

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno – biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Ana Mandura

6625/PT

PRIMJENA HLADNE PLAZME U INAKTIVACIJI
MIKROORGANIZMA ČISTE KULTURE *E.coli*
ZAVRŠNI RAD

Modul: Prehrambeno-procesno inženjerstvo 1.

Mentor: prof.dr.sc. Zoran Herceg

Zagreb, 2016.

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procesno-prehrambeno inženjerstvo**

**PRIMJENA HLADNE PLAZME U INAKTIVACIJI MIKROORGANIZMA ČISTE
KULTURE *E.coli***

Ana Mandura, 6625/PT

Sažetak: Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj hladne plazme na stupanj redukcije, oksidacijski stres stanica *E. coli* i fiziološke čimbenike (pH, temperaturu, konduktivnost i slobodnih radikale) tretiranih uzoraka. Uzorci su tretirani hladnom plazmom pri frekvencijama od 60, 90 i 120 Hz u trajanju od 5 i 10 min.

Tehnologija hladne plazme pokazala se efikasnom za postizanje potpune redukcije broja mikroorganizama. Dužim tretmanom i povećanjem frekvencije, došlo je do smanjenja pH vrijednosti i povećanja temperature i konduktivnosti otopine. Također, utvrđen je povišeni oksidacijski stres u bakterijskim stanicama. Osim redukcije, nakon tretmana postignuto je istjecanje staničnih makromolekula kao posljedica elektroporacije stanica. Bakterijske stanice su se rekuperirale nakon 18 h pri temperaturi inkubacije od 30°C.

Ključne riječi: hladna plazma, *E. coli*, redukcija, oksidacijski stres, rekuperacija

Rad sadrži: 26 stranica, 10 slika, 7 tablica, 32 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof.dr.sc. Zoran Herceg

Pomoć pri izradi: Višnja Stulić, mag.ing.

Tomislava Vukušić, mag. ing.

Rad predan: lipanj, 2016.

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Food Technology
Department of Food Engineering
Laboratory for Food-Process Engineering

Application of cold plasma treatment on inactivation of microorganism *E.coli* in pure culture

Ana Mandura, 6625/PT

Abstract: The aim of this study was to investigate the influence of cold plasma treatment on degree of reduction, oxidative stress of cells *E. coli* and physiological factors (pH, temperature, conductivity, free radicals) in treated samples. The samples were treated with cold plasma at frequencies of 60, 90 and 120 Hz during 5 and 10 minutes.

Cold plasma technology was proved as the effective method for complete reduction of microorganisms. Longer treatment time with higher frequency showed decrease of pH value, increase of temperature and solution conductivity. Also, increased oxidative stress was found in bacterial cells. Except reduction, leakage of cellular macromolecules was achieved after treatment as a result of electroporation of cells. Cells were recovered after 18 h of incubation at 30 °C.

Keywords: cold plasma, *E.coli*, reduction, oxidative stress, recuperation

Thesis contains: 26 pages, 10 figures, 7 tables, 32 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Ph.D. Zoran Herceg , Full professor

Technical support and assistance: Višnja Stulić, mag. MSc
Tomislava Vukušić, MSc

Thesis delivered: June, 2016.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. DEFINICIJA PLAZME	2
2.1.1. POBUĐIVANJE PLAZME I OSNOVNA PODJELA.....	2
2.2. <i>Escherichia coli</i>	4
2.3. UTJECAJ PLAZME NA MIKROORGANIZME	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO	8
3.1. MATERIJALI.....	8
3.1.1. UZORCI	8
3.1.2. HRANJIVE PODLOGE	8
3.1.3. PRIBOR I APARATURA.....	9
3.2. METODE RADA.....	9
3.2.1. PRIPREMA UZORKA.....	9
3.2.2. PRIPREMA PODLOGA.....	10
3.2.3. NAČIN GENERIRANJA HLADNE PLAZME.....	10
3.2.4. ODREĐIVANJE pH I ELEKTRIČNE PROVODNOSTI.....	12
3.2.5. METODA ODREĐIVANJA SLOBODNIH RADIKALA.....	12
3.2.6. METODA ODREĐIVANJA ISTJECANJA UNUTARSTANIČNOG SADRŽAJA PRI 260/280 nm.....	13
3.2.7. ODREĐIVANJE BROJA ŽIVIH STANICA MIKROORGANIZAMA...	13
3.2.8. REKUPERACIJA MIKROORGANIZAMA.....	14
3.2.9. PROVOĐENJE EKSPERIMENTA.....	14
4. REZULTATI	16
5. RASPRAVA	19
6. ZAKLJUČCI	22
7. REFERENCE	23

1. UVOD

Primjena učinkovitih i neinvazivnih tehnologija uz upotrebu kontrolirano uzgojene sirovine presudni su faktori za dobivanje kvalitetnog i tržišno prihvatljivog proizvoda. Nove tehnologije već nizom godina zamjenjuju konvencionalne metode za procesiranje hrane zbog niza ekoloških i ekonomskih kvaliteta; brže su u izvođenju, omogućavaju ekološki i ekonomski prihvatljivu proizvodnju te su se pokazale kao iznimno učinkovite u pogledu inaktivacije mikroorganizama, istodobno zadržavajući kvalitetu hrane. Primjer takve nekonvencionalne tehnologije je hladna plazma; primjenjivana kao netermalni postupak inaktivacije mikroorganizama uz istovremeno očuvanje nutritivne i senzorske vrijednosti, ali i svježine proizvoda. Godinama se koristila za sterilizaciju osjetljivih materijala, a svoju ulogu polagano pronalazi i u prehrambenoj industriji. Pogodna je i za inaktivaciju endogenih enzima (polifenoloksidaze, peroksidaze) koji uzrokuju posmeđivanje proizvoda.

Cilj prehrambenog tehnologa je, pored zdravstveno ispravnog i senzorski kvalitetnog, dobiti mikrobiološki ispravan proizvod. Mikroorganizmi, poput plijesni i patogenih bakterija, glavni su izvor kontaminacije namirnice. Svojim enzimskim aktivnostima narušavaju njihovu kvalitetu i potencijalno izazivaju oboljenja kod ljudi tijekom konzumacije kontaminiranog proizvoda.

Escherichia coli primjer je takvog mikroorganizma. Pripada skupini široko rasprostranjenih štapićastih bakterija koje normalno žive u probavnom traktu sisavaca. Iako je većina podvrsta bezopasna, neki sojevi u ljudskom organizmu mogu se ponašati kao nametnici koji uzrokuju brojne zdravstvene tegobe. Prenosi se lako, zaraženom vodom i hranom te se inaktivira povišenom temperaturom.

Cilj rada bio je utvrditi utjecaj fizioloških čimbenika (pH, temperature, konduktivnosti, slobodnih radikala), stupanj redukcije i oksidacijski stres stanica *E. coli* tretiranih hladnom plazmom u čistoj kulturi te zaključiti može li se primjenom hladne plazme postići redukcija, a potom i spriječiti rekuperacija tretiranih stanica.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. DEFINICIJA PLAZME

Plazma se odnosi na četvrto stanje materije; uz tekućine, krutine i plinove. Sam termin prvi je upotrijebio Irving Langmuir 1928. te ju je definirao kao parcijalni ili potpuno ionizirani plin (Langmuir, 1928).

Sastoji se od pozitivno i negativno nabijenih iona i elektrona, neutralnih atoma i molekula. Plazma je kvazineutralni plin, što znači da makroskopski gledano ne posjeduje električni naboj, no sadrži nosioce naboja i kao takav dobro provodi električnu energiju i reagira na elektromagnetska polja (Tendero i sur., 2006).

Uzrok ionizacije molekula koje tvore plazmu je povećanje dovoda energije ispod određene granice koja prevodi krutinu preko tekućine u plinovito stanje (Luo i sur., 1998).

2.1.1. POBUĐIVANJE PLAZME I OSNOVNA PODJELA

Da bi narušili strukturu krute tvari, potrebno je prevladati energiju veza između molekula od kojih je ona građena. Dovođenjem toplinske energije veće od energije veza, dolazi do prevođenja krutine u tekuće stanje. Daljnjim povećanjem količine topline, tekućina prelazi u plin (sustav molekula koje titraju i sudaraju se), a molekule pare disociraju u atome. Pri još većoj toplinskoj energiji, disocirani atomi se ioniziraju, tj. pri sudarima se razdvajaju na elektrone i pozitivno nabijene ione. Nosioci naboja tako stvaraju električna i magnetska polja koja pri strujanju utječu na sve čestice u sustavu. Takvo stanje materije nazivamo plazma. Percipiramo ju kao iskrinu nastalu kao posljedica formiranja električne veze između dvije elektrode od kojih se jedna ponaša kao anoda (privlači negativne čestice), a druga kao katoda (privlači jezgru atoma) (Bogaerts i sur., 2002).

