

# Određivanje parametara stresa u bakterije *Listeria innocua* nakon tretmana ultrazvukom

---

Zovko, Josipa

Master's thesis / Diplomski 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:159:772335>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

Josipa Zovko 760/PI

ODREĐIVANJE PARAMETARA  
STRESA U BAKTERIJE *Listeria*  
*inocua* NAKON TRETMANA  
ULTRAZVUKOM

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

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za procesno-prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### ODREĐIVANJE PARAMETARA STRESA U BAKTERIJE *Listeria innocua* NAKON TRETMANA ULTRAZVUKOM

*Josipa Zovko, 760/PI*

**Sažetak:** *Listeria innocua* nepatogena je bakterija, široko rasprostranjena u okolišu i hrani, te se zbog sličnosti s patogenom bakterijom *Listeria monocytogenes* koristi kao modelni organizam u istraživanjima. U ovom radu određivani su mehanički utjecaji ultrazvuka visoke snage na stvaranje parametara stresa bakterijske kulture *Listeria innocua* ATC33090. Uzorci bakterijske suspenzije tretirani su toplinom te toplinom i ultrazvukom u kombinaciji. Uzorcima koji su tretirani ultrazvučnom sondom frekvencije 20 kHz, mjerene su tri nezavisne varijable: amplituda (75 %, 100 %), temperatura (40 °C, 60 °C) i vrijeme tretmana (5, 10 minuta). Rezultati su analizirani metodom odzivne površine (RSM) koristeći program STATGRAPHICS Centurion. Pri 40 °C i amplitudi od 100 %, postignuta je potpuna inaktivacija već nakon 5 minuta ultrazvučnog tretmana, te najviši stupanj redukcije ( $4,31 \log_{10} \text{CFU ml}^{-1}$ ). Najveći porast koncentracije slobodnih radikala je 30 % od početne vrijednosti, pri 60 °C i 100 %-tnoj amplitudi, nakon 10 minuta tretmana. Kod istih uvjeta tretmana u vremenu od 5 minuta dobivena je najznačajnija redukcija stvaranja biofilma (92,25 %). Primjenom viših temperatura (60 °C) uz ultrazvučno tretiranje dolazi do apoptoze stanica te se one ne mogu revitalizirati. Značajnu ulogu pri inaktivaciji bakterijskih stanica osim uvjeta tretmana ima i kavitacijski efekt ultrazvuka, pri kojem se formiraju slobodni radikali.

**Ključne riječi:** ultrazvuk, *Listeria innocua*, kavitacija, biofilm, slobodni radikali, stupanj redukcije, stanično istjecanje, revitalizacija stanica

**Rad sadrži:** 51 stranicu, 25 slika, 12 tablica, 62 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Pomoć pri izradi:** Višnja Stulić, mag. ing.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof.dr.sc. Višnja Bačun Družina
2. Izv.prof.dr.sc. Anet Režek Jambrak
3. Prof.dr.sc. Zoran Herceg
4. Prof.dr.sc. Jadranka Frece (zamjena)

**Datum obrane:** 25. rujna, 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Food Engineering**  
**Laboratory for Food Processes Engineering**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### **DETERMINATION OF STRESS PARAMETERS IN BACTERIA *Listeria innocua* AFTER ULTRASOUND TREATMENT**

*Josipa Zovko 760/PI*

**Abstract:** *Listeria innocua* is a non-pathogenic bacterium, widespread in the environment and food, and because of its similarity to the pathogenic bacterium *Listeria monocytogenes*, is used as a model organism in researches. In this paper, the mechanical effects of the high power ultrasound have been determined on the creation of stress parameters of bacterial culture *Listeria innocua* ATC33090. Samples of the bacterial suspension were treated by heat and ultrasound in combination. Samples were analyzed by ultrasound probe frequency of 20 kHz and three independent variables were measured: amplitude (75 %, 100 %), temperature (40 °C, 60 °C) and treatment time (5, 10 minutes). The results were analyzed by response surface methodology (RSM) using the STATGRAPHICS Centurion program. At 40 °C and 100 % amplitudes, complete inactivation was achieved after 5 minutes of ultrasonic treatment and the highest degree of reduction ( $4,31 \log_{10} \text{CFU ml}^{-1}$ ). The highest increase in free radical concentration was 30 %, at 60 °C and 100 % amplitude, after 10 minutes of treatment. At the same treatment conditions, in 5 minutes the most significant reduction in biofilm production (92.25 %) was achieved. Applied to higher temperatures (60 °C) with ultrasound treatment, cell apoptosis occurs and cells can not be revitalized. A significant role in the inactivation of bacterial cells, apart from the condition of the treatment, has the cavitation effect of ultrasound, creating free radicals.

**Key words:** ultrasound, *Listeria innocua*, cavitation, biofilm, free radicals, degree of reduction, cellular leakage, cell revitalization

**Thesis contains:** 51 pages, 25 pictures, 12 tables, 62 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD. Anet Režek Jambrak, Associate Professor

**Technical support and assistance:** Višnja Stulić, MSc

**Reviewers:**

1. PhD. Višnja Bačun Družina, Full professor
2. PhD. Anet Režek Jambrak, Associate professor
3. PhD. Zoran Herceg, Full professor
4. PhD. Jadranka Frece, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** September 25, 2017

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Definicija ultrazvuka -----	2
2.1.1. Ultrazvučna aparatura .....	2
2.1.2. Podjela ultrazvuka .....	3
2.1.3. Mehanizam rada ultrazvuka .....	3
2.1.4. Kavitacija.....	4
2.1.5. Metode primjene ultrazvuka.....	6
2.2. Ultrazvuk u konzerviranju hrane -----	7
2.2.1. Mehanizam inaktivacije mikroorganizama .....	7
2.2.2. Slobodni radikali .....	8
2.3. Aplikacije u prehrambenoj industriji -----	9
2.4. <i>LISTERIA</i> -----	11
2.4.1. Morfologija, fiziologija i epidemiologija .....	11
2.4.2. <i>Listeria innocua</i> .....	11
2.4.2.1. Struktura genoma .....	12
2.4.2.2. Stanična struktura i metabolizam .....	12
2.5. Biofilm -----	12
2.6. Stanično istjecanje -----	14
2.7. Stanje mirovanja i revitalizacija stanica -----	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	16
3.1. MATERIJALI -----	16
3.1.1. Kemikalije potrebne za pripremu uzorka .....	16
3.1.2. Hranjive podloge za uzgoj bakterijske kulture.....	16
3.1.3. Priprema i čuvanje mikrobne kulture <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090.....	17
3.1.4. Priprema suspenzije mikroorganizama .....	17
3.1.5. Priprema uzorka za tretiranje ultrazvukom .....	17

3.2. METODE	18
3.2.1. Provedba eksperimenta-ultrazvučno tretiranje	18
3.2.2. Određivanje broja stanica	19
3.2.3. Određivanje pH vrijednosti i provodljivosti	20
3.2.4. Određivanje koncentracije slobodnih radikala	20
3.2.5. Izrada baždarnog pravca za određivanje koncentracije slobodnih radikala:	20
3.2.6. Određivanje istjecanja unutarstaničnog sadržaja	21
3.2.7. Određivanje biofilma	21
3.2.8. Određivanje revitalizacije stanica	22
3.2.9. Obrada podataka	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. Utjecaj ultrazvuka na inaktivaciju	23
4.1.1. Rezultati statističke obrade za stopu redukcije	25
4.2. Utjecaj ultrazvuka na pH i provodnost	27
4.2.1. Rezultati statističke obrade za pH vrijednost	28
4.3. Utjecaj ultrazvuka na stvaranje slobodnih radikala	29
4.3.1. Rezultati statističke obrade za slobodne radikale (stvaranje vodikovog peroksida)	31
4.4. Utjecaj ultrazvuka na stanično istjecanje	32
4.4.1. Rezultati statističke obrade za stanično istjecanje (A 260 nm i A 280 nm)	34
4.5. Utjecaj ultrazvuka na stvaranje biofilma	38
4.5.1. Rezultati statističke obrade za biofilm	40
4.6. Revitalizacija stanica nakon ultrazvučnog tretmana	42
4.6.1. Rezultati statističke obrade za revitalizaciju stanica	43
5. ZAKLJUČCI	45
6. LITERATURA	46



# 1.UVOD

Jedna od stalnih težnji znanstvenika je razvitak novih prehrambeno procesnih tehnologija te prehrambenih proizvoda s produljenim vijekom trajanja. Potrošači često zahtijevaju namirnice visoke kvalitete kojima su očuvana sva prirodna organoleptička svojstva, ali i namirnice bez dodataka aditiva i konzervansa. Zbog toga se razvijaju nove tehnologije koje omogućavaju obradu namirnica bez upotrebe toplinske energije prilikom procesiranja kao npr. visoki hidrostatski tlak, pulsno električno polje, magnetsko polje, ultrazvuk, itd. (Ercan i Soysal, 2013; Rastogi, 2011). Danas se nove alternativne tehnike procesiranja kombiniraju s već postojećim u cilju stvaranja hrane bolje kvalitete i niže cijene.

Ultrazvučno tretiranje je prepoznata tehnologija u prehrambenoj industriji kao zamjena ili nadopuna konvencionalne toplinske obrade. Ultrazvuk visoke snage smatra se netermalnom tehnikom procesiranja namirnica. Jako brze lokalizirane promjene u tlaku i temperaturi uzrokuju promjene sila smicanja, kavitaciju, stanjivanje staničnih membrana, lokalizirano zagrijavanje, te produkciju slobodnih radikala; što ima letalan učinak na mikroorganizme (Leighton, 1998; Rastogi, 2011; Sala i sur., 1995; Suslick, 1988).

U ovom radu istražiti će se utjecaj ultrazvuka visoke snage na inaktivaciju bakterije *Listeria innocua* ATCC 33090, istjecanje staničnog materijala tijekom tretiranja, stvaranje slobodnih radikala, postotak stvaranja biofima te revitalizacija stanica nakon tretmana. Cilj rada je utvrditi optimalne uvjete ultrazvučnog tretmana u kombinaciju s toplinskim, pri kojima dolazi do potpune inaktivacije bakterijskih stanica.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Definicija ultrazvuka

Ultrazvučna energija je oblik energije dobiven od zvučnih valova frekvencija koje su previsoke da bi se detektirale ljudskim uhom (Jayasooriya i sur., 2004). To su frekvencije jednake ili više od 20 kHz. U tekućinama ima brzinu oko  $1000 - 1600 \text{ ms}^{-1}$  i ima valnu duljinu raspona od mikrometara do centimetara (Rosenthal i sur., 2004).

Ultrazvučno tretiranje namirnica započelo je 1927. godine kada je objavljen rad "The chemical effects of high frequency sound waves I.A. preliminary survey" (Richards i Loomis, 1927). Spoznali su kako ultrazvučni valovi stvaraju fizikalne, mehaničke ili kemijske učinke koji su sposobni promijeniti svojstva tretiranog materijala (npr. ubrzanje kemijskih reakcija) stvarajući gradijent tlaka i temperature te trenja u mediju unutar kojeg se prostiru (Dolatowski i sur., 2007).

#### 2.1.1. Ultrazvučna aparatura

Ultrazvuk se sastoji od generatora, pretvarača i aplikacijskog sustava. Generator stvara električnu ili mehaničku energiju dok ju pretvarač pretvara u energiju zvuka na ultrazvučnim frekvencijama (Ercan i Soysal, 2013). Tri su glavna tipa pretvarača:

- a.) na tekućinski pogon,
- b.) magnetostriktivni,
- c.) piezoelektrični.

Posljednji se najviše koriste i imaju visoku efikasnost pretvaranja (85-95 %). Oni produciraju akustičnu energiju, proizvedenu od električnih signala u piezokeramičkim materijalima kao olovov cirkonat titanat, barijev titanat i olovov metaniobat (Leadley i Williams, 2006).

#### Metode ultrazvučnih aplikacija:

- 1) direktno apliciranje na proizvod,
- 2) spajanje s uređajem,
- 3) uranjanje u ultrazvučnu kupelj (Ercan i Soysal, 2013).

### 2.1.2. Podjela ultrazvuka

U prehrambenoj industriji ultrazvuk se razlikuje i po generiranoj energiji. Postoji ultrazvuk niske i visoke energije odnosno intenziteta, a razlikuju se prema gustoći energije zvuka ( $\text{W sm}^{-3}$ ), snazi ( $\text{W}$ ) te intenzitetu zvučnih valova ( $\text{Wm}^{-2}$ ) (Ercan i Soysal, 2013).

- UZ niske enegije (niske snage, niskog intenziteta) podrazumijeva frekvencije više od 100 kHz i intenzitete ispod  $1 \text{ Wm}^{-2}$ . Budući da se koriste male snage, učinci ovog tipa ultrazvuka nisu razarajući te ne uzrokuju nikakve promjene u kemijskim ili fizikalnim svojstvima hrane. U prehrambenoj industriji generalno se koristi za analitička ispitivanja fizikalno-kemijskih svojstava hrane (sastav, struktura, tekstura itd.) (Jayasooriya i sur., 2004; Knorr i sur., 2004).

- UZ visoke energije (snage, intenziteta) najčešće čini frekvencije između 18 i 100 kHz te intenzitete više od  $1 \text{ Wm}^{-2}$  (McClements, 1995). UZ visoke snage generalno ovisi o induciranim vibracijskim efektima medija unutar kojeg se širi, što prouzrokuje kavitaciju u tekućinama ili biološkim tkivima. Osim toga, UZ može oslabiti fizikalnu strukturu materijala ili medija, ako su dimenzije medija slične korištenim valnim duljinama ultrazvuka (Got i sur., 1999). Takve snage imaju razarajuća svojstva što se pripisuje fizikalnim, mehaničkim ili kemijskim efektima zvučnih valova (npr. ubrzavanje nekih kemijskih reakcija) (Ercan i Soysal, 2013).

Ultrazvuk se može primjeniti na krute, tekuće i plinovite sustave za različite svrhe.

Može biti potpuno automatiziran proces i činiti brza i precizna mjerenja prilikom procesiranja. Primarna svrha mu je smanjenje vremena procesiranja, štednja energije te povećanje kvalitete proizvoda i trajnosti (Dolatowski i sur., 2007). Prednosti ultrazvuka nad toplinskom obradom uključuju minimizaciju gubitka arome, povećanje homogenosti te značajne uštede energije (Earnshaw i sur., 1995).

### 2.1.3. Mehanizam rada ultrazvuka

Tijekom sonikacije stvaraju se longitudinalni valovi kada zvučni val dođe u kontakt s tekućim medijem. Time se stvaraju regije naizmjenične kompresije i ekspanzije. Ta područja promjene tlaka uzrokuju kavitaciju te stvaranje mjehurića plina. Ti mjehurići imaju veću površinu tijekom ekspanzijskog ciklusa, što povećava difuziju plina, te dovodi do ekspanzije

mjehurića. Kada pružena ultrazvučna energija nije dovoljna kako bi zadržala plinsku fazu u mjehuriću, dolazi do brze kondenzacije. Zatim se kondenzirane molekule burno sudaraju stvarajući „šok valove“, koji stvaraju regije vrlo visokih temperatura i tlakova (dosežu do 5500 °C i 50 MPa). Kavitacija može rezultirati protokom koji može ubrzati prijenos topline i mase (Jayasooriya i sur., 2004; Zheng i Sun, 2006). Sposobnost nastanka kavitacije ultrazvukom ovisi o njegovim karakteristikama (npr. frekvencija, intenzitet), karakteristikama proizvoda (npr. viskoznost, površinska napetost) te uvjetima pri kojima se procesira (temperatura, tlak) (Dolatowski i sur., 2007).

Fundamentalni učinak ultrazvuka u nekom fluidu je stvoriti zvučni tlak ( $P_a$ ) uz hidrostatski tlak koji već djeluje u mediju. Zvučni tlak je sinusoidalan val ovisan o vremenu ( $t$ ), frekvenciji ( $f$ ) i maksimalnom tlaku amplitude vala ( $P_{a,max}$ ) (Muthukumar i sur., 2006), te se može izračunati prema izrazu [1] (Patist i Bates, 2008).

