



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 PLAZMATEM AKTIVOVANÉ VODY NA PLÍSNĚ

INFLUENCE OF PLASMA ACTIVATED WATER ON FUNGAL DISEASES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Anastasia Moskvina

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1769/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Anastasia Moskvina**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Vliv plazmatem aktivované vody na plísň

Zadání bakalářské práce:

- Seznamte se s problematikou generace plazmatu v interakci s kapalinami.
- Proveďte odbornou rešerši zaměřenou na přípravu plazmatem aktivované vody, její charakterizaci a využití.
- Připravte plazmatem aktivovanou vodu v plazmových systémech využívajících přímou i nepřímou interakci plazmatu s povrchem kapaliny.
- Aplikujte plazmatem aktivovanou vodu na vybraný mikroorganismus a vyhodnoťte její 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.

Anastasia Moskvina
studentka

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

Tématem této bakalářské práce je vliv plazmatem ošetřené vody na plísně. Teoretická část je věnována interakci plazmatu s kapalinami, vlastnostem a využití plazmatem aktivované vody a jejího vlivu na různé druhy mikroorganismů. Reaktivní částice obsažené v plazmatem ošetřené vodě způsobují inhibici živých buněk, proto může být plazmatem ošetřená voda využívána jako sterilizační prostředek.

V experimentální části je porovnána účinnost tří způsobů přípravy plazmatem ošetřené vody. Pro aktivaci nad vodní hladinou byl použit plazmový systém dielektrického bariérového výboje. K aktivaci pod hladinou vody byla použita plazmová tryska; byly studovány dvě metody – střídavý (vysokofrekvenční) a stejnosměrný výboj. Ze vzorků plazmatem ošetřené vody byly připraveny suspenze plísně *Aspergillus niger*, které byly následně zaočkovány na sladidlové médium a kultivovány po dobu 72 hodin. Výsledný efekt byl vyhodnocen stanovením počtu jednotek tvořících kolonie.

Takto experimentálně získaná data byla zpracována a diskutována v kapitole výsledků a diskuze. Bylo zjištěno, že metoda aktivace vody pod její hladinou má výraznější účinky, což odpovídá informacím shrnutým v teoretické části. Účinek dielektrického bariérového výboje byl o něco mírnější, ale všechny tři metody způsobily značný úbytek počtu kolonií oproti kontrolnímu neošetřenému vzorku.

KLÍČOVÁ SLOVA

Plazma, plazmatem ošetřená voda, reaktivní částice kyslíku, reaktivní částice dusíku, plíseň, inhibice, *Aspergillus niger*

ABSTRACT

This bachelor thesis focuses on influence of plasma treated water on fungal diseases. The theoretical part is dedicated to plasma-liquid interactions, properties and application of plasma activated water and its influence on different microorganisms. Plasma activated water contains reactive oxygen species which cause inactivation of living cells, making it a potential sterilizer.

The experimental part of this work compares the effectiveness of three plasma treated water preparation techniques. Dielectric barrier discharge system was used to activate water above its surface. For the under the surface activation, a two-electrode system of both alternating and direct current was used. Plasma treated water was then used to prepare a suspended mixture with *Aspergillus niger* spores. The latter was then cultivated on agar plates for 72 hours. The overall effect was evaluated in amounts of colony forming units.

The experimentally obtained data was processed and discussed in the results and discussion section of the thesis. It was found that the underwater surface activation had more significant effect on mold deactivation, which corresponds with the information contained in the theoretical part. Although the effect of dielectric barrier discharge was not as promising, all three methods used led to a decrease of colony forming units in comparison to the non-treated control sample.

KEYWORDS

Plasma, plasma treated water, reactive oxygen species, reactive nitrogen species, fungi, *Aspergillus niger*

MOSKVINA, Anastasia. *Vliv plazmatem aktivované vody na plísně* [online]. Brno, 2023. 24 s. 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.

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 své vedoucí bakalářské práce paní doc. Ing. Zdence Kozákové, Ph.D., za umožnění pracovat na tomto tématu, za věnovaný čas a cenné rady. Dále bych ráda poděkovala své konzultantce Ing. Zuzaně Měšťánkové za veškerou pomoc při práci v laboratoři a hlavně za ochotu a trpělivost. Nakonec bych chtěla poděkovat svým blízkým za podporu během celého studia.

Obsah

1	ÚVOD.....	5
2	TEORETICKÁ ČÁST	6
2.1	Plazma.....	6
2.2	Interakce plazmatu s kapalinami.....	8
2.3	Vliv plazmatem ošetřené vody na mikroorganismy	11
2.3.1	Bakterie	11
2.3.2	Kvasinky	11
2.3.3	Plísně.....	11
2.4	<i>Aspergillus niger</i>	13
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	16
3.1	Použité chemikálie, aparatura a materiál	16
3.1.1	Chemikálie	16
3.1.2	Přístroje a plazmové systémy.....	16
3.1.3	Materiál	17
3.2	Sterilizace.....	18
3.3	Příprava plazmatem ošetřené vody	18
3.3.1	Příprava PTW pomocí stejnosměrného a střídavého výboje v roztoku.....	18
3.3.2	Příprava PTW pomocí DBD s tekutou elektrodou	18
3.4	Charakterizace plazmatem ošetřené vody.....	18
3.5	Příprava a odběry vzorků, očkování a kultivace.....	19
3.6	Simulace PTW prostředí	19
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	20
4.1	Charakterizace PTW	20
4.2	Vliv PTW na růst plísně.....	20
4.3	Porovnání metod	24
4.4	Simulace PTW prostředí	25
5	ZÁVĚR	28
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	29
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	35
8	PŘÍLOHA	36

1 ÚVOD

Většina atomární hmoty ve vesmíru existuje ve formě plazmatu. Nejvýznamnějším příkladem je slunce, které nám umožňuje život na Zemi. Proto je plazma považováno za čtvrté skupenství hmoty. Stejně jako kapalina se přemění na plyn přidáním energie, tak i z plynu vznikne plazma. Jedná se o ionizovaný plyn tvořený kladně a záporně nabitými částicemi o stejné koncentraci [1–3].

Jak už bylo zmíněno, plazma je nejběžnější formou hmoty, ale naše planeta je výjimkou – všechny látky kolem nás existují buď ve formě pevné, kapalné nebo plynné. Plazma se na Zemi vyskytuje poměrně zřídka, například v podobě blesku nebo polární záře. V poslední době roste zájem o zkoumání vlastností plazmatu a jeho využití v různých oborech – v medicíně, potravinářství, zemědělství, čištění vod, stavebnictví (svařování) a dokonce i na venkovní reklamě (neonové cedule) [3, 4].

V laboratořích se zpravidla pracuje s tzv. nízkoteplotním plazmatem. Jeho interakcí s různými látkami mohou vznikat plazmatem aktivované aerosoly, hydrogely a kapaliny [2]. Tato práce se věnuje studiu plazmatem ošetřené vody (PTW). Plazma je nejčastěji generováno elektrickým výbojem. Při kontaktu s vodou mění její vlastnosti, hlavně pH a konduktivitu, a to díky vzniku reaktivních kyslíkatých a dusíkatých částic. Používá se hlavně v oblastech medicíny a potravinářství ke sterilizaci. Za hlavní příčinu antimikrobiálních vlastností PTW je považována kombinace efektů jejího nízkého pH a vzniku sekundárních, dlouho nezanikajících chemických částic (H_2O_2 , O_3 , NO_2^- , NO_3^-). Acidní směs dusitanů, dusičnanů a peroxidu vodíku dodává PTW silnější sterilizační vlastnosti, než má neošetřená voda o nízkém pH [5, 6]. Využití PTW pro hygienické účely má velice pozitivní perspektivy. Momentálně nejčastěji používaným dezinfekčním prostředkem je chlor, který je ovšem toxický vůči prostředí. Navíc, ošetřování potravin (například ovoce a zeleniny) chlorem může vyvolat otravy u konzumentů. Z tohoto důvodu některé evropské státy postupně zakazují jeho použití pro dané účely. Plazmatem ošetřená voda je dobrou potenciální náhradou chemického ošetření [7].

Jednou skupinou mikroorganismů představující velké nebezpečí pro lidi (a zvířata) jsou plísně. Jsou to kontaminanty potravin převážně rostlinného původu, například ořechů, cereálií, olejnin, ovoce, zeleniny apod. Můžou způsobit zdravotní potíže u lidí a hospodářských zvířat. Vyvolávají různá kožní onemocnění (mykózy) a také onemocnění dýchacích cest. Nebezpečné jsou i některé jejich metabolity – mykotoxiny. Způsobují v těle záněty nervového, imunitního, kardiovaskulárního a vylučovacího systému [8, 9]. Cílem této práce je studium vlivu plazmatem ošetřené vody na plísň druhu *Aspergillus niger*. Pro účely experimentu byl tento konkrétní druh zvolen kvůli tomu, že je jedním z nejrozšířenějších druhů plísní a je vysoce odolný. Způsobuje vážné onemocnění aspergilózu, kterou se postižený nakazí vdechnutím spor. Poškozuje především dolní dýchací cesty [10]. Ve výsledku práce je diskutován inhibiční účinek plazmatem ošetřené vody na daný mikroorganismus.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Plazma

Plazma je z fyzikálního hlediska ionizovaný plyn, který vykazuje kolektivní chování a kvazineutralitu – kladně a záporně nabité částice se pohybují v závislosti na náboji a jejich koncentrace jsou přibližně stejné. Celkově je plazma tvořeno směsí elektronů, kationtů, aniontů, radikálů, neionizovaných částic a fotonů. Díky kompenzaci proměnlivosti hustoty náboje je plazma považováno za elektricky neutrální. Vzdálenost, ve které nejsou náboje vyrovnány, se nazývá Debyeova délka. Aby plyn mohl být považován za plazma, musí splňovat několik podmínek:

$$\lambda_D \ll L \quad (1)$$

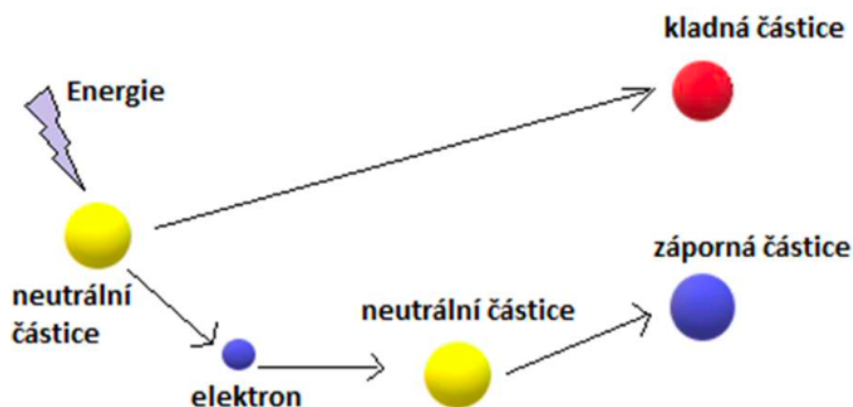
$$N_D \gg 1 \quad (2)$$

$$\omega\tau > 1 \quad (3)$$

$$N^+ = N^- \quad (4)$$

kde λ_D je Debyeova délka, L je charakteristický rozměr plazmatu, N_D je počet částic v Debyeově sféře, ω je frekvence oscilací a τ je střední doba mezi srážkami s neutrálními částicemi, N^+ je počet kladně nabitých částic a N^- je počet záporně nabitých částic [1, 2].

Ke vzniku nabitých částic z neutrálních jim musí být dodána energie, například zvýšením teploty nebo působením elektrického pole (Obrázek 1). Po skončení působení ionizujícího faktoru si částice nechávají získanou energii, a proto zůstávají oddělené [3].



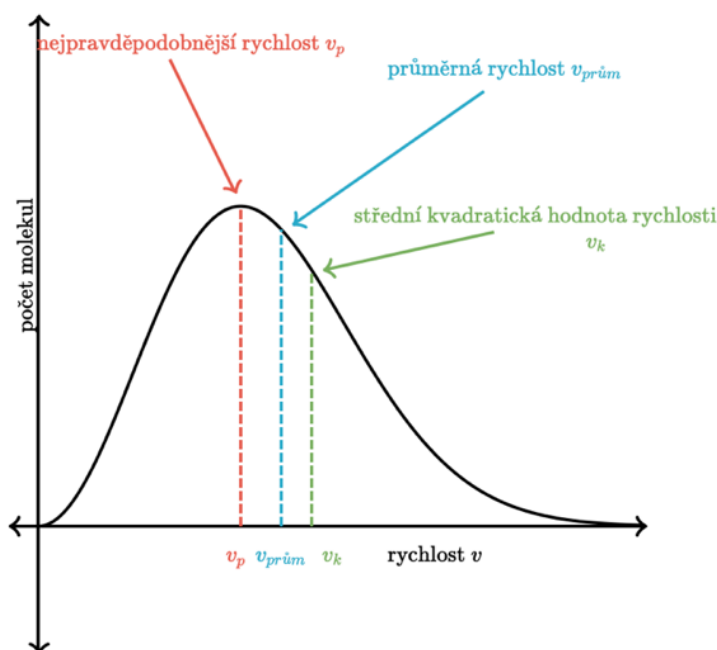
Obrázek 1: Rozpad neutrálních částic [3].

Odhaduje se, že skoro 99 % hmoty je tvořeno plazmatem (například galaxie a hvězdy), proto je plazma považováno za čtvrté látkové skupenství. Na Zemi se plazma nevyskytuje přirozeně často, může se však objevit jen na krátkou dobu v podobě blesku nebo polární záře [1, 2].

Jedním ze základních parametrů plazmatu je stupeň ionizace, který závisí na teplotě a četnosti srážek částic. Stupeň ionizace popisuje Sahova rovnice [2]:

$$\frac{n_i}{n_n} \cong 2,4 \times 10^{21} \frac{T^{\frac{3}{2}}}{n_i} e^{-\frac{U_i}{kT}}, \quad (5)$$

kde n_i je koncentrace iontů, n_n je koncentrace neutrálních atomů, T je teplota, U_i je ionizační energie a k je Boltzmannova konstanta. Ve slabě ionizovaném plazmatu je koncentrace nabitých částic skoro zanedbatelná, ty se srážejí hlavně s molekulami plynu. V silně ionizovaném plazmatu je koncentrace nabitých částic naopak vysoká a dochází mezi nimi k srážkám. Díky těmto vzájemným srážkám částic vznikají ionty a radikály. Různé druhy částic mají různou rychlost v plynu; distribuce rychlosti v rovnovážném plazmatu udává Maxwelllovo-Boltzmannovo rozdělení rychlosti (Obrázek 2).



Obrázek 2: Maxwelllovo-Boltzmannovo rozdělení rychlosti [11].

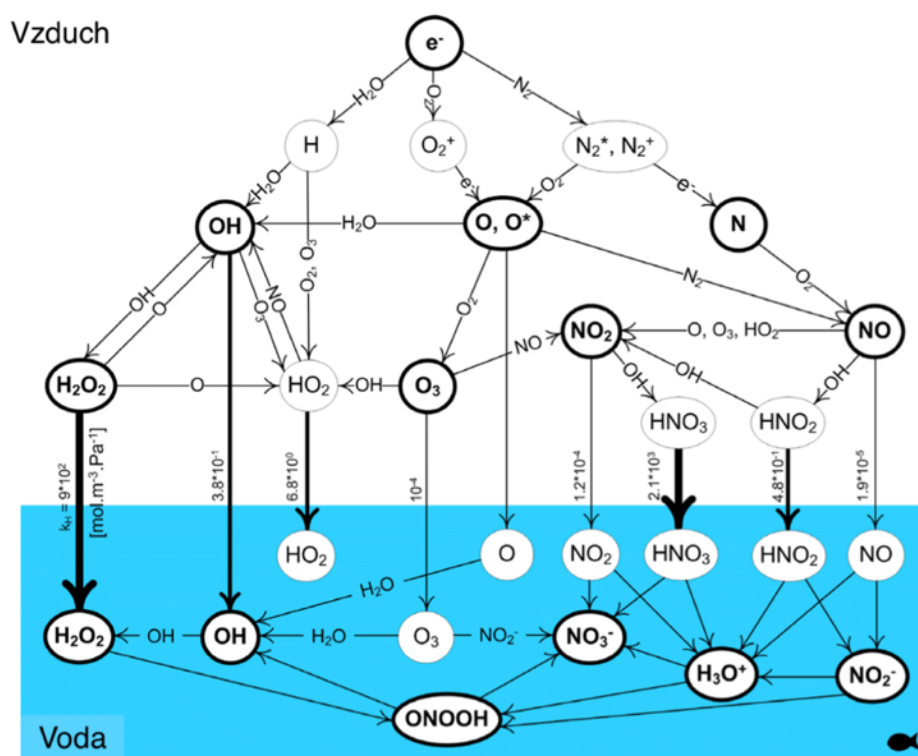
Druhým důležitým parametrem je teplota plazmatu, podle ní ho dělíme na nízkoteplotní a vysokoteplotní. Existují dva pohledy na teplotu plazmatu – makroskopická teplota a mikroskopická teplota. Pod pojmem makroskopická teplota se rozumí teplota neutrálních a kladně nabitých částic, která určuje výsledný teplotní efekt vůči vnějšímu prostředí. Mikroskopická teplota neříká nic o celkovém množství tepla, je definována jako míra kinetické energie částic. Udává se buď v Kelvinech nebo elektronvoltech, přičemž platí, že 1 eV odpovídá teplotě zhruba 11 600 K. Nízkoteplotní plazma má kinetickou energii elektronů odpovídající teplotě větší jako 10^4 K, vysokoteplotní větší jako 1 MK. V plazmových technologiích je zpravidla používáno nízkoteplotní plazma [1, 2]. V případě, že teplota

elektronů je vyšší než teplota iontů a neutrálních částic, je plazma považováno za nerovnovážné; pokud je teplota stejná, mluvíme o rovnovážném plazmatu [3].

