



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

INTERAKCE NÍZKOTEPLTNÍHO PLAZMATU ZA ATMOSFÉRICKÉHO TLAKU (CAPP) S NEPATOGENNÍMI BAKTERIEMI

INTERACTION OF NON-THERMAL PLASMA AT ATMOSPHERIC PRESSURE (CAPP) WITH NON-PATHOGENIC BACTERIA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Barbora Chobotská

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1926/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Barbora Chobotská**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Interakce nízkoteplotního plazmatu za atmosférického tlaku (CAPP) s nepatogenními bakteriemi

Zadání bakalářské práce:

- Seznamte se s problematikou generace nízkoteplotního plazmatu v plynné fázi, jeho interakcí s živými organismy a nastudujte si zvolené mikroorganismy.
- Provedte odbornou rešerši zaměřenou na využití nízkoteplotního plazmatu v biomedicině.
- Připravte a ošetřete vzorky modelových mikroorganismů přímým působením nízkoteplotního mikrovlnného jetu v různých modifikacích a způsobech ošetření.
- Vyhodnoťte dekontaminační vliv nízkoteplotního plazmového systému a metody ošetření.

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2024:

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

Barbora Chobotská
studentka

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Předmětem této bakalářské práce je studium dekontaminačních vlastností nízkoteplotního plazmatu generovaného za atmosférického tlaku na vybrané bakterie *Escherichia coli* a *Staphylococcus epidermidis*. Bylo použito nízkoteplotní mikrovlnné plazma s pochodňovým výbojem. Plazmová tryska byla propojena se softwarem v počítači, díky čemuž mohlo docházet k jejímu pohybu po ošetřované ploše. Byl použit výkon, který kolísal mezi 12–13 W, a jako pracovní plyn byl zvolen argon (čistota plynu 4,6) s konstantním průtokem 5 l/min. Byl pozorován úbytek jednotlivých kolonií v závislosti na zvoleném parametru ošetření. Mezi zvolené parametry ošetření patřil vliv rychlosti, směru a doby ošetření u obou studovaných bakterií. Cílem bylo dosáhnout co nejvyšší dekontaminace ošetřované plochy a zjistit, jaký z těchto parametrů je nejvýznamnější.

Bylo zjištěno, že mezi jednotlivými směry ošetření není viditelný rozdíl v celkové dekontaminaci ošetřované plochy u studované bakterie *Escherichia coli*. Negativní vliv rychlosti byl zaznamenán pouze u nejrychlejší použité rychlosti v případě grampozitivní bakterie *Staphylococcus epidermidis*. Nejvýznamnějším parametrem byl čas ošetření, kdy byl pozorován výrazný úbytek nárůstu kolonií se zvyšujícím se časem daného ošetření.

Dále bylo provedeno opakované ošetření, kdy z již ošetřených bakterií bylo znovu nachystáno inokulum a bylo pozorováno, zda nevzniká rezistence vůči ošetření nízkoteplotním plazmatem. Z výsledků je patrné, že nedochází k výraznému nárůstu kolonií ani po znovu opakovaném ošetření. Dále bylo pozorováno, že u grampozitivní bakterie *Staphylococcus epidermidis* dochází k menšímu úbytku kolonií nežli u gramnegativní bakterie *Escherichia coli* ve všech studovaných parametrech ošetření.

KLÍČOVÁ SLOVA

Escherichia coli, *Staphylococcus epidermidis*, nízkoteplotní mikrovlnné plazma

ABSTRACT

The subject of this bachelor thesis is the study of decontamination effects of cold atmospheric pressure plasma (CAP) on selected bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. A non-thermal microwave plasma torch was used. The plasma torch was connected to the software in the computer, which allowed its movement over the treated area. The used power fluctuated between 12–13 W and argon (gas purity 4.6) was chosen as the working gas with a constant flow rate of 5 l/min. Inhibition efficacy was observed depending on the type of the selected treatment. The chosen treatment parameters included the effect of speed, direction, and treatment time for both studied bacteria. The aim was to achieve the highest decontamination of the treated area and to determine which of these parameters appeared to be the most significant.

No obvious difference (between the treatment directions) was found in the overall decontamination of the treated area for studied bacteria *Escherichia coli*. The negative effect of speed was only observed for the fastest speed used in the case of gram-positive *Staphylococcus epidermidis*. The most significant parameter was found to be the treatment time, where a significant decrease in colony growth was observed with increasing treatment time.

Furthermore, a repeated treatment was done, where the inoculum was prepared from the already treated bacteria. By this set of experiments, possible development of microbial resistance against the plasma treatment was tested. The results showed that there was no significant increase in the number of colonies even after the repeated treatment. It was also observed that the gram-positive bacteria *Staphylococcus epidermidis* showed lower decontamination effect evaluated via the number of colonies than the gram-negative bacteria *Escherichia coli* for all treatment types studied.

KEY WORDS

Escherichia coli, *Staphylococcus epidermidis*, non-thermal microwave plasma

CHOBOTSKÁ, Barbora. *Interakce nízkoteplotního plazmatu za atmosférického tlaku (CAPP) s nepatogenními bakteriemi* [online]. Brno, 2024 [cit. 2024-02-28], s. 41. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156193>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce doc. Ing. Zdenka Kozáková, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

Barbora Chobotská

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce doc. Ing. Zdence Kozákové, Ph.D. za cenné rady, pomoc, ochotu a čas během psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat konzultantkám Ing. Veronice Petrové a Ing. Kristině Trebulové zejména za pomoc s mikrobiální a experimentální částí této bakalářské práce a za jejich cenné rady, nápady a neupadající optimismus při řešení této práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Ing. Přemyslu Menčíkovi, Ph.D. za údržbu a programování posuvného aparátu plazmové trysky.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	<i>Escherichia coli</i>	9
2.1.1	Patogenita	9
2.1.2	Virulence	10
2.1.3	Rezistence.....	11
2.2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	11
2.2.1	Patogenita	12
2.2.2	Virulence	12
2.2.3	Rezistence.....	12
2.3	Biofilm.....	12
2.4	Možnosti sterilizace bakterií.....	13
2.4.1	Chemické postupy sterilizace.....	13
2.4.2	Fyzikální postupy sterilizace	13
2.5	Plazma	14
2.5.1	Vznik plazmatu	14
2.6	Nízkoteplotní plazma	14
2.6.1	Zdroje nízkoteplotního plazmatu	15
2.6.2	Inaktivační mechanismus plazmatu	16
2.7	Aplikace plazmatu	18
2.7.1	Plazma v biomedicínských aplikacích	18
2.7.2	Plazma v potravinářství	19
2.7.3	Inaktivace <i>E. coli</i> pomocí plazmatu	20
2.7.4	Inaktivace <i>S. epidermidis</i> pomocí plazmatu.....	21
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
3.1	Chemikálie, přístroje a materiály	22
3.1.1	Chemikálie a materiály.....	22
3.1.2	Přístroje	22
3.2	Příprava mikrobiálních vzorků.....	23
3.2.1	Příprava inokula	23
3.2.2	Příprava kultivačních médií	23
3.2.3	Kultivace mikroorganismů	23

3.3	Expozice připravených vzorků pochodňovým výbojem s přímým prouděním plynu.....	24
3.3.1	Zapojení mikrovlnné plazmové trysky.....	24
3.3.2	Ošetření mikroorganismů.....	25
3.4	Zpracování a vyhodnocení výsledků.....	26
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	27
4.1	Vliv směru ošetření	27
4.2	Vliv času ošetření	28
4.3	Vliv rychlosti ošetření	30
4.4	Vliv opakovaného ošetření	32
4.4.1	<i>E. coli</i>	32
4.4.2	<i>S. epidermidis</i>	34
5	ZÁVĚR.....	36
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	37
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	41

1 ÚVOD

Nepatogenní bakterie mohou hrát v lidském těle důležitou roli. Často tvoří s člověkem, jakožto hostitelem, vzájemně pozitivní vztah. Bakterie tak mohou čerpat živiny z prostředí, které jim lidské tělo zajišťuje, a tím produkovat tělu prospěšné metabolity. Avšak problém může nastat, pokud dojde k oslabení imunity či jinému narušení rovnovážného prostředí. Bakterie se musí rychle adaptovat na nově vzniklé podmínky, což má za příčinu vznik adaptovaných kmenů se specifickými vlastnostmi virulence [1].

Alarmujícím problémem je rezistence bakterií vůči antibiotikům. Bakterie mnohdy bývají rezistentní, jak k několika příbuzným antibiotikům, tak i k antibiotikům s jinou chemickou strukturou [2]. Tento problém patří mezi klíčové globální výzvy v oblasti zdravotnické péče, což vyvolává snahu najít alternativní terapeutické přístupy, mezi které patří i využití aplikace nízkoteplotního plazmatu.

Tato terapeutická cesta nabízí hned několik výhod. Nízkoteplotní plazma, jenž je charakterizováno jako kvazineutrální slabě ionizovaný plyn, který vykazuje kolektivní chování a jehož teplota nepřesahuje 40 °C, je vhodné jak pro biomedicínské aplikace, tak sterilizaci těžko sterilizovatelných nástrojů [3]. Ke generaci plazmatu je využívána celá řada druhů zdrojů. V této práci je využito nízkoteplotní pochodňový mikrovlnný výboj s přímým prouděním plynu (argonu). Na inaktivaci mikroorganismů se podílí celá škála faktorů, avšak nejdůležitější roli zde mají reaktivní formy kyslíku a dusíku [4].

Budoucnost aplikace plazmatu je zaměřována zejména na léčbu akutních chronických ran, u nichž konvenční antibiotická léčba selhává. Další odvětví výzkumu se zabývá léčbou rakoviny, zde se jedná zejména o pilotní studie. Je však důležité zmínit, že jednotlivá zařízení pro generaci plazmatu se liší, což komplikuje stanovení přesné dávky pro jednotlivá zařízení.

Výzkumy se rovněž zaměřují na možnosti aplikace nízkoteplotního plazmatu na potraviny, neboť by v porovnání s běžně používanými metodami nedocházelo k negativnímu ovlivnění kvality potravin vlivem chemických látek či tepla [4].

V této práci byly zvoleny dvě bakterie, a to *Escherichia coli* jakožto zástupce gramnegativních bakterií a *Staphylococcus epidermidis* jakožto zástupce grampozitivních bakterií. Byly sledovány tři aspekty ošetření, a to směr pohybu plazmové trysky, rychlost pohybu plazmové trysky a doba ošetření. Navíc byly provedeny experimenty, zda při plazmovém ošetření nedochází ke vzniku rezistence bakterií na tento typ ošetření. Tyto aspekty jsou pro budoucnost aplikace plazmatu v biomedicínských aplikacích klíčové.

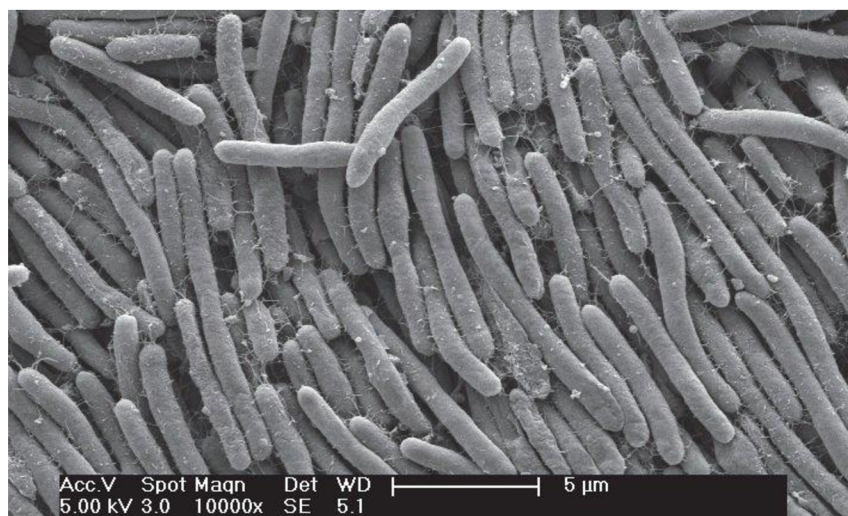
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) je bakterie, která se řadí do třídy *Grammaproteobacteria*, řádu *Enterobacterales* a čeledi *Enterobacteriaceae*. Jedná se o fakultativně anaerobní, nesporulující koliformní bakterie. Buňky mají tyčinkovitý tvar s velikostí 1–3 μm (viz Obrázek 1) a jsou opatřeny peritrichními bičíky umožňující pohyb. Vyskytují se však i nepohyblivé kmeny [5].

E. coli je řazena mezi gramnegativní bakterie, jejichž buněčná stěna je tvořena z tenké vrstvy peptidoglykanu neboli mureinu. Při Gramově barvení dochází k vymytí barviva krystalové violeti ethanolem. Jelikož nedojde ke stabilnímu navázání krystalové violeti v komplexu s jodidem draselným na buněčnou stěnu, konečné zbarvení buněk se jeví jako růžové [2]. Obal buňky gramnegativních bakterií tvoří dvě membrány, vnitřní a vnější, mezi nimiž se nachází periplazma. Vnější membrána je složena z fosfolipidů, lipopolysacharidů, lipoproteinů a integrálních membránových proteinů. Tato vnější membrána může poskytovat bariéru pro určitá antibiotika, což může způsobovat problémy s léčbou potenciálních infekcí [6].

K optimálnímu růstu *E. coli* dochází při 37 °C. Díky své schopnosti růstu v anaerobních i aerobních podmínkách a kompletní sekvenci genomu se používá v široké škále aplikací jak průmyslových, tak lékařských [7].



Obrázek 1: *Escherichia coli*, snímek pořízený pomocí SEM [8]

2.1.1 Patogenita

E. coli patří k nejhojněji se vyskytujícím fakultativním anaerobům lidské střevní mikroflóry [9]. V prvních hodinách až dnech od narození kolonizují tyto bakterie gastrointestinální trakt většiny teplokrevných živočichů. Za normálních podmínek představuje neškodného komenzála (vztah dvou organismů, kdy jeden organismus z tohoto vztahu má prospěch a druhý není ovlivněn), který využívá zdroje střevní mikroflóry, zejména pak vitamín K a vitamíny B. Většina kmenů *E. coli* je tedy avirulentní (neschopné vyvolat onemocnění). Některé kmeny *E. coli* získávají specifické vlastnosti virulence, což vede ke vzniku vysoce adaptovaných kmenů se schopností se přizpůsobit novému prostředí. Tato

schopnost se projevuje zejména při vzniku infekcí nebo narušení imunity, což narušuje rovnováhu prostředí a podporuje vznik a růst virulentních forem této bakterie [1]. Patogenní kmeny *E. coli* mají nejčastěji specifické faktory adherence (přilnavost), což jim umožňuje kolonizovat místa, která běžně neobývají. Přestože se patogenita *E. coli* objevuje nejčastěji ve spojení s gastrointestinálním traktem, může dojít také ke kolonizaci močového traktu nebo mozkových plen [9].

