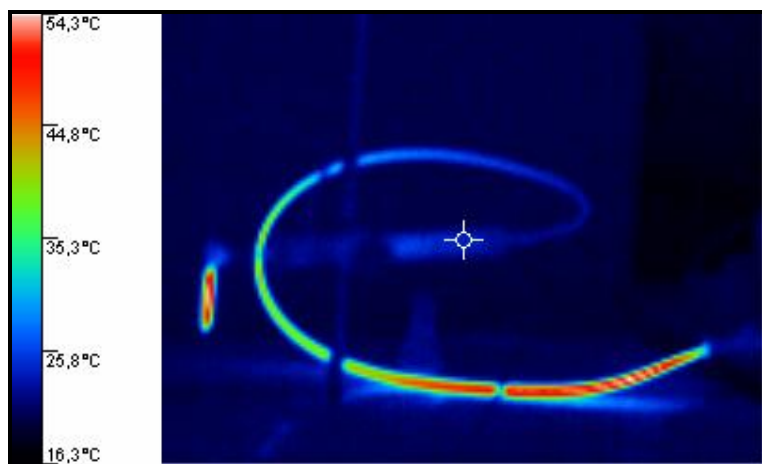
Bylo zjištěno, že se tato teplota pro všechny použité časové úseky vždy pohybovala v rozmezí mezi 40-45°C.

Takto byla potvrzena a splněna podmínka pro omezení teplotního působení plasmového výboje na experimentální kapalinový objem.

Termokamera jako monitorovací zařízení

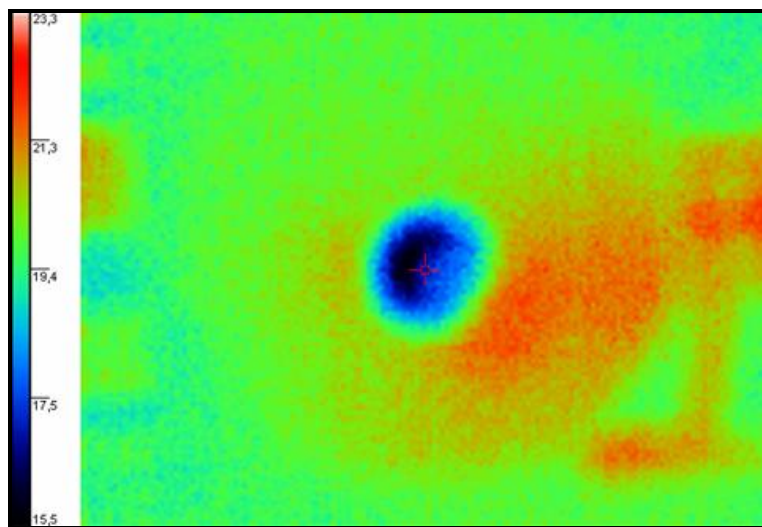
Pomocí termokamery bylo sledováno rozložení teploty na filtračním papíře během aplikace vysokofrekvenčního a nízkofrekvenčního plasmatu jako sterilizačního media na experimentální vzorek.

S využitím softwaru pro zpracování údajů z termokamery byly následně získány a vyhodnoceny teplotní mapy snímaných objektů, které tak potvrdily nezávislost teplotního činitele na sterilizační účinky plasmového výboje.

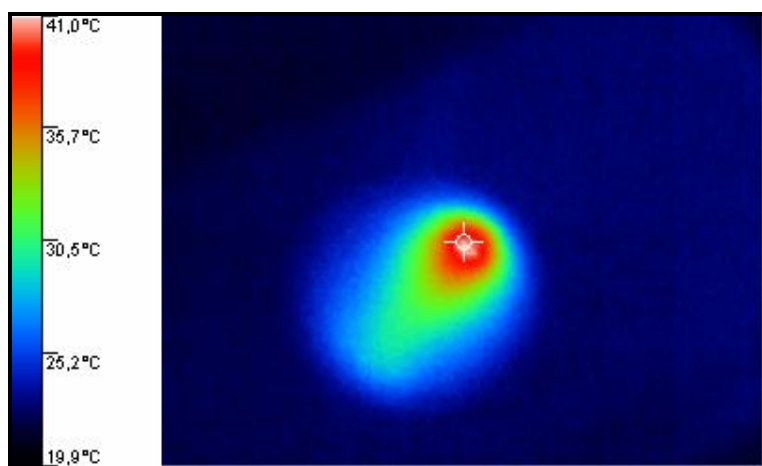


Obr. 3.09 : Teplotní mapa plasmové tužky

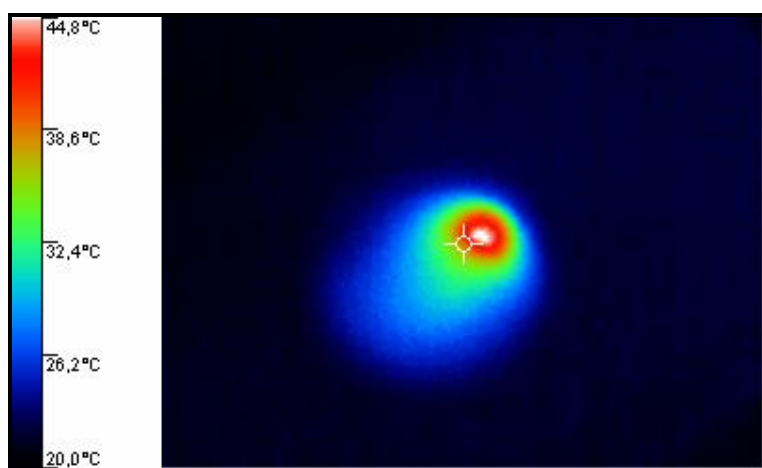
Na obrázku Obr. 3.09 je zařízení pro vysokofrekvenční plasmový výboj snímané termokamerou. Lze zde vidět rozložení teploty podél křemenné kapiláry. Znatelné je také zvýšení teploty na přívodním kabelu, které bylo způsobeno absorpcí výkonu v těchto místech.



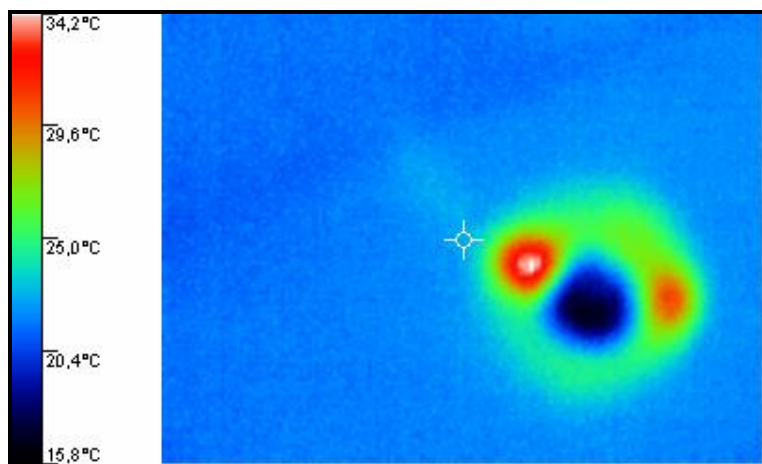
Obr. 3.10 : Teplotní rozložení Petriho misky s filtračním papírem a 25 μ l vzorku



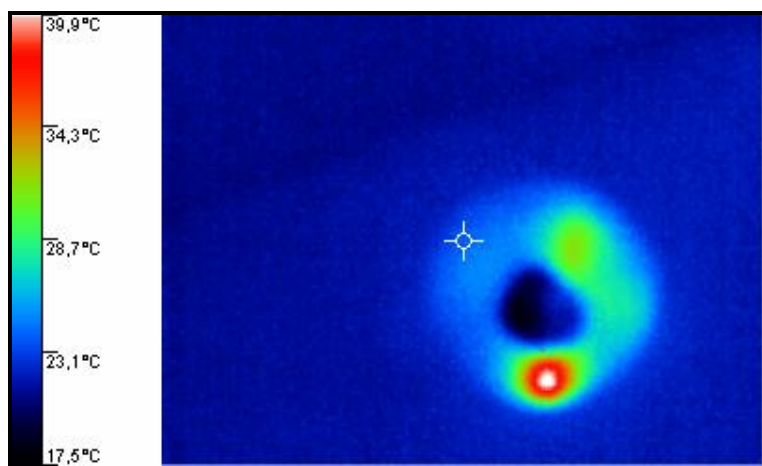
Obr. 3.11 : Filtrační papír po aplikaci vf výboje (bez vzorku)



Obr. 3.12 : Filtrační papír po aplikaci nf výboje (bez vzorku)



Obr. 3.13 : Filtrační papír s 25µl vzorku po aplikaci vf výboje



Obr. 3.14 : Filtrační papír s 25µl vzorku po aplikaci nf výboje

3.6 Vliv proudu plynu na úbytek CFU/ml

Během aplikace plasmového výboje jako sterilizačního média při sterilizaci vzorku o objemu 25ml na filtračním papíru není možné buňky na tomto povrchu jakýmkoliv způsobem fixovat, aniž by při tom došlo k poškození či usmrcení mikrobiálních buněk. Proud plynu vycházející z křemenné kapiláry, která je součástí zařízení pro plasmovou sterilizaci, tak může způsobit to, že některé mikroorganismy jsou proudem tohoto plynu odneseny mimo filtrační papír.

Bylo tak nutné experimentálně zjistit, jakou měrou se proud plynu během sterilizačního procesu podílí na úbytku CFU/ml.

