



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# STUDIUM VLIVU PLAZMATEM AKTIVOVANÉ VODY NA PŮDNÍ MIKROORGANISMUSY

STUDY OF PLASMA ACTIVATED WATER INFLUENCE ON SOIL MICROORGANISMS

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Tereza Lungová

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. František Krčma, Ph.D.

BRNO 2021

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1651/2020 Akademický rok: 2020/21  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Tereza Lungová**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **prof. RNDr. František Krčma, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Studium vlivu plazmatem aktivované vody na půdní mikroorganismy

### Zadání bakalářské práce:

Cílem práce je studium vlivu aplikace plazmatem aktivované vody na vybrané půdní mikroorganismy.

Dílčí úkoly práce jsou následující:

1. Seznamte se s vlastnostmi půd s důrazem na půdní mikroorganismy
2. Seznamte se s metodami přípravy plazmatem aktivované vody
3. Aplikujte plazmatem aktivovanou vodu na vybrané půdní mikroorganismy
4. Aplikujte plazmatem aktivovanou vodu na vybrané půdní vzorky
5. Sledujte vliv aplikace plazmatem aktivované vody na životaschopnost půdních mikroorganismů a složení půdních mikroorganismů

### Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

---

Tereza Lungová  
student(ka)

---

prof. RNDr. František Krčma, Ph.D.  
vedoucí práce

---

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

---

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Bakalářská práce se zabývá účinky plazmatem aktivované vody na mikroorganismy nacházející se ve vzorku hnědozemě. Teoretická část je rozdělena do dvou částí. První část se zaměřuje na rozbor půdy a mikroorganismů v ní žijících. Druhá část se zabývá obecnými vlastnostmi plazmatu a vznikem plazmatem aktivované vody. V experimentální části této práce byla plazmatem aktivovaná voda aplikována na výluh půdních mikroorganismů a současně přímo na vybraný vzorek půdy v různých koncentracích. Následně byl pozorován vliv na životaschopnost půdních mikroorganismů. Na základě výsledků z praktické části bylo zjištěno, že plazmatem aktivovaná voda nemá na půdní mikroorganismy výrazně pozitivní ani negativní vliv. Z tohoto důvodu bude nutné se při dalším výzkumu zaměřit na konkrétní typy mikroorganismů.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

plazma, plazmatem aktivovaná voda, půdní mikroorganismy, reaktivní formy kyslíku a dusíku, radikály, oxidačně-redukční potenciál, dielektrický bariérový výboj

## **ABSTRACT**

The bachelor thesis deals with the effects of plasma activated water on microorganisms found in the brown earth sample. The theoretical part is divided into two parts. The first part focuses on the analysis of soil and microorganisms living in it. The second part deals with the general properties of plasma and the formation of plasma-activated water. In the experimental part of this work, plasma-activated water was applied to the leachate of soil microorganisms and also directly to a selected soil sample in various concentrations. Subsequently the effect on the viability of soil microorganisms and the composition of soil microorganisms was observed. Based on the results from the practical part, it was found that plasma-activated water has no significant positive or negative effect on soil microorganisms. For this reason, it will be necessary to focus on specific types of microorganisms in further research.

## **KEYWORDS**

plasma, plasma activated water, soil microorganisms, reactive forms of oxygen and nitrogen, radicals, oxidation-reduction potential, dielectric barrier discharge

LUNGOVÁ, Tereza. *Studium vlivu plazmatem aktivované vody na půdní mikroorganismy*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131377>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce František Krčma.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

Podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu prof. RNDr. Františkovi Krčmovi, PhD. za odborné vedení, užitečné rady a tipy na zdroje. Dále mu děkuji za pohotové odpovědi, trpělivost, a hlavně za celkový zájem o kvalitu mé práce.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	8
2.1	Půda.....	8
2.1.1	Rozdělení půdního systému .....	8
2.1.2	Funkce půdy .....	9
2.2	Mikroorganismy .....	10
2.2.1	Prokaryotická buňka .....	10
2.2.2	Eukaryotická buňka .....	11
2.3	Půdní edafon.....	11
2.3.1	Půdní mikroorganismy .....	12
2.4	Plazma.....	14
2.4.1	Vlastnosti plazmatu.....	15
2.4.2	Základní parametry plazmatu.....	15
2.5	Plazmatem aktivovaná voda (PAW).....	17
2.5.1	Fyzikálně-chemické vlastnosti PAW.....	18
2.5.2	Dielektrický bariérový výboj.....	19
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	20
3.1	Příprava PAW.....	20
3.2	Příprava živného média.....	21
3.3	Příprava roztoků varianty č. 1 .....	21
3.4	Příprava roztoků varianty č. 2 .....	22
3.5	Desítkové ředění a očkování na živné médium .....	22
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	24
5	ZÁVĚR .....	32
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	34
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	37

# 1 ÚVOD

Předmětem této práce je studium vlivu plazmatem aktivované vody na půdní mikroorganismy. Společenstva mikroorganismů, zejména bakterií a hub, jsou zodpovědná za řadu biochemických procesů, které probíhají v půdě. Podílejí se například na rozkladu mrtvé organické hmoty a ovlivňují přeměnu organických látek a tím dostupnost živin v prostředí. Hlavním cílem teoretické části této bakalářské práce je seznámit se s vlastnostmi půd s důrazem na půdní mikroorganismy a dále přiblížit pojem plazma a s ním související pojem plazmatem aktivovaná voda, pro kterou se v literatuře využívá také zkratka PAW z anglického Plasma Activated Water.

V poslední době se do popředí dostávají nové environmentálně šetrné postupy v zemědělství. Jednou z cest je i aplikace plazmatem aktivované vody ať už na listy rostlin nebo přímo na půdu. Synergický účinek PAW například jako ekologicky šetrného hnojiva nebo také sterilizačního média se jeví jako velmi slibný pro jeho použití v zemědělství. Avšak obecným problémem využívání v zemědělství jsou zcela chybějící informace o vlivu plazmatem aktivované vody právě na půdní mikroorganismy, bez nichž by byla půda pouze mrtvým substrátem. Jelikož vždy alespoň část aplikované PAW skončí v půdě, je třeba tento vliv ověřit, aby při případném masovém využití PAW nedošlo k devastaci půdy. Na toto téma byl doposud proveden pouze výzkum vlivu PAW na fyzikálně-chemické vlastnosti půdy [1] a ten byl použit jako teoretický základ pro tuto bakalářskou práci, která se tedy jako první zabývá problematikou chybějících informací o vlivu PAW na půdu a mikroorganismy v ní žijící.

V experimentální části této práce je plazmatem aktivovaná voda generována pomocí dielektrického bariérového výboje (DBD) za atmosférického tlaku s pomocí vysokofrekvenčního generátoru LIFETECH. Dielektrický bariérový výboj je elektrický výboj mezi dvěma elektrodami oddělenými izolační dielektrickou bariérou. Aktivace probíhá v tomto případě s destilovanou vodou za současné tvorby reaktivních částic. Takto generovaná PAW je poté následně aplikována na výluh půdních mikroorganismů i přímo na vybraný vzorek půdy a je sledován vliv na životaschopnost půdních mikroorganismů a složení půdních mikroorganismů.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

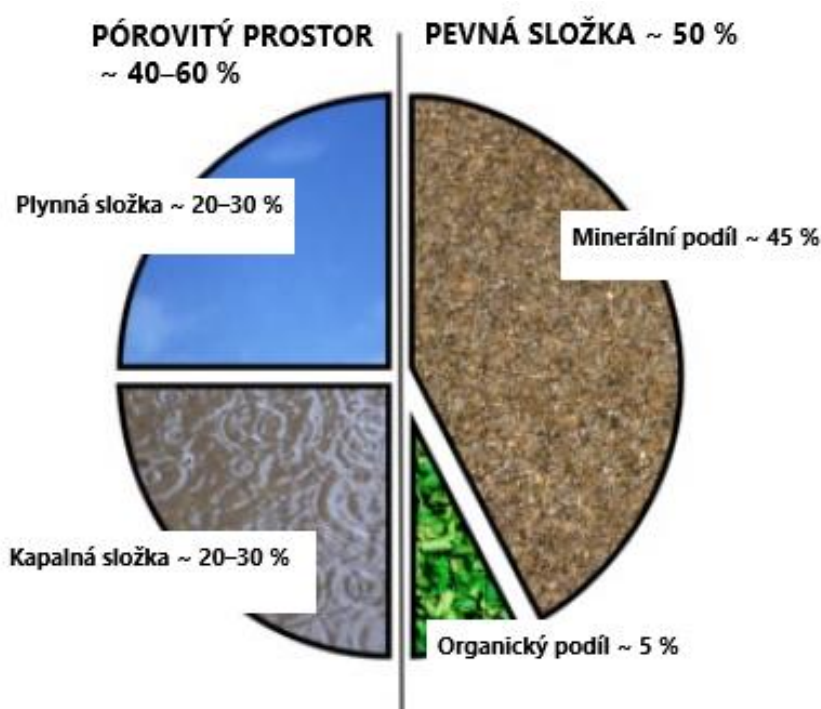
### 2.1 Půda

Půdu lze definovat mnoha způsoby. Obecně se jedná o složitý systém, který je nezbytný pro existenci života na naší planetě a který je významně ovlivněn lidskou činností. Vyznačuje se schopností autoregulace. Půda vzniká složitým, dlouhotrvajícím procesem, a proto ji lze vnímat jako neobnovitelný zdroj. Skládá se z neživých a živých souborů. V půdě lze nalézt přibližně 90 % druhů mikroorganismů, které jsou nepostradatelné, jelikož mají mnoho úloh, například mineralizaci organické hmoty, biosyntézy, zvětrávání minerálů, podporu tvorby stabilní půdní struktury apod [2].

Půda, jako svrchní část zemské kůry, představuje průnik mezi několika geosférami (litosférou, atmosférou, biosférou a hydrosférou) a vytváří vlastní geosféru, označovanou jako pedosféra, což je půdní obal Země na povrchu litosféry [2].

#### 2.1.1 Rozdělení půdního systému

Půda je tvořena čtyřmi půdními složkami. Jedná se o pevnou minerální složku, pevnou organickou složku, kapalnou složku a plynnou složku. Každá z půdních složek má zcela specifický význam pro produkční a mimoprodukční funkce půdy. Zastoupení jednotlivých půdních složek v hmotnostních procentech je uvedeno na obrázku (viz *Obrázek 1*) [2].



Obrázek 1: Znárodnění zastoupení jednotlivých půdních složek [3]



Minerální podíl pevné složky půdy je tvořen především minerálními částicemi, tedy různými anorganickými sloučeninami a částicemi různé velikosti, od velkých úlomků hornin a balvanů až po koloidní částice. Podle velikosti jsou půdní částice tříděny na písek, prach a jíl.

Písek má částice o velikosti 0,05 - 2 mm, které jsou často tvořeny křemenem a úlomky křemičitanových hornin a živců. Benefitem písčité půdní složky je dobrá propustnost vody, nicméně voda se v půdě dlouho neudrží. Při vysokém obsahu písku jsou půdy dobře propustné a provzdušněné, avšak za sucha dochází k rychlému vysychání. Prachové částice mají rozsah velikostí 0,002 - 0,05 mm a nacházejí se především v půdách vytvořených na spraších, což jsou úlomkovité usazené horniny naváté větrem. Prachové půdy zajišťují dobré fyzikální vlastnosti a optimální poměr mezi obsahem vody a vzduchu pro organismy a procesy v půdě. Jílovité částice nebývají větší než 0,002 mm. Jílovité půdy jsou méně propustné pro vodu a málo vzdušné na rozdíl od půd písčitých [4].

