

Research Article

Agricultural Engineering, 47(1) (2024) 95-109  
DOI: 10.22055/agen.2024.45553.1705

ISSN (P): 2588-526X  
ISSN (E): 2588-5944

## Study of the effect of high-power ultrasonic waves on the survival of two types of bacteria in the tomatoes washing effluent

M. Azhdar<sup>1</sup>, N. Shahgholian<sup>2\*</sup>, H. Zaki Dizaji<sup>3</sup> and M. Amin<sup>4</sup>

1. Graduated M.Sc. student, Department of Biosystems Engineering, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
2. Assistant professor, Department of Biosystems Engineering, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
3. Associate professor, Department of Biosystems Engineering, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
4. Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

Received: 25 December 2023 Accepted: 3 March 2024 \*Corresponding Author: n.shahgholian@scu.ac.ir

### Abstract

**Introduction:** These days, most of the disinfectants used in the food industry such as chlorinated compounds are dangerous and harmful. Common methods of removing all types of water pollution have many disadvantages for human health and the environment. It is possible to preserve the environment and human health by replacing these methods with new ones such as ultrasound technology. Ultrasonic waves are non-thermal technology that helps increase microbial safety and prolong the shelf life of heat-sensitive foods with nutritional value and functional characteristics. Ultrasonic waves are known as one of the most effective disinfection methods for all forms of microbial and fungal contamination. These waves reduce the resistance of microorganisms by physically damaging them. Therefore, this study deals with the effect of high-power ultrasonic waves on the population of two types of pathogenic microorganisms in the washing effluent of tomatoes. The selected bacteria included one type of gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*) and one type of gram-negative bacteria (*Escherichia coli*) to compare the effect of ultrasonic waves on the two different types of bacteria with different cell walls.

**Materials and Methods:** In this research, irradiation of high-power ultrasonic waves was applied to the water after washing the tomatoes. In this washing effluent, the impacts of ultrasonic power (100, 300, 500 W), radiation time (300, 750, 1200 s), and water temperature (0, 30, 60 °C) were examined on the survival of the *S. aureus* and *E.coli*. The data analysis was done for each experimental runs, using the response surface methodology (RSM), to find the best model for estimating the difference in bacterial population (CFU) before and after irradiation.

**Results and Discussion** The lack of fit was not significant in the analysis of variance and also the value of the explanation coefficient in the model for *S. aureus* and *E.coli* were 0.9721% and 0.9206%, respectively. This indicated the appropriate accuracy of the quadratic model in estimating the number of *S. aureus* and *E.coli* remaining in the water after washing tomatoes (for



the mentioned independent variables). Gram-negative bacteria (*E. coli*), are composed of an inner thin peptidoglycan cell wall, surrounded by an outer lipopolysaccharide membrane. Gram-positive bacteria (*S. aureus*), lack an outer membrane but are made up of a multi-layered and very complex structure layers of peptidoglycan many times thicker than is found in the Gram-negatives. In general, the application of ultrasonic waves causes to destruction of the mentioned bacteria. The main disinfection effect of ultrasonic waves on the population of *S. aureus* was power, while the main variable for *E.coli* was temperature (based on the highest coefficient of quadratic equations/ 99% confidence level). Through physical, chemical and mechanical effects caused by acoustic cavitation, ultrasound is able to affect the bacterial suspension without producing a side product. The antimicrobial effect of ultrasound is achieved by a combination of chemical effects such as the production of active free radicals and thermal effects such as the production of local hot spots. The observations showed that increasing the temperature first increased and then decreased the effectiveness of ultrasonic waves in the inactivation of bacteria. The negative effect of increasing temperature could be related to the decrease in the intensity of bubble explosion.

**Conclusion:** According to the results the destruction effect of ultrasonic waves on *S. aureus* and *E.coli* increased at the average time of 750 s, with the simultaneous decrease in temperature (from 60 to 0 °C) and increase in power (from 100 to 500 W),. In the perturbation curves, the simultaneous effect of all parameters (temperature, time and power), were investigated at the middle points (30 °C, 750 s and 300 W). At these points, power changes were more effective in reducing the population of *S. aureus*, while temperature changes were more effective on the population reduction of *E coli*. The population of *S. aureus* and *E. coli* decreased by increasing power of ultrasonic waves. Temperature and power had a synergistic effect, that is, the increase of both parameters led to the decrease of bacterial population. Finally, the tested variables were optimized by desirability in the RSM to minimize the population of microorganisms (*S. aureus* and *E. coli* simultaneously), and parameters (in the range) obtained for the ultrasonic power, time, and temperature were 300 W, 1200 s, and 0 °C respectively.

