Primjena visokonaponskoga električnoga pražnjenja na inaktivaciju mikroorganizama

Stulić, Višnja

Doctoral thesis / Disertacija

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:159:106047

Rights / Prava: Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI



Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Višnja Stulić

PRIMJENA VISOKONAPONSKOGA ELEKTRIČNOGA PRAŽNJENJA NA INAKTIVACIJU MIKROORGANIZAMA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.



University of Zagreb

FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Višnja Stulić

APPLICATION OF ELECTRICAL DISCHARGE PLASMA ON INACTIVATION OF MICROORGANISMS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2018.



Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Višnja Stulić

PRIMJENA VISOKONAPONSKOGA ELEKTRIČNOGA PRAŽNJENJA NA INAKTIVACIJU MIKROORGANIZAMA

DOKTORSKI RAD

Mentor: Dr.sc. Zoran Herceg, red.prof.

Zagreb, 2018.



University of Zagreb

FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Višnja Stulić

APPLICATION OF ELECTRICAL DISCHARGE PLASMA ON INACTIVATION OF MICROORGANISMS

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Ph.D. Zoran Herceg, Full professor

Zagreb, 2018.

Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za procesno-prehrambeno inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Laboratoriju za elektronsku mikroskopiju, Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu te inkubacijskom centru BIOCentar u Zagrebu pod mentorstvom prof.dr.sc. Zorana Hercega u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod naslovom: „Application of electrical discharge plasma for preservation of liquid foods" (IP-11-2013-6248), čiji je voditelj i glavni istraživač prof.dr.sc. Zoran Herceg.

Tema doktorskog rada prihvaćena je na 1. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta za akad. god. 2015./2016. održanoj 28.10.2015. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktora znanosti u okviru doktorskog studija 09. veljače 2016. godine na 7. sjednici u 347. akademskoj godini (2015./2016.).

Informacije o mentoru

Prof.dr.sc. Zoran Herceg, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Zoran Herceg rođen je 28. studenoga 1969. godine u Zagrebu. Diplomirao je na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u lipnju 1994. godine. Magistrirano je 19. prosinca 1997, a doktorski rad obranio je 03. studenoga 2000. godine. Zaposlio se kao znanstveni novak na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Laboratorij za procesno-prehrambeno inženjerstvo u listopadu 1994., a 2015. godine izabran je u znanstveno nastavno zvanje redovitog profesora u trajnom zvanju. Trenutno je pročelnik Laboratorija za procesno-prehrambeno inženjerstvo. Koordinator je na preddiplomskom modulu „Procesi konzerviranja hrane“, diplomskim modulima „Prehrambeno-procesno inženjerstvo I“ i „Prehrambeno-procesno inženjerstvo II“ te modulu na doktorskom studiju „Prehrambeno-procesno inženjerstvo“. Autor je sveučilišnog udžbenika „Procesi-konzerviranja hrane-novi procesi“ objavljenog 2009. godine te sveučilišnog udžbenika „Procesi u prehrambenoj industriji“ koji je obajvljen 2011. godine. Član je Akademije tehničkih znanosti Hrvatske. Od 2014 – 2018 godine bio je voditelj projekta Hrvatske zaklade za znanost „Application of electrical discharge plasma for preservation of liquid foods“ te je trenutni voditelj projekta koji financira EU „Opremanje poluindustrijskog praktikuma za razvoj novih prehrambenih tehnologija“. Sudjelovao je na projektima koje je financirala EU„Višnja Maraska (*Prunus cerasus* var. Marasca) kao sastojak funkcionalne hrane“, „Primjena inovativnih tehnologija u izolaciji bioaktivnih spojeva iz organskog otpada u proizvodnji vina“. Član je upravnog odbora tri COST projekta, COST Action TD1104 i COST Action FA2012.

Publicirao je 89 znanstvenih radova, od čega 56 kategorije a_1, 20 radova kategroje a_2, 9 radova kategorije a_3 i 4 rada koji nisu indeksirani u skupinama a_1, a_2 i a_3.

Sudjelovao je na 51 znanstvenom skupu, od čega 31 inozemnih i 20 domaćih s međunarodnim sudjelovanjem.

Mentor je 7 obranjenih doktorskih disertacija, jednog magistarskog rada te 30 diplomskih radova. Dobitnik je godišnje nagrade „Rikard Podhorsky“ Akademije tehničkih znanosti Hrvatske u 2014. godini te Državne nagrade za znanost u 2017. godini.

Zahvaljujem se mentoru prof.dr.sc. Zoranu Hercegu na usmjeravanju i pomoći tijekom izrade ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se prof.dr.sc. Višnji Bačun-Družina i izv.prof.dr.sc. Ivanu Kosalecu na savjetima tijekom pisanja rada.

Veliko hvala prijateljici i kolegici doc.dr.sc. Tomislavi Vukušić na nebrojenim savjetima i potpori!

Zahvaljujem se svojoj obitelji na podršci i strpljenju.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Sveučilište u Zagrebu **Doktorski rad**
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni poslijediplomski studij Biotehnologija
i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam
UDK: 544.3.03:544.552:612.336:628.353.153(043.3)
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

PRIMJENA VISOKONAPONSKOGA ELEKTRIČNOGA PRAŽNJENJA NA INAKTIVACIJU MIKROORGANIZAMA

Višnja Stulić, mag.ing.

Rad je izrađen na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu te u BIOCentru Zagreb.

Mentor: Dr.sc. Zoran Herceg, red.prof.

Kratki sažetak disertacije: Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj tretmana plinskom plazmom i tekućinskom plazmom u mjehurićima na inaktivaciju 7 mikroorganizama u stacionarnoj i eksponencijalnoj fazi rasta (*Escherichia coli* MG1655-K12, *Salmonella enterica* serotip Typhimurium LT21, *Listeria innocua* ATCC 33091, *Staphylococcus aureus* 3048, *Bacillus cereus* 30, *Rhodotorula* spp 74 i *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 204508). Analizirani su fizikalno-kemijski parametri, revitalizacija stanica nakon tretmana, istjecanje unutar staničnog sadržaja, odgovor stanica na stres i formiranje biofilma. Dizajniran je eksperiment s tri različite varijable (frekvencija: 60, 90, 120 Hz, vrijeme: 5' i 10', plin: zrak i argon) kako bi se utvrdili optimalni uvjeti tretmana pomoću dva tipa reaktora pri pozitivnom polaritetu i provodljivosti medija od 100 $\mu S\ cm^{-1}$. Potpuna inaktivacija u stacionarnoj fazi rasta postignuta je kod oba tipa reaktora te svih mikroorganizama, osim za kvasac *Rhodotorula* spp. U eksponencijalnoj fazi rasta potpuna inaktivacija tretmanom tekućinskom plazmom u mjehurićima u argonu postignuta je kod 4 mikroorganizma: *S. enterica*, *L. innocua*, *S. aureus* i *S. cerevisiae*. Iako su rezultati analize istjecanja staničnog sadržaja pri 260 i 280 nm pokazali istjecanje DNA i proteina, analizom revitalizacije stanica dokazan je oporavak stanica. Tekućinska plazma u mjehurićima pri uvjetima tretmana (90 Hz, 10', argon) pokazala se kao najučinkovitiji tretman te je isti odabran za analizu proteoma odabranih mikroorganizama u stacionarnoj fazi rasta: *E. coli*, *L. innocua* i *S. cerevisiae* i analize trasmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM). Proteomskim analizama provedenim pomoću MALDI-TOF/TOF MS-a dokazano je stanje stresa tretiranih mikroorganizama nakon jednostrukog tretmana, revitalizacije stanica te trostrukog tretmana istog uzorka. TEM analizom nakon tretmana dokazane su stanice s dezintegriranom membranom. Redukcija biofilma dokazana je nakon oba tretmana, plinskom plazmom i tekućinskom plazmom u mjehurićima.

Broj stranica: 184
Broj slika: 67
Broj tablica: 38
Broj literaturnih navoda: 229
Broj priloga: /
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: hladna plazma, mikroorganizmi, inaktivacija, revitalizacija, biofilm, odgovor na stres, fizikalno-kemijska svojstva

Datum obrane: 12. prosinca 2018.

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. Dr.sc. Višnja Bačun-Družina, red.prof. (PBF, Zagreb)
2. Doc.dr.sc. Tomislava Vukušić (PBF, Zagreb)
3. Dr.sc. Ivan Kosalec, izv.prof. (FBF, Zagreb)

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23 i u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice b.b.; Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb **Ph.D. thesis**
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Postgraduate study Biotechnology and Bioprocess Engineering
Food Technology and Nutrition
UDK: 544.3.03:544.552:612.336:628.353.153(043.3)
Scientific Area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

APPLICATION OF ELECTRICAL DISCHARGE PLASMA ON INACTIVATION OF MICROORGANISMS

Višnja Stulić, MS

Thesis performed at Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Institute Ruđer Bošković, Zagreb and BIOCenter, Zagreb.

Supervisor: Ph.D. Zoran Herceg, Full professor

Short abstract: The aim of this study was to investigate the influence of gas phase and liquid phase plasma discharges in bubbles on inactivation of 7 various microorganisms in stationary and exponentially growth phase (*Escherichia coli* MG1655-K12, *Salmonella enterica* serotype Typhimurium LT21, *Listeria innocua* ATCC 33091, *Staphylococcus aureus* 3048, *Bacillus cereus* 30, *Rhodotorula* spp 74 and *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 204508). Furthermore, physico-chemical parameters, revitalization of samples after the treatment, leakage of cellular macromolecules, stress response and biofilm formation were analyzed. An experimental design with three different variables (frequency: 60, 90, 120 Hz, time: 5' and 10', gas: air and argon) was designed to determine optimal treatment conditions using two types of reactor at positive polarity and conductivity of media 100 µS cm^{-1}. Complete inactivation in the stationary growth phase in both type of reactors and for all microorganisms was achieved, except for the *Rhodotorula* spp. In the exponential growth phase, complete inactivation by treatment of liquid plasma in argon bubbles was achieved for 4 microorganisms: *S. enterica*, *L. innocua*, *S. aureus* and *S. cerevisiae*. Although results of cellular leakage showed DNA and protein leakage, cell revitalization analysis proved the cell recovery. The most effective treatment, plasma discharges in bubbles (90 Hz, 10', argon) was selected for protein analyses of certain microorganisms in stationary growth phase: *E. coli*, *L. innocua* and *S. cerevisiae*. Under the same conditions selected microorganisms were analyzed with transmission electron microscopy (TEM). Proteomic analyses conducted by MALDI-TOF/TOF MS proved stress response after the single treatment, revitalization and triple treatment of the same sample. TEM analyses after the treatment illustrated cells with disintegrated membrane. Reduction in biofilm formation has been confirmed for both types of the reactor.

Number of pages: 184
Number of figures: 67
Number of tables: 38
Number of references: 229
Number of supplements: /
Original in: Croatian

Key words: cold plasma, microorganisms, inactivation, revitalization, biofilm, response to stress, physico-chemical parameters

Date of the thesis defense: 12 December 2018

Reviewers:
1. Ph.D. Višnja Bačun-Družina, Full professor (Faculty of Food Technology and Biotechnology, Zagreb)
2. Ph.D. Tomislava Vukušić, Assistant professor (Faculty of Food Technology and Biotechnology, Zagreb)
3. Ph.D. Ivan Kosalec, Associate professor (Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb)

Thesis deposited in: Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23 and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice b.b.; University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14.

SAŽETAK

Visokonaponsko električno pražnjenje-hladna plazma kao netermalna tehnologija sve je više u fokusu istraživanja zbog učinkovite inaktivacije mikroorganizma, ali i minimalne promjene u fizikalno-kemijskim karakteristikama obrađenog materijala. Brojne studije potvrdile su inaktivacijski učinak na mikroorganizme, ali je malo pozornosti upućeno na utvrđivanje sposobnosti revitalizacije stanica nakon obrade i njihov odgovor na stres.

Cilj ovog rada bio je utvrditi učinak visokonaponskoga električnoga pražnjenja primjenom dva tipa reaktora, pražnjenje u plinskoj fazi i tekućinsko pražnjenje u mjehurićima na inaktivaciju u stacionarnoj i eksponencijalnoj fazi rasta odabranih mikroorganizama. Također je cilj rada bio utvrditi revitalizaciju stanica nakon tretmana, istjecanje unutar staničnog sadržaja, formiranje biofilma, fizikalno-kemijske karakteristike medija te odgovor stanica na stres nakon jednostrukog tretmana, revitalizacije stanica te trostrukog tretmana istog uzorka. Tretirano je 7 različitih mikroorganizama: *Escherichia coli* MG1655-K12, *Salmonella enterica* serotip Typhimurium LT21, *Listeria innocua* ATCC 33091, *Staphylococcus aureus* 3048, *Bacillus cereus* 30, *Rhodotorula* spp 74 i *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 204508.

Neposredno prije plazma obrade navedenih mikroorganizama dizajniran je plan pokusa s tri promjenjive varijable (vrijeme: 5' i 10', frekvencija: 60, 90 i 120 Hz, plin: zrak ili argon) te je prema istom provedeno cjelokupno istraživanje. Nakon obrade plinskom plazmom i tekućinskom plazmom u mjehurićima postignuta je potpuna inaktivacija sljedećih mikroorganizama u stacionarnoj fazi rasta: *E. coli, S. enterica, L. innocua, S. aureus* neovisno o primjenjenom plinu. Potpuna inaktivacija stanica *B. cereus* i *S. cerevisiae* u stacionarnoj fazi rasta postignuta je tekućinskom plazmom u mjehurićima u argonu. Nakon provedene analize učinka plazma tretmana na redukciju broja mikroorganizama utvrđeni su optimalni uvjeti tretmana. Odabranim najučinkovitijim tretmanom, tekućinskom plazmom u mjehurićima (10', 90 Hz, argon) proveden je plazma tretman u eksponencijalnoj fazi rasta za sve mikroorganizme. Potpuna inaktivacija u eksponencijalnoj fazi rasta postignuta je za sljedeće mikroorganizme: *S. enterica, L. innocua, S. aureus* i *S. cerevisiae.* Testom revitalizacije utvrđen je potpuni oporavak i metabolička aktivnost stanica nakon tretmana pri kojima je postignuta potpuna inaktivacija. Snimanjem odabranih mikroorganizama (*E. coli, L. innocua* i *S. cerevisiae*) transmisijskim elektronskim mikroskopom pri tretmanu (tekućinska plazma u mjehurićima, 10', 90 Hz, argon, stacionarna faza rasta) uočene su stanice s dezintegriranom membranom. Proteomskim analizama provedenim na MALDI-TOF/TOF MS na odabranim mikroorganizmima (*E. coli, L.*

innocua i *S. cerevisiae*) i tretmanu (tekućinska plazma u mjehurićima, 10', 90 Hz, argon, stacionarna faza rasta) dokazan je stanični odgovor na stres.

KLJUČNE RIJEČI: hladna plazma, mikroorganizmi, inaktivacija, revitalizacija, biofilm, odgovor na stres, fizikalno-kemijska svojstva

SUMMARY

High voltage electrical discharge plasma as a non-thermal technology is in the focus of research because of effective microorganism's inactivation, but also because of the minimal change in physico-chemical parameters of treated material. Several studies have confirmed inactivation effect of plasma treatment on microorganisms, but far too little attention has been given on recovery of cells after the treatment and their response to stress conditions.

The aim of this thesis was to confirm the effect of high voltage electrical discharge plasma using two types of reactor, gas phase reactor and liquid phase reactor with the generation of plasma in bubbles. Furthermore, the aim was to define the inactivation of chosen microorganisms in stationary and exponential growth phase and to define whether the recovery of cells after the treatment occurs. Leakage of cellular macromolecules, formation of biofilm, physico-chemical parameters of treated media and cells response to stress after the treatment, recovery and three times treatment of the same sample were also determined. Seven microorganisms have been plasma treated: *Escherichia coli* MG1655-K12, *Salmonella enterica* serotype Typhimurium LT21, *Listeria innocua* ATCC 33091, *Staphylococcus aureus* 3048, *Bacillus cereus* 30, *Rhodotorula* spp 74 and *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 204508.

Before the plasma treatments of mentioned microorganisms, a plan design with three variable variables was designed (time: 5' and 10', frequency: 60, 90 and 120 Hz, gas: air or argon). According to the plan design research was conducted. After the treatments by gas phase and liquid phase plasma in bubbles complete inactivation's were achieved for: *E. coli*, *S. enterica*, *L. innocua*, *S. aureus* in stationary growth phase regardless of the applied gas. Complete inactivation's of *B. cereus* and *S. cerevisiae* in stationary growth phase were achieved after the treatments by liquid phase plasma generated in argon bubbles. Following the performed analysis optimal treatment conditions were established. The most effective treatment was (10', 90 Hz, argon) with the liquid phase plasma discharges in bubbles. This treatment was chosen for the plasma treatments of microorganisms in exponential growth phase. Complete inactivation's in exponential growth phase were achieved for the following microorganisms: *S. enetrica, L. innocua, S. aureus* and *S. cerevisiae.* For the samples where complete inactivation's were determined recovery of cells were observed. Transmission electron microscopy pictures of *E. coli*, *L. innocua* and *S. cerevisiae* cells after the liquid phase plasma discharges in bubbles (10', 90 Hz, argon, stationary growth phase) had shown cells with disintegrated membrane. Proteomic analyses by MALDI-TOF/TOF MS of *E. coli*, *L. innocua* and *S. cerevisiae* cells after

the liquid phase plasma discharges in bubbles (10', 90 Hz, argon, stationary growth phase) had shown cells response to stress conditions.

KEY WORDS: cold plasma, microorganisms, inactivation, revitalization, biofilm, response to stress, physico-chemical parameters

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. OPĆI DIO 3
2.1. Mikroorganizmi i njihova podjela 3
2.1.1. Bakterije 4
2.1.2. Kvasci 7
2.2. Kulture bakterija i kvasaca 9
2.2.1. *Escherichia coli* 9
2.2.2. *Salmonella enterica* 9
2.2.3. *Listeria innocua* 10
2.2.4. *Staphylococcus aureus* 11
2.2.5. *Bacillus cereus* 11
2.2.6. *Rhodotorula* spp 12
2.2.7. *Saccharomyces cerevisiae* 12
2.3. Faze rasta bakterijske populacije 12
2.4. Okolišni čimbenici koji utječu na istjecanje unutar staničnog sadržaja i VBNC stanje mikroorganizama 14
2.5. Biofilm 15
2.6. Transmisijski elektronski mikroskop 18
2.7. Proteomika 19
2.8. Definicija plazme 20
2.8.1. Nastajanje i svojstva plazme 20
2.8.2. Klasifikacija plazmi 23
2.8.3. Vrste pražnjenja laboratorijskih plazmi 24
2.8.3.1. Pražnjenja istosmjerne struje i niskih frekvencija 24
2.9. Visokonaponsko pražnjenje u tekućinama 27
2.9.1. Mehanizam nastajanja izboja u tekućinama 29
2.9.2. Fizikalno-kemijski procesi tijekom plazma tretmana u tekućoj i plinskoj fazi 30
2.10. Optička emisijska spektroskopija 31
2.11. Primjena plazme u prehrambenoj industriji 32
3. MATERIJAL I METODE 34
3.1. Materijal 35
3.1.1. Kemikalije za uzgoj stanica 35
3.1.2. Kemikalije za analizu vodikova peroksida 35

3.1.3. Kemikalije za analizu biofilma 35
3.1.4. Kemikalije za transmisijsko elektronsko mikroskopiranje 36
3.1.5. Kemikalije za analizu proteoma 36
3.1.6. Laboratorijska oprema 37
3.1.7. Radni mikroorganizmi 38
3.1.8. Hranjive podloge za uzgoj stanica bakterija i kvasaca 39
3.1.8.1. Hranjiva podloga za uzgoj bakterijskih stanica 39
3.1.8.2. Malt ekstrakt podloga za uzgoj stanica kvasca 39
3.1.8.3. Puferirana peptonska voda 39
3.1.8.4. Selektivne podloge za uzgoj mikroorganizama (revitalizacija) stanica 40
3.1.9. Puferi i otopine 41
3.1.9.1. Fosfatni pufer (*engl*. Phosphate Buffer Saline, PBS) 41
3.1.9.2. Titanij otopina 41
3.2. Metode 41
3.2.1. Tretmani plazmom - provedba eksperimenta 41
3.2.2. Dizajn eksperimenta 44
3.2.3. Određivanje fizikalno-kemijskih promjena 46
3.2.3.1. Optička emisijska spektroskopija (OES) 46
3.2.3.2. Određivanje pH vrijednosti, provodljivosti i temperature 46
3.2.3.3. Određivanje koncentracije vodikova peroksida 46
3.2.3.4. Izrada baždarnog pravca za određivanje koncentracije vodikova peroksida 47
3.2.4. Čuvanje i održavanje bakterijskih kultura i kultura kvasaca 47
3.2.5. Baždarni pravci mikroorganizama 47
3.2.6. Priprema i uzgoj mikrobioloških kultura za tretman u stacionarnoj fazi rasta 48
3.2.7. Priprema i uzgoj mikrobioloških kultura za tretman u eksponencijalnoj fazi rasta 49
3.2.8. Priprema uzorka za tretiranje 49
3.2.9. Određivanje broja stanica prije i nakon tretmana 50
3.2.10. Revitalizacija stanica nakon tretmana 50
3.2.11. Određivanje istjecanja unutar staničnog sadržaja 51
3.2.12. Transmisijski elektronski mikroskop 51
3.2.12.1. Priprema uzoraka za snimanje transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM) 51
3.2.13. Određivanje biofilma 52
3.2.14. Analiza proteoma 53
3.2.14.1. Uzgoj stanica za analizu proteoma prije i nakon tretmana 53

3.2.14.2. Uzgoj stanica za analizu proteoma nakon revitalizacije stanica....54
3.2.14.3. Uzgoj stanica i trostruki tretman za analizu proteoma....54
3.2.14.4. Priprava uzorka za analizu proteoma, metoda Pierce™ Mass Spec Sample Prep Kit for Cultured Cells....55
3.2.14.5. Određivanje koncentracije proteina....55
3.2.14.6. Taloženje i digestija proteina u otopini....56
3.2.14.7. Pročišćavanje i separacija peptida te analiza spektrometrom masa....56
3.2.14.8. Identifikacija proteina....58
3.2.14.9. Kvantitativna analiza rezultata....59
3.2.14.10. Protein-protein interakcije....59
4. REZULTATI....60
4.1. Optička emisijska spektroskopija....60
4.2. Fizikalno-kemijski parametri....64
4.3. Redukcija broja mikroorganizama u stacionarnoj fazi rasta....71
4.4. Redukcija broja stanica odabranih mikroorganizama nakon tretmana u eksponencijalnoj fazi rasta....78
4.5. Statistički parametri za redukciju broja mikroorganizama....79
4.6. Revitalizacija stanica nakon tretmana u stacionarnoj fazi rasta....84
4.7. Istjecanje unutar staničnog sadržaja....90
4.8. Statistički parametri za istjecanje unutar staničnog sadržaja....97
4.9. Transmisijski elektronski mikroskop....109
4.10. Biofilm....112
4.11. Rezultati proteomskih istraživanja....119
5. RASPRAVA....134
5.1. Utjecaj tretmana plazmom na fizikalno-kemijske parametre te produkciju radikala u modelnim sustavima ispitivanih mikroorganizama....134
5.2. Utjecaj tretmana plazme na inaktivaciju mikrooganizama....139
5.3. Revitalizacija stanica nakon tretmana....144
5.4. Istjecanje unutar staničnog sadržaja....145
5.5. Trasmisijski elektronski mikroskop....148
5.6. Utjecaj tretmana na redukciju biofilma....151
5.7. Proteomske analize i odgovor na stres....153
6. ZAKLJUČCI....158
7. LITERATURA....161

1. UVOD

Patogeni i kontaminirajući mikroorganizmi u hrani predstavljaju opasnost po ljudsko zdravlje. Mikroorganizmi, iako izloženi različitim vrstama stresa uslijed gladovanja, promjene pH, osmotskog ili temperaturnog šoka, imaju izvrsnu moć prevladavanja nepovoljnih uvjeta. U tom smjeru razvijaju se nove netermalne tehnologije kao što je pulsirajuće električno polje, visoki hidrostatski tlak, pulsirajuće svjetlo te hladna plazma (Misra i sur., 2011; Niemira, 2012; Rendueles i sur., 2011; Oms-Oliu i sur., 2010). U današnje vrijeme sve je veći naglasak na biološki i senzorski nepromijenjenoj hrani pri čemu se mora održati sigurnost proizvoda od mogućih toksikacija. Karakteristike netermalnih tehnologija minimalna su promjena u temperaturi, pri čemu dolazi do redukcije nepoželjnih mikroorganizama, ali i očuvanja fizikalno-kemijskih karakteristika obrađenog materijala. Prema preporuci Svjetske organizacije za hranu i lijekove (*engl.* Food and Drug Administration FDA) potrebno je postići 5 log redukcija kako bi se metoda pokazala učinkovitom pri inaktivaciji patogenih mikroorganizama u hrani, temeljem čega se svaka tehnologija mora dubinski ispitati kako bi se primijenila u prehrambenoj industriji.

Hladna plazma nova je netermalna tehnologija koja se u posljednje vrijeme sve intenzivnije razvija. Plazma se definira kao kvazineutralni plin koji sadrži nosioce naboja (elektroni, fotoni, ioni), ali i neutralne molekule (atoma i molekula) koji dobro provode električnu energiju (Misra i sur., 2016). Prilikom generiranja plazma izboja u tekućinama i plinskoj fazi dolazi do stvaranja različitih radikala, UV svjetla, kavitacijskih valova kojima se pripisuje inaktivacijski učinak plazme na različite mikroorganizme (Misra i sur., 2011; Niemira, 2012; Shen i sur., 2015). Veliki je broj provedenih znanstvenih studija na temu inaktivacije različitih mikroorganizama tretmanom hladnom plazmom, pri čemu se inaktivacijski učinak pripisuje zajedničkom utjecaju električnih, fizikalnih i kemijskih parametara. Međutim, gotovo ne postoji studija na temu revitalizacije stanica nakon plazma tretmana i odgovora stanica na stres.

Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj visokonaponskoga električnoga pražnjenja-hladne plazme generirane u plinskoj i tekućoj fazi u mjehurićima na 7 mikroorganizama: *Escherichia coli* MG1655-K12, *Salmonella enterica* serotip Typhimurium LT21, *Listeria innocua* ATCC 33091, *Staphylococcus aureus* 3048, *Bacillus cereus* 30, *Rhodotorula* spp 74 i *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 204508. Ispitao se utjecaj plazma tretmana na inaktivaciju zadanih mikroorganizama, revitalizaciju stanica, istjecanje unutar staničnog sadržaja, redukciju biofilma, fizikalno-kemijske parametre te odgovor stanica na stres nakon jednostrukog tretmana, revitalizacije i trostrukog tretmana istog uzorka. Protemske analize provedene su na 3 mikroorganizma (*E. coli*, *L. innocua* i *S. cerevisiae*). Također se prikazala protein-protein

interakcija kako bi se utvrdila poveznica u proteomu između izmijenjenih metaboličkih puteva nakon plazma tretmana. Kako bi se utvrdilo koji su uzroci revitalizacije stanica provedeno je snimanje transmisijskim elektronskim mikroskopom odabranih mikroorganizama (*E. coli*, *L. innocua* i *S. cerevisiae*).

2. OPĆI DIO

2.1. Mikroorganizmi i njihova podjela

Mikroorganizmi predstavljaju zajednički naziv za bakterijske vrste, gljive, viruse i protiste koje su vidljive pod mikroskopom (Madigan i sur., 2017). Osnovna je jedinica svih živih organizama osim virusa stanica. Karakteristika stanica mikroorganizama mala je veličina (u μm) te različiti oblik. Što je stanica manja to je odnos površina-volumen veći pa je i brža apsorpcija hrane, što posljedično omogućava brži rast stanice i njezinu diobu.
Prema temperaturi rasta mikroorganizmi se dijele na:

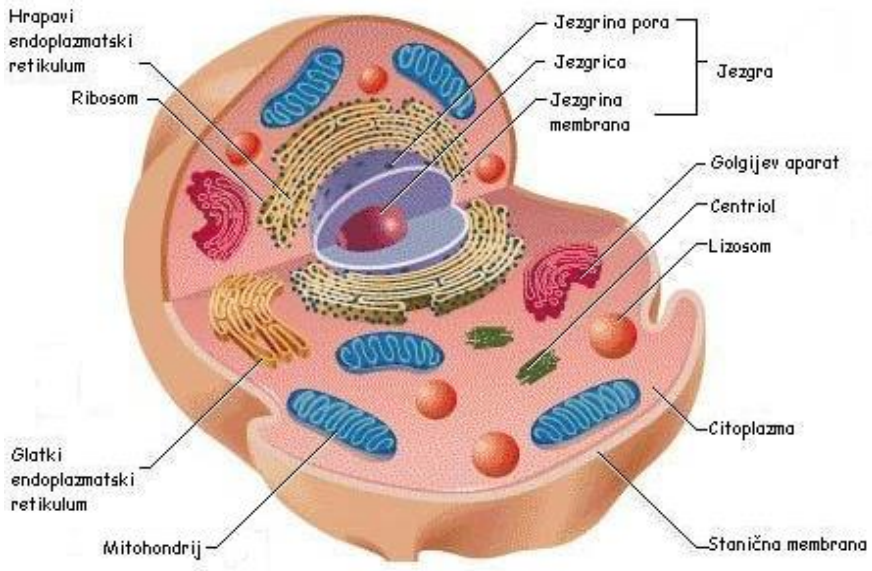
- psihrofile – optimalna temepratura rasta je od 0 do 30 °C
- mezofile – optimalna temperatura rasta je od 20 do 52 °C
- termofile - optimalna temperatura rasta je iznad 55 °C

Tablica 1. Razlika u staničnoj građi prokariota i eukariota

Karakteristika	**Prokarioti**	**Eukarioti**
Veličina	0,1-10 μm	10-100 μm
Stanična jezgra	Ne (nukleoid)	Da (nukleus)
Plazmidi	Da	Ne
Organizacija genoma	Kružna molekula DNA	Kromosomi
Organele	Ne	Da
Stanična dioba	Stvaranje pregrada	Mitoza i citokineza

Svi organizmi u osnovi imaju sličnu strukturu stanice koja je građena od DNA, RNA, proteina, lipida i fosfolipida (Silhavy i sur., 2010). Ovisno o organizaciji stanice mikroorganizmi se dijele na prokariote i eukariote. Osnovna razlika između prokariotske i eukariotske stanice leži u činjenici da prokariotske stanice sadrže genetički materijal (DNA) koji nije obavijen s membranom i povezan s histonima (tablica 1). Također organele koje se nalaze unutar stanice nisu obavijene s membranom (Struhl, 1999). Prokariotske stanice najčešće se razmnožavaju binarnim cijepanjem pri čemu se DNA udvostručuje te se pri tome stanica dijeli u dvije (Struhl, 1999). Eukariotske stanice imaju pravu jezgru (nukleus) omotanu sa membranom, dok su i oraganele koje se ne nalaze u prokariotskim stanicama (endoplazmatski retikulum, Golgijev kompleks) omotane s membranom (slika 1). Unutar jezgre nalazi se više od jednog kromosoma kojeg čine DNA i proteini povezani s histonima. Horiike i sur. (2001)

predložili su model prema kojim su eukariotske stanice nastale simbiozom arheja i bakterija. Njihovi rezultati temeljeni su na rezultatima sličnosti proteina pronađenih u genomu kvasaca i genomu arheja i bakterija.



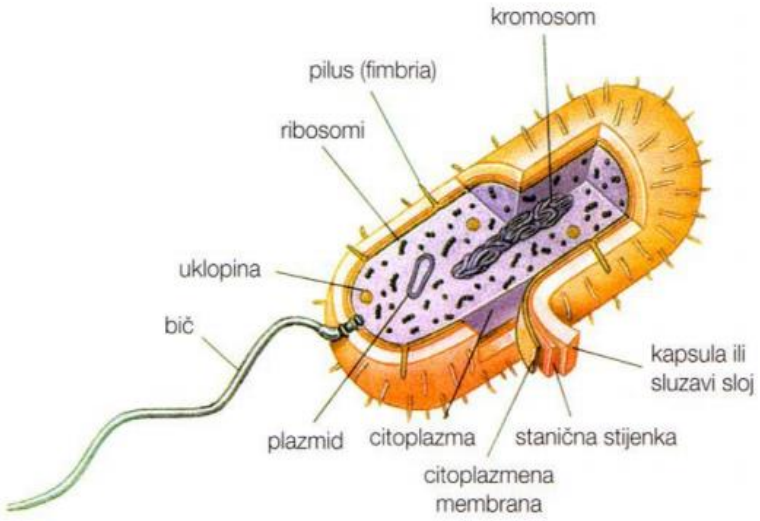
Slika 1. Građa eukariotske stanice (prema http://e-skola.biol.pmf.unizg.hr)

2.1.1. Bakterije

Bakterije su jednostanični organizmi koji se svrstavaju u carstvo *Monera* i domenu prokariota. Smatraju se prvim oblikom života na Zemlji te su prisutne u svim pogledima života: tlo, zrak, voda, živa bića. Smatra se da na Zemlji živi $5x10^3$ bakterija koje tvore različite biomase. Svrstavaju se u mikroorganizme veličine najčešće od 0,25 do 10 μm (Tille, 2015). Optimalni pH rasta je oko 7, ali mogu rasti i u vrijednostima pH ispod i iznad 7. Optimalna temperatura rasta ovisi o bakterijskoj vrsti, a mogu rasti u rasponu temperature ispod 0 °C do iznad 100 °C. Za rast im je neophodna voda kao i makronutrijenti fosfat i ugljik (Horn i sur., 2004).

Nekoliko je oblika bakterija od čega su najzastupljeniji: koki, štapići, vibrio i spirili koji mogu rasti kao pojedinačne kolonije ili u nakupinama. Karakterizira ih nedostatak jezgrine membrane i membrana oko organela (Struhl, 1999) (slika 2). Stanična morfologija bakterijske stanice definirana je staničnom stijenkom (Lengeler i sur., 1999). Citoplazma, kao glavni dio protoplazme pretežno je vodena okolina s upakiranim proteinima i nukleotidno-proteinskim kompleksima. Genetička informacija sadržana je u jednostrukoj dvolančanoj molekuli DNA

koja se naziva nukleoid. Sadržaj citoplazme ograđen je tankom, elastičnom citoplazmatskom membranom debljine 5-10 nm u koju su većinom ukorporirani fosfolipidi i proteini (Pollard i sur., 2016; Tille, 2015). Membrane prokariotske stanice većinom su bogatije s proteinima nego molekulama fosfolipida. Stanična stijenka omogućava zatvaranje protoplasta te se nalazi s vanjske strane citoplazmatske membrane. Semipermeabilna je, čvrste strukture te debljine 10-25 nm. Građena je od peptidoglikana koji se naziva murein. Murein je građen od polisaharida i peptida koji sadrže D-aminokiseline, N-acetil-glikoziamin i D-lizin ili D-alanin koji je povezan aminskim vezama s drugim mureinskim lancem. Takva struktura omogućava čvrstoću stanične stijenke i naziva se mureinski sakulus. Omogućava održavanje visokog osmotskog tlaka unutar citoplazme.



Slika 2. Građa prokariotske (bakterijske) stanice (prema http://svet-biologije.com/)

Na osnovu građe stanične stijenke razlikujemo Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterijske vrste. Metodu je otkrio danski biolog Hans Christian Gram 1884. godine kada je uočio da se Gram-pozitivne bakterijske vrste boje u plavo-ljučičasto, a Gram-negativne u ružičasto-crveno (Tille, 2015) (tablica 2). Stanična stijenka Gram-pozitivnih bakterijskih vrsta odlikuje se debljinom te je građena 90% od mureina i teikoične kiseline. Teikoična kiselina građena je od lanca ugljikohidrata i aminokiselina. Za razliku od Gram-pozitivne bakterijske vrste, Gram-negativne bakterije odlikuje tanja stanična stijenka koja se sastoji od dvije membrane, unutrašnje i vanjske (Duraković i Redžepović, 2002). Unutrašnja membrana građena je od mureina, dok se vanjska membrana sastoji od dva listića:

- gornji listić – građen od lipopolisaharida koji sadrži dvije komponente: lipid A koji je po kemijskom sastavu ester ugljikohidrata i masnih kiselina s

pirofosfatnim vezama i druge komponente koja je po kemijskom sastavu lanac šećera i glikofosfata koji su povezani s lipidom A

- donji listić – građen je od fosfolipida

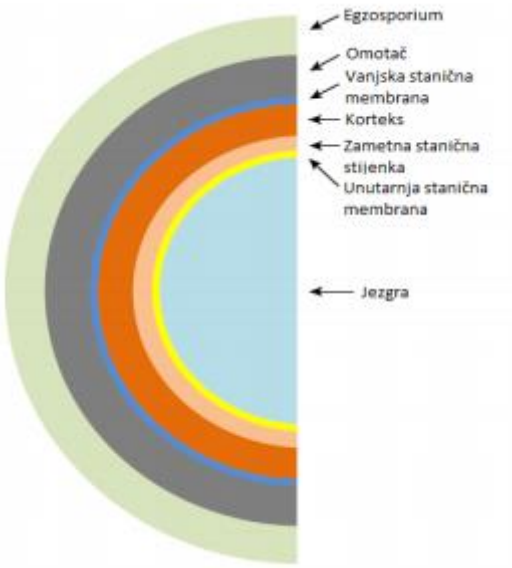
Tablica 2. Karakteristike Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterijske vrste

Karakteristika	**Gram-pozitivna bakterijska vrsta**	**Gram-negativna bakterijska vrsta**
Građa stanične stijenke	Debeli peptidoglikanski sloj	Tanki lipopolisaharidni sloj
Teikoična kiselina	Prisutna	Odsutna
Lipoproteini	Odsutni	Prisutni
Periplazmički prostor	Odsutan	Prisutan
Bojanje po Gramu	Zadržavaju kristal violetno obojenje. Boje se u plavo-ljubičasto	Ne zadržavaju kristal violetno obojenje. Boje se u ružičasto-crveno

Izvan stanične stijenke može postojati zaštitni gelatinozni sloj, glikokaliks ili kapsula čija je uloga zaštita od fagocitoze. Uglavnom se sastoji od vode i malog udjela polisaharida ili polipeptida (Pollard i sur., 2016; Tille, 2015). S vanjske strane stanične stijenke pronalaze se bičevi, fimbrije i pili. Uloga pila transfer je genetičkog materijala, dok se fimbrije vezuju uz adheziju različitih tvari. Bičevi prvenstveno služe za pokretanje stanice, a građene su od polimernog proteina flagelina (Pollard i sur., 2016; Tille, 2015).

Pojedine bakterijske vrste mogu stvarati endospore koje predstavljaju dormantni stadij mikroorganizama čija je metabolička aktivnost svedena na minimum. Mogu preživjeti jako dugačko vremensko razdoblje nepovoljnih uvjeta (gladovanja, temperature, pH). Vrlo su otporne te mogu preživjeti različita stresna stanja kao što su sušenje, termička obrada i temperature smrzavanja (Nakamura, 1998). Mogu preživjeti nekoliko desetaka godina pa čak i milijuna. Karakteristična građa spora je zametna stanična stijenka koja je obavijena nepropusnim korteksom (debeli sloj peptidoglikana) i vanjska stanična membrana (Ćosić, 2017) (slika 3). Vanjska stanična membrana obavijena je sa proteinskim omotačem koji čini 40 specifičnih proteina. Pojedine bakterijske spore sadrže dodatan vanjski sloj koji je građen od ugljikohidrata i proteina, nazvan egzosporium (Paredes-Sabja i sur., 2014). Unutrašnjost spore čini jezgra sastavljena od DNA i RNA te enzima. Visok sadržaj kalcija i dipikolinske kiseline

(DPA), niski sadržaj vode te vrlo niska metabolička i enzimatska aktivnost (Peredes-Sabja i sur., 2014) doprinose otpornosti spora. Ca-DPA kompleks veže vodu te pospješuje proces dehidracije. Između ostalog veže se na baze molekule DNA što omogućava veću otpornost na toplinu (Madigan i sur., 2015). Upravo ovakva građa stanice omogućava im višegodišnje preživljavanje u nepovoljnim uvjetima. Uspostavom optimalnih uvjeta spore započinju proces klijanja. Tijekom ovog razdoblja spora bubri, dolazi do dezintegracije korteksa, vanjska se ovojnica otvara te dolazi do aktivacije vegetativne stanice.



Slika 3. Građa bakterijske spore (prema Ćosić, 2017)

2.1.2. Kvasci

Kvasci su jednostanični eukariotski organizmi koji se svrstavaju u carstvo *Fungi*. Ovisno o morfološkoj, fiziološkoj i molekularnoj građi, stanice kvasca karakteriziraju se u rodove: *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Candid*a i *Zygosaccharomyces*. Već tisućljećima godina upotrebljavaju se u proizvodnji piva, vina i kruha. Veličina stanica najčešće je veličine 1-10 µm. Razmnožavaju se vegetativno pupanjem ili fisijom (cijepanjem), dok se neki mogu razmnožavati spolno. Predstavlja organelu čiji se kemijski sastav mijenja ovisno o okolišnim i stresnim čimbenicima. Rastu u rasponu pH od 2 do 8 pri čemu je najpovoljnija sredina od 4,0 do 4,5, dok je optimalna temepratura rasta oko 30 °C. Za rast stanica kvasaca potrebna je prisutnost makronutrijenata (C, H, O, S, P, K i Mg) te mikronutrijenata (Ca, Zn, Fe i Mn) (Pollard i sur., 2016). Kvaščeve stanice za svoj rast preferiraju šećere s C-6 atoma jer ih

metaboliziraju u piruvat i na kraju oksidiraju do CO_2 i H_2O pri čemu se oslobađa energija u postupku oksidativne fosforilacije. Fakultativni su anaerobi što znači da ako raspolažu dovoljnom koncentracijom kisika nastupa proces aerobne respiracije pri čemu nastaju CO_2 i voda. U anaerobnim uvjetima nastupa proces fermentacije ugljikohidrata gdje se šećer metabolizira u ugljični dioksid i alkohol. Stanica kvasca naziva se i blastokonidija te su njezini dijelovi vidljivi pod elektronskim mikroskopom: višeslojna stanična stijenka, periplazmatski prostor, citoplazmatska membrana, mitohondriji, jezgra, ribosomi, glikogenska zrnca, lipidne čestice, endoplazmatski retikulum, Golgijev aparat, peroksisomi i vakuole. Stanična stijenka koja čini 10-25% ukupne mase stanice (Klis i sur., 2002) građena je od polisaharida (glukan, hitin i manoproteini) gdje su disulfidnim vezama međusobno povezane molekule glikoproteina (Walker, 2009; Škara i sur., 2016). Upravo disulfidne veze s molekulama glikoproteina omogućavaju čvrstoću stanične stijenke. S udjelom većim od 50% mase stijenke, glukan je najzastupljeniji polisaharid stanične stijenke kvasca. Stanična stijenka sadrži dvije vrste glukana: β-1,6-glukan i β-1,3- glukan koji čini gotovo polovicu mase stanične stijenke. Unutarnji sloj izgrađen od β-1,3-glukana (50% mase stijenke), β-1,6-glukana (5% mase stijenke) i hitina (1-2% mase stijenke), odgovoran je za mehaničku i osmotsku stabilnost (Teparić, 2005). Vanjski sloj sastavljen od manoproteina (35% mase stijenke) određuje površinska svojstva stijenke, a ujedno ima i protektivnu ulogu. Smatra se da su proteini odgovorni za površinska svojstva stijenke kao što su hidrofobnost i električni naboj, ali i za održavanje interakcija između stanica u procesima aglutinacije i flokulacije (Teparić, 2005). Citoplazmatska membrana građena je od fosfolipidnog dvosloja u koju su umetnute molekule sterola, sfingolipida i proteina. Glavni je sterol u stanicama kvasca ergosterol koji omogućava čvrstoću i propusnost stanice. Površina stanične membrane kvasca negativno je nabijena zbog prisutnosti fosfatnih skupina koje su spojene na polisaharide koji se nalaze u strukturi stanične stijenke. To utječe na međustanični prostor u kojem dolazi do interakcija susjednih stanica, a kalcijevi ioni koji su prisutni služe kao mostovi kod ionskog transporta (Bamforth, 2008).

Kvasci su industrijski korisni organizmi (proizvodnja pekarskih i konditorskih proizvoda, piva), ali isto tako mogu uzrokovati kvarenje namirnica s posebnim naglaskom na kisele i slatke proizvode.

2.2. Kulture bakterija i kvasaca

2.2.1. *Escherichia coli*

E. coli svrstava se u skupinu *Enterobacteriaceae,* kao gram-negativna nesporogena bakterijska vrsta, štapićastog oblika duljine oko 2 μm te promjera 0,25-1 μm. Smatra se fakultativnim anaerobom, što označava da u prisutnosti kisika proizvodi ATP staničnim disanjem, ali u odsustvu kisika energiju proizvodi fermentacijom. Optimalna je temperatura rasta 37 °C, što ih svrstava u mezofilne bakterije, ali mogu rasti na temperaturi i do 49 °C. U većini slučajeva nema negativnog utjecaja na ljudsko zdravlje, ali neke vrste mogu uzrokovati ozbiljna trovanja kao što je *E. coli* O157:H7. Najčešće do trovanja s *E. coli* O157:H7 dolazi zbog konzumacije kontaminirane neprerađene hrane kao što je sirovo mlijeko posljedično uzrokujući otkazivanje bubrega, hemoragični kolitis te naposljetku i smrt (Bavaro, 2012; Oliveira i sur., 2012). U laboratorijskim je uvjetima najčešće korištena bakterijska vrsta *E. coli* serotip MG1655-K12. Razlog tomu je potpuno sekvencioniran genom, ali i proteom navedene *E. coli* (Blattner i sur., 1997).

Stanični ciklus *E. coli* podijeljen je u tri faze. Faza B događa se između završetka podjele stanica i početka DNA replikacije. Faza C obuhvaća vrijeme potrebno da se replicira kromosomska DNA. Faza D odnosi se na fazu između završetka DNA replikacije i kraja stanične diobe (Wang i Levin, 2009). Prema najbržim stopama rasta, replikacija počinje prije nego što je prethodni krug replikacije završen, što rezultira višestrukim replikacijama duž DNA i preklapajućim ciklusima stanica.

2.2.2. *Salmonella enterica*

S. enterica štapićasta je gram-negativna bakterija koja se svrstava u skupinu *Enterobacteriaceae,* rod *Salmonelle*. Fakultativni je anaerob. Veličina je stanice 2-5 μm, dok joj promjer iznosi 0,7-1,5 μm. Većina stanica pokreće se pomoću bičeva. Raspon temperature rasta joj je od 5 do 45 °C, dok optimalna temepratura rasta iznosi 35-37 °C. Rast im je omogućen u pH vrijednosti od 4 do 9, ali isto je tako zabilježen rast i na pH 3,7.

U najpoznatije patogene vrste roda *Salmonella* ubrajaju se *Salmonella typhi, Salmonella paratyphi, Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurium, Salmonella pullorum* i *Salmoenlla enterica*. Najčešće toksikoze uzrokovane konzumirajem hrane kao što je konzumacija nedovoljno termički obrađenog mesa peradi i govedine uzrokovane su *S. enterica* vrstom

(Morishige i sur., 2013). Vrste roda *Salmonella* izuzetno su invazivne bakterije, koje nakon što uđu u organizam domaćina, prodiru u površinske stanice tankog i debelog crijeva te dalje preko krvi u različite organe, posljedično uzrokujući različite upalne procese kao što su dijareja, povraćanje i vrućica te teška oboljenja kao što su meningitis i upala pluća.

Inaktivacija patogenih vrsta roda *Salmonella* najčešće se potiže termičkom obradom. Pri temperaturi od 65,5 °C 1,12 min potrebno je da se koncentracija od 3 160 000,000 stanica reducira za 6,5 decimalnih jedinica. Pri temperaturi 71 °C i istim uvjetima potrebno je 6,7 sekundi za redukciju od 6,5 decimalnih jedinica (Murphy i sur., 2004).

2.2.3. *Listeria innocua*

L. innocua je gram-pozitivna, nesporogena štapićasta bakterijska vrsta. Jedna je od 6 vrsta roda *Listeria* u koju se još ubrajaju *Listeria monocytogenes*, *Listeria welshimeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seligeeri* i *Listeria grayi*. *L. monocytogenes* i *L. ivanovii* jedine su patogene *Listeria* vrste. *L. innocua* mezofilna je bakterija, a optimalna joj je temperatura rasta između 30-37 °C, iako se može dijeliti u temperaturnom rasponu od 1 do 45 °C. Deblja stanična stijenka osigurava joj dobru zaštitnu barijeru, a zahvaljujući pilima i bičevima je pokretna (Pine i sur., 1989). Fakultativni je anaerob, zbog čega može metabolizirati glukozu (i ostale šećere) u aerobnim, ali i anaerobnim uvjetima. U aerobnim uvjetima metabolizma glukoze, *L. innocua* stvara mliječnu i octenu kiselinu dok u anaerobnim uvjetima samo mliječnu kiselinu (Pine i sur., 1989). U optimalnim uvjetima koncentracija *Listeria* stanica povećava se tijekom jednog sata na duplu koncentraciju od početne. Široko je rasprostranjena u prirodi, ali isto tako može se pronaći i u hrani. Može preživjeti ekstremne uvjete pH od 4,5 do 9,4 (Nolan i sur., 1992), ali i medij koji sadržava jako visoku koncentraciju soli. Vrlo je značajna nepatogena bakterija u pogledu genetičke sličnosti s patogenom vrstom *L. monocytogenes*. Patogene vrste nakon unosa u organizam uzrokuju različite zdravstvene smetnje kao što su septikemija, abortus te infekcije središnjeg živčang sustava (meningitis) (Farber i Peeterkin, 1991; Schuchat i sur., 1991). U većini slučajeva patogene *Listeria* vrste dovode do smrti. Patogenost vrste *L. monocytogenes* očituje se ekspresijom proteina internalina (InlA), koji nije eksprimiran u nepatogenoj vrsti *L. innocua* (Glaser i sur., 2001).

2.2.4. *Staphylococcus aureus*

S. aureus gram-pozitivna je, kuglasta bakterijska vrsta koja se svrstava u rod *Staphylococcus*. Fakultativni je anaerob te ne tvori spore. *S. aureus* producira različite enzime kao što su koagulaze, hiluronidaze, deoksiribonukleaze, lipaze, stafilokinaze i beta-laktamaze (Cheesbrough, 1981) koje pretvaraju tkivo domaćina u hranjive tvari potrebne za bakterijski rast. Patogena je bakterija te se smatra glavnim uzročnikom gastrointestinalnih problema uzrokovanih konzumacijom zagađene hrane (Soriano i sur., 2002). Trovanje hrane uzrokovano stafilokokom događa se zbog konzumiranja hrane koja sadrži termotolerantni enterotoksin (SE) (Scherrer i sur., 2004). Uzokuje infekcije kože, upale pluća i sindrom toksičnog šoka. Optimalna je temperatura rasta od 30 do 37 °C, dok isto tako može rasti i dijeliti se u temperaturnom rasponu od 7 do 48.5 °C (Schmitt i sur., 1990). Optimalni pH je 6-7, ali pokazuje rast i u pH rasponu od 4 do 10.

MRSA-meticilin rezistentni *S. aureus* (zlatni stafilokok) zajednički je naziv za sve vrste stafilokoka otporne na različite vrste antibiotika. Najčešća zaraza zlatnim stafilokokom u bolnicama je i to pacijentima s otvorenim ranama te oslabljenim imunološkim sustavom.

2.2.5. *Bacillus cereus*

B. cereus štapićasta je gram pozitivna, sporogena bakterijska vrsta. Uz *B. cereus* zabilježeno je 6 vrsta roda *Bacillus*: *Bacillus anthracis, Bacillus thuringiensis, Bacillus mycoides, Bacillus pseudomycoides, Bacillus weihenstephanensis* i *Bacillus cytotoxicus*. Aerobni je mikroorganizam koji ima mogućnost rasta i u anaerobnim uvjetima. Pri anaerobnim uvjetima energiju dobiva razgradnjom ugljikohidrata i aminokiselina do ugljičnog dioksida, alkohola i organskih kiselina. Kao patogeni mikroorganizam većina trovanja hranom uzrokom je kompleksnih enterotoksina koji se stvaraju tijekom vegetativne faze rasta (Granum i Lund, 1997). *B. cereus* proizvodi nekrotizirajuće i emetične enterotoksine, fosfolipaze, proteaze i hemolizine (Turnbull 1981; Granum 1994). Optimalna je temperatura rasta između 28-35 °C, ali i temperaturni raspon od 10 do 50 °C također omogućuje nesmetani rast (Ultee i sur., 1999). Vegetativne stanice inaktiviraju se s povišenom temperaturom (121 °C), dok su spore otpornije na toplinsko djelovanje. Poznato je da povišena temperatura pogoduje germinaciji spora (Granum i Lund, 1997). Epidemiološki podatci pokazuju da do pojave simptoma uzrokovanih konzumacijom kontaminirane hrane s bakterijskom vrstom *B. cereus* dolazi ukoliko je koncentracija stanica veća od 10^5 broj stanica g^{-1} (Becker i sur., 1994).

2.2.6. *Rhodotorula* spp

Rhodotorula se svrstava u saprofitne kvasce, porodicu *Sporidiobolaceae*. Rod *Rhodotorula* sadrži 37 vrsta od kojih samo 3 vrste: *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula minuta* i *Rhodotorula glutinis* uzrokuju zaraze kod ljudi (Biswas i sur., 2001; Wirth i Goldani, 2012). Optimalna temperatura rasta je 30 °C. Većina *Rhodotorula* vrsta proizvodi kolonije ružičaste boje, koje su morfološki okrugle, glatke i vlažne. Boja kolonija sprečava apsorpciju valnih duljina (620-750 nm) koje uzrokuju oštećenja stanice. Široko su rasprostranjene u prirodi (zrak, tlo, morska voda, biljke, mliječni proizvodi, kućanstva). Najčešća zaraza kvascem *Rhodotorula* događa se konzumacijom minimalno procesiranog voća i povrća ili nepasteriziranih voćnih sokova (Tournas i sur., 2011). Zaraza se očituje u vidu gastrointestinalnih problema kod bolesnika smanjenog imuniteta kao što su maligno oboljeli pacijenti, bolesnici na kortikosteroidima i citotoksičnim lijekovima (Wirth i Goldani, 2012).

2.2.7. *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *S. cerevisiae* modelni je eukariotski organizam koji se koristi u proučavanju različitih procesa u prehrambenoj i biotehnološkoj grani. Svrstava se u porodicu *Saccharomycetaceae*, rod *Saccharomyces*. Genom stanice *S. cerevisiae* u potpunosti je sekvencioniran. Idealan je modelni organizam za eksperimentalna istraživanja biokemijskih procesa eukarotskih stanica jer ga karakterizira jednostavan životni ciklus, kratko generacijsko vrijeme i laka genetička manipulacija (Kellis i sur., 2004). Od antičkih vremena poznata je njegova upotreba u proizvodnji piva i pekarstvu. Najbolje raste na podlogama bogatim glukozom, fruktozom, galaktozom, saharozom i maltozom prilikom čega šećere metabolizira do CO_2 i etanola. Optimalna je temperatura rasta oko 30 °C, a optimalan pH je neutralan ili blago kisel. Iako kvasac *S. cerevisiae* ima ključnu ulogu u alkoholnoj fermentaciji pri proizvodnji vina i piva, vrlo lako može doći do ponovljene fermentacije gotovog proizvoda pri čemu dolazi do zamućenja i plinovitosti proizvoda (Fleet, 2008). Ovaj oblik kontaminacije proizvoda doprinosi njegovu kvarenju.

2.3. Faze rasta bakterijske populacije

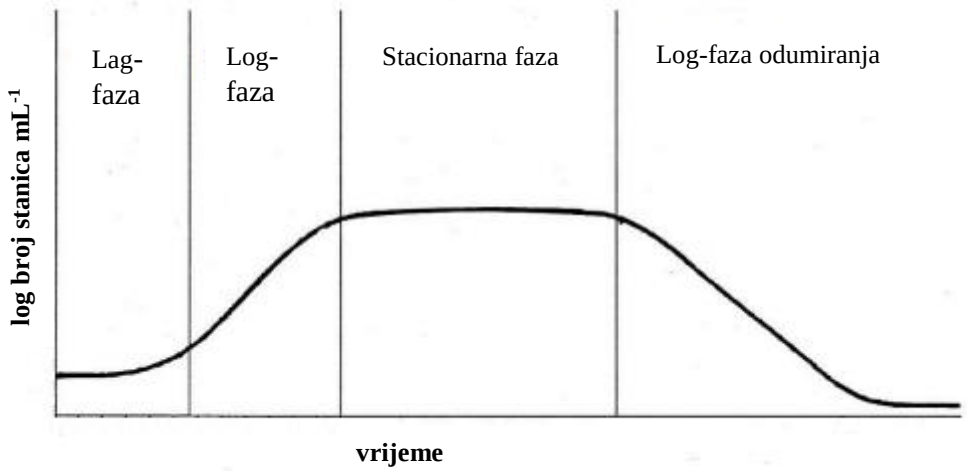
Rast nesporogenih mikroorganizama karakteriziran je fazama rasta, odnosno fazama razmnožavanja i odumiranja. Ukoliko su zadovoljeni optimalni uvjeti (temperature, aktiviteta

vode, pH, hranjivih nutrijenata, dostupnosti kisika) dolazi do razmnožavanja mikroorganizama. Optimalna je temperatura razmnožavanja mikroorganizama od 14 do 40 °C, iako se pojedini mikroorganizmi mogu razmnožavati i na temperaturama ispod 0 °C i iznad 100 °C.

Kinetika rasta bakterijskih populacija može se podijeliti na (Marriott i Gravani, 2006) (slika 4):

a) *lag faza* – u prvoj fazi, mikroorganizmi prolaze kroz prilagodbu na okruženje s blagim smanjenjem njihova broja zbog nastalog stresa te se njihov broj ne povećava.
b) *log faza* – tijekom ove faze broj mikroorganizama se povećava do točke kada povećanje broja mikroorganizama postane eksponencijalno, sve dok ga neki faktori okruženja ne ograniče. Dužina ove faze može varirati od 2 do nekoliko sati. Broj mikroorganizama i faktora sredine, kao što su dostupnost nutrijenata i temperatura, utječu na daljni rast većeg broja mikroorganizama.
c) *stacionarna faza* – označava usporavanje faze rasta i dostizanje ravnoteže, a događa se kada faktori okruženja, kao što su dostupnost nutrijenata, temperatura, aktivitet vode, pH i konkurencija neke druge populacije mikroorganizama, postanu ograničavajući. Možemo reći da se razmnožavanje zaustavlja u ovoj fazi ili da čak dolazi do blagog smanjenja stope razmnožavanja. Dužina ove faze varira od 1 do preko 30 dana, ovisno o okruženju.
d) *faza odumiranja* – koncentracija mikroorganizama ispočetka se sporo smanjuje, a zatim se naglo ubrzava po eksponencijalnom stupnju. Uzroci su: nepovoljni energetski uvjeti, nedostatak nutrijenata i nagomilavanje metaboličkih nusprodukata.

Vrijeme i oblik svakog dijela krivulje i broj živih stanica različiti su u ovisnosti o vrsti mikroorganizma i upotrebljenoj hranjivoj podlozi.



Slika 4. Prikaz dinamike rasta bakterijske populacije (vlastita shema)

2.4. Okolišni čimbenici koji utječu na istjecanje unutar staničnog sadržaja i „VBNC“ stanje mikroorganizama

Pri optimalnim uvjetima za rast (optimalna temperatura, nutrijenti, pH, udio kisika) mikroorganizmi rastu i razmnožavaju se maksimalnom brzinom. Ukoliko se naruše optimalni uvjeti, mikroorganizmi se dovode u stanje stresa (temperaturni, oksidativni, osmotski, kiselinski). U pojedinim slučajevima stanica je u mogućnosti detektirati vrstu stresa te na odgovarajući način odgovoriti na njega i omogućiti preživljavanje stanice. Stanice mogu odgovoriti na okolišni stres fiziološkim (rast, katabolizam i stanična morfologija) i genetičkim promjenama te omogućiti stanično prilagođavanje novonastalim uvjetima (Kroemer i sur., 2010). Najčešći opći odgovor na stres smanjenje je djelovanja metaboličkih puteva i indukcije gena koji dovode do rasta stanica. Dolazi do redukcije metabolizma proteina, ugljikohidrata, nukleinskih kiselina i masnih kiselina. Redukcijom metabolizma proteina onemogućava se proces transkripcije, a posljedično i translacije što dovodi do smanjene proizvodnje proteina. Bakterijske stanice i stanice kvasca izložene oksidativnom stresu najčešće odgovaraju produkcijom proteina aldehid dehirogenaze koja ima značajan učinak u obrani stanice od stresa (Singh i sur., 2013).

Tijekom plazma tretmana stanice mogu preživjeti u tzv. vidljivoj, ali nekulturabilnoj fazi (*engl.* „viable but non-culturable“ VBNC state) (Abramzon i sur., 2006; Brelles-Mariño, 2012). U ovoj fazi stanice imaju netaknutu membranu, smanjenu respiratornu aktivnost, transkripciju gena i sintezu proteina, ali nisu sposobne za stvaranje kolonija na hranjivim podlogama u laboratorijskim uvjetim (Mai-Prochnow i sur., 2014). 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. Kada ponovno nastupe povoljni uvjeti i stanica izađe iz VBNC stanja, može se nastaviti dijeliti. Bitno je naglasiti da su stanice u VBNC stanju sposobne izazvati infekciju. Ukoliko stanica ne uđe u fazu mirovanja, stresni okolišni uvjeti mogu biti letalni (Oliver, 2005). Ako je stanica ireverzibilno permeabilizirana, dakle nije ušla u fazu mirovanja letalni učinak manifestira se istjecanjem unutar staničnih molekula (nukelinskih kiselina, proteina, sadržaja citoplazme) koje su temelj funkcioniranja stanice. Narušavanjem ravnoteže stanice dolazi do inaktivacije odnosno smrti stanice.

Broj mikroorganizama koji mogu ući u VBNC stanje neprekidno raste. Smatra se da ih postoji 60-ak, uključujući i veliki broj ljudskih patogena kao što su *Campylobacter spp., Escherichia coli i Listeria monocytogenes* (Oliver, 2005).

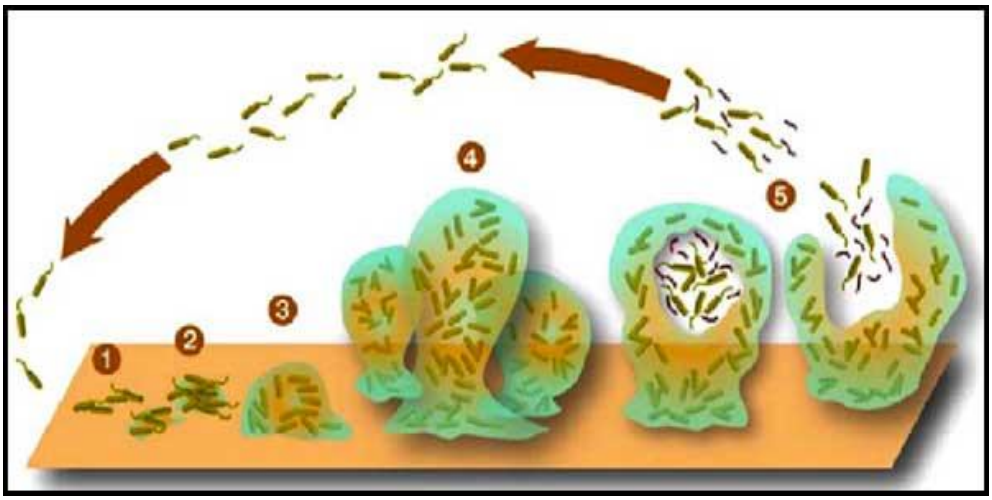
2.5. Biofilm

U protekla dva desetljeća definicija biofilma neprestano se mijenjala jer svako novo istraživanje nadograđuje postojeće znanje o stvaranju, strukturi, sazrijevanju te rezistenciji biofilma. Biofilm je danas definiran kao sesilna zajednica mikroorganizama čije su stanice ireverzibilno povezane sa supstratom i međusobno te uklopljene u izvanstanični matriks polisaharidnih polimera (*engl.* extracellular polymeric substances (EPS)) koji su same stvorile, a ispoljavaju izmijenjen fenotip uslijed promijenjene brzine razmnožavanja i transkripcije gena (Donlan i Costerton, 2002). Matriks biofilma visoko je hidratiran i po svom sastavu sadrži 85-95% vode, šećere (glukozu, galaktozu, manozu, fruktozu, ramnozu), proteine, fosfolipide, nukleinske kiseline i druge polimere (Donland, 2002).

Danas je opće prihvaćeno da je biofilm najčešći način života mikroorganizama (Steenackers i sur., 2012). Stanice koje čine biofilm zaštićene su od negativnih utjecaja okoliša, imaju sposobnost disperzije i pokazuju vrlo veliku rezistenciju na djelovanje antibakterijskih čimbenika (Marić i Vraneš, 2007). Bez obzira na to jesu li sastavljeni od jedne ili više mikrobnih vrsta, biofilmovi se razvijaju po obrascima višestaničnog ponašanja (Scheie i Petersen, 2004). Bakterije ih mogu formirati na najrazličitijim površinama – živima i neživima, u vlažnom okolišu, na medicinskoj opremi i živom tkivu, ali i u najekstremnijim prirodnim uvjetima (Plančak i sur., 2015).

Hidrofobnost stanične površine, prisutnost bičeva i fimbrija i proizvodnja EPS-a utječu na brzinu i opseg vezanja mikrobnih stanica (Donlan, 2002). Formiranje biofilma započinje adhezijom mikroorganizama na neku površinu (slika 5). Prijanjanje i posljedično vezivanje mikrobnih stanica za površinu može biti aktivno ili pasivno, ovisno o staničnoj pokretljivosti (Milanov i sur., 2008). Pasivno vezivanje uvjetovano je gravitacijskom silom i difuzijom, dok na aktivno vezivanje utječu osobine stanične površine mikroorganizma, tj. bičevi, pili, proteini, kapsule i površinski naboj (Milanov i sur., 2008). Nakon početnog, reverzibilnog vezivanja stanica za površinu supstrata, slijedi stvaranje stabilne veze posredovane adhezinima na staničnoj stijenki, a potom proliferacija te nakupljanje stanica u višeslojne stanične nakupine uz stvaranje izvanstaničnog polisaharidnog matriksa (EPS-a). Održavanje takve višestanične zajednice bilo bi teško bez postojanja međustanične komunikacije stanica, posredovane malim signalnim molekulama sa sposobnošću difuzije u izvanstanični okoliš. Nakupljanje signalnih molekula u okolišu omogućuje svakoj pojedinoj stanici procjenu stanične gustoće, odnosno ukupnog broja. Ta se pojava naziva detekcija kvoruma (*engl.* quorum sensing, QS). Signalne molekule uključene u QS kod bakterija podijeljene su u 3 razreda: oligopeptidi, autoinduceri i acil homoserin laktoni (Donland, 2002). QS se smatra ključnim procesom u regulaciji ekspresije gena odgovornih za različite fiziološke aktivnosti poput kompeticije, simbioze, kretanja, sporulacije, biolumiscencije, produkcije antimikrobnih peptida, regulacije virulencije, a neki od gena odgovornih za formiranje biofilma također su regulirani QS sistemom (Annous i sur., 2009). Kako QS zavisi od gustoće populacije, on se ne javlja u početnim, već u kasnijim fazama formiranja biofilma.

