

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

LAURA MOLAN I EMMA JUREŠA

ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNOG UČINKA PLAZMOM
AKTIVIRANE VODE NA ODABRANE
MIKROORGANIZME

Zagreb, 2025.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za procesno-prehrambeno inženjerstvo i Laboratoriju za tehnologiju vrenja i kvasca Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet pod vodstvom izv.prof.dr.sc. Tomislave Vukušić Pavičić te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2024./2025.



Rad je izrađen u okviru znanstveno-istraživačkog projekta „Potencijal primjene plazmom aktivirane vode na funkcionalne komponente hrane“ financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ Powerful, IP-2024-05-9863), voditeljice izv. prof. dr. sc. Tomislave Vukušić Pavičić.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Tehnologija generiranja plazme: vrste reaktora i sustava.....	2
1.2. Sigurnosni i okolišni aspekti upotrebe PAW u industriji.....	5
1.3. Kemijski sastav i kinetika razgradnje aktivnih spojeva u PAW	7
1.4. Antimikrobni mehanizmi djelovanja PAW	9
1.5. Odabrani mikroorganizmi: svojstva i osjetljivost.....	11
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI	14
2.1. Opći i specifični ciljevi	15
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. Materijali	17
3.1.1. Kemikalije i standardi	17
3.1.2. Aparatura i pribor	17
3.1.3. Radni mikroorganizmi	18
3.1.4. Hranjive podloge za uzgoj stanica bakterija i kvasaca	18
3.2. Metode rada.....	20
3.2.1. Priprema uzoraka plazmom aktivirane vode (PAW).....	20
3.2.2. Određivanje fizikalno-kemijskih parametara	23
3.2.3. Priprema radnih mikroorganizama	24
3.2.4. Određivanje antimikrobnog učinka	25
4. REZULTATI.....	27
4.1. Plinski reaktor	28
4.1.1. Fizikalno – kemijska analiza uzoraka PAW generiranih u plinskom reaktoru.....	28
4.1.2. Antimikrobni učinak uzoraka PAW generiranih u plinskom reaktoru ...	28
4.2.1. Fizikalno – kemijska analiza uzoraka PAW generiranih u tekućinskom reaktoru	30
4.2.2. Antimikrobni učinak uzoraka PAW generiranih u tekućinskom reaktoru	
31	
4.3. Prikaz poraslih kolonija odabranih mikroorganizama.....	32
4.4. Statistička obrada	35
5. RASPRAVA	36
5.2. Fizikalno – kemijska analiza uzoraka PAW-e	37

5.2.1. Fizikalno – kemijska analiza uzoraka PAW-e generiranih u plinskom reaktoru.....	37
5.2.2. Fizikalno – kemijska analiza uzoraka PAW-e generiranih u tekućinskom reaktoru.....	39
5.2.3. Usporedba fizikalno-kemijskih svojstava prema reaktorima.....	40
5.3. Antimikrobni učinak uzoraka PAW-e	42
5.3.1. Antimikrobni učinak uzoraka PAW-e generiranih u plinskom reaktoru	42
5.3.2. Antimikrobni učinak uzoraka PAW-e generiranih u tekućinskom reaktoru.....	44
5.3.3. Usporedba antimikrobnih rezultata prema zadanim mikroorganizmima	46
6. ZAKLJUČCI.....	48
7. ZAHVALE.....	50
8. LITERATURA.....	51
9. SAŽETAK	59
10.SUMMARY	60

1. UVOD

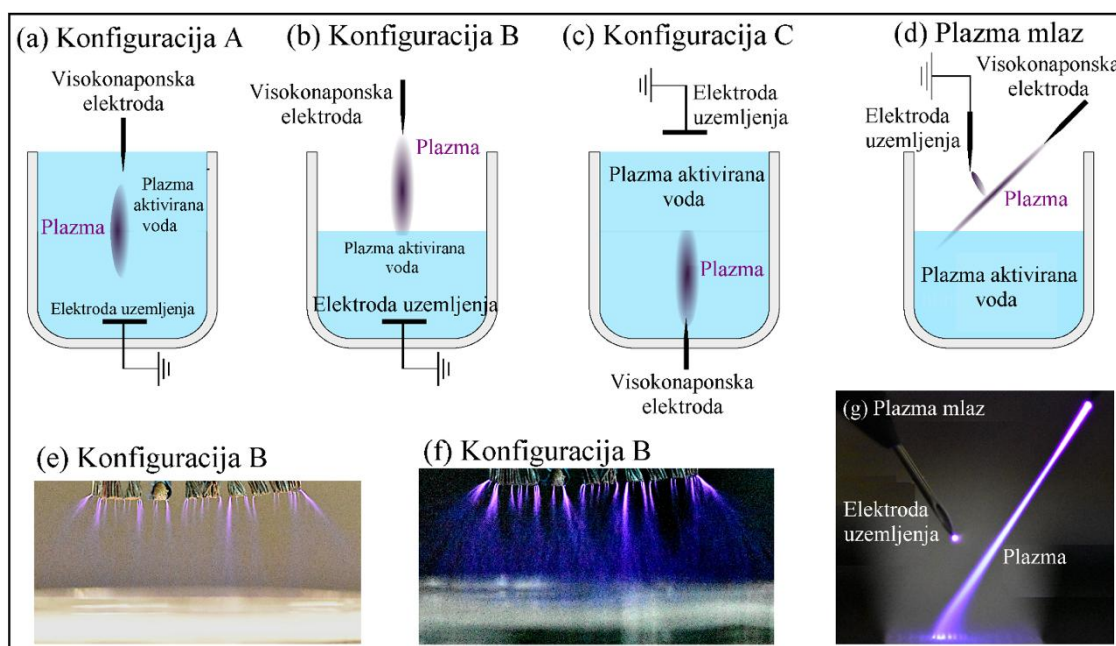
1.1. Tehnologija generiranja plazme: vrste reaktora i sustava

Plazma se uz čvrste tvari, tekućine i plinove smatra četvrtim agregatnim stanjem. Langmuir je 1928. godine prvi predložio termin „plazma“. Za razliku od ostalih triju agregatnih stanja sastav plazme uključuje mnoštvo visokoenergetskih elektrona, slobodnih radikala, kemijski aktivnih iona i pobuđenih stanja. Plazma je električno neutralna jer je ukupni električni naboj elektrona i negativnih iona otprilike jednak naboju pozitivnih iona. Na temelju temperature unutarnjih elektrona plazma se može podijeliti na niskotemperaturnu i visokotemperaturnu plazmu. Niskotemperaturna plazma se na temelju termodinamičke ravnoteže dijeli na toplinsku i netermalnu plazmu. Plazma, za razliku od običnih plinova, predstavlja skup nabijenih čestica koje joj daju posebna svojstva. Zbog slobodnog gibanja iona i elektrona, plazma ima vodljivost usporedivu s vodljivošću metala. Kretanje pozitivnih i negativnih naboja stvara snažna električna i magnetska polja, a rezultat toga su visoka toplinska vodljivost i intenzivno toplinsko zračenje. Količina pozitivnih i negativnih naboja u plazmi je uvijek jednaka. Ima reaktivan kemijski karakter te je podložan kemijskim reakcijama (Ju Li i sur., 2019).

Plazma se opaža u prirodi te je tako većina svemira sastavljena od plazme, galaksije su uglavnom sastavljene od ovog oblika materije. Prvi ju je otkrio William Crooks 1879. godine, a Irving Langmuir 1928. godine daje službeni naziv ovoj materiji plazma. Plazma se sastoji od negativnih iona i teško nabijenih čestica, stoga se može definirati i kao ionizirani plin koji je obično proizveden električnim pražnjenjem na sobnoj temperaturi. Mnogi znanstvenici prepoznali su potencijal i prednosti plazme te se posljednjih godina primjena plazme razvija vrlo brzo. Stvaranje plazme zahtijeva primjenu energije na plin što uzrokuje ionizaciju plina. Prema temperaturi iona plazma se dijeli na: netermalnu (hladnu) i termičku. Vruća (termalna) plazma sastoji se od negativnih iona i teško nabijenih čestica te su obje na istoj temperaturi odnosno nalaze se u termalnoj ravnoteži jedna s drugom. Primjenom istosmjernog električnog polja preko katode i anode dolazi do ubrzanja elektrona na prednjem dijelu katode čime dolazi do povećanja neelastičnog sudara između atoma i elektrona dovodeći do ionizacije i pobuđivanja iona. Ioni i elektroni nastali ionizacijskim sudarom snažno se ubrzavaju električnim poljem prema katodi koja izbacuje nove elektrone koji su nastali ionskom-indukcijom sekundarnom emisijom elektrona. Povećanjem ionizacijskih sudara dolazi do povećanja koncentracije novih elektrona i iona na katodi čime se stvara izbojni sjaj od samoodržive plazme. Tri najčešće korištene tehnike za generiranje plazme atmosferskog tlaka za proizvodnju PAW: plazma mlaz, dielektrično barijerno pražnjenje i korona pražnjenje (Wong i sur., 2023).

Važni parametri generiranja plazme su konfiguracije elektroda, njihova geometrija te materijal od kojeg su izgrađene. Na slici 6. (a-c) prikazane su uobičajene konfiguracije elektroda. Kod konfiguracije A koje se također može zvati i tekuće pražnjenje obje elektrode uronjene su u vodu i proizvode veće koncentracije H_2O_2 u tretiranoj vodi. Kod konfiguracije B poznate kao i plinsko pražnjenje ionizacija plina odvija se u plinovitom stanju, a nastale reaktivne vrste se otapaju u tekućini. Kod konfiguracije C

poznate kao i hibridno plinsko-tekuće pražnjenje istovremeno se generira električno pražnjenje iznad vode i u vodi što poboljšava proizvodnju reaktivnih vrsta difuzijom i izravnom interakcijom s vodom. Korona pražnjenje kao i plazma mlaz proizvodi se s dvije igličaste elektrode (slika 6. (d)) (Wong i sur., 2023).



Slika 1. (a) Konfiguracija A- obje elektrode uronjene u vodu (b) Konfiguracija B-visokonaponska elektroda je iznad, a elektroda uzemljenja je uronjena u vodu (c) Konfiguracija C- elektroda uzemljena je iznad, a visokonaponska elektroda je uronjena u vodu (d) Plazma mlaz- obje elektrode su iznad vode (e, f) generiranje plazme atmosferskog tlaka na temelju konfiguracije B (g) Plazmu plazma mlaz pražnjenja (prema Wong i sur., 2023).

Primjenom visokog napona jakost električnog polja u blizini elektrode s manjim radijusom zakrivljenosti značajno se povećava. Plin oko igle se pobuđuje jakim električnim poljem te se razgrađuje na elektrone i ione i formira plazmu. Mali radijusi zakrivljenosti važni su za generiranje visoke lokalizirane jakosti električnog polja. Što se tiče materijala elektrode poželjniji je metal zbog dobre električne vodljivosti. Visoko lokalizirano električno polje fokusirano na vrh metalnih elektroda i interakcija metala s reaktivnim vrstama smanjuje radni vijek zbog njihove erozije. Elektrode s većom stopom erozije generiraju više iona u vodi (Wong i sur., 2023).

Uspoređujući korona pražnjenje s plazma mlazom i dielektričnim barijernim pražnjenjem, korona pražnjenje privuklo je značajnu pažnju radi njezinih privlačnih karakteristika, uključujući jednostavnost postavljanja i rada, mogućnost podešavanja položaja elektroda te trajnosti i stabilnosti plazmom

aktivirane vode (engl. *Plasma activated water-PAW*) (Tajiknezhad i sur., 2025). Plazma aktivirana voda (PAW) je voda koja je tretirana strujom ioniziranog plina (plazme) bogatog reaktivnim vrstama (Wong i sur., 2023).

Voda je podvrgnuta plazmi korištenjem kontroliranih parametara poput napona stvaranja plazme, radnog plina, temperature, impulsa ili frekvencije prema potrebi. PAW ima niži pH, veću električnu vodljivost i veći potencijal redukcije kisika u usporedbi s netretiranom vodom zbog prisustva reaktivnih vrsta kojih stvara plazma (Soni i sur., 2021).

Postoje tri konfiguracije elektrode: plinsko pražnjenje, tekuće pražnjenje i hibridno plinsko-tekuće pražnjenje. U konfiguraciji tekućeg pražnjenja obje elektrode su uronjene u vodu. Ovom konfiguracijom mogu se generirati veće koncentracije vodikova peroksida u PAW-i. U konfiguraciji plinskog pražnjenja visokonaponska elektroda je postavljena iznad vode, a uzemljena elektroda je uronjena u vodu. Ovdje se ionizacija plina događa u plinskoj fazi, a reaktivne vrste koje pritom nastaju se otapaju u tekućini. Važni parametri su također i električna snaga i trajanje obrade vode. Povećanjem električne snage dolazi do povećanog stvaranja OH iona u plinovitom stanju. Električna snaga je izravno povezana sa snagom pražnjenja. Veće snage pražnjenja proizvode PAW-u koja ima veću električnu vodljivost i koncentracije vodikova peroksida. Povećanjem trajanja obrade rezultira povećanjem koncentracije reaktivnih vrsta (Tajiknezhad i sur., 2025).

Što se tiče zakrivljenosti elektroda, manji radijusi zakrivljenosti elektrode imaju bolji učinak pri generiranju veće jakosti električnog polja. Metal je poželjan materijal za elektrode zbog njegove dobre električne vodljivosti. Visoko lokalizirano električno polje koje je fokusirano na vrh metalnih elektroda i interakcija metala s reaktivnim vrstama uzrokuje eroziju zbog čega se pogoršava radni vijek elektroda. Materijal koji ima veći stupanj erozije (poput volframa) može generirati više iona u tekućini čime se povećava električna vodljivost u PAW-i. Volframove i ugljične elektrode zahtijevaju niže struje pražnjenja u usporedbi s aluminijskim, bakrenim i srebrnim elektrodama zbog njihovih različitih stupnjeva oštine i krhkosti materijala (Wong i sur., 2023).

Prema istraživanju Ragni i sur. (2016) uočili su da najveću baktericidnu učinkovitost imaju elektrode od mjeda i srebrne elektrode. Elektrode koje su izrađene od materijala koji su otporni na oksidaciju bolje proizvode ozon te zbog toga imaju bolji dekontaminacijski učinak. Ozon je poznat kao vrlo snažan oksidans. Zbog toga se koristi pri sterilizaciji te je učinkovit dezinficijens za uništavanje mikroorganizama. Uključivanjem materijala koji imaju poznati baktericidni učinak dodatno se povećava dekontaminacijski utjecaj (Ragni i sur., 2016).

U istraživanju Gott i sur. (2023) proučavani su utjecaji materijala elektrode na svojstva PAW-e. Korištene su različite elektrode od nehrđajućeg čelika, bakra, volframa i platine. Uočeno je da su elektrode od nehrđajućeg čelika i platine davale stabilne rezultate s visokom koncentracijom nitrata.

Elektroda od volframa je otporna i dugotrajna, no proizvodnja reaktivnih spojeva je manja (Gott i sur., 2023).

Prema istraživanju Simon i sur. (2022) uočeno je da duljim trajanjem tretmana plazmom dolazi do povećanja koncentracije reaktivnih vrsta i poboljšava fizikalno-kemijske karakteristike PAW-e. Ovo uzrokuje bolju antimikrobnu aktivnost bakterija *E. coli* i *S. aureus* (Simon i sur., 2022).

1.2. Sigurnosni i okolišni aspekti upotrebe PAW u industriji

Plazmom aktivirana voda (PAW) nastaje izlaganjem obične vode hladnoj plazmi, čime dolazi do stvaranja reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta (RONS) poput hidroksilnih radikala, ozona, vodikova peroksida, dušikova monoksida, nitrita i nitrata. Upravo te čestice odgovorne su za snažno antimikrobno djelovanje, a pritom se radi o otopini koja ne zahtijeva dodavanje kemikalija niti ostavlja štetne rezidue. PAW je zbog toga privukla pozornost kao alternativa klasičnim dezinficijensima, posebno u prehrambenoj tehnologiji, biotehnološkoj i farmaceutskoj industriji gdje je potrebna učinkovita i ekološki prihvatljiva dezinfekcija (Rahman i sur., 2022; Rotondo i sur., 2025).

Kemijske i fizikalne karakteristike PAW-e značajno se razlikuju od obične vode. U njoj se mogu naći kratkotrajne reaktivne vrste, poput hidroksilnih radikala i ozona, čije je djelovanje izrazito snažno, ali vremenski ograničeno, te dugotrajnije vrste poput vodikova peroksida, nitrita i nitrata koje mogu opstati satima ili čak danima (Wong i sur., 2023). Tipična PAW ima pH vrijednost sniženu u kiselo područje, obično između 2 i 4, zbog otapanja dušikovih oksida u vodi. Oksidacijsko-redukcijski potencijal obično je povišen, u rasponu od 400 do 900 mV, što svjedoči o njenom snažnom oksidacijskom kapacitetu, a električna vodljivost također raste jer se povećava koncentracija otopljenih iona (Han i sur., 2023). Na ta svojstva snažno utječu parametri procesa, poput vrste plazma izvora, vremena tretmana i korištenog plina. Važno je naglasiti da aktivnost PAW-e opada s vremenom jer reaktivne vrste spontano reagiraju i razgrađuju se u stabilnije spojeve, pa se preporučuje njezina uporaba neposredno nakon proizvodnje ili čuvanje u uvjetima koji produljuju stabilnost, primjerice na niskim temperaturama i pH nešto višem od izrazito kiselog (Scholtz, 2025).

Sigurnosni aspekti uporabe PAW-e pokazuju jasne prednosti u usporedbi s klasičnim kemijskim dezinficijensima. Budući da nakon primjene ostaje samo voda s niskim koncentracijama nitrata i nitrita, PAW ne predstavlja rizik za ljude ni životinje. Istraživanja su pokazala da nije korozivna za kožu, nije toksična i čak može imati biološki povoljne učinke, primjerice poticanje zacjeljivanja rana (Scholtz, 2025). Osim toga, njezin antimikrobni mehanizam djelovanja temelji se na nespecifičnim oksidativnim procesima, koji istovremeno oštećuju membrane, proteine i nukleinske kiseline mikroorganizama. Takav višestruki pristup značajno smanjuje vjerojatnost razvoja antimikrobne rezistencije, za razliku

od kemikalija koje djeluju ciljano i mogu selekcionirati rezistentne sojeve (Rotondo i sur., 2025). Ipak, postoje i određeni izazovi, a najvažniji su ograničena stabilnost, kiselost te potreba za standardizacijom. PAW se često proizvodi neposredno prije upotrebe zbog postupnog gubitka aktivnosti tijekom vremena, dok njezina niska pH vrijednost može dugoročno uzrokovati koroziju osjetljivih materijala, premda je industrijska oprema uglavnom konstruirana od materijala otpornih na agresivne uvjete. Različiti uređaji proizvode PAW s varijabilnim sastavom, pa je za industrijsku primjenu važno razviti protokole i metode kontrole kvalitete (Rotondo i sur., 2025).

Okolišni aspekti uporabe PAW-e također idu u prilog njezinoj široj primjeni. Za razliku od klornih spojeva, peroksida ili jakih kiselina i lužina koji se tradicionalno koriste za dezinfekciju i koji stvaraju toksične nusprodukte te opterećuju otpadne vode, PAW se spontano razgrađuje na kisik i vodu, uz manje količine nitrata i nitrita (Rahman i sur., 2022 ;Rotondo i sur., 2025). Ti spojevi u niskim koncentracijama nisu štetni, a u nekim slučajevima mogu imati i pozitivnu ulogu jer djeluju kao nutrijenti u okolišu (Rotondo i sur., 2025). Time se smanjuje ekološki otisak industrijske sanitarne prakse, a istovremeno se smanjuje potreba za transportom i zbrinjavanjem velikih količina opasnih kemikalija. Dodatna prednost je sposobnost PAW-e da razgradi određene organske polutante poput pesticida ili farmaceutskih ostataka bez stvaranja opasnih nusprodukata (Han i sur., 2023). Na taj način ova tehnologija može pridonijeti i širem konceptu održivosti.

