

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA ELEKTROTECHNICKÁ

KATEDRA TEORIE OBVODŮ



## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Změny biocidních vlastností suspence nanodiamantů po ošetření  
plazmatem

Changes in biocidal properties of nanodiamond suspensions after  
plasma treatment

Autor: Bc. Veronika Dvořáková

Vedoucí práce: Ing. Vladyslava Čeledová

Místo a rok: Praha 2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

**Student:** Bc. Veronika Dvořáková

**Studijní program:** Biomedicínské inženýrství a informatika

**Obor:** Biomedicínské inženýrství

**Název tématu:** Změny biocidních vlastností suspenze nanodiamantů po ošetření plazmatem

### Pokyny pro vypracování:

1. Seznámit se s biocidními vlastnostmi suspenze nanodiamantů (ND) a se způsoby jejich ošetření netermálním plazmatem.
2. Navrhnout experimenty, jejichž cílem bude nastavení vhodných parametrů aparatury a zjištění neoptimálnější doby ošetření suspenze ND.
3. Navrhnout a provést biologické analýzy.
4. Provést navržené experimenty a konzultovat výsledky.

### Seznam odborné literatury:

- [1] Kracík J., Slavík J. B., Tobiáš J. Elektrické výboje, Praha 1964.
- [2] Hipper R., et al. Low Temperature Plasmas. Německo, 2008.
- [3] Piel A., Plasma Physics - An introduction to Laboratory, Space and Fusion Plasmas. Springer 2010.
- [4] Julák J., Mikrobiologie - praktikum. Praha, 2003.
- [5] Kromka A. et al. Bacterial response to nanodiamonds and graphene oxide sheets, IPSS, 2016.

**Vedoucí diplomové práce:** Ing. Vladyslava Čeledová

**Platnost zadání:** do konce letního semestru 2017/2018

L.S.

prof. Ing. Pavel Sovka, CSc.  
**vedoucí katedry**

prof. Ing. Pavel Ripka, CSc.  
**děkan**

V Praze dne 6. 1. 2017

### **Prohlášení autora práce**

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla veškeré použité informační zdroje v souladu s Metodickým pokynem o dodržování etických principů při přípravě vysokoškolských závěrečných prací.

V Praze dne .....

.....

podpis autorky práce

## **Poděkování**

Ráda bych tímto poděkovala své vedoucí diplomové práce Ing. Vladyslavě Čeledové za vedení této práce a její věcné připomínky. Ráda bych také poděkovala Ing. Kateřině Vlkové za odborný dohled a pomoc během provádění experimentů. Také chci poděkovat paní RNDr. Pavle Štenclové, Ph.D. za provedení analýz vzorků HND. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat i svojí rodině za podporu nejen během psaní práce, ale především za podporu během celého studia.

## Abstrakt

Práce je zaměřena na výzkum vlivů účinků nanodiamantů (ND), plazmatem aktivované vody (PAW) a jejich synergického působení na mikroorganismus *Escherichia coli*. Působení ND, PAW a plazmatu má prokazatelný vliv na úbytek mikroorganismů, doposud však nebyly hlouběji prozkoumány jejich synergické účinky. Záměrem práce je ověření funkčnosti vybraných metod pomocí nastavení vhodných parametrů a analýzy povrchových změn ošetřených ND.

V práci je navrženo vícero experimentů, při kterých je zkoumán úbytek bakterií, a to například smícháním roztoku *E. coli* s roztokem s ND (dále H-ND<sup>1</sup>) nebo s roztokem obsahující ošetřené H-ND pomocí plazmatu. K ošetření bylo použito korónového výboje a přechodové jiskry po dobu 1, 3 a 5 minut. Byly zkoumány vlivy po 5 a 24 hodinách od ošetření; popřípadě po 0 a 5 hodinách v případě zkoumání synergických účinků plazmatu a H-ND. Vyhodnocení proběhlo na základě porovnání počtu vytvořených kolonií po kultivaci na živných půdách (Mueller-Hinton agar) vůči kontrolní skupině, která nebyla nijak ošetřena.

Tato práce navazuje na publikaci doc. Ing. Alexandra Kromky DrSc. et al. v níž byly popsány výsledky biocidních účinků roztoku mimo jiné H-ND na *E. coli*. Rovněž navazuje na doposud neotištěnou publikaci RNDr. Pavly Štenclové Ph.D. et al., ve které je zkoumán vliv plazmatu na různé druhy nanomateriálů, mezi nimiž je H-ND.

Záměrem této diplomové práce je poskytnutí bližších informací o biocidních účincích H-ND a PAW spolu s plazmatem, které doposud nebyly podrobněji prozkoumány. Změny povrchových vlastností ošetřených H-ND byly pozorovány pomocí metody FTIR (Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací).

## Klíčová slova

*Nanodiamanty (ND), hydrogenované nanodiamanty (HND), plazma, plazmatem aktivovaná voda (PAW), korónový výboj, přechodová jiskra, inaktivace bakterií, E. coli, FTIR*

---

<sup>1</sup> H-ND jsou nanodiamanty použité v této práci. Na jejich povrchu je velké množství C-H vazeb, proto jsou označovány jako H-ND.

## **Abstract**

This thesis focuses on nanodiamonds (ND), plasma activated water (PAW) separately and their synergistic impact on inactivation of microorganism *Escherichia coli*. It is strong evidence, that ND, PAW and plasma reduce population of microorganisms. Nevertheless, it is only small amount of data considering synergistic effects of all mentioned factor on bacteria reduction in the liquids phase. The goal of the research presented here lies in verifying functionality of selected methods through fitting experimental setup parameters and surface analysis of treated ND using fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).

The thesis describes multiple experiments, which examine bacteria reduction caused by their exposure to ND (H-ND<sup>2</sup>) solution, PAW or plasma treated H-ND solution.

H-ND solution was treated with corona discharge or transient spark for 1, 3 or 5 minutes. Bactericidal effects were evaluated after 5 and 24 hours bacteria exposure to the H-ND solution; and after 0 and 5 hours of *E. coli* exposure to plasma activated water or H-ND. Effectivity of each method was evaluated through comparison of number of CFU (colony forming units) cultivated on non-selective Mueller-Hinton agar surface.

This work is partially based on research of doc. Ing. Alexandr Kromka DrSc. and co-workers, whose research was focused on investigation of bactericidal effects of different nanomaterials in time (one of them was H-ND). Secondly, this thesis is based on not yet printed paper of RNDr. Pavla Štenclová, Ph.D. and co-workers, where the changes on nano-materials treated with corona discharge and transient spark are described.

The goal of the thesis is to examine more information about biocidal impact of HND, PAW and plasma activated H-ND solution on *E. coli*. Changes on H-ND surface were measured using FTIR.

## **Key words**

*Nanodiamond (ND), hydrogenated nanodiamond (HND), plasma, plasma activated water (PAW), corona discharge, transient spark, E. coli, bacteria reduction, FTIR*

---

<sup>2</sup> As-received ND with high amount of C-H bonds are called H-ND.

## Seznam použitých zkratk

ATB	antibiotika
AC	Alternative current – střídavý proud
CFU	Colony Forming Unit - počet vytvořených kolonií
DC	Direct current – jednosměrný proud
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HND	hydrogenované nanodiamanty
H-ND	Detonační metodou vyrobené nanodiamanty s velkým počtem C-H vazeb na povrchu
IR	infrared – infračervené
MFU	McFarland Units
ND	nanodiamanty
OND	oxidované nanodiamanty
PAW	Plasma Activated Water – plazmou aktivovaná voda
UZV	ultrazvuk
RF	radiofrekvenční
RTG	rentgenové
ROS	Reactive Oxygen Species – reaktivní kyslíkové částice
RNS	Reactive nitrogen Species – reaktivní dusíkové částice

## Obsah

<b>ÚVOD</b> .....	11
<b>Teoretická část diplomové práce</b> .....	12
<b>1. Uhlík a jeho struktury</b> .....	12
1.1    Diamant .....	13
1.2    Nanodiamant.....	13
1.2.1    Výroba ND .....	14
1.2.2    Povrchové úpravy ND .....	15
1.2.3    Hydrogenované nanodiamanty .....	17
1.2.4    Využití ND v biologii a medicíně .....	19
1.2.5    Toxicita ND z hlediska využití v medicíně .....	20
<b>2. Plazma</b> .....	21
2.1    Základní poznatky o plazmatu .....	21
2.3    Elektrické výboje .....	22
2.4    Produkty netermálního plazmatu za atmosférického tlaku .....	23
2.4.1    Nabité částice .....	23
2.4.2    Volné radikály a reaktivní formy kyslíku a dusíku ROS a RNS.....	24
2.4.3    UV záření .....	24
2.5    Elektrické výboje ke generaci plazmatu, použité v této práci.....	25
2.5.1    Korónový výboj.....	25
2.5.2    Přechodová jiskra .....	26
2.6    Povrchové a biocidní účinky plazmatu .....	27
2.7    Plazmová medicína.....	28
<b>3 Plazmatem aktivovaná voda (PAW)</b> .....	29
3.1    Vznik PAW a její trvání.....	29
3.2    Produkované radikály a jak je lze ovlivnit .....	29
3.3    Účinky PAW na živý organismus.....	30
<b>4 Mikrobiologie</b> .....	32



4.1	Morfologie a cytologie buňky .....	32
4.2	Růst a množení bakterií .....	33
4.3	Smrt bakterií .....	34
4.4	Enterobakterie - <i>Escherichia coli</i> .....	35
<b>5</b>	<b>Metody měření parametrů ND</b> .....	<b>36</b>
5.1	Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) .....	36
5.2	Ramanova spektroskopie .....	38
	<b>Praktická část diplomové práce</b> .....	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>Použité laboratorní metody</b> .....	<b>41</b>
6.1	Zásady práce s mikroorganismy .....	41
6.2	Příprava vzorků <i>E. coli</i> .....	41
6.3	Příprava Mueller-Hinton agar .....	41
6.4	Příprava bakteriální suspenze .....	42
6.5	Příprava vzorků H-ND .....	42
6.6	Použité přístroje .....	43
6.7	Aparatura – Schéma zapojení pro vznik plazmatu .....	43
<b>7</b>	<b>Experimenty</b> .....	<b>46</b>
7.1	ND bez aktivace plazmatu .....	46
7.1.1	Metodologie .....	46
7.1.2	Výsledky měření po 5 a 24 hodinách .....	47
7.1.3	Zhodnocení .....	48
7.2	ND aktivované plazmatem 1 minuta .....	48
7.2.1	Metodologie .....	48
7.2.2	Výsledky měření po 1 minutě ošetření plazmatem .....	50
7.2.3	Zhodnocení .....	51
7.3	ND aktivované plazmatem 3 minuty .....	51
7.3.1	Metodologie .....	51
7.3.2	Výsledky měření po 3 minutách ošetření plazmatem .....	52

7.3.3	Zhodnocení.....	53
7.4	ND aktivované plazmatem po dobu 5 minut.....	53
7.4.1	Metodologie .....	53
7.4.2	Výsledky měření po 5 minutách ošetření plazmatem.....	54
7.4.3	Zhodnocení.....	55
7.5	Celkové grafické zhodnocení výsledků druhého experimentu .....	55
<b>8</b>	<b>Výsledky spektrální analýzy .....</b>	<b>57</b>
8.1	Spektrum H-ND bez ošetření plazmatem.....	57
8.2	Spektrum H-ND po ošetření korónovým výbojem .....	58
8.3	Spektrum H-ND po ošetření přechodovou jiskrou .....	60
8.4	Srovnání všech získaných spekter .....	61
<b>9</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>62</b>
<b>10</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>64</b>
<b>11</b>	<b>Použitá literatura a zdroje .....</b>	<b>65</b>
<b>12</b>	<b>Reference obrázků.....</b>	<b>68</b>
<b>13</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>71</b>

## ÚVOD

Nanodiamanty v posledních letech nachází široké uplatnění stejně jako netermální plazma. Stále se pracuje na prozkoumání vlastností, které skrývají například hydrogenované nanodiamanty. Tato práce je zaměřena na zjištění změn biocidních vlastností nanodiamantů s vysokým počtem C-H vazeb označované jako H-ND, po jejich aktivaci plazmatem. Pro zjištění takovýchto vlastností byla použita aparatura generující korónový výboj a přechodovou jiskru, kterými byly H-ND ošetřeny. Také byly v rámci této práce navrženy a provedeny experimenty, jejichž výsledky jsou posléze diskutovány.

Touto cestou bylo možné ověřit tvrzení, že pokud jsou H-ND ošetřeny plazmatem, změní se jejich povrchové vlastnosti natolik, že budou mít lepší baktericidní účinky ve srovnání s H-ND neošetřenými plazmatem. Tato práce navazuje především na dvě publikace: práci doc. Ing. Alexandra Kromky DrSc. a jeho spolupracovníků, v níž jsou popsány baktericidní vlastnosti různých typů nanomateriálů, mimo jiné H-ND, a v době podání této práce neotištěné publikace RNDr. Pavly Štenclové, Ph.D. a její spolupracovníků, v níž jsou uvedené změny povrchových a jiných vlastností různých nanomateriálů (mimo jiné H-ND) v důsledku jejich ošetření plazmatem.

Ošetřené i neošetřené vzorky byly analyzovány ve spolupráci s Fyzikální ústavem Akademie věd ČR, v. v. i., s pomocí paní RNDr. Pavly Štenclové, Ph.D. Zde byla provedena infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR).

Tato práce je rozdělena do dvou hlavních oddílů – teoretické a praktické části. Každá z nich má další kapitoly a podkapitoly. Čtenář je tak přehledně seznámen s problematikou netermálního plazmatu, nanodiamantů, plazmatem aktivované vody, seznámí se s druhem zkoumané bakterie či používanými analytickými metodami daného odvětví.

*Jsme jako trpaslíci hledíce z ramenou obrů.*

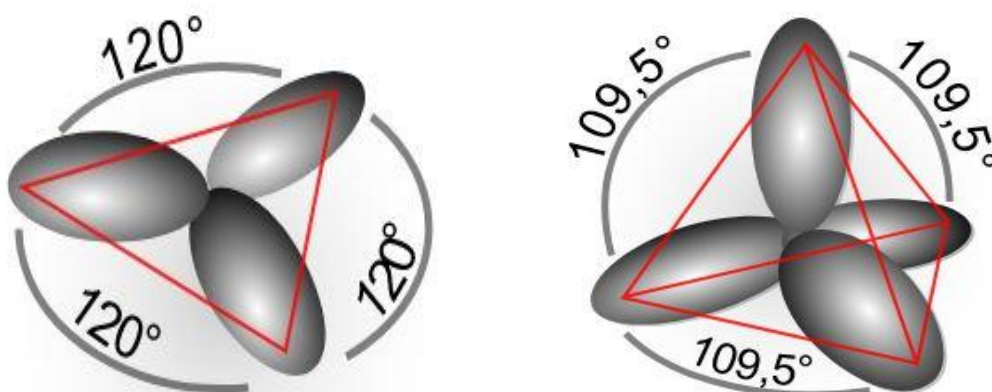
*„Bernard z Chartres“*

## Teoretická část diplomové práce

### 1. Uhlík a jeho struktury

Uhlík je jeden ze základních chemických prvků, jenž vytváří zhruba 18 milionů různých, zejména organických, sloučenin. V přírodě je uhlík běžný v podobě izotopu  $^{12}\text{C}$ , vyskytuje se však ve stopovém množství v podobě izotopů  $^{13}\text{C}$  a  $^{14}\text{C}$ . Uhlík v podobě  $^{12}\text{C}$  a  $^{13}\text{C}$  z hlediska radioaktivity nevyvolává škodlivé účinky v živých organizmech, zatímco  $^{14}\text{C}$  radioaktivitu vykazuje a to s poločasem rozpadu 5730 let.

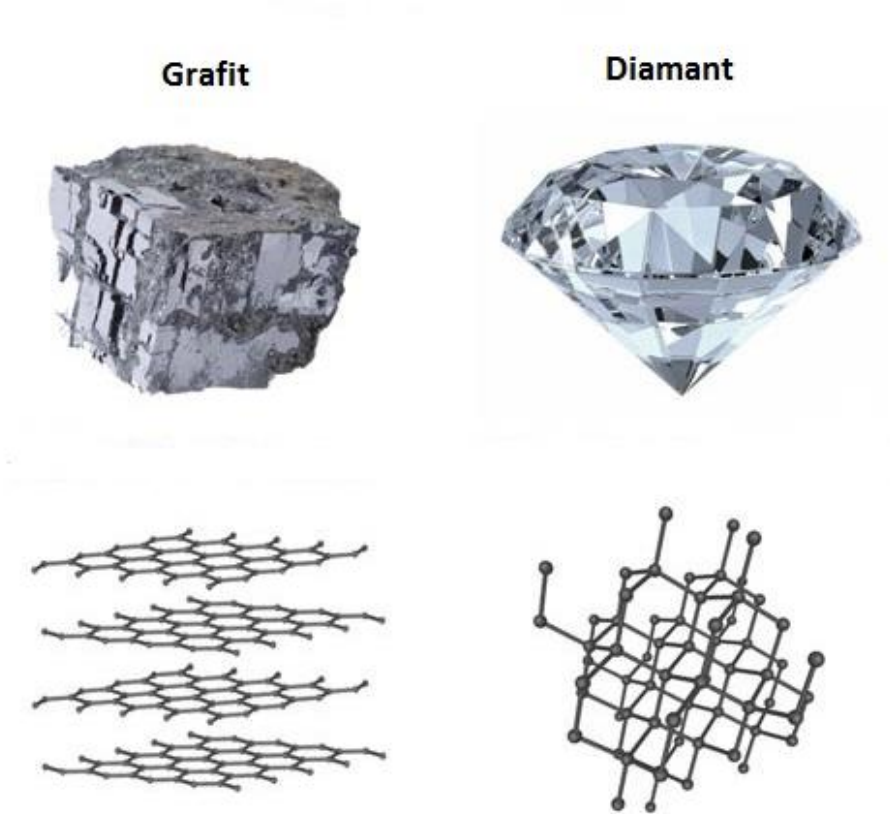
Nejstálější formou uhlíku je grafit neboli tuha. Skládá se z vrstev atomů uhlíků spojených pevnou kovalentní vazbou. Základem je hexagonální tvar připomínající včelí plástev, což je vidět na Obrázku 1.2, vlevo. Ačkoli je uhlík čtyřvazný, hexagonálním uspořádání se váže pouze třemi vazbami o délce 141 pm. Elektrony z poslední teoretické čtvrté vazby jsou pravidelně rozprostřeny mezi první tři. Dobrá elektrická vodivost grafitu je tedy důsledkem přítomnosti těchto volných elektronů. Na druhou stranu, vazby mezi jednotlivými vrstvami šestistěnných plátů jsou slabé, proto je tuha měkká a snadno oddělitelná. Uhlík v tuze má  $sp^2$  hybridizaci, vizte Obrázek 1.1. Uhlík má své modifikace - diamanty, fulereny, uhlíkové nanotrubičky či grafén, které mají mnohá využití. Pro tuto práci jsou relevantní modifikací diamanty, potažmo nanodiamanty, jejichž ošetřením se tato práce zabývá [1].



Obrázek 1.1: Typy hybridizace  $sp^2$  a  $sp^3$  [A]

## 1.1 Diamant

Diamant, na rozdíl od grafitu, je mezi jednotlivými atomy propojen čtyřmi kovalentními vazbami. Vazby jsou orientovány do tetraedru, čtyřstěnu, kde těžiště představuje střed atomu, a každý vrchol představují orbitály, které poskytují své elektrony k vytvoření kovalentních vazeb. Vazebné úhly jsou  $109,5^\circ$  a odpovídají  $sp^3$  hybridizaci (vizte Obrázky 1.1 a 1.2). Tímto je docíleno dokonalé prostorové sítě, jejímž důsledkem je i tvrdost diamantu. Roku 1810 F. Mohs zavedl stupnici tvrdosti, na níž diamant zaujal první místo mezi nerosty. Diamant je materiál, jenž lze vyrábět i v laboratorních podmínkách, vizte kapitola 1.2.1. Přírodní diamanty jsou používány k výrobě šperků, kdežto syntetické pak k broušení, řezání a leštění [1].



Obrázek 1.2: Srovnání struktury tuhy (vlevo) a diamantu (vpravo) [B]

## 1.2 Nanodiamant

Nanodiamanty jsou diamanty o velikosti 3–100 nm. Jejich významnými vlastnostmi jsou již zmíněná tvrdost (stupeň 10), vysoký index lomu a dobrá tepelná vodivost. Mezi nejvíce oceňované vlastnosti se řadí jeho biokompatibilita, tedy vlastnost, která vypovídá o materiálu při kontaktu s živým organismem podle jeho odezvy. Lidský organismus dobře reaguje na přítomnost ND a nejsou prozatím známy

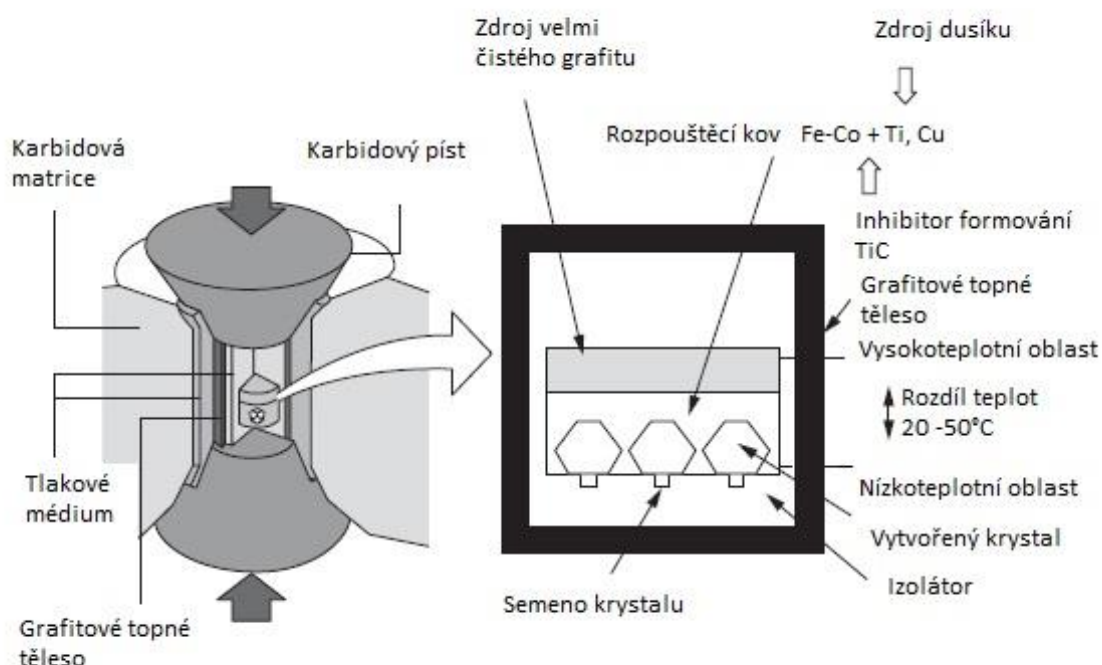
negativní reakce. Diamant, stejně jako ND, má hybridizaci  $sp^3$ , atomy se staví tak, že tvoří pomyslný tetraedr. Je třeba zmínit stabilitu ND a bohaté možnosti modifikace jejich povrchu pro následné navázání různých molekul. V souvislosti s biocidními vlastnostmi se jako nejlepší jeví H-ND, respektive ND s velkým množstvím C-H vazeb, a právě proto jsou v experimentální části používány právě takovéto ND a jsou označovány jako H-ND. Další zvýšení C-H vazeb lze dosáhnout cílenou hydrogenací (povrchová modifikace), takovéto ND jsou pak v práci označovány jako HND [2] [3] [4].

### 1.2.1 Výroba ND

Diamanty vyráběné v laboratorních podmínkách jsou nazývány „umělé“. Hlavní výhodou spolu s jejich dokonalým tvarem je jejich až čtyřnásobně nižší cena v porovnání s přírodními. Existuje několik metod, jakými lze syntetické ND vyrobit.

#### 1.2.1.1 HPHT – High Pressure, High Temperature

HPHT je původní metoda objevená na přelomu 20. století současně v Rusku, USA a Švédsku. Postup výroby je založen na použití vysokého tlaku a teploty v uzavřené kovové komoře. Její vnitřní část se zahřeje na teplotu  $1400\text{ }^\circ\text{C}$  a dovnitř se vloží tzv. diamantové semeno, okolo něhož vzniká nový ND. Schéma pro výrobu HPHT ND je znázorněno na Obrázku 1.3. Známý jsou tři varianty působení tlaků. Tímto způsobem vznikají nejběžnější ND.



Obrázek 1.3: Schéma HPHT technologie [C]

#### 1.2.1.2 Ultrazvukově syntetizované ND

Tato metoda využívá ultrazvukových vln v kapalinách. Při velké intenzitě ultrazvuku (UZV) lze způsobit prudký výkyv tlaku v kapalině, což může vést ke vzniku vakuových bublin, kavitám. Ty v určité chvíli kolabují a vznikají rázy o vysoké rychlosti. Takto lze vyrobit ND ze suspenze grafitu. Výhodou této metody je, že ji lze provádět za atmosférického tlaku a okolní teploty.

