



České vysoké učení technické v Praze
Fakulta elektrotechnická



Katedra teorie obvodů
Obor: Biomedicínské inženýrství

**Synergické působení silic a netermálního plazmatu na
mikroorganismy na definovaných živých půdách**

**Synergistic effects of essential oil and non-thermal plasma
on microorganisms on the surface on defined cultivation
media**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vypracovala: Bc. Kateřina Vlková
Vedoucí práce: Ing. Vladyslava Fantova
Praha 2016

České vysoké učení technické v Praze
Fakulta elektrotechnická

Katedra teorie obvodů

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Student: Bc. Kateřina V I k o v á
Studijní program: Biomedicínské inženýrství a informatika
Obor: Biomedicínské inženýrství
Název tématu: Synergické působení silic a netermálního plazmatu na mikroorganismy na definovaných živných půdách

Pokyny pro vypracování:

1. Seznámit se s tématem inaktivace mikroorganismů pomocí netermálního plazmatu, generovaného korónovým výbojem.
2. Provést návrh zapojení a elektrodového systému.
3. Navrhnout experimenty, jejichž cílem bude nastavení vhodné koncentrace silic ve vhodném roztoku.
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.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Vladyslava Fantova

Platnost zadání: do konce letního semestru 2016/2017

L.S.

prof. Ing. Pavel Sovka, CSc.
vedoucí katedry

prof. Ing. Pavel Ripka, CSc.
děkan

V Praze dne 10. 12. 2015

Prohlášení

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

Poděkování

Děkuji Ing. Vladyslavě Fantové za vedení mé diplomové práce, za cenné rady a připomínky, které tuto práci obohatily. Dále bych ráda poděkovala MUDr. Ing. Vítězslavu Kříhovi, Ph.D. za podporu a cenné rady, doc. Ing. Pavlu Kloučkovi, Ph.D. za zapůjčení silic, Ing. Jaroslavu Jírovi, CSc. za spolupráci při elektrických zapojeních a rodičům za poskytnutí podpory při studiu.

Název práce: Synergické působení silic a netermálního plazmatu na mikroorganismy na definovaných živých půdách

Autor: Kateřina Vlková

Obor: Biomedicínské inženýrství

Druh práce: Diplomová práce

Vedoucí práce: Ing. Vladyslava Fantova

Abstrakt: Tato diplomová práce se věnuje inaktivaci bakterií a kvasinky po ošetření netermálním plazmatem, generovaného stejnosměrným výbojem, za přítomnosti silic a Tweenu 80. Pro tyto účely byl sestaven elektrodový systém, který je složen ze zdroje napětí, dávkovače, rotačního stolku a páru elektrod (dutá s kapilárou a plochá připevněná k obvodu měděným proužkem). Pro optimální výsledky měření bylo nutné všechny parametry zafixovat na konkrétní hodnoty (např. hloubka zasunutí kapiláry, mezielektrodová vzdálenost atd.). V praktické části bylo provedeno nastavení navrženého setupu a následně byly zkoumány inaktivace bakterií a kvasinky. Práce zahrnuje základní informace o plazmatu, silicích a vlastnostech daných mikroorganismů.

Klíčová slova: netermální plazma, silice, Tween 80, inaktivace, bakterie, kvasinka

Title: Synergistic effects of essential oil and non-thermal plasma on microorganisms on the surface on defined cultivation media

Author: Kateřina Vlková

Abstract: This diploma thesis is dedicated to bacteria and yeast activation after non-thermal plasma treatment, generated by direct discharge, in the presence of essential oil and Tween 80. The electrode system, including voltage source, dispenser, rotating desk and pair of electrodes (hollow electrode with capillary and flat electrode fixed to the circuit by a copper strip), was constructed for these purposes. To get the optimal results, all the parameters had to be fixed to constant values (e.g. the depth of capillary insertion, inter-electrode distance, etc). The configuration of designed setup was performed in the practical part of this work and consequently, bacteria and yeast inactivations were researched. The work includes elementary information about plasma, essential oils and properties of present microorganisms.

Key words: non-thermal plasma, essential oil, Tween 80, inactivation, bacteria, yeast

Obsah

Úvod.....	7
1 Plazma.....	8
1.1 Rozdělení plazmatu.....	9
1.2 Netermální plazma	10
1.3 Generace plazmatu výbojem	11
1.3.1 Samostatný a nesamostatný výboj	11
1.3.2 Výboje v plynech	12
1.3.3 Towsendovo kritérium průrazu plynu.....	13
1.4 Stejnoseměrný výboj.....	14
1.4.1 Tvorba elektronové laviny	15
1.4.2 Teorie strimeru.....	17
1.5 Liderový mechanismus	18
1.6 Elektrospraying	19
2 Silice	21
2.1 Oreganová silice.....	21
2.1.1 Thymol.....	21
2.1.2 Karvakrol	22
2.1.3 P-cymen	22
2.2 Rozpustnost silic	23
2.2.1 Tween 80.....	23
3 Mikrobiologie	24
3.1 Bakterie	24
3.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	25
3.1.2 <i>Deinococcus radiodurans</i>	25
3.1.3 <i>Escherichia coli</i>	26
3.2 Kvasinky	26
3.2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
4 Experimentální část.....	28
4.1 Aparatura.....	28
4.2 Příprava vzorků	30
4.2.1 Sterilita.....	30
4.2.2 Příprava kultivačního média	30
4.2.3 Postup přípravy vzorků	31
4.3 Ošetření plazmatem.....	32
4.3.1 Parametry měření	32
4.4 Výsledky měření	33

4.4.1	Zjištění optimálního množství roztoku Tweenu 80 a silic oregano pro inaktivaci maximální ošetřované plochy	33
4.4.2	Inaktivace <i>Staphylococcus aureus</i> pomocí 5% roztoku Tweenu 80 a oregánové silice	35
4.4.3	Inaktivace <i>Deinococcus radiodurans</i> pomocí 5% roztoku Tweenu 80 a oregánové silice	37
4.4.4	Inaktivace <i>Escherichii coli</i> pomocí 5% roztoku Tweenu 80 a silic oregano ..	39
4.4.5	Inaktivace <i>Saccharomycei cerevisiae</i> pomocí 5% roztoku Tweenu 80 a silic oregano	41
5	Závěr	43
6	Reference	45

Úvod

Plazma zpravidla vzniká za pomoci ionizace neutrálního plynu. Energie, která je nezbytná pro ionizaci může být dodávána v různých formách. V praxi jsou ovšem rozlišovány dva způsoby generování plazmatu, a to termickým ohřevem či výbojem v elektrickém nebo elektromagnetickém poli. Při dodání tepelné energie dochází ke vzniku plazmatu. Rozlišujeme termodynamické rovnovážné a nerovnovážné plazma (záleží na teplotách iontů a elektronů). Typickým zdrojem nerovnovážného plazmatu jsou elektrické výboje. Právě nerovnovážné výbojové plazma je velmi dobře uplatnitelné v technologiích plazmatu.

Výboj, zde konkrétně kladný strimer, probíhá v mezielektrodevém prostoru. Elektrody mají rozdílný potenciál konstantní v čase, kdy anodou je označována elektroda s vyšším potenciálem a elektroda s nižším potenciálem katodou. Závislost napětí na výbojovém proudu popisuje základní chování výboje. Tato volt-ampérová charakteristika je závislá na řadě parametrů (tlak, druh pracovního plynu, geometrie elektrod).

V této práci je zkoumán vliv netermálního plazmatu, generovaného stejnosměrným výbojem, na inaktivaci mikroorganismů. Zkoumán je vliv netermálního plazmatu, za pomoci oreganové silic, na bakteriích *Staphylococcus aureus*, *Deinococcus radiodurans*, *Escherichia coli*) a kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*), které jsou umístěny na kultivačním médium

Kultivačním povrchem je zde míněn Mueller-Hintonův agar, který je považován za živné médium sloužící k testování antimikrobiální citlivosti metodou difúze v agaru nebo diluční metodou [1].

Ošetření kontaminovaného povrchu je prováděno za pomoci 5% Tweenu 80 a koncentrace silic v 5% Tweenu 80.

Pro účely inaktivace bakterií byla speciálně sestavena aparatura, která obsahuje dávkovač, zdroj napětí, rotační stolek, dutou anodu a plochou katodu. K výboji dochází v mezielektrodevém prostoru. Proud výbojem závisí na přiloženém napětí a mezielektrodevé vzdálenosti.

Pro optimální výsledky měření bylo nutné všechny parametry zafixovat na konkrétní hodnoty (např. hloubka zasunutí kapiláry, mezielektrodevá vzdálenost atd.).

1 Plazma

Pod termínem plazma podle klasické definice rozumíme kvazineutrální plyn nabitých a neutrálních částic, který vykazuje kolektivní chování [2]. Hovoříme o čtvrtém skupenství látky.

Ve viditelném vesmíru je většina atomové látky ionizována a nachází se ve formě plazmatu. Nitra i obálky hvězd, mlhoviny aj. jsou tvořeny plazmatem. Na Zemi se plazma přirozeně vyskytuje ve výbojových kanálech blesků, při sršení z ostrých konců rostlin při bouřce dále v ionosféře, v e slunečního větru, který neustále atakuje magnetické pole Země, v polárních zářích a samozřejmě dokážeme do tohoto skupenství dostat v uměle vytvořených zdrojích od doutnavek v schodišťových vypínačích přes úsporné žárovka a zářivky, plazmové displeje televizorů a oblouky při svařování až po epicentra výbuchů jaderných zbraní.

Aby bylo možné považovat ionizovaný plyn za plazma, musí vykazovat kvazineutralitu a kolektivní chování. Pro soubor nabitých i neutrálních částic v různých kvantových stavech tak musí platit, že celkový prostorový náboj je přibližně roven nule.

Pod pojmem kolektivní chování se rozumí skutečnost, že každý pohyb nabitě částice v plazmatu ovlivní pohyb ostatních částic. Na plazma tak vnějšími poli působíme jako na celek. Pro převahu kolektivního chování musí být kolektivní působení, charakterizované elektronovou plazmovou frekvencí, která je silnější než binární působení, charakterizované srážkovou frekvencí.

Částice obsažené v plazmatu jsou nejen elementární (např. elektrony či protony), ale spadají sem také kladné a záporné ionty, neutrální atomy a molekuly.

Schopnost odstínit vložené elektrické potenciály je jednou z charakteristických vlastností plazmatu. V okolí nabitě elektrody, která je vložena do plazmatu, dochází k vytváření vrstvy prostorového náboje a následnému odstínění pole elektrody. Tato stínící vzdálenost je Debyeova délka, která je definována jako

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 k_B T_e}{e^2 n_e}} \quad (1.1)$$

kdy ϵ_0 je permitivita vakua, k_B je Boltzmannova konstanta, T_e teplota elektronů, e náboj elektronu a n_e koncentrace elektronů [3]. Definovaný vztah je platný pouze při dostatečném počtu nabitých částic ve sféře o poloměru Debyeovy délky [4]

$$\frac{4\pi}{3} n_{e0} \lambda_D^3 \gg 1 \quad (1.2)$$

V oblastech vzdálenějších než je zmiňovaná Debyeova délka, dochází k tomu, že celkové množství kladně i záporně nabitých částic je přibližně stejné a plazma je opět kvazineutrální. Charakteristický rozměr plazmatu musí být větší než λ_D .

Dalšími důležitými parametry plazmatu jsou stupeň jeho ionizace a teploty iontů a elektronů, které nemusí být vždy stejné. Pod pojmem stupeň ionizace plazmatu rozumíme poměr počtu ionizovaných částic k celkovému počtu částic. Teplota elektronů či iontů je vyjádřena pomocí parametru Maxwellova rozdělení (T) rychlostí částic, kde m značí hmotnost částice a k_B je Boltzmannovou konstantou:

$$f(v_x, v_y, v_z) = \sqrt{\left(\frac{m}{2\pi k_B T}\right)^3} \exp\left(-\frac{m(v_x^2 + v_y^2 + v_z^2)}{2k_B T}\right) \quad (1.3)$$

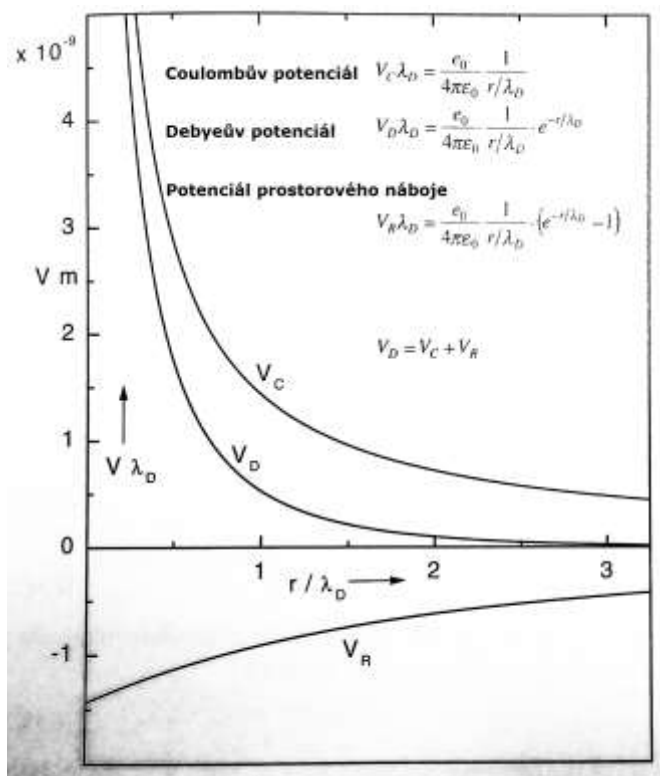
kdy je předpokládáme, že toto rozdělení bylo normováno na jedničku [3].

$$\iiint_{-\infty}^{+\infty} f(v_x, v_y, v_z) dv_x, dv_y, dv_z = 1 \quad (1.4)$$

Lineární závislost kinetické energie částice na teplotě $k_B T$ je příčinou toho, že teplota je obvykle vyjadřována za pomoci jednotek energie. Ve fyzice plazmatu je teplota často udávána v elektronvoltech (eV), kdy platí převodní vztah $1 \text{ eV} = 1,6 \times 10^{-19} \text{ J} = 11\,600 \text{ K}$.

