

Maria Laskowska¹, Elżbieta Bogusławska-Wąs^{1*}, Patrycja Kowal¹,
Marcin Hołub², Waldemar Dąbrowski¹

¹Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii Stosowanej
²Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Katedra Elektroenergetyki i Napędów Elektrycznych

Wpłynęło w sierpniu 2015 r.
Zaakceptowano w styczniu 2016 r.

1. Wstęp. 2. Mechanizm działania zimnej plazmy na mikroorganizmy. 2.1. Efektywność działania sterylizującego. 3. Zastosowanie zimnej plazmy w medycynie. 4. Podsumowanie

Efficiency of using non-thermal plasma in microbiology and medicine

Abstract: Plasma is a partially or totally ionized gas which occurs in nature (e.g. lightning discharge, outer space), but can be also created in the laboratory conditions. Non-thermal plasma generates free radicals of oxygen, nitrogen, high energy electrons and uncharged particles such as atoms and molecules, in aquatic and gas environment. Thus, plasma exerts its effect on both prokaryotic and eukaryotic cells. In many studies, non-thermal plasma was applied mainly to achieve the sterilization effects of e.g. surfaces and medical tools. The results obtained were largely dependent upon the applied parameters of plasma (e.g. frequency, voltage, type of gas). Non-thermal plasma can be applied in microbiology and also in medicine where it can be used to speed up wound healing process or as an effective tool in oncology.

1. Introduction. 2. Plasma action on microorganisms. 2.1. Sterilization efficiency. 3. Application of cold plasma in medicine. 4. Summary

Słowa kluczowe: medycyna, mikrobiologia, plazma, wolne rodniki, zimna plazma

Key words: free radicals, medicine, microbiology, non-thermal plasma, plasma

1. Wstęp

Pojęcie plazmy, rozumianej jako stan rozproszenia materii (czwarty stan skupienia) wprowadził w 1928 roku amerykański fizykochemik Irving Langmuir, noblista z 1932 roku [31]. Stanowi ona materię, która jest złożona z cząsteczek obojętnych, mieszaniny zjonizowanych i niezjonizowanych atomów w stanie podstawowym i wzbudzonych, wolnych rodników oraz elektronów. Podziału plazmy dokonuje się przede wszystkim z uwagi na ciśnienie, temperaturę i gaz, w którym jest ona generowana. Ze szczegółowym opisem jej rodzajów możemy się zapoznać w wielu publikacjach [2, 11, 50, 53, 60].

W przypadku plazmy termicznej wysokotemperaturowej, elektrony oraz inne cząsteczki wchodzące w jej skład mają taką samą temperaturę. Do jej powstania niezbędne jest wytworzenie wysokiego ciśnienia i utrzymanie równowagi termodynamicznej między cięższymi cząsteczkami chemicznymi a elektronami. W przypadku zimnej plazmy, niskotemperaturowej (CAP – *cold atmospheric plasma*), generowanej w ciśnieniu atmosferycznym bądź w warunkach próżniowych, energia zewnętrzna wykorzystana jest do wytwarzania wysokoenergetycznych elektronów. Elektrony te mają wyższą temperaturę niż inne cząsteczki wchodzące w skład zimnej plazmy w związku z czym temperatura całego procesu podnosi się nieznacznie.

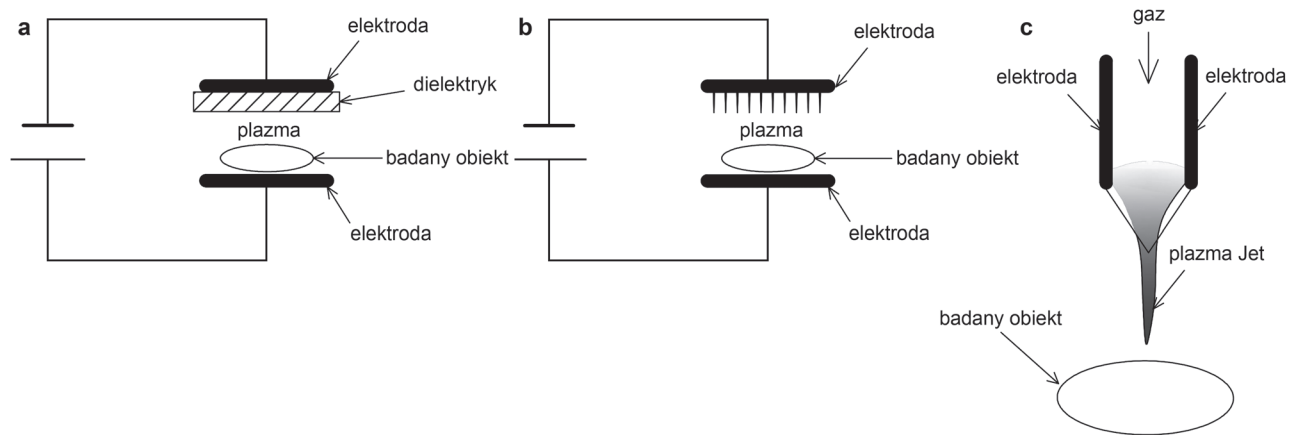
Charakterystyczna dla CAP, niska temperatura procesu wraz z wygenerowanymi właściwościami: biomodulującymi, stymulującymi, dezynfekcyjnymi i sterylizacyjnymi; umożliwia jej wykorzystanie w medycynie [17, 26, 22], technologii żywności [3, 14, 16, 18, 24, 42, 45, 60] i ochronie środowiska [50]. Jej wykorzystanie w nowych obszarach badawczych wymusza dostosowanie technologii wytwarzania CAP. Schematy podstawowych urządzeń wykorzystywanych w procesach stosowanych do generowania niskotemperaturowej plazmy przy ciśnieniu atmosferycznym przedstawiono na rys. 1.

Oddziaływanie zimnej plazmy na żywe organizmy jest procesem złożonym. Polega ono na działaniu:

- wysokoenergetycznych elektronów nabywających energię w polu elektrycznym,
- zjonizowanych atomów i cząsteczek, które ulegają jonizacji wskutek uderzeń wysokoenergetycznych elektronów,
- działaniu wolnych rodników w tym tlenu, azotu – RONS (*reactive oxygen nitrogen species*), czy rodników hydroksylowych,
- promieniowania UV,
- nadtlenku wodoru,
- ozonu [17].

Skuteczność procesu zależy przede wszystkim od takich elementów jak: moc i budowa urządzenia, częstotliwość prądu, długość trwania pojedynczego impulsu

* Autor korespondencyjny: Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii Stosowanej, ul. Papieża Pawła VI nr 3 71-459 Szczecin; tel. 91 4496542; e-mail: elzbieta.boguslawska-was@zut.edu.pl



Rys. 1. Podstawowe schematy konstrukcyjne stosowane do generowania niskotemperaturowej plazmy przy ciśnieniu atmosferycznym
a – wyładowanie dielektryczne barierowe DBD; b – wyładowanie koronowe; c – wyładowanie w układzie Plazma JET

wzbudzającego, czasu oddziaływania plazmy na komórki i tkanki oraz rodzaju użytego gazu [21]. Badania przeprowadzone nad eliminacją *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* oraz *Microsporium canis*, wykazały iż krótkie impulsy (30 ns) generujące plazmę przy wyższym napięciu (14,1 kV) są bardziej skuteczne niż impulsy dłuższe (2 μ s) ale o niższym napięciu (10,3 kV). Helmke i wsp. sugerują, że wyższe napięcia generują bardziej energetyczne elektrony, które w efekcie dają więcej wysoko reaktywnych cząsteczek [21], i to właśnie im, najczęściej przypisuje się efekt działania na żywe komórki. W znacznie mniejszym stopniu uwzględnia się oddziaływanie pola elektromagnetycznego szczególnie w przypadku plazmy generowanej promieniowaniem mikrofalowym czy radiowym.

