

ODCP FCHPT STU v Bratislave

**Dezinfekčné účinky nízкотеплотnej
atmosférickej plazmy na papierové
nosiče informácií a dedičstva**

Literárny prieskum

Nikola Šípošová, Katarína Vizárová, Radko Tiňo,

Barbora Kaliňáková



2017

1 Prieskum biologického napadnutia depozitárov

Depozitáre, múzeá, knižnice a archívy sú poznačené prítomnosťou mikroorganizmov, najčastejšie mikroskopickými hubami. Tieto priestory sú veľmi často umiestnené v budovách so zlými klimatickými podmienkami, ktoré podporujú rast húb. Taktiež deponované knihy, obrazy a podobne, sú často zdrojom výživy pre rast a rozvoj fungálnej kontaminácie. Huby majú deštruktívnu aktivitu, poškodzujú a vedú k strate materiálu, nepriaznivo vplyvajú na zdravie ľudí. V tab. č. 1 sú uvedené najčastejšie sa vyskytujúce vláknité huby vo vnútorných priestoroch, čo je nezanedbateľné aj zo zdravotného hľadiska.

Tab. č. 1: Najčastejšie druhy mikroskopických húb izolovaných vo vnútorných priestoroch (2):

<ul style="list-style-type: none">• <i>Alternaria alternata</i>	<ul style="list-style-type: none">• <i>Aureobasidium pullulans</i>
<ul style="list-style-type: none">• <i>Alternaria tenuissima</i>	<ul style="list-style-type: none">• <i>Cladosporium herbarum</i>
<ul style="list-style-type: none">• <i>Aspergillus flavus</i>	<ul style="list-style-type: none">• <i>Penicillium chrysogenum</i>
<ul style="list-style-type: none">• <i>Aspergillus niger</i>	<ul style="list-style-type: none">• <i>Penicillium expansum</i>
<ul style="list-style-type: none">• <i>Aspergillus ochraceus</i>	<ul style="list-style-type: none">• <i>Rhizopus stolonifer</i>
<ul style="list-style-type: none">• <i>Aspergillus versicolor</i>	<ul style="list-style-type: none">• <i>Trichoderma viride</i>

Nasledujúce prípady mikrobiálnej kontaminácie sú uvedené pre ilustráciu, pre ich častý výskyt, v pamäťových inštitúciách v SR. Z týchto faktov vyplýva aj potreba neustáleho vývoja nových možností dezinfekcie a sterilizácie priestorov a objektov.

V SNK v Martine a vo Vrútkach boli počas prieskumu na dokumentoch z konzervačného fondu identifikované pomocou makroskopickej a mikroskopickej analýzy vláknité huby (VH) rodov *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp. zriedkavejšie *Chaetomium* spp., *Alternaria* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp. ale aj *Epicoccum* spp., *Botrytis*

spp. a *Curvularia* spp. Po mikrobiologickej analýze vzduchu sa určili rody húb ako *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp., *Monilia* spp., *Aspergillus* spp., *Neurospora* spp. a *Penicillium* spp. (3).

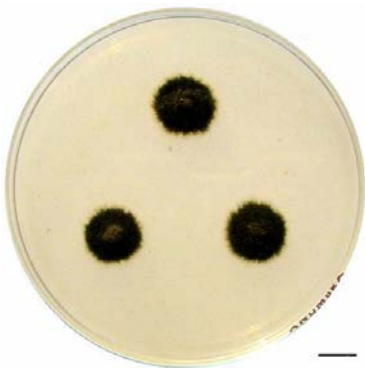
„V rámci interdisciplinárnej spolupráce medzi SNM a STU v Bratislave bola vykonaná analýza stavu štyroch barokových z 18. storočia“. Obrazy boli uložené v depozitári v Pezinku a za účelom určiť spôsob reštaurovania sa urobili stery a podrobili sa mikrobiologickému vyšetreniu. Identifikované boli druhy vlákňitých húb ako *A. fumigatus*, *A. restrictus*, *A. flavus* a *A. oryzae*. Obrazy boli následne dekontaminované a očistené (4).

Taktiež počas projektu KnihaSK bol uskutočnený prieskum prítomnosti mikroorganizmov (MO) v SNK v Martine a v Slovenskom národnom archíve v Bratislave. Sledovala sa kontaminácia baktériami a vlákňitými hubami zo starých kníh, jednotlivých tlačovín, časopisov, krabíc a grafických listov. Charakterizovaných bolo 30 baktérií z rodov *Proteus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Sarcina* a *Serratia*, a 40 vlákňitých húb z rodov *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Trichoderma*, *Chaetomium*. Najviac kontaminované priestory boli hlavne suterén a vstupné miestnosti (5).

Opakovaný a rozšírený prieskum sa konal v priestoroch SNM v Bratislave s cieľom skrínového hodnotenia mikrobiálnej kontaminácie. Až 141 zo 144 odobraných vzoriek bolo kontaminovaných, čo predstavovalo 97,92 %. Z výsledkov sa dalo usúdiť, že kontaminácia je veľmi intenzívna v 40 % prípadoch, množstvo kolónie tvorných jednotiek bolo nepočítateľných (KTJ) (6).

1.1 Charakterizácia najčastejšie sa vyskytujúcich vláknitých húb v priestoroch alebo na objektoch kultúrneho dedičstva

Cladosporium herbarum



Obr. č. 1: *Cladosporium herbarum*, 7 dní (7).

Tvorí zamatové, tmavo olivovo zelené kolónie, rastúce pomaly na SLA médiu približne 7 dní, pri 25 °C s priemerom 18-32 mm. Spodná strana kolónií je až miestami čierna. Konídie sú valcovité alebo elipsovité, svetlo hnedé s cca 8-15(-20) x 4-6 μm veľkosťou. Vyskytuje sa najčastejšie na substrátoch rastlinného aj živočíšneho pôvodu, v lete a na jeseň sa nachádza vo veľkom množstve v ovzduší. Môže poškodiť výrobky v chladiarenských boxoch, spôsobovať hniloby zeleniny a ovocia (7).

Vláknitá huba dokáže rásť v rozpätí troch teplotných bodoch:

- minimum (min.) – najnižšia teplota, pri ktorej sa VH ešte rozmnožuje zistiteľnou rýchlosťou,
- optimum (opt.) – VH sa rozmnožuje najväčšou rýchlosťou,
- maximum (max.) – najvyššia teplota, VH je schopná sa ešte rozmnožovať (8).

Tepelné minimum pre *Cladosporium herbarum* predstavuje - 6 °C, optimum 18 - 28 °C a maximum 32 °C. Produkcia mykotoxínov nebola zistená (7). Výskyt tejto vláknitej huby sa uvádza aj na papieroch, pergamenoch, koži, plastoch, textile a vosku (9).