Maturacija ili sazrijevanje biofilma odvija se u 4 razvojna stadija. Prvi je stadij reverzibilno povezivanje, u kojem se stanice kratkotrajno vežu za supstrat. Drugi stadij, karakterizira ireverzibilno povezivanje, u kojem se stanice čvrsto vežu na površinu supstrata i gube svojstvo pokretljivosti. Treći stadij maturacije karakteristično je stvaranje izvanstaničnog matriksa te povećavanje i višeslojnost mikrokolonija. Mikrokolonije svoju maksimalnu veličinu dosežu u drugom stadiju maturacije. Proces maturacije završava dispezijom u kojoj se između mikrokolonija formiraju vodeni kanalići, a same mikrokolonije mijenjaju svoj oblik, uslijed izdvajanja stanica smještenih u središnjem dijelu mikrokolonija u potrazi za novim i boljim izvorom hranjivih tvari (Marić i Vraneš, 2007) (slika 5).



Slika 5. Faze razvijanja biofilma (prema Milanov i sur., 2008). 1. faza – stadij reverzibilnog vezivanja; 2. faza – stadij ireverzibilnog vezivanja (produkcija EPS); 3. faza –razmnožavanje; 4. faza – sazrijevanje biofilma; 5. faza – odvajanje dijelova biofilma

Stanice bakterija čine tek 15 – 20 % ukupnog volumena biofilma, a ostatak tvori matriks u kojem su kolonije međusobno povezane. Struktura matriksa biofilma uvjetovana je brojnim faktorima uključujući hidrodinamičke uvjete sredine, koncentraciju hranjivih tvari, pokretljivost bakterija i postojanje intracelularne komunikacije (Flemming i Wingender, 2010). Matriks biofilma ima i zaštitnu ulogu, štiti bakterije od isušivanja, biocida, antibiotika, metalnih kationa, UV zračenja i stanica imunološkog odgovora omogućavajući im dugoročno preživljavanje.

Biofilmovi koje mikroorganizmi formiraju na različitim površinama u industrijskim pogonima predstavljaju dugotrajan izvor kontaminacije namirnica, ne samo bakterijama koje izazivaju njihovo kvarenje, već i vrstama koje se prenose hranom: *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *E. coli* i *L. monocytogenes* (Giaouris i sur., 2014; Habimana i sur., 2014). Poznato je da pojedini sojevi patogenih vrsta bakterija u industrijskim pogonima mogu preživjeti tijekom duljeg vremenskog razdoblja (Habimana i sur., 2014). Ovakvi sojevi poznati su kao „kućni sojevi“ (*engl.* house strains), a pretpostavlja se da je egzistencija takvih sojeva omogućena upravo njihovom sposobnošću da formiraju biofilm. Biofilmovi formirani u industrijskim pogonima predstavljaju opasnost za javno zdravlje i mogu uzrokovati velike ekonomske gubitke.

2.6. Transmisijski elektronski mikroskop

Transmisijski elektronski mikroskop uređaj je pomoću kojeg se dobiva uvid u mikrostrukturu uzorka koji se promatra pomoću uskog snopa elektrona (Williams i Carter, 1996). Radi u uvjetima visokog napona, a debljina uzroka ne smije biti veća od 1 μm. Maksimalno povećanje iznosi 100 000x, a maksimalna jačina snopa elektrona iznosi 100 kV (slika 6). Uzorci se mogu pregledavati direktno, ako su dovoljno kontrastni i stabilni ili kao ultratanki prerezi dodatno kontrastirani. Izvor elektronskog snopa elektronski je top koji čini katoda od volframske niti koja zagrijavanjem emitira elektrone. U sastavu mikroskopa nalazi se i Wehneltov cilindar za fokusiranje elektronskoga snopa te anoda s velikom razlikom potencijala prema katodi. Razlika između katone i anode dovodi do snažnog ubrzavanja elektrona te se njihov snop pomoću prve elektronske leće, odnosno kondenzora, usmjerava na uzorak. Prolaskom kroz uzorak elektroni se u susretu s atomima raspršuju razmjerno debljini i gustoći područja na koje nailaze. Preostali, neraspršeni elektroni čine elektronsku sliku uzorka, koja se povećava sustavom elektronskih leća (leća objektiva, međuleća, projektorska leća) (Fultz i Howe, 2012).



Slika 6. Transmisijski elektronski mikroskop (vlastita fotografija)

2.7. Proteomika

Pojam proteom prvi je puta upotrijebljen 1994. godine kako bi se opisao set proteina kodiran genima. Definira se kao grana biologije koja se bavi proučavanjem proteoma, a uključuje identifikaciju, karakterizaciju i kvantifikaciju kompletnog seta proteina koji su kodirani s genomom stanice, uključujući izoforme, polimorfizme, modifikacije, protein-protein interakcije te strukture proteina i kompleksa u kojima se proteini nalaze (Lane, 2005). Kao glavna tehnika identifikacije proteina u posljednje vrijeme postala je spektrometrija masa (*engl.* mass spectrometry, MS) upravo zbog svoje visoke osjetljivosti. Spektrometar masa predstavlja osnovni instrument za analizu i identifikaciju proteina. MS spektrometrija oslanja se na baze podatka koje sadrže informacije o genima i genomima (Eng i sur., 2013). Analize MS spektra omogućavaju proučavanje ukupnog proteoma stanice, usporednu produkciju proteina, lokaliziranje i proučavanje posttranslacijskih modifikacija te protein-protein interakcije (Chandramouli i Qian, 2009).

MS je tehnika koja omogućava da se uz pomoć spektrometra masa analiziraju ioni u plinskoj fazi. MS se u proteomici može primijeniti za analiziranje intaktnih proteina ili peptida nastalih nakon enzimatske digestije. Osnovne komponente svakog spektrometra masa su:

- ionski izvor
- analizator masa
- sustav za detekciju

Analiza proteina spektrometrom masa provodi se u nekoliko koraka:

- ionizacija proteina/peptida – ioni se prevode u plinsku fazu. Ionizacija se provodi pomoću matricom potpomognute ionizacije uz desorpciju laserskim zračenjem (*engl*. matrix assisted laser desorption/ionization, MALDI) i tehnikom elektroraspršenja (*engl*. electrospray ionization, ESI)
- separacija iona na temelju odnosa mase i naboja (engl. mass to charge ratio, m/z)
- detekcija broja iona pri svakoj izmjerenoj vrijednosti m/z

Kako bi se dobio uvid u primarnu strukturu proteina, peptidni fragmenti nastali cijepanjem proteinazama dalje se mogu fragmentirati tehnikama tandemne spektrometrije masa (MS/MS). Korištenjem ionizacijske tehnike MALDI i analizatora masa TOF/TOF, MS/MS provodi se selekcijom iona u prvom analizatoru TOF, a zatim fragmentacijom iona prekursora u kolizijskoj ćeliji. Kombinacijom podataka dobivenih iz MS i MS/MS spektara i njihovom usporedbom s proteinskim bazama podataka identifikacija proteina postala je mnogo točnija.

Razvijeni su različiti računalni programi pomoću kojih se vrši identifikacija proteina, a bazirani su na usporedbi eksperimentalno određenih podataka s podacima pohranjenim u bazama podataka kao što su NCBI, PDB (*engl*. the protein data base) ili UniProt baza podataka. Svaki protein u bazi podataka in silico je pocijepan sa specifičnim enzimom te je izračunata teorijska masa svakog peptida i teorijska masa svih predviđenih fragmentnih iona. Ukoliko dođe do poklapanja eksperimentalno dobivenih masa peptida iz MS spektara s masama u bazi podataka, algoritmi uspoređuju mase fragmentnih iona iz MS/MS spektara s teorijskim podacima u bazi. Na taj način može se potvrditi i sekvenca analiziranih peptida (Cottrell, 2011).

2.8. Definicija plazme

Riječ „*plazma*“ definirana je u grčko vrijeme, a označavala je tvar koja se može oblikovati. Pojam „*plazma*“ kao ionizirani plin 1923. godine prvi je definirao američki kemičar i nobelovac Irving Langmuir.

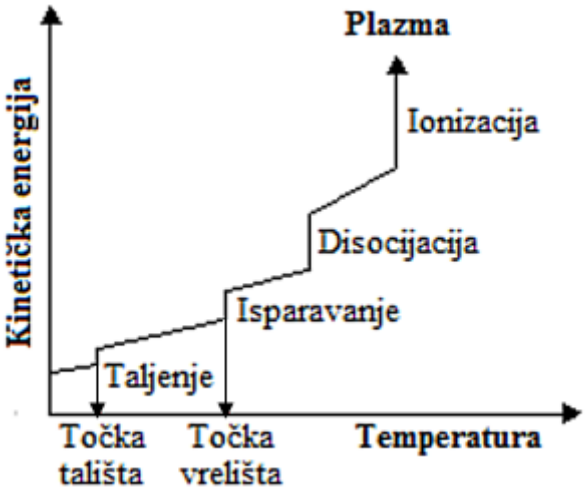
Danas se plazma definirana kao neutralni ionizirani plin koji se sastoji od nabijenih (fotoni, elektroni, pozitivni i negativni ioni, radikali) i neutralnih čestica (atomi i molekule) koje su u međusobnoj interakciji (Moreau i sur., 2008). Kvazineutralni je plin što znači da joj je broj pozitivnih i negativnih nosioca naboja jednak. Upravo zbog slobodnih nosioca naboja dobar je vodič te provodi električnu energiju.

2.8.1. Nastajanje i svojstva plazme

Plazma se definira kao četvrto stanje materije. Povišenjem temperature materija prelazi iz krutog u tekuće, iz tekućeg u plinovito te iz plinovitog u plazma stanje. Kod krutog stanja udaljenost je između čestica jako mala, privlačne sile jake su te čestice titraju oko središnjeg položaja prilikom čega ne napuštaju položaj. Tekuće stanje između čestica definira slabija privlačnost, veća udaljenost između čestica te se čestice slobodno gibaju. Kod plinovitog stanja jako je velika udaljenost između čestica, privlačne su sile slabe, čestice se slobodno gibaju te nemaju uređenu strukturu.

Općenito, da bi došlo do stvaranja plazme, potrebno je atomima i molekulama u plinu osigurati dovod energije iz vanjskog izvora. Električni potencijal i odgovarajuće električno polje uzrokuju privlačenje elektrona prema anodi, dok jezgru atoma privlači katoda. Kako napon raste povećava se naprezanje u atomima, sve do dielektrične granice, kada se pojavljuje iskra i plin postaje ioniziran. Taj proces naziva se ionizacija (slika 7). Dolazi do lavine

ionizacije, sudar elektrona i neutralnog atoma stvara nove elektrone i pozitivno nabijene ione (Fridman, 2008). Uz ionizaciju, dolazi i do reakcija disocijacije, ekscitacije, rekombinacije i dr. Dakle, elektronska lavina proces je u kojem se broj slobodnih elektrona u mediju u kojem se prenose podvrgava jakom električnom polju prilikom čega dolazi do sudara elektrona s atomima. Oslobađaju se dodatni elektroni koji se ubrzavaju i sudaraju s drugim atomima čime dolazi do lančane reakcije. Lavina elektrona intenzivira formiranje fotoelektrona kao rezultat UV zračenja koje se emitira pobuđenim atomima. Nastanak plazme očituje se vidljivim sjajem, a boja plazme karakteristična je za primijenjeni plin (Hamerli, 2004).



Slika 7. Shematski prikaz prijelaza stanja materije (prema Harmeli, 2004)

Energiju plinu možemo dovoditi toplinom, ali i pomoću elektromagnetskog i čestičnog zračenja, no u praksi je najčešće korištena metoda pomoću električnih izboja (Akiyama, 2000). Električno polje prenosi energiju na elektrone, a oni svoju energiju prenose na neutralne čestice putem sudara. Ti sudari mogu biti elastični i neelastični (Braithwaite, 2000). Elastični sudari su sudari čestica kod kojih ne dolazi do promjene unutarnje energije sudarajućih čestica, a sačuvana je i ukupna kinetička energija. Znači, prilikom takvih sudara dolazi samo do raspršenja bez promjene energije. Elastični sudari ne mijenjaju kemijski sastav ili pobuđenja atoma. Kod neelastičnih sudara prilikom sudaranja čestica dolazi do prijenosa kinetičke energije u unutrašnju energiju. Primjeri mogućih reakcija elektrona, iona i neutralnih čestica prilikom neelastičnih sudara dani su u tablici 3.

Tablica 3. Primjeri mogućih reakcija elektrona, iona i neutralnih čestica u plazma fazi (prema Braithwaite, 2000)

Reakcije elektrona:	
Ionizacija:	$e^- + X - X \rightarrow X - X^+ + 2e^-$
	$e^- + X \rightarrow X^+ + 2e^-$
Disocijacija:	$e^- + X - X \rightarrow 2X + e^-$
Rekombinacija:	$e^- + X^+ \rightarrow X$
	$e^- + X - X^+ \rightarrow X - X$
Pridruživanje:	$e^- + X - X \rightarrow X - X^-$
	$e^{\mp} + X \rightarrow X^-$
Reakcije iona:	
Prijenos naboja:	$X^+ + X - X \rightarrow X - X^- + X$
	$X - X^+ + X \rightarrow X - X + X^+$
Odcjepljenje:	$X^- + X \rightarrow X - X + e^-$
	$X^- + X - X \rightarrow X + X - X + e^-$
Ion-ion rekombinacija:	$X^- + X^+ \rightarrow X - X$
	$X^- + X - X^+ \rightarrow X - X + X$

Jedno od najvažnijih obilježja plazme električna je neutralnost, tj. ravnoteža između pozitivno i negativno nabijenih iona. Plazme je moguće opisati pomoću tri osnovna parametra:

- temperature čestica koja se obično mjeri u elektronvoltima (1 eV = 11605 K)
- gustoće čestica (broj čestica po kubičnom metru)
- jačine stacionarnog magnetskog polja (Tesla) (Bellan, 2008)

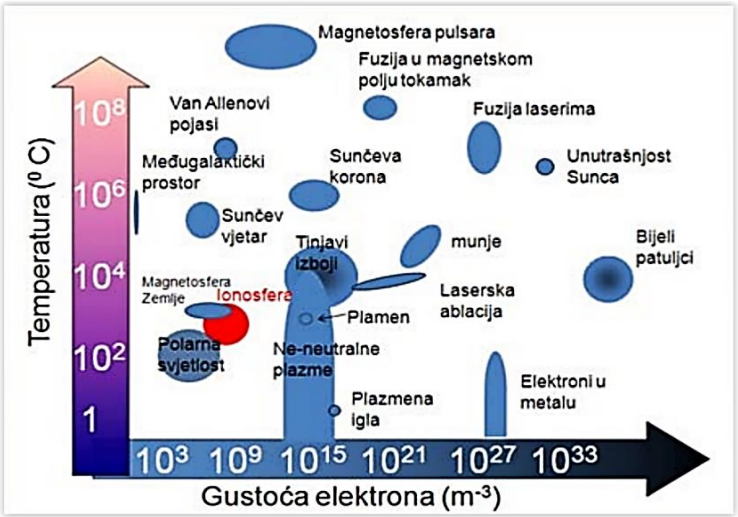
Kako bi se sačuvala neutralnost, elektroni se u plazmi zbog svog visokog omjera mase i naboja raspodjeljuju kako bi se očuvala tzv. kvazineutralnost. Taj efekt se naziva Debyev-ovo zasjenjenje. Definira se λ_D duljinom koja predstavlja udaljenost izvan koje su naboji zasjenjeni

(Braithwaite, 2000). U plazmi dobivenoj električnim pražnjenjem elektronske temperature od 1 eV i gustoće elektrona od 10^{16} m^{-3} Deby-eva duljina iznosi oko 0.1 mm (Bryant, 1996).

2.8.2. Klasifikacija plazmi

Oblici i vrste plazmi brojne su zbog čega se plazme mogu klasificirati prema više kriterija:

- energiji i gustoći nabijenih čestica (slika 8)
- temperaturi te tlaku plina pri kojem nastaje plazma (Tendero i sur., 2006)



Slika 8. Vrste plazmi s obzirom na temperaturu i gustoću elektrona (prema Milošević, 2007)

Prema temperaturi pri kojoj se primjenjuju, plazme se dijele na hladne (engl. *cold plasma*) i vruće (engl. *hot plasma*). Karakteristika vruće plazme koja je obično iznad 6000 °C (Schlüter i sur., 2013) stanje je termodinamičke ravnoteže, a to znači da je temperatura svih čestica (iona, elektrona i neutralnih čestica) u plazmi jednaka. Također se koristi i izraz lokalna termodinamička ravnoteža (eng. *LTE – local thermodynamic equilibrium*) što označava da je temperatura svih čestica jednaka samo u nekim dijelovima plazme.

Hladnu plazmu karakterizira temperatura elektrona koja je mnogo viša od temperature iona i neutralnih čestica pa se naziva i netermalna, odnosno neravnotežna plazma (eng. *non-local thermodynamic equilibrium plasma*). Temperatura hladnih plazmi približno je jednaka sobnoj temperaturi ili nešto malo viša. Teže čestice ostaju na sobnoj temperaturi, iako temperatura

elektrona može iznositi i nekoliko desetaka tisuća Celzijusa (Laroussi i Lu, 2005). Do povišenja temperature dolazi zbog već navedenih elastičnih i neelastičnih sudara (Inagaki, 2014). Tijekom generiranja plazma izboja frekvencija titraja uzorkuje i veću snagu izboja te se energija prenosi na medij koji ju okružuje te posljedično dolazi do zagrijavanja /1/.

$$P = \frac{1}{2} x C x U^2 x f \qquad /1/$$

S obzirom na radni tlak plina, plazme možemo podijeliti u dvije skupine: niskotlačne i atmosferske (Rahman i sur., 2014). U niskotlačnoj plazmi, zbog male gustoće, srednji slobodni put čestica kratak je i sukladno tome frekvencija je sudara niska. Stoga elektroni zadržavaju visoku temperaturu dok teže čestice ostaju hladne pa je niskotlačna plazma u pravilu uvijek i netermalna. U atmosferskoj plazmi srednji slobodni put čestica puno je kraći, frekvencija je sudara visoka i može se postići termodinamička ravnoteža.

Atmosferska plazma dijeli se na termalnu i netermalnu. Prilikom generiranja atmosferske plazme nije potrebno generirati vakuum, no pri višim tlakovima potreban je veći napon za ionizaciju plina što stvara rizik od izbijanja električnih lukova između elektroda. Termalna atmosferska plazma koristi se za varenje, rezanje, spaljivanje otpada, obradu metala i legura. Koristi se u obliku plazmenih baklji koje se generiraju na temperaturi do 15000 °C (Tendero i sur., 2006).

2.8.3. Vrste pražnjenja laboratorijskih plazmi

U laboratorijskim uvjetima plazmu je moguće generirati na 3 načina:

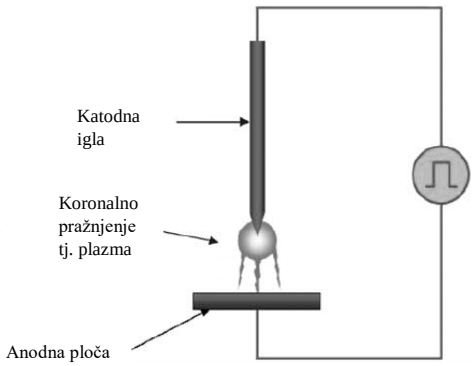
- pražnjenja istosmjerne struje i niskih frekvencija
- radio-frekventna plazma
- mikrovalno inducirana plazma

2.8.3.1. Pražnjenja istosmjerne struje i niskih frekvencija

Pražnjenja istosmjerne struje mogu biti kontinuirana i pulsirajuća. Kod kontinuiranog načina rada plazma može biti u dva oblika: lukovi (*engl.* arc) i pražnjenja plasma jet-om. Što se tiče pulsirajućeg načina rada, ono obuhvaća koronalno pražnjenje (*engl.* corona discharge) i pražnjenje uz izolatorske pregrade (*engl.* dielectric barrier discharge – DBD).

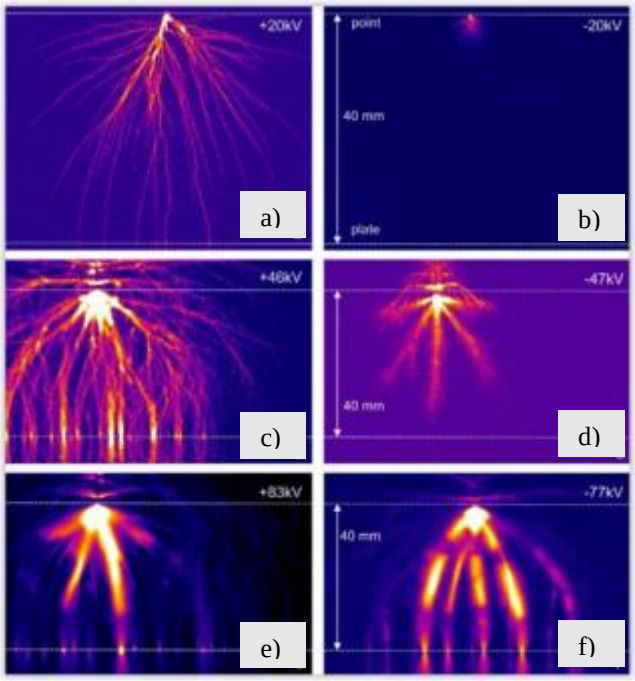
2.8.3.1.1. Koronalno pražnjenje

Koronalno pražnjenje neravnotežno je pražnjenje s niskom gustoćom struje. Uređaj, vidljiv na slici 9, sastoji se od katodne igle i anodne ploče, dok je izvor napajanja istosmjerni pulsirajući. Plazma stvara svjetleću krunu oko igle i upravo iz tog razloga i posjeduje naziv koronalno. Ovisno o polarnosti igle, korona može biti negativna i pozitivna.



Slika 9. Princip koronalnog pražnjenja (prema Tendera i sur., 2006)

Kod primjene negativnog visokog napona na iglu dobiva se negativno koronalno pražnjenje. Tada se pozitivni ioni ubrzavaju prema igli gdje se zatim sekundarni elektroni emitiraju i ubrzavaju u plazmu: ta pokretna fronta visoko-energetskih elektrona (oko 10 eV) iza koje se nalaze i nisko-energetski elektroni (oko 1 eV) naziva se strimer, tj. električni izboj. Nakon toga dolazi do neelastične kolizije između visoko-energetskih elektrona i teških čestica koje izazivaju stvaranje kemijski reaktivnih vrsta. Postoji i pozitivna korona: pozitivno polarizirana igla koja se ponaša kao anoda. Kod pozitivne korone elektroni se kreću u suprotnom smjeru, prema elektrodi, a pozitivni ioni prema plazmi. Pozitivni izboji imaju veći domet i promjer uspoređeno s negativnim izbojima (slika 10).



Slika 10. Usporedni prikaz pozitivnih (a, c, e) i negativnih (b, d, f) izboja pri različitim naponima i atmosferskom tlaku (Briels i sur., 2008)

Glavni je nedostatak korone mala veličina tretirane površine. Kako bi se povećala površina kod površinskog tretiranja, katodna igla može se zamijeniti ravnom elektrodom koja je paralelna s tretiranom površinom: taj sustav stvara mikro izboje koji su okomiti na područje između elektroda. Izboji se uvijek stvaraju na istom mjestu, što uzrokuje nehomogeno tretiranje na površini materijala. Kako bi se izbjegao ovaj problem, razvijeno je pražnjenje preko izolatorske ploče (Tendero i sur., 2006).

Korona pražnjenje dovodi do generiranja UV svjetla, radijacije, kavitacije, stvaranja ozona, mehaničke erozije površina kao posljedice bombardiranja ionima i razvoja topline (Bartnikas i McMahon, 1979; Dobrynin i sur., 2011).

2.8.3.1.2. Pražnjenje preko izolatorske pregrade (DBD)

Najpopularniji izvori hladne atmosferske plazme baziraju se na pražnjenju preko izolatorske pregrade. Izolatorska pregrada na jednoj ili dvije elektrode može potisnuti i u kombinaciji s visokom frekvencijom struje, spriječiti stvaranje izboja pri čemu je jedna od elektroda prekrivena dielektričnim slojem. Postoji veliki broj različitih konstrukcija, elektroda, oblika te izolatorskih pregrada koje se koriste prilikom stvaranja ovakve plazme za različite primjene.

Kod svih DBD sustava, akumulirani površinski naboji na dielektričnoj barijeri moraju biti neutralizirani npr. pomoću bipolarne pulsirajuće istosmjerne struje u statičnom ili pokretnom režimu plina (Fridman, 2008).

2.8.3.1.3. Radio-frekventna, RF plazma

RF izvori plazme mogu raditi sa strujom visoke ili niske snage. To utječe na svojstva plazme, a samim time i na njenu potencijalnu primjenu. U RF plazme s pražnjenjem visoke snage spadaju: induktivno spregnuta plazma, tj. ICP te IST sistem (Tendero i sur., 2006).

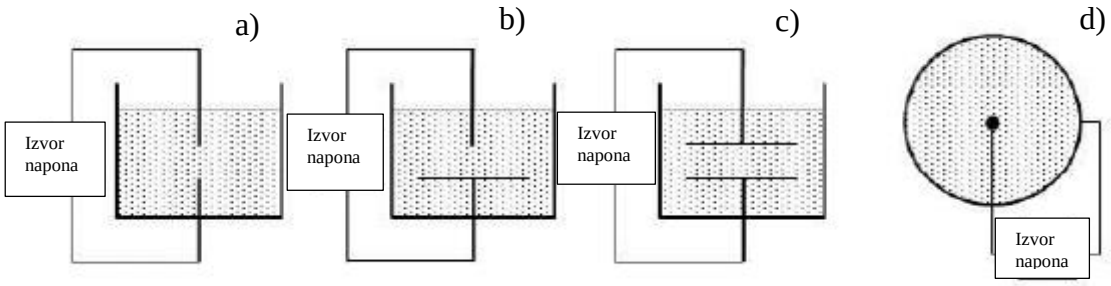
2.8.3.1.4. Mikrovalna pražnjenja

Sve plazme koje su stvorene injektiranjem mikrovalne snage, tj. elektromagnetske radijacije u rasponu frekvencije od 300 MHz do 10 GHz, u principu se mogu zvati mikrovalno inducirane plazme (*engl.* microwave induced plasmas, MIPs). U mikrovalna pražnjenja svrstava se nekoliko tipova plazmi koji mogu raditi pri širokom rasponu parametara, tj. tlaku manje od 0,1 pa do nekoliko atmosfera, snage između nekoliko W i nekoliko stotina kW i to se sve može održati i u atmosferi plemenitih i molekularnih plinova (Bogaerts i sur., 2002).

2.9. Visokonaponsko pražnjenje u tekućinama

Posljednjih nekoliko godina sve se više istražuju visokonaponska pražnjenja u tekućinama i to prvenstveno za inaktivaciju mikroorganizama, obradu otpadnih voda, kemijske sinteze i razgradnje te biomedicinska istraživanja (Misra i sur., 2011; Niemira, 2012). Jedna od glavnih razlika između generiranja plazme u plinovitoj ili tekućoj fazi je taj što su tekućine puno gušći medij te je nemoguće postići akceleraciju elektrona kao u plinovima. Kako molekule u tekućinama imaju puno viši ionizacijski potencijal potrebno je uložiti puno više energije da bi se uklonio elektron. Parametri koji utječu na električna pražnjenja u tekućinama su: udaljenost elektroda, električna vodljivost tekućine i hidrostatski tlak.

- Udaljenost elektroda - postoji nekoliko različitih konfiguracija elektroda koje se primjenjuju za stvaranje električnog pražnjenja u tekućinama, a to su točka-na-točku, točka-na-ploču, ploča-na-ploču te žičani cilindar geometrije koje možemo vidjeti na slici 11.



Slika 11. Osnovne konfiguracije elektroda: a) točka-na-točku, b) točka-na-ploču, c) ploča na ploču, d) žičani cilidar (Gasanova, 2013)

Najčešće upotrebljavana konfiguracija za stvaranje električnog pražnjenja kroz direktnu ionizaciju tekućina visoko je asimetrična geometrija točka-na-ploču. Tako stvoreni električni izboj klasično je koronalno pražnjenje. U ovoj konfiguraciji točka se uobičajeno koristi kao visokonaponska elektroda pomoću koje se događa pražnjenje u tekućoj fazi. Početak električnog pražnjenja kod ove konfiguracije određen je amplitudom primijenjenog naponskog pulsa te polumjerom zakrivljenosti vrha. Ograničenje je ove metode trajnost vrha elektrode koji je kratak zbog njenog razaranja tijekom pražnjenja. Električno pražnjenje dobiveno na ovaj način zauzima malu površinu tretiranog medija (Gasanova, 2013).

- Električna vodljivost tekućine - povećanjem električne provodljivosti vode smanjuje se napon potreban za inicijaciju izboja (Malik, 2001). U deioniziranoj vodi izboji su relativno slabi (Malik, 2001). Povišenje provodljivosti u rasponu od 10 do 80 μS cm^{-1} rezultira u jačim i dužim izbojima, višoj struji, a samim time i povećanom stvaranju kemijskih aktivnih spojeva i intenzivnijem UV zračenju (Vukušić, 2016). Pri vrijednostima provodljivosti iznad 5 mS cm^{-1} izboji su kraći od 1 mm i stvaraju se jaki akustični valovi (Lukeš i sur., 2006) pri čemu dolazi do smanjenog generiranja kemijskih aktivnih spojeva i UV zračenja.

- Hidrostatski tlak – ima jako veliki utjecaj na veličinu i gustoću izboja. Povećanjem hidrostatskog tlaka veličina i gustoća izboja opada (Beroual i Kebbabi , 2009). Također, povećanje tlaka može uzrokovati i izostanak izboja (Akiyama, 2000). Povišenjem tlaka

dolazi do blagog povećanja napona što se objašnjava smanjenjem slobodnog puta elektrona pri višim tlakovima što uzrokuje smanjenje kinetičke energije elektrona.

2.9.1. Mehanizam nastajanja izboja u tekućinama

Postoje dvije teorije mehanizma nastajanja izboja u tekućinama (Joshi i sur., 2009):

- teorija mjehurića
- teorija direktne ionizacije

Kod teorije mjehurića pražnjenje uključuje i plinovitu i tekuću fazu (inicijacija električnog pražnjenja događa se u plinskoj fazi s daljnjim širenjem u tekuću fazu). Početak raspada veže se uz postojanje ili stvaranje lokaliziranih regija male gustoće i mikro mjehurića. Nakon nukleacije mikro mjehurića, dolazi do početka električnog raspada u plinskoj fazi. Elektroni su zatim ubačeni u mjehuriće lokalizirane blizu površine elektrode i ubrzani od električnog polja. Kada izboj dosegne zid mjehurića (dodirna površina između mjehurića i tekućine), električna se struja povećava te se naboji deponiraju na zid mjehurića. Mehanizam narednog širenja može se objasniti konstantnim stvaranjem plinovite šupljine oko kanala (izboja) pražnjenja u kojem nastaju valovi elektrona. Važno je napomenuti da je stvaranje mjehurića jedino moguće kod dugih naponskih pulseva (> 1 μs).

Kod teorije direktne ionizacije u tekućini, pretpostavlja se da do raspada uzrokovanog električnim pražnjenjem, dolazi bez prisutnosti mjehurića plina, ali preko direktne ionizacije molekula i atoma u tekućini. Postoje dva snažna argumenta protiv ove teorije. Prvi je činjenica da je stvaranje elektron valova u tekućini gotovo zanemarivo zbog velikog raspršivanja elektrona čime se onemogućuje da elektroni postignu visoku kinetičku energiju u mediju kao što je voda. Drugi je argument nemogućnost postojanja slobodnih elektrona u tekućini. No Dobrynin i sur. (2011) među prvima su ukazali na uspješnu ionizaciju tekućina, tj. vode direktnom elektron kolizijskom ionizacijom. Za realizaciju ovog mehanizma koristili su kratke naponske pulseve i igličnu visokonaponsku elektrodu.

2.9.2. Fizikalno-kemijski procesi tijekom plazma tretmana u tekućoj i plinskoj fazi

Stvaranje električnog pražnjenja ispod površine vode dovodi do stvaranja različitih fizikalnih i kemijskih procesa, a važnu ulogu imaju toplinski efekti i emisija UV i vidljivog svjetla.

Što se tiče fizikalnih procesa, električna su pražnjenja izvor intenzivne UV radijacije koja dovodi do različitih fotokemijskih reakcija. Ona dovodi ili do direktne fotolize organskih komponenata ili do formiranja visoko reaktivnih vrsta. Što je veća snaga plazme povećava se UV radijacija (Niemira, 2012). Kod fizikalnih efekata važno je da prilikom generiranja plazme ne dolazi do značanijeg zagrijavanja ukupnog volumena tekućine koja se tretira. Temperatura kanala pražnjenja uglavnom je visoka, no cijela se otopina ne zagrijava na visoke temperature već zadržava sobnu temperaturu.

Fotoliza organskih komponenata moguća je, no kako su toplinske regije vrlo malog volumena, efikasnost je toplinske dekompozicije mala. Najveći je doprinos ovakvog termalnog efekta u toplinskoj disocijaciji molekula vode uz stvaranje primarnih reaktivnih vrsta. Električnim pražnjenjima u tekućini također može doći do stvaranja visokoamplitudnih ultrazvučnih valova koji dovode do stvaranja šok valova u okolnoj tekućoj fazi (Kirkpatrick i Locke, 2005).

Upravo je visoka kemijska efikasnost glavna prednost električnih pražnjenja ispod površine tekućine. Elektroni bogati energijom uz protone bogate energijom pokreću brojne kemijske procese. Većina eksperimentalnih podataka pokazuje da električni raspad u vodenom mjehuriću dovodi do stvaranja vrsta kao što su hidroksil, hidrogen i kisikovi radikali vidljivo iz izraza /2/, /3/ i /4/. Disocijacija vode djelovanjem neelastičnog elektron sudara smatra se glavnim mehanizmom stvaranja radikala. Primarne su vrste visoko reaktivne, ali kratkog života stoga je za njihovo promatranje potrebno koristiti emisijsku spektroskopiju, visokosenzitivnu i brzu tehniku. Reakcije inicijacije započinju disocijacijom i ionizacijom molekula vode zbog sudara s visokoenergetskim elektronima (e^{-*}) prema sljedećem mehanizmu (Kozáková, 2011):

$$H_2O + e^{-*} \rightarrow OH\cdot + H\cdot + e^- \qquad /2/$$

$$H_2O + e^{-*} \rightarrow \cdot H_2O^+ + 2\ e^- \qquad /3/$$

$$\cdot H_2O^+ + H_2O \rightarrow H_3O^+ + OH\cdot \qquad /4/$$

Nakon raspada mjehurića dolazi do stvaranja raznih vrsta u zoni koja okružuje kanale pražnjenja. Te vrste uključuju vodikov peroksid (H_2O_2), ozon (O_3), molekularni kisik (O_2), hidrogen ion ($H^{\cdot}$) itd. koje karakterizira veća stabilnost od reaktivnih radikala.

$$H\cdot + H\cdot \rightarrow H_2 \qquad /5/$$

$$OH\cdot + OH\cdot \rightarrow H_2O_2 \qquad /6/$$

$$H\cdot + OH\cdot \rightarrow H_2O \qquad /7/$$

Dvije sumarne reakcije koje se odvijaju istodobno prikazuju nastajanje glavnih produkata kao što su hidroksilni i vodikov radikal, vodikov peroksid i vodik:

$$H_2O \rightarrow OH\cdot + H\cdot \qquad /8/$$

$$2\ H_2O \rightarrow H_2O_2 + H_2 \qquad /9/$$

Kada se medij tretira s plazmom koja se stvara iznad razine tekućine govorimo o plazmi stvorenoj u plinskoj fazi. Energija je elektrona u plinskoj fazi oko 1-10 eV za razliku od elektrona u tekućoj fazi koja iznosi nekoliko kilo do mega volti (Lukeš i sur., 2006). Optičkom emisijskom spektroskopijom u plinskoj fazi dokazani su $H\cdot$, $O\cdot$ i $OH\cdot$ radikali, H_2O_2, ali i molekula ozona koja kao jaki oksidirajući agens ima inaktivacijski učinak na mikroorganizme. Tijekom plazma izboja u plinskoj fazi dolazi do stvaranja i dušikovih radikala (Lukeš i sur., 2006).

2.10. Optička emisijska spektroskopija

Kako bi se utvrdili generirani radikali i molekule tijekom plazma pražnjenja koristi se optička emisijska spektroskopija. Optička emisijska spektroskopija metoda je mjerenja koja se temelji na činjenici da neki kvantni sustav prelaskom iz jedno u drugo kvantno stanje mijenja energiju. Ukoliko se radi o prelasku energije iz višeg u niže energetsko stanje, višak energije oslobađa se u obliku elektromagnetskog zračenja, tj. fotona. Ukoliko se radi o obratnom slučaju prelaska iz nižeg u više stanje, energija se apsorbira u obliku fotona. Prednost metode mogućnost je dobivanja energetskih stanja i procesa generirane plazme bez dodira detektora s plazmom. Intezitet emitiranog ili apsorbiranog zračenja ovisi o električnom dipolnom momentu atomskog sustava i valnim funkcijama početnog i konačnog stanja (Sarani i sur., 2010).

Općenito se elektronski prijelazi, u atomima i molekulama mogu podijeliti na tri vrste:

- vezano-vezani
- slobodno-vezani
- slobodno-slobodni

Za vezano-vezane prijelaze karakterističan je linijski spektar, tj. zračenje se sastoji od diskretnih linija. U slučaju kad prijelaz uključuje slobodna stanja, dobiveni spektar više neće biti linijski nego se javlja kontinuum. To se može objasniti na sljedeći način. Pri prolasku pokraj iona slobodni elektron biva uhvaćen u neko od njegovih vezanih stanja te pritom višak energije elektrona odlazi u obliku fotona. S obzirom na to da početna energija slobodnog elektrona može biti proizvoljna, razlika energija početnog i konačnog stanja, a time i energija fotona, također može biti proizvoljna. Ovaj se proces još naziva i radijativna elektronsko ionska rekombinacija, proces suprotan od fotoionizacije. Također, elektron može biti uhvaćen i od neutrona te pri tome nastaje negativno nabijeni ion. U slučaju kada su i početno i konačno stanje elektrona u kontinuumu, govorimo o slobodno-slobodnim prijelazima. Slobodni elektron pri prolasku kroz kulonsko polje iona ili u interakciji s neutronom gubi dio svoje energije u obliku zračenja te čini kontinuum u infracrvenom području. To zračenje naziva se zakočno zračenje (prema njem. *Bremsstralung*) (De Giacomo, 2003).

2.11. Primjena plazme u prehrambenoj industriji

Hladna plazma već se nekoliko desetljeća istražuje kao metoda za dekontaminaciju prehrambenih proizvoda koji se nalaze u čvrstom stanju (meso, voće i povrće, riba, začini, sjemenke) (Misra i sur., 2011; Thirumdas i sur., 2015). Učinkovitu primjenu pronašla je u tehnologiji i industriji polimera, računalnoj industriji pri proizvodnji mikročipova, u području dermatologije, stomatologije, biomedicine, zrakoplovstva i automobilske industrije. Također se uspješno primjenjuje za površinsku sterilizaciju ambalažnih materijala, ali i za njihovu funkcionalnu modifikaciju kako bi imala željena svojstva. U posljednje vrijeme sve se više istražuje i učinak hladne plazme na inaktivaciju mikroorganizama u tekućem mediju (voda, voćni sokovi, otpadna voda) (Shi i sur., 2011; Surowsky i sur., 2014). Zadnjih nekoliko godina sakupio se niz podataka o utjecaju netermalne plazme na inaktivaciju mikroorganizama prilikom tretmana sirovih i sušenih proizvoda, redukciji biofilmova, površinskoj dekontaminaciji jaja, sterilizaciji ambalažnog materijala i tretmanu otpadne vode (Misra i sur., 2011; Perni i sur., 2008; Rowan i sur., 2007).

Tretman plazmom može efektivno inaktivirati širok spektar mikroorganizama, uključujući spore (Patil i sur., 2014). Prema Patil i sur. (2014) hladna plazma učinkovita je u primjeni površinske sterilizacije i dezinfekcije pri čemu ima utjecaj na vegetativne stanice i spore u kratkom vremenu. Uspješno se primjenjuje na svježim namirnicama s ciljem produljenja svježine i skladištenja. Primjeri su tretiranje sirovog mlijeka kontaminiranog s *E. coli* u vremenu od 3 minute nakon čega je dokazana njena redukcija od čak 54% (Gurol i sur., 2012). Primjenom hladne plazme na svježim jagodama uočeno je smanjenje prisutnosti kvasaca i plijesni za 44 do 95% i mezofilnih bakterija za 12-85% (Misra i sur., 2014). Utjecaj plazme na mikroorganizme temelji se na činjenici da nastali slobodni radikali i ioni direktno oštećuju DNA i RNA. Tijekom tretmana plazmom stvaraju se superoksidni anioni, hidroksil radikali i vodikov peroksid koji stupaju u reakcije s nukleinskim bazama u lancima DNA pri čemu dolazi do njihove oksidacije, što posljedično vodi do destrukcije staničnih membrana i ostalih komponenata (Misra i sur. 2011).

Fizikalno-kemijski učinci plazme imaju učinka i na procese ekstrakcije. Roselló-Soto i sur. (2015) u svom su radu istraživali utjecaj hladne plazme, pulsirajućeg električnog polja i ultrazvuka na ekstrakciju bioaktivnih komponenti iz koštica masline. Tretman hladnom plazmom pokazao se učinkovitijim od navedena poreostala dva tretmana. Tijekom tretmana hladnom plazmom uložena je manja energija i kraće vrijeme tretiranja kako bi se ekstrahirali fenolni spojevi i proteini.

Važno je reći da ne postoje standardizirane metode za tretiranje plazmom. Veličina i oblik reaktora, procesni uvjeti, radni plin, volumen, oblik i tekstura uzoraka variraju od studije do studije. Svaki od tih uvjeta mogu značajno utjecati na konačan rezultat te je stoga često teško donositi konačne zaključke o djelotvornosti plazme. Hladna plazma definitivno ima potencijala za primjenu pri inaktivaciji mikroorganizama, ali isto je tako potrebno istražiti dolazi li nakon plazma tretmana do revitalizacije stanice te shodno tome dizajnirati optimalni reaktor kako bi se spriječio mogući oporavak stanica.

3. MATERIJAL I METODE

U ovom radu ispitivan je utjecaj hladne plazme na:

- fizikalno-kemijske parametre: pH, električnu provodljivost, temperaturu i generirane slobodne radikale
- inaktivaciju stanica mikroorganizama: *Escherichia coli* MG 1655 K-12, *Salmonella enterica* serotip Typhimurium LT21, *Listeria innocua* ATCC 33091, *Staphylococcus aureus* 3048, *Bacillus cereus* 30, *Rhodotorula* spp 74, *Saccahromyces cerevisiae* ATCC 204508
- revitalizaciju stanica nakon tretmana
- istjecanje unutar staničnog sadržaja
- dezintegraciju membrane analizirane transmisijskim elektronskim mikroskopom
- stvaranje biofilma
- razlikovno producirane proteine

Centralno kompozitni plan upotrijebljen je za dizajniranje eksperimenta. Tretmani su provedeni s dva tipa plazme, plazmom generiranom u plinskoj fazi i tekućinskom plazmom u mjehurićima pri pozitivnom polaritetu i radnim plinovima, argonom i zrakom. Provedena su istraživanja utjecaja različite konfiguracije reaktora na zadane fizikalno-kemijske parametre, inaktivaciju i revitalizaciju stanica i istjecanje staničnih makromolekula DNA i proteina. Također je provedeno snimanje stanica transmisijskim elektronskim mikroskopom (*E. coli*, *L. innocua* i *S. cerevisiae*) kako bi se utvrdilo dolazi li do propusnosti stanične membrane i istjecanja staničnih makromolekula. Analize stvaranja biofilma provedene su prije i nakon tretmana. Odabrani mikroorganizmi: *E. coli*, *L. innocua* i *S. cerevisiae* podvrgnuti su proteomskim analizama kako bi se utvrdila razlika u ekspresiji proteina prije i nakon tretmana, nakon revitalizacije stanica i trostrukog tretmana istog uzorka stanica.

Pomoću centralno kompozitnog plana, odnosno polinoma optimizacije dobiveni su optimalni uvjeti tretmana za izlazne varijable: inaktivaciju stanica i istjecanje unutar staničnog sadržaja pri 260 i 280 nm.

3.1. Materijal

3.1.1. Kemikalije za uzgoj stanica

- agar, *Biolife*, Italija
- agar Listeria Ottaviani & Agosti-ALOA agar, *Biolife*, Italija
- baird parker agar, *Biolif*e, Italija
- fraiser bujon, *Biolife*, Italija
- glicerol, *Gram-mol*, Hrvatska
- kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) p.a., *Kemika*, Hrvatska
- kalijev klorid (KCl) p.a., *Kemika*, Hrvatska
- ksiloza lizin deoksikolat-XLD agar, *Biolife*, Italija
- malt ekstrakt bujon, *Biolife*, Italija
- natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) p.a., *Kemika*, Hrvatska
- natrijev klorid (NaCl) p.a., *Kemika*, Hrvatska
- natrijev nitrat 0,01 M, *Kemika*, Hrvatska
- hranjivi bujon, *Biolife*, Italija
- puferirana peptonska voda, *Biolife*, Italija

3.1.2. Kemikalije za analizu vodikova peroksida

- sumporna kiselina, *Kemika*, Hrvatska
- titanij prah, *Sigma-Aldrich*, SAD

3.1.3. Kemikalije za analizu biofilma

- kristal violet, *Sigma-Aldrich*, Njemačka
- 99% metanol, *Kemika*, Hrvatska
- octena kiselina, *Kemika*, Hrvatska

3.1.4. Kemikalije za transmisijsko elektronsko mikroskopiranje

- aceton, *Merck*, Njemačka
- apsolutni etanol, *Kemika*, Hrvatska
- 96% etanol, *Kemika*, Hrvatska
- glutaraldehid, *Sigma-Aldrich*, SAD
- natrij kakodilat, *Sigma-Aldrich*, SAD
- olovni citrat, *Sigma-Aldrich*, SAD
- osmij-tetroksid, *Sigma-Aldrich*, SAD
- spurr resin - smola, *Sigma-Aldrich*, SAD
- uranil acetat, *Sigma-Aldrich*, SAD

3.1.5. Kemikalije za analizu proteoma

- aceton, *Merck*, Njemačka
- acetonitril, *Merck*, Njemačka
- amonijev dihidrogen fosfat ($NH_4H_2PO_4$), *Sigma-Aldrich*, SAD
- amonijev hidrogen karbonat (NH_4HCO_3), *Sigma-Aldrich*, SAD
- albumin goveđeg seruma (BSA), *Sigma-Aldrich*, SAD
- α-cijano-4-hidroksi-cimetna kiselina (CHCA), *Sigma-Aldrich*, SAD
- coomassie brilliant plavo R, *Sigma-Aldrich*, SAD
- etanol, *Merck*, Njemačka
- fosfatna kiselina, *Merck*, Njemačka
- kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) p.a., *Kemika*, Hrvatska
- kalijev klorid (KCl) p.a., *Kemika*, Hrvatska
- natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) p.a., *Kemika*, Hrvatska
- natrijev klorid (NaCl) p.a., *Kemika*, Hrvatska
- mili-Q voda, 18 mΩ*cm
- mravlja kiselina, *Merck*, Njemačka
- Pierce™ Mass Spec Sample Prep Kit for Cultured Cells, *Thermo scientific*, SAD
- ProteoMAss MALDI Calibration kit, *Sigma*, Njemačka
- trifluoroctena kiselina (TFA), *Merck*, Njemačka

- tripsin, *Merck*, Njemačka

3.1.6. Laboratorijska oprema

- *Acquity UPLC column BEH300 C18, 100 µm x 100 mm, Waters,* SAD
- kvarcne leće
- analitička vaga, *Sartorius*, Velika Britanija
- autoklav, *INKO Lab d.o.o.*, Hrvatska
- centrifuga Centric 150, *Tehtnica*, Slovenija
- centrifuga Rotina 380R, *Hettich*, Njemačka
- ESI-qTPF SYNAPT G2-Si, *Waters*, SAD
- *2G-V/M Trap 5 µm Symmetry C18, 180 µm x 20 mm, Waters,* SAD
- infracrveni termometar PCE-777, *PCE Instruments*, Velika Britanija
- laminar s UV-lampom (30 W), *Klimaoprema*, Hrvatska
- magnetska miješalica MM-540, *Tehtnica*, Slovenija
- MALDI pločica, *Applied Biosystems*, SAD
- mjerač protoka, *Messer*, Njemačka
- mjerač frekvencija, *Eaton electric*, Kanada
- motor za plazma uređaj Techtop, *Techtop*, SAD
- NanoAcquity UPLC system, *Waters*, SAD
- NanoDrop One/Onec, UV-Vis Spectrophotometer, *Thermo Scientific*, SAD
- naponska sonda Tektronix P6015A, *Tektronix*, SAD
- osciloskop Hantek DS05202BM, *Hantek*, Kina
- peristaltička pumpa SP311, *VELP Scientifica*, Italija
- pH metar i koduktometar pH 340i/SET, *WTW*, Njemačka
- 30 kV pulsni visokonaponski generator, *Spellman*, Velika Britanija
- spektrometar Avantes AvaSpec 3648, *Avantes*, Nizozemska
- spektrofotometar SECOMAM UviLine 9400 Spectrophotometer, *Secomam Groupe Aqualabo*, Francuska
- stolna miješalica SA8, *Stuart*, SAD
- sustav za pročišćavanje vode, Synergy® UV Water Purification System, *Merck*, Njemačka

- tehnička vaga, *Sartorius,* Velika Britanija
- termostat, *Istrumentaria,* Hrvatska
- transmisijski elektronski mikroskop Zeiss EM10, *Zeiss*, Njemačka
- ultramikrotom, *Leica Utracut R,* Velika Britanija
- ultrazvučna kupelj FALC, *Progen Scientific,* UK
- vodena kupelj, *Memmert*, Njemačka

3.1.7. Radni mikroorganizmi

U ovom radu kao radni mikroorganizmi korištene su tri gram-pozitivne bakterijske vrste: *L. innocua* ATCC 33091, *S. aureus* 3068 te sporogena bakterijska vrsta *B. cereus* 30, dvije gram-negativne bakterijske vrste: *E. coli* MG1655 K-12 i *S. enterica* serotip Typhimurium LT21 te dvije vrste kvasca: *Rhodotorula* spp 74 i *S. cerevisiae* ATCC 204508.

Bakterijska vrsta *Listeria innocua* ATCC 33091 uzeta je iz Njemačke zbirke mikroorganizma i staničnih kultura (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ) i čuvana u zbirci mikroorganizama Laboratorija za procesno-prehrambeno inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Bakterijske vrste *E. coli* MG1655 K-12 i *S. enterica* serotip Typhimurium LT21 uzete su iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu te čuvane u zbirci mikroorganizama Laboratorija za procesno-prehrambeno inženjerstvo.

Bakterijske vrste *B. cereus* 30, *S. aureus* 3068 i vrsta kvasca *Rhodotorula* spp 74 uzete su iz Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu te čuvane u zbirci mikroorganizama Laboratorija za procesno-prehrambeno inženjerstvo. Kvasac *S. cerevisiae* ATCC 204508 uzet je iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju vrenja i kvasaca, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu te je u istom i čuvan. Bakterijske kulture čuvane su u 50% glicerolu na -20 °C. Kvaščeve kulture čuvane su u 25% glicerolu na -20 °C. Istraživanja su vršena tijekom faze rasta i stacionarne faze svakog pojedinog mikroorganizma.

3.1.8. Hranjive podloge za uzgoj stanica bakterija i kvasaca

3.1.8.1. Hranjiva podloga za uzgoj bakterijskih stanica

Za uzgoj bakterijskih stanica korišten je neselektivni hranjivi bujon. Nakon otapanja 8 g praha u 1000 mL destilirane vode, podloga je sterilizirana 15 min pri temperaturi 121 °C i tlaku $1{,}01 \times 10^5$ Pa. Konačni pH otopine iznosio je 7±0,2.
Za pripravu čvrste hranjive podloge u 8 g praha na 1000 mL destilirane vode dodano je 20 g agara. Otopina je sterilizirana 15 min pri temperaturi 121 °C i tlaku $1{,}01 \times 10^5$ Pa. Konačni pH otopine iznosio je 7±0,2.

3.1.8.2. Malt ekstrakt podloga za uzgoj stanica kvasca

Za uzgoj stanica kvasaca korišten je malt ekstrakt bujon. U 1000 mL destilirane vode otopljeno je 20 g L^{-1} malt extract dehidriranog praha. Pripremljena otopina sterilizirana je 15 min pri temperaturi 121 °C i tlaku $1{,}01 \times 10^5$ Pa. Konačni pH otopine iznosio je 5,4±0,2.
Za pripravu čvrste malt ekstrakt podloge u 20 g praha na 1000 mL destilirane vode dodano je 20 g agara. Otopina je sterilizirana 15 min pri temperaturi 121 °C i tlaku $1{,}01 \times 10^5$ Pa. Konačni pH otopine iznosio je 5,2±0,2.

3.1.8.3. Puferirana peptonska voda

Za revitalizaciju stanica bakterija koristila se puferirana peptonska voda, dok se za revitalizaciju stanica kvasaca koristio malt ekstrakt bujon. Za pripremu 1000 mL puferirane peptonske vode odvagano je i otopljeno 20 g dehidriranog praha u 1000 mL destilirane vode. Pripremljena otopina streilizirana je 15 min pri temperaturi 121 °C i tlaku $1{,}01 \times 10^5$ Pa. Konačni pH otopine iznosio je 7±0,1.

3.1.8.4. Selektivne podloge za uzgoj mikroorganizama (revitalizacija) stanica

3.1.8.4.1. Tryptone bile x-gluc (TBX) agar za uzgoj stanica vrste *E. coli*

U 1000 mL destilirane vode odvagano je 35,6 g dehidriranog praha TBX agara. Otopina je sterilizirana 15 min pri temperaturi 121 °C i tlaku $1{,}01 \times 10^5$ Pa. Konačni pH otopine iznosio je 7,2±0,2.

3.1.8.4.2. Ksiloza lizin deoksikolat (XLD) agar za uzgoj stanica vrste *Salmonella*

U 1000 mL destilirane vode odvagano je 55 g dehidriranog praha XLD agara. Otopina je sterilizirana 15 min pri temperaturi 121 °C i tlaku $1{,}01 \times 10^5$ Pa. Konačni pH otopine iznosio je 7,4±0,2.

3.1.8.4.3. Fraser bujon i Agar Listeria Ottaviani & Agosti (ALOA) agar za uzgoj stanica vrste *Listeria*

Za pripremu Fraser bujona otopljeno je 27,4 g dehidriranog praha u 500 mL destilirane vode. Otopina je sterilizirana 15 min pri temperaturi 121 °C i tlaku $1{,}01 \times 10^5$ Pa. Konačni pH otopine iznosio je 7,2±0,2. Nakon što se sterilizirani bujon ohladio dodan je rekonstituirani prah željezo amonij citrata. Prah željezo amonij citrata rekonstituiran je sa 5 mL sterilne destilirane vode.

Za pripremu ALOA agara otopljeno je 35,3 g dehidrirane podloge u 500 mL destilirane vode te sterilizirano 15 min pri temperaturi 121 °C i tlaku $1{,}01 \times 10^5$ Pa. Konačni pH otopine iznosio je 7,2±0,2. Kada je otopina ohlađena na 50 °C dodan je ALOA obogaćeni suplement zagrijan na 50 °C i ALOA selektivni suplement rekonstituiran sa 5 mL sterilne destilirane vode.

3.1.8.4.4. Baird Parker agar za uzgoj stanica vrste *Staphylococcus*

Za pripremu Baird Parker agara otopljeno je 58 g dehidriranog praha u 1000 mL destilirane vode. Otopina je sterilizirana 15 min pri temperaturi 121 °C i tlaku $1{,}01 \times 10^5$ Pa. Konačni pH otopine iznosio je 7,2±0,2. Nakon sterilizacije otopina je ohlađena na 50 °C te je dodana 20% Egg Yolk Tellurite emulzija.

3.1.9. Puferi i otopine

3.1.9.1. Fosfatni pufer (*engl*. Phosphate Buffer Saline, PBS)

Otopina fosfatnog pufera pripremljena je otapanjem 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,62 g $Na_2HPO_4x2H_2O$, 0,24 g KH_2PO_4 u 1 L destilirane vode. Vrijednost pH korigirana je sa 6 mol L^{-1} HCl na 7,00. Otopina je sterilizirana 15 min pri temperaturi 121 °C i tlaku $1,01x10^5$ Pa.

3.1.9.2. Titanij otopina

Titanij otopina pripremila se odvagom 1 g titanij praha, tj. titan (IV) oksida u 100 mL vruće sumporne kiseline (1:1). Reakcijska smjesa zagrijavala se na oko 190°C i miješala na magnetskoj mješalici u vremenskom razdoblju od 20 h. Titanij je otopljen kada inicijalno bijela otopina postane prozirna (može se dodati destilirane vode tijekom zagrijavanja ako se uoči značajan gubitak vode). Nakon što se sav titan otopio, reagens otopina ohladila se na sobnu temperaturu i razrijedila destiliranom vodom na volumen od 500 mL. Reagens otopina zatim se skladištila u hladnjaku na +4 °C.

3.2. Metode

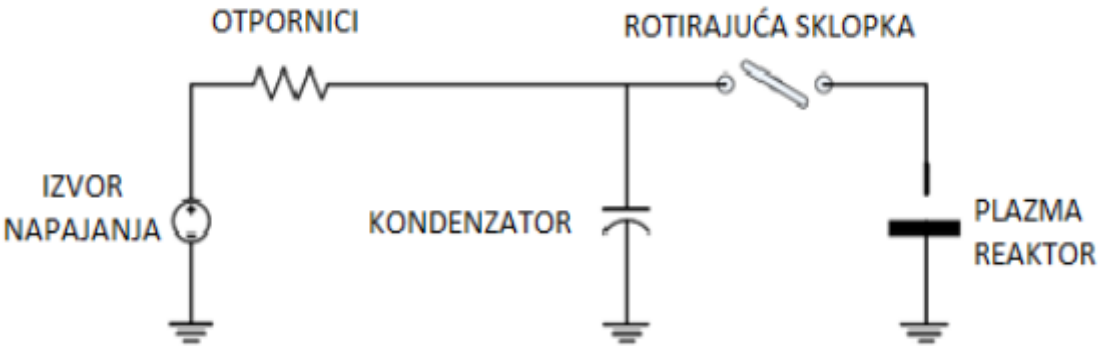
3.2.1. Tretmani plazmom - provedba eksperimenta

Tretmani su se proveli pri pozitivnom polaritetu plazme, provodljivosti otopine 100 μS cm^{-1}, vremenskom razdoblju 5 i 10 min, frekvencijama 60, 90 i 120 Hz. Prilikom tretmana upuhivani su plinovi:

- plemeniti plin argon čistoće 99,99%
- zrak pomoću peristaltičke pumpe.

Za generiranje plazme korišten je 30 kV pulsni visokonaponski generator izlazne snage 1200 W i izlazne struje 40 mA, spojen na kondenzator električnog kapaciteta 0,75 nF, te serijski spojene otpornike ukupnog otpora 9,5 MΩ (slika 12). Napon je mjeren naponskom sondom spojenom na osciloskop. Ovisno o eksperimentu frekvencija izboja namještena je preko mjerača frekvencija i rotirajuće sklopke. Visokonaponski kabel s rotirajuće sklopke direktno je bio povezan s visokonaponskom elektrodom u reaktoru. Reaktor je bio volumena 1000 mL, s

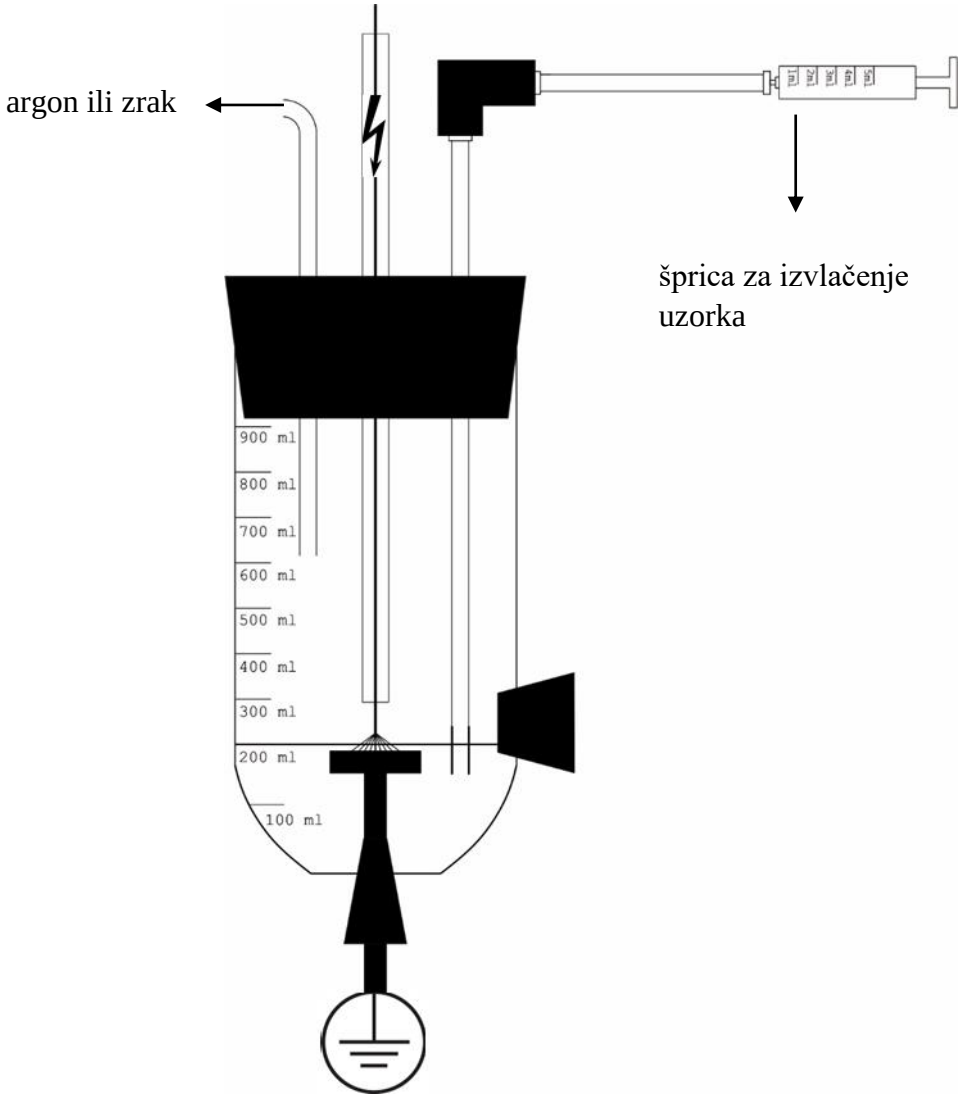
gumenim čepom s prilagođenim otvorima za elektrode ovisno o vrsti tretmana. Konfiguracija elektroda u reaktoru bila je postavljena u obliku točka-ploča konfiguracije, odnosno s igličnom visokonaponskom elektrodom te pločastom elektrodom uzemljenja od nehrđajućeg čelika promjera 4,5 cm.



Slika 12. Strujni krug visokonaponskoga električnoga pražnjenja-plazma

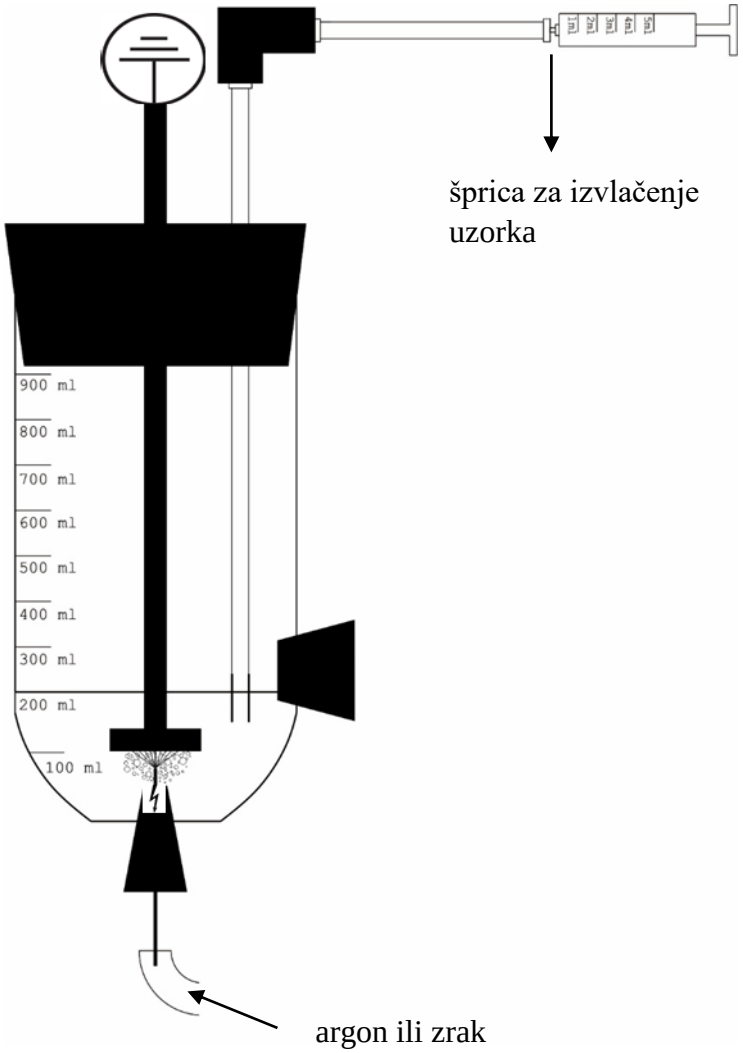
Ovisno o konfiguraciji elektroda plazma se generirala u dva tipa reaktora:

- plazma generirana u plinskoj fazi – kod ovog tipa reaktora visokonaponska elektroda od titana (2r=1 mm) nalazila se u plinskoj fazi iznad razine tekućine dok se pločasta elektroda uzemljenja promjera 4,5 cm nalazila u tekućoj fazi. Ovisno o tretmanu iznad razine tekućine upuhivani su plinovi, argon 99,99% ili zrak protokom 6 L min^{-1}. Udaljenost između dviju elektroda iznosila je 1 cm (slika 13).