#### 1.2.1.3 Chemická depozice

Principem této metody, jinak nazývané CVD z anglického Chemical Vapor Deposition, je urychlená depozice z plynné fáze za účinku mikrovlnného výboje a plazmatu. Diamanty se připravují rozkladem směsi vodíku a metanu vystaveného mikrovlnnému záření, které dává vzniku novým ND na speciálních substrátech. Intenzita mikrovlnného výboje je kolem 1300 W a tlak je přibližně 30 mbar. Teploty se pohybují mezi 600–850 °C. Výsledkem jsou kvalitní a čisté ND.

#### 1.2.1.4 ND vyrobené detonační technikou

UDD je akronym pocházející z anglického Ultradisperse Diamond, pro název metody výroby ND, které vznikají během exploze trinitrotoluenu (TNT) a RDX (akronym sloučeniny z anglického Research Department Explosive). Jedná se o výbušné organické sloučeniny, které obsahují uhlík. Právě při jejich explozi v uzavřené kovové odpalovací komoře, při vodním nebo suchém prostředí, vznikají ND a to na čele detonační vlny. Vše probíhá v řádu několika mikrosekund. Metoda rovněž vyžaduje vyššího tlaku a teploty, aby mohlo dojít k vzniku nanodiamantů. Proces musí být intenzivně chlazen a platí zde přímá úměra mezi množstvím chladicího média a velikostí vzniklých ND. Takovéto ND se používají zejména pro leštící a brusné účely. Diamanty vyrobené metodou HPHT a detonací se liší svou reaktivitou, velikostí částic, tvarem, ale i množstvím grafitových  $sp^2$  struktur na jejich povrchu. Touto metodou byly vyrobené ND použité při experimentech popsanych v této práci [2] [3] [5].

### 1.2.2 Povrchové úpravy ND

ND mají různá využití například v luminiscenčním zobrazování, transportu léčiv, kvantovém inženýrství či pro úpravy povrchů různých materiálů. Pro každou z těchto oblastí jsou vyžadovány různé povrchové úpravy surových ND zejména pro zlepšení jejich vlastností, stability, odstranění nečistot nebo nežádoucích organických sloučenin navázaných během vzniku. Jedná se hlavně o kovové nečistoty a zbytky grafitového uhlíku tj. ty s  $sp^2$  hybridizací. Aby bylo možné ND očistit, nejprve je třeba je od sebe mechanicky oddělit například pomocí UZV. Kovové nečistoty jsou odstraňovány hlavně působením minerálních kyselin.

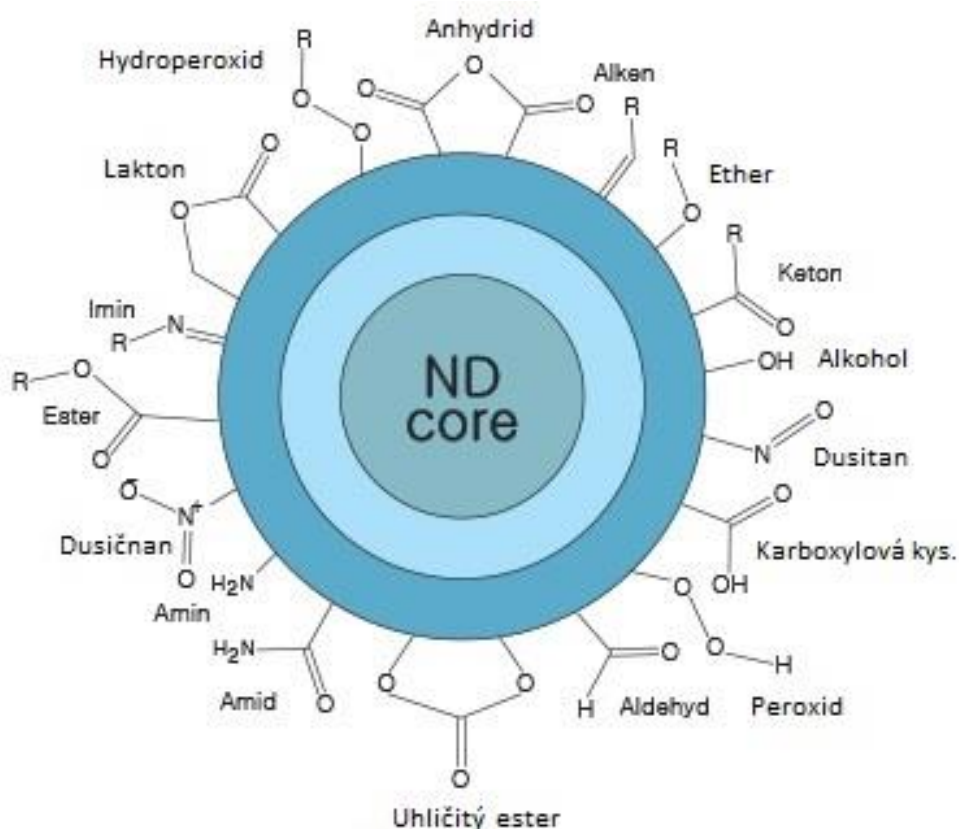
Mezi nejvýznamnější úpravy patří homogenizace povrchu, kovalentní a nekovalentní imobilizace různých funkčních částí či následné roubování větších funkčních skupin na již upravený povrch.

Níže jsou uvedeny nejčastěji používané úpravy povrchu ND.

- Cíleně se využívá karboxylace ND pomocí COOH skupin popřípadě keto skupinami. Konkrétně ND-COOH, či níže zmíněné ND-NH<sub>2</sub> prokazatelně potlačují biofilm tvořený *E. coli* stejně dobře jako standardní antibiotikum (ATB) ampicilin.
- Homogenní pokrytí velkým počtem skupin -OH označujeme hydroxylací, která je vhodná pro již zmíněné kovalentní nebo nekovalentní interakce s většími funkčními skupinami. Stejně tak lze pomocí hydrogenace (tj. navázání vodíků) docílit homogenizace povrchu.
- Žíhání povrchu se provádí pro částečnou či celkovou karbonizaci povrchu tj. odstranění většiny povrchových funkčních skupin.
- Aminace povrchu tj. zavedení -NH<sub>2</sub> je poměrně obtížná, a přímá aminace je velmi složitá. Proto se využívá různých pomocných sloučenin a různých vlivů pro zavedení této skupiny.
- Také je možné navázání různých prvků jako brom, chlór či fluór.
- Fluorescence ND je založena na existenci tzv. nitrogen-vacancy (N-V) coloured centres. Tato centra jsou vytvořena již při vzniku ND navázáním malého množství dusíku, který je zabudován v mřížce ND. Množství center N-V, a tím pádem i jasnost fluorescenčních částic, stoupá s rozměrem ND. Pokud se ND ozáří zeleným světlem, lze pak detekovat jejich fluorescenci v IR spektru.

Obecně lze říci, že vlastnosti ND se liší podle druhu a metody výroby, a proto se pro další úpravy vždy hodí určitý typ zhotovených ND. Některé zmíněné a mnohé další skupiny, které mohou být na ND navázány, jsou přehledně znázorněny na Obrázku 1.4 [3] [6] [7] [8] [9].

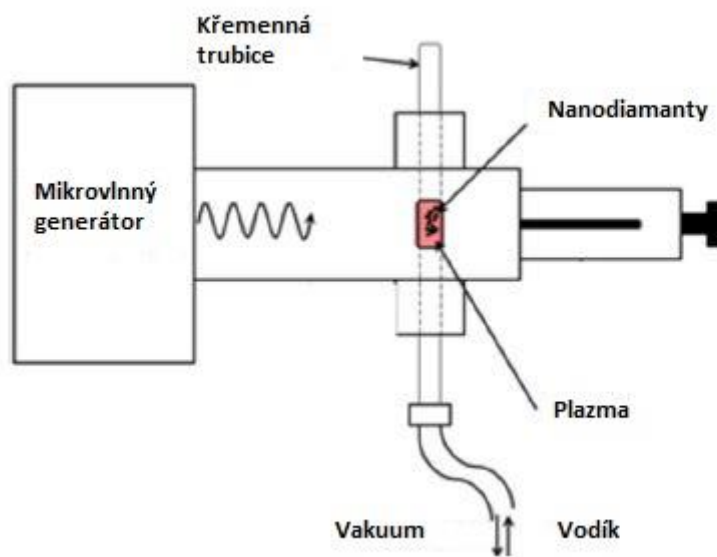




Obrázek 1.4: Možnosti funkcionalizace ND [D]

### 1.2.3 Hydrogenované nanodiamanty

Hydrogenací ND lze dosáhnout homogenizace povrchu, odstranění nediamantových respektive grafitových zbytků nebo eliminovat maximální množství kyslíkatých skupin a stabilizovat tak C-H koncové vazby na povrchu ND. HND vykazují specifické povrchové vlastnosti (negativní elektronová afinita, povrchově vodivá vrstva), kterých by mohlo být využíváno pro bioaplikace. Elektronegativní prvky mají schopnost poutat elektrony. Význam této vlastnosti bude dále zmíněn v kapitole 3 – Plazmatem aktivovaná voda. Hydrogenaci je možné provádět různými způsoby, a to plazmatem nebo žíháním. Při použití plazmatu je využívána metoda MPCVD (microwave plasma CVD, vizte podkapitulu 1.2.1.3). Jedná se o hydrogenaci v mikrovlnném plazmovém reaktoru ve vodíkové atmosféře, který je znázorněn na Obrázku 1.5. Takto se ošetřují ND vzniklé metodou HPHT i CVD. U obou typů ND bylo pomocí analytických metod prokázáno, vymizení velkého množství kyslíkových vazeb, navázání vodíků a ověření hydrogenace zkouškou navázání jiných skupin, konkrétně pomocí diazoniových skupin a alkenů. O analytických metodách blíže pojednává kapitola 5. HND jsou velmi vhodným výchozím bodem pro další funkcionalizaci povrchu právě díky homogenitě povrchu a pevným C-C vazbám odolným proti oxidaci a hydrolýze.

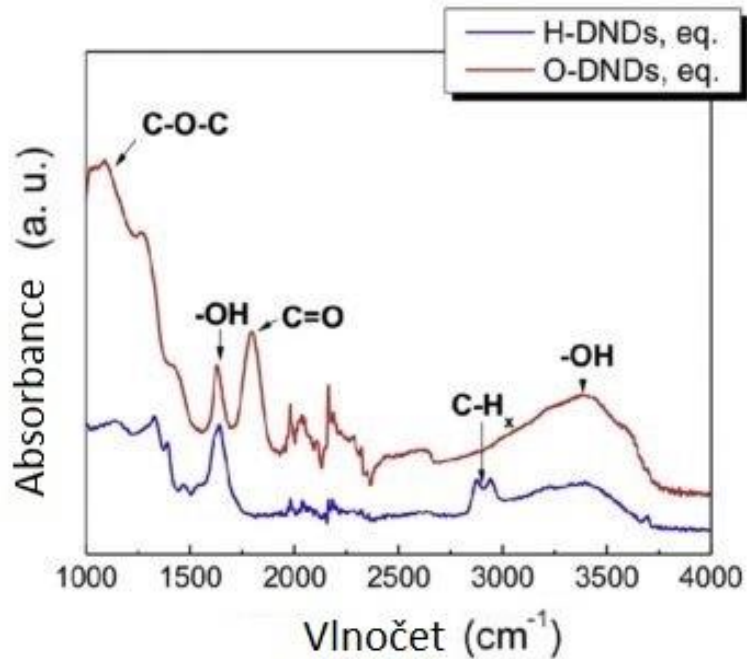


Obrázek 1.5: Mikrovlnný plazmový reaktor [E]

Druhou metodou je hydrogenizace žíháním. V literatuře jsou prezentovány různé variace této metody. Žíhání probíhá pod proudem vodíku při teplotě 500–850 °C po dobu přibližně 3 až 5 hodin za různých tlaků. Analýzami byla prokázána přítomnost C-H vazeb stejně jako OH skupin. Je uváděno, že zbytky OH skupin jsou pravděpodobně zapříčiněny reakcí s vodou.

Rovněž byly zkoumány a porovnávány vlastnosti HND a OND ve vodním prostředí. Bylo prokázáno, že HND vykazují hydrofobní vlastnosti vzhledem k C-H vazbám. Nicméně byla také pozorována silnější vrstva vody na povrchu HND a možné nanokapénky v jejich struktuře. HND se díky jejich snadné funkcionalizaci biomolekulami jeví potenciálně vhodnými nanonosiči. Kombinace fotoemisních vlastností HND a afinita k vodě daly podnět k jejich využití jako radiosenzibilizátorů pro rentgenovou (RTG) terapii, kde lze využít lokálního nárůstu produkce reaktivních kyslíkových částic (ROS). Oproti zlatu či gadolinu, které se v současné době využívají, mohou být oproti tomu HND dobrou alternativou díky malé velikosti, afinitě k vodě, nízké toxicitě a dobré dostupnosti. Také bylo zjištěno, že tenké vrstvy HND mohou poskytovat rozpuštěné elektrony po UV ozáření pomocí fotolytické redukce  $\text{CO}_2$ .

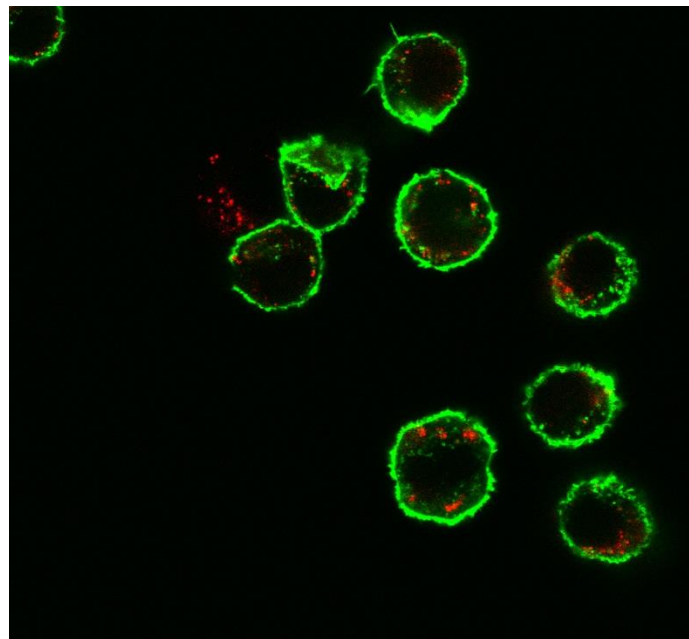
Na Obrázku 1.6 je uveden výsledek ze spektrální analýzy pomocí Fourierovy transformace, kde lze vidět charakteristické protažení (angl. stretching) a ohýbání (angl. bending) vazeb u HND a OND [3] [7] [10] [11].



Obrázek 1.6: FTIR analýza HND a OND [F]

#### 1.2.4 Využití ND v biologii a medicíně

Využití ND v medicíně se objevuje především v posledních letech. Využívají se zejména pro fluorescenční značení (Obrázek 1.6), cílený transport léčiv například k nádorovým buňkám nebo napomáhá při léčbě Alzheimerovy choroby. ND nabízí širokou škálu využití, jsou však nutné další studie, aby je bylo možné v běžné klinické praxi využívat [3] [6] [12].



Obrázek 1.7: Fluorescence ND na makrofázích [G]

### 1.2.5 Toxicita ND z hlediska využití v medicíně

Toxicita ND je diskutována kvůli jejich malé velikosti. Malý rozměr jim umožňuje snadný prostup do tkání a buněk. Z dýchacího ústrojí mohou přecházet do nervového systému. Z doposud získaných poznatků však lze usoudit, že koncentrace používané pro bioaplikace nevyvolávají žádné zánětlivé nebo cytotoxické změny v organismu. Ani množství produkovaných reaktivních částic obsahující  $O_2$  není významné. Nezpůsobují ani morfologické změny na buňce, nejsou známky, že by nepříznivě ovlivňovaly jejich životnost. Avšak při zvýšených koncentracích se o možné toxicitě hovoří. Toxicita ND je také ovlivněna metodou jejich výroby, velikostí nanočástic a přítomností různých navázaných sloučenin na povrchu. Důležité je ale zmínit, že se žádné částice ND doposud nenalezly v jádře buňky. V opačném případě by jejich přítomnost naznačovala možnou genotoxicitu a tím pádem by použití ND bylo nevhodné [3] [13].

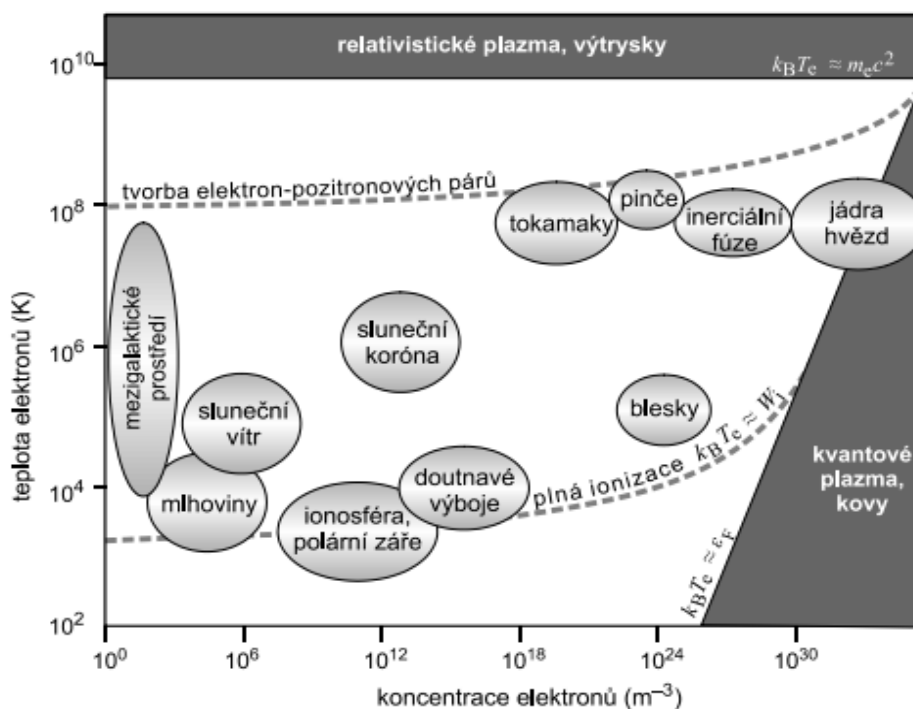
## 2. Plazma

Hmotu lze rozdělit do čtyř skupenství: pevné, kapalné, plynné a to poslední je označováno jako plazma. Pokud je plynu dodána dostatečná energie, dochází k jeho ionizaci. Jednou ze základních vlastností plazmatu je kvazineutralita. Kvazineutralita znamená, že se v jednotce objemu plynu vyskytuje stejné množství kladně, tak záporně nabitých částic a celkový prostorový náboj je tedy roven nule. Další podmínkou, kterou musí ionizovaný plyn splňovat, aby se mohl za plazma považovat je kolektivní chování. To znamená, že plazma vytváří elektrické a magnetické pole, a jako celek na něj i reaguje. Důležitým parametrem je Debeyova délka  $\lambda_D$ . Pokud se nabitá částice nachází ve vakuu, její potenciál se snižuje se vzdáleností a to v poměru  $\frac{1}{r}$ . Do vzdálenosti  $\lambda_D$  od nabitě částice se jeví jako částice, pokud přesáhne danou vzdálenost, její potenciál je odstíněn. Plazma je tedy soubor nabitých a neutrálních částic, excitovaných metastabilů, záření a volných radikálů.

Pojem “plazma” jako fyzikálního plynu se objevil ve čtvrtině minulého století (1928). Toto označení získalo díky podobnosti s krevní plazmou. V češtině je tento pojem fyzikálního plazmatu užíván ve středním rodě [14] [15] [16].

### 2.1 Základní poznatky o plazmatu

Plazma se vyskytuje v mnoha stavech a při mnohých teplotách. Na Obrázku 2.1 je diagram znázorňující druhy plazmatu v závislosti na koncentraci elektronů a teplotě.



Obrázek 2.1: Druhy plazmatu [H]

Plazma může být částečně či zcela ionizované. Mezi jednotlivými částicemi plazmatu dochází ke srážkám a to pružným a nepružným. U nepružných srážek může docházet k nabuzení, ionizaci nebo rekombinaci částic. Například světélkování plazmatu je důsledkem nepružných srážek a můžeme ho pozorovat mimo jiné u plazmatu vznikajícího za atmosférického tlaku. Světélkování bývá doprovázeno akustickými efekty z rázových vln způsobených rychlými změnami tlaku. Plazma také může a nemusí tvořit elektron pozitronové páry. Plazma je schopno vést elektrický proud a vodivost je závislá na teplotě.

Plazma z velké většiny vzniká za vysokého tlaku a teploty, téměř v celém vesmíru, standardně je však dělíme dle zdroje pracujícím při nízkém, atmosférickém a vysokém tlaku. Plazma může být buzeno vysokofrekvenčním magnetickým polem či elektricky a to střídavým i stejnosměrným napětím. Elektrody, mezi kterými se vytváří nízkoteplotní plazma, mohou být připojeny na RF napětí, AC-RF nebo DC napětí se zapojenými impedančními prvky v sérii. Elektrody, dávající vznik vysokoteplotnímu plazmatu, mohou být připojeny na pulzní AC napětí, pozitivní nebo negativní DC napětí.

V plazmatu, jenž vzniká působením elektrického pole mezi elektrody, jsou částice tímto polem urychlovány. Přičemž malé a lehké elektrony při nepružných srážkách s velkými a těžkými atomy ztrácejí jen malou část své energie. A tak mohou získat energii, která odpovídá vysoké termodynamické teplotě (v řádu tisíců K). Oproti tomu, těžké a velké ionty získávají energii pomaleji. Takovéto plazma označujeme jako nízkoteplotní. U nízkoteplotního plazmatu je ochlazování iontů a nenabitých molekul efektivnější než energetický přenos z elektronů a plyn tak vykazuje termodynamickou nerovnováhu. Z toho důvodu se nízkoteplotnímu také říká non-equilibrium tedy nerovnovážné. Izotermické plazma je pak to, kde částice vykazují teplotní rovnováhu, mají stejnou kinetickou teplotu [14] [16] [17].

### 2.3 Elektrické výboje

Elektrické výboje jsou rozděleny podle toho, zdali vznik nabitých částic závisí na vnějším působení ionizačního činitele na výboje samostatné a nesamostatné. Ionizačním činitelem je například UV či RTG záření nebo proud elektronů ze žhavené katody. Pokud tato činitele přestanou působit, výboj okamžitě ustává. Samostatné výboje jsou takové, při kterých není nutné působení ionizačního činitele pro udržení výboje. V Tabulce 2-1 jsou uvedené výboje, generující plazma a příslušné teploty [18] [19].

Tabulka 2-1: Rozdělení výbojů dle typu a teploty

Napájení	Typ výboje	Teplota iontů a neutrálních částic [K]	Typ plazmatu	Možnost použití v bioaplikacích
AC	Dielektrický bariérový výboj	300 – 400	Netermální	ANO
AC, DC, pulzní, mikrovlnné	Plazmová tryska	300 – 400	Netermální	ANO
DC, pulzní	Korónový výboj	300 – 400	Netermální	ANO
DC, pulzní	Přechodová jiskra (strimer)	1000 – 10000	Termální	NE, nebo nepřímo
AC	Klouzavý výboj	1000 – 5000	Termální	NE, nebo nepřímo
AC, DC	Obloukový výboj	2000 – 8000	Termální	NE
mikrovlnné	Mikrovlnný výboj	1000 – 9000	Termální	NE, nebo nepřímo

## 2.4 Produkty netermálního plazmatu za atmosférického tlaku

Jak je již velmi dobře známo, mezi hlavní stavební (makrobiogenní) prvky organismů patří C, O, H, N. Tyto 4 prvky tvoří až 95 % živé hmoty. Z toho kyslík tvoří až 63 % a dusík kolem 5 % hmotnosti buněk. Reaktivní formy těchto prvků vznikají působením plazmatu za atmosférického tlaku a jsou fyziologickou součástí živých organismů. Účastní se mnoha důležitých dějů nutných pro přežití. Z mikrobiologického hlediska jsou nejzajímavějšími činiteli reaktivní částice (ROS z anglického Reactive Oxygen Species a RNS Reactive Nitrogen Species), UV záření a elektrické pole. Tyto činitele jsou podrobněji popsány v následujících podkapitolách [18] [20].

### 2.4.1 Nabité částice

Ke vzniku záporných iontů dochází především při srážkách pomalých elektronů s molekulami plynu nebo při srážkách iontů a atomů s molekulami plynu. Elektronegativní prvky vytváří záporné ionty poměrně snadno, vzácné plyny téměř vůbec. Závisí totiž na obsazenosti valenčních vrstev daných atomů. K zániku dochází při ději zvaném rekombinace. Stává se tehdy, pokud se záporná částice spojí s kladně nabitým protějškem [16].

