

Određivanje parametara stresa kod bakterije *Listeria innocua* nakon tretmana plazmom

Žugčić, Tihana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:805199>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-30**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2018.

Tihana Žugčić

772/PI

**ODREĐIVANJE PARAMETARA
STRESA KOD BAKTERIJE *Listeria*
innocua NAKON TRETMANA
PLAZMOM**

Rad je izrađen u Laboratoriju za procesno-prehrambeno inženjerstvo, Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak te uz pomoć asistentice Višnje Stulić, mag. ing.

ZAHVALA

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak na svoj njezinoj pomoći, prenesenom znanju, ukazanim prilikama za daljnjim napretkom koji ne bi bio moguć bez njenog poticaja, motivacije i podrške.

Zahvaljujem se i mag. ing. Višnji Stulić na njenom stručnom vodstvu i pomoći u tehnološkoj izvedbi diplomskog rada te na svom vremenu koje mi je posvetila.

Zahvaljujem se i doc. dr. sc. Tomislavi Vukušić na pomoći u tehnološkoj izvedbi diplomskog rada, svim udijeljenim savjetima i podršci.

Također se zahvaljujem svojim prijateljicama uz koje je period studiranja imao posebne čari.

Najveće zahvale upućujem svojoj obitelji, koja je uvijek bila uz mene, vjerovala u moj uspjeh, podržavala me te s razumijevanjem i vjerovanjem prihvaćala sve moje odluke.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procesno-prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

ODREĐIVANJE PARAMETARA STRESA KOD BAKTERIJE *Listeria innocua* NAKON TRETMANA PLAZMOM

Tihana Žugčić, 772/PI

Sažetak: Svrha ovog rada je proučiti odgovor bakterije *Listeria innocua* ATCC 33091 na stres izazvan tretmanom hladnom plazmom. Uzorci bakterijske suspenzije tretirani su tekućinskom plazmom u mješuricama argona. Promatran je utjecaj plazme na stopu redukcije, revitalizaciju, koncentraciju slobodnih radikala, istjecanje unutarstaničnog sadržaja te stvaranje biofilma. Uzorci su tretirani uz tri nezavisne varijable: vrijeme izloženosti plazmi (5 i 10 min), frekvencija (60, 90 i 120 Hz) i polaritet (pozitivan i negativan). Rezultati su analizirani metodom odzivne površine (RSM) koristeći program STATGRAPHICS Centurion. Pri pozitivnom polaritetu, uz frekvenciju od 90 Hz postignuta je potpuna inaktivacija bakterijskih stanica nakon 5 minuta tretmana te najviši stupanj redukcije ($6,25 \log_{10} \text{CFU mL}^{-1}$). Najveći porast koncentracije radikala je pri pozitivnom polaritetu, uz frekvenciju od 120 Hz i 10 minuta tretiranja. Najznačajnija redukcija stvaranja biofilma (90,05 %) postignuta je nakon 10 minuta tretmana, pri pozitivnom polaritetu i 120 Hz. Bolja inaktivacija postignuta je pri pozitivnom polaritetu, dok je pri negativnom polaritetu postignut manji postotak revitalizacije, iako je kod svih tretiranih uzoraka došlo do revitalizacije stanica nakon inkubacije od 24 sata.

Ključne riječi: hladna plazma, *Listeria innocua*, inaktivacija, revitalizacija, parametri stresa

Rad sadrži: 52 stranice, 21 sliku, 8 tablica, 56 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak

Pomoć pri izradi: Višnja Stulić, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić
2. Izv. prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak
3. Prof. dr. sc. Ksenija Markov
4. Doc. dr. sc. Tomislava Vukušić (zamjena)

Datum obrane: 5. srpnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Food Processes Engineering

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

DETERMINATION OF STRESS PARAMETERS IN BACTERIA *Listeria innocua* AFTER PLASMA TREATMENT

Tihana Žugčić, 772/PI

Abstract: The aim of this work is to analyze bacterial behavioral responses of *Listeria innocua* ATCC 33091 on the creation of stress parameters after cold plasma treatment. Samples of the bacterial suspension were treated by plasma generated in bubbles of argon immersed in liquid. The influence of cold plasma on the degree of reduction and recovery of *Listeria innocua* ATCC 33091, the leakage of intercellular content, free radical concentration and formation of biofilm were determined. The samples were treated using three independent variables: exposure time to plasma (5 and 10 min), frequency (60, 90 and 120 Hz) and polarity (positive and negative). The results were analyzed using the STATGRAPHICS Centurion program and results were represented by response surface methodology (RSM). Complete inactivation was achieved at the positive polarity, frequency of 90 Hz and 5 minutes treatment. The highest increase in free radical concentration was at positive polarity, 120 Hz and 10 minutes treatment. The best effect on reduction of biofilm formation (90,05 %) is achieved after 10 minutes, at positive polarity and 120 Hz. The results showed better inactivation at positive polarity and reduced recuperation at negative polarity. All the samples were recovered after the incubation period of 24 hours.

Keywords: cold plasma, *Listeria innocua*, inactivation, recovery, stress parameters

Thesis contains: 52 pages, 21 figures, 8 tables, 56 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD. Anet Režek Jambrak, Associate Professor*

Technical support and assistance: *Višnja Stulić, MSc*

Reviewers:

1. PhD. *Jasna Mrvčić*, Associate professor
2. PhD. *Anet Režek Jambrak*, Associate Professor
3. PhD. *Ksenija Markov*, Full professor
4. PhD. *Tomislava Vukušić*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 5 July 2018

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Četvrto agregatno stanje – plazma	3
2.2. Nastanak plazme – pobuđivanje elektrona	4
2.3. Klasifikacija plazmi	6
2.4. Hladna atmosferska plazma	7
2.5. Plazma u tekućinama	8
2.6. Primjena plazme – inaktivacija bakterija	9
2.6.1. Stres i odgovor mikroorganizama na stres	11
2.6.2. Ovisnost mikrobne inaktivacije o svojstvima mikroorganizama i plazme	12
2.7. Karakteristike bakterijskih vrsta roda <i>Listeria</i>	13
2.7.1. Karakteristike bakterijske vrste <i>Listeria innocua</i>	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. Materijali	15
3.1.1. Odabrani mikroorganizam	15
3.1.2. Hranjive podloge	15
3.1.3. Kemikalije	15
3.1.4. Izvor tekućinske plazme	15
3.1.5. Priprema uzoraka	16
3.1.5.1. Čuvanje i uzgoj mikrobne kulture	16
3.1.5.2. Priprema potrebnih reagensa i hranjivih podloga	17
3.2. Metode rada	18
3.2.1. Priprema suspenzije mikroorganizma	18
3.2.2. Priprema uzoraka za tretiranje plazmom	18
3.2.3. Obrada uzoraka tekućinskom plazmom	19
3.2.4. Određivanje temperature	19
3.2.5. Određivanje broja stanica	20
3.2.6. Određivanje koncentracije slobodnih radikala	20
3.2.7. Određivanje istjecanja unutarstaničnog sadržaja	21
3.2.8. Određivanje biofilma	22
3.2.9. Određivanje revitalizacije stanica	23

3.2.10. Obrada podataka	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. Utjecaj hladne plazme na stopu redukcije	26
4.1.1. Rezultati statističke obrade za stopu redukcije	28
4.2. Utjecaj hladne plazme na revitalizaciju stanica nakon tretmana hladnom plazmom	30
4.2.1. Rezultati statističke obrade za revitalizaciju	31
4.3. Utjecaj hladne plazme na formiranje biofilma	33
4.3.1. Rezultati statističke obrade za formiranje biofilma	35
4.4. Utjecaj hladne plazme na istjecanje staničnog sadržaja	37
4.4.1. Rezultati statističke obrade za istjecanje staničnog sadržaja (A 260 nm i A 280 nm)	39
4.5. Utjecaj hladne plazme na stvaranje slobodnih radikala	42
4.5.1. Rezultati statističke obrade za slobodne radikale (stvaranje H ₂ O ₂)	43
5. ZAKLJUČAK	47
6. LITERATURA	48

1. UVOD

Opstanak ljudske vrste i nastanak zajednica može se pripisati saznanju kako očuvati hranu. Njeno čuvanje isprva je čovjeku predstavljalo izazov, no postepeno otkrivanje i razvijanje novih metoda očuvanja i prerade hrane dovelo je do konstantnog rasta interesa za razvojem i poboljšanjima u prehrambenoj industriji.

Tijekom godina, ljudska se potražnja za visoko kvalitetnom hranom s obiljem nutrijenata, arome i prirodnih okusa nije prestajala povećavati. Vodeći se zdravim životnim stilom, zahtjev potrošača za minimalno procesiranom hranom, što sličnijom svježim proizvodima, potiče industrijama izazov i interes za razvojem inovativnih pristupa prerade hrane. Kako bi se postigla ekonomičnija, brža, kvalitetnija i ekološki prihvatljivija obrada sirovina, s ciljem dobivanja proizvoda izvrsne kvalitete, konvencionalni procesi sve se češće zamjenjuju novima, a upotreba organskih otapala nastoji se minimalizirati te zamijeniti „zelenim“ otapalima.

Stoga se mnogo napora ulaže u razvijanje i istraživanje alternativnih tehnologija, među kojima su:

- fizikalne tehnologije: visoki hidrostatski tlak (high-hydrostatic pressure), visokotlačna homogenizacija (high-pressure homogenization);
- elektromagnetske tehnologije: pulsirajuće električno polje (pulsed electric field), omsko zagrijavanje (ohmic heating), mikrovalovi (microwaves), hladna plazma, ultraljubičasto zračenje, oscilirajuće električno polje (oscillating magnetic field);
- akustične tehnologije: ultrazvuk i udarni valovi; te druge, poput membranske filtracije.

Svrha tih tehnologija je inaktivirati aktivnost mikroorganizama prisutnih u hrani i određenih enzima bez utjecaja na njenu kvalitetu, čuvajući nutritivne komponente i senzorske karakteristike, koje se konvencionalnim toplinskim metodama uništavaju i mijenjaju [1].

Međutim, mnoge od ovih postupaka, karakteriziraju nedostaci poput visokih troškova i potencijalne opasnosti za sigurnost ljudi, što ograničava njihovu veliku praktičnost korištenja. Plazma je tzv. četvrto stanje materije koje nastaje ionizacijom plina i sastoji se od nabijenih (elektrona, iona) i neutralnih čestica (atoma, molekula), radikala i fotona. Visokonaponsko električno pražnjenje („hladna plazma“) daje mnoge prednosti kao nova metoda prerade hrane i obećava na mnogim poljima prerade hrane, inaktivacije mikroorganizama i u postupcima

ekstrakcije visokovrijednih komponenti [2]. Zahtijeva malo energije, kratko vrijeme tretiranja, lako se prilagođava i primjenjuje u pogonima za proizvodnju hrane. Brojna istraživanja samo potvrđuju njen veliki potencijal pri konzerviranju prehrambenih proizvoda.

S obzirom na njihovu prirodno visoku otpornost i sposobnost preživljavanja ekstremnih uvjeta prerade, bakterije predstavljaju veliki izazov prehrambenoj industriji. Zbog procesa oksidacije kojeg uzrokuju nastali radikali, utvrđeno je da plazma inaktivira vegetativne stanice i bakterijske endospore narušavanjem njihove površine adsorpcijom reaktivnih molekula slobodnih radikala.

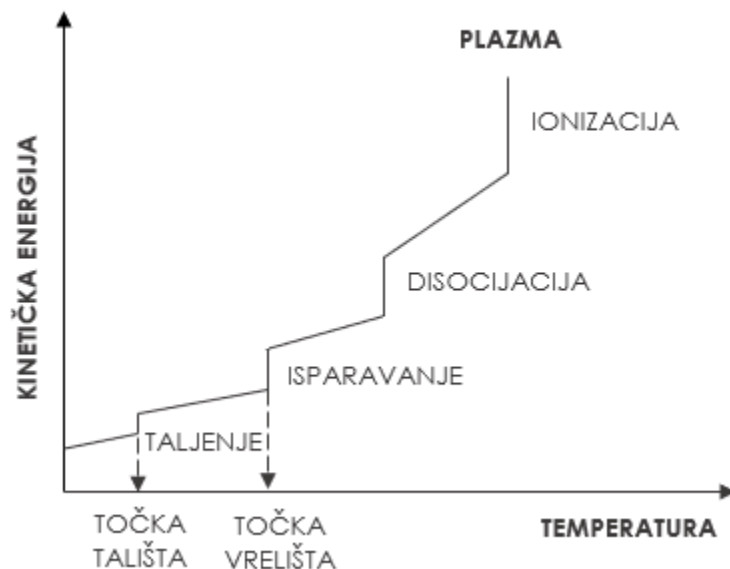
Svrha ovog rada bila je istražiti utjecaj hladne plazme pri različitim frekvencijama, polaritetu i vremenu tretiranja na stopu redukcije, revitalizaciju, koncentraciju slobodnih radikala, istjecanje unutarstaničnog sadržaja te stvaranje biofilma bakterije *Listeria innocua* ATCC 33091.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ČETVRTO AGREGATNO STANJE – PLAZMA

Objašnjenje materije, unapređenje primjene električne energije i razotkrivanje strukture atoma doveli su do otkrića novog agregatnog stanja. Više od 100 godina prošlo je otkako je Crookes eksperimentirao električnim pražnjenjima u vakuumskim cijevima te predložio postojanje nove vrste plina koji se sastoji od nabijenih čestica, mješavine elektrona i protona. Američki znanstvenik, Irving Langmuir, 1923. godine bavio se istraživanjima električnog pražnjenja u plinovima, a par godina kasnije, 1929. godine zajedno s američkim znanstvenikom Levy Tonks-om, prvi je upotrijebio izraz „plazma“ kako bi opisao oscilacije elektronskog oblaka tijekom pražnjenja [3], [4].

Struktura krutina i statički razmještaj atoma i molekula u njihovoj kristalnoj strukturi određeni su elektromagnetskim silama. Energija veza između molekula u takvim je strukturiranim sustavima veća od okolne termalne energije. Ukoliko tijelo u krutom stanju izložimo dovoljno vrućoj okolini, dolazi do sve intenzivnijeg gibanja atoma tako da u jednom trenutku počinju napuštati svoje mjesto određeno potencijalnom energijom, temeljna struktura se razara i dolazi do prijelaza u sljedeću fazu: kristali se tope, npr. led se pretvara u tekućinu, a potom tekućina prelazi u paru. Kinetička energija molekula postaje veća od njihove potencijalne energije, molekule su slobodne, ubrzano se gibaju i međusobno sudaraju. Daljnjim povećanjem temperature na više od nekoliko tisuća stupnjeva molekule u plinu/pari disociraju (razdvajaju se na atome koji ih sastavljaju) i dolazi do ionizacije (atomi se u sudarima rastavljaju na negativno nabijene elektrone i pozitivno nabijene ione). Električki nabijene čestice u gibanju stvaraju električna i magnetska polja pri čemu se dobiva energija potrebna za daljnju ionizaciju, odnosno nastanak potpuno ionizirane tvari – plazme [5], [6]. Prikaz prijelaza stanja materije prikazan je na slici 1.



Slika 1. Shematski prikaz prijelaza stanja materije (prema Hamerli, 2004.)

Plazma kao četvrto stanje materije, u fizici se opisuje kao ionizirani plin koji se sastoji od reaktivnog skupa atoma, pobuđenih molekula, nabijenih čestica, reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva te UV fotona [7].

2.2. NASTANAK PLAZME – POBUĐIVANJE ELEKTRONA

Električno pražnjenje temelj je plazme u industriji. Industrijske plazme mogu se podijeliti u 2 kategorije: ravnotežne i neravnotežne. Ravnotežnu plazmu, često nazivanu i toplinskom plazmom karakteriziraju jednake temperature elektrona i iona. Dok elektroni u neravnotežnoj plazmi imaju višu temperaturu od težinskih ionskih čestica, a tlak plina je niži. Ova plazma još se naziva i hladnom plazmom [3].

Općenito, kako bi došlo do nastanka plazme, potrebno je atomima i molekulama u plinu osigurati dovod energije iz vanjskog izvora. Primjenom visoke temperature dobivaju se termalne plazme, dok se električnim pražnjenjem koje nastaje između dviju elektrodi priključenih na vanjski izvor energije dobivaju hladne plazme. Odgovarajuće električno polje i električni potencijal

uzrokuju privlačenje elektrona prema anodi, dok jezgru atoma privlači katoda. Proces razgradnje se događa unutar mjehurića ili u mjestu dodira tekućine i plina. Većina eksperimentalnih podataka podupire teoriju da mjehurići potiču raspadanje u vodi [8]. Električna razgradnja se općenito definira kao trenutak razbijanja molekula, kada vodljivi kanal plazme stvara električnu vezu između dvije elektrode (obično metala) u tekućini. To dovodi do formiranja iskre ili luka. Dakle, rastom napona povećava se naprezanje u atomima, a kada su dosegnute potencijalne razlike između elektroda, elektroni se ubrzavaju stvarajući električno i magnetno polje i sudaraju se s neutralnim atomima. Tada kreće lavina ionizacije, sudari elektrona i neutralnih atoma dovode do stvaranja novih elektrona i pozitivno nabijenih iona. Uz ionizaciju dolazi i do reakcija disocijacije, ekscitacije, rekombinacije itd. [3].

Putem sudara energija se prenosi s elektrona na neutralne čestice. Ti sudari mogu biti elastični i neelastični. Prilikom elastičnih sudara unutarnja energija sudarajućih čestica se ne mijenja, a sačuvana je i ukupna kinetička energija. Ne dolazi do promjene kemijskog sastava niti pobuđivanja atoma i molekula. Takvi sudari imaju veliku ulogu u električnoj vodljivosti plazme (difuzno i driftno gibanje), kao i u apsorpciji elektromagnetskog zračenja. Prilikom neelastičnih sudara elektroni gube energiju i ona se prenosi na česticu. Kinetička energija sudarajućih čestica prelazi u unutrašnju energiju te dovodi do promjene unutrašnjih stupnjeva slobode. Najvažniji sudar je neelastičan sudar koji vodi do pobuđenog stanja i ionizacije. Energije pobude atoma iznose od minimalno $\sim 1,5$ do $4-5$ eV, dok se energije ionizacije kreću od oko $5-15$ eV. Energije vezanja atoma u molekulama su manje pa tako prvo dolazi do raspada (disocijacije) molekula [9].

