

# Utjecaj ne-toplinske obrade ultrazvukom visoke snage na stvaranje biofilma

---

Ljubić, Andrea

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:159:341105>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-06-27**



*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno - biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Andrea Ljubić

6887/PT

UTJECAJ NE-TOPLINSKE OBRAD  
ULTRAZVUKOM VISOKE SNAGE NA  
STVARANJE BIOFILMA

ZAVRŠNI RAD

Modul: Prehrambeno – procesno inženjerstvo

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

Zagreb, 2017.

Rad je izrađen u Laboratoriju za procesno - prehrambeno inženjerstvo na Zavodu za prehrambeno - tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Anet Režek Jambrak, izv. prof., dr. sc. Tomislave Vukušić, doc te uz pomoć Višnje Stulić, mag.ing.

---

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Završni rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procesno-prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ NE-TOPLINSKE OBRADJE ULTRAZVUKOM VISOKE SNAGE NA STVARANJE BIOFILMA

*Andrea Ljubić, 0058204776*

**Sažetak:** Svrha ovog rada je utvrditi utjecaj ne-toplinske obrade ultrazvukom visoke snage na stvaranje biofilma bakterijske kulture *Listeria innocua* ATCC 33090. Uzorci su ultrazvučno tretirani sondom frekvencije 20 kHz uz tri nezavisne varijable, amplituda (75%, 100%), vrijeme tretmana (5min, 10 min) i temperatura (40°C, 60°C). Rezultati su analizirani površinskom metodom (RSM) koristeći program STATGRAPHICS Centurion. Najviša redukcija stvaranja biofilma postignuta je nakon 5 min tretmana ultrazvukom pri temperaturi 60°C i 100 % amplitudi. Vrijednost biofilma se smanjila u odnosu na početnu vrijednost za 92.25 %. Kod 75 % amplitude i 60 °C te 5 min tretmana nije došlo do očekivane redukcije biofilma već do povećanja za 99.83 %. Temperaturni tretman (60 °C) rezultirao je potpunom redukcijom  $7.08 \log_{10}$  CFU/mL što je ujedno i najviša inaktivacija bakterijskih stanica *L. innocua*. Prilikom ultrazvučnog tretmana na stvaranje biofilma i inaktivaciju utjecala je temperatura, razina ultrazvučne amplitude, vrijeme tretmana. Posljedično se formiraju različiti oblici radikala koji su mjera za intenzitet kavitacije. Radikali oštećuju stanicu i time je inaktiviraju.

**Ključne riječi:** biofilm, kavitacija, *Listeria innocua*, stupanj redukcije, ultrazvuk

**Rad sadrži:** 29 stranice, 9 slika, 6 tablica i 28 literaturnih 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:** doc.dr.sc. Tomislava Vukušić, asistentica, mag. ing. Višnja Stulić, asistentica

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

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

**Bachelor thesis**

THE INFLUENCE OF NON-THERMAL TREATMENT OF HIGH INTENSITY ULTRASOUND ON  
FORMATION BIOFILM

*Andrea Ljubić, 0058204776*

**Abstract:** The aim of this final work is to determine the influence of non-thermal treatment of high intensity ultrasound on the formation of biofilm of *Listeria innocua* ATCC 33090. Samples were treated with the ultrasound probe with a frequency of 20 kHz with three independent variables, amplitude (75 %, 100 %), duration of treatment (5 min, 10 min) and temperature (40 °C, 60 °C). The results were analyzed by surface method (RSM) using the STATGRAPHICS Centurion program. The highest biofilm reduction was achieved after the 5 minutes of ultrasound treatment at 60 °C and 100 % of amplitude. The biofilm amount decreased in relation to the initial amount for 92.25 %. At the 75 % amplitude, 60 °C and 5 minutes of treatment there was no expected reduction of biofilm. Biofilm formation was higher for 99.83 % comparing to the initial level. Temperature treatment (60 °C) resulted in a total reduction of 7.08 log<sub>10</sub> CFU / mL, which is the highest inactivation of *L. innocua* bacterial cells. During ultrasonic treatment forming biofilm and inactivation was influenced by temperature, ultrasonic amplitude level and treatment time. Consequently, different forms of radicals are formed which are the measure of the intensity of cavitation. They damage the cell and thereby inactivate them.

**Keywords:** biofilm, cavitation, degree of reduction, *Listeria innocua*, ultrasound

**Thesis contains:** 29 pages, 9 figures, 6 tables and 28 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:** PhD Anet Režek Jambrak, Associate Professor

**Technical support and assistance:** PhD Tomislava Vukušić, Višnja Stulić, MSc

**Thesis delivered:** June 13<sup>th</sup>, 2017

# Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Definicija ultrazvuka.....	2
2.3. Dijelovi ultrazvuka.....	2
2.4. Princip rada ultrazvuka.....	3
2.5. Kavitacija .....	4
2.6. Nastajanje radikala .....	4
2.7. Primjena ultrazvuka .....	6
2.8. Ultrazvučna inaktivacija mikroorganizama .....	7
2.9. Biofilm .....	8
2.10. Ultrazvuk i biofilm .....	10
2.11. <i>Listeria innocua</i> .....	11
3. MATERIJALI I METODE .....	12
3.1. Materijali.....	12
3.1.1. Priprema i čuvanje mikrobiološke kulture <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 .....	12
3.1.2. Hranjive podloge za uzgoj bakterijske kulture .....	12
3.1.3. Kemikalije za mikrobiološka istraživanja .....	12
3.1.4. Priprema suspenzije bakterija.....	13
3.1.5. Priprema uzorka za tretiranje ultrazvukom.....	13
3.2. Metode.....	13
3.2.1. Provedba eksperimenta .....	13
3.2.2. Određivanje pH vrijednosti i provodljivosti .....	14
3.2.3. Određivanje biofilma .....	15
3.2.4. Određivanje broja stanica.....	15
3.2.5. Obrada podataka .....	15
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	17
4.1. UTJECAJ ULTRAZVUKA NA BIOFILM.....	17
4.1.1. Usporedba s dosadašnjim istraživanjima .....	19
4.2. UTJECAJ ULTRAZVUKA NA INAKTIVACIJU .....	19
4.2.1. Usporedba sa dosadašnjim istraživanjima .....	20
4.3. UTJECAJ ULTRAZVUKA NA pH I PROVODLJIVOST.....	21
4.4. Rezultati statističke obrade.....	22
5. ZAKLJUČAK.....	26
6. LITERATURA.....	27

# 1. UVOD

Usprkos proširenom znanju o toplinskim metodama, potreba za povećanom mikrobiološkom sigurnošću i kvalitetom pri čemu dolazi do minimalnih promjena u nutritivnim, funkcionalnim i senzorskim karakteristikama hrane stvorila je interes u razvoju ne-toplinskih inovativnih procesa. Upotreba ultrazvuka u okviru prehrambene industrije postala je predmet istraživanja i razvoja u analizi hrane i procesiranju hrane. Sonifikacija je prepoznata kao obećavajući tehnološki proces koji bi zamijenio ili nadopunio konvencionalne toplinske obrade u prehrambenoj industriji. Ultrazvuk visoke snage oštećuje stanične stijenke što dovodi do uništavanja živih stanica. Letalni učinak pripisan je kavitaciji, tj. stvaranju mjehurića plina u tekućem mediju kroz koji prolazi ultrazvučni val.

U ovom radu istražit će se utjecaj ultrazvuka visoke snage na stvaranje biofilma bakterije *Listeria innocua* ATCC 33090. Biofilm se može definirati kao sesilna organizacija bakterija u prirodnim ekosistemima. Većina dosadašnjih istraživanja svodila se na ultrazvučno uništavanje nastalog biofilma, dok će se u ovom radu odgovoriti na pitanje kakav je utjecaj ultrazvuka ovisno o mijenjanju parametara razine ultrazvučne amplitude, trajanju tretmana te temperaturi uzorka na stvaranje biofilma.

Cilj ovog rada je prikazati teorijske osnove upotrebe ultrazvuka u prehrambenoj industriji, odrediti utjecaj ultrazvuka visoke snage na stvaranje biofilma, odrediti ovisnost logaritma broja stanica nakon tretmana o vremenu tretmana te usporediti apsorbanciju koja odgovara broju stanica nakon tretmana sa vremenom tretmana.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Definicija ultrazvuka

Ultrazvuk je mehanički val sa periodičnim vibracijama čestica koji se širi u kontinuiranom, elastičnom mediju pri frekvencijama jednakim ili višim od 20 kHz. U tekućinama, njegova je brzina otprilike 1000-1600 m/s i pretvara se u valnu duljinu raspona od mikrometara do centimetara (Rosenthal i sur, 2004). Ultrazvučni valovi imaju frekvencije (veće od 20 kHz) koje su iznad ljudskog zvučnog raspona (Mohideen, 2011).

### 2.2. Podjela ultrazvuka

Ultrazvuk se dijeli na:

- 1.) dijagnostički ultrazvuk (1-10 MHz),
- 2.) visokofrekventni ultrazvuk od 100 kHz-1 MHz sa niskim zvučnim intenzitetom ( $0,1-1 \text{ W/cm}^2$ ),
- 3.) niskofrekventni ultrazvuk u rasponu od 20-100 kHz sa visokim zvučnim intenzitetom ( $10-1000 \text{ W/cm}^2$ ) (Mohideen, 2011).

Kada ultrazvučni valovi prolaze kroz medij oni će stvoriti seriju kompresije i prorjeđivanja valova na molekule medija (Mohideen, 2011). Na niskim intenzitetima (amplitudama) ultrazvučni valovi sa niskim akustičnim tlakom potiču kretnje u tekućini koje uzrokuju miješajući efekt poznat kao akustično strujanje. Kad je ultrazvučni intenzitet (amplituda) dovoljno visok, ciklusi razrjeđivanja nadvisu privlačne sile između molekula tekućine rezultirajući stvaranjem kavitacijskih mjehurića u tekućem mediju. Kavitacijski mjehurići nakon nekoliko ciklusa narastu do kritične veličine što ih čini nestabilnim.