Sudar elektrona i neutralnog atoma stvara nove elektrone i pozitivno nabijene ione. Oni mogu biti elastični (kinetička energija se ne mijenja) i neelastični (elektroni gube energiju koja se prenosi na česticu). Iako se elastičnim sudarima ne ostvaruju pobuđenja atoma i molekula, onimaju veliku ulogu u električnoj vodljivosti plazme. Kod neelastičnih sudara dolazi do prijelaza kinetičke energije sudarajućih čestica u unutrašnju energiju; oni su ujedno i presudni jer dovode do ionizacije atoma. Energije pobude atoma iznose od minimalno oko 1.5 do 4-5 eV, dok se energije ionizacije kreću od oko 5- 15 eV (Bárdos i sur., 2010).

Plazma može biti generirana različitim oblicima energije: toplinskom, primjenom električnog i magnetskog polja te mikro i radio valovima. Svi oblici djeluju na povećanje ukupne kinetičke energije elektrona i posljedično na povećanje broja sudara u samom plinu formirajući na taj način komponente plazme poput iona, elektrona, radikala i radijacije različitih valnih duljina, uključujući i one u UV rasponu.

Koncepti za generiranje plazme uključuju(Tendero i sur.,2006):

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

Ovisno o dizajnu, pražnjenja mogu biti kontinuirana i pulsirajuća. U pulsirajućem načinu rada razlikujemo koronalno pražnjenje (eng. *corona discharge*) i pražnjenje izolatorske pregrade (eng. *dielectric barrier discharge – DBD*).

Koronalno pražnjenje jedan je od najboljih načina produkcije hladne atmosfere plazme. Očituju je manji početni troškovi u odnosu na ostale načine proizvodnje plazme koji su ujedno i kompleksniji. Kemijski sastav plazme generiran na atmosferskom tlaku koronalnim pražnjenjem još nije u potpunosti razjašnjen. Poznato je da su prisutne reaktivne čestice poput vodikovog peroksida, hidroksil i hidroperoksilnih radikala, dušikovih kationa i oksida te drugih dušikovih spojeva te neutralnih čestica poput atomskog kisika, ozona i singletnih oblika kisika (Pontiga, 2002. iJoshi, 2011) koje se ponašaju kao snažni oksidansi (Deng, 2007).

Plazme se klasificiraju prema više kriterija: temperaturi i tlaku plina pri kojem nastaje plazma, energiji i gustoći nabijenih čestica.

Prema temperaturi pri kojoj se primjenjuju, plazme se dijele na vruće i hladne.

U vrućoj plazmi, temperatura čestica je jednaka u svim dijelovima plazme, tj.postignuta je termodinamička ravnoteža u sustavu (eng. *LTE – local thermodynamic equilibrium*), dok je u hladnoj plazmi temperatura elektrona veća od temperature iona i neutralnih čestica pa se još naziva i neravnotežna plazma (eng. *non-local thermodynamic equilibrium plasma*)(Schlüter i sur., 2013).

S obzirom na radni tlak plina, plazme možemo podijeliti u dvije skupine: niskotlačne i atmosfere (Rahman i sur., 2014).

2.2. *Escherichia coli*

Jedna od najpoznatijih predstavnika porodice Enterobacteriaceae upravo je ova gram-negativna bakterija, štapićastog oblika i jedan od glavnih stanovnika donjeg probavnog trakta sisavaca. Fakultativni je anaerob, što znači da preživljava i u uvjetima u kojima se nalazi kisik, ali može rasti i bez njega. Kao izvor hrane koristi različite supstrate, a produkti metabolizma su laktati, etanol, ugljikov dioksid, acetati i sukcinati.

Optimalna temperatura za njen rast je 37 °C, iako se neki laboratorijski sojevi mogu razvijati i na temperaturi većoj od 49 °C. Za ovu mezofilnu bakteriju, optimalna pH vrijednost je oko 7, iako postoje i određeni sojevi poput *Escherichie coli* 0157: H7, tj. Shiga toxin-producing *E. coli*, čiji je optimum pH vrijednosti 4,5 (Duraković i sur., 2002). Osjetljiva je na toplinske tretmane iznad 70°C (Krauss i sur., 2003), a inaktivirati ju može i ozon (Wickramanayake i Weavers, 2001). Izvandomaćina može preživjeti od 1,5 sati do 16 mjeseci na suhim površinama (Kramer, Schwebke i Kampf, 2006) dok joj je vrijeme inkubacije (razdoblje od trenutka unosa patogena pa do prve pojave simptoma) od 6-48 sati (Chao i Chen., 2006).

Nekoliko tipova ove bakterije se nalazi u crijevnoj flori čovjeka blagotvorno utječući na probavu, kao što je produkcija vitamina K2 i prevencija od razvoja patogenih bakterija.

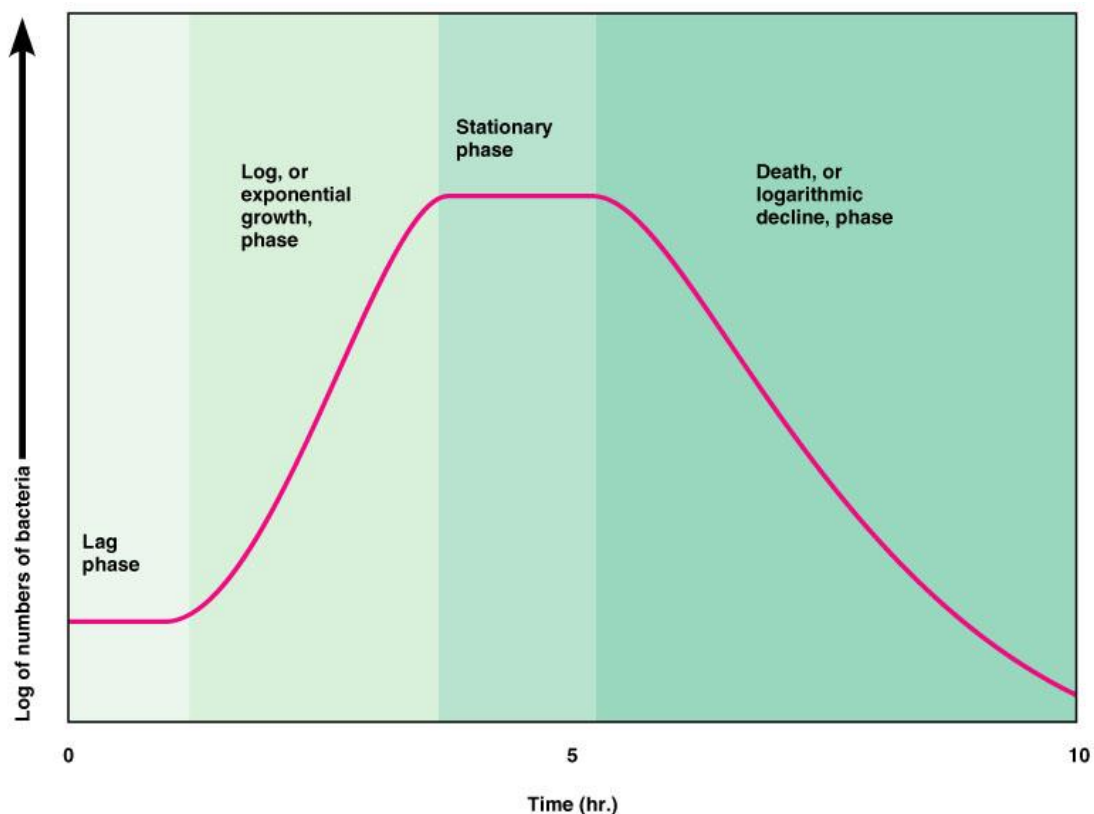
Međutim, određeni sojevi *E. coli* su izrazito opasni po čovjeka uzrokujući urinarne infekcije, trovanje hranom, meningitis kod novorođene djece i dr., a to su: Shiga toxin-producing *E. coli*, enteroinvasive *E. coli*, enteroaggregative *E. coli*, enteropathogenic *E. coli*, enterotoxigenic *E. coli* i diffusely adherent *E. coli* (Center for disease control and prevention, 2015).