2.2 Interakce plazmatu s kapalinami

Nízkoteplotní plazma je zdrojem reaktivních částic, které jsou dobrými oxidačními činidly. Díky svým sterilizačním a antibakteriálním účinkům je plazma využíváno v různých oblastech, například v potravinářském průmyslu k dekontaminaci některých druhů potravin a obalů, v medicíně k hojení ran, sterilizaci chirurgických nástrojů a dalších zařízení, čištění vody atd. [4, 12–15].

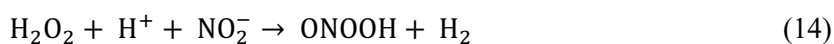
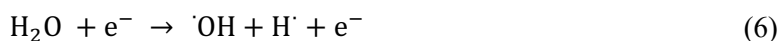
Při kontaktu plazmového výboje s kapalinami dochází k rozkladu, odpařování kapaliny a materiálů elektrod a vzniku produktů s redoxními vlastnostmi [5]. Interakcí nízkoteplotního plazmatu s vodou vzniká plazmatem ošetřená voda (PTW). Při kontaktu plazmatu s povrchem vody dochází k fyzikálně-chemickým procesům. Výsledkem těchto procesů jsou reaktivní částice vzniklé z N_2 , O_2 a molekul vody – RONS (reaktivní kyslíkaté a dusíkaté částice) (Obrázek 3). Dusík z okolního vzduchu se dostává do výboje difúzí; díky němu v plazmatu vznikají RONS, které pak přecházejí do kapaliny [16]. Mezi primární částice se řadí volné elektrony, hydroxylový radikál a atomární dusík, kyslík a vodík. Díky interakcím těchto primárních částic, molekul vody a plazmatu vznikají dlouho trávající sekundární částice, například H_2O_2 , NO_x , O_3 , HNO_3 , HNO_2 , O_2^- [6].



Obrázek 3: Nejdůležitější vznikající částice a mechanismus interakce plazmatu s vodou [6].

Taková směs plynů a aerosolu kyselin se následně rozpouští ve vodě a reaguje s organickými kontaminanty (u mikroorganismu dochází k degradaci buněčných membrán). Největší význam má peroxid vodíku jakožto dlouho trávající reaktivní částice, především díky které mají

plazmové systémy svoje antimikrobiální, hojící a podle některých studií dokonce i protirakovinné účinky. Velkou roli při ničení mikroorganismů hrají také peroxodusitan ONOO^- , který vzniká reakcí mezi peroxidem a dusitanovým aniontem, a ozon O_3 [4, 12, 17–19]. Některé z reakcí vzniku RONS jsou:

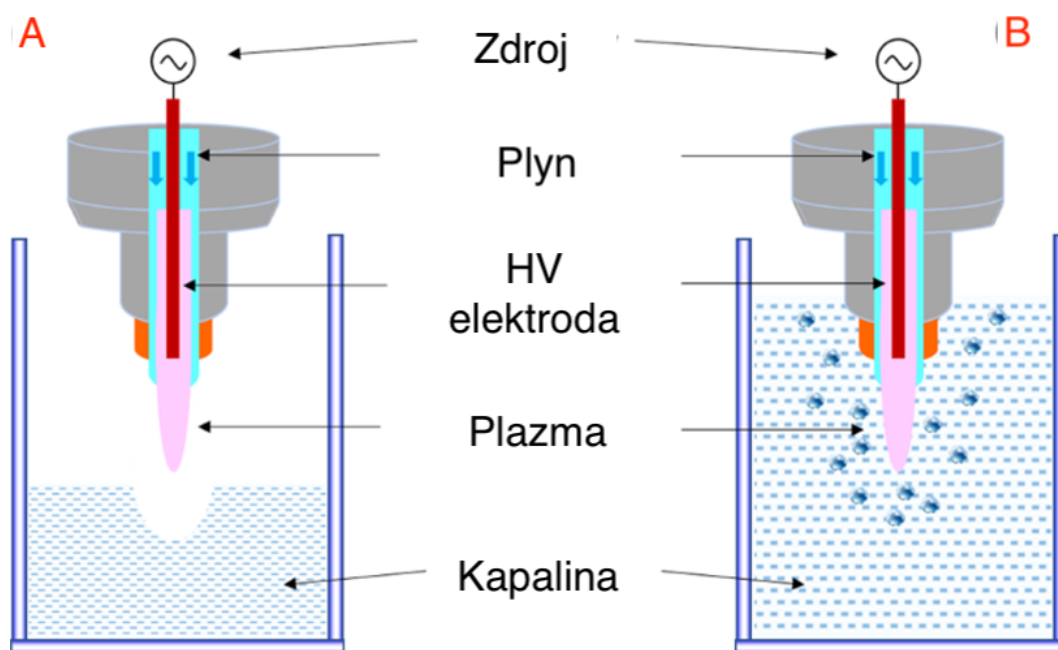


Kromě oxidačních vlastností jsou RONS dobrými stimulatory a inhibitory některých buněčných funkcí, například růstu, adhezi a smrti, díky čemu v poslední době roste zájem o využití PTW v medicíně, v onkologii a hojení ran. Při přímém ošetření je plazma vždycky v kontaktu s tělními tekutinami (například krví, hnísem). Obsah těchto roztoků (organické a neorganické molekuly, buňky atd.) ovlivňuje, které částice budou vznikat, a tím pádem ovlivňuje i účinnost PTW. Plazmatem ošetřená voda může mít podobné účinky, ale na rozdíl od samotného plazmatu má výhodu v tom, že může být snadno použitá na všechny části těla [20]. V potravinářském průmyslu se PTW využívá z důvodu, že je šetrná k životnímu prostředí a neovlivňuje kvalitu potravin [7].

Díky obsahu reaktivních částic (především dusíkatých) má PTW nižší pH, vyšší konduktivitu a vyšší redoxní potenciál než neošetřená voda, díky čemu může PTW sloužit jako alternativní metoda mikrobiální desinfekce [16, 21–23]. Vlastnosti PTW se mohou lišit v závislosti na způsobu generování plazmatu a ošetření vody (Obrázek 4) a na použitém plynu pro generování plazmatu. Vzduch a dusík vytvářejí kyselé prostředí, kyslík a argon nemění pH nijak výrazně; plazma na bázi kyslíku produkuje nejvíce peroxidu vodíku. Výsledná efektivita PTW závisí na zdroji vody – některé studie prokázaly, že přítomnost iontů kovů nebo organických složek ve vodě má negativní vliv na efektivitu PTW. Významnou roli hraje také i čas působení – čím déle bude vzorek vody vystaven plazmatu, tím vyšší bude efektivita připravené PTW. Podobný vliv na efektivitu má napětí – příliš vysoké napětí může způsobit vznik nerovnoměrného elektrického pole a zvýšení teploty: oba faktory zkracují životaschopnost vzniklých reaktivních částic. Zdroj plazmatu (DBD, plazma jet apod.) a vzdálenost mezi elektrodou a povrchem

kapaliny také ovlivňují, které částice budou vznikat, jak budou transportovány do kapaliny a jak účinná bude PTW [13, 16, 18].

Jak už bylo zmíněno, vlastnosti PTW – hlavně kvalitu a kvantitu RONS – ovlivňuje metoda aktivace vody [23, 24]. Pro přípravu PTW jsou nejčastěji používány plazmové jety a DBD-systém (dielektrický bariérový výboj). V případě DBD jsou dvě elektrody od sebe odděleny izolační bariérou. Plazmový jet využívá dodatečného proudu plynu, který transportuje plazma k místu aplikace [24]. Zatím bylo zjištěno, že voda ošetřená plazmatem pod její hladinou má výraznější antimikrobiální účinky než voda ošetřená nad její hladinou, protože plazma produkuje větší množství reaktivního kyslíku pod hladinou vody (Obrázek 4). Například, Ying Tian *et al* při studiu vlivu PTW na bakterie zjistili, že PTW připravená aktivací pod vodní hladinou způsobuje větší oxidační stres, čímž spouští hromadění RONS uvnitř buňky. Dochází k poklesu membránového potenciálu, narušení membránové integrity a buněčné smrti [25].



Obrázek 4: Aktivace vody plazmatem nad hladinou (A) a pod hladinou (B) [24].

Plazmatem ošetřená voda má široké biotechnologické využití: v zemědělství jako hnojivo (díky obsahu dusíkatých částic), v medicíně a potravinářství jako způsob sterilizace. Má avšak svoje limity – hlavním je krátká doba existence reaktivních částic [23]. Otázkou stále je, jestli a jak moc se mění vlastnosti PTW s časem – příprava PTW před každým ošetření výrobků není pro velký průmysl praktické. V roce 2021 Junghyun Lim *et al* vydali článek, ve kterém zkoumali vliv PTW na *E. coli*. Zjistili, že efektivita plazmatem ošetřené vody značně klesla po 7 hodinách od její přípravy. Jako vysvětlení bylo uvedeno, že s časem se mění chemické složení PTW – koncentrace peroxidu vodíku a dusitanu s časem klesala; dusitan nebyl detekovatelný po 1 týdnu od ošetření vody plazmatem, peroxid už po půlhodině [7]. Navíc, Vlad a Anghel ve své publikaci z roku 2017 o stabilitě PTW v závislosti na použitém plazmovém systému

předpokládají, že přítomnost dusitanu způsobuje výrazný pokles koncentrace peroxidu vodíku z důvodu vzniku peroxodusitanu [16].

2.3 Vliv plazmatem ošetřené vody na mikroorganismy

Bylo zjištěno, že PTW má schopnost inaktivovat biofilmy, bakterie, kvasinky, plísně, a dokonce i viry [19]. PTW působí na mikroorganismy tak, že poškozují membránu a integritu buňky a způsobuje degradaci nitrobuněčných komponent, především nukleových kyselin a proteinů [18]. Hydroxylový radikál $\cdot\text{OH}$ způsobuje porušení vnější membrány mikrobiálních buněk peroxidací membránových lipidů za vzniku malondialdehydu jako produktu reakce. Malondialdehyd poškozují DNA, což vede k usmrcení buňky. Navíc, některé studie prokázaly, že hydroxylový radikál a peroxid vodíku mají schopnost rušit intramolekulární vazby peptidoglykanu obsaženého v buněčných stěnách bakterií. Peroxodusitan způsobuje peroxidací membránových lipidů, působí jako mutagen a cytotoxin a tím vyvolává buněčnou smrt. Taková kombinace ROS a RNS dodává plazmatem ošetřené vodě silnější antimikrobiální vlastnosti než má neošetřená voda o nižším pH. Mechanismus ničení virů pomocí PTW není zatím hluboce prozkoumán, ale existuje teorie, že hlavní roli při jejich inaktivaci hraje singletový kyslík. Li Guo *et al* na příkladu bakteriofágu stanovili, že singletový kyslík reaguje s některými aminokyselinami za vzniku hydroperoxidů, které údajně snižují enzymovou aktivitu [26].

2.3.1 Bakterie

V poslední době bylo publikováno velké množství studií o antibakteriálních vlastnostech PTW. Destilovaná voda ošetřená plazmatem generovaným nad její hladinou úspěšně inaktivuje bakterie rodu *E. coli*, *S. aureus*, *P. fluorescens*, *L. monocytogenes* aj. *in vitro* [18, 27, 28]. Zajímavé je, že PTW působí na Gram-pozitivní a Gram-negativní druhy různě – tlustší stěna Gram-pozitivních bakterií (například *S. aureus*, *L. innocua*) je odolnější vůči RONS [29].

2.3.2 Kvasinky

Informace týkající se vlivu PTW na kvasinky jsou zatím také limitované. Doposud je známo, že PTW je schopná zabít kvasinky vyskytující se v zelenině a ovoci [28, 30–32]. Rathore a kol. stanovili účinky PTW na kvasinky na příkladu rodu *Candida albicans*. *C. albicans* je nejčastější příčinou kvasinkových onemocnění člověka. Je součástí mikroflóry organismu, vyskytující se v gastrointestinálním traktu, ústní dutině a vagině. Při nadbytečném množení způsobuje onemocnění daných orgánových systémů [33]. Ke generování plazmatu nad povrchem vody byl jako plyn použit vzduch; bylo prokázáno, že oxidační účinky PTW připravenou za použití vzduchu jsou větší než za použití O_2 [31, 34]. Po 30 minutách působení PTW došlo k úplnému zničení kvasinek ve vzorku. PTW zachovala své antimikrobiální účinky po dobu jednoho týdne, pak začala její efektivita klesat [31].

2.3.3 Plísně

Na rozdíl od jednobuněčných bakterií a kvasinek, jsou plísně mnohobuněčná vlákna hub. Poznatků o interakci PTW s plísněmi je v dnešní době poměrně málo a studia jsou zaměřena především na ošetření potravin [28, 30, 35]. Samotné plazma ale je využíváno v medicíně k léčbě onemocnění způsobených kožními plísněmi [15, 36].

Existují dva způsoby ošetření potravin v případě výskytu mykotoxinů, a to jsou ničení plísni produkujících dané toxiny nebo degradace už vyloučených mykotoxinů.

2.3.3.1 Inhibice mykotoxinů

Mykotoxiny jsou sekundárními metabolity plísni [10]. Představují pro lidský organismus velké nebezpečí, poškozují nervový, imunitní, gastrointestinální, kardiovaskulární systém a ledviny [8, 31]. Jsou nebezpečné i pro zvířata, vyskytují se v obilovinách a olejninách jako jsou například kukuřice, pšenice a sója. Nejnebezpečnějšími jsou mykotoxiny aflatoxiny (produkované plísněmi rodu *Aspergillus*), fumonisiny (produkované plísněmi rodu *Fusarium* a *Aspergillus*), ochratoxiny (produkované plísněmi rodu *Penicillium* a *Aspergillus*), fumonisiny (produkované plísněmi rodu *Fusarium* a *Aspergillus*) [8, 9].

Několik studií prokázalo, že plazma a plazmatem ošetřená voda mají schopnost degradovat mykotoxiny a tím bránit kontaminaci potravin [35].

Jedním příkladem je objev, že PTW je schopná snižovat počet kolonie tvořících jednotek plísni (CFU) o 1,04log CFU/g v zelenině [28]. Navíc se používá k ošetření nakrájeného ovoce pro zachování čerstvosti. Žádné negativní účinky PTW na kvalitu a vlastnosti potravin nebyly prozatím zjištěny [30, 32].

Vliv PTW na mykotoxiny v potravinách není zatím hluboce prozkoumán. V roce 2018 Chen a kol. opublikovali práci o interakci PTW s deoxynivalenolem v ječmenu, což je mykotoxin produkovaný plísní rodu *Fusarium*. Způsobuje onemocnění zrn, které následně může vyvolávat zažívací problémy u konzumentů. Experiment prokázal, že se množství daného mykotoxinu snížilo o 25,30 % ve vzorku s neklíčeným ječmenem a o 38,30 % ve vzorku s klíčeným ječmenem; plazma bylo vygenerováno nad hladinou vody za použití techniky plasma jet, jako výchozí plyn byl použit vzduch, výsledné pH PTW bylo 2,80, doba působení PTW na vzorek byla 20 minut [37, 38].

Detailní mechanismus působení PTW na mykotoxiny ale dosud není známý [35].