### 2.3. Dijelovi ultrazvuka

Tipičan ultrazvučni procesor se sastoji od generatora koji prevodi većinu napona u visoku električnu frekvencijsku energiju na 20 kHz (Mohideen, 2011). Glavna uloga generatora snage je da pretvara standardnu električnu frekvenciju (5 – 60 Hz) u frekvenciju preko 20 kHz potrebnu za ultrazvučni prijenos kroz serije oscilirajućih, proširujućih i odgovarajućih krugova. Postoje stotine tipova ultrazvučnih sistema koji se koriste, koji ovise o tipu generatora, tipu pretvarača i o načinu na koji je ultrazvuk unesen u proces.

Nekoliko primjera koji su od posebnog interesa prehrambenoj industriji su: ultrazvučna kada, sistem ultrazvuka sa sondom, sistem lebdećeg ultrazvuka (Zheng i Sun, 2002).



## 2.4. Princip rada ultrazvuka

Generator prevodi napon u visoko električnu frekvencijsku energiju. Tako se puni element ultrazvučnog pretvornika koji se zove piezoelektrični pretvarač koji pretvara isporučenu energiju u 20 kHz mehaničku vibracijsku energiju (Mohideen, 2011). Sonda se nalazi na dnu opreme, i koristi se za prijenos ultrazvučne vibracijske energije u otopinu da bi se stvorila intenzivna kavitacija. Frekvencija je obrnuto proporcionalna veličini mjehurića, prema tome snaga ultrazvuka stvara velike mjehuriće u kavitacijskoj zoni povećavajući temperaturu i tlak (Mohideen, 2011). Povećavajući frekvenciju dolazi do zahtjeva za povećanjem intenziteta primijenjenog zvuka da bi došlo do kavitacije. Visoke frekvencije stvaraju kratke cikluse kompresije i razrjeđivanja ultrazvučnih valova koji ne mogu razdvojiti molekule tekućine da stvore šupljine, i stoga ne stvaraju kavitaciju. Intenzitet sonifikacije je proporcionalan amplitudi ultrazvučnih vibracija, povećavajući amplitudu povećavaju se i sonokemijski efekti. Primjena ultrasonifikacije se uglavnom provodi u vodi, međutim ovisno o zahtjevu, može se upotrijebiti i manje polarno otapalo. Velika viskoznost i velika površinska napetost otapala usporava učinke kavitacije. Iako se povećanjem temperature povećava i broj kavitacijskih mjehurića, raspadanje tih mjehurića će biti otežano zbog povećanog tlaka pare. Stoga se kavitacija bolje postiže na nižim temperaturama. Broj kavitacijskih mjehurića se smanjuje sa povećanjem vanjskog pritiska zbog povišenja kavitacijskog praga. Suprotno, povećani tlak u tekućini će povećati pritisak u raspadnutim mjehurićima rezultirajućim brzim i snažnim raspadanjem osiguravajući veće sonokemijske efekte (Mohideen, 2011).

Ultrazvučni intenzitet prikazuje se ili kao električna potrošnja generatora ili kao električna energija koju opskrbljuje od strane generatora do pretvarača. Ovakav pristup ne pruža potpunu informaciju o primijenjenom ultrazvučnom polju s tim da također ovisi o parametrima kao što su: veličina i geometrija komore za obradu, karakteristike medija (viskoznost, površinska napetost, tlak pare, koncentracija), temperatura, impedancija i sl. Dakle, faktor pretvorbe električne/akustične energije određuje količinu stvorene akustične energije.

Da bi utvrdili utjecaj ultrazvuka u procesu i da možemo usporediti sa drugim obradama, neophodno je izmjeriti stvarnu ultrazvučnu energiju koja je prenesena u medij. Postoje različite metode za mjerenje akustičnog polja, kalorimetrijske tehnike su među najjednostavnijim i najpouzdanijim tehnikama (Carcel i sur., 2007).

## 2.5. Kavitacija

Kada se velika snaga ultrazvuka širi tekućinom, stvaraju se kavitacijski mjehurići zbog promjena u tlaku (Valdramidis i sur., 2010). Visoki intenzitet ultrazvučnih valova može potaknuti rast i kasnije raspad mjehurića u tekućini, taj fenomen zove se kavitacija (Carcel i sur., 2007). Iznad specifičnog zvučnog intenziteta, mikro - mjehurići se stvaraju u tekućini tijekom faze niskog pritiska sonifikacijske oscilacije (Freitas i sur., 2006). Ultrazvuk stvara izmjenične cikluse kompresije i dekompresije poznatih pod nazivom zvučna kavitacija, koja jest proces stvaranja, rasta i implodije mjehurića u tekućini izloženoj ultrazvučnim valovima sa niskom frekvencijom (20 kHz – 100 kHz) i velikom snagom (10 - 1000 W/cm<sup>2</sup>). Implodijom mjehurića dolazi do visoke lokalne temperature (5000 K) i visokog tlaka (1000 atm) rezultirajući velikim brzinama smicanja i stvaranju snažnog mikro - strujanja, koji doprinose inaktivaciji enzima i mikroba (Fonteles i sur., 2012). Inaktivacija enzima i mikroba ultrazvukom ovisi o prirodi enzima, varijabli procesa (snaga ultrazvučnog tretiranja, ultrazvučne frekvencije, temperaturi i tlaku), karakteristikama medija (viskoznost) kao i o tipu povezivanja i kemijskih reakcija koje uspostave sa drugim molekulama (Fonteles i sur., 2012). Međutim, kada je tekućina izložena većim tlakom od praga, koji ovisi o temperaturi i fizikalno kemijskim karakteristikama tekućine, do kavitacije neće doći (Freitas i sur., 2006). Nesimetrična implodija kavitacijskih mjehurića koji su u blizini čvrste površine, stvara mikro - mlaznice u smjeru površine koja može utjecati na prijenos mase (Carcel i sur., 2007). U konačnici, mikro - mjehurići se raspadnu, ili implodiraju snažno, šaljući šok valove u susjedne dijelove medija.

Kada je akustična amplituda veća od 20 kHz, sadržaj mjehurića je većinom vodena para, a temperatura unutar mjehurića je relativno niska. Kada je amplituda relativno niska, sadržaj mjehurića je većinom ispunjen neukapljenim plinom na kraju kolapsa mjehurića i temperatura je poprilično visoka (Yasui i sur., 2005).

## 2.6. Nastajanje radikala

Kod visoke temperature i tlaka u mjehuriću, pri snažnom raspadanju, vodena para disocira i nastaju kemijski produkti u mjehurićima poput hidroksilnih radikala, kisikovih radikala, vodikovih radikala, peroksidnih radikala i molekula ozona. Kemijski produkti difundiraju iz mjehurića te se otapaju u tekućini (Yasui i sur., 2005) i oksidiraju otopljene organske spojeve. Napolarni hlapljivi spojevi stupaju u kemijske reakcije pirolize (De Visscher i Van

Langenhove, 1998). Ako su hlapljive tvari otopljene u tekućini, evaporacijom ulaze u mjehuriće i disociraju na visokoj temperaturi i tlaku u mjehuriću pri snažnom raspadanju mjehurića (Yasui i sur., 2005).

Ultrazvuk može uzrokovati brzo i kompletno otplinjavanje, započevši niz različitih reakcija koje vode do nastanka slobodnih radikala, ubrzanja reakcija polimerizacije/depolimerizacije, poboljšanja brzine difuzije i mnogih drugih efekta (Tiwari i sur., 2010).

Vercet i sur. (2009) prikazali su u svom radu da se stvaranje hidroksilnog iona linearno povećava sa povećanjem ultrazvučne razine amplitude i smanjuje sa povećanjem temperature. Uočili su da je stvaranje hidroksilnog iona veće na 70 °C nego na 130 °C što naznačuje da se broj kavitacijskih mjehurića smanjio sa povećanjem temperature zbog ublažavajućeg efekta uvlačenja pare u unutrašnjost mjehurića. Kavitacijska termoliza može stvoriti hidroksilne radikale i vodikove atome, što slijedi nakon formiranja vodikovog peroksida; te bez prisustva kisika, hidroperoksidnih radikala. Nastanak vodikovog peroksida tijekom ultrazvučnog tretiranja je također ovisan o temperaturi, smanjuje se sa povišenjem temperature. Ultrazvučne reakcije koje vode nastanku vodikovog peroksida, pri višim temperaturama će biti manje intenzivne (Tiwari i sur., 2010). Mjera za intenzitet kavitacije je brzina nastajanja vodikovog peroksida (Tiwari i sur., 2009). Stvaranje hidroksilnog radikala slijedi iduće navedene reakcije:



Biocidni efekt ultrazvuka se uglavnom pripisuje fizikalnim (kavitaciji, mehaničkim efektima, mikro - mehaničkim šokovima) i/ili kemijskim (stvaranje slobodnih radikala zahvaljujući kemijskim reakcijama tijekom ultrazvučnog tretiranja) načelima (Tiwari i sur., 2010). Ovisno o intenzitetu i trajanju ultrazvučnog tretiranja, nastaju fizikalne, kemijske i biokemijske promjene.