Veoma mali stupanj ionizacije potreban je da bi neki plin pokazao elektromagnetska svojstva i smatrao se plazmom. Polovicu svoje maksimalne električne provodljivosti postiže već pri $0,1\%$ ionizacije, a već pri 1% gotovo maksimalnu ionizaciju [10].

Plazmu je moguće opisati pomoću tri osnovna parametra: temperature čestica, gustoće čestica i jačine stacionarnog magnetskog polja. Temperatura je u korelaciji s energijom gibanja elektrona i iona u plazmi. Obično se mjeri u elektronvoltima ($1 \text{ eV} = 11605 \text{ K}$). Osim temperature, gustoća je važan parametar plazme. Definira se kao broj čestica (elektrona ili iona) u jedinici volumena (kubičnom metru), dok je jedinica za jačinu stacionarnog magnetskog polja Tesla [3], [11]. Temperatura i gustoća povezane su s pritiskom (tlakom) plazme. Tlak plazme induciran je gibanjem njenih čestica i mjeri se kao sila primijenjena po jedinici površine. Računa se kao

umnožak gustoće i temperature te se proporcionalno povećava povećanjem tih dviju varijabli. Temperatura uzrokuje povećanje tlaka u plazmi, što potiče plazmu da se proširi [3].

2.3. KLASIFIKACIJA PLAZMI

Razne vrste plazme klasificiraju se prema više kriterija:

- temperaturi
- gustoći i energiji nabijenih čestica
- tlaku pri kojem plazma nastaje
- obliku supstrata

Razne gustoće i temperature postoje u plazmi u atmosferi, na suncu, zvijezdama i u svemiru, a laboratorijske plazme mogu steći različite gustoće i temperature u ovisnosti o različitim uređajima koji se koriste. Prema kriteriju temperature pri kojoj se obrade provode, plazme se svrstavaju u termalne ili vruće (eng. Hot plasma, thermal plasma) i hladne (eng. Cold plasma, non-thermal plasma). Kao što je ranije navedeno, termalna plazma primjer je ravnotežne plazme i svoju primjenu najčešće pronalazi u postupcima zavarivanja, toplinskog raspršivanja te kao metoda za utvrđivanje metala pri analizi vode i mnoge druge [8]. S druge strane, netermalna, odnosno neravnotežna plazma primjer je hladne plazme. Iako je temperatura elektrona u ovoj plazmi mnogo viša od temperature iona i neutralnih čestica i može iznositi i nekoliko desetaka tisuća Kelvina, teže čestice ostaju na sobnoj temperaturi. Stoga je temperatura ovih vrsta plazmi nerijetko samo malo viša od sobne temperature i prikladna je za obradu termički osjetljivih materijala [5].

S obzirom na radni tlak neutralnog plina u kojem se kreću ionizirane čestice, plazme se dijele na niskotlačne, atmosferske, subatmosferske i visokotlačne plazme [12].

Hladna atmosferska plazma zbog svojih je nedestruktivnih svojstava puno zanimljivija u prehrambenoj industriji. Njena primjena i način dobivanja detaljnije će biti opisani u sljedećem poglavlju.

2.4. HLADNA ATMOSFERSKA PLAZMA

Hladnoj plazmi generiranoj pri atmosferskom tlaku (oko 101 kPa) sve se više pridodaje pažnja kao potencijalnom pristupu uklanjanju i kontroli infekcija i/ili bakterijskih ili gljivičnih kontaminacija. Prednosti ovakve plazme su jednostavna izvedba, niska cijena korištenja, upotreba netoksičnih plinova s radnim uvjetima pri ili blizu sobne temperature i bez štetnih rezidua [13].

S obzirom na način na koji se plazma generira, možemo je podijeliti u 3 skupine [14]:

- **Pražnjenja istosmjerne struje i niskih frekvencija**
- **Radio – frekventna plazma**
- **Mikrovalno inducirana plazma**

Tijekom bljeska prilikom udara munje, dolazi do vrlo snažnog nekontroliranog električnog pražnjenja. Radi postizanja udara munje u kontroliranim laboratorijskim uvjetima, bilo je potrebno krenuti od vakuumske zatvorene cijevi gdje je gustoća plina znatno smanjena za mnogo redova veličine. U cijevi bi se nalazila 2 metala, anoda koja je žicom povezana na pozitivan terminal baterije i katoda koje je povezana na negativni, dok je sustav upravljan prekidačem. Kada je uključen, dolazi do pojave električnog pražnjenja u zatvorenoj cijevi. Plin koji pri normalnim uvjetima tlaka i temperature predstavlja električni izolator, pretvara se u stanje plazme koja je izvrstan električni vodič. Posljedično tome, istosmjerna struja prolazi kroz plazmu. Svojstva plazme određena su vrijednostima struje i naponom između anode i katode [3].

Pražnjenja istosmjerne struje i niskih frekvencija mogu biti kontinuirana i pulsirajuća. Kontinuiranim se smatraju plazma lukovi i plazma *jet*.

1. Električni luk je toplinsko pražnjenje visoke snage (između 1 i 100 000 ampera) i niskog napona između anode i katode (oko 10 V). Pražnjenje plazma lukom u fluorescentnoj žarulji uzrokuje pobuđivanje atoma u plinu da emitiraju ultraljubičasto svjetlo što uzrokuje da fluorescentni materijal zrači vidljivim svjetlom.
2. Plazma *jet* pražnjenje ili tzv. plazma mlaz predstavlja visokostrujni luk koji kroz konusni otvor na anodi izlazi velikom brzinom u slobodan prostor. Velika brzina posljedica je povećanog pritiska zraka, tj. velike kinetičke energije odnosno temperature čestica plazme. U mlazu, temperatura plina može biti 25 – 200 °C, gustoća nabijenih čestica iznosi 10^{11} -

10^{12} cm^{-3} , a reaktivne vrste prisutne su u visokim koncentracijama, 10-100 ppm. Može se koristiti pri niskim temperaturama i za tretiranje velikih površina [15].

Pulsirajuća pražnjenja mogu biti koronalno (eng. corona discharge) i pražnjenje preko dielektričnih materijala (eng. dielectric barrier discharge - DBD).

1. Korona pražnjenje karakterizirano je niskom gustoćom struje i primjenom vrlo visokih napona na oštri vrh elektrode (igle, oštri rubovi, tanke žice). Ovisno o polarnosti igle, korona može biti negativna i pozitivna. Kod negativne korone pozitivni ioni se kreću prema elektrodi te uzrokuju sekundarnu emisiju elektrona koji su ubrzavani u plazmu i nastaje intenzivan strujni puls (tzv. streamer), dok se kod pozitivne korone elektroni kreću prema elektrodi, a pozitivni ioni prema plazmi. Obrada koronom jedna je od najstarijih i najčešće primjenjivanih tehnika obrade plazmom uz okolni zrak kao radni plin [3], [16].
2. Dielektrično barijerno pražnjenje odvija se primjenom visokog impulsnog napona i izmjenične struje između para paralelnih metalnih elektroda od kojih je jedna prekrivena izolirajućim (dielektričnim) materijalom, a njihova udaljenost svega je nekoliko mm [17].

2.5. PLAZMA U TEKUĆINAMA

Električna pražnjenja u vodi ili tzv. elektro hidraulična pražnjenja zanimljivu su upotrebu pronašla ponajprije u biologiji, kemiji i elektrokemiji za obradu otpadnih voda kao i za vode za piće, mikrobiološku inaktivaciju, biomedicinske tretmane, sinteze nano-materijala te kemijske sinteze i razgradnje [18]. Električno pražnjenje u tekućinama po mnogo čemu je slično onome u plinovima, no postoji nekoliko ključnih razlika. Srednji slobodni put kretanja elektrona mnogo je kraći kod tekućina zbog njihove veće gustoće u odnosu na plinove. Iz toga je razloga nemoguće postići akceleraciju elektrona kao u plinovima. Također, molekule u tekućini imaju mnogo veći ionizacijski potencijal i potrebno je puno više energije da im se ukloni elektron.

Najstarija istraživanja pokazala su da električno pražnjenje u vodi može razgraditi vodu na hidrosilne (OH^\cdot) i vodikove (H^\cdot) radikale te da još više energetsko pražnjenje može dovesti do disocijacije OH^\cdot na kisikov atom (O) i H^\cdot . Kasnija istraživanja pokazala su nastanak vodikovog peroksida (H_2O_2), molekula kisika (O_2) i vodika (H_2), hidroperoksida (HO_2^\cdot) te drugih radikala. No, u ovisnosti o vodljivosti otapala i jačine električnog pražnjenja, udarni valovi i UV svjetlost se

moгу formirati. Stoga, primarne i sekundarne molekule, ioni i radikali nastali nakon nastanka električnog pražnjenja (plazme) napadaju komponente prisutne u tretiranim tekućinama i uzrokuju kemijske promjene i njihovu degradaciju [19].

No, što se samog mehanizma nastajanja plazme u tekućini tiče, razvile su se dvije glavne teorije: teorija mjehurića i teorija direktne ionizacije.

Teorija mjehurića uključuje plinovitu i tekuću fazu. S obzirom da tekućina sadrži veliki broj mjehurića u vidu otopljenih plinova ili raznih nečistoća, električno pražnjenje započinje u plinovitoj fazi (mjehurićima zraka), a plazmatski kanali (izboji) potom se propagiraju u tekućinu. Početak izboja povezan je s prisutnošću lokalnih regija niske gustoće, tzv. mikro-mjehurićima. Oni mogu biti formirani i Jouleovim zagrijavanjem zbog prolaska električne struje. Budući da je za njihov razvoj potrebna barem 1 mikrosekunda, širina impulsa mora biti $\geq \mu\text{s}$, u protivnom mjehurići u tekućini moraju biti prethodno prisutni [20].

Teorija direktne ionizacije pretpostavlja da električno pražnjenje u tekućinama može nastati u odsutnosti mjehurića plina i toplinskog učinka i da dolazi do direktne ionizacije molekule i atoma u tekućini. No, mnogo je protivnika ove teorije koji tvrde da elektroni zbog gustoće tekućina ne mogu razviti dovoljno kinetičke energije za ionizaciju izazvanu sudarima. Također, slobodni elektroni gotovo i da nisu prisutni u vodi zbog brzog otapanja čak i za 1 ps [20], [21]. Unatoč tome, Starikovskiy i sur. (2011) uspješno su postigli ionizaciju u tekućoj fazi (vodi) direktnom ionizacijom [22].

2.6. PRIMJENA PLAZME – INAKTIVACIJA BAKTERIJA

Iako je 99% svemira sastavljeno od plazme, onu na Zemlji, stvorio je čovjek. U prošlosti se hladna plazma koristila za sterilizaciju osjetljivih materijala, a s godinama se njena primjena širila na mnoga područja i tako učinkovitu upotrebu ima u tehnologiji inaktiviranja otpadnih voda, industriji polimera, računalnoj industriji pri proizvodnji mikročipova, u području dermatologije, stomatologije, biomedicine, zrakoplovstva, automobilske industrije, tehnologije pakiranja proizvoda. Danas je primjena plazme proširena i na prehrambenu industriju za sterilizaciju i dekontaminaciju hrane kao inovativna metoda [2], [3].

Jedina koja je masovno industrijalizirana, ali i najstarija primjena plazme u prehrambenoj industriji je za dezinfekciju vode pomoću ozona. Visokim se naponom djeluje na suhi zrak koji se upuhuje u vodu u protoku. Inaktivacija virusa, razgradnja i oksidacija organskih tvari u vodi, uklanjanje fenola, klorfenola i nitrita iz vode, taloženje mangana i željeza, poboljšani okus i miris vode bez mijenjanja njenog mineralnog sastava, sve su prednosti koje svrstavaju ozon u red najboljih kemijskih sredstava za dezinfekciju vode, u odnosu na uobičajenu metodu dezinfekcije vode klorom [23]. Plazma se može generirati koristeći veći opseg plinova ili mješavine plinova, a najčešće korišteni su argon, helij, dušik, zrak ili kisik. Plazma generirana u zraku sastoji se od čitavog skupa reaktivnih čestica koje sve zajedno doprinose plazminim antimikrobnim svojstvima.

Hladna plazma učinkovito se može koristiti kao tehnologija za inaktivaciju mikroorganizama i enzima u pakiranoj hrani [1]. To je dokazano u nekoliko istraživanja kada je mikrobna i enzimska inaktivacija postignuta tretiranjem pakiranih svježih proizvoda, a svojstva same hrane ostala su sačuvana [24], [25], [26].

Zdravstveno neispravna hrana predstavlja globalnu zdravstvenu prijetnju. Bolesti, a ponekad čak i smrt, uzrokovane hranom posljedica su bakterija, virusa, parazita ili kemijskih tvari koje uđu u tijelo konzumacijom kontaminirane hrane ili vode. Bakterije koje su najčešći uzročnici bolesti uzrokovane konzumacijom kontaminirane hrane su *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Listeria spp.* i *Vibrio cholerae* [27]. S ciljem suzbijanja rasta mikroorganizama u hrani, konstantno se nastoje razvijati nove metode i tehnologije. Kako bi se smanjila rezistentnost bakterija na antibiotike i kako bi borba protiv infekcija bila što uspješnija, potrebno je optimizirati trenutnu upotrebu antibiotika i razviti antibakterijske metode koje ne podliježu razvijanju otpornosti bakterija. Tehnologije razvijene s ciljem inaktivacije neželjenih bakterija uključuju korištenje antibiotika, topline, tlaka, UV zračenja te u novije vrijeme antimikrobne nanočestice, antibakterijske peptide i hladnu plazmu. Stoga, svoju primjenu plazma pronalazi u inaktivaciji bakterija, stanica raka, gljiva, spora, parazita, faga i virusa [28].

Inaktivacija štetnih mikroorganizama kao što su bakterije može se postići kemijskim ili fizičkim sredstvima - toplinom, kemijskim otopinama, plinovima ili zračenjem. Većina uobičajenih metoda sterilizacije uzrokuje određen stupanj oštećenja materijala što predstavlja problem ukoliko je očuvanje kvalitete materijala nakon sterilizacije neophodno. Tada konvencionalne metode nisu pogodne ni praktične za primjenu. To je dovelo do razvoja novih metoda koje su jednako

učinkovite kao konvencionalne, ali s mnogim prednostima kao što su kratko vrijeme tretmana, netoksičnost, nepostojanje štetnih ostataka i očuvanje tretiranog materijala. Tijekom izlaganja plazmi, bakterijske stanice mogu biti inaktivirane utjecajem topline, UV zračenja, nabijenim česticama i/ili reaktivnim neutralnim vrstama [28], [29]. Da bi učinak bio potpun, neophodno je optimizirati proces i parametre koji na njega utječu i određuju učinkovitost tretmana, a bit će navedeni kasnije u poglavlju.

Istraživanja ukazuju na uspješnu inaktivaciju bakterija primjenom plazme. Mai-Prochnow i sur. (2014) izvijestili su da inaktivacija bakterija nastupa trima različitim mehanizmima [28]:

1. direktnom permeabilizacijom stanične membrane ili stjenke, nakon koje slijedi istjecanje staničnih komponenti, uključujući kalij, nukleinske kiseline i proteine
2. oštećenjem proteina pod utjecajem kisikovih i dušikovih radikala
3. direktnim oštećenjem DNA

2.6.1. Stres i odgovor mikroorganizama na stres

Stanice prije same inaktivacije prolaze kroz niz fizioloških i morfoloških promjena. Nekoliko studija pokazalo je da su nakon kratkog izlaganja plazmi stanice sposobne za život, ali u tzv. nekulturable fazi (tzv. „viable but non-culturable“ (VBNC) stanje) [30], [31]. U ovoj fazi stanice imaju netaknutu membranu, respiratornu aktivnost, transkripciju gena i sintezu proteina, ali nisu sposobne za stvaranje kolonija na hranjivim podlogama u laboratorijskim uvjetima [28]. Ulazak u ovu fazu posljedica je staničnog odgovora na neki oblik stresa, poput gladovanja, povišenog osmotskog tlaka, inkubacije izvan optimalne temperature rasta, nedostatka kisika, izlaganja bijeloj svjetlosti itd. No, ukoliko stanica ne uđe u fazu mirovanja, ovakvi okolišni uvjeti mogu biti letalni [32]. Kada ponovno nastupe povoljni uvjeti i stanica izađe iz VBNC stanja, može se nastaviti dijeliti. Revitalizacija stanica dokaz je da prilikom tretmana ne dolazi do istjecanja unutarstaničnog sadržaja, odnosno apoptoze stanica.

Broj bakterijskih vrsta za koje je dokazano da mogu ući u VBNC stanje neprekidno raste. Smatra se da ih postoji oko 60, uključujući i veliki broj ljudskih patogena kao što su *Campylobacter spp.*, *E.coli* i *Listeria monocytogenes* [32].

Atmosferska plazma, tj. oksidativne vrste nastale njenim generiranjem (OH i NO) uzrokuju oštećenje na bakterijskim staničnim stjenkama (gram pozitivnih) i vanjskoj membrani (gram negativnih) mikroorganizama, uzrokujući pad intracelularnog ATP i istjecanje nukleinskih kiselina i proteina iz mikrobnih stanica [33]. Reaktivni kisikovi spojevi izazivaju oksidativni stres koji dovodi do lipidne peroksidacije, inaktivacije Fe-S-ovisne dehidrataze, inaktivacije mononuklearnih Fe proteina i oštećenja DNA s posljedicom inaktivacije stanica.

