Utjecaj toplinskog zagrijavanja na stresne parametre odabranih mikroorganizama

Hradec, Gloria

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:188212

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Gloria Hradec

6869/PT

UTJECAJ TOPLINSKOG ZAGRIJAVANJA NA STRESNE PARAMETRE ODABRANIH MIKROORGANIZAMA

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Fizikalna svojstva složenih sustava- hrane.

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

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

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

Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procesno-prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstevno polje: Prehrambena tehnologija

Utjecaj toplinskog zagrijavanja na stresne parametre odabranih mikroorganizama

Gloria Hradec, 0058204323

Sažetak: Cilj ovog rada je istražiti utjecaj toplinskog zagrijavanja na stresne parametre bakterijske kulture *L. innocua*, kao surogat patogene *L. monocytogenes*. Određivan je utjecaj povišene temperature na istjecanje staničnog sadržaja, stupanj redukcije i oporavka, nastanak biofilma kao i na fizikalne čimbenike (pH, provodnost). Uzorci su tretirani pri temperaturnom rasponu 20ºC do 60ºC u vremenskim periodima 5 min i 10 min.

Toplinski tretman pokazao se efikasnim pri postizanju redukcije broja tretiranih stanica, a povećanjem temperature i trajanja toplinskog tretmana zabilježeno je pojačano istjecanje unutarstaničnog sadržaja, smanjenje pH vrijednosti, povećanje provodnosti te je zabilježena pojava slobodnih radikala kao posljedica oksidacijskog stresa u stanici. Također je i zabilježen nastanak biofilma kao posljedica izlaganja stanica stresnim uvjetima.

Oporavak stanica zabilježen je pri temperaturama 20ºC do 50ºC. Pri 60ºC nije došlo do oporavka tretiranih stanica.

Ključne riječi: biofilm, *L. innocua*, oporavak, redukcija, toplinsko zagrijavanje
Rad sadrži: 28 stranica, 7 slika, 4 tablice, 25 literaturna navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: izv.prof.dr.sc*. Anet Režek Jambrak*
Pomoć pri izradi:*Višnja Stulić*, mag. ing
Datum obrane: 17. srpnja 2017.

BASIC DOCUMENTACION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology

Department of Food Engineering
Laboratory for Food-Process Engineering

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Influence of thermal heating on stress parameters of selected microorganisms

Gloria Hradec, 0058204323

Abstract: The aim of this work is to investigate the influence of heating on the stress parameters of bacterial culture *L. innocua*, as a surrogate of the pathogenic *L. monocytogenes*. The influence of elevated temperature on the leakage of intercellular content, the degree of reduction and recovery, biofilm formation as well as physical factors (pH, conductivity) were determined. The samples were treated at a temperature range of 20ºC to 60ºC in time periods of 5 min and 10 min. Heat treatment was shown to be effective in reducing the number of treated cells. Increased temperature and duration of heat treatment resulted in increased leakage of intercellular content, increased concentracion of free radicals resulting from oxidative stress, decreased pH value, increased conductivity and biofilm formation. Recovery of the cells was recorded at temperature range of 20ºC to 50ºC. At 60ºC there was no recorded recovery of treated cells.

Keywords: biofilm, heating, *L. innocua*, recovery, reduction
Thesis contains: 28 pages, 7 figures, 4 tables, 25 references
Original in: Croatian
Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: izv.prof.dr.sc*. Anet Režek Jambrak*
Technical support and assistance: *Višnja Stulić*, mag. ing
Defence date: July 17th 2017

SADRŽAJ

1.UVOD.....1
2. TEORIJSKI DIO.....2
2.1 TOPLINSKO ZAGRIJAVANJE.....2
2.2 *Listeria* spp. 6
2.3 *Listeria innocua* 7
3.EKSPERIMENTALNI DIO.....9
3.1. MATERIJALI I METODE.....9
3.1.1 *Listeria innocua* ATCC 20649.....9
3.1.2 Hranjive podloge.....9
3.1.3. Materijali i aparatura.....9
3.2. METODE RADA.....11
3.2.1. Priprema suspenzije mikroorganizama.....11
3.2.2. Provođenje eksperimenta.....12
3.2.3 Određivanje istjecanja unutarstaničnog sadržaja.....13
3.2.4 Određivanje slobodnih radikala.....13
3.2.5 Određivanje broja stanica.....14
3.2.6 Određivanje biofilma.....14
3.2.7 Oporavak stanica.....15
3.2.8 Određivanje pH i električne provodnosti.....15
4. REZULTATI I RASPRAVA.....16
5. ZAKLJUČAK.....24
6.LITERATURA.....25

1.UVOD

Mikrobiološka kontaminacija hrane predstavlja jednu od najvećih opasnosti za ljudsko zdravlje. Jedan od najčešćih načina zaraze mikroorganizmima je konzumacija nedovoljno termički obrađene hrane, ili hrane koja nije pripremljena na zdravstveno ispravan način. Termička obrada hrane u svrhu inaktivacije mikroorganizama ključan je proces svake prehrambene industrije.

Termička obrada hrane podrazumijeva primjenu povišene temperature kroz određeno vrijeme u cilju postizanja inaktivacije mikroorganizama. Pri određivanju parametara termičke obrade potrebno je voditi računa o kemijskom sastavu namirnice koja prolazi termičku obradu kako bi degradacija hranjivih sastojaka bila što manja. Temperature pri kojima dolazi do inaktivacije mikroorganizama razlikuju se s obzirom na vrstu određenog mikroorganizma. Mikroorganizmi su podijeljeni prema optimalnoj temperaturi rasta na psihrofile, mezofile, termofile i hipertermofile. Mikroorganizmi koji se prema temperaturi rasta svrstavaju u psihrofile jedan su od najčešćih izvora mikrobiološke kontaminacije hrane s obzirom na sposobnost rasta pri niskim temepraturama.

Bakterije roda *Listeria* spp. primjer su patogene skupine psihrofilnih mikroorganizama. Uzročnici su listerioze, bakterijske infekcije s visokim stopama smrtnosti. *Listeria* spp. svrstava se u razred pravilnih, nesporogenih, gram-pozitvnih štapića. Nalaze se u velikom broju namirnica koje se svakodnevno konzumiraju kao što su svježi sir, svježe povrće i voće, nepasterizirano mlijeko te sirovo meso (sirova piletina, riba i sl.). Predstavljaju veliki problem za ljudsko zdravlje jer posjeduju sposobnost rasta pri temperaturi hladnjaka.

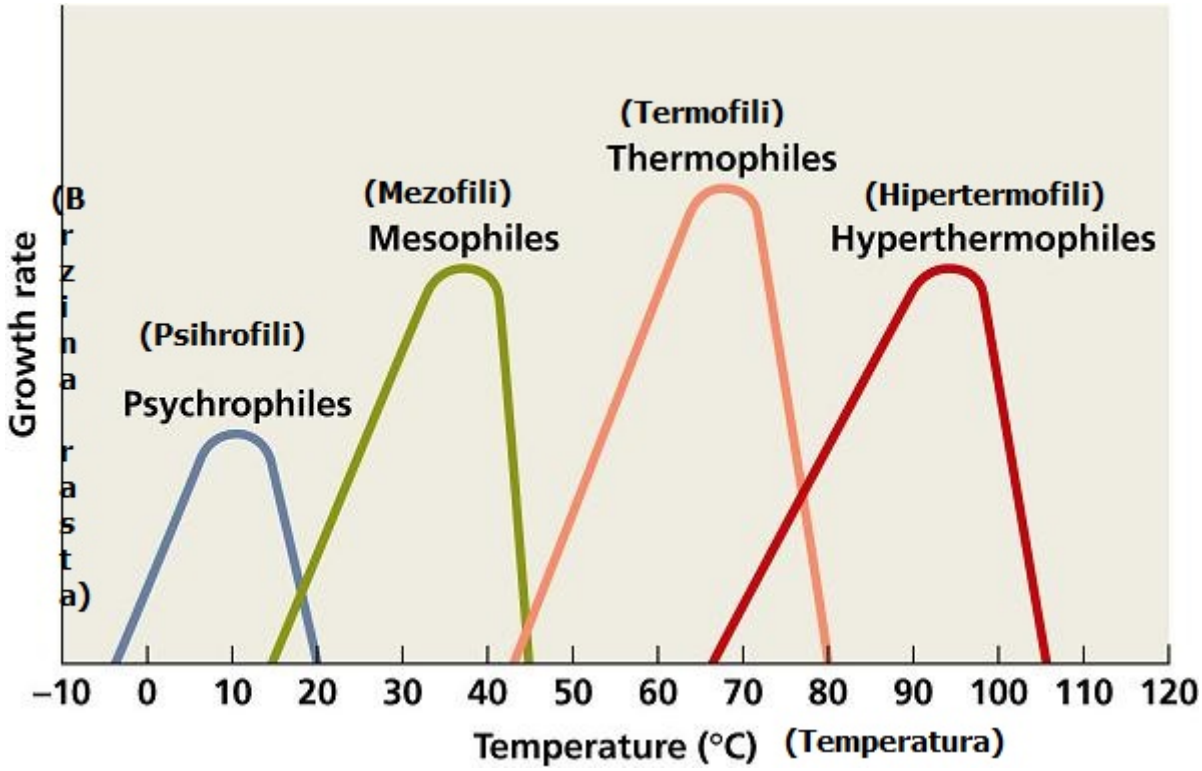
U ovom radu određivan je utjecaj toplinskog zagrijavanja na stresne parametre *Listeria innocua* ATCC 20649. Određivano je istjecanje unutarstaničnog sadržaja, koncentracija slobodnih radikala, nastanak biofilma, stupanj inaktivacije te oporavak stanica nakon tretmana.