1.1 Rozdělení plazmatu

Plazma lze rozdělit podle teploty na nízkoteplotní a vysokoteplotní, kdy nízkoteplotní se dále dělí na termální a netermální plazma.



Obrázek 1.1: Verifikace elektrického potenciálu kolem iontu přítomného v plazmatu [4].

NÍZKOTEPLTNÍ PLAZMA (LTP)		VYSOKOTEPLTNÍ PLAZMA (HTTP)
TERMÁLNÍ	NETERMÁLNÍ	
$T_E \approx T_I \approx T \lesssim 2 \times 10^4 \text{ K}$	$T_i \approx T \approx 300 \text{ K}$ $T_i \ll T_e \lesssim 10^5 \text{ K}$	$T_i \approx T_e \gtrsim 10^7 \text{ K}$

Tabulka 1.1: Rozdělení plazmatu podle teploty[4].

Teploty různých druhů částic obsažených v plazmatu se mohou lišit. V důsledku různých frekvencí srážek částic mezi sebou a především rozdílných hmotností, může dojít k ustálení rozdílných teplot pro jednotlivé složky plazmatu. Z tohoto důvodu je zaveden parametr anizotermicity plazmatu, tedy

$$\tau_a = \frac{T_i}{T_e} \quad (1.5)$$

přičemž T_e značí teplotu elektronů a T_i teplotu iontů. Pro různé hodnoty parametru anizotermicity jsou rozlišovány dva druhy plazmatu a to izotermické ($\tau_a = 1$), kdy všechny typy částic mají stejnou teplotu, a neizotermické ($\tau_a \ll 1$), kdy teplota elektronů převažuje nad teplotou ostatních typů částic [3].

1.2 Netermální plazma

V plazmatu je teplota určena průměrnou energií neutrálních a nabitých částic, které jsou v něm přítomny a jejich příslušných stupňů volnosti (translační, rotační, vibrační a těch, které souvisejí s elektronovou excitací).

Elektrické pole urychluje náhodně se objevující elektrony, které by mohly být produkovány kosmickým zářením, k energiím několika eV. Po srážce elektronů s molekulami plynu, jako je například N_2 a O_2 ve vzduchu, může dojít k ionizaci, disociaci či oddělení molekuly plynu. Elektrony se však mohou připojit k molekule a zapříčiní tak vznik záporných iontů. Excitované stavy molekul a atomů pak emitují fotony. Tyto chemické procesy zahrnují jak ionizační procesy, které produkují další elektrony, tak rekombinace a zachycovací procesy, které elektrony spotřebovávají.

Netepelné plazma generované při atmosférickém tlaku produkuje směs reaktivních a nabitých částic, elektrické pole, viditelné a UV záření a teplo. Role všech zmíněných složek byla široce studována a zkoumána [5, 6]. Bylo zjištěno, že při použití některých druhů výbojů (korónový výboj, dielektrický bariérový výboj, plazmové trysky), účinnost

inaktivace závisí hlavně na přítomnosti nabitých částic (v případě pokojových podmínek), avšak účinek záření je zanedbatelný [7].

1.3 Generace plazmatu výbojem

V pozemských podmínkách se v přírodě plazma nevyskytuje. Generace plazmatu je dělena do dvou skupin [8]:

- ❖ Ohřevem plynu na vysokou teplotu (tisíce K) dochází k termické ionizaci. Vzniklé plazma se tak nachází ve stavu termodynamické rovnováhy, kdy je možné popsat jeho vlastnosti metodami statistické fyziky.
- ❖ Za pomoci využití elektrických výbojů vzniká plazma, které není v rovnovážném stavu a tak jeho vlastnosti nejsou termodynamicky popsatelné. Takové plazma je možné přesně popsat pouze metodami fyzikální kinetiky (rozdělovací funkce pro rychlost nabitých částic v elektrickém poli).

1.3.1 Samostatný a nesamostatný výboj

Prostor, ve kterém dochází k elektrickému výboji je nazýván jako výbojový. Pokud vezmeme v úvahu makroskopické prostory a časové projevy, jsou elektrické výboje děleny do několika hlavních typů.

Elektrický proud protéká prostorem při každém elektrickém výboji. Výboje lze rozdělit na dva hlavní typy, a to na nesamostatný a samostatný výboj. Toto rozdělení je založeno na tom, zda dochází k vytvoření nabitých částic, tedy i elektrického proudu v závislosti na ionizačním činidle či nikoli. Ionizační činidlo může být tvořeno ionizačním zářením (rentgenové, UV, radioaktivní) nebo ohřevem plynu plamenem [9].

Nesamostatný výboj je tedy takový, který přestane právě v okamžiku přerušení působení ionizačního činidla. I přesto, že elektrické pole mezi elektrodami stále trvá.

K samostatnému výboji dochází v případech, kdy i přesto, že ionizační činidlo nepůsobí, ke vzniku a udržení elektrického výboje, tj. dochází k lavinové ionizaci. Jinak řečeno, zejména elektrony předchozí ionizace získají takovou energii, že samy ionizují přítomný plyn ještě před dopadem na elektrodu. Samostatný výboj zaniká při zhášecím napětí.

Samostatné výboje mohou být děleny buď podrobněji, viz tab. 1.2, nebo dle intenzity proudu na hlavní tři typy - výboj doutnavý, jiskrový a obloukový.

Procesy vznikající při samostatném výboji vedou nejen ionizaci, ale i excitaci částic plynu, kdy následně dochází k vyslání elektromagnetického záření, tj. výboj svítí (často ve viditelném spektru).

ELEKTRICKÝ VÝBOJ	
NESAMOSTATNÝ	SAMOSTATNÝ
	temný
	doutnavý
	obloukový
	jiskrový
	koróna
	vysokofrekvenční

Tabulka 1.2: Rozdělení elektrického výboje.

1.3.2 Výboje v plynech

Při dosažení průrazného napětí vzniká výboj, kdy jeho charakter závisí nejen na složení a tlaku plynu, ale také na tvaru elektrod a vlastnostech zdroje napětí. Ustálený stav výboje je možný díky toku elektrického proudu výbojem. Energie výboje, doplňovaná elektrickým proudem, se uvolňuje do okolí ve formě tepla a světla. Po přerušení výboje dochází k rychlému úbytku až úplnému zániku energie a vzájemné rekombinaci částic. V zásadě jsou rozeznávány tři druhy výboje: korónový, doutnavý a obloukový výboj. U těchto výbojů se předpokládá napájení stejnosměrným proudem. Je však možné používat proudy střídavé [8].

K tomu, aby plyny byly schopné vést elektrický proud, je nutná jejich ionizace. Při vysokém tlaku dochází k ionizaci velmi obtížně, protože je vyžadována značná intenzita elektrického pole. Právě díky tomuto faktu se častěji využívá nízký tlak, kdy elektrony mají mnohem větší střední volnou dráhu a mohou tak ze srážek získat více kinetické energie. Díky tomu je plyn ionizovaný v celém objemu. Velkou nevýhodou výbojů o nízkém tlaku je vakuová aparatura. Právě proto byla vytvořena třetí alternativa – výboje za atmosférického tlaku. Jedním z typů výboje za atmosférického tlaku je jiskrový výboj.

K jiskrovému výboji dochází při dostatečné intenzitě elektrického pole mezi elektrodami, která je potřebná pro lavinovou ionizaci. Zdroj pole však není schopen dodávat elektrický proud trvale. Díky přeskoku jiskry vzniká zvuková vlna, která je vnímána jako praskání (malé výboje) či třesk (silné výboje). Povrch elektrod je narušován díky vysoké teplotě.

1.3.3 Townsendovo kritérium průrazu plynu

Po uvolnění primárního elektronu z katody dochází k jeho urychlení v elektrickém poli, které je dle předpokladů před průrazem homogenní. Může tak dojít k ionizaci atomů plynu s typickou střední vlnovou dráhou λ_i , kdy při tomto procesu dochází k vytvoření elektron-iontového páru. Dochází k urychlování dvou elektronů, které vytvářejí čtyři elektrony v další generaci atd., pak celý tento proces vytváří elektronovou lavinu. Ionty jsou urychlovány směrem ke katodě, kdy nastává možnost uvolnění nového elektronu, který nahradí primární elektron a dojde tak ke spuštění další laviny.

Za pomoci ionizačního činidla je emitováno n_{e0} elektronů. Při průletu mezi elektrodami dochází u nárazové ionizace ke zvyšování počtu elektronů. Právě při tomto ději na dráze d_z vytvoří při srážkách dn_e nových elektronů. Po zanedbání rekombinace i difúze je získán vztah [10]

$$dn_e = \alpha n_e dz , \quad (1.6)$$

což vede k exponenciálnímu růstu $n_e = \alpha n_{e0} e^{\alpha z}$, kde $\alpha = 1/\lambda_i$ ($1/\lambda_i$ - střední počet srážek) je počet dvojic nosičů vytvořených elektronem na dráze 1 cm ve směru pole. Tento faktor byl zaveden Townsendem.

Elektrony jsou emitovány z katody vnějším ionizačním činidlem, kdy počet elektronů dopadajících z anody je n_e . Tok elektronů na kladné elektrodě [10]

$$\Gamma_e(d) = n_e(d) \mu_e E \quad (1.7)$$

opouštějící vzdálenost $z = d$.

Skutečnost, že stejné množství iontů a elektronů bylo vyrobeno v procesu laviny vyžaduje, že iontový tok na katodě je dán vztahem $\Gamma_i(0) = -\Gamma_e(d) + \Gamma_e(0)$, proto [10]

$$\Gamma_i(0) = -\Gamma_e(0)(e^{\alpha d} - 1) \quad (1.8)$$

Pravděpodobnost, že dojde k uvolnění elektronu z katody za pomoci iontového nárazu je popsána koeficientem γ , který je definovaný jako poměr emitovaného elektronového toku na předchozím iontovém toku, neboli $\gamma = |\Gamma_e(0)/\Gamma_i(0)|$. U samostatného výboje může v průběhu laviny dojít k průrazu. Tato bilance je popsána rovnicí 1.9

$$\gamma(e^{\alpha d} - 1) = 1 \quad (1.9)$$

Townsend používá však empirický zákon pro závislost α na elektrickém poli, tedy [10]

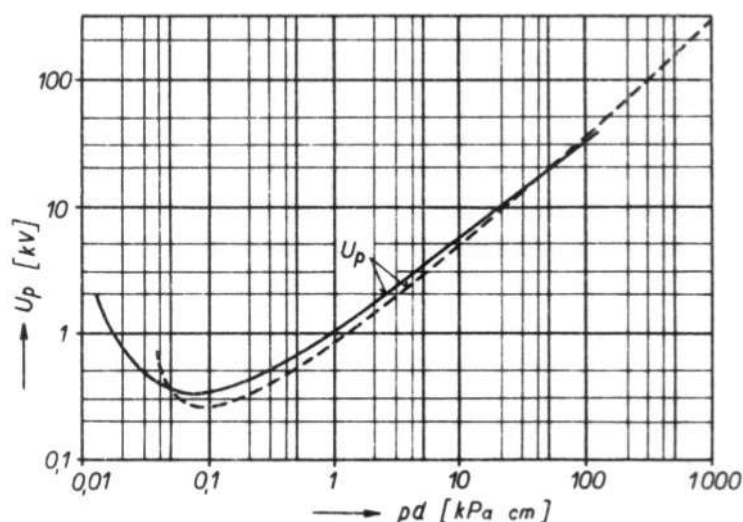
$$\frac{\alpha}{p} = Ae^{\left(\frac{-B}{E/p}\right)} \quad (1.10)$$

s konstantami A, B , které jsou charakteristické pro každý plyn. $A = \alpha/p$ představuje multiplikátor střední vlnové dráhy pro elektrony, $B = E/p$ energetický zisk pro střední vlnovou dráhu, $\propto E\lambda_{mfp}$, což činí (1.10) nezávisle na tlaku plynu.

