

# Utjecaj hladne plazme na stvaranje biofilma

---

**Magdić, Valentina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2017**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:084771>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-07**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

Valentina Magdić  
6859/PT

**UTJECAJ HLADNE PLAZME NA STVARANJE BIOFILMA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Modul:** Prehrambeno – procesno inženjerstvo

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

Zagreb, 2017.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno – biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno – tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procesno - prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

## UTJECAJ HLADNE PLAZME NA STVARANJE BIOFILMA

*Valentina Magdić, 0058204274*

**Sažetak:** Svrha ovog rada je utvrditi učinak hladne plazme na stvaranje biofilma i inaktivaciju bakterijskih stanica *Listeria innocua* ATCC 33091. Uzorci su tretirani uz tri nezavisne varijable – frekvencija (60, 90, 120 Hz), vrijeme tretiranja (5 i 10 min) te polaritet (+/-). Eksperiment je proveden s dva tipa hladne plazme, a to su plazma generirana u mjehurićima te tekućinska plazma bez miješanja. Potpuna inaktivacija postignuta je pri frekvenciji (90 Hz) te najduljem vremenskom tretmanu (10 min) pri pozitivnom polaritetu plazme generirane u mjehurićima (6.20 log<sub>10</sub> CFU/mL). Najbolji učinak s obzirom na stvaranje biofilma je također postignut najduljim tretiranjem (10 min) uz najvišu frekvenciju (120 Hz) pri pozitivnom polaritetu plazme generirane u mjehurićima (90.16%). Statističkom obradom utvrđena je statistička značajnost ( $p < 0.05$ ) frekvencije te kombinacija frekvencije i polariteta na stvaranje biofilma. Za razliku od toga, promatranjem stope redukcije nije utvrđen niti jedan čimbenik koji bi statistički značajno utjecao ( $p > 0.05$ ).

**Ključne riječi:** bakterija, biofilm, hladna plazma, inaktivacija, polaritet

**Rad sadrži:** 26 stranica, 10 slika, 5 tablica, 21 literaturni navod

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

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

**Pomoć pri izradi:** Višnja Stulić, mag.ing.

**Datum obrane:** 13.lipnja 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study of Food Technology  
Department of Food Engineering  
Laboratory for Food Processes Engineering  
Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Food Technology

Bachelor thesis

### THE EFFECT OF COLD PLASMA TRETAMENT ON THE FORMATION OF BIOFILM

*Valentina Magdić, 0058204274*

**Abstract:** The aim of this study is to determine the effect of cold plasma on formation of biofilm and inactivation rate of *Listeria innocua* ATCC 33091. The samples were treated using three independent variables – frequency (60, 90, 120 Hz), time (5 and 10 mins) and polarity (+/-). The experiment was conducted with two types of cold plasma: plasma generated in the bubbles and liquid plasma without stirring. Complete inactivation was achieved at the frequency value of 90 Hz and the longest treatment time (10 min) at the positive polarity of plasma generated in the bubbles (6.20 log<sub>10</sub> CFU/mL). The best effect on biofilm formation is also at the longest time of treating (10 mins) with the highest frequency (120 Hz) and the positive polarity of plasma generated in the bubbles (90.16 %). Statistical analysis determined the statistical significance (p<0.05) of frequency and a combination of frequency and polarity on the formation of biofilm. None of the factors had a statistically significant effects on the reduction rate (p>0.05).

**Key words:** bacterium, biofilm, cold plasma, inactivation, polarity

**Thesis conteins:** 26 pages, 10 figures, 5 tables, 21 references

**Orginal in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

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

**Technical support and assistance:** mag. ing. Višnja Stulić, Scientific Assistant

**Defence date:** June 13<sup>th</sup> 2017

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. DEFINICIJA PLAZME .....	2
2.2. NASTAJANJE PLAZME .....	2
2.3. VRSTE PLAZMI .....	3
2.4. NAČINI GENERIRANJA I VRSTE PRAŽNENJA PLAZME .....	4
2.5. PRIMJENA PLAZME U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI .....	5
2.6. MIKROBIOLOŠKA INAKTIVACIJA MEHANIZMOM HLADNE PLAZME .....	5
2.7. OSTALI UČINCI PLAZME .....	6
2.8. <i>LISTERIA INNOCUA</i> .....	7
2.9. DEFINICIJA I STVARANJE BIOFILMA .....	8
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>10</b>
3.1. MATERIJALI .....	10
3.1.1. <i>Odabrani mikroorganizam</i> .....	10
3.1.2. <i>Priprema i čuvanje mikroorganizma</i> .....	10
3.1.3. <i>Kemikalije potrebne za pripremu uzorka</i> .....	10
3.2. PRIPREMA SUSPENZIJE BAKTERIJE .....	11
3.3. METODE .....	11
3.3.1. <i>Priprema uzorka za tretiranje hladnom plazmom</i> .....	11
3.3.2. <i>Provedba eksperimenta</i> .....	11
3.3.3. <i>Određivanje broja stanica</i> .....	14
3.3.4. <i>Određivanje biofilma</i> .....	14
3.3.5. <i>Obrada podataka</i> .....	15
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>16</b>
4.1. UTJECAJ HLADNE PLAZME NA INAKTIVACIJU BAKTERIJE <i>L. INNOCUA</i> ATCC 33091 .....	16
4.2. UTJECAJ HLADNE PLAZME NA STVARANJE BIOFILMA .....	18
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>24</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>25</b>

## 1. UVOD

U posljednje vrijeme mnoga istraživanja usmjerena su prema razvoju novih tehnologija obrade hrane, s ciljem dobivanja prehrambenih proizvoda visoke kvalitete. Nove tehnologije omogućavaju bržu i ekonomičniju obradu sirovina. Nova netermalna tehnologija koja se primjenjuje pri inaktivaciji patogenih mikroorganizama u hrani je hladna plazma. Plazma je tzv. četvrto stanje materije koje nastaje ionizacijom plina i sastoji se od nabijenih čestica (elektrona, iona), radikala, fotona i neutralnih čestica (atoma, molekula) (Roya i sur., 2014). Visokonaponsko električno pražnjenje („hladna plazma“) kao novi postupak procesiranja hrane ima brojne pogodnosti, lako se prilagođava i primjenjuje u pogonima za proizvodnju hrane, zahtijeva malo energije, te kratko vrijeme tretiranja. Inaktivacijski učinak plazme uključuje širok raspon mikroorganizama, bakterijskih spora i virusa. Tijekom generiranja plazme u tekućini stvaraju se hidrosilni radikali koji u reakciji s organskim molekulama dovode do lančane reakcije i razaranja DNA molekule pri čemu se postiže inaktivacija mikroorganizama (Roya i sur., 2014). Značajan utjecaj inaktivacije hladnom plazmom očituje se i u razaranju biofilma koji se stvara kao odgovor stanice na stresne uvjete u kojima se stanica nalazi. Stvoreni biofilmovi imaju veću otpornost na inaktivaciju.

Cilj ovog rada je prikazati teorijske osnove dobivanja i uporabe hladne plazme, odrediti učinak inaktivacije tretirane bakterije *Listeria innocua* ATCC 33091 u ovisnosti o primijenjenoj frekvenciji, vremenu tretiranja te polaritetu. Također, cilj je odrediti utjecaj hladne plazme na stvaranje biofilma kao obrambenog mehanizma bakterije.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Definicija plazme

Plazma je ionizirani plin s jednakim brojem pozitivno i negativno nabijenih čestica kao što su elektroni, pozitivni i negativni ioni, slobodni radikali, atomi plina i molekula ili druge različite vrste koje se mogu generirati u pobuđenom ili nepobuđenom stanju (Roya i sur., 2014). Smatra se četvrtim agregatnim stanjem. Sredinom 19. stoljeća češki fiziolog Jan Evangelista Purkinje upotrijebio je grčku riječ „plazma” kako bi opisao prozirnu tekućinu koja preostane nakon što se iz krvi uklone čestice. Pedesetak godina kasnije, američki znanstvenik Irving Langmuir je predložio da se elektroni, ioni i neutralne čestice u ioniziranom plinu mogu smatrati, krvnim česticama u tekućem mediju. Prvi je plazmu opisao na znanstveni način Sir William Crookes, nazvavši je, “materijom koja zrači” (Milošević, 2008).