Cilj rada je odrediti pri kojoj je najnižoj temperaturi moguće postići redukciju *L. innocua*, kao surogat patogene *L. monocytogenes*, te spriječiti oporavak toplinski tretiranih stanica.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. TOPLINSKO ZAGRIJAVANE

Toplinsko zagrijavanje najčešći je oblik inaktivacije mikroorganizama u prehrambenoj industriji. Inaktivacija mikroorganizama toplinskim zagrijavanjem temelji se načinjenici kako svi mikroorganizimi rastu unutar određenog raspona temperature. Prema optimalnoj temperaturi rasta, mikroorganizme je moguće podijeliti u 4 skupine: psihrofili, mezofili, termofili te hipertermofili.



Slika 1. Prikaz četiri mikrobne kategorije temeljene prema optimalnim temperaturama rasta (Anonimus 1., 2017)

Toplinski tretman u okvirima prehrambene industrije obuhvaća procese pasterizacije i sterilizacije. Oba procesa provode se u svrhu konzerviranja hrane, tj. kako bi se osigurala mikrobiološka stabilnost i zdravstvena ispravnost. Pasterizacija je relativno blaga toplinska obrada koja uništava vegetativne stanice patogenih mikroorganizama koji utječu na sigurnost hrane.

Optimalni toplinski proces pasterizacije ovisi o prirodi prehrambenog proizvoda, pH vrijednosti, brojnosti i otpornosti ciljnih mikroorganizama; općenito različit broj kombinacija vremenskih i temperaturnih odnosa može biti jednako učinkovit za mikrobiološku kontrolu. Kriterij prema kojima se vrši odabir optimalnog procesa pasterizacije su osiguranje senzorskih svojstava hrane, kao i kvalitete pasteriziranog prehrambenog proizvoda (Aamir i sur., 2013).

U prehrambenoj industriji prema uvjetima (vrijeme/temperatura) toplinskog tretmana pasterizacija se provodi na dva načina. HTST (visoka temperatura, kratko vrijeme djelovanja) i LTLT (niska temperatura i dugo vrijeme djelovanja). HTST proces pasterizacije provodi se pri 72ºC u vremenskom periodu 15 sekundi, dok se LTLT provodi pri temperaturi 63ºC u vremenskom periodu 30 minuta. Odabir načina kojim će se provesti toplinski tretman pasterizacije ponajviše ovisi o kemijskom sastavu namirnice nad kojom se provodi toplinski tretman, pri čemu je glavni cilj u što većoj mjeri očuvati biološki aktivne komponente u hrani. Sterilizacija, kao tehnološki proces u prehrambenoj industriji, provodi se pri minimalnom temperaturnom iznosu 100ºC. U prehrambenoj industriji najčešće se provodi UHT (primjena ultra visoke temperature) sterilizacija u vremenskom periodu trajanja 2-3 sekunde. Odabir primjene procesa pasterizacije ili sterilizacije u svrhu konzerviranja hrane ponajviše ovisi i o toplinskoj otpornosti mikroorganizama.

Različiti mikroorganizmi posjeduju različite karakteristike, a kao rezultat toga, njihova razina otpornosti na tehnike sterilizacije ili dezinfekcije razlikuju se jedna od druge. U pogledu njihove otpornosti na sterilizaciju, redom od visokog do niskog, dokazano je da su bakterijske spore najrezistentnije, a slijede mikobakterije, virusi koji ne posjeduju vanjsku ovojnicu, gljivice, bakterije te virusi koji posjeduju vanjsku ovojnicu (Dai i sur., 2016).

Toplinskim zagrijavanjem povećava se temperatura okoline te se stvaraju nepovoljni uvjeti za mikrobni rast i razvoj. Povećanjem temperature iznad optimalne temperature za rast dolazi do nagle inaktivacije mikroorganizama u kratkom vremenskom periodu. Temperatura utječe na iznose kemijskih reakcija i trodimenzionalnu strukturu proteina, stoga djeluje i na iznose enzimskih aktivnosti (Duraković i sur., 2002). Gubitkom tercijarne strukture, enzimi više nisu u mogućnosti katalizirati metaboličke reakcije, a kako je brzina odvijanja metaboličkih reakcija izuzetno niska ukoliko nije katalizirana enzimom, to sa staničnog gledišta znači kako se reakcija uopće ne odvija.

Temperatura okoline, veća od temperature optimalne za rast i razvoj mikroorganizama, također nepovoljno utječe na propusnost citoplazmatske membrane. Budući da se pri povišenim temperaturama proteini denaturiraju, to rezultira propusnošću citoplazmene membrane, odnosno limitiranjem gornje temperature za rast bakterija (Durakovć i sur., 2002). Posljedica denaturacije proteina citoplazmatske membrane je istjecanje unutarstaničnog sadržaja odnosno makromolekula (DNA, RNA, enzimi) koji se nalaze unutar stanice i nužni su za preživljavanje bakterijske stanice.

Povišena temperatura okoline utječe na povećanje koncentracije slobodnih radikala u stanici, tj. dolazi do pojave nazvane oksidativni stres. Oksidativni stres definiran je kao pomak ravnoteže u oksidacijsko-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije. Oksidativni stres nastaje uslijed neravnomjernog stvaranja slobodnih radikala reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i reaktivnih dušikovih vrsta (RNS) koji dovode do pojave oksidativnog i/ili nitrozativnog stresa , te posljedično i do oštećenja makromolekula, uključujući frakcije lipida i proteina (Falowo i sur., 2014).

Slobodni radikali (tj. vodikov perokisid) u normalnim uvjetima u određenoj količini nastaju u mitohodrijima kao posljedica normalne metaboličke funkcije stanice. Tako nastali vodikov peroksid spontano se razlaže na vodu i kisik, te nema razarajući utjecaj na stanicu. Ukoliko je stanica izložena stresnim uvjetima (povišenje temperature) dolazi do pojačanog nastajanja vodikovog peroksida. U velikim količinama nastali vodikov peroksid djeluje razarajuće na makromolekule u stanici, uzrokuje lipidnu peroksidaciju (time negativno utječe na čvrstoću stanične stijenke), uzorokuje slabljenje veza između lanca DNA pri čemu dolazi do pucanja lanca DNA. Pucanje molekule DNA posljedično dovodi do nemogućnosti sinteze novih proteina (enzima) te daljnje diobe bakterijske stanice.

Povišenje temperature okoline, kao jednog od mogućih stresnih parametara djelovanja na bakterijsku stanicu također dovodi i do nastanka biofima. Bakterijske biofilmove formiraju zajednice mikroorganizama ugrađene u samostalno proizvedenu matricu ekstracelularnih polimernih supstanci (EPS). Važno je naglasiti da bakterije koje tvore biofilm pokazuju skup „novih osobina" koje se značajno razlikuju od bakterijskih stanica koje ne tvore biofilm (Flemming i sur., 2016).

Ekstracelularne polimerne supstance (EPS) proizvedene od strane mikroorganizama su složena smjesa biopolimera koji se prvenstveno sastoje od polisaharida, kao i proteina, nukleinskih kiselina, lipida i huminskih tvari. EPS čine međustanični prostor mikrobnih agregata koje oblikuju strukturu i arhitekturu matrice biofilma. Ključne funkcije EPS-a obuhvaćaju posredovanje početnog vezanja stanica na različite supstrate i zaštitu od stresa i dehidracije u okolišu (Vu i sur., 2009). Biofilmovi, iako se uobičajeno definiraju kao krute vezane strukture, u načelu mogu biti povezane s bilo kojom vrstom površine uključujući zrak-tekućina, tekućina-tekućina, tekućina-čvrsta površina ili zrak-čvrsta površina (Chang i sur., 2015).

Nastanak biofilmova u postrojenjima za preradu hrane dovodi do povećane mogućnosti za mikrobiološku kontaminaciju procesiranog proizvoda. Biofilmovi u svom sastavu mogu obuhvaćati i patogene mikroorganizme te mikrorganizme koji uzrokuju kvarenje hrane. Mikroorganizmi unutar biofilmova zaštićeni su od dezinfekcijskih sredstava, što povećava vjerojatnost preživljavanja i mogućnost naknadne kontaminacije prehrambenog proizvoda. Time se povećava rizik smanjenog roka trajanja prehrambenog proizvoda i prijenosa bolesti (Chmielewski i Frank., 2003).

