



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

STUDIUM ÚČINKŮ MIKROVLNNÉHO NÍZKOTEPLTNÍHO PLAZMATU NA KVASINKY

STUDY OF LOW TEMPERATURE MICROWAVE PLASMA ON YEASTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Veronika Petrová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. František Krčma, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1659/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Veronika Petrová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **prof. RNDr. František Krčma, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Studium účinků mikrovlnného nízkoteplotního plazmatu na kvasinky

Zadání bakalářské práce:

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

1. Prostudujte v současnosti používané plazmové systémy pro biomedicínské aplikace
2. Nastudujte metody použitelné pro stanovení vitality kvasinek
3. Aplikujte na vybrané kvasinky plazmové mikrovlnné plazma za různých podmínek
4. Vyhodnoťte účinky plazmatu na vitalitu kvasinek pomocí velikosti inhibičních zón

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

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

Veronika Petrová
student(ka)

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předmětem této bakalářské práce je studium účinku nízkoteplotního mikrovlnného plazmatu na kvasinky. Pro tyto účely byla vybrána kvasinka *Candida Glabrata*. Sledovány jsou tři parametry, které mají různý vliv na velikost inhibičních zón a jejich časovou stabilitu. Je zkoumán vliv počáteční koncentrace kvasinek, délka ošetření a velikost výkonu (9 W a 12 W). Je používán mikrovlnný pochodňový výboj. Pracovním plynem je argon a po celý experiment byl udržován konstantní průtok 5,0 Slm. Viditelný konec výboje je při experimentu v kontaktu s povrchem vzorku.

V experimentální části bylo zjištěno, že ačkoli je použitý mikrovlnný pochodňový výboj nestabilní, byl prokázán jeho sterilizační účinek na kvasinky.

KLÍČOVÁ SLOVA

Candida Glabrata, nízkoteplotní mikrovlnné plazma, inhibiční zóny

ABSTRACT

This bachelor thesis subject is the study of low temperature microwave plasma torch on yeasts. For this purpose, the yeast *Candida Glabrata* was selected. Three parameters, which have different effects on the size of the inhibition zones and their time stability, are monitored. The effect of sample concentration, exposure time, and applied power (9 W and 12 W) are investigated. A microwave torch discharge at atmospheric pressure is used. The working gas is argon and a constant flow rate of 5.0 Slm was maintained throughout the experiment. The visible end of the discharge is in direct contact with the sample surface during the experiment. In the experimental part, although the microwave torch discharge used was found to be unstable, its sterilizing effect on yeast was demonstrated.

KEY WORDS

Candida Glabrata, low temperature microwave plasma, inhibition zones

PETROVÁ, Veronika. *Studium účinků mikrovlnného nízkoteplotního plazmatu na kvasinky*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131387>.
Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce František Krčma.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem 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.

.....

Veronika Petrová

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce panu prof. RNDr. Františkovi Krčmovi, PhD. za cenné rady, ochotu a trpělivost při zpracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Petře Matouškové, PhD. za její čas při spolupráci na experimentální části a rovněž za cenné rady.

Obsah

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	KVASINKY	8
2.1.1	<i>Patogenní kvasinky</i>	8
2.1.2	<i>Candida glabrata</i>	9
2.2	PLAZMA	15
2.2.1	<i>Základní terminologie</i>	15
2.2.2	<i>Významné vlastnosti plazmatu</i>	15
2.2.3	<i>Nízkoteplotní plazma</i>	16
2.2.4	<i>Druhy plazmových výbojů</i>	17
2.2.5	<i>Sterilizace plazmatem</i>	20
2.2.6	<i>Aplikace plazmatu</i>	21
2.2.7	<i>Interakce plazmatu s kvasinkami</i>	24
3	PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	26
3.1	ÚČINEK NÍZKOTEPLTNÍHO PLAZMATU GENEROVANÝM ELEKTRICKÝM VÝBOJEM	26
3.2	INAKTIVACE KVASINEK DIELEKTRICKÝM BARIÉROVÝM VÝBOJEM PLAZMATU	27
3.3	ÚČINEK MIKROVLNNÉ PLAZMOVÉ TRYSKY NA KVASINKY <i>CANDIDA GLABRATA</i>	28
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
4.1	CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A MATERIÁLY	30
4.1.1	<i>Chemikálie a materiál</i>	30
4.1.2	<i>Přístroje</i>	30
4.2	PŘÍPRAVA VZORKŮ <i>CANDIDA GLABRATA</i>	30
4.2.1	<i>Příprava inokula</i>	30
4.2.2	<i>Příprava kultivačního média</i>	30
4.2.3	<i>Kultivace kvasinek</i>	31
4.3	OŠETŘENÍ PŘIPRAVENÝCH VZORKŮ POMOCÍ MIKROVLNNÉ PLAZMOVÉ TRYSKY	31
4.3.1	<i>Zapojení mikrovlnné plazmové trysky</i>	31
4.3.2	<i>Mikrovlnná plazmová tryska</i>	33
4.3.3	<i>Ošetření kvasinek plazmatem</i>	33

4.3.4	<i>Zpracování a vyhodnocení výsledků</i>	33
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	34
5.1	VÝSLEDKY	34
5.1.1	<i>Stanovení koncentrace</i>	34
5.1.2	<i>Vliv parametrů</i>	34
5.1.3	<i>Velikost inhibičních zón s časem</i>	38
6	ZÁVĚR	40
7	SEZNAMY	41
7.1	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	41
7.2	SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ	42
7.3	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	44

1 Úvod

Kvasinky jsou pro člověka již po řadu tisíciletí velice užitečné, využívají se zejména v potravinářském průmyslu pro výrobu vína, piva nebo pekařského droždí. Mohou však být i velmi nevíтанé v momentě, kdy se v hotovém výrobku projevují jako škodlivé kontaminanty nebo pokud se vyskytují jako nežádoucí patogeny, což může způsobovat více či méně závažná onemocnění [1].

V posledních letech rapidně vzrostl výskyt infekce způsobené kvasinkami *Candida Glabrata*. Důvodem vzrůstu této infekce je nárůst imunosupresivní terapie spolu s léčbou pomocí antimykotik. Tímto se *C. glabrata* stala druhou nejčastější příčinou kandidóz (hned po *C. albicans*). Problémem je i kontaminace potravin a vody kvasinkami [2, 3, 4].

Kandidózy tedy představují poměrně zásadní medicínský problém. Běžná léčba antibiotiky, ačkoliv je úspěšná, přináší řadu vedlejších problémů, například vysokou zátěž na organismus nebo postupnou rezistenci kvasinek na antibiotika. Proto se zkoumají možnosti využití nízkoteplotního plazmatu, které má pro tyto aplikace řadu výhod. Nejdůležitějším aspektem pro biologické aplikace je, jak už z názvu vypovídá, že nízkoteplotní plazma nezvyšuje teplotu opracovávaných materiálů. Proto je nízkoteplotní plazma vhodné využít na kůži nebo potraviny, nedochází totiž k poškození vlivem tepla, ani vlivem chemicky agresivních látek [5]. Nízkoteplotní plazma může být tedy využito v medicíně zejména pro zlepšení hojení ran nebo sterilizaci zdravotnických pomůcek. Dále se v oblasti medicíny studuje využití nízkoteplotního plazmatu v onkologii, kde by se pomocí plazmatu mohla zesílit imunogenní buněčná smrt [6, 7, 8].

Nízkoteplotní plazma by se mohlo využívat i v ekologii a potravinářském průmyslu. Tato využití se zdají být velice slibná, je však zapotřebí provést více studií, to je ale potřebné i v oblasti medicíny [3, 4].

Tato práce se bude zabírat studiem účinku mikrovlnného nízkoteplotního plazmatu na kvasinky, konkrétně tedy půjde o kvasinky *C. Glabrata*. Bude sledována účinnost nízkoteplotního mikrovlnného plazmatu na inhibici kvasinek a budou měřeny vzniklé inhibiční zóny. Tyto výsledky budou následně diskutovány a porovnávány.

2 Teoretická část

2.1 Kvasinky

Kvasinky jsou heterotrofní eukaryotní mikroorganismy, které se zařazují mezi houby. Samotné tedy netvoří taxonomickou skupinu. Dosahují velikosti 3 až 15 μm . Tvar buněk je dán především rodovou příslušností [1]

Buňky kvasinek jsou chemickým složením, funkcí i stavbou velice podobné jiným eukaryotickým buňkám. Největším rozdílem je, že kvasinky mají pevné a silné buněčné stěny, které buňku chrání před okolními vlivy [9].

Kvasinky se rozmnožují jak vegetativně, tak pohlavně. Většina kvasinek se ale rozmnožuje vegetativně, nejčastěji pučením a méně často příčným dělením [10].

Co se týče využití, tak se kvasinky využívají již řadu tisíciletí zejména v kvasném průmyslu například při výrobě piva, vína, anebo pekařského droždí. Některé kmeny kvasinek však mohou být potenciálními lidskými patogeny, anebo mohou být nežádoucími kontaminanty některých průmyslových výrob (ke kontaminaci v průmyslové výrobě dochází zejména kvasinkami, které velice dobře rostou v prostředí se zvýšeným obsahem cukrů a solí) [1, 11].

2.1.1 Patogenní kvasinky

Patogenní kvasinky zapříčiňují mnohá onemocnění. Tyto choroby jsou řazeny mezi mykózy a bližší název závisí na místě účinku a také na typu mikroorganismu, který zapříčinil dané onemocnění [12].

Kvasinky mohou způsobovat různé choroby. Jedná se například o onemocnění kůže (dermatomykózy), orgánů, uší (otomykózy) nebo nehtů (onychomykózy) [12].

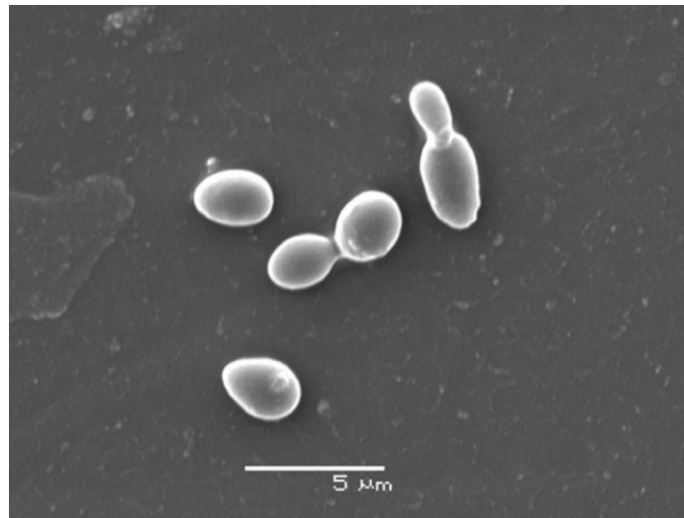
Jak už bylo zmíněno, choroby se rozdělují podle toho, jaký druh kvasinek onemocnění způsobil. Takže například choroby, které byly zapříčiněny rodem *Candida*, se nazývají kandidózy (podrobněji níže). Ty, které jsou zapříčiněny rodem *Cryptococcus* se nazývají kryptokokózy a choroby zapříčiněné rodem *Torulopsis* jsou torulopsidózy a podobně.

Důležité je zmínit, že ne všechny kvasinky jsou patogenní. Patogenními kvasinkami jsou jen určité rody kvasinek. A navíc jen některé druhy daných rodů. Nejčastěji se setkáváme například s *Candida albicans* nebo s *Cryptococcus neoformans* [12].

2.1.2 *Candida glabrata*

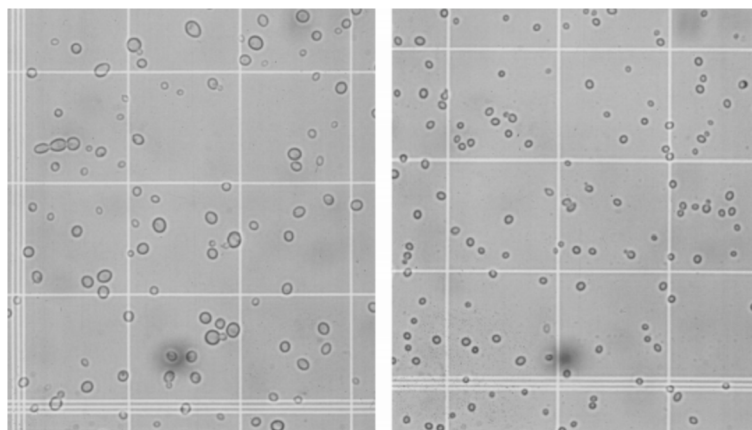
Pro účely této bakalářské práce byla vybrána jako modelový organismus kvasinka *Candida Glabrata*, proto bude v této kapitole popsána detailněji.

Candida glabrata (viz Obr. 1) se řadí spolu s dalšími druhy rodu *Candida* do třídy *Fungi Imperfecti*, řádu *Moniliales* a do čeledi *Cryptococcaeae* [2].



Obrázek 1: *C. glabrata* pod elektronovým mikroskopem [13]

C. glabrata je nedimorfní kvasinka, která se vyskytuje jako malá blastokonidie. V řadě vlastností je *C. glabrata* odlišná od ostatních druhů rodu *Candida*. Například jako jediná nevytváří pseudohyfy nad teplotou 37 °C. V porovnání s *C. albicans*, s kterou se porovnává nejčastěji, tvoří menší blastokonidie (viz Obr. 2) a kolonie jsou jiné barvy (*C. albicans* vytváří zelené nebo modro zelené kolonie, *C. glabrata* vytváří krémově zbarvené, růžové nebo fialové kolonie). Důležitým rozdílem je také to, že *C. glabrata* má haploidní genom, kdežto *C. albicans* má genom diploidní [2, 14].