### 2.2. Nastajanje plazme

Povećanje energije u sustavu dovodi do promjena agregatnog stanja tvari iz krutog u tekuće do plinovitog. Pri većim termalnim energijama atomi se sudaraju te rastavljaju na pozitivno i negativno nabijene čestice. Kako plazma sadrži jednak broj pozitivno i negativno nabijenih čestica, rekli bismo da je električki neutralna, no plazma sadrži slobodne nosioce naboja i električki je vodljiva. Nabijene čestice stvaraju magnetska i električna polja koje nazivamo plazma stanje čestica. Sudari mogu biti elastični prilikom čega se ne mijenja kinetička energija te neelastični pri čemu elektroni gube energiju koja se prenosi na česticu. Kada je energija elektrona dovoljno velika, u sudaru s neutralnom česticom dolazi do promjene elektronske strukture. Što je energija sudara veća vjerojatniji su procesi pobude atoma odnosno molekule (prijelaz vezanog elektrona atoma u višu atomsku orbitalu), disocijacije atoma koji čine molekulu ili ionizacije (izbacivanje elektrona iz atoma odnosno molekule). Energije vezanja atoma u molekulama su manje, stoga najprije dolazi do disocijacije molekula. Pobuđeni atomi odnosno molekule u pravilu kratko žive u takvom stanju, nekoliko nanosekundi, tijekom kojih se atom vraća u nepobuđeno stanje uz emisiju fotona. Jedan od osnovnih načina stvaranja plazme je pomoću električnih izboja (Scholz i sur., 2015). Prilikom generiranja plazme dolazi do stvaranja različitih reaktivnih vrsta kao što su:

- reaktivne vrste molekula i atoma kisika, kao što je atomski kisik, superoksidni anion, ozon

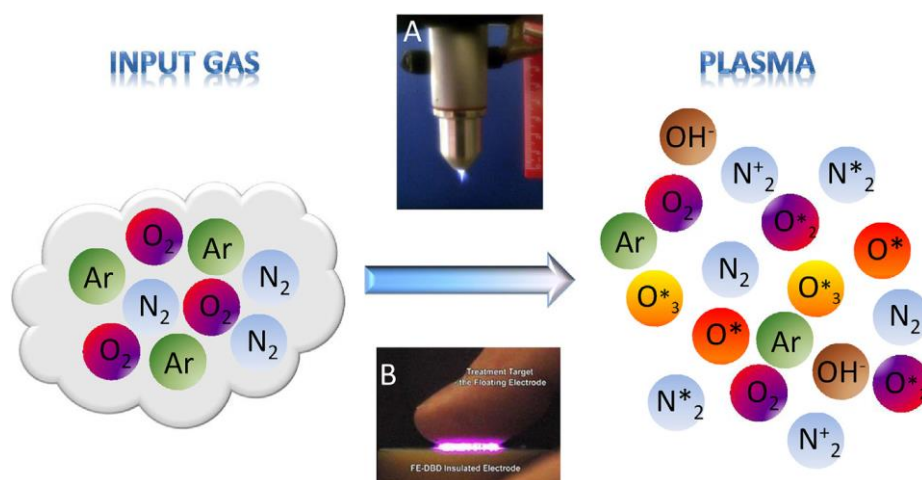
- reaktivne dušikove vrste, kao što je atomski dušik, pobuđeni dušik i nitratni oksid
- hidroksidni anion, hidroksidni radikal ili vodikov peroksid.

### 2.3. Vrste plazmi

Plazmu je moguće opisati pomoću tri osnovna parametra: temperature čestica, gustoće čestica te jačine stacionarnog magnetskog polja. S obzirom na temperaturu plazme se dijele na visokotemperaturnu i niskotemperaturnu plazmu. Kod visoko temperaturnih plazmi elektroni, ioni i neutrane vrste su u ravnotežnom stanju gdje je temperatura svih čestica jednaka (eng. *local thermodynamic equilibrium*) (Nehra i sur., 2006). Toplinska plazma ima brojne prednosti uključujući: visoku temperaturu, visoki intenzitet, neionizirajuću radijaciju i visokoenergetsku gustoću. Mogući nedostatak, osobito s ekonomske perspektive je korištenje izvora energije. Tretman toplinskom plazmom je široko rasprostranjen i uključuje korištenje u: tehnici premazivanja, sintezi pudera, metalurgiji, uništavanju i tretmanu opasnih otpadnih materijala. Plazme niske temperature su podijeljene na toplinsku plazmu koja se još naziva termodinamička ravnotežna plazma te netoplinsku ili hladnu plazmu. Kod hladne plazme temperatura elektrona je viša od temperature iona i neutralnih čestica pa se naziva netermalna ili neravnotežna plazma (eng. *non-local thermodynamic equilibrium plasma*). Karakteristična značajka hladne plazme uključuje jaku termodinamičku, neravnotežnu prirodu, nisku temperaturu plina, prisutnost reaktivnih kemijskih vrsta i visoku selektivnost te izvora hladne plazme u širokom opsegu primjene (Nehra i sur., 2006). Navedene karakteristike hladne plazme čine ju pogodnom za korištenje u procesima u kojima primjena visoke temperature nije poželjna, kao što je obrada hrane. Upotrebljava se pri dekontaminaciji mesa, voća, povrća, žitarica (Roya i sur., 2014). Primarni način dekontaminacije hrane hladnom plazmom je pomoću generiranog UV svjetla i reaktivnih kemijskih produkata. Sterilizacija hrane hladnom plazmom omogućava visoku učinkovitost, prilikom čega dolazi do minimalnih toplinskih učinaka na nutritivne i senzorske karakteristike hrane (Niemira, 2011).

Upravo su tehnološke primjene plazme jedan od osnovnih pokretača istraživanja. Proizvodi koje je omogućila tehnologija na bazi plazme preplavili su našu svakodnevicu. Svi mikroelektronički elementi, izvori svjetlosti, veliki plazma zaslone, solarne ćelije, lopatice turbo motora te razni ostali proizvodi, ili se temelje na plazmi ili se ona koristi u njihovoj proizvodnji. Općenito, na temelju svojstava, plazma se koristi u različitim područjima kao što su životne znanosti, elektronika, priprema ambalaže i drugo.





Slika 1. Nastajanje plazme djelovanjem električne struje na ulazni plin (Prochnow, 2013).

## 2.4. Načini generiranja i vrste pražnjenja plazme

Način na koji se plazma može generirati je najčešće pomoću istosmjernje struje, ali postoji širok spektar načina koji se također koriste. Dobiva se električnim pražnjenjem koje nastaje između dvije elektrode priključene na vanjski izvor električne energije. Električni potencijal i odgovarajuće električno polje uzrokuju privlačenje elektrona prema anodi, dok jezgri atoma privlači katoda. Kako napon raste povećava se naprezanje u atomima, sve do dielektrične granice, kada se pojavljuje iskra te dolazi do ionizacije (Bogaerts i sur., 2001). Kod generiranja plazme radiofrekvencijom nastaje visoka frekvencija izmjenične struje koju stvara generator koji pretvara izmjeničnu struju iz napajanja. Za generiranje plazme pomoću visoke frekvencije potrebna je frekvencija i do 500 kHz. Generirati se može i pulsiranjem gdje se napon primjenjuje u obliku pulseva. Zbog mogućnosti korištenja znatno viših napona pri kojima se stvaraju pulsevi za očekivati je i veću učinkovitost. Plazme mogu biti stvorene i mikrovalnom snagom odnosno elektromagnetnim zračenjem u rasponu frekvencija 300 MHz do 10 GHz (Bogaerts i sur., 2001).

Postoje različite izvedbe pražnjena plazme, kao što supražnjenje u plinskoj i pražnjenje u tekućoj fazi. Generiranje plazme u tekućini odvija se unutar uređaja koji stvara plazmu, a sastoji se od dviju elektroda. Jedna od elektroda uronjena je u tekućinu, a drugom se vrši dobava električne energije pomoću visokofrekventnog izvora struje na onu elektrodu uronjenu u tekućinu (Murase i sur., 2005). Elektroda uronjena u tekućinu je električki vodljiva te ima električni kraj koji je u kontaktu s tekućinom, dok izolator obuhvaća ostatak vanjskog dijela kojeg ne čini električni ispusni kraj.

Razvojem različitih vrsta reaktora električnog pražnjenja postoje i različite konfiguracije elektroda. Jedna od najčešćih konfiguracija elektroda postavljena je u točka-ploča obliku, odnosno s igličnom visokonaponskom elektrodom, te pločastom elektrodom uzemljenja od nehrđajućeg čelika.

## **2.5. Primjena plazme u prehrambenoj industriji**

Tehnologija plazme je jedna od obećavajućih netoplinskih tehnika koja se koristi u industriji žitarica. Pri tretmanu smeđe riže plazmom mijenjaju se njena svojstva. Smanjeno je vrijeme kuhanja, teksturalna svojstva su poboljšana te je smanjena tvrdoća i ljepljivost s povećanjem vremena tretmana (Mir i sur., 2016).

