

Plazma a živé organizmy

Zdenko Machala

Oddelenie fyziky životného prostredia, Katedra astronómie, fyziky Zeme a meteorológie, Fakulta matematiky, fyziky a informatiky, Univerzita Komenského, Mlynská dolina, 84248 Bratislava

Článok sa venuje interakcii studenej plazmy so živými organizmami, predovšetkým jej aplikáciám na bio-dekontamináciu. Popisuje výsledky bio-dekontaminácie v troch typoch jednosmerných elektrických výbojov pri atmosférickom tlaku vo vzduchu a vode. Pomocou elektrickej a optickej diagnostiky, porovnávania efektov výbojov a priameho i nepriameho pôsobenia plazmy na mikroorganizmy, bol identifikovaný vplyv reaktívnych kyslíkových častíc ako dominantný mechanizmus bio-inaktivácie. Článok načrtá aj rôzne biomedicínske aplikácie plazmy tvoriace základ novej vednej disciplíny – plazmovej medicíny.

PLAZMA

Úvod

Plazma sa považuje za štvrté skupenstvo hmoty. Ide o čiastočne alebo úplne ionizovaný plyn, kde platí podmienka kvázineutrality, tzn. že počet kladných a záporných nábojov je približne vyrovnaný a plazma je navonok elektricky neutrálna, a podmienka kolektívneho správania, tzn. že kladné a záporné náboje sa navzájom ovplyvňujú a tienia. Vzhľadom na hustotu častíc, ktorá závisí od tlaku a teploty, tu záleží na vonkajších rozmeroch plazmy, ktoré musia byť dostatočné na to, aby sa náboje mohli navzájom tieniť. Toto kritérium sa nazýva aj Debyeovo tienenie a vzdialenosť, na ktorú sa náboje tienia, sa nazýva Debyeova dĺžka [1].

Hoci sa plazma vo vesmíre hojne vyskytuje, v článku sa podrobnejšie venujem interakcii plazmy a živých organizmov, pôjde o plazmu generovanú v laboratóriu, zvyčajne pri atmosférickom tlaku (p_a).

Generácia plazmy

Existujú dva prístupy ako ionizovať plyn, a tým vytvoriť plazmu v laboratórnych podmienkach. Prvý spôsob je termická ionizácia – čiže zohriatie plynu na vysokú teplotu, aby pri vzájomných zrážkach molekúl (atómov) plynu dochádzalo k ionizácii. K tomu dochádza až pri teplotách niekoľkých 1000 K. Žiadny živý organizmus, ani väčšina materiálov takú vysokú teplotu neznesie, preto sa týmto prístupom nebudem zaoberať.

Druhý spôsob je ionizácia pomocou elektrického poľa. Pri naložení vonkajšieho poľa sa nabitie častice začnú pohybovať zrýchleným pohybom. Elektróny majú voči všetkým ostatným časticám omnoho menšiu hmotnosť (rádovo 10^4 -krát), preto omnoho rýchlejšie reagujú na vonkajšie pole a rýchlo dosiahnu vysoké kinetické energie, zatiaľ čo ostatné častice sa len pomaly rozbiehajú. Rýchle elektróny sa často zrážajú s inými časticami plynu, obzvlášť pri p_a , kde je vysoká zrážková frekvencia. Pri zrážkach ionizujú neutrálne častice, a tým vznikajú ióny a ďalšie elektróny, ktoré opäť získavajú kinetickú energiu od poľa a ionizujú ďalšie častice. Tento rýchlo sa šíriaci pro-

ces sa nazýva elektrónová lavína a je základom pre vznik plazmy.

Okrem toho nepružné zrážky elektrónov s časticami plynu vedú aj k vzбудeniu (excitácii) častíc, čím vznikajú radiačné stavy vedúce k vyžarovaniu fotónov a metastabilné stavy, ktoré slúžia ako rezervoáre energie. Zrážkami s elektrónmi dochádza tiež k disociácii molekúl, čím vznikajú chemicky nerovnovážne fragmenty molekúl – radikály. Tieto ďalej reagujú navzájom a s prítomnými iónmi, excitovanými časticami a elektrónmi. V plazme tak vzniká ohromné množstvo vzájomných interakcií, ich popis a kinetika sa venuje plazmochémii. Práve toto reaktívne prostredie je zodpovedné za zaujímavé účinky plazmy a umožňuje jej použitie napr. na čistenie plyných exhalátov a vody, alebo pre biologickú dekontamináciu.

Elektrické výboje

Pri generácii plazmy vonkajším elektrickým poľom hovorme o elektrických výbojoch. Tieto môžu byť jednosmerné (DC), striedavé (AC) alebo pulzné, podľa aplikovaného napätia na elektródach. Podľa frekvencie môžu AC výboje byť až v rádiovýfrekvenčnej (RF) a mikrovlnnej (MW) oblasti – v týchto prípadoch už nie je nutná priama prítomnosť elektród a plazma sa generuje bezkontaktné, čo má výhody pri aplikáciách. Podľa konfigurácie elektród môže byť elektrické pole homogénne (rovinné elektródy) alebo nehomogénne (napr. hrot-rovina či koaxiálne usporiadanie vytvárajú nehomogénne pole typické pre korónový výboj). Výboje s dielektrikami na povrchu elektród alebo medzi nimi – tzv. dielektrické bariérové výboje (DBD), vyžadujú striedavé alebo pulzné napájanie, využívajú opakované nabíjanie povrchu dielektrík, a tým vznikajúce zosilnenie elektrického poľa potrebné pre ionizáciu.

Pri atmosférickom tlaku sa významne uplatňuje tzv. streamerovský mechanizmus vzniku výboja, ktorý je základom koróny, iskry i DBD. Streamery, alebo ionizačné vlny, sú rýchlo expandujúce elektrónové lavíny, ktoré sa šíria do priestoru procesom fotoionizácie, až vytvoria vodivostný kanál medzi elektródami. Všetky spomínané výboje, okrem oblúka, generujú nerov-

novážnu (netermickú, studenú) plazmu, kde je teplota (čiže kinetická energia) elektrónov oveľa vyššia ako teplota plynu, $T_e \gg T_g$. Práve takáto studená plazma sa dá najlepšie využiť pri pôsobení na organizmy.

