



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM PŘÍMÉ APLIKACE NÍZKOTEPLTNÍHO PLAZMATU NA KVASINKY CANDIDA GLABRATA A BAKTERIE

STUDY OF LOW TEMPERATURE PLASMA DIRECT APPLICATION ON YEASTS CANDIDA GLABRATA AND BACTERIES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Veronika Petrová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. František Krčma, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1898/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Veronika Petrová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie bioaktivních látek
Vedoucí práce: **prof. RNDr. František Krčma, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Studium přímé aplikace nízkoteplotního plazmatu na kvasinky *Candida Glabrata* a bakterie

Zadání diplomové práce:

1. Naučte se kultivovat kvasinky a bakterie odděleně i společně
2. Aplikujte nízkoteplotní plazma na kultury kvasinek i bakterií v suspenzi i na kultivačním médiu
3. Vyhodnoťte účinnost aplikace plazmatu na inhibici mikroorganismů
4. Pokuste se najít optimální podmínky pro současnou inhibici obou skupin mikroorganismů

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

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

Bc. Veronika Petrová
studentka

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

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Předmětem této diplomové práce je studium nízkoteplotního mikrovlnného plazmatu na mikroorganismy *Candida glabrata*, *Staphylococcus epidermidis* a *Escherichia coli*. Sledován je inhibiční účinek plazmatu na zmíněné mikroorganismy na pevném živném médiu a v suspenzi (živné médium a PBS). Na pevném živném médiu je studován i inhibiční účinek na společné kultivace daných mikroorganismů. V práci je používán mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou, pracovním plynem je argon. Pro experiment na pevném živném médiu je po celý experiment udržován konstantní průtok 5,0 Slm a výkon kolísající mezi 8-10 W. Pro experiment v suspenzi je po celý experiment udržován konstantní průtok 2,0 Slm a výkon 13 W.

Byl pozorován inhibiční účinek plazmatu na pevném živném médiu na jednotlivé mikroorganismy a také na společné kultury. Bylo zjištěno, že mikroorganismy, které jsou ošetřené plazmatem na pevném živném médiu jsou inhibované a nekultivovatelné, přičemž mají neporušenou cytoplazmatickou membránu.

Při ošetření mikroorganismů v suspenzi docházelo k usmrcení jednotlivých buněk, avšak tato účinnost byla nízká. Nízká účinnost byla způsobena experimentálním uspořádáním, konkrétně tím, že kolem viditelného výboje se kvůli zanoření kapiláry vyskytoval pouze pracovní plyn argon.

KLÍČOVÁ SLOVA

Candida glabrata, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, nízkoteplotní mikrovlnné plazma, mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou, průtokový cytometr, inhibiční účinek

ABSTRACT

The subject of this thesis is to study the interactions of the low-temperature microwave plasma with selected microorganisms *Candida glabrata*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Escherichia coli* and their combinations. The inhibitory effect of the plasma on these microorganisms is monitored on selected solid nutrient media and in suspension (nutrient medium and PBS). The inhibitory effect on the mixed cultures of these microorganisms is also studied on the solid nutrient media. The surface wave microwave discharge is used, with argon as a working gas. For the experiment on the solid nutrient media, a constant gas flow rate of 5,0 Slm and a power fluctuating between 8-10 W are maintained throughout the experiment. For the suspension experiment, a constant gas flow rate of 2,0 Slm and 13 W power are maintained throughout the experiment.

The inhibitory effects of plasma on the solid nutrient media were observed on the individual microorganisms as well as on the mixed cultures. It was found that the microorganisms treated by plasma on the solid nutrient media were inhibited and uncultivable, while their cytoplasmic membrane remained intact.

When the microorganisms were treated in suspension, individual cells were killed, but the efficiency was low. This was caused by the experimental setup, specifically due to the plasma only being formed in argon (no intermixing with air), as the capillary was submerged in the treated suspension.

KEY WORDS

Candida glabrata, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, low temperature microwave plasma, surface wave microwave discharge, flow cytometry, inhibitory effect

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 František Krčma.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovávala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce.

.....

Veronika Petrová

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce panu prof. RNDr. Františkovi Krčmovi, PhD. za cenné rady, ochotu a čas. Také bych chtěla poděkovat konzultantkám, a to konkrétně paní Ing. Julii Hoové, Ph.D. a Ing. Kristíně Trebulové za jejich zkušenosti, znalosti, nápady a také za jejich čas při spolupráci na experimentální části. Rovněž mé díky patří panu Bc. Janu Hrudkovi, který je autorem programu Aurora.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Mikrobiologická část	10
2.1.1	Kožní mikrobiota	10
2.1.2	<i>Candida glabrata</i>	11
2.1.3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13
2.1.4	<i>Escherichia coli</i>	15
2.1.5	Průtoková cytometrie	18
2.1.6	Plazma	21
2.1.7	Mikrovlnné výboje	22
2.1.8	Chemické a fyzikální procesy iniciované plazmatem ve vzduchu	23
2.1.9	Chemické a fyzikální procesy v kapalině	23
2.1.10	Sterilizace plazmatem	24
2.1.11	Interakce plazmatu s mikroorganismy	26
2.1.12	Biomedicinské aplikace plazmatu	27
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
3.1	Chemikálie, přístroje a materiály	30
3.1.1	Přístroje	30
3.1.2	Chemikálie a materiál	30
3.2	Příprava mikrobiálních vzorků	31
3.2.1	Příprava kultivačních médií	31
3.2.2	Příprava inokul	33
3.3	Kalibrační křivky	33
3.4	Příprava společného živného média	33
3.4.1	Příprava vzorku	33
3.4.2	Gramovo barvení a mikroskopování	33
3.5	Růstové křivky	34
3.6	Přímé ošetření mikroorganismů na pevném živém médiu	34
3.6.1	Příprava vzorků	34

3.6.2	Ošetření připravených vzorků pomocí mikrovlnného plazmového výboje s povrchovou vlnou	35
3.7	Přímé ošetření mikroorganismů v suspenzi	38
3.7.1	Příprava vzorků	38
3.7.2	Ošetření připravených vzorků pomocí mikrovlnného plazmového výboje s povrchovou vlnou	38
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	41
4.1	Kalibrační křivky	41
4.2	Příprava společného živného média	42
4.3	Růstové křivky	42
4.4	Přímé ošetření mikroorganismů na pevném živném médiu	44
4.4.1	Identifikace mikroorganismů	47
4.4.2	Určení viability mikroorganismů v inhibované ploše	48
4.5	Přímé ošetření mikroorganismů v suspenzi	50
5	ZÁVĚR	57
6	SEZNAMY	59
6.1	Seznam použitých zkratk	59
6.2	Seznam použitých obrázků	61
6.3	Seznam použité literatury	63

1 ÚVOD

V posledních letech je celosvětovým alarmujícím problémem rostoucí rezistence mikroorganismů na antibiotika a antimykotika. Ačkoliv existuje řada chemických a fyzikálních prostředků, které jsou schopné inaktivovat nežádoucí organismy, tak se u většiny konvenčních technik setkáváme s problémem, že při sterilizaci zároveň dochází k poškození sterilizovaného materiálu, což může být pro určité aplikace nežádoucí. Proto dochází k vývoji nových technik, díky kterým by došlo k uspokojivé sterilizaci a zároveň by nedošlo k poškození sterilizovaného materiálu. Do těchto technik řadíme i využití plazmatu. Při sterilizaci plazmatem totiž nedochází k poškození ošetřovaného materiálu a výhodou je také netoxická povaha plazmatu a poměrně nízká teplota, kdy teplota ošetřovaného materiálu nepřesáhne 50 °C [1]. Zároveň je výhodou, že rezistence mikroorganismů nebyla prokázána a ani se nepředpokládá vyvinutí rezistence při ošetření plazmatem, takže i v tomto směru by plazma mohlo mít vysoký aplikační potenciál [2].

Plazma je využíváno v řadě biomedicinských aplikací. Studie se zabývají řešením zdravotních problémů v mnoha oborech, z těch biomedicinských je to například dermatologie, zubní lékařství a onkologie. Hlavním předmětem zájmu jsou zejména dekontaminační procesy realizované plazmatem.

Tato práce navazuje na bakalářskou práci, kde byla předmětem kvasinka *Candida glabrata*, která je normální součástí mikrobioty. U zdravého jedince to není problém, ten ale nastává u pacientů, kteří mají sníženou imunitu, což může vést k rozvoji mykotické infekce způsobené právě touto kvasinkou [3]. Pro to, abychom se více přiblížili reálným podmínkám, budeme společně s kvasinkou *C. glabrata* kultivovat i bakterie. Konkrétně se jedná o bakterie *Staphylococcus epidermidis* a *Escherichia coli*, které byly zvoleny proto, že zastupují jak grampozitivní, tak gramnegativní bakterie. *S. epidermidis* je běžnou součástí kožní mikrobioty, *E. coli* byla zvolena jako modelový organismus, ačkoliv není součástí běžné kožní mikrobioty, ale je součástí běžné střevní mikroflóry [4, 5].

Diplomová práce se bude zabývat ošetřením mikroorganismů pomocí nízkoteplotního mikrovlnného plazmatu s povrchovou vlnou v podobě plazmové trysky. Bude sledována účinnost inhibice plazmatu na mikroorganismy *C. glabrata*, *E. coli* a *S. epidermidis*. Mikroorganismy budou ošetřovány plazmatem na pevném živném médiu a v suspenzi (tekuté živné médium NB obohacené o glukózu a PBS). Na pevném živném médiu bude sledována inhibovaná plocha v procentech vztažená na povrch Petriho misky o průměru 90 mm.

V suspenzi bude sledován počet mrtvých a živých buněk (CFU/ml) pomocí průtokové cytometrie.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Mikrobiologická část

2.1.1 Kožní mikrobiota

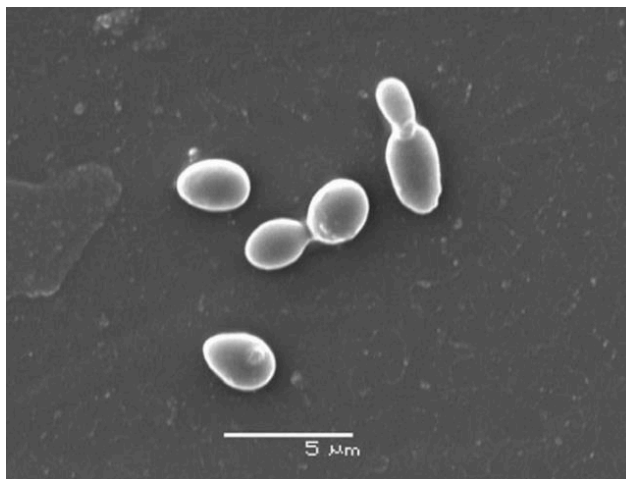
Termín mikrobiota vystihuje celkový počet mikroorganismů na konkrétním místě, v tomto případě budeme hovořit o kůži. Kůže je největším orgánem těla a funguje jako mechanická bariéra mezi vnějším a vnitřním prostředím těla. Mezi její funkce patří tedy i zamezení vstupu patogenů dovnitř těla a také zamezení ztráty vlhkosti. Kůže je ale také ekosystém, jehož součástí je řada prospěšných mikroorganismů [6, 7, 8].

Lidské tělo je pokryto mikroorganismy i přesto, že se kůže zdá být nehostinným prostředím pro jejich život a růst. Epidermální povrch je z větší části suchý, hrubý a neustále se odlupuje, což neumožňuje mikroorganismům nepřetržité rozmnožování a tvorbu biofilmů. Dalším omezujícím faktorem je nižší pH kůže, které se pohybuje v rozmezí 4–6,5 a také schopnost některých buněk produkovat antimikrobiální sloučeniny. I přesto je počet bakterií, které pokrývají kůži, několikrát vyšší než počet tělu vlastních buněk (10:1). Kůži ale také kromě bakterií osidlují plísně, viry i roztoči. Vzhledem k již zmíněným podmínkám, může být kůže kolonizována pouze specifickými mikrobiálními druhy. Tyto podmínky mají také významný vliv na počet mikroorganismů, díky čemuž je kožní mikrobiota odolná vůči změnám a je stabilní, co se počtu a složení týče [7, 9].

2.1.2 *Candida glabrata*

Druhy rodu *Candida* jsou nejčastějšími oportunními houbovými patogeny u lidí [10]. Nejčastějším původcem kandidóz je kvasinka *Candida albicans* (46,3 %), která je následována kvasinkou *Candida glabrata* (24,4 %) [3].

Candida glabrata (viz Obr. 1) se s ostatními druhy rodu *Candida* řadí do třídy *Fungi Imperfecti*, řádu *Moniliales* a do čeledi *Cryptococcaceae* [3].



Obrázek 1: *Candida glabrata* pod elektronovým mikroskopem [11]

Buňky *Candida glabrata* jsou na rozdíl od jiných druhů tohoto rodu znatelně menší. Pro srovnání buňky *C. glabrata* dosahují asi 1–4 μm, kdežto buňky *C. albicans* už dosahují 4–6 μm a buňky *C. tropicalis* jsou téměř dvakrát větší, konkrétně 4–8 μm [12].

Kolonie tvořené kvasinkami *C. glabrata* jsou bílé až krémově zbarvené, jsou lesklé a hladké. *C. glabrata* jako jediná z rodu *Candida* netvoří pseudohyfy při teplotách přesahujících 37 °C. Dále má na rozdíl od *C. albicans* nebo *C. tropicalis* haploidní genom [3].

2.1.2.1 *Virulence*

Za patogenitou druhů *Candida* stojí několik virulentních faktorů. Mezi tyto faktory můžeme zařadit adheenci, tvorbu biofilmů, ale i tvorbu hydrolytických enzymů poškozujících tkáň hostitele [12].

Mezi virulentní faktory kvasinky *C. glabrata* se řadí tvorba biofilmů a hydrolytických enzymů (proteázy, fosfolipázy, hemolyziny). Tyto enzymy přispívají k adheenci, buněčnému poškození a také k invazi v tkáních hostitele. Také mají genotypovou a fenotypovou variabilitu. Tyto virulentní faktory stojí za tvorbou antifungální rezistence, a také udělují kvasinkám schopnost vyhýbat se imunitní odpovědi hostitele [13].

2.1.2.2 Patogenita

Candida glabrata byla dříve považována za relativně nepatogenní druh rodu *Candida*. Avšak s rostoucím užíváním širokospektrálních antimykotik a imunosupresivní léčby začala být *C. glabrata* velice častým původcem systémových a slizničních infekcí [3].

C. glabrata je oportunní patogen. Onemocnění se tedy projevuje u imunokompromitovaných pacientů, což jsou pacienti, kteří mají porušené přirozené obranné mechanismy, jako je tomu například u pacientů s AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrom, tj. syndrom získaného imunodeficitu) [14].

C. glabrata zařazujeme mezi NAC (*non-albicans Candida*) druhy spolu s *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* a dále i méně výraznými druhy jako jsou *C. kefyr*, *C. rugosa*, aj. Právě tyto NAC druhy začínají být velice častými původci kandidóz. Přesněji mezi lety 1970 a 1990 představovaly NAC druhy 10–40 % všech systémových kandidóz, kdežto mezi lety 1990-2010 už představovaly 35–65 % [15].

2.1.2.3 Rezistence

Alarmujícím problémem je to, že většina NAC druhů vykazuje primární rezistenci nebo sníženou citlivost vůči určitým druhům antimykotik [15].

Konkrétně *C. glabrata* je odolná vůči azolovým léčivům, zejména pak vůči flukonazolu. Je také rezistentní vůči itrakonazolu, který bývá většinou účinný proti druhům *Candida*, které jsou rezistentní na flukonazol. Naopak posakonazol má fungistatickou aktivitu vůči kvasince *C. glabrata* a vorikonazol dokonce antifungicidní aktivitu [12].

2.1.2.4 Infekce

Infekce způsobené kvasinkami *Candida* se nazývají kandidózy [14]. Obecně mykózy v posledních letech výrazně narůstají. U kandidóz je důvodem hned několik faktorů, které podporují kvasinkovou infekci. Často tyto faktory souvisí s imunodeficiencí. K podpoření kvasinkové infekce mohou vést faktory, jako je například léčba antibiotiky, steroidy, cytostatiky nebo imunosupresivy. Poté také onemocnění jako je leukémie, diabetes či AIDS. Mezi nejčastější druhy patří orální a vaginální kandidózy [3, 16].

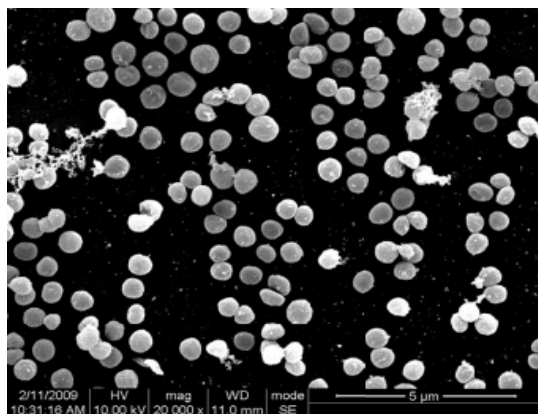
Orální kandidóza je oportunní infekce, která je běžná u imunokompromitovaných pacientů. *C. glabrata* je častý patogen v ústní sliznici. Častěji se vyskytuje i s kvasinkou *C. albicans*, ale

nachází se i jako jediný detekovatelný druh. Důležité je zmínit, že infekce, které jsou způsobené *C. glabrata*, jsou pro léčbu obtížnější než ty, které jsou způsobené zmíněnou *C. albicans* [10]. Vaginální kandidóza je nejčastějším onemocněním ženského pohlavního ústrojí. Běžně se jedná o nekomplikované infekce, které jsou způsobeny kvasinkou *C. albicans*. Nicméně přibližně 10 % žen trpí komplikovanou vaginální kandidózou, kde může být infekce způsobena i NAC druhy. Tyto komplikované infekce jsou zaznamenávány nejčastěji u žen s cukrovkou nebo s imunosupresivními stavy. Infekce, která je způsobená *C. glabrata*, tedy představuje komplikovanou formu onemocnění [3].

2.1.3 Staphylococcus epidermidis

Stafylokoky jsou shlukující se grampozitivní koky. Jedná se o fakultativně anaerobní bakterie, které nevytváří spory a jsou nepohyblivé. Dělí se do dvou druhů, na koaguláza negativní a koaguláza pozitivní bakterie (koaguláza je enzym vyvolávající koagulaci, koaguláza pozitivní bakterie tedy produkuje tento enzym a koaguláza negativní bakterie nikoliv) [17].

Buňky *S. epidermidis* jsou kulovitěho tvaru a dosahují v průměru velikosti 0,5–1,5 μm (viz Obr. 2). Kolonie jsou hladké, lesklé a kulaté. Mají bílé zbarvení a jsou lepkavé. V průměru dosahují velikosti asi 2,5 mm [18].



Obrázek 2: *Staphylococcus epidermidis* pod elektronovým mikroskopem [18]

S. epidermidis je nejčastěji izolovanou koaguláza negativní bakterií. *S. epidermidis* se běžně vyskytuje na kůži a také na sliznicích [19].

2.1.3.1 Virulence

Zásadním faktorem virulence u *S. epidermidis* je tvorba biofilmů a adherence k hostiteli. Méně se poté na virulenci podílí tvorba toxinů a exoenzymů, které způsobují narušení tkáně [19].

V průběhu infekce jde u tvorby biofilmů o dvě stádia - primární připojení bakterií k materiálu a následná tvorba vícevrstevných buněčných shluků [19]. Biofilm vytváří bakteriální ochranu proti obraným mechanismům hostitele a také vůči antimikrobiálním látkám. Biofilmy *S. epidermidis* obsahují veliké množství perzistentních buněk, které chrání mikroorganismus před inaktivací a zabitím neutrofily a imunoglobuliny G [20].

Zásadním toxinem, který je produkován *S. epidermidis*, je δ -toxin, který způsobuje lýzu erytrocytů tvorbou pórů v cytoplazmatické membráně. δ -toxin je biologickou funkcí přirovnáván k detergentům a hraje roli v konstrukci struktury biofilmů. Avšak pro přesné pochopení tohoto toxinu je zapotřebí dalších studií. Dále *S. epidermidis* produkuje pouze omezené množství jiných toxinů či exoenzymů [19].

2.1.3.2 Patogenita

S. epidermidis je komenzální mikroorganismus (tzn. vztah mezi dvěma jedinci, kdy jeden není ovlivněn a druhý má ze vztahu prospěch), který je běžnou součástí mikrobioty, jak bylo uvedeno výše. Jedná se o oportunní patogen, který se v posledních letech stal nejvýznamnějším původcem nozokomiálních infekcí [19]. Nicméně u určité skupiny pacientů způsobuje invazivní infekce. Jedná se o imunokompromitované pacienty, novorozence nebo pacienty, kteří mají zavedené zdravotnické prostředky [21].

Vzhledem k tomu, že má *S. epidermidis* omezený počet faktorů virulence, není schopen u zdravých hostitelů vyvolat invazivní infekci [21].

2.1.3.3 Rezistence

Zvýšené užívání širokospektrálních antibiotik k prevenci nebo k léčbě infekce vedlo k nárůstu rezistence také u *S. epidermidis* [22].

Zejména docházelo k nadužívání beta-laktamových antibiotik. Tato antimikrobiální léčiva mohou být *S. epidermidis* inaktivována pomocí tří mechanismů. Může to být realizováno pomocí enzymu beta-laktamázy, nebo může dojít k modifikaci permeability, anebo také může dojít k modifikaci cíle antibiotika [20]. Dochází zejména ke zvyšování rezistence vůči meticilinu, kdy je už přibližně 80 % kmenů *S. epidermidis* na tato antibiotika rezistentní. Zároveň také dochází ke zvyšování rezistence i na jiná antibiotika [19].

Velice alarmujícím zjištěním bylo, že rezistence může být přenesena *in vivo* z jednoho stafylokokového druhu na druhý. Proto je stálá snaha o tvorbu nových antibiotik a vyřešení problému, že jedním z posledních účinných antibiotik proti multirezistentním kmenům je

vankomycin. Mezi nově vzniklá účinná antibiotika můžeme zařadit dalfopristin nebo oxazolidinony [19].