## 2.7. Primjena ultrazvuka

Ultrazvuk se koristi u procesiranju hrane kao što su ekstrakcija, emulgiranje, homogenizacija, kristalizacija, filtracija, separacija, otpjenjavanje i ekstruzija (Karaman i sur., 2012). Ultrazvučno procesiranje je obećavajuća ne - toplinska tehnologija i potencijalna je alternativa za tradicionalnu toplinsku metodu, pasterizaciju, pri čemu se ostvaruje mikrobiološka ispravnost. Metoda je priznata od strane US Food and Drug Administration (USFDA) za 5 log redukciju *Escherichie coli* u voćnim sokovima (Tiwari i sur., 2010). Sonifikacija, kao ne - toplinska metoda je djelotvorna u inaktivaciji mikroorganizama i enzima koji su povezani sa degradacijom voćnih sokova. Unatoč činjenici da neki istraživači iznose iste negativne utjecaje ultrazvučnog procesiranja na kvalitetu sokova, kao što su blago pogoršanje senzorskih karakteristika u narančinom soku kojem je dodan kalcij i off-flavor u narančinom soku, prema nedavnom osvrtu prema O'Donnell i sur. voćni sokovi tretirani ultrazvukom imali su minimalne učinke na kvalitetu gotovog proizvoda (Fonteles i sur., 2012). Posljedično, intenzivna lokalna energija i visoki tlak dovode do učinka lokalne pasterizacije. Prednosti sonifikacije uključuju smanjeno vrijeme procesiranja, veću propusnu moć i manju potrošnju energije umanjujući toplinske učinke (Valdramidis i sur., 2010). Nutritivna vrijednost narančinog soka je usko povezana sa sadržajem askorbinske kiseline. Askorbinska kiselina je termolabilna i visoko osjetljiva na različite procesne uvjete. Ultrazvučno tretiranje narančinog soka ima najmanji učinak na sadržaj askorbinske kiseline tijekom procesiranja i dokazana je poboljšana stabilnost tijekom skladištenja u usporedbi sa toplinskim metodama (Valdramidis i sur., 2010). Pozitivan učinak ultrazvuka vidljiv je kod uklanjanja preostalog kisika iz soka, što je kritičan parametar koji utječe na stabilnost askorbinske kiseline (Valdramidis i sur., 2010). Nekoliko istraživanja je pokazalo da ne - toplinske metode uključujući visoki tlak, pulsirajuće električno polje i sonifikacija zadržavaju veću razinu askorbinske kiseline u usporedbi sa toplinski procesiranim sokovima (Valdramidis i sur., 2010). Pozitivna strana ultrazvuka se pripisuje djelotvornom uklanjanju vezanog kisika u soku. Ultrazvučno procesiranje povećava ekstrakciju fenolnih i bioaktivnih komponenti iz groždanog mošta ili vina (Tiwari i sur., 2009). Ultrazvuk pokazuje mnoge prednosti kao što su kraće vrijeme reakcije, smanjeno vrijeme pripreme uzorka, korištenje manjih količina materijala, učinkovit i minimalan izdatak za otapala, reagense i povećanje propusnosti uzorka. Koristan je kod izolacije i pročišćavanja bioaktivnih spojeva u farmaceutskoj industriji (Ishtiaq i sur., 2009).

## 2.8. Ultrazvučna inaktivacija mikroorganizama

Najčešće tehnike za inaktivaciju mikroorganizama u prehrambenim proizvodima su konvencionalna toplinska pasterizacija i sterilizacija (Dolatowski i sur., 2007). Usprkos proširenom znanju o konzerviranju hrane toplinskim metodama i usprkos stalnim pokušajima za poboljšanje kvalitete procesirane hrane tu je uvijek potreba za tehnologijama koje minimaliziraju destruktivne učinke na toplinski osjetljive spojeve u hrani. Potreba za povećanom mikrobiološkom sigurnošću i kvalitetom, bez degradacije nutritivnih, funkcionalnih i senzorskih karakteristika hrane stvorila je interes u ne - toplinske inovativne procese za očuvanje hrane. Za razliku od tradicionalnih toplinskih procesa, ne - toplinske tehnologije uglavnom se oslanjaju na fizikalne procese uključujući procesiranje visokim tlakom, elektro-zagrijavanje (radio frekvencije, mikrovalovi i ohmsko zagrijavanje), pulsirajuće električno polje, ultrazvuk, mikrofiltracija i hladna plazma koja inaktivira mikroorganizme na sobnoj ili umjereno povišenoj temperaturi (Särkkä-Tirkkonen i sur., 2010).

Mikroorganizmi mogu biti inaktivirani (ireverzibilno inaktivirani) različitim fizikalnim mikrobiocidnim tretmanima, kao što su zagrijavanje, UV ili ionizirajuće zračenje, ne-toplinskim metodama kao što su tretiranje hidrostatskim visokim tlakom, pulsirajućim električnim poljem, oscilirajućim magnetskim poljem ili fotodinamičkim učincima; ili u kombinaciji fizikalnih procesa kao što je zagrijavanje i visoki tlak. Najviše istraženo i obećavajuće ne - toplinsko procesiranje pokazalo se procesiranje visokim tlakom, pulsirajućim električnim poljem i ultrazvuk visoke snage kombiniran s tlakom. Prednosti ultrazvuka naspram pasterizacije su: smanjenje gubitka okusa, bolja homogeniziranost, i značajne uštede energije (Dolatowski i sur., 2007). Visoke frekvencije izmjenične električne struje mogu se pretvoriti u ultrazvučne valove putem ultrazvučnog pretvornika. Ultrazvučni valovi se mogu proširiti pomoću ultrazvučne sonde koja je uronjena u tekućinu ili u ultrazvučnoj kadi sa ispunjenom tekućinom. Ultrazvuk visoke snage oštećuje ili remeti funkciju biološke stanične stijenke što dovodi do uništavanja živih stanica. Termosonifikacija (toplina i sonifikacija), manosonifikacija (tlak i sonifikacija), i manotermosonifikacija (toplina, tlak, sonifikacija) su najbolje metode za inaktivaciju mikroba (Dolatowski i sur., 2007). U 60-im godinama prošlog stoljeća istraživanja su se usredotočila na razumijevanje mehanizma interakcije ultrazvuka na mikrobne stanice. Fenomen kavitacije, lokalizirano zagrijavanje i stvaranje slobodnih radikala su utvrđeni uzroci inaktivacije (Mason i sur., 2003). Mnogi istraživači vjeruju da je inaktivacija direktna posljedica kavitacijske štete na mikrobiološkim

membranama. Ali neki istraživači (Piyasena i sur., 2003) su pokazali da se inaktivacija može postići i bez učinka kavitacije. Mikroorganizmi pokazuju različitu osjetljivost ovisno o veličini, obliku i vrsti mikroorganizma. Prema prijašnjim podacima, veće stanice pokazuju veću razinu inaktivacije od onih manjih. Koki oblici su više osjetljiviji od štapićastih bakterija (Mohideen, 2011). Također, Gram-pozitivne su osjetljivije od Gram-negativnih bakterija i aerobi su osjetljiviji od anaerobnih bakterija (Mohideen, 2011). Nadalje, fiziološko stanje stanica također utječe na brzinu inaktivacije, mlađe stanice mogu biti osjetljivije od starijih, i sporogeni oblici pokazuju veću otpornost nego vegetativne stanice (Mohideen, 2011). Efikasnost tretiranja također ovisi o temperaturi i vremenu (Dolatowski i sur., 2007).

Implodirajući mjehurići također uzrokuju visoke smicajne sile i tekuće mlazove u otapalu koji mogu imati dovoljno energije za fizikalnu štetu na membrani/staničnoj stijenci (Mason i sur., 2003).

Antimikrobni učinak ultrazvuka je posljedica kavitacije koja stvara intenzivne lokalne promjene tlaka i temperature stvarajući smicajne sile koje razrušavaju stanične membrane, remeti i stanjuje stanične membrane te šteti DNA putem stvaranja slobodnih radikala (Särkkä-Tirkkonen i sur., 2010). Mnoštvo ne-tradicionalnih tehnika konzerviranja su se razvile da zadovolje zahtjeve potrošača s obzirom na nutricionistički i senzorski aspekt, prikladnost, odsutnost sintetičkih aditiva, malu potrošnju energije i zaštitu okoliša. Zahtjevi potrošača za svježom hranom, a sa time i većom razinom sigurnosti razvio se interes za ne-toplinske tehnike za inaktivaciju mikroorganizama i enzima u hrani. Tehnologija ultrazvuka ima široki spektar upotrebe u sadašnjosti, a i u budućnosti u prehrambenoj industriji. Tehnika se općenito koristi u tekućim sistemima i definirana je valovima visoke frekvencije. Kada se ultrazvuk kombinira sa konvencionalnim zagrijavanjem, povećava se učinak samog ultrazvuka (Ertugay i sur., 2004).

## 2.9. Biofilm

Danas je poznato da bakterije mogu opstati u slobodnom, tj. planktonskom obliku ili u obliku biofilma u kojem formiraju kolonije. Biofilm se može definirati kao sesilna organizacija bakterija u prirodnim ekosistemima. Nazivamo ih još „sluzavi gradovi" (Anonymous 1). Prema Milanov i sur. (2008) : „Teoriju biofilma postavili su Costerton i sur. 1978. godine i definirali ga kao strukturnu zajednicu bakterijskih stanica koje su vezane za nežive ili žive površine i uklopljene u polimerni matriks koji same stvaraju." Donlan i Costerton su 2002. godine postavili novu, dopunjenu definiciju po kojoj je biofilm zajednica mikroorganizama koji su ireverzibilno vezani za površinu, međufazu ili nešto drugo, koji su uklopljeni u matriks

ekstracelularne polimerne supstance i koji pokazuju izmijenjeni fenotip u odnosu na brzinu rasta i transkripciju gena (Milanov i sur., 2008).