Obrázek 2: Porovnání velikosti blastokonidií, zleva *C. albicans*, *C. glabrata* [2]

Dalším rozdílem *C. glabrata* a *C. albicans* jsou jejich biochemické reakce. *C. glabrata* je schopná fermentovat a asimilovat pouze glukózu a trehalózu na rozdíl od *C. albicans*, která je schopná fermentovat a asimilovat velkou škálu sacharidů včetně sacharózy [14].

Jak bylo uvedeno výše, *C. glabrata* se od *C. albicans* liší řadou vlastností. To vede k zajímavému faktu, že *C. glabrata* se více podobá *Saccharomyces cerevisiae* než *C. albicans* [14].

2.1.2.1 Patogenita

Dříve byla *C. glabrata* zařazována jako relativně nepatogenní saprofyt. Jen ojediněle u člověka způsobovala nějaké vážnější infekce. Bohužel narůstající imunosupresivní terapie spolu s antimykotiky vedla k tomu, že výskyt infekce způsobené *C. glabrata* rapidně vzrostl, a tím se *C. glabrata* stala druhou (někdy uváděno třetí) nejčastější příčinou kandidóz (hned po *C. albicans*) [2].

Mykózy, které jsou způsobeny rodem *Candida* vykazují široké spektrum klinických projevů. Nejčastěji jde o povrchní infekce kůže či sliznic, ale může dojít k hlubokým velmi rozšířeným závažným infekcím, jako je tomu u invazivní kandidózy [6].

Invazivní kandidóza je velice vážnou komplikací zejména u onkologických pacientů či pacientů, kteří trpí poruchou imunity z různých důvodů. Nejčastěji je za příčinou invazivní kandidózy *C. albicans*, která dobře reaguje na flukonazol (antimykotikum). Problém ale nastává, pokud je příčinou *C. glabrata* nebo jiné kvasinky rodu *Candida*, které jsou na flukonazol rezistentní [15].

Běžně se ale druhy *Candida* vyskytují v mikrobiotě sliznice ústní dutiny, v trávicím traktu či v pochvě jedinců. U zdravých lidí jsou komenzální (vztah mezi dvěma jedinci, kdy jeden není ovlivněn a druhý má ze vztahu prospěch), ale mohou způsobit systémové infekce, pokud u jedince dojde ke snížení či poruše imunity. Kandidové infekce představují nejčastější plísňové infekce u pacientů s AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrom, tj. syndrom získaného imunodeficitu), což může mít za následek špatnou absorpci medikace [6].

Kandidová infekce se buďto může vyvinout endogenně, anebo se na pacienta může přenést z vnějšího prostředí (exogenní cestou). Pokud dojde k oslabení jedince, tak druhy *Candida*, které se normálně vyskytují v mikrobiotě hostitele, se začnou chovat jako oportunní patogeny (jsou podmíněně patogenní). Z vnějšího prostředí dochází k přenosu prostřednictvím rukou anebo kontaminovaného zdravotnického materiálu, jako jsou například katétrů [6].

2.1.2.2 Virulence [2]

Relativně nepatogenní povaha *C. glabrata* u zvířecích modelů vede k tomu, že by *C. glabrata* měla mít málo virulentních atributů. Nicméně proti tomuto tvrzení stojí již zmiňovaný fakt, že výskyt infekce způsobené *C. glabrata* v posledních letech rapidně vzrostl.

U mnohem podrobněji prostudované kvasinky *C. albicans* je známo několik virulentních faktorů, které přispívají k patogenitě. Tyto virulentní faktory zahrnují adhezi na epiteliální i endoteliální buňky, produkci proteinázy, produkci pseudohyf a hyf, fenotypovou změnu, produkci fosfolipázy a další. Pokud je tedy *C. glabrata* málo virulentní, tak by k tomu mohlo přispívat to, že nevytváří nad 37 °C pseudohyfy. Tvorba hyf vede u *C. albicans* například k vyšší přilnavosti.

Bylo dokázáno, že i izolovaná *C. glabrata* je schopná produkce proteinázy, která však nebyla blíže specifikována (na rozdíl od *C. albicans*). Adherence (která je velice důležitým faktorem virulence) je ovlivňována tvorbou hyf, ale i například hydrofobicitou buněčného povrchu. Hydrofobicita buněčného povrchu je totiž ovlivňována prostředím a může ovlivnit přilnavost kvasinky. Hydrofobicita buněčného povrchu je téměř shodná jak u *C. albicans*, tak u *C. glabrata*. Zajímavé je, že *C. glabrata* je méně ovlivnitelná a méně citlivá na environmentální faktory.

Co se týče testů adheze na vaskulární endotel *in vitro*, tak *C. albicans* prokazuje nejvyšší adhezi a *C. glabrata* nejnižší spolu s *C. parapsilosis* a *C. kefyr*.

Dalším zmiňovaným atributem virulence byla tvorba fosfolipáz, která vede ke zvýšení patogenity u *C. albicans*. U *C. glabrata* však nebyla aktivita fosfolipáz studována.

Také je faktorem virulence u *C. albicans* tzv. fenotypové přepínání. To je fenotypová nestabilita, která kmenům umožňuje měnit fenotyp, aniž by došlo k ovlivnění genotypu. Ke změně fenotypu může dojít i u *C. glabrata*. Je zajímavé, že tento jev se tedy projevuje, jak u nedimorfních organismů, tak i u haploidních organismů. Nicméně u *C. glabrata* není známý vztah virulence se změnou fenotypu. Pokud by ale vztah mezi fenotypovým přepínáním a virulencí byl prokázán, mohlo by to hrát roli v příčině symptomatických infekcí.

2.1.2.3 Biofilmy

Tvorba biofilmu u několika druhů rodu *Candida* přispívá k patogenitě. Několik studií prokázalo, že mikroorganismy se na tkáních hostitele (ale i na protézách, katétrech, či jiných površích) téměř nevyskytují samostatně, ale nejčastěji se nachází ve skupinách, které vytváří multiceulární společenství [6].

Prvním krokem při tvorbě biofilmu je to, že dochází k adhezi mezi buňkami kvasinky a povrchem. Povrchem mohou být hostitelské buňky nebo se může jednat o povrch z jiného materiálu. K adhezi tedy dochází jak na povrch biotický, tak i na povrch abiotický. Vazba mezi buňkami a materiálem je zprostředkována například hydrofobními nebo elektrostatickými interakcemi, ale i specifickými interakcemi, konkrétně vazbou mezi adhesinem a ligandem [6].

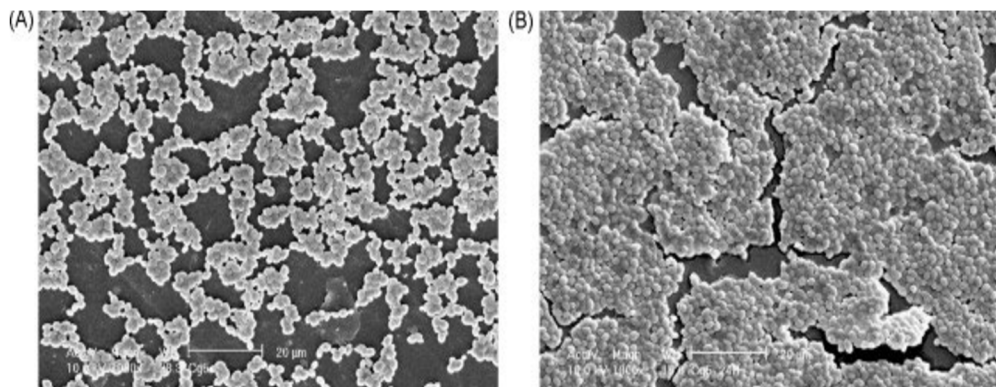
Biofilmy jsou specifické a uspořádané společenství buněk, nejedná se o náhodné uspořádání. Typickým druhem, který tvoří biofilmy je *C. albicans*. Dále však dokáže tvořit biofilmy například i *C. glabrata* nebo *C. tropicalis*. Biofilmy různých druhů se však liší podle vnějších podmínek. Obecně matrice biofilmu obsahuje sacharidy, proteiny, fosfor a také hexosaminy [6].

Jak bylo zmíněno, tvorba biofilmu přispívá k patogenitě. Důvodem je to, že biofilmy jsou odolné vůči antifungální léčbě a odolávají i imunitní reakci hostitele. To vede k tomu, že infekce, které jsou spojené s tvorbou biofilmu, jsou bohužel velmi obtížně léčitelné [6].

U *C. glabrata* je tvorba biofilmu nejzávažnějším faktorem virulence. Klinicky izolovaná *C. glabrata* vytváří kompaktní strukturu biofilmu ve více vrstvách. Matrice biofilmu obsahuje proteiny, sacharidy a ergosterol. Adheze je zde zprostředkována epiteliálními adheziny [14].

Problémem je, že se biofilmy mohou tvořit i na abiotických površích, tedy i na zdravotnických zařízeních či pomůckách, což vede k přenosu onemocnění na člověka (jak již bylo zmíněno výše). Konkrétně infekce, které jsou způsobeny infikovaným katétrem, vedou k infekcím krevního řečiště. Biofilmy se ale mohou vyskytovat i na kontaktních čočkách nebo na protézách [6, 14].

Na obrázku číslo 3 je snímek biofilmu *C. glabrata* pomocí elektronového rastrovacího mikroskopu [16].



Obrázek 3: Biofilm *C. Glabrata*, (A) fáze adheze, (B) po 24 hodinách [16]

2.1.2.4 Rezistence

Antifungální rezistence jde rozdělit na dvě kategorie – klinická rezistence a *in vitro* rezistence. Klinická rezistence značí nedostatečnou klinickou odpověď na použitou antifungální látku. Příčin je několik. Velice často ale dochází ke klinické rezistenci u pacientů trpící AIDS, kdy ani vysoké dávky antifungálních léčiv nejsou schopny pacienta vyléčit. *In vitro* rezistence se poté rozděluje na primární a sekundární. Pokud je organismus přirozeně rezistentní k antifungální látce, jde o primární rezistenci (např. rezistence na flukonazol u *C. krusei*). Sekundární rezistence, neboli získaná rezistence, nastává, pokud se infekce stane rezistentní na dané léčivo [2].

K rezistenci přispívají i již zmíněné biofilmy, které brání proniknutí antifungálních léčiv, protože dokáží vytvořením difúzní bariéry vázat nabitě molekuly antibiotik [6].

C. glabrata je rezistentní vůči řadě antifungálních léčiv, jako jsou Echinokandiny, Amfotericin B nebo azolová antimykotika aj. Nicméně antifungální rezistence je závažnější, pokud se nevyvíjí jen rezistence vůči podanému léčivu, ale i vůči jiným chemickým

sloučeninám. *C. glabrata* je proto velkou hrozbou, je totiž schopná rychle získávat rezistenci vůči různým třídám léčiv a dochází ke zkřížené rezistenci [6].

2.2 Plazma

Plazma je označováno jako čtvrté skupenství hmoty. Naprosto se liší jak od plynu, tak od kapalin – má zcela rozdílné vlastnosti. Pokud je plynu dodávána energie, dojde k jeho ionizaci a látka se stane plazmatem. V plazmatu se nachází volné nosiče náboje, a proto reaguje s magnetickým i elektrickým polem. Ačkoliv se na Zemi setkáváme s plazmatem minimálně, ve vesmíru je zastoupeno ve velké míře. V běžném životě se setkáváme s plazmatem nejčastěji u žárovek a výbojek. Plazma je často využíváno v mikroelektronickém, papírenském i v textilním průmyslu [17, 18].

2.2.1 Základní terminologie

Plazma rozdělujeme na slabě a silně ionizované. Rozdělení na základě ionizace vypovídá o fyzikálních vlastnostech plazmatu. Dále můžeme plazma rozdělit na vysokoteplotní a nízkoteplotní [17].

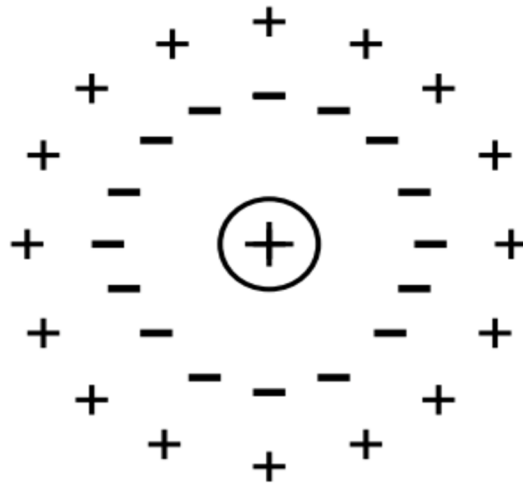
Slabě ionizované plazma je takové, kde je koncentrace nabitých částic oproti koncentraci neutrálních molekul zanedbatelná. Naopak u silně ionizovaného plazmatu je zanedbatelná koncentrace neutrálních molekul oproti koncentraci nabitých částic, která převládá [17].

Rozdělení plazmatu na vysokoteplotní a nízkoteplotní je pouze konvenční. Mezi tímto rozdělením neexistuje ostrá hranice, jako tomu bylo u silně a slabě ionizovaného plazmatu. Z praktického hlediska ale určujeme, že pokud je střední energie nabitých částic větší jak 100 eV, tedy teplota je vyšší jak 1 MK, tak se jedná o vysokoteplotní plazma [17].