2.3.3.2 Inhibice plísni

Jak už bylo zmíněno, jedním z nejnebezpečnějších druhů mykotoxinů jsou aflatoxiny produkované rodem *Aspergillus*. Je to jeden z nejrozšířenějších druhů plísni vyskytujících se v půdě. Napadá cereálie, ořechy, olejninu apod.; proto se aflatoxiny často objevují v mléce hospodářských zvířat [39]. Nedávné studie působení PTW na *Aspergillus flavus* prokázaly nejen schopnost PTW snižovat množství spor daného druhu plísně, ale i schopnost snižovat jejich metabolickou aktivitu. Největší efekt měla PTW připravená aktivací vody plazmatem po dobu 20 minut (avšak byl nižší než za působení samotného plazmatu): množství spor bylo sníženo o 0,2-log₁₀ kolonie tvořících jednotek po 2 hodinách a 0,6-log₁₀ kolonie tvořících jednotek po 24 hodinách vystavení vzorků PTW. Metabolická aktivita spor klesla o 42,2 % po 2 hodinách a o 55,2 % po 24 hodinách. Jako produkt vznikl malondialdehyd. V článku s výsledkem daného experimentu bylo specifikováno, že na přípravu PTW byla použita destilovaná ionizovaná voda, která byla vystavena přímému a nepřímému působení plazmatu, takže se nedá posoudit, zda na efektivitu měla vliv aktivace vody nad nebo pod její hladinou. Bylo ale uvedeno, že plazma samotné je účinnější než PTW [27]. V roce 2014 Salama

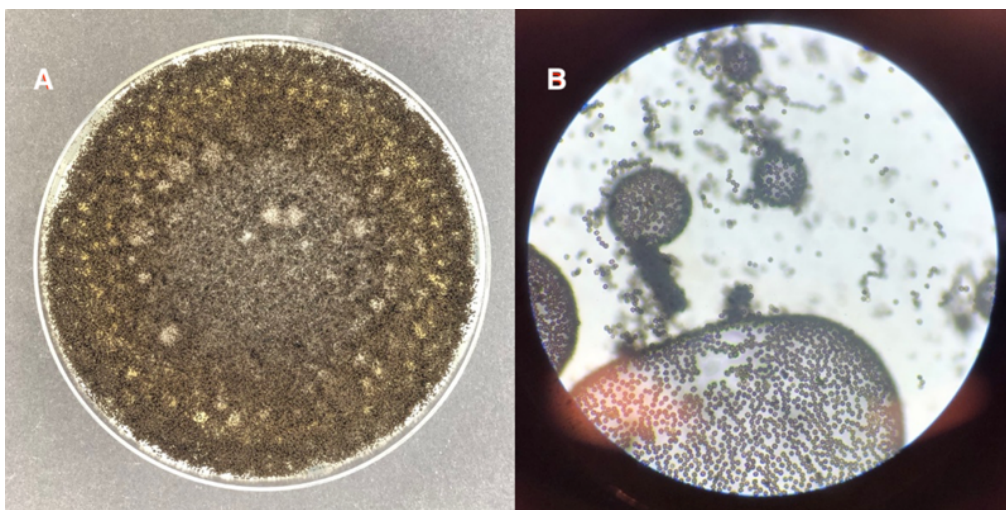
A Ouf *et al* zkoumali vliv plazmatu na *Aspergillus niger* na datlích. Pro účely experimentu byl použit dvojkapilární plazmový jet, kterým bylo generováno argonové plazma za atmosférického tlaku, které poskytlo více OH a O radikálů. Ve výsledku stanovili, že plazma snižuje vitalitu spor a koncentraci plísni produkovaných fumonisinů a ochratoxinů [40].

Plísně druhu *Penicillium* napadají především rostliny rodu *Citrus* – citróny, pomeranče, limetky, grapefruity apod. *Penicillium digitatum* (zelená plíseň) a *Penicillium italicum* (modrá plíseň) jsou nejčastější příčinou onemocnění citrusů a představují velké ekonomické riziko pro země Jižní Asie a Ameriky, které jsou největšími producenty těchto rostlin ve světě [31, 41]. Černá plíseň citrusů (citrus black spot) je způsobena patogenní plísní druhu *Guignardia citricarpa* [31, 42]. V roce 2021 Rathore a kol. publikovali práci o deaktivaci těchto druhů plísni za použití plazmatem ošetřené vody. Pro vytvoření PTW byly použity plyny N₂ a vzduch a destilovaná voda. Plazma bylo vygenerováno nad hladinou vody za použití techniky plazmového pera (Pencil Plasma Jet). Vzorky plísni byly extrahovány z povrchu plodu citronu (*Citrus limon*). V průběhu experimentu byly vyzkoušeny dvě metody vyhodnocení výsledků – kolonie tvořící jednotky (colony-forming unit) a inhibiční zóna (zone of inhibition), obě měly stejné výsledky. Bylo stanoveno, že čím delší je doba interakce PTW s plísní, tím vyšší je její fungicidní účinek: k úplné likvidaci došlo po 15 minutách působení PTW [31].

Ohledně konkrétního mechanismu účinků byla navržena hypotéza, že deaktivace plísni PTW je založená na jejich morfologických změnách způsobených apoptózou, částečným nebo úplným porušením buněčných stěn, peroxidací membránových lipidů, poškozením DNA plísni atd. Ve výsledku je analyzována přítomnost proteinů a extracelulární DNA ve vzorku k stanovení účinnosti PTW [27, 31, 35].

2.4 *Aspergillus niger*

Aspergillus niger je plíseň z oddělení Ascomycota. Rozmnožuje se nepohlavními sporami (mikrokonidii). Na začátku růstu mají kolonie bílé až žluté zbarvení, které se po sporulaci mění na černé díky produkci pigmentu aspergillinu. Mikrokonidie mají kulovitý tvar (Obrázek 5), konidiofory jsou dlouhé. *A. niger* je velice rozšířený druh, vyskytuje se v půdě, a hlavně na potravinách rostlinného původu, jako jsou například obiloviny, olejnaté plodiny, ořechy atd. [10, 43–45]. Je to saprotrofní druh, přičemž v jedné práci bylo zjištěno, že se může chovat jako autotrofní při nedostatku dusíku. Navíc je termorezistentní, což znamená, že přežívá při teplotě 6 až 47 °C, a také je rezistentní vůči změnám pH – udává se, že je schopen růst v rozmezí pH 1,4 až 9,8 [46, 47].

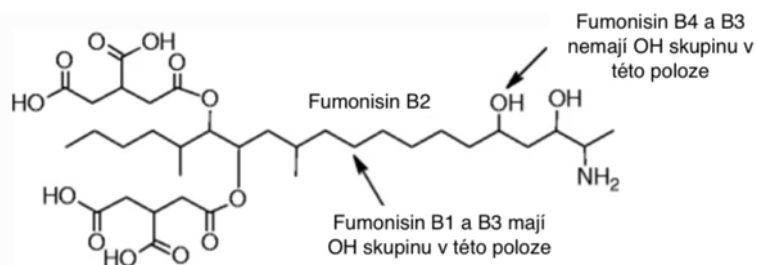


Obrázek 5: (A) *Aspergillus niger* (spory), (B) *Aspergillus niger* pod mikroskopem (zvětšení 40x).

Daný rod plísně je klasifikován jako patogenní pro člověka, neboť způsobuje onemocnění dýchacích cest aspergilózu. U velkého množství lidí dochází k náhodné inhalaci spor během dne, k infekci dochází u jedinců se sníženou imunitou. Bylo prokázáno, že *Aspergillus niger* může vyvolávat tzv. invazivní aspergilózu, která poškozuje především plíce [48, 49].

A. niger produkuje velké množství sekundárních metabolitů, například kyselinu citronovou, šťavelovou, glukonovou, fumarovou, glutarovou, malformin, karcinogenní ochratoxiny, fumonisiny a mnoho dalších [10, 43]. I přes to, že jsou toxické, některé metabolity se využívají v průmyslu díky svým biodegradačním vlastnostem. Mají schopnost hromadit těžké kovy a jiné toxické látky (např. ropu a odvozené produkty) z odpadních vod [50].

Fumonisin jsou mykotoxiny produkované různými patogenními druhy plísní v obilovinách (hlavně kukuřice), arašídech a hroznech. Mají strukturu podobnou sfingoidním bázím, a proto mohou zasahovat do metabolismu sfingolipidů (Obrázek 6). Ačkoliv za hlavní producenty daného toxinu jsou považovány plísně rodu *Fusarium*, několik studií udává, že *A. niger* obsahuje geny zodpovědné za produkci fumonisinu (ale nemusí se projevit). Homology fumonisinu jsou klasifikovány do 4 skupin – A, B, C a P; *Aspergillus niger* produkuje skupinu B. Tato skupina je toxická pro plíce, játra a ledviny zvířat, u člověka může způsobit rakovinu jícnu [51]-[54]. Nejhojněji se vyskytujícími formami jsou fumonisiny B₁, B₂ a B₃; nejnebezpečnější z nich je B₁, který je podle IARC (International Agency for Research on Cancer) karcinogenem skupiny 2B (potenciální karcinogen). Působí tak, že zpomaluje syntézu ceramidu v buňce, což vede ke zvýšení koncentraci toxických mimobuněčných sfingoidních látek. Dochází k narušení buněčného cyklu, oxidačnímu stresu, a nakonec buněčné smrti [10, 52, 54].



Obrázek 6: Rozdíl ve struktuře fumonisinu B₁, B₂, B₃ a B₄ [55].

Ochratoxiny spadají do skupiny toxinů poškozujících primárně ledviny, ale také střeva a játra. Vyskytují se v hroznových nápojích, suchém ovoci, ořechách, kávových zrnech. Rod *Aspergillus* produkuje ochratoxiny skupiny A, B a C. Ochratoxin A brzdí proteosyntézu a, stejně jako fumonisin B₁, vyvolává oxidační stres a buněčnou smrt, je považován za karcinogen skupiny 2B a mutagen. Může se hromadit v tělních tekutinách a tkáních. Ochratoxin C má podobné vlastnosti jako A, navíc se může v těle měnit na A formu [10, 54, 56].

Rod *Aspergillus* také produkuje aflatoxiny. Některé studie udávají, že mohou být produkovány druhem *A. niger*, některé říkají, že produkce aflatoxinů je charakteristická spíše pro příbuzné druhy stejného rodu. Aflatoxiny se dělí do čtyř skupin B₁, B₂, G₁ a G₂. Nejnebezpečnější je B₁, který je považován za karcinogen a mutagen [54]. Existují studie o tom, že ROS mohou zvyšovat produkci aflatoxinů. Navíc mohou mít v případě druhu *Aspergillus flavus* pozitivní vliv na růst a vývoj plísně [57].

Kromě mykotoxinů jsou za sekundární metabolity *A. niger* považovány organické kyseliny [10]. Kyselina šťavelová ve velkém množství poškozuje játra a ledviny (minimální letální dávka pro člověka je 600 mg/kg) [58]. Její konjugovaná báze oxalát funguje v těle jako chelátotvorné činidlo pro ionty kovů, čím může způsobit u infikovaného jedince zvýšení koncentrace vápníku v moči (primární hyperoxaurie), které následně vede ke vzniku ledvinových kamínek [10], [59]. *A. niger* se díky svým fermentačním schopnostem hojně využívá v biotechnologiích k produkci kyseliny citronové. Je netoxická a díky tomu má široké využití v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu jako konzervant, emulgátor, oxidační činidlo. Udává se, že se ročně vyrobí 2 miliony tun kyseliny citronové [53, 60, 61].

Problémem při ošetření plísní plazmatem ošetřenou vodou je, že pro svůj metabolismus kyselin potřebuje plíseň určité podmínky; jednou z nich je kyselé pH. Šimonovičová *et al* ve své studii v roce 2020 o acidogenezi u *A. niger* dospěli k závěru, že vhodné pH pro syntézu kyseliny citronové, glukonové a šťavelové je 3,5 [60]. V roce 1999 Ruijter *et al* sledovali produkci kyseliny šťavelové u *A. niger* a zjistili, že optimální rozmezí pH pro syntézu dané kyseliny je 4 až 6, avšak menší koncentrace byla detekovatelná i při pH 2 [62]. Podle článku Andersena *et al* z roku 2009 optimální rozmezí pro kyselinu šťavelovou je 5 až 8 a při hodnotě 3 už kyselina detekovatelná není. Kyselina citronová je syntetizována při pH 3 a níž, glukonová kolem 5. Na základě těchto výsledků vznikla teorie, že *Aspergillus niger* v určitý moment syntetizuje tu organickou kyselinu, která bude schopná co nejvíce okyselit dané médium [63].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem této bakalářské práce je studium vlivu plazmatem ošetřené vody na plíseň *Aspergillus niger* (CCM-F 8189). PTW (fyziologický roztok) byla připravená za pomoci tří různých plazmových systémů – stejnosměrného výboje v roztoku (Obrázek 7A), střídavého vysokofrekvenčního výboje v roztoku (Obrázek 7B) a dielektrického bariérového výboje nad roztokem (Obrázek 8). Následně byla PTW charakterizována z hlediska koncentrace RONS a pH. Suspenze plísní v PTW byla kultivována na sladidovém médiu; vliv PTW byl vyhodnocen počítáním narostlých kolonií 72 hodin po očkování.

3.1 Použité chemikálie, aparatura a materiál

3.1.1 Chemikálie

Tabulka 1: Použité chemikálie.

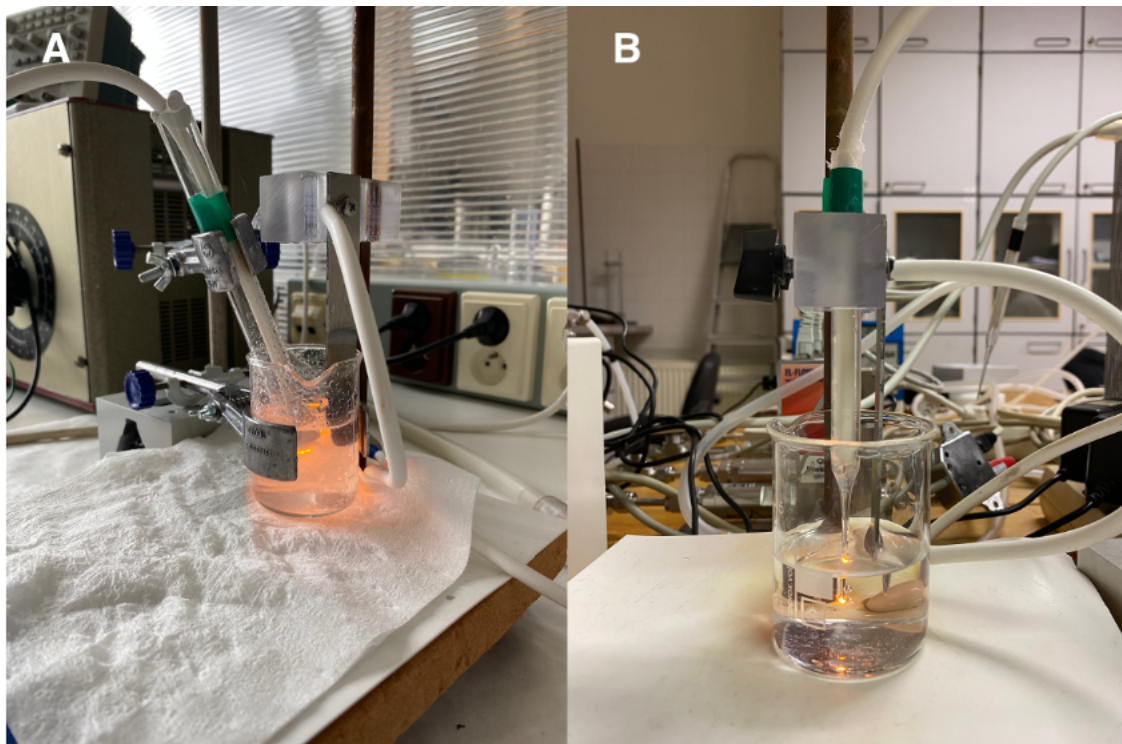
Látka	CAS	Výrobce
Test pro stanovení dusičnanů	-	Merck KGaA
Test pro stanovení dusitanů	-	Merck KGaA
Oxysulfát titaničitý v kyselině sírové	123334-00-9	Sigma-Aldrich
Dusitan sodný	7632-00-0	Lach-Ner, s.r.o.
Dusičnan sodný	7631-99-4	Lach-Ner, s.r.o.
Chlorid sodný	7647-14-5	Lach-Ner, s.r.o.
Peroxid vodíku 30 % nestabilizovaný	7722-84-1	Lach-Ner, s.r.o.
Fosfátový pufr	-	Zdroj FCH
Sladidový agar	-	Himedia Labs, s.r.o.

3.1.2 Přístroje a plazmové systémy

Tabulka 2: Přístroje.

Přístroj	Výrobce
Plazmová tryska pro generaci plazmatu v kapalině + vysokofrekvenční zdroj napětí (AC 40 W)	Vlastní výroba (laboratoř plazmochemie, FCH VUT) + Liferech s.r.o.
Plazmová tryska pro generaci plazmatu v kapalině + stejnosměrný zdroj napětí (DC 40 W)	Vlastní výroba (laboratoř plazmochemie, FCH VUT)
Dielektrický bariérový výboj s tekutou elektrodou + vysokofrekvenční zdroj napětí (DBD 36 W)	Vlastní výroba (laboratoř plazmochemie, FCH VUT) + Lifetech s.r.o.
Spektrofotometr	Helios Omega (Unicam)

Přístroj	Výrobce
pH metr	WTW inoLab



Obrázek 7: Plazmová tryska pro generaci plazmatu – (A) stejnosměrný výboj, (B) střídavý vysokofrekvenční výboj.