Alternaria alternata

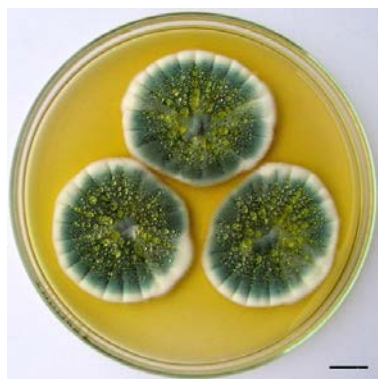


Obr. č. 2: *Alternaria alternata*, 7 dní (7).

Jej kolónie (7 dní, pri 25 °C, priemer 40-50 mm) tvoria jemne vlnivé až zamatové, tmavo červenoolivové zafarbenie, ktoré sú zo spodnej strany tmavo šedé až čierne. Jej teplotné minimum je -5 °C, optimum je 25 – 28 °C, maximum 36 °C. Konídie má tmavo pigmentované s veľkosťou 20 - 40 x 8 - 12 μm. Dobré sa jej darí v pôde, na potravinách a krmivách. Produkuje toxický

metabolit AAT (*Alternaria alternata* toxin, spôsobuje aj nepríjemné kožné reakcie (7). Najčastejšie sa zachycuje na papieroch, pergamenoch, textile a podobne ako *C. herbarum* (9).

Penicillium chrysogenum

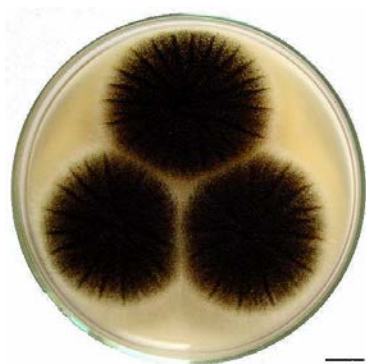


Obr. č. 3: *Penicillium chrysogenum*, 10 dní (7).

Po 7 dňoch, pri 25 °C jej kolónie dosahujú priemer až 30 - 45 mm. Tvorí biely až nažltlý myceliálny okraj, s modrozelenou až žltozelenou zafarbenou sporulujúcou časťou. Je známa produkciou žltého pigmentu do živného média a pomerne rýchlym rastom oproti iným druhom penicilií. Teplotné podmienky predstavujú: min. 4 °C, opt. 23°C, max. 37 °C. Je to pravdepodobne najčastejšie izolovaná vláknitá huba z archívov. Elipsovité, guľovité, hladké konídie majú veľkosť 2,5 - 4 μm.

Je známa kontamináciou rastlinných aj živočíšnych potravín, krmiva a rôznych surovín. Rastie aj na stenách a je pôvodcom rôznych typov mykóz u človeka, avšak dokáže produkovať antibiotikum penicilín (7). *P. chrysogenum* rastie predovšetkým na obaloch kníh a kartónov. Spóry často zamorujú prostredie a spôsobujú tak alergické reakcie (10).

Aspergillus niger



Obr. č. 4: *Aspergillus niger*, 5 dní (7).

Rýchle rastúca vláknitá huba, ktorá po 7 dňoch, pri 25 °C tvorí kolónie v priemere 40 - 60 mm hnedočervenej až čierne farby, hrubozrnitej formy, občasne produkujúce žltý pigment do agaru. Tepelné nároky pre *Aspergillus niger*: min. 6 - 8 °C, opt. 35 - 37 °C, max. 45 - 47 °C. Konídie má guľovité, s cca 3,5 - 5 µm v priemere.

Jej výskyt je známy najmä v teplejších oblastiach, na rozmanitých potravinách živočíšneho aj rastlinného pôvodu, produkuje mykotoxíny (7). Patrí medzi najčastejšie izolované huby z umeleckých predmetov, archiválií, kníh, papierov, pergamenov a pod. (9).

Trichoderma viride



Obr. č. 5: *Trichoderma viride*, 14 dní (7).

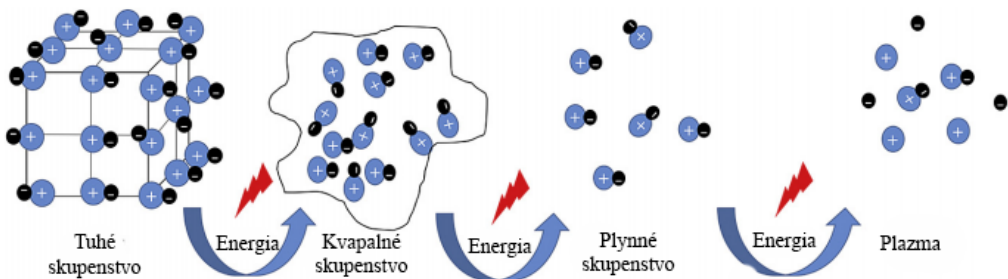
Riedke belavé mycélium dokáže v rýchлом čase narásť tak, že dokáže pokryť celú Petriho misku (7 dní, 25 °C), ďalšie štádium predstavuje tmavozelené sporulujúce mycélium. Teplotné nároky: min. 0 °C, opt. (6-) 20-28 (-32) °C a max. 30 (- 37) °C. Široko elipsovité, guľovité konídie tvoria 3,5 - 4,5 µm. Najčastejšie sa *T. viride* nachádza v pôde, taktiež na dreve, obilninách, zelenine a ovocí. Produkuje sekundárne metabolity, napr. mykotoxín trichoremin (7). Často jej rast môžeme

nájsť aj na substrátoch ako papier, koža, pergamen, povrch fotografií a pod. (9).

2 Plazma a jej účinky

2.1 Nízko-teplotná plazma

Vo všeobecnosti sa plazma považuje za čiastočne alebo plne ionizovaný plyn, obsahujúci ióny a elektróny, vykazujúc kvázineutralitu, tzv. približnú koncentráciu kladných i záporne nabitých častíc (11). Existujú dva druhy plazmy a to tepelná a nízko-teplotná.



Obr. č. 6: Schéma skupenských stavov hmoty. Keď sa energia zvyšuje, molekuly tuhej látky sa budú pohybovať, čím sa vytvorí tekutý stav. Ak sa úroveň energie zvýši, voľné molekuly sa rozptýlia a prenesú sa do stavu plynu. Napokon dostatok energie bude schopný rozdeliť molekuly plynu na voľné elektróny a ióny (12).