Najistraživaniji je prokariot i glavni modelni mikroorganizam u biotehnologiji i mikrobiologiji.

Kinetika njezinog rasta može se podijeliti na 4 faze prikazane grafički na Slici 1.

- ✓ lag faza - u prvoj fazi, mikroorganizmi prolaze kroz prilagodbu na okruženje, s blagim smanjenjem njihovog broja zbog nastalog stresa te se njihov broj ne povećava.
- ✓ log faza - tokom 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 (Marriott i Gravani, 2006).

- ✓ 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 (Marriott i Gravani, 2006).
- ✓ faza odumiranja - količina bakterija se ispočetka sporo smanjuje, a zatim se naglo ubrzava po eksponencijalnom stupnju. Uzroci su: nepovoljni energetske uvjeti, nedostatak nutrijenata i nagomilavanje metaboličkih nusprodukata.



Slika 1. Prikaz mikrobnog rasta podijeljenog u faze (Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings, 2004)

E.coli pripada nesporulirajućim bakterijama koje nemaju mogućnost stvaranja rezistentnog oblika spore tokom nepovoljnih uvjeta (promjena pH, temperature, osmotskog tlaka, nedostatak hrane, smanjen aktivitet vode) u cilju preživljavanja. Međutim, takvi

mikroorganizmi su razvili drugačiji sistem opstanka u uvjetima nedostatka razvojnih čimbenika.

Prema Hengge-Aronis-u (1996), nesporulirajuće bakterije prilikom ulaska u stacionarnu fazu rasta, kao odgovor na novonastale uvjete gladovanja, prolaze kroz niz morfoloških i fizioloških promjena. U ovoj fazi moguća su dva ishoda za bakterijsku kulturu. Ukoliko se populacija stanica ne prilagodi na uvjete, kultura stanica ulazi u fazu odumiranja, međutim, ukoliko populacija stanica uvede promjene u svoj metabolizam koji će joj omogućiti rast u novonastalim uvjetima, takva će populacija nastaviti živjeti u produljenoj stacionarnoj fazi rasta koja može trajati i do pet godina (Finkel i Kolter, 1999). Takva vrsta mehanizma drastičnog smanjenja metaboličke aktivnosti i povećanja rezistencije na stres zove se GASP (*Growth Advantage in Stationary Phase*), tj. prednost rasta u stacionarnoj fazi.

Kolter i suradnici primijetili su da bakterijske stanice *E. coli* imaju mogućnost preživljavanja u produženoj stacionarnoj fazi. Kada bakterijska populacija umire kao rezultat gladovanja, postoje bakterijske stanice koje se mogu bolje prilagoditi nastalim uvjetima. Takvi mutanti mogu bolje iskoristiti siromašne izvore hranjivih tvari koje su nastale od mrtvih stanica, a zovu se GASP mutanti.

Enterobakterije poput *E. coli* mogu opstati u vrlo različitim uvjetima i opremljene su s velikim brojem regulatornih mehanizama koji reagiraju na promjene u okolišu. Izgladnjele kulture ove bakterije su visoko dinamične i podvrgnute stalnim genetičkim promjenama. Stanica će zamijeniti rast za rezistenciju na stresne uvjete i to je mehanizam koji će joj pomoći da opstane (Vulić i Kolter, 2001).

Ulazak *E. coli* u stacionarnu fazu je u velikoj mjeri regulirana sa σ^S podjedinicom RNA polimeraze (enzima koji katalizira transkripciju DNA) koja pozitivno ili negativno utječe na ekspresiju preko 70 gena. Glavni determinirajući faktor za indukciju σ^S podjedinice je količina hranjivih sastojaka, kao i broj prisutnih stanica koji mogu koristiti raspoložive hranjive tvari. Dakle, stanice mogu odgovoriti kao populacija na promjenu u njihovom okolišu i ostvariti koordiniranu tranziciju u stacionarnu fazu. Ulazak u stacionarnu fazu može se opisati kao stanje nalik spori u kojem stanica koristeći minimalne količine hrane uspijeva preživjeti dugi period vremena, izdržavajući mnoge napade iz okoliša (Vulić i Kolter, 2001).

2.3. UTJECAJ PLAZME NA MIKROORGANIZME

Tretman plazmom može efektivno inaktivirati širok spektar mikroorganizama, uključujući spore (Feichtinger i sur., 2003) i viruse (Lee, 2006). Prema Feichtingeru (2003), hladna plazma je učinkovita u primjeni površinske sterilizacije i dezinfekcije djelujući na vegetativne stanice i spore u kratkom vremenu.

Kemijski sastav plazme se sastoji od slobodnih radikala i radijacija izazvanih djelovanjem UV i vidljivog dijela spektra. Jedna od posljedica uništenja mikroba pomoću UV zračenja je isparavanje pojedinih komponenti spora i njihova adsorpcija na površinu zbog velikog afiniteta istih prema slobodnim radikalima (Philip i sur., 2002). Uspješno se primjenjuje na svježim namirnicama s ciljem produljenja svježine i skladištenja. Primjeri su: tretiranje sirovog mlijeka kontaminiranog sa *E.coli* u vremenu od 3 minute nakon čega je dokazana njena redukcija od čak 54% (Gurol i sur.,2012). Primjena hladne plazme na svježim jagodama nakon čega je uočeno smanjenje prisutnosti kvasaca i plijesni za 44-95% i mezofila za 12-85% (Misra i sur., 2014).

Efikasnost tretmana ovisi o nizu čimbenika kao što su: površina tretiranog materijala, vrijeme tretiranja, sastav plina i sam uređaj plazme (Fernandeza i sur. 2012;Ziuzina i sur. 2014). Utjecaj plazme na mikroorganizme očituje se preko generiranih iona i nastalih staničnih interakcija nakon same primjene. Novonastale reaktivne vrste u plazmi direktno se povezuju sa oksidacijskim efektom nastalim na površini stanica.

Aplikacija plazme temelji se na činjenici da nastali slobodni radikali i ioni direktno oštećuju DNA i RNA. Wiseman i Halliwell (1996) iznijeli su rezultate kojima potvrđuju formiranje mehanizma djelovanja plazme pomoću stvaranja ROS-a (reaktivnih kisikovih čestica) koje djeluju na okruženje DNA u samom nukleusu. Stvaraju se superoksidni anioni, hidroksil radikali i vodikov peroksid. Zatim se novonastale reaktivne čestice vežu na vodu tvoreći sve više hidroksilnih radikala koji su dokazano najreaktivniji i najštetniji za stanicu. Formiranjem hidratacijskog sloja oko DNA molekule, uzrokuju čak 90% cjelokupnog oštećenja. Nadalje, reagiraju sa nukleinskim bazama u lancima DNA pri čemu dolazi do njihove oksidacije što vodi do destrukcije staničnih membrana i ostalih komponenata (Azis i sur. 2014).

Mikroorganizmi su izloženi intenzivnom bombardiranju slobodnih radikala koji stvaraju površinske lezije na stanicama stupajući u interakciju sa molekulama supstrata. Stanica ih u tako kratkom roku ne može dovoljno obnoviti, s vremenom dolazi do njihovog nakupljanja

što dovodi do stvaranja elektrostatske sile koja na vanjskoj strani membrana uzrokuje tzv. elektropermeabilizaciju – propusnost staničnih membrana izazvanih električnim impulsima (Fridovitch,1995. Laroussi i sur. 2003,Mendis i sur.2002, Toepfl i sur.2006). Dolezalova i Lukes su svojim eksperimentom dokazali da je peroksidacija lipidnih membrana u stanici pomoću hladne plazme uvelike bitna za bakterijsku inaktivaciju. Povezali su i količinu stvorenog malondialdehida koji sudjeluje u stvaranju nepovoljnog okruženja za oštećenje DNA sa povećanom propusnosti membrane *E.coli* kao uzroka inaktivacije stanica primjenjujući plazmu.