2.1.3.4 Infekce

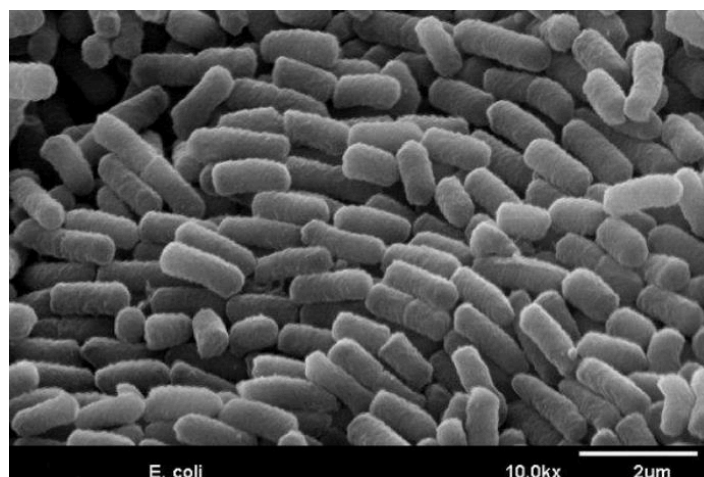
S. epidermidis je nejčastěji se vyskytujícím druhem koaguláza negativních stafylokoků, tvoří 65–90 % všech stafylokoků získaných z krve. V posledních letech se stal hlavní příčinou nozokomiálních bakteriálních infekcí. Infekce *S. epidermidis* jsou často spojené s katétry, kloubními náhradami či cévními štěpy [22].

Infekce jsou tedy nejčastěji spojené se zavedením cizího tělesa do organismu. Cizí tělesa výrazně zvyšují náchylnost organismu k infekci a také rezistenci na léčbu antibiotiky [23].

Dále může být infekce způsobena i bez zavedení cizího tělesa. Může se jednat o pooperační infekční komplikace neurochirurgické (zabývá se mozkiem a nervovým systémem), oftalmologické (oční lékařství) nebo kardiotorakální (zabývá se orgány uvnitř hrudníku v oblasti srdce) chirurgie [23].

2.1.4 Escherichia coli

Escherichia coli je gramnegativní tyčinkovitá bakterie. Je fakultativně anaerobní a řadí se do čeledi *Enterobacteriaceae* [24, 25]. Buňky jsou tyčinkovitého tvaru (viz Obr. 3) a dosahují v průměru 1–3 μm . *E. coli* je opatřena peritrichními bičíky pro pohyb, jen některé kmeny jsou nepohyblivé [26].



Obrázek 3: *Escherichia coli* pod elektronovým mikroskopem [27]

Kolonie tvořené *E. coli* jsou hladké, kulaté a mají šedobílé zbarvení. V průměru dosahují velikosti mezi 1–3 mm [26].

E. coli se běžně vyskytuje jako komenzální bakterie součástí mikrobioty ve střevním traktu u lidí a zvířat [25].

2.1.4.1 Virulence

E. coli je slizniční patogen a obdobně, jako většina slizničních patogenů, má určitou strategii rozvoje infekce. Nejdříve dochází ke kolonizaci místa na sliznici, následně se bakterie vyhýbá obraně hostitele a začne se množit. Poté dojde k poškození hostitele [28].

E. coli způsobuje průjemová onemocnění. Patogenní *E. coli* dokáže navzdory peristaltice střeva a velké konkurenci o živiny kolonizovat povrch střevní sliznice. Zároveň je povrch střevní sliznice kolonizován i nepatogenními kmeny *E. coli* [28].

Nápomocné při adhezenci na povrch sliznice střeva hostitele jsou povrchově adherentní fimbrie. Patogenní druhy mají potom specifické fimbriální antigeny, které umožňují lepší adhezenci a kolonizaci v tenkém střevě. Dále k adhezi k epitelialním buňkám přispívají kromě fimbriálních adhezínů také amfimbriální adheziny nebo vnější membránové proteiny [25, 28].

Virulentním faktorem je i tvorba exotoxinů, což jsou proteiny, které mohou cílit na metabolismus buňky nebo na cytoplazmatickou membránu či na buněčnou kostru [25].

2.1.4.2 Patogenita

E. coli je komenzální nebo patogenní bakterie. Je to velice všestranný mikroorganismus, který je důležitou součástí střevní mikroflóry u lidí a jiných savců. Může však být i velice problematickým patogenem způsobující různá onemocnění [29, 30].

Komenzální kmeny téměř nezpůsobují onemocnění, výjimkou mohou být imunokompromitovaní pacienti nebo pacienti, kteří mají narušenou gastrointestinální bariéru. Avšak je známo několik kmenů *E. coli*, které jsou vysoce adaptované a získaly specifické vlastnosti virulence. Právě tyto patogenní kmeny jsou schopné vyvolat onemocnění i u jinak zdravých pacientů [30].

2.1.4.3 Rezistence

Jak bylo naznačeno výše, tak rostoucí rezistence mikroorganismů vůči antibiotikům je celosvětovým problémem [31].

E. coli je přirozeně rezistentní díky své membránové bariéře vůči penicilinu G, který se řadí do beta-laktamových antibiotik. *E. coli* je rezistentní i na jiná beta-laktamová antibiotika, je totiž

schopná produkovat enzym beta-laktamázu, který je nejdůležitějším faktorem rezistence pro tento typ antibiotik. *E. coli* také vykazuje rezistenci na karbapenemy; tento problém je způsobený plazmidy, které kódují karbapenemázy (enzymy, které hydrolyzují karbapenemová antibiotika). Dále je *E. coli* rezistentní i na řadu jiných antibiotik, které se liší mechanismem účinku [32].

2.1.4.4 Infekce

Patogenní kmeny *E. coli* je možné rozdělit do několika tříd na základě jejich specifických vlastností. Pro příklad budou následně uvedené dvě třídy patogenní *E. coli*, ale v této době je znám již větší počet. Jednou z tříd je enteroxigenní *E. coli* (ETEC), která produkuje enterotoxiny a způsobuje nadměrné vylučování elektrolytů a vody. Dále můžeme uvést enteroinvazivní *E. coli* (EIEC), která napadá enterocyty (buňky střeva) u lidí a primátů [25].

Kromě průjmových onemocnění je *E. coli* původcem extraintestinální infekce močových cest, krevního řečiště a centrálního nervového systému [29].

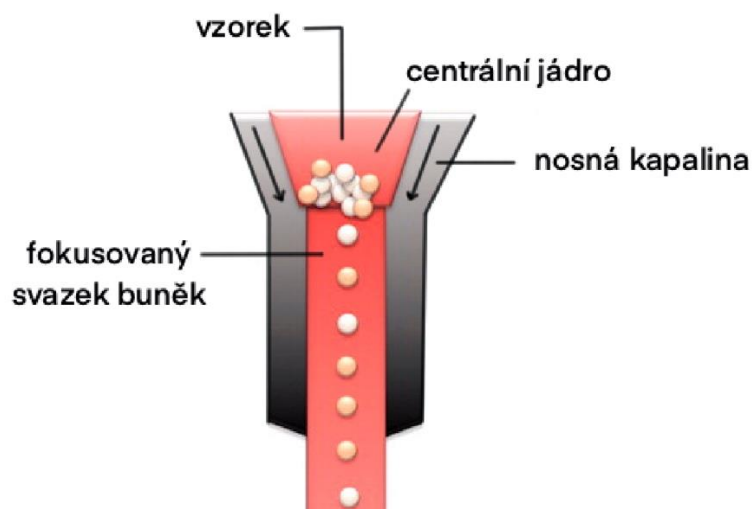
2.1.5 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je analytická metoda, která umožňuje rychlou multiparametrickou analýzu jednotlivých buněk v roztoku. V této práci je tato analytická metoda využívána pro analýzu buněk po ošetření plazmatem a sledování počtu živých a mrtvých buněk (tedy sledování účinnosti ošetření) [33].

2.1.5.1 Instrumentace

Průtokový cytometr se skládá ze tří systémů: fluidního systému, optického systému a elektroniky [33].

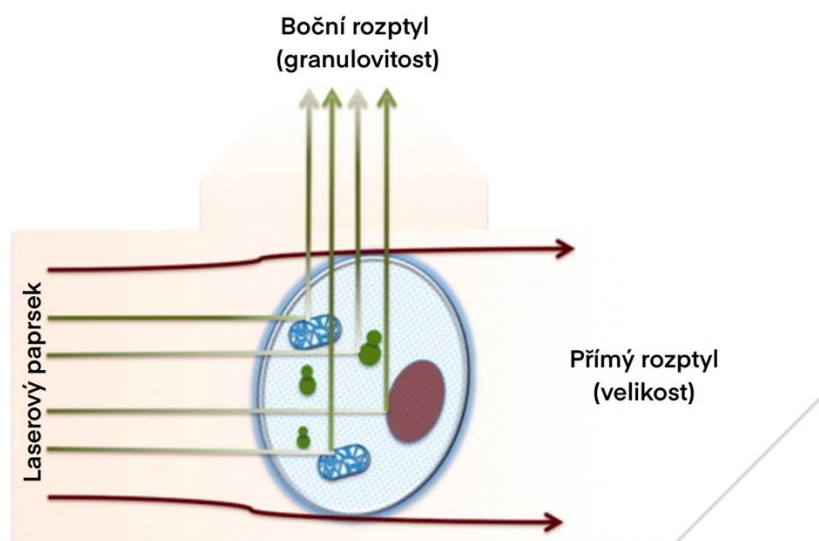
Nejdříve dochází k nasátí buněčné suspenze pomocí kapiláry. Tato suspenze se dostává do průtokové cely, kam byla dopravena pomocí nosné kapaliny. Fluidním systémem dochází k vytvoření fokusovaného svazku jednotlivých po sobě jdoucích buněk (viz Obr. 4). To je zajištěno tím, že je buněčná suspenze přivedena do centrálního jádra, které je ohraničeno vnějším pláštěm, kde protéká nosná kapalina. Tato nosná kapalina strhává jednotlivé buňky a dochází tedy k tzv. hydrodynamické fokusaci [34].



Obrázek 4: Fluidní systém, upraveno [35]

Následně dochází k ozáření jednotlivých buněk pomocí laserů. Světlo, které dopadá na buňky je rozptýleno. Informace o buňce se získávají ze dvou směrů rozptýlení. Přímý rozptyl je snímán detektorem, který je umístěn v úhlu 160–180°. Kanál, který tento přímý rozptyl snímá, se nazývá přední rozptylový kanál (FSC, tj. forward scatter channel). FSC je úměrný velikosti buněčného povrchu. Boční rozptyl je potom snímán detektorem, který je umístěn v úhlu 90°.

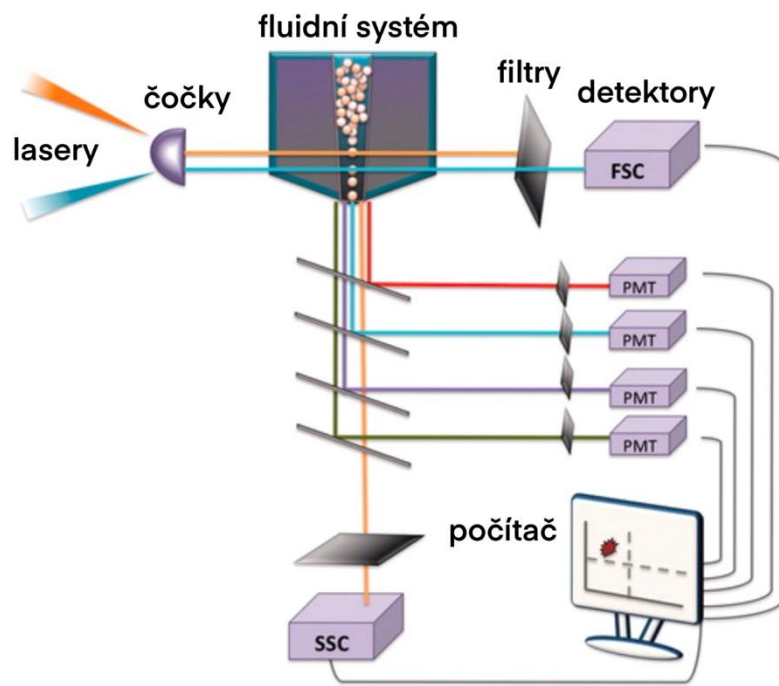
Kanál, který tento boční rozptyl snímá, se nazývá boční rozptylový kanál (SSC, tj. side scatter chanel). SSC je úměrný buněčné granulovitosti. Obrázek 5 znázorňuje přímý a boční rozptyl světla [34, 35].



Obrázek 5: Rozptyl světla, upraveno [34]

Další informace jsou získané snímáním emise různých fluoroforů, které se přidávají ke vzorku. K emisi dochází po excitaci laserem s vhodnou vlnovou délkou. K detekci emitované fluorescence jsou používány separované fluorescenční kanály. Nejčastěji jsou jako detektory použity křemíkové fotodiody (PD) nebo fotonásobiče (PMT). Specifičnost detektoru pro konkrétní barvivo je dána umístěním vhodného filtru. Tyto optické filtry propouští pouze světlo určitých vlnových délek a ostatní vlnové délky jsou blokovány. Může se jednat o band-pass filtry, které propouští úzký rozsah vlnových délek, které se blíží absorpčnímu maximu daného fluorescenčního barviva. Short-pass filtry propouští světlo o nižší než specifikované vlnové délce a long-pass filtry pak naopak propouští světlo o vyšší než specifikované vlnové délce. Obrázek 6 znázorňuje vše výše popsání [35].

Problémem u průtokové cytometrie je rozmanitost analyzovaných mikroorganismů. Fluorofory musí být optimalizované pro každý určitý druh mikroorganismu. Je nutné optimalizovat jejich koncentraci a také podmínky inkubace. Vše musí probíhat s ohledem na analyzovaný mikroorganismus. V některých případech je použití určitého fluoroforu dokonce znemožněno. Fluorofory používané v průtokové cytometrii mají různý mechanismus účinku, nebo jejich fluorescence závisí na buněčných fyziologických parametrech, může také záviset na enzymatické aktivitě. Dle toho, co chceme zjišťovat, volíme tedy vhodný fluorofor (nebo více fluoroforů) [36].



Obrázek 6: Znáznornění detekce záření v průtokovém cytometru, upraveno [34]

Výstupem měření jsou obvykle dvouparametrové histogramy, mohou být ale pouze monoparametrické, anebo se může jednat o trojrozměrnou interpretaci [33, 35].

2.1.6 Plazma

Plazma můžeme označit jako čtvrté skupenství hmoty. Má totiž oproti kapalině a plynu zcela rozdílné vlastnosti. Plazma je ionizovaný plyn, který vzniká tím, že je plynu dodávána energie. V plazmatu se nachází volné nosiče náboje, které jsou schopné reagovat s elektrickým i magnetickým polem [37, 38].

Plazma můžeme rozdělit na slabě a silně ionizované, a také na nízkoteplotní a vysokoteplotní. O slabě ionizovaném plazmatu hovoříme, pokud je koncentrace nabitých částic oproti koncentraci neutrálních molekul zanedbatelná. Naopak u silně ionizovaného plazmatu je zanedbatelná koncentrace neutrálních molekul oproti nabitým částicím. Další rozdělení plazmatu na nízkoteplotní a vysokoteplotní je pouze konvenční a neexistuje zde přesně daná hranice. Obvykle se ale označuje plazma za vysokoteplotní, pokud teplota přesáhne 1 MK a střední energie nabitých částic přesáhne hodnotu 100 eV [37].

Jak bylo zmíněno, tak plazma obsahuje volné elektrické náboje, a je tedy elektricky vodivé. Elektrická vodivost je nejvýznamnější vlastností plazmatu. Jak dobře dokáže plazma vést elektrický proud, závisí na stupni ionizace. Avšak nezávisí jen na stupni ionizace, ale také na střední kinetické energii elektronů obvykle charakterizované teplotou elektronů. Elektrická vodivost se tedy zvyšuje s rostoucí teplotou a s rostoucí koncentrací volných elektrických nábojů [37].

2.1.6.1 *Studené plazma za atmosférického tlaku (CAP)*

Jedná se o nerovnovážné nízkoteplotní plazma, kde mají elektrony podstatně vyšší teplotu než těžké částice (ionty, molekuly, atomy). Díky tomu je možné plazma využít v řadě biomedicinských aplikací, protože ošetřením nedochází ke zvýšení teploty ošetřovaného materiálu. Další výhodou je, že nevznikají chemicky agresivní látky, při aplikaci nevznikají žádné vedlejší produkty a je možné nízkoteplotním plazmatem opracovat lokálně velké plochy. Využití je výhodné i z ekonomického hlediska, protože pořizovací ani provozní náklady nejsou vysoké [39].

Obrovskou výhodou plazmatu je, že u mikroorganismů nedochází, na rozdíl od jiných čistě chemických postupů, k rezistenci. V kapitolách výše bylo uvedeno, že rezistence mikroorganismů je obrovským celosvětovým problémem, proto by plazma mohlo mít v tomto směru vysoký aplikační potenciál. Další výhodou je to, že pokud dochází k ošetření kůže, tak

nedochází k zásadnímu poškození zdravých kožních buněk, ale spíš k selektivnímu poškození mikroorganismů [2].

2.1.7 Mikrovlnné výboje

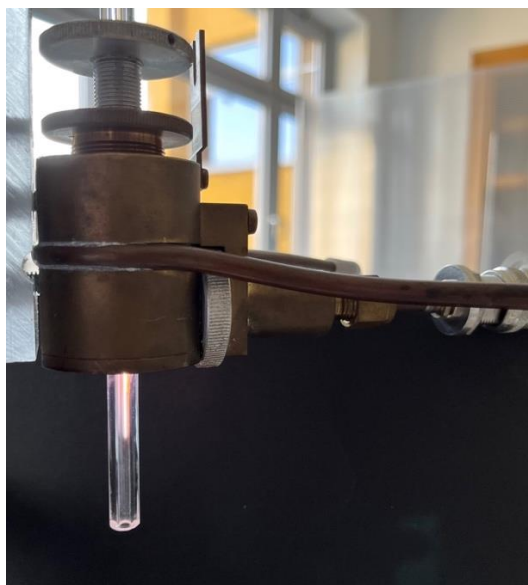
Mikrovlnné výboje jsou elektrické výboje, které jsou generované elektromagnetickými vlnami o frekvencích přesahujících 300 MHz. Nejčastěji se používá frekvence 2,54 GHz. Důležité však je, abychom se pohybovali v mikrovlnných frekvencích, které jsou povolené pro průmyslové, lékařské a vědecké aplikace [40].

Mikrovlnný výboj lze zkonstruovat jako bezelektrodový a lze jej generovat v režimu pulzních a kontinuálních vln při dopadajících mikrovlnných výkonech v rozmezí od několika W až po stovky kW [40].

Existuje řada mikrovlnných plazmových generátorů. V této práci je využíván mikrovlnný výboj, který je generovaný povrchovou vlnou.

2.1.7.1 Mikrovlnný výboj generovaný povrchovou vlnou

Mikrovlny, které jsou generované polovodičovým generátorem při frekvenci 2,54 GHz a výkonu 9–12 W, jsou vedeny koaxiálním kabelem do rezonanční dutiny surfatronu. V surfatronu dochází k tomu, že část vln začne vytvářet stojaté vlnění a část vln uniká malou štěrbinou a dostává se na hranici dielektrika (křemenná kapilára, která je obklopená vzduchem a proudí v ní nosný plyn). Po zapálení výboje se pak vytváří na rozhraní mezi plazmatem a okolím (křemennou kapilárou nebo vzduchem) takzvaná povrchová vlna. Ta postupuje podél rozhraní a předává svou energii plazmatu, čímž postupně její energie slábne. V určité vzdálenosti pak vlna zaniká a viditelný rozsah výboje zmizí [41, 42]. Mikrovlnný výboj generovaný povrchovou vlnou, který byl používán při experimentu lze pozorovat na Obrázku 7.



Obrázek 7: Mikrovlnný výboj generovaný povrchovou vlnou v argonu při výkonu 13 W a průtoku 2 Slm

2.1.8 Chemické a fyzikální procesy iniciované plazmatem ve vzduchu

Pokud je ošetřován povrch materiálu a elektrický výboj je ve styku se vzduchem, tak dochází k tomu, že plazma se vzduchem reaguje. Reakce plazmatu se vzduchem vede ke vzniku reaktivních částic kyslíku a dusíku, které jsou pro sterilizaci zásadní (podrobněji budou diskutovány níže) [43]. Důležitý vliv má také elektrické pole, které způsobuje zvýšení propustnosti membrány buněk. Dochází také ale k působení jiných faktorů, jako jsou teplo, UV záření, VUV záření a elektrické pole. Tyto faktory mají však pouze sekundární roli při sterilizaci [1].

K rozdílným chemickým a fyzikálním procesům dochází v kapalině, což bude diskutováno v následující kapitole.

2.1.9 Chemické a fyzikální procesy v kapalině

Elektrické výboje v kapalinách iniciují různé chemické a fyzikální procesy. Nejdůležitějším fyzikálním jevem je vznik silného elektrického pole, UV záření a také vznik rázových vln. Při přímém účinku plazmatu na suspenzi dochází i k účinku právě těchto zmíněných fyzikálních jevů [44, 45].

V kapalině také dochází k chemickým procesům, nejzásadnější je vznik různých reaktivních částic. Může docházet ke vzniku částic s krátkou dobou života pomocí excitace a ionizace molekul kapaliny, nejčastěji se jedná o radikály. Vznikat mohou i částice s dlouhou dobou

života, do této kategorie řadíme neutrální molekuly s vysokým oxidačním potenciálem a ionty. Ve vodě a vodných roztocích vznikají zejména vodíkové, kyslíkové a hydroxylové radikály, peroxid vodíku a ozón. Předpokládá se, že v systému dochází zároveň ke dvěma souhrnným reakcím. Rovnice (1) a (2) zobrazují tyto souhrnné reakce, které vedou ke vzniku hlavních reaktivních částic, tedy k hydroxylovým a vodíkovým radikálům, peroxidu vodíku a vodíku [46]:



2.1.10 Sterilizace plazmatem

Při sterilizaci pomocí plazmatu dochází ke spolupůsobení několika faktorů, avšak nejdůležitějším faktorem je působení již zmíněných reaktivních částic. Jak bylo uvedeno v předešlých kapitolách, tak dochází ke vzniku reaktivních částic kyslíku a dusíku, obecně jsou označovány jako RONS, tedy Reactive oxygen and nitrogen species. Záleží však na aplikaci. Pokud se jedná o přímou aplikaci, kdy je plazmatem ošetřovaný povrch materiálu bez ochranné atmosféry, tak díky kontaktu se vzduchem vznikají jak reaktivní částice kyslíku, tak i dusíku. Pokud ale dochází k ošetření mikroorganismů v suspenzi (tedy ve vodním prostředí), tak dochází zejména k tvorbě reaktivních částic kyslíku [1]. V následujících kapitolách budou jednotlivé reaktivní částice diskutovány.

2.1.10.1 Singletový kyslík

Singletový kyslík (1O_2) má oxidační potenciál 0,65 eV. Může reagovat s různými buněčnými složkami, jako jsou proteiny, nukleové kyseliny či nenasycené membránové lipidy. Jeho antibakteriální účinek je založený na inhibici enzymů dýchacího řetězce, a to zejména na úrovni syntézy ATP (adenosintrifosfát), což je pro buňku jediný možný zdroj energie [47, 48].