Slika 13. Prikaz pražnjenja u plinskoj fazi

- tekućinska plazma u mjehurićima – kod ovog tipa reaktora visokonaponska elektroda od nehrđajućeg čelika (medicinska igla od nehrđajućeg čelika Microlance TM 3,81 cm) nalazila se u tekućoj fazi kroz koju je pomoću peristaltičke pumpe upuhivan zrak protokom 6 L min^{-1} ili plemeniti plin argon čistoće 99,99% također protokom 6 L min^{-1}. Elektroda uzemljenja od nehrđajućeg čelika s pločastom elektrodom promjera 4,5 cm također se nalazila u tekućoj fazi. Udaljenost između dviju elektroda iznosila je 1 cm. Ovakav tip rektora omogućio je bolje miješanje uzorka (slika 14).



Slika 14. Prikaz pražnjenja tekućinske plazme u mjehurićima

3.2.2. Dizajn eksperimenta

Dizajn eksperimenta izveden je pomoću statističkog programa central composite design, CCD; STATGRAPHICS Centurion, StatPoint Technologies. Eksperiment se sastoji od 12 eksperimentalnih pokusa (tablica 4). Kao nezavisne varijable odabrane su frekvencija (A) (Hz), vrijeme tretmana (B) (min) i radni plin (C) (L min^{-1}).

Tablica 4. Dizajn eksperimenta za tretman visokonaponskim električnim pražnjenjem za sve radne mikroorganizme

Uzorak	**Vrijeme (min)**	**Frekvencija (Hz)**	**Plin (L min^{-1})**
1	10	90	Argon
2	10	90	Zrak
3	5	60	Argon
4	5	120	Zrak
5	10	120	Zrak
6	5	60	Zrak
7	10	60	Zrak
8	5	90	Argon
9	5	90	Zrak
10	10	120	Argon
11	10	60	Argon
12	5	120	Argon

Provedena je analiza varijance (ANOVA) kako bi se mogla utvrditi odstupanja ($p<0,05$) u provedenim tretmanima s razinom pouzdanosti od 95%. Operativne varijable promatrane su na 3 razine: niskom (-1), centralnom (0) i visokom (1). Provedeno je 12 eksperimenata organiziranih u faktorski plan (uključujući faktorske točke, aksijalne točke i centralne točke). Izlazne vrijednosti su redukcija broja mikroorganizama (logaritam broja stanica u mL suspenzije i istjecanje staničnog sadržaja pri 260 i 280 nm).
Ukupni broj eksperimenata (N) računat je po sljedećoj jednadžbi:

$$N=N_i+N_o+N_j \qquad /10/$$

gdje je $N_i=2^n$ broj eksperimenata s punim faktorskim planom na dvije razine, N_0 je broj centralnih točaka, a $N_j=2*n$ je broj zvjezdastih točaka.

Kako bi se optimizirali tretmani plazmom za navedene izlazne vrijednosti korišten je centralno kompozitni dizajn tipa *face centred* (ispred lica centrirana kocka) s varijablama na tri razine.

Matrica za eksperiment i regresijski model predložen za izlazne podatke dana je sljedećom jednadžbom (Lu i sur., 2008):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{4} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{4} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i<j}^{i} \beta_{ij} X_i X_j \qquad /11/$$

gdje je β_0 vrijednost fiksnog rezultata u centralnoj točki eksperimenta (točka 0,0,0), β_i, β_{ii} i β_{ij} su redom linearni, kvadratni i međusobni produkt koeficijenata (Myers i sur. 2002). Demonstracija značajnih efekata prikazana je 3D grafom (Kuehl, 2000). Izvršena je linearna regresija (MLR).

3.2.3. Određivanje fizikalno-kemijskih promjena

3.2.3.1. Optička emisijska spektroskopija (OES)

Optička emisijska spektroskopija provedena je pomoću Avantes spektrometra s rezolucijom od 0,8 nm u rasponu od 200 do 1100 nm. Svjetlost je skupljena pomoću kvarcne leće postavljenje na optičko vlakno. Za svako mjerenje prosječno je snimljeno 30 spektara te je izračunata srednja vrijednost. Vrijeme integracije optičkog signala postavljeno je na 500 ms, što odgovara 1350 snimljenih izboja plazme. Mjerenja su provedena pri frekvenciji 90 Hz, upuhivanom plinu argonu i zraku te provodljivosti medija 100 μS cm^{-1}.

3.2.3.2. Određivanje pH vrijednosti, provodljivosti i temperature

Mjerenje pH-vrijednosti i električne provodljivosti provodilo se na digitalnom pH-metru/konduktometru u netretiranim i tretiranim uzorcima. Temperatura se mjerila pomoću infracrvenog termometra također prije i nakon tretmana.

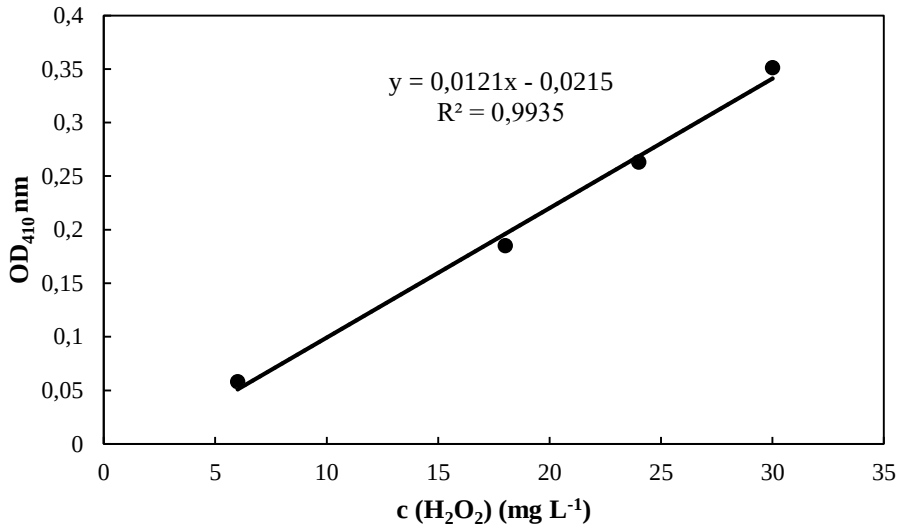
3.2.3.3. Određivanje koncentracije vodikova peroksida

Metoda određivanja koncentracije slobodnih radikala bazira se na promjeni boje dodatkom titan reagensa (TiO_2) iz prozirne u žutu. Koncentracija vodikova peroksida u uzorku odredila se spektrofotometrijski pri 410 nm na način da se 1 mL pripremljenog titan reagensa

pomiješao sa 2 mL uzorka te se preko izrađenog baždarnog pravca očitala koncentracija prisutnih slobodnih radikala.

3.2.3.4. Izrada baždarnog pravca za određivanje koncentracije vodikova peroksida

Volumen 1 mL točno zadane koncentracije vodikova peroksida otpipetiran je u 2 mL titan reagensa te je pri 410 nm određena apsorbancija za svaku pojedinu koncentraciju. Iz dobivenih podataka određen je baždarni pravac za određivanje koncentracije slobodnih radikala (slika 15).



Slika 15. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji vodikova peroksida (mg L^{-1}).

3.2.4. Čuvanje i održavanje bakterijskih kultura i kultura kvasaca

Kulture bakterija i kvasaca čuvane su u Eppendorf epruvetama na -20 °C. Bakterijske kulture čuvane su u 50% glicerolu, dok su kulture kvasaca čuvane u 25% glicerolu. Precjepljivane su svakih mjesec.

3.2.5. Baždarni pravci mikroorganizama

Za svaki od navedenih mikroorganizama izrađen je baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o logaritmu broja stanica u mL suspenzije te vremenu rasta kako bi se utvrdila

pojedina faza rasta mikroorganizama. Kulture mikroorganizama nacijepljene su u sterilne plastične epruvete u sterilnim uvjetima u laminaru na način da je 20 µL čiste kulture odabranog mikroorganizma iz 25 odnosno 50% glicerola pipetirano u 10 mL odgovarajućeg hranjivog bujona. Bakterijske kulture nacijepljene su u neselektivni hranjivi bujon, a kulture kvasca u malt ekstrakt bujon. Bakterijske kulture inkubirane su pri 37 °C, a uzorci kvasca pri 30 °C. Svakih sat vremena očitala se apsorbancija pri 600 nm. Broj živih stanica određivan je nacjepljivanjem odgovarajućih razrjeđenja na odgovarajuće hranjive podloge za bakterijske, odnosno stanice kvasca. Decimalna razrjeđenja pripremljena su na način da je za prvo decimalno razrjeđenje odpipetiran volumen od 10 µL početnog uzorka u 90 µL sterilne otopine PBS-a. Za pripremu drugog decimalnog razrjeđenja pipetiran je volumen od 10 µL prvog razrjeđenja koji je prenesen u 90 µL sterilne otopine PBS-a. Postupak je ponavljan do sedmog razrjeđenja. Uzorci su nacijepljeni u triplikatu na način da je odpipetiran volumen od 10 µL uzorka na hranjivu podlogu bez razmazivanja. Uzorci nacijepljeni bakterijskim stanicama *E. coli* inkubirali su se 18 h pri 37 °C. Uzorci bakterijske kulture *L. innocua* inkubirali su se 48 h pri 37 °C. Uzorak nacijepljen s bakterijskom kulturom *B. cereus* inkubiran je pri 37 °C kroz 48 h. Ostale bakterijske kulture inkubirale su se 24 h pri 37 °C. Nacijepljeni uzorci kvasaca inkubirali su se 48 h pri 30 °C. Za svako razrjeđenje odredila se srednja vrijednost, a ukupni broj izražava se kao logaritam broja stanica u mililitru suspenzije ($\log_{10}$ broj stanica mL^{-1}). U proračun se uzimaju u obzir nacijepljene hranjive ploče koje imaju broj poraslih kolonija <30 i >10.

Na osnovu dobivenih rezultata izračunat je broj stanica u mililitru bakterijske suspenzije prema formuli:

$$Broj\ stanica\ u\ mL\ suspenzije = \frac{broj\ poraslih\ kolonija}{upotrebljeni\ volumen\ uzorka}\ x\ recipročna\ vrijednost\ decimalnog\ razrjeđenja \quad /12/$$

3.2.6. Priprema i uzgoj mikrobioloških kultura za tretman u stacionarnoj fazi rasta

Kulture mikroorganizama nacijepljene su u sterilne plastične epruvete u sterilnim uvjetima u laminaru na način da je 20 µL čiste kulture odabranog mikroorganizma iz 25, odnosno 50% glicerola pipetirano u 10 mL odgovarajućeg hranjivog bujona. Bakterijske kulture nacijepljene su u neselektivni hranjivi bujon, a kulture kvasca u malt ekstrakt bujon. Uzorci nacijepljeni bakterijskim stanicama *E. coli* inkubirali su se 18 h pri 37 °C. Uzorci

bakterijske kulture *L. innocua* inkubirali su se 48 h pri 37 °C. Uzorak nacijepljen s bakterijskom kulturom *B. cereus* termostatiran je u vodenoj kupelji pri 80 °C kroz 10 min kako bi se potakao rast spora. Potom je uzorak stavljen na inkubaciju pri 37 °C kroz 48 h. Ostale bakterijske kulture inkubirale su se 24 h pri 37 °C. Nacijepljeni uzorci kvasaca inkubirali su se 48 h pri 30 °C. Nakon inkubacije suspenzije su se centrifugirale pri 4000 okretaja u minuti (o min^{-1}) kroz 10 min. Supernatant se odlio te se u uzorak pipetiralo 10 mL sterilne otopine PBS-a. Uzorak se vorteksirao te se ponovno centrifugirao nakon čega se ponovno odlio supernatant te se u uzorak pipetiralo 10 mL sterilne otopine PBS-a. Ispiranje uzorka provelo se 4 puta gdje se pri zadnjem centrifugiranju i odlijevanju supernatanta odpipetiralo 10 mL otopine 0,01 M $NaNO_3$ provodljivosti 100 µS cm^{-1}.

3.2.7. Priprema i uzgoj mikrobioloških kultura za tretman u eksponencijalnoj fazi rasta

Kulture mikroorganizama nacijepljene su u sterilne plastične epruvete u sterilnim uvjetima u laminaru na način da je 20 µL čiste kulture odabranog mikroorganizma iz 25, odnosno 50% glicerola pipetirano u 10 mL odgovarajućeg hranjivog bujona. Bakterijske kulture nacijepljene su u neselektivni hranjivi bujon, a kulture kvasca u malt ekstrakt bujon. Uzorci su inkubirani pri temperaturi opisanoj pod točkom 3.2.6. Vrijeme inkubacije ovisilo je o radnoj kulturi i potrebnom vremenu da mikroorganizam postigne eksponencijalnu fazu rasta. Bakterijske kulture *E. coli* i *S. enterica* tretirane su nakon 5 h rasta. Bakterijska kultura *S. aureus* tretirana je nakon 6 h rasta, a kultura *L. innocua* i *B. cereus* nakon 18 h rasta. Kvaščeva kultura *Rhodotorula* tretirana je nakon 8 h rasta kao i kvasac *S. cerevisiae*. Nakon inkubacije uzorak je pripremljen na način opisan pod točkom 3.2.6.

3.2.8. Priprema uzorka za tretiranje

Ukupni volumen uzorka prilikom tretmana iznosio je 200 mL. Uzorak se pripremio u sterilnoj staklenoj čaši od 500 mL na način da se 190 mL otopine 0,01 M $NaNO_3$ provodljivosti 100 µS cm^{-1} odpipetiralo u sterilnu čašu te se pomiješalo sa 10 mL pripremljene suspenzije odabranog mikroorganizma.

3.2.9. Određivanje broja stanica prije i nakon tretmana

Ukupni broj stanica određen je prije i nakon tretmana kako bi se odredila redukcija u broju stanica. Broj živih stanica određivan je nacjepljivanjem odgovarajućih razrjeđenja na odgovarajuće hranjive podloge. Bakterijske stanice nacijepljene su na neselektivni hranjivi agar, a stanice kvasca na malt ekstrakt agar. Decimalna razrjeđenja pripremljena su na način da je za prvo decimalno razrjeđenje otpipetiran volumen od 10 µL početnog uzorka u 90 µL sterilne otopine PBS-a. Za pripremu drugog decimalnog razrjeđenja pipetiran je volumen od 10 µL prvog razrjeđenja koji je prenesen u 90 µL sterilne otopine PBS-a. Postupak je ponavljan do sedmog razrjeđenja. Uzorci su nacijepljeni u triplikatu na način da se otpipetirao 10 µL uzorka na hranjivu podlogu bez razmazivanja. Nacijepljene ploče inkubirale su se prema točki 3.2.6. Za svako razrjeđenje odredila se srednja vrijednost, a ukupni broj izražava se kao logaritam broja stanica u mililitru suspenzije ($\log_{10}$ broj stanica mL^{-1}). U proračun se uzimaju u obzir nacijepljene hranjive ploče koje imaju broj poraslih kolonija <30 i >10.
Na osnovu dobivenih rezultata izračunat je broj stanica u mililitru bakterijske suspenzije prema formuli broj /12/.

3.2.10. Revitalizacija stanica nakon tretmana

Metoda revitalizacije stanica dokaz je inaktivacije ili neinaktivacije stanica. Metoda se bazira na određivanju broja stanica u odnosu na broj stanica određen nakon tretmana.
Nakon tretmana iz ukupnog volumena pipetirao se 1 mL uzorka koji se nacijepio u 9 mL puferirane peptonske vode za bakterijske stanice, odnosno 9 mL malt ekstrakt bujona za stanice kvasca. Uzorci su se nacijepili u paraleli te inkubirali pri 37 °C za bakterijske stanice, odnosno 30 °C za stanice kvasca, kroz vremensko razdoblje od 24-48 h (bakterije) i 48 h (kvasci). Broj revitaliziranih stanica odredio se metodom nacjepljivanja serija razrjeđenja na odgovarajuće selektivne hranjive podloge (*E. coli* TBX agar, *S. enterica* XLD agar, *L. innocua* ALOA agar, *S. aureus* Baird Parker agar, *B. cereus* hranjivi agar, *Rhodotorula* i *S. cerevisiae* malt ekstrakt agar). Decimalna razrjeđenja i nacijepljivanje na hranjive podloge priređena su prema točki 3.2.9. Broj stanica izražen je kao logaritam broja stanica u mililitru suspenzije ($\log_{10}$ broj stanica mL^{-1}) te je izračunat prema formuli broj /12/.

3.2.11. Određivanje istjecanja unutar staničnog sadržaja

Metoda određivanja istjecanja unutar staničnog sadržaja je spektrofotometrijska, filtracijska metoda. Volumen od 3 mL stanične kulture filtrirao se kroz filtar veličine pora 0,25 μm. U dobivenom filtratu odredila se apsorbancija pri 260 nm i 280 nm. Pri 260 nm određuje se koncentracija nukleinskih kiselina, a pri 280 nm određuje se koncentracija proteina.
Koncentracija proteina izračunata je pomoću opće formule za izračun masene koncentracije proteina:

$$\gamma(proteina)\left(\frac{mg}{L}\right) = 1{,}55xA_{280} - 0{,}76xA_{260} \qquad /13/$$

3.2.12. Transmisijski elektronski mikroskop

Snimanje transmisijskim elektronskim mikroskopom provedeno je na stanicama u stacionarnoj fazi rasta prije i nakon tretmana u reaktoru čija konfiguracija osigurava produkciju plazme u mjehurićima, pri frekvenciji 90 Hz i vremenu obrade 10 minuta, uz upotrebu argona kao radnog plina. Odabrane su dvije bakterijske kulture i jedna kultura kvasca, *E. coli* kao gram-negativna bakterija, *L. innocua* kao gram-pozitivna bakterija te *S. cerevisiae* kao kultura kvasca. Posebno su nacijepljeni uzroci za analizu prije i nakon tretmana, te su kao takvi zasebno pripremljeni za mikroskopsko analiziranje. Uzorci su pripremljeni prema točkama 3.2.6. i 3.2.8. Cjelokupni volumeni uzoraka (200 mL) prije i nakon tretmana centrifugirani su 10 min pri 9000 o min^{-1}. Stanice su sakupljene u Eppendorf epruvete te isprane sa 1 mL sterilne otopine PBS-a. Uzorak je ponovno centrifugiran 10 min pri 9000 o min^{-1}. Postupak je ponovljen 6 puta.

3.2.12.1. Priprema uzoraka za snimanje transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM)

Priprema uzoraka za transmisijski elektronski mikroskop odvijala se u osam faza u Eppendorf epruvetama. Fiksiranje stanica, postfikasija i dehidratacija uzoraka provedena je na ledu.

- **Fiksiranje stanica** - pelet prikupljenih stanica resuspendiran je u 0,05 M Na-cac puferu. Potom je uzorak centrifugiran 5 min pri 3000 o min^{-1}. Nakon toga slijedila je fiksacija sa 2% glutaradehidom otopljenim u 0,05 M Na-cac puferu pri pH 7,2 tijekom 20 min. Uzorci su potom centrifugirani 5 min pri 3000 o min^{-1}. Ponovno je dodan 2%

glutaradehid otopljen u Na-cac puferu pri pH 7,2 tijekom 40 min. Nakon 40 min slijedilo je ispiranje s Na-cac puferom, četiri puta. Između svakog pranja uzorci su centrifugirani pri 3000 o min^{-1} tijekom 5 min.

- **Postfiksacija stanica** provedena je sa 2% osmium tetroksidom otopljenim u Na-cac puferu kroz 1 h pri pH 7,2. Uzorci su potom centrifugirani 5 min pri 3000 o min^{-1} te četiri puta isprani s destiliranom vodom. Između svakog pranja uzorci su centrifugirani 5 min pri 3000 o min^{-1}.
- **Dehidratacija** uzoraka provedena je tijekom 10 min s etanolom koncentracije 50%, 60%, 70%, 80% i 90%. Između dehidratacije uzoraka s različitim koncentracijama etanola uzorci su centrifugirani 5 min pri 3000 o min^{-1}. Apsolutni etanol dodan je preko noći. Uzorci su potom centrifugirani 5 min pri 3000 o min^{-1}. Zatim je dodana otopina etanol:aceton 1:1 tijekom 1 h. Uzorci su centrifugirani 5 min pri 3000 o min^{-1} te je dodan aceton tijekom 1 h nakon čega je slijedilo ponovno 5 min centrifugiranje pri 3000 o min^{-1}.
- **Infiltracija** je provedena na tresilici pri sobnoj temperaturi. Uzorcima su dodane otopine smola:aceton koncentracije 1:2 tijekom 1 h, zatim otopina smola:aceton koncentracije 1:1 tijekom 1 h te posljednja otopina smola:aceton koncentracije 2:1 tijekom 1 h. Između svake otopine uzorci su centrifugirani 5 min pri 3000 o min^{-1}. 100% otopina smole pipetirana je u uzorak te je uzorak ostavljen na tresilici tijekom noći.
- **Polimerizacija** je provedena u Eppendorf epruvetama pri 65 °C tijekom 48 h.
- **Rezanje** ultratankih prereza (60-70 μm) provedeno je ultramikrotomom.
- **Kontrastiranje** je provedeno sa 2% uranil acetatom tijekom 10 min nakon čega su uzorci isprani s destiliranom vodom. Nakon ispiranja dodan je olovni citrat. Nakon 10 min uzroci su isprani s toplom redestiliranom vodom.
- **Mikroskopiranje** je provedeno transmisijskim elektronskim mikroskopom Zeiss EM10.

3.2.13. Određivanje biofilma

Metoda određivanja biofilma spektrofotometrijska je metoda koja se bazira na kristal violetnom obojenju (Peeters i sur., 2008). Uzorci su se nacijepili u jažice višerednih ploča na način da se svaki uzorak u volumenu od 200 μl nacijepio u paraleli te se u svaku jažicu odpipetirao volumen od 2 mL hranjivog bujona ovisno o kulturi stranica. Bakterijske stanice

nacijepljene su u neselektivni hranjivi bujon, a stanice kvasca u malt ekstrakt bujon. Nacijepile su se i kontrolne jažice u koje se nije dodao uzorak već je samo nacijepljen hranjivi bujon. Nakon 4 h inkubacije, tijekom koje dolazi do adhezije stanica za podlogu, uklonio se supernatant iz jažica te su se iste isprale sa 2 mL sterilne otopine PBS-a. Potom se u svaku jažicu odpipetiralo 2 mL svježeg hranjivog bujona. Višeredne ploče inkubirale su se tijekom 24 h kako bi se stvorio biofilm.

Nakon 24 h inkubacije provela se kvantifikacija biofilma kristal violet testom. Uklonio se supernatant iz jažica te su se stanice isprale sa 2 mL sterilne otopine PBS-a. Kako bi fiksirali biofilm, u svaku jažicu odpipetirano je 2 mL 99%-tnog metanola. Fiksacija je provedena u vremenskom periodu od 15 min. Nakon 15 min metanol se uklonio, jažice su se posušile te se dodalo 2 mL kristal violetne boje tijekom 20 min. Nakon 20 min uklonila se boja i jažice su se isprale sa destiliranom vodom. Kako bi odvojili sve stanice s površine u svaku jažicu dodano je 2 mL 33%-tne octene kiseline te se izmjerila apsorbancija pri 590 nm.

Biofilm je prikazan kao postotak smanjenja, odnosno povećanja broja stanica u odnosu na početni uzorak.

3.2.14. Analiza proteoma

Proteomskim istraživanjem analizirani su proteomi gram-negativne bakterije *E. coli*, gram-pozitivne bakterije *L. innocua* i kvasca *S. cerevisiae* u stacionarnoj fazi rasta prije i nakon tretmana, nakon revitalizacije stanica *E. coli* tijekom 24 h i revitalizacije stanica *L. innocua* i *S. cerevisiae* tijekom 48 h te nakon trostrukog tretmana istog uzorka. Uzorci su tretirani u reaktoru čija konfiguracija osigurava produkciju plazme u mjehurićima, pri frekvenciji 90 Hz i vremenu obrade 10 minuta, uz upotrebu argona kao radnog plina. Analize su provedene u triplikatu.

3.2.14.1. Uzgoj stanica za analizu proteoma prije i nakon tretmana

Uzorci mikrobnih stanica pripremljeni su prema točkama 3.2.6. i 3.2.8. Posebno su nacijepljeni uzroci za analizu prije tretmana, posebno za analizu nakon tretmana te su zasebno i pripremljeni za analizu proteoma. Priprema uzorka nakon tretmana započeta je pola sata nakon tretmana. Volumen uzorka od 200 mL prije i nakon tretmana centrifugiran je pri 9000 o min^{-1} kroz 10 min. Uzorci su sakupljeni u Eppendorf epruvete, isprani sa 1 mL sterilne otopine PBS-

a te ponovno centrifugirani 10 min pri 9000 o min^{-1}. Postupak je ponovljen 6 puta. Koncentracija mikrobnih stanica prije tretmana iznosila je $1x10^7$ broj stanica mL^{-1}, dok je nakon tretmana koncentracija bakterijskih stanica iznosila $1x10^6$ broj stanica mL^{-1}, a stanica kvasca $1x10^7$ broj stanica mL^{-1}.

3.2.14.2. Uzgoj stanica za analizu proteoma nakon revitalizacije stanica

Nakon tretmana 1 mL bakterijskog uzorka nacijepljen je u 9 mL puferirane peptonske vode te inkubiran tijekom 24 h pri 37 °C za bakteriju *E. coli,* odnosno 48 h za bakteriju *L. innocua*. Volumen od 1 mL uzorka kvasca nacijepljen je u 9 mL malt ekstrakt bujona i inkubiran pri 30 °C tijekom 48 h. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani 10 min pri 9000 o min^{-1}, sakupljeni u Eppendorf epruvetu te isprani u 1 mL sterilne otopine PBS-a. Postupak ispiranja ponovljan je 6 puta.

3.2.14.3. Uzgoj stanica i trostruki tretman za analizu proteoma

Nakon tretmana, prije postupka centrifugiranja 20 µL bakterijskog uzorka *E. coli* i *L. innocua* nacijepljen je u 10 mL neselektivnog hranjivog bujona dok je 20 µL kvaščevog uzorka *S. cerevisiae* nacijepljen u 10 mL malt ekstrakt bujona. Bakterijska kultura *E. coli* inkubirana je pri 37 °C tijekom 18 h dok je bakterijska kultura *L. innocua* inkubirana pri 37 °C tijekom 48 h. Uzorci kvasca inkubirani su pri 30 °C tijekom 48 h. Uzorci su pripremljeni za tretman prema točkama 3.2.6. i 3.2.8. Tretman stanica proveden prema parametrima opisanim pod točkom 3.2.14. Uzorci nakon tretmana su ponovno nacijepljeni postupkom da je 20 µL bakterijskog uzorka *E. coli* i *L. innocua* nacijepljen u 10 mL neselektivnog hranjivog bujona dok je 20 µL kvaščevog uzorka *S. cerevisiae* nacijepljen u 10 mL malt ekstrakt bujona. Bakterijska kultura *E. coli* inkubirana je pri 37 °C tijekom 18 h dok je bakterijska kultura *L. innocua* inkubirana pri 37 °C tijekom 48 h. Uzorci kvasca inkubirani su pri 30 °C tijekom 48 h. Uzorci su pripremljeni za tretman prema točkama 3.2.6. i 3.2.8. Tretman je proveden prema parametrima opisanim pod točkom 3.2.14. Priprema uzorka nakon tretmana započeta je pola sata nakon tretmana. Uzorci su centrifugirani 10 min pri 9000 o min^{-1}, sakupljeni u Eppendorf epruvete te isprani sa 1 mL sterilne otopine PBS-a. Postupak je ponovljen 6 puta.

3.2.14.4. Priprava uzorka za analizu proteoma, metoda Pierce™ Mass Spec Sample Prep Kit for Cultured Cells

20 µL uzorka pipetirano je u Eppendorf epruvete te je dodano 100 µL pufera za lizu stanica. Uzorci su vorteksirani te inkubirani pri 95 °C kroz 5 min. Nakon 5 min inkubacije uzorci su ohlađeni na ledu tijekom 5 min. U uzorke su nadodane staklene kuglice (0,05 g). Stanice su lizirane mehaničkim miješanjem tijekom 3 min na vorteksu. Potom su uzorci centrifugirani pri 10000 o min^{-1} i 8 °C tijekom 10 min. Supernatant se skupio u čistu Eppendorf epruvetu, a talog se odbacio. Kako bi se uklonile nukleinske kiseline iz uzoraka dodan je Pierce Universal Nuclease for Cell Lysis tijekom 15 min. Uzorci su centrifugirani pri 10000 o min^{-1} i 8 °C tijekom 10 min. Bijeli proteinski sloj prikupio se u čistu Eppendorf epruvetu, ostali je dio smjese odbačen.

3.2.14.5. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina odredila se metodom po Bradfordu koristeći NanoDrop One/Onec, UV-Vis spektrofotometar pri 595 nm i slijepoj probi (Bradford 1976). Metoda se bazira na promjeni boje Cooumassie brilliant blue G250 iz crveno smeđe u plavu prilikom vezanja na bazične aminokiseline u proteinima, u kiselom mediju. Mjerenjem apsorbancija niza standardnih otopina proteina poznatih koncentracija izradila se baždarna krivulja te se na temelju baždarne krivulje odredila koncentracija proteina. Standardne otopine proteina pripravljene su od goveđeg serumskog albumina (*engl.* Bovine Serum Albumin, BSA) volumena 100 µL te masenim koncentracijama 1 µg mL^{-1}, 2 µg mL^{-1}, 4 µg mL^{-1}, 6 µg mL^{-1}, 8 µg mL^{-1}, 10 µg mL^{-1}, 20 µg mL^{-1}, 40 µg mL^{-1} i 60 µg mL^{-1}. U uzorke točno poznate koncentracije dodano je 1 mL Bradford reagensa. Uzorci su inkubirani 10 min pri sobnoj temperaturi te im je izmjerena apsorbancija pri 595 nm usporedno sa slijepom probom. Slijepa proba pripremljena je tako da je u 100 µL destilirane vode dodano 1 mL Bradford reagensa. Na temelju dobivenih podataka izrađen je baždarni pravac.

Proteinski uzorci izolirani iz stanica razrijeđeni su u destiliranoj vodi u omjeru 1:100. U 100 µL razrijeđenog uzorka dodan je 1 mL Bradford reagensa. Uzorak je inkubiran 10 min pri sobnoj temperaturi te mu je izmjerena apsorbancija pri 595 nm. Iz baždarnog pravca očitana je koncentracija proteina.

3.2.14.6. Taloženje i digestija proteina u otopini

Na volumen uzoraka koji sadrži 50 μg proteina dodalo se 4 volumena acetona ohlađenog na -20 °C. Uzorci su se inkubirali tijekom 2 sata pri -20 °C, a zatim centrifugirali 10 minuta pri 10000 o min^{-1} i 8 °C. Proteini sakupljeni centrifugiranjem otopili su se u 50 μL pufera za digestiju (Pierce™ Mass Spec Sample Prep Kit for Cultured Cells) te su se lagano resuspendirali pomoću mikropipete.

3.2.14.7. Pročišćavanje i separacija peptida te analiza spektrometrom masa

Pročišćavanje i separacija peptida provela se na instrumentu NanoAcquity UPLC system. Separirani peptidi analizirali su se koristeći spektrometar masa ESI-q TOF SYNAPT G2-Si. Parametri analize podešeni su koristeći računalni program Mass Lynx 4.1. SCN902 kao što je opisano u tablicama 5 i 6. Svaki uzorak analizirao se u tri tehničke replike.

Tablica 5. Parametri pročišćavanja i separacije peptida te MS analize

Pročišćavanje peptida			
Pokretna faza A	0,1% vodena otopina mravlje kiseline (v/v)		
Pokretna faza B	95% acetonitil / 5% 0,1% vodena otopina mravlje kiseline (v/v)		
Protok	15 µL min^{-1}		
Injektor	10 °C		
Volumen injektiranja	4 µL		
LC predkolona	*2G-V/M Trap 5 µm Symmetry C18, 180 µm x 20 mm*		
Temperiranje predkolone	40 °C		
Ispiranje kolone	Izokratno, A/B=99/1 (v/v), 5 minuta		
Razdvajanje peptida			
Pokretna faza A	0,1 % vodena otopina mravlje kiseline (v/v)		
Pokretna faza B	95% acetonitil / 5% 0,1% vodena otopina mravlje kiseline (v/v)		
Protok	1 µL min^{-1}		
LC kolona	*Acquity UPLC column BEH300 C18,100 µm x 100 mm*		
Temperiranje kolone	40 °C		
Ispiranje kolone	Gradijentno		
	Retencijsko vrijeme	B(%)	Protok (µLmin^{-1})
	0,1	1,0	1,0
	35	30,0	1,0
	55	50,0	1,0
	67	99,0	1,0
	69	1.0	1,0
	75	1.0	1,0
Detekcija	*ESI-qTOF SYNAPT G2-Si*		

Tablica 6. Karakteristike MS analize

MS analiza	
Tip analize	MS pozitiv
Detekcija iona	Pozitivna
Način rada	Rezolucijski način rada, MS^E
Protok dušika	0,6 Bar
Temperatura	150 °C
Napon kapilare	4,0 kV
Napon na konusu	40 V
Vrijeme akvizicije/spektru	1 s
Raspon masa /Da	700-4000
Kalibracija MS spektra	Masa za utočnjavanje: leucin enkefalin koncentracije 1 ng μL^{-1} pri protoku 0,3 µL min^{-1}, *m/z* 556,2771 Da $[M+H]^+$
Tolerancija mase	0,25 Da
Kolizijska energija	Niska energija: konstantna kolizijska energija 4 eV Povišena energija: raspon od 20 do 45 eV tijekom ciklusa od 1 s

3.2.14.8. Identifikacija proteina

Program ProteinLynx Global Server 3.0.1. koristio se za pretragu baza proteina koje su preuzete s UniProt baze podataka. Lista signala dobivena MS^E analizama generirana je nakon dekonvolucije i uklanjanja izotopa, pri zadanom pragu detekcije od 125 count. Pretraga baze podataka vršila se prema parametrima zadanim u tablici 7.

Tablica 7. Parametri pretrage baze podataka

Pretraga baze podataka	
Baza podataka	UniProt
Pretraživač	*ProteinLynx Global Server 3.0.1.*
Enzim	Tripsin, 2 preskočena cijepanja
Varijable modifikacije	Oksidacija metionina, deamidacija asparagina i glutamina, dehidracija serina i treonina

3.2.14.9. Kvantitativna analiza rezultata

Rezultati dobiveni obradom podataka međusobno su se usporedili koristeći alat Expression analysis koji je sastavni dio programa ProteinLynx Global Server 3.0.1. Alatom Expression analysis izolirale su se i ekstrahirale mase peptida te se izračunao njihov relativan udio. Relativni udio ukazuje ima li određeni peptid (protein) pojačanu ekspresiju ili je njegova ekspresija smanjena. Proteini su analizirani UniProt bazom podataka (dostupno na http://www.uniprot.org/).

Za kvantitativnu analizu rezultata koristili su se podaci dobiveni analizom tri tehničke replike svakog uzorka. Tehničke replike grupirane su u grupe te su liste identificiranih proteina svake grupe korištene za analizu. Za normalizaciju je korišten interni standard (BSA digest).

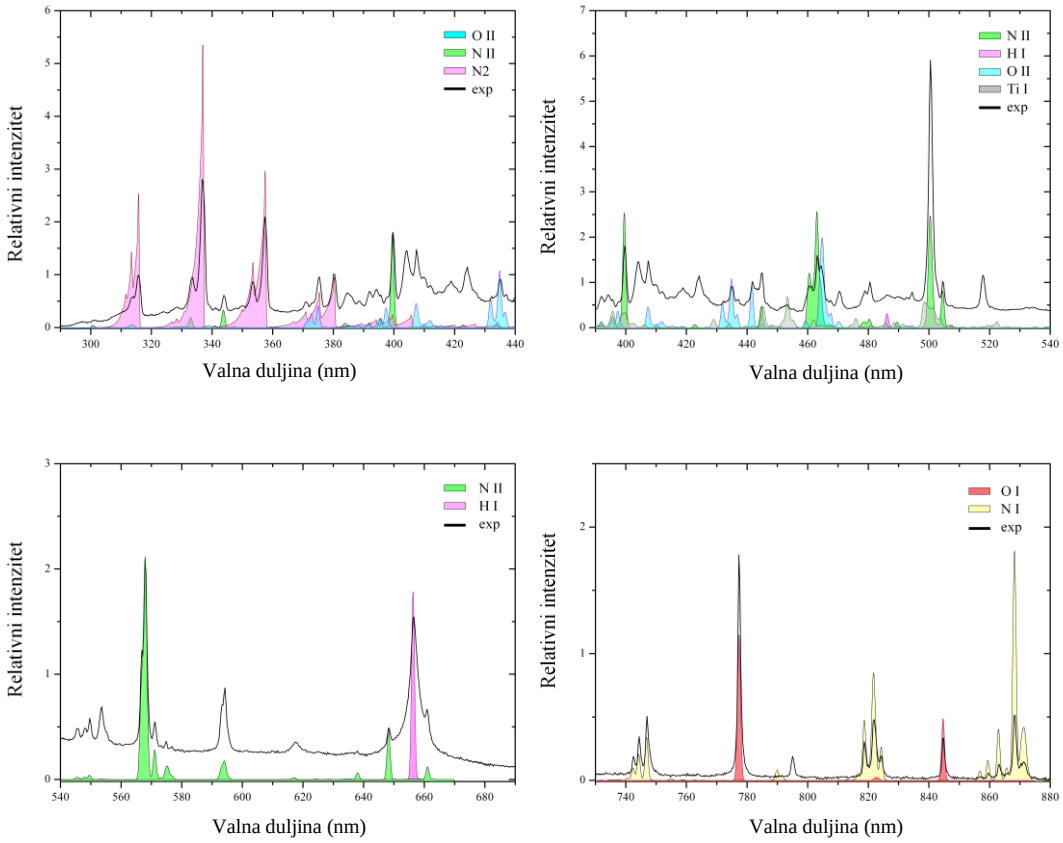
3.2.14.10. Protein-protein interakcije

Protein-protein interakcija načinjena je koristeći web sučelje STRING (Franceschini i sur., 2012; dostupno na https://string-db.org/). Protein-protein interakcijama odredila se povezanost različito eksprimiranih proteina u analiziranim uzorcima.

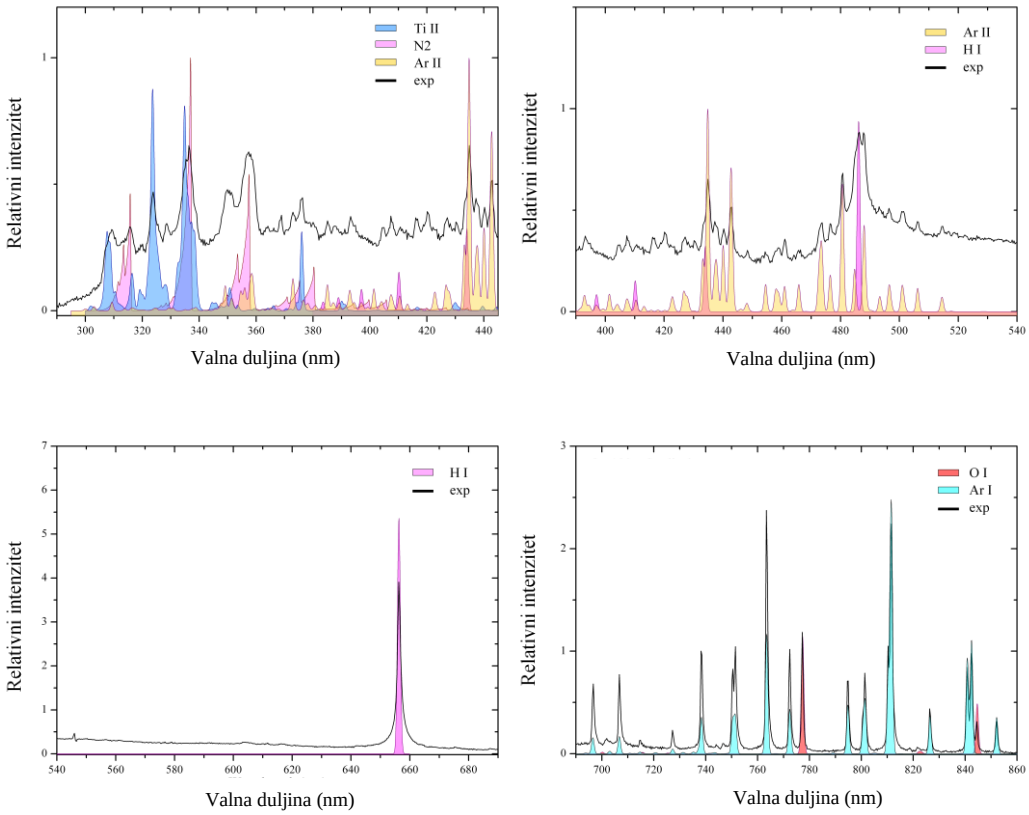
4. REZULTATI

4.1. Optička emisijska spektroskopija

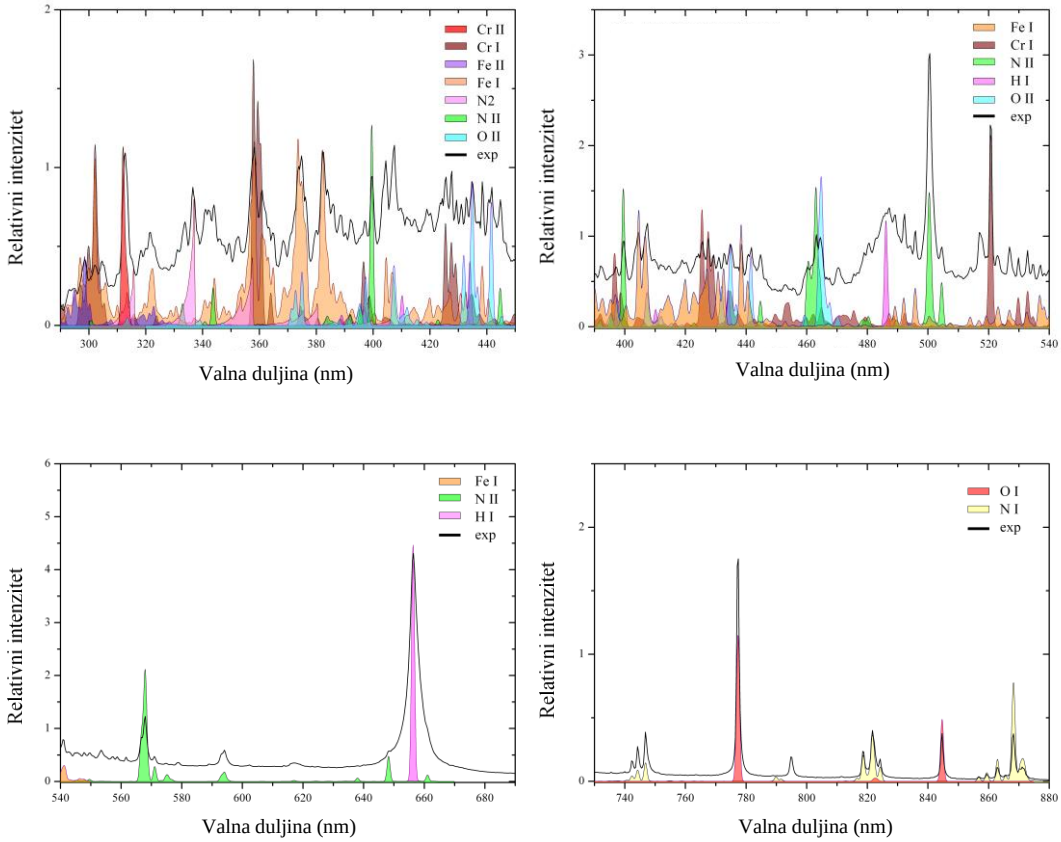
Optička emisijska spektroskopija je metoda mjerenja koja se temelji na činjenici da kvantni sustav prelaskom iz jednog kvantnog stanja u drugo mijenja energiju. Iz odnosa relativnog intenziteta i valne duljine očitavaju se generirane kemijske vrste tijekom plazma tretmana.



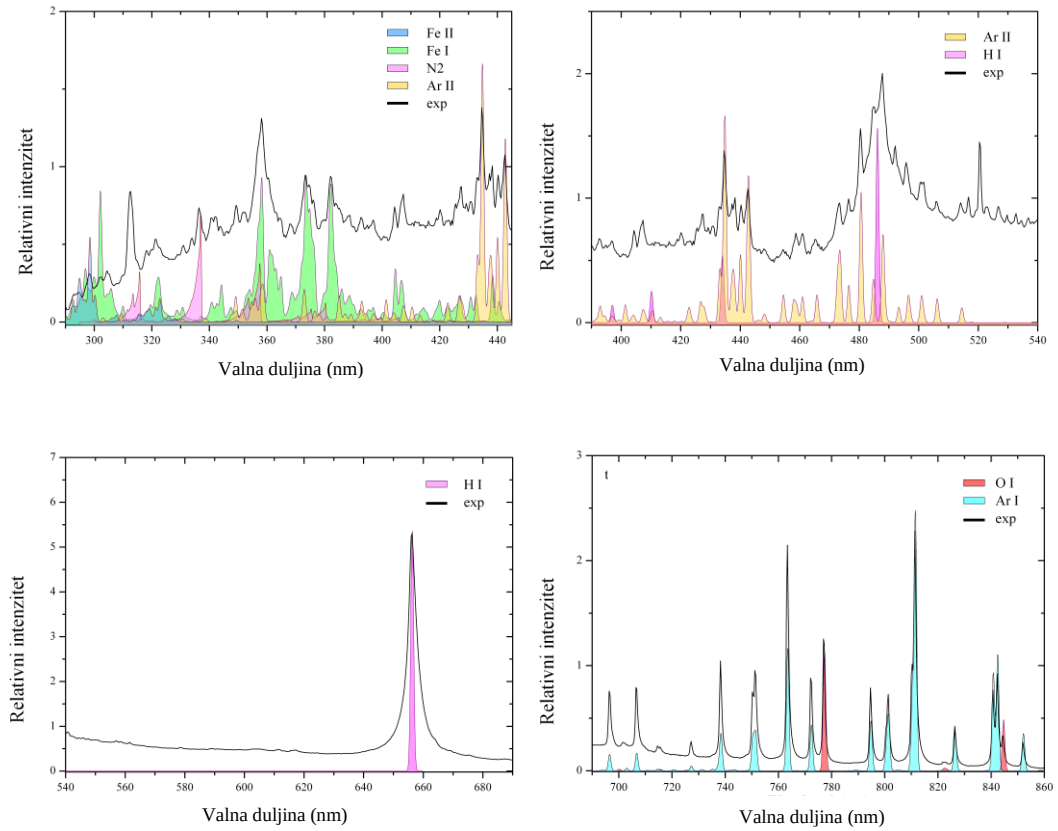
Slika 16. Optička emisijska spektroskopija pri tretmanu u plinskoj fazi pri 90 Hz, radnom plinu zraku i pozitivnom polaritetu



Slika 17. Optička emisijska spektroskopija pri tretmanu u plinskoj fazi pri 90 Hz, radnom plinu argonu i pozitivnom polaritetu



Slika 18. Optička emisijska spektroskopija pri tretmanu plazme u tekućinskoj fazi u mjehurićima pri 90 Hz, radnom plinu zraku i pozitivnom polaritetu



Slika 19. Optička emisijska spektroskopija pri tretmanu plazme u tekućinskoj fazi u mjehurićima pri 90 Hz, radnom plinu argonu i pozitivnom polaritetu

4.2. Fizikalno-kemijski parametri

Tablica 8. Rezultati analize H_2O_2 (mg L^{-1}), pH, provodljivosti (µS cm^{-1}) i temperature (°C) prije i nakon tretmana bakterije *E. coli* plinskom plazmom

Uz.	H_2O_2 (mg L^{-1}) pr. tret.	H_2O_2 (mg L^{-1}) po. tret.	pH pr. tret.	pH po. tret.	σ (µS cm^{-1}) pr. tret.	σ (µS cm^{-1}) po. tret.	T (°C) pr. tret.	T (°C) po. tret.
1	0,0±0,01	16,7±0,02	7,0±0,01	5,3±0,01	100,0±0,02	156,6±0,05	18,2±0,001	26,4±0,002
2	0,1±0,03	22,5±0,03	7,0±0,05	3,8±0,02	100,0±0,04	155,6±0,04	18,0±0,005	29,7±0,008
3	0,0±0,01	2,3±0,01	6,9±0,05	5,1±0,05	100,0±0,05	115,4±0,01	18,1±0,005	23,3±0,006
4	0,2±0,02	11,4±0,01	6,9±0,04	6,0±0,05	100,0±0,03	135,1±0,01	18,0±0,008	23,9±0,001
5	0,2±0,03	17,1±0,05	6,9±0,05	5,0±0,03	100,0±0,04	159,1±0,05	18,0±0,004	29,2±0,001
6	0,0±0,01	7,3±0,05	6,9±0,03	5,9±0,01	100,0±0,01	111,3±0,05	18,0±0,005	22,1±0,001
7	0,0±0,01	14,8±0,02	6,9±0,03	3,9±0,01	100,0±0,02	129,5±0,01	18,1±0,007	25,8±0,005
8	0,0±0,05	11,7±0,02	7,0±0,02	6,1±0,03	100,0±0,01	122,4±0,02	18,2±0,008	23,5±0,006
9	0,1±0,05	15,4±0,01	7,0±0,02	5,6±0,01	100,0±0,01	138,2±0,02	18,0±0,002	22,4±0,008
10	0,2±0,01	10,9±0,01	6,9±0,05	4,5±0,05	100,0±0,02	164,7±0,02	18,0±0,001	30,1±0,001
11	0,0±0,01	7,5±0,05	6,9±0,05	3,8±0,04	100,0±0,02	128,6±0,05	18,1±0,001	22,7±0,001
12	0,2±0,02	4,8±0,05	6,9±0,05	5,8±0,05	100,0±0,02	125,9±0,05	18,1±0,001	21,9±0,001

*Rezultati su prikazani prema planu pokusa (tablica 4)

Tablica 9. Rezultati analize H_2O_2 (mg L^{-1}), pH, provodljivosti (µS cm^{-1}) i temperature (°C) prije i nakon tretmana bakterije *E. coli* tekućinskom plazmom u mjehurićima

Uz.	H_2O_2 (mg L^{-1}) pr. tret.	H_2O_2 (mg L^{-1}) po. tret.	pH pr. tret.	pH po. tret.	σ (µS cm^{-1}) pr. tret.	σ (µS cm^{-1}) po. tret.	T (°C) pr. tret.	T (°C) po. tret.
1	0,1±0,01	11,7±0,01	6,9±0,02	4,6±0,03	100,0±0,05	147,2±0,08	18,3±0,003	25,8±0,005
2	0,2±0,02	10,7±0,01	7,0±0,05	4,2±0,01	100,0±0,07	149,6±0,04	18,0±0,002	26,1±0,009
3	0,0±0,01	3,4±0,05	7,0±0,05	6,0±0,01	100,1±0,02	117,2±0,02	18,1±0,005	20,3±0,009
4	0,1±0,01	8,6±0,05	6,9±0,01	5,7±0,05	100,0±0,06	145,7±0,05	18,0±0,008	25,8±0,002
5	0,1±0,05	13,7±0,02	6,9±0,01	4,7±0,05	100,0±0,02	168,3±0,05	18,0±0,004	28,7±0,003
6	0,0±0,01	3,4±0,02	7,0±0,02	6,1±0,02	100,0±0,02	115,7±0,02	18,1±0,006	20,4±0,003
7	0,0±0,01	7,2±0,01	7,0±0,02	5,9±0,01	100,0±0,01	127,6±0,01	18,1±0,001	22,8±0,001
8	0,1±0,05	6,4±0,01	6,9±0,01	5,2±0,01	100,0±0,01	123,4±0,02	18,3±0,001	22,4±0,001
9	0,2±0,05	6,3±0,01	7,0±0,01	5,0±0,02	100,0±0,05	119,7±0,02	18,0±0,005	21,8±0,005
10	0,1±0,02	14,1±0,01	6,9±0,03	4,3±0,01	100,0±0,04	170,1±0,01	18,1±0,007	29,6±0,005
11	0,0±0,01	6,2±0,02	7,0±0,03	5,6±0,03	100,1±0,05	126,8±0,01	18,1±0,002	21,8±0,004
12	0,1±0,01	7,5±0,02	6,9±0,01	5,5±0,03	100,0±0,05	142,3±0,01	18,1±0,002	25,8±0,004

*Rezultati su prikazani prema planu pokusa (tablica 4)

Tablica 10. Rezultati analize H_2O_2 (mg L^{-1}), pH, provodljivosti (µS cm^{-1}) i temperature (°C) prije i nakon tretmana bakterije *S. enterica* plinskom plazmom

Uz.	H_2O_2 (mg L^{-1}) pr. tret.	H_2O_2 (mg L^{-1}) po. tret.	pH pr. tret.	pH po. tret.	σ (µS cm^{-1}) pr. tret.	σ (µS cm^{-1}) po. tret.	T (°C) pr. tret.	T (°C) po. tret.
1	0,2±0,05	16,4±0,04	7,0±0,05	4,7±0,01	100,0±0,01	157,6±0,04	18,9±0,001	27,5±0,002
2	0,1±0,02	18,4±0,01	6,9±0,05	4,0±0,05	100,1±0,03	142,1±0,03	19,1±0,005	28,9±0,005
3	0,1±0,02	4,4±0,01	7,0±0,01	6,2±0,05	100,0±0,03	118,4±0,05	18,7±0,009	21,1±0,005
4	0,3±0,05	4,7±0,02	7,0±0,01	5,9±0,04	100,0±0,02	162,4±0,05	18,9±0,005	26,1±0,004
5	0,3±0,01	9,6±0,01	7,0±0,05	4,1±0,04	100,0±0,02	193,12±0,04	18,9±0,005	30,5±0,001
6	0,3±0,01	0,7±0,02	6,9±0,05	6,1±0,02	100,0±0,01	116,7±0,06	19,6±0,001	20,4±0,001
7	0,3±0,05	1,9±0,05	6,9±0,01	5,0±0,02	100,0±0,01	129,1±0,01	19,6±0,001	22,7±0,005
8	0,2±0,05	8,2±0,05	7,0±0,01	6,4±0,01	100,0±0,05	142,1±0,01	18,9±0,001	23,9±0,001
9	0,1±0,04	9,5±0,04	6,9±0,05	5,8±0,04	100,1±0,05	135,6±0,05	19,1±0,002	23,7±0,005
10	0,2±0,02	16,9±0,05	7,0±0,03	5,3±0,05	100,0±0,01	184,3±0,06	19,0±0,005	30,1±0,005
11	0,1±0,02	10,2±0,04	7,0±0,03	5,6±0,05	100,0±0,01	126,1±0,04	18,7±0,005	24,3±0,004
12	0,2±0,01	9,1±0,04	7,0±0,06	6,0±0,01	100,0±0,01	152,7±0,02	19,0±0,005	26,9±0,004

*Rezultati su prikazani prema planu pokusa (tablica 4)

Tablica 11. Rezultati analize H_2O_2 (mg L^{-1}), pH, provodljivosti (µS cm^{-1}) i temperature (°C) prije i nakon tretmana bakterije *S. enterica* tekućinskom plazmom u mjehurićima

Uz.	H_2O_2 (mg L^{-1}) pr. tret.	H_2O_2 (mg L^{-1}) po. tret.	pH pr. tret.	pH po. tret.	σ (µS cm^{-1}) pr. tret.	σ (µS cm^{-1}) po. tret.	T (°C) pr. tret.	T (°C) po. tret.
1	1,3±0,02	9,3±0,05	7,0±0,02	5,1±0,01	100,0±0,04	142,5±0,02	20,6±0,002	28,1±0,003
2	2,5±0,01	7,6±0,05	6,9±0,05	4,7±0,01	100,1±0,03	140,6±0,02	19,0±0,001	27,1±0,004
3	0,9±0,01	5,6±0,02	7,0±0,05	6,5±0,05	100,1±0,04	115,4±0,05	19,0±0,001	21,6±0,002
4	0,1±0,05	6,2±0,02	7,0±0,01	6,2±0,05	100,0±0,04	148,6±0,05	19,1±0,002	25,8±0,001
5	0,1±0,05	9,0±0,03	7,0±0,05	5,6±0,04	100,0±0,02	186,5±0,05	19,1±0,001	30,4±0,001
6	0,1±0,01	4,2±0,03	7,0±0,05	6,3±0,05	100,0±0,03	114,7±0,01	19,1±0,001	23,4±0,001
7	0,1±0,01	6,8±0,05	7,0±0,01	5,4±0,05	100,0±0,02	119,2±0,03	19,1±0,003	27,2±0,005
8	1,3±0,05	4,9±0,05	7,0±0,05	6,2±0,01	100,0±0,02	127,1±0,05	20,6±0,008	24,3±0,005
9	2,5±0,05	4,5±0,01	6,9±0,04	5,8±0,05	100,1±0,01	124,3±0,05	19,0±0,002	24,3±0,002
10	0,8±0,01	10,1±0,01	7,0±0,05	4,7±0,05	100,1±0,02	153,7±0,01	19,2±0,001	26,4±0,001
11	0,9±0,01	8,1±0,04	7,0±0,05	6,0±0,02	100,1±0,01	120,1±0,01	19,0±0,005	24,3±0,001
12	0,8±0,02	10,1±0,04	7,0±0,05	6,1±0,01	100,1±0,02	199,6±0,01	19,2±0,002	30,1±0,006

*Rezultati su prikazani prema planu pokusa (tablica 4)

Tablica 12. Rezultati analize H_2O_2 (mg L^{-1}), pH, provodljivosti (µS cm^{-1}) i temperature (°C) prije i nakon tretmana bakterije *L. innocua* plinskom plazmom

Uz.	H_2O_2 (mg L^{-1}) pr. tret.	H_2O_2 (mg L^{-1}) po. tret.	pH pr. tret.	pH po. tret.	σ (µS cm^{-1}) pr. tret.	σ (µS cm^{-1}) po. tret.	T (°C) pr. tret.	T (°C) po. tret.
1	0,2±0,05	6,6±0,05	7,0±0,05	5,6±0,01	100,1±0,01	115,3±0,05	16,3±0,001	20,3±0,002
2	0,5±0,01	6,4±0,05	6,9±0,05	3,0±0,01	100,4±0,06	155,9±0,05	16,2±0,001	22,2±0,004
3	0,2±0,01	4,7±0,01	6,9±0,01	6,0±0,05	100,9±0,08	117,8±0,03	16,2±0,003	17,1±0,001
4	0,1±0,02	3,5±0,01	6,9±0,03	4,9±0,05	100,0±0,04	148,7±0,01	15,8±0,001	20,3±0,001
5	0,1±0,05	2,7±0,01	6,9±0,06	2,8±0,01	100,0±0,06	184,9±0,01	15,8±0,001	23,9±0,001
6	0,1±0,05	1,9±0,01	7,0±0,06	5,6±0,04	100,5±0,05	125,4±0,02	15,6±0,001	18,1±0,002
7	0,1±0,01	2,8±0,05	7,0±0,02	3,0±0,06	100,5±0,05	146,1±0,02	15,6±0,003	21,1±0,003
8	0,2±0,01	6,7±0,05	7,0±0,01	6,1±0,01	100,1±0,01	113,8±0,04	16,3±0,005	18,6±0,003
9	0,5±0,05	2,3±0,02	6,9±0,03	5,9±0,05	100,4±0,01	131,4±0,01	16,2±0,001	18,1±0,001
10	0,1±0,05	5,2±0,01	6,9±0,01	3,9±0,05	100,0±0,04	148,2±0,01	15,7±0,001	23,7±0,001
11	0,2±0,05	5,5±0,06	6,9±0,01	5,7±0,07	100,9±0,04	129,6±0,03	16,2±0,001	18,1±0,001
12	0,1±0,05	5,0±0,08	6,9±0,01	5,0±0,04	100,0±0,01	127,5±0,03	15,7±0,001	20,8±0,001

*Rezultati su prikazani prema planu pokusa (tablica 4)

Tablica 13. Rezultati analize H_2O_2 (mg L^{-1}), pH, provodljivosti (µS cm^{-1}) i temperature (°C) prije i nakon tretmana bakterije *L. innocua* tekućinskom plazmom u mjehurićima

Uz.	H_2O_2 (mg L^{-1}) pr. tret.	H_2O_2 (mg L^{-1}) po. tret.	pH pr. tret.	pH po. tret.	σ (µS cm^{-1}) pr. tret.	σ (µS cm^{-1}) po. tret.	T (°C) pr. tret.	T (°C) po. tret.
1	0,4±0,02	29,5±0,01	7,0±0,02	4,5±0,01	100,5±0,02	157,1±0,02	18,9±0,001	28,7±0,001
2	0,2±0,01	4,3±0,01	7,0±0,05	4,7±0,05	100,3±0,01	146,5±0,04	19,6±0,006	27,8±0,008
3	0,5±0,01	14,3±0,05	6,9±0,04	5,8±0,04	100,0±0,05	124,2±0,05	19,1±0,007	21,7±0,002
4	0,1±0,05	2,6±0,05	7,0±0,07	6,5±0,01	100,2±0,05	134,7±0,05	20,4±0,001	25,7±0,009
5	0,1±0,01	4,5±0,01	7,0±0,06	5,0±0,01	100,2±0,04	192,4±0,05	20,4±0,001	31,4±0,001
6	0,5±0,01	3,9±0,01	6,9±0,04	6,0±0,03	100,0±0,03	124,1±0,01	19,9±0,005	25,1±0,005
7	0,5±0,05	7,3±0,05	6,9±0,04	5,1±0,04	100,0±0,04	132,1±0,01	19,9±0,005	28,7±0,004
8	0,4±0,04	15,3±0,05	7,0±0,03	5,8±0,03	100,5±0,01	134,2±0,04	18,9±0,003	24,6±0,007
9	0,2±0,01	2,6±0,01	7,0±0,01	6,4±0,05	100,3±0,05	127,6±0,03	19,6±0,001	25,7±0,006
10	0,1±0,01	30,4±0,01	7,0±0,01	3,8±0,05	100,1±0,04	187,9±0,04	18,8±0,001	30,4±0,004
11	0,5±0,02	26,5±0,04	6,9±0,05	5,0±0,01	100,0±0,01	132,4±0,07	19,1±0,005	24,6±0,002
12	0,1±0,01	16,2±0,07	7,0±0,04	4,9±0,05	100,1±0,01	153,6±0,05	18,8±0,005	26,8±0,002

*Rezultati su prikazani prema planu pokusa (tablica 4)

Tablica 14. Rezultati analize H_2O_2 (mg L^{-1}), pH, provodljivosti (µS cm^{-1}) i temperature (°C) prije i nakon tretmana bakterije *S. aureus* plinskom plazmom

Uz.	H_2O_2 (mg L^{-1}) pr. tret.	H_2O_2 (mg L^{-1}) po. tret.	pH pr. tret.	pH po. tret.	σ (µS cm^{-1}) pr. tret.	σ (µS cm^{-1}) po. tret.	T (°C) pr. tret.	T (°C) po. tret.
1	0,2±0,02	15,4±0,01	7,0±0,01	4,7±0,05	100,0±0,05	145,6±0,01	18,2±0,004	25,4±0,006
2	0,0±0,02	18,3±0,01	6,9±0,01	4,0±0,04	100,0±0,05	153,7±0,01	18,0±0,002	26,7±0,009
3	0,1±0,01	8,6±0,05	6,9±0,05	5,2±0,04	100,0±0,01	124,9±0,03	18,1±0,002	20,4±0,001
4	0,0±0,04	11,4±0,05	6,9±0,01	5,0±0,05	100,0±0,01	158,1±0,01	18,0±0,001	26,3±0,002
5	0,0±0,04	19,2±0,01	6,9±0,01	4,6±0,05	100,0±0,02	189,4±0,01	18,0±0,001	30,2±0,004
6	0,0±0,01	8,7±0,01	6,9±0,05	6,0±0,01	100,0±0,05	129,6±0,05	18,1±0,004	21,6±0,005
7	0,0±0,01	13,6±0,05	6,9±0,02	4,2±0,01	100,0±0,05	138,2±0,05	18,1±0,004	22,5±0,005
8	0,2±0,05	11,6±0,04	7,0±0,02	5,2±0,01	100,0±0,04	146,4±0,01	18,2±0,005	23,7±0,001
9	0,0±0,01	15,7±0,05	6,9±0,02	5,0±0,04	100,0±0,02	142,7±0,01	18,0±0,001	25,1±0,005
10	0,1±0,01	16,3±0,04	6,9±0,01	4,9±0,04	100,0±0,01	184,2±0,04	18,0±0,001	29,5±0,009
11	0,1±0,01	9,6±0,02	6,9±0,01	5,1±0,01	100,0±0,01	123,0±0,04	18,1±0,001	23,1±0,007
12	0,1±0,01	7,8±0,01	6,9±0,01	6,1±0,01	100,0±0,01	119,6±0,04	18,0±0,005	24,9±0,002

*Rezultati su prikazani prema planu pokusa (tablica 4)

Tablica 15. Rezultati analize H_2O_2 (mg L^{-1}), pH, provodljivosti (µS cm^{-1}) i temperature (°C) prije i nakon tretmana bakterije *S. aureus* tekućinskom plazmom u mjehurićima

Uz.	H_2O_2 (mg L^{-1}) pr. tret.	H_2O_2 (mg L^{-1}) po. tret.	pH pr. tret.	pH po. tret.	σ (µS cm^{-1}) pr. tret.	σ (µS cm^{-1}) po. tret.	T (°C) pr. tret.	T (°C) po. tret.
1	0,0±0,01	15,7±0,05	6,9±0,01	5,0±0,01	100,0±0,04	168,4±0,02	18,2±0,002	27,1±0,005
2	0,1±0,05	17,6±0,05	6,9±0,01	4,7±0,05	100,0±0,02	159,4±0,01	18,2±0,005	26,8±0,005
3	0,1±0,05	7,4±0,01	6,9±0,04	5,8±0,01	100,0±0,02	132,7±0,01	18,2±0,009	22,5±0,004
4	0,0±0,05	13,4±0,04	7,0±0,05	5,0±0,01	100,0±0,05	163,3±0,05	18,0±0,004	26,8±0,008
5	0,0±0,01	19,6±0,05	7,0±0,05	4,2±0,05	100,0±0,02	189,2±0,05	18,0±0,001	30,4±0,006
6	0,0±0,01	8,6±0,04	6,9±0,02	5,3±0,04	100,0±0,04	132,1±0,04	18,1±0,006	22,9±0,002
7	0,0±0,02	11,7±0,05	6,9±0,02	5,0±0,05	100,0±0,01	139,4±0,04	18,1±0,005	23,1±0,002
8	0,0±0,05	10,5±0,05	6,9±0,05	5,3±0,05	100,0±0,05	143,5±0,05	18,2±0,005	24,3±0,002
9	0,1±0,05	12,4±0,05	6,9±0,05	5,0±0,01	100,0±0,05	154,2±0,05	18,2±0,008	25,1±0,005
10	0,0±0,05	16,9±0,01	7,0±0,05	4,2±0,01	100,0±0,05	183,2±0,01	18,2±0,004	29,6±0,003
11	0,1±0,01	10,4±0,01	6,9±0,03	5,1±0,03	100,0±0,04	146,7±0,01	18,2±0,001	24,8±0,001
12	0,0±0,01	12,6±0,01	7,0±0,03	5,0±0,03	100,0±0,04	171,5±0,05	18,2±0,001	27,2±0,001