Odgovor stanica na tretman plazmom ovisi o vrsti bakterija. U cilju sterilizacije, istraživani su stupanj inaktivacije mikroorganizama primjenom plazme. Gram pozitivne bakterije pokazale su se otpornijima u odnosu na gram negativne [34], [35]. Gram pozitivne bakterije nemaju vanjsku membranu, ali imaju deblju staničnu stjenku koja im pruža snagu, čvrstoću i otpornost. Također, bakterije koje rastu u biofilmu zahtijevaju dulje vrijeme tretmana kako bi bile inaktivirane [28].

Biofilm je definiran kao sesilna zajednica mikroorganizama čije su stanice ireverzibilno povezane sa supstratom i međusobno te uklopljene u izvanstanični matriks polisaharidnih polimera koji su same stvorile, a ispoljavaju izmijenjen fenotip uslijed promijenjene brzine razmnožavanja i transkripcije gena koje ne uočavamo u planktonskim organizmima. Osim što su povezani na površini, mikroorganizmi su okruženi jedni drugima, a svojim djelovanjem omogućuju brži rast i razvoj zajednice [36]. Tvorba biofilma nastaje u nekoliko koraka: i) inicijalno vezanje, ii) ireverzibilno vezanje, iii) tvorba mikrokolonija, iv) sazrijevanje, v) disprezija (raspršivanje) [37].

Biofilmovi mogu biti sastavljeni od jedne ili više vrsta mikroorganizama, koji mogu biti uzročnici kvarenja hrane i/ili patogeni. Mogu biti nekoliko mikrometara do nekoliko milimetara debljine i sadrže 90-97% vode [38].

2.6.2. Ovisnost mikrobne inaktivacije o svojstvima mikroorganizama i plazme

Učinkovitost samog tretmana plazmom na inaktivaciju bakterija ovisi o nizu faktora: bakterijskim vrstama, fazi i načinu rasta kao i samim karakteristikama plazme. Glavna razlika između raznih izvora plazme je izvor napajanja, dizajn elektroda i izbor radnog plina. Istraživanja su pokazala da tretmani s istim izvorom plazme s 2 različita izvora napajanja, generirajući naponske pulseve različitih duljina, utječu na učinkovitost inaktivacije bakterija [39]. U tim eksperimentima plazma generirana kratkim pulsevima (30 ns) i visokim naponom (14,1 kV)

pokazala se učinkovitija pri inaktivaciji *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* i *Microsporium canis* uzgojenima na hranjivoj podlozi uspoređujući s plazmom generiranom dugim pulsevima i nižim naponom. Mogući uzrok su nastali elektroni koji se ubrzavaju većim električnim poljem pri visokom naponu i stoga posjeduju više energije. Takvi elektroni mogu izazivati kemijske reakcije veće energetske razine i kao takvi aktiviraju dodatne i često kemijski reaktivnije vrste. No, zanimljivo je što se isti učinak ne može uočiti kod inaktivacije *Escherichia coli* gdje je generiranje plazme iz oba izvora napajanja bilo jednako efektivno [39].

Drugo istraživanje uspoređivalo je učinak različitih radnih plinova (zrak, samo helij i helij pomiješan sa raznim postotkom kisika) na učinkovitost inaktivacije uz radio frekvencijski plazma *jet*. Različiti plinovi pokazali su različite učinke na inaktivaciju testiranih bakterijskih vrsti, a najveća inhibicija postignuta je bila u prisustvu najvećeg postotka kisika [40].

Nadalje, učinkovitost inaktivacije plazmom ovisi i o nizu drugih čimbenika poput vremena izloženosti plazmi, direktnom ili indirektnom plazma tretmanu i površini tretiranog proizvoda. Primjena direktnog ili indirektnog plazma tretmana različito utječu na redukciju broja bakterijskih stanica. Reaktivni spojevi nastali tretmanom direktnom plazmom mogu direktno utjecati na bakterije uzrokujući stupanj redukcije znatno veći nego indirektnom plazmom [41].

Da je površina tretiranog proizvoda bitna, pokazali su Critzer i sur. kada su 2007. utvrdili da je potreban puno duži tretman plazmom (9 kV, 6 Hz) da se postigne jednaki stupanj inaktivacije na hrapavoj površini (tretiranoj salati) za razliku od glatkih površina (npr. hranjive podloge) inokuliranih *L. monocytogenes* [29]. A kako bi se osigurao doticaj plazme sa cijelom površinom tretiranog materijala, grupa istraživača iz Japana, razvila je sistem rotacijske transportne trake uz primjenu hladne plazme. Sistem se sastoji od elektroda koje rotiraju povezane sa visoko naponskim izvorom napona, radeći kao kontinuirani sustav uz mogućnost mjerenja temperature u uzorku [42].

2.7. KARAKTERISTIKE BAKTERIJSKIH VRSTA RODA *Listeria*

U rod *Listeria* pripada 10 vrsta: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. rocourtiae*, *L. marthii* *L. fleischmannii* i *L. weihenstephanensis* od kojih *L. monocytogenes* i *L. ivanovii* pripadaju patogenim vrstama s time da je *L. ivanovii* striktno animalni patogen. *Listeria spp* su gram pozitivne, fakultativno anaerobne, štapićaste bakterije [43].

Pripadnici roda *Listeria*, a prvenstveno *Listeria monocytogenes*, ističu se po svojoj iznimnoj prilagodljivosti i otpornosti na okolišne uvjete, posebice na promjene temperature, veliki raspon pH vrijednosti, sposobnosti rasta u okolišu s ili bez prisutnosti kisika, kao i pri visokim koncentracijama soli [44]. *L. monocytogenes* je fakultativni anaerob i može rasti u temperaturnom rasponu od 0,4 °C do 45 °C, a optimalne temperature za rast su joj u rasponu od 30 do 37 °C. Ima sposobnost rasta u širokom pH području (4,0 – 9,6) s optimumom oko 6-8 i aktivitetu vode (a_w) od čak 0,90 [45], [46].

Listerioza je zarazna bolest brojnih vrsta životinja i čovjeka koja se očituje encefalitisom, pobačajem, septikemijom, mastitisom, spinalnim mijelitisom ili keratokonjuktivitisom. Uzročnik je bakterija *Listeria monocytogenes*. Primarni izvor su bolesne životinje i kliconoše te strvine životinja, a posebice su štakori rezervoari zaraze. Sekundarni izvori su kontaminirana hrana, osobito silaža u kojoj se uzročnik može umnažati ako je pH veći od 5 [44]. Od 10 vrsti *Listeria*, *Listeria monocytogenes* je patogena za ljudski rod, a zaražena hrana glavni uzrok listerioze. Iako je bolest rijetka, visoke su stope smrtnosti ljudi pogođene njome.

Listeria innocua uvelike podsjeća na patogenu vrstu *L. monocytogenes* i mnogo se češće može pronaći u hrani. Razlog tome može biti njena prirodno viša rasprostranjenost na ulazu u skladišta hrane ili njen brži rast tijekom skladištenja. Alternativno, viša učestalost oporavka *L. innocua* može biti rezultat preferencijalne selekcije tijekom laboratorijskih i izolacijskih postupaka [47].

2.7.1. Karakteristike bakterijske vrste *Listeria innocua*

KLASIFIKACIJA: *Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Listeriaceae; Listeria*

Listeria innocua, nesporogena je, fakultativno anaerobna, i gram pozitivna bakterija štapićastog oblika. Može preživjeti u ekstremnim pH vrijednostima i temperaturama te visokim koncentracijama soli. Svojom genetskom strukturom vrlo sliči *L. monocytogenes*, no za razliku od nje nepatogena je i stoga se često koristi u istraživanjima [48]. Deblja stanična stjenka osigurava joj dobru zaštitnu barijeru, a zahvaljujući pilima i flagelama je pokretna. Ima kompleksan metabolizam. Fakultativni je anaerob, zbog čega može metabolizirati glukozu (i ostale šećere) u aerobnim, ali i anaerobnim uvjetima. U aerobnim uvjetima metabolizma glukoze, *Listeria innocua* stvara mliječnu i octenu kiselinu dok u anaerobnim uvjetima samo mliječnu kiselinu [49].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Odabrani mikroorganizam

Proučavana je inaktivacija bakterije *Listeria innocua* ATCC 33091 koja je pribavljena iz Njemačke zbirke mikroorganizma i staničnih kultura (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ).

3.1.2. Hranjive podloge

Hranjivi agar (Biolife, Milan, Italija), hranjivi bujon (Biolife, Milan, Italija).

3.1.3. Kemikalije

PBS-fosfatni pufer, titan reagens (TiO_2), otopina natrijevog nitrata (NaNO_3), puferirana peptonska voda.

3.1.4. Izvor tekućinske plazme

Za generiranje plazme korišten je pulsni visokonaponski generator (Spellman, UK). Strujni krug sastoji se od visokonaponskog napajanja, kondenzatora kapaciteta 0,75 nF, serijski spojenih otpornika od ukupno 9,5 M Ω , rotirajuće sklopke tzv. „spark – gap“ komore spojene na elektromotor s regulatorom frekvencije i kontrolne jedinice napajanja koji su izolirani u Faradayevu kavezu. Napon od 30 kV je mjerjen naponskom sondom Tektronix P6015A spojenom na osciloskop Hantek DS05202BM. Reaktor je bio volumena 1000 ml, zatvoren s gumenim čepom s prilagođenim otvorom za elektrodu uzemljenja.

Prilikom generiranja plazme u tekućini korišten je dizajn reaktora prikazan na slici 2. Plazma je generirana u tekućoj fazi uz upuhivanje mjehurića plina, a konfiguracija elektroda u reaktoru bila je postavljena u obliku točka-ploča, odnosno s igličnom visokonaponskom

elektrodom (igla od nehrđajućeg čelika Microlance™ 3,81 cm), te pločastom elektrodom uzemljenja od nehrđajućeg čelika promjera 4,5 cm. S donje strane reaktora kroz igličnu elektrodu pomoću peristaltičke pumpe upuhivan je plemeniti plin protoka 4 Lh^{-1} koji je omogućavao miješanje uzorka te samo pražnjenje u mjehurićima upuhivanog plina. Kao operativni plin korišten je argon (Messer, Njemačka) čistoće 99,99%.



Slika 2. Plazma generirana u mjehurićima argona u uzorku *Listeria innocua*

Važno je napomenuti da je u korištenoj konfiguraciji udaljenost između elektroda bila 1 cm pri pozitivnom polaritetu i 0,5 cm pri negativnom polaritetu. Udaljenost elektroda uvjetuje širinu i jačinu iskri nastalih prilikom pražnjenja.

3.1.5. Priprema uzoraka

3.1.5.1. Čuvanje i uzgoj mikrobne kulture

Kao uzorak korištena je bakterija *Listeria innocua* ATCC 33091. Odabrana bakterijska kultura čuvana je na hranjivom agaru u hladnjaku pri 34°C . Kultura se precjepljuje svakih 14 dana na svježiji hranjivi agar.

Uzgoj mikrobne kulture: U sterilnim uvjetima u komori za sterilni rad s UV-lampom (30 W) (Klimaoprema, Samobor, Hrvatska), mikrobna kultura *Listeria innocua* ATCC 33091 pripravljena na hranjivom agaru precijepi se u 10 mL hranjive podloge - hranjivog bujona (Biolife, Italija). Nacijepljena bakterija potom se inkubira pri 37° C kroz 48 h.

3.1.5.2. Priprema potrebnih reagensa i hranjivih podloga

- a) Za pripremu hranjive podloge za uzgoj *L. innocua*, prema preporuci proizvođača, izvaže se 13 g dehidrirane podloge hranjivog bujona koja se potom otopi u 1000 mL destilirane vode.
- b) Za uzgoj bakterijskih stanica nakon tretmana plazmom korišten je hranjivi agar. Za pripremu agara, prema preporuci proizvođača, izvaže se 13 g dehidrirane podloge te 10 g tehničkog agara (Biolife, Milan, Italija). Izvagani sastojci otopljeni su u 1000 mL destilirane vode. Pripremljene podloge steriliziraju se u autoklavu ("Sutjeska", model 200-189) pri 121 °C kroz 15 min.
- c) Za pripremu uzorka korišten je fosfatni pufer (PBS) sastava:

Kemikalija	Masa (g)
NaCl	8
KCl	0,2
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	1,62
KH ₂ PO ₄	0,24

Izvagane mase otope se u 900 mL destilirane vode, pH 7 podese s klorovodičnom kiselinom, a potom ukupni volumen nadopuni do 1000 mL. Pripremljena otopina sterilizira se u autoklavu pri 121 °C u vremenskom periodu od 15 min. Otopina PBS-a čuva se pri +4 °C kroz 3 mjeseca.

- d) Bakterijska kultura tretirana je u otopini natrijevog nitrata 0.01 M NaNO₃. Za pripremu otopine odvaže se 8,4 g NaNO₃ (Kemika, Zagreb) i otopi u 1000 mL destilirane vode.
- e) Za određivanje koncentracije slobodnih radikala korišten je titan reagens (TiO₂). Za njegovu pripremu izvaže se 1 g titanij praha tj. titan (IV) oksida (Sigma Aldrich, CAS: 13463-67-7) u 100 mL vruće sumporne kiseline (1:1). Reakcijska smjesa se zatim zagrijava

na oko 190 °C i miješa kroz 20 h. Titanij je otopljen kada inicijalno bijela otopina postane prozirna. Nakon što se sav titan otopi, reagens otopina hladi se na sobnu temperaturu i razrijedi na volumen od 500 mL destiliranom vodom. Reagens otopina se zatim skladišti u hladnjaku na +4 °C.

- f) Za određivanje revitalizacije stanica koristi se puferirana peptonska voda (Biolife, Milan, Italija) za nacjepljivanje stanica nakon tretmana plazmom. Za pripremu puferirane peptonske vode na tehničkoj vagi izvaže se 20 g praškastog medija (10 g peptona, 5 g NaCl, 3,5 g Na₂PO₄ * 2 H₂O i 1.5 g KH₂PO₄) koji se otopi u 1000 mL destilirane vode. Pripremljena puferirana peptonska voda autoklavira se pri 121 °C kroz 15 min te se čuva u hladnjaku na +4 °C kroz 3 mjeseca.

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema suspenzije mikroorganizama

Nakon 48 h inkubacije pri 37 °C, mikrobna kultura centrifugira se (Hettich, Rotofix 32) pri 4000 rpm/10 min. U sterilnim uvjetima u komori za sterilni rad, supernatant se odlije, a u uzorak se doda 10 mL sterilnog fosfatnog pufera (PBS). Uzorak se homogenizira na rotirajućoj miješalici i postupak se ponovi još dva puta. Nakon 3. centrifugiranja, supernatant se odvoji u sterilnim uvjetima, a u uzorak se doda 10 mL sterilne destilirane vode i ponovno homogenizira na rotirajućoj miješalici.

3.2.2. Priprema uzoraka za tretiranje plazmom

Ukupni volumen uzorka za tretiranje iznosi 200 mL. Uzorak se priprema u čaši od 500 mL tako što se 10 mL pripremljene suspenzije *Listeria innocua* pomiješa sa 190 mL 0,01 M NaNO₃. Početna koncentracija uzoraka za tretiranje bila je 4 – 7,2 log CFU/mL⁻¹. S obzirom da tretirani uzorci nisu pripremani iz jedne nacijepljene bakterijske kulture jer nisu svi uzorci tretirani u istom danu, početna koncentracija suspenzija *Listeria innocua* nije jednaka za sve tretmane.

Tako pripremljeni uzorak tretira se plazmom.

3.2.3. Obrada uzoraka tekućinskom plazmom

Pripremljeni uzorak suspenzije *L. innocua* u otopini 0,01 M NaNO₃ prebacuje se iz laboratorijske čaše u reaktor te započinje eksperiment. Plan pokusa za tretman *L. innocua* tekućinskom plazmom u mjehurićima argona prikazan je u tablici 1. Tretmani se provode pri oba polariteta (pozitivan i negativan). Vrijeme tretiranja je 5 i 10 min, a tijekom provedbe eksperimenta korištene su frekvencije od 60, 90, 120 Hz. Tretiranim uzorcima određivana je koncentracija slobodnih radikala, istjecanje unutarstaničnog sadržaja, stvaranje biofilma prije i poslije tretmana, postupak revitalizacije nakon tretmana hladnom plazmom i stopa redukcije.

Tablica 1. Plan pokusa za tretman *L. innocua* tekućinskom plazmom u mjehurićima argona

UZORAK	FREKVENCIJA [Hz]	TRAJANJE TRETMANA [min]	POLARITET*
1.a.	60	5	-
1.b.	60	10	-
2.a.	90	5	-
2.b.	90	10	-
3.a.	120	5	-
3.b.	120	10	-
4.a.	60	5	+
4.b.	60	10	+
5.a.	90	5	+
5.b.	90	10	+
6.a.	120	5	+
6.b.	120	10	+

* '-' = negativan polaritet

'+' = pozitivan polaritet

3.2.4. Određivanje temperature

Mjerenje temperature netretiranog uzorka, kao i svih tretiranih uzoraka provodi se digitalnim infracrvenim termometrom (InfraRed Tehrmometer, PCE-777, PCE Instruments). Mjerenje se provodi direktnim pozicioniranjem termometra iznad uzorka, te očitanjem temperature s ekrana uređaja.

3.2.5. Određivanje broja stanica

Ukupni broj stanica određuje se prije i nakon tretmana kako bi se odredio stupanj redukcije. Stupanj redukcije razlika je broja stanica prije i nakon tretmana. Volumen od 10 μL uzorka naciepi se u 90 μL PBS-a te se napravi serija razrjeđenja (do 10^{-6}) u istom omjeru 1:9. Uzorci se pripremaju i naciepljuju u komori za sterilni rad s UV-lampom (30 W) (Klimaoprema, Samobor, Hrvatska). Pripremljena razrjeđenja naciepljuju se u tri replike na pripremljene hranjive podloge (hranjivi agar) na način da se pipetira 10 μL uzorka na hranjivu podlogu. Naciepljene ploče inkubiraju se kroz 48 h. Za svako razrjeđenje određuje se srednja vrijednost naciepljenih ploča u tri replike, a ukupni broj izražava se kao logaritam broja stanica ($\log \text{CFU mL}^{-1}$).