**Keywords:** *Ultrasonic waves, tomato, water disinfection, S.aureus, E.coli.*

## مطالعه تاثیر امواج پر قدرت فراصوت (HPUS) بر زنده‌مانی دو نوع باکتری در آب پس از شستشوی گوجه‌فرنگی

مژگان اژدر<sup>۱</sup>، نرگس شاهقلیان<sup>۲\*</sup>، حسن ذکی دیزجی<sup>۳</sup> و منصور امین<sup>۴</sup>

- ۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه مهندسی بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران  
 ۲- استادیار گروه مهندسی بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران  
 ۳- دانشیار گروه مهندسی بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران  
 ۴- استاد گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

| تاریخچه مقاله   | چکیده   |
|---|---|
| دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۰۴<br>پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۱۲/۱۳   |   |
| <b>کلمات کلیدی:</b><br>امواج فراصوت،<br>گوجه‌فرنگی،<br>ضد عفونی آب،<br><i>E.Coli</i><br><i>S.aureus</i> |   |
| *عهده دار مکاتبات<br>E-mail: n.shahgholian@scu.ac.ir  |   |
|   | <p>امروزه بیشتر ضد عفونی‌کننده‌هایی که در صنایع غذایی استفاده می‌شوند، برای بهداشت و سلامتی انسان خطرناک و مضر هستند. در سال‌های اخیر، به‌منظور غلبه بر این محدودیت‌ها، محققان کار روی روش‌های جایگزین را در دستور کار خود قرار داده‌اند. روش‌های رایج حذف انواع آلودگی دارای معایب بسیاری برای سلامتی انسان و محیط هستند. می‌توان با جایگزین کردن این روش‌ها با روش‌هایی نوین همچون فراصوت به حفظ محیط زیست و سلامت انسان‌ها کمک کرد. در این مقاله، تاثیر امواج فراصوت پر قدرت بر فعالیت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای آب پس از شستشوی گوجه‌فرنگی مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور متغیرهای مستقل شامل توان فراصوت (۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰ وات)، زمان موج‌دهی (۳۰۰، ۷۵۰، ۱۲۰۰ ثانیه) و دما (۰، ۳۰، ۶۰ درجه سلسیوس) انتخاب شدند تا تاثیر آن بر دو نوع باکتری گرم مثبت و گرم منفی بررسی شود. پس از انجام آزمایشات، تحلیل داده‌ها به روش سطح پاسخ نشان داد که مدل درجه دوم با ضریب تبیین ۹۷٪ و ۹۳٪ به ترتیب بهترین مدل برای برآورد تعداد باکتری‌های <i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> و <i>اشرشیاکلی</i> در تیمارهای مختلف بوده است. نتایج نشان داد که با افزایش توان و زمان امواج‌دهی اثر کشندگی امواج فراصوت افزایش می‌یابد و همین‌طور مشخص شد که افزایش دما ابتدا موجب افزایش و سپس کاهش اثرگذاری امواج فراصوت در غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها بوده است. در پایان، متغیرهای مورد آزمایش با روش سطح پاسخ برای کاهش همزمان جمعیت میکروارگانیسم‌های <i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> و <i>اشرشیاکلی</i> بهینه شد و به ترتیب مقادیر به دست آمده برای توان، زمان و دمای اعمال امواج فراصوت به آب، ۳۰۰ وات، ۱۲۰۰ ثانیه و ۰ درجه سلسیوس بودند.</p> |

### مقدمه

از ضروری‌ترین عوامل توسعه جوامع انسانی، آب است و ایران از جمله کشورهایی است که در آن، تأمین آب برای مصارف مختلف، از دغدغه‌های مهم دولت‌مردان در راستای توسعه پایدار محسوب می‌شود. تاکنون حجم قابل توجهی از منابع آبی کشور به دلیل کیفیت پایین، مورد استفاده قرار نگرفته و یا در استفاده از آنها ضوابط و معیارهای زیست محیطی لحاظ نگردیده‌است. از سوی دیگر به دلیل امکان گسترش بیماری‌های متعدد ناشی از آلودگی آب، لازم است پساب‌ها به نحو مناسب جمع‌آوری، تصفیه و به چرخه‌ی طبیعی آب بازگردانده شوند. در کارخانجات غذایی، فاضلاب‌ها را باید از جهت فیزیکی، شیمیایی و میکروارگانیسم‌ها مورد بررسی قرار داد (۵).

سبزیجات به علت دارا بودن ارزش غذایی و نیز فیبر خوراکی، توسط مصرف‌کنندگان به میزان زیادی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۸). در جهان، ۳۷ کشور امکان فرآوری گوجه-فرنگی را دارند و تنها ۱۲ کشور اول، ۹۰ درصد فرآوری را انجام می‌دهند. ایران پس از آمریکا، ایتالیا، چین و ترکیه مقام پنجم را دارد. بر اساس «سامانه هوشمند اطلاعات کشاورزی» تولید سالیانه رب گوجه‌فرنگی در بازه سال‌های ۱۳۸۲ تا ۱۳۹۸ از ۱۳۸/۰۰۰ تن به ۵۷۷/۳۸۹ تن افزایش یافته است (۹).