Primjene PAW-e u industriji raznolike su i već dobro dokumentirane u literaturi. U prehrambenoj tehnologiji pokazala se učinkovitom protiv širokog spektra patogena poput *Escherichia coli*, *Salmonella* i *Listeria monocytogenes* na svježem voću, povrću, mesu i morskim proizvodima (Rothwell i sur., 2021). Posebno je važno što tretmani PAW-om ne narušavaju organoleptička svojstva hrane niti njezin nutritivni sastav, a u nekim slučajevima čak dolazi do povećanja antioksidativnih aktivnosti i smanjenja lipidne oksidacije, što doprinosi duljoj trajnosti i očuvanju kvalitete (Han i sur., 2023; Rahman i sur., 2022). U industrijskim pogonima PAW se koristi i za sanitaciju opreme u okviru CIP (cleaning-in-place) postupaka, gdje je jednako učinkovita kao konvencionalne kaustične otopine u uklanjanju biofilmova i proteinskih naslaga, ali bez korozivnog učinka i potrebe za složenom obradom otpadnih voda (Rotondo i sur., 2025).

U biotehnološkoj praksi PAW može zamijeniti agresivne kemikalije u čišćenju i sterilizaciji fermentora, bioreaktora i laboratorijske opreme. Njena prednost leži u činjenici da nakon primjene ne ostaju inhibirajući ostaci koji bi mogli ometati rast mikroorganizama ili stanica u sljedećim procesima. Zbog toga se razmatra i njezina uporaba za sterilizaciju hranjivih medija ili kao komponenta u pripremi medija, gdje bi nitrati mogli poslužiti kao izvor dušika (Wong i sur., 2023). U poljoprivrednoj biotehnologiji istraživanja su pokazala da tretman sjemena PAW-om povećava klijavost, ubrzava rast

biljaka i poboljšava otpornost na bolesti, a pritom nitrati djeluju kao prirodno gnojivo u ranim fazama razvoja (Judée i sur., 2018).

Farmaceutska industrija, u kojoj su zahtjevi za sterilnost i sigurnost najstroži, također pokazuje interes za PAW. Ova tehnologija može omogućiti kombinaciju čišćenja i dezinfekcije u jednom koraku, što značajno štedi vrijeme i smanjuje potrošnju kemikalija u GMP pogonima. Good Manufacturing Practice (GMP) pogoni odnose se na proizvodne sustave u farmaceutskoj industriji koji posluju prema strogim regulatornim standardima, osiguravajući da su procesi, oprema i okoliš kontrolirani kako bi se zajamčila sterilnost, sigurnost i konzistentna kvaliteta proizvoda (Scholtz, 2025). PAW se može koristiti za sanitaciju proizvodnih linija, opreme i ambalaže, a budući da se nakon primjene razgrađuje u običnu vodu, ne ostavlja film ni miris na površinama, što je ključno za aseptičke prostore (Rotondo i sur., 2025). Osim toga, otpadne vode nakon primjene PAW-e imaju znatno niže zahtjeve za tretman i obradu. Ključni izazov ostaje validacija i standardizacija učinkovitosti prema strogim farmaceutskim normama, no preliminarni rezultati pokazuju da PAW može ispuniti te zahtjeve (Scholtz, 2025).

Sve navedeno pokazuje da plazmom aktivirana voda ima jasne prednosti u pogledu sigurnosti i okolišne prihvatljivosti, uz istodobno visoku antimikrobnu učinkovitost. Posebno je važno naglasiti da se radi o tehnologiji koja kombinira funkcije čišćenja i dezinfekcije, bez stvaranja štetnih rezidua i uz smanjene rizike za ljude i okoliš. Premda je potrebno dodatno istražiti dugoročnu stabilnost i osigurati regulatorno priznanje za specifične industrijske namjene, dostupni podaci jasno potvrđuju da PAW predstavlja održivu i sigurnu alternativu konvencionalnim kemijskim dezinficijensima u prehrambenoj, biotehnološkoj i farmaceutskoj industriji.

1.3. Kemijski sastav i kinetika razgradnje aktivnih spojeva u PAW

Plazmom aktivirana voda (PAW) rezultat je interakcije hladne atmosferske plazme i vodenog medija, što dovodi do stvaranja raznovrsnih reaktivnih kisikovih (ROS) i dušikovih vrsta (RNS). Njihova koncentracija i međusobni omjeri ovise o uvjetima generiranja plazme, trajanju obrade, plinskoj atmosferi i početnom sastavu vode (Bradu i sur., 2020). Najvažniji spojevi koji se u pravilu kvantificiraju su vodikov peroksid (H_2O_2), nitriti (NO_2^-), nitrati (NO_3^-) i ozon (O_3), dok među kratkoživućim vrstama prevladavaju hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$), dušikov monoksid ($\text{NO}\cdot$), dušikov dioksid ($\text{NO}_2\cdot$) i peroksinitrit (ONOO^-) (Lukes i sur., 2014; Zhou, i sur., 2018). Upravo interakcija kratkotrajnih i stabilnijih vrsta određuje ukupna kemijska svojstva PAW-a i njezinu biološku aktivnost.

Nastajanje ROS i RNS u vodi odvija se putem niza fizikalno-kemijskih procesa. Elektroni i radikali proizvedeni u plazmi reagiraju s molekulama kisika i dušika u zraku, stvarajući ozon, NO i NO_2 , koji se dalje otapaju u vodi. Istodobno, plazmom inducirana disocijacija molekula vode dovodi do stvaranja hidroksilnih radikala, dok njihovim spajanjem nastaje H_2O_2 . NO i NO_2 pri kontaktu s vodenom fazom

stvaraju HNO_2 i HNO_3 , što rezultira formiranjem nitrita i nitrata te zakiseljavanjem otopine (Bradů i sur., 2020; Glaze i sur., 1987). Kiselost je jedan od najčešćih pokazatelja kemijske modifikacije, budući da tipičan pH PAW-e pada u područje 2–4 (Zhou i sur., 2018).

Koncentracije reaktivnih vrsta u PAW-i variraju ovisno o parametrima tretmana. Dulje trajanje i veća snaga obično povećavaju koncentraciju H_2O_2 i nitrata, dok se nitrit akumulira do određene razine, nakon čega zbog svoje reaktivnosti počinje opadati. Plin koji se koristi u plazmi također igra važnu ulogu: korištenje zraka ili kisika pogoduje nastanku nitrata i zakiseljavanju, dok argon potiče formiranje viših koncentracija H_2O_2 i ozona uz manji udio dušikovih spojeva. Time se otvara mogućnost finog podešavanja sastava PAW-e prema ciljanom učinku (Lukes i sur., 2014).

Nakon prestanka plazma tretmana u vodi se odvija složena sekundarna kemija. Jedna od najznačajnijih reakcija je interakcija H_2O_2 i HNO_2 , pri čemu nastaje peroksinitrit (ONOO^-), iznimno snažan oksidans i nitrirajuće sredstvo. Njegovo stvaranje slijedi kinetiku drugog reda, a koncentracija doseže vrhunac ubrzo nakon tretmana, nakon čega naglo opada zbog nestabilnosti. ONOO^- se raspada u nitrat ili se pretvara u radikale $\cdot\text{OH}$ i $\cdot\text{NO}_2$, čime dodatno pojačava oksidacijsku moć otopine (Tarabová i sur., 2019). Slično tome, ozon reagira s nitritom i vodikovim peroksidom, tvoreći dodatne $\cdot\text{OH}$ radikale (peroksonske procese). Ove reakcije naglašavaju sinergijski karakter PAW-e: različite vrste ne djeluju izolirano, već kontinuirano reagiraju i tvore nove oksidanse.

Kinetika razgradnje stabilnijih vrsta u PAW-u predmet je brojnih istraživanja. Vodikov peroksid se raspada relativno sporo, a poluvijek mu je nekoliko sati do dana, ovisno o prisutnosti katalitičkih iona poput Fe^{2+} i Cu^{2+} koji ubrzavaju raspad Fentonovim mehanizmom (Kutasi i sur., 2021). Ozon je znatno nestabilniji; u vodi se tipično raspada unutar nekoliko desetaka minuta, a proces je osjetno brži u alkalnim uvjetima zbog lančanog radikalnog mehanizma. Nitrit je stabilan pri neutralnom pH, no u kiselim uvjetima brzo prelazi u HNO_2 , koji se dismutira ili reagira s H_2O_2 , stvarajući ONOO^- . Većina nitrita tako u konačnici prelazi u nitrat, koji je najstabilniji i ostaje kao krajnji proizvod u otopini.

Peroksinitrit se, iako ključan za antimikrobno djelovanje, ubraja u izrazito kratkoživuće vrste. Njegov poluvijek u kiselim uvjetima je svega nekoliko sekundi, a čak i u neutralnijim uvjetima nestaje unutar minuta, najčešće raspadajući se na nitrat. Unatoč tome, kratkotrajna prisutnost ONOO^- smatra se kritičnom za biološku učinkovitost PAW-e jer može nepovratno oštetiti proteine i nukleinske kiseline mikroorganizama (Tarabová i sur., 2019).

Na stabilnost aktivnih spojeva u PAW-i značajno utječu pH, temperatura i prisutnost drugih tvari u vodi. Niži pH pogoduje stvaranju HNO_2 i ONOO^- , ali istovremeno ubrzava potrošnju nitrita i smanjuje njegovu dugotrajnu stabilnost. Neutralniji pH omogućuje sporiju kinetiku i dulju postojanost reaktivnih vrsta. Temperatura je također ključna: porast temperature ubrzava raspad H_2O_2 i O_3 , dok skladištenje

PAW-e na 4 °C omogućuje očuvanje značajnog dijela reaktivnih vrsta tijekom više dana (Shen i sur., 2016).

Konačno, ukupna stabilnost PAW-e u vremenu odražava se u postupnom gubitku reaktivnih vrsta. Najprije nestaju ozon i peroksinitrit unutar minuta, potom slijedi postupni pad koncentracije nitrita i vodikova peroksida tijekom sati do dana, dok nitrat ostaje stabilan. Time se PAW-a s vremenom kemijski “istroši” i gubi dio svoje biološke učinkovitosti. Produženje stabilnosti moguće je optimizacijom uvjeta skladištenja, ponajprije hlađenjem i održavanjem pH u neutralnijem području (Shen i sur., 2016).

Razumijevanje kemijskog sastava i kinetike razgradnje aktivnih spojeva u PAW-i ključno je za njezinu racionalnu primjenu. Poznavanje dinamike ROS i RNS omogućuje precizno određivanje vremena uporabe i skladištenja, prilagodbu tretmana ciljanom učinku te optimizaciju učinkovitosti u dezinfekciji i drugim procesima. Istodobno, kinetički modeli pomažu predvidjeti kako će PAW reagirati u složenim sustavima, bilo da je riječ o kontaktu s organskom tvari u hrani ili primjeni u biomedicinskom okruženju. Time se postavljaju temelji za standardizaciju i industrijsku validaciju ove tehnologije.

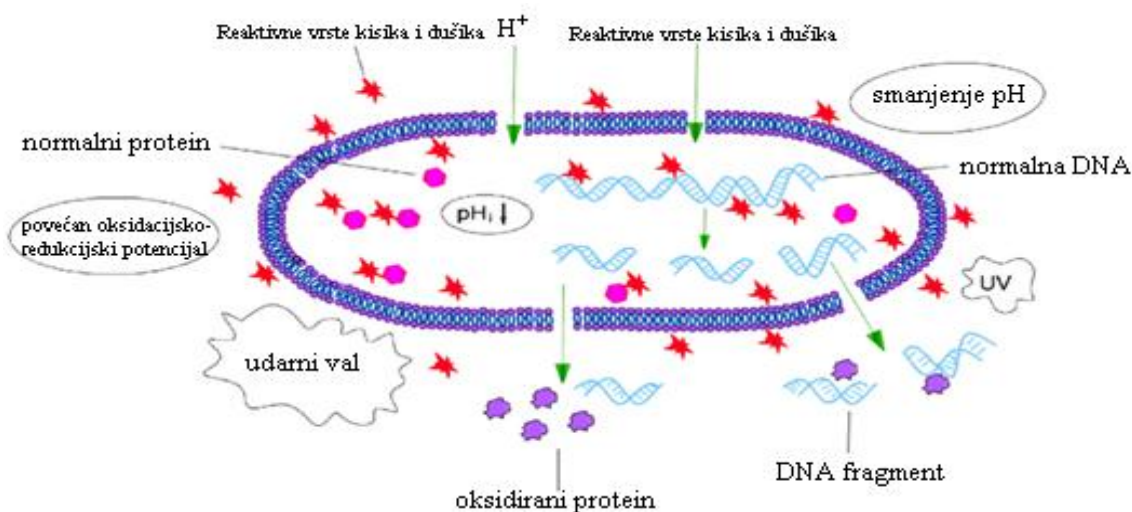
1.4. Antimikrobni mehanizmi djelovanja PAW

PAW-a se može koristiti kao antimikrobna ili dezinfekcijska otopina kod proizvoda budući da su električno polje i UV zrake iz izravne plazma obrade isključeni. PAW je pogodna za uzorke koji su osjetljivi na toplinu. Ovisno o uvjetima skladištenja antimikrobna svojstva i reaktivnost PAW može određeno vrijeme ostati stabilno. Velik broj istraživanja pokazuju da PAW učinkovito djeluje u inaktivaciji širokog raspona mikroorganizama. Glavi mehanizmi inaktivacije mogu se podijeliti na one koji rezultiraju stvaranjem malondialdehida kao konačnog produkta. Malondialdehid je mutagen i toksičan za bakterije (Zhao i sur., 2020).

Reagira s DNA stvarajući adukte nukleotida, također mogu stvarati unakrsne veze koje ometaju replikaciju stanica dovodeći do smrti stanica. U istraživanju Dezest i sur. (2017) uočen je značajan porast oksidiranih proteina bez obzira na radne plinove kod *Escherichiae coli* nakon izlaganja s plazmom. Karbonilne funkcionalne skupine mogu se inducirati u oksidirane proteine putem različitih oksidativnih procesa, uključujući izravnu oksidaciju aminokiselina s H₂O₂ kao i produkte lipidne peroksidacije na staničnoj membrani. Reaktivne vrste kisika, hidroksilni radikali i H₂O₂, mogu uzrokovati oksidativni stres na stanicama. Reaktivne vrste kisika, uključujući OH radikale, O₃ i H₂O₂ mogu strukturno prekinuti važne veze peptidoglikana čime se uništava bakterijska stanična stijenka. Reaktivne vrste kisika odgovorne su za peroksidaciju membrane (Zhao i sur., 2020).

Lipidi membrane posebno polinezasićene masne kiseline najosjetljiviji su na reaktivne vrste kisika. Duljim vremenom izlaganja PAW dolazi do povećane propusnosti membrane kod *Escherichiae coli* (Zhao i sur., 2020).

Također PAW je uzrokovao rupe na stanicama i valovitu staničnu površinu. Ovo je uzrok oksidativnog stresa uzrokovano PAW čime je došlo do oštećenja stanične strukture i membrane. Fizički utjecaj PAW na stanice uključuje pH, oksidacijsko-redukcijski potencijal, UV zračenje i udarne valove. Stvaranjem reaktivnih vrsta kisika i dušika dolazi do nižeg pH u PAW. pH ovakvog okoliša dovodi do smanjenja unutarstaničnog pH. Kada je pH ispod određene granice sve metaboličke aktivnosti u živim mikroorganizmima će biti zaustavljene dovodeći do oštećenja i smrti stanica. UV zračenje dovodi do inaktivacije mikroorganizma. UV zračenje iz koronalnog pražnjenja u vodi dovodi do inaktivacije mikroorganizama. Zbog kavitacijskih mjehurića tijekom generiranja plazme mogu nastati udarni valovi koji dovode do inaktivacije mikroorganizama. U PAW se stvara niz primarnih i sekundarnih reaktivnih vrsta kisika i dušika dovodeći do smanjenja pH, povećanja oksidacijsko-redukcijskih potencijala i električne vodljivosti što uzrokuje fizički stres na stanice. Reaktivne vrste kisika i dušika uzrokuju oksidativni stres koji uništava strukturu peptidoglikana na staničnoj stijenci i pokreće peroksidaciju lipida i proteina na staničnoj membrani. Ovime dolazi do dezintegracije stanične membrane, stvaranja pora na stanicama. Nakon toga dolazi do depolarizacije potencijala stanične membrane. Reaktivne vrste kisika i dušika u okolnom okruženju mogu ući kroz pore u stanice gdje će se nakupljati unutar stanice. Protoni u PAW-i također mogu ući u stanicu te tako smanjiti pH unutar stanice. Unutarstanične reaktivne vrste kisika i dušika oksidiraju unutarstanične komponente, uključujući DNA, proteine, lipide i ugljikohidrate. Može doći do fragmentacije DNA i oksidiranih proteina. PAW-a može dovesti do smrti stanica, ali također ne mora doći do potpune smrti stanica, mogu se samo subletalno oštetiti (Zhao i sur., 2020).



Slika 2. Mehanizmi inaktivacije bakterija PAW-om u oksidativnom i fizičkom aspektu (prema Zhao i sur., 2020)

Gram-pozitivne bakterije su otpornije na tretman s plazmom jer one sadrže deblji sloj peptidoglikana od gram-negativnih bakterija. Deblji sloj peptidoglikana služi kao fizički štiti od plazme. Antimikrobno djelovanje PAW ovisi o kemijsko-fizikalnim svojstvima PAW. Glavno antimikrobno svojstvo PAW je niska pH otopine i mnoštvo kratkotrajnih i dugotrajnih aktivnih kemijskih vrsta. pH vrijednost utjecati će na sastav PAW i time će utjecati na količinu određenih reaktivnih vrsta. Reaktivne vrste kisika i dušika mogu oštetiti mnoge komponente kao što je DNA, RNA, membranske komponente (lipide) i proteine. Bakterije prirodno susreću reaktivne vrste kisika i dušika dok žive aerobno zbog čega su razvile niz zaštitnih sustava poput enzima, malih proteina poput tioredoksina i glutaredoksina te molekula poput glutatona kako bi neutralizirale reaktivne vrste kisika i dušika i kako bi im pomoglo da prežive (Zhao i sur., 2020).

Proizvodnjom enzima, uključujući katalazu, peroksidazu i superoksid dismutazu, stanice mogu pretvoriti štetne reaktivne vrste kisika i dušika u stanici u one spojeve koje ne uzrokuju štetu u stanici. Učinak reaktivnih vrsta u PAW na bakterije ovisi o bakterijskoj vrsti, posebno o tome je li vrsta gram-pozitivna ili gram-negativna, fiziološkom stanju (eksponencijski ili stacionarni rast) i načinu rasta (Mai-Prochnow i sur., 2021).

1.5. Odabrani mikroorganizmi: svojstva i osjetljivost

Listeria monocytogenes je gram-pozitivna, nesporigena bakterija štapićasta oblika, fakultativno anaerobna i psihrotrofna, sposobna za rast u širokom temperaturnom rasponu (od $-0,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $45\text{ }^{\circ}\text{C}$) te u različitim pH uvjetima (4,4–9,6) (Manyi-Loh i Lues, 2025). Stanična stijenka sastoji se od debelog sloja peptidoglikana, što joj daje određenu otpornost na vanjske utjecaje, no ona ne sadrži vanjsku membranu tipičnu za Gram-negativne bakterije. Ova vrsta je poznata po stvaranju biofilmova na površinama procesne opreme, pri čemu se stanice dodatno štite od djelovanja oksidativnih sredstava. Kao uzročnik listerioze, bolesti s visokom stopom smrtnosti, predstavlja značajan javnozdravstveni problem. Biotehnoški, *L. monocytogenes* služi kao modelni organizam u istraživanjima intracelularne patogeneze i imunološkog odgovora domaćina te je važna u razvoju vakcinalnih vektora. Fiziološki gledano, posjeduje enzime poput superoksid-dismutaze, koji doprinose djelomičnoj toleranciji prema oksidativnim spojevima, no osjetljivost na reaktivne vrste kisika i dušika prisutne u PAW-i ipak dovodi do oštećenja membrana i nukleinskih kiselina (Mai-Prochnow i sur., 2016).

