



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

VLIV PLAZMATU A PLAZMATEM AKTIVOVANÉ
VODY NA PLÍSEŇ *ASPERGILLUS NIGER*

INFLUENCE OF PLASMA AND PLASMA ACTIVATED WATER ON FUNGI *ASPERGILLUS
NIGER*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Michal Žitný

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1786/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Michal Žitný**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.**

NÁZEV BAKALÁŘSKÉ PRÁCE:

Vliv plazmatu a plazmatem aktivované vody na plíseň *Aspergillus niger*

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE:

- Seznamte se s problematikou generace plazmatu v interakci s kapalinami a živými organismy.
- Proveďte odbornou rešerši zaměřenou na: i) přípravu plazmatem aktivované vody, její charakterizaci a využití; ii) generaci plazmatu v interakci s živými organismy a jeho využití v biomedicíně.
- Připravte plazmatem aktivovanou vodu v plazmových systémech využívajících přímou i nepřímou interakci plazmatu v kapalině.
- Ošetřete vzorky modelového mikroorganismu (plíseň *Aspergillus niger*) plazmatem aktivovanou vodou a v kombinaci s přímým působením plazmatu a vyhodnoťte jejich dekontaminační vliv.

TERMÍN ODEVZDÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE: 22.5.2023:

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

Michal Žitný
student

doc. Ing. Zdenka Kozáková,
Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc. vedoucí
ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Práce se zabývá problematikou dekontaminace plísně *Aspergillus niger* pomocí plazmatu, plazmatem aktivované vody a jejich kombinace. Teoretická část se zaměřuje na obecné vlastnosti plazmatu, jeho generaci, dosud známé účinky na mikroorganismy a jeho využití v průmyslu se speciálním zaměřením na medicínu. Dále se zaměřuje na generaci, charakterizaci plazmatem aktivované vody, její účinky na bakterie, kvasinky a plísně a její využití. Dále se zabývá popisem plísní, jejich výskytem a jejich sterilizací. Část teorie byla zaměřena přímo na plíseň *Aspergillus niger*. Byla zde popsána její kultivace a její využití v průmyslu, jako je její použití na kultivaci kyseliny citrónové.

Experimentální část se zaměřuje charakterizaci plazmatem aktivované vody generované pomocí pochodňového jetu. Sleduje se vliv dodávaného výkonu na tvorbu iontů v plazmatem aktivované vodě. Sleduje se dekontaminační účinek plazmatu, generovaným pochodňovým jetem, samostatně a v kombinaci s plazmatem aktivovanou vodou generovanou pomocí střídavého a stejnosměrného proudu. Charakterizace plazmatem aktivované vody byla provedena s 20 ml destilované vody při rychlosti nosného plynu 2 l/ min a výkonu mikrovlnného zdroje 9 a 12 W. Dekontaminační vliv plazmatu a jeho kombinace s plazmatem aktivovanou vodou byl pozorován očkovaním 100 µl desetkrát a stokrát zředěné ošetřené kultury plísně na Petriho misky se sladivým agarem. Vyhodnocení účinku bylo provedeno počítáním narostlých kolonií plísně a následným porovnáním s kontrolními vzorky.

Všechna naměřená a získaná data byla zpracována ve výsledcích. Bylo zjištěno, že plazmatem aktivovaná voda generovaná pochodňovým jetem obsahuje vyšší koncentrace dusíkatých látek a nižší koncentrace peroxidu vodíku, přičemž u nižšího výkonu jsou generované koncentrace dusičnanů vyšší než u vyššího výkonu. Plazmatem aktivovaná voda generovaná pomocí stejnosměrného napětí obsahuje nízké koncentrace dusíkatých látek a vysoké koncentrace peroxidu vodíku oproti PAW generované pochodňovým jetem. Dále plazmatem aktivovaná voda generovaná pomocí vysokofrekvenčního zdroje obsahuje minimální koncentrace dusíkatých látek a lehce zvýšenou koncentraci peroxidu vodíku oproti PAW vytvořené pochodňovým jetem. Nejvyšší dekontaminační vliv ze všech použitých metod měla kombinace plazmatu a plazmatem aktivované vody, připravené plazmovou tryskou pomocí stejnosměrného napětí, a to při aplikaci plazmatu jako prvního. Naopak nejméně účinná metoda byla aplikace plazmatu a plazmatem aktivované vody, generované střídavým napětím. Omezování přístupu kyslíku nemělo téměř žádný vliv při přímém ošetření plazmatem, ale další metody jím byly výrazně ovlivněny. Největší rozdíl dekontaminačního vlivu byl pozorován u kombinace plazmatu a plazmatem aktivované vody, generované střídavým proudem, kde rozdíl byl až 30 %, ale všechny metody měly významný dekontaminační vliv oproti kontrole.

KLÍČOVÁ SLOVA

Plazma, plazmatem aktivovaná voda, *Aspergillus niger*, sterilizace.

ABSTRACT

The thesis deals with the issue of decontamination of *Aspergillus niger* mold using plasma, plasma-activated water and their combination. The theoretical part concerns the effects on the general properties of plasma, its generation, effects on microorganisms known so far and its use in industry with a special focus on medicine. It also focuses on the generation and characterization of plasma-activated water, its effects on bacteria, yeasts and fungi and its use. It also deals with the description of fungi, their occurrence and their sterilization. Part of the theory was aimed directly at the fungus *Aspergillus niger*. Its cultivation and its industrial uses, such as its use for the cultivation of citric acid, were described here.

The experimental part deals with the characterization of plasma-activated water generated using a torch jet. The influence of the supplied power on the formation of particles in plasma-activated water was monitored. The decontamination effect of the plasma, generated by the torch jet, alone and in combination with plasma-activated water generated by alternating and direct current is monitored. The characterization of plasma activated water was performed with 20 ml of distilled water at a carrier gas rate of 2 l/min and a power of a microwave source of 9 and 12 W. The decontamination effect of plasma and its combination with plasma-activated water was observed by inoculating 100 µl of a ten-fold and a hundred-fold diluted treated mold culture on Petri dishes with malt agar. The evaluation of the effect was carried out by counting the grown fungal colonies and subsequent comparison with control samples.

All measured and obtained data were processed in the results. Plasma activated water generated by the torch jet has been found to contain higher concentrations of nitrogenous substances and lower concentrations of hydrogen peroxide, with the generated nitrate concentrations being higher at lower output than at higher output. DC-generated plasma activated water containing low concentrations of nitrogenous species and a very high concentration of hydrogen peroxide compared to PAW generated by a torch jet. Furthermore, plasma-activated water generated using a high frequency source contains minimal concentrations of nitrogenous substances and slightly elevated concentration of hydrogen peroxide in regard to torch jet PAW. The highest decontamination effect of all the methods used was the combination of plasma and plasma activated water, prepared by a plasma nozzle using direct voltage, when the plasma was applied first. On the contrary, the least effective method was the application of plasma and plasma activated water, generated by high frequency voltage. Limiting oxygen access had almost no effect on direct plasma treatment, but other methods were significantly affected by it. The greatest difference in decontamination effect was observed for the combination of plasma and plasma activated water, generated by high frequency current, where the difference was up to 30 %, but all methods had a significant decontamination effect compared to the control.

KEYWORDS

Plasma, plasma activated water, *Aspergillus niger*, sterilization.

ŽITNÝ, Michal. *Vliv plazmatu a plazmatem aktivované vody na plíseň Aspergillus niger*. Brno, 2023. 47 s. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce doc. Ing. Zdenka Kozáková, PhD.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. 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

Rád bych poděkoval vedoucí mé bakalářské práce doc. Ing. Zdence Kozákové, Ph.D. za její ochotu, cenné rady a dohled zpracování této práce. Dále bych chtěl poděkovat moji konzultantce Ing. Zuzaně Měšťánkové za její trpělivost a ochotnou pomoc jak v laboratoři, tak při zpracování této práce. Zároveň bych chtěl poděkovat Janu Hrudkovi (VŠCHT), který svým programem ochotně zpracoval některá naměřená data. Rovněž bych chtěl moc poděkovat své rodině, za jejich psychickou podporu.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Plazma	9
2.1.1	Generace plazmatu	10
2.1.2	Využití plazmatu	11
2.2	Antimikrobiální účinky plazmatu.....	12
2.2.1	Účinky ultrafialového záření	12
2.2.2	Účinky reaktivních forem kyslíku a dusíku.....	12
2.2.3	Účinky na mikroorganismy	12
2.3	Plazmatem aktivovaná voda	14
2.3.1	Generace plazmatem aktivované vody	15
2.3.2	Aplikace plazmatem aktivované vody	16
2.3.3	Antimikrobiální účinky plazmatem aktivované vody	16
2.4	Plísně	18
2.4.1	Výskyt a ekologický význam.....	19
2.4.2	Škodlivost	19
2.4.3	Využití	19
2.4.4	Sterilizace	20
2.5	<i>Aspergillus niger</i>	20
2.5.1	Kultivace.....	21
2.5.2	Využití	21
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	22
3.1	Chemikálie	22
3.1.1	Činidla pro charakterizaci plazmatem ošetřené vody.....	22
3.1.2	Příprava růstového média	23
3.2	Aparatury	23
3.2.1	Spektrofotometr	23
3.2.2	Aparatura pochodňového jetu	23
3.2.3	Aparatura plazmové trysky v kapalině pro přípravu plazmatem ošetřené vody.....	24
3.3	Metodika experimentů.....	26
3.3.1	Charakterizace plazmatem ošetřené vody	26

3.3.2	Charakterizace plazmatem ošetřené vody vytvořené jetem.....	26
3.3.3	Přímé ošetření plísně plazmatem	26
3.3.4	Kombinované ošetření plazmatem spolu s PAW.....	27
3.3.5	Vyhodnocení	27
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	28
4.1	Charakterizace PAW pomocí spektrofotometrie	28
4.2	Přímá interakce mezi plazmatu s plísní <i>Aspergillus niger</i>	31
4.3	Kombinovaná interakce plazmatu a PAW (DC) s plísní <i>Aspergillus niger</i>	33
4.4	Kombinovaná interakce plazmatu a PAW (AC) s plísní <i>Aspergillus niger</i>	37
4.5	Porovnání dekontaminačního účinku jednotlivých metod	38
5	ZÁVĚR	39
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	40
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	47

1 ÚVOD

V poslední dekádě se část pozornosti vědecké obce obrátila na nízkoteplotní plazma a jeho využití se zaměřením na snížení energie potřebné k vyvolání plazmatu. Lze pozorovat zejména extenzivní rozvoj v oblasti přípravy plazmatu za atmosférického tlaku [1]. Za těchto podmínek se plazma v nosném plynu tvoří nerovnovážně a zachovává si teplotu použitého plynu, jež je velmi často totožná s laboratorní. Plazma je i přesto silně reagující substance díky značné tvorbě vysoce reaktivních molekul (radikálů, excitovaných atomů a iontů), jež umožňují aplikaci plazmatu na povrch [2]. Díky nízké teplotě plazmatu je lze aplikovat na termolabilní a termosenzitivní látky jako jsou polymery a živé systémy.

Plazma jako čtvrté skupenství hmoty je ionizovaný plyn, občas také známý jako zářná hmota [3], který se v dnešní době využívá v medicíně jako sterilizační prostředek či jako podpora hojení ran, v zemědělství je používáno jako podpora klíčení semen nebo úprava živin v povrchu pro určité rostliny [4, 5]. Plazmatem lze ošetřit povrchy přímo nebo nepřímo za použití plazmatem aktivované vody.

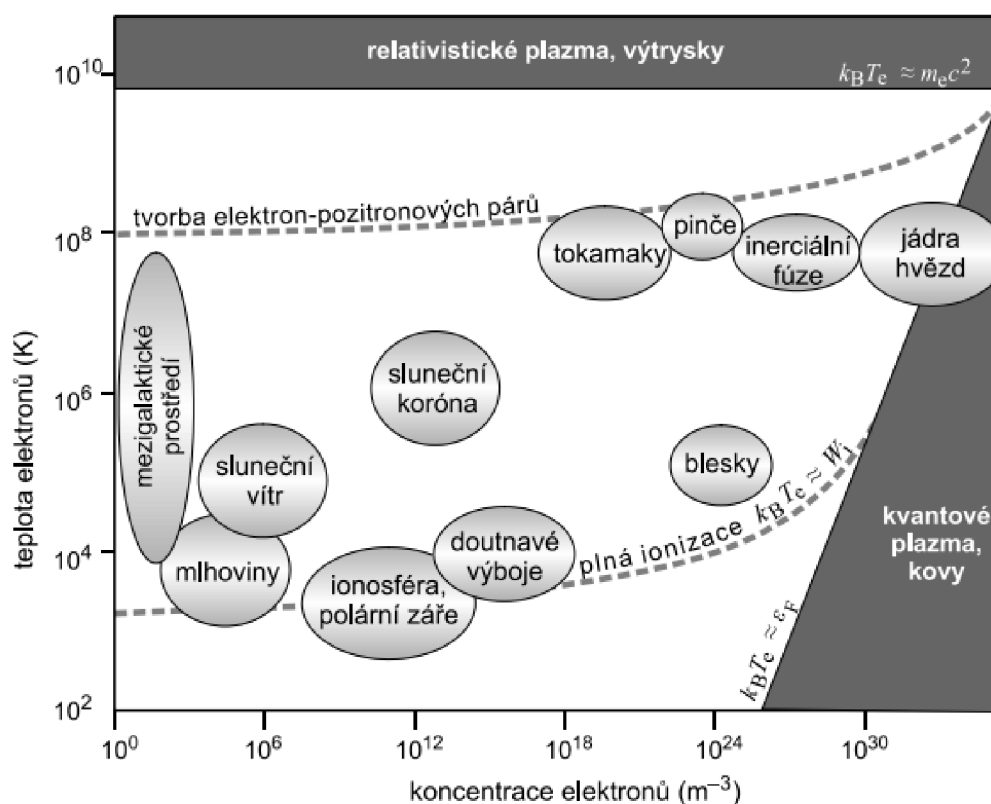
Interakcí mezi vygenerovaným plynným plazmatem a vodou vzniká plazmatem aktivovaná voda (PAW). PAW lze připravit pomocí interakce plazmatu s povrchem hladiny za přítomnosti vzduchu nebo vháněním nosného plynu přímo do kapaliny. Pro tvorbu PAW je nejčastěji využívána destilovaná voda, ale lze také použít různorodé vodné roztoky (fyziologický roztok, fosfátový pufr (PBS) a další pufr) [6]. PAW má změněné fyzikálně-chemické vlastnosti. Při ošetření se mění chemické složení, přibývá iontů. S vyšším obsahem iontů se zvyšuje elektrická vodivost a zároveň se mění pH díky přítomnosti H^+ a OH^- iontů. V různých výzkumných oblastech je možné se setkat s různým označením pro takto upravenou vodu či obecně kapalinu, mezi které patří pojmy aktivovaná voda, resp. kapalina (PAW, PAL; častěji používaná v zemědělství atd.) nebo ošetřená voda, resp. kapalina (PTW, PTL; pojem používaný v medicíně).

Na základě výše uvedeného a vzhledem k již prověřeným sterilizačním účinkům nízkoteplotního plazmatu na některých bakteriích a kvasinkách [7] se tato práce zaměřuje na aplikaci plazmatu a PAW na vyšší organismus, kterým je plíseň *Aspergillus niger*. V práci je zkoumáno jak přímé ošetření pomocí mikrovlnného výboje, tak nepřímé působení plazmatem aktivované vody připravené interakcí vybranými plazmovými systémy (mikrovlnný zdroj, vysokofrekvenční zdroj, stejnosměrný zdroj), která poskytuje různé složení chemicky reaktivních částic jako jsou dusičnany, dusitany či peroxid vodíku.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Plazma

Plazma bývá často označováno jako čtvrté skupenství hmoty [8], jde ale o částečně ionizovaný plyn, jenž musí splňovat určité podmínky. Vůči okolí musí vykazovat kvazineutralitu a jeho části vykazují kolektivní chování [9]. V plazmatu lze nalézt neutrální částice (atomy, molekuly), ionty, elektrony, volné radikály a fotony. Celkově tyto částice musí mít neutrální náboj neboli počet kladně nabitých a záporně nabitých částic musí být stejný [10]. Plazma je vodivé a svým projevem je schopné generovat elektrické a magnetické pole a zároveň být jimi ovlivňováno. V plazmatu jsou tyto částice rozprostřeny nerovnoměrně, a tudíž mají za důsledek kvazineutralitu, ne neutralitu. To znamená, že nabitě částice v bezprostřední blízkosti plazmatu jsou na něj schopné reagovat díky svému náboji. Vzdálenost, ve které částice reagují se nazývá Debyeův poloměr (Debyeova stínící délka) [10]. Pro popsání plazmatu se velice často používá jednotka elektronvolt, jelikož je schopná vyjádřit energii ($1 \text{ eV} \approx 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ J}$), teplotu ($E = k_B \cdot T$, $1 \text{ eV} \approx 11\,600 \text{ K}$) nebo hmotnost částic (přes vztah $E = mc^2$) [7, 9, 10]. Plazma lze dělit dle různých kritérií. Mezi hlavní dělení uvažujeme dělení dle rovnovážnosti, teploty, stupně ionizace, tvorby elektron-positronových párů a tlaku (koncentrace částic) (Obrázek 1) [8].



Obrázek 1: Diagram teploty elektronů na koncentraci elektronů v plazmatu vodíku [8].