Obrázek 8: DBD s tekutou elektrodou.

3.1.3 Materiál

Ke kultivaci byly použity spory plísně *Aspergillus niger* – zdroj laboratoř mikrobiologie FCH VUT, kód plísní CCM-F 8189.

3.2 Sterilizace

Sterilizace laboratorních pomůcek a chemikálií (fyziologický roztok, PBS) byla provedena při teplotě 120 °C po dobu 35 minut.

3.3 Příprava plazmatem ošetřené vody

Na přípravu PTW byl použit 0,9 % fyziologický roztok. Do 1 l vody bylo přidáno 9 g chloridu sodného, po smíchání byl roztok sterilizován. Objem a časy vystavení fyziologického roztoku působení plazmatu v jednotlivých systémech jsou uvedeny v Tabulka 3.

Tabulka 3: Objem fyziologického roztoku a čas působení plazmatu v jednotlivých systémech.

Zařízení	Výkon [W]	Objem [ml]	Čas [min]
DBD	36	75	5
AC	40	50	1
DC	40	50	1

3.3.1 Příprava PTW pomocí stejnosměrného a střídavého výboje v roztoku

Plazmová tryska v DC a AC konfiguraci je systém pro generaci plazmatu pod hladinou vody, tedy přímo v ošetřovaném roztoku (Obrázek 7). Skládá se ze zdroje napětí (střídavého nebo stejnosměrného), reaktoru s fyziologickým roztokem (kádinka o objemu 100 ml), hlavní elektrody a hliníkové protielektrody. Konfigurace hlavní elektrody kombinuje korónový a šterbinový výboj a je tvořena wolframovým drátem ukončeným v keramické hlavici (v případě stejnosměrného výboje) nebo ve skleněné kapiláře (v případě vysokofrekvenčního výboje). Obě elektrody byly ponořeny do roztoku, který byl plazmatu vystaven po dobu 1 minuty.

3.3.2 Příprava PTW pomocí DBD s tekutou elektrodou

Dielektrický bariérový výboj je systém pro generaci plazmatu nad hladinou vody (Obrázek 8). Skládá se z vysokofrekvenčního zdroje napětí (frekvence 11 kHz) a reaktoru, na kterém je postavena Petriho miska s 75 ml fyziologického roztoku. Na spodní straně misky je umístěna grafitová elektroda; miska s roztokem se přikrývá keramickou deskou se svrchní stříbrnou elektrodou. Ošetření se provádělo v minutových intervalech, horní elektroda byla po každém intervalu osušena buničinou. Celková doba vystavení fyziologického roztoku plazmatu byla 5 minut.

3.4 Charakterizace plazmatem ošetřené vody

Pro charakterizaci PTW byl stanoven obsah vybraných dlouhodobých RONS (dusitanů, dusičnanů a peroxidu vodíku) a bylo sledováno její pH. Koncentrace dusitanu, dusičnanu a peroxidu vodíku byly stanoveny kolorimetricky s využitím selektivních činidel a následně spektrofotometricky. Pro každou částici byla naměřena absorpční spektra výsledného barevného komplexu částice s činidlem a stanoveno jeho absorpční maximum. Na základě

kalibračních křivek naměřených v příslušném koncentračním rozmezí pro každou částici zvlášť byla absorbance následně přepočítána na koncentraci. pH PTW bylo změřeno pH-metrem.

3.5 Příprava a odběry vzorků, očkování a kultivace

Pro přípravu suspenze PTW a plísní bylo odebráno 25 ml PTW do malé Erlenmeyerovy baňky, do níž byla přidána 2 očka spor, následně byly provedeny odběry suspenze v různých časových intervalech – 10 min, 3 h, 6 h a 24 h. Do mikrokumavky typu Eppendorf bylo napipetováno 900 μ l PBS, ke kterým bylo přidáno 100 μ l suspenze. Byla připravena dvě ředění pro každý vzorek – 10x a 100x. 100 μ l takovým způsobem připravené kultury bylo pak naočkováno na agar. Pro vyhodnocení vlivu PTW byly připraveny kontrolní vzorky kultury ve fyziologickém roztoku. Kultivace plísně probíhala za laboratorní teploty po dobu 72 h. Kontrolní vzorek byl připraven roztěrem suspenze plísně ve fyziologickém roztoku na agar. Vyhodnocení účinku PTW bylo provedeno počítáním kolonií na agaru.

3.6 Simulace PTW prostředí

Pro posouzení vlivu konkrétních RONS na růst plísní byla provedena simulace prostředí PTW a to tak, že byly připraveny suspenze plísní s roztokem dusitanu sodného a peroxidu vodíku. Pro přípravu roztoků dusitanu o koncentraci 0,03 a 0,3 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla použita sterilní voda a dusitan sodný. Pro přípravu roztoku peroxidu o koncentraci 0,4 a 4 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla použita sterilní voda a 30 % nestabilizovaný roztok peroxidu vodíku. Odběry vzorků a očkování bylo provedeno stejným způsobem jako u PTW.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Charakterizace PTW

Pro detekci jednotlivých aktivních částic byly sestrojeny kalibrační křivky v příslušném koncentračním rozmezí: dusitany $0,1 - 1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a dusičnany $1,0 - 100,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Výsledné kalibrační rovnice při příslušné maximální vlnové délce jsou uvedeny v Tabulka 4, vlastní kalibrační křivky jsou v PŘÍLOHA; rovnice kalibrační křivky peroxidu vodíku byla získána z předcházející diplomové práce [64].

Zjistilo se, že systém DC generuje nejvíce dusičnanů a peroxidu vodíku, zatímco DBD produkuje nejvíce dusitanů. pH roztoku u DC systému a DBD klesá, zatímco u AC systému se nijak významně nemění.

Tabulka 4: Rovnice kalibračních křivek aktivních částic.

Částice	Vlnová délka	Rovnice kalibrační křivky ¹
H_2O_2	407 nm	$A = 0,4600 * c$
NO_2^-	540 nm	$A = 0,6334 * c$
NO_3^-	526 nm	$A = 0,0017 * c$

Tabulka 5: Charakterizace PTW připravené pomocí různých plazmových systémů [65].

Plazmový systém	Koncentrace [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]			pH
	H_2O_2	NO_2^-	NO_3^-	
AC	2,86	0,031	-	7,1
DC	13,57	0,024	0,91	5,2
DBD	0,71	0,086	0,05	5,3

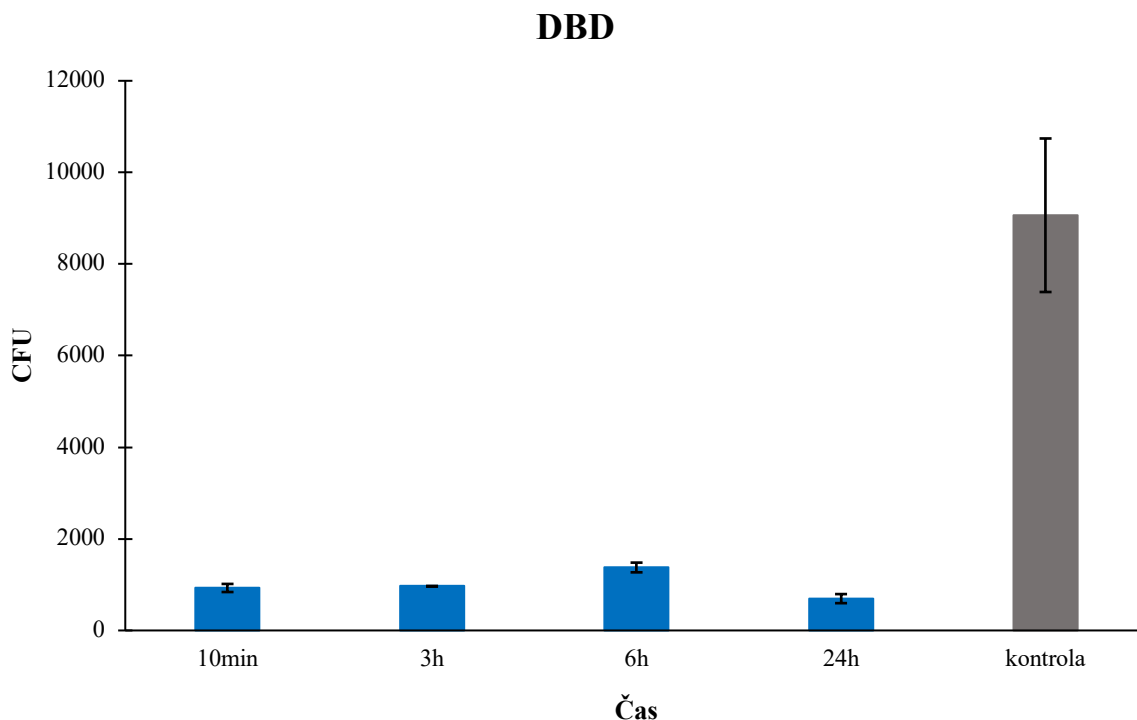
4.2 Vliv PTW na růst plísně

Následující podkapitoly obsahují výsledky ošetření plísně PTW připravené různými způsoby. Grafy na Obrázek 9 Obrázek 11 znázorňují, jak ovlivňuje PTW růst kolonií s časem. Na ose x jsou vyneseny hodnoty časových intervalů, ve kterých byly vzorky odebrány ze suspenze plísně v PTW ke kultivaci. Na ose y jsou vyneseny počty jednotek CFU (jednotky tvořící kolonie v 1 ml PTW). Ošetřené vzorky jsou vždy porovnány s kontrolním vzorkem. Procentuální úbytky CFU oproti kontrolnímu vzorku shrnuje Tabulka 6.

Studia zabývající se vlivem plazmatem ošetřené vody na mikroorganismy většinou udávají, že inhibiční účinek PTW roste s časem působení [31]. Cílem tohoto experimentu bylo

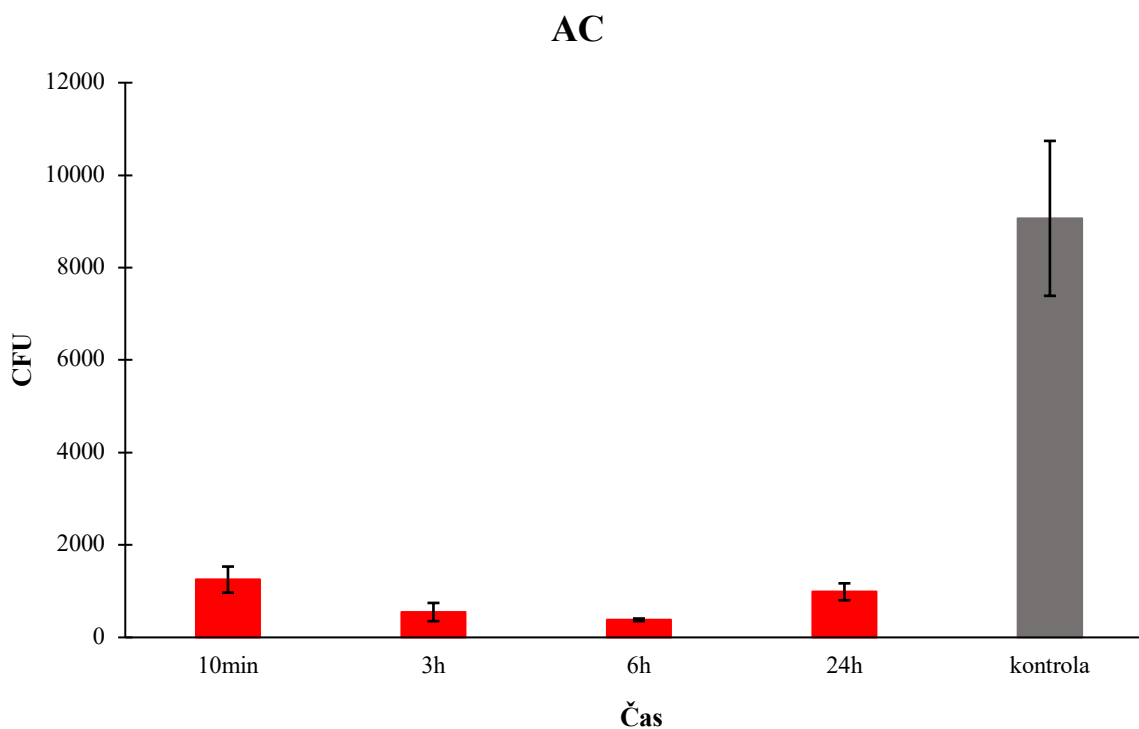
¹ Kalibrační rovnice peroxidu vodíku je pro koncentraci v $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Tabulka 5 obsahuje hodnoty koncentrace H_2O_2 přepočtené na $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

vyzkoušet, zda tomu tak ve skutečnosti je. V případě PTW z dielektrického bariérového výboje (Obrázek 9) je pozorován nárůst počtu CFU s časem. Při charakterizaci PTW bylo stanoveno pH DBD na 5,3. Podle některých článků na dané téma, kyselé pH prostředí podporuje metabolismus *A.niger* [60], což můžeme pozorovat v čase 10 minut až 6 hodin. Po 24 hodinách od doby odběru vzorku počet CFU naopak klesá. Můžeme předpokládat, že DBD systém neprodukuje dostatečné množství reaktivních částic na to, aby docházelo k inhibici plísně. Avšak jsou počty kolonií mnohem nižší, než u kontrolního vzorku.



Obrázek 9: Graf závislosti počtu kolonií na čase odběru vzorků (DBD PTW).

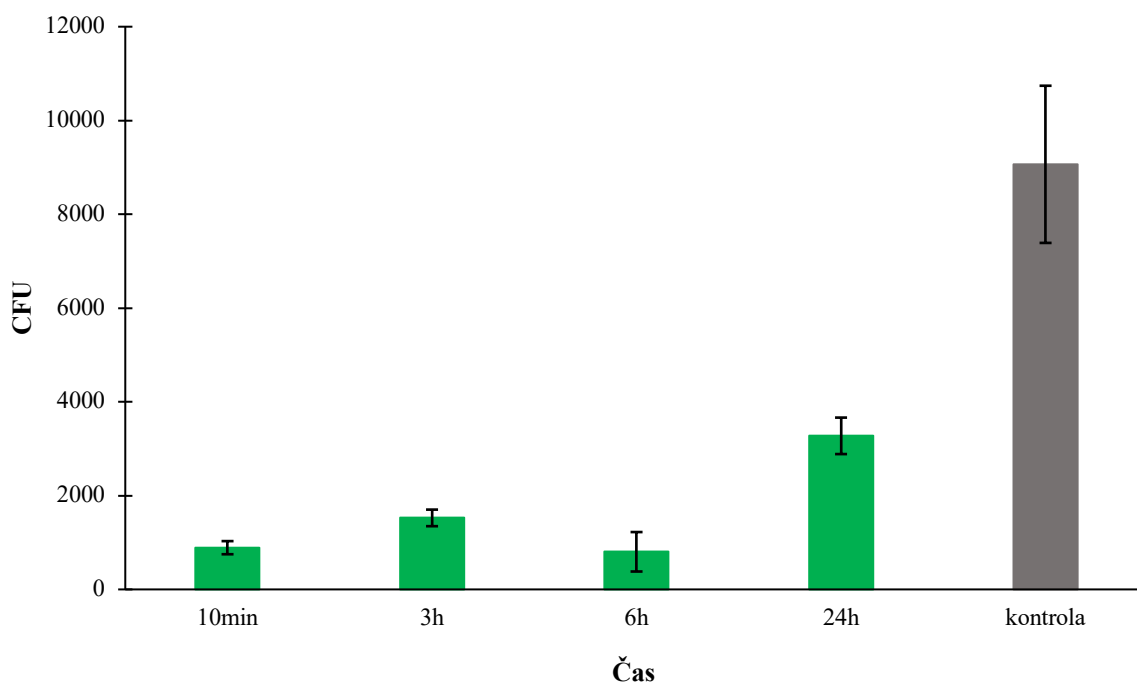
V případě střídavého výboje byl pozorován pokles počtu CFU s časem (Obrázek 10). Během prvních 6 hodin činil celkový úbytek skoro 96 % (Tabulka 6) oproti kontrolnímu vzorku. Po 24 hodinách počet CFU naopak vzrostl, což pravděpodobně můžeme vysvětlit tak, že došlo k částečnému zániku aktivních částic v PTW.



Obrázek 10: Graf závislosti počtu kolonií na čase odběru vzorků (AC PTW).