Organická hmota je tvořena rostlinnými a živočišnými zbytky a odumřelými buňkami mikroorganismů, které jsou v různém stádiu rozkladu a přeměny na nové látky. Pojmem humus je označována část organické hmoty v půdě, která prošla procesy přeměn zahrnující rozkladné i syntetické procesy. Humusové látky jsou potřebné k tvorbě agregátů minerálních částic, slouží jako zásobárna živin pro rostliny a mikroorganismy, jsou zdrojem energie a významně ovlivňují vodní režim půdy [4].

Kapalnou fází půdy představuje půdní voda, což je ve skutečnosti půdní vodní roztok různých minerálních a organických látek, jenž slouží k zabezpečení zásobování rostlin vodou a živinami a ovlivňuje i celou půdu. Celková koncentrace látek v půdním roztoku většinou nepřesahuje 1 %. Dalšími charakteristikami půdního roztoku jsou jeho pH a celkový obsah vody v půdě [4].

Plynnou fází půdy představuje půdní vzduch, jenž se nachází v půdních pórech, které nejsou zaplněny půdní vodou. Kromě celkového obsahu vzduchu v půdě je důležité jeho složení, jež se liší od složení nadzemního atmosférického vzduchu. Půdní vzduch může často dosáhnout až 100% relativní vlhkosti. Obsahuje více CO<sub>2</sub> a méně O<sub>2</sub> než nadzemní vzduch a také značná množství dalších plynů jako je methan, oxidy dusíku a síry, sirovodík aj. [4].

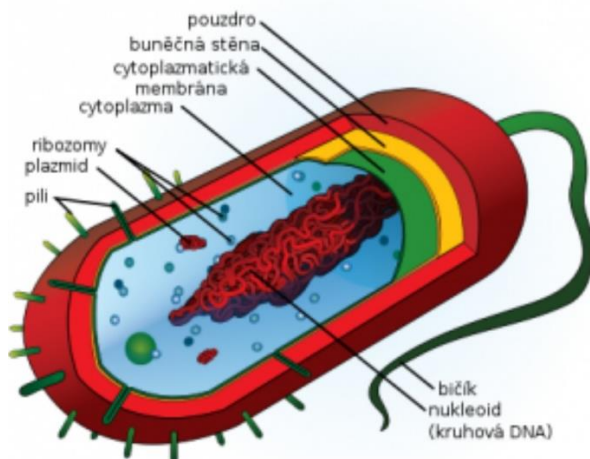
### **2.1.2 Funkce půdy**

Půda vykonává mnoho funkcí a jejich rozdělení je pouze informativní, jelikož v reálném prostředí se všechny funkce vzájemně prolínají. Obecně lze jmenovat 5 základních funkcí půdy, a to je vytváření životního prostoru pro organismy, retence a infiltrace vody spolu s pufrovací a transformační funkcí, plocha pro hospodářské a stavební využití, rozklad, syntéza látek a půdní úrodnost a životní prostředí pro růst rostlin [2].

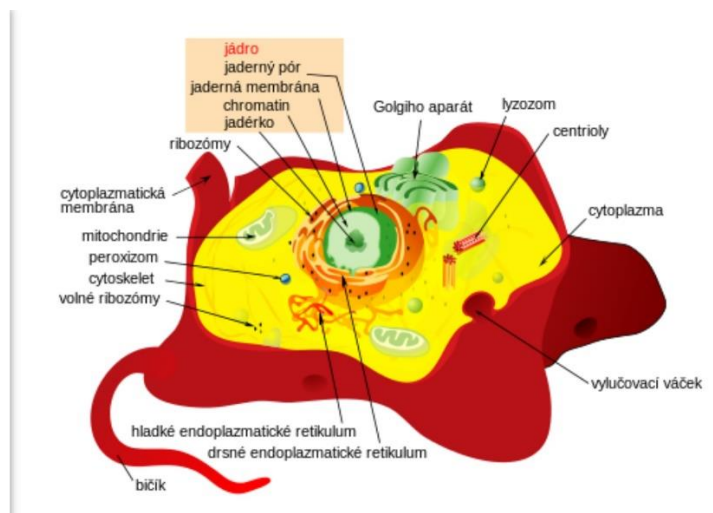
## 2.2 Mikroorganismy

Jako mikroorganismy jsou označovány jednobuněčné nebo vícebuněčné organismy, jež nejsou schopny tvořit funkčně diferenciované tkáně nebo pletiva. Mikroorganismy se vyznačují velmi malými rozměry těl, v řádech několika desetin  $\mu\text{m}$  až  $\text{mm}$ . Jsou nepostradatelnou součástí koloběhu živin a energie na této planetě, což je nutným předpokladem pro vývoj všech živých organismů. Autotrofní organismy syntetizují z jednoduchých anorganických složek ekosystému látky organické, které jsou nezbytným zdrojem živin a energie pro heterotrofní organismy včetně člověka. Po odumření podléhají těla všech organismů rozkladným procesům uskutečňovaným mikroorganismy, kdy dochází k opětovným přeměnám organických látek v látky minerální. Při tomto procesu nazývaném mineralizace, jsou z těl všech organismů uvolňovány jednoduché minerální látky, jež jsou dále opět využívány autotrofními organismy [5,6].

Po cytologické stránce se organismy dělí na prokaryota, jež nemají diferenciované buněčné jádro a eukaryota, což jsou organismy s pravým jádrem odděleným od cytoplazmy jaderným obalem. Rozdíly mezi nimi lze pozorovat na obrázcích číslo 2 a 3.



Obrázek 2: Stavba prokaryotické buňky [7]



Obrázek 3: Stavba živočišné eukaryotické buňky [8]

### 2.2.1 Prokaryotická buňka

U prokaryot jsou rozeznávány základní buněčné struktury, které jsou až na výjimky společné všem prokaryotickým buňkám. Především se jedná o buněčnou stěnu, cytoplazmatickou membránu, cytoplazmu, ribozomy a jadernou hmotu, tzv. nukleoid. Vyskytují se zde také doplňující struktury, jako jsou plazmidy, fimbrie, bičík, pouzdro, mesozomy či endospory. Prokaryota mají genom obsažen v makromolekule dvouřetězcové DNA. Mají nepravé jádro, tzv. nukleoid. Prokaryota zahrnují domény *Archaea* a *Bacteria* [6].

## 2.2.2 Eukaryotická buňka

Buňka eukaryotických organismů má oproti prokaryotické buňce vyšší stupeň vnitřní diferenciace a organizace. Kromě cytoplazmatické membrány má i další membrány tvořící základ většiny organel. Strukturním základem organel je tedy biomembrána. Na rozdíl od prokaryot nemají eukaryota v buněčné stěně peptidoglykan. Složitou strukturní organizaci eukaryotických mikroorganismů vytváří soubor specializovaných organel v cytoplazmě.

Mezi nejdůležitější organely patří cytoplazmatická membrána, jádro, endoplazmatické retikulum s ribozomy, mitochondrie, Golgiho aparát, lysozomy, chloroplasty a vakuoly. Do domény Eukarya je zahrnováno 5 říší organismů a to *Protozoa*, *Chromista*, *Fungi*, *Plantae* a *Animalia* [6].

## 2.3 Půdní edafon

Půdní organismy představují velmi malou část půdy, respektive půdní organické hmoty, ale jejich význam pro kvalitu a zdraví půdy je velký a díky jejich přítomnosti dochází k přeměně organických látek. Organismy žijící v půdě jsou souhrnně označovány jako edafon. Půdní edafon představuje rozsáhlý soubor organismů, který lze obecně rozdělit podle mnoha kritérií, především však podle trofických vztahů, podle místa výskytu a podle velikosti [9].

Organismy se na základě trofických vztahů dělí na autotrofy, saprofyty, fytofágy a zoofágy. Autotrofní organismy jsou organismy, které jsou schopné přeměňovat anorganický uhlík na organický. Patří sem chemoautotrofní organismy a organismy schopné fotosyntézy. Saprofytní organismy se živí odumřelou organickou hmotou a jsou to především mikroorganismy jako bakterie, aktinomycety a mikromycety. Mezi fytofágy se řadí hlavně zástupci hmyzu a hlístic a tyto organismy konzumují rostlinou biomasu. Organismy, které konzumují jiné živočichy se nazývají zoofágové a těmito typickými půdními predátory jsou zástupci dravého hmyzu [10].

Na základě místa výskytu se organismy rozdělují do třech kategorií. První kategorií je epigeon, což jsou organismy žijící na povrchu půdy. Dalšími kategoriemi jsou hemiedafon, kdy se jedná o organismy, které obývají svrchní vrstvy půdy a euedafon, což jsou organismy obývající hlubší vrstvy půdy [10].

Podle velikosti se půdní organismy dělí na mikroedafon, mezoedafon, makroedafon a megaedafon. Organismy, které jsou menší než 0,2 mm jsou řazeny do mikroedafonu. Patří sem řasy, sinice, lišejníky, bakterie apod. Organismy v rozsahu velikostí 0,2 - 2 mm jsou řazeny do mezoedafonu a jsou to zejména roupice a rybenky. Do makroedafonu jsou řazeny organismy v rozsahu velikostí 0,2 - 20 mm. Jedná se například o žížaly, plže, stonožky a mravence. Organismy větší než 2 cm patří do megaedafonu a jsou to hlavně obratlovci a větší druhy žížal. Nejvýznamnější druhy půdních mikroorganismů, které ovlivňují půdní prostředí, jsou zástupci mikroflóry [9, 10].

### 2.3.1 Půdní mikroorganismy

Mikroorganismy se primárně v půdě vyskytují v tzv. kořenové půdě, což je vrstvička půdy o tloušťce několika mm okolo jednotlivých kořenů, a nazývá se rhizosféra. Probíhají zde nejdůležitější biochemické reakce, jako je např. zpřístupňování živin pro rostliny a jejich zadržování v tělech mikroorganismů. S rostoucí hloubkou půdního profilu klesá početnost jednotlivých skupin půdních mikroorganismů, jelikož jejich zastoupení v půdě není rovnoměrné [10].

Mikroorganismy vykonávají v půdě celou řadu funkcí. Rozkládají organickou hmotu a syntetizují nové organické látky, slouží k promíchávání organické a minerální hmoty v půdě, podporují tvorbu strukturních agregátů a zvětrávání minerálů, zadržují živiny v půdě, apod [10].

Půdní mikroorganismy jsou obecně rozdělovány na autochtonní, zymogenní a patogenní.

Autochtonní, neboli původní, mikroorganismy jsou v půdě přirozeně a trvale vyskytující se organismy, které mají schopnost rozkládat humus. Jsou charakterizovány vysokou odolností vůči nepříznivým podmínkám, energetickou nenáročností a pomalou, ale konstantní aktivitou. Do této skupiny se řadí především rody bakterií a aktinomycet *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Cellulomonas* a zástupci hub *Mucor*, *Penicilium*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus* [11].

