



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 ÚČINKŮ PLAZMOVÉ TRYSKY NA KVASINKY

STUDY OF PLASMA JET EFFECTS ON YEAST

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kristína Trebulová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. František Krčma, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1590/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Kristína Trebulová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **doc. RNDr. František Krčma, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Studium účinků plazmové trysky na kvasinky

Zadání bakalářské práce:

Cílem práce je studium vlivu studeného plazmatu generovaného za atmosférického tlaku na kvasinky, zejména s ohledem na jejich vitalitu. Dílčí úkoly jsou následující:

1. Prostudujte v současnosti používané systémy plazmových trysek pro biomedicínské aplikace
2. Nastudujte metody použitelné pro stanovení vitality kvasinek
3. Aplikujte na kvasinky plazmové jety za vybraných podmínek
4. Vyhodnoťte účinky plazmatu na vitalitu kvasinek

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

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

Kristína Trebulová
student(ka)

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

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Predmetom tejto bakalárskej práce je štúdium účinkov mikrovlnnej plazmovej trysky, pracujúcej na frekvencii 2,45 GHz, na kvasinku *Candida glabrata*. Mikrovlnná plazma je generovaná pomocou surfatronového rezonátora a pracovným plynom je čistý argón s konštantným prietokom 5 Slm. Vďaka veľkému počtu aktívnych častíc generovaných v nízкотеплотnej plazme sa tento druh plazmy stal veľmi populárnym, najmä kvôli svojim baktericídnym účinkom. Antimykotické účinky a mechanizmy inaktívácie húb plazmou však ešte stále nie sú úplne objasnené. Aj preto sú predmetom tejto štúdie antimykotické účinky nízкотеплотnej plazmy v podobe mikrovlnného výboja s modelovým príkladom kvasinky *Candida glabrata*. Podstatou štúdie je pozorovanie vplyvu počiatočnej koncentrácie buniek, veľkosti aplikovaného výkonu a doby ožarovania na výsledné inhibičné účinky.

Teoretická časť je zameraná na základné informácie týkajúce sa kvasinky *Candida glabrata*, jej patogenity, virulencie a infekčnosti. Ďalej je pozornosť upriamená na plazmu vo všeobecnosti, rôzne typy výbojov a ich aplikácie v potravinárskom a biomedicínskom priemysle.

Experimentálna časť sa zaoberá stanovením inaktivačných účinkov plazmy generovanej pomocou mikrovlnnej plazmovej trysky na kvasinku *Candida glabrata*. Stanovenie spočíva v aplikácii výboja na čerstvo naočkovanú kolóniu *Candida glabrata* na agarových platniach a pozorovaní inhibičných účinkov v podobe inhibičných zón vytvorených po následnej kultivácii.

Vďaka sľubným výsledkom, ktoré boli dokázané aj v tejto práci, má inhibícia kvasiniek mikrovlnným výbojom veľkú perspektívu pre ďalší vedecký výskum a možné zavedenie do procesu. Táto metóda je zaujímavá nie len vedecky, ale aj ekonomicky, keďže používaným nosným plynom je argón, ktorý je cenovo dostupnejší než hélium, a taktiež chladnejší než vzduch bežne používaný vo výbojoch za atmosférického tlaku ako napr. dielektrický bariérový výboj, tleci výboj alebo korónový výboj.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Candida glabrata, mikrovlnná plazmová tryska, nízкотеплотná plazma za atmosférického tlaku, inhibícia, inaktivačné účinky

ABSTRACT

The purpose of this work is to study the effects of a 2.45 GHz microwave plasma jet on the yeast *Candida glabrata*. The microwave plasma was generated by a surfatron resonator and as a working gas pure argon at constant flow rate 5 Slm was used. Thanks to a high number of active particles generated in a low temperature plasma, this type of plasma has become highly popular, especially thanks to its bactericidal effects. However, its antifungal effects and mechanisms of fungal inactivation have still not been fully understood. Therefore, the study focuses on the antimycotic effects of the low temperature plasma in a form of a microwave discharge on *Candida glabrata* as a model yeast example. The principal focus is on the measurement and evaluation of changes in inactivation effects caused by varying the initial concentration of *Candida glabrata* cells, applied power, and the exposure time.

The theoretical part presents the basic information concerning *Candida glabrata*, its pathogenicity, virulence and infectivity. Furthermore, plasma in general, various types of discharges and their applications in the food and biomedical industries are discussed.

The experimental part focalizes on the determination of the inactivating effects of the microwave plasma jet on the yeast *Candida glabrata*. The experiment consists of applying the discharge on a freshly inoculated colony of *Candida glabrata* on agar plates and observing inhibitory effects in the form of inhibitory zones formed after subsequent cultivation.

The inhibition of yeasts by the microwave discharge is interesting scientifically due to its promising results, which have also been proven in this work, but also economically, especially due to the use of argon. Argon as a carrier gas is much cheaper than helium and colder than common atmospheric pressure discharges in air such as DBDs, corona or glow discharges.

KEY WORDS

Candida glabrata, microwave plasma jet, cold temperature atmospheric pressure plasma, inhibition, inactivation properties

TREBULOVÁ, Kristína. *Studium účinků plazmové trysky na kvasinky*. Brno, 2020. 55 s. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123838>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce František Krčma.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovávala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť použitá na komerčné účely len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce.

.....

podpis študenta

POĎAKOVANIE

Na tomto mieste by som chcela poďakovať svojmu vedúcemu bakalárskej práce pánovi doc. RNDr. Františkovi Krčmovi, PhD. za jeho rady, pomoc, trpezlivosť, nadhľad a elán pri experimentoch a písaní práce a pani Petre Matouškovej, Ing., Ph.D. za jej čas, cenné rady a ústretovosť pri riešení bakalárskej práce.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČASŤ.....	9
2.1	<i>Candida glabrata</i>	9
2.1.1	Infekčnosť a dopad na ľudské zdravie	10
2.1.2	Patogenita a virulencia	11
2.1.2.1	Tvorba biofilmov	12
2.2	Plazma	13
2.2.1	Vznik plazmy	13
2.2.2	Vlastnosti plazmy	13
2.2.3	Druhy plazmových výbojov	14
2.2.3.1	Korónový výboj	14
2.2.3.2	Tlecí výboj	15
2.2.3.3	Oblúkový výboj	16
2.2.3.4	Dielektrické bariérové výboje a plazmová tryska.....	17
2.2.3.5	Iskové výboje.....	18
2.2.3.6	Mikrovlnný výboj	19
2.3	Aplikácie plazmy	19
2.3.1	Plazma v potravinárskom priemysle	19
2.3.2	Plazma v biomedicínskych aplikáciách.....	20
2.3.3	Anitimikrobiálne aktívne prvky plazmy	21
2.3.4	Plazma a kvasinky	21
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	22
3.1	Chemikálie, prístroje, a materiál.....	22
3.1.1	Chemikálie a materiál.....	22
3.1.2	Prístroje	22
3.2	Príprava vzoriek <i>Candida glabrata</i>	22
3.2.1	Príprava inokula	22
3.2.2	Kultivačné médium	22
3.2.3	Kultivácia kvasiniek.....	23
3.3	Ožarovanie pripravených vzoriek mikrovlnnou plazmovou tryskou	23

3.3.1	Zapojenie plazmovej trysky	23
3.3.2	Ožarovanie kvasiniek	25
3.3.3	Postup spracovania a vyhodnocovania výsledkov	25
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA	26
4.1	Výsledky	26
4.1.1.1	Vplyv doby ožarovania	26
4.1.1.2	Vplyv použitého výkonu	26
4.1.1.3	Vplyv počiatkovej koncentrácie buniek	31
4.1.2	Ožarovanie biofilmu	33
5	ZÁVER	34
6	ZOZNAMY	35
6.1	Zoznam použitých skratiek	35
6.2	Zoznam obrázkov	36
6.3	Zoznam použitej literatúry	38
7	PRÍLOHY	42

1 ÚVOD

Počas posledných desaťročí, kedy počet objavených druhov mikroorganizmov narastá a zvyšuje sa aj ich rezistencia na antibiotiká či antimykotiká, sa pozornosť vedy koncentrovala na nájdenie nových spôsobov inaktivácie nežiaducich mikroorganizmov. Tento problém viedol k zavedeniu nového interdisciplinárneho odboru plazmochémie, ktorý kombinuje fyziku, biológiu a chémiu pri skúmaní nových možností sterilizácie potravín, potravinárskych a medicínskych zariadení a nástrojov či liečení chorôb [1].

Plazmové technológie a ich aplikácie v potravinárskom a biomedicínskom priemysle sa stali jedným z najnovších trendov vo vedeckom výskume nášho storočia. Plazma použitá na vystavenie potravinám musí byť nerovnovážna s teplotou neutrálneho plynu okolo 20–50° C, aby sa zabránilo degradácii vitamínov, bielkovín a iných biologických a biologicky aktívnych látok. Teplotná hranica je veľmi striktno korigovaná aj v prípade biomedicínskych aplikácií, keďže pri liečbe dochádza k styku plazma – živé tkanivo, a tým pádom je potrebné zaručiť nenarušenie tkaniva [2]. Na druhej strane však musí byť používaný plyn dostatočne aktivovaný, čo znamená, že musí obsahovať vysokú koncentráciu častíc iniciujúcich mikrobiálnu inaktiváciu. Tieto podmienky môžu byť veľmi účinne naplnené nízkoteplotnou nerovnovážnou plazmou za atmosférického tlaku (Atmospheric pressure non-thermal plasma APNTP), kde neutrálna teplota plynu (teplota súvisiaca s kinetickým pohybom ťažkých častíc: atómov, molekúl a iónov) zostáva blízka okoliu, ale teplota voľných elektrónov zvyčajne dosahuje tisíce Kelvinov. Použitím bežných plynov, ako je vzduch alebo argón, je možné za veľmi krátku dobu produkovať reaktívne druhy kyslíka (Reactive oxygen species ROS) a dusíka (Reactive nitrogen species RNS), ale aj ozón, oxidy a peroxidy. Plazmy s elektrickým výbojom navyše účinne produkujú ultrafialové (UV) žiarenie v oblasti UVC a vákuové ultrafialové (VUV) žiarenie, ktoré majú silné antimikrobiálne účinky [3].

Zariadenia produkujúce takýto typ plazmy sú založené na typoch korónového výboja, dielektrického bariérového výboja, tlecieho výboja, plazmového lúča alebo nanosekundového pulzného výboja [4]. Zdrojom nízkoteplotnej plazmy môže byť aj výboj povrchovej vlny (Surface wave discharge SWD). Plazma je produkovaná elektromagnetickou vlnou, ktorá sa pohybuje pozdĺž rozhrania plazmy a dielektrika. V mikrovlnnom výboji má plazma vyššiu elektrónovú teplotu než plazma získaná jednosmerným a vysokofrekvenčným výbojom. Vďaka vysokej teplote elektrónov je aj vyššie percento ionizovaných častíc, čo sa odzrkadľuje na širokom spektre využití tohto typu výboja [5].

V potravinárskom priemysle sa plazma využíva najmä na sterilizáciu zariadení a nástrojov a vedú sa štúdie o možnej aplikácii plazmy v oblasti sterilizácie ovocia a ovocných štiav, najmä vďaka dokázanému neporušeniu vitamínov a aktívnych látok [6]. V biomedicínskych aplikáciách je plazma využívaná taktiež na sterilizáciu zariadení a nástrojov, ale vo fáze výskumu je aj možné liečenie kožných chorôb, rakoviny či povrchových zranení [2, 7].

2 TEORETICKÁ ČASŤ

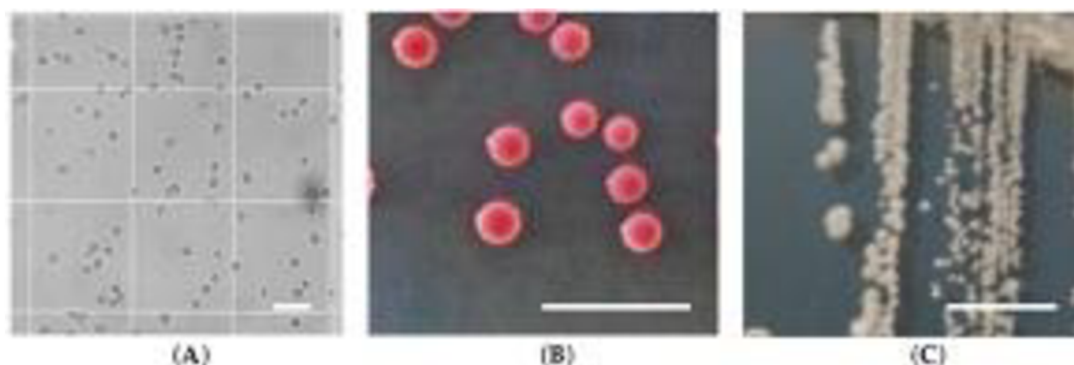
2.1 *Candida glabrata*

Candida glabrata, predtým známa ako *Torulopsis glabrata*, kontrastuje s inými druhmi *Candida* vo svojej nedimorfnej morfológii blastokonvencie a haploidnom genóme. *Candida glabrata* spolu s inými druhmi rodu *Candida* patrí do triedy *Fungi Imperfecti*, rádu *Moniliales* a čeľadi *Cryptococcaceae*. *Candida glabrata* je radená medzi nedimorfne kvasinky, ktoré existujú ako malé blastokonídie. V skutočnosti je *Candida glabrata* jediným druhom rodu *Candida*, ktorý pri teplotách nad 37 °C netvorí *pseudohyphae*. Rozhodujúcou charakteristickou črtou *Candida glabrata* je jej haploidný genóm, na rozdiel od diploidného genómu *Candida albicans*, s ktorou je najčastejšie zrovnávaná. Zaujímavé je, že *Candida glabrata* je geneticky príbuznejšia s pekárskymi kvasinkami (*Saccharomyces cerevisiae*) ako s *Candidou albicans* alebo *Candidou parapsilosis*. Väčšina druhov kvasiniek, ktoré úzko súvisia s *Candidou glabrata*, nie je spojená s ľuďmi, ale nachádza sa v rastlinách a pôde [8].

Candida glabrata sa nachádza v ľudskom tele ako súčasť prirodzenej mikroflóry. Môže byť prítomná v gastrointestinálnom trakte, ústach či genitálnej oblasti. *Candida glabrata* je u zdravých ľudí zvyčajne dobre kontrolovaná alebo neškodná. U ľudí s potlačeným imunitným systémom sa však môže stať problémom. Ohrození sú najmä hospitalizovaní pacienti, ľudia s HIV, ľudia liečení na rakovinu a ľudia, ktorým boli transplantované orgány [1].

Až donedávna bola *Candida glabrata* považovaná za relatívne nepatogénny fungálny organizmus ľudských slizničných tkanív. Avšak so zvýšeným používaním imunosupresív (látok potlačujúcich funkciu imunitného systému) sa mukozálne a systémové infekcie spôsobené *Candidou glabrata* významne zvýšili, najmä v populácii infikovanej vírusom ľudskej imunodeficiencie (HIV – human immunodeficiency virus). Hlavnou prekážkou pri infekciách spôsobených *Candidou glabrata* je ich vrodenej rezistencia na azolovú antimykotickú liečbu, ktorá je veľmi účinná pri liečbe infekcií spôsobených inými druhmi rodu *Candida*. Ďalším faktorom jej vysokej odolnosti je schopnosť rýchlej adaptácie sa na stresové podmienky. *Candida glabrata* je v súčasnosti na druhom alebo treťom mieste svetového rebríčka ako pôvodca povrchových (orálnych, pažerákových, vaginálnych, močových) alebo systémových kandidových infekcií. Infekcie spôsobené *Candidou glabrata* sú zodpovedné za vysokú mieru úmrtnosti ohrozených hospitalizovaných pacientov. Hrozbu teda predstavuje najmä v nemocničných zariadeniach [8].

Príznaky najbežnejších typov infekcie *Candida glabrata* sa najčastejšie vyskytujú v podobných oblastiach tela ako infekcie zapríčinené ostatnými druhmi rodu *Candida*. Infekcie vyvolané *Candidou glabrata* ovplyvňujú najmä močový trakt, ktorý vedie z močovej trubice do močového mechúra a obličiek, genitálie, ústa a krvné riečisko [1].



Obrázok 1: Bunky *Candida glabrata*: (A) mikroskopická štruktúra; (B) *Candida glabrata* na CHROMagar™; (C) *Candida glabrata* na agare Sabouraud dextróza. Stupnica zodpovedá 5 μm [9]

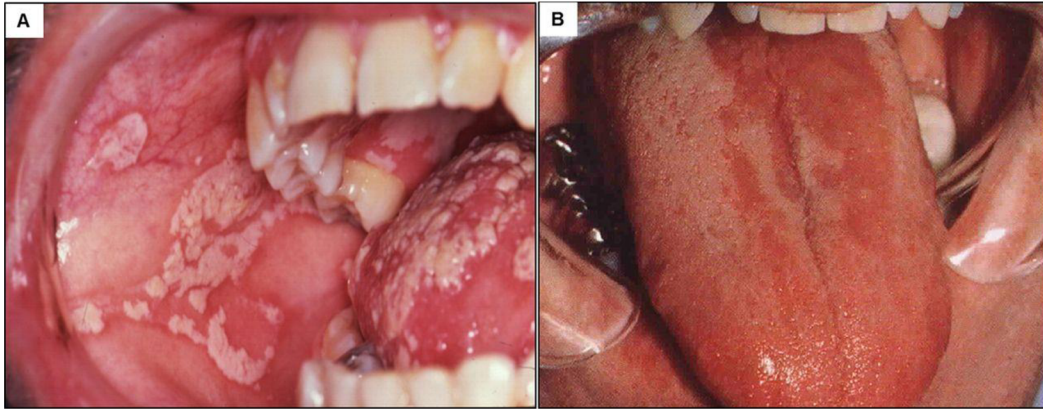
2.1.1 Infekčnosť a dopad na ľudské zdravie

Infekcie spôsobené kvasinkami rodu *Candida* sa nazývajú kandidózy. Existujú 3 základné typy týchto infekcií:

- 1) invazívna kandidóza je infekcia v ľudskom tele, ktorá môže ovplyvniť vnútorné orgány alebo iné časti ľudského tela;
- 2) fungémia je prítomnosť kvasiniek alebo húb v krvi. Najbežnejším typom tejto infekcie je kandidóza, keď sa v krvi nachádzajú kvasinky rodu *Candida*. Kandidémia je jednou z najbežnejších príčin infekcií krvného riečiska u ľudí v nemocnici;
- 3) akútna hematogénna kandidóza je infekcia, ktorá sa šíri krvným riečiskom do ďalších orgánov v tele. Napríklad šírenie *Candidy* krvou až do mozgu môže viesť k meningitíde [10].

Kvasinky rodu *Candida* môžu spôsobiť infekcie vagíny a penisu. *Candida glabrata* často spôsobuje komplikovanejšie infekcie, ktoré môžu byť ťažko liečiteľné. Isté množstvo kvasiniek rodu *Candida* v genitálnej oblasti je normálne a vyvážené baktériami rodu *Lactobacillus*, ktoré sa prirodzene vyskytujú aj v tejto časti tela. Keď sa však hladina laktobacilov nejakým spôsobom zmení, respektíve zníži, môžu kvasinky rodu *Candida* prerastať a spôsobiť infekciu. Infekciu genitálií spôsobenú kvasinkami rodu *Candida* je možno získať aj po určitých sexuálnych aktivitách, najmä pri tých, ktoré sa týkajú orálno-genitálneho kontaktu [1, 10].

Napriek tomu, že sú kvasinky rodu *Candida* normálnou súčasťou mikroflóry v ústach, môžu spôsobiť jej infekcie, ak ich koncentrácia prerastie. Infekcia nemusí byť obmedzená iba na ústa. Orálna kandidóza sa môže rozšíriť na mandle a chrbát hrdla. Ťažké infekcie sa môžu rozšíriť až do pažeráka [1, 11].