Naglo povišenje temperature okoline dovodi do pojave toplinskog stresa u mikrobnim stanicama. U bakterijskim stanicama toplina uzrokuje oštećenje makromolekularnih staničnih komponenti kao što su proteini i DNA (Guevara i sur., 2015). Prema Richter i sur. (2010) kao odgovor na toplinski stres, stanice aktiviraju signalni put koji dovodi do prolazne ekspresije proteina toplinskog šoka koji sprečavaju stvaranje nespecifičnih agregata proteina i pomažu proteinima u stjecanju njihovih izvornih struktura.

2015. godine, Guevara i sur. proveli su istaživanje u kojem je određivan utjecaj umjereno visoke temperature (55ºC) posebno ili u kombinaciji s djelovanjem carvacrola i timola (c=0,3 mM) na vitalnost, ozljede i odgovor na stres kod *L. monocytogenes*. Rezultati istraživanja pokazali su kako su stresni uvjeti kojima je bila izložena *L. monocytogenes* povećali ekspresiju 5 proteina uključenih u metaboličke procese za dva do četiri puta, kao pokušaj kompenziranja djelomično smanjene sposobnosti stvaranja energije izazvane stresnim tretmanima.

Kao zaključak istraživanja navode kako je povećana ekspresija proteina, zaslužna, između ostalog, i za vraćanje proteina u prvobitnu formaciju te za metabolizam stanice, a takav odgovor na stresne uvjete može rezultirati preživljavanjem tretiranih stanica, ugrožavajući sigurnost hrane kod koje se mikrobiološka inaktivacija pokušala ostvariti kombiniranim procesima.

2.2. *Listeria* spp.

Bakterija roda *Listeria* glavni su patogeni koji se prenose hranom, a uzročnici su listerioze, teške infekcije s visokim stopama smrtnosti (Rosimin i sur., 2016). U rod *Listeria* trenutno je klasificirano 17 vrsta, od kojih je 9 vrsta novootkriveno od 2009. godine. Od svih 17 vrsta samo se *L. monocytogenes* i *L. ivanovii* smatraju patogenim vrstama (Orsi i Wiedmann., 2016). *Listeria monocytogenes* klasificirana je kao jedini humani patogen koji uzrokuje listeriozu, infekciju s visokom stopom smrtnosti koja je uzorkovana konzumacijom kontaminirane hrane. *Listeria ivanovii* je jedina druga patogena vrsta roda *Listeria*, a smatra se specifičnim uzročnikom listerioze u preživača, osim iznimno rijetkih slučajeva infekcije kod ljudi (Snapir i sur., 2006).

Kako navode u svom radu (Orsi i Wiedmann., 2016.) 17 vrsta bakterija iz roda *Listeria* podijeljene su u 2 glavne skupine. *Listeria* sensu strictu (koja obuhvaća *L. monocytogenes, L. seeligeri, L. ivanovii, L. welshimeri, L. innocua* kao i *L. marthii*) te *Listeria* sensu lato. Podjela je temeljenja na genetskoj sličnosti skupina s *L. monocytogenes*. *Listeria* vrste koje pripadaju *Listeria* sensu strictu skupini posjeduju mogućnost rasta na niskim temperaturama (4ºC). U skupinu *Listeria* sensu strictu pripadaju obje patogene Listeria vrste (*L. monocytogenes* i *L. ivanovii*) te zbog svoje sposobnosti za rast pri temperaturi hladnjaka predstavljaju veliku opasnost za zdravlje ljudi.

S obzirom na svoju visoku stopu patogenosti te mogućnost preživljavanja pri niskim temperaturama *Listeria monocytogenes* predstavlja veliki problem prehrambene industrije. S obzirom na svoju široku rasprostranjenost postoje razni načini *Listeria* spp. za ulazak u procese proizvodnje i prerade hrane (Gliot i Content., 2002).

U svom radu, (Garrido i sur., 2011) navode kako se infekcije uzorkovane *L. monocytogenes* javljaju u dva oblika. Neinvazivne listerioze koje uzorkuju bolesti gastrointestinalnog sustava, a očituju se povišenom temperaturom, povraćanjem i drugim simptomima te invazivne listerioze sa stopama smrtnosti 20% do 30%.

Infekcijama uzrokovane *L. monocytogenes* najpodložnije su trudnice, starije osobe i osobe sa slabijim imunitetom. Klinički simptomi infekcije kreću se od blagih simptoma, sličnih gripi ili gatsoentristisa do septikemije, infekcije središnjeg živčanog sustava, infekcije fetusa što posljedično odvodi do abortusa, preranog poroda ili rođenja zaraženog djeteta (Gliot i Content., 2002)

2.3. *Listeria innocua*

L. innocua zbog svoje genetske sličnosti s *L. monocytogenes* kao i zbog svoje nepatogenosti u istraživanjima se često koristi kao surogat za patogenu *L. monocytogenes*.

2010. godine, Chen i sur. proveli su istraživanje o mikroevoluciji nepatogene *L. innocua* Istraživanje je provedeno profiliranjem 37 internih gena i MLST (mutliocus sequence typing) metodom bazirano na sekvencijama 9 nepovezanih gena (*gyrB*, *sigB*, *dapE*, *hisJ*, *ribC*, *purM*, *gap*, *tuf* i *betL*).
Vrsta *L. innocua* podijeljena je u 4 podgrupe, u istraživanju nazvane A,B,C,D. Podgrupa A u svojoj genetskoj mapi sadrži čitav niz *L. monocytogenes* - *L. innocua* zajedničkih, te *L. innocua* specifičnih gena, te se naspram podskupine B sastoji od veće stope rekombiniranih gena.
Rezultati istraživanja također upućuju na nedostatak 17 virulencijskih gena pronađenih u *L. monocytogenes*, izuzevši u podgrupe D (soj L43 koji sadrži inlJ gen) i podgrupa B (čija dva soja (1603 i 386) sadrže bsh gen).
Chen i sur. (2010) kao zaključak istraživanja navode kako podgrupa A, zbog specifičnih rekombiniranih gena predstavlja mogući evolucijski smjer prilagodbe okolini, dok atipična podskupina D služi kao veza u evolucijskom lancu *L. monocytogenes* - *L . innocua*.

Tome u prilog proizlazi i istraživanje objavljeno 2015. godine (Silva-Angulo A. B. i sur.) u kojem je ispitivan utjecaj citrala, kao antimikrobne tvari, na rast i oštećenje bakterijskih stanica *L. innocua* i *L. monocytogenes.* 95%-tni citral (3,7-dimetil-2,6-oktadienal) u istraživanju je korišten kao antimikrobna tvaru kontroli mikrobnog rasta u razinama ispod minimalne inhibicijske koncentracije*. L. innocua* i *L. monocytogenes* inokulirane su na TSB hranjivoj podlozi u koncentacijama 10^2 CFU/mL ili 10^6 CFU/mLu kombinaciji s 3 različite koncetracije citrala (0,0 µL/mL, 0,150 µL/mL ili 0,250 µL/mL). Prema rezultatima istraživanja, *L. innocua* moguće je koristiti kao surogat *L. monocytogenes* u daljnim istraživanjima antimikrobnog utjecaja eteričnih ulja koja u svom sastavu sadrže citral jer je citral imao jednak antimikrobni utjecaj na obje vrste, s obzirom da su obje vrste pokazale gotovo jednake maksimalne specifične stope rasta.

L. innocua je široko rasprostranjena u mesu i mesnim proizvodima, genetski je najbliža *L. monocytogenes*, međutim općenito se smatra nepatogenom bakterijom (Yildirimi sur., 2016); važan je pokazatelj higijene u prehrambenoj industriji, jer pokazuje slične karateristike kao za ljude patogena *Listeria monocytogenes* (Takahasi i sur., 2014.).

Razlikovanje *Listeria* vrsta je vrlo teško, čak i uz sofisticiranu MALDI-TOF MS tehniku zbog bliske genetske veze vrste i uobičajenog prijenosa gena (Pusztahelyi i sur., 2016). U svom radu, objavljenom 2015. godine, Mazza i sur., navode kako s obzirom na biokemijsku sličnost, prisutnost drugih vrsta Listeria, različite od *L. monocytogenes* mogle bi prikriti prisutnost *L. monocytogenes* u ispitivanim uzorcima.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. *Listeria inoccua* ATCC 20649

Čista dehidratirana kultura *Listeria inoccua* ATCC 20649 pribavljena je iz banke mikrobioloških kultura DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganisem und Zellkuturen GmbH, Njemačka. Pripremljena čista kultura *L. inoccua* precijepi se iz 50% glicerola na način da se 20 µL kulture pipetira u 10 mL nutrient hranjivog bujona (Biolife, Italia). Uzorak se inkubira pri 37^{o}C u vremenskom periodu od 48 h.

3.1.2. Hranjive podloge

Za uzgoj bakterijske kulture *Listeria inoccua* ATCC 20649 kao hranjiva podloga koristi se nutrient hranjivi bujon (Biolife, Italija). Nakon toplinskog tretmana uzorci se nacijepljuju na nutrient hranjivi agar (Biolife, Italia). Za postupak određivanja biofilma, uzorci se nacijepljuju u jažice multiwell ploče (TPP 92012). U svaku jažicu pipetira se volumen 2 mL nutrient hranjivog bujona (Biolife, Italija). Za određivanje broja revitaliziranih stanica kao hranjivi bujon koristi se puferirana peptonska voda (Biolife, Milan, Italija).