یکی از مشکلات تولید رب گوجه‌فرنگی در کارخانجات آلودگی‌های میکروبی است. نحوه برداشت، حمل و نقل و جابجایی محصول به کارخانه و نیز ماهیت میکروبیولوژیکی و شیمیایی آب مورد استفاده در مرحله شستشوی گوجه‌فرنگی در کارخانه از عواملی هستند که می‌توان آنها را به‌عنوان نقاط کنترلی<sup>۱</sup> (CP) یا نقاط کنترل بحرانی<sup>۲</sup> (CCP) در نظر گرفت (۲). بیشترین باکتری‌های گزارش شده در کارخانجات مواد غذایی به ترتیب مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس*<sup>۳</sup>، *باسیلوس سرئوس*<sup>۴</sup> و *اشرشیاکلی*<sup>۵</sup> بوده است (۶).

آلودگی‌های میکروبی آب و غذا یکی از علل مرگ‌ومیر در کشورهای در حال توسعه است. شکی نیست که تصفیه آب آشامیدنی در صدسال اخیر، بیماری‌های قابل انتقال توسط آب را در حد قابل ملاحظه‌ای کاهش داده است؛ به طوری که در بسیاری از کشورهای پیشرفته این بیماری‌ها تقریباً ریشه کن شده و یا به طور کامل تحت کنترل قرار گرفته است، اما در کشورهای در حال توسعه لازم است که برای ریشه کن شدن این بیماری‌ها تلاش‌های جدی‌تری صورت گیرد (۱۵). برای ضدعفونی آب روش‌های گوناگون فیزیکی و شیمیایی مانند حرارت خشک، حرارت مرطوب، گاز پلاسما، مواد شیمیایی سترون‌کننده، یونیزاسیون و شعله وجود دارد (۱۲ و ۱۶).

امروزه بیشتر مواد ضد میکروبی و ضد عفونی‌کننده‌هایی مانند ترکیبات کلردار که در صنایع غذایی استفاده می‌شوند، برای بهداشت و سلامتی انسان خطرناک و مضر هستند. در سال‌های اخیر، تقاضای زیادی برای مواد ضد میکروبی و ضد عفونی‌کننده‌های ایمن برای صنعت غذا وجود داشته است (۱۱ و ۱۷). به‌منظور غلبه بر این محدودیت‌ها، محققان کار روی روش‌های جایگزین را در دستور کار خود قرار داده‌اند. روش‌های رایج حذف انواع آلودگی دارای معایب بسیاری برای سلامتی انسان و محیط می‌باشند. می‌توان با جایگزین کردن این روش‌ها با روش‌هایی نوین همچون فراصوت به حفظ محیط زیست و سلامت انسان‌ها کمک کرد.

امواج فراصوت یک فناوری غیرحرارتی است که به‌عنوان یکی از مؤثرترین روش‌های گندزدایی شناخته می‌شود و ماندگاری مواد غذایی حساس به حرارت و ارزش تغذیه‌ای آنها را حفظ می‌کند (۴). در روش اعمال امواج فراصوت، عمل کاویتاسیون روی داده که موجب تخریب دیواره سلولی غشا و از بین رفتن میکروارگانیسم‌ها می‌شود. هنگامی که توان بالای امواج فراصوت در محیط پخش می‌شود میکرو حباب‌هایی با فشار نوسانی ایجاد می‌شود که ترکیدن آنها موجب افزایش دما و فشار محیطی می‌شود. این فرآیند با ایجاد نیروی برشی و تغییر سریع فشار تولید شده اثر مخربی را بر دیواره‌ی میکروپ‌ها اعمال می‌کند. این اعمال اگر با افزایش دما ترکیب شود اثر مضاعف در بر خواهد داشت (۱۰). بنابراین امواج

1- CP: Critical Point

2- CCP: Critical Control Point

3- *Staphylococcus aureus*

4- *B. Subtilis*

5- *E. Coli*

رقت  $10^{-5}$  رقیق شد (این رقت بر اساس پیش تست آزمون بر باکتری‌های خالص *E. coli* و *S. aureus* تعیین شد). منبع باکتری‌های خالص مورد استفاده از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران<sup>۷</sup> بود. سپس از هر نمونه مقدار یک میلی‌لیتر آب شستشو توسط سمپلر برداشته و در کنار شعله، هم در محیط کشت EMB Agar و هم در محیط کشت MSA توسط لوپ، کشت خطی داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷/۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند، سپس شمارش کلنی‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس انجام شد.