Při použití Townsendovy stacionární podmínky, z rovnice 1.9 a definovaného průrazného napětí $U_{bd} = E_{bd}d$, lze napsat známý Paschenův zákon (dle Fridricha Paschena) [10].

$$U_{bd} = \frac{Bpd}{C + \ln(pd)} \quad \text{kde} \quad C = \ln\left(\frac{A}{\ln(1 + \frac{1}{\gamma})}\right) \quad (1.11)$$

Průrazové napětí závisí na součinu tlaku p a vzdálenosti elektrod d , při homogenním poli za konstantní teploty. Při vykreslení Paschenovy křivky, obr.1.2, je viditelné výrazné minimum. Minimální napětí je závislé na způsobu kombinace plynu a materiálu katody.



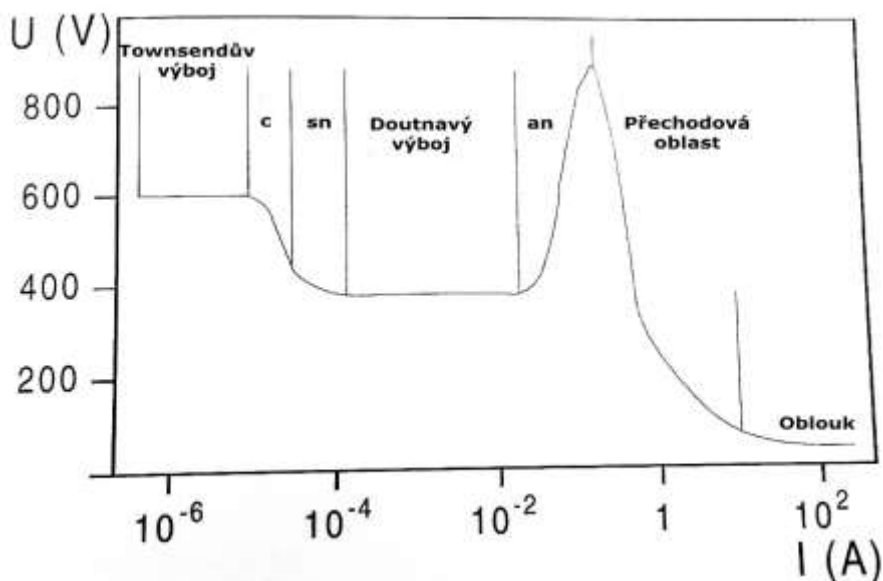
Obrázek 1.2: Paschenova křivka. Závislost průrazového napětí U_p v homogenním poli pro vzduch (plná čára - experimentálně zjištěná, přerušovaná čára - vypočtená) [11].

1.4 Stejnosemřný výboj

Tato práce je zaměřena výhradně na výboj při stejnosměrném napětí (přechodová jiskra), která je pro přehlednost znázorněna volt-ampérovou charakteristikou výbojů, obr. 1.3. Charakteristika je uvedena pro snížený tlak, při kterém je možné docílit poměrně velké mezielektrodové vzdálenosti.

Základní chování výboje je popsáno již zmíněnou volt-ampérovou charakteristikou, kdy její přesná podoba je závislá na množství parametrů (geometrie elektrod, druh pracovního plynu, tlak), obr. 1.3. Je zde znázorněno pět oblastí a to Townsendův (nesamostatný, temný) výboj,

koróna, doutnavý výboj (subnormální, normální, anormální), přechodová oblast a obloukový výboj.

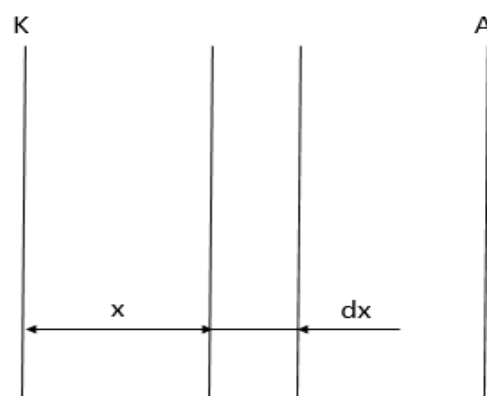


Obrázek 1.3: Vývoj stejnosměrného elektrického výboje s rostoucím proudem [13].

Pro výboje, kterých bylo dosaženo za atmosférického tlaku, doutnavý výboj není proveditelný. Při zvyšování napětí se nejprve zažehne korónový výboj, dalším přidáním napětí se vytvoří vcelku stabilní vodivá dráha s poměrně velkým proudem, tzv. strimer. Pokud by bylo možné na zdroji přidat další napětí, bylo by docíleno výboje s velkou hustotou proudu.

1.4.1 Tvorba elektronové laviny

Za předpokladu, že elektrony opouštějí katodu následkem fotoemise, dochází za jednotku času k emisi N_0 elektronů z povrchu katody s proudovou hustotou J_0 . Elektrony jsou elektrickým polem, mezi anodou a katodou, urychlovány od jedné srážky ke druhé, kdy některé srážky jsou ionizační (nepružné). Ionizační srážky jsou úměrné intenzitě elektrického pole, tedy čím silnější pole, tím více srážek. Hovoříme o ionizaci nárazem elektronů urychlovaných polem nebo-li ionizaci elektrickým polem.



Obrázek 1.4: Vznik lavinového výboje [9].

Elektron vytvoří ionizačními srážkami na jedné dráze α nových elektronů a α kladných iontů. Dojde-li k průchodu N elektronů vrstvičkou o jednotkovém průřezu a tloušťce dx ve vzdálenosti x od katody za jednotku času, dojde ke vzniku $dN = N\alpha dx$ nových elektronů a kladných iontů. Řešením a úpravou této rovnice dostaneme počet elektronů ve vzdálenosti x [9].

$$N = N_0 e^{\alpha x} \quad (1.12)$$

Kdy pro $x = 0$ platí $N = N_0$.

Je tedy zřejmé, že z jednoho elektronu, který byl emitován katodou, se vytvoří celá lavina nových elektronů. Počet elektronů exponenciálně roste se vzdáleností od katody. Při vzdálenosti d obou elektrod, dochází ke vzniku $(N_0 e^{\alpha d} - N_0)$ elektronů a stejnému počtu kladných iontů [9]. Je možné zanedbat ionizaci nárazem kladných iontů, a proto je možné zavedení vztahu $N_0(e^{\alpha d} - 1)$, který vyjadřuje zároveň i počet kladných iontů dopadajících na katodu [9].

Právě kladné ionty dopadající na katodu způsobují vyvolání emise η_+ nových elektronů. A tedy z katody vystupuje mnohem větší počet elektronů (i kladných iontů) než N_0 , celý tento děj probíhá až do ustáleného děje.

Počet elektronů (N_1), které v ustáleném stavu vystupují z katody se skládá zejména z N_0 elektronů vystupujících z katody za pomoci fotoemise a dále z $\eta_+ N_0(e^{\alpha d} - 1)$ elektronů, které jsou vyraženy z katody $N_1(e^{\alpha d} - 1)$ dopadem kladných iontů, jinak řečeno [9]

$$N_1 = N_0 + \eta_+ N_1(e^{\alpha d} - 1) \quad (1.13)$$

Na anodu dopadá nyní $N_a = N_1 e^{\alpha d}$ elektronů, dle vzorce 1.12. Po dosazení N_1 do vztahu 1.13 a následné úpravě je získán vztah 1.14 [9].

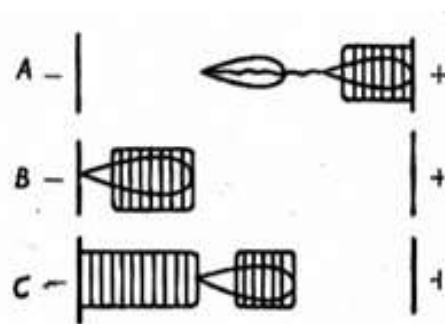
$$N_a = \frac{N_0 e^{\alpha d}}{1 - \eta_+(e^{\alpha d} - 1)} \quad (1.14)$$

Součinitel η_+ charakterizuje vlastnosti materiálu katody, kdy právě tyto vlastnosti ovlivňují pravděpodobnost emise elektronů z katody kladnými ionty. Tento fakt napovídá tomu, že pokud je zvolena např. katoda s velkým η_+ a anoda s malým η_+ , dochází k usměrnění účinku výboje a to tak, že od elektrody s malým η_+ poteče mnohem menší proud než od elektrody s velkým η_+ . Toto zjištění má podstatný význam při vzniku samostatného výboje.

1.4.2 Teorie strimeru

V prostoru mezi katodou a anodou, pouze za přítomnosti dostatečně velké intenzity elektrického pole (z elektronu uvolněného z katody nebo z některého elektronu mezi katodou a anodou), vzniká lavina, která obsahuje značnou koncentraci nabitých částic. Tyto podmínky bývají zpravidla splněny při velkých koncentracích částic v plynu. Elektronů,

které za sebou zanechávají kladný iontový prostorový náboj, se pohybují velkou rychlostí k anodě. Prostorový náboj, nacházející se v blízkosti anody, může vytvořit pole o intenzitě $E_1 > E$, přičemž E značí právě intenzitu pole vytvořeného elektrickým polem (mezi anodou a katodou), viz obr. 1.5 [9]. Do tohoto prostoru jsou nyní přitahovány elektrony, které jsou tvořeny fotoionizací v prostoru u čela laviny a dochází tak ke vzniku dílčí laviny, která se šíří k čelu prvotní laviny (na obrázku znázorněno vlnovkou). Při dosažení čela laviny nastává neutralizace kladného náboje a vzniká vodivý sloupec plazmatu, tzv. strimer. V přední části strimeru vzrůstá kladný prostorový náboj, zbytkový efekt z druhotných lavin. Strimer se šíří cestou určenou kladným prostorovým nábojem prvotní laviny, tedy směrem ke katodě. K vodivému spojení mezi katodou a anodou plazmatickým sloupcem dochází k dosažení katody. Těsně před tímto procesem je z katody uvolněno fotoionizací značné množství elektronů. Takovéto množství elektronů se strimerem šíří k anodě v podobě proudové vlny. Zároveň dochází k ionizaci prostoru strimeru a vzniku výbojového kanálu. Dochází k ohřevu katody v důsledku dopadajících iontů a následné emisi elektronů z katodové skvrny. Strimer (označen na obrázku 1.5 svislými čarami), je šířen do místa vzniku prvotní laviny. Současně se zvětšuje elektrické pole ve výbojovém prostoru. To je způsobeno také tím, že vodivý strimer efektivně přiblížil anodu ke katodě. Výboj záporného strimeru, který vzniká na katodě, je znázorněn na obr. 1.5 písmeny *a*, *b*, *c*. Tento typ strimeru vzniká stupňovitě s neplynulým vývojem. Nejprve z laviny, která vznikla na katodě, dochází k vytvoření části strimeru. Během tohoto procesu kladný prostorový náboj zesiluje (směrem k záporné katodě) nebo zeslabuje (směrem ke kladné anodě) elektrické pole. Jakmile dojde k dosažení katody, vzniká vodivý kanál, který pomyslně posouvá katodu o svou délku k anodě. Po této skutečnosti dochází k opakování celého děje.



Obrázek 1.5: Vznik strimeru (a – stupňovitý kladný strimer, b, c – záporný strimer) [9].

Matematický zápis formulace strimeru vychází z předpokladu, že každý cyklus udržující samostatný výboj musí být schopen po svém proběhnutí zajistit podmínky pro stejný nový cyklus. Tedy fotoelektron, který vytváří sekundární lavinu, musí být po dosažení čela laviny strimeru nahrazen novým fotoelektronem. Tento fakt vede ke vztahu

$$Kf e^{\int_0^{x_K} \alpha dx} = 1, \quad (1.15)$$

kde $(\exp \int_0^{x_K} \alpha dx)$ značí počet elektronů vytvořené v sekundární lavině fotoelektronem na dráze x_K v poli před strimerem, f je konstantou úměrnosti a K je pravděpodobnost, že některý z fotonů vytvoří nový fotoelektron [9]. Platí úměrnost mezi počtem fotonů vzniklých při dosažení strimeru druhotnou lavinou a počtem elektronů v lavině. Levá strana rovnice definuje počet fotoelektronů vzniklých z jedné sekundární laviny, který je roven jedné.

Dále také platí, že počet fotonů vznikajících před strimerem musí být větší než určitá hodnota C , pro niž platí za atmosférického tlaku hodnota $C = 7 \cdot 10^{17} \text{ m}^{-3} \text{ s}^{-1}$ a napětí průrazu vyhovuje Paschenovu zákonu [9].