*Rezultati su prikazani prema planu pokusa (tablica 4)

Tablica 16. Rezultati analize H_2O_2 (mg L^{-1}), pH, provodljivosti (µS cm^{-1}) i temperature (°C) prije i nakon tretmana bakterije *B. cereus* plinskom plazmom

Uz.	H_2O_2 (mg L^{-1}) pr. tret.	H_2O_2 (mg L^{-1}) po. tret.	pH pr. tret.	pH po. tret.	σ (µS cm^{-1}) pr. tret.	σ (µS cm^{-1}) po. tret.	T (°C) pr. tret.	T (°C) po. tret.
1	0,0±0,02	14,3±0,01	7,0±0,03	4,4±0,02	100,0±0,05	158,6±0,01	18,0±0,008	26,7±0,001
2	0,1±0,05	11,7±0,01	6,9±0,05	5,0±0,02	100,0±0,04	160,9±0,05	18,1±0,004	27,5±0,005
3	0,0±0,01	5,8±0,05	6,9±0,05	6,3±0,04	100,0±0,02	118,4±0,01	18,0±0,001	20,3±0,005
4	0,0±0,01	8,9±0,02	7,0±0,05	6,0±0,05	100,0±0,02	147,2±0,02	18,1±0,001	25,9±0,008
5	0,0±0,04	17,4±0,05	7,0±0,02	5,2±0,05	100,0±0,02	185,3±0,02	18,1±0,003	30,1±0,002
6	0,1±0,05	7,3±0,05	7,0±0,02	6,4±0,02	100,0±0,04	121,7±0,04	18,2±0,005	20,3±0,003
7	0,1±0,05	9,6±0,05	7,0±0,01	6,0±0,03	100,0±0,01	132,4±0,02	18,2±0,002	22,9±0,003
8	0,0±0,01	7,4±0,01	7,0±0,01	5,7±0,04	100,0±0,01	139,2±0,01	18,0±0,003	22,6±0,008
9	0,1±0,03	6,9±0,01	6,9±0,04	5,3±0,04	100,0±0,01	141,4±0,01	18,1±0,001	23,4±0,004
10	0,1±0,02	16,8±0,01	7,0±0,02	4,6±0,02	100,0±0,05	182,6±0,01	18,1±0,002	29,6±0,001
11	0,0±0,03	10,1±0,05	6,9±0,05	6,0±0,02	100,0±0,01	127,3±0,05	18,0±0,001	22,8±0,001
12	0,1±0,01	9,4±0,05	7,0±0,05	5,3±0,01	100,0±0,01	149,1±0,03	18,1±0,001	24,7±0,001

*Rezultati su prikazani prema planu pokusa (tablica 4)

Tablica 17. Rezultati analize H_2O_2 (mg L^{-1}), pH, provodljivosti (µS cm^{-1}) i temperature (°C) prije i nakon tretmana bakterije *B. cereus* tekućinskom plazmom u mjehurićima

Uz.	H_2O_2 (mg L^{-1}) pr. tret.	H_2O_2 (mg L^{-1}) po. tret.	pH pr. tret.	pH po. tret.	σ (µS cm^{-1}) pr. tret.	σ (µS cm^{-1}) po. tret.	T (°C) pr. tret.	T (°C) po. tret.
1	0,0±0,02	7,7±0,01	6,9±0,05	6,0±0,02	100,0±0,01	142,8±0,02	21,9±0,002	26,4±0,005
2	0,1±0,04	10,6±0,05	7,0±0,05	4,5±0,04	100,0±0,05	185,3±0,05	24,4±0,006	30,1±0,003
3	0,0±0,02	6,0±0,05	6,9±0,02	6,3±0,01	100,0±0,01	158,6±0,05	22,1±0,004	27,2±0,005
4	0,2±0,01	4,4±0,04	7,0±0,01	6,0±0,01	100,0±0,01	145,4±0,01	23,1±0,008	26,9±0,005
5	0,2±0,03	18,3±0,05	7,0±0,01	5,1±0,05	100,0±0,01	196,3±0,01	23,1±0,001	30,0±0,001
6	0,0±0,01	12,8±0,01	7,0±0,05	6,3±0,05	100,0±0,04	137,2±0,05	23,8±0,001	25,3±0,001
7	0,0±0,01	8,0±0,05	7,0±0,04	6,1±0,01	100,0±0,04	171,3±0,05	23,8±0,005	29,3±0,006
8	0,0±0,01	7,7±0,05	6,9±0,01	6,0±0,01	100,0±0,04	142,8±0,05	21,9±0,004	26,4±0,003
9	0,1±0,04	7,2±0,02	7,0±0,01	5,6±0,01	100,0±0,04	168,4±0,04	24,4±0,008	28,5±0,003
10	0,1±0,05	11,5±0,02	7,0±0,04	4,2±0,05	100,0±0,05	189,4±0,04	23,1±0,004	30,0±0,004
11	0,0±0,05	9,2±0,01	6,9±0,02	6,0±0,05	100,0±0,05	176,4±0,05	22,1±0,004	29,1±0,004
12	0,1±0,01	4,4±0,01	7,0±0,01	5,7±0,05	100,0±0,05	152,6±0,05	23,1±0,001	27,4±0,008

*Rezultati su prikazani prema planu pokusa (tablica 4)

Tablica 18. Rezultati analize H_2O_2 (mg L^{-1}), pH, provodljivosti (µS cm^{-1}) i temperature (°C) prije i nakon tretmana kvasca *Rhodotorula* spp plinskom plazmom

Uz.	H_2O_2 (mg L^{-1}) pr. tret.	H_2O_2 (mg L^{-1}) po. tret.	pH pr. tret.	pH po. tret.	σ (µS cm^{-1}) pr. tret.	σ (µS cm^{-1}) po. tret.	T (°C) pr. tret.	T (°C) po. tret.
1	0,1±0,02	25,9±0,03	6,9±0,02	4,0±0,01	100,0±0,02	147,3±0,02	18,0±0,002	24,2±0,001
2	0,2±0,04	15,3±0,05	7,0±0,01	4,2±0,01	100,0±0,05	142,8±0,01	18,0±0,008	20,7±0,005
3	0,2±0,02	13,3±0,05	7,0±0,01	6,1±0,05	100,0±0,05	115,6±0,02	19,5±0,004	21,4±0,005
4	0,1±0,05	13,1±0,02	7,0±0,01	6,1±0,03	100,0±0,03	140,7±0,02	18,2±0,002	24,0±0,002
5	0,1±0,05	18,4±0,03	7,0±0,05	5,8±0,01	100,0±0,01	171,5±0,01	18,2±0,004	29,6±0,001
6	0,1±0,04	8,7±0,02	7,0±0,05	4,1±0,02	101,4±0,01	110,1±0,05	18,0±0,001	20,3±0,001
7	0,1±0,01	26,3±0,02	6,9±0,01	4,0±0,01	100,0±0,05	117,4±0,05	18,0±0,001	21,1±0,005
8	0,1±0,05	18,0±0,02	6,9±0,01	5,1±0,01	100,0±0,05	129,6±0,01	18,0±0,005	23,7±0,003
9	0,2±0,05	16,1±0,01	7,0±0,05	6,1±0,01	100,0±0,02	128,7±0,01	18,0±0,003	24,6±0,001
10	0,2±0,03	19,4±0,01	7,0±0,03	5,6±0,04	100,0±0,01	175,1±0,05	19,5±0,005	30,4±0,001
11	0,2±0,01	15,6±0,05	7,0±0,01	5,0±0,03	100,0±0,02	123,3±0,01	19,5±0,005	22,8±0,005
12	0,2±0,01	17,9±0,05	7,0±0,01	5,1±0,05	100,0±0,01	122,4±0,01	19,5±0,002	23,7±0,005

*Rezultati su prikazani prema planu pokusa (tablica 4)

Tablica 19. Rezultati analize H_2O_2 (mg L^{-1}), pH, provodljivosti (µS cm^{-1}) i temperature (°C) prije i nakon tretmana kvasca *Rhodotorula* spp tekućinskom plazmom u mjehurićima

Uz.	H_2O_2 (mg L^{-1}) pr. tret.	H_2O_2 (mg L^{-1}) po. tret.	pH pr. tret.	pH po. tret.	σ (µS cm^{-1}) pr. tret.	σ (µS cm^{-1}) po. tret.	T (°C) pr. tret.	T (°C) po. tret.
1	0,1±0,02	8,2±0,01	7,0±0,01	4,7±0,05	100,0±0,04	146,2±0,02	18,0±0,002	26,5±0,004
2	0,1±0,01	7,2±0,01	6,9±0,03	4,6±0,04	100,0±0,03	151,4±0,04	18,3±0,009	25,9±0,004
3	0,3±0,01	6,8±0,03	6,9±0,02	6,0±0,02	101,2±0,04	110,4±0,04	18,5±0,001	20,3±0,002
4	0,1±0,04	6,1±0,05	7,0±0,01	6,1±0,02	100,0±0,01	139,4±0,03	18,1±0,001	25,4±0,001
5	0,1±0,05	10,3±0,05	7,0±0,01	4,7±0,01	100,0±0,01	174,3±0,03	18,1±0,005	29,4±0,001
6	0,2±0,05	6,8±0,05	7,0±0,05	6,2±0,01	100,5±0,05	111,4±0,05	18,3±0,001	20,1±0,005
7	0,2±0,02	7,8±0,02	7,0±0,01	5,2±0,05	100,5±0,05	121,3±0,05	18,3±0,001	22,7±0,005
8	0,1±0,02	7,1±0,02	7,0±0,01	5,9±0,05	100,0±0,01	128,6±0,01	18,0±0,006	23,1±0,001
9	0,1±0,01	5,9±0,01	6,9±0,03	5,1±0,03	100,0±0,01	125,1±0,01	18,3±0,006	22,4±0,001
10	0,2±0,01	11,2±0,01	6,9±0,03	4,5±0,03	100,4±0,02	169,5±0,05	18,0±0,001	28,1±0,006
11	0,3±0,05	7,5±0,01	6,9±0,04	5,0±0,01	101,2±0,02	118,6±0,05	18,5±0,001	21,4±0,001
12	0,2±0,05	7,2±0,04	6,9±0,04	5,3±0,01	100,4±0,01	147,3±0,01	18,0±0,002	24,8±0,001

*Rezultati su prikazani prema planu pokusa (tablica 4)

Tablica 20. Rezultati analize H_2O_2 (mg L^{-1}), pH, provodljivosti (µS cm^{-1}) i temperature (°C) prije i nakon tretmana kvasca *S. cerevisiae* plinskom plazmom

Uz.	H_2O_2 (mg L^{-1}) pr. tret.	H_2O_2 (mg L^{-1}) po. tret.	pH pr. tret.	pH po. tret.	σ (µS cm^{-1}) pr. tret.	σ (µS cm^{-1}) po. tret.	T (°C) pr. tret.	T (°C) po. tret.
1	0,1±0,01	10,1±0,05	7,0±0,05	4,2±0,02	100,4±0,02	145,2±0,05	18,4±0,001	25,4±0,005
2	0,2±0,05	6,4±0,02	6,8±0,02	4,8±0,02	100,0±0,01	141,8±0,05	18,0±0,008	24,9±0,005
3	0,1±0,02	8,7±0,01	7,0±0,02	6,2±0,05	100,2±0,01	112,4±0,01	18,2±0,005	21,4±0,002
4	0,3±0,02	6,7±0,01	7,0±0,05	6,0±0,05	100,1±0,01	129,6±0,01	18,0±0,005	24,7±0,002
5	0,3±0,01	10,9±0,01	7,0±0,05	5,1±0,04	100,1±0,05	168,4±0,02	18,0±0,001	28,7±0,005
6	0,1±0,01	5,3±0,04	6,9±0,01	6,2±0,05	100,0±0,05	110,7±0,02	18,2±0,001	20,8±0,005
7	0,1±0,05	4,2±0,01	6,9±0,01	5,8±0,01	100,0±0,05	117,6±0,05	18,2±0,003	22,4±0,003
8	0,1±0,01	5,2±0,05	7,0±0,05	5,1±0,01	100,4±0,04	127,6±0,05	18,4±0,003	22,3±0,001
9	0,2±0,01	5,1±0,05	6,8±0,05	5,2±0,04	100,0±0,05	124,3±0,02	18,0±0,001	22,0±0,001
10	0,1±0,02	12,2±0,03	7,0±0,02	5,3±0,05	100,0±0,05	163,8±0,02	18,0±0,001	28,4±0,003
11	0,1±0,01	10,2±0,03	7,0±0,02	5,0±0,05	100,2±0,02	126,2±0,05	18,2±0,005	21,7±0,003
12	0,1±0,01	8,5±0,01	7,0±0,02	5,4±0,01	100,0±0,02	140,0±0,05	18,0±0,005	24,3±0,003

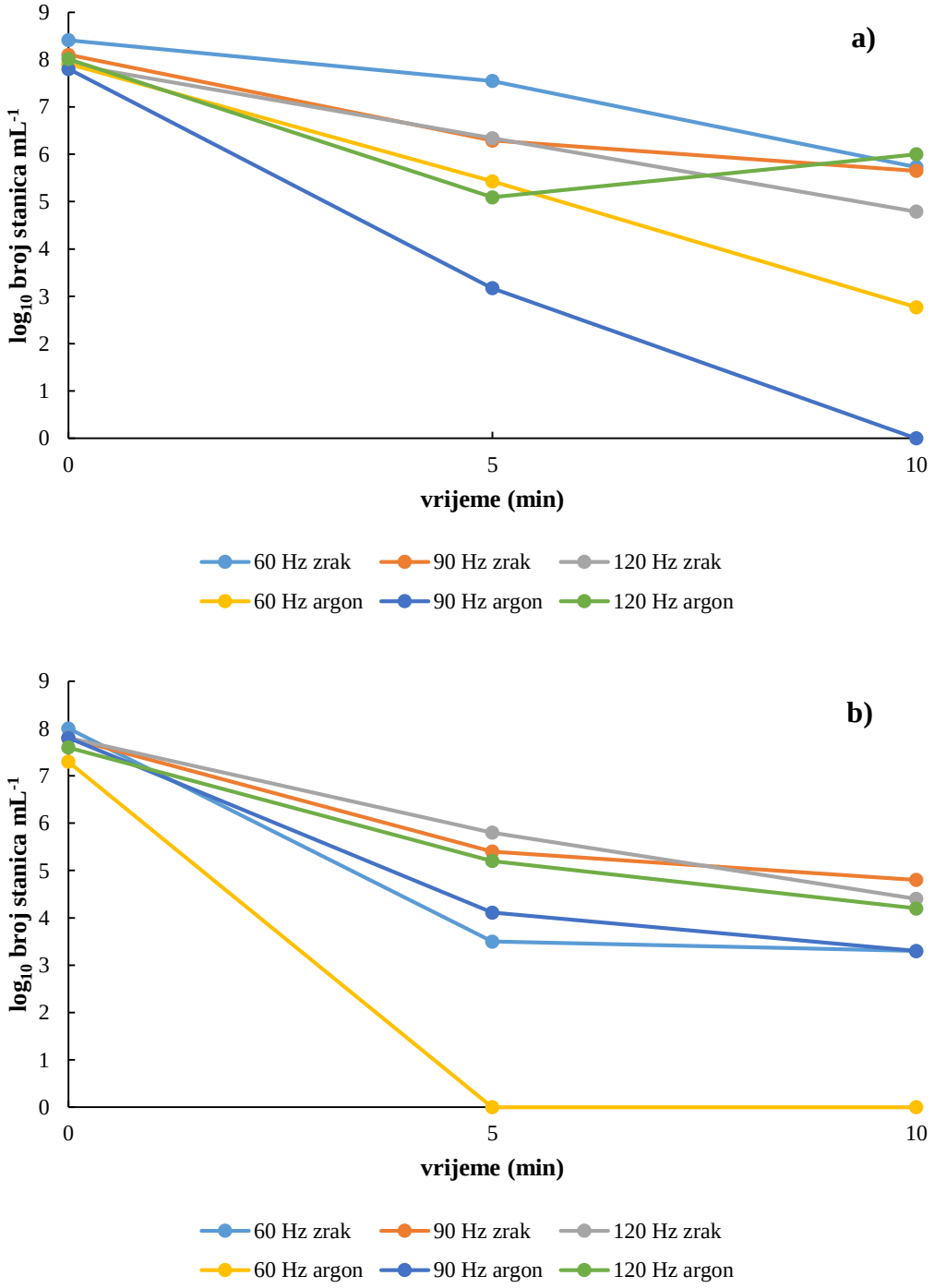
*Rezultati su prikazani prema planu pokusa (tablica 4)

Tablica 21. Rezultati analize H_2O_2 (mg L^{-1}), pH, provodljivosti (µS cm^{-1}) i temperature (°C) prije i nakon tretmana kvasca *S. cerevisiae* tekućinskom plazmom u mjehurićima

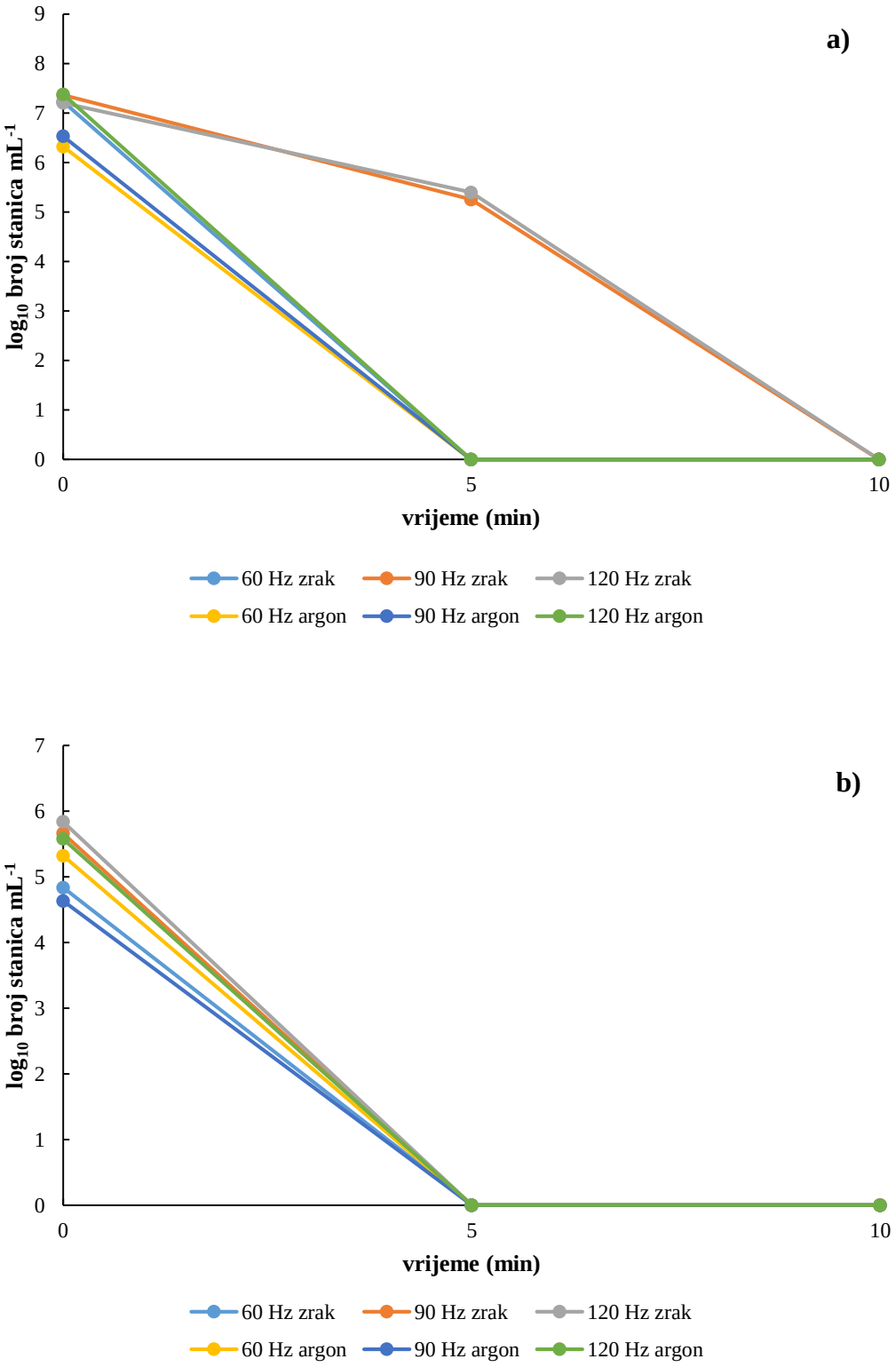
Uz.	H_2O_2 (mg L^{-1}) pr. tret.	H_2O_2 (mg L^{-1}) po. tret.	pH pr. tret.	pH po. tret.	σ (µS cm^{-1}) pr. tret.	σ (µS cm^{-1}) po. tret.	T (°C) pr. tret.	T (°C) po. tret.
1	0,2±0,05	5,4±0,02	7,0±0,01	4,7±0,05	100,1±0,04	148,4±0,05	18,1±0,001	26,1±0,002
2	0,4±0,04	3,3±0,02	6,9±0,05	4,8±0,05	100,0±0,04	137,1±0,05	18,0±0,005	25,1±0,007
3	0,1±0,04	6,9±0,05	7,0±0,05	5,9±0,02	100,0±0,05	114,1±0,02	18,1±0,009	19,9±0,002
4	0,1±0,05	4,1±0,05	6,9±0,05	6,0±0,01	100,0±0,05	142,7±0,04	18,1±0,009	25,8±0,002
5	0,1±0,05	9,3±0,05	6,9±0,01	4,7±0,01	100,0±0,05	174,3±0,05	18,1±0,001	29,7±0,001
6	0,1±0,02	2,8±0,03	7,0±0,02	6,2±0,05	100,0±0,03	112,5±0,05	18,0±0,001	20,1±0,005
7	0,1±0,02	3,6±0,03	7,0±0,02	5,1±0,05	100,0±0,02	124,1±0,03	18,0±0,001	22,3±0,001
8	0,2±0,05	4,1±0,04	7,0±0,01	6,1±0,01	100,1±0,05	136,4±0,05	18,1±0,005	24,2±0,001
9	0,4±0,05	2,7±0,05	6,9±0,01	6,1±0,01	100,0±0,05	127,1±0,05	18,0±0,001	21,8±0,005
10	0,2±0,01	9,3±0,05	7,0±0,02	4,2±0,03	100,0±0,05	168,6±0,02	18,2±0,005	28,8±0,005
11	0,1±0,01	8,4±0,05	7,0±0,01	5,0±0,03	100,0±0,02	120,3±0,02	18,1±0,005	21,4±0,001
12	0,2±0,05	5,1±0,01	7,0±0,01	5,2±0,01	100,0±0,02	135,9±0,02	18,2±0,001	24,4±0,001

*Rezultati su prikazani prema planu pokusa (tablica 4)

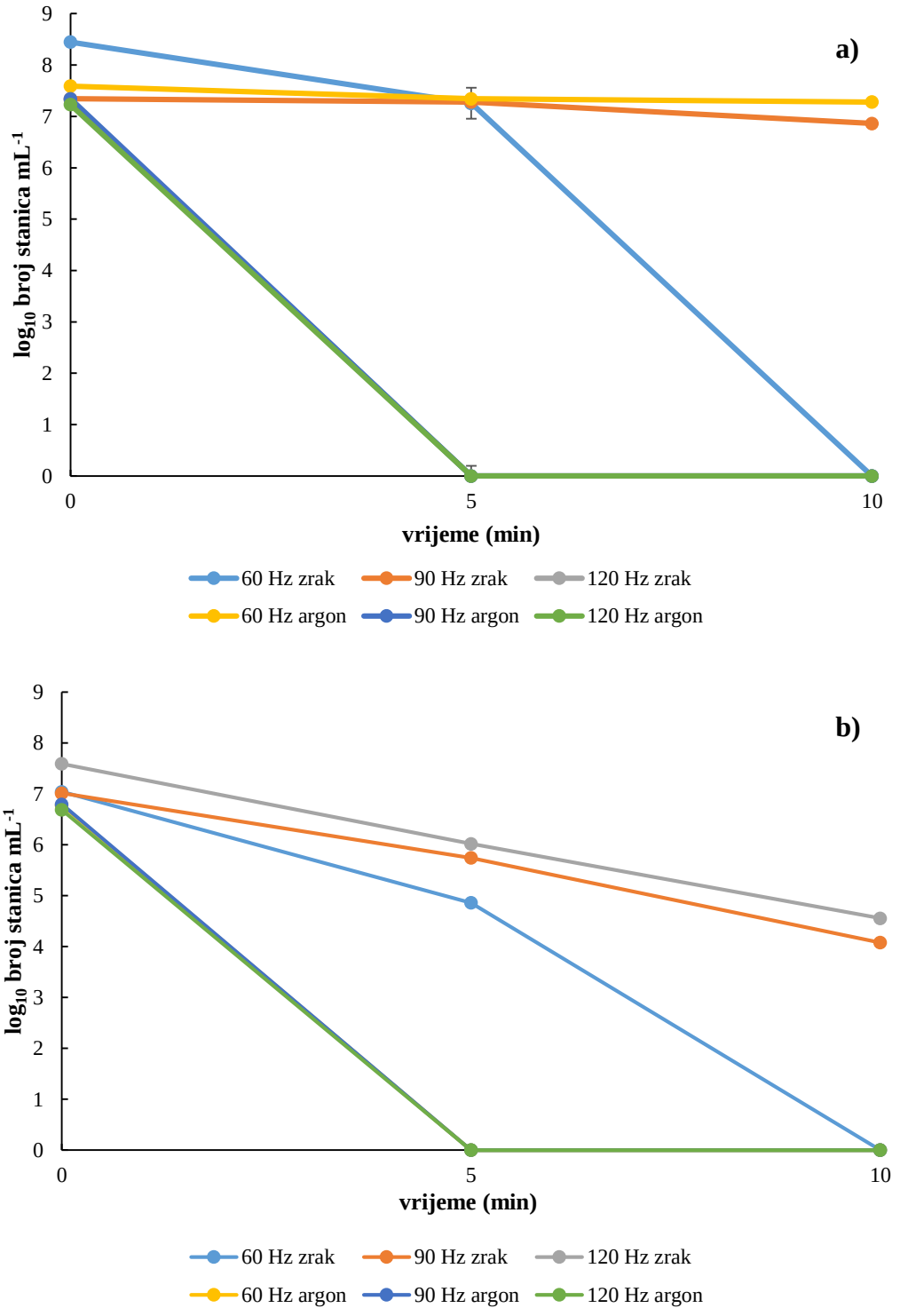
4.3. Redukcija broja mikroorganizama u stacionarnoj fazi rasta



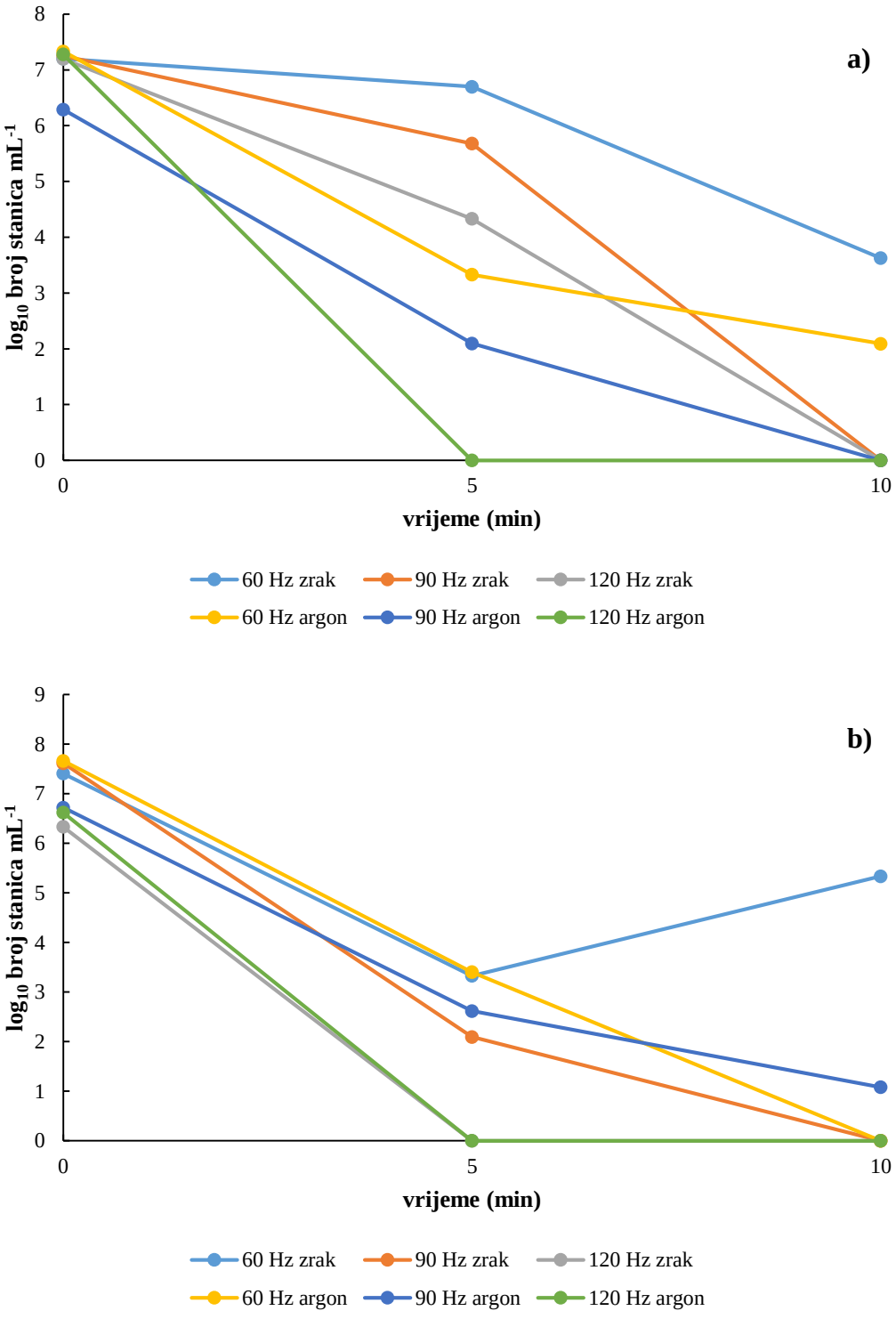
Slika 20. Redukcija broja stanica ($\log_{10}$ broj stanica mL^{-1}) u ovisnosti o vremenu tretiranja, frekvenciji, i radnom plinu za bakteriju *E. coli* prilikom tretmana plazmom generiranom u plinskoj fazi (a) i tekućinskom plazmom u mjehurićima (b)



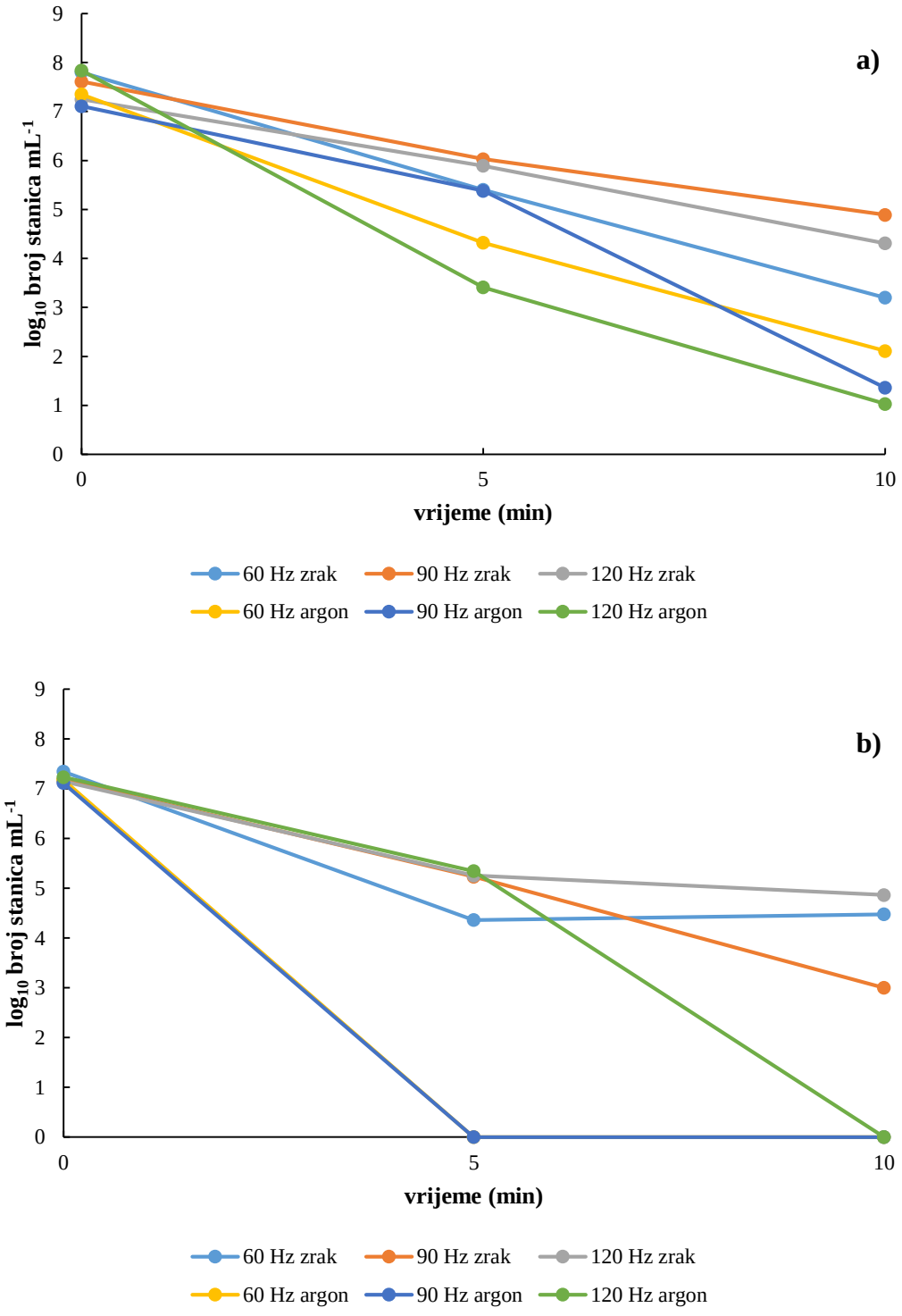
Slika 21. Redukcija broja stanica (log_{10} broj stanica mL^{-1}) u ovisnosti o vremenu tretiranja, frekvenciji i radnom plinu za bakteriju *S. enterica* prilikom tretmana plazmom generiranom u plinskoj fazi (a) i tekućinskom plazmom u mjehurićima (b)



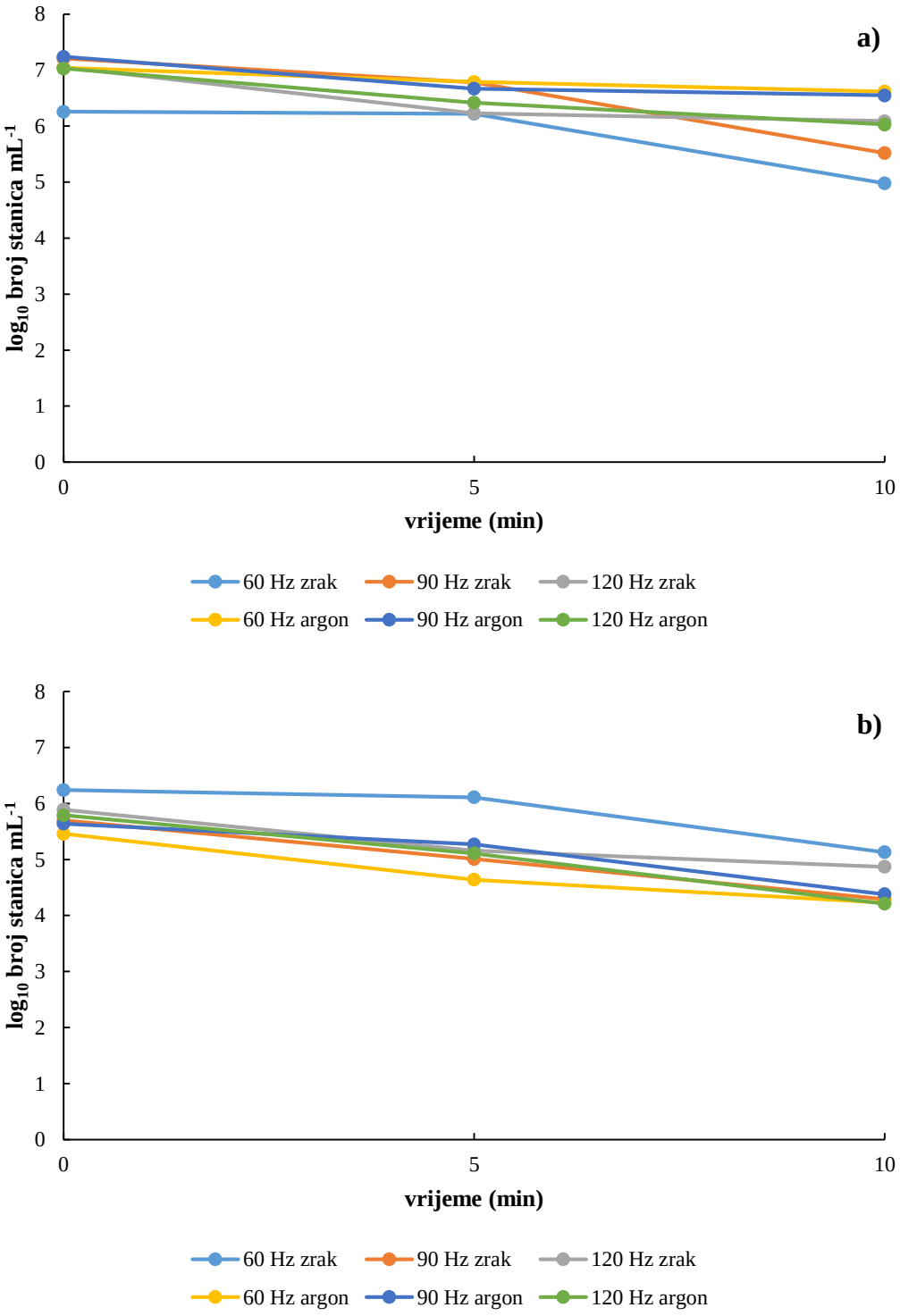
Slika 22. Redukcija broja stanica (log_{10} broj stanica mL^{-1}) u ovisnosti o vremenu tretiranja, frekvenciji i radnom plinu za bakteriju *L. innocua* prilikom tretmana plazmom generiranom u plinskoj fazi (a) i tekućinskom plazmom u mjehurićima (b)



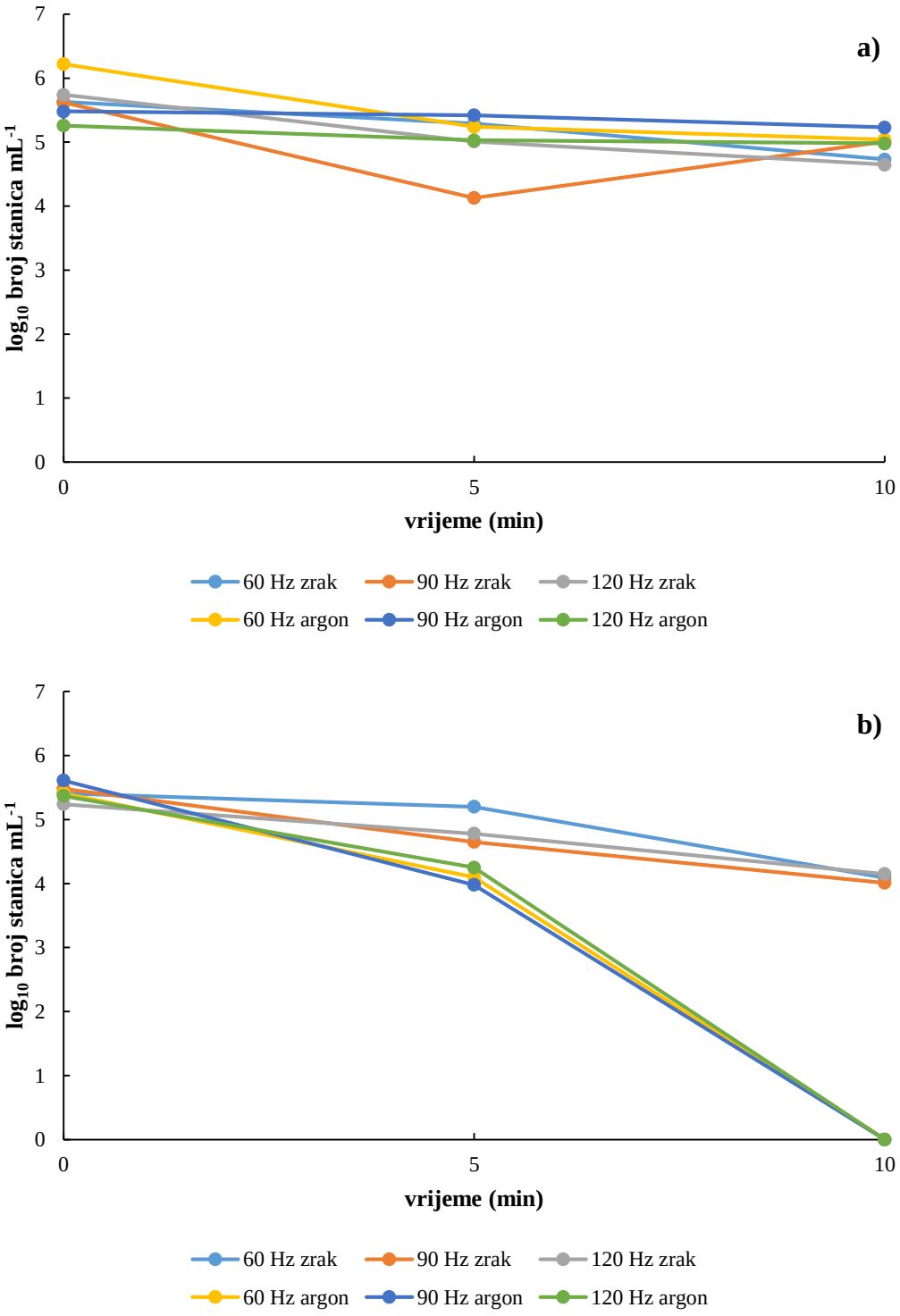
Slika 23. Redukcija broja stanica (log_{10} broj stanica mL^{-1}) u ovisnosti o vremenu tretiranja, frekvenciji i radnom plinu za bakteriju *S. aureus* prilikom tretmana plazmom generiranom u plinskoj fazi (a) i tekućinskom plazmom u mjehurićima (b)



Slika 24. Redukcija broja stanica (log_{10} broj stanica mL^{-1}) u ovisnosti o vremenu tretiranja, frekvenciji i radnom plinu za bakteriju *B. cereus* prilikom tretmana plazmom generiranom u plinskoj fazi (a) i tekućinskom plazmom u mjehurićima (b)

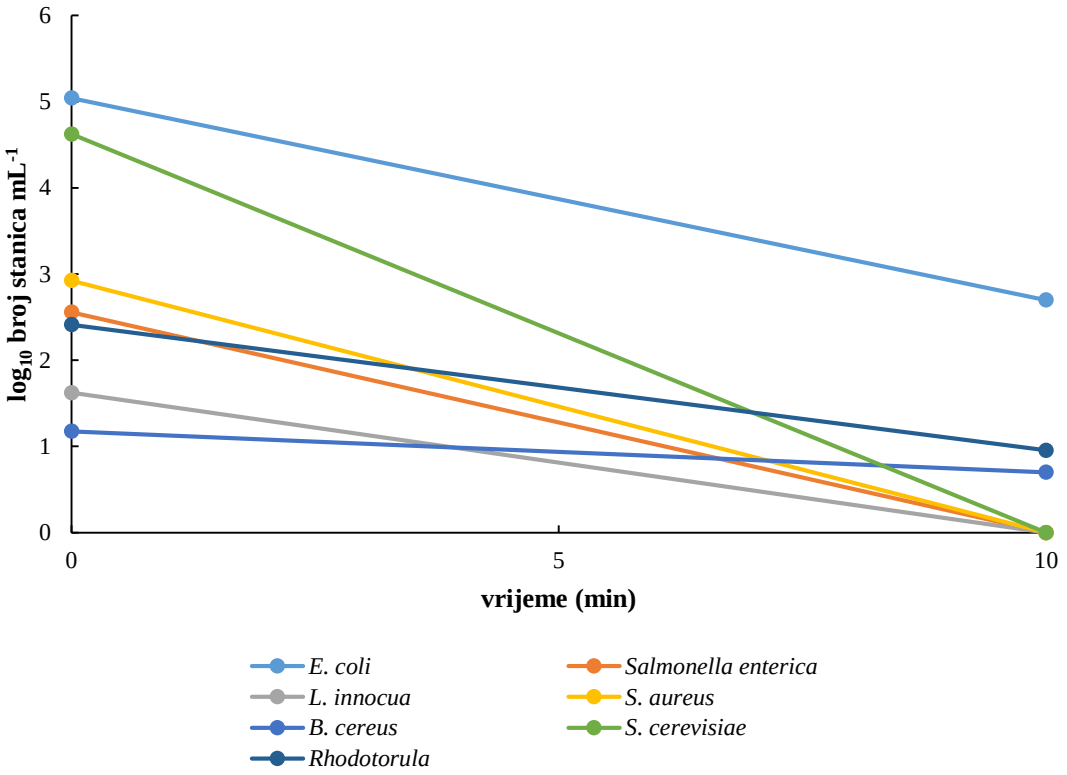


Slika 25. Redukcija broja stanica (log_{10} broj stanica mL^{-1}) u ovisnosti o vremenu tretiranja, frekvenciji i radnom plinu za kvasac *Rhodotorula* spp. prilikom tretmana plazmom generiranom u plinskoj fazi (a) i tekućinskom plazmom u mjehurićima (b)



Slika 26. Redukcija broja stanica (log_{10} broj stanica mL^{-1}) u ovisnosti o vremenu tretiranja, frekvenciji i radnom plinu za kvasac *S. cerevisiae* prilikom tretmana plazmom generiranom u plinskoj fazi (a) i tekućinskom plazmom u mjehurićima (b)

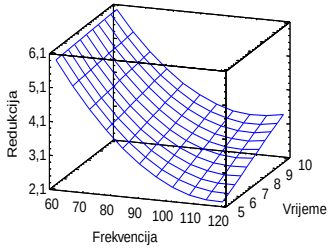
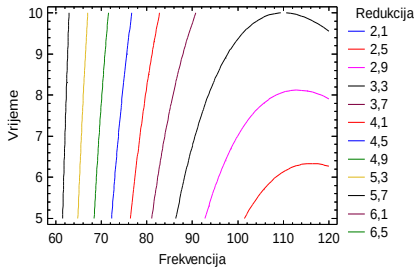
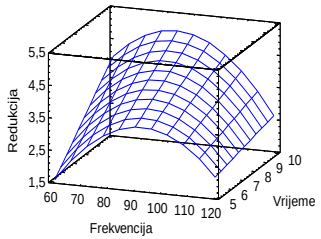
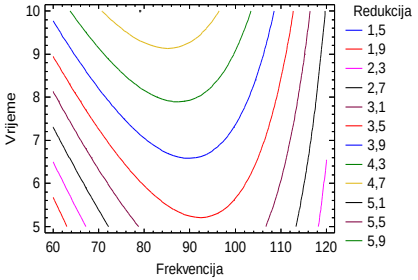
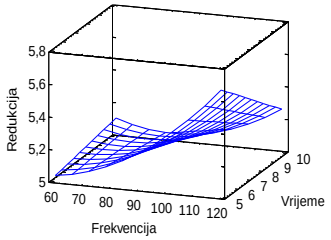
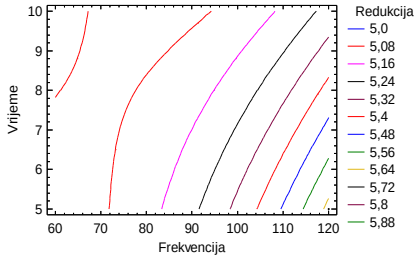
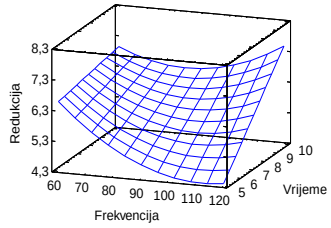
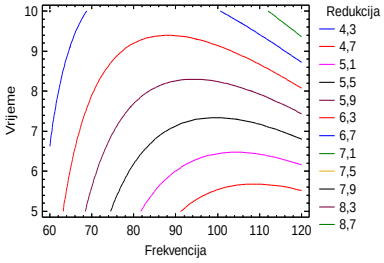
4.4. Redukcija broja stanica odabranih mikroorganizama nakon tretmana u eksponencijalnoj fazi rasta

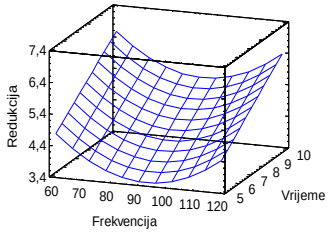
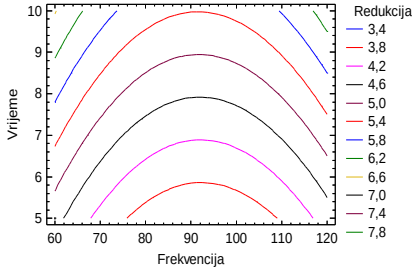
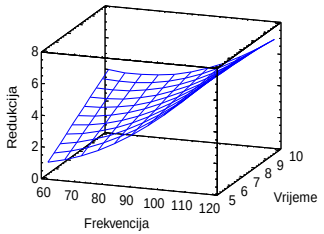
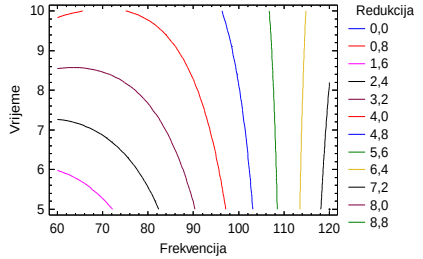
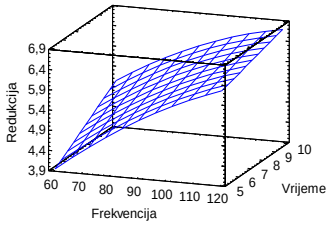
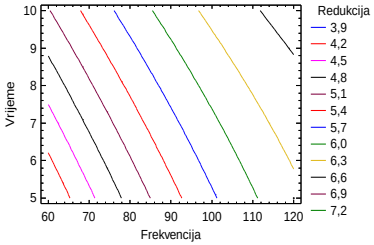
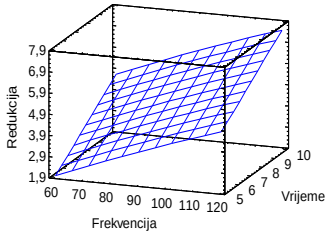
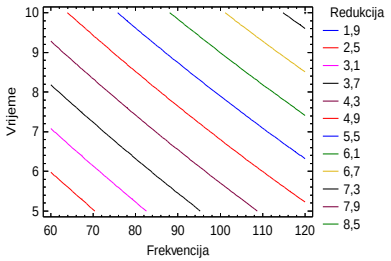


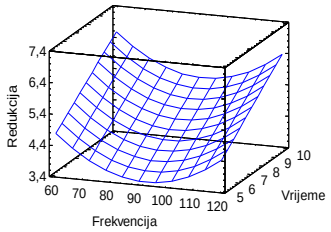
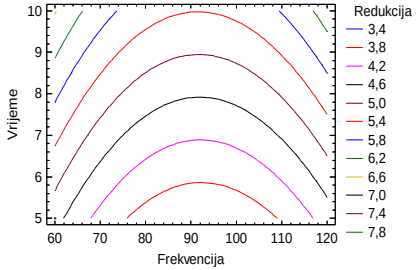
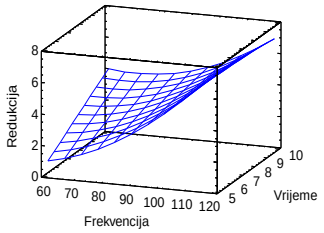
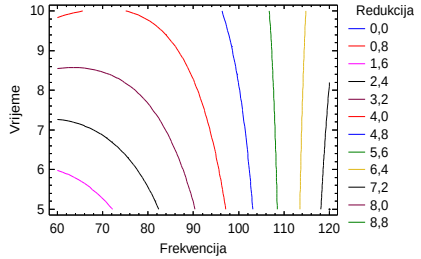
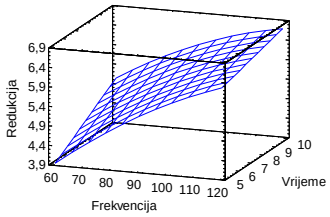
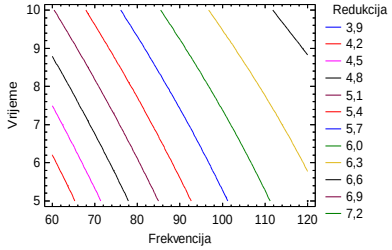
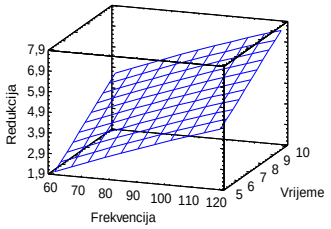
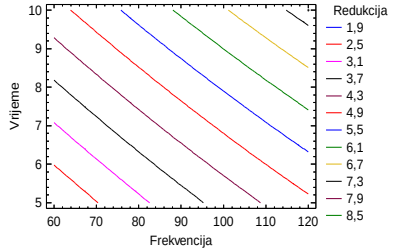
Slika 27. Redukcija broja stanica (log_{10} broj stanica mL^{-1}) u ovisnosti o vremenu tretiranja, frekvenciji i radnom plinu za sve radne mikroorganizme prilikom tretmana tekućinskom plazmom u mjehurićima pri 90 Hz i radnom plinu argonu

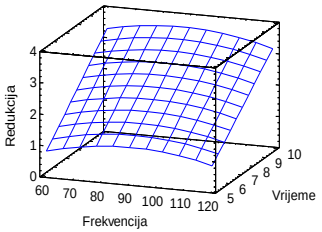
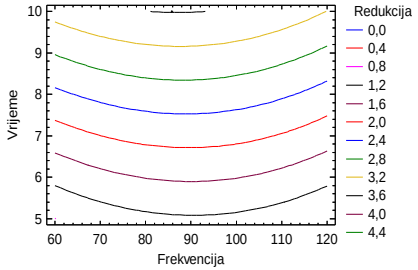
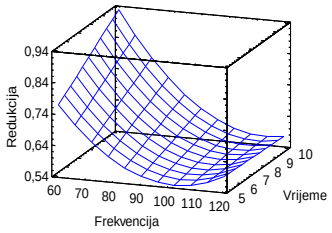
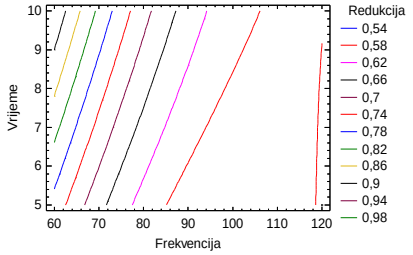
4.5. Statistički parametri za redukciju broja mikroorganizama

Tablica 22. 3D i konturni dijagram za redukciju broja mikroorganizama nakon tretmana tekućinskom plazmom u mjehurićima i plinskom plazmom

	PLAZMA U MJEHURIĆIMA		PLINSKA PLAZMA	
	3D graf	**konturni dijagram**	**3D graf**	**konturni dijagram**
E. coli				
S. enterica				

	PLAZMA U MJEHURIĆIMA		PLINSKA PLAZMA	
	3D graf	**konturni dijagram**	**3D graf**	**konturni dijagram**
L. innocua				
S. aureus				

	PLAZMA U MJEHURIĆIMA		PLINSKA PLAZMA	
	3D graf	**konturni dijagram**	**3D graf**	**konturni dijagram**
B. cereus				
***Rhodotorula* spp**				

	PLAZMA U MJEHURIĆIMA		PLINSKA PLAZMA	
	3D graf	**konturni dijagram**	**3D graf**	**konturni dijagram**
S. cerevisiae				

Tablica 23. Analiza varijance parametara plazma tretmana (A: frekvencija, B:vrijeme, C:plin) na redukciju broja mikroorganizama

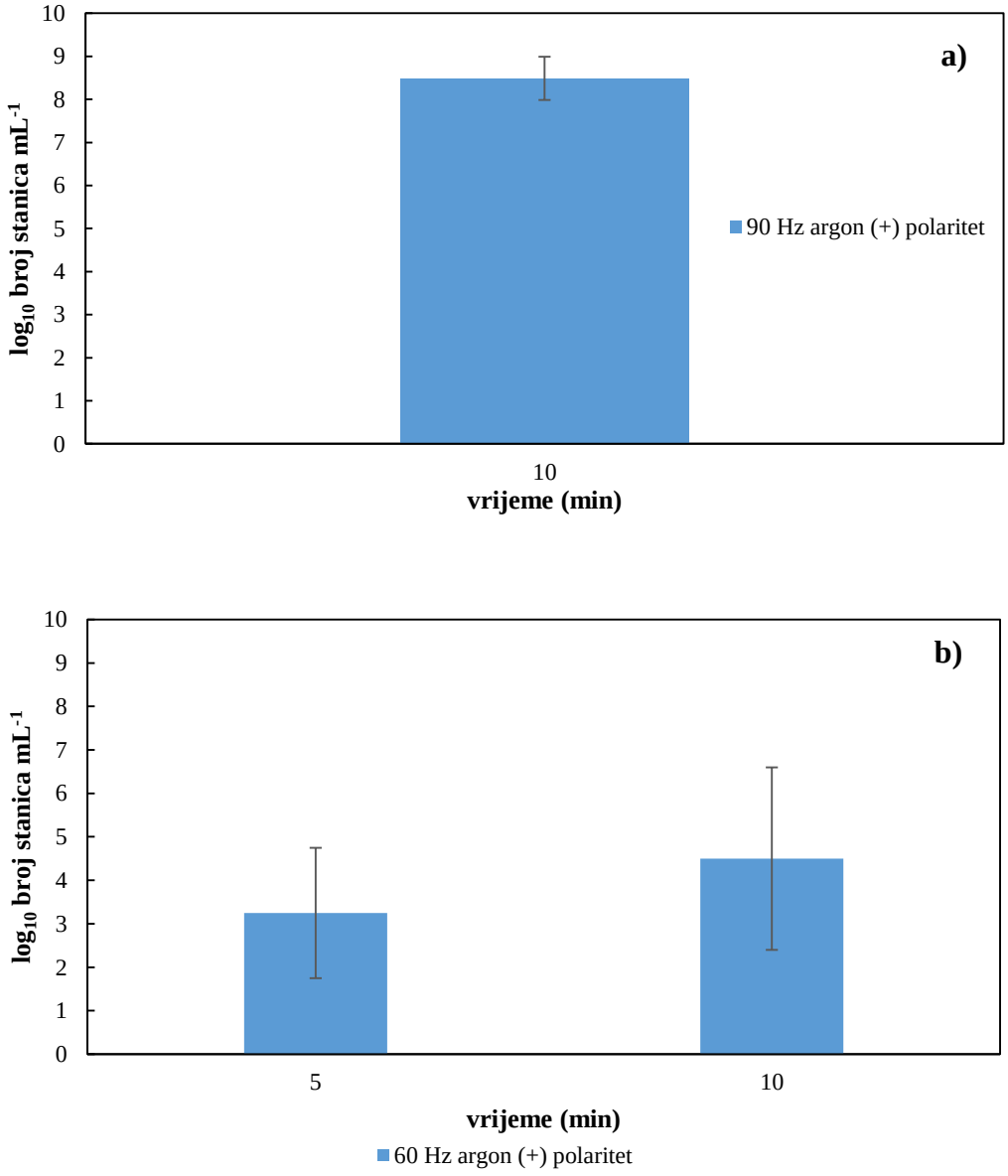
Uzorak	**A**		**B**		**C**		**AA**		**AB**		**AC**		**BC**	
	F	**P**	**F**	**P**	**F**	**P**	**F**	**P**	**F**	**P**	**F**	**P**	**F**	**P**
E. coli[1]	1515,30	**0,00**	102,30	**0,00**	469,50	**0,00**	194,50	**0,00**	46,20	**0,00**	238,63	**0,00**	238,63	0,97
E. coli[2]	0,13	0,73	2,80	0,16	5,50	0,07	2,80	0,16	0,78	0,42	0,77	0,42	0,77	**0,03**
Salmonella[1]	1,65	0,26	0,40	0,56	2,92	0,16	0,23	0,65	0,60	0,48	4,04	0,11	4,04	0,40
Salmonella[2]	0,89	0,39	6,04	0,06	3,02	0,15	0,90	0,39	0,96	0,20	4,58	0,09	4,58	6,04
L. innocua[1]	0,09	0,77	6,18	0,06	16,50	0,01	1,77	0,25	0,00	0,94	0,04	0,84	0,04	6,18
L. innocua[2]	2,61	0,18	0,29	0,61	0,12	0,75	0,19	0,68	0,39	0,56	0,58	0,48	0,58	0,28
S. aureus[1]	2,24	0,20	0,59	0,48	0,20	0,67	0,04	0,85	0,06	0,81	0,96	0,38	0,96	0,55
S. aureus[2]	14,16	0,01	19,98	0,01	9,49	**0,03**	0,02	0,90	0,02	0,99	0,05	0,83	0,05	7,05
B. cereus[1]	2,19	0,21	0,22	0,66	8,25	**0,04**	4,73	0,09	1,58	0,27	0,58	0,48	0,58	1,98
B. cereus[2]	0,03	0,87	43,59	**0,00**	30,89	**0,00**	6,26	0,06	0,07	0,80	11,48	**0,02**	11,48	3,24
Rhodotorula[1]	0,64	0,46	14,35	**0,01**	0,59	0,48	0,01	0,92	0,05	0,83	0,11	0,75	0,11	**0,04**
Rhodotorula[2]	0,15	0,71	29,71	**0,00**	2,37	0,19	4,74	0,09	0,15	0,71	1,81	0,24	1,81	8,46
S. cerevisiae[1]	0,27	0,63	874,01	**0,00**	917,30	**0,00**	15,72	**0,01**	0,66	0,46	0,38	0,57	0,38	399,89
S. cerevisiae[2]	0,56	0,49	0,07	0,79	1,55	0,28	0,13	0,73	0,06	0,81	2,43	0,19	2,43	0,05

[1]plazma u mjehurićima; [2]plinska plazma

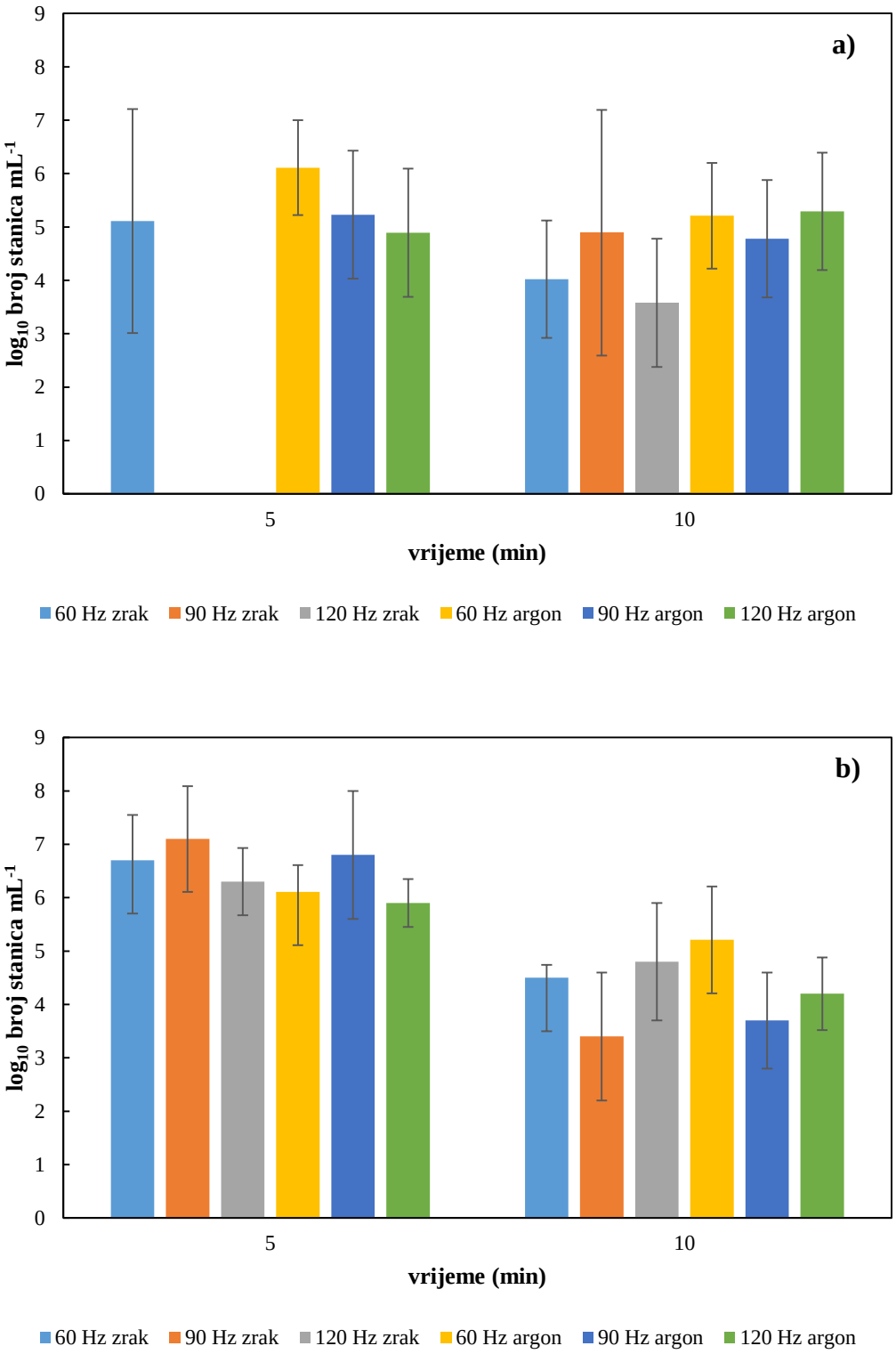
statistička značajnost $p<0,05$

4.6. Revitalizacija stanica nakon tretmana u stacionarnoj fazi rasta

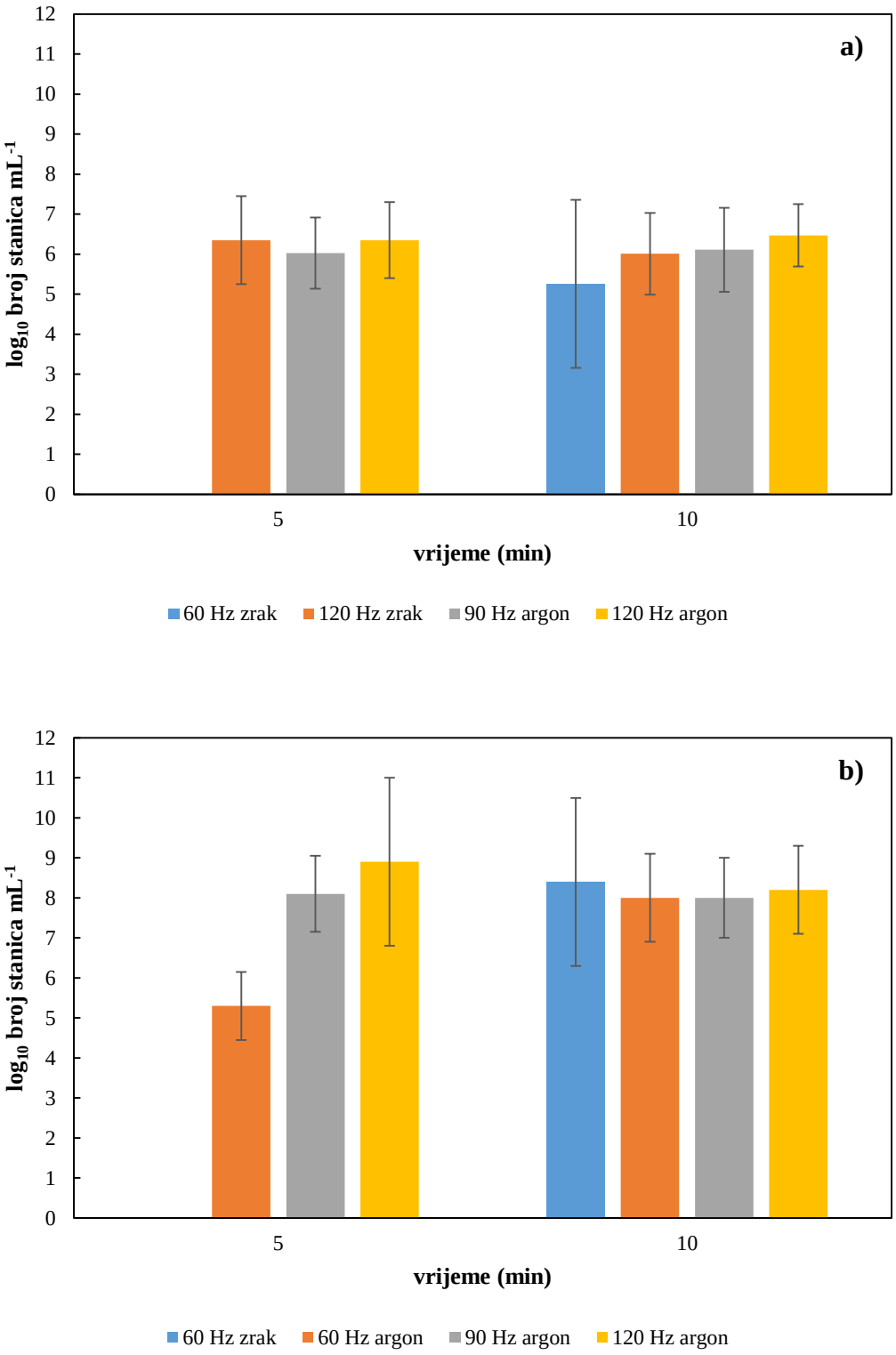
Na osnovu rezultata inaktivacije zadanih mikroorganizama te za daljnje provođenje testa revitalizacije odabrani su tretirani uzorci mikroorganizama (*E. coli*, *Salmonella enterica*, *L. innocua*, *S. aureus*, *B. cereus* i *S. cerevisiae*) kod kojih je postignuta potpuna inaktivacija. Prikazani grafovi revitalizacije predstavljaju vrijednosti $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1} nakon postavljenih najučinkovitijih uvjeta za svaki pojedini mikroorganizam.