U DC systému byly počty kolonií v čase 10 minut a 6 hodin zhruba stejné, k největšímu nárůstu došlo po 24 hodinách od doby odběru vzorku (Obrázek 11); avšak oproti kontrolnímu vzorku byl počet kolonií mnohem menší. Stejnoseměrným výbojem ve vodě vzniká nejvíce peroxidu vodíku; můžeme předpokládat, že si plíseň s časem zvykne na stres, a proto roste. Navíc, podle teoretických poznatku rozmezí pH 3 až 8 je optimální pro acidogenezi *A.niger* [60], [62]. Podle výsledků charakterizace (Tabulka 5) je hodnota pH PTW připravené pomocí DC plazmové trysky 5,2. Při zániku reaktivních částic s časem dochází i k zvýšení pH PTW, čím může být objasněn nárůst kolonií – prostředí se stává vhodným pro normální metabolismus plísni. Stejně platí i pro DBD systém.

DC

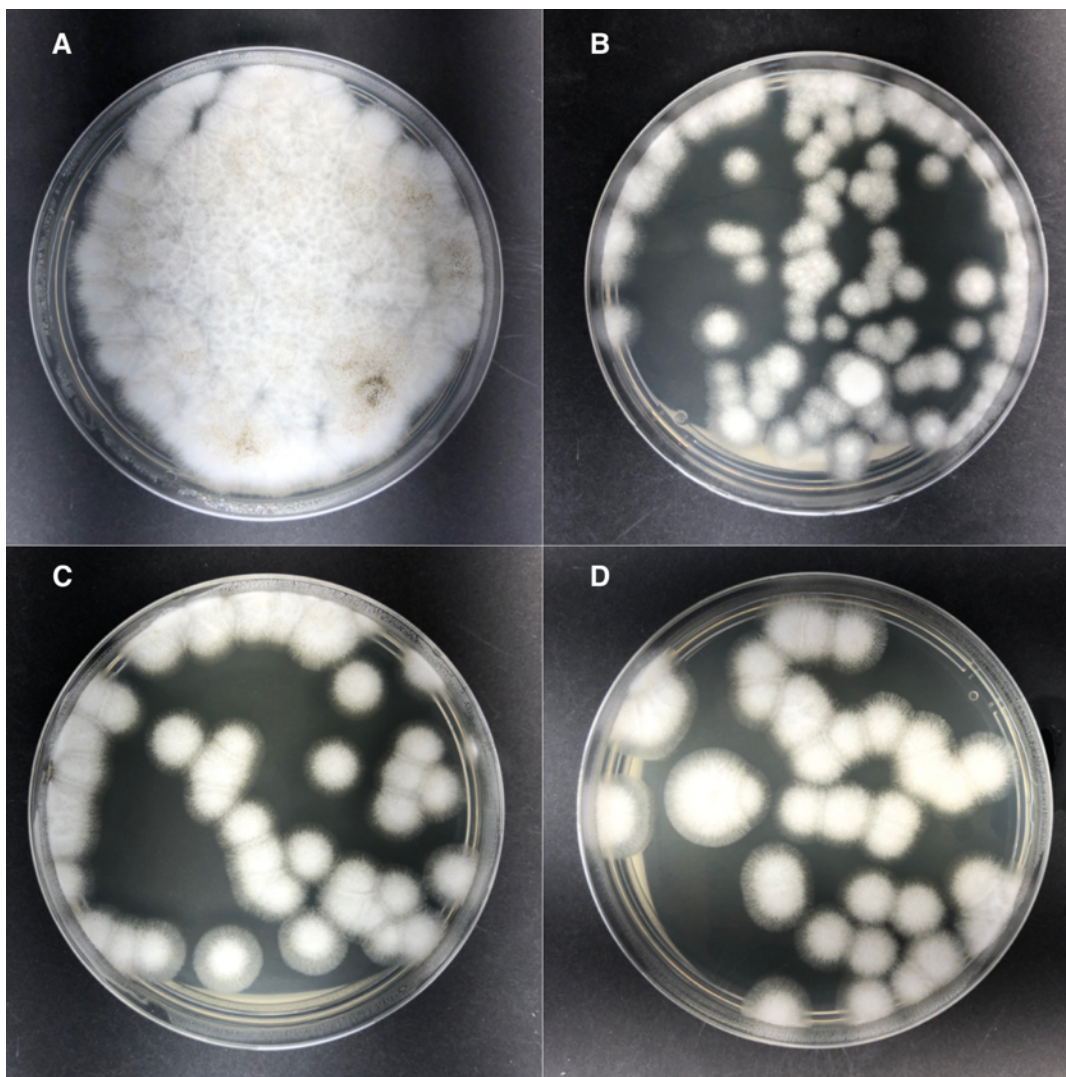


Obrázek 11: Graf závislosti počtu kolonií na čase odběru vzorků (DC PTW).

Tabulka 6: Procentuální úbytky CFU po ošetření plísně pomocí PTW z různých plazmových systémů.

Plazmový systém	Úbytek s časem [%]				Kontrolní vzorek [CFU]
	10 min	3 h	6 h	24 h	
AC	86,2 ± 25,1	93,9 ± 22,0	95,8 ± 19,6	89,1 ± 23,0	9065,0 ± 1675,8
DC	90,2 ± 22,2	83,2 ± 24,6	91,2 ± 25,4	63,9 ± 35,7	
DBD	89,8 ± 21,7	89,3 ± 20,7	84,8 ± 23,2	92,3 ± 21,2	

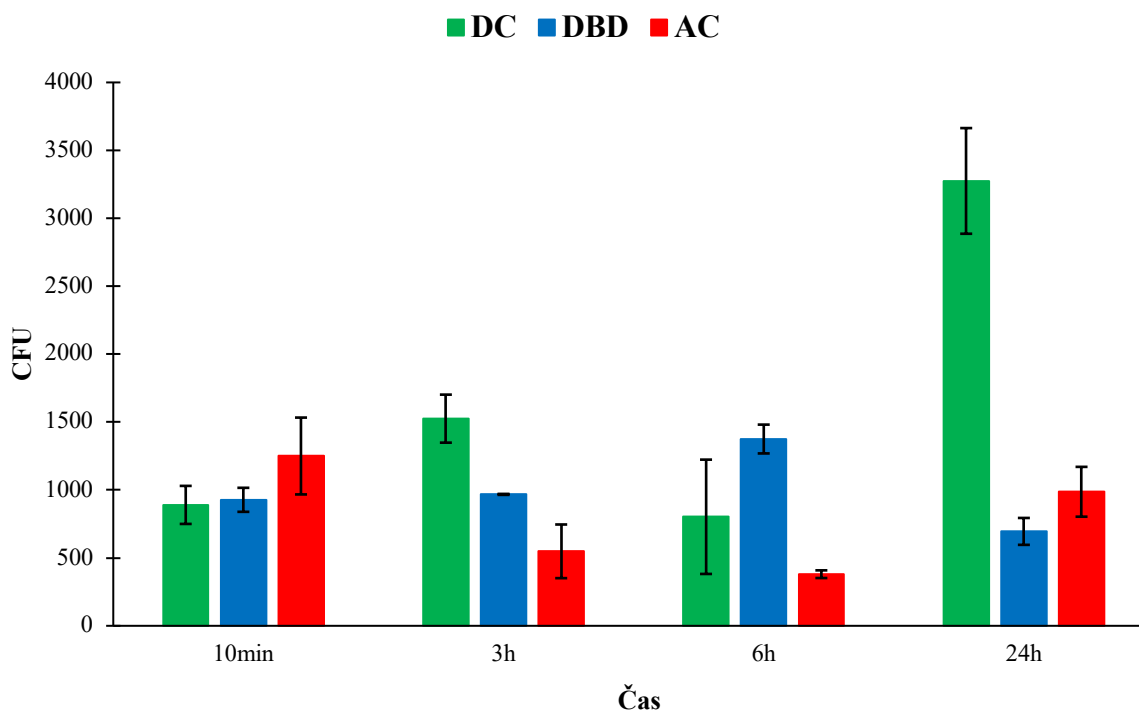
Podle Tabulka 6 nejlepších výsledků bylo dosaženo v čase 6 hodin u AC (95,8 ± 19,6 % úbytek) a DC (91,2 ± 25,4 % úbytek) a v čase 24 hodin u DBD (92,3 ± 21,2 % úbytek). I přesto, že pokles kolonií nebyl u všech tří systémů konstantní, sporulace u ošetřených vzorků byla pomalá na rozdíl od kontrolního vzorku (Obrázek 12; více fotek viz. PŘÍLOHA).



Obrázek 12: Kolonie *A.niger* po 6 hodinách (ředění 10x); (A) kontrolní vzorek, (B) DBD, (C) DC, (D) AC.

4.3 Porovnání metod

Graf na Obrázek 13 znázorňuje účinnost všech tří metod přípravy PTW. Při porovnání můžeme vidět, že DC a AC poskytují lepší výsledky, což odpovídá teoretickým poznatkům – PTW připravená generací plazmatu pod vodní hladinou má lepší inhibiční účinky, než PTW připravená generací plazmatu nad hladinou vody [25]. Plazmové trysky produkovaly více peroxidu vodíku (hlavně DC), tím pádem vznikalo víc peroxodusitanu než v případě DBD, a proto by mohl být jejich účinek lepší. U DBD byl pozorován opačný trend, plíseň s časem spíše rostla.



Obrázek 13: Porovnání účinnosti metod přípravy PTW pomocí DC, AC a DBD.

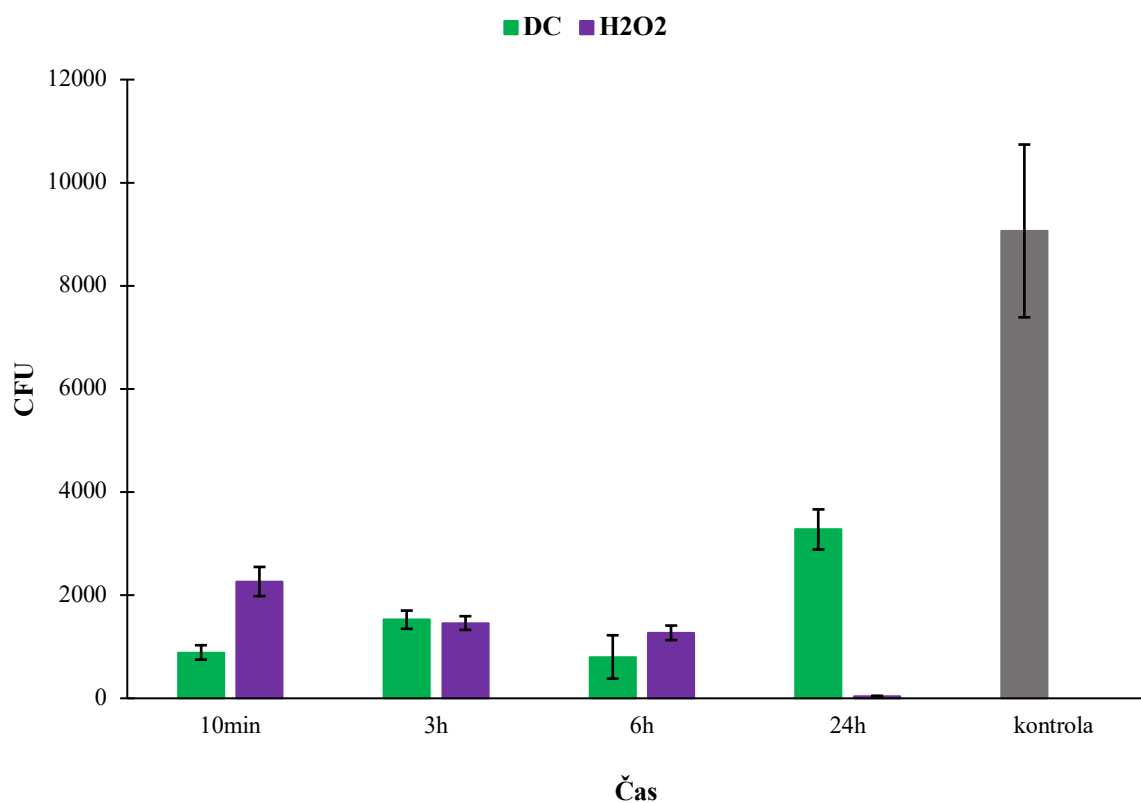
4.4 Simulace PTW prostředí

Cílem experimentu bylo posoudit, jak se liší vliv plazmatem ošetřené vody oproti roztokům konkrétních částic bez interakce s plazmatem. PTW má svoje antimikrobiální vlastnosti hlavně díky obsahu peroxidu vodíku a dusitanů (i dalším látkám, které se v této práci nestanovují, například peroxodusitany).

Stejným výbojem je produkováno více peroxidu, proto byl účinek DC PTW porovnán s roztokem peroxidu ($0,4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Z grafu na Obrázek 14 je vidět, že roztok H_2O_2 měl větší inhibiční účinek ($99,5 \pm 18,6 \%$ celkově) než PTW, která obsahuje směs různých částic. Avšak DC PTW měla od začátku větší vliv než roztok peroxidu. Procentuální úbytky jsou shrnuté v Tabulka 7.

Tabulka 7: Procentuální úbytky CFU u DC a roztoku peroxidu vodíku.

Roztok	Úbytek s časem [%]				Kontrolní vzorek [CFU]
	10 min	3 h	6 h	24 h	
H_2O_2	$75,0 \pm 28,8$	$83,9 \pm 23,8$	$85,9 \pm 23,3$	$99,5 \pm 18,6$	$9065,0 \pm 1675,8$
DC	$90,2 \pm 22,2$	$83,2 \pm 24,6$	$91,1 \pm 25,4$	$63,9 \pm 21,2$	

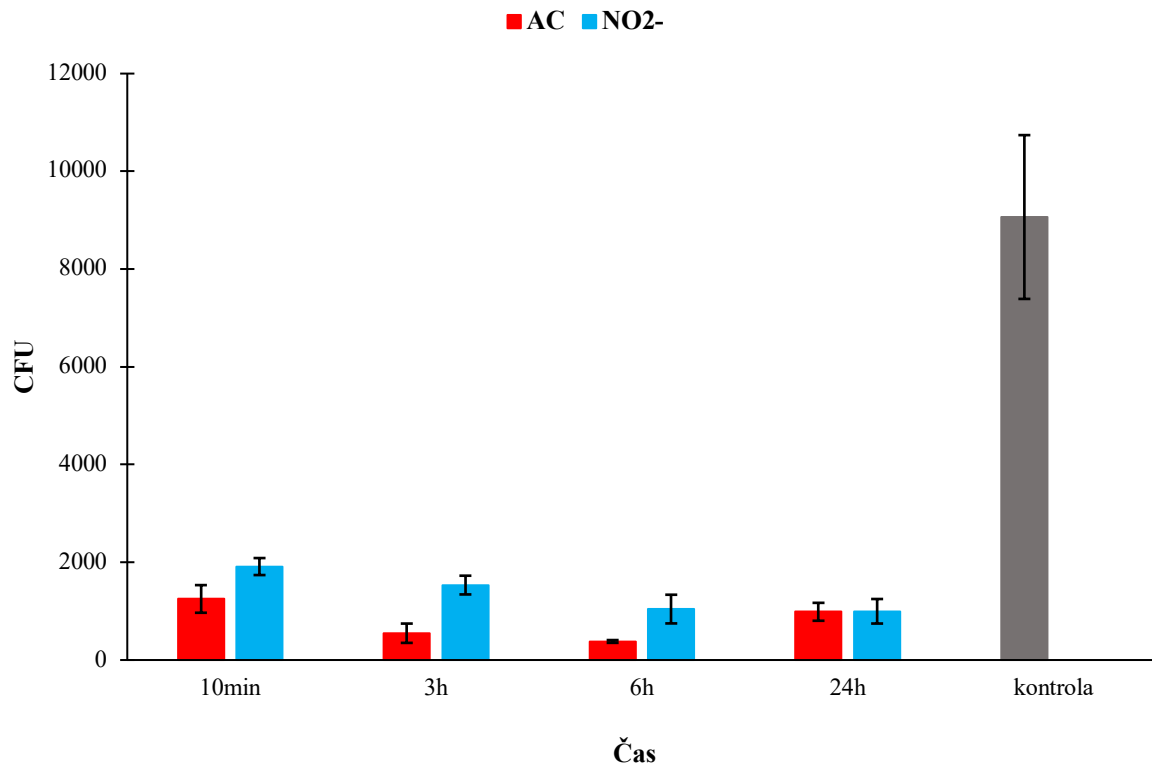


Obrázek 14: Porovnání vlivu DC PTW a roztoku peroxidu vodíku na růst kolonií.