Formula [1] za izračun broja stanica:

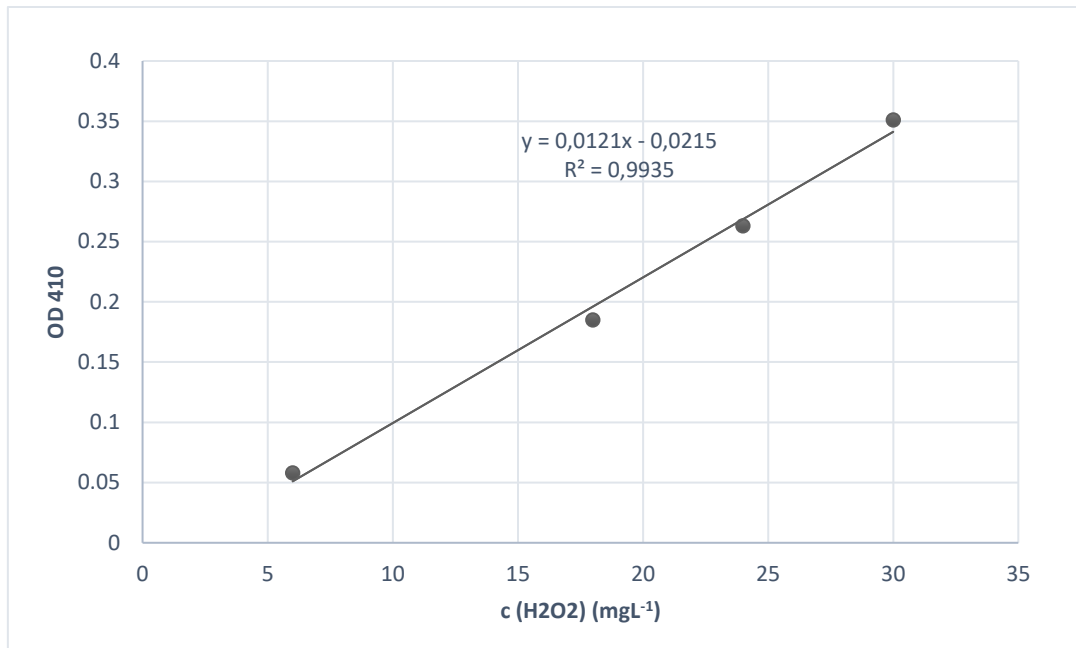
$$CFU = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{upotrebljeni volumen uzorka}} \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja} \quad [1]$$

3.2.6. Određivanje koncentracije slobodnih radikala

Metoda određivanja koncentracije slobodnih radikala bazira se na promjeni boje dodatkom titan reagensa (TiO_2) iz prozirne u žutu.

Koncentracija slobodnih radikala u uzorku određuje se spektrofotometrijski (SECOMAM UviLine 9400 Spectrophotometer, Secomam Groupe Aqualabo, Francuska) pri 410 nm na način da se 1 mL pripremljenog titan reagensa pomiješa sa 2 mL uzorka te se preko izrađenog baždarnog pravca očita koncentracija prisutnih slobodnih radikala.

Kako bi se izradio baždarni pravac potrebno je volumen od 1 mL točno zadane koncentracije vodikovog peroksida (Sigma Aldrich) otpipetirati u 2 mL titan reagensu te pri 410 nm odrediti apsorbanciju za svaku pojedinu koncentraciju. Iz dobivenih podataka odredi se baždarni pravac za određivanje koncentracije slobodnih radikala (slika 3).



Slika 3. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji H₂O₂

3.2.7. Određivanje istjecanja unutarstaničnog sadržaja

Volumen od 3 mL stanične kulture filtrira se kroz CHROMAFIL Xtra PTFE-20/25 filter (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Duren, Njemačka) sa 0,25 μm veličinom pora. Na porama filtra zaostaju neoštećene bakterijske stanice, a ukoliko je došlo do oštećenja bakterijskih stanica unutarstanični sadržaj biti će prisutan u dobivenom filtratu. Prisutnost unutarstaničnog sadržaja provjerava se pomoću spektrofotometra (SECOMAM UviLine 9400 Spectrophotometer, Secomam Groupe Aqualabo, Francuska) određivanjem apsorbancije filtrata pri 260 nm, valnoj duljini pri kojoj apsorbiraju nukleinske kiseline i 280 nm, valnoj duljini pri kojoj apsorbiraju proteini.

3.2.8. Određivanje biofilma

Metoda određivanja biofilma je spektrofotometrijska metoda (SECOMAM UviLine 9400 Spectrophotometer, Secomam Groupe Aqualabo, Francuska) koja se bazira na kristal violetnom obojenju. Dobivena apsorbancija odgovara broju stanica određene mikrobiološke kulture.

Uzorci se nacijspe u jažice mikrotitarske ploče (TPP 92012, Švicarska) na način da se svaki uzorak u volumenu od 200 μ L nacijspe u paraleli te se pipetira volumen od 2 mL hranjivog bujona u svaku nacijspljenu jažicu. Nacijspljuju se i kontrolne jažice u koje se ne dodaje uzorak, već 2 mL hranjivog bujona. Nakon 4h inkubacije, tijekom koje dolazi do adhezije stanica na dno jažica, uklanja se supernatant iz jažica, a potom se iste ispiru sa 2 mL PBS-a. Nakon ispiranja, u svaku pojedinačnu jažicu pipetira se 2 mL svježeg medija hranjivog bujona. Nakon toga mikrotitarske ploče inkubiraju se pri 37 °C kroz 24 h kako bi se stvorio biofilm.

Nakon 24 h inkubacije provodi se kvantifikacija biofilma kristal violet testom. Ukloni se supernatant iz jažica te se stanice ispiru sa 2 mL PBS-a. Kako bi se fiksirao biofilm, dodaje se 2 mL 99 %-tnog metanola kroz 15 min. Nakon 15 min metanol se ukloni, jažice se posuše te se pipetira 2 mL kristal violet boje kroz 20 min. Nakon 20 min ukloni se višak boje i jažice se ispiru s destiliranom vodom, a potom suše. Kristal violet boja koja je ostala vezana za adhezirane bakterije otapa se dodavanjem 2 mL 33 %-tne octene kiseline u svaku jažicu, a potom se mjeri intenzitet nastalog obojenja spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 590 nm.

Na osnovi količine boje koje stanice vežu za sebe, ispituje se sposobnost stvaranja biofilma u uvjetima stresa [50]. Kada su stanice izložene stresu, teže stvaraju biofilm koji veže kristal violet boju. Intenzitet nastalog obojenja stoga je manji. Ukoliko izloženost stresu nije dovoljno velika da stanice budu inaktivirane, dolazi do većeg stvaranja biofilma koji veže više boje i intenzitet mjerenog obojenja je veći [51]. Rezultati biofilma prikazani su kao postotak smanjenja, odnosno povećanja biofilma (na osnovi izmjerene apsorbancije) u odnosu na početni uzorak.

3.2.9. Određivanje revitalizacije stanica

Nakon tretmana plazmom iz ukupnog volumena u reaktoru pipetira se 1 mL uzorka koji se naciepljuje u 9 mL puferirane peptonske vode. Uzorci se naciepljuju u paraleli te se inkubiraju pri 37 °C kroz vremenski period od 24 h. Određivanje broja revitaliziranih stanica određuje se metodom naciepljivanja serija razrjeđenja na hranjivi agar. Iz inkubiranih uzoraka pipetira se 10 µL uzorka u 90 µL PBS-a, a potom se radi serija razrjeđenja (do 10⁻⁷). Uzorci se pripremaju i naciepljuju u komori za sterilni rad. Pripremljena razrjeđenja naciepljuju se u tri replike tako što se 10 µL uzorka pipetira na hranjivu podlogu. Naciepljene ploče inkubiraju se kroz 48 h. Za svako razrjeđenje određuje se srednja vrijednost naciepljenih uzoraka u tri replike, a ukupni broj izražava se kao logaritam broja stanica (log₁₀ CFUmL⁻¹) prema formuli 1.

Formula [2] za izračun postotka revitalizacije:

$$\% = \frac{\log \frac{CFU}{mL} (nakon tretiranja)}{\log \frac{CFU}{mL} (revitalizacija)} \times 100 \quad [2]$$

3.2.10. Obrada podataka

S ciljem određivanja utjecaja raznih parametara na učinkovitost tretmana korišteni su centralni složeni dizajn (central composite design, CCD; STATGRAPHICS Centurion, StatPoint Technologies) i površinski centrirani model. Kao operativni parametri za CCD odabrani su vrijeme tretmana, frekvencija i polaritet.

Provedena je analiza varijance (ANOVA) kako bi se mogla utvrditi odstupanja ($p < 0,05$) u provedenim tretmanima. Operativne varijable su promatrane na 3 nivoa; niskom (-1), centralnom (0) i visokom (1). Izlazne vrijednosti su stopa redukcije, biofilm, istjecanje staničnog sadržaja, revitalizacija i koncentracija H₂O₂.

Eksperimentalni rezultati su analizirani responzivnom površinskom metodom (RSM) koristeći program STATGRAPHICS Centurion. RSM se koristio za proučavanje 3 različita parametra; A – frekvencija plazme, B – trajanje tretmana, C – polaritet. Kako bi se optimizirao tretman atmosferskom tekućinskom plazmom i istražio utjecaj tri nezavisne varijable na inaktivaciju bakterije *Listeria innocua* ATCC 33091, uspostavljen je centralni složeni rotirajući dizajn gdje su se varijable koristile na 5 razina.

Točnost kvadratnog empirijskog modela provjerena je analizom varijance (ANOVA) s razinom pouzdanosti od 95 %.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj eksperimentalnog dijela ovoga rada je odrediti učinak koji hladna plazma ima na postupak inaktivacije čiste bakterijske kulture *Listeria innocua* ATCC 33091, pri atmosferskom tlaku i različitim uvjetima tretiranja. Hladnom tekućinskom plazmom u mjehurićima argona obrađeno je 12 uzoraka koji su organizirani u faktorski plan s 3 operativne varijable (vrijeme tretiranja, frekvencija i polaritet). Na uzorcima je određivana i analizirana stopa redukcije, revitalizacija stanica nakon tretiranja, formiranje biofilma stanica prije i nakon tretmana hladnom plazmom, oštećenje membrane, odnosno istjecanje staničnog sadržaja te stvaranje slobodnih radikala, tj. vodikovog peroksida. Također, praćena je i promjena temperature tijekom tretmana.

Za navedene rezultate provedena je statistička analiza u programu STATGRAPHICS Centurion, a određivan je učinak svake varijable (A – frekvencija plazme; B – trajanje tretmana; C – polaritet;) te njihovih kombinacija na konačne rezultate.

Promjena temperature uzorka tijekom tretmana

Hladna plazma pripada u kategoriju netermalnih metoda procesiranja hrane čije je obilježje tretiranje proizvoda pri sobnoj temperaturi. U tablici 2 prikazani su rezultati izmjerene temperature prije i nakon tretmana.

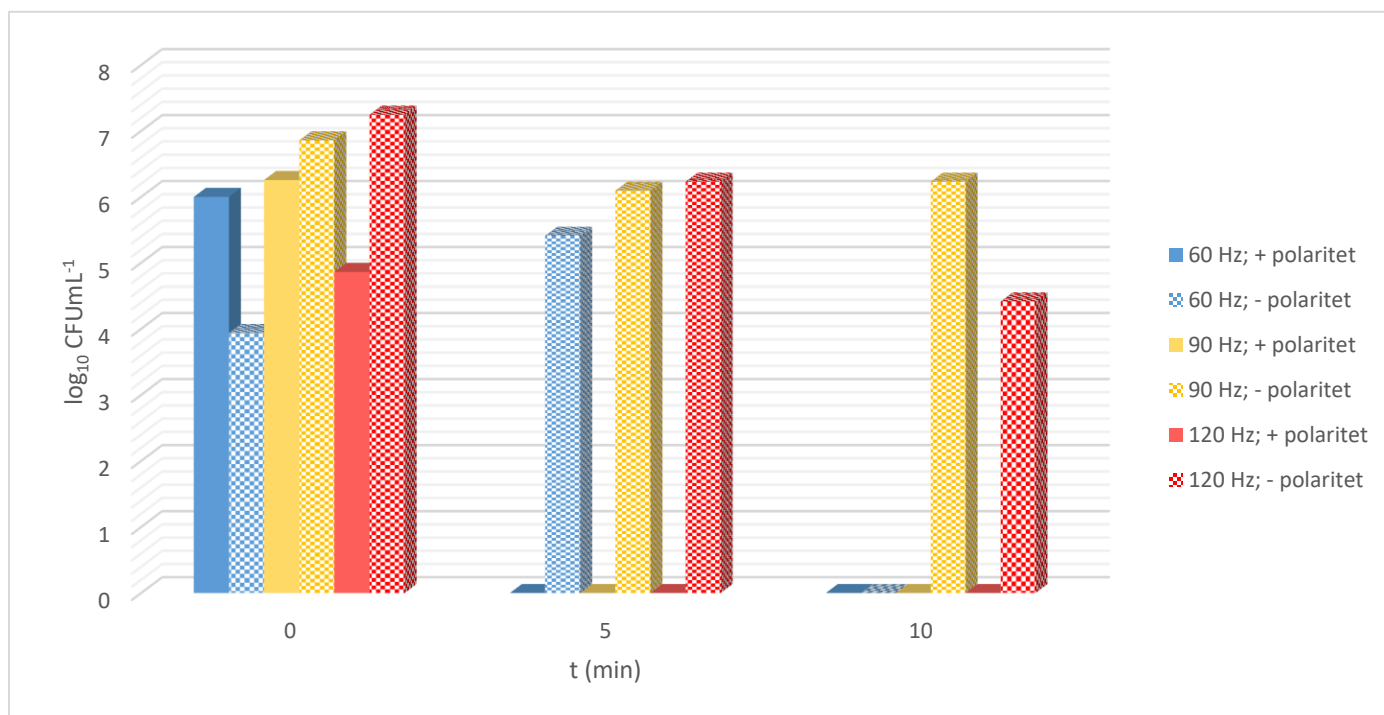
Tablica 2. Izmjerene vrijednosti temperature prije i poslije tretmana plazmom

UZORAK	TEMPERATURA prije [°C]	TEMPERATURA poslije [°C]
1.a.	20,3	24,2
1.b.	20,3	26,3
2.a.	20,1	26,3
2.b.	20,1	27,9
3.a.	19,9	24,9
3.b.	19,9	29,4
4.a.	19,1	21,7
4.b.	19,1	24,6
5.a.	18,9	24,6
5.b.	18,9	28,7
6.a.	18,8	26,8
6.b.	18,8	30,4

Iz prikazanih rezultata može se uočiti da promjene temperature tijekom tretmana hladnom plazmom nisu značajne, no bitno je imati na umu da je trajanje tretmana plazmom do 10 minuta. Najmanja promjena temperature od samo 2,6 °C zabilježena je za tretman pri pozitivnom polaritetu, 60 Hz frekvencije i nakon 5 minuta, a najveća promjena temperature zabilježena je za tretman pri pozitivnom polaritetu, frekvenciji od 120 Hz, nakon 10 minuta tretmana pri čemu je došlo do porasta temperature od 11,6 °C. Temperature se povećava uslijed povećanja ukupne kinetičke energije elektrona i broja sudara čestica. Utjecaj temperature na inaktivaciju bakterije *L. innocua* je neznatan jer temperatura uzorka nakon tretmana ne prelazi 50 °C [52].

4.1. UTJECAJ HLADNE PLAZME NA STOPU REDUKCIJE

Dobiveni eksperimentalni rezultati prikazani su grafički (slika 4). Na grafičkom je prikazu vidljivo kako je sa 60 Hz frekvencije i pri pozitivnom polaritetu već nakon 5 minuta tretiranja hladnom plazmom postignuta inaktivacija bakterijske kulture, a stupanj redukcije iznosi 6 log₁₀ CFUmL⁻¹. Isti slučaj zabilježen je i prilikom povećanja frekvencije na 90 i 120 Hz pri pozitivnom polaritetu pri kojima stupanj redukcije iznosi 6,25 log₁₀ CFUmL⁻¹ i 4,86 log₁₀ CFUmL⁻¹. Iz toga slijedi da je već 5 minuta tretiranja sa 60 Hz pri pozitivnom polaritetu dovoljno za inaktivaciju bakterijske kulture, no to nije slučaj za tretmane plazmom pri negativnom polaritetu gdje sa 90 Hz frekvencije nakon 5 min stupanj redukcije iznosi 0,76 log₁₀ CFUmL⁻¹, a nakon 10 min se smanjuje i iznosi 0,63 log₁₀ CFUmL⁻¹. Kod uzoraka (120 Hz, negativni polaritet) stupanj redukcije povećava se vremenom tretiranja te tako nakon 5 minuta iznosi 1,02 log₁₀ CFUmL⁻¹, a nakon 10 minuta 2,83 log₁₀ CFUmL⁻¹. Međutim, uzorci tretirani sa 60 Hz pri negativnom polaritetu nakon 5 min tretiranja pokazuju broj stanica veći od početnog, dok se povećanjem vremena tretiranja do 10 minuta tretmana postiže inaktivacija bakterijske kulture i stupanj redukcije iznosi 5,41 log₁₀ CFUmL⁻¹. Ovakvi rezultati mogu se objasniti činjenicom da tijekom tretmana hladnom plazmom, uslijed mehaničkih udarnih valova tijekom miješanja i upuhivanja argona dolazi do razbijanja nakupina bakterijskih stanica. Početni agregat degradira i stanice se otpuštaju [53]. Stoga je, u ovom slučaju, broj stanica *L. innocua* značajno veći u odnosu na početni.