### روش تحلیلی، بهینه‌سازی و مدل‌سازی سطح پاسخ

روش سطح پاسخ مجموعه‌ای از روش‌های ریاضی است که رابطه بین یک یا چند متغیر پاسخ را با چندین متغیر مستقل تعیین می‌کند. روش سطح پاسخ، روشی برای بهینه‌سازی خروجی‌های آزمایش است که این روش با تعیین میزان سطح پاسخ بهینه هر یک از متغیرهای طراحی، به بهترین سطح پاسخ دست پیدا می‌کند. این روش برای توسعه و بهینه‌سازی فرآیندهایی به کار می‌رود که در آنها سطح مورد نظر تحت تاثیر متغیرهای زیادی قرار داشته و هدف، بهینه کردن پاسخ آن است.

برای به دست آوردن مقدار بهینه، از رابطه (۱) رگرسیون استفاده شد.

$$Y_i = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2 \quad (1)$$

+ع

در این رابطه،  $\beta_0$ ،  $\beta_i$ ،  $\beta_{ij}$ ،  $\beta_{ii}$  ضرایب ثابت،  $X_i$ ،  $X_j$  متغیرهای مستقل و  $\epsilon$  خطای تصادفی هستند. در این آزمایش از طرح مرکب مرکزی با پنج نقطه استفاده شد که با توجه به جدول ۱ سطوح متغیرهای مستقل، کدبندی شدند.

فراصوت مقاومت میکروارگانیسم‌ها را با آسیب فیزیکی وارده به آنها، کاهش می‌دهند (۱۶).

پژوهش حاضر به منظور بررسی اثرات توان و زمان اعمال امواج فراصوت و دما بر آب پساب شستشوی گوجه‌فرنگی بر باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس درون آب پس شستشوی گوجه‌فرنگی انجام شد. استافیلوکوکوس اورئوس، یک نوع باکتری گرم مثبت و اشرشیاکلی، یک نوع باکتری گرم منفی است که برای مقایسه تاثیر امواج فراصوت انتخاب شدند.

### مواد و روش‌ها

تجهیزات و دستگاه‌ها شامل ارلن، بشر، لوله‌های آزمایش درب‌دار، پلیت (پتری‌دیش<sup>۱</sup>)، فیلدورپلاتین (لوپ، آنس)، سمپلر و سرسمپلر، PH سنج<sup>۲</sup>، اتوکلاو<sup>۳</sup>، انکوباتور<sup>۴</sup> (گرمخانه)، همزن مغناطیسی، دستگاه فراصوت بود. مواد شیمیایی و محیط‌های کشت مورد استفاده شامل محیط کشت<sup>۵</sup> EMB Agar و محیط کشت<sup>۶</sup> MSA از شرکت سیگما آلد ریچ تهیه شد.

در این پژوهش از یک دستگاه پروب فراصوت استوانه‌ای پر قدرت (مدل APU1500 ساخت شرکت آدیکو، ایران) استفاده شده است. طبق جدول ۱، تیمارهای متفاوت اعمال شده شامل ترکیب سه متغیر توان، زمان موج‌دهی و دما جهت بررسی میزان اثرگذاری امواج بر باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus* درون آب پس شستشوی گوجه‌فرنگی بود. دامنه متغیرهای انتخاب شده بر اساس بررسی منابع و نیز انجام پیش تست‌های اولیه تعیین شده است. پیش از تیماردهی ابتدا نمونه‌های گوجه‌فرنگی در آزمایشگاه شسته و آب شستشوی به دست آمده در محیط استریل به لوله‌های آزمایش درب‌دار منتقل شدند، به هر لوله آزمایش مقدار ۱۰ میلی‌لیتر آب شستشو انتقال داده شد و سپس هر نمونه به روش رقیق‌سازی سریالی تا

- 1- Petri Dish
- 2- PH Meter
- 3- Autoclave
- 4- Incubator
- 5- Eosin Methylene Blue Agar
- 6- Mannitol Salt Agar

اژدر و همکاران: مطالعه تاثیر امواج پر قدرت فراصوت...

جدول (۱) سطوح متغیرهای مستقل در روش سطح پاسخ  
Table (1) Levels of independent variables in the response surface method

| سطوح (Levels) |     |     | واحد (Unit) | پارامتر (Parameter) | متغیر (Variable) |
|---------------|-----|-----|-------------|---------------------|------------------|
| +1            | 0   | -1  |             |                     |                  |
| 60            | 30  | 0   | °C          | دما                 | A                |
| (Temperature) |     |     |             |                     |                  |
| 1200          | 750 | 300 | s           | زمان                | B                |
| (Time)        |     |     |             |                     |                  |
| 500           | 300 | 100 | W           | توان                | C                |
| (Power)       |     |     |             |                     |                  |

$$6250 BC) - (6.41 A^2) + (1.09 B^2) + (3.09 C^2)$$

## نتایج و بحث

### تحلیل آماری

در معادله‌های بالا پارامتر A دما (°C)، B زمان موج‌دهی (S) و C توان فراصوت (W) هستند.