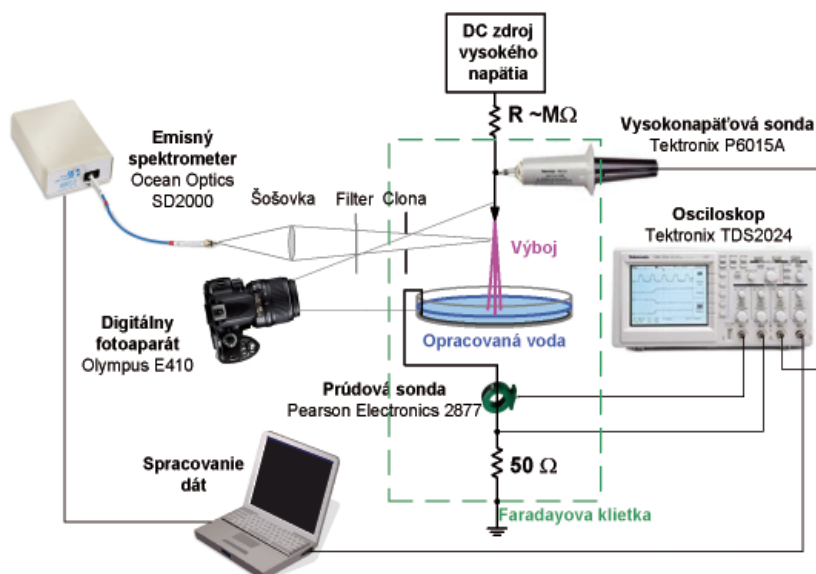
Čo však majú živé organizmy spoločné s plazmou? Je pravdepodobné, že život na Zemi vznikol v morskej vode pri bleskovej činnosti, keď z anorganických zložiek vznikala organická hmota, z ktorej neskôr vznikali prvé bielkoviny – základné stavebné látky buniek. Prvý slávny laboratórny experiment tohto druhu vykonal Miller (1953), keď v iskrovom výboji syntetizoval organické látky v anorganickej atmosfére [2]. Podobnú syntézu organických látok z anorganickej plynnej zmesi N_2 - CO_2 - H_2 sme previedli aj u nás [3].

PLAZMA A MIKROORGANIZMY – BIO-DEKONTAMINÁCIA

V tomto článku však chcem poukázať hlavne na to, že interakcia studenej plazmy s organizmami môže byť užitočná. Predovšetkým sa venujem nebezpečným mikroorganizmom. Ide o vírusy, baktérie a ich rezistentné formy života – spóry, sinice, plesne a spoločenstvá mikroorganizmov vytvárajúce biofilmy, ktoré spôsobujú kontamináciu vody a vzduchu, potravín, medicínskych nástrojov a prístrojov, spôsobujú rôzne nákazy a choroby, často epidémie, ale aj napr. zubný kaz. Niektoré z nich môžu byť potenciálnym nástrojom bioterorizmu, napr. Anthrax. Preto je všeobecným záujmom ich ničiť – sterilizovať, resp. dezinfikovať. Sterilizácia znamená úplné zničenie mikroorganizmov, v praxi aspoň šesť rádový pokles ich populácie [4]. Toto prísne kritérium berie do úvahy, že mikroorganizmy majú vysokú reprodukčnú schopnosť, za vhodných podmienok sú niektoré baktérie schopné zdvojnásobiť populáciu už za 20 minút. Dezinfekcia označuje čiastočné zníženie ich populácie. Oba tieto termíny budem ďalej nazývať všeobecne bio-dekontaminácia.

Klasické metódy sterilizácie sa zakladajú na suchom alebo vlhkom teple, napr. medicínske nástroje sa bežne sterilizujú autoklávom, kde sa mikróby ničia pri teplote cca $120^\circ C$ a tlaku $p = 1,2 \text{ atm}$ po dobu 20-30 min. Niektoré citlivé medicínske prístroje a pomôcky však pri tomto spôsobe podliehajú degradácii materiálu, napr. plastové katétre, endoskopy a iné, čím sa znemožňuje ich viacnásobné použitie. Problém predstavuje aj dezinfekcia prístrojov a medicínskeho prostredia, napr. interiéru nemocníc, operačných sál a pod. Takisto nie je možné teplom sterilizovať potraviny bez toho, aby stratili svoju nutričnú hodnotu. Iné spôsoby sterilizácie a dezinfekcie sú chemické (napr. použitie konzervačných látok pre uchovanie potravín, dezinfekcia pitnej vody chlóróm či ozónóm), alebo radiačné (dezinfekcia ultrafialovým žiarením). Preto má zmysel hľadať nové alternatívne spôsoby bio-dekontaminácie nespôsobujúce degradáciu materiálov a nežiaduce vedľajšie účinky chemikálií. Plazma a elektrické výboje tu predstavujú veľký aplikačný potenciál.

Bio-dekontaminácia sa v elektrických výbojoch dosahuje vďaka generovaniu plazmy vhodných vlastností na iniciovanie rôznych plazmochemických, najmä oxidačných procesov. Studenú plazmu generovanú elektrickými výbojmi pri p_a dnes využívajú aj mnohé environmentálne a priemyselné aplikácie [5, 6]. Vďaka nerovnovážnym podmienkam prebiehajú v plazme procesy ionizácie, excitácie, disociácie a ná-

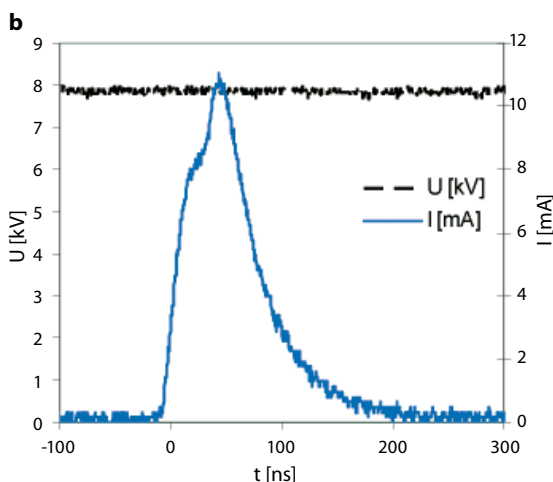


Obr. 1 Schéma základnej experimentálnej aparatury na testovanie biologických účinkov DC výbojov a ich elektrickej a optickej diagnostiky.

sledné plazmochemické reakcie pri pomerne nízkej teplote plynu. Tak vznikajú voľné elektróny a ióny, ktoré získavajú energiu z elektrického poľa, excitované častice, ktoré sú zdrojom žiarenia plazmy (napr. UV), alebo uskladňujú energiu, a napokon radikály (napr. OH, HO_2 , O, H, N, NO). V porovnaní s konvenčnými metódami sterilizácie teplom, či s UV ožarovaním alebo ozonizáciou, dosahuje plazma elektrických výbojov často vysoké účinnosti v krátkych časoch opracovania. Je to vďaka synergii efektov tepla, UV žiarenia, reaktívnych neutrálnych i nabitých častíc a elektrického poľa.