Sirovo mlijeko je prirodni, brz i jednostavan dodatak ljudskoj prehrani. Uporaba kontaminiranog mlijeka je još uvijek glavni zdravstveni problem. Dosadašnje metode toplinske dekontaminacije izazivaju promjene u kemijskom sastavu mlijeka. Tehnologija plazme je jedna od novih tehnologija koja ima potencijalnu primjenu u mljekarskoj industriji zbog sposobnosti za rad pri niskim temperaturama, bez povećanja radne temperature, a pritom dolazi do znatnog smanjenja patogenih vrsta (Mir i sur., 2016). Hladna plazma se uspješno primjenjuje za selektivnu modifikaciju strukture proteina i stoga poboljšava funkcionalnost izolata proteina sirutke. Sveukupne promjene nastaju u samo nekoliko minuta tretmana plazmom te pritom dolazi i do blage oksidacije proteina.

Mesna industrija je glavna u razvoju i primjeni novih načina obrade. Obrada plazmom može produžiti vijek trajanja mesa s obzirom na mikrobiološku kontaminaciju, posebno kod pilećeg mesa (Mir i sur., 2016).

Tehnika plazmom u industriji voća i povrća koristi se posljednjih desetak godina. Obrada plazmom ima sposobnost smanjena mikrobne populacije na površini proizvoda. Kroz samo nekoliko minuta tretmana dolazi do željene redukcije prisutnih mikroorganizama s površine.

## **2.6. Mikrobiološka inaktivacija mehanizmom hladne plazme**

Plazma kao sterilizacijska metoda prvi put je upotrebljena 1968. godine. Poslije toga, prilično mnogo istraživanja je napravljeno kako bi se ustanovio mehanizam mikrobiološke inaktivacije plazmom. Tretiranje plazmom može učinkovito inaktivirati širok raspon mikroorganizama uključujući spore i viruse (Roya i sur., 2014). Učinak plazme na različite mikroorganizme može biti potpuno selektivan, što znači da može uništiti patogene

mikroorganizme bez da uništi stanicu. Reaktivne vrste nastale generiranjem plazme uzrokuju oksidativne učinke na vanjskoj površini mikrobne stanice. Usprkos oksidaciji lipida, aminokiselina i stanica nukleinskih kiselina dolazi i do oksidacije spora koje su osjetljive na djelovanje ovih reaktivnih vrsta. Pritom dolazi do promjena koje dovode do oštećenja ili potpune inaktivacije. Osim toga reaktivne vrste, u ovom slučaju UV fotoni dovode do rekombinacije DNA mikroorganizmima, što onemogućava daljnju replikaciju. (Roya i sur., 2014). Prilikom generiranja plazme u tekućinama (vodenim otopinama) dolazi do stvaranja hidroksilnih radikala koji se smatraju najodgovornijim za inaktivaciju mikroorganizama (Roya i sur., 2014). Hidroksidni radikali reagiraju s obližnjim organskim molekulama vodeći do lančane oksidacije i razaranja DNA molekule, stanične membrane te ostalih komponenti stanice. Također, baktericidno djelovanje navedenih vrsta temelji se na staničnoj propusnosti i uništenju RNA molekule. Lipidni dvostruki sloj mikrobne stanice je osjetljiviji na atomski kisik koji može degradirati lipide, proteine i samu DNA molekulu. Doletalova i Lukes (2008) su dokazali svojim eksperimentom da peroksidacija stanične membrane lipida hladnom plazmom dovodi do bakterijske inaktivacije. Tijekom obrade plazmom, mikroorganizmi su izloženi intenzivnom bombardiranju radikalima. Nagomilavanje nabijenih čestica dovodi do elektrostatske sile na vanjskoj površini stanične membrane što može izazvati puknuće stanične stijenke (Roya i sur., 2014). Doprinos svakog od spomenutih mehanizama u inaktivaciji mikroorganizama ovisi o karakteristikama plazme i vrsti tretiranog mikroorganizma. Istraživanje o utjecaju hladne plazme na bakteriju *Citrobacter freundii* u soku jabuke je pokazalo da duljim vremenskim izlaganjem te većom koncentracijom kisika dolazi do većih inaktivacijskih rezultata (Surowsky i sur., 2013).

## **2.7. Ostali učinci plazme**

Plazma može biti primijenjena i na druge biološke molekule kao što su enzimi. Enzimi, poput polifenoloksidaze i peroksidaze su glavni uzrok enzimskog posmeđivanja kod voća i povrća, čime se uglavnom i kvare (Thirumdas i sur., 2014). Enzimi se inaktiviraju kroz oksidacijske reakcije posredovane slobodnim radikalima i kisikom.

Hladna plazma koristi se za dekontaminaciju ambalaže te pritom ne mijenja niti stvara promjene na površini. Omogućuje brzu i sigurnu sterilizaciju ambalaže bez štetnog utjecaja na svojstva materijala (Thirumdas i sur., 2014). Svrhu je pronašla i u modifikaciji površine organskih polimera. Među brojnim modifikacijama površine koje su dostupne, modifikacija površine plazmom donosi fleksibilan i okolišno prihvatljiv proces, a glavna uloga je

izobličenje površine kao i promjene kemijske strukture kako bi se spriječila adhezija patogenih bakterija na površini. U biomedicini hladna plazma se koristi za sterilizaciju uređaja. Zadnjih 10 godina upotreba netoplinske plazme se proširila na nova biološka područja primjene kao na primjer za inaktivaciju mikroorganizama, pripremanja hrane, razaranje biofilma ili u liječenju, gdje će biti važno za tretiranje stanica raka, inaktivacije priona, prevenciju bolničke infekcije ili u terapiji infektivnih rana (Thirumdas i sur., 2014). Među novim metodama za inaktivaciju nepoželjne mikroflore, netoplinska plazma pruža dovoljnu učinkovitost za smanjivanje uništavanja izloženog biomaterijala, kao i za biljke, životinjska tkiva te u proizvodnji hrane ili u termolabilnom materijalu za pakiranje.

## **2.8. *Listeria innocua***

Rod *Listeria* pripada grupi blisko povezanih gram-pozitivnih, fakultativno anaerobnih štapićastih bakterija koje ne stvaraju spore. Podijeljena je u brojne vrste uključujući *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* i *L. grayi*, od kojih su samo *L. monocytogenes* i *L. ivanovii* patogene (Carvalho i sur., 2006). *L. monocytogenes* uzrokuje bolest pod nazivom listerioza. Listerioza ima visoku stopu smrtnosti te jedna od najčešćih uzroka smrti zbog trovanja hranom. Vrste roda *Listeria* neobične su po tome što mogu preživljavati i razmnožavati se pri niskim i visokim temperaturama. One mogu također izdržati širok raspon pH od 4.4 do 9.8. Te činjenice pomažu objasniti zašto su sveprisutni u svim vrstama okruženja poput vode, tla, vegetacija, divljih i domaćih životinja te ljudi.

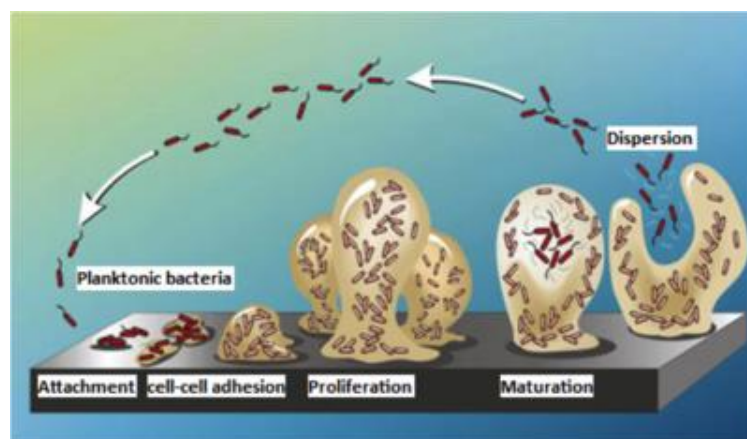
*Listeria innocua* pripada jednoj od šest navedenih vrsta roda *Listeria*. Široko je okolišno rasprostranjena, a preživljava podložnost visokim koncentracijama soli, kao i ekstremnoj temperaturi te pH. To je gram-pozitivna štapićasta bakterija širine 0-0.5  $\mu\text{m}$  te dužine 1-1.5  $\mu\text{m}$ . Može živjeti sama ili se združiti u lance s drugim *Listeria innocua* bakterijama. S obzirom na temperature mezofilna je, a optimalan temperaturni raspon joj je 30-37 °C (Lawley, 2013). *L. innocua* izolirana je iz mesa, tehnikom površinske imunofluorescencije. Od izrazite je važnosti jer je slična hranom patogenoj vrsti *L. monocytogenes*, iako sama nije patogenog karaktera. Njen genom se uspoređuje s genomom *L. monocytogenes* u svrhu proučavanja razloga patogenosti bakterije *L. monocytogenes*. Zbog pripadnosti *L. innocua* skupini gram-pozitivnih bakterija poznato je da sadrži debelu staničnu stijenku za zaštitu. Stanična stijenka je okovana hidrofilnim molekulama kao što su kiseline koje onda djeluju odbijajuće na hidrofobne molekule poput lijekova. *L. innocua* ima vrlo složen metabolizam, sposobna je metabolizirati metan, sumpor i dušik, ali i mnoge druge organske i anorganske

spojewe. Također provodi neke od biosintetskih puteva te ima mogućnost metaboliziranja glukoze (i drugih jednostavnih šećera) u aerobnim i anaerobnim uvjetima jer pripada fakultativnim anaerobima. Pod aerobnim uvjetima, djelovanjem bakterije *L. innocua* stvara se mliječna i octena kiselina iz glukoze, a pri anaerobnim uvjetima nastat će samo mliječna kiselina.