Salmonella enterica var. Typhimurium je Gram-negativna, pokretna bakterija štapićasta oblika s bičevima, jedan od najčešćih uzročnika salmoneloze diljem svijeta. Stanična struktura uključuje tanki sloj peptidoglikana i vanjsku membranu bogatu lipopolisaharidima (LPS), koja je ključna meta oksidativnih spojeva iz PAW-e (Abdo i sur., 2023; Ma i sur., 2016). Ta vanjska membrana, iako pruža određenu zaštitu, može biti brzo destabilizirana djelovanjem reaktivnih vrsta, što dovodi do povećane

propusnosti i smrti stanice. *S. Typhimurium* ima sposobnost stvaranja biofilмова, a fiziološki posjeduje enzimske mehanizme za obranu od stresa, uključujući katalazu i peroksidazu, no oni često nisu dovoljni protiv visokih koncentracija oksidansa u PAW-i. U biotehnologiji služi kao modelni sustav za proučavanje interakcija patogena s crijevnim epitelom i razvoj cjepiva, a zbog dobro istraženog genoma koristi se i u genetičkim istraživanjima. Eksperimentalni podaci pokazuju da *S. Typhimurium* brzo gubi održivost u kontaktu s PAW-om, uz izraženo oštećenje membranskih struktura (Abdo i sur., 2023).

Lactobacillus plantarum je Gram-pozitivna, nesporogena bakterija mliječno-kiselog vrenja. Stanična stijenka sastoji se od debelog sloja peptidoglikana koji doprinosi mehaničkoj otpornosti, ali nedostatak katalaze čini ovu vrstu osjetljivom na oksidativni stres (Behera i sur., 2018). Njegova fiziologija uključuje proizvodnju mliječne kiseline i bakteriocina, čime se inhibira rast neželjenih mikroorganizama u fermentiranim namirnicama. U prehrambenoj tehnologiji primjenjuje se kao starter kultura u fermentacijama povrća, sireva i mesnih proizvoda, dok u biotehnologiji i farmaciji ima značaj kao probiotički soj koji može modulirati imunološki sustav i doprinijeti očuvanju zdravlja. Osjetljivost na PAW povezuje se s nedostatkom enzima za neutralizaciju peroksida, što rezultira nakupljanjem oksidativnih oštećenja u staničnim membranama i DNA. Ipak, tolerantnost na niske pH vrijednosti može pridonijeti djelomičnoj stabilnosti pri oksidativnim tretmanima, osobito u kombinaciji s kiselim okolišem. (Behera i sur., 2018)

Candida utilis je jednobunkovni eukariotski kvasac, poznat i kao torula kvasac. Stanična stijenka sastoji se od slojeva glukana, mananoproteina i hitina, što osigurava visoku mehaničku otpornost i otežava penetraciju oksidativnih molekula. Fiziološki, ovaj kvasac posjeduje razvijen antioksidativni sustav koji uključuje katalazu, peroksidazu i glutation, čime učinkovito neutralizira perokside i superokside (Chiappim i sur., 2021). Zbog tih svojstava pokazuje znatno veću otpornost na PAW u usporedbi s bakterijama. U prehrambenoj industriji koristi se kao izvor proteina i vitamina, a u biotehnologiji je značajan u proizvodnji enzima i rekombinantnih proteina, kao i u procesima kružne bioekonomije, gdje omogućuje preradu nusproizvoda prehrambene industrije u vrijedne biomase (Buerth i sur., 2016). Istraživanja pokazuju da kratkotrajna izloženost PAW-i ne uzrokuje značajnu redukciju broja stanica *C. utilis*, što potvrđuje otpornost eukariotskih stanica na oksidativne uvjete (Chiappim i sur., 2021).

Usporedba ovih mikroorganizama jasno pokazuje da morfološka struktura i fiziološki mehanizmi značajno utječu na osjetljivost prema PAW-i. Gram-negativne bakterije poput *S. Typhimurium* osjetljivije su zbog tanke stanične stijenke i ranjive vanjske membrane, dok Gram-pozitivne bakterije, zahvaljujući debljem sloju peptidoglikana, pokazuju veću otpornost (Mai-Prochnow i sur., 2016). Kvasci poput *C. utilis* dodatno se ističu višeslojnim stijenkama i snažnim antioksidativnim sustavom, što ih čini najotpornijima na oksidativno djelovanje PAW-e. Ovakva diferencijacija jasno ilustrira kako

PAW ima snažan potencijal u inaktivaciji patogenih bakterija, dok istodobno otvara pitanja o njegovom utjecaju na korisne i industrijski važne mikroorganizme u prehrambenoj tehnologiji i biotehnologiji.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI

2.1. Opći i specifični ciljevi

Glavni cilj ovoga rada bio je istražiti antimikrobni učinak plazmom aktivirane vode (PAW) na odabrane mikroorganizme: bakterije *Listeria monocytogenes* 3112, *Salmonella enterica* var. Typhimurium 3064, BMK *Lactobacillus plantarum* 73 te kvasac *Candida utilis* 11, kao i ispitati mehanizme njezina djelovanja. Poseban naglasak stavljen je na određivanje promjena u fizikalno-kemijskim parametrima svojstava PAW-a (pH-vrijednosti, oksidacijskog potencijala te koncentracije reaktivnih dušikovih i kisikovih vrsta), budući da upravo te značajke značajno doprinose njezinoj antimikrobnoj aktivnosti.

U istraživanju su korištena dva tipa reaktora: plinski i tekućinski. U plinskom reaktoru voda se aktivira djelovanjem plazme formirane iznad njezine površine, pri čemu se reaktivne vrste prenose u vodenu fazu difuzijom i otapanjem. Suprotno tome, u tekućinskom reaktoru plazma se generira izravno unutar same vode, čime dolazi do intenzivnijeg stvaranja i interakcije reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta s vodenom matricom. Time se omogućuje usporedba različitih mehanizama prijenosa energije i učinkovitosti aktivacije vode.

Uz to, rad je imao za cilj procijeniti razlike u osjetljivosti između različitih vrsta mikroorganizama, s naglaskom na potencijalne razlike između Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Dobiveni rezultati trebali bi doprinijeti boljem razumijevanju mogućnosti primjene PAW-e kao alternativne, ekološki prihvatljive metode dezinfekcije u području prehrambene tehnologije i sigurnosti hrane.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije i standardi

- titanium (IV) oxide, 98+%, anatase powder, Acros Organics, Belgija
- nitrite Test (sadrži slufanilnu kiselinu), Spectroquant, Merck, Njemačka
- nitrate Test (sadrži sumpornu kiselinu), Spectroquant, Merck, Njemačka
- testne trakice QUANTOFIX za nitrate i nitrite, Macherey-Nagel, Njemačka
- argon 5.0, Messer, Hrvatska
- dušik 4.6, Messer Hrvatska
- 30 % otopina vodikovog peroksida (Gram-mol d.o.o., Hrvatska)
- sumporna kiselina, Kemika, Hrvatska
- agar, Biolife, Italija
- malt ekstrakt bujon, Biolife, Italija
- hranjivi bujon, Biolife, Italija

3.1.2. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Infracrveni beskontaktni termometar PCE-777 – PCE Instruments, Velika Britanija
- Multiparametarski mjerač pH/EC/DO – Edge HI2020, Hanna Instruments, Rumunjska
- Peristaltička pumpa SP311 – VELP Scientifica, Italija
- Podesiva pipeta (100–1000 µL) – DLAB Scientific, Kina
- Podesiva pipeta (1000–5000 µL) – DLAB Scientific, Kina
- Spektrofotometar Spectroquant Prove 300 – Merck, Njemačka
- Spektrofotometar UviLine 9400 – Secomam, Francuska
- Uređaj za generiranje plazme – Impel d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- Mikrobiološki zaštitni kabinet – Klimaoprema, Zagreb, Hrvatska
- Vibromješač MS 2 digital – IKA, SAD
- Autoklav – „Sutjeska“ fabrika medicinskih uređaja i instrumenata, Beograd, Srbija
- Termostat – Termo medicinski aparati Bodalec, Hrvatska

Pribor:

- Petrijeve zdjelice, promjer 9 cm – Medicplast, Zagreb, Hrvatska
- Mikroeprovete 2 mL – Deltalab, Barcelona, Španjolska
- Eppendorf pipetmani 10-100 µL

3.1.3. Radni mikroorganizmi

Kao radni mikroorganizmi korišteni su sojevi bakterija *Listeria monocytogenes* 3112, *Salmonella enterica* var. Typhimurium 3064 i BMK *Lactobacillus plantarum* 73, te kvasac *Candida utilis* 11. Korišteni sojevi su iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju vrenja i kvasca, Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta. U tablici 1 prikazani su korišteni sojevi, njihove oznake, hranjive podloge i uvjeti rasta.

Tablica 1. Prikaz sojeva mikroorganizama, hranjivih podloga u kojima su uzgojeni i uvjeti rasta

Mikroorganizam	Oznaka soja	Hranjiva podloga i temperatura rasta
<i>Listeria monocytogenes</i>	3112	Muller-Hintonov bujon, 25 °C
<i>Salmonella</i>	3064	Muller-Hintonov bujon, 25 °C
<i>Lactobacillus plantarum</i>	73	De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) bujon, 37 °C
<i>Candida utilis</i>	11	Malt ekstrakt bujon, 25 °C

3.1.4. Hranjive podloge za uzgoj stanica bakterija i kvasaca

3.1.4.1. Hranjiva podloga za uzgoj prekonoćnih kultura radnih mikroorganizama

Za uzgoj prekonoćnih kultura radnih mikroorganizama korišten je Mueller–Hintonov bujon. Mikrobnе kulture inkubirane su pri temperaturi od 37 °C kroz 24 sata. Nakon uzgoja, kulture su bile spremne za izdvajanje biomase i daljnje mikrobiološke analize.

3.1.4.2. Hranjiva podloga za uzgoj bakterijskih stanica

Mueller–Hintonov bujon pripremljen je otapanjem 11 g komercijalne dehidrirane hranjive podloge u 500 mL destilirane vode. Dobivena otopina zagrijavana je uz povremeno miješanje do vrenja (jedna minuta), nakon čega je sterilizirana u autoklavu tijekom 15 minuta pri 121 °C i tlaku od $1,01 \times 10^5$ Pa. Nakon hlađenja do 50 °C, podloga je aseptično razlivena u sterilne Petrijeve zdjelice unutar laminarnog kabineta. Ova podloga pogodna je za rast različitih bakterijskih vrsta i često se koristi za ispitivanje osjetljivosti na antimikrobna sredstva.

3.1.4.3. Hranjiva podloga za uzgoj bakterija mliječne kiseline

Za uzgoj bakterija mliječne kiseline (npr. *Lactobacillus plantarum*) koristi se komercijalna dehidrirana hranjiva podloga de Man, Rogosa and Sharpe (MRS). U 1 litri destilirane vode otopi se 55,2 g MRS hranjive podloge te 20 g agara. Pripremljena podloga sterilizira se u autoklavu pri 121 °C i tlaku od

$1,01 \times 10^5$ Pa. Nakon hlađenja podloga se aseptično razlijeva u sterilne Petrijeve zdjelice unutar laminara.

3.1.4.4. Hranjiva podloga za uzgoj stanica kvasaca

Za uzgoj stanica kvasaca korišten je malt ekstrakt bujon. Pripremljen je otapanjem 20 g malt ekstrakta u 1000 mL destilirane vode, a zatim steriliziran u autoklavu tijekom 15 minuta pri 121 °C i $1,01 \times 10^5$ Pa. Za pripremu 1 L čvrste podloge izvagano je 20 g malt ekstrakta te dodano 20 g agara, nakon čega je smjesa ponovno sterilizirana pod istim uvjetima. Tako pripremljena podloga omogućava uspješan rast i izolaciju kvasaca iz uzoraka.

3.2. Metode rada

3.2.1. Priprema uzoraka plazmom aktivirane vode (PAW)

U ovom eksperimentu pripremljeni su uzorci plazmom aktivirane vode (PAW) korištenjem dvaju tipova reaktora – tekućinskog i plinskog. Ukupno je pripremljeno 12 uzoraka, koji su se međusobno razlikovali prema vrsti korištenog plina (argon, dušik, kisik), naponu (20 kV i 30 kV) te tipu reaktora. Kao uzorak korištena je destilirana voda dobivena iz sustava za pročišćavanje vode na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu. Svaki uzorak imao je volumen od 100 mL.

Svi uzorci bili su izloženi djelovanju plazme u trajanju od 7 minuta. Nakon tretmana provedena su mjerenja fizikalno-kemijskih parametara: pH, električna vodljivost ($\mu\text{S}/\text{cm}$) i temperatura ($^{\circ}\text{C}$). Također je spektrofotometrijski određena koncentracija vodikovog peroksida (H_2O_2) (mg/L), nitrata (NO_3^-) (mg/L) i nitrita (NO_2^-) (mg/L).

Parametri korišteni pri tretmanu prikazani su u tablici 2, a dobiveni rezultati analizirani su s ciljem razumijevanja utjecaja različitih uvjeta plazme na svojstva PAW.

Tablica 2. Parametri tretmana za stvaranje plazma aktivirane vode

Uzorak	Naziv uzorka	Napon (kV)	Vrijeme (min)	Plin	Vrsta plazme
1	P_Ar_20	20	7	Argon (Ar)	Plinska
2	P_Ar_30	30	7	Argon (Ar)	Plinska
3	P_N2_20	20	7	Dušik (N2)	Plinska
4	P_N2_30	30	7	Dušik (N2)	Plinska
5	P_O2_30	30	7	Kisik (O2)	Plinska
6	P_O2_20	20	7	Kisik (O2)	Plinska
7	T_Ar_20	20	7	Argon (Ar)	Tekućinska
8	T_Ar_30	30	7	Argon (Ar)	Tekućinska
9	T_O2_20	20	7	Kisik (O2)	Tekućinska
10	T_O2_30	30	7	Kisik (O2)	Tekućinska
11	T_N2_20	20	7	Dušik (N2)	Tekućinska
12	T_N2_30	30	7	Dušik (N2)	Tekućinska

3.2.1.1. Opis plazma generatora i reaktora

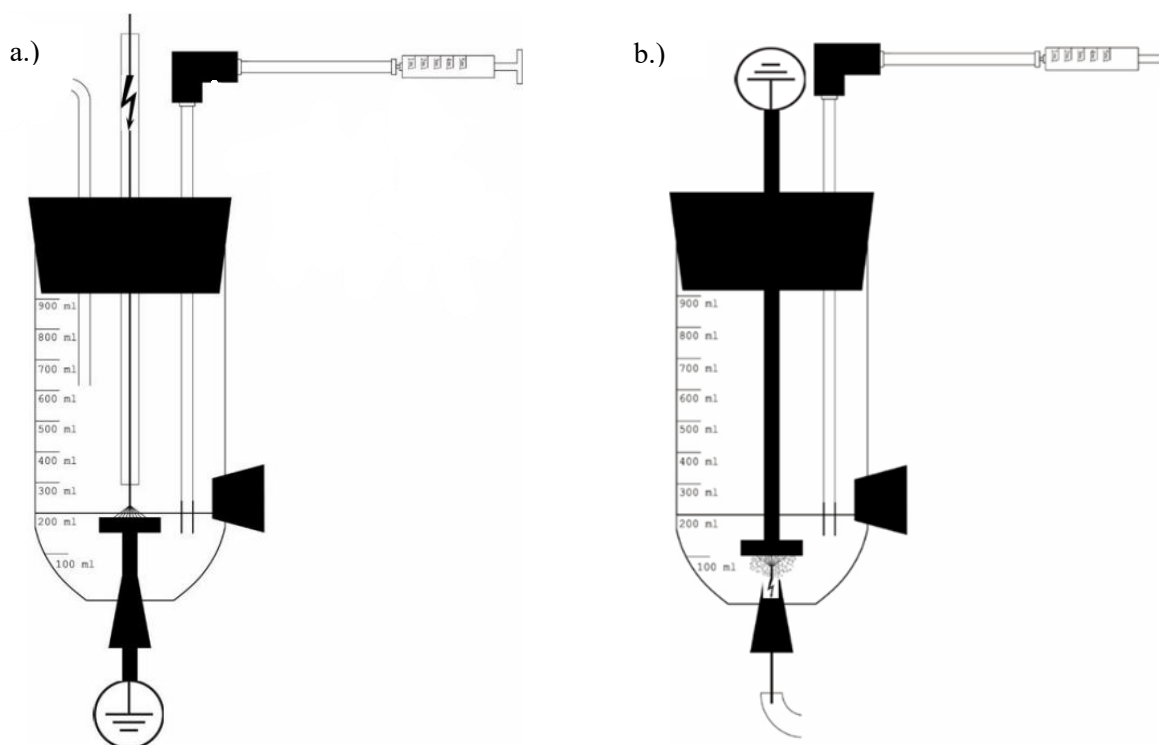
Uzorci vode dobiveni su korištenjem dva tipa reaktora u istoj konfiguraciji elektroda točka-ploča. Kod plinskog tipa reaktora visokonaponska elektroda nalazi se iznad površine tekućine, te se plazma izboji stvaraju na površini vode dok se kod tekućinskog reaktora visokonaponska elektroda nalazi uronjena u tekućinu, pa dolazi do pojave plazma izboja u samoj tekućini. U oba tipa reaktora korištena je srebrna elektroda kao visokonaponska elektroda, dok se za elektrodu uzemljena koristila pločica od nehrđajućeg

čelika. U tekućinskom reaktoru dolazi do izravne interakcije plazme s molekulama vode čime nastaju reaktivne vrste i dolazi do promjene fizikalno – kemijskih parametara tretirane vode.

Kod plinskog reaktora dolazi do stvaranja plazme u plinskoj fazi te plazma izboji dodiruju površinu vode u promjeru pločice koja se koristi kao elektroda uzemljena. U području kontakta plazma izboja i tekućine dolazi do otapanja nastalih slobodnih vrsta koje dovode do promjene fizikalno – kemijskih parametara tretirane vode.

a) Generiranje plazmom aktivirane vode u plinskom reaktoru

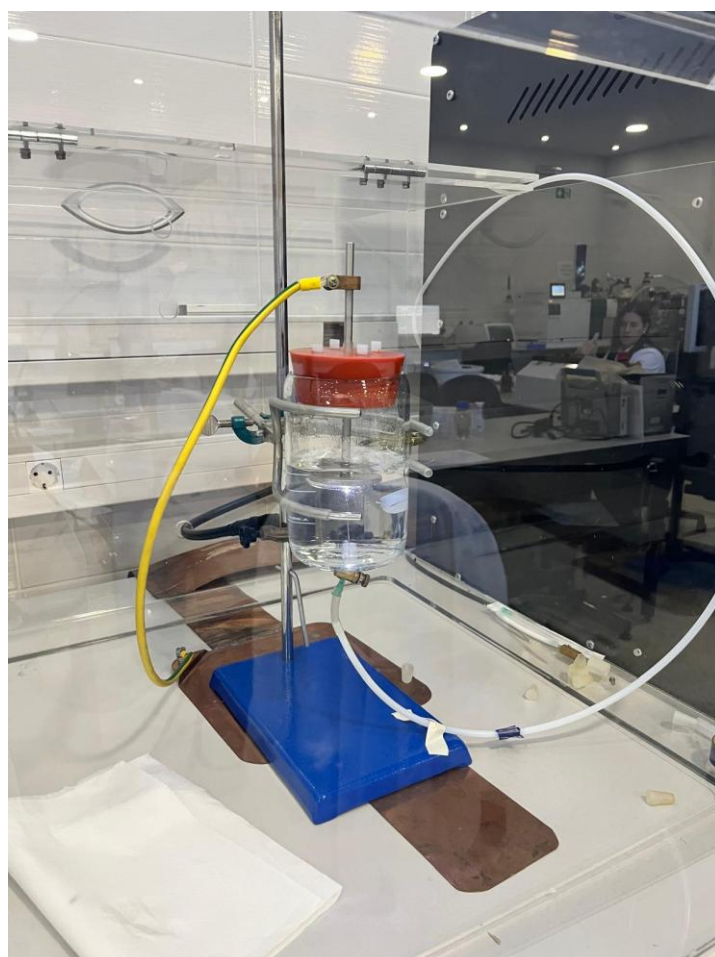
U plinskom reaktoru došlo je do stvaranja plazme iznad površine uzoraka vode te nije bilo izravnog kontakta elektrode s vodom. U uređaju za generiranje plazme uzorci vode su izloženi plazmi čime je dobivena PAW-a. Uređaj se sastoji od plazma generatora korištenog za stvaranje električnih impulsa visokog napona i plinskog reaktora. Odabrani plinovi (argon, dušik, kisik) upuhivani su u reaktor u prostor iznad površine vode putem plastične cijevi kroz gumeni čep reaktora. Visokonaponska elektroda nalazi se iznad površine vode u reaktoru u plinskoj fazi, a pločasta elektroda uzemljena nalazila se u tekućoj fazi. Dolazi do stvaranja plazme između dviju elektroda. U plinskoj fazi generirana je plazma koja je indirektno djelovala na površinu vode. Reaktivni spojevi nastali u plinu difundiraju kroz međupovršinu plin-tekućina. Mjerena je temperatura prije i nakon obrade vode infracrvenim beskontaktnim termometrom. Obrada vode trajala je 7 minuta pri sobnoj temperaturi.