Obrázok 2: Orálna kandidóza v pokročilom štádiu [13]

2.1.2 Patogenita a virulencia

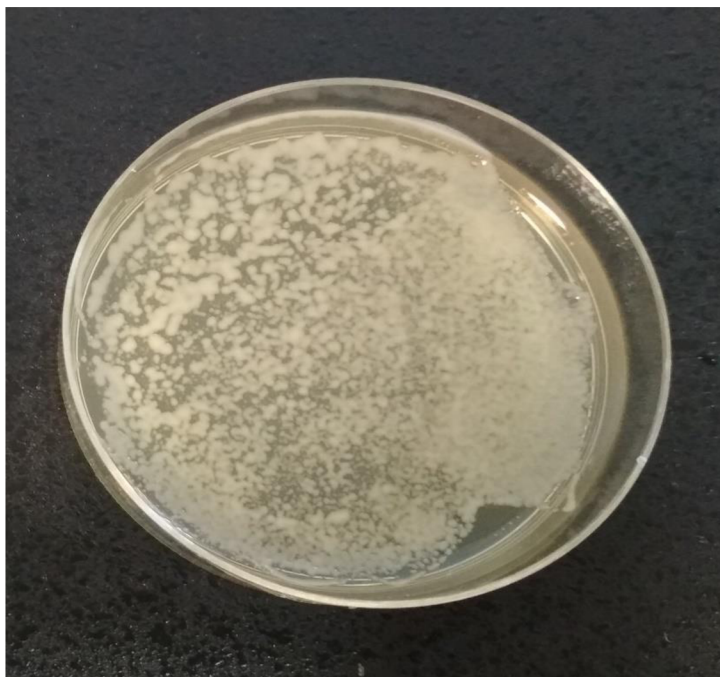
Patogenita je schopnosť mikroorganizmov vyvolávať infekcie alebo choroby v organizme. Mierou intenzity prejavu infekcie či závažnosti ochorenia je práve virulencia, ktorá sa v závislosti od podmienok mení.

Na rozdiel od svojej neschopnosti tvoriť hýfy alebo pseudohýfy či vylučovať proteázy si *Candida glabrata* zachováva mnoho faktorov virulencie, ako je schopnosť vylučovať fosfolipázy, lipázy a hemolyzíny, ktoré prispievajú k extrémnej agresivite, ktorá vedie k nízkej terapeutickému odpovedi a vážnym opakujúcim sa kandidózam [9]. Okrem svojej vrodenej tolerancie proti antimykotikám najmä azolom, ktoré sa inak bežne používajú na liečbu kandidózy, k patogenite *Candidy glabrata* prispievajú aj ďalšie potenciálne faktory virulencie. Jedným z nich je expresia génu adhezínu [8]. Tieto gény, ktoré sú v *Candide glabrata* väčšinou kódované v subtelomerickej oblasti chromozómu, majú svoju expresiu vysoko aktivovanú, takže organizmus môže priľnúť na biotické a abiotické povrchy v mikrobiálnych podložkách. Expresia adhezínu je mechanizmus, ktorým *Candida glabrata* vytvára hubové biofilmy, ktoré sa ukázali byť odolnejšie voči antimykotikám ako planktonické bunky [12].

Genóm *Candidy glabrata* často prechádza zmenami, o ktorých sa predpokladá, že prispievajú k zlepšeniu jeho reakcií na vystavenie stresovým podmienkam a niektorí autori sa domnievajú, že táto vlastnosť je taktiež spojená s virulencným potenciálom týchto kvasiniek. Nedávno boli charakterizované stovky klinických izolátov *Candidy glabrata* pre svoje genómy [13]. Tieto izoláty vykazujú enormnú genomickú plasticitu. Počet a veľkosť chromozómov sa drasticky líšia, rovnako to ako často dochádza k duplikácii intrachromozomálnych a interchromozomálnych segmentov. Pozorované zmeny genómu by mohli ovplyvniť fenotypové vlastnosti, a tak pomôcť prispôbiť sa veľmi variabilným a drsným biotopom, ktoré kvasinky nachádzajú u rôznych ľudských pacientov a ich tkanív. Charakterizovaných bolo aj niekoľko genómov sesterských druhov *Candidy glabrata* (klinické a environmentálne izoláty). Táto oblasť ešte nie je dostatočne prebádaná, avšak ďalšie genómové sekvenovanie patogénnych izolátov by mohlo poskytnúť hodnotný nástroj na pochopenie mechanizmov dynamiky genómu a pomohlo by objasniť gény, ktoré prispievajú k potenciálu virulencie [13].

2.1.2.1 Tvorba biofilmov

Schopnosť vytvárať biofilmy je považovaná za najzávažnejší virulentný faktor *Candidy glabrata*. Biofilmy sú známe ako povrchovo asociované spoločenstvá mikroorganizmov zabudovaných do extracelulárnej matrice, ktoré vyžadujú významnú antimykotickú terapiu a imunitné odpovede hostiteľa. Klinické izoláty *Candida glabrata* majú schopnosť tvoriť kompaktnú štruktúru biofilmu v rôznych viacvrstvách, s proteínmi, ergosterolom a sacharidmi (napr. β -1,3 glukánmi) vo svojich matriciach. Prvým krokom vo vývoji biofilmu *Candida glabrata* je adhézia a kolonizácia kvasinkových buniek na abiotický alebo biotický povrch. Adhézia je mimoriadne dôležitým krokom, nielen pri tvorbe biofilmu, ale aj pri infekčných procesoch, a jej rozsah závisí od charakteristík buniek *Candidy glabrata* (bunkový povrch, hydrofóbnosť, zloženie bunkových stien, atď.) a od vlastností hostiteľa alebo abiotika. Predpokladá sa, že biofilmy vo väčšej alebo menšej miere bránia prenikaniu antifungálnych liekov cez ich štruktúru vytvorením difúznej bariéry, ktorá pôsobí ako ionomeničová živica viažuca nabité molekuly antibiotika a prispievajúca tak k rezistencii na biofilmové liečivá. Biofilmy sa môžu tvoriť na rôznych implantovaných lekárskech zariadeniach, ako sú napr. cievne a močové katetre, srdcové chlopne, kontaktné šošovky či protézy. Tvorba biofilmu na povrchu zubnej protézy má zásadný význam pre patogenézu u väčšiny kvasinkových infekcií ústnej dutiny [9].



Obrázok 3: Biofilm vytvorený *Candidou glabrata* po 48 hodinách kultivácie v termostate

2.2 Plazma

Slovo plazma bolo zavedené v roku 1928 Irvingom Langmuikom pri jeho práci s ortuťovým plazmatickým oblúkom. Pojem pochádza z gréčtiny a v preklade znamená želé alebo želatína, ktorú ortuťové plazmatické oblúky naozaj pripomínajú. Moderné definície plazmy sa skôr stotožňujú s pojmom ionizovaný plyn, ktorý vykazuje vlastnosti kolektívneho správania a kvázineutrality [14].

Vďaka týmto špecifickým vlastnostiam býva označovaná aj ako štvrté skupenstvo hmoty. Na Zemi sa s ňou môžeme najčastejšie stretnúť v podobe bleskov či polárnej žiary, ale vo vesmíre tvorí až 99% celkovej hmoty vo forme hviezd, medzihviezdneho priestoru, hmlovín, čiernych dier a iných vesmírnych telies [15].

2.2.1 Vznik plazmy

V laboratórnych podmienkach či technológiách využívaných na Zemi plazma vzniká vybudením elektrónov plynu dodaním veľkého množstva energie. Táto energia býva väčšinou dodaná formou elektrického prúdu či rádiových vĺn, pretože zahrievaním by sme museli dosiahnuť extrémne vysokých teplôt (desiatky tisíc Kelvinov) aby došlo k termickej ionizácii. V praxi sa preto preferuje ionizácia elektrickým výbojom. Po dodaní dostatočného množstva energie sa elektróny odtrhnú z molekuly alebo atómu. Po odtrhnutí elektrónov dochádza k zrážkam voľných elektrónov s neutrálnymi časticami za vzniku nabitých častíc či ďalších voľných elektrónov. Vzniká teda ionizovaný plyn, ktorý obsahuje: neutrálné molekuly, kladne nabité katióny a záporne nabité anióny a elektróny [14].

2.2.2 Vlastnosti plazmy

Zo zloženia plazmy môžeme odvodiť aj jej vlastnosti. Vďaka prítomnosti elektricky nabitých častíc a ich pohyblivosti je plazma vodivá a schopná generovať priestorový náboj, elektrostatické pole a reagovať naň. Elektrická vodivosť plazmy je považovaná za jednu z jej najdôležitejších vlastností. Podľa počtu nabitých častíc rozlišujeme plazmu slabo a silne ionizovanú. Slabo ionizovaná plazma je taká, v ktorej je počet neutrálnych molekúl omnoho väčší než počet častíc nabitých, na druhej strane v silne ionizovanej plazme dominujú častice nabité. S narastajúcim stupňom ionizácie rastie aj elektrická vodivosť plazmy. Dôsledkom elektrickej vodivosti je aj pôsobenie silného magnetického poľa, ktorého pôvod možno pripísať Lorentzovej sile pôsobiacej na voľné elektróny. Výskyt a účinky magnetického poľa možno najlepšie pozorovať vo Vesmíre, napr. v podobe solárneho vetra zo Slnka. Navonok sa plazma javí ako elektroneutrálna či kvázineutrálna, pretože počet kladne a záporne nabitých častíc je približne rovnaký.

S ohľadom na strednú energiu častíc môžeme plazmu rozdeliť na nízкотеплотnú a vysokотеплотnú. Pokiaľ je stredná energia nabitých častíc vyššia ako 100 eV, čo odpovedá 10^6 K, ide o plazmu vysokотеплотnú, ktorá je vždy silne ionizovaná. V prípade plazmy nízкотеплотnej je stupeň ionizácie závislý na teplote elektrónov, ktorá sa väčšinou pohybuje v rozmedzí 10^4 – $5 \cdot 10^4$ K, na rozdiel od teploty katiónov a neutrálnych častíc, ktorá je zvyčajne podobná izbovej teplote. Pokiaľ je teplota elektrónov vyššia ako 10^5 K, považujeme plazmu za

silne ionizovanú. Špeciálnym prípadom je plazma v úplnej termodynamicknej rovnováhe, kedy nastáva rovnováha plazmy so spojitým žiarením. Tento sa stav je významný tým, že je možné ho opísať zákonmi štatistickej fyziky. Prirodzene sa takýto prípad vyskytuje na Slnku a laboratórne sme schopní pomocou vysokého tlaku generovať iba plazmu v lokálnej termodynamicknej rovnováhe. Zvyčajne však generujeme plazmu výbojom a výsledkom je plazma nerovnovážna, na ktorej opis musíme použiť fyzikálnu kinetiku.

Ďalšou dôležitou vlastnosťou plazmy je kolektívne správanie, vďaka ktorému má sklon prispôsobovať sa vonkajším vplyvom [14, 16].

2.2.3 Druhy plazmových výbojov

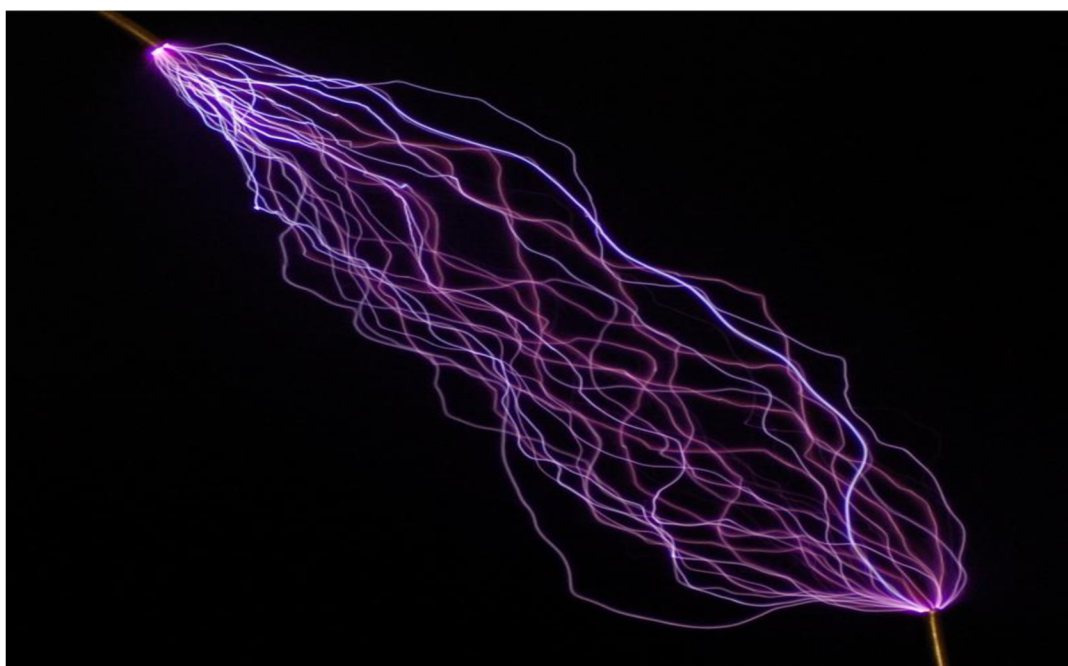
Rozpoznávame viacero druhov plazmových výbojov, ktoré sa líšia nie len ich vlastnosťami, ale aj spôsobom akým boli vybudené, a teda od tlaku a charakteristík plynu, vlastností aplikovaného napätia, tvaru či usporiadania elektród a celkových podmienok pracovného prostredia. Vlastnosti výboja sú závislé na smere prúdu (jednosmerný či striedavý) a frekvencii. Podľa frekvencie rozoznávame výboje nízkofrekvenčné, vysokofrekvenčné a mikrovlnné. V priemyselných aplikáciách sa najčastejšie využívajú nasledovné typy výbojov [15].

2.2.3.1 Korónový výboj

Korónový výboj vzniká len v nehomogénnom elektrickom poli pri tlaku nad 1 kPa medzi dvoma elektródami, z ktorých aspoň jedna musí mať malý polomer krivosti (hrot, tenký drôt, ihla). Vďaka malému zakriveniu vzniká v okolí korónujúcej elektródy elektrické pole, ktoré má vysokú intenzitu a dochádza na nej k lokálnemu prerazeniu. Okolie elektródy je jediná oblasť, kde dochádza k ionizácii, a teda je v nej plyn silne disociovaný. Táto oblasť sa nazýva korónujúca či ionizačná vrstva a je viditeľná ako jemne svietiaci oblasť obkolesená tmavým kruhom, vonkajšou oblasťou, v ktorej sa ionizácia nevyskytuje. Jedným z príkladov zo života môže byť tzv. Eliášov oheň, kedy hroty sťažňov na lodiach, hromozvody či ostré hrany striech pred búrkami žiaria, pretože elektrický náboj atmosféry vytvára dostatočné elektrické pole na vybudenie elektrónov. V moderných aplikáciách sa tento typ výboja obvykle využíva v ťažko dostupných priestoroch malých rozmerov, xerografii a odstraňovaní prachu pri nanášaní farieb. Korónový výboj môže prebiehať v kontinuálnom i v pulznom režime. Týmto spôsobom získajú elektróny vysokú energiu, čo má za následok generáciu nízkoteplotnej plazmy [4, 15].



Obrázok 4: Multi-hrotový korónový výboj [17]

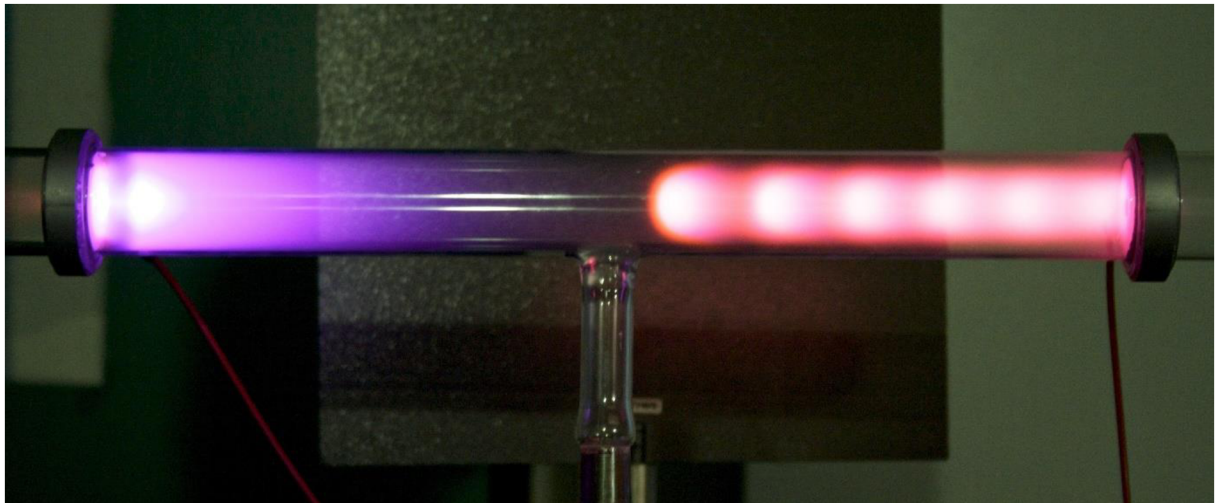


Obrázok 5: Bipolárny korónový výboj [18]

2.2.3.2 Tlecí výboj

Tlecí výboj je možno zapáliť a udržať len pri nízkych tlakoch (1–10000 Pa), teplote (300 K) a prúdoch (0,1–100 mA). Pri zvýšení prúdu či tlaku prechádza do oblúkového výboja. Zvyčajne sa preto stretávame s tlecím výbojom v sklenených výbojkách pod vákuom. Princíp vzniku a udržania tlecieho výboja tkvie v katódovom tmavom priestore, kde dochádza k potenciálovému spádu a lavínovej ionizácii, ku ktorej dochádza vďaka sekundárnej emisii elektrónov po dopade urýchlených katiónov na katódu. Tlecí výboj sa skladá z troch hlavných

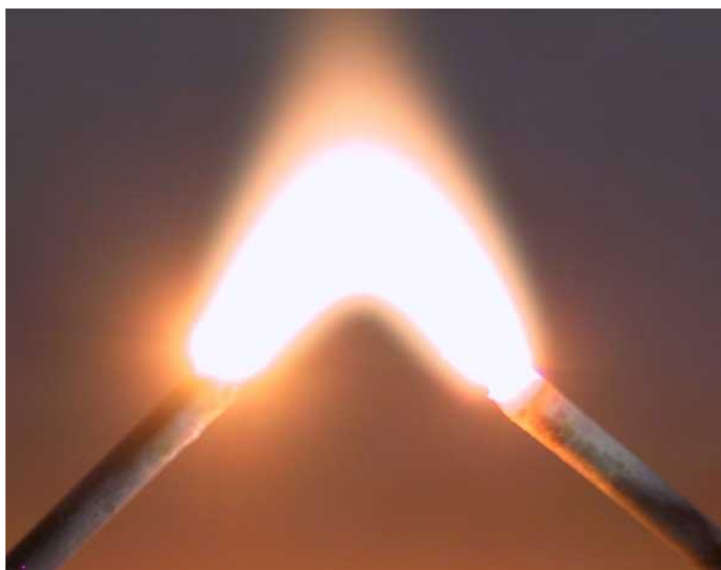
častí: katódovej vrstvy, kladného stĺpca a anódového svetla. Jednotlivé zóny tlecieho výboja sa od seba odlišujú svetelnou intenzitou. Najvyššiu intenzitu nachádzame v kladnom stĺpci a z toho dôvodu je aj v praxi najdôležitejší. Tento typ výboja je typický svojou vysokou hustotou elektrónov aj vo väčších objemoch a hlavne je označovaný za kvázineutrálnu izotermickú plazmu, a preto je veľmi zaujímavý pre rôzne aplikácie. Nájdeme ho napríklad v neónkach, žiarivkách či plynových laseroch [15, 19].



Obrázok 6: Tlecí výboj v sklenenej výbojke [20]

2.2.3.3 Oblúkový výboj

Výboje v oblúku sú vysokotlakové výboje (tlaky v rozmedzí 50–10132 kPa) charakterizované nízkym napätím (10–50 V) a vysokými prúdmi (1–100 A). Nijaké presné hranice existencie tohto výboja nie sú definované asi z dôvodu, že neexistuje vhodnejšia forma, do ktorej by mohol prejsť. Známym príkladom je oblúkový výboj pri atmosférickom tlaku medzi dvoma uhlíkovými elektródami. Podobne ako tlejúci výboj sa skladá z viacerých častí: anódového spádu, kladného stĺpca a katódového spádu. Rozdielom medzi tlecími a oblúkovými výbojmi je mechanizmus generácie elektrónov na katóde. Ako už bolo spomínané, pri tlecom výboji je elektrónová emisia z katódy spôsobená hlavne produkciou sekundárnych elektrónov nárazmi silných iónov. Pri oblúkových výbojoch je elektrónová produkcia spôsobená termoionickou emisiou. Podstatou termoemisie je vyšší prúd, kvôli ktorému ióny dopadajúce na katódu zvýšia jej teplotu natoľko, že hovoríme o termickej emisii. Jej dôsledkom je aj markantný pokles katódového spádu, zapríčiňujúci tvorbu elektrického poľa tesne u katódového povrchu. Toto miesto intenzívne žiari a označuje sa ako katódová škvrna. Využitie tohto výboja je najmä pri zváraní, tavení a rezaní kovov [15, 19, 21].