Z technologického i finančného hľadiska je výhodné pri aplikáciách pracovať pri p_a , keďže nie sú nutné vákuové zariadenia. Výskumu bio-dekontaminácie pomocou elektrických výbojov pri p_a sa v poslednom desaťročí venuje mnoho renomovaných inštitúcií po celom svete a boli testované rôzne druhy elektrických výbojov: korónové [7], DBD [8, 9], pulzné [10, 11], rádiodifrekvenčné a mikrovlnné [12-14], a rôzne plazmové trysky a afterglow (zhasínajúca plazma výbojov) [12-15]. Autori kvôli homogenite a ľahšiemu zapáleniu výbojov zvyčajne generujú plazmu v inertných plynoch (He, Ar) bez/s prímiesou O_2 . Z praktického hľadiska má väčší význam generovať výboje priamo vo vzduchu, je to však náročnejšie na prevenciu prierazu a homogenitu plazmy. Nedá sa všeobecne povedať, ktorý druh výboja je najlepší, výber vhodnej plazmy, pracovného plynu a konfigurácie závisí silne od:

- druhu mikroorganizmu (Gram-pozitívne a Gram-negatívne baktérie sa líšia hrúbkou a štruktúrou bunkovej membrány, Gram-pozitívne tvoria v nepriaznivých podmienkach vysoko rezistentné formy – spóry. Takisto je ťažké dekontaminovať biofilmy – mnohovrstvové kolónie mikroorganizmov. Vyššie eukaryotické bunky (napr. plesne) sú tiež rezistentné voči dekontaminačným účinkom).
- prostredia, v ktorom sa nachádza (napr. vo vode, vzduchu, či povrchu rôznych materiálov). Pri sterilizácii a dezinfekcii vody je nutné ju čo najúčinnejšie vystaviť účinkom plazmy, čo je možné napr. generovaním pulzných výbojov priamo vo vode alebo na rozhraní voda-plyn [11].



Obr. 2 Fotografia (a) a typický priebeh napätia a prúdu (b) streamerovej koróny (SC, 26 kHz, $I_{max} = 25$ mA, $d = 6$ mm) nad vodou.

BIO-DEKONTAMINÁCIA PLAZMOU NA FMFI UK

V Bratislave sa pôsobením plazmy na živé organizmy zaoberali už od r. 1979 pri opracovaní semien jačmeňa korónovým výbojom za účelom zvýšenia ich klíčivosti [16]. V posledných rokoch sa na oddelení Fyziky životného prostredia FMFI UK intenzívne venujeme výskumu bio-dekontaminácie vody a povrchov pomocou DC elektrických výbojov pri p_a . Testujeme a porovnávame pôsobenie koróny, prechodovej iskry a tlecieho výboja v kladnej i zápornej polarite na rôzne mikroorganizmy vo vode a na povrchoch. Tieto výboje boli predtým úspešne aplikované na čistenie plynov od prchavých organických látok, rozklad CO_2 a i. [17-19].

Aparatúra

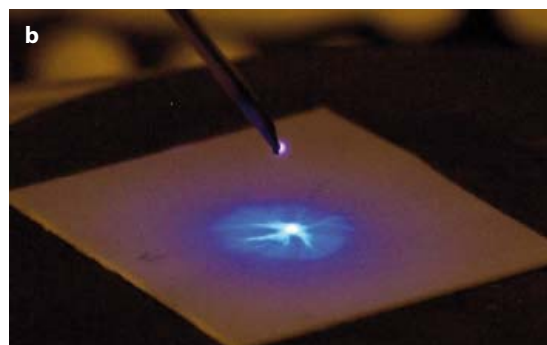
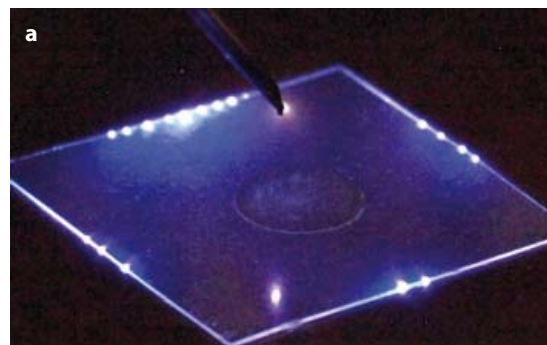
Schéma základnej experimentálnej aparatúry na testovanie biologických účinkov DC výbojov je znázornená na obr. 1. Výboje generujeme zvyčajne v konfigurácii hrot-rovina, pričom rovinná elektróda je ponorená do dekontaminovaného média (voda, fyziologický roztok, živný agar). Pri dekontaminácii papiera a plastov sú povrchy položené priamo na rovinnú elektródu. Aparatúra umožňuje komplexnú elektrickú a optickú diagnostiku výbojov pomocou osciloskopických meraní napätí a prúdov a emisnej spektroskopie. Pre praktickú aplikovateľnosť metódy na dezinfekciu pretekajúcej vody sme vyvinuli trubicovú výbojku s piatimi paralelnými výbojmi. Ďalšia aparatúra umožňuje pretekajúcej kontaminovanej vody cez dutú ihlovú vysokonapäťovú elektródu do aktívnej zóny výboja pri stanovenom prietoku vody.

Výboje

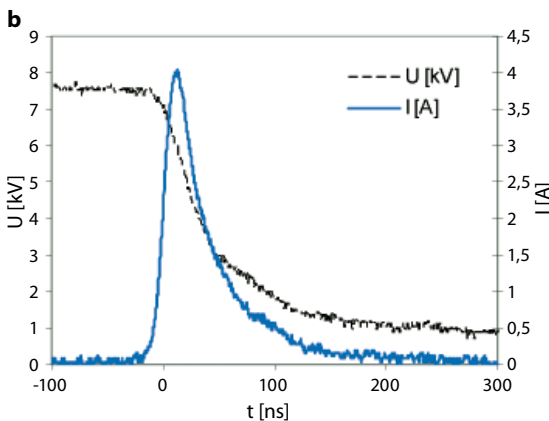
Streamerová koróna (streamer corona, SC) je typická krátkymi malými prúdovými pulzami (~ 100 ns, ~ 10 mA) a vysokou frekvenciou (~ 30 kHz), pri ktorých ostáva napätie takmer konštantné. Energia uvoľnená v pulze je veľmi malá ($\sim 0,1$ - 1 μJ). Fotografia a typický osciloskopický záznam SC sú zobrazené na obr. 2.