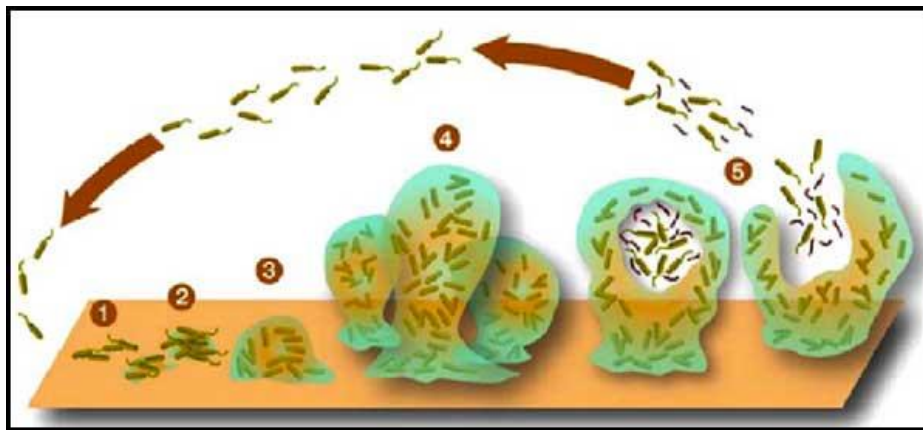
Stvaranje biofilma započinje kada se slobodne bakterije iz zraka u prvoj fazi privremeno pričvršćuju za podlogu pomoću bičeva i fila (Anonymous 1). Prijanjanje i posljedično vezivanje bakterija za površinu može biti aktivno ili pasivno, ovisno o staničnoj pokretljivosti (Milanov i sur., 2008). Pasivno vezivanje je uvjetovano gravitacijskom silom i difuzijom, dok na aktivno vezivanje utječu osobine stanične površine bakterija, tj. flagele, pili, proteini, kapsule i površinski naboj (Milanov i sur., 2008). Već nakon nekoliko minuta od prvotnog vezanja, neke bakterije proizvode EPS (ekstracelularne polimerne supstance) kojima se dodatno pričvršćuju za površinu. Na početku, biofilm eksponencijalno raste sve dok debljina biofilma ne počne utjecati na difuziju nutrijenata potrebnih za rast mikroorganizama ili dok se zbog prevelikog protoka vode dijelovi biofilma počnu otkidati s površine. Ako su okolnosti povoljne za uspješan rast i aglomeraciju, biofilm se razvija u organiziranu strukturu i taj proces se naziva sazrijevanje biofilma (Milanov i sur., 2008). Biofilm raste u nekoliko faza i njegove se karakteristike mogu s vremenom mijenjati. Tijekom ranih faza razvoja najprije se tragovi organskih tvari adsorbiraju na površinu i tvore primarni sloj, nakon čega se bakterije istovremeno adsorbiraju i desorbiraju s njega. Prvotno vezanje bakterija za površinu odvija se pomoću povratnih adsorpcijskih procesa, koji su regulirani elektrostatskim privlačenjem i fizikalnom adsorpcijom, kao što su primjerice Van der Waalove sile i hidrofobne interakcije, ali ne i kemisorpcijom. Jačina privlačnih sila ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima supstrata i stanju površine metala, primjerice hidrofobnost i površinski naboj. Prvotno vezanje bakterija je najvažniji korak u razvoju biofilma (Huljev, 2012). Izlučivanjem određenih polimernih supstanci započinje trajno pričvršćenje za podlogu i stvaranje gljivolikih nakupina stanica (Anonymous 1). Razvoj biofilma je najbrži kada ga sačinjava populacija mikroorganizama koji jedni od drugih imaju izravne koristi (Huljev, 2012). Stanice u biofilmu međusobno komuniciraju putem produkata koji su u stanju da difundiraju iz jedne u drugu stanicu (Milanov i sur., 2008). S vremenom dolazi do stvaranja tunela u nakupinama kroz koje struji voda ili neki drugi fluid (Anonymous 1). Kako biofilm sazrijeva, u njemu se akumuliraju enzimi i ostali proteini koji mogu međudjelovati s egzopolisaharidima i pritom tvoriti razne biokomplekse, koje čine zreli biofilm mnogo stabilnijim i otpornijim od novonastalog biofilma (Huljev, 2012).

Biofilmovi štite mikroorganizme od isušivanja. Sastoji se od velikog udjela vode, udio vode varira, a može činiti i do 94 % ukupne mase biofilma. U biofilmu se fiksiraju pojedine hranjive tvari i enzimi (spojevi za razgradnju tvari) što omogućuje međusobnu prehranu

različitih vrsta bakterija – što jedne vrste izlučuju druge koriste za svoj rast. Tako mikroorganizmi opstaju u naslagama koje nisu optimalne za njihovo umnažanje.

Površina biofilma je vrlo aktivna. Na njoj dolazi do istovremenog pričvršćivanja i otpuštanja bakterija. Bakterije se iz biofilma spontano odvajaju od nje dok se istovremeno planktonske bakterije za nju pričvršćuju. Povremeno, dijelovi biofilma mogu skliznuti sa površine zahvaljujući dinamici toka i efektu ispiranja tekućine, djelovanjem kemikalija ili zbog promjena uvjeta u biofilmu. Oslobođene bakterije mogu ostati u tekućini kao kontaminanti ili se mogu prenijeti do drugih lokacija gdje će započeti ponovo formiranje biofilma (Milanov i sur., 2008). Kako se debljina biofilma povećava, difuzija otopljenih plinova i nutrijenata iz okolne vode postaje otežana. Biofilm dobiva svoju ravnotežnu debljinu od oko 500 - 1000  $\mu\text{m}$ .

1. Stadij reverzibilnog vezivanja; 2. Stadij ireverzibilnog vezivanja (produkcija EPS); 3. Razmnožavanje bakterija; 4. Sazrijevanje biofilma; 5. Odvajanje dijelova biofilma.



Slika 1. Faze razvoja biofilma (izvor: [www.erc.montana.edu/biofilmbook/](http://www.erc.montana.edu/biofilmbook/))

## 2.10. Ultrazvuk i biofilm

Ključni faktor u metodama koje proučavaju mikrobiološku adheziju i opstanak na površinama gdje se priprema hrana je efikasnost kojom se mikroorganizmi udruženi u biofilm mogu ukloniti (Barnes i sur., 1996). Kao alternativa klasičnim metodama, ustanovljeno je da ultrazvuk stvara dovoljnu kavitacijsku aktivnost mjehurića za uklanjanje biofilma sa metalnih, staklenih, keramičkih i plastičnih površina (Stickler i Hewitt, 1991). Wirtanen (1995) je pokazao da ultrazvuk može uništiti 10 puta više stanica sa površine u usporedbi sa mehaničkim načinom (Oulahal-Lagsir i sur., 1999).



### 2.11. *Listeria innocua*

*Listeria innocua* je jedna od šest vrsta roda *Listeria*. Uglavnom se može pronaći u okruženju kao što je tlo i hrana. *Listeria* može preživjeti u mnogim ekstremnim uvjetima kao što su visoke koncentracije soli, visoki pH i visoka temperatura. Vrste roda *Listeria* su neobične jer mogu preživjeti i razmnožiti se i na niskim i na visokim temperaturama. *Listeria innocua* je štapičasta Gram-pozitivna bakterija, nesporogena. Može živjeti odvojeno ili može stvarati lance sa drugim bakterijama *L.innocua*. Kolonije *Listerie* su male, glatke i plavo sive boje. *Listeria* je široko rasprostranjena u okolišu, nastanjuje tlo, propadajuće biljno tkivo, kanalizaciju, vodu, hranu za životinje, svježu i smrznutu perad, procesirano meso, sirovo mlijeko, sir i ljude. Primarnim staništima se smatraju tlo i propadajuće biljno tkivo, živeći kao saprofiti. Mezofilna je, optimalna temperatura je u rasponu od 30 – 37 °C (Anonymous 2). Raspon pH vrijednosti na kojem može bakterija obitavati je od 4.4 - 9.8. *Listeria innocua* mnogo slični svojim ostalim srođnicima, patogenoj *Listeria monocytogenes*.

*Listeria innocua* je bliži srođnik *Listerie monocytogenes*, prisutna je u istom okruženju kao *L.monocytogenes*, samo je nepatogena (Wurtzel i sur., 2012). Sličnost između genoma i načina života ovih dviju vrsta omogućila je usporedne genetičke pristupe za istraživanje *L.monocytogenes* – specifičnih gena koji mogu biti uključeni u zaraznost. Ovakva usporedba vodila je otkriću gena koji su krivi za zaraznost *Listerie monocytogenes* (Wurtzel i sur., 2012). Iznenadujuće, mnogi kodirajući proteini su slični onim bakterijama iz tla *Bacillus subtilis*. *Listeria innocua* ima složen metabolizam. Sposobna je metabolizirati metan, sumpor, dušik i mnoge organske i anorganske spojeve. Može provoditi mnoge biosintetske puteve, uključujući sintezu peptidoglikana. *L.innocua* je fakultativni anaerob, što znači da može razgraditi glukozu (i ostale jednostavne šećere) pod aerobnim i anaerobnim uvjetima. Ukoliko su aerobni uvjeti, *L.innocua* prevodi glukozu do mliječne i octene kiseline. Dok, u anaerobnim uvjetima, razgradnja glukoze ide samo do mliječne kiseline.

*Listeria* može proizvesti adenozin trifosfat kroz dišni lanac, ima nekoliko fermentacijskih puteva. To se poklapa sa načinom života mikroaerofilnih, fakultativnih anaeroba. *Listerie* su intercelularni patogeni koji koriste aktinske filamente proizvedene od strane domaćina za pokretljivost unutar stanice domaćine. Bakterija se kreće naprijed kroz citoplazmu zaražene stanice koristeći rep sastavljen od aktina. Oba oblika *Listerie* imaju ovu sposobnost. Vrste *Listeria* također tvore biofilm, koji im omogućava da se zadrže na čvrstim površinama gdje se razmnože te ih je teško ukloniti (Anonymous 3).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Priprema i čuvanje mikrobiološke kulture *Listeria innocua* ATCC 33090

Volumen od 10 µL suspenzije bakterijske kulture *Listeria innocua* ATCC 33090 čuvane u 50 % glicerolu pri temperaturi od -20 °C, precijepi se aseptično u struji zraka u laminaru u 10 mL Nutrient bujona (Biolife, Milan, Italija). Da bi se postigao očekivani rast bakterijske kulture, plastična epruveta s naciepljenim bujonom inkubira se u termostatu ("Bodalec i Bodalec", model EBT) pri 37 °C u vremenskom periodu od 48 h. Kultura se precijepljuje svaka 3 mjeseca.

##### 3.1.2. Hranjive podloge za uzgoj bakterijske kulture

###### a.) Nutrient agar

Sastav: 13 g dehidrirane podloge, 1000 mL destilirane vode, 20 g tehničkog agara (Biolife, Milan, Italija)

Za pripremu 1000 mL Nutrient bujona odvaže se 13 g dehidrirane podloge. Dehidrirana podloga otopi se u 1000 mL destilirane vode.