## **2.9. Definicija i stvaranje biofilma**

Biofilm je skup mikrobnih stanica koje su nepovratno združene (ne uklanjaju se blagim ispiranjem s površine) i okruženi su u matriksu prvobitnog polisaharidnog materijala (Donlan, 2002). Biofilm se može stvoriti sa svim biotskim i abiotskim površinama koje su u kontaktu s tekućinama na površini mekih tkiva u organizmu, biljkama, mineralnim površinama te stijenama. Matriks biofilma je visoko hidratiran i po svom sastavu on je dominantno voda (Donlan, 2002). Sadrži 85-95% vode, polisaharide, proteine, fosfolipide, nukleinske kiseline i druge polimere. Većinu matriksa biofilma čine šećeri: glukoza, galaktoza, manoz, fruktoza, ramnoza. Nestanični materijali kao što su mineralni kristali, korozivne čestice, čestice gline ili mulja mogu se također pronaći u matriksu biofilma (Milanov i sur., 2008). Biofilm se može formirati na raznovrsnoj površini, uključujući živa tkiva, unutrašnjost medicinskih uređaja, industrijske ili cijevi sustava pitke vode ili prirodne vodene sustave (Milanov i sur., 2008). Kruto-tekući odnos između površine i vodenog medija pruža idealni okoliš za povezanost i rast mikroorganizama. Mittelman (1998) prvu fazu reverzibilnog povezivanja opisuje kao inicijalnu, slabu interakciju između bakterijske stanice i supstrata posredovanu van der Waalsovima i elektrostatičkim silama kao i hidrofobnim interakcijama. Ovu primarnu adheziju Dunne (2002) naziva i fazom spajanja. U funkciji vremena veza između bakterija i supstrata jača, čineći vezivanje ireverzibilnim procesom (Milanov i sur., 2008). Ta druga faza, koju Dunne naziva i "fazom zaključavanja", rezultat je produkcije ekstracelularne polimerne tvari, glikokaliksa ili matriksa biofilma. Ionsko i kovalentno povezivanje izvanstaničnih polimernih tvari može varirati u kemijskim i fizikalnim svojstvima, ali su primarno sastavljeni od polisaharida. Neki od tih polisaharida su neutralni ili polianionski, kao što je u slučaju za izvanstanične polimerne tvari gram-negativnih bakterija. Prisustvo uronske kiseline daje anionska svojstva. Ta svojstva su važna zato što omogućuju pridruživanje dvovalentnih kationa kao što su kalcij i magnezij koji su povezani s polimernim lancima i pružaju jače sile vezivanja u razvoju biofilma. U slučaju gram-pozitivnih bakterija, kemijski sastav izvanstaničnih polimernih tvari može biti uveliko različit te je prvenstveno kationski.

Izvanstanične polimerne tvari također doprinose antimikrobnim svojstvima otpornosti biofilma, ometanja prijenosa mase antibiotika kroz film te direktnim spajanjem tih agenasa. Prianjanje i posljedično povezivanje bakterija za površinu može biti aktivno ili pasivno, ovisno o staničnoj pokretljivosti. Pasivno povezivanje je uvjetovano gravitacijskom silom, difuzijom i dinamikom fluida, dok na aktivno povezivanje utječu osobine stanične površine bakterija tj. flagele, pili, adhezijski proteini, kapsule te površinsko naelektriziranje (Milanov i sur., 2008). Potencijal rasta jednog bakterijskog biofilma limitiran je raspoloživošću hranjiva u neposrednoj okolini, difuzijom ovih sastojaka do bakterijskih stanica i uklanjanjem metaboličkih produkata. Ako su okolnosti povoljne za uspješan rast i aglomeraciju, biofilm se razvija u organiziranu strukturu i taj proces se naziva maturacija ili sazrijevanje biofilma. Povremeno dijelovi biofilma mogu skliznuti s površine zahvaljujući dinamici toka i efektu ispiranja tekućine, djelovanjem kemikalija ili zbog promjene uvjeta u biofilmu. Važna prednost života u biofilmu je povećana otpornost bakterija na antibiotike i dezinfekcijska sredstva. Stanice u biofilmu međusobno komuniciraju putem produkata koji su u stanju difundirati iz jedne u drugu stanicu. Prijašnja istraživanja su dokazala da je tretman atmosferskom hladnom plazmom učinkovit. Također, kao odgovor na sve veći porast tolerantnih mikroorganizama prema širokom spektru antibiotika, posebno otpornost biofilma, istraživanja su se usmjerila na postizanje učinkovitije inaktivacije i uklanjanje bakterijskih biofilmova. Među ostalim metodama, tehnologija hladne plazme pokazala je izvanrednu učinkovitost protiv mnogobrojnih mikroorganizama uključivši i lance biofilmova koji su otporni na antibiotike. Unatoč sposobnosti primjene atmosferske hladne plazme koja lako prodire i uništava bakterijsku stanicu koja je u složenoj strukturi biofilma, bakterijsko metaboličko stanje te stanična morfologija mogu biti važni čimbenici u određivanju inaktivacijske učinkovitosti.



Slika 2. Proces stvaranja biofilma (Toole 2000)

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Odabrani mikroorganizam**

*Listeria innocua* ATCC 33091

##### **3.1.2. Priprema i čuvanje mikroorganizma**

Bakterijska kultura čuva se u 50 % glicerolu u zamrzivaču pri -20 °C. Precjepljivanje kulture radi se svakih 3 mjeseca.

##### **3.1.3. Kemikalije potrebne za pripremu uzorka**

Za pripremu uzorka korišteni su:

- a.) fosfatni pufer (PBS) sastava: NaCl (8 g), KCl (0,2 g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O (1,62 g) KHP<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (0,24 g).

Mase navedenih kemikalija izvažu se te otope u 900 mL destilirane vode, a pH vrijednost na 7 podese se s klorovodičnom kiselinom. Volumen se nadopuni do 1000 mL. Otopina se zatim autoklavira ("Sutjeska, model 200-189) pri 121 °C u trajanju od 15 minuta. Otopina PBS-a čuva se pri 4 °C kroz 3 mjeseca.

- b.) Otopina natrijevog nitrata 0.01 M NaNO<sub>3</sub> pripremi se odvagom 8.4 g NaNO<sub>3</sub> (Kemika, Zagreb) koji je otopljen u 1000 mL destilirane vode. Otopina se zatim autoklavira ("Sutjeska, model 200-189) pri 121 °C u trajanju od 15 minuta.

- c.) Hranjiva podloga za uzgoj mikroorganizma: Nutrient bujon/agar (Biolife, Milan, Italija)  
Pri pripremi 1 L Nutrient bujona izvaže se 13 g dehidrirane podloge koja se otopi u 1000 mL destilirane vode. Prilikom pripremanja 1 L Nutrient agara izvaže se 13 g dehidrirane podloge te 10 g tehničkog agara (Biolife, Milan, Italija). Sastojci koji su izvagani otopljeni su u 1000 mL destilirane vode. Pripremljene podloge se u autoklavu ("Sutjeska, model 200-189) steriliziraju na temperaturi od 121 °C u trajanju od 15 minuta.

### **3.2. Priprema suspenzije bakterije**

Suspenzija odabranog mikroorganizma pripremi se inokuliranjem 20  $\mu\text{L}$  čiste kulture iz 50 % glicerola u 10 mL Nutrient bujona. Bakterijske stanice se inkubiraju (“Bodalec i Bodalec”, model EBT) pri temperaturi od 37 °C u vremenskom periodu od 48 h. Nakon provedene inkubacije suspenzija se centrifugira (Hettich, Rotofix 32) pri 4000 RPM/10 minuta. Postupak centrifugiranja se ponavlja 3 puta. Nakon svakog završenog postupka centrifugiranja supernatant se odlijeva te se u uzorak pipetira 10 mL PBS-a. Postupak se provodi sve do zadnjeg centrifugiranja, prilikom čega se nakon odlijevanja supernatanta u uzorak pipetira 10 mL 0.01 M  $\text{NaNO}_3$ .