Slika 4. Ovisnost \log_{10} CFU mL^{-1} o vremenu tretmana hladnom plazmom pri 60, 90, 120 Hz i pozitivnom i negativnom polaritetu

U radu Fröhlinga i sur. (2012) znanstvenici su istraživali utjecaj atmosferske hladne plazme na inaktivaciju bakterije *L. innocua* [52]. Uz promatrane parametre snage izvora plazme i vremena tretiranja, najveća postignuta stopa redukcije bakterije *L. innocua* je više od 6 log redukcije pri operativnoj snazi plazme od 40 W već nakon 1,5 minute. Najmanji učinak na redukciju pokazao je tretman pri snazi plazme od 10 W, dok je obećavajući tretman za površinsku inaktivaciju hrane uz operativnu snagu od 20 W i vrijeme tretmana od 4 minute [52].

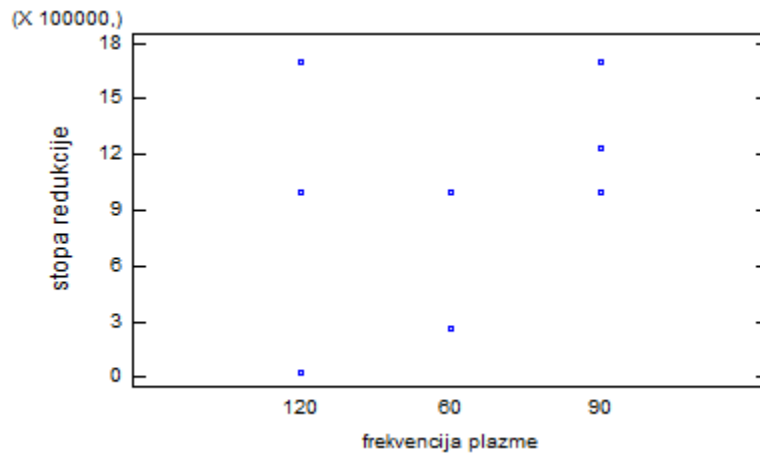
Da je atmosferska plazma pogodna tehnika za inaktivaciju mikrobne populacije dokazali su i Critzer i sur. (2007) kada su ispitivali učinkovitost tretmana plazmom na inaktivaciju *L. monocytogenes* na površini salate [29]. Nakon 1 minute tretmana postignut je 1 log stupanj redukcije dok je vrijeme tretiranja od 3 i 5 minuta rezultiralo >3 log i >5 log stupnju redukcije. Dobiveni rezultati ukazali su na veću osjetljivost *L. monocytogenes* na tretman plazmom u usporedbi s *E. coli* O157: H7 i *Salmonella sp.* što se u ovom slučaju ne slaže s tvrdnjom da su gram pozitivne bakterije poput *Listeria sp.* rezistentnije od gram negativnih [29].

4.1.1. Rezultati statističke obrade za stopu redukcije

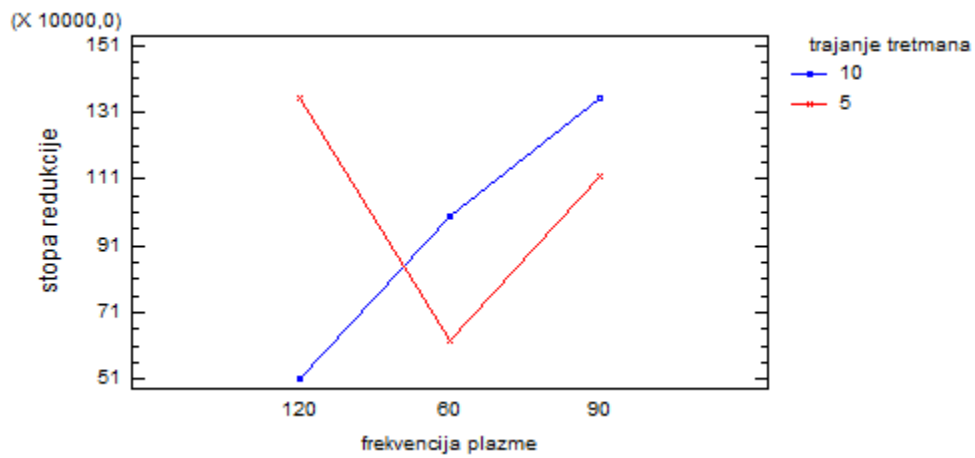
Da bi se procijenila statistička značajnost učinaka, provedena je ANOVA – analiza varijanci. U tablici 3. vidljiva je ANOVA razdioba varijabilnosti za stopu redukcije ($\log \text{CFU mL}^{-1}$) u posebnim dijelovima za svaki od učinaka. Ona ispituje statističku važnost svakog učinka usporedbom srednjeg odstupanja sa procjenom eksperimentalne pogreške. Statistička obrada eksperimentalno dobivenih podataka za stopu redukcije (tablica 3 i slike 5 i 6) pokazuje kako niti jedan učinak nema P-vrijednost manju od 0,05 što ukazuje da su značajno različiti od nule pri razini pouzdanosti (confidence level, CL) od 95 %.

Tablica 3. Statistička značajnost varijabli za stopu redukcije

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Df</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F-omjer</i>	<i>P-vrijednost</i>
GLAVNI UČINCI:					
A: frekvencija plazme	3,76829E11	2	1,88414E11	0,43	0,6984
B: trajanje tretmana	1,85653E10	1	1,85653E10	0,04	0,8557
C : polaritet	4,81333E8	1	4,81333E8	0,00	0,9765
INTERAKCIJE:					
AB	8,72545E11	2	4,36272E11	1,00	0,5000
AC	3,76829E11	2	1,88414E11	0,43	0,6984
BC	1,85653E10	1	1,85653E10	0,04	0,8557
OSTATAK	8,72545E11	2	4,36272E11		
UKUPNO (ISPRAVLJENO)	2,53636E12	11			



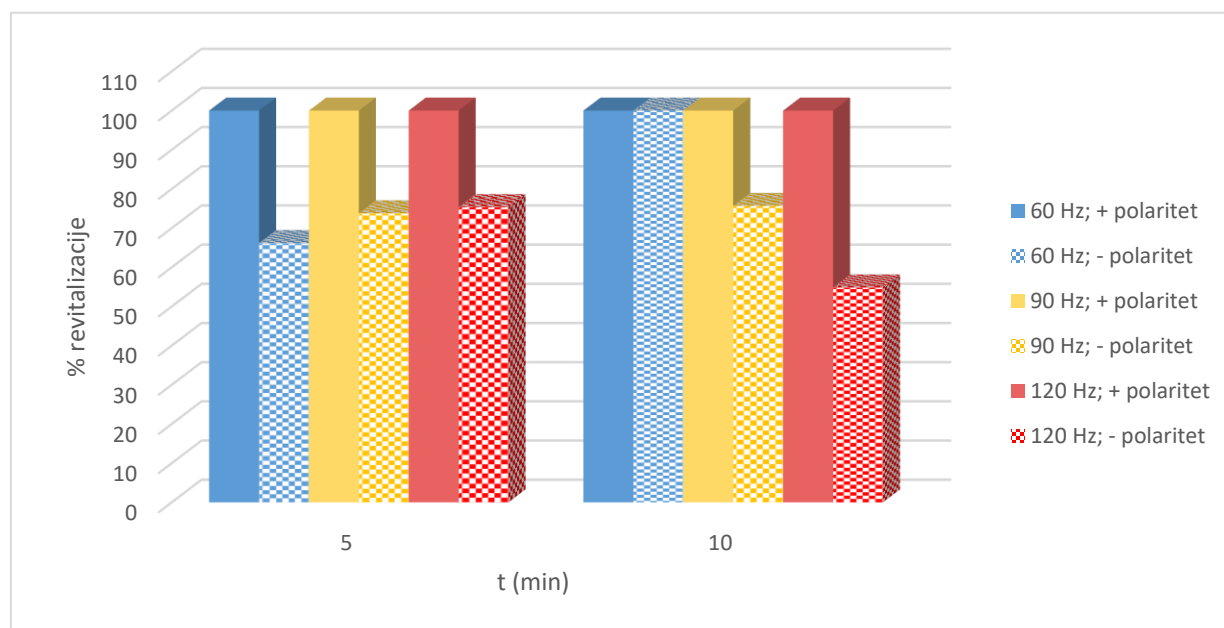
Slika 5. Prikaz ovisnosti stope redukcije o frekvenciji plazme



Slika 6. Prikaz ovisnosti stope redukcije o frekvenciji plazme i njihove međusobne interakcije na učinak tretmana hladnom plazmom nakon 5 i 10 minuta tretiranja

4.2. UTJECAJ HLADNE PLAZME NA REVITALIZACIJU STANICA NAKON TRETMANA HLADNOM PLAZMOM

Na slici 7 prikazani su rezultati revitalizacije stanica nakon tretmana (5 i 10 min), graf ovisnosti postotka revitalizacije o vremenu uz različite kombinacije frekvencije i polariteta. Provedenom analizom dobiveni su rezultati koncentracije stanica nakon procesa revitalizacije koji je određen kao logaritam broja stanica koje su narasle nakon 24 h inkubacije, a potom je izračunat postotak revitalizacije stanica prema formuli 2.



Slika 7. Ovisnost postotka revitalizacija o vremenu tretmana hladnom plazmom pri 60, 90, 120 Hz te pozitivnom i negativnom polaritetu

Ukoliko tijekom tretmana plazmom nije došlo do apoptoze stanica i ušle su u stanje mirovanja, one se nakon određenog vremena mogu revitalizirati, što je vidljivo iz prikazanih rezultata. Broj preživjelih stanica kod uzoraka tretiranih frekvencijama 60, 90 i 120 Hz uz pozitivan polaritet, već nakon 5 min iznosio je 0 uz postignuti stupanj redukcije od 5-6 \log_{10} CFU mL^{-1} . Nakon perioda inkubacije od 24 h, broj revitaliziranih stanica kod uzoraka tretiranih 5 i 10 min i pri pozitivnom polaritetu bio je 8-9 \log_{10} CFU mL^{-1} , tj. postotak revitalizacije u svim slučajevima iznosio je 100% što znači da su se bakterijske stanice potpuno uspjele revitalizirati, a prilikom tretmana ušle su u stanje mirovanja tj. VBNC stanje. Prema tome, u svim uzorcima tretiranim primjenom pozitivnog polariteta, nije došlo do apoptoze i bakterijske su stanice ušle u stanje mirovanja i u potpunosti su uspjele preživjeti ovakav režim tretmana hladnom plazmom.

Uz 60 Hz frekvencije i negativni polaritet, nakon 5 minuta tretmana broj preživjelih stanica iznosio je $5,41 \log_{10} \text{CFU mL}^{-1}$ (slika 4), a nakon 24 h inkubacije, broj revitaliziranih stanica iznosio je $8,18 \log_{10} \text{CFU mL}^{-1}$. Postotak revitalizacije u tom slučaju iznosi 66,18 % (slika 7). Daljnjim tretiranjem pri istom režimu, nakon 10 minuta tretmana postignuta je potpuna redukcija i broj stanica iznosio je 0. Postotak revitalizacije stanica u ovom slučaju je 100 % jer je nakon 24 h inkubacije broj revitaliziranih stanica narastao na $8,2 \log_{10} \text{CFU mL}^{-1}$. Kod uzorka (90 Hz, negativni polaritet) postotak revitalizacije iznosio je oko 75 % za oba tretmana od 5 i 10 minuta. Povećanjem frekvencije na 120 Hz uz negativni polaritet, s produljenjem vremena tretiranja, postotak revitalizacije smanjio se sa 75,38 % na 54,88 %.

Na temelju dobivenog grafičkog prikaza može se uočiti da su nakon potpune inaktivacije stanica *Listeria innocua* (slika 4), a potom nakon procesa revitalizacije (slika 7), bakterijske stanice oporavljene te da su nakon tretmana ušle u stanje mirovanja, tzv. „VBNC – viable but non culturable“ stanje, kao odgovor na stresne uvjete. Drugim riječima, ne pokazuju rast na hranjivoj podlozi, ali zadržavaju metaboličku aktivnost. Kada se postave u optimalne uvjete (temperatura, medij - hranjivi bujon, pH...) bakterijske stanice nastavljaju proces diobe te se, nakon naciepljivanja na hranjivi agar, uočavaju na podlozi.

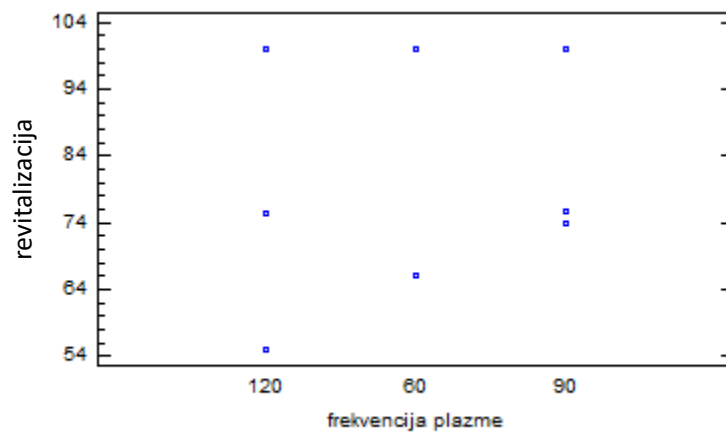
Revitalizacija stanica bakterije *Listeria innocua* ukazuje na njihov izlazak iz VBNC stanja, što nam govori da proučavani parametri nisu djelotvorni na inaktivaciju bakterije *Listeria innocua* ATCC 33091 te da je za potpunu inaktivaciju bakterijskih stanica potrebna optimizacija korištenih režima tretiranja.

4.2.1. Rezultati statističke obrade za revitalizaciju

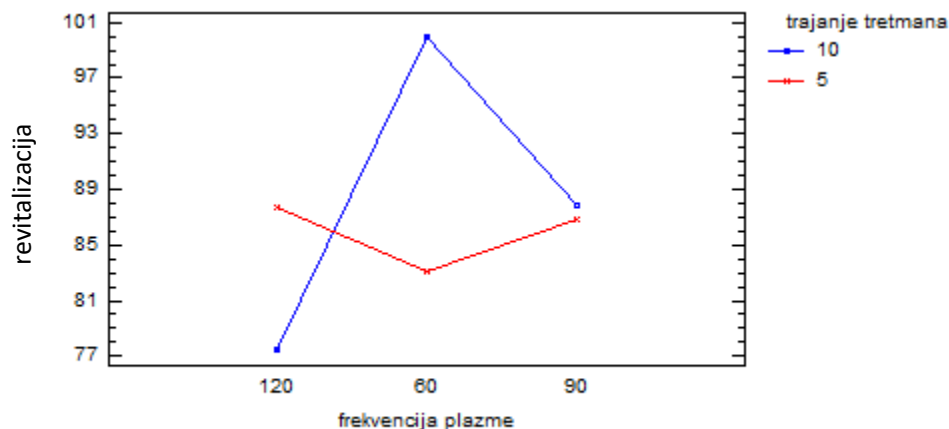
Statistička obrada eksperimentalno dobivenih podataka za revitalizaciju stanica prikazana je u tablici 4 i na slikama 8 i 9. U tablici 4 je ANOVA razdioba varijabilnosti za revitalizaciju u posebne dijelove za svaki od učinaka. Kao što se može zaključiti iz prethodnog poglavlja, a u ovom je statistički dokazano, niti jedan učinak nema utjecaja na revitalizaciju bakterijskih stanica.