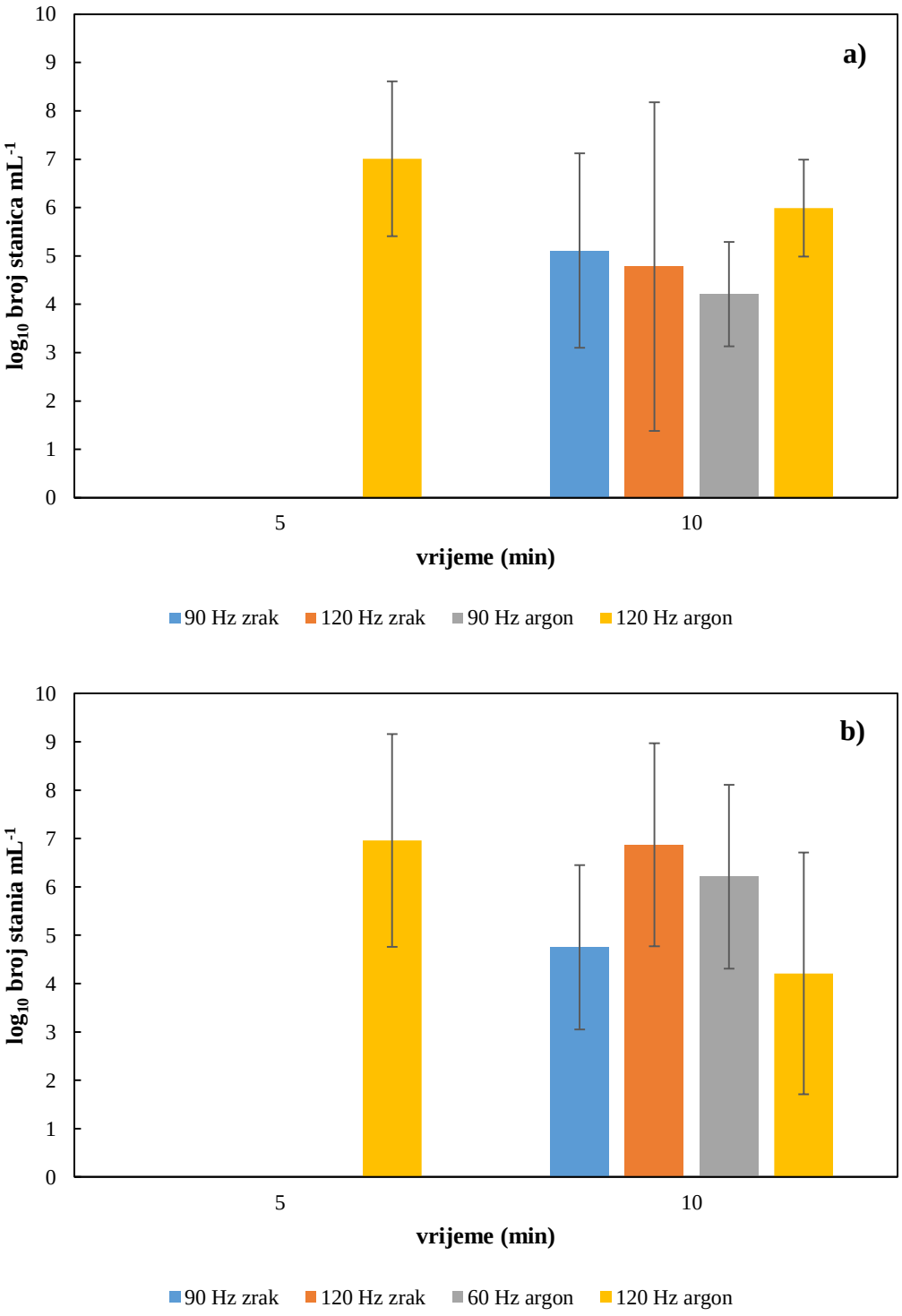
Slika 28. Revitalizacija stanica ($\log_{10}$ broj stanica mL^{-1}) bakterije *E. coli* nakon tretmana plazmom generiranom u plinskoj fazi (a) i tekućinskom plazmom u mjehurićima (b)



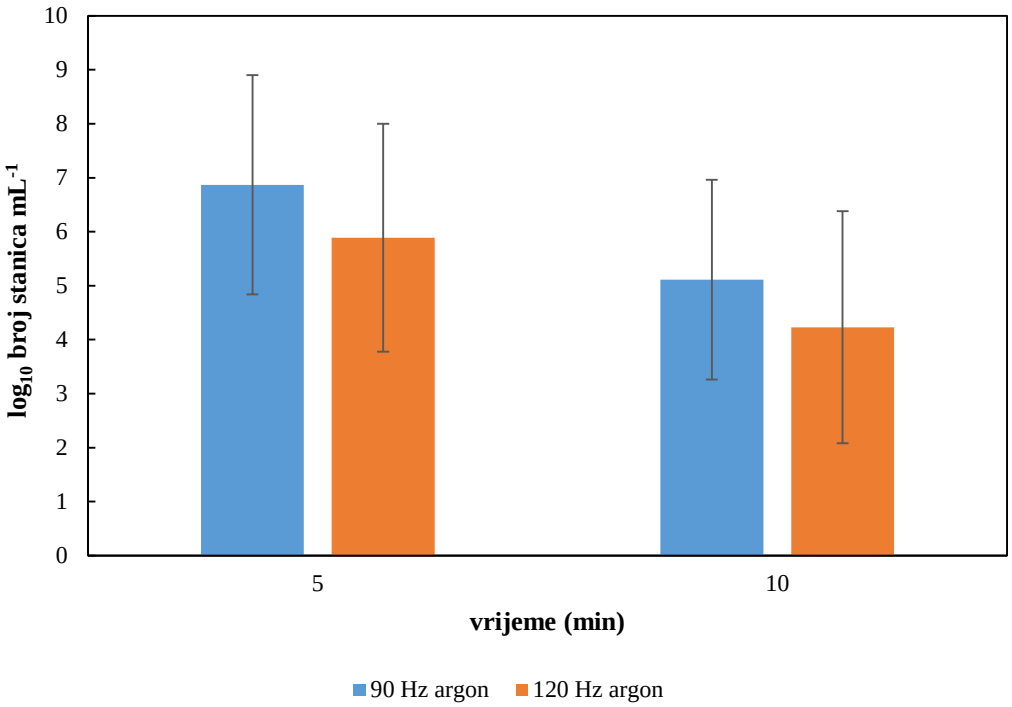
Slika 29. Revitalizacija stanica ($\log_{10}$ broj stanica mL^{-1}) bakterije *S. enterica* nakon tretmana plazmom generiranom u plinskoj fazi (a) i tekućinskom plazmom u mjehurićima (b)



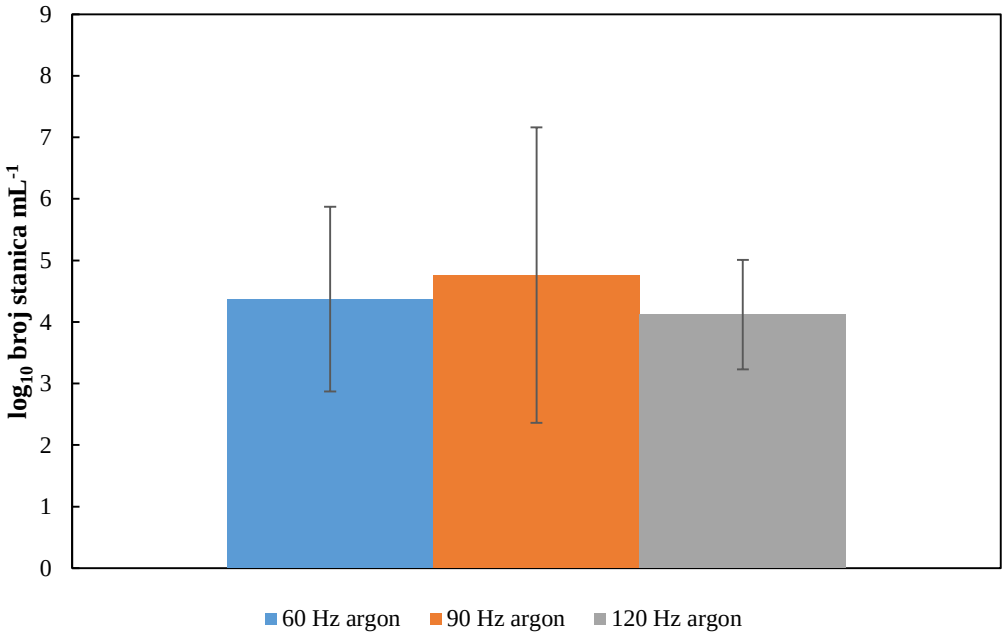
Slika 30. Revitalizacija stanica ($\log_{10}$ broj stanica mL^{-1}) bakterije *L. innocua* nakon tretmana plazmom generiranom u plinskoj fazi (a) i tekućinskom plazmom u mjehurićima (b)



Slika 31. Revitalizacija stanica (log_{10} broj stanica mL^{-1}) bakterije *S. aureus* nakon tretmana plazmom generiranom u plinskoj fazi (a) i tekućinskom plazmom u mjehurićima (b)

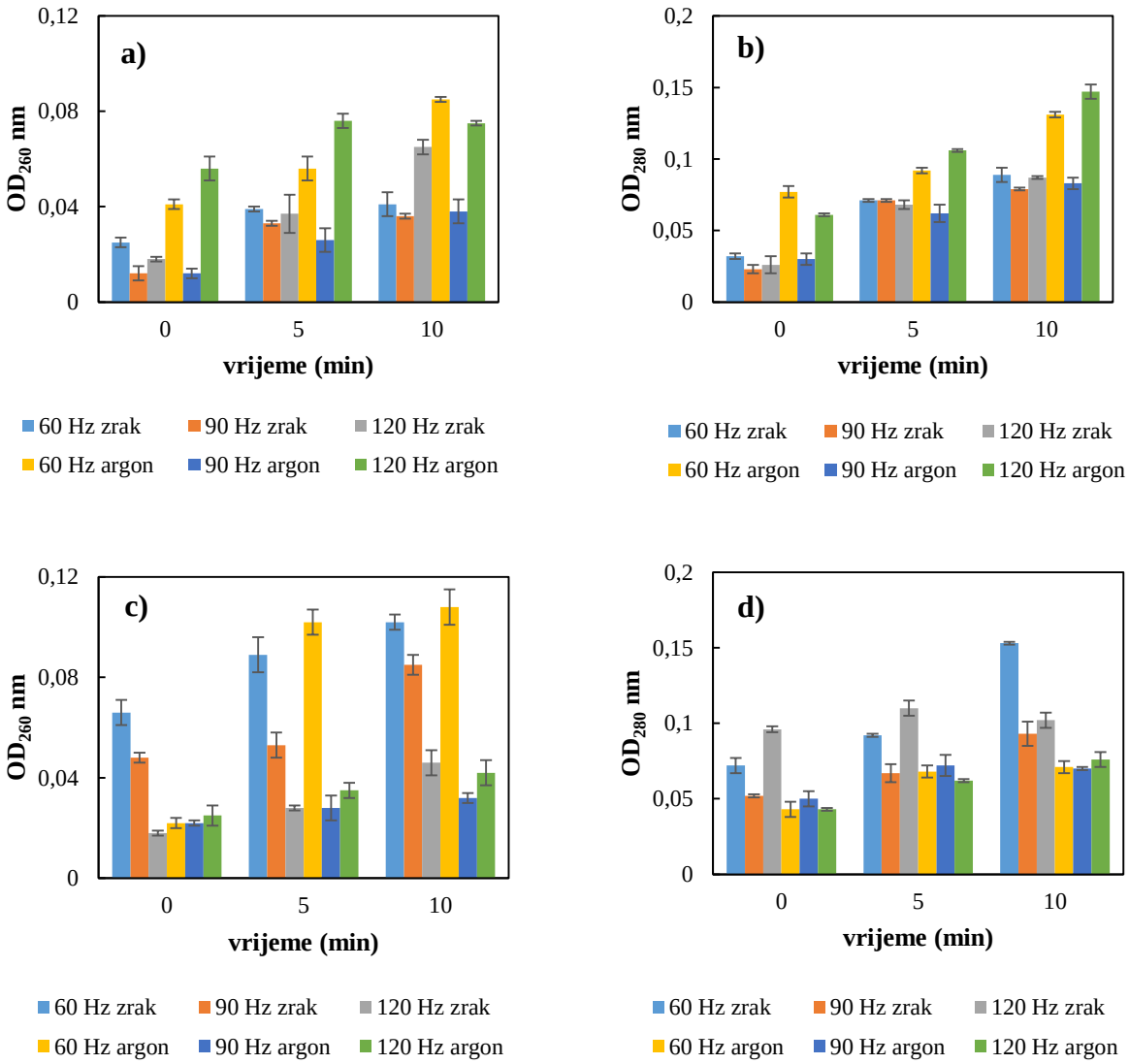


Slika 32. Revitalizacija stanica (log_{10} broj stanica mL^{-1}) bakterije *B. cereus* nakon tretmana tekućinskom plazmom u mjehurićima

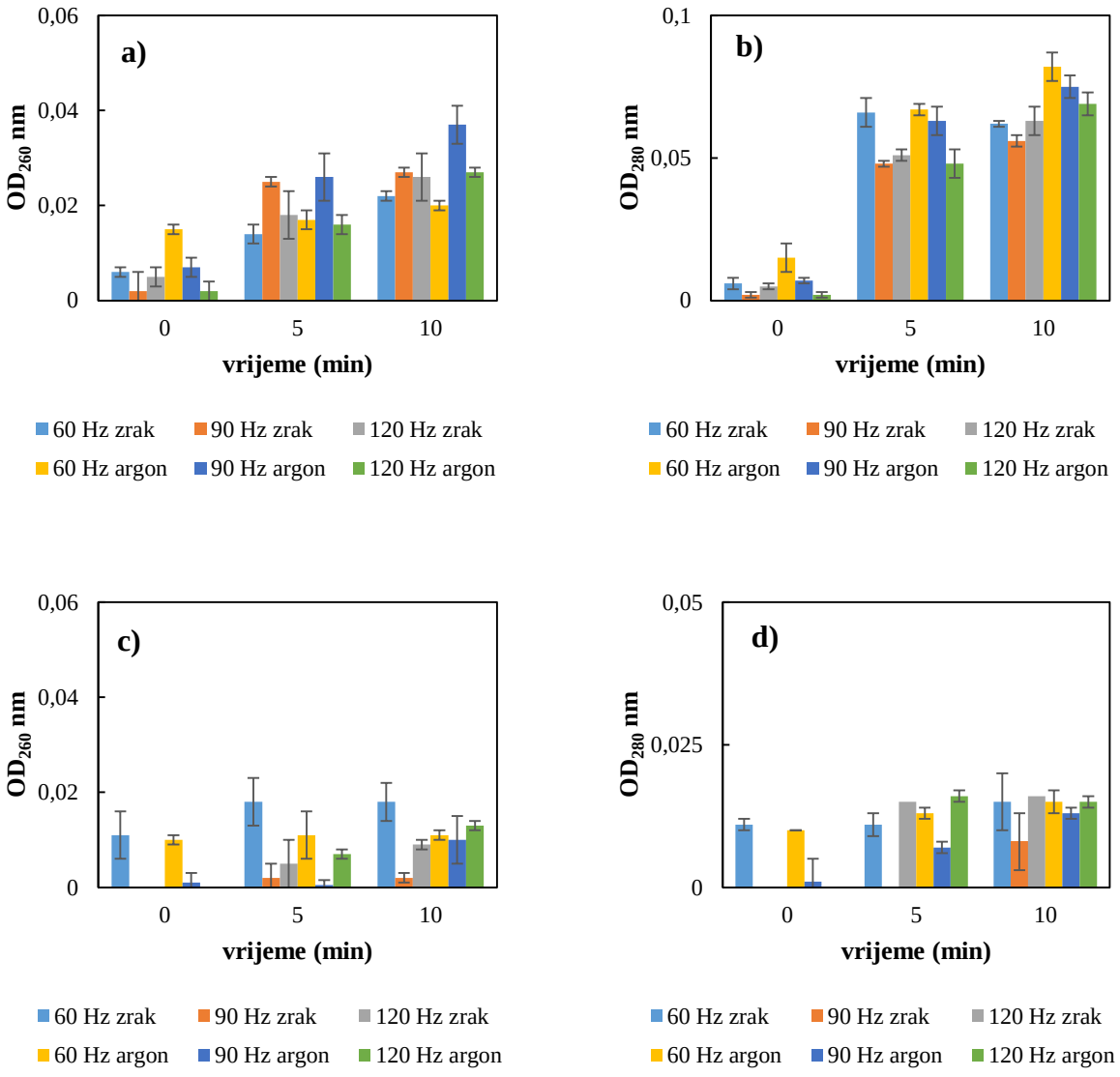


Slika 33. Revitalizacija stanica (log_{10} broj stanica mL^{-1}) kvasca *S. cerevisiae* nakon 10 min tretmana tekućinskom plazmom u mjehurićima

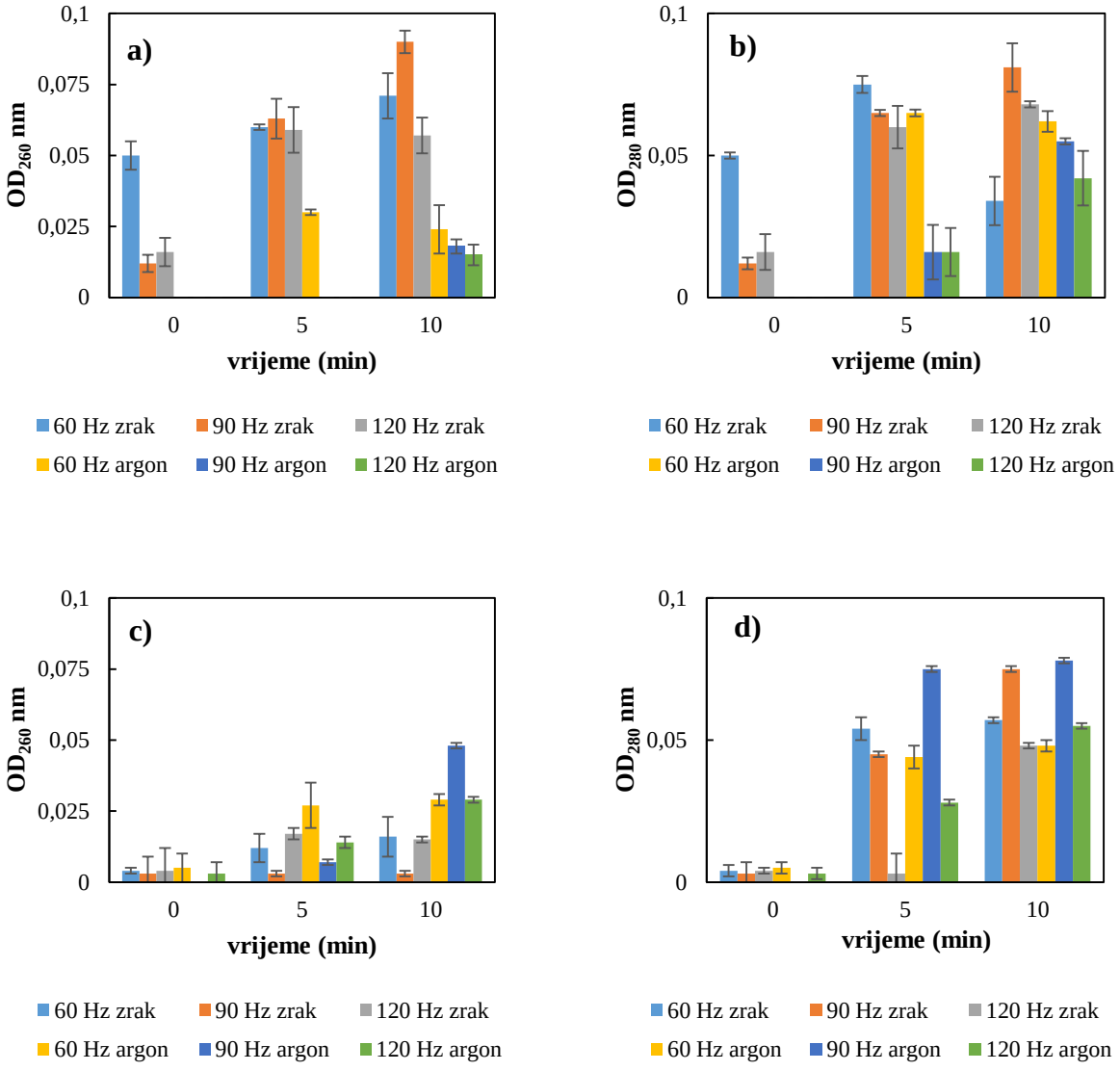
4.7. Istjecanje unutar staničnog sadržaja



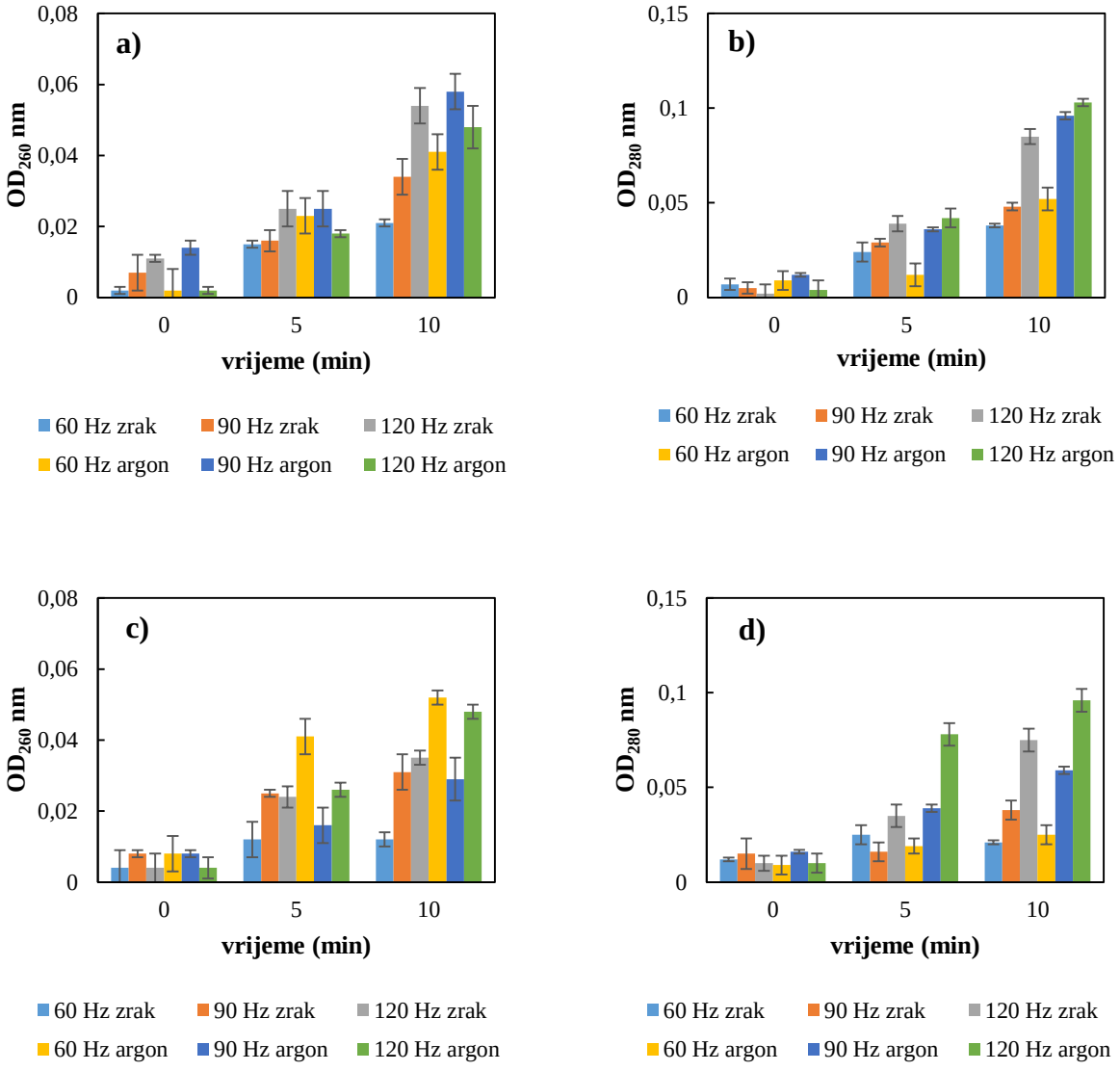
Slika 34. Istjecanje staničnog sadržaja bakterije *E. coli* pri 260 i 280 nm u ovisnosti o primjenjenom vremenu, frekvenciji i plinu prilikom tretmana plazmom generiranom u plinskoj fazi (a i b) i tekućinskom plazmom u mjehurićima (c i d)



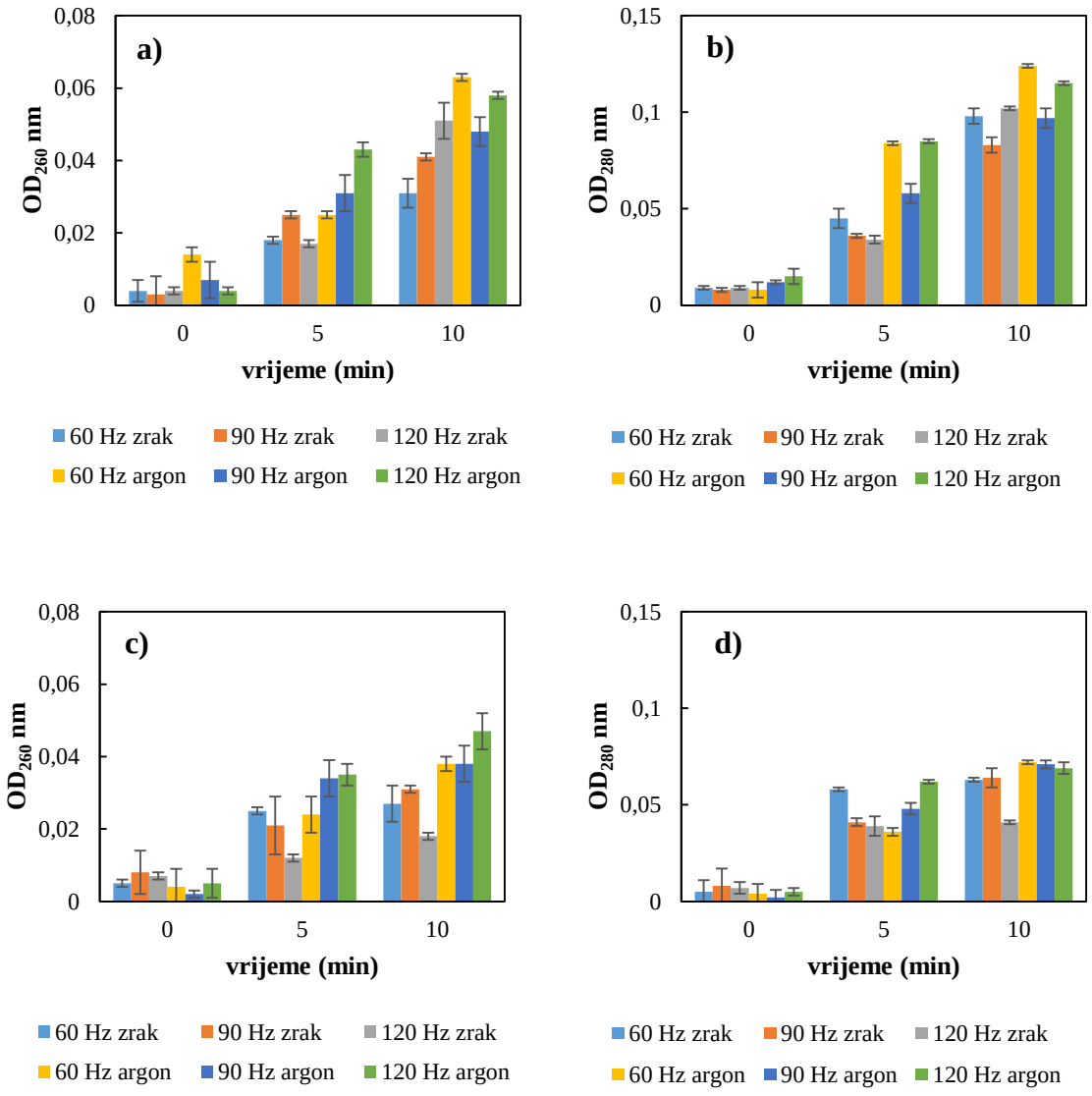
Slika 35. Istjecanje staničnog sadržaja bakterije *S. enterica* pri 260 i 280 nm u ovisnosti o primjenjenom vremenu, frekvenciji i plinu prilikom tretmana plazmom generiranom u plinskoj fazi (a i b) i tekućinskom plazmom u mjehurićima (c i d)



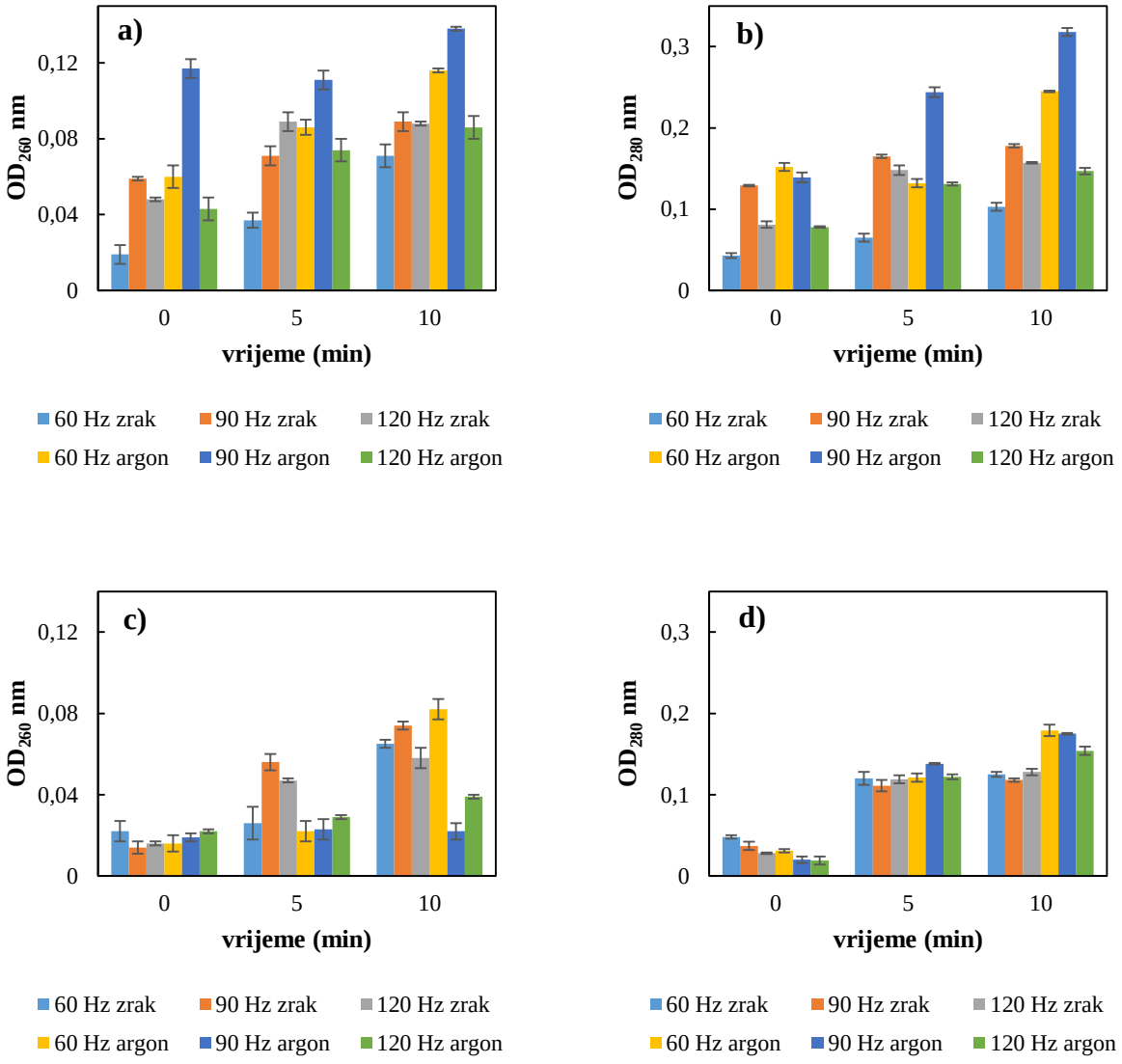
Slika 36. Istjecanje staničnog sadržaja bakterije *L. innocua* pri 260 i 280 nm u ovisnosti o primjenjenom vremenu, frekvenciji i plinu prilikom tretmana plazmom generiranom u plinskoj fazi (a i b) i tekućinskom plazmom u mjehurićima (c i d)



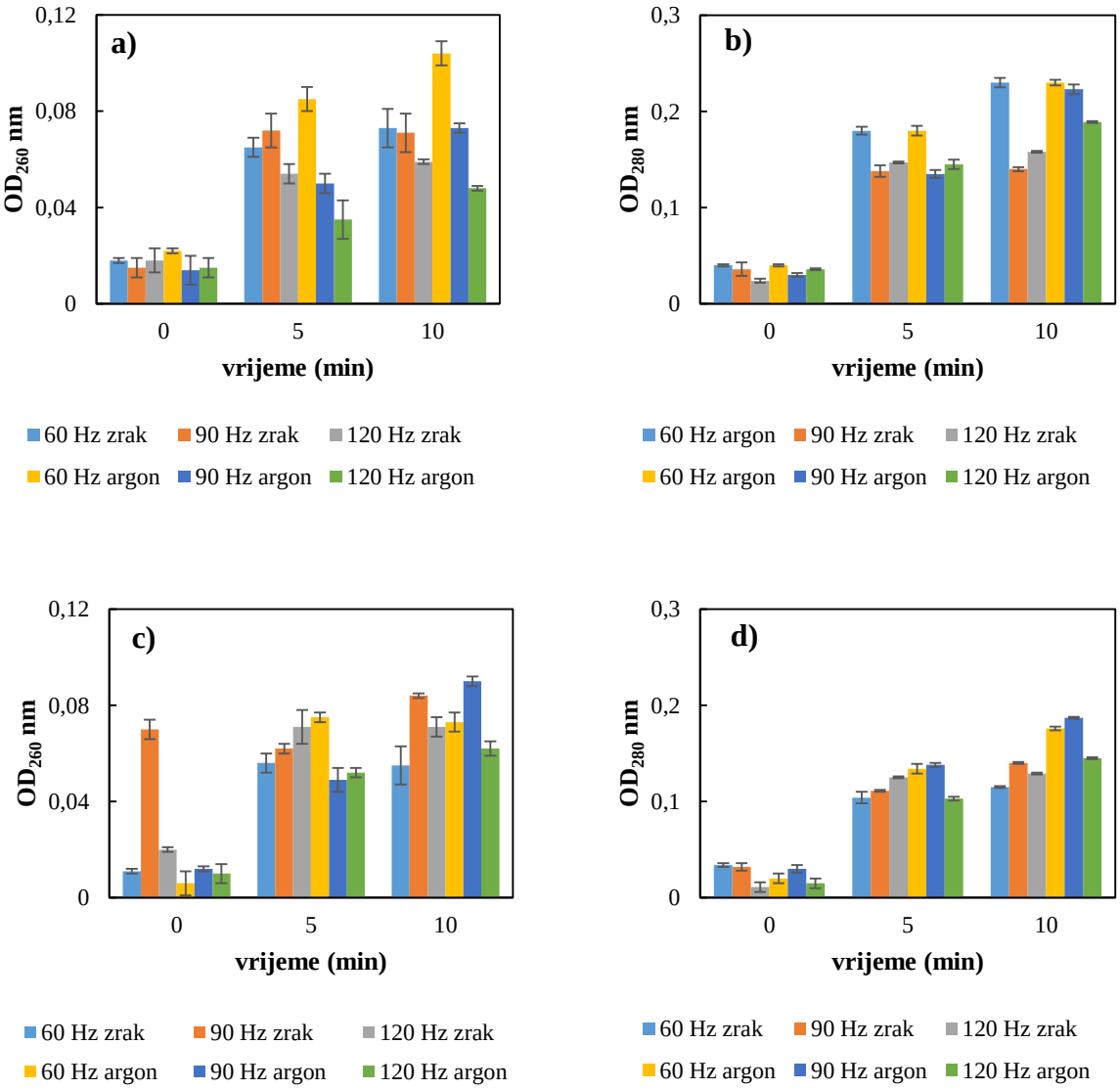
Slika 37. Istjecanje staničnog sadržaja bakterije *S. aureus* pri 260 i 280 nm u ovisnosti o primjenjenom vremenu, frekvenciji i plinu prilikom tretmana plazmom generiranom u plinskoj fazi (a i b) i tekućinskom plazmom u mjehurićima (c i d)



Slika 38. Istjecanje staničnog sadržaja bakterije *B. cereus* pri 260 i 280 nm u ovisnosti o primjenjenom vremenu, frekvenciji i plinu prilikom tretmana plazmom generiranom u plinskoj fazi (a i b) i tekućinskom plazmom u mjehurićima (c i d)



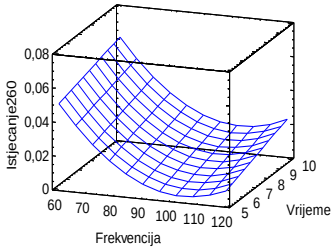
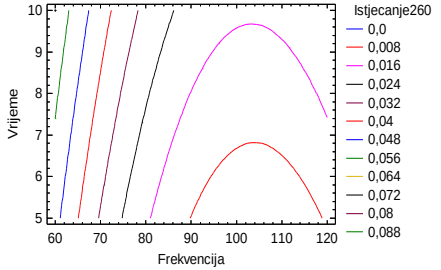
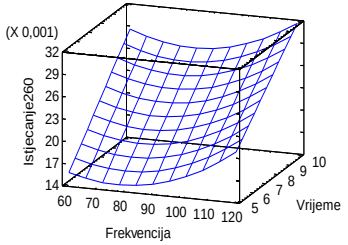
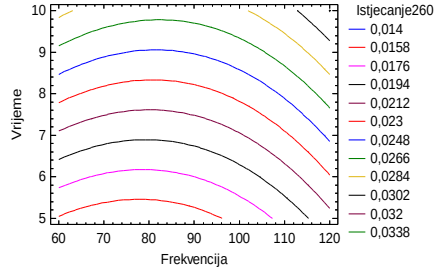
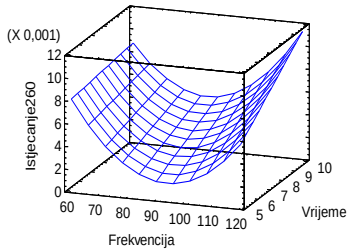
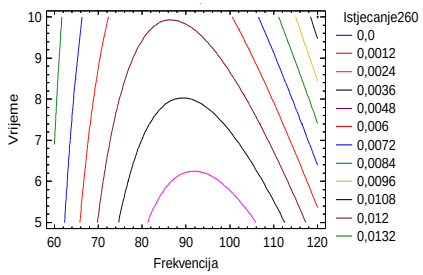
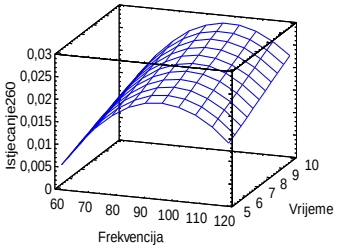
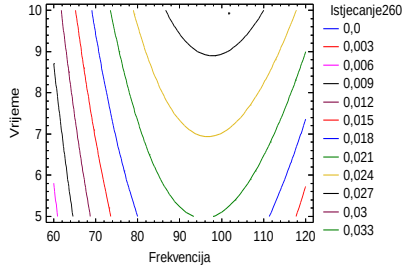
Slika 39. Istjecanje staničnog sadržaja kvasca *Rhodotorula* spp pri 260 i 280 nm u ovisnosti o primjenjenom vremenu, frekvenciji i plinu prilikom tretmana plazmom generiranom u plinskoj fazi (a i b) i tekućinskom plazmom u mjehurićima (c i d)

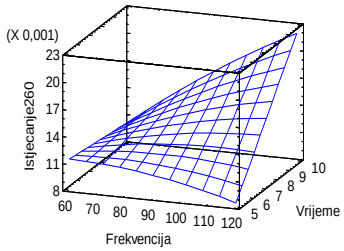
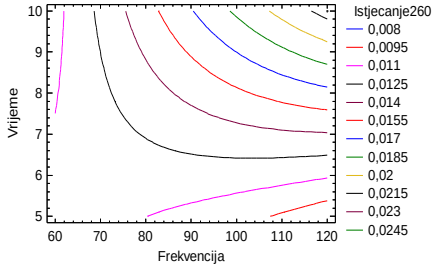
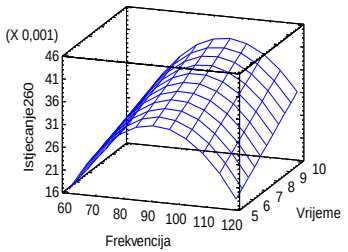
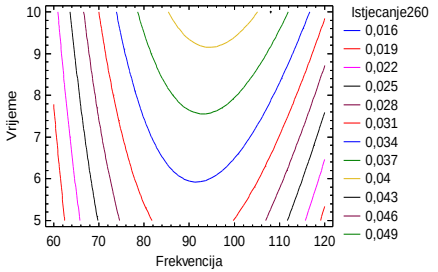
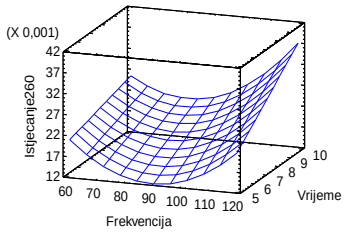
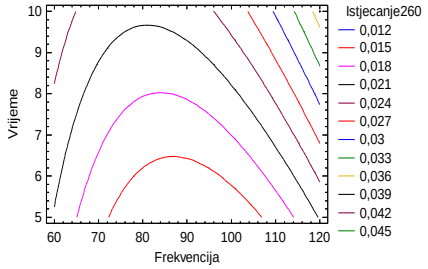
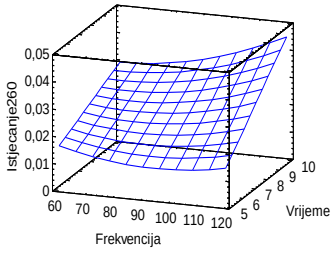
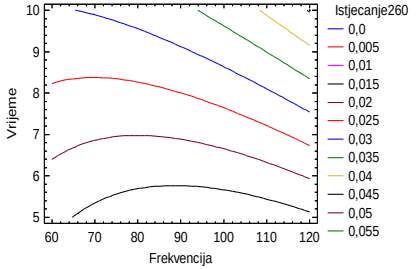


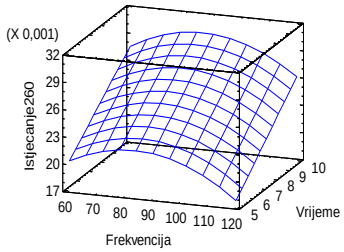
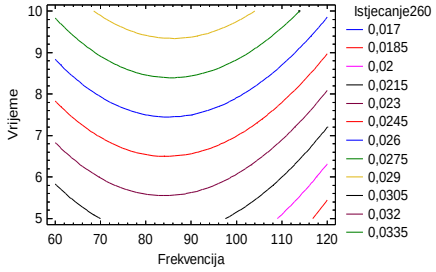
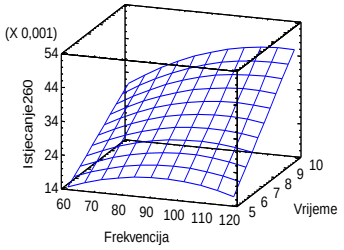
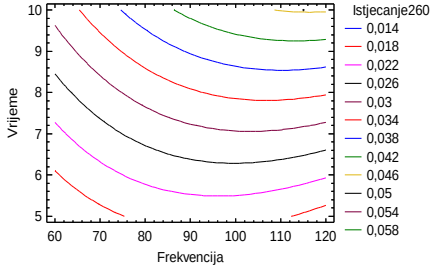
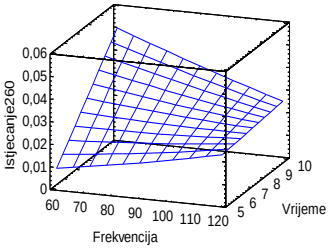
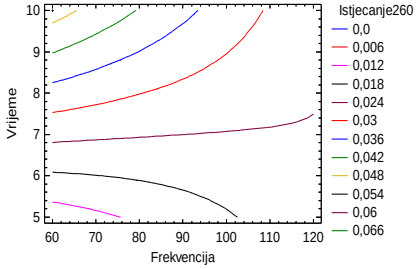
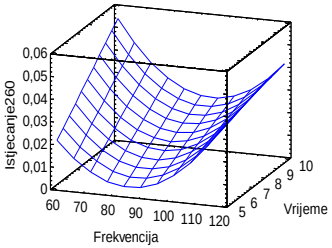
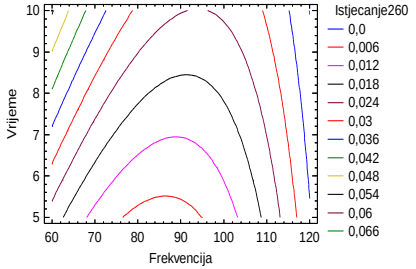
Slika 40. Istjecanje staničnog sadržaja kvasca *S. cerevisiae* pri 260 i 280 nm u ovisnosti o primjenjenom vremenu, frekvenciji i plinu prilikom tretmana plazmom generiranom u plinskoj fazi (a i b) i tekućinskom plazmom u mjehurićima (c i d)

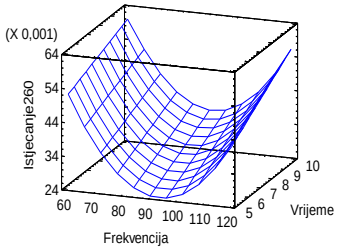
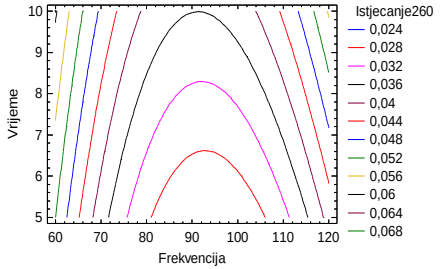
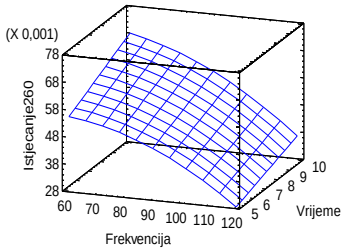
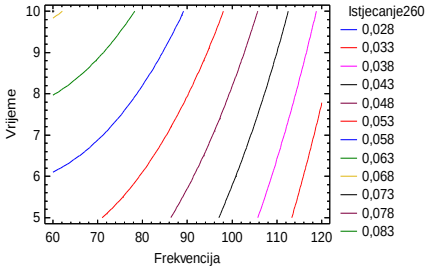
4.8. Statistički parametri za istjecanje unutar staničnog sadržaja

Tablica 24. 3D i konturni dijagram za istjecanje unutar staničnog sadržaja pri 260 nm

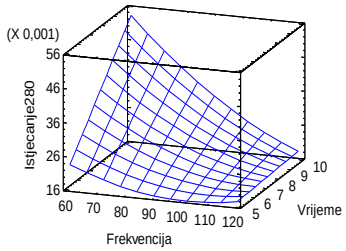
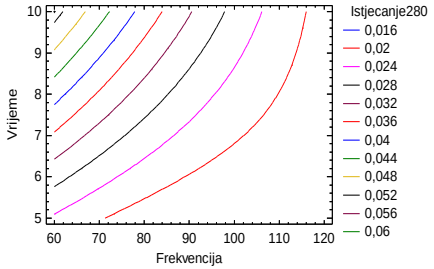
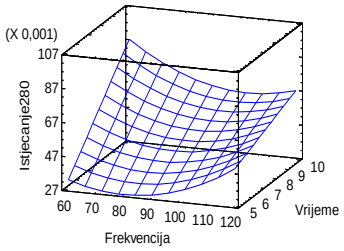
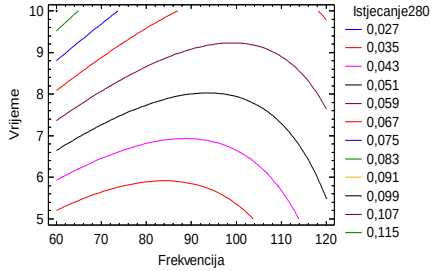
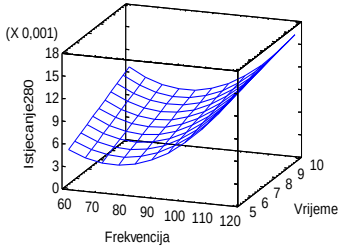
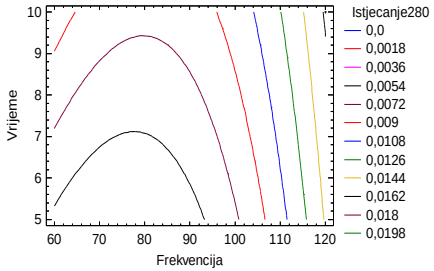
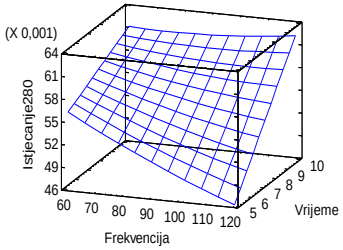
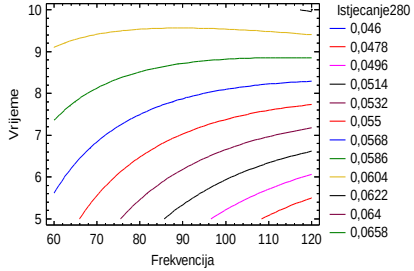
	PLAZMA U MJEHURIĆIMA		PLINSKA PLAZMA	
	3D graf	**konturni dijagram**	**3D graf**	**konturni dijagram**
E. coli				
S. enterica				

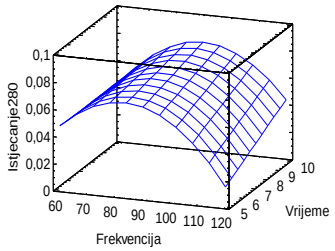
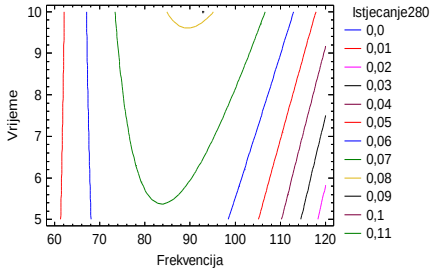
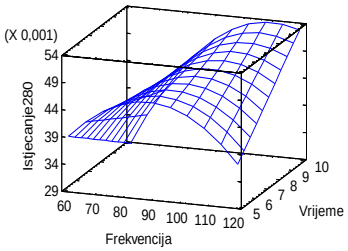
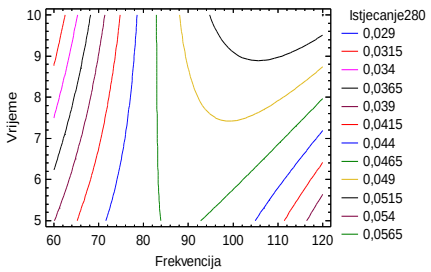
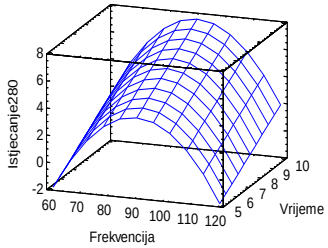
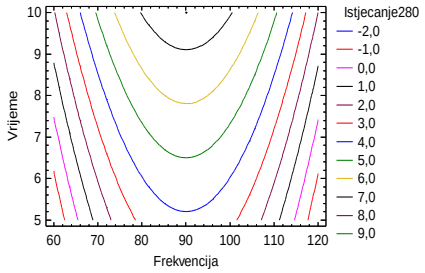
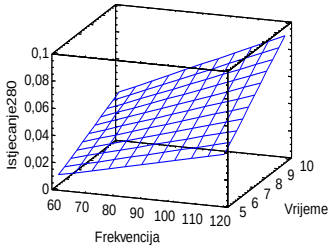
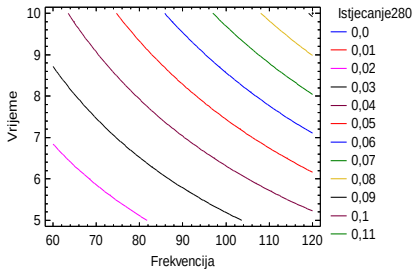
	PLAZMA U MJEHURIĆIMA		PLINSKA PLAZMA	
	3D graf	**konturni dijagram**	**3D graf**	**konturni dijagram**
L. innocua				
S. aureus				

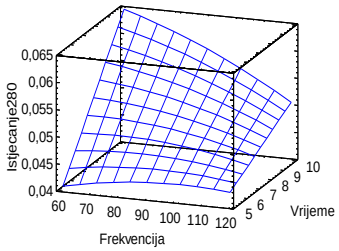
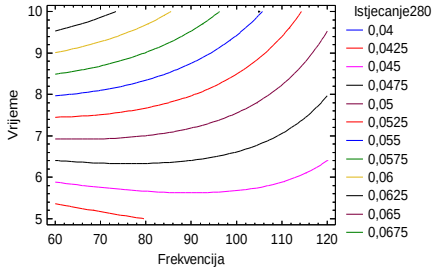
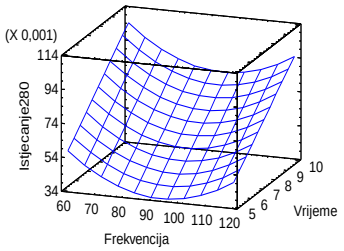
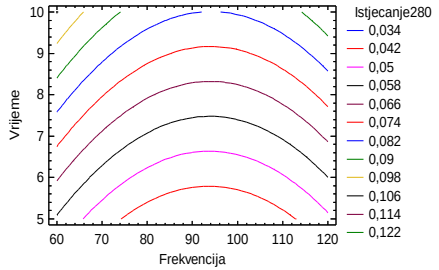
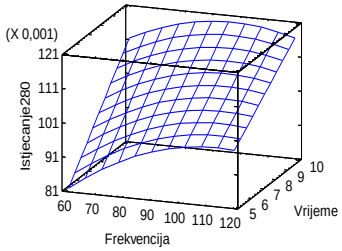
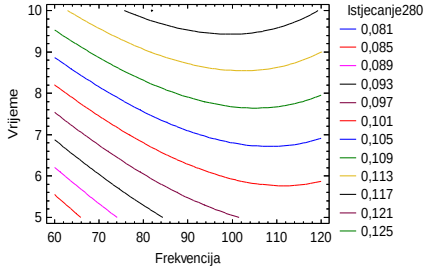
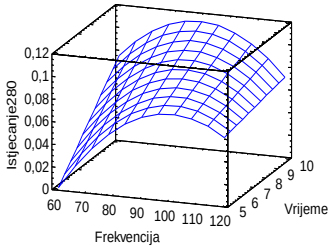
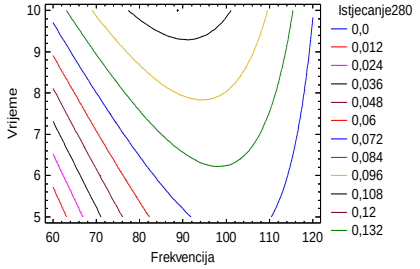
	PLAZMA U MJEHURIĆIMA		PLINSKA PLAZMA	
	3D graf	**konturni dijagram**	**3D graf**	**konturni dijagram**
B. cereus				
***Rhodotorula* spp**				

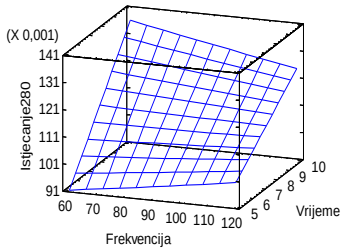
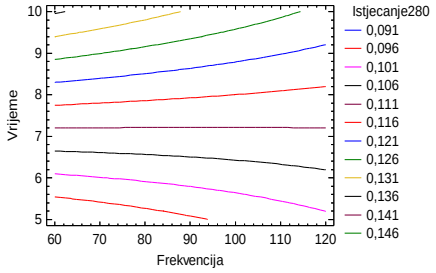
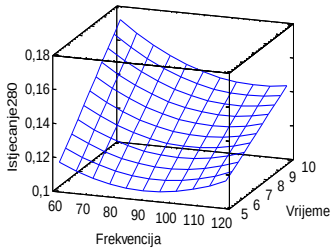
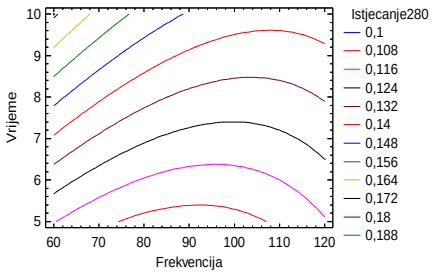
	PLAZMA U MJEHURIĆIMA		PLINSKA PLAZMA	
	3D graf	**konturni dijagram**	**3D graf**	**konturni dijagram**
S. cerevisiae				

Tablica 25. 3D i konturni dijagram za istjecanje unutar staničnog sadržaja pri 280 nm

	PLAZMA U MJEHURIĆIMA		PLINSKA PLAZMA	
	3D graf	**konturni dijagram**	**3D graf**	**konturni dijagram**
E. coli				
S. enterica				

	PLAZMA U MJEHURIĆIMA		PLINSKA PLAZMA	
	3D graf	**konturni dijagram**	**3D graf**	**konturni dijagram**
L. innocua				
S. aureus				

	PLAZMA U MJEHURIĆIMA		PLINSKA PLAZMA	
	3D graf	**konturni dijagram**	**3D graf**	**konturni dijagram**
B. cereus				
***Rhodotorula* spp**				

	PLAZMA U MJEHURIĆIMA		PLINSKA PLAZMA	
	3D graf	**konturni dijagram**	**3D graf**	**konturni dijagram**
S. cerevisiae				

Tablica 26. Analiza varijance parametara plazma tretmana (A: frekvencija, B:vrijeme, C:plin) na istjecanje unutar staničnog sadržaja pri 260 nm

Uzorak	**A**		**B**		**C**		**AA**		**AB**		**AC**		**BC**	
	F	**P**	**F**	**P**	**F**	**P**	**F**	**P**	**F**	**P**	**F**	**P**	**F**	**P**
E. coli[1]	12,70	**0,02**	2,12	0,21	1,62	0,27	5,01	0,08	0,02	0,90	6,91	0,05	0,70	0,44
E. coli[2]	0,29	0,62	3,97	0,11	0,01	0,93	0,21	0,66	0,02	0,90	3,51	0,13	0,04	0,85
Salmonella[1]	0,00	1,0	7,27	0,05	5,25	0,08	16,00	**0,01**	2,73	0,17	0,00	1,00	2,62	0,18
Salmonella[2]	26,3	**0,00**	18,40	**0,01**	1,20	0,33	40,30	**0,00**	2,32	0,38	7,22	0,05	0,49	0,52
L. innocua[1]	0,12	0,74	0,40	0,56	1,44	0,29	0,00	0,95	0,35	0,58	0,03	0,86	0,32	0,60
L. innocua[2]	0,16	0,71	0,51	0,51	3,94	0,11	1,31	0,31	0,09	0,78	2,85	0,16	0,00	0,98
S. aureus[1]	0,71	0,44	3,27	0,14	3,48	0,13	2,14	0,21	0,60	0,48	2,62	0,18	0,69	0,45
S. aureus[2]	8,43	**0,04**	138,0	**0,00**	20,84	**0,01**	3,24	0,14	14,16	**0,01**	6,12	0,06	6,04	0,06
B. cereus[1]	0,72	0,44	17,30	**0,01**	75,40	**0,00**	2,17	0,21	0,05	0,84	21,92	0,00	1,09	0,35
B. cereus[2]	2,63	0,20	33,0	**0,01**	0,62	0,48	1,08	0,37	1,47	0,31	0,03	0,87	0,36	0,59
Rhodotorula[1]	0,14	0,72	3,21	0,14	2,75	0,17	0,00	0,96	1,59	0,27	1,51	0,28	0,00	0,98
Rhodotorula[2]	0,02	0,88	24,70	**0,00**	0,83	0,41	0,32	**0,00**	7,24	0,05	0,93	0,38	0,56	0,49
S. cerevisiae[1]	0,21	0,66	0,83	0,41	3,70	0,12	2,70	0,17	0,04	0,84	0,77	0,43	0,13	0,73
S. cerevisiae[2]	42,1	**0,00**	9,22	**0,03**	0,00	0,96	1,56	0,27	0,25	0,64	13,83	0,02	3,80	0,12

[1]plazma u mjehurićima; [2]plinska plazma

statistička značajnost $p<0,05$

Tablica 27. Analiza varijance parametara plazma tretmana (A: frekvencija, B:vrijeme, C:plin) na istjecanje unutar staničnog sadržaja pri 280 nm