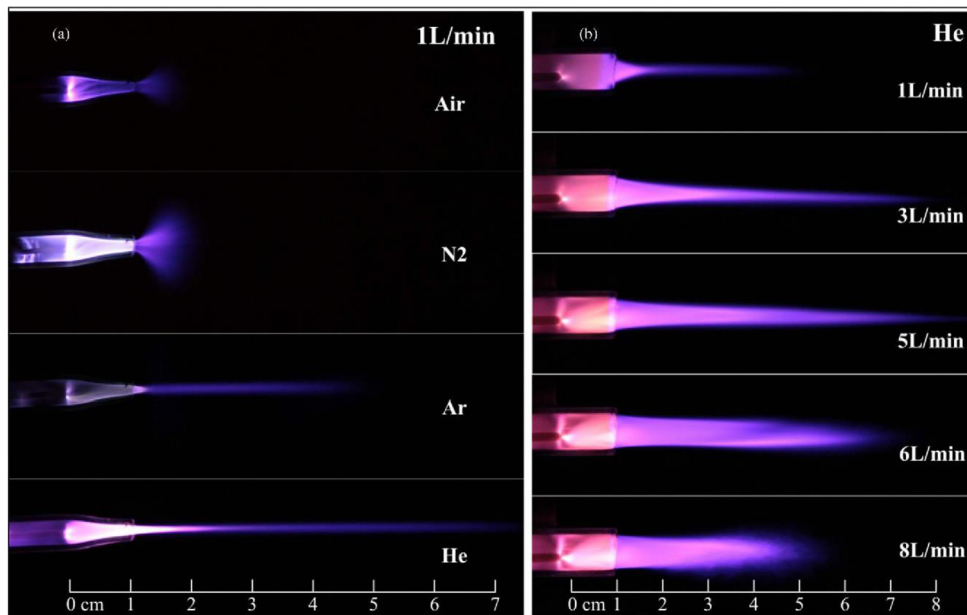


Obrázok 7: Oblúkový výboj medzi dvoma hrotmi [22]

2.2.3.4 Dielektrické bariérové výboje a plazmová tryska

Dielektrické bariérové výboje (DBD) sú charakterizované prítomnosťou aspoň jednej izolačnej vrstvy v priestore medzi kovovými elektródami. Klasické usporiadanie tvoria dve elektródy oddelené jednou alebo viacerými dielektrickými vrstvami. V prípade, že predmet, ktorý má byť modifikovaný, tvorí jednu z elektród, umožňuje výboj priame opracovanie objektu [4]. V základe delíme bariérové výboje na 3 podtypy: povrchový výboj, objemový bariérový výboj a koplanárny výboj. V prípade povrchového výboja ide o horenie za atmosférického tlaku, čím sa líši od väčšiny iných výbojov, ktoré potrebujú veľmi nízky tlak. Výboj je generovaný a regulovaný na povrchu elektródy tvorenej kovovými pásikmi oddelenými dielektrickou vrstvou [23]. Objemový výboj je generovaný v priestore medzi dvoma elektródami, z ktorých aspoň jedna je pokrytá dielektrickou bariérou. Koplanárny výboj vzniká na povrchu dielektrika zásluhou dvoch opačne polarizovaných elektród v paralelnom usporiadaní. Obmedzením prúdu je možné bezbolestné ošetrenie živých tkanív. Prednostne sa však tento typ výboja používa na plazmové čistenie, leptanie, polymerizáciu či úpravu povrchov a ďalšie technické aplikácie [24].

Variantom DBD je valcová konfigurácia v podobe plazmovej trysky. Atmosférická plazmová tryska sa skladá z trubice, ktorou preteká plyn a obsahuje jednu alebo dve elektródy. Plazma je zapálená vnútri trysky a je vyfukovaná von na objekt. Rôzne plazmové trysky sa líšia v konfigurácii elektród, druhom plynu a elektrickými parametrami. Pri tomto druhu bariérového výboja môžeme zaviesť pulzný režim, ktorý je riadený pulzným elektrickým generátorom a vytvára veľmi ostrý pulz vysokého napätia na krátky časový úsek. Týmto spôsobom elektróny získajú vysokú energiu, čo má za následok generáciu nízkoteplotnej plazmy. Plazmová tryska (Plasma jet) je hojne využívaná v biomedicínskych aplikáciách napr. na zlepšenie zrážanlivosti krvi či liečenie kožných chorôb. Používa sa aj v odvetví poľnohospodárstva na sterilizáciu semienok a bio-filmov alebo všeobecne na úpravu povrchov, lakovanie a nanášanie farieb [25, 26].



Obrázok 8: Plazmová tryska pri prietoku 1L/min pri použití rôznych plynov (vľavo) a rôznych prietokových rýchlostí pri použití hélia ako nosného plynu (vpravo) [26]

2.2.3.5 Iskrové výboje

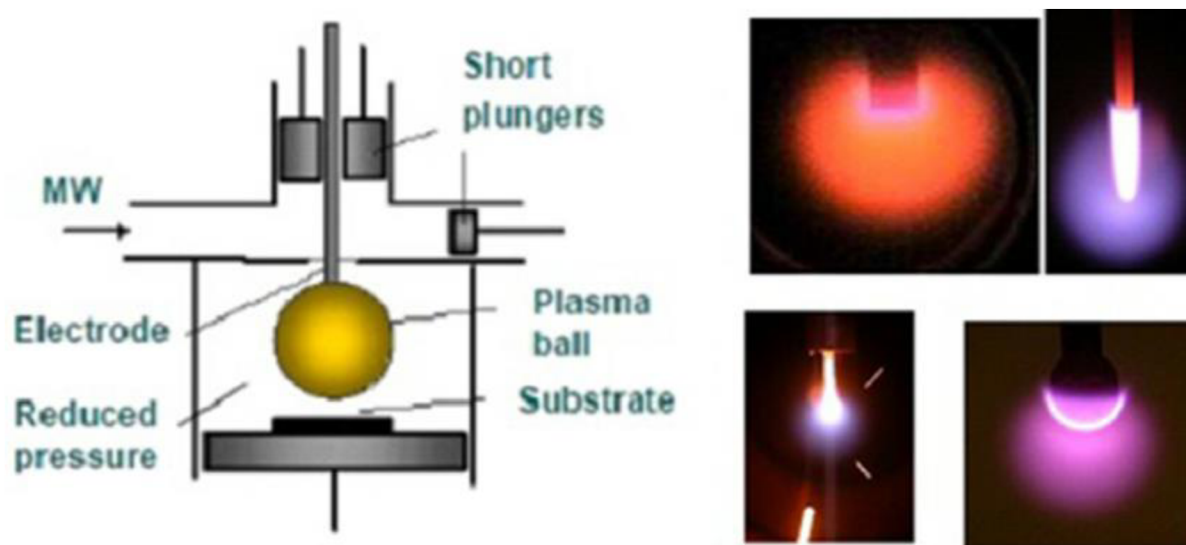
Iskrové výboje vznikajú pri atmosférickom tlaku a veľmi vysokej intenzite elektrického poľa. Elektróny získajú zrážkami takú rýchlosť, že dochádza k lavínovej ionizácii a vzniku iskrového výboja. Tento typ výboja je teda tvorený elektrónovými a iónovými lavínami v iskrových kanálikoch. Výboj trvá veľmi krátko, pretože zdroj nie je schopný poskytovať dostatočný prúd na jeho udržanie. Býva sprevádzaný praskaním či inými zvukovými efektmi. Najlepším príkladom sú blesky so sprievodným zvukovým efektom hrmením. V praxi sa iskrový výboj využíva na obrábanie kovov, ale napríklad aj v sviečke zážihového motora automobilov [27].



Obrázok 9: Iskrový výboj v podobe blesku [28]

2.2.3.6 Mikrovlnný výboj

Mikrovlny sú elektromagnetické vlny s frekvenciou v rozmedzí $3 \cdot 10^8 - 3 \cdot 10^{11}$ Hz. V mikrovlnnom výboji môže plazma dosahovať až desaťkrát vyššiu elektrónovú hustotu než pri vysokofrekvenčných výbojoch. Takýto typ plazmy sa zvykne nazývať mikrovlnne indukovaná plazma a možno ju rozdeliť do troch podtypov. Prvým je plazma generovaná v rezonančnej dutine a vystupujúca von z dutiny cez malý otvor ako dohasínajúci výboj (post-discharge). Druhým typom je plazma tvoriaca sa v dielektrickej trubici a následne prechádzajúca cez rezonančnú dutinu alebo povrchovú vlnu, kde sa zosilňuje mikrovlnné pole. Posledným typom sú voľne sa šíriace plazmové trysky na konci elektródy [5].



Obrázok 10: Mikrovlnne indukovaná plazma v laboratórnych podmienkach [29]

2.3 Aplikácie plazmy

2.3.1 Plazma v potravinárskom priemysle

Dopyt po kvalite potravín a väčšej čerstvosti bez použitia škodlivých chemikálií sa za posledné desaťročie stal veľmi diskutovanou témou. Nové technológie využívajú na dekontamináciu povrchov potravín UV žiarenie, silné elektrické pole, ozón či iné reaktívne látky. Nízko teplotná plazma za atmosférického tlaku (Cold atmospheric pressure plasma CAPP) kombinuje vyššie uvedené metódy, a preto vďaka ich synergickému účinku možno dosiahnuť sľubné výsledky pri dekontaminácii povrchu ovocia či ovocných štiav [6, 7, 30, 31].

Štúdie dokázali, že účinnosť mikrobiálnej dekontaminácie vybraných druhov ovocia prirodzene kontaminovaných mikroorganizmami je silne závislá od tvaru a povrchu ovocia. Dekontaminácia ovocia s drsným a nepravidelným povrchom ako napr. jahody nie je vhodná pre nízku účinnosť, avšak pre ovocie s hladkým povrchom ako sú napr. čučoriedky či čerešne boli výsledky veľmi sľubné [3]. Výhodou je aj, že merania antioxidačnej aktivity nevykazujú žiadne zmeny v dôsledku pôsobenia plazmy hlavne kvôli skutočnosti, že interakcia plazma – ovocie je obmedzená na povrch ovocia. Získané experimentálne výsledky optickej

emisnej spektroskopie ukazujú prítomnosť rôznych aktívnych častíc, ktoré môžu hrať významnú úlohu pri sterilizácii povrchu ovocia. Iniciovane procesy môžu viesť k inhibícii baktérií alebo dokonca k ich úplnému zničeniu otvorením bunkovej steny. Prítomnosť radikálu oxidu dusnatého (NO) môže spustiť procesy deaktivácie baktérií, UV žiarenie tohto radikálu patrí do oblasti UV-C, ktorá je známa svojimi baktericídnyimi účinkami. Zároveň je radikál NO veľmi reaktívny a pri reakcii s vodou (prítomnou na povrchu ovocia) tvorí kyselinu dusitú, ktorá znižuje pH povrchu. Tento účinok môže tiež prispieť k deaktivácii niektorých druhov baktérií. Hydroxidový radikál (OH), potvrdený optickými emisnými spektrami, je dobre známy ako jeden z najsilnejších neselektívnych oxidačných druhov a je účinný pri inaktivácii baktérií prítomných na povrchu. Všetky tieto druhy tiež tvoria ďalšie aktívne molekuly, ako napr. peroxyinitril, ktorých úloha pri deaktivácii baktérií nie je úplne objasnená. Okrem toho prítomnosť atómového kyslíka vedie k tvorbe ozónu, ktorý je známy pre svoje antimikrobiálne účinky [32].

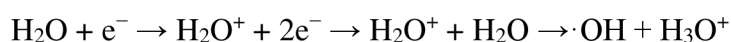
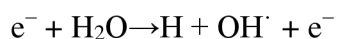
Podobné výsledky boli namerané pri sterilizácii ovocných štiav, kde najrozšírenejším zdrojom kontaminácie nie sú baktérie ale kvasinky, a preto je potrebné metódy prispôbiť. Pre potravinárske účely je dôležité zväčšiť plochu, ktorá je plazmou sterilizovaná. Z tohto dôvodu sa preferujú spôsoby sterilizácie ako vstrekovanie plynových bublín do kvapaliny pomocou pulzného plazmového systému, pri ktorých však nastávajú problémy s plynovými bublinami spojené. V tomto ohľade môže byť alternatívnou metódou inaktivácie kvasiniek v tekutej potrave metóda využívajúca rozprašovací plazmatický reaktor [6].

2.3.2 Plazma v biomedicínskych aplikáciách

Nízkoteplotná plazma je používaná v rôznych odvetviach biomedicínskych aplikácií, medzi ktoré patria napr. sterilizácia, hojenie rán či liečba rakoviny. Na priamu biologickú povrchovú úpravu sa spravidla používajú dve hlavné konfigurácie výboja. Prvá skupina je založená na konfiguráciách planárnych dielektrických bariérových výbojov, ktoré sú použiteľné hlavne na priame plazmové ošetrovanie takmer rovných povrchov a umožňujú ošetrovanie väčšej plochy. Druhú tvoria rôzne plazmové trysky, ktoré sú vhodné najmä na ošetrovanie lokálne. Obidva koncepty majú rôzne vzory, ktoré sa riadia dvoma jednoduchými princípmi: sú studené (<40 °C) v mieste kontaktu so vzorkou a sú stabilné za atmosférických podmienok [33]. Pôsobením elektrickej energie na vzácny plyn (He, Ar, N₂ alebo ich zmesi) vznikajú elektróny s veľmi vysokou teplotou, pričom ióny a molekuly si zachovávajú nízku kinetickú energiu. Presný mechanizmus interakcie plazmy s rôznymi biologickými objektmi zatiaľ nie je úplne jasný. Je dobre známe, že nízkoteplotná plazma produkuje reaktívne častice kyslíka (ROS) a reaktívne častice dusíka (RNS), ktoré sa potom prenášajú do bunky reakciami v kvapalnej fáze. Ďalšími zložkami plazmy, ktoré môžu ovplyvniť biologické reakcie, sú UV žiarenie, elektrické pole/prúd, elektróny a ióny. Táto jedinečná kombinácia aktívnych zložiek plazmy poskytuje široké spektrum aplikácií v biologických vedách [2, 34].

2.3.3 Anitimikrobiálne aktívne prvky plazmy

Je všeobecne známe, že hlavnými prvkami zodpovednými za antimikrobiálne účinky plazmy sú reaktívne druhy kyslíka a dusíka (Reactive oxygen nitrogen species RONS). Medzi tieto častice patria najmä NO radikály a OH radikály. OH radikály sú extrémne reaktívne, a preto je ich životnosť veľmi krátka 10^{-9} sekundy, avšak ich reakcie s širokým spektrom biomolekúl sú podnetom rôznych štúdií. Generácia OH radikálov súvisí s vyparovaním vody. Vďaka tomuto tvrdeniu môžeme usúdiť, že OH radikály sú tvorené 3 hlavnými spôsobmi:



Medzi niektoré z účinkov RONS patrí vybudenie oxidatívneho stresu v mikroboch pri hojení rán plazmou či abstrakcia vodíkových atómov z ceramidov. Vyvolanie oxidatívneho stresu spôsobuje narušenie vnútrobunkovej homeostázy, čo spôsobuje denaturáciu proteínov, DNA mutáciu a zmeny v enzymatickej aktivite. Ďalšou dôležitou kategóriou sú H_2O_2 , ktoré sa až následne štiepia na radikály, a na rozdiel od OH radikálov sú považované za dlho pôsobiace antimikrobiálne častice. Ďalším z plazmatických antimikrobiálnych účinkov sú: vysoký oxidačne-redukčný potenciál (ORP), nízke pH a UV žiarenie [32].

2.3.4 Plazma a kvasinky

Existuje mnoho prác opisujúcich biologické účinky plazmy, ktoré sa venujú usmrteniu prokaryotických baktérií, ale o fungicídnych účinkoch plazmy ich veľa nie je. Z nameraných dát a štúdií je zrejmé, že fungicídny účinok je nižší ako analogický baktericídny účinok a medzi jednotlivými hubami sa podstatne líši. Napriek nižšej účinnosti však fungicídne účinky dokázané boli a spolu s nimi aj pomalší rast exponovaných spór húb. [32]

Jednou z veľmi úzko preskúmaných kvasiniek je napr. *Sacharomyces cerevisiae*. Štúdiami účinkov plazmy na tento druh kvasinky sa zistilo, že za prítomnosti OH radikálov sa kolónia *S. cerevisiae* nevytvorila, čo svedčí o účinnosti OH radikálov pri deaktivácii mikrobov. Taktiež sa zistilo, že pH nehrá dôležitú rolu v deaktivácii týchto mikrobov a dôvodom poklesu pH teda môže byť napríklad zničenie transportných proteínov v membráne a pumpovanie protónov von z bunky, ako dôsledok modifikácie iontových kanálov UV žiarením, H_2O_2 , Fentonovými reagentmi či tiež produkciou MDA (3,4-metyléndioxyamfetamín). MDA ako iniciátor peroxidácie lipidov by mohol oxidovať kyselinu malónovú, ktorá by mohla byť dekarboxylovaná na acetát. MDA môže tiež reagovať s amínmi za vzniku Schiffových báz. Vďaka fluorescenčnému pozorovaniu kolónie *S. cerevisiae* bol vyvodený mechanizmus pôsobenia plazmového výboja. OH radikály so zvyšujúcou sa ožarovacou dobou zvyšujú priepustnosť bunkovej membrány. Porušenie integrity tejto membrány vedie k zmenám ORP a pH. Postupné prenikanie aktívnych častíc kyslíka a dusíka (RONS) do vnútra bunky spôsobuje ničenie proteínov, lipidov, nukleových kyselín čo vyvoláva k oxidatívny stres v bunke, ktorý je považovaný za hlavný dôvod usmrtenia bunky plazmovým výbojom [32, 33, 34].

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Chemikálie, prístroje, a materiál

3.1.1 Chemikálie a materiál

Kvasinková kultúra *Candida glabrata* CCM 8270 z Českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity v Brne

Živné médium Malt Extract Agar Base

Tekuté kultivačné médium GPY (Glucose yeast peptone, Himedia, India)

Petriho misky s priemerom 52,8 mm

Bežné pomôcky na mikrobiálne očkovanie

Pracovný plyn argón 4,6 (čistota: 99,9965%)

3.1.2 Prístroje

Autokláv Vaposteri BMT

UV/VIS Spektrofotometer S-220 Boeco, Germany

Teslov Transformátor

Mikrovlnný generátor (Sairem, GMS 200 W)

Elektromagnetický rezonátor povrchovej vlny (Sairem, SURFATRON 80)

Regulátor hmotnostného prietoku (Bronkhorst FG201-CV)

Termostat

Mobilný fotoaparát

3.2 Príprava vzoriek *Candida glabrata*

3.2.1 Príprava inokula

Inokulum bolo pripravené do 7 ml komplexného tekutého média Glucose yeast peptone (GPY). Pomocou kľučky bola do média zavedená kultúra kvasinky *Candida glabrata*. Kultivácia následne prebiehala 24 hodín v termostate bez trepania.

3.2.2 Kultivačné médium

Pre prípravu pevného živného média na kultiváciu kvasinky *Candida glabrata* bol použitý Malt Extract Agar Base of firmy HIMEDIA (pozri Tabuľka 1). Podľa návodu bolo médium pripravené v pomere 10 g na 200 ml destilovanej vody. Sterilizácia média následne prebiehala v autokláve pri teplote 121 °C po dobu 45 minút. Po sterilizácii malo médium pri 25 °C konečné pH 5,4 ± 0,2.