3.1.3. Materijali i aparatura

-mikropipeta (10µL- 100 µL ; 100 µL-1000 µL)
-nastavci za mikropipete
-Falcon ^{TM} epruvete
-staklene laboratorijske epruvete
-stalak za epruvete
-Petrijeve zdjelice
-staklene laboratorijske čaše (V=250 mL, V=400 mL)
-termometar (PCE-777, PCE Instruments)
-eppendorf epruvete
-Erlenmayerove tikvice
-menzura, plastična (V=1000 mL)
-vortkes (IKA, Vortex 4 basic; BV)
-centrifuga (Hettich, Rotofix 32)
-laminar (Klimaoprema, model KTV-A)

-termostat (Bodalec i Bodalec, model EBT)

-autoklav („Sutjeska", model 200-189)

-plamenik

-digitalni pH metar HANNA edge

-spetrofotometar – (UV UNICAM HELIOS ß)

-kivete

- *Listeria inoccua* ATCC 20649

-mikrobiloška ušica

-filter- CHROMAFIL Xtra PTFE-20/25 filtar (MACHEREY-NAGEL Gmbh & Co. KG, Duren, Germany)

-nutrient agar (Biolife; Milan, Italija)

-nutrient bujon

-puferirana peptonska voda (Bilofie, Milan, Italija)

-PBS fosfatni pufer

-Titan reagens (Sigma Aldrich, CAS: 13463-67-7)

-otopina $NaNO_3$, c=0.01 M

PBS fosfatni pufer

SASTAV: natrijev klorid (NaCl), kalijev klorid (KCl), natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4 * $2H_20$), kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), destilirana voda, klorovodična kiselina (HCl)

PRIPREMA: Izvaže se 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.62 g Na_2HPO_4 * $2H_20$, i 0.24 g KH_2PO_4 u 900 mL destilirane vode. Sa HCl-om podesi se pH na 7.4 te se nadopuni do 1000 mL destiliranom vodom. Pripremljena otopina autoklavira se pri 121 °C kroz 15 min. Autoklavirana otopina čuva se pri +4 °C kroz 3 mjeseca.

Titan reagens

SASTAV: titan (IV) oksid (Sigma Aldrich, CAS: 13463-67-7), sumporna kiselina (1:1), destilirana voda

PRIPREMA: Izvaže se 1g titan (IV) oksida u 100 mL vruće sumporne kiseline (1:1). Reakcijska smjesa zagrijava se na oko 190°C i miješa 20 sati. Nakon što je sav titan (IV) oksid otopljen, reagens otopina ohladi se na sobnu temperaturu i razrijedi na volumen 500 mL destiliranom vodom. Pripremljena reagens otopina skladišti se pri +4 °C.

Nutrient agar

Nutrient agar priprema se otapanjem 13 g dehidrirane podloge i 20 g tehničkog agara (Biolife, Milan, Italija) u 1 L destilirane vode. Podloga se sterilizira u autoklavu („Sutjeska", model 200-189) 15 minuta pri 121°C. Podloge se sterilno razliju u Petrijeve zdjelice u laminaru (Klimaoprema, model KTV-a) kako ne bi došlo do naknadne kontaminacije hranjivog agara. Razlivene podloge suše se u struji zraka u laminaru.

Puferirana peptonska voda

SASTAV: pepton, natrijev klorid (NaCl), natrijev hidrogenfosfat ($Na_2HPO_4*2H_20$), kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), destilirana voda.

PRIPREMA: Izvaže se 10 g peptona, 5 g NaCl, 3.5 g Na_2HPO_4 * $2H_20$, i 1.5 g KH_2PO_4 u 1000 mL destilirane vode. Pripremljena smjesa zagrijava se do potpunog otapanja svih sastojaka. Pripremljena otopina autoklavira se pri 121 °C kroz 15 min. Konačni pH iznosi 7.0±0.1. Pripremljena peptonska voda skladišti se pri +2ºC do +8°C kroz 3 mjeseca.

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema suspenzije mikroorganizama

Za pripremu uzorka koristi se čista kultura *Listeria inoccua* ATCC 20649 uzgojena aerobno na hranjivom agaru pri 37°C. Nacijepljivanje uzorka provodi se aseptično, u laminaru (Klimaoprema, model KTV-a).

Uzorak *Listeria inoccua* nacijepi se sterilnom mikrobiološkom ušicom s hranjivog agara u 10 mL nutrient bujona. Bakterijske stanice inkubiraju se u termostatu (Bodalec i Bodalec, model EBT) pri 37°C/48 h. Nakon inkubacije suspenzija mikroorganizama centrifugira se (Hettich Rotofix 32) pri 4000 RPM u vremenskom periodu 10 minuta. Nakon centrifugiranja supernatant je odliven,a na biomasu bakterije pipetira se 10 mL sterilnog fosfatnog pufera. Uzorak se zatim vorteksira (IKA vorteks 4 basic; BV) brzinom 4000 o/min te ponovno centrifugira. Postupak odljevanja sterilnog fosfatnog pufera, pipetiranja fosfatnog pufera, centrifugiranja i vorteksiranja ponavlja se dva puta. Uzorak se prije toplinskog tretiranja miješa s 190 mL 0.01 M otopine $NaNO_3$. Za svaku temperaturu pri kojoj se provodi eksperiment pripremi se zasebna suspenzija mikroorganizama.

3.2.2. Provođenje eksperimenta

Definirani parametri eksperimentalnog rada su temperatura (20°C, 30°C, 40°C, 50°C i 60°C) i vrijeme djelovanja primjenjene topline (0 min, 5 min i 10 min), prikazano u tablici 1.

Tablica 1. Prikaz definiranih parametara eksperimentalnog rada

Uzorak čiste kulture	Temperatura toplinskog tretmana (°C)	Vrijeme tretiranja (min)		
L. innocua (1)	20	0	5	10
L. innocua (2)	30	0	5	10
L. innocua (3)	40	0	5	10
L. innocua (4)	50	0	5	10
L. innocua (5)	60	0	5	10

Određivane varijable su: istjecanja staničnog sadržaja, koncentracija slobodnih radikala, biofilm, postotak oporavka, pH i provodnost uzorka prije i nakon toplinskog tretmana prikazano u tablici 2.

Tablica 2. Prikaz određivanih varijabli prije/nakon eksperimentalnog rada

Mjerena varijabla	Provodnost	pH	Istjecanje unutarstaničnog sadržaja 260/280 nm	Nastanak slobodnih radikala 410 nm	Biofilm	Oporavak
Prije tretmana	+	+	+	+	+	-
Poslije tretmana	+	+	+	+	+	+

Volumen od 190 mL sterilnog fosfatnog pufera zagrijava se u toplinskoj kupelji do temperature provođenja eksperimenta. Temperatura se očitava infracrvenim termometrom (PCE-777, PCE Instruments). Nakon postizanja željene temperature u 190 mL zagrijane otopine sterilnog fosfatnog pufera dodaje se 10 mL uzorka te započinje mjerenje vremena. Svaki uzorak zagrijava se u vremenskom periodu 10 minuta, a uzorci se izuzimaju na 0 min, 5 min i 10 min. Za svaki izuzeti uzorak određuju se prethodno navedene varijable.
Postupak toplinskog zagrijavanja provodi se 6 puta; tj. pojedinačno, za svaku određenu temperaturu tretiranja prethodno pripremljene suspenzije.

3.2.3. Određivanje istjecanja unutarstaničnog sadržaja

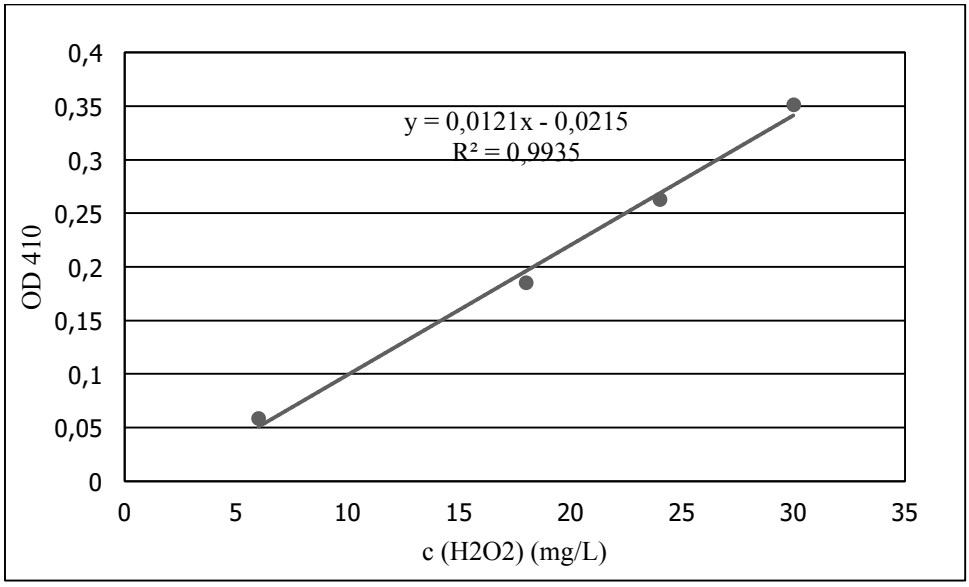
Za svaki izuzeti uzorak pri određenoj temperaturi (20°C, 30°C, 40°C, 50°C i 60°C) i određenom vremenu (0, 5 i 10 min) tretiranja odredi se istjecanje unutarstaničnog sadržaja (nukleinske kiseline i proteini). Alikvot 2 mL izuzetog uzorka profiltira se kroz CHROMAFIL Xtra PTFE-20/25 filtar (MACHEREY-NAGEL Gmbh & Co. KG, Duren, Germany) veličine pora 0.25 μm. Profiltriranom uzorku mjeri se apsorbancija na UV/VIS spektrofotometru pri valnoj duljini 260 nm i 280 nm. Slijepa proba provodi se sa 0.01 M otopinom $NaNO_3$.