Za pripremu 1000 mL Nutrient agara odvaže se 13 g dehidrirane podloge te 10 g tehničkog agara (Biolife, Milan, Italija) kako bi se podloga održala u čvrstoj fazi pri temperaturi inkubacije. Podloge pripremljene na opisani način steriliziraju se u autoklavu ("Sutjeska", model 200-189) 15 min pri 121 °C. U laminaru (Klimaoprema) aseptično u struji zraka, podloge se sterilno razliju u Petrijeve zdjelice kako bi se spriječila moguća kontaminacija podloge. Razlivene podloge uz poluotvorene poklopce suše se u struji zraka u laminaru.

##### 3.1.3. Kemikalije za mikrobiološka istraživanja

Za pripremu otopine natrijevog nitrata 0.01 M NaNO<sub>3</sub> odvaže se 8.4 g NaNO<sub>3</sub> te otopi u 1000 mL destilirane vode. Pripremljena otopina sterilizira se pri 121 °C/15 min ("Sutjeska", model 200-189).

Za pripremu fosfatnog pufera (PBS) odvaže se 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.62 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O i 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> te otopi u 900 mL destilirane vode. Kako bi se pH vrijednost podesila na 7 dodaje se HCl. Volumen se nadopuni sa destiliranom vodom do 1000 mL. Pripremljena otopina sterilizira se pri 121 °C/15 min ("Sutjeska", model 200-189).

#### 3.1.4. Priprema suspenzije bakterija

Nakon precijepljivanja bakterijske kulture iz 50 % glicerola u Nutrient bujon i inkubiranja (48 h) suspenzija se centrifugira (Hettich, Rotofix 32) pri 4000 RPM/10 min. Nakon centrifugiranja, odlije se supernatant te se na biomasu bakterije dodaje 10 mL fosfatnog pufera. Uzorak u plastičnoj epruveti homogenizira se na vorteksu (IKA, Vortex 4 basic; BV) te se ponovi centrifugiranje pri istim uvjetima 3 puta.

#### 3.1.5. Priprema uzorka za tretiranje ultrazvukom

U laboratorijsku staklenu čašu od 500 mL ulije se volumen od 190 mL 0.01 M NaNO<sub>3</sub>. Prije ultrazvučnog tretmana, u kontroliranu zagrijanu vodenu kupelj stavlja se staklena čaša. Nakon što se postigne zadana temperatura 40 °C ili 60 °C dodaje se 10 mL pripremljene suspenzije bakterije. Temperatura se kontrolira pomoću infracrvenog termometra (PCE-777, PCE Instruments).

### 3.2. Metode

#### 3.2.1. Provedba eksperimenta

Tretiranje ultrazvukom visoke snage provodi se ultrazvučnim procesorom model S-4000 (MisonixSonicators, Newtown, Connecticut, SAD).



Slika 2. Ultrazvučni procesor model S-4000 (MisonixSonicators, Newtown, Connecticut, SAD)

Termočlanak i ultrazvučna sonda (model: HI 9063, Hanna Instruments Ltd, Leighton, Buzzard LU7 4AD, UK) se sterilizira alkoholom, te potom ispere sa destiliranom vodom. Podese se parametri na uređaju, trajanje tretmana i amplituda; ultrazvučna sonda

frekvencije 20 kHz i promjera 127 mm uroni se u staklenu čašu sa uzorkom do dva promjera (sonde) od dna staklene čaše. Termočlanak je priključen na ultrazvučni procesor i uronjen u čašu s uzorkom, kako bi se pratila temperatura uzorka. Započinje ultrazvučni tretman, te se temperatura bilježi svakih 30 s. Održavanje željene temperature uzorka prilikom tretmana ultrazvukom postiže se uranjanjem staklene čaše sa uzorkom u plastičnu posudu sa ledom, pri tome je dozvoljeno variranje temperature za  $\pm 3$  °C. Temperature uzoraka održavaju se tijekom cijelog postupka tretiranja, kako bi u potpunosti utvrdili kakav je utjecaj ultrazvuka visoke snage bez utjecaja temperature. Nakon ultrazvučnog tretiranja, izuzima se plastičnom špricom 3 mL uzorka. Sterilizacija sonde i termočlanak provodi se prije svakog tretmana.

Tablica 1. Plan pokusa ultrazvučnog tretmana za *Listeria innocua* ATCC 33090

Uzorak	Amplituda %	Vrijeme tretmana (min)	Temperatura (°C)
A0	/	5/10	40
A0a	/	5/10	60
A1	100	5	60
A2	100	5	40
A3	75	5	60
A4	75	10	40
A5	100	10	60
A6	75	5	40
A7	100	10	40
A8	75	10	60

Uzorak A0 i A0a zagrijevaju se u kontroliranoj vodenoj kupelji pri određenoj temperaturi (40 °C i 60 °C) i nisu tretirani ultrazvukom. Nakon 5 i 10 min izuzima se uzorak i provodi naciepljivanje uzoraka za određivanje biofilma. Za ostale uzorke provedeno je zagrijavanje u kombinaciji sa ultrazvučnim tretiranjem, mijenjajući parametre amplitude i trajanje tretmana.

### 3.2.2. Određivanje pH-vrijednosti i provodljivosti

Mjerenje pH-vrijednosti provodi se na digitalnom pH-metru (pH 340i/SET, WTW, Weilheim, Germany) prije (zagrijavanje u kupelji na 40 °C i 60 °C) i poslije tretmana ultrazvukom.

### 3.2.3. Određivanje biofilma

**Princip određivanja:** Metoda određivanja biofilma je spektrofotometrijska metoda koja se bazira na kristal violetnom obojenju.

**Postupak određivanja:** Svaki uzorak volumena od 200  $\mu\text{L}$  u paraleli se nacijepi u jažice multiwell ploče (TPP 92012, Švicarska). U svaku jažicu otpipetira se volumen od 2 mL hranjivog bujona te kontrolne jažice u koje se dodaje samo hranjivi bujon. Multiwell ploča inkubira se 4 h u termostatu (EBT - Termomedicinski aparati, Bodalec i Havočić, Hrvatska). Razlog inkubacije jest adhezija stanica za podlogu. Nakon 4 h iz jažica multiwell ploče uklanja se supernatant te ispiri sa 2 mL PBS - a. Nakon ispiranja, otpipetira se 2 mL hranjivog bujona u svaku jažicu, slijedi inkubacija od 24 h kako bi se formirao biofilm. Nakon 24 h, ukloni se supernatant iz jažica te slijedi ispiranje fosfatnim puferom. Nakon ispiranja puferom, dodajemo 2 mL 99% - tnog metanola u jažice da se biofilm fiksira kroz 15 min. Metanol se uklanja, jažice se posuše te se dodaje 2 mL boje kristal violet. Nakon 20 min slijedi ispiranje destiliranom vodom i to tri puta. U digestoru se u svaku jažicu dodaje 2 mL 33%-tne octene kiseline, kako bi se sa površine jažica odvojile sve stanice. Apsorbancija se mjeri pri 590 nm na spektrofotometru UV UNICAM HELIOS  $\beta$ . Analize biofilma provode se u paraleli.

### 3.2.4. Određivanje broja stanica

Ukupni broj stanica određuje se prije i nakon tretmana kako bi se odredio stupanj redukcije. Stupanj redukcije je razlika broja stanica prije i poslije tretmana. Volumen od 10  $\mu\text{L}$  uzorka nacijepi se u 90  $\mu\text{L}$  PBS - a i napravi se serija razrijeđenja (do  $10^{-7}$ ). Razrijeđenja se nacijepuju u triplikatu, uzima se po 10  $\mu\text{L}$  na hranjivu podlogu i štapićem po Drygalskom se razmaže kružnim pokretima po ploči. Nakon 48 h inkubacije, izbroje se narasle kolonije na pločama. U obzir dolaze samo one ploče koje imaju broj poraslih kolonija između 10 i 300. Određuje se srednja vrijednost za svako razrijeđenje, a ukupni broj izražava se kao  $\log_{10}\text{CFU/mL}$ .

### 3.2.5. Obrada podataka

Kako bi se odredio utjecaj raznih parametara na učinkovitost tretmana korišten je centralni složeni dizajn (central composite design, CCD; STATGRAPHICS Centurion, StatPoint

Technologies). Kao operativni parametri odabrani su vrijeme tretmana, temperatura uzorka i amplituda. Provedena je analiza varijance (ANOVA) kako bi se mogla utvrditi odstupanja ( $p < 0.05$ ) u provedenim tretmanima. Izlazne vrijednosti su  $\log_{10}$  CFU/mL, biofilm, te temperatura. Kako bi se optimizirao tretman ultrazvuka i istražio utjecaj tri nezavisnih varijabli na stvaranje biofilma, koristile su se 3 razine promijenljivih faktora.

Točnost kvadratnog empirijskog modela provjerena je analizom varijance (ANOVA) sa razinom pouzdanosti od 95 %.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

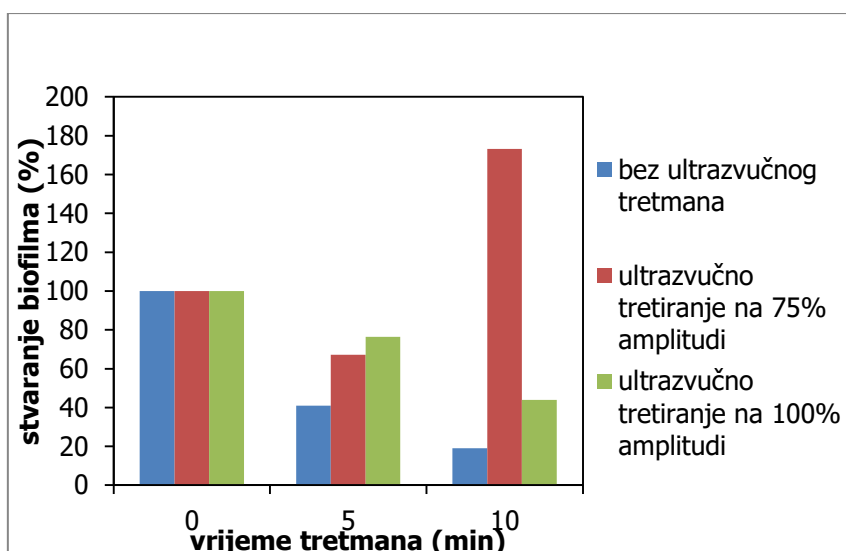
Cilj eksperimentalnog dijela ovog rada je odrediti utjecaj ultrazvuka visoke snage na stvaranje biofilma bakterije *Listeria innocua* ATCC 33090 te odrediti učinak ultrazvučnog tretiranja na inaktivaciju stanica. Provedeno je 8 ultrazvučnih tretmana. Uzorak za tretiranje je prethodno zagrijan u vodenoj kontroliranoj kupelji. Nezavisne varijable koje su se mijenjale: amplituda, vrijeme tretmana te temperatura na koju je uzorak prethodno zagrijan. Dva uzorka nisu ultrazvučno tretirani već samo zagrijani na određenu temperaturu zbog usporedbe ultrazvučnog i toplinskog tretmana. Biofilm se odredio spektrofotometrijskom metodom bojanjem sa kristal violetom.