1.5 Liderový mechanismus

Strimer je vcelku úzký (1 mm), chladný, má malou vodivost a značný potenciálový úbytek podél jeho dráhy. Při delších průbojných drahách dochází k přerůstání strimeru do vodivějšího kanálu tzv. lideru (s malou změnou potenciálu). Strimer se dále šíří v čele lideru.

Lider má v průměru cca 1 cm, je řídký a chladný. Při fázi lideru je do kanálu přiveden elektrický náboj příslušné elektrody.

Boční strimery a laviny se napojují na lider. Samotné lidery se mohou šířit i od obou elektrod současně. Dochází k vytvoření vysokého potenciálového rozdílu, v místě konečného propojení lideru s elektrodou. Narůstající proud uvolňuje velké množství tepla, které způsobuje velmi silnou ionizaci plazmatu v kanále i okolním plynu. Dochází také k rychlému nárůstu vodivosti. Vzniklý potenciálový rozdíl nezůstává lokalizován na jednom místě, ale přesouvá se k druhé elektrodě ve formě tzv. zpětné vlny.

1.6 Elektrospraying

Pod pojmem elektrospraying neboli elektrorozprašování je míněno elektrické pole vysokého napětí, které je aplikované mezi kapilárou (skleněná či kovová), s obsahem roztoku látky a přítomnou deskovou nebo jinou elektrodou. Roztok je přiveden do vodivé kapiláry, kdy na jejím výstupu při dostatečně vysokém napětí dochází k vytvoření tzv. Taylorova kuželu. Taylorův kužel vzniká v důsledku interakce elektrického pole s povrchovým napětím roztoku [13]. Po dalším zvyšování napětí vzniká na vrcholu kuželu tryska, vystřelující nabitě mikroskopické kapky, u kterých během letu dochází k rychlému odpařování přítomného rozpouštědla, tedy snižuje se objem i povrch kapky. Díky rychlému odpařování rozpouštědla dochází v kapičkách ke zvyšování povrchové hustoty elektrického náboje, tento fakt vede k tzv. Coulombovské repulzi, disperze kapičky až na nanočástice. Náboj, který je přítomen na povrchu kapiček, brání jejich koagulaci (srážení). Celý jev je opakován až do chvíle dopadu kapičky na spodní elektrodu, nebo do odpaření dostatečného množství rozpouštědla, tedy vzniku pevné fáze. V průběhu procesu dochází k nahromadění vznikajících kapiček vlivem odpuzivých sil stejně nabitých povrchů kapek.

Množství rozprašených atomů N_r a počet dopadajících iontů N_+ z povrchu elektrody lze vyjádřit vztahem, viz níže

$$N_r = \beta_0 N_+ \quad (1.16)$$

přičemž β_0 představuje součinitel katodového rozprašování [9]. Součinitel β_0 je závislý na stavu, složení a struktuře povrchu katody. Dále závisí na dopadajících iontech i jejich energii a tlaku plynu.

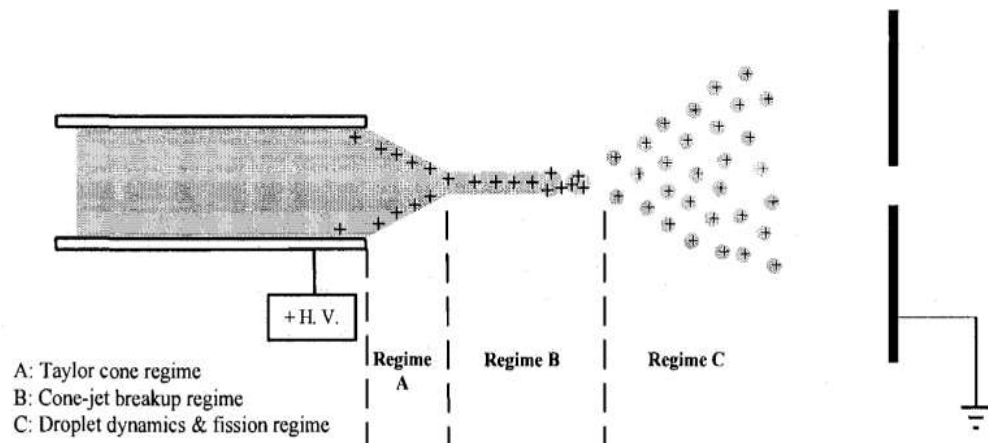
V průběhu tvorby kapek může vzniknout několik módů rozprašování, které významně ovlivňují výslednou polydisperzitu a velikost vytvářených kapek. Módy se od sebe odlišují způsobem vytvoření menisku¹ kapaliny a následnému vytvoření rozprašující trysky. Přechody mezi jednotlivými módy nejsou zcela jednoznačné.

Módy dripping, mikrodrilling, spindle a přerušovaný cone-jet nevykazují kontinuální tok kapaliny z menisku. Pro dripping mód je charakteristická produkce stejně velkých kapek, které jsou generovány s nízkou frekvencí a větším průměrem než jaký je průměr kapiláry.

¹ Meniskem se nazývá obloukovité prohnutí kapaliny, vzniká vlivem mezipovrchového napětí na rozhraní kapaliny, stěny nádoby a vzduchu.

Tyto módy nejsou použitelné pro výrobu kvalitních nanočástic (nízká frekvence produkce, velká polydisperzita).

Kontinuální tok kapaliny z menisku je typický pro pulzační módy. Při elektrosprayingu je nejčastěji využíván mód Cone-jet, tzv. Taylorův kužel. Tento mód je velmi stabilní a dokáže produkovat velmi úzkou distribuci kapiček. Hovoříme o kuželovém profilu s vytvářející se tryskou, která emituje nabité kapičky a díky Coulombovské repulzi dochází k rychlému rozpadu na menší kapičky (u všech stejná velikost). Se zvyšujícím se napětím se častěji projevují nestability v Taylorově kuželu. Tyto nestability vedou ke vzniku dalších trysek, které následně generují kapénky. Takovýto mód je nazýván multi-jet mód, který je typický generováním velmi malých polydisperzních kapiček.



Obrázek 1.6: Módy elektrosprayingu [13].

2 Silice

Silice se v přírodě vyskytují jako vonné a těkavé sloučeniny přítomné v rostlinách . Tyto látky jsou olejovité, lipofilní a tudíž zpravidla ve vodě nerozpustné. Při pokojové teplotě mívají tekutou konzistenci. Můžeme v nich objevit sloučeniny zastoupené snad všemi chemickými skupinami, zejména potom nízkomolekulární, a bez vazby na cukry.

V silicích většinou bývá zastoupen velkou převahou jeden typ sloučenin (např. terpenické uhlovodíky). Případy, kdy je dominantní pouze jediná sloučenina, jsou vzácné [14]. Mívají anti-invazivní (definujeme vstup jakéhokoli infekčního agens do organismu) a antimikrobiální aktivitu [15]. Silice mohou inhibovat syntézu DNA a RNA proteinů a polysacharidů v buňkách hub a bakterií [16].

2.1 Oreganová silice

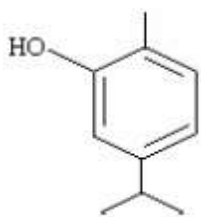
V oreganové silici se z monoterpenů vyskytují thymol, karvakrol, p-cymen a linaloon. Ze seskviterpenů jsou to potom α - a β -karyotylen, α -bisabolen, p-cymolen [17].

Terpenoidní uhlovodíky neboli izorpenoidy, jsou rozdělovány podle počtu izoprenových jednotek

- ❖ Monoterpeny (2 isoprenové jednotky, 10 C)
- ❖ Seskviterpeny (3 isoprenové jednotky, 15 C)
- ❖ Diterpeny (4 isoprenové jednotky, 20 C)

Hovoříme o nejpočetnější skupině (více než 30 000 terpenoidů) vonných látek. Tyto látky mohou být nalezeny u mikroorganismů, rostlin (složka antibakteriální aktivity silic) i živočichů [18].

2.1.1 Thymol

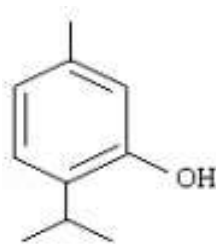


Obrázek 2.1: Strukturální vzorec Thymolu [23].

Systematický název thymolu je 2-isopropyl-5-methylfenol. Tvoří bezbarvé krystalky, je však velmi těžce rozpustný ve vodě, ale snadno rozpustný v 96% ethanolu i v etheru, v silicích, olejích a dále mírně rozpustný v glycerolu a ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů [19].

Sumární vzorec thymolu je $C_{10}H_{14}O$. Jeho molekulová hmotnost je rovna 150,22. Bod tání thymolu je $51,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ [20]. Je využíván jako složka průmyslových protizánětlivých a desinfekčních prostředků (zubní pasty, ústní vody) a často bývá kombinován s chlorethynolem [21]. Potlačuje růst hub na *Penicillium digitatum*. Taktéž je mutagenem působící na *Salmonella typhimurium* a s cytotoxickým i antivirovým účinkem na lidské T-lymfoblastoidní buňky (imunitní systém) [22].

2.1.2 Karvakrol



Obrázek 2.2: Strukturální vzorec karvakrolu [23].

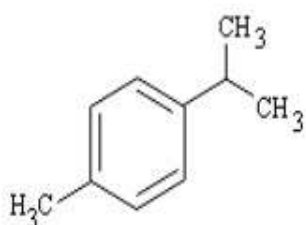
Karvakrol je známý pod systematickým názvem jako 5-isopropyl-2-methylfenol či 2-hydroxy-p-cymol [20]. Je řazen mezi jednoduché alkylfenoly.

Hovoříme o látce nerozpustné ve vodě, ale rozpustné v ethanolu a etheru. Za běžné teploty se vyskytuje v kapalném skupenství.

Sumární vzorec karvakrolu je $C_{10}H_{14}O$. Disponuje molekulovou hmotností 150,22 a bodem tání $2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ [24]. Má antibakteriální účinky na *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Také působí pozitivně proti *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Penicillium digitatum* a *Escherichia coli*. Zároveň také zabraňuje peroxidaci membránových lipidů, vyvolané železitými ionty [25].

Mechanismus účinku látek s obsahem karvakrolu a thymolu na *P. aeruginosa* a *S. aureus* je založen na porušení membránové integrity a úniku iontů. Zkoumán může být také vliv na vnitřní pH mikroorganismů [26].

2.1.3 P-cymen



Obrázek 2.3: Strukturální vzorec p- cymenu [23].

Systematický vzorec odpovídá názvu 1-isopropyl-4-methylbenzen. P-cymen je označován jako monoterpen, který je nerozpustný ve vodě, ale je také mísitelný s ethanolem a etherem. V přírodě je to nejběžněji vyskytující se forma cymenu. [27].

Strukturální vzorec je $C_{10}H_{14}$. Co se týče fyzikálních vlastností, p-cymen je známý pro optickou otáčivost a bodem tání $-68\text{ }^{\circ}\text{C}$ [28]. Potlačuje růst hub na *Penicillium digitatum* a je využíván jako analgetikum, antirevmatikum, sedativum a také jako účinná látka proti bakteriím, virům i plísním [29].

2.2 Rozpustnost silic

Silice mívají menší hustotu než voda. Vzhledem k absenci polárních skupin jsou ve vodě nerozpustné. Rozpustné jsou v tucích, chloroformu, etheru benzínu či alkoholu. Nevýhodou těchto látek je jejich hořlavost a negativní vliv samotného rozpouštědla na bakterie (sama rozpouštědla působí cidně). Vzhledem k tomuto faktu byl pro rozpuštění silic využit Tween 80, který sám nemá cidní účinky.

2.2.1 Tween 80

Tween 80, označovaný též polysorbát 80 je syntetická, viskózní, ve vodě či glycerinu rozpustná sloučenina, považována za aktivní látku a emulgátor, který je využíván v potravinářské i biologické praxi, např. povrchová sterilizace, emulgátor potravin, solubilizační činidlo (obsaženo v ústní vodě), atd [31].

Právě pro svoji dobrou rozpustnost esenciálních olejů byl v případě této práce použit 5% roztok Tweenu 80 ve vodě. Toto množství polysorbátu 80 se prokázalo jako nejvhodnější z praktických důvodů, mimo jiné vzhledem k viskozitě. Zároveň bylo ověřeno, že v této koncentraci neovlivňuje růst bakterií, a tak bylo možné v kombinaci se silicemi rozprašovat získaný roztok přímo na povrch kontaminovaného kultivačního média.