باتوجه به رابطه (۲) ملاحظه می‌شود که ضرایب متغیرهای مستقل توان، اثر متقابل زمان-توان و مجذور دما منفی هستند. این بدان معناست که افزایش هر یک از متغیرهای نام برده اثری کاهشی بر تعداد *S.aureus*، در مدل ارائه شده دارد. در رابطه (۲) بیشترین ضریب متغیر مستقل، مربوط به متغیر توان (مجذور توان) است و افزایش توان از ۱۰۰ به ۵۰۰ وات تاثیر بیشتری بر کاهش جمعیت میکروبی *استافیلوکوکوس اورئوس* داشت. مربع افزایش دما از صفر به ۶۰ درجه سلسیوس و اثر متقابل افزایش توان-زمان نیز تاثیر مشابهی دارد.

بر اساس رابطه (۳) ضرایب متغیرهای مستقل زمان، توان و مربع دما منفی است و بیشترین ضریب متغیر مستقل مربوط به مجذور دما است. لازم به ذکر است که مدل‌های پیش‌بینی شده درجه دوم هستند و روند کمی تغییرات در نمودارها به خوبی مشخص است. با توجه به بررسی همزمان دو متغیر در نمودارها، متغیر سوم در نقطه مرکزی بررسی شده است.

همانطور که در جدول ۲ مشخص است، در تحلیل به روش منحنی سطح پاسخ، اثرات اصلی توان فراصوت و دما در سطح اطمینان ۹۹٪ و مدت زمان موج‌دهی در سطح اطمینان ۹۵٪ بر تعداد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* معنی‌دار بوده است. عدم معنی‌داری خطای برازش در آنالیز واریانس و مقدار ضریب تبیین مدل با مقادیر ۰/۹۷۲۱٪ و ۰/۹۲۰۶٪ به ترتیب برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی*، دقت مدل درجه دوم در تخمین تعداد میکروارگانسیم‌های مذکور در آب پس شستشوی گوجه‌فرنگی (به ازای متغیرهای مستقل ذکر شده)، را نشان می‌دهد.

باتوجه به جدول ۲، مدل ساده شده درجه دوم برای داده‌های واقعی آزمایش به ترتیب به صورت رابطه (۲) و (۳) است.

$$S.aureus = +30.69 + (0.6000 A) + (0.6000 B) - (3.60 C) + (0.1250 AB) + (5.88 AC) - (1.12 BC) - (3.80 A^2) + (4.20 B^2) + (8.20 C^2) \quad (2)$$

$$E.Coli = +30.07 + (0.6000 A) - (0.7000 B) - (0.1000 C) + (1.88 AB) + (2.8 AC) + (0. \quad (3)$$

جدول (۲) نتایج حاصل از آنالیز ANOVA برای پارامترهای خروجی  
 Table (2) Results of the ANOVA analysis for output parameters

| R-Squared | P-Value              | F Value | متغیر وابسته<br>(Dependent variable)                       |
|-----------|----------------------|---------|--|
| 0.9721    | <0.0001              | 34.82   | <i>S.aureus</i><br>مدل (درجه دوم)<br>Model (Second degree) |
|           | 0.2719               | 1.37    | =A دما (Temp)  |
|           | 0.2719               | 1.37    | =B زمان (Time)   |
|           | <0.0001**            | 49/32   | =C توان (Power)  |
|           | 0.8322               | 0.0476  | AB   |
|           | <0.0001**            | 105.08  | AC   |
|           | 0.0813               | 3.85    | BC   |
|           | 0.0037**             | 15.05   | A <sup>2</sup>   |
|           | 0.0021**             | 18.31   | B <sup>2</sup>   |
|           | <0.0001**            | 69.85   | C <sup>2</sup>   |
|           | 0.1451 <sup>ns</sup> | 3.14    | Lack of Fit  |
| 0.9206    | 0.0006**             | 11.60   | <i>E.Coli</i><br>مدل (درجه دوم)<br>Model (Second degree)   |
|           | 0.2061               | 1.86    | =A دما (Temp)  |
|           | 0.1463               | 2.53    | =B زمان (Time)   |
|           | 0.8254               | 0.0516  | =C توان (Power)  |
|           | 0.0042**             | 14.51   | AB   |
|           | 0.0009**             | 23.28   | AC   |
|           | 0.02361*             | 10.61   | BC   |
|           | <0.0001**            | 57.95   | A <sup>2</sup>   |
|           | 0.2288               | 1.67    | B <sup>2</sup>   |
|           | 0.0052**             | 13.44   | C <sup>2</sup>   |
|           | 0.1769 <sup>ns</sup> | 2.69    | Lack of Fit  |

ns: غیرمعنی دار، \* و \*\*: معنی دار به ترتیب در سطح اطمینان ۹۵ و ۹۹ درصد

باکتری کشی امواج فراصوت به دلیل ترکیبی از اثرات شیمیایی مانند تولید رادیکال های آزاد فعال و اثرات حرارتی مانند تولید نقاط داغ موضعی است. به طور کلی از بین بردن میکروارگانیسم ها به دلیل نازک شدن غشای سلولی، متمرکز ساختن حرارت و تولید رادیکال های آزاد در آب پس شستشو است. در طول فرآیند که موج فراصوت به مایع برخورد می کند، باعث ایجاد موج های