2.2.2 Významné vlastnosti plazmatu

Nejvýznamnější vlastností plazmatu je, že je elektricky vodivé. Vodivost je způsobena tím, že plazma obsahuje volné elektrické náboje (viz Obr. 4). Jak dobře dokáže plazma vést elektrický proud, závisí na stupni ionizace plazmatu. Vodivost narůstá se zvyšující se koncentrací nabitých částic. Avšak u silně ionizovaného plazmatu nezávisí pouze na tomto kritériu, ale závisí i na teplotě. Přesněji, elektrická vodivost závisí i na teplotě elektronů, tedy na jejich střední kinetické energii, a to s exponentem $3/2$. Z toho vyplývá, že plazma může být při vysokých teplotách velice dobře vodivé. Dokonce může být vodivost plazmatu lepší než vodivost některých kovových vodičů. Elektrická vodivost plazmatu je významná pro využití v řadě různých aplikací [17].

Díky vodivosti na plazma působí i magnetické pole. Lorentzova síla působí na volné elektrické náboje v plazmatu a brání v kolmém pohybu na magnetické siločáry. Tohoto jevu se dá využít pro uchování vysokoteplotního plazmatu [17].



Obrázek 4: Polarizace plazmatu v okolí kladného náboje [17]

2.2.3 Nízkoteplotní plazma

V nízkoteplotním plazmatu jsou na vysokou energii excitované pouze elektrony, ale ionty zůstávají teplotně blízké svému okolí. Tento fakt umožňuje využití nízkoteplotního plazmatu např. v biomedicinských aplikacích. Váže se s tím totiž řada výhod. První výhodou je to, že plazma nezvyšuje teplotu opracovávaných materiálů a ani neznečišťuje povrch chemicky agresivními látkami. Další výhodami jsou, že nízkoteplotní plazma nám umožňuje opracovat lokálně velké plochy, které není možné umístit do uzavřeného prostoru a také to, že při aplikaci nevznikají žádné vedlejší produkty. Nezanedbatelnou výhodou je i to, že investice a provozní náklady nejsou vysoké [5].

Výhodou léčby nízkoteplotním plazmatem je fakt, že dochází k velice malému poškození lidských buněk a těla. Další výhodou je, že na rozdíl od jiných čistě chemických postupů nedochází k rezistenci [19].

Velice dobře prozkoumaným a slibným zdrojem nízkoteplotního plazmatu je kINPen (viz Obr. 5). Jedná se o radiofrekvenčně buzený argonový plazmový paprsek, který funguje za atmosférického tlaku. Je velice vhodný pro biomedicínské aplikace skrze jeho tvar a snadnou manipulaci s ním [20].



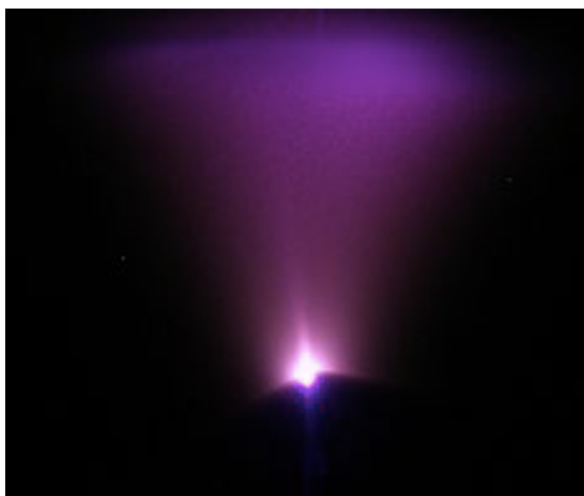
Obrázek 5: kINPen [20]

2.2.4 Druhy plazmových výbojů

Plazmových výbojů existuje celá řada. Liší se tím, jak byly vytvořeny, a také svými vlastnostmi. Každé mají určitou aplikaci a pro každou aplikaci by měl být vhodně přizpůsobený plazmový výboj. V této kapitole je uvedeno několik základních druhů plazmových výbojů, které se často využívají v biomedicínských aplikacích.

2.2.4.1 Korónový výboj

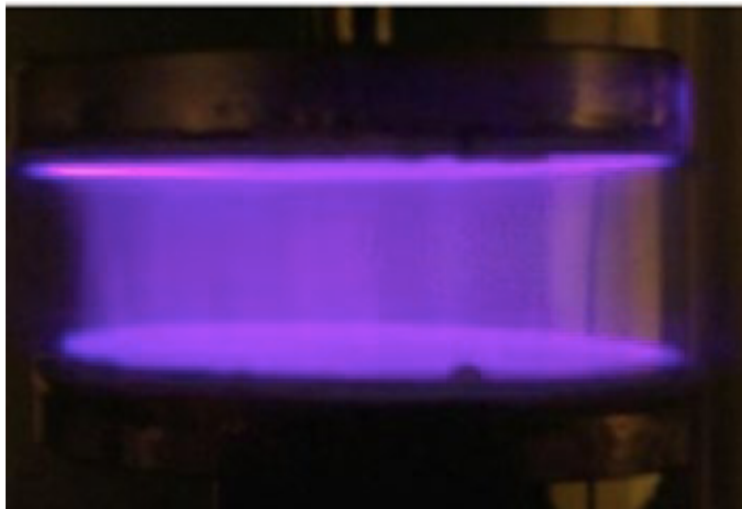
Korónový výboj vzniká v nehomogenním elektrickém poli, které vzniká mezi dvěma elektrodami. Alespoň jedna z elektrod musí mít malý poloměr křivosti, tedy musí být špičatá. Díky tomu vzniká v okolí elektrody s malým poloměrem křivosti elektrické pole s vysokou intenzitou. Při dostatečné intenzitě pak dochází na elektrodě k lokálním elektronovým lavinám a k lokálnímu průrazu. Vizualně pak můžeme pozorovat slabě svítící prostor okolo elektrody obklopený tmavou vnější oblastí (viz Obr. 6) [5].



Obrázek 6: Korónový výboj [5]

2.2.4.2 Plošný dielektrický bariérový výboj

Plošný dielektrický bariérový výboj (DBD, tj. dielectric barrier discharge) vzniká mezi dvěma elektrodami mezi kterými se nachází kromě plynu i vhodná dielektrická vrstva, která zabraňuje přechodu nabitých částic. Dielektrická bariéra může být například ze skla, křemene nebo z keramiky. Podobá se korónovému výboji, ale rozměry elektrod mohou být větší a vzdálenost mezi nimi je malá (viz Obr.7). Plošný dielektrický bariérový výboj je vhodný pro úpravu větších ploch [5].

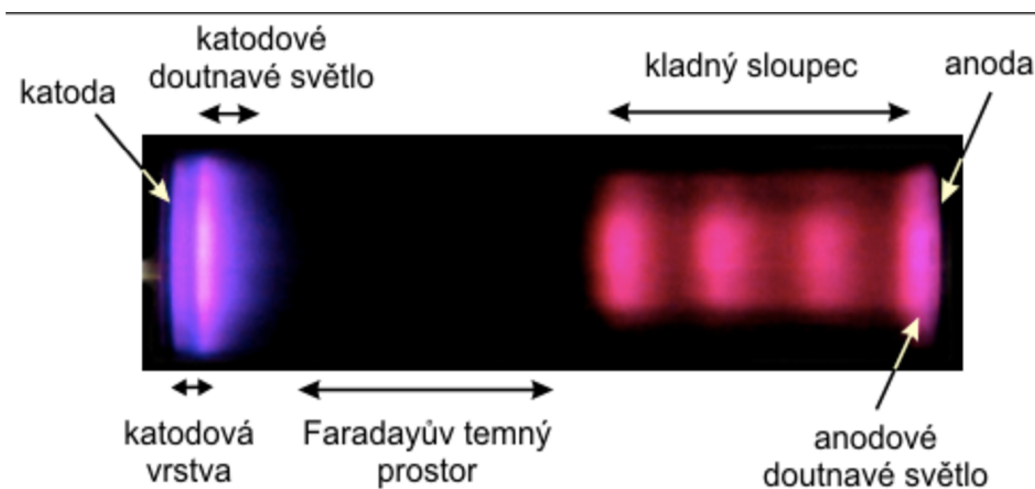


Obrázek 7: Plošný dielektrický bariérový výboj [5]

2.2.4.3 Doutnavý výboj

U doutnavého výboje je nutné, aby došlo k vytvoření lavinové ionizace. Elektron, který je urychlen v elektrickém poli, je ionizován. Ionty, které dopadají na katodu, musí mít dostatečnou energii, aby došlo k sekundární emisi elektronů z katody. Doutnavý výboj je využíván například v osvětlovací technice nebo pro úpravu znečištěných plynů [21].

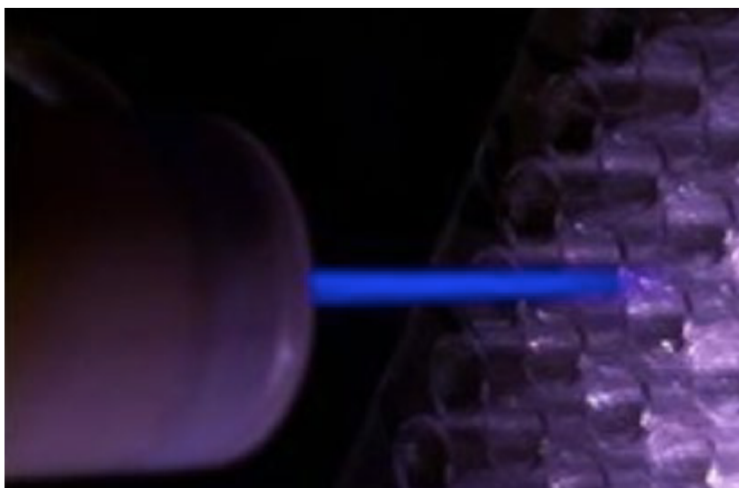
Doutnavý výboj je složen ze tří základních vrstev – katodové vrstvy, kladného sloupce a anodové vrstvy (viz Obr. 8). Kde elektrony mají u anody největší kinetickou energii, a proto dochází k ionizaci a excitaci právě v této oblasti [21].



Obrázek 8: Doutnavý výboj s viditelnými typickými vrstvami [21]

2.2.4.3 Plazmová tryska

Velice často využívaným zdrojem nízkoteplotního plazmatu je plazmová tryska. Jde o dvě elektrody, které jsou postavené naproti sobě a vzniká mezi nimi podobný elektrický výboj jako u DBD. Rozdílem je ale to, že proudící plyn strhává částice plazmatu do prostoru, čímž se vytváří dojem trysky, jak je vidět na obrázku 9 [5].



Obrázek 9: Plazmová tryska [5]

2.2.4.4 Mikrovlnná plazmová tryska

Mikrovlny jsou elektromagnetické vlny, které mají frekvenci mnohem vyšší, než je frekvence u radiofrekvenčních výbojů. V mikrovlnném výboji má plazma vyšší elektronovou hustotu než plazma získané stejnosměrným a vysokofrekvenčním výbojem [22].

Mikrovlnná plazmová tryska bude použita v experimentu, a proto bude detailněji uvedena v kapitole 4.

2.2.5 Sterilizace plazmatem

Sterilizace je proces, při kterém dochází k odstranění veškerých mikroorganismů. Sterilizační postupy bývají nejčastěji fyzikální povahy. Sterilizace lze provádět mnohými způsoby, a to i plazmatem. Výhodou sterilizace pomocí plazmatu je netoxická povaha plazmatu, poměrně nízká teplota (nepřevyší 50 °C) a nepoškození sterilizovaného materiálu [23, 24].

Za sterilizací pomocí plazmatu stojí několik faktorů, které spolupůsobí. Nicméně nejdůležitější roli při destrukci mikroorganismů hraje vliv volných radikálů [24].

Během sterilizace pomocí plazmatu dochází ke vzniku radikálů díky excitaci a disociaci. Přesněji jde o reaktivní částice kyslíku a dusíku (RONS, tj. Reactive oxygen nitrogen species), nejčastěji radikály NO a OH. Nejsilnější je radikál OH, který je však extrémně reaktivní a jeho životnost je tedy velice krátká (10^{-9} s). Nicméně je schopný neselektivně interagovat skoro se všemi biomolekulami, což vyvolává řadu biologických účinků jako např. indukování oxidačního stresu v mikrobech. Dalším prvkem, který je generovaný plazmatem je H_2O_2 , který

je považován za dlouhodobě působící antimikrobiální činidlo. Některé studie ještě uvádějí, že dochází k inaktivaci mikroorganismů pomocí peroxynitridu, který je generovaný kontinuálně z peroxidu vodíku a dusitanu. Zvýšené hladiny peroxynitridu vedou k buněčné smrti prostřednictvím apoptózy nebo nekrózy [24, 25, 26].

2.2.6 Aplikace plazmatu

2.2.6.1 Aplikace plazmatu v medicíně

V posledních letech se nízkoteplotní plazma využívá i v medicíně. Plazma se může využít pro ošetření lékařských materiálů či zařízení, ale může se využít i při léčbě živých buněk např. při ošetření kůže. Během posledních let je zkoumána zejména interakce plazmatu právě s živými buňkami, kde díky tomu může docházet k inhibici nebo stimulaci buněčných funkcí, a tím pádem je plazma možné využít i pro terapeutické účely. Jednou z důležitých výhod využití plazmatu je fakt, že se jedná pouze o povrchové ošetření a neporušují se vlastnosti materiálu [27].