3 Mikrobiologie

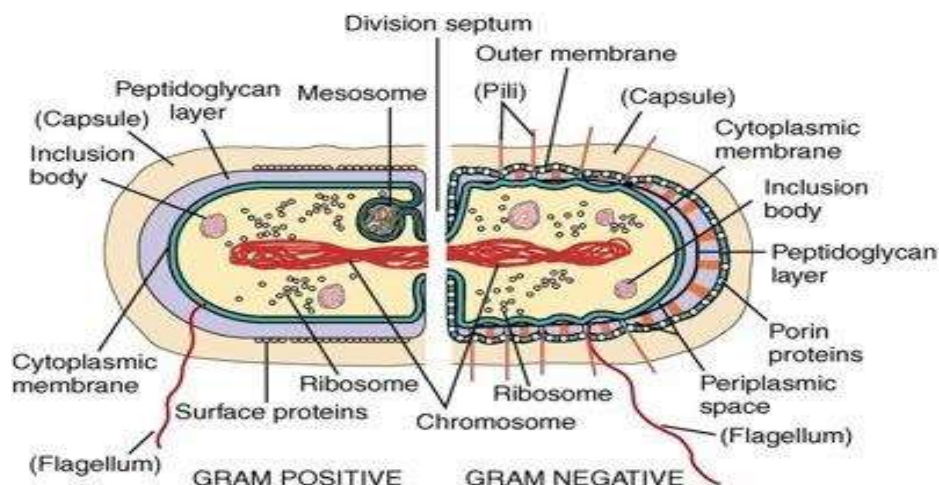
Ke studiu biologických efektů je v první řadě nutné použití metodicky jednoduchých organismů, kdy by měl být přesně definován jejich fenotyp. Tento fakt je důvodem, proč by výzkum měl být prováděn primárně na jednobuněčných mikroorganismech. V této práci byl využit modelový soubor mikroorganismů a to grampozitivní a gramnegativní bakterie a kvasinky.

3.1 Bakterie

Bakterie se vyskytují všude v přírodě, kolem nás i v potravě, kterou přijímáme. V případě, že mají vhodné podmínky (živiny, vlhkost a příznivou teplotu), dochází k jejich rychlému množení. Při dosažení určitého počtu se některé patogenní bakterie stávají nebezpečnými a mohou způsobit onemocnění. Právě díky tomuto faktu jsou snahy zabránit zbytečnému přemnožení bakterií (potravinářství, aj.). Za nejvhodnější teplotu pro rychlý růst bakterií je považováno rozmezí teplot 4 až 60 °C [32].

Bakterie patří mezi jednobuněčná prokaryota nemají jádro ani vnitřní membránami oddělené prostory, avšak obsahují membránu cytoplasmatickou. Mají schopnost tvořit vysoce rezistivní spóry. Způsob kódování DNA je odlišuje od eukaryot (jaderných organismů) i archeí. Samostatné buňky bakterií (řády mikrometrů) jsou různého tvaru [33].

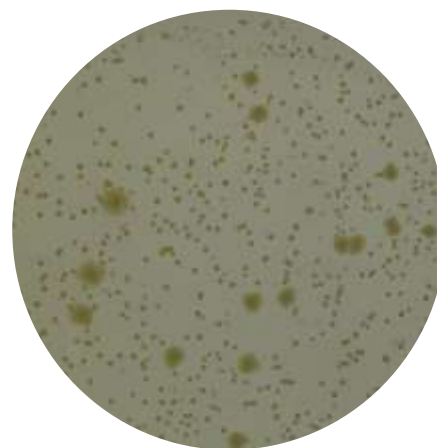
Buněčná stěna bakterií obsahuje vrstvu polysacharidů a peptidů, známé pod názvem peptidoglykany. Peptidoglykany se nachází nad cytoplazmaticou membránou, kdy udržuje tvar bakteriální buňky a zároveň plní ochrannou funkci. Grampozitivní bakterie jsou význačné tím, že obsahují silnou vrstvu peptidoglykanu obsaženého v buněčné stěně (Gramovo barvení stěnu barví do modrofialova). Gramnegativní bakterie mají tenčí stěnu (peptidoglykanová vrstva a vnější membrána), avšak celková stavba buňky je komplikovanější než je tomu u grampozitivních bakterií [34].



Obrázek 3.1: Stavba buněčné stěny bakterií [34].

3.1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (zlatý stafylokok) je grampozitivní, koková, fakultativně anaerobní, nenáročná, osmoticky resistantní a nesporulující bakterie. Jedná se o nepohyblivé koky o průměru 1 μm nacházejících se v nepravidelných shlucích. Je však možné pozorovat i dvojice nebo zcela krátké řetízky. Některé druhy kmenů jsou opouzdřené. Přenos genetické informace probíhá nejčastěji za pomoci transdukce, byl prokázán i in-vivo.



Obrázek 3.2: Foto *Staphylococcus aureus*.

Je častým původcem různých infekcí v rozsahu od mírných zánětů kůže a měkkých tkání až po život ohrožující sepse. Nepatogenní stafylokoky se často vyskytují u lidí, zvířat i hmyzu. Hovoříme o růstově málo náročném koku, který dostal svého pojmenování podle oranžově zbarvených kolonií [35].

3.1.2 *Deinococcus radiodurans*

Deinococcus radiodurans, extrémofilní kokovitá bakterie, pochází z kmene *Deinococcus - thermus*.

D. radiodurans je vcelku velká, kulovitá bakterie, o průměru 1,5 až 3,5 μm. Je složena z buněk tvořící čtveřice. Bakterie tohoto typu se snadno kultivují a nejspíše nezpůsobují žádná onemocnění [36]. Kolonie jsou hladké, konvexní a narůžovělé až červené barvy. Tyto

buňky jsou řazeny jako grampozitivní, přestože obsahují neobvyklý obal a buněčnou stěnu připomínající gramnegativní bakterii [37]. *D. radiodurans* netvoří endospory a nevykazuje pohyb. K získání energie z organických látek ve svém prostředí využívá kyslík [37].

Tato bakterie je dobře odolná vůči nízké teplotě, suchu, vakuu i kyselému prostředí. Nejznámější je však pro svoji velkou odolností vůči radioaktivitě (přežije dokonce i absorbovanou dávku gama záření 15 000 Gy). Při ozáření dochází k rozlámání DNA, ale ta je schopna se během několika hodin znovu opravit [38].

Tato bakterie je extrémně odolná proti ionizujícímu záření, ultrafialovému světlu, vysoušení a proti oxidačním a elektrofilním činidlům [39].

3.1.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli (původním názvem *Bacterium coli*) je gramnegativní fakultativně anaerobní spory netvořící tyčinkovitá bakterie pohybující se pomocí bičků. Spadá pod čeleď *Enterobacteriaceae*, jež také zahrnuje mnoho patogenních rodů mikroorganismů. *E. coli* patří ke střevní mikroflóře teplokrevných živočichů, včetně člověka. Z tohoto důvodu je její přítomnost v pitné vodě indikátorem fekálního znečištění. Člověku je jako součást přirozené mikroflóry prospěšná, jelikož produkuje řadu látek, které brání rozšíření patogenních bakterií (koliciny) a podílí se i na tvorbě některých vitamínů (např. vitamín K).

E. coli patří k nejlépe prostudovaným mikroorganismům, jelikož je modelovým organismem pro genové a klinické studie. Joshua Lederberg jako první r. 1947 pozoroval a popsal na bakterii *E. coli* výměnu genetického materiálu tzv. konjugaci [40].

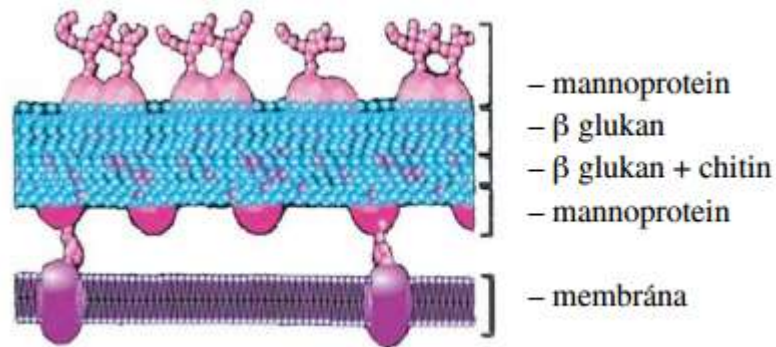
3.2 Kvasinky

Kvasinky jsou jednobuněčná eukaryota s povrchovými strukturami, které jsou plazmatickou membránou, buněčnou stěnou. V cytoplazmě je pak umístěn vnitro-buněčný obsah.

Buněčná stěna plní stejnou funkci jako u bakterií, tedy chrání buňku před mechanickými vlivy, osmotickým šokem a udává jí tvar. Stěna kvasinkové buňky je charakteristická tvorbou tzv. jizev (trvalé kruhové struktury vzniklé pučením).

Typickým jevem kvasinkových buněk je flokulace (vysrážení nečistot) a následná sedimentace buněk. Tohoto jevu je využíváno v potravinářském odvětví (výroba piva, vína, atd.), kde tento jev může být žádoucí, nebo nežádoucí.

Kvasinky jsou široce využívány jako modelové základní systémy a aplikace jak ve vědě, tak v medicíně či biotechnologii [41]. Mohou být izolovány z půdy, vody i vzduchu. Pro některé druhy je možná izolace i z extrémních prostředí (vysoká koncentrace cukrů a solí, nedostatek kyslíku či nízká teplota) [42].



Obrázek 3.3: Buněčná stěna kvasinek [23].

3.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae (pivní, pekařská nebo vinná kvasinka) je druh kvasinky z oddělení vřeckovýtrusých hub, která je člověkem využívána v kvasných procesech. Kvasinky *S. cerevisiae* je možné rozdělit do geneticky spřízněných kmenů podle toho, jaký substrát kvasí, přičemž hlavní jsou pivní, pekařské a vinné kvasinky, samotné vinné kvasinky mají podle analýzy genetické příbuznosti až na několik výjimek společný původ [43].

Buňky *S. cerevisiae* jsou oválného až kulovitého tvaru, velké 5 – 10 μm . Pivní kvasinka se rozmnožuje speciálním typem dělení, které je typické pro kvasinky – tzv. pučení.

Pivní kvasinka je jedním z nejstudovanějších eukaryotních organismů z hlediska molekulární a buněčné biologie, významná je především pro studium buněčného cyklu, nitro-buněčné signalizace a protein-proteinových interakcí [44].

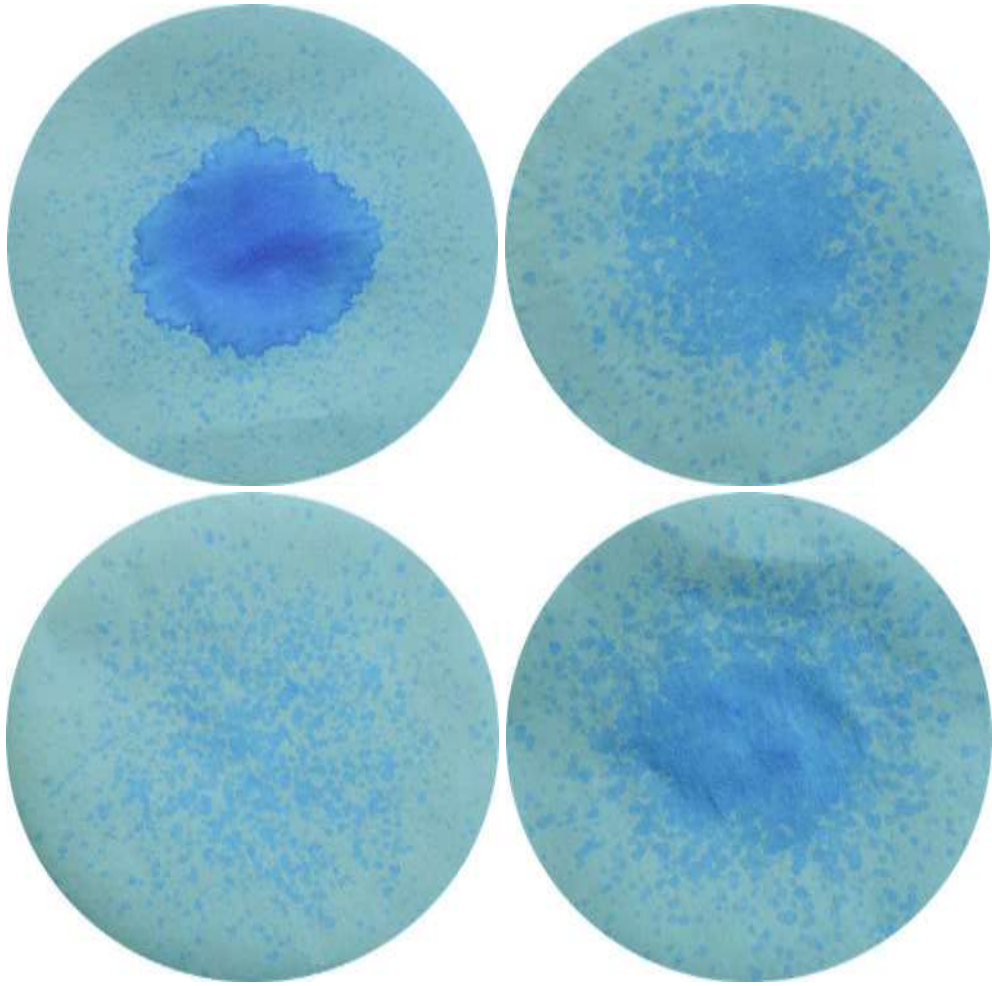
4 Experimentální část

Náplní experimentální části byl návrh elektrodového systému a zapojení společně s provedením experimentů v oblasti inaktivace mikroorganismů pomocí netermálního plazmatu, generovaného stejnosměrným výbojem za atmosférického tlaku.