2.1.2 Virulence

Analýzou sekvence celého genomu byla prokázána značná genetická variabilita i v rámci jednotlivých patogenních druhů *E. coli* [10]. Podle projevů virulence se dále dělí nejméně na pět skupin, které zde budou uvedené, ale v dnešní době je znám již větší počet. Také je velmi obtížné přes velkou genomovou plasticitu striktně kategorizovat patogenní druhy *E. coli* do ostře ohraničených patotypů [7].

EPEC jsou enterotoxigenní *E. coli*, které nejdříve adherují k buňkám epitelu tenkého střeva prostřednictvím povrchových struktur (fimbrií), a poté dochází k sekreci enterotoxinů. Jedná se o sekreci dvou enterotoxinů, a to tepelně stabilní toxiny (ST) a tepelně labilní toxiny (LT), které aktivují produkci cyklických nukleotidů, a tím přispívají ke ztrátě vody, solí a tekutin ve střevech. Jelikož se geny kódující enterotoxiny nachází nejen na chromozomu, ale i na plazmidech, mohou být přenášeny mezi různými patotypy *E. coli* [11]. Tímto dochází k projevu infekce vodovými průjmy bez horečky [12].

EPEC neboli enteropatogenní *E. coli* je hlavní příčinou vzniku průjmových onemocnění u kojenců [12]. Při této infekci dochází k uvolňování jediného toxinu, který může vést k nekróze epitelálních buněk. K připojení na povrch hostitelské buňky dochází pomocí vlasovitých struktur podobných *pilusům* [11].

EIEC je enteroinvazivní *E. coli*. V tomto případě dochází k přilnutí na sliznici, pravděpodobně bílkovinou vnější membrány a dochází k pronikání do sliznice a následnému rozmnožení [12]. Infekce se projevuje vodnatým průjmem a zánětlivou kolitidou [11].

UAEC je enteroadherentní *E. coli*, která adheruje k sliznici. Projevy infekce jsou celkem mírné [12].

Poslední skupinou je EHEC, tedy enterohemoragická *E. coli*. Dochází k vyvolání hemoragické kolitidy, kdy může dojít k rozvinutí smrtelného hemoragicko-uremického syndromu (HUS). Zdrojem infekce může být nepropečené maso, mošty nebo voda. Hlavním faktorem virulence jsou shiga-like toxiny (SLT) neboli verotoxiny [12].

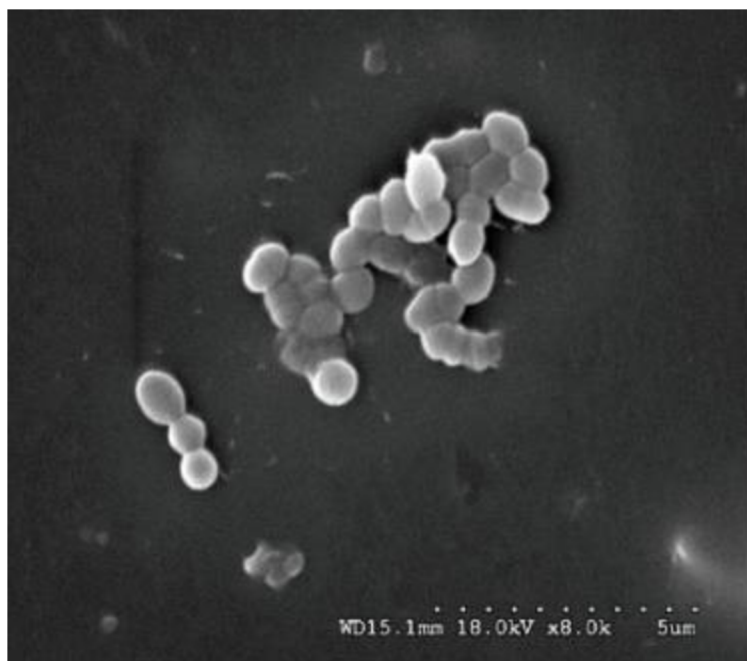
Genotypově různorodou podskupinu představuje uropatogenní *E. coli* (UPEC). Tento poddruh se vyvinul z komenzální *E. coli* získáním faktorů virulence horizontálním přenosem genů. Na rozdíl od výše zmíněných druhů *E. coli* způsobujících průjmová onemocnění nemají UPEC žádnou základní sadu faktorů virulence. Ke stoupání močovým traktem využívají bičíky a různé adheziny. Genotypová různorodost vyplývá z heterogenního souboru faktorů virulence i fázové variability, což vede ke komplikaci spojené s vývojem vakcín a umožňuje to pravděpodobnost opakovaných infekcí [10].

2.1.3 Rezistence

Antimikrobiální rezistence je jeden z hlavních globálních problémů zdravotní péče. *E. coli*, jak už bylo výše zmíněno, je řazena mezi gramnegativní bakterie, a díky své vnější membráně je přirozeně rezistentní vůči terapeutickým hladinám penicilinu G (β -laktamového antibiotika). U *E. coli* se vyskytuje také rezistence na několik různých tříd antibiotik s odlišným mechanismem účinku, než výše zmíněný penicilin G. Rezistence je způsobena produkcí široké třídy enzymů β -laktamázy, které jsou často kódovány na plazmidech. Také byla prokázána rezistence na karbapenemy nebo (fluoro)chinolony. Obecně prostředí hraje velmi klíčovou roli v rezistenci vůči antibiotikům. *E. coli* může získat rezistentní vlastnosti od bakterie vyskytující se v daném prostředí, a naopak může přenášet své rezistentní geny na potenciální patogeny. Jako zdroj multirezistentní *E. coli* se udávají odpadní vody z nemocnic, což může způsobit šíření těchto kmenů do komunálních vod, a proto by měla být její koncentrace ve vodách striktně hlídána [7].

2.2 *Staphylococcus epidermidis*

S. epidermidis (*Staphylococcus epidermidis*) je bakterie, která se řadí do třídy *Bacilli* řádu *Bacillales* a čeledi *Staphylococcaceae*. Jedná se o grampozitivní, nepohyblivé, fakultativně anaerobní a nesporulující koky (viz Obrázek 2). *S. epidermidis* je řazen mezi koaguláza negativní stafylokoky [13]. Koaguláza může být volná nebo vázaná, v obou případech však způsobuje polymeraci fibrinogenu na fibrin. Koaguláza negativní stafylokoky byly považovány za nepatogenní. Poslední dobou se však řadí k podmíněným patogenům, které jsou u oslabeného jedince schopny vyvolat onemocnění [14].



Obrázek 2: *S. epidermidis*, snímek pořízený pomocí SEM [13]

2.2.1 Patogenita

S. epidermidis je jeden z nejčastěji se vyskytujících koaguláza negativních stafylokoků na povrchu lidského epitelu a sliznicích. Řadí se mezi oportunní patogen (mikroorganismus, který je schopen za určitých podmínek, zejména při snížení imunity, vyvolat onemocnění), který může způsobit infekce v okolí implantovaných cizích těles, jako jsou například kloubní náhrady nebo chlopenní protézy. Vyniká ve vytváření biofilmů, které následně inhibují obranné mechanismy hostitele [16].

S. epidermidis je považován za původce nozokomiálních infekcí (infekce způsobené v souvislosti s hospitalizací pacientů v nemocničním zařízení). Konkrétně se jedná o nozokomiální infekce krevního řečiště či kardiovaskulární infekce. Na rozdíl od *S. aureus* (*Staphylococcus aureus*) není *S. epidermidis* spojován s pyogenními infekcemi (infekce vyvolávající hnisání) u pacientů, kteří nemají oslabenou imunitu [17].

2.2.2 Virulence

S. epidermidis neprodukuje příliš mnoho toxinů poškozujících tkáň. Je jich malé množství a jejich role jako specifických faktorů virulence musí být ještě podrobněji stanovena. Obecně však jeho úspěch jako patogenu je přičítán schopnosti přilnout k povrchu a zůstat zde v relativní tichosti pod ochranným krytem. Tvorba biofilmu tedy patří mezi hlavní faktor virulence. Biofilm obsahuje velké množství perzistentních buněk, které poskytují *S. epidermidis* ochranu před neutrofily (typ bílých krvinek) a imunoglobuliny G [13,17].

2.2.3 Rezistence

Jak už bylo výše zmíněno, zvyšující se rezistence bakterií vůči antibiotikům komplikuje léčbu infekcí způsobených *S. epidermidis*. Navíc slizové pouzdro tvořené stafylokoky slouží jako nepropustná bariéra pro mnoho antibiotik. Čím dál více se zvětšuje rezistence vůči met icilinu, což je nejčastěji podávané antibiotikum proti stafylokokům [17].

Byla navržena nová antibiotika proti multirezistentním kmenům. Za poslední účinné antibiotikum je považován vankomycin. Ovšem je důležité poznamenat, že i v tomto případě dochází ke zvýšení rezistence. Rezistence byla také zaznamenána vůči (fluoro)chinolonům, jako je například ciprofloxacin a ofloxacin [13].

2.3 Biofilm

Schopnost tvořit biofilm je univerzální vlastnost bakterií. Jedná se o mnohobuněčná společenství, která drží u sebe vlastní extracelulární matrix [16]. Tvorba biofilmu je nejčastěji spojována s komplikacemi během léčby infekcí souvisejících s *E. coli* a *S. epidermidis*. Obecně se jedná o složitý proces složený z několika kroků, které jsou řízeny řadou genů [19].

První fází je adheze. K adhezi může dojít jak na povrchu abiotickém, tak na povrchu biotickém. Byly objeveny geny odolnosti vůči stresu, které napomáhají biofilmu přežít v nepříznivých podmínkách, a tím i zvýšit jeho odolnost. V kapalném prostředí se vyskytují hydrodynamické a elektrostatické síly, které zabraňují jeho tvorbě. K překonání těchto sil bakterie využívají bičík. Další fází je zrání biofilmu, ke které dochází po pevném přilnutí buněk k povrchu. Biofilm zde získává trojrozměrnou strukturu z důvodů produkce extracelulární matrix, která zprostředkovává snadné interakce mezi jednotlivými buňkami a mezi buňkami a povrchem.

Poslední fází je disperze, kdy dochází k oddělení bakterií od zralého biofilmu a jejich rozptýlení. Rozptýlení slouží k přenosu bakterií do vzdálenějších míst, kde opět může dojít k usazení a tvorbě nového biofilmu [19].

2.4 Možnosti sterilizace bakterií

Sterilizací mikroorganismů se rozumí odstranění všech životaschopných forem mikroorganismů. Sterilizace může být provedena pomocí fyzikálních nebo chemických postupů [20].

2.4.1 Chemické postupy sterilizace

Pro chemické postupy sterilizace se používají látky zvané biocidy, což jsou dezinfekční látky. Dezinfekční látky se dělí do různých skupin podle chemické struktury. Jsou to například oxidační činidla, halogeny, alkylační činidla a jiné. Při chemické dezinfekci dochází ke specifickému účinku chemických látek na mikroorganismy. Odolnost jednotlivých typů mikrobů se výrazně liší u různých dezinfekčních látek. Je zde možnost vyvinutí rezistence, pokud se nějaká dezinfekční látka používá příliš dlouho [20].

2.4.2 Fyzikální postupy sterilizace

Nejčastěji se jedná o působení tepla, méně časté je záření. Teplo může působit na bakterie různými způsoby. V praxi je nejčastěji používána horkovzdušná sterilizace a autoklávování. Ostatní způsoby, jako je sterilizace varem nebo tyndalizace, nejsou tak účinné [20].

Další možností je sterilizace zářením. Ultrafialové záření je poměrně účinné, ale neproniká do hloubky. Infračervené záření působí svým tepelným zářením. Ionizační záření se využívá k radiační sterilizaci. Jeho účinnost je vysoká, avšak některé druhy virů jsou stabilní i vůči tomuto záření. Výše uvedené postupy sterilizace lze účinně použít na sterilizaci například nástrojů, avšak ne přímo na živé tkáně [20].

K nejnovějším způsobům sterilizace patří plazma. Konkrétně se využívá nízkoteplotního plazmatu, které lze aplikovat i na teplotně citlivé materiály a živé tkáně [20].

2.5 Plazma

Plazma je definováno jako kvazineutrální plyn, který vykazuje kolektivní chování.

Kvazineutralita je chápána tak, že se plazma navenek jeví jako neutrální, avšak z mikroskopického hlediska se zde vyskytuje směs částic obsahující neutrální atomy, molekuly, ionty, elektrony, volné radikály a fotony [21].

Pohyb molekul nezávisí pouze na lokálních podmínkách, ale též i na stavu plazmatu ve vzdálených oblastech. Tímto se rozumí kolektivní chování plazmatu [22].

Hustota elektricky nabitých částic musí být dostatečně vysoká, aby elektromagnetické interakce převládly nad srážkami neutrálních atomů a molekul. Díky tomuto ději je ionizovaný plyn schopen eliminovat elektrické pole. Sám vytváří určité prostorové náboje a ustanovuje se nová rovnováha [22].

2.5.1 Vznik plazmatu

Plazma se rozlišuje na vysokoteplotní a nízkoteplotní, avšak toto rozdělení nemá pevně stanovenou hranici. Přesto se za vysokoteplotní plazma považuje takové, jehož průměrná energie nabitých částic přesáhne 10^6 kelvinů. S plazmatem dosahujících takových teplot se setkáváme ve vesmíru například na Slunci a hvězdách nebo při experimentech s jadernou fúzí. Vysokoteplotní plazma je silně ionizované a obsahuje tedy mnoho volných elektronů a iontů [23].

S nízkoteplotním plazmatem se setkáváme v běžných situacích například u zářivek nebo výbojek. V laboratoři se k ionizaci plynu využívá elektrický výboj, který může být realizován jak při nízkém tlaku, tak při atmosférickém tlaku. Dodáním velkého množství energie, dochází k odtržení elektronu z molekul či atomů, což má za následek vznik dalších volných elektronů nebo nabitých částic. Dalším způsobem, kterým může dojít ke generování plazmatu, je ohřátí plynu na vysokou teplotu, až k několika tisícům kelvinů. Tento způsob se nazývá termický způsob ionizace a v praxi je užívaný méně než elektrická ionizace [23]. Tato práce se zabývá nízkoteplotním plazmatem, které je generováno za atmosférického tlaku.

2.6 Nízkoteplotní plazma

Jedná se o slabě ionizovaný plyn (zpravidla 1–10 %), který může vznikat i za atmosférického tlaku. Takto ionizovaný plyn může být buzen a udržován pomocí různých zdrojů, např. mikrovlňného výkonu, vysokofrekvenčního výkonu, střídavého proudu nebo stejnosměrného proudu. Nízkoteplotní plazma je také označováno jako nerovnovážné plazma. Teplota částic se navzájem liší. Ionty a neutrální molekuly zde mají podstatně nižší teplotu (300–1000 K) ve srovnání s teplotou elektronů (10^5 K) [3].

Nízkoteplotní plazma generované za atmosférického tlaku má značné výhody oproti plazmatu generovanému za nízkého tlaku. Jedná se zejména o snadnější přístup zařízení k postiženým buňkám. Z ekonomického hlediska je méně nákladné, neboť pro generaci plazmatu za nízkého tlaku jsou potřeba velké vakuové generátory, jejichž cena je velmi vysoká. V neposlední řadě při využití plazmatu generovaného za nízkého tlaku nesmí být v ošetřovaných vzorcích přítomna voda, která se ovšem nachází ve všech tkáních a buněčné vzorky pak mohou explodovat [24].