Co se týče terapeutických aplikací, tak se plazma dá využít pro ošetřování např. atopického ekzému, ran a jizev [28].

Při ošetření atopického ekzému nízkoteplotním plazmatem za atmosférického tlaku, bylo zjištěno, že se zmírnil pocit svědění, celkově se ekzém zlepšil a nebyly pozorované žádné vedlejší účinky. Nicméně bylo prokázáno, že ke zmírnění pocitu svědění dochází i při použití placebo. Zdá se tedy, že by ošetření plazmatem mohlo mít dobré účinky, ale je ještě zapotřebí více studií [28].

U hojení ran bylo také prokázáno zlepšení po ošetření plazmatem. Příkladem je studie [28], která se zabývá právě ošetřením ran pomocí plazmatu. V této studii bylo vybráno 14 pacientů, kde 7 z nich bylo ošetřováno standardní péčí a dalších 7 bylo ošetřováno jak standardní péčí, tak plazmatem. U obou případů došlo ke zmenšení velikosti vředu o 50 %, nicméně v případě ošetření plazmatem se rána zmenšila rychleji, a dokonce byla i menší (5,30 cm² při standardním ošetření, 3,40 cm² při ošetření s plazmatem). Dokonce byl ve skupině, kde byla rána ošetřována plazmatem pacient, u kterého došlo k úplnému uzdravení vředu. Příklad úspěšného hojení rány je uveden na obrázku číslo 10. Studie ukázala, že když se rána ošetří plazmatem, dochází k významnému snížení bakteriální zátěže v ráně [28].



Obrázek 10: Ošetření rány nízkoteplotním plazmatem za atmosférického tlaku, (a) rána před ošetřením, (b) rána po ošetření [28]

V posledních letech se kromě využití plazmatu při hojení ran nebo v dermatologii zkoumá i využití plazmatu v onkologii. V současné době se výzkum soustředí na specifické využití plazmatu pro eradikaci rakoviny nebo alespoň pro selektivní redukci rakoviny, a to pomocí zesílení imunogenní buněčné smrti (tj. buněčná smrt, která vede ke stimulaci imunitního systému) [7, 8].

Bylo dokázáno, že při lokálním ošetření pomocí plazmatu dochází k inaktivaci jednotlivých vrstev rakovinných buněk. Reálně se zdá využití plazmatu jako podpůrné léčby spolu s chirurgickými resekcemi nádorů, kde by mohlo dojít k ošetření místa plazmatem tam, odkud byl nádor odstraněn. Došlo by totiž k inaktivaci případných zbylých rakovinných buněk. Dalším slibným využitím je aplikace plazmatu při léčbě melanomu. Melanomy se obvykle vyskytují na kůži a jsou velice náchylné k imunogenním terapiím. Navíc je kůže velmi dobře přístupná pro aplikaci plazmatu. Proto může dojít díky aplikaci plazmatu spolu s imunoterapií ke zvýšení účinnosti léčby. Kromě toho je to na rozdíl od chemoterapie, která se běžně používá, pouze lokální léčba. Je to tedy mnohem méně zatěžující pro již tak zesláblý organismus [7].

Jak už bylo ale nastíněno výše, předpokládá se, že léčba pomocí plazmatu nebude jedinou terapeutickou možností v léčbě rakoviny, ale bude součástí kombinovaných terapeutických strategií, jako je například uvedená chirurgická resekce nádoru nebo imunoterapie [7].

Důležité je zmínit, že než dojde k aplikaci plazmatu v medicíně, tak je nutné zodpovědět otázky ohledně bezpečnosti použití. Musí být totiž prokázáno, zda je ošetření skutečně selektivní vůči rakovinným buňkám a jestli nedochází k poškození zdravé tkáně v důsledku inaktivace rakovinných buněk. Dalším zásadním problémem je, že v okrajové zóně dopadu plazmatu může

dojít ke zrychlení růstu a proliferaci rakovinných buněk, což by v konečném důsledku vedlo k tvorbě metastáz. Ačkoli tento problém první *in vitro* studie vyvrátila [29], je zapotřebí tuto otázku ještě více prověřit. Dále některé *in vivo* studie prokázaly [30, 31], že léčba pomocí nízkoteplotního plazmatu může vést ke zvýšení okysličení tkání a může dojít k modulaci průtoku krve. Tento fakt by na jednu stranu mohl vést k podpoře růstu metastáz, na druhou stranu by ale mohl zvýšit účinky radioterapie a chemoterapie při kombinované léčbě. Je tedy důležité, aby se touto problematikou zabývalo více studií a zjistily se veškeré výhody a nevýhody využití nízkoteplotního plazmatu pro léčbu rakoviny [7].

Další cestou je nepřímé využití plazmatu pomocí takzvané plazmatem aktivované vody. Nepřímé využití je to proto, že nedochází k přímé interakci mikroorganismů s plazmatem. Nejdříve je totiž plazmatem ošetřena voda a mikroorganismy jsou této plazmatem aktivované vodě následně vystaveny. Účinky takto ošetřené vody jsou založené zejména na přítomnosti RONS, které působí antimikrobiálně. Rozdílem oproti přímému ošetření plazmatem je, že nedochází k účinku UV záření a elektrických polí. Plazmatem aktivovaná voda dokáže velice dobře zabít mikroorganismy i rakovinné buňky. Jednou z možností je ji využít jako dezinfekční prostředek (musí však dojít ke srovnání s běžnými prostředky i z hlediska ekonomiky). Další slibnou aplikací je využít takto ošetřenou vodu pro výplach břicha v případě peritoneálních nádorů, kdy je znemožněna chirurgická a radiační léčba a výplach pomocí chemoterapeutických léků má řadu vedlejších účinků. U tohoto využití je však opět zapotřebí dalšího výzkumu a vyřešit otázky ohledně ekonomického a efektivního zacházení. I přes několik nezodpovězených otázek se zdá, že by nepřímé využití plazmatu mohlo mít velice slibnou budoucnost [7].

2.2.6.2 Aplikace plazmatu v ekologii

V posledních letech se pozornost upíná i na využití plazmatu v ekologii. Jedná se zejména o dekontaminaci vody, kde dochází k degradaci různých látek. Z vodných roztoků mohou být odstraněny například pesticidy nebo mohou být odstraněna textilní barviva, která vodu znečistila. V těchto případech je nejvíce využíváno plazma s dielektrickým bariérovým výbojem [3, 32].

Výhodou dekontaminace vody plazmovými technikami je fakt, že nedochází ke zvýšení teploty, nemění se pH a nezahrnuje to žádné externí oxidanty. To umožňuje opětované ošetření odpadních vod. Je ale nutné, aby u této techniky byla více prozkoumaná kinetika, toxicita

vzniklých látek a energetická účinnost. Současně je ale největším problémem spotřeba plynu, na čemž se pracuje a zkoumá se vhodná alternativa směsi plynů, v ideálním případě vzduchu. V laboratorním měřítku ale vypadá degradace nežádoucích látek pomocí plazmatu velice slibně [3].

2.2.6.3 Aplikace plazmatu v potravinářském průmyslu

Kvasinky jsou poměrně častým kontaminantem různých potravin, proto je důležité zmínit i aplikaci plazmatu v potravinářském průmyslu.

Kvalita a bezpečnost potravin je v této době velmi důležitá. Na oba aspekty jsou kladeny vysoké nároky a jsou přísně hlídány. Organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture Organization of the United Nation, FAO) odhaduje, že asi 25 % potravin je kontaminováno nežádoucími chemikáliemi, jako jsou pesticidy, mykotoxiny a nežádoucí mikroorganismy. Ke kontaminaci jídla živočišného původu (mléko, vejce, ...) dochází zejména kvůli kontaminované potravě živočichů. U jídla rostlinného původu dochází ke kontaminaci před nebo po sklizni různými způsoby [4].

Kontaminaci se dá předcházet různými postupy, anebo dochází k detoxikaci chemickými postupy, možná je ale i detoxikace plazmovými technologiemi. Úprava potravin pomocí nízkoteplotního plazmatického výboje vede ke snížení počtu nežádoucích mikroorganismů na jejich povrchu. Díky plazmatu může dojít i k rozkladu nežádoucích chemických sloučenin, jako jsou již zmiňované pesticidy nebo mykotoxiny [4].

Ošetření potravin pomocí plazmatu je velice slibné v laboratorním měřítku. Nicméně expanze do potravinářského průmyslu není tak velká, jak by se očekávalo, protože je zde několik nezodpovězených otázek. Otázkou je, jaké produkty vznikají při rozkladu mykotoxinů či jiných chemických sloučenin. Rozložené látky by totiž mohly být škodlivější než původní mykotoxiny. Další otázkou je, zda se při léčbě plísní nebudou vylučovat mykotoxiny. Nicméně výzkum je nadějný a bude dále pokračovat [4].

2.2.7 Interakce plazmatu s kvasinkami

Jak již bylo zmíněno výše, plazma ovlivňuje vlastnosti živých buněk. Záleží však na době expozice plazmatu a na typu buňky. Několik studií se věnuje interakci plazmatu s prokaryotickými bakteriálními buňkami, bohužel interakce plazmatu s kvasinkami dosud není

tolik prozkoumána. Bylo však dokázáno, že baktericidní účinek je větší než analogický fungicidní účinek [33, 34].

Podrobně studovanou kvasinkou pro pochopení všech dějů při interakci plazmatu s kvasinkami je *Sachcaromyces cerevisiae*. *S. cerevisiae* byla zvolena proto, že je to vhodný eukaryotický model, ve kterém lze řešit veškeré aspekty účinku plazmatu na eukaryotickou buňku, a to by tedy mohlo umožnit pochopit i účinky plazmatu na složitější buňky savců [33].

Ošetření nízkoteplotním plazmatem vyvolává několik typů buněčných stresů v kvasince. Zdá se, že je to vyvolané přítomností reaktivních částic, např. reaktivních forem kyslíku nebo dusíku. Tyto reaktivní částice reagují s buněčnými složkami, což vede k jejich poškození, a to nejspíše přispívá k usmrcení buňky. Pomocí elektronového rastrovacího mikroskopu byly pozorovány buňky kvasinky *S. cerevisiae*, kde bylo zjištěno, že po ošetření plazmatem dochází ke změně v morfologii buněk a ke změně buněčné stěny. Při ošetření plazmovým paprskem He/O₂ byly pozorovány nejzávažnější změny, pokud byly kvasinky ošetřeny ve vodě. Méně závažné změny byly pozorovány ve fyziologickém roztoku a nejmírnější změny byly pozorovány v YPD (tj. živná půda z kvasničného extraktu, peptonů a dextrózy). Tyto pozorované změny odpovídají míře přežití kvasinek. Bylo totiž zjištěno, že nejnižší míra přežití je u buněk, které byly ošetřené ve vodě. Menší účinek byl pozorován u buněk, které byly ošetřené ve fyziologickém roztoku a nejmírnější efekt byl u buněk, které byly ošetřené v YPD [33].

3 Přehled současného stavu řešené problematiky

V této kapitole bude uvedeno několik experimentů, které se týkají podobné problematiky. Bude zde uvedený i experiment, který byl součástí bakalářské práce [36], na kterou nepřímo navazují. Právě tyto výsledky budou diskutovány a porovnávány s výsledky mé práce.

3.1 Účinek nízkoteplotního plazmatu generovaným elektrickým výbojem [34]

Experiment se věnuje studii fungicidního účinku a změnám dynamiky růstu kvasinek a plísní pomocí stabilizovaného koronového výboje plazmatu. Napětí bylo nastaveno na 9,7 kV a vzdálenost mezi špičkou jehly a vzorkem byla 3 mm tak, aby se dosáhlo výbojového proudu 400 μ A. Veškerá měření byla provedena pod laminárním prouděním filtrovaného vzduchu. Tento experiment byl analogicky porovnáván s baktericidním účinkem nízkoteplotního plazmatu generovaného elektrickým výbojem.

Byly studovány kvasinky druhu *Candida Albicans*, které byly kultivované v médiu YGC (yeast extract glucose chloramphenicol) po dobu 5 dnů při teplotě 20 °C. Bylo připraveno 0,5 ml suspenze, která byla pipetována na kultivační destičku do sterilních jamek. Tyto vzorky byly ošetřeny plazmatem po různou dobu. Po ošetření plazmatem byl každý vzorek odpipetován na povrch YGC agaru. Takto připravený vzorek byl kultivován při 20 °C a následně byl určen počet živých kolonií.

Bylo zjištěno, že počet živých buněk *C. Albicans* se snížil z $5 \cdot 10^4$ CFU/ml na nulu po šesti minutovém ošetření plazmatem. Pro srovnání, u bakterií došlo k úplné inaktivaci v kratším časovém intervalu. Konkrétně u *Escherichia coli* došlo k úplné inaktivaci za 2 minuty a k úplné inaktivaci *Staphylococcus aureus* došlo za 4 minuty. Z čehož vyplývá, že bakterie jsou více náchylné na působení nízkoteplotního plazmatu. Co se týče srovnání s plísněmi, tak ty byly vůči nízkoteplotnímu plazmatu více odolné než kvasinky. K úplné inaktivaci spor plísní *Cladosporium sphaerospermum* a *Penicilium crustosum* došlo až za 20-25 minut a u *Aspergillus oryzae* nedošlo k úplné inaktivaci ani po 30 minutách expozice. Vyšší odolnost plísní je pravděpodobně způsobena zapouzdřenými spórami hub.