Částice v plazmatu se pohybují různými rychlostmi, což je způsobeno srážkami těchto částic a následným přenosem energie z jedné částice na druhou. V rovnovážném stavu platí Maxwell-Boltzmannovo rozdělení rychlostí, jenž nám ukazuje pravděpodobnou rychlost částice v plazmatu [8]. Maxwell-Boltzmannovo rozdělení platí pro každý druh částic

(elektrony, ionty, neutrální atomy) zvlášť. V důsledku srážek a předávání energie se tyto rozdíly v rychlosti (energii, teplotě) zmenšují v jevu termalizace plazmatu [7, 9]. V různých typech plazmatu dochází k termalizaci jinou rychlostí, např. v nízkotlakém plazmatu (malá koncentrace částic) je výrazně pomalejší než v plazmatu generovaném při atmosférickém tlaku, a to v důsledku malého počtu srážek částic.

Nejvíce obecné dělení plazmatu je podle stupně ionizace a teploty, jelikož částečně zahrnují i ostatní způsoby dělení [9]. Rozlišujeme vysokoteplotní a nízkoteplotní plazma, které se navíc dělí na izotermické a neizotermické [8]. U vysokoteplotního plazmatu dosahuje stupeň ionizace až 100 % a teplota částic (iontů) přesahuje 10^6 K. Plazma tohoto typu lze vidět při fúzních reakcích, nukleárních výbuších nebo v jádru slunce (Obrázek 1) [8]. Oproti tomu nízkoteplotní plazma (někdy také studené) se pohybuje mezi 1–10 % stupně ionizace. Teplota nízkoteplotního plazmatu nepřekračuje 10^5 K [8]. V případě izotermního plazmatu si teploty různých druhů částic, tj. elektronů a těžkých částic (ionty, neutrální molekuly) přibližně odpovídají. Můžeme si ho představit jako například obloukový výboj za atmosférického tlaku. Neizotermické plazma vzniká v případě, kdy teplota elektronů je mnohonásobně vyšší než teplota iontů a neutrálních částic [11]. Je to typ plazmatu generovaný jak při nízkotlakém doutnavém výboji (zářivky, výbojky), tak při výbojích za atmosférického tlaku (povrchový, sluneční koróna, výboje v tekutinách či jetech).

2.1.1 Generace plazmatu

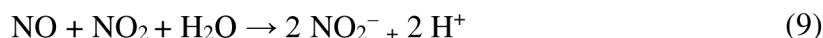
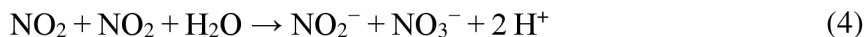
Všeobecně platí, že energie je přidána k vnitřní energii atomu, molekuly plynu, aby se se tyto částice urychlily. Pravděpodobnost srážek se díky tomu zvýší a může dojít k excitaci, ionizaci částic [1, 6, 11]. Srážky mohou být pružné, při kterých se přenáší pouze kinetická energie, nebo nepružné, které přenáší i část vnitřní energie částice. Pro tvorbu plazmatu jsou důležité především nepružné srážky, které způsobují excitaci či ionizaci částic [9, 10]. Přičemž po ionizaci, excitaci částic působí různé procesy, ale ne všechny vedou k tvorbě plazmatu. Část částic se rekombinuje, deexcituje zpět do neutrálního stavu. Je proto důležité dodávat energii do chvíle, kdy se vytvoří samo udržující se plazma. Z excitovaných částic se musí nejdříve vytvořit nestabilní nebo metastabilní částice, aby mohly přejít do formy plazmatu [6]. V obou případech k tomu dochází při dalších srážkách s jinými částicemi. Toto opět může přinést také deexcitaci a vracení do neutrálního stavu.

Při generaci nízkoteplotního plazmatu za atmosférického tlaku ve vzduchu dochází k excitaci a ionizaci molekul dusíku, kyslíku, vodní páry a dalších atomů a molekul, které následně vytvářejí tzv. reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS). Mezi ně patří např. radikály kyslíku, vodíku, dusíku, hydroxylové radikály, oxidy dusíku, peroxid vodíku a další – viz. rovnice (1–10) [7].

Pro ionizaci lze použít jakýkoli zdroj energie jako jsou elektrické pole, zvýšení teploty, gama záření, chemické reakce a další [1]. Pro nízkoteplotní plazma je nejvíce používáno elektrické a elektromagnetické pole. Vlastnosti plazmatu jsou poté ovlivněny typem elektrické energie a konfigurace elektrod, jako jsou střídavý proud (AC), stejnosměrný proud (DC), dielektrický bariérový výboj (DBD) či plynem, ve kterém je plazma generováno atd. [1].

V plazmochemické praxi se plazma generuje v aparatuře sestávající z plazmového reaktoru a zdroje vysokého napětí. Ten může využívat střídavý proud s použitím vysokého

napětí o různých frekvencích (audiofrekvenční AF, radiové vlny RF, mikrovlny MW) nebo stejnosměrný proud (pulzní nebo nepulzní) [1]. Typ výboje je určen konstrukcí plazmového reaktoru.



2.1.2 Využití plazmatu

Z industriálního hlediska lze studené plazma využít jako vynikající přenašeč iontů vzniklých v plazmatu na povrch. V tomto případě primární aplikace zahrnují předúpravu povrchu, čištění a aktivaci nebo pasivaci [1]. Dále také sprejování filmů; a dodatečná úprava potažených povrchů za účelem změny chemického složení nebo krystalické struktury nátěru [1]. V medicíně se plazma využívá jako sterilizační prostředek, podpora hojení ran a koagulace krve [12]. V případě srážení krve se teplé plazma aplikuje nepřímo na otevřené rány použitím tzv. Argon Plasma Coagulation (APC) zařízení nebo studené plazma pomocí tzv. Cold Atmospheric Plasma (CAP) zařízení [12]. V případě APC se spoléhá více na teplotu, a tedy vypálení ran a funguje díky vytvořeným iontům a reaktivním formám plynů [12]. Tyto molekuly stimulují přirozené procesy vedoucí k srážení krve. Po ošetření plazmatem je pozorována rozsáhlá aktivace a agregace krevních destiček a také tvorba fibrinu [12].

Jednou z oblastí, ve které se tepelné plazma může využít, je zpracování odpadních látek. To se aplikuje za různými účely. Plazma může v určitých případech ničit kontaminanty v materiálu a regeneruje užitečné produkty z materiálu (kovy, chemikálie, ...) [13]. V případech toxických materiálů je plazma schopné je inaktivovat, pokud už je není schopné využít pro jiné účely. Přičemž toto se využívá téměř výhradně u pevných odpadních látek, a ne u kapalných nebo plynných [13]. Další možností využití teplého plazmatu je v oblasti metalurgie, kde plazmové pece mají vysokou efektivitu a produkují slitiny s malým obsahem uhlíku, kyslíku a vodíku [13]. Tohoto se využívá pro výrobu čistého křemíku, ultra jemných vysoce čistých keramických prášků a výrobu vysoce čisté titanové strusky z ilmenitu [13, 14]. Dalším možným využitím je příprava nanočástic atomizací materiálů a následným rychlým zchlazením [13].

2.2 Antimikrobiální účinky plazmatu

2.2.1 Účinky ultrafialového záření

Ultrafialové záření (UV) působí na buňky bakterií aktivací tvorby thyminových dimerů v DNA. To potlačuje schopnost bakterií replikovat se [15]. Bylo ale prokázáno u některých druhů plazmatu, že UV není hlavním inaktivačním faktorem plazmatu [16, 17]. V experimentu H. W. Herrmanna bylo mezi plazma a bakterie položeno křemenné sklo, které zablokovalo přístup reaktivních částic plazmatu k buňkám bakterie. Při zablokování přístupu se koncentrace živých buněk podstatně neměnila [17]. Toto se vysvětluje s pomocí bakteriocidního rozsahu UV světla. Plazma negeneruje UV při potřebných vlnových délkách, a proto je účinek UV mizivý [15]. Různé druhy plazmatických generátorů tvoří plazma o jiné charakteristice (emise částic při jiných vlnových délkách), tudíž generátor se správným nastavením by mohl generovat UV o správných vlnových délkách s baktericidním účinkem [18].

2.2.2 Účinky reaktivních forem kyslíku a dusíku

Reaktivní formy kyslíku generované plazmatem jako je ozon, singletový kyslík a atomární kyslík mají germicidní účinky [15]. Reakce vzniku reaktivních forem jsou zobrazeny výše, viz. rovnice (1–10). Toto bylo experimentálně prokázáno při porovnání účinků plazmatu s kyslíkem a při zamezení přístupu kyslíku [17]. Vytvořený ozon zamezuje buňce přístup ke kyslíku a potlačuje buněčné dýchání, což vede k buněčné smrti [15]. Sloučeniny jako oxid dusný a vyšší stupně oxidace přidávají na sterilizačním účinku plazmatu [15].

2.2.3 Účinky na mikroorganismy

***Streptococcus mutans* biofilm**

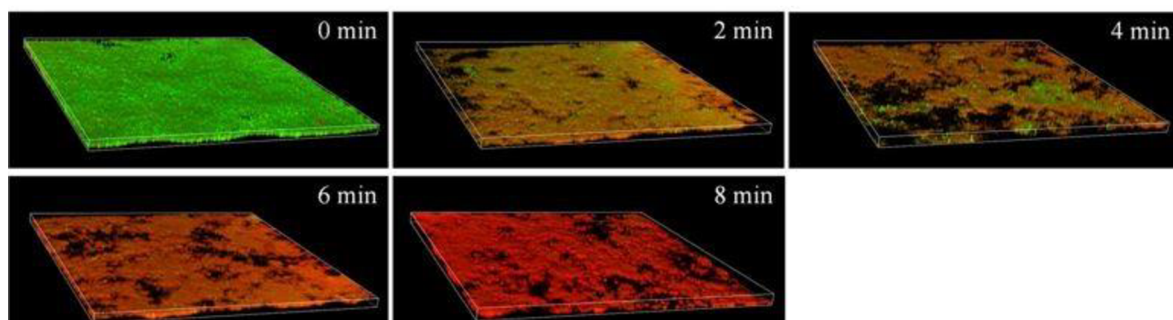
Ošetření plazmatem vykazuje inhibiční účinky na růst proti *S. mutans* biofilmu. Buněčné membrány byly narušeny reaktivními formami kyslíku a dusíku. Účinnost ošetření se mění se zvětšující se vrstvou biofilmu. Vnější vrstva biofilmu je plně sterilizována, ale tvoří ochranou bariéru pro další vrstvy biofilmu [19]. Reaktivní formy kyslíku a dusíku jsou zadržovány mrtvými buňkami *Streptococcus mutans* a nejsou schopny se dostat do kontaktu s buněčnými membránami zdravých buněk [19].

Escherichia coli* a *Salmonela

U obou Gram negativních bakterií jsou pozorovány známky inhibice po ošetření plazmatem. Stupeň inhibice se mění s časem ošetření, přičemž oproti neošetřeným vzorkům je vždy počet živých bakterií porovnán [20]. *Salmonela* vykazuje větší závislost na době ošetření. Vzorky ošetřované déle byly inhibovány více než by počáteční trend naznačoval. Z výsledku experimentu provedených Niemrem a Sitesem bylo vidět, že u *Salmonela* byl stupeň redukce bakterie celkově vyšší než u *E. coli*. Toto je pravděpodobně způsobeno rozdílnou strukturou buněčné stěny [20].

***Candida albicans* a její biofilm**

Buňky *Candida albicans* jsou ošetřením plazmatem přivedeny k apoptóze. Po 2 min v přítomnosti plazmatu polovina buněk *Candida albicans* prošla apoptózou. Po následujících 2 min je koncentrace buněk snížena sedmkrát od původní koncentrace [7]. Inaktivace biofilmu je vidět na obrázku společně s časovou závislostí samotné inaktivace (Obrázek 2). V čase 4 min je vidět, že přibližná polovina je mrtvá a po 8 min je vidět, že téměř všechny buňky byly inaktivovány.



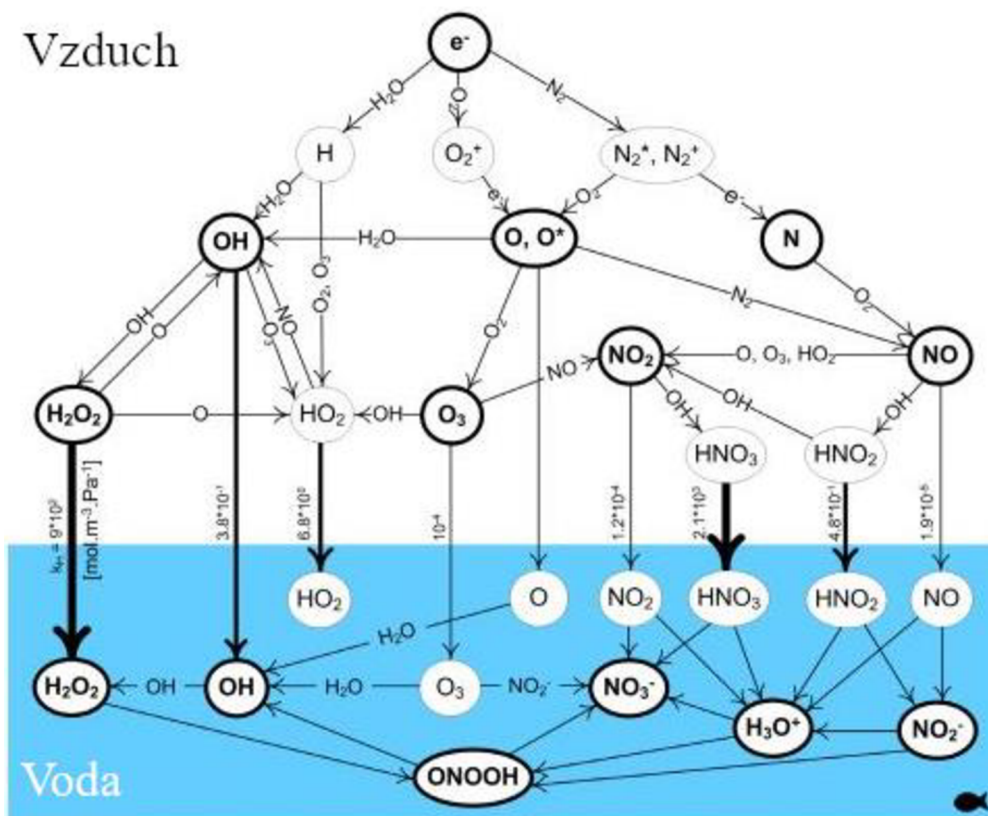
Obrázek 2: Inaktivace biofilmu *Candida albicans*. Zelená fluorescence ukazuje živé bakteriální buňky a červená mrtvé [7].

Aspergillus flavus

Plísně jsou komplikovanější organismy než jednoduché bakterie. Toto jim dodává rezistivitu vůči sterilizaci. Studené plazma je tudíž neschopné plně usmrtit plísně, pokud je generováno pomocí nižší energie. Plazma je tudíž za těchto podmínek pro plísně pouhým inhibítoem a není většinou letální [21]. Při dostatečném čase ošetření reaktivní formy O a N jsou schopny narušit membránu buňky a způsobit její apoptózu. V experimentu s cereáliemi z hnědé rýže, které sloužily jako substrát pro *A. flavus*, bylo vidět, že ošetřené vzorky vykazují růst plísně až po značné době (15 dní) později než kontrolní vzorky [21].

2.3 Plazmatem aktivovaná voda

Plazmatem ošetřená voda je voda ošetřená plazmatem ve smyslu přeměny molekul vody na jiné molekulové celky. Mnoho studií o PAW ukázalo, že hlavními účinnými látkami PAW jsou reaktivní formy kyslíku (ROS) a reaktivní formy dusíku (RNS). Tyto dvě aktivní formy molekul spolu tvoří celek [22]. Mezi hlavní složky ROS patří hydroxylové radikály, peroxid vodíku, singletový kyslík, superoxidové anionty a ozon, zatímco RNS zahrnuje hlavně dusičnany, dusitany, peroxodusitany, radikály oxidu dusnatého, amoniak a dusík (Obrázek 3). Mezi nimi reaktivní druhy s dlouhou dobou života jsou peroxid vodíku, dusičnany a dusitany [22]. Procentuální obsah těchto molekul je z velké části závislý na podmínkách přípravy. Fyzikální a chemické vlastnosti vody, jako je vodivost, pH a redoxní potenciál, jsou ovlivněny aktivací plazmatu [22]. Drastické snížení pH v důsledku tvorby H_3O^+ iontů může mít na svědomí antimikrobiální účinky PAW spolu s přítomností peroxidu vodíku [23]. Avšak peroxid vodíku z valné většiny způsobuje oxidační vlastnosti PAW. Experimenty ukazují, že hodnota pH klesne k hodnotě cca. 3,5 a zde již stagnuje, ať už probíhá ošetření jakkoli dlouho [22].