### 2.4.2 Volné radikály a reaktivní formy kyslíku a dusíku ROS a RNS

Do reaktivních forem kyslíku (ROS angl. Reactive Oxygen Species) jsou zahrnuty především:  $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{O}_3$ . Ty vznikají během výboje a v kontaktu s vodou, spolu s UV zářením, rázovými vlnami a volnými elektrony. Právě vzniklým reaktivním formám jsou připisovány nejsilnější účinky inaktivace bakterií. Jejich přítomnost narušuje funkci lipidové membrány a následně způsobuje transport nežádoucích molekul do buňky [18].

RNS mají podobný původ jako ROS s tou výjimkou, že se jedná o reaktivní formy dusíku, tedy  $\text{NO}$ ,  $\text{ONOO}^-$  a  $\text{HONOO}$ . Stejně jako ROS mají významný vliv na inaktivaci bakterií. Jak již bylo nastíněno v úvodu této kapitoly, ROS a RNS se podílí na mnoha procesech v lidském organismu. Jejich funkčnost a účinek ve tkáních, u terapeuticky používaného netermálního plazmatu, přímo souvisí s poločasem jejich výskytu ve tkáních potažmo v buňkách. V tabulce 2-2 jsou přehledně uvedeny poločasy výskytu jednotlivých aktivních forem [18] [21] [22].

Tabulka 2-2: Aktivní formy ROS a RNS, a jejich poločasy výskytu

Aktivní forma	Název	Poločas výskytu
$\text{OH}\cdot$	Hydroxylový radikál	$10^{-9}$ s
$\text{ONOO}^-$	Peroxynitrid	1-2 s
$\text{NO}_2$	Oxid dusičitý	$<10^{-6}$ s
$\text{O}_2^-$	Superoxidový anion	$>10^{-6}$ s
$\text{NO}$	Oxid dusnatý	0.1-6.4 s
$^1\text{O}_2$	Singletonový kyslík	$10^{-6}$ s
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peroxid vodíku	$10-10^2$ s

### 2.4.3 UV záření

UV záření je elektromagnetické záření o vlnové délce kratší, než je viditelné světlo a to přibližně v rozsahu 100–380 nm. UV záření lze dělit podle rozsahů vlnových délek na UVA, UVB a UVC, kde každé z nich má své specifické účinky na lidský organismus. Přírodním zdrojem UV záření je Slunce, kdy vzniká v důsledku interakce mezi částicemi ve vysoce ionizovaném plynu. Uměle je poměrně snadno generováno pomocí nízkotlakých či vysokotlakých rtuťových výbojek. Jeho využití je především v oblasti dezinfekce. Je známo, že UV záření má germicidní účinky a dá se využít jako náhrada za chloraci vody. Využití nachází i v medicíně například k léčbě lupénky. Důležité je také zmínit jeho negativní působení, kdy nadměrné expozice UV mohou způsobovat rakovinu kůže. UV záření má vliv na buněčnou DNA a snadno ji poškozuje. Nejúčinnější je UV záření o vlnové délce 254 nm, jelikož tato



vlnová délka je nejbližší absorpci DNA. Použitím UV záření o této vlnové délce lze významně ovlivnit životnost bakterií [23] [24].

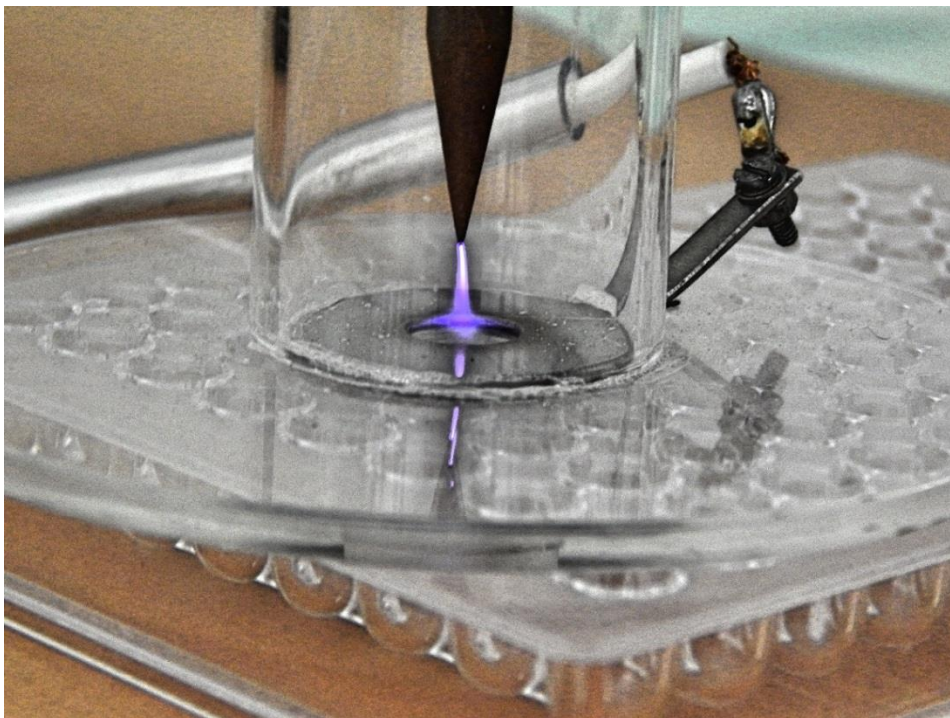
## 2.5 Elektrické výboje ke generaci plazmatu, použité v této práci

### 2.5.1 Korónový výboj

Korónový výboj patří k stabilním a samostatným výbojům. Vzniká v nehomogenním elektrickém poli, okolo elektrod s malým poloměrem křivosti, kde je gradient elektrického pole nejvyšší. Příkladem může být drát, hrotová elektroda, vedení vysokého napětí nebo válcová elektroda. Pokud na elektrody přivedeme několikanásobně větší napětí, než průrazné napětí plynu, tzv. počáteční napětí, nastane průraz výbojové dráhy a koróna pak přechází v jiskru. Rozložení elektrického pole před vznikem výboje, jež je dáno vzorcem pro válcový kondenzátor, ve kterém je vyjádřena intenzita elektrického pole  $E$  jako

$$E = E_{k/0} \cdot r_0 \cdot r - 1$$

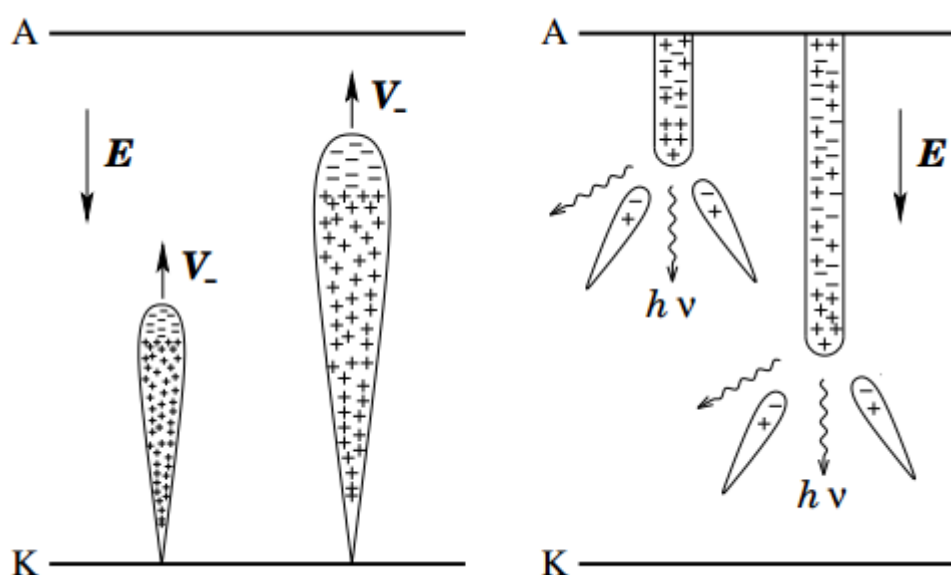
kde  $E_k$  je kritické napětí,  $E_0$  intenzita pole povrchu vodiče,  $r_0$  je poloměr vodiče. Pokud  $E_0$  dosáhne kritické velikosti  $E_k$ , dojde k výboji. Kritické nebo zápalné napětí závisí na geometrii elektrod, vzdáleností elektrod a na napětí na elektrodách, spolu s vlastnostmi plynu. Světélkující korónový výboj je doprovázen slabšími akustickými jevy. Ionizace probíhá v blízkém okolí korónující elektrody. Tato vrstva je nazývána aktivní. Mechanismus i děje kladné a záporné koróny se liší, nicméně se neliší v hodnotě kritického napětí [16] [25].



Obrázek 2.2: Ukázka korónového výboje

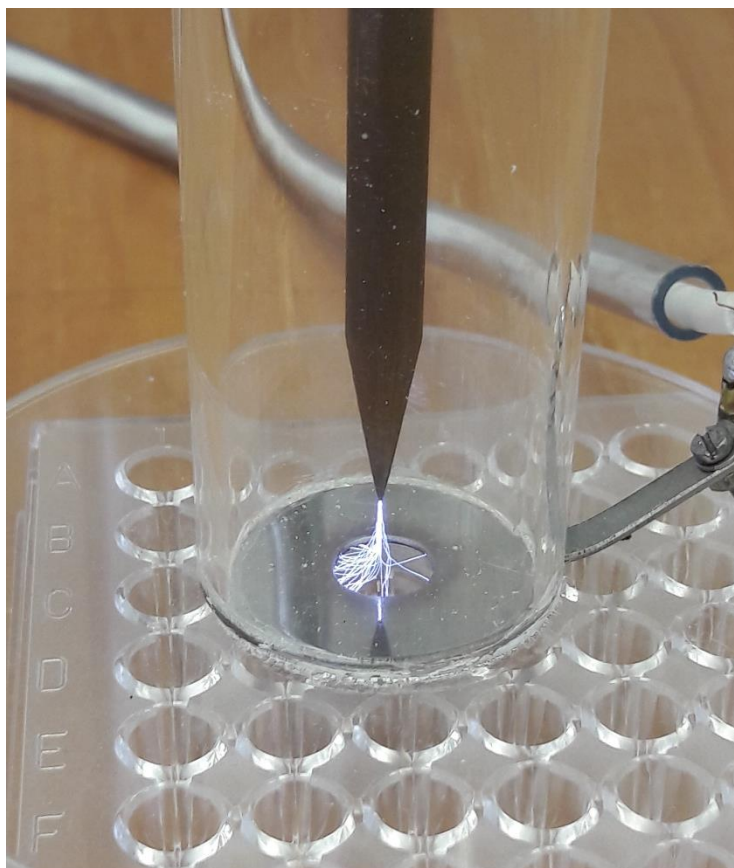
### 2.5.2 Přechodová jiskra

Jedná se o přechodovou formu elektrického samostatného výboje. Výboj vypadá jako klikatící se úzké kanálky vznikající mezi elektrodami popřípadě na elektrodách vyzařující velmi jasné světlo. Teplota výboje je přibližně 10 000 K. Výboj jiskry je doprovázen silnými akustickými jevy, které jsou způsobené rázovou vlnou v důsledku rychlých změn tlaku při vzniku výbojové dráhy. Pomocí teorie lavin lze přibližně popsat, jak dochází k vzniku tohoto výboje. Pokud je přivedeno na elektrody dostatečné napětí, mezi anodou a katodou vzniká tzv. lavina s vysokou koncentrací nabitých částic. Čelo laviny se pohybuje směrem k anodě, poté následuje šíření kladného strimeru od anody spolu se sekundárními lavinami v blízkosti jeho čela spolu s emitovanými fotony. Vizte Obrázek 2.3. Poté se celý děj opakuje.



Obrázek 2.3: Teorie strimerů- Elektronová lavina ve dvou po sobě jdoucích okamžicích [1]

Výboj respektive napětí a velikost elektrického pole potřebné k průrazu závisí na geometrickém tvaru elektrod, jejich vzdálenostech, tlaku a druhu plynu ve výbojové dráze. V práci bylo použito výboje za atmosférického tlaku okolního vzduchu,  $p < 1$  atm (1 atmosféra = 101,325 kPa). Za atmosférického tlaku je elektrická pevnost vzduchu cca  $4,4 \text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ , což je minimální hodnota průrazného napětí při nastavené mezielektrodové vzdálenosti na 1 cm [16] [25] [26].



Obrázek 2.4: Ukázka přechodové jiskry

## 2.6 Povrchové a biocidní účinky plazmatu

Vysokoteplotního plazmatu, se i v současné době stále používá například pro kauterizaci či ablací tkáně. Nízkoteplotní plazma v medicíně se začalo využívat později, až s vývojem plazmatických zdrojů, schopných fungovat za atmosférického tlaku v běžných podmínkách. Je ho využíváno například při zkoumání transfekce<sup>3</sup> nebo buněčného dělení, hojení ran, ošetření krve či jako NO terapie spojená s objevem koncem 20. století oceněným Nobelovou cenou. Samozřejmě je také důležité brát v potaz termální účinky generovaného nízkoteplotního plazmatu interagujícího s živou tkání. Nerovnovážné nízkoteplotní plazma je schopno iniciovat, podporovat, kontrolovat a katalyzovat různé komplexní chování a odpovědi v biologických systémech. Hlavními účinky pak jsou: specifické uvolnění buněk, buněčná migrace, angiogeneze a proliferace, exprese povrchových proteinů buněk, narušení celistvosti DNA, vyvolání apoptózy<sup>4</sup>, inaktivace mikroorganismů a nádorových buněk, dočasné zvýšení propustnosti membrán a koagulace krve.

<sup>3</sup> Metoda přenosu DNA do eukaryotických buněk.

<sup>4</sup> Naprogramovaná smrt buněk.

Plazma má využití i ve zpracování odpadů a to tak, že způsobí rozklad škodlivých látek na atomy. K tomu lze využít vysokoenergetické plazmové výboje s teplotou 10 000 K [18] [27] [28].

## 2.7 Plazmová medicína

Plazmová medicína je poměrně nový obor, v němž se kombinuje biologie, klinická medicína a v neposlední řadě fyzika a chemie iniciována plazmatem v definovaném prostředí. Cílem je tedy ovlivnit nejen povrchovou mikroflóru na požadovaných místech, ale i stimulovat či inhibovat růstové procesy. Pro terapeutické účely se využívá především netermálního plazmatu, které pro lidskou tkáň, dle dosavadních poznatků, nepředstavuje riziko. Takovéto plazma je generováno především elektrickými výboji, a vzniká za atmosférického tlaku; stává se zdrojem iontů, rekombinovaných neutrálních částic, radikálů, reaktivních částic a elektromagnetického záření od ultrafialového až po infračervené, důležitých pro další interakci s buňkou.

Výboj lze navíc upravit tak, aby generoval plazma s určitou koncentrací částic, aby bylo dosaženo požadovaného medicínského efektu. Plazma lze využít v různých odvětvích medicíny, například dermatologii při léčbě kožních onemocnění, stomatologii, chirurgii, onkologii či v estetické medicíně. S tím přímo souvisí využití pro modifikaci ploch, které mají být v přímém kontaktu s tkání (např. jejich sterilizaci nebo aktivaci) a to zejména chirurgických přístrojů, dekontaminace nebo úpravě implantátů [18] [28].

### 3 Plazmatem aktivovaná voda (PAW)

Jak již bylo zmíněno ve druhé kapitole, netermální plazma lze využít v různých odvětvích medicíny. V posledních letech se studují vlastnosti ROS a RNS rozpuštěné ve vodě. Ty vznikají po aktivaci vody plazmatem. Plazmatem aktivovaná voda je pojmenování z anglického Plasma Activated Water a obsahuje mnoho aktivních částic. U PAW se předpokládá delší životnost aktivních forem kyslíku a dusíku [29]. Pro generování PAW byla použita stejná sestava určená i pro ošetřený H-ND, která je podrobně popsána v praktické části této práce v kapitole 6.6.

#### 3.1 Vznik PAW a její trvání

Vodu lze aktivovat pomocí plazmatu a to několika způsoby:

- ošetřením vody plazmatem generovaného v plynné fázi (vzduch, argon apod.) přímo, tedy ošetřovaná voda je zároveň elektroda anebo je v přímém kontaktu s plazmatem generovaným např. plazmovou tryskou;
- ošetřením vody plazmatem generovaném přímo ve vodě;
- anebo ošetřením vody nepřímo produkty výboje unášenými iontovým větrem a difundujícími do vody skrz hladinu.

PAW může být aktivována všemi typy plazmových zdrojů, zmíněných v kapitole 2 jako pulzní korónou, plazmovými tryskami či pomocí dielektrického bariérového vývoje (DBD). PAW vytvořena pomocí netermálního plazmatu obsahuje převážně reaktivní formy kyslíku a dusíku (ROS, RNS). Pro tvorbu RNS je ale lepší použití termálního plazmatu z důvodu vyšší teploty. Nutností je zařídit dostatečný přísun vzduchu (kyslíku a dusíku), pro vznik zmíněných reaktivních komponent. Pro dokonalé využití plazmatu je vhodné pohybovat s ošetřovanou kapalinou, aby vzniklé produkty byly rovnoměrně rozpuštěny. Tato metoda umožňuje vznik a výrobu PAW za využití elektřiny, vody a vzduchu, a nejsou nutné žádné chemikálie.

#### 3.2 Produkované radikály a jak je lze ovlivnit

Nejvíce zastoupené primární částice ve vodě ošetřené plazmatem jsou  $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{H}\cdot$ ,  $\text{O}\cdot$  a  $\text{NO}\cdot$  radikály. Ty reagují s dalšími molekulami, což vede k vzniku  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_x$ ,  $\text{O}_3$ ,  $\text{HNO}_2$ ,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{ONOOH}$ . Hodnota pH PAW se pohybuje od 3 do 7. U nepufrovaných roztoků ale pH se většinou nezvedne vyš než 4,5, což odpovídá kyselému pH. Díky kyselému prostředí dochází ke vzniku peroxydusitanu z peroxidu vodíku a dusitanu, které jsou přítomny v PAW po dobu asi 15 minut od její aktivace.

V případě použití stejnosměrných zdrojů plazmatu pH závisí na polaritě přiváděného napětí, kde při negativním zapojením je výsledné pH nižší, než při pozitivním [30]. Vodivost a pH roztoku jsou úzce

spjaty a závisí na podílu OH<sup>-</sup> a H<sup>+</sup>. Vodivost se zvyšuje protože H<sup>+</sup> mají relativně vyšší pohyblivost oproti OH<sup>-</sup>.

V závislosti na typu zdroje napětí, jeho energii a chemickém složení okolního prostředí, jsou generovány různé druhy primárních a sekundárních reaktantů, a to buď ve vodní či plynné fázi, a také dochází k různým plasm-chemickým reakcím. Výsledné složení PAW ovlivňuje přítomnost elektrolytů a zřašedel. Dalším faktorem ovlivňujícím chemické složení roztoku mohou být ionty a částice uvolněné z elektrod. Mimo to, v prostředí pro vypouštění plynu a kapaliny, druh plynné fáze bude ovlivňovat vznik plynných částic, které se posléze změny na tekutiny. Tím pádem lze říci, že celkový výtěžek plasm-chemických procesů je dán synergistickým působením mnoha různých elementárních reakcí současně probíhajících ve výboji.

V experimentu využíváme PAW, která vzniká reakcí tekutin s částicemi generovanými plazmatem, které difundují do tekutiny.

Skupiny reaktantů lze dle jejich vzniku rozdělit do 4 základních skupin a to:

- Acido-bazické reakce dané kyselými účinky vody způsobené chemickými produkty plazmatu
- Oxidativní reakce způsobené oxidačními činidly ROS a RNS produkovanými plazmatem (OH<sup>-</sup> radikál, O<sub>3</sub>, peroxid vodíku, a peroxynitrit)
- Redukční reakce způsobené redukčními činidly produkovanými plazmatem (H<sup>•</sup>, HO<sub>2</sub><sup>•</sup> radikály)
- Fotochemické reakce iniciované UV zářením z plazmatu (fotolýza H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> a perhydroxyl radikál)

[20] [30] [31].

### 3.3 Účinky PAW na živý organismus

Nejvýznamnější jsou pro živý organismus oxidační reakce. Oxidativní stres je komplex různých abnormálních dějů, které postihují buňky a vedou k nadprůměrné koncentraci exogenních nebo endogenních kyslíkových radikálů, které nejsou dostatečně rychle likvidovány antioxidačním systémem. Kyslíkové radikály mají afinitu především k nenasyceným mastným kyselinám, které jsou hlavní součástí buněčných membrán. V případě navázání kyslíkového radikálu na polynenasycenou mastnou kyselinu buněčné membrány dojde k předání elektronu mezi radikálem a mastnou kyselinou, ta se stává radikálem a celý děj předávání elektronů pokračuje řetězově mezi jednotlivými chemickými strukturami membrány až do doby, kdy dojde k jejímu úplnému rozrušení a tím k zániku buňky. Bakterie obsahují ve svých membránách polynenasycené mastné kyseliny. Působením kyslíkových radikálů tedy dochází ke změnám na buněčné membráně od poruch funkčních (transportní děje, propustnost kanálů apod.) až po zánik bakterií.

Složky, které se v PAW nacházejí, spolu s nízkým pH mají antimikrobiální efekt: ničí bakterie, biofilmy, kvasinky a jiné mikroorganismy.

PAW může být použita jako růstová podpora, která má za účinek zlepšení klíčivosti semen a stimuluje růst rostlin. Výzkumy ukazují, že pomocí PAW lze zvýšit životnost řezaných květin či snížit infekci a počet bakterií až o 1,5 log<sup>5</sup>. Také bylo prokázáno, že pokud se PAW použije během první 15 minut od výroby, lze u *S. epidermis*<sup>6</sup> docílit úbytku až 8,4 log v čase 5 minut a pro *S. aureus*<sup>7</sup> 6,5 log po 10 minutách. Bylo ukázáno, že PAW, která byla aktivována povrchovým plazma má menší inaktivační účinky na *S. Aureus* nežli PAW aktivovaná „zevnitř“, tedy výbojem přímo v kapalině. Po dobu 15 minut od přípravy má PAW nejvyšší aktivitu a je silným desinfekčním činidlem. S postupem času baktericidní účinky klesají. Mírnější baktericidní účinky si však PAW může uchovat po dobu až 1,5 roku, za splnění určených skladovacích podmínek.

PAW se, mimo jiné, dá používat k desinfekci užitkové i pitné vody. V medicíně PAW umožňuje desinfekci kůže, ran, zubních kanálků, lékařských nástrojů, vybavení a povrchů. Na kůži dochází k zabití mikroorganismů účinkem ROS a RNS v důsledku oxidativního stresu a samotná tkáň není nijak poškozena. Uplatnit se dá především na onemocnění způsobená houbami tj. mykotického původu. Je prokázána závislost na množství H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v PAW a buněčné odpovědi. Pokud je koncentrace H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v PAW nízká, dochází ke stimulaci růstu buněk. Zastavení růstu je docíleno se středními koncentracemi a při vysokých koncentracích již dochází k apoptóze tedy cílené smrti buněk.

Hlavní mechanismus plasm-chemické dekompozice organických sloučenin rozpuštěných ve vodě zahrnuje oxidační procesy iniciované OH radikály, O<sub>3</sub> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (zvláště v přítomnosti určitých katalyzátorů jako je železo, platina či wolfram) [29] [31] [30] [32] [33] [34].

---

<sup>5</sup> Množství bakterií se uvádí v logaritickém měřítku, log je tedy řád.

<sup>6</sup> *Staphylococcus epidermis* je gram-positivní bakterie.

<sup>7</sup> *Staphylococcus aureus* je gram-positivní bakterie, běžně se vyskytující na lidské kůži.



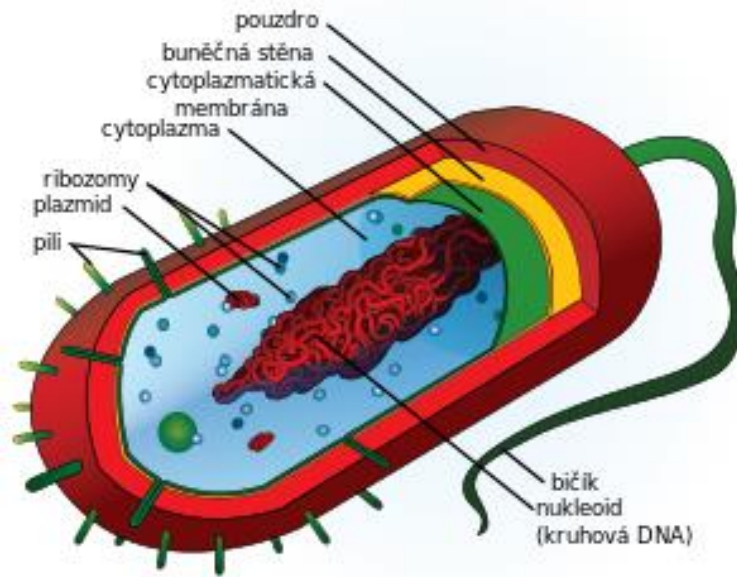
## 4 Mikrobiologie

Mikrobiologie je věda, která se zajímá o původce onemocnění v lidském těle, stejně tak o nepatogenní mikroby v těle a jeho blízkém okolí. Důležitost této vědy vychází právě z ohrožení života pacienta. Dále je nutno říci, že se jedná o organizmy velmi malé a pouhým okem mnohdy nepozorovatelné, což však nevyovídá nic o jejich potencionální škodlivosti, virulentnosti či patogenitě. Mikroorganismy mohou naopak prospívat živému organismu a žít s ním v symbióze. Mikroorganismy dělíme na prokaryota, kam řadíme bakterie a sinice, a eukaryota, kam řadíme řasy, plísňe (obecně houby) a protozoa. V této práci je zkoumán vliv pouze na bakterie [35] [36].