Tablica 4. Statistička značajnost varijabli za revitalizaciju

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Df</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F-omjer</i>	<i>P-vrijednost</i>
GLAVNI UČINCI:					
A: frekvencija plazme	161,554	2	80,7769	0,43	0,6976
B: trajanje tretmana	19,304	1	19,304	0,10	0,7781
C : polaritet	1977,87	1	1977,87	10,62	0,0827
INTERAKCIJE:					
AB	372,609	2	186,305	1,00	0,5000
AC	161,554	2	80,7769	0,43	0,6976
BC	19,304	1	19,304	0,10	0,7781
OSTATAK	372,609	2	186,305		
UKUPNO (ISPRAVLJENO)	3084,81	11			



Slika 8. Prikaz ovisnosti revitalizacije o frekvenciji plazme

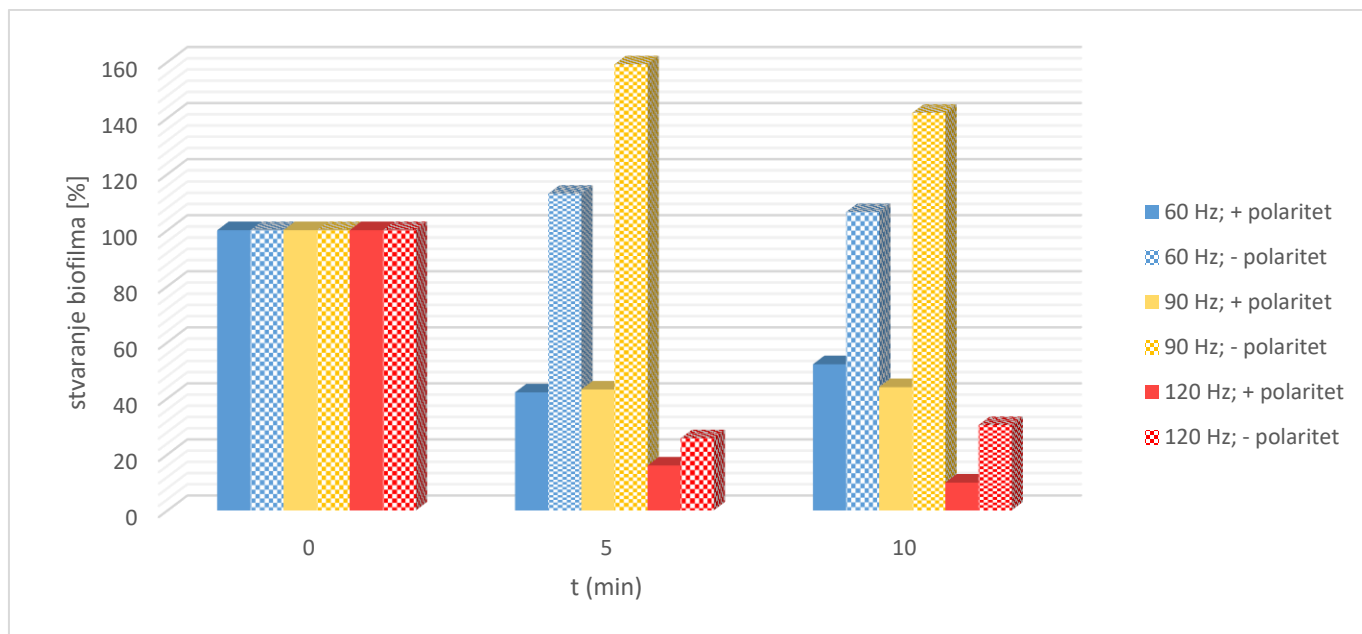


Slika 9. Prikaz ovisnosti revitalizacije o frekvenciji plazme i njihove međusobne interakcije na učinak tretmana hladnom plazmom nakon 5 i 10 minuta tretiranja

4.3. UTJECAJ HLADNE PLAZME NA FORMIRANJE BIOFILMA

Rezultati stvaranja biofilma bakterije *L. innocua* nakon tretiranja hladnom plazmom prikazani su na slici 10. Kod uzoraka tretiranih pri pozitivnom polaritetu, redukcija stvaranja biofilma veća je pri povećanju frekvencije. Najveću redukciju nastanka biofilma pokazuju uzorci tretirani pri pozitivnom polaritetu i frekvenciji od 120 Hz nakon 10 minuta tretiranja, a ona iznosi 90,05 %. Ujedno, to je i najučinkovitiji tretman plazmom jer se njime dokazuje najmanji porast biofilma, odnosno najsporija reakcija bakterija na stresne uvjete. Smanjenjem frekvencije na 60 i 90 Hz pri pozitivnom polaritetu, redukcija stvaranja biofilma nije značajna kao pri najvišoj frekvenciji te tako nakon tretmana plazmom od 5 do 10 minuta iznosi 48 – 58 %.

Stoga, najviša frekvencija i najdulje vrijeme tretiranja pri pozitivnom polaritetu nepovoljni su uvjeti za stvaranje biofilma kod bakterije *L. innocua*. Pri nižim frekvencijama manji je utjecaj plazme na bakteriju *L. innocua* i u mogućnosti je bolje razviti biofilm.



Slika 10. Ovisnost stvaranja biofilma o vremenu tretmana hladnom plazmom pri 60, 90, 120 Hz te pozitivnom i negativnom polaritetu

Međutim, uzorci tretirani pri negativnom polaritetu (kod frekvencija od 60 i 90 Hz) pokazuju drugačije rezultate (slika 10). Kod uzoraka tretiranih pri 60 Hz, nakon 5 i 10 minuta dolazi do povećanja stvaranja biofilma u odnosu na početnu vrijednosti i to za 7 - 12 %. Povišenjem frekvencije na 90 Hz, povećanje biofilma iznosi čak do 59 % za uzorke tretirane 5 minuta i 42 % za uzorke tretirane 10 minuta. U stresnim i neoptimalnim uvjetima moguće je očekivati različite načine rasta i oporavka bakterija kao odgovora na stresne uvjete pa je jedno od njih i objašnjenje ovakvog rezultata nepostignute redukcije.

Povećanjem frekvencije na 120 Hz, pri negativnom polaritetu, za uzorke tretirane 5 i 10 minuta, smanjenje nastanka biofilma iznosi 70 – 74 %.

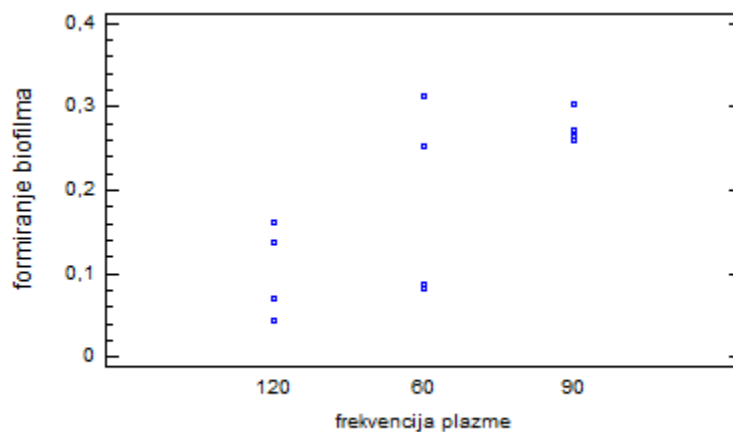
Sladek i sur. (2007) su tretmanom netoplinskom atmosferskom plazmom proučavali stvaranje biofilma bakterije *Streptococcus mutans*, s i bez prisustva saharoze [54]. Za postizanje baktericidnog učinka na biofilm kultiviran bez saharoze, bila je dovoljna 1 minuta tretmana plazmom. Biofilm kultiviran sa saharozom nakon tretmana plazmom pokazao je baktericidni učinak samo na površini, a antibakterijska aktivnost plazme ne dolazi do izražaja. Time je omogućen lakši oporavak, a takvi deblji slojevi biofilma predstavljaju puno veći izazov za prodor radikala plazme [54].

4.3.1. Rezultati statističke obrade za formiranje biofilma

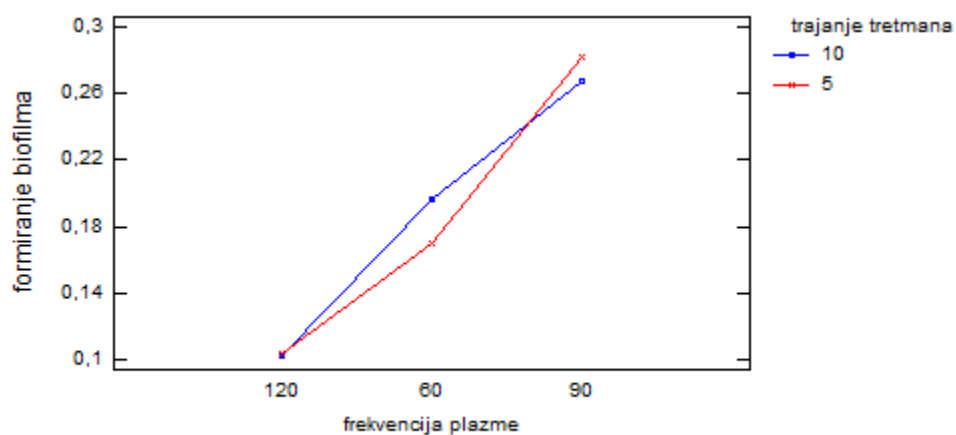
U tablici 5 prikazana je ANOVA razdioba varijabilnosti za biofilm. Iz tablice 5 i slika 11 i 12 vidljivo je da učinak frekvencije plazme i kombinacija AC (frekvencije plazme i polariteta) imaju P-vrijednost manju od 0,05, tj. redom 0,0310 i 0,0392 što ukazuje da su značajno različiti od nule pri CL od 95,0 %. Drugim riječima, statistički značajan utjecaj na formiranje biofilma ostvario je učinak frekvencije plazme te interakcija frekvencije plazme i polariteta čija je P-vrijednost manja od 0,05. Ostale značajke nisu imale značajan statistički učinak s obzirom da im je P-vrijednost manja od 0,05.

Tablica 5. Statistička značajnost varijabli za formiranje biofilma

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Df</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F-omjer</i>	<i>P-vrijednost</i>
GLAVNI UČINCI:					
A: frekvencija plazme	0,0585702	2	0,0292851	31,21	0,0310
B: trajanje tretmana	0,0000520833	1	0,0000520833	0,06	0,8357
C : polaritet	0,00210675	1	0,00210675	2,25	0,2727
INTERAKCIJE:					
AB	0,000901167	2	0,000450583	0,48	0,6756
AC	0,0460395	2	0,0230197	24,53	0,0392
BC	0,00021675	1	0,00021675	0,23	0,6782
OSTATAK	0,0018765	2	0,00093825		
UKUPNO (ISPRAVLJENO)	0,109763	11			



Slika 11. Prikaz ovisnosti formiranja biofilma o frekvenciji plazme

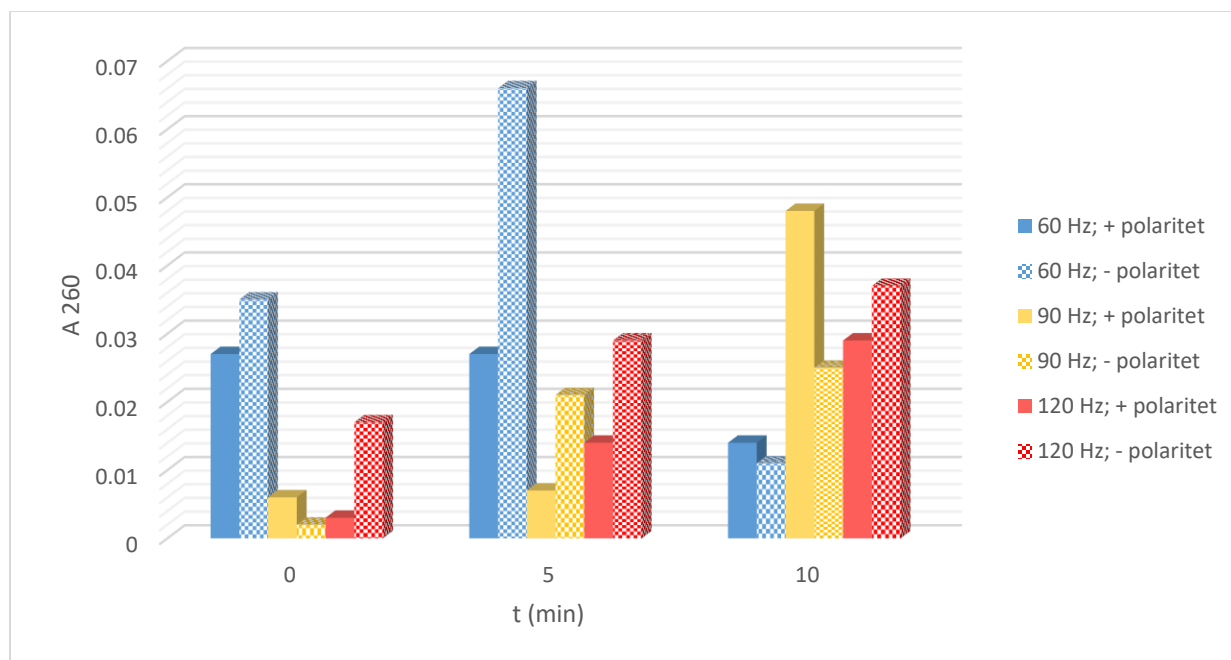


Slika 12. Prikaz ovisnosti revitalizacije o frekvenciji plazme i njihove međusobne interakcije na učinak tretmana hladnom plazmom nakon 5 i 10 minuta tretiranja

4.4. UTJECAJ HLADNE PLAZME NA ISTJECANJE STANIČNOG SADRŽAJA

Mjerenjem apsorbancije filtrata uzorka pri dvjema valnim duljinama (260 nm - valnoj duljini pri kojoj apsorbiraju nukleinske kiseline i 280 nm - valnoj duljini pri kojoj apsorbiraju proteini) može se detektirati oštećenje stanične membrane uzrokovano tretmanom plazmom uslijed čega dolazi do istjecanja unutarstaničnog materijala.

Na slici 13 vidljivi su rezultati za vrijednosti apsorbancije pri 260 nm na kojoj apsorbiraju DNA molekule. Najmanju vrijednost apsorbancije i njeno smanjenje povećanjem vremena tretiranja pokazuje uzorak tretiran uz frekvenciju od 60 Hz i pozitivni polaritet (0,027 nakon 5 minuta tretmana i 0,014 nakon 10 minuta) te uzorak tretiran pri istoj frekvenciji, ali negativnom polaritetu gdje se nakon porasta apsorbancije kod 5 minuta tretiranja (ujedno i najvišeg postignutog istjecanja DNA materijala) apsorbancija značajno smanjila sa 0,066 na 0,011. Kod svih ostalih uzoraka apsorbancija je rasla produljenjem vremena tretiranja, što upućuje na povećano istjecanje staničnog sadržaja, odnosno nukleinskih kiselina.

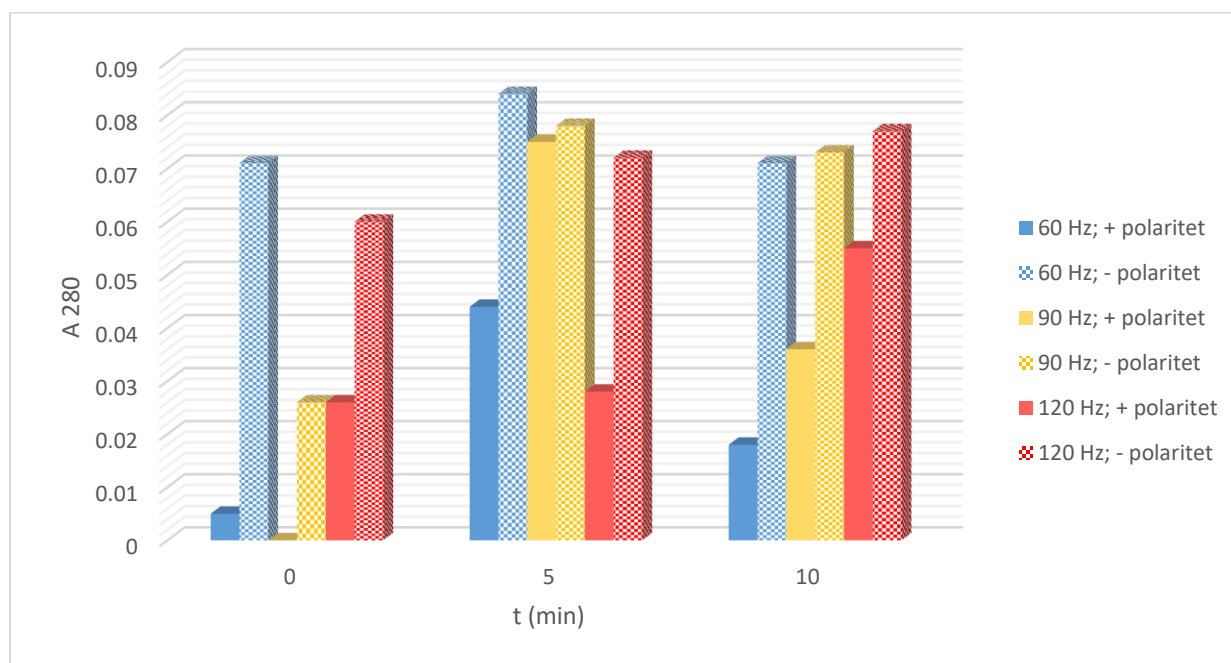


Slika 13. Ovisnost apsorbancije (A 260 nm) o vremenu tretiranja hladnom plazmom

Najveću izmjerenu apsorbanciju nakon 10 minuta tretmana imaju uzorci tretirani uz frekvenciju od 90 Hz i pozitivni polaritet, a iznosi 0,048, dok najmanju imaju uzorci tretirani 5 minuta u istim uvjetima (90 Hz, pozitivni polaritet) i iznosi 0,007. Uz frekvenciju od 120 Hz, viša apsorbancija i samim time veće istjecanje nukleinskih kiselina postignuti su uz negativni polaritet nakon 10 minuta tretiranja.

Osim u uzorcima tretiranim pri 60 Hz kod oba polariteta, istjecanje nukleinskih kiselina veće je primjenom viših frekvencija i dužim vremenom tretiranja, što bi značilo da primjenom viših frekvencija i duljim tretmanom plazme dolazi do sve veće poracije stanica i istjecanja staničnog sadržaja.

Pri valnoj duljini od 280 nm apsorbiraju stanični proteini. Vrijednosti izmjerene apsorbancije (A_{280}) kod uzoraka tretiranih 5 i 10 minuta prikazane su na slici 14.



Slika 14. Ovisnost apsorbancije (A_{280}) o vremenu tretiranja hladnom plazmom

Kod uzoraka tretiranih uz frekvenciju od 90 Hz, apsorbancija, tj. istjecanje staničnih proteina povećava se do 5 minuta tretiranja, nakon čega se, nakon 10 minuta tretiranja, apsorbancija smanjuje. Ova pojava može se objasniti time što prilikom tretmana hladnom plazmom dolazi do

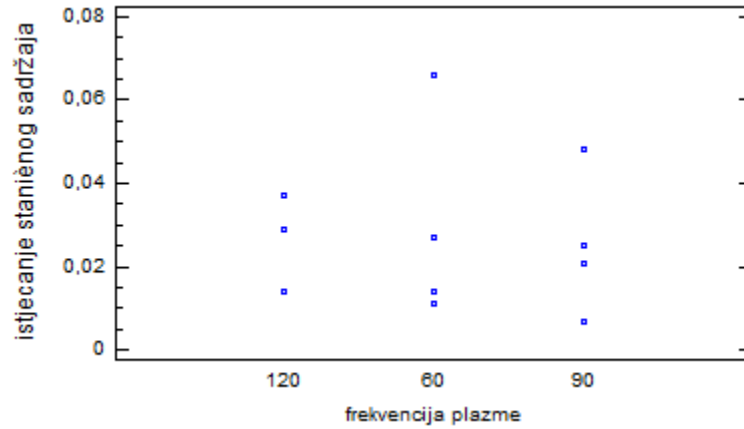
nastanka slobodnih radikala i samim time može doći do mijenjanja strukture staničnih proteina i njihove razgradnje. Kod tretmana uz frekvenciju od 120 Hz, vidljiv je suprotan učinak, gdje se produljenjem vremena tretiranja, apsorbcija, tj. istjecanje staničnih proteina, povećava. Tretmani pri negativnom polaritetu rezultirali su većom apsorbcijom u odnosu na pozitivni polaritet uz jednake frekvencije, što može biti posljedica većeg intenziteta emisije sekundarnog pražnjenja koji je mnogo veći kod negativnog nego pozitivnog polariteta. Samim time, ruptura stanica je veća i više staničnog sadržaja može isteći. Različiti polariteti plazme utječu na generiranje određenih reaktivnih vrsta. Istraživanja pokazuju da gustoća reaktivnih vrsta ovisi o polaritetu i amplitudi napona. Tako je utvrđeno da je gustoća hidroksilnog radikala gotovo jednaka za oba polariteta, da pozitivni polaritet ima značajniji utjecaj na stvaranje više reaktivnih čestica dušika, a negativni polaritet na stvaranje kisikovih čestica [55].