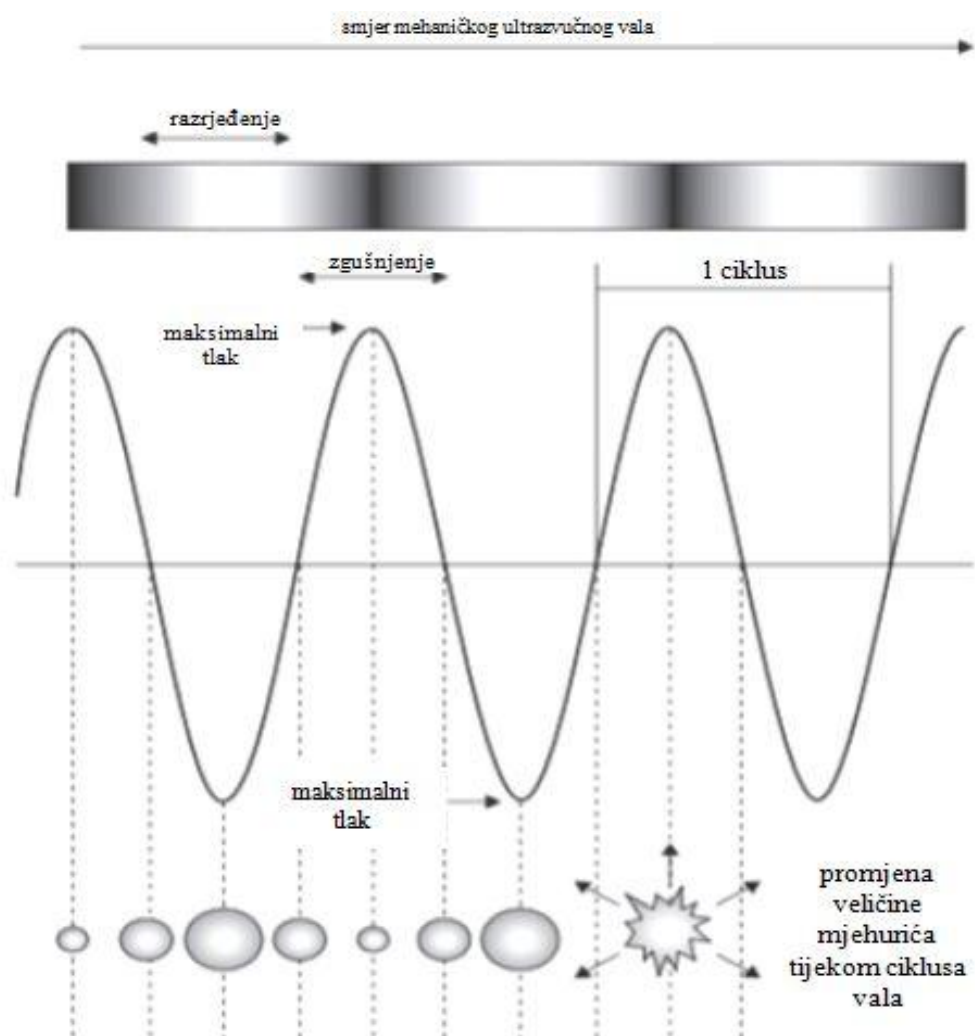
$$P_a = P_{a,max} \sin(2\pi ft) \quad [1]$$

Maksimalni tlak amplitude vala ( $P_{a,max}$ ) je direktno proporcionalan snazi pretvarača. Na manjim intenzitetima (amplitudama), tlak vala inducira kretanje i miješanje unutar fluida, što se zove akustični protok. Pri većim intenzitetima, tlak u ekspanzijskoj fazi ciklusa pada ispod tlaka pare tekućine te tako stvara male mjehuriće koji rastu (nastale od postojećih jezgri plina unutar fluida) (Patist i Bates, 2008). Daljnje povećanje izaziva negativan prijelazan tlak unutar fluida, povećavajući rast mjehurića i stvaranje nove kavitacije zbog napetosti tekuće faze (Mason, 1998). Tijekom kompresijskog ciklusa, mjehurići se smanjuju i njihov sadržaj se absorbira natrag u tekućinu. Ipak, kako je površina mjehurića veća, ne absorbira se cijela parna faza natrag u tekuću pri čemu mjehurići rastu tijekom niza ciklusa. Kad se postigne kritična veličina, oscilacija stijenki mjehurića odgovara primjenjenoj frekvenciji zvučnih valova te mjehurići implodiraju tijekom pojedinačnog kompresijskog ciklusa (Moholkar i sur., 2000). Taj proces zgušnjavanja i razrjeđenja medija i kolapsa mjehurića je poznati fenomen kavitacije, najvažniji učinak ultrazvuka visoke snage (slika 1).

#### 2.1.4. Kavitacija

Pokretačka snaga pri procesiranju sonikacijom je akustična kavitacija. Kavitacija se sama po sebi inače smatra neželjenim problemom jer uzrokuje eroziju na mjestima gdje se

tekućine kreću velikim brzinama po metalnim površinama, npr. cijevi i rotori. Međutim, kad se energija kavitacije iskoristi daje nevjerovatne rezultate. Kavitacijski mjehurići se stvaraju ultrazvučnim valovima koji prolaze tekućinom (Tiwari i Mason, 2012). Kao svaki zvučni val, prenosi se kao serija ciklusa zgušnjavanja i razrjeđivanja pogađajući molekule tekućine. Kad negativni tlak ciklusa razrjeđivanja prevlada privlačne sile između molekula tekućine dolazi do stvaranja praznina. Ta praznina ili kavitacija u strukturi zauzima malu količinu pare iz otopine tako da pri zgušnjavanju neće dolaziti do totalnog kolapsa, nego nastavlja rasti u sljedećim ciklusima kako bi formirala aukustični kavitacijski mjehurić. Takvih mjehurića je više tisuća od kojih su neki vrlo stabilni dok drugi rastu dalje do nestabilne veličine. Dolazi do naglog kolapsa mjehurića pri čemu dolazi do stvaranja lokaliziranih temperatura od 5000 K i tlakova od 50 MPa (slika 1) (Piysena i sur., 2003).



**Slika 1.** Ultrazvučna kavitacija (prema Tiwari i Mason, 2012)

Promjene tlaka nastalih implozijom glavni su mehanizam za disrupciju mikrobnih stanica. Kavitacijski mjehurići stvoreni na ovaj način se dijele na dva tipa:

- stabilna kavitacija su mjehurići koji osciliraju, često nelinearni, oko neke ravnotežne veličine tijekom mnogo ciklusa zvučnog tlaka. Postoje toliko dugo da se zajedno spoje i formiraju veće mjehuriće.
- prijelazna kavitacija, naziva se i inercijska, kod koje mjehurići postoje samo kratki period, nekad i manje od jednog ciklusa, i naglo dožive kolaps (Show i sur., 2007).

#### 2.1.5. Metode primjene ultrazvuka

Ultrazvuk se može koristiti za konzerviranje hrane u kombinaciji s drugim tretmanima kako bi se poboljšala njegova inaktivacijska efikasnost. U mnogim istraživanjima on se kombinira s tlakom, temperaturom ili oboje (Ercan i Soysal, 2013).

1) Ultrasonikacija (US) je primjena ultrazvuka na niskim temperaturama. Stoga se može primijenjivati na proizvodima osjetljivim na toplinu. Međutim, zahtijeva dulje vrijeme obrade kako bi se inaktivirali stabilni enzimi i/ili mikroorganizmi što može uzrokovati veću potrošnju energije. Tijekom procesa obrade, može doći do povišenja temperature ovisno o snazi ultrazvuka i trajanju obrade, te je potrebna kontrola za optimizaciju procesa (Zheng i Sun, 2006).

2) Termosonikacija (TS) je kombinirana metoda primjene ultrazvuka i topline. Proizvod se podvrgava obradi ultrazvukom te se istovremeno zagrijava. Istraživanja su pokazala kako ovakav način obrade daje bolje rezultate inaktivacije nekih mikroorganizama nego sam ultrazvuk (Ercan i Soysal, 2013). Kada se termosonikacija koristi za konzerviranje ili sterilizaciju potrebne su niže temperature i vremena procesiranja kako bi se postigao isti stupanj inhibicije u usporedbi s konvencionalnim metodama (Mason i sur., 1996).

3) Manosonikacijom (MS) se kombiniraju ultrazvuk i tlak. Dokazano inaktivira enzime i/ili mikroorganizme upotrebom umjerenih tlakova na niskim temperaturama. Ima veću efikasnost nego sam ultrazvuk na istoj temperaturi (Ercan i Soysal, 2013).

4) Manotermosonikacija (MTS) kombinira toplinu, ultrazvuk i tlak. Inaktivira određene enzime na nižim temperaturama i/ili u kraćem vremenskom razdoblju nego toplinski

tretmani na istim temperaturama (Chemat i sur., 2011). Primjenjena temperatura i tlak povećava kavitaciju i imploziju mjehurića u mediju što povećava stupanj inaktivacije, zbog čega se ova metoda može primjenjivati za inaktivaciju mikroorganizama koji imaju visoku toplinsku toleranciju kao i termorezistentnih enzima, kao što su: lipooksigenaza, peroksidaza i polifenoloksidaza (Manas i sur., 2006).

## **2.2. Ultrazvuk u konzerviranju hrane**

### **2.2.1. Mehanizam inaktivacije mikroorganizama**

Termalna inaktivacija (npr. pasterizacija na visokim temperaturama) je uobičajena metoda za inaktivaciju bakterija u namirnicama, no često ima negativne posljedice koje se očituju u gubitku nutrijenata hrane ili formiranju neželjenih okusa (Dolatowski i sur., 2007). Mehanizam inaktivacije mikroorganizama ultrazvukom objašnjava se fenomenom kavitacije koja uzrokuje promjene u tlaku (Ercan i Soysal, 2013; Piysena i sur., 2003; Dolatowski i sur., 2007). Earnshaw (1998), objašnjava kako ekstremno brza stvaranja i razaranja mjehurića stvorenih ultrazvučnim valovima u mediju, dovode do nastanka antimikrobnog učinka. Tijekom kavitacije, lokalizirane promjene u tlaku i temperaturi uzrokuju razaranje staničnih stijenki i staničnih membrana, te oštećenja DNA molekula stvaranjem slobodnih radikala (Dolatowski i sur., 2007; Sala i sur., 1995). Zapravo, važan kriterij za učinkovitost tretmana ultrazvukom je vrsta bakterije, budući da različiti mikroorganizmi imaju različite strukture staničnih membrana. Tako Gram-negativne i Gram-pozitivne bakterije ne pokazuju isto ponašanje tijekom tretiranja ultrazvukom jer nemaju iste strukture staničnih membrana. Gram-pozitivne bakterije imaju deblju staničnu stijenku bez membrane, dok Gram-negativne imaju tanju stijenku s vanjskom staničnom membranom. Istraživanja su pokazala kako su Gram-negativne bakterije osjetljivije na inaktivaciju ultrazvukom nego gram-pozitivne (Ercan i Soysal, 2013).

Učinak inaktivacije će također ovisiti o primjenjenom intenzitetu i frekvenciji ultrazvuka. Frekvencije 20-60 kHz povećavaju efekt ultrazvuka na mikroorganizme (Wordon i sur., 2011), zbog čega se koristi ultrazvuk visoke snage.

Sama efektivnost mikrobiološke inaktivacije ovisna je o amplitudi ultrazvučnih valova, vremenu izlaganja/kontakta, volumenu hrane koja se procesira te strukturi hrane i uvjetima tretmana (Ercan i Soysal, 2013).

Korištenjem većih amplituda primijećena je veća inaktivacija što je najvjerojatnije posljedica nastajanja većeg broja kavitacijskih mjehurića po jedinici vremena ili povećanja volumena tekućine za što je odgovorna kavitacija (Suslick, 1988).

Svi ti faktori mogu uzrokovati modifikaciju sekundarne i tercijarne strukture proteina zbog razaranja vodikovih ili Van der Waalsovih privlačnih sila u polipeptidnim lancima, što rezultira gubitkom aktivnosti mnogih enzima. Ekstremni tlakovi i temperature također dovode do homolitičkog cijepanja molekula vode stvarajući intermedijarne produkte visoke energije poput hidroksilnih i vodikovih slobodnih radikala. Oni mogu reagirati s nekim ostacima aminokiselina koji uspostavljaju stabilnost enzima, vežu supstrat ili imaju katalitičku funkciju što dovodi do značajne promjene biološke aktivnosti enzima (Feng i sur., 2011).

### 2.2.2. Slobodni radikali

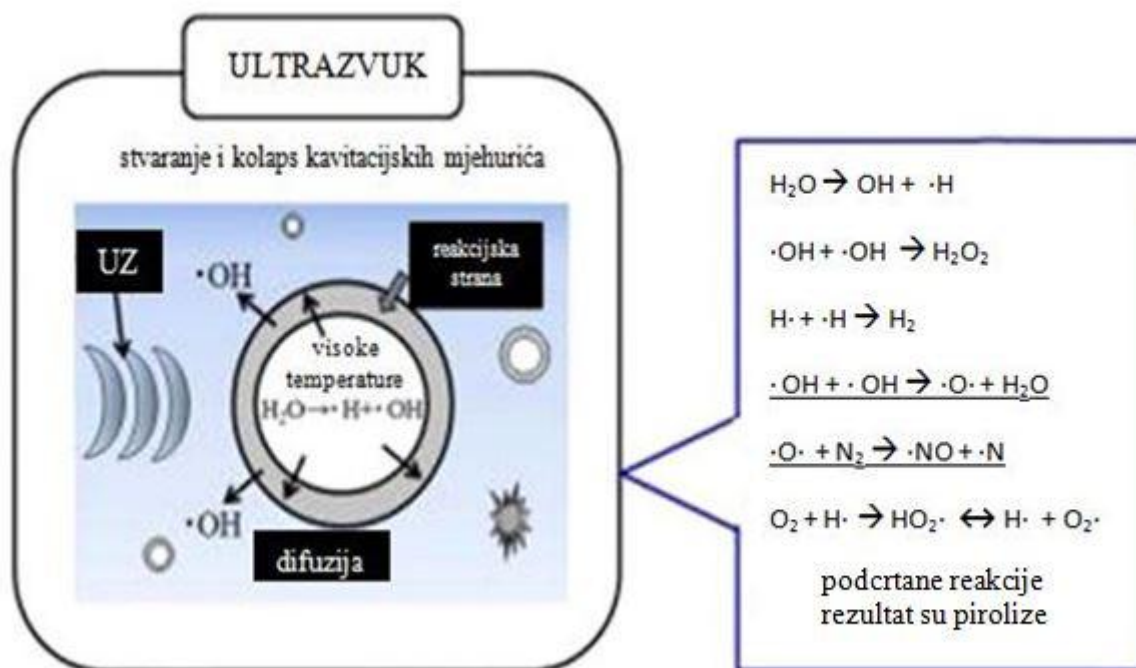
Prilikom kavitacije, molekule vode se mogu raspasti pritom stvarajući radikale, koji intenziviraju kemijske reakcije, induciraju umrežavanje proteinskih molekula u vodenom mediju (Ashokkumar i sur., 2008; Awad i sur., 2012) te pojačavaju stopu reakcija prijenosa mase zbog generacije lokalne turbulencije i tekućih mikro-cirkulacija (Gogate i Pandit, 2011).

Hidroksidni radikali ( $\text{OH}^\ominus$ ) i vodikovi atomi (slika 2) se generiraju iz disociranih molekula vode u vodenim otopinama kao rezultat visokih temperatura i tlaka koje nastaju od mjehurića plina koji puca tijekom kavitacijskog procesa (sonoliza) (Awad i sur., 2012).

Također, dokazano je kako slobodni radikali kao rezultat kavitacije nastaju i u ne vodenim otopinama i polimerima. Međutim, kavitacija bolje nastaje u vodenim nego u drugim organskim medijima. Tvorba slobodnih radikala pri tretiranju ultrazvukom može i ne mora biti korisna (Earnshaw, 1998). Kako slobodni radikali mogu uzrokovati oksidativnu štetu, tretiranje ultrazvukom se ne provodi kod očuvanja fenola, ali može poboljšati antioksidacijsku efikasnost kod flavonoida (Ashokkumar i sur., 2008). U izvedbama gdje slobodni radikali imaju štetan utjecaj, preferira se upotreba ultrazvuka visokih frekvencija jer je smanjen broj mjehurića kao i nastanka slobodnih radikala (Awad i sur., 2012).



Tvorba slobodnih radikala inducirana ultrazvukom nastaje zbog sonokemijske reakcije, koja se može zbivati u tri različite regije. Prva je visoko temperaturna regija mjehurića plina pri kolapsu. Druga je na granici regija između tekućeg medija i vruće plinovite faze mjehurića kojeg okružuje. Ovdje povećanje hidrofobnosti otopine rezultira većim nastankom termalnih raspadnih produkata. Treća regija je glavnina otopine na sobnoj temperaturi, gdje su slobodni radikali formirani u kavitacijskom mjehuriću koji nisu izbačeni u međugraničnu regiju te reagiraju s organskim otopljenim tvarima čime doprinose stvaranju slobodnih radikala (Rehman i sur., 2016).



**Slika 2.** Stvaranje slobodnih radikala kao posljedica ultrazvučne kavitacije (prema Rehman i sur., 2016)

### 2.3. Aplikacije u prehrambenoj industriji

Ultrazvuk se počeo istraživati u procesiranju namirnica u počecima Drugog svjetskog rata, primijenjući različite tehnologije kao što je emulzifikacija i površinsko čišćenje. Do 1960-ih ultrazvuk se koristio u čišćenju i zavarivanju plastike (Mason, 2003).