W ocenie efektywności działania CAP, należy również uwzględnić modyfikację właściwości fizyko-chemicznych i fizyko-mechanicznych prowadzących do zmian strukturalnych plazmowanego środowiska. Sugestie naukowców dotyczą przede wszystkim cieczy, w tym wody [12, 23, 39]. W przeprowadzonych bowiem badaniach wykazano, że w wodzie poddanej promieniowaniu koronowemu dochodzi do znacznego obniżenia pH, pojawiają się nadtlenek wodoru, ozon oraz reaktywne formy tlenu i azotu – RONS [17]. Efektem plazmowania jest więc powstanie wody o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych [29, 47]. Cechy dekontaminacyjne, względem *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* oraz *C. albicans*, woda utrzymuje nawet przez czas 1-miesięcznego przechowywania, pomimo zanikania nadtlenu wodoru i ozonu [23].

2. Mechanizm działania zimnej plazmy na drobnoustroje

Zasadnicze wykorzystanie zimnej plazmy w naukach przyrodniczych i medycynie koncentruje się na jej właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Bada-

nia te prowadzone są dwukierunkowo: działanie sterylizacyjne, np. w leczeniu zakażeń u ludzi oraz możliwość dekontaminacji mikrobiologicznej żywności oraz nasion i cebulek roślin.

Pierwsze badania wskazujące na aktywność sterylizującą plazmy pod ciśnieniem atmosferycznym zostały opublikowane w 1996 roku przez Laroussi i wsp. z Uniwersytetu w Tennessee. Plazma generowana była przez źródło fal radiowych – RF (*radio frequency*) przy napięciu (od 1 kV do 5 kV). Zakres częstotliwości, w którym otrzymano stabilne wyładowanie w całej przestrzeni pomiędzy elektrodami wynosił od 300 Hz do 4 KHz. Efektem tych badań była eliminacja drobnoustrojów zachodząca w ciągu kilku minut plazmowania [33]. Dalsze badania wykazały skuteczność sterylizującą działania zimnej plazmy na komórki wegetatywne bakterii i ich spory oraz drożdże, pleśnie i wirusy [47, 54, 28, 56]. Wielu autorów zwraca uwagę na istotną rolę gazów w środowisku którego dochodzi do wygenerowania zimnej plazmy [34, 37]. Zastosowanie znalazły: O_2 , N_2 , powietrze, halogeny, H_2O , CO_2 , SO_2 , oraz Ar, Ne, He. W przypadku gazów szlachetnych ich działanie sterylizacyjne zwiększa się po dodaniu 2–5% O_2 . Proces sterylizacji jest zwykle prowadzony bezpośrednio w miejscu wygenerowania zimnej plazmy. Działają wtedy promieniowanie UV, elektrony, RONS oraz zjonizowane atomy i cząsteczki. Metoda ta najczęściej stosowana jest w przypadku generowania plazmy promieniowaniem RF (1–100 MHz) oraz mikrofalami (> 300 MHz), ponieważ wysokie częstotliwości powodują znaczny wzrost temperatury napromieniowywanego środowiska [37].

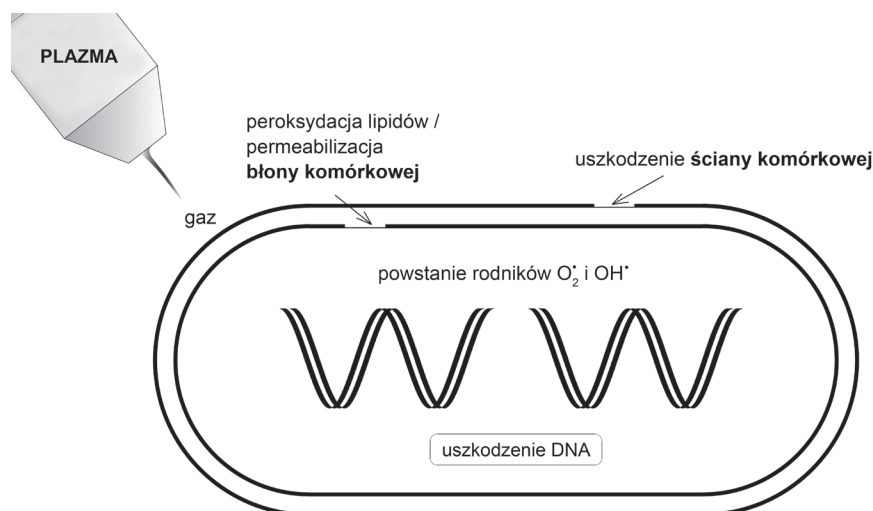
Niszczące działanie zimnej plazmy w stosunku do drobnoustrojów, tłumaczone jest mechanizmami zachodzącymi w różnych obszarach komórki – uszkodzenie ściany komórkowej, błony cytoplazmatycznej, DNA i aparatu enzymatycznego. Z przeprowadzonych badań na sporach *Bacillus sp.* wynika, że w procesie plazmowania kinetyka zabijania drobnoustrojów zachodzi

dwu lub trzy etapowo. Początkowo sugerowano, że podstawowym procesem jest zniszczenie DNA poprzez promieniowanie UV. Mechanizm działania promieniowania ultrafioletowego jest dobrze znany. Jego destrukcyjne działanie na kwasy nukleinowe wynika z wysokiej wartości energetycznej i dużego stopnia absorpcji tego rodzaju promieniowania przez cząsteczki DNA i RNA. Najczęściej zachodzące zmiany prowadzą do powstania dimerów tyminy i fragmentacji nukleoidu. Znaczące i gwałtowne zmiany w strukturze DNA mające miejsce jedynie pod wpływem UV nie dają zawsze skutecznego efektu letalnego wskutek ograniczonej penetracji fotonów promieniowania przez struktury spor [38]. Dlatego też, destrukcji DNA drobnoustroju muszą towarzyszyć zmiany wynikające z aktywności rodników utleniających i energii elektronów. Na przykładzie mechanizmów zmian zachodzących w strukturze DNA *Citrobacter freundii*, Surowsky i wsp. ustalili, że związki generowane w plazmie takie jak np. H_2O_2 oraz rodniki wodorotlenowe również przyczyniają się do uszkodzania DNA, co może być jedną z przyczyn śmierci bakterii [52]. Obecnie sugeruje się, że w procesie sterylizacji plazmowej promieniowanie UV odgrywa minimalną rolę [32].