Nízko-teplotná plazma (NTP), je čiastočne ionizovaný plyn, ktorého celková teplota ostáva na nízkej úrovni a jeho energia je zložená prevažne z voľných elektrónov. Môže byť generovaná elektrickými výbojmi v plynoch pod nízkym tlakom alebo pri atmosférickom tlaku. Najčastejšie pri atmosfére prírodného alebo syntetického vzduchu, dusíka, kyslíka, vodíka, argónu, hélia alebo ich prímiesi. Plazma je vyfukovaná do voľného priestoru pomocou prietoku plynu, kde sa zmieša s atmosférou v okolí. NTP generovaná pri atmosférickom tlaku sa skladá z rôznych aktívnych látok – UV fotónov a častíc ako neutrálnych alebo excitovaných atómov a molekúl, záporných a kladných iónov, voľných radikálov a elektrónov. Najbežnejšími používanými formami sú:

1. aktívna forma molekuly a atómov kyslíka (atómový kyslík O, singletový kyslík $^1\text{O}_2$, superoxidový anión O_2^- a ozón O_3 ,
2. elektricky a vibračne excitovaný kyslík O_2 a dusík N_2 ,
3. reaktívne formy dusíka N, excitovaného dusíka N_2 a oxidu dusnatého NO^\bullet

4. V prítomnosti vlhkosti: voda H_2O^+ , OH^- anión, $\text{OH}\cdot$ radikál alebo hydrogén peroxid H_2O_2

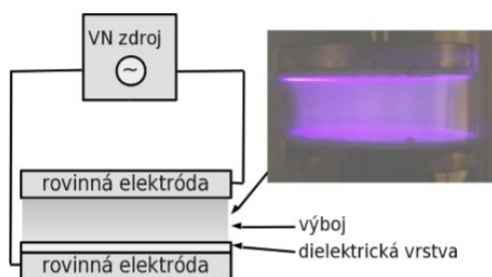
Dôležité je však zloženie a množstvo týchto látok, ktoré sa líšia od typu plazmového zdroja.

Elektrické výboje/zdroje, ktoré sú najčastejšie využívané pri NTP sú:

- dielektrický bariérový výboj,
- korónový výboj,
- mikrovlnné výboje,
- plazmový horák,
- gliding arc
- kometárny výboj (13, 14).

2.1.1 Dielektrický bariérový výboj (DBD)

Dielektrický bariérový výboj predstavuje striedavý prúd generovaný horiacim výbojom medzi dvoma elektródami umiestnenými blízko seba (vzdialenosť medzi elektródami je niekoľko milimetrov). Aspoň jedna elektróda je pokrytá pevným dielektrickým materiálom (plast, sklo). Kým korónový výboj sa aktívne objaví v blízkosti len elektródového bodu, DBD elektródy sú zvyčajne kovové dosky a preto je plocha plazmy rádovo väčšia a sila je obmedzená len pridávanie vysokého napätia (13, 15). Využíva sa hlavne na čerpanie CO_2 z excimérnych laserov a lúčov, a pri generovaní ozónu (16).



Obr. č. 7: Schéma zapojenia DBD výboja (11).

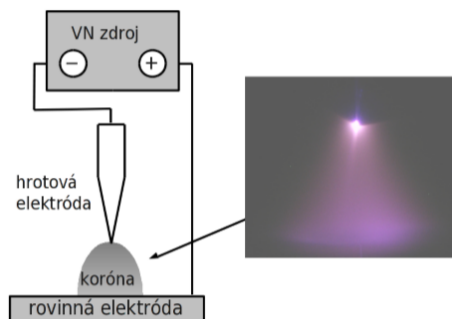
2.1.2 Korónový výboj

Korónový výboj je zvyčajne generovaný medzi dvoma elektródami s ostrými zakončeniami alebo drôtikmi s vysokým napätím. Elektrické pole vysokej intenzity je tvorené v blízkosti týchto bodov vďaka malému pomeru krivosti (13).

Pri korónovom výboji sa zvyčajne využíva usporiadanie elektród typu:

- hrot proti rovine (jedna elektróda je hrotová s malou ionizačnou oblasťou vysokej intenzity a druhú elektródu tvorí vodivý plochý materiál),
- hrot proti hrotu (medzi oboma hrotovými elektródami sa nachádza oblasť ionizácie, kde vzniknuté nabité častice reagujú s umiestnenými objektami do tejto oblasti).

Koróny podľa polarít rozlišujeme na kladné a záporné, kde pri kladnej koróne je napätie korónujúcej elektródy voči druhej elektróde kladné a pri zápornej je napätie elektródy voči druhej záporné (11).



Obr. č. 8: Schéma zapojenia korónového negatívneho výboja (11).

2.1.3 Mikrovlnový výboj (MD)

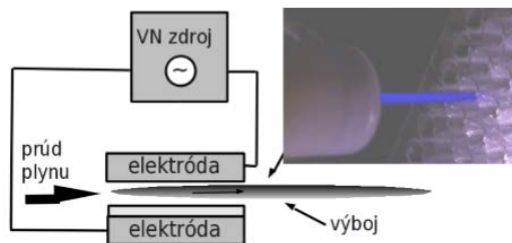
Elektromagnetické vlny s frekvenciou vyššou než stovky MHz sa vytvárajú pomocou mikrovlnového výboja. Výboj zvyčajne horí v krabici, kde sú vlny v rezonancii. Vzhľadom na nutnosť potrebného tienenia pre mikrovlnové zariadenie sa zdá byť menej dôležité v oblasti biotechnológií, no vo výskume v spojení s NTP s biomateriálmi, je často používaný.

MD predstavuje veľmi progresívny zdroj s konfiguráciou plazmového lúča pre lekárske účely (13), sterilizáciu biologických patogénov a priame čistenie povrchov (15).

2.1.4 Plazmový lúč/tryska

Plazmový lúč nepredstavuje „typ“ výboja, ale skôr konfiguráciou výbojov. Všeobecne platí, že aktívny región použitých výbojov vháňaných pomocou prúdiaceho pomocného plynu, ktorý ťahá častice mimo oblasť elektródy v ionizovanej vlne vytvára prúd aktívnych častíc horiacich ako slabý lúč.

Typy používaných plazmových zdrojov môžeme rozdeliť na plazmové pero, plazmovú ihlu či trysku. Pre jednoduchú konštrukciu a ľahkú údržbu sa väčšinou využíva na štúdium mikrobicídnych vlastností plazmy generovanej aj pri nízkom tlaku (13). Využitie nájde aj pri liečbe lokálnych živých tkanív (15).



Obr. č. 9: Schéma zapojenia plazmového lúča (11).

Ak zoskupíme viacero týchto plazmových trysiek, vznikne tzv. plazmová multitryska. Jej výhodou je zoskupenie množstva počtu trysiek, ktoré umožňujú ošetriť aj materiály s väčším rozmerom povrchu, avšak takéto opracovanie môže byť nehomogénne. Naopak, plazmová štrbinová tryska umožňuje homogénnu úpravu povrchov materiálov (17).