Uzorak	**A**		**B**		**C**		**AA**	**AB**		**AC**		**BC**	
	F	**P**	**F**	**P**	**F**	**P**	**F**	**P**	**F**	**P**	**F**	**P**	**F**	**P**
E. coli[1]	3,99	0,11	3,49	0,13	0,36	0,58	0,18	0,69	2,00	0,23	3,80	0,12	1,62	0,27
E. coli[2]	0,01	0,91	6,85	0,05	0,48	0,52	0,66	0,46	1,13	0,34	0,10	0,76	2,43	0,19
Salmonella[1]	25,18	0,00	6,56	0,06	16,79	**0,01**	13,11	**0,02**	0,89	0,40	11,90	**0,02**	0,59	0,48
Salmonella[2]	1,93	0,23	16,29	**0,01**	5,15	0,08	0,03	0,86	2,89	0,16	0,21	0,66	4,07	0,11
L. innocua[1]	7,28	0,05	7,72	**0,04**	0,56	0,49	47,96	**0,00**	7,28	0,05	5,21	0,08	0,23	0,65
L. innocua[2]	0,33	0,59	0,04	0,85	0,34	0,59	0,28	0,62	0,46	0,53	2,85	0,16	0,32	0,60
S. aureus[1]	0,00	0,99	0,67	0,45	0,66	0,46	1,33	0,31	0,00	0,99	0,00	0,99	0,67	0,45
S. aureus[2]	48,74	**0,00**	70,44	**0,00**	3,83	0,12	0,00	0,98	5,15	0,08	0,66	0,46	8,22	**0,04**
B. cereus[1]	1,34	0,31	14,31	**0,01**	7,61	0,05	0,08	0,79	2,39	0,19	10,15	**0,03**	2,01	0,22
B. cereus[2]	1,68	0,26	66,54	**0,00**	19,68	**0,01**	8,61	**0,04**	0,01	0,92	0,65	0,46	2,13	0,21
Rhodotorula[1]	1,60	0,27	13,26	**0,02**	39,07	**0,00**	0,48	0,52	0,44	0,54	1,60	0,27	6,80	0,05
Rhodotorula[2]	0,73	0,44	2,79	0,17	1,15	0,34	2,04	0,22	0,96	0,38	0,01	0,93	0,82	0,41
S. cerevisiae[1]	0,02	0,88	27,78	**0,00**	13,85	**0,02**	0,00	0,98	1,57	0,27	9,17	**0,03**	1,89	0,24
S. cerevisiae[2]	1,13	0,34	13,76	**0,02**	6,65	0,06	0,85	0,40	0,99	0,37	1,82	0,24	2,45	0,19

[1]plazma u mjehurićima; [2]plinska plazma

statistička značajnost $p<0,05$

Tablica 28. Koncentracije proteina za odabrane bakterije prije i nakon tretmana plinskom plazmom i plazmom u mjehurićima

F (Hz)	T (min)	Plin	Reaktor *	*E. coli*	*Salmonella*	*L. innocua*	*S. aureus*	*B. cereus*
				γ (prot.) (mg L^{-1})	γ (prot.) (mg L^{-1})	γ (prot.) (mg L^{-1})	γ (prot.) (mg L^{-1})	γ (prot.) (mg L^{-1})
60	0	Zrak	1	0,030	0,004	0,039	0,009	0,010
60	5	Zrak	1	0,080	0,091	0,070	0,036	0,056
60	10	Zrak	1	0,106	0,079	0,0002	0,042	0,128
90	0	Zrak	1	0,026	0,001	0,009	0,002	0,010
90	5	Zrak	1	0,080	0,055	0,052	0,032	0,036
90	10	Zrak	1	0,090	0,066	0,057	0,048	0,097
120	0	Zrak	1	0,026	0,003	0,012	0,000	0,010
120	5	Zrak	1	0,077	0,065	0,048	0,041	0,039
120	10	Zrak	1	0,085	0,077	0,062	0,090	0,119
60	0	Argon	1	0,088	0,011	0,000	0,012	0,001
60	5	Argon	1	0,100	0,090	0,077	0,001	0,111
60	10	Argon	1	0,138	0,111	0,077	0,049	0,144
90	0	Argon	1	0,037	0,005	0,000	0,007	0,013
90	5	Argon	1	0,076	0,077	0,024	0,036	0,066
90	10	Argon	1	0,099	0,088	0,071	0,104	0,113
120	0	Argon	1	0,051	0,001	0,000	0,004	0,020
120	5	Argon	1	0,106	0,062	0,024	0,051	0,099
120	10	Argon	1	0,170	0,086	0,053	0,123	0,134
60	0	Zrak	2	0,061	0,008	0,003	0,015	0,003
60	5	Zrak	2	0,074	0,003	0,074	0,029	0,070
60	10	Zrak	2	0,159	0,009	0,076	0,023	0,077
90	0	Zrak	2	0,044	0,000	0,002	0,017	0,006
90	5	Zrak	2	0,063	0,000	0,067	0,005	0,047
90	10	Zrak	2	0,079	0,010	0,113	0,035	0,075
120	0	Zrak	2	0,135	0,000	0,003	0,012	0,005
120	5	Zrak	2	0,149	0,019	0,000	0,036	0,051
120	10	Zrak	2	0,123	0,017	0,063	0,089	0,049
60	0	Argon	2	0,049	0,007	0,003	0,007	0,003
60	5	Argon	2	0,027	0,011	0,047	0,000	0,037
60	10	Argon	2	0,027	0,014	0,052	0,000	0,082
90	0	Argon	2	0,060	0,0007	0,000	0,018	0,001
90	5	Argon	2	0,090	0,010	0,110	0,048	0,048
90	10	Argon	2	0,084	0,012	0,084	0,069	0,081
120	0	Argon	2	0,047	0,000	0,002	0,012	0,003
120	5	Argon	2	0,069	0,019	0,032	0,101	0,069
120	10	Argon	2	0,085	0,013	0,063	0,112	0,071

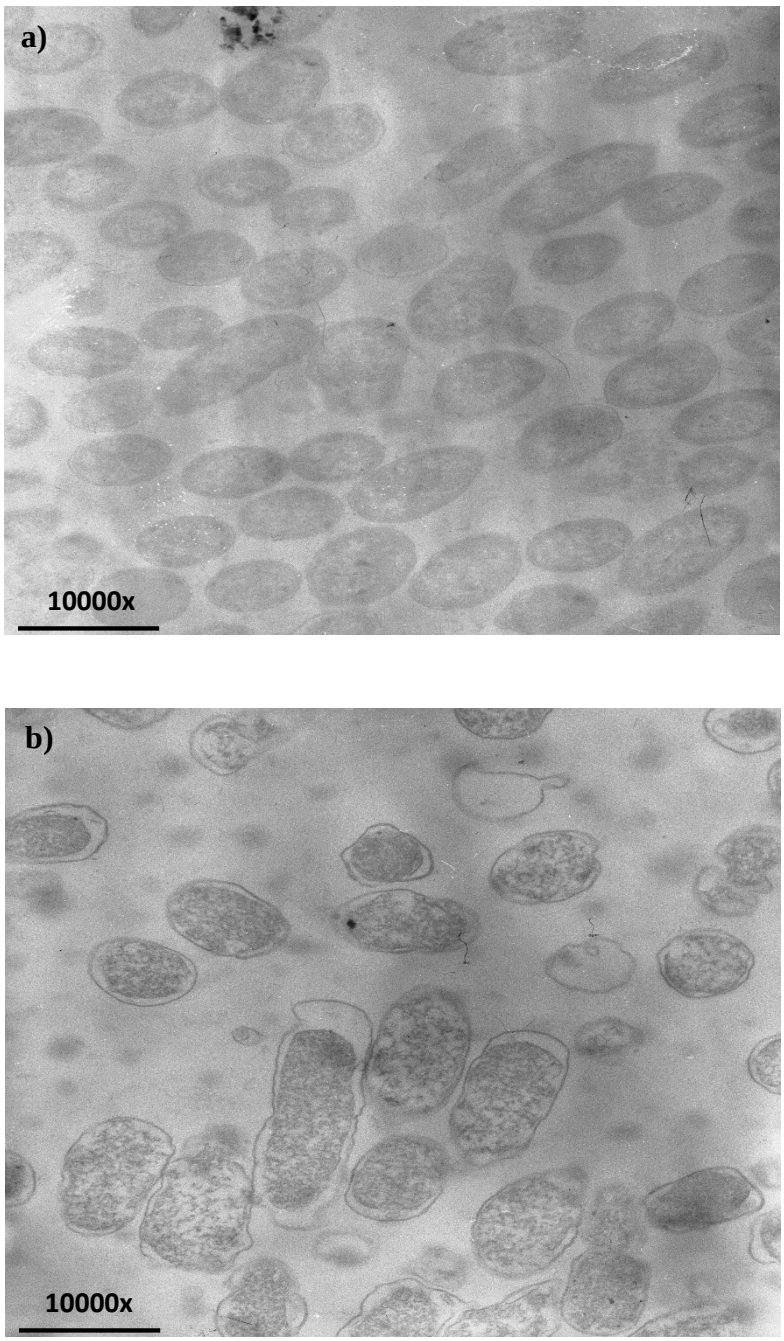
*1 plinska plazma; 2 tekućinska plazma u mjehurićima

Tablica 29. Koncentracije proteina kulture kvasca *Rhodotorula* spp. prije i nakon tretmana plinskom plazmom i plazmom u mjehurićima

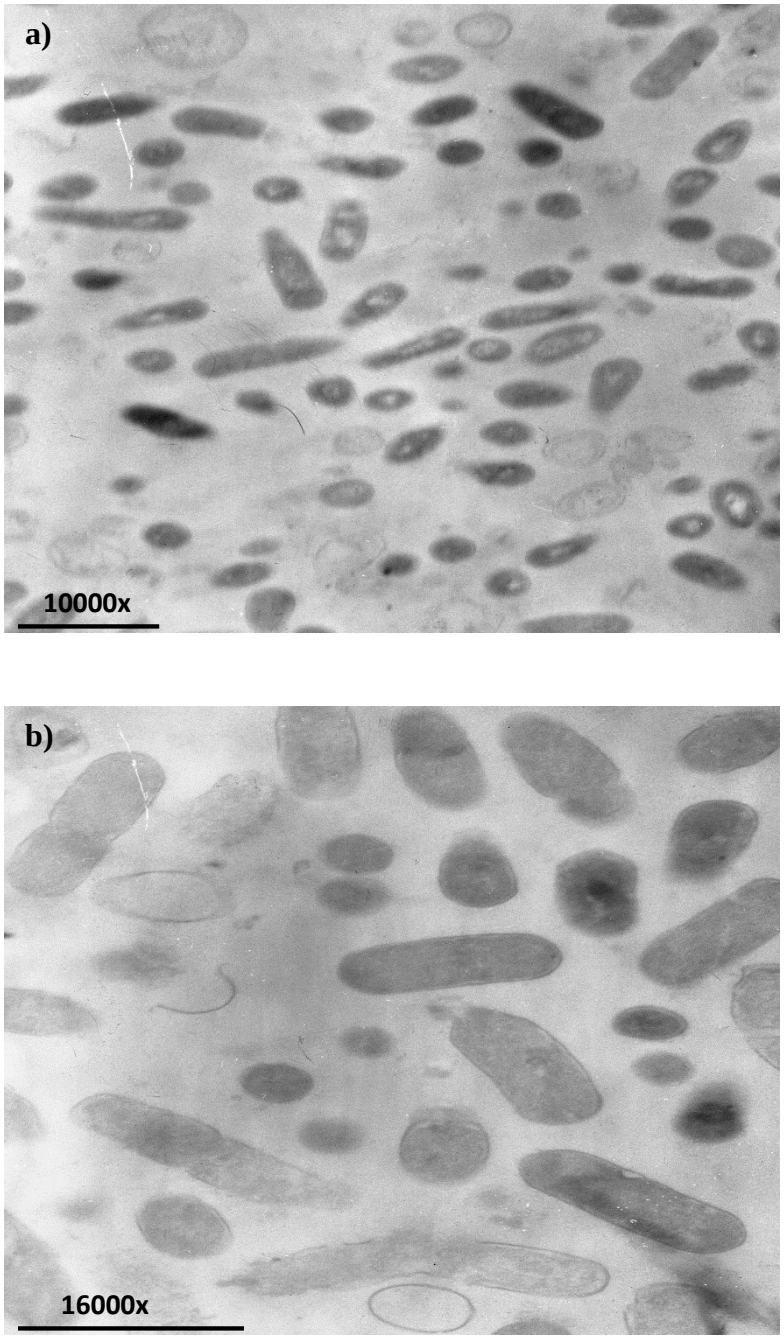
F (Hz)	T (min)	Plin	Reaktor*	*Rhodotorula* spp.	*S. cerevisiae*
				γ (prot.) (mg L^{-1})	γ (prot.) (mg L^{-1})
60	0	Zrak	1	0,052	0,021
60	5	Zrak	1	0,072	0,131
60	10	Zrak	1	0,105	0,220
90	0	Zrak	1	0,155	0,044
90	5	Zrak	1	0,201	0,159
90	10	Zrak	1	0,208	0,163
120	0	Zrak	1	0,089	0,023
120	5	Zrak	1	0,161	0,186
120	10	Zrak	1	0,176	0,200
60	0	Argon	1	0,190	0,045
60	5	Argon	1	0,139	0,214
60	10	Argon	1	0,291	0,277
90	0	Argon	1	0,126	0,035
90	5	Argon	1	0,293	0,171
90	10	Argon	1	0,388	0,290
120	0	Argon	1	0,088	0,044
120	5	Argon	1	0,146	0,198
120	10	Argon	1	0,162	0,256
60	0	Zrak	2	0,057	0,044
60	5	Zrak	2	0,167	0,118
60	10	Zrak	2	0,144	0,136
90	0	Zrak	2	0,046	0,000
90	5	Zrak	2	0,129	0,124
90	10	Zrak	2	0,126	0,153
120	0	Zrak	2	0,031	0,001
120	5	Zrak	2	0,148	0,139
120	10	Zrak	2	0,154	0,145
60	0	Argon	2	0,035	0,026
60	5	Argon	2	0,170	0,150
60	10	Argon	2	0,215	0,217
90	0	Argon	2	0,016	0,037
90	5	Argon	2	0,196	0,176
90	10	Argon	2	0,254	0,221
120	0	Argon	2	0,012	0,015
120	5	Argon	2	0,167	0,120
120	10	Argon	2	0,209	0,177

*1 plinska plazma; 2 tekućinska plazma u mjehurićima

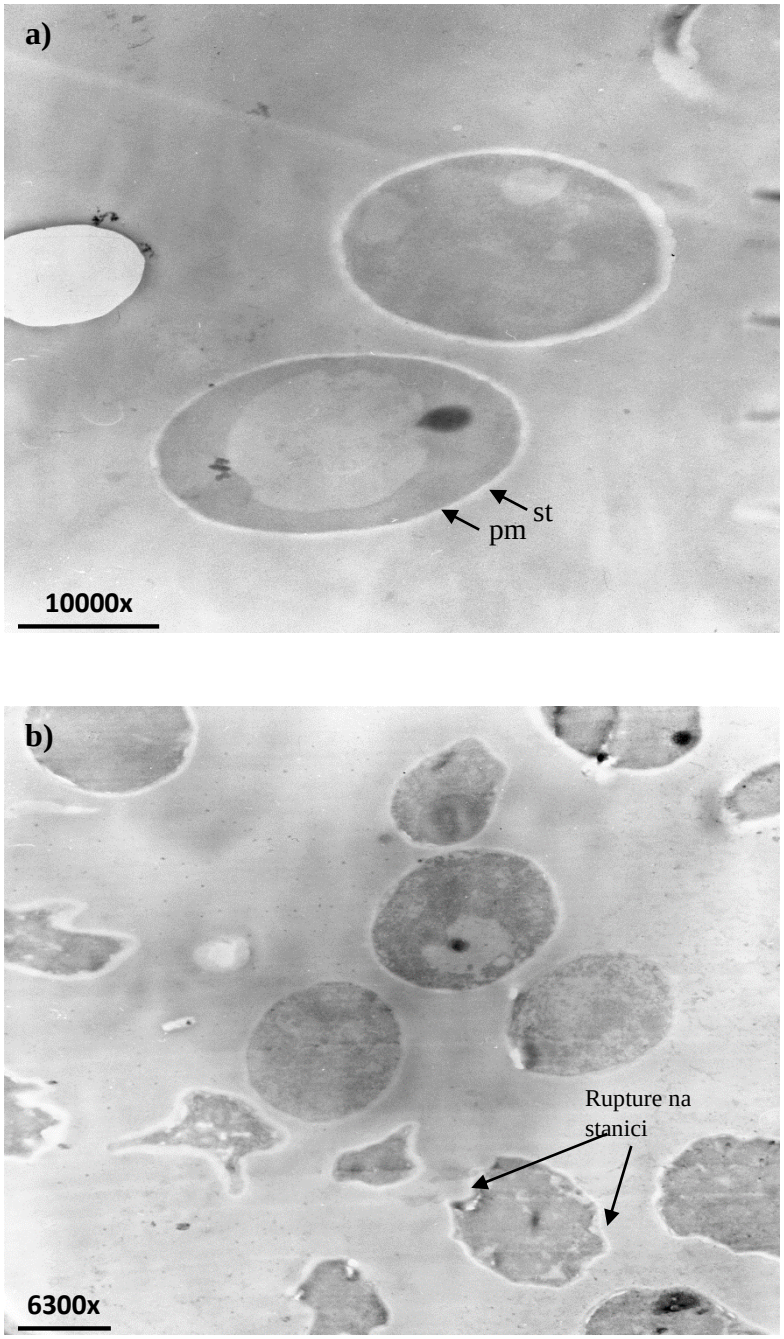
4.9. Transmisijski elektronski mikroskop



Slika 41. Prikaz bakterijskih stanica *E. coli* transmisijskim elektronskim mikroskopom prije (a) i nakon tretmana (b) tekućinskom plazmom u mjehurićima (tretman: 90 Hz, argon, 10')

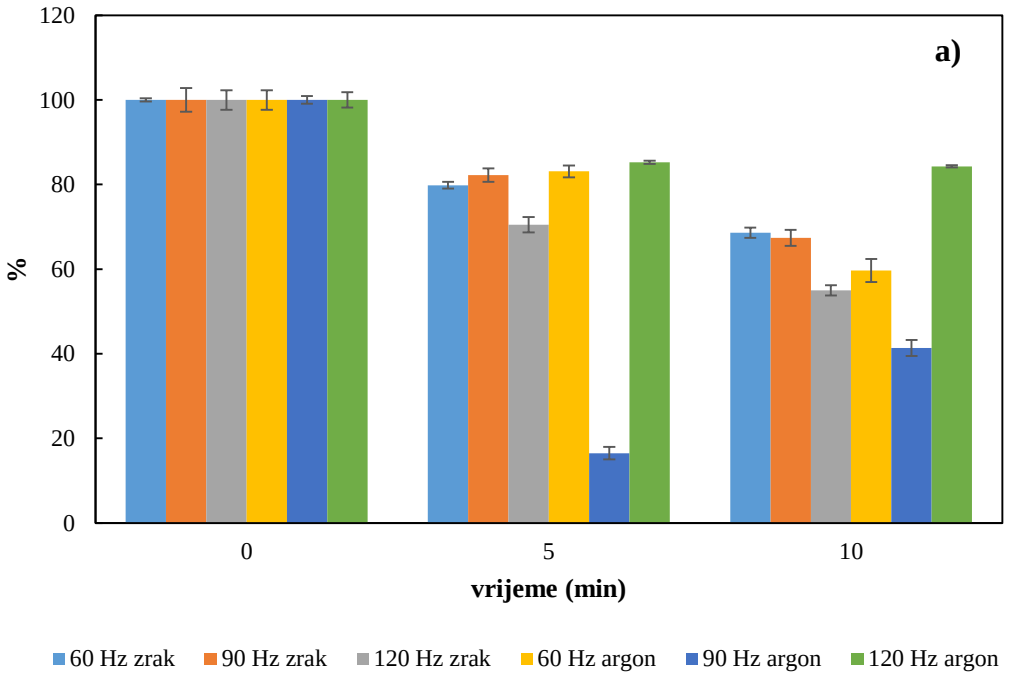


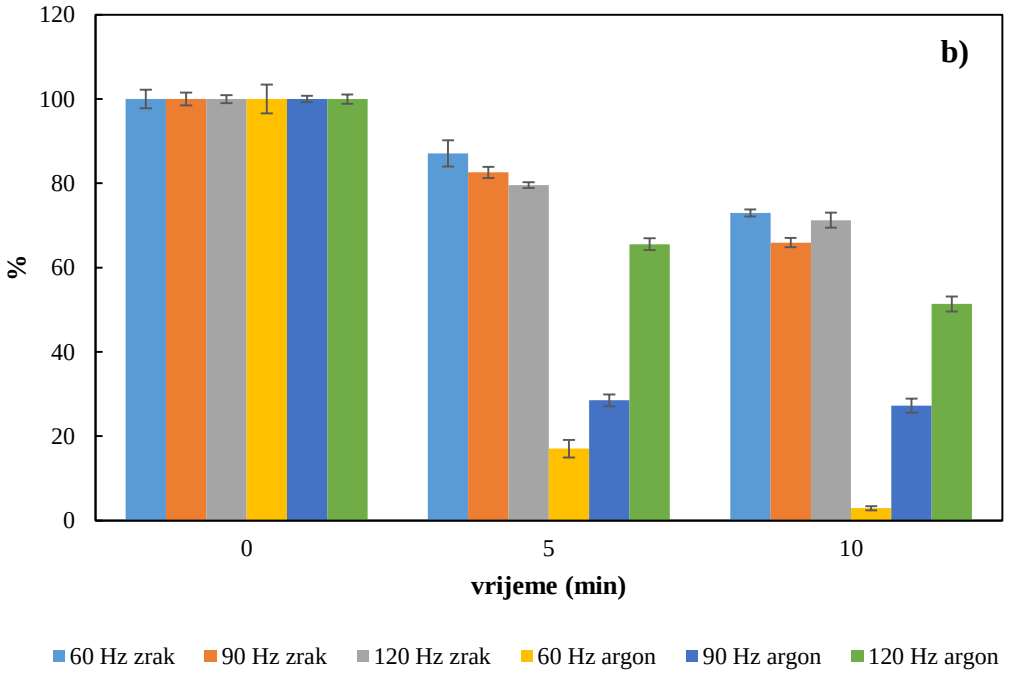
Slika 42. Prikaz bakterijskih stanica *L. innocua* transmisijskim elektronskim mikroskopom prije (a) i nakon tretmana (b) tekućinskom plazmom u mjehurićima (tretman: 90 Hz, argon, 10')



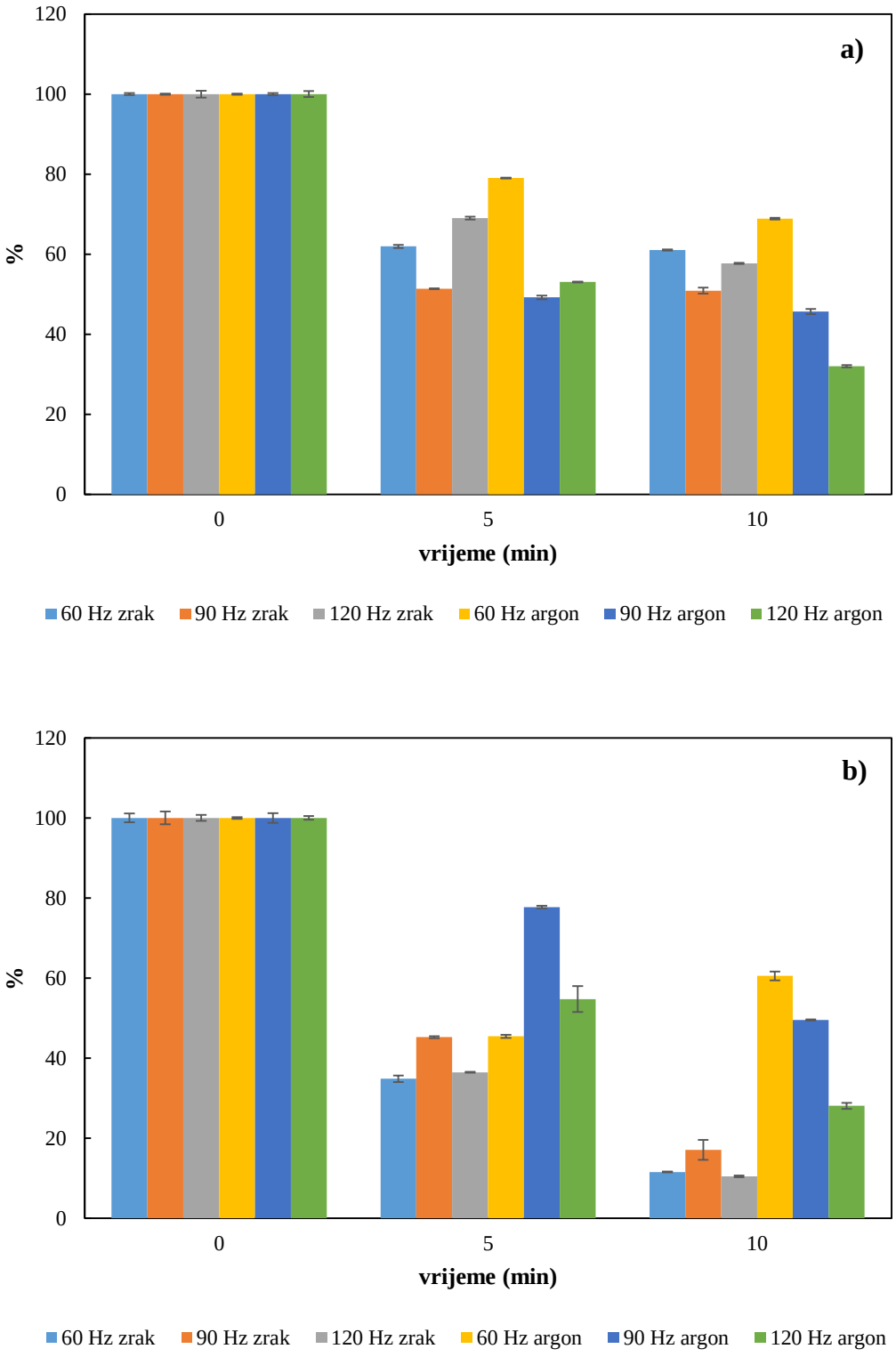
Slika 43. Prikaz stanica kvasca *S. cerevisiae* transmisijskim elektronskim mikroskopom prije (a) i nakon tretmana (b) tekućinskom plazmom u mjehurićima (tretman: 90 Hz, argon, 10')

4.10. Biofilm

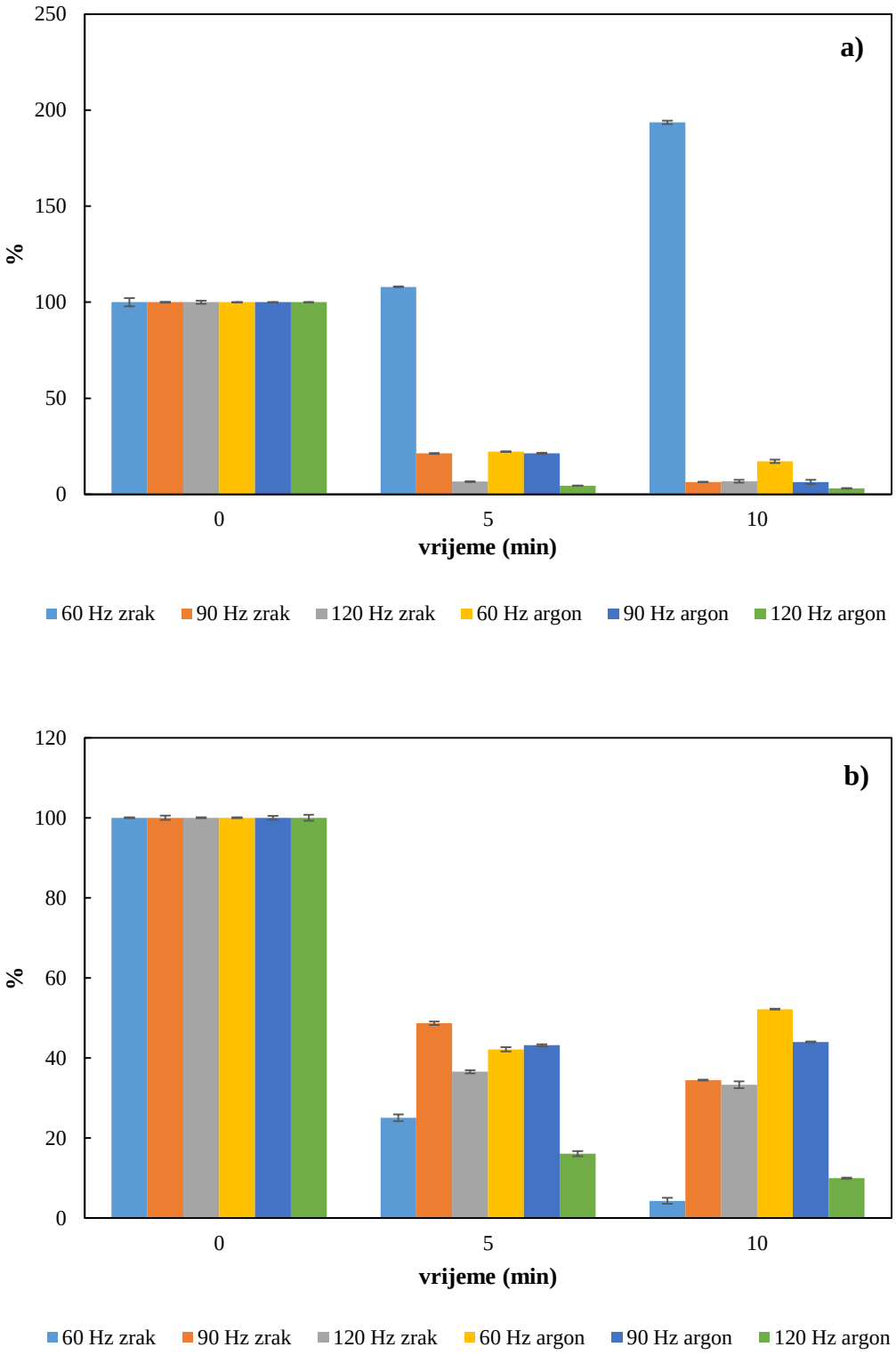




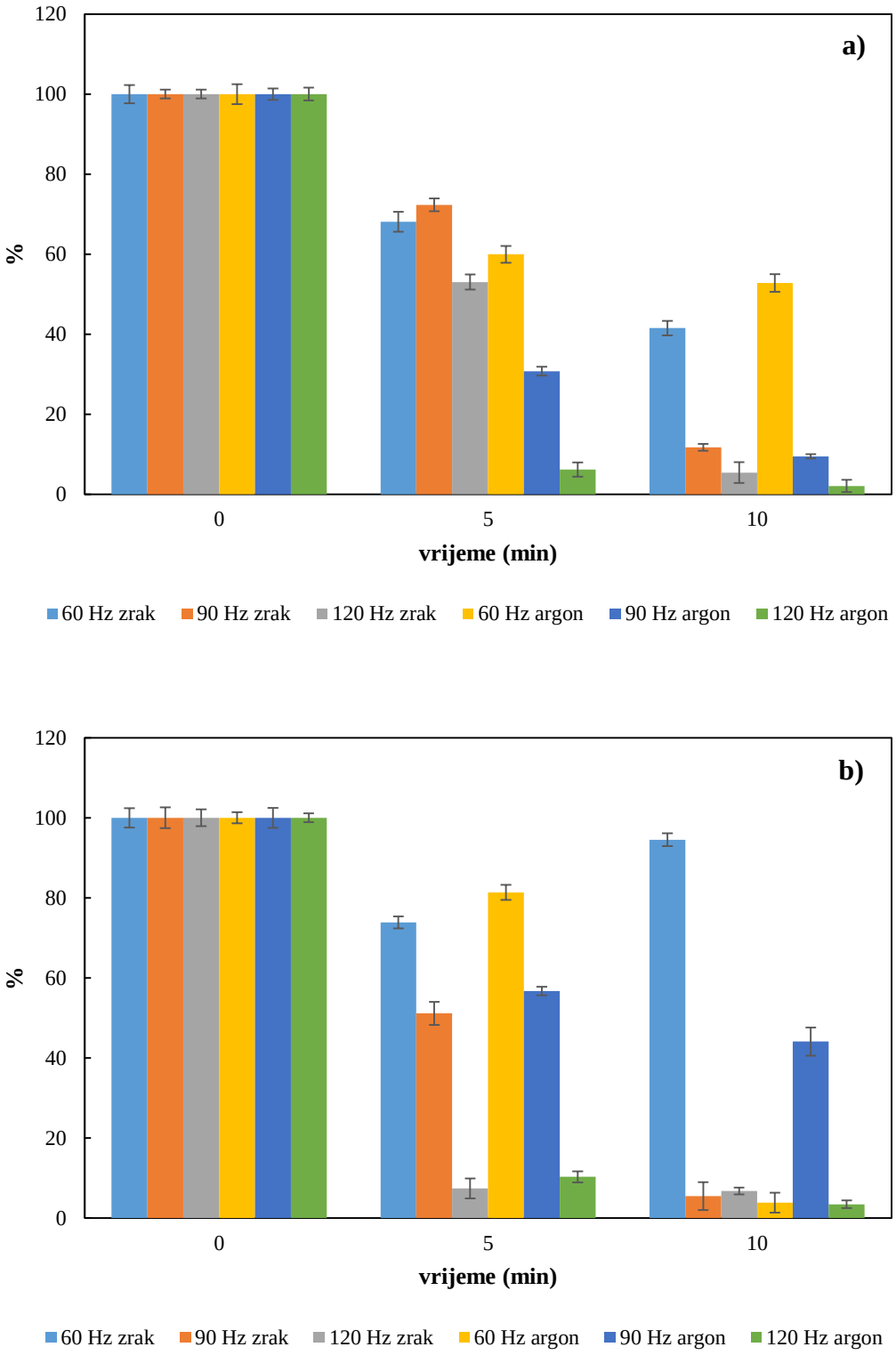
Slika 44. Stvaranje biofilma u ovisnosti o vremenu tretiranja, primjenjenoj frekvenciji i plinu prije i nakon tretmana plazmom generiranom u plinskoj fazi (a) i tekućinskom plazmom u mjehurićima (b) za bakterijske stanice *E. coli*



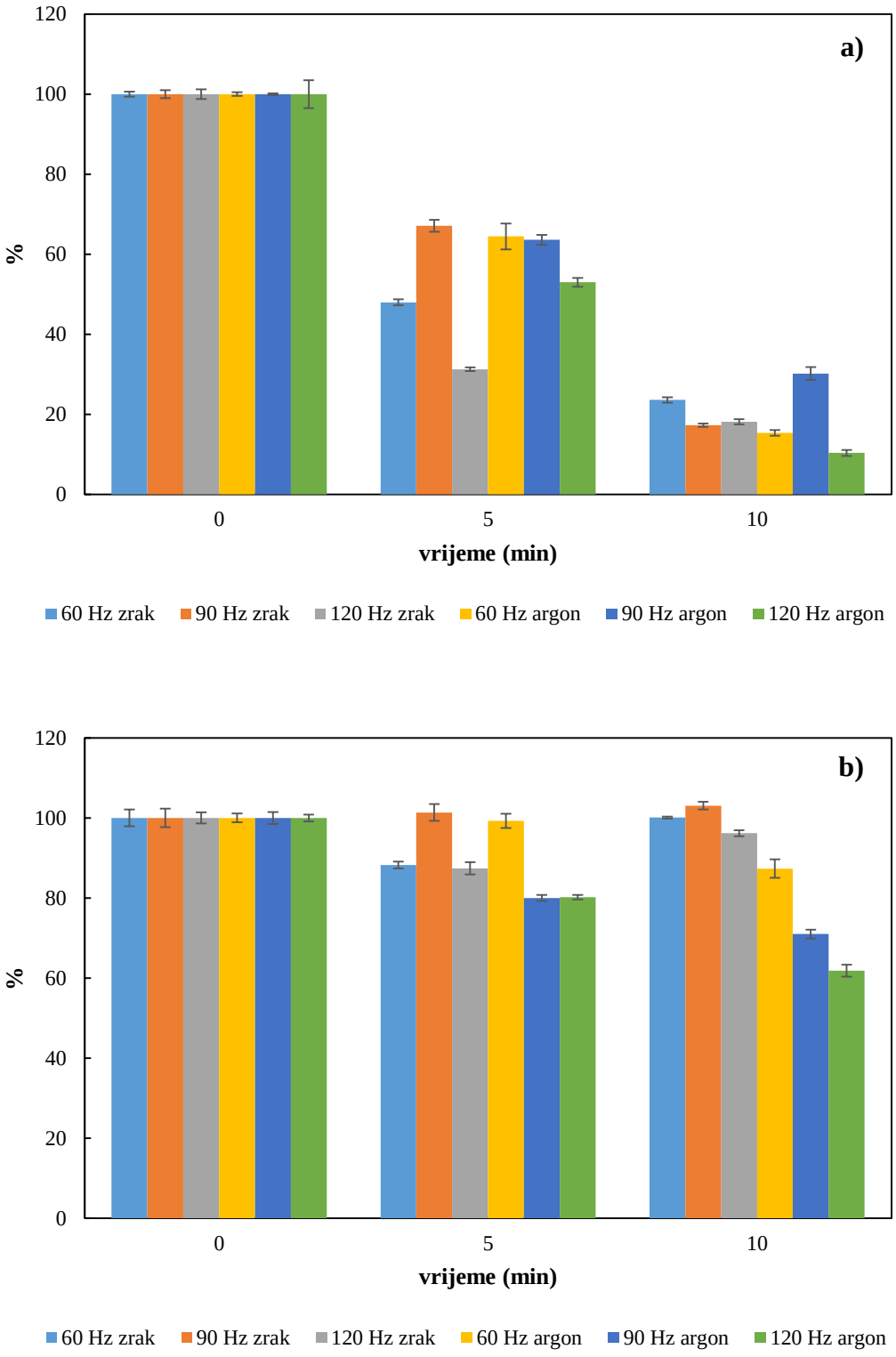
Slika 45. Stvaranje biofilma u ovisnosti o vremenu tretiranja, primjenjenoj frekvenciji i plinu prije i nakon tretmana plazmom generiranom u plinskoj fazi (a) i tekućinskom plazmom u mjehurićima (b) za bakterijske stanice *S. enterica*



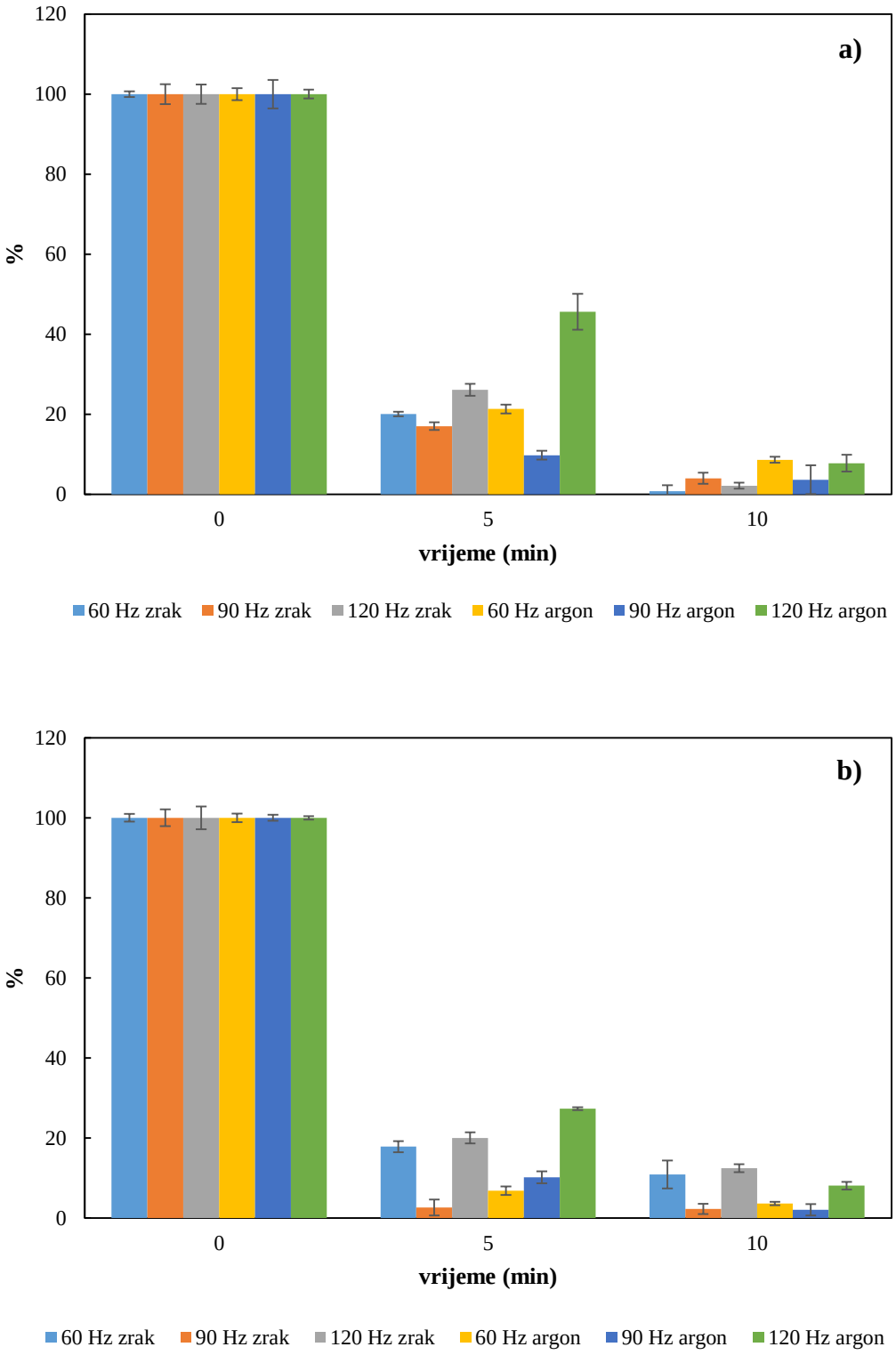
Slika 46. Stvaranje biofilma u ovisnosti o vremenu tretiranja, primjenjenoj frekvenciji i plinu prije i nakon tretmana plazmom generiranom u plinskoj fazi (a) i tekućinskom plazmom u mjehurićima (b) za bakterijske stanice *L. innocua*



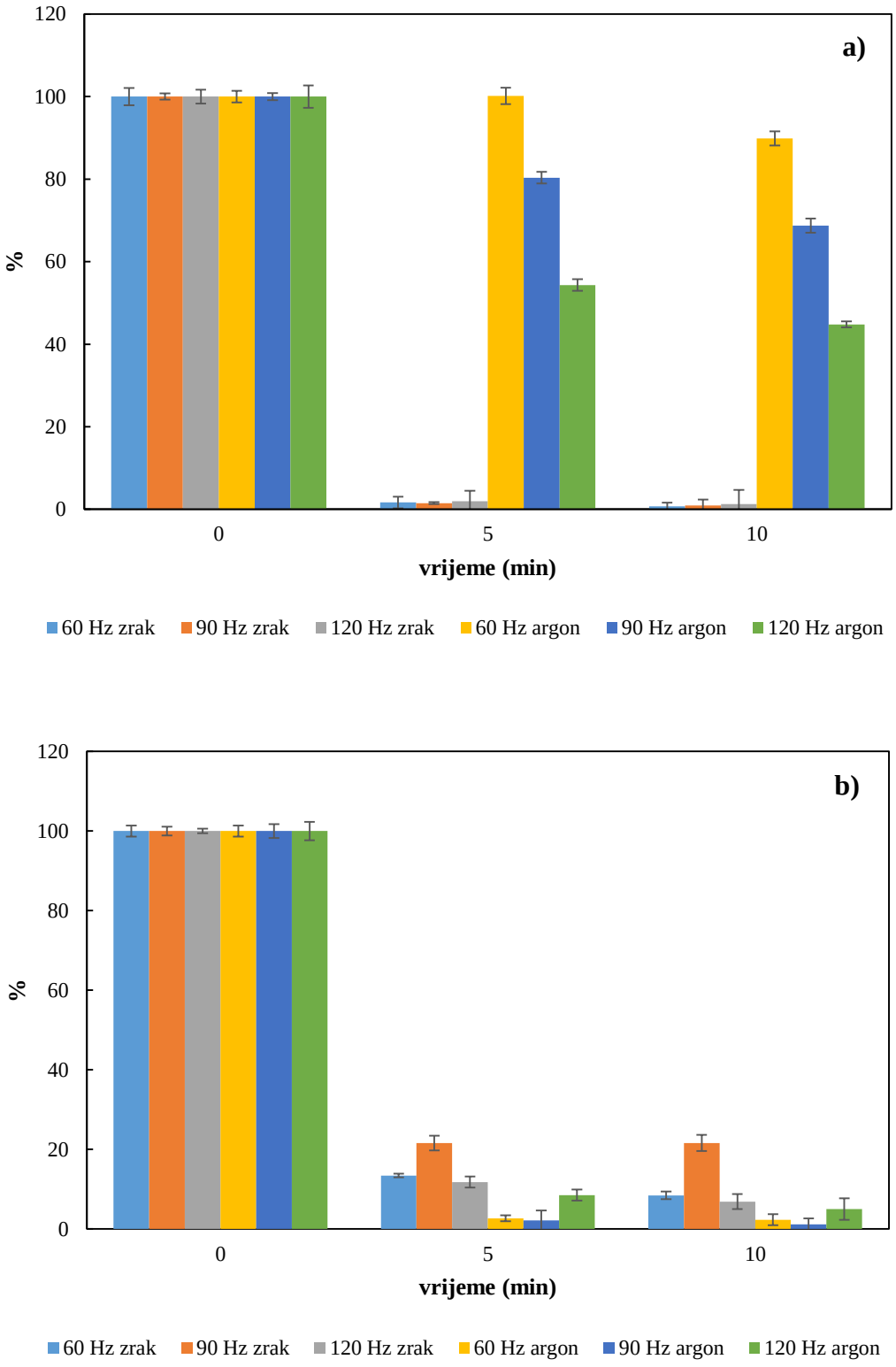
Slika 47. Stvaranje biofilma u ovisnosti o vremenu tretiranja, primjenjenoj frekvenciji i plinu prije i nakon tretmana plazmom generiranom u plinskoj fazi (a) i tekućinskom plazmom u mjehurićima (b) za bakterijske stanice *S. aureus*



Slika 48. Stvaranje biofilma u ovisnosti o vremenu tretiranja, primjenjenoj frekvenciji i plinu prije i nakon tretmana plazmom generiranom u plinskoj fazi (a) i tekućinskom plazmom u mjehurićima (b) za bakterijske stanice *B. cereus*



Slika 49. Stvaranje biofilma u ovisnosti o vremenu tretiranja, primjenjenoj frekvenciji i plinu prije i nakon tretmana plazmom generiranom u plinskoj fazi (a) i tekućinskom plazmom u mjehurićima (b) za stanice kvasca *Rhodotorula* spp



Slika 50. Stvaranje biofilma u ovisnosti o vremenu tretiranja, primjenjenoj frekvenciji i plinu prije i nakon tretmana plazmom generiranom u plinskoj fazi (a) i tekućinskom plazmom u mjehurićima (b) za stanice kvasca *S. cerevisiae*

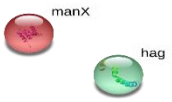
4.11. Rezultati proteomskih istraživanja

Tablica 30. Razlikovni prikaz proteina koje bakterija *E. coli* producira prije i nakon tretmana

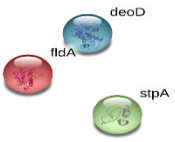
Pristupni broj u bazi UniProt	Ime proteina	Gen	Eksp.*	Funkcija proteina
P04949	Flagelin	fliC	+	Subprotein koji polimerizira prilikom stvaranja vlakana bakterijskih flagela.
P69797	PTS sustav manoza specifična EIIAB komponenta	manX	+	Katalizira fosforilaciju šećernih supstrata s njihovom translokacijom preko stanične membrane.
P0ACG1	DNA-vezujući protein	stpA	-	Katalizira potiskivanje niza gena, kriptični blg operon, papB i proU lokus.
P61949	Flavodoksin	fldA	-	Sudjeluje u reaktivaciji neaktivnog cob(II) alamina u metioninskoj sintazi.
P0ABP8	Purin nukleozid fosforilaza	deoD	-	Katalizira odcjepljivanje guanozina ili inozina na odgovarajuće baze i molekule šećer-1-fosfata.

*(+) produciran kod netretiranog

(-) produciran kod tretiranog



Slika 51. Protein-protein interakcije između proteina produciranih prije tretmana bakterije *E. coli* izrađene pomoću web alata STRING i UniProt baze bakterije *E. coli*. Proteini su opisani u tablici 30



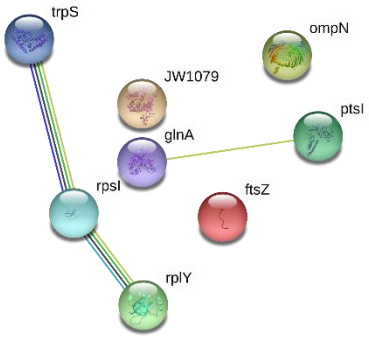
Slika 52. Protein-protein interakcije između proteina produciranih nakon tretmana bakterije *E. coli* izrađene pomoću web alata STRING i UniProt baze bakterije *E. coli*. Proteini su opisani u tablici 30

Tablica 31. Razlikovni prikaz proteina koje bakterija *E. coli* producira prije i nakon revitalizacije

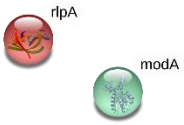
Pristupni broj u bazi UniProt	**Ime proteina**	**Gen**	**Eksp.***	**Funkcija proteina**
P21420	Putativni vanjski membranski porin protein	nmpC	+	Kodirajući profag DLP12.
P08839	Fosfoenolpiruvat-protein fosfotrasferaza	ptsI	+	Fosforilacija ugljikohidrata s njihovom translokacijom preko stanične membrane.
P0AEK2	3-oksoacil-reduktaza	fabG	+	Redukcija NADPH ovisne redukcije beta-ketoacil-ACP supstrata. Prvi reduktivni korak u ciklusu produljenja biosinteze masnih kiselina.
P0A7X3	30S ribosomalni protein S9	rpsI	+	C-terminalni kraj ima ulogu u afinitetu 30S P mjesta za različite tRNA.
P00954	Triptofan-tRNA ligaza	trpS	+	Katalizira vezanje triptofana na tRNA.
P68919	50S ribosomalni protein L25	rplY	+	Vezanje se na 5S RNA u ribosomu na mjestu središnjeg izbočenja.
P0A9C5	Glutamin sintetaza	glnA	+	ATP ovisna biosinteza glutamina iz glutamata i amonijaka.
P77747	Vanjsko membranski protein N	ompN	+	Oblikuje pore koje omogućuju pasivnu difuziju malih molekula preko vanjske membrane.
P0A9A6	Protein diobe stanica	ftsZ	+	Osnovni protein diobe stanica koji oblikuje kontraktilnu prstenastu strukturu (Z prsten) na budućem mjestu podjele stanica. Regulacija sklopa prstena kontrolira vrijeme i mjesto diobe stanica. Jedna od funkcija ftsZ prstena je pribavljanje drugih proteina stanične diobe u septum kako bi se stvorila nova stanična stijenka između stanica razdjeljivanja. Vezuje GTP i pokazuje aktivnost GTP-aze.
P37329	Molibdat vezujući protein	modA	-	Dio ABC transport sustava. Transport molibdena i volframa u stanicu.
P10100	Endolitička peptidoglikanska transglikozilaza	rlpA	-	Litička transglikozilaza sa jakom preferencijom za gama glikanske niti koje nedostaju matičnim peptidima.

*(+) produciran kod netretiranog

(-) produciran kod revitalizacije



Slika 53. Protein-protein interakcije između proteina produciranih prije revitalizacije bakterije *E. coli* izrađene pomoću web alata STRING i UniProt baze bakterije *E. coli*. Proteini su opisani u tablici 31



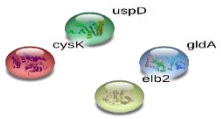
Slika 54. Protein-protein interakcije između proteina produciranih nakon revitalizacije bakterije *E. coli* izrađene pomoću web alata STRING i UniProt baze bakterije *E.coli*. Proteini su opisani u tablici 31

Tablica 32. Razlikovni prikaz proteina koje bakterija *E. coli* producira prije i nakon trostrukog tretmana

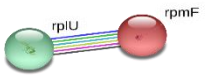
Pristupni broj u bazi UniProt	**Ime proteina**	**Gen**	**Eksp.***	**Funkcija proteina**
P0A9S5	Glicerol dehidrogenaza	gldA	+	Oksidacija NAD ovisne reakcije glicerola u dihidrokisaceton. Omogućuje mikroorganizmima da koriste glicerol kao izvor ugljika pod anaerobnim uvjetima. Regulira intarcelularnu razinu dihidrokisacetona katalizacijom reverzne reakcije (dihidroksiaceton u glicerol)
P0ABK5	Cistein sintaza A	cysK	+	Sinteza cisteina.
P0ABU5	Glikolaza	elbB	+	Glikoksalazna aktivnost. Konverzija glioksalata u glikolat.
P0AAB8	Univerzalni protein stresa	uspD	+	Otpornost na agense koji oštećuju DNA.
P0AG48	50S ribosomalni protein L21	rplU	-	Vezanje se na 23S rRNA u prisutnosti proteina L20.
P0A7N4	50S ribosomalni protein L32	rpmF	-	Stukturni konstituent ribosoma. Odgovor na zračenje i reaktivne oksidativne kemijske vrste.

*(+) produciran kod netretiranog

(-) produciran kod trostrukog tretmana



Slika 55. Protein-protein interakcije između proteina produciranih prije trostrukog tretmana bakterije *E. coli* izrađene pomoću web alata STRING i UniProt baze bakterije *E. coli*. Proteini su opisani u tablici 32



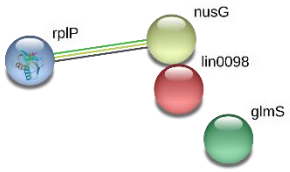
Slika 56. Protein-protein interakcije između proteina produciranih nakon trostrukog tretmana bakterije *E. coli* izrađene pomoću web alata STRING i UniProt baze bakterije *E. coli*. Proteini su opisani u tablici 32

Tablica 33. Razlikovni prikaz proteina koje bakterija *L. innocua* producira prije i nakon tretmana

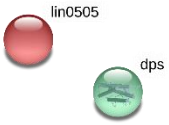
Pristupni broj u bazi UniProt	**Ime proteina**	**Gen**	**Eksp.***	**Funkcija proteina**
H1GA44	Protein transkripcijske terminacije i antiterminacije	nusG	+	Produljenje transkripcije i terminacije.
H1G8P2	Aminotransferaza	HMPREF0557_00362	+	Transaminazna aktivnost. Selektivno i ne-kovalentno reagira s piridoksal 5'-fosfatom, 3-hidroksi-5-(hidroksimetil) -2-metil-4-piridinkarboksialdehid 5'-fosfatom, biološki aktivnim oblikom vitamina B6.
H1GFY7	50S ribosomalni protein L16	rplP	+	Spaja se s 23S rRNA i A i P stranom tRNA. Sudjeluje u translaciji.
H1GDH4	Format C aciltrasferaza	HMPREF0557_02066	+	Metabolički put ugljikohidrata. Format C aciltrasferazna aktivnost (acetil-CoA + format = CoA + piruvat).
H1G8F5	3-oksoacil reduktaza	HMPREF0557_00272	+	Biosintetski put masnih kiselina. Vezuje NAD. Katalizira reakciju stvaranja NADPH.
H1GE76	Nekarakterizirani protein	HMPREF0557_02319	+	-
H1G853	Glioksalaza protein	HMPREF0557_00165	-	Metiloksalat degradacija. Metiglioksalat + H_2O → (R)-laktat + H^+
H1G8G6	Ribuloza-fosaft 3-epimeraza	HMPREF0557_00283	-	Vezuje jedan divalentni metalni kation po jednoj podjedinici. Katalitička aktivnost: D-ribuloza 5-fosfat = D-ksiloza 5-fosfat.
H1GB50	CBS protein	HMPREF0557_01235	-	Dio cistationin beta sintaze. Katalizira vezanje molekule sa AMP i ATP.
H1GC76	Zaštitni DNA protein tijekom gladovanja	HMPREF0557_01616	-	Vezuje Fe ion. Homeostaza Fe iona u stanici. Odgovor na stres. Oksidoreduktazna aktivnost.

*(+) produciran kod netretiranog

(-) produciran kod tretiranog



Slika 57. Protein-protein interakcije između proteina produciranih prije tretmana bakterije *L. innocua* izrađene pomoću web alata STRING i UniProt baze bakterije *L. innocua*. Proteini su opisani u tablici 33



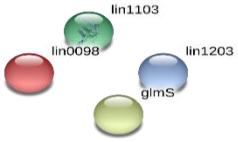
Slika 58. Protein-protein interakcije između proteina produciranih nakon tretmana bakterije *L. innocua* izrađene pomoću web alata STRING i UniProt baze bakterije *L. innocua*. Proteini su opisani u tablici 33

Tablica 34. Razlikovni prikaz proteina koje bakterija *L. innocua* producira prije i nakon revitalizacije

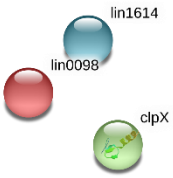
Pristupni broj u bazi UniProt	**Ime proteina**	**Gen**	**Eksp.***	**Funkcija proteina**
H1GEL1	ATP ovisna Clp proteaza, proteolitička podjedinica	clpP	+	Odcjepljuje peptide različitih proteina koji zahtjeva hidrolizu ATP-a. Ima aktivnost kao kimotripsin.
H1G8P2	Aminotransferaza	HMPREF0557_00362	+	Transaminazna aktivnost. Selektivno i ne-kovalentno reagira s piridoksal 5'-fosfatom, 3-hidroksi-5-(hidroksimetil) -2-metil-4-piridinkarboksialdehid 5'-fosfatom, biološki aktivnim oblikom vitamina B6.
H1GD04	Fosfoesteraza	HMPREF0557_01895	+	Veže metalne ione. Hidrolazna aktivnost. Kofaktor za divalentne metalne katione.
H1GDA2	Nekarakterizirani protein	HMPREF0557_01994	+	-
H1GE76	Nekarakterziran i protein	HMPREF0557_02319	+	-
H1GBE7	Nekarakterizirani protein	HMPREF0557_01333	-	Citoplazmatski protein.
H1GD36	ATP-ovisna Clp proteaza	clpX	-	Vezuje Zn^{2+} ion. Vezuje ATP. Peptidazna aktivnost.
H1GFT1	Lichenan specifična fosfotransveraza IIB komponenta	HMPREF0557_02889	-	Fosforil transfer put za prijenos tvari preko membrane.
H1GDZ9	Alanin dehidrogenaza	HMPREF0557_02242	-	L-alanin katabolički proces. Uključen u prvi korak sinteze NH_3 i piruvata iz L-alanina. L-alanin + H_2O + NAD^+ = piruvat + NH_3 + NADH.

*(+) produciran kod netretiranog

(-) produciran kod revitalizacije



Slika 59. Protein-protein interakcije između proteina različito produciranih prije revitalizacije bakterije *L. innocua* izrađene pomoću web alata STRING i UniProt baze bakterije *L. innocua*. Proteini su opisani u tablici 34



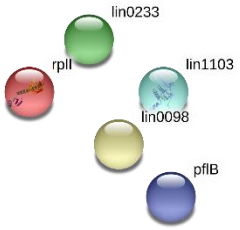
Slika 60. Protein-protein interakcije između proteina različito produciranih nakon revitalizacije bakterije *L. innocua* izrađene pomoću web alata STRING i UniProt baze bakterije *L. innocua*. Proteini su opisani u tablici 34

Tablica 35. Razlikovni prikaz proteina koje bakterija *L. innocua* producira prije i nakon trostrukog tretmana

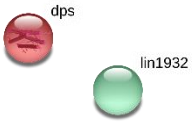
Pristupni broj u bazi UniProt	**Ime proteina**	**Gen**	**Eksp.***	**Funkcija proteina**
H1GEL1	ATP ovisna Clp proteaza, proteolitička	clpP	+	Odcjepljuje peptide različitih proteina koji zahtjeva hidrolizu ATP-a.
H1GDH4	Format C-acetiltransferaza	pflB	+	Metabolički put ugljihohidrata.
H1GDF7	ABC transporter, ATP vezujući	HMPREF0557_02049	+	Vezuje ATP.
H1GB79	Protein P60	HMPREF0557_01264	+	-
H1GF69	50S ribosomalni protein L9	rplI	+	Veže se na 23S rRNA. Dio ribosoma. Sudjeluje u translaciji.
H1GE76	Nekarakterizirani protein	HMPREF0557_02319	+	-
H1G8G6	Ribuloza-fosfat 3-epimeraza	rpe	-	Veže jedan divalentni metalni kation po podjedinici. Katalitička
H1GC76	Protein zaštite DNA tijekom gladovanja	dps	-	Vezuje Fe^{2+} ion. Oksidira metalne ione. Homeostaza staničnog Fe iona.

*(+) produciran kod netretiranog

(-) produciran kod trostrukog tretmana



Slika 61. Protein-protein interakcije između proteina različito produciranih prije trostrukog tretmana bakterije *L. innocua* izrađene pomoću web alata STRING i UniProt baze bakterije *L. innocua*. Proteini su opisani u tablici 35

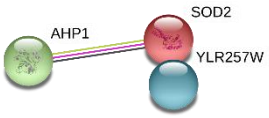


Slika 62. Protein-protein interakcije između proteina različito produciranih nakon trostrukog tretmana bakterije *L. innocua* izrađene pomoću web alata STRING i UniProt baze bakterije *L. innocua*. Proteini su opisani u tablici 36

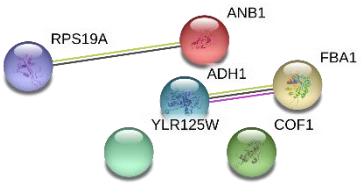
Tablica 36. Razlikovni prikaz proteina koje kvasac *S. cerevisiae* producira prije i nakon tretmana

Pristupni broj u bazi UniProt	**Ime proteina**	**Gen**	**Eksp.***	**Funkcija proteina**
P00447	Superoksid dismutaza	SOD2	+	Uništavanje superoksid anionskih radikala koji se normalno proizvode unutar stanica i koji su toksični za biološke sustave.
P38013	Peroksiredoksin	AHP1	+	Zaštita od oksidativnog stresa. Katalizira redukciju vodikovog peroksida i organskih hidroperoksida u vodu i alkohol. Stanična Mn^{2+} homeostaza.
Q06146	Nekarakteriziran i protein	YRL257 W	+	Odgovor na stres replikacije DNA.
P14540	Fruktoza-bifosfat aldolaza	FBA1	-	Aldol kondenzacija dihidroksiaceton fosfata s gliceraldehid 3-fosfatom (G3P) kako bi se dobila fruktoza 1,6-bisfosfat (FBP) u glukoneogenezi i reverzna reakcija u glikolizi. Vezanje Zn^{2+} iona.
P00330	Alkohol dehidrogenaza 1	ADH1	-	Konverzija primarnih nerazgranatih alkohola u aldehide. Aktivnost prema sekundarnim alkoholima. Vezuje Zn^{2+} ion. Katalitička aktivnost: primarni alkohol + NAD^+ =aldehid + NADH Sekundarni alkohol + NAD^+ = keton + NADH
Q12138	Nekatakteriziran i protein	YRL125 W	-	Ne pokazuje karakteristike esencijalnog gena.
Q03048	Kofilin	COF1	-	Uloga u mitotičkoj reorganizaciji aktinskog citoskeleta. Povećava brzinu aktinizacijske polimerizacije tako što omogućuje novo završavanje za dodavanje aktinskih podjedinica. Takav protein kompleks je važan za polarizirani rast stanica kvasca. Usmjereno kretanje proteina iz golgijevog tijela u plazmatsku membranu transportnih vezikula.
P19211	Eukariotski inicijacijski translacijski faktor 5A-2	ANB1	-	mRNA-vezujući protein uključen u translacijsko produljenje. Odgovor na stres te održavanje integriteta stanične stijenke. Polarizacijski rast.
P07280	40S ribosomalni protein S-19 A	RPS19A	-	Odgovoran za sintezu proteina u stanici. Podaci u messenger RNA (mRNA) koriste za određivanje sekvenci aminokiselina u proteinu. Usmjereno kretanje rRNA od jezgre do citoplazme.

*(+) produciran kod netretiranog; (-) produciran kod tretiranog



Slika 63. Protein-protein interakcije između proteina produciranih prije tretmana kvasca *S. cerevisiae* izrađene pomoću web alata STRING i UniProt baze kvasca *S. cerevisiae*. Proteini su opisani u tablici 37



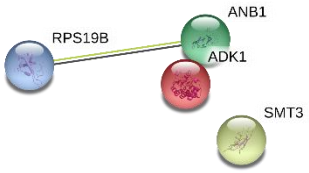
Slika 64. Protein-protein interakcije između proteina produciranih nakon tretmana kvasca *S. cerevisiae* izrađene pomoću web alata STRING i UniProt baze kvasca *S. cerevisiae*. Proteini su opisani u tablici 37

Tablica 37. Razlikovni prikaz proteina koje kvasac *S. cerevisiae* producira prije i nakon revitalizacije stanica

Pristupni broj u bazi UniProt	**Ime proteina**	**Gen**	**Eksp.***	**Funkcija proteina**
P00447	Superoksid dismutaza	SOD2	+	Uništavanje superoksid anionskih radikala koji se normalno proizvode unutar stanica i koji su toksični za biološke sustave.
Q12306	Ubikvitin protein	SMT3	-	Selektivna i kovalentna interakcija sa identičnim proteinima. Uključen u transport.
P07170	Adenilat kinaza	ADK1	-	Homeostaza stanične energije i metabolizma adeninskih nukleotida. (ATP + AMP = 2 ADP)
P07281	40S ribosomalni protein S19-B	RPS19B	-	Strukturni konstituent ribosoma. Stvaranje proteina u citoplazmi.
P19211	Eukariotski inicijacijski translacijski faktor 5A-2	ANB1	-	mRNA-vezujući protein uključen u translacijsko produljenje. Odgovor na stres te održavanje integriteta stanične stijenke. Polarizacijski rast.