Na bio-dekontamináciu plastových a papierových povrchov od spór sme využívali zápornú korónu v režime Trichelových pulzov. Nad plastovou fóliou sa prejavovali typické Trichelove pulzy [21] s frekvenciami 0,5-5 MHz a amplitúdami do 0,26 mA. Frekvencia pulzov rástla s aplikovaným napätím až do hodnoty, kedy pulzný mód prešiel do bezpulzného "glow" módu s konštantným malým prúdom.

V prípade dekontaminácie papiera položeného na uzemnenú elektródu, výboj čiastočne prenikal do poréznej štruktúry papiera, v ktorej sa tvorili mikrovýboje. Podobný jav nastáva u spätnej koróny [22], ktorá vzniká na poréznej vrstve s veľkým odporom pokrývajúcej nízkonapäťovú elektródu. Tomu zodpovedajúce



Obr. 3 Fotografie zápornej koróny nad plastovým (a) – Trichelove pulzy, $f = 2,7$ MHz, a papierovým povrchom, (b) – spätná koróna, $f = 1,3$ kHz, $d = 4$ -5 mm.



Obr. 4 Fotografia (a) a typický priebeh napätia a prúdu (b) prechodovej iskry (TS, 1 kHz, $I_{max} = 2$ A, $d = 6$ mm) nad vodou.

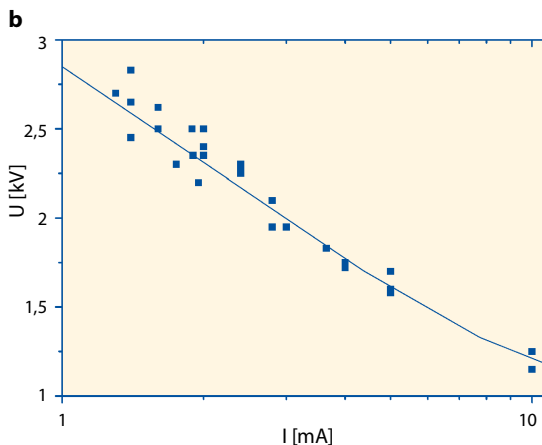
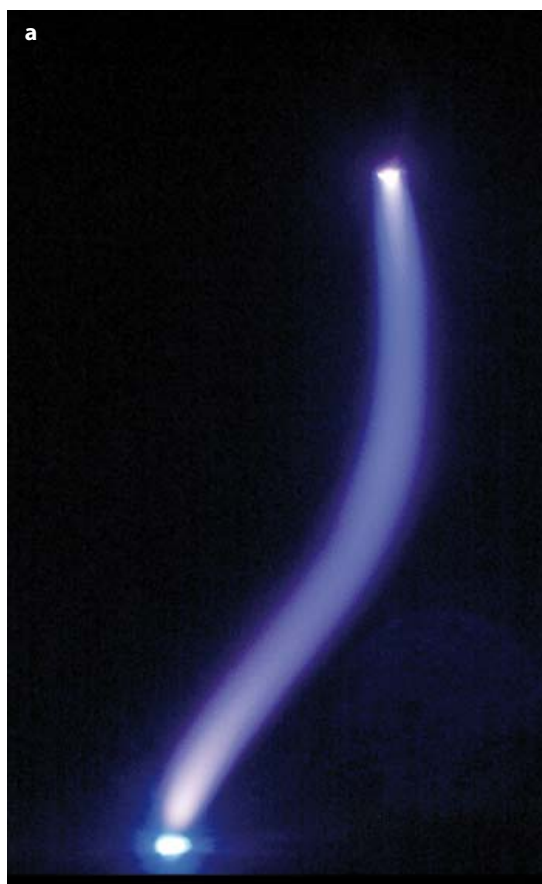
výbojové pulzy boli vyššie ako Trichelove (do 16 mA), ale s nižšou frekvenciou (~ 1-2 kHz). Obr. 3 zobrazuje fotografie zápornej koróny nad plastovým a papierovým povrchom.

Prechodová iskra (transient spark, TS) je napriek DC napájaniu pulzný výboj s veľmi krátkymi silnými impulzmi prúdu (~ 100 ns, ~ 1 A) a regulovateľnou frekvenciou (~ 1-10 kHz). Jej fotografia a typický osciloskopický záznam sú zobrazené na obr. 4. Je iniciovaná streamerom, ktorý v dôsledku lokálneho ohrevu plynu, a tým zvýšením redukovaného elektrického poľa, prestane do iskry. Pomocou vhodnej konštrukcie výbojky a elektrického obvodu je možné kontrolovať energiu pulzu a udržiavať ju na veľmi malých hodnotách (~ 10-100 μ J), aby impulz trval veľmi krátko a energia sa nemíňala na neefektívny ohrev plynu. Naopak, väčšina energie sa použije na urýchlenie elektrónov, ktoré iniciujú všetky ostatné plazmochemické procesy, a tým zabezpečujú vysokú účinnosť procesu.

Vysokotlaký tleci výboj (high pressure glow discharge, GD) je veľmi jednoducho udržateľný bezpulzný režim výboja fungujúci pri malých prúdoch (~ mA) a bez prítomnosti dielektrických vrstiev medzi elektródami. Hoci sa časť jeho energie stráca na ohrev plynu a dosahuje vyššie teploty v kanáli, dá sa ním generovať netermická plazma väčších objemov s vysokou hustotou elektrónov, čo je zaujímavé pre mnohé technické aplikácie. Jeho fotografia a volt-ampérová charakteristika sú znázornené na obr. 5. Skúmané DC výboje sú podrobne popísané v prácach [17, 22, 23].