Obserwacje w mikroskopie elektronowym i skaningowym wykazują, że proces plazmowania uszkodza zewnętrzne struktury bakterii. Zachodzi to wskutek dezintegracji struktur powierzchniowych – ściany komórkowej i błony komórkowej. Charakteryzuje się ona najwolniejszą kinetyką, w związku z tym jest to faza, która determinuje szybkość całego procesu sterylizacji. Dezintegracja powierzchni drobnoustrojów przez wytrawianie i fotodesorpcję jest procesem niszczenia ich „atom po atomie”. Reaktywne składniki plazmy zderzając się z drobnoustrojami, powodują poważne i trudne do naprawienia uszkodzenia błony komórkowej. W konsekwencji mogą prowadzić do przerwania jej ciągłości. Efekt ten jest również następstwem gromadzenia się ładunku elektrycznego na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej. W tym procesie największe działanie letalne wykazują tlen atomowy oraz rodniki hydroksylowe [38]. Podobny efekt uzyskuje się w wyniku zajścia elektroporacji, inaczej określonej elektropermeabilizacją. Proces ten polega na elektrycznie indukowanym powstaniu nowych mikrospor w błonie komórkowej oraz na wzroście już istniejących. Destrukcyjne działanie tego mechanizmu, opisane na przykładzie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serowar Typhimurium i *Listeria monocytogenes*, polega na zwiększeniu przepuszczalności membrany cytoplazmatycznej komórki. Bezpośrednio wpływa to na potencjał transbłonowy komórek i ich zdolności do regulacji wewnątrzkomórkowej pH [46]. W przypadku fotodesorpcji, w ścianie i błonie komórkowej drobnoustrojów ulegają zerwaniu wiązania chemiczne związków budujących te struktury.

W dalszym etapie, z uszkodzonych białek, cukrów i tłuszczów powstają lotne związki węgla, które stopniowo „wyparowują” z powierzchni bakterii. Wykazano, że tworzenie się dwutlenku węgla i innych lotnych związków, wzrasta wraz z temperaturą powierzchni. Oznacza to, że wyższa temperatura powierzchni znacznie zmniejsza czas zabicia drobnoustrojów [37]. W mechanizmie wytrawiania dochodzi także do zmian natury oksydacyjnej w lipidach i białkach budujących drobnoustroje. Moreau i wsp. uważają, że ma to ogromny wpływ na procesy enzymatyczne, a związku z tym i na procesy metaboliczne zachodzące w komórce [38]. Ginięcie drobnoustrojów tłumaczy się także zmianami pH środowiska. Liu i wsp. poddali ekspozycji plazmowej w układzie mikroJET wodę z zawiesiną bakteryjną *S. aureus*. Bezpośrednia obróbka plazmowa, podczas którego zmiana uległo pH środowiska, skutecznie inaktywowała *S. aureus* w ciągu 20 minut. Przy czym najlepszy efekt sterylizacyjny uzyskano przy pH 4,5. Według autorów, zabicie bakterii wynikało ze zmiany kwasowości płynu oraz interakcji reaktywnych związków generowanych przez plazmę, w głównej mierze rodnika hydroksylowego ($HO\cdot$) z komórką. Rodnik ten jest odpowiedzialny za peroksydację kwasów tłuszczowych występujących w komórce bakteryjnej [35].

Szczegółowa analiza obrazów w mikroskopii fluorescencyjnej daje podstawy do wnioskowania, że przyczyną destrukcji komórki na poziomie błony komórkowej jest utrata jej integralności. W przypadku *B. subtilis*, jest to mechanizm oparty na reakcji błony komórkowej ze związkami reaktywnymi wydzielanymi przez plazmę. Obserwacji dokonali Lackmann i Bandow, stosując dysze plazmowe JET [30]. W tym typie, plazma występuje poza układem elektrod a otaczające powietrze pozwala wysokoenergetycznym fotonom na głębokie dotarcie w głąb drobnoustroju. Warto podkreślić, rolę genów *oxyR* lub *soxS* w reakcji komórki na działanie zimnej plazmy. Mutanty pozbawione tych genów są bardziej podatne na działanie zimnej plazmy z wykorzystaniem mieszanki helu z tlenem. Białko SoxS jest regulatorem kontrolującym geny głównie odpowiedzialne za detoksykację nadtlenków i tlenków azotu, natomiast gen *oxyR* jest regulatorem procesów transkrypcyjnych zachodzących podczas aktywacji genów w odpowiedzi na stres oksydacyjny. Dlatego też mutanty z brakuującym regulatorem SoxS są wrażliwe na zabicie przez nadtlenki i tlenki azotu, natomiast bakterie z brakującym genem *oxyR* są wrażliwe na reaktywne formy tlenu. Błona komórkowa bakterii nie jest jedynym uszkodzonym miejscem, ponieważ zostaje również uruchomionych aż 18 genów należących do odpowiedzi SOS, który obejmuje różne systemy naprawcze DNA [30]. Sharma i wsp. zaobserwowali zwiększoną ekspresję genów odpowiedzi SOS i genów w odpowiedzi na stres oksy-



Rys. 2. Wewnątrzkomórkowy efekt działania reaktywnych form tlenu wytwarzanych podczas obróbki plazmowej

dacyjny (*oxyS*, *katG*, *sodA*) u *E. coli* po działaniu zimnej plazmy. Taka odpowiedź komórkowa może sugerować znaczne uszkodzenia DNA u tego drobnoustroju. Autorzy również postulują, że skuteczność obróbki zimną plazmą drobnoustrojów ma związek z synergicznym działaniem fotonów UV oraz rodników tlenowych [49]. Odpowiedź komórkową po zastosowaniu zimnej plazmy zauważyli również Cooper i wsp. Analizowali oni biologiczną odpowiedź bakterii *Bacillus stratosphericus* na obróbkę plazmową z użyciem wyładowania dielektrycznego (DBD – *dielectric barrier discharge*). Autorzy zaobserwowali przejście komórek bakteryjnych w stadium żyjących ale nie dających się hodować (stadium VBNC – *viable but nonculturable*) już 2 godziny po procesie obróbki plazmowej [9]. Prawdopodobnie jest to reakcja na stres oksydacyjny jakemu poddane są komórki. Na Rys. 2 przedstawiono schemat sterylizacyjnego działania reaktywnych form tlenu.

Kluczową rolę rodników tlenowych oraz hydroksylowych w eliminacji drobnoustrojów podkreślają również Weiyuan i wsp. Badali oni wpływ obróbki plazmowej pod ciśnieniem atmosferycznym na *E. coli*. Użyto do tego celu specjalnie zaprojektowanego przenośnego urządzenia wytwarzającego plazmę w wielodyszowym układzie JET. Urządzenie to składa się z wolframowych elektrod przechodzących przez otwory w dielektryku z Al_2O_3 . Jednocześnie przez otwory te wylatuje zjonizowany gaz. Autorzy podkreślają, że plazma o tak specyficznej budowie była skuteczna w zabiciu bakterii znajdujących się na płytce z pożywką. Za przyczynę tego efektu, uznano związki reaktywne zawierające tlen, które były w stanie zniszczyć wiązania C-C lub C-H występujące w komórce, a następnie powodować rozkład związków organicznych [59].

Wykorzystanie mikroskopii sił atomowych jednoznacznie wskazuje, że jednym kryteriów destrukcji ściany komórkowej i błony cytoplazmatycznej jest

rodzaj gazu lub jego mieszanina. Zespół naukowców pod kierunkiem Galvin ustalił, że 5-minutowa ekspozycja z zastosowaniem helu powoduje powstanie w ścianie komórkowej *S. aureus* wgłębień znacznie mniejszych niż ma to miejsce w środowisku mieszaniny helu i powietrza. Tym niemniej wyniki te wykazują, że działanie sterylizacyjne plazmy związane jest nie tylko z działaniem wolnych rodników, ponieważ zachodzi ono także w środowisku zjonizowanych gazów szlachetnych. W procesie tym nie bez znaczenia jest również budowa ściany komórkowej, w której różnice w budowie peptydoglikanu i stopień jego acetylacji wpływają na efekt sterylizujący [15]. W przypadku *E. coli* i *B. subtilis* zastosowanie zimnej plazmy DBD doprowadziło do znacznego zniszczenia błony komórkowej i uwolnienia cytoplazmy do otaczającego medium jedynie u bakterii Gram-ujemnej. W przypadku *B. subtilis*, w obrazie mikroskopowym nie stwierdzono znaczących zmian morfologicznych. Zaobserwowano jedynie redukcję żywotności komórek [32].