2.1.10.2 Hydroxylové radikály

Nejsilnějším radikálem je právě hydroxylový radikál, má nejvyšší oxidační potenciál (2,8 eV). Je však extrémně reaktivní, takže jeho doba života je velice krátká (10^{-9} s). Hydroxylový radikál je schopný neselektivně interagovat téměř se všemi biomolekulami. Jeho působením dochází k rozrušení integrity buněčné stěny, což vede k buněčné smrti [1, 47].

2.1.10.3 Peroxid vodíku

Peroxid vodíku (H_2O_2) je dalším důležitým antimikrobiálním činidlem, které vzniká díky plazmatu. Peroxid vodíku může vznikat různými reakcemi, například rozpuštěním vzdušného H_2O_2 nebo reakcí hydroxylového radikálu s vodou nebo vodní párou. Na rozdíl od singletového kyslíku a hydroxylového radikálu má peroxid vodíku dlouhou dobu života [49]. Peroxid vodíku má antimikrobiální vlastnosti a je zásadní při hojení ran. Je také důležitou složkou, která se studuje ohledně protirakovinných vlastností nízkoteplotního plazmatu [50]. Má hydrofobní povahu, a tak má schopnost procházet přes buněčné membrány. Peroxid vodíku dokáže dlouhodobě poškozovat buněčný obsah, ačkoliv sám o sobě není natolik reaktivní. Důležité je, že dojde k efektivnímu štěpení peroxidu vodíku na dvě molekuly OH. A právě tyto molekuly OH jsou potom zodpovědné za tato poškození [51].

2.1.10.4 Ozón

Ozón má stejně jako peroxid vodíku dlouhou dobu života a má germicidní účinek, který je založený na interferenci ozónu s buněčným dýcháním. Respektive dochází k interferenci s atomárním kyslíkem, který vznikne rozkladem nestabilního ozónu (spolu s molekulou kyslíku O_2). Atomární kyslík je vysoce reaktivní a neselektivní [1, 49].

Nicméně působení ozónu je pro člověka škodlivé. Výhodou však je, že množství, které je produkováno při ošetření kůže plazmatem, je velice malé, protože i doba ošetření bývá zpravidla krátká [52].

2.1.10.5 Oxidy dusíku

Oxidy dusíku (NO_x) jsou vysoce reaktivní složky, reagují zejména se složkami vnější membrány buněk, tedy zejména s proteiny a lipopolysacharidy. NO_x generované pomocí plazmatu vyvolávají oxidaci lipidů. NO_x zahrnují NO, NO_2 , NO_3 , NO_4 , N_2O_4 , a také N_2O_5 a hrají důležitou roli při inaktivaci mikroorganismů [52]. NO má také důležitou roli jako signální látka.

2.1.10.6 Peroxynitril

Peroxynitril se řadí mezi nejvýznamnější reaktivní částice dusíku. Při nízkém pH (přibližně pH 3) dochází k jeho vzniku kontinuálně z peroxidu vodíku a dusitanu. Peroxynitril je cytotoxický

a zvýšené hladiny mohou vést ke kritickému poškození buněčných složek, což může vést k buněčné smrti prostřednictvím apoptózy nebo nekrózy [53].

2.1.11 Interakce plazmatu s mikroorganismy

Při interakci plazmatu s mikroorganismy dochází k ovlivnění vlastností mikroorganismů. Do jaké míry dojde k ovlivnění mikroorganismů, záleží na různých parametrech plazmatu, druhu plazmatu, na typu ošetření a také na mikroorganismu, který je studován. Bylo totiž zjištěno, že baktericidní účinek je vyšší než analogický fungicidní účinek [54].

2.1.11.1 Interakce plazmatu s bakteriemi

Jak bylo uvedeno výše, tak za sterilizací pomocí nízkoteplotního plazmatu stojí zejména reaktivní částice. Bylo zjištěno, že u gramnegativní bakterie *E. coli* působí ROS (Reactive Oxygen Species, tedy reaktivní částice kyslíku) zejména na membránové lipidy pomocí peroxidativních reakcí. U grampozitivní bakterie *S. Aureus* došlo k tomu, že ROS mohly být aktivně transportovány skrze buněčnou membránu a mohly tak vyvolat poškození na intercelulární úrovni. Působením nízkoteplotního plazmatu může však dojít i k poškození membránových proteinů, a to nejspíše pomocí hydroxylového radikálu. Nedochází však k poškození DNA ani cytoplazmatických proteinů. ROS také stojí za vyvoláním oxidačního stresu buňky, což následně vede k programované buněčné smrti. Nicméně je důležité zmínit, že obecně jsou gramnegativní bakterie citlivější na expozici plazmatu než grampozitivní bakterie, vzhledem k jejich rozdílnostem v buněčné stěně [55, 56].

Také je podstatné to, že ne vždy vede poškození k přímé smrti buňky, ale může se jednat o takový typ poškození, že jsou bakterie životaschopné, ale nekultivovatelné [55]. Tento stav je reverzibilní, mikroorganismy mohou za dobrých životních podmínek opět nabýt plné vitality pomocí opravných buněčných mechanismů.

2.1.11.2 Interakce plazmatu s kvasinkami

Na rozdíl od bakterií, interakce plazmatu s kvasinkami není tolik prostudována. Nejvíce studovanou kvasinkou je kvasinka *Sacharomyces cerevisiae*, a to z toho důvodu, že se jedná o vhodný eukaryotický model. Takto lze studovat účinek plazmatu na eukaryotických buňkách, což by mohlo vést k lepšímu pochopení účinků plazmatu na složitější živočišné buňky [57].

Při ošetření kvasinek *S. cerevisiae* dochází k vyvolání několika typů buněčného stresu. Za vyvoláním buněčného stresu stojí RONS, které reagují s buněčnými strukturami, což vede k jejich poškození [57].

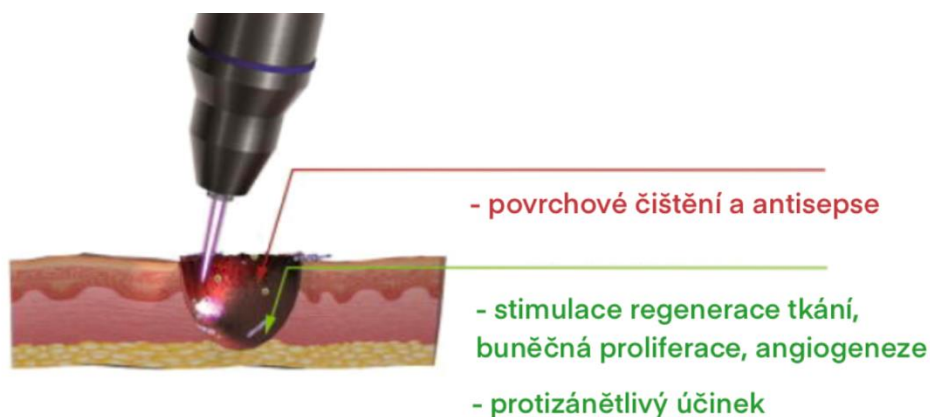
Po ošetření plazmatem může dojít u kvasinky *S. cerevisiae* ke změně morfologie buňky a ke změně buněčné membrány. Poškození může vést až k apoptóze buňky. Velice častým cílem oxidačního poškození jsou membránové lipidy, a to zejména polynenasycené mastné kyseliny. Dochází tedy k peroxidaci lipidů, což vede k poškození buněčné membrány, a to vede ke vzniku dalších reaktivních produktů. Jedním z hlavních je malondialdehyd (MDA). K produkci MDA dochází i u bakterií, konkrétně poprvé byla popsána u bakterie *E. coli*. Dále po ošetření plazmatem dochází nejspíše k poškození intracelulární membrány, což bylo odvozeno zvýšením koncentrace Ca^{2+} v intracelulárním prostoru. Dále plazma reaguje i s dalšími buněčnými složkami jako jsou proteiny a DNA. Všechny tyto reakce přispívají k buněčné smrti kvasinek *S. cerevisiae*, avšak pro bližší pochopení musí být tato problematika dále studována [57].

2.1.12 Biomedicinské aplikace plazmatu

Pro biomedicinské aplikace je nízkoteplotní plazma studováno jako prostředek pro ošetření lékařských materiálů a zařízení, ale i živých buněk [58].

2.1.12.1 Dermatologie

Jednou z důležitých aplikací je využití plazmatu v dermatologii, zejména pak pro léčbu chronických ran. V ráně dochází pomocí plazmatu k antisepsi a také ke stimulaci regenerace tkáně, což je jedinečná vlastnost, kterou konvenční techniky postrádají (viz Obr. 8) [58].



Obrázek 8: Hojení ran pomocí nízkoteplotního atmosférického plazmatu, upraveno [58]

Kromě hojení ran je v dermatologii studována také interakce plazmatu se zánětlivými kožními onemocněními jako je akné, atopický ekzém nebo pásový opar a další [58].

2.1.12.2 Onkologie

Dále je využití plazmatu studováno v onkologii. Přesné mechanismy účinku nejsou v tuto chvíli zcela pochopeny, ale bylo zjištěno, že velice důležitou roli v inhibici či zabíjení rakovinných buněk hrají RONS generované plazmatem. V rakovinných buňkách, u kterých je přirozeně zvýšená hladina oxidativního stresu, dochází při nárůstu koncentrace RONS k překročení limitu tolerance pro oxidativní stres, což může vést k oxidativnímu poškození intracelulárních buněčných složek. Na rozdíl od zdravých buněk, kde je hladina RONS nižší, a tedy při aplikaci stejné dávky RONS, nedochází k překročení zmíněného limitu a buňky se pomocí opravných mechanismů dokážou s externími RONS vypořádat. Z toho lze tvrdit, že při této aplikaci (i jiných biomedicinských aplikacích) je působení plazmatu selektivní. Nedochází tedy k zásadnímu poškození tělních buněk na rozdíl od těch rakovinných (či mikrobiálních).

Než však dojde k poškození intracelulárních buněčných složek, dochází k poškození buněčné membrány, a to buďto oxidací membránových lipidů nebo chemickou modifikací. RONS nejpravděpodobněji prochází dovnitř buňky pomocí membránových proteinů – akvaporinů. Akvaporiny jsou důležité pro transport vody, kromě toho jimi ale mohou procházet i sloučeniny jako H_2O_2 , NO a NO_3 . Rakovinné buňky mají v cytoplazmatické membráně obvykle více akvaporinů než normální buňky, což by mohlo vysvětlovat proč jsou rakovinné buňky citlivější na expozici plazmatu [51].

Reálné je využití plazmatu v onkologii jako podpůrné léčby. Například spolu s chirurgickými resekce nádorů, kde by místo odkud byl nádor odstraněn bylo následně ošetřeno plazmatem, čímž by mohlo dojít k inaktivaci případných zbylých rakovinných buněk. Dále by plazma mohlo být využíváno při léčbě melanomu spolu s imunoterapií, což by mohlo zvyšovat účinnost léčby, a navíc by tato léčba byla pouze lokální (na rozdíl od chemoterapie). Je tedy předpokládáno, že plazma bude pro tuto aplikaci využíváno, ale bude součástí kombinovaných terapeutických strategií [58].

2.1.12.3 Zubní lékařství

Dalším studovaným směrem je aplikace CAP v zubním lékařství. Plazma může být využíváno pro povrchové úpravy dentálních materiálů, dezinfekci, k léčbě parodontitidy (tj. zánětlivé onemocnění postihující závěsný aparát, tedy parodont) nebo pro odstraňování biofilmů [59].

Studie se zabývaly inhibicí různých mikroorganismů, které jsou příčinou onemocnění v dutině ústní. V posledních letech bylo prokázáno, že CAP je možné využít pro eliminaci širokospektrálních mikroorganismů a zubního plaku. Bylo prokázáno, že CAP účinně redukuje orální biofilm na titanových discích *in situ* a také biofilm *Porphyromonas gingivalis in vitro*. Právě *P. gingivalis* je častým původcem onemocnění parodontu. Antibakteriální účinky byly také prokázány na běžných druzích mikroorganismů v dutině ústní, jako jsou *Streptococcus oralis* nebo *Enterococcus faecalis*. Avšak účinnost CAP na biofilm má svá omezení, protože nedochází k úplnému odstranění bakterií v biofilmu, protože pronikání CAP je zabráněno maticí v silných biofilmech [59].

Pomocí plazmatu je také možné čistit kořenové kanálky. Vzhledem ke složité struktuře kořenových kanálků je dezinfekce chemickými prostředky (typicky roztoky chlorhexidinu a hypochloridu sodného nebo obklady hydroxidem vápenatým) problematická. Pro ionizovaný plyn, tedy plazma, to však problém není. Zároveň bylo potvrzeno, že při sedmi denní terapii bylo využití CAP účinnější (při ošetření nad 6 minut) než využití konvenční terapie s využitím obkladů Ca(OH)_2 . Obklady i plazma byly aplikovány *in vitro* na vyjmuté zuby kontaminované *Enterococcus faecalis* [60].

2.1.12.4 Nepřímé využití plazmatu

Možnou cestou je i nepřímé využití plazmatu pomocí plazmatem ošetřené vody (PTW), ale také jiných biologicky relevantních vodných roztoků. Při této aplikaci dochází nejdříve k ošetření vody (nebo vodného roztoku) pomocí plazmatu, tzn. nejdříve je ošetřena voda (vodný roztok), a až poté jsou této vodě (vodném roztoku) vystaveny mikroorganismy. Na rozdíl od přímé aplikace tady však nedochází k účinku UV záření a elektrického pole. PTW nebo ošetřené vodné roztoky se dají využít pro již zmíněné aplikace, PTW se navíc dá využít jako dezinfekční prostředek [58].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie, přístroje a materiály

3.1.1 Přístroje

Denzitometr DEN-1, Biosan Ltd.

Optický mikroskop Intraco Micro LM 666 PV/LED (CZE)

Optický mikroskop Labomed, Lx 500

UV/VIS spektrofotometr NanoPhotometr Implen (DEU)

Spektrofotometr Helios γ , Unicam (GB)

Mikrovlnný autokláv Microjet ML2, Enbio

Tlakový hrnec

Termostat s inkubátorem Heidolph Unimax 1010

Centrifuga Hermle Z36 HK (CZE)

ELISA Reader BioTek ELx808, Biotek (DE)

Průtokový cytometr NL-2000, Cytex Biosciences (NL)

Teslův transformátor

Mikrovlnný generátor (Sairem, GMS 200 W)

Regulátor hmotnostního průtoku (Bronkhorst FG201-CV)

Elektromagnetický rezonátor povrchové vlny (Sairem, SURFATRON 80)

Fotoaparát NIKON D3100, AF-S NIKKOR 18-55 mm

3.1.2 Chemikálie a materiál

Kvasinková kultura *Candida Glabrata* CCM 8270 z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně

Bakteriální kultura *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně

Bakteriální kultura *Escherichia coli* CCM 3954 z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně

Tekuté kultivační médium YPD (Yeast Extract – Peptone – Dextrose/Glucose)

Yeast Extract Powder, Himedia

Peptone aus Casein, Carl Roth

D-glukóza monohydrát p.a., Lach: Ner

Tekuté kultivační médium LB (Lennox Broth), Sigma Aldrich

Tekuté kultivační médium BHI (Brain Heart Infusion), Himedia

Tekuté kultivační médium NB (Nutrient Broth), Himedia

Selektivní médium MacConkey agar, Himedia

Agar powder, Himedia

PBS (Phosphate Buffered Saline), VWR Life Science

Propidium jodid, eBioscience

Barviva pro Gramovo barvení (Krystalová violet, Lugolův roztok, Karbolfuchsin)

Imerzní olej, OPTIKA Italy

Sterilní polystyrénové Petriho misky s průměrem 90 mm

Běžné pomůcky na mikrobiální očkování

Pracovní plyn argon (čistota: 99,9965 %)

3.2 Příprava mikrobiálních vzorků

3.2.1 Příprava kultivačních médií

Pro kvasinku *C. glabrata* bylo pro účely této práce zvoleno komplexní živné médium YPD (Yeast Extract – Peptone – Dextrose/Glucose). Pro bakterii *S. epidermidis* bylo zvoleno médium BHI (Brain Heart Infusion) a pro bakterii *E. coli* bylo zvoleno médium LB (Lennox Broth). Tato živná média byla připravována dle standardního postupu (viz Tabulka 1, 2 a 3). Dále bylo připravováno společné živné médium pro všechny uvedené mikroorganismy, které obsahovalo komplexní živné médium NB (Nutrient Broth) a glukózu, poměry jsou uvedené v tabulce 4. Pokud bylo připravováno pevné živné médium, tak byl do média přidán agar (15 g/l). Pro identifikaci bakterie *E. coli* bylo použito selektivní médium MacConkey agar, které bylo připraveno dle standardního postupu (viz Tabulka 5). Připravená média byla sterilizována v mikrovlnném autoklávu, případně v tlakovém hrnci.

Tabulka 1: Složení kultivačního média YPD pro kvasinku C. glabrata

Složení	Obsah (g/l)
Kvasničný extrakt	10
Pepton z kaseinu	20
D-glukóza monohydrát	20

Tabulka 2: Složení kultivačního média BHI pro bakterii S. epidermidis

Složení	Obsah (g/l)
BHI	37

Tabulka 3: Složení kultivačního média LB pro bakterii E. coli

Složení	Obsah (g/l)
LB	20

Tabulka 4: Složení společného kultivačního média pro C. glabrata, S. epidermidis a E. coli

Složení	Obsah (g/l)
NB	25
D-glukóza monohydrát	20

Tabulka 5: Složení selektivního média MacConkey agar pro bakterii E. coli

Složení	Obsah (g/l)
MacConkey agar	49,53

3.2.2 Příprava inokul

Inokula byla připravována do 50 ml sterilního živného média (připraveno dle Tabulky 1,2 a 3), vhodného pro daný mikroorganismus. Tedy YPD pro *C. Glabrata*, BHI pro *S. epidermidis* a LB pro *E. coli*. Pomocí kličky byla kultura zavedena do živného média. Kultivace probíhala v inkubátoru s třepáním při 37 °C po dobu 24 hodin.

3.3 Kalibrační křivky

Pro tuto práci bylo nutné sestavit kalibrační křivky pro bakterie *S. epidermidis* a *E. coli*. Kalibrační křivka pro kvasinku *C. glabrata* byla převzata ($y = 3,475x$) [42].

Pro obě tyto bakterie byl postup stejný. Inokulum bylo naředěno tak, aby hodnota odpovídala co nejlíže 0,5 McFarland, což odpovídá $1,5 \cdot 10^8$ buněk. Ředěno bylo sterilním kultivačním médiem, specifickým pro danou kulturu. BHI pro *S. epidermidis*, LB pro *E. coli*. Inokulum *S. epidermidis* bylo naředěno na 0,4 McFarland. Inokulum *E. coli* bylo naředěno na 0,6 McFarland. Následně byla sestrojena řada vhodných ředění. Kultura (která odpovídala přibližně 0,5 McFarland) byla naředěna 5x, 10x, 20x, 50x a 100x. Takto naředěné vzorky byly proměřeny na UV-VIS spektrofotometru při vlnové délce $\lambda = 630$ nm. Naředěné kultury byly ještě naředěny 1000x destilovanou vodou a proměřené na průtokovém cytometru. Tato data byla zpracována a byly sestrojeny kalibrační křivky pro obě bakterie.

3.4 Příprava společného živného média

3.4.1 Příprava vzorku

Pro účely této práce bylo nutné najít vhodné živné médium pro všechny mikroorganismy: *C. glabrata*, *S. epidermidis* a *E. coli*. Bylo zvoleno živné médium NB, které je vhodné pro širokou škálu mikroorganismů a bylo obohaceno o glukózu (příprava viz Tab. 4). Do 10 ml tohoto média bylo naočkováno 100 μ l z každého inokula *C. glabrata*, *S. epidermidis* a *E. coli*. Takto připravené vzorky byly kultivované při 37 °C s třepáním po dobu 24 hodin.

3.4.2 Gramovo barvení a mikroskopování

Po kultivaci byla tato společná kultura barvena pomocí Gramova barvení. Společná kultura byla nanášena na podložní sklíčko a zafixována protažením nad plamenem. Následně byl na vzorek nakapán roztok krystalové violeti, který byl po 30 s opláchnut destilovanou vodou. Dále byl na vzorek nakapán Lugolův roztok, který byl rovněž po 30 s opláchnut destilovanou vodou. Poté

byl vzorek překryt ethanolem na 15 s a opláchnut destilovanou vodou. Nakonec byl na vzorek nakapán karbolfuchsin, který byl opláchnut po 60 s [61]. Takto připravený preparát byl pozorován pod optickým mikroskopem při sto násobném zvětšení (s využitím imerzního oleje).

3.5 Růstové křivky

Byly proměřeny růstové křivky pro srovnání růstu mikroorganismů ve svém specifickém živném médiu a ve společném živném médiu (NB s glukózou). Inokulum každého mikroorganismu bylo naředěno tak, aby absorbance odpovídala přibližně hodnotě $A = 0,2$ při vlnové délce $\lambda = 630$ nm. Tedy kvasinka *C. glabrata* byla ředěna v YPD a také v NB s glukózou, bakterie *S. epidermidis* byla ředěna v BHI a rovněž v NB s glukózou a stejně tomu bylo i u *E. coli*, která byla ředěna v LB, a i ve společném živném médiu. Vhodně naředěné vzorky byly odpipetovány na 96 jamkovou mikrotitrační destičku v triplicátech. Do jamky bylo odpipetováno vždy 200 μ l připraveného vzorku. Takto připravená mikrotitrační destička byla dána na ELISA reader, kde byla proměřována absorbance po každých 30 minutách po dobu 22 hodin. Z dat byly sestrojeny růstové křivky pro dané mikroorganismy ve svém specifickém a společném živném médiu. Následně byly tyto růstové křivky srovnávány.