Tako je provedeno istraživanje korištenjem CDPJ (eng, Corona discharge plasma jet) pri inaktivaciji *E.coli* i *Listeria monocytogenes* prethodno inokuliranih u modelni supstrat svinjetine u svježem i smrznutom obliku jer *E.coli* može opstati duže vrijeme na niskim temperaturama. Rezultati istraživanja su provedeni 48 sati nakon tretmana pri iznosima frekvencija od 0,30,60,90 i 120 Hz, a pokazano je da se *E.coli* reducirala za 96,84% pri frekvenciji od 120 Hz te se pokazala osjetljivijom na hladnu plazmu pri nižim frekvencijama od *L.monocytogenes* (Vieira, 2009, Leygonie, 2012).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. *E.coli*

Čista kultura *E.coli*MG1665 preuzeta je iz banke mikroorganizama - Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama te je naciepljena u Nutrient bujon (Biolife, Milan, Italija) iz 50% glicerola. Otopina natrijevog nitrata provodnosti 100 μ S/cm pripravljena je od destilirane vode i dehidriranog natrijevog nitrata (Sigma Aldrich).

3.1.2. HRANJIVE PODLOGE

Korišten je Nutrient agar (Biolife, Milan, Italija) za naciepljivanje uzoraka čiste kulture *E.coli*MG1655. Kao podloga za tretirani mikroorganizam pri praćenju postotka rekuperacije korištena je puferirana peptonska voda (Biolife, Milan, Italija).

3.1.3. PRIBOR I APARATURA

- Petrijeve zdjelice
- Mikropipeta
- Nastavci za mikropipete
- Kivete
- Tehnička vaga „Axis“
- Vortex IKA Vortex 4 basic
- Centrifuga Tehtnics Centric 150
- Termostat BTES
- Autoklav „Sutjeska“ , serija 1-62-161
- Laminar „Cleanroom technology“
- Spektrofotometar Secoman Uviline 9400
- Digitalni pH metar HANNA edge
- Osciloskop Hantek DS05202BM
- Frekvenciometar Teco FM50 Fluxmaster
- Infracrveni mjerač „PCE instruments PCE-777“, No.12121199
- Električni motor Tti Motors
- Generator Spellman: SLM-30-P-1200; 0-30 Kv, 40 mA, 1200 W
- Natrijev nitrat, dehidrirani (Sigma Aldrich)
- Nutrient bujon/agar
- Puferirana peptonska voda
- Fosfatni pufer sljedećeg sastava: natrijev klorid (NaCl), kalijev klorid (KCl), natrijev hidrogenfosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), destilirana voda, klorovodična kiselina (HCl) (Kemika)

Priprema: Izvagalo se 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.62 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, i 0.24 g KH_2PO_4 u 900 mL destilirane vode. Sa HCl-om se podesio pH na 7.4 te se nadopunio do 1000 mL destiliranom vodom. Pripremljena otopina autoklavirala se pri 121 °C kroz 15 min. Autoklavirana otopina čuva se pri +4 °C kroz 3 mjeseca.

3.2. METODE RADA

3.2.1. PRIPREMA UZORKA

Za pripremu uzorka koristila se čista kultura *E.coli* MG 1655, koja je čuvana u 50 % glicerolu pri -20 C. 20 µL naciepljeno je u 10 mL Nutrient bujona. *E. coli* nakon 18 sati ulazi u stacionarnu fazu najpogodniju za tretiranje.

Procesi pripreme obuhvaćali su: vorteksiranje (vrtložno/kružno miješanje), centrifugiranje (sedimentacija čestica pomoću centrifugalne sile) i ispiranje u PBS-u i destiliranoj vodi. Centrifugiranje je provedeno pri 4000 RPM-a u vremenu od 10 min. Uzorak je ispran sa 10 ml PBS-a, uključujući ponovno vorteksiranje i centrifugiranje. Nakon toga je primijenjeno posljednje ispiranje sa 10 ml destilirane vode.

Tako pripremljeni uzorak volumena 10 ml pomiješali smo sa 190 ml otopine natrijevog nitrata i destilirane vode provodnosti 100 µS/cm te ga tretirali hladnom plazmom.

3.2.2. PRIPREMA PODLOGA

Za uzgoj netretirane *E.coli* korišten je Nutrient bujon (Biolife, Milan, Italija) pripremljen suspendiranjem 8g dehidriranog praha u 1000 ml destilirane vode. Otopina se miješala i zagrijavala do vrenja nakon čega se sterilizirala u autoklavu pri 121 °C kroz 15 minuta.

Za naciepljivanje uzoraka korišten je Nutrient agar (Biolife, Milan, Italija) pripremljen suspendiranjem 8 g dehidriranog praha i 10 g agara (Biolife, Milan, Italija) u 1000 ml destilirane vode. Podloga se autoklavirala pri 121 °C kroz 15 minuta. Nakon autoklaviranja, podloga se razlila u pripremljene Petrijeve zdjelice. Razlijevanje i označavanje podloga provelo se u laminaru pri sterilnim uvjetima.

Za praćenje rekuperacije korištena je puferirana peptonska voda (Biolife, Milan, Italija). Dehidrirani prah (20 g) otopio se u 1000 ml destilirane vode te se autoklavirao pri 121 °C na 15 min.

3.2.3. NAČIN GENERIRANJA HLADNE PLAZME

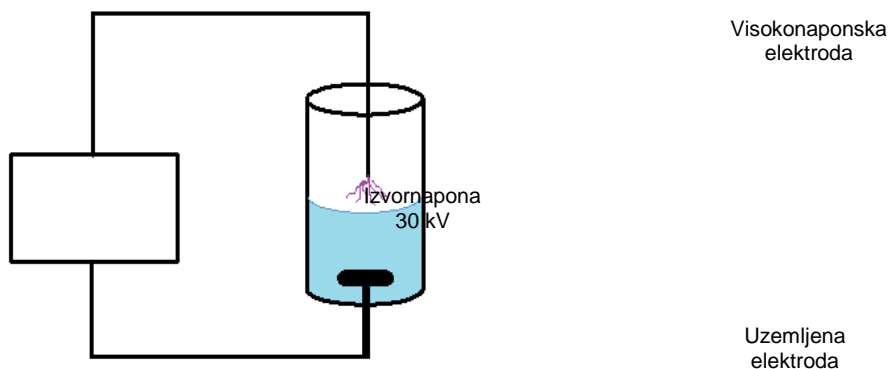
Za generiranje plazme korišten je pulsni visokonaponski generator (Spellman, UK). Tijekom eksperimenta je varirana frekvencija (60, 90, 120 Hz), a izlazni napon bio je 30 kV s kondenzatorom kapaciteta 0,75nF. Napon je mjeren naponskom sondom Tektronix P6015A spojenim na osciloskop Hantek DS05202BM. Reaktor je bio volumena 1000 ml, s gumenim čepom s prilagođenim otvorom za elektrodu uzemljenja. Konfiguracija elektroda u reaktoru bila je postavljena u obliku točka-ploča, odnosno s igličnom visokonaponskom elektrodom (titan elektroda), te pločastom elektrodom uzemljenja od nehrđajućeg čelika promjera 4,5 cm. Plazma je generirana u plinskoj fazi gdje je visokonaponska elektroda od titana bila smještena iznad razine tekućine, a uzemljena elektroda ispod razine tekućine (slika 3.). Kao operativni plin je upuhivan je argon čistoće 99,9%.