2.6.1 Zdroje nízkoteplotního plazmatu

Při generování plazmatu pomocí elektrického výboje je využíváno vzniku elektrického pole, které je vytvářeno aplikací vysokého napětí a následným průchodem proudu. Elektrický proud je do plazmatu zpravidla přiváděn kovovými elektrodami. Elektrony jsou elektrickým polem urychlovány, až dosáhnou určité kinetické energie, díky které jsou schopny ionizovat molekuly plynu [23].

Existuje několik druhů zdrojů využívaných ke generaci plazmatu za atmosférického tlaku, např. korónové či bariérové výboje nebo mikrovlnné plazmové trysky.

2.6.1.1 Korónový výboj

Podmínkou vzniku korónového výboje (viz Obrázek 3) je, že alespoň jedna elektroda, mezi kterými je nehomogenní elektrické pole, musí mít malý poloměr křivosti. Jedná se o hrotovou neboli korónovou elektrodu. V důsledku malého poloměru zakřivení elektrody se v jejím okolí vytváří intenzivní elektrické pole. Při dostatečné intenzitě elektrického pole dochází k lokálním lavinám elektronů. Tato oblast je označována jako ionizační oblast a je viditelná jako slabě zářící oblast okolo elektrody. Podle polaritě korónové elektrody a připojeného napětí je rozlišováno několik druhů korónových výbojů. Jedná se o kladné stejnosměrné, záporné stejnosměrné, střídavé a vysokofrekvenční korónové výboje. Procházející proud se pohybuje v řádu stovek mikroampérů. Pokud je procházející proud vyšší, přechází korónový výboj na jiskrový výboj [25].



Obrázek 3: Korónový výboj [25]

2.6.1.2 Dielektrický bariérový výboj

Dielektrický bariérový výboj (DBD) (viz Obrázek 4) vzniká typicky mezi dvěma elektrodami, které jsou napájeny střídavým napětím [25]. Mezi elektrodami se nachází vhodná dielektrická vrstva, která má za následek zabránění průchodu nabitých částic po počátečním rozkladu plynu, a tím dojde ke ztrátě výboje [24]. Výboj v plynu je tedy udržován pouze indukčně. DBD se z hlediska plazmo-chemických reakcí a hustoty nabitých částic velmi podobá korónovému výboji. Hlavním rozdílem je však to, že rozměry elektrod mohou u DBD dosahovat až několika centimetrů čtverečných. Jejich vzdálenost ale zůstává malá, stejně jako je tomu u korónového výboje. Z tohoto hlediska jsou DBD vhodným zdrojem pro působení na velkých plochách [25]. Pro lékařské účely se nejčastěji používají DBD s plovoucí elektrodou (FE-DBD). Tyto zařízení neobsahují uzemněnou elektrodu, ta je nahrazována postiženými tkáněmi nebo buňkami. Výhodou je také možnost generování plazmatu bez spotřeby nosného plynu, jelikož ionizovaný je zde okolní vzduch [24].



Obrázek 4: Objemový dielektrický bariérový výboj [25]

2.6.1.3 Mikrovlnné výboje

Mikrovlnné výboje (MV) jsou elektrické výboje, které jsou generované elektromagnetickými vlnami s vysokou intenzitou. Mikrovlnné plazma lze generovat za nízkého i atmosférického tlaku s frekvencí nad 300 MHz, avšak pro lékařské a vědecké aplikace je nejčastěji využívána frekvence 2,45 GHz [26]. Výkon mikrovlnného zdroje je přenášen do rezonátoru, v němž je plazma generováno, pomocí koaxiálního kabelu. Podle konstrukce lze MV dělit na několik typů. V této práci je použit vhodný mikrovlnný výboj s přímým prouděním plynu [27].

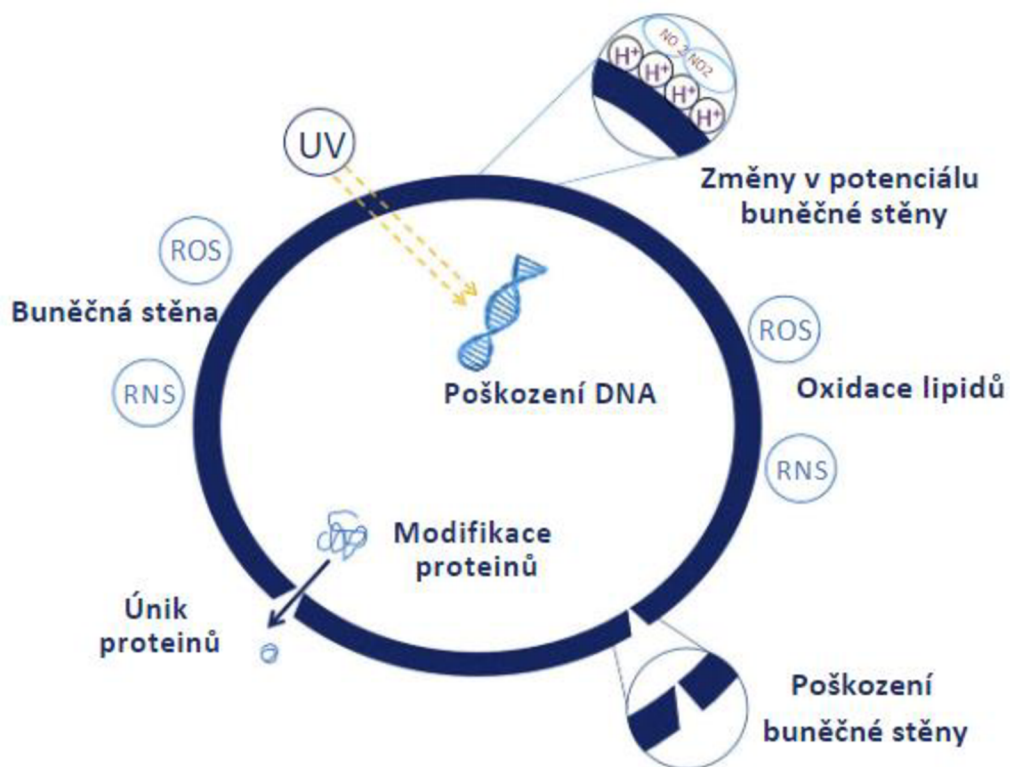
2.6.2 Inaktivační mechanismus plazmatu

Na inaktivaci mikroorganismů v plazmatu se podílí velká škála faktorů, jako je elektrické pole, teplota, UV (ultrafialové záření) a VUV (vakuové ultrafialové záření). Avšak největší význam zde mají reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS) (viz Obrázek 5).

Bakterie jsou tedy napadány RONS, čímž dojde k rozbití chemických vazeb a narušení buněčné membrány. Tímto je otevřen vstup pro pronikání RONS do celého vnitřního objemu bakterie. Vlivem těchto částic dochází ke změně prostředí buněk, a tím může dojít ke změně chování.

Dochází k oxidaci aminokyselin, poškození DNA a RNA, poškození buněčné stěny a membrány, což může vést i k apoptóze buňky [4].

Byla provedena studie založená na simulaci molekulární dynamiky pole reaktivních sil, která prokázala, že reaktivní formy kyslíku (O, OH, HO₂, H₂O₂) interagují s glukánovou strukturou kvasinky *S. cerevisiae* a dochází k abstrakci vodíku za štěpení chemických vazeb uhlík-kyslík a uhlík-uhlík, což vede k výše zmíněné destrukci buněčné stěny. Bylo zjištěno, že singletový kyslík vyvolá největší počet abstrakcí vodíku a jeho aktivita je přibližně dvakrát větší než aktivita hydroxylového radikálu. Aktivita peroxidu vodíku je nejnižší z důvodů rozkladu na dva radikály ·OH, které následně znovu reagují s H₂O za vzniku HO₂ a H₂O. Také bylo potvrzeno, že ROS ničí glukán na různých strukturních místech [28].



Obrázek 5: Vliv plazmového ošetření na mikrobiální buňku [28]

2.7 Aplikace plazmatu

2.7.1 Plazma v biomedicínských aplikacích

Od samotného počátku aplikací nízkoteplotního plazmatu bylo zjištěno, že klíčovou roli hrají reaktivní formy kyslíku (ROS) a reaktivní formy dusíku (RNS). Také bylo brzy pozorováno, že využití nízkoteplotního plazmatu vede k inaktivaci mikroorganismů na abiotických površích, což může být využíváno ke sterilizaci těžko sterilizovatelných nástrojů. V neposlední řadě se výzkumy zabývají hojením ran (Obrázek 6) a možností destrukce rakovinotvorných buněk [30]. Jednotlivé druhy aplikací plazmatu v biomedicině budou popsány níže.



Obrázek 6: Vlevo: ukázka komerčního zdroje plazmatu pro hojení ran, vpravo: ukázka ošetřované rány pacienta s bérčovými vředy; rána po sedmi ošetřeních (B), rána po jedenácti ošetřeních (C) [3]

Inaktivace bakterií pomocí CAP (studené plazma za atmosférického tlaku) v poslední době nabývá na významu, zejména z hlediska zvyšující se rezistence bakterií vůči antibiotikům [30].

Momentálně lze CAP aplikovat dvěma různými způsoby, a to přímo a nepřímo. Při přímé expozici dochází k přímému kontaktu biologického vzorku s plazmatem, a tedy všechny látky produkované plazmatem působí na buňky. Druhou možností je nepřímá expozice. V tomto případě dochází k využití kapaliny, která je ošetřena plazmatem (PTL) a následně je provedena aplikace na buňky. V tomto způsobu expozice působí pouze reaktivní částice (RONS), které byly plazmatem generovány v kapalině. RONS následně podléhají difuzi a solvataci do vodného prostředí. Nedochází tedy k působení UV záření, tepla atd. (viz výše) [30].

2.7.1.1 Léčba akutních a chronických ran

Hojení kožních ran je velmi komplikovaný proces, který se skládá z několika fází. Jednotlivé fáze hojení ran jsou snadno ovlivnitelné vnějšími i vnitřními faktory, což může vést ke vzniku chronických ran, mezi které patří například diabetické vředy, dekubity (proleženiny) a rakovinné vředy [31].

Většina kožních ran je kolonizována bakteriemi. Chronické rány jsou charakteristické přítomností perzistentních bakterií, které tvoří biofilm, což značně komplikuje celý proces hojení. V současnosti se k odstranění bakteriální zátěže využívají antimikrobiální činidla, ale

jejich použití je značně omezeno přecitlivostí na antibiotika. CAP je schopno inaktivovat široké spektrum bakterií, aniž by došlo k alergickým kožním reakcím [31].

Do procesu hojení se zapojují keratinocyty (základní stavební buňka pokožky), fibroblasty (buňka vaziva produkující základní vazivovou hmotu), endoteliální buňky (buňky vystylající vnitřek cév) a imunitní buňky. Působení CAP podporuje proliferaci (množení) a migraci keratinocytů a fibroblastů. Množení buněk je podporováno stresovými faktory, a to působením oxidačních a dusíkatých látek z plazmatu. Působení CAP také může vyvolat expresi genů produkujících proteiny podporující hojení ran, jako je například kolagen typu I či transformační růstové faktory. Též může být zvýšena saturace kůže kyslíkem, což zlepšuje vaskulární smykové napětí, které přispívá k tvorbě nových krevních kapilár [31].

2.7.1.2 Léčba rakoviny plazmatem

Léčba rakoviny pomocí CAP je současně se rozvíjející obor v plazmové medicíně. Bylo provedeno několik experimentů, které potvrdily, že nízké koncentrace nízkoteplotního plazmatu dokázaly zastavit růst nádorových buněk a za vyšších koncentrací vyvolat buněčnou smrt. Také bylo prokázáno, že CAP se jeví selektivně pro rakovinotvorné buňky nežli pro buňky nenádorové, jelikož působení CAP bylo na nádorových buňkách účinnější [32].

Mechanismus buněčné smrti byl podrobněji zkoumán v různých buněčných liniích odvozených z lidského melanomu, rakoviny jater, rakoviny prsu a později od mozkových nádorů a leukémie. Bylo potvrzeno, že hlavním mechanismem buněčné smrti u nižších dávek nízkoteplotního plazmatu je nejspíše apoptóza. Důležité je, že apoptické buněčné fragmenty jsou pohlceny a odstraněny fagocytózou, tudíž nedojde k uvolnění toxických buněčných fragmentů do okolní tkáně a ke vzniku zánětlivých změn, které jsou běžné u nekrózy. Buněčná odpověď je zprostředkovávána volnými radikály (zejména RONS) generovanými plazmatem [32].

Důležité je zmínit, že se jedná pouze o pilotní studie, na které je důležité navázat dalším výzkumem, zejména z hlediska optimální dávky, jelikož nízké dávky nemusí být dostatečně účinné a vysoké dávky mohou být škodlivé. Také se jednotlivá zařízení pro generování plazmatu liší, a proto je obtížné definovat jednotnou dávku [32, 33].

2.7.2 Plazma v potravinářství

Celosvětově roste poptávka po čerstvých, bezpečných a minimálně zpracovaných potravinách. Ke zpracování potravin se využívá celá řada metod, jako je pasterizace, ozonizace či různé chemické úpravy. Nevýhodou těchto metod ošetřování potravin je možnost jejich negativního vlivu na kvalitu potravin a z tohoto důvodu se potravinářský průmysl snaží neustále hledat nové možnosti. Úprava pomocí CAP se zdá být účinná pro konzervaci potravin již při pokojových teplotách, což snižuje negativní vliv působení tepla na potraviny [4].

Je důležité podotknout, že antimikrobiální účinek plazmatu je velmi závislý na struktuře, povrchu a objemu dané potraviny. Také při ošetření potravin nízkoteplotním plazmatem byly pozorovány mírné změny v konzistenci či barvě dané potraviny [4, 33].

Ošetření plazmatem může vést také k rozkladu nežádoucích látek, jako jsou například pesticidy nebo mykotoxiny. Zde je však důležité objasnit možný vznik meziproductů při rozkladu

mykotoxinů, které mohou být stejně nebezpečné jako samotné mykotoxiny. Rozšíření celého procesu do průmyslové oblasti se jeví komplikovaně vzhledem k široké rozmanitosti používaných zařízení pro generaci plazmatu [34].