### 4.1 Morfologie a cytologie buňky

Velikost bakterií se uvádí 0,2  $\mu\text{m}$  až 0,75 mm. Podle stavby buněčné stěny se bakterie dělí na gram-pozitivní a gram-negativní, přičemž název je odvozen od metody gramova barvení, díky které lze rozlišit, do jaké skupiny se bakterie řadí. Mezi gram-pozitivní patří například *Pseudomonas* a mezi gram-negativní *Escherichia* či *Salmonella*. Bakterie mohou mít různý tvar. Známý jsou tvary kulovité (koky), tyčinkovité (bacil) nebo rohlíčkovité (spirila) a další. Bakterie je zevně ohraničena cytoplazmatickou membránou a nad ní se nachází pevná buněčná stěna, která se v tloušťce liší podle druhu. Právě vnější obal bakterie a přítomné látky v něm jsou základem gramova barvení. Ten také dává bakterii tvar a vytváří hlavní ochrannou vrstvu. Zevnitř musí buňka odolávat osmotickému tlaku. Propustnost membrány je pouze pro molekuly menší než 1 nm. V membráně jsou však i bílkoviny, díky kterým lze transportovat i větší molekuly do nitra buňky. Uvnitř se nachází cytoplazma. V ní se nachází ribozomy nutné pro proteosyntézu a také se v ní nachází i bakteriální chromozom (nukleoid). Jedná se o molekulu dvouvláknové DNA, vytvářející kruh. Na Obrázku 4.1 je zobrazen náčrt stavby bakteriální buňky.





Obrázek 4.1: Morfologie buňky [J]

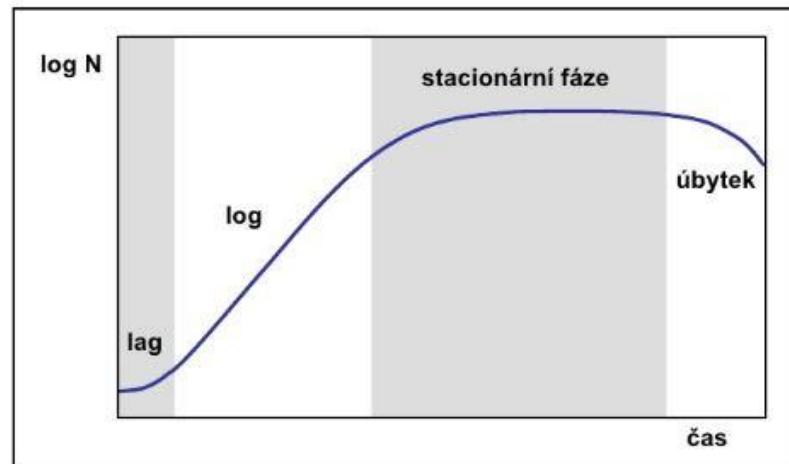
## 4.2 Růst a množení bakterií

Bakteriální buňky se množí dělením, tj. že se duplikuje vše potřebné v buňce k jejímu samostatnému fungování a před ukončením růstu se bakterie rozdělí na dvě stejně rovnocenné buňky. Existují různé způsoby, jakými lze sledovat četnost populace bakterií. Jedním z nich je počítání buněk v určeném objemu kultivačního média nebo měření zákalu určitého objemu. Za určitý čas se v optimálních podmínkách tj. při správné teplotě (pro *E. coli* 35- 37 °C) a vhodném pH (pro *E. coli* 6,0 – 8,0) bakterie dělí a to exponenciální řadou. Jedno takové dělení se nazývá generační doba. Například generační doba *E. coli* je 20 min. Pro srovnání, pивní kvasinka má generační dobu 2 hodiny, bakterie TBC má generační dobu 36 hodin. Lze tedy předvídat i eventuální konečný počet bakterií dle vzorce  $B = B_0 \cdot 2^n$ , kde  $n$  je počet generací a  $B_0$  je počet bakterií na začátku. Dále lze uvést pojem rychlost množení dle vzorce  $C = n \cdot t^{-1}$  což je poměr počtu generací vůči časové jednotce (hodina).

Pokud je sledován průběh množení v čase, lze z vykultivovaných vzorků získat tzv. růstovou křivku, vizte Obrázek 4.2. Byly zjištěny čtyři fáze růstu a vývoje buněk.

- Lag fáze – buňky se adaptují na nové prostředí, zatím se nemnoží
- Log nebo Exponenciální fáze – postupný nárůst rychlosti množení, v určité chvíli je konstantní, tj. všechny buňky se dělí stejně rychle. Pokud data (počet buněk) vyneseme do logaritmického grafu, potom vidíme lineární závislost a průběh.
- Stacionární fáze nastává v okamžiku, kdy se již buňky dále nedělí. Důvody nejsou zcela jasné, ačkoli důvod není nedostatkem živin ale spíše nahromaděním toxických metabolitů.

- d) Fáze hynutí - po delší době buňky začnou odumírat a jejich počet klesá. To se děje pokud v prostředí, v němž se bakterie nacházejí, například dojdou živiny nebo z důvodu zamoření prostředí důsledky vlastního metabolismu.



Obrázek 4.2: Růstová křivka bakterií [K]

Pro upřesnění, během 18 hodin se v živném médiu, při teplotě 35-37 °C namnoží  $10^9$  buněk·ml<sup>-1</sup>. Významné je i zbarvení tekutiny. Tento proces růstu je dobře pozorovatelný v tekutém médiu, kterým může být například Mueller-Hinton bujon.

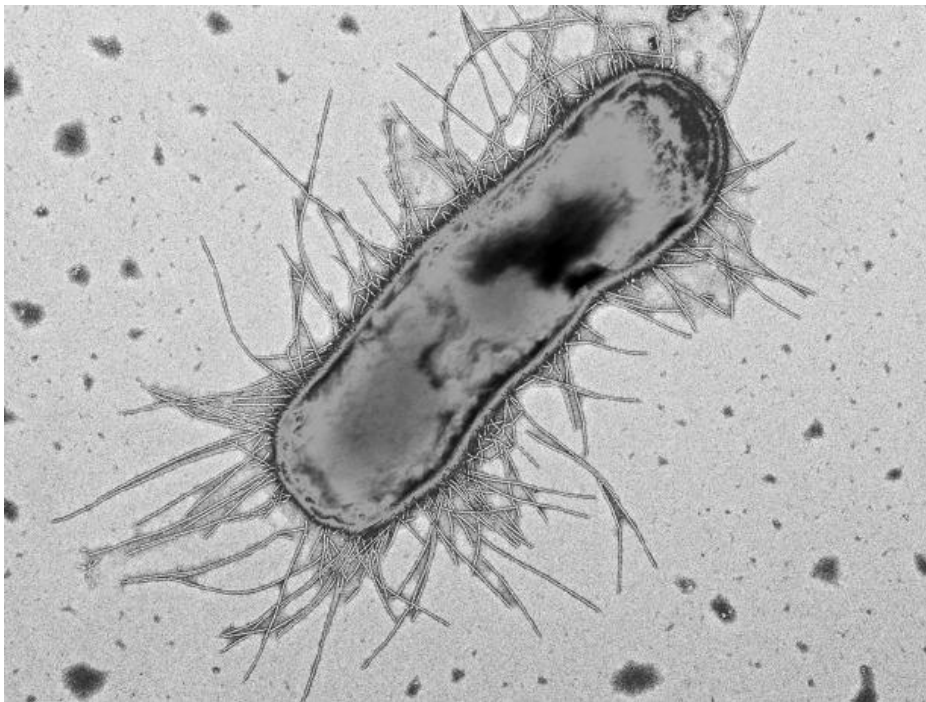
Bakterie se také mohou pěstovat na pevných živných půdách (agary), například v plastových nebo skleněných Petriho miskách, kde vytváří kolonie. Tyto kolonie bývají mnohdy druhově specifické. U bakterie *Escherichia coli* lze po 18 až 20 hodinách pozorovat kolonie s pravidelným okrajem. Tento tvar je jakýmsi artefaktem laboratorní kultivace v důsledku nadbytku živin. Aby bylo docíleno tohoto tvaru, který je vhodný pro počítání, je třeba nechat roztok s *E. coli* plně zaschnout, jinak dochází ke znehodnocení vzorku v důsledku pohybů pomocí již zmíněných bičků, kterými je *E. coli* obdařena. V kontextu této práce byly použity oba druhy prostředí, proto je vhodné je uvést.

### 4.3 Smrt bakterií

Usmrcení bakterie nastává tehdy, pokud se již buňka není schopna rozmnožovat. Jsou různé procesy inaktivace bakterií. Sterilizace je proces vedoucí k usmrcení všech bakterií, dezinfekce usmrtí pouze mikroby na povrchu předmětů. Antiseptika mají podobný účinek jako dezinfekce. Dále se pak používají konzervační látky, ATB, biocidní látky, záření a obecně příliš vysoké nebo nízké teploty. Obecně platí, že působením zmíněných vlivů dochází k narušení DNA, popřípadě poškození stavební bílkoviny a jejich následné denaturaci. ND, které jsou hlavním předmětem této práce, mají biocidní vlastnosti a podílejí se na poklesu bakteriální kultury. Tato klíčová vlastnost ND je zmíněna také v kapitole 1.2.4.

#### 4.4 Enterobakterie - *Escherichia coli*

*Escherichia coli* je bakterie, která patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jsou to gram-negativní tyčinkovité bakterie délky 1–6  $\mu\text{m}$  a tloušťce 0,4–1  $\mu\text{m}$ . Produkují LT toxin, který má za následek sekreci vody a iontů. Nejznámější z druhů *Escherichia* je právě *E. coli*, známá zejména z důvodu přítomnosti v lidském střevě. Tam je součástí střevní mikroflóry a přispívá k tvorbě vitamínu K. Pozornost získala také díky své kultivační nenáročnosti. *E. coli* je jedním z nejlépe prostudovaných mikroorganismů, jelikož slouží jako modelový organismus pro klinické a genové studie. Také proto byla vybrána jako zkoumaná bakterie této práce. U *Escherichia coli* se délka DNA pohybuje kolem 1 mm. Chromozom *Escherichia coli* má asi 4500 kB a obsahuje 4405 genů. Buňky na sobě mohou mít i křehké bičíky. *E. coli* je má na celém povrchu těla. Bičíky rotují rychlostí 18000 rpm a díky tomu se bakterie posune o cca 30  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Bakterie *E. coli* může obsahovat různé plazmidy<sup>8</sup>, které jí předurčují různé specifické vlastnosti. Takovéto bakterie jsou původci průjmových onemocnění. *E. coli* je mj. nejčastějším původcem způsobující záněty a infekce močového ústrojí (asi 50 %). Dále se asi 10 % podílí na vzniku infekcí ran. Ukázkou bakterie *E. coli* lze vidět na Obrázku 4.2 [35] [36] [37].



Obrázek 4.2: *Escherichia coli* [L]

---

<sup>8</sup> Molekula DNA nesoucí doplňkovou genetickou informaci.

## 5 Metody měření parametrů ND

V následujících kapitolách jsou zmíněny metody a možnosti zkoumání nanodiamantu, potažmo jeho struktury a povrchu. V experimentální části byla použita metoda infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací.

### 5.1 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

FTIR je anglický akronym Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Infračervená spektroskopie využívá dva typy měřících zařízení FTIR a disperzní spektrometr. Měří se závislost intenzity respektive absorbance a transmitance infračerveného záření na vlnové délce. Výpočet absorbance je dán vztahem

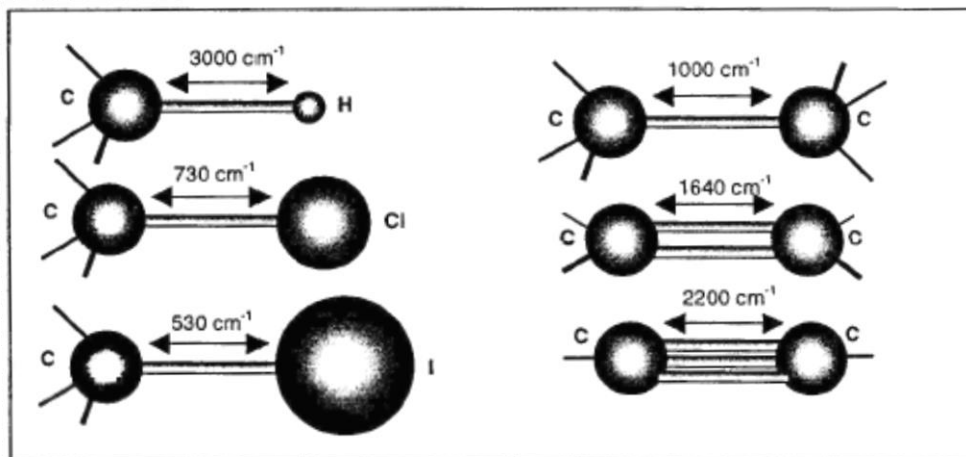
$$A = -\log\left(\frac{R}{R_0}\right)^9$$

kde  $R$  je spektrum analyzovaného vzorku a  $R_0$  pak referenční destičky. Tou je křemíková destička potažená titanem a zlatem. Metoda nabízí možnost identifikace a analýzy anorganických i organických sloučenin, možné je získat informace o tvaru molekuly.

Měřená látka může být v pevném, kapalném i plynném skupenství. Radiační zdroj FTIR spektrometru vyzařuje infračervené záření, které dopadá na interferometr. Zde je záření modulováno například pomocí Michelsonova interferometru a přechází, pod přesně stanoveným úhlem pro danou látku, přes vzorkový prostor na detektor. Pokud paprsek projde přes interferometr, díky pohyblivému zrcadlu je získána výstupní vlna s proměnlivou intenzitou nazývaná interferogram. Z něho se pak počítá výsledné spektrum pomocí Fourierovy transformace.

---

<sup>9</sup> Transmitanci je definována jako  $T = \frac{I_v}{I_b}$ ; kde  $I_v$  je intenzita světla, které prošlo vzorkem a  $I_b$  pak intenzita světla, která prošla slepým vzorkem.



Obrázek 5.1: Vztah mezi vlnočtem valenčních vibrací, povahou vazby a druhem vázaných atomů u FTIR [M]

Vibrace, u kterých se mění délka vazby, jsou označovány jako valenční vibrace. Vibrace doprovázející změnu vazebného úhlu, jsou nazývány deformačními, vizte Obrázek 5.1.

Měření spekter probíhá v dusíkovém prostředí popřípadě ve vakuu. Dusík totiž nemá dipólový moment a tím pádem se ve spektru nezobrazí. Snahou je zamezení nežádoucích vzdušných residuí, především H<sub>2</sub>O. Na Obrázku 5.2 lze vidět příklady vlnočtů některých skupin. Podrobná interpretace spekter vzorků H-ND je popsána v experimentální části v kapitole 8 [38] [39] [40] [41].

Tabulka 5-1: Příklad vlnočtů valenčních vibrací některých skupin

Skupina	Typ sloučeniny	Skupina	Vlnocet cm <sup>-1</sup>
C-H	sp <sup>3</sup> hybridizace uhlovodíku	-CH <sub>3</sub>	2865-2975
C-H	sp <sup>2</sup> hybridizace uhlovodíku	-CH <sub>2</sub> -	2840-2940
C-H	sp hybridizace uhlovodíku	>C=CR-H	3010-3040
C-H	Aldehydy	H-(C=O)R	2720, 2820
N-H	Primární aminy, amidy	RNH-H, RCONH-H	cca 3400
O-H	Alkoholy, fenoly	-OH	3580-3670
C=O	Aldehydy	R(C=O)H	1720-1740
C=O	Ketony	R(C=O)R	1705-1725
-NO <sub>2</sub>	Nitroskupiny	RNO <sub>2</sub>	1320-1380, 1500-1560

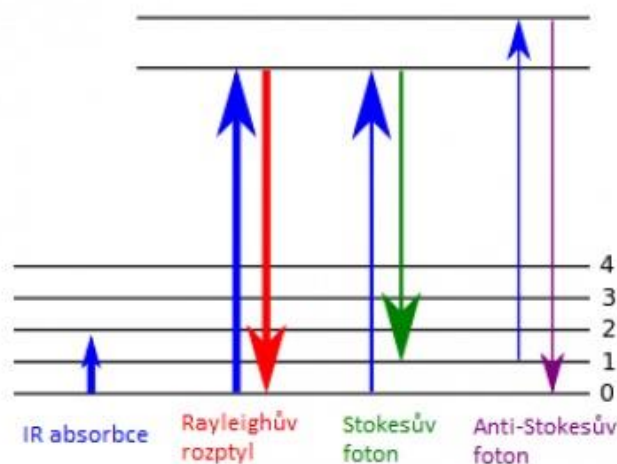
## 5.2 Ramanova spektroskopie

Tato spektroskopie je založena naměření vibrační stavů molekul. Základem je jev neelastického optického rozptylu. Tato metoda je vhodná pro určování látek, jejich prvkového složení a struktury. Lze ji využít pro analýzu kapalin i pevných látek, pro analýzy biologických systémů či analýze povrchů. Metoda dovoluje studovat zářivý dvoufotonový přechod mezi vibračními stavy molekul s danými energiemi  $E_1$  a  $E_2$ . Přechod je vyvolaný dopadem záření o frekvenci  $\nu_0$ , kde platí

$$\nu_0 > |E_2 - E_1|/h$$

Kde  $h$  je Planckova konstanta ( $h = 6,626 \cdot 10^{-34}$  J·s).

V molekule interagující se zářením je indukován dipólový moment. Působením laseru na materiál dochází k excitaci atomu tak, že elektron přejde do energetické hladiny s vyšší energií. Po krátké době dojde k přechodu elektronu zpět do nižší energetické hladiny a molekula emituje záření s nezměněnou frekvencí (Rayleighův rozptyl) a nenesou žádnou informaci. V případě, že se elektron vrátí vyšší nebo do nižší energetické hladiny než jeho původní, to pak nazýváme Ramanův rozptyl. Ty s nižší frekvencí náleží Stokesovu rozptylu a vyšší pak anti-Stokesovu rozptylu, vizte Obrázek 5.1. Pro vznik Ramanovy linie je nutná změna polarizovatelnosti molekul.

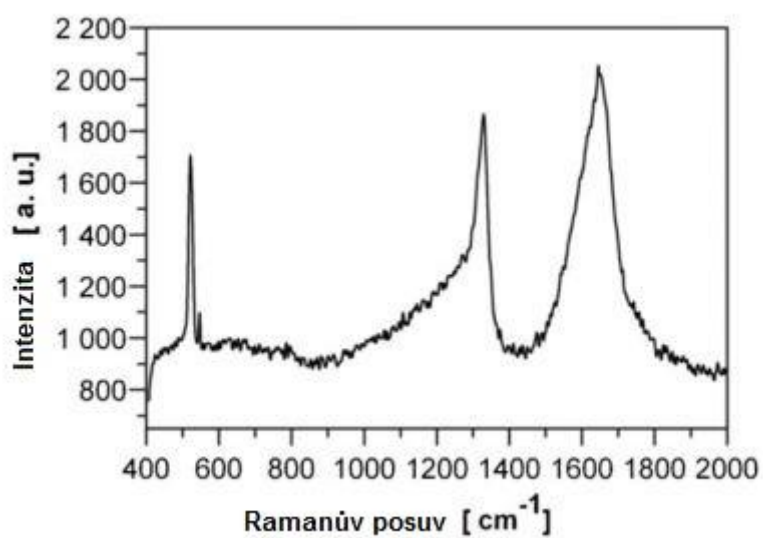


Obrázek 5.2: Schéma excitací [N]

Ramanova spektra poskytují informace o vibračních pohybech molekul nebo krystalů aj. Frekvence normálních vibračních módů je závislá na síle vzájemných vazeb atomů a na jejich hmotnosti. Síla vzájemných vazeb je základní parametr, který popisuje strukturu molekul.

Ramanův spektrometr se skládá ze zdroje excitujícího záření, kterým je například Ar, Kr či YAG laser, vzorkovací komora, sběrná komora, filtry a detektor, vizte Obrázek 5.2.

Pomocí Ramanovy spektroskopie lze dobře charakterizovat uhlíkové materiály tj. v našem případě ND či grafitické vrstvy. ND vykazují v Ramanově spektru typicky velmi intenzivní a úzký pás při  $1332\text{ cm}^{-1}$ , odpovídající krystalickým  $\text{sp}^3$  uhlíkům v jeho struktuře. Vizte Graf 5.3. Získaná spektra lze srovnávat s již naměřenými a identifikovanými vzorky z knihoven a tak provádět přesnější identifikaci zkoumané látky [3] [42] [43] [44].



Graf 5.3: Ramanovo spektrum detonačních ND [O]



## Praktická část diplomové práce

Aby bylo možné zjistit, jaké účinky budou mít nanodiamanty na bakterii *Escherichia coli*, byly navrženy dva experimenty pro zkoumání

- Biocidních účinků suspenze H-ND v ředěném živném médiu na *E. coli*
- Biocidních účinků H-ND ošetřených plazmatem spolu s plazmatem aktivovanou vodou v ředěném živném médiu na *E. coli*

Pro bližší seznámení se přímo s biocidními vlastnostmi H-ND byl proveden pokus, při němž byl použit pouze roztok H-ND. Ten byl přidán v poměru 1:1 k suspenzi *E. coli* v tekutém živném médiu. Tato suspenze byla ponechána v termostatu po dobu 24 hodin a namnožené bakterie byly odebrány v čase 5 a 24 hodin. Výsledkem je tříbodová křivka vypovídající o inhibičním růstu bakterie. Tímto pokusem jsme navázali na studii, ve které se zkoumaly vlivy různých nanočástic na uhlíkové bázi na bakterii *E. coli* [39]. Studie uvádí, že nejlepšími výsledky bylo dosaženo při použití H-ND, proto byl tento materiál vybrán jako vhodný pro zopakování experimentu, a tím získání referenčních výsledků jeho účinků pro druhý experiment.

Pro realizaci druhého experimentu bylo nutné použití plazmatu. Vzorky H-ND byly ošetřeny různými typy elektricky generovaného plazmového výboje a to po různou dobu. Je nutné zmínit, že H-ND byly rozředěny v destilované vodě, která se po působení plazmatu aktivuje a vzniká PAW popsaná v kapitole 3. Dále následovalo zkoumání toho, jak se změní biocidní vlastnosti H-ND po ošetření plazmatem. Doby ošetření byly stanoveny na 1, 3 a 5 minut. Pro srovnání byly také stejně dlouhou dobu ošetřovány vzorky destilované vody jako další reference pro účinky samotné PAW.

Vzorky byly analyzovány ve spolupráci s Fyzikální ústavem Akademie věd ČR, v. v. i., s pomocí paní RNDr. Pavly Štenclové, Ph.D. Zde byla provedena Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací.

Cílem experimentů bylo zjistit optimální dobu ošetření suspenze ND a pomocí analýzy sledovat změny na jejich povrchu. Zhodnocení bylo možné po provedení experimentů. Výsledky jsou prezentovány v podkapitolách u jednotlivých experimentů. V závěru je popsáno celkové zhodnocení dosažených výsledků.



## 6 Použité laboratorní metody

### 6.1 Zásady práce s mikroorganismy

Bakterie, stejně jako rostlinné a živočišné buňky, rostou také *in vitro* tj. v umělých podmínkách. Díky jejich kultivaci lze pozorovat, jak rostou, jak se dělí a diferencují. Také je možné pozorovat jejich reakce na různé stimuly jako například záření, teplotu, pH apod. Pomocí živné půdy a podmínkám *in vitro* lze kontrolovat a zároveň definovat prostředí, ve kterém se vyvíjí. Vždy je ale nutné dodržovat určitá, předem stanovená, pravidla, která zabezpečují funkčnost zvolené metody či získání požadovaných výsledků. Prvotní kultury mikroorganismů by měly pocházet z certifikovaných laboratoří. Nutné je dodržení sterility prostředí, pracovních pomůcek a kultivační půdy, zajistit vhodné prostředí pro růst buněk s vhodným pH, teplotou, množstvím živin a vlhkostí. Důležité je zabránit kontaminaci kultury správným zacházením a uchováváním.