4.4.1. Rezultati statističke obrade za istjecanje staničnog sadržaja (A 260 nm i A 280 nm)

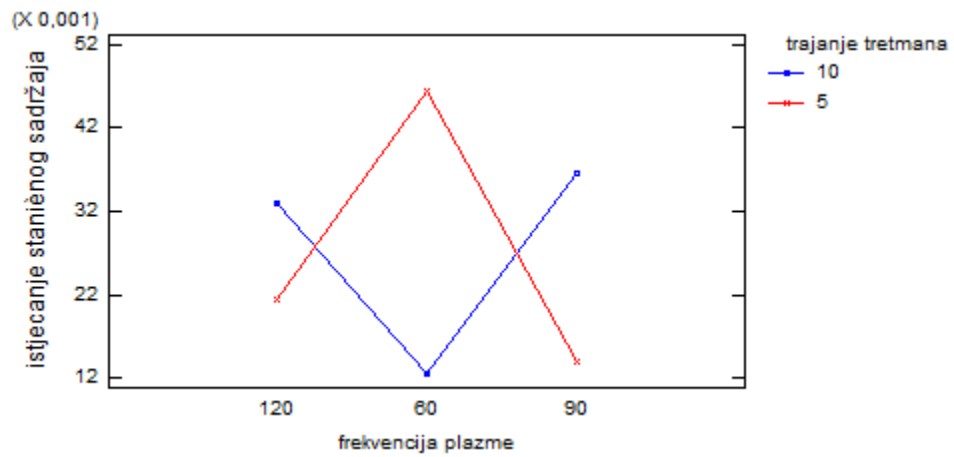
Rezultati statističke obrade za istjecanje staničnog sadržaja pri A 260 nm i A 280 nm prikazani su u tablici 6 i 7 te na slikama 15-18. Može se uočiti da niti jedna varijabla nema P-vrijednost manju od 0,05 što znači da nemaju statistički značajan utjecaj na učinak tretmana, tj. istjecanje staničnog sadržaja.

Tablica 6. Statistička značajnost varijabli za istjecanje staničnog sadržaja A 260 nm

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Df</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F-omjer</i>	<i>P-vrijednost</i>
GLAVNI UČINCI:					
A: frekvencija plazme	0,0000361667	2	0,0000180833	0,20	0,8320
B: trajanje tretmana	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
C : polaritet	0,000208333	1	0,000208333	2,33	0,2668
INTERAKCIJE:					
AB	0,0017945	2	0,00089725	10,02	0,0908
AC	0,000268167	2	0,000134083	1,50	0,4005
BC	0,000616333	1	0,000616333	6,88	0,1198
OSTATAK	0,000179167	2	0,0000895833		
UKUPNO (ISPRAVLJENO)	0,00310267	11			



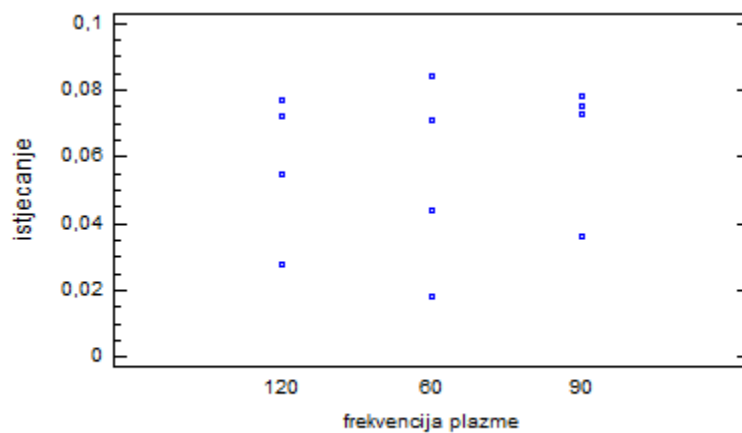
Slika 15. Prikaz ovisnosti istjecanja staničnog sadržaja pri A 260 nm o frekvenciji plazme



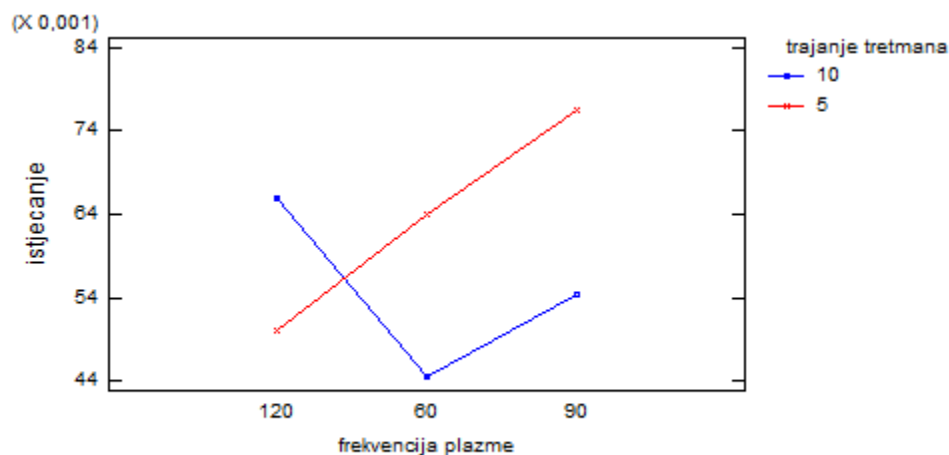
Slika 16. Prikaz ovisnosti istjecanja staničnog sadržaja pri 260 nm o frekvenciji plazme i njihove međusobne interakcije na učinak tretmana hladnom plazmom nakon 5 i 10 minuta tretiranja

Tablica 7. Statistička značajnost varijabli za istjecanje staničnog sadržaja A 280 nm

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Df</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F-omjer</i>	<i>P-vrijednost</i>
GLAVNI UČINCI:					
A: frekvencija plazme	0,0002625	2	0,00013125	0,66	0,6039
B: trajanje tretmana	0,00021675	1	0,00021675	1,08	0,4073
C : polaritet	0,00330008	1	0,00330008	16,49	0,0556
INTERAKCIJE:					
AB	0,0009035	2	0,00045175	2,26	0,3070
AC	0,000351167	2	0,000175583	0,88	0,5326
BC	0,0000520833	1	0,0000520833	0,26	0,6606
OSTATAK	0,000400167	2	0,000200083		
UKUPNO (ISPRAVLJENO)	0,00548625	11			



Slika 17. Prikaz ovisnosti istjecanja staničnog sadržaja pri 280 nm o frekvenciji plazme

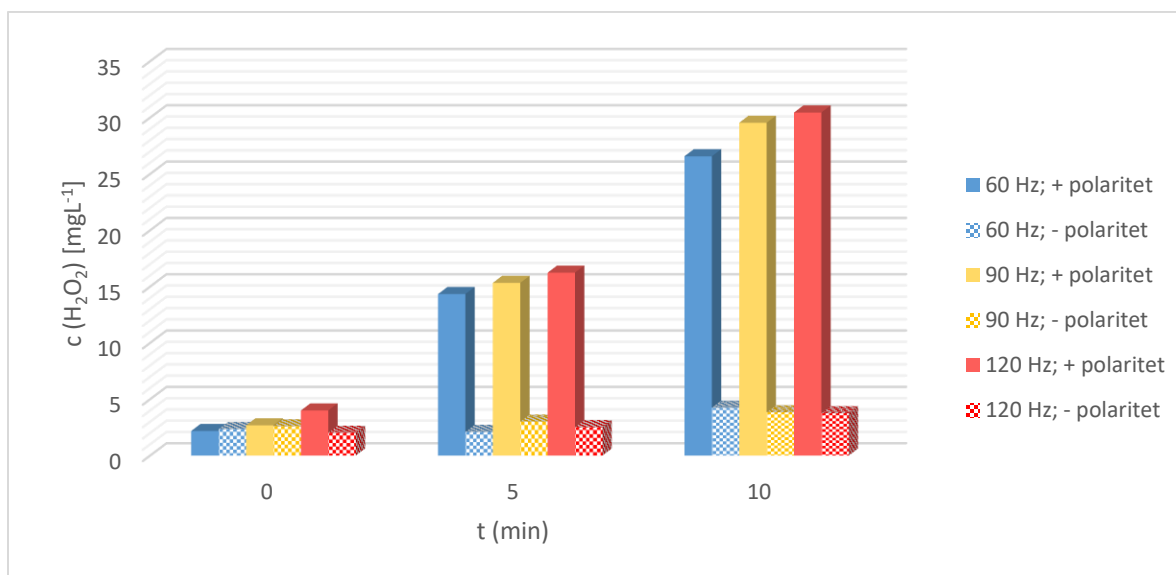


Slika 18. Prikaz ovisnosti revitalizacije o frekvenciji plazme i njihove međusobne interakcije na učinak tretmana hladnom plazmom nakon 5 i 10 minuta tretiranja

4.5. UTJECAJ HLADNE PLAZME NA STVARANJE SLOBODNIH RADIKALA

Na slici 19, prikazan je utjecaja hladne plazme na stvaranje slobodnih radikala u uzorcima tretiranim 5 i 10 minuta. Koncentracija slobodnih radikala prikazana je kao koncentracija vodikovog peroksida (mgL^{-1}) koji je produkt kaskadnih reakcija nastalih djelovanjem slobodnih radikala.

Kod svih uzoraka koncentracija vodikovog peroksida proporcionalno se povećava s višom frekvencijom i duljim vremenom tretiranja. Porast koncentracije radikala značajniji je u tretmanima pri pozitivnom u odnosu na negativni polaritet, što su utvrdili i Sun i sur. (1997) u svome radu [56]. Nakon 5 minuta tretiranja pri pozitivnom polaritetu, koncentracije vodikovog peroksida za 60, 90 i 120 Hz iznose 14,34, 15,33 i 16,24 mgL^{-1} , a nakon 10 minuta tretiranja koncentracije vodikovog peroksida značajno su više i redom za 60, 90 i 120 Hz iznose 26,57, 29,55 i 30,455 mgL^{-1} . Porast koncentracije H_2O_2 i slobodnih radikala, kao i prisutnost UV zračenja i šok valova uslijed generiranja plazme, utječu na povećanje oksidacijskog stresa kod stanica *L. innocua*, a samim time i na njenu inaktivaciju. Vidljivo je da koncentracija slobodnih radikala H_2O_2 raste primjenom pozitivnog polariteta te povećanjem frekvencije i vremena tretiranja. Prema tome, na povećanje stvaranja slobodnih radikala značajno utječe trajanje tretmana i polaritet plazme, što potvrđuje i statistička obrada podataka.



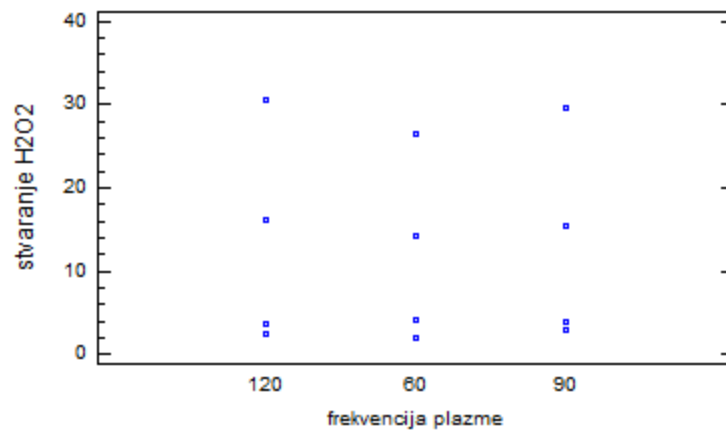
Slika 19. Stvaranje slobodnih radikala (koncentracije H₂O₂) u ovisnosti o vremenu tretiranja hladnom plazmom (prikazano kao prije i nakon tretmana od 5 i 10 min)

4.5.1. Rezultati statističke obrade za slobodne radikale (stvaranje H₂O₂)

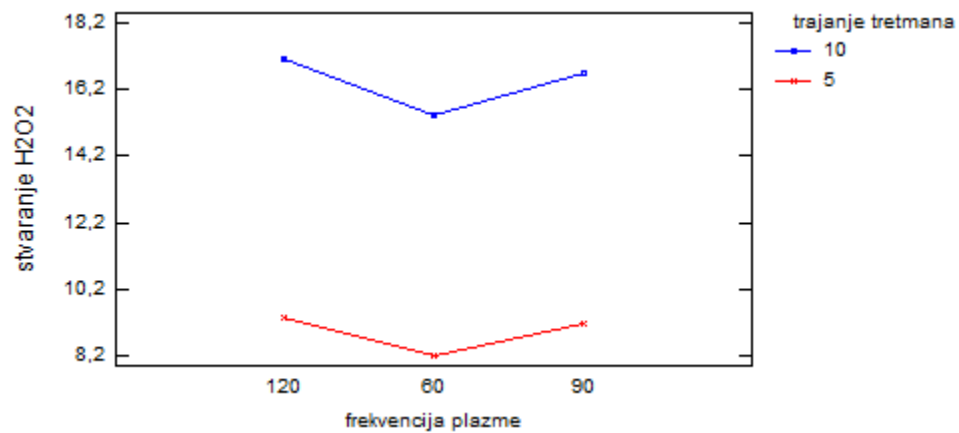
Prema tablici 8 i slikama 20 i 21, može se zaključiti da statistički značajan utjecaj na stvaranje slobodnih radikala (stvaranje H₂O₂) imaju trajanje tretmana i polaritet budući da im je P-vrijednost manja od 0,05. Logično je, stoga, da interakcija ove dvije varijable (BC) također statistički značajno utječe na stvaranje H₂O₂.

Tablica 8. Statistička značajnost varijabli za stvaranje H₂O₂

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Df</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F-omjer</i>	<i>P-vrijednost</i>
GLAVNI UČINCI:					
A: frekvencija plazme	4,50004	2	2,25002	2,77	0,2651
B: trajanje tretmana	167,806	1	167,806	206,80	0,0048
C : polaritet	1063,63	1	1063,63	1310,79	0,0008
INTERAKCIJE:					
AB	0,146706	2	0,073353	0,09	0,9171
AC	4,35206	2	2,17603	2,68	0,2716
BC	110,693	1	110,693	136,41	0,0073
OSTATAK	1,62288	2	0,811442		
UKUPNO (ISPRAVLJENO)	1352,75	11			



Slika 20. Prikaz ovisnosti stvaranja H₂O₂ o frekvenciji plazme



Slika 21. Prikaz ovisnosti stvaranja H₂O₂ o frekvenciji plazme i njihove međusobne interakcije na učinak tretmana hladnom plazmom nakon 5 i 10 minuta tretiranja

Očigledno je da brojni faktori utječu na inaktivaciju bakterije *L. innocua* hladnom plazmom. Kao što je već navedeno, posebnu pažnju potrebno je posvetiti optimizaciji procesa. Učinkovitost inaktivacije bakterija ovisi o nizu faktora: dizajnu elektroda, izboru radnog plina, površini tretiranog proizvoda, vremenu izloženosti plazmi, frekvenciji, polaritetu kao i svojstvima bakterijskih vrsta. Jasno je da je svaka bakterijska kultura specifična i da zahtijeva prilagodbu navedenih faktora za što učinkovitiju inaktivaciju.

Kod generiranja plazme, tj. električnog pražnjenja u tekućini, plazma se najprije razvija u mjehurićima argona koji se upuhuje, a potom se širi kroz tekućinu. Šok valovi nastaju kao posljedica električnih izboja i mogu izazvati inaktivaciju stanica. UV svjetlo koje plazma emitira, može imati mutageno djelovanje na stanice, ali i ulogu katalizatora reakcija oksidacije koje provodi vodikov peroksid. Iz dobivenih rezultata provedenog eksperimenta vidljivo je da koncentracija slobodnih radikala H_2O_2 raste primjenom pozitivnog polariteta te povećanjem vremena tretiranja i povišenjem frekvencije. Prema tome, na povećanje stvaranja slobodnih radikala značajno utječe trajanje tretmana i polaritet plazme, što potvrđuje i statistička obrada podataka. Mehanizam inaktivacije bakterija hladnom plazmom uključuje oksidaciju bakterijskih stanica novonastalim reaktivnim kemijskim vrstama (ponajviše hidroksilnim radikalima i vodikovim peroksidom) što potvrđuju i dobiveni rezultati redukcije bakterijskih stanica. Pri uvjetima u kojima koncentracija nastalih slobodnih radikala (H_2O_2) raste (kod pozitivnog polariteta uz sve primijenjene frekvencije i već nakon 5 minuta tretmana), dolazi do najviše stope redukcije bakterijskih stanica i njihove inaktivacije. Da je pozitivan polaritet (uz povišenje frekvencije i produljenje vremena tretiranja) najučinkovitiji pri inaktivaciji bakterije *L. innocua* pokazuju i rezultati stvaranja biofilma. Naime, povećanjem frekvencije pri pozitivnom polaritetu dokazan je veći oksidacijski stres u bakterijskim stanicama i postotak stvaranja biofilma je manji. Najmanji postotak nastalog biofilma postignut je pri frekvenciji od 120 Hz, 10 minuta tretmana i pri pozitivnom polaritetu.