2.1.5 Kapacitný rádiovfrekvenčný výboj

ADRE plazma

„Atmospheric Discharge with Runaway Electrons (atmosférický výboj s unikajúcimi elektrónmi) je nízкотеплотná plazma, ktorá je generovaná pri atmosférickom tlaku. Množstvo rýchlych elektrónov s energiou 20 – 350 keV sa tvorí v medzielektródovom priestore a za anódou. „Prúd rýchleho elektrónového zväzku sa deteguje za anódou a ukazuje jasnú žiaru cez celý priestor. Pri náraste napäťového impulzu, 2 - 3 x, dochádza k zmene vyžarovania v priestore medzi elektródami“ (17).

Výhodou ADRE plazmy je jej vzdialenosť elektród, ktorá predstavuje zhruba 6 cm. Preto je najlepšie použiteľná pri sterilizácii materiálov, taktiež dokáže spracovávať hrubšie materiály. Jej výboj ničí anorganické a organické látky, vírusy, baktérie a taktiež huby (17).

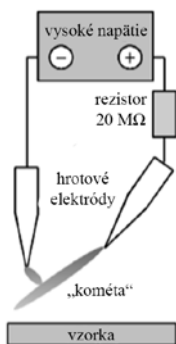
Prednosťami týchto druhov NTP plazmy je ich aktivácia a modifikácia povrchov materiálov, vytvrdzovanie nanosených vrstiev a tvorba vrstiev na povrchoch materiálov (hydrofóbne, hydrofilné, antibakteriálne a pod.) (17).

2.1.6 Tlecí výboj

Je typickým zdrojom termickej plazmy, ktorá sa v určitých podmienkach môže taktiež použiť pri NTP. Tento výboj horí medzi dvoma odlišnými elektródami fúkaného vstrekaného plynu. Výboj je iniciovaný v najužšej blízkosti elektródovej plochy a prúdiaci plyn je unášaný mimo rozbiehajúcu sa oblasť. Tlecí výboj kombinuje výhody tepelnej a netermálnej plazmy, pričom pri netermálna plazma si vyžaduje vyšší výkon (13).

2.1.7 Kometárny výboj

Pri tomto výboji vzniká medzi usporiadanými elektródami v tvare hrotu prúd reaktívnych častíc, ktorý pripomína tvar kométy. Tvorí sa za atmosférického tlaku vo vzduchu. Medzi dve hrotové elektródy sa vloží jednosmerné vysoké napätie tak, že časť kladnej elektródy je naklonená k zápornej, kde z kladnej elektródy prúdi prúd ionizovaných častíc a tak vytvára oblak nízkoteplotnej plazmy (11).



Obr. č. 10: Schéma zobrazenia aparatury kometárneho výboja (11).

Nízkoteplotná plazma sa mnoho rokov prevažne využívala na odstraňovanie plynných škodlivín, rozklad prchavých uhlíkovdík a NO_x v odpadových plynoch. V posledných rokoch sa jej využitie rozšírilo. Začína sa používať v oblasti biológie na deaktiváciu mikroorganizmov, taktiež v zdravotníctve, kde sa ukázala ako účinná pre dekontamináciu infikovaných povrchov od baktérií, mikroskopických húb, vírusov a biomolekúl, pre liečbu nádorových buniek, prevencie nozokomiálnych infekcií alebo pri liečbe infikovaných rán (18).

Pri úprave materiálu má NTP nasledujúce výhodné vlastnosti:

- nezvyšuje teplotu opracovaného materiálu a zanecháva len nízky počet reziduí,
- nízke prevádzkové a investičné náklady,
- lokálne ošetrovanie veľkých objektov, ktoré nie je možné umiestniť do uzavretého priestoru,
- skladovanie chemikálií nie je problematické (19).

2.2 Dekontaminačné účinky NTP

Mikrobiálna dekontaminácia je považovaná za rozklad alebo odstránenie mikroorganizmov (vírusov, baktérií, húb). Európska norma EN 12740 uznáva všetky biologické látky spôsobujúce infekcie, alergie alebo otravu ako mikroorganizmy. V tejto skupine sú taktiež zahrnuté viroidy, plazmidy a rastlinné a živočíšne bunky. Termín mikrobicídna metóda je definovaná aj pre sterilizáciu, dezinfekciu aj ako aseptické a antiseptické postupy.

Plazmová sterilizácia predstavuje jednu z najstarších a najlepšie preskúmaných aplikácií. Spôsob expozície môže byť priamy, kde je vzorka v priamom kontakte s plazmou alebo nepriamy, kde je vzorka umiestnená mimo dosahu plazmy. Časom sa testovali rôzne mikroorganizmy, rovnako aj použitie rôznych zdrojov plazmy, pracujúcich pri rôznych pracovných podmienkach, čo viedlo k premenlivým zloženiam mikrobicídnych činidiel (13). K deaktivácií spór prispievajú súčasne tri procesy:

- zvýšenie teploty,
- interakcia plazmových častíc so vzorkou,
- emisia UV žiarenia (15).

Hoci sterilizačný účinok môže byť spôsobený produkovaným UV žiarením, ktoré by mohlo narušiť genetický materiál, niekoľko štúdií ukázalo, že UV žiarenie produkované NTP nemá významnú úlohu pri inaktivácii mikroorganizmov. Zistilo sa, že reaktívne formy

v nízko-teplotných atmosférických plazmách sú založené na dusíku a kyslíku, vo forme atómového kyslíka, ozónu, oxidu dusíka a hydroxylov. Tieto aktívne druhy, by mali byť hlavným kľúčom v mikrobiálnom inaktivačnom mechanizme, pretože priamo interagujú s membránou bunky, hlavné chemické reakcie vedúce k produkcii reaktívnych druhov v atmosférických výbojoch plazmy sú uvedené v tab. č. 2. Tieto reaktívne druhy majú výraznejšie sterilizačné účinky na MO a chemické potenciály, ako bežné chemické činitele, ktoré dávajú plazme svoj potenciálny antimikrobiálny účinok (20).

Tab. č. 2: Možné chemické reakcie v atmosférickej plazme (20).