Tabuľka 1: Zloženie kultivačného média Malt Extract Agar Base

Zloženie	Obsah [g/l]
sladový extrakt	30,00
mykologický peptón	5,00
agar	15,00

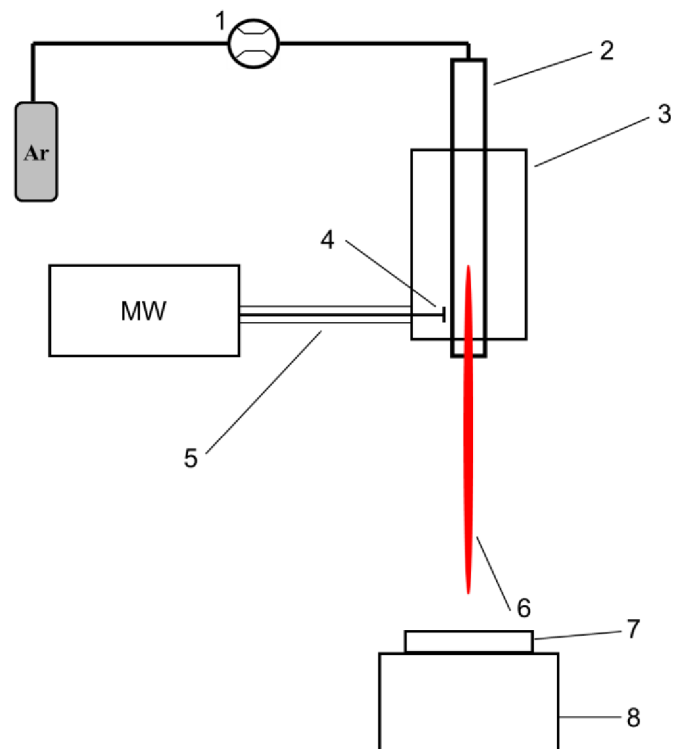
3.2.3 Kultivácia kvasiniek

Sterilizované živné médium bolo rovnomerne naliate do plastových Petriho misiek s priemerom 52,8 mm. Z vopred pripraveného inokula bola dvakrát odobraná časť kultúry, ktorá bola týmto spôsobom nariedená 10-krát a 100-krát do sterilného tekutého média GPY. Po zatuhnutí bolo na agarové platne naočkovaných 50 μ l pripravených kultúr s rôznou koncentráciou kvasinky *Candida glabrata*. Takto pripravené vzorky boli ihneď ožiarené plazmovou tryskou a následne kultivované v termostate bez trepania po dobu 48 hodín.

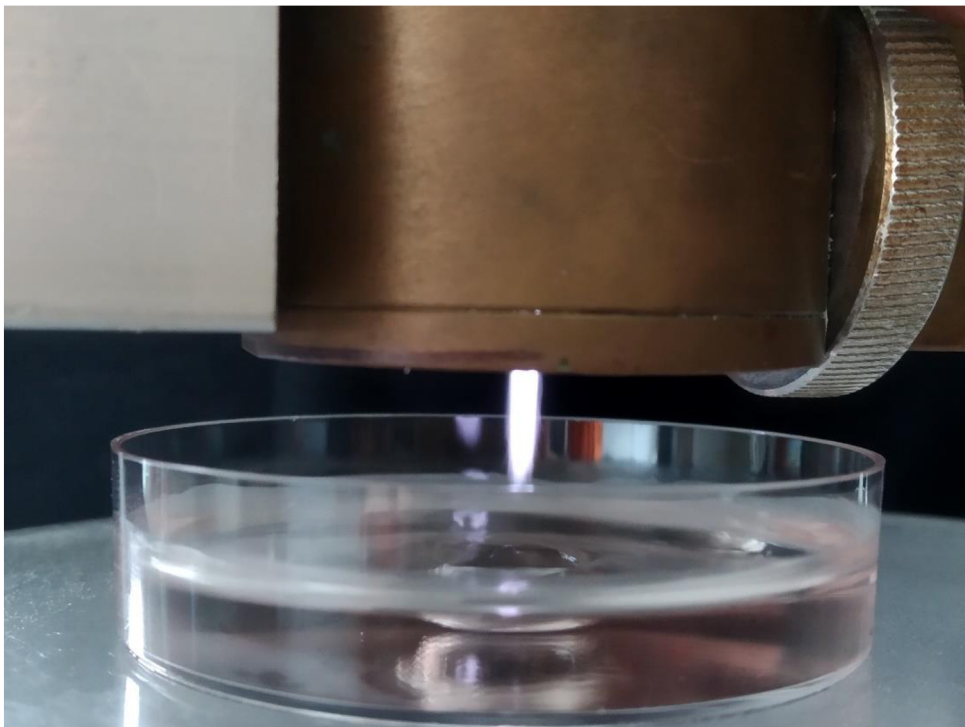
3.3 Ožarovanie pripravených vzoriek mikrovlnnou plazmovou tryskou

3.3.1 Zapojenie plazmovej trysky

Experimentálne usporiadanie je schematicky znázornené na obrázku Obrázok 11. Mikrovlnný generátor (Sairem, GMS 200 W) bol koaxiálnym káblom spojený s komerčným elektromagnetickým rezonátorom povrchovej vlny (Sairem, SURFATRON 80). Výboj v argóne bol vytvorený vo vnútri kremennej trubice (reálna dielektrická permitivita ($\epsilon_r = 3,2541$), imaginárna dielektrická permitivita ($\epsilon_i = 0,0062$), vonkajší priemer (o.d. = 8 mm), vnútorný priemer (i.d. = 3 mm)). Pracovným plynom bol argón 4,6 (čistota 99,9965 %) pri konštantnom hmotnostnom prietoku 5 Slm, ktorý bol regulovaný regulátorom hmotnostného prietoku Bronkhorst FG201-CV (pozri Obrázok 11). Experimenty boli uskutočnené pri dvoch rôznych výkonoch 9 W a 12 W, vďaka čomu teplota ožarovaného povrchu nepresahovala hranicu teplotnej tolerancie [34]. Výboj bol smerovaný kolmo k povrchu agarových platní približne do stredu Petriho misiek tak, aby sa viditeľný koniec lúča nedotýkal povrchu (pozri Obrázok 12). V prípade 9 W bola jeho vzdialenosť od povrchu 5 mm. V prípade 12 W sa plazmový lúč zväčšil takže jeho vzdialenosť od povrchu činila 3,5 mm.



Obrázok 11: Schéma experimentálneho zapojenia: 1 – regulátor hmotnostného prietoku; 2 – kremenná kapilára; 3 – surfatronový rezonátor; 4 – MW anténa; 5 – MW-koaxiálny kábel; 6 – plazmový lúč; 7 – Petriho miska s naočkovanou kultúrou *Candida Glabrata*; 8 – držiak na Petriho misku



Obrázok 12: Usporiadanie merania: plazmový lúč mieriaci kolmo na Petriho misku

3.3.2 Ožarovanie kvasiniek

Kultúry *Candida glabrata* boli hneď po naočkovaní ožiarené plazmovou tryskou. Každá Petriho miska bola opracovaná jednotlivo, pričom plazmový lúč bol mierený kolmo na vzorku. Pre všetky 3 koncentrácie boli premerané 2 rôzne výkony (9 W a 12 W) obe pri konštantnom prietoku argónu 5 Slm po dobu 10 s, 30 s, 60 s, 120 s. Pre nezriedenú koncentráciu boli oba výkony premerané aj po dobu ožarovania 300 s. Všetky merania boli vykonané paralelne dvakrát a pre každú koncentráciu bola odložená kontrolná vzorka (bez aplikácie mikrovlnného výboja). Nakoniec bolo pri rovnakých podmienkach merania uskutočnené ožarovanie už vzniknutého biofilmu nezriedenej kultúry. V tomto prípade bolo inokulum nanesené na agarových platniach najprv kultivované 24 hodín v termostate a následne ožarované po dobu 10 s, 30 s, 60 s, 120 s, 300 s pri konštantnom prietoku argónu 5 Slm a výkonoch 9 W, 12 W a 15 W .

3.3.3 Postup spracovania a vyhodnocovania výsledkov

Všetky Petriho misky boli nafotené po 24 a 48 hodinách. Veľkosť inhibičných zón bola následne stanovená pomocou programu Microsoft Power Point, v ktorom sa cez každú zónu a príslušnú misku nakreslila elipsa popřípade kružnica, ktorých rozmery boli zaznamenané. Zo zaznamenaných rozmerov boli následne vypočítané obsahy jednotlivých zón a misiek, ktoré boli prepočítané na skutočné rozmery Petriho misiek s priemerom 52,8 mm. Tieto veľkosti boli následne vynesené do grafov, z ktorých bola skúmaná účinnosť jednotlivých kombinácií aplikovaného výkonu a doby ožarovania pre všetky skúmané koncentrácie.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

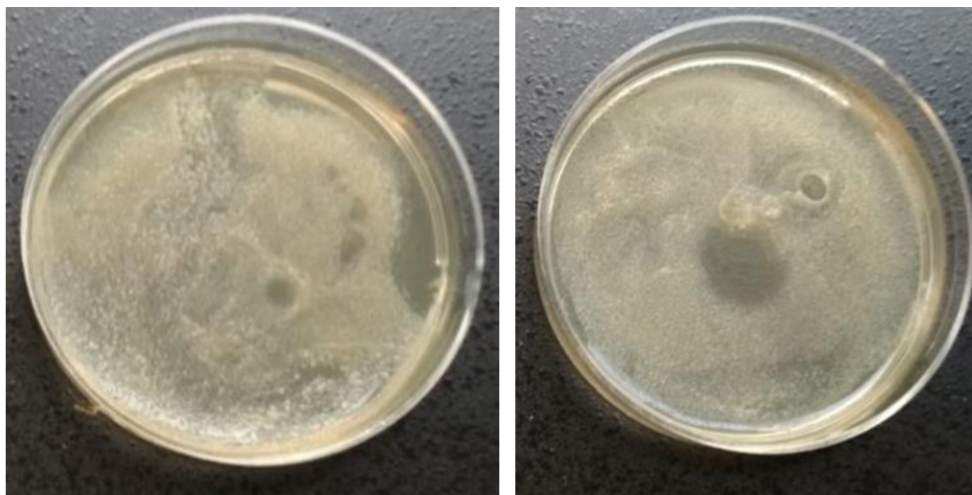
4.1 Výsledky

Boli pozorované 3 faktory a ich vplyv na veľkosť inhibičných zón a ich časovú stabilitu:

- doba ožarovania;
- veľkosť výkonu;
- počiatočná koncentrácia buniek.

4.1.1.1 Vplyv doby ožarovania

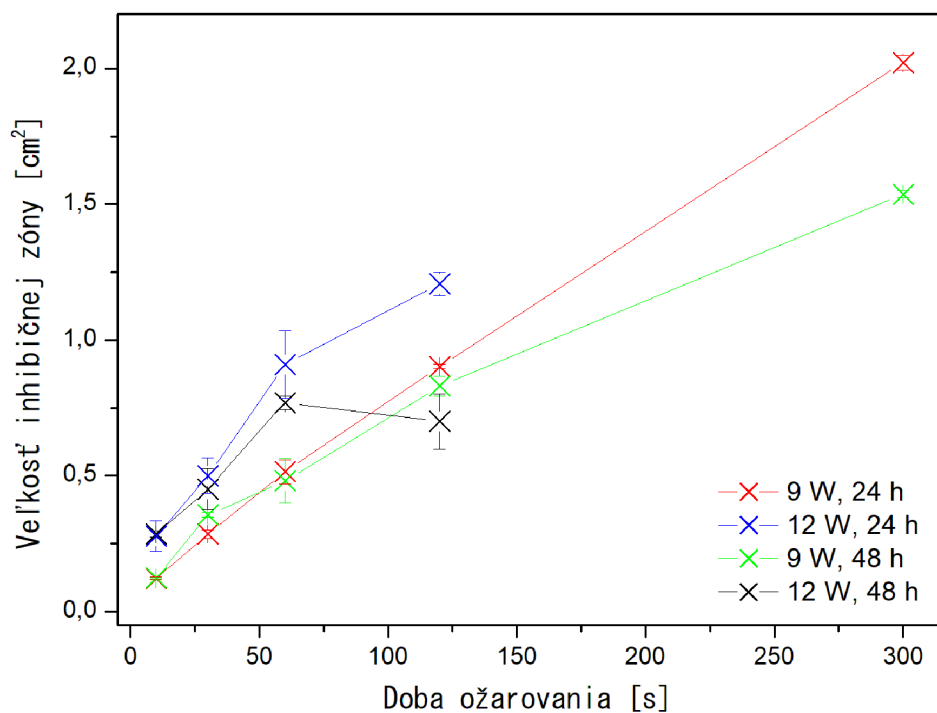
Porovnaním veľkosti inhibičných zón bolo zistené, že veľkosť inhibičných zón takmer lineárne narastá s časom aplikácie, z čoho vyplýva, že čím dlhšia je doba ožarovania, tým väčšia inhibičná zóna vznikne (pozri Obrázok 13). Rovnaká závislosť platí pre všetky koncentrácie a aplikované výkony (pozri Obrázky 14, 15, 16).



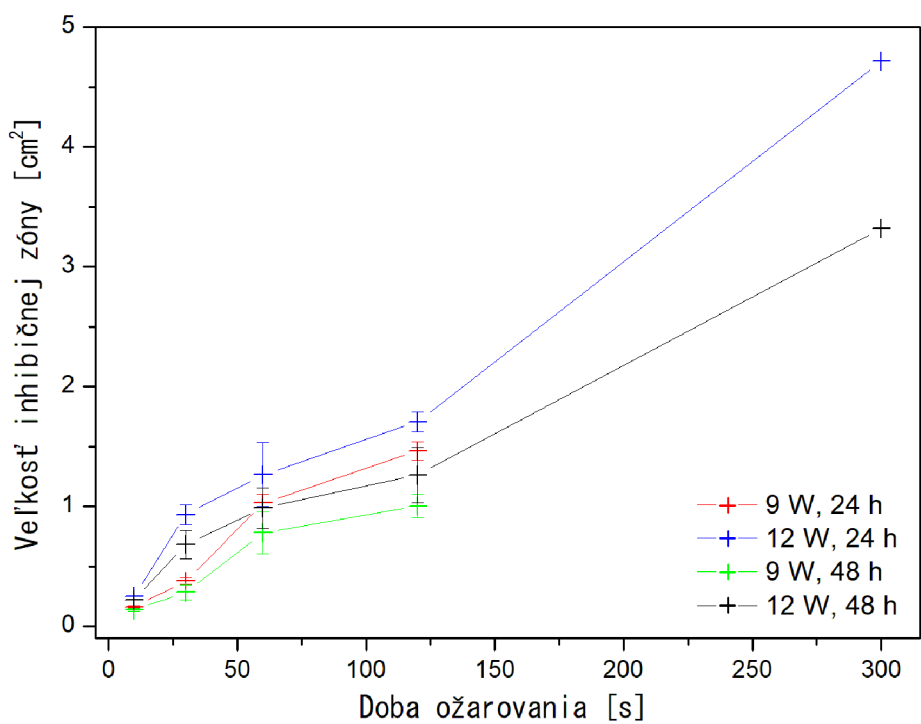
Obrázok 13: Porovnanie veľkosti inhibičných zón vzniknutých pri nasledovnej 24 hodinovej kultivácii po aplikácii 9 W po dobu 10 s (vľavo) a 120 s (vpravo) na nezriedenú kultúru

4.1.1.2 Vplyv použitého výkonu

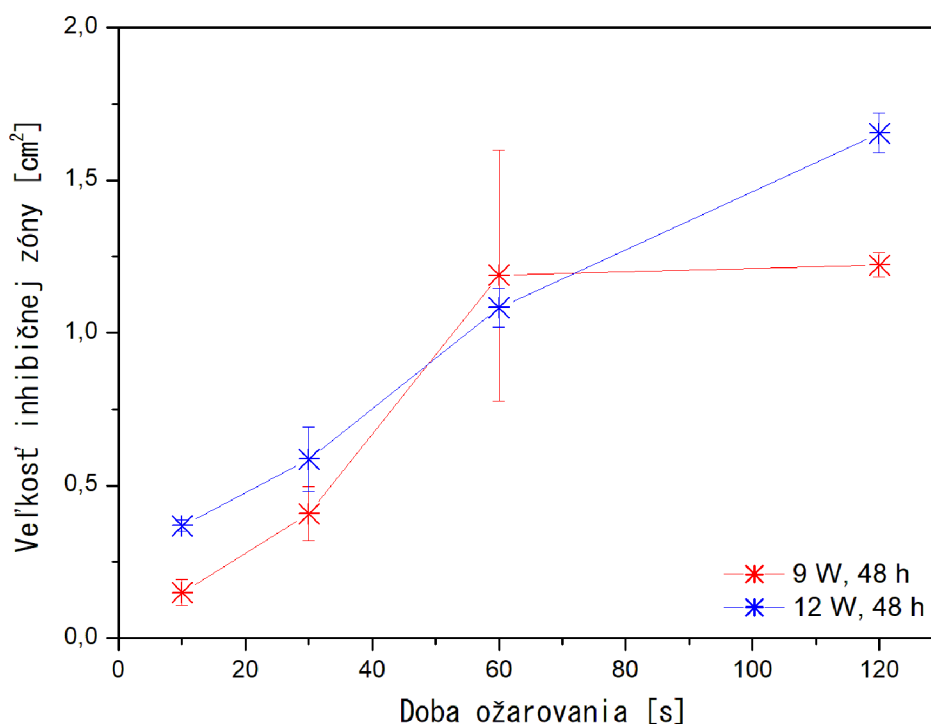
Podobný trend ako v prípade doby ožarovania platí aj v prípade veľkosti použitého výkonu. Z grafov (pozri Obrázky 14, 15, 16) vyplýva, že pôsobenie 12 W je účinnejšie než 9 W, keďže vzniknuté inhibičné zóny boli najväčšie práve pri použití 12 W v prípade všetkých použitých koncentrácií.



Obrázok 14: Zobrazenie veľkosti inhibičných zón v závislosti na dobe ožarovania pre nezriedenú kultúru

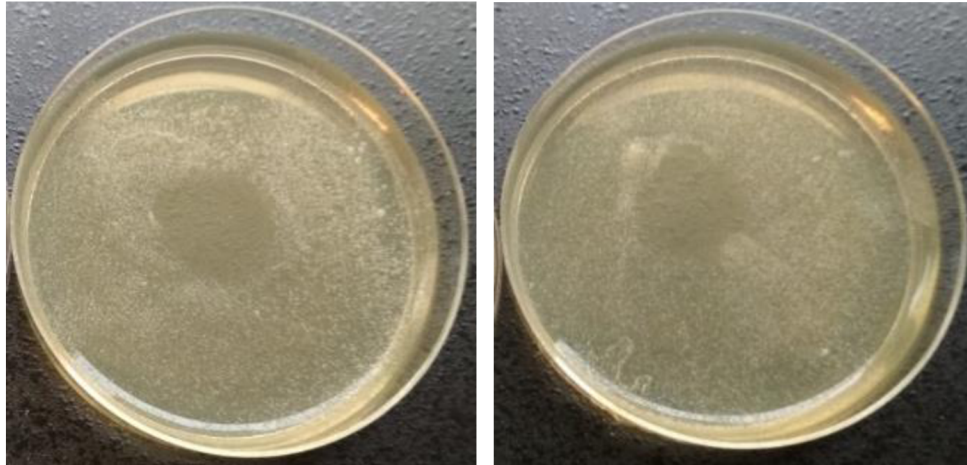


Obrázok 15: Zobrazenie veľkosti inhibičných zón v závislosti na dobe ožarovania pre 10-násobne zriedenú kultúru



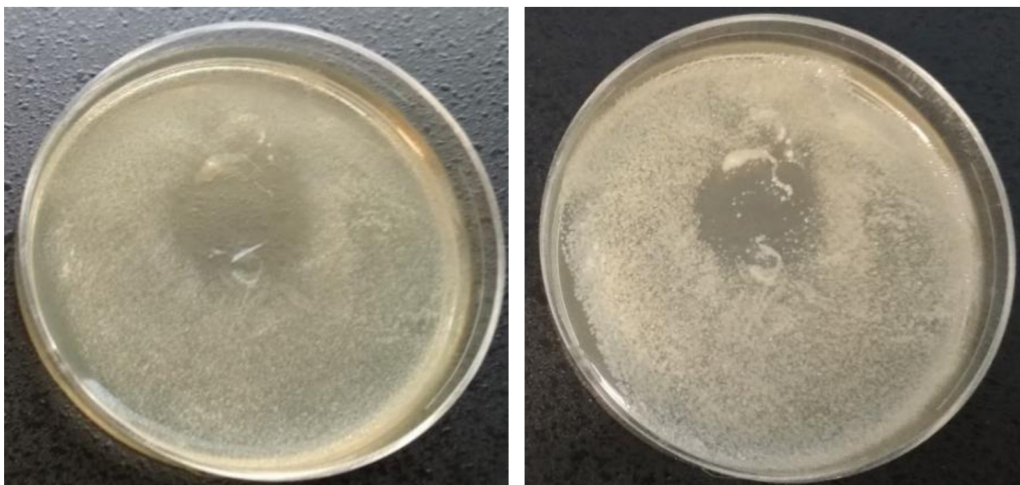
Obrázok 16: Zobrazenie veľkosti inhibičných zón v závislosti na dobe ožarovania pre 100-násobne zriedenú kultúru

Z nameraných veľkostí inhibičných zón bolo zistené, že na vytvorenie zóny rovnakej veľkosti je v prípade použitia 12 W dostačujúci polovičný čas ožarovania ako pri použití 9 W. Napr. pri 10-násobne zriedenej kultúre je pre vznik zóny s veľkosťou 1 cm², pri použití výkonu 9 W potrebná 1 minúta, ale pri zvýšení výkonu na 12 W sa doba ožarovania zníži na 30 s. To isté platí aj v prípade nenariedenej kultúry a zóny s veľkosťou 1,5 cm², na ktorej vznik musíme pri 9 W ožarovať 2 minúty, a pri 12 W dosiahneme rovnako veľkej zóny už za minútu (pozri Obrázok 17). Tento trend platí pre všetky koncentrácie (pozri Obrázky 14, 15, 16).