Při experimentech byla použita zařízení pro nízkofrekvenční i vysokofrekvenční výboj, rychlost skenování byla $12,5 \text{ mm.s}^{-1}$. Vzdálenost konce kapiláry od filtračního papíru s experimentálním vzorkem byla 2 mm. Průtok pracovního plynu byl 2,5 l/min.

Použité zkratky :

Origin – původní vzorek

CTRL – kontrolní vzorek (bez opracování)

VF – zařízení pro vysokofrekvenční plasmový výboj

NF – zařízení pro nízkofrekvenční plasmový výboj

P – opracovaný vzorek

Origin [CFU/ml]	CTRL [CFU/ml]	Typ zařízení	Počet skenování	P [CFU/ml]
$1,091 \cdot 10^{10}$	$6,227 \cdot 10^6$	VF	2	$2,873 \cdot 10^5$
$1,091 \cdot 10^{10}$	$6,227 \cdot 10^6$	NF	2	$3,910 \cdot 10^5$

Tab. 3.01 : Výsledky experimentu pro zjištění vlivu proudu plynu na úbytek CFU/ml

Bylo experimentálně zjištěno, že proud plynu bez plasmového výboje má vliv na úbytek CFU/ml v bakteriálním vzorku.

Tento úbytek byl pro obě sterilizační zařízení (pro vysokofrekvenční i nízkofrekvenční plasmový výboj) charakterizován snížením hodnoty CFU/ml přibližně o jeden řád.

3.7 Kolorimetrické stanovení změn filtračního papíru

Při sterilizaci bakteriálního vzorku o objemu 25 μl na filtračním papíru pomocí plasmového výboje docházelo k interakci plasmatu právě s filtračním papírem. Bylo tak nutné zjistit, zda při aplikaci tohoto výboje nedochází k degradaci filtračního papíru.

Pro toto měření byl použit kolorimetr X-RITE 918 a byly tak určeny parametry *XYZ*, *bělost WI* a *žlutost YI*. Pozorovací podmínky byly nastaveny podle standartu E313 (typ osvětlení *C* a pozorovací úhel 2°).

Tento přístroj spočetl průměr z pětinasobného měření v jednom bodě a následně určil výše dané hodnoty.

Všechny vzorky byly měřeny na podložce, kterou byl bílý papír.

Jako zdroj plasmového výboje byl použit nízkofrekvenční výboj (45,07 V, 0,63 A, 10 kHz) a vysokofrekvenční výboj (50W, 13,56 Mhz) s průtokem pracovního plynu 2,5 l/min pro oba typy výboje, kterým byl argon.

Rychlost skenování pracovaného vzorku byla $12,5 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$.

Nastavené parametry pro standart :

$$X = 83,86$$

$$Y = 86,15$$

$$Z = 101,92$$

Typ vzorku	Počet skenování	Bělost WI	Žlutost YI
Podložka	-	121,66	- 10,44
Kontrolní vzorek	-	94,96	- 1,71
VF výboj	1	94,24	- 1,46
VF výboj	4	94,91	- 1,77
NF výboj	1	94,67	- 1,66
NF výboj	4	94,40	- 1,66

Tab. 3.02 : Výsledky kolorimetrických experimentů

Vzhledem k tomu, že se parametry *bělost WI* a *žlutost YI* pro vzorky (filtrační papír) s různou dobou opracování plasmatickým výbojem (vysokofrekvenčním či nízkofrekvenčním) neměnily, nebyla tak způsobena degradace těchto vzorků. Bylo tak ověřeno, že lze plasmový výboj použít i pro sterilizaci velice citlivých materiálů.

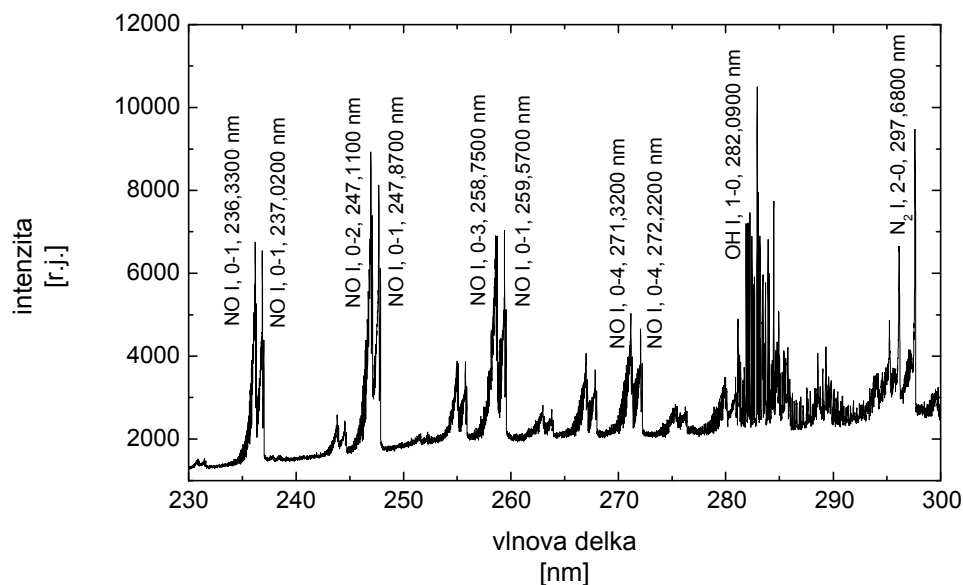
3.8 Důkaz existence volných radikálů v průběhu plasmové sterilizace

Volné radikály mají v procesu sterilizace plasmatem 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.

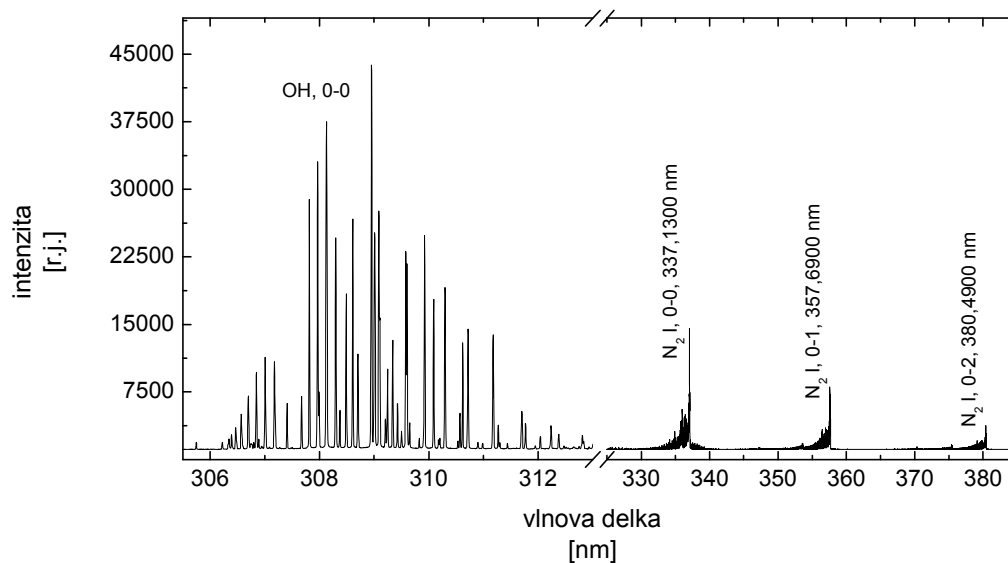
Přítomnost těchto chemických agens byl ověřen pomocí spektrální analýzy plasmového výboje, a to nízkofrekvenčního i vysokofrekvenčního.

Pro měření spekter byl použit spektrometr HORIBA JOBIN-YVON FHR 1000 a spektrometr JOBIN-YVON TRIAX 550.

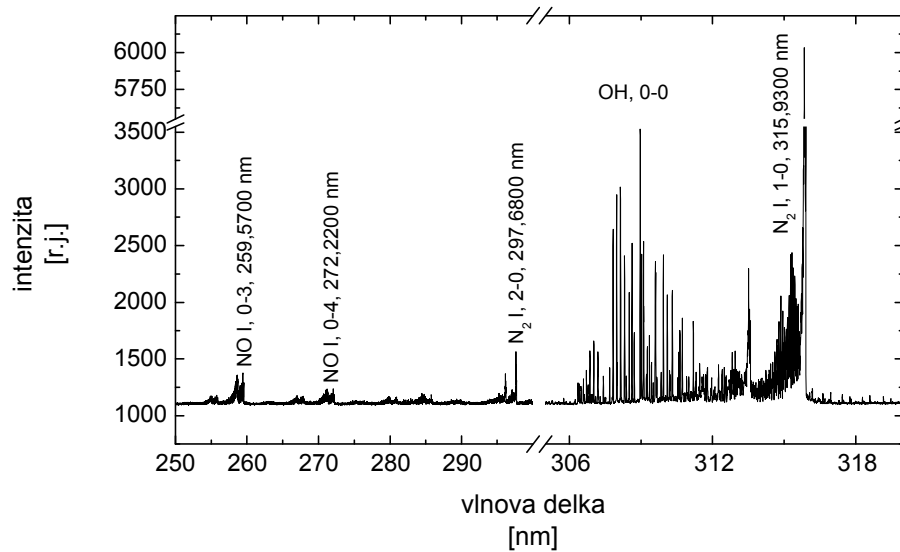
Následná analýza byla provedena pomocí programu Spektrum Analyzer 1.6 [53].