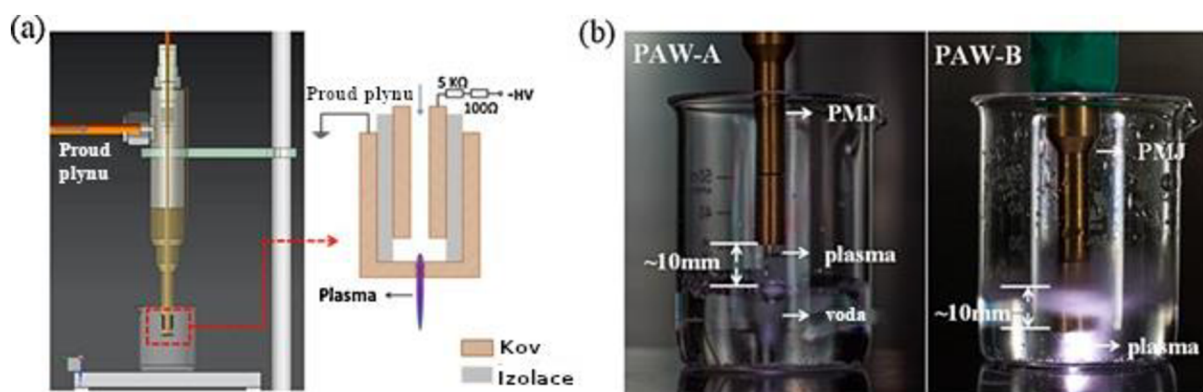


Obrázek 3: Možné mechanismy dodávání reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS) generovaných v plynné fázi do vodního prostředí (upravené) [24].

Při dlouhodobém skladování se ztrácí efektivnost PAW. Po týdnu skladování nestabilní ionty vytvořené ve vodě rekombinují a stabilizují se. PAW ztrácí tedy svoji účinnost a nabývá vlastností vody použité na přípravu PAW obohacené o dusitany a dusičnany [22].

2.3.1 Generace plazmatem aktivované vody

Bylo mnohokrát potvrzeno, že účinnost biologické aktivity plazmatem ošetřené vody (PAW) je v přímé korelaci chemie a relativní koncentrace složek RONS, které se obvykle vytvářejí ve vodném prostředí nebo na rozhraní mezi plynnou a kapalnou fází [6]. Produkce těchto plazmatem indukovaných RONS závisí na různých parametrech, jako jsou typy plazmového napájení, typ nosného plynu, konfigurace elektrod, použité napětí, polarita elektrod, doba interakce plazmatu, průtok plynu, objem roztoku, vzdálenost mezi elektrodami a povrchem kapaliny, složení roztoku, trvání pulzu a tak dále [22, 23]. Je dobře známo, že různé metody generování PAW povedou k různému množství reaktivních částic, což nakonec ovlivní aktivitu výsledného PAW pro různé aplikace. Například vyšší koncentrace dusitanů/dusičnanů v PAW mohou být preferovány pro urychlení růstu rostlin nebo klíčení semen v zemědělství. Naproti tomu vyšší podíl peroxid vodíku a dusitanů vykazují vyšší sterilizační a proliferační efekt využitelný v medicíně při hojení ran. Existují dva hlavní způsoby generování plazmatem aktivované vody, a to jsou přímá generace v roztoku (PAW-B) anebo nepřímá generace nad povrchem roztoku a přenos pomocí nosného plynu do roztoku (PAW-A), viz. Obrázek 4 [6].



Obrázek 4: a) Generování plazmatu nad povrchem roztoku a b) generování plazmatu pod povrchem roztoku (upravené) [25].

Jelikož ionizace plynu a jeho následný přechod na plazma je více energicky úsporný proces, používají se častěji metody generace plazmatu v plynné fázi a poté přenosu částic do kapaliny. Vlastnosti PAW generované různými aktivačními metodami jsou také odlišné. Plazmové záření iniciuje změny ve složení vody při úpravě PAW-A na rozhraní plynného plazmatu a vody. Když je plazma vypuštěno pod hladinu vody, stává se součástí výbojové odezvy, takže reakce je prudší a produkuje více aktivních látek [26].

PAW-B je proces, kdy se plazma generuje přímo v zásobním roztoku. V této konfiguraci je vysokonapěťová elektroda ve tvaru jehly nebo destičky ponořena do kapaliny [6]. Elektrické pulzy musí být silnější, než jsou u generace plazmatu v plynu, kvůli kolizím hustěji uskupených molekul vody. Díky vysokému proudu procházejícímu systémem se systém rychle zahřívá a není možné používat teplotně nestálé látky jako roztok bez dlouhých dob chlazení [26].

Nedávno byly široce prozkoumány mechanismy tvorby a transportu reaktivních forem z plynné fáze do kapaliny, solvatace reaktivních druhů a také interakce plazma-kapalina. K přenosu reaktivity z plazmatu do kapaliny dochází hlavně na rozhraní plyn-kapalina, doprovázený četnými fyzikálními a chemickými procesy, např. srážky plynných částic, přenos

hmoty, rozprašování a fotolýza vyvolaná UV fotony a další [6, 26, 27]. Obecně platí, že reaktivní částice jsou nejprve produkovány, když je na plyn aplikováno vysoké napětí nebo jiný energetický vstup, a existují v plynné fázi. Některé z vytvořených částic jsou pak transportovány na rozhraní plyn-kapalina, následně prostupují fázové rozhraní a vstupují do vody [6]. Radikály produkované plynným plazmatem mají značný vliv na produkci řady sekundárních reaktivních látek ve vodných roztocích [6, 26].

2.3.2 Aplikace plazmatem aktivované vody

Bylo dobře prokázáno, že aplikace studeného plazmatu přímo na potravinářské produkty hraje významnou roli v mikrobiální inaktivaci. Mezi několika experimenty prováděnými za účelem dekontaminace jsou důležité faktory pro antimikrobiální aktivitu použití různých pracovních plynů a aplikovaného napětí [27]. V poslední době nabývá mezi výzkumníky na významu aplikace PAW jako zdroje antimikrobiálního nebo dezinfekčního prostředku. Jako dezinfekční prostředek doposud neposkytuje žádná negativa [27]. Další potenciální aplikací PAW je urychlení klíčení semen a růstu rostlin [23].

2.3.3 Antimikrobiální účinky plazmatem aktivované vody

Protože se bakterie přirozeně setkávají s RONS, když žijí aerobně, vyvinuly si řadu ochranných systémů, jako jsou enzymy, malé proteiny, jako je thioredoxin a glutaredoxin, a molekuly, jako je glutation, které neutralizují RONS a pomáhají jim přežít [32]. Několik studií pozoruje nižší míru smrtelnosti, když se plazmatem aktivovaná voda používá k dezinfekci biofilmů ve srovnání s planktonickými buňkami [32]. Biofilm je tvořen s vysokou hustotou buněk vedle sebe a ty se mohou podporovat navzájem.

Psoudomonas deceptionensis

Při styku buněk *P. deceptionensis* s PAW byly buňky deaktivovány postupně. S delším aktivačním časem PAW se efektivita deaktivace zvyšuje. K tomu s prodloužením času probíjení elektřinou PAW se efektivita deaktivace zvyšuje [29, 30]. Při vystavení *P. deceptionensis* plazmatem aktivované vodě dochází ke změnám v morfologii buněk bakterie. V membráně buňky se tvoří díry, jimiž poté ven proudí organely a ostatní vnitřnosti, což vede ke kompletní apoptóze bakterie [29, 30].

Escherichia coli* a *Listeria innocua

Při styku buněk *Escherichia coli* a *Listeria innocua* s PAW byly buňky deaktivovány postupně. Při ponechání generace plazmatu delší dobu se efektivita zvýšila. Po nějaké době se však narazí na bariéru [31]. Při delším ošetření se generuje větší množství nestabilních, rychle působících částic, ale po určité době budou všechny molekuly tvořící tyto částice spotřebovány. Po tomto čase budou působit pouze stabilnější ionty, jejichž antimikrobiální účinky jsou pomaleji působící. Při styku s PAW reagují podobně jako *P. deceptionensis* s rozdílem, že jejich deaktivace je neprobíhá stejnou rychlostí. Deaktivace *Escherichia coli* probíhá rychleji než deaktivace *Listeria innocua* [31]. *Listeria innocua* je jedna z grampozitivních bakterií (se silnější buněčnou membránou), což prokazuje, že tloušťka membrány je důležitý faktor v rychlosti deaktivace bakterií [31].

***Staphylococcus aureus* biofilm**

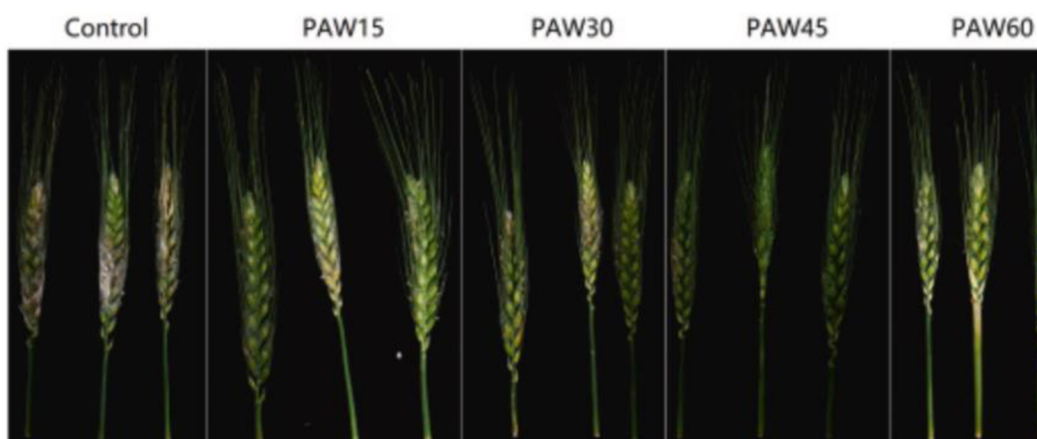
Bylo zjištěno, že PAW indukovaná podvodním plazmovým paprskem je schopna snížit koncentraci *E. coli* a *S. aureus* více než PAW připravená jako PAW-A, tedy působením plazmatu nad vodní hladinou [33]. Stojí za zmínku, že ve výzkumu společnosti Royintarat mohla PAW indukovaná po dobu 6,5 min podvodním proudem Ar plazmatu optimálně snížit asi 3,10 log planktonických *S. aureus* po 1 hodině ošetření, zatímco 11,5 min indukovaná PAW dielektrickým bariérovým výbojem (DBD) pod vodou prostřednictvím Ar/O₂ (1 %) mohl optimálně snížit přibližně 2,45 log planktonického *S. aureus* po namáčení po stejnou dobu [33]. Při krátkém pobytu (10 min) v PAW se membrána *S. aureus* moc nedeformuje, ale při prodloužení času na 30 min více než 50 % bakterií prošlo buněčnou smrtí [33]

***Enterobacter aerogenes* biofilm**

V studii byly buňky *Enterobacter aerogenes* použity jako nepatogenní simulace pro *Salmonela*. PAW byla testována jako alternativa chlorované vody [34]. Při aplikaci vrstvy PAW (ekvivalent na 100 ppm chlorované vody) na biofilm odumřela vnější vrstva biofilmu, ale zbytek stále zůstal [34]. Při častém doplňování PAW bylo vidět, že PAW je možná náhrada za chlorovanou vodu, která se používá pro účely dekontaminace bakterií [34].

Fusarium graminearum

PAW byla aplikována na pšeničné klásky napadené plísní *F. graminearum*. Klásky ošetřené PAW mají symptomy výrazně redukované oproti kláskům neošetřeným, což zahrnuje menší změnu barvy a usychání rostliny, jak lze vidět na Obrázku 4. Patogen nebyl schopen proniknout do 'naočkovaných' klásků [35]. V porovnání s komerčně používanými fungicidy má PAW přibližně stejnou účinnost. K jejímu vypaření ale dochází mnohem rychleji [35]. Oblast rozšíření je silně omezena za použití PAW po určitou dobu. Nejdelší inhibice byla pozorována u roztoků, na které bylo nejdéle působeno plazmatem. Inhibice růstu mycelia je v přímé korelaci k době ošetření vody plazmatem [35].



Obrázek 5: Účinky PAW na *Fusarium graminearum* parazitující na kláscích obilí [35].

Penicillium italicum

Studie ukazuje, že při styku s PAW, jež byla aktivovaná jen krátký čas (15 min), nejsou inhibiční schopnosti PAW rozpoznatelné [36]. Naopak při dlouhé aktivační době jsou spory *Penicillium italicum* na ovoci, výrazně inhibovány [36]. Použití PAW k inaktivaci *Penicillium italicum* na ovoci nezpůsobilo žádnou významnou změnu barvy povrchu, kyseliny askorbové, celkových flavonoidů a celkových karotenoidů ovoce [36]. PAW by mohla udržet nebo dokonce zvýšit pevnost kumquatů během skladování po sklizni [36]. Po ošetření PAW byly pozorovány minimální zbytky dusičnanů a dusitanů [36].

Candida albicans* a *Citrus limon

Současný výzkum ukazuje fungicidní účinky PAW na *C. albicans* a *C. limon* (kazící houby) [37]. Plazmatem ošetřená voda napadá buňky a perforuje v jejich membránách díry [37]. Toto je potvrzeno přítomností organel v PAW po ošetření [37]. Zvýšením reaktivity PAW podporuje deaktivaci hub, jelikož vznikají málo stabilní ionty a radikály, které poté ničí membránu, díky čemuž dochází k buněčné smrti [37].

Aspergillus brasiliensis

Při vystavení buněk *Aspergillus brasiliensis* PAW dochází k perforaci buněk. Membrána byla silně deformována scvrknutím [38]. Bylo zjištěno že při deformaci membrány se membrána stává porézní místo celistvé [38]. Dekontaminace spor měla tendenci se zvyšovat s ošetřeními PAW, které měly delší dobu aktivace plazmatem [38].

Agaricus bisporus

Populace bakterií a faktory, které ovlivňují jejich růst, hrají důležitou roli v posklizňové kvalitě žampionů [39]. Po sedmi dnech skladování se populace mikrobů postupně zvyšovala ve všech skupinách, ale mikroorganismy na houbách ve skupinách ošetřených PAW byly sníženy ve srovnání s kontrolní skupinou, což bylo zvláště patrné u bakterií [39]. Mokré houby za normálních podmínek se rozkládají rychleji díky mikrobům ve vodě.

2.4 Plísňe

Plísňe jsou poddruh hub, jež rostou ve formě mnohobuněčných vláken zvaných hyfy [40]. Plísňe tvoří velké a rozmanité množství druhů hub, u nichž tvorba hyf způsobuje změny barvy a chlupatý vzhled, zejména na potravinách [40]. Soubor větvených vláken hyf tvoří jediný organismus zvaný mycelium (podhoubí) [40]. Plísňe se jeví jako velmi jemná chlupatá vlákna (většinou bílá) na povrchu. Z podhoubí vyrůstají rozmnožovací orgány a z nich se uvolňují lehké a vodoodpudivé výtrusy (spory) kontaminující povrchy, předměty a potraviny. Optimální teplota pro růst plísni zahrnuje široké rozmezí v závislosti na druhu plísni (18 až 28 °C), některé rostou i při -10 °C nebo 60 °C. Známe tisíce druhů plísni, přičemž většina se vyskytuje za jiných podmínek. Mezi plísňe patří saprotrofy, mesofily, psychrofilny a termofily, které jsou děleny pomocí místa výskytu nebo způsobem potravy [41]. Dalším druhem plísni jsou plísňe, které jsou patogenní vůči člověku [41]. Obecně se plísňe rozmnožují vytroušením z výtrusnic při přístupu alespoň 1 % kyslíku ve vzduchu.

2.4.1 Výskyt a ekologický význam

Plísně jako všechny houby se nacházejí v místech s dostatečnou vlhkostí a v jejich teplotní toleranci od -10 do 60 °C, což je pro eukaryotické buňky limitní hodnota [42]. Zvýšení vlhkosti podporuje tvorbu plísní. Tvoří se na organickém povrchu, který slouží jako potrava. Plísně vylučují enzymy, které degradují komplexní biopolymery jako celulóza, škrob či lignin. Tímto se zapojují do recyklace živin skrze ekosystémy. Termofilní plísně jsou jedny z nejvíce aktivních v procesu rozkladu [42]. Je možné je nalézt kdekoli, kde dochází k rozkladu, ale nejčastěji jsou v kompostech, hnoji, plážovém písku a průmyslových uhelných dolech. I když jsou zvané termofilní, jejich diseminace v tropických zemích se nijak zvlášť neliší od chladnějších krajín [42]. Jako jeden z mála viditelných organismů se plísně vyskytují i v domácnostech. Nejčastěji se vyskytují při zvýšené vlhkosti vzduchu jako u domácích spotřebičů využívající vodu nebo čistících zařízení [43]. Jsou také často vidět jako důsledek špatného zateplení. Plíseň se uchytává na porézních materiálech jako je dřevo nebo sádrokarton, kde má dostatečný přístup ke vzduchu a dostatečnou vlhkost. V zimních studenějších měsících plíseň zpravidla bují, jelikož se jí dostává vyšší vlhkosti. Často jsou vidět v rozích místností nebo pod okny, kde se mísí studený a teplý vzduch [43].

2.4.2 Škodlivost

Jako velké množství věcí v malé míře jsou plísně prospěšné, ale přebytek je škodlivý. Pro člověka je velké množství plísní inertních [43]. Výtrusy plísní jsou běžnou součástí prachu v domácnosti. Je důležité udržovat výšku obsahu výtrusů relativně nízkou, jelikož i když jsou pro člověka povětšinou neškodné, mohou způsobit alergické reakce a respirační potíže [43]. Mohou být také pozorovány slzení očí, nedostatek dechu a vznik před vystavením neviděných nemocí [43].