Slika 2. Sustav za generiranje plazme u tekućini visokonaponskim pražnjenjem: A) reaktor, B) pumpa, C) visokonaponski generator D) kontrolna jedinica za napajanje, E) otpornici 9,5 M Ω F) kondenzator 0,75 nF G) rotirajuća sklopka, H) elektromotor s regulatorom frekvencije



Slika 3. Tretman čiste kulture *E.coli* plazmom generiranom u plinskoj fazi



Slika 4. Shematski prikaz pražnjenja u plinskoj fazi

3.2.4. ODREĐIVANJE pH I ELEKTRIČNE PROVODNOSTI

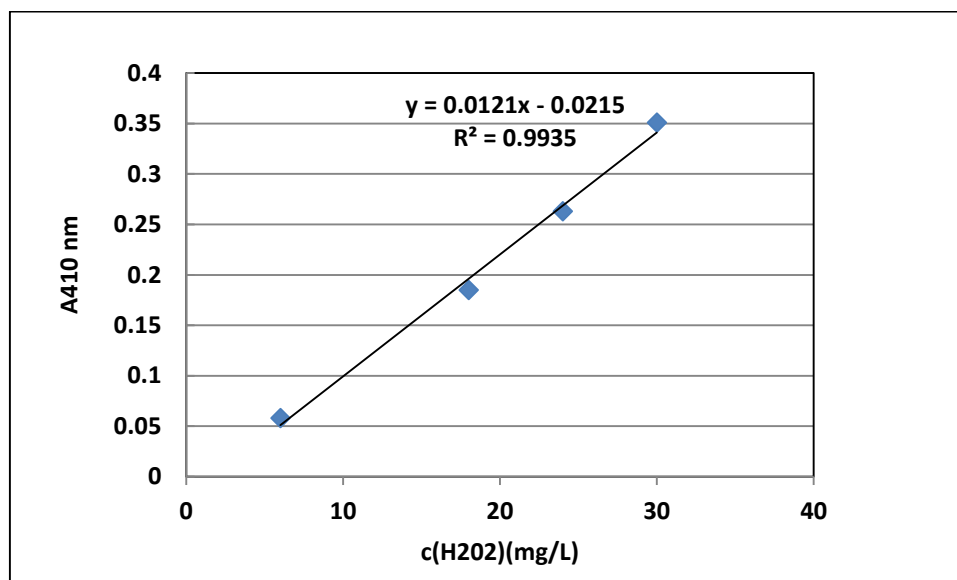
Vrijednosti pH i provodnosti određivane su prije i nakon tretiranja na digitalnom pH-metru HANNA edge. Mjerenje se vršilo tako da su se elektrode uronile u uzorak te su se nakon stabilizacije očitavale izmjerene vrijednosti.

3.2.5 METODA ODREĐIVANJA SLOBODNIH RADIKALA

Slobodni radikali određivali se se spektrofotometrijski pri 410 nm nakon tretmana hladnom plazmom. 1 mL uzorka dodao se u 2 mL pripremljene titanijeve otopine. U prisustvu nastalih

slobodnih radikala H_2O_2 , uzorak se obojio u žuto. Koncentracija vodikovog peroksida očitala se na osnovu baždarnog pravca prikazanog na Slici 5.

Titan otopina pripremila se na sljedeći način: 1 g titanijevog praha (npr. titanijev (IV) oksida, Sigma Aldrich, CAS: 13463-67-7) pomiješan je sa 100 mL vruće sumporne kiseline u omjeru 1:1. Smjesa je zagrijavana do oko 190 °C i miješana oko 20 h. Titanij je otopljen kada se početna bijela otopina obezboji (moguće je po potrebi dodati destilirane vode tijekom zagrijavanja ako udio tekućine značajno opadne). Pripremljena otopina ohladila se na sobnoj temperaturi te je razrijeđena sa 500 mL destilirane vode . Otopina je čuvana u hladnjaku pri +4 °C.



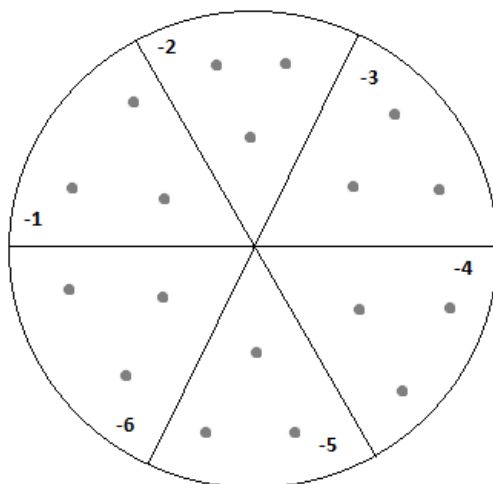
Slika 5. Ovisnost apsorbanije (nm) o koncentraciji vodikovog peroksida (mg/L)

3.2.6. METODA ODREĐIVANJA ISTJECANJA UNUTARSTANIČNOG SADRŽAJA PRI 260/280 nm

Za određivanje istjecanja unutarstaničnog sadržaja primjenjena je spektrofotometrijska metoda pri 260 i 280 nm. Profiltriralo se 3 mL uzorka kroz filter pora 0,25 μ m (CHROMAFIL Xtra PTFE-20/25 filter (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Duren, Germany) te se izmjerila apsorbanija pri zadanim valnim duljinama. Ovom metodom promatra se istjecanje staničnih makromolekula, nukleinskih kiselina i proteina.

3.2.7. ODREĐIVANJE BROJA ŽIVIH STANICA MIKROORGANIZAMA

Metoda se bazira na porastu pojedinačnih kolonija mikroorganizama iz svake žive stanice . U ovom slučaju, određivan je porast čiste kulture *E.coli* prije i nakon tretiranja hladnom plazmom. Svaki uzorak razrijeđen je u otopini PBS-a u omjeru 1:9, što znači da se 10 μL uzorka dodalo u 90 μL PBS-a. Učinjena je serija decimalnih razrjeđenja do na -6. Volumen uzorka od 10 μL nacijepljen je u seriji po 3 puta svakog razrjeđenja, kao što je okvirno prikazano na slici 6. (točke označene sivom bojom u svakom odjeljku predstavljaju nanaseni uzorak u Petrijevoj zdjelici).Uzorci su inkubirani pri 37 °C. Na isti način praćena je rekuperacija bakterije nakon 3h i 18 h.



Slika 6. Prikaz metode nacijepljivanja tretiranog uzorka *E.coli* u Petrijevoj zdjelici

Broj poraslih kolonija izražava se kao CFU vrijednost (Colony Forming Units) (CFU/mL. [1]). Iz serije decimalnih razrjeđenja izračunat je početni broj živih stanica mikroorganizama, kao i konačni broj nakon tretmana. Rezultati su prikazani kao log CFU/mL.

$$CFU = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{volumen uzorka}} \times \text{recipročna vrijednost decim. razrjeđenja (CFU/mL)} [1]$$

3.2.8. REKUPERACIJA MIKROORGANIZMA

Tokom eksperimenta praćena je rekuperacija *E.coli*, odnosno, mogućnost preživljavanja u stacionarnoj fazi osiromašenoj hranjivim sastojcima. Naćin njene prilagodbe u stresnim uvjetima opisan je u odjeljku 2.2. ovog rada.

Nakon tretiranja uzorka, uzet je 1 ml uzorka i inokuliran je u 9 ml peptonske vode. Takav uzorak inkubiran je na 30 °C te je nacijepljivan na hranjivu podlogu nakon 3 i 18 h..

3.2.9. PROVOĐENJE EKSPERIMENTA

Za provođenje eksperimenta koristila su se prethodno pripremljena 3 uzorka ćiste kulture *E.coli* opisanih u toćki rada 3.2.1. Definirani parametri procesa bili su: frekvencija (60 Hz, 90 Hz i 120 Hz) i vrijeme trajanja (0 min, 5 min i 10 min) te polaritet (+) kao što je prikazano u tablici 1.

Tablica 1. Prikaz definiranih parametara eksperimentalnog procesa

Uzorak ćiste kulture	Polaritet	Vrijeme tretiranja (min)			Frekvencija (Hz)
E.c.1	+	0	5	10	60
E.c.2	+	0	5	10	90
E.c.3	+	0	5	10	120

Određivane varijable prije i nakon tretiranja uzoraka hladnom plinskom plazmom pozitivnog polariteta bili su: pH, temperatura, elektrićna provodnost, koncentracija nastalih slobodnih radikala i unutarstanićni sadržaj pri 260/280 nm.

Tablica 2. Prikaz varijabli mjerenih prije/nakon eksperimentalnog procesa

Faza u procesu tretiranja	pH	Temperatura	El.provodnost	Slobodni radikali	Unutarstanićni sadržaj pri 260/280 nm
prije	✓	✓	✓	✓	✓
poslije	✓	✓	✓	✓	✓

Prije samog početka tretiranja uzorka hladnom plazmom, mjereni su slijedeći parametri procesa: pH, električna provodnost, temperatura i količina slobodnih radikala.

Svaki uzorak prije tretmana pomiješan je sa prethodno pripremljenom otopinom destilirane vode i natrijevog nitrata provodnosti 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ tj. 10 ml uzorka razrijeđeno je sa 190 ml pripravljene otopine.

U reaktor volumena 1000 ml stavljen je razrijeđen uzorak od 200 mL te je vršeno tretiranje plazma uređajem opisanim u točki 3.2.1. ovog rada. Nakon 5 min, zaustavljen je proces; mjerena je temperatura infracrvenim mjeračem „PCE instruments PCE-777“ te je izuzeto 4 ml uzorka potrebnog za daljnje analize.