Aktinomycety patří mezi nejběžnější bakterie vyskytující se v půdě. Půdní aktinomycety jsou důležitými dekompozitory a jsou citlivé na teplotu a vlhkost. Řada druhů aktinomycet produkuje antibiotika. Bakterie rodu *Pseudomonas* (viz Obrázek 4) mají schopnost využívat aromatické uhlovodíky (např. toulen) v aerobních podmínkách, což má velký význam nejen z hlediska půdní úrodnosti, ale i z hlediska ochrany životního prostředí. Dalším zástupcem jsou například bakterie rodu *Streptomyces* (viz Obrázek 5), jež patří k nejčastěji se vyskytujícím autochtonním aktinomycetám v půdě. Tento rod je typický tím, že produkuje látku zvanou geosmin, která způsobuje typickou půdní vůni zeminy [11, 12].



Obrázek 4: Rod *Pseudomonas* [13]



Obrázek 5: Rod *Streptomyces* [14]

Zymogenní, neboli oportunní, mikroorganismy se objevují ve velkých počtech při přítomnosti vhodného lehce rozložitelného substrátu. Jsou vysoce aktivní, mají významný podíl na procesech mineralizace a potřebují stálý přísun potravy. Další charakteristikou je, že poskytují rostlinám potřebné organické látky, které potom postupně zpracovávají. Patří sem například bakterie rodu *Bacillus*, což jsou aerobní bakterie (viz Obrázek 6) se schopností produkovat amylázy, které poměrně rychle v úrodných půdách rozkládají škrob až na  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ . Dále do této skupiny patří také bakterie rodu *Mycobacterium*, některé druhy rodů *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Aeromonas* a sinic *Nostoc*, *Anabaena* nebo hub *Rhizopus*, *Fusarium*, *Cephalosporium* [11].



Obrázek 6: *Bacillus subtilis* [15]

Patogenní, neboli choroboplodné, mikroorganismy jsou děleny na primární a sekundární. Pro primární patogeny je přirozeným stanovištěm půda. Jsou patogenní především pro rostliny (např. *Pseudomonas*, *Xantomonas*, *Erwinia*, *Clavibacter*, *Agrobacterium*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Phytophthora*), ale i pro člověka (např. *Clostridium*). Tyto bakterie mohou člověku způsobit závažné zdravotní potíže. Sekundární patogeny se dostávají do půdy nepřímou a mohou v ní přežívat dlouhou dobu. Do této skupiny patří například *Neisseria* nebo *Bacillus anthracis* [11, 16].



## 2.4 Plazma

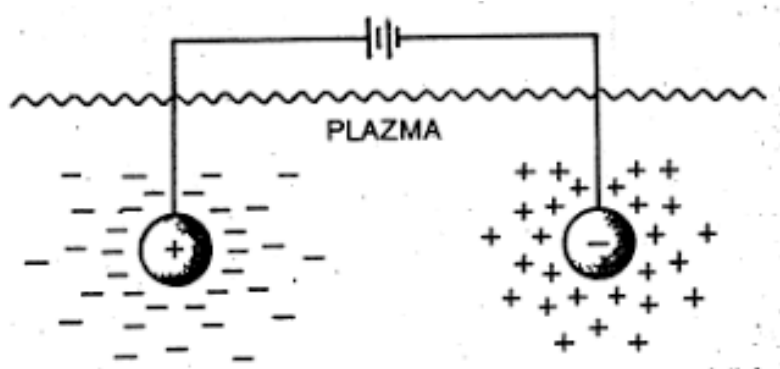
Plazma je kvazineutrální plyn nabitých a neutrálních částic, který vykazuje kolektivní chování. Pojmem kvazineutralita je označován stav, kdy se koncentrace kladně nabitých iontů a záporně nabitých částic (elektronů i iontů) v oblasti plazmatu přibližně rovnají. Plazma se tedy chová navenek elektricky neutrálně, přestože obsahuje elektricky nabitě částice. Kolektivním chováním jsou pak myšleny pohyby, které nezávisí pouze na lokálních podmínkách, ale také na stavu plazmatu ve vzdálených oblastech [17, 18].

Plazma musí splňovat tři podmínky. První podmínkou je, že ionizovaný plyn může být nazýván plazmatem pouze tehdy, pokud je hustota nábojů tak vysoká, že Debyeova délka (viz dále) je mnohem menší než velikost systému ( $\lambda_D \ll L$ ). Dále musí platit, že počet částic v Debyeově sféře musí být mnohem větší než jedna ( $N_D \gg 1$ ) a poslední podmínkou je, že součin frekvence plazmových oscilací a střední doby mezi srážkami s neutrálními atomy musí být větší než jedna ( $\omega\tau > 1$ ) [17, 18].

V přítomnosti pevné látky v plazmatu lze pozorovat děj zvaný Debyeovo stínění, kdy pevná látka nese náboj, ale ten je díky kvazineutralitě odstíněn. Ve vzdálenosti zvané Debyeova stínící délka je plazma opět kvazineutrální. Jestliže do předpokládaného homogenního plazmatu vložíme nepohyblivý náboj  $q$ , částice se souhlasným nábojem jsou jím odpuzované, s nesouhlasným přitahované. Plazma se proto polarizuje a elektrické pole vloženého náboje tím pádem odstíní. Odstíněním klesne potenciál elektrického pole v plazmatu oproti potenciálu elektrického pole ve vakuu na  $1/e$  ve vzdálenosti rovné Debyeově stínící délce. Výpočet se provádí z teplot (charakterizujících střední kinetickou energii)  $T_+$  a  $T_-$  kladných iontů a elektronů a koncentrace nabitých částic  $n_o = n_+ = n_-$  pomocí vztahu (1),

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \cdot k \cdot T_+ \cdot T_-}{e^2 \cdot n_o \cdot T_+ + T_-}}, \quad (1)$$

kde  $\epsilon_0$  je permitivita vakua,  $k$  je Boltzmannova konstanta,  $n_o$  je koncentrace nabitých částic a  $e$  je náboj elektronu [17, 19].



Obrázek 7: Stínící vrstva kolem nábojů vložených do plazmatu [17]

### 2.4.1 Vlastnosti plazmatu

Plazma se od plynu liší tím, že obsahuje volné elektrické náboje, a proto je elektricky vodivé. Elektrická vodivost plazmatu je jednou z nejvýznamnějších fyzikálních vlastností, která jej předurčuje pro různé technické aplikace. Elektrická vodivost plazmatu závisí na stupni ionizace. Pokud se jedná o slabě ionizované plazma, tak elektrická vodivost narůstá s koncentrací nabitých částic. V případě silně ionizovaného plazmatu elektrická vodivost vůbec na koncentraci nabitých částic nezávisí. Díky elektrické vodivosti působí na plazma i silné magnetické pole. Další významnou vlastností plazmatu je, že produkuje velké množství reaktivních částic, jako jsou elektrony, ionty, radikály a fotony a je považováno za vynikajícího přenašeče těchto částic ve vodě. Na základě místa styku výboje s kapalinou dělíme systémy do tří kategorií: elektrický výboj v kapalinách, nad kapalinou a v bublinách plynu zaváděného do kapaliny [20].

### 2.4.2 Základní parametry plazmatu

Základní parametry plazmatu jsou veličiny, které plazma charakterizují a umožňují jeho popis a rozdělení. Patří mezi ně Debyeova délka, stupeň ionizace plazmatu, teplota, hustota částic a plynu, distribuční funkce energie elektronů, plazmová frekvence atd. [18].

#### *Stupeň ionizace*

Tento parametr nejvíce určuje chování plazmatu. Jedná se o poměr počtu ionizovaných částic vůči celkovému počtu částic v daném systému a závisí především na teplotě. Ionizační stupeň lze popsat pomocí Sahovy rovnice pro jedenkrát ionizované plazma v termodynamické rovnováze (2),

$$\frac{n_i^2}{n_n} = CT^{\frac{3}{2}} \cdot \exp\left(-\frac{U_i}{kT}\right), \quad (2)$$

kde  $C \approx 2,4 \cdot 10^{21} \text{ m}^{-3}$ ,  $n_i$  je koncentrace jednonásobných ionů,  $n_n$  je koncentrace neutrálních částic,  $U_i$  je ionizační potenciál,  $T$  je teplota plazmatu a  $k$  je Boltzmanova konstanta [18, 21].

Podle stupně ionizace rozdělujeme plazma na slabě a silně ionizované.

Slabě ionizované plazma může existovat za pokojové teploty a koncentrace nabitých částic v něm je zanedbatelně malá v porovnání s koncentrací neutrálních molekul. Dochází tedy převážně ke srážkám nabitých částic s molekulami plynu. Na rozdíl od slabě ionizovaného plazmatu, u silně ionizovaného plazmatu převládá koncentrace nabitých částic nad koncentrací neutrálních molekul plynu, a tedy dominují vzájemné srážky nabitých částic. Charakter silového působení mezi částicemi je dán Coulombovými silami [20, 22].

#### *Teplota*

Podle střední energie částic v plazmatu je rozlišováno vysokoteplotní a nízkoteplotní plazma. Toto dělení je založeno na termodynamické teplotě rovnováhy složek a má charakter konvence, jelikož neexistují fyzikální důvody, které by stanovovaly objektivní hranici [20].

Za vysokoteplotní plazma je považováno z praktického hlediska plazma, ve kterém je střední energie nabitých částic větší než 100 eV, čemuž přísluší teplota větší než 1 MK. S vysokoteplotním plazmatem se lze setkat při experimentech s řízenou termonukleární syntézou a v astrofyzice. Za nízkoteplotní plazma se považuje plazma v elektrických výbojích a plazma používané v plazmových technologiích. Typická zařízení obsahující nízkoteplotní plazma jsou osvětlovací výbojky, používané v osvětlovací technice a na reklamní účely, s rozsahem teploty elektronů  $10^4$ – $5 \cdot 10^4$  K, přičemž molekuly neutrálního plynu a kladných iontů mají pokojovou teplotu [19, 20].

Nízkoteplotní plazma může být generováno za atmosférického tlaku a teploty blízké teplotě okolí, což tuto technologii předurčuje k ošetření teplotně citlivých materiálů nebo předmětů, které jsou navíc citlivé na vakuum, např. organické materiály, pěny, kapaliny nebo živé biologické tkáně. V současné době je plazma aplikováno v medicíně k sterilizaci či hojení ran, dále v zemědělství ke zvýšení klíčivosti semen nebo pro povrchovou úpravu materiálů. Plazma může být aplikováno buď přímou, nebo nepřímou metodou. K nepřímé aplikaci je používána tzv. plazmatem aktivovaná voda [23].