Část plísní produkuje mykotoxiny, jež jsou škodlivé i v menších dávkách. Tyto můžeme získat skrze konzumaci infikovaných vajec, pití mléka atd. [44]. Po většinou jsou mykotoxiny orálně užity a vyvolávají mykotoxicitu. Dosavadní výzkum se směřuje na karcinogenní a mutagenní mykotoxiny. Tyto látky jsou nebezpečné jak člověku, tak i domácím zvířatům [45]. Příjmutím mykotoxinů v potravě může dojít k akutní intoxikaci [46]. Díky dnešnímu dbání na bezpečnost chovných zvířat se do potravy nedostává množství potřebné k vyvolání akutní reakce. Mnohem častěji dochází k chronickému užívání mykotoxinů, které v krátké době proběhne bez povšimnutí. Při dlouhodobém užívání může způsobovat neplodnost, snížení produktivity, nenadálé nabrání váhy a snížení imunity [45].

2.4.3 Využití

Plísně se využívají ve farmaceutickém, chemickém a potravinářském průmyslu. Nejznámějším využitím plísní je příprava penicilínu, jenž se používá jako antibiotikum a obecně působí proti bakteriím, způsobem usmrcení. Za objev penicilínu dostal roku 1945 Nobelovu cenu Alexander Fleming a spolu s ním i jeho spolupracovníci Chain a Florey [47]. V potravinářském průmyslu se používají plísně u dlouho zrajících sýrů, jako je např. Hermelín či niva. Doba zrání takovýchto sýrů se pohybuje od 2 týdnů až po 6 měsíců. Dále se také používají k opracování vybraných masných produktů např. uherský salám.

2.4.4 Sterilizace

Na plísň jako zástupce hub působí fungicidy, které na ně působí inhibičně až smrtelně. Nejčastější je však použití chlorových bělidel, které jsou nebezpečné i pro člověka. Rozsah plísně určuje druh nanesení fungicidu, např. postřik, otření atd. [48]. Další z možností je použití ozonu, který je oproti bělidlům mnohem šetrnější. Po použití se rozpadne rychle na dvouatomární kyslík a nezatěžuje životní prostředí. Pokud je potřeba účinnější technika na pevné materiály, lze použít UV lampy, které deaktivují plíseň [48]. Oproti tomu nízkoteplotní plazma nebo plazmatem aktivovanou vodu lze aplikovat při ošetření teplotně citlivých materiálů, a to včetně živých tkání.

2.5 *Aspergillus niger*

Aspergillus niger (Obrázek 6) se řadí mezi vláknité houby třídy Ascomycetes. Svůj název dostal podle tmavě až černě zbarvených kolonií. *Aspergillus niger* patří do sekce rodu Nigri, jenž se vyznačuje právě černou barvou kolonií [49]. Do této sekce patří 15 dalších druhů *Aspergillus*, které si jsou vzhledově velmi blízké. Tento rod je možné nalézt po celém světě a rostou na velkém množství rozličných substrátů. Jsou považovány za běžné houby kazící potraviny [49]. Také se jim přezdívá metaboličtí olympionici [50]. Členové tohoto rodu jsou převážně považovány za netoxické, ale *A. niger*, který je nejběžnější, je příležitostným patogenem díky schopnosti produkovat ochratoxin A [49].



Obrázek 6: *Aspergillus niger* rostoucí na médiu v Petriho misce (vlevo) a jeho mikroskopické zobrazení (vpravo) [51].

2.5.1 Kultivace

Aspergillus niger je schopen růst v širokém teplotním rozmezí 6–47 °C, přičemž jeho teplotní optimum se pohybuje okolo 35–37 °C. *A. niger* je striktně aerobní, tudíž by při nepřístupu kyslíku zemřela [52]. Zároveň je schopen růst v širokém rozmezí pH 1,9–9,8, což je pro plísně neobvyklé [53]. *A. niger* se rozšiřuje velmi rychle díky schopnosti produkovat velké množství konidií, které se rozšiřují vzduchem [50].

2.5.2 Využití

Aspergillus niger byl v průmyslu použit poprvé v roce 1919 k syntéze kyseliny citronové skrze fermentaci. Kyselina citronová je využívána v obrovském množství produktů. V potravinářství se začleňuje do nealkoholických nápojů, ovocných džusů, dezertů a různých dalších cukrovinek [53]. Ve farmaci se s ní setkáme ve formě citrátu železitého. Dále se používá jako konzervant v krevních bankách. V kosmetice je ji možné použít jako pufr a antioxidant [53]. Kyseliny citronová a glukonová, kterou *A. niger* produkuje z glukózy, jsou tvořeny ve velkých kvantitách a téměř bez nežádoucích vedlejších produktů [53][50]. Úřad pro potraviny a léčiva (FDA) uvedl *A. niger* jako zdroj kyseliny citronové a zaručil se za její bezpečnost [53].

Dále se využívá *Aspergillus niger* jako syntetizér enzymů. Produkuje extracelulární enzymy – amylolytické, proteolytické, lipolytické, pektolytické a celulolytické [55]. Pektolytické enzymy produkované pomocí *A. niger* se využívají při výrobě vína a ovocných džusů ke snížení jejich viskozity a pro zlepšení číření. Hemicelulózy získané z *A. niger* zlepšují reologické vlastnosti těsta a zvětšují objem bochníku [53]. Glukosaoxidasa a katalasa z *A. niger* slouží ke stanovení glukózy hlavně v diagnostických enzymových kitech. Také se používají pro odstranění glukózy nebo kyslíku z potravin a nápojů [53].

Aspergillus niger se nemusí používat pouze jako kultivační objekt pro žádané produkty, ale je schopná být využitelná sama o sobě. Biomasu *A. niger*, jenž vzniká po fermentaci, lze využít jako adsorbční medium [56]. Biomasa imobilizovaná v solidní struktuře je schopna adsorbovat některá barviva z vodných roztoků s minimálně 70 % úspěšností [56]. Přičemž struktura barvy je klíčovým faktorem pro adsorpci [56].

I přes pozitivní využití se jedná o příležitostně patogenní bakterii, jejíž přemnožení může mít negativní účinky na zdraví, a tudíž je žádoucí prostudovat její dekontaminaci pomocí šetrné sterilizační techniky, jakou je přímá i nepřímá (PAW) aplikace plazmatu.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V této bakalářské práci se zabývám dekontaminačním účinkem přímého působení nízkoteplotního plazmatu pochodňového výboje a jeho kombinace s plazmatem ošetřenou vodou na plíseň *Aspergillus niger* CCM-F 8189. Sleduji úbytek kolonií v závislosti na čase ošetření a použité metodě ošetření.

3.1 Chemikálie

Tabulka 1: Tabulka použitých chemikálií pro přípravu fyziologického roztoku, fosfátového pufru a kalibrační roztoků produsitany a dusičnany.

Název	Sumární vzorec	M (g/mol)	Registrační číslo CAS	Výrobce
Destilovaná voda	H ₂ O	18,03	-	zdroj FCH
Dusičnan sodný	NaNO ₃	84,995	7631-99-4	Lach-Ner, s.r.o
Dusitan sodný	NaNO ₂	68,995	7632-00-0	Lach-Ner, s.r.o
Dihydrogenfosforečnan sodný	NaH ₂ PO ₄	119,98	7558-80-7	Lach-Ner, s.r.o
Dihydrogenfosforečnan draselný	KH ₂ PO ₄	136,086	7778-77-0	Lach-Ner, s.r.o
Hydrogenfosforečnan didraselný	K ₂ HPO ₄	174,18	7758-11-4	Lach-Ner, s.r.o
Chlorid draselný	KCl	74,55	7647-14-5	Lach-Ner, s.r.o
Chlorid sodný	NaCl	58,44	7647-14-5	Lach-Ner, s.r.o
Identifikační číslo				
Sladinový agar báze	-	-	M137-500G	Himedia labs. s.r.o

3.1.1 Činidla pro charakterizaci plazmatem ošetřené vody

Tabulka 2: Tabulka činidel pro kolorimetrickou charakterizaci plazmatem ošetřené vody

Název	Detekční rozsah	Identifikační číslo	Výrobce
Nitrite Test, Spectroquant	0,007–3,28 mg/l	1.14776	Merck KGaA
Nitrate Test, Spectroquant	0,3–30,0 mg/l	1.01842	Merck KGaA
Roztok oxysulfátu titaničitého v kyselině sírové	-	123334-00-9	Sigma-Aldrich

3.1.2 Příprava růstového media

Do 1000 ml sterilní destilované vody bylo přidáno 50 g báze sladivového agaru a necháno ustálit 15 min. S pomocí autoklávu byla teplota zvýšena, dokud se báze kompletně nerozpustila. Dále byl agar sterilizován po dobu 15 min. Následně byl agar ochlazen a nalit do sterilních Petriho misek.

3.2 Aparatury

3.2.1 Spektrofotometr

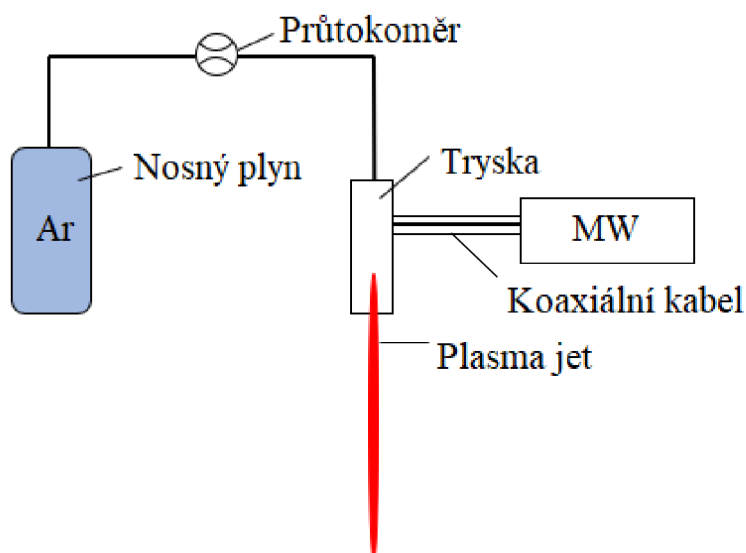
Pro spektrofotometrickou charakterizaci PAW byl použit spektrofotometr Helios Omega Unicam; viz. (Obrázek 7). Spektrofotometr operuje na základě absorpce procházejícího světla analyzovaným vzorkem, přičemž se detekuje množství absorbovaného světla. Přístrojem se zjišťuje koncentrace roztoku na základě kalibrační křivky nebo Lambert-Beerova zákona o absorpanci. Vlastní charakterizace PAW je založena na kolorimetrické detekci aktivních částic (peroxidu vodíku, dusitanů a dusičnanů), které selektivně reagují s příslušnými činidly za vzniku barevných produktů, jejichž absorpance při příslušné vlnové délce je úměrná koncentraci dané částice.



Obrázek 7: Spektrofotometr Helios Omega (Unicam)

3.2.2 Aparatura pochodňového jetu

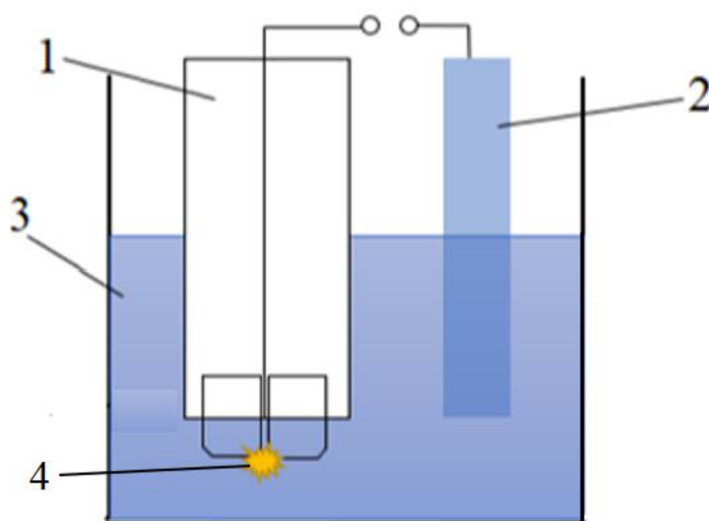
Aparatura na přímé ošetření vzorku plísně byla sestavena z reaktoru, mikrovlnného zdroje Sairem GMS 200W (frekvence 2,45 GHz), zdroje nosného plynu (plynová láhev argonu), průtokoměru a trysky jetu (vytvořená 3D tiskem), viz. (Obrázek 8). Reaktor byl složen z Petriho misky obsahující destilovanou vodu o objemu 20 ml pro charakterizaci PAW. Pro samotné měření byla použita mikrotitrační destička (12 jamek) s objemem 1 ml nebo 0,5 ml fyziologického roztoku s plísní *Aspergillus niger*. Ze zdroje pro generaci plazmatu bylo odebíráno 9 a 12 W. Rychlost proudění plynu byla nastavena na 5 l/min.



Obrázek 8: Schéma aparatury pochodňového jetu (proudu plazmatu)

3.2.3 Aparatura plazmové trysky v kapalině pro přípravu plazmatem ošetřené vody

Aparatura na přípravu plazmatem ošetřené vody pomocí plazmové trysky v kapalině byla složena z reaktoru, zdroje vysokého napětí (stejnoseměrného DC nebo vysokofrekvenčního AC) a osciloskopu (Tektronix TDS 1012B). Vlastní reaktor byl složený z kádinky s fyziologickým roztokem o objemu 50 ml a dvou elektrod. Hlavní elektrodu pracující na principu kombinovaného korónového a štěrbinového výboje tvořil wolframový drát zasazený do keramické hlavice a skleněného držáku nebo do celoskleněné kapiláry (Obrázek 9) [58, 59]. Druhá elektroda byla plochá hliníková elektroda sloužící jako protielektroda. Výkon stejnosměrného zdroje (DC) pro přípravu PAW se pohyboval v rozmezí 40–50 W (Obrázek 10). Doba přípravy PAW byla 1 min. Pro přípravu PAW pomocí střídavého napětí (AC) byl použit zdroj vysokofrekvenční (15 kHz), výkon 40 W, doba přípravy PAW 1 min, objem ošetřovaného fyziologického roztoku 50 ml (Obrázek 11).



Obrázek 9: Schéma reaktoru pro přípravu PAW za použití AC nebo DC aparatury. 1 – hlavní vysokonapěťová elektroda (AC – skleněná špička, DC – keramická špička), 2 – hliníková elektroda, 3 – ošetřovaná voda, 4 – generace plazmatu



Obrázek 10: Příprava PAW plazmovou tryskou v kapalině se stejnosměrným zdrojem napětí (DC).



Obrázek 11: Příprava PAW plazmovou tryskou v kapalině se střídavým vysokofrekvenčním zdrojem napětí (AC).

3.3 Metodika experimentů

3.3.1 Charakterizace plazmatem ošetřené vody

Vytvoření kalibračních křivek

Pro tvorbu kalibrační křivky dusičnanů byly připraveny vzorky rozpuštěním NaNO_3 v destilované vodě se vzrůstající koncentrací NO_3^- v rozmezí 0 až 100 mg/l. Tyto koncentrace byly vybrány kvůli omezené citlivosti stanovovacího kitu, jenž se normálně používá ke stanovení obsahu dusičnanů v kohoutkové vodě. Ze stejného důvodu bylo pro dusitany použito rozmezí 0 až 1,5 mg/l, přičemž vzorky byly připraveny rozpuštěním NaNO_2 v destilované vodě. Rovnice kalibrační křivky pro peroxid vodíku byla získána z předcházející diplomové práce [60, 61]. Pro spektrofotometrické stanovení dusičnanů a dusitanů se použily komerčně dostupné práškové kity. U dusičnanů byl použit Nitrate Test: Spectroquant. Dusitany byly stanovovány pomocí Nitrite Test: Spectroquant. Peroxid vodíku se stanovoval pomocí titanového činidla ($\text{TiOSO}_4 \cdot (\text{H}_2\text{SO}_4)_x$).

Stanovení reaktivních částic

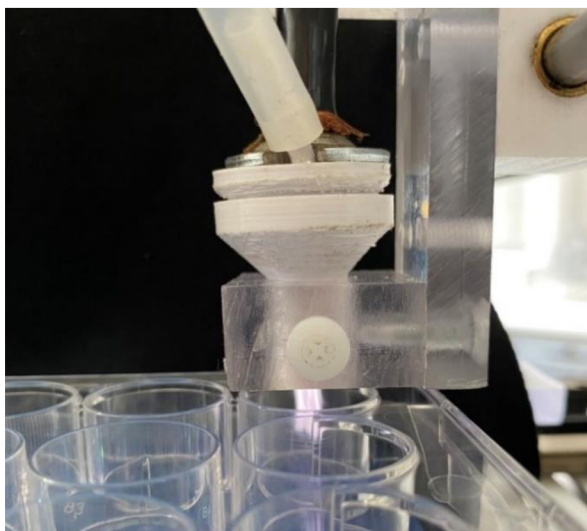
Samotné stanovení dusitanů, dusičnanů a peroxidu vodíku proběhlo pomocí UV-VIS spektrofotometrie při určitých vlnových délkách. Vzorek plazmatem ošetřené vody byl smíchán s příslušným činidlem a následně byla proměřena jeho absorbance při příslušné vlnové délce. Dusitany byly stanovovány při 540 nm. Dusičnany byly stanovovány při 380 a 526 nm, jelikož absorbují při dvou vlnových délkách. A peroxid vodíku byl stanoven při 407 nm.