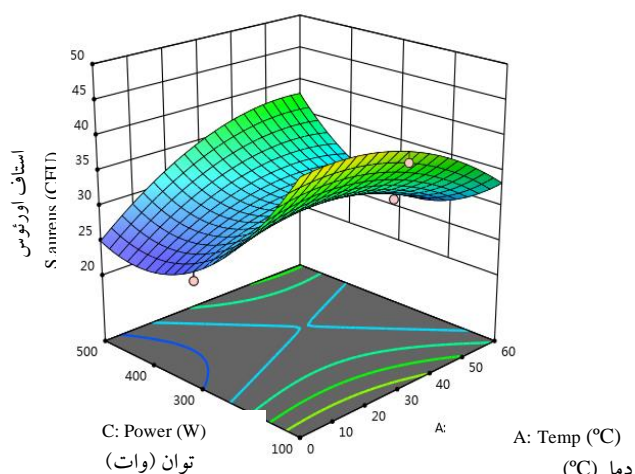
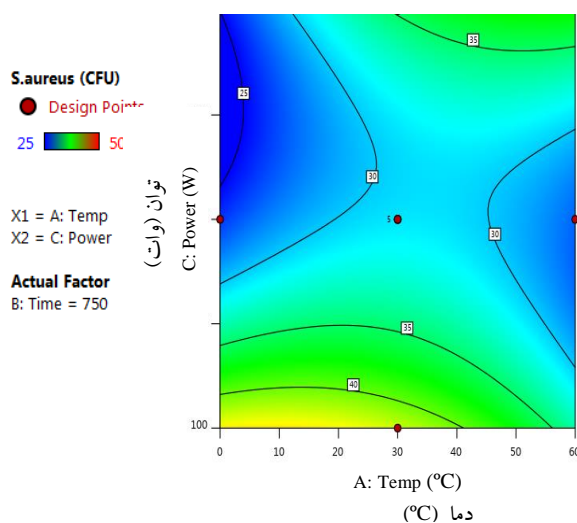
باکتری گرم منفی اشرفیاکلی از یک دیواره سلولی نازک پپتیدوگلیکان داخلی تشکیل شده است که توسط یک غشای لیپولی ساکاریدی بیرونی احاطه شده است. باکتری های گرم مثبت استافیلوکوک، فاقد غشای خارجی هستند اما از لایه های ساختاری چند لایه و بسیار پیچیده از پپتیدوگلیکان ساخته شده اند که ضخیم تر از لایه مشابه در باکتری های گرم منفی است (۱۹). اثر

اژدر و همکاران: مطالعه تاثیر امواج پر قدرت فراصوت...

شرایط می‌باشد (۱۳). همانگونه که در شکل ۱ (الف و ب) مشخص است، باتوجه به نتایج آزمایش‌های تجربی در زمان میانی ۷۵۰ ثانیه، با کاهش همزمان دما (از ۶۰ به ۰ درجه سلسیوس) و افزایش توان (از ۱۰۰ به ۵۰۰ وات)، اثر کشندگی امواج فراصوت بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* افزایش یافت. به عنوان مثال، در شکل ۱ (الف)، در دمای حدود ۶۰ درجه سلسیوس و توان بین ۳۰۰ تا ۴۰۰ وات، تعداد باکتری‌ها کاهش یافته است. در این راستا تحقیقات زیادی اثر توان فراصوت را بر کاهش میکروارگانیسم‌ها گزارش کرده‌اند (۱۰ و ۱۸).

مطالعه‌ای که روی آب پرتقال انجام شد، نشان داد با افزایش توان فراصوت، جمعیت میکروارگانیسم‌ها با شدت بیشتری کاهش یافت (۱۰).