Emisná spektroskopia DC výbojov

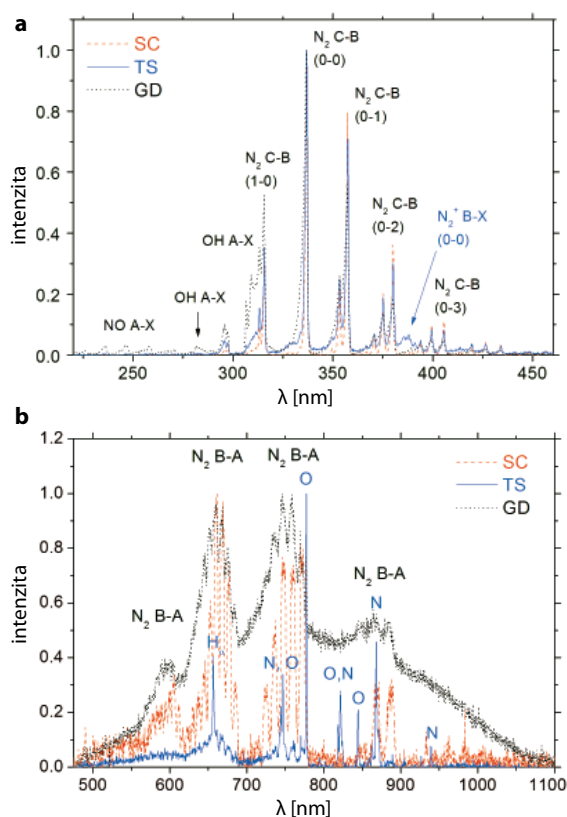
Emisná spektroskopia v UV a viditeľnej oblasti je účinnou technikou neinvazívnej diagnostiky plazmy [24]. Využíva jav excitácie atómu alebo molekuly a následnej deexcitácie s vyžiarením (emisiou) fotónov, ktoré detegujeme. Typické namerané spektrá výbojov sú zobrazené na obr. 6. Ich analýzou sme u všetkých výbojov



Obr. 5 Fotografia (a) a volt-ampérová charakteristika (b) tlecieho výboja (GD, $I = 6$ mA, $d = 6$ mm) nad vodou.

» Emisná spektroskopia v UV a viditeľnej oblasti je účinnou technikou neinvazívnej diagnostiky plazmy. «

» Kombinácia plazmového opracovania vody s filtráciou alebo sedimentáciou môže viesť k úplnej sterilizácii. <<



Obr. 6 Typické emisné spektrá DC výbojov v UV (a) a VIS-NIR (b) oblasti.

zistili vyžarovanie N_2 (2. a 1. pozitívny systém) a OH, čo poukazuje na prítomnosť OH radikálov vznikajúcich disociáciou molekúl vody. V GD je OH najsilnejšie kvôli silnému vyparovaniu vody a pozorujeme aj NO γ systém. NO vzniká reakciou radikálov N+O vznikajúcich disociáciou N_2 a O_2 v dôsledku zvýšenej teploty plynu. V TS vyžaruje aj N_2^+ , čo svedčí o vysokej energii elektrónov, pretože na excitáciu N_2^+ do stavu $B^3\Pi_u^+$ je potrebných 19 eV. Vysokoenergetické elektróny sa prejavujú u TS aj vo viditeľnom spektre ako čiary atómových radikálov O, N a H.

Simulovaním emisných spektier a následným porovnaním s nameranými spektrami je možné určovať teploty plazmy: rotačnú T_r a vibračnú T_v teplotu. Vo výbojoch pri p_a platí, že teplota plynu sa vyrovnáva s T_r v dôsledku vysokej zrážkovej frekvencie. Porovnaním T_r a T_v možno zistiť, či je plazma v termodynamickej rovnováhe (vtedy $T_r = T_v$). Na simuláciu emisných spektier používame program SPECAIR [25]. Všetky tri vyšetrované DC výboje generujú nerovnovážnu

plazmu s $T_r = 300-350$ K (SC), 450-650 K (TS) a 1800-2000 K (GD).

Pomocou nameraných a simulovaných spektier je možné zmerať aj koncentráciu OH radikálov, ktoré sú dôležité oxidanty pri procese bio-dekontaminácie. Emisno-spektroskopická analýza skúmaných DC výbojov a meranie koncentrácie OH sú podrobne popísané v [26].

Bio-dekontaminačné účinky DC výbojov

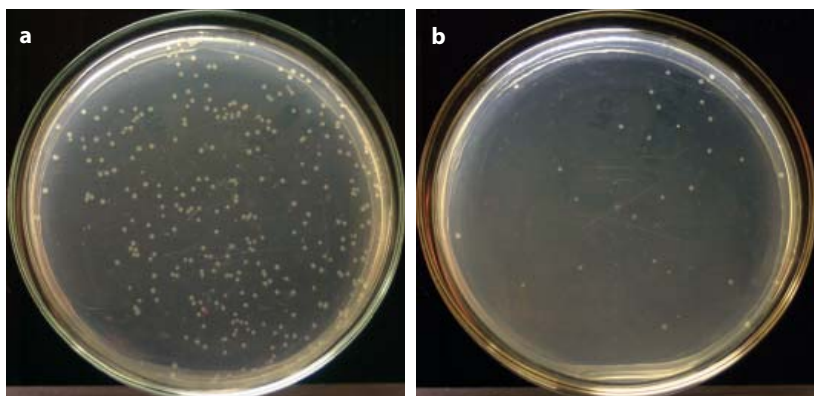
Biologické účinky atmosférických DC výbojov sme testovali vo vodnom roztoku Gram-negatívnych (*Salmonella typhimurium*) a Gram-pozitívnych (*Bacillus cereus*) baktérií a kvasiniek (*Saccharomyces cerevisiae*), a na plastových a papierových povrchoch kontaminovaných spórmi (*Bacillus cereus*). Tieto mikroorganizmy sú dôležité z hľadiska dekontaminácie pitnej vody a potravín, sterilizácie medicínskych nástrojov, aj opatrení proti bioterorizmu.

Kultiváciu mikroorganizmov a vyhodnotenie plazmovej dekontaminácie robíme vo vlastnom mikrobiologickom laboratóriu v sterilnom digestore so zabudovanou UV germicídnu lampou a manipuláciou nad plameňom plynového kahana, štandardnou mikrobiologickou kultivačnou metódou. Jej podstata spočíva v tom, že každá živá baktéria sa v priaznivom prostredí (na živnom agare a pri optimálnej teplote, zvyčajne 37 °C) rýchlo rozmnožuje a za niekoľko hodín vytvorí kolóniu. Jednotlivé baktérie, ktoré sa stanú kolóniotvornými jednotkami, sú po kultivácii viditeľné okom na Petriho miske s agarom a spočítateľné (obr. 7).

Pri prvých experimentoch sme porovnávali účinnosť troch DC výbojov (SC, TS a GD) v oboch polaritách pri rôznych časoch ich pôsobenia (15, 30 a 60 s) na vzorku 5 ml kontaminovanej vody pri rôznych počiatkových koncentráciách baktérií. Ukázalo sa, že najvyššiu účinnosť má TS v kladnej polarite. SC má najnižšiu objemovú hustotu energie, ale aj najnižšiu účinnosť. GD je účinný, no energeticky náročný, čo súvisí s vysokou teplotou v kanáli výboja.