3.2 Inaktivace kvasinek dielektrickým bariérovým výbojem plazmatu [35]

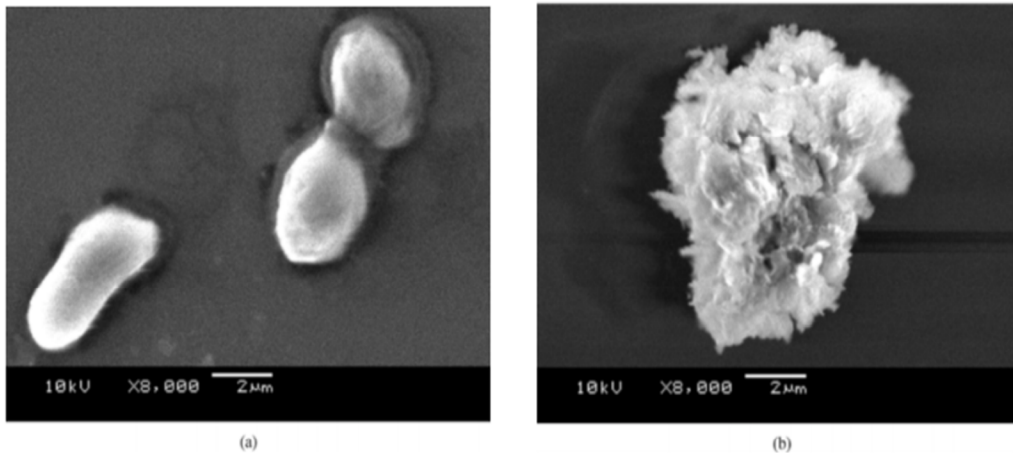
V tomto experimentu byl zkoumán účinek plazmatu generovaného dielektrickým bariérovým výbojem v heliu za atmosférického tlaku. Zkoumaným organismem byla kvasinka druhu *Saccharomyces cerevisiae*.

S. cerevisiae byla naočkována na kultivační médium (glukóza 30 g/l, kvasničný extrakt 3,85 g/l a trypton 3 g/l). Takto připravený vzorek byl inkubován po dobu 24 hodin při 37 °C. Pro ošetření plazmatem byl připraven vzorek z 1 ml inokula zředěného na 150 ml média. Tento vzorek byl kultivován při 140 otáčkách za minutu po dobu 48 hodin při teplotě 37 °C.

Podle nastavení výšky spodní elektrody byla při měření vzdálenost mezi horní elektrodou a povrchem suspenze kvasinek 3 mm. Ošetřována byla suspenze kvasinek o objemu 2 ml. Napájecí zdroj se skládal z výkonového zesilovače, který pracuje v rozsahu 0-20 kHz a pulzního transformátoru, který poskytuje špičkové napětí 40 kV. Provozní podmínky pro tento experiment byly 5 kHz a 8 kV. Pracovním plynem bylo helium.

Při těchto podmínkách byla ošetřena suspenze kvasinek a následně byla zkoumána mitochondriální aktivita, koncentrace proteinů v roztoku supernatantu, morfologie a hodnota pH.

Bylo zjištěno, že mitochondriální aktivita slabě klesala při expozici 1 minuty a následně prudce klesala v intervalu 1-2,5 minuty a poté zůstala téměř nezměněna. To ukazuje, že ke ztrátě mitochondriální aktivity došlo během expozice kratší než 2,5 minuty. Co se týče koncentrace proteinů v roztoku supernatantu, tam došlo k poměrně velké fluktuaci při expozici do 1 min. Při expozici mezi 1-2,5 min byl zaznamenán prudký nárůst koncentrace proteinů v roztoku supernatantu, což značí, že došlo k prasknutí buněk (viz Obr. 11).



Obrázek 11: (a) kvasinka neošetřená plazmatem, (b) kvasinka ošetřená DBD plazmatem pod elektronickým rastrovacím mikroskopem [35]

Na rozdíl od mitochondriální aktivity, koncentrace proteinů v roztoku supernatantu dále rostla po expozici delší jak 3,5 min. Tedy některé inaktivované buňky začaly znovu praskat s prodloužením doby expozice. Hodnota pH téměř lineárně klesala s dobou expozice, což dokazuje, že při chemickém procesu interakce mezi plazmatem a vzorkem došlo ke zvýšení kyselosti.

Bylo prokázáno, že pomocí dielektrického bariérového výboje dochází k inaktivaci buněk *S. cerevisiae*, při čemž dochází k ruptuře buněk, snižuje se mitochondriální aktivita a pH a zvyšuje se koncentrace proteinů v supernatantu.

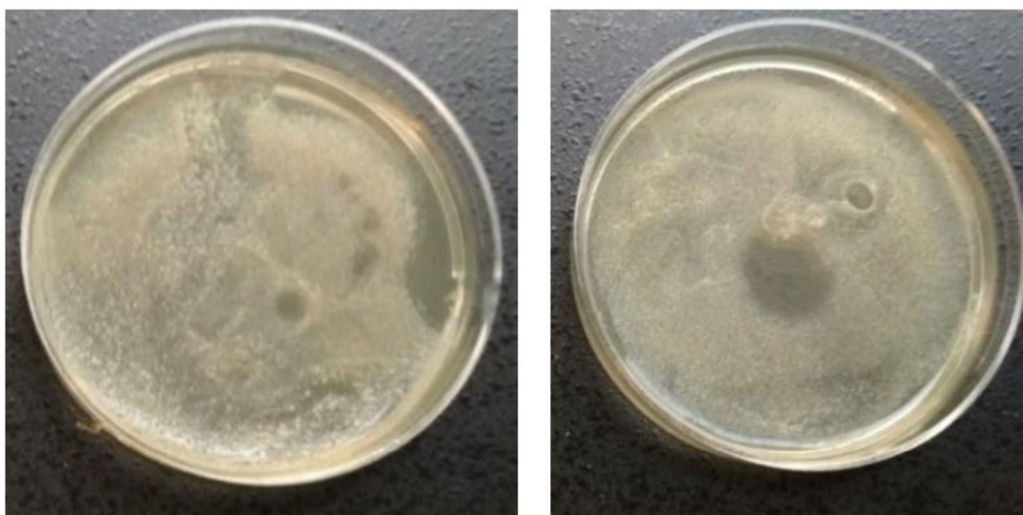
3.3 Účinek mikrovlnné plazmové trysky na kvasinky *Candida glabrata* [36, 37]

V tomto experimentu bylo pozorováno, jak ovlivní mikrovlnná plazmová tryska buňky kvasinek *C. Glabrata*. Byly pozorované tři faktory – doba ošetření, velikost výkonu a koncentrace buněk.

Inokulum pro tento experiment bylo připraveno do 7 ml komplexního tekutého média GPY (Glucose yeast peptone), kdy pomocí kličky byla do média zavedená kultura *C. Glabrata*. Následná kultivace probíhala v termostatu bez třepání po dobu 24 hodin. Takto připravené inokulum bylo 10x a 100x naředěno. Na živné médium bylo odpipetováno vždy 50 µl připravených kultur. Takto připravené vzorky byly ihned ošetřeny plazmatem a následně byly kultivované v termostatu bez třepání po dobu 48 hodin. Experiment byl tedy uskutečněn pro tři

různé koncentrace a dva výkony 9 W a 12 W, kdy byla Petriho miska se vzorkem od trysky vzdálená 5 mm při výkonu 9 W a v případě 12 W byla vzdálenost 3,5 mm. Pracovním plynem byl argon.

Co se týče vlivu doby ošetření, tak bylo zjištěno, že dochází téměř lineárně ke zvětšování inhibičních zón. Tedy čím delší je doba expozice plazmatem, tím větší inhibiční zóna vznikne (viz Obr. 12).



Obrázek 12: Porovnání inhibičních zón s použitím výkonu 9 W za dobu 10 s (vlevo) a 120 s (vpravo) [36]

Podobný trend platí i při použití rozdílného výkonu. Použití 12 W je účinnější než použití výkonu 9 W, protože inhibiční zóny při použití výkonu 12 W byly větší. Bylo také zjištěno, že pro vytvoření stejně velké inhibiční zóny stačí u výkonu 12 W pouze poloviční čas oproti použití výkonu 9 W. V případě vlivu počáteční koncentrace bylo zjištěno, že větší inhibiční zóny vznikly u menších koncentrací, tedy největší inhibiční zóny byly u 100x zředěného vzorku a nejmenší inhibiční zóny byly u nezředěných vzorků. Dále bylo zjištěno, že po 48 hodinách dochází k zarůstání inhibičních zón.

Tento experiment bude dále diskutován a porovnáván s výsledky získanými v této bakalářské práci.

4 Experimentální část

4.1 Chemikálie, přístroje a materiály

4.1.1 Chemikálie a materiál

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

Tekuté kultivační médium YPD (Yeast Extract-Peptide-Dextrose)

Živné médium YPD s agarem

Sterilní polystyrénové Petriho misky s průměrem 55 mm

Pracovní plyn argon (čistota: 99,9965 %)

4.1.2 Přístroje

UV/VIS spektrofotometr NanoPhotometr Implen

Teslův transformátor

Mikrovlnný generátor (Sairem, GMS 200 W)

Regulátor hmotnostního průtoku (Bronkhorst FG201-CV)

Termostat

Mobilní fotoaparát

4.2 Příprava vzorků *Candida glabrata*

4.2.1 Příprava inokula

Inokulum bylo připraveno do 50 ml tekutého kultivačního média YPD. Pomocí sterilního kapátka bylo 0,5 ml kultury *C. glabrata* zavedené do kultivačního média. Kultivace probíhala v termostatu při 37 °C s třepáním po dobu 24 hodin.

4.2.2 Příprava kultivačního média

Pevné živné médium na kultivaci kvasinky *C. glabrata* bylo připraveno z kultivačního média YPD a agaru. Podle návodu bylo připravené kultivační médium v poměru 1:2:2 (viz Tab. 1)

a byl do něj přidán agar v poměru 20 g na 1 l destilované vody. Médium bylo sterilizované po dobu 60 minut při teplotě 120 °C.

Tabulka 1: Složení kultivačního média

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

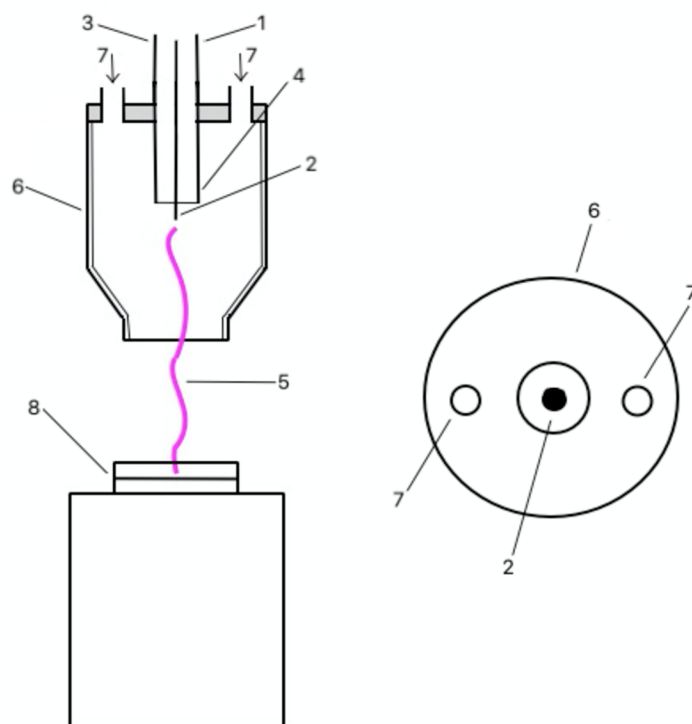
4.2.3 Kultivace kvasinek

Do Petriho misek s průměrem 55 mm bylo nalito 10 ml sterilizovaného živného média s agarem. Po zatuhnutí bylo na agarové plotny naočkováno 50 µl kultury. Z předem připraveného inokula byla odebrána část kultury, která byla naředěna. Byly použité kultury s ředěním 10^{-3} , 10^{-4} a 10^{-5} . Z každé koncentrace bylo připraveno 25 Petriho misek. Takto připravené vzorky byly okamžitě ošetřeny plazmatem. Poté byly kultivované v termostatu bez třepání při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin.