### **3.3. METODE**

#### **3.3.1. Priprema uzorka za tretiranje hladnom plazmom**

Ukupni volumen za tretiranje (200 mL) priprema se u sterilnoj čaši od 500 mL. Volumen od 190 mL 0.01 M  $\text{NaNO}_3$ , provodljivosti 100  $\mu\text{S}/\text{cm}$  miješa se sa 10 mL prethodno pripremljene suspenzije bakterije.

#### **3.3.2. Provedba eksperimenta**

Pripremljeni volumen uzorka tretira se pri oba polariteta plazme (pozitivan i negativan) u staklenom reaktoru volumena 1000 mL s gumenim čepom te prilagođenim otvorima za elektrode ovisno o vrsti tretmana. Tretmani pri pozitivnom polaritetu plazme provode se tekućinskom plazmom s mjehurićima, dok tretmani pri negativnom polaritetu plazme se provode tekućinskom plazmom bez miješanja. Prilikom tretmana s tekućinskom plazmom s mjehurićima upuhuje se plemeniti plin argon 99.99 % (Messer, Njemačka), protoka=0.4 L/min. Konfiguracija elektroda u reaktoru postavljena je u obliku točka-ploča, odnosno s igličnom visokonaponskom elektrodom od titana (tekućinska plazma bez miješanja) te medicinskom iglom od nehrđajućeg čelika (plazma generirana u mjehurićima), te pločastom elektrodom uzemljenja od nehrđajućeg čelika promjera 4.5 cm.

Vrijeme tretiranja iznosi 5 i 10 min, a frekvencije se ovisno o eksperimentu namještaju na 60, 90 i 120 Hz. Za generiranje plazme koristi se visokonaponski generator (Spellman, UK).

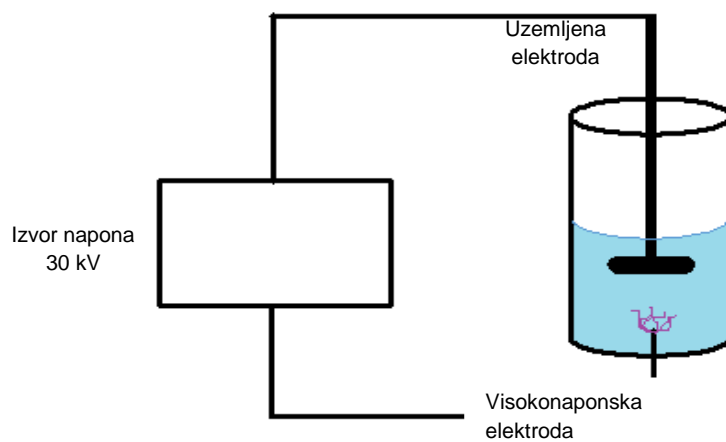


Tablica 1. Plan pokusa za tretman *L. innocua* tekućinskom plazmom bez miješanja

Frekvencija [Hz]	Trajanje tretmana [min]	Polaritet*
60	5	0
60	10	0
90	5	0
90	10	0
120	5	0
120	10	0

\*0=negativan polaritet

Na slici 3. prikazana je izvedba reaktora tekućinske plazme odnosno generiranje plazme u tekućini bez miješanja. Visokonaponska elektroda od titana nalazi se s donje strane reaktora, u tekućini, dok je elektroda uzemljena postavljena s gornje strane reaktora, iznad razine tekućine. Tretman se provodi bez miješanja. Udaljenost između elektroda iznosi 1.5 cm.



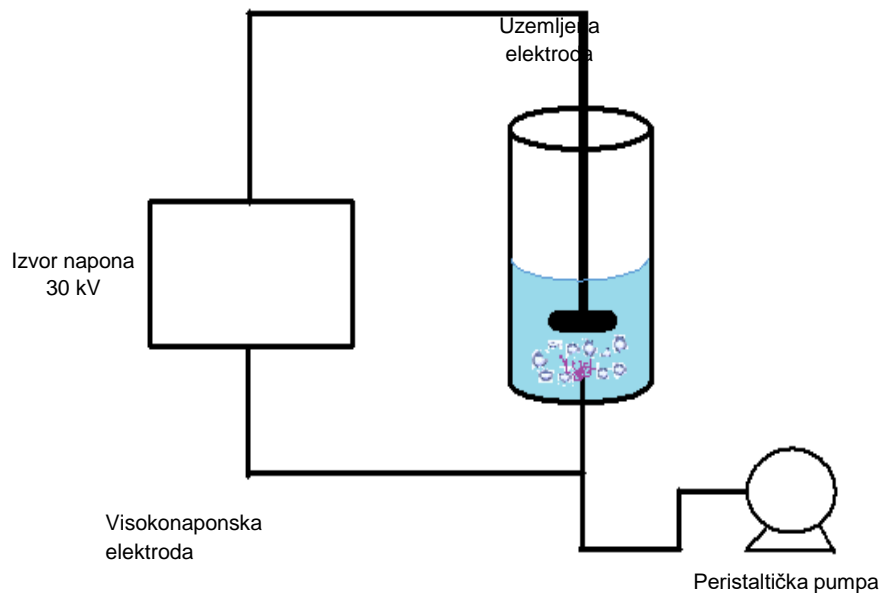
Slika 3. Shematski prikaz pražnjenja u tekućoj fazi bez miješanja

Tablica 2. Plan pokusa za tretman *L. innocua* plazmom u mjehurićima

Frekvencija [Hz]	Trajanje tretmana [min]	Polaritet*
60	5	1
60	10	1
90	5	1
90	10	1
120	5	1
120	10	1

\*1=pozitivan polaritet

Na slici 4. prikazan je shematski prikaz generiranja plazme u mjehurićima. Prilikom generiranja plazme u tekućoj fazi upuhivanje mjehurića argona vrši se kroz igličnu visokonaponsku elektrodu (igla od nehrđajićeg čelika Microlance TM 3,81 cm). Visokonaponska elektroda nalazi se s donje strane reaktora. Korištenjem argona reakcija je intenzivnija i stvara se karakteristična boja (ljubičasto-plava). S gornje strane reaktora nalazi se uzemljena elektroda. Udaljenost između elektroda iznosi 1 cm.



Slika 4. Shematski prikaz pražnjenja u mjehurićima u tekućini

### 3.3.3. Određivanje broja stanica

Ukupni broj stanica određuje se prije i nakon tretmana kako bi se odredio stupanj redukcije. Stupanj redukcije je razlika broja stanica prije i nakon tretmana. Priprema i naciepljivanje uzoraka vrši se u laminaru (Klimaoprema). U 90  $\mu$ L PBS-a naciepi se 10  $\mu$ L uzorka te se napravi serija razrjeđenja (do  $10^{-7}$ ). Pripremljena razrjeđenja naciepljuju se u triplicatu na odgovarajuće hranjive podloge na način da se pipetira 10  $\mu$ L uzorka na hranjivu podlogu te se naciepljeni uzorak razmaže štapićem po Drygalskom kružnim pokretima po ploči. Inkubiranje naciepljenih ploča traje 48 h. Za svako razrjeđenje određuje se srednja vrijednost naciepljenih ploča u triplicatu, a ukupni broj se izražava kao logaritam broja stanica ( $\log_{10}$  CFU/mL). U proračun se u obzir uzimaju naciepljene hranjive ploče koje imaju broj poraslih kolonija  $<300$  i  $>10$ .

Formula za izračun broja stanica:

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

### 3.3.4. Određivanje biofilma

Princip određivanja: Biofilm je zajednica mikroorganizama čije su stanice ireverzibilno povezane sa supstratom i međusobno, te uklopljene u izvanstanični matriks polisaharidnih polimera koji su same stvorile. Metoda određivanja biofilma se bazira na spektrofotometriji odnosno kristal violetnom obojenju. Dobivena apsorbancija odgovara broju stanica određene mikrobiološke kulture.

Postupak određivanja: Uzorci se naciepe u jažice multiwall ploče (TPP 92012, Švicarska) tako da se svaki uzorak volumena 200  $\mu$ L naciepi u paraleli, a potom se u svaku jažicu pipetira 2 mL hranjivog bujona. Naciepljuju se i kontrolne jažice u koje ne ide uzorak već isključivo hranjivi bujon. Tijekom 4h inkubacije dolazi do adhezije stanica za podlogu, uklanja se supernatant iz jažica koje se potom ispiru s 2 mL fosfatnog pufera. Nakon ispiranja se dodaje 2 mL svježeg medija hranjivog bujona u svaku jažicu te se potom postavlja 24h na inkubiranje kako bi se stvorio biofilm. Nakon 24h se provodi kvantifikacija biofilma kristal violet testom. Supernatant se ukloni, a jažice se ispiru s 2 mL PBS-a. Za fiksaciju biofilma

dodaje se 2 mL 99 %-tnog metanola kroz 15 minuta. Slijedi uklanjanje metanola, sušenje jažica te dodavanje 2 mL kristal violet boje kroz 20 minuta. Nakon 20 minuta se uklanja boja, a jažice se nekoliko puta ispiru destiliranom vodom. Za odvajanje stanica s površine dodaje se u svaku jažicu 2 mL 33%-tne octene kiseline te se mjeri apsorbancija pri 590 nm.