W opinii wielu autorów publikacji naukowych, procesy zachodzące w komórce są wynikiem synergistycznego działania czynników powstających podczas generowania plazmy, peroksydacji lipidów w błonie komórkowej, uszkodzenie genomowego DNA i denaturacji białek [15, 32, 37, 38, 52]. Laroussi i wsp. sugerują również, że poza listą komórek, którą powoduje zimna plazma ma miejsce proces dyfuzji reaktywnych związków do wnętrza komórki bakteryjnej. Mogą one powodować śmierć komórki lub też wprowadzić ją w stan żyjącej ale nie dającej się hodować [32].

2.1. Efektywność działania sterylizującego

Metoda sterylizacji z zastosowaniem zimnej plazmy, generowanej w warunkach ciśnienia atmosferycznego jest coraz częściej badana w aspekcie eliminacji

drobnoustrojów i ich produktów metabolicznych z żywności. W przeciwieństwie do obecnie używanych metod termicznych proces ten nie powoduje znaczących zmian sensorycznych, koloru lub też utraty wartości odżywczych produktu.

Poddanie żywności procesowi plazmowania wprowadza konieczność uwzględnienia dodatkowych czynników ograniczających jej efektywność. Testy przeprowadzone przez Fernández i wsp., jednoznacznie wskazują, że skuteczność zimnej plazmy może zależeć od poziomu zróżnicowania struktury powierzchni badanych produktów żywnościowych. W badaniu wykorzystano sałatę, truskawki oraz ziemniaki, które zaszczepiono *Salmonella* ser. Typhimurium. W wyniku 15-minutowej obróbki plazmowej liczebność bakterii obniżyła się o 2,72 log na sałacie, na truskawkach o 1,76 log. Najmniejszą zaś redukcję uzyskano na ziemniakach – 0,94 log. Za przyczynę takich rozbieżności autorzy podają zróżnicowanie budowy powierzchni. Na podstawie analizy obrazów uzyskanych w mikroskopie skaningowym stwierdzili, że aparaty szparkowe w sałacie, pofałdowania powierzchni truskawek czy ziemniaka mogą przyczyniać się do „chowania” komórek bakteryjnych przez co zmniejsza się ich ekspozycja na czynniki sterylizujące plazmy [14]. Podobne wnioski wynikają z badań Ziuzina i wsp., którzy działaniu CAP poddali pomidory i truskawki. Poziom niewykrywalności drobnoustrojów na pomidorach uzyskano już po 10 sekundach plazmowania szczepów *Salmonella*, 60 sekundach *E. coli* i po 120 sekundach *L. monocytogenes*. W przypadku truskawek (bardziej złożona struktura powierzchni), znaczną redukcję liczebności mikroflory patogennej uzyskano dopiero po 300 sekundach plazmowania. Z powierzchni produktu izolowano o 3,5 log mniej *E. coli*, 3,8 log *Salmonella* ser. Typhimurium oraz 4,2 log *L. monocytogenes* [63].

W tym miejscu należało by również wspomnieć o znaczeniu budowy ściany komórkowej i związanej z tym skuteczności działania zimnej plazmy. W literaturze bowiem nie ma jednoznacznej opinii dotyczącej tych zależności. Według Ermolaeva i wsp., stosujących plazmę nietermiczną w leczeniu zakażeń ran u ludzi, skuteczność jej działania jest uzależniona od gatunku i pochodzenia szczepu. W przeprowadzonych przez autorów badaniach wykorzystano izolaty kliniczne oraz pochodzące z kolekcji szczepy bakterii Gram-ujemnych: *P. areuginosa*, *Burkholderia cenocepacia*, *E. coli* oraz bakterii Gram-dodatnich: *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecium*. Wszystkie testowane szczepy bakterii Gram-ujemnych wykazywały podobną podatność na obróbkę plazmową. Po 5 minutach plazmowania stwierdzono ich całkowitą eliminację. W przypadku szczepów Gram-dodatnich, autorzy wyróżnili poziomy wrażliwości drobnoustrojów

na wygenerowaną plazmę. Do średnio wrażliwych zaliczono *S. epidermidis* i *E. faecium*, natomiast kliniczne izolaty *S. pyogenes* i pochodzący z kolekcji szczep *S. aureus* do najmniej podatnych [13]. Odmienne wyniki badań w swojej pracy przedstawili Daeschlein i wsp. Wykazali oni bowiem, że bakterie Gram-dodatnie są znacznie bardziej wrażliwe niż Gram-ujemne. Jednocześnie wykazali, brak związku efektywności działania wygenerowanej plazmy z opornością na określone antybiotyki [10]. Nieco inne efekty badań uzyskali Galvin i wsp. Oceniali oni wpływ zimnej plazmy z zastosowaniem helu oraz mieszaniny helu z powietrzem na szczepy odporne na metycylinę (MRSA – *methicillin-resistant S. aureus*) i wrażliwe na metycylinę (MSSA – *methicillin-sensitive S. aureus*) oraz spory *Clostridium difficile*. Autorzy zaobserwowali brak wpływu rodzaju użytego gazu na skuteczność bakteriobójczą wobec klinicznego szczepu *S. aureus* MRSA, którego liczebność zmniejszała się od 5 do 1 log w tych samych warunkach sterylizujących, wyższą przeżywalność zaobserwowano natomiast dla szczepów *S. aureus* MSSA i brak istotnych zmian w liczebności dla *C. difficile* [15].

Kolejnym bardzo istotnym zagadnieniem jest wpływ plazmy na biofilm bakteryjny. Analiza mikroskopowa wykazała bowiem, że w wielowarstwowej strukturze drobnoustrojów zmniejszenie ich liczebności następuje w ograniczonym stopniu. Wynika to z bariery ochronnej, powstającej z górnej warstwy obumierających komórek, które ograniczają działanie plazmy [14]. W związku z tym pojawiają się sugestie, że metoda sterylizacji zimną plazmą może być jedynie zastosowana w przypadku niskiego poziomu kontaminacji [27]. Innych obserwacji dokonali Alkawareek i wsp., według których skuteczność działania omawianej techniki zależy od rodzaju drobnoustrojów tworzących biofilm oraz mechanicznej stabilności macierzy zewnątrzkomórkowej. Badania przeprowadzone na 48 godzinnej hodowli *Vibrio alginolyticus* oraz *Vibrio proteolyticus* wskazują na możliwość całkowitego zniszczenia biofilmów bakteryjnych, co uzyskano w czasie 60–120 sekundowego procesu plazmowania. Na uwagę zasługuje również fakt, iż stopień wrażliwości *V. alginolyticus* był znacznie większy niż w przypadku biofilmu *V. proteolyticus*. Sugerują również, że zimna plazma pod ciśnieniem atmosferycznym może być obiecującym narzędziem w usuwaniu biofilmu morskiego jak również biofilmu tworzącego się na powierzchni będącej w bezpośrednim kontakcie ze środowiskiem wodnym [1].