3.2.4.Određivanje slobodnih radikala

Za svaki izuzeti uzorak pri određenoj temperaturi (20°C, 30°C, 40°C, 50°C i 60°C) i određenom vremenu (0, 5 i 10 min) tretiranja odredi se koncentracija vodikovog peroksida na UV/VIS spektrofotometrupri valnoj duljini 410 nm. U 2 mL izuteog uzorka dodaje se 1 mL prethodno pripremljenog titan reagensa (Sigma Aldrich, CAS: 13463-67-7). Dodatkom titan reagensa uzorak poprima žuto obojenje ekvivalentno količini nastalih radikala u toplinski tretiranom uzorku.

Slijepa proba sastoji se od prethodno pripremljene otopine titan reagensa.

Koncentracija nastalog vodikovog peroksida očitava se na osnovu baždarnog pravca prikazanog na slici 2.



Slika 2. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji H_2O_2

3.2.5. Određivanje broja stanica

Ukupan broj poraslih kolonija određuje se prije i nakon toplinskog tretmana kako bi se odredio stupanj redukcije stanica. Uzorak izuzet nakon toplinskog tretmana razrijeđuje se sterilnim fosfatnim puferom u omjeru 1:9. 10 µL izuzetog uzorka dodaje se u 90 µL sterilnog fosfatnog pufera. Provodi se serija razrijeđenja od (10^{-1} do 10^{-6}). Tako pripremljena razrijeđenja nacijepljuju se u triplikatu na prethodno pripremljene petrijeve zdjelice s nutrient agarom (Biolife; Milan, Italija). Nacijepljene petrijeve zdjelice inkubiraju se aerobno u termostatu (Bodalec i Bodalec, model EBT) kroz vremenski period 48 sata, pri temperaturi 37^{o}C.

Nakon provedena 48 sata inkubacije izbroje se porasle kolonije. Broj živih stanica prije i nakon toplinskog tretmana određen je prema formuli:

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

3.2.6. Određivanje biofilma

Određivanje biofilma provodi se nacjepljivanjem toplinski tretiranog uzorka u jažice multiwell ploče (TPP 92012, Švicarska). 200 µL tretiranog uzorka nacijepi se u jažice multiwell ploče, te se u svaku nacijepljenu jažicu pipetira volumen 2 mL nutrient bujona. Nakon provedene inkubacije (vremenski period 4h) tijekom koje dolazi do adhezije stanica na podlogu, uklanja se supernatant iz jažica, te se svaka jažica ispire sa 2 mL PBS-a. U svaku jažicu se zatim dodaje 2 mL nutrient bujona, te se multiwell ploče ponovno stavljaju na inkubaciju (vremenski period 24 sata) u svrhu stvaranja biofilma. Nakon 24 sata započinje se s postupkom određivanja biofilma. Iz jažica se uklanja supernatant, te se one ispiru fosfatnim puferom. U svrhu fiksacije biofilma, u jažice se pipetira 2 mL 99% metanola; period djelovanja metanola iznosi 15 minuta. Nakon 15 minuta, metanol se uklanja. U posušene jažice pipetira se 2 mL kristal violet bojila, period bojenja iznosi 20 minuta. Iz jažica se zatim uklanja kristal violet bojilo, te se jažice ispiru destiliranom vodom kako bi se uklonio višak kristal violet bojila zadržanog u jažicama. U svrhu odvajanja fiksiranih stanica s površine, dodaje se 2 mL 33% octene kiseline. Uzorci se zatim izuzimaju iz jažica te se svakom uzorku mjeri apsorbancija na UV/VIS spektrofometru pri 590 nm u svrhu određivanja nastalog biofilma. Kao kontrola nacijepljuje se uzorak bez tretmana.

3.2.7. Oporavak stanica

Određivanje oporavka stanica *Listeria inoccua* provodi se na način da se nakon tretiranja uzorka pri određenoj temperaturi (20^{o}C, 30^{o}C, 40^{o}C, 50^{o}C i 60^{o}C) i određenom vremenu (5 i 10 min) tretiranja izuzima volumen od 1 mL. Volumen od 1 mL nacijepi se u 9 mL puferirane peptonske vode. Uzorci se zatim inkubiraju u vremenskom periodu 48 sati pri temperaturi 37 ^{o}C. Određivanje broja revitaliziranih stanica provodi se na način opisanom u 3.2.5. odlomku ovog rada.

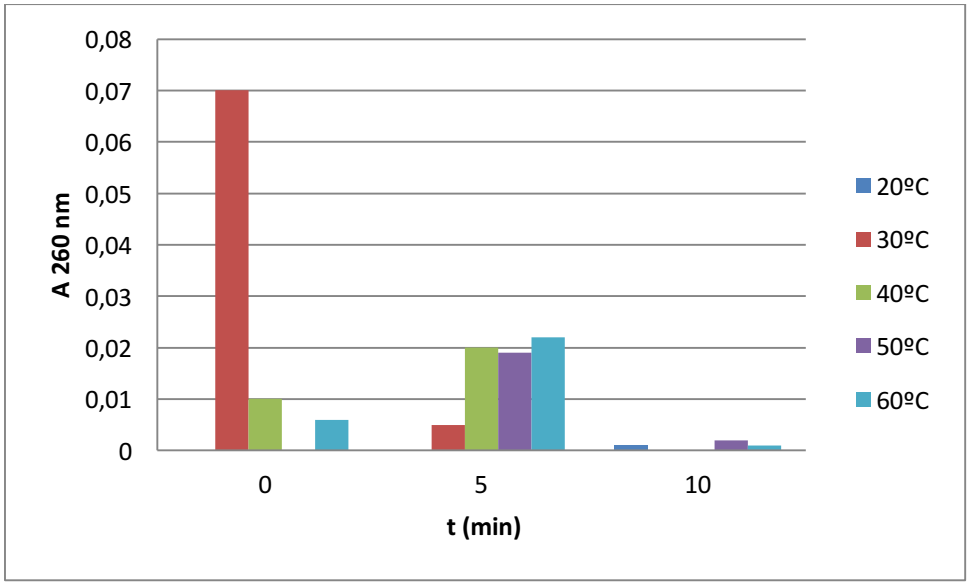
3.2.8. Određivanje pH i električne provodnosti

Mjerenje pH vrijednosti i eklektrične provodnosti provodi se za svaki uzorak pri temperaturi 20^{o}C, 30^{o}C, 40^{o}C, 50^{o}C i 60^{o}C. Mjerenje se provodi na digitalnom pH metru HANNA edge na način da se elektrode za mjerenje pH i električne provodnosti urone u uzorak te se nakon stabilizacije očitaju izmjerene vrijednosti.

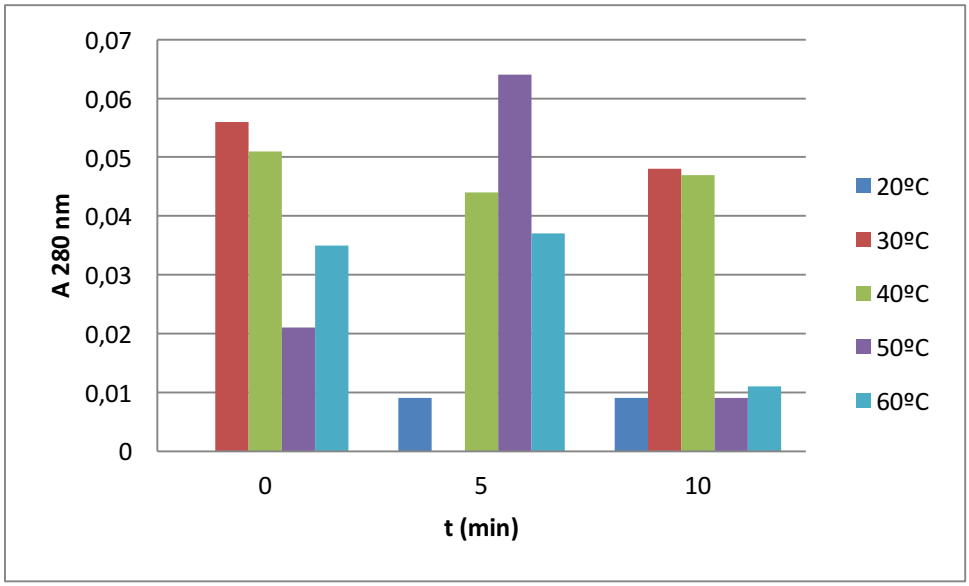
4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom završnom radu ispitivan je utjecaj toplinskog zagrijavanja na bakterijske stanice *L. innocua* te je određivana minimalna temperatura toplinske obrade pri kojoj dolazi do potpune inaktivacije *L. innocua*, te oporavka stanica. Toplinski utjecaj određivan je u temperaturnom rasponu 20ºC do 60ºC u vremenskom periodu 5 i 10 minuta. Praćenje utjecaja toplinskog zagrijavanja na *L. innocua*-u provedeno je eksperimentalnim određivanjem promjena stresnih parametara tijekom trajanja toplinskog zagrijavanja. Određivani su stresni parametri: istjecanje unutarstaničnog sadržaja (mjerenjem apsorbancije pri 260 nm (DNA) i 280 nm (proteini)), stupanj redukcije te oporavak nakon tretmana, kao i udio nastalog biofilma. Također je određivan i udio nastalih radikala, te promjena vrijednosti pH i provodnosti u ovisnosti o temperaturi i trajanju toplinskog tretmana.