Obrázok 17: Porovnanie doby ožarovania potrebnej na vytvorenie podobne veľkých inhibičných zón pri použití 9 W – 120 s (vľavo) a 12 W – 60 s (vpravo), pre 10-násobne zriedenú kultúru po 24 hodinovej kultivácii

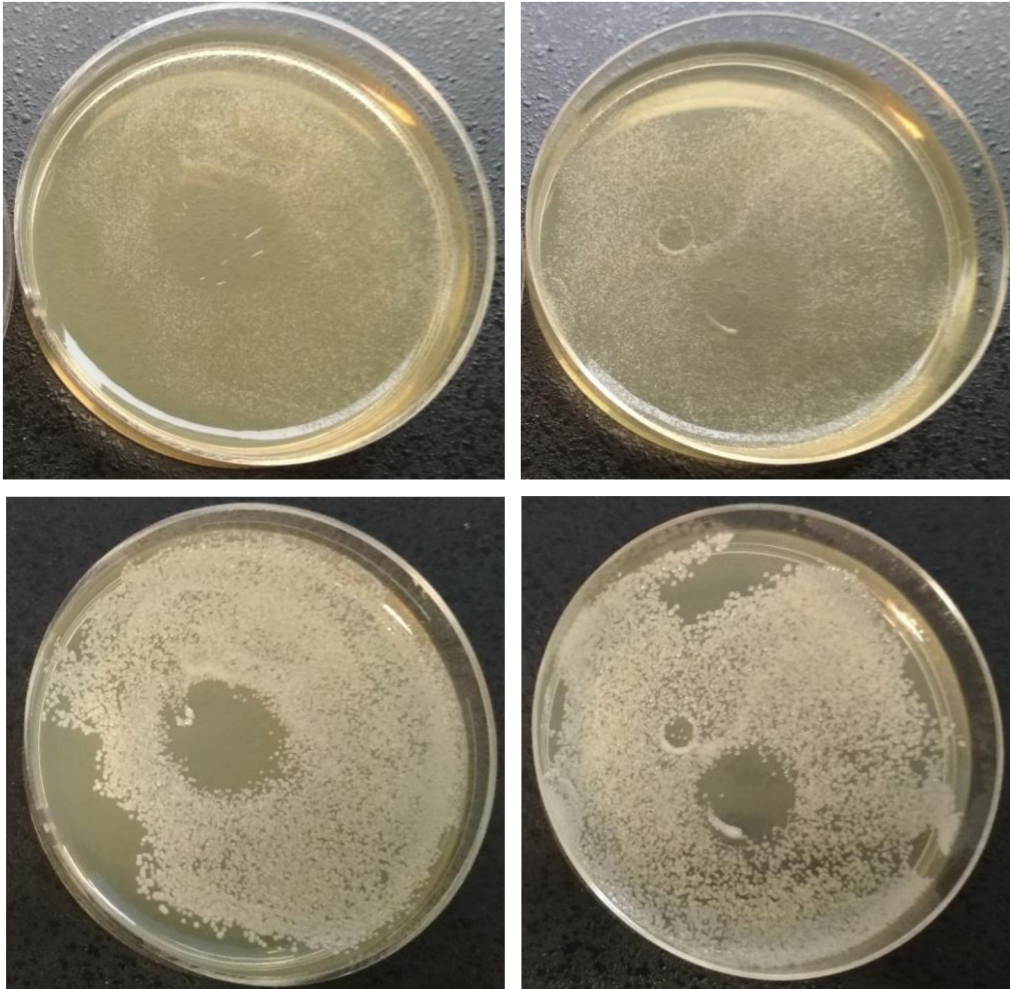
Takisto je možné si povšimnúť, že sa veľkosť inhibičných zón po 48 hodinách zmenšila, čo je spôsobené zarastaním vzniknutých inhibičných zón (pozri Obrázok 18). Ďalšou výhodou použitia 12 W je teda dlhšia časová stabilita inhibičných zón. Po aplikácii 9 W bolo po 48 hodinovej kultivácii pozorované markantnejšie zmenšenie inhibičných zón než pri použití výkonu 12 W (pozri Obrázok 19).



Obrázok 18: Inhibičná zóna vytvorená po 24 hodinovej kultivácii po 5 minútach pôsobenia výkonom 9 W na nezriedenú kultúru (vľavo), porovnanie zarastania inhibičnej zóny nezriedenej kultúry po 48 hodinách (vpravo)

Zarastanie inhibičných zón je z dôvodu kolonizácie okolitých buniek či neúplnej inhibícií kvasinkových buniek na okrajoch zón. Opätovné zarastanie bolo pozorované najmä od krajov inhibičných zón, a preto usudzujeme, že vnútro zóny bolo dostatočne inhibované, vďaka čomu bol len veľmi zriedka pozorovaný opätovný výskyt kolónií vo vnútri inhibičných zón.

Paradoxne najväčšie inhibičné zóny zarástli po 48 hodinách viac než zóny menšie. Výnimku tvorilo pôsobenie 12 W po dobu 300 s na 10-násobne zriedenú kultúru, kde bola nameraná aj najväčšia inhibičná zóna v experimente (pozri Obrázok 20).



Obrázok 19: Porovnanie zarastania inhibičných zón po 24 hodinách (hore) a 48 hodinách (dole) kultivácie po ožarovaní mikrovlnným výbojom s použitím 9 W (vpravo) a 12 W (vľavo) na 10-násobne zriedenú kultúru po dobu 120 s



Obrázok 20: Zobrazenie najväčšej inhibičnej zóny vytvorenej v experimente pôsobením mikrovlnného výboja s výkonom 12 W po dobu 300 s na 10-násobne zriedenú kultúru kvasinky *Candida glabrata* po 48 hodinách kultivácie

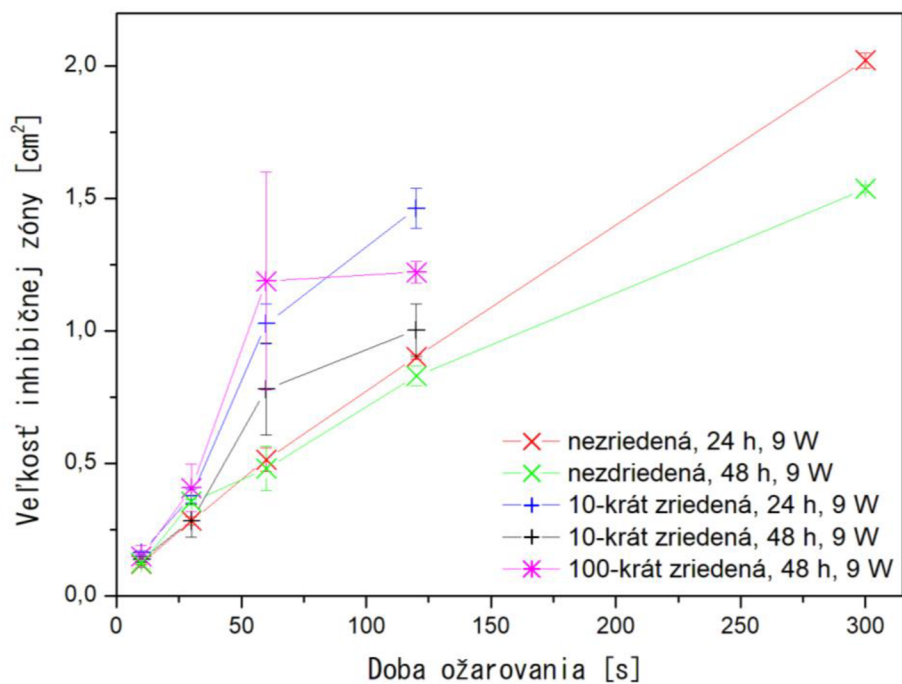
4.1.1.3 Vplyv počiatkovej koncentrácie buniek

Koncentrácia buniek bola prepočítaná z hodnoty absorpcie nameranej spektrofotometricky (pozri Tabuľka 2). Na výpočet bola použitá experimentálne stanovená rovnica kalibračnej priamky ($y = 3,475x$) pre absorpciu inokula *Candida glabrata* pri $\lambda = 630$ nm, kde x je počet buniek v 1 ml média ($1 \cdot 10^7$ CFU/ml).

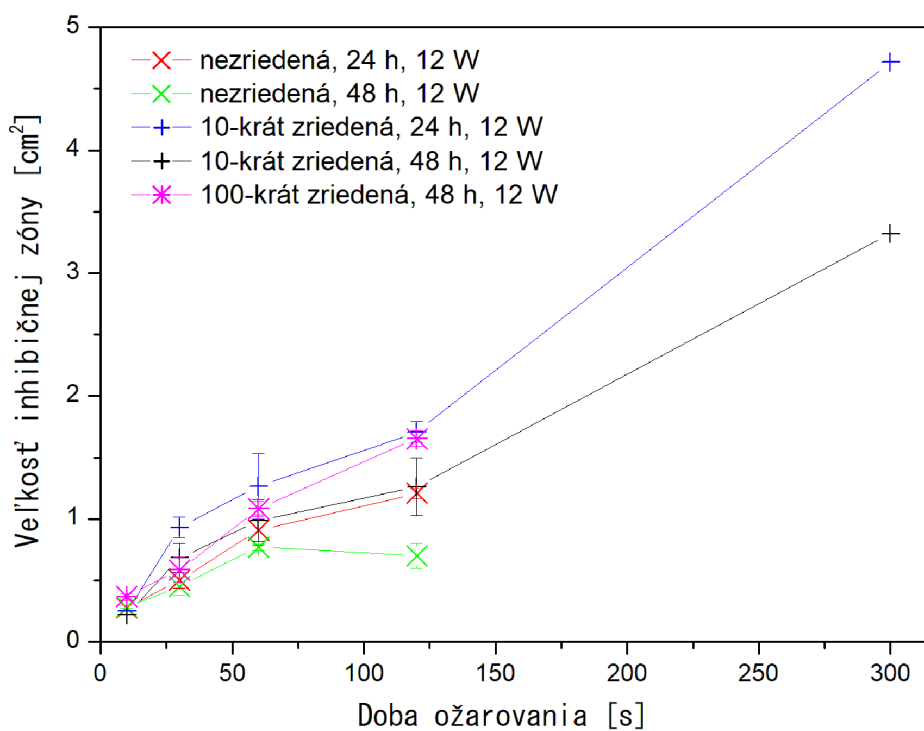
Tabuľka 2: Hodnoty absorpcií a koncentrácií buniek v jednotlivých riedeniach

Kultúra <i>Candida glabrata</i>	nezriedená	10-krát zriedená	100-krát zriedená
Absorbancia 1	0,8940	0,1050	0,0230
Absorbancia 2	0,9930	0,1210	0,0240
Priemerná hodnota absorpcie	0,9435	0,1130	0,0235
CFU v 1 ml	2720000	325000	67700
CFU v 50 μ l	136000	16300	3400

Vplyv počiatkovej koncentrácie buniek na účinnosť inhibície kvasinky *Candida glabrata* mikrovlnným výbojom bol pozorovaný pri použití nezriedenej kultúry, 10-násobne a 100-násobne zriedenej kultúry kvasinky *Candida glabrata*. Všeobecne môžeme tvrdiť, že veľkosť inhibičných zón narastá s menšou koncentráciou buniek, a teda, že najväčšie zóny možno pozorovať pre 100-krát nariadenú koncentráciu buniek, už aj po kratšej dobe ožarovania (pozri Obrázky 21, 22).

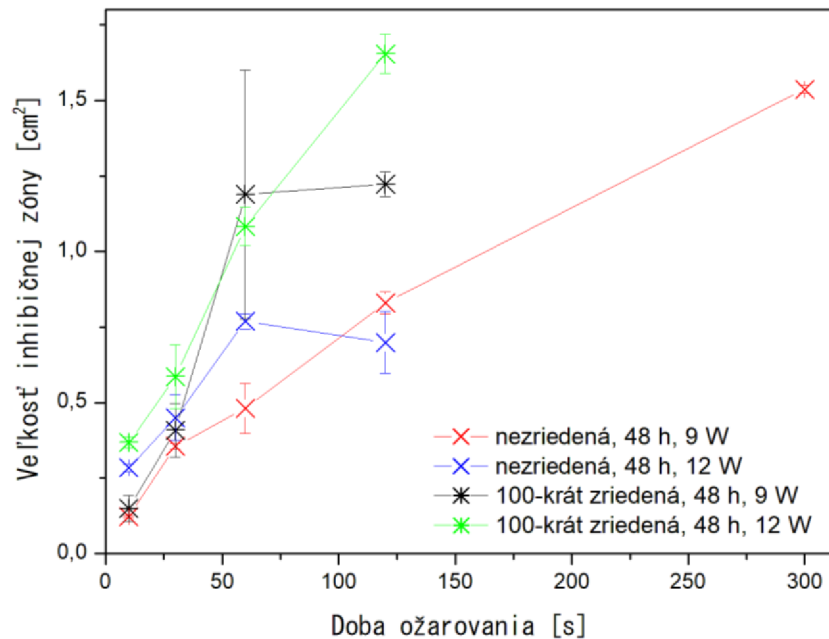


Obrázok 21: Graf zobrazujúci účinky mikrovlnného výboja na inhibíciu kultúry *Candida glabrata* o rôznej koncentrácii pri použití výkonu 9 W



Obrázok 22: Graf zobrazujúci účinky mikrovlnného výboja na inhibíciu kultúry *Candida glabrata* o rôznej koncentrácii pri použití výkonu 12 W

V prípade 100-násobne zriedenej koncentrácie nemožno zaručiť homogénnu distribúciu buniek na celom povrchu Petriho misky, a preto sa paralelné merania líšili viac než v prípade nezriedenej či 10-násobne zriedenej kultúry (pozri Obrázok 23).



Obrázok 23: Porovnanie odchylok paralelných meraní pre 100 násobne zriedenú a nezriedenú kultúru *Candida glabrata*

4.1.2 Ožarovanie biofilmu

Na záver boli pozorované účinky mikrovlnného výboja na biofilm tvorený kvasinkou *Candida glabrata*. Pri tomto experimente bolo nezriedené inokulum po nanosení na Petriho misky kultivované v termostate 24 hodín a následne ožarované. Pri ožarovaní však neboli pozorované žiadne zmeny v štruktúre biofilmu či už voľným okom či pod mikroskopom. Zmeny neboli viditeľné ani po následnej 24 hodinovej kultivácii. Dôvodom môže byť viacvrstvá štruktúra a kompaktnosť biofilmu, ktoré spôsobujú jeho vysokú rezistenciu (9). Ďalším dôvodom môže byť vysoká koncentrácia buniek a ich rapídne množenie a dorastanie vzniknutého priestoru. To znamená, že aj v prípade kedy niektoré z vrstiev by boli pri ožarovaní zničené, boli pri následnej kultivácii obnovené ostatnými vitálnymi bunkami. Hypotézu by bolo možné potvrdiť vyfarbovacími technikami živých a mŕtvych buniek, ktoré sú plánované v ďalších experimentoch.

5 ZÁVER

Cieľom práce bolo sledovať účinky nízko-teplotnej plazmovej trysky budenej mikrovlnným výbojom na kvasinku *Candida glabrata*. Dvadsaťštyri hodinové inokulum bolo nanosené na agarové platne v Petriho miskách a následne ožarované mikrovlnným výbojom. Účinky boli vyhodnotené na základe veľkosti vytvorených inhibičných zón a ich časovej stability 24 hodín a 48 hodín po ožiarení. Výsledky dokázali, že už po krátkodobom ožarovaní (10 s) možno pozorovať vznik inhibičných zón, ktorých veľkosť sa s narastajúcou dobou ožarovania zväčšuje. Podobne je tak v prípade použitého výkonu, a teda, že použitím výkonu 12 W dochádza k vzniku väčších inhibičných zón než v prípade použitia 9 W. Takisto bolo zistené, že za použitia 12 W sme schopní vytvoriť rovnako veľkú zónu, ako v prípade 9 W, za polovičný čas. Sledovaním vplyvu koncentrácie bolo zistené, že s menším počtom buniek, a teda aj ich menšej súdržnosti, dochádza k vzniku väčších a stabilnejších inhibičných zón. Pri pokuse o ožarovanie už vzniknutého biofilmu výsledky neboli pozorovateľné, a to najmä z dôvodu viacvrstvovej štruktúry biofilmu a jeho vysokej kompaktnosti.

Z experimentov je teda zrejmé, že použitím výkonu 12 W sú inhibičné účinky oveľa vyššie. Nevýhodou jeho použitia však môže byť vyššia teplota generovaná najmä pri dlhšom ožarovaní. Z hľadiska použitia by teda záležalo od pôvodu ožarovaného objektu. Z poznatkov o kvasinke *Candida glabrata* vieme, že je hrozbou najmä v nemocniciach pre hospitalizovaných pacientov. Pokiaľ by sa teda jednalo o sterilizáciu lekárskeho nástrojov či iných neživých objektov, vyššia teplota by nemala predstavovať problém a dalo by sa s výhodou použiť výkon 12 W (popríklad aj viac) za účelom urýchlenia a zdokonalenia sterilizácie. Pokiaľ by však ožarované objekty boli živé, napríklad ľudské tkanivá postihnuté kandidózou, určite by bolo rozumnejšie voliť kratšiu dobu ožarovania, výkon 9 W a proces viackrát opakovať, aby nedošlo k poškodeniu zdravých tkanív. V prípade práce na hranici teplotnej tolerancie živých objektov (pri použití 12 W a dlhšej doby ožarovania) by liečba nemusela byť pacientovi osožná. Tieto hypotézy však nie sú dokázané prácou na živom tkanive, a preto by pre ich potvrdenie boli potrebné ďalšie experimenty. Ďalšou perspektívou sú testy pre stanovenie vitality či inhibície buniek pomocou selektívnych farbív a samostatné sledovanie jednotlivých aktívnych častíc plazmy, ich efektov, produkovaného žiarenia a tepla za účelom sledovania ich efektu a vplyvu na inhibíciu. Po samostatnom sledovaní by bolo možné vyhodnotiť synergické pôsobenie jednotlivých efektov.