2.7.3 Inaktivace *E. coli* pomocí plazmatu

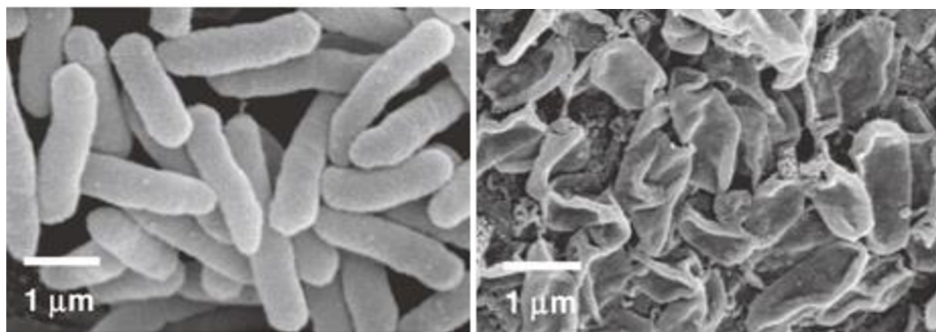
Pro inaktivaci bakterie *E. coli* bylo již dříve využito různých plazmových systémů, jako je například DBD. Byla provedena studie na inaktivaci *E. coli* pomocí plazmatu generovaného za atmosférického tlaku pomocí dielektrického bariérového výboje. V tomto experimentu byl jako nosný plyn využit argon. Plazmový paprsek byl generován při frekvenci 10 kHz, použité napětí bylo 10 kV a průtok plynu (Ar) byl nastaven na 10 l/min. Bakterie *E. coli* byly umístěny na agar na Petriho miskách a doba ošetření byla zvolena na 1 a 5 s. Po ošetření byly Petriho misky inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin [35].

Nárůst kolonií nebyl pozorován již u ošetření po dobu jedné sekundy a průměr inaktivované plochy odpovídala průměru plazmové trysky (7 mm). Morfologické změny *E. coli* byly pozorovány pomocí SEM (skenovací elektronové mikroskopie) (viz Obrázek 7) [35].

Byly prováděny termografické snímky agarového média po ošetření plazmatem. Teplota místnosti během provedení experimentu byla 22 °C. Bylo dokázáno, že povrchová teplota média se snížila vlivem odpaření vody z agarové plotny, k čemuž došlo vlivem působení plazmového paprsku. Z tohoto lze konstatovat, že teplo nepřispělo ke smrti *E. coli* [35].

Dále byla vyhodnocována emisní spektra, která ukázala, že v plazmovém paprsku byly excitované atomy argonu, excitované molekuly dusíku a $\cdot\text{OH}$ radikály. Pomocí testu bylo vyhodnoceno, že k inaktivaci *E. coli* je potřeba koncentrace H_2O_2 300 mg/l, avšak naměřená koncentrace H_2O_2 na agarové plotně činila pouze 25 mg/l [35].

Toto vše poukazuje na to, že inaktivace *E. coli* byla způsobena excitovanými molekulami dusíku a $\cdot\text{OH}$ radikály, nikoli excitovanými atomy argonu nebo vznikajícím H_2O_2 [35].

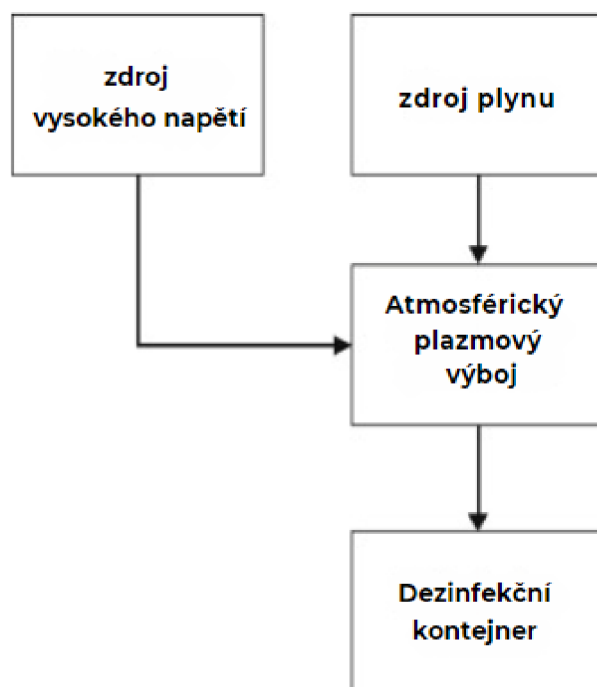


Obrázek 7: SEM snímky *E. coli*, vlevo: neošetřená kontrola, vpravo: po ošetření Ar plazmovou tryskou po dobu 5 sekund [35]

2.7.4 Inaktivace *S. epidermidis* pomocí plazmatu

Působení reaktivních částic generovaných plazmatem na *S. epidermidis* bylo testováno v systému využívajícím přímé i nepřímé působení plazmatu. Byla provedena studie na dezinfekci biofilmů způsobených bakteriálními kmeny *S. epidermidis* a *S. aureus* rezistentních vůči met icilinu. Krycí skříčka byla ponořena do BHI média, které bylo naočkováno danou kulturou. Po 24 hodinách byla krycí skříčka vyjmuta a omyta sterilním Ringerovým roztokem (izotonický fyziologický roztok s obsahem sodných a chloridových iontů). Vlastní dezinfekční systém využitý v této studii je založen na generování plazmatu za atmosférického tlaku, jehož aktivní částice jsou následně přiváděny do dezinfekční nádoby (viz Obrázek 8). Dochází zde tedy k oddělení plazmového výboje a nádoby pro působení aktivních částic. Plazma zde bylo generováno pomocí dielektrického bariérového výboje. Skříčka s biofilmem byla umístěna do uzavřených sáčků z polyethylenu. Tyto sáčky jsou používány jako obalový materiál pro zdravotnické prostředky [36].

Výsledky experimentu byly podobné u vzorků umístěných do lékařských obalových sáčků s těmi, kde vzorky byly přímo vystaveny plynu proudícímu v dezinfekční komoře. U obou případů došlo ke značnému poklesu počtu životaschopných buněk. Důležité je zde zmínit výhodu plazmové dezinfekce oproti běžnějším metodám. Relativně nízká provozní teplota nepřesahující 50 °C má za následek zachování integrity materiálu na bázi polymerů, které nelze umístit do autoklávů. Studie ovšem zmiňuje, že použité zařízení je pouze prototyp a je pravděpodobné, že vylepšení povedou k zvýšení účinnosti [36].



Obrázek 8: Schéma použitého dezinfekčního systému v dané studii [36]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie, přístroje a materiály

3.1.1 Chemikálie a materiály

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

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

Tekuté živné médium LB (Lennox Broth), MP Biomedicals

Tekuté živné médium BHI (Brain Heart Infusion), Himedia

Agar powder, Himedia

Sterilní polystyrenové Petriho misky s průměrem 52,8 mm

Pracovní plyn argon 4,6 (čistota: 99,9965 %)

3.1.2 Přístroje

UV/VIS spektrofotometr VWR UV-1600PC

Papinův hrnec

Automatické pipety 100–1000 μ l a 20–200 μ l

Termostat s inkubátorem Heidofolpj Unimax 1010

Termostat IKA INC 125 F digital

Teslův transformátor

Plazmový hořák pro generaci pochodňového výboje s přímým prouděním plynu

Mikrovlnný generátor (Sairem, GMS 200 W)

Regulátor hmotnostního průtoku (Bronkhorst FG201-CV)

Fotoaparát NIKON D3100, AS-F NIKKOR 18-55 mm

Sterilní box BIOAIR

Váhy VWR Science Education

3.2 Příprava mikrobiálních vzorků

3.2.1 Příprava kultivačních médií

Pro bakterii *Escherichia coli* bylo zvoleno živné médium Lennox Broth (LB). Pro bakterii *Staphylococcus epidermidis* bylo zvoleno živné médium Brain Heart Infusion (BHI). Obě média byla navážena dle návodu a bylo k nim přidáno potřebné množství agarů (viz Tabulka 1). Takto nachystaná média byla dána na sterilizaci do Papinova hrnce při teplotě 120 °C po dobu 35 minut.

Tabulka 1: Složení kultivačního média pro bakterii *E. coli* a *S. epidermidis*

Složení	[g/l]
LB médium	25,00
BHI médium	37,00
Agar	15,00

3.2.2 Příprava inokula

Inokulum bylo připraveno do 20 ml tekutého sterilního živného média. Bakterie *E. coli* byla nachystána do LB média a bakterie *S. epidermidis* do BHI média. Kultivace probíhala 20 hodin v termostatu s třepáním při teplotě 37 °C. Pro testování rezistence byl čas kultivace 4 hodiny.

3.2.3 Kultivace mikroorganismů

Sterilní živné médium bylo rovnoměrně rozlito do sterilních polystyrenových Petriho misek s vnitřním průměrem 52,8 mm. Z připraveného inokula byla pomocí vhodného ředění sterilním LB médiem (pro *E. coli*) nebo BHI médiem (pro *S. epidermidis*) nachystána kultura, která svou koncentrací odpovídala 10^8 CFU/ml. U takto naředěné kultury byla vždy změřena absorbance na UV-VIS spektrofotometru při vlnové délce 630 nm (pro *E. coli* a *S. epidermidis*) (viz Tabulka 2). Hodnoty přesné koncentrace (c) byly vypočteny z absorbance (A) pomocí naměřených kalibračních křivek ($A = 2,186 \cdot c$ pro *S. epidermidis* a $A = 2,853 \cdot c$ pro *E. coli* v 10^9 CFU/ml pro obě kalibrační křivky). Pomocí desítkového ředění byla kultura s koncentrací 10^8 CFU/ml zředěna až na koncentraci odpovídající 10^2 CFU/ml. Po zatuhnutí byl na agarové plotny očkovan objem 50 μ l připravené kultury s požadovanou koncentrací. Takto naočkované agarové plotny byly ihned ošetřeny pomocí pochodňového výboje s přímým prouděním plynu.

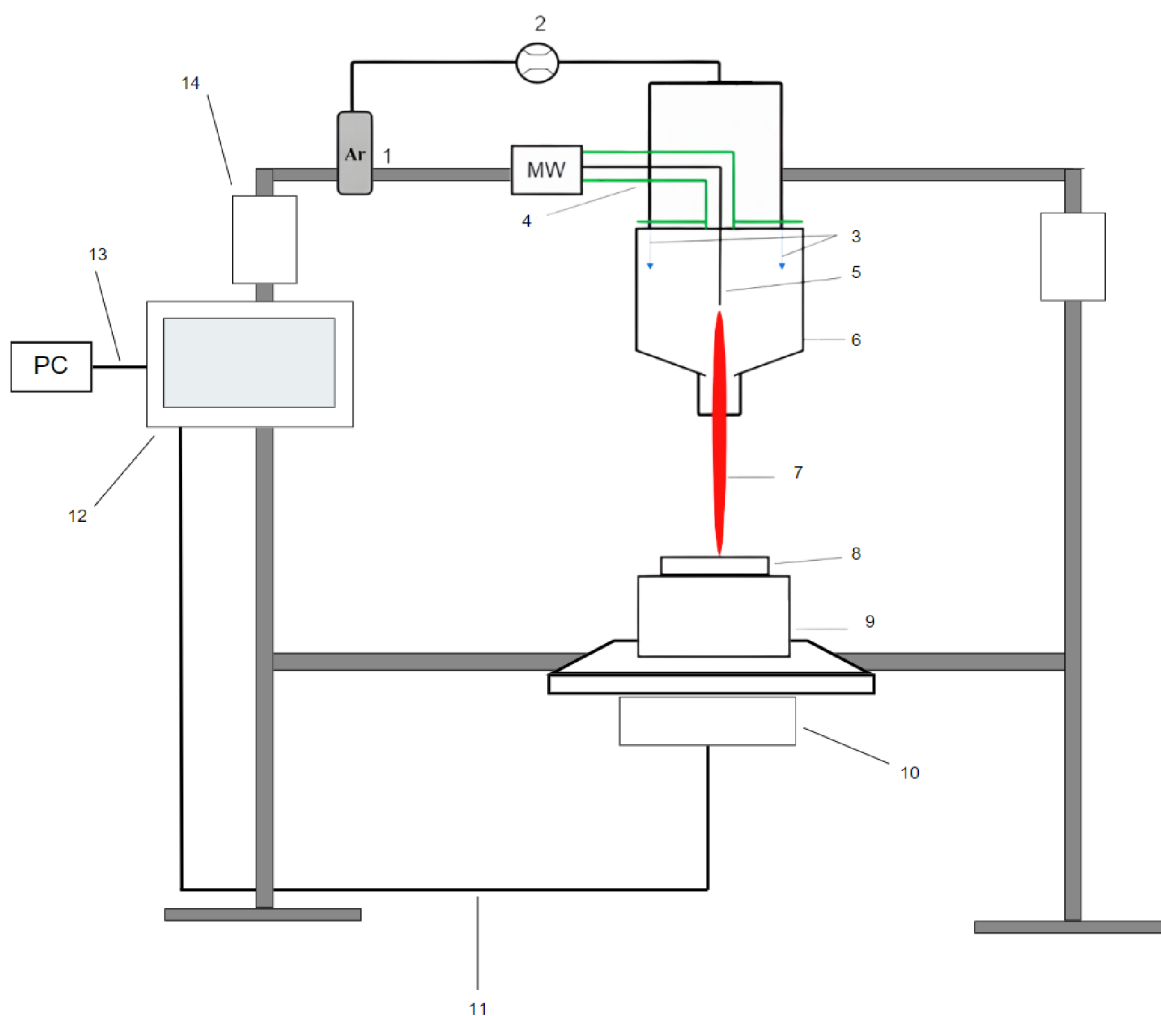
Tabulka 2: Příklady naměřených hodnot absorbancí pro bakterie *E. coli* a *S. epidermidis*

	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>
A [-]	0,393	0,392
	0,394	0,391
	0,389	0,395
Průměr	$0,392 \pm 0,003$	$0,393 \pm 0,002$
CFU/1 ml	$1,37 \cdot 10^8$	$1,79 \cdot 10^8$

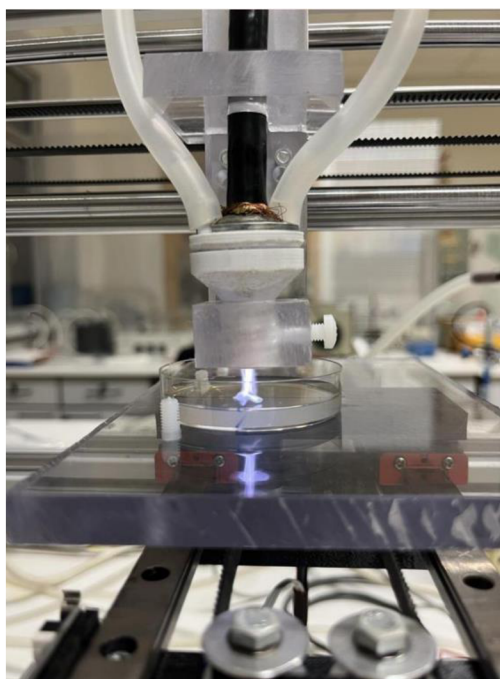
3.3 Expozice připravených vzorků pochodňovým výbojem s přímým prouděním plynu

3.3.1 Zapojení mikrovlnné plazmové trysky

Mikrovlny byly generovány pomocí mikrovlnného generátoru (Sairem, GMS 200 W) při frekvenci 2,45 GHz. Použitý výkon byl 12 W. Mikrovlny byly přivedeny do rezonanční dutiny, kde se pomocí mikrovlnné antény dostaly do celého prostoru rezonanční dutiny a tímto způsobem došlo k ionizaci molekul argonu. Argon byl do rezonanční dutiny přiváděn přes regulátor hmotnostního průtoku (Bronkhorst FG201-CV), který byl nastaven na 5 l/min. V rezonanční dutině došlo ke vzniku ionizovaného plynu, tedy plazmatu, který byl vyfukován otvorem z rezonanční dutiny ven. Plazma bylo pozorováno ve formě plazmových kanálů, které byly v přímém kontaktu s ošetřovanou Petriho miskou (viz Obrázek 9, 10).