4.1 Aparatura

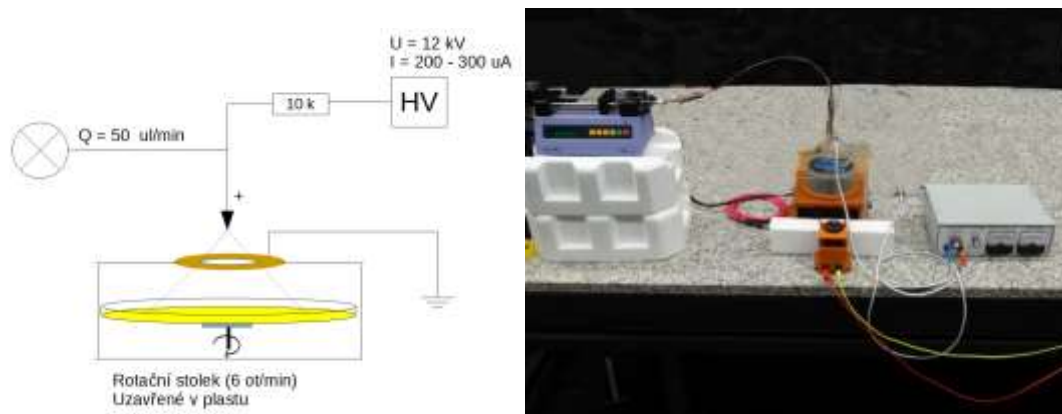
Elektrodový systém je tvořen dutou měděnou anodou s vnitřním průměrem 2 mm. Vnitřní průměr anody odpovídá vnějšímu průměru kapiláry, která slouží k přivedení pracovní tekutiny. Katoda je plocha s otvorem o průměru 9 mm. Výboj tedy vzniká mezi dutou anodou a katodovým prstencem. Proud výbojem závisí na přiloženém napětí a mezielektrode vzdálenosti. Vzhledem k tomu, že cílem experimentu bylo nalezení optimálních podmínek pro rozprášení minimálního množství silic při současném docílení maximální inaktivace mikroorganismů na definovaném povrchu, bylo rozhodnuto nepoužívat výboj koronový, ale strimerový. Tohoto výboje je docíleno nastavením mezielektrode vzdálenosti 6 mm a proudem 200 μA , při přiloženém napětí 13 až 15 kV. Potřebné napětí záleželo na aktuálních atmosférických podmínkách (atmosférickém tlaku, teplotě a vlhkosti vzduchu).

Pro optimální rozprášení pracovní tekutiny na povrch Petriho misky o průměru 9 cm, bylo potřeba nastavit další parametr, a to zasunutí kapiláry vedoucí tekutinu dovnitř anody. Tento parametr, označený jako z , byl po několika experimentech nastaven na 2 mm.



Obrázek 4.1: Rozprášení 5% Tweenu v mezelektrodové vzdálenosti 6 mm, při hloubce zasunutí kapiláry 0 mm (vlevo nahoře), 1 mm (vpravo nahoře), 2 mm (vlevo dole) a 3 mm (vpravo dole). Rozprašování bylo provedeno při 12 kV, 200 μ A.

Při sestavování celé aparatury byl kladen důraz na to, aby mohlo být dosaženo maximálního zkrácení doby ošetření kontaminovaného povrchu bakterií a zachování maximální možné dekontaminace za pomoci využití minimálního množství silic. Proto průtok média byl nastaven na pouhých 50 μ l/min s celkovou dobou ošetření 4 min. Omezení rozprášeného množství a minimálního průtoku bylo dáno použitou aparaturou (zejména pumpou) a mikrostríkačkou, jejíž maximální objem je 250 μ l. Pro rovnoměrné pokrytí ošetřované ploch rozprášeným médiem byl vzorek v Petriho misce umístěn na rotační stolek a byl otáčen rychlostí 6 otáček za minutu. Vzdálenost mezi katodou a vzorkem byla nastavena na 30 ± 5 mm.



Obrázek 4.2: Navržené schéma zapojení aparatury (vlevo), reálná testovací aparatura (vpravo).

4.2 Příprava vzorků

Každé pracoviště i laboratoř by mělo splňovat podmínky sterility a čistoty, které jsou nezbytné pro minimální kontaminaci výsledků.

4.2.1 Sterilita

Veškeré použité přístroje či nádoby musí být sterilní. Této sterility bylo dosaženo za pomoci autoklávu, uzavíratelné tlakové nádoby pro reakce, probíhající za vysokého tlaku a teploty, kdy laboratorní nádoby (zkumavky, kádinky, atd.) bylo nejprve třeba řádně omýt. Omývání probíhalo pod tekoucí vodou několikrát po sobě, poté následovalo omytí destilovanou vodou. Po dokončení byly nádoby uzavřeny alobalem tak, aby vznikl malý prostor pro vniknutí páry během autoklávování. Po celkovém procesu bylo připravené nádobí naskládáno do autoklávu a ten byl zapnut. Celá sterilizace trvala cca 45 minut, poté byly nádoby vyňaty a uzavřeny, aby nemohly být kontaminovány.

Špičky do pipet byly po provedení sterilizace v autoklávu dále umístěny do horkovzdušného sterilizátoru předehřátého na 100 °C a úplně vysušené.

4.2.2 Příprava kultivačního média

Pro měřené vzorky je neoptimálnější použití čerstvého kultivačního média (agaru). Proto celková příprava probíhala minimálně 24 hodin před začátkem měření.

Do destilované vody je rozmícháno příslušné množství práškového agaru, dle pokynů výrobce. Poté byla nádoba s rozmíchaným práškem umístěna do mikrovlnné trouby a po dobu cca 10 minut byla ohřívána (až do přivedení k varu), kdy zhruba každé dvě minuty bylo nutné roztok promíchat. Poté byla nádoba přikryta (např. alobalem) a umístěna do autoklávu (opět musí být umožněn přístup páry do nádoby). Zhruba po 45 minutách

bylo kultivační médium vysterilizováno a připraveno k práci. Na předem připravené Petriho misky bylo pomocí pipety aplikováno 20 ml agaru. Po rozlití na Petriho misky, které byly umístěny v laminárním boxu bylo nutné nechat agar vyschnout. Jakmile teplota agaru klesla pod 40 °C, byly Petriho misky umístěny do lednice. Měření na takto připravených miskách bylo možné začít po 12 hodinách, kdy zkondenzovala nadbytečná voda.

4.2.3 Postup přípravy vzorků

Minimálně jeden den před měřením bylo nutno připravit mikroorganismy, ze zmrazeného zásobního roztoku byl odebrán 1 ml bakteriální suspenze a vylit na agar. Po úplném vstřebání suspenze a vyschnutí nadbytečné tekutiny byl vzorek umístěn do termostatu, předehřátého na 37 °C. Kultivace v tomto případě probíhala 16 až 20 hodin. Po kultivaci v termostatu bakterie dosáhly saturační fáze svého životního cyklu a bylo možné tedy použít pro experiment.

Pomocí kličky, jejíž sterilita byla dosažena zahřátím v plameni do červeného žáru a následným ochlazením byly bakterie sejmuty z povrchu agaru a rozsuspendovány v 10 ml sterilního fyziologického roztoku. Vzniklý roztok obsahoval počáteční koncentraci pro aktuální měření (řádově 10^8 bakterií). Odhad koncentrace buněk v konkrétním zásobním roztoku pro aktuální měření byl zjištěn za pomoci dozimetru McFarland typu DEN-1, který je určen pro měření zákalu v rozsahu 0,3 až 12,0 MFU ($0,3 \times 10^7$ – 12×10^7 CFU/ml) s přesností 0,1 MFU. MFU, McFarlandova jednotka je jednotka zákalu suspenzí.

Provedené ředění řadou 1:10, tedy do zkumavky s 9 ml fyziologického roztoku byl přidán 1 ml bakteriální suspenze. Postupným ředěním bylo dosaženo koncentrace 10 kolonií formujících jednotek (CFU) na 1 ml.

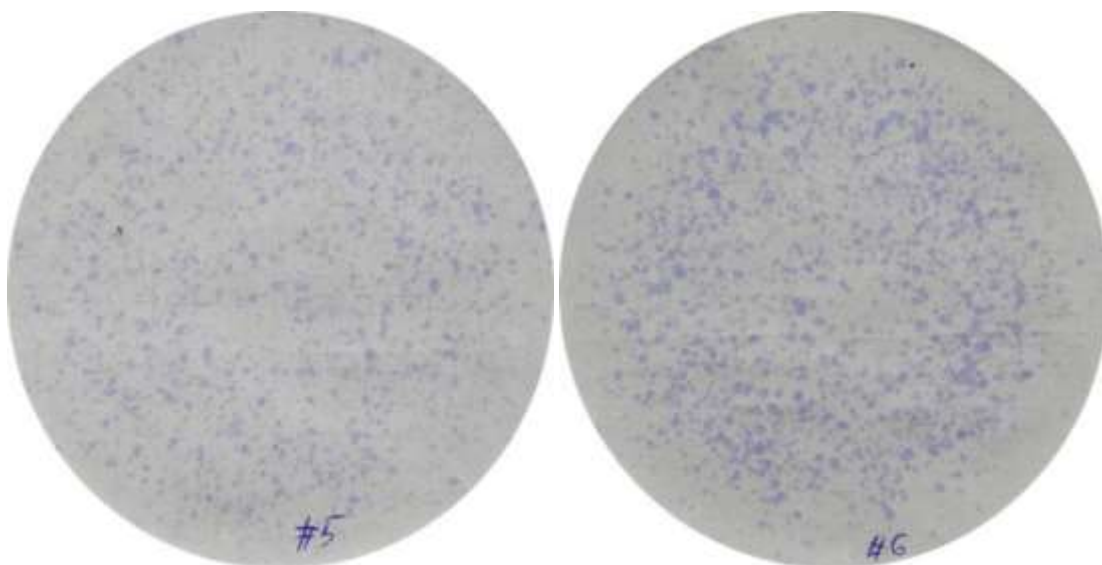
Pro přesnější měření koncentrace tří nejvíce rozředěných suspenzí, s předpokládanou koncentrací bakterií 1, 10 a 100 CFU/ml, byly použity ke kultivaci. Na Petriho misku s agarem byl pipetou aplikován 1 ml bakteriální suspenze. Poté byl roztok rozprostřen po kultivačním médiu umístěného v Petriho misce tak, aby bylo docíleno celkového pokrytí povrchu agaru.

Takto připravené vzorky byly umístěny do laminárního boxu a ponechány do úplného zaschnutí.

K ošetření plazmatem byly použity obdobně připravené vzorky s tím, že byla použita jiná koncentrace bakterií (vždy maximální možná v rámci aktuálního experimentu).

4.3 Ošetření plazmatem

Aby mohlo být docíleno maximální možné homogenity rozprášení roztoku, byla uskutečněna měření s přidáním 20 μl kapky krystalové violeti pro obarvení daného roztoku. Při měření s obarvenou tekutinou byl použit bílý filtrační papír. Velikost dopadajících kapek záleží na hloubce zasunutí přívodové kapiláry do duté anody (optimálně 2 mm od konce), mezielektrodové vzdálenosti (optimálně 6 mm) a také na vodivosti roztoku.



Obrázek 4.3: . Rozprášení 5% Tweenu v mezielektrodové vzdálenosti 6 mm (vlevo) a 5% Tweenu v mezielektrodové vzdálenosti 7 mm (vpravo). Rozprašování bylo provedeno při 12 kV, 200 μA .

Pro maximální inaktivaci mikroorganismů bylo dále nutné provedení nalezení vhodné koncentrace silic v daném roztoku, množství roztoku a optimální doba ošetření.

4.3.1 Parametry měření

Pro optimální výsledky byly všechny parametry, jako je např. proud, napětí, mezielektrodová vzdálenost atd., zafixovány na konkrétní hodnoty, viz tab. 4.1. Při takto nastavených parametrech bylo nejvhodnější množství roztoku v poměru 194 μl 5% Tweenu 80 ve vodě s 6 μl oreganové silice, tedy celkem 200 μl . Takovéto množství roztoku bylo rozprášeno na velkou Petriho misku (průměr 9 cm) s rychlostí rotace 6 otáček za minutu. Doba ošetření při průtoku 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ byla 4 minuty.