6 ZOZNAMY

6.1 Zoznam použitých skratiek

A = Ampér; mA= miliampér

APNTP – Atmospheric pressure non-thermal plasma = Nízkoteplotná nerovnovážna plazma za atmosférického tlaku

CAPP – Cold atmospheric pressure plasma = Nízkoteplotná plazma za atmosférického tlaku

DBD – Dielectric barrier discharge = Dielektrické bariérové výboje

eV = elektrónvolt

GPY = Glucose yeast peptone

HIV – Human immunodeficiency virus = Vírus ľudskej imunodeficiencie

Hz = Hertz; GHz= gigahertz

K = Kelvin

MDA – 3,4-Methylenedioxyamphetamine = 3,4-metyléndioxyamfetamín

napr.= napríklad

ORP – Oxidation-reduction potential = Oxidačne-redukčný potenciál

Pa = Paskal; kPa= kilopaskal

RNS – Reactive nitrogen species = Reaktívne druhy dusíka

RONs – Reactive oxygen nitrogen species= Reaktívne druhy kyslíka a dusíka

ROS – Reactive oxygen species = Reaktívne druhy kyslíka

s = sekunda

S. cerevisiae = *Sacharomyces cerevisiae*

Slm = Standard liter per minute = Štandardný liter za minútu

SWD – Surface wave discharge = Výboj povrchovej vlny

UV – Ultra violet light = Ultrafialové žiarenie

UVC – Ultra violet light C = Ultrafialové žiarenie v oblasti UV-C

V = Volt

VUV –Vacuum ultraviolet light = Vákuové ultrafialové žiarenie

W = Watt

6.2 Zoznam obrázkov

Obrázok 1: Bunky Candida glabrata: (A) mikroskopická štruktúra; (B) Candida glabrata na CHROMagar™; (C) Candida glabrata na agare Sabouraud dextróza. Stupnica zodpovedá 5 µm [9].....	10
Obrázok 2: Orálna kandidóza v pokročilom štádiu [13]	11
Obrázok 3: Biofilm vytvorený Candidou glabrata po 48 hodinách kultivácie v termostate.....	12
Obrázok 4: Multi-hrotový koronový výboj [17]	15
Obrázok 5: Bipolárny koronový výboj [18]	15
Obrázok 6: Tlecí výboj v sklenenej výbojke [20]	16
Obrázok 7: Oblúkový výboj medzi dvoma hrotmi [22]	17
Obrázok 8: Plazmová tryska pri prietoku 1Slm pri použití rôznych plynov (vľavo) a rôznych prietokových rýchlostí pri použití hélia ako nosného plynu (vpravo) [26].....	18
Obrázok 9: Iskrový výboj v podobe blesku [28].....	18
Obrázok 10: Mikrovlnne indukovaná plazma v laboratórnych podmienkach [29]	19
Obrázok 11: Schéma experimentálneho zapojenia: 1 – regulátor hmotnostného prietoku; 2 – kremenná kapilára; 3 – surfatronový rezonátor; 4 – MW anténa; 5 – MW-koaxiálny kábel; 6 – plazmový lúč; 7 – Petriho miska s naočkovanou kultúrou Candida Glabrata; 8 – držiak na Petriho misku.....	24
Obrázok 12: Usporiadanie merania: plazmový lúč mieriaci kolmo na Petriho misku.....	24
Obrázok 13: Porovnanie veľkosti inhibičných zón vzniknutých pri nasledovnej 24 hodinovej kultivácii po aplikácii 9 W po dobu 10 s (vľavo) a 120 s (vpravo) na nezriedenú kultúru.....	26
Obrázok 14: Zobrazenie veľkosti inhibičných zón v závislosti na dobe ožarovania pre nezriedenú kultúru.....	27
Obrázok 15: Zobrazenie veľkosti inhibičných zón v závislosti na dobe ožarovania pre 10-násobne zriedenú kultúru	27
Obrázok 16: Zobrazenie veľkosti inhibičných zón v závislosti na dobe ožarovania pre 100-násobne zriedenú kultúru	28
Obrázok 17: Porovnanie doby ožarovania potrebnej na vytvorenie podobne veľkých inhibičných zón pri použití 9 W – 120 s (vľavo) a 12 W – 60 s (vpravo), pre 10-násobne zriedenú kultúru po 24 hodinovej kultivácii	29
Obrázok 18: Inhibičná zóna vytvorená po 24 hodinovej kultivácii po 5 minútach pôsobenia výkonom 9 W na nezriedenú kultúru (vľavo), porovnanie zarastania inhibičnej zóny nezriedenej kultúry po 48 hodinách (vpravo)	29
Obrázok 19: Porovnanie zarastania inhibičných zón po 24 hodinách (hore) a 48 hodinách (dole) kultivácie po ožarovaní mikrovlnným výbojom s použitím 9 W (vpravo) a 12 W (vľavo) na 10-násobne zriedenú kultúru po dobu 120 s.....	30

Obrázok 20: Zobrazenie najväčšej inhibičnej zóny vytvorenej v experimente pôsobením mikrovlnného výboja s výkonom 12 W po dobu 300 s na 10-násobne zriedenú kultúru kvasinky <i>Candida glabrata</i> po 48 hodinách kultivácie	31
Obrázok 21: Graf zobrazujúci účinky mikrovlnného výboja na inhibíciu kultúry <i>Candida glabrata</i> o rôznej koncentrácii pri použití výkonu 9 W	32
Obrázok 22: Graf zobrazujúci účinky mikrovlnného výboja na inhibíciu kultúry <i>Candida glabrata</i> o rôznej koncentrácii pri použití výkonu 12 W	32
Obrázok 23: Porovnanie odchýlok paralelných meraní pre 100 násobne zriedenú a nezriedenú kultúru <i>Candida glabrata</i>	33

6.3 Zoznam použitej literatúry

- [1] MENDES GIANNINI, M. J. S., T. BERNARDI, L. SCORZONI, A. M. FUSCO-ALMEIDA a J. C. O. SARDI. Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 2013, **62**(1), 10-24 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1099/jmm.0.045054-0. ISSN 0022-2615. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.045054-0>
- [2] DOBRYNIN, Danil, Gregory FRIDMAN, Gary FRIEDMAN a Alexander FRIDMAN, 2009. Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New Journal of Physics*. 11(11), 115020-. DOI: 10.1088/13672630/11/11/115020. ISSN 1367-2630. Dostupné také z: <http://stacks.iop.org/13672630/11/i=11/a=115020?key=crossref.518f10daf4439017689fe0b7141d1c29>
- [3] BOGDANOV, Todor, Ivan TSONEV, Plamena MARINOVA, et al. Microwave Plasma Torch Generated in Argon for Small Berries Surface Treatment. *Applied Sciences* [online]. 2018, **8**(10) [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.3390/app8101870. ISSN 2076-3417. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2076-3417/8/10/1870>
- [4] SCHOLTZ, V., Nízkoteplotná plazma I: Čo je to. *Aldebaran bulletin* [online]. 2012(12) [cit. 2020-03-03]. Dostupné z: http://www.aldebaran.cz/bulletin/2012_22_pla.php
- [5] KOVÁČ, Ján. *POVRCHOVÉ ÚPRAVY BIOKOMPATIBILNÍCH MATERIÁLŮ*. Brno, 2018. Bakalárska práca. VUT Brno. Vedúci práce Doc. RNDr. František Krčma, Ph.D.
- [6] WANG, Ying, Tiecheng WANG, Yahong YUAN, et al. Inactivation of yeast in apple juice using gas-phase surface discharge plasma treatment with a spray reactor. *LWT* [online]. 2018, **97**(41), 530-536 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.07.049. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643818306327>
- [7] MARINOVA, P, E BENOVA, Y TODOROVA, et al. Surface-wave-sustained plasma torch for water treatment. *Journal of Physics: Conference Series* [online]. 2018, **982**(41), 530-536 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.1088/1742-6596/982/1/012009. ISSN 1742-6588. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/17426596/982/i=1/a=012009?key=crossref.154919d6d895c250d9edfba5f05e764e>
- [8] FIDEL, Paul L., Jose A. VAZQUEZ a Jack 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. 2020-03-08]. DOI: 10.1128/CMR.12.1.80. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <https://cmr.asm.org/content/12/1/80>
- [9] RODRIGUES, Célia, Maria RODRIGUES, Sónia SILVA, Mariana HENRIQUES, Olena P. ISHCHUK a Jure PIŠKUR. Candida glabrata Biofilms: How Far Have We Come? *Journal of Fungi* [online]. 2017, **3**(1), 529-535 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.3390/jof3010011. ISSN 2309-608X. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2309-608X/3/1/11>
- [10] SYKES, Jane E., T. BERNARDI, L. SCORZONI, A. M. FUSCO-ALMEIDA a J. C. O. SARDI. Candidiasis: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Canine and Feline Infectious Diseases* [online]. Elsevier, 2014, 2014, **62**(1), 653-659 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1016/B978-

1-4377-0795-3.00067-3. ISBN 9781437707953. ISSN 0022-2615. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781437707953000673>

[11] PAPPAS, Peter G., John H. REX, Jack D. SOBEL, Scott G. FILLER, William E. DISMUKES, Thomas J. WALSH a John E. EDWARDS. Guidelines for Treatment of Candidiasis. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2004, **38**(2), 161-189 [cit. 2020-07-05]. DOI: 10.1086/380796. ISSN 1537-6591. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/380796>

[12] AHMAD, Khadija M., Janez KOKOŠAR, Xiaoxian GUO, Zhenglong GU, Olena P. ISHCHUK a Jure PIŠKUR. Genome structure and dynamics of the yeast pathogen *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Research* [online]. 2014, **14**(4), 529-535 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1111/1567-1364.12145. ISSN 1567-1364. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsyr/article/14/4/529/586193>

[13] JABRA-RIZK, Mary Ann, Eric F. KONG, Christina TSUI, M. Hong NGUYEN, Cornelius J. CLANCY, Paul L. FIDEL, Mairi NOVERR a A. T. MAURELLI. *Candida albicans* Pathogenesis: Fitting within the Host-Microbe Damage Response Framework. *Infection and Immunity* [online]. 2016, **84**(10), 2724-2739 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1128/IAI.00469-16. ISSN 0019-9567. Dostupné z: <http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.00469-16>

[14] GOLDSTON, R. J. a P. H. RUTHERFORD. *Introduction to plasma physics*. Philadelphia: Institute of Physics Pub., c1995. ISBN 07-503-0183-X.

[15] MARTIŠOVITŠ, Viktor, 2006. *Základy fyziky plazmy: učebný text pre magisterské štúdium*. Bratislava: Vydavateľstvo UK. ISBN 80-223-1983-X.

[16] CHEN, Francis F. *Úvod do fyziky plazmatu*. Praha: Academia, 1983. ISBN (váz.).

[17] YOUSFI, M., N. MERBAHI, J. P., O. EICHWALD, A. RICARD, J.P. GARDOU, O. DUCASSE a M. BENHENNI. Non Thermal Plasma Sources of Production of Active Species for Biomedical Uses: Analyses, Optimization and Prospect. *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges* [online]. InTech, 2011, 2011-08-01 [cit. 2020-03-03]. DOI: 10.5772/19129. ISBN 978-953-307-309-5. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/biomedical-engineering-frontiers-and-challenges/non-thermal-plasma-sources-of-production-of-active-species-for-biomedical-uses-analyses-optimization>

[18] Jiskry a výboje - Korónový výboj. In: *Zajímavý fyzika aneb Nevšední jevy všedního dne* [online]. [cit. 2020-03-03]. Dostupné z: <http://zajfyz.physics.muni.cz/index.php?web=jiskry2009>

[19] KEIDAR, Michael a Isak I. BEILIS. *Plasma Engineering: Chapter 3- Electrical Discharges*. 2nd edition. Academic Press, 2018, s. 125-155. ISBN 9780128137024.

[20] SCHNITZER, Jannis Andrija. Glow discharge region. In: *Flickr* [online]. 2010 [cit. 2020-03-03]. Dostupné z: <https://www.flickr.com/photos/xjs-khaos/4444189404/>

[21] Micromachining Using Electrochemical Discharge Phenomenon. *Micromachining using electrochemical discharge phenomenon: Chapter 1 - Machining with Electrochemical Discharges—An Overview*. Boston, MA: Elsevier, 2014, s. 1-9. ISBN 9780323241427.

- [22] GROCHOWSKI, Achim. Lichtbogen 3000 Volt. In: *Wikipedia Commons* [online]. 2008 [cit. 2020-03-03]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lichtbogen_3000_Volt.jpg
- [23] BUDÍK, M. Elektrické charakteristiky povrchového výboje pro rozklad organických látek. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2009. 64 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Milada Bartlová, Ph.D.
- [24] SZALAY, Zsolt. Plazmová úprava povrchov lignocelulóзовých materiálů. Bratislava, 2009. 79 s. Diplomová práce. Univerzita Komenského v Bratislave.
- [25] WOEDTKE, Th. von, S. REUTER, K. MASUR a K.-D. WELTMANN, 2013. Plasmas for medicine: *Physics Reports*[online]. 530(4), 291-320 [cit. 2020-03-04]. ISSN 0370-1573.
- [26] NIU, Zheng, Tao SHAO, Cheng ZHANG, Hui JIANG, Chunxia LI, Ganping WANG, Jie TAN a Ping YAN. Atmospheric-Pressure Plasma Jet Produced by a Unipolar Nanosecond Pulse Generator in Various Gases. *IEEE Transactions on Plasma Science* [online]. 2011, **39**(11), 2322-2323 [cit. 2020-03-04]. DOI: 10.1109/TPS.2011.2127495. ISSN 0093-3813. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/5759096/>
- [27] Samostatný výboj v plynu za atmosférického a za sníženého tlaku. *Encyklopedie fyziky* [online]. 2007, 1-2 [cit. 2020-03-04]. Dostupné z: <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/283-samostatny-vyboj-v-plynu-za-atmosferickeho-a-za-snizeneho-tlaku>
- [28] Lightning pictures. In: *How stuff works* [online]. 2008 [cit. 2020-03-04]. Dostupné z: <https://science.howstuffworks.com/nature/climate-weather/storms/lightning-pictures.htm>
- [29] LEBEDEV, Yu A. Microwave discharges at low pressures and peculiarities of the processes in strongly non-uniform plasma. *Plasma Sources Science and Technology* [online]. 2015, **24**(5) [cit. 2020-03-04]. DOI: 10.1088/0963-0252/24/5/053001. ISSN 0963-0252. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/09630252/24/i=5/a=053001?key=crossref.236f70611f6f192cbf64d5cb4a84af59>
- [30] STULIĆ, Višnja, Tomislava VUKUŠIĆ, Ana BUTORAC, Dean POPOVIĆ a Zoran HERCEG. Proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* response to plasma treatment. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2019, **292**, 171-183 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.017. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160518304227>
- [31] ČTVRTEČKOVÁ, Lucie, Alena PICHOVÁ, Vladimír SCHOLTZ, Josef KHUN a Jaroslav JULÁK. Non-thermal plasma-induced apoptosis in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Contributions to Plasma Physics* [online]. 2019, **59**(8), 171-183 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1002/ctpp.201800064. ISSN 08631042. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ctpp.201800064>
- [32] XU, Hangbo, Yupan ZHU, Dongjie CUI, Mengru DU, Jiaqi WANG, Ruonan MA a Zhen JIAO. Evaluating the roles of OH radicals, H₂O₂, ORP and pH in the inactivation of yeast cells on a tissue model by surface micro-discharge plasma. *Journal of Physics D: Applied Physics* [online]. 2019, **52**(39), 171-183 [cit. 2020-07-12]. DOI: 10.1088/1361-6463/ab273d. ISSN 0022-3727. Dostupné z: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1361-6463/ab273d>

[33] KRCMA, Frantisek, Ivan TSONEV, Darina TRUCHLA, et al., 2018. Microwave micro torch generated in argon based mixtures for biomedical applications. Journal of physic D: Applied Physics. Article reference: JPhysD-117004

[34] BOGDANOV, Todor, Ivan TSONEV, Mariana ATANASOVA, Plamena MARINOVA, Yana TOPALOVA, Yovana TODOROVA, Ivaylo YOTINOV a Evgenia BENOVA. *SURFACE-WAVE-SUSTAINED PLASMA SOURCE FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS* [online]. 2019 [cit. 2020 04-06]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/331975966_SURFACE-WAVE-SUSTAINED_PLASMA_SOURCE_FOR_BIOMEDICAL_APPLICATIONS

7 PRÍLOHY

Tabuľka 3: Záznam veľkosti inhibičných zón z merania nezriedenej kultúry

Nezriedená kultúra po 24 hodinách			Nezriedená kultúra po 48 hodinách		
Doba ožarovania [s]	Výkon [9 W]	Výkon [12 W]	Doba ožarovania [s]	Výkon [9 W]	Výkon [12 W]
	Veľkosť zóny [cm ²]	Veľkosť zóny [cm ²]		Veľkosť zóny [cm ²]	Veľkosť zóny [cm ²]
10	0,13	0,24	10	0,12	0,28
10	0,12	0,32	10	0,13	0,29
30	0,27	0,55	30	0,36	0,50
30	0,30	0,45	30	0,35	0,40
60	0,55	0,82	60	0,42	0,75
60	0,48	1,00	60	0,54	0,79
120	0,90	1,24	120	0,86	0,77
120	0,91	1,18	120	0,80	0,63
300	2,00		300	1,55	
300	2,04		300	1,53	

Tabuľka 4: Záznam veľkosti inhibičných zón pre 10 násobne zriedenú kultúru

10- krát zriedená kultúra po 24 hodinách			10- krát zriedená kultúra po 48 hodinách		
Doba ožarovania [s]	9 W	12 W	Doba ožarovania [s]	9 W	12 W
	Veľkosť zóny [cm ²]	Veľkosť zóny [cm ²]		Veľkosť zóny [cm ²]	Veľkosť zóny [cm ²]
10	0,19	0,28	10	0,13	0,22
10	0,17	0,27	10	0,15	0,22
30	0,44	0,96	30	0,33	0,60
30	0,39	1,09	30	0,24	0,77
60	1,07	1,59	60	0,90	1,11
60	1,19	1,18	60	0,66	0,87
120	1,66	1,94	120	0,93	1,10
120	1,55	1,81	120	1,07	1,43
300		5,17	300		3,32
300			300		

Tabuľka 5: Záznam veľkostí inhibičných zón pre 100 násobne zriedenú kultúru

100- krát zriedená kultúra po 24 hodinách		
Doba ožarovania [s]	9 W	12 W
	Veľkosť zóny [cm²]	Veľkosť zóny [cm²]
10	0,18	0,38
10	0,12	0,36
30	0,47	0,66
30	0,35	0,51
60	0,90	1,13
60	1,48	1,04
120	1,19	1,61
120	1,25	1,70

Impact of microwave plasma torch on the yeast *Candida glabrata*

Kristína Trebulová¹, František Krčma^{1*}, Zdenka Kozáková^{1*} and Petra Matoušková^{1*}

¹ Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Purkyňova 118, 61200 Brno, Czech Republic; krcma@fch.vut.cz

* Correspondence: krcma@fch.vut.cz; matouskova@fch.vut.cz

Received: date; Accepted: date; Published: date

Featured Application: A cold gaseous plasma torch generated in argon at low powers and atmospheric pressure is applicable in medicinal treatment where it could significantly decrease microbial skin or tissue contamination in short time and with low operating costs.

Abstract: Recently, various cold plasma sources have been tested for their bactericidal and fungicidal effects with respect to their application in medicine and agriculture. The purpose of this work is to study the effects of a 2.45 GHz microwave generated plasma torch on a model yeast example *Candida glabrata*. The microwave plasma was generated by a surfatron resonator and pure argon at constant flow rate of 5 Slm was used as a working gas. Thanks to a high number of active particles generated in a low-temperature plasma, this type of plasma has become highly popular, especially thanks to its bactericidal effects. However, its antimycotic effects and mechanisms of fungal inactivation have still not been fully understood. Therefore, this study focuses on the antifungal effects of the microwave discharge on *Candida glabrata*. The main focus is on the measurement and evaluation of changes in inactivation effects caused by varying the initial concentration of *Candida glabrata* cells, applied microwave power and the exposure time. The discharge was applied on a freshly inoculated colony of *Candida glabrata* spread on the agar plates and its inhibitory effects were observed in a form of inhibition zones formed after the subsequent cultivation.

Keywords: microwave discharge; surface wave sustained discharge; atmospheric pressure plasma torch; low-temperature plasma; plasma sterilization, yeast inactivation, *Candida glabrata*

1. Introduction

In the last decades, the number of recently discovered pathogenic microorganisms has rapidly grown up and their resistance to antibiotics or antifungals has increased as a result of the excessive use of antibiotics, antifungals and immunosuppressants (drugs that suppress the function of the immune system) [1, 2]. Therefore, the attention of scientists has focused on finding new ways to inactivate unwanted microorganisms (ideally without the side effects or potential build-up of microorganism resistance). This problem has led to the introduction of a new interdisciplinary field called plasma medicine that combines physics, biology and chemistry in exploring new possibilities for food sterilization, the sterilization of medical equipment and tools or direct therapeutic treatments of various diseases.

Plasma technologies and their applications in the food and biomedical industries have become one of the latest trends in the scientific research of our century. Plasma used for food or living tissue exposure must be operating with a neutral gas temperature of around 20–50 °C to prevent a degradation of vitamins, proteins and other biological and biologically active substances, or to prevent an injury or discomfort of living organisms in case of biomedical applications [3–9].