$e + O_2 \rightarrow 2O + e$
$O + O_2 \rightarrow O_3$
$O_3 + H_2O \rightarrow O_2 + H_2O_2$
$H_2O_2 \rightarrow 2 OH\cdot$
$e + H_2O \rightarrow H\cdot + OH\cdot + e$
$e + N_2 \rightarrow N\cdot + N\cdot + e$
$e + N_2 \rightarrow N_2\cdot + e$
$e + NO \rightarrow N\cdot + O\cdot + e$
$2H_2O \rightarrow H_2O_2 + H_2$
$OH\cdot, O_3 + M \rightarrow [\text{rozložený M}], \text{ kde M predstavuje makromolekulovú zlúčeninu.}$

2.2.1 Deaktivácia baktérií a kvasiniek

V roku 2001 bola prezentovaná prvá recenzia sterilizácie pomocou NTP Moisanom a i. Štúdie porovnávali niekoľko druhov baktérií (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) v rôznych druhov výbojov (DBD, MV) použitím rôznych plynov (vzduch, čistý Ar, O₂, CO₂ a zmesi N₂ / O₂, Ar / O₂) (1) a sledovali účinok plazmy na eróziu bunkových stien a spór (15).

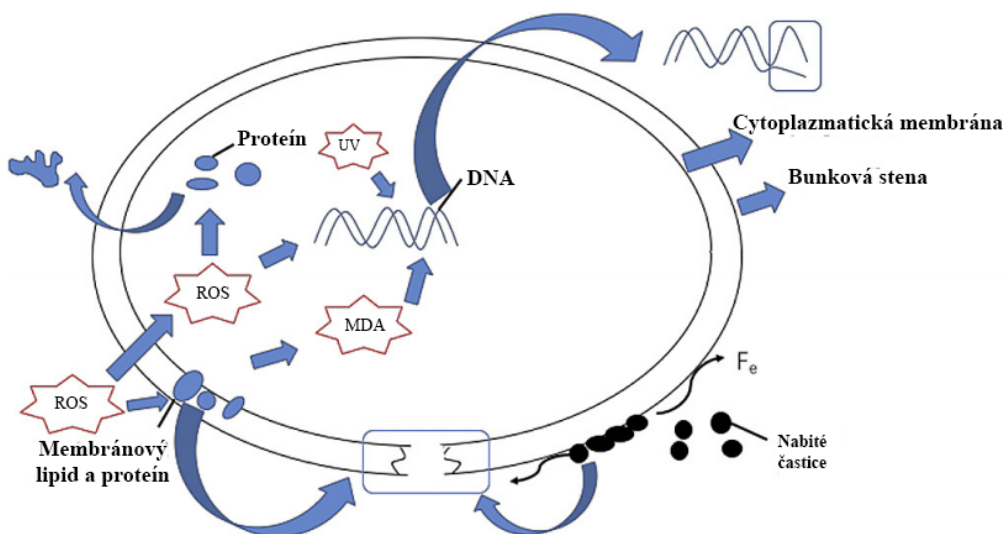
Testovanie NTP na citlivosť rôznych baktérií a kvasiniek generovanej negatívnym korónovým výbojom v režime „bod v rovine“ vykazovalo, že úplná devitalizácia baktérie *Escherichia coli* sa dosiahla v priebehu 120 sekúnd a *Staphylococcus epidermidis* behom 4 - 5 minút. Na druhej strane však kvasinka *Candida albicans* je vo vode menej citlivá a vyžaduje si 30 minút pôsobenia plazmy pre jej kompletnú inaktiváciu (21).

Mechanizmus baktericídnej inaktivácie pomocou NTP možno rozdeliť na biologické a fyzikálne aspekty.

Mechanizmus účinku

Poškodenie DNA pôsobením UV žiarenia

V počiatočnom výskume bolo poškodenie DNA priamo indukované UV žiarením produkovaným z plazmy. Je známe, že UV svetlo, najmä okolo 260 nm, môže viesť k reakcii tymínu a cytozínu v rovnakom reťazci DNA do diméru a poškodzuje tým tak reprodukčnú schopnosť baktérií. Avšak mnoho ďalších výskumov ukázalo, že sa nedosiahla ideálna dávka UV žiarenia pre deštrukciu buniek (12).



Obr. č. 11: Mikrobiálne inaktivačné mechanizmy NTP v biologických a fyzikálnych aspektoch (12).

Peroxidácia lipidov

Oxidačné poškodenie membrán alebo intracelulárnych zložiek (napr. DNA, proteínov, sacharidov, atď), môže byť považované za mechanizmus zabíjania baktérií pomocou NTP. Membránové lipidy, najmä polynenasýtené masné kyseliny (PUFA) sú najzraniteľnejšie kvôli ich umiestneniu v blízkosti povrchu bunky a ich citlivosti na reaktívny kyslík. Lipidová peroxidačná reťazová reakcia začína uvoľnením atómu H z PUFA pomocou ROS (reaktívny kyslík) za vzniku radikálu mastnej kyseliny. Nakoniec sa oxiduje na lipidový hydroperoxid (LOOH) O₂.

Autori v štúdiách navrhovali tézu, aby druhy ROS indukované plazmou nepôsobia len na bunkové membrány iba priamo, ale tiež cez vonkajšie membrány pôsobením s intracelulárnymi zložkami. Han a kol. navrhli rôzne mechanizmy vysokého napätia atmosférickej plazmy pôsobiacej na gramnegatívne a grampozitívne baktérie. ROS, pokiaľ sa jedná o gramnegatívne baktérie *E.coli*, by sa mohla dostať cez membránové lipidy prostredníctvom peroxidných reakcií. V prípade grampozitívnych baktérií *S. aureus*, by ROS sa dostali cez membránu aktívnych buniek a indukovali by oxidačné poškodenie intracelulárnych zložiek (21).

Modulácia proteínov

Modifikácia a degradácia membránových proteínov po plazmovej expozícii môže byť spôsobená hydroxylovými radikálmi generovanými NTP plazmou, avšak žiadna DNA alebo cytoplazma tak nebola poškodená. Ošetrovanie plazmou dokáže pozmeniť 3D štruktúru proteínov bez štiepenia peptidovej väzby a ničí štruktúru 2D polypeptidu (12).

Fyzikálne mechanizmy

Elektrostatické narušenie

Predstavuje najznámejší fyzikálny mechanizmus pôsobenia NTP. Elektrostatické sily spôsobené akumuláciou nabitých častíc generovaných z plazmy spôsobujú narušenie bunkových membrán a následne smrť bunky. Elektrostatické odpudenie generované bombardovaním nabitých častíc na povrch bunky by sa malo dostať cez pevné bunkové steny, pretože elektrostatická sila, prekonáva pevnosť v ťahu a bunková stena sa stáva nestabilnou a ľahko popraská (12).

Elektroporácia

V nepriamom režime sa vzorky vo všeobecnosti nachádzajú ďaleko od plazmy a generovaného elektrického prúdu, preto slabé napätie elektrického poľa neprichádza do úvahy pri antimikrobiálnych účinkoch. Naopak, priamy režim poskytuje dostatočne veľkú silu elektrického poľa pôsobiaceho na mikroby, ktoré sa vložia do oblasti plazmového výboja. Tvorba pórov v bunkových membránach tak vedie k úniku obsahu a nakoniec bunkovej smrti (12).