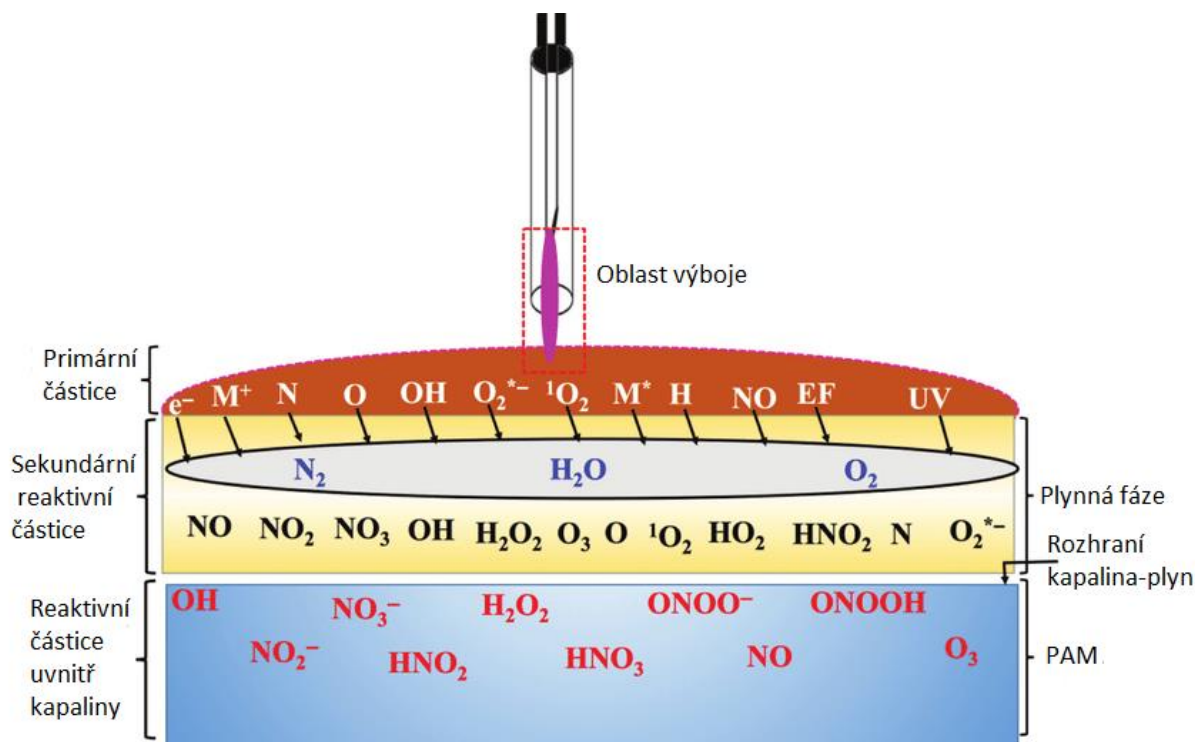


## 2.5 Plazmatem aktivovaná voda (PAW)

Plazma iniciuje v plynné fázi chemické procesy, které vedou k syntéze celé řady chemicky aktivních částic, jejichž vlastnosti a identitu lze dobře kontrolovat proměnlivými parametry plazmatu [1, 25].

Plazmatem aktivovaná voda je produktem nízkoteplotního plazmatu reagujícího s vodou. Při tvorbě plazmatu nad vodním sloupcem dochází k transportu některých chemicky aktivních látek vytvořených v plynné fázi přes rozhraní plazma-kapalina do vodního sloupce. Reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS), společně známé jako RONS, indukují chemické změny ve vodných roztocích. Tímto se voda aktivuje a nazývá se plazmatem aktivovaná. Mezi RONS lze zařadit například různé radikály ( $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{NO}\cdot$ ,  $\text{NO}_2\cdot$ ), ionty ( $\text{H}^+$ ,  $\text{ONOO}^-$ ), oxidy dusíku ( $\text{N}_2\text{O}_5$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ) a další částice, jejichž vzájemnými interakcemi nakonec vznikají více či méně stabilní konečné produkty, jako jsou například  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{O}_3$  [1, 24, 25].

Plazmatem generované RONS ve spojení s pH PAW jsou zodpovědné za jedinečné vlastnosti PAW (zejména vyšší oxidační potenciál), které jsou účinné při rozkladu organických znečišťujících látek, biologické nebo chemické dekontaminaci vzduchu, vody a půdy. Také lze dosáhnout vysoké účinnosti odstraňování nejrůznějších kontaminantů z vody, aniž by bylo nutné přidávat další chemikálie. Již zmíněný vysoký oxidační potenciál RONS je také zodpovědný za silné antibakteriální a fungicidní vlastnosti PAW. V zemědělství se poslední dobou, díky svému vysokému obsahu dusíku, stala středem zájmu aplikace PAW jako alternativa ke komerčním dusíkatým hnojivům [1, 25].



Obrázek 8: Schematický diagram tvorby aktivních složek v médiu aktivovaném konvenčním plazmovým paprskem [26]

### 2.5.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti PAW

Plazmatem aktivovaná voda má jiné chemické složení než běžná destilovaná nebo kohoutková voda, tudíž se liší i ve fyzikálních a chemických vlastnostech, jako je například pH, vodivost, redoxní potenciál a koncentrace ROS a RNS.

#### *pH*

pH je obecně hodnota určující koncentrace vodíkových iontů v roztoku. Reakce probíhající mezi chemickými látkami vytvořenými v plazmatu mají za následek okyselení vody. Se zvyšující se dobou ošetření kvůli tvorbě silných kyselin dochází k drastickému snižování pH plazmatem aktivované vody. Okyselení vodných roztoků plazmatickou reakcí vede k tvorbě peroxidu vodíku, kyseliny dusičné a kyseliny peroxynitrilové. Syntéza nově vytvořených chemických sloučenin vede ke snižování pH PAW, což je jeden z hlavních důvodů antimikrobiální aktivity PAW. Při skladování plazmatem aktivované vody připravené výbojem ve vzduchu hodnota pH mírně klesá, naopak pH PAW generované výbojem v kyslíku vykazuje lineární přírůstek [27].

#### *Redoxní potenciál*

Oxidačně-redukční potenciál (ORP) vyjadřuje schopnost roztoku oxidovat nebo redukovat jinou látku a závisí na koncentraci oxidačních činidel a jejich síle. Výhodou měření ORP vody je, že poskytuje rychlé hodnocení dezinfekčního potenciálu. ORP je považován za důležitý faktor ovlivňující mikrobiální inaktivaci, který poškozují buněčnou membránu mikrobů a jejich obranný mechanismus. Peroxid vodíku, patřící mezi ROS vytvořené v PAW, se podílí na redoxních reakcích, kde se může chovat jako oxidant nebo jako redukční činidlo. Pro PAW generovanou uvnitř vody jsou pozorovány vyšší hodnoty ORP než pro PAW generovanou nad vodní hladinou. Stejně jako u pH, nezpůsobují různé skladovací teploty PAW žádnou významnou změnu v hodnotách ORP, ale různé doby skladování vedou k poklesu hodnot ORP. To ukazuje, že hodnoty ORP nejsou závislé na teplotě skladování [27].

#### *Vodivost*

Vodivost je fyzikální veličina, která je často používána jako důležitý indikátor koncentrace reaktivních iontů existujících ve vodě. Reaktivní ionty produkované během ošetření plazmatem se snadno rozpouštějí ve vodě, a tím dochází k výrazné změně vodivosti. Tvorba ROS a RNS během aktivace vody plazmatem přispívá ke zvýšení vodivosti PAW. Vodivost PAW generované přímo ve vodě je vyšší ve srovnání s vodivostí PAW připravenou pomocí výboje nad vodní hladinou [24, 27].

#### *Tvorba peroxidu vodíku*

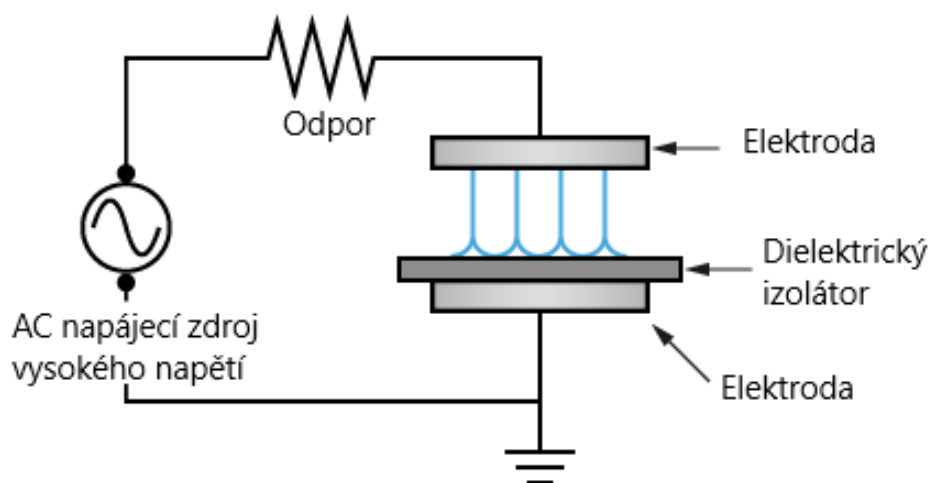
$H_2O_2$  patří mezi ROS vytvořené v PAW a hraje významnou roli v antimikrobiálních vlastnostech PAW. V kyselém prostředí přispívá koncentrace  $H_2O_2$  spolu se superoxidovým aniontem k nejdůležitější části oxidačních vlastností PAW. Koncentrace  $H_2O_2$  závisí na vodivosti vody po výboji.  $H_2O_2$  je ve vodě považován za stabilní konečný produkt s životností v rozmezí 8 hodin – 20 dní [27].

### **Koncentrace dusitanů ( $\text{NO}_2^-$ ) a dusičnanů ( $\text{NO}_3^-$ )**

Detekce dusitanových a dusičnanových iontů v PAW je hlavním důkazem pro tvorbu RNS. Dusičnanové ionty s dlouhou životností v PAW se tvoří jako sekundární produkty a rozšiřují antimikrobiální aktivitu při skladování. Povýbojové reakce mezi  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  vyskytujícími se v PAW vedou k tvorbě peroxynitridu, který má významné antibakteriální vlastnosti. Stejně jako ROS, s prodlužující se dobou skladování koncentrace  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  klesá. Koncentrace dusičnanů a dusitanů vytvářených v PAW připravené výbojem generovaným přímo ve vodě je o něco vyšší než koncentrace těchto iontů v PAW připravené výbojem nad vodní hladinou [27].

### **2.5.2 Dielektrický bariérový výboj**

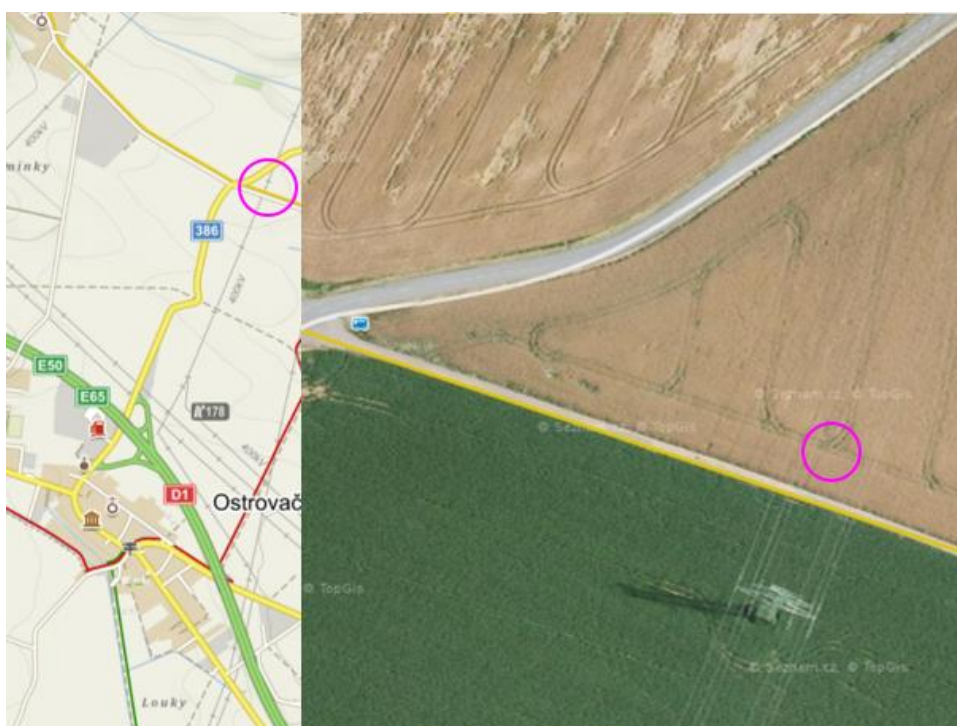
Dielektrický bariérový výboj neboli DBD, je typ výboje založený na použití alespoň jedné dielektrické bariéry (např. skla, křemene, keramiky, slídy a oxidu hlinitého) ve výbojové mezeře s vysokým střídavým napětím aplikovaným na elektrody, což zabraňuje tvorbě jisker, eliminuje leptání a korozi elektrod a distribuuje výboj téměř rovnoměrně po celé ploše elektrody. Tento proces probíhá za atmosférického tlaku a díky použití vysokého napětí se tvoří intenzivní elektrické pole, které ionizuje plyn. V důsledku toho dochází ke generaci elektronů, metastabilních látek a ROS. DBD je proto systémem sloužícím ke generaci ozonu. Napětí mezi dvojicí elektrod bývá v intervalu 1–100 kV a frekvence v rozsahu desítek kHz. Bariérové výboje lze rozdělit podle konfigurace elektrod a dielektrika na objemové (volume discharge – VD), povrchové (surface discharge – SD) a koplanární (coplanar discharge – CD) [28, 29].