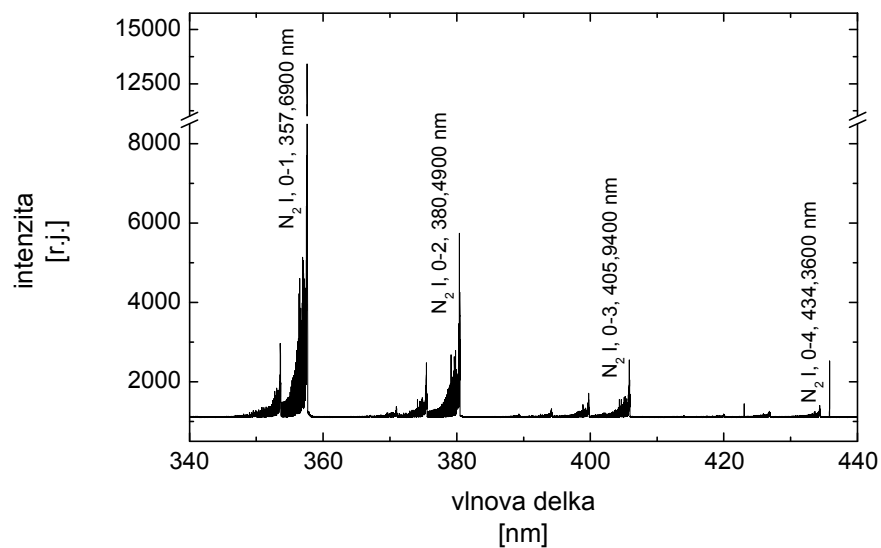
Obr. 3.15 : Vysokofrekvenční výboj, výkon 50W,
NO, N₂ a OH radikály



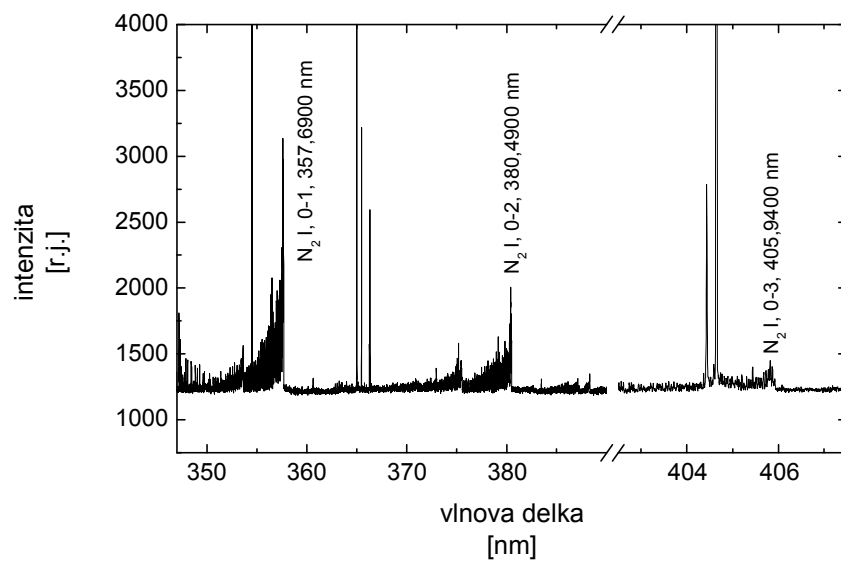
Obr. 3.16 : Vysokofrekvenční výboj, výkon 50W,
 N_2 a OH radikály



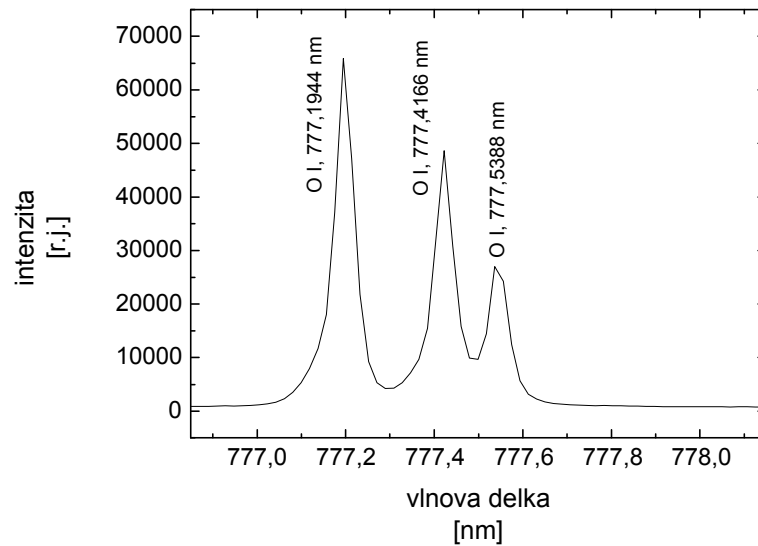
Obr. 3.17 : Nízkofrekvenční výboj, 46,3 V, 0,75 A,
 NO, N_2 a OH radikály



Obr. 3.18 : Nízkofrekvenční výboj, 46,3 V, 0,75 A,
 N_2 radikály



Obr. 3.19 : Vysokofrekvenční výboj, výkon 110W,
 N_2 radikály



Obr. 3.20 : Kyslíkový triplet

Díky spektrální analýze vysokofrekvenčního i nízkofrekvenčního plasmového výboje byla dokázána přítomnost volných radikálů, které se značně podílejí na vlastním účinku během sterilizačního procesu.

Touto analýzou byla prokázána existence radikálů NO, N₂ a OH a to pro obě frekvenční nastavení použítá při plasmové sterilizaci.

U nastavení plasmového výboje pro sterilizaci bakteriálního vzorku s objemem 25 μl byla pomocí spektrální analýzy prokázána přítomnost kyslíkového radikálu, který se vzhledem ke své vysoké reaktivitě ihned mění na molekulu ozonu.

3.9 Optická diagnostika plasmatu

Pro snímání emisních spekter plasmových výbojů, které byly použity při sterilizačních experimentech, byl využit spektrometr HORIBA JOBIN-YVON FHR 1000 se CCD detektorem.

Takto naměřená emisní spektra byla dále zpracována pomocí programu Spektrum Analyzer 1.6 [53], který byl vytvořen na PřF MU Brno. Pomocí něj byl určen výpočet rotační a vibrační teploty plasmového výboje.

Data pro samotný výpočet byla naměřena pro všechny typy experimentálních zařízení použitých při plasmové sterilizaci – vysokofrekvenční (13,56 MHz) i nízkofrekvenční (10 kHz) plasmový výboj.

Pracovní výkon pro vysokofrekvenční plasmový výboj byl nastavován pomocí vysokofrekvenčního generátoru CESAR 1310 a pro nízkofrekvenční plasmový výboj pomocí zdroje Mesit YE 3 T a generátoru Lifetech.

Hodnota průtoku plynu byla nastavena pomocí průtokoměru Omega FMA na hodnotu 2,5 l/min a to pro všechny typy plasmového výboje.

Samotná teplota byla měřena podél celé kapiláry od pracovní elektrody až po konec jazýčku plazmatu.

Poloha sondy 0 mm tedy určuje hodnotu teploty v místě ústí kapiláry. Kladné hodnoty označují posunutí sondy spektrometru ven z kapiláry a záporné hodnoty směrem k elektrodě, tedy dovnitř kapiláry.

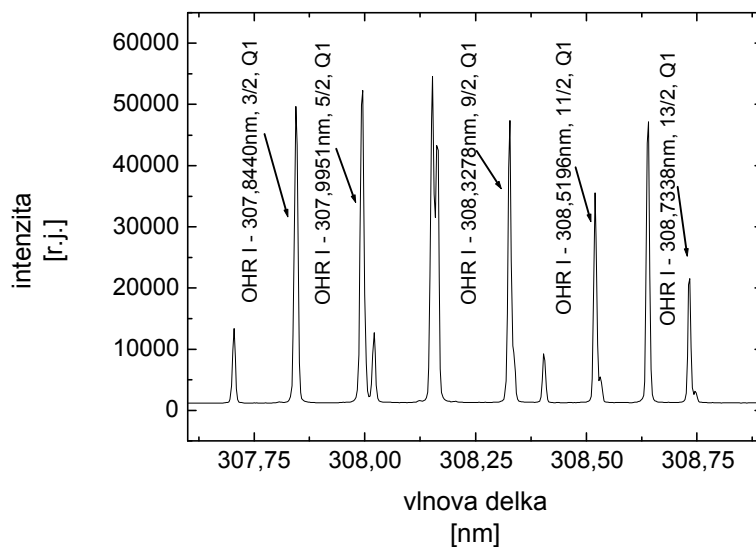
Vzdálenost konce kapiláry od elektrody pro vysokofrekvenční výboj s výkonem 45 W byla 4 cm, pro výkon 50 W byla 6 cm a pro výkon 110 W byla tato vzdálenost 14 cm.

Kalibrace na citlivost měřicího přístroje nebyla provedena, jelikož interval měřené vlnové oblasti byl malý a citlivost přístroje tak byla pro tento rozsah vlnových délek s dobrou aproximací konstantní [54].