Obrázek 9: Schéma experimentálního zapojení pochodňového výboje s přímým prouděním plynu: 1 – zdroj argonu; 2 – regulátor hmotnostního průtoku; 3 – přímý přívod argonu; 4 – MW-koaxiální kabel; 5 – MW anténa; 6 – rezonanční dutina; 7 – plazmový paprsek; 8 – Petriho miska s naočkovanou kulturou; 9 – posuvný držák na Petriho misku; 10 – motorek pro pohyb Petriho misky; 11 – kabel; 12 – obrazovka propojená pomocí USB kabelu s počítačem; 13 – USB kabel; 14 – motorek pro pohyb plazmové trysky



Obrázek 10: Ukázka aplikace plazmatu generovaného pochodňovým výbojem s přímým prouděním plynu na Petriho misku s naočkovanou bakteriální kulturou

3.3.2 Ošetření mikroorganismů

3.3.2.1 *E. coli*

Petriho misky s kulturou *E. coli* byly ihned po zaočkování ošetřeny plazmatem. Byly zkoumány tři hlavní aspekty ošetření, a to doba ošetření (1 min, 2 min, 5 min, 8 min), směr ošetření (paralelně, kolmo) a rychlost ošetření, která byla zkoumána pouze u ošetření trvajících po dobu dvou minut. Jak už bylo výše zmíněno, výkon byl nastaven na 12 W. Průtok byl nastaven na konstantních 5 l/min. Měření byla prováděna vždy v tripletech pro jednotlivé koncentrace (10^6 , 10^4 CFU/ml) a druh ošetření (doba, směr a rychlost). Zároveň ke každé sérii měření byly nechány počitatelné kontroly s koncentrací 10^2 a 10^3 CFU/ml, které nebyly ošetřeny a následně byly přepočítané na požadovanou koncentraci. Jelikož u nižší koncentrace (10^4 CFU/ml) docházelo k příliš velké dekontaminaci a rozdíly mezi jednotlivými parametry nebyly dobře viditelné, jako optimální koncentrace se jevila koncentrace 10^6 CFU/ml. Proto tato koncentrace byla zvolena jako jediná pro další ošetření.

Důležité je zmínit, že na bakterii *E. coli* nejprve probíhala optimalizace přístroje, která zahrnovala správné nastavení posunu plazmového jetu, nastavení optimálních rychlostí a dob ošetření s cílem dosáhnout co největší dekontaminace ošetřované plochy. Z tohoto důvodu u bakterie *S. epidermidis* bylo prováděno menší množství měření. Po provedení jednotlivých ošetření byly všechny Petriho misky kultivovány v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

Také byly prováděny experimenty s opakovaným ošetřením, kdy z již ošetřené kultury bylo připraveno inokulum, které bylo opět inkubováno v termostatu s třepáním při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Takto nachystané inokulum bylo naředěno a ošetřeno stejným způsobem popsaným výše.

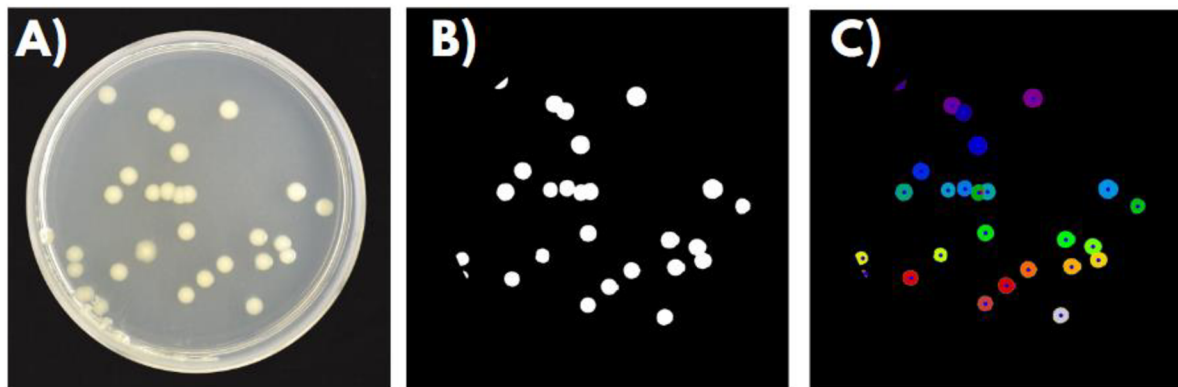
3.3.2.2 *S. epidermidis*

Petriho misky s kulturou *S. epidermidis* byly ihned po zaočkování ošetřeny nízkoteplotním plazmatem. V případě této bakterie byly studovány pouze dva aspekty ošetření, a to doba ošetření (2 min, 5 min, 8 min) a rychlost ošetření, která byla opět zkoumána pouze u ošetření trvajících po dobu dvou minut. Opět byly ponechány počitatelné kontroly s koncentrací 10^2 a 10^3 CFU/ml. Výkon a průtok byl nastaven na stejné hodnoty jako u bakterie *E. coli*.

Dále byly provedeny experimenty s opakovaným ošetřením, kdy z již ošetřené kultury bylo připraveno inokulum, které bylo inkubováno po dobu 4 hodin v termostatu s třepáním, jelikož po 4 hodinách začíná exponenciální fáze růstu těchto bakterií [36]. Takto nachystané inokulum bylo naředěno na požadované koncentrace (10^6 , 10^3 a 10^2 CFU/ml). Naočkované Petriho misky byly ošetřeny způsobem popsáním výše. V případě bakterie *S. epidermidis* bylo opakované ošetření prováděno po dobu 4 dnů, kdy inokulum bylo vždy nachystáno z buněk ošetřených předešlý den.

3.4 Zpracování a vyhodnocení výsledků

Po uplynutí kultivační doby byly všechny Petriho misky nafoceny. Počet kolonií byl vyhodnocen ve spolupráci s HexTech Research s.r.o. pomocí programu Aurora, jehož autorem je Ing. Jan Hrudka. Tento program dokáže spočítat počet kolonií za pomoci strojového učení a umělé inteligence (viz Obrázek 11). Z takto získaných dat byly následně sestaveny grafy, které znázorňují pokles počtu kolonií oproti neošetřené kontrole pro jednotlivý druh ošetření. Pro přehlednost grafu byly všechny použité koncentrace přepočítány na 10^6 CFU/ml.

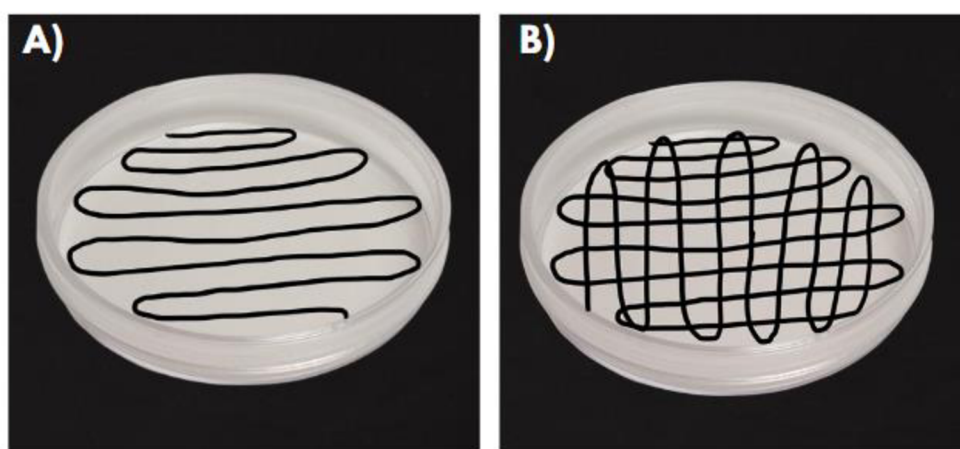


Obrázek 11: Ukázka vyhodnocení z programu Aurora: A) původní nafocená Petriho miska s koloniemi *E. coli*, B) ořezání okrajů misky a označení kolonií programem Aurora, C) výpočet počtu kolonií programem Aurora

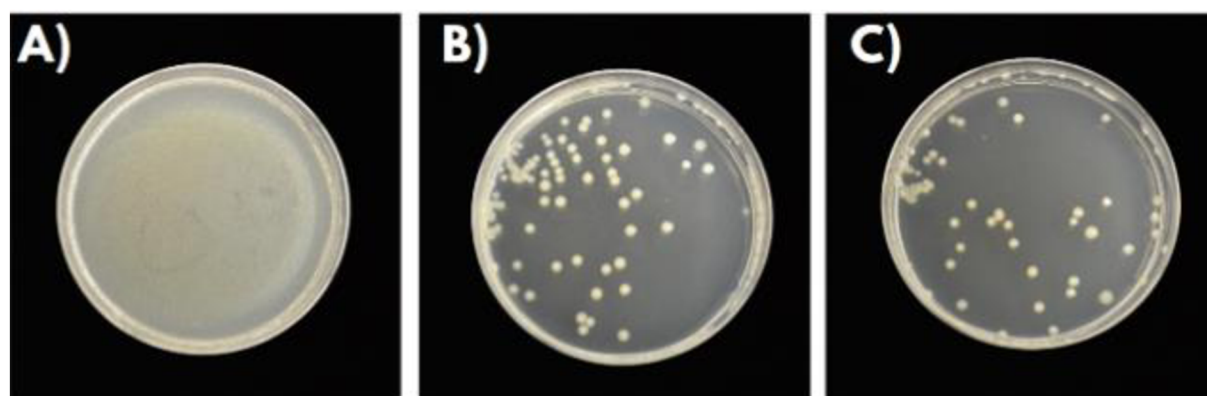
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Vliv směru ošetření

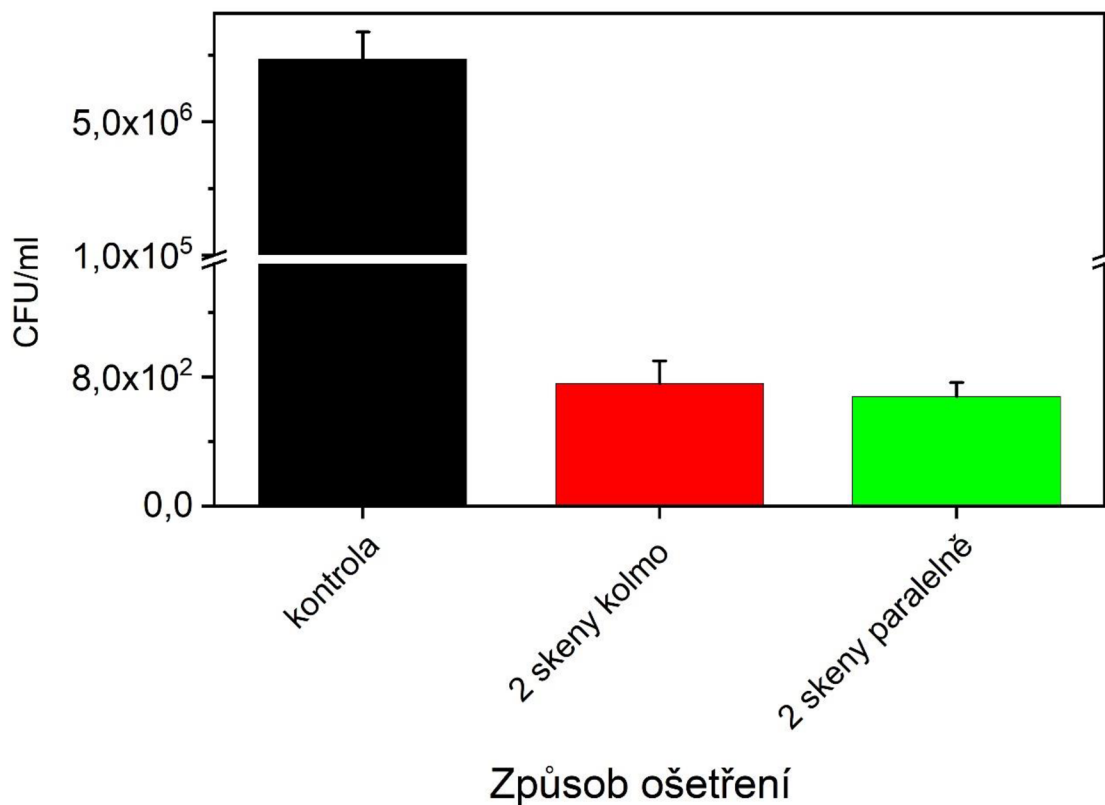
Bylo zkoumáno, zda různý posun plazmové trysky má vliv na účinnost dekontaminace ošetřované plochy. Ošetření bylo prováděné pouze u bakteriální kultury *Escherichia coli*. Byly zvoleny dva druhy ošetření. Při prvním druhu ošetření se plazmová tryska pohybovala po dobu 2 minut po naočkované agarové plotně ve stejné dráze (typ ošetření: paralelně). Při druhém typu ošetření se plazmová tryska pohybovala po naočkované agarové plotně po dobu 1 minuty v jednom směru a poté došlo k otočení Petriho misky o 90° a pohybu plazmové trysky po dobu další 1 minuty v kolmém směru na směr původní (typ ošetření: kolmo) (viz Obrázek 12). Jak je patrné z fotografií kolonií po 24hodinové kultivaci a grafu (viz Obrázek 13, 14), mezi jednotlivými druhy ošetření není viditelný rozdíl. V obou případech dochází k poklesu o 4 log.