3.6 Přímé ošetření mikroorganismů na pevném živém médiu

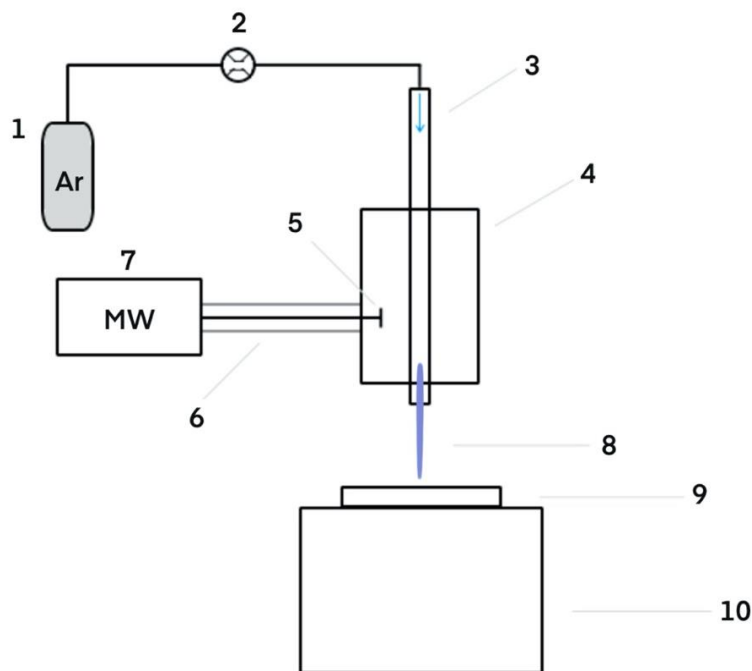
3.6.1 Příprava vzorků

Bylo připraveno inokulum, které bylo vhodně naředěno tak, aby koncentrace odpovídala rozmezí $10^4 - 10^5$ CFU/ml. Pokud byla připravována společná kultura, tak bylo ze zvolených kultur, které byly předtím vhodně naředěné na koncentraci $10^4 - 10^5$ CFU/ml, odpipetováno v poměru 1:1 nebo 1:1:1, aby byla získána požadovaná směsná kultura. Takto připravené vzorky byly naočkovány na pevné kultivační médium NB obohacené o glukózu. Na agarové plotny bylo naočkováno vždy 100 μ l daného vzorku. Vzorky byly vždy připravovány v kvadruplicátech. Takto připravené vzorky byly ihned ošetřeny plazmatem. Poté byly kultivovány v termostatu po dobu 24 h při 37 °C bez třepání.

3.6.2 Ošetření připravených vzorků pomocí mikrovlnného plazmového výboje s povrchovou vlnou

3.6.2.1 Zapojení mikrovlnné plazmové trysky

Experimentální zapojení bylo složeno z mikrovlnného generátoru (Sairem, GMS 200 W), který byl koaxiálním kabelem spojený s komerčním rezonátorem povrchové vlny (Sairem, SURFATRON 80). Jako pracovní plyn byl použit argon 4,6 (čistota 99,9965 %) při konstantním hmotnostním průtoku 5 Slm, ten byl regulovaný regulátorem hmotnostního průtoku Bronkhorst FG201-CV. Výboj byl tvořen uvnitř křemenné trubice, která má vnitřní průměr 3 mm a vnější průměr 8 mm. Experimentální zapojení je uvedeno na Obrázku 9. Výkon, který byl použit pro tento experiment kolísal mezi 8-10 W. Při ošetření agarových ploten výboj hořel kolmo směrem k povrchu. Vzdálenost mezi povrchem a koncem viditelné části elektrického výboje byla 10 mm (viz Obr. 10).



Obrázek 9: Schéma experimentálního zapojení: 1 – argon, 2 – regulátor hmotnostního průtoku, 3 – křemenná kapilára, 4 – surfatronový rezonátor, 5- MW anténa, 6 – MW koaxiální kabel, 7 – zdroj MW, 8 – elektrický výboj, 9 – Petriho miska zaočkovaná kulturou, 10 – držák



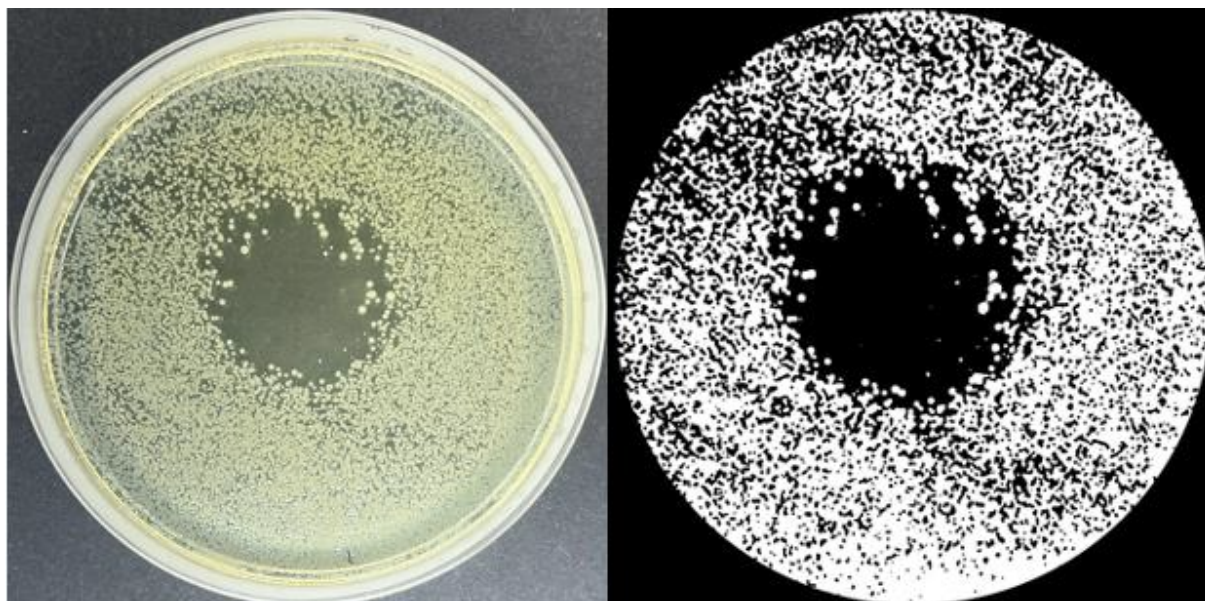
Obrázek 10: Ukázka aplikace plazmatu generovaného povrchovou vlnou na pevném živném médiu

3.6.2.2 Ošetření mikroorganismů

Po naočkování byly vzorky ihned ošetřeny plazmatem. Každá Petriho miska byla ošetřena zvlášť pro různé časy: 30 s, 60 s, 2 min a 5 min. Byl použit jeden výkon, který kolísal mezi 8-10 W. Všechny měření byly paralelně proměřeny v kvadruplikátech. A pro každý vzorek byly připraveny čtyři kontrolní vzorky, které nebyly ošetřeny plazmatem.

3.6.2.3 Zpracování a zhodnocení výsledků

Po uplynutí kultivační doby 24 h byly veškeré Petriho misky nafoceny. Velikost inhibičních zón byla vyhodnocena ve spolupráci s HexTech Research s.r.o. pomocí speciálního programu Aurora, jehož autorem je Bc. Jan Hrudka. Jedná se o vícekový algoritmus, který využívá umělou inteligenci a strojové učení. Z dat programu lze určit, jaká část Petriho misky je pokryta mikroorganismy (viz Obr. 11). Program je vyvíjený a testovaný ve spolupráci s VŠCHT. Data byla zpracována do grafů, které reprezentují účinnost inhibice plazmatu.



Obrázek 11: Vyhodnocení pokrytí Petriho misky programem Aurora

3.6.2.4 *Identifikace mikroorganismů*

Pokud na inhibované ploše u společných kultivací vyrostly jednotlivé kolonie, tak bylo nutné identifikovat o jaký mikroorganismus se jedná, aby byla ověřena případná selektivita. Jednotlivé kolonie (v ploše inhibice z jednoho vzorku) byly rozsuspendovány v 1 ml PBS (Phosphate-buffered saline, tj. fosfátový pufr). Takto připravený vzorek byl studován pod optickým mikroskopem při sto násobném zvětšení s imerzním olejem. Rovněž byl vzorek připraven pro Gramovo barvení, stejně jako v kapitole 3.4.2., takto připravené vzorky byly pozorovány pod mikroskopem při sto násobném zvětšení s použitím imerzního oleje.

3.6.2.5 *Určení viability mikroorganismů v inhibované ploše*

Inhibovaná plocha byla nabrána kličkou a rozsuspendována v 1 ml PBS. Do takto připraveného vzorku bylo odpipetováno 3 μ l propidium jodidu, následně byl vzorek ponechán 5 min ve tmě a poté analyzován na průtokovém cytometru.

Propidium jodid (PI) je malá fluorescenční molekula, která se váže na DNA. Využívá se pro identifikaci mrtvých buněk, není totiž schopný pasivně procházet do buněk, které mají neporušenou cytoplazmatickou membránu. PI je excitován vlnovými délkami mezi 400-600 nm a emituje světlo mezi 600-700 nm [62].

Inhibovaná plocha byla zkoumána i po týdenní kultivaci ošetřených vzorků při 37 °C v termostatu bez třepání. Pro zjištění kultivovatelnosti byla kličkou nabrána oblast inhibice

(zóna bez růstu) u vzorků *E. coli*, která byla naočkována na selektivní MacConkey agar. Takto připravený vzorek byl dán do termostatu na 24 h při 37 °C bez třepání.

3.7 Přímé ošetření mikroorganismů v suspenzi

3.7.1 Příprava vzorků

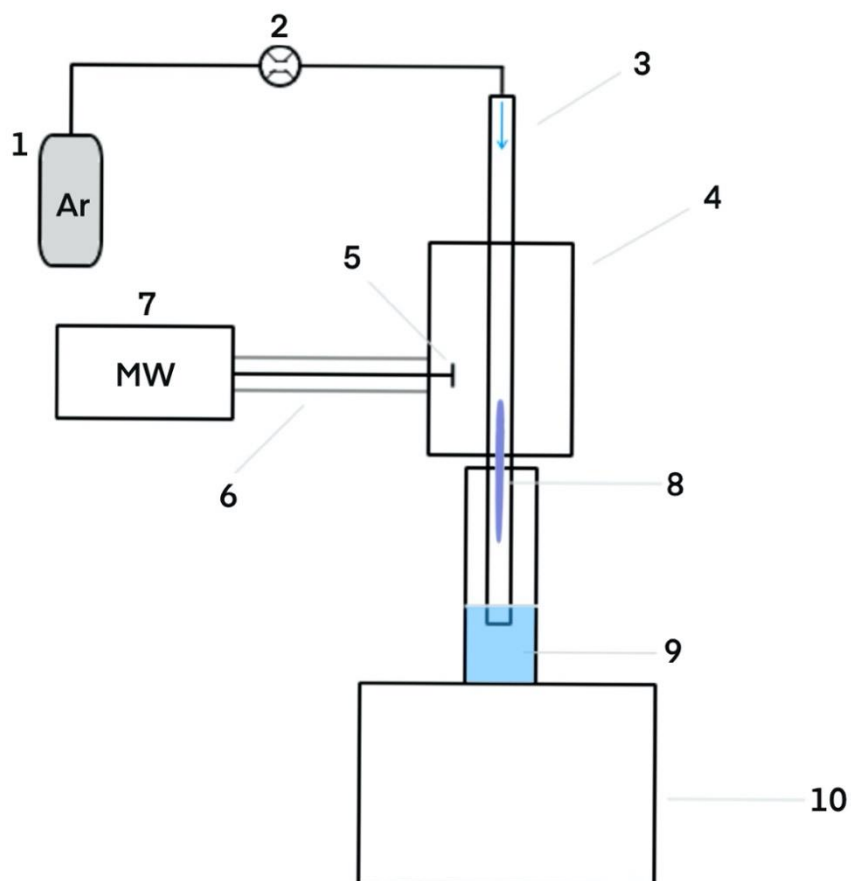
Vzorky byly připravovány v médiu NB obohacené o glukózu a v PBS. Pokud byla suspenze připravována v PBS, tak byly buňky nejdříve stočeny na centrifuze po dobu 3 min při 2500 rpm. Následně bylo odpipetováno médium a buňky byly rozsuspendovány v PBS. Takto připravený vzorek byl vhodně naředěn na koncentraci 10^6 CFU/ml. V případě média bylo inokulum pouze naředěno na stejnou koncentraci 10^6 CFU/ml. Do sterilních skleněných vialek bylo odpipetováno vždy 5 ml připraveného vzorku. Vzorky byly připraveny vždy paralelně v duplikátech. Takto připravené vzorky byly ošetřeny plazmatem.

3.7.2 Ošetření připravených vzorků pomocí mikrovlnného plazmového výboje s povrchovou vlnou

3.7.2.1 Zapojení mikrovlnné plazmové trysky

Zapojení je stejné jako při ošetření pevných vzorků. Rozdílem je, že při ošetření suspenze je křemenná kapilára více vysunutá a je zanořena těsně pod hladinu ošetřované suspenze (viz Obr. 12 a 13).

Výkon je nastaven na 13 W a po celý experiment je udržován konstantní průtok plynu 2,0 Slm.



Obrázek 12: Schéma experimentálního zapojení: 1 – argon, 2 – regulátor hmotnostního průtoku, 3 – křemenná kapilára, 4 – surfatronový rezonátor, 5- MW anténa, 6 – MW koaxiální kabel, 7 – zdroj MW, 8 – elektrický výboj, 9 – ošetřovaná suspenze, 10 – držák



Obrázek 13: Zanoření křemenné kapiláry s výbojem v argonu pod hladinu suspenze

3.7.2.2 Ošetření mikroorganismů

Vhodně naředěná suspenze v PBS a v médiu byla ošetřena plazmatem. Ošetřováno bylo v různých časech: po dobu 60 s, 5 min a 10 min. Každý vzorek byl paralelně proměřen v duplikátech. Pro každý vzorek byly připraveny dva kontrolní vzorky, kdy jeden ze vzorků byl považován pro usmrcení buněk. Byl tedy připraven kontrolní vzorek s živými buňkami a s mrtvými buňkami pro účely měření na průtokovém cytometru.

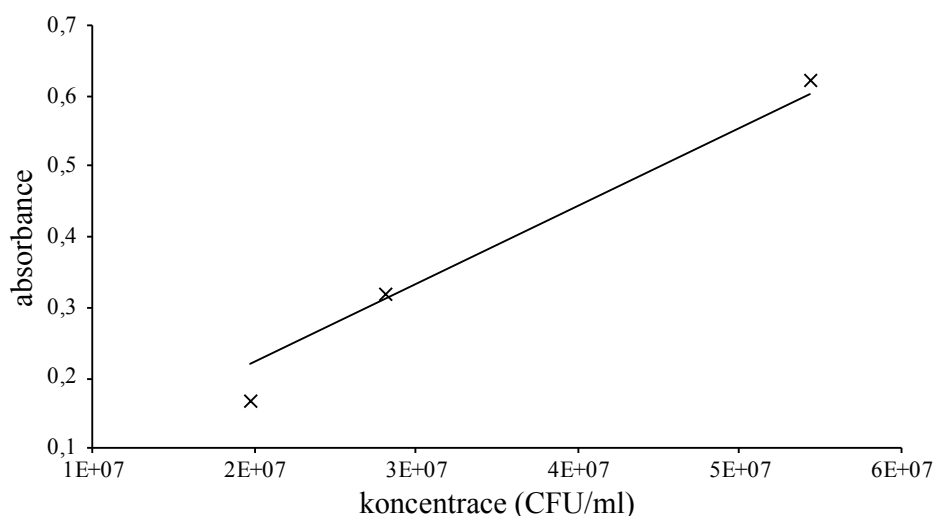
3.7.2.3 Zpracování a zhodnocení výsledků

Po ošetření plazmatem byly vzorky proměřeny na průtokovém cytometru. Pro proměření na průtokovém cytometru byly vzorky následně ředěny Milli-Q vodou 10x nebo 100x. Do 1 ml vzorku bylo přidáno 3 μ l propidium jodidu. Vzorky byly stejným způsobem proměřeny po 24 h (vzorky byly uchovány v lednici pro pozorování působení reaktivních částic s dlouhou dobou života). Výsledky byly přepočítány na 1 ml a vyneseny do grafů.

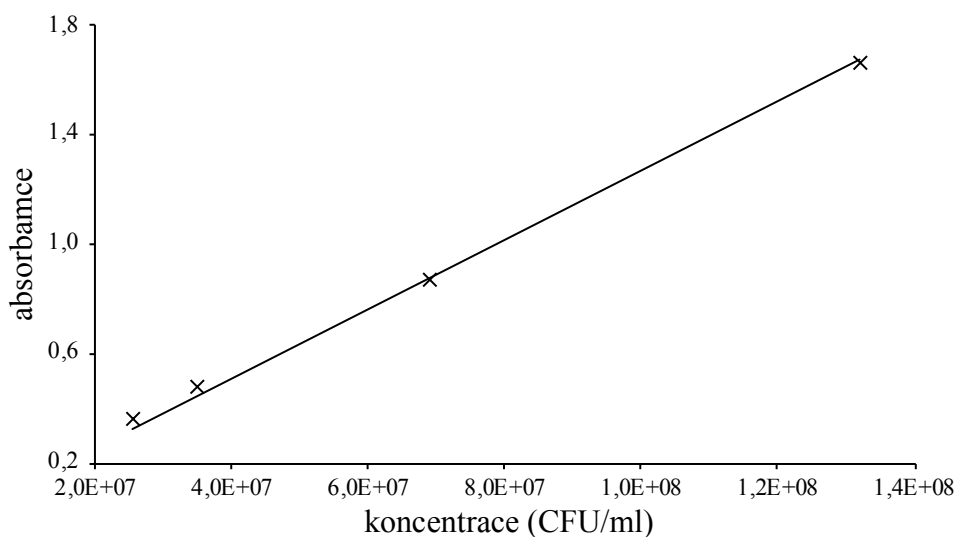
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Kalibrační křivky

Z dat průtokového cytometru byl počet buněk přepočítán na 1 ml. Následně byla dopočítána koncentrace (CFU/ml) podle použitého ředění. Z těchto dat byly sestrojeny kalibrační křivky pro bakterie *S. epidermidis* a *E. coli*. Kalibrační křivka *S. epidermidis* byla stanovena na $y = 1,2760 \cdot 10^{-8} \cdot x$ (viz Obr. 14). Kalibrační křivka *E. coli* byla stanovena na $y = 1,2662 \cdot 10^{-8} \cdot x$ (viz Obr. 15).



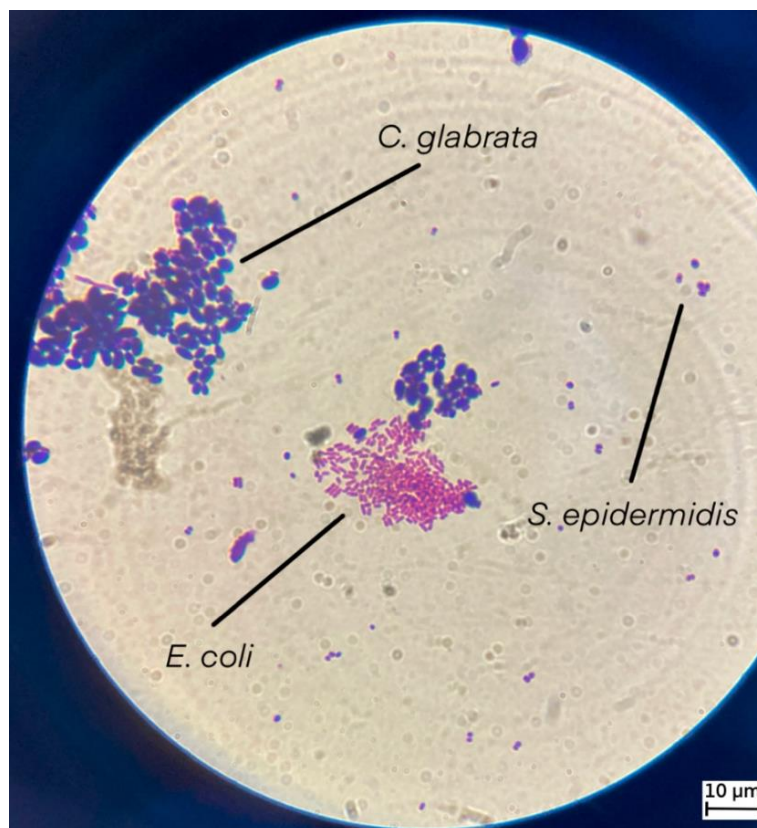
Obrázek 14: Kalibrační křivka pro bakterii *S. epidermidis*



Obrázek 15: Kalibrační křivka pro bakterii *E. coli*

4.2 Příprava společného živného média

Pro účel této práce bylo nutné najít společné živné médium, ve kterém budou růst mikroorganismy: *C. glabrata*, *S. epidermidis* a *E. coli*. Bylo zvoleno médium, které je vhodné pro široké spektrum mikroorganismů Nutrient Broth (NB) a bylo obohaceno o glukózu. Pro identifikaci mikroorganismů bylo zvoleno Gramovo barvení, abychom dokázali rozpoznat grampozitivní a gramnegativní bakterie dle zbarvení. Grampozitivní bakterie jsou zbarvené do fialova (*S. epidermidis*) a gramnegativní bakterie do červena (*E. coli*). Kvasinka *C. glabrata* byla rozpoznána díky větší velikosti. Bylo zjištěno, že v tomto médiu rostou všechny tři uvedené mikroorganismy, jak je znázorněno na obrázku 16.

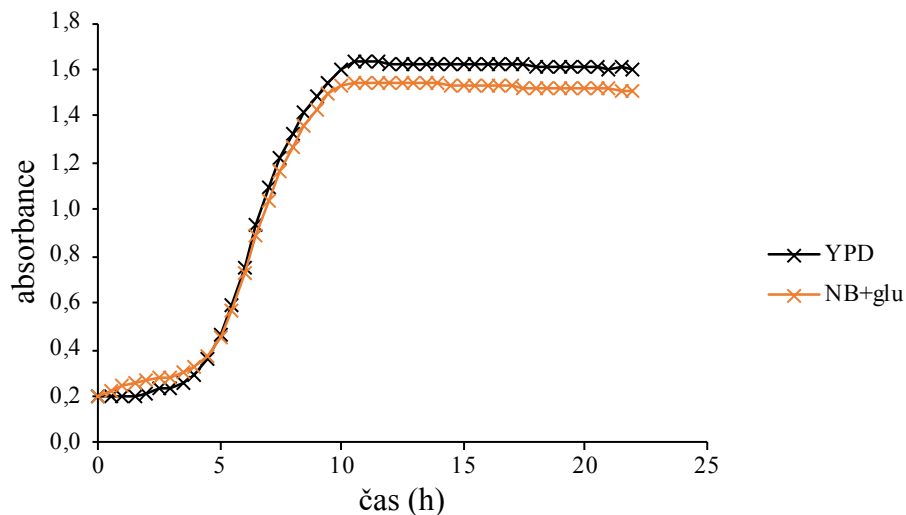


Obrázek 16: *C. glabrata*, *S. epidermidis* a *E. coli* pod optickým mikroskopem při sto násobném zvětšení

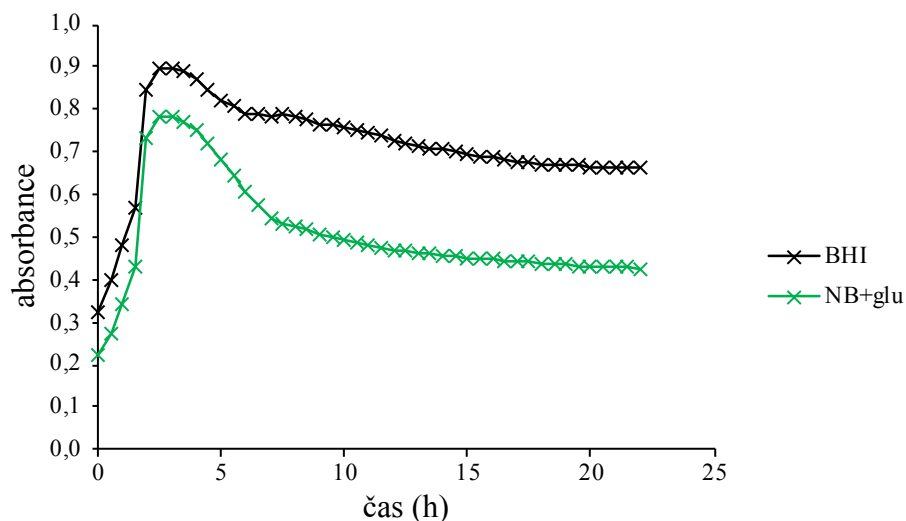
4.3 Růstové křivky

Růstové křivky byly proměřeny pro každý mikroorganismus v jeho specifickém živném médiu (YPD, BHI, LB) a v komplexním živném médiu NB obohacené o glukózu. Tyto růstové křivky byly porovnávány. Bylo zjištěno, že všechny mikroorganismy rostou v porovnání se svým specifickým živným médiem ve společném živném médiu přijatelně pro náš experiment.