Pri klasickej sterilizácii sa jej účinnosť popisuje tzv. *D-hodnotou* (decimálnou hodnotou). Je to čas, za ktorý klesne mikrobiálna populácia o 1 rád. V neoptimalizovanom statickom režime sme dosiahli *D-hodnoty* 1,8-30 min, porovnateľné s klasickými metódami sterilizácie.

Pri bio-dekontaminácii kladnou TS v prietochom režime vody v trubicovej výbojke pri rôznych prietokoch sme dosiahli omnoho vyššie účinnosti dekontaminácie oproti statickému režimu, zodpovedajúce 2-4 rádovému poklesu mikrobiálnej populácie. Takisto *D-hodnoty* boli o 1-2 rády nižšie (3-8 s), čiže metóda je vysoko účinná. Pre praktické aplikácie na dezinfekciu vody má význam sledovať dlhodobé časové závislosti populácie baktérií po plazmovom opracovaní, ako sú zobrazené na obr. 8 spolu s časovým vývojom populácie v kontrolnej vzorke. Populácia po cca 18 min opracovania v TS ďalej klesala. To indikuje, že okrem priamych účinkov plazmy vznikajú vo vode dlhšie žijúce aktívne častice, napr. ozón, zodpovedné za ďalšiu inaktiváciu baktérií. Navyše zostávajúce baktérie po plazmovom opracovaní vo vode koagulovali a vytvorili sediment a populácia vo vyčírenej časti klesla na nulu v čase 40 h. Tento výsledok ukazuje, že kombinácia plazmového opracovania vody s filtráciou alebo sedimentáciou môže viesť k úplnej sterilizácii.



Obr. 7 Kultivácia baktérií *S. typhimurium* na Petriho miskách. Kolóniotvorné jednotky (colony-forming units, CFU) v referenčnej (a) a plazmou opracovanej vzorke (b).

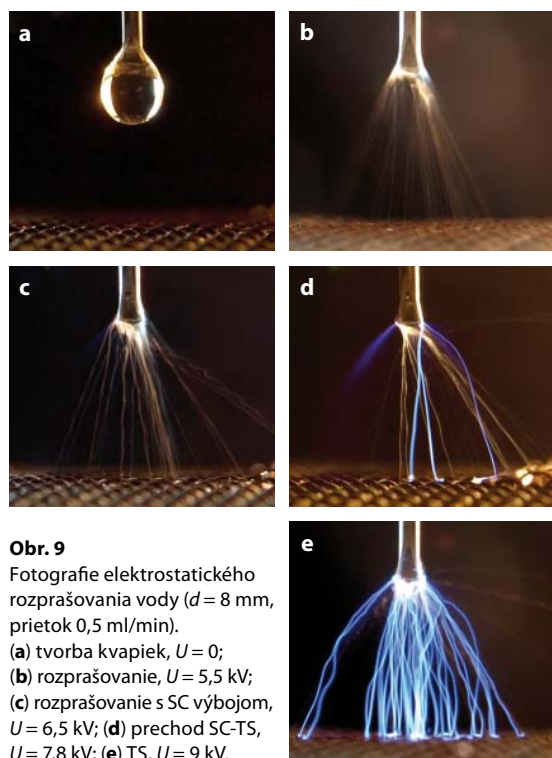
Pre ešte účinnejšiu interakciu výbojovej plazmy s mikroorganizmami sme vyvinuli konfiguráciu, kde voda pretekala cez vysokonapäťovú dutú ihlu priamo do aktívnej zóny výboja. Na hrote ihly tvoriace sa kvapky so zvyšovaním napätia znižovali svoj objem, až nastával jav elektrostatického rozprašovania vody (elektro-hydro-dynamickej atomizácie), obr. 9 [27]. Tento jav je spôsobený narušením elektrostatických síl medzi molekulami vody a následným poklesom povrchového napätia vody v dôsledku zvyšovania intenzity elektrického poľa. Jednotlivé kvapky sa nabíjajú, a teda sú medzi elektródami urýchľované a vzájomne sa odpuďujú. V tejto konfigurácii sme dosiahli pomerne vysoké účinnosti bio-dekontaminácie s veľmi krátkymi *D-hodnotami* (od 0,1 s), a to aj v koróne, ktorá bola v statickom režime neúčinná. Navyše sme tu dosiahli najnižšie energetické náklady procesu (0,7-20 J/ml na jeden rád poklesu populácie).

Bio-dekontaminácia spór *B. cereus* na plastových a papierových povrchoch v zápornej koróne viedla k povzbudivým výsledkom napriek tomu, že spóry sú veľmi ťažko inaktivovateľné.

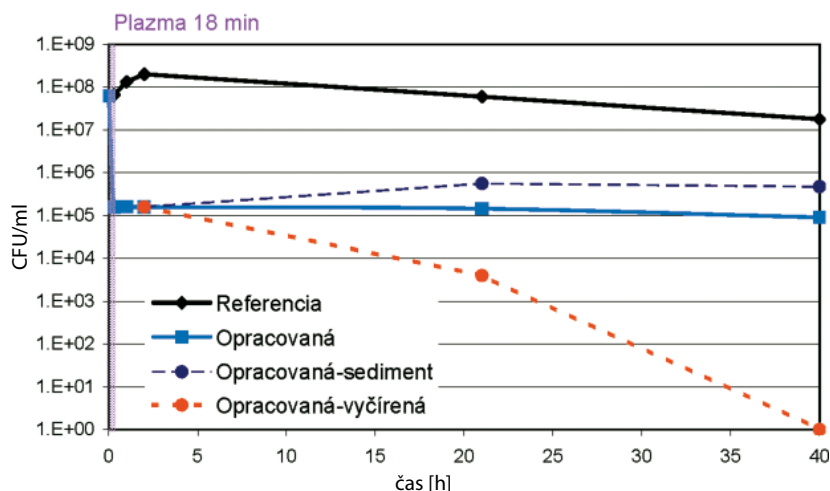
Identifikácia dominantných mechanizmov bio-dekontaminácie

Okrem dosiahnutia maximálnych účinností bio-dekontaminácie a optimalizácie procesu pre aplikácie je ťažiskom nášho výskumu tiež vniknúť do podstaty elementárnych mechanizmov interakcie plazmy so živou bunkou a zistiť, ktoré inaktivačné činitele plazmy (UV žiarenie, teplo, elektrické pole, nabitých častíc, radikálov a i.) sú pri bio-dekontaminácii dominantné. K tomu používame komplexnú elektrickú a optickú diagnostiku výbojov, porovnávame účinky výbojov pri rôznych parametroch na mikroorganizmy a dávame ich do súvislosti s ich elektrickými a spektrálnymi charakteristikami.