3.3.2 Charakterizace plazmatem ošetřené vody vytvořené pochodňovým jetem

Tento pokus simuloval produkční aktivitu jetu pro přímé ošetření plísni plazmatem. Pro studium inhibičního účinku byla následně použita PAW připravená pomocí DC a AC plazmové trysky. Do Petriho misky bylo pro ošetření nalito 20 ml destilované vody. Ošetření probíhalo po zvyšujících intervalech času (1, 2, 3, 4, 5 min) při výkonu zdroje 9 a 12 W. Pro každý čas a výkon se použilo nových 20 ml. V tomto experimentu se stanovovali peroxid vodíku, dusitany a dusičnany. Pro stanovení každé látky byly odebrány vzorky a do nich přidáno příslušné činidlo. V případě dusitanů byla do 5 ml vzorku přidána jedna odměrná lžička (součást balení kitu) a vzorek byl důkladně protřepán. V případě dusičnanů to byly dvě odměrné lžičky příslušného činidla do 5 ml vzorku. Pro stanovení peroxidu vodíku byl smíchán 1 ml činidla se 2 ml vzorku, který byl následně protřepán.

3.3.3 Přímé ošetření plísně plazmatem

Dvě kličky spor plísně byly přidány do 25 ml fyziologického roztoku pro vytvoření zásobního roztoku. Do mikrotitrační destičky bylo nepipetován 1 ml zásobního roztoku plísně do každé jamičky. Ošetření plazmatem probíhalo pomocí pochodňového jetu dle časové osy (Obrázek 12). Počáteční experimenty se ošetřovalo 1; 5; 10; 30 min. Další měření byla změněna na 1; 5; 10; 15 min. A dále zkrácena na 1; 2,5; 5 min. Ošetření probíhalo dvojím způsobem: za omezeného přístupu vzduchu (s víčkem) a za neomezeného přístupu vzduchu (bez víčka). Z ošetřeného vzorku bylo odebráno 100 μl a přidáno k 900 μl fosfátového pufru (PBS) k zastavení účinků vytvořených molekul. Na Petriho misky plněné sladidlovým agarem byly vzorky očkované jako desetkrát a stokrát zředěné. Na Petriho misky s agarem bylo očkováno 100 μl vzorku.



Obrázek 12: Přímé ošetření plísně v roztoku plazmatem pochňového jetu na mikrotitrační destičce.

3.3.4 Kombinované ošetření plazmatem spolu s PAW

Plazmatem ošetřená voda byla vytvořena s pomocí plazmové trysky v kapalině s AC nebo DC zdrojem napětí. Ošetření plísně s použitím PAW bylo provedeno dvěma metodami. Při použití první metody byla nejprve plíseň zaočkována přímo do 25 ml PAW. Následně byla PAW ponechána působit po dobu 10 min, což vycházelo z výsledků souběžné bakalářské práce [62]. Následně byl napipetován 1 ml do jamiček mikrotitrační destičky a ošetřen po dobu 1; 2,5; 5 min plazmatem pochodňového výboje. Pro druhou metodu byl proces obrácen, kdy došlo prvně k ošetření 0,5 ml roztoku plísně plazmatem a poté bylo přidáno 0,5 ml PAW a necháno působit 10 min. V případě obou metod bylo z ošetřeného vzorku odebráno 100 μ l a přidáno k 900 μ l PBS. Na Petriho misky byly vzorky očkované desetkrát a stokrát zředěné. Na Petriho misky vyplněné sladidovým agarem bylo očkováno 100 μ l vzorku.

3.3.5 Vyhodnocení

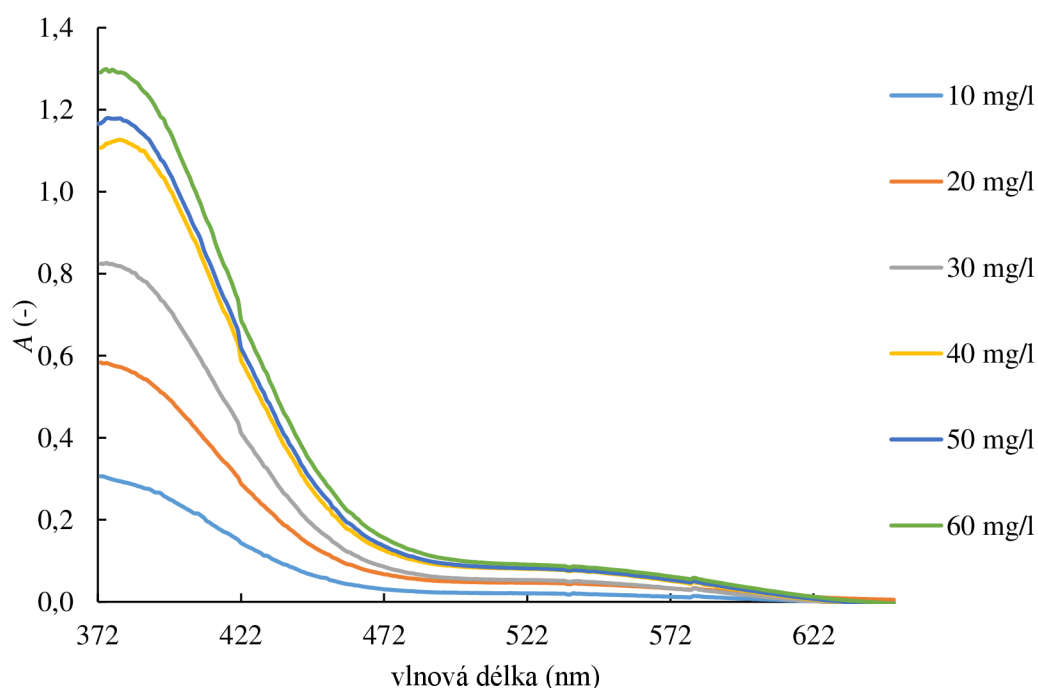
Vyhodnocení proběhlo po 72 h od odebrání a naočkování vzorků počítáním kolonií vzorků oproti kontrolám. Následně byly Petriho misky vyfoceny a poslány na vyhodnocení metodou obrazové analýzy s prvky umělé inteligence programem Aurora, který vytvořil Jan Hrudka (VŠCHT). Výsledkem je procentuální pokrytí Petriho misky koloniemi mikroorganismů. Naměřená data a výsledky byly zpracovávány v programu Microsoft Excel Office 365. Výsledky měření jsou zpracovány a předloženy ve formě grafů a tabulek s následnou diskuzí.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Charakterizace PAW pomocí spektrofotometrie

Kalibrační křivky

Kalibrační křivka je grafickým znázorněním závislosti absorbance na koncentraci absorbující látky v roztoku. Hodnoty absorpce dusičnanů byly měřeny při 380 a 526 nm, jelikož dosahují při daných vlnových délkách absorpčního maxima, viz. Obrázek 13. Pro vytvoření kalibračních křivek byly využity koncentrace 10–50 mg/l, jelikož při vyšších hodnotách dochází k saturaci detektoru, a tudíž již výsledky absorbance nejsou relevantní. Hodnoty absorpce byly následně měřeny při 380 nm, jelikož jsou v hodnoty absorpce v těchto výsledcích mnohonásobně vyšší. Grafy kalibračních křivek jsou zobrazeny v Příloze, výsledné rovnice kalibračních křivek pro příslušné vlnové délky jsou shrnuty následující Tabulce 3.



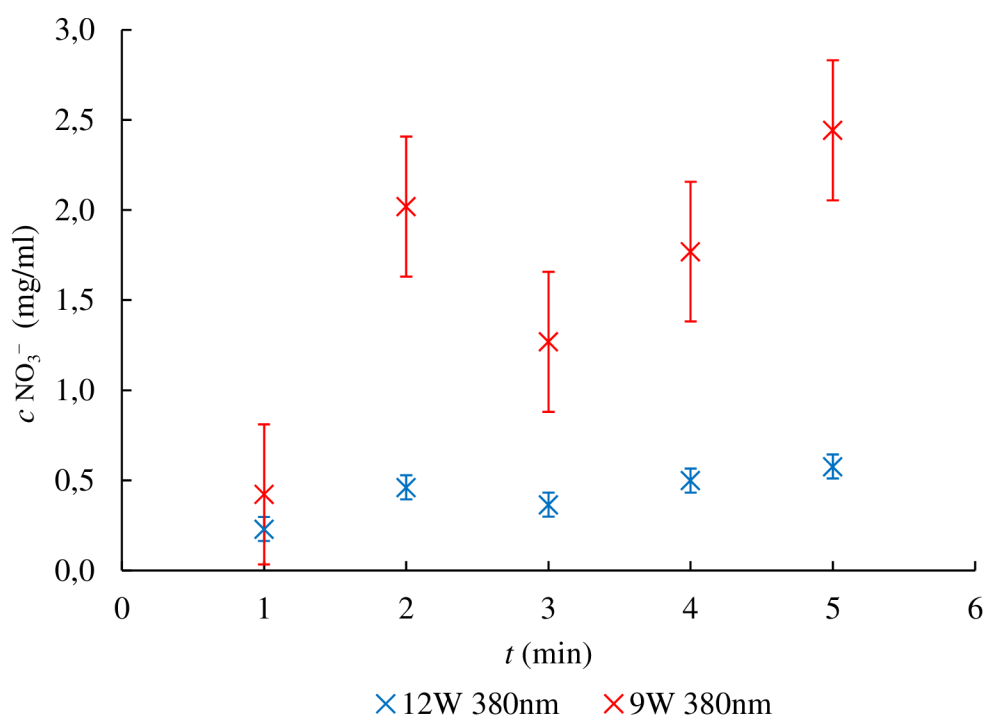
Obrázek 13: UV-VIS absorpční spektrum dusičnanů v závislosti na vlnové délce.

Tabulka 3: Tabulka kalibračních křivek pro ionty a peroxid vodíku hodnocené v PAW.

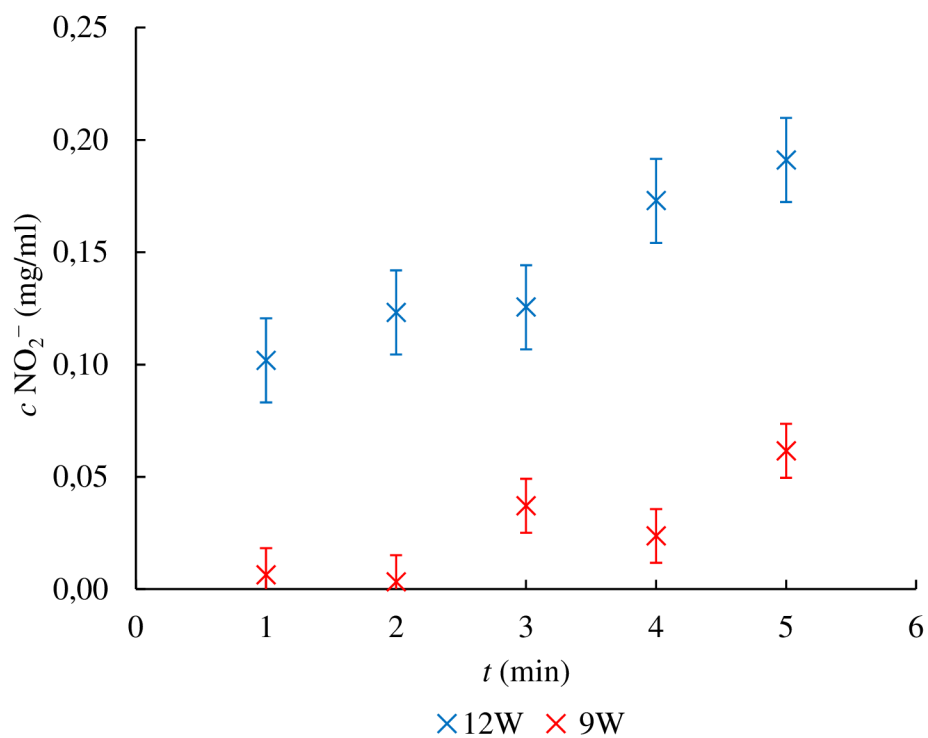
Dusitany (540 nm)	$y = 0,6334x$
Dusičnany (380 nm)	$y = 0,0260x$
Dusičnany (526 nm)	$y = 0,0018x$
Peroxid vodíku (407 nm)	$y = 0,4600x$

Stanovení reaktivních částic v PAW po přímém ošetření plazmatem pochodňového jetu

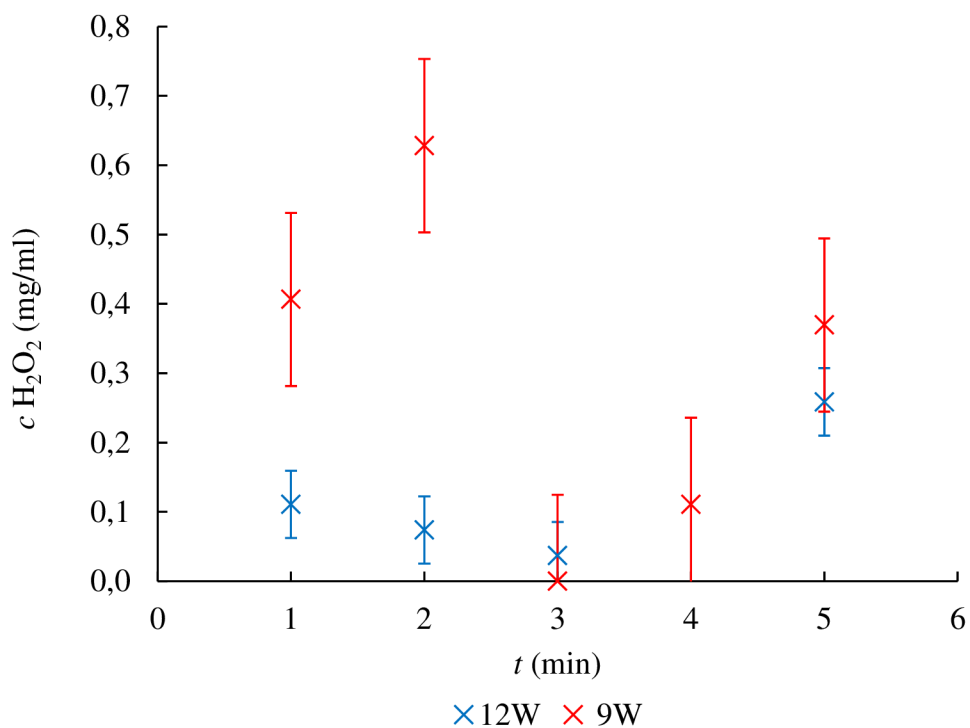
Koncentrace dusičnanů, dusitanů a peroxidu vodíku byla sledována v závislosti na době ošetření plazmatem mikrovlnného pochodňového jetu, který byl použit pro přímé ošetření plísně, viz. Obrázek 14–16. Hodnoty koncentrace dusičnanů při 526 nm, jsou zobrazeny v Příloze. V průběhu ošetření se koncentrace všech reaktivních částic zvyšuje, což je předpokládáno díky vyššímu množství iontů dopravenému přes rozmezí voda-plyn. Překvapivé je, že při nižším výkonu zdroje (9 W), kdy by tedy mělo být vytvořeno méně iontů, se v PAW vytvořilo více dusičnanů než při vyšším výkonu zdroje (12 W). Překvapující je i vidět korelaci mezi koncentrací dusičnanů a peroxidem vodíku, jehož koncentrace také byla při vyšším výkonu nižší. Může to souviset s posunem rovnováhy směrem k dusitanům, kterých se při vyšším výkonu tvořilo více. Peroxid vodíku tak bude hrát roli redukčního činidla.



Obrázek 14: Závislost koncentrace dusičnanů na době ošetření plazmatem měřené při 380 nm.



Obrázek 15: Závislost koncentrace dusitanů na době ošetření plazmatem měřené při 540 nm.



Obrázek 16: Závislost koncentrace peroxidu vodíku na době ošetření plazmatem měřené při 407 nm.

Stanovení reaktivních částic v PAW připravené plazmovou tryskou v kapalině

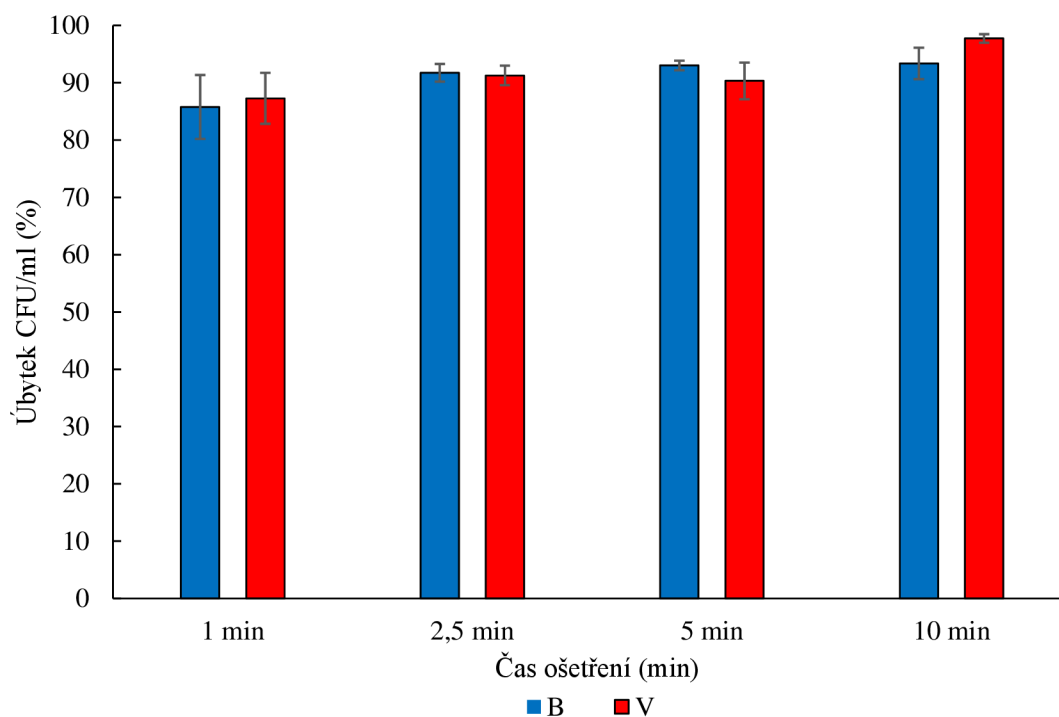
PAW připravená pomocí plazmové trysky ve fyziologickém roztoku, která byla použita pro kombinované ošetření plísně (PAW a přímé ošetření pochodňovým jetem), byla charakterizována v souběžně probíhající diplomové práci, viz. (Tabulka 4) [63].