Slika 3. Shema plinskog reaktora za generiranje PAW (a); shema tekućinskog reaktora za generiranje PAW (b)

b) Generiranje plazmom aktivirane vode u tekućinskom reaktoru

Stvaranje plazma aktivirane vode izvođeno je u zatvorenom staklenom reaktoru unutar kojeg se radni plin (argon, dušik ili kisik) upuhivao kroz medicinsku iglu u dno reaktorske posude direktno u vodu. Tekućinski reaktor sastoji se od staklene posude u kojoj se nalaze dvije elektrode. Radni plin je kontinuiranim protokom uveden u reaktorsku posudu, što je omogućilo stvaranje plazme unutar tekuće faze. Elektroda visokonaponskog izvora (medicinska igla) bila je uronjena u vodu te postavljena s donje strane reaktora, a elektroda uzemljenja nalazila se s gornje strane reaktora. Između dviju elektroda došlo je do uspostavljanja električnog polja unutar same vode. Temperatura vode mjerena je prije i nakon tretmana vode infracrvenim beskontaktnim termometrom PCE-777. Za svaki uzorak, proveden je tretman u trajanju od 7 minuta pri sobnoj temperaturi. Ovom metodom došlo je do izravnog stvaranja reaktivnih vrsta u vodi čime je došlo do značajnih promjena u fizikalno – kemijskim parametrima.



Slika 4. Prikaz tekućinskog reaktora u Laboratoriju za procesno-prehrambeno inženjerstvo

3.2.2. Određivanje fizikalno-kemijskih parametara

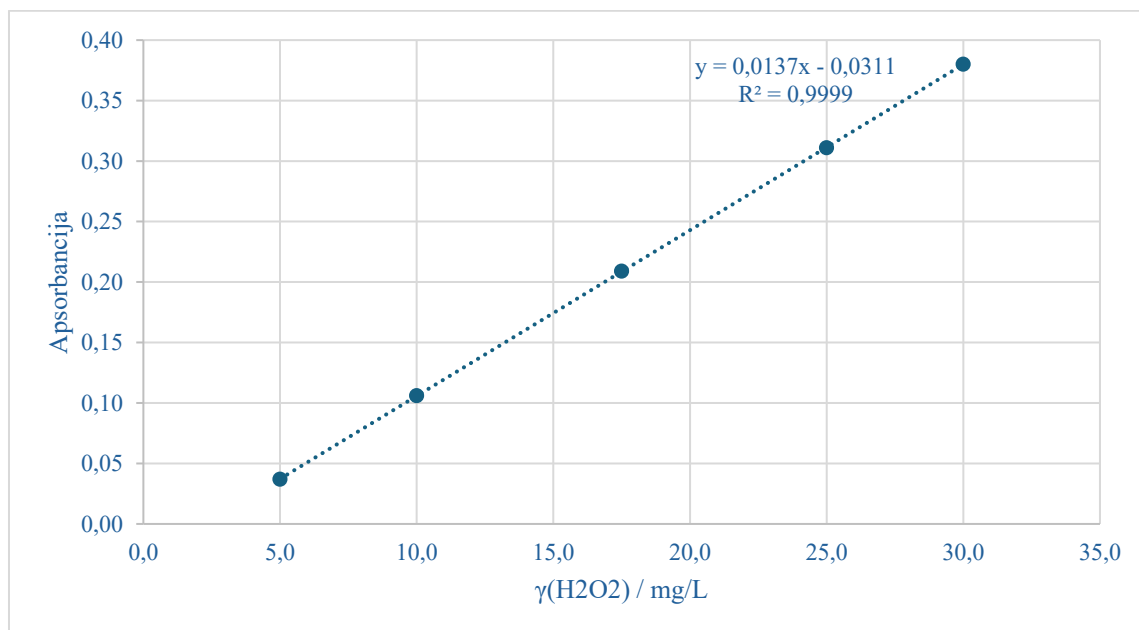
Električna provodljivost ($\mu\text{S}/\text{cm}$), pH i temperatura ($^{\circ}\text{C}$) određivani su pomoću multiparametarskog mjerača Edge HI2020 i infracrvenog beskontaktnog termometra.

3.2.2.1. Određivanje koncentracije vodikova peroksida

Za određivanje koncentracije vodikova peroksida (H_2O_2) korišten je titanov reagens (Hossain i sur., 2022). Uzorci su pripremljeni miješanjem 1 mL reagensa s 2 mL uzorka plazma aktivirane vode, pri čemu prisutnost H_2O_2 uzrokuje razvoj žute obojenosti (Hossain i sur., 2022). Intenzitet boje analiziran je spektrofotometrom UviLine 9400 na valnoj duljini od 410 nm, a koncentracija H_2O_2 (mg/L) određena je iz jednadžbe pravca (Osha, 1978).

3.2.2.2. Izrada baždarnog pravca za određivanje koncentracije vodikovog peroksida

Za izradu baždarnog pravca (slika 11) korištena je 30 % otopina vodikova peroksida, koja je serijski razrijeđena do različitih koncentracija. Svaka pripremljena otopina (2 mL) pomiješana je s 1 mL titanova reagensa, nakon čega je izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od 410 nm. Dobiveni podaci iskorišteni su za izradu baždarnog pravca, prema kojem je određena koncentracija vodikova peroksida (mg/L) u uzorcima plazmom aktivirane vode.



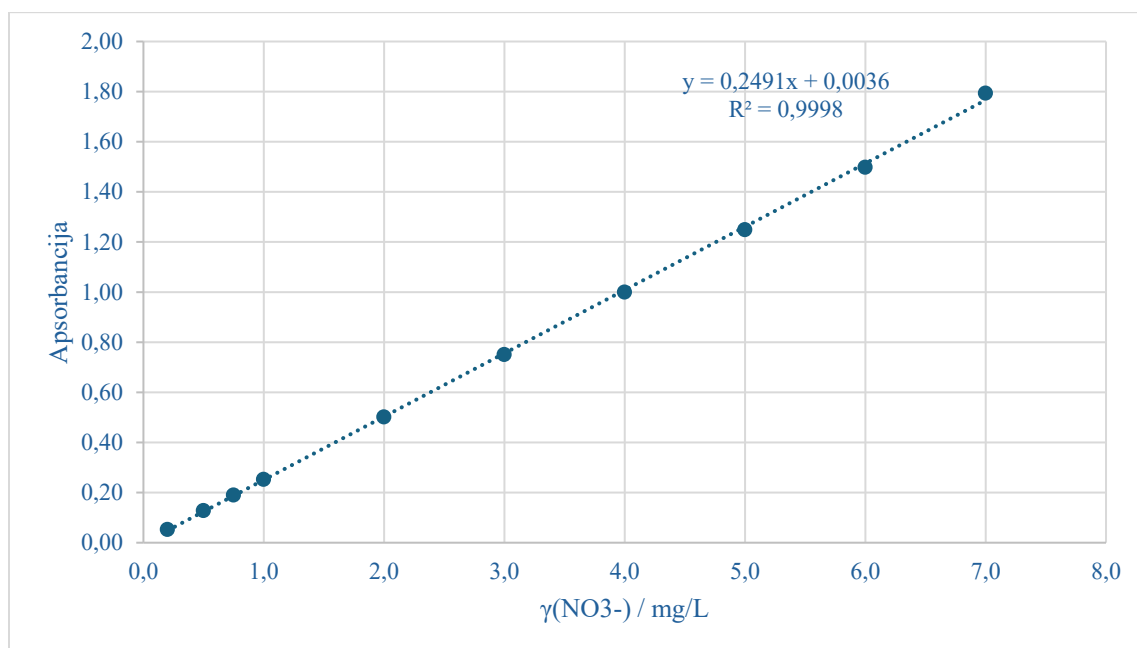
Slika 5. Baždarni pravac za očitavanje koncentracije vodikovog peroksida

3.2.2.3. Određivanje koncentracije nitrita

Za određivanje koncentracije nitrita korišten je testni komplet Spectroquant Nitrite Test (Merck). U 5 mL uzorka dodana je jedna mjerna žličica reagensa u prahu, nakon čega je provedeno spektrofotometrijsko mjerenje pomoću uređaja Spectroquant Prove 300. Dobiveni rezultati izraženi su u mg/L.

3.2.2.4. Određivanje koncentracije nitrata

Nitrati su određivani sa sumpornom kiselinom kao reagensom. U 5 mL uzorka plazma aktivirane vode dodano je 15 µL koncentrirane sumporne kiseline, te smo koncentraciju nitrata mjerili pomoću uređaja Spektrofotometar UviLine 9400. Množinsku koncentraciju nitrata izrazili smo u mg/L pri valnoj duljini 220 nm. Za provjeru rezultata provedeno je kvalitativno određivanje nitrata pomoću test trakica (Nitrate Test, Spectroquant) koje također sadrže sumpornu kiselinu kao reagens.



Slika 6. Baždarni pravac za očitavanje koncentracije nitrata

3.2.3. Priprema radnih mikroorganizama

Za ispitivanje antimikrobnog učinka korišteni su sljedeći radni mikroorganizmi: *Candida utilis* 11, *Salmonella enterica* var. *Typhimurium* 3064, *Lactobacillus plantarum* 73 i *Listeria monocytogenes* 3112. Svaka je kultura prethodno uzgojena u odgovarajućoj hranjivoj podlozi tijekom 24 sata pri optimalnim uvjetima rasta (37 °C za bakterije, a za kvasce prema preporukama za vrstu). Nakon

inkubacije, stanične suspenzije podvrgnute su centrifugiranju u cilju odvajanja biomase od tekuće hranjive podloge.

Dobivena biomasa resuspendirana je u 3 mL sterilnog PBS pufera (phosphate-buffered saline), čime je pripremljena homogenizirana stanična suspenzija. Prvo razrjeđenje pripremljeno je dodavanjem 100 µL stanične suspenzije u 900 µL PBS-a, čime se dobio uzorak spreman za daljnje razrjeđivanje i izlaganje ispitivanim uzorcima.

3.2.4. Određivanje antimikrobnog učinka

Nakon pripreme radnih mikroorganizama, pristupilo se ispitivanju antimikrobnog učinka plazmom aktivirane vode (PAW). Postupak je proveden aseptično, unutar laminarnog kabineta, kako bi se izbjegla kontaminacija uzoraka i osigurali pouzdani rezultati.

Za svaku od 12 plazmom aktiviranih voda (PAW 1–12) te za kontrolnu skupinu (slijepa proba, sterilna destilirana voda), provedena su serijska razrjeđenja. U početnom koraku, 100 µL prethodno pripremljene stanične suspenzije odpipetirano je u 900 µL PAW uzorka ili slijepa probe, čime je postignuto razrjeđenje 10^{-1} . Iz tog razrjeđenja uzeto je 100 µL uzorka i dodano u 900 µL sterilne destilirane vode, čime su pripremljena daljnja razrjeđenja: 10^{-2} , 10^{-3} i 10^{-4} . Time je svako razrjeđenje izrađeno u faktoru 1:10, uz ukupno pet razina (10^0 do 10^{-4}).

Iz svakog pojedinog razrjeđenja uzeto je 100 µL te naciepljeno na odgovarajuće hranjive podloge u četiri paralelne ponovljenosti. Postupak je proveden za sve uzorke (PAW 1–12) te kontrolu (slijepu probu).

Inokulirane podloge inkubirane su u termostatu tijekom 24 sata. Mikrobiološke vrste *Candida utilis* i *Lactobacillus plantarum* inkubirane su na temperaturi 32 °C, dok su *Listeria monocytogenes* i *Salmonella spp.* inkubirane na 37 °C, što predstavlja optimalne uvjete rasta za te mikroorganizme.

Nakon 24-satne inkubacije, provedeno je brojanje kolonija (CFU – colony forming units) za svaku paralelu i razrjeđenje. Na temelju prosječnog broja kolonija te pripadajućeg razrjeđenja izračunata je koncentracija mikroorganizama u početnom uzorku, izražena kao broj kolonija koje formiraju jedinice (CFU/mL). Usporedbom rezultata između uzoraka PAW i slijepa probe omogućena je procjena prisutnosti i intenziteta antimikrobnog učinka plazmom aktivirane vode.

$$\frac{\text{CFU}}{\text{mL}} = \frac{a}{b} \cdot c$$

a = srednja vrijednost broja poraslih kolonija na odgovarajućem razrjeđenju

b = volumen upotrijebljenog uzorka (mL)

c = recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja

3.2.3. Statistička obrada podataka

Za svaku skupinu mjerenja izračunate su aritmetičke sredine i standardne devijacije. Aritmetička sredina računata je prema formuli:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

a standardna devijacija prema izrazu:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Antimikrobni učinak izražen je kao razlika logaritama broja kolonija:

$$\Delta \log = \log (\text{CFU kontrola}) - \log (\text{CFU tretirano})$$

Za usporedbu više skupina korištena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA), koja na temelju F-testa procjenjuje postoje li statistički značajne razlike među aritmetičkim sredinama (razina značajnosti $\alpha = 0,05$).

4. REZULTATI

4.1. Plinski reaktor

4.1.1. Fizikalno – kemijska analiza uzoraka PAW generiranih u plinskom reaktoru

Nakon obrade vode u plinskom reaktoru provedena je fizikalno-kemijska analiza dvanaest uzoraka PAW. U tu analizu pripada mjerenje pH, električne provodljivosti ($\mu\text{S}/\text{cm}$), temperature ($^{\circ}\text{C}$) te određivanje koncentracije nitrata (mg/L), nitrita (mg/L) i vodikova peroksida (mg/L). U tablici 3. prikazani su rezultati ispitane analize fizikalno-kemijskih parametara.

Tablica 3. Rezultati ispitivanih fizikalno – kemijskih parametara PAW za plinski reaktor

Uzorak	Naziv uzorka	pH	σ ($\mu\text{S}/\text{cm}$)*	c (H_2O_2) mg/L	c (NO_3^-) mg/L	c (NO_2^-) mg/L	T prije ($^{\circ}\text{C}$)	T poslije ($^{\circ}\text{C}$)
1	P_Ar_20	6,73 $\pm$ 0,15	19,01 $\pm$ 0,23 pri 21,3 $^{\circ}\text{C}$	11,45	15	0,75 $\pm$ 0,02	26,4	28,9
2	P_Ar_30	6,52 $\pm$ 0,22	7,16 $\pm$ 0,04 pri 21,4 $^{\circ}\text{C}$	21,14	>10	0,24 $\pm$ 0	25,9	31,1
3	P_N2_20	6,57 $\pm$ 0,18	23,54 $\pm$ 0,01 pri 20,9 $^{\circ}\text{C}$	4,91	25	1,84	24,8	26,9
4	P_N2_30	3,85 $\pm$ 0,19	85,7 $\pm$ 0,28 pri 21 $^{\circ}\text{C}$	6,47	20	1,74	24,6	24,6
5	P_O2_30	3,98	51,2 pri 20,4 $^{\circ}\text{C}$	12,02 $\pm$ 0,0 1	0,05 $\pm$ 0,03	0,09 $\pm$ 0,01	20,1	23,4
6	P_O2_20	5,10	60,4 pri 20,4 $^{\circ}\text{C}$	7,29 $\pm$ 0,13	0,04 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,04	20,1	28,1

* pri izmjerenoj temperaturi

4.1.2. Antimikrobni učinak uzoraka PAW generiranih u plinskom reaktoru

U ovom radu ispitan je i antimikrobni učinak PAW generirane u plinskom reaktoru koja je provedena pri različitim uvjetima koji su opisani u tablici 3. Pratila se stopa preživljavanja nakon tretmana s PAW na uzorcima četiri mikroorganizama: *Listeria monocytogenes* 3112, *Salmonella enterica* var. Typhimurium 3064, *Lactobacillus plantarum* 73 i *Candida utilis* 11. Određivao se broj preživjelih stanica (CFU/mL) nakon 3 i 24 sata inkubacije. U tablici 4. prikazan je učinak PAW-e na preživljavanje bakterije *Listeria monocytogenes*. Tablica 5. prikazuje antimikrobi učinak PAW na bakteriju *Salmonella*. Tablica 6. prikazuje rezultate za bakteriju mliječne kiseline *Lactobacillus plantarum*, a u tablici 7. prikazano je djelovanje PAW na ispitivani kvasac *Candida utilis*.

Tablica 4. Stupanj redukcije stanica *Listeria monocytogenes* (log CFU/mL) nakon tretmana PAW generirane u plinskom reaktoru.

Mikroorganizam	Naziv uzorka	$\Delta \log$ redukcija (log CFU/mL) 3h	$\Delta \log$ redukcija (log CFU/mL) 24h
<i>Listeria monocytogenes</i> <i>p</i> (0,042847)*	P_Ar_20	2,91±0,11	3,62±0,70
	P_Ar_30	4,35±0,34	3,62±0,13
	P_N2_20	0,85±0,23	3,62±0,31
	P_N2_30	1,18±0,13	3,62±0,00
	P_O2_20	0,30±0,20	5,60±0,00
	P_O2_30	4,35±4,45	5,60±0,00

*Statistički značajna varijacija pri $p \leq 0,05$

Tablica 5. Stupanj redukcije stanica *Salmonella enterica* (log CFU/mL) nakon tretmana PAW generirane u plinskom reaktoru.

Mikroorganizam	Naziv uzorka	$\Delta \log$ redukcija (log CFU/mL) 3h	$\Delta \log$ redukcija (log CFU/mL) 24h
<i>Salmonella</i>	P_Ar_20	4,27±0,17	3,35±0,13
	P_Ar_30	4,94±0,28	3,35±0,23
	P_N2_20	4,94±0,14	3,35±0,12
	P_N2_30	3,86±0,08	3,35±0,24
	P_O2_20	5,92±0,00	6,12±0,00
	P_O2_30	4,58±4,04	6,12±0,00

Tablica 6. Stupanj redukcije stanica *Lactobacillus plantarum* (log CFU/mL) nakon tretmana PAW generirane u plinskom reaktoru.

Mikroorganizam	Naziv uzorka	$\Delta \log$ redukcija (log CFU/mL) 3h	$\Delta \log$ redukcija (log CFU/mL) 24h
<i>Lactobacillus plantarum</i>	P_Ar_20	5,31±1,15	3,81±0,00
	P_Ar_30	5,31±0,12	3,81±0,00
	P_N2_20	5,31±0,22	3,81±0,00
	P_N2_30	5,31±0,16	3,81±0,00
	P_O2_20	4,60±5,20	6,58±0,00
	P_O2_30	1,52±0,25	6,58±0,00

Tablica 7. Stupanj redukcije stanica *Candida utilis* (log CFU/mL) nakon tretmana PAW generirane u plinskom reaktoru.