### 3.3.5. Obrada podataka

Kako bi se odredio utjecaj 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, te 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 tj. niskom (-1), centralnom (0) i visokom (1). Izlazne vrijednosti su  $\log_{10}$  CFU/mL te biofilm.

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 plinskom 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%.

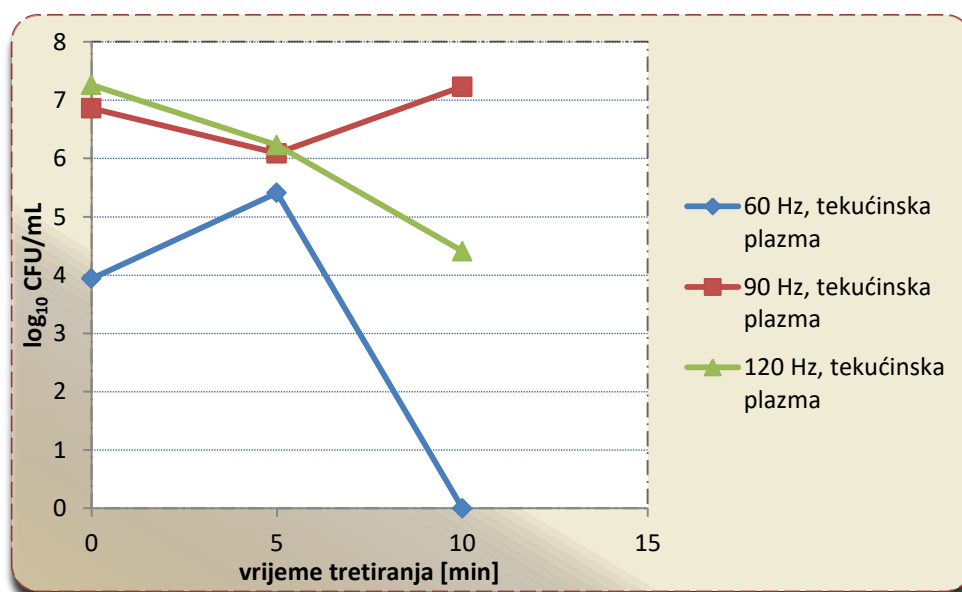
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj eksperimentalnog dijela ovog rada je odrediti utjecaj hladne plazme na stvaranje biofilma i redukciju bakterije *Listeria innocua* ATCC 33091. Provedeni su tretmani s tekućinskom plazmom pri negativnom polaritetu, te s plazmom u mjehurićima pri pozitivnom polaritetu. Tretirano je 6 uzorka sa svakom od navedenih plazmi, dakle ukupno 12 uzoraka s tri operativne varijable (frekvencija plazme, vrijeme tretiranja te polaritet).

### 4.1. Utjecaj hladne plazme na inaktivaciju bakterije *L. innocua* ATCC 33091

#### a.) Učinak tekućinske plazme na inaktivaciju

Tretiranjem bakterije tekućinskom plazmom pri negativnom polaritetu utvrđena je potpuna inaktivacija ( $3.94 \log_{10}$  CFU/mL) nakon 10 minuta tretmana te frekvenciji od 60 Hz (slika 5). Također, iz slike 5 može se vidjeti da je postignuta redukcija od  $1.03 \log_{10}$  CFU/mL pri frekvenciji 120 Hz i 5 minuta, dok je nakon 10 minuta tretmana  $\log_{10}$  CFU/mL iznosio 2.85. Dakle, duljim vremenskim tretmanom postigao se veći stupanj redukcije. Najmanja inaktivacija očituje se pri frekvenciji od 90 Hz te vremenu tretiranja od 5 minuta pri čemu je postignuta redukcija od  $0.77 \log_{10}$  CFU/mL. Fröhling i sur. (2011) istraživali su utjecaj plazme na inaktivaciju, a promatrani parametri bili su snaga izvora plazme te vrijeme tretiranja. Pritom najveće smanjenje broja stanica *L. innocua* do granice detekcije postignuto je pri operativnoj snazi plazme od 40 W nakon 2 minute te 1,5 minute. Najmanji učinak na redukcije imao je tretman pri snazi plazme od 10 W i 4 minute tretmana.

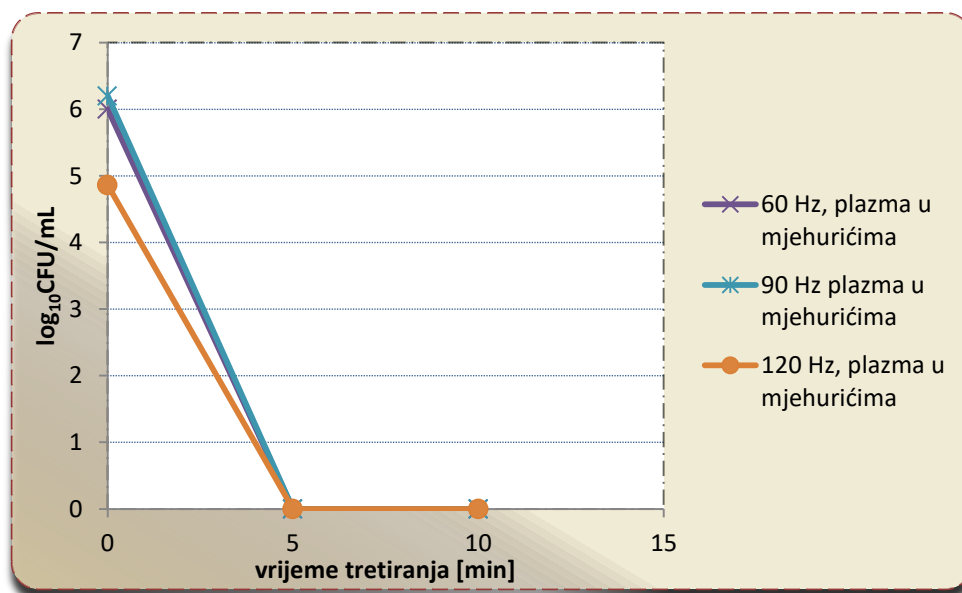


Slika 5. Ovisnost  $\log_{10}$  CFU/mL o vremenu tretiranja tekućinskom plazmom bez miješanja

#### b.) Učinak plazme u mjehurićima na inaktivaciju

Tretman *L. innocua*-e plazmom generiranom u mjehurićima pri pozitivnom polaritetu očituje se u višestrukim potpunim inaktivacijama bakterije. Zapravo, sva tretiranja od 60, 90 te 120 Hz u trajanju tretmana 5 i 10 minuta dovela su do istog učinka, odnosno do potpune inaktivacije (slika 6). Najveća redukcija broja stanica postignuta je pri 90 Hz (6.20  $\log_{10}$  CFU/mL). (slika 6). Noriega i sur., (2011) u provedenom istraživanju učinkovitosti hladne plinske plazme na dekontaminiranje peradskih proizvoda inokuliranih s *L. innocua*, dobili su rezultate koji ukazuju na to da je maksimalna bakterijska inaktivacija postignuta kombinacijom visokih frekvencija, napona te prisustvom kisika u nosivom plinu. Tretman od 10 sekundi dao je 3  $\log_{10}$  redukciju *L. innocua*, dok tretman na membranskim filterima u trajanju od 8 minuta daje redukciju od 1  $\log_{10}$  (Noriega i sur., 2011).

Različiti polariteti plazme utječu na generiranje određenih reaktivnih vrsta. Također različitim polaritetom mijenja se oblik, ali i gustoća kod određenih čestica. Primjerice, za hidroksidni radikal utvrđeno je da gustoća gotovo jednaka za oba polariteta odnosno da nema niti jedan polaritet značajan utjecaj na navedenu česticu. Negativni polaritet pritom ima značajniji utjecaj na stvaranje kisikovih reaktivnih čestica, a pozitivni polaritet na stvaranje više reaktivnih čestica dušika (Yonemori, 2015).