2.2.2 Deaktivácia húb a kvasiniek

Vláknité huby sú všadeprítomné v prírode. Predstavujú potenciálne nebezpečenstvo nielen pre človeka (najmä so zníženou imunitou), ale aj pre rastliny a živočíchy.

V porovnaní s baktériami reakcia vláknitých húb s NTP nie je zatiaľ skúmaná, no zdá sa, že NTP má veľký potenciál pre dekontamináciu húb z hľadiska bezpečnosti pre životné prostredie a ľudské zdravie. Prvá podrobná štúdia sa zaoberá povrchovej dekontaminácie prostredníctvom NTP vláknitých húb *A. niger* a kvasinky *C. lipolytica* bola publikovaná Akishev et al. Spóry *Aspergillus* alebo bunky *Candida* boli rozotreté na povrch testovacieho média a umiestnené do prúdu atmosférickej plazmy so zmesou plynov ($N_2 + O_2$), pozoroval sa vznik inhibičnej zóny veľkosti 30 - 40 mm po dobu pôsobenia 30 - 60 sekúnd.

Zatiaľ čo neboli spozorované žiadne rozdiely v citlivosti u baktérií, citlivosť húb zjavne závisí od druhu. Úplná inkativácia u baktérií sa dosiahne po 2 - 4 minútach expozície, zatiaľ čo inaktivácia húb prebieha počas 20 - 30 minút v závislosti od druhu huby a pri kvasinkách je to 6 minút. Toto však platí len pre korónové výboje. Vo všeobecnosti sa dá teda povedať, že účinnosť inaktivácie húb je najmä závislá na zdroji plazmy a jeho prevádzkových podmienkach, pretože štruktúra buniek húb je zložitejšia ako bakteriálna (13).

2.2.3 Deaktivácia vírusov

Letálny účinok plazmy na vírusy preukázal Venezia a i. (2008) a Yasuda a i. (2010). Popísali účinok netermálnej plazmy na DNA vírusy. Mnoho ďalších autorov preukázalo, že NTP pri atmosférickom tlaku sa javí ako účinná metóda pre dezinfekciu a čistenie znečistených plôch (13).

2.2.4 Deštrukcia biofilmov

Biofilmy sú štruktúrované spoločenstvá mikroorganizmov vyznačujúcich sa tým, že bunky sú nenávratne pripojené k substrátu alebo k sebe, uložené v matici extracelulárnych polymérnych látok, produkovaných bunkami. Vykazujú zmenený fenotyp vzhľadom na rast a rýchlosť transkripcie génov (13).

2.3 Použitie NTP v oblasti kultúrnych objektov

Aplikácie NTP v oblasti zachovania kultúrnych objektov sú datované už z osemdesiatych rokov dvadsiateho storočia, kedy sa NTP s prídavkom vodíka javila ako vhodná metóda na obnovu daguerrotypií, poškodených strieborných predmetov a skorodovaných kovových artefaktov (medené zliatiny najmä z bronzu (22, 23). Experimentálne zariadenie postavené podľa návrhu prof. Vepčeka sa naďalej zdokonaľovalo a slúžilo na ochranu archeologických artefaktov. Výsledky ukázali, že po ošetrení plazmou došlo k poklesu kyslíka a chlóru, (chloridové ióny sú hlavnými prostriedkami korózie), čo dokazuje správne použitie plazmy pri ochrane artefaktov (23).

Účinky korónového výboja taktiež vykazuje dobré výsledky. Korónový výboj kedysi skúmali Gassan a i. pri aplikácii na jutové vlákna. Vďaka tejto úprave dosiahli nárast polárnych zložiek voľnej povrchovej energie. Neskôr skúmali aj priadze. Pevnosť vlákien poklesla poklesla, ale naopak Youngov modul pružnosti v ťahu sa zvýšil o 15 %.

Pizzi a i., ktorí skúmali vplyv použitia korónového výboja na ľanovú rohož, zistili, že zvýšiť drsnosť povrchu sa zvyšuje. Zlepšuje sa modul pružnosti v ťahu a ohybe, a ich výskum preukázal, že na zlepšujú aj adhézie počas krátkej časovej úpravy (5 min) (24).

Čistenie historických kamenných objektov vždy predstavovalo náročnú úlohu, pri ktorej vznikali nové problémy ako odstrániť dlhoročné zachované polymérne vrstvy a zároveň sa vyhnúť ďalšiemu poškodeniu. Keďže metódy boli prevažne založené na chemických bázach, zaoberali sa potenciálom čistiacej techniky atmosférickej plazmy pre odstraňovanie polymérov (epoxidových, akrylátových a siloxánových). Výskum ukázal, že DBD výboj nie je účinný. Naopak, odstraňovanie epoxidových a akrylátových povrchových náterov pomocou progresívnej oxidácie zosieťovaných polymérov, zabezpečil oblúkový výboj (25).

2.4 Sterilizácia a dezinfekcia papierových nosičov plazmou

Archívne a knižničné fondy, predstavujú z hľadiska materiálového zastúpenia rôznorodú škálu obsahujúcu papier, pergamen, kožu, textil, fotografie, lepidlá a voskové pečiatky sú vďaka svojmu zloženiu ľahko infikované mikroorganizmami, zvlášť v podmienkach s vysokou

vlhkosťou. Mikroorganizmy svojou metabolickou činnosťou môžu, spôsobiť zmenu farby, nepríjemný zápach, rozklad alebo zníženie pevnosti papiera. Taktiež spôsobujú vážne zdravotné riziká pre pracovníkov v kontakte s kontaminovaným materiálom, medzi ktoré sú najčastejšie zahrnuté respiračné a infekčne ochorenia, alergie a mykózy a podobne.

Pri dezinfekcii kníh sa veľký dôraz kladie na praktickú aplikáciu chemickými metódami, využívajúc chemické látky, t.j. alkoholy, fenoly, aldehydy a povrchovo aktívne látky. Bežne používanou dezinfekčnou metódou je aplikácia etylénoxidu alebo formaldehydu, gama a ultrafialové žiarenie. Vzhľadom na karcinogénne účinky etylénoxidu a k výraznému poklesu pevnosti a zmeny papiera po ožiarení budú postupne nahrádzané v Európskej únii (26).

V súčasnosti s rastúcou obavou o zdravie a bezpečnosť sa skúma čoraz viac nových alternatívnych metód. Jednou z výhodných novodobých techník v oblasti obnovy pamiatok, môže byť pôsobenie plazmy, ktorá je bežne využívaná v procesoch ako je plazmové čistenie, leptanie a podobne.