Obrázek 9: Schéma DBD [30]

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Hlavním předmětem daného výzkumu byla aplikace plazmatem aktivované vody na půdní vzorek hnědozemí odebraného z lokality Ostrovačice v okrese Brno-venkov (viz *Obrázek 10*). Celý experiment probíhal ve dvou variantách. První variantou byla aplikace PAW ve 100% a 50% koncentraci přímo na vzorek půdy, z níž byl po 24 hodinách vyextrahován půdní výluh. Ve druhé variantě byl nejprve vyextrahován půdní výluh, ten byl ponechán k odstátí a poté smíchan s PAW ve 100% a 50% koncentraci. Pro srovnání byl pokus u obou variant proveden také s destilovanou vodou. Všechny vzniklé roztoky byly následně systémem desítkového ředění naředěny a naočkovány na živné médium v Petriho miskách. Celkem došlo k vytvoření 45 Petriho misek se zředěním  $1 \cdot 10^{-2}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$  a  $1 \cdot 10^{-6}$ , které byly následně ponechány 6 dní ke kultivaci ve tmě při laboratorní teplotě 27 °C a během této doby docházelo k průběžnému počítání vznikajících kolonií pomocí elektronického počítadla kolonií s fixem.



*Obrázek 10: Ostrovačice – lokalita odběru vzorku půdy*

#### 3.1 Příprava PAW

Pro obě varianty experimentu bylo potřeba vytvořit plazmatem aktivovanou vodu. K tomuto účelu bylo využito dielektrického bariérového výboje buzeného v reaktoru pro přípravu PAW, jež se sestává z Petriho misky o průměru 90 mm, na jejíž dno je z vnější strany souose nanese uhlíková elektroda o průměru 50 mm. Víko reaktoru je zhotoveno z korundové keramiky (102x102 mm<sup>2</sup>), z vnější strany je ve středu napařena hliníková elektroda, která má taktéž průměr 50 mm. Ke generaci výboje byl využit na zakázku vyrobený audiofrekvenční generátor od firmy LIFETECH (viz *Obrázek 11*).



Obrázek 11: Reaktor pro přípravu plazmatem aktivované vody

Do Petriho misky, která je součástí reaktoru, bylo nalito 75 ml destilované vody pomocí odměrného válce a následně byla miska přikryta horní částí přístroje s keramickou elektrodou. Poté byl zapnut generátor a samotný výboj hořel mezi korundovou keramikou a povrchem vody v Petriho misce za atmosférického tlaku. Výboj musel být pravidelně po patnácti sekundách přerušován a víko bylo ořeno rukou, aby bylo zabráněno nadbytečné tvorbě ozonu a  $\text{NO}_x$ . Celý postup byl opakován osmkrát, aby celkový čas působení elektrického výboje na vzorek destilované vody trval 2 minuty. Pro účely práce bylo třeba připravit celkem 8 dávek PAW, které byly smíchány a ihned použity. Tím bylo docíleno identického složení PAW aplikované na všechny vzorky.

### 3.2 Příprava živného média

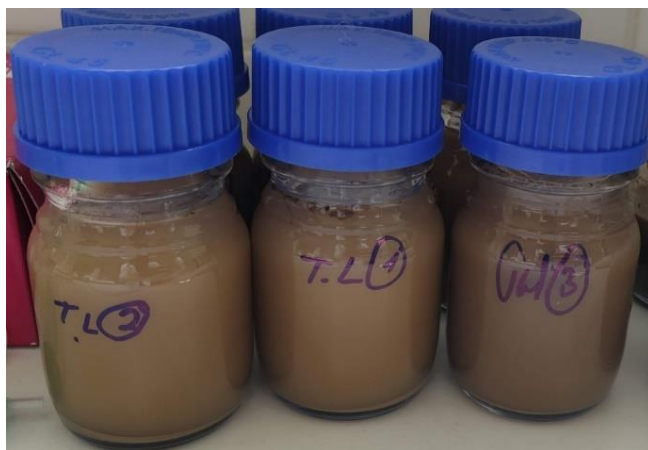
12,5 g kultivačního média (Nutrien Broth w/1% Peptone) bylo smícháno s 10 g agaru (HiMedia GRM026 Agar powder, Bacteriological) a následně došlo k rozpuštění v 500 ml vody při laboratorní teplotě. Dále bylo živné médium sterilizováno při 120 °C po dobu 50 minut. Sterilizované médium bylo nalito po 10 ml do Petriho misek a ponecháno ke ztuhnutí.

### 3.3 Příprava roztoků varianty č. 1

Do každé ze tří reagenčních láhví, které byly dopředu vysterilizovány ozonem, bylo na analytických vahách odváženo ( $100 \pm 1$ ) g hnědozemi. Následně bylo do první láhve přidáno 100 ml PAW, do druhé láhve bylo přidáno 50 ml PAW a 50 ml destilované  $\text{H}_2\text{O}$  a do třetí láhve bylo přidáno 100 ml destilované  $\text{H}_2\text{O}$ . Všechny 3 roztoky byly poté promíchány a ponechány po 24 hodin při pokojové teplotě v tmavé místnosti.

Po 24 hodinách bylo ze všech vzorků odpipetováno 10 g čirého výluhu do nových reagenčních láhví a do každé bylo následně přidáno 100 ml destilované vody.





Obrázek 12: Reagenční láhve s roztoky varianty č. 1 (vzorek 1 – destilovaná  $H_2O$ ; vzorek 2 – PAW; vzorek 3 – PAW + destilovaná  $H_2O$ )

### 3.4 Příprava roztoků varianty č. 2

Nejprve bylo smícháno 100 ml destilované vody se 100 g vzorku půdy. Tento roztok byl ponechán 10 minut k dekantaci a mezitím došlo k ozonové sterilizaci tří kádinek, do kterých bylo následně po dekantaci odpipetováno 10 g čirého výluhu. Poté bylo do první kádinky přidáno 100 ml PAW, do druhé 50 ml PAW s 50 ml destilované  $H_2O$  a do třetí 100 ml destilované  $H_2O$ , podobně jako u varianty číslo 1. Kádinky s roztoky se poté nechaly před odebráním vzorků k desítkovému ředění 40 minut odstát při laboratorní teplotě.



Obrázek 13: Kádinky s roztoky varianty č. 2 (vzorek A – destilovaná  $H_2O$ ; vzorek B – PAW; vzorek C – PAW + destilovaná  $H_2O$ )

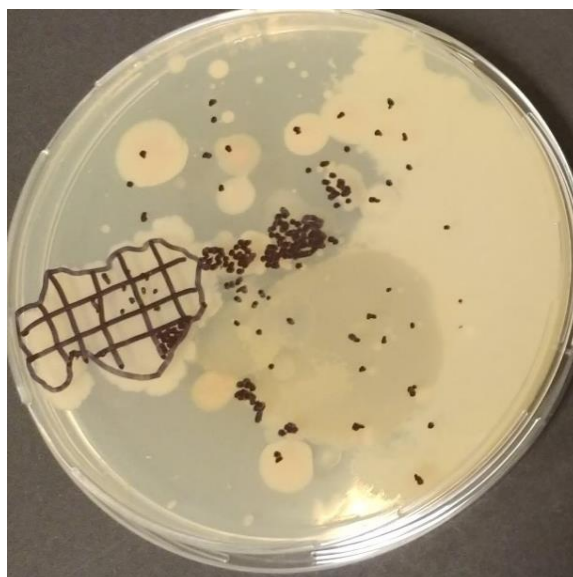
### 3.5 Desítkové ředění a očkování na živné médium

Z každého ze šesti připravených roztoků obou variant byl odpipetován 1 ml čirého výluhu, který byl dále ředěn systémem desítkového ředění až na zředění  $1 \cdot 10^{-6}$ . Z důvodu velkého počtu vzorků byly pro experiment použity pouze sudé hodnoty zředění, tedy  $1 \cdot 10^{-2}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$  a  $1 \cdot 10^{-6}$ . Na živné médium bylo poté očkováno vždy 100  $\mu$ l daného zředění. Bylo vytvořeno celkem 45 naočkovaných Petriho misek podle tabulky (viz Tab. 1). Po naočkování byly všechny vzorky opět ponechány ke kultivaci při 27 °C a během následujících 6 hodin byly pravidelně odečítány počty narůstajících kolonií.

Tab. 1: Počet naočkovaných Petriho misek pro jednotlivá zředění

	Zředění		
	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-6}$
vzorek 1	2	2	2
vzorek 2	3	3	3
vzorek 3	3	3	3
vzorek A	2	2	2
vzorek B	3	3	3
vzorek C	2	2	2

K počítání kolonií bylo používáno elektronické počítadlo kolonií s fixem (Heathrow Scientific, eCount Colony Counter). Pokud byla kolonie větší, hustší a nešla spočítat pouhým tečkováním, tak byla celá oblast rozdělena na několik stejných částí. Poté byly spočítány kolonie v jedné části a toto číslo pak bylo vynásobeno počtem vzniklých částí (viz Obrázek 14).



Obrázek 14: Ukázka metody počítání kolonií rozdělením na několik stejných oblastí na vzorku 2 při zředění  $1 \cdot 10^{-2}$

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Praktická část této práce byla zaměřena na pozorování růstu kolonií mikroorganismů po aplikaci PAW. Výsledky pozorování mohl výrazně ovlivnit odebraný vzorek hnědozemě, jelikož nešlo zajistit, aby v každém vzorku použitým ke zředění byl stejný obsah a druh mikroorganismů. Půda byla skladována v chladničce při teplotě 0 °C po dobu asi 6 měsíců od odběru z odběrného místa. Tento fakt mohl taktéž ovlivnit výsledek, jelikož mohlo dojít k úhynu mikroorganismů. Dalším rozhodujícím faktorem mohl být také odběr čirého extraktu před ředěním. Vzorky varianty číslo 1 byly ponechány po dobu 24 hodin v klidu a poté byl odebrán extrakt ke zředění bez předešlého protřepání lahví. Tím mohlo dojít k usazení MO spíše do spodní části reagenčních lahví, a ne do vrchní čiré části, ze které byl vzorek pro ředění odebírán. Naproti tomu vzorky varianty číslo 2 byly k dekantaci ponechány pouze po dobu 10 minut, tudíž MO byly pravděpodobně rozptýleny do celého objemu roztoku rovnoměrně. Při dalším výzkumu by bylo vhodné experiment zopakovat s tím rozdílem, že reagenční láhve s roztoky vzorků varianty 1 by byly po uplynutí 24 hodin protřepány a odběr 10 g čirého výluhu by byl proveden až po desetiminutové dekantaci.