Obrázek 12: Názorné zobrazení směru pohybu plazmové trysky, A) paralelní ošetření bakteriální kultury, B) kolmé ošetření bakteriální kultury



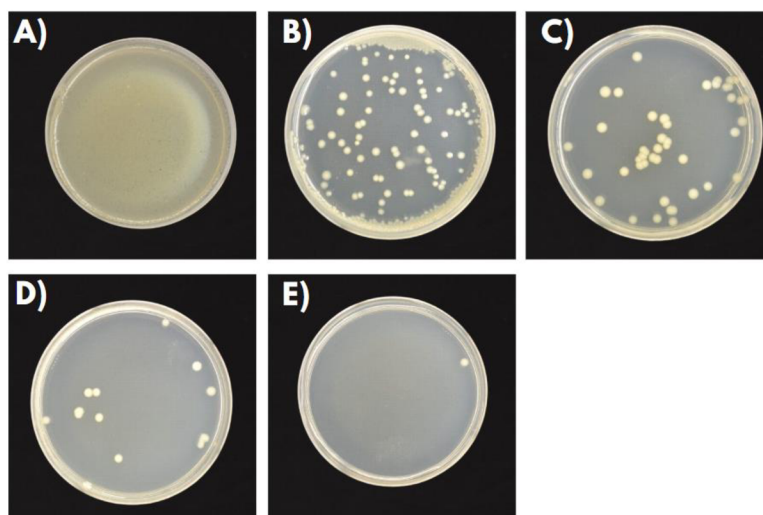
Obrázek 13: Zobrazení bakteriální kultury *E. coli* po 24hodinové kultivaci od ošetření, A) kontrola s koncentrací 10^6 CFU/ml, B) kolmé ošetření bakteriální kultury s původní koncentrací 10^6 CFU/ml, C) paralelní ošetření bakteriální kultury s původní koncentrací 10^6 CFU/ml



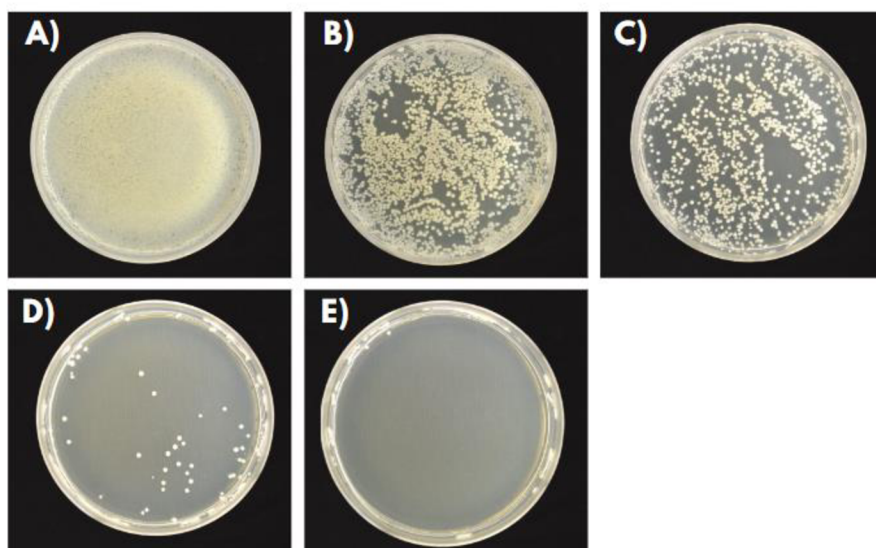
Obrázek 14: Graf zobrazující vliv směru ošetření u bakterie *E. coli*

4.2 Vliv času ošetření

Dalším parametrem, který byl zkoumán, je vliv času ošetření. Byly zvoleny čtyři různé časy ošetření, a to 1, 2, 5 a 8 minut. Jak je patrné z fotografií ošetřených agarových ploten po 24hodinové kultivaci (viz Obrázek 15, 16), se zvyšujícím se časem ošetření agarové plotny pomocí posuvné plazmové trysky dochází k větší dekontaminaci u obou studovaných bakterií.



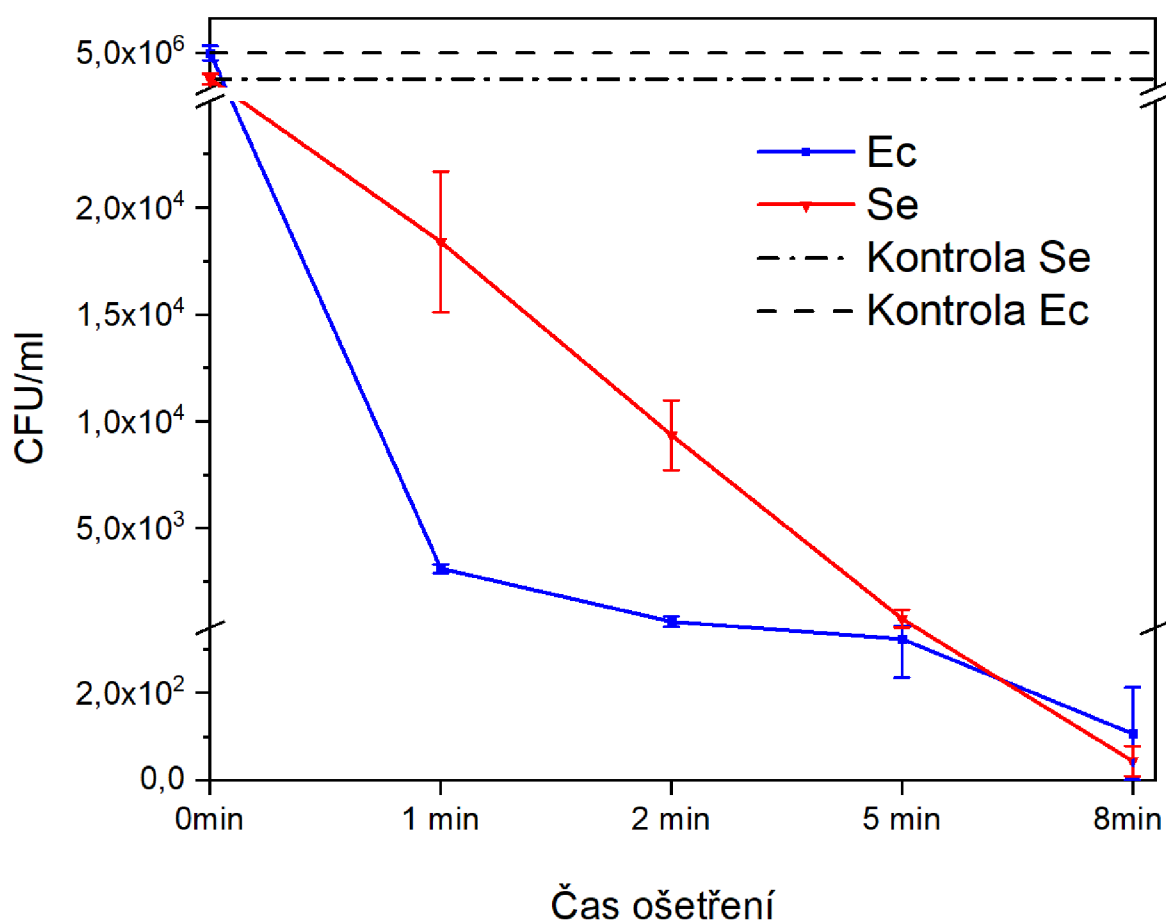
Obrázek 15: Zobrazení inhibičních účinků pro různé časy ošetření pro bakterii *E. coli* s původní koncentrací 10⁶ CFU/ml: A) kontrola s koncentrací 10⁶ CFU/ml, B) 1minutové ošetření, C) 2minutové ošetření, D) 5minutové ošetření, E) 8minutové ošetření



Obrázek 16: Zobrazení inhibičních účinků pro různé časy ošetření pro bakterii *S. epidermidis* s původní koncentrací 10^6 CFU/ml: A) kontrola s koncentrací 10^6 CFU/ml, B) 1minutové ošetření, C) 2minutové ošetření, D) 5minutové ošetření, E) 8minutové ošetření

Z grafu (viz Obrázek 17) je patrné, že v případě gramnegativní bakterie *E. coli* dochází u ošetření trvajících jednu a dvě minuty k většímu úbytku kolonií než u grampozitivní bakterie *S. epidermidis*. Tento výsledek odpovídá předpokladu, že gramnegativní bakterie ve své buněčné stěně obsahují tenčí vrstvu peptidoglykanu než grampozitivní bakterie, a proto jsou k plazmovému ošetření více citlivé [38].

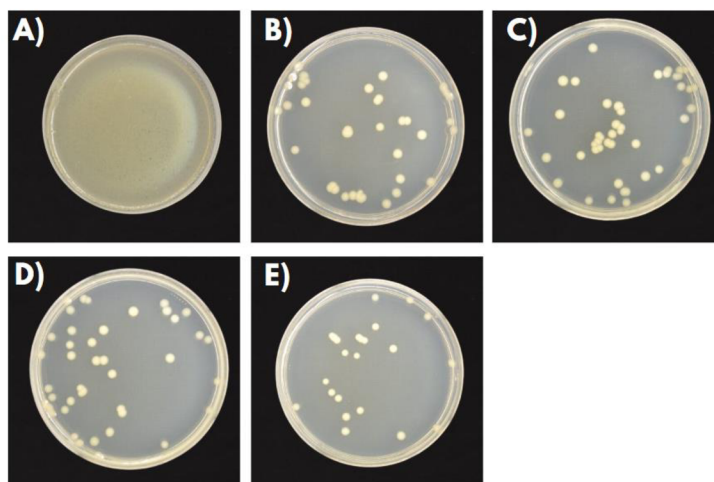
Dále bylo pozorováno, že při pětiminutovém a osmiminutovém ošetření dochází ke stejnému potlačení nárůstu kolonií na ošetřené agarové plotně, a to jak u grampozitivní bakterie *S. epidermidis*, tak u gramnegativní bakterie *E. coli*. V případě těchto dvou ošetření (5 minut a 8 minut) už na bakterie působí dostatečně dlouhou dobu reaktivní částice kyslíku a dusíku, aby dekontaminace ošetřované plochy byla účinná.



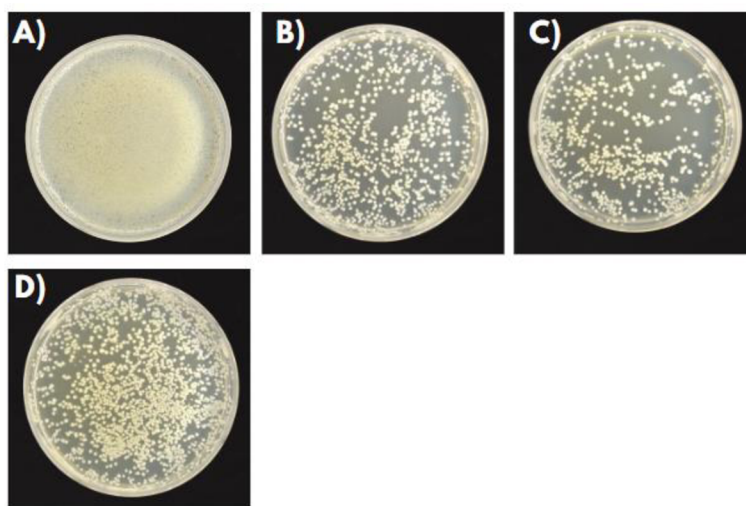
Obrázek 17: Graf zobrazující vliv času ošetření na dekontaminaci ošetřované plochy, červená křivka pro *S. epidermidis*, modrá křivka pro *E. coli*, černé křivky zobrazují kontroly pro obě bakterie

4.3 Vliv rychlosti ošetření

Vliv rychlosti ošetření byl zkoumán na způsobu ošetření, u kterého byla nastavena celková doba ošetření na 2 minuty vždy s rozdílnou rychlostí paralelního posunu plazmové trysky. Byly zvoleny celkem 4 druhy rychlostí. Posun 8x snake znamená, že plazmová tryska přejela ošetřovanou plochu 8x za zvolený čas dvou minut. V případě 5x snake došlo k přejetí ošetřované plochy 5x po dobu dvou minut. Rychlost 2x snake označuje, že plazmová tryska ošetřovanou plochu přejela 2x, rychlost 1x snake značí, že plazmová tryska přejela ošetřovanou plochu pouze jednou. Tudíž rychlost 8x snake značí nejrychlejší posun plazmové trysky a rychlost 1x snake značí nejpomalejší posun plazmové trysky. Jak je patrné z fotografií kolonií po 24hodinové kultivaci (viz Obrázek 18, 19), rozdíl mezi jednotlivými rychlostmi ošetření není příliš markantní pro obě studované bakterie.



Obrázek 18: Zobrazení inhibičních účinků pro různé rychlosti ošetření pro bakterii *E. coli* s původní koncentrací 10^6 CFU/ml: A) kontrola s koncentrací 10^6 CFU/ml, B) ošetření 1x snake, C) ošetření 2x snake, D) ošetření 5x snake, E) ošetření 8x snake



Obrázek 19: Zobrazení inhibičních účinků pro různé rychlosti ošetření pro bakterii *S. epidermidis* s původní koncentrací 10^6 CFU/ml: A) kontrola s koncentrací 10^6 CFU/ml, B) ošetření 1x snake, C) ošetření 2x snake, D) ošetření 8x snake

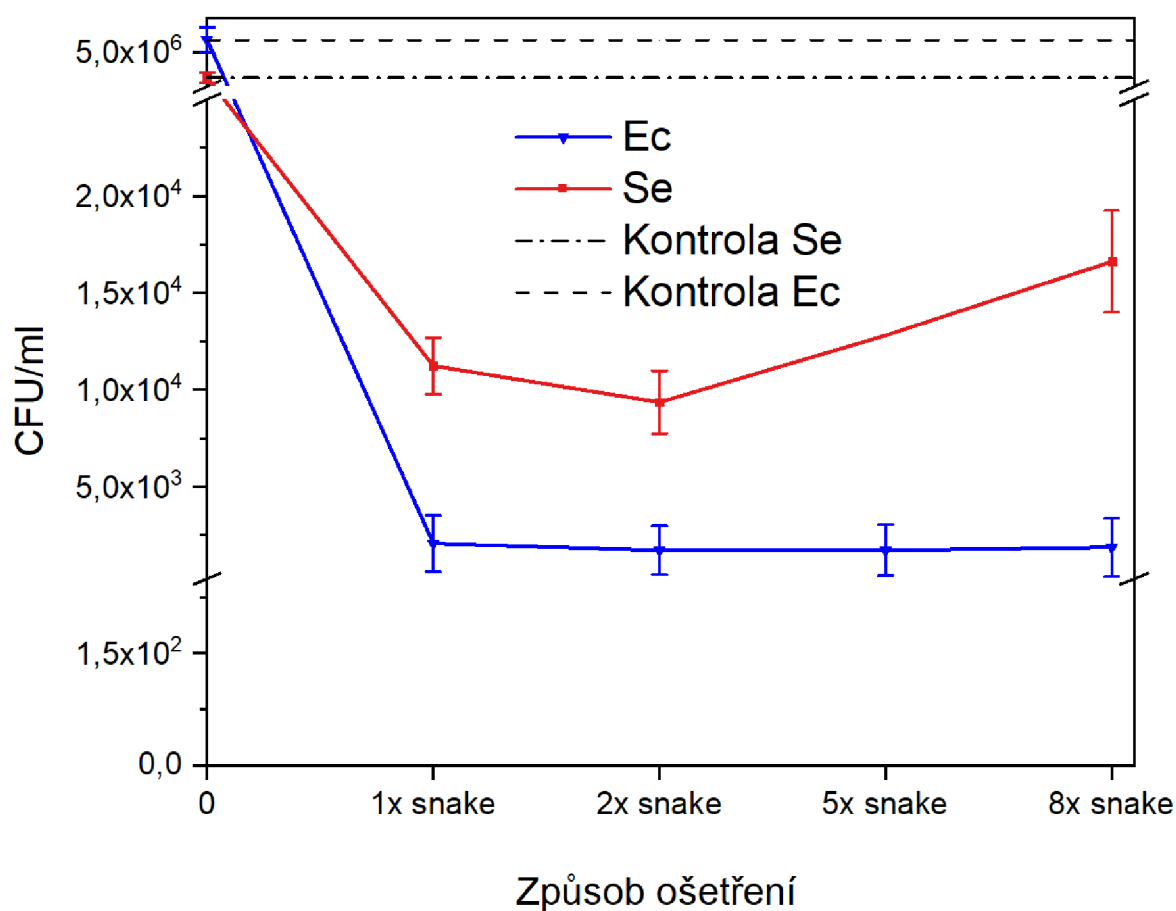
Dále byl sestaven graf vlivu rychlosti na ošetření pro obě studované bakterie (viz Obrázek 20). V případě gramnegativní bakterie *E. coli* nemá rozdílná rychlost žádný vliv na potlačení nárůstu kolonií na ošetřené ploše.