NTP sa využíva aj v procese dezinfekcie, ktorá má však okrem dezinfekčných účinkov aj vplyv na povrchové vlastnosti materiálov nielen na báze celulózy. Hlavným cieľom je odstránenie fungálnej kontaminácie v kombinácii so zvýšením pevnosti papiera po použití NTP. Tento proces je bezpečný pre odborných pracovníkov, konzervátorov a reštaurátorov a životné prostredie.

Súčasný experimenty sa zameriavajú na špeciálne plazmové reaktory, aby sa zaoberalo s papierom šetrne. Ukázalo sa, že pozitívny vplyv na stabilitu papiera (až 20 %, avšak závisí na druhu papiera), bol dosiahnutý rôznymi parametrami plazmového ošetrenia ako prietok, tlak, energia, čas (22, 27).

Súčasný stav využitia/aplikácie NTP na dezinfekciu papierových nosičov je v štádiu výskumu. Príkladom účinnej aplikácie NTP na ošetrenie papiera je after-glow plazma, ktorej experimentálna zostava sa skladá z dvoch tzv.komôr. Horná komora bola navrhnutá ako kapacitne rovinný reaktor a horná elektróda je spojená s 1356 MHz s rádiovým vysielateľom ENI OEM 25 a prívodom plynu. Tu sa môže papier priamo ošetriť v plazmovej zóne pôsobením systému tokov plynu. Alebo nepriamo, kedy je papier uložený v dolnej komore. Platí však podmienka, že čím je väčší papier, tým môže viac negatívne ovplyvňovať podmienky prietoku plynu. Najlepšia možná veľkosť je DIN A4 (22).

Ako ďalší účinný zdroj NTP bol použitý vysokofrekvenčný viacbodový korónový výboj v uzavretom zariadení. Prehľad doterajších zistení poznatkov vo výskume v tejto oblasti je

zosumarizovaný v tab. č. 3. Uvádajú sa druhy a podmienky plazmovej úpravy, druh mikroorganizmov a zhodnotili sa výhody a nevýhody sledovaných procesov.

Pri sledovaní inaktivácie mikrobiálnej kontaminácie sa najčastejšie vyberajú spóry *Bacillus subtilis* a *Aspergillus niger*, ktoré sú dobre známe a obzvlášť odolné a všadeprítomné. Ďalším MO je *Trichoderma longibrachiatum*, ktorá rozkladá celulózu a spolu s *Aspergillus niger* sa najviac nachádza v znečistených knihách. NTP mala najlepšie devitalizačné účinky na MO ako *Chaetomium elatum*, *Chaetomium murorum*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Penicillium chrysogenum* (huby) a baktérie ako *Psychrobacillus psychrodurans*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. pasteurii*, *S. succinus* (26).

Za účelom zistenia zvýšenia alebo zníženia pevnosti papiera po ošetrovaní plazmou sa prevažne meria pevnosť papiera v ťahu, ktorý bol po ošetrovaní skladovaný v klimatických podmienkach a to pri RH 15 % a 20 °C, použitím metód merania indexu ťahu, napätia pri pretrhnutí a ťahovej energie (22).

Tab. č. 3: Prehľad výsledkov výskumu NTP plazmy na dezinfekciu papierov (22, 26, 28, 14, 19).

autor	druh plazmy	atmosféra plynov	podmienky ošetrenia plazmou	materiál	mikroorganizmy	výhody (V) a nevýhody (N) V/N
Vohrer a kol. (22)	priama plazmová zóna	O ₂	* 100-500 W * 60 min * 0,177-0,89 mbar	drevitý papier (60 cm ²)	* <i>Bacillus subtilis</i> , * <i>Aspergillus niger</i> , * <i>Micrococcus luteus</i> , * <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	V: *inaktivuje veľkú škálu MO na polymérnych substrátoch N: *leptá polymérny substrát (najmä celulózu) *môže meniť povrch celulózy počas ošetrenia plazmou, ako aj drasticky klesá pevnosť v ťahu *leptá papier na okrajoch dokumentov *mení farbu atramentu

Vohrer a kol. (22)	priama plazmová zóna	H ₂	* 100-500 W * 60 min * 0,177-0,89 mbar	drevitý papier (60 cm ²)	* <i>Bacillus subtilis</i> , * <i>Aspergillus niger</i> , * <i>Micrococcus luteus</i> , * <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	V: *najmenej výrazná degradácia papiera N: *menej účinný ako O ₂
Vohrer a kol. (22)	after glow	O ₂ + H ₂	* 300-1000 W * 20 min * 0,177-0,89 mbar	drevitý papier (60 cm ²)	* <i>Bacillus subtilis</i> , * <i>Aspergillus niger</i> , * <i>Micrococcus luteus</i> , * <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	V: *inaktivácia mikrobiálnej kontaminácie
Vohrer a kol. (22)	after glow	H ₂	* 300-1000 W * 20 min * 0,177-0,89 mbar	drevitý papier (60 cm ²)	* <i>Bacillus subtilis</i> , * <i>Aspergillus niger</i> , * <i>Micrococcus luteus</i> , * <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	V: *zlepšenie mechanických vlastností *20 % zvýšenie stability papiera
Pietrak a kol. (26)	vysoko-frekvenčný viacbodový korónový výboj	N ₂	* 14-16 kV * 0,5 mA * 7-8 W * 130kHz * komora: 23 cm * 30 min	poškodené historické knihy	*stery z kníh a následná identifikácia	V: *lepšia pre baktérie *nemení pH N: *žltnutie papiera

Vrajová a kol. (28)	atm. tlak DBD	N ₂	vzdialenosť medzi elektródami: * 4 mm * 6kHz * prietok: 3 slm * príkon: 1083 mWcm ⁻³ * 180 s	Whatman 1	* <i>Aspergillus niger</i> F8189	V: *lepšia inkativácia MO ako He
Vrajová a kol. (28)	DBD	He	vzdialenosť medzi elektródami: * 10 mm * 516 mWcm ⁻³ * 180 s	Whatman 1	<i>Aspergillus niger</i> F8189	N: *iba pri vyššom výkone (zvýšenie intenzity O a OH) V: *nezhoršuje žltnutie papiera
Vrajová a kol. (28)	DBD	Ar	vzdialenosť medzi elektródami: * 4 mm * 6kHz * príkon: 305,6 mWcm ⁻³ * 180 s	Whatman 1	* <i>Aspergillus niger</i> F8189	V: *lepšie sterilizačné účinky ako He a N ₂ *nezhoršuje žltnutie
Yu a kol. (14)	plasma brush	Ar	* 1-5 min *3500 cm ³ /min *pod 1 atm	P5 filtračný papier	* <i>Escherichia coli</i> * <i>Micrococcus luteus</i>	V: *vhodnejší pre grampozitívne baktérie (<i>M.luteus</i> : nemajú vonkajšiu membránu)