Tabulka 4: Tabulka koncentrací částic obsažených v PAW vytvořené pomocí stejnosměrného zdroje (DC = PAW generovaná pomocí stejnosměrného zdroje) a vysokofrekvenčního zdroje (AC = PAW generovaná pomocí vysokofrekvenčního zdroje).

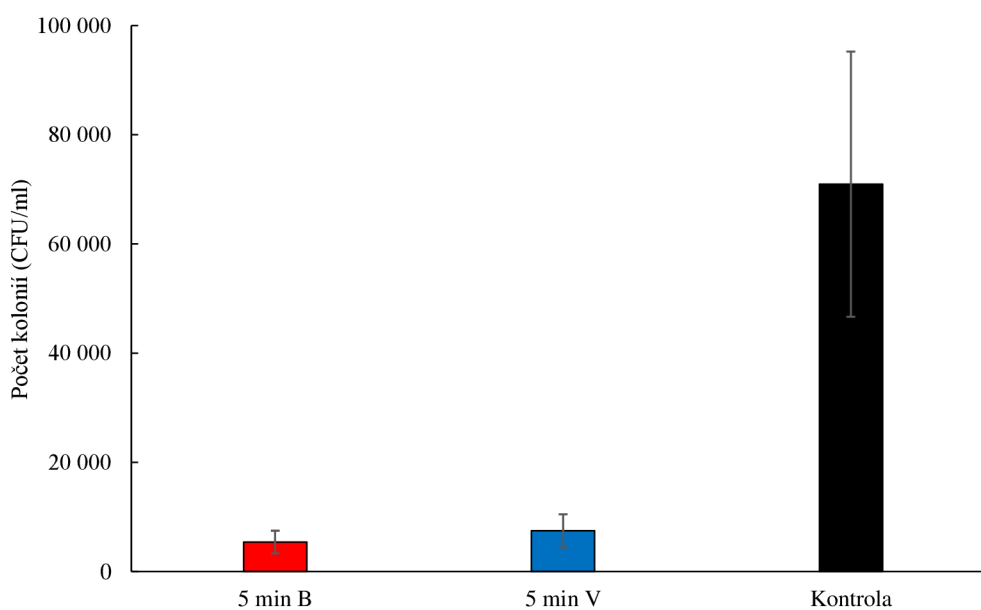
	koncentrace [mg/l]		
	H ₂ O ₂	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻
AC	2.86	0.031	-
DC	13.57	0.024	0.911

4.2 Přímá interakce plazmatu s plísní *Aspergillus niger*

Dekontaminace buněk plísně proběhla velmi rychle, ale nikdy nedošlo k úplné dekontaminaci. Průměrně bylo vždy dekontaminováno 90 % buněk plísně, ale zbylých 10 % bylo stále plně funkčních se schopností sporulace. Dekontaminační účinek se mírně zvyšoval s dobou ošetření až do 10 min ošetření (Obrázek 17). Omezování přístupu vzduchu pomocí víčka nemělo nijaké měřitelné důsledky (Obrázek 18) až do ošetřování po dobu 10 min, zde došlo k překvapivému zlomu a omezením přístupu vzduchu došlo ke zvýšení dekontaminačního účinku plazmatu. Toto může být vysvětleno zvýšenou produkcí vytvořených reaktivních částic v atmosféře pod víčkem, tudíž na buňky působilo více stresujících faktorů. Zároveň se při takto dlouhém ošetření začala aparatura značně zahřívat a fyziologický roztok se vypařoval, takže byly buňky plísně soustředěny v menším objemu. Tím byly buňky přístupnější pro částice vytvořené plazmatem. Proto se při dalších měřeních používaly ošetření pouze po doby 1; 2,5; 5 min. Snížení účinku je možné vysvětlit s pomocí souběžné diplomové práce, která ukázala, že i když část buněk kvasinek ztratila schopnost rozmnožovat se, jsou stále živé. Jelikož jsou kvasinky nejpodobnější mikroorganismy plísním, lze předpokládat, že to platí i pro plísně [64]. Toto bylo stanoveno pomocí průtokové cytometrie. Buňky tedy jsou stále živé a je možné, že delší aplikace plazmatu je schopná umožnit malé části buněk regenerovat schopnost tvořit kolonie.



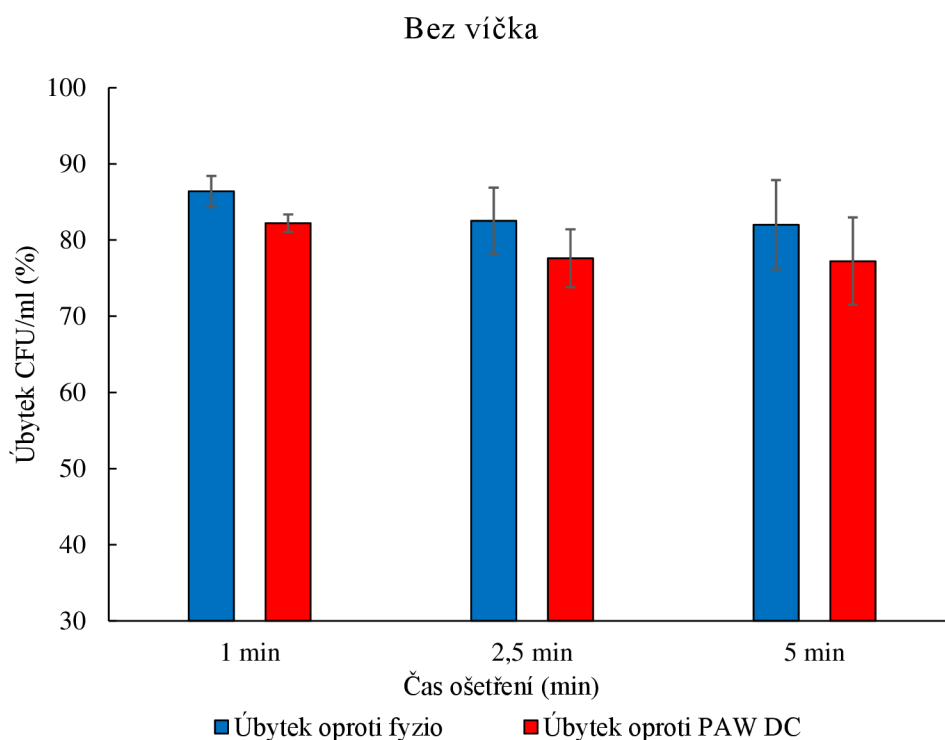
Obrázek 17: Graf procentuálního úbytku viabilních kolonie tvořících jednotek v závislosti na čase ošetření. První sloupec ukazuje data získaná při ošetření plazmatem za volného přístupu vzduchu (B = bez víčka) a druhý za omezeného přístupu vzduchu (V = s víčkem).



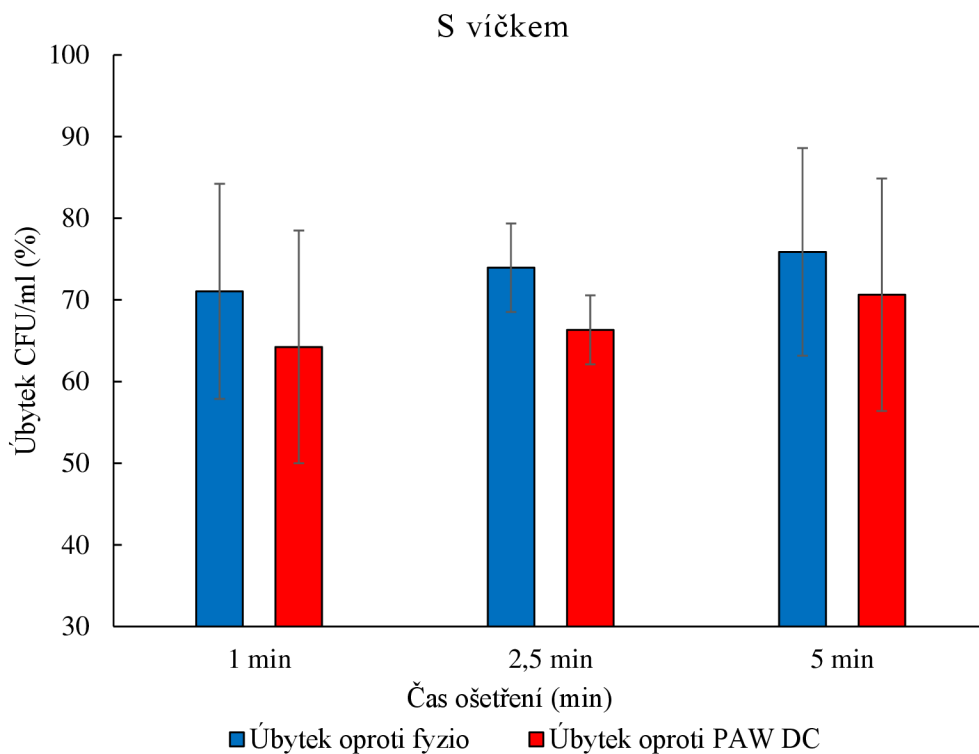
Obrázek 18: Graf počtu kolonií po 5 min přímého ošetření plazmatem oproti kontrole bez jakéhokoli ošetření (pouze fyziologický roztok). 5 min bylo vybráno po porovnání výsledků a vyhodnocení, že přes všechny metody byl dekontaminační účinek zde nejvyšší.

4.3 Kombinovaná interakce plazmatu a PAW (DC) s plísní *Aspergillus niger*

Kombinované působení, jak přímé aplikace plazmatu pochodňového jetu, tak plazmatem ošetřené vody (generované DC i AC plazmovou tryskou v kapalině), bylo zkoumáno dvěma metodami. V první byl testován postup, kdy PAW byla aplikována jako první a následně bylo působeno přímým plazmatem. Z grafů (Obrázek 19–20) je vidět, že dekontaminační účinek ošetření byl snížen přidáním nového činidla PAW. Jak již bylo zmíněno výše, snížení účinku je pravděpodobně způsobeno tím, že část buněk schopných tvořit kolonie je stále živá. Dále je také možné, že díky aplikaci PAW v prvním kroku jsou buňky plísně stresovány mírněji s pomocí PAW než plazmatem a při následné aplikaci přímého plazmatu už na nový stres nereagují tak markantně, jako kdyby byly ošetřeny plazmatem prvně. Z jednoho z těchto důvodů jsou účinky plazmatu utlumeny a dekontaminace je nižší. Dále je vidět, že ošetření za omezeného přístupu vzduchu (s víčkem) má nižší účinnost (Obrázek 20), jelikož není možné tvořit tolik reaktivních molekul jako u neomezeného přístupu vzduchu. A toto v kombinaci s předcházejícím stresem snižuje účinnost dekontaminace.

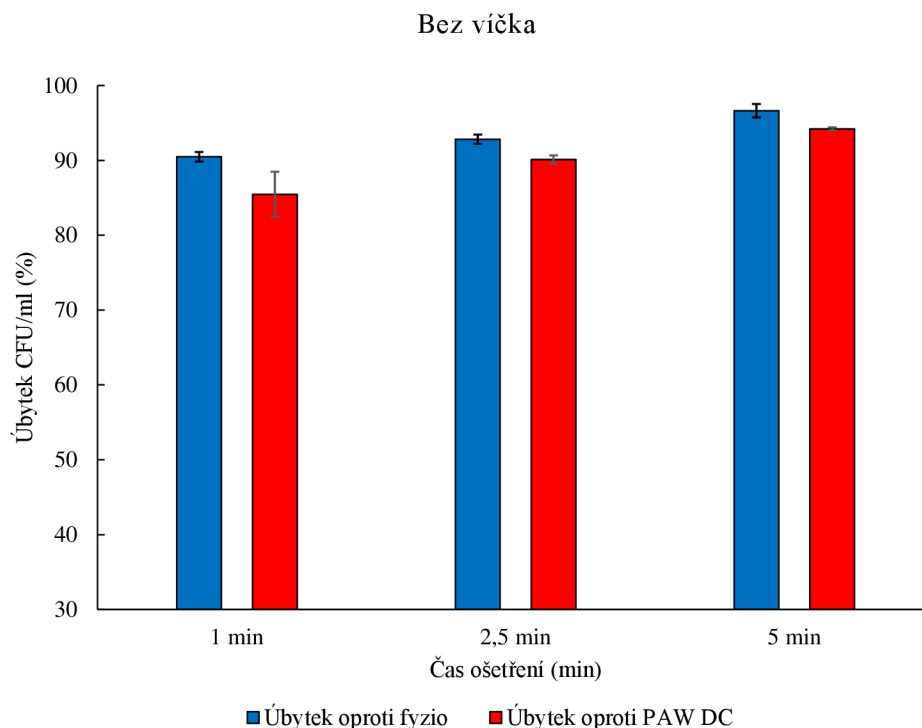


Obrázek 19: Graf procentuálního úbytku viabilních kolonie tvořících jednotek v závislosti na čase ošetření za volného přístupu vzduchu (bez víčka) při kombinované aplikaci PAW (DC) před přímým plazmatem. První sloupec ukazuje data získaná oproti kontrole kultivované na mediu bez jakéhokoli ošetření a druhý oproti kontrole po ošetření PAW po dobu 10 min.

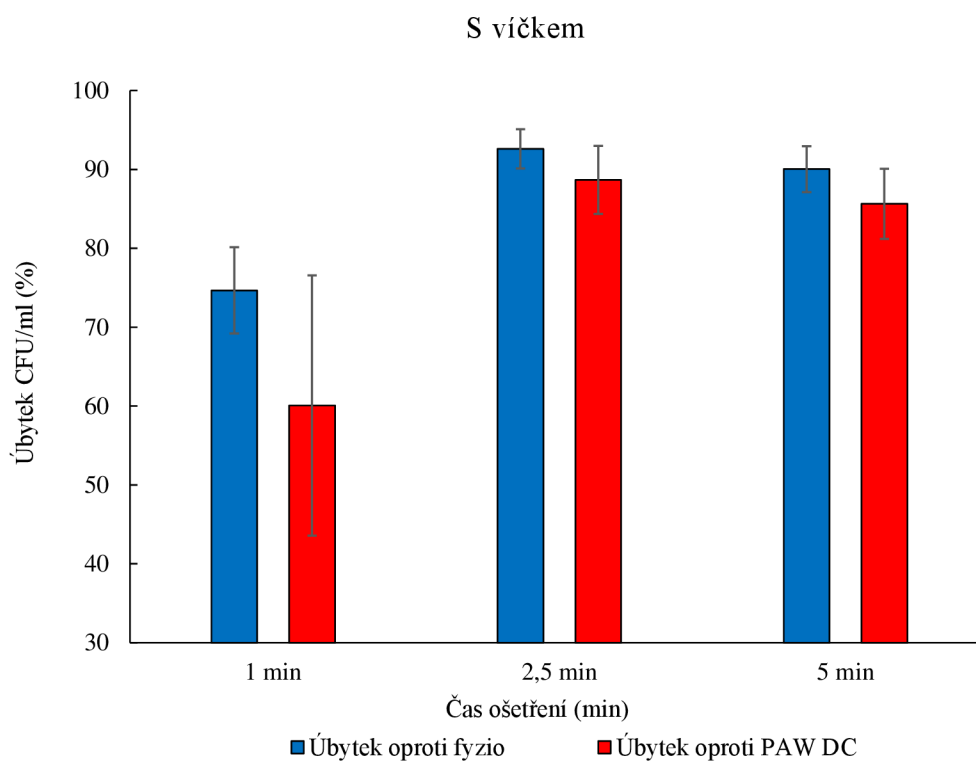


Obrázek 20: Graf procentuálního úbytku viabilních kolonie tvořících jednotek v závislosti na čase ošetření za omezeného přístupu vzduchu (s víčkem) při kombinované aplikaci PAW (DC) před přímým plazmatem. První sloupec ukazuje data získaná oproti kontrole kultivované na mediu bez jakéhokoli ošetření a druhý oproti kontrole po ošetření PAW po dobu 10 min.