Průběžně odečítané počty kolonií byly zapisovány do tabulek a hodnoty pak byly pro větší přehlednost zprůměrovány přes všechna opakování stejné varianty.

Tab. 2: Kolonie MO varianty č. 1 vyrostlé za 24, 48 a 144 hodin

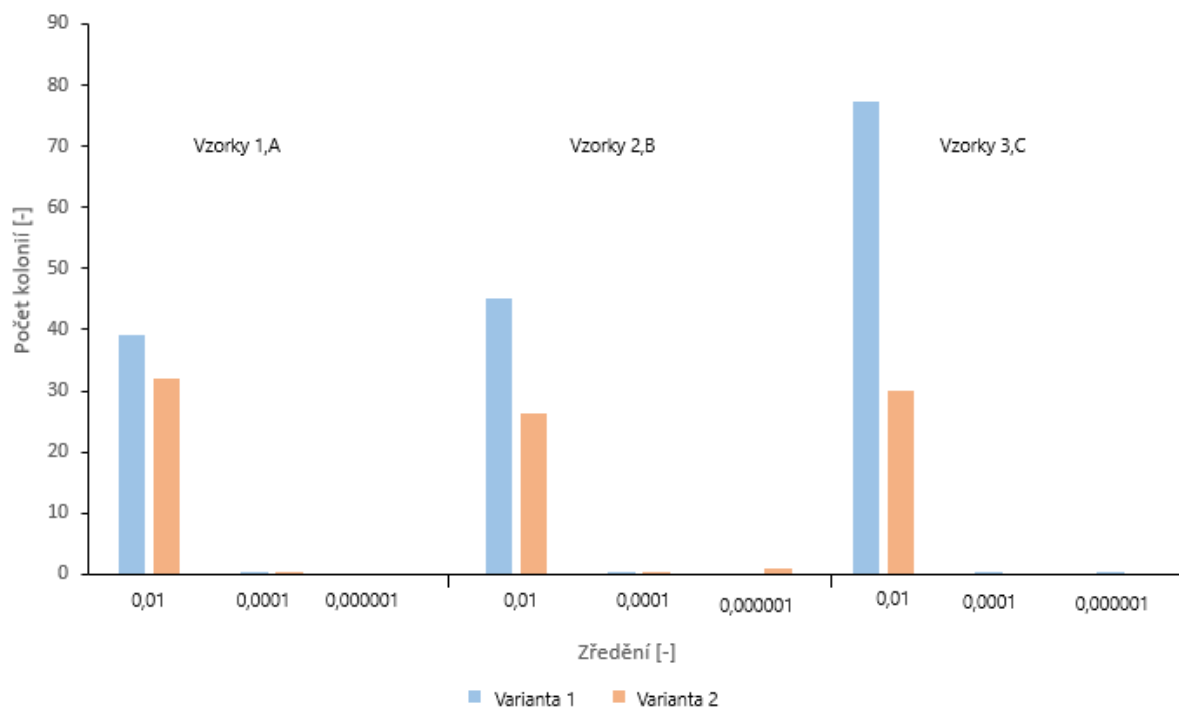
	24 hodin			48 hodin			144 hodin		
	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-6}$
1	42	0	0	138	5	2	-	172	120
	36	1	0	200	2	1	-	207	148
průměr	39	0,5	0	169	3,5	1,5	-	189,5	134
2	60	0	0	608	2	2	-	138	162
	35	1	0	217	1	2	-	153	134
	40	0	0	83	4	0	-	165	110
průměr	45	0,3	0	302,7	2,3	1,3	-	152	135,3
3	125	1	1	283	1	0	-	120	119
	59	0	0	175	2	1	-	179	136
	48	0	0	323	4	0	-	87	160
průměr	77,3	0,3	0,3	260,3	2,3	0,3	-	128,7	138,3



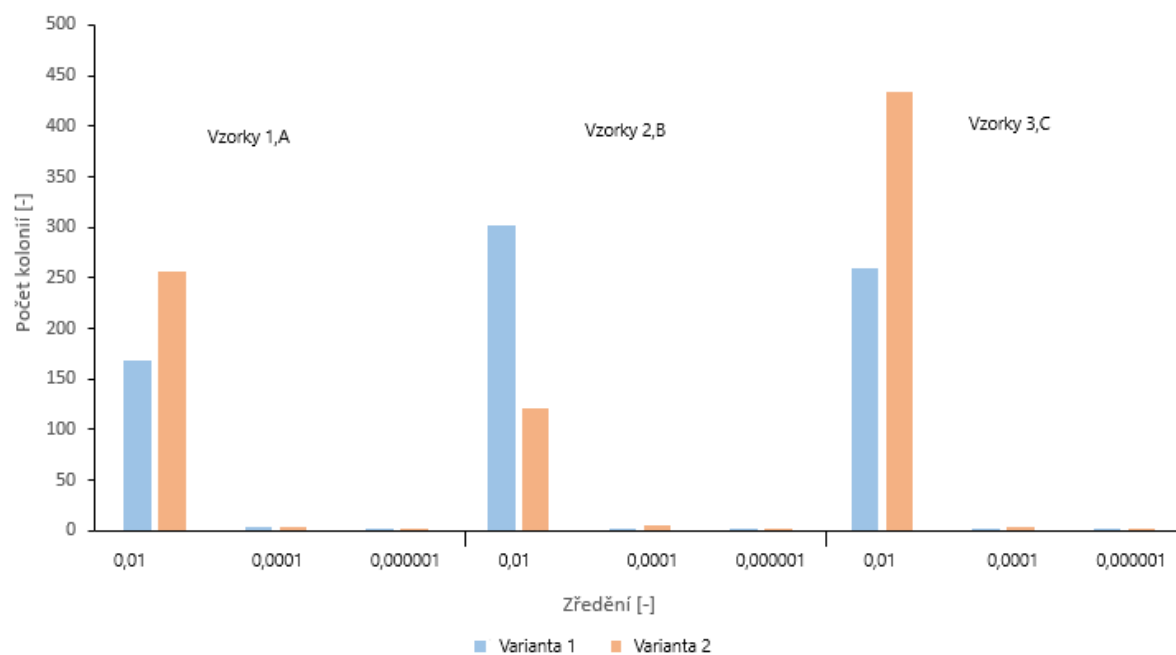
Tab. 3: Kolonie MO varianty číslo 2 vyrostlé za 24, 48 a 144 hodin

	24 hodin			48 hodin			144 hodin		
	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-6}$
A	24	1	0	48	3	2	-	130	120
	40	0	0	466	3	2	-	119	111
průměr	32	0,5	0	257	3	2	-	124,5	115,5
B	25	1	1	189	2	2	-	137	122
	23	0	0	80	13	3	-	150	39
	31	0	2	92	2	2	-	143	197
průměr	26,3	0,3	1	120,3	5,7	2,3	-	143,3	119,3
C	36	0	0	707	4	0	-	152	136
	24	0	0	161	2	1	-	154	164
	30	0	0	434	3	0,5	-	153	150
průměr	30	0	0	434	3	0,5	-	153	150

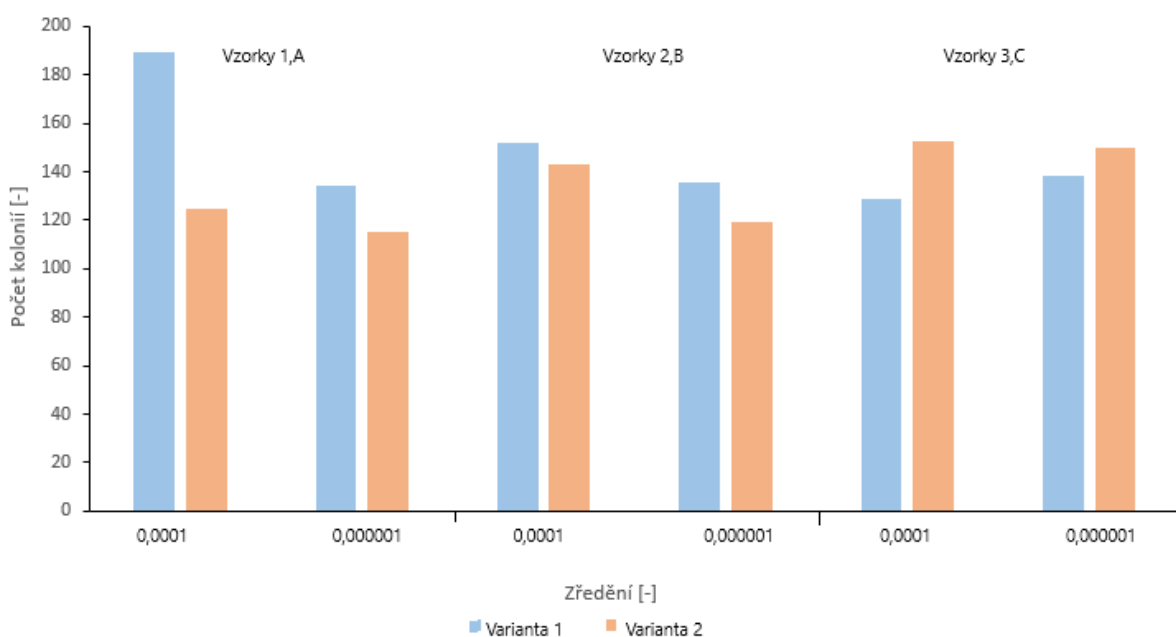
Pro lepší přehlednost ve srovnání variant experimentu číslo 1 a 2 byly závislosti počtu kolonií na zředění vzorků vyneseny do grafů (viz Obrázek 15, 16, 17).



Obrázek 15: Graf závislosti počtu kolonií na zředění při odečtu po 24 hodinách



Obrázek 16: Graf závislosti počtu kolonií na zředění při odečtu po 48 hodinách



Obrázek 17: Graf závislosti počtu kolonií na zředění při odečtu po 144 hodinách

Z grafu (viz Obrázek 15) lze vyčíst, že po 24 hodinách nestačily kolonie mikroorganismů při zředění  $1 \cdot 10^{-4}$  a  $1 \cdot 10^{-6}$  dostatečně vyrůst. Pokud se tedy zaměříme pouze na zředění  $1 \cdot 10^{-2}$ , kde již došlo k mírnému nárůstu počtu kolonií, tak z průměrných hodnot lze vyvodit, že nejvíce se rozrostly kolonie MO ve vzorku 3 (destilovaná  $H_2O$  + PAW) z varianty experimentu číslo 1 a dále vzorek A (destilovaná  $H_2O$ ) z druhé varianty experimentu.