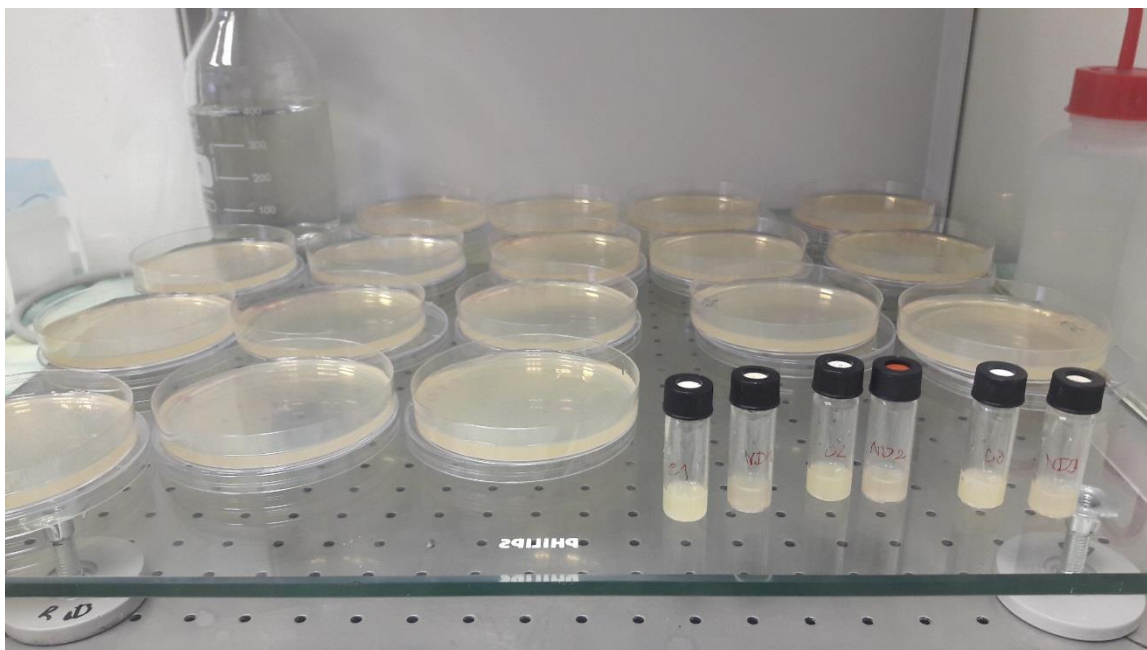
Vhodným nástrojem pro sterilizaci a udržení sterility je přístroj zvaný autokláv, jenž zajišťuje vlhkou sterilizaci. Proces vlhké sterilizace probíhá při teplotě kolem 121 °C po dobu cca 20 minut za zvýšeného tlaku. Je možné také použít suché sterilizace, která probíhá ve většině případů po dobu 1 hodiny při teplotě vzduchu 200 °C. Metoda je vhodná pro běžné ošetření různých materiálů jako sklo, kov a teplu odolných plastů [4] [37].

### 6.2 Příprava vzorků *E. coli*

Roztok *E. coli* byl pro každý pokus připravován z čerstvé zásobní kultury těsně před experimentem. Na začátku každého pokusu byla vždy naměřena koncentrace bakterií pomocí McFarland densitometru, jenž měří průhlednost roztoku. Počáteční čírost roztoku *E. coli* byl zvolena 0.5 MFU proto, aby byly zajištěny stejné výchozí podmínky různých experimentů, co do počtu bakterií *E. coli*. 0.5 MFU dle kalibrační křivky odpovídá přibližné koncentraci bakterií  $10^6$  CFU·ml<sup>-1</sup> (CFU - počet vytvořených kolonií). Původní kultura *E. coli* pochází z Ústavu experimentální biologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity. Další vzorky byly získány rekultivací z původních certifikovaných vzorků.

### 6.3 Příprava Mueller-Hinton agar

Pro kultivaci a pozorování růstu bakterií byl použit Mueller-Hinton agar. Agar je skladován ve formě prášku a posléze je míchán s destilovanou vodou v poměru 39 g na 1 litr a před sterilizací pomocí autoklávu je nutné ho uvést do varu. Poté, co je sterilizován v autoklávu, je nutné ho rozlít do Petriho misek. Roztok změní své skupenství z kapalného na pevnou hmotu světle žluté barvy již při 60 °C a uchovává se v lednici. Jeho použitelnost je pak zhruba jeden měsíc. Hlavní složku tvoří hovězí bílkovina, škrob, kasein hydrolyzát a mořská řasa. Tímto postupem byly vždy připravovány agary pro účely experimentů. Ukázka agarů vizte Obrázek 6.1.



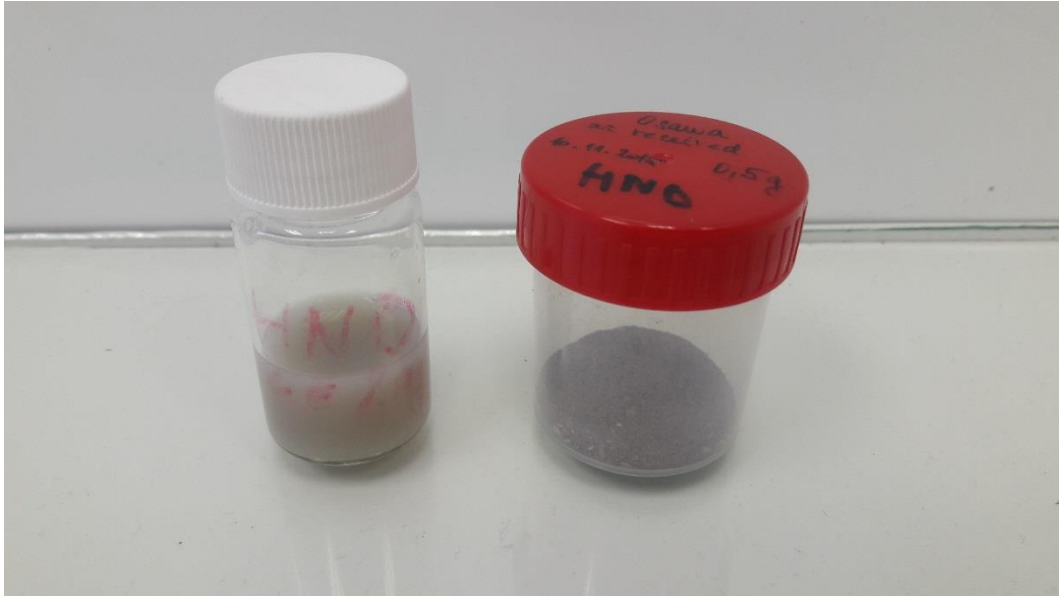
Obrázek 6.1: Příprava agarů a vzorků pro experimenty

#### 6.4 Příprava bakteriální suspenze

*E. coli* byla rozmíchána v tekutém roztoku Mueller-Hinton bujón, který se rovněž jako Mueller-Hinton agar prodává ve formě dehydratovaného nažloutlého prášku, který je posléze smíchán v předepsaném poměru s destilovanou vodou. Jedná se o tekutou živnou půdu pro určité typy bakterií. Většinou byl roztok *E. coli* připraven z 5–6 ml MH bujónu a 0,2–0,3 ml *E. coli*. Hlavní složkou bujónu je hovězí bílkovina, škrob a kasein hydrolyzát.

#### 6.5 Příprava vzorků H-ND

Pro experimenty byl připraven roztok destilované vody a HND o koncentraci  $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Výpočet vychází z článku [39], kde cílová koncentrace je  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Takováto koncentrace je však žádoucí až po smíchání s roztokem obsahující *E. coli*. Vždy totiž byly obě směsi smíchány v poměru 1:1, tudíž ve finále je získána cílová koncentrace  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Ukázku namíchaného roztoku a surového prášku H-ND lze vidět na Obrázku 6.2. Samotné ND byly vyrobeny detonační metodou a byly poskytnuty japonskou společností NanoAmando, New Metals and Chemicals Corp. Ltd. Jejich průměr je přibližně 5 nm. Jelikož mají ND vysoké množství C-H vazeb jsou proto označovány jako H-ND.



Obrázek 6.2: Roztok a suspenze H-ND

## 6.6 Použité přístroje

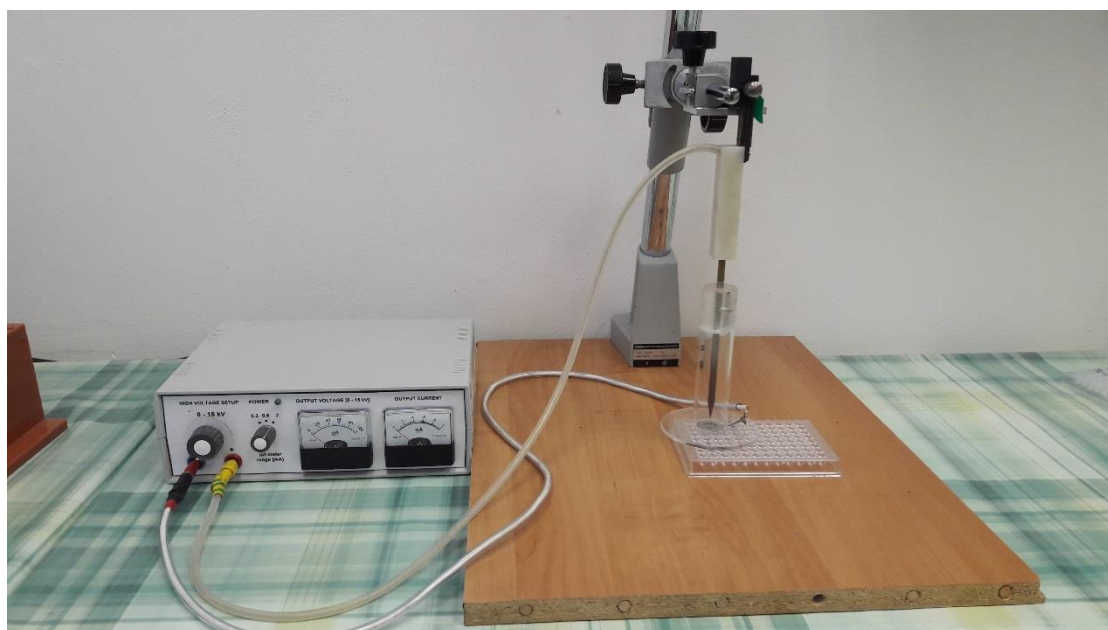
Použité přístroje:

- analytické váhy ABT 320-4M značky Kern s přesností  $\pm 0,1$  mg;
- pipety o objemu od 10–100 a 100–1000  $\mu\text{l}$  značky Sartorius;
- vortexovací přístroj Advanced Vortex Mixer ZX3;
- laminární box značky Alpina K500, zajišťující sterilní ovzduší;
- termostat typu TCH 100 (10-50  $^{\circ}\text{C}$ ), důležitý pro kultivaci bakterií a vzorků;
- Mcfarland densitometer Den-1B firmy bioSan, pro měření koncentrace roztoku *E.coli*;
- light panel Reflecta pro podsvícení vzorků pro zachycení lepší kvality při jejich fotodokumentaci;
- pH meter Voltcraft s přesností  $\pm 0,02$ ;
- vysokonapěťový zdroj do 15 kV;
- zařízení pro generování plazmatu vizte aparatura.

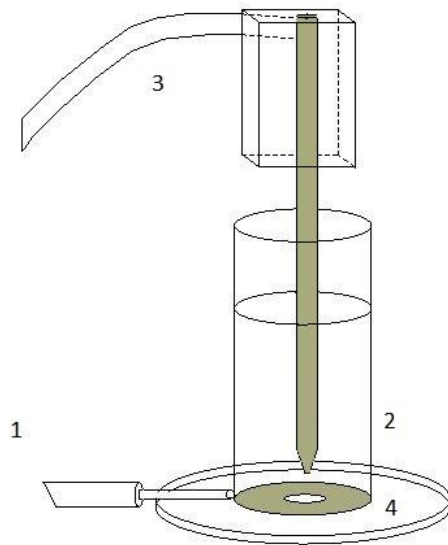
## 6.7 Aparatura – Schéma zapojení pro vznik plazmatu

Pro experimenty byla použita sestava pro generování korónového výboje a přechodové jiskry tak, aby mohly být ošetřovány vzorky. Sestavu tvoří stejnosměrný zdroj vysokého napětí, hrotová nerezová elektroda, plošná nerezová elektroda s průměrem 25 mm a kruhovým otvorem v jejím středu o průměru 10 mm. Kompletní sestavu lze vidět na Obrázku 6.3. Hodnoty proudu lze ovlivňovat mezielektrodovou vzdáleností, avšak v zájmu zachování stejných podmínek pro různé experimenty

i měření byla tato vzdálenost stanovena a ponechána na 6 mm. Plošná elektroda byla uzemněna, hrotová elektroda kladná. Takto bylo docíleno kladného korónového výboje. Hrotová elektroda se nachází ve válci z plexiskla, který slouží jako izolant a mechanická ochrana, a končí plošnou elektrodou. Schéma lze vidět na Obrázku 6.4. Vzorčky byly ošetřovány ve sterilních 96 jamkových mikrotitračních destičkách typu U (tvar dna mikrotitračních jamek) o maximálním objemu jamky 250  $\mu$ l. Nastavované parametry napětí byly sledovány přímo na výstupu napěťového zdroje. Hodnoty okamžitého napětí a proudu u jednotlivých typů výboje vždy kolísaly a tedy nebyly konstantní. Podrobněji jsou popsány v Metodologii 7.2.1, kde se nachází na Obrázku 7.4 ukázka okamžitého napětí a proudu na zdroji.



Obrázek 6.3: Kompletní sestava pro generování plazmatu



Obrázek 6.4: Popis zařízení: 1- Přívod záporného napětí, 2- Hrotová elektroda, 3- Přívod kladného napětí, 4- Plošná kruhová elektroda

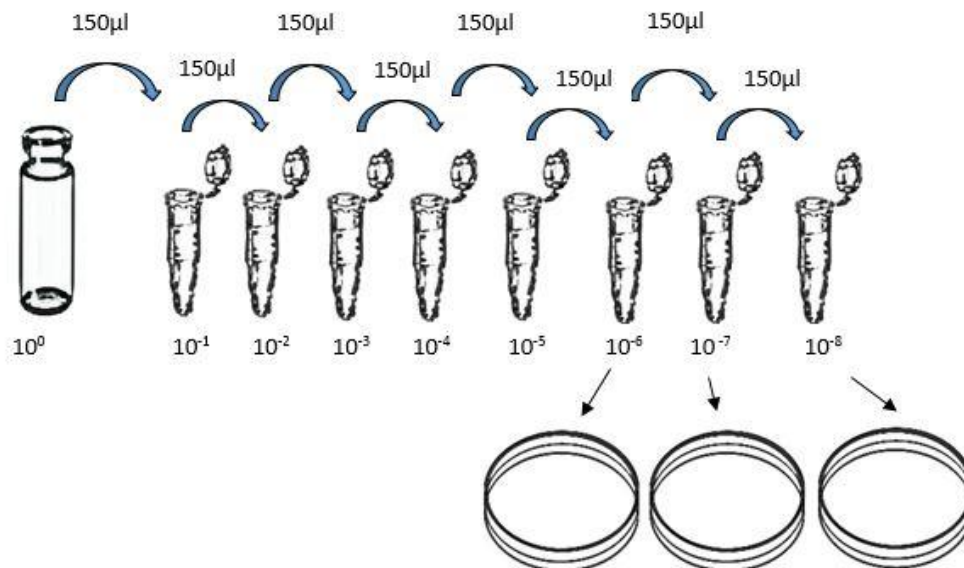
## 7 Experimenty

### 7.1 ND bez aktivace plazmatu

#### 7.1.1 Metodologie

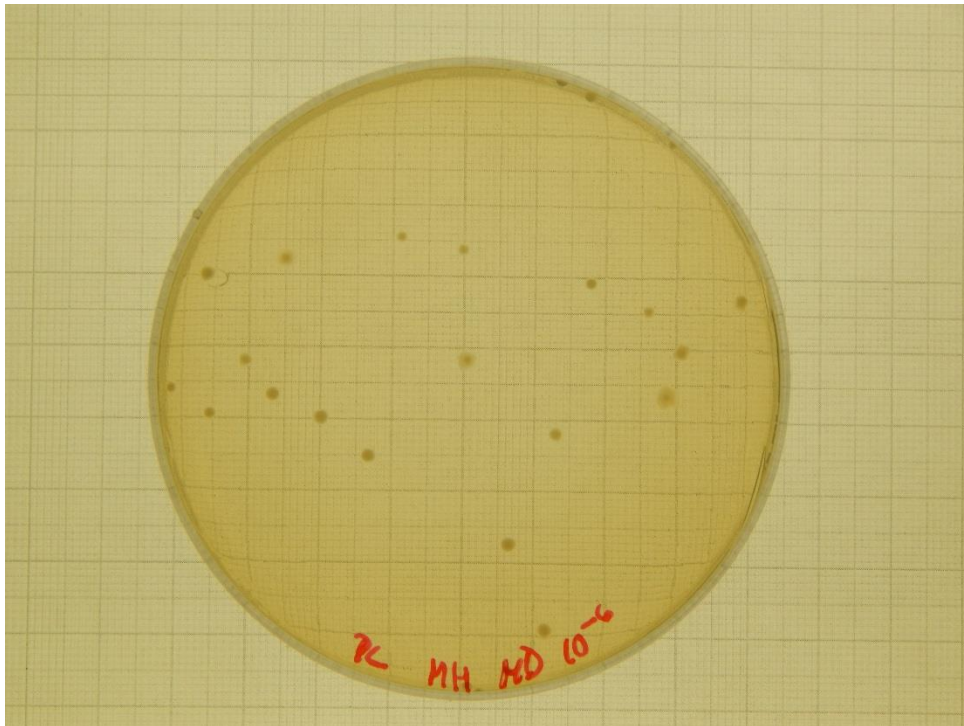
Pro první část experimentu byly vždy připraveny kontrolní a testovací vzorky. Kontrolní roztoky o celkovém objemu 1,2 ml byly připraveny smícháním 0,6 ml roztoku *E. coli* 0,5 MFU a 0,6 ml destilované vody. Tyto vzorky byly použity jako referenční, kdy růst bakterií nebyl inhibován. Testovací vzorky byly připraveny smícháním 0,6 ml roztoku H-ND o koncentraci  $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  a 0,6 ml roztoku *E. Coli*. Kontrolní i testovací vzorky byly smíchány ve vialkách, úzkých skleněných uzavíratelných nádobkách. Posléze byly umístěny na 5 až 24 hodin do termostatu při 100 otáčkách za minutu (rpm).

V čase 5 a 24 hodin byly vzorky ředěny v poměru 1:9 ve fyziologickém vzorku tolikrát, aby výsledná koncentrace bakterií byla  $10^2 \text{ CFU/ml}$  a menší. K ředění byly použity eppendorfky. Celkový objem byl vždy 1,5 ml tj., z původního roztoku bylo odebráno  $150 \mu\text{l}$  a tento objem přidán do 1,35 ml fyziologického roztoku. Vzniklý roztok se potřepal pomocí třepačky (vortexu) a ředění se opakovalo až do potřebné koncentrace bakterií. Posléze byl z dostatečně naředěných roztoků odebrán 1 ml objemu, který byl rozlit a kultivován v Petriho misce. Kultivace probíhala po dobu 15–18 hodin, pak mohly být spočítány vytvořené kolonie. Postup ředění lze vidět na Obrázku 7.1. V závislosti na době, po které byly bakterie z původního roztoku odebrané, se použilo ředění  $10^{-6}$  až do  $10^{-9}$ .



Obrázek 7.1: Způsob ředění vzorků

Petriho misky s přibližným obsahem 20 ml agarů byly připraveny zhruba týden před prováděním experimentu. Na Obrázku 7.2 lze vidět Petriho misku s již vykultivovanými bakteriemi. Většina kultur byla zdokumentována a archivována.

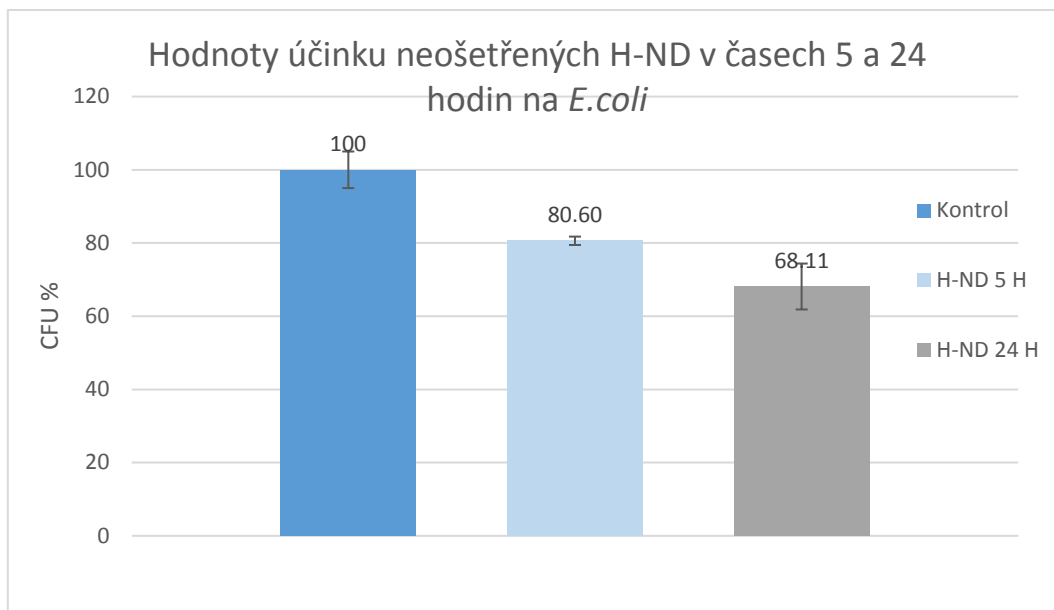


Obrázek 7.2: Kultivované bakterie na Petriho misce

#### 7.1.2 Výsledky měření po 5 a 24 hodinách

Na Grafu 7.3 jsou vyneseny výsledky prvního experimentu. Je vidět, že schopnost H-ND inaktivovat mikroorganismy je poměrně vysoká. Po 5 hodinách působení byl zaznamenán úbytek téměř 20% (19,40 %). Po 24 hodinách působení H-ND byl zaznamenán pokles o 31,89 %. Podrobnější data vizte tabulky v příloze. Data v grafu byly spočítány ze 7 měření.





Graf 7.3: Výsledky prvního experimentu 5 a 24 hodin působení H-ND

### 7.1.3 Zhodnocení

Jak již bylo psáno v úvodu této kapitoly, tento důležitý experiment je referenční pro další experimenty s plazmatem. Díky výsledkům tohoto experimentu bude následně možné porovnat, do jaké míry se změní biocidní vlastnosti ošetřených H-ND vůči této referenční, nijak neošetřené skupině. V čase odebrání 5 hodin a následné kultivaci je úbytek necelých 20 % a v čase 24 hodin necelých 32 %. Výsledky tohoto experimentu se liší od experimentu, ze kterého bylo vycházeno [39] z důvodu jiných výchozích podmínek, a to především v počáteční koncentraci bakteriálního roztoku *E. coli* a nejspíše v počáteční fázi růstu bakterií.

## 7.2 ND aktivované plazmatem 1 minuta

### 7.2.1 Metodologie

Roztok H-ND byl ošetřován produkty plazmatu, tzv. afterglow po dobu 1 minuty. V důsledku ošetření vzniká také PAW. Jak již bylo zmíněno v kapitole o PAW, takto aktivovaná voda má inhibiční účinky na různé druhy bakterií. Cílem experimentu bylo zjistit existenci biocidních účinků roztoku nanodiamantů v destilované vodě, tedy PAW a plazmatem ošetřených H-ND. K tomuto účelu byly použity dva typy plazmatu, a sice korónový výboj a přechodová jiskra (popisováno výše, v kapitole **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů**. Elektrické výboje ke generaci plazmatu, použité v této práci). Ošetřovaná kultura byla opět *E. coli* v tekutém médiu s koncentrací 0,5 MFU.

Roztok H-ND byl ošetřen kladným korónovým výbojem a kladnou přechodovou jiskrou. Nastavené hodnoty napětí a proudu pro korónový výboj byly 80–90  $\mu\text{A}$  a 9–10 kV, pro přechodovou jiskru



230  $\mu\text{A}$  a 10–12 kV. Vzdálenost mezi oběma elektrodami byla 6 mm v obou případech. Doba ošetření byla v tomto případě jedna minuta.