Podľa súčasných zdrojov literatúry sa názory na mechanizmy inaktívácie mikroorganizmov v plazme líšia. Väčšina autorov sa zhoduje na tom, že pri výbojoch



Obr. 9 Fotografie elektrostatického rozprašovania vody ($d = 8$ mm, prietok 0,5 ml/min). (a) tvorba kvapiek, $U = 0$; (b) rozprašovanie, $U = 5,5$ kV; (c) rozprašovanie s SC výbojom, $U = 6,5$ kV; (d) prechod SC-TS, $U = 7,8$ kV; (e) TS, $U = 9$ kV.



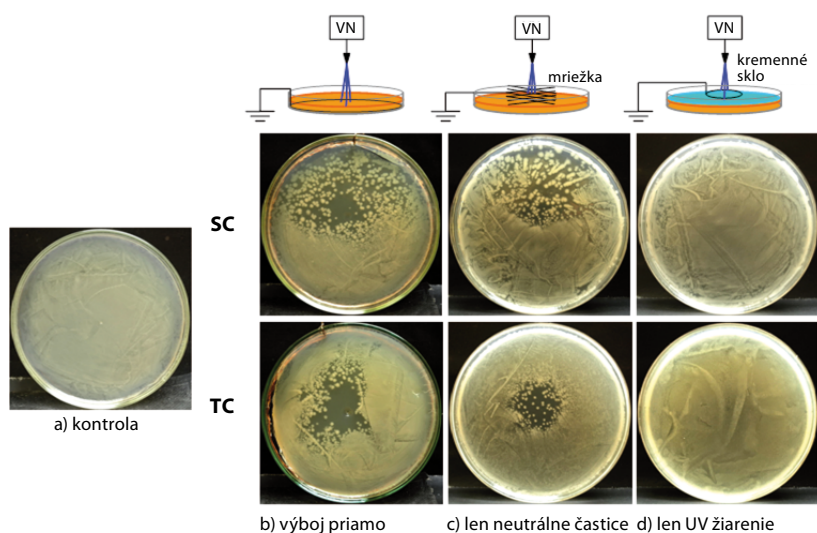
Obr. 8 Krivka prežitia baktérií *S. typhimurium* v 0,1 l vody opracovanej v trubicovej výbojke 5 TS výbojmi počas 18 min, vývoj populácie v dlhej časovej škále v semilogaritmickej mierke. Vo vyčistenej vode po spontánnej koagulácii baktérií došlo k úplnej sterilizácii.

pri atmosférickom tlaku dominantnú úlohu hrajú radikály a iné aktívne častice, predovšetkým reaktívne kyslíkové častice, čiže najmä O, OH, O₃, ktoré pôsobia deštruktívne na bunkové membrány [9, 12-15]. Efekty teploty a UV žiarenia sú známe biocídne faktory, ale v studenej plazme pri p_a sú málo významné. UV efekt sa prejavuje len vtedy, keď plazma vyžaruje v UV germicídnej oblasti (220-280 nm). V našich DC výbojoch bolo toto žiarenie generované NO γ systémom len v GD. Názory expertov sa však líšia pri efekte nabitých častíc a elektrického poľa, ktoré môžu narušovať integritu bunkovej membrány, resp. obmedziť látkovú výmenu cez membrány, ktorá funguje na elektrostatickom princípe [8].

Svetlo do identifikácie mechanizmov bio-inaktívácie vnášajú aj naše experimenty zamerané na porovnanie priameho a nepriameho pôsobenia plazmy na mikroorganizmy, s postupným odfiltrovaním elektrického poľa, nabitých častíc, ostatných reaktívnych častíc a UV žiarenia. Výsledky týchto experimentov, dokumentované na obr. 10, ukazujú minimálnu úlohu žiarenia generovaného plazmou. Navyše, efekt priamej expozície plazmy a nepriameho pôsobenia len neutrálnych aktívnych častíc bol takmer totožný, čo poukazuje na dominantnú rolu týchto aktívnych častíc. V spolupráci s Odd. biomedicínskej fyziky FMFI UK sme vyvinuli merania plazmou vyvolaného oxidačného stresu membrán buniek (metóda TBARS [28]), ktoré potvrdili dominantnú rolu reaktívnych kyslíkových častíc.

BIOMEDICÍNSKE APLIKÁCIE PLAZMY

V medicíne má veľký význam sterilizovať vnútorné plochy tenkých plastových trubíc (katétre, endoskopy), ktoré nie je možné autoklavovať. Na to sa dajú vhodne použiť RF a MW výboje alebo afterglow iných výbojov. Tu sa zvyčajne pracuje pri nízkom tlaku, pretože plazma viac expanduje do objemu a dostane sa aj do vnútorných častí sterilizovaných nástrojov. Nízkotlaké sterilizátory pracujúce s RF plazmou sú už aj komerčne dostupné [29]. Na druhej strane, výhodou p_a je, že nie sú nutné vákuové zariadenia, čo znižuje cenu, zvyšuje flexibilitu a uľahčuje prevádzku. Pri aplikáciách na živých bunkách či tkanivách *in vivo* (v živom organizme) sú nízke tlaky neprípustné.



Obr. 10 Porovnanie efektov priameho a nepriameho pôsobenia plazmy na baktérie *S. typhimurium* na agare. (a) kontrolná vzorka, (b) priame pôsobenie výbojov SC a TS – tmavé miesta indikujú dekontaminovanú oblasť, (c) pôsobenie len neutrálnych aktívnych častíc – nabité častice a elektrické pole odfiltrované uzemnenou mriežkou, (d) pôsobenie len UV žiarenia z výbojov cez kremenné sklo.

Biocídne účinky plazmy sa dajú uplatniť aj priamo na ľuďoch či zvieratách, napr. pri terapii kožných ochorení. Plazmová sterilizácia mikroorganizmov v otvorených ranách či vredoch významne urýchľuje ich hojenie. Okrem účinku sterilizácie rany, studená plazma tiež urýchľuje procesy koagulácie krvi, a tým napomáha rýchlemu hojeniu [30, 31]. Plazmová ihla bola úspešne testovaná pre aplikácie v zubnom lekárstve, jej aplikácia môže v budúcnosti nahradiť bolestivé vrtanie pri odstraňovaní zubného kazu [32]. Pri *in vivo* aplikáciách na ľudských tkanivách samozrejme nie je možné aplikovať priamo vysoké napätie na elektródach, je nutné použiť dielektrické či vysokofrekvenčné bezelektrodové výboje alebo afterglow.