Slika 6. Ovisnost  $\log_{10}$  CFU/mL o vremenu tretiranja plazmom generiranom u mjehurićima

## 4.2. Utjecaj hladne plazme na stvaranje biofilma

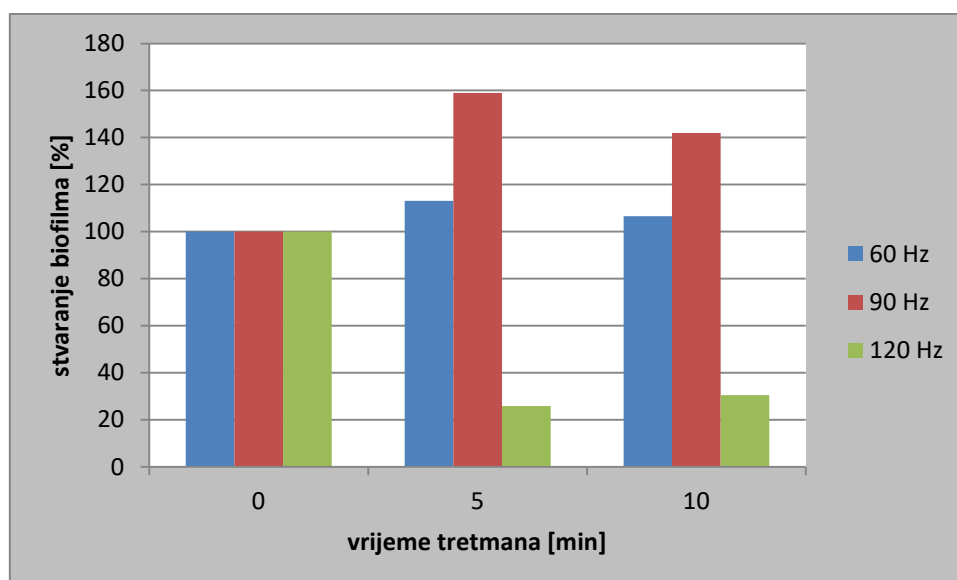
### a.) Utjecaj tekućinske plazme na stvaranje biofilma

Nakon tretiranja bakterije tekućinskom plazmom te određivanja biofilma dobivene apsorbancije dokazuju prisutnost stanica *L. innocua* (Tablica 3). Najveća redukcija postignuta je tijekom tretmana pri 120 Hz u trajanju od 5 minuta, pri čemu redukcija biofilma iznosi 74.25 % u odnosu na početni broj (Slika 7). Ujedno, to je i najbolji učinak plazme jer se time dokazuje najmanji porast biofilma odnosno najsporija reakcija bakterija pod stresnim uvjetima. Najveća vrijednost stvaranja biofilma je ona pri tretiranju na 90 Hz i 5 minuta pri čemu nije došlo do redukcije, naprotiv došlo je do još većeg stvaranja biofilma od onog prije samog tretmana (Slika 7). Naime, u stresnim i neoptimalnim uvjetima moguće je očekivati različite načine u rastu i oporavku bakterija kao odgovora na stresne uvjete pa je jedno od njih i objašnjenje ovakvog rezultata nepostignute redukcije. Stoffels (2007) je tretmanom netoplinskom atmosferskom plazmom odredio stvaranje biofilma bakterije *S. mutans*. Biofilmovi su tretirani s i bez prisustva saharoze. Jedno tretiranje plazmom 1 minutu na biofilm kultiviran bez saharoze uzrokovalo je baktericidni učinak. Međutim, s tretmanima plazme na biofilm kultiviran sa saharozom, ometa se antibakterijska aktivnost plazme pa dolazi do baktericidnog učinka samo na površini. Time se omogućuje lakši oporavak te takvi

deblji slojevi biofilma predstavljaju puno jači izazov za prodor radikala plazme (Stoffels, 2007).

Tablica 3. Utjecaj operativnih varijabli na stvaranje biofilma

frekvencija plazme [Hz]	trajanje tretmana [min]	polaritet	formiranje biofilma $A_{590}$
60	5	0	0,087
60	10	0	0,082
90	5	0	0,304
90	10	0	0,271
120	5	0	0,137
120	10	0	0,162
60	5	1	0,252
60	10	1	0,312
90	5	1	0,259
90	10	1	0,264
120	5	1	0,071
120	10	1	0,044

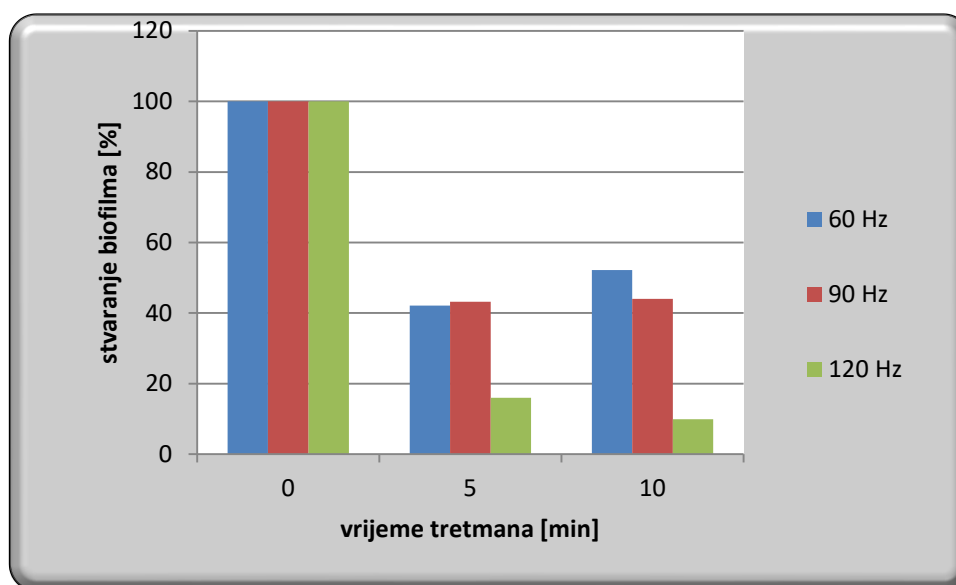


Slika 7. Ovisnost stvaranja biofilma o vremenu tretiranja tekućinskom plazmom



## b.) Utjecaj plazme u mjehurićima na stvaranje biofilma

Utjecaj plazme u mjehurićima na stvaranje biofilma imalo je najbolji učinak pri frekvenciji od 120 Hz i vremenu tretiranja od 10 minuta. Prilikom navedenog tretmana postignuta je redukcija od 90.16 % (Slika 8). Najveći porast biofilma je pri tretiranju sa 60 Hz u trajanju od 10 minuta, pri čemu se s obzirom na početnu vrijednost prije tretiranja, stvaranje biofilma reduciralo za 47.83 % (Slika 8). Dakle, najveća frekvencija i najdulje vrijeme trajanja tretmana pokazuje izrazitu nemogućnost obrane bakterije izložene stresnim parametrima. Niža vrijednost frekvencije tretmana omogućuje bolji razvoj biofilma odnosno manji utjecaj na bakterije. Lerouge i sur. (2011) proveli su istraživanje tretiranjem *S. aureus* pri čemu je unutar jedne minute tretmana plazmom s mjehurićima došlo do znatne redukcije broja bakterija. Zatim su tretirani nastali porasli biofilmovi u rasponu trajanja od 0 do 10 minuta. Najbolji učinak dobiven je najduljim tretmanom, a kao plin koristili su se dušik, kisik i argon. Sva tri plina davali su identičnu anti-biofilmsku aktivnost usprkos svojim različitim kemijskim i fizikalnim svojstvima (Lerouge i sur., 2011).



Slika 8. Ovisnost stvaranja biofilma o vremenu tretiranja plazmom u mjehurićima

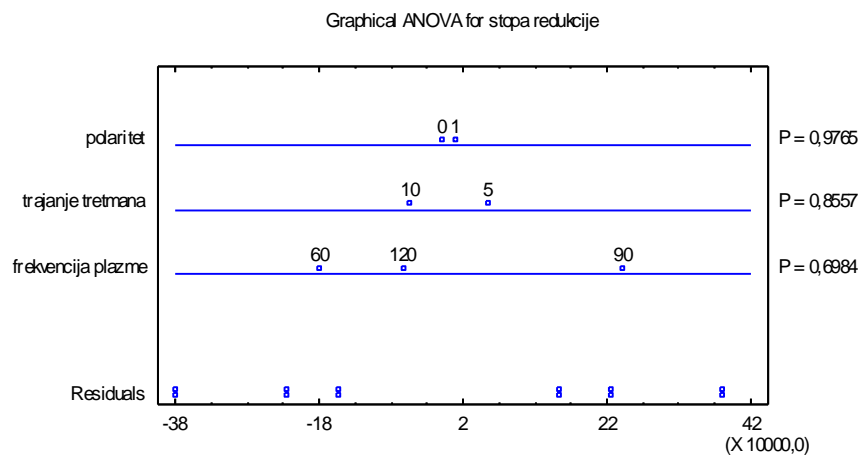
### 4.3. Rezultati statističke obrade

Određivao se učinak svake od varijabli (A = frekvencija, B = vrijeme, C = polaritet) i kombinacije istih na stopu redukcije. Na temelju rezultata utvrdilo se da li navedeni čimbenici imaju statistički značajan utjecaj na stopu redukcije odnosno stvaranje biofilma.