Vliv AC PTW byl porovnán s roztokem dusitanu (koncentrace $0,03 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Z grafu na Obrázek 15 je vidět, že oba roztoky měly na plíseň stejný vliv, ale účinek PTW byl silnější. Důvodem může být to, že dusitan v PTW reaguje s peroxidem za vzniku peroxodusitanu, který dodává PTW její antimikrobiální vlastnosti (a je účinnější než samotný dusitan). Je také možná reakce dusitanu a dusičnanu, v jejímž výsledku vzniká oxid dusičitý. Ten následně může reagovat s peroxidem vodíku za vzniku kyselin dusitá a peroxodusičné. I přesto, že počet CFU v PTW vzorku začal po 6 hodinách stoupat, po 24 hodinách byl úbytek oproti kontrole stejný v obou případech. Procentuální úbytky jsou shrnuté v Tabulce 8.

Tabulka 8: Procentuální úbytky CFU při aplikaci PTW z AC systému a roztoku dusitanu.

Roztok	Úbytek s časem [%]				Kontrolní vzorek [CFU]
	10 min	3 h	6 h	24 h	
NO_2^-	$78,9 \pm 25,9$	$83,1 \pm 24,8$	$85,5 \pm 24,5$	$89,0 \pm 23,9$	$9065,0 \pm 1675,8$
AC	$86,1 \pm 25,1$	$93,9 \pm 22,0$	$95,8 \pm 19,6$	$89,1 \pm 23,0$	



Obrázek 15: Porovnání vlivu AC PTW a roztoku dusitanů na růst kolonií.

5 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo studium antimikrobiálních účinků plazmatem ošetřené vody na příkladu plísně rodu *Aspergillus niger*. Byla porovnána účinnost dvou metod aktivace vody – nad a pod její hladinou. Pro účely experimentu bylo využito tří plazmových systémů: dielektrický bariérový výboj (nad vodní hladinou), plazmová tryska za stejnosměrného výboje a plazmová tryska za střídavého výboje (obě pod vodní hladinou). Výsledný vliv PTW byl posouzen na základě sledování růstu kolonií plísní.

Účinnost plazmatem ošetřené vody byla stanovena jako úbytek množství kolonií s časem oproti kontrolnímu neošetřenému vzorku. Nejslabší účinek z hlediska procentuálního úbytku ze všech tří metod vykazovala PTW připravená za pomoci dielektrického bariérového výboje. Počet kolonií plísní s časem stoupal, ale po 24 hodinách od doby ošetření byl inhibiční účinek nejvýraznější. PTW vzniklá interakcí plazmatu s vodou pod její hladinou měla větší inhibiční účinek, což odpovídá teoretickým poznatkům. Nejlepší výsledek poskytla PTW připravená plazmovou tryskou za střídavého výboje. Během prvních 6 hodin byl pozorován značný pokles v počtu kolonií; avšak efektivita AC PTW se s časem snižovala, a po 24 hodinách byl pozorován vzrůst počtu kolonií. Zajímavé výsledky poskytla PTW připravená pomocí plazmové trysky za stejnosměrného výboje. Po prvních 10 minutách byl její účinek nejvyšší ze tří, ale následně nebyl pozorován žádný trend. Stejně jako u AC došlo k poklesu aktivity PTW po 24 hodinách; avšak celkový efekt DC byl lepší, než v případě DBD. Pro objektivnější posouzení by bylo vhodné se do budoucna zaměřit na prozkoumání vlivu pH na acidogenezi *A.niger* měřením koncentrací organických kyselin (citronové, šťavelové) v různých časech odběrů vzorků.

Pro lepší pochopení účinků PTW byla navíc provedena simulace jejího prostředí pomocí roztoků aktivních částic. K tomuto byly zvoleny AC a DC systémy, jakožto nejefektivnější. Charakterizací plazmatem ošetřené vody připravené za pomoci všech tří zařízení bylo zjištěno, že největší koncentrace peroxidu vodíku poskytuje DC systém. Vliv DC PTW na plíseň byl porovnán s vlivem roztoku peroxidu vodíku. Zjistilo se, že PTW připravená za využití stejnosměrného výboje vykazují silnější inhibiční účinky než roztok peroxidu už během prvních 10 minut po ošetření. K napodobování prostředí PTW připravené střídavým výbojem byl použit roztok dusitanu sodného. Podobně jako u DC, byl účinek AC PTW od začátku výraznější, než u roztoku dusitanů, ale s časem se snižoval a nakonec se vyrovnal roztoku soli. Z těchto výsledků můžeme posoudit, že pro lepší účinek by se měla v praxi používat nově připravená PTW (řádově po 10 minutách), neboť časem její efektivita klesá. Nicméně, nemůžeme se stoprocentní jistotou posoudit o výsledcích tohoto experimentu, neboť PTW obsahuje kromě zmíněných částic i jiné, které se navzájem reagují a mění vlastnosti a chování PTW. Proto do budoucna by bylo vhodné porovnat účinky PTW připravené různými systémy s roztokem několika druhů částic o různých koncentracích.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MATIŠOVITS V., *Základy fyziky plazmy*, Učební text pro magisterské studium, Univerzita Komenského, Bratislava, 2006 [cit. 2023-03-03].
- [2] CHEN, Francis F. *Introduction to plasma physics*. New York: Plenum Press, 1974. ISBN 978-1-4757-0461-7 [cit. 2023-03-03].
- [3] *Plazma na ÚFE* [online]. In: Výzkum plazmatu na Ústavu Fyzikální Elektroniky Masarykovy univerzity [cit. 2023-04-23]. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/bo2um/Brozura-plazma_final_ZD.pdf.
- [4] BRUGGEMAN, P J, M J KUSHNER, B R LOCKE, et al. Plasma–liquid interactions: a review and roadmap. *Plasma Sources Science and Technology* [online]. 2016, **25**(5) [cit. 2023-03-10]. ISSN 1361-6595. Dostupné z: doi:10.1088/0963-0252/25/5/053002.
- [5] CHEN, Qiang, Junshuai LI a Yongfeng LI. A review of plasma-liquid interactions for nanomaterial synthesis. *Journal of physics. D, Applied physics* [online]. BRISTOL: IOP Publishing, 2015, **48**(42), 424005 [cit. 2023-03-16]. ISSN 0022-3727. Dostupné z: doi:10.1088/0022-3727/48/42/424005.
- [6] MACHALA, Z, B TARABOVÁ, D SERSENOVÁ, M JANDA a K HENSEL. 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]. BRISTOL: IOP Publishing, 2019, **52**(3), 34002 [cit. 2023-04-11]. ISSN 0022-3727. Dostupné z: doi:10.1088/1361-6463/aae807.
- [7] LIM, Junghyun, Yong-seong BYEON, Eun Jeong HONG, Seungmin RYU a Seong Bong KIM. Effect of post-discharge time of plasma-treated water (PTW) on microbial inactivation and quality of fresh-cut potatoes. *Journal of food processing and preservation* [online]. Wiley Subscription Services, 2021, **45**(5) [cit. 2023-04-18]. ISSN 0145-8892. Dostupné z: doi:10.1111/jfpp.15387.
- [8] VONDRÁŠKOVÁ. Šárka. Mykotoxiny. In: *bezpecnostpotravin.cz* [online]. 12.8.2011 [cit. 2023-03-11]. Dostupné z: <https://bezpecnostpotravin.cz/mykotoxiny/>.
- [9] DANA, Hrubošová a Vytřasová JARMILA. In: *Toxické účinky mykotoxinů* [online]. Univerzita Pardubice, 2014 [cit. 2023-03-11]. ISBN 807395821X.
- [10] FRISVAD, Jens C., Lars L. H. MØLLER, Thomas O. LARSEN, Ravi KUMAR a José ARNAU. Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. *Applied microbiology and biotechnology* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2018, **102**(22), 9481-9515 [cit. 2023-04-09]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-018-9354-1.
- [11] Maxwelllovo-Boltzmannovo rozdělení. In: *KhanAcademy* [online]. [cit. 2023-02-10]. Dostupné z: <https://cs.khanacademy.org/science/fyzikalni-chemie/xecb1a3ac274b46c2:vlastnosti-plynu/xecb1a3ac274b46c2:kineticka-teorie-plynu/a/what-is-the-maxwell-boltzmann-distribution>.
- [12] HE, Bangbang, Xinning GONG, Xin WANG, Junshuai LI, Qing XIONG, Qiang CHEN a Qing Huo LIU. What Are the Effective Reactants in the Plasma-Induced Wastewater Treatment?. *Journal of The Electrochemical Society* [online]. 2018, **165**(10), E454-E459 [cit. 2023-03-10]. ISSN 0013-4651. Dostupné z: doi:10.1149/2.0241810jes
- [13] BOLOUKI, Nima, Wen-hui KUAN, Yu-yun HUANG a Jang-hsing HSIEH. Characterizations of a Plasma-Water System Generated by Repetitive Microsecond Pulsed Discharge with Air, Nitrogen, Oxygen, and Argon Gases Species. *Applied sciences* [online]. Basel: MDPI, 2021, **11**(13), 6158 [cit. 2023-03-16]. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app11136158.

- [14] REZAEI, Fatemeh, Patrick VANRAES, Anton NIKIFOROV, Rino MORENT a Nathalie DE GEYTER. Applications of plasma-liquid systems: A review. *Materials* [online]. BASEL: Mdpi, 2019, **12**(7), 2751 [cit. 2023-03-16]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma12172751.
- [15] KLÄMPFL, Tobias G., Georg ISBARY, Tetsuji SHIMIZU, et al. Cold Atmospheric Air Plasma Sterilization against Spores and Other Microorganisms of Clinical Interest. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2012, **78**(15), 5077-5082 [cit. 2023-03-16]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.00583-12.
- [16] VLAD, Iulia-elena a Sorin Dan ANGHEL. Time stability of water activated by different on-liquid atmospheric pressure plasmas. *Journal of electrostatics* [online]. AMSTERDAM: Elsevier B.V, 2017, **87**, 284-292 [cit. 2023-04-18]. ISSN 0304-3886. Dostupné z: doi:10.1016/j.elstat.2017.06.002.
- [17] SUNKÁ, P, V BABICKÝ, M CLUPEK, P LUKES, M SIMEK, J SCHMIDT a M CERNÁK. Generation of chemically active species by electrical discharges in water. *Plasma Sources Science and Technology*[online]. 1999, **8**(2), 258-265 [cit. 2023-10-03]. ISSN 0963-0252. Dostupné z: doi:10.1088/0963-0252/8/2/006.
- [18] WANG, Qingyang a Deepti SALVI. Recent progress in the application of plasma-activated water (PAW) for food decontamination. *Current opinion in food science* [online]. Elsevier, 2021, **42**, 51-60 [cit. 2023-11-03]. ISSN 2214-7993. Dostupné z: doi:10.1016/j.cofs.2021.04.012.
- [19] ZHOU, Renwu, Rusen ZHOU, Peiyu WANG, et al. Plasma-activated water: generation, origin of reactive species and biological applications. *Journal of physics. D, Applied physics* [online]. IOP Publishing, 2020, **53**(30), 303001 [cit. 2023-03-11]. ISSN 0022-3727. Dostupné z: doi:10.1088/1361-6463/ab81cf.
- [20] VERONICO, Valeria, Pietro FAVIA, Francesco FRACASSI, Roberto GRISTINA a Eloisa SARDELLA. The active role of organic molecules in the formation of long-lived reactive oxygen and nitrogen species in plasma-treated water solutions. *Plasma processes and polymers*[online]. Weinheim: Wiley Subscription Services, 2022, **19**(3) [cit. 2023-04-16]. ISSN 1612-8850. Dostupné z: doi:10.1002/ppap.202100158.
- [21] SONI, Aswathi, Jonghyun CHOI a Gale BRIGHTWELL. Plasma-Activated Water (PAW) as a Disinfection Technology for Bacterial Inactivation with a Focus on Fruit and Vegetables. *Foods* [online]. 2021, **10**(1) [cit. 2023-04-18]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods10010166.
- [22] ŠIMEČKOVÁ, Jana, František KRČMA, Daniel KLOFÁČ, Lukáš DOSTÁL a Zdenka KOZÁKOVÁ. Influence of plasma-activated water on physical and physical-Chemical soil properties. *Water (Basel)*[online]. Basel: MDPI, 2020, **12**(9), 2357 [cit. 2023-04-18]. ISSN 2073-4441. Dostupné z: doi:10.3390/W12092357.
- [23] THIRUMDAS, Rohit, Anjinelyulu KOTHAKOTA, Uday ANNAPURE, Kaliramesh SILIVERU, Renald BLUNDELL, Ruben GATT a Vasilis P. VALDRAMIDIS. Plasma activated water (PAW): Chemistry, physico-chemical properties, applications in food and agriculture. *Trends in Food Science & Technology* [online]. LONDON: Elsevier, 2018, **77**, 21-31 [cit. 2023-04-20]. ISSN 0924-2244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2018.05.007.
- [24] MAI-PROCHNOW, Anne, Renwu ZHOU, Tianqi ZHANG, Kostya (Ken) OSTRIKOV, Sudarsan MUGUNTHAN, Scott A. RICE a Patrick J. CULLEN. Interactions of plasma-activated water with biofilms: inactivation, dispersal effects and mechanisms of action. *NPJ biofilms and microbiomes* [online]. United States: Nature Publishing Group, 2021, **7**(1), 11-12 [cit. 2023-04-20]. ISSN 2055-5008. Dostupné z: doi:10.1038/s41522-020-00180-6.

- [25] TIAN, Ying, Ruonan MA, Qian ZHANG, Hongqing FENG, Yongdong LIANG, Jue ZHANG a Jing FANG. Assessment of the Physicochemical Properties and Biological Effects of Water Activated by Non-thermal Plasma Above and Beneath the Water Surface. *Plasma processes and polymers* [online]. WEINHEIM: Blackwell Publishing, 2015, **12**(5), 439-449 [cit. 2023-03-11]. ISSN 1612-8850. Dostupné z: doi:10.1002/ppap.201400082.
- [26] GUO, Li, Ruobing XU, Lu GOU, et al. Mechanism of Virus Inactivation by Cold Atmospheric-Pressure Plasma and Plasma-Activated Water. *Applied and environmental microbiology* [online]. WASHINGTON: Amer Soc Microbiology, 2018, **84**(17) [cit. 2023-04-20]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.00726-18.
- [27] LOS, Agata, Dana ZIUZINA, Daniela BOEHM, Patrick J. CULLEN, Paula BOURKE a Edward G. DUDLEY. Inactivation Efficacies and Mechanisms of Gas Plasma and Plasma-Activated Water against *Aspergillus flavus* Spores and Biofilms: a Comparative Study. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2020, **86**(9), e02619-19 [cit. 2023-03-03]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.02619-19.
- [28] RAHMAN, Mizanur, Md. Shariful HASAN, Raihanul ISLAM, et al. Plasma-Activated Water for Food Safety and Quality: A Review of Recent Developments. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2022, **19**(11) [cit. 2023-03-06]. ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph19116630.
- [29] ZHAO, Y.-M., S. OJHA, C.M. BURGESS, D.-W. SUN a B.K. TIWARI. Inactivation efficacy and mechanisms of plasma activated water on bacteria in planktonic state. *Journal of applied microbiology* [online]. England: Wiley Subscription Services, 2020, **129**(5), 1248-1260 [cit. 2023-04-20]. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi:10.1111/jam.14677.
- [30] HARSH P. Sharma, ARPIT H Patel and MAHENDRA Pal. Effect of Plasma Activated Water (PAW) on Fruits and Vegetables. *American Journal of Food and Nutrition*. 2021; **9**(2):60-68. [cit. 2023-04-20]. doi: 10.12691/ajfn-9-2-1.
- [31] RATHORE, Vikas, Divyesh PATEL, Niyati SHAH, Shital BUTANI, Harikrishna PANSURIYA a Sudhir Kumar NEMA. Inactivation of *Candida albicans* and Lemon (*Citrus limon*) Spoilage Fungi Using Plasma Activated Water. *Plasma chemistry and plasma processing*[online]. New York: Springer US, 2021, **41**(5), 1397-1414 [cit. 2023-03-08]. ISSN 0272-4324. Dostupné z: doi:10.1007/s11090-021-10186-3.
- [32] GUO, Jian, Kang HUANG, Xiao WANG, Chenang LYU, Nannan YANG, Yanbin LI a Jianping WANG. Inactivation of Yeast on Grapes by Plasma-Activated Water and Its Effects on Quality Attributes. *Journal of Food Protection* [online]. 2017, **80**(2), 225-230 [cit. 2023-03-08]. ISSN 0362028X. Dostupné z: doi:10.4315/0362-028X.JFP-16-116.
- [33] SELADI-SCHULMAN, Jill. About *Candida albicans*: Natural yeast and problematic infections. *MedicalNewsToday* [online]. 09.08.2018 [cit. 2023-03-08]. Dostupné z: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/322722>.
- [34] WU, Mu-chien, Chih-tung LIU, Chun-yi CHIANG, Yi-jia LIN, Ying-hong LIN, Yao-wen CHANG a Jong-shinn WU. Inactivation Effect of *Colletotrichum Gloeosporioides* by Long-Lived Chemical Species Using Atmospheric-Pressure Corona Plasma-Activated Water. *IEEE transactions on plasma science* [online]. PISCATAWAY: IEEE, 2019, **47**(2), 1100-1104 [cit. 2023-03-06]. ISSN 0093-3813. Dostupné z: doi:10.1109/TPS.2018.2871856.
- [35] CHEN, Hsiu-Ling; ARCEGA, Rachelle D.; HERIANTO, Samuel; HOU, Chin-Yao; LIN, Chia-Min. Mycotoxin decontamination of foods using nonthermal plasma and plasma-activated water [online], [cit. 2023-03-07]. Dostupné z: <https://cdn.intechopen.com/pdfs/80942.pdf>.