Utjecaj toplinskog zagrijavnja na istjecanje unutarstaničnog sadržaja određivan je spektrofotometrijski pri 260 nm (DNA) i 280 nm (proteini). Dobiveni rezultati prikazani su na slikama 3. i 4. izraženi kao ovisnost apsorbancije (A 260/280 nm) o vremenu tretiranja (min).

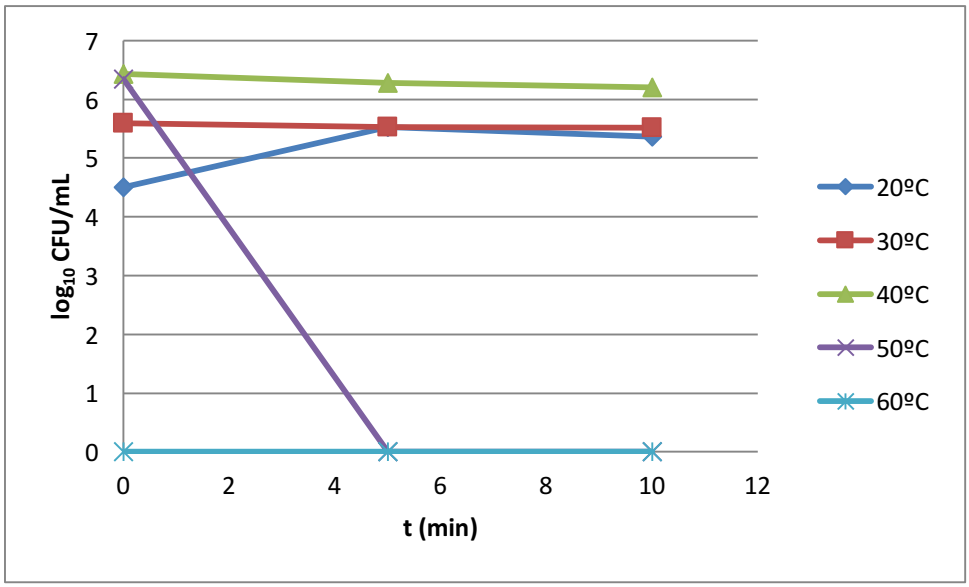


Slika 3. Graf ovisnosti apsorbancije (A 260 nm) o vremenu tretiranja pri određenoj temperaturi.



Slika 4. Graf ovisnosti apsorbancije (A 280 nm) o vremenu tretiranja pri određenoj temperaturi.

Stupanj redukcije *L. innocua* prikazan je na slici 5. izražen kao ovisnost $\log_{10}$ CFU/mL o vremenu tretiranja (min).



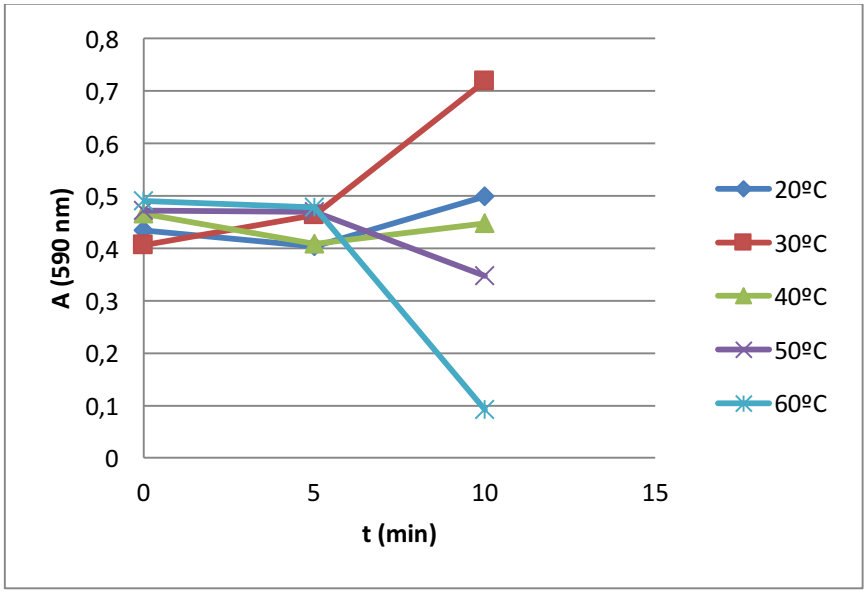
Slika 5. Ovisnost logaritma broja stanica pri 20°C, 30°C, 40°C, 50°C i 60°C o vremenu tretiranja.

Izmjerene vrijednosti pH i provodnosti (µS/cm) pri temperaturnom rasponu prikazane su u Tablici 3.

Tablica 3. Ovisnost pH i provodnosti o temperaturi

Temperatura (°C)	pH	Provodnost (µS/cm)
20	7,49	949
30	7,83	1005
40	6,47	993
50	6,46	1026
60	6,64	1724

Nastali biofilm nakon toplinskog tretmana određen je na UV/VIS spektrofotometru mjerenjem apsorbancije pri 590 nm. Udio nastalog biofima nakon toplinskog tretmana grafički je prikazan na slici 6.



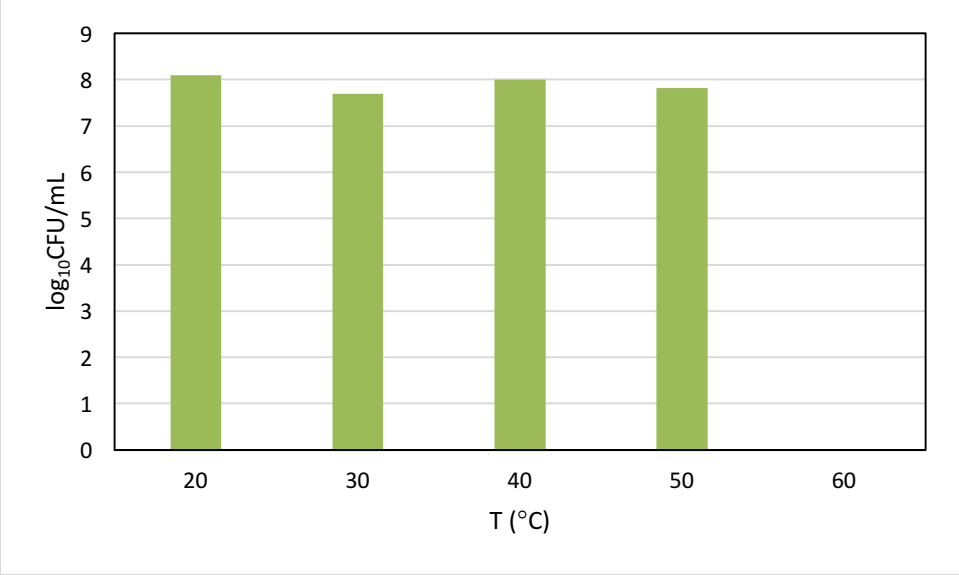
Slika 6. Grafički prikaz nastanka biofilma nakon tretiranja uzorka pri 20°C, 30°C, 40°C, 50°C i 60°C o određenom vremenu tretiranja

Udio slobodnih radikala nakon toplinskog tretmana određen je na UV/VIS spektrofotmetru pri 410 nm, dobivene vrijednosti apsorbancija uvrštene su u jednadžbu baždarnog pravca iz kojih su dobivene koncentracije novonastalih slobodnih radikala izraženih kao c(H_2O_2)/mg/L.

Tablica 4. Koncentracije nastalih slobodnih radikala izraženih u mg/L H_2O_2nakon provedenog toplinskog tretmana

	Temperatura toplinskog tretmana (°C)				
Vrijeme tretiranja (min)	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C
0 min	0	0	2,7686	0	0
5 min	0	0	1,3636	0	0
10 min	0	0	0	0	0

Stupanj oporavka *L. innocua* prikazan je na slici 7. izražen kao ovisnost $\log_{10}$CFU/mL o temperaturi toplinskog tretmana (°C). Stupanj oporavka određivan je nakon 10 minuta trajanja toplinskog tretmana.