Mikroorganizam	Naziv uzorka	$\Delta \log$ redukcija (log CFU/mL) 3h	$\Delta \log$ redukcija (log CFU/mL) 24h
<i>Candida utilis</i> <i>p</i> (0,018269)	P_Ar_20	5,22±0,00	3,71±0,00
	P_Ar_30	5,22±0,00	3,71±0,00
	P_N2_20	5,22±18	3,71±0,00
	P_N2_30	3,12±0,00	3,71±0,00
	P_O2_20	4,27±0,00	3,19±0,00
	P_O2_30	4,27±0,00	3,19±0,00

*Statistički značajna varijacija pri $p \leq 0,05$

4.2. Tekućinski reaktor

4.2.1. Fizikalno – kemijska analiza uzoraka PAW generiranih u tekućinskom reaktoru

Tablica 8. Rezultati ispitivanja fizikalno – kemijskih parametara PAW za tekućinski reaktor

Uzorak	Naziv uzorka	pH	σ ($\mu\text{S}/\text{cm}$ pri izmjerenoj temperaturi)	c (H_2O_2) mg/L	c (NO_3^-) mg/L	c (NO_2^-) mg/L	T prije ($^{\circ}\text{C}$)	T poslije ($^{\circ}\text{C}$)
7	T_Ar_20	4,80±0,00	9,46±0,00 pri 20,4 $^{\circ}\text{C}$	3,29±0,16	0,13	0,04	20,3	21,6
8	T_Ar_30	4,02±0,00	49,5±0,00 pri 20,4 $^{\circ}\text{C}$	6,34±0,25	0,17	0,16	20,3	24,9
9	T_N2_20	7,46±0,00	7,59±0,00 pri 21,6 $^{\circ}\text{C}$	6,08±0,50	0	0,13	20,5	23,2
10	T_N2_30	8,18±0,00	5,04±0,00 pri 21,0 $^{\circ}\text{C}$	18,82±0,83	0	0,12	20,5	22,4
11	T_O2_20	7,67±0,00	96,20±0,00 pri 20,5 $^{\circ}\text{C}$	6,03±0,17	0,04	0,20	20,1	23,4
12	T_O2_30	7,74±0,00	5,06±0,00 pri 21,1 $^{\circ}\text{C}$	21,86±0,23	0	0,14	20,1	28,1

4.2.2. Antimikrobni učinak uzoraka PAW generiranih u tekućinskom reaktoru

Tablica 9. Stupanj redukcije stanica *Listeria monocytogenes* (log CFU/mL) nakon tretmana PAW generirane u tekućinskom reaktoru

Mikroorganizam	Naziv uzorka	$\Delta \log$ redukcija (log CFU/mL) 3h	$\Delta \log$ redukcija (log CFU/mL) 24h
<i>Listeria monocytogenes</i> <i>p</i> (0,00065)	T_Ar_20	0,62±0,06	5,16±0,00
	T_Ar_30	0,98±0,05	5,16±0,00
	T_N2_20	1,33±0,10	5,5±0,00
	T_N2_30	2,44±0,21	5,5±0,00
	T_O2_20	0,99±0,15	5,5±0,00
	T_O2_30	5,22±0,00	5,5±0,00

*Statistički značajna varijacija pri $p \leq 0,05$

Tablica 10. Stupanj redukcije stanica *Salmonella enterica* (log CFU/mL) nakon tretmana PAW generirane u tekućinskom reaktoru.

Mikroorganizam	Naziv uzorka	$\Delta \log$ redukcija (log CFU/mL) 3h	$\Delta \log$ redukcija (log CFU/mL) 24h
<i>Salmonella</i> <i>p</i> (0,016051)	T_Ar_20	1,97±0,07	6,02±0,00
	T_Ar_30	4,23±4,76	6,02±0,00
	T_N2_20	4,48±3,61	6,02±0,00
	T_N2_30	4,97±2,25	6,02±0,00
	T_O2_20	4,97±4,5	6,02±0,00
	T_O2_30	5,97±0,00	6,02±0,00

*Statistički značajna varijacija pri $p \leq 0,05$

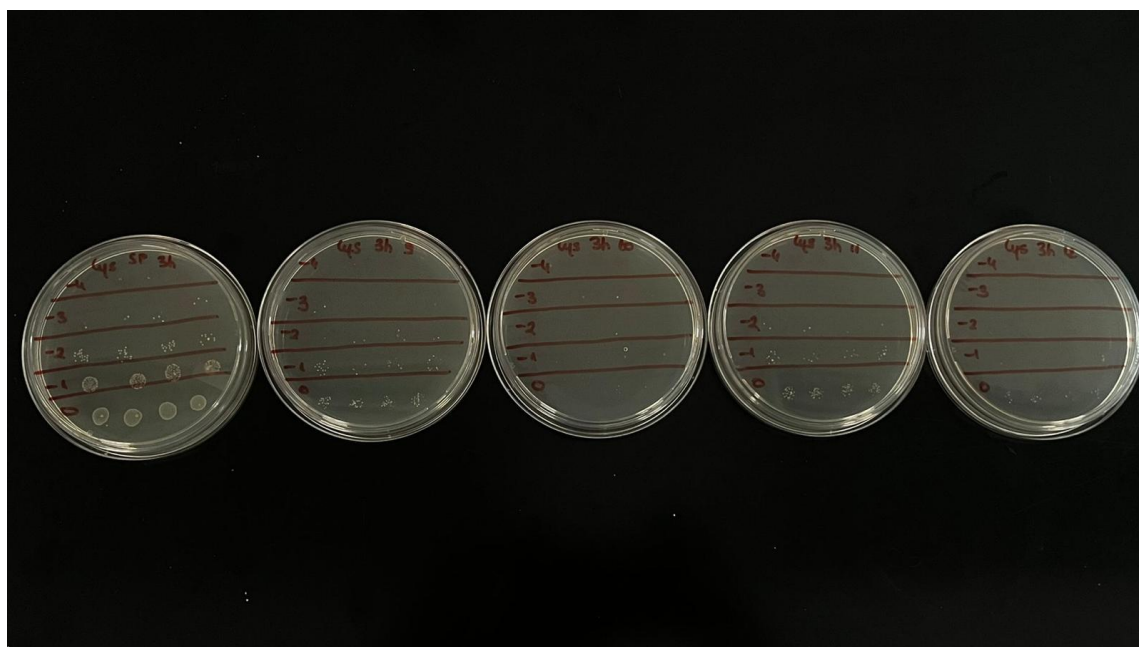
Tablica 11. Stupanj redukcije stanica *Lactobacillus plantarum* (log CFU/mL) nakon tretmana PAW generirane u tekućinskom reaktoru.

Mikroorganizam	Naziv uzorka	$\Delta \log$ redukcija (log CFU/mL) 3h	$\Delta \log$ redukcija (log CFU/mL) 24h
<i>Lactobacillus plantarum</i>	T_Ar_20	6,31±0,00	4,85±0,00
	T_Ar_30	6,31±0,00	4,85±0,00
	T_N2_20	2,31±0,17	6,77±0,00
	T_N2_30	0±4,00	6,77±0,00
	T_O2_20	5,84±3,74	6,77±0,00
	T_O2_30	5,27±4,27	6,77±0,00

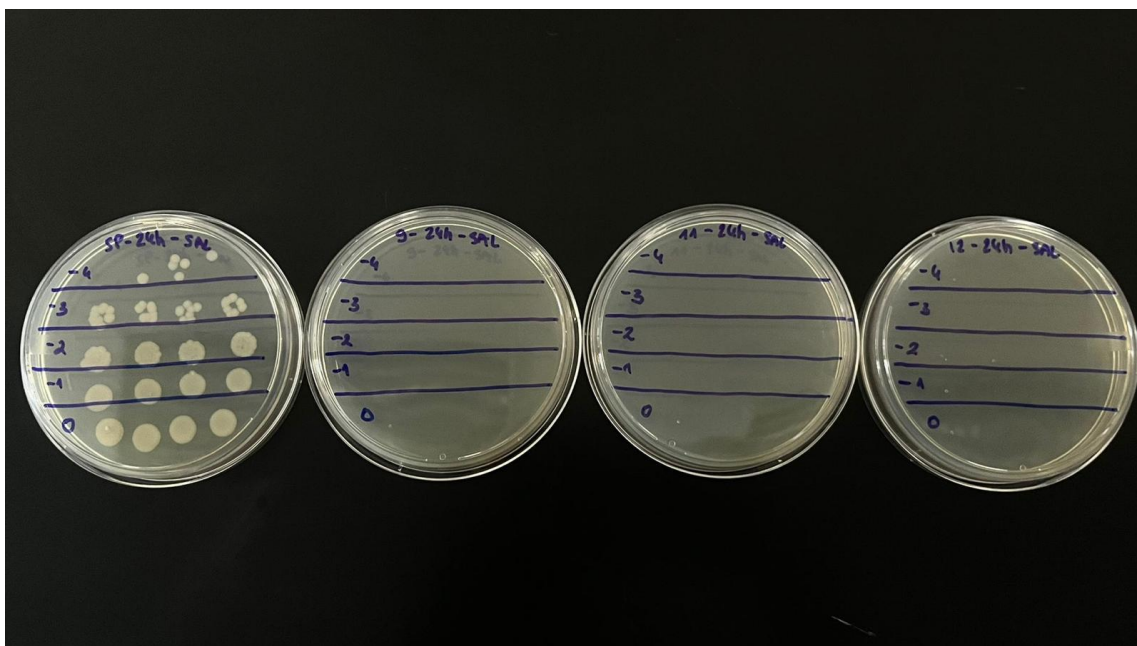
Tablica 12. Stupanj redukcije stanica *Candida utilis* (log CFU/mL) nakon tretmana PAW generirane u tekućinskom reaktoru.

Mikroorganizam	Naziv uzorka	$\Delta \log$ redukcija (log CFU/mL) 3h	$\Delta \log$ redukcija (log CFU/mL) 24h
<i>Candida utilis</i>	T_Ar_20	2,76±0,00	4,01±0,00
	T_Ar_30	2,76±0,00	4,01±0,00
	T_N2_20	4,01±0,00	3,91±0,00
	T_N2_30	3,97±0,00	3,91±0,00
	T_O2_20	3,97±0,00	3,97±0,00
	T_O2_30	3,97±0,00	3,91±0,00

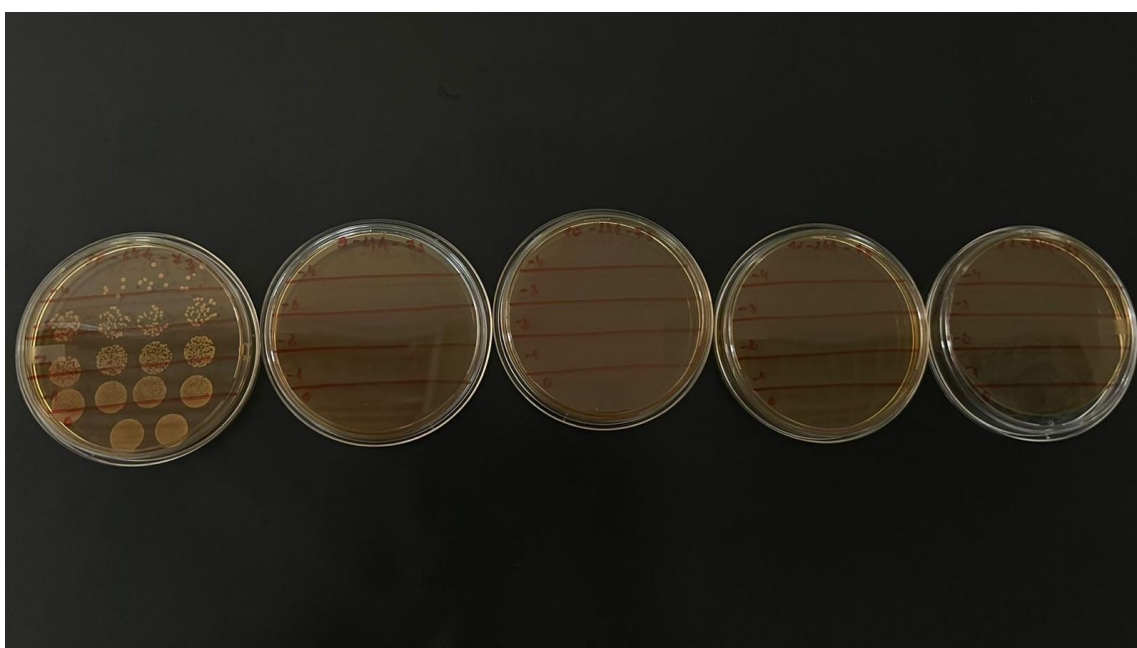
4.3. Prikaz poraslih kolonija odabranih mikroorganizama



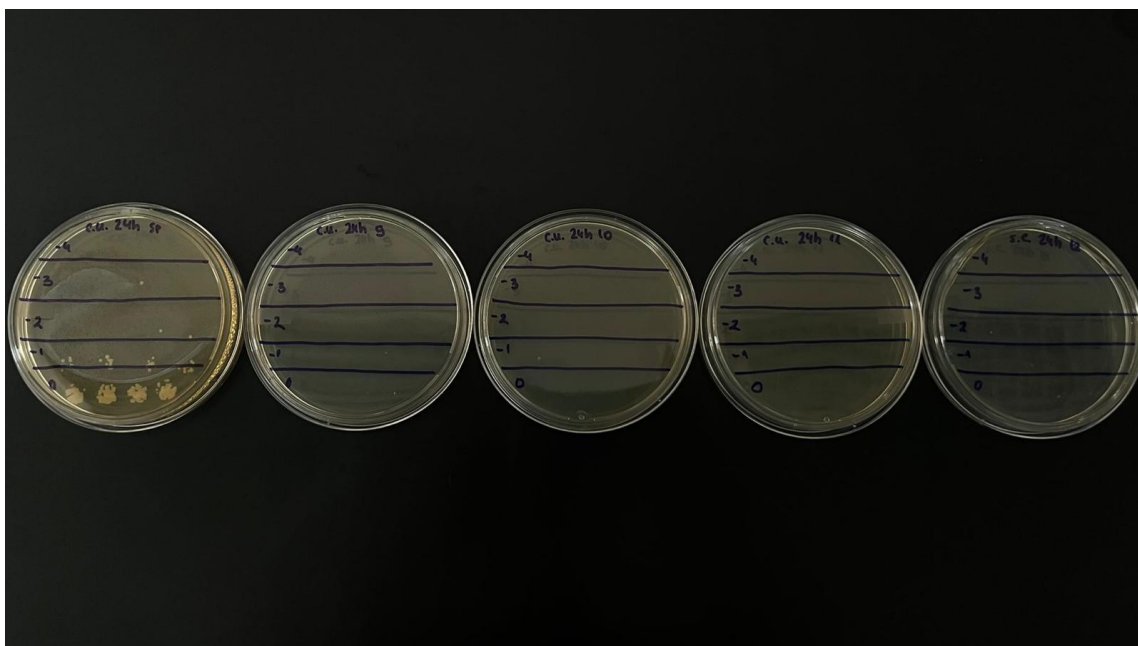
Slika 7. Petrijeve zdjelice s poraslim kolonijama prilikom indirektne metode određivanja broja živih stanica *Listeria monocytogenes*



Slika 8. Petrijeve zdjelice s poraslim kolonijama prilikom indirektne metode određivanja broja živih stanica *Salmonella enterica*



Slika 9. Petrijeve zdjelice s poraslim kolonijama prilikom indirektne metode određivanja broja živih stanica *Lactobacillus plantarum*



Slika 10. Petrijeve zdjelice s poraslim kolonijama prilikom indirektne metode određivanja broja živih stanica *Candida utilis*

4.4. Statistička obrada

Tablica 13. Analiza varijance parametara plazma tretmana (tip reaktora i odabrani plin) na inaktivaciju mikroorganizama nakon 3h i 24h

Reaktor	Plin	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Candida utilis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Candida utilis</i>
plinski	Ar	0,0193						0,0120	
tekućinski									
plinski	N ₂	0,0180				0,0028			
tekućinski									
plinski	O ₂	0,0006				0,0421	0,0876	0,0495	0,0550
tekućinski									

*Statistički značajna varijacija pri $p \leq 0,05$

5. RASPRAVA

5.2. Fizikalno – kemijska analiza uzoraka PAW-e

5.2.1. Fizikalno – kemijska analiza uzoraka PAW-e generiranih u plinskom reaktoru

U ovom radu praćene su fizikalno – kemijske promjene u uzorcima PAW proizvedene u plinskom reaktoru i tekućinskom reaktoru. U plinskom reaktoru dolazi do indirektne interakcije između reaktivnih spojeva i uzorka vode. Iz tablice 2. u kojoj su prikazani fizikalno – kemijski parametri generirani u plinskom reaktoru svakog uzorka PAW može se zaključiti da pH, električna vodljivost i koncentracija reaktivnih spojeva uzoraka varira ovisno o naponu i radnom plinu.

Učinkovitost PAW ponajviše ovisi o koncentraciji reaktivnih vrsta koje se mogu podijeliti u dvije glavne skupine: reaktivne vrste kisika i reaktivne vrste dušika. Reaktivne vrste kisika kao što je vodikov peroksid, hidroksilni radikal i ozon jaki su oksidacijski agensi i izazivaju oksidativni stres na membranama stanica. Reaktivne vrste kisika mogu potaknuti i oksidaciju lipida u staničnoj membrani. Također, mogu uništiti intramolekularne veze peptidoglikana uklanjanjem atoma vodika iz peptidne veze iz sloja peptidoglikana čime može dovesti do razgradnje stanične stijenke, zaustavljanja metaboličkih aktivnosti, oštećenja stanica i smrti. Reaktivne vrste dušika služe u regulaciji staničnog redoks statusa olakšavajući razvoj stanica. Reaktivne vrste dušika mogu promijeniti fizička svojstva otopina. Dolaskom plazme u kontakt s vodom, na granici zrak-tekućina nastaju različite reaktivne vrste kisika i dušika. Primarne reaktivne vrste reagiraju s molekulama vode i nastaju različite sekundarne vrste ključne za primjenu PAW. Aktivne vrste mogu se podijeliti na dugotrajne vrste koje imaju vrijeme poluraspada od nekoliko minuta do nekoliko dana te su to vodikov peroksid, ozon, nitrit i nitrati, također generiraju se i kratkotrajne vrste koje imaju vrijeme poluraspada od jedne nanosekunde do nekoliko sekundi i brzo stvaraju stabilne vrste te su to hidroksilni radikali, dušikov oksid i peroksinitrit. Električna vodljivost se povećava u PAW budući da se u PAW nalaze različito slobodno nabijene vrste i ioni zbog difuzije reaktivnih vrsta u vodu. Ona je važan pokazatelj ukupne koncentracije reaktivnih vrsta i iona. PAW ima viši oksidacijsko-redukcijski potencijal. Vodikov peroksid ima sposobnost da djeluje kao oksidans ili kao redukcijsko sredstvo. Također, nitrati i nitriti doprinose višem oksidacijsko-redukcijskom potencijalu. Vodikov peroksid ima važnu ulogu kod antimikrobnog djelovanja jer slobodno difundira u staničnu membranu te mogu oštetiti i povećati propusnost stanične membrane. Nitrati i nitriti u okruženju s niskim pH stvaraju dušikov oksid i dušikov dioksid koji su toksični za stanice (Wong i sur., 2023).