Parametry	Hodnoty	Jednotky
U	11 – 13	kV
I	200 – 300	μA
d	6	Mm
r	9	Mm
z	2	Mm
Q	50	$\mu\text{l}/\text{min}$
t	4	min







Tabulka 4.1: Hodnoty nastavených parametrů. Kde d značí mezielektrodovou vzdálenost, r průměr průřezu ploché elektrody a z je zasunutí kapiláry dovnitř duté elektrody.

4.4 Výsledky měření

Inaktivace mikroorganismů byla uskutečněna rozprášením definovaného množství pomocí netermálního plazmatu, generovaného stejnosměrným výbojem, byla uskutečněna za přítomnosti 5% vodného roztoku Tweenu 80, oregánové silice vody.

4.4.1 Zjištění optimálního množství roztoku Tweenu 80 a silice oregano pro inaktivaci maximální ošetřované plochy

Byly zafixovány hodnoty testovací aparatury (proud, napětí, mezielektrodová vzdálenost, průměr průřezu ploché elektrody a hloubka zasunutí kapiláry do duté elektrody) na konkrétní hodnoty a množství oregánové silice (6 μl). Za těchto podmínek bylo zkoumáno optimální množství roztoku, ve kterém jsou silice rozpouštěny. Výsledným zjištěním bylo, že nejvhodnějším poměrem je 194 μl 5% Tweenu 80 ve vodě s 6 μl silice, tedy celkem 200 μl vodného roztoku. Takovéto množství roztoku je rozprášeno na velkou Petriho misku (průměr 9 cm) s rychlostí rotace 6 otáček za minutu a je tak dosaženo maximálního ošetření plochy. Celková doba ošetření byla stanovena na optimální čas 4 minut.

		
<i>Escherichia coli</i> 6 µl silic + 94 µl 5% Tweenu Doba rozprášení 2 min Počet bakterií na plotně 10 ⁸	<i>Escherichia coli</i> 6 µl silic + 144 µl 5% Tweenu Doba rozprášení 3 min Počet bakterií na plotně 10 ⁸	<i>Escherichia coli</i> 6 µl silic + 194 µl 5% Tweenu Doba rozprášení 4 min Počet bakterií na plotně 10 ⁸
		
<i>Escherichia coli</i> 100 µl 5% Tweenu Doba rozprášení 2 min Počet bakterií na plotně 10 ⁸	<i>Escherichia coli</i> 150 µl 5% Tweenu Doba rozprášení 3 min Počet bakterií na plotně 10 ⁸	<i>Escherichia coli</i> 200 µl 5% Tweenu Doba rozprášení 4 min Počet bakterií na plotně 10 ⁸



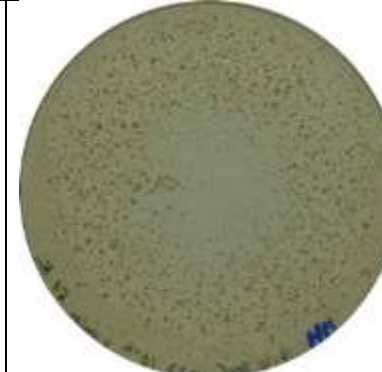


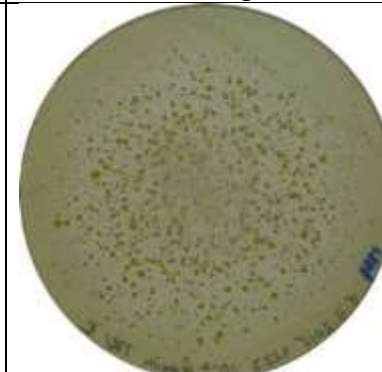



Tabulka 4.2: Bakterie *Escherichia coli* kultivovaná na MH agaru.

4.4.2 Inaktivace *Staphylococcus aureus* pomocí 5% roztoku Tweenu 80 a oregánové silice

Inaktivace bakterie *Staphylococca aurea*, kultivované na MH agaru, byla prováděna jak za pomoci samostatného roztoku 5% Tweenu, tak 5% roztoku Tween 80 a oregánové silice. Příslušné velikosti ošetřené plochy jsou uvedeny v tabulce 4.3. Získané vzorky jsou uvedeny v tabulce 4.4.

		Koncentrace bakterií [CFU/ml]				
		10^7	10^6	10^5	10^4	10^3
5% Tween 80	Ošetřená plocha [cm²]	39,2	47,7	50,4	54,7	56,2
	Ošetřená plocha [%]	62,6	75,0	79,2	86,0	88,3
Silice + 5% Tween 80	Ošetřená plocha [cm²]	43,3	39,0	47,2	51,3	
	Ošetřená plocha [%]	68,1	61,3	74,2	80,7	

Tabulka 4.3: Velikosti ošetřené plochy pro konkrétní koncentrace. Při ošetření 5% Tweenem 80 bylo pro koncentraci 10^4 spočteno 525 bakterií (pokles o dva řády), v případě ošetření 5% Tweenem 80 s oregánovými silicemi pro koncentraci 10^4 bylo spočteno 21 bakterií (pokles o 3 řády).

		
<i>Staphylococcus aureus</i> 6 μ l silic + 194 μ l 5% Tweenu Doba rozprášení 4 min Počet bakterií na plotně 10^7	<i>Staphylococcus aureus</i> 6 μ l silic + 194 μ l 5% Tweenu Doba rozprášení 4 min Počet bakterií na plotně 10^6	<i>Staphylococcus aureus</i> 6 μ l silic + 194 μ l 5% Tweenu Doba rozprášení 4 min Počet bakterií na plotně 10^5
		
<i>Staphylococcus aureus</i> 200 μ l 5% Tweenu Doba rozprášení 4 min Počet bakterií na plotně 10^7	<i>Staphylococcus aureus</i> 200 μ l 5% Tweenu Doba rozprášení 4 min Počet bakterií na plotně 10^6	<i>Staphylococcus aureus</i> 200 μ l 5% Tweenu Doba rozprášení 4 min Počet bakterií na plotně 10^5
		
<i>Staphylococcus aureus</i> Kontrolní měření Počet bakterií na plotně 10^0	<i>Staphylococcus aureus</i> Kontrolní měření Počet bakterií na plotně 10^1	<i>Staphylococcus aureus</i> Kontrolní měření Počet bakterií na plotně 10^2

Tabulka 4.4: Bakterie *Staphylococcus aureus* kultivovaná na MH agaru.

4.4.3 Inaktivace *Deinococcus radiodurans* pomocí 5% roztoku Tweenu 80 a oregánové silice

Inaktivace bakterie *Deinococcus radiodurans*, kultivované na MH agaru, byla prováděna jak pomocí samostatného roztoku 5% Tweenu, tak 5% roztoku Tween 80 a silice oregano. Příslušné velikosti ošetřené plochy jsou uvedeny v tabulce 4.5. Získané vzorky jsou uvedeny v tabulce 4.6.

		Koncentrace bakterií [CFU/ml]		
		10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵
5% Tween 80	Ošetřená plocha [cm²]	26,4	34,0	48,7
	Ošetřená plocha [%]	41,4	53,5	76,6
Silice + 5% Tween 80	Ošetřená plocha [cm²]	42,8	47,2	54,3
	Ošetřená plocha [%]	67,2	74,2	85,4

Tabulka 4.5: Velikosti ošetřené plochy pro konkrétní koncentrace. Pokles cca 4 řády.

		
<i>Deinococcus radiodurans</i> 6 µl silic + 194 µl 5% Tweenu Doba rozprášení 4 min Počet bakterií na plotně 10 ⁷	<i>Deinococcus radiodurans</i> 6 µl silic + 194 µl 5% Tweenu Doba rozprášení 4 min Počet bakterií na plotně 10 ⁶	<i>Deinococcus radiodurans</i> 6 µl silic + 194 µl 5% Tweenu Doba rozprášení 4 min Počet bakterií na plotně 10 ⁵
		
<i>Deinococcus radiodurans</i> 200 µl 5% Tweenu Doba rozprášení 4 min Počet bakterií na plotně 10 ⁷	<i>Deinococcus radiodurans</i> 200 µl 5% Tweenu Doba rozprášení 4 min Počet bakterií na plotně 10 ⁶	<i>Deinococcus radiodurans</i> 200 µl 5% Tweenu Doba rozprášení 4 min Počet bakterií na plotně 10 ⁵
		
<i>Deinococcus radiodurans</i> Kontrolní měření Počet bakterií na plotně 10 ⁰	<i>Deinococcus radiodurans</i> Kontrolní měření Počet bakterií na plotně 10 ¹	<i>Deinococcus radiodurans</i> Kontrolní měření Počet bakterií na plotně 10 ²

Tabulka 4.6: Bakterie *Deinococcus radiodurans* kultivovaná na MH agaru.

4.4.4 Inaktivace *Escherichii coli* pomocí 5% roztoku Tweenu 80 a silice oregano

Inaktivace bakterie *Escherichii coli*, kultivované na MH agaru, byla prováděna jak pomocí samostatného roztoku 5% Tweenu, tak 5% roztoku Tween 80 a oregánové silice. Příslušné velikosti ošetřené plochy jsou uvedeny v tabulce 4.7. Získané vzorky jsou uvedeny v tabulce 4.8.

		Koncentrace						
		bakterií	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3
		[CFU/ml]						
5% Tween 80	Ošetřená plocha [cm²]	17,1	19,9	28,4	30,0	31,4	34,18	
	Ošetřená plocha [%]	26,9	31,3	44,6	47,1	49,3	53,7	
Silice + 5% Tween 80	Ošetřená plocha [cm²]	22,5	30,7	32,0	37,0	48,3	61,9	
	Ošetřená plocha [%]	35,4	48,3	50,4	58,1	75,9	97,3	

Tabulka 4.7: Velikosti ošetřené plochy pro konkrétní koncentrace. Tween 10^5 obsahuje 222 bakterií, Silice 10^5 obsahuje 48 bakterií.

<i>Escherichia coli</i> 6 µl silic + 194 µl 5% Tweenu Doba rozprášení 4 min Počet bakterií na plotně 10 ⁸	<i>Escherichia coli</i> 6 µl silic + 194 µl 5% Tweenu Doba rozprášení 4 min Počet bakterií na plotně 10 ⁷	<i>Escherichia coli</i> 6 µl silic + 194 µl 5% Tweenu Doba rozprášení 4 min Počet bakterií na plotně 10 ⁶
<i>Escherichia coli</i> 200 µl 5% Tweenu Doba rozprášení 4 min Počet bakterií na plotně 10 ⁸	<i>Escherichia coli</i> 200 µl 5% Tweenu Doba rozprášení 4 min Počet bakterií na plotně 10 ⁷	<i>Escherichia coli</i> 200 µl 5% Tweenu Doba rozprášení 4 min Počet bakterií na plotně 10 ⁶
<i>Escherichia coli</i> Kontrolní měření Počet bakterií na plotně 10 ⁰	<i>Escherichia coli</i> Kontrolní měření Počet bakterií na plotně 10 ¹	<i>Escherichia coli</i> Kontrolní měření Počet bakterií na plotně 10 ²

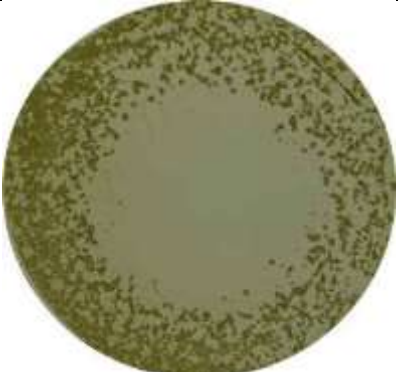
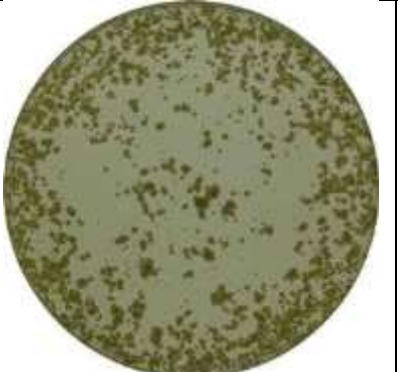




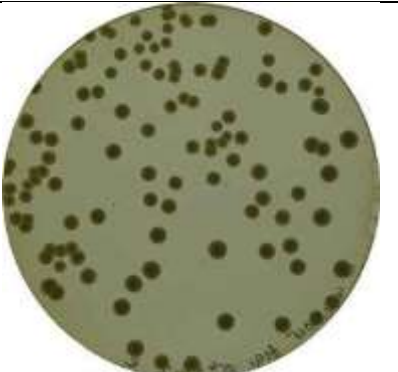

Tabulka 4.8: Bakterie *Escherichia coli* kultivovaná na MH agaru.

4.4.5 Inaktivace *Saccharomycei cerevisiae* pomocí 5% roztoku Tweenu 80 a silice oregano

Inaktivace kvasinky *Saccharomycei cerevisiae*, kultivované na S agaru, byla prováděna jak pomocí samostatného roztoku 5% Tweenu, tak 5% roztoku Tween 80 a silice oregano. Příslušné velikosti ošetřené plochy jsou uvedeny v tabulce 4.9. Získané vzorky jsou uvedeny v tabulce 4.10.