Danas se u prehrambenoj industriji ultrazvuk niskog intenziteta koristi pri određivanju strukture namirnica te nadgledanju sastava hrane tijekom procesiranja. Uređaji se mogu potpuno automatizirati i ostvariti brza i precizna mjerenja, koja su sama po sebi nedestruktivna te se mogu adaptirati *on-line* (McClements, 1995). Primjeri takvih nedestruktivnih tehnika su pronalaženje stranih tijela u hrani, analiza veličina kapljica u emulzijama jestivih ulja i masti te određivanje stupnja kristalizacije dispergiranih kapljica u emulzijama (Mason i sur., 1996).

Osnova ultrazvučnih analiza je veza između mjerljivih ultrazvučnih svojstava hrane (brzina, koeficijent prigušenja te otpora) i njihovih fizikalno-kemijskih svojstava (sastav, struktura i agregatno stanje). Ovaj se odnos može ustanoviti empirijskom izradom kalibracijske krivulje gdje se ispitivano svojstvo mjerenja stavlja u odnos s izmjerenom ultrazvučnom snagom (intenzitetom), ili teoretski koristeći jednadžbe kojima se opisuje širenje ultrazvučnih valova kroz materijale (McClements, 1995).

Može se pratiti stupanj homogenizacije mliječne masti u mlijeku mjereći prigušenje ultrazvučnih pulseva te određivanje duljine stabilnosti voćnih sokova i emulzija (majoneza) (Mason, 1996).

Međutim, najznačajnija i najdugotrajnija industrijska primjena je ultrazvučno čišćenje koje dokazano ima jako visoku učinkovitost (Mason i sur., 1996). Površinsko čišćenje je primjenjivo na gotovo svaki dio u procesiranju (senzori, filteri, supstrati, reaktori, izmjenivači topline), te je efikasan u „in situ“ čišćenju skupa s kemijskim čišćenjem što pruža prednosti (redukcija kemikalija, direktnog kontakta radnika s opasnim sredstvima, poboljšanje učinka čišćenja, automatizacija, ušteda energije, itd.) (Mason, 2003).

Osim toga, našao je primjenu u biokemiji, gdje se ultrazvučna snaga koristi ili pri inhibiranju enzima ili aktivaciji imobiliziranih enzima. Također, važna primjena ultrazvuka je prilikom ekstrakcije organskih spojeva iz biljaka i sjemenki jer mehanički efekti ultrazvuka osiguravaju jaču penetraciju otapala u stanične materijale te poboljšavaju prijenos mase. Iznimno je koristan i u procesima kristalizacije, jer značajno doprinosi u inicijaciji stvaranja cenatara kristalizacije (Mason, 1996). Nadalje, koristi se pri filtraciji, akustičnom sušenju na nižim temperaturama nego kod konvencionalnih metoda (Ensminger, 1988), zamrzavanju gdje se stvaraju manji kristali leda (Zheng i Sun, 2006), te kod oksidacije nezasićenih ulja, starenja alkoholnih pića, dekalifikacije kosti, hidrolize estera itd. (McClements, 1995).

## 2.4. LISTERIA

### 2.4.1. Morfologija, fiziologija i epidemiologija

Rod *Listeria* uključuje 15 vrsta: *L.monocytogenes*, *L.innocua*, *L.seeligeri*, *L.welshimeri*, *L.ivanovii*, *L.grayi*, *L.marthii*, *L.rocourtiae*, *L.leichmannii*, *L.weihenstephanensis*, *L.floridensis*, *L.aquatic*, *L.cornellensis*, *L.riparia* i *L.grandensis* (Meloni, 2014). Samo *L. monocytogenes* i *L.ivanovii* pripadaju patogenim vrstama, iako je *L.ivanovii* striktno animalni patogen (Mead i sur., 1999). *L. monocytogenes* je katalaza pozitivna, oksidaza negativna i može rasti u aerobnim i anaerobnim uvjetima u temperaturnom rasponu od 0,4 °C do 45 °C (Junttila i sur., 1988). Optimalne temperature rasta su joj u rasponu od 30 do 37 °C. Može rasti u širokom pH spektru (4,0 – 9,6) s optimumom oko 6-8 i aktivitetu vode ( $a_w$ ) od čak 0,90 (Farber i sur., 1992). Ona je etiološki agens nastanka listerioze, bolesti u čovjeka s različitim simptomima od gastroenteritisa praćenog visokom temperaturom koji se javlja u zdravih osoba (Piana i sur., 2005), do nekih invazivnih poput abortusa, sepse i meningoencefalitisa u osoba rizičnih skupina, poput mladih, starih, trudnica te imunokompromitiranih ljudi (Mackiw i sur., 2016).

Listerioza je značajna bolest u Europi, to je četvrta najčešća zoonoza. U 2013. EU je zabilježila stopu od 0,44 slučaja na 100,000 stanovnika i 1763 potvrđenih ljudskih slučajeva, ponajviše otrovanja u kućanstvu (EFSA, 2015). Povećanje u odnosu na 2012. godinu iznosi 7,3 %. Listerioza ima najveći postotak hospitalizacije od svih zoonoza u EU (EFSA, 2015).

### 2.4.2. *Listeria innocua*

**KLASIFIKACIJA:** *Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Listeriaceae; Listeria*

**VRSTA:** *Listeria innocua*

*L.innocua* je jedna od vrsti roda *Listeria*. Široko je rasprostranjena u okolišu (tlo) i izvorima hrane. Može preživjeti u ekstremnim pH vrijednostima i temperaturama, te visokim koncentracijama soli (Buchrieser i sur., 2003). To je gram pozitivna bakterija štapičastog oblika, nesporogena. Može živjeti individualno ili organizirana u lance s drugim *L.innocua* bakterijama. Mezofilna je, s optimalnim temperaturama rasta od 30 do 37 °C. *L.innocua*

uvelike podsjeća na drugu članicu svoje obitelji, patogenu *L.monocytogenes* (Buchrieser i sur., 2003). *L.innocua* je izolirana iz mesa površinskom adhezijskom imunofluorescijom. Vrlo je značajna bakterija jer je jako slična patogenoj *L.monocytogenes*, ali sama nije patogena (Blair i sur., 1997).

#### 2.4.2.1. Struktura genoma

*L.innocua* ima kružni komosom sačinjen od 3,011.209 parova baza, s 37 % G + C baza. U *L.innocui* otkriveno je 2,973 gena koji kodiraju, dok 37 % gena nema kodirajuću funkciju (Glaser i sur., 2001). Genom sadrži gene koji kodiraju za velik broj regulatornih, površinskih i transportnih proteina, što objašnjava dobro prilagođavanje vrsta *Listeria* na različite okolišne uvjete. *L.innocua* nema 10-kb virulentan lokus, grupu gena koji izaziva patogenost u *L.monocytogenes* (Buchrieser i sur., 2003). To objašnjava zašto ona ne inficira ljude ili životinje. Također, genom joj sadrži kružni plazmid od 81,905 parova baza čija je funkcija nepoznata (Glaser i sur., 2001).

#### 2.4.2.2. Stanična struktura i metabolizam

*L.innocua* kao Gram-pozitivna bakterija ima deblju staničnu stijeku te dobru zaštitnu barijeru. Pokretna je zahvaljujući flagelama i pilima. Ima kompleksan metabolizam. Može metabolizirati metan, sumpor i dušik, te puno drugih organskih i anorganskih spojeva. Provodi niz različitih biosintetskih puteva, uključujući sintezu peptidoglikana. *L.innocua* je fakultativni anaerob, zbog čega može metabolizirati glukozu (i ostale jednostavne šećere) i u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Pri aerobnim uvjetima metabolizma glukoze *L.innocua* stvara mliječnu i octenu kiselinu. Međutim, u anaerobnim uvjetima producira samo mliječnu kiselinu (Brooks i sur., 1989).

## 2.5. Biofilm

Pojam biofilm u suštini opisuje sesilnu zajednicu mikrobioloških organizama, koje su povezane adhezijom na biotičke ili abiotičke površine, sa stalnom produkcijom ekstracelularnih polimernih substanci (Nikolaev i Plakunov, 2007). Osim što su povezani na površini, mikroorganizmi su okruženi jedni drugima, i svojim djelovanjem omogućavaju brži rast i razvoj zajednice (Donolan i Costerton 2002). U prirodi i hrani, mikroorganizmi se vežu

na čvrste površine i primarno su lagano vezani za njih. Kasnije se vežu snažnije, te rastu i aktivno se multipliciraju kako bi formirali kolonije stanica. Tada te mase stanica postaju dovoljno velike kako bi uhvatile organske i anorganske ostatke i druge mikroorganizme što dovodi do stvaranja mikrobioloških biofilмова. Takav biofilm može biti nekoliko mikrometara do nekoliko milimetara debljine i sadrži 90 – 97 % vode (Sutherland i sur., 2004). Biofilmovi mogu biti sastavljeni od jedne vrste ili od više vrsta mikroorganizama, koji mogu biti uzročnici kvarenja hrane i/ili patogeni.

U suštini, formiranje biofilma ovisi o morfologiji same površine kao što su kemijski, topografski, fizikalno-kemijski, okolišni faktori (pH, dostupnost nutrijenata, temperatura, dinamika fluida) te mikrobiološki faktori (gram negativna/pozitivna bakterija, oblik, struktura, molekularna kompozicija, vrsta, faza rasta, starost, postojanje flagela, pila, kapsula ili egzopolimernih supstanci) (Campoccia i sur., 2013). U slučaju *Listerie*, elektrostatski naboj stanične stijenke (peptidoglikanske tehoične kiseline) i hidrofobne površine stanice (zbog prisutnosti mliječne kiseline) daje mogućnost vezanja i na nehrđajući čelik (Briandet i sur., 1999).

Međutim, tvorba biofilma nastaje u koracima i ona je dinamičan proces koji uključuje: i) inicijalno vezanje, ii) ireverzibilno vezanje, iii) tvorbu mikrokolonija, iv) sazrijevanje, v) dispreziju (raspršivanje).

Prva faza vezanja odvija se slabim elektrostatskim i van der Waalsovima vezama i događa se brzo, ali u kratkom vremenu počinje rast filma, s fizičkim vezanjem stanica na površinu pomoću polisaharidnog kompleksa. Tijekom ove faze bakterije se mogu lagano ukloniti. U sljedećoj fazi dolazi do ireverzibilnog vezanja stanica. Direktni kontakt između stanica i površine je olakšan produkcijom površinskih tvorevina bakterija (flagele, pili, fimbrije) i egzopolisaharidnih fibrila. U ovoj fazi uklanjanje stanica zahtijeva puno jače sile. Ireverzibilno vezane bakterije rastu i dijele se, dovodeći do stvaranja bakterijskih mikrokolonija. To je treća faza tijekom koje vezane stanice proizvode dodatne egzopolisaharide koji pomažu pričvršćivanju stanica na površinu.

Sazrijevanje biofilma je korak u kojem nastaje organizirana struktura koja može biti ravna ili oblika gljive, ovisno o izvorima dostupnih nutrijenata. Disperzija je zadnja faza u ciklusu nastajanja biofilma, u kojoj se vezane bakterije oslobađaju. To je zapravo aktivni proces koji dozvoljava bakterijsku kolonizaciju novih niša (Ciccio i sur., 2015).

Bakterijskim stanicama stvaranje biofilma daje brojne prednosti:

- a) štiti ih od stresnih ili štetnih okolišnih uvjeta pružajući im određeni stupanj zaštite i održavanja homeostaze,
- b) kompeticija za prisvajanje dostupnih nutrijenata u ograničenim područjima,
- c) koristi od metaboličkih interakcija između mikrobnih vrsta od komensalizma, kooperacije do simbioze,
- d) transfera gena što dovodi do stvaranja novih otpornijih i adaptivnijih fenotipova (Davey i O'Toole, 2000).

## 2.6. Stanično istjecanje

Stanicu štiti polupropusna membrana koja se sastoji od fosfolipidnog dvosloja (proteinsko – lipidnog dvosloja, sačinjenog od hidrofobnih lipida i hidrofilnih fosfornih molekula s ugrađenim proteinskim molekulama). Ona stvara barijeru između citoplazme i ekstracelularnog okoliša. Prokariotske i biljne stanice su još okružene i staničnom stijenkom. Unutrašnjost eukariotskih stanica čine organeli, jezgra, mitohondrij, te su stabilizirani citoskeletom. Prilikom lize stanice, dolazi do uništavanja stanične stijenke, odnosno membrane, te istjecanja staničnog sadržaja (proteini, nukleinske kiseline itd.) uslijed djelovanja vanjskih čimbenika koji remete normalne životne funkcije stanice kao što su kemijski i fizikalni agensi te enzimi (Balasundaram i sur., 2009).

## 2.7. Stanje mirovanja i revitalizacija stanica

Još od 1982. godine poznato je kako veliki broj patogenih i nepatogenih bakterija mogu ući u fazu mirovanja, fenomen poznat kao vijabilne ali nekulturable stanice (*engl. viable but nonculturable, VBNC state*) koji ima značaj u medicini, bioremedijaciji, te u većini mikrobioloških istraživanja (Oliver, 2005). Bakterijske kolonije u fazi VBNC neće narasti na uobičajenoj podlozi ili mediju na kojem bi pri normalnim uvjetima rastle, ali su žive i sposobne obnoviti svoje metaboličke aktivnosti (Oliver, 2005). Stanice u toj fazi pokazuju jako nisku metaboličku aktivnost: dolazi do redukcije u prijenosu nutrijenata i stope respiracije kao i sinteze makromolekula (Porter i sur., 1995). Međutim, ne prekida se

biosinteza te se sintetiziraju određeni proteini rezistentcije, i dalje je kontinuirana ekspresija gena, te dolazi do promjena u staničnoj strukturi uz biokemijske promjene stanične stijenke i veću autolitičku sposobnost stanice. Kada stanice izađu iz ove faze, te kada ponovno nastupe povoljni uvjeti, one se mogu nastaviti dijeliti. Ulazak u stanje VBNC, posljedica je staničnog odgovora na neke oblike stresa, kao što je gladovanje, inkubacija izvan optimalne temperature rasta, povišen osmotski tlak, neadekvatna koncentracija kisika, izlaganje bijeloj svjetlosti itd. Ovakvi okolišni uvjeti mogu biti letalni ukoliko stanica ne uđe u fazu mirovanja. Broj bakterijskih vrsta koje mogu ući u ovu fazu neprekidno raste, te se smatra da ih postoji oko 60-ak, koje uključuju i velik broj ljudskih patogena kao npr. *Campylobacter spp.*, *E.coli*, *Listeria monocytogenes* (Oliver, 2005).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Kemikalije potrebne za pripremu uzorka

Za pripremu uzorka koristi se fosfatni pufer (PBS) sastavljen od 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,62 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  te 0,24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Mase tih soli otope se u 900 mL destilirane vode, te se pH vrijednost podesi dodatkom HCl kiseline do pH 7. Volumen se nadopuni do 1000 mL. Pripremljena otopina se autoklavira pri 121 °C/15 minuta („Sutjeska“, model 200-189).

Za pripremu otopine natrijevog nitrata 0,01 M  $\text{NaNO}_3$  odvažuje se 8,4 g  $\text{NaNO}_3$  (Kemika, Zagreb) te otopi u 1000 mL destilirane vode, nakon čega se otopina sterilizira pri 121 °C/15 minuta („Sutjeska“, model 200-189).

Za pripremu titan reagensa ( $\text{TiO}_2$ ) na tehničkoj vagi odvažuje se 1 g titanij praha, tj. titan (IV) oksida (Sigma Aldrich, CAS: 13463-67-7) u 100 mL pipetirane vruće sumporne kiseline (1:1). Reakcijska smjesa se zatim zagrijava na oko 190 °C i miješa kroz 20 h. Titanij je otopljen kada inicijalno bijela otopina postane prozirna, te kad se sav otopi, reagens otopina se hladi na sobnu temperaturu i razrijedi na volumen od 500 mL destiliranom vodom. Reagens otopina skladišti se u hladnjaku na + 4 °C.

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

Koristi se hranjiva podloga Nutrient bujon/agar (Biolife, Milan, Italija). Za pripremu 1000 mL Nutrient bujona odvažuje se 13 g dehidrirane podloge koja se zatim otopi u 1000 mL destilirane vode.

Za pripremu 1000 mL Nutrient bujona odvažuje se 13 g dehidrirane podloge te 10 g tehničkog agara (Biolife, Milan, Italija) kako bi podloga ostala u čvrstoj fazi pri temperaturi inkubacije.

Pripremljene podloge se steriliziraju u autoklavu pri 121 °C/15 minuta („Sutjeska“, model 200-189). Zatim se podloge, u laminaru (Klimaoprema) aseptično u struju zraka, sterilno razliju u Petrijeve zdjelice kako bi se spriječila kontaminacija podloga. Tako razlivene podloge uz poluotvorene poklopce, suše se u struji zraka u laminaru.



Puferirana peptonska voda (Bolife, Milan, Italija) koristi se kao hranjivi bujon za nacijspljivanje stanica nakon tretmana. Za 1000 mL PBS-a na tehničkoj vagi odvaži se 20 g dehidrirane podloge koja se otopi u 1000 mL destilirane vode. Pripremljeni bujon autoklavira se pri 121 °C/15 minuta te se čuva u hladnjaku na + 4 ° C.