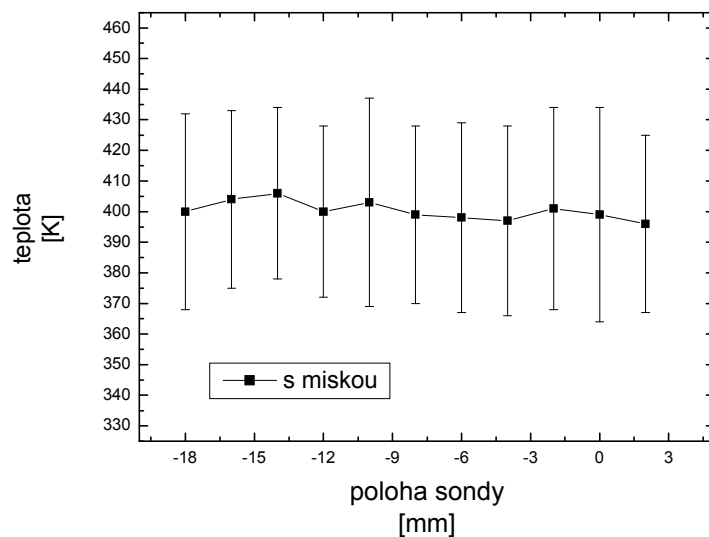
Chyba takto vypočtených hodnot byla stanovena pomocí programu Spektrum Analyzer 1.6 a pohybovala se okolo hodnoty 10 % z vypočtené hodnoty.

3.9.1 Výpočet teploty z rotačních čar molekulových spekter

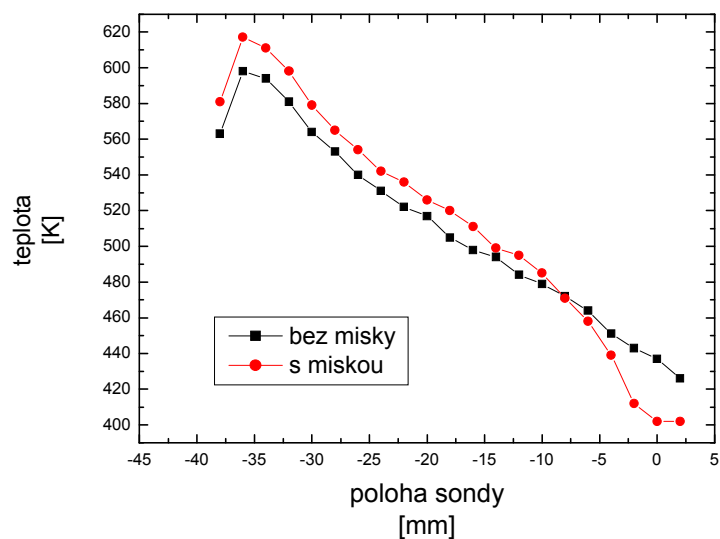
Pro vlastní výpočty rotačních teplot byly použity molekulové pásy OH^- iontů a to větev Q1 pro přechod ${}^2\Sigma \rightarrow {}^2\Pi$.



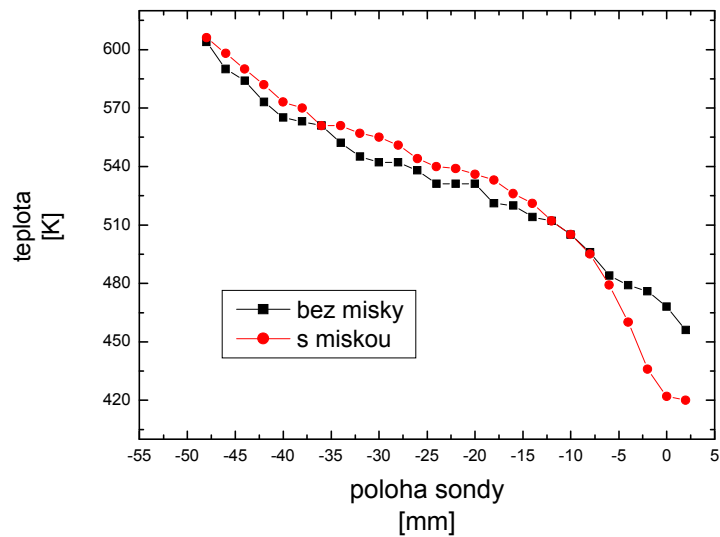
Obr. 3.21 : Část spektra, které bylo použito pro výpočet rotační teploty



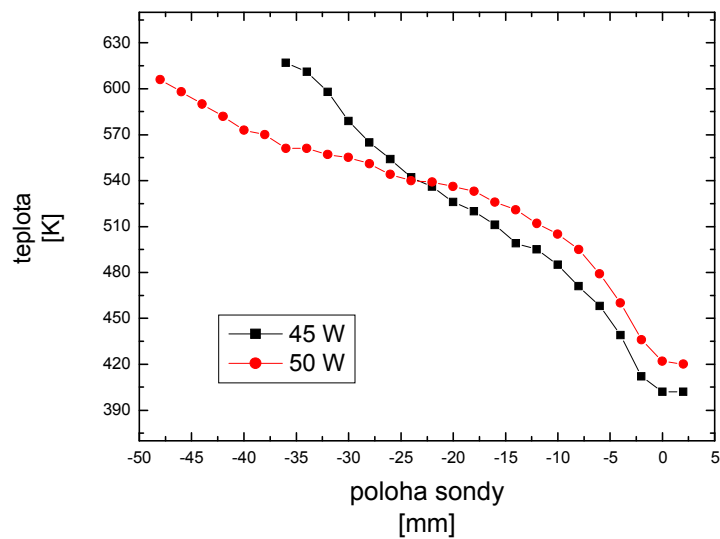
Obr. 3.22 : Rotační teplota nízkofrekvenčního výboje v uspořádání s miskou



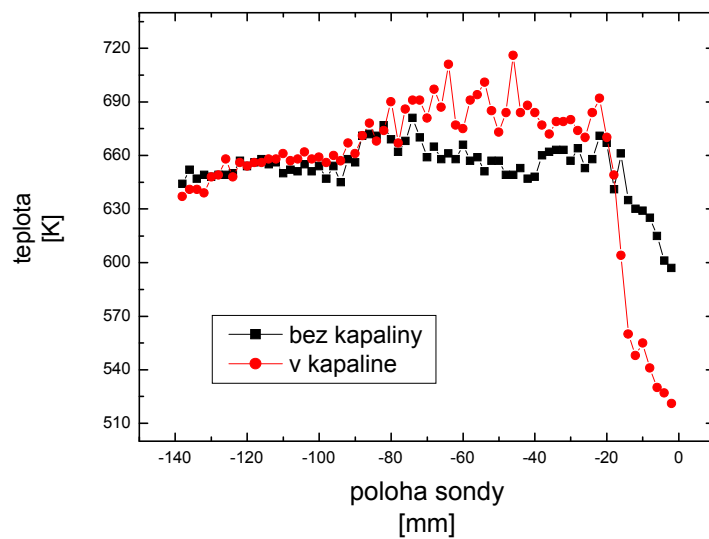
Obr. 3.23 : Rotační teplota vysokofrekvenčního výboje s výkonem 45 W uspořádání bez misky a s miskou



Obr. 3.24 : Rotační teplota vysokofrekvenčního výboje s výkonem 50 W uspořádání bez misky a s miskou



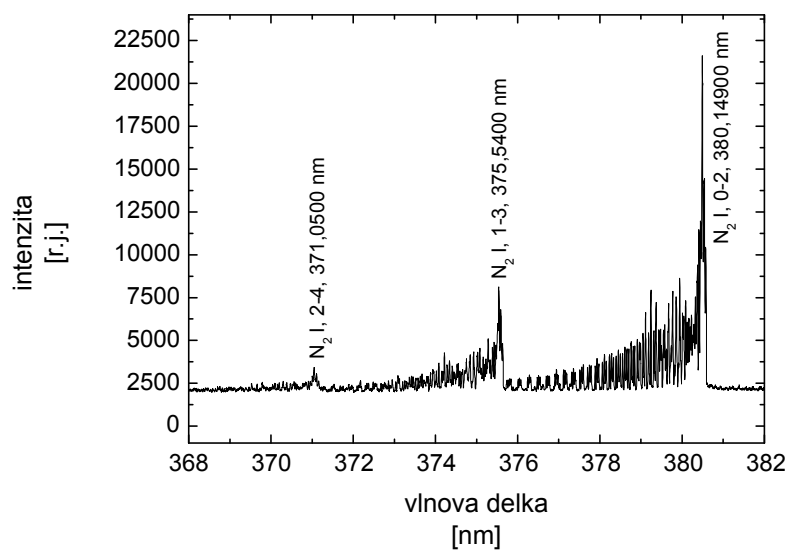
Obr. 3.25 : Rotační teplota vysokofrekvenčního výboje s výkonem 45 a 50 W uspořádání s miskou



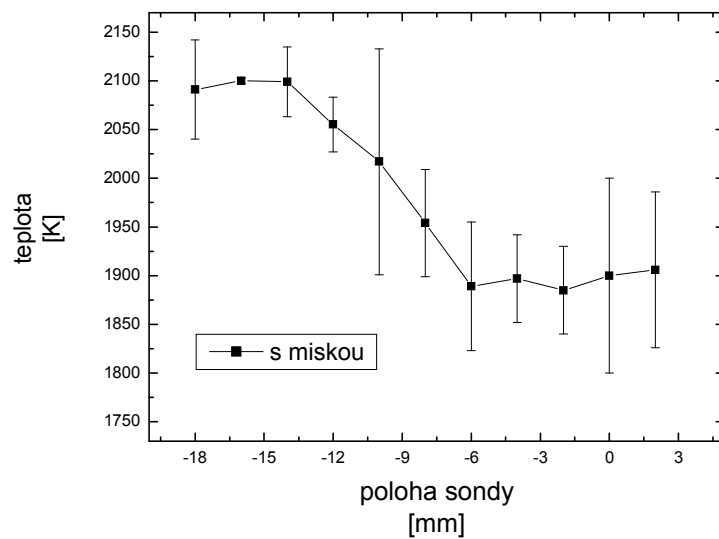
Obr. 3.26 : Rotační teplota vysokofrekvenčního výboje s výkonem 110 W uspořádání bez kapaliny a v kapalině