- [36] DAESCHLEIN, G, S SCHOLZ, T VON WOEDTKE, M NIGGEMEIER, E KINDEL, R BRANDENBURG, Klaus-dieter WELTMANN a Michael JÜNGER. In Vitro Killing of Clinical Fungal Strains by Low-Temperature Atmospheric-Pressure Plasma Jet. *IEEE transactions on plasma science* [online]. PISCATAWAY: IEEE, 2011, **39**(2), 815-821 [cit. 2023-03-16]. ISSN 0093-3813. Dostupné z: doi:10.1109/TPS.2010.206344.
- [37] Deoxynivalenol. In: *Bezpečnostpotravin.cz* [online]. [cit. 2023-03-12]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92006.aspx>.
- [38] CHEN, Dongjie, Paul CHEN, Yanling CHENG, Peng PENG, Juer LIU, Yiwei MA, Yuhuan LIU a Roger RUAN. Deoxynivalenol Decontamination in Raw and Germinating Barley Treated by Plasma-Activated Water and Intense Pulsed Light. *Food and Bioprocess Technology* [online]. 2019, **12** (2), 246-254 [cit. 2023-03-12]. ISSN 1935-5130. Dostupné z: doi:10.1007/s11947-018-2206-2.
- [39] KVASNIČKOVÁ, Alexandra. *Aspergillus a aspergilóza* [online]. [cit. 2023-03-12]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/aspergillus-a-aspergiloza.aspx>.
- [40] OUF, Salama A, Abdulrahman H BASHER a Abdel-Aleam H MOHAMED. Inhibitory effect of double atmospheric pressure argon cold plasma on spores and mycotoxin production of *Aspergillus niger* contaminating date palm fruits. *Journal of the science of food and agriculture* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2015, **95**(15), 3204-3210 [cit. 2023-04-16]. ISSN 0022-5142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.7060.
- [41] PALOU, Lluís Chapter 2 - *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* (Green Mold, Blue Mold), Editor(s): Silvia Bautista-Baños, Postharvest Decay, Academic Press, 2014, Pages 45-102, ISBN 9780124115521, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00002-8>.
- [42] *Guignardia citricarpa* (citrus black spot). In: *CABI: Invasive Species Compendium* [online]. [cit. 2023-03-13]. Dostupné z: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/26154>.
- [43] *Aspergillus niger*. In: *VŠB TUO Sbíрка Mikroorganismů*. Dostupné z: http://hgf10.vsb.cz/546/mikro/houby/Aspergillus_niger.html.
- [44] *Aspergillus niger*. In: *VŠCHT Miniatlas mikroorganismů*. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/asp-ni.htm>.
- [45] RAY, A C a R E EAKIN. Studies on the biosynthesis of aspergillin by *Aspergillus niger*. *Applied microbiology* [online]. 1975, **30**(6), 909-915 [cit. 2023-04-06]. ISSN 0003-6919. Dostupné z: doi:10.1128/am.30.6.909-915.1975.
- [46] UPTON, Daniel John, Simon John MCQUEEN MASON a Andrew James WOOD. *An accurate description of Aspergillus niger organic acid batch fermentation through dynamic metabolic modelling* [online]. 2017 [cit. 2023-05-06]. Dostupné z: doi:10.1186/s13068-017-0950-6.
- [47] KAUR, Baljinder a Narayan S. PUNEKAR. Autophagy is important to the acidogenic metabolism of *Aspergillus Niger*. *PloS one*[online]. SAN FRANCISCO: Public Library Science, 2019, **14**(10), e0223895-e0223895 [cit. 2023-04-20]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0223895.
- [48] KOSMIDIS, Chris a David W DENNING. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax* [online]. LONDON: Bmj Publishing Group, 2015, **70**(3), 270-277 [cit. 2023-04-09]. ISSN 0040-6376. Dostupné z: doi:10.1136/thoraxjnl-2014-206291.
- [49] SEGAL, Brahm H. MEDICAL PROGRESS Aspergillosis. *The New England journal of medicine* [online]. WALTHAM: Massachusetts Medical Soc, 2009, **360**(18), 1870-1884 [cit. 2023-04-09]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMra0808853.
- [50] ŠIMONOVICHOVÁ, Alexandra, Hana VOJTKOVÁ, Sanja NOSALJ, et al. *Aspergillus niger* Environmental Isolates and Their Specific Diversity Through Metabolite Profiling. *Frontiers in microbiology* [online]. Frontiers Media S.A, 2021, **12**, 658010-658010 [cit. 2023-04-16]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2021.658010.

- [51] Fumonisin. In: *bezpecnostpotravin.cz* [online]. [cit. 2023-04-10]. Dostupné z: <https://bezpecnostpotravin.cz/termin/fumonisin/>.
- [52] KAMLE, Madhu, Dipendra K. MAHATO, Sheetal DEVI, Kyung Eun LEE, Sang G. KANG a Pradeep KUMAR. Fumonisin: Impact on agriculture, food, and human health and their management strategies. *Toxins* [online]. BASEL: Mdpi, 2019, **11**(6), 328 [cit. 2023-04-10]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins11060328.
- [53] FRISVAD, Jens C., Jørn SMEDSGAARD, Robert A. SAMSON, Thomas O. LARSEN a Ulf THRANE. Fumonisin B 2 Production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2007, **55**(23), 9727-9732 [cit. 2023-04-09]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf0718906.
- [54] AL-JAAL, Belqes Ahmad, Morana JAGANJAC, Andrei BARCARU, Peter HORVATOVICH a Aishah LATIFF. Aflatoxin, fumonisin, ochratoxin, zearalenone and deoxynivalenol biomarkers in human biological fluids: A systematic literature review, 2001–2018. *Food and chemical toxicology* [online]. OXFORD: Elsevier, 2019, **129**, 211-228 [cit. 2023-04-10]. ISSN 0278-6915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2019.04.047.
- [55] NIELSEN, Kristian Fog, Jesper Mølgaard MOGENSEN, Maria JOHANSEN, Thomas O LARSEN a Jens Christian FRISVAD. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Analytical and bioanalytical chemistry* [online]. Berlin/Heidelberg : Springer-Verlag, 2009, **395**(5), 1225-1242 [cit. 2023-04-16]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-009-3081-5.
- [56] ZAPAŚNIK, Agnieszka, Marcin BRYŁA, Agnieszka WAŚKIEWICZ, Edyta KSIENIEWICZ-WOŹNIAK a Grażyna PODOLSKA. Ochratoxin A and 2' R-ochratoxin a in selected foodstuffs and dietary risk assessment. *Molecules (Basel, Switzerland)* [online]. Switzerland: MDPI, 2022, **27**(1), 188 [cit. 2023-04-10]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27010188.
- [57] FOUNTAIN, Jake C., Brian T. SCULLY, Zhi-yuan CHEN, et al. Effects of hydrogen peroxide on different toxigenic and atoxigenic isolates of *Aspergillus flavus*. *Toxins* [online]. BASEL: Mdpi, 2015, **7**(8), 2985-2999 [cit. 2023-04-20]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins7082985.
- [58] YASSIN, Mohamed A., Abd El-Rahim M.A. EL-SAMAWATY, Mohamed A. MOSLEM a Abdullah A. AL-ARFAJ. Coffee bean Myco-contaminants and oxalic acid producing *Aspergillus Niger*. *Italian journal of food science* [online]. BRISBANE: Codon Publications, 2015, **27**(1), 82-87 [cit. 2023-04-10]. ISSN 1120-1770. Dostupné z: doi:10.14674/1120-1770/ijfs.v77.
- [59] Physiopedia contributors. Oxalosis [online]. Physiopedia, ; 2022 Apr 2, [cit.2023-04-10]. Dostupné z: <https://www.physio-pedia.com/index.php?title=Oxalosis&oldid=299600>.
- [60] ŠIMONOVICHOVÁ, Alexandra, Daniel KUPKA, Sanja NOSALJ, et al. Differences in metabolites production using the Biolog FF Microplate™ system with an emphasis on some organic acids of *Aspergillus niger* wild type strains. *Biología* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2020, **75**(10), 1537-1546 [cit. 2023-04-16]. ISSN 0006-3088. Dostupné z: doi:10.2478/s11756-020-00521-y.
- [61] CIRIMINNA, Rosaria, Francesco MENEGUZZO, Riccardo DELISI a Mario PAGLIARO. Citric acid: emerging applications of key biotechnology industrial product. *Chemistry Central journal* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017, **11**(1), 22-22 [cit. 2023-04-16]. ISSN 1752-153X. Dostupné z: doi:10.1186/s13065-017-0251-y.
- [62] RUIJTER, George J. G., Peter J. I. VAN DE VONDERVOORT a Jaap VISSER. Oxalic acid production by *Aspergillus niger*: an oxalate-non-producing mutant produces citric acid at pH 5 and in the presence of manganese. *Microbiology* [online]. 1999, **145**(9),

- 2569-2576 [cit. 2023-04-19]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi:10.1099/00221287-145-9-2569.
- [63] ANDERSEN, Mikael R., Linda LEHMANN a Jens NIELSEN. Systemic analysis of the response of *Aspergillus niger* to ambient pH. *Genome Biology* [online]. LONDON: Springer Nature, 2009, **10**(5), R47-R47 [cit. 2023-04-20]. ISSN 1474-7596. Dostupné z: doi:10.1186/gb-2009-10-5-r47.
- [64] 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.
- [65] 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.
- [66] ŽITNÝ, Michal. Vliv plazmatu a plazmatem aktivované vody na plíseň *Aspergillus niger*. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/student/zav-prace/detail/147916>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce doc. Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PTW – plazmatem ošetřená voda (plasma treated water)

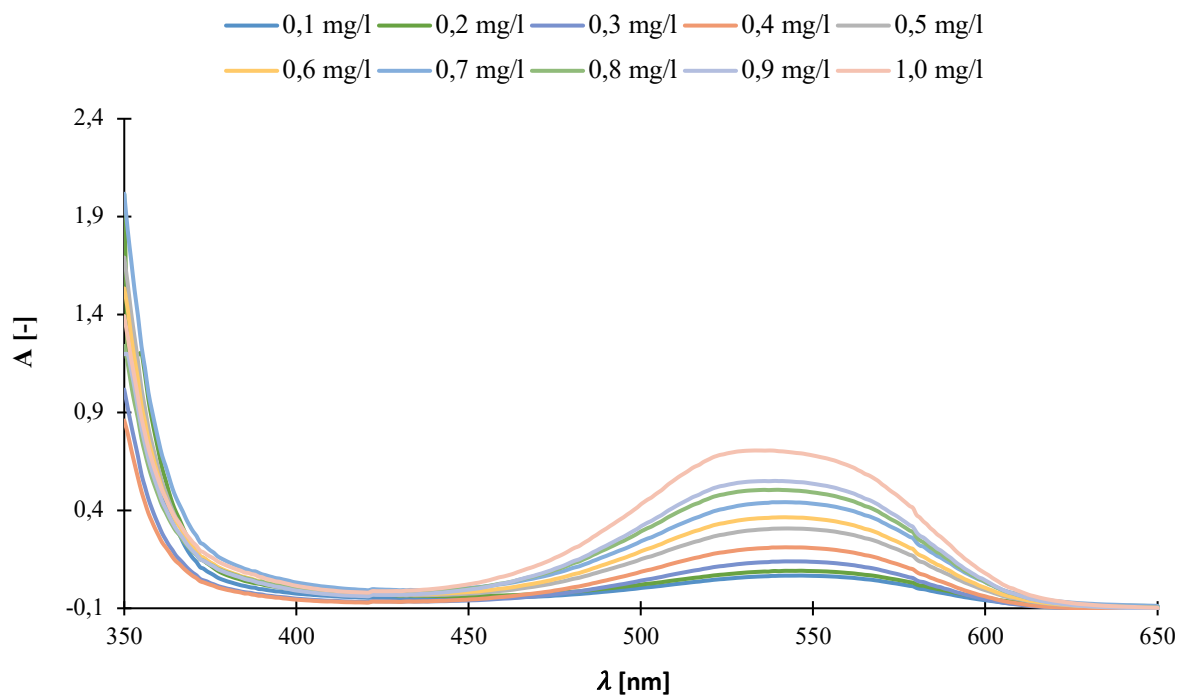
DBD – dielektrický bariérový výboj (dielectric barrier discharge)

AC – střídavý výboj (alternating current)

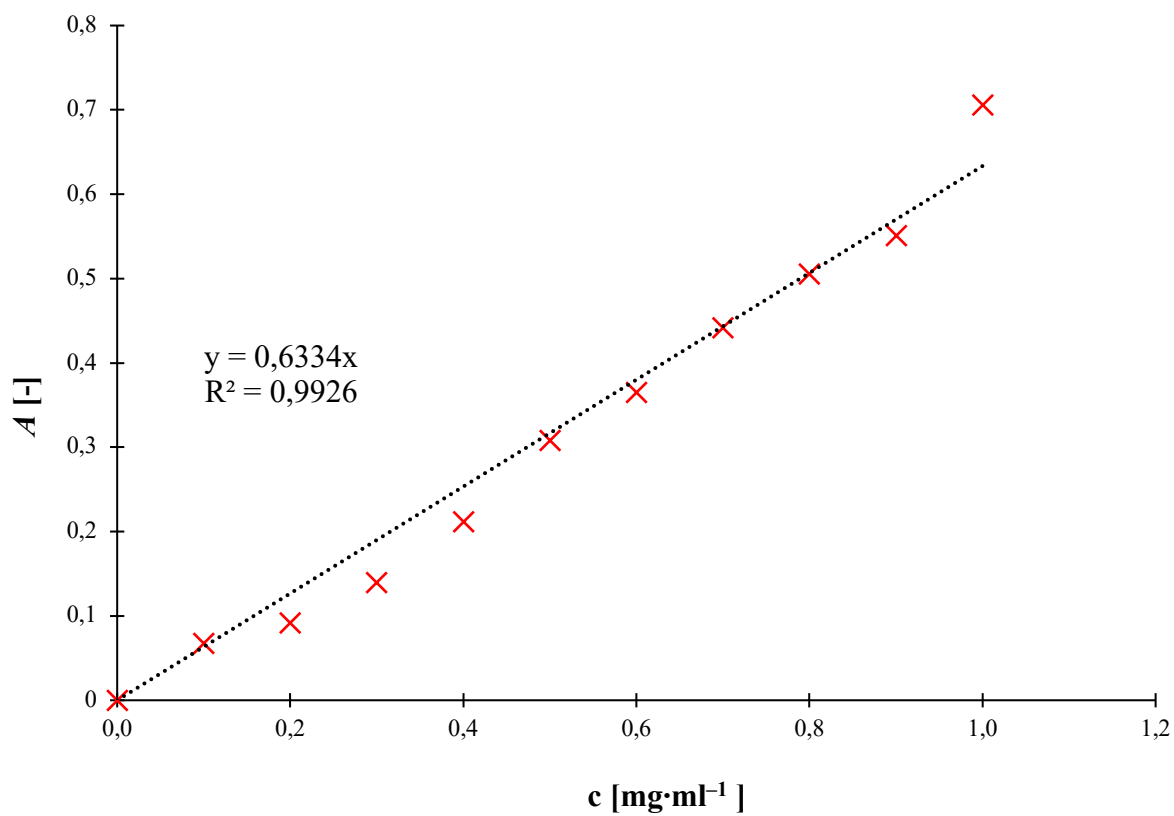
DC – stejnosměrný výboj (direct current)

CFU – jednotky tvořící kolonie (colony forming unit)