### 3.1.3. Priprema i čuvanje mikrobne kulture *Listeria innocua* ATCC 33090

Bakterijska kultura čuva se u 50 %-tnom glicerolu u zamrzivaču pri temperaturi od -20°C. Za uzgoj bakterijske kulture uzima se volumen od 10 µL suspenzije kulture mikroorganizma te se precijepi, aseptično u laminaru, u plastičnu epruvetu u kojoj je 10 mL hranjive podloge Nutrient bujona (Bioflife, Milan, Italija). Zatim se plastična epruveta s kulturom inkubira u termostatu („Bodalec i Bodalec“, model EBT) pri 37 °C u vremenskom periodu od 24 h.

### 3.1.4. Priprema suspenzije mikroorganizama

Nakon inkubacije u termostatu, suspenzija bakterijske kulture se centrifugira (Hettich, Rotofic 32) pri 4000 RM/10 min. Supernatant se odlije te se u uzorak biomase bakterije pipetira 10 mL fosfatnog pufera (PBS). Uzorak se u plastičnoj epruveti homogenizira na vorteksu (IKA, Vortex 4 basic; BV), a centrifugiranje se ponavlja tri puta.

### 3.1.5. Priprema uzorka za tretiranje ultrazvukom

Ukupni tretirani volumen iznosi 200 mL. Uzorak se priprema tako da se u laboratorijsku čašu od 500 mL ulije 190 mL 0,01 M NaNO<sub>3</sub>. Prije ultrazvučnog tretmana, u kontroliranu zagrijanu vodenu kupelj stavlja se staklena čaša, te se temperira dok se ne postigne zadana temperatura (40 ili 60 °C) na kojoj se eksperiment provodi. Nakon toga se u laboratorijsku čašu dodaje 10 mL pripremljene suspenzije bakterijske kulture. Temperatura se kontrolira pomoću infracrvenog termometra (PCE-777, PCE-Instruments).

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Provedba eksperimenta-ultrazvučno tretiranje

Tretiranje ultrazvukom visoke snage provodi se ultrazvučnim procesorom model S-4000 (MisonixSonicators, Newtown, Connecticut, SAD) (Slika 3).



**Slika 3.** 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 steriliziraju alkoholom, pa isperu destiliranom vodom. Prije tretiranja, na zaslonu uređaja podese se parametri provedbe eksperimenta (vrijeme trajanja i amplituda ultrazvuka). Ultrazvučna sonda frekvencije 20 kHz, promjera 127 mm uranja se u staklenu čašu s uzorkom u mediju do malo više od polovice volumena. Termočlanak je priključen na ultrazvučni procesor i uronjen u čašu s uzorkom radi praćenja temperature. Pritiskom na *display* započinje ultrazvučni tretman, a temperatura se bilježi svakih 30 sekundi. Kako bi se održala željena temperatura uzorka pri tretmanu (u intervalu  $\pm 3$  °C), staklena čaša s uzorkom uranja se u plastičnu posudu s vodom i/ili ledom. Potrebno je održavati stalnu zadanu temperaturu tijekom tretmana, kako bi rezultati odgovarali utjecaju ultrazvučnog tretiranja na uzorak, a ne temperature. Nakon tretmana, plastičnom špricom uzima se 5 mL uzorka potrebnog za analize. Sterilizacija sonde i termočlanka provodi se prije svakog tretmana.

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

<b>UZORAK</b>	<b>amplituda</b>	<b>vrijeme tretmana</b>	<b>temperatura</b>
	<b>%</b>	<b>(min)</b>	<b>(°C)</b>
<b>A0</b>	/	5/10	40
<b>A0A</b>	/	5/10	60
<b>A1</b>	100	5	60
<b>A2</b>	100	5	40
<b>A3</b>	75	5	60
<b>A4</b>	75	10	40
<b>A5</b>	100	10	60
<b>A6</b>	75	5	40
<b>A7</b>	100	10	40
<b>A8</b>	75	10	60

Uzorci A0 i A0A (tablica 1) nisu tretirani ultrazvukom, već samo toplinom u vodenoj kupelji na određenim temperaturama (40 °C i 60 °C) tijekom 5, odnosno 10 minuta. Nakon zagrijavanja uzroci se izuzimaju špricom za daljnje analize, kao i nakon tretmana ultrazvukom. Na uzorcima A1-A8 (tablica 1) provodi se zagrijavanje na određenoj temperaturi, te nakon toga podvrgava ultrazvučnom tretmanu određeno vrijeme i na određenoj amplitudi.

### 3.2.2. Određivanje broja stanica

Ukupni broj stanica određuje se prije i nakon tretmana ultrazvukom kako bi se odredio stupanj redukcije (razlika broja stanica prije i nakon tretmana). Volumen od 10 µL uzorka nacijepi se u 90 µL PBS-a te se napravi serija razrijeđenja (do -6). Pripremljena razrijeđenja

se nacijepljuju u triplikatu na hranjivu podlogu na kojoj se uzorak štapićem po Drygalskom razmaže kružnim pokretima po ploči. Nakon inkubacije (24h) izbroje se narasle kolonije na pločama, i to one koje imaju broj poraslih kolonija između 10 i 300. Određuje se srednja vrijednost za svako razrijeđenje, a ukupni broj se izražava kao logaritam broja stanica ( $\log_{10}$  CFU mL<sup>-1</sup>).

Formula [2] za izračun broja stanica:

$$\text{CFU} = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{upotrebljeni volumen uzorka}} \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razrijeđenja} \quad [2]$$

### 3.2.3. Određivanje pH vrijednosti i provodljivosti

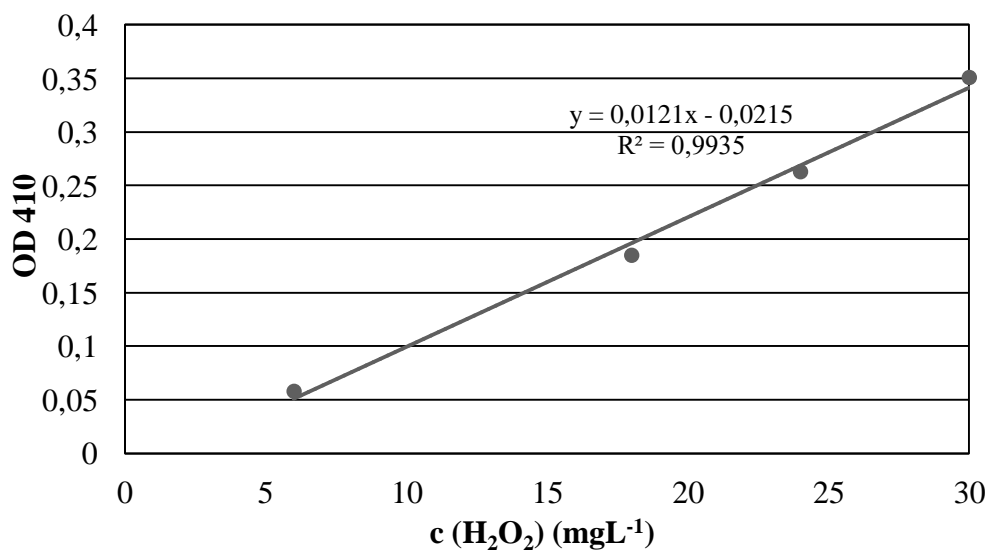
Mjerenje pH-vrijednosti i provodljivosti provodi se na digitalnom pH-metru (pH 340i/SET, WTW, Weilheim, Germany) u netretiranim i tretiranim uzorcima.

### 3.2.4. Određivanje koncentracije slobodnih radikala

Metoda određivanja se bazira na promjeni boje dodatkom titan reagensa (TiO<sub>2</sub>) iz prozirne u žutu. Koncentracija slobodnih radikala u uzorku određuje se spektrofotometrijski pri 410 nm tako da se 1 mL pripremljenog titan reagensa pomiješa s 2 mL uzorka, izmjeri apsorbancija, te se preko izrađenog baždarnog dijagrama ovisnosti apsorbancije o koncentraciji vodikovog peroksida, očita koncentracija slobodnih radikala u uzorku.

### 3.2.5. Izrada baždarnog pravca za određivanje koncentracije slobodnih radikala:

Volumen 1 mL točno zadane koncentracije vodikovog peroksida (Sigma Aldrich) otpipetira se u 2 mL titan reagensu te se pri 410 nm odredi apsorbancija za svaku pojedinu koncentraciju. Iz dobivenih podataka odredi se baždarni pravac (slika 4) iz kojeg se izračuna jednadžba pravca ovisnosti apsorbancije o koncentraciji vodikovog peroksida, prema kojoj se računa koncentracija slobodnih radikala u uzorcima.



**Slika 4.** Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 3.2.6. Određivanje istjecanja unutarstaničnog sadržaja

Pri određivanju istjecanja unutarstaničnog sadržaja mjeri se količina staničnih makromolekula, nukleinskih kiselina i proteina, koje su zaostale na porama filtra ukoliko je došlo do poracije, tj. apoptoze stanica tijekom tretmana. Volumen od 3 mL uzorka filtrira se kroz CHROMAGIL Xtra PTFE-20/25 filtar (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Duren, Germany) s 0,25 µm veličine pora. U dobivenom filtratu se zatim mjeri apsorbancija pri 260 nm i 280 nm.

### 3.2.7. Određivanje biofilma

Metoda određivanja je spektrofotometrijska metoda te se bazira na kristal violetnom obojenju. Svaki od uzoraka volumena 200 µL nacijepljuje se u jažice *multiwell* ploče (TPP 92012, Švicarska) te se pipetira volumen od 2 mL hranjivog nutrient bujona u svaku nacijepljenu jažicu. Nacijepljuju se i kontrolne jažice u koje se ne dodaje uzorak, nego samo hranjivi bujon. Tako nacijepljena *multiwell* ploča inkubira se u termostatu (EBT – Termomedicinski aparati, Bodalec i Havočić, Hrvatska), tijekom koje dolazi do adhezije stanica za podlogu. Nakon 4 h inkubacije, uklanja se supernatant iz jažica te se jažice ispiru s 2 mL PBS-a. Potom se u svaku jažicu dodaje 2 mL hranjivog nutrient bujona, te se ploče inkubiraju tijekom 48 h kako bi se formirao biofilm.

Nakon 48 h provodi se kvantifikacija biofilma kristal violet testom. Prvo se uklanja supernatant iz jažica, zatim slijedi ispiranje fosfatnim puferom. Za fiksiranje biofilma u jažice, dodaje se 2 mL 99 %-tnog metanola kroz 15 minuta. Metanol se zatim uklanja, jažice se posuše te se dodaje 2 mL boje kristal violet kroz 20 minuta. Slijedi ispiranje destiliranom vodom i to tri puta. Nakon toga se u digestoru u svaku jažicu dodaje 2 mL 33 %-tne octene kiseline, kako bi se odvojile sve stanice s površine jažica. Apsorbancija se mjeri pri 590 nm na spektrofotometru UV UNICAM HELIOS β. Analize biofilma provode se u paraleli.

### 3.2.8. Određivanje revitalizacije stanica

Postupak određivanja revitalizacije stanica provodi se samo za uzorke koji su prošli tretman ultrazvukom. Nakon tretmana izuzima se 1 mL uzoraka te se nacijepkuje u 9 mL puferirane peptonske vode, nakon čega se uzorci inkubiraju u termostatu 24 h. Broj revitaliziranih stanica (stanica kod kojih tijekom tretmana nije došlo do apoptoze) određuje se metodom nacijepkivanja serija razrijeđenja na hranjive podloge. Iz inkubiranih uzorka pipetira se 10 μL u 90 μL PBS-a te se radi serija razrijeđenja (do - 6), nakon čega se vrši nacijepkivanje na podloge u laminaru (Klimaoprema), na isti način kao i kod određivanja broja stanica. Nacijepkane ploče inkubiraju se kroz 24 h, a ukupni broj se izražava kao logaritam broja stanica ( $\log_{10}\text{CFU mL}^{-1}$ ).

Formula [3] za izračun broja stanica:

$$\text{CFU} = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{upotrebljeni volumen uzorka}} \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razrijeđenja} \quad [3]$$

### 3.2.9. Obrada podataka

Kako bi se odredio utjecaj raznih parametara na učinkovitost tretmana korišteni su centralni složeni dizajn (*central composite design*, CCD; STATGRAPHICS Centurion, StatPoint Technologies) i površinski centrirani model (Kuehl, 2000). Kao operativni parametri za CCD odabrani su vrijeme tretmana, amplituda te temperatura.

Provedena je analiza varijance (ANOVA) kako bi se mogla utvrditi odstupanja ( $p < 0,05$ ) u provedenim tretmanima.

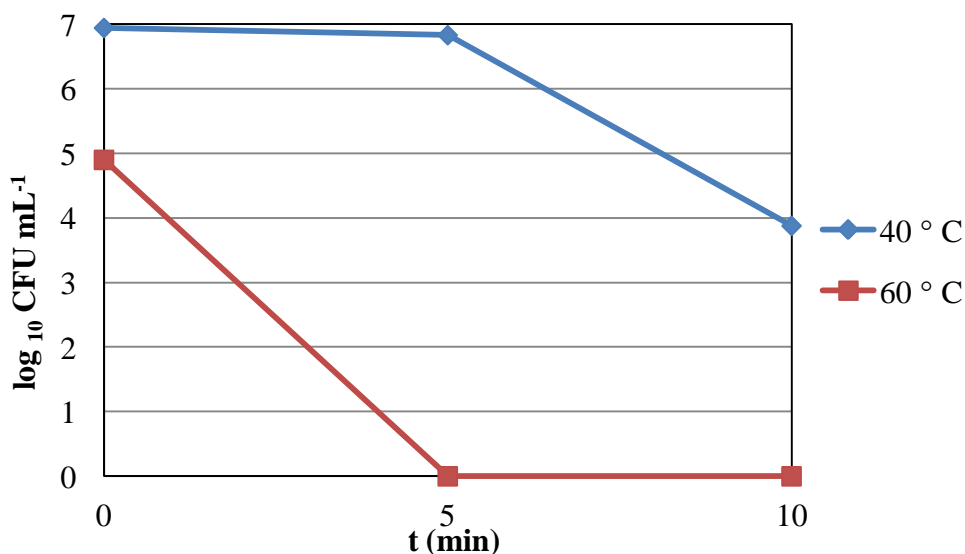
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj eksperimentalnog dijela ovoga rada je odrediti utjecaj ultrazvuka visoke snage na inaktivaciju bakterije *Listeria innocua* ATC 33090, odnosno odrediti njene parametre stresa nakon tretmana. Ti parametri uključuju stvaranje slobodnih radikala, istjecanje staničnog materijala, stvaranje biofilma te provjeru revitalizacije stanica. Ukupno je provedeno osam ultrazvučnih tretmana, te je svaki prethodno zagrijan u vodenoj kupelji na temperaturu pri kojoj se tretman odvijao. Nezavisne varijable koje su se mijenjale su: amplituda ultrazvuka, vrijeme tretmana i temperatura na kojoj je uzorak zagrijan. Dva uzorka nisu podvrgnuta ultrazvučnom tretmanu, nego su zagrijani na određene temperature (40 i 60 °C) kako bi se mogao usporediti ultrazvučni i toplinski tretman.

Analiza varijance (ANOVA) je korištena za statističku obradu dobivenih eksperimentalnih rezultata, kako bi se ustanovilo koji su od faktora pri tretmanu bili značajni, odnosno koji doprinose skupa (interakcija) na učinkovitost tretmana.

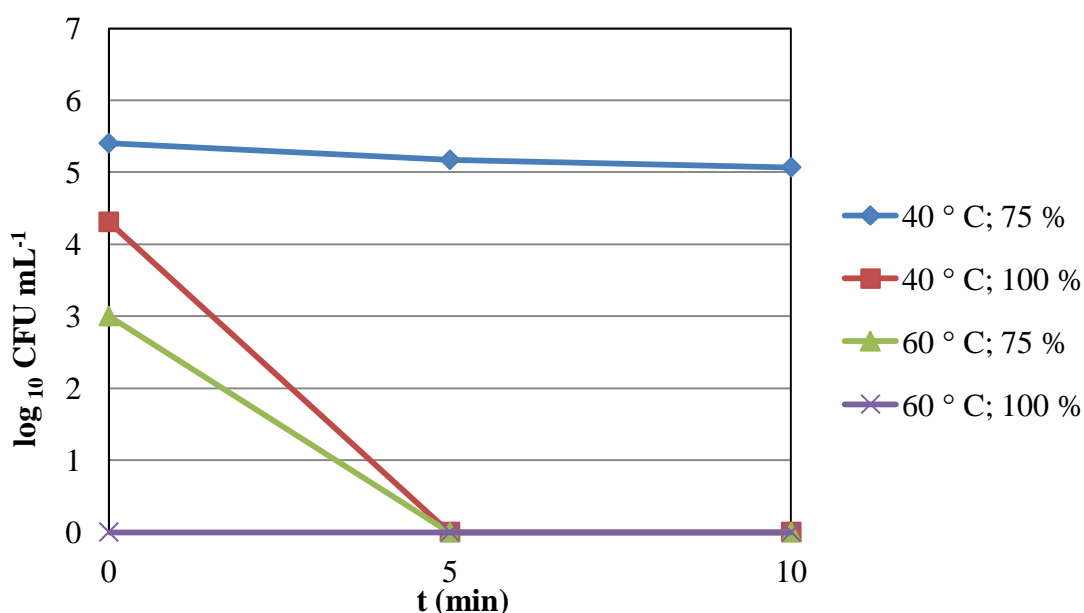
Parametri eksperimenta su: *A* – amplituda ; *B* – vrijeme tretmana; *C* – temperatura te se za svaku izlaznu vrijednost eksperimenta odredio utjecaj ovih triju varijabli i njihovih interakcija na konačne rezultate.