3.9.2 Výpočet teploty z vibračních čar molekulových spekter

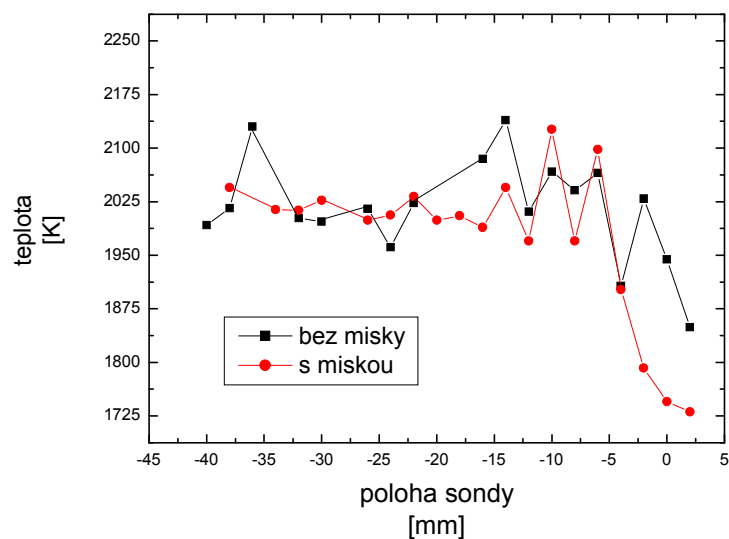
Tato teplota byla stanovena pomocí emisních čar molekulového pásu dusíku N_2 . Byly použity hlavy 0-2, 1-3 a 2-4.



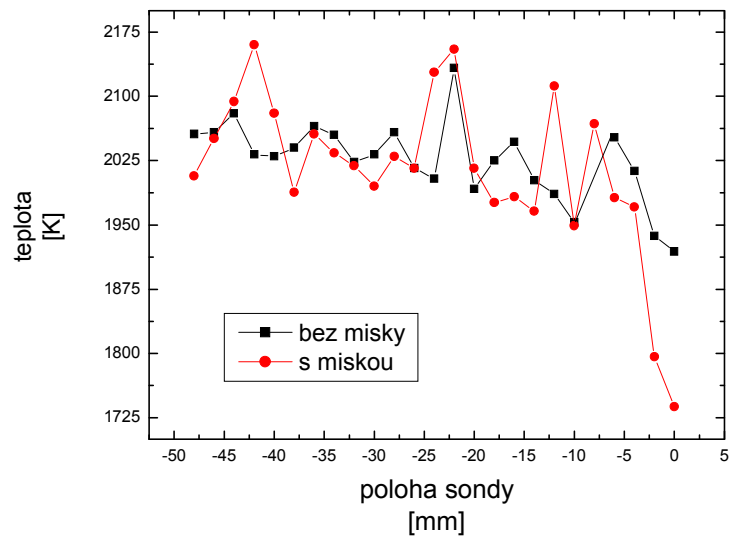
Obr. 3.27 : Část spektra, které bylo použito pro výpočet vibrační teploty



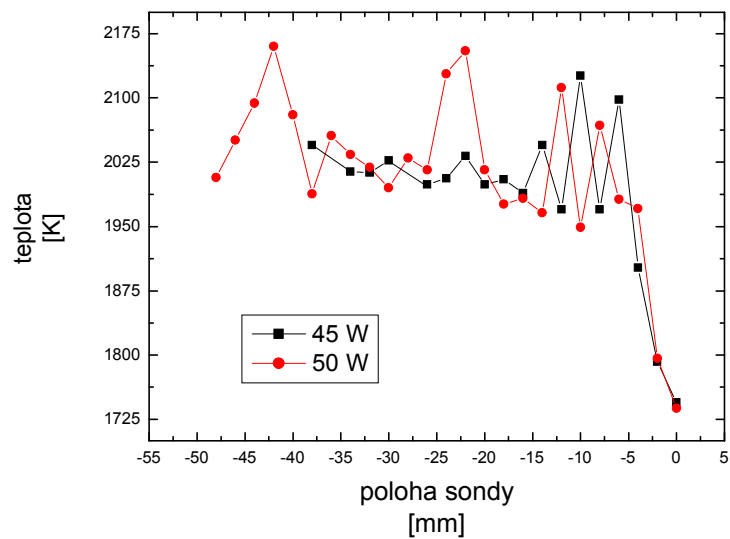
Obr. 3.28 : Vibrační teplota nízkofrekvenčního výboje v uspořádání s miskou



Obr. 3.29 : Vibrační teplota vysokofrekvenčního výboje s výkonem 45 W uspořádání bez misky a s miskou



Obr. 3.30 : Vibrační teplota vysokofrekvenčního výboje s výkonem 50 W uspořádání bez misky a s miskou



Obr. 3.31 : Vibrační teplota vysokofrekvenčního výboje s výkonem 45 a 50 W uspořádání s miskou

Pomocí optické diagnostiky byly proměřeny teplotní závislosti (rotační a vibrační teplota) plasmového výboje na poloze snímací sondy.

Výpočet rotační teploty

Bylo zjištěno, že teplotní závislost u nízkofrekvenčního výboje se na poloze sondy mění jen s malými odchylkami a to v celé délce kapiláry.

Při analýze vysokofrekvenčního výboje při výkonu 45 a 50 W v uspořádání s Petriho miskou a bez ní byl prokazatelný podobný průběh závislosti na poloze sondy pro obě použité hodnoty výkonu. U obou nastavení byl také vidět trend snížení teploty od polohy sondy 6 mm směrem dovnitř kapiláry v uspořádání s Petriho miskou oproti uspořádání bez misky, které bylo pravděpodobně způsobeno ochlazením touto miskou. Při porovnání rotační teploty vysokofrekvenčního výboje při výkonu 45 a 50 W bylo vidět, že teplotní závislost byla pro výkon 50 W posunuta k vyšším teplotám.

Pro teplotní závislosti vysokofrekvenční výboje s výkonem 110 W (uspořádání bez kapaliny a s kapalinou) bylo opět znatelné, že jsou tyto teploty podobné a mění se až v poloze sondy 22 mm směrem dovnitř kapiláry, kdy teplota v uspořádání s kapalinou náhle klesá. Právě k této vzdálenosti od konce kapiláry dosahovala hladina kapaliny v uspořádání plasmového výboje s kapalinou. Tento pokles teploty byl způsoben právě přítomností kapaliny.

Výpočet vibrační teploty

Pro nízkofrekvenční plasmový výboj byl viditelný pokles vibrační teploty ihned za elektrodou.

Při porovnávání teplotní závislosti vysokofrekvenčního výboje s výkonem 45 a 50 W v uspořádání s Petriho miskou a bez ní byla vidět podobnost těchto hodnot až do polohy sondy 4 mm směrem dovnitř kapiláry, kdy se tato teplota snižovala v přítomnosti Petriho misky a to u obou použitých pracovních výkonů. Toto snížení teploty bylo pravděpodobně způsobeno ochlazením Petriho miskou.

Teplotní závislosti a hodnoty získaných vibračních teplot pro vysokofrekvenční plasmový výboj s výkonem 45 a 50 W si byly velice podobné.

3.10 Výsledky sterilizačních experimentů

Plasmový výboj, použitý při sterilizačním procesu, byl realizován pomocí nízkofrekvenčního a vysokofrekvenčního výboje.

Pomocí nízkofrekvenčního výboje byl sterilizován bakteriální vzorek o objemu 25 μl , který byl nanesen na sterilní filtrační papír.

Vysokofrekvenčním výbojem byl sterilizován bakteriální vzorek o objemu 25 μl nanesený na sterilní filtrační papír a také bakteriální suspenze 20 ml, která byla umístěna ve sterilní baňce.

Pracovní nastavení při použití nízkofrekvenčního výboje bylo 44,02 V a 0,66 A. Pracovní frekvence byla 10 kHz.

Pracovní nastavení s využitím vysokofrekvenčního výboje (13,56 MHz) pro sterilizaci vzorku o objemu 25 μl bylo 45 a 50 W a pro sterilizaci 20 ml bakteriální suspenze bylo 110 W.

Při aplikaci plasmového výboje na vzorek o objemu 25 μl byla vzdálenost konce křemenné kapiláry od povrchu filtračního papíru 2 mm. V tomto nastavení byla použita rychlost skenování 12,5 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$. Následně byl pro posouzení sterilizačních účinků měněn počet skenování bakteriálního vzorku.

S použitím vysokofrekvenčního plasmového výboje byla pro výkon 45 W vzdálenost konce kapiláry od elektrody 4 cm a pro výkon 50 W byla tato vzdálenost 6 cm.

Průtok pracovního plynu, kterým byl argon, byl pro všechna experimentální zařízení nastaven na hodnotu 2,5 l/min.