Slika 7. Ovisnost logaritma broja oporavljenih stanica pri 20°C, 30°C, 40°C, 50°C i 60°C nakon 10 minuta trajanja toplinskog tretmana.

U bakterijskim stanicama toplina uzrokuje oštećenje makromolekularnih staničnih komponenti kao što su proteini i DNA (Guevara i sur., 2015). Utjecaj toplinskog zagrijavanja na istjecanje unutarstaničnog sadržaja (DNA i proteina) prikazan je grafički na slikama 3. i 4. Rezultati tretiranih uzoraka pokazali su povećano istjecanje unutarstaničnog sadržaja pri višim temperaturama. Iz rezultata mjerenja pri valnoj duljini 260 nm, gdje je određivan utjecaj toplinskog zagrijavanja na istjecanje DNA vidljivo je kako je već pri 30ºC moguće postići istjecanje dijela DNA. Pri 30ºC pri početku provedbe toplinskog tretmana istjecanje DNA izmjerena je asporbancija u iznosu 0,07. Pri 40ºC, 50ºC i 60ºC najveća koncentracija DNA u izvanstaničnom okruženju određena je u 5. minuti trajanja tretmana. Pri 40ºC (0,02), 50ºC (0,019) i 60ºC (0,022). Rezultati mjerenja pri valnoj duljini 280 nm, gdje je određivan utjecaj toplinskog zagrijavanja na istjecanje proteina,ukazuju kako je pri temperaturi toplinskog tretmana u iznosu 30ºC i 40ºC za vrijeme trajanja tretmana 10 minuta koncentracija proteina u izvanstaničnom okruženju gotovo jednaka na početku i na kraju trajanja tretmana, razlika u izmjerenoj apsorbanciji iznosi 0,008 (30ºC) tj., 0,004 (40ºC). Iz rezultata toplinskog tretmana pri 50ºC može se uočiti kako je koncentracija proteina u izvanstaničnom okruženju znatno porasla u vremenskom periodu tretiranja 5 minuta, a nakon 5. minute dolazi do značajnog pada u istjecanju proteina. Za 50ºC porast koncentracije proteina u izvanstaničnom okruženju nakon 5 minute tretiranja iznosi 0,043. Pri 60ºC zabilježena je razlika u izmjerenoj asporbanciji pri 280 nm, na početku tretiranja izmjerena je apsorbancija u iznosu 0,035, dok je nakon 5. minute tretmana izmjerena apsorbancija 0,037. Nakon 10. minute trajanja tretmana izmjeren je pad apsorbancije, razlika u izmjerenoj apsorbanciji iznosi 0,026 gledano u odnosu na 5. minutu trajanja tretmana.

Na slici 5. prikazan je stupanj redukcije *L. innocua*. Rezultati su izraženi kao ovisnost $\log_{10}$CFU/mL o vremenu trajanja toplinskog tretmana. Iz grafičkog prikaza moguće je uočiti kako temperature toplinskog tretmana u iznosu 20ºC, 30ºC i 40ºC ne pokazuju značajan utjecaj na stupanj redukcije tretiranih uzoraka. Dobiveni rezultati pri 50ºC pokazuju vidljiv stupanj redukcije *L. innocua*. Stupanj redukcije nakon 5 minuta tretmana pri 50ºC iznosio je 6,342 $\log_{10}$CFU/mL jedinica redukcije. Iz grafičkog prikaza je vidljivo kako je primjenom toplinskog tretmana pri 60ºC postignuta trenutačna redukcija.

Rezultati eksperimenta u skladu s istraživanjem provedenim 2008. godine, u kojem su Métris i sur. matematičkim modelima proveli modeliranje varijablinosti vremena i utjecaja temperature toplinske obrade na *L. innocua*.
Određivan je utjecaj toplinskog tretmana određivanog u lag fazi rasta, gdje je lag faza podijeljena na vrijeme oporavka (ujednačen za sve stanice) i vrijeme prilagodbe (koje je variralo od stanice do stanice). Maksimalna temperatura tretmana iznosila je 65ºC, a maksimalno vrijeme provedbe toplinskog tretmana 40 min. Toplinski tretmani koji su se pokazali letalnim provedeni su pri vremenskom periodu 20 minuta na 53°C, 10 min na 54°C, ili 4 min na 55°C te svi toplinski tretmani provedeni na 62°C i 65°C.

U tablici 3. prikazana je ovisnost pH i provodnosti (µS/cm) o temperaturi. Iz rezultata je vidljivo kako povišenjem temperature dolazi do značajnog pada pH vrijednosti, te značajnog porasta provodnosti tretiranog uzorka. Pad pH vrijednosti usporednih rezultata 20ºC i 60ºC iznosi 0,85 jedinica, dok je provodnost povećanjem temperature toplinskog tretmana s 20ºC do 60ºC porasla za 775 µS/cm.

Na slici 6. grafički je prikazan udio nastalog biofilma (mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini 590 nm) nakon tretiranja uzorka pri 20°C, 30°C, 40°C, 50°C i 60°C. Do formiranja biofilma dolazi kada su baketrijske stanice izložene stresnim uvjetima okoline poput povišene temperature. Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako je udio nastalog biofilma podjednak u prvih 5 minuta toplinskog tretmana za sve temperature pri kojima su uzorci tretirani. Pri očitavanju rezultata nastalog biofilma važno je naglasiti da je biofilm složena smjesa biopolimera koji se prvenstveno sastoje od polisaharida, kao i proteina, nukleinskih kiselina, lipida i huminskih tvari (Vu i sur., 2009). Pri tumačenju dobivenih rezultata bitno je uočiti kako su s obzirom na postignuti potpuni stupanj redukcije dobiveni rezultati za nastali biofim pri 50ºC i 60ºC u skladu s mjerenjima istjecanja unutarstaničnog sadržaja pri 50ºC i 60ºC. Nakon 10 minuta tretmana postotak smanjena stvaranja biofilma za 50ºC iznosi 26,48%, dok za 60ºC iznosi 81,22%. Pri 20ºC i 30ºC vidljiv je postotak povećanja stvaranja biofilma. Za 20ºC postotak povećanja iznosi 13,02 %, za 30ºC iznosi 43,53 % dok je za 40ºC postotak stvaranja biofilma u blagom padu te iznosi 3,86%. *L. innocua* klasificirana je u psihotrofnu skupinu mikroorganizama, te iako 20ºC i 30ºC nisu optimalne temperature za rast, zbog stvaranja biofilma navedene temperature ne predstavljaju kritične temperature koje bi utjecale na daljni rast nakon prestanka djelovanja stresnih uvjeta.

Dobiveni rezultati u skladu s rezultatima istraživanja provedenog 2015. godine, (Nowak i sur.) u kojemje ispitivan utjecaj nastanka biofilma (*L. monocytogenes*) pri raznim uvjetima rasta (anaerobni/aerobni, statični/dinamični), različitom satavu hranjivih podloga (BHI, TSB, TSBYE i MWB),te različitim temperaturama toplinskog tretmana (20ºC, 30ºC i 37ºC). Maksimalno formiranje biofilma zabilježeno je pri 37ºC, (osim pri uzgoju na MWB, gdje je maksimalno formiranje biofilma zabilježeno pri 30ºC).

U tablici 4. prikazan je utjecaj toplinskog tretmana na koncentracije nastalih slobodnih radikala izraženih u mg/L H_2O_2. Povećana koncentracija nastalih slobodnih radikala očitana je samo pri 40ºC, te iznosi 2,7686 mg/L H_2O_2 na samom početku tretmana, te 1,3636 mg/L H_2O_2 nakon 5 minuta trajanja toplinskog tretmana. Nakon 10 minuta toplinskog tretmana nije zabilježena koncentracija slobodnih radikala. Takav nagli pad u koncentraciji H_2O_2u tretiranom uzorku posljedica je velike nestabilnosti slobodnih radikala, tj. spontanog raspadanja H_2O_2 na vodu i kisik. Na temelju rezultata moguće je zaključiti kako je većina radikala nastala u prvih 5 minuta trajanja tretmana. Nastanak slobodnih radikala u stanici normalan je metabolički proces, a povišene koncentracije nastalih slobodnih radikala očituju se pri stresnim uvjetima okoline (povišena temperatura). Na temelju dobivenih rezultata moguće je zaključiti kako temperatura toplinskog tretmana 20ºC i 30ºC ne predstavlja stresni uvjet s obzirom da *L. innocua* u prirodi posjeduje sposobnost rasta pri tim temperaturama, iako te temperature nisu nužno optimalne za rast. Temperatura 40ºC prema količini nastalih radikala predstavlja stresni uvjet za rast *L. innocua*. Pri 50ºC nakon 5 minuta tretiranja dolazi do drastičnog opadanja logaritamske vrijednosti broja stanica, a s obzirom na veliku nestabilnost nastalih slobodnih radikala i na temelju dobivenih rezultata mjerenja moguće je zaključiti kako je većina slobodnih radikala nastala u prvih nekoliko minuta trajanja tretmana. Pri 60ºC nije zabilježena koncentracija radikala u tretiranom uzroku s obzirom da je kod toplinskog tretmana pri toj temperaturi moguće ostvariti gotovo trenutnu inaktivaciju *L. innocua.*

Na slici 7. grafički je prikazan stupanj oporavka *L. innocua* kao ovisnost $\log_{10}$CFU/mL o temperaturi toplinskog tretmana (ºC). Iz grafičkog prikaza vidljivo je kako je gotovo jednak stupanj oporavka nakon toplinskog tretmana postignut pri temperaturi 20ºC do 50ºC. Stupanj oporavka postignut pri temperaturi 50ºC iznosi 7,826 $\log_{10}$CFU/mL, a pri temperaturi 20ºC iznosi 8,1 $\log_{10}$CFU/mL.