Eliminacja drobnoustrojów zazwyczaj powiązana jest z miejscem ich namnażania. Wykorzystanie zimnej plazmy w dekontaminacji mikrobiologicznej produktów żywnościowych pozwala jednocześnie na zachowanie podstawowych atrybutów produktu. Bardzo interesujące prace dotyczą działania plazmy na przyprawy. Według

danych amerykańskich 5% importowanych z krajów afrykańskich próbek pieprzu jest zanieczyszczonych bakteriami *Salmonella* [8], co wymusza na producentach wprowadzenie sterylizacji. Jednakże, wysoka temperatura znacząco zmienia ich teksturę oraz własności sensoryczne. Zastosowanie w tym procesie zimnej plazmy minimalizuje pojawianie się nieporządkach cech i ogranicza znacząco liczebność np. zarodników grzybów pleśniowych. Przeprowadzone przez Kim i wsp. badania dotyczące redukcji zarodników *A. flavus* i spor *B. cereus* jednoznacznie wskazują iż działanie zimnej plazmy spowodowało obniżenie ich liczebności, odpowiednio o 2,5 log i 3,4 log [25]. Na podkreślenie zasługuje również fakt, że proces plazmowania nie wpłynął istotnie na wartości smakowe i zapachowe dekontaminowanych przypraw [16]. Podobne wnioski technologiczne uzyskano w eksperymencie przeprowadzonym przez Kim i wsp. W tym przypadku, sterylizacji poddano bekon, a inaktywowanymi bakteriami były: *L. monocytogenes*,

Salmonella ser. Typhimurium oraz *E. coli*. Zastosowanie mieszaniny gazów helu z tlenem zredukowało liczebność drobnoustrojów o 2–3 cykle logarytmiczne [24].

Zastosowanie plazmy nietermicznej ma również miejsce w przemyśle mleczarskim tym bardziej, że coraz częściej pojawia się na rynku „mleko prosto od krowy” – nie poddane obórcie termicznej. Odkażanie mleka, ze względu na jego specyficzną strukturę jest procesem bardzo trudnym. Krótki czas oraz uzyskiwane temperatury podczas procesu plazmowania nie wpływają w znaczący sposób na własności tego produktu przy jednoczesnej redukcji drobnoustrojów [18]. Przeprowadzone przez Gurol i wsp. badania wskazują, że liczebność *E. coli* w mleku (3,0% tłuszczu) została obniżona z początkowej wartości 7,78 log CFU/ml do 3,63 log CFU/ml w czasie 20 minutowej obróbki. Nieco mniejszą skuteczność czynników sterylizujących oznaczono w mleku o mniejszej zawartości tłuszczu i mleku od tłuszczonym [18]. Zestawienie danych dotyczących

Tabela I

Przykładowe publikacje dotyczące zastosowania zimnej plazmy do zabijania drobnoustrojów w żywności

Drobnoustrój	Sposób generowania plazmy	Środowisko	Stopień redukcji drobnoustrojów	Piśmienictwo
<i>Citrobacter freundii</i>	Plasmajet Ar+0,1%O ₂	Sok jabłkowy	5 log	[52]
<i>Escherichia coli</i>	Wyładowanie koronowe, powietrze	Sałata, marchew, pomidory	1,6 log	[4]
<i>Escherichia coli</i>	Wyładowanie koronowe, powietrze	Mleko	5 log	[18]
<i>Listeria innocua</i>	Wyładowanie koronowe He+5%O ₂	Mięso, skóra drobiowa	1 log skóra, 3 log mięso	[42]
Ogólna liczba psychotrofów, grzybów i pleśni	Reaktor plazmy pulsacyjnej He, N, Ar	Mięso wieprzowe	2–3 log	[57]
Spory <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Bacillus cereus</i>	Reaktor mikrofalowy N ₂ , N ₂ +O ₂ , He, N ₂ +O ₂ , He+O ₂	Mielona czerwona papryka	<i>A. flavus</i> 2,5 ± 0,3 log <i>B. cereus</i> 3,4 ± 0,7 log	[25]
<i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Salmonella</i> ser. Typhimurium	Wyładowanie DBD	Powierzchnia skorup jaj kurzych	<i>S. Enteritidis</i> 4,5 log <i>S. Typhimurium</i> 2,5 log	[44]
<i>Listeria innocua</i>	Wyładowanie DBD, Ar 70%+30% O ₂	Breasola-plasterkowane mięso	0,8–1,6 log	[45]
<i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.	Reaktor niskociśnieniowy, powietrze, SF6	Nasiona pomidorów, pszenicy, fasoli, grochu, soi, jęczmienia, owsa, żyta, soczewicy, kukurydzy	3 log	[48]
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Reaktor niskociśnieniowy, powietrze, SF6	Orzechy laskowe, ziemne, pistacje	1 log	[3]
<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> ser. Typhimurium, <i>Listeria monocytogenes</i>	Wyładowanie DBD, powietrze	Pomidory, truskawki	Pomidor – <i>Salmonella</i> – 3,1 log, <i>E. coli</i> – 6,3 log <i>L. monocytogenes</i> – 6,7 log, Truskawki – <i>E. coli</i> – 3,5 log, <i>Salmonella</i> – 3,8 log, <i>L. monocytogenes</i> – 4,2 log	[63]
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium	Reaktor mikrofalowy, O ₂	Szpinak, sałata, pomidory, ziemniaki	Szpinak – 3,0 log Sałata – 2,7 log Pomidor – 2,3 log Ziemniaki – 2,2 log	[62]
<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> ser. Typhimurium	Wyładowanie DBD, He, He+O ₂	Plasterkowany bekon	Hel – 1–2 log, Mix hel i tlen – 2–3 log	[24]

działania plazmy na drobnoustroje występujące w żywności przedstawiono w tabeli I.

Wykorzystanie zimnej plazmy w technologii żywności nie powinno ograniczać się jedynie do procesów niszczenia żywych drobnoustrojów w środowisku. Basaran i wsp., w swoich badaniach zwracają uwagę, że poza faktem eliminacji *Aspergillus parasiticus*, wynikiem procesu plazmowania jest również redukcja ich produktów metabolicznych. Stwierdzili oni zmniejszenie o 50% ilości aflatoksyn: B1, B2, G1 i G występujących w orzechach [3]. Surowsky i wsp., natomiast wykazali redukcję aktywności oksydazy polifenolowej i peroksydazy – enzymów odpowiedzialnych za enzymatyczne brązowienie owoców i warzyw oraz wyrabianych z nich świeżych soków [51].

3. Zastosowanie zimnej plazmy w medycynie

W efekcie działania plazmy na żywe organizmy podkreśla się głównie ich wpływ na biopolimery występujące w komórkach. Obróbka plazmowa może doprowadzić do: sieciowania, czyli tworzenia nowych wiązań, wytrawiania – usunięcia z polimeru pewnych składowych bądź wstawiania – dołączania się zjonizowanych cząstek do makromolekuł [55].

Bardzo intensywnie prowadzone są prace nad zastosowaniem zimnej plazmy w medycynie. Dowodem zainteresowania tą problematyką jest pojawienie się terminu „plazma oncology”. Badania te ogniskują się na określaniu bezpośredniego działania plazmy na stan fizjologiczny komórek prawidłowych i nowotworowych, hamowaniem rozwoju nowotworów i przyspieszeniem gojenia się ran. W tym ostatnim przypadku dodatkowym elementem jest działanie plazmy na bakterie rozwijające się w zranionej tkance [17].