Použité zkratky :

Origin – původní vzorek

CTRL – kontrolní vzorek (bez opracování)

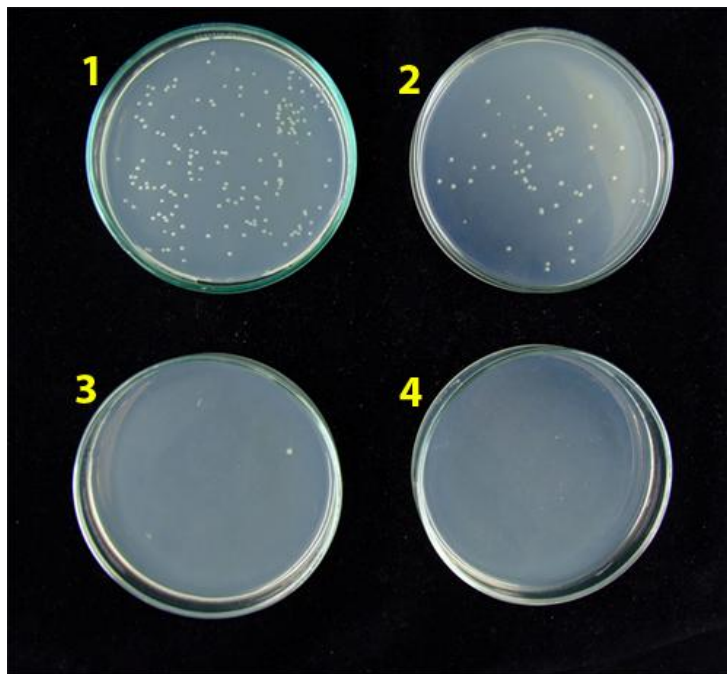
VF – zařízení pro vysokofrekvenční plasmový výboj

NF – zařízení pro nízkofrekvenční plasmový výboj

P – opracovaný vzorek

Žlutá/nesterilní – kvalitativní metoda pomocí média Presence Absence Broth

Červená/sterilní – kvalitativní metoda pomocí média Presence Absence Broth



Obr. 3.32 : 1 – Origin - ředění 10^{-7} , 2 – CTRL - ředění 10^{-4} ,
3 – ošetření nf výbojem 1x - ředění 10^0 , 4 – ošetření nf výbojem 3x - ředění 10^0

Sterilizace bakteriálního vzorku o objemu 25 µl na filtračním papíře

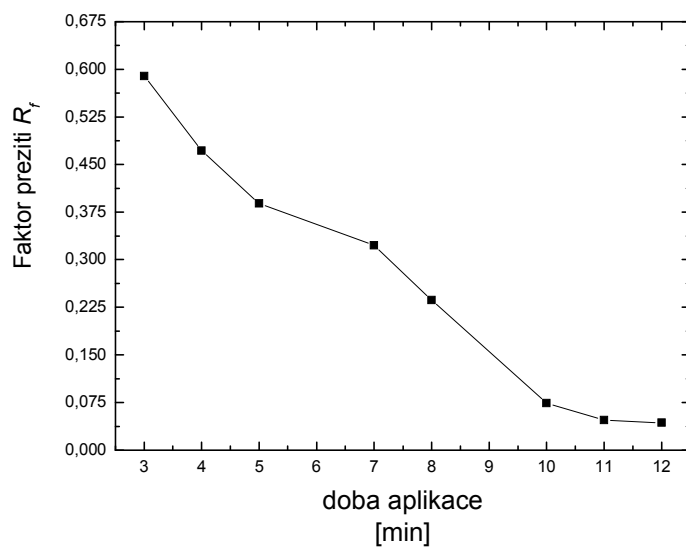
Origin [CFU/ml]	CTRL [CFU/ml]	Typ zařízení	Počet skenování	P
1,246*10 ¹⁰	7,189*10 ⁶	NF 44,02 V 0,66 A	1	Žlutá/nesterilní
1,246*10 ¹⁰	7,189*10 ⁶		2	Žlutá/nesterilní
1,246*10 ¹⁰	7,189*10 ⁶		3	Červená/sterilní
1,246*10 ¹⁰	7,189*10 ⁶		4	Červená/sterilní
1,721*10 ¹⁰	8,567*10 ⁶	VF – 45 W	1	Červená/sterilní
1,721*10 ¹⁰	8,567*10 ⁶		2	Červená/sterilní
1,721*10 ¹⁰	8,567*10 ⁶		3	Červená/sterilní
1,721*10 ¹⁰	8,567*10 ⁶		4	Červená/sterilní
6,567*10 ⁹	4,933*10 ⁵	VF – 50 W	1	Červená/sterilní
6,567*10 ⁹	4,933*10 ⁵		2	Červená/sterilní
6,567*10 ⁹	4,933*10 ⁵		3	Červená/sterilní
6,567*10 ⁹	4,933*10 ⁵		4	Červená/sterilní

Tab. 3.03 : Výsledky sterilizačních experimentů pro daná zařízení

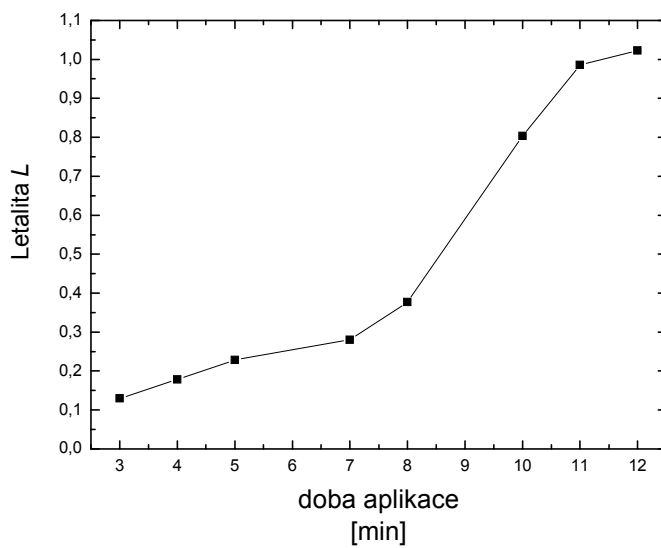
Sterilizace bakteriální suspenze o objemu 20 ml v sterilní baňce

Origin [CFU/ml]	Aplikační doba	P [CFU/ml]	Faktor přežití R_f	Letalita L
1,486*10 ¹⁰	3 min	1,102*10 ¹⁰	5,888*10 ⁻¹	1,294*10 ⁻¹
1,486*10 ¹⁰	4 min	9,838*10 ⁹	4,717*10 ⁻¹	1,788*10 ⁻¹
1,842*10 ¹⁰	5 min	1,030*10 ¹⁰	3,885*10 ⁻¹	2,283*10 ⁻¹
1,842*10 ¹⁰	7 min	1,024*10 ⁹	3,226*10 ⁻¹	2,805*10 ⁻¹
1,842*10 ¹⁰	8 min	9,656*10 ⁹	2,364*10 ⁻¹	3,769*10 ⁻¹
2,246*10 ¹⁰	10 min	3,534*10 ⁹	7,436*10 ⁻²	8,031*10 ⁻¹
2,246*10 ¹⁰	11 min	2,322*10 ⁹	4,739*10 ⁻²	9,856*10 ⁻¹
2,246*10 ¹⁰	12 min	2,128*10 ⁹	4,324*10 ⁻²	1,023*10 ⁰

Tab. 3.04 : Výsledky sterilizačních experimentů pro daná zařízení



Obr. 3.33 : Závislost Faktoru přežití R_f na době aplikace plazmového výboje



Obr. 3.34 : Závislost Letality L na době aplikace plazmového výboje

Bylo experimentálně zjištěno, že sterilizační účinek nízkofrekvenčního výboje je úplný až pro větší počet skenování, tzn. pro delší aplikační dobu. Pro počty skenování 1x a 2x byla koncentrace CFU/ml velice nízká (řádově 10^0 CFU/ml), avšak přítomnost bakteriálních buněk v opracovaném vzorku byla ověřena pomocí kultivačního média Presence-Absence Broth.

Při aplikaci vysokofrekvenčního výboje na bakteriální vzorek o objemu 25 μ l nanesený na sterilní filtrační papír byl sterilizační účinek prokázán pro všechny aplikační doby. Pro vyhodnocení účinku vysokofrekvenčního výboje na bakteriální suspenzi o objemu 20 ml byly použity vztahy pro Faktor přežití R_f [$R_f = \log(N_0) - \log(N_d)$] a Letalitu L [$L = \log(N_0) - \log(N)$] (viz kapitola 3.3.3). Byly tak zjištěny a zpracovány křivky charakterizující sterilizační účinky tohoto plasmového výboje.

KAPITOLA 4

ZÁVĚR

4.1 Závěr

Během prováděných experimentů bylo prokázáno, že plasmový výboj za atmosférického tlaku lze úspěšně použít jako fyzikálně chemické sterilizační médium. Jako experimentální mikroorganismus byla použita bakterie *E.Coli*. K samotné sterilizaci byl použit nízkofrekvenční a vysokofrekvenční plasmový výboj pro sterilizaci povrchu za atmosférického tlaku a dále vysokofrekvenční plasmový výboj pro sterilizaci kapaliny.

Vzhledem k náročnosti přípravy samotných sterilizačních experimentů a jejich následného zpracování (časová náročnost použitých kultivačních metod) způsobila to, že nebylo možné provést větší množství mikrobiologických experimentů.

Pomocí emisní optické spektroskopie byla dokázána přítomnost volných radikálů a to pro všechny typy použitých plasmových výbojů. Tyto volné radikály mají majoritní podíl na sterilizačním účinku plasmového výboje. Takto byla zjištěna existence volných radikálů N_2 , NO , OH a kyslíkového radikálu.