Na temelju dobivenih rezultata vodikov peroksid je stabilniji od nekoliko minuta do nekoliko dana. Iz Tablice 3. uočene su slične pH vrijednosti za uzorke P_Ar_20, P_Ar_30 i P_N2_20. Najviša pH vrijednost uočena je u uzorku P_Ar_20 gdje je pH vrijednost bila 6,73. Uzorci u kojemu je kao radni plin bio dušik pokazuje najnižu pH vrijednost odnosno najvišu kiselost od 3,85 za P_N2_30 i 3,98 za P_O2_30. U ovim uzorcima došlo je do formiranja jakih kiselih oksidacijskih produkata poput nitrata,

nitrita i vodikova peroksida koji smanjuju pH vrijednost. U uzorku P_O2_20 očitana je pH vrijednost od 5,1 što je blago kiselog karaktera. Pri naponu od 30 kV očitane su niže vrijednosti pH i više stvaranje reaktivnih spojeva. Uzorci s argonom su blago kiselog karaktera što ukazuje na slabije stvaranje kiselih produkata pri djelovanju ovog radnog plina. Napon od 20 kV kod radnog plina dušika također pokazuje blago kiseli pH što ukazuje da viši napon pogoduje stvaranju reaktivnih kiselih produkata u vodi. Najvišu električnu vodljivost ima uzorak P_N2_30 s vodljivošću od 85,7 $\mu\text{S}/\text{cm}$ pri 21°C. Zatim slijedi uzorak P_O2_20 s električnom vodljivošću od 60,4 $\mu\text{S}/\text{cm}$ pri 20,4°C. Najnižu električnu vodljivost ima P_Ar_30 s rezultatom od 7,16 $\mu\text{S}/\text{cm}$ pri 21,4°C. Ovo potvrđuje da inertni plin argon ne doprinosi značajnom stvaranju reaktivnih kemijskih vrsta u vodi, dok kisik i dušik imaju najviše vrijednosti električne vodljivosti.

U tablici 3. uočeno je da je koncentracija vodikova peroksida bila najviša kod uzorka P_Ar_30 (21,14 mg/L). Ovo upućuje na to da argon uz viši napon pogoduje stvaranju viših koncentracijama vodikova peroksida u plinskom reaktoru. Najnižu koncentraciju vodikova peroksida imali su uzorci P_N2_20 (4,91 mg/mL) i P_N2_30 (6,47 mg/mL). Niži napon (20 kV) kod plina argona u uzorku P_Ar_20 (11,45 mg/mL) također pokazuje niže koncentracije vodikova peroksida. Rezultati pokazuju da niži napon i plinovi poput dušika i kisika nisu optimalni za formiranje vodikova peroksida. Najviše koncentracije nitrata i nitrita očitane su kod upuhivanja dušika kao radnog plina, kod uzoraka P_N2_20 i P_N2_30, a najniže kod kisika (P_O2_30 i P_O2_20). Najviše očitane koncentracije nitrita i nitrata bile su kod uzorka P_N2_20. Najviše koncentracije nitrata i nitrita očitane su kod upuhivanja dušika i kisika kao radnog plina, dok su najviše koncentracije vodikovog peroksida očitane upuhivanjem argona.

Tijekom tretmana u plinskom reaktoru nisu očitane značajne razlike u temperaturi prije i nakon tretmana. Najveća temperaturna razlika bila je kod argona (P_Ar_20=28,9 °C; P_Ar_30=31,1 °C) i uzorka pri upuhivanju kisika (P_O2_20=28,1 °C) što ukazuje na jače energetske djelovanje pri višem naponu.

Prema istraživanju Ferreyra i sur. (2025) promatrana su fizikalno- kemijska svojstva PAW. Primijećeno je da povećanjem vremena izlaganje vode plazmi dolazi do povećane električne vodljivosti i smanjenja pH. Ovo je povezano s nastankom nitritnih i nitratnih kiselina i iona kao što su nitriti, nitrati. Voda iz slavine ima neutralan pH i sadržava samo nitrata što se tiče reaktivnih vrsta dušika, dok PAW sadrži vodikov peroksid, nitrata i nitrite te ima niži pH (Ferreyra i sur., 2025).

U istraživanju od Ferreyra i sur. (2025) naglašeno je da duljim izlaganjem vode plazmi dolazi do većih koncentracija reaktivnih vrsta u PAW. Rezultati ovog rada se slažu s istraživanjem od Ferreyra i sur. (2025) gdje niži pH i viša električna vodljivost nastaju zbog nastajanja nitrita i nitrata. U istraživanju od Ferreyra i sur. (2025) koncentracija vodikova peroksida je bila 20 mg/L, dok je koncentracija vodikova peroksida izmjerenog u ovom radu bila slična (P_Ar_30=21,14 mg/L).

5.2.2. Fizikalno – kemijska analiza uzoraka PAW-e generiranih u tekućinskom reaktoru

Uzorci tretirani argonom imali su najniže pH vrijednosti, koje su dodatno snižene porastom napona (4,80 – 4,02). Argon je inertan plin, no u plazmi stvara visokoenergetske elektrone i metastabilna stanja, koja mogu pobuditi molekule vode ili dušika iz zraka. Time se omogućuje nastanak dušične i dušikaste kiseline, što uzrokuje pad pH vrijednosti. Suprotno tome, uzorci tretirani dušikom pokazali su porast pH vrijednosti (7,46 – 8,18), što upućuje na formaciju baznih dušikovih vrsta poput amonijaka (NH_3). Uzorci tretirani kisikom (7,67 i 7,74) zadržali su blago alkalne vrijednosti pH-a, uz minimalnu promjenu porastom napona. Dobiveni rezultati upućuju na to da kisik ima najmanji učinak na promjene pH u promatranim uvjetima, što potvrđuju i ranija istraživanja, Ikawa i sur. (2010), Lukeš i sur. (2014) te Machala i sur. (2013).

Vrsta plina i napon imali su izražen utjecaj i na električnu vodljivost uzoraka. Kod argona vodljivost je značajno porasla porastom napona (9,46 – 49,5 $\mu\text{S}/\text{cm}$), dok je kod dušika zabilježen obrnuti trend (7,59 – 5,04 $\mu\text{S}/\text{cm}$). U slučaju kisika uočen je izrazito visok rezultat pri nižem naponu (96,20 $\mu\text{S}/\text{cm}$), dok je pri višem naponu zabilježen pad na 5,06 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Električna vodljivost PAW-e izravno ovisi o koncentraciji otopljenih iona poput nitrata, nitrita, amonijevih i hidroksilnih iona, a uočen porast kod argona povezan je s intenzivnijom formacijom NO_3^- , NO_2^- i H^+ , dok se kod dušika pri višem naponu favoriziraju neutralne vrste (Jiang i sur., 2014; Lukeš i sur., 2006; Machala i sur., 2013).

Vodikov peroksid, jedan od najstabilnijih reaktivnih kisikovih spojeva u PAW-i, pokazao je jasnu povezanost s porastom napona. Kod argona su izmjerene niske koncentracije (3,29 – 6,34 mg/L), dok su kod dušika (6,08 – 18,82 mg/L) i kisika (6,03 – 21,86 mg/L) vrijednosti bile znatno više, što potvrđuje da upravo ovi plinovi značajno potiču formaciju H_2O_2 pri višem naponu. H_2O_2 nastaje prvenstveno rekombinacijom hidroksilnih radikala ($\bullet\text{OH}$) te se smatra glavnim indikatorom oksidacijskog potencijala otopine (Bruggeman i Leys, 2009; Judée i sur., 2018; Lukeš i sur., 2014; Ma i sur., 2015).

Koncentracije nitrata bile su mjerljive samo kod uzoraka tretiranih argonom (0,13 i 0,17 mg/L), dok su kod dušika bile ispod granice detekcije. U uzorcima tretiranim kisikom uočena je vrijednost od 0,04 mg/L pri nižem naponu, dok pri višem nisu zabilježeni nitrati. S druge strane, nitriti su detektirani u svim uzorcima. Kod argona su vrijednosti rasle s naponom (0,04 – 0,16 mg/L), dok su kod dušika bile stabilne (0,13 i 0,12 mg/L). Uzorci tretirani kisikom pokazali su blago višu vrijednost pri nižem naponu (0,20 – 0,14 mg/L). Ovi rezultati potvrđuju da je formacija nitrata i nitrita ovisna o vrsti plina i prisutnosti molekularnog dušika, pri čemu argon zbog interakcije s molekulama zraka pogoduje njihovom stvaranju (Brisset i Hnatiuc, 2012; Lukeš i sur., 2014; Ma i sur., 2015; Machala i sur., 2013; Oehmigen i sur., 2011).

Temperatura vode prije tretmana bila je ujednačena ($20,1 - 20,5\text{ }^{\circ}\text{C}$), dok su nakon tretmana zabilježene razlike povezane s vrstom plina i naponom. Najveći porast uočen je kod kisika, osobito pri višem naponu ($28,1\text{ }^{\circ}\text{C}$), dok su argon i dušik pokazali manji porast ($24,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $22,4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Porast temperature može se pripisati dielektričnim gubicima, električnoj disipaciji i egzotermnim kemijskim reakcijama, a poznato je da viša temperatura ubrzava kinetiku stvaranja i razgradnje reaktivnih vrsta u PAW-i (Judée i sur., 2018; Locke i sur., 2006).

5.2.3. Usporedba fizikalno-kemijskih svojstava prema reaktorima

1. Temperatura i električna vodljivost

Električna vodljivost uzoraka za radni plin argon pri 20 kV viša je kod uzoraka generiranih u plinskom reaktoru ($19,01\text{ }\mu\text{S/cm}$) nego kod uzoraka generiranih u tekućinskom reaktoru ($9,46\text{ }\mu\text{S/cm}$), dok je pri 30 kV viša u tekućinskom reaktoru ($T_{\text{Ar}_30}=49,5\text{ }\mu\text{S/cm}$ naspram $P_{\text{Ar}_30}=7,16\text{ }\mu\text{S/cm}$). Vodljivost uzoraka tretiranih u plinskom reaktoru bila je znatno viša ($P_{\text{O}_2_30} = 51,2\text{ }\mu\text{S/cm}$; $P_{\text{N}_2_30} = 85,7\text{ }\mu\text{S/cm}$) u usporedbi s uzorcima tretiranim u tekućinskom reaktoru ($T_{\text{O}_2_30} = 5,06\text{ }\mu\text{S/cm}$; $T_{\text{N}_2_30} = 5,04\text{ }\mu\text{S/cm}$). Ovo ukazuje da na električnu vodljivost utječe radni napon koji je korišten za generiranje plazme. Kod dušika viša električna vodljivost bila je kod plinskog reaktora ($P_{\text{N}_2_20}=23,54\text{ }\mu\text{S/cm}$, $P_{\text{N}_2_30}=85,7\text{ }\mu\text{S/cm}$) nego kod tekućinskog reaktora ($T_{\text{N}_2_20}=5,04\text{ }\mu\text{S/cm}$, $T_{\text{N}_2_30}=5,04\text{ }\mu\text{S/cm}$). Kod radnog plina kisika za napon od 20 kV viša električna vodljivost uočena je kod tekućinskog reaktora ($96,20\text{ }\mu\text{S/cm}$) u odnosu na plinski reaktor ($60,4\text{ }\mu\text{S/cm}$), dok pri 30 kV električna vodljivost bila je viša kod plinskog reaktora ($51,2\text{ }\mu\text{S/cm}$) u odnosu na tekućinski reaktor ($5,06\text{ }\mu\text{S/cm}$). Najviša električna vodljivost bila je kod uzoraka $T_{\text{O}_2_20}$ ($96,20\text{ }\mu\text{S/cm}$) i $P_{\text{O}_2_20}$ ($60,4\text{ }\mu\text{S/cm}$). Najnižu električnu vodljivost pokazuju uzorci $T_{\text{O}_2_30}$ ($5,06\text{ }\mu\text{S/cm}$) i $T_{\text{N}_2_30}$ ($5,04\text{ }\mu\text{S/cm}$). Ovo ukazuje da najbolje rezultate pokazuje kisik pri naponu od 20 kV.

U plinskom reaktoru očitana je viša temperatura u odnosu na tekućinski. Najviša temperatura očitana je kod plinskog reaktora u uzorku P_{Ar_30} ($31,1\text{ }^{\circ}\text{C}$). Najniža temperatura očitana je kod tekućinskog i plinskog reaktora u uzorcima s kisikom ($20,1\text{ }^{\circ}\text{C}$). Najviši porast temperature očitana je za uzorke $T_{\text{O}_2_30}$ i $P_{\text{O}_2_20}$ (za $8\text{ }^{\circ}\text{C}$). Najniži porast temperature bio je u plinskom reaktoru u uzorku $P_{\text{N}_2_30}$ gdje nije došlo do promjene temperature. U istraživanju Wong i sur. (2023) pokazano je da su fizikalno-kemijska svojstva PAW vrlo osjetljiva na vrstu radnog plina, radne procese parametara i dizajn reaktora. U većini tipova plinskih reaktora dolazi do sniženja pH i porasta električne vodljivosti što se može pripisati povećanoj koncentraciji reaktivnih dušikovih vrsta nitrita i nitrata kao i ostalih plinovitih produkata koji su otopljeni u vodi (Wong i sur., 2023).

U istraživanju Wong i sur. (2023) zaključeno je da su svojstva PAW ovisila o radnom plinu, parametrima radnih procesa i dizajnu reaktora. Ovo se slaže s rezultatima ovog rada jer su fizikalno-kemijska svojstva uzoraka PAW bila drugačija ovisno o radnom plinu, naponu i tipu reaktora.

U istraživanju Rothwell i sur. (2022) uspoređivano je dva tipa reaktora: pražnjenje mjehuričaste iskre i difuzor dielektričnog barijernog pražnjenja. PAW generirana u difuzoru dielektričnog barijernog pražnjenja pokazivao je nižu pH vrijednost i višu električnu vodljivost. Dizajn reaktora presudan je faktor kod fizikalno-kemijskih parametara PAW (Rothwell i sur., 2022).

U istraživanju Rothwell i sur. (2022) PAW nastao u dielektričnom barijernom pražnjenju imaju je nižu pH i višu vodljivost. Ovime je zaključeno da je tip reaktora presudan faktor za fizikalno-kemijska svojstva PAW. Ovo se slaže s rezultatima ovog rada jer plinski i tekućinski reaktori također pokazuju različite fizikalno-kemijske parametre. Tip reaktora utječe na pH i vodljivost uzoraka PAW koji su rađeni u ovom radu.

U istraživanju Rathore i sur. (2023) pokazano je da vrsta plina za generiranje PAW ima važan utjecaj na fizikalno-kemijska svojstva. Reaktor s ugljičnim dioksidom pokazao je najbolje rezultate. Ovo je u skladu s rezultatima ovog rada jer različiti radni plinovi daju različite rezultate te ovisno o radnom plinu nastali su uzorci PAW s različitim fizikalno-kemijskim svojstvima.

2. pH i koncentracija kemijskih spojeva

Prema podacima iz tablica 3. i 8., pH vrijednosti i koncentracije ključnih kemijskih spojeva u plazmom aktiviranoj vodi (PAW) značajno su se razlikovale između uzoraka generiranih u plinskom i tekućinskom reaktoru, pri čemu su razlike ovisile o radnom plinu i primijenjenom naponu. Općenito, uzorci iz plinskog reaktora pokazivali su niže pH vrijednosti u odnosu na tekućinski, što upućuje na to da u plinskom sustavu dolazi do intenzivnijeg stvaranja kiselih oksidacijskih produkata. Najniža pH vrijednost zabilježena je kod uzoraka P_N2_30 (pH = 3,85) i P_O2_30 (pH = 3,98), dok su u tekućinskom reaktoru ekstremne vrijednosti bile blaže, s T_Ar_30 (pH = 4,02) kao najnižom i T_N2_30 (pH = 8,18) kao najvišom izmjerenom vrijednosti. Ovakvi rezultati pokazuju da plinski reaktor, zbog interakcije plazme s okolnim zrakom, pogoduje stvaranju reaktivnih dušikovih vrsta koje se otapaju u vodi i snižavaju pH, dok tekućinski sustav pri višem naponu i posebno kod dušika može rezultirati čak i blagim porastom pH vrijednosti (Rathore i sur., 2023; Rothwell i sur., 2022; Wong i sur., 2023).

Analiza koncentracija vodikovog peroksida (H_2O_2), nitrata (NO_3^-) i nitrita (NO_2^-) dodatno potvrđuje razlike među reaktorima. Kod argona, plinski reaktor proizveo je znatno više H_2O_2 (11,45 mg/L pri 20 kV; 21,14 mg/L pri 30 kV) u usporedbi s tekućinskim (3,40–6,20 mg/L). Sličan obrazac zabilježen je i za nitrate i nitrite: u plinskom reaktoru izmjereno je 15 mg/L NO_3^- i 0,75 mg/L NO_2^- , dok su u

tekućinskom vrijednosti ostale vrlo niske (0,13–0,17 mg/L NO_3^- ; 0,04–0,16 mg/L NO_2^-). To potvrđuje da plinski reaktor u prisutnosti argona intenzivno generira reaktivne dušikove vrste posredovane interakcijom s okolišnim zrakom (Bruggeman i sur., 2006; Jiang i sur., 2014).

U sustavu s dušikom trend je bio obrnut. U plinskom reaktoru nitrati su dosežali vrlo visoke koncentracije (25 mg/L pri 20 kV i 20 mg/L pri 30 kV), uz povišene nitrite (1,74 – 1,84 mg/L), dok je H_2O_2 bio relativno nizak (4,91 – 6,47 mg/L). Nasuprot tome, u tekućinskom reaktoru gotovo da nije bilo nitrata ni nitrita (0 – 0,12 mg/L), dok je koncentracija H_2O_2 bila izrazito povišena pri višem naponu (18,23 – 19,40 mg/L). To upućuje na to da plinski reaktor s dušikom potiče nastanak reaktivnih dušikovih vrsta, dok tekućinski favorizira stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta, osobito hidroksilnih radikala i vodikovog peroksida (Lukeš i sur., 2014).

Kod kisika, razlike su bile obrnute u odnosu na argon: u plinskom reaktoru H_2O_2 je dosežao 12,02 mg/L pri 30 kV, dok je u tekućinskom pri istom naponu izmjereno čak 22,03 mg/L. Nitrati i nitriti u kisikovoj atmosferi bili su vrlo niski u oba reaktora ($\text{NO}_3^- \approx 0,0379 - 0,0509$ mg/L; $\text{NO}_2^- \approx 0,08 - 0,14$ mg/L), što potvrđuje da je u prisutnosti kisika dominantan mehanizam stvaranje ROS (H_2O_2 , O_3 , $^1\text{O}_2$), dok su RNS zanemarive (Machala i sur., 2013; Oehmigen i sur., 2011).

Dobiveni rezultati jasno pokazuju da tip reaktora u kombinaciji s radnim plinom presudno određuje pH i sastav otopljenih reaktivnih vrsta. Plinski reaktor, osobito s argonom i dušikom, pogoduje formaciji nitrata i nitrita, dok tekućinski reaktor, posebice pri višem naponu i uz kisik, generira više H_2O_2 . Ovi obrasci u potpunosti se slažu s nalazima drugih autora koji naglašavaju da dizajn reaktora i vrsta plina izravno određuju fizikalno-kemijska svojstva PAW-e (Burlica i sur., 2006; Locke i sur., 2006; Rathore i sur., 2023; Rothwell i sur., 2022; Wong i sur., 2023). Promjene u pH i koncentracijama kemijskih spojeva međusobno su povezane i izravno definiraju oksidacijski potencijal PAW-e, što je ključan čimbenik njezina antimikrobnog učinka.

5.3. Antimikrobni učinak uzoraka PAW-e

5.3.1. Antimikrobni učinak uzoraka PAW-e generiranih u plinskom reaktoru

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem potvrđuju da plazmom aktivirana voda (PAW) ima izražen antimikrobni učinak na sve ispitivane mikroorganizme: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Lactobacillus plantarum* i *Candida utilis*. Nakon 24 sata inkubacije postignuta je potpuna inhibicija rasta kod svih uzoraka, što pokazuje snažan potencijal PAW-a u inaktivaciji bakterijskih i gljivičnih stanica. Međutim, nakon 3 sata inkubacije uočene su jasne razlike među pojedinim vrstama

mikroorganizama i među različitim uzorcima PAW-a, što ukazuje na specifične mehanizme osjetljivosti i djelovanja.