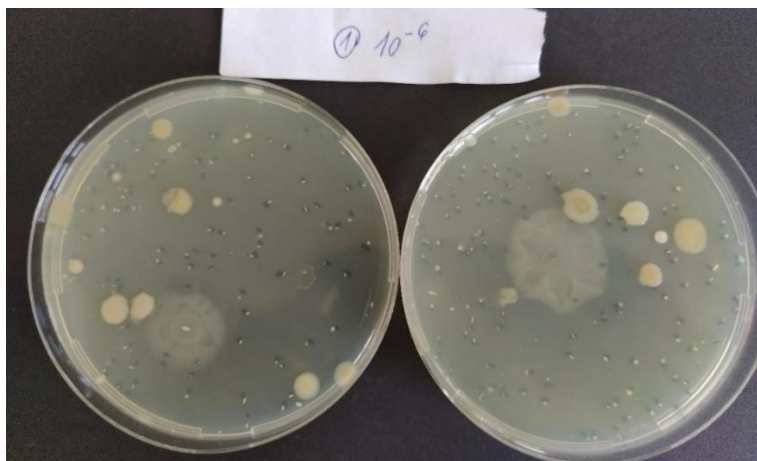
Na Obrázku 16 můžeme z grafu pozorovat po 48 hodinách mírný nárůst počtu kolonií u zředění  $1 \cdot 10^{-4}$  a  $1 \cdot 10^{-6}$ . U zředění  $1 \cdot 10^{-2}$  došlo k největšímu nárůstu kolonií MO u vzorku 2 (PAW) a u vzorku C (destilovaná  $H_2O$  + PAW).

Při posledním odečtu kolonií MO po 144 hodinách již nebylo možné spočítat vzorky při zředění  $1 \cdot 10^{-2}$  kvůli jejich vysokému počtu. Do grafu (viz *Obrázek 17*) byly tedy zařazeny pouze průměrné hodnoty počtu kolonií odečtených při zředěních  $1 \cdot 10^{-4}$  a  $1 \cdot 10^{-6}$ , u kterých došlo k velkému nárůstu. Největší nárůst lze pozorovat u vzorků 1 (destilovaná  $H_2O$ ) a C (destilovaná  $H_2O$  a PAW).

Pokud budeme porovnávat mezi sebou vzorky 1, 2 a 3 z varianty číslo 1, tak je z výsledků patrné, že mezi počty kolonií jsou opravdu minimální rozdíly. Ve všech případech docházelo k nárůstu počtu kolonií MO s časem. U vzorků 2, 3 obsahujících PAW je pozorovatelné, že v prvních 48 hodinách došlo k velkému nárůstu kolonií, ale během dalších hodin se nárůst prakticky srovnal s nárůstem kolonií vzorku číslo 1, který obsahoval pouze destilovanou  $H_2O$ . Vzorek číslo 1 měl nárůst přibližně pořád stejný a nedošlo zde ke zpomalení, což lze pozorovat z hodnot v Tab. 2.

U vzorků A, B, C varianty 2 taktéž nejsou velké rozdíly mezi počty kolonií. Opět nedocházelo k odumírání MO, nýbrž k nárůstu jejich počtu. Podobně jako v předešlém případě, u vzorku B, který obsahoval přídavek PAW, došlo s časem ke zpomalení nárůstu MO, zatímco u vzorků obsahujících destilovanou  $H_2O$  byl nárůst postupný.

Po posledním odečtu kolonií byly vybrány největší kolonie MO, a ty byly pozorovány pod mikroskopem se zvětšením 40x. Vzorky k mikroskopickému pozorování byly odebírány z Petriho misek se zředěním  $1 \cdot 10^{-6}$  (viz *Obrázky 18, 19, 20, 21, 22, 23*).



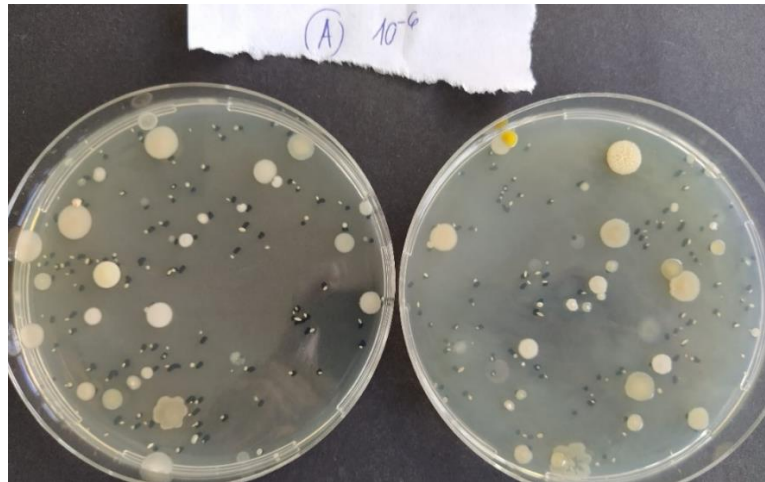
*Obrázek 18: Vzorek 1 obsahující přídavek destilované  $H_2O$*



*Obrázek 19: Vzorek 2 obsahující přídavek 100% PAW*



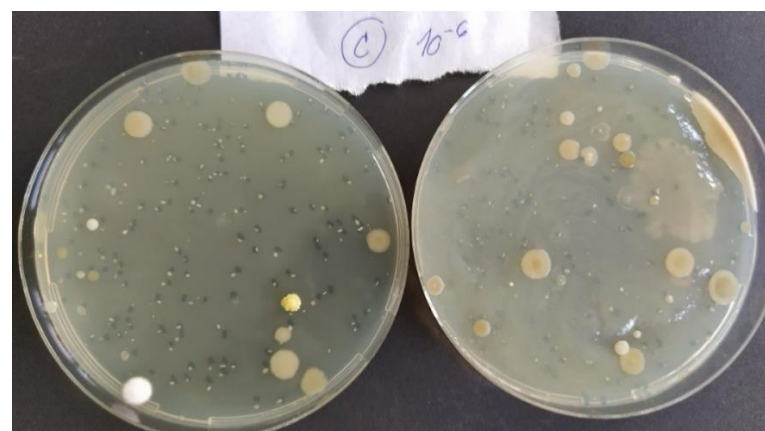
*Obrázek 20: Vzorek 3 obsahující přídavek 50% PAW*



Obrázek 21: Vzorek A obsahující přídavek destilované H<sub>2</sub>O



Obrázek 22: Vzorek B obsahující přídavek 100% PAW



Obrázek 23: Vzorek C obsahující přídavek 50% PAW



Na obrázcích (zejména *Obrázek 19* a *Obrázek 22*) lze pozorovat bílé rozrostlé struktury vytvořené bakteriemi. Tyto struktury jsou nazývány biofilm. Tloušťka biofilmu tvořeného na živném médiu závisí na dostupnosti živin a na tom, zda je složen z jednoho či více bakteriálních druhů. Mnohem častější je přítomnost více druhů najednou. Velké rozrostlé oblasti biofilmu tvoří pravděpodobně mikroorganismy aerobní, které potřebují k aktivaci dostatek kyslíku. Naopak menší nerozrostlé oblasti budou tvořit mikroorganismy anaerobní, které ke svému životu a množení nepotřebují kyslík.

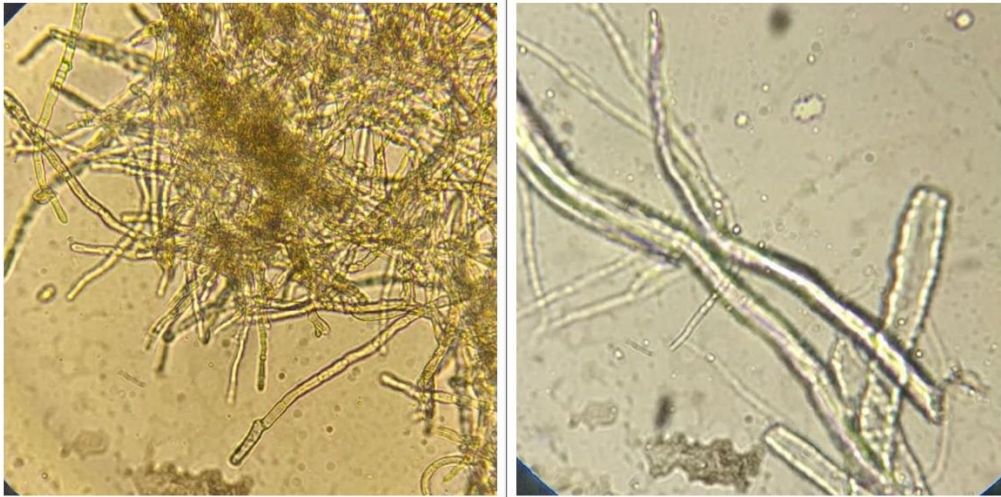
Jak už bylo zmíněno v kapitole 2.3.1 zaměřující se na půdní MO, mezi běžnou půdní mikroflórou patří bakterie rodů *Pseudomonas*, *Bacillus* či například *Rhizopus*. Na *Obrázku 24* můžeme pozorovat koky nějakého bakteriálního rodu, který byl odebrán z Petriho misky vzorku 3. Identifikujeme je především tak, že jejich kolonie jsou zbarveny do oranžova či žluta.

Na Petriho miskách se dále vyskytuje řada hladkých gelovitých kolonií. Jedná se pravděpodobně o půdní kvasinky různých druhů, může jít například o zástupce rodů *Cryptococcus*, *Trichosporon* či *Zygosaccharomyces*.

Dále lze na živném médiu pozorovat vrásčité a ochlupené kolonie MO, kdy se podle všeho jedná o plísň. Napovídá tomu rozvětvené mycelium, které je viditelné na *Obrázku 25*, kdy byl vzorek kolonie pozorován pod mikroskopem při zvětšení 40x. Pravděpodobně by se mohlo jednat o plísň z oddělení *Zygomycota*, přesněji o třídu *Trichomycetes*. Tmavě zelené až černé kolonie budou patrně houby rodů *Penicillium* nebo *Aspergillus*.



*Obrázek 24: Bakterie pod mikroskopem při zvětšení 40x*



*Obrázek 25: Plíseň pod mikroskopem při zvětšení 40x*

Z celkového pozorování narůstajících kolonií plyne, že půdní mikroflóra je velmi bohatá, což dokazují Obrázky 24 a 25. Z výsledků je také patrné, že PAW zřejmě nemá celkový negativní vliv na půdní mikroorganismy, tedy rozhodně nedošlo k úhynu všech mikroorganismů. Pro další zkoumání bude třeba provést selektivní pozorování na různých skupinách bakterií, plísni a kvasinek, abychom mohli říct, co přesně se s půdními mikroorganismy po aplikaci PAW děje. Rozdíly mezi variantou 1 a 2 nejsou příliš významné, tudíž bude třeba provést experiment s větším počtem vzorků a s větší selektivitou skupin druhů mikroorganismů.

## 5 ZÁVĚR

V této bakalářské práci byla řešena problematika aplikace plazmatem aktivované vody a nedostatečných informací o jejím vlivu na půdní mikroorganismy. Teoretická část se zaměřuje na rozbor půdního systému a mikroorganismů v něm žijících a dále popisuje základní poznatky o plazmatu a plazmatem aktivované vodě. Experimentální část je věnována aplikaci plazmatem aktivované vody v různých koncentracích na půdní vzorek hnědozemě, přičemž aplikace probíhala ve dvou od sebe se lišících variantách. V první variantě byla PAW aplikována přímo na vzorek půdy, a poté došlo k extrakci výluhu. Druhá varianta proběhla přesně naopak, tedy PAW byla aplikována na vzorky až po proběhlé extrakci z půdního roztoku. Následně bylo u všech vzorků provedeno desítkové ředění a očkování na živné médium. Po kultivaci vzorků v Petriho miskách byly během 6 dnů 3× odečítány narůstající kolonie mikroorganismů.