Jelikož u gramnegativní bakterie *E. coli* nebyl pozorován rozdíl v účinnosti dekontaminace ošetřované plochy mezi jednotlivými rychlostmi, pro grampozitivní bakterii *S. epidermidis* byly zvoleny pouze rychlosti 1x snake (nejpomalejší) a rychlost 8x snake (nejrychlejší). Rychlost 2x snake byla také zvolena, jelikož s touto rychlostí se pohybovala plazmová tryska i v případě experimentů zkoumající vliv směru a času na ošetření.

U bakterie *S. epidermidis* byl již pozorován větší rozdíl mezi jednotlivými rychlostmi ošetření. Při rychlosti 8x snake (tedy nejrychlejší rychlosti) dochází k výraznějšímu nárůstu kolonií po 24hodinové kultivaci na ošetřené ploše. Tento fakt může opět vysvětlovat rozdíl ve stavbě buněčné stěny, kdy rychlost 8x snake už je příliš rychlá, aby účinně dekontaminovala odolnější

grampozitivní bakterii *S. epidermidis*. Také se tato bakterie mezi jednotlivými skeny stihne rychleji regenerovat, respektive adaptovat na stresové podmínky. Jako optimální rychlost se jeví rychlost 2x snake, avšak rozdíl mezi rychlostí 1x snake a 2x snake je minimální i v případě bakterie *S. epidermidis*.

Pro budoucí aplikace by tedy bylo vhodné se vyhnout příliš rychlému posunu plazmové trysky po ošetřované ploše. Jak je patrné u grampozitivní bakterie *S. epidermidis*, příliš velká rychlost je parametr, který má vliv na dekontaminaci ošetřované plochy, a může tak dojít k snížení účinnosti ošetření.



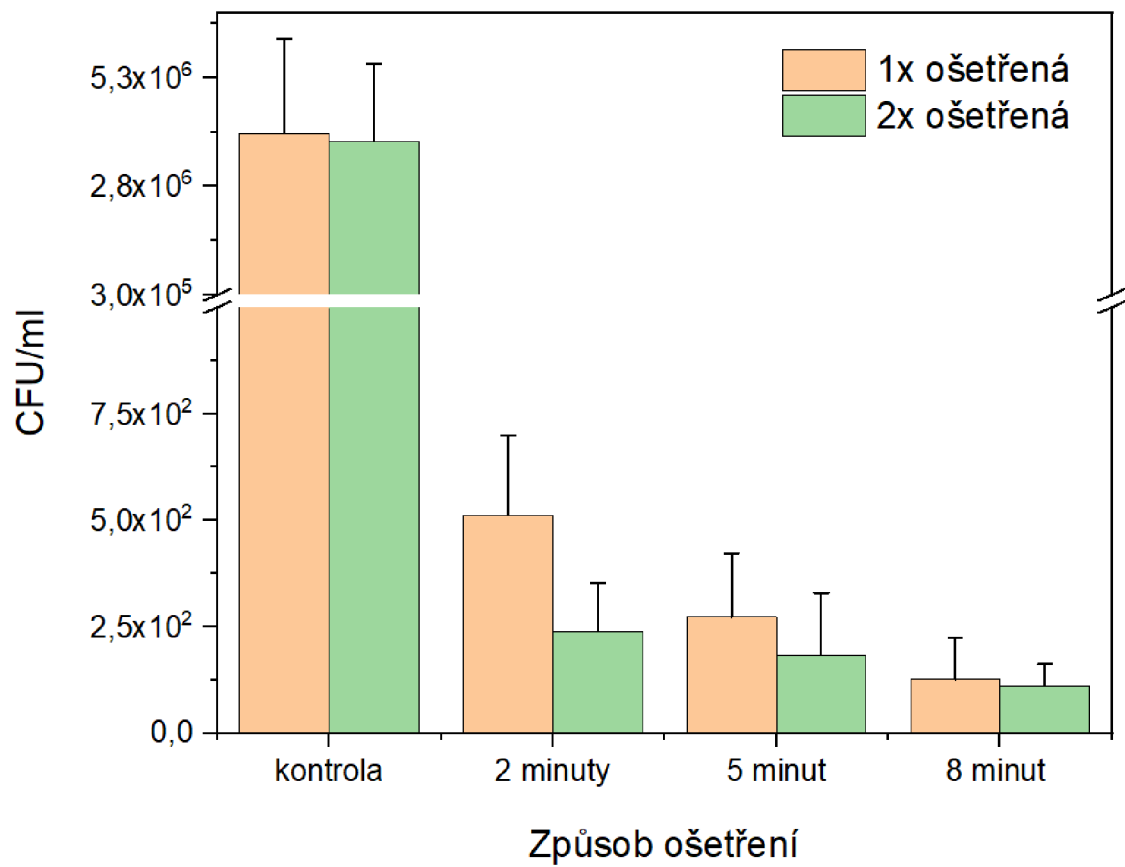
Obrázek 20: Graf zobrazující vliv rychlosti na ošetření plazmovou tryskou, modrá křivka značí *S. epidermidis*, červená křivka značí *E. coli*, černá křivka značí kontroly pro obě ošetřované bakterie

4.4 Vliv opakovaného ošetření

4.4.1 *E. coli*

Byly provedeny experimenty, zda nedochází ke vzniku rezistence bakterií na plazmové ošetření. U bakterie *E. coli* bylo opakované ošetření provedeno pouze jednou, kdy z již ošetřených buněk bylo nachystáno nové inokulum, které bylo následně rozředěno na požadované koncentrace (10^6 , 10^3 , 10^2 CFU/ml). Jak je patrné z grafu (viz Obrázek 21), při druhém opakování nedochází ke zvyšování nárůstu kolonií. Naopak dochází k jejich mírnému

úbytku u všech časů ošetření, což značí, že při opakovaném ošetření nebyl zaznamenán vznik rezistence bakterie.



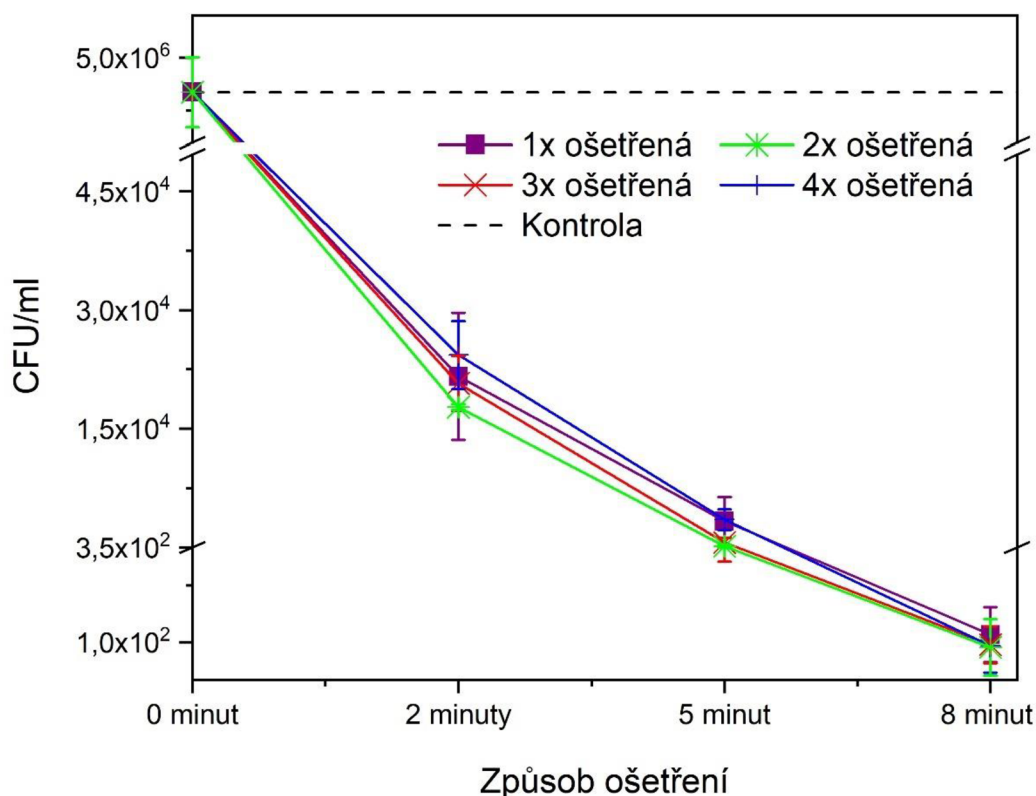
Obrázek 21: Graf zobrazující opakované ošetření u bakterie *E. coli*, kdy oranžová barva značí 1x ošetřené kolonie a zelená barva značí 2x ošetřené kolonie

4.4.2 *S. epidermidis*

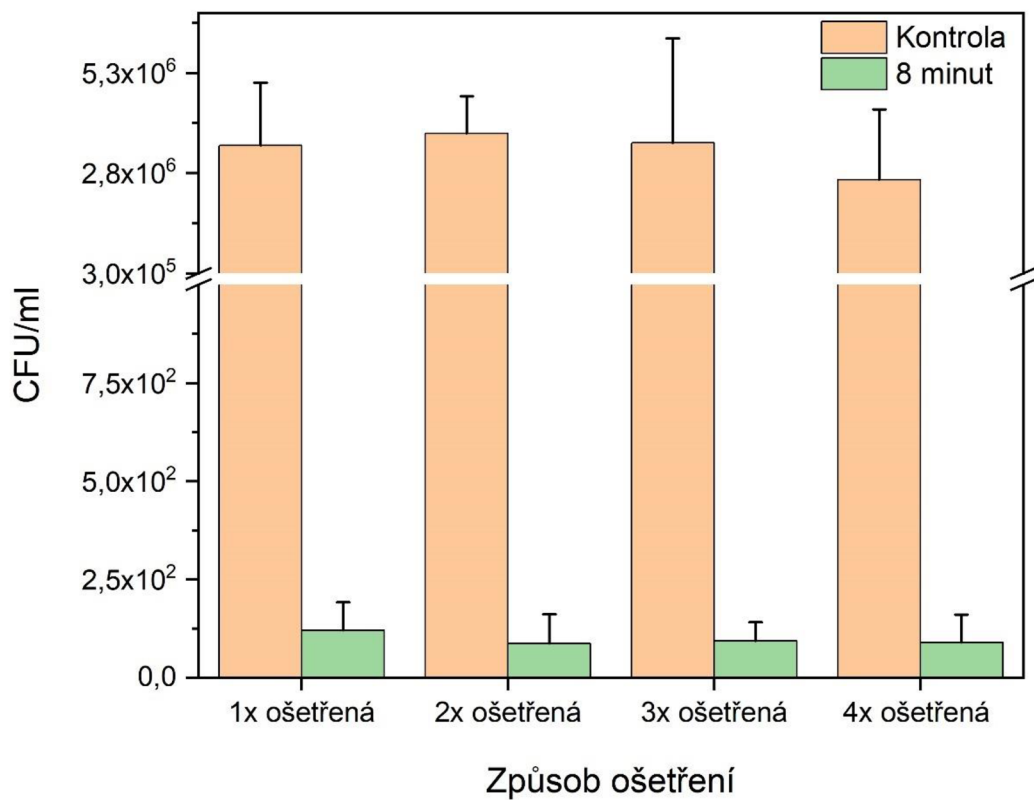
U bakterie *S. epidermidis* bylo také testováno, zda nedochází ke vzniku rezistence na ošetření pomocí plazmové trysky. Zde už bylo ošetření opakováno celkem čtyřikrát, kdy z již ošetřených buněk bylo vždy nachystáno nové inokulum, které bylo dále ředěno na požadovanou koncentraci. Byl sestaven graf zobrazující opakované ošetření u bakterie *S. epidermidis* (viz Obrázek 22). Jako kontrola byla zvolena průměrná hodnota počáteční koncentrace CFU/ml ze všech měření z důvodů přehlednosti grafu. Hodnoty kontrol pro jednotlivá opakování jsou poté blíže zobrazeny v obrázku 23, tedy v grafu zobrazujícím pouze vývoj 8minutového ošetření v závislosti na počtu opakování.

Jak je patrné z grafů (viz Obrázek 22, 23), mezi jednotlivými opakováními jsou drobné odchylky, avšak nebyl zaznamenán výrazný nárůst kolonií v žádném ze všech zvolených časech ošetření. To napovídá tomu, že i v případě čtyřnásobného ošetření u bakterie *S. epidermidis* nedochází ke vzniku rezistence na plazmové ošetření.

Antimikrobiální účinek plazmatu pro opakované ošetření byl zaznamenán i v případě studie zaměřené na grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* [39]. To potvrzuje fakt, že tato metoda ošetření může být vhodnou alternativou pro léčbu infikovaných ran.



Obrázek 22: Graf zobrazující opakované ošetření u bakterie *S. epidermidis*, kdy fialová křivka značí jednou ošetřené kolonie, zelená křivka dvakrát ošetřené kolonie, červená křivka třikrát ošetřené kolonie a modrá křivka čtyřikrát ošetřené kolonie, černá křivka kontrolu



Obrázek 23: Graf zobrazující opakované ošetření u bakterie *S. epidermidis* se zaměřením na 8minutové ošetření

5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo porovnat vliv parametrů ošetření (směr, rychlost a čas) nízkoteplotní posuvné plazmové trysky na studované bakterie *Escherichia coli* a *Staphylococcus epidermidis*. Inokulum po 24hodinové kultivaci bylo vhodně naředěno a naočkováno na Petriho misky s agarovými plotnami. Zaočkované Petriho misky byly ihned ošetřovány pomocí mikrovlnného pochodňového výboje (frekvence 2,45 GHz, výkon 12 W) s přímým prouděním plynu (argon, průtok 5 l/min). Po 24hodinové kultivaci byl pozorován úbytek kolonií v závislosti na zvoleném parametru ošetření u obou studovaných bakterií.

Nejprve byl zkoumán vliv směru ošetření, kdy byly zvoleny dva různé směry a to paralelně (pohyb plazmové trysky dvakrát po stejné dráze) a kolmo (po prvním ošetření byl změněn směr ošetření o 90°). Obě tato ošetření trvala dvě minuty a nebyl zaznamenán žádný rozdíl v úbytku kolonií. Tento poznatek je důležitý pro budoucnost biomedicínských aplikací plazmového ošetření, jelikož nezáleží na směru pohybu plazmové trysky a účinnost dekontaminace bude stále stejná.