Najizraženiji učinak nakon 3 sata zabilježen je kod kvasca *Candida utilis*, gdje je potpuna inhibicija postignuta u svim uzorcima osim P_N2_30. Ovi rezultati ukazuju na visoku osjetljivost kvaščeve stanice na reaktivne kemijske vrste prisutne u PAW-u, što se može objasniti strukturom stanične stijenke i membranskim lipidima osjetljivim na oksidativni stres. U slučaju bakterije *Lactobacillus plantarum* potpuna inaktivacija postignuta je u većini uzoraka već nakon 3 sata, dok su uzorci generirani u atmosferi kisika (P_O2_20 i P_O2_30) pokazali slabiji učinak. To potvrđuje da različiti radni plinovi u reaktoru utječu na sastav i koncentraciju reaktivnih vrsta u PAW-u, što izravno određuje intenzitet antimikrobnog učinka.

Za *Salmonella enterica* potpuna inhibicija zabilježena je u uzorcima P_Ar_30, P_N2_20 i P_O2_20, dok su P_N2_30 i P_Ar_20 pokazali djelomičan učinak. Time se potvrđuje da Gram-negativne bakterije mogu biti osjetljivije na određene kombinacije reaktivnih vrsta, ali i da duljina tretmana značajno povećava učinkovitost. Najmanju osjetljivost pokazala je Gram-pozitivna bakterija *Listeria monocytogenes*. Potpuna inhibicija nakon 3 sata postignuta je samo u uzorku P_Ar_30, dok su uzorci P_O2_20 (0,30 log CFU/mL) i P_N2_20 (0,85 log CFU/mL) zabilježili vrlo nisku redukciju. Ovi rezultati vjerojatno su posljedica debljeg sloja peptidoglikana u staničnoj stijenci *Listerije*, koji pruža određenu zaštitu od oksidativnih oštećenja i djelovanja reaktivnih kemijskih vrsta.

Općenito, može se zaključiti da su uzorci s višim koncentracijama reaktivnih vrsta (nitriti, nitrati, H₂O₂) pokazali i jači antimikrobni učinak. Time se potvrđuje da je ključni mehanizam djelovanja PAW-a povezan s oksidativnim stresom i oštećenjem staničnih struktura. Reaktivne vrste mogu uzrokovati disrupciju i razaranje membrane, peroksidaciju lipida, oštećenje DNA te denaturaciju i modifikaciju proteina. Takvi procesi dovode do narušavanja vitalnih funkcija stanice, a konačno i do potpune inaktivacije mikroorganizama.

Dobiveni rezultati u skladu su s ranijim istraživanjima. Rothwell i sur. (2021.) pokazali su da učinkovitost PAW-a ovisi o parametrima generiranja plazme te da dielektrično barijerno pražnjenje pri frekvenciji od 1500 Hz postiže najučinkovitiju inaktivaciju, čak i do 6 log redukcije kod različitih bakterijskih sojeva. Naši rezultati potvrđuju važnost koncentracije reaktivnih vrsta i radnih plinova u postizanju željenog antimikrobnog učinka. Posebno treba naglasiti da je u svim slučajevima nakon 24 sata došlo do potpune inhibicije, što ukazuje na trajni učinak PAW-a i mogućnost njegove primjene u sustavima dekontaminacije.

Analizom razlika među vrstama može se uočiti trend osjetljivosti: *Candida utilis* > *Lactobacillus plantarum* > *Salmonella enterica* > *Listeria monocytogenes*. Ovaj poredak pokazuje da eukariotske

stanice kvasca mogu biti izrazito osjetljive na oksidativni stres, dok su Gram-pozitivne bakterije, zbog građe svoje stanične stijenke, otpornije od Gram-negativnih. Time se otvara mogućnost ciljane primjene PAW-a ovisno o mikroorganizmu koji je potrebno inaktivirati.

Provedeno istraživanje potvrđuje da PAW generiran u plinskom reaktoru predstavlja vrlo učinkovito sredstvo za inaktivaciju različitih mikroorganizama. Dobiveni rezultati jasno pokazuju da intenzitet učinka ovisi o vrsti mikroorganizma, vrsti radnog plina i koncentraciji reaktivnih kemijskih vrsta. Posebno je značajno da je nakon 24 sata u svim slučajevima postignuta potpuna inhibicija, što naglašava potencijal primjene PAW-a u prehrambenoj industriji za dekontaminaciju hrane, produženje roka trajanja i povećanje sigurnosti proizvoda.

5.3.2. Antimikrobni učinak uzoraka PAW-e generiranih u tekućinskom reaktoru

Antimikrobni učinak plazmom aktivirane vode (PAW) u tekućinskom reaktoru ispitan je na četiri mikroorganizma: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Lactobacillus plantarum* i *Candida utilis*. Rezultati potvrđuju da vrsta radnog plina i primijenjeni napon značajno utječu na učinkovitost PAW-a, osobito u ranim fazama kontakta (3 h), dok je nakon 24 sata u svim slučajevima postignuta gotovo potpuna inaktivacija stanica.

Rezultati (Tablica 9) pokazuju da povećanje napona pojačava antimikrobni učinak. Najveće redukcije zabilježene su pri tretmanu kisikom, osobito na 30 kV (5,22 log). Time je potvrđeno da kombinacija kisika i višeg napona potiče stvaranje reaktivnih oksidacijskih vrsta (ROS) odgovornih za brzu inaktivaciju (Handorf i sur., 2021). Nakon 24 sata svi uzorci, neovisno o plinu i naponu, pokazali su gotovo potpunu inaktivaciju ($\Delta\log$ 5,16–5,50). Dugotrajan učinak može se pripisati rezidualnoj aktivnosti stabilnih komponenti poput H_2O_2 i nitrita/nitrata te održanoj kiselosti, što je u skladu s ranijim opažanjima o važnosti stabilnosti i „aging“ efekta PAW-a (Judée i sur., 2018; Tsoukou i sur., 2020).

Nakon 3 sata kontakta s PAW-om, jasno su vidljive razlike među tretmanima, što potvrđuje izražen utjecaj vrste plina i napona na brzinu inhibicije stanica *Salmonella enterica* (tablica 10). Kod ovog Gram-negativnog mikroorganizma jasno se očitovao utjecaj vrste plina i napona (tablica 10). Argon pri 20 kV (T_Ar_20) pokazao je slabiji inicijalni učinak (1,97 log), dok je povećanje napona na 30 kV (T_Ar_30) rezultiralo značajnom redukcijom (4,23 log). Dušik je imao još snažnije djelovanje (T_N2_20: 4,48 log; T_N2_30: 4,97 log), dok je kisik pokazao najizraženiji učinak (T_O2_20: 4,97 log; T_O2_30: 5,97 log). Nakon 24 sata svi tretmani doveli su do potpune inhibicije, što ukazuje na važnu ulogu dugotrajnog djelovanja stabilnih reaktivnih vrsta (Bruggeman i sur., 2016; Lukeš i sur., 2014). Mehanizmi djelovanja uključuju lipidnu peroksidaciju, povećanu propusnost membrane i oštećenje DNA uzrokovano ROS i RNS (Fernández i sur., 2019; Ma i sur., 2016; Mai-Prochnow i sur., 2016).

Rezultati inaktivacije *Lactobacillus plantarum* (tablica 11) pokazuju da je najveći inicijalni učinak postignut pri tretmanu argonom, gdje su oba napona (T_Ar_20 i T_Ar_30) ostvarila gotovo potpunu redukciju (6,31 log). Nasuprot tomu, tretmani dušikom imali su značajno slabiji učinak (T_N2_20: 2,31 log; T_N2_30: 0,44 log), dok su tretmani kisikom dali visoke, ali nešto niže vrijednosti od argona (5,84 i 5,27 log). Nakon 24 sata sve su vrijednosti pokazale gotovo potpunu inaktivaciju, pri čemu su tretmani s kisikom i dušikom postigli 6,77 log redukcije, dok je argon pokazao nešto nižu vrijednost (4,85 log). Ovi rezultati potvrđuju da i bakterije s razvijenim antioksidativnim sustavima (superoksid dismutaza, peroksidaze) i prilagodbom na kiseli okoliš (Behera i sur., 2018) podliježu kumulativnom djelovanju ROS i RNS tijekom duljeg kontakta.

U tablici 12 prikazani su rezultati za *C. utilis*, koji pokazuju da PAW može ostvariti vrlo snažan antimikrobni učinak već u ranim fazama kontakta. Nakon 3 sata, tretmani argonom (T_Ar_20 i T_Ar_30) pokazali su 2,76 log redukcije. Dušik je imao još snažniji učinak – T_N2_20 postigao je 4,01 log, dok je T_N2_30 ostvario 3,97 log redukcije. Kisik je pokazao visoku i stabilnu učinkovitost, pri čemu su oba tretmana (T_O2_20 i T_O2_30) rezultirala vrijednostima od 3,97 log. Nakon 24 sata kontakta sa uzorkom generiranim u argonu očitana je redukcija od 4,01 log, u dušiku 3,91 log, dok su kisikovi uzorci imali 3,97 log (T_O2_20) i 3,91 log (T_O2_30) redukcije. Ovi rezultati upućuju na to da je *C. utilis* vrlo osjetljiva na dugotrajan kontakt s PAW-om, pri čemu produljena izloženost omogućuje kontinuiranu inaktivaciju čak i kada je inicijalni učinak bio skromniji. Posebno treba naglasiti da kvasci poput *Candida* spp. imaju membranu bogatu nezasićenim masnim kiselinama, koje su podložne peroksidaciji pod djelovanjem reaktivnih kisikovih vrsta, što značajno narušava integritet membrane (Laroussi, 2009; Misra i sur., 2019). Dugotrajniji učinak objašnjava se i ograničenom sposobnošću kvasaca da induciraju antioksidativne enzime poput katalaze, što dovodi do progresivne inaktivacije čak i pri nižim koncentracijama ROS i RNS (Cabiscol i sur., 2000; Jamet i Nassif, 2019).

Dobiveni rezultati potvrđuju da PAW generirana u tekućinskom reaktoru ima snažan i širokospektralni antimikrobni učinak. Razlike među plinovima i naponima jasno se očituju u inicijalnim fazama kontakta, no nakon 24 sata dolazi do potpune inaktivacije kod svih mikroorganizama. Trend osjetljivosti bio je: *Salmonella enterica* > *Listeria monocytogenes* > *Lactobacillus plantarum* > *Candida utilis*, što ukazuje da struktura stanične stijenke i metaboličke karakteristike određuju otpornost na oksidativni stres. Ovi rezultati, u skladu s literaturom, potvrđuju da su ROS i RNS u kombinaciji sa sniženim pH ključni mehanizmi djelovanja PAW-a te naglašavaju njegov potencijal za primjenu u sigurnosti hrane i dekontaminaciji okoliša.

5.3.3. Usporedba antimikrobnih rezultata prema zadanim mikroorganizmima

Jednosmjerna ANOVA analiza potvrdila je postojanje statistički značajnih razlika ($p < 0,05$) u učinkovitosti inaktivacije svih ispitivanih mikroorganizama, pri čemu su tip reaktora i odabrani radni plin pokazali ključan utjecaj na postignute rezultate.

Listeria monocytogenes: Najviši stupanj inaktivacije postignut je u plinskom reaktoru pri tretmanu argonom, dok je u tekućinskom najbolji učinak ostvaren s kisikom. Statistički značajne razlike uočene su pri tretmanu s dušikom, što sugerira selektivnu interakciju reaktivnih dušikovih spojeva s ovom vrstom. Otpornost *L. monocytogenes* na oksidativni stres, koju navode i Nestel i sur. (2025), može objasniti zašto membranska oštećenja ostaju ograničena i zahtijevaju prisutnost snažnijih reaktivnih vrsta za potpunu inhibiciju.

Salmonella enterica: U tekućinskom reaktoru postignuta je potpuna inhibicija u svim uvjetima (6 log), dok su u plinskom najbolji učinci ostvareni pri kisiku (P_O₂_20 i P_O₂_30). Iako su razlike među pojedinim uvjetima bile izražene, ANOVA nije potvrdila značajne varijacije unutar iste skupine tretmana, što upućuje na to da oksidacijski potencijal plina ima presudniji učinak od samog tipa reaktora.

Lactobacillus plantarum: Analiza je pokazala značajne razlike u inaktivaciji između reaktora pri korištenju argona. To upućuje na činjenicu da konfiguracija reaktora u kombinaciji s inertnim plinom određuje spektar i intenzitet nastalih reaktivnih vrsta. Za razliku od drugih plinova, argon inducira prvenstveno kratkoživuće čestice, a njihova distribucija ovisi o hidrodinamičkim i elektroenergetskim karakteristikama reaktora. Time se objašnjava veća osjetljivost *L. plantarum* na plazmom inducirane mehanizme u specifičnim konfiguracijama.

Candida utilis: Unatoč početno visokim redukcijama u plinskom reaktoru (do 5,2 log nakon 3 h), nakon 24 h inhibicija se stabilizirala na $\approx 3,7$ log. ANOVA nije potvrdila značajne razlike među plinovima, što sugerira da je otpornost kvasca na oksidativni stres glavni limitirajući čimbenik. Dodatno, stabilniji učinak u tekućinskom reaktoru povezan je s prisutnošću dugotrajno aktivnih spojeva poput H₂O₂ i nitrita, dok kratkoživuće vrste nastale u plinskom reaktoru gube aktivnost tijekom vremena.

Općenito, najizraženiji učinak tipa reaktora zabilježen je pri tretmanu s kisikom, gdje su za sve testirane mikroorganizme uočene značajne razlike. To potvrđuje da oksidacijski uvjeti snažno ovise o dizajnu reaktora i kapacitetu generiranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS).

Sveukupno, rezultati upućuju na to da učinkovitost plazmom aktivirane vode (PAW) proizlazi iz složene interakcije između odabranog plina, tipa reaktora, i fizioloških svojstava ciljanih mikroorganizama.

Ova spoznaja naglašava važnost optimizacije parametara procesa u svrhu postizanja maksimalnog antimikrobnog učinka u primjeni PAW-a u području sigurnosti i očuvanja hrane.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata provedenog istraživanja, može se zaključiti sljedeće:

1. Rezultati pokazuju da je tekućinski reaktor u svim uvjetima ostvario ujednačeniji i stabilniji antimikrobni učinak, dok se kod plinskog reaktora učinak značajno razlikovao ovisno o vrsti radnog plina i primijenjenom naponu.
2. Kod stanica *Salmonella enterica* u tekućinskom reaktoru nakon 24 sata u svim uzorcima postignuta je potpuna redukcija (6 log CFU/mL), bez obzira na plin i napon, dok su se u plinskom reaktoru razlike među uzorcima zadržale i nakon 24 sata, pri čemu je kisik bio najučinkovitiji.
3. Stanice kvasca *Candida utilis* su pokazale veću otpornost na PAW u usporedbi s bakterijama. Najveća postignuta redukcija iznosila je 3,71 log u tekućinskom i 3,19 log u plinskom reaktoru nakon 24 h.
4. *Listeria monocytogenes* pokazala je potpunu inhibiciju u tekućinskom reaktoru, 5,50 log nakon 24 sata, dok je u plinskom reaktoru postignuta redukcija od 5,60 log nakon 24 sata.
5. *Lactobacillus plantarum* pokazao je gotovo potpunu inhibiciju u tekućinskom reaktoru nakon 24 sata u svim uzorcima, dok je u plinskom reaktoru potpuna inaktivacija ostvarena već nakon 3 sata, pri čemu su uzorci s kisikom pokazali slabiji inicijalni učinak. Najveća postignuta redukcija iznosila je 6,77 log u tekućinskom i 6,58 log u plinskom reaktoru nakon 24 h.
6. Najniži pH postignut je u plinskom reaktoru pri dušiku i kisiku ($P_{N_2_30} = 3,85$; $P_{O_2_30} = 3,98$), a u tekućinskom pri argonu ($T_{Ar_30} = 4,02$); najviši pH imao je $T_{N_2_30}$ (8,18). U uvjetima s nižim pH-om zabilježene su i veće redukcije bakterija, osobito pri kisiku: u plinskom reaktoru; *Salmonella* 24 h = 6,12 log i *Listeria* 24 h = 5,60 log; u tekućinskom $T_{O_2_30}$ već nakon 3 sata daje 5,97 log (*Salmonella*) i 5,22 log (*Listeria*). To potvrđuje da sniženi pH snažno doprinosi antimikrobnom učinku PAW-a.
7. Najviša električna vodljivost zabilježena je; u tekućinskom reaktoru pri kisiku 20 kV za $T_{O_2_20} = 96,20 \mu S/cm$; u plinskom pri dušiku 30 kV za $P_{N_2_30} = 85,7 \mu S/cm$, dok su najniže vrijednosti bile $T_{N_2_30} = 5,04 \mu S/cm$, $T_{O_2_30} = 5,06 \mu S/cm$ i $P_{Ar_30} = 7,16 \mu S/cm$.
8. Najviše koncentracije vodikova peroksida postignute su u tekućinskom reaktoru pri kisiku 30 kV ($T_{O_2_30} = 21,86 mg/L$) i u plinskom pri argonu 30 kV ($P_{Ar_30} = 21,14 mg/L$); uvjeti s višim vodikovim peroksidom i nižim pH-om povezani su s najbržim i/ili najvišim redukcijama – uzorak $T_{O_2_30}$ postigao je potpunu inaktivaciju za *Salmonella* (5,97 log) i *Listeria* (5,22 log) već nakon 3 h kontakta, a nakon 24 h u tekućinskom reaktoru postiže se potpuna ili gotovo potpuna inaktivacija bakterija (*Salmonella* 6,02 log; *L. plantarum* 6,77 log; *Listeria* 5,5 log).

7. ZAHVALE

Zahvaljujemo svim djelatnicima Laboratorija za procesno-prehrambeno inženjerstvo i Laboratorija za tehnologiju vrenja i kvasca na velikoj pomoći i podršci, a posebno izv.prof.dr.sc. Tomislavi Vukušić Pavičić, dr.sc. Višnji Stulić, dr.sc. Karli Hanousek Čiča, prof.dr.sc. Jasni Mrvčić te dr.sc. Ivan Karlo Cingesar na vrijednim savjetima i podršci.

Posebna zahvala našoj dragoj mentorici izv.prof.dr.sc. Tomislavi Vukušić Pavičić, s kojom smo imale privilegiju raditi na ovom istraživanju. Naš zajednički rad bio je izuzetno iskustvo, te smo neizmjereno zahvalne na velikoj pomoći, podršci, strpljenju te svim dragocjenim savjetima i novim saznanjima koje ste nam prenijeli.

Na kraju, veliku zahvalnost dugujemo i jedna drugoj na strpljenju, međusobnoj pomoći, motivaciji i velikom prijateljstvu koje nas je vodilo kroz cijeli proces izrade ovog rada.