		Koncentrace bakterií [CFU/ml]		
		10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵
5% Tween 80	Ošetřená plocha [cm ²]	14,5	18,7	29,1
	Ošetřená plocha [%]	22,8	29,4	45,8
Silice + 5% Tween 80	Ošetřená plocha [cm ²]	23,1	35,5	39,0
	Ošetřená plocha [%]	36,2	55,8	61,2

Tabulka 4.9: Velikosti ošetřené plochy pro konkrétní koncentrace. Silice pro 10⁵ obsahuje 72 bakterií.

		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 6 μ l silic + 194 μ l 5% Tweenu Doba rozprášení 4 min Počet bakterií na plotně 10^6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 6 μ l silic + 194 μ l 5% Tweenu Doba rozprášení 4 min Počet bakterií na plotně 10^5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 6 μ l silic + 194 μ l 5% Tweenu Doba rozprášení 4 min Počet bakterií na plotně 10^4
		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 200 μ l 5% Tweenu Doba rozprášení 4 min Počet bakterií na plotně 10^6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 200 μ l 5% Tweenu Doba rozprášení 4 min Počet bakterií na plotně 10^5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 200 μ l 5% Tweenu Doba rozprášení 4 min Počet bakterií na plotně 10^4
		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Kontrolní měření Počet bakterií na plotně 10^0	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Kontrolní měření Počet bakterií na plotně 10^1	

Tabulka 4.10: *Saccharomyces cerevisiae* kultivovaná na S agaru.

5 Závěr

Cílem práce bylo zajistit maximálně účinnou dekontaminaci povrchu v minimálním možném čase. Pro tento účel bylo k dispozici netermální plazma a velmi malé množství silic, které mohou zatěžovat životní prostředí. Přičemž je známo, že silice se používají v potravinářském průmyslu běžně, ale jejich použití je časově velice náročné.

Elektrodotový systém byl navržen tak, aby se s jeho pomocí podařilo snížit potřebnou dobu ošetření ze 24 hodin na pouhé 4 minuty. Rovněž se podařilo zajistit synergii působení produktů výboje, které mají nezanedbatelný cidní účinek, stejně jako silice oregano.

Pro optimální výsledky tak byly všechny parametry, jako je např. proud, napětí, mezielektrodotová vzdálenost atd., zafixovány na konkrétní hodnoty (tab. 4.1) s nejhodnějším množstvím roztoku v poměru 194 μl 5% Tweenu 80 ve vodě s 6 μl silic oregano, tedy celkem 200 μl . Na vcelku velké ploše povrchu kultivačního média bylo tedy možné docílit rychlé inaktivace bakterií při použití malého množství silic.

Dále byl zkoumán vliv netermálního plazmatu, za pomoci oregánové silice, na bakteriích (*Staphylococcus aureus*, *Deinococcus radiodurans*, *Echerichia coli*) a kvasince (*Saccharomyces cerevisiae*), které byly umístěny na kultivačním médiu.

Pro inaktivaci povrchu kultivačního média pomocí 5% roztoku Tweenu 80 a oregánové silice byly použity různé koncentrace. Při vysokých koncentracích pro ošetření povrchu za pomoci samotného 5% Tweenu 80 nebyl patrný žádný či zanedbatelný vliv na bakterie. U koncentrací nižších byla patrná nenulová inaktivace bakterií i za pomoci samotného 5% Tweenu 80. Z čehož lze soudit, že roztok nosného média po aktivaci plazmatem získává některé cidní účinky, zároveň samotné nepřímé působení plazmatu má malý, ale nezanedbatelný vliv na bakterie a kvasinky. Tyto účinky lze přisoudit reaktivním částicím (ozón, singletový kyslík, hydroxidové skupiny apod.).

Zároveň však inaktivace bakterií záleží na množství silic rozsuspendovaných v nosném roztoku. Poměr 194 μl 5% Tweenu 80 ve vodě s 6 μl silic oregano byl v tomto případě nejlepší. Důvodem je pravděpodobně delší doba rozprašování, tedy delší doba působení plazmatu na povrch a větší množství nosné tekutiny, čímž je docíleno lepšího pokrytí kontaminovaného povrchu. Výsledky po ošetření silicemi v roztoku 5% Tweenu 80 ukazují velmi dobrou inaktivaci bakterií, kdy dochází ke snížení koncentrace bakterií na povrchu

až o 4 řády (v případě *S. cerevisiae*) a až o 8 řádů (v případě *E. coli* a *S aurea*). K úspěšné dekontaminaci bakterií napomohla uzavřená atmosféra, kdy docházelo ke kumulaci produktů výboje (ozón, ROS, RNS atd.) v okolí kultivačního média, a tak mohlo dojít k poškození bakterie a zrychlení její inaktivaci.

Závěrem lze konstatovat skutečnost, že díky vynikajícím výsledkům měření, silice mají prokazatelně významný vliv při inaktivaci bakterií a kvasinek. Ve výsledku byla zajištěna inaktivace až 8 řádů 4 různých mikroorganismů, které byly zvolené tak, aby reprezentovaly grampozitivní a gramnegativní bakterie i eukaryotické buňky.

6 Reference

- [1] *Mueller-Hinton agar (MH)* [online]. BioVendor: Laboratorní medicína. [cit. 8. 4. 2016]. Dostupné z: <https://www.biovendor.cz/kultivacni-pudy/c-178/?pf%5B%5D=1249&page=3>
- [2] Chen, F. F. *Úvod do fyziky plazmatu*. ACADEMIA 1984, 3. vydání.
- [3] Šebek, O. *Využití emisní sondy pro diagnostiku plazmatu*. Praha: ČVUT 2008. Bakalářská práce, ČVUT, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, Katedra fyziky.
- [4] Hipper, R. et al. *Low temperature plasma physics: fundamental aspects and applications*. 1. vydání. Wiley-VCH, 2001. ISBN 35-272-8887-2
- [5] Laroussi M., Leipold F. *Evaluation of the role of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure*. International Journal of Mass Spectrometry. 2004. s. 81–86.
- [6] Stoffels E. *Gas plasmas in biology and medicine*. Journal of Physics D: Applied Physics. 2006. s. 39.
- [7] Dobrynin D., Friedman G., Fridman A., Starikovskiy A. *Inactivation of bacteria using DC corona discharge: role of ions and humidity*. New J. Phys., 13, 2011
- [8] Martišovits, V. *Základy fyziky plazmy*. 1. vydání. Bratislava: Univerzita Komenského Bratislava, 2006. 192 s. ISBN 80-223-1983-X
- [9] Karelík J., Slavík J.B., Tobiáš J. *Elektrické výboje*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1964.
- [10] Piel, A. *Plasma Physics: An Introduction to Laboratory, Space, and Fusion Plasmas*. Springer 2010. ISBN 978-3-642-10490-9.
- [11] Ohring, M: *Materials Science of Thin Films*. 2. vydání. London: Academic Press, 2001. ISBN 00-804-9178-2
- [12] Roth, J. R. *Industrial Plasma Engineering: Volume 1 - Applications to Nonthermal Plasma Processing*. CRC Press, 2001. ISBN 07-503-0545-2
- [13] Mei, F. *Dual Capillary Electrospraying - fundamentals and Applications*. Washington University in St. Louis. ProQuest, 2008. ISBN 05-498-3915-1.

- [14] Moravcová, J. *Biologicky aktivní přírodní látky*. [přednáška]. Praha: VŠCHT, 2006, s. 11-78.
- [15] Opletal, L. Šimerda, B. *Antiinvazivní látky přírodního původu jako aditiva do krmiv*. Ministerstvo zemědělství ČR – Vědecký výbor pro výživu zvířat. Výzkumný ústav pro výživu zvířat Praha - Uhřetěves. Hradec Králové, Šumperk, 2005. s. 27-39.
- [16] Kalemba, D., Kunicka, A. *Antibacterial and antifungal properties of essential oils*. *Curr. Med. Chem.*, 2003. Č. 10, s. 813-29.
- [17] Pacák, J. *Úvod do organické chemie*. 1. vydání. Praha: SNTL, 1982. ISBN-13: 978-80-246-1837-1
- [18] Baser, K. H. C., Demirci, F. *Chemistry of Essential Oils*. Berger, Ralf Gütner: Flavours and fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability 2007. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. s. 42-64, ISBN 978-3-540-49338-9.
- [19] Český lékopis, Grada Publishing, 1997, 3. díl, s. 2677-2853
- [20] Červinka O. *Chemie organických sloučenin II. díl*. 1. vydání. Praha: SNTL, 1987. 1056 s. ISBN 80-85427-03-6
- [21] Harmotha J. *Chemie a biochemie přírodních látek*. 2. vydání. Praha: Akademie věd České republiky, 2003. ISBN 80-86241-17-3, 295 s.
- [22] Kim D. O., Lee, C. I. *Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship*. *Crit Rev Food Sci Nutr*. United states: Tailor and Francis, 2004, 44 (4). ISSN 1549-7852
- [23] Sigma - Aldrich: A Part of Merck [picture]. Product Comparison Guide. [Online]. Dostupné z: <http://sigmaaldrich.com/>
- [24] Kácl K. *Organická chemie*. 1. vydání. Praha: SNTL, 1970, 1072 s.
- [25] Bartoděj Z. *Chemie v hygieně a toxikologii*. 2. vydání. Praha: Kradim, 1994. 872 s. ISBN 80-7319-003-6.
- [26] Lambert, R. J., Skandamis, P. N., Coote, P. J.; Nychas, G. J. *A study of minimal inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol*. *J. Appl. Microbiol.*, 2001. Č. 3, s. 453-62.

- [27] *Limonene Oxide* [online]. Chemicalland21. [cit. 10. 4. 2016]. Dostupné z: <http://chemicalland21.com/specialtychem/perchem/LIMONENE%20OXIDE.htm>
- [28] Wichterle, O. *Organická chemie*. 1. vydání. Praha: Academia, 1969, 892 s. ISBN 80-7080-561-7.
- [29] Lincová, D., Farghali, H. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 1. vydání. Praha: Galen, 2005, 600 s. ISBN 80-7262-168-8.
- [30] *Polysorbate 80*. In: Wikipedie: otevřená encyklopedie [online]. Wikipedia Foundation, 2014. Stránka naposledy edit. 11. 2. 2016 v 9:36. [vid. 15. 5. 2016]. Anglická verze. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Polysorbate_80
- [31] Kudlová, E., Mydlilová, A. *Výživové poradenství u dětí do dvou let*. Praha: Grada Publishing a.s., 2005. ISBN 80-247-1039-0.
- [32] Junák, J. *Úvod do lékařské bakteriologie*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1270-4.
- [33] Alcamo, I.E. *Microbes and Society. An Introduction to Microbiology*. John and Bartlett Publishing, 2003. ISBN 07-637-1430-5.
- [34] Štindl, P. *Cytologie, věda o buňkách*. [přednáška]. Hradec Králové: VOŠZ a SZŠ, listopad 2008. In: videotéka VOŠZ a SZŠ [online]. [vid. 8. 4. 2016]. Dostupné z: <http://www.zshk.cz/>
- [35] Schindler, J. *Mikrobiologie: Pro studenty zdravotnických oborů*. 2., doplněné a přepracované vydání, Praha: Grada Publishing a.s., 2014. ISBN 80-247-9275-3.
- [36] Makarova, K. S., Aravind L., et al. *Genome of the extremely radiation-resistant bacterium Deinococcus radiodurans viewed from the perspective of comparative genomics*. Microbiology and molecular biology reviews: MMBR 65 (1): 44–79, 2005.
- [37] Battista, J. R. *Against all odds: the survival strategies of Deinococcus radiodurans*. Annual review of microbiology 51: 203–24, 1997.
- [38] Stephen. *Kde tedy všichni jsou?*. 1. vydání. Svazek 21. Praha: Fénix, 2007. 352 s. ISBN 80-7185-877-5.
- [39] Slade D., Radman M. *Oxidative stress resistance in Deinococcus radiodurans*. Microbiol Mol Biol, Rev 75(1): 133-91, 2011.

- [40] Lederberg, J. *Sex compatibility in Escherichia coli*. Genetics, 1952, Rev 37(6): 720–730.
- [41] Osumi M. *The ultrastructure of yeast: Cell wall structure and formation*. Micron, 1998, p. 207–233.
- [42] Schaechter, M., Lederberg, J. *The desk encyclopedia of microbiology*. Elsevier Academic Press, 2004. ISBN 0-12-621361-5.
- [43] Legras, J. L., Merdinoglu, D., Cornuet, J. M. et al. *Bread, beer and wine: Saccharomyces cerevisiae diversity reflects human history*. Mol Ecol. May 2007, roč. 16, čís. 10, s. 2091-102.
- [44] Xiao, W. *Yeast Protocol*. Springer Science & Business Media, 2006. ISBN 15-925-9958-3