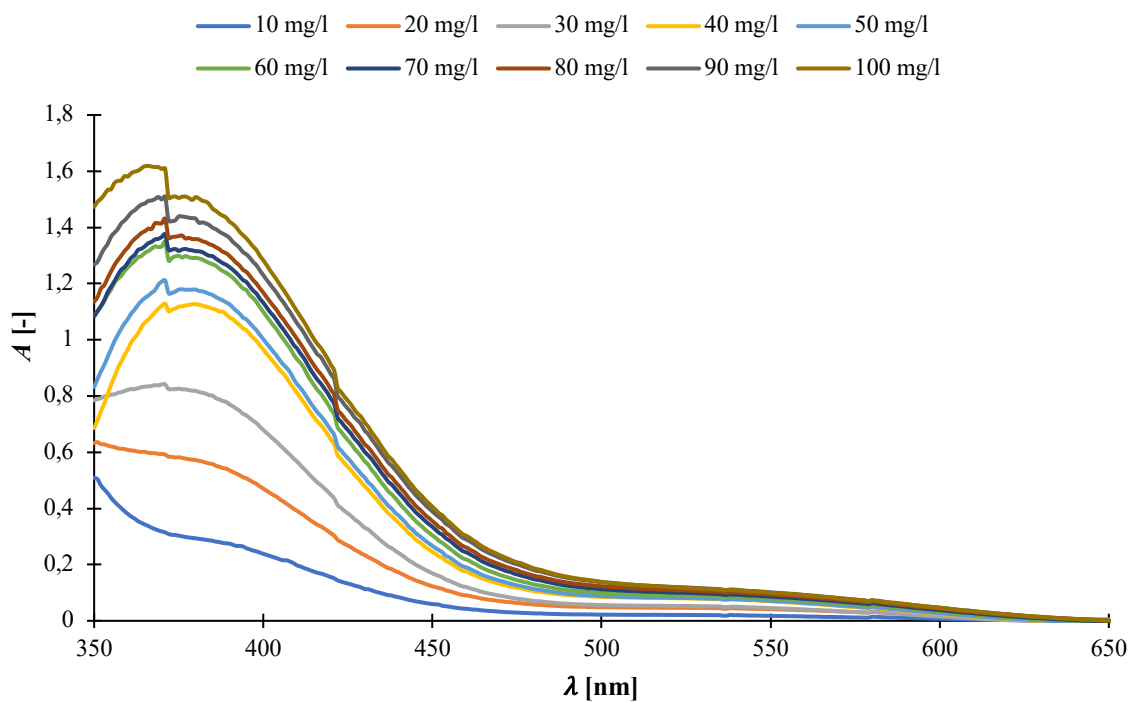
8 PŘÍLOHA



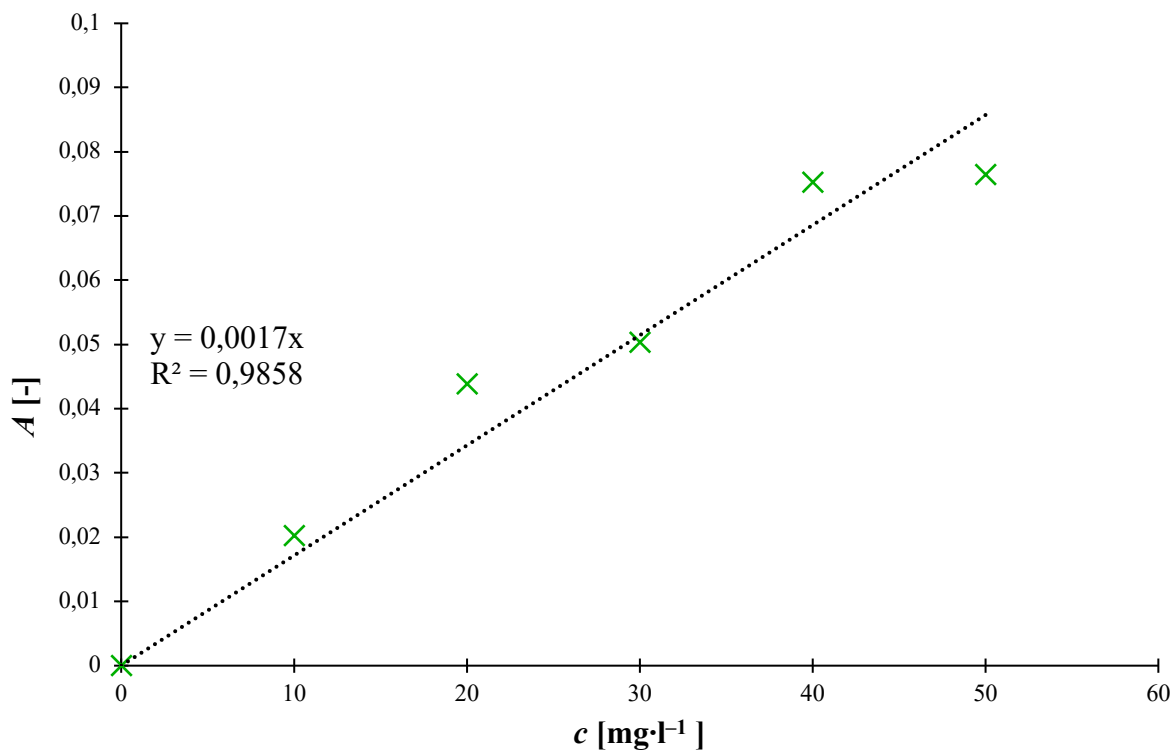
Obrázek 16: Absorpční spektra dusitanů s činidlem – kalibrační roztoky o různé koncentraci.



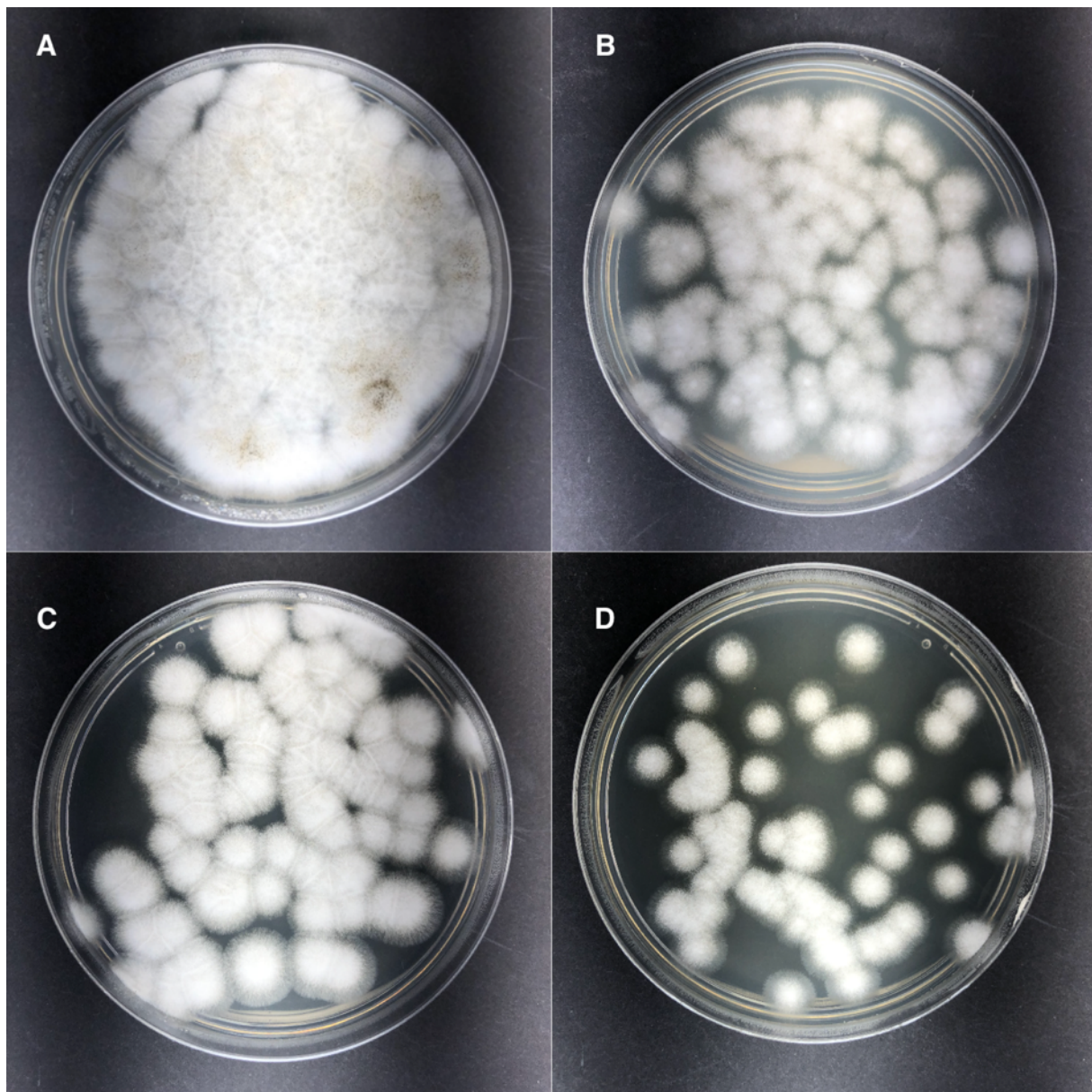
Obrázek 17: Kalibrační křivka dusitanů při vlnové délce 540 nm.



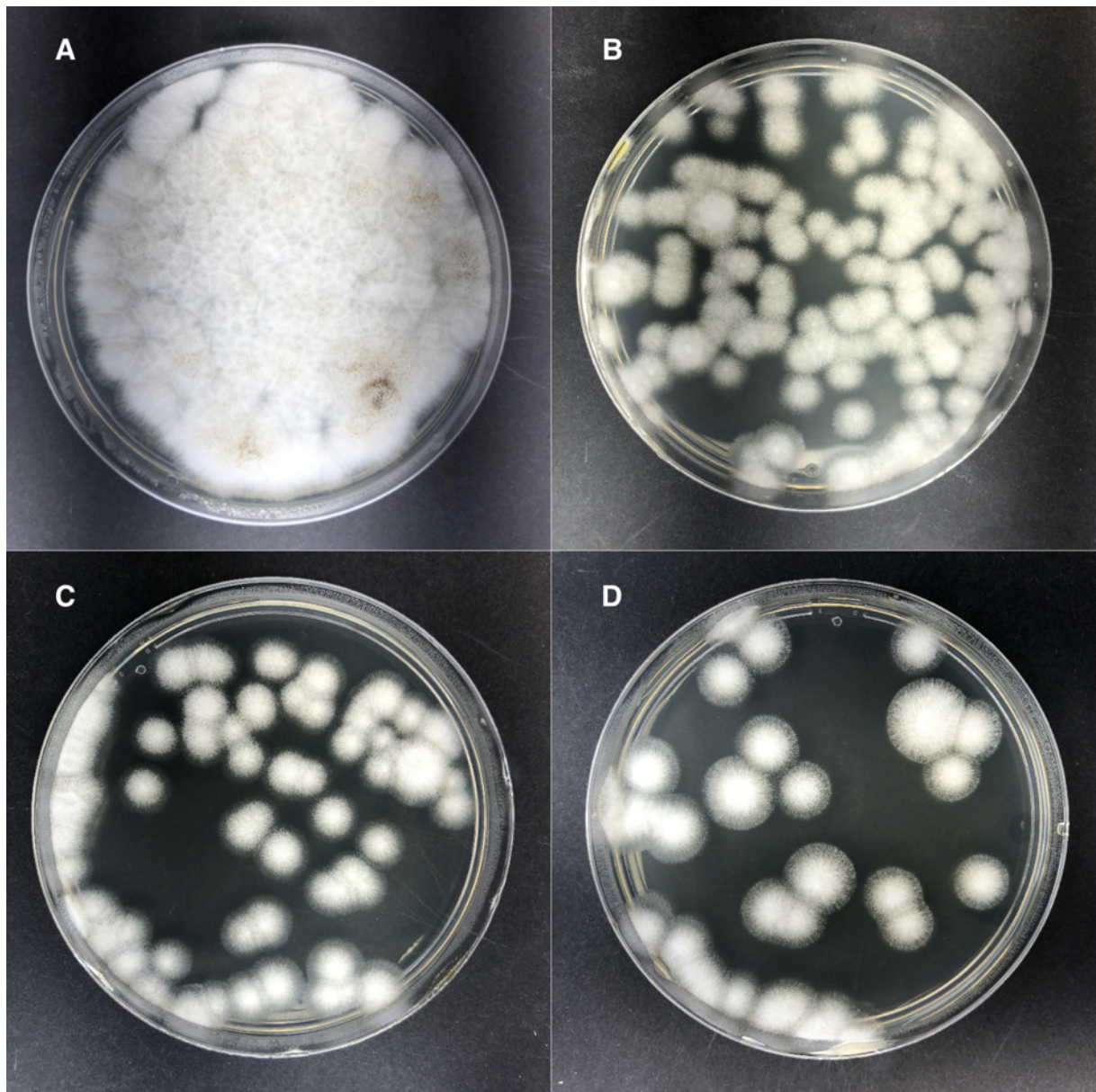
Obrázek 18: Absorpční spektra pro dusičnany s činidlem – kalibrační roztoky o různé koncentraci [66].



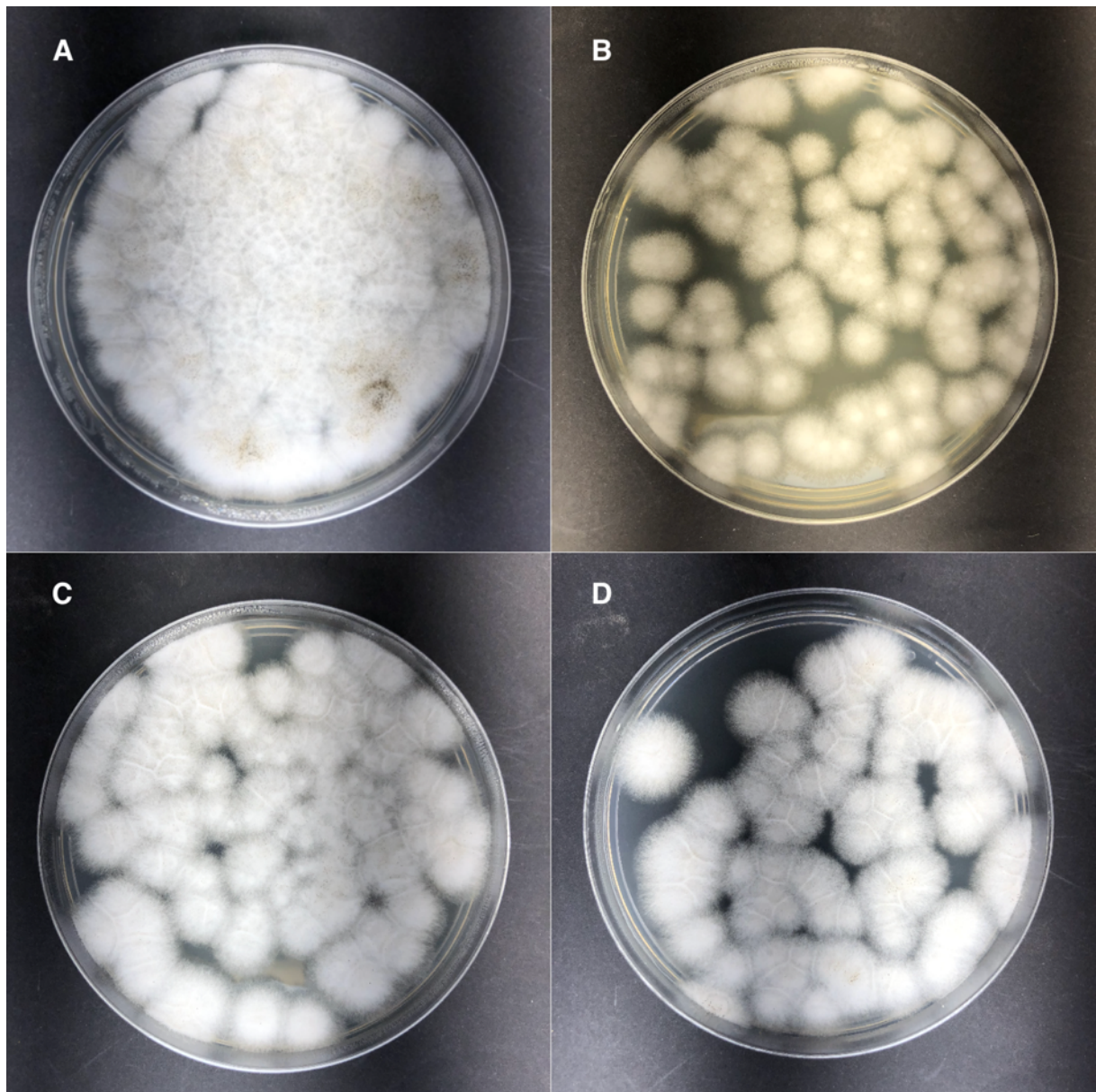
Obrázek 19: Kalibrační křivka dusičnanů vlnové délce 526 nm [66].



Obrázek 20: Kolonie *A.niger* po 10 minutách (ředění 10x); (A) kontrolní vzorek, (B) DBD, (C) DC, (D) AC.



Obrázek 21: Kolonie *A.niger* po 3 hodinách (ředění 10x); (A) kontrolní vzorek, (B) DBD, (C) DC, (D) AC.



Obrázek 22: Kolonie *A.niger* po 24 hodinách (ředění 10x); (A) kontrolní vzorek, (B) DBD, (C) DC, (D) AC.