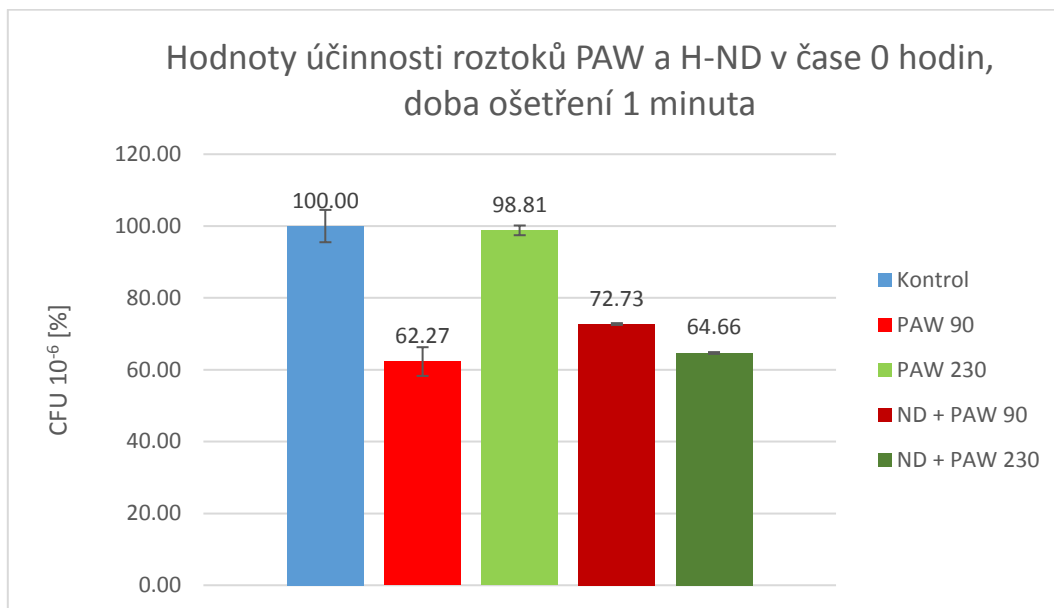
Obrázek 7.4: Okamžité napětí a proud zdroje pro korónový výboj

Pro ošetření kapalin byly použity jednorázové sterilní 96 jamkové mikrotitrační destičky. Aby bylo možné prokázat, do jaké míry jsou biocidní účinky způsobené H-ND, a ne PAW, byl připraven kontrolní vzorek bez aktivace, vzorek s destilovanou vodou ošetřenou korónovým výbojem, a další vzorek s destilovanou vodou ošetřený přechodovou jiskrou. Stejně tak i vzorky suspenze roztoku H-ND byly ošetřeny korónovým výbojem a přechodovou jiskrou. Vždy bylo ošetřováno 200  $\mu\text{l}$  roztoku tj. destilované vody nebo suspenze H-ND, a odebráno 150  $\mu\text{l}$  aktivovaného roztoku, rezerva je dána ztrátami objemu během působení plazmatu, v důsledku odpařování vzorku. Takto bylo po čtyřech ošetřeních získáno 0,6 ml roztoku. Ošetřená kapalina nebyla ihned po ošetření přidávána přímo k 0,6 ml roztoku *E. coli* ve víálce, aby působení kapaliny bylo okamžité. V tomto případě bylo provedeno ředění již v čase do 10 minut po ošetření. Poté byly vzorky opět uloženy do termostatu vytemperovaného na 37 °C pro kultivaci po dobu 5 a 24 hodin. V těchto hodinách byly pak vzorky ředěny a rozlity na pevnou živnou půdu v Petriho miskách. Po zhruba 18 hodinách byly spočítány vytvořené kolonie.

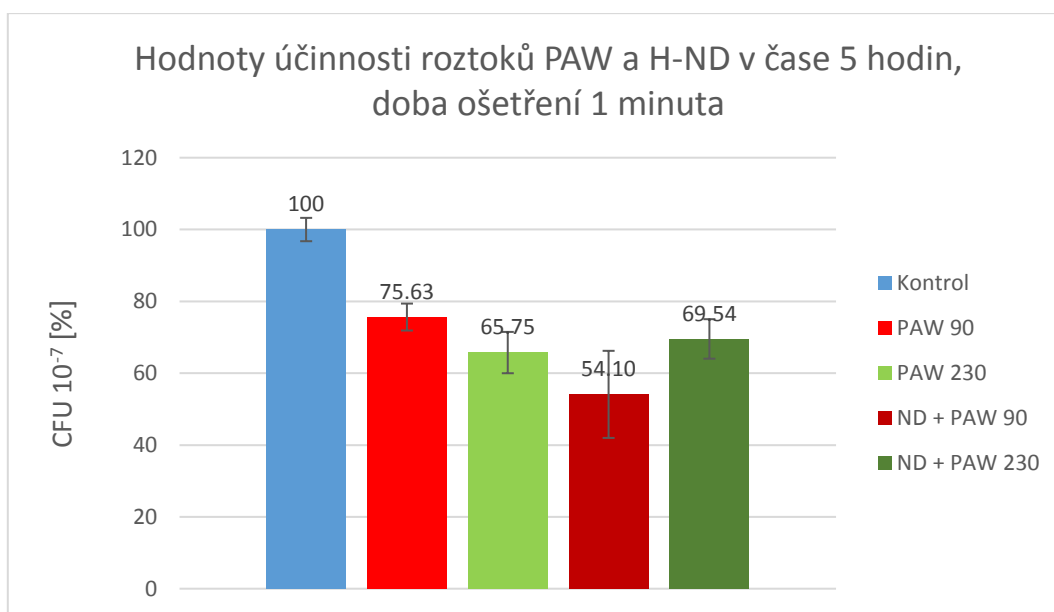
V histogramech jsou označovány vzorky pomocí zkratk, kde můžeme rozlišit Kontrol pro kontrolní vzorky, samotnou PAW popřípadě ošetřené ND, kde mj. vzniká PAW a číslo pak určuje, zda se jedná o ošetření korónou (90) nebo přechodovou jiskrou (230). Číslo odpovídá proudům v mikroampérech.

## 7.2.2 Výsledky měření po 1 minutě ošetření plazmatem

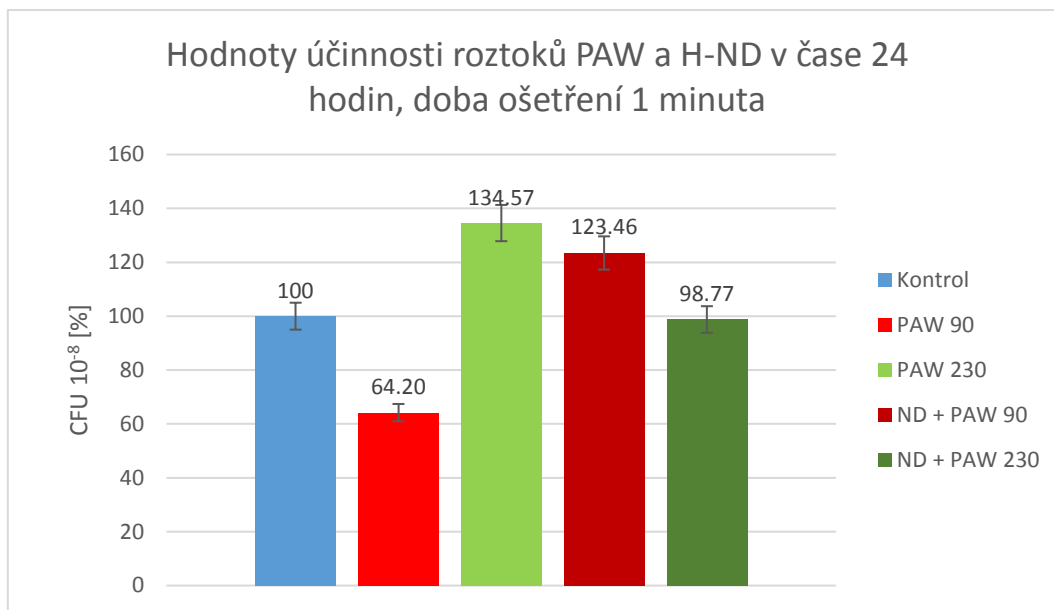
Výsledky jsou graficky znázorněny v Grafu 7.5. a 7.6.



Graf 7.5: Inaktivace bakterií různými roztoky, doba působení = 1 minuta, čas odběru = 0 hodin, počet vzorků = 3. Z výsledků je patrné, že PAW i H-ND se podílí na úbytku bakterií. Pokud je snaha zjistit do jaké míry je úbytek bakterií dán působením H-ND je třeba odečíst hodnotu u ND + PAW s příslušným číslem od samotné hodnoty PAW. Rozdíl tedy udává, do jaké míry účinkují samotné H-ND na bakterie. U koróny je vidět v čase do 10 minut spíše účinky PAW a u přechodové jiskry se H-ND podílí na úbytku bakterií 34,15 %. V čase 5 hodin u koróny lze sledovat zhruba 20 % úbytku u roztoku H-ND, u přechodové jiskry je pak účinnější samotná PAW.



Graf 7.6: Výsledky druhého experimentu, doba ošetření = 1 minuta, čas odběru = 5 hodin, počet vzorků = 3



Graf 7.7: Výsledky druhého experimentu, doba ošetření = 1 minuta, čas odběru = 24 hodin, počet vzorků = 3

### 7.2.3 Zhodnocení

U obdržných výsledků po 24 hodinách, vizte Graf 7.7, nelze s jistotou říci, že aktivace H-ND plazmatem je přínosná. Jediný účinek měla samotná PAW aktivovaná korónovým výbojem. Daná doba působení plazmatu na roztok ND není dostačující, neboť v časech 0 a 5 hodin neošetřené H-ND vykazují lepší biocidní vlastnosti oproti ošetřeným. Proto se doba ošetření v následujícím experimentu musela zvýšit na dobu působení z 1 na 3 minuty.

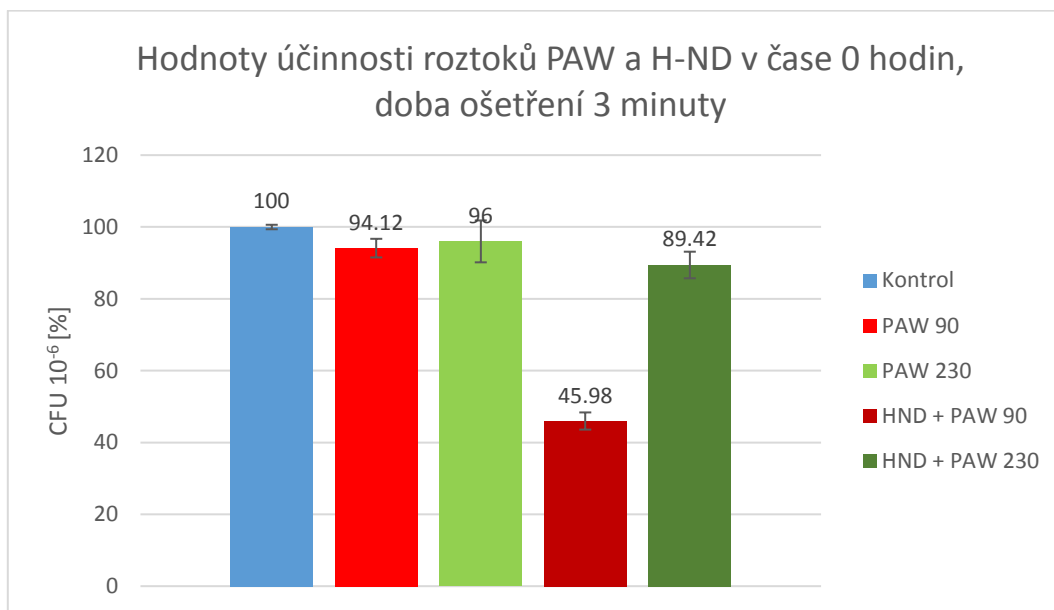
## 7.3 ND aktivované plazmatem 3 minuty

Jelikož v předchozím experimentu nebyly účinky H-ND významné, patrně z důvodů krátkého působení plazmatu či z důvodu chemických reakcí s kultivačním roztokem, byla doba zvýšena na 3 minuty. Hypotézou je, že při delším působení je inaktivace vyšší. Z důvodů časové náročnosti měření se vzorek po 24 hodinách neodebíral.

### 7.3.1 Metodologie

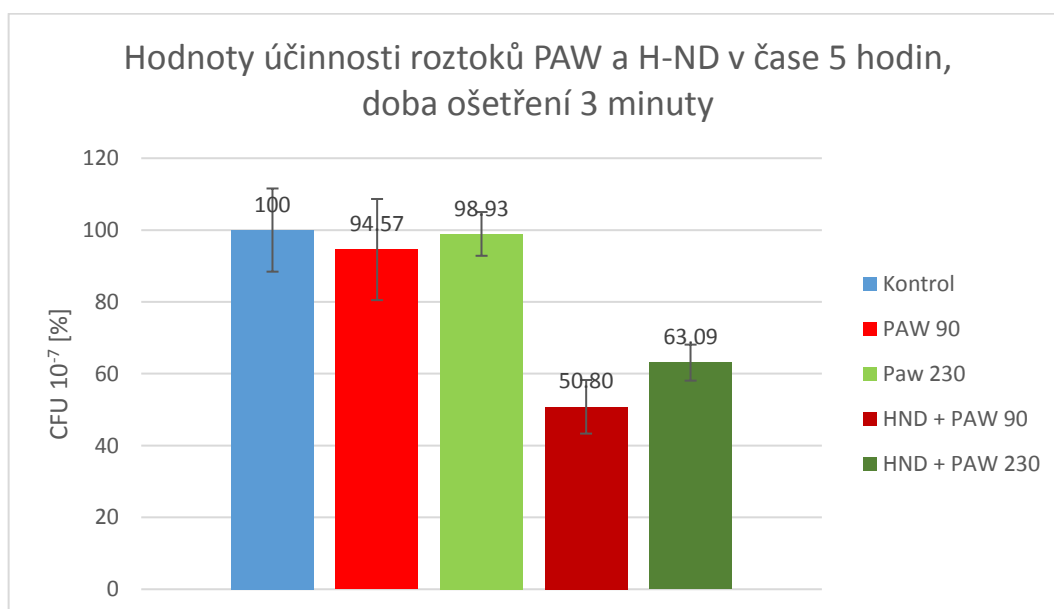
Postup je obdobný jako v předchozí části s tím rozdílem, že doba ošetření roztoků plazmatem byla prodloužena na tři minuty. Také je nutné doplnit, že ke kontrolnímu roztoku se přidává destilovaná voda nikoli fyziologický roztok. Tím se živné médium zředí a množství živin, které bakterie mají k dispozici je srovnatelné s množstvím v testovacích vzorcích.

### 7.3.2 Výsledky měření po 3 minutách ošetření plazmatem



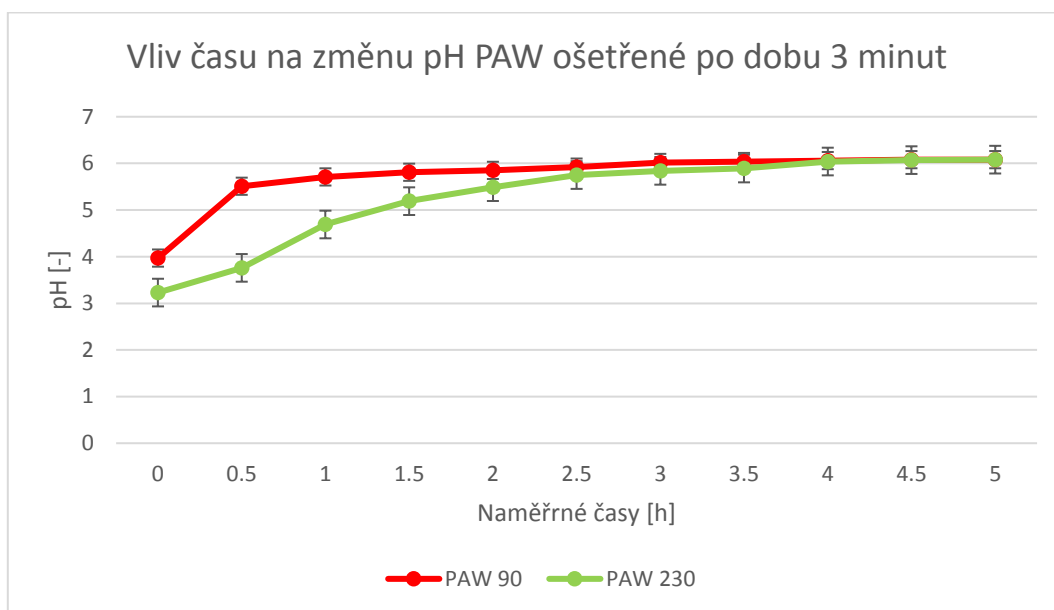
Graf 7.8: Výsledky druhého experimentu, doba ošetření = 3 minuty, čas odběru = 0 hodin, počet vzorků = 3

Na Grafu 7.8 je vidět nápadný úbytek bakterií při působení H-ND ošetřených korónovým výbojem. Rozdíl odpovídajících hodnot je téměř 50% (přesně 48.14 %). V čase 5 hodin (Graf 7.9) lze pozorovat i účinnost H-ND při působení přechodové jiskry s úbytkem 35.74 %. Korónou ošetřené H-ND pak dosahují úbytku 43.77 %.



Graf 7.9: Výsledky druhého experimentu, doba ošetření = 3 minuty, čas odběru = 5 hodin, počet vzorků = 3

Také bylo měřeno pH PAW 90 a PAW 230 ošetřovaných po dobu 3 minut přechodovou jiskrou a korónovým výbojem, vizte Graf 7.10. Je patrné, že v první hodině po aktivaci je pH nejnižší a pak stoupá a ustaluje se někde lehce nad hodnotou pH=6, což odpovídá pH destilované vody. Koncentrace aktivních částic by ihned po ošetření plazmatem měla být nejvyšší. Měl by tedy být očekáván vyšší úbytek bakterií v čase do 1 hodiny. Je ale nutné zmínit, že měření byla vypočítána každé pouze z jednoho vzorku, takže jsou spíše orientační. Směrodatné odchylky v grafu jsou tedy závislé pouze na třídě přesnosti přístroje.



Graf 7.10: Hodnoty pH roztoků PAW 90 a PAW 230 ošetřené korónovým výboje a přechodovou jiskrou v průběhu 5ti hodin

### 7.3.3 Zhodnocení

Výsledky po 5 hodinách jasně ukazují, že H-ND ošetřené plazmatem vykazují biocidní vlastnosti na druh *E. coli*. Korónou ošetřené H-ND vykazují lepší biocidní vlastnosti nežli H-ND ošetřené přechodovou jiskrou. Pro zjištění, zda je možné dosáhnout ještě lepších výsledků, byl čas ošetření prodloužen na 5 minut.

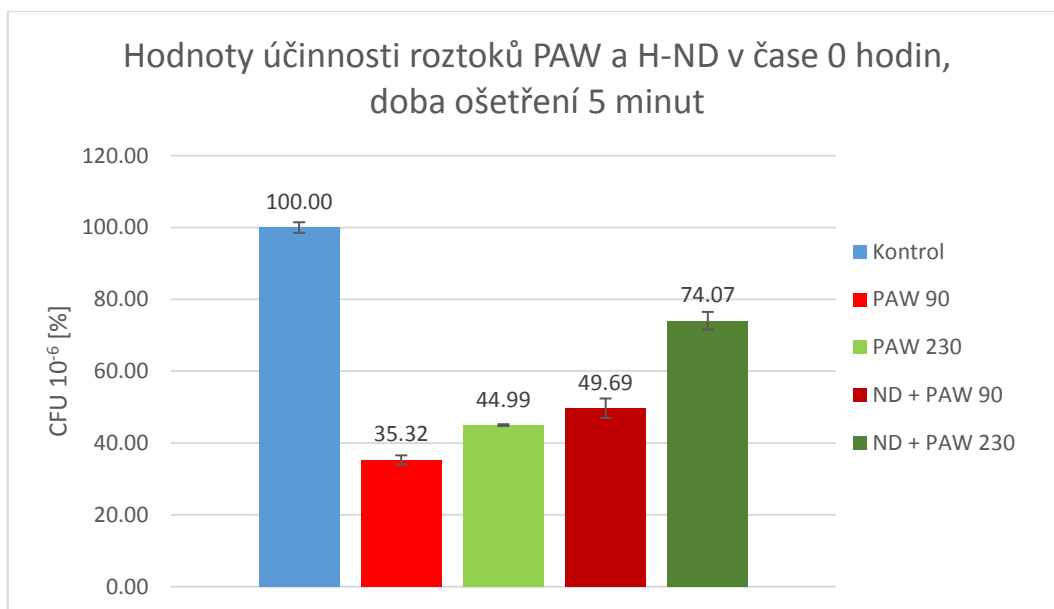
## 7.4 ND aktivované plazmatem po dobu 5 minut

### 7.4.1 Metodologie

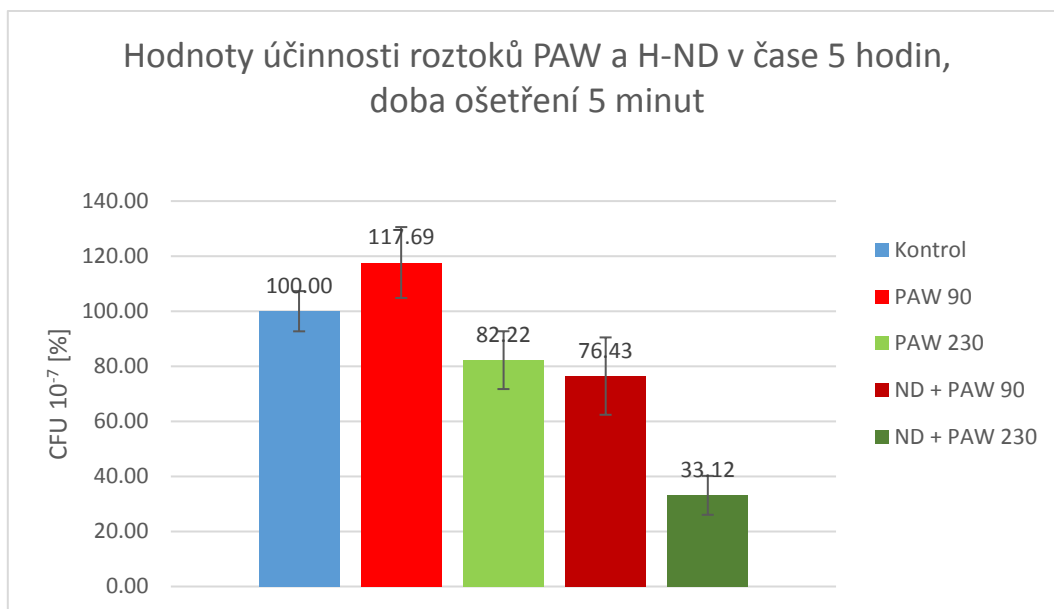
Postup je obdobný jako u předcházejících experimentů s dobou ošetření plazmatem stanovenou na 5 minut. Očekávána je zvýšená účinnost metody. Otázkou však zůstává, zdali tomu bude z důvodu silných reakčních vlastností PAW aktivované po dobu 5 minut, či samotných H-ND.

#### 7.4.2 Výsledky měření po 5 minutách ošetření plazmatem

Z Grafu 7.11 je patrné, že účinky samotné PAW jsou opravdu silné a tomu odpovídá i úbytek počtu bakterií. Je dosaženo úbytku 67,41 % u PAW 90 a téměř 60 % u PAW 230. U roztoků s obsaženými H-ND je tedy zdání, že úbytek bakterií spíše potlačují.



Graf 7.11: Výsledky třetího experimentu, doba ošetření = 5 minut, čas odběru = 0 hodin, počet vzorků = 3



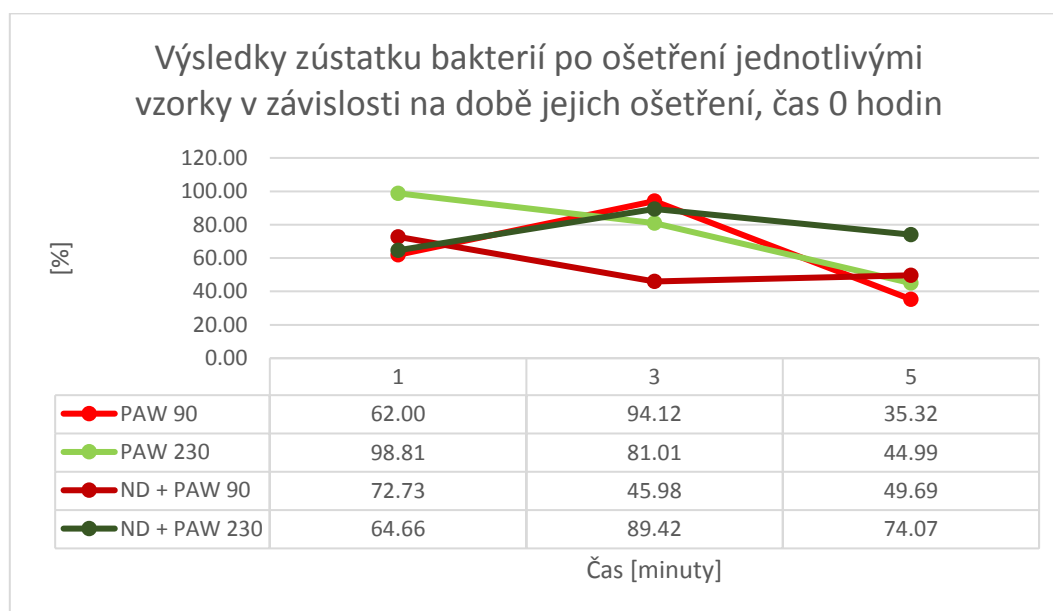
Graf 7.12: Výsledky třetího experimentu, doba ošetření = 5 minut, čas odběru = 5 hodin, počet vzorků = 3

Naopak po 5 hodinovém působení jsou účinky PAW již zanedbatelné podobně jako při 1 a 3 minutách ošetřování. Nejlepší výsledky jsou pozorovány u H-ND ošetřené přechodovou jiskrou. Po odečtení účinků samotné PAW 230 je rozdíl 51,11 %. Hodnoty lze vidět na Grafu 7.12.