Generiranjem plazme u neposrednoj blizini elektroda razvija se pulsirajuće električno polje koje izaziva elektroporaciju i pucanje membrana stanica te na taj način dolazi do olakšanog izlaska staničnih sastojaka, tj. istjecanja proteina i nukleinskih kiselina. Više istjecanje nukleinskih kiselina je općenito postignuto pri negativnom polaritetu, povećanjem frekvencije i vremena tretiranja uz odstupanja pri frekvenciji od 60 Hz. Primjena negativnog polariteta pokazala se učinkovitija i kod istjecanja staničnih proteina, koje se nakon 10 minuta tretmana povećava s povećanjem frekvencije.

Najviše istjecanje unutarstaničnog sadržaja postignuto je pri negativnom polaritetu, frekvenciji od 60 Hz i 5 minuta tretmana. Ovi rezultati podudaraju se s postotkom revitalizacije stanica koji je najmanji pri istim uvjetima.

Zahvaljujući mehanizmu povećanja rezistencije na stres, *L. innocua* može se prilagoditi nepovoljnim uvjetima i ući u stanje mirovanja. Kada nastupe povoljni uvjeti, izlaskom iz VBNC stanja, bakterijske stanice mogu se ponovno nastaviti dijeliti, što je vidljivo u provedenom eksperimentu. Nakon tretmana plazmom došlo je do revitalizacije svih uzoraka *L. innocua* nakon 24 h inkubacije pri 37 °C i zato na temelju dobivenih rezultata nije moguće utvrditi optimalne uvjete za njenu potpunu inaktivaciju. Uvjeti tretmana plazmom (frekvencija od 120 Hz, pozitivan polaritet i vrijeme tretiranja od 10 minuta) pokazali su se kao najučinkovitiji stresni uvjeti pri kojima je rast bakterije *L. innocua* nakon tretmana zaustavljen, postotak stvorenog biofilma najmanji, a koncentracija nastalih slobodnih radikala (H₂O₂) najviša.

U drugu ruku, za najviše istjecanje staničnog sadržaja i najmanji postotak revitalizacije stanica, kao najučinkovitiji, pokazali se uvjeti tretmana stanica pri negativnom polaritetu, frekvenciji od 60 Hz i vremenu tretmana od 5 minuta.

Hladna plazma pokazala se kao potencijalna za inaktivaciju bakterije *L. innocua*. Međutim, da bi se postigao letalan učinak potrebna je optimizacija korištenih režima tretiranja.

Stoga, osim promatranih faktora u ovome radu, za daljnja istraživanja treba obratiti pažnju i na ostale faktore kako bi se svi uvjeti maksimalno prilagodili za što učinkovitiju inaktivaciju bakterijskih stanica.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Tijekom tretmana bakterijske suspenzije hladnom plazmom najbolja redukcija broja stanica bakterije *L. innocua* ATCC 33091 i to od $6,25 \log_{10} \text{ CFU mL}^{-1}$ ostvarena je uz sljedeće uvjete: frekvencija 90 Hz, 5 minuta tretiranja i pozitivni polaritet. Uz istu frekvenciju i vrijeme tretiranja, ali pri negativnom polaritetu, postignuta je znatno manja stopa redukcije ($0,76 \log_{10} \text{ CFU mL}^{-1}$).
2. Tretmanima hladnom plazmom pri pozitivnom polaritetu uz sve primijenjene frekvencije (60, 90 i 120 Hz) i vremena tretiranja (5 i 10 minuta), postotak revitalizacije stanica *L. innocua* ATCC 33091 iznosio je 100 %. Pri negativnom polaritetu, revitalizacija bakterijskih stanica bila je manja. Najmanji postotak revitalizacije od 54,88 % vidljiv je pri primijenjenoj frekvenciji od 120 Hz pri čemu se tretiranje u trajanju od 10 minuta pokazalo kao učinkovitije.
3. Najznačajnija redukcija stvaranja biofilma od 90,05 % postignuta je pri pozitivnom polaritetu plazme, najvišoj frekvenciji od 120 Hz i najduljim vremenom tretiranja od 10 minuta.
4. Utvrđeno istjecanje staničnog sadržaja pri 260 i 280 nm ukazuje na gubitak unutarstaničnih proteina i nukleinskih kiselina. Istjecanje nukleinskih kiselina je općenito veće pri dužem vremenu tretiranja uz odstupanja kod frekvencije od 60 Hz, a istjecanje unutarstaničnih proteina veće je pri negativnom polaritetu u odnosu na pozitivni polaritet. Istjecanje staničnog sadržaja nije značajno te se stanice *L. innocua* ATCC 33091 dobro revitaliziraju nakon tretmana hladnom atmosferskom plazmom u mjehurićima argona.
5. Koncentracija nastalih slobodnih radikala (H_2O_2) veća je kod tretmana plazmom pri pozitivnom polaritetu, povećanjem frekvencije i produljenjem vremena tretiranja. Najveća koncentracija slobodnih radikala (H_2O_2) prisutna je u uzorcima tretiranim 10 minuta pri 120 Hz i pozitivnom polaritetu. Veća količina H_2O_2 uzrokuje veći oksidacijski stres stanica.

6. LITERATURA

1. Barba, F. J., Ahrné, L., Xanthakis, E., Landerslev, M. G., Orliern, V. (2018) Chapter 2 - Innovative Technologies for Food Preservation. U: Innovative Technologies for Food Preservation: Inactivation of Spoilage and Pathogenic Microorganisms, (Barba, F. J., Sant'Ana, A. S., Orlien, V., Koubaa, M. ured.) Elsevier Science Publishing Co Inc, San Diego, str. 25-51.
2. Thirumdas, R., Sarangapani, C., Annapure, U. (2014) Cold Plasma: A novel Non-Thermal Technology for Food Processing. *Food Biophys.* **10**, 1–11.
3. Eliezer, S., Eliezer, Y. (2001) The Fourth State of Matter: An Introduction to Plasma Science, 2. izd., Institute of Physics Publishing, London.
4. Tonks, L., Langmuir, I. (1929) Oscillations in Ionized Gases. *Phys Rev.* **33**, 195–210.
5. Ercegović Ražić, S., Čunko, R. (2009) Modifikacija svojstava tekstilija primjenom plazme. *Tekstil.* **58**, 55–74.
6. Hamerli, P. (2004) Plasma aminofunctionalisation of polymeric membrane surfaces for tissue engineering applications, Dissertation, Univesity of Veszprem
7. Philip, N., Saoudi, B., Crevier, M. C., Moisan, M., Barbeau, J., Pelletier, J. (2002) The respective roles of UV photons and oxygen atoms in plasma sterilization at reduced gas pressure: The case of N₂-O₂ mixtures. *IEEE T Plasma Sci.* **30**, 1429–1436.
8. Bogaerts, A., Neyts, E., Gijbels, R., van der Mullen, J. (2002) Gas discharge plasmas and their applications. *Spectrochim. Acta B.* **57**, 609–658.
9. Bárdos, L., Baránková, H. (2010) Cold atmospheric plasma: Sources, processes, and applications. *Thin Solid Films.* **518**, 6705–6713.
10. Inan, U. S., Golkowski. M. (2010) Principles of Plasma Physics for Engineers and Scientists. Cambridge University Press, New York.
11. Bellan, P. M. (2006) Basic concepts. U: Fundamentals of Plasma Physics (Bellan, P. M., ured.), Cambridge University Press, New York, str. 1–33.
12. Boulos, M. I., Fauchais, P., Pfender, E. (1994) The plasma state. U: Thermal Plasmas- Fundamentals and Applications (Boulos, M. I., Fauchais, P., Pfender, E., ured.), Springer Science + Business Media, LLC, New York, str. 1-47.

13. Doria, A. C. O. C., Sorge, C. D. P. C., Santos, T. B., Brandão, J., Gonçalves, P. A. R., Maciel, H. S., Khouri, S., Pessoa, R. S. (2015) Application of post-discharge region of atmospheric pressure argon and air plasma jet in the contamination control of *Candida albicans* biofilms. *Res Biomed Eng.* **31**, 358–362.
14. Tendero, C., Tixier, C., Tristant, P., Desmaison, J., Leprince, P. (2006) Atmospheric pressure plasmas: A review. *Spectrochim Acta B.* **61**, 2–30.
15. Schütze, A., Jeong J. Y., Babayan, S. E., Park, J., Selwyn, G. S., Hicks, R. F. (1998) The Atmospheric-Pressure Plasma Jet: A Review and Comparison to Other Plasma Sources. *IEEE T Plasma Sci.* **26**, 1685–1694.
16. Joshi, A. A., Locke, B. R., Arce, P., Finney, W. C. (1995) Formation of hydroxyl radicals, hydrogen peroxide and aqueous electrons by pulsed streamer corona discharge in aqueous solution. *J Hazard Mater.* **41**, 3–30.
17. Kogelschatz, U. (2003) Dielectric-Barrier Discharges: Their History, Discharge Physics, and Industrial Applications. *Plasma Chem Plasma P.* **23**, 1–46.
18. Locke, B. R., Sato, M., Sunka, P., Hoffmann, M. R., Chang, J. S. (2006) Electrohydraulic Discharge and Nonthermal Plasma for Water Treatment. *Ind Eng Chem Res.* **45**, 882–905.
19. Joshi, R. P., Thagard, S. M. (2013) Streamer-Like Electrical Discharges in Water: Part II. Environmental Applications. *Plasma Chem Plasma P.* **33**, 17-49.
20. Gasanova, S. (2013) Aqueous-phase electrical discharges: generation, investigation and application for organics removal from water. Dissertation. Universität Duisburg-Essen.
21. Laenen, R., Roth, T., Laubereau, A. (2000) Novel Precursors of Solvated Electrons in Water: Evidence for a Charge Transfer Process. *Phys Rev Lett.* **85**, 50–53.
22. Starikovskiy, A., Yang, Y., Cho, Y. I., Fridman, A. (2011) Non-equilibrium plasma in liquid water: dynamics of generation and quenching. *Plasma Sources Sci T.* **20**, 24003.
23. Mijatović, I., Matošić, M. (2013) Tehnologija vode, interna skripta, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.
24. Min, S. C., Roh, S. H., Boyd, G., Sites, J. E., Uknalis, J., Fam, X., Niemira, B. A. (2017) Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and Aerobic Microorganisms in Romaine Lettuce Packaged in a Commercial Polyethylene Terephthalate Container Using Atmospheric Cold Plasma. *J Food Prot.* **80**, 35–43.

25. Ziuzina, D., Patil, S., Cullen, P.J., Keener, K. M., Bourke, P. (2012) Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli* in liquid media inside a sealed package. *J Appl Microbiol.* **114**, 778–787.
26. Misra, N. N., Keener, K. M., Bourke, P., Mosnier, J. P., Cullen, P. J. (2014) In-package atmospheric pressure cold plasma treatment of cherry tomatoes. *J Biosci Bioeng.* **118**, 177–182.
27. WHO (2017) World Health Organization, <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>>. Pristupljeno 13. lipnja 2018.
28. Mai-Prochnow, A., Murphy, A. B., McLean, K. M., Kong, M. G., Ostrikov, K. (K.) (2014) Atmospheric pressure plasmas: Infection control and bacterial responses. *Int J Antimicrob Ag* **43**, 508-517.
29. Critzer, F., Kelly-Wintenberg, K., South S. L., Golden, D. A. (2007) Atmospheric Plasma Inactivation of Foodborne Pathogens on Fresh Produce Surfaces. *J Food Prot* **70**, 2290–2296.
30. Abramzon, N., Joaquin, J. C., Bray, J., Brelles-Mariño, G. (2006) Biofilm Destruction by RF High-Pressure Cold Plasma Jet. *IEEE T Plasma Sci.* **34**, 1304-1309.
31. Brelles-Mariño, G. (2012) Induction of a viable-but-non-culturable state in bacteria treated with gas discharge plasma. *J Appl Microbiol.* **112**, 412–413.
32. Oliver, J. D. (2005) The Viable but Nonculturable State in Bacteria. *J. Microbiol.* **43**, 93-100.
33. Kvam, E. P., Davis, B., Mondello, F. J., Garner, A. L. (2012) Nonthermal atmospheric plasma rapidly disinfects multidrug-resistant microbes by inducing cell surface damage. *Antimicrob Agents Ch.* **56**, 2028-2036.
34. Lee, K., Paek, K., Ju, W. T., Lee, Y. (2006) Sterilization of bacteria, yeast, and bacterial endospores by atmospheric-pressure cold plasma using helium and oxygen. *J Microbiol.* **44**, 269–275.
35. Ermolaeva, S. A., Varfolomeev, A. F., Chernukha, M. Y., Yurov, D. S., Vasiliev, M. M., Kaminskaya, A. A., Moisenovich, M. M., Romanova, J. M., Murashev, A. N., Selezneva, I. I., Shimizu, T., Sysolyatina, E. V., Shaginyan, I. A., Petrov, O. F., Mayevsky, E. I., Fortov, V. E., Morfill, G. E., Naroditsky, B. S., Gintsburg, A. L. (2011) 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.

36. Donlan, R. M., Costerton, J. W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 167-193.
37. Ciccio, D. P., Meloni, D., Ianieri, A. (2015) *Listeria Monocytogenes: Growth in biofilms in the food industry*. U: *Listeria Monocytogenes: Incidence, Growth Behavior and Control*, (Tiffany Vicario, ured.), Nova Science Publishers, New York, str. 37-58.
38. Sutherland, I. W., Hughes, K. A., Skillman, L. C., Tait, K. (2004) The interaction of phage and biofilms. *FEMS Microbiol Lett.* **232**, 1–6.
39. Helmke, A., Grünig, P., Fritz, U. M., Wandke, D., Emmert, S., Petersen, K., Viöl, W. (2012) Low-temperature Plasma - a Prospective Microbicidal Tool. *Recent Pat Anti-Canc.* **7**, 221-230.
40. Matthes, R., Bekeschus, S., Bender, C., Koban, I., Hübner, N. O., Kramer, A. (2012) Pilot-study on the influence of carrier gas and plasma application (open resp. delimited) modifications on physical plasma and its antimicrobial effect against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *GMS Krankenhhyg Interdiszip.* **7**, 1-7.
41. Millan-Sango, D., Han, L., Milosavljevic, V., Valdramidis, V. P. (2015) Assessing bacterial recovery and efficacy of cold atmospheric plasma treatments. *Food Bioprod Process.* **96**, 154–160.
42. Toyokawa, Y., Yagyū, Y., Misawa, T., Sakudo, A. (2017) A new roller conveyer system of non-thermal gas plasma as a potential control measure of plant pathogenic bacteria in primary food production. *Food Control.* **72**, 62–72.
43. Cocolin, L. S., Rantsiou, K. (2016) *Listeria: Detection*. U: *Encyclopedia of Food and Health* (Caballero, B., Finglas, P. M., Toldrá, F., ured.), Elsevier Science and Technology, University of Turin, Turin, str. 556–560.
44. Humski, A., Mikulić, M., Klarić, M., Havrda, T. (2011) *Listeria monocytogenes* u svježem kravljem siru. *Veterinarska stanica.* **42**, 317-321.
45. Junttila, J. R., Niemelä, S. I., Hirn, J. (1998) Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic listeria. *J Appl Bacteriol.* **65**, 321–327.
46. Farber, J. M., Coates, F., Daley, E. (1992) Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol.* **15**, 103–105.

47. Duffy, G., Walsh, D., Sheridan, J. J., Logue, C. M., Harrington, D., Blair, I. S., McDowell, D. A. (2000) Behaviour of *Listeria monocytogenes* in the presence of *Listeria innocua* during storage of minced beef under vacuum or in air at 0°C and 10°C. *Food Microbiol.* **17**, 571–578.
48. Buchrieser, C., Rusniok, C., Kunst, F., Cossart, P., Glaser, P. (2003) Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **35**, 207–213.
49. Pine, L., Malcolm, G., Brooks, J., Daneshvar, M. (1989) Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. *Can. J. Microbiol.* **35**, 245–54.
50. Peeters, E., Nelis, H. J., Coenye, T. (2008) Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods.* **72**, 157–165.
51. Traba, C., Liang, J. F. (2011) Susceptibility of *Staphylococcus aureus* biofilms to reactive discharge gases. *Biofouling.* **27**, 763–772.
52. Fröhling, A., Baier, M., Ehlbeck, J., Knorr, D., Schlüter, O. (2012) Atmospheric pressure plasma treatment of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* at polysaccharide surfaces: Inactivation kinetics and flow cytometric characterization. *Innov Food Sci Emerg.* **13**, 142–150.
53. Fleming, D., Rumbaugh, K. P. (2017) Approaches to Dispersing Medical Biofilms. *Microorganisms.* **5**, 15.
54. Sladek, R. E., Ffloche, S. K., Sissons, C. H., Stoffels, E. (2007) Treatment of *Streptococcus mutans* biofilms with a nonthermal atmospheric plasma. *Lett Appl Microbiol.* **45**, 318–323.
55. Yonemori, S., Ono, R. (2015) Effect of discharge polarity on the propagation of atmospheric-pressure helium the densities of OH, NO and O radicals. *Biointerphases.* **10**, 43–51.
56. Sun, B., Sato, M., Clements, J.S. (1997) Optical study of active species produced by a pulsed streamer corona discharge in water. *J Electrostat.* **39**, 189–202.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

TIHANA ŽUGOČIĆ

Ime i prezime studenta

Žugović