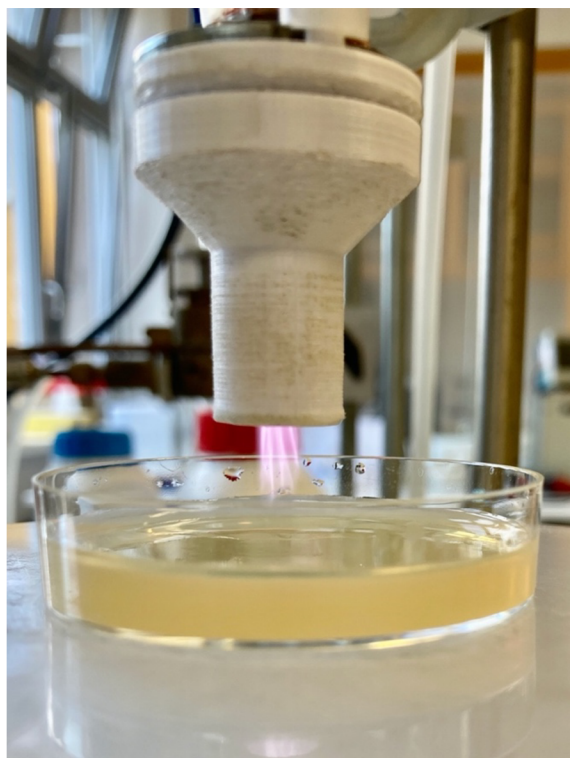
4.3 Ošetření připravených vzorků pomocí mikrovlnné plazmové trysky

4.3.1 Zapojení mikrovlnné plazmové trysky

Experimentální zapojení sestávalo z mikrovlnného koaxiálního kabelu, vysokonapěťového vodiče, uzemněného vodiče, dielektrika a plastového nástavce. Pracovním plynem byl argon 4,6 (čistota 99,9965 %) a pro celý experiment byl použit konstantní průtok 5,0 Slm, ten byl regulován pomocí regulátoru hmotnostního průtoku (Bronkhorst FG201-CV). Schéma experimentálního zapojení je uvedeno na obrázku č. 13. Výboj plazmatu byl směřován kolmo ke vzorku, do středu Petriho misky. Použit byl výkon 9 W a 12 W. Zářící část konce výboje byla jak v případě 9 W, tak v případě 12 W v kontaktu s povrchem vzorku (viz Obr. č. 14). Měnila se tedy vzdálenost zdroje od ošetřovaného povrchu.



Obrázek 13: Schéma experimentálního zapojení: 1 – mikrovlnný koaxiální kabel, 2 – vysokonapěťový vodič, 3 – uzemněný vodič, 4 – dielektrikum, 5 – plazmový kanál, 6 – plastový nástavec, 7 – přívod argonu, 8 - vzorek



Obrázek 14: Plazmová tryska

4.3.2 Mikrovlnná plazmová tryska

Na rozdíl od předchozí bakalářské práce [36], kde bylo využito výboje generovaného v kapiláře pomocí povrchové vlny, byla použita konfigurace pochodňového výboje. Tento výboj je nestabilní a dochází zde k turbulentnímu proudění plynu.

4.3.3 Ošetření kvasinek plazmatem

Jak bylo zmíněno výše, kultury *C. Glabrata* byly ihned po naočkování ošetřené plazmatem. Měření bylo pro všechny koncentrace stejné. Bylo měřeno po dobu 10 s, 20 s, 30 s, 60 s, 2x30 s (s pauzou 30 s mezi ošetřením) a 120 s. Vždy byly použity dva různé výkony (9 W a 12 W) s konstantním průtokem argonu 5,0 Slm a vždy byl každý parametr proměřen dvakrát. Pro všechny tři koncentrace byl pro porovnání ponechám vzorek, který plazmatem ošetřen nebyl a mohl sloužit jako reference.

4.3.4 Zpracování a vyhodnocení výsledků

Všechny Petriho misky byly vyfocené a byl změřen průměr inhibičních zón po 24 hodinách a následně po 48 hodinách. Ze zaznamenaných rozměrů byl vypočítán obsah jednotlivých inhibičních zón. Obsahy inhibičních zón byly dále vyneseny do grafů, kde se sledoval vliv jednotlivých parametrů (koncentrace, čas, výkon).

5 Výsledky a diskuze

5.1 Výsledky

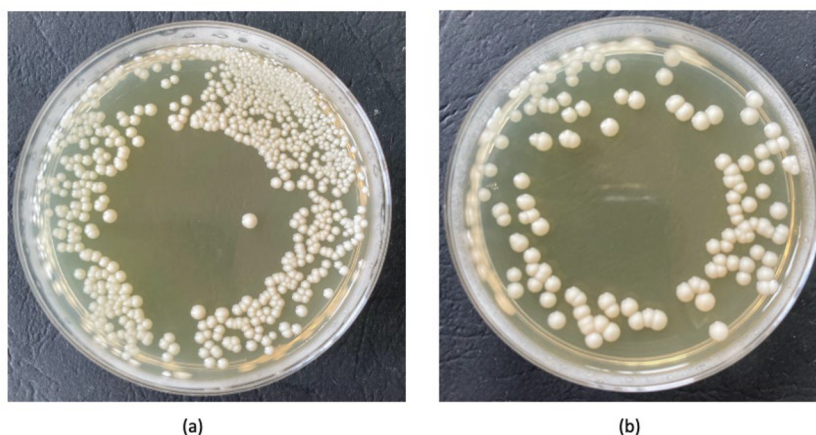
Byly pozorovány tři parametry, které měly různý vliv na velikost inhibičních zón a jejich časovou stabilitu. Byl pozorován vliv počáteční koncentrace vzorků, čas ošetření plazmatem a různá velikost výkonu (9 W a 12 W).

5.1.1 Stanovení koncentrace

Počáteční koncentrace byla stanovena z hodnoty absorbance. Hodnota absorbance byla změřena pomocí spektrofotometru při vlnové délce $\lambda = 630$ nm. Pro výpočet byla použita experimentálně stanovená rovnice kalibrační přímky ($y = 3,475x$) pro absorbanci inokula *C. Glabrata*, kde x je počet buněk v 1 ml média ($1 \cdot 10^7$ CFU/ml) [36]. Naměřená absorbance byla $A = 0,407$ a to se rovná koncentraci $c = 1171000$ CFU/ml vzorku, který byl 100x zředěn. Vzorky, které byly použité pro experiment, měly tedy koncentraci $c_1 = 117100$ CFU/ml pro kulturu s ředěním 10^{-3} , $c_2 = 11700$ CFU/ml pro kulturu s ředěním 10^{-4} a $c_3 = 1170$ CFU/ml pro kulturu s ředěním 10^{-5} .

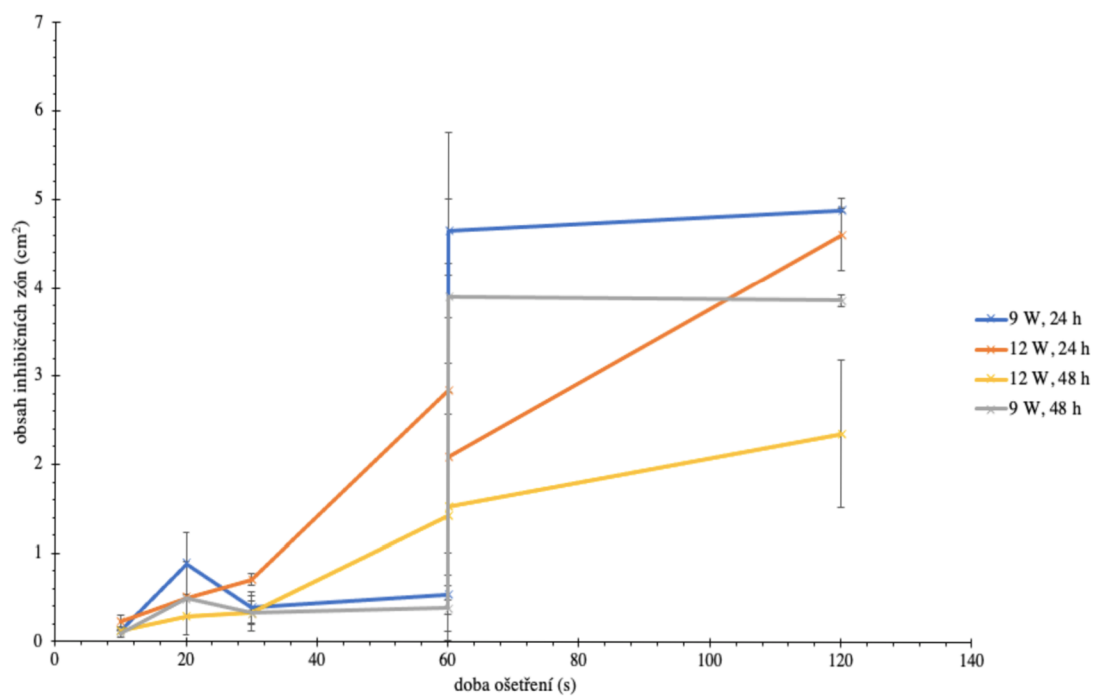
5.1.2 Vliv parametrů

Všechna naměřená data jsou zpracována v grafech. U vlivu počáteční koncentrace lze pomocí rozdílné velikosti inhibičních zón pozorovat, že čím menší je koncentrace, tím větší jsou inhibiční zóny (viz Obr. 15).

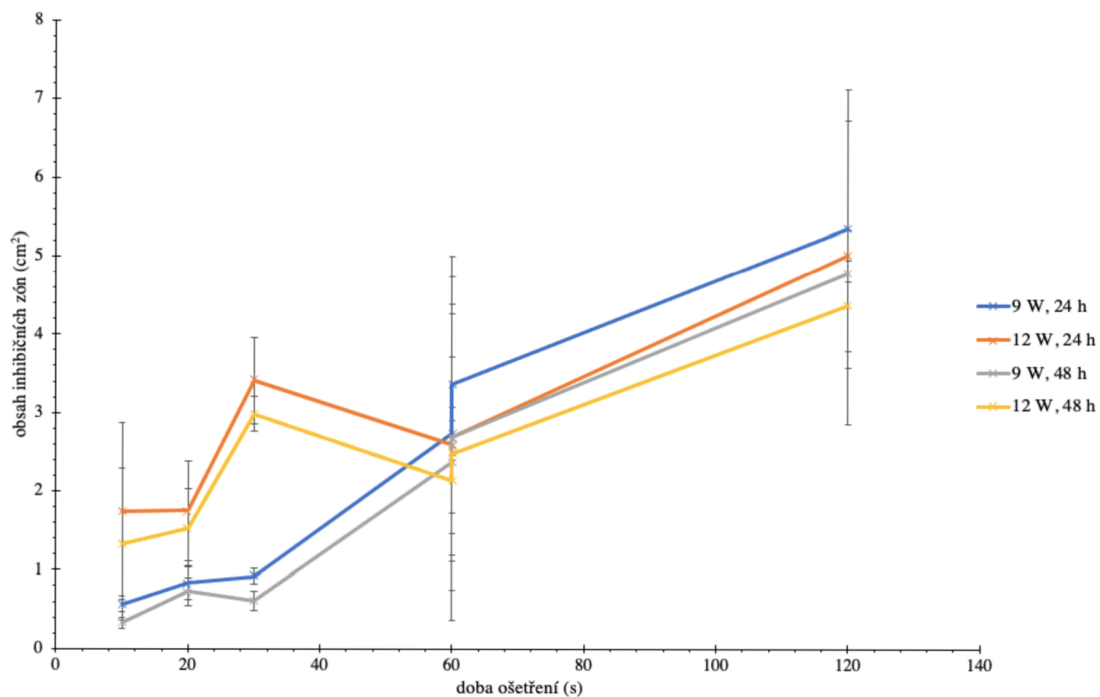


Obrázek 15: Porovnání velikosti inhibičních zón, které vznikly po 48 hodinách kultivace a použití výkonu 12 W s ředěním (a), 10^{-3} (b) 10^{-4}

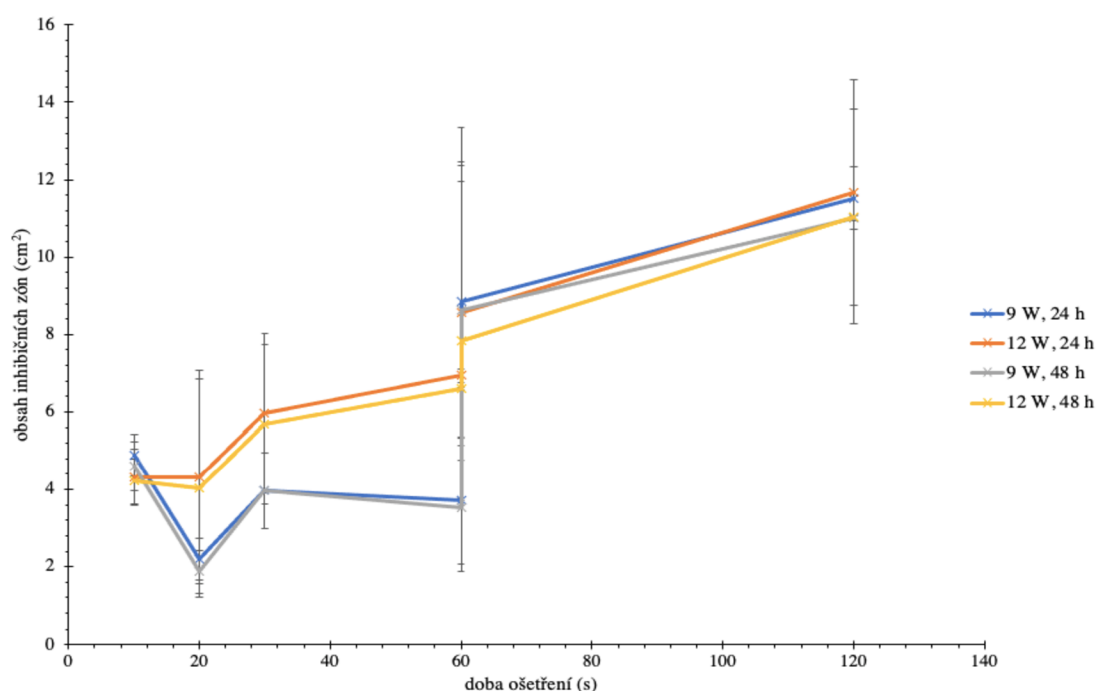
U dalších parametrů nelze určit jasný trend, což můžeme vidět na obrázcích 16, 17 a 18.