### 4.1. Utjecaj ultrazvuka na inaktivaciju



Slika 5. Ovisnost  $\log_{10}\text{CFU mL}^{-1}$  o vremenu toplinskog tretiranja na 40 °C i 60 °C

Dobiveni eksperimentalni rezultati prikazani su grafički, jedan za netretirane uzorke tj. uzorke koji su podvrgnuti samo zagrijavanju na temperature (40 i 60 °C) (slika 5), bez ultrazvučnog tretmana, te jedan graf za ultrazvučno tretirane uzorke (slika 6). Na grafičkom prikazu vidljivo je kako se pri temperaturi od 40 °C nakon 5 minuta zagijavanja postiže redukcija od 0,11 log<sub>10</sub>CFU mL<sup>-1</sup>, a nakon 10 minuta redukcija je 3,07 log<sub>10</sub>CFU mL<sup>-1</sup> (slika 5). Na temperaturi od 60 °C bez tretmana ultrazvukom, postignuta je potpuna redukcija već nakon 5 minuta tretmana u iznosu od 4,9 log<sub>10</sub>CFU mL<sup>-1</sup> (slika 5). Prema tome vidimo kako zagrijavanje na višim temperaturama i dulje vrijeme rezultira većim stupnjem inaktivacije, odnosno redukcije.



**Slika 6.** Ovisnost log<sub>10</sub> CU mL<sup>-1</sup> o vremenu ultrazvučnog tretiranja uzoraka na 40 °C i 60 °C, pri 75 %-tnoj i 100 %-tnoj amplitudi

Kod ultrazvučno tretiranih uzoraka (slika 6), zagrijanih na 40 °C, te tretiranih ultrazvukom pri amplitudi od 75 %, stupanj redukcije nakon 5 min iznosi 0,23 log<sub>10</sub> CFU mL<sup>-1</sup>, dok je nakon 10 minuta tretiranja stupanj redukcije 0,33 log<sub>10</sub>CFU mL<sup>-1</sup>. Iz toga slijedi da se povećanjem vremena ultrazvučnog tretiranja povećava i stupanj redukcije. Pri istoj temperaturi, ali amplitudi od 100 %, postignuta je potpuna inaktivacija već nakon 5 minuta ultrazvučnog tretmana, te stupanj redukcije iznosi 4,31 log<sub>10</sub>CFU mL<sup>-1</sup> (slika 6). Povećanjem



amplitude ultrazvučnog tretmana, smanjuje se potrebno vrijeme inaktivacije bakterijskih stanica. Posljednja dva uzorka tretirana su pri temperaturi od 60 °C. Pri povišenoj temperaturi, veći broj stanica je inaktiviran već i samom toplinom, dok uz kombinaciju povišene temperature i ultrazvučnog tretiranja, potpuna inaktivacija se postiže nakon 5 minuta i to pri manjoj amplitudi od 75 %. Stupanj redukcije u tom slučaju iznosi 3 log<sub>10</sub>CFU mL<sup>-1</sup>. Kod uzorka (60 °C i 100 % amplituda), postignuta je temperaturna inaktivacija bakterijske kulture, tj. prije početka tretiranja ultrazvukom log<sub>10</sub> CFU mL<sup>-1</sup> bio je 0 (slika 6).

U radu Bermúdez-Aguirre i sur. (2009), znanstvenici su istraživali utjecaj ultrazvuka na inaktivaciju *L.innocue* i mezofilnih bakterija u sirovom mlijeku, pri različitim amplitudama i konstantnom temperaturom procesiranja (63 °C) u vremenu od 30 minuta. Uspoređivali su se rezultati same termalne inaktivacije i kombinacije povišene temperature s ultrazvukom. Za 90 % i 100 %-tne tretmane ustanovljeno je da kombinacija ultrazvuka i topline pri inaktivaciji stanica smanjuje vrijeme procesiranja (s 30 na 10 minuta) uspoređujući ju s termalnim procesiranjem. Upravo zbog toga se ultrazvuk smatra netermalnom tehnologijom procesiranja jer je glavni letalni učinak u stanicama povezan s efektom kavitacije koja nastaje pri ultrazvučnom tretmanu, dok toplina vjerojatno olakšava inaktivaciju oslabljujući stanice (Bermúdez-Aguirre i sur., 2009).

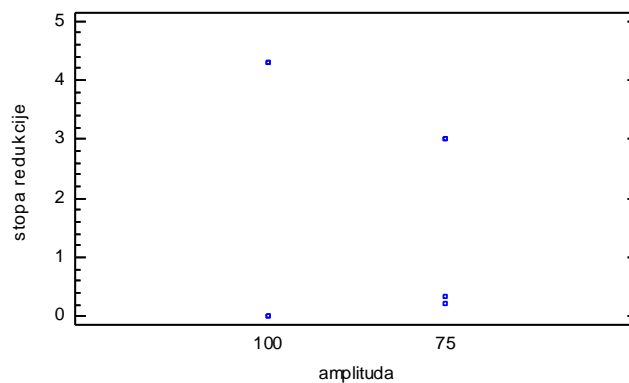
Bermudez-Aguirre i sur. (2011) su također istraživali učinak inaktivacije *L.innocue* u mlijeku tretiranom ultrazvukom i toplinom. Nakon 10 minutnog termalnog tretmana, redukcija je iznosila 0,5 log log<sub>10</sub>CFU mL<sup>-1</sup>; nakon 30 minuta više od 5 log log<sub>10</sub>CFU mL<sup>-1</sup>. Kod termosonikacijskog tretmana postignuta je inaktivacija iznad 5 log log<sub>10</sub>CFU mL<sup>-1</sup> već nakon 10 minuta, i skoro 6 log<sub>10</sub>CFU mL<sup>-1</sup> nakon 30 minuta.

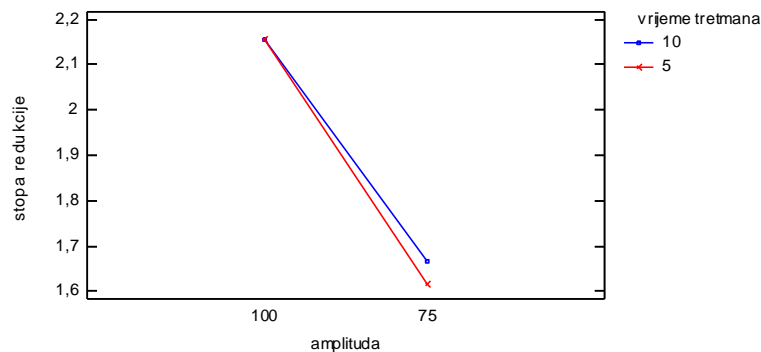
#### 4.1.1. Rezultati statističke obrade za stopu redukcije

Iz dobivenih rezultata statističke obrade (tablica 2, slike 7 i 8) može se zaključiti kako na stopu redukcije broja bakterija statistički značajno utječe amplituda i temperatura, budući da im odgovarajuće *p* – vrijednosti iznose manje od 0,05. Stoga je i logično da zajednička interakcija ove dvije varijable (AC) također statistički značajno utječe na stopu redukcije (tablica 7).

**Tablica 2.** Statistička značajnost varijabli za stopu redukcije

<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	0,526736	1	0,526736	404,42	0,0316
B:vrijeme tretmana	0,00130244	1	0,00130244	1,00	0,5000
C:temperatura	1,26523	1	1,26523	971,43	0,0204
INTERAKCIJE					
AB	0,00130244	1	0,00130244	1,00	0,5000
AC	24,6851	1	24,6851	18952,91	0,0046
BC	0,00130244	1	0,00130244	1,00	0,5000
OSTATAK	0,00130244	1	0,00130244		
UKUPNO (ISPRAVLJENO)	26,4822	7			

**Slika 7.** Prikaz ovisnosti stope redukcije o amplitudi



**Slika 8.** Prikaz ovisnosti stope redukcije o amplitudi i njihove međusobne interakcije na učinak ultrazvučnog tretmana nakon 5 i 10 minuta tretiranja

#### 4.2. Utjecaj ultrazvuka na pH i provodnost

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

40 °C	prije tretmana	nakon tretmana
<i>pH</i>	6,9	6,64
<i>provodnost (<math>\mu\text{S cm}^{-1}</math>)</i>	384	490
60 °C	prije tretmana	nakon tretmana
<i>pH</i>	6,79	6,7
<i>provodnost (<math>\mu\text{S cm}^{-1}</math>)</i>	503	1000

Prema rezultatima mjerenja prikazanim u tablici 3, vidljivo je kako se vrijednost pH nije značajno smanjila nakon ultrazvučnog tretmana. Na temperaturi od 40 °C, pH uzorka iznosio je 6,9 dok je nakon tretmana bio 6,64. Međutim, izmjerena vrijednost provodljivosti uzorka pri istoj temperaturi, prije tretmana iznosila je 384  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , dok je nakon tretiranja vrijednost porasla na 490  $\mu\text{S cm}^{-1}$ . Pri 60 °C, pH uzorka se sa 6,79 prije tretmana smanjio na 6,7 nakon tretiranja, dok je provodljivost prije tretmana iznosila 503  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , a nakon tretmana 1000  $\mu\text{S cm}^{-1}$ . Dobiveni rezultati za pH ukazuju kako se nakon 10 minuta ultrazvučnog tretiranja vrijednosti smanjuju, i to kod 40 °C za 0,26 pH jedinica (tablica 4,  $p > 0,05$ ), a kod uzorka zagrijanog na 60 °C pH se smanjio za 0,09 pH jedinica (tablica 4,  $p > 0,05$ ). Provodljivost se u oba slučaja nakon tretmana statistički značajno povećala. Isto tako, može se zaključiti što je viša temperatura zagrijavanja bakterijske suspenzije, pH

vrijednost je manja, dok provodljivost suspenzije raste. Osim toga provodljivost suspenzije raste budući da i tijekom tretmana dolazi do staničnog istjecanja, što potvrđuju rezultati mjerenja (poglavlje 4.4.). Naime, tijekom oslobađanja staničnih molekula unutar suspenzije povećava se ukupni broj pozitivnih i negativnih iona, odnosno molekula, te je povećanje provodnosti upravo dokaz staničnog istjecanja tijekom ultrazvučnog tretmana.

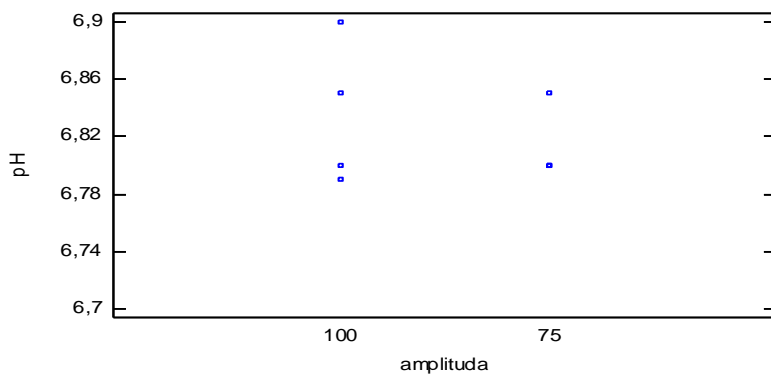
U istraživanjima Supene (Supeno, 2000) dokazano je da sonikacija u vodenim otopinama tretiranim ultrazvukom visoke frekvencije stvara nitrite i vodikov peroksid kao primarne produkte, a oksidacijom nitrita nastaju nitrati. Također, budući da prilikom sonikacije nastaju slobodni radikali (poglavlje 2.2.2.) u mediju nastaje veći broj nabijenih čestica koje doprinose povećanju provodljivosti.

#### 4.2.1. Rezultati statističke obrade za pH vrijednost

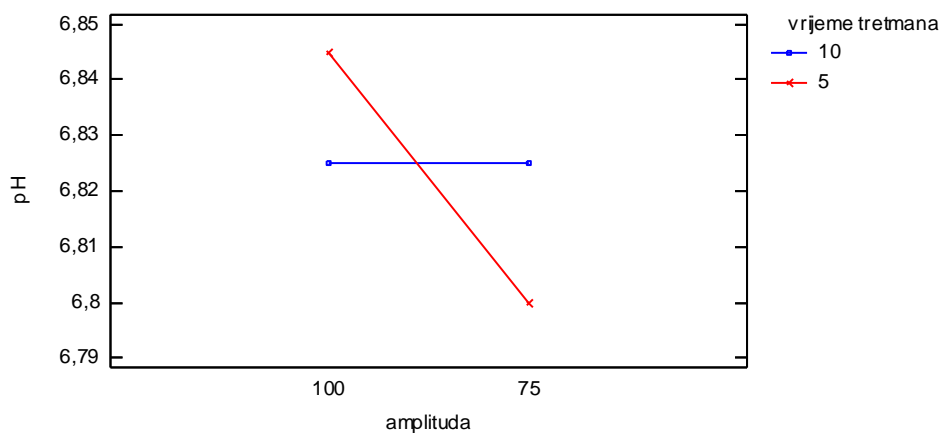
**Tablica 4.** Statistička značajnost varijabli za pH vrijednost

<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			

Prema tablici 4 i slikama 9 i 10, statistički značajan utjecan na pH vrijednost ostvarila je interakcija amplitude ultrazvuka i temperature medija (AC). Ostale značajke nisu imale značajan statistički učinak, budući da im p – vrijednosti nisu manje od 0,05.



**Slika 9.** Prikaz rezultata ovisnosti pH o amplitudi



**Slika 10.** Prikaz ovisnosti pH vrijednosti o amplitudi i njihove međusobne interakcije na učinak ultrazvučnog tretmana nakon 5 i 10 minuta tretiranja

#### 4.3. Utjecaj ultrazvuka na stvaranje slobodnih radikala

**Tablica 5.** Stvaranje slobodnih radikala kod ultrazvučno netretiranih uzoraka bakterijske suspenzije

UZORAK	c (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) (mgL <sup>-1</sup> ) (0' / 5' / 10')
A0	2,52 / 2,36 / 2,27
A0A	3,76 / 3,10 / 3,68

**Tablica 6.** Stvaranje slobodnih radikala kod ultrazvučno tretiranih uzoraka bakterijske suspenzije

<b>UZORAK</b>	<b>c (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (mgL<sup>-1</sup>) prije tretmana</b>	<b>c (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (mgL<sup>-1</sup>) nakon tretmana</b>
<b>A1</b>	1,78	1,78
<b>A2</b>	2,69	2,36
<b>A3</b>	1,78	2,02
<b>A4</b>	3,51	3,18
<b>A5</b>	1,78	2,52
<b>A6</b>	3,51	3,51
<b>A7</b>	2,69	3,26
<b>A8</b>	1,78	1,86

Iz tablice 5, vidi se prikaz stvaranja slobodnih radikala u netretiranim uzorcima u vremenskom periodu od 0, 5 i 10 minuta, a u tablici 5 u tretiranim uzorcima prije i nakon ultrazvučnog tretmana. Koncentracija slobodnih radikala prikazana je kao koncentracija vodikovog peroksida (mgL<sup>-1</sup>), produkta kaskadnih reakcija koje nastaju djelovanjem slobodnih radikala. Kod ultrazvučno netretiranih uzoraka (tablica 5), na temperaturi od 40 °C (A0), nakon 10 minutnog toplinskog tretmana došlo je do pada koncentracije slobodnih radikala za 10 %, dok je kod 60 °C (A0A) koncentracija manja za 2 %.

Prilikom tretiranja ultrazvukom (tablica 6) na 40 °C, nakon 10 minuta tretiranja koncentracija slobodnih radikala smanjila se za 9 % kod uzoraka s amplitudom od 75 % (A6/A4). Kod iste temperature i amplitude od 100 %, koncentracija slobodnih radikala porasla je nakon 10 minutnog tretiranja za 17 % (A7). Slična je situacija i s tretiranim uzorcima na 60 °C, gdje je kod amplitude od 75 % nakon tretmana koncentracija vodikovog peroksida porasla 5 % (A8). Pri 100 %-tnoj amplitudi i temperaturi od 60 °C porast koncentracije radikala iznosi čak 30 % (A5). Prema tome, na povećanje stvaranja slobodnih radikala značajno utječe amplituda ultrazvučnog tretmana, dok na nižim temperaturama nastaje manja koncentracija slobodnih radikala.