*(+) produciran kod netretiranog

(-) produciran kod revitalizacije



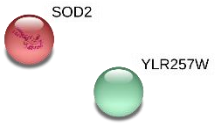
Slika 65. Protein-protein interakcije između proteina različito produciranih nakon revitalizacije kvasca *S. cerevisiae* izrađene pomoću web alata STRING i UniProt baze kvasca *S. cerevisiae*. Proteini su opisani u tablici 38

Tablica 38. Razlikovni prikaz proteina koje kvasac *S. cerevisiae* producira prije i nakon trostrukog tretmana

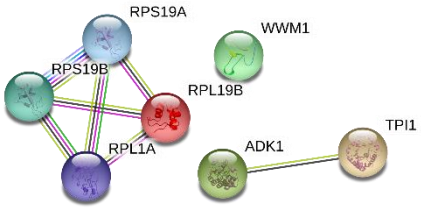
Pristupni broj u bazi UniProt	**Ime proteina**	**Gen**	**Eksp.***	**Funkcija proteina**
P00447	Superoksid dismutaza	SOD2	+	Uništavanje superoksid anionskih radikala koji se normalno proizvode unutar stanica i koji su toksični za biološke sustave. Vezuje Mn^{2+} ion.
Q06146	Nekarakterizirani protein	YRL257W	+	Protein rasta.
P00942	Triozafosfat izomeraza	TPI1	-	Glukogeneza kao dio sinteze ugljikohidrata. Uključen u prvi korak sinteze D-gliceraldehid-3-fosfata iz glicerol fosfata.
P0CX83	60S ribosomalni protein L19-B	RPL19B	-	Sinteza proteina u stanici.
P0CX82	60S ribosomalni protein L19-A	RPL1A	-	Sinteza proteina u stanici.
P43582	WW protein	WWM1	-	Uključen u apoptozu. Kontrolira staničnu proliferaciju. Uzrokuje poremećaj rasta.
P07170	Adenilat kinaza	ADK1	-	Homeostaza stanične energije i metabolizma adeninskih nukleotida. (ATP + AMP = 2 ADP)
P07281	40S ribosomalni protein S19-B	RPS19B	-	Strukturni konstituent ribosoma. Stvaranje proteina u citoplazmi.
P07280	40S ribosomalni protein S-19 A	RPS19A	-	Odgovoran za sintezu proteina u stanici. Podaci u messenger RNA (mRNA) koriste se za određivanje sekvenci aminokiselina u proteinu. Usmjereno kretanje rRNA od jezgre do citoplazme.

*(+) produciran kod netretiranog

(-) produciran kod trostrukog tretmana



Slika 66. Protein-protein interakcije između proteina različito produciranih prije trostrukog tretmana kvasca *S. cerevisiae* izrađene pomoću web alata STRING i UniProt baze kvasca *S. cerevisiae*. Proteini su opisani u tablici 39



Slika 67. Protein-protein interakcije između proteina različito produciranih nakon trostrukog tretmana kvasca *S. cerevisiae* izrađene pomoću web alata STRING i UniProt baze kvasca *S. cerevisiae*. Proteini su opisani u tablici 39

5. RASPRAVA

Primjena tretmana hladnom plazmom u inaktivaciji mikroorganizama nova je netermalna metoda u kojoj mehanizam inaktivacije mikroorganizama još uvijek nije temeljito razjašnjen. Prema preporuci Svjetske organizacije za hranu i lijekove (FDA) potrebno je postići 5 log redukcija kako bi se metoda pokazala učinkovitom pri inaktivaciji patogenih mikroorganizama u hrani (Choi i sur., 2010). Patogeni i kontaminirajući mikroorganizmi u hrani predstavljaju veliki zdravstveni problem, stoga je u cilju razvijati nove tehnologije kako bi se spriječio izvor zaraze. Također je, pri tome potrebno voditi računa i o ekonomskoj isplativosti te energetskoj učinkovitosti predložene tehnologije.

U ovom poglavlju obrazloženi su i raspravljeni dobiveni rezultati istraživanja provedenih na zadanim mikroorganizmima (*E. coli*, *S. enterica*, *L. innocua*, *S. aureus*, *B. cereus*, *Rhodotorula* spp i *S. cerevisiae*) u modelnim otopinama prilikom tretmana hladnom plazmom generiranom u plinskoj fazi i tekućinskoj plazmi u mjehurićima.

5.1. Utjecaj tretmana plazmom na fizikalno-kemijske parametre te produkciju radikala u modelnim sustavima ispitivanih mikroorganizama

Sastav reaktivnih vrsta produciranih djelovanjem plazme može se jednostavno dobiti iz linijskih spektara odnosno relativnog intenziteta te valne duljine. Kako bi se dokazali generirani radikali tijekom izboja plazme koristila se optička emisijska spektroskopija. Prikazana je optička emisija u rasponu od 300 do 880 nm. Plinskom plazmom generiranom u zraku jasno je definirana molekula dušika u rasponu od 300 do 400 nm (slika 16). U rasponu od 400 do 470 nm dokazan je dvovalentni atom kisika. Također su dokazani jednovalentni kisikovi i dušikovi atomi te vodikovi atomi. Prisutan je i jednovalentni atom titana što je dokaz da prilikom generiranja plazme dolazi do erozije elektrode (slika 16). Bitno je zamijetiti da ne postoji značajna emisija ispod 290 nm (ravna linija) koja se prepisuje baktericidnom učinku NOγ radikalima (slika 16) (Hähnel i sur., 2010). Slika 17 prikazuje formiranje jednovalentnog vodikovog, kisikovog i argonovog atoma, dvovalentnog argon i titan atoma te molekule dušika tijekom generiranja plinske plazme u argonu. Brojne studije su dokazale da generirani radikali oštećuju stanične makromolekule kao što su DNA, proteini i lipidi što posljedično dovodi do oksidativnog stresa stanice (Cabiscol Català i sur., 2000; Dolezalova i Lukes, 2015; Gaunt i sur., 2006). Posebno osjetljive na oksidativni stres jesu molekule lipida. Radikali napadaju nesaturirane masne kiseline stanične membrane inicirajući lipidnu peroksidaciju (Gaunt i sur., 2006; Boxhammer i sur., 2012). Tijekom lipidne peroksidacije mogu nastati aldehidi koji dovode do oštećenja proteina (Singh i Singh, 1982). Druga ciljna molekula generiranih radikala

jesu molekule DNA. Generirani radikali mogu uzrokovati brojne lezije na molekulama DNA reakcijama sa bazama i šećerom (Farr i Kogoma, 1991; Lackmann i sur., 2013). Hidroksil radikal vrlo vjerojatno je glavni uzrok DNA oštećenja zbog svoje ekstremne reaktivnosti pri čemu dolazi do vezivanja na šećernu bazu te kidanja DNA lanca (Cabiscol Català i sur., 2000; Liao i sur., 2017).

Tekućinskom plazmom u mjehurićima i radnim plinom zrakom, optičkom emisijskom spektroskopijom dokazani su dvovalentni atomi: krom, željezo, dušik i kisik, jednovalentni atomi: krom, željezo, dušik, vodik i kisik te molekula dušika (slika 18). Atomi kroma i željeza vrlo vjerojatno su posljedica erozije medicinske igle tijekom tretmana. Do erozije elektroda dolazi zbog jakog električnog polja te agresivnosti samog tretmana (Lukes i sur., 2006). Tekućinskom plazmom u mjehurićima i radnim plinom argonom dokazani su dvovalentni atomi željeza i argona, jednovalentni atomi željeza, vodika, kisika i argona te molekula dušika (slika 19). Prikazanim spektrima može se uočiti da se niža erozija postiže tijekom tretmana u argonu prilikom čega ne dolazi do erozije metala kroma. Moguće objašnjenje je inertnost plemenitog plina argona koji sprečava oksidaciju, manji kontakt elektrode sa okolnom tekućinom zbog generiranih mjehurića što posljedično dovodi do manje erozije elektroda.

Optičkom emisijskom spektroskopijom dokazani su radikali koji navedenim kemijskim reakcijama /2-9/ omogućuju sniženje pH uzorka, povišenje provodljivosti te generiranje molekula H_2O_2 što posljedično može uzrokovati sinergistički efekt fizikalno-kemijskih parametara na inaktivaciju stanica ili uzrokovati oksidativni stres stanica.

Tijekom generiranja plazme u plinskoj i tekućinskoj fazi u mjehurićima dolazi do značajnih promjena u koncentraciji H_2O_2, pH i provodljivosti medija koji imaju utjecaj na inaktivaciju tretiranih stanica. Iz priloženih tablica koncentracije H_2O_2, pH, provodljivosti i temperature može se zaključiti da povećanjem frekvencije i vremena tretiranja proporcionalno dolazi do povišenja temperature, koncentracije H_2O_2, provodljivosti, dok vrijednost pH opada što je dokazano i brojnim studijama (Baroch i sur., 2008; Guo i sur., 2015; Kurahashi i sur., 1997). Viša koncentracija H_2O_2 zabilježena je tretmanom s plinom argonom što se slaže i s rezultatima studije Locke i Shih (2011). Utjecaj temperature na inaktivaciju je minimalan jer se temperatura tijekom tretmana povisila na maksimalno 31,4 °C i to prilikom tretmana tekućinskom plazmom u mjehurićima stanica *L. innocua* (tablica 13). Do povišenja temperature tijekom tretmana plazmom dolazi zbog elastičnih i ne-elastičnih sudara elektrona i molekula (Inagaki, 2014). Također povišenjem frekvencije posljedično dolazi do povišenja snage, a time i temperature medija prema formuli /1/. Prilikom generiranja pozitivnih izboja

plazme u zraku grananje izboja je veće od grananja u argonu stoga dolazi i do neznačajno višeg zagrijavanja medija (slika 10; tablice 8-21) (Van Veldhuizen i Rutgers, 2002).

Povišenje provodljivosti direktno je povezano sa sniženjem pH. Uzrok tomu je otapanje nastalog dušikovog oksida tijekom generiranja plazme u plinskoj fazi, u vodi (Sathiamoorthy i sur., 1999) odnosno formiranje H_3O^+ iona u vodi zbog elektrostatičkog i ionskog bombardiranja molekula vode (Hickling, 1971). Navedeni spojevi formiraju se i u plinskoj i u tekućoj fazi. Provodljivost je povezana i s formiranjem vodikovih iona stoga direktno i sa pH (Baroch i sur., 2008), dok je formiranje H_2O_2 direktno povezano sa $^{\bullet}OH$ radikalima u plinskoj i u tekućoj fazi (Kurahashi i sur., 1997). Na povišenje provodljivosti također utječu i ioni koji se iz stanice otpuštaju u okolni medij tijekom samog tretmana.

Tretmanom plinskom plazmom stanica *E. coli* najviše generiranje H_2O_2 (22,3 mg L^{-1}) određeno je prilikom tretmana: 10', 90 Hz, zrak (tablica 8). Pri istom tretmanu nije postignuta potpuna inaktivacija stanica, a pH vrijednost maksimalno se snizila za 3,2 jedinice odnosno na pH 3,8 (tablica 8). Izmjereni rezultati sugeriraju da sniženi pH i najviša određena koncentracija H_2O_2 nemaju utjecaj na inaktivaciju stanica *E. coli*. Najviša provodljivost 164,7 μS cm^{-1} određena je prilikom tretmana: 10', 120 Hz, argon (tablica 8). Tretmanom tekućinskom plazmom u mjehurićima najviša koncentracija H_2O_2 izmjerena je pri tretmanu: 10', 120 Hz, argon, a iznosila je 13,9 mg L^{-1} (tablica 9). Pri zabilježenim najvišim vrijednostima nije postignuta potpuna inaktivacija. Vrijednost pH snizila se za 2,7 jedinica odnosno na pH 4,2 pri uvjetima tretmana: 10', 90 Hz, zrak (tablica 9). Najviša provodljivost (170,1 μS cm^{-1}) izmjerena je pri tretmanu: 10', 90 Hz, zrak (tablica 9).

Tretmanom plinskom plazmom stanica *S. enterica* najviša koncentracija H_2O_2 iznosila je 18,2 mg L^{-1} pri uvjetima tretmana: 10', 120 Hz, zrak (tablica 10). Najviše sniženje pH bilo je za 2,8 jedinica pri istom tretmanu (tablica 10). Pri navedenim uvjetima postignuta je potpuna inaktivacija stanica. Najviša provodljivost (184,3 μS cm^{-1}) utvrđena je pri tretmanu: 10', 120 Hz, argon (tablica 10). Tekućinskom plazmom u mjehurićima najviša koncentracija H_2O_2 od 9,3 mg L^{-1} izmjerena je nakon tretmana: 5', 120 Hz, argon, dok je najviše sniženje pH iznosilo 2,2 jedinice (pH 4,7) pri tretmanu: 10', 120 Hz, argon (tablica 11). Pri navedenim uvjetima postignuta je potpuna inaktivacija. Najviša provodljivost od 199,6 μS cm^{-1} izmjerena je prilikom tretmana: 5', 120 Hz, argon (tablica 11).

Prilikom tretmana stanica *L. innocua* u plinskoj fazi najviša koncentracija H_2O_2 iznosila je 6,5 mg L^{-1}, a utvrđena je pri tretmanu: 5', 90 Hz, argon (tablica 12). Vrijednost pH snizila se za 4,1 jedinica odnosno na pH 2,8 pri tretmanu: 10', 120 Hz, zrak (tablica 12). To je ujedno i najviše izmjereno sniženje pH svih provedenih tretmana. Pri istom tretmanu određena je i

najviša provodljivost od 184,9 μS cm^{-1} (tablica 12). Najviša koncentracija H_2O_2 i pH koreliraju sa potpunom inaktivacijom stanica *L. innocua*. Tekućinskom plazmom u mjehurićima najviša koncentracija H_2O_2 30,3 mg L^{-1} izmjerena je nakon tretmana: 10', 120 Hz, zraku (tablica 13). Pri istim uvjetima tretmana pH se snizio za 3,1 jedinica odnosno na pH 3,8, no međutim nije postignuta potpuna inaktivacija. Najviša provodljivost, 192,4 μS cm^{-1} izmjerena je nakon tretmana: 5', 120 Hz, zrak (tablica 13).

Prilikom tretmana u plinskoj fazi bakterijske kulture *S. aureus* najviša koncentracija H_2O_2 izmjerena je pri uvjetima tretmana: 10', 90 Hz, zrak, a iznosila je 18,3 mg L^{-1} (tablica 14). Pri istom tretmanu pH se snizio za 2,9 jedinica odnosno na pH 4,0 te je postignuta potpuna inaktivacija stanica. Maksimalna provodljivost, 189,4 μS cm^{-1} utvrđena je pri tretmanu: 10', 120 Hz, zrak (tablica 14). Tretmanom tekućinskom plazmom u mjehurićima najviša koncentracija H_2O_2 iznosila je 19,6 mg L^{-1} pri tretmanu: 10', 90 Hz, zrak (tablica 15). Pri istim uvjetima pH se snizio za 2,7 jedinica na pH 4,21 te je najviša provodljivost iznosila 189,2 μS cm^{-1} (tablica 15). Navedenim tretmanom postignuta je potpuna inaktivacija stanica.

Tretmanom plinskom plazmom stanica *B. cereus* najviša koncentracija H_2O_2 izmjerena je pri tretmanu: 10', 120 Hz, zrak, a iznosila je 17,4 mg L^{-1} (tablica 16). Vrijednost pH snizila se za 2,5 jedinice (pH 4,45) tretmanom: 10', 90 Hz, argon. Pri navedenim uvjetima nije postignuta potpuna inaktivacija. Najviša provodljivost, 185,3 μS cm^{-1} utvrđena je pri tretmanu: 5', 120 Hz, zrak (tablica 16). Tekućinskom plazmom u mjehurićima najviša koncentracija H_2O_2 izmjerena je pri tretmanu: 10', 120 Hz, zrak, a iznosila je 18,0 mg L^{-1} (tablica 17). Pri istim uvjetima najviša provodljivost iznosila je 196,3 μS cm^{-1}, ali potpuna inaktivacija nije zabilježena. Vrijednost pH snizila se za 2,7 jedinice (pH 4,2) pri 120 Hz, 10' i radnom plinu argonu (tablica 17).

Tretmanom kvasca *Rhodotorula* spp. plinskom plazmom najviša koncentracija H_2O_2 iznosila je 26,2 mg L^{-1} pri tretmanu: 10', 90 Hz, argon (tablica 18). Vrijednost pH snizila se za 2,9 jedinica (pH 4,02) nakon tretmana od 10', 90 Hz, argon (tablica 18). Pri navedenim tretmanima potpuna inaktivacija nije zabilježena. Maksimalna provodljivost određena je pri tretmanu: 10', 120 Hz, argon, a iznosila je 175,1 μS cm^{-1} (tablica 18). Tekućinskom plazmom u mjehurićima maksimalna koncentracija H_2O_2 iznosila je 11,0 mg L^{-1} pri tretmanu: 10', 120 Hz, argon (tablica 19). Vrijednost pH snizila se za 2,4 jedinice (pH 4,5), međutim potpuna inaktivacija nije postignuta (tablica 19).

Tretmanom plinskom plazmom stanica kvasca *S. cerevisiae* najviša koncentracija H_2O_2 određena je pri tretmanu: 10', 120 Hz, argon, a iznosila je 12,1 mg L^{-1} (tablica 20). Vrijednost pH snizila se za 2,8 jedinice (pH 4,2) pri 90 Hz, radnom plinu argonu i 10' tretmana. Pri očitanim

najvišim vrijednostima H_2O_2 i pH nije postignuta potpuna inaktivacija. Najviša provodljivost očitana je pri tretmanu: 10', 120 Hz, zrak, a iznosila je 168,4 μS cm^{-1} (tablica 20). Tekućinskom plazmom u mjehurićima najviša koncentracija H_2O_2 iznosila je 9,2 mg L^{-1} pri tretmanu: 10', 120 Hz, zrak, međutim potpuna inaktivacija nije postignuta (tablica 21). Pri istim uvjetima, ali radnom plinu argonu pH se snizio za 2,2 jedinica (pH 4,7) pri čemu je postignuta potpuna inaktivacija. Najviša provodljivost iznosila je 174,3 μS cm^{-1} nakon 10' tretmana, 120 Hz i radnom plinu zraku (tablica 21).

Suprotna su mišljenja o tome da li nizak pH utječe na inaktivaciju mikroorganizama. Različite studije su pokazale da nizak pH (oko 4) značajno ne utječe na inaktivaciju bakterija dok stanice kvasca mogu preživjeti i pH ispod 2 (Korachi i sur., 2010; Wheeler i sur., 1991). Međutim, postoje istraživanja koja dokazuju da se inaktivacija mikroorganizama postiže niskim pH zbog povećane oksidacije molekula stanične membrane (Al-Holy i sur., 2015; Álvarez i sur., 2003; Geveke i Kozempel., 2003; Kim i sur., 2009). U ovom radu vrlo mala je vjerojatnost da jedino pH ima utjecaj na inaktivaciju mikroorganizama. Potpuna inaktivacija postigla se i nakon 5 min tretmana kada je pH bio u vrijednostima od 5-6.

Generirane molekule H_2O_2 topljive su u vodi te se relativno lako transportiraju kroz membrane mikroorganizama, ali isto tako i spora tijekom plazma tretmana (Lemmen i sur., 2015; Melly i sur., 2002). Međutim vjerojatnost da H_2O_2 uzrokuje inaktivaciju spora je vrlo mala jer spore sadrže vrlo male koncentracije nesaturiranih masnih kiselina koje su najčešći ciljevi prilikom djelovanja oksidirajućih molekula u staničnoj membrani (Song i sur., 2000). Također stanice posjeduju obrambeni mehanizam od molekula H_2O_2 jer se reakcijama kataliziranim superoksid dimutazom molekula H_2O_2 razlaže na vodu i kisik (Gaunt i sur., 2006).

Stanice kvasca izložene oksidativnom stresu i molekulama H_2O_2 prilagođavaju se izloženom stresu produkcijom gena koji kodiraju enzime uključene u metabolizam masnih kiselina i ergosterola što dovodi do promjena lipidnog sastava membrane (Lushchak, 2011). Najznačajnije promjene su: smanjenje omjera između zasićenih i nezasićenih dugolančanih masnih kiselina, smanjenje sadržaja oleinske kiseline i povećanje omjera fosfatidilkolina/fosfatidiletanolamina (Pedroso i sur., 2009).

Iz priloženih rezultata vidljivo je da je koncentracija generiranog H_2O_2 različita pri isitim frekvencijama prilikom tretmana odabranih mikroorganizma. Viša koncentracija molekula H_2O_2 prvenstveno ovisi o vremenu tretitanja. Dužim tretiranjem kocentracija H_2O_2 je viša, ali isto tako ovisi i o interakciji iona kationa i aniona koji istječu iz stanice prilikom plazma tretmana. Što je istjecanje više veća je i inetrakcija sa generiranim radikalima i molekulama vode što posljedično utječe i na koncentraciju molekula H_2O_2.

5.2. Utjecaj tretmana plazme na inaktivaciju mikrooganizama

Inaktivacija mikroorganizama temeljni je čimbenik učinkovitosti određene tehnologije, stoga je glavni cilj istraživanja bio odrediti stupanj redukcije zadanih mikroorganizama nakon tretmana hladnom plazmom pri pozitivnom polaritetu. Pozitivni izboji kreću se puno brže od negativnih izboja (Briels i sur., 2008), usmjereniji su i tanji, stoga je i električno polje puno jače (Luque i sur., 2008). Inaktivacija mikroorganizama primjenom hladne plazme ovisi o nekoliko parametara kao što su vrsta mikroorganizma (Gram-pozitivna bakterijska vrsta, Gram-negativna bakterijska vrsta, sporogena bakterijska vrsta ili stanice kvasca), primijenjeni tretman (napon, frekvencija, snaga, polaritet izboja, konfiguracija reaktora), fizikalno-kemijski parametri otopine prije i nakon tretmana (pH, provodljivost, temperatura, generirani slobodni radikali) (Misra i sur., 2011; Vukusic i sur., 2016). Na slici 20a je vidljivo kako tretman plinskom plazmom (10', 90 Hz, argon) dovodi do potpune inaktivacije Gram-negativne bakterijske vrste *E. coli*. Postignuta je redukcija od 7,8 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1}. Pri tretmanu (10', 60 Hz, argon) postignuta je redukcija od 5,14 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1}. Također je vidljivo da je viša inaktivacija postignuta tretmanom sa radnim plinom argonom u odnosu na tretman u kojem je korišten zrak kao radni plin. Brojne su studije (Perni i sur., 2007; Sharma i sur., 2009) pokazale da tijekom generiranja plazme u plinskoj fazi u argonu dolazi do povišenog stvaranja oksidativnih vrsta ($^{\bullet}O$, O_2, O_3, $^{\bullet}OH$) koje imaju dominirajući inaktivacijski učinak na stanice mikroorganizama. Disocijacija vode najvjerojatniji je mehanizam nastajanja $^{\bullet}OH$ radikala u plinskoj fazi nakon čega $^{\bullet}OH$ radikal difundira u tekuću fazu (Lukes i Locke, 2005; Thirumdas i sur., 2015) dok je atom kisika potencijalno vrlo jaki oksidirajući agens čija je kemijska konstanta oksidacije pri sobnoj temperaturi oko 10^6 puta viša od kemijske konstante molekularnog kisika (Misra i sur., 2011). Na slici 20b prikazan je učinak tekućinske plazme u mjehurićima na inaktivaciju stanica *E. coli* gdje je vidljivo da je potpuna inaktivacija postignuta pri tretmanu (5', 60 Hz, argon), a iznosila je 7,3 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1}. Kao i kod plinske plazme viša inaktivacija postignuta je prilikom tretmana s radnim plinom argonom. Prilikom tretmana tekućinskom plazmom u mjehurićima plazma se generira i u mjehurićima i okolnoj tekućini s čime se povećava površina djelovanja zadanog tretmana (Kurahashi i sur., 1997). Inaktivacijski učinak tekućinske plazme u mjehurićima može se povezati sa generiranjem $^{\bullet}OH$ radikala koji kemijski reagiraju te dolazi do generiranja molekula H_2O_2 prema reakcijama /6/ i /9/. Upuhivanjem zraka dolazi do generiranja ozona koji kemijski može reagirati sa molekulom H_2O_2 (Anpilov i sur., 2001; Jiang i sur., 2014). Iz analize varijance (tablica 23) vidljivo je da statistički značajan učinak ($p<0,05$) na inaktivaciju stanica *E. coli* nakon tretmana tekućinskom

plazmom u mjehurićima ima utjecaj frekvencije, vremena, radnog plina, kvadratna vrijednost frekvencije, utjecaj frekvencije i vremena, frekvencije i radnog plina i vremena i radnog plina. Tretmanom plinskom plazmom niti jedan od parametara nije imao statistički značajan ($p>0,05$) utjecaj na inaktivaciju *E. coli* (tablica 23). Optimalni faktori za tretman plinskom plazmom i tekućinskom plazmom u mjehurićima su (10', 90 Hz, argon).

Na slici 21a prikazana je inaktivacija Gram-negativne bakterije *S. enterica* plinskom plazmom gdje je vidljivo da se nakon tretmana (5', 60, 90, 120 Hz, argon) postiže potpuna inaktivacija i to redom za frekvenciju od 60 Hz 6,32 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1}, 90 Hz 6,53 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1} i 120 Hz 7,38 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1}. Tretman (5', 60 Hz, zrak) rezultirao je u potpunoj inaktivaciji stanica *S. enterica*, dok su tretmani pri 90 i 120 Hz rezultirali potpunom inaktivacijom nakon 10 min tretmana. Tretmanom pri 60 Hz i radnom plinu argonu postignuta je inaktivacija od 7,23 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1}, pri 90 Hz 7,36 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1} i 120 Hz 7,2 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1}. Razlika u inaktivaciji tretmanom plinskom plazmom i radnim plinovima argonom i zrakom nije uočena. Prilikom tretmana stanica *S. enterica* tekućinskom plazmom u mjehurićima nakon 5 min tretmana pri svim frekvencijama i radnim plinovima argonom i zrakom postignuta je potpuna inaktivacija (slika 21b). Također nije uočena razlika u inaktivaciji pri generiranju tekućinske plazme u mjehurićima i radnim plinovima argonu i zraku. Machala i sur. (2009) su u svom radu dokazali da se tretmanom hladnom plazmom stanica *S. enterica* potiže viša inaktivacija ukoliko dolazi do miješanja tretiranog uzorka. Kim i sur. (2013) su prezentirali slične rezultate, ali nakon tretmana stanica *E. coli*. U ovom radu to je bio slučaj sa tekućinskom plazmom u mjehurićima gdje je dokazana viša inaktivacija prilikom generiranja plazme u mjehurićima. Tijekom generiranja tekućinske plazme u mjehurićima dolazi do formiranja mikrolokacija s visokim temperaturama i to do 9726 °C. Uzrok tomu su generirani šok i akustični valovi koji posljedično mogu ubrzati kemijske reakcije radikala, a samim time može se postići i viša inaktivacija (Akiyama, 2000; Sun i sur., 2005; Parvulescu i sur., 2012). Parametri tretmana plinskom plazmom i tekućinskom plazmom u mjehurićima nisu imali statistički značajan utjecaj na inaktivaciju ($p>0,05$) (tablica 23).

Na slici 22a vidljivo je da se plinskom plazmom potpuna inaktivacija Gram-pozitivne bakterije *L. innocua* postiže nakon tretmana (10', 60 Hz, zrak). Pri frekvenciji od 120 Hz potpuna inaktivacija postignuta je nakon 5 min tretmana. Također potpuna inaktivacija postignuta je nakon 5 min tretmana pri 90 i 120 Hz i radnom plinu argonu. Tekućinskom plazmom u mjehurićima (slika 22b) potpuna inaktivacija postignuta je nakon 5 min tretmana pri svim frekvencijama i radnom plinu argonu. Potpuna inaktivacija prilikom tretmana sa radnim plinom zrakom postignuta je nakon 10 min tretmana i 60 Hz. Radni plin imao je

statistički značajan utjecaj ($p<0,05$) na inaktivaciju stanica *L. innocua* nakon tretmana tekućinskom plazmom u mjehurićima (tablica 23). Optimalni faktori za tretman plinskom plazmom su (5', 60 Hz, argon) i tekućinskom plazmom u mjehurićima (10', 90 Hz, argon).

Tretman Gram-pozitivne bakterije *S. aureus* plinskom plazmom rezultirao je u potpunoj inaktivaciji prilikom tretmana (10', 90 i 120 Hz, zrak i argon) (slika 23a). Prilikom tretmana tekućinskom plazmom u mjehurićima potpuna inaktivacija postignuta je pri (10', 90 Hz, zrak), (5', 120 Hz zrak), (10', 60 Hz, argon) i (5', 120 Hz, argon) (slika 23b). Frekvencija, vrijeme i radni plin imali su statistički značajan utjecaj ($p<0,05$) na inaktivaciju stanica *S. aureus* nakon tretmana plinskom plazmom (tablica 23).

Inaktivacija sporogene bakterijske vrste *B. cereus* nakon tretmana plinskom plazmom nije rezultirala u potpunoj inaktivaciji stanica (slika 24a). Najviša inaktivacija postignuta je pri 120 Hz, radnom plinu argonu i 10' tretmana. Sa početne koncentracije od 7,84 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1} postignuta je koncentracija stanica od 1,03 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1}. Prilikom tretmana tekućinskom plazmom u mjehurićima potpuna inaktivacija postignuta je pri svim frekvencijama i radnom plinu argonu (slika 24b). Statistički značajan utjecaj ($p<0,05$) nakon tretmana tekućinskom plazmom u mjehurićima imao je radni plin, dok je kod plinske plazme statistički značajan utjecaj na inaktivaciju stanica *B. cereus* imalo vrijeme tretiranja i radni plin (tablica 23).

Tretmanom kvasca *Rhodotorula* spp. nije postignuta potpuna inaktivacija prilikom tretmana plinskom plazmom. Najviša inaktivacija od 1,69 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1} postignuta je tretmanom (10', 90 Hz, zrak) (slika 25a). Tretmanom tekućinskom plazmom u mjehurićima također nije postignuta potpuna inaktivacija. Najviša inaktivacija od 1,58 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1} postignuta je tretmanom (10', 120 Hz, argon) (slika 25b). Tretmanom plinskom plazmom i tekućinskom plazmom u mjehurićima statistički značajan utjecaj ($p<0,05$) na inaktivaciju imalo je vrijeme tretiranja (tablica 23).

Tretmanom plinskom plazmom stanica kvasca *S. cerevisiae* nije postignuta potpuna inaktivacija (slika 26a). Najviša inaktivacija zabilježena je pri (10', 60 Hz, argon). Tretman tekućinskom plazmom u mjehurićima rezultirao je u potpunoj inaktivaciji stanica *S. cerevisiae* pri svim frekvencijama i radnom plinu argonu (slika 26b). Statistički značajan utjecaj ($p<0,05$) na inaktivaciju stanica *S. cerevisiae* nakon tretmana tekućinskom plazmom u mjehurićima imalo je vrijeme tretiranja, radni plin i kvadratna vrijednost frekvencije (tablica 23). Odzivne plohe (3D i konturni dijagrami) dobivene na osnovu polinoma optimizacije inaktivacije za sve tretirane mikroorganizme dane su u tablici 22. Optimalni faktori za tretman plinskom plazmom su (5', 120 Hz, zrak) i tekućinskom plazmom u mjehurićima (10', 90 Hz, argon).

Inaktivacija pojedinog mikroorganizma ovisi o vrsti mikroorganizma koji se tretira. Iz priloženih rezultata može se zaključiti da se povećanjem vremena tretiranja povećava inaktivacija mikroorganizama. Za očekivati je da će Gram-negativne bakterijske vrste biti otpornije na inaktivaciju prilikom plazma tretmana zbog građe stanične stijenke. Za razliku od Gram-pozitivnih bakterijskih vrsta Gram-negativne bakterijske vrste imaju dodatnu staničnu membranu građenu od lipopolisaharida i proteina, no Gram-pozitivne bakterijske vrste u svojoj staničnoj membrani imaju deblji sloj mureina. Soušková i sur. (2011, 2012) su svojim istraživanjima dokazali da ne postoji značajna razlika u inaktivaciji Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija tretmanom hladnom plazmom, ali postoji razlika u inaktivaciji stanica kvasaca. Njihovo istraživanje potvrđuje i rezultate prikazane u ovom radu gdje je vidljivo da ne postoji značajna razlika u inaktivaciji stanica bakterija. Tretmanom svake pojedine bakterije postignuta je potpuna inaktivacija neovisno o tretmanu plinskom ili tekućinskom plazmom u mjehurićima. Isto tako vidljiva je viša inaktivacija pri upuhivanom plinu argonu. Inaktivacija stanica kvasaca prvenstveno ovisi o tretiranoj vrsti. Stanice kvasca svrstavaju se u eukariotske stanice te se slabija inaktivacija stanica kvasca pripisuje kompleksnijoj građi stanice (Scholtz i sur., 2015). Prilikom generiranja plazme dolazi do pojave električnog polja koje ima utjecaj na staničnu membranu mikroorganizma, odnosno dolazi do električne disrupcije stanične membrane (elektroporacije). Elektroporacija stanične membrane zahtijeva dva ključna koraka: stvaranje pora te osiguranje stabilnosti nastalih pora. Uzrokuje razaranje stanične stijenke zbog nametnute razlike potencijala (Kotnik i sur., 2012; Zimmerman, 1996). Djelovanjem plazme, mikroorganizmi su izloženi intenzivnom „bombardiranju“ slobodnim radikalima što uzrokuje površinske lezije koje živa stanica ne može dovoljno brzo i učinkovito popraviti (Moreau i sur., 2008). Pelletier (1993) je taj proces nazvao „*etching“*. Otvaranjem pora na membrani oksidacijske molekule (H_2O_2, O_3, $NO^{\bullet}$, $^{\bullet}OH$) koje se formiraju mogu ući u stanicu te izazvati različite kemijske reakcije u citoplazmi stanice. Dolazi do oksidacije proteina i molekule DNA. Također dolazi do reakcija lipidne peroksidacije te posljedično oštećenja stanične membrane (Klämpfl i sur., 2012). Tijekom generiranja plazme sudaranjem elektrona i fotona emitira se i UV svijetlo u rasponu (100-380 nm) koje može inducirati fotokemijske reakcije (Lieberman i Lichtenberg, 2005; Niemira i Gutsol, 2011). Dokazano je da zajednički utjecaj radikala i UV fotona ima inaktivacijski utjecaj na staničnu membranu mikroorganizama odnosno DNA molekulu (McDonald i sur., 2000; Thirumdas i sur., 2015). DNA pokazuje najvišu absorpciju u spektru između 260-265 nm (Croteau i sur., 1997). Absorpcijom svjetla pri 253,7 nm nukleinske kiseline formiraju pirimidinske lezije (Beggs, 2002) pri čemu UV svjetlo uzrokuje kidanje DNA lanca, odnosno dimerizaciju timinskih baza (Niemira, 2012). Međutim,

mikroorganizmi posjeduju mehanizam popravka DNA kao što je fotoreaktivacija pomoću enzima DNA fotoliaze pri čemu se omogućava brzi oporavak DNA molekula (Richardson i sur., 2003). Također kao što je navedeno u rezultatima optičke emisijske spektrometrije ne postoji značajna emisija ispod 290 nm (ravna linija) koja se prepisuje baktericidnom učinku NOγ radikalima (slika 16-19).

Mikroorganizmi koji formiranju spore visoko su otporni na različite utjecaje upravo zbog snažne fizičke barijere (Klämpfl i sur., 2012). Spore su visoko rezistentne na okolišni stres kao što je pH, oksidirajuće molekule, UV i gama zračenje, što minimizira oštećenja DNA (Setlow, 2006; Setlow, 2007). DNA se štiti visokim udjelom Ca^{2+}-dipikolinske kiseline, ali prvenstveno zasićenošću sporogene DNA s grupom malih proteina koji su topljivi u kiselinama, a sintetiziraju se tijekom dijeljenja spora (Setlow, 2007). Patil i sur. (2014) su postigli inaktivaciju spora *B. suptilis* nakon 30 sekundi tretmana sa DBD hladnom plazmom, dok je u ovom radu potpuna inaktivacija spora postignuta tretmanom tekućinskom plazmom u mjehurićima i radnom plinu argonu nakon 10' tretmana.

Na slici 27 prikazana je inaktivacija mikroorganizama u eksponencijalnoj fazi rasta gdje je vidljivo da nakon 10' tretmana, 90 Hz i radnom plinu argonu dolazi do potpune inaktivacije stanica *S. enterica, L. innocua, S. aureus* i *S. cerevisiae*. Tijekom stacionarne faze rasta mikroorganizmi se prilagođavaju različitim stresnim uvjetima, ponajprije gladovanja te kao mehanizam obrane razvijaju rezistentnije stanice (Navarro Llorens i sur., 2010). Posljedično je za očekivati da su stanice u stacionarnoj fazi rasta otpornije na inaktivaciju hladnom plazmom. Međutim u ovom radu nije dokazana značajna razlika u inaktivaciji stanica u stacionarnoj fazi i eksponencijalnoj fazi rasta. Yu i sur. (2006) su također u svom radu dokazali da ne postoji statistički značajna razlika u tretmanu stanica *E. coli* K-12 u eksponencijalnoj i stacionarnoj fazi rasta hladnom plazmom generiranoj u plinskoj fazi dok su Molinari i sur. (2004) dokazali da su stanice *S. cerevisiae* u eksponencijalnoj fazi rasta osjetljivije na tretman hladnom plazmom. Alvarez i sur. (2000) su dokazali da su stanice *Salmonella seftenberg* u eksponencijalnoj fazi rasta gotovo neznačajno osjetljivije na tretman pulsirajućim električnim poljem. Može se zaključiti da tretmanom hladnom plazmom ne dolazi do značajne razlike u inaktivaciji stanica u eksponencijalnoj fazi rasta neovisno o vrsti koja se tretira (Gram-pozitivna, Gram-negativna bakterijska vrsta ili stanice kvasca).

5.3. Revitalizacija stanica nakon tretmana

Tijekom tretmana stanice su izložene različitim oksidativnim vrstama, električnom polju te UV zračenju (100-380 nm) (Schlüter i sur., 2013). Kako bi se dokazala potpuna inaktivacija tretiranih stanica proveden je test revitalizacije stanica nakon tretmana. Nakon 10' tretmana stanica *E. coli* plinskom plazmom, 90 Hz i radnom plinu argonu postignuta je potpuna inaktivacija, ali nakon postupka revitalizacije stanice *E. coli* postigle su rast od gotovo 8,49 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1} (slika 28a). Potpuna inaktivacija stanica *E. coli* nakon tretmana tekućinskom plazmom u mjehurićima postignuta je nakon tretmana (5', 60 Hz, argon), ali nakon revitalizacije postignut je rast od 3,25 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1} i 4,5 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1} (slika 28b).

Potpuna inaktivacija stanica *S. enterica* postignuta je nakon tretmana plinskom plazmom (5' i 10', 60 Hz), (10', 90 i 120 Hz, zrak) i (5' i 10', 60, 90 i 120 Hz, argon) (slika 21a i b). Nakon postupka revitalizacije stanica redom je postignut rast od 5,11 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1} i 4,02 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1} za tretman (60 Hz, zrak, 5' i 10'), 4,89 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1} i 3,58 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1} za (90 i 120 Hz, zrak, 10'), 6,11 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1} i 5,21 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1} za (60 Hz, argon, 5' i 10'), 5,23 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1} i 4,78 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1} za (90 Hz, argon, 5' i 10') te 4,89 i 5,29 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1} za tretman (120 Hz, argon, 5' i 10') (slika 29a). Nakon tretmana tekućinskom plazmom u mjehurićima potpuna inaktivacija postignuta je pri svim uvjetima tretmana, ali isto tako i potpuna revitalizacija stanica (slika 29b).

Nakon tretmana plinskom plazmom postignuta je potpuna inaktivacija stanica *L. innocua*, ali revitalizacijom stanica došlo je ponovnog rasta stanica (približno 6 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1}) (slika 30a). Potpuna inaktivacija postignuta je i tretmanom tekućinskom plazmom u mjehurićima, ali revitalizacijom stanica došlo je do oporavka stanica i njihovog rasta od približno 8 $\log_{10}$ broj stanica mL^{-1} (slika 30b).

Kod uzoraka *S. aureus* i *B. cereus* (slika 23a i b; 24b) kod kojih je postignuta potpuna inaktivacija također je dokazana revitalizacija stanica (slika 31a i b; 32), kao i kod stanica kvasca *S. cerevisiae* (slika 33).

Testom revitalizacije potvrđeno je da bakterijske stanice i stanice kvasca nakon tretmana nisu inaktivirane. Takvo stanje opisuje se „vidljivim, ali ne kulturabilnim"-VBNC (*engl.* viable but non culturable state) stanjem stanica (Oliver, 2005). Dakle stanice mikroorganizama imaju nisku metaboličku aktivnost, ali nacjepljivanjem na podloge ne pokazuju rast (Oliver, 2005).

Takve stanice nadilaze smanjenje makromolekularne sinteze, ali plazmidi i dalje održavaju razinu ATP-a te visokog membranskog potencijala (Oliver, 2010).

Vidljivo, ali ne kulturabilno stanje odgovor je stanica mikroorganizama na stres i način preživljavanja u stresnim uvjetima (Lleò i sur., 2007a). Prilikom tretmana stanice se izlažu oksidativnom stresu (Moisan i sur., 2002), stresu pod utjecajem UV svjetla (Moisan i sur., 2002) te stresu uzrokovanog gladovanjem (Cook i Bloster, 2007). Oksidativni stres javlja se zbog dokazanih kisikovih i vodikovih radikala koji utječu na dezintegraciju stanične membrane (Montie i sur., 2000; Brandenburg i sur., 2007; Han i sur., 2016). UV svjetlo dovodi do oštećenja stanične membrane i unutar staničnih molekula te do razbijanja lanca DNA (Moisan i sur., 2002; Niemira, 2012). Stanice koje nisu ireverzibilno inaktivirane, kada se postave u optimalne uvjete (pH, hranjiva podloga, temperatura) pokreću procese dijeljenja prilikom čega dolazi do revitalizacije stanica (Gupte i sur., 2003; Ziuzina i sur., 2015).

5.4. Istjecanje unutar staničnog sadržaja

Istjecanje unutar staničnog sadržaja podrazumijeva istjecanje proteina i nukleinskih kiselina te citoplazme iz stanice. Kako se generiranjem plazme stvara električno polje te posljedično dolazi do elektroporacije stanica omogućeno je i istjecanje staničnih makromolekula (Mir i sur., 2016). Tijekom tretmana događa se djelomična fragmentacija DNA koja pospješuje istjecanje DNA iz stanice (Moreau i sur., 2008).

Tretmanom plinskom plazmom stanica *E. coli* najviše istjecanje pri 260 nm (istjecanje DNA) (0,047) izmjereno je pri (10', 120 Hz, zrak) (slika 34a). Najviše istjecanje proteina pri 280 nm određeno je pri uvjetima tretmana (10', 120 Hz, argon) (slika 34b) te je iznosilo 0,119 mg L^{-1} proteina (tablica 28). Tekućinskom plazmom u mjehurićima najviše istjecanje DNA (0,086) izmjereno je pri 60 Hz i 10 min tretmana (slika 34c). Najviše istjecanje proteina utvrđeno je pri uvjetima (10', 60 Hz, zrak) (slika 34d), a iznosilo je 0,098 mg L^{-1} proteina (tablica 28). Statistički značajni utjecaj ($p<0,05$) na istjecanje DNA tretmanom tekućinskom plazmom u mjehurićima imao je kvadratni utjecaj frekvencije (tablica 26).

Tretmanom plinskom plazmom stanica *S. enterica* najviše istjecanje DNA (0,025) izmjereno je pri (10', 90 Hz, zrak) i (10', 120 Hz, argon) (slika 35a). Najviše istjecanje proteina utvrđeno je pri radnom plinu argonu pri 90 Hz i 10' (slika 35b) tretmana što odgovara 0,083 mg L^{-1} proteina (tablica 28). Tekućinskom plazmom u mjehurićima najviše istjecanje DNA (0,013) izmjereno je pri (10', 120 Hz, argon) (slika 35c). Najviše istjecanje proteina 0,017 mg L^{-1} (tablica 28) utvrđeno je pri tretmanu (10', 120 Hz, zrak) (slika 35d). Statistički značajan utjecaj

($p<0,05$) na istjecanje DNA prilikom tretmana plinskom plazmom imao je utjecaj frekvencije, vremena i kvadratne vrijednosti frekvencije (tablica 26). Kod tretmana tekućinskom plazmom u mjehurićima statistički značajan utjecaj ($p<0,05$) imao je kvadratni utjecaj frekvencije (tablica 26). Statistički značajan utjecaj na istjecanje proteina ($p<0,05$) prilikom tretmana plinskom plazmom imalo je vrijeme tretiranja, dok je tekućinskom plazmom u mjehurićima statistički značajan utjecaj imala frekvencija, plin, i kvadratni utjecaj frekvencije (tablica 27).

Najviše istjecanje DNA nakon tretmana plinskom plazmom na stanicama *L. innocua* izmjereno je pri tretmanu (10', 90 Hz, argon) i iznosilo je 0,078 (slika 36a). Najviše istjecanje proteina određeno je pri tretmanu (5', 60 Hz, zrak) (slika 36b), a iznosilo je 0,077 mg L^{-1} (tablica 28). Tekućinskom plazmom u mjehurićima najviše istjecanje DNA (0,026) dokazano je pri tretmanu (10', 120 Hz, argon) (slika 36c). Pri tretmanu (10', 90 Hz, zrak) (slika 36d) izmjereno je najviše istjecanje proteina te je iznosilo 0,111 mg L^{-1}(tablica 28). Statistički značajan utjecaj ($p<0,05$) na istjecanje proteina tretmanom tekućinskom plazmom u mjehurićima imalo je vrijeme tretiranja i kvadratni utjecaj frekvencije (tablica 27).

Tretmanom plinskom plazmom na stanice *S. aureus* najviše istjecanje DNA izmjereno je pri (10', 120 Hz, argon), a iznosilo je 0,046 (slika 37a). Najviše istjecanje proteina (0,119 mg L^{-1}) (tablica 28) određeno je pri tretmanu (10', 120 Hz, argon) (slika 37b). Tekućinskom plazmom u mjehurićima najviše istjecanje DNA (0,044) izmjereno je pri (10', 120 Hz, argon) (slika 37c). Najviše istjecanje proteina utvrđeno je pri (10', 120 Hz, argon) (slika 37d), a iznosilo je 0,100 mg L^{-1} proteina (tablica 28). Statistički značajan utjecaj ($p<0,05$) na istjecanje DNA tretmanom plinskom plazmom imala je frekvencija, vrijeme, plin te kombinirajući učinak frekvencije i vremena (tablica 26). Statistički značajan utjecaj ($p<0,05$) na istjecanje proteina tretmanom plinskom plazmom imala je frekvencija, vrijeme te kombinirajući učinak vremena i plina (tablica 27).

Prilikom tretmana plinskom plazmom stanica *B. cereus* najviše istjecanje DNA (0,054) utvrđeno je pri tretmanu (10', 120 Hz, argon) (slika 38a). Najviše istjecanje proteina zabilježeno je pri radnom plinu argonu, 60 Hz i 10' tretmana (slika 38b), a iznosilo je 0,143 mg L^{-1} proteina (tablica 28). Tretmanom tekućinskom plazmom u mjehurićima najviše istjecanje DNA (0,042) izmjereno je pri radnom plinu argonu, 90 Hz i 10' tretmana (slika 38c). Najviše istjecanje proteina zabilježeno je pri radnom plinu zraku, 60 Hz i 10' tretmana (slika 38d) te je iznosilo 0,074 mg L^{-1} proteina (tablica 28). Statistički značajan utjecaj ($p<0,05$) na istjecanje DNA tretmanom plinskom plazmom imalo je vrijeme tretiranja (tablica 26) dok je na istjecanje DNA tretmanom tekućinskom plazmomu u mjehurićima imao utjecaj vremena, plina, te kombinirajući učinak frekvencije i plina (tablica 26). Na istjecanje proteina tretmanom

plinskom plazmom statistički značajan utjecaj ($p<0,05$) imao je utjecaj vremena, plina te kvadratni učinak frekvencije, dok je tretmanom tekućinskom plazmom u mjehurićima statistički značajan utjecaj imalo vrijeme te kombinirajući učinak frekvencije i plina (tablica 27).

Tretmanom stanica kvasca *Rhodotorula* spp. plinskom plazmom i radnim plinom argonom najviše istjecanje DNA izmjereno je pri 60 Hz i 10' tretmana (0,056) (slika 39a). Najviše istjecanje proteina postiglo se tretmanom od (10', 120 Hz, argon) (slika 39b), a iznosilo je 0,262 mg L^{-1} (tablica 29). Tekućinskom plazmom u mjehurićima i radnim plinom zrakom najviše istjecanje DNA iznosilo je 0,06 pri 90 Hz i 10' tretmana (slika 39c), dok je pri radnom plinu argonu, 60 Hz i 10' tretmana izmjereno gotovo isto istjecanje od 0,066 (slika slika 39c). Najviše istjecanje proteina pri radnom plinu argonu postignuto je pri 90 Hz i 10' tretmana (slika 39d), a iznosilo je 0,238 mg L^{-1} proteina (tablica 29). Statistički značajan utjecaj na istjecanje DNA ($p<0,05$) tretmanom plinskom plazmom imao je utjecaj vremena i kvadratni utjecaj frekvencije (tablica 26). Tretmanom tekućinskom plazmom statistički značajan utjecaj ($p<0,05$) na istjecanje proteina imalo je vrijeme i utjecaj plina (tablica 27).

Tretmanom plinskom plazmom u zraku stanica kvasca *S. cerevisiae* najviše istjecanje (0,082) DNA očitano je pri tretmanu (10', 60 Hz, argon) (slika 40a). Najviše istjecanje proteina postignuto je pri 60 Hz i 10' tretmana (slika 40b), a iznosilo je 0,199 mg L^{-1} (tablica 29). Tekućinskom plazmom u mjehurićima u argonu najviše istjecanje (0,078) DNA očitano je pri 120 Hz i 10' tretmana (slika 40c). Pri 90 Hz, radnom plinu argonu i 10' tretmana (slika 40c) najviše istjecanje proteina iznosilo je 0,184 mg L^{-1} (tablica 29). Statistički značajan utjecaj ($p<0,05$) na istjecanje DNA tretmanom plinskom plazmom imao je utjecaj frekvencije, vremena te kombinirajući učinak frekvencije i plina, dok je na istjecanje proteina statistički značajan utjecaj tijekom tretmana plinskom plazmom imao utjecaj vremena (tablica 26). Tijekom tretmana tekućinskom plazmom u mjehurićima statistički značajan utjecaj imalo je vrijeme, plin te kombinirajući učinak vremena i plina (tablica 29). Odzivne plohe za istjecanje staničnog sadržaja pri 260 i 280 nm (3D i konturni dijagrami) za sve tretirane mikroorganizme dane su u tablicama 24 i 25.

Iz priloženih rezultata vidljivo je da se povišenjem vremena tretiranja povećava i istjecanje nukleinskih kiselina i proteina. Dolezalova i Lukes (2015) su u svom radu dokazali da gubitkom integriteta stanične membrane i dužim vremenom tretiranja dolazi do višeg istjecanja staničnih makromolekula u okolni plazma tretirani uzorak, što odgovara rezultatima ovog rada. Također je vidljivo više istjecanje nukleinskih kiselina i proteina tretmanom u plinskoj fazi prilikom čega se upuhivao radni plin argon. Isto tako tekućinskom plazmom u

mjehurićima u argonu postignuto je više istjecanje u odnosu na tretman tekućinskom plazmom u mjehurićima u zraku. Iako je argon inertan plin koji sprečava reakciju generiranih radikala sa staničnim molekulama, dušik koji je prisutan u zraku reagira s kisikom stvarajući reaktivne dušikove radikale (RNS) koji stupanju u kemijske reakcije s molekulama stanične membrane, uzrokujući pri tome njihovu oksidaciju. Plazma tretmanom dolazi do stvaranja jakog električnog polja koje u sinergiji s generiranim radikalima uzrokuje dezintegraciju membrane i stanične stijenke stanice prilikom čega dolazi do istjecanja sadržaja citoplazme i staničnih makromolekula (Misra i sur., 2011; Niemira, 2011) (poglavlje 4.7.). Kod tretmana sa radnim plinom argonom uočeno je i više generiranje H_2O_2 molekula, a samim time i molekula radikala (poglavlje 4.1. i 4.2.).

Istjecanje staničnih makromolekula nije proporcionalno prikazanoj inaktivaciji stanica, što znači da maksimalno očitano istjecanje DNA i proteina ne korelira sa potpunom inaktivacijom stanica. Vidljivo je da je istjecanje proteina više nego istjecanje nukleinskih kiselina, što je mogući uzrok ne proporcionalne inaktivacije pri maksimalnom istjecanju DNA i proteina. Više istjecanje proteina mogući je uzrok revitalizacije stanica. Vrlo vjerojatno tijekom tretmana citoplazma istječe iz stanice, ali je DNA ostala sačuvana specifičnim proteinima koji omogućavaju stabilnost DNA molekule. Nakon postavljanja optimalnih uvjeta stanica je u mogućnosti nastaviti se dijeliti što dovodi do potpune revitalizacije tretiranih uzoraka.

Prema rezultatima na slikama 39 i 40 vidljivo je više istjecanje proteina i DNA molekula u stanicama kvasca uspoređeno sa stanicama bakterija što je u skladu sa rezultatima Aronsson i sur. (2005). Stanice kvasca su dimenzijama veće od stanica bakterija te je samim time i za očekivati da će istjecanje staničnih makromolekula biti više. Druga mogućnost je da su stanične stijenke odnosno stanične membrane stanica kvasaca više permeabilizirane od stanica bakterija, što je posljedično dovelo do višeg istjecanja staničnog sadržaja.

5.5. Trasmisijski elektronski mikroskop

Kako bi se potvrdilo istjecanje staničnih makromolekula provedeno je mikroskopiranje sa transmisijskim elektronskim mikroskopom pri odabranom tretmanu tekućinske plazme u mjehurićima u argonu pri 90 Hz i 10' za bakterije *E. coli* i *L. innocua* i kvasac *S. cerevisiae*. Transmisijski elektronski mikroskop koristi se za pregledavanje ultrastruktura bioloških uzoraka prolaskom snopa elektrona kroz uzorak koji se skenira (De Graef, 2003). Omogućen

je pregled svih dijelova stanice (stanične membrane, stijenke, citoplazme te staničnih makromolekula).

Na stanicama *E. coli* prije tretmana vidljiva je jasno definirana stanična stijenka i stanična membrana s unutrašnjim sadržajem citoplazme te staničnim makromolekulama (slika 41a). Na tretiranim stanicama *E. coli* vidljivo je da tretmanom tekućinskom plazmom u mjehurićima u argonu dolazi do dezintegracije stanične membrane i stanične stijenke (slika 41b). Stanična stijenka se smatra vitalnom komponentom bakterijskih stanica koja je odgovorna za oblik stanice. Održava turgor unutar stanice, ali isto tako i stanične makromolekule (Daniel i Errington, 2003; Doyle i Marquis, 1994; Pillet i sur., 2016). Stoga je destabilizacija stanične stijenke osnovni cilj prilikom inaktivacije stanica.

Tretmanom hladnom plazmom dolazi do stvaranja električnog polja odnosno električnog naboja koji se akumulira na vanjskoj membrani Gram-negativne bakterijske vrste, što posljedično dovodi do rupture membrane te stvaranja pora (Liao i sur., 2017; Montie i sur., 2000) (slika 41b). Rupture na membrani omogućavaju ulazak generiranih radikala (kisikovih, vodikovih, dušikovih) u stanicu i njihovu kemijsku reakciju sa staničnim molekulama. Generirani radikali imaju baktericidno djelovanje, što dovodi do inaktivacije stanice (Birmingham, 2004; Gaunt i sur., 2006; Lu i sur., 2016; Moreau i sur., 2000).

Periplazmički prostor tretiranih stanica izgleda hiperhidratirano, ali kod nekih stanica stanična stijenka i stanična membrana nisu dezintegrirane (slika 41b). Nasuprot tome vidljivo je i potpuno istjecanje unutar staničnog sadržaja iz tretiranih stanica *E. coli* (slika 41b). Kada stanica počinje bubriti, mehanički osjetljivi kanali u unutrašnjoj membrani oslobađaju vodu, otopljene tvari i ione u periplazmički prostor kako nebi došlo do pucanja membrane (Miller i sur., 1986; Morbach i Krämer, 2002). TEM analize također sugeriraju da je uzrok vidljivog, ali nekulturabilnog stanja gubitak integriteta stanične membrane, odnosno formiranje pora na membrani. Destabilizacijom peptidoglikanskog sloja dolazi do nemogućnosti razlikovanja stanične stijenke i stanične membrane, što dovodi do istjecanja staničnih makromolekula i sadržaja citoplazme (Gadri i sur., 2000; Lunov i sur., 2016). Istjecanje staničnih makromolekula dokazano je i testom pri 260 i 280 nm. Postavljanjem tretiranih stanica u optimalne uvjete, stanice čija membrana nije u potpunosti dezintegrirana (reverzibilna permeabilizacija) u mogućnosti su nastaviti se dijeliti kako je i dokazano testom revitalizacije stanica (poglavlje 4.6.). Reverzibilna permeabilizacija stanica rezultat je difuzije lipidnih molekula i preraspodjele proteina (Locke i Shih, 2011).

Poznato je da stanice *E. coli* i druge Gram-negativne bakterije izložene osmotskom stresu povećavaju stvaranje negativno nabijenih membranskih oligosaharida (MDO) te ih

akumuliraju u periplazmičkom prostoru (Kennedy, 1982). MDO molekule smanjuju osmotski tlak duž unutrašnje membrane te imaju svojstvo hidrogela, dakle vezuju vodu i katione. U takvom stanju stanice pokazuju tamnu citopazmu i široki periplazmički prostor (Koch 1998; Meury i Devilliers, 1999).

Na stanicama Gram-pozitivne bakterije *L. innocua* prije tretmana vidljiva je jasno definirana stanična membrana i stanična stijenka (slika 42a). Nakon tretmana tekućinskom plazmom u mjehurićima u argonu vidljive su promjene na stanicama (dezintegracija membrane i istjecanje staničnog sadržaja) (slika 42b). Vidljivo je da je dezintegracija membrane stanica bakterije *L. innocua* nakon tretmana manja u odnosu na dezintegraciju Gram-negativne bakterije *E. coli,* (slika 42b). Gram-pozitivne bakterijske vrste imaju glatku površinu i deblji sloj mureina, stoga i veću čvrstoću i krutost (Gadri i sur., 2000), što je i dokazano na priloženim slikama 42a i b. Na tretiranim stanicama vidljive su rupture na membrani, ali pri tome nije došlo do potpunog istjecanja makromolekula (slika 42b). Dokaz tome je i potpuna revitalizacija stanica nakon tretmana, odnosno vidljivo, ali ne kulturabilno stanje stanica nakon tretmana (poglavlje 4.6.).

Stanice kvasca *S. cerevisiae* kao modelni eukariotski organizam dobro je istražen. Osim što se razlikuju po veličini, također se razlikuju i po organelama koje nisu prisutne u prokariotskim stanicama kao što su jezgra, mitohondriji, golgijev aparat, endoplazmatski retikulum, lizosomi. Eukariotske stanice građene su od citoskeleta (mreže tankih bjelančevinastih niti) i plazmatske membrane koja predstavlja polupropusni lipidni dvosloj (Osumi, 1998). Stanična stijenka građena je 80-90% od polisaharida (glukana, manoze, hitina) što dodatno otežava njihovu inaktivaciju. Zbog navedenih činjenica za očekivati je da će inaktivacija i posljedično istjecanje staničnog sadržaja biti niže nego u prokariotskim stanicama. Potpuna inaktivacija nije postignuta, ali je istjecanje proteina i DNA bilo više nego nakon tretmana bakterijskih stanica (slika 39 i 40) (detaljno opisano u poglavlju 5.4.). Na stanicama kvasca *S. cerevisiae* prije tretmana može se uočiti da su stanična stijenka i plazmatska membrana jasno definirane kao i stanične organele (jezgra, mitohondrij, endoplazmatski retikulum) (slika 43a). Na tretiranim stanicama može se uočiti dezintegracija membrane. Pojedine stanice su u potpunosti vakuolizirane sa nemogućnošću razlikovanja organela te stanične stijenke i plazmatske membrane. Potom su vidljive rupture na staničnoj stijenci i membrani prilikom čega dolazi do djelomičnog istjecanja staničnog sadržaja u okolni medij. Također su vidljive stanice sa jasno definiranim staničnim sadržajem te staničnom stijenkom i membranom, ali i stanice sa ireverzbilno permeabiliziranom membranom prilikom čega je došlo do potpunog istjecanja unutar staničnih organela (slika 43b). Prema priloženim

rezultatima vidljivo je da su nepermeabilzirane stanice postavljanjem u optimalne uvjete bile u mogućnosti nastaviti se dijeliti i time se u potpunosti revitalizirati.

5.6. Utjecaj tretmana na redukciju biofilma

Biofilmovi koje mikroorganizmi formiraju na različitim površinama u industrijskim pogonima predstavljaju dugotrajan izvor kontaminacije namirnica (Cabarkapa i sur., 2013; Giaouris i sur., 2014; Habimana i sur., 2014). Kao takvi predstavljaju opasnost za ljudsko zdravlje te mogu uzrokovati velike ekonomske gubitke (Čabarkapa, 2015). Konvencionalne metode dezinfekcije i sterilizacije vrlo često su neučinkovite u inaktivaciji biofilma, a razlog leži u polisaharidnim polimerima od kojih je građen izvanstanični matriks (Abramzon i sur., 2006). Stoga se sve više teži primjeni inovativnih tehnika kao što je hladna plazma. Tretmanom u tekućinama postiže se inaktivacijski učinak na stanice biofilma upravo zbog generiranih slobodnih radikala koji mogu biti dugo i kratko živući (Kamgang i sur., 2007). Ovom analizom pokušalo se dokazati da li tretman netermalnom hladnom plazmom dovodi do smanjenog rasta biofilma tretiranih mikroorganizama. Najviše sniženje stvaranja biofilma, 97,11% tretmanom stanica *E. coli* uočeno je pri tretmanu (10', 60 Hz, argon) tekućinskom plazmom u mjehurićima (slika 44b). Također je vidljivo da viši inaktivacijski učinak u stvaranju biofilma na stanice *E. coli* ima tretman tekućinskom plazmom u mjehurićima nego tretman plinskom plazmom (slika 44a i b). Tijekom tretmana tekućinskom plazmom upuhivanjem plina dolazi do miješanja uzorka te ravnomjernije raspodjele generiranih radikala te već spomenutog efekta prilikom čega dolazi do lokalno visokih temperatura. Iako se upuhuje inertni plin argon koji sprečava iterakcije radikala sa organskom materijom, generirani radikali i primjenjeno električno polje doveli su do ireverzibilne destabilizacije membrane.

Tretmanom stanica *S. enterica* viša inaktivacija stvaranja biofilma postignuta je tretmanom tekućinskom plazmom u mjehurićima i sa radnim plinom zrakom. Najviša redukcija iznosila je 89,56 % prilikom tretmana: 10', 120 Hz, zrak (slika 45b). Prilikom tretmana u plinskoj fazi maksimalna redukcija u stvaranju biofilma, 67,99% postignuta je nakon tretmana (10', 120 Hz, argon) (slika 45a). Iz priloženih rezultata vidljivo je da se pri tretmanu stanica *E. coli* postiže viša koncentracija radikala nego kod tretmana stanica *S. enetrica*. To predstavlja jedan od mogućih uzroka više inaktivacije biofima kod stanica *E. coli*.

Tretmanom stanica *L. innocua* maksimalna redukcija, 96,85% u stvaranju biofilma postiže se tretmanom u plinskoj fazi i radnim plinom argonom pri uvjetima tretmana (10', 120

Hz, argon) (slika 46a). Tekućinskom plazmom u mjehurićima najviša redukcija iznosila je 95,74% pri uvjetima tretmana (10', 60 Hz, zrak) (slika 46b).

Plinskom plazmom u argonu i tretmanom stanica *S. aureus* najviša redukcija, 97,91% u stvaranju biofilma postignuta je nakon (10', 120 Hz, argon) (slika 47a). Gotovo ista redukcija postignuta je tekućinskom plazmom u mjehurićima u argonu gdje je najviša redukcija, 96,58% postignuta pri tretmanu (10', 120 Hz, argon) (slika 47b).

Prilikom tretmana sporogene bakterijske vrste *B. cereus* najviša redukcija, 89,65% u stvaranju biofilma postignuta je plinskom plazmom u argonu pri tretmanu (10', 120 Hz, argon) (slika 48a) što odgovara i maksimalnoj očitanoj koncentraciji H_2O_2 nakon tretmana stanica *B. cereus* (tablica 16).

Tretmanom stanica kvasca *Rhodotorula* spp najviša redukcija biofilma, 99,2% plinskom plazmom očitana je pri tretmanu (10', 60 Hz, zrak) (slika 48a), dok je tekućinskom plazmom u mjehurićima najviša redukcija biofilma (97,94%) očitana nakon (10', 90 Hz, argon) (slika 48b).

Plinskom plazmom i tretmanom stanica kvasca *S. cerevisiae* najviša redukcija biofilma, 99,11% postignuta je pri tretmanu (10', 60 Hz, zrak) (slika 49a), dok je tekućinskom plazmom u mjehurićima najviša redukcija biofilma, 98,73 postignuta pri tretmanu (10', 90 Hz, argon) (slika 49b).

Iz priloženih rezultata može se uočiti da nema statistički značajne razlike u zadanim tretmanima plinskom plazmom i tekućinskom plazmom u mjehurićima. Povišenjem vremena tretiranja postiže se viša redukcija biofilma što je u korelaciji sa sniženjem pH i koncentracijom radikala nakon tretmana. Salsali i sur. (2006) su dokazali da sniženi pH može pozitivno utjecati na inaktivaciju biofilma, dok se i generiranim radikalima pripisuje inaktivacijski učinak na stanice biofilma (Maisch i sur., 2012). Za razliku od specifičnih kemikalija koje se upotrebljavaju za dezinfekciju biofilma, a rade po principu ključ-brava, što znači da se specifična kemikalija mora na točno odgovarajuće mjesto vezati sa stanicom mikroorganizma (Maisch i sur., 2012), tretman hladnom plazmom omogućuje brzu dezinfekciju zbog sinergističkog djelovanja slobodnih radikala i pH prilikom čega nije potrebna specifična iterakcija kako bi se postigao inaktivacijski učinak. U pojedinim slučajevima tretmanom hladnom plazmom moguće je u potpunosti ukloniti stanice biofilma prilikom čega se postiže potpuna inaktivacija mikrooganizama. Potpuna inaktivacija biofilma ovisi o procesnim parametrima, vrsti mikroorganizma, početnoj koncentraciji i okolišnim uvjetima nakon tretmana.

5.7. Proteomske analize i odgovor na stres

Stanice mikroorganizama reagiraju na stresne čimbenike različitim adaptivnim mutacijama odnosno produciranjem obrambenih proteina. Proteom je dinamičan sustav koji se mijenja ovisno o vanjskim uvjetima prilikom čega dolazi do različitih interakcija proteina kako bi se postigli povoljni uvjeti za funkcioniranje stanice. Većinom u protein-protein interakcije stupaju proteini s istim funkcionalnim grupama (Meyerkord i Fu, 2015; Von Mering i sur., 2002).

Kako bi se utvrdilo do kakvih promjena dolazi tretmanom stanica *E. coli, L. innocua* i *S. cerevisiae*, analiziran je razlikovni prikaz proteina prije i nakon tekućinskog tretmana u mjehurićima (10', 90 Hz, argon), revitalizacije stanica te trostrukog tretmana, gdje je vidljivo da stanice mikroorganizama podvrgnute stresu pokazuju indukciju gena povezanih sa stresom.