Mai-Prochnow i wsp. podzielili działanie plazmy na komórki organizmów wyższych w zależności od mocy dawki. Przy niskich dawkach, dochodzi do zabicia bakterii lecz nie ma to wpływu na komórki ssaków. Przy średnich, zachodzi proces przyspieszenia gojenia ran, zwiększenia proliferacji komórek, zwiększenia wydzielania czynnika wzrostu oraz apoptozy komórek nowotworowych. Wysokie dawki plazmy powodują śmierć komórek ssaków i nekrozę tkanek. Szczególnie ważną rolę przeciwnowotworową przypisuje się aktywnej formie tlenu azotu NO^{*}, która ma hamować angiogenezę, metastazy, zwiększać apoptozę, cytotoksyczność i chemiowrażliwość [36].

Ze względu na duże zainteresowanie plazmą przez chirurgów i dermatologów podjęto badania nad jej wpływem na ludzkie keratynocyty. Stwierdzono, że plazma generowana przez 1–5 min techniką DBD nie wpływała na apoptozę komórek HaCaT, natomiast poddawanie działaniu zimnej plazmy przez 10 do

20 min powodowało wzrost apoptozy, zmieniało morfologię tych komórek i ich żywotność. Interesujące przy tym jest to, że wymiana podłoża po działaniu plazmy znacznie obniżała destrukcyjne działanie procesu co jest dowodem na wpływ plazmy na środowisko wodne. Autorzy wykazali, że w podłożu tworzone są reaktywne formy tlenu, które odpowiedzialne są za efekt destrukcyjny [5].

Haertel i wsp. badali wpływ DBD z użyciem argonu i tlenu na apoptozę komórek HaCaT oraz na koncentrację integryn na ich powierzchni. Stwierdzili, że tlen wzmacnia apoptozę komórek i zwiększa koncentrację wyżej wymienionych białek adhezyjnych na ich powierzchni [19]. Grupa tego samego badacza analizowała także działanie plazmy DBD na szczurze mononuklearne komórki śledzionowe. Autorzy zanotowali różną wrażliwość tych komórek na plazmę. W 24 godziny po naświetleniu najmniejszą żywotność wykazywały limfocyty T helper w przeciwieństwie do limfocytów B [20]. W dalszych badaniach prowadzonych na ludzkich komórkach CD4⁺ oraz monocytach linii THP-1 wykazano, że plazma zwiększa ilość komórek ulegających apoptozie wskutek aktywacji pro-apoptotycznych białek sygnałowych. Intrygującym było to, że dochodziło także do aktywacji pro-proliferacyjnych cząstek sygnałowych co może tłumaczyć pozytywne działanie plazmy w gojeniu się ran [7]. Analizując działanie mikrodysz plazmowych z zastosowaniem helu na mysie komórki nowotworowe TC-1 i fibroblasty CL.7 wykazano, że komórki nowotworowe są znacznie bardziej wrażliwe niżeli fibroblasty. Istotnym jest, że plazma indukowała apoptozę komórek nie działała natomiast bezpośrednio nekrotycznie [26]. Plazmowanie może także przyspieszać rozmnażanie i migracyjność fibroblastów wskutek stymulacji wydzielania FGF 1 (czynnik wzrostu fibroblastów – *fibroblast growth factor*) [41]. Walk i wsp. badali wpływ zimnej plazmy na myszą neuroblastomę. W warunkach *in vitro* zanotowali zmniejszenie metabolicznej aktywności komórek nowotworowych i wzrost apoptozy. *In vivo* zanotowano zmniejszenie wielkości rozwijającego się guza oraz ponad dwukrotne przedłużenie życia zwierząt [58]. Zachęcające wyniki uzyskali również Brulle i wsp. zajmujący się nowotworem trzustki. Plazmowanie powodowało zahamowanie namnażania komórek nowotworowych trzustki MIA PaCa2 *in vitro* zaś *in vivo* efekt był wzmacniany poprzez zastosowanie gemcytabin-antynowotworowego chemioterapeutyku [6]. Interesujące badania z użyciem nanosekundowej plazmy w układzie JET przeprowadzili Xiong i wsp. Materiałem badawczym były mysie komórki nerwowe, które poddane ekspozycji na plazmę wykorzystującą wyładowania impulsowe, wykazywały szybką proliferację – ulegały różnicowaniu z powstaniem dłuższych neurytów a także powstaniem komórek formujących sieci

neuronowe. Autorzy podają, że zastosowana plazma nanosekundowa w układzie JET była w stanie różnicować około 75 % komórek nerwowych w neurony, co ważne, z większą skutecznością niż przy zastosowaniu czynnika wzrostu nerwu [61].

Interesujące wyniki badań *in vitro* oraz *in vivo* na zwierzętach zaowocowały próbami wprowadzenia technologii zimnej plazmy do kliniki. Obecnie największe zainteresowanie wykazują dermatolodzy, chirurdzy, kosmetolodzy oraz stomatolodzy. Próbuje się ją stosować do leczenia przewlekłych ran w tym odleżyn oraz dezynfekcji kanałów korzeni zębowych [22]. Niewątpliwym zachęceniem wprowadzania techniki zimnej plazmy do klinik jest taka praca Ngo i wsp., którzy wykazali znaczne zwiększenie angiogenezy i odtwarzanie nabłonka w ranach oparzeniowych u myszy [40]. W celu ograniczenia zakażeń wewnątrzszpitalnych, sugeruje się także zastosowanie technologii plazmy nietermicznej do mikrobiologicznej dekontaminacji środowisk szpitalnych [43].

Plazma niskotemperaturowa znajduje już praktyczne zastosowanie w sterylizacji narzędzi medycznych. W urządzeniach tego typu wstępnie wytwarza się próżnię po czym następuje wypełnienie sterylizatora gazowym nadtlakiem wodoru. Następnym etapem jest generowanie plazmy wskutek czego powstaje wysoka koncentracja aktywnych rodników. Do głównych zalet tego procesu należy zaliczyć bardzo niskie koszty eksploatacji, bezpieczeństwo procesu sterylizacji oraz ograniczenie korozji i uszkodzeń sterylizowanych przedmiotów.

4. Podsumowanie

Zimna plazma generuje w środowisku gazowym i wodnym powstawanie wolnych rodników tlenu, azotu oraz wysokoenergetycznych elektronów. Wywiera przez to działanie na komórki prokariotyczne jak i eukariotyczne. Uzyskiwane efekty zależą od źródła zimnej plazmy, mocy urządzenia, częstotliwości prądu, długości trwania pojedynczego impulsu wzbudzającego, czasu oddziaływania plazmy na komórki i tkanki oraz rodzaju użytego gazu. W przypadku prokariotów dochodzi do uszkodzenia struktur zewnętrznych jak ściany i błony komórkowej, DNA oraz aparatu enzymatycznego. W związku z tym większość badań skupia się na efektywności procesu sterylizacji. W medycynie badana jest możliwość eliminacji drobnoustrojów z zakażonych ran, kanałów zębowych oraz środowiska szpitalnego. W technologii żywności dekontaminacja patogenów i mikroflory zepsucia ma na celu zwiększenie trwałości i bezpieczeństwa żywności. Działanie plazmy na komórki eukariotyczne daje wielorakie efekty. W przypadku nowotworów zmniejsza angioge-

nezę i metastazy oraz zwiększa apoptozę, cytotoksyczność i chemiowrażliwość komórek nowotworowych. W przypadku komórek nienowotworowych wpływa na ich różnicowanie, tempo podziałów oraz produkcję cytokin. Z tego względu uznaje się tę technikę za nowe narzędzie w medycynie a w szczególności w onkologii. Technologia ta jednak wymaga wielu dalszych badań i optymalizacji przed wdrożeniem jej do rutynowego zastosowania w medycynie, przemyśle spożywczym jak i wielu innych dziedzinach nauki.