### 7.4.3 Zhodnocení

Výsledky inaktivace jsou velmi dobré a to zejména u H-ND ošetřených přechodovou jiskrou sledované v čase 5 hodin po odběru. Stejně tak H-ND ošetřené korónovým výbojem vykazují dobré biocidní vlastnosti, ale ve srovnání s 3 minutovým ošetřením nedochází k jejich zlepšení. Nejlepších inhibičních vlastností dosahují H-ND ošetřené přechodovou jiskrou po dobu 5 minut. Takto je dosaženo úbytku bakterií 51,11 %. Souvislosti a výsledky pozorované pomocí spektrální analýzy, jsou prezentovány v kapitole 8.

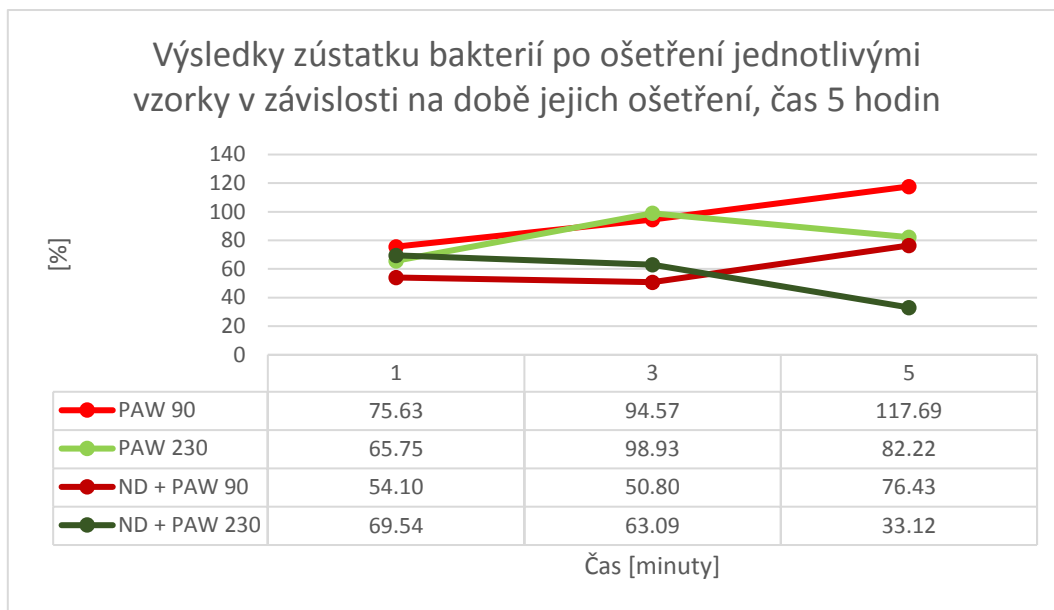
### 7.5 Celkové grafické zhodnocení výsledků druhého experimentu



Graf 7.13: Celkový vývoj v čase, Korónový výboj, 1 minuta

Na Grafu 7.13 lze vidět přehledné 3 bodové křivky všech ošetřovaných roztoků a jejich vliv na inhibici bakterií *E. coli*. Hodnoty při době ošetření 3 minuty nasvědčují, že takovéto roztoky mají nejmenší vliv. Tmavší křivky reprezentují roztoky s H-ND, a lze vidět, že lepších výsledků dosahují H-ND ošetřené přechodovou jiskrou.

Naproti tomu výsledky inaktivace v čase pozorování 5 hodin jsou velmi dobré pro všechny vzorky, Velmi dobré inhibiční vlastnosti pak vykazují H-ND ošetřené po dobu 3 i 5 minut. Nejlepší pak H-ND ošetřené přechodovou jiskrou po dobu 5 minut, jak lze vidět na Grafu 7.14. Směrodatná odchylka v obou Grafech nepřesáhla hodnotu 30 %.

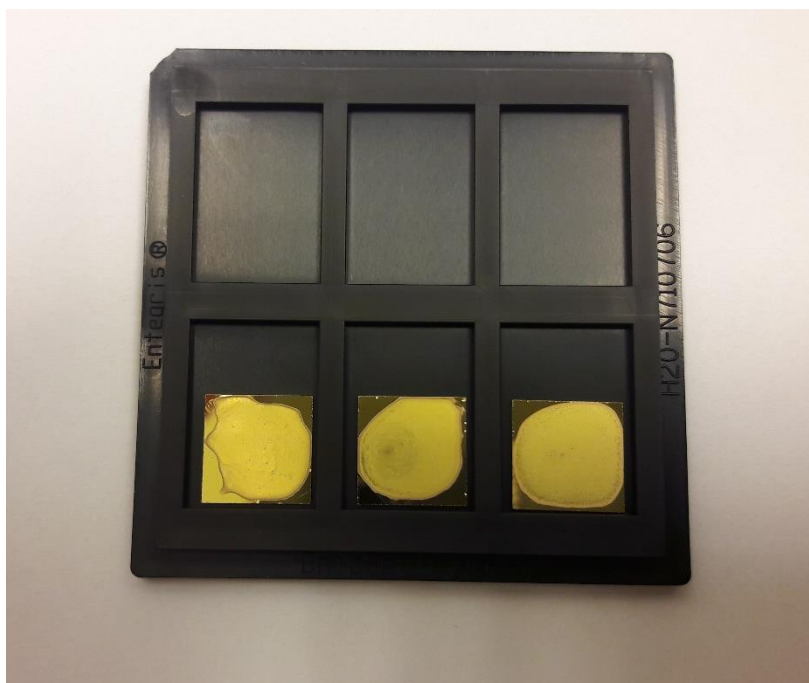


Graf 7.14: Celkový vývoj v čase, Přechodová jiskra, 1 minuta



## 8 Výsledky spektrální analýzy

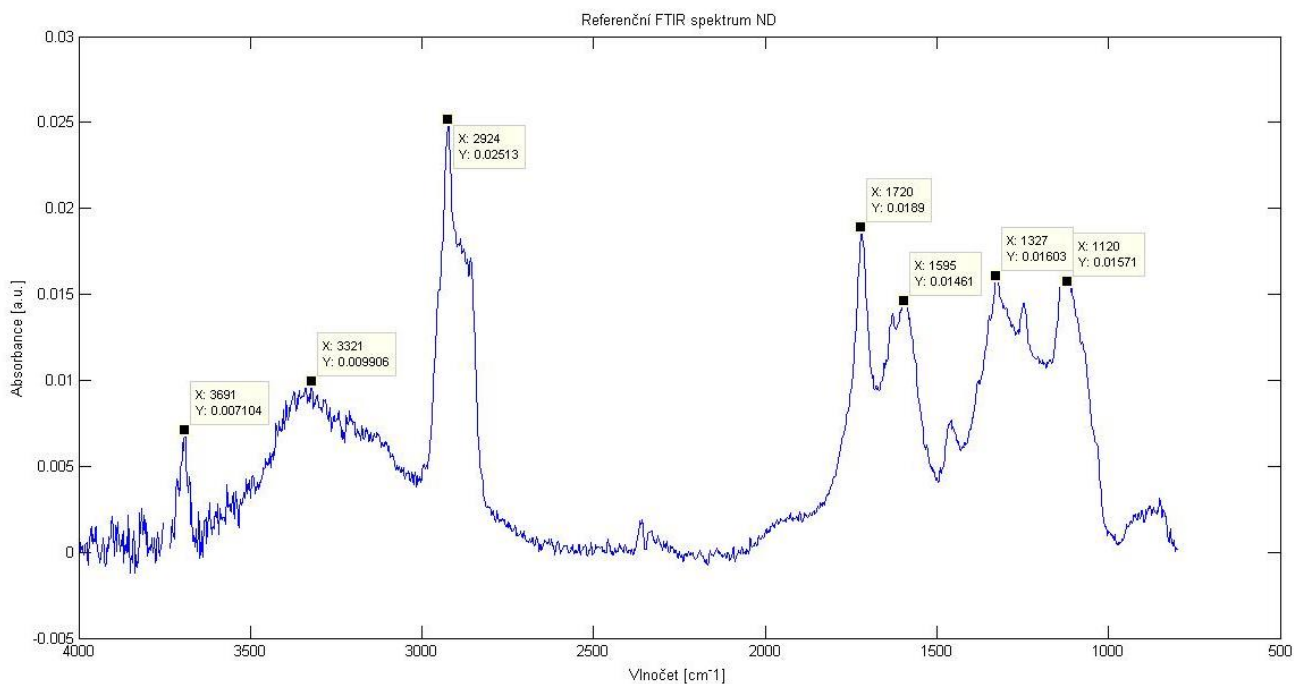
Analýza dat probíhala ve spolupráci s Fyzikálním ústavem AV ČR. Byla provedena analýza vzorků metodou FTIR, kterou prováděla RNDr. Pavla Štenclová PhD. Měření vzorků probíhalo na přístroji Thermo Nicolet 8700. Infračervený spektrometr Nicolet 8700 je ovládán pomocí spektroskopického softwaru Omnic™. Do vzorkového prostoru, kde probíhá měření je přiváděn dusík, pro zajištění lepších podmínek. Vzorek byl nanášen v množství 50  $\mu$ l na destičku o rozměru 1x1 cm potaženou zlatem. Poté byl vzorek vysušen na plotně o teplotě 100 °C. Před analýzou vzorku bylo nutné provést referenční spektrální analýzu povrchu destičky. Toto spektrum pak bylo odečteno od spektra zkoumaného vzorku. Destičky lze vidět na Obrázku 8.1. Data byla exportována ve formátu .csv a poté upravena v programu Matlab a následně vykreslena do grafů podobně, jako jsou vykreslována v softwaru Omnic™ [46].



Obrázek 8.1: Ukázka měřících destiček se vzorky H-ND

### 8.1 Spektrum H-ND bez ošetření plazmatem

Na Grafu 8.2 je znázorněno spektrum surových H-ND. Ty budou sloužit jako referenční spektrum pro porovnání s ostatními naměřenými spektry. Takto lze vzorky vyhodnotit a říci, jaké změny jsou pozorovány.

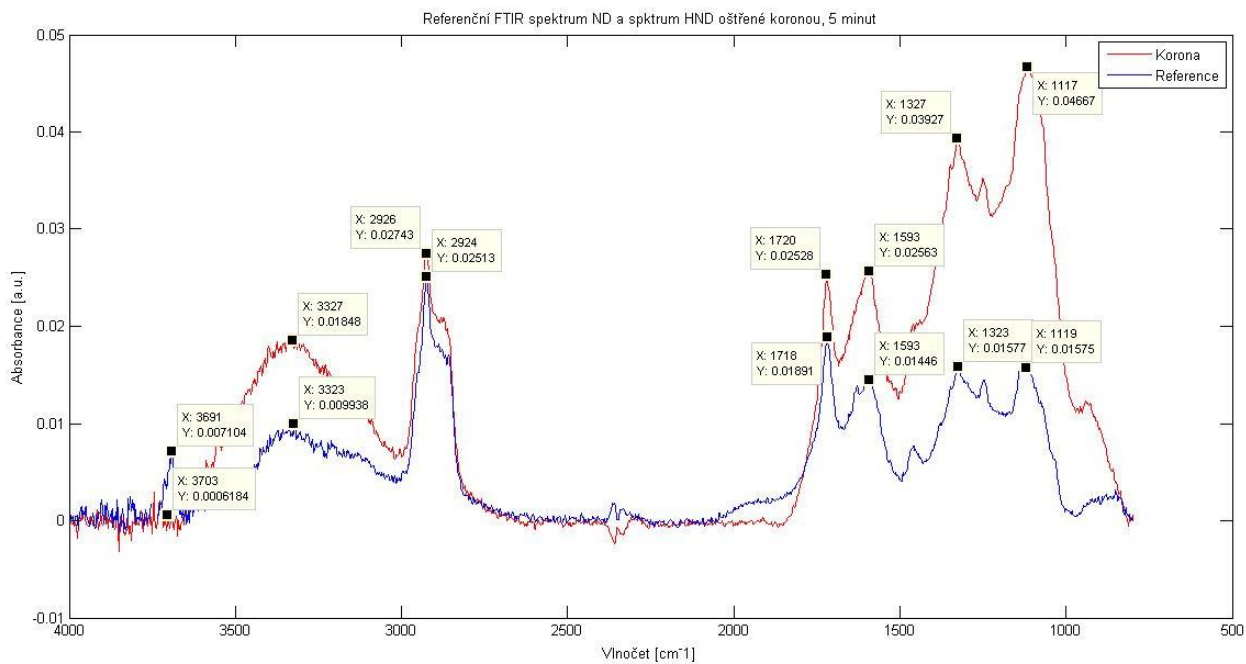


Graf 8.2: Referenční spektrum neošetřených H-ND získané metodou FTIR

V Grafu s referenčním vzorkem H-ND jsou vidět v hodnotách nad  $3000\text{ cm}^{-1}$  odpovídající O-H prodloužením. V úzkém pásu kolem  $2900\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$  jsou vazby  $\text{CH}_2$  a  $\text{CH}_3$ .  $1720\text{ cm}^{-1}$  odpovídá dvojně vazbě mezi  $\text{C}=\text{O}$  a vedle pak bending (ohýbání molekul) nad  $3000\text{ cm}^{-1}$ .  $1327\text{--}1332$  pak odpovídá  $\text{sp}^3$  hybridizovanému uhlíku s trojnou vazbou typickému pro ND. Nižší vlnočty jsou pak dány C-O-C vazbám.

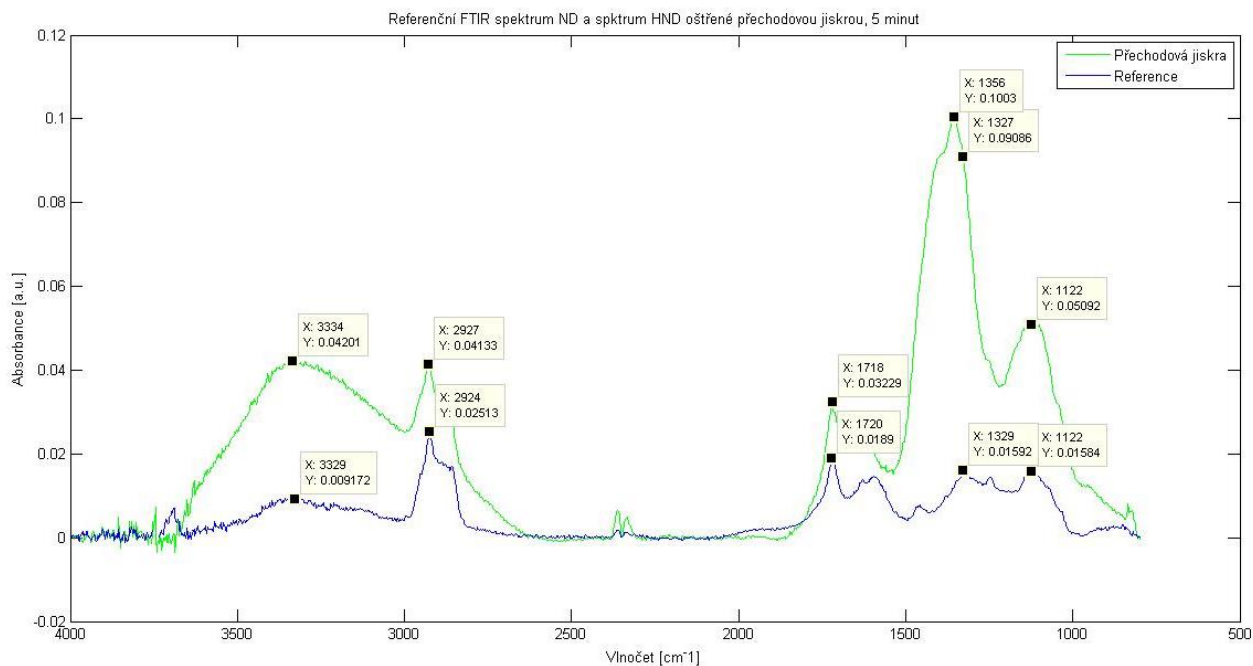
## 8.2 Spektrum H-ND po ošetření korónovým výbojem

Na Grafu 8.3 jsou znázorněny dvě křivky. Modrá křivka značí spektrální čáru referenčního vzorku, červená pro spektrum z H-ND ošetřených korónovým výbojem. Lze pozorovat podobné absorpční pásy a píky jako u reference s tím rozdílem, že někde může docházet k poměrovým změnám. Tj. v určitých místech může docházet k úbytku určitých typů vazeb a jinde naopak přibývají. Žádné výraznější změny však nejsou pozorovány. V Grafu 8.3 jsou znázorněny hodnoty na stejných nebo podobných vlnočtech, které jsou u obou křivek viditelné.



Graf 8.3: FTIR spektra H-ND a H-ND ošřené korunou

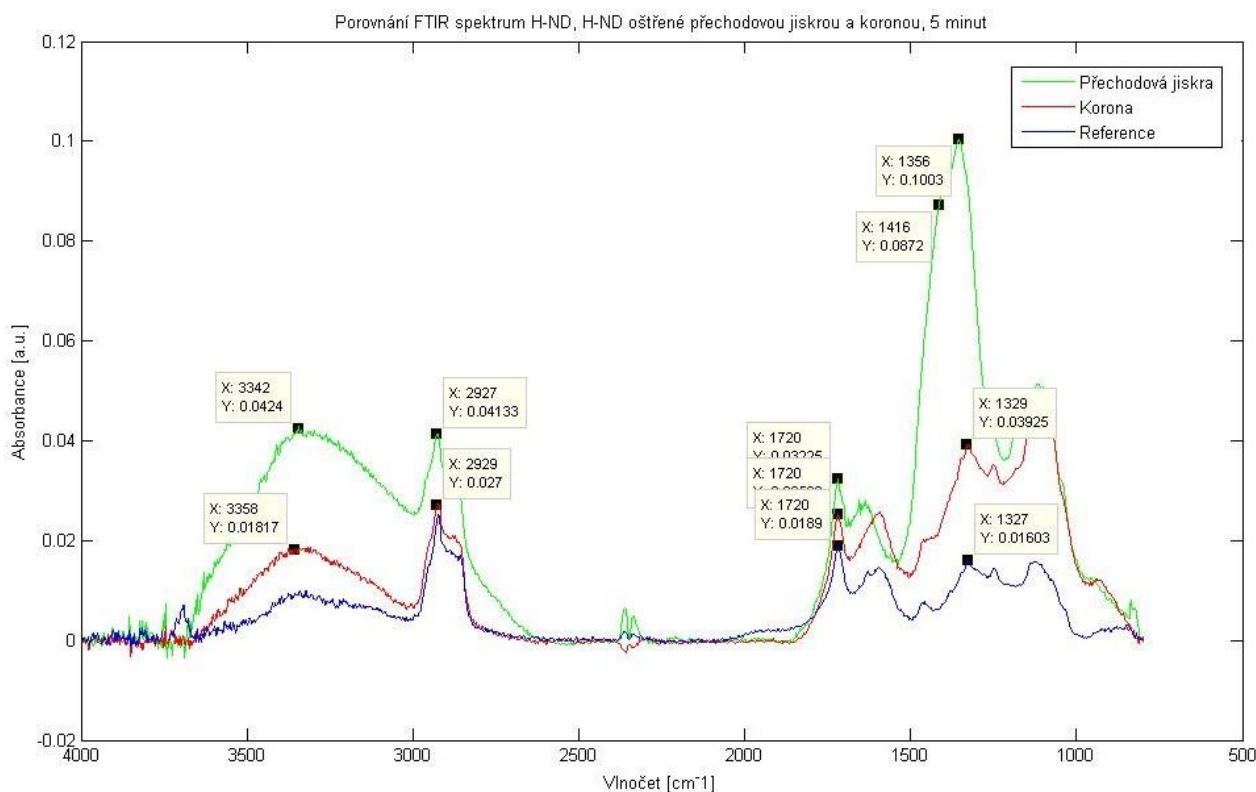
### 8.3 Spektrum H-ND po ošetření přechodovou jiskrou



Graf 8.4: FTIR spektra H-ND a H-ND ošetřené přechodovou jiskrou

U H-ND ošetřené přechodovou jiskrou je viditelný 1329-1327  $\text{cm}^{-1}$  úzký pás charakteristický pro diamanty. Ten je vidět u obou spekter na Grafu 8.4. Nově je zaznamenaný pás v oblasti 1340 až 1380  $\text{cm}^{-1}$  typický pro dusíkaté vazby jako například  $\text{NH}_2$  a  $\text{NH}_3$ . Nejčastěji se nové vazby uskutečňují na původních dvojných vazbách, kde jedna je silná  $\sigma$  a druhá slabší  $\pi$ . Vazba  $\pi$  bývá narušena a do jejího místa se pak váže například zmíněný dusík nebo OH skupina apod. Stejně tak lze pozorovat možný nárůst a poles v oblasti nad 3500  $\text{cm}^{-1}$ . Žádné významnější změny nejsou pozorovatelné.

## 8.4 Srovnání všech získaných spekter



Graf 8.5: FTIR spektra H-ND a H-ND ošetřené přechodovou jiskrou a korónou

Na Grafu 8.5. jsou uvedeny v jednom grafu tři spektra, jednak ošetřených vzorků, ale i referenční H-ND. Všechny až na malé změny vypadají podobně a vykazují podobné absorpční pásy typické pro dané vazby. Jedinou změnou je u zelené křivky vyznačující spektrum H-ND ošetřených přechodovou jiskrou, absorpční pás v oblasti 1356 – 1400  $\text{cm}^{-1}$ . Lze tedy tvrdit, že účinky koróny po ošetření 5 minut nemají na povrch H-ND takový vliv ve srovnání s účinky přechodové jiskry, která nejspíše zařídila zachycené a pozorované změny.

Také na Obrázku 8.1 je možné pozorovat změny vzhledu usušených vzorků. Vzorek ošetřený přechodovou jiskrou se lišil od referenčního a od vzorku H-ND ošetřených korónou. Jevil se více homogenní a na povrchu nevytvářel kruhy po zasychání. Jeho rozložení na podložce bylo rovnoměrné. Bylo prokázáno, že ND-COOH a ND-NH<sub>2</sub> potlačují biofilm tvořený *E. coli* stejně dobře jako standardní ATB ampicilin. [8] Pravděpodobně se tedy tyto dusíkaté skupiny podílejí i na biocidních vlastnostech *E. coli*.

## 9 Diskuze

Z výsledků prvního experimentu je patrné, že H-ND mají biocidní vlastnosti a podílejí se na úbytku bakterií, což bylo potvrzeno měřením počtu kolonií po 5 a 24 hodinách působení roztoku H-ND na *E. coli*. Dosažená inaktivace v rámci této práce však není tak velká, jak uvádí doc. Ing Kromka DrSc. [39], na jehož studii jsme navázali. Rozdíly ve výsledcích jsou pravděpodobně způsobené různými kmeny použitých bakterií a jejich počáteční koncentrací (0,4 vs. 0,5 MFU). Výsledky dosažené v experimentech s plazmatem byly vztahovány ke vzorkům z prvního experimentu. Celková dosažená inaktivace byla lepší a H-ND ošetřené plazmatem po dobu 3 a 5 minut tak mají prokazatelně lepší biocidní vlastnosti, než neošetřené H-ND.

S výsledkem souvisí i statistické vyhodnocení dat a počet vzorků, se kterými se v práci počítalo. Jelikož jsou experimenty časově náročné a ne všechna měření se zdařila, například z důvodů kontaminace vzorků apod., byl k dispozici jen minimální počet měření. Průměr a směrodatná odchylka se počítala minimálně pro 3 a maximálně pro 7 vzorků. Toto může mít vliv na interpretaci dosažených výsledků jednotlivých experimentů. V ideálním případě by bylo vhodné dané experimenty a měření opakovat a případně potvrdit již dosažené výsledky. Také nebyl uvažován vliv odpařování, který například při době 5 minut ošetřování vzorku může mít vliv na finální koncentraci ošetřeného vzorku, respektive na zvýšení koncentrace H-ND ve vzorku.

Bez podrobnějších testů a zkoumání nelze zcela odhadnout, jaké reakce se dějí po smíchání PAW a také H-ND s neošetřenou organickou kapalinou, ve které je rozmíchána bakterie *E. coli*. Je však zřejmé, že koncentrace radikálů a aktivovaných forem působí spolu s ošetřenými H-ND na *E. coli*, ne však do takové míry jaké bylo očekáváno. Vliv může mít polarita (kladný nebo záporný) výboje. Vliv také může mít typ zvolené elektrody a tedy použitý materiál, stejně jako použití destilované či demineralizované vody.

Ze spektrálních analýz jsou patrné větší změny pouze na H-ND ošetřených přechodovou jiskrou. Z finanční i časové náročnosti byly prováděny měření spekter pouze u vzorků s nejvyšší dobou ošetření. Zde se totiž předpokládají nejvýraznější změny. Je ale nutné zmínit přítomnost možných nanomolekul vody ve struktuře H-ND, které zde i po osušení mohou zůstat a tím případně ovlivnit výsledek měření spekter.