Podle průměrných počtů kolonií mikroorganismů uvedených v tabulkách (viz *Tab. 2, Tab. 3*) není zatím zcela jasné, jestli má plazmatem aktivovaná voda na mikroorganismy žijící v půdě pozitivní či negativní vliv. Jelikož ani v jedné variantě experimentů nárůst mikroorganismů, na které byla aplikována PAW, nebyl výrazně rychlejší či větší než u vzorků, na které aplikována PAW nebyla, tak nelze s úplnou jistotou hovořit o pozitivním účinku na růst. Na druhou stranu nedocházelo ani k výraznému úhynu či úbytku kolonií mikroorganismů vzhledem ke srovnávacím vzorkům s destilovanou vodou, tudíž nelze potvrdit ani zcela negativní vliv na růst mikroorganismů nacházejících se v půdním vzorku. Opět musíme brát v potaz, že selektivita druhů mikroorganismů v tomto experimentu není dostačující na celkové posouzení vlivu PAW na půdní mikroorganismy.

Z výsledků výše uvedených experimentů je tedy patrné, že vliv PAW na půdní mikroorganismy je spíše neutrální, prakticky shodný jako vliv destilované vody, což nemusí být považováno za špatný výsledek. Znamenalo by to, že voda aktivovaná plazmatem může být bez negativního dopadu na půdní mikroorganismy používána v zemědělství ve formě postřiku.

Pokud budeme srovnávat kolonie vyrostlé na Petriho miskách po 24 hodinách, neuvidíme zde žádné výrazné typy kolonií. Když se ale podíváme na kolonie vyrostlé na Petriho miskách po 48 a více hodinách, tak si můžeme všimnout, že na vzorcích, které obsahovaly přírůstek PAW vyrostly zajímavěji zbarvené a více rozrostlé kolonie než na vzorcích bez přírůstku PAW. Taktéž se zde vyskytovalo obecně více plísní. Tato skutečnost může nasvědčovat tomu, že některé typy mikroorganismů mohou po určitém čase odumírat, ale PAW může podporovat jejich růst, a z toho důvodu se vyskytují pouze na vzorcích s přírůstkem PAW. Podpora růstu plísní by ale mohla být v zemědělství spíše negativní, jelikož by byl podporován vznik plísní na rostlinách.



Jelikož nebyly přesně známy všechny typy mikroorganismů nacházejících se ve vzorku půdy, nemůžeme výsledky tohoto experimentu vztahovat obecně na všechny typy mikroorganismů. Musíme také brát v potaz, že mikrobiální kolonizace půd záleží nejen na typu půdy, ale i na lokalitě odběru vzorku, tudíž mikrobiální složení stejného půdního typu z různých lokalit nebude zcela totožné. Z těchto důvodů bude předmětem dalšího výzkumu také sledování vlivu PAW na konkrétní, dopředu známé skupiny mikroorganismů, které můžeme identifikovat pomocí vhodných molekulárních metod.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] ŠIMEČKOVÁ J, F. KRČMA, D. KLOFÁČ, L. DOSTÁL, Z. KOZÁKOVÁ. *Influence of Plasma-Activated Water on Physical and Physical–Chemical Soil Properties*. Water. 2020; 12(9):2357. ISSN 2073-4441. Dostupné z: doi:10.3390/w12092357
- [2] ELBL J. *Význam půdních mikroorganismů pro produkční a mimoprodukční funkce půdy: Neviditelný život v půdě – mikroorganismy*. Dostupné z: [https://web2.mendelu.cz/af\\_291\\_projekty2/vseo/stranka.php?kod=3971](https://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=3971)
- [3] *Alternativní znázornění zastoupení jednotlivých půdních složek*. Dostupné z: [https://web2.mendelu.cz/af\\_291\\_projekty2/vseo/print.php?page=3969&typ=html](https://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=3969&typ=html)
- [4] ŠIMEK M., D. ELHOTTOVÁ. a PIŽL V. *Rozmanitost života a zdraví ekosystémů: Živá půda*. Národní 3, 117 20 Praha 1: Středisko společných činností AV ČR, 2015. ISBN 978-80-200-2567-8.
- [5] ŠILHÁNKOVÁ L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [6] TŮMA I. *Mikrobiologie (pro zahradnické obory)*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2015. ISBN 978-80-7509-226-7.
- [7] VILLARREAL M.R. *Stavba prokaryotické buňky*. Dostupné z: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/ef/Average\\_prokaryote\\_cell\\_cs.svg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/ef/Average_prokaryote_cell_cs.svg)
- [8] MAŇAS M. *Stavba eukaryotické buňky*. Dostupné z: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Animal\\_cell\\_structure\\_cs.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Animal_cell_structure_cs.svg)
- [9] ELBL J. *Význam půdních mikroorganismů pro produkční a mimoprodukční funkce půdy: Neviditelný život v půdě – mikroorganismy*. Dostupné z: [https://web2.mendelu.cz/af\\_291\\_projekty2/vseo/stranka.php?kod=3971](https://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=3971)
- [10] *Mikroorganismy jako indikátory stavu půdního prostředí: Půdní edafon – živá část půdy*. Agronomická fakulta – Mendelova univerzita v Brně. Dostupné z: [http://web2.mendelu.cz/af\\_291\\_projekty2/vseo/print.php?page=3407&typ=html](http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=3407&typ=html)
- [11] TŮMA I. *Mikrobiologie (pro zahradnické obory): Ekologie mikroorganismů*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2015. ISBN 978-80-7509-227-4.

- [12] JIANG J., X. HE a D. E. CANE. Biosynthesis of the earthy odorant geosmin by a bifunctional *Streptomyces coelicolor* enzyme. *Nature Chemical Biology*. 2007, 3(11), 711-715. ISSN 1552-4450. Dostupné z: doi:10.1038/nchembio.2007.29
- [13] HARRIS S. *Pseudomonas*. In: *Medical News Today: Pseudomonas infections: What to know*. 2018. Dostupné z: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/322386>
- [14] SCHARF D. *Streptomyces* bacteria, SEM. In: *Science photo library*. Dostupné z: <https://www.sciencephoto.com/media/13161/view/streptomyces-bacteria-sem>
- [15] *Bacillus subtilis*, SEM. In: *Science photo library: Nano Creative*. Dostupné z: <https://www.sciencephoto.com/media/996366/view/bacillus-subtilis-sem>
- [16] SCHINDLER J. *Ze života bakterií*. Praha: Academia, 2008. Průhledy (Academia). ISBN 978-80-200-1666-9.
- [17] CHEN. F. F. Úvod do fyziky plazmatu. Praha: Academia, 1984, 328 s.
- [18] *Definice plazmatu, základní charakteristiky plazmatu*. In: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Dostupné z: [http://ufmi.ft.utb.cz/texty/plazmochemie/PCH\\_02.pdf](http://ufmi.ft.utb.cz/texty/plazmochemie/PCH_02.pdf)
- [19] *Plazmochemie: Plazmochemické reakce*. Dostupné z: [https://is.muni.cz/th/77987/prif\\_m/plazmochemie.pdf](https://is.muni.cz/th/77987/prif_m/plazmochemie.pdf)
- [20] MARTIŠOVITŠ V. *Základy fyziky plazmy: učebný text pre magisterské štúdium*. Bratislava: Vydavateľstvo UK, 2006. ISBN 80-223-1983-X.
- [21] *Astrofyzika: Co je to plazma*. Dostupné z: <https://www.aldebaran.cz/astrofyzika/plazma/basics.php>
- [22] KRÁLOVÁ M. *Plazma*. In: Techmania Science Centre. Dostupné z: <https://edu.techmania.cz/cs/encyklopedie/fyzika/skupenstvi/plazma>
- [23] STOFFELS E., Y. SAKIYAMA a D. B. GRAVES. *Cold Atmospheric Plasma: Charged Species and Their Interactions With Cells and Tissues*. IEEE Transactions on Plasma Science. 2008, 36(4), 1441-1457. ISSN 0093-3813. Dostupné z: doi:10.1109/TPS.2008.2001084
- [24] ZHOU R., R. ZHOU, K. PRASAD, Z. FANG, R. SPEIGHT, K. BAZAKA a K. OSTRIKOV. *Cold atmospheric plasma activated water as a prospective disinfectant: the crucial role of peroxyxynitrite*. Green Chemistry. 2018, 20(23), 5276-5284. ISSN 1463-9262. Dostupné z: doi:10.1039/C8GC02800A

- [25] TARABOVÁ, B., E. DOLEŽALOVÁ, P. LUKEŠ a Z. MACHALA. Formation of RONS in cold air plasma activated water and their effects on cell membranes of Escherichia Coli. *Book of Contributed Papers: Hakone XV: International Symposium on High Pressure Low Temperature Plasma Chemistry*. Department of Physical Electronics – Faculty of Science Masaryk University, 2016, s. 457-459. ISBN 978-80-210-8318-9.
- [26] KAUSHIK N. K., B. GHIMIRE, Y. LI, et al. Biological and medical applications of plasma-activated media, water and solutions. *Biological Chemistry*. 2018, **400**(1), 39-62. ISSN 1437-4315. Dostupné z: doi:10.1515/hsz-2018-0226
- [27] THIRUMDAS R., A. KOTHAKOTA, U. ANNAPURE, K. SILIVERU, R. BLUNDELL, R. GATT a V. P. VALDRAMIDIS. Plasma activated water (PAW): Chemistry, physico-chemical properties, applications in food and agriculture. *Trends in Food Science & Technology*. 2018, **77**, 21-31. ISSN 09242244. Dostupné z: doi: 10.1016/j.tifs.2018.05.007
- [28] JIANG, B., J. ZHENG, S. QIU, M. WU, Q. ZHANG, Z. YAN a Q. XUE. Review on electrical discharge plasma technology for wastewater remediation. *Chemical Engineering Journal*. 2014, **236**, 348-368. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2013.09.090
- [29] ŠTAHEL P. 2012. Dielektrické bariérové výboje a jejich aplikace. Brno. Dostupné z: [https://is.muni.cz/do/rect/habilitace/1431/Stahel/habilitace/Barrierove\\_vyboje\\_a\\_jejich\\_aplika\\_ce3final.pdf](https://is.muni.cz/do/rect/habilitace/1431/Stahel/habilitace/Barrierove_vyboje_a_jejich_aplika_ce3final.pdf). Habilitační práce. Masarykova Univerzita.
- [30] Dielectric Barrier Discharge. <https://www.matsusada.com/>. Dostupné z: [https://www.matsusada.com/product/app/dielectric\\_barrier\\_discharge.html](https://www.matsusada.com/product/app/dielectric_barrier_discharge.html)

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

MO	mikroorganismy
PAW	plazmatem aktivovaná voda (plasma activated water)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
RNS	reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)
RONS	reaktivní formy kyslíku a dusíku (reactive oxygen and nitrogen species)
DBD	dielektrický bariérový výboj (dielectric barrier discharge)
ORP	oxidačně-redukční potenciál
VD	objemový bariérový výboj (volume discharge)
SD	povrchový bariérový výboj (surface discharge)
CD	koplanární bariérový výboj (coplanar discharge)