U jednom istraživanju se mjerila količinu proizvedenih slobodnih radikala pri manotermosonifikaciji pod različitim uvjetima temperature, tlaka i amplitude. Pokazalo se da

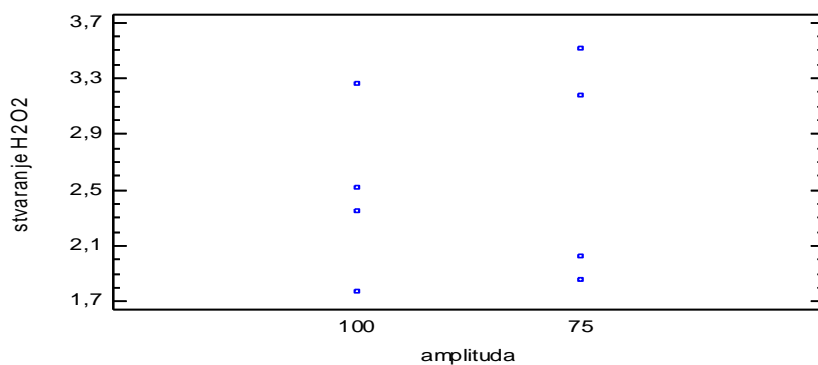
povećanju stvaranja slobodnih radikala linearno doprinosi povećanje amplitude ultrazvuka. Također, istraživani su temperaturni učinci (između 30 °C i 140 °C) na jednakoj amplitudi. Rezultati pokazuju kako povećanje temperature rezultira smanjenjem stvaranja hidroksilnih radikala (Vercet i sur., 1998). Smatra se kako je tomu razlog smanjenje kavitacijskog učinka zbog povećanja tlaka pare (Mclean i Mortimer, 1988).

#### 4.3.1. Rezultati statističke obrade za slobodne radikale (stvaranje vodikovog peroksida)

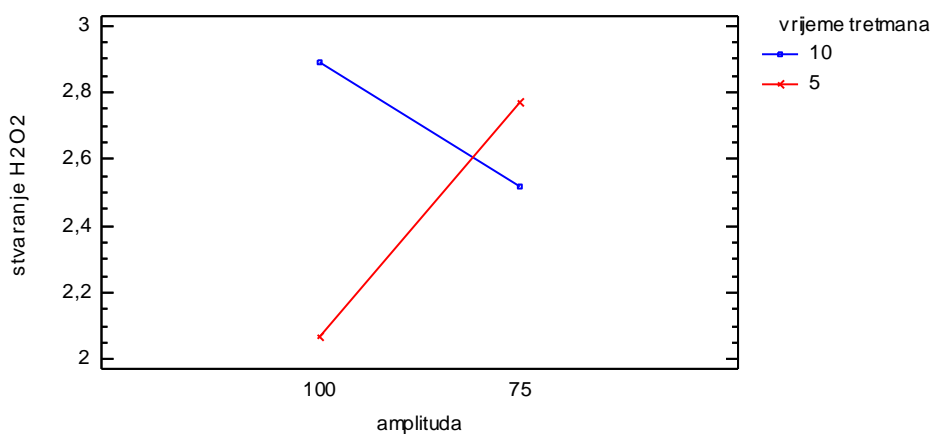
**Tablica 7.** Statistička značajnost varijabli za stvaranje vodikovog peroksida

<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			

Iz statističkih rezultata (tablica 7 i slika 11 i 12) vidljivo je kako niti jedna varijabla nema statistički značajan utjecaj na stvaranje vodikovog peroksida, odnosno slobodnih radikala, budući da nijedna varijabla nema p – vrijednost ispod 0,05.



**Slika 11.** Prikaz ovisnosti stvaranja vodikovog peroksida o amplitudi

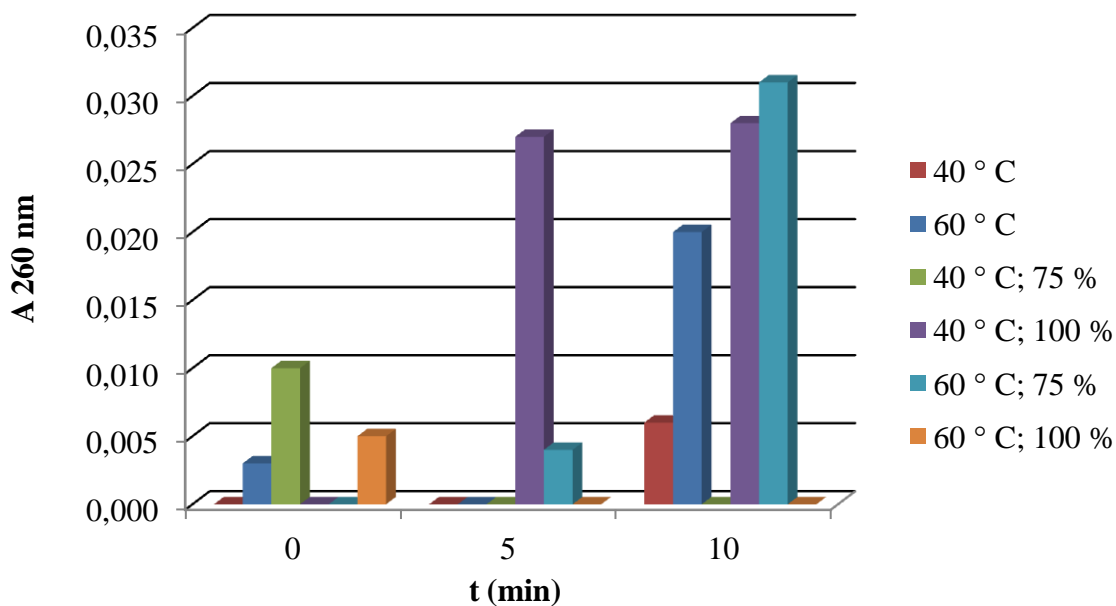


**Slika 12.** Prikaz ovisnosti stvaranja vodikovog peroksida o amplitudi i njihove međusobne interakcije na učinak ultrazvučnog tretmana nakon 5 i 10 minuta tretiranja

#### 4.4. Utjecaj ultrazvuka na stanično istjecanje

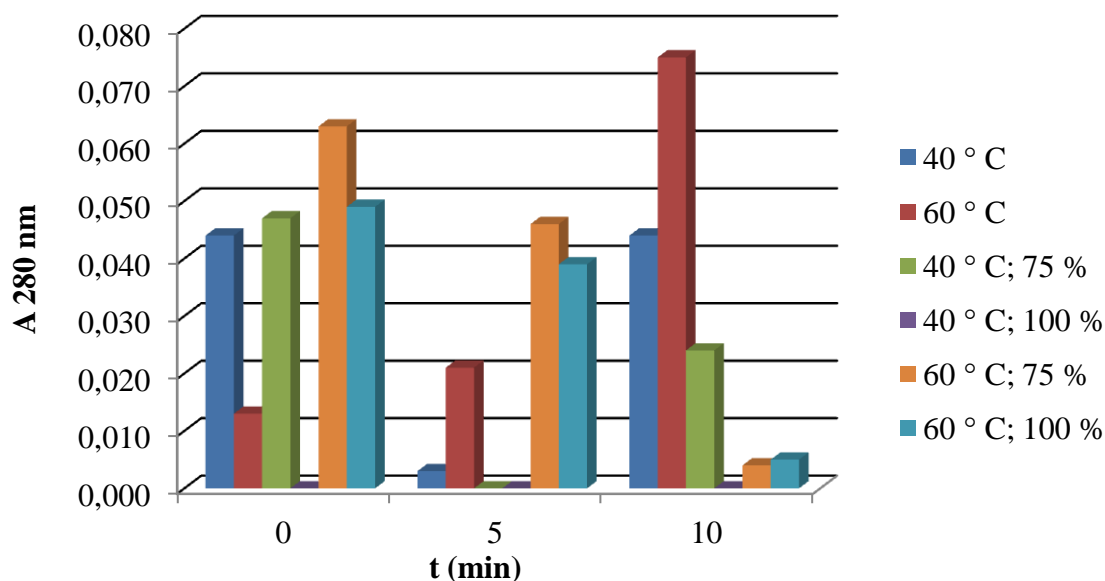
Mjerenje apsorbancije na dvije valne duljine (260 i 280 nm) pokazuje koliko je unutarstaničnog sadržaja isteklo prije i nakon ultrazvučnog tretmana, odnosno zagrijavanja bez ultrazvučnog tretmana.





**Slika 13.** Ovisnost apsorbancije (A 260 nm) o vremenu ultrazvučnog i toplinskog tretiranja

Prema dobivenim rezultatima, na vrijednosti apsorbancije od 260 nm (slika 13), na kojoj apsorbiraju DNA molekule, kod netretiranih uzoraka pri 40 °C je nakon 10 minuta izmjerena apsorbancija od 0,006; dok kod 60 °C nakon 10 minuta tretmana apsorbancija iznosi 0,023. Kod tretiranih uzoraka najmanju vrijednost apsorbancije pokazuje uzorak na 40 °C i 75 % amplitude, kao i 60 °C i 100 % amplitude, gdje nakon tretmana apsorbancija iznosi 0. Nakon 5 minuta tretmana na 40 °C i 100 % amplitude, apsorbancija je narasla do 0,027 što upućuje na istjecanje staničnog sadržaja tijekom tretmana, odnosno DNA materijala. Daljnim tretiranjem, nakon 10 minuta, apsorbancija je neznatno narasla, što upućuje na to da je došlo do daljnjeg staničnog istjecanja. Najveću izmjerenu apsorbanciju ima uzorak nakon 10 minuta tretiranja pri 60 °C i 75%-tnoj amplitudi, koja je iznosila 0,031, dakle pri tim uvjetima došlo je do najvećeg staničnog istjecanja genetskog materijala bakterije. Zbog toga se može zaključiti kako na njegovo istjecanje ima utjecaj temperatura i amplituda te vrijeme tretiranja, što potvrđuju i statistički rezultati (tablica 8,  $p < 0,05$ ).



**Slika 14.** Ovisnost apsorbancije (A 280 nm) o vremenu ultrazvučnog i toplinskog tretiranja

Na slici 14 prikazana je ovisnost apsorbancije pri 280 nm (na kojoj apsorbiraju stanični proteini) o vremenu tretiranja, odnosno zagrijavanja. Na netretiranom uzorku, zagrijanom na 40 °C, u početku je izmjerena viša apsorbancija 0,044, koja je poslije 5 minuta zagrijavanja pala, zatim se nakon 10 minuta vratila na istu vrijednost. Kod uzorka zagrijanog na 60 °C, apsorbancija je rasla s vremenom, te je nakon 10 minuta iznosila 0,075, što je ujedno i najviša izmjerena apsorbancija svih uzoraka. Tretirani uzorci pokazuju pad apsorbancije u odnosu na početne vrijednosti. Više početne vrijednosti pokazuju velik utjecaj temperature na razaranje stanične membrane, zbog čega dolazi do istjecanja staničnih proteina. Na 60 °C vidljiva je najviša apsorbancija (i u tretiranim i netretiranim uzorcima). Smanjenje apsorbancije nakon 5 i 10 minuta u tretiranim uzorcima, može se objasniti time što prilikom kavitacije pri ultrazvučnom tretmanu dolazi do mijenjanja strukture staničnih proteina i njihove razgradnje, kao i stvaranja slobodnih radikala (poglavlje 2.2.2.).

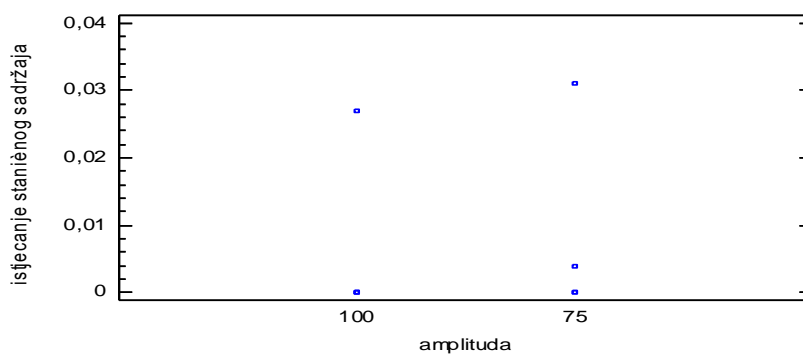
#### 4.4.1. Rezultati statističke obrade za stanično istjecanje (A 260 nm i A 280 nm)

Statistički rezultati pokazuju kako na istjecanje unutarstaničnog sadržaja statistički značajno utječu amplituda i temperatura kao i njihova interakcija (AC) (tablica 8, slike 15 i 16).

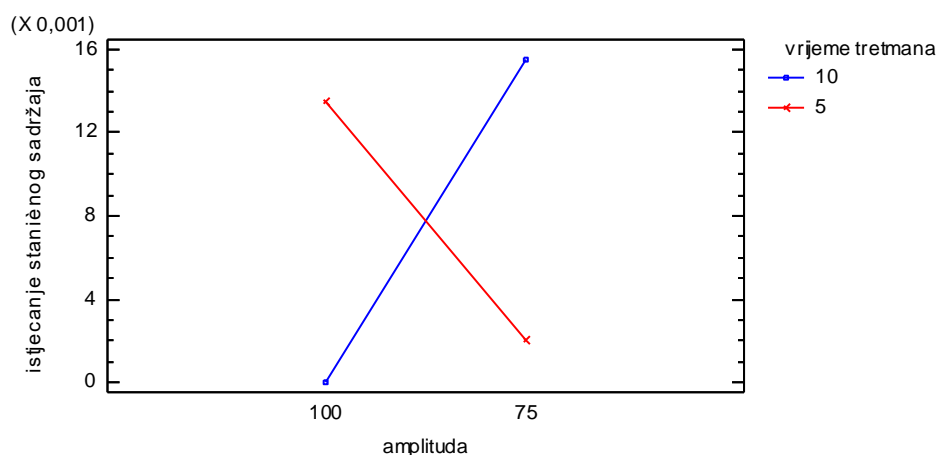
Međutim, također je vidljivo kako interakcija amplitude i vremena tretmana (AB) statistički značajno utječe na učinak tretmana, kao i interakcija vremena tretmana i temperature (BC).

**Tablica 8.** Statistička značajnost varijabli za istjecanje staničnog sadržaja A 260 nm

<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	0,000008	1	0,000008	*****	0,0000
B:vrijeme tretmana	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
C:temperatura	0,000008	1	0,000008	*****	0,0000
INTERAKCIJE					
AB	0,0003645	1	0,0003645	*****	0,0000
AC	0,0004805	1	0,0004805	*****	0,0000
BC	0,0003645	1	0,0003645	*****	0,0000
OSTATAK	0,0	1	0,0		
UKUPNO (ISPRAVLJENO)	0,0012255	7			



**Slika 15.** Prikaz ovisnosti istjecanja staničnog sadržaja pri 260 nm o amplitudi

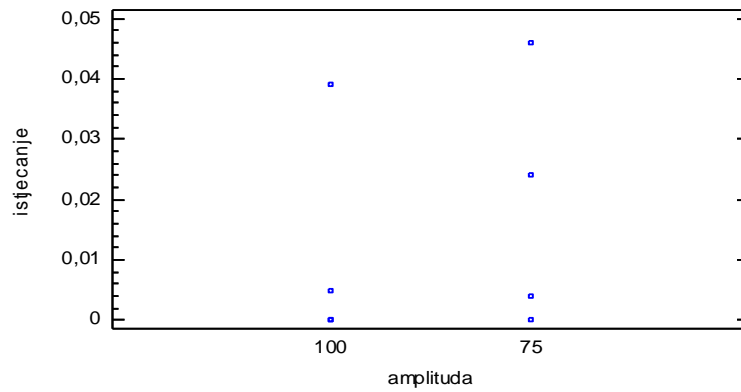


**Slika 16.** Prikaz ovisnosti istjecanja staničnog sadržaja pri 260 nm o amplitudi i njihove međusobne interakcije na učinak ultrazvučnog tretmana nakon 5 i 10 minuta tretiranja

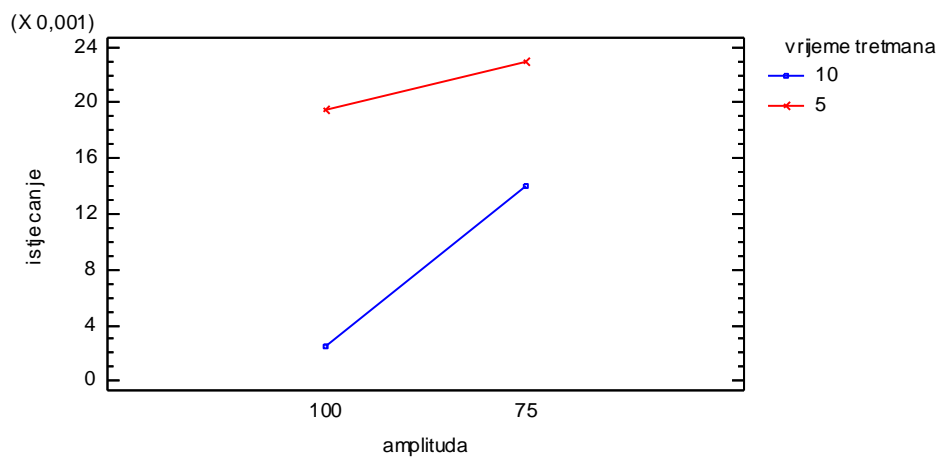
**Tablica 9.** Statistička značajnost varijabli za istjecanje staničnog sadržaja A 280 nm

<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	0,0001125	1	0,0001125	0,88	0,5205
B:vrijeme tretmana	0,000338	1	0,000338	2,64	0,3512
C:temperatura	0,0006125	1	0,0006125	4,79	0,2730
INTERAKCIJE					
AB	0,000032	1	0,000032	0,25	0,7048
AC	0,0000405	1	0,0000405	0,32	0,6738
BC	0,00125	1	0,00125	9,77	0,1972
OSTATAK	0,000128	1	0,000128		
UKUPNO (ISPRAVLJENO)	0,0025135	7			

Iz statističkih rezultata (tablica 9, slike 17 i 18) vidljivo je kako niti jedna odabrana varijabla, kao ni njihove međusobne interakcije, nema statistički značajan utjecaj na istjecanja staničnog sadržaja mjenog na 260 nm, na valnoj duljini gdje apsorbiraju stanični proteini.