### 4.1. UTJECAJ ULTRAZVUKA NA BIOFILM

Tablica 2. Prikaz rezultata apsorbancije za biofilm

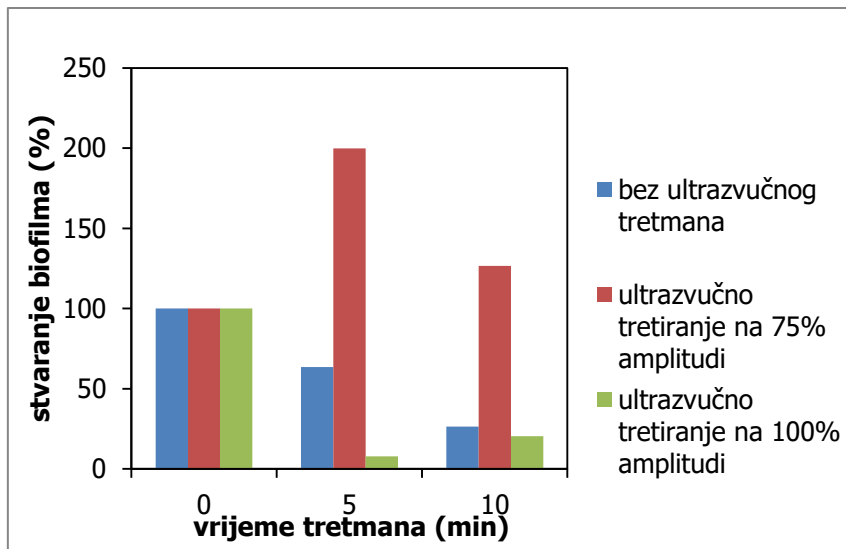
Uzorak	Amplituda (%)	t (min)	Temperatura (°C)	A (590 nm)
A0	-	0	40	1.316
	-	5	40	0.538
	-	10	40	0.251
A0a	-	0	60	0.406
	-	5	60	0.257
	-	10	60	0.107
A1	100	0	60	0.587
	100	5	60	0.045
A5	100	10	60	0.120
A3	75	0	60	1.186
	75	5	60	2.370
A8	75	10	60	1.501
A2	100	0	40	1.613
	100	5	40	1.233
A7	100	10	40	0.707
A6	75	0	40	1.030
	75	5	40	0.692
A4	75	10	40	1.784

Iz dobivenih rezultata u tablici 2 kod ultrazvučno tretiranih uzoraka postoji odstupanje od očekivajućeg pada apsorbancije ovisno o vremenu. Iz dobivenih podataka eksperimentalnog dijela kada se uspoređi tretman uzoraka bez ultrazvučnog tretmana zagrijanih na 40 °C i 60 °C, može se zaključiti da pri nižoj temperaturi ne dolazi do značajne redukcije u stvaranju biofilma jer nije postignuta značajna inaktivacija mikroorganizama (slika 3). Uspoređujući sliku 3 i sliku 4 može se uočiti da nakon najduljeg tretmana od 10 min, najznačajnija redukcija stvaranja biofilma je pri 100 % amplitude i 60 °C, redukcija stvaranja biofilma iznosi 79.56 %. Iz tablice 2 dolazimo do zaključka da ukoliko se uzorak zagrijava na 60 °C i podesi najveća amplituda 100 % i tretira 5 min, dobivamo najmanju vrijednost apsorbancije koja u tablici 2 odgovara uzorku A1. Najveći pad odnosno najveće smanjenje stvaranja biofilma u odnosu na početnu vrijednost prije tretmana je zabilježen pri 60 °C i 100 % amplitude, uočavamo to na slici 4 gdje je nakon 5 min tretmana zabilježen pad stvaranja biofilma od čak 92.25 %. Kod 75 % amplitude i 60 °C te 5 min tretmana nije došlo do redukcije stvaranja biofilma, već do povećanja za 99.83 % (slika 4). To objašnjavamo činjenicom da se mikroorganizmi različito ponašaju kod neoptimalnih uvjeta stoga je došlo do neočekivanog porasta stanica u odnosu na početni broj. Do očekivanog ishoda nije došlo zbog toga što se u navedenim uvjetima mikroorganizmi mogu drukčije ponašati. Iz slike 3 i 4 uočava se da kod ultrazvučno tretiranih uzoraka vrijednost biofilma se smanjuje osim kod parametara 40 °C i 75 % amplitude i kod 60 °C i 100 % amplitude.



Slika 3. Ovisnost stvaranja biofilma o vremenu ultrazvučnog tretmana uzoraka zagrijanih na 40 °C





Slika 4. Ovisnost stvaranja biofilma o vremenu ultrazvučnog tretmana uzoraka zagrijanih na 60 °C

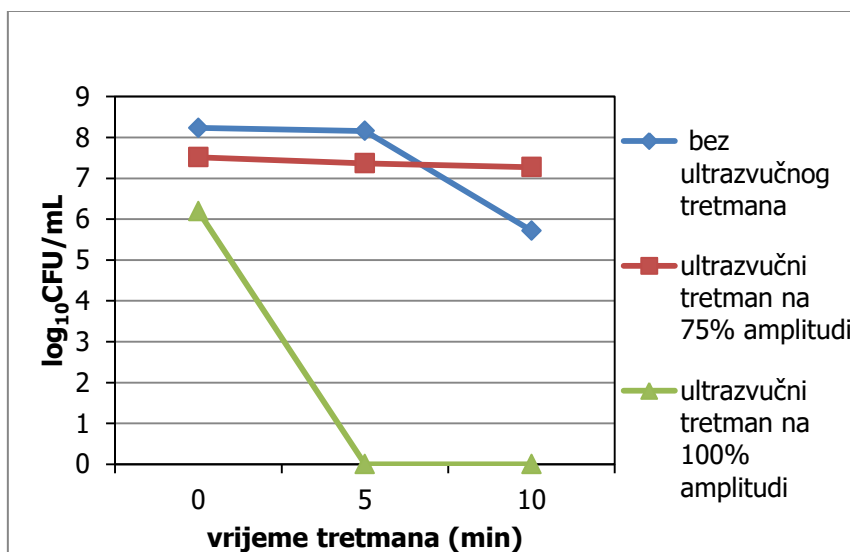
#### 4.1.1. Usporedba s dosadašnjim istraživanjima

Bigelow i sur. (2009) promatrali su redukciju stvaranja biofilma *Escherichie coli* ATCC 23724 tretiranih s ultrazvukom i visokim tlakom raspona od 3.1 - 7.6 MPa. Kombinacijom tlaka većeg od 5.5 MPa i ultrazvuka postignuta je potpuna redukcija stvaranja biofilma iz čega možemo zaključiti da kombinacija više tehnologija omogućava i bolju učinkovitost u redukciji stvaranja biofilma.

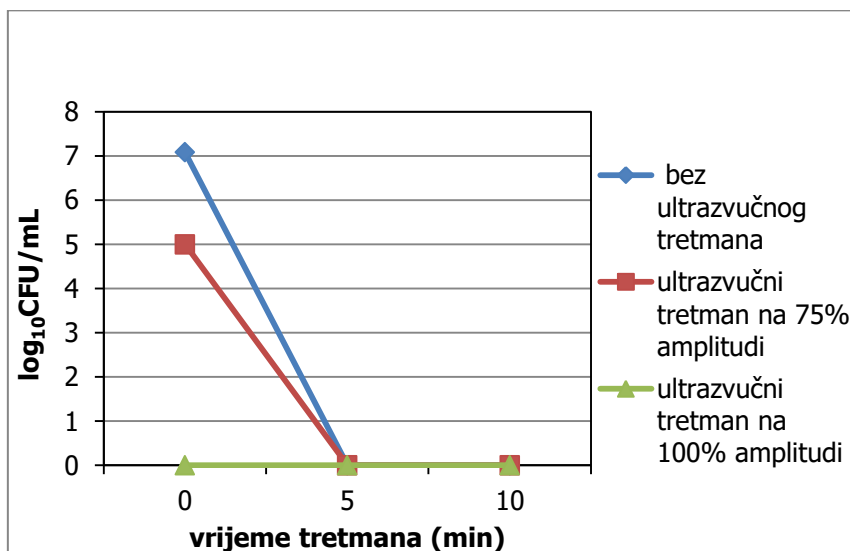
#### 4.2. UTJECAJ ULTRAZVUKA NA INAKTIVACIJU

Iz dobivenih rezultata eksperimentalnog dijela rada, uočavamo da kod uzoraka koji nisu ultrazvučno tretirani već su samo zagrijavani na 40 °C je postignuta redukcija nakon 5 min od 0.07 log<sub>10</sub> CFU/mL što je ujedno i najniža redukcija, dok je nakon 10 min redukcija iznosila 2.52 log<sub>10</sub>CFU/mL (slika 5). Kod netretiranog uzorka zagrijanog na 60 °C i nakon 5 min tretmana postignuta je potpuna inaktivacija mikroorganizama u iznosu 7.08 log<sub>10</sub> CFU/mL (slika 6). Pri tim uvjetima je ujedno postignuta najviša temperaturna inaktivacija bakterijskih stanica *L. innocua*. Stoga, zagrijavanje uzorka na višoj temperaturi i dulje zagrijavanje rezultira većim stupnjem redukcije. Kod ultrazvučno tretiranih uzoraka, najmanja redukcija postignuta je prema slici 5 pri 75 % amplitude i zagrijavanja na 40 °C kada je pri 5 min redukcija iznosila 0.15 log<sub>10</sub> CFU/mL, a nakon 10 min 0.24 log<sub>10</sub>CFU/mL.