Uspoređujući rezultate grafički prikazane na slici 5. (stupanj redukcije *L. innocua)* i slici 7. (stupanj oporavka *L. innocua*) vidljivo je kako *L. innocua* nakon toplinskog tretmana pri 50ºC prelazi u VBNC stanje. Prema (Shimizu, 2014.) tijekom stacionarne faze rasta, hranjive tvari iz okoline se iscrpljuju, a otpadni proizvodi postupno se akumuliraju , što djeluje stresno na bakterijsku stanicu i posljedično dovodi do odumiranja stanice. U tom procesu smanjuje se broj vijablnih stanica, a veći dio stanica odumire. Odumiranjem stanica hranjive tvari oslobađaju se u medij, a vijablilne stanice ne mogu se ponovno uzgajati niti izolirati (eng. Viable But Non-Cultuable), ali imaju sposobnost ulaska u produženu stacionarnu fazu (koja može trajati mjesecima ili godinama) zahvaljujući otpuštenim hranjivim tvarima iz odumrlih stanica.

Uspoređujući rezultate grafički prikazane na slikama 5. i 7. može se zaključiti kako je minimalan iznos temperature toplinskog tretmana pri kojoj dolazi do potupne inaktivacije *L. innocua* kao i temperatura nakon koje ne postoji mogućnost oporavka stanica 60ºC.

5. ZAKLJUČAK

1. Toplinskim zagrijavanjem moguće je postići redukciju broja mikroorganizama u odnosu na početni broj. Povišenjem temperature tretmana povećava se stupanj redukcije. Pri 60°C postignuta je potpuna inaktivacija mikroorganizama bez oporavka stanica.

2. Toplinsko zagrijavanje pokazuje znatan utjecaj na istjecanje unutarstaničnog sadržaja. Makisimumi apsorbancije (pri 260 nm) izmjereni su pri 30°C (0,07 na početku trajanja tretmana) i u 5. minuti trajanja tretmana te iznose 0,019 (pri 50°C) te 0,022 (pri 60°C). Ostale temperature pri kojima se provodio toplinski tretman nisu pokazale znatan utjecaj na istjecanje DNA. Mjerenjem apsorbancije pri 280 nm maksimum apsorbancije izmjeren je pri 50°C (0,064 nm).

3. Povećanjem temperature toplinskog tretmana dolazi do značajnog pada pH vrijednosti i značajnog povećanja provodnosti tretiranog uzorka.

4. Redukcija biofilma zabilježena je pri temperaturi toplinskog tretmana 50°C i 60°C. Nakon 10 minuta tretmana postotak smanjena stvaranja biofilma za 50°C iznosi 26,48%, dok za 60°C iznosi 81,22%.

5. Povećanje temperature toplinskog tretmana utječe na pojavu oksidacijskog stresa u tretiranim stanicama.

6. LITERATURA

1) Aamir, M., Ovissipour, M., Sablani, S. S., Rasco, B. (2013). Predicting the quality of pasteurized vegetables using kinetic models: a review. *International journal of food science*, *2013*. doi: 10.1155/2013/271271

2) Anonimus 1.
Portland Community College
<http://spot.pcc.edu/~jvolpe/b/bi234/lec/4_growth/index.bak> Pristupljeno 27. lipnja 2017.

3) Chang Y., Fragkopoulos A. A., Marquez S. M, Kim H. D., Angelini T. E., Fernández-Nieves A.(2015) Biofilm formation in geometries with different surface curvature and oxygen availability,*New Journal of Phsyics* **17(3):**033017

4) Chen J., Chen Q., Jiang L., Cheng C., Bai F., Wang J., Mo F., Fang W. (2010) Internalin profiling and multilocus sequence typing suggest four *Listeria innocua* subgroups with different evolutionary distances from *Listeria monocytogenes. BMC Microbiology* **10**:97

5) Chmielewski R.A.N, Frank J.F. (2003) Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Technology* **2:**22-32

6) Dai, Z., Ronholm, J., Tian, Y., Sethi, B., & Cao, X. (2016). Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications. *Journal of tissue engineering*, *7* doi: 10.1177/2041731416648810

7) Duraković S. , Delaš F., Stilinović B., Duraković L. (2002) Moderna mikrobiologija namirnica, knjiga prva, Kugler, str. 10-20.

8) Falowo A. B., Fayemi P.O., Muchenje V. (2014) Natural antioxidants against lipid–protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Research International* ***64:****171-181*

9) Flemming H., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P.,Rice S. A., Kjelleberg S. (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology* **14:**563–575

10) Garrido V., Vitas A.I., García-Jalón I. (2011) The problem of Listeriosis and ready-to eat products: prevalence and persistence. U:Current Research, Technology and Education Topics in Appplied Microbiology and Microbial Biotechnology, 2. izd., Méndez-Vilas A., ur., Formatex Research Center, str 1182-1189.

11) Gliot P., Content J.(2002) Specific Identification of *Listeria welshimeri* and *Listeria monocytogenes* by PCR Assays Targeting a Gene Encoding a Fibronectin-Binding Protein. *Journal of Clinical Microbiology* **40(2):** 698-703

12) Guevara L., Antolinos V., Palop A., Periago P.M. (2015) Impact of Moderate Heat, Carvacrol, and Thymol Treatments on the Viability, Injury, and Stress Response of Listeria monocytogenes, *BioMed Research International 2015.* doi:10.1155/2015/548930

13) Mazza R.,Piras F., Ladu D.,Putzolu M., Consolati S.G., Mazzette R. (2015) Identification of *Listeria* spp. Strains Isolated from Meat Products and Meat Production Plants by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Italian Journal of Food Safety* **4(4):**5498

14) Métris A., George S.M., Mackey B.M., Barany J. (2008) Modeling the Variability of Single-Cell Lag Times for *Listeria innocua* Populations after Sublethal and Lethal Heat Treatments*. Applied And Enviromental Microbiology* **74:**6949-6955

15) Nowak J., Cruz C.D., Palmer J., Fletcher G.C., Flint S.(2015) Biofilm formation of the L. monocytogenes strain 15G01 is influenced by changes in environmental conditions. *Journal of Microbiological Methods* **119**:189-185

16) Orsi R.H, Wiedmann M. (2016) Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009*. Applied Microbiology and Biotechnology* **100**:5273–5287.

17) Pusztahelyi T., Szabó J., Dombrádi Z., Kovács S., Pócsi I. (2016) Foodborne Listeria monocytogenes: A real Challenge in Quality Control. S*cientifica,* doi:10.1155/2016/5768526

18) Richter K., Haslbeck M., Bucnher J. (2010) The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death, *Molecular cell* **40(2):**253-66

19) Rosimin A. A., Kim M., Joo I., Suh S., Kim K. (2016) Simultaneous detection of pathogenic *Listeria* including atypical *Listeria innocua* in vegetables by a quadruplex PCR method. *LWT-Food Science and Technology***69**:601-607

20) Shimizu K. (2014) Regulation Systems of Bacteria such as *Escherichia coli* in Response to Nutrient Limitation and Environmental. Stresses *Metabolities* **4(1):** 1–35

21) Silva-Angulo A. B., Zanini S.F., Rosenthal A., Rodrigo D., Klein G., Martínez A. (2015) Comparative Study of the Effects of Citral on the Growth and Injury of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* Cells. *PLoS ONE* **10(2):** e0114026

22) Snapir Y.M., Vaisben E., Nassar F. (2006) Low virulence but potentially fatal outcome—*Listeria ivanovii. European Journal of Internal Medicine* **17(4):** 286-287

23) Takahashi H., Ohshima C., Nakagawa M., Thanatsang K., Phraephaisarn C., Chaturongkasumrit Y., Keeratipibul S., Kuda T., Kimura B. (2014) Development of New Multilocus Variable Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA) for Listeria innocua and Its Application in a Food Processing Plant. *PLoS ONE* **9(9):** e105803

24) Vu B., Chen M., Crawford R. J.,Ivanova E. P. (2009) Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. *Molecules **14*(7):** 2535-2554

*25)*Yıldırım Z., Yerlikaya S., Öncül N., Sakin T. (2016) Inhibitory Effect of Lactococcin BZ Against *Listeria innocua* and Indigenous Microbiota of Fresh Beef*. Food Technology and Biotecnology* **54(3):** 317–323

Izjava o izvornosti

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

Gloria Hradec