Přítomností emisních spektrálních čar volných radikálů v oblasti vlnových délek 230 – 400 nm bylo prokázáno působení UV záření během sterilizace povrchu, které je dalším z hlavních sterilizačních faktorů plasmové sterilizace.

Emisní optická spektroskopie a následná analýza také neprokázala přítomnost žádných toxických látek.

Pomocí optické diagnostiky plasmatu byla také určena závislost rotační a vibrační teploty plasmových výbojů na poloze sondy.

Závislost rotační teploty na poloze sondy měla pro nízkofrekvenční výboj téměř konstantní průběh, zatímco u závislosti pro vibrační teplotu byl znatelný její pokles v místech za elektrodou.

Bylo také prokázáno, že pro rotační i vibrační teploty, naměřené u daného výkonu vysokofrekvenčního výboje v uspořádání s Petriho miskou a bez ní, je znatelná podobnost až do polohy sondy přibližně 5 mm směrem dovnitř sondy. Od tohoto místa teplota v uspořádání s Petriho miskou klesala znatelně rychleji než pro uspořádání bez misky. Toto bylo pravděpodobně způsobeno ochlazením samotnou Petriho miskou.

U vysokofrekvenčního výboje v uspořádání pro sterilizaci kapaliny byl znatelný pokles rotační teploty oproti seskupení bez kapaliny v místech, kde se nacházela hladina kapaliny.

Kolorimetrická analýza filtračního papíru použitého při sterilizaci povrchu pomocí nízkofrekvenčního a vysokofrekvenčního výboje prokázala, že samotný plasmový výboj nezpůsobuje optickou změnu tohoto filtračního papíru. Lze tak říci, že se jedná o velice šetrnou sterilizační metodu.

Během prováděných sterilizačních experimentů bylo monitorováno tepelné působení plasmového výboje, aby tak nedocházelo ke sterilizaci pomocí vysoké teploty. Takovýto druh sterilizace totiž nebyl předmětem zkoumání této práce.

Při sterilizaci povrchu pomocí zařízení pro nízkofrekvenční a vysokofrekvenční plasmový výboj byl experimentálně zjištěn vliv působení proudu pracovního plynu. Toto proudění sice způsobilo snížení počtu bakteriálních buněk v experimentálním vzorku o přibližně jeden řád (charakterizovaný pomocí jednotky CFU/ml), nemohlo však při plasmové sterilizaci způsobit falešně pozitivní výsledek.

Během sterilizačních experimentů s využitím vysokofrekvenčního plasmového výboje na sterilní filtrační papír s naneseným bakteriálním vzorkem o objemu 25 μ l byl prokázán úplný sterilizační účinek pro výkon 45 a 50 W.

Při aplikaci nízkofrekvenčního plasmového výboje na sterilní filtrační papír s naneseným bakteriálním vzorkem o objemu 25 μ l byl zjištěn úplný sterilizační účinek pro větší počet skenování. Při počtu skenování 1x a 2x byla koncentrace buněk, které sterilizační proces přežily, velice nízká (jednotky CFU/ml).

Při použití vysokofrekvenčního plasmového výboje pro sterilizaci bakteriální suspenze o objemu 20 ml byly získány křivky závislosti Faktoru přežití R_f a Letality L , které charakterizují účinek tohoto plasmového výboje.

Tato práce tedy potvrdila sterilizační účinky použitých plasmových výbojů. Ostatní experimenty také zjistily, že použitá plasmová zařízení jsou použitelná pro sterilizaci teplosenzitivních materiálů (kolorimetrická analýza, skenování termokamerou) či materiálů náchylných na toxické látky (spektrální analýza). Plasmová sterilizace při použití daných experimentálních zařízení se také vyznačovala krátkou aplikační dobou.

Studium účinků tohoto zařízení při nastavení jiných provozních parametrů by tak mohlo být námětem dalších odborných prací. Bylo by tak vhodné ověřit sterilizační účinky plasmového výboje na jiné mikroorganismy, použití pracovního plynu s vyšší koncentrací kyslíku či použití jiného režimu generátoru plasmového výboje než kontinuálního [55].

Vzhledem k jednoduchosti zařízení, jeho přenositelnosti, možnosti snadné manipulace s krátkou aplikační dobou a nízkým provozním nákladům či absenci toxických látek by tak plasmová sterilizace s využitím tohoto plasmového zařízení mohla být vhodnou alternativou oproti standardním sterilizačním metodám, které jsou pro svou fyzikální a chemickou podstatu sterilizačního účinku nevhodné pro opracování mnohých materiálů. Vzhledem k tomu, že dané zařízení pracuje za atmosférického tlaku, odpadá zde také nutnost potřeby zařízení pro získání nízkého tlaku, které jsou pro jiné sterilizační metody nezbytné, a jsou velice finančně náročné.

LITERATURA

01. **Bellan Paul M.**, Fundamentals of plasma physics, Cambridge University Press, New York, 2006
02. **Chen Francis F.**, Úvod do fyziky plazmatu, třetí vydání, Academia, Praha, 1984
03. **Bittencourt J.A.**, Fundamentals of plasma physics, Third Edition, Springer Verlag New York Inc., 2004
04. **Laroussi Mounir, Tendero Claire, Lu Xinpei, Alla Sudhakar, Hynes Wayne L.**, Inactivation of Bacteria by the Plasma Penci, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Plasma Process. Polym. 2006, 3, 470–473
05. **Mozetic Miran**, Characterization of reactive plasmas with catalytic probes, Elsevier Science B.V., Surface & Coatings Technology, 2006.07.031
06. **Baars-Hibbe Lutz, Schrader Christian, Sichler Philipp, Cordes Thorben, Gericke Karl-Heinz, Buttgenbach Stephanus, Draeger Siegfried**, Micro-structured electrode arrays: high-frequency discharges at atmospheric pressure-characterization and new applications, Elsevier Ltd., Vacuum 73 (2004) 327–332
07. **Singh Amarjit, Ehteshami Gholamreza, Massia Stephen, He Jiping, Storer Robin G., Raupp Gregory**, Glial cell and fibroblast cytotoxicity study on plasma-deposited diamond-like carbon coatings, Elsevier Ltd., Biomaterials 24 (2003) 5083–5089
08. **Ehlbeck J., Ohl A., Maaß M., Krohmann U., Neumann T.**, Moving atmospheric microwave plasma for surface and volume treatment, Elsevier Science B.V., Surface and Coatings Technology 174 –175 (2003) 493–497

09. **Pérez-Martínez J.A., Peña-Eguiluz R., López-Callejas R., Mercado-Cabrera A., Valencia R.A., Barocio S.R., Benítez-Read J.S., Pacheco-Sotelo J.O.**, An RF microplasma facility development for medical applications, Elsevier B.V., Surface & Coatings Technology 2006.07.056
10. **Nahodilová Jana**, Studium sterilizace povrchu materiálu pomocí rf plazmatu, bakalářská práce, Brno, 2007
11. **Andersová Marcela**, Sterilizace vody plazmatem, bakalářská práce, Brno, 2007
12. **Novotný Ondřej**, Využití bariérových výbojů pro sterilizaci, bakalářská práce, Brno, 2007
13. **Smékal Petr**, Studium účinku plazmatu na biologické tkáně, bakalářské práce, Brno, 2007
14. **Jitka Kadlecová**, Užití plazmové tužky v chirurgii, bakalářská práce, Brno, 2005
15. **Jitka Kadlecova**, Studium účinku plazmové tužky a jejího použití jako chirurgického nástroje, diplomová práce, Brno, 2007
16. **Akitsu Tetsuya, Ohkawa Hiroshi, Tsuji Masao, Kimura Hideo, Kogoma Masuhiro**, Plasma sterilization using glow discharge at atmospheric pressure, Elsevier B.V., Surface & Coatings Technology 193 (2005) 29– 34
17. **McKane Larry, Kandel, Judy**, Microbiology: essentials and applications. 2nd ed. New Aster: York Graphic Services, 1996
18. **Moisan M., Barbeau J., Moreau S., Pelletier J., Tabrizian M., Yahia L'H.**, Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms, Elsevier Science B.V., International Journal of Pharmaceutics 226 (2001) 1–21
19. **Bruchanov Martin**, Plazmová sterilizace, semestrální práce, UK, 2005

20. **Wang T., MacGregor S.J., Anderson J.G., Woolsey G.A.**, Pulsed ultra-violet inactivation spectrum of *Escherichia coli*, Elsevier Ltd. *Water Research* 39 (2005) 2921–2925
21. **Gorna Katarzyna, Gogolewski Sylwester**, Molecular stability, mechanical properties, surface characteristics and sterility of biodegradable polyurethanes treated with low-temperature plasma, Elsevier Science Ltd., *Polymer Degradation and Stability* 79 (2003) 475–485
22. **Goldman Marni, Pruitt Lisa**, Comparison of the effects of gamma radiation and low temperature hydrogen peroxide gas plasma sterilization on the molecular structure, fatigue resistance, and wear behavior of UHMWPE, 1998 John Wiley & Sons, Inc., CCC 0021-9304/98/030378-07
23. **Borriello Peter, Murray Patrick R., Funke Guido**, Topley & Wilson's *Mikrobiology & Microbial Infections*, 10th Edition, Hodder Arnold, 2005
24. **Feng Huiyun, Wu Lijun, Yu Lixiang, Han Wei, Liu Xuelan, Yu Zengliang**, Mutagenic effect of a keV range N⁺ beam on mammalian cells, Elsevier B.V., *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 234 (2005) 477–486
25. **Winker Robert, Ivancsits Sabine, Pilger Alexander, Adlkofer Franz, Rudiger H.W.**, Chromosomal damage in human diploid fibroblasts by intermittent exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields, Elsevier B.V., *Mutation Research* 585 (2005) 43–49
26. **Reyns Kristien M.F.A., Diels Ann M.J., Michiels Chris W.**, Generation of bactericidal and mutagenic components by pulsed electric field treatment, Elsevier B.V., *International Journal of Food Microbiology* 93 (2004) 165–173
27. **Nester Eugene W., Roberts C. Evans, Pearsall Nancy N., Anderson Denise G., Nester Martha T.**, *Mikrobiology: A human perspective*. 2nd ed. The McGraw-Hill Companies, Inc., 1998