Dakle, povećanjem vremena ultrazvučnog tretmana povećava se stupanj redukcije. Ultrazvučni tretman pri 100 % amplitude, 40 °C rezultirao je potpunom redukcijom 6.20 log<sub>10</sub> CFU/mL (slika 5) i to je ujedno najviša ultrazvučna inaktivacija mikroorganizama, dok je pri uvjetima 75 % amplitude i 60 °C (slika 6) došlo do potpune inaktivacije u iznosu 5 log<sub>10</sub> CFU/mL. Kod ultrazvučnog tretmana 100 % ultrazvučne amplitude i zagrijavanje uzorka na 60 °C došlo je do temperaturne inaktivacije bakterijske kulture, odnosno kod početnog broja stanica postignuta je potpuna inaktivacija.



Slika 5. Ovisnost log<sub>10</sub>CFU/mL o trajanju ultrazvučnog tretmana uzoraka zagrijanih na 40 °C



Slika 6. Ovisnost log<sub>10</sub>CFU/mL o trajanju ultrazvučnog tretmana uzoraka zagrijanih na 60 °C

#### 4.2.1. Usporedba sa dosadašnjim istraživanjima

Gastelum i sur. (2012), prikazali su u svom radu da kombinacija ultrazvuka, vanilina i temperature rezultira povećanjem stope inaktivacije i smanjenjem vremena za inaktivaciju *Listeria innocua*. U navedenom istraživanju u temperaturnom rasponu od 45 - 55 °C postigli su 4 log<sub>10</sub> redukciju *L.innocua*, dok se u ovom radu zagrijavanjem na 60 °C i pri 75 % amplitude postigla potpuna inaktivacija mikroorganizama u iznosu 5 log<sub>10</sub> CFU/mL.

Bermúdez-Aguirre i sur. (2008), su u punomasnom mlijeku s kulturom *Listeria innocua* nakon termalne pasterizacije na temperaturi od 63 °C i 10 min ultrazvučnog tretmana postigli 0.69 log<sub>10</sub> redukciju, nakon pola sata 5.3 log<sub>10</sub> redukciju. U ovom provedenom eksperimentalnom radu prema dobivenim podacima nakon zagrijavanja uzorka na 60 °C i 10 - minutnog tretmana pri 100 % amplitudi se postigla potpuna temperaturna inaktivacija, odnosno kod početnog broja stanica postignuta je potpuna inaktivacija.

#### 4.3. UTJECAJ ULTRAZVUKA NA pH I PROVODLJIVOST

Tablica 3. Rezultati mjerenja pH i provodljivosti prije i nakon tretmana

Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	$\sigma$ ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	pH
40°C	0	6.90	384
60°C	0	6.79	503
40°C	10	6.64	490
60°C	10	6.70	1000

Vrijednost pH se smanjila nakon ultrazvučnog tretmana a provodljivost se povećala. Kada se uzorak zagrijavao na 40 °C njegova pH vrijednost je iznosila 6.9, a provodljivost 384  $\mu\text{S}/\text{cm}$  prije tretmana, dok je nakon ultrazvučnog tretmana pH vrijednost iznosila 6.64, a provodljivost 490  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Pri zagrijavanju uzorka na 60 °C prije ultrazvučnog tretmana pH vrijednost iznosila je 6.79, a provodljivost 503  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , dok se nakon tretmana pH snizio na 6.7, a provodljivost se povećala na 1000  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Kada usporedimo na koju je temperaturu suspenzija mikroorganizama zagrijana uočavamo da što je ona veća to je pH manji, a provodljivost veća. Bermúdez-Aguirre i sur. (2008) su u punomasnom mlijeku s kulturom *Listeria innocua* ATCC 51742 nakon kombinacije povišene temperature (63 °C) i 10-minutnog ultrazvučnog tretmana dobili da je kiselost uzoraka nakon tretmana pala je za 0.14%. U ovom eksperimentalnom dijelu rada kada je uzorak zagrijan na 40 °C i ultrazvučno tretiran

10 minuta pH vrijednost se smanjila čak za 3.77 %. Kada je uzorak zagrijan na 60 °C pad kiselosti nakon tretmana iznosio je 1.33 %.

Do porasta provodljivosti dolazi zbog većeg broja nabijenih čestica u tekućini što je detaljnije objašnjeno u poglavlju 2.6. Kod visoke temperature i tlaka u mjehuriću, pri snažnom raspadanju, vodena para disocira i nastaju kemijski produkti u mjehurićima poput hidroksilnih radikala, kisikovih radikala, vodikovih radikala, peroksidnih radikala. Tijekom ultrazvučnog tretiranja nastaje vodikov peroksid koji je ovisan o temperaturi. Njegova koncentracija se smanjuje sa povišenjem temperature prema istraživanju Tiwari i sur. (2009). Uočili su da je produkcija hidroksilnog iona u soku od grejpa veća na 70 °C nego na 130 °C što naznačuje da se broj kavitacijskih mjehurića smanjuje sa povećanjem temperature zbog efekta uvlačenja pare u unutrašnjost mjehurića.

#### 4.4. Rezultati statističke obrade

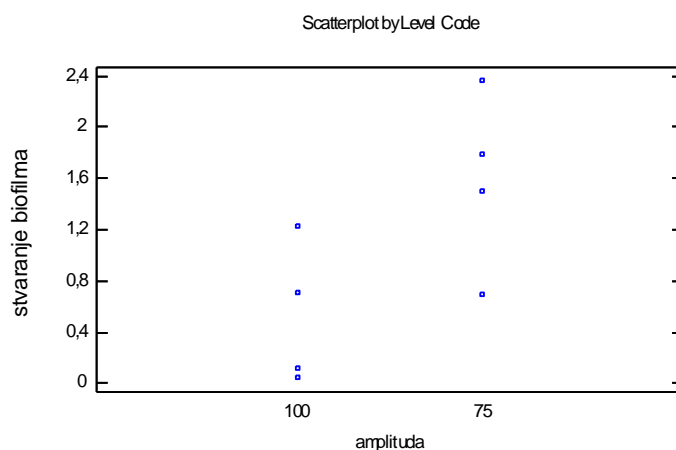
Tablica 4. Statistička značajnost varijabli na stvaranje biofilma

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Df</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F-omjer</i>	<i>P-vrijednost</i>
GLAVNI UČINCI					
A:amplituda	2,24932	1	2,24932	2,74	0,3458
B:vrijeme tretmana	0,006498	1	0,006498	0,01	0,9435
C:temperatura	0,0181451	1	0,0181451	0,02	0,9060
INTERAKCIJE					
AB	0,0567845	1	0,0567845	0,07	0,8362
AC	1,25532	1	1,25532	1,53	0,4327
BC	0,23154	1	0,23154	0,28	0,6890
OSTATAK	0,81984	1	0,81984		
UKUPNO (ISPRAVLJENO)	4,63745	7			

AB= utjecaj amplitude i vremena tretmana

AC= utjecaj amplitude i temperature

BC= utjecaj vremena tretmana i temperature



Slika 7. Statistička značajnost varijabli na stvaranje biofilma

Parametri koji imaju  $p$ -vrijednost manju od 0.05 imaju značajan statistički utjecaj. Stoga, prema tablici 4. i slici 7. statistički značajan utjecaj na stvaranje biofilma nema niti jedna varijabla od gore navedenih.

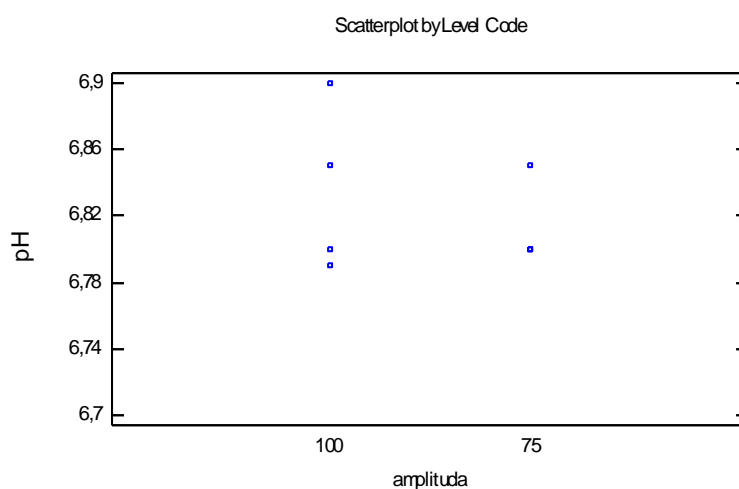
Tablica 5. Statistička značajnost varijabli na pH-vrijednost

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Df</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F-omjer</i>	<i>P-vrijednost</i>
GLAVNI UČINCI					
A:amplituda	0,0010125	1	0,0010125	81,00	0,0704
B:vrijeme tretmana	0,0000125	1	0,0000125	1,00	0,5000
C:temperatura	0,0015125	1	0,0015125	121,00	0,0577
INTERAKCIJE					
AB	0,0010125	1	0,0010125	81,00	0,0704
AC	0,0055125	1	0,0055125	441,00	0,0303
BC	0,0015125	1	0,0015125	121,00	0,0577
OSTATAK	0,0000125	1	0,0000125		
UKUPNO (ISPRAVLJENO)	0,0105875	7			

AB= utjecaj amplitude i vremena tretmana

AC= utjecaj amplitude i temperature

BC= utjecaj vremena tretmana i temperature



Slika 8. Statistička značajnost varijabli na pH-vrijednost

Prema tablici 5. i slici 8. statistički značajan utjecaj na pH-vrijednost ima kombinacija utjecaja amplitude i temperature. Ostale varijable nemaju značajan statistički utjecaj jer  $p$ -vrijednosti nisu manje od 0.05.