Nakon 10 – minutnog tretiranja, izmjerena je temperatura te su provedene sve zadane analize.

4. REZULTATI

Izmjerene vrijednosti fizikalnih parametara pH, temperature i konduktivnosti prije i poslije tretiranja plazmom prikazani su u Tablicama 3.,4.,i 5.

Tablica 3. pH vrijednosti prije i nakon tretmana hladnom plazmom pri 60, 90 i 120 Hz

pH	60 Hz	90 Hz	120 Hz
0'	6,13	5,44	5,75
10'	3,94	3,77	3,81

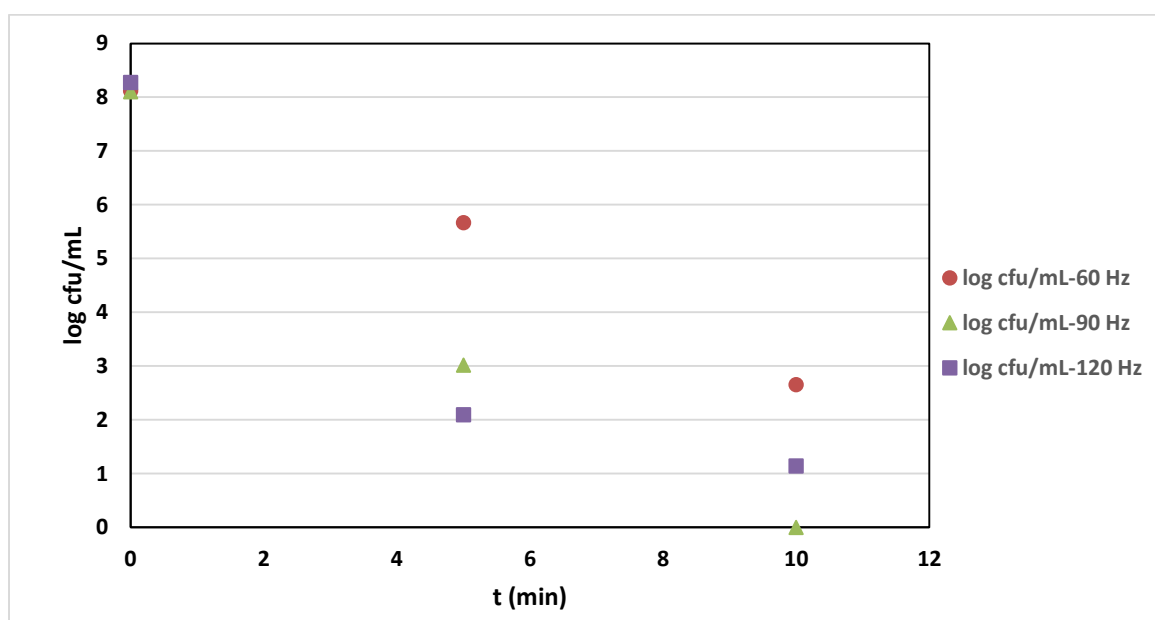
Tablica 4. Očitane temperature prije i nakon tretmana hladnom plazmom pri 60, 90 i 120 Hz

Temperatura (°C)	60 Hz	90 Hz	120 Hz
0'	18,10	18,50	18,73
10'	25,83	29,70	29,23

Tablica 5. Očitane vrijednosti konduktivnosti prije i nakon tretmana hladnom plazmom pri 60, 90 i 120 Hz

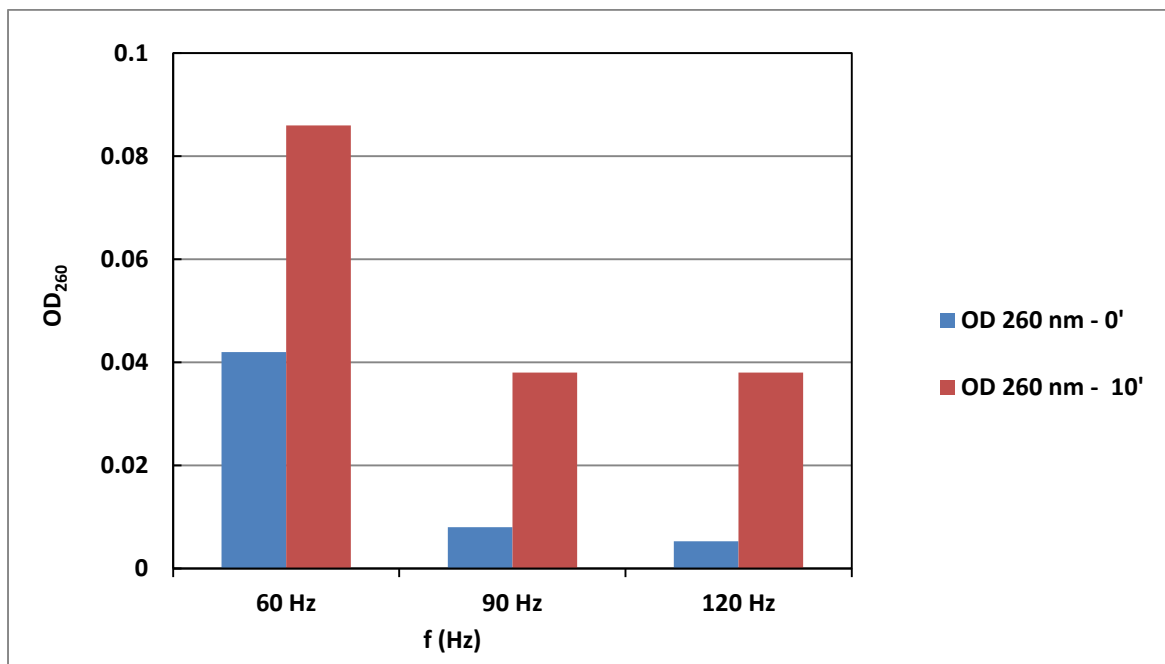
Konduktivnost (μS/cm)	60 Hz	90 Hz	120 Hz
0'	95,23	93,32	93,60
10'	129,57	148,95	152,60

Stupanj redukcije *E.coli* tretirane plazmom pri 60, 90 i 120 Hz prikazan je na Slici 7. i pokazuje ovisnost logcfu (broju poraslih kolonija)/(ml) o vremenu tretiranja (min).

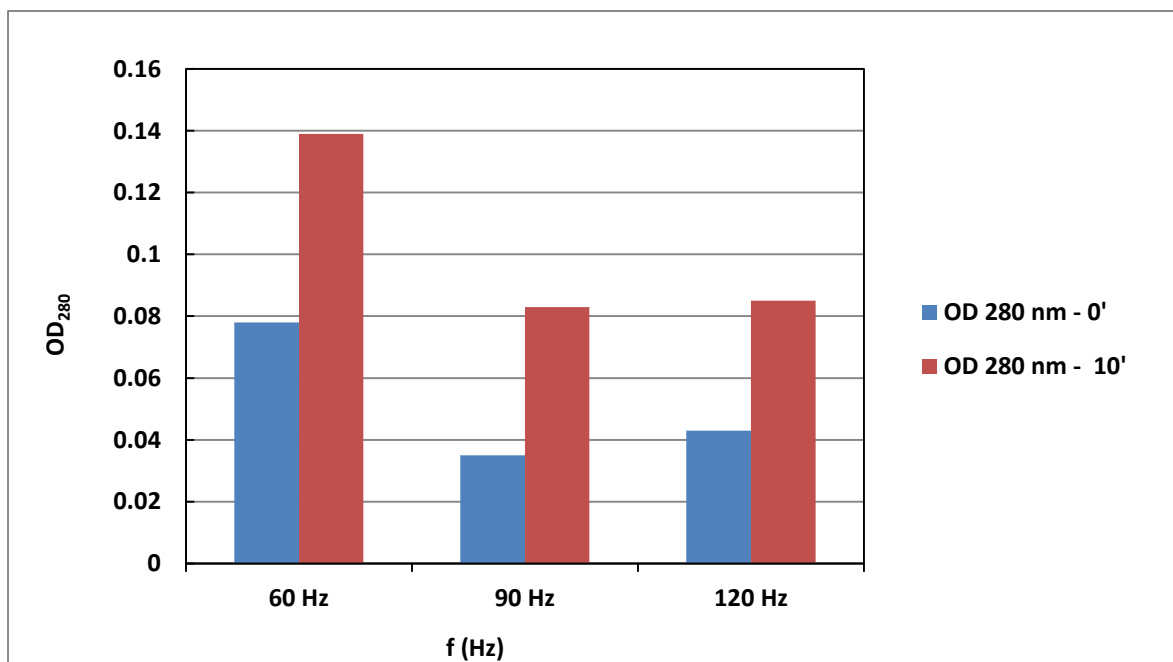


Slika 7. Ovisnost logaritma broja stanica *E.coli* pri 60, 90 i 120 Hz o vremenu tretiranja

Utjecaj hladne plazme na istjecanje unutarstaničnog sadržaja mjereno je spektrofotometrijskom metodom na 260/280 nm, a rezultati prije i nakon tretmana prikazani su na slikama 8. i 9. u ovisnosti OD (*optical density*) pri 260/280 nm o zadanim frekvencijama 60, 90 i 120 Hz.