Valentová (19)	teslov transformátor (korónový výboj)	O ₂ + N ₂	*130 kHz *40 V *0,7 A *0, 10, 20, 30 min	Whatman 1	* <i>Aspergillus</i> <i>bsariliensis</i>	N: *nízka dezinfekcia *znižovanie polymerizačného stupňa aj u neošetrených vzoriek spoločne uložených s ošetrenými
-----------------------	--	---------------------------------------	---	-----------	---	---

Zoznam použitej literatúry

1. **Moisan, M. - Barberau, J. - Moreau, J. a i.** Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, vol. 226, p. 1-21.
2. **Machariková, M. - Lisalová M.** Detekcia kontaminácie - dôkaz prítomnosti mikroskopických húb, odbery, kultivácia, identifikácia. *Knižnica*. Ročník 6, 2005,3.
3. **Híreš, O.** Metódy identifikácie biologickej kontaminácie knižničných dokumentov. *Diplomová práca*. Bratislava: Slovenská technická univerzita, 2014.
4. **Kližanová, H. - Krištofiková, E. - Vizárová, K.** Boli to plesne ? - interdisciplinárna spolupráca pri záchrane štyroch obrazov z kaštieľa Veľké Leváre. *Zborník príspevkov z konferencie CSTI 2015*.
5. **Rosenberg, M. - Krištofiková, E. - Vollek, V. a i.** *Mikrobiálne osídlenie vo vybraných priestoroch SNK v Martine a SNA v Bratislave: výskumná správa*.
6. **Vizárová, K. - Jablonský, M. - Hanus, J. a i.** *Opakovaný a rozšírený prieskum mikrobiálnej kontaminácie v priestoroch SNM: výskumná správa*.
7. [Online] [Dátum: 8. máj 2017]
<http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/cla.htm>
8. **Hudecová, D. - Šimkovič, M.** *Mikrobiológia*. Bratislava : STU, 2011. ISBN 97880227360089.
9. **Gallo, F.** *Biological factors in deterioration of paper*. Roma: ICCROM, 1985, p-115.
10. **Fassatiová, O.** Micromycetes in archives and book depositories in the Czech Republic. *Czech Mycol.* 1995, vol. 1, 48.
11. **Scholz, V.** Mikrobicídne vlastnosti nízkoteplotnej plazmy. *Habilitačná práca: Praha, VŠCHT 2013*.
12. **Xinyu, L. a i.** Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: *A review. Food control*, 75, p. 83-91.
13. **Scholtz, V. - Pazlarova, J. - Souskova, H. a i.** Nonthermal plasma — A tool for decontamination and disinfection: *Biotechnology Advances*, Volume 33, Issue 6, Part 2, 1 November 2015, p. 1108-1119, ISSN 0734-9750.
14. **Yu, Q. S. - Huang, C. - Hsieh, F. a i.** Bacterial Inactivation Using a Low-Temperature Atmospheric Plasma Brush Sustained With Argon Gas: *Journal of Biomedical Materials REsearch Part B: Allpied Biomaterials*. 2006.
15. **Rossi, F. - Kylián, O.** *Sterilization and decontaminattion of surface by plasma discharges Woodhead Publishing limited*, 2012.
16. **Michal, H.** Úprava vlastností aglomerovaných lignocelulózových materiálov účinkom. *Bakalárska práca*, Bratislava: Slovenská technická univerzita, 2008.
17. **Fančovičová, J.** Príprava ochranných povlakov na povrchoch lignocelulózových materiálov pomocou nízkoteplotnej atmosférickej plazmy. *Dipolomová práva*, Bratislava: Slovenská technická univerzita, 2015

18. **Hozák, P.** Plazmo-chemické procesy a dekontaminační vlastnosti plazmatu generovaného Teslovým transformátorem: *Organizace Studentské vědecké konference*. Praha, 2014.
19. **Valentová, M.** Vliv nízkoteplotního plazmatu na vlastnosti lignocelulósových materiálů: *Bakalářská práce*. Praha: VŠCHT, 2016.
20. **Korachi, M. - Aslan, N.** Low temperature atmospheric plasma for microbial decontamination: *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. *Formatex*, p. 453-459 2013.
21. **Scholtz, V. - Julák, J. - Kříha, V.** *The Microbicidal Effect of Low-Temperature Plasma Generated by Corona Discharge: Comparison of Various Microorganisms Surface or in Aqueous Suspension*.
22. **Vohrer, U. - Trick, I. – Bernhardt, J. a i.** Plasma treatment — an increasing technology for paper restoration? *Surface and Coatings Technology*, 2001, vol. 142–144, p. 1069-1073, ISSN 0257-8972.
23. **Fojtíková, P. - Sázavská, V. - Mika, F. a i.** Effect of Hydrogen Plasma on Model Corrosion Layers of Bronze: *Journal of Physics, The International Workshop and Summer School on Plasma Physics*, 2012. Brno.
24. **Demková, E.** Plazmochemická úprava přírodních vláken. *Bakalářská práce*, Vysoké učení technické, Brno, 2015.
25. **Voltolina, S. - Nodari, L. - Aibéo, C. a i.** Assessment of plasma torches as innovative tool for cleaning of historical stone material: *Journal of Cultural Heritage*, 2016.
26. **Pietrzak, K. - Otlewska, A. – Danielewicz, D. a i.** Disinfection of archival documents using thyme essential oil, silver nanoparticles misting and low temperature plasma. *Journal of Cultural Heritage*, 2016.
27. **Laguardia, L. a i.** Investigation of the effects of plasma treatments on bioteriorated ancient paper: *Applied Surface Science*, 2005, vol. 252, p. 1159-1166.
28. **Vraňová, J. - Chalupová, L. - Čech, J. a i.** Paper sterilization by atmospheric pressure DBD discharge: *Chemické Listy*, 102, s 1445-1449, Brno.
29. **Lojewska, J:** *Cellulose oxidative and hydrolytic degradation: In situ FTIR approach*, *Polymer Degradation and Stability*, 2005, vol. 88, p. 512-520..
30. **Pervez, M.R.** Plasma Based Sterilization: Overview and the Stepwise Inactivation Process of Microbial by Non-thermal Atmospheric Pressure Plasma Jet. *International Journal of Engineering & Technology IJET-IJENS*, 2014, vol:14, No:05.
31. **LIU, D. X. - LIU, Z. C. - CHEN, C. a i.** Aqueous reactive species induced by a surface air discharge: Heterogeneous mass transfer and liquid chemistry pathways. *Scientific Reports*, 2016, vol. 6 .