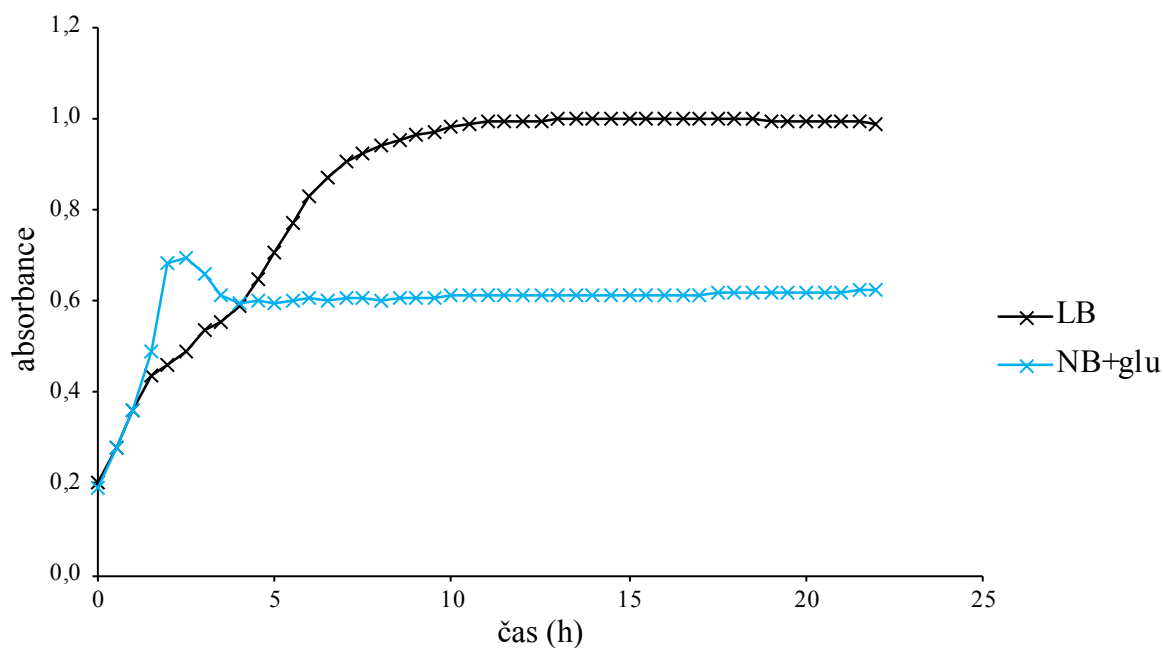
U kvasinky *C. glabrata* lze tvrdit, že jsou růstové křivky ve specifickém živném médiu YPD a ve společném komplexním živném médiu srovnatelné (viz Obr. 17). U bakterie *S. epidermidis* došlo k většímu poklesu počtu buněk (viz Obr. 18) ve společném živném médiu. Proto bylo při identifikaci mikroorganismů ve vzorku vždy *S. epidermidis* méně než bakterie *E. coli* nebo kvasinky *C. glabrata* (viz Obr. 16). U bakterie *E. coli* poté došlo k rychlejšímu nárůstu buněk ve společném živném médiu, ale nárůst byl celkově nižší než ve specifickém živném médiu LB (viz Obr. 19).



Obrázek 17: Porovnání růstových křivek kvasinky *C. glabrata* v YPD a NB obohacené o glukózu



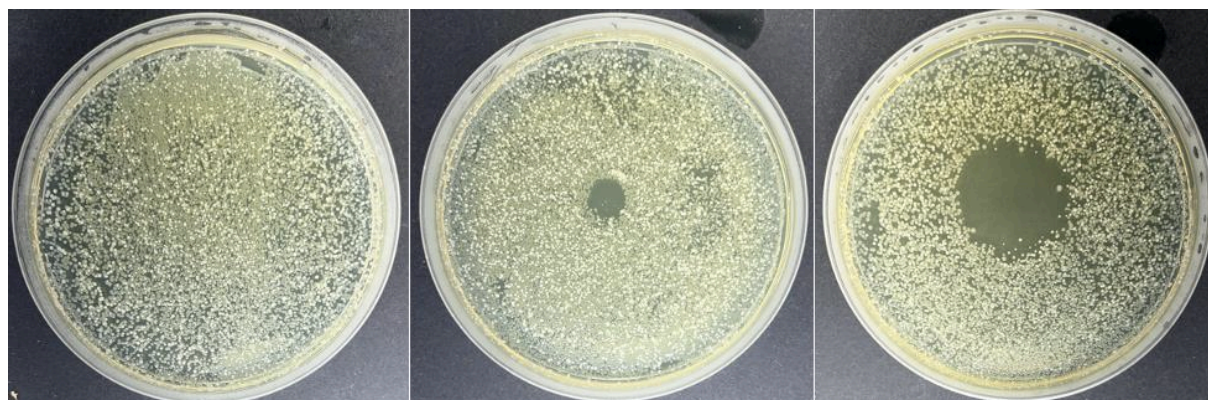
Obrázek 18: Porovnání růstových křivek bakterie *S. epidermidis* v BHI a NB obohacené o glukózu



Obrázek 19: Porovnání růstových křivek bakterie *E. coli* v LB a NB obohacené o glukózu

4.4 Přímé ošetření mikroorganismů na pevném živném médiu

Byl prokázán inhibiční účinek na jednotlivé mikroorganismy i na společné kultury, který se shoduje s trendy, které byly naměřeny v předešlých pracích [42, 63] při ošetření jednotlivých mikroorganismů na jejich optimálních živných médiích. Docházelo ke zvětšování inhibované plochy, respektive účinnosti inhibice s rostoucím časem ošetření pomocí nízkoteplotního mikrovlnného plazmatu. Stejný trend se ukázal i na společném živném médiu NB obohaceném o glukózu, jak pro jednotlivé mikroorganismy, tak i pro společné kultury (viz Obr. 20).

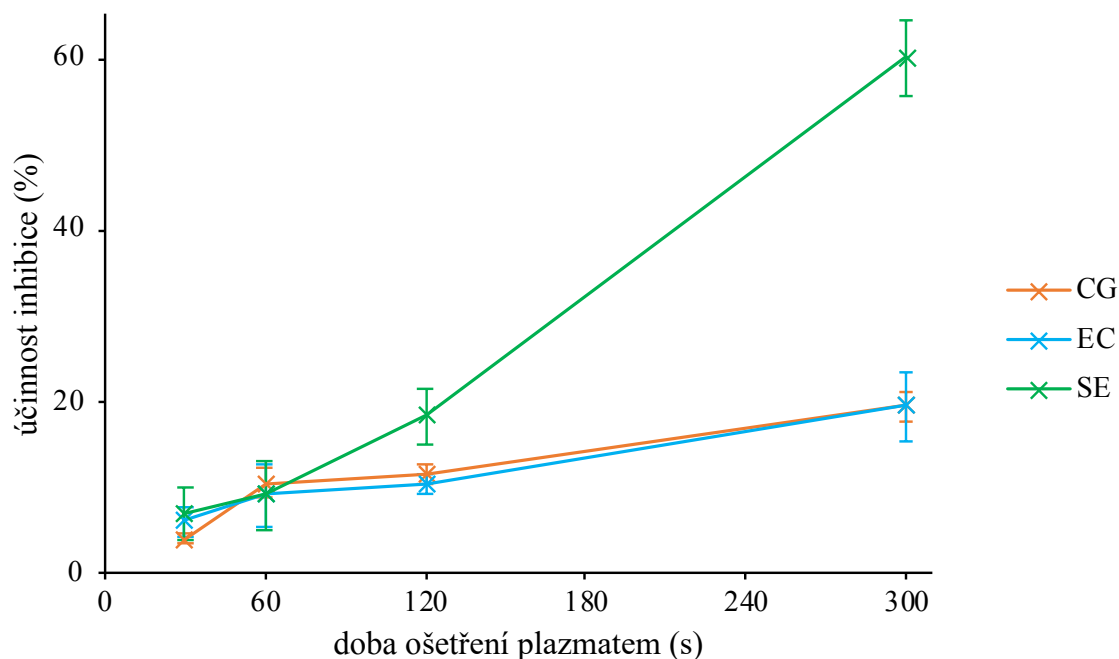


Obrázek 20: Inhibovaná plocha společné kultury *C. glabrata*, *E. coli* a *S. epidermidis* po ošetření plazmatem; zleva: 0 s (kontrola), 30 s, 300 s

Inhibiční účinek, který bude nadále diskutován je vztažen na plochu Petriho misky s průměrem 90 mm. Inhibiční účinek je vždy uváděn vůči kontrole.

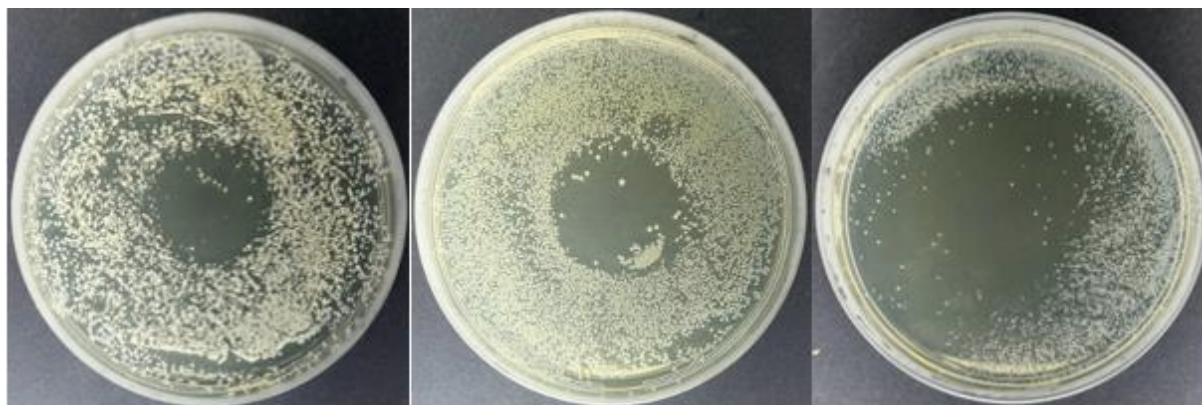
Inhibiční účinek na jednotlivé mikroorganismy byl největší při nejdelší době ošetření (5 min), dosáhl téměř 20 %, viz Obr. 21 (*C. glabrata*, *E. coli*).

Rozdílné bylo působení plazmatu na *S. epidermidis*, kde inhibiční účinek vzrostl až na 60 % (viz Obr. 21).



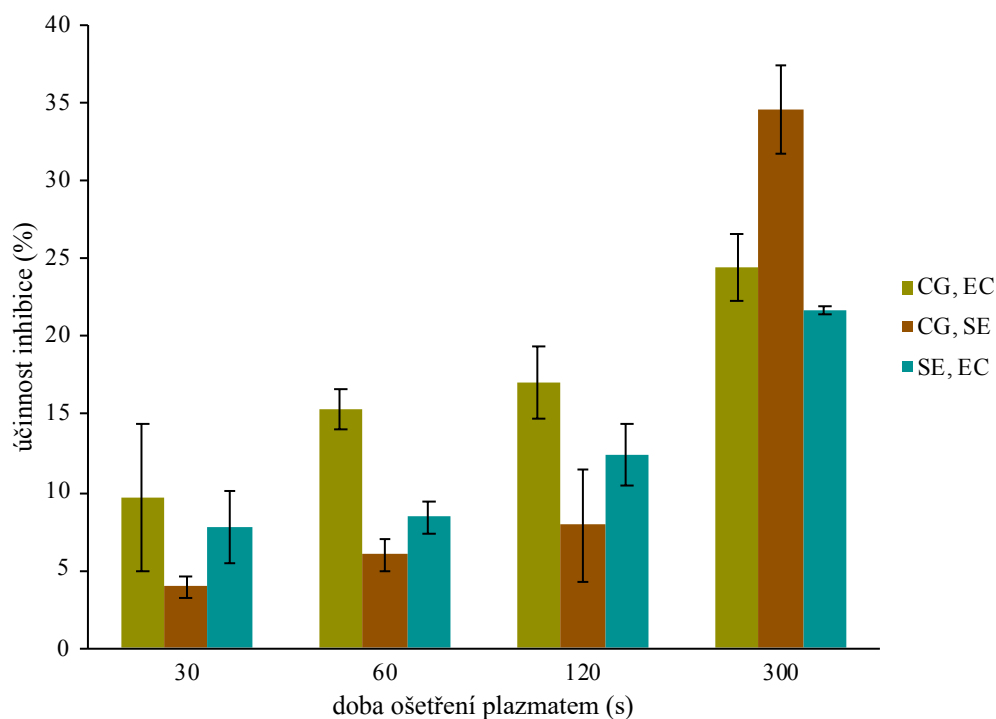
Obrázek 21: Účinnost inhibice nízkoteplotního plazmatu na jednotlivé mikroorganismy

Tento výsledek pro *S. epidermidis* odporuje tomu, že grampozitivní bakterie jsou vůči ošetření plazmatem odolnější [55, 56]. Důvodem může být vyšší náchylnost *S. epidermidis* na plazma v námi vybraném společném médiu NB obohacené o glukózu, ve kterém tato bakterie vykazovala menší růst než ve svém optimálním médiu (BHI) (viz Obr. 17). Mohla být tedy ve stresových podmínkách, čímž mohla klesat její odolnost, a proto došlo k takovému rozdílu inhibičního účinku od dvou zbylých mikroorganismů. Paralelně s touto diplomovou prací byla měřena i diplomová práce kolegyně Bc. Sarah Šrámkové [64], kde se na optimálním médiu (BHI) potvrdil trend, že jsou gramnegativní bakterie (na optimálním médiu LB) více náchylné na působení plazmatu než grampozitivní bakterie na svém optimálním médiu (BHI). Rozdílnost velikosti inhibované plochy plazmatem po 5 min ošetření pro všechny studované mikroorganismy lze vidět na obrázku 22.



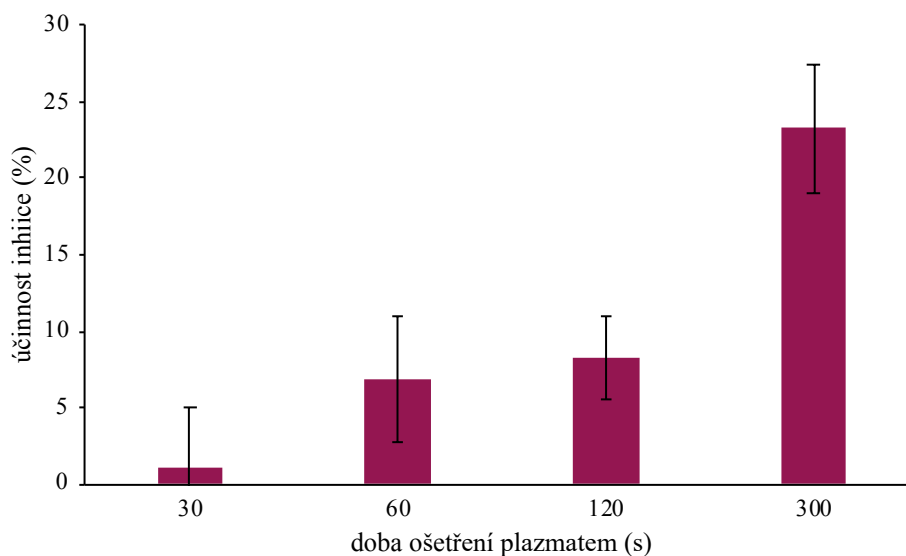
Obrázek 22: Inhibovaná plocha po 5 min ošetření plazmatem; zleva: *C. glabrata*, *E. coli*, *S. epidermidis*

V případě společných kultivací bakterií s kvasinkou se inhibiční účinek lehce zvýšil (v porovnání inhibičního účinku plazmatu na *E. coli* a *C. glabrata*). V případě společné kultivace bakterie *E. coli* a kvasinky *C. glabrata* je inhibiční účinek při nejdelší době ošetření plazmatem 24 %. U společné kultivace bakterie *S. epidermidis* a kvasinky *C. glabrata* inhibiční účinek dosahuje při nejdelší době ošetření plazmatem téměř 34 %. Při společné kultivace bakterie *S. epidermidis* a *E. coli* dosáhl inhibiční účinek plazmatu necelých 22 % (viz Obr. 23).



Obrázek 23: Účinnost inhibice nízkoteplotního plazmatu na společné kultury

Při ošetření všech tří studovaných mikroorganismů dosáhl inhibiční účinek při času ošetření 5 min 23 % (viz Obr. 24).



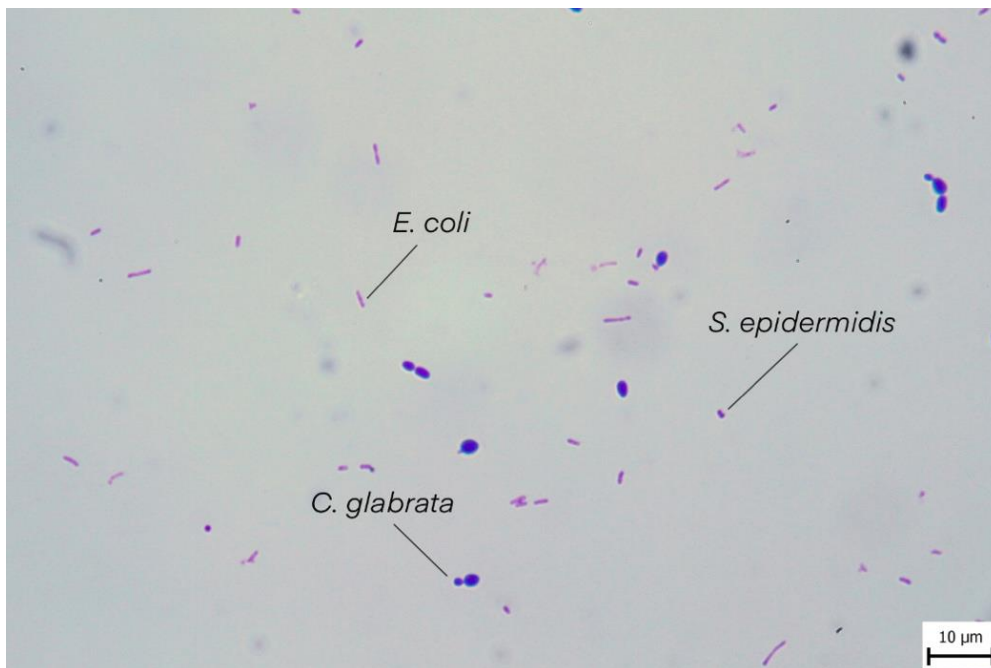
Obrázek 24: Účinnost inhibice nízkoteplotního plazmatu na společnou kulturu kvasinky *C. glabrata* a bakterií *S. epidermidis* a *E. coli* při různé době ošetření

Účinnost inhibice se tedy pohybovala u většiny vzorků kolem 20 % (výbojem se nepohybovalo, proto ani nelze dosáhnout 100% účinnosti), přičemž účinnost inhibice byla u společných kultur lehce vyšší. Výjimkou byla *S. epidermidis*, pro kterou zvolené médium není zcela ideální, kvůli čemuž byl inhibiční účinek až třikrát vyšší. Oslabení *S. epidermidis* vlivem média NB obohacené o glukózu mohlo následně vést k překročení limitu tolerance pro oxidativní stres při čase ošetření 5 minut, což může být důvodem tak vysokého inhibičního účinku oproti jiným kulturám. Vyšší účinnost inhibice se projevila také u společné kultivace kvasinky *C. glabrata* a *S. epidermidis*. Za rozdílnou účinností může stát několik faktorů, například kompetitivní chování mikroorganismů [65]. Nebo za tím může stát právě *S. epidermidis* a již zmíněné důvody, které se však tolik neprojeví u vzorků s *E. coli*, protože ta roste jako bakterie rychleji než kvasinka *C. glabrata* (využije tedy prostoru na úkor *S. epidermidis*). To může vést k tomu, že u vzorků, kde je se *S. epidermidis* i *E. coli* není pozorován takový rozdíl. Tato problematika však studována nebyla a může být předmětem dalšího výzkumu.