Obrázek 16: Graf závislosti velikosti inhibičních zón na době ošetření nízkoteplotním mikrovlnným plazmatem pro vzorek s ředěním 10^{-3}



Obrázek 17: Graf závislosti velikosti inhibičních zón na době ošetření nízkoteplotním mikrovlnným plazmatem pro vzorek s ředěním 10^{-4}



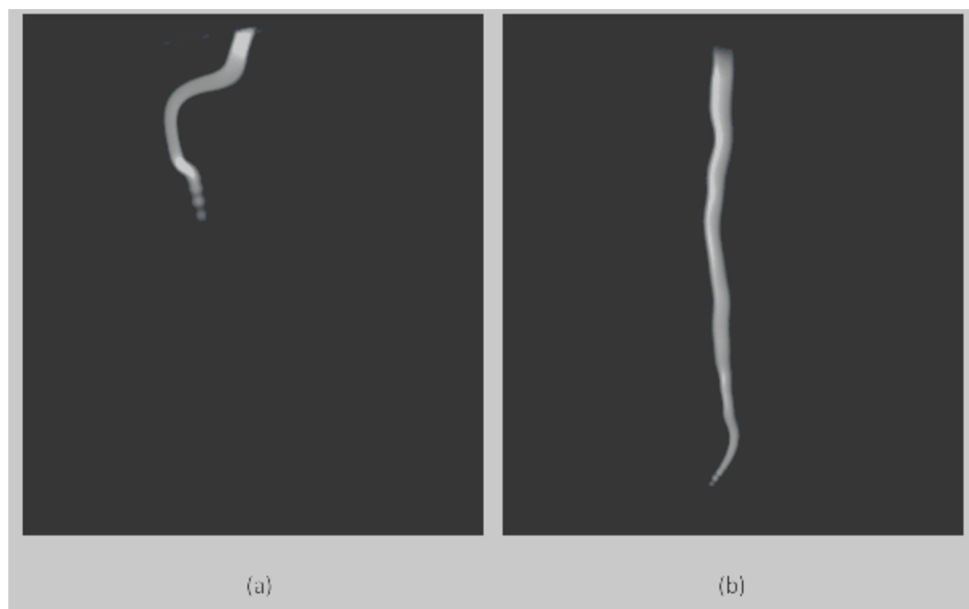
Obrázek 18: Graf závislosti velikosti inhibičních zón na době ošetření nízkoteplotním mikrovlnným plazmatem pro vzorek s ředěním 10^{-5}

Důvodem, proč nelze pozorovat jasný trend je fakt, že byl použit pochodňový výboj plazmatu s přímým prouděním plynu, který je nestabilní. Na rozdíl od výboje generovaného povrchovou vlnou, který byl využit v již zmíněné bakalářské práci [36], na kterou nepřímo navazují. Zde byl výboj stabilní a docházelo k lineárnímu proudění plynu (viz Obr. 19). Docházelo tedy k lineárnímu zvětšování inhibičních zón s časem i s vyšším výkonem, což v tomto případě nebylo pozorováno [36, 37].

V tomto případě bylo pozorováno turbulentní proudění (viz Obr. 19). Turbulentní proudění způsobuje, že nedošlo k ošetření menší definované plochy, ale došlo k ošetření větší plochy, ovšem s menší účinností.

Výhodou je však to, že při turbulentním proudění dochází k většímu mísení argonu a kyslíku, což vede ke vzniku většího množství reaktivních částic plazmatu. V případě lineárního proudění se plyn rovnoměrně rozprostřel po povrchu, ale v tomto případě dochází k většímu počtu nárazů do stěn Petriho misky a tím k většímu mísení plynů. Sterilizace je tedy u turbulentního proudění vyšší zejména s vyšší délkou ošetření. Tento fakt lze pozorovat v rozdílných výsledcích předchozí práce a této práce. V předchozí práci [36] byly totiž obecně

naměřeny menší inhibiční zóny (zejména při delším ošetření plazmatem), což dokazuje tvrzení o vyšší sterilizaci při použití výboje s turbulentním prouděním. Tento fakt potvrzuje i tabulka 2 (viz níže), kde jsou u 100x zředěné kultury uvedeny hodnoty z předchozí bakalářské práce, kde je koncentrace buněk $c = 67700$ CFU/ml [36] a u 1000x zředěné kultury jsou hodnoty získané v rámci této bakalářské práce, kde je koncentrace $c_I = 117100$ CFU/ml.



Obrázek 19: Snímky výboje z rychlé kamery, (a) pochodňový výboj s přímým prouděním plynu, (b) výboj generovaný povrchovou vlnou při průtoku argonu 6 l/min a 12 W

Tabulka 2: Rozdílná velikost inhibičních zón v předchozí a této práci [36, 37]

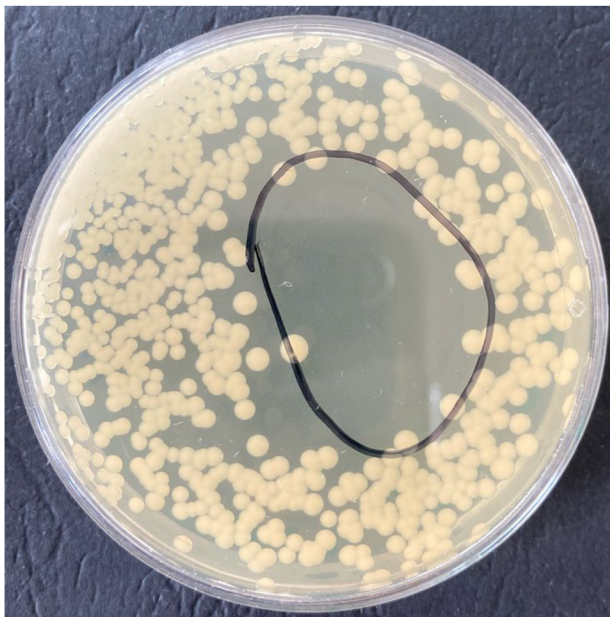
	12 W	
	100x zředěná kultura	1000x zředěná kultura
doba ozařování (s)	průměrná velikost inhibiční zóny (cm ²)	
10	0,37	0,24
30	0,59	0,71
60	1,09	2,84
120	1,66	4,62

Nicméně, biomedicínské aplikace většinou vyžadují plošné ošetření a nízkou teplotu. Vzhledem k mísení argonu a kyslíku, nedocházelo k takovému zvyšování teploty. Můžeme tedy tvrdit, že výboj, který byl použit v této bakalářské práci, by do budoucna mohl mít pro takové využití vyšší potenciál.

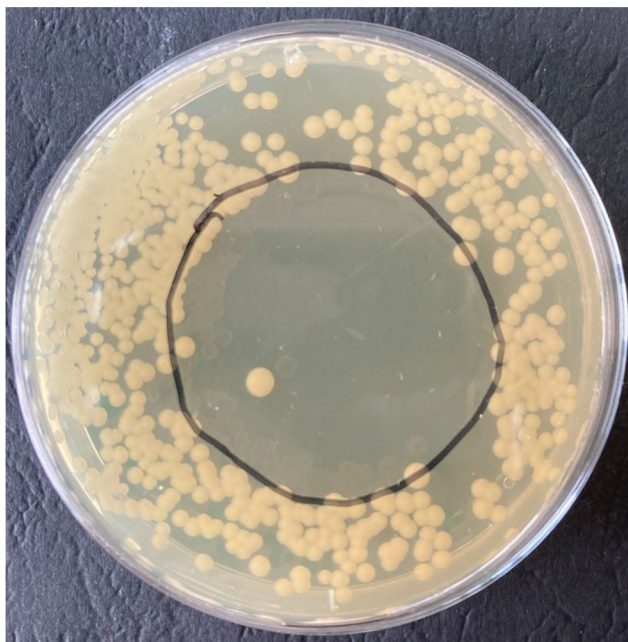
5.1.3 Velikost inhibičních zón s časem

Dále bylo zjištěno, že po kultivaci po dobu 24 hodin byly inhibiční zóny větší, než po kultivaci po dobu 48 hodin. To lze pozorovat na obrázku 20, kde je čarou vyznačena inhibiční zóna, která byla naměřena po 24 hodinách a obrázek byl pořízen po 48 hodinách.

Důvodem je to, že docházelo k zarůstání inhibičních zón. Bylo pozorováno, že inhibiční zóny zarůstaly zejména z kraje, kde docházelo buďto ke kolonizaci okolními buňkami nebo na kraji inhibiční zóny nedošlo k úplné inhibici kvasinkových buněk. Výjimečně bylo pozorováno, že došlo k nárůstu buněk i uvnitř inhibiční zóny (viz Obr. 21). Vzhledem k tomu, že inhibiční zóny zarůstaly zejména od krajů, můžeme tvrdit, že uvnitř inhibiční zóny došlo při ošetření plazmatem k dostatečné inhibici buněk.



Obrázek 20: Zarůstání inhibiční zóny po 48 hodinách, která byla vytvořena působením plazmatu po dobu 120 s a výkonem 12 W, k zarůstání dochází z kraje inhibiční zóny



Obrázek 21: Zarůstání inhibiční zóny po 48 hodinách, která byla vytvořena působením plazmatu po dobu 120 s a výkonem 9 W, k zarůstání došlo i uvnitř inhibiční zóny

Obecně můžeme tvrdit, že k zarůstání inhibičních zón uvnitř zóny dochází více s menším výkonem. S vyšším výkonem dochází k zarůstání inhibičních zón zejména z kraje. Tohle tvrzení lze pozorovat na obrázcích 20 a 21, kdy doba ošetření byla v obou případech 120 s. Rozdílem je výkon, při výkonu 12 W můžeme pozorovat zarůstání pouze z kraje a v případě výkonu 9 W pozorujeme zarůstání i uvnitř inhibiční zóny. K účinnější inhibici tedy dochází s vyšším výkonem.

6 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit účinek mikrovlnného nízkoteplotního plazmatu na kvasinky. Teoretická část se zabývala charakterizací kvasinky *Candida Glabrata*, která byla pro účely této bakalářské práce vybrána jako modelový organismus. Následně bylo charakterizováno plazma, kde bylo detailněji popsáno nízkoteplotní plazma, které bylo předmětem této bakalářské práce. Bylo zde popsáno i využití nízkoteplotního plazmatu v různých aplikacích, nejvíce však v medicíně. V další kapitole byly diskutovány články, jež se zabývaly podobnou tematikou a byl zmíněn i článek, který vzešel z bakalářské práce, se kterou byla data této bakalářské práce porovnávána.

Druhou částí bakalářské práce byla experimentální část, výsledky a diskuze. Byl zde popsán průběh experimentu, kdy byly vzorky kvasinek *Candida Glabrata* ošetřeny plazmatem, a následně byly zkoumány velikosti inhibičních zón a jejich časová stabilita. Byl sledován vliv tří parametrů, a to délka ošetření plazmatem, původní koncentrace vzorku a použitý výkon.

Bylo zjištěno, že čím nižší byla původní koncentrace vzorků, tím větší byla velikost inhibičních zón. U času ošetření a výkonu nebyl nalezen žádný jasný trend, protože použitý výboj byl nestabilní. Ačkoliv jasný trend nalezen nebyl, bylo zjištěno, že když se využije turbulentní výboj plazmatu, tak došlo k vyšší sterilizaci. Díky turbulentnímu proudění totiž došlo k většímu mísení argonu a kyslíku, což vedlo k tomu, že se vytvořilo více reaktivních částic, které za sterilizaci stojí. Dále bylo zjištěno, že nestabilní výboj plazmatu by mohl mít vyšší potenciál v biomedicinských aplikacích. Právě zmíněné mísení plynů zajišťuje to, že nedochází ke zvyšování teploty plazmatu, což je pro tyto účely žádoucí.

Při ošetření kvasinek plazmatem s různým výkonem bylo zjištěno, že při vyšším výkonu 12 W dochází k účinnější inhibici, než při výkonu 9 W, kde docházelo k zarůstání i ve středu inhibičních zón.

Sterilizační účinek mikrovlnného nízkoteplotního plazmatu na kvasinky byl prokázán. Dále by bylo zapotřebí dalších studií, kde by se zajistilo, aby tok plynu nebyl ovlivněn stěnami Petriho misek. Další možné experimenty na toto téma byly diskutovány a mohly by se stát předmětem diplomové práce, která by na tuto práci navazovala. Ale již v tomto momentě můžeme říci, že využití plazmatu do budoucna vypadá slibně.