On the other hand, the gas used must be sufficiently activated, which means that it must contain a high concentration of reactive particles (ions, radicals, excited species) initiating microbial inactivation. These conditions can be very efficiently fulfilled by the atmospheric pressure non-thermal plasma (APNTP, also called Cold atmospheric plasma - CAP), where the neutral gas temperature (temperature related to the kinetic motion of heavy particles - atoms, molecules and ions) remains close to the environment, but the temperature of free electrons usually reaches thousands of Kelvin. Using conventional gases such as air or argon, it is possible to produce Reactive oxygen species (ROS) and Reactive nitrogen species (RNS) [10, 11], ozone [1], oxides and peroxides [2] in a very short time. In addition, non-thermal plasmas efficiently produce ultraviolet (UV) radiation in the UVC region and vacuum ultraviolet (VUV) radiation, which both have strong antimicrobial effects [12–14]. Devices [15] effectively producing such type of plasma are based on the corona discharge [16], dielectric barrier discharge [17], atmospheric pressure glow discharge [18], plasma beam or nanosecond pulsed discharge [19].

In the food industry, plasma is mainly used to sterilize equipment and instruments, and studies are being carried out on the possible application of plasma for the sterilization of fruit and fruit juices, mainly due to the proven integrity of vitamins and active substances [20]. In biomedical applications, plasma is also used for the sterilization of equipment and tools, and several pilot studies focus on the treatment of skin diseases, cancer or superficial injuries [3, 21]. Different systems were used for the study of selected yeast properties after the plasma exposure. The yeast proteomics was studied using both discharges in the gaseous phase and in gaseous bubbles in the liquid phase [22]. The corona discharge was used for the apoptosis study of *Saccharomyces cerevisiae* in [23]. The role of oxidative stress on the yeast apoptosis after the exposure by the transient spark discharge was evaluated in [24]. Quite popular are studies of various discharges for the antifermentation treatment of juices, mainly apple juice. The corona discharge was used by [20, 25], the transient spark was used for this purpose in [26]. The gliding arc discharge was used for the cold sterilization of tomato juice in [27]. A few studies were also completed using the surface discharge for the determination of the selected active species role in the direct tissue treatment [28, 29].

Our, recently developed, surface wave initiated microwave torch [30–35] can also be a source of the low-temperature plasma. In this case, the plasma is produced by an electromagnetic wave that travels along the interface between the plasma and the dielectric [36]. Standardly, we use argon as a carrier gas for the plasma generation and the yeast treatment because it is cheaper than helium and colder than common atmospheric pressure discharges in air such as DBDs, corona or glow discharges [34].

In the microwave discharge, the plasma has a higher electron temperature than plasma obtained by the indirect and high-frequency discharge. Due to the high temperature of the electrons, there is also a higher dissociation and ionization degree, which is reflected in a wide range of uses of this type of the discharge including wound healing [30–33], surface decontamination of fruits [34] or deposition of thin layers [35]. This paper focuses on the first use of this discharge on the yeast *Candida glabrata* as a model microorganism.

Candida glabrata is classified as a non-dimorphic yeast that exists as a small blastocoid. In fact, *Candida glabrata* is the only species of the genus *Candida* that does not form pseudohyphae at temperatures above 37 °C. A distinguishing feature between *Candida glabrata* and better known and investigated *Candida albicans* is its haploid genome (in contrast to the diploid genome of *Candida albicans*). Interestingly, *Candida glabrata* is more genetically related to baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) than to *Candida albicans* or *Candida parapsilosis* [37, 38].

Candida glabrata can be found in the human body as a part of its natural microflora, mainly in the gastrointestinal tract, mouth or genital area. *Candida glabrata* is usually well controlled or harmless in healthy people. However, it may cause problems to people with a suppressed immune system. Particularly at risk are hospitalized patients, people with HIV, people being treated for cancer and people who have had organ transplants [39].

The danger of the infections caused by *Candida glabrata* lies in its innate resistance to theazole antifungal therapy, which is very effective in treating infections caused by other *Candida* species. *Candida glabrata* retains many other virulence factors, such as the ability to adapt quickly to stressful conditions, the ability to secrete phospholipases, lipases, and hemolysins, which contribute to an extreme aggression leading to a low therapeutic response and severe recurrent candidiasis. One of the most crucial virulence factors is the expression of the gene adhesin, thanks to which the organism can adhere to biotic and abiotic surfaces in microbial substrates. Adhesin expression is the mechanism by which *Candida glabrata* produces fungal biofilms that have been shown to be more resistant to antifungals than planktonic cells. The ability to form biofilms is considered to be the most important virulence factor of *Candida glabrata*. Biofilms are known as the surface-associated communities of microorganisms embedded in the extracellular matrix that require significant antifungal therapy and host immune responses [40, 41].

Infections caused by the yeasts of the genus *Candida* are called candidiasis. *Candida glabrata* is currently ranked the second or the third in the world as a cause of superficial (oral, esophageal, vaginal, urinary) or systemic candidiasis [40]. Based on these facts, there is an emergent necessity to find new non-traditional ways how to inactivate this yeast.

2. Materials and Methods

Microwave plasma jet set up

A low power solid state microwave power supply operating at frequency of 2.45 GHz (Sairem, GMS 200 W) was connected by a flexible coaxial cable to a commercial compact electromagnetic surface wave (SW) launcher (Sairem, SURFATRON 80). The discharge was created in a quartz capillary (real dielectric permittivity $\epsilon_r = 3.2541$, imaginary dielectric permittivity $\epsilon_i = 0.0062$, i.d. 3 mm, o.d. 8.0 mm) in argon (purity of 99.9965 %) at a constant mass flow rate of 5 Slm, controlled by the Bronkhorst FG201-CV mass flow controller. The experimental set up is shown in Fig. 1. The experiments were performed at 2 different powers (9 W, 12 W; maximal reflected power of 0.5 W), thanks to which the surface temperature of agar plates stayed within the temperature tolerance of the living tissues [3]. Based on our previous results obtained by the thermal camera, temperature of the treated object does not exceed 40 °C even after 30 s of the treatment [34]. The rotational temperature (indicating the real temperature of the plasma core) was obtained from the emission spectrum of the OH radical and it reached (650±50) K at the end of the quartz capillary and decreased linearly to (600±50) K at the treated surface [34]. The visible end of the discharge was directed perpendicularly to the treated area approximately at the center of the agar in the sterile petri dishes so that the visible end of the beam did not touch the surface. In case of 9 W, the distance from the top of the inoculated culture was 5 mm while using 12 W, the discharge torch was longer so the distance between its visible end and the treated area was reduced to 3.5 mm. The distribution of active particles and calculated plasma parameters at similar operating conditions were described in details in [34].

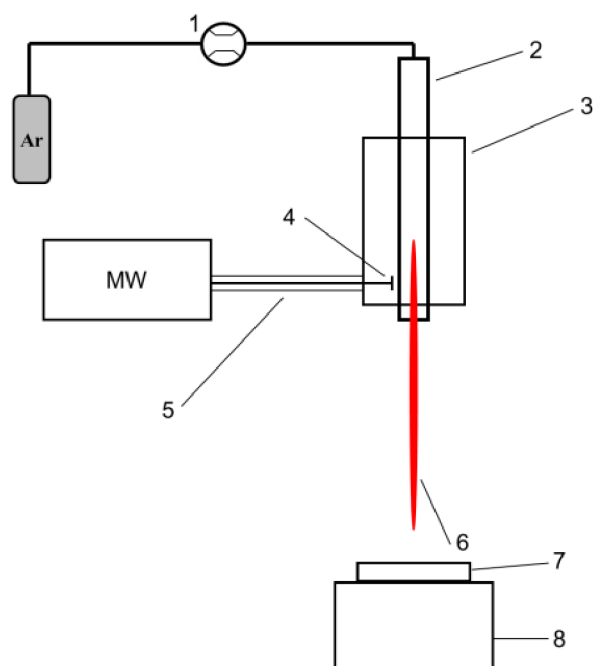


Figure 1. Scheme of the experimental set up: 1 - mass flow controller; 2 - quartz capillary; 3 - surfatron resonator; 4 - MW antenna; 5 - MW-coaxial cable; 6 - plasma beam; 7 - Petri dish with inoculated *Candida glabrata* culture; 8 - Petri dish holder

Preparation of *Candida glabrata* samples

For preliminary testing of antimicrobial activity of the microwave plasma, yeast strain *Candida glabrata* CCM 8270 was used. This testing strain was supplied by the Czech Collection of Microorganisms in Brno [42]. The yeast culture was grown in the GPY liquid medium (Glucose Yeast Peptone, HiMedia, India) for 24 hours. Temperature of cultivation was 37 °C.

Then, the yeast culture (50 µl; 1×10^7 CFU/ml) grown for 24 h was cultivated on the surface of agar medium in the Petri dishes. Agar plates were prepared using the commercial medium Malt Extract Agar Base (HiMedia, India) and Petri dishes with diameter of 52.6 mm were used. For the antimicrobial activity testing of the microwave generated torch, three different concentrations of microorganism were used (24 h culture with concentration 1×10^7 CFU/ml and a 10-fold and a 100-fold diluted culture). The cell concentration was calculated from the absorbance value measured spectrophotometrically at $\lambda = 630$ nm and from the experimentally determined calibration curve dependence of absorbance on concentration of the *Candida glabrata* cells (CFU/ml).

The plasma torch was applied on the prepared agar plates with microbial samples at selected conditions (see Results). After the plasma application, the agar plates were incubated at 37 °C for 24 and 48 h. Microbial inhibition of plasma was determined by measuring the clear inhibition zone of microorganism growth and recorded as an area of the inhibition zone in square centimetres. Their sizes were measured using Microsoft Power Point where an ellipse or a circle was drawn over each zone and a corresponding dish. Their diameters and heights were recalculated to fit the real dimensions of the Petri dishes with a diameter of 52.6 mm. Each sample was treated by the plasma twice independently and the inhibition zone measurement was realized independently three times for each sample to eliminate random errors.

Application of the discharge

Petri dishes with the freshly inoculated *Candida glabrata* cultures were treated under the microwave plasma torch for selected exposure times of 10 s, 30 s, 60 s, 120 s, and 300 s. Each Petri dish was treated individually. All the measurements were done twice and the control sample (without the plasma treatment) was preserved for each yeast concentration. After the plasma application, the Petri dishes were

incubated at 37 °C for 48 hours. Documentation in a form of photographs of all Petri dishes was recorded after 24 and 48 hours.

3. Results and discussion

Three factors and their impact on the inhibition zone size and its time stability were measured:

- a) plasma exposure time
- b) applied microwave power
- c) initial cell concentration

3.1 Plasma exposure time impact

Comparing the sizes of the inhibition zones, it was found that the size of the inhibition zones increases more or less linearly with the plasma treatment duration. Thus the longer the exposure time is, the bigger the inhibition zone is achieved (see Fig. 2). This correlation is observed at all test concentrations and applied powers (see Fig. 3–5).

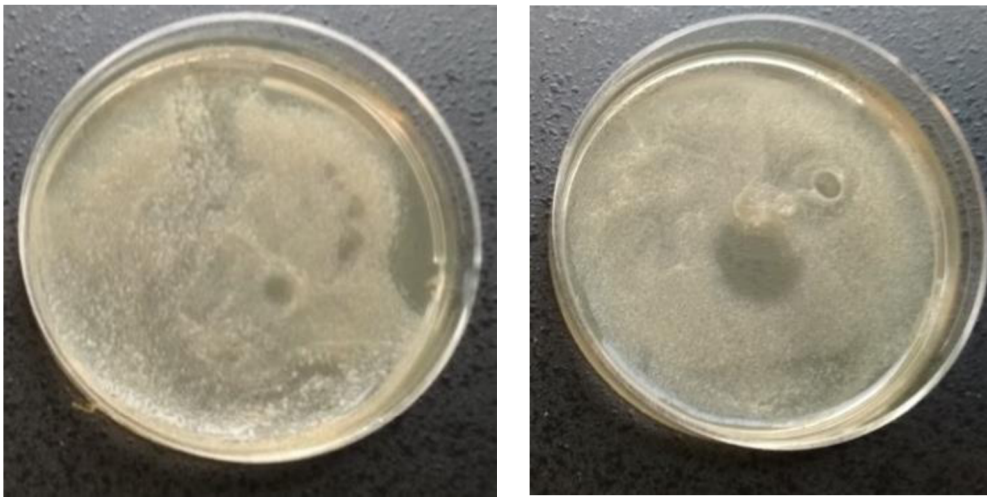


Figure 2. Comparison of inhibition zone sizes created by 10 s [left] and 120 s [right] plasma treatment with 9 W power after 48 hours from the exposure of the undiluted culture.

3.2 Applied power impact

A similar trend like in case of the exposure time is also valid for the impact of the power used for the treatment. The results shown in Figs. 3–5 demonstrate that the power of 12 W is more effective than 9 W, since by applying the greater power, bigger inhibition zones were created at all concentrations.

Inhibition zones created using 12 W were twice as big as the ones created by 9 W, so we can state that power of 12 W has a double impact on the inhibition of *Candida glabrata* compared to 9 W. From the measured inhibition zone sizes one may conclude that for the creation of an inhibition zone of the same size it is possible to use 12 W and reduce the exposure time to half compared to 9 W. For example, to create the zone with the size of 1 cm², in case of the 10-fold dilution the power of 9 W must had been applied for 1 minute but by using the power of 12 W the exposure time was reduced to 30 s. Another example might be the original concentration and the zone of 1.5 cm². For the creation of this zone, the exposure time must had been 2 minutes when using 9 W but the zone of the same size was reached just after 1 minute using the power of 12 W. This trend also fits to all concentrations.

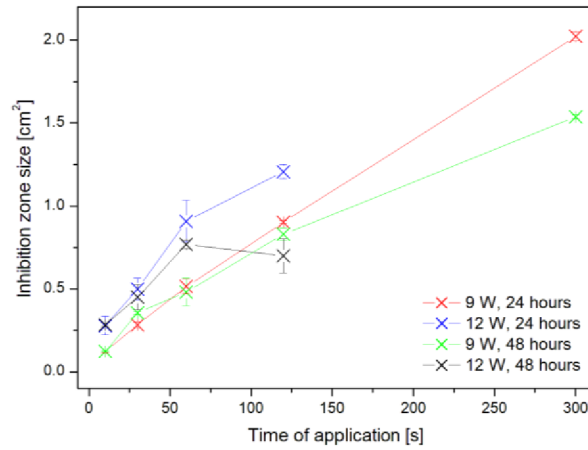


Figure 3. The dependence of the inhibition zone size on the plasma exposure time for the original undiluted culture.

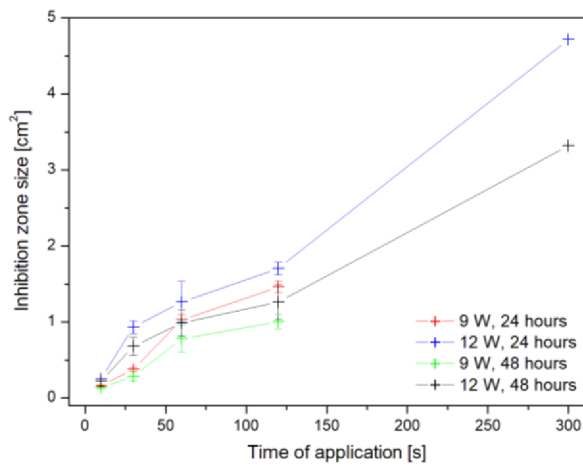


Figure 4. The dependence of the inhibition zone size on the plasma exposure time for the 10-fold dilution.

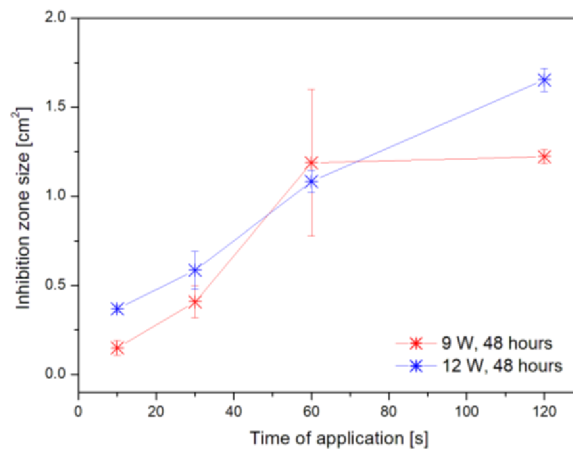


Figure 5. The dependence of the inhibition zone size on the plasma exposure time for the 100-fold dilution.

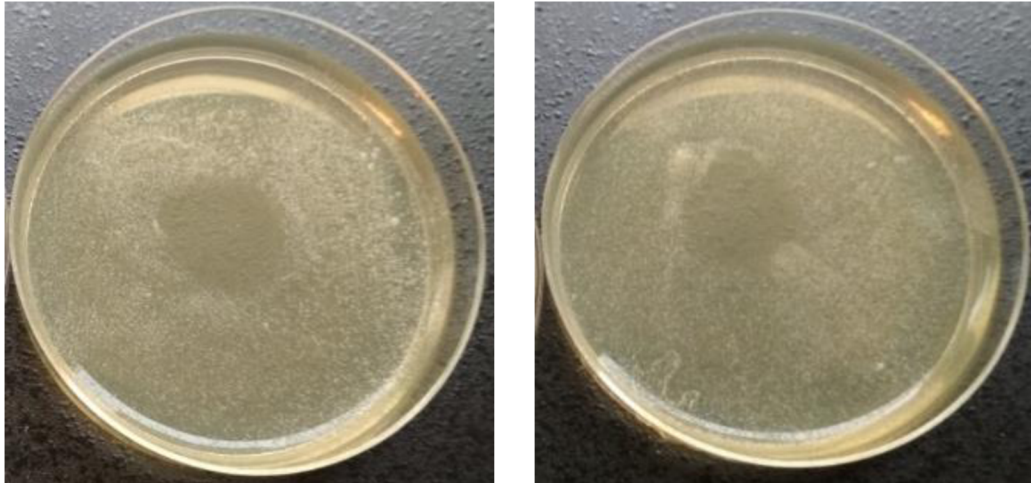


Figure 6. Comparison of exposure times needed for the creation of the same zone size when using 120 s at 9 W (left) or 60 s at 12 W (right) in case of the 10 fold dilution after the 24 hour cultivation.

It can be also noticed that the sizes of the inhibition zones decreased after 48 hours, which is due to the recolonization of the zones (Fig. 6). After the application of 9 W, a greater reduction of the inhibition zones was observed than in case of the power of 12 W (see Fig. 9). Thus, another advantage of using 12 W is a longer stability of the inhibition zones. The overgrowth of the inhibition zones is due to the colonization of surrounding cells or incomplete inhibition of yeast cells at the edges of the zones. The regrowth was observed mainly in the peripheral regions of the inhibition zones, and therefore we conclude that the interior of the zone was sufficiently inhibited, thanks to which the re-occurrence of the colonies inside the inhibition zones was very rarely observed.

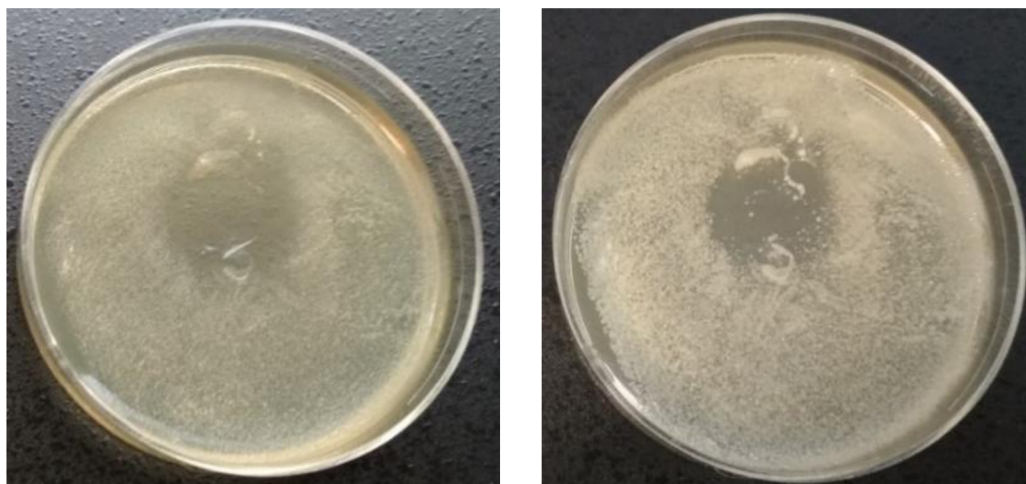


Figure 7. Inhibition zone observed after 24 hours from the 5 minute treatment of the undiluted culture using 9 W power [left], the regrowth of the peripheral regions of the zone after the 48 hour cultivation [right].