4.4.1 Identifikace mikroorganismů

Pokud na inhibované ploše došlo k nárůstu mikroorganismů, tak bylo pod optickým mikroskopem identifikováno, o jaký mikroorganismus se jedná. Bylo zjištěno, že při ošetření plazmatem nedochází k selektivnímu působení a dochází k inhibici všech studovaných

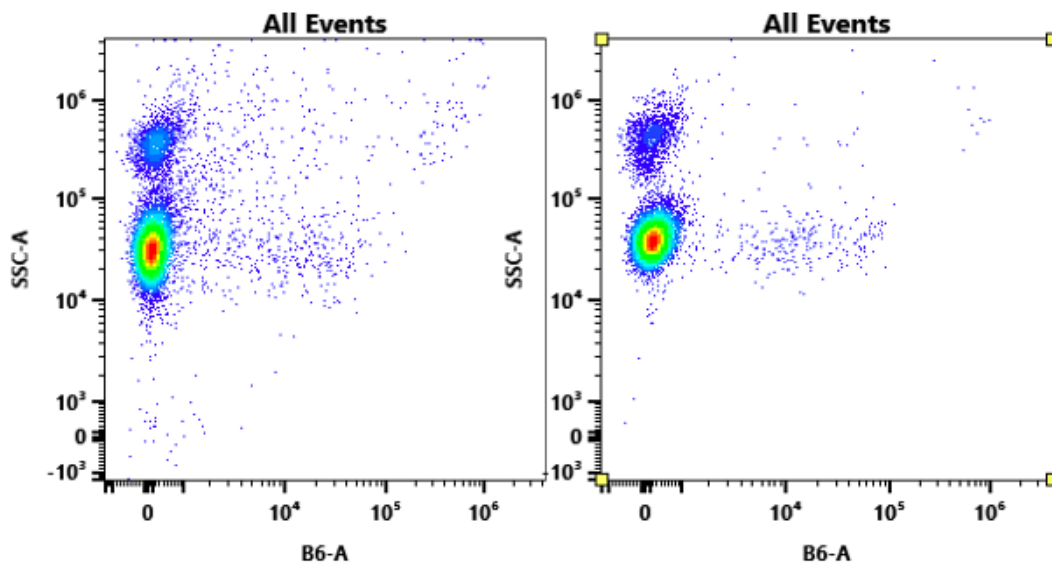
mikroorganismů. Při studované koncentraci mikroorganismů nebyla inhibice ošetřované plochy stoprocentní, takže v inhibované ploše byl pozorován výskyt jednotlivých kolonií. K nárůstu kolonií v inhibované ploše došlo i po ošetření 5 min, přičemž v inhibované ploše byl pozorován nárůst všech tří studovaných mikroorganismů (viz Obr. 25).



Obrázek 25: Identifikace živých mikroorganismů v inhibované ploše po 5 min ošetření plazmatem (po 24 h kultivaci)

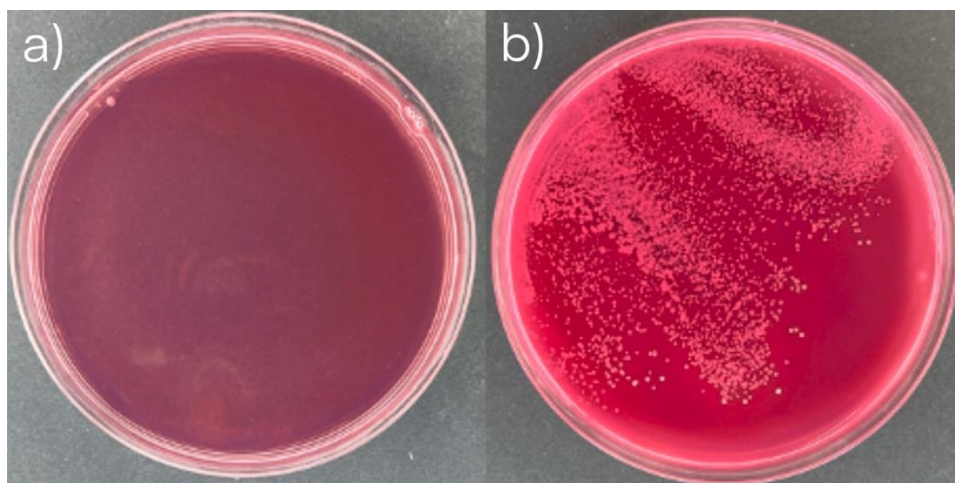
4.4.2 Určení viability mikroorganismů v inhibované ploše

Pro bližší pochopení interakce plazmatu s mikroorganismy bylo studováno, zda se ve vzorku odebraném z inhibované plochy nachází mikroorganismy usmrcené nebo inhibované plazmatem. Bylo zjištěno, že mikroorganismy nejsou usmrcené, ale jeví se živé. Realizováno to bylo pomocí průtokového cytometru, kde živá kontrola nevykazovala žádnou fluorescenci stejně jako měřený vzorek. Jev lze pozorovat na Obrázku 26. Tento fakt může být způsoben tím, že studované buňky jsou skutečně živé, nebo faktem, že nemají porušenou cytoplazmatickou membránu. Tím pádem by použitá fluorescenční sonda PI nemohla vnikat do buněk a vykazovat fluorescenci. Použití dalších fluorescenčních sond založených na jiných principech je perspektivou další práce. Z provedených experimentů můžeme tvrdit, že buňky, které jsou ošetřeny plazmatem ani po týdnu kultivace nerostou a nemnoží se, přičemž ale nemají porušenou buněčnou membránu.



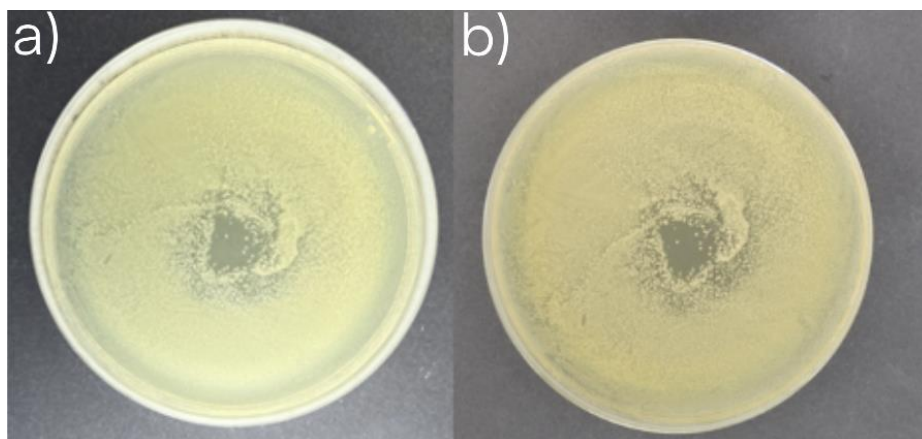
Obrázek 26: Cytogramy společné kultury *C. glabrata* a *E. coli* (po 24 h kultivaci); vlevo: vzorek odebraný z inhibované plochy po 5 min ošetření plazmatem, vpravo: živá kontrola (bez ošetření)

Abychom zjistili, zda jsou ošetřené mikroorganismy kultivovatelné, byla inhibovaná plocha kličkou naočkována na selektivní MacConkey agar (u vzorku s *E. coli*), kde bylo zjištěno, že mikroorganismus není nadále kultivovatelný, na rozdíl od kontroly (viz Obr. 27), kde byla kličkou naočkována kolonie *E. coli*, která se vyskytovala v inhibované oblasti.



Obrázek 27: Určení kultivovatelnosti *E. coli* (po 24 h kultivaci); a) vzorek odebraný z inhibované plochy po 5 min ošetření, b) kontrola

Dále bylo pozorováno, zda inhibovaná plocha plně zaroste, což se ani po týdenní kultivaci nepotvrdilo (u žádného z mikroorganismů). Uvedená inhibovaná plocha je pro vzorek s *E. coli* po 5 min ošetření plazmatem při vyšší koncentraci 10^6 CFU/ml (viz Obr. 28).



Obrázek 28: Inhibovaná plocha *E. coli* po 5 min ošetření plazmatem; a) po 24 h kultivaci, b) po týdenní kultivaci

4.5 Přímé ošetření mikroorganismů v suspenzi

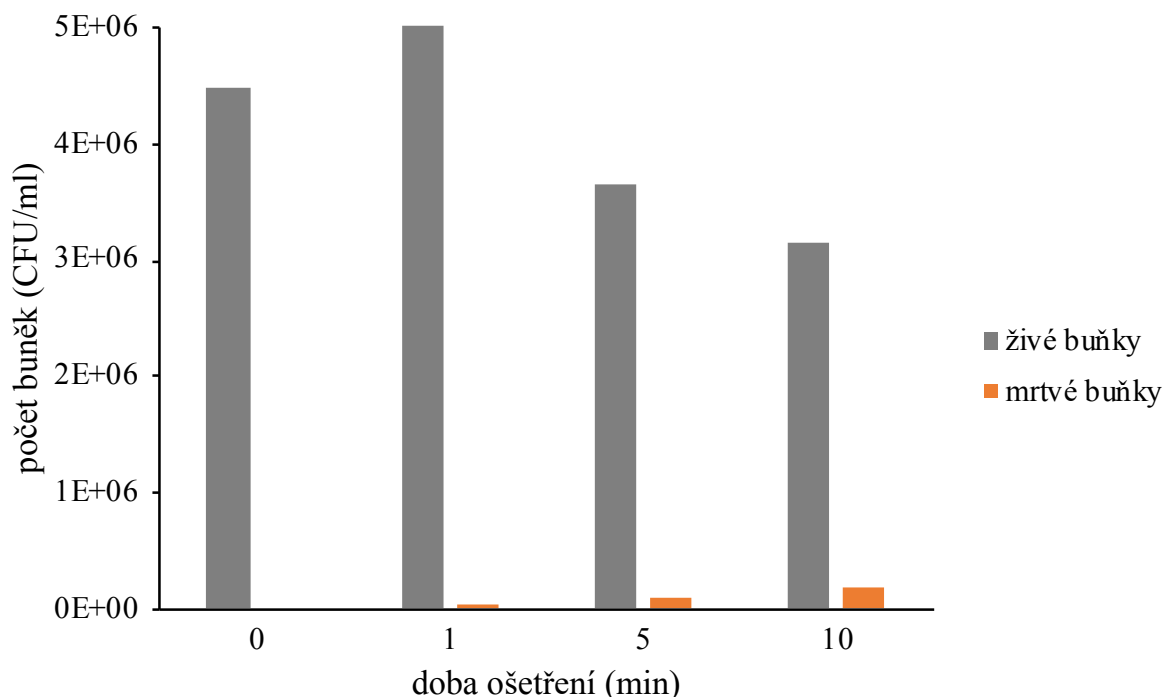
Mikroorganismy *C. glabrata*, *S. epidermidis* a *E. coli* byly jednotlivě ošetřeny plazmatem ve společném živném médiu NB obohaceném o glukózu a v PBS. Bylo zjištěno, že dochází k usmrcení buněk pomocí nízkoteplotního mikrovlnného plazmatu s povrchovou vlnou. Avšak tato účinnost je poměrně nízká, a to od jednotek procent po maximálně 16 % (při nejdelší době ošetření). Tato zjištění jsou v souladu s výše prokázanými výsledky, kdy za využití fluorescenční sondy PI, ve vzorku z inhibované plochy nebyly prokázány téměř žádné mrtvé buňky. Prodloužením doby ošetření na 10 minut a změnou uspořádání bylo dosaženo maximálně zmíněných 16 % usmrcených buněk. Z principu fungování sondy PI se jednalo o buňky, které měly poškozenou buněčnou membránu. Mohly to tedy být zejména buňky nekrotické, což je typ buněčné smrti, u které dochází k ruptuře membrány. Jak jsme však viděli výše, inhibované buňky nebylo možné za pomoci sondy PI vizualizovat, a tudíž skutečnou účinnost ošetření není možné posuzovat na základě těchto výsledků. Možností by bylo suspenze po ošetření naočkovat na agarové plotny a vyhodnotit je metodou počítání kolonií. Tento experiment však realizován nebyl z důvodu omezeného času, ale může být perspektivou další práce.

Jak lze vidět na schématu experimentálního zapojení (viz Obr. 11), tak křemenná kapilára je zanořena pod hladinu suspenze. Kvůli vysunutí křemenné kapiláry z rezonanční dutiny hoří výboj poměrně vysoko nad ošetřovanou suspenzí. Tím, že je křemenná kapilára zanořena pod hladinu suspenze, tak jediným plynem, který je kolem viditelného výboje je pracovní plyn – argon, čímž je vytvořena inertní atmosféra v křemenné kapiláře. Vzhledem k tomu nedochází

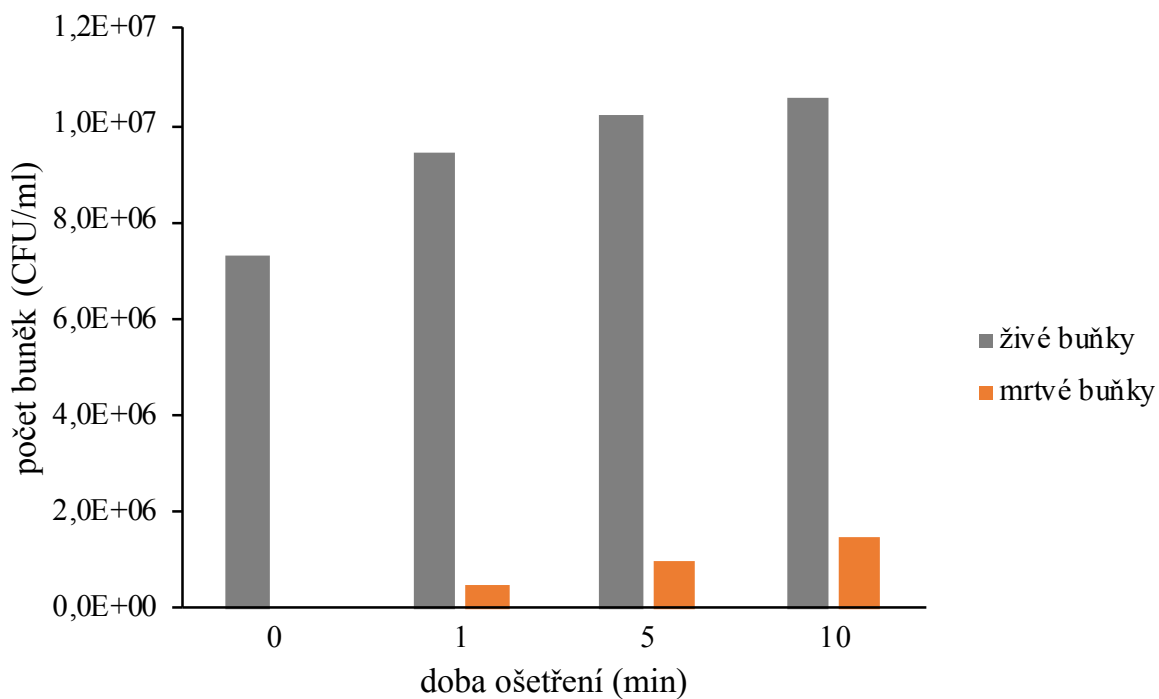
k přímému kontaktu viditelného výboje se vzduchem ani se suspenzí, a tak nedochází k přímé tvorbě RONS.

Pomocí elektrického výboje dochází ke vzniku různě excitovaných a jednou ionizovaných stavů argonu. Jedním z nich je metastabilní stav argonu, což je zvláštní excitovaný stav s dlouhou dobou života (až několik ms). Vzhledem k dlouhé době života metastabilního stavu argonu může docházet k jeho interakci s jinými částicemi v okolí (vzduch, voda, ...) a tvorbě RONS, kterých je ale méně, než když je výboj přímo v kontaktu s okolím obsahujícím kyslík nebo dusík. Tedy za usmrcením mikroorganismů v tomto případě stojí RONS produkované pouze pomocí metastabilního argonu [66, 67, 68]. Následně lze účinnost připisovat také působení elektrického pole, UV nebo VUV záření. Synergické působení všech zmíněných faktorů je pak zodpovědné za inhibiční vlastnosti plazmatu [1]. V této práci však nebyl studován jejich vliv jednotlivě, a proto nelze určit, který z faktorů se na inhibici podílí nejvíce. To však může být dalším předmětem studie.

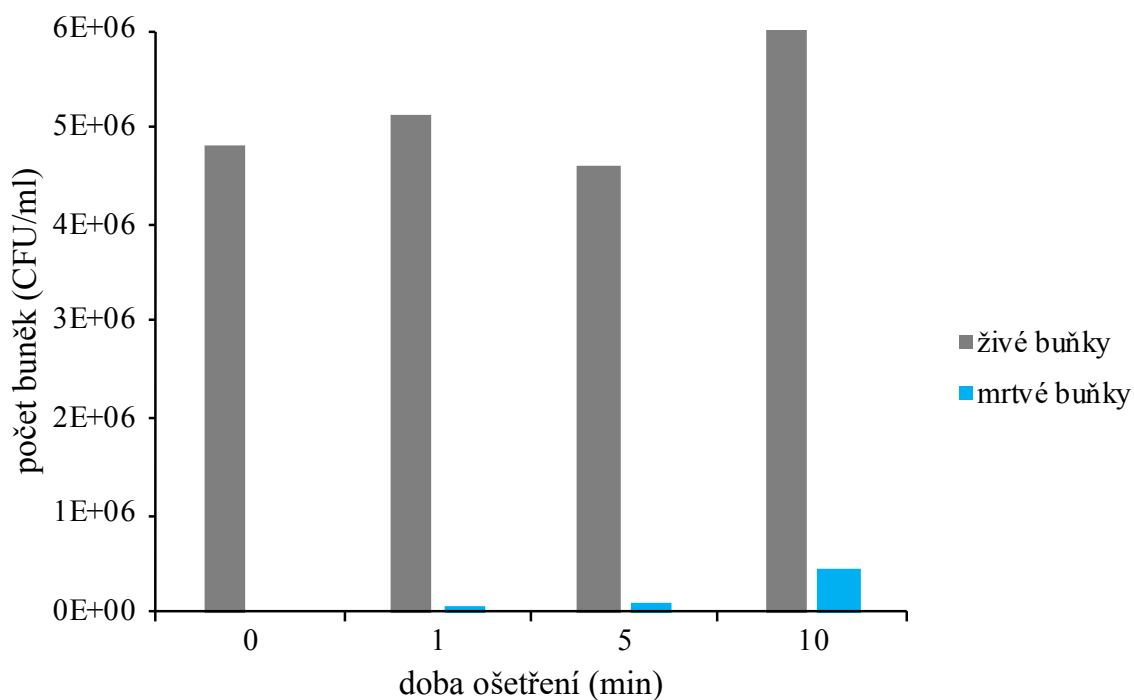
Účinnost usmrcení buněk lze pozorovat na následujících Obrázcích 29-34, kde je srovnání počtů mrtvých a živých buněk (v médiu i v PBS) při různé době ošetření plazmatem pro všechny studované mikroorganismy.



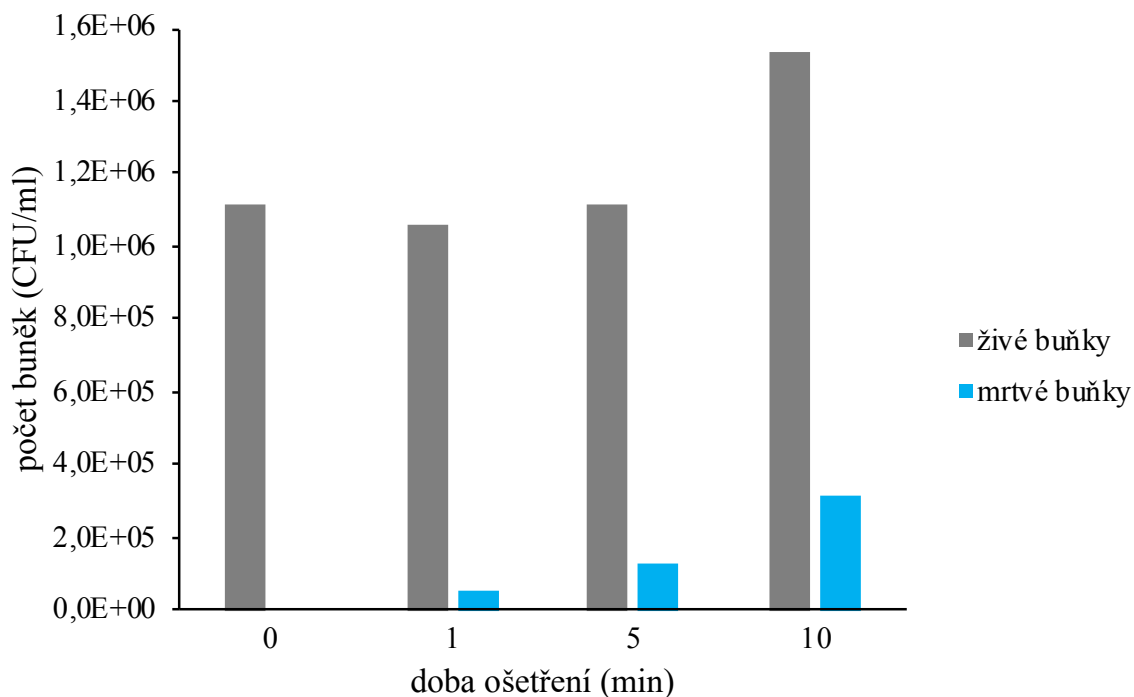
Obrázek 29: Živé a usmrcené buňky kvasinky *C. glabrata* v PBS po ošetření plazmatem při různé době ošetření



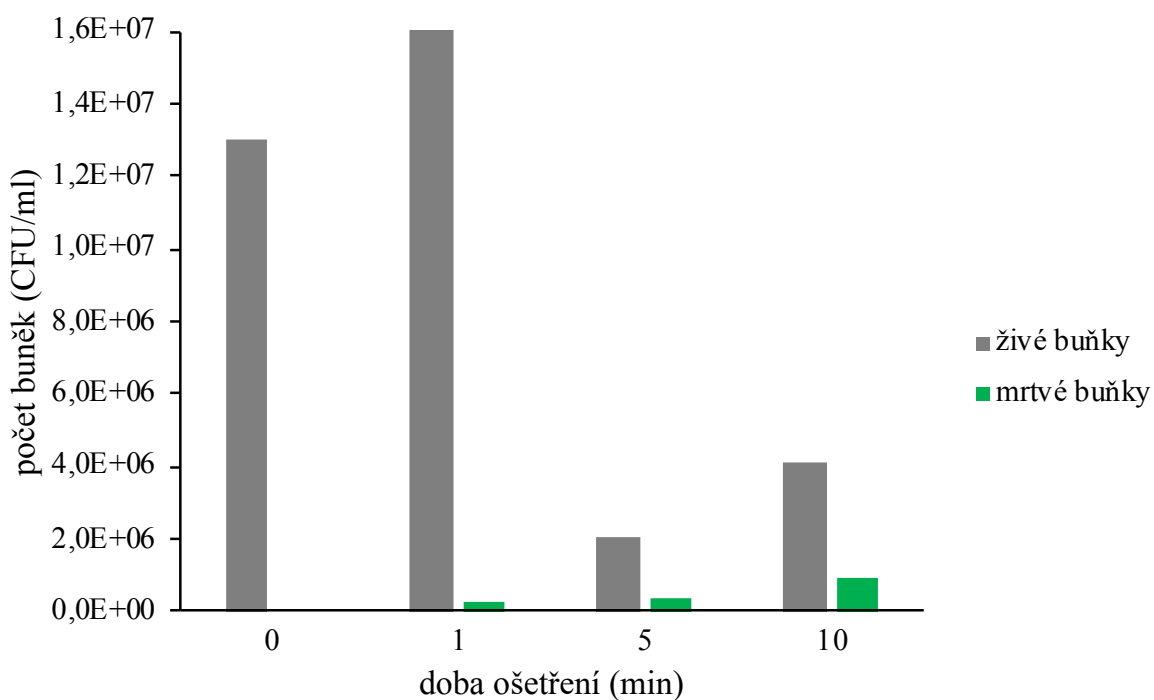
Obrázek 30: Živé a usmrcené buňky kvasinky *C. glabrata* v médiu po ošetření plazmatem při různé době ošetření