8. LITERATURA

- Abdo, A., McWhorter, A. R., Hasse, D., Schmitt-John, T., & Richter, K. (2023). Efficacy of plasma-treated water against *Salmonella Typhimurium*: Antibacterial activity, inhibition of invasion, and biofilm disruption. *Antibiotics*, 12(9), 1371. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12091371>
- Abolore, R. S., Jaiswal, S., & Jaiswal, A. K. (2025). A comprehensive review of the application of cold plasma technology in lignocellulosic biomass pretreatment. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 19(2), 453–468. <https://doi.org/10.1002/bbb.2706>
- Behera, S. S., Ray, R. C., & Zdolec, N. (2018). *Lactobacillus plantarum* with functional properties: An approach to increase safety and shelf-life of fermented foods. *BioMed Research International*, 2018, 9361614. <https://doi.org/10.1155/2018/9361614>
- Bradů, C., Kutasi, K., Magureanu, M., Puač, N., & Živković, S. (2020). Reactive nitrogen species in plasma-activated water: Generation, chemistry and application in agriculture. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 53(22), 223001. <https://doi.org/10.1088/1361-6463/ab7bd2>
- Brisset, J.-L., & Hnatiuc, E. (2012). Peroxynitrite: A re-examination of the chemical properties of non-thermal discharges burning in air over aqueous solutions. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 32, 655–674. <https://doi.org/10.1007/s11090-012-9393-0>
- Bruggeman, P. J., & Leys, C. (2009). Non-thermal plasmas in and in contact with liquids. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 42(5), 053001. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/42/5/053001>
- Bruggeman, P. J., Kushner, M. J., Locke, B. R., Gardeniers, J. G., Graham, W. G., Graves, D. B., ... & Mason, N. J. (2016). Plasma–liquid interactions: A review and roadmap. *Plasma Sources Science and Technology*, 25(5), 053002. <https://doi.org/10.1088/0963-0252/25/5/053002>
- Buerth, C., Tielker, D., & Ernst, J. F. (2016). *Candida utilis* and *Cyberlindnera (Pichia) jadinii*: Yeast relatives with expanding applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(16), 6981–6990. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7641-3>
- Cabiscol, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E., & Ros, J. (2000). Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(35), 27393–27398. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910344199>
- Chiappim, W., Sampaio, A. G., Miranda, F., Fraga, M., Petraconi, G., da Silva Sobrinho, A., & Pessoa, R. (2021). Antimicrobial effect of plasma-activated tap water on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Water*, 13(11), 1480. <https://doi.org/10.3390/w13111480>

- Fanelli, F., Sima, S., Chiruta, D., Brisset, J.-L., & Trunfio, A. (2019). Plasma-activated water production and its stability over time. *Applied Sciences*, 9(12), 2553. <https://doi.org/10.3390/app9122553>
- Fernández, A., Noriega, E., & Thompson, A. (2019). Bacterial inactivation mechanisms of plasma-activated water: Role of reactive oxygen and nitrogen species. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(10), e02494-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02494-18>
- Ferreira, M. G., Caffaro, M. M., Santamaría, B., Zilli, C., Hernández, A., Fina, B. L., Vélez, A. S., Balestrasse, K. B., & Prevosto, L. (2025). Voda aktivirana plazmom proizvedena u umjereno visoko energetski učinkovitom reaktoru od 1 litre: Učinci na klijanje i rast biljaka rajčice i paprike. *Plants*, 14(5), 722. <https://doi.org/10.3390/plants14050722>
- Glaze, W. H., Kang, J. W., & Chapin, D. H. (1987). The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and ultraviolet radiation. *Ozone: Science & Engineering*, 9(4), 335–352. <https://doi.org/10.1080/01919518708552148>
- Gott, R. P., Engeling, K. W., Olson, J., & Franco, C. (2023). Plasma activated water: A study of gas type, electrode material, and power supply selection and the impact on the final frontier. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 25(6), 5130–5145. <https://doi.org/10.1039/D2CP03489A>
- Guo, L., Xu, R., Gou, L., Tang, J., Liu, D., Zhang, L., ... & Kong, M. G. (2018). Mechanisms of inactivation of *Escherichia coli* by plasma-activated water. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1006. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01006>
- Han, Q., Li, X., & Zhou, T. (2023). Application of plasma-activated water in the food industry. *Food Chemistry*, 405, 134823. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134823>
- Handorf, O., Pauker, V. I., Weihe, T., Schäfer, J., Freund, E., Schnabel, U., ... & Ehlbeck, J. (2021). Plasma-treated water affects *Listeria monocytogenes* vitality and biofilm structure. *Frontiers in Microbiology*, 12, 652481. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.652481>
- Ikawa, S., Kitano, K., & Hamaguchi, S. (2010). Effects of pH on bacterial inactivation in aqueous solutions due to low-temperature atmospheric pressure plasma application. *Plasma Processes and Polymers*, 7(1), 33–42. <https://doi.org/10.1002/ppap.200900090>
- Jamet, A., & Nassif, X. (2019). Fungal responses to oxidative stress. *Mycobiology*, 47(6), 397–408. <https://doi.org/10.1080/12298093.2019.1691788>

- Jiang, B., Zheng, J., Qiu, S., Wu, M., Zhang, Q., Yan, Z., & Xue, Q. (2014). Review on electrical discharge plasma technology for wastewater remediation. *Science of the Total Environment*, 469–470, 121–133. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.016>
- Judée, F., Simon, S., Bailly, C., & Dufour, T. (2018). Plasma-activation of tap water using DBD for agronomy applications: Identification and quantification of long lifetime chemical species and production/consumption mechanisms. *Water Research*, 133, 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.035>
- Jyung, S., Kang, J. W., & Kang, D. H. (2023). Inactivation of *Listeria monocytogenes* through the synergistic interaction between plasma-activated water and organic acid. *Food Research International*, 167, 112687. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112687>
- Kazemi, A., Nicol, M. J., Bilén, S. G., Kirimanjeswara, G. S., & Knecht, S. D. (2024). Cold Atmospheric Plasma Medicine: Applications, Challenges, and Opportunities for Predictive Control. *Plasma*, 7(1), 233–257. <https://doi.org/10.3390/plasma7010014>
- Kutasi, K., Krstulović, N., Jurov, A., Salamon, K., Popović, D., & Milošević, S. (2021). Controlling the composition of plasma-activated water by Cu ions. *Plasma Sources Science and Technology*, 30(4), 045013. <https://doi.org/10.1088/1361-6595/abe6a7>
- Laroussi, M. (2009). Low-temperature plasma jet for biomedical applications: A review. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 37(6), 713–725. <https://doi.org/10.1109/TPS.2009.2017267>
- Laurita, R., Barbieri, D., Gherardi, M., Colombo, V., & Lukes, P. (2016). The chemical and biophysical mechanisms of cold plasma-induced bacterial inactivation: An analysis of cell–plasma interaction. *Scientific Reports*, 6, 38610. <https://doi.org/10.1038/srep38610>
- Li, J., et al. (2019). A review of recent advances of dielectric barrier discharge plasma in catalysis. *Nanomaterials*, 9(10), 1428. <https://doi.org/10.3390/nano9101428>
- Locke, B. R., Sato, M., Sunka, P., Hoffmann, M. R., & Chang, J.-S. (2006). Electrohydraulic discharge and nonthermal plasma for water treatment. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45(3), 882–905. <https://doi.org/10.1021/ie050981u>
- Lukes, P., Clupek, M., Babicky, V., & Sunka, P. (2005). Pulsed corona discharge in water: Formation of hydroxyl and hydrogen radicals and their reactivity. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 38(24), 409–416. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/38/24/012>

- Lukes, P., Dolezalova, E., Sisrova, I., & Clupek, M. (2014). Plasma-activated water: Generation, properties, and applications. *Plasma Sources Science and Technology*, 23(4), 045019. <https://doi.org/10.1088/0963-0252/23/4/045019>
- Lukes, P., Doležalová, E., Šišrová, I., & Clupek, M. (2014). Aqueous-phase chemistry and bactericidal effects from an air discharge plasma in contact with water: Evidence for the formation of peroxynitrite through a pseudo-second-order post-discharge reaction of H₂O₂ and HNO₂. *Plasma Sources Science and Technology*, 23(1), 015019. <https://doi.org/10.1088/0963-0252/23/1/015019>
- Machala, Z., Tarabová, B., Hensel, K., Spetlikova, E., Sikurova, L., & Lukeš, P. (2013). Formation of ROS and RNS in water electro-sprayed through transient spark discharge in air and their bactericidal effects. *Plasma Processes and Polymers*, 10(7), 649–659. <https://doi.org/10.1002/ppap.201200113>
- Mai-Prochnow, A., Clauson, M., Hong, J., & Murphy, A. B. (2016). Gram positive and gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Scientific Reports*, 6, 38610. <https://doi.org/10.1038/srep38610>
- Mai-Prochnow, A., Zhou, R., Zhang, T., Ostrikov, K. K., Mugunthan, S., Rice, S. A., & Cullen, P. J. (2021). Interactions of plasma-activated water with biofilms: Inactivation, dispersal effects and mechanisms of action. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 7(1), 11. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-00180-6>
- Manyi-Loh, C. E., & Lues, R. (2025). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: The global enigma. *Foods*, 14(7), 1266. <https://doi.org/10.3390/foods14071266>
- Ma, R., Wang, G., Tian, Y., Wang, K., Zhang, J., & Fang, J. (2015). Non-thermal plasma-activated water inactivation of food-borne pathogen on fresh produce. *Journal of Hazardous Materials*, 300, 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.07.061>
- Ma, R., Wang, G., Tian, Y., Wang, K., Zhang, J., & Fang, J. (2016). Bactericidal effects and mechanisms of atmospheric-pressure cold plasma on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Scientific Reports*, 6, 24712. <https://doi.org/10.1038/srep24712>
- Ma, Y., Zhang, G., Shi, X., Xu, D., Zhang, Y., & Liu, J. (2017). Evaluation of the antibacterial activity of plasma-activated water against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Science of the Total Environment*, 575, 312–320. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.226>
- Mehmood, F., Kamal, T., & Ashraf, U. (2018). Generation and applications of plasma (an academic review). *Preprints*. <https://www.preprints.org/manuscript/63199e393d96518df9c808e1272377e3>

- Misra, N. N., Tiwari, B. K., Raghavarao, K. S., & Cullen, P. J. (2019). Cold plasma in modified atmospheres for microbial inactivation: Mechanisms and applications. *Trends in Food Science & Technology*, 94, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.002>
- Ragni, L., Berardinelli, A., Iaccheri, E., Gozzi, G., Cevoli, C., & Vannini, L. (2016). Influence of the electrode material on the decontamination efficacy of dielectric barrier discharge gas plasma treatments towards *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.07.029>
- Rahman, M., Smith, J., Lee, A., & Novak, P. (2022). Plasma-Activated Water for Food Safety and Quality: A Review of Recent Developments. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(11), 6630. <https://doi.org/10.3390/ijerph19116630>
- Rathore, V., & Nema, S. K. (2023). Selective generation of reactive oxygen species in plasma-activated water using CO₂ plasma. *Journal of Vacuum Science & Technology A*, 41(4), 043201. <https://doi.org/10.1116/6.0002460>
- Rotondo, P. R., Aceto, D., Ambrico, M., Stellacci, A. M., Faretra, F., De Miccolis Angelini, R. M., & Ambrico, P. F. (2025). Physicochemical properties of plasma-activated water and associated antimicrobial activity against fungi and bacteria. *Scientific Reports*, 15, 5536. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-88369-7>
- Rothwell, J. G., Alam, D., Carter, D. A., Soltani, B., McConchie, R., Zhou, R., ... & Mai-Prochnow, A. (2021). The antimicrobial efficacy of plasma activated water is modulated by reactor design and water composition. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.07.14.452435>
- Sasikumar, R., Mangang, I. B., Kaviarasu, G., Kaushik, R., Mansingh, P., Tomer, V., & Jaiswal, A. K. (2025). A comprehensive review on cold plasma applications in the food industry. *Sustainable Food Technology*. <https://doi.org/10.1039/D5FB00148J>
- Scholtz, V. (2025). Is plasma activated water really magical? A reflection on recent findings and applications. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 45(4), 1337–1351. <https://doi.org/10.1007/s11090-025-10464-1>
- Shen, J., Tian, Y., Li, Y., Ma, R., Zhang, Q., Zhang, J., & Fang, J. (2016). Bactericidal effects against *Staphylococcus aureus* and physicochemical properties of plasma-activated water stored at different temperatures. *Scientific Reports*, 6, 28505. <https://doi.org/10.1038/srep28505>

Soni, A., Choi, J., & Brightwell, G. (2021). Plasma-activated water (PAW) as a disinfection technology for bacterial inactivation with a focus on fruit and vegetables. *Foods*, 10(1), 166. <https://doi.org/10.3390/foods10010166>

Simon, S., Salgado, B., Hasan, M. I., Sivertsvik, M., Fernández, E. N., & Walsh, J. L. (2022). Influence of potable water origin on the physicochemical and antimicrobial properties of plasma activated water. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 42(2), 377–393. <https://doi.org/10.1007/s11090-021-10221-3>

Tajiknezhad, S., Jandaghi, N., & Khanzadeh, A. (2025). The characteristics of plasma-activated water by different methods of corona electric discharge. *Journal of Interfaces, Thin Films, and Low Dimensional Systems*, 8(2), 885–892. <https://doi.org/10.22051/jitl.2025.49048.1119>

Tarabová, B., Lukeš, P., Hammer, M. U., Jablonowski, H., von Woedtke, T., Reuter, S., & Machala, Z. (2019). Fluorescence measurements of peroxynitrite/peroxynitrous acid in cold air plasma treated aqueous solutions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 21(17), 8883–8896. <https://doi.org/10.1039/C8CP07391H>

Traylor, M. J., Pavlovich, M. J., Karim, S., Hait, P., Sakiyama, Y., Clark, D. S., & Graves, D. B. (2011). Long-term antibacterial efficacy of air plasma-activated water. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 44(47), 472001. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/44/47/472001>

Tsoukou, E., et al. (2020). Temperature stability and effectiveness of plasma-activated liquids. *Water*, 12(4), 1099. <https://doi.org/10.3390/w12041099>

Xu, D., Cui, Q., Xu, Y., Wang, B., Tian, M., Pan, Y., ... Zhang, J. (2016). Inactivation of fungal spores in aqueous suspension by non-thermal plasma: Influence of oxidative stress. *Scientific Reports*, 6, 18831. <https://doi.org/10.1038/srep18831>

Yousfi, N., Merbahi, N., Bouajila, J., Taillandier, P., & Debouba, M. (2025). Microbial fermentation assisted by pulsed electric fields, magnetic fields and cold atmospheric plasma: State of the art. *Fermentation*, 11(7), 417. <https://doi.org/10.3390/fermentation11070417>

Zhang, Q., Liang, Y., Feng, H., Ma, R., Tian, Y., Zhang, J., & Fang, J. (2022). Effects and mechanisms of plasma activated water on inactivation of yeast cells. *Food Control*, 134, 108684. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108684>

Zhao, Y. M., Patange, A., Sun, D. W., & Tiwari, B. (2020). Plasma-activated water: Physicochemical properties, microbial inactivation mechanisms, factors influencing antimicrobial effectiveness, and

applications in the food industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 3951–3979. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12644>

Zhou, R., Zhou, R., Prasad, K., Fang, Z., Speight, R., Bazaka, K., & Ostrikov, K. K. (2018). Cold atmospheric plasma activated water as a prospective disinfectant: The crucial role of peroxyxynitrite. *Green Chemistry*, 20(24), 5276–5284. <https://doi.org/10.1039/C8GC02800A>

Zhou, R., Zhou, R., Zhang, X., Yang, S., Bazaka, K., & Ostrikov, K. K. (2018). Cold atmospheric plasma for biofilm inactivation and microbial disinfection: A review of current status and future perspectives. *Current Opinion in Food Science*, 20, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.02.007>

Ziuzina, D., Patil, S., Cullen, P. J., Keener, K. M., & Bourke, P. (2015). Cold plasma inactivation of bacterial biofilms and reduction of quorum sensing regulated virulence factors. *PLoS ONE*, 10(9), e0138209. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138209>

Nestel, S., Wagner, R., Meister, M., Weihe, T., & Schnabel, U. (2025). Plasma-treated water effect on sporulating *Bacillus cereus* vs. non-sporulating *Listeria monocytogenes* biofilm cell vitality. *Applied Microbiology*, 5(3), 80. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol5030080>

Wong, K., Zhang, L., & Petrović, M. (2023). Plasma-Activated Water: Physicochemical Properties, Generation Techniques, and Applications. *Processes*, 11(7), 2213. <https://doi.org/10.3390/pr11072213>

9. SAŽETAK

Laura Molan i Emma Jureša

Određivanje antimikrobnog učinka plazmom aktivirane vode na odabrane mikroorganizme

Ključne riječi: Plazmom aktivirana voda (PAW); antimikrobna aktivnost; reaktivne vrste kisika i dušika (RONS)

Sažetak:

Hladna plazma kao netermalna tehnologija sve se više ističe u području biomedicine i prehrambene tehnologije zbog izraženog antimikrobnog učinka i minimalnih promjena u fizikalno-kemijskim svojstvima obrađenih sustava. Posebnu pažnju privlači plazmom aktivirana voda (PAW) koja djelovanjem reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta pokazuje potencijal za učinkovitu inaktivaciju mikroorganizama, uz istodobno očuvanje stabilnosti tretiranog medija. Iako je učinak PAW na smanjenje broja mikroorganizama detaljno istraživao, još uvijek postoji potreba za sustavnim proučavanjem mehanizama djelovanja, stabilnosti te ograničenja primjene u različitim okruženjima. Cilj ovoga rada bio je analizirati antimikrobno djelovanje plazmom aktivirane vode na različite mikroorganizme (*Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus plantarum* i *Candida utilis*) te utvrditi mehanizme koji pridonose njezinoj učinkovitosti. Posebna je pozornost posvećena razlikama u osjetljivosti Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija te kvasaca na inaktivaciju nakon određenog vremenskog kontakta (3 h i 24 h) sa plazma aktiviranom vodom. Određene su i fizikalno-kemijske karakteristike plazma aktivirane vode (pH, električna provodljivost, temperatura te koncentracije vodikovog peroksida, nitrata i nitrita). Rezultati su pokazali značajne razlike između plinskog i tekućinskog reaktora, pri čemu su uzorci iz plinskog reaktora imali niže pH vrijednosti (4,02; 4,80) i višu električnu vodljivost (96,20 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Utvrđeno je da vrsta plina snažno utječe na sastav PAW-e, s tim da argon daje najviše koncentracije vodikovog peroksida (21,14 mg/L), dok dušik i kisik rezultiraju najvišim koncentracijama nitrata (25 mg/L) i nitrita (0,75 mg/L). Antimikrobni učinak PAW potvrđen je na svim ispitivanim mikroorganizmima u ovisnosti o odabranom reaktoru, vrsti plina te fiziološkim svojstvima mikroorganizma.

10. SUMMARY

Laura Molan and Emma Jureša

Evaluation of the Antimicrobial Effect of Plasma-Activated Water on Selected Microorganisms

Keywords: Plasma-activated water (PAW); Antimicrobial activity; Reactive oxygen and nitrogen species (RONS)

Summary:

Cold plasma, as a non-thermal technology, is increasingly recognized in the fields of biomedicine and food technology due to its pronounced antimicrobial effect and minimal changes in the physicochemical properties of treated systems. Particular attention has been given to plasma-activated water (PAW), which, through the action of reactive oxygen and nitrogen species, shows strong potential for effective microbial inactivation while maintaining the stability of the treated medium. Although the effect of PAW on microbial reduction has been extensively studied, there is still a need for systematic investigation of its mechanisms of action, stability, and limitations in various environments.

The aim of this study was to analyze the antimicrobial activity of plasma-activated water against different microorganisms (*Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus plantarum*, and *Candida utilis*) and to determine the mechanisms contributing to its effectiveness. Special attention was given to differences in the sensitivity of Gram-negative and Gram-positive bacteria and yeast to inactivation after defined contact times (3 h and 24 h) with PAW. Physicochemical characteristics of PAW were also determined, including pH, electrical conductivity, temperature, and the concentrations of hydrogen peroxide, nitrates, and nitrites. The results revealed significant differences between gaseous and liquid reactors, with gaseous reactors producing samples of lower pH and higher electrical conductivity. The results revealed pronounced differences between the gaseous and liquid reactors, with samples generated in the gaseous reactor exhibiting lower pH values (4.02; 4.80) and higher electrical conductivity (96.20 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Furthermore, the type of gas was found to strongly influence the composition of PAW, whereby argon produced the highest concentrations of hydrogen peroxide (21.14 mg/L), while nitrogen and oxygen resulted in the highest concentrations of nitrates (25 mg/L) and nitrites (0.75 mg/L). The antimicrobial effect of PAW was confirmed on all tested microorganisms, depending on the selected reactor, type of gas, and the physiological properties of the microorganism.