7 Seznamy

7.1 Seznam použitých zkratek

AIDS = Acquired Immune Deficiency Syndrom = syndrom získaného imunodeficitu

C. albicans = *Candida albicans*

C. glabrata = *Candida glabrata*

C. kefyri = *Candida kefyri*

C. krusei = *Candida krusei*

C. parapsilosis = *Candida parapsilosis*

C. tropicalis = *Candida tropicalis*

CFU = colony-forming unit = jednotka tvořící kolonie

DBD = dielectric barrier discharge = dielektrický bariérový výboj

GPY = glucose yeast peptone

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

S. cerevisiae = *Saccharomyces cerevisiae*

Slm = standard liter per minute = standardní litr za minutu

YGC = yeast extract glucose chloramphenicol

YPD = yeast extract peptone-dextrose

7.2 Seznam použitých obrázků

Obrázek 1: <i>C. glabrata</i> pod elektronovým mikroskopem [13].....	9
Obrázek 2: Porovnání velikosti blastokonidií, zleva <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> [2].....	10
Obrázek 3: Biofilm <i>C. Glabrata</i> , (A) fáze adheze, (B) po 24 hodinách [16]	13
Obrázek 4: Polarizace plazmatu v okolí kladného náboje [17].....	16
Obrázek 5: kINPen [20]	17
Obrázek 6: Korónový výboj [5]	17
Obrázek 7: Plošný dielektrický bariérový výboj [5]	18
Obrázek 8: Doutnavý výboj s viditelnými typickými vrstvami [21]	19
Obrázek 9: Plazmová tryska [5].....	20
Obrázek 10: Ošetření rány nízkoteplotním plazmatem za atmosférického tlaku, (a) rána před ošetřením, (b) rána po ošetření [28]	22
Obrázek 11: (a) kvasinka neošetřená plazmatem, (b) kvasinka ošetřená DBD plazmatem pod elektronickým rastrovacím mikroskopem [35]	28
Obrázek 12: Porovnání inhibičních zón s použitím výkonu 9 W za dobu 10 s (vlevo) a 120 s (vpravo) [36]	29
Obrázek 13: Schéma experimentálního zapojení: 1 – mikrovlnný koaxiální kabel, 2 – vysokonapěťový vodič, 3 – uzemněný vodič, 4 – dielektrikum, 5 – plazmový kanál, 6 – plastový nástavec, 7 – přívod argonu, 8 - vzorek	32
Obrázek 14: Plazmová tryska.....	32
Obrázek 15: Porovnání velikosti inhibičních zón, které vznikly po 48 hodinách kultivace a použití výkonu 12 W s ředěním (a), 10^{-3} (b) 10^{-4}	34
Obrázek 16: Graf závislosti velikosti inhibičních zón na době ošetření nízkoteplotním mikrovlnným plazmatem pro vzorek s ředěním 10^{-3}	35
Obrázek 17: Graf závislosti velikosti inhibičních zón na době ošetření nízkoteplotním mikrovlnným plazmatem pro vzorek s ředěním 10^{-4}	35
Obrázek 18: Graf závislosti velikosti inhibičních zón na době ošetření nízkoteplotním mikrovlnným plazmatem pro vzorek s ředěním 10^{-5}	36

Obrázek 19: Snímky výboje z rychlé kamery, (a) pochodňový výboj s přímým prouděním plynu, (b) výboj generovaný povrchovou vlnou při průtoku argonu 6 l/min a 12 W	37
Obrázek 20: Zarůstání inhibiční zóny po 48 hodinách, která byla vytvořena působením plazmatu po dobu 120 s a výkonem 12 W, k zarůstání dochází z kraje inhibiční zóny.....	38
Obrázek 21: Zarůstání inhibiční zóny po 48 hodinách, která byla vytvořena působením plazmatu po dobu 120 s a výkonem 9 W, k zarůstání došlo i uvnitř inhibiční zóny	39

7.3 Seznam použité literatury

- [1] BENDO VÁ, O., a B. JANDERO VÁ. *Základy biologie kvasinek*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1985.
- [2] FIDEL, P. L., J. A. VAZQUEZ a J. D. SOBEL. *Candida glabrata: Review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 1999, 12(1), 80-96 [cit. 2020-01-27]. DOI: 10.1128/CMR.12.1.80. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <https://cmr.asm.org/content/12/1/80>
- [3] HIJOSA-VALSERO, M., R. MOLINA, H. SCHIKORA, M. MÜLLER, J. M. BAYONA a L. BOECKMANN. Removal of priority pollutants from water by means of dielectric barrier discharge atmospheric plasma: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. *Journal of Hazardous Materials*. 2013, **262**, 664-673. ISSN 03043894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2013.09.022
- [4] BARTOŠ, P., P. KRÍŽ, Z. HAVELKA, A. BOHATÁ, P. OLŠAN, P. ŠPATENKA, V. ČURN a M. DIENSTBIER. Plazmové technologie v potravinářském průmyslu: mini-review. *Kvasný Průmysl*. 2017, **63**(3), 134-138. ISSN 00235830. Dostupné z: doi:10.18832/kp201716
- [5] SCHOLTZ, V., Nízkoteplotná plazma I: Čo je to. *Aldebaran bulletin* [online]. 2012(12) [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: http://www.aldebaran.cz/bulletin/2012_22_pla.php
- [6] SARDI, J. C. O., L. SCORZONI, T. BERNARDI, A. M. FUSCO-ALMEIDA, M. J. S. MENDES GIANNINI a Jure PIŠKUR. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*. 2013, **62**(1), 10-24. ISSN 0022-2615. Dostupné z: doi:10.1099/jmm.0.045054-0
- [7] VON WOEDTKE, T., S. EMMERT, H. R. METELMANN, S. RUPF a K. D. WELTMANN. Perspectives on cold atmospheric plasma (CAP) applications in medicine. *Physics of Plasmas*. 2020, **27**(7), 19-28. ISSN 1070-664X. Dostupné z: doi:10.1063/5.0008093
- [8] FUČÍKOVÁ, J., J. BARTŮŇKOVÁ, R. ŠPÍŠEK, S. RUPF a K. D. WELTMANN. The concept of immunogenic cell death in antitumor immunity. *Klinická onkologie*. 2015, **28**(Suppl 4), 4S48-4S55. ISSN 0862495X. Dostupné z: doi:10.14735/amko20154S48
- [9] KOPECKÁ, J., *Kvasinky a jejich využití* [online]. Brno, 2009 [cit. 2021-01-27]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/vr7w4/>. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Miroslav Němec.

- [10] NĚMEC, M., a D. MATOULKOVÁ. *Základy obecné mikrobiologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2015. ISBN 978-80-210-7923-6.
- [11] BUŇKOVÁ, L., a M. DOLEŽALOVÁ. *Obecná mikrobiologie*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007. ISBN 978-80-7318-516-9.
- [12] KOČKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy*. Bratislava: Alfa, 1982. Edícia potravinárskej literatúry (Alfa).
- [13] AHMAD, K. M., J. KOKOŠAR, X. GUO, Z. GU, O. P. ISHCHUK a J. PIŠKUR. Genome structure and dynamics of the yeast pathogen *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Research*. 2014, **14**(4), 529-535. ISSN 1567-1364. Dostupné z: doi:10.1111/1567-1364.12145
- [14] RODRIGUES, C., M. RODRIGUES, S. SILVA, M. HENRIQUES, O. P. ISHCHUK a J. PIŠKUR. *Candida glabrata* biofilms: How far have we come? *Journal of Fungi*. 2017, **3**(1), 529-535. ISSN 2309-608X. Dostupné z: doi:10.3390/jof3010011
- [15] CAMPION, E. W., B. J. KULLBERG, M. C. ARENDRUP, A. M. FUSCO-ALMEIDA, M. J. S. MENDES GIANNINI a J. PIŠKUR. Invasive Candidiasis: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *New England Journal of Medicine*. 2015, **373**(15), 1445-1456. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMra1315399
- [16] SENEVIRATNE, C.J., W.J. SILVA, L.J. JIN, Y.H. SAMARANAYAKE a L.P. SAMARANAYAKE. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Archives of Oral Biology*. 2009, **54**(11), 1052-1060. ISSN 00039969. Dostupné z: doi:10.1016/j.archoralbio.2009.08.002
- [17] MARTIŠOVITŠ, V. *Základy fyziky plazmy: učebný text pre magisterské štúdium*. Bratislava: Vydavateľstvo UK, 2006. ISBN 80-223-1983-X.
- [18] KULHÁNEK, P. *Úvod do teorie plazmatu*. Praha: AGA, 2011. ISBN 978-80-904582-2-2.
- [19] KITAZAKI, S., K. KOGA, M. SHIRATANI a N. HAYASHI. Growth control of dry yeast using scalable atmospheric-pressure dielectric barrier discharge plasma irradiation. *Japanese Journal of Applied Physics* [online]. 2012, **51** [cit. 2021-03-18]. DOI: 10.1143/JJAP.51.11PJ02. ISSN 0021-4922. Dostupné z: <https://iopscience.iop.org/article/10.1143/JJAP.51.11PJ02>
- [20] BEKESCHUS, S., A. SCHMIDT, K. D. WELTMANN, T. VON WOEDTKE a L.P. SAMARANAYAKE. The plasma jet kINPen – A powerful tool for wound healing. *Clinical Plasma Medicine*. 2016, **4**(1), 19-28. ISSN 22128166. Dostupné z: doi:10.1016/j.cpme.2016.01.001

- [21] Nízkoteplotní plazma IV – doutnavý výboj [online]. 10. 2012 [cit. 2021-03-18]. ISSN 1214-1674. Dostupné z: https://www.aldebaran.cz/bulletin/2012_42_pla.php
- [22] ELIEZER, S. a Y. ELIEZER. The fourth state of matter: An introduction to plasma science. Second edition. Institute of Physics Publishing, Dirac House, Temple Back, Bristol BS1 6BE, UK: Institute of Physics Publishing Bristol and Philadelphia, 2001. ISBN 0 7503 0740 4.
- [23] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun, 2005. ISBN 80-868-5000-5.
- [24] LAROUSSE, M. a F. LEIPOLD. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2004, **233**(1-3), 81-86. ISSN 13873806. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijms.2003.11.016
- [25] XU, H, Y. ZHU, D. CUI, Mengru DU, J. WANG, R. MA a Z. 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*. 2019, **52**(39), 81-86. ISSN 0022-3727. Dostupné z: doi:10.1088/1361-6463/ab273d
- [26] ZHOU, R., R. ZHOU, K. PRASAD, Z. FANG, R. SPEIGHT, K. BAZAKA a K. OSTRIKOV. Cold atmospheric plasma activated water as a prospective disinfectant: the crucial role of peroxyxynitrite. *Green Chemistry*. 2018, **20**(23), 5276-5284. ISSN 1463-9262. Dostupné z: doi:10.1039/C8GC02800A
- [27] VON WOEDTKE, Th., S. REUTER, K. MASUR, K.-D. WELTMANN, Violeta KAUNELIENE, Inga STASIULAITIENE a Dainius MARTUZEVICIUS. Plasmas for medicine: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. *Physics Reports*. 2013, **530**(4), 291-320. ISSN 03701573. Dostupné z: doi:10.1016/j.physrep.2013.05.005
- [28] BERNHARDT, T., M. L. SEMMLER, M. SCHÄFER, S. BEKESCHUS, S. EMMERT a L. BOECKMANN. Plasma medicine: Applications of cold atmospheric pressure plasma in dermatology. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019, **2019**, 1-10. ISSN 1942-0900. Dostupné z: doi:10.1155/2019/3873928
- [29] BEKESCHUS, S., E. FREUND, C. SPADOLA, et al. Risk assessment of kINPen plasma treatment of four human pancreatic cancer cell lines with respect to metastasis. *Cancers*. 2019, **11**(9). ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers11091237

- [30] COLLET, G., E. ROBERT, A. LENOIR, et al. Plasma jet-induced tissue oxygenation: potentialities for new therapeutic strategies. *Plasma Sources Science and Technology*. 2014, 23(1). ISSN 0963-0252. Dostupné z: doi:10.1088/0963-0252/23/1/012005
- [31] KISCH, T., A. HELMKE, S. SCHLEUSSER, et al. Improvement of cutaneous microcirculation by cold atmospheric plasma (CAP): Results of a controlled, prospective cohort study. *Microvascular Research*. 2016, 104(1), 55-62. ISSN 00262862. Dostupné z: doi:10.1016/j.mvr.2015.12.002
- [32] TICHONOVAS, M., E. KRUGLY, V. RACYS, R. HIPPLER, V. KAUNELIENE, I. STASIULAITIENE a D. MARTUZEVICIUS. Degradation of various textile dyes as wastewater pollutants under dielectric barrier discharge plasma treatment: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. *Chemical Engineering Journal*. 2013, 229, 9-19. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2013.05.095
- [33] POLČIC, P., Z. MACHALA, J. JULÁK, L. KOMMOVÁ, D. SAVICKÁ a J. PAZLAROVÁ. Effects of non-thermal plasma on yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(5), 77-79. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22052247
- [34] SOUŠKOVÁ, H., V. SCHOLTZ, J. JULÁK, L. KOMMOVÁ, D. SAVICKÁ a J. PAZLAROVÁ. The survival of micromycetes and yeasts under the low-temperature plasma generated in electrical discharge. *Folia Microbiologica*. 2011, 56(1), 77-79. ISSN 0015-5632. Dostupné z: doi:10.1007/s12223-011-0005-5
- [35] HONG YU, H., V. ZHI LONG XIU, J. CHUN SHENG REN, L. JIA LIANG ZHANG, D. DE ZHEN WANG, J. YOU NIAN WANG a TENG CAI MA. Inactivation of yeast by dielectric barrier discharge (DBD) plasma in helium at atmospheric pressure. *IEEE Transactions on Plasma Science*. 2005, 33(4), 1405-1409. ISSN 0093-3813. Dostupné z: doi:10.1109/TPS.2005.851961
- [36] TREBULOVÁ, K. 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.
- [37] TREBULOVÁ, K., F. KRČMA, Z. KOZÁKOVÁ a P. MATOUŠKOVÁ. Impact of microwave plasma torch on the yeast *Candida glabrata*. *Applied Sciences*. 2020, 10(16). ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app10165538