Paradoxically, the largest inhibition zones had overgrown more intensively after 48 hours than the smaller zones. An exception was the power of 12 W applied for 5 minutes on the 10-fold dilution, where the largest inhibition zone in the experiment was measured (see Fig. 8).

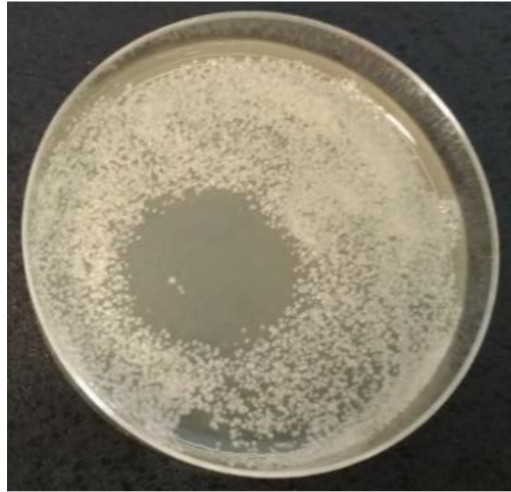


Figure 8. Picture of the largest zone created in the experiment using 12 W power for 5 minutes in case of the 10-fold dilution.

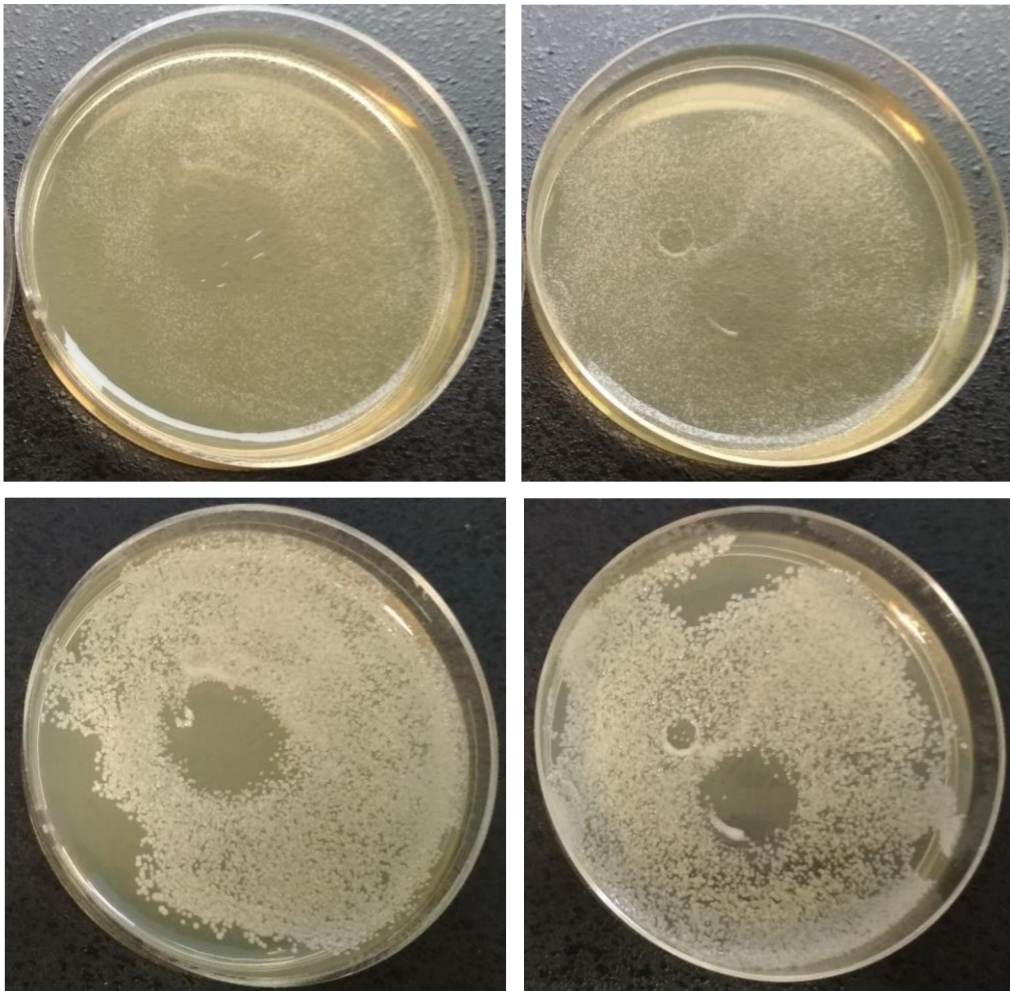


Figure 9. Comparison of the regrowth after the 24 hour [top] and 48 hour [bottom] cultivation of the 10-fold dilution after the 2 minute treatment with the use of 9 W [right] or 12 W [left] power.

3.3 Initial cell concentration impact

The influence of the initial cell concentration of *Candida glabrata* on the microwave discharge inhibition efficiency was observed using undiluted culture, 10- and 100-fold dilutions of *Candida glabrata*. In general, we can say that the size of the inhibition zones increases with the lower cell

concentration, namely that the largest zones can be observed for the 100-fold dilution, even after the shorter plasma exposure time (see Figs. 10 and 11).

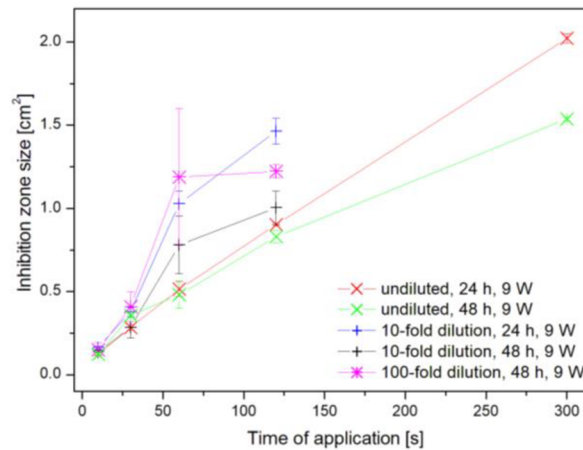


Figure 10. Dependence of the inhibition zone size on the exposure time using power of 9 W.

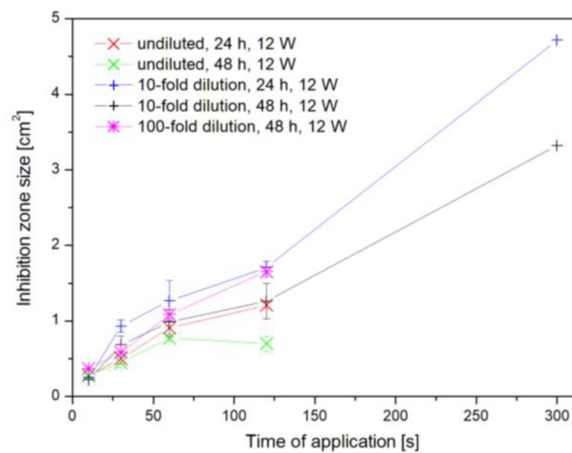


Figure 11: Dependence of the inhibition zone size on the exposure time using power of 12 W.

However, for the 100-fold dilution, a homogeneous distribution of the cells over the entire surface of the Petri dish cannot be guaranteed, and therefore the parallel measurements differed more than in case of the original concentration or the 10-fold dilution.

Based on our previous experimental results obtained by optical emission spectroscopy [34], we suppose the action of reactive oxygen and nitrogen species (RONS) produced by our torch that can play a significant role in the decontamination process. Even though we use pure argon as the carrier gas, molecules contained in the surrounding air (oxygen, nitrogen, water vapor, etc.) are swept into the plasma flow where they are excited or ionized. Therefore, the presence of RONS such as nitrogen monoxide radical (NO), hydroxyl radical (OH), atomic oxygen (O), peroxy radical (ONOOH) or ozone (O₃) was determined in our plasma torch [34]. The NO radical is very reactive and, in a reaction with water, forms nitrous acid, which decreases the substrate pH. This effect might contribute to the deactivation of some kinds of microorganisms. Also the OH radical is well known as one of the strongest non-selective oxidative species. Further, UV radiation of the NO radical belongs to the UVC region, which is well known for its bactericidal effects [14].

4. Conclusions

The target of this work was to study the effects of the microwave low-temperature plasma torch on the yeast *Candida glabrata*. The 24-hour inoculum was spread on the top of the agar plates in the Petri dishes and then exposed to the microwave discharge. The evaluation of inhibitory effects was based on

the size of the inhibition zones formed during the subsequent cultivation and their time stability 24 and 48 hours after the treatment. The results showed that even after a short time exposition (10 s), it is possible to observe the formation of inhibition zones, the size of which increases with the increasing treatment time. It is similar in the case of the applied power effect, higher power leads to the formation of bigger inhibition zones. The effect is not linear because the change of power from 9 W to 12 W leads to the same inhibition area formation in half time. By monitoring the effect of concentration, it was found that with a smaller number of cells, and thus their less cohesion, larger and more stable inhibition zones occur. When trying to expose the already formed biofilm, the inhibition zone formation was not observable, mainly due to the multilayer structure of the biofilm and its high compactness [9].

It is clear from the experiments that a power of 12 W is more effective and the inhibitory effects are much higher. However, the disadvantage of its use may be the higher temperature generated, especially during the prolonged treatment. From the viewpoint of the usage, it would therefore depend on the origin of the exposed object. From the knowledge about the yeast *Candida glabrata*, we know that it is a threat, especially in hospitals for hospitalized patients. Thus, in the case of sterilization of medical instruments or other inanimate objects, the higher temperature should not be a problem and the power of 12 W (or even more) could be advantageously used to speed up and improve the sterilization. However, if the exposed objects are alive, such as human tissues affected by candidiasis, it would certainly be more sensible to choose a shorter exposition time, 9 W power and repeat the process several times to avoid any damage on the healthy tissues. When working at 12 W for longer time, the top of the temperature range could easily be reached and the treatment may not be comfortable for the patient. However, these hypotheses are not proven by working on the living tissue, and therefore further experiments would be needed to confirm them. Another perspective for future experiments is to determine the vitality or inhibition of yeast cells using selective dyes, and separate monitoring of individual active plasma particles, their effects, radiation and heat produced to analyze their effect on the inhibition. After an independent monitoring, it would be possible to evaluate the synergistic effect of individual factors and plasma particles on the yeasts.

Author Contributions: Conceptualization F.K. and P.M.; methodology K.T., F.K. and P.M.; investigation K.T., F.K., Z.K., and P.M.; writing—original draft preparation K.T., F.K. and P.M. review and editing K.T., F.K., Z.K., and P.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received external funding from EU cohesion funds, program INTEREG SK-CZ, project No. 304011P709.

Acknowledgments: The research was financially supported by the EU cohesion funds, program INTEREG SK-CZ, project No. 304011P709.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Grzegorzewski, F. *Influence of non-thermal plasma species on the structure and functionality of isolated and plantbased 1,4-benzopyrone derivatives and phenolic acids*. Dissertation, Technische Universität Berlin, 2011.
2. Soloshenko, I.A., Tsiolko, V.V., Pogulay, S.S., Kalyuzhnaya, A.G., Bazhenov, V.Y., Shchedrin, A.I. Effect of water adding on kinetics of barrier discharge in air. *Plasma Sources Sci Technol*, **2009**, *18*(4), 045019.
3. Dobrynin, D., Fridman, G., Fridman, G., Dridman, A., Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New Journal of Physics*. **2009**, *11*(11), 115020.
4. Misra, N.N., Tiwari, B.K., Raghavarao, K.S.M.S. et al. Nonthermal Plasma Inactivation of Food-Borne Pathogens, *Food Eng Rev*, **2011**, *3*, 159-170.
5. Fröhling, A., Durek, J., Schnabel, U., Ehlbeck, J., Bolling, J., Schlüter, O. Indirect plasma treatment of fresh pork: Decontamination efficiency and effects on quality attributes, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **2012**, *16*, 381-390.

6. Hertwig, C., Reineke, K., Ehlbeck, J., Erdoğan, B., Rauh, C., Schlüter, O. Impact of remote plasma treatment on natural microbial load and quality parameters of selected herbs and spices, *Journal of Food Engineering*, **2015**, *167, Part A*, 12-17.
7. Ehlbeck, J., Schnabel, U., Andrasch, M., Stachowiak, J., Stolz, N., Fröhling, A., Schlüter, O., Weltmann, K.-D. Plasma Treatment of Food, *Contributions to Plasma Physics*, **2015**, *55*, 753-757.
8. Moritz, M., Wiacek, C., Koethe, M., Braun, P.G. Atmospheric pressure plasma jet treatment of *Salmonella Enteritidis* inoculated eggshells, *International Journal of Food Microbiology*, **2017**, *245*, 22-28.
9. Won, M.Y., Lee, S.J., Min, S.C. Mandarin preservation by microwave-powered cold plasma treatment, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **2017**, *39*, 25-32.
10. Lukeš, P., Locke, B.R., Brisset, J.L. *Aqueous-phase chemistry of electrical discharge plasma in water and in gas-liquid environments*. In: Parvulescu VI, Magureanu M, Lukeš P (eds) *Plasma chemistry and catalysis in gases and liquids*. Wiley, Weinheim, **2012**, pp 243–308.
11. Ono, R., Oda, T., Ozone production process in pulsed positive dielectric barrier discharge. *J Phys D Appl Phys*, **2007**, *40(1)*, 176-184.
12. Koutchma, T. UV Light for Processing Foods. *Ozone Science and Engineering*. **2008**, *30*. 93-98.
13. Choudhary, R., Bandla, S. Ultraviolet Pasteurization for Food Industry. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, **2012**, *2*, 12-15.
14. Sosnin, E.A., Stoffels, E., Erofeev, M.V., Kieft I. E., Kunts, S. E. The effects of UV irradiation and gas plasma treatment on living mammalian cells and bacteria: a comparative approach, *IEEE Transactions on Plasma Science*, **2004**, *32(4)*, 1544-1550
15. Lu, P.; Cullen, P.J.; Ostrikov, K. Chapter 4 - *Atmospheric Pressure Nonthermal Plasma Sources*. In *Cold Plasma in Food and Agriculture: Fundamentals and Applications*; Misra, N.N.; Schluter, O.; Cullen, P.J.; Publisher: Elsevier Inc., **2016**; pp. 83-116.
16. Lee, T., Puligundla, P., Mok, C., Corona discharge plasma jet inactivates food-borne pathogens adsorbed onto packaging material surfaces, *Packaging Technology and Science An International Journal*, **2017**, *30(10)*, 681- 690.
17. Jayasena, D., Kim, H.J., Cheorun, J. *Dielectric barrier discharge: Meat treatment*. In *Encyclopedia of plasma technology*, Edition: 1st Edn, Editors: J. Leon Shohet Publisher: CRC Press, **2017**.
18. Zhang, B., Chen, L., Lin, L.X., Zhang, H. Understanding the multi-scale structure and functional properties of starch modulated by glow-plasma: A structure-functionality relationship, *Food Hydrocolloids*, **2015**, *50*, 228-236.
19. Stoffels, E., Flikweert, A.J., Stoffels, W.W., Kroesen, G.M.W. Plasma needle: a non-destructive atmospheric plasma source for fine surface treatment of (bio)materials, *Plasma Sources Science and Technology*, **2002**, *11(4)*, 383-388.
20. Wang, Y., Wang, T., Yuan, Y., Fan, Y., Guo, K., Yue, T., Inactivation of yeast in apple juice using gas-phase surface discharge plasma treatment with a spray reactor. *LWT Food Science and Technology*, **2018**, *97(41)*, 530-536.
21. Marinova, P, Benova, E., Todorova Y., Topalova, Y., Yotinov, I., Atanasova, M., Krcma, F., Surface-wave-sustained plasma torch for water treatment, *Journal of Physics: Conference Series.*, **2018**, *982*, 530-536.
22. Stulic, V., Vukusic, T., Butorac, A., Popovic, D., Herceg, Z., Proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* response to plasmatareatment, *International Journal of Food Microbiology*, **2019**, *292*, 171-183.
23. Čtvrtečková, L., Píchová, A., Scholtz, V., Khun, J., Julák, J., Non-thermal plasma-induced apoptosis in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Contributions to Plasma Physics*, **2019**, *59(8)*, 00064.
24. Polčič, P., Pakosová, L., Chovančíková, Machala, Z., Reactive cold plasma particles generate oxidative stress in yeast but do not trigger apoptosis, *Canadian Journal of Microbiology*, **2018**, *64(6)*, 367-375.
25. Wang, Y., Wang, Z. R., Zhu, X., Yuan, Y. H., Gao, Z. P., Yue, T. L., Application of electrical discharge plasma on the inactivation of *Zygosaccharomyces rouxii* in apple juice, *LWT-Food Science and Technology*, **2020**, *121*, 108974.
26. Tarabová, B., Žilková, A., Machala, Z., Cold Air Plasma pasteurisation of fresh apple juice, *Proceedings of HAKONE XV*, Brno, 2016, 453-456.
27. Starek, A., Pawlat, J., Chudzik, B., Kwiatkowski, M., Terebun, P., Sagan, A., Andrejko, D., Evaluation of selected microbial and physicochemical parameters of fresh tomato juice after cold atmospheric pressure plasma treatment during refrigerated storage , *Scientific Reports*, **2019**, 8407.

28. Xu, H. B., Zhu, Y. P., Cui, D. J., Du, M. R., Wang, J. Q., Ma, R.N., Jiao, Z., Evaluating the roles of OH radicals, H₂O₂, ORP and pH in the inactivation of yeast cells on a tissue model by surface micro-discharge plasma, *Journal of Physics D – Applied Physics*, **2019**, 52(39), 395201.
29. Du, M. R., Xu, H. B., Zhu, Y. P., Ma, R. N., Jiao, Z., 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), 025036.
30. Benova, E., Atanasova, M., Bogdanov, T., Marinova, P., Krčma, F., Mazánková, V., Dostál, L., Microwave Plasma Torch at a Water Surface, *Plasma medicine*, **2016**, 6(1), 59 – 65.
31. Benova, E., Marinova, P., Atanasova, M., Petrova, T., Surface-wave-sustained argon plasma kinetics from intermediate to atmospheric pressure, *Journal of Physics D: Applied Physics*, **2018**, 51(47), 474004.
32. Bogdanov, T., Benova, E., Theoretical parametric investigation of plasma sustained by traveling electromagnetic wave in coaxial configuration, *Vacuum*, **2018**, 155, 280-291.
33. Krčma, F., Tsonev, I., Smejkalová, K., Truchlá, D., Kozáková, Z., Zhekova, M., Marinova, P., Bogdanov, T., Benova, E., Microwave micro torch generated in argon based mixtures for biomedical applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*, **2018**, 51(41), 414001.
34. Bogdanov, T., Tsonev, I., Marinova, P., Benova, E., Rusanov, K., Rusanova, M., Atanassov, I., Kozáková, Z., Krčma, F., Microwave Plasma Torch Generated in Argon for Small Berries Surface Treatment, *Applied Sciences-Basel*, **2018**, 8(10), 1870.
35. Narimisa, M., Krčma, F., Onyshchenko, Y., Kozáková, Z., Morent, R., De Geyter, N., Atmospheric Pressure Microwave Plasma Jet for Organic Thin Film Deposition, *Polymers*, **2020**, 12 (2), 354.
36. Lebedev, Yu. A., Microwave discharges at low pressures and peculiarities of the processes in strongly non-uniform plasma. *Plasma Sources Science and Technology*, **2015**, 24(5), 053001.
37. Fidel, P.L., Vazquez, J.A., Sobel, J.D., *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*. **1999**, 12(1), 80-96.
38. Ahmad, K.M., Kokošar, J., Guo, X., Gu, Zh., Ishchuk, O.P., Piškur, J., Genome structure and dynamics of the yeast pathogen *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Research*, **2014**, 14(4), 529-535.
39. Mendes-Giannini, M. J. S., Bernardi, T., Scorzoni, L., Fusco-Almeida, A. M., Sardi, J.C.O., *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options, *Journal of Medical Microbiology*, **2013**, 62(1), 10-24.
40. Sykes, J. E., Bernardi, T., Scorzoni, L., Fusco-Almeida, A.M., Sardi, J.C.O., *Candidiasis*: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Canine and Feline Infectious Diseases*, **2014**, 62(1), 653-659.
41. Rodrigues, C., Rodriguez, M., Silva, S., Henriques, M., Ishchuk, O.P., Piškur, J., *Candida glabrata* biofilms: How far have we come? *Journal of Fungi*, **2017**, 3(1), 529-535.
42. Czech Microorganism Collection, <https://www.sci.muni.cz/ccm/index.html>



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).