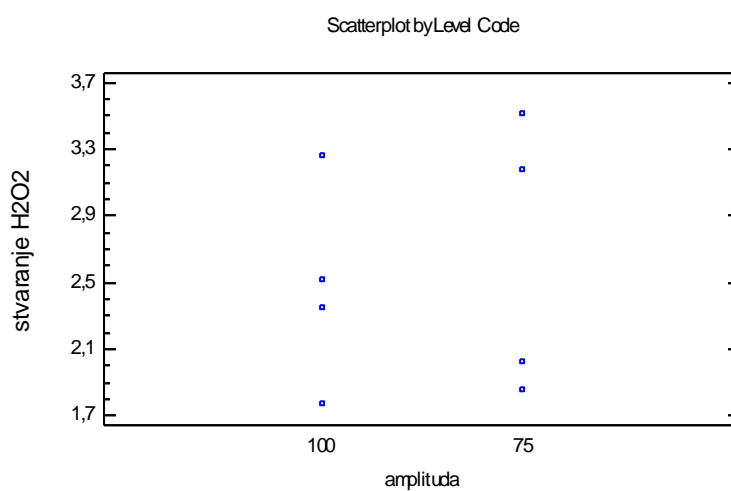
Tablica 6. Statistička značajnost varijabli na stvaranje  $H_2O_2$

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Df</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F-omjer</i>	<i>P-vrijednost</i>
GLAVNI UČINCI					
A:amplituda	0,0546402	1	0,0546402	4,00	0,2952
B:vrijeme tretmana	0,167337	1	0,167337	12,25	0,1772
C:temperatura	2,13441	1	2,13441	156,25	0,0508
INTERAKCIJE					
AB	0,577149	1	0,577149	42,25	0,0972
AC	0,276619	1	0,276619	20,25	0,1392
BC	3,12506E-12	1	3,12506E-12	0,00	1,0000
OSTATAK	0,0136607	1	0,0136607		
UKUPNO (ISPRAVLJENO)	3,22382	7			

AB= utjecaj amplitude i vremena tretmana

AC= utjecaj amplitude i temperature

BC= utjecaj vremena tretmana i temperature



Slika 9. Statistička značajnost varijabli na stvaranje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Parametri koji imaju  $p$ -vrijednost manju od 0.05 imaju značajan statistički utjecaj. Stoga, prema tablici 6. i slici 9. statistički značajan utjecaj na stvaranje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nema niti jedna varijabla od gore navedenih.

## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Ultrazvučnim tretmanom (100 %; 5 min) i prethodnim zagrijavanjem pripremljenog uzorka (60 °C) ostvareno je manje stvaranje biofilma tj. značajnija je redukcija stvaranja biofilma nego kod samog zagrijavanja (92.25 %).
2. Najniža redukcija mikroorganizama kod ultrazvučno tretiranih uzoraka (75 %, 40 °C, 5 min) iznosi 0.15 log<sub>10</sub> CFU/mL.
3. Potpuna najviša temperaturna inaktivacija mikroorganizama postignuta je kod 60 °C i iznosila je 7.08 log<sub>10</sub> CFU/mL.
4. Potpuna najviša inaktivacija mikroorganizama kod ultrazvučno tretiranih uzoraka postignuta je pri 100 %, 40 °C i iznosi 6.20 log<sub>10</sub> CFU/mL.
5. Vrijednost pH se smanjila nakon ultrazvučnog tretmana, a provodljivost se povećala. Na višoj temperaturi, zapažamo nižu pH vrijednost i veću provodljivost zbog nastanka radikala te njihovog otapanja u vodi, odnosno većeg broja nabijenih čestica.



## 6. LITERATURA

- Anonymous 1, Što su biofilmovi i kako nastaju, <<http://miloc.hr/rectorkovi-savjeti-klima/vijest/to-su-biofilmovi-i-kako-nastaju/>>. Pristupljeno 16.veljače.2017.
- Anonymous 2, Listeria innocua, <[https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Listeria\\_innocua](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Listeria_innocua)>. Pristupljeno 17.ožujka.2017.
- Anonymous 3, Listeria innocua, <<http://bacmap.wishartlab.com/organisms/91>>. Pristupljeno 20.ožujka.2017.
- Bermúdez-Aguirre, D., Corradini, M.G., Mawson R., Barbosa-Cánovas,G.V. (2009) Modeling the inactivation of Listeria innocua in raw whole milk treated under thermo-sonication. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **10**, 172–178.
- Bigelow, A.T., Northagen, T., Hill,T.M., Sailer, F.C. (2009) The destruction of Escherichia Coli biofilm using high – intensity focused ultrasound. *Ultrasound in Medicine & Biology*. **35 (6)**, 1026–1031.
- Carcel, J.A., Benedito, J., Rossello, C., Mulet, A. (2007) Influence of ultrasound intensity on mass transfer in apple immersed in a sucrose solution. *Journal of Food Engineering*. **78**, 472-479.
- De Visscher, A., Van Langenhove, H. (1998) Sonochemistry of organic compounds in homogeneous aqueous oxidising systems. *Ultrasonics Sonochemistry*. **5**, 87–92.
- Dolatowski, Z.J., Stadnik, J., Stasiak, D. (2007) Applications of ultrasound in food technology. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. **6 (3)**, 89-99.
- Ertugay, M.F., Sengul, M., Sengul, M. (2004) Effect of Ultrasound Treatment on Milk Homogenisation and Particle Size Distribution of Fat. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. **28**, 303-308.
- Fonteles, T.V., Costa, M.G.M., Tibério de Jesus, A.L., Alcantra de Miranda, M.R., Fernandes, F.A.N., Rodrigues, S. (2012) Power ultrasound processing of cantaloupe melon juice: Effects on quality parameters. *Food Research International*. **48**, 41–48.

- Freitas, S., Hielscher, G., Merkle, H.P., Gander, B. (2006) Continuous contact- and contamination-free ultrasonic emulsification- a useful tool for pharmaceutical development and production. *Ultrasonics Sonochemistry*. **13**, 76–85.
- Gastelum, G.G., Avila-Sosa, R., Lopez - Malo, A., Palou, E. (2012) *Listeria innocua* Multi-target Inactivation by Thermo-sonication and Vanillin. *Food Bioprocess Technology*. **5**, 665–671.
- Huljev, K., Ekatarina, K. (2012) Utjecaj mikroorganizama i njihovih metabolita na stabilnost konstrukcijskih materijala u morskoj vodi. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije. Sveučilište u Zagrebu.
- Ishtiaq, F., Farooq, R., Farooq, U., Farooq, A., Siddique, M., Shah, H., Ul-Hassan, M., Shaheen, M.A. (2009) Application of Ultrasound in Pharmaceuticals. *World Applied Sciences Journal*. **6 (7)**, 886-893.
- Karaman, S., Yilmaz, M.T., Ertugay, M.F., Baslar, M., Kayacier, A. (2012) Effect of ultrasound treatment on steady and dynamic shear properties of glucomannan based salep dispersions: Optimization of amplitude level, sonication time and temperature using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*. **19**, 928–938.
- Mason, T.J., Joyce, E., Phull, S.S., Lorimer, J.P. (2003) Potential uses of ultrasound in the biological decontamination of water. *Ultrasonics Sonochemistry*. **10**, 319–323.
- Milanov, D., Ašanin, R., Vidić, B., Krnjajić, D., Petrović, J. (2008) Biofilm – organizacija života bakterija u prirodnim ekosistemima. Arhiv veterinarske medicine. **1 (2)**.
- Mohideen, F.W. (2011) Comparison of thermally pasteurized and ultrasonically pasteurized blueberry juice (*vaccinium corymbosum*) and an investigation of blueberry juice effect on lipid oxidation during microencapsulation of poly-unsaturated fish oils. University of Peradeniya, Louisiana.
- Oulahal-Lagsir, N., Martial-Gros, A., Boistier, E., Blum, L.J., Bonneau, M. (2000) The development of an ultrasonic apparatus for the noninvasive and repeatable removal of fouling in food processing equipment. *Letters in Applied Microbiology*. **30**, 47–52.

- Piyasena, P., Mohareb, E., McKellar, R.C. (2003) Inactivation of microbes using ultrasound. *International Journal of Food Microbiology*. **87**, 207– 216.
- Rosenthal, I., Sostaric, J.Z., Riesz, P. (2004) Sonodynamic therapy- a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*. **11**, 349-363.
- Särkkä-Tirkkonen, M., Väisänen, H.M., Beck, A., Kretschmar, U., Seidel, K. (2010) Quality analysis of critical control points within the whole food chain and their impact on food quality, safety and health. University of Helsinki, Ruralia Institute.
- Tiwari, B.K., O'Donnell, C.P., Cullen, P.J. (2009) Effect of non thermal processing technologies on the anthocyanin content of fruit juices. *Trends in Food Science & Technology*. **20**, 137-145.
- Tiwari, B.K., Patras, A., Brunton, N., Cullen, P.J., O'Donnell, C. (2010) Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrasonics Sonochemistry*. **17**, 598–604.
- Valdramidis, V., Cullen, P., Tiwari, B., O'Donnell, C. (2010) Quantitative modelling approaches for ascorbic acid degradation and non-enzymatic browning of orange juice during ultrasound processing. Dublin Institute of Technology, Dublin.
- Wurtzel, O., Sesto, N., Mellin, J.R., Karunker, I., Edelheit, S., Becavin, C., Archambaud, C., Cossart, P., Sorek, R. (2012) Comparative transcriptomics of pathogenic and non-pathogenic *Listeria* species. *Molecular Systems Biology*. **8**, br.članka 583.
- Yasui, K., Tuziuti, T., Iida, Y. (2005) Dependence of the characteristics of bubbles on types of sonochemical reactors. *Ultrasonics Sonochemistry*. **12**, 43–51.
- Zheng, L., Sun, D.W. (2002) Enhancement of Food Freezing Process by Power Ultrasound. University College Dublin, National University of Ireland, Earlsfort Terrace, Dublin.

## 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.*