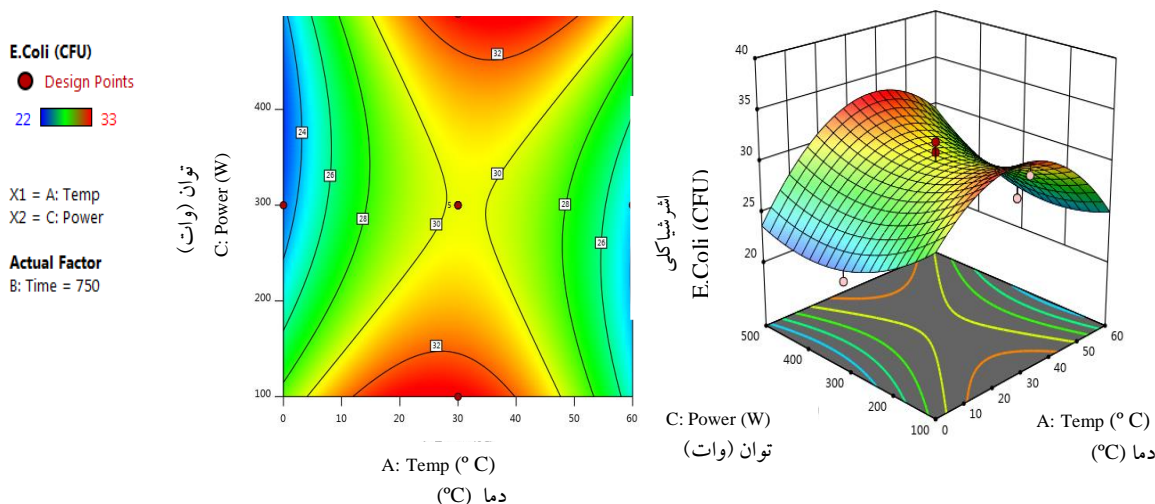
طولی می‌شود که خود، موجب ایجاد زمینه‌هایی از تغییر فشار خواهد شد. این حباب‌ها در طول چرخه انبساط سطح مقطع بزرگتری دارند که به افزایش انتشار گاز و توسعه حباب‌ها منتهی می‌شود. زمانی که حباب‌ها به نقطه بحرانی برسند، انرژی فراصوت ایجاد شده برای رسیدن به فاز بخار در حباب کافی نیست و در نتیجه این مولکول‌های منقبض شده، با یکدیگر برخورد می‌کنند و موج‌های شوک مانند ایجاد می‌کنند. این موج‌های شوک‌دار باعث ایجاد مناطقی با دمای بسیار بالا و فشار زیاد می‌شوند که گاهی دمای آن به ۵۵۰۰ درجه سلسیوس و فشار ۵۰۰ بار می‌رسد. این افزایش دمای موضعی و تغییرات فشار، اصلی‌ترین تاثیر ضدباکتریایی در اعمال فراصوت است (۱۳). اصلی‌ترین تاثیر ضدباکتریایی در فراصوت، تغییرات فشار حاصل از این



شکل (۱-الف) نمودارهای دوبعدی و سه بعدی اثر گذاری دما (درجه سلسیوس)، و توان (وات) در زمان ثابت (۷۵۰ ثانیه) بر زنده‌مانی *استافیلوکوکوس اورئوس* (کاهش CFU، معادل رنگ‌های سردتر در نمودار است)

Figure (1-a) 2D and 3D graphs of the effect of temperature (°C) and power (W) at constant time (750 s) on the survival of *S. aureus* (CFU reduction in the graph is equivalent with colder colors)





شکل (۱-ب) نمودارهای دوبعدی و سه بعدی اثرگذاری دما (درجه سلسیوس)، و توان (وات) در زمان ثابت (۷۵۰ ثانیه) بر زنده‌مانی باکتری‌های *اشرشیاکلی* (کاهش CFU، معادل رنگ‌های سردتر در نمودار است)

Figure (1-b) 2D and 3D graphs of the effect of temperature (°C) and power (W) at constant time (750 s) on the survival of *Escherichia coli* (CFU reduction in the graph is equivalent with colder colors)

در یک بررسی، اثربخشی ضد میکروبی مواد طبیعی در ترکیب با امواج فراصوت با فرکانس پایین و فرکانس بالا در برابر *E. coli K12* یا *L. innocua* (در دما و چگالی توان کنترل شده) مطالعه شد. غیرفعال‌سازی باکتری‌ها با کاهش نیم تا دو سیکل لگاریتمی در هنگام استفاده همزمان از امواج فراصوت (۱ مگاهرتز یا ۲۰ کیلوهرتز) و ترکیبات طبیعی (سیترال، کارواکرول یا ژرانیول)، در مقایسه با مجموع تیمارهای فردی در ۱۵-۳۰ دقیقه مشاهده شد (۲۰). کاربرد همزمان از اشعه ماوراء بنفش به همراه فراصوت، کلرین آزاد و پراستیک اسید بر میزان برخی باکتری‌ها در کاهو و گوجه گیلاسی بررسی شده است و مشخص شد که این ترکیب از تیمارها، زمان شستشوی مفید را کاهش داده و بهره‌وری را بهبود می‌بخشد (۱۷). در یک بررسی میزان تاثیر امواج فراصوت بر باکتری‌های مزوفیل، کلیفرم، مخمر و اسید لاکتیک باکتری و بر عصاره گوجه‌فرنگی نشان داد که آب میوه ای که به مدت ۶۰۰ ثانیه در معرض میدان فراصوت با شدت ۴۰ وات بر مترمربع قرار گرفته بود، حتی پس از ۱۰ روز ذخیره‌سازی، از نظر میکروبیولوژیکی خالص و عاری از میکروارگانیسم‌های فساد بود. این مطالعه نشان داد که امواج فراصوت را می‌توان با موفقیت در مقیاس