**Slika 17.** Prikaz rezultata ovisnosti staničnog istjecanja pri 280 nm o amplitudi



**Slika 18.** Prikaz ovisnosti istjecanja staničnog sadržaja pri 280 nm o amplitudi i njihove međusobne interakcije na učinak ultrazvučnog tretmana nakon 5 i 10 minuta tretiranja

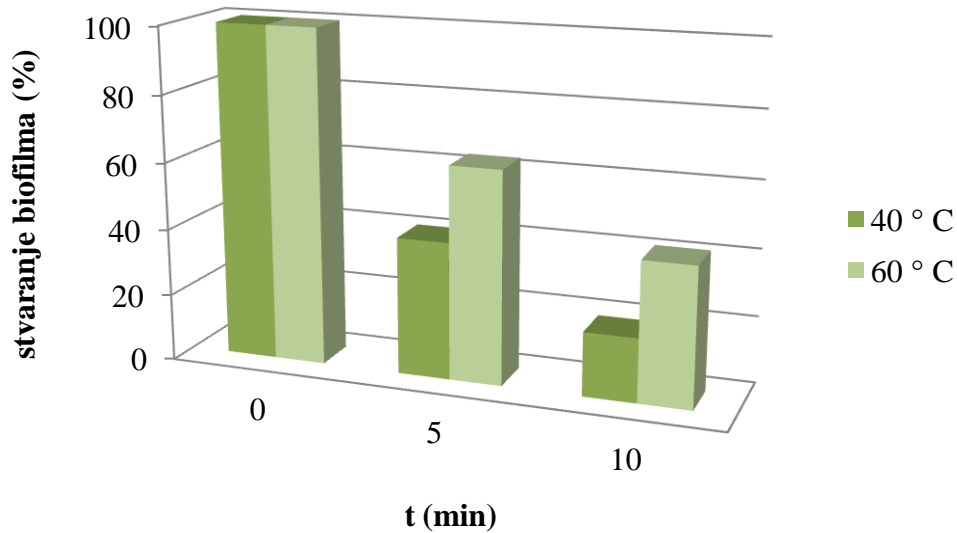
#### 4.5. Utjecaj ultrazvuka na stvaranje biofilma

**Tablica 10.** Prikaz rezultata apsorbancije za biofilm

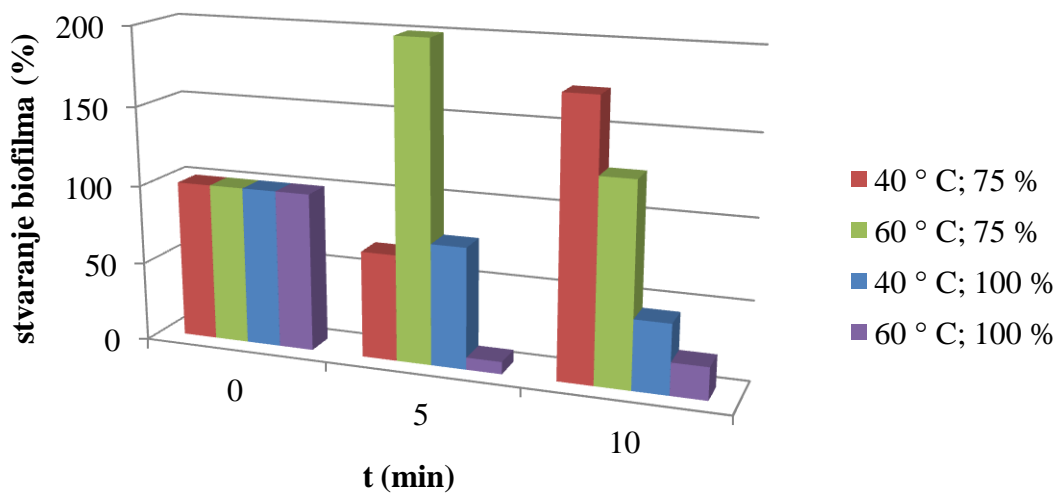
<b>UZORAK</b>	<b>AMPLITUDA (%)</b>	<b>VRIJEME (MIN)</b>	<b>T ° C</b>	<b>A 590</b>
<b>AO</b>	/	0	40	1,316
	/	5	40	0,538
	/	10	40	0,251
<b>A0A</b>	/	0	60	0,406
	/	5	60	0,2575
	/	10	60	0,107
<b>A6</b>	75	0	40	1,0305
	75	5	40	0,6925
<b>A4</b>	75	10	40	1,7845
<b>A3</b>	75	0	60	1,186
	75	5	60	2,37
<b>A8</b>	75	10	60	1,501
<b>A2</b>	100	0	40	1,6135
	100	5	40	1,233
<b>A7</b>	100	10	40	0,7075
<b>A1</b>	100	0	60	0,587
	100	5	60	0,0455
<b>A5</b>	100	10	60	0,12

Iz dobivenih rezultata apsorbancija za uzorke koji nisu tretirani ultrazvukom (tablica 10) postoji odstupanje od očekivanog pada apsorbancije ovisno o vremenu. Naime, uzorci zagrijani na 40 °C, pokazuju veći pad apsorbancije, odnosno veću redukciju u stvaranju biofilma nakon 5 i 10 minuta, nego oni zagrijani na 60 °C (slika 19). Međutim, početna apsorbancija na 40 °C bila je puno veća nego na 60 °C (tablica 10). To pokazuje kako su bakterijske stanice na toj temperaturi već razorene pa ni nemaju više mogućnosti stvarati biofilm. Na 40 °C veći je pad postotka stvaranja biofilma nakon 5 i 10 minuta (slika 19) nego

na 60 °C, budući da je početni postotak bio puno veći jer je većina bakterijskih stanica pri toj temperaturi aktivna i živa.



**Slika 19.** Ovisnost stvaranja biofilma o vremenu zagrijavanja uzoraka koji nisu tretirani ultrazvukom pri 40 ° C i 60 ° C



**Slika 20.** Ovisnost stvaranja biofilma o vremenu ultrazvučnog tretiranja uzoraka pri 40 ° C i 60 ° C i amplitudama od 75 % i 100 %

Rezultati uzoraka koji su tretirani (slika 20), pokazuju kako je najznačajnija redukcija stvaranja biofilma pri 100 % amplitude i temperature 60 °C te iznosi 79,56 % nakon 10 minuta tretiranja, dok nakon 5 minuta tretiranja iznosi čak 92,25 %. Najmanji iznos

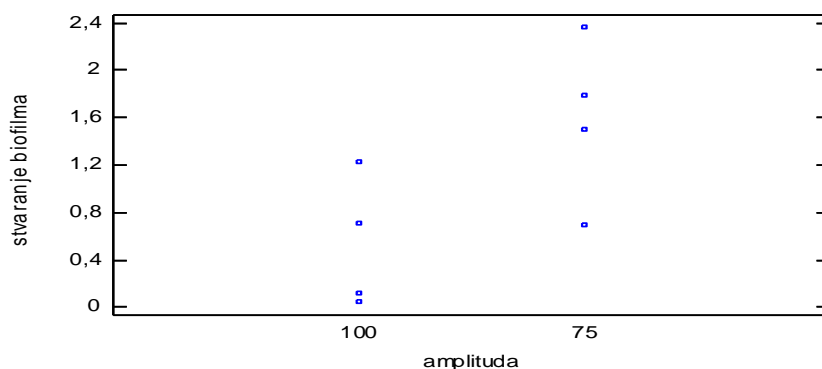
apsorbancije (tablica 10) upravo odgovora tom uzorku na 60 ° C i amplitudi 100 % nakon 5 minuta ultrazvučnog tretiranja (slika 20), te se može zaključiti kako je taj tretman optimalan.

Međutim, uzorci tretirani 75 %-tnom amplitudom (slika 20), pokazuju drugačije rezultate. Naime, uzorak zagrijan na 40 °C, nakon 5 minuta pokazuje smanjenje nastanka biofilma za samo 32,8 %, no nakon 10 minuta tretiranja dolazi do porasta stvaranja biofilma u odnosu na početnu vrijednost i to za čak 73,17 %. Kod iste amplitude te temperature od 60 °C, nakon 5 minuta tretiranja dolazi do najvećeg rasta u stvaranju biofilma, i to za čak 99,83 % u odnosu na početnu vrijednost. Nakon 10 minuta tretiranja taj se postotak smanjio, no i dalje iznosi više od početnog (slika 20). Ovakvi rezultati mogu se objasniti činjenicom kako se mikroorganizmi pri nepovoljnim uvjetima različito ponašaju, zbog čega je njihov broj stanica značajno veći u odnosu na početni. To je obrabeni mehanizam, stvaranje biofilma, sesilne zajednice mikroorganizama, koji im omogućava veću otpornost na promijenjene vanjske uvjete.

U radu Bigelowa i sur. (2009), znanstvenici su dokazali da je ultrazvučni tretman uništio biofilmove sojeva bakterije *Esheria coli* ATCC 23724 u kombinaciji s najvišim tlakovima od 6,2 i 7,6 MPa. Dakle, kombinacijom više tehnologija s ultrazvukom se postiže veća stopa redukcije stvaranja biofilma.

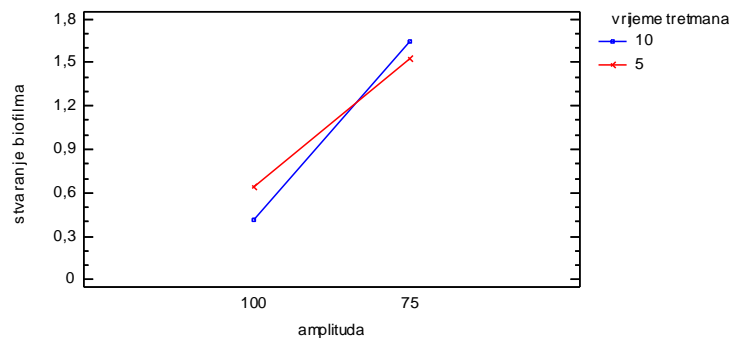
#### 4.5.1. Rezultati statističke obrade za biofilm

Prema dobivenim rezultatima, u tablici 11 i na slikama 21 i 22 može se vidjeti kako odabrane varijable A, B i C nemaju statistički značaj na stvaranje biofilma.



**Slika 21.** Prikaz ovisnosti stvaranja biofilma o amplitudi



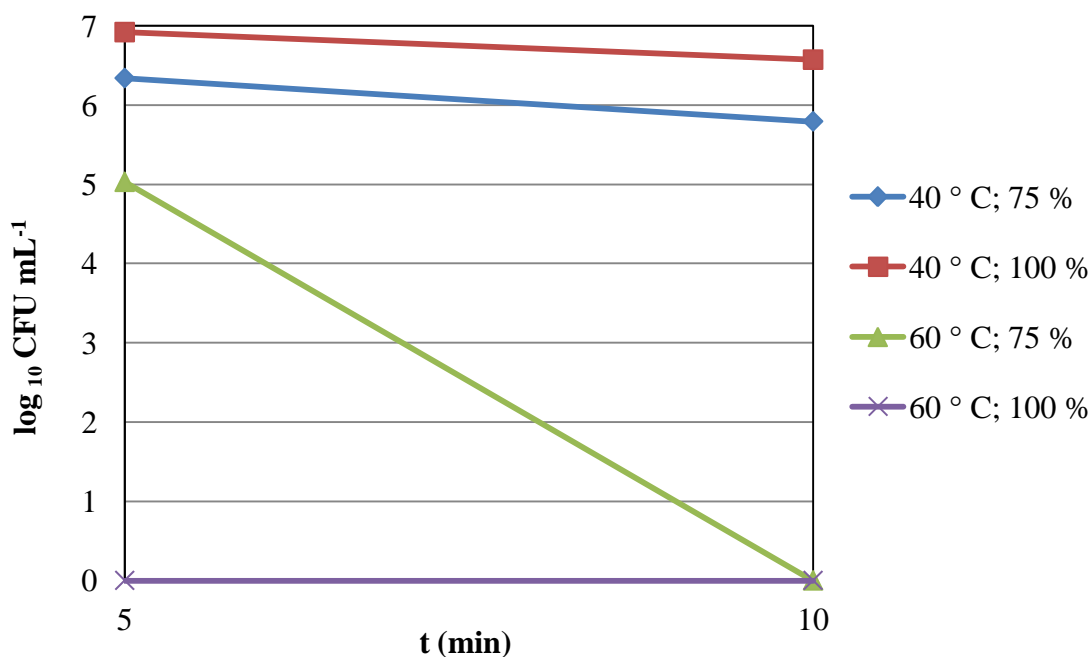


**Slika 22.** Prikaz ovisnosti stvaranja biofilma o amplitudi i njihove međusobne interakcije na učinak ultrazvučnog tretmana nakon 5 i 10 minuta tretiranja

**Tablica 11.** Statistička značajnost varijabli za 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>
<b>GLAVNI UČINCI</b>					
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
<b>INTERAKCIJE</b>					
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			

#### 4.6. Revitalizacija stanica nakon ultrazvučnog tretmana



**Slika 23.** Ovisnost  $\log_{10}\text{CFU mL}^{-1}$  o vremenu ultrazvučnog tretiranja

Na slici 23 prikazani su rezultati revitalizacije stanica. Revitalizacija stanica određena je kao logaritam broja stanica koje su narasle nakon inkubacije tijekom 24 h. Ukoliko su stanice tijekom tretmana ušle u stanje mirovanja (poglavlje 2.7.) odnosno, nije došlo do apoptoze, one se nakon određenog vremena mogu revitalizirati. Uzorci temperature 40 °C i amplitude 75 %, nakon 5 minuta tretmana imali su 6,43  $\log_{10}\text{CFU mL}^{-1}$ , dok je nakon 10 minuta tretmana ta vrijednost smanjena na 5,79  $\log_{10}\text{CFU mL}^{-1}$ . Postotak revitalizacije u tim slučajevima je čak 82,22 % nakon 5 minuta, te 87,22 % nakon 10 minuta tretmana. Prema tome, u ovim uzorcima bakterijske su stanice uvelike uspjele preživjeti ovakav režim ultrazvučnog tretmana. Kod uzoraka na 40 °C i 100 % amplitude, ukupan broj revitaliziranih stanica iznosio je 6,92  $\log_{10}\text{CFU mL}^{-1}$  nakon 5 minuta, te 6,57  $\log_{10}\text{CFU mL}^{-1}$  nakon 10 minuta tretmana. Ovaj uzorak imao je 100 %-tnu revitalizaciju, dakle bakterijske stanice su ušle u stanje mirovanja prilikom tretmana, te su se potpuno uspjele revitalizirati.