28. **Chau Tu, Kao Kwan Chi , Blankt Gregory, Madrid Francisco**, Microwave plasmas for lowtemperature dry sterilization, Elsevier Science Limited, Biomateriak 17 (1996)1273-1277
29. **Ekem Naci, Akan Tamer, Akgun Yurdanur, Kiremitci Abdurrahman, Pat Suat, Musa Geavit**, Sterilization of Staphylococcus aureus by atmospheric pressure pulsed plasma, Elsevier B.V., Surface & Coatings Technology 201 (2006) 993–997
30. **Moreira Adir José, Mansano Ronaldo Domingues, Pinto Terezinha de Jesus Andreoli, Ruas Ronaldo, Zambon Luis da Silva, da Silva Monica Valero, Verdonck Patrick Bernard**, Sterilization by oxygen plasma, Elsevier B.V., Applied Surface Science 235 (2004) 151–155
31. **Lado Beatrice H., Yousef Ahmed E.**, Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms, Elsevier SAS., Microbes and Infection 4 (2002) 433–440
32. **Park Bong Joo, Takatori Kosuke, Lee Mi Hee, Han Dong-Wook, Woo Yeon I., Son Hyun Joo, Kim Jeong Koo, Chung Kie-Hyung, Hyun Soon O., Park Jong-Chul**, Escherichia coli sterilization and lipopolysaccharide inactivation using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure, Elsevier B.V., Surface & Coatings Technology 2006.07.039
33. **Lee Kwon-Yong, Park Bong Joo, Lee Dong Hee, Lee In-Seop, Hyun Soon O., Chung Kie-Hyung, Park Jong-Chul**, Sterilization of Escherichia coli and MRSA using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure, Elsevier B.V., Surface & Coatings Technology 193 (2005) 35– 38
34. **Gadri Rami Ben, Roth J. Reece, Montie Thomas C., Kelly-Wintenberg Kimberly, Tsai Peter P.-Y., Helfritch Dennis J., Feldman Paul, Sherman Daniel M., Karakaya Fuat, Chen Zhiyu, UTK Plasma Sterilization Team**, Sterilization and plasma processing of room temperature surfaces with a one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP), Elsevier Science B.V., Surface and Coatings Technology 131(2000.528)542

35. **Kočí Radka**, Vliv stresových podmínek na metabolickou aktivitu kvasinek, disertační práce, VUT, Brno, 2003
36. **Zepp R.G., Callaghan T.V., Erickson D.J.**, Effects of enhanced solar ultraviolet radiation on biogeochemical cycles, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 46 (1998) 69-82
37. **Melicherčíková Věra, Pavlíček Jan**, Mikrobicidní působení UV záření, *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2003; 12(12):513
38. **Chichester C.O., Maxwell W.A.**, The effects of high intensity visible and ultraviolet light on the death of microorganisms, *Life Sci. Space Res.* 7, str.8-11, 1969
39. **Šašek Jaroslav, Kopecký Jaroslav, Kožíšek František**, Problematika desinfekce vody UV zářením, Státní zdravotní ústav, Praha, 2001
40. **Burger Amanda, Raymer Jenny, Bockrath R.**, DNA damage-processing in *E. coli*: on-going protein synthesis is required for fixation of UV-induced lethality and mutation, *Elsevier Science B.V., DNA Repair* 1 (2002) 821–831
41. **Racek Jaroslav, Holeček Václav**, Enzymy a volné radikály, *Chem. Listy* 93,11A - 780 (1999)
42. **Bergendi L', Beneš L., Juračková Z., Ferenčík M.**, Chemistry, physiology and pathology of free radicals, *Life Sciences*, Vol. 65, Nos. 18/19, pp. 1865-1874, 1999
43. **Laroussi M., Leopold F.**, Evaluation of the role of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure, *Elsevier B.V., International Journal of Mass Spectrometry* 233 (2004) 81-86
44. **Cotton F. Albert, Wilkinson Geoffrey, Murillo Carlos A., Bochmann Manfred**, *Advanced inorganic chemistry*, 6th edition, A Wiley-Interscience publication, 1999, 0-471-19957-5

45. **Machala Z., Jedlovsky I., Hensel K., Martisovits V., Foltin V.**, Biological effects of DC Discharges in atmospheric air with water, 7P-09, in Sborník SAPP, 2007, p. 277 – 283
46. **Niedhardt Frederick C., Curtiss III Roy, Ingraham John L., Lin Edmund C.C., Low K. Brooks, Magasanik Boris, Rfznikopp William S., Riley Monica, Schaechter Moselio, Umbarger H. Edwin**, Escherichia coli and Salmonella_ cellular and molecular biology, Sekond Edition, American Society for Mikrobiology Press, I-55581-084-5, 1996
47. **Marr Geoffrey V.**, Plasma spectroscopy, Elsevier publishing company Ltd., England, 1968
48. **Becker K.H., Kogelschatz U., Schoenbach K.H., Barker R.J.**, Non-Equilibrium air plasma at atmospheric pressure, Institute of Physics Publishing Ltd., London, 2005
49. **Svanberg Sune**, Atomic and Molecular Spectroscopy, Basic aspects and Practical Applications, Second Edition, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1992
50. **Kloc Petr**, Využití povrchového bariérového výboje pro depozici tenkých ochranných vrstev, bakalářská práce, Brno, 2006
51. **Jandová Božena, Kotoučková Ludmila**, Praktikum z mikrobiologie, Brno, 1996, 80-210-1374-5
52. **Mechlová Erika, Košťál Karel**, Výkladový slovník fyziky pro základní vysokoškolský kurz fyziky, Havlíčkův Brod, 2001, 80-7196-151-5
53. **Navrátil Z., Trunec D., Šmíd R., Lazar L.**, A software for optical emission spectroscopy-problem formulation and application to plasma diagnostics, Czechoslovak Journal of Physics, Springer Netherlands, 2006, 0011-4626
54. **Vaněk Pavel**, Metodika měření a zpracování optických emisních spekter různých typů výbojů pro účel výuky a výzkumu, diplomová práce, Brno, 2007

55. **Yasunari Sakai, Vahid Khajoe, Yasuhiro Ogawa, Koichi Kusuhara, Yoshiki Katayama, Toshiro Hara**, A novel transfection method for mammalian cells using gas plasma, Elsevier B.V., Journal of Biotechnology 121 (2006) 299–308

56. **Walker T. Stuart**, Mikrobiology, W.B. Saunders Company, 1998, USA, ISBN 0-7216-4641-7

57. <http://www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/atlas.htm>

58. www.wikipedia.org

PUBLIKACE

- 1. Slavíček P., Janča J., Kapička V., Brabec A., Kadlecová J., Smékal P., Klíma M.,** Spectral diagnostics of rf plasma discharge generated by plasma pencil at atmospheric pressure. In *XXVII ICPIG*. Eindhoven, Netherlands : TU Eindhoven, 2005, od s. 06-224, 3 s.
- 2. Slavíček P., Janča J., Brabec A., Kadlecová J., Smékal P.,** Plazmová tužka jako perspektivní chirurgický nástroj. In *XXVIII. Dny lékařské biofyziky - Sborník abstrakt*. Brno : Masarykova universita, 2005, od s. 79-79, 1 s.
- 3. Slavíček P., Janča J., Kapička V., Brabec A., Kadlecová J., Smékal P., Klíma M.,** Diagnostics of rf unipolar barrier discharge generated by plasma pencil at atmospheric pressure. In *XVI Symposium on Physics of Switching Arc*. Brno : Faculty of Electrical Engineering and Communication, BUT, 2005, od s. 170-173, 4 s.
- 4. Slavíček P., Klíma M., Janča J., Brabec A., Kadlecová J., Smékal P.,** RF plasma pencil - diagnostics of plasma and biomedical application. In *3rd International Workshop on Microplasmas*, Greifswald, 2006, od str. 112-112, 1 str., ISBN 3-00-018723-5
- 5. Slavíček P., Klíma M., Janča J., Brabec A., Kadlecová J., Smékal P.,** Diagnostics of RF Microdischarge Generated at Atmospheric Pressure. In *22nd Symposium on Plasma Physics and Technology*, Praha, 2006, 56, B, od str. 1057-1061, 5 str., ISSN 0011-4626
- 6. Slavíček P., Kapička V., Brabec A., Kadlecová J., Smékal P., Vaněk P., Klíma M.,** Diagnostics and comparison of RF and low frequency discharges generated by plasma pencil at atmospheric pressure. In *Proceeding of XXVIII International Conference on Phenomena in Ionized Gases*. Praha : Institute of Plasma Physics AVCR, 2007. od s. 197-200, 4 s. ISBN 9788087026014