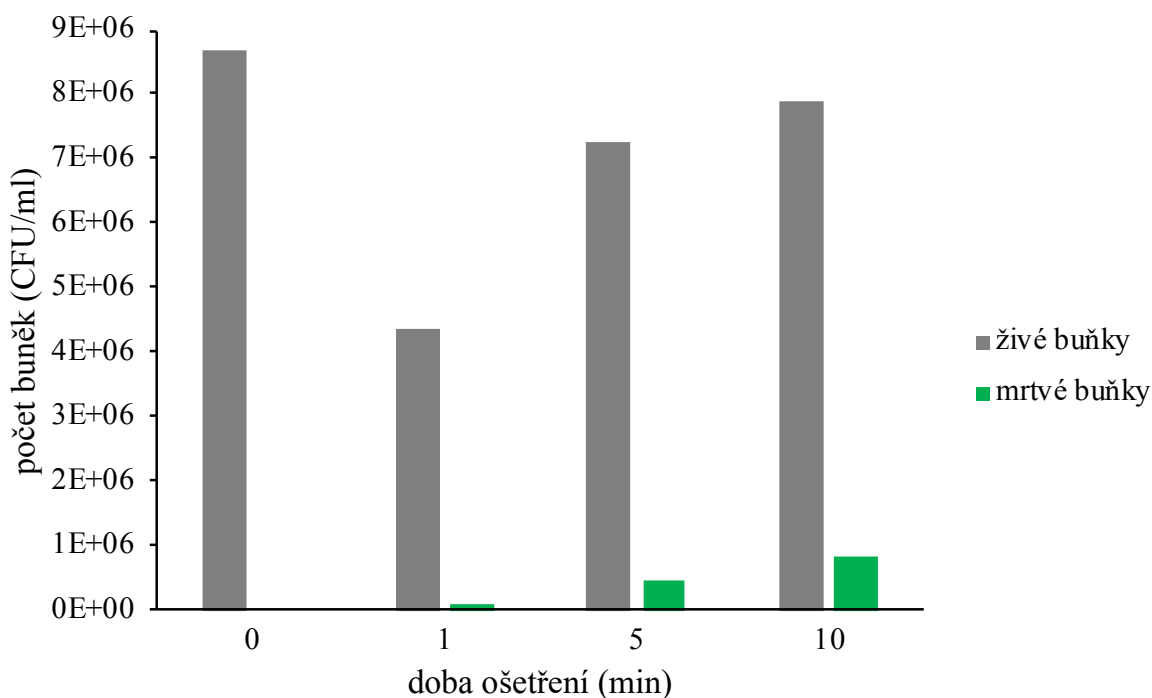
Obrázek 31: Živé a usmrcené buňky bakterie *E. coli* v PBS po ošetření plazmatem při různé době ošetření



Obrázek 32: Živé a usmrcené buňky bakterie *E. coli* v médiu po ošetření plazmatem při různé době ošetření

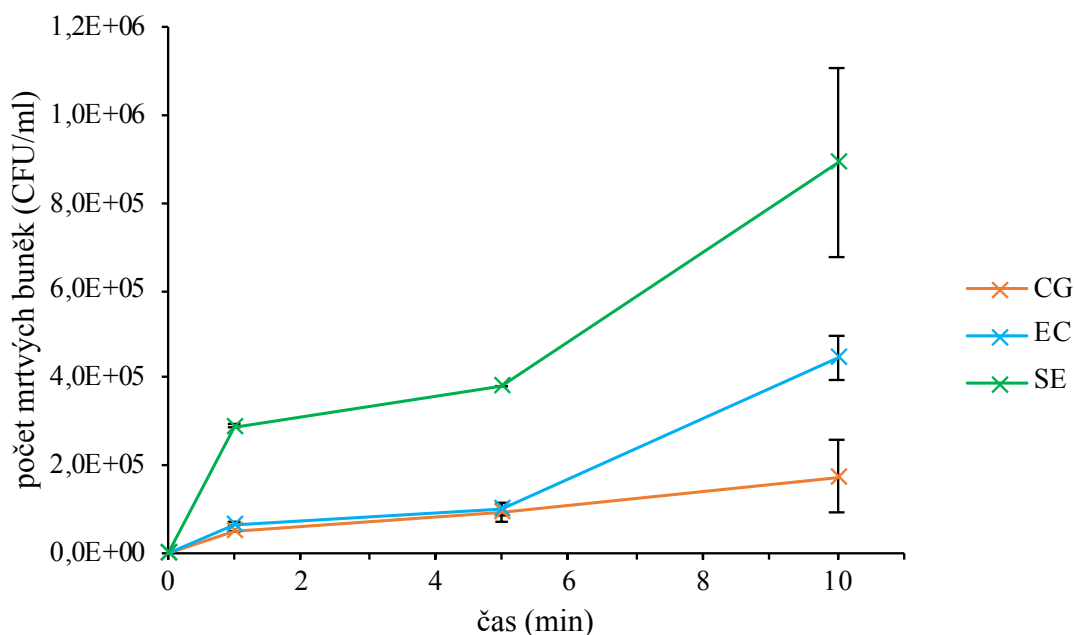


Obrázek 33: Živé a usmrcené buňky bakterie *S. epidermidis* v PBS po ošetření plazmatem při různé době ošetření

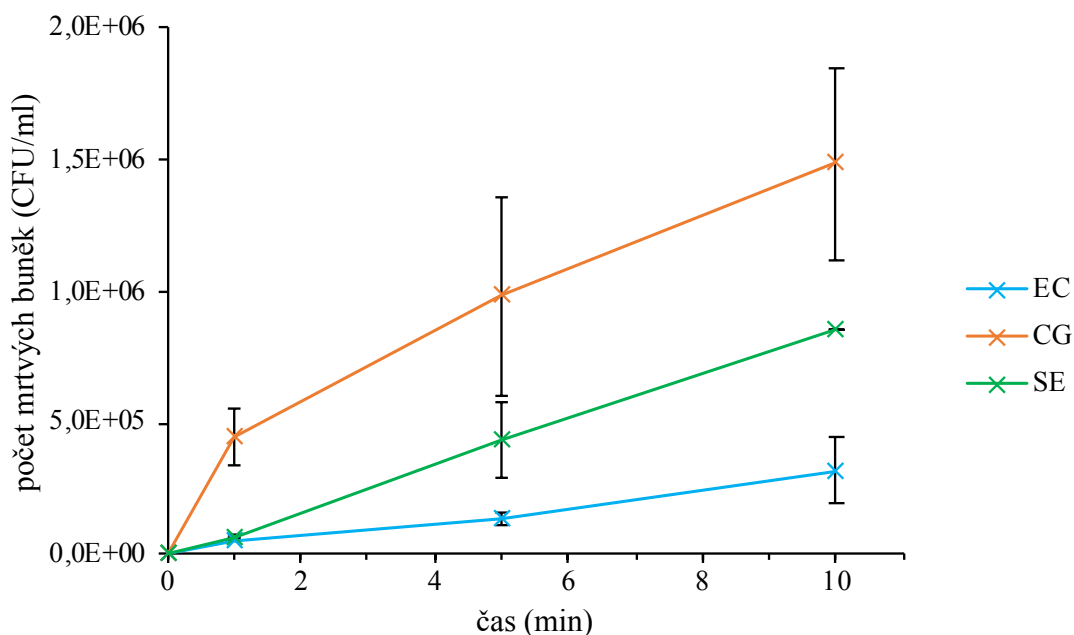


Obrázek 34: Živé a usmrcené buňky bakterie *S. epidermidis* v médiu po ošetření plazmatem při různé době ošetření

Účinnost inhibice pro všechny mikroorganismy je blíže zobrazena na Obrázku 35 a 36, kde můžeme u všech mikroorganismů pozorovat lehce vyšší účinnost v médiu než v PBS, za kterou je pravděpodobně zodpovědné jiné složení suspenze, a tedy i tvorba jiných reaktivních částic, které následně reagují s mikroorganismy a částicemi v suspenzi. Toto tvrzení však není podloženo a je v perspektivě následujících prací. Ze statistického hlediska mezi ošetřením v PBS a ošetřením v médiu není významný rozdíl jak u jednotlivých bakterií, tak u celkového přehledu. Pro bakterie *E. coli* ($p = 0,82$) a *S. epidermidis* ($p = 0,85$) byl rozdíl velice malý, u kvasinky *C. glabrata* bylo možné pozorovat větší rozdíl v naměřených datech ($p = 0,14$), což ale pořád není možné pokládat za statisticky významné. Celkově se tedy ošetření v PBS od ošetření v médiu významně neliší ($p = 0,24$). Účinnost inhibice na jednotlivé mikroorganismy je zde velice blízká a vždy stoupá s časem ošetření, což odpovídá tvrzením předchozích prací ohledně této problematiky, stejně jako tomu bylo u ošetření na pevném živném médiu [42, 63].

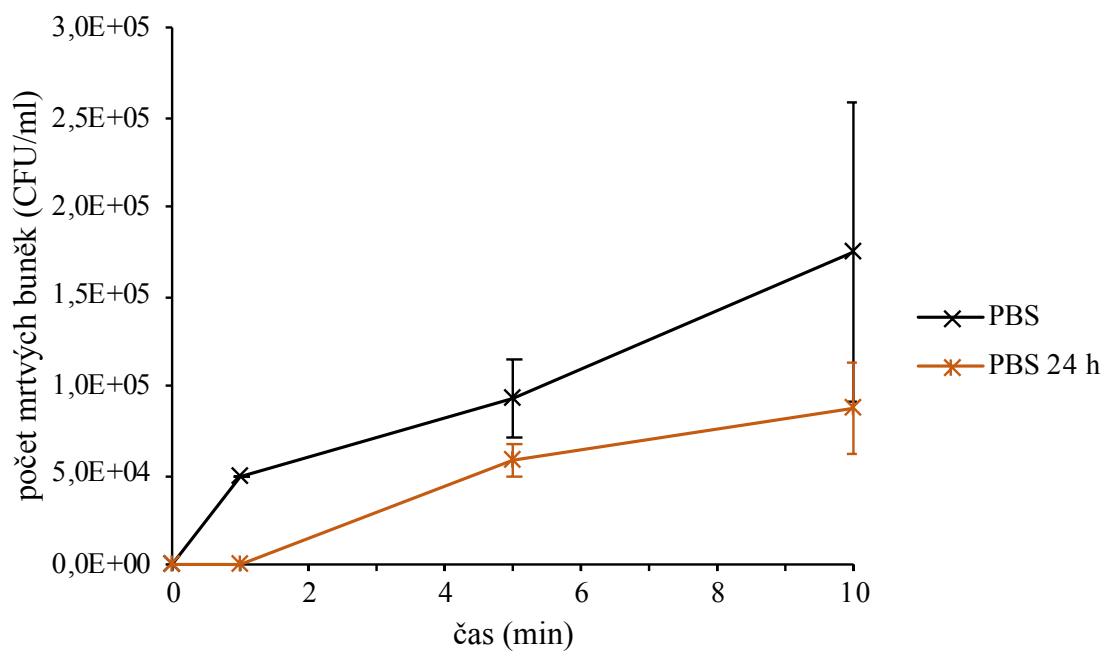


Obrázek 35: Počet mrtvých buněk v závislosti na různé době ošetření plazmatem (PBS)

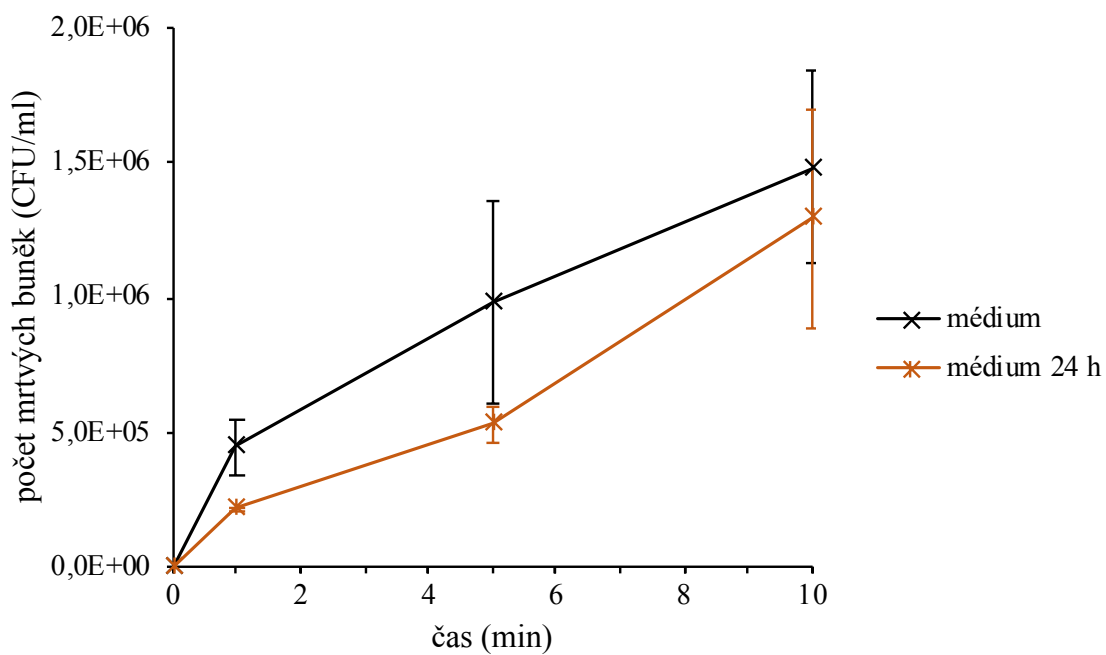


Obrázek 36: Počet mrtvých buněk v závislosti na různé době ošetření plazmatem (médiu)

Pokud bychom srovnali měření ihned po ošetření a po 24 hodinách, tak se neprojevuje žádný významný rozdíl v PBS ($p = 0,54$) ani v médiu ($p = 0,11$). Pokles mrtvých buněk byl nejspíše způsoben nárůstem živých, neporušených buněk. Není tedy prokázáno, že by docházelo k účinku reaktivních částic s dlouhou dobou života. Trend je u všech mikroorganismů stejný, pro příklad bude uvedeno měření s *C. glabrata* (viz Obr. 37, 38).



Obrázek 37: Počet mrtvých buněk *C. glabrata* ihned po ošetření a po 24 h při různé době ošetření plazmatem (PBS)



Obrázek 38: Počet mrtvých buněk *C. glabrata* ihned po ošetření a po 24 h při různé době ošetření plazmatem (médium)

5 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala studiem přímé aplikace nízkoteplotního mikrovlnného plazmatu v interakci s kvasinkami *C. glabrata* a bakteriemi *E. coli* a *S. epidermidis*. Byla studována inhibiční účinnost mikrovlnného výboje s povrchovou vlnou v suspenzi (v živném médiu NB obohacené o glukózu a v PBS) a na pevném živném médiu (rovněž NB obohacené o glukózu). Mikroorganismy byly ošetřovány jednotlivě a na pevném živném médiu byly ošetřovány i jejich společné kultury.

Pro účely této práce bylo nejdříve nutné najít vhodné živné médium, kde dojde k růstu všech tří studovaných mikroorganismů. Jako společné živné médium bylo zvoleno NB obohacené o glukózu. Růst mikroorganismů byl ověřen proměřením růstových křivek v tomto vybraném médiu a v optimálním médiu pro dané mikroorganismy (YPD pro *C. glabrata*, BHI pro *S. epidermidis* a LB pro *E. coli*). Výskyt všech tří mikroorganismů ve zvoleném médiu byl potvrzen pozorováním pod optickým mikroskopem za pomoci Gramova barvení.

Na pevném živném médiu NB obohacené o glukózu byly vzorky ošetřeny plazmatem po dobu 30 s, 60 s, 2 min a 5 min. Inhibiční účinek plazmatu byl vyhodnocován pomocí softwaru Aurora a je vztažen na plochu Petriho misky o průměru 90 mm. U všech studovaných časů byl prokázán inhibiční účinek plazmatu, jak pro jednotlivé mikroorganismy, tak i pro společné kultury. Nejvyšší inhibiční účinek byl pozorován u nejdelsí doby ošetření plazmatem (5 min) u všech studovaných vzorků. Bylo zjištěno, že inhibiční účinek se u většiny vzorků pohybuje kolem 20 % při nejdelsí době ošetření plazmatem. Při ošetření *S. epidermidis* byl zaznamenán inhibiční účinek až 60 %, nejspíše kvůli zvolenému médiu, které nebylo pro tuto bakterii zcela optimální. Toto oslabení mohlo následně vést k překročení limitu tolerance pro oxidativní stres při čase ošetření 5 minut. Vyšší inhibiční účinek byl také pozorován u společné kultury *C. glabrata* a *S. epidermidis*. Za rozdílnou účinností může stát několik faktorů, které nebyly studovány a mohou být předmětem další studie. Při studované koncentraci nebyla inhibice na ošetřované ploše stoprocentní a došlo v ní k nárůstu jednotlivých kolonií. Tyto kolonie byly pozorovány pod optickým mikroskopem pro to, aby se určilo, o jaké mikroorganismy se jedná a zda nedochází k selektivnímu působení plazmatu při společných kulturách. Selektivní účinek nebyl potvrzen, pod mikroskopem byly pozorovány všechny studované mikroorganismy. Na pevném živném médiu bylo, pro bližší pochopení interakce plazmatu s mikroorganismy, studováno také zda jsou buňky v inhibované oblasti usmrcené. Vzorek byl proměřen na průtokovém cytometru za pomoci fluorescenčního barviva PI. Měřený vzorek nevykazoval fluorescenci stejně jako živá kontrola, proto můžeme předpokládat, že mikroorganismy

v inhibované oblasti jsou živé. U vzorku z inhibované plochy bylo také určováno, zda jsou mikroorganismy stále kultivovatelné, přičemž bylo zjištěno, že inhibované mikroorganismy nadále kultivovatelné nejsou. Také bylo prokázáno, že i po týdenní kultivaci nedochází k zarůstání inhibované oblasti ani u jednoho ze studovaných vzorků.

Při ošetření jednotlivých mikroorganismů v suspenzi (PBS a živné médium NB obohacené o glukózu) pomocí nízkoteplotního plazmatu dochází k usmrcení jednotlivých mikroorganismů. Avšak tato účinnost je nízká. Důvodem je experimentální uspořádání. Vzhledem k zanoření kapiláry pod hladinu suspenze je jediným plynem okolo viditelného výboje argon (pracovní plyn). Za usmrcením mikroorganismů tedy stojí primárně RONS produkované pomocí metastabilního stavu argonu a také teplo, UV a VUV záření a elektrické pole. Pro zlepšení účinnosti by bylo vhodné jako pracovní plyn použít spolu s argonem také kyslík, aby docházelo k větší produkci reaktivních částic.

Co se týče perspektivy této práce, tak by bylo vhodné podrobněji prostudovat interakci plazmatu s mikroorganismy, což by mohlo být realizováno za použití jiných fluoroforů. Také by bylo vhodné k argonu (pracovní plyn) přidat i kyslík pro to, aby docházelo k větší účinnosti inhibice díky vyšší produkci reaktivních částic kyslíku. Dále by bylo dobré prověřit, zda by se při opakované expozici nezlepšil inhibiční účinek. A také k jaké účinnosti inhibice dochází v suspenzích po ošetření plazmatem, kdybychom vzorky poté naočkovaly na agarové ploty a účinnosti inhibice vyhodnotili metodou počítání kolonií.

Vzhledem k tomu, že mnohé konvenční metody, které se pro dekontaminační procesy využívají mají různá negativa, které jsou při určitých aplikacích nežádoucí, tak je využití plazmatu slibnou metodou. Rovněž na rozdíl od antibiotik nebyla prokázána a nepředpokládá se vznik rezistence mikroorganismů na tento typ ošetření, což je vzhledem k problematice rezistence na antibiotika nadějný přístup. Nicméně je důležité optimalizovat podmínky, aby se při co nejnižším času dosáhlo co nejvyšší inhibice.