Slika 8. Graf ovisnosti OD_{260nm} o frekvencijama pri 60, 90 i 120 Hz



Slika 9. Graf ovisnosti OD_{280nm} o frekvencijama pri 60, 90 i 120 Hz

Praćen je oksidacijski stres koji se definira kao poremećaj ravnoteže prooksidansa i antioksidansa u korist prooksidansa (slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih čestica).

Udio slobodnih radikala mjeren je spektrofotometrijski pri 410 nm poslije tretmana, a dobivene vrijednosti apsorbancija uvrštene su u jednadžbu baždarnog pravca iz kojih su dobivene koncentracije novonastalih slobodnih radikala izraženih kao $c(\text{H}_2\text{O}_2)/\text{mg/L}$.

Iznosi koncentracija nastalih radikala prikazani su Tablici 6.

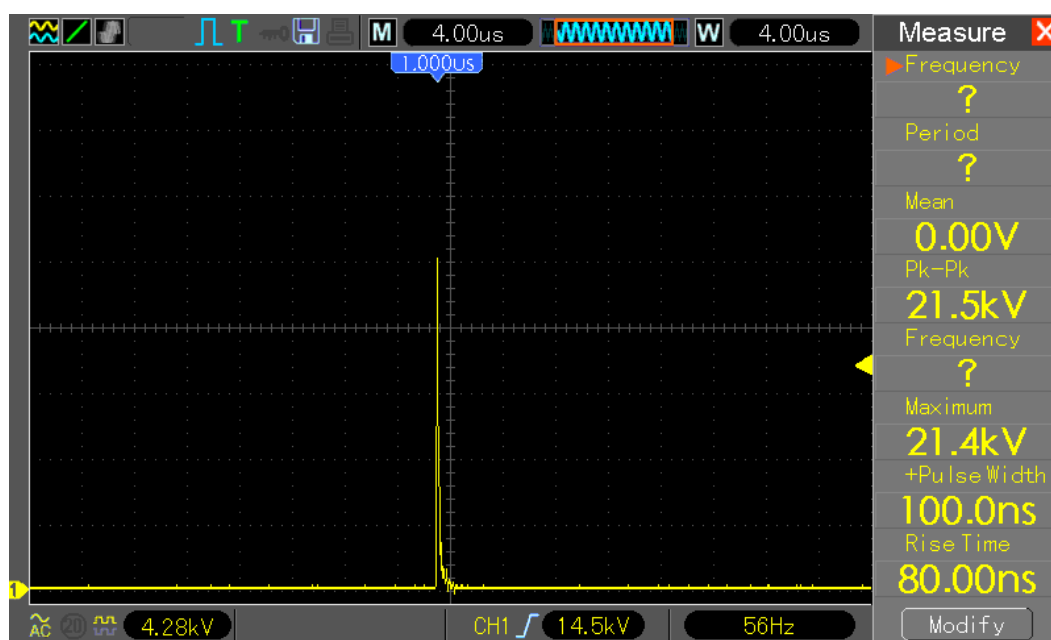
Tablica 6. Koncentracije slobodnih radikala izražene u mg/L nakon tretmana pri 60, 90 i 120 Hz

c(H ₂ O ₂)/mg/L	60 Hz	90 Hz	120 Hz
10'	13,25	16,00	16,80

Rezultati rekuperacije bakterije pri 30 °C mjerene nakon 3h i 18 h navedeni su u Tablici 7.

Tablica 7. Rekuperacija tretirane bakterije prikazana kao logcfu/ml nakon 3h i 18 h inkubacije

log cfu/ml	60 Hz	90 Hz	120 Hz
nakon 3 h	5,55	2,33	5,01
nakon 18 h	8,33	8,49	8,85



Slika 10. Grafički prikaz pozitivnog naponskog vala tijekom tretmana plinskom plazmom

5. RASPRAVA

Iz rezultata pH vrijednosti prije i poslije desetominutnog tretmana hladnom plazmom prikazanih u Tablici 3. vidljivo je smanjenje pH vrijednosti. Nakon tretmana u prosjeku su vrijednosti niže za 1.93 pH jedinice. Kako je optimalni pH za rast *E.coli* 7, iz dobivenih rezultata vidljivo je da su sniženjem pH za skoro 2 pH jedinice postignuti nepovoljni uvjeti za rast bakterijskih stanica.

U literaturi se promjene pH opisuju u ovisnosti o svojstvima plazme kao i medija koji se tretira. Satoh i sur. 2007. otkrili su da dolazi do značajnog pada pH vrijednosti u vodi kada se plazma generira u zraku ili dušiku. Stoga se može zaključiti da glavnu ulogu pri padu pH u ovom slučaju imaju H⁺ ioni koji se generiraju tijekom rada plazme.

Prema Tablici 4. temperatura u reaktoru proporcionalno raste sa primjenom frekvencije od 60 i 90 Hz dok se pri 120 Hz neznatno smanjuje. To je opravdano jer dolazi do povećanja ukupne kinetičke energije elektrona što posljedično povećava broj sudara u samom plinu.

Ovisnost konduktivnosti o primjenjenoj frekvenciji na uzorcima prikazan je u Tablici 5., a iz čega možemo zaključiti da provodnost proporcionalno raste sa frekvencijom; nakon tretmana pri 60 Hz porasla je za 34,34 μS/cm dok se nakon primjene frekvencije od 120 Hz povećala za 59,00 μS/cm. Do porasta provodljivosti dolazi zbog povećanog broja nabijenih čestica i slobodnih iona u tekućini. Povećanjem električne provodljivosti vode smanjuje se napon potreban za inicijaciju izboja (Zhu i sur., 2009).

Nakon tretmana, sva tri uzorka za svaku frekvenciju naciepljena su na hranjive podloge i stavljena u idealne uvjete rasta kako bi se detektirao mogući porast kolonija bakterija i analizirala učinkovitost primjenjene tehnologije. Od tri tretirana uzorka, uzimala se izračunata srednja vrijednost, a redukcija broja mikroorganizama izrazila se kao logcfu/ml.

Na Slici 7. prikazan je broj log-ova redukcije poraslih kolonija bakterije u ovisnosti vremena tretiranja uzorka (prije tretiranja, nakon 5 i 10 min tretmana). Iz grafa se može uočiti da je pri svim frekvencijama broj log-ova redukcije poraslih bakterija proporcionalan duljini tretiranja uzorka. Kod 60 Hz, početni broj logova prisutnih bakterija bio je 8,122 dok se tretmanom od 10 minuta smanjio za 5,47 logova. Veći stupanj redukcije uočava se kod primjene veće

frekvencije od 90 Hz kod koje je početan broj prisutnih bakterija u uzorku prije tretiranja bio 8,107 log jedinica dok se petominutnim tretmanom smanjio za čak 5,09 logova, a nakon 10 minuta je postignuta potpuna redukcija, tj. nisu bile prisutne porasle kolonije. Pri primjenjenoj frekvenciji od 120 Hz početni broj bakterijskih stanica bio je 8,28 log cfu/mL, a nakon 10 min tretmana postignuto je 7,14 log cfu/mL jedinica redukcije.

Na Slikama 8. i 9. može se uočiti efekt hladne plazme na istjecanje staničnih makromolekula, nukleinskih kiselina i proteina u usporedbi sa netretiranim uzorcima. Dokazano je da tretmanom hladne plazme dolazi do elektroporacije tj. do stvaranja pora u membrani stanice. Kao posljedica polarizacije iona u membrani, dolazi do njene kompresije i naposljetku pucanja (Fincan i sur., 2004).