Tablica 4. Statistička značajnost pojedinih varijabli na stopu redukcije

Izvor	Zbroj kvadrata	Df	Srednja vrijednost kvadrata	F-Omjer	P-Vrijednost
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			

(AB= utjecaj frekvencije i trajanja tretmana na stopu redukcije; AC= utjecaj frekvencije i polariteta na stopu redukcije; BC= utjecaj trajanja tretmana i polariteta na stopu redukcije).



Slika 9. Statistička značajnost varijabli na stopu redukcije

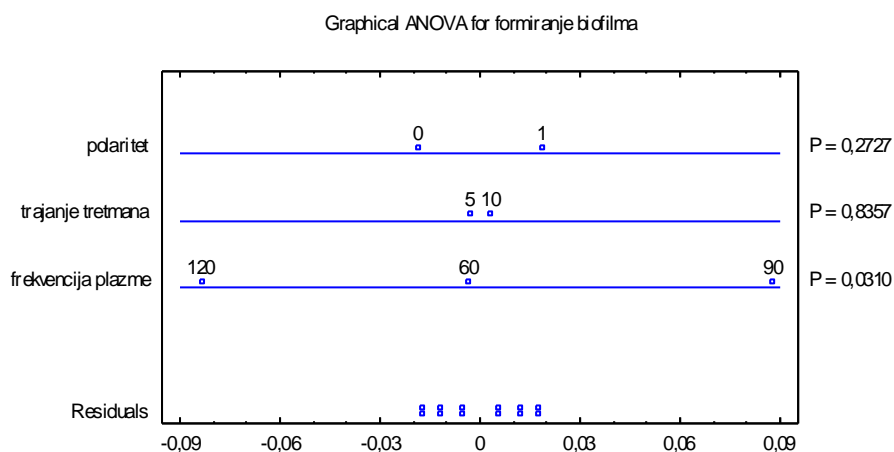
Na temelju tabličnog te grafičkog prikaza vidljivo je kako niti jedna  $p$ -vrijednost nije manja od 0.05 što ukazuje na to da niti jedan od čimbenika, a niti njihova kombinacija nema statistički značajan utjecaj na stopu redukcije (Tablica 4 i slika 9).

Ista analiza koja uključuje iste varijable provedena je na utjecaj stvaranja biofilma odnosno utvrđivanje statističke značajnosti različitih čimbenika na stvaranje biofilma.

Tablica 5. Statistička značajnost varijabli na stvaranje biofilma

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

(AB= utjecaj frekvencije i trajanja tretmana na stvaranje biofilma; AC= utjecaj frekvencije i polariteta na stvaranje biofilma; BC= utjecaj trajanja tretmana i polariteta na stvaranje biofilma).



Slika 10. Statistička značajnost varijabli na stvaranje biofilma

Statistički značajan utjecaj imaju parametri čija je  $p$ -vrijednost manja od 0.05. Dakle, statistički značajan utjecaj na stvaranje biofilma ima frekvencija plazme te kombinacija dva čimbenika, frekvencije plazme i polariteta plazme. Učinak ostalih varijabli nema statistički značajan utjecaj jer utvrđene  $p$ -vrijednosti ne ukazuju na to (Tablica 5 i slika 10).

## 5. ZAKLJUČCI

1. Plazmom generiranom u mjehurićima postignuta je najveća stopa redukcije tretiranjem bakterije 10 min pri frekvenciji 90 Hz te pozitivnom polaritetu plazme ( $6.20 \log_{10}$  CFU/mL).
2. Tretmanom tekućinskom plazmom pri frekvenciji 90 Hz, kraćim vremenskim tretiranjem (5 min) te negativnim polaritetom očituje se manja inaktivacija ( $0.77 \log_{10}$  CFU/mL).
3. Stvaranje biofilma bilo je najveće pri tretmanu s nižom frekvencijom (60 Hz) te je pritom došlo do redukcije stvaranja biofilma za 47.83%. Najmanji porast biofilma odnosno najznačajniji utjecaj hladne plazme u mjehurićima postignut pri najduljem vremenskom tretmanu (10 min), najvišoj frekvenciji (120 Hz) i pozitivnom polaritetu plazme. Prilikom navedenog tretmana postignuta je redukcija od 90.16 %.
4. Na stopu redukcije primjenom plazme u mjehurićima, ali i tekućinske plazme nije utvrđen niti jedan čimbenik koji je statistički značajno utjecao ( $p > 0.05$ ). Na stvaranje biofilma, statističkom obradom, utvrđen je statistički značajan utjecaj frekvencije te kombinacija utjecaja dvaju čimbenika, frekvencije i polariteta kod obje vrste hladne plazme ( $p < 0.05$ ).

## 6. LITERATURA

- Bogaerts A., Neyts E., Gijbels R. (2001) Gas discharge plasmas and their applications. *Spectrochimica Acta Part .* **57**, 609-658.
- Carvalheira A., Silva J., Gibbs P., Teixeira P. (2006) Influence of *Listeria innocua* on the growth of *Listeria monocytogenes*. Universidade Católica Portuguesa, 4200-072 Porto, Portugal
- Donlod R.M., Costerton J.W. (2002) Biofilms: survival mechanism of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews.* **15**, 167-193.
- Fröhling A., Baier M., Ehlbeck J., Knorr D. (2011) Atmospheric pressure plasma treatment of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* at polysaccharide surfaces: Inactivation kinetics and flow cytometric characterization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* **13**, 142-150.
- Lawely R. (2013) *Listeria*, Food Safety Watch, *The science of safe food* <<http://www.foodsafetywatch.org/factsheets/listeria/>> Pristupljeno 10. Ožujka 2017.
- Lerouge P., Traba C., Liang J.F. (2011) Susceptibility of *Staphylococcus aureus* biofilms to reactive discharge gases. *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research.* **27**, 763-772.
- Milanov D., Ašanin R., Vidić B., Krnjajić D., Petrović J. (2008) Biofilm- organizacija života bakterija u prirodnim ekosistemima. Naučni institut za veterinarstvo, Fakultet veterinarske medicine, Beograd. **2**, 1-9.
- Milošević S. (2008) Plazma, svjetlost i spektroskopija, Institut za fiziku, Zagreb
- Mir S.H., Shah A.M., Mir M.M. (2016) Understanding the Role of Plasma Technology in Food Industry. *Food and Bioprocess Technology.* **9**, 734-750.
- Murase H. (2005) In- Liquid Plasma Electrode, In-Liquid Plasma Generating Apparatus and In-Liquid Plasma Generating Method. **8**, 404-453.
- Nehra V., Kumar A., Dwivedi H.K. (2006) Atmospheric Non-Thermal Plasma Sources. University of Science & Technology, Hisar-125001, India. **2**, 53-68.

- Niemira B.A. (2011) Cold Plasma Decontamination of Foods. *Annual Review of Food Science and Technology*. **3**, 125-142.
- Noriega E., Shama G., Kong M.G. (2011) Cold atmospheric gas plasma disinfection of chicken meat and chicken skin contaminated with *Listeria innocua*. *Food Microbiology*. **28**, 1293-1300.
- Prochnow A.M., Murphy A.B., McLean K.M., Kong G.M., Ostrikov K. (2014) Atmospheric pressure plasmas: Infection control and bacterial responses. *Internacional Journal of Antimicrobial Agents*. **43**, 508-517.
- Roya A., Hosseini H. (2014). Non-thermal plasma as a new food preservation method, Its present and future prospect. *Journal of Paramedical Sciences*. **5**, 1-5.
- Scholtz V., Pazlarová J., Soušková H., Khun J., Julák J. (2015) Nonthermal plasma – the tool for decontamination and disinfection. *Biotechnology Advances*. **33**, 112-118.
- Stoffels E., Sissons C.H., Filoche S.K., Sladek R.E.J. (2007) Treatment of *Streptococcus mutans* biofilms with a nonthermal atmospheric plasma. *Applied Microbiology*. **45**, 318-323.
- Surowsky B., Fröhling A., Gottscalk N., Knorr D. (2013) Impact of cold plasma on *Citrobacter freundii* in apple juice: Inactivation kinetics and mechanisms. *Internacional Journal of Food Microbiology*. **74**, 63-71.
- Thirumdas R., Annapure U.S., Sarangapani C. (2014) Cold plasma: A novel Non-Thermal Technology for Food Processing. *Food Biophysics*. **9**, 193-300.
- Toole G., Kaplan B.H., Kolter R. (2000) Biofilm Formation as Microbial Development. *Annual Review Microbiology*. **54**, 49-79.
- 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.

## Izjava o izvornosti

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

---

ime i prezime studenta