Utvrđeno je da stanice *E. coli* prije tretmana imaju aktivirane proteine vezane uz metabolizam ugljikohidrata i to PTS sustav manoza specifična EIIAB komponenta koja sudjeluje u fosforilaciji šećernih supstrata te protein koji je odgovoran za pokretljivost stanica-flagelin koji polimerizira prilikom stvaranja vlakana bakterijskih flagela (tablica 30). Proteini producirani nakon tretmana ukazuju na aktivaciju općeg odgovora na stres, a vezuju se uz oksidoredukcijske reakcije, staničnu diobu i metabolizam nukleotida. Eksprimirani su protein flavodoksin koji sudjeluje u reaktivaciji neaktivnog kobalt(II) alamina u metioninskoj sintazi (reducirani kobalt(I) alamin se povremeno oksidira u kobalt(II) alamin koji je katalitički inaktivan (Dixon i sur., 2006)), DNA vezujući protein koji ima ulogu u regulaciji staničnog odgovora, te purin nukleozid fosforilaza koja katalizira reverziblinu fosforolizu purinskih nukleozida, odcjepljivanje guanozina ili inozina na odgovarajuće baze i molekule šećer-fosfata (riboza-1-fosfat) (Parks i Argawal, 1972) (tablica 30). Sniženi pH (4,65) i generirani radikali djelovali su stresno na tretirane stanice, no međutim protein-protein interakcije (slika 51 i 52) ne pokazuju interakciju proteina produciranih nakon tretmana. Velika većina staničnih biokemijskih funkcija kontrolira se proteinskim interakcijama (Weigt i sur., 2009) koje su u ovom slučaju napravljene pomoću web alata STRING i UniProt baze.

Tablica 31 prikazuje razlikovne proteine producirane u uzorku *E. coli* prije i nakon revitalizacije stanica. Vidljivo je da su producirani proteini stresa prije i nakon postupka revitalizacije stanica. Proteini producirani u uzorku prije tretmana uključeni su u metabolizam masnih kiselina, nukleotida, ugljikohidrata, stanične diobe, transportni sustav, biosintezu proteina i oksidoredukcijske reakcije. Nakon revitalizacije producirani su proteini uključeni u metabolizam aminokiselina i oksidoredukcijske reakcije. Molibdat vezujući protein kao

producirani protein oksidoredukcijskih reakcija nakon revitalizacije stanica uključen je u ABC transportni sustav te je esencijalan prilikom anaerobnih uvjeta okoliša (Rech i sur., 1995). Ključan je za funkciju nekoliko enzima kao što su nitrat reduktaza, formijat dehidrogenaza, dimetil sulfoksid reduktaza, trimetilamin-N-oksid reduktaza i biotin sulfoksid reduktaza (Rajagopalan i Johnson, 1992). ModA protein veže molibdat i prenosi ga do ModB proteina na vanjskoj strani citoplazmatske membrane. Potom ModB protein pomoću ModC proteina transportira molibdat u staničnu citoplazmu. ModC posjeduje ATP hidrolaznu aktivnost te na taj način osigurava energiju za trasportni sustav (Rech i sur., 1995). Protein-protein interakcijama (slika 53) prije revitalizacije vidljiva je interakcija jedne grupe proteina vezanih uz translaciju (30S ribosomalni protein S9, 50S ribosomalni protein L25 i triptofan-tRNA ligaza) te druge grupe proteina vezanih uz transferazne sustave (glutamin sintetaza i fosfoenolpiruvat-protein fosfotrasferaza).

Prema tablici 32 razlikovno produciranih proteina vidljivo je da su prije i nakon trostrukog tretmana stanica *E. coli* producirani proteini obrane od stresnih uvjeta. Prije tretmana produciran je univerzalni protein stresa, koji sprečava utjecaj različitih agenasa na DNA. Također je producirana glicerol dehidrogenaza koja ima ulogu u metabolizmu glicerolipida. Nakon tretmana aktiviran je 50S ribosomalni protein L32 kao odgovor stanice na zračenje i reaktivne oksidativne vrste koje se generiraju tijekom plazma tretmana (Sargentini i sur., 2016) te 50S ribosomalni protein L21 koji sudjeluje u translaciji tako što veže 23S rRNA u prisutnosti proteina L20 (Fox, 2010). Protein protein interakcijama (slika 56) vidljiva je iterakcija dvaju proteina produciranih nakon trostrukog tretmana stanica i to proteini koji sudjeluju u procesu translacije (50S ribosomalni protein L2 i 50S ribosomalni protein L32).

U tablici 33 prikazani su razlikovni proteini koje bakterija *L. innocua* producira prije i nakon tretmana. Vidljivo je da su prije tretmana producirani proteini koji sudjeluju u metaboličkom putu ugljikohidrata gdje se pomoću format C aciltrasferaze, acetil-CoA prevodi u CoA i piruvat. Produciran je i protein aminotransferaza koji sudjeluje u metaboličkom putu nukleotida i aminokiselina, kao i metabolizmu lizina (izvor http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?md:M00527). Prije tretmana produciran je enzim vezan uz metabolički put masnih kiselina 3-oksoacil reduktaza što znači da su stanice nakon tretmana izložene stresu izgladnjivanja upravo zbog smanjene ekspresije gena uključenih u metabolizam masnih kiselina, ali isto tako i metabolizam ugljikohidrata odnosno sintezu piruvata. Protein-protein inetrakcijom prije tretmana vidljiva je interakcija proteina vezanih uz translaciju i transkpricpiju (50S ribosomalni protein L16 i protein transkripcijske terminacije i antiterminacije) (slika 57). Nakon tretmana vidljiva je produkcija proteina odgovornog za zaštitu DNA tijekom gladovanja.

Produkcija ovog proteina odgovorna je i za zaštitu stanice od stresa uzrokovanog ionizirajućim zračenjem (Calhoun i Kwon, 2011) kojim se pokušava održati homeostaza Fe iona u stanici oksidacijsko redukcijskim reakcijama. Također su aktivirani enzimi koji kataliziraju reakcije alternativnog izvora ugljika kao što je glioksalaza protein i ribuloza-5-fosfat-epimeraza.

Tablicom 34 prikazani su razlikovni proteini producirani prije i nakon revitalizacije bakterije *L. innocua*. Vidljivo da je produciran protein aminotransveraza koji sudjeluje u metabolizmu nukleotida i aminokiselina te omogućava stanici normalnu diobu i rast. Navedeni protein nije produciran nakon revitalizacije stanica. Producirana je i ATP ovisna Clp proteaza kao proteolitička podjedinica koja ima temeljnu funkciju u degradaciji nepravilno povezanih proteina. Navedeni protein također nije produciran nakon revitalizacije, ali je producirana ATP-ovisna Clp proteaza s ATP vezujućom podjedinicom ClpX koja ima funkciju šaperona koji se aktiviraju kao odgovor stanice na stres (Nair i sur., 2000). Nakon revitalizacije produciran je protein lichenan specifična fosfotransveraza IIB komponenta, koja ima ulogu u metabolizmu ugljikohidrata odnosno posredno omogućava transport šećera u stanicu preko fosfoenolpiruvata. Producirana je i alanin dehidrogenaza također uključena u metabolizam ugljikohidrata odnosno prvi korak sinteze piruvata iz L-alanina, vode i NAD^+ pri čemu se molekula alanina prevodi u piruvat, molekulu NH_3 i reducirani oblik NADH. Dakle nakon revitalizacije, stanica je uspjela prevladati stresne uvjete što je vidljivo produciranim proteinima za metabolizma ugljikohidrata, čime se stanici omogućava energija.

Tablicom 35 prikazan je razlikovni prikaz produciranih proteina prije i nakon trostrukog tretmana bakterije *L. innocua*. Prije tretmana producirana je ATP ovisna Clp proteaza kao proteolitička podjedinica koja kao što je već navedeno sudjeluje u degradaciji nepravilno povezanih proteina. Producirana je i format C acetiltransveraza koja je uključena u metabolički put ugljihohidrata te protein koji sudjeluje u translaciji (50S ribosomalni protein L9). Nakon trostrukog tretmana produciran je protein obrane od staničnog gladovanja kao odgovor stanice na stres te ribuloza-5-fosfat-epimeraza uključena u alternativne metaboličke puteve kako bi se stanici osigurala energija. D-riboza 5-fosfat se prevodi u D-ksiloza 5-fosfat.

Tablicom 36 prikazani su razlikovni proteini producirani prije i nakon tretmana kvasca *S. cerevisiae*. Vidljivo je da stanica prije tretmana ima producirane proteine (superoksid dismutazu i peroksiredoksin) koji štite stanicu odnosno DNA od molekule H_2O_2 koja se normalno producira u stanici. Peroksiredoksin sudjeluje u homeostazi Mn^{2+} iona te razlaže molekulu H_2O_2 reakcijom tioredoksina i H_2O_2 na tioredoksin disulfid i vodu. Mn^{2+} ion ima funkciju u obrani stanice od oksidativnog stresa pri čemu snizuje koncentraciju superoksida (Archibald i Fridovich, 1982; McNaughton i sur., 2010). Navedeni proteini nisu producirani u

stanicama nakon tretmana što znači da stanica ima oslabljene mehanizme obrane od stresa uzrokovanih plazma tretmanom, odnosno aktivirani su drugi mehanizmi obrane stanice od stresa. U studiji Willi i sur. (2018) je dokazano da oksidacijski stres može narušiti korake u ciklusu ribosomske elongacije. Također je dokazano da uklanjanje oštećenih ribosomskih jedinica omogućava stanici popravak neispravnih ribosoma (Mathis i sur., 2016). Stanice nakon tretmana produciraju protein alkohol dehidrogenazu koji katalizira oksidoredukcijsku reakciju pretvorbe acetaldehida u etanol pri čemu se molekula NADH oksidira u NAD^+ (Raj i sur., 2015). U protein-protein interakciji (slika 64) s alkohol dehidrogenazom producirana je fruktoza-bifosfat aldolaza uključena u produkciju gliceraldehid-3-fosfata koji s enzimima gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazom, fosfoglicerat kinazom i fosfoglicerat mutazom 1 dovodi do sinteze piruvata što daljnim reakcijama dovodi do pretvorbe piruvata u etanol. Također je produciran protein vezan uz reakcije produljene translacije proteina (eukariotski inicijacijski translacijski faktor 5A-2) koji omogućava obranu stanice od stresa, očuvava integritet stanične stijenke te smanjuje proces translacije smanjenjem mRNA (Park, 2006). Polarizirani rast stanica kvasca nakon tretmana kataliziran je enzimom kofilinom koji ubrzava polimerizaciju aktinskih podjedinica (Bernstein i Bamburg, 2010). Navedeni enzim potvrđuje obranu stanice od stresnih uvjeta. Aktiviran je i 40S ribosomalni protein S-19 A koji je u protein protein interakciji s proteinom eukariotski inicijacijski translacijski faktorom 5A-2 (slika 64).

U tablici 37 prikazani su razlikovno producirani proteini prije i nakon revitalizacije kvasca *S. cerevisiae*. Superoksid dismutaza producirana je u stanicama prije revitalizacije, dok nakon revitalizacije nije. Neaktivnost navedenog proteina smanjuje mehanizam obrane stanice od oksidativnog stresa. Nakon revitalizacije producirani su proteini uključeni u produljenu translaciju proteina koji su i u protein-protein interakciji (slika 65). Također je aktiviran ubikvitin protein koji je mali regulatorni protein prisutan kod svih eukariota. Ima djelovanje u različitim staničnim procesima kao što je odgovor na stres i vanjske čimbenike, transkripciju DNA i njen popravak (Hicke, 2001; Peng i sur., 2003). Adenilat kinaza producirana nakon revitalizacije sudjeluje u metabolizmu nukleotida, odnosno metabolizmu purinskih baza (izvor http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ko:K00939). Katalizira pokretanje replikacije DNA (Ma i sur., 2010) što je još jedan dokaz revitalizacije stanica nakon tretmana.

Tablicom 38 prikazani su razlikovno producirani proteini prije i nakon trostrukog tretmana kvasca *S. cerevisiae*. Vidljivo je da je prije tretmana produciran enzim superoksid dismutaza koji katalizira reakcije uništavanja superoksid anionskih radikala koji se normalno proizvode unutar stanica te imaju toksični utjecaj na biološke sustave. Isti enzim nije produciran nakon trostrukog tretmana čime je oslabljena obrana stanice od generiranih radikala tijekom

plazma tretmana. Nakon trostrukog tretmana istog uzorka producirani su enzimi koji sudjeluju u translaciji proteina kao načina obrane od stresa (60S ribosomalni protein L19-B, 60S ribosomalni protein L19-A, 40S ribosomalni protein S19-B, 40S ribosomalni protein S19-A) koji su i u protein-protein interakcijskoj mreži (slika 67). Nakon trostrukog tretmana produciran je i WW protein koji je uključen u odgovor stanice na apoptozu koja je uzrokovana peroksidima (Madeo i sur., 2004; Stevenson i sur., 2001; Szallies i sur., 2002), proliferaciju te poremaćaj rasta. Apoptozu karakterizira smrt stanice, odnosno smežuravanje stanične stijenke, prilikom čega dolazi do fragmentacije DNA (Carmona-Gutierrez i sur., 2010; Samali i sur., 1999). Međutim, WW protein katalizira i proliferaciju rasta odnosno poremećaj rasta pri čemu stanice kod kojih DNA nije u potpunosti fragmentirana nastavljaju mitotičku diobu. Nakon tretmana aktiviran je protein uključen u metabolizam ugljikohidrata triozafosfat izomeraza koja je uključena u prvi korak sinteze D-gliceraldehid-3-fosfata iz dihidroksiaceton fosfata te adenilat kinaza koja sudjeluje u metabolizmu nukleotida odnosno replikaciji DNA. Navedena dva proteina se nalaze i u protein-protein interakcijskoj mreži (slika 67).

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu prikazanih rezultata nakon tretmana plinskom plazmom i tekućinskom plazmom u mjehurićima i provedene rasprave može se zaključiti:

1. Optičkom emisijskom spektroskopijom utvrđeno je prisustvo radikala $OH^{\bullet}$, $H^{\bullet}$, $O^{\bullet}$ te atoma argona, titana, kroma i željeza.

2. Više koncentracije H_2O_2 postignute su nakon tretmana plinskom plazmom i radnim plinom argonom osim pri tretmanu bakterija *L. innocua*, *S. aureus* i *B. cereus*.

3. Koncentracije H_2O_2 postignute nakon tretmana plinskom plazmom su ~2x više od koncentracija H_2O_2 postignutih nakon tretmana tekućinskom plazmom u mjehurićima.

4. Tretmanima s oba tipa reaktora, plinski i tekućinski u mjehurićima, ne dolazi do značajnog povećanja temperature, a najviša očitana temperatura nakon obrade iznosila je 31,4 °C.

5. Povećanjem frekvencije i vremena tretiranja kod oba tipa reaktora dolazi do povećanja provodljivosti te sniženja pH za 2-3 pH jedinice.

6. Tretmanom plinskom plazmom i tekućinskom plazmom u mjehurićima i radnim plinovima, zrak i argon, postignuta je potpuna inaktivacija sljedećih mikroorganizama u stacionarnoj fazi rasta: *E. coli*, *S. enterica*, *L. innocua*, *S. aureus*. Potpuna inaktivacija stanica *B. cereus* i *S. cerevisiae* u stacionarnoj fazi rasta postignuta je tekućinskom plazmom u mjehurićima u argonu.

7. Najučinkovitija inaktivacija stanica *E. coli*, *S. enterica*, *L. innocua*, *S. aureus*, *B. cereus* i *S. cerevisiae* u stacionarnoj fazi rasta ostvarena je tretmanom tekućinskom plazmom u mjehurićima: 10', 90 Hz, argon.

8. U eksponencijalnoj fazi rasta tretmanom tekućinskom plazmom u mjehurićima ostvarena je potpuna inaktivacija za sljedeće mikroorganizme: *S. enetrica*, *L. innocua*, *S. aureus* i *S. cerevisiae*.

9. Testom revitalizacije pri idealnim uvjetima za razvoj mikroorganizama utvrđen je potpuni oporavak i metabolička aktivnost stanica.

10. Utvrđena je vidljiva, ali ne kulturabilna faza mikroorganizama nakon tretmana, čime je omogućen oporavak stanica nakon tretmana.

11. Analizom istjecanja unutar staničnog sadržaja pri 260 i 280 nm prije i nakon tretmana uočeno je više istjecanje proteina, što posljedično omogućava brži oporavak stanice.

12. Snimanjem stanica *E. coli, L. innocua* te kvasca *S. cerevisiae* transmisijskim elektronskim mikroskopom uočene su inaktivirane stanice s dezintegriranom membranom i sadržajem stanice koji je u potpunosti istekao iz same stanice.

13. Viša redukcija biofilma za mikroorganizme *E. coli, S. enterica* i *S. cerevisiae* uočena je nakon tretmana tekućinskom plazmom u mjehurićima i radnim plinovima argonu i zraku, dok je za mikroorganizme *L. innocua, S. aureus, B. cereus* i *Rhodotorula* spp viša redukcija biofilma uočena nakon tretmana plinskom plazmom neovisno o primijenjenom plinu.

14. Razlikovnom proteomskom analizom stanica u stacionarnoj fazi rasta utvrđeno je:
    - da stanice *E. coli* prije tretmana imaju producirane proteine vezane uz metabolizam ugljikohidrata. Proteini producirani nakon tretmana ukazuju na aktivaciju općeg odgovora na stres, a vezuju se uz oksidoredukcijske reakcije, staničnu diobu i metabolizam nukleotida.

    - proteini producirani prije revitalizacije stanica *E. coli* uključeni su u metabolizam masnih kiselina, nukleotida, ugljikohidrata, stanične diobe, transportni sustav, biosintezu proteina i oksidoredukcijske reakcije. Nakon revitalizacije producirani su proteini uključeni u metabolizam aminokiselina i oksidoredukcijske reakcije.

    - prije trostrukog tretmana stanica *E. coli* producirani su proteini uključeni u metabolizam aminokiselina i univerzalni protein stresa. Nakon tretmana produciran je 50S

ribosomalni protein L32 kao odgovor stanice na zračenje i reaktivne oksidativne vrste i proteini koji sudjeluju u translaciji.

- prije tretmana stanica *L. innocua* producirani su proteini koji se vezuju uz metabolizam ugljikohidrata, masnih kiselina i sintezu proteina. Nakon tretmana uočena je ekspresija proteina odgovornog za zaštitu DNA tijekom gladovanja i ionizirajućeg zračenja i metabolizam ugljikohidrata.

- prije revitalizacije stanica *L. innocua* producirani su proteini vezani za metabolizam aminokiselina i oksidoredukcijske reakcije. Nakon tretmana producirani su proteini koji ima ulogu šaperona kao odgovor stanice na stres i metabolizam ugljikohidrata.

- prije trostrukog tretmana stanica *L. innocua* producirani su proteini vezani za metabolizam ugljikohidrata i sintezu proteina. Nakon tretmana produciran je protein obrane od staničnog gladovanja kao odgovor stanice na stres i ribuloza-5-fosfat-epimeraza uključena u alternativne metaboličke puteve kako bi se stanici osigurala energija.

- prije tretmana stanica *S. cerevisiae* produciran je protein superoksid dismutaza odgovoran za zaštitu stanice od H_2O_2 koji se stvara u stanici. Nakon tretmana produciran je protein koji katalizira obranu stanice od stresa i održava integritet stanične stijenke, zatim protein koji sudjeluje u sintezi proteina te metabolizmu ugljikohidrata.

- prije revitalizacije stanica *S. cerevisiae* producirana je superoksid dismutaza. Nakon revitalizacije stanica produciran je ubikvitin protein kao odgovor na stres i vanjske čimbenike, transkripciju DNA i njen popravak kao i eukariotski inicijacijski translacijski faktor 5A-2, protein vezan uz metabolizam nukleotida i sintezu proteina.

- prije trostrukog tretmana stanica *S. cerevisiae* producirana je superoksid dismutaza, dok su nakon tretmana producirani WW protein koji je uključen u odgovor stanice na apoptozu, proliferaciju i poremećaj rasta, proteini uključeni u sintezu proteina, metabolizam ugljikohidrata i nukleotida.

7. LITERATURA

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.

Akiyama, H. (2000) Streamer discharges in liquids and their applications. *IEEE T. Dielect. El. In.* **7**, 646 – 653.

Al-Holy, M. A., Rasco, B. A. (2015) The bactericidal activity of acidic electrolyzed oxidizing water against *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on raw fish, chicken and beef surfaces. *Food control* **54**, 317 – 321.

Alvarez, I., Raso, J., Palop, A., Sala, F. J. (2000) Influence of different factors on the inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.*, **55**, 143 – 146.

Álvarez, I., Pagán, R., Condón, S., Raso, J. (2003) The influence of process parameters for the inactivation of Listeria monocytogenes by pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.* **87**, 87 – 95.

Annous, A.B., Fratamico, P.M., Smith, J.L. (2009) Quorum Sensing in Biofilms: Why Bacteria Behave the Way They Do. *J. Food Sci.* **74**, 24 – 37.

Anpilov, A. M., Barkhudarov, E. M., Bark, Y. B., Zadiraka, Y. V., Christofi, M., Kozlov, Y. N., Kossyi, I.A., Kop'ev, V.A., Silakov, V.P., Taktakishvili, M.I. (2001) Electric discharge in water as a source of UV radiation, ozone and hydrogen peroxide. *J. Phys. D Appl. Phys.* **34**, 993.

Archibald, F. S., Fridovich, I. (1982) The scavenging of superoxide radical by manganous complexes: in vitro. *Arc. Bioch. Biophys.* **214**, 452 – 463.

Aronsson, K., Rönner, U., Borch, E. (2005) Inactivation of *Escherichia coli, Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to membrane permeabilization and subsequent leakage of intracellular compounds due to pulsed electric field processing. *Int. J. Food Microbiol.* **99**, 19 – 32.

Baroch, P., Saito, N., Takai, O. (2008) Special type of plasma dielectric barrier discharge reactor for direct ozonization of water and degradation of organic pollution. *J. Phys. D Appl. Phys.* **41**, 085207.

Bartnikas, R., McMahon, E.J. (1979) Engineering dielectrics: 1st volume corona measurement and interpretation, 1. izd., American society for testing and materials, Philadelphia.

Bamforth, C. W. (2008) Food, fermentation and micro-organisms, 1.izd., John Wiley & Sons, New York.

Bavaro, M. F. (2012) *E. coli* O157: H7 and other toxigenic strains: the curse of global food distribution. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **14**, 317 – 323.

Becker, H., Schaller, G., von Wiese, W., Terplan, G. (1994) *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. *Int. J. Food Microbiol.* **23**, 1 – 15.

Beggs, C. B. (2002) A quantitative method for evaluating the photoreactivation of ultraviolet damaged microorganisms. *Photoch. Photobio. Sci.* **1**, 431 – 437.

Bellan, P. M. (2006) Fundamentals of Plasma Physics, 1. izd., Cambridge University Press, London.

Bernstein, B. W., Bamburg, J. R. (2010) ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends Cell. Bio.* ***20***, 187 – 195.

Beroual, A., Kebbabi, L. (2009) Influence of the voltage waveform and hydrostatic pressure on morphology and final length of discharges propagating over solid-liquid interfaces. *IEEE T. Dielect. El. In.* **16**, 1574 – 1581.

Birmingham, J. G. (2004) Mechanisms of bacterial spore deactivation using ambient pressure nonthermal discharges. *IEEE T. Plasma Sci.* **32**, 1526 – 1531.

Biswas, S. K., Yokoyama, K., Nishimura, K., Miyaji, M. (2001) Molecular phylogenetics of the genus *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **51**, 1191 – 1199.

Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatric, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau. B., Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453 – 1462.

Bogaerts, A., Neyts, E., Gijbels, R., Mullen, van der J. (2002) Gas discharge plasmas and their applications. *Spectrochim Acta B.* **57**, 609 – 658.

Boxhammer, V., Morfill, G. E., Jokipii, J. R., Shimizu, T., Klämpfl, T., Li, Y. F., Köritzer, J., Schlegel, J., Zimmermann, J. L. (2012) Bactericidal action of cold atmospheric plasma in solution. *New J. Phys.* **14**, 113042.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248 – 254.

Brandenburg, R., Ehlbeck, J., Stieber, M., Zeymer, J., Schlüter, O., Weltmann, K. D. (2007) Antimicrobial Treatment of Heat Sensitive Materials by Means of Atmospheric Pressure Rf-Driven Plasma Jet. *Contrib. Plasm. Phys.* **47**, 72 – 79.

Braithwaite, N. St. J. (2000) Introduction to gas discharges. *Plasma Sources Sci. Technol.* **9**, 517 – 527.

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.

Briels, T. M. P., Kos, J., Winands, G. J. J., Van Veldhuizen, E. M., Ebert, U. (2008) Positive and negative streamers in ambient air: measuring diameter, velocity and dissipated energy. *J. Phys.D Appl. Phys.* **41**, 234004.

Bryant, D. A. (1996) Debye length in a kappa-distribution plasma. *J. Plasma Phys.* **56**, 87 – 93.

Cabarkapa, I., Levic, J., Djuragic, O. (2013) Biofilm, Formatex Research Center, Badajoz, 42 – 51.

Cabiscol Català, E., Tamarit Sumalla, J., Ros Salvador, J. (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol.* **3**, 3 – 8.

Calhoun, L. N., Kwon, Y. M. (2011) Structure, function and regulation of the DNA-binding protein Dps and its role in acid and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*: a review. *J. Appl. Microbiol.* **110**, 375 – 386.

Carmona-Gutierrez, D., Eisenberg, T., Büttner, S., Meisinger, C., Kroemer, G., Madeo, F. (2010) Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell Death Differ.* **17**, 763.

Chandramouli, K., Qian, P. Y. (2009) Proteomics: challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity. *Hum. Genom. Proteomics* **1**, e239204.

Cheesbrough, M. (1981) Medical laboratory manual for tropical countries, 1. izd., Cambridgeshire.

Choi, M. S., Cheigh, C. I., Jeong, E. A., Shin, J. K., Chung, M. S. (2010) Nonthermal sterilization of *Listeria monocytogenes* in infant foods by intense pulsed-light treatment. *J. Food Eng.* **97**, 504 – 509.

Cottrell, J.S. (2011) Protein identification using MS/MS data. *J. Proteomics* **74**, 1842 – 1851.

Costerton, J. W., Montanaro, L., Arciola, C. R. (2005) Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int. J. Artif. Organs* **28**, 1062 – 1068.

Cook, K. L., Bolster, C. H. (2007) Survival of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* in groundwater during prolonged starvation at low temperatures. *J. Appl. Microbiol.* **103**, 573 – 583.

Croteau, D. L., Bohr, V. A. (1997) Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 25409 – 25412.

Čabarkapa, I. (2015) Sposobnost formiranja biofilma različitih sojeva *Salmonella* Enteritidis i inhibitorni efekat etarskih ulja na inicijalnu adheziju i formirani biofilm. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom Sadu.

Ćosić, J. (2017) Bakterijske spore. Doktorska disertacija, Sveučilište Josip Juraj Strossmayer, Osijek.

Daniel, R. A., Errington, J. (2003) Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell* **113**, 767 – 776.

De Giacomo, A. (2003) Experimental characterization of metallic titanium-laser induced plasma by time and space resolved optical emission spectroscopy. *Spectrochim. Acta Part B.* **58**, 71 – 83.

De Graef, M. (2003) Introduction to conventional transmission electron microscopy, 1. izd., Cambridge University Press, Cambridge.

Dixon, M. M., Huang, S., Matthews, R. G., Ludwig, M. (1996) The structure of the C-terminal domain of methionine synthase: presenting S-adenosylmethionine for reductive methylation of B12. *Structure* **4**, 1263 – 1275.

Dobrynin, D., Arjunan, K., Fridman, A., Friedman, G., Clyne, A. M. (2011) Direct and controllable nitric oxide delivery into biological media and living cells by a pin-to-hole spark discharge (PHD) plasma. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **44**, 075201.

Dolezalova, E., Lukes, P. (2015) Membrane damage and active but nonculturable state in liquid cultures of *Escherichia coli* treated with an atmospheric pressure plasma jet. *Bioelectrochemistry* **103**, 7 – 14.

Donlan, R.M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 881 – 890.

Donlan, R.M., Costerton, J.W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol Rev.* **15**, 167 – 193.

Doyle, R. J., Marquis, R. E. (1994) Elastic, flexible peptidoglycan and bacterial cell wall properties. *Trends Microbiol.* **2**(2), 57 – 60.

Duraković, S., Redžepović, S. (2002) Uvod u opću mikrobiologiju, 1. izd., Kugler, Zagreb.

Eng, J. K., Jahan, T. A., Hoopmann, M. R. (2013) Comet: an open-source MS/MS sequence database search tool. *Proteomics* **13**, 22 – 24.

Farber, J. M., Peterkin, P. I. (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* **55**, 476 – 511.

Farr, S. B., Kogoma, T. (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*. *Microbiol. Rev.* **55**, 561 – 585.

Fleet, G. H. (2010) Yeast spoilage of foods and beverages, 5. izd., Elsevier, London.

Flemming, H.C., Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nat. Rev.Microbiol*. **8**, 623 – 633.

Fox, G. E. (2010) Origin and evolution of the ribosome. *CSH. Perspect. Biol.* **2**, a003483.

Franceschini, A., Szklarczyk, D., Frankild, S., Kuhn, M., Simonovic, M., Roth, A., Jensen, L. J. (2012) STRING v9. 1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res.* **41**, 808 – 815.

Fridman, A. (2008) Plasma Chemistry, Cambridge University Press, New York.

Fultz, B., Howe, J. M. (2012) Transmission electron microscopy and diffractometry of materials. 1. izd., Springer Science & Business Media, New York.

Gadri, R. B., Roth, J. R., Montie, T. C., Kelly-Wintenberg, K., Tsai, P. P. Y., Helfritch, D. J., Feldman, P., Sherman, D. M., Karakaya, F., Chen, Z., Team, U. P. S. (2000) Sterilization and

plasma processing of room temperature surfaces with a one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP). *Surf. Coat. Tech.* **131**, 528 – 541.

Gasanova, S. (2013) Aqueous-phase electrical discharges. Doktorska disertacija, Universität Duisburg-Essen, Fakultät für Chemie.

Gaunt, L. F., Beggs, C. B., Georghiou, G. E. (2006) Bactericidal action of the reactive species produced by gas-discharge nonthermal plasma at atmospheric pressure: a review. *IEEE T. Plasma Sci.* **34**, 1257 – 1269.

Geveke, D. J., Kozempel, M. F. (2003) Pulsed electric field effects on bacteria and yeast cells. *J. Food Process. Pres.* **27**, 65 – 72.

Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Skandamis, P.N., Nychas, G.J. (2012) Attachment and biofilm formation by *Salmonella* in food processing environments, 1. izd., InTech, Rijeka, 57 – 180.

Giaouris, E., Heir, E., Hébraud, M., Chorianopoulos, N., Langsrud, S., Møretrø, T., Habimana, O., Desvaux, M., Renier, S., Nychas, G.J. (2014) Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Sci.* **97**, 298 – 309.

Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couve, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Dominguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., Dussurget, O., Entian, K-D., Fsihi, H., Garcia del Portillo, F., Gariddo, F., Gautier, L., Goebel, W., Gomez-Lopez, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L-M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapkat, G., Madueno, E., Maitournam, A., Mata Vicente, J., Ng, E., Nedjari, H., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Perez-Diaz, J-C. Purcell, R., Remmel, B., Rose, M., Schueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vasquez-Boland, J-A., Voss, H., Wehland, J., Charbit, A. (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**, 849 – 852.

Granum, P. E. (1994) *Bacillus cereus* and its toxins. *J. Appl. Bacteriol.* **76**, 61S-66S.

Granum, P. E., Lund, T. (1997) *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* **157**, 223 – 228.

Gupte, A.R., De Rezende, C.L.E., Joseph, S.W. (2003) Induction and Resuscitation of Viable but Nonculturable *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104†. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6669 – 6675.

Guo, J., Huang, K., Wang, J. (2015) Bactericidal effect of various non-thermal plasma agents and the influence of experimental conditions in microbial inactivation: A review. *Food Control*, **50**, 482 – 490.

Gurol, C., Ekinci, F. Y., Aslan, N., Korachi, M. (2012) Low temperature plasma for decontamination of E. coli in milk. *Int. J. Food Microbiol.* **157**, 1 – 5.

Habimana, O., Nesse, L.L., Møretrø, T., Berg, K., Heir, E., Vestby, L.K., Langsrud, S. (2014) The persistence of *Salmonella* following desiccation under feed processing environmental conditions: a subject of relevance. *Lett. Appl. Microbiol.* **59**, 464 – 470.

Hähnel, M., von Woedtke, T., Weltmann, K. D. (2010) Influence of the air humidity on the reduction of Bacillus spores in a defined environment at atmospheric pressure using a dielectric barrier surface discharge. *Plasma Process. Polym.* **7**, 244 – 249.

Han, L., Patil, S., Boehm, D., Milosavljević, V., Cullen, P. J., Bourke, P. (2016) Mechanisms of inactivation by high-voltage atmospheric cold plasma differ for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microb.* **82**, 450 – 458.

Hamerli, P. (2004) Plasma aminofunctionalisation of polymeric membrane surfaces for tissue engineering applications. Doktorska disertacija, Sveučilište Veszprem.

Hicke, L. (2001) Ubiquitin and proteasomes: protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **2**, 195.

Hickling, A. (1971) Electrochemical processes in glow discharge at the gas-solution interface, 6. izd., Springer, Boston.

Horiike, T., Hamada, K., Kanaya, S., Shinozawa, T. (2001) Origin of eukaryotic cell nuclei by symbiosis of Archaea in Bacteria is revealed by homology-hit analysis. *Nat. Cell Bio.* **3**, 210.

Horn, J. M., Masterson, B. A., Rivera, A., Miranda, A., Davis, M. A., Martin, S. (2004) Bacterial growth dynamics, limiting factors, and community diversity in a proposed geological nuclear waste repository environment. *Geomicrobiol. J.* **21**, 273 – 286.

Inagaki, N. (2014) Plasma surface modification and plasma polymerization, 2. izd., Taylor & Francis, London.

Jiang, B., Zheng, J., Qiu, S., Wu, M., Zhang, Q., Yan, Z., Xue, Q. (2014) Review on electrical discharge plasma technology for wastewater remediation. *Chem. Eng. J.* ***236***, 348 – 368.

Joshi, R. P., Kolb, J. F., Xiao, S., Schoenbach, K. H. (2009) Aspects of plasma in water: streamer physics and applications. *Plasma Processes and Polym.* **6**, 763 – 777.

Kamgang, J. O., Briandet, R., Herry, J. M., Brisset, J. L., Naïtali, M. (2007) Destruction of planktonic, adherent and biofilm cells of *Staphylococcus epidermidis* using a gliding discharge in humid air. *J. Appl. Microbiol.* **103**, 621 – 628.

Kellis, M., Birren, B. W., Lander, E. S. (2004) Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **428**, 617.

Kennedy, E. P. (1982) Osmotic regulation and the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *P. Natl. A. Sci.* **79**, 1092 – 1095.

Kim, Y. J., Kim, M. H., Song, K. B. (2009) Efficacy of aqueous chlorine dioxide and fumaric acid for inactivating pre-existing microorganisms and *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on broccoli sprouts. *Food Control* **20**, 1002 – 1005.

Kim, H. S., Cho, Y. I., Hwang, I. H., Lee, D. H., Cho, D. J., Rabinovich, A., Fridman, A. (2013) Use of plasma gliding arc discharges on the inactivation of *E. Coli* in water. *Sep. Purif. Technol.* **120**, 423 – 428.

Kirkpatrick, M. J., Locke, B. R. (2005) Hydrogen, Oxygen, and Hydrogen Peroxide Formation in Aqueous Phase Pulsed Corona Electrical Discharge. *Ind. Eng. Chem. Res.* **44**, 4243 – 4248.

Klämpfl, T. G., Isbary, G., Shimizu, T., Li, Y. F., Zimmermann, J. L., Stolz, W., Schlegel, J., Morfill, G.E., Schmidt, H. U. (2012) Cold atmospheric air plasma sterilization against spores and other microorganisms of clinical interest. *Appl. Environ. Microb.* **78**, 5077 – 5082.

Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K., Brul, S. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 239 – 256.

Koch, A. L. (1998) The biophysics of the gram-negative periplasmic space. *Crit. Rev. Microbiol.* **24**, 23 – 59.

Korachi, M., Gurol, C., Aslan, N. (2010) Atmospheric plasma discharge sterilization effects on whole cell fatty acid profiles of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Electrostat.* **68**, 508 – 512.

Kotnik, T., Kramar, P., Pucihar, G., Miklavcic, D., Tarek, M. (2012) Cell membrane electroporation-Part 1: The phenomenon. *IEEE Electr. Insul. M.* **28**, 14 – 23.

Kozáková, Z. (2011) Electric Discharges in Water Solutions. Doktorska disertacija, Brno, Republika Češka.

Kroemer, G., Mariño, G., Levine, B. (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell* **40**, 280 – 293.

Kurahashi, M., Katsura, S., Mizuno, A. (1997) Radical formation due to discharge inside bubble in liquid. *J. Electrostat.* **42**, 93 – 105.

Lackmann, J. W., Schneider, S., Edengeiser, E., Jarzina, F., Brinckmann, S., Steinborn, E., Havenith, M., Benedikt, J., Bandow, J. E. (2013) Photons and particles emitted from cold atmospheric-pressure plasma inactivate bacteria and biomolecules independently and synergistically. *J. R. Soc. Interface* **10**, 20130591.

Lane, C. S. (2005) Mass spectrometry-based proteomics in the life sciences. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 848 – 869.

Laroussi, M., Lu, X. (2005) Room-temperature atmospheric pressure plasma plume for biomedical applications. *Appl. Phys. Lett.* **87**, 113902.

Lemmen, S., Scheithauer, S., Häfner, H., Yezli, S., Mohr, M., Otter, J. A. (2015) Evaluation of hydrogen peroxide vapor for the inactivation of nosocomial pathogens on porous and nonporous surfaces. *Am. J. Infect. Control* **43**, 82 – 85.

Lengeler, J. W., Drews, G., Schlegel, H. G. (1999) Biology of the Prokaryotes, 1.izd., Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Liao, X., Liu, D., Xiang, Q., Ahn, J., Chen, S., Ye, X., Ding, T. (2017) Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: a review. *Food Control* **75**, 83 – 91.

Lieberman, M. A., Lichtenberg, A. J. (2005) Principles of plasma discharges and materials processing, 2. izd., John Wiley & Sons, New Jersey.

Lleò, M.M., Benedetti, D., Tafi, M.C., Signoretto, C., Canepari, P. (2007a) Inhibition of the resuscitation from the viable but non-culturable state in *Enterococcus faecalis*. *Environ. Microbiol.* **9**, 2313 – 2320.

Locke, B. R., Shih, K. Y. (2011) Review of the methods to form hydrogen peroxide in electrical discharge plasma with liquid water. *Plasma Sources Sci. T.* **20**, 034006.

Lushchak, V. I. (2011) Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Com. Biochem. Phys. C.* **153**, 175 – 190.

Lukes, P., Locke, B. R. (2005) Plasmachemical oxidation processes in a hybrid gas–liquid electrical discharge reactor. *J. Phys. D Appl. Phys.* **38**, 4074.

Lukeš, P., Člupek, M., Babický, V., Šunka, P., Skalný, J. D., Štefečka, M., Novák, J., Málková, Z. (2006) „Erosion of needle electrodes in pulsed corona discharge in water“. *Czech. J. Phy*. **56**, 916 – 24.

Lunov, O., Zablotskii, V., Churpita, O., Jäger, A., Polívka, L., Syková, E., Dejneka, A., Kubinová, Š. (2016) The interplay between biological and physical scenarios of bacterial death induced by non-thermal plasma. *Biomaterials* **82**, 71 – 83.

Lu, X., Naidis, G. V., Laroussi, M., Reuter, S., Graves, D. B., Ostrikov, K. (2016) Reactive species in non-equilibrium atmospheric-pressure plasmas: Generation, transport, and biological effects. *Phys. Rep.* **630**, 1 – 84.

Luque, A., Ratushnaya, V., Ebert, U. (2008) Positive and negative streamers in ambient air: modelling evolution and velocities. *J. Phys. D Appl. Phys.* **41**, 234005.

Ma, L., Zhai, Y., Feng, D., Chan, T. C., Lu, Y., Fu, X., Wang, J., Chen, Y., Li, J., Xu, K., Liang, C. (2010) Identification of novel factors involved in or regulating initiation of DNA replication by a genome-wide phenotypic screen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Cycle* **9**, 4399 – 4410.

Machala, Z., Jedlovský, I., Chládeková, L., Pongrác, B., Giertl, D., Janda, M., Šikurová, I., Polčic, P. (2009) DC discharges in atmospheric air for bio-decontamination–spectroscopic methods for mechanism identification. *Eur. Phys. J. D.* **54**, 195 – 204.

Madeo, F., Herker, E., Wissing, S., Jungwirth, H., Eisenberg, T., Frohlich, K.U. (2004) Apoptosis in yeast. Curr. *Opin. Microbiol.* **7**, 655 – 660.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Stahl, D.A. (2015) Brock Biology of Microorganisms, 14. izd., Prentice Hall, New Jersey.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (2017) Brock biology of microorganisms, 13. izd., Pearson, New Jersey.

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. Agents* **43**, 508 – 517.

Maisch, T., Shimizu, T., Isbary, G., Heinlin, J., Karrer, S., Klämpfl, T. G., Li,Y-F., Morfill, G., Zimmermann, J. L. (2012) Contact-free inactivation of *Candida albicans* biofilms by cold atmospheric air plasma. *Appl. Environ. Microb.* **78**, 4242 – 4247.

Malik, M. A., Ghaffar, A., Malik, S. A. (2001) Water purification by electrical discharges. *Plasma Sources Sci. T.* **10**, 82.

Marić, S., Vraneš, J. (2007) Characteristics and significance of microbial biofilm formation. *Period Biol.* **109**, 115 – 121.

Marriott, N. G., Gravani, R. B. (2006) Principles of Food Sanitation, 1.izd., Springer, Boston.

Mathis, A. D., Naylor, B. C., Carson, R. H., Evans, E., Harwell, J., Knect, J., Hexem, E., Peelor, Miller, B. F., Hamilton, K. L., Transtrum, M. K., Bukman, B. T., Transtrum, M. K. (2016) Mechanisms of in vivo ribosome maintenance change in response to nutrient signals. *Mol. Cell. Proteomics* **16**, 243-254.

McDonald, K. F., Curry, R. D., Clevenger, T. E., Unklesbay, K., Eisenstark, A., Golden, J., Morgan, R. D. (2000) A comparison of pulsed and continuous ultraviolet light sources for the decontamination of surfaces. *IEEE T. Plasma Sci.* **28**, 1581 – 1587.

McNaughton, R. L., Reddi, A. R., Clement, M. H., Sharma, A., Barnese, K., Rosenfeld, L., Gralla, E. D., Valentine, J. S., Cullota, V. C., Hoffman, B. M. (2010) Probing in vivo Mn2+ speciation and oxidative stress resistance in yeast cells with electron-nuclear double resonance spectroscopy. *P. Natl. A. Sci.* **107**, 15335 – 15339.

Melly, E., Cowan, A. E., Setlow, P. (2002) Studies on the mechanism of killing of *Bacillus subtilis* spores by hydrogen peroxide. *J. Appl. Microbiol.* **93**, 316 – 325.

Meury, J., Devilliers, G. (1999) Impairment of cell division in tolA mutants of *Escherichia coli* at low and high medium osmolarities. *Biol. Cell* **91**, 67 – 75.

Meyerkord, C. L., Fu, H. (2015) Protein-Protein Interactions 1. izd., Humana Press, New York.

Milanov, D., Ašanin, R., Vidić, B., Krnjajić, D., Petrović, J. (2008) Biofilm–organizacija života bakterija u prirodnim ekosistemima. *Arhiv Veterinarske Medicine* **1**, 5 – 15.

Miller, K. J., Kennedy, E. P., Reinhold, V. N. (1986) Osmotic adaptation by gram-negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharides. *Science* **231**, 48 – 51.

Milošević, S. (2007) Plazma – osnovni oblik materije u svemiru (http://eskola.hfd.hr/proc_za_vas/proc-21/proc21.htm).

Mir, S. A., Shah, M. A., Mir, M. M. (2016) Understanding the role of plasma technology in food industry. *Food Bioprocess Tech.* **9**, 734 – 750.

Misra, N. N., Tiwari, B. K., Raghavarao, K. S. M. S., Cullen, P. J. (2011). Nonthermal plasma inactivation of food-borne pathogens. *Food Eng. Rev.* **3**, 159 – 170.

Misra, N. N., Patil, S., Moiseev, T., Bourke, P., Mosnier, J. P., Keener, K. M., Cullen, P. J. (2014). In-package atmospheric pressure cold plasma treatment of strawberries. *J. Food Eng.* **125**, 131 – 138.

Misra, N. N., Schlüter, O., Cullen, P. J. (2016) Cold plasma in food and agriculture: fundamentals and applications, 1. izd., Academic Press, London.

Moisan, M., Barbeau, J., Crevier, M. C., Pelletier, J., Philip, N., Saoudi, B. (2002) Plasma sterilization. Methods and mechanisms. *Pure Appl. Chem.* **74**, 349 – 358.

Molinari, P., Pilosof, A.M.R., Jagus, R.J. (2004) Effect of growth phase and inoculum size on the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in fruit juices, by pulsed electric fields. *Food Res. Int.* **37**, 793 – 798.

Montie, T. C., Kelly-Wintenberg, K., Roth, J. R. (2000) An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP) for sterilization of surfaces and materials. *IEEE T. Plasma Sci.* **28**, 41 – 50.

Morishige, Y., Fujimori, K., Amano, F. (2013) Differential resuscitative effect of pyruvate and its analogues on VBNC (viable but non-culturable) *Salmonella*. *Microbes Environ.* **28**, 180 – 186.

Morbach, S., Krämer, R. (2002) Body shaping under water stress: osmosensing and osmoregulation of solute transport in bacteria. *Chembiochem.* **3**, 384 – 397.

Moreau, S., Moisan, M., Tabrizian, M., Barbeau, J., Pelletier, J., Ricard, A., Yahia, L. H. (2000) Using the flowing afterglow of a plasma to inactivate *Bacillus subtilis* spores: Influence of the operating conditions. *J. Appl. Phys.* **88**, 1166 – 1174.

Moreau, M., Orange, N., Feuilloley, M. G. J. (2008) Non-thermal plasma technologies: new tools for bio-decontamination. *Biotechnol. Adv.* **26**, 610 – 617.

Murphy, R. Y., Osaili, T., Duncan, L. K., Marcy, J. A. (2004) Thermal inactivation of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in ground chicken thigh/leg meat and skin. *Poultry Sci.* **83**, 1218 – 1225.

Nair, S., Milohanic, E., Berche, P. (2000) ClpC ATPase is required for cell adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes*. *Infec. Immun.* **68**, 7061 – 7068.

Nakamura, L. K. (1998) *Bacillus pseudomycoides* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **48**, 1031 – 1035.

Navarro Llorens, J. M., Tormo, A., Martínez-García, E. (2010) Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 476 – 495.

Niemira, B. A. (2012) Cold plasma decontamination of foods. *Food Sci. Tech.* **3**, 125 – 142.

Niemira, B. A., Gutsol, A. (2011) Nonthermal plasma as a novel food processing technology. *Nonthermal Processing Technologies for Food* 272 – 288.

Nolan, D. A., Chamblin, D. C., Troller, J. A. (1992) Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Int. J. Food Microbiol.* **16**, 323 – 335.

Oliveira, M., Viñas, I., Usall, J., Anguera, M., Abadias, M. (2012) Presence and survival of *Escherichia coli* O157: H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. *Int. J. Food Microbiol.* **156**, 133 – 140.

Oliver, J. D. (2005) The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* **43**, 93 – 100.

Oliver, J. D. (2010) Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 415 – 425.

Oms-Oliu, G., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R. (2010) Pulsed light treatments for food preservation. A review. *Food Bioprocess Tech.* **3**, 13.

Osumi, M. (1998) The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron* **29**, 207 – 233.

Paredes-Sabja, D., Shen, A., Sorg, J. A. (2014) *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends Microbiol.* **22**, 406 – 416.

Park, M. H. (2006) The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). *J. Biochem.* **139**, 161 – 169.

Parks Jr, R. E., Agarwal, R. P. (1972) 16 Purine Nucleoside Phosphorylase. *The Enzymes* **7**, 483 – 514.

Parvulescu, V. I., Magureanu, M., Lukes. P. (2012) Plasma Chemistry and Catalysis in Gases and Liquids. 1. izd., Wiley-VCH Verlag&co. KGaA, Weinheim.

Patil, S., Moiseev, T., Misra, N. N., Cullen, P. J., Mosnier, J. P., Keener, K. M., Bourke, P. (2014) Influence of high voltage atmospheric cold plasma process parameters and role of relative humidity on inactivation of *Bacillus atrophaeus* spores inside a sealed package. *J. Hosp. Infect.* **88**, 162 – 169.

Pedroso, N., Matias, A. C., Cyrne, L., Antunes, F., Borges, C., Malhó, R., Almeida, R. F. M., Herrero, E., Marinho, H. S. (2009) Modulation of plasma membrane lipid profile and microdomains by H2O2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radical Bio. Med.* **46**, 289 – 298.

Peeters, E., Nelis, H. J., Coenye, T. (2008) Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J. Microbiol. Meth.* **72**, 157 – 165.

Pelletier, J. (1993) La sterilisation par le procede plasma. *Agressologie* **33**, 105 – 110.

Peng, J., Schwartz, D., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., Gygi, S. P. (2003) A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat. Biotechnol.* **21**, 921.

Perni, S., Shama, G., Kong, M.G. (2008) Cold atmospheric plasma decontamination of the pericarps of fruit. *J. Food Protect.* **71**, 302 – 308.

Pillet, F., Formosa-Dague, C., Baaziz, H., Dague, E., Rols, M. P. (2016) Cell wall as a target for bacteria inactivation by pulsed electric fields. *Sci. Rep.* **6**, 19778.

Pine, L., Malcolm, G. B., Brooks, J. B., Daneshvar, M. I. (1989) Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. *Can. J. Microbiol.* **35**, 245 – 254.

Plančak, D., Musić, L., Puhar, I. (2015) Međustanična komunikacija parodontopatogenih bakterija. *Acta stomatol. Croat*. **49**, 234 – 241.

Pollard, T. D., Earnshaw, W. C., Lippincott-Schwartz, J., Johnson, G. (2016) Cell Biology E-Book, Elsevier Health Sciences.

Rahman, Z., Rahman, H., Rahman, A. (2014) Classification and Generation of Atmospheric Pressure Plasma and Its Principle Applications. *Int. J. Math. Phys. Sci. Res.* **2**, 127 – 146.

Raj, S. B., Ramaswamy, S., Plapp, B. V. (2014) Yeast alcohol dehydrogenase structure and catalysis. *Biochemistry* **53**, 5791 – 5803.

Rajagopalan, K. V., Johnson, J. L. (1992) The pterin molybdenum cofactors. *J. Biol. Chem*. **267**, 10199 – 10202.

Rech, S., Deppenmeier, U., Gunsalus, R. P. (1995) Regulation of the molybdate transport operon, modABCD, of *Escherichia coli* in response to molybdate availability. *J. Bacteriol.* **177**, 1023 – 1029.

Rendueles, E., Omer, M. K., Alvseike, O., Alonso-Calleja, C., Capita, R., Prieto, M. (2011) Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: a review. *LWT-Food Sci. Technol.* **44**, 1251 – 1260.

Richardson, G., Eick, S. A., Harwood, D. J., Rosén, K. G., Dobbs, F. (2003) Negative air ionisation and the production of hydrogen peroxide. *Atmos. Environ.* **37**, 3701 – 3706.

Roselló-Soto, E., Barba, F. J., Parniakov, O., Galanakis, C. M., Lebovka, N., Grimi, N., Vorobiev, E. (2015) High voltage electrical discharges, pulsed electric field, and ultrasound assisted extraction of protein and phenolic compounds from olive kernel. *Food Bioprocess Tech.* **8**, 885 – 894.

Rowan, N. J., Espie, S., Harrower, J., Anderson, J. G., Marsili, L., MacGregor, S. J. (2007) Pulsed-plasma gas-discharge inactivation of microbial pathogens in chilled poultry wash water. *J. Food Protect.* **70**, 2805 – 2810.

Salsali, H.R., Parker, W.J., Sattar, S.A. (2006) Impact of concentration, temperature, and pH on inactivation of *Salmonella* spp. by volatile fatty acids in anaerobic digestion. *Can. J. Microbiol.* **52**, 279 – 286.

Samali, A., Zhivotovsky, B., Jones, D., Nagata, S., Orrenius, S. (1999) Apoptosis: cell death defined by caspase activation. *Cell Death Differ.* **6**, 495.

Sarani, A., Nikiforov, A. Y., Leys, C. (2010) Atmospheric pressure plasma jet in Ar and Ar/H 2 O mixtures: Optical emission spectroscopy and temperature measurements. *Phys. Plasmas* **17**, 063504.

Sargentini, N. J., Gularte, N. P., Hudman, D. A. (2016) Screen for genes involved in radiation survival of Escherichia coli and construction of a reference database. *Mut. Res.-Fund. Mol. M. Muta.* **793**, 1 – 14.

Sathiamoorthy, G., Kalyana, S., Finney, W. C., Clark, R. J., Locke, B. R. (1999) Chemical reaction kinetics and reactor modeling of NOx removal in a pulsed streamer corona discharge reactor. *Ind. Eng. Chem. Res.* **38**, 1844 – 1855.

Scheie, A. A., Petersen, F. C. (2004). The biofilm concept: Consenquences for future prophylaxis of oral diseases? *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **15**, 4 – 12.

Scherrer, D., Corti, S., Muehlherr, J. E., Zweifel, C., Stephan, R. (2004) Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. *Vet. Microbiol.* **101**, 101 – 107.

Scholtz, V., Pazlarova, J., Souskova, H., Khun, J., Julak, J. (2015) Nonthermal plasma—A tool for decontamination and disinfection. *Biotechnol. Adv.* **33**, 1108 – 1119.

Schlüter, O., Ehlbeck, J., Hertel, C., Habermeyer, M., Roth, A., Engel, K. H., Holzhauser, T., Knorr, D., Eisenbrand, G. (2013) Opinion on the use of plasma processes for treatment of foods*. *Mol. Nutr. Food Res.* **57**, 920 – 927.

Schuchat, A., Swaminathan, B., Broome, C. V. (1991) Epidemiology of human listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**, 169 – 183.

Schmitt, M., Schuler-Schmid, U., Schmidt-Lorenz, W. (1990) Temperature limits of growth, TNase and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Int. J. Food Microbiol.* **11**, 1 – 19.

Setlow, P. (2006) Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J. Appl. Microbiol.* **101**, 514 – 525.

Setlow, P. (2007) I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends Microbiol.* **15**, 172 – 180.

Sharma, A., Collins, G., Pruden, A. (2009) Differential gene expression in *Escherichia coli* following exposure to nonthermal atmospheric pressure plasma. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 1440 – 1449.

Shen, J., Sun, Q., Zhang, Z., Cheng, C., Lan, Y., Zhang, H., Zimu, X., Zhao, Y., Weidong, X., Chu, P. K. (2015) Characteristics of DC Gas-Liquid Phase Atmospheric-Pressure Plasma and Bacteria Inactivation Mechanism. *Plasma Processes Polym.* **12**, 252 – 259.

Shih, K. Y., Locke, B. R. (2010) Chemical and physical characteristics of pulsed electrical discharge within gas bubbles in aqueous solutions. *Plasma Chem. Plasma P.* **30**, 1 – 20.

Shi, X. M., Zhang, G. J., Wu, X. L., Li, Y. X., Ma, Y., Shao, X. J. (2011) Effect of low-temperature plasma on microorganism inactivation and quality of freshly squeezed orange juice. *IEEE T. Plasma Sci.* **39**, 1591 – 1597.

Silhavy, T. J., Kahne, D., Walker, S. (2010) The bacterial cell envelope. *CSH Perspect. Biol.* a000414.

Singh, A., Singh, H. (1982) Time-scale and nature of radiation-biological damage: approaches to radiation protection and post-irradiation therapy. *Prog. Biophys. Mol. Bio.* **39**, 69 – 107.

Singh, S., Brocker, C., Koppaka, V., Chen, Y., Jackson, B. C., Matsumoto, A., Thompson, D. C., Vasiliou, V. (2013) Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilicstress. *Free Radical Bio. Med.* **56**, 89-101.

Song, Y., Yang, R., Guo, Z., Zhang, M., Wang, X., Zhou, F. (2000) Distinctness of spore and vegetative cellular fatty acid profiles of some aerobic endospore-forming bacilli. *J. Microbiol. Meth.* **39**, 225 – 241.

Soriano, J. M., Font, G., Moltó, J. C., Mañes, J. (2002) Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. *Trends Food Sci. Tech.* **13**, 60 – 67.

Soušková, H., Scholtz, V., Julák, J., Kommová, L., Savická, D., Pazlarová, J. (2011) The survival of micromycetes and yeasts under the low-temperature plasma generated in electrical discharge. *Folia Microbiol.* **56**, 77 – 79.

Soušková, H., Scholtz, V., Julák, J., Savická, D. (2012) The fungal spores survival under the low-temperature plasma, 1. izd., Springer, Dordrecht, 57 – 66.

Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C.J. (2012) *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Res. Int.* **45**, 502 – 531.

Stevenson, L. F., Kennedy, B. K., Harlow, E. (2001) A large-scale overexpression screen in *Saccharomyces cerevisiae* identifies previously uncharacterized cell cycle genes. *P. Natl. A. Sci.* **98**, 3946 – 3951.

Struhl, K. (1999) Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell* **98**, 1 – 4.

Sun, Y. H., Zhou, Y. X., Jin, M. J., Liu, Q., Yan, P. (2005) New prototype of underwater sound source based on the pulsed corona discharge. *J. Electrostat.* **63**, 969 – 975.

Surowsky, B., Fröhling, A., Gottschalk, N., Schlüter, O., Knorr, D. (2014) Impact of cold plasma on *Citrobacter freundii* in apple juice: Inactivation kinetics and mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* **174**, 63 – 71.

Szallies, A., Kubata, B. K., Duszenko, M. (2002) A metacaspase of *Trypanosoma brucei* causes loss of respiration competence and clonal death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **517**, 144 – 150.

Škara, J., Nadalin, S., Buretić-Tomljanović, A., Blagović, B. (2016) Izučavanje neurodegenerativnih bolesti na kvascu kao modelnom organizmu. *Medicina Fluminensis: Medicina Fluminensis* **52**, 15 – 27.

Tendero, C., Tixier C., Tristant, P., Desmaison, J., Leprince, P. (2006) Atmospheric pressure plasmas: A review. *Spectrochim. Acta B.* **61**, 2 – 30.

Teparić, R. (2005) Proteini stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae*: mehanizam ugradnje u stijenku i moguće fiziološke funkcije. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

Thirumdas, R., Sarangapani, C., Annapure, U. S. (2015) Cold plasma: a novel non-thermal technology for food processing. *Food Biophys.* **10**, 1 – 11.

Tille, P. (2015) Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology-E-Book, Elsevier Health Sciences.

Tournas, V. H., Heeres, J., Burgess, L. (2006) Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiol.* **23**, 684 – 688.

Turnbull, P. C. B. (1981) *Bacillus cereus* toxins. *Pharmacol. Therapeut.* **13**, 453 – 505.

Ultee, A., Kets, E. P. W., Smid, E. J. (1999) Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen Bacillus cereus. *Appl. Environ. Microb.* **65**, 4606 – 4610.

Van Veldhuizen, E. M., Rutgers, W. R. (2002) Pulsed positive corona streamer propagation and branching. *J. Phys. D Appl. Phys.* **35**, 2169.

Von Mering, C., Krause, R., Snel, B., Cornell, M., Oliver, S. G., Fields, S., Bork, P. (2002) Comparative assessment of large-scale data sets of protein–protein interactions. *Nature* **417**, 399.

Vukušić, T., (2016) Primjena hladne plazme na obradu voćnih sokova. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

Vukusic, T., Shi, M., Herceg, Z., Rogers, S., Estifaee, P., Thagard, S. M. (2016) Liquid-phase electrical discharge plasmas with a silver electrode for inactivation of a pure culture of *Escherichia coli* in water. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **38**, 407 – 413.

Walker, G. M. (2009) Yeasts. Desk Encyclopedia of Microbiology, 2. izd., Elsevier Inc., Dundee.

Wang, J. D., Levin, P. A. (2009) Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 822.

Weigt, M., White, R. A., Szurmant, H., Hoch, J. A., Hwa, T. (2009) Identification of direct residue contacts in protein–protein interaction by message passing. *P. Natl. A. Sci.* **106**, 67 – 72.

Wheeler, K. A., Hurdman, B. F., Pitt, J. I. (1991) Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *Int. J. Food Microbiol.* **12**, 141 – 149.

Williams, D. B., Carter, C. B. (1996) The transmission electron microscope, 1. izd., Springer, Boston.

Willi, J., Küpfer, P., Evéquoz, D., Fernandez, G., Katz, A., Leumann, C., Polacek, N. (2018) Oxidative stress damages rRNA inside the ribosome and differentially affects the catalytic center. *Nucleic Acids Res.* **46**, 1945 – 1957.

Wirth, F., Goldani, L. Z. (2012) Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. *Interdisc. P. Inf. Diseas.*

Yu, H., Perni, S., Shi, J. J., Wang, D. Z., Kong, M. G., Shama, G. (2006) Effects of cell surface loading and phase of growth in cold atmospheric gas plasma inactivation of *Escherichia coli* K12. *J. Appl. Microbiol.* **101**, 1323 – 1330.

Zimmermann, U. (1996) The effect of high intensity electric field pulses on eucaryotic cell membranes: fundamentals and applications, 1. izd., CRC Press, Boca Raton, 1 – 106.

Ziuzina, D., Han, L., Cullen, P. J., Bourke, P. (2015) Cold plasma inactivation of internalised bacteria and biofilms for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* **210**, 53 – 61.

ŽIVOTOPIS

Višnja Stulić mag. ing. rođena je 26. kolovoza 1986. godine u Zadru. Osnovnu školu Petra Zoranića završila je u Ninu, a potom opću gimnaziju Franje Petrića u Zadru. Prediplomski studij Prehrambene tehnologije na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2005. godine. Nakon obrane prvostupanjske titule 2008. godine upisuje diplomski studij Prehrambenog inženjerstva. Titulu magistre inženjerke prehrambene tehnologije stječe 2011. godine pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivana Mijatovića. U 2013. godini započinje s radom kao asistent u Laboratoriju za procesno-prehrambeno inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu. Tijekom rada započinje eksperimentalno istraživanje utjecaja hladne plazme na inaktivaciju mikroorganizama. U proljeće 2014. godine zapošljava se kao analitičar u mikrobiološkom laboratoriju „Euroinspekt-Agroinspekt“ u Zagrebu. Od 2. siječnja 2015. godine zapošljava se u Laboratoriju za procesno-prehrambeno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu kao stručni suradnik na projektu „Application of electrical discharge plasma for preservation of liquid foods“. U akademskoj godini 2014./2015. upisuje doktorski studij „Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Zorana Hercega. Od lipnja 2017. godine zapošljava se kao znanstveni novak/asistent u istom laboratoriju. Tijekom studija u 2017. godini kao dobitnica Stipendije Vlade Republike Francuske i Erasmus + studijskog boravaka usavršava se tri mjeseca na Sveučilištu u Avignonu, Francuska pod mentorstvom prof. dr. sc. Farid Chemata. Provedeno usavršavanje temeljilo se na odabiru zelenih otapala za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz mediteranskog bilja.

Kao asistent sudjeluje u izvođenju laboratorijskih i terenskih vježbi te seminara na modulima: Fizikalna svojstva složenih sustava hrane, Procesi konzerviranja hrane, Prehrambeno-procesno inženjerstvo I, Prehrambeno-procesno inženjerstvo II. Također sudjeluje u izradi završnih i diplomskih radova. Objavila je sedam znanstvenih radova iz skupine a_1 i jedan rad iz skupine a_2. Sudjelovala je na sedam međunarodnih znanstvenih skupova te dvije međunarodne radionice.

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

Znanstveni radovi iz skupine a1

1. **Stulić, V**., Vukušić, T., Jambrak, A. R., Bačun-Družina, V., Popović, D., Mrvčić, J., Herceg, Z. (2018) Quantitative microbial assessment for *Escherichia coli* after treatment by high voltage gas phase plasma. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol*. Rad prihvaćen za objavu. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.08.007

2. Giacometti, J., Kovačević, D. B., Putnik, P., Gabrić, D., Bilušić, T., Krešić, G., **Stulić, V.,** Barba, F.J., Chemat, F., Barbosa-Canovas, G., Jambrak, A. R. (2018) Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. *Food Res. Int*. **113**, 245 – 262.

3. Van Impe, J., Smet, C., Tiwari, B., Greiner, R., Ojha, S., **Stulić, V.,** Vukušić, T., Režek Jambrak, A. (2018) State of the art of nonthermal and thermal processing for inactivation of micro-organisms. *J. Appl. Microbiol.* **125**, 16 – 35.

4. Kujundžić, D., Jambrak, A. R., Vukušić, T., **Stulić, V.,** Kljusurić, J. G., Banović, M., & Herceg, Z. (2017). Near-infrared spectroscopic characterization of steviol glycosides extracted from Stevia rebaudiana Bertoni using high-power ultrasound and gas-phase plasma. *Journal of Food & Nutrition Research*, **56**, 109 – 120.

5. Ćurko, J., Matošić, M., Crnek, V., **Stulić, V.,** Mijatović, I. (2016) Adsorption Characteristics of Different Adsorbents and Iron (III) Salt for Removing As (V) from Water. *Food Technol. Biotech.* **54**, 250 – 255.

6. Herceg, Z., Režek Jambrak, A., Vukušić, T., **Stulić, V.,** Stanzer, D., Milošević, S. (2015) The effect of high-power ultrasound and gas phase plasma treatment on *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. count in pure culture. *J. Appl. Microbiol.* **118**, 132 – 141.

7. Jambrak, A. R., Vukušić, T., **Stulić, V.,** Mrvčić, J., Milošević, S., Šimunek, M., Herceg, Z. (2015) The effect of high power ultrasound and cold gas-phase plasma treatments on selected yeast in pure culture. *Food Bioprocess Tech.* **8**, 791-800.

Znanstveni radovi iz skupine a2

1. Vukušić, T., **Stulić, V.,** Režek Jambrak, A., Milošević, S., Stanzer, D., Herceg, Z. (2016) Effect of treatment by non-thermal plasma jet on the growth of various food spoilage bacteria in superfluous. *Croatian Journal of Food Science and Technology,* **8**, 20 – 29.