Rezultati uzoraka pokazali su povećano istjecanje unutarstaničnog sadržaja u odnosu na netretirane uzorke, a koje se smanjuje povećanjem frekvencije. Pri tretmanu od 60 Hz $\Delta OD_{260nm}(10' - 0')$, razlika istjecanja staničnih makromolekula iznosi 0,044 dok pri 120 Hz $\Delta OD_{260nm}(10' - 0')$ iznosi 0,033. Slično je i kod mjerenja pri valnoj duljini od 280 nm. Na 60 Hz, $\Delta OD_{280nm}(10' - 0')$, razlika istjecanja staničnih makromolekula iznosi 0,061, a pri 120 Hz $\Delta OD_{280nm}(10' - 0')$ je 0,042. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je upotreba niže frekvencije nešto pogodnija za narušavanje struktura i funkcija bakterijskih stanica *E.coli*.

Određeno je nastajanje slobodnih radikala izraženih kao $c(H_2O_2)$ mg/L. Plazma je kemijski veoma aktivna, a kao glavni produkti djelovanja plazme u vodi nastaju hidroksilni radikal ($OH\cdot$) i vodikov peroksid (H_2O_2). Ta oksidacija katalizirana je UV zračenjem, a plazma je dobar izvor UV zračenja koje i samo po sebi izaziva mutagene promjene u stanicama (Boussetta i Vorobiev, 2014). Prisutnost vodikovog peroksida i radikalnih vrsta kao i prisutno UV zračenja i šok valova stvaraju uvjete koji su povoljni za degradaciju organskih molekula, a moguća je i inaktivacija virusa, kvasaca i bakterija (Locke i sur., 2006).

Dobiveni su sljedeći rezultati: pri 60 Hz, $c(H_2O_2)$ iznosi 13,25 mg/L dok se kod 90 Hz povećala za 2,75 mg/L. Razlika u koncentraciji vodikovih peroksida nastalih pri 90 i 120 Hz je vrlo mala; povećanje iznosi samo 0.8 mg/L.

Nakon tretmana plazmom došlo je do rekuperacije svih uzoraka nakon 18 h inkubacije pri 30 °C. Zahvaljujući mehanizmu povećanja rezistencije na stres, ova bakterija može se prilagoditi

nepovoljnim uvjetima i nastaviti svoj rast u produženoj stacionarnoj fazi. Zasad nisu poznati načini zaustavljanja njenog rasta nakon izlaganja oksidacijskom i okolišnom stresu izazvanog plazmom.

6. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Tretmanom hladnom plazmom postignuta je redukcija broja mikroorganizama u odnosu na početni broj.
2. Pri 90 Hz postignuta je potpuna redukcija *E.coli* MG1655.
3. Primjena hladne plazme na čistu kulturu *E.coli* utjecala je na promjenu fizioloških čimbenika; pH, temperature, konduktivnosti i povećanja koncentracije slobodnih radikala.
4. Povećanjem frekvencije dokazan je veći oksidacijski stres u bakterijskim stanicama.
5. Osim redukcije, plazma narušava staničnuravnotežu mikroorganizama uzrokujući elektroporaciju i pucanje membrana te istjecanje proteina i ostalih staničnih makromolekula.
6. Svi uzorci su se rekuperirali nakon 18 h inkubacije pri 30 °C.

7. REFERENCE

Aziz M.F.A., Mahmoudb E.A., Elaragi G.M. (2014) Cold Plasma: A novel non-thermal T technology for food processing, *J. Stored Prod. Res.*

Bačun-Družina V., Čagalj Ž., Gjuračić K. (2007) The growth advantage in stationary-phase (GASP) phenomenon in mixed cultures of enterobacteria, *FEMS (0378-1097)* 266 1; 119-127.

Bárdos L., Baránková H. (2010) Cold atmospheric plasma: Sources, processes, and applications, *Thin Solid Films*, 518, 6705–6713.

Bogaerts A., Neyts E., Gijbels R., Mullen J. (2002) Gas discharge plasmas and their applications., *Spectrochimica Acta Part B*, 85,105.

Boussetta, N., Vorobiev, E. (2014) Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges, *C. R. Chim.*, 17, 197 – 203.

Center for Disease Control and Prevention

<<http://www.cdc.gov/ecoli/>>, [pristupljeno 12. svibnja , 2016.]

Deng S.B., Ruan R., Mok C.K., Huang G.W. et al. (2007) Inactivation of Escherichia coli on almonds using nonthermal plasma, *J. Food Sci.*, 72,62.

Feichtinger J., Schulz A., Walker M., Schumacher U. (2003) Sterilisation with low-pressure microwave plasmas. Surface and Coating Technology, *SURF COAT TECH.*, 174, 564.

Fernandez E., Noriega B., Thompson A. (2012) *Food Microbiol.*, 33, 24.

Fridovitch, Ann (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases, *Rev. Biochem.*, 64, 97.

Gurul C., Ekinici F.Y., Aslan N., Korachi M. (2012) Low temperature plasma for decontamination of E. coli in milk, *Int. J. Food Microbiol.*, 15, 157.

Langmuir (1928) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A*, 14, 627.

Laroussi M., Mendis D., Rosenberg M. (2003) Plasma interaction with microbes, *New J. Phys.*, 5, 41.

Lee K., Paek K., Ju .W.T., Lee Y. (2006) *J. Microbiol.*, 44, 269.

Locke, B. R., Sato, M., Sunka, P., Hoffman, M. R., Chang, J.-S. (2006) Electrohydraulic discharge and nonthermal plasma for water treatment. *Ind.Eng. Chem. Res.*, 45, 882 – 905.

Luo Q.Z., Angelo N., Merlino R.L. (1998) Dept of phys & Astron Retrieved, 20.

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

Duraković S., Delaš F., Duraković L. (2002) Moderna mikrobiologija namirnica – knjiga prva, Kugler, Zagreb

Mendis D., Rosenberg M., Azam F. (2002) Plasma Sci. IEEE Trans., 28,1304.

Miller, A. R. (1986) Oxidation of cell wall polysaccharides by hydrogen peroxide: a potential mechanism for cell wall breakdown in plants, *Biochem. Biophys. Res.Comm.*, 141, 238-244.

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.

Philip N., Saoudi B., Crevier M.C., Moisan M., Barbeau J., Pelletier J. (2002) Plasma sterilization: methods and mechanisms, *IEEE Trans. Plasma Sci.*, 30, 1429.

Pontiga F., Soria C., Castellanos A., Skalny J. (2002) A study of ozone generation by negative corona discharge through different plasma chemistry models, *Ozone-Sci Eng*, 24:447–462.

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.

Satoh, K., MacGregor, S. J., Anderson, J. G., Woolsey, G. A., Fouracre, R. A. (2007) Pulsed-plasma disinfection of water containing *Escherichia coli*, *Jpn. J.Appl. Phys.*, 46, 1137 – 1141.

Schluter O., Ehlbeck J., Hertel C. (2013) Opinion of the use of plasma processes for treatment of foods, *Mol. Nutr. Food Res.* 57, 920.

Tendero, C., Tixier C., Tristant, P., Desmaison, J., Leprince, P. (2006) Atmospheric pressure plasmas, *Spectrochim. acta* , 61, 2-30.

Toepfl S. , A. Mathys, Heinz V., Knorr D. (2006) Potential of high hydrostatic pressure and pulsed electric fields for energy efficient and environmentally, *Food Rev. Int.*, 22, 405.

Vieira C, Diaz MY, Martínez B, García-Cachán MD (2009) Effect of frozen storage conditions (temperature and length of storage) on microbial and sensory quality of rustic crossbred beef at different stages of aging, *Meat Sci* , 83:398–404.

Wiseman H., Halliwell B. (1996) *Biochem. J.* 313, 17.

Zhu, T., Zhang, Q., Jia, Z., Yang, L. (2009) The effect of conductivity on streamer initiation and propagation between dielectric-coated sphere-plate electrodes in water, *IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insul.*, 16, 1552 – 1557.

Ziuzina D., Patil S., Cullen P.J., Keener K.M., Bourke P. (2014) Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh produce, *Food Microbiol.*, 42, 109.