Pri 60 °C i 75 % amplitude, nakon 5 minuta tretmana broj revitaliziranih stanica iznosio je 5,03  $\log_{10}\text{CFU mL}^{-1}$ , dok je nakon 10 minuta tretmana vrijednost bila jednaka 0. Nakon 5 minuta, postotak revitalizacije stanica je bio 59,65%, no daljnjim tretiranjem pri tom

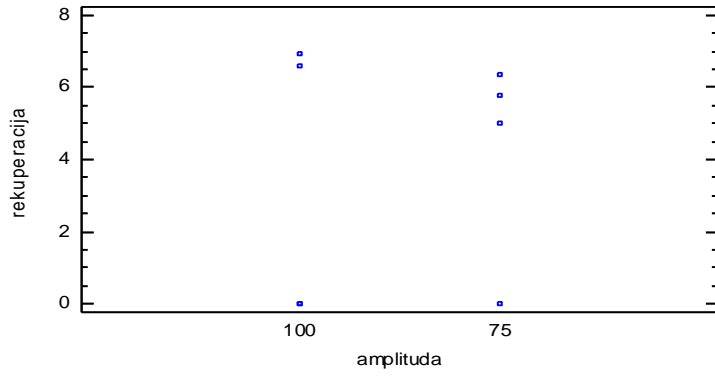
režimu, nakon 10 minuta postotak revitalizacije je 0. Dakle, pri ovim uvjetima nakon 10 minutnog tretmana, došlo je do apoptoze stanica, zbog čega nije bilo revitalizacije. Zadnja dva uzorka, na 60 °C i 100 % amplitude, nisu pokazala nikakav rast stanica nakon 5, a niti nakon 10 minuta. U oba slučaja postotak revitalizacije je 0. Stoga se može zaključiti kako je ovakav režim tretiranja najpogodniji za potpunu inaktivaciju bakterijskih stanica.

#### 4.6.1. Rezultati statističke obrade za revitalizaciju stanica

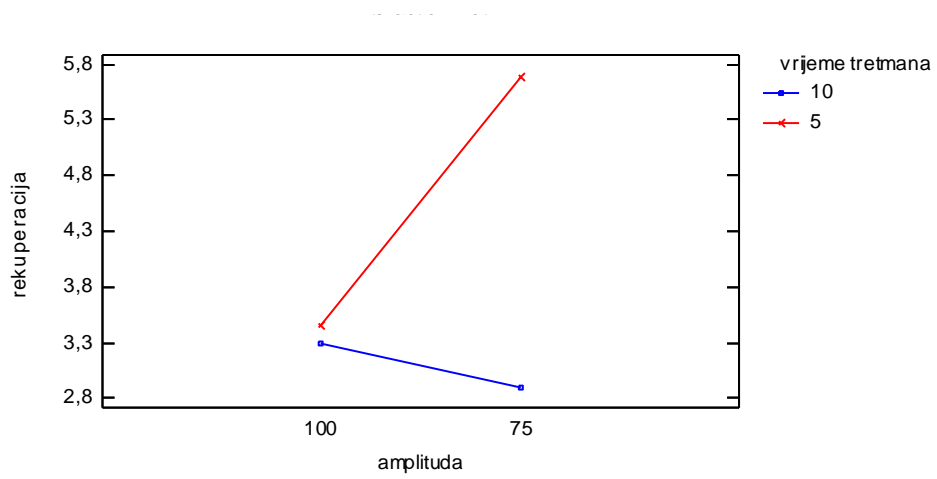
**Tablica 12.** Statistička značajnost varijabli za revitalizaciju stanica

<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	1,68501	1	1,68501	0,58	0,5863
B:vrijeme tretmana	4,38534	1	4,38534	1,50	0,4356
C:temperatura	52,9944	1	52,9944	18,17	0,1467
INTERAKCIJE					
AB	3,41628	1	3,41628	1,17	0,4749
AC	5,0996	1	5,0996	1,75	0,4122
BC	2,138	1	2,138	0,73	0,5493
OSTATAK	2,91724	1	2,91724		
UKUPNO (ISPRAVLJENO)	72,6359	7			

Statistička obrada eksperimentalno dobivenih podataka za revitalizaciju stanica (tablica 12 i slike 24 i 25) pokazuje kako nema statistički značajnog utjecaja odabranih ulaznih varijabli, niti njihovih interakcija na revitalizaciju bakterijskih stanica.



**Slika 24.** Prikaz ovisnosti revitalizacije stanica o amplitudi



**Slika 25.** Prikaz ovisnosti revitalizacije stanica o amplitudi i njihove međusobne interakcije na učinak ultrazvučnog tretmana nakon 5 i 10 minuta tretiranja

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

- Zagrijavanjem na višim temperaturama (60 °C) ostvarena je potpuna redukcija bakterijskih stanica već nakon 5 minuta tretmana od  $4,9 \log_{10}\text{CFU mL}^{-1}$ .
- Povećanjem vremena ultrazvučnog tretiranja povećava se i stupanj redukcije bakterijskih stanica.
- Pri 40 °C i ultrazvučnoj amplitudi od 100 %, postignuta je potpuna inaktivacija već nakon 5 minuta ultrazvučnog tretmana, te najviši stupanj redukcije ( $4,31 \log_{10}\text{CFU mL}^{-1}$ ).
- Povećanjem amplitude smanjuje se vrijeme ultrazvučnog tretiranja potrebnog za inaktivaciju bakterijskih stanica i temperatura tretmana.
- Pri višim temperaturama bakterijske suspenzije tijekom ultrazvučnog tretmana, pH vrijednost pada, a provodljivost raste, zbog nastanka radikala te njihovih produkata, tj. većeg broja nabijenih čestica u mediju.
- Na povećanje stvaranja slobodnih radikala utječe amplituda ultrazvučnog tretmana. Najveći porast koncentracije slobodnih radikala je za 30 %, pri 60 °C i 100 %-tnoj amplitudi, nakon 10 minuta tretmana.
- Najveću izmjerenu apsorbanciju pri 260 nm ima ultrazvučni tretman pri 60 °C i 75 %-tnoj amplitudi gdje apsorbiraju DNA molekule; dok istjecanje staničnih proteina prati pad apsorbancije na 280 nm, što upućuje na mijenjanje njihove strukture tijekom ultrazvučnog tretmana te njihove razgradnje.
- Kod ultrazvučnog tretmana (60 °C, 100 %) nakon 5 minuta postignuta je najznačajnija redukcija stvaranja biofilma koja iznosi 92,25 %.
- Kod ultrazvučnih tretmana na 40 °C, 75 % i 100% amplitude stanice su se uspjele potpuno revitalizirati. Međutim, primjenom više temperature (60 °C) nakon 10 minuta tretmana i pri 75 %-tnoj amplitudi, došlo je do apoptoze stanica te postotak revitalizacije iznosi 0 %.

## 6. LITERATURA

- Ashokkumar, M., Sunartio, D., Kentish, S., Mawson, R., Simons, L., Vilku, K. (2008), Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: A preliminary study on a model system. *Innov. Food Sci. Emerg.* **9**, 155–160.
- Awad, S.T., Moharram, A.H., Shaltout, E.O., Asker, D., Youssef, M.M. (2012) Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Res. Int.* **48**, 410-427.
- Balasundaram, B., Harrison, S., Bracewell, G.D. (2009) Advances in product release strategies and impact on bioprocess. *Trends Biotechnol.* **27**, 477–485.
- Bermúdez-Aguirre, D., Corradini, G.M., Mawson, R., Barbosa-Cánovas, V.G. (2009) Modeling the inactivation of *Listeria innocua* in raw whole milk treated under thermo-sonication, *Innov. Food Sci. Emerg.* **10**, 172-178.
- Bermúdez-Aguirre D., Mawson R., Barbosa-Cánovas V.G (2011) Study of Possible Mechanisms of Inactivation of *Listeria Innocua* in Thermo-Sonicated Milk Using Scanning Electron Microscopy and Transmission Electron Microscopy. *J. Food Process. Preserv.* **35**, 767-777.
- Bigelow, T.A., Northagen, T., Hill, T.M., Sailer, F.C. (2009) The destruction of *Escherichia coli* biofilms using high-intensity focused ultrasound. *Ultrasound Med Biol.* **6**, 1026-1031.
- Blair, I., Duffy, G., McDowell, D., Sheridan, J. (1997) Development of a surface adhesion immunofluorescent technique for the rapid isolation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat. *J. Appl. Microbiol.* **82**, 225-32.
- Briandet, R., Meylheuc, T., Maher, C., Bellon-Fontaine, M.N. (1999) *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5328-5333.
- Brooks, J., Daneshvar, M., Malcolm, G., Pine, L. (1989) Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. *Can. J. Microbiol.* **35**, 245-54.

- Buchrieser, C., Cossart, P., Kunst, F., Glaser, P. and Rusniok, C. (2003) Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **35**, 207-13.
- Campoccia, D., Montanaro, L., Arciola, C.R. (2013) A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomater.* **34**, 8533-8554.
- Chemat, F., Huma, Z., Khan, M.K. (2011) Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrason. Sonochem.* **18**, 813-835.
- Ciccio, D.P., Meloni, D., Ianieri, A. (2015) *Listeria Monocytogenes*: Growth in biofilms in the food industry. U: *Listeria Monocytogenes*: Incidence, Growth Behavior and Control, (Tiffany Vicario, ured.), Nova Science Publishers, New York, str. 37-58.
- Davey, M. E., O'Toole, G. A. (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol.Mol.Biology Rev.* **64**, 847– 67.
- Dolatowski, J.Z., Stadnik, J., Stasiak, D. (2007) Applications of ultrasound in food technology. *Acta Sci. Pol., Technol. Alimen.* **6**, 89-99.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 167-193.
- Earnshaw, R.G. (1998) Ultrasound: A new opportunity for food preservation. U: *Ultrasound in Food Processing* (Powey, M.J.W., Mason, T.J., ured.), Blackie Academic and Professional, London, str. 183-192.
- Earnshaw, R.G., Appleyard, J., Hurst, R.M. (1995) Understanding physical inactivation processes: Combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. *Int. J. Food Microbiol.* **28**, 197-219.
- EFSA i ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control) (2015) The European union summary report on trends and sources of Zoonoses, Zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA J.* **13**, 162
- Ensminger, D. (1988) Acoustic and electroacoustic methods of dewatering and drying. *Drying Techn.* **6**, 473-499.
- Ercan, S.S., Soysal, Ç. (2013) Use of ultrasound in food preservation. *Nat. Sci. J.* **5**, 5-13.

- Farber, J. M., Coates, F., & Daley, E. (1992) Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* **15**, 103-105.
- Feng, H., Barbosa-Canovas, G.V, Weiss, J. (2011) Ultrasound technologies for food and bioprocessing, Springer, New York.
- Glaser, P. i sur. (2001) Comparative Genomics of Listeria Species. *Sci.* **294**, 849-52.
- Gogate, P. R., Pandit, A. B. (2011) Sonocrystallization and its application in food and bioprocessing. U: Ultrasound technologies for food and bioprocessing (H. Feng, G. Barbosa-Canovas, J. Weiss, ured.), Springer, New York, str. 467–493.
- Got, F., Culioli, J., Berge, P., Vignon, X., Astruc, T., Quideau, J.M., Lethiecq, M. (1999) Effects of high-intensity high frequency ultrasound on ageing rate, ultrastructure and some physicochemical properties of beef. *Meat Sci.* **51**, 35-42.
- Jayasooriya, S.D., Bhandari, B.R., Torley, P., D’Arcy, B.R. (2004) Effect of high power ultrasound waves on properties of meat. *Int. J. Food Prop.* **7**, 301-319.
- Junttila, J. R., Niemela, S. I., Hirn, J. (1988). Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. *J. Appl. Bact.* **65**, 321-327
- Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., Lee, D.U. (2004) Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends Food Sci. Techn.* **15**, 261- 266.
- Kuehl, R. O. (2000) Design of Experiments: Statistical Principles of Research Design and Analysis, Duxbury Press, Pacific Grove.
- Leadley, C.E., Williams, A. (2006) Pulsed electric field processing, power ultrasound and other emerging technologies. U: Food Processing Handbook (Brennan, J.G., ured.), Wiley-VCH, Weinheim, str. 214-218.
- Leighton, T.G. (1998) The principles of cavitation. U: Ultrasound in Food Processing, (Powey, M.J.W., Mason, T.J., ured.), Blackie Academic and Professional, London, str. 151-182.
- Mackiw, E., Modzelewska, M., Maka L., Sciezynska, H., Pawłowska, K., Postupolski, J., Korsak, D. (2016) Antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat products in Poland in 2007-2011. *Food Control.* **59**, 7-11.



- Manas, P., Munoz, B., Sanz, D., Condon, S. (2006) Inactivation of lysozyme by ultrasonic waves under pressure at different temperatures. *Enzyme Microb. Tech.* **39**, 1177-1182.
- Mason, T.J., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P. (1996) The uses of ultrasound in food technology. *Ultrason. Sonochem.* **3**, 253-260.
- Mason, T. J. (1998) Power ultrasound in food processing — The way forward. U: Ultrasound in Food Processing (Powey, M.J.W., Mason, T.J., ured.), Blackie Academic and Professional, London, str. 103–126.
- Mason, T.J. (2003) Sonochemistry and sonoprocessing: the link, the trends and (probably) the future. *Ultrason. Sonochem.* **10**, 175-179.
- McClements, D.J. (1995) Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends Food Sci. Tech.* **6**, 293-299.
- Mclean, J.R., Mortimer, A.J. (1988) A cavitation and free radical dosimeter for ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* **14**, 59.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V. (1999) Food related illness and death in United States. *Emerg. Infect. Dis.* **5**, 607-625.
- Meloni, D. (2014) Focusing on the main morphological and physiological characteristics of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *J. Vet. Sci. Res.* **1**, 1–2.
- Moholkar, V. S., Rekveld, S., Warmoeskerken, M. M. C. G. (2000) Modeling of the acoustic pressure fields and the distribution of the cavitation phenomena in a dual frequency sonic processor. *Ultrasonics.* **38**, 666–670.
- Muthukumar, S., Kentish, S. E., Stevens, G. W., Ashokkumar, M. (2006) Application of ultrasound in membrane separation processes. *Rev. Chem. Eng.* **22**, 155–194
- Nikolaev, Y.A., Plakunov, V.K. (2007) Biofilm -“City of Microbes” or an Analogue of Multicellular Organisms? *Microbio.* **76**, 125-138.
- Oliver, J.D. (2005) The Viable but Nonculturable State in Bacteria. *J. Microbiol.* **43**, 93-100.
- Patist, A., Bates, D. (2008) Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.* **9**, 147-154.

- Piana, A., Are, R., Orrù, M., Saba, F., Dettori, M., Maida, I., Sotgiu, G., Rais, C., Mura, M.S. (2005) *Listeria monocytogenes* meningoencephalitis: Molecular methods for diagnosis and for monitoring the response to chemotherapy. *Ital. J. Public Health.* **2**, 29–34.
- Piyasena, P., Mohareb, E., McKellar, R.C. (2003) Inactivation of microbes using ultrasound. *Int. J. Food Microbiol.* **87**, 207-216
- Porter, J., Edwards C., Pickup W.R. (1995) Rapid assessment of physiological status in *Escherichia coli* using fluorescent probes. *J. Appl. Bacteriol.* **4**, 399-408.
- Rastogi, K.N. (2011) Opportunities and challenges in application of ultrasound in food processing. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **51**, 705-722
- Rehman, U.M., Jawaid, P., Uchiyama, H., Kondo, T. (2016) Comparison of free radicals formation induced by cold atmospheric plasma, ultrasound, and ionizing radiation. *Arch. Biochem. Biophys.* **605**, 19-15, doi: 10.1016/j.abb.2016.04.005.
- Richards, W.T., Loomis, A.L. (1927) The chemical effects of high frequency sound waves I. A preliminary survey. *J. Am. Chem. Soc.* **49**, 3086-3100.
- Rosenthal, I., Sostaric, J.Z., Riesz, P. (2004) Sonodynamic therapy - a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound. *Ultrason. Sonochem.* **11**, 349-363.
- Sala, F.J., Burgos, J., Condón, S., López, P., Raso, J. (1995) Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. U: *New Methods of Food Preservation* (Gould, W., ured.), Blackie Academic and Professional, London, str. 176–204.
- Show, K.Y., Mao, T.H., Lee, D.J. (2007) Optimisation of sludge disruption by sonication. *Water Res.* **41**, 4741-4747.
- Supeno, P. K. (2000) Sonochemical formation of nitrate and nitrite in water. *Ultrason. Sonochem.* **7**, 109–113.
- Suslick, K.S. (1988) Homogeneous sonochemistry. U: *Ultrasound: Its Chemical, Physical, and Biological Effects* (Suslick, K.S., ured.), VCH Publishers, Inc., New York, str. 123–163.
- Sutherland, I.W., Hughes, K.A., Skillman, L.C., Tait, K. (2004) The interaction of phage and biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* **232**, 1–6.

Tiwari, B.K., Mason, J.T. (2012) Ultrasound Processing of Fluid Foods. U: Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods (Cullen P.J., Tiwari, B. K, Valdramidis, V., ured.), Elsevier Inc., Amsterdam, str. 135-165.

Vercet, A., Lopez, P., Burgos, J. (1998) Free radical production by manothermosonication. *Ultrasonics*. **36**, 615-618.

Wordon, B.A., Mortimer, B., McMast, L.D. (2011) Comparative real-time analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell viability, injury and death induced by ultrasound (20 kHz) and heat for the application of hurdle technology. *Food Res. In*. **47**, 134-139.

Zheng, L., Sun, D.W. (2006) Innovative applications of power ultrasound during food freezing processes. *Trends Food Sci. Technol*. **17**, 16-23.