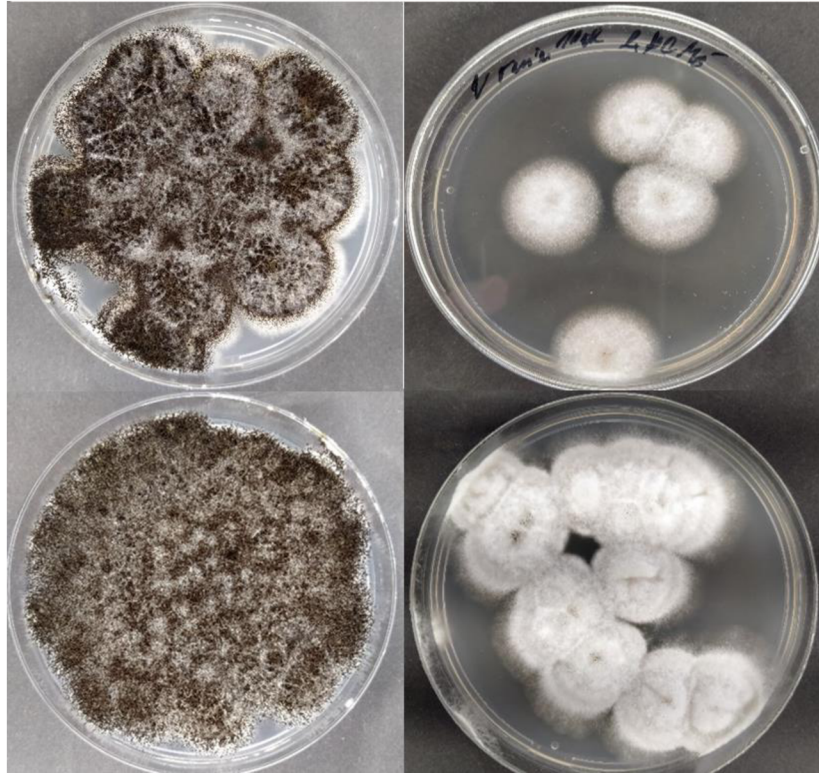
Druhá metoda kombinovaného ošetření měla postup opačný, kdy byla nejprve provedena přímá aplikace plazmatu, aby se odstranil efekt mírnějšího stresu. Následně byla na vzorky aplikována PAW. Výsledky jsou zobrazeny v grafech na Obrázku 21 a Obrázku 22. efekt mírnějšího stresu odstranil. Z výsledků lze vidět, že míra dekontaminačních účinků je opět vyšší, než byla v případě přednostní aplikace PAW. Navíc kolonie, které se i přes nepříznivé podmínky vytvořily, ztratily schopnost vytvářet spory i v dlouhodobém měřítku (až tři týdny), viz. Obrázek 23. Ošetření za omezeného přístupu vzduchu vykazuje stejnou míru dekontaminace jako ošetření bez omezení, až na dobu přímého ošetření 1 min s víčkem, kde byl dekontaminační účinek signifikantně mírnější.



Obrázek 21: Graf procentuálního úbytku viabilních kolonie tvořících jednotek v závislosti na čase ošetření za neomezeného přístupu vzduchu (bez víčka) při kombinované aplikaci přímého plazmatu před PAW. První sloupec ukazuje data získaná oproti kontrole kultivované na mediu bez jakéhokoli ošetření a druhý oproti kontrole po ošetření PAW po dobu 10 min.



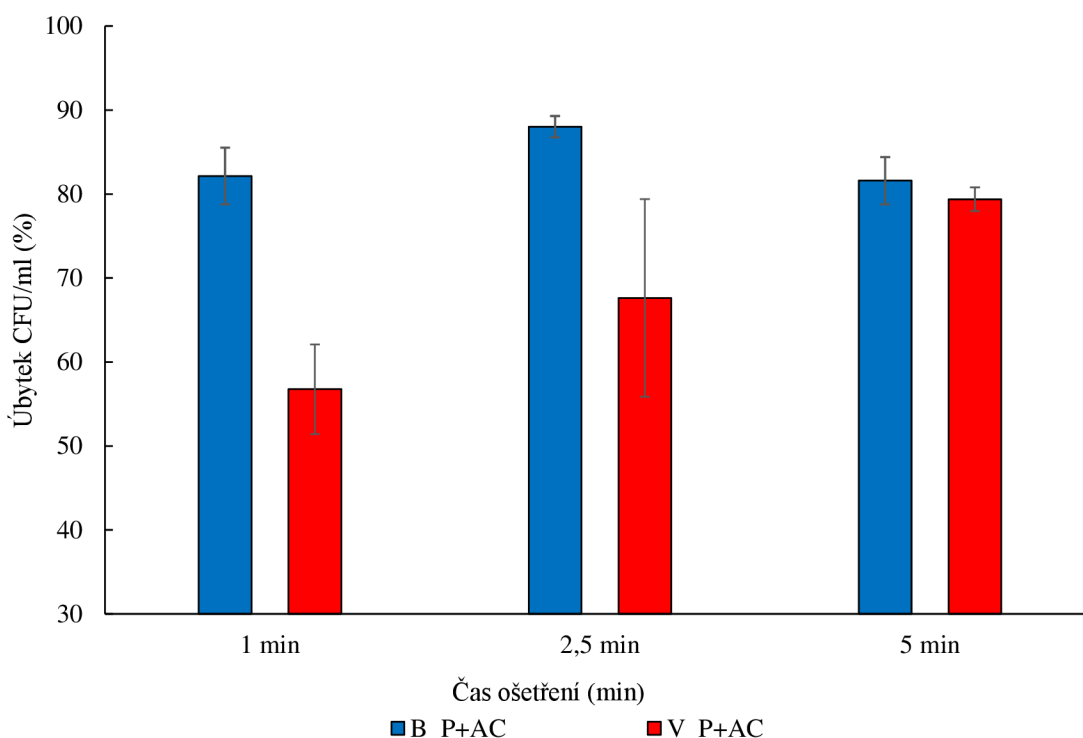
Obrázek 22: Graf procentuálního úbytku viabilních kolonie tvořících jednotek v závislosti na čase ošetření za omezeného přístupu vzduchu (s víčkem) při kombinované aplikaci přímého plazmatu před PAW. První sloupec ukazuje data získaná oproti kontrole kultivované na mediu bez jakéhokoli ošetření a druhý oproti kontrole po ošetření PAW po dobu 10 min.



Obrázek 23: Kontrolní vzorky plísně *Aspergillus niger* bez ošetření (vlevo) a vzorky po kombinovaném ošetření přímým plazmatem a PAW (vpravo). Kultivace plísni trvala 3 týdny.

4.4 Kombinovaná interakce plazmatu a PAW (AC) s plísní *Aspergillus niger*

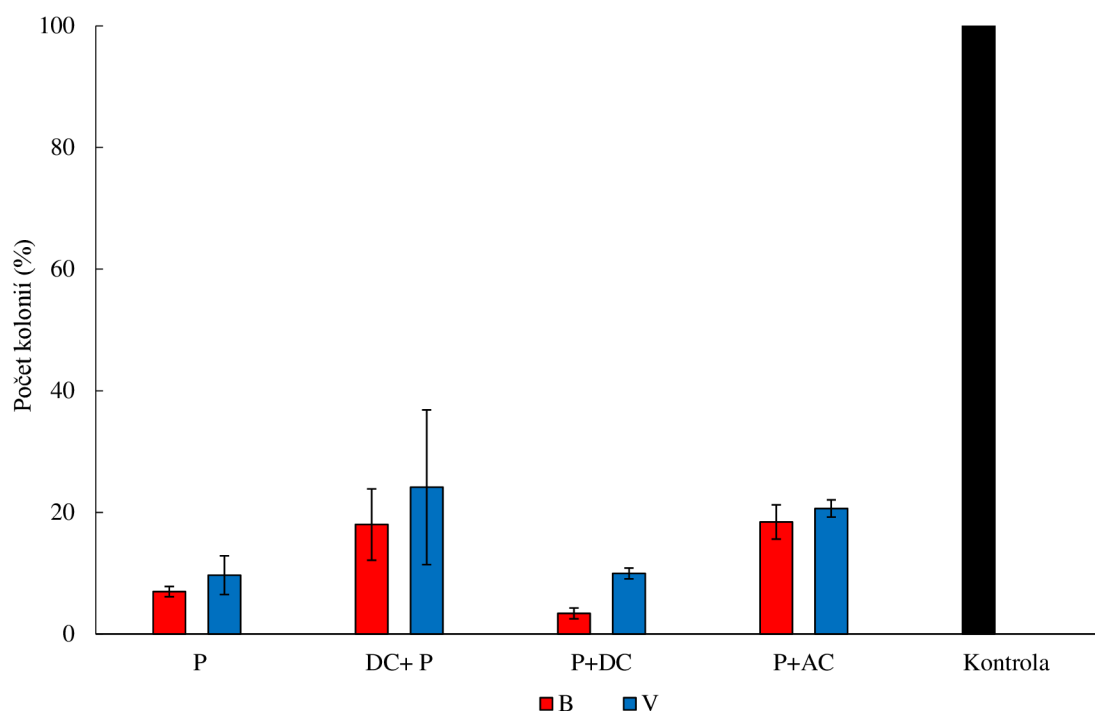
Na základě předchozích experimentů byla pro kombinovanou interakci přímého působení nízkoteplotního plazmatu pochodňového jetu s plazmatem ošetřenou vodou generovanou vysokofrekvenčním zdrojem (AC) zvolena druhá metoda, tj. první přímá aplikace plazmatu a poté působení PAW (AC). Mezi vybranými způsoby ošetření bylo ošetření vysokofrekvenčním zdrojem nejméně účinné, viz. Obrázek 24. U ošetření bez omezení vzduchu se dekontaminace plísně pohybuje kolem 82 % a stagnuje. S omezeným přístupem vzduchu (s víčkem) a s prodlužující dobou ošetření vykazuje dekontaminace vzrůstající charakter, který by pravděpodobně pokračoval až na podobné hodnoty, jako jsou pozorovány u neomezeného přístupu vzduchu. Omezením přístupu vzduchu a vzrůstající teplotou pod víčkem se dekontaminace značně zpomalila. Buňky ošetřené kratší dobu (1 a 2,5 min) jsou značně méně dekontaminovány, než jsou buňky ošetřené s neomezeným přístupem vzduchu.



Obrázek 24: Graf procentuálního úbytku viabilních kolonie tvořících jednotek v závislosti na čase ošetření. První sloupec ukazuje data získaná při ošetření plazmatem za volného přístupu vzduchu (B = bez víčka) a druhý za omezeného přístupu vzduchu (V = s víčkem) v kombinaci s PAW (AC).

4.5 Porovnání dekontaminačního účinku jednotlivých metod

Data ošetření po dobu 5 min ze všech použitých metod (samotné přímé ošetření plazmatem a jednotlivá kombinovaná ošetření plazmatem a PAW byla porovnána a vynesena do grafu (Obrázek 25). Nejlepší metoda s nejvyšším dekontaminačním vlivem je kombinované přímé ošetření plazmatem prvně a poté ošetření PAW (DC) (3 a 10 % přeživších kolonií), která jako jediná vykazuje pozitivní vliv PAW na dekontaminaci. V ostatních kombinovaných metodách se dekontaminační účinky snížily oproti přímému ošetření plazmatem (7 a 10 % přeživších kolonií). Nejnížší dekontaminační účinek v době ošetření 5 min vykazují metody kombinované přímé ošetření plazmatem s PAW (DC), kdy je ale nejprve vzorek vystaven působení PAW a teprve poté přímému ošetření (18 a 24 % přeživších kolonií), a kombinované přímé ošetření plazmatem s následnou aplikací PAW (AC) (18 a 21 % přeživších kolonií). Kombinované přímé ošetření plazmatem s PAW (AC) sice vykazuje lehce vyšší míru dekontaminace než kombinované přímé ošetření plazmatem s PAW (DC) v době ošetření 5 min, ale při kratších interakčních časech vychází značně hůř, viz. 4.3 a 4.4. Oproti kontrole ale mají všechny metody inhibiční účinek vyšší než 75 %.



Obrázek 25: Graf porovnání počtu kolonií po 5 min ošetření samotným plazmatem pochodňového jetu (P = přímé ošetření plazmatem) nebo ve spojení s ošetřením PAW připravené plazmovou tryškou ve fyziologickém roztoku pomocí stejnosměrného (DC) (DC = ošetření PAW (DC)) nebo vysokofrekvenčního (AC) zdroje (AC = ošetření PAW (AC)).

5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zaměřuje na řešení problematiky dekontaminace plísně *Aspergillus niger* za pomoci nízkoteplotního plazmatu mikrovlnného pochodňového jetu působícího samostatně a v kombinaci s plazmatem ošetřenou vodou generovanou plazmovou tryskou v kapalině (fyziologickém roztoku) pomocí střídavého a stejnosměrného napětí. Zároveň byla charakterizována generace plazmatem aktivované vody s pomocí plazmového jetu.

V prvním typu experimentu bylo zkoumáno složení plazmatem ošetřené vody generované pochodňovým jetem, jelikož tento experiment simuluje přímé ošetření plísně ve fyziologickém roztoku. Z výsledků je patrné, že tento druh PAW obsahuje malou koncentraci peroxidu vodíku a vyšší koncentrace dusíkatých látek.

V druhém typu experimentu byly zkoumány interakce mezi plazmatem a plísní *Aspergillus niger*. Po ošetření plazmatem byla pozorována dekontaminace *A. niger*. Účinek plazmatu byl nejmírnější u nejkratšího měření 1 min, kde bylo dekontaminováno 85 % CFU. Při delším ošetření začaly hodnoty dekontaminace stagnovat až do doby ošetření 10 min, kde byl efekt mírně vyšší (95 %). V rámci měření předcházející 10 min bylo přibližně dekontaminováno 90 % CFU. Při delší době ošetření byly pozorovány i jiné vlivy dekontaminace než samotného plazmatu. Tyto efekty byly primárně pozorovány při uzavření plazmatického reaktoru víčkem, což umožňovalo vyšší míru kumulace iontů a tepla, které samo o sobě působí dekontaminačně.

V třetím typu experimentu byl pozorován vliv plazmatu v kombinaci s plazmatem ošetřenou vodou generovanou pomocí stejnosměrného napětí. Tento experiment byl proveden jednou s aplikací PAW jako první a po druhé s aplikací plazmatu jako prvního. Při aplikaci PAW byl dekontaminační účinek lehce zmírněn oproti aplikaci samotného plazmatu. Naopak při aplikaci plazmatu jako prvního byl účinek mírně zvýšen oproti aplikaci samotného plazmatu. U obou metod aplikace dekontaminačních činidel byly pozorovány výrazné rozdíly mezi aplikací plazmatu s přítomností víčka a bez něj. Ošetření s omezeným přístupem vzduchu mělo průměrně o 5–10 % menší účinek než ošetření s neomezeným přístupem vzduchu.

Ve čtvrtém typu experimentu se aplikovalo na buňky plísně *A. niger* plazma a PAW generovaná pomocí střídavého vysokofrekvenčního napětí. Tato metoda byla vyhodnocena jako nejméně účinná. Dekontaminační účinek na buňky byl průměrně 83 % u neomezeného přístupu vzduchu. Při tomto měření byl pozorován největší rozdíl mezi omezením přístupu vzduchu a bez něj. Byl také poprvé pozorován stoupající trend dle doby ošetření. Po 5 min době ošetření se účinek blížil 80 %, kde se pohybovaly také hodnoty dekontaminace při ošetření bez omezení přístupu vzduchu.

Tato práce byla zaměřena na dekontaminaci modelové plísně *Aspergillus niger* pomocí plazmatu samostatně a v kombinaci s plazmatem ošetřenou vodou z důvodu dekontaminace nežádoucích a nebezpečných plísní na živých tkáních (medicině), kde je potřeba aplikovat šetrnější dekontaminační činidla, než je většina dnes dostupných možností.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1]BÁRDOS, L. a H. BARÁNKOVÁ, 2010. Cold atmospheric plasma: Sources, processes, and applications. *Thin Solid Films* [online]. 518(23), 6705-6713 [cit. 2023-03-17]. ISSN 00406090. Dostupné z: doi: 10.1016/j.tsf.2010.07.044
- [2]CONRADS, H a M SCHMIDT, 2000. Plazma generation and plazma sources. *Plazma Sources Science and Technology* [online]. 9(4), 441-454 [cit. 2023-03-31]. ISSN 0963-0252. Dostupné z: doi:10.1088/0963-0252/9/4/301
- [3]The Bakerian Lecture— On radiant matter spectroscopy. A new method of spectrum analysis, 1883. *Proceedings of the Royal Society of London* [online]. 35(224-226), 262-271 [cit. 2023-03-31]. ISSN 0370-1662. Dostupné z: doi:10.1098/rspl.1883.0045
- [4]HEINLIN, J, G ISBARY, W STOLZ, et al., 2011. Plazma applications in medicine with a special focus on dermatology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* [online]. 25(1), 1-11 [cit. 2023-03-31]. ISSN 09269959. Dostupné z: doi:10.1111/j.1468-3083.2010.03702.x
- [5]*Cold Plazma in Food and Agriculture* [online], 2016. Elsevier [cit. 2023-03-31]. ISBN 9780128013656. Dostupné z: doi:10.1016/C2014-0-00009-3
- [6]ZHOU, Renwu, Rusen ZHOU, Peiyu WANG, et al., 2020. Plazma-activated water: generation, origin of reactive species and biological applications. *Journal of Physics D: Applied Physics* [online]. 53(30) [cit. 2022-06-30]. ISSN 0022-3727. Dostupné z: doi:10.1088/1361-6463/ab81cf
- [7]HE, Mengwen, Jiangwei DUAN, Jialu XU, et al., 2020. Candida albicans biofilm inactivated by cold plasma treatment in vitro and in vivo. *Plasma Processes and Polymers* [online]. 17(4) [cit. 2023-04-01]. ISSN 1612-8850. Dostupné z: doi:10.1002/ppap.201900068
- [8]KULHÁNEK, Petr, 2011. Úvod do teorie plazmatu. Praha: AGA. ISBN 9788090458222.
- [9]TENDERO, Claire, Christelle TIXIER, Pascal TRISTANT, Jean DESMAISON a Philippe LEPRINCE, 2006. Atmospheric pressure plasmas: A review. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 61(1), 2-30 [cit. 2023-04-24]. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2005.10.003
- [10] BRAITHWAITE, N St J, 2000. Introduction to gas discharges. *Plasma Sources Science and Technology* [online]. 9(4), 517-527 [cit. 2023-04-24]. ISSN 0963-0252. Dostupné z: doi:10.1088/0963-0252/9/4/307
- [11] SAMAL, Sneha, 2017. Thermal plazma technology: The prospective future in material processing. *Journal of Cleaner Production* [online]. 142, 3131-3150 [cit. 2023-03-16]. ISSN 09596526. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jclepro.2016.10.154