Piśmiennictwo

1. Alkawareek M.Y., Gorman S.P., Graham W.G., Gilmore B.F., Gorman S.P.: Eradication of marine biofilms by atmospheric pressure non-thermal plasma: A potential approach to control biofouling. *Int. Biodeter. Biodegr.* **86**, 14–18 (2014)
2. Bárδος L., Baránková H.: Cold atmospheric plasma: Sources, processes and applications. *Thin Solid Films*, **518**, 6705–6713 (2010)
3. Basaran P., Basaran-Akgul N., Oksuz L.: Elimination of *Aspergillus parasiticus* from nut surface with low pressure cold plasma (LPCP) treatment. *Food Microbiol.* **25**, 626–632 (2008)
4. Bermúdez-Aguirre D., Wemlinger E., Pedrow P., Barbosa-Cánovas G., Garcia-Perez M.: Effect of atmospheric pressure cold plasma (APCP) on the inactivation of *Escherichia coli* in fresh produce. *Food Control*, **34**, 149–157 (2013)
5. Blackert S., Haertel B., Wende K., Woedtke T., Lindequist U.: Influence of non-thermal atmospheric pressure plasma on cellular structures and processes in human keratinocytes (HaCaT). *J. Dermatol. Sci.* **70**, 173–181 (2013)
6. Brulle L., Alain P. i wsp.: Effects of a non thermal plasma treatment alone or in combination with gemcitabine in a MIA PaCa2-luc Orthotopic Pancreatic Carcinoma Model. *PLoS one*, **7**, e52653 (2012)
7. Bundscherer L., Lindequist U. i wsp.: Impact of non-thermal plasma treatment on MAPK signaling pathways of human immune cell lines. *Immunobiology*, **218**, 1248–1255 (2013)
8. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Draft Risk Profile: Pathogens and Filth in Spices, Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services, 38–40 (2013)
9. Cooper M., Fridman G., Fridman A., Joshi S.G.: Biological responses of *Bacillus stratosphericus* to floating electrode-dielectric barrier discharge plasma treatment. *J. Appl. Microbiol.* **6**, 2039–2048 (2010)
10. Daeschlein G., Junger M. i wsp.: *In vitro* susceptibility of multi-drug resistant skin and wound pathogens against Low Temperature Atmospheric Pressure Plasma Jet (APPJ) and Dielectric Barrier Discharge Plasma (DBD). *Plasma Process. Polym.* **11**, 175–183 (2014)
11. Dzimitrowicz A., Jamróz P., Nowak P.: Sterylizacja za pomocą niskotemperaturowej plazmy generowanej, w warunkach ciśnienia atmosferycznego. *Post. Mikrobiol.* **54**, 195–200 (2015)
12. Elkin I.: Wpływ niskociśnieniowej plazmy na aktywność biologiczną immunocytów. *Doniesienie wstępne. Inz. Biomed.* **15**, 387–398 (2009)
13. Ermolaeva S.A., Gintsburg A.L.: Bactericidal effects of non-thermal argon plasma *in vitro*, in biofilms and in the animal model of infected wounds. *J. Med. Microbiol.* **60**, 75–83 (2010)
14. Fernández A., Noriega E., Thompson A.: Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on fresh produce by cold atmospheric gas plasma technology. *Food Microbiol.* **33**, 24–29 (2013)