Lze také předpokládat, že při dalším prodloužení doby ošetření, by se na povrchu H-ND mohly dít další změny, které by se ale na inaktivaci pravděpodobně projeví až například po 5 hodinách působení s roztokem *E. coli*, jelikož by byly v čase 0 hodin nejspíše potlačeny účinky PAW.

Provedením experimentů bylo možné potvrdit tvrzení, že pokud jsou H-ND ošetřeny plazmatem, změní se tak jejich povrchové vlastnosti natolik, že mají lepší biocidní účinky na zkoumaný mikroorganismus, než H-ND neošetřené plazmatem.

## 10 Závěr

Cílem práce bylo seznámit se s biocidními vlastnostmi ND a způsoby jejich ošetření plazmatem, navrhnout experimenty pro ošetření ND a výsledky experimentů diskutovat. Byly provedeny experimenty, které měly za cíl zjistit inhibiční vlastnosti suspenze H-ND a roztoku PAW na mikrobiální kulturu *E. coli*. Byl proveden referenční experiment s neošetřenými H-ND, kde bylo z výsledků zjištěno, že H-ND dokážou snížit počet kolonií zhruba o 20 % v čase do 5 hodin působení a zhruba o 30 % po 24 hodinách působení. Dále bylo aplikováno plazma na různé roztoky. Jednalo se o suspenzi H-ND a destilovanou vodu. Vzorky byly ošetřovány plazmatem po dobu 1, 3 a 5 minut.

Z výsledků dosažených experimentů lze sledovat, jaký vliv mají jednotlivé roztoky na inhibici bakterií *E. coli*. Samotná plazmatem aktivovaná voda má nejvyšší účinek zejména v časech působení do 1 hodiny s nejdělsí dobou ošetření, kde je zaznamenán pokles bakterií o 65 % pro vzorky ošetřené korónovým výbojem a 55 % pro vzorky ošetřené přechodovou jiskrou. V delším časovém horizontu ale PAW již zdaleka neměla tak silný účinek, naopak H-ND ošetřované po dobu 3 a 5 minut vykazují zhruba 50% účinek v čase 5 hodin od ošetření. Nejlepšího výsledku dosahují H-ND ošetřené přechodovou jiskrou po dobu 5 minut, a sice 51.11 %. Z výsledků lze předpokládat, že pokud by se prodloužila doba ošetření, lze předpokládat i další nárůst inhibičních vlastností. Otázkou je do jaké míry. Pomocí ošetřených H-ND po dobu 5 minut lze dosáhnou 0,5 log úbytku bakterií *E. coli*.

Aby bylo možné lépe hodnotit změny na povrchu H-ND, byla provedena FTIR spektrální analýza ve spolupráci s Fyzikálním ústavem AV ČR. NA vzorcích H-ND ošetřených po dobu 5 minut přechodovou jiskrou byly zaznamenány nově vzniklé funkční skupiny –NH, které mají již prokázaný negativní vliv na biofilm *E. coli*. Lze tedy uvažovat souvislosti těchto skupin na povrchu zkoumaných H-ND s jejich inhibičními vlastnosti na bakterii *E. coli*. Pokud by například byla prodloužena doba ošetření z 5 na 7 popřípadě 10 minut, možná by se takovéto skupiny objevily i na povrchu H-ND ošetřených korónovým výbojem nebo by mohlo dojít k navýšení jejich počtu na H-ND ošetřených přechodovou jiskrou a v obou případech je možné předpokládat zvýšení inhibičních vlastností.



## 11 Použitá literatura a zdroje

- [1] "Chemie-obecná-a-anorganická-pro-gymnázia.pdf." .
- [2] "Vladimír Příbyl: Nanodiamanty." [Online]. Dostupné z: [http://www.aldebaran.cz/bulletin/2015\\_30\\_dia.php](http://www.aldebaran.cz/bulletin/2015_30_dia.php). [Accessed: 22-Mar-2017].
- [3] "JITKA ŠLEGEROVÁ a PETR CÍGLER\*," *Chem. List.*, vol. 108, pp. 387–393, 2014.
- [4] B. A. Mornstein V., Hrazdira I., *Lékařská fyzika a informatika - Lékařská literatura a pomůcky pro mediky - Lékařské knihkupectví ...*. 2007.
- [5] "Nanodiamonds: Applications in Biology and Nanoscale Medicine - Knihy Google." [Online]. Available: [https://books.google.cz/books?id=uKcDZ37Amh4C&pg=PA90&lpg=PA90&dq=Atmospheric+plasma+treatment+of+detonation+nanodiamonds+in+water&source=bl&ots=-tgH6dO2xk&sig=0Y6GQao7rg3fuWLJ0Qqv8i1M1U&hl=cs&sa=X&redir\\_esc=y#v=onepage&q=Atmospheric+plasma+treatment](https://books.google.cz/books?id=uKcDZ37Amh4C&pg=PA90&lpg=PA90&dq=Atmospheric+plasma+treatment+of+detonation+nanodiamonds+in+water&source=bl&ots=-tgH6dO2xk&sig=0Y6GQao7rg3fuWLJ0Qqv8i1M1U&hl=cs&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=Atmospheric+plasma+treatment). [Accessed: 08-May-2017].
- [6] A. Krueger and D. Lang, "Functionality is key: Recent progress in the surface modification of nanodiamond," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 22, no. 5, pp. 890–906, 2012.
- [7] H. A. Girard, T. Petit, S. Perruchas, T. Gacoin, C. Gesset, J. C. Arnault, and P. Bergonzo, "Surface properties of hydrogenated nanodiamonds: a chemical investigation," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 13, no. 24, p. 11517, Jun. 2011.
- [8] M. Khanal, V. Raks, R. Issa, V. Chernyshenko, A. Barras, J. M. Garcia Fernandez, L. I. Mikhalovska, V. Turcheniuk, V. Zaitsev, R. Boukherroub, A. Siriwardena, I. R. Cooper, P. J. Cragg, and S. Szunerits, "Selective Antimicrobial and Antibiofilm Disrupting Properties of Functionalized Diamond Nanoparticles Against Escherichia coli and Staphylococcus aureus," *Part. Part. Syst. Charact.*, vol. 32, no. 8, pp. 822–830, Aug. 2015.
- [9] "Nanodiamond | NEOMOND." [Online]. Dostupné z: <http://neomond.com/en/technology-2/nanodiamond-3/>. [Accessed: 25-Apr-2017].
- [10] J. C. Arnault and H. A. Girard, "Hydrogenated nanodiamonds: Synthesis and surface properties," *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, pp. 1–7, 2016.
- [11] S. Stehlik, T. Glatzel, V. Pichot, R. Pawlak, E. Meyer, D. Spitzer, and B. Rezek, "Water interaction with hydrogenated and oxidized detonation nanodiamonds - Microscopic and spectroscopic analyses," *Diam. Relat. Mater.*, vol. 63, pp. 97–102, 2016.
- [12] V. N. Mochalin, O. Shenderova, D. Ho, and Y. Gogotsi, "The properties and applications of nanodiamonds," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 7, no. 1, pp. 11–23, Dec. 2011.
- [13] Y. Yuan, Y. Chen, J. H. Liu, H. Wang, and Y. Liu, "Biodistribution and fate of nanodiamonds in vivo," *Diam. Relat. Mater.*, vol. 18, no. 1, pp. 95–100, 2009.
- [14] P. Kulhánek, *Úvod Do Teorie Plazmatu*. 2014.
- [15] A. Piel, *Plasma Physics*, vol. 9. 2010.
- [16] "Elektrické výboje - Kračlik (1964).pdf." .
- [17] J. W. Grizzle, C. Chevallereau, R. W. Sinnet, and A. D. Ames, "Models, feedback control, and open problems of 3D bipedal robotic walking," *Automatica*, vol. 50, no. 8, pp. 1955–1988, 2014.
- [18] V. Kříha and České vysoké učení technické v Praze. Elektrotechnická fakulta., *Perspektivy*

*plazmové medicíny = Prospects of plasma medicine*. České vysoké učení technické, 2015.

- [19] V. Scholtz, J. Julák, and V. Kříha, "The Microbicidal Effect of Low-Temperature Plasma Generated by Corona Discharge: Comparison of Various Microorganisms on an Agar Surface or in Aqueous Suspension," *Plasma Process. Polym.*, vol. 7, no. 3–4, pp. 237–243, Mar. 2010.
- [20] [online]. [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: [http://www.quickseal.eu/img/Kyslikove\\_radikaly.pdf](http://www.quickseal.eu/img/Kyslikove_radikaly.pdf)
- [21] D. Dobrynin, G. Friedman, A. Fridman, and A. Starikovskiy, "Inactivation of bacteria using dc corona discharge: Role of ions and humidity," *New J. Phys.*, vol. 13, Oct. 2011.
- [22] E. Sysolyatina, A. Mukhachev, M. Yurova, M. Grushin, V. Karalnik, A. Petryakov, N. Trushkin, S. Ermolaeva, and Y. Akishev, "Role of the charged particles in bacteria inactivation by plasma of a positive and negative corona in ambient air," *Plasma Process. Polym.*, vol. 11, no. 4, pp. 315–334, 2014.
- [23] A. L. A. J. Č. Íková and L. U. D. Ě. K. Pekárek, "Ultraviolet Radiation and Its Health Impact," pp. 57–61.
- [24] T. P. Coohill and J. L. Sagripanti, "Overview of the inactivation by 254 nm ultraviolet radiation of bacteria with particular relevance to biodefense," *Photochem. Photobiol.*, vol. 84, no. 5, pp. 1084–1090, 2008.
- [25] B. Gross, *Elektrické výboje v plynech /*, Vyd. 1. Státní nakladatelství technické literatury, 1967.
- [26] V. Martišovits, "Základy fyziky plazmy," *Univerzita Komenského, Bratislava*, 2004.
- [27] "Fyzika plazmatu - Aplikace." [Online]. Dostupné z: <http://physics.mff.cuni.cz/kevf/s4r/plazma/?p=5>. [Accessed: 10-Apr-2017].
- [28] G. Fridman, G. Friedman, A. Gutsol, A. B. Shekhter, V. N. Vasilets, and A. Fridman, "Applied plasma medicine," *Plasma Process. Polym.*, vol. 5, no. 6, pp. 503–533, 2008.
- [29] Y. Xu, Y. Tian, R. Ma, Q. Liu, and J. Zhang, "Effect of plasma activated water on the postharvest quality of button mushrooms, *Agaricus bisporus*," *Food Chem.*, vol. 197, pp. 436–444, 2016.
- [30] van Ooij, "Plasma activated water," 2016.
- [31] P. Lukes, J. Brisset, and B. R. Locke, "Biological Effects of Electrical Discharge Plasma in Water and in Gas – Liquid Environments," no. Chapter 6, pp. 36–43, 2012.
- [32] Y. Tian, R. Ma, Q. Zhang, H. Feng, Y. Liang, J. Zhang, and J. Fang, "Assessment of the physicochemical properties and biological effects of water activated by non-thermal plasma above and beneath the water surface," *Plasma Process. Polym.*, vol. 12, no. 5, pp. 439–449, 2015.
- [33] G. Kamgang-Youbi, J. M. Herry, T. Meylheuc, J. L. Brisset, M. N. Bellon-Fontaine, A. Doubla, and M. Naïtali, "Microbial inactivation using plasma-activated water obtained by gliding electric discharges," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 48, no. 1, pp. 13–18, 2009.
- [34] Q. Zhang, Y. Liang, H. Feng, R. Ma, Y. Tian, J. Zhang, and J. Fang, "A study of oxidative stress induced by non-thermal plasma-activated water for bacterial damage," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 102, no. 20, p. 203701, 2013.
- [35] L. Šilhánková, "Mikrobiologie pro potravináře a biotechnolgy ." p. 364, 2002.
- [36] *Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů - Jiří Schindler | Databáze knih.* .
- [37] P. L. R. Bonner and A. Hargreaves, *Basic bioscience laboratory techniques : a pocket guide*. John

Wiley & Sons, 2011.

- [38] "P.Klouda---Moderní-analytické-metody.pdf." .
- [39] A. Kromka, J. Jira, P. Stenclova, V. Kriha, H. Kozak, J. Beranova, V. Vretenar, V. Skakalova, and B. Rezek, "Bacterial response to nanodiamonds and graphene oxide sheets," *Phys. Status Solidi Basic Res.*, vol. 5, pp. 1–5, 2016.
- [40] "Infračervená Spektrometrie. Dostupné z [https://tftp.zcu.cz/www/files/projects/frvs-3892007/skripta\\_kap3\\_irspektrometrie.pdf](https://tftp.zcu.cz/www/files/projects/frvs-3892007/skripta_kap3_irspektrometrie.pdf)"
- [41] "Atomová-spektrometrie---Černohorský,-Jandera.pdf." .
- [42] V. Kohoutková, "PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA Ramanova spektroskopie DNA modifikované protinádorově účinnými komplexy platiny RIGORÓZNÍ PRÁCE Brno 2008," 2008.
- [43] J. Filik, J. Hodkiewicz, T. F. Scientific, T. R. Society, P. Transactions, E. Sciences, I. Childres, L. Jauregui, W. Park, H. Cao, Y. Chen, and J. B. Lambert, "Raman spectroscopy : a the lightest touch," *Spectrosc. Eur.*, vol. 17, no. 5, pp. 10–16, 2005.
- [44] M. Dendisová, P. Žvátora, and P. Matějka, "Ramanova Spektrometrie," no. 2, pp. 1–22, 1930.
- [45] J. Beranová, G. Seydlová, H. Kozak, Š. Potocký, I. Konopásek, and A. Kromka, "Antibacterial behavior of diamond nanoparticles against Escherichia coli," *Phys. Status Solidi Basic Res.*, vol. 249, no. 12, pp. 2581–2584, 2012.
- [46] A. Ft-ir, "Nicolet 8700 FT-IR Spectrometer.pdf"

## 12 Reference obrázků

- [A] [online]. [cit. 2017-05-08]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Hybridizace\\_orbital%C5%AF](https://cs.wikipedia.org/wiki/Hybridizace_orbital%C5%AF)
- [B] [online]. [cit. 2017-05-08]. Dostupné z: <http://www.philosophyib.com/3/wholebrain/diamond-vs-graphite>
- [C] [online]. [cit. 2017-05-08]. Dostupné z: <http://diamondabrasives.eu/synthetic-diamonds/>
- [D] [online]. [cit. 2017-05-08]. Dostupné z: <http://neomond.com/en/technology-2/nanodiamond-3/>
- [E] ARNAULT, J.C. a H.A. GIRARD. Hydrogenated nanodiamonds: Synthesis and surface properties. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2017, 21(1), 10-16. DOI: 10.1016/j.cossms.2016.06.007. ISSN 13590286. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359028616300730>
- [F] S. Stehlik, T. Glatzel, V. Pichot, R. Pawlak, E. Meyer, D. Spitzer, and B. Rezek, "Water interaction with hydrogenated and oxidized detonation nanodiamonds - Microscopic and spectroscopic analyses," *Diam. Relat. Mater.*, vol. 63, pp. 97–102, 2016.
- [G] [online]. [cit. 2017-05-08]. Dostupné z: <http://www.rug.nl/alumni/images/nano-diamanten/macrophages-fluorescence2>
- [H] P. Kulhánek, *Úvod Do Teorie Plazmatu*. 2014.
- [I] V. Martišovits, "Základy fyziky plazmy," Univerzita Komenského, Bratislava, 2004.
- [J] [online]. [cit. 2017-05-08]. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Bakterie>
- [K] [online]. [cit. 2017-05-08]. Dostupné z: <https://pt.slideshare.net/medik.cz/biologie-pro-bakale-praktikum-2?nomobile=true>
- [L] <http://hsnewsbeat.uw.edu/story/pandemic-e-coli-strain-h30-cloaks-its-stealth-strategies>
- [M] "P.Klouda---Moderní-analytické-metody.pdf." .
- [N] [online]. [cit. 2017-05-08]. Dostupné z: <http://www.lao.cz/aplikace-79/mereni-spektralnich-charakteristik-98/ramanova-spektroskopie-216>
- [O] J. Beranová, G. Seydlová, H. Kozak, Š. Potocký, I. Konopásek, and A. Kromka, "Antibacterial behavior of diamond nanoparticles against Escherichia coli," *Phys. Status Solidi Basic Res.*, vol. 249, no. 12, pp. 2581–2584, 2012.

## Seznam obrázků a grafů

Obrázek 1.1: Typy hybridizace $sp^2$ a $sp^3$ [A].....	12
Obrázek 1.2: Srovnání struktury tuhy (vlevo) a diamantu (vpravo) [B] .....	13
Obrázek 1.3: Schéma HPHT technologie [C].....	14
Obrázek 1.4: Možnosti funkcionalizace ND [D] .....	17
Obrázek 1.5: Mikrovlnný plazmový reaktor [E].....	18
Obrázek 1.6: FTIR analýza HND a OND [F].....	19
Obrázek 1.7: Fluorescence ND na makrofázích [G].....	19
Obrázek 2.1:Druhy plazmatu [H].....	21
Obrázek 2.2: Ukázka korónového výboje.....	25
Obrázek 2.3: Teorie strimerů- Elektronová lavina ve dvou po sobě jdoucích okamžicích [I] .....	26
Obrázek 2.4: Ukázka přechodové jiskry .....	27
Obrázek 4.1: Morfologie buňky [J] .....	33
Obrázek 4.2: Escherichia coli [L].....	35
Obrázek 5.1: Vztah mezi vlnočtem valenčních vibrací, povahou vazby a druhem vázaných atomů u FTIR [M] .....	37
Obrázek 5.2: Schéma excitací [N].....	38
Graf 5.3:Ramanovo spektrum detonačních ND [O] .....	39
Obrázek 6.1: Příprava agarů a vzorků pro experimenty.....	42
Obrázek 6.2: Roztok a suspenze H-ND .....	43
Obrázek 6.3: Kompletní sestava pro generování plazmatu .....	44
Obrázek 6.4: Popis zařízení: 1- Přívod záporného napětí, 2- Hrotová elektroda, 3- Přívod kladného napětí, 4- Plošná kruhová elektroda .....	45
Obrázek 7.1: Způsob ředění vzorků.....	46
Obrázek 7.2: Kultivované bakterie na Petriho misce .....	47
Graf 7.3: Výsledky prvního experimentu 5 a 24 hodin působení H-ND .....	48
Obrázek 7.4: Okamžité napětí a proud zdroje pro korónový výboj .....	49
Graf 7.5: Inaktivace bakterií různými roztoky, doba působení = 1 minuta, čas odběru = 0 hodin, počet vzorků = 3 .....	50
Graf 7.6: Výsledky druhého experimentu, doba ošetření = 1 minuta, čas odběru = 5 hodin, počet vzorků = 3 .....	50
Graf 7.7: Výsledky druhého experimentu, doba ošetření = 1 minuta, čas odběru = 24 hodin, počet vzorků = 3 .....	51

Graf 7.8: Výsledky druhého experimentu, doba ošetření = 3 minuty, čas odběru = 0 hodin, počet vzorků = 3 .....	52
Graf 7.9: Výsledky druhého experimentu, doba ošetření = 3 minuty, čas odběru = 5 hodin, počet vzorků = 3 .....	52
Graf 7.10: Hodnoty pH roztoků PAW 90 a PAW 230 ošetřené korónovým výboje a přechodovou jiskrou v průběhu 5ti hodin .....	53
Graf 7.11: Výsledky třetího experimentu, doba ošetření = 5 minut, čas odběru = 0 hodin, počet vzorků = 3 .....	54
Graf 7.12: Výsledky třetího experimentu, doba ošetření = 5 minut, čas odběru = 5 hodin, počet vzorků = 3 .....	54
Graf 7.13: Celkový vývoj v čase, Korónový výboj, 1 minuta .....	55
Graf 7.14: Celkový vývoj v čase, Přechodová jiskra, 1 minuta .....	56
Obrázek 8.1: Ukázka měřících destiček se vzorky H-ND .....	57
Graf 8.2: Referenční spektrum neošetřených H-ND získané metodou FTIR .....	58
Graf 8.3: FTIR spektra H-ND a H-ND ošetřené korunou .....	59
Graf 8.4: FTIR spektra H-ND a H-ND ošetřené přechodovou jiskrou .....	60
Graf 8.5: FTIR spektra H-ND a H-ND ošetřené přechodovou jiskrou a korónou .....	61

## Seznam tabulek

Tabulka 2-1: Rozdělení výbojů dle typu a teploty .....	23
Tabulka 2-2: Aktivní formy ROS a RNS, a jejich poločasy výskytu .....	24
Tabulka 5-1: Příklad vlnočtů valenčních vibrací některých skupin .....	37
Tabulka 13-1: Výsledky pro 5 a 24 hodin neošetřených H-ND .....	71
Tabulka 13-2: Výsledky hodnot pro vzorky ošetřené 1 minutu – doba odběru 0 hodin .....	71
Tabulka 13-3: Výsledky hodnot pro vzorky ošetřené 1 minutu – doba odběru 5 hodin .....	71
Tabulka 13-4: Výsledky hodnot pro vzorky ošetřené 3 minuty – doba odběru 0 hodin .....	72
Tabulka 13-5: Výsledky hodnot pro vzorky ošetřené 3 minuty – doba odběru 5 hodin .....	72
Tabulka 13-6: Výsledky hodnot pro vzorky ošetřené 5 minut – doba odběru 0 hodin .....	72
Tabulka 13-7: Výsledky hodnot pro vzorky ošetřené 5 minut – doba odběru 5 hodin .....	72

## 13 Přílohy

Tabulka 13-1: Výsledky pro 5 a 24 hodin neošetřených H-ND

Vzorek	Řád	Průměr	Směrodatná odchylka
Kontrol 5 H	10 <sup>-7</sup>	64,33	6,94
Kontrol 24 H	10 <sup>-8</sup>	53,33	9,18
ND 5 H	10 <sup>-7</sup>	83,33	12,07
ND 24 H	10 <sup>-8</sup>	62,25	3,25

Tabulka 13-2: Výsledky hodnot pro vzorky ošetřené 1 minutu – doba odběru 0 hodin

Vzorek	Řád	Průměr CFU	Směrodatná odchylka
Kontrol	10 <sup>-6</sup>	31,00	9,00
PAW 90	10 <sup>-6</sup>	20,00	8,00
PAW 230	10 <sup>-6</sup>	27,50	2,75
ND + PAW 90	10 <sup>-6</sup>	20,50	0,50
ND + PAW 230	10 <sup>-6</sup>	18,50	0,50

Tabulka 13-3: Výsledky hodnot pro vzorky ošetřené 1 minutu – doba odběru 5 hodin

Vzorek	Řád	Průměr CFU	Směrodatná odchylka
Kontrol	10 <sup>-7</sup>	103,50	6,50
PAW 90	10 <sup>-7</sup>	77,50	7,50
PAW 230	10 <sup>-7</sup>	68,50	11,50
ND + PAW 90	10 <sup>-7</sup>	54,25	24,25
ND + PAW 230	10 <sup>-7</sup>	71,00	11,00

Tabulka 13-4: Výsledky hodnot pro vzorky ošetřené 3 minuty – doba odběru 0 hodin

Vzorek	Řád	Průměr CFU	Směrodatná odchylka
Kontrol	10 <sup>-6</sup>	23,33	1,25
PAW 90	10 <sup>-6</sup>	24,33	5,19
PAW 230	10 <sup>-6</sup>	18,50	11,67
ND + PAW 90	10 <sup>-6</sup>	10,33	4,78
ND + PAW 230	10 <sup>-6</sup>	20,00	7,41

Tabulka 13-5: Výsledky hodnot pro vzorky ošetřené 3 minuty – doba odběru 5 hodin

Vzorek	Řád	Průměr CFU	Směrodatná odchylka
Kontrol	10 <sup>-7</sup>	94,17	23,16
PAW 90	10 <sup>-7</sup>	86,67	28,15
PAW 230	10 <sup>-7</sup>	88,33	12,19
ND + PAW 90	10 <sup>-7</sup>	50,50	14,92
ND + PAW 230	10 <sup>-7</sup>	60,33	10,03

Tabulka 13-6: Výsledky hodnot pro vzorky ošetřené 5 minut – doba odběru 0 hodin

Vzorek	Řád	Průměr CFU	Směrodatná odchylka
Kontrol	10 <sup>-6</sup>	23,33	1,25
PAW 90	10 <sup>-6</sup>	24,33	5,19
PAW 230	10 <sup>-6</sup>	18,50	11,67
ND + PAW 90	10 <sup>-6</sup>	10,33	4,78
ND + PAW 230	10 <sup>-6</sup>	20,00	7,41

Tabulka 13-7: Výsledky hodnot pro vzorky ošetřené 5 minut – doba odběru 5 hodin

Vzorek	Řád	Průměr CFU	Směrodatná odchylka
Kontrol	10 <sup>-7</sup>	94,17	23,16
PAW 90	10 <sup>-7</sup>	86,67	28,15
PAW 230	10 <sup>-7</sup>	88,33	12,19
ND + PAW 90	10 <sup>-7</sup>	50,50	14,92
ND + PAW 230	10 <sup>-7</sup>	60,33	10,03