Ďalšie zaujímavé aplikácie plazmy v medicíne sú rôzne bunkové manipulácie v tkanivách, napr. bunkový odtrh od povrchov, či naopak umožnenie adhézie buniek na povrchy implantátov a protéz, alebo riadená bunková smrť – tzv. apoptóza, ktorá má obrovský potenciál pri terapii rakovinových nádorov. Všetky tieto aplikácie zahŕňa *plazmová medicína* – nová, no veľmi rýchlo sa rozvíjajúca vedecká disciplína [30-32].

ZÁVER

Studená plazma generovaná rôznymi elektrickými výbojmi vo všeobecnosti interaguje s bunkami mikroorganizmov a pôsobí na ne viacerými faktormi, čo vedie k ich inaktivácii a smrti. Tento jav sa úspešne využíva pri plazmovej bio-dekontaminácii vody, povrchov a nástrojov, čo potvrdili aj naše experimenty porovnávajúce tri DC výboje vo vzduchu pri p_a . Syntéza našich výsledkov štúdia fyzikálnych vlastností týchto výbojov a ich emisných spektier s výsledkami testov ich biologických účinkov v rôznych konfiguráciách a porovnaním priamej a nepriamej expozície v plazme, doplnená o merania oxidačného stresu buniek, nám umožnila čiastočne vniknúť do problematiky mechanizmov bio-inaktivácie. Na základe týchto experimentálnych zistení konštatujeme, že v plazme generovanej DC výbojmi vo vzduchu za i bez prítomnosti vody, sú dominantným inaktivačným faktorom mikroorganizmov radikály a aktívne častice, predovšetkým reaktívne kyslíkové častice.

Okrem plazmovej bio-dekontaminácie a sterilizácie, nachádza studená plazma nové možnosti využitia v medicíne pri terapii kožných, zubných i rakovinových ochorení. Plazmová medicína má obrovský potenciál stať sa medicínou budúcnosti.

Podakovanie

Výskum podporený agentúrou VEGA, grant 1/0293/08. Na experimentoch i plodných diskusiách sa významne podieľali moji kolegovia M. Janda, K. Hensel, V. Martišovič, I. Jedlovský, L. Chládeková, B. Pongráč, M. Pelech, L. Šikurová (FMFI UK) a P. Polčic (PriF UK).

Literatúra

- [1] V. Martišovič: *Základy fyziky plazmy*, UK Bratislava 2006.
- [2] S. L. Miller: *Science* **117**, 528 (1953).
- [3] M. Janda, M. Morvová, Z. Machala, I. Morva: *Orig. Life Evol. Biosph.* **38**, 23 (2008).
- [4] T. von Woedtke et al.: *Plasma Process. Polym.* **5**, 534 (2008).
- [5] R. Hippler et al.: *Low temperature plasma physics*, Wiley-VCH, Weinheim 2001.
- [6] K. H. Becker et al.: *Non-Equilibrium Air Plasmas at Atmospheric Pressure*, IoP Publishing, Bristol 2005.
- [7] R. S. Sigmond, B. Kurdelová, M. Kurdel: *Czech. J. Phys.* **49**, 405 (1999).
- [8] G. Fridman et al.: *Plasma Process. Polym.* **4**, 370 (2007).
- [9] M. Laroussi, F. Leipold: *Int. J. Mass Spectrom.* **233**, 81(2004).
- [10] H. Ayan et al.: *J. Phys. D: Appl. Phys.* **42**, 125202 (2009).
- [11] P. Lukeš et al.: *Plasma Sources Sci. Technol.* **17**, 024012 (2008).
- [12] E. Stoffels et al.: *Plasma Sources Sci. Technol.* **11**, 383 (2002).
- [13] R. Brandenburg et al.: *Contrib. Plasma Phys.* **47**, 72 (2007).
- [14] T. C. Montie, K. Kelly-Wintenberg, J. R. Roth: *IEEE Trans. Plasma Sci.* **28**, 41 (2000).
- [15] X. Lu et al.: *J. Appl. Phys.* **104**, 053309 (2008).
- [16] P. Lukáč, V. Sekerka: *Acta Phys. Univ. Comen.* **XXIV**, 57 (1984).
- [17] Z. Machala, M. Morvová, E. Marode, I. Morva: *J. Phys. D: Appl. Phys.* **33**, 3198 (2000).
- [18] Z. Machala, E. Marode, M. Morvová, P. Lukáč: *Plasma Process. Polym.* **2**, 152 (2005).
- [19] M. Morvová, F. Hanic, I. Morva: *J. Therm. Anal. Calorimetry* **61**, 273 (2000).
- [20] R. S. Sigmond, M. Goldman: in *Corona discharge physics and applications, Electrical Breakdown and Discharges in Gases*, NATO ASI Series B: Physics, ed. E. E. Kunhardt a L. H. Luessen, Plenum, New York, 1983.
- [21] A. Jaworek, A. Krupa, T. Czech: *J. Phys. D: Appl. Phys.* **29**, 2439 (1996).
- [22] Z. Machala, I. Jedlovský, V. Martišovič: *IEEE Trans. Plasma Sci.* **36**, 918 (2008).
- [23] Z. Machala, E. Marode, C.O. Laux, C.H. Kruger: *J. Advanced Oxid. Technol.* **7**, 133 (2004).
- [24] C. O. Laux, T. G. Spence, C. H. Kruger, R. N. Zare: *Plasma Sources Sci. Technol.* **12**, 125 (2003).
- [25] C. O. Laux: <http://www.specair-radiation.net>.
- [26] Z. Machala et al.: *J. Mol. Spectrosc.* **243**, 194 (2007).
- [27] G. Taylor: *Proc. R. Soc. Lon. A* **280**, 383 (1964).
- [28] Z. Machala et al.: *Eur. J. Phys. D* **54**, 195 (2009).
- [29] Sterrad, <http://sterrad.com>.
- [30] G. Fridman et al.: *Plasma Process. Polym.* **5**, 503 (2008).
- [31] A. Kramer et al.: *GMS Krankenhaushyg. Interdiszip.* **3**, 1 (2008).
- [32] E. Stoffels et al.: *Plasma Sources Sci. Technol.* **15**, S169 (2006).