Dalším sledovaným parametrem byla rychlost, kdy byl celkový čas ošetření nastaven na dvě minuty a rychlost posunu plazmové trysky byla rozdílná. U gramnegativní bakterie *E. coli* nebyl zaznamenán žádný rozdíl mezi zvolenými rychlostmi. U grampozitivní bakterie *S. epidermidis* došlo k mírnému nárůstu počtu kolonií při nejvyšší zvolené rychlosti. To naznačuje, že by bylo vhodné se vyvarovat velkým rychlostem posunu plazmové trysky, jelikož u grampozitivní bakterie má tento parametr vliv na účinnost dekontaminace ošetřované plochy. Avšak je důležité konstatovat, že nárůst kolonií u nejvyšší použité rychlosti nebyl příliš markantní a stále odpovídal stejnému řádu poklesu jako u jiných zvolených rychlostí.

Posledním parametrem, který byl zkoumán, byl vliv doby ošetření. Tento parametr se jevil jako nejvýznamnější. V případě jednodeminutového a dvouminutového ošetření byl pozorován výše zmíněný trend, kdy došlo k větší dekontaminaci ošetřované plochy u gramnegativní bakterie *E. coli*. Avšak u pětiminutového a osmiminutového ošetření došlo téměř ke stejné dekontaminaci u obou zvolených bakterií. Lze tedy konstatovat, že tato doba už je dostatečně dlouhá na to, aby došlo k dekontaminaci ošetřované plochy se stejnou účinností u obou studovaných bakterií.

Obecně lze konstatovat, že grampozitivní bakterie *S. epidermidis* byla více odolná na plazmové ošetření nežli gramnegativní bakterie *E. coli* ve všech zvolených parametrech. Tento výsledek odpovídá stavbě buněčné stěny, kdy grampozitivní bakterie obsahují silnější vrstvu peptidoglykanu, která je odolnější na působení plazmového ošetření [38].

V neposlední řadě byly prováděny pilotní studie týkající se vzniku rezistence na plazmové ošetření. U obou studovaných bakterií nebyl zaznamenán vznik rezistence na tento druh ošetření. Do budoucna by však bylo vhodné zkusit delší série opakování expozice plazmatu na ošetřované plochy.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] JNANI, Dina a Sidartha D. REY. *Escherichia coli*. In: *Encyclopedia of Toxicology* [online]. 4th ed. Academic Press, 2023, s. 357-367 [cit. 2024-01-18]. ISBN 978-0-323-85434-4. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128243152001901?via%3Dihub>
- [2] ROSYPAL, Stanislav. *Nový přehled biologie*. Praha: Scientia, 2003 ISBN 8071832685.
- [3] TANAKA, Hiromasa, Kenji ISHIKAWA, Masaaki MIZUNO, Shinya TOYOKUNI, Hiroaki KAJIYAMA, Fumitaka KIKKAWA, Hans-Robert METELMANN a Masaru HORI. State of the art in medical applications using non-thermal atmospheric pressure plasma. *Reviews of Modern Plasma Physics* [online]. 2017, **1**(1) [cit. 2024-04-27]. ISSN 2367-3192. Dostupné z: doi:10.1007/s41614-017-0004-3
- [4] DOMONKOS, Mária, Petra TICHÁ, Jan TREJBAL a Pavel DEMO. Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma Technology in Medicine, Agriculture and Food Industry. *Applied science* [online]. 2021, **11**(11) [cit. 2024-01-31]. Dostupné z: doi:10.3390/app11114809
- [5] STARČIĆ ERJAVEC, Marjanca. *Escherichia coli - Old and New Insights* [online]. IntechOpen, 2023 [cit. 2024-01-16]. ISBN 978-1-83969-870-5. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.95203
- [6] BOS, Martine P., Viviane ROBERT a Jan TOMMASSEN. Biogenesis of the Gram-negative bacterial outer membrane. *Annual Review of Microbiology* [online]. 2007, **61**(1), 191-214 [cit. 2024-04-27]. ISSN 0066-4227. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093245
- [7] ALLOCATI, Nerino, Michele MASULLI, Michail F. ALEXEJEV a Carmine DI ILLIO. *Escherichia coli* in Europe: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2013, **10**(12), 20 [cit. 2024-01-16]. ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph10126235
- [8] MUELLER, W. H. Bacteria Protocol - Critical Point Drying of *E. coli* for SEM. In: *Leica microsystems* [online]. 2016, [cit. 2024-01-16]. Dostupné z: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/life-science/bacteria-protocol-critical-point-drying-of-e-coli-for-sem/>
- [9] KAPER, James B., James P. NATARO a Harry L. T. MOBLEY. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2004, **2**(2), 123-140 [cit. 2024-04-27]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro818
- [10] DONNENBERG, Michael S, ed. *Escherichia coli* patotypes. In: *Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis* [online]. 2013, 2nd. Academic Press, s. 75-304 [cit. 2024-01-16]. ISBN 978-0-12-397048-0. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/book/9780123970480/escherichia-coli#book-info>

- [11] PAKBIN, Babak, Wolfram M. BRÜCK a John W. A. ROSSEN. Virulence Factors of Enteric Pathogenic Escherichia coli: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(18) [cit. 2024-04-27]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22189922
- [12] SCHINDLER, DRSC., Prof.MUDr. Jiří. *Mikrobiologie, Pro studenty zdravotnických oborů. 2.*, doplněné a přepracované vydání. Praha 7: Grada Publishing, 2014. ISBN 978-80-247-4771-2.
- [13] NAMVAR, E. A., S. BASTARAHANG, N. ABBASI, et al. Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review. *GMS Hygiene and Infection Control* [online]. 2014, **9**(3) [cit. 2024-02-18]. Dostupné z: doi:10.3205/dgkh000243
- [14] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 80-210-4207-9.
- [15] LEI, Yujie, Yushan XU, Peng JING, et al. The effects of TGF- β 1 on staphylococcus epidermidis biofilm formation in a tree shrew biomaterial-centered infection model. *Annals of Translational Medicine* [online]. 2021, **9**(1), 57-57 [cit. 2024-04-27]. ISSN 23055839. Dostupné z: doi:10.21037/atm-20-4526
- [16] OTTO, Michael. *Staphylococcus epidermidis* Pathogenesis. In: FEY, Paul D., ed. *Staphylococcus Epidermidis* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2014, s. 17-31 [cit. 2024-04-27]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-62703-735-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-62703-736-5_2
- [17] VUONG, Cuong a Michael OTTO. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and Infection* [online]. 2002, **4**(4), 481-489 [cit. 2024-04-27]. ISSN 12864579. Dostupné z: doi:10.1016/S1286-4579(02)01563-0
- [18] LOPEZ, Daniel, Hera VLAMAKIS a Roberto KOTLER. Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2010 **2**(7),398[cit. 2024-01-18]. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a000398
- [19] SHARMA, G., S. SHARMA, P. SHARMA, D. CHANDOLA, S. DANG, S. GUPTA a R. GABRANI. Escherichia coli biofilm: development and therapeutic strategies. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2016, **121**(2), 309-319 [cit. 2024-04-27]. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/jam.13078
- [20] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná. 2.*, přepr. vyd. Brno: Neptun, 2005. ISBN 80-86850-00-5.
- [21] *Světlo: Plazma je všude kolem nás* [online], 2001. Praha: FCC Public [cit. 2023-06-11]. ISSN 1212-0812. Dostupné z: <http://www.odbornecasopisy.cz/svetlo/casopis/tema/plazma-je-vsude-kolem-nas--16959>
- [22] CHEN, Francis F. *Úvod do fyziky plazmatu. 3. vyd.* Praha: Academia, 1983.
- [23] MARTIŠOVITŠ, Viktor, 2004. *Základy fyziky plazmy: učební text pre magisterské štúdium* [online]. Bratislava [cit. 2023-06-11]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/jaro2014/C6900/um/Martisovits-Zaklady_fyziky_plazmy.pdf

- [24] BRANÝ, Dušan, Dana DVORSKÁ, Erika HALAŠOVÁ a Henrieta ŠKOVIEROVÁ. Cold atmospheric plasma: A powerful tool for modern medicine. *International journal of molecular sciences* [online]. Switzerland: MDPI, 2020, **21**(8), 29-32 [cit. 2023-06-10]. ISSN 1661-6596. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21082932
- [25] SCHOLTZ, Vladimír. Nízkotepelná plazma I: Čo je to plazma? Aldebran bulletin [online]. 2012.(12).[cit. 2023-06-11]. ISSN 1214-1674. Dostupné z: https://www.aldebaran.cz/bulletin/2012_22_pla.php
- [26] LEBEDEV, Yu A. Microwave discharges: generation and diagnostics. *Journal of Physics: Conference Series* [online]. 2010, 2010-11-01, **257** [cit. 2024-04-27]. ISSN 1742-6596. Dostupné z: doi:10.1088/1742-6596/257/1/012016
- [27] WINTER, J., R. BRANDENBURG a K-D. WELTMAN, 2015. Atmospheric pressure plasma jets: an overview of devices and new directions. *Plasma Source Science and Technology* [online]. **24**(6) [cit. 2024-01-31]. Dostupné z: doi:10.1088/0963-0252/24/6/064001
- [28] CUI, Jingxian, Tong ZHAO, Liang ZOU, Xiaolong WANG a Yuantao ZHANG. Molecular dynamics simulation of *S. cerevisiae* glucan destruction by plasma ROS based on ReaxFF. *Journal of Physics D: Applied Physics* [online]. 2018, **51**(35) [cit. 2024-04-27]. ISSN 0022-3727. Dostupné z: doi:10.1088/1361-6463/aad4ec
- [29] RAJAN, Anbarasan, Bhavadharini BOOPATHY, Mahendran RADHAKRISHNAN, Lakshminarayana RAO, Oliver K. SCHLÜTER a Brijesh K. TIWARI. Plasma processing: a sustainable technology in agri-food processing. *Sustainable Food Technology* [online]. 2023, **1**(1), 9-49 [cit. 2024-01-31]. ISSN 2753-8095. Dostupné z: doi:10.1039/D2FB00014H
- [30] LAROUSSE, Mounir. Cold Plasma in Medicine and Healthcare: The New Frontier in Low Temperature Plasma Applications. *Frontiers in Physics* [online]. 2020, **8**(74), 7 [cit. 2024-01-31]. Dostupné z: doi:10.3389/fphy.2020.00074
- [31] GAN, Lu, Song ZHANG, Devesh POORUN, Dawei LIU, Xinpei LU, Mengwen HE, Xiaoru DUAN a Hongxiang CHEN. Medical applications of nonthermal atmospheric pressure plasma in dermatology. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* [online]. 2018, **16**(1), 7-13 [cit. 2024-04-27]. ISSN 1610-0379. Dostupné z: doi:10.1111/ddg.13373
- [32] SCHLEGEL, Jürgen, Julia KÖRITZER a Veronika BOXHAMMER. Plasma in cancer treatment. *Clinical Plasma Medicine* [online]. 2013 **1**(2), 2-7 [cit. 2024-01-31]. ISSN 22128166. Dostupné z: doi: 10.1016/j.cpme.2013.08.001
- [33] ZHANG, Jingqi, Fuzhong LI, Keliang LU, Weifen ZHANG a Jinlong MA. Recent advances in cold atmospheric plasma for tumor therapy. *Process Biochemistry* [online]. 2023, **131**, 77-90 [cit. 2024-01-31]. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2023.06.009
- [34] BARTOŠ, Petr, Pavel KŘÍŽ, Zbyněk HAVELKA, Andrea BOHATÁ, Pavel OLŠAN, Petr ŠPATENKA, Vladislav ČURN a Miroslav DIENSTBIER, 2017. Plazmové

- technologie v potravinářském průmyslu: mini-review. *Kvasný Průmysl* [online]. 2017, **63**(3), 134-138 [cit. 2024-01-31]. ISSN 00235830. Dostupné z: doi:10.18832/kp201716
- [35] KUWAHATA, Hiroshi, Takeshi YAMAGUCHI, Ryu-ichiro OHYAMA a Atsushi ITO, 2015. Inactivation of *Escherichia coli* using atmospheric-pressure plasma jet. *Japanese Journal of Applied Physics* [online]. 2015, **54**(1S) [cit. 2024-02-05]. ISSN 0021-4922. Dostupné z: doi:10.7567/JJAP.54.01AG08
- [36] COTTER, J.J., P. MAGUIRE, F. SOBERON, S. DANIELS, J.P. O'GARA a E. CASEY. Disinfection of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms using a remote non-thermal gas plasma. *Journal of Hospital Infection* [online]. 2011 **78**(3), 204-207 [cit. 2024-02-18]. ISSN 01956701. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhin.2011.03.019
- [37] PETROVÁ, Veronika. Studium přímé aplikace nízkoteplotního plazmatu na kvasinky *Candida Glabrata* a bakterie. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zavprace/detail/147928>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce prof. RNDr. František Krčma, Ph.D.
- [38] SCHOLTZ, Vladimír, Eva VAŇKOVÁ, Petra KAŠPAROVÁ, Ramya PREMANATH, Iddya KARUNASAGAR a Jaroslav JULÁK. Non-thermal Plasma Treatment of ESKAPE Pathogens: A Review. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2021, **12** [cit. 2024-04-27]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2021.737635
- [39] MATTHES, Rutger, Ojan ASSADIAN a Axel KRAMER. Repeated applications of cold atmospheric pressure plasma does not induce resistance in *Staphylococcus aureus* embedded in biofilms. *GMS Hyg Infect Control* [online]. 2014 **9**(3) [cit. 2024-04-17]. Dostupné z: doi:10.3205/dgkh000237

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

CAP = Cold atmospheric pressure plasma = Nízkoteplotní plazma za atmosférického tlaku

CFU = Colony forming units = Jednotky tvořící kolonie

DBD = Dielectric barrier discharge = Dielektrický bariérový výboj

DNA = deoxyribonucleic acid = Deoxyribonukleová kyselina

EAEC = Enteroaggregative *Escherichia coli* = Enteroadherentní *Escherichia coli*

EHEC = Enterohemorrhagic *Escherichia coli* = Enterohemoragická *Escherichia coli*

EIEC = Enteroinvasive *Escherichia coli* = Enteroinvazivní *Escherichia coli*

EPEC = Enteropathogenic *Escherichia coli* = Enteropatogenní *Escherichia coli*

ETEC = Enterotoxigenic *Escherichia coli* = Enterotoxigenní *Escherichia coli*

FE-DBD = Floating electrode dielectric barrier discharge = Dielektrický bariérový výboj s plovoucí elektrodou

HUS = Hemolytic uremic syndrom = Hemolytický-uremický syndrom

MV = mikrovlnný výboj

PTL = Plasma treated liquid = plazmatem ošetřená kapalina

RNA = ribonucleic acid = Ribonukleová kyselina

RNS = Reactive nitrogen species = Reaktivní druhy dusíku

RONs = Reactive oxygen nitrogen species = Reaktivní druhy kyslíku a dusíku

ROS = Reactive oxygen species = Reaktivní druhy kyslíku

SEM = Scanning electron microscopy = skenovací elektronová mikroskopie

SLT = Shiga-like toxin

UPEC = Uropathogenic *Escherichia coli* = Uropatogenní *Escherichia coli*

USB = Universal serial bus = univerzální sériová sběrnice

UV = Ultra violet light = Ultrafialové záření