15. Galvin S., Cahill O., O'Connor N., Cafolla A.A., Daniels S., Humphreys H.: The antimicrobial effects of helium and helium-air plasma on *Staphylococcus aureus* and *Clostridium difficile*. *Lett. Appl. Microbiol.* **57**, 83–90 (2013)
16. Grabowski M., Hołub M., Balcerak M., Kalisiak S., Dąbrowski W.: Decontamination of black pepper powder using dielectric barrier discharge systems in atmospheric pressure. *Jpn. J. Appl. Phys.* **1**, DOI: 10.13140/2.1.1798.5287 (2015)
17. Graves D.B.: Reactive species from cold atmospheric plasma: implications for cancer therapy. *Plasma Process. Polym.* **11**, 1120–1127 (2014)
18. Gurol C., Ekinci F.Y., Aslan N., Korachi M.: Low temperature plasma for decontamination of *E. coli* in milk. *Int. J. Food Microbiol.* **157**, 1–5 (2012)
19. Haertel B., Straßenburg S., Oehmigen K., Wende K., Woedtke T., Lindequist U.: Differential influence of components resulting from atmospheric-pressure plasma on integrin expression of human HaCaT keratinocytes. *BioMed. Research International.* **2013**, 1–9 (2013)
20. Haertel B., Volkman T., Woedtke U.: Differential sensitivity of lymphocyte subpopulations to non-thermal atmospheric-pressure plasma. *Immunobiology*, **217**, 628–633 (2012)
21. Helmke A., Grunig P., Fritz U.M., Wandke D., Emmert S., Petersen K., Viöl W.: Low-temperature plasma – a prospective microbicidal tool. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* **7**, 223–30 (2012)
22. Jiang C., Chen M.-T., Gorur A., Schaudinn C., Jaramillo D.E., Costerton J.W., Sedghizadeh P.P., Vernier P.T., Gundersen M.A.: Nanosecond pulsed plasma dental probe. *Plasma Process. Polym.* **6**, 479–483 (2009)
23. Julak J., Scholtz V., Kotucova S., Janouskova O.: The persistent microbicidal effect in water exposed to the corona discharge. *Phys. Medica*, **28**, 230–239 (2012)
24. Kim B., Yun H., Jung S., Jung Y., Jung H., Choe W., Jo C.: Effect of atmospheric pressure plasma on inactivation of pathogens inoculated onto bacon using two different gas compositions. *Food Microbiol.* **28**, 9–13 (2011)
25. Kim J.E., Lee D.-U., Min S.C.: Microbial decontamination of red pepper powder by cold plasma. *Food Microbiol.* **38**, 128–136 (2014)
26. Kim J.Y., Ballatob J., Foy P., Hawkins T., Wei Y., Li J., Kim S.-O.: Apoptosis of lung carcinoma cells induced by a flexible optical fiber-based cold microplasma. *Biosens. Bioelectron.* **28**, 333–338 (2011)
27. Kim J.-S., Lee E.-J., Choi E.H., Kim Y.-J.: Inactivation of *Staphylococcus aureus* on the beef jerky by radio-frequency atmospheric pressure plasma discharge treatment. *IFSET*. **22**, 124 – 130 (2014)
28. Klämpfl T.G., Schmidt H.-U. i wsp.: Cold atmospheric air plasma sterilization against spores and other microorganisms of clinical interest. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 5077–5082 (2012)
29. Kojtari A., Ercan U., Smith J., Friedman G., Sensenig R.B., Tyagi S., Joshi S.G., Ji H.-F., Brooks A.D.: Chemistry for antimicrobial properties of water treated with non-equilibrium plasma. *J. Nanomedicine. Biotherapeutic Discov.* **4**, DOI: 10.4172/2155-983X.1000120 (2013)
30. Lackmann J.W., Bandow J.E.: Inactivation of microbes and macromolecules by atmospheric-pressure plasma jets. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 6205–6213 (2014)
31. Langmuir I.: Oscillations in ionized gases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **14**, 627–637 (1928)
32. Laroussi M., Mendis D.A., Rosenberg M.: Plasma interaction with microbes. *New J. Phys.* **5**, 41.1–41.10 (2003)
33. Laroussi M., Rader M., Dyer F., Dever M., Alexeff I.: Plasma-Aided Sterilization. *APS DPP Bull.* **41**, 1539–1540 (1996)
34. Lerouge S., Wertheimer M.R., Yahia L.H.: Plasma sterilization: A review of parameters, mechanisms and limitations. *Plasma Polym.* **6**, 175–188 (2001)
35. Liu F., Sun P., Bai N., Tian Y., Zhou H., Wei S., Zhou Y., Zhang J., Fang J.: Inactivation of bacteria in an aqueous environment by a direct-current, cold atmospheric-pressure air plasma microjet. *Plasma Process. Polym.* **7**, 231–236 (2010)
36. Mai-Prochnow A., Murphya A.B., McLean K.M., Kongc M.G., Ostrikov K.: Atmospheric pressure plasmas: Infection control and bacterial responses. *Int. J. Antimicrob. Agents*, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.01.025> (2014)
37. Moisan M., Barbeau J., Moreau S., Pelletier J., Tabrizian M., Yahia L.H.: Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *Int. J. Pharm.* **226**, 1–21 (2001)
38. Moreau M., Orange N., Feuilloley M.G.: Non-thermal plasma technologies: new tools for bio-decontamination. *Biotechnol. Adv.* **26**, 610–617 (2008)
39. Mystkowska J., Dąbrowski J.R., Kowal K., Nemirowicz K., Car H.: Physical and chemical properties of deionized water and saline treated with low-pressure and low-temperature plasma. *Chemik*, **67**, 719–724 (2013)
40. Ngo M.-H.T., Liao J.-D., Shao P.-L., Weng C.-C., Chang C.-Y.: Increased fibroblast cell proliferation and migration using atmospheric N₂/Ar Micro-Plasma for the stimulated release of fibroblast growth factor-7. *Plasma Process. Polym.* **11**, 80–88 (2014)
41. Ngo M.-H.T., Shao P.-L., Liao J.-D., Lin C.-C. K., Yip H.-K.: Enhancement of angiogenesis and epithelialization processes in mice with burn wounds through ROS/RNS signals generated by non-thermal N₂/Ar Micro-Plasma. *Plasma Process. Polym.* **11**, 1076–1088 (2014)
42. Noriega E., Shama G., Laca A., Díaz M., Kong M.G.: Cold atmospheric gas plasma disinfection of chicken meat and chicken skin contaminated with *Listeria innocua*. *Food Microbiol.* **28**, 1293–1300 (2011)
43. O'Connor N., Cahill O., Daniels S., Galvin S., Humphreys H.: Cold atmospheric pressure plasma and decontamination. Can it contribute to preventing hospital-acquired infections? *J. Hosp. Infect.* **88**, 59–65 (2014)
44. Ragni L., Berardinelli A., Vannini L., Montanari C., Sirri F., Guerzoni M.E., Guarneri A.: Non-thermal atmospheric gas plasma device for surface decontamination of shell eggs. *J. Food Eng.* **100**, 125–132 (2010)
45. Rød S.K., Hansen F., Leipold F., Knøchel S.: Cold atmospheric pressure plasma treatment of ready-to-eat meat: Inactivation of *Listeria innocua* and changes in product quality. *Food Microbiol.* **30**, 233–238 (2012)
46. Russell N.J., Colley M., Simpson R.K., Trivett A.J., Evans R.I.: Mechanism of action of pulsed high electric field (PHEF) on the membranes of food-poisoning bacteria is an “all-or-nothing” effect. *Int. J. Food Microbiol.* **55**, 133–136 (2000)
47. Ryu Y.-H., Kim Y.-H., Lee J.-Y., Shim G.-B., Uhm H.-S., Park G., Choi E.H.: Effects of background fluid on the efficiency of inactivating yeast with non-thermal atmospheric pressure plasma. *PLoS one*, **8**(6): e66231, DOI:10.1371/journal.pone.0066231 (2013)
48. Selcuk M., Oksuz L., Basaran P.: Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by cold plasma treatment. *Bioresour. Technol.* **99**, 5104–5109 (2008)
49. Sharma A., Collins G., Pruden A.: Differential gene expression in *Escherichia coli* following exposure to nonthermal atmospheric pressure plasma. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 1440–1449 (2009)

50. Stryczewska H.D.: Technologie plazmowe w energetyce i inżynierii środowiska. Wydawnictwo Politechniki Lubelskiej, Lublin (2009)
51. Surowsky B., Fischer A., Schlueter O., Knorr D.: Cold plasma effects on enzyme activity in a model food system. *IFSET*. **19**, 146–152 (2013)
52. Surowsky B., Fröhling A., Gottschalk N., Schlüter O., Knorr D.: Impact of cold plasma on *Citrobacter freundii* in apple juice: inactivation kinetics and mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* **17**, 63–71 (2014)
53. Szalatkiewicz J.: Wytwarzanie plazmy i jej zastosowania. *PAR*. **3**, 9–12 (2010)
54. Terrier O., Moules V. i wsp.: Cold oxygen plasma technology efficiency against different airborne respiratory viruses. *J. Clin. Virol.* **45**, 119–124 (2009)
55. Thirumidas R., Sarangapani C., Annapure U.S.: Cold plasma: A novel non-thermal technology for food processing. *Food Biophys. S.* **10**, 1–11 (2015)
56. Tyczkowska-Sieroń E., Markiewicz J.: Inaktywacja grzybów z rodzaju *Candida* przy użyciu zimnej plazmy atmosferycznej – na drodze ku nowej metodzie eradykacji grzybic powierzchniowych. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **66**, 121–129 (2014)
57. Ulbin-Figlewicz N., Brychcy E., Jarmoluk A.: Effect of low-pressure cold plasma on surface microflora of meat and quality attributes. *J. Food Sci. Technol.* **52**, 1228–1232 (2015)
58. Walk R.M., Snyder J.A., Srinivasan P., Kirsch J., Diaz S.O., Blancom F.C., Shashurin A., Keidar M., Sandler A.D.: Cold atmospheric plasma for the ablative treatment of the ablative treatment of neuroblastoma. *J. Pediatr. Surg.* **48**, 67–73 (2013)
59. Weiyuan N., Longfei J., Jinhai N., Hongyu F., Ying S., Qi Z., Dongping L.: Plasma inactivation of *Escherichia coli* cells by atmospheric pressure air brush-shape plasma. *Surf. Coat. Tech.* **234**, 120–125 (2013)
60. Wiktor A., Śledź M., Nowacka M., Witrowa-Rajchert D.: Możliwości zastosowania niskotemperaturowej plazmy w technologii żywności. *Żywn. Nauka Technol. Jakość*, **5**, 5–14 (2013)
61. Xiong Z., Zhao S., Mao X., Lua X., Heb G., Yang G., Chenb M., Ishaq M., Ostrikov K.: Selective neuronal differentiation of neural stem cells induced by nanosecond microplasma agitation. *Stem Cell Research*, **12**, 387–399 (2014)
62. Zhanga M., Oh J.K., Cisneros-Zevallos L., Akbulut M.: Bactericidal effects of nonthermal low-pressure oxygen plasma on *S. typhimurium* LT2 attached to fresh produce surfaces. *J. Food Eng.* **119**, 425–432 (2013)
63. Ziuzina D., Patil S., Cullen P.J., Keener K.M., Bourke P.: Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh produce. *Food Microbiol.* **42**, 109–116 (2014)