- [12] HEINLIN, J, G ISBARY, W STOLZ, et al., 2011. Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* [online]. **25**(1), 1-11 [cit. 2023-04-02]. ISSN 09269959. Dostupné z: doi:10.1111/j.1468-3083.2010.03702.x
- [13] SAMAL, Sneha, 2017. Thermal plasma technology: The prospective future in material processing. *Journal of Cleaner Production* [online]. **142**, 3131-3150 [cit. 2023-04-02]. ISSN 09596526. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jclepro.2016.10.154
- [14] SAMAL, S., K.K. RAO, P.S. MUKHERJEE a T.K. MUKHERJEE, 2008. Statistical modelling studies on leachability of titania-rich slag obtained from plasma melt separation of metallized ilmenite. *Chemical Engineering Research and Design* [online]. **86**(2), 187-191 [cit. 2023-04-02]. ISSN 02638762. Dostupné z: doi: 10.1016/j.cherd.2007.10.018
- [15] LAROUSSE, M., 2002. Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: review, analysis, and prospects. *IEEE Transactions on Plasma Science* [online]. **30**(4), 1409-1415 [cit. 2023-03-31]. ISSN 0093-3813. Dostupné z: doi:10.1109/TPS.2002.804220
- [16] LAROUSSE, M. Sterilization of contaminated matter with an atmospheric pressure plasma. *IEEE Transactions on Plasma Science* [online]. **24**(3), 1188-1191 [cit. 2023-03-31]. ISSN 00933813. Dostupné z: doi:10.1109/27.533129
- [17] HERRMANN, H. W., I. HENINS, J. PARK a G. S. SELWYN, 1999. Decontamination of chemical and biological warfare (CBW) agents using an atmospheric pressure plasma jet (APPJ). *Physics of Plasmas* [online]. **6**(5), 2284-2289 [cit. 2023-03-31]. ISSN 1070664X. Dostupné z: doi:10.1063/1.873480
- [18] EHLBECK, J, U SCHNABEL, M POLAK, J WINTER, Th VON WOEDTKE, R BRANDENBURG, T VON DEM HAGEN a K-D WELTMANN, 2010. Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. *Journal of Physics D: Applied Physics* [online]. **44**(1) [cit. 2023-04-01]. ISSN 0022-3727. Dostupné z: doi:10.1088/0022-3727/44/1/013002
- [19] SLADEK, R.E.J., S.K. FILOCHE, C.H. SISSONS a E. STOFFELS, 2007. Treatment of *Streptococcus mutans* biofilms with a nonthermal atmospheric plasma. *Letters in Applied Microbiology* [online]. **45**(3), 318-323 [cit. 2023-04-01]. ISSN 0266-8254. Dostupné z: doi:10.1111/j.1472765X.2007.02194.x
- [20] NIEMIRA, Brendan A. a Joseph SITES, 2008. Cold Plasma Inactivates *Salmonella* Stanley and *Escherichia coli* O157: H7 Inoculated on Golden Delicious Apples. *Journal of Food Protection* [online]. **71**(7), 1357-1365 [cit. 2023-04-01]. ISSN 0362028X. Dostupné z: doi:10.4315/0362028X-71.7.1357
- [21] SUHEM, Kitiya, Narumol MATAN, Mudtorlep NISOA a Nirundorn MATAN, 2013. Inhibition of *Aspergillus flavus* on agar media and brown rice cereal bars using cold atmospheric plasma treatment. *International Journal of Food*

- Microbiology* [online]. **161**(2), 107-111 [cit. 2023-04-01]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.002
- [22] GUO, Dingmeng, Hongxia LIU, Lei ZHOU, Jinzhuo XIE a Chi HE, 2021. Plazma-activated water production and its application in agriculture. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 101(12), 4891-4899 [cit. 2022-06-30]. ISSN 0022-5142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.11258
- [23] THIRUMDAS, Rohit, Anjinelyulu KOTHAKOTA, Uday ANNAPURE, Kaliramesh SILIVERU, Renald BLUNDELL, Ruben GATT a Vasilis P. VALDRAMIDIS, 2018. Plazma activated water (PAW): Chemistry, physico-chemical properties, applications in food and agriculture. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 77, 21-31 [cit. 2022-06-30]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi: 10.1016/j.tifs.2018.05.007
- [24] MACHALA, Z, B TARABOVÁ, D SERSENOVÁ, M JANDA a K HENSEL, 2019. Chemical and antibacterial effects of plasma activated water: correlation with gaseous and aqueous reactive oxygen and nitrogen species, plasma sources and air flow conditions. *Journal of Physics D: Applied Physics* [online]. **52**(3) [cit. 2023-04-04]. ISSN 0022-3727. Dostupné z: doi:10.1088/1361-6463/aae807
- [25] <https://onlinelibrary.wiley.com/cms/asset/069da1bb-b644-47d8-9e4e-7c5dc9fd7209/ppap201400082-fig-0001-m.jpg>
- [26] TIAN, Ying, Ruonan MA, Qian ZHANG, Hongqing FENG, Yongdong LIANG, Jue ZHANG a Jing FANG, 2015. Assessment of the Physicochemical Properties and Biological Effects of Water Activated by Non-thermal Plazma Above and Beneath the Water Surface. *Plazma Processes and Polymers* [online]. 12(5), 439-449 [cit. 2022-06-30]. ISSN 16128850. Dostupné z: doi:10.1002/ppap.201400082
- [27] GAO, Yawen, Keziah FRANCIS a Xuehua ZHANG, 2022. Review on formation of cold plazma activated water (PAW) and the applications in food and agriculture. *Food Research International* [online]. 157 [cit. 2022-06-30]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi: 10.1016/j.foodres.2022.111246
- [28] ZHOU, Renwu, Rusen ZHOU, Karthika PRASAD, Zhi FANG, Robert SPEIGHT, Kateryna BAZAKA a Kostya (Ken) OSTRIKOV, 2018. Cold atmospheric plazma activated water as a prospective disinfectant: the crucial role of peroxyxynitrite. *Green Chemistry* [online]. 20(23), 5276-5284 [cit. 2022-06-30]. ISSN 1463-9262. Dostupné z: doi:10.1039/C8GC02800A
- [29] MAN, Chenxi, Cheng ZHANG, Haiqin FANG, Renwu ZHOU, Bangdou HUANG, Yuanzhong XU, Xiaoxing ZHANG a Tao SHAO, 2022. Nanosecond-pulsed microbubble plazma reactor for plazma-activated water generation and bacterial inactivation. *Plazma Processes and Polymers* [online]. 19(6) [cit. 2022-06-30]. ISSN 1612-8850. Dostupné z: doi:10.1002/ppap.202200004

- [30] XIANG, Qisen, Chaodi KANG, Liyuan NIU, Dianbo ZHAO, Ke LI a Yanhong BAI, 2018. Antibacterial activity and a membrane damage mechanism of plazma-activated water against *Pseudomonas deceptionensis* CM2. LWT [online]. 96, 395-401 [cit. 2022-06-30]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi: 10.1016/j.lwt.2018.05.059
- [31] WANG, Qingyang a Deepti SALVI, 2021. Evaluation of plazma-activated water (PAW) as a novel disinfectant: Effectiveness on *Escherichia coli* and *Listeria innocua*, physicochemical properties, and storage stability. LWT [online]. 149 [cit. 2022-06-30]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi: 10.1016/j.lwt.2021.111847
- [32] MAI-PROCHNOW, Anne, Renwu ZHOU, Tianqi ZHANG, Kostya (Ken) OSTRIKOV, Sudarsan MUGUNTHAN, Scott A. RICE a Patrick J. CULLEN, 2021. Interactions of plazma-activated water with biofilms: inactivation, dispersal effects and mechanisms of action. Npj Biofilms and Microbiomes [online]. 7(1) [cit. 2022-06-30]. ISSN 2055-5008. Dostupné z: doi:10.1038/s41522-020-00180-6
- [33] XU, Zimu, Xiaoxia ZHOU, Weishu YANG, et al., 2020. In vitro antimicrobial effects and mechanism of air plazma-activated water on *Staphylococcus aureus* biofilm. Plazma Processes and Polymers [online]. 17(8) [cit. 2022-06-30]. ISSN 1612-8850. Dostupné z: doi:10.1002/ppap.201900270
- [34] TAN, Juzhong a Mukund V. KARWE, 2021. Inactivation and removal of *Enterobacter aerogenes* biofilm in a model piping system using plazma-activated water (PAW). Innovative Food Science & Emerging Technologies [online]. 69 [cit. 2022-06-30]. ISSN 14668564. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ifset.2021.102664
- [35] GUO, Jian, Jiaoyu WANG, Hui XIE, et al., 2022. Inactivation effects of plazma-activated water on *Fusarium graminearum*. Food Control [online]. 134 [cit. 2022-06-30]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi: 10.1016/j.foodcont.2021.108683
- [36] GUO, Jian, Dingkui QIN, Wanting LI, Fenghua WU, Ling LI a Xingquan LIU, 2021. Inactivation of *Penicillium italicum* on kumquat via plazma-activated water and its effects on quality attributes. International Journal of Food Microbiology [online]. 343 [cit. 2022-06-30]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109090
- [37] RATHORE, Vikas, Divyesh PATEL, Niyati SHAH, Shital BUTANI, Harikrishna PANSURIYA a Sudhir Kumar NEMA, 2021. Inactivation of *Candida albicans* and Lemon (*Citrus limon*) Spoilage Fungi Using Plazma Activated Water. Plazma Chemistry and Plazma Processing [online]. 41(5), 1397-1414 [cit. 2022-06-30]. ISSN 0272-4324. Dostupné z: doi:10.1007/s11090-021-10186-3
- [38] KI, Se Hoon, Hyeongjin NOH, Geum Ran AHN, Seong Hwan KIM, Nagendra K. KAUSHIK, Eun Ha CHOI a Geon Joon LEE, 2020. Influence of Nonthermal Atmospheric Plazma-Activated Water on the Structural, Optical, and Biological Properties of *Aspergillus brasiliensis* Spores. Applied Sciences [online]. 10(18) [cit. 2022-06-30]. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app10186378

- [39] XU, Yingyin, Ying TIAN, Ruonan MA, Qinghong LIU a Jue ZHANG, 2016. Effect of plasma activated water on the postharvest quality of button mushrooms, *Agaricus bisporus*. *Food Chemistry* [online]. 197, 436-444 [cit. 2022-06-30]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi: 10.1016/j.foodchem.2015.10.144
- [40] MOORE, D, G ROBSON a A TRINCI, 2011. 21st Century Guidebook to Fungi. Cambridge: Cambridge University Press. ISBN 978-0521186957.
- [41] RYAN, Kenneth a C RAY, 2003. *Sherris Medical Microbiology (Lange Basic Science)*. 4th ed. New York: McGraw-Hill Education / Medical. ISBN 978-0-8385-8529-0.
- [42] SINGH, Bijender, Marcio J. POÇAS-FONSECA, B. N. JOHRI a Tulasi SATYANARAYANA, 2016. Thermophilic molds: Biology and applications. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. 42(6), 985-1006 [cit. 2022-06-29]. ISSN 1040841X. Dostupné z: doi:10.3109/1040841X.2015.1122572
- [43] SAMSON, Robert A. a Olaf C. G. ADAN, 2011. *Fundamentals of mold growth in indoor environments and strategies for healthy living*. Wageningen: Wageningen Academic Publishers Wageningen. ISBN 978-90-8686-722-6. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-722-6>
- [44] HURRASS, Julia, Birger HEINZOW, Ute AURBACH, et al., 2017. Medical diagnostics for indoor mold exposure. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* [online]. 220(2), 305-328 [cit. 2022-06-29]. ISSN 14384639. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijheh.2016.11.012
- [45] VAN DEN BRANDHOF, Jeroen G. a Han A. B. WÖSTEN, 2022. Risk assessment of fungal materials. *Fungal Biology and Biotechnology* [online]. 9(1) [cit. 2022-06-29]. ISSN 2054-3085. Dostupné z: doi:10.1186/s40694-02200134x
- [46] FINK-GRERNMELS, Johanna, 1999. Mycotoxins: Their implications for human and animal health. *Veterinary Quarterly* [online]. 21(4), 115-120 [cit. 2022-06-29]. ISSN 0165-2176. Dostupné z: doi:10.1080/01652176.1999.9695005
- [47] The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1945. NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach AB 2022. Thu. 30 Jun 2022. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1945/summary/>
- [48] GOWDER, Sivakumar Joghi Thatha, 2015. *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*. Saudi Arabia: IntechOpen. ISBN 978-9535122005.
- [49] ABARCA, M. Lourdes, Francesc ACCENSI, José CANO a F. Javier CABAÑES, 2004. Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. 86(1), 33-49 [cit. 2023-03-30]. ISSN 0003-6072. Dostupné z: doi:10.1023/B:ANTO.0000024907.85688.05

- [50] KLICH, Maren A, 2009. Health effects of *Aspergillus* in food and air. *Toxicology and Industrial Health* [online]. **25**(9-10), 657-667 [cit. 2023-03-30]. ISSN 0748-2337. Dostupné z: doi:10.1177/0748233709348271
- [51] <https://img.grepmed.com/uploads/11793/aspergillus-microscopy-niger-clinical-microbiology-1680w.png>
- [52] COSTA, Carina Pedrosa, Diogo GONÇALVES SILVA, Alisa RUDNITSKAYA, Adelaide ALMEIDA a Sílvia M. ROCHA, 2016. Shedding light on *Aspergillus niger* volatile exometabolome. *Scientific Reports* [online]. **6**(1) [cit. 2023-03-30]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep27441
- [53] E., Schuster, Dunn-Coleman N., Frisvad J. a P. van DIJCK, 2002. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **59**(4-5), 426-435 [cit. 2023-03-30]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-002-1032-6
- [54] VARGA, János, Sándor KOCSUBÉ, Beáta TÓTH, Jens C. FRISVAD, Giancarlo PERRONE, Antonia SUSCA, Martin MEIJER a Robert A. SAMSON, 2007. *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriata black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. **57**(8), 1925-1932 [cit. 2023-03-30]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.65021-0
- [55] KLABAN, Vladimír, c2005. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. Praha: Galén. ISBN isbn80-7262-341-9.
- [56] FU, Yuzhu a T VIRARAGHAVAN, 2004. Column studies for biosorption of dyes from aqueous solutions on immobilised *Aspergillus niger* fungal biomass. *Water SA* [online]. **29**(4), 465-472 [cit. 2023-03-30]. ISSN 0378-4738. Dostupné z: doi:10.4314/wsa.v29i4.5054
- [57] MATTANOVICH, Diethard, Pablo IVAN NIKEL, Timothy C. CAIRNS, Lars BARTHEL a Vera MEYER, 2021. Something old, something new: challenges and developments in *Aspergillus niger* biotechnology. *Essays in Biochemistry* [online]. **65**(2), 213-224 [cit. 2023-03-30]. ISSN 0071-1365. Dostupné z: doi:10.1042/EBC20200139
- [58] KRČMA, F.; Vysoké učení technické v Brně: Systém trysky pro generování plazmatu v kapalinách. 305304, patent. (2015)
- [59] KRČMA, F.; Vysoké učení technické v Brně: Method for plasma generation in liquids using jet system. EP3122161B1, patent. (2019)
- [60] MOŽÍŠOVÁ, Aneta. Plazmatem aktivovaná voda připravená elektrickým výbojem v kapalině. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/123763>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce doc. Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.

- [61] STARÁ, Zdenka. Diafragmový výboj v kapalinách. Brno: VUT, 2002, 51 s.
- [62] MOSKVINÁ, Anastasia. Vliv plazmatem aktivované vody na plísně. Brno, 2023. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/147918>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce doc. Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.
- [63] KOREČKOVÁ, Svatava. Studium účinku plazmatu a plazmatem aktivované vody při léčbě bakteriálních infekcí. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/147867>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce doc. Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.
- [64] PETROVÁ, Veronika. Studium přímé aplikace nízkoteplotního plazmatu na kvasinky *Candida Glabrata* a bakterie. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/147928>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce prof. RNDr. František Krčma, Ph.D.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

A	absorbance
AC	Střídavý proud
ACP	Srážení za pomoci argonového plazmatu (Argon Plasma Coagulation)
AF	audiofrekvenční
<i>c</i>	koncentrace
CAP	nízkoteplotní atmosférické plazma (Cold Atmospheric Plasma)
CFU	kolonie tvořící jednotka (Colony Forming Unit)
DC	Stejnoseměrný proud
MW	mikrovlnné
PAL	plazmatem aktivovaná kapalina (Plasma Activated Liquid)
PAW	plazmatem aktivovaná voda (Plasma Activated Water)
PTL	plazmatem ošetřená kapalina (Plasma Treated Liquid)
PTW	plazmatem ošetřená voda (Plasma Treated Water)