6 SEZNAMY

6.1 Seznam použitých zkratek

AIDS = Acquired Immune Deficiency Syndrom = syndrom získaného imunodeficitu

ATP = adenosintrifosfát

BHI = Brain-Heart-Infusion

C. albicans = *Candida albicans*

C. glabrata = *Candida glabrata*

C. kefyr = *Candida kefyr*

C. krusei = *Candida krusei*

C. parapsilosis = *Candida parapsilosis*

C. rugosa = *Candida rugosa*

C. tropicalis = *Candida tropicalis*

CAP = cold atmospheric pressure plasma = studené plazma za atmosférického tlaku

CFU = colony-forming unit = jednotka tvořící kolonie

E. coli = *Escherichia coli*

EIEC = enteroinvazivní *Escherichia coli*

ETEC = enteroxigenní *Escherichia coli*

FSC = forward scatter channel

LB = Lennox Broth

MDA = malondialdehyd

MW = microwave = mikrovlnné

NAC = *non-albicans Candida*

NB = Nutrient Broth

P. gingivalis = *Porphyromonas gingivalis*

PBS = Phosphate-buffered saline = fosfátový pufr

PD = photodiode = fotodioda

PI = propidium jodid

PMT = Photomultiplier Tube = fotomultiplikační trubice

PTW = plasma treated water = plazmatem ošetřená voda

RONS = reactive oxygen nitrogen species = reaktivní částice kyslíku a dusíku

ROS = reactive oxygen species = reaktivní částice kyslíku

rpm = revolutions per minute = otáčky za minutu

S. cerevisiae = *Saccharomyces cerevisiae*

S. epidermidis = *Staphylococcus epidermidis*

Slm = standard liter per minute = standardní litr za minutu

SSC = side scatter channel

YPD = Yeast extract-Peptone-Dextrose

6.2 Seznam použitých obrázků

Obrázek 1: <i>Candida glabrata</i> pod elektronovým mikroskopem	11
Obrázek 2: <i>Staphylococcus epidermidis</i> pod elektronovým mikroskopem.....	13
Obrázek 3: <i>Escherichia coli</i> pod elektronovým mikroskopem.....	15
Obrázek 4: Fluidní systém	18
Obrázek 5: Rozptyl světla.....	19
Obrázek 6: Znázornění detekce záření v průtokovém cytometru	20
Obrázek 7: Mikrovlnný výboj generovaný povrchovou vlnou v argonu při výkonu 13 W a průtoku 2 Slm	23
Obrázek 8: Hojení ran pomocí nízkoteplotního atmosférického plazmatu	27
Obrázek 9: Schéma experimentálního zapojení.....	35
Obrázek 10: Ukázka aplikace plazmatu generovaného povrchovou vlnou na pevném živném médiu	36
Obrázek 11: Vyhodnocení pokrytí Petriho misky programem Aurora	37
Obrázek 12: Schéma experimentálního zapojení.....	39
Obrázek 13: Zanoření křemenné kapiláry s výbojem v argonu pod hladinu suspenze	39
Obrázek 14: Kalibrační křivka pro bakterii <i>S. epidermidis</i>	41
Obrázek 15: Kalibrační křivka pro bakterii <i>E. coli</i>	41
Obrázek 16: <i>C. glabrata</i> , <i>S. epidermidis</i> a <i>E. coli</i> pod optickým mikroskopem při sto násobném zvětšení	42
Obrázek 17: Porovnání růstových křivek kvasinky <i>C. glabrata</i> v YPD a NB obohacené o glukózu.....	43
Obrázek 18: Porovnání růstových křivek bakterie <i>S. epidermidis</i> v BHI a NB obohacené o glukózu.....	43
Obrázek 19: Porovnání růstových křivek bakterie <i>E. coli</i> v LB a NB obohacené o glukózu..	44
Obrázek 20: Inhibovaná plocha společné kultury <i>C. glabrata</i> , <i>E. coli</i> a <i>S. epidermidis</i> po ošetření plazmatem.....	44
Obrázek 21: Účinnost inhibice nízkoteplotního plazmatu na jednotlivé mikroorganismy	45
Obrázek 22: Inhibovaná plocha po 5 min ošetření plazmatem.....	46
Obrázek 23: Účinnost inhibice nízkoteplotního plazmatu na společné kultury.....	46

Obrázek 24: Účinnost inhibice nízkoteplotního plazmatu na společnou kulturu kvasinky <i>C. glabrata</i> a bakterií <i>S. epidermidis</i> a <i>E. coli</i> při různé době ošetření.....	47
Obrázek 25: Identifikace živých mikroorganismů v inhibované ploše po 5 min ošetření plazmatem.....	48
Obrázek 26:Cytogramy společné kultury <i>C. glabrata</i> a <i>E. coli</i>	49
Obrázek 27: Určení kultivovatelnosti <i>E. coli</i>	49
Obrázek 28: Inhibovaná plocha <i>E. coli</i>	50
Obrázek 29: Živé a usmrcené buňky kvasinky <i>C. glabrata</i> v PBS po ošetření plazmatem při různé době ošetření.....	51
Obrázek 30: Živé a usmrcené buňky kvasinky <i>C. glabrata</i> v médiu po ošetření plazmatem při různé době ošetření.....	52
Obrázek 31: Živé a usmrcené buňky bakterie <i>E. coli</i> v PBS po ošetření plazmatem při různé době ošetření	52
Obrázek 32: Živé a usmrcené buňky bakterie <i>E. coli</i> v médiu po ošetření plazmatem při různé době ošetření	53
Obrázek 33: Živé a usmrcené buňky bakterie <i>S. epidermidis</i> v PBS po ošetření plazmatem při různé době ošetření.....	53
Obrázek 34: Živé a usmrcené buňky bakterie <i>S. epidermidis</i> v médiu po ošetření plazmatem při různé době ošetření.....	54
Obrázek 35: Počet mrtvých buněk v závislosti na různé době ošetření plazmatem (PBS)	55
Obrázek 36: Počet mrtvých buněk v závislosti na různé době ošetření plazmatem (médiu)	55
Obrázek 37: Počet mrtvých buněk <i>C. glabrata</i> ihned po ošetření a po 24 h při různé době ošetření plazmatem (PBS)	56
Obrázek 38: Počet mrtvých buněk <i>C. glabrata</i> ihned po ošetření a po 24 h při různé době ošetření plazmatem (médiu).....	56

6.3 Seznam použité literatury

- [1] LAROUSSE, M., F. LEIPOLD, Ulrike LINDEQUIST, Klaus-Dieter WELTMANN a Thomas VON WOEDTKE. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure: generation and diagnostics. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2004, **233**(1-3), 81-86. ISSN 13873806. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijms.2003.11.016
- [2] KITAZAKI, S., K. KOGA, M. SHIRATANI a N. HAYASHI. Growth control of dry yeast using scalable atmospheric-pressure dielectric barrier discharge plasma irradiation. *Japanese Journal of Applied Physics* [online]. 2012, **51** [cit. 2023-02-18]. DOI: 10.1143/JJAP.51.11PJ02. ISSN 0021-4922. Dostupné z: <https://iopscience.iop.org/article/10.1143/JJAP.51.11PJ02>
- [3] FIDEL, P. L., J. A. VAZQUEZ a J. D. SOBEL. *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 1999, 12(1), 80-96 [cit. 2022-11-03]. DOI: 10.1128/CMR.12.1.80. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <https://cmr.asm.org/content/12/1/80>
- [4] RODRIGUES, C. F., S. SILVA a M. HENRIQUES. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. 2014, **33**(5), 673-688. ISSN 0934-9723. Dostupné z: doi:10.1007/s10096-013-2009-3
- [5] OTTO, Michael, S. SILVA a M. HENRIQUES. *Staphylococcus epidermidis* — the 'accidental' pathogen: a review of its features and resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 2009, **7**(8), 555-567. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro2182
- [6] BYRD, Allyson L., Yasmine BELKAID a Julia A. SEGRE. The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*. 2018, **16**(3), 143-155. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro.2017.157
- [7] GRICE, Elizabeth A., Heidi H. KONG, Sean CONLAN, et al. Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. *Science*. 2009, **324**(5931), 1190-1192. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1171700
- [8] ADAMCZYK, Katarzyna, Agnieszka A. GARNCARCZYK, Paweł P. ANTOŃCZAK, et al. The microbiome of the skin. *Dermatology Review*. 2018, **105**(2), 285-297. ISSN 0033-2526. Dostupné z: doi:10.5114/dr.2018.75584
- [9] *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. 10. 2013. ISSN 17406765. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1740676513000023>

- [10] LI, L., S. REDDING a A. DONGARI-BAGTZOGLOU. *Candida glabrata* , an Emerging Oral Opportunistic Pathogen. *Journal of Dental Research*. 2007, **86**(3), 204-215. ISSN 0022-0345. Dostupné z: doi:10.1177/154405910708600304
- [11] AHMAD, K. M., J. KOKOŠAR, X. GUO, Z. GU, O. P. ISHCHUK a J. PIŠKUR. Genome structure and dynamics of the yeast pathogen *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Research*. 2014, **14**(4), 529-535. ISSN 1567-1364. Dostupné z: doi:10.1111/1567-1364.12145
- [12] SILVA, Sónia, Melyssa NEGRI, Mariana HENRIQUES, Rosário OLIVEIRA, David W. WILLIAMS a Joana AZEREDO. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 2012, **36**(2), 288-305. ISSN 1574-6976. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x
- [13] FRÍAS-DE-LEÓN, María Guadalupe, Rigoberto HERNÁNDEZ-CASTRO, Esther CONDE-CUEVAS, et al. *Pharmaceutics*. 2021, **13**(10). ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics13101529
- [14] SARDI, J. C. O., L. SCORZONI, T. BERNARDI, A. M. FUSCO-ALMEIDA, M. J. S. MENDES GIANNINI a Joana AZEREDO. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*. 2013, **62**(1), 10-24. ISSN 0022-2615. Dostupné z: doi:10.1099/jmm.0.045054-0
- [15] PAPON, Nicolas, Vincent COURDAVAULT, Marc CLASTRE, Richard J. BENNETT a Joseph HEITMAN. Emerging and Emerged Pathogenic *Candida* Species: Beyond the *Candida albicans* Paradigm. *PLoS Pathogens*. 2013, **9**(9). ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1003550
- [16] LÓPEZ-MARTÍNEZ, Rubén. Candidosis, a new challenge. *Clinics in Dermatology*. 2010, **28**(2), 178-184. ISSN 0738081X. Dostupné z: doi:10.1016/j.clindermatol.2009.12.014
- [17] Namvar AE, Bastarahang S, Abbasi N, Ghehi GS, Farhadbakhtiarian S, Arezi P, Hosseini M, Baravati SZ, Jokar Z, Chermahin SG. Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review. *GMS Hyg Infect Control*. 2014 Sep 30;9(3):Doc23. doi: 10.3205/dgkh000243. PMID: 25285267; PMCID: PMC4184040.
- [18] Supragingival Microbes. *Atlas of Oral Microbiology*. Elsevier, 2015, 2015, 41-65. ISBN 9780128022344. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802234-4.00003-3

- [19] VUONG, Cuong a Michael OTTO. Staphylococcus epidermidis infections. *Microbes and Infection*. 2002, **4**(4), 481-489. ISSN 12864579. Dostupné z: doi:10.1016/S1286-4579(02)01563-0
- [20] Namvar AE, Bastarahang S, Abbasi N, Ghehi GS, Farhadbakhtiarian S, Arezi P, Hosseini M, Baravati SZ, Jokar Z, Chermahin SG. Clinical characteristics of Staphylococcus epidermidis: a systematic review. *GMS Hyg Infect Control*. 2014 Sep 30;9(3):Doc23. doi: 10.3205/dgkh000243. PMID: 25285267; PMCID: PMC4184040.
- [21] SABATÉ BRESCÓ, Marina, Llinos G. HARRIS, Keith THOMPSON, Barbara STANIC, Mario MORGENSTERN, Liam O'MAHONY, R. Geoff RICHARDS a T. Fintan MORIARTY. Pathogenic Mechanisms and Host Interactions in Staphylococcus epidermidis Device-Related Infection. *Frontiers in Microbiology*. 2017, **8**. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2017.01401
- [22] RAAD, Issam, Amin ALRAHWAN, Kenneth ROLSTON, Barbara STANIC, Mario MORGENSTERN, Liam O'MAHONY, R. Geoff RICHARDS a T. Fintan MORIARTY. Staphylococcus epidermidis: Emerging Resistance and Need for Alternative Agents. *Clinical Infectious Diseases*. 1998, **26**(5), 1182-1187. ISSN 1058-4838. Dostupné z: doi:10.1086/520285
- [23] LOWY, FRANKLIN D., Amin ALRAHWAN, Kenneth ROLSTON, Barbara STANIC, Mario MORGENSTERN, Liam O'MAHONY, R. Geoff RICHARDS a T. Fintan MORIARTY. Staphylococcus epidermidis Infections: Emerging Resistance and Need for Alternative Agents. *Annals of Internal Medicine*. 1983, **99**(6), 1182-1187. ISSN 0003-4819. Dostupné z: doi:10.7326/0003-4819-99-6-834
- [24] GOMES, Tânia A.T., Waldir P. ELIAS, Isabel C.A. SCALETSKY, Beatriz E.C. GUTH, Juliana F. RODRIGUES, Roxane M.F. PIAZZA, Luís C.S. FERREIRA a Marina B. MARTINEZ. Diarrheagenic Escherichia coli. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2016, **47**, 3-30. ISSN 15178382. Dostupné z: doi:10.1016/j.bjm.2016.10.015
- [25] MAINIL, Jacques. Escherichia coli virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2013, **152**(1-2), 2-12. ISSN 01652427. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetimm.2012.09.032
- [26] BASAVARAJU, M. a B.S. GUNASHREE. Escherichia coli: An Overview of Main Characteristics. *Escherichia coli [Working Title]*. IntechOpen, 2021, 2022-11-11. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.105508

- [27] Krishnakumar, Keerthana. (2016). COMPARITIVE STUDY ON DURABILITY PROPERTIES OF BACTERIAL CONCRETE. *International Research Journal of Engineering and Technology*. 03. 129-132.
- [28] NATARO, James P. a James B. KAPER. Diarrheagenic Escherichia coli. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998, **11**(1), 142-201. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.11.1.142
- [29] CROXEN, Matthew A. a B. Brett FINLAY. Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*. 2010, **8**(1), 26-38. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro2265
- [30] KAPER, James B., James P. NATARO a Harry L. T. MOBLEY. Pathogenic Escherichia coli. *Nature Reviews Microbiology*. 2004, **2**(2), 123-140. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro818]
- [31] ERB, A., T. STÜRMER, R. MARRE a H. BRENNER. Prevalence of antibiotic resistance in Escherichia coli: overview of geographical, temporal, and methodological variations. *Nature Reviews Microbiology*. 2007, **26**(2), 83-90. ISSN 0934-9723. Dostupné z: doi:10.1007/s10096-006-0248-2
- [32] ALLOCATI, Nerino, Michele MASULLI, Mikhail ALEXEYEV a Carmine DI ILIO. Escherichia coli in Europe: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2013, **10**(12), 6235-6254. ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph10126235
- [33] MCKINNON, Katherine M. Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology*. 2018, **120**(1). ISSN 1934-3671. Dostupné z: doi:10.1002/cpim.40
- [34] MACEY, Marion G. Flow cytometry: principles and applications. Totowa, N.J.: Humana Press, c2007. ISBN 1597454516.
- [35] ADAN, Aysun, Günel ALIZADA, Yağmur KIRAZ, Yusuf BARAN a Ayten NALBANT. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2017, **37**(2), 163-176. ISSN 0738-8551. Dostupné z: doi:10.3109/07388551.2015.1128876
- [36] ALVAREZ-BARRIENTOS, A., J. ARROYO, R. CANTON, C. NOMBELA a M. SANCHEZ-PEREZ. Applications of Flow Cytometry to Clinical Microbiology: basic principles and applications. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000, **13**(2), 167-195. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.13.2.167-195.2000
- [37] MARTIŠOVITŠ, V. *Základy fyziky plazmy: učebný text pre magisterské štúdium*. Bratislava: Vydavateľstvo UK, 2006. ISBN 80-223-1983-X.

- [38] KULHÁNEK, P. *Úvod do teorie plazmatu*. Praha: AGA, 2011. ISBN 978-80-904582-2-2.
- [39] SCHOLTZ, V., Nízкотеплотná plazma I: Čo je to. Aldebaran bulletin [online]. 2012(12) [cit. 2023-02-18]. Dostupné z: http://www.aldebaran.cz/bulletin/2012_22_pla.php
- [40] LEBEDEV, Yu A, Kati LANDSBERG, Ulrike LINDEQUIST, Klaus-Dieter WELTMANN a Thomas VON WOEDTKE. Microwave discharges: generation and diagnostics. *Journal of Physics: Conference Series*. 2010, **257**(9), 2479-2485. ISSN 1742-6596. Dostupné z: doi:10.1088/1742-6596/257/1/012016
- [41] TREBULOVÁ, Kristína, František KRČMA, Zdenka KOZÁKOVÁ, Petra MATOUŠKOVÁ a Thomas VON WOEDTKE. Impact of Microwave Plasma Torch on the Yeast *Candida glabrata*: generation and diagnostics. *Applied Sciences*. 2020, **10**(16), 81-86. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app10165538
- [42] Trebulová, K. Studium interakce plazmatu s kvasinkami *Candida glabrata*. Diplomová práce, Brno, 2022, p.
- [43] LAROUSSI, Mounir, Donghong LIU, Qisen XIANG, et al. Low-Temperature Plasma Jet for Biomedical Applications: A Review. *IEEE Transactions on Plasma Science*. 2015, **43**(3), 703-712. ISSN 0093-3813. Dostupné z: doi:10.1109/TPS.2015.2403307
- [44] Devins J.C., Rząd S.J., Schwabe R.J., *J. Appl. Phys.* 52 (7) (1981) 4531–4545.
- [45] VON WOEDTKE, T., S. EMMERT, H. R. METELMANN, S. RUPF a K. D. WELTMANN. Perspectives on cold atmospheric plasma (CAP) applications in medicine. *Physics of Plasmas*. 2020, **27**(7), 19-28. ISSN 1070-664X. Dostupné z: doi:10.1063/5.0008093
- [46] KOZÁKOVÁ, Zdenka. *Electric Discharges in Water Solutions*. Brno, 2011. Habilitation thesis. Vysoké učení technické v Brně.
- [47] XU, Hangbo, Cao FANG, Changsheng SHAO, Lamei LI a Qing HUANG. Study of the synergistic effect of singlet oxygen with other plasma-generated ROS in fungi inactivation during water disinfection. *Science of The Total Environment*. 2022, **838**. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2022.156576
- [48] SCHUSTER, Matthias, Rico RUTKOWSKI, Anna HAUSCHILD, et al. Side effects in cold plasma treatment of advanced oral cancer—Clinical data and biological interpretation. *Clinical Plasma Medicine*. 2018, **10**, 9-15. ISSN 22128166. Dostupné z: doi:10.1016/j.cpme.2018.04.001
- [49] DU, Mengru, Hangbo XU, Yupan ZHU, et al. A comparative study of the major antimicrobial agents against the yeast cells on the tissue model by helium and air surface micro-

discharge plasma. *AIP Advances*. 2020, **10**(2), 9-15. ISSN 2158-3226. Dostupné z: doi:10.1063/1.5110972

[50] GORBANEV, Yury, Deborah O'CONNELL, Victor CHECHIK, et al. Non-Thermal Plasma in Contact with Water: The Origin of Species. *Chemistry - A European Journal*. 2016, **22**(10), 3496-3505. ISSN 09476539. Dostupné z: doi:10.1002/chem.201503771

[51] BOGAERTS, Annemie, Maksudbek YUSUPOV, Jamoliddin RAZZOKOV, et al. Plasma for cancer treatment: How can RONS penetrate through the cell membrane? Answers from computer modeling. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*. 2019, **13**(2), 253-263. ISSN 2095-0179. Dostupné z: doi:10.1007/s11705-018-1786-8

[52] HEO, Ye Seul, Dong Gyun YIM, Ki Ho BAEK, et al. Effect of inkjet-printed flexible dielectric barrier discharge plasma on reduction of pathogen and quality changes on sliced cheese: How can RONS penetrate through the cell membrane? Answers from computer modeling. *LWT*. 2021, **143**(2), 253-263. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2021.111128

[53] ZHOU, Renwu, Rusen ZHOU, Karthika PRASAD, et al. Cold atmospheric plasma activated water as a prospective disinfectant: the crucial role of peroxyxynitrite. *Green Chemistry*. 2018, **20**(23), 5276-5284. ISSN 1463-9262. Dostupné z: doi:10.1039/C8GC02800A

[54] SOUŠKOVÁ, H., V. SCHOLTZ, J. JULÁK, L. KOMMOVÁ, D. SAVICKÁ a J. PAZLAROVÁ. The survival of micromycetes and yeasts under the low-temperature plasma generated in electrical discharge. *Folia Microbiologica*. 2011, **56**(1), 77-79. ISSN 0015-5632. Dostupné z: doi:10.1007/s12223-011-0005-5

[55] ERMOLAEVA, Svetlana A., Alexander F. VARFOLOMEEV, Marina Yu. CHERNUKHA, et al. Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds: the crucial role of peroxyxynitrite. *Journal of Medical Microbiology*. 2011, **60**(1), 75-83. ISSN 0022-2615. Dostupné z: doi:10.1099/jmm.0.020263-0

[56] LIAO, Xinyu, Donghong LIU, Qisen XIANG, et al. Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: A review. *Food Control*. 2017, **75**(1), 83-91. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2016.12.021

[57] POLČIC, P., Z. MACHALA, J. JULÁK, L. KOMMOVÁ, D. SAVICKÁ a J. PAZLAROVÁ. Effects of non-thermal plasma on yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, **22**(5), 77-79. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22052247

[58] VON WOEDTKE, Thomas, Steffen EMMERT, Hans-Robert METELMANN, Stefan RUPF a Klaus-Dieter WELTMANN. Perspectives on cold atmospheric plasma (CAP)

applications in medicine. *Physics of Plasmas*. 2020, **27**(7). ISSN 1070-664X. Dostupné z: doi:10.1063/5.0008093

[59] ZHOU, Wen, Xiuqing WANG a Xiaojing HUANG. Cold atmospheric pressure plasmas applications in dentistry. *Plasma Processes and Polymers*. 2022, **19**(8). ISSN 1612-8850.

Dostupné z: doi:10.1002/ppap.202200024

[60] GHERARDI, M., R. TONINI a V. COLOMBO. Plasma in Dentistry: Brief History and Current Status. *Trends in Biotechnology*. 2018, **36**(6), 583-585. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2017.06.009

[61] *Current Protocols in Microbiology*. 00. 2006. ISSN 1934-8525. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780471729259.mca03cs00>

[62] CROWLEY, Lisa C., Adrian P. SCOTT, Brooke J. MARFELL, Jeanne A. BOUGHABA, Grace CHOJNOWSKI a Nigel J. WATERHOUSE. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2016, **2016**(7). ISSN 1940-3402. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.prot087163

[63] ŠRÁMKOVÁ, Sarah. Studium interakce plazmatu s bakteriemi pro zvýšení podpory hojení ran. Brno, 2021. 40 s. Dostupné také z:

<https://www.vutbr.cz/studenti/zavprace/detail/131035>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce doc. Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.

[64] ŠRÁMKOVÁ, Sarah. Využití plazmatu a plazmatem aktivované vody pro podporu hojení ran. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/147866>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce doc. Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.

[65] GHOUL, M. a S. MITRI. The Ecology and Evolution of Microbial Competition. *Trends in Microbiology*. 2016, **24**(10), 833-845. ISSN 0966842X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tim.2016.06.011

[66] YOON, S.Y., K.-H. KIM, Y.J. SEOL, S.J. KIM, Byeongjun BAE, S.R. HUH a G.H. KIM. Effects of metastable species in helium and argon atmospheric pressure plasma jets (APPJs) on inactivation of periodontopathogenic bacteria. *Journal of the Korean Physical Society*. 2016, **68**(10), 1176-1191. ISSN 0374-4884. Dostupné z: doi:10.3938/jkps.68.1176

[67] YU, Q. S., C. HUANG, F.-H. HSIEH, H. HUFF, Y. DUAN, S.R. HUH a G. H. KIM. Bacterial inactivation using a low-temperature atmospheric plasma brush sustained with argon

gas. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2007, **80B**(1), 211-219. ISSN 15524973. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.30586

[68] TODOROVA, Y., E. BENOVA, P. MARINOVA, I. YOTINOV, T. BOGDANOV, Y. TOPALOVA a G. H. KIM. Non-Thermal Atmospheric Plasma for Microbial Decontamination and Removal of Hazardous Chemicals: An Overview in the Circular Economy Context with Data for Test Applications of Microwave Plasma Torch. *Processes*. 2022, **10**(3), 211-219. ISSN 2227-9717. Dostupné z: doi:10.3390/pr10030554