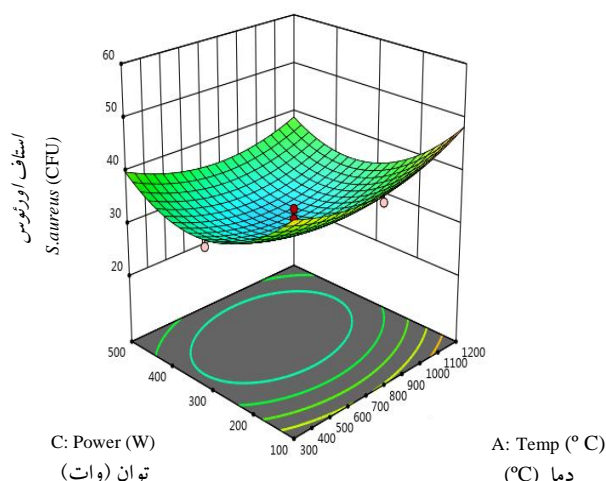
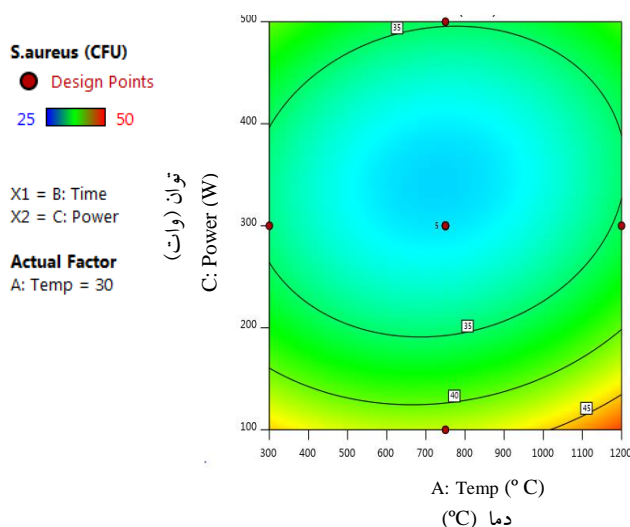
در شکل ۲-الف) مشاهده می‌شود که افزایش زمان بویژه زمان‌های میانی (۷۵۰ ثانیه) و توان میانی (بخصوص ۳۰۰ وات) بیشترین تاثیر را بر کاهش تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* داشت. در شکل ۲-ب) مشاهده می‌شود که افزایش زمان به خصوص زمان‌های میانی (۷۵۰ ثانیه) و توان‌های میانی فراصوت (۳۰۰ وات)، باعث کاهش شمارش کلی *اشرشیاکلی* در آب پس‌شستشو شد؛ زیرا افزایش زمان تیماردهی باعث افزایش تعداد دوره‌های جریان‌های صوتی در راکتور می‌شود که این موضوع باعث تاثیرگذاری بیشتر امواج فراصوت بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* می‌گردد. در مطالعه‌ای اثر زمان تیماردهی فراصوت بر غیرفعال‌سازی پکتین متیل استراز آب گوجه‌فرنگی بررسی شد، نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش زمان تیماردهی، غیرفعال‌سازی پکتین متیل استراز افزایش یافت. ذکر این نکته حائز اهمیت است که این کاهش در زمان‌های اولیه دارای شیب بیشتری نسبت به زمان‌های پایانی بود (۱۸). در تحقیقی دیگر با افزایش زمان قرار گرفتن آب لیمو در معرض امواج فراصوت، میزان شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها و نیز شمارش مخمرها و کپک‌ها روند کاهشی نشان داد (۳).

اژدر و همکاران: مطالعه تاثیر امواج پر قدرت فراصوت...

شکل ۳ (الف) و ۳ (ب) تاثیر همزمان هر سه پارامتر دما، زمان و توان را در نقاط میانی (۳۰ درجه سلسیوس، ۷۵۰ ثانیه و ۳۰۰ وات) نشان می‌دهد. در شکل ۳-الف مشاهده می‌شود که در این نقاط، تغییرات توان (دارای شیب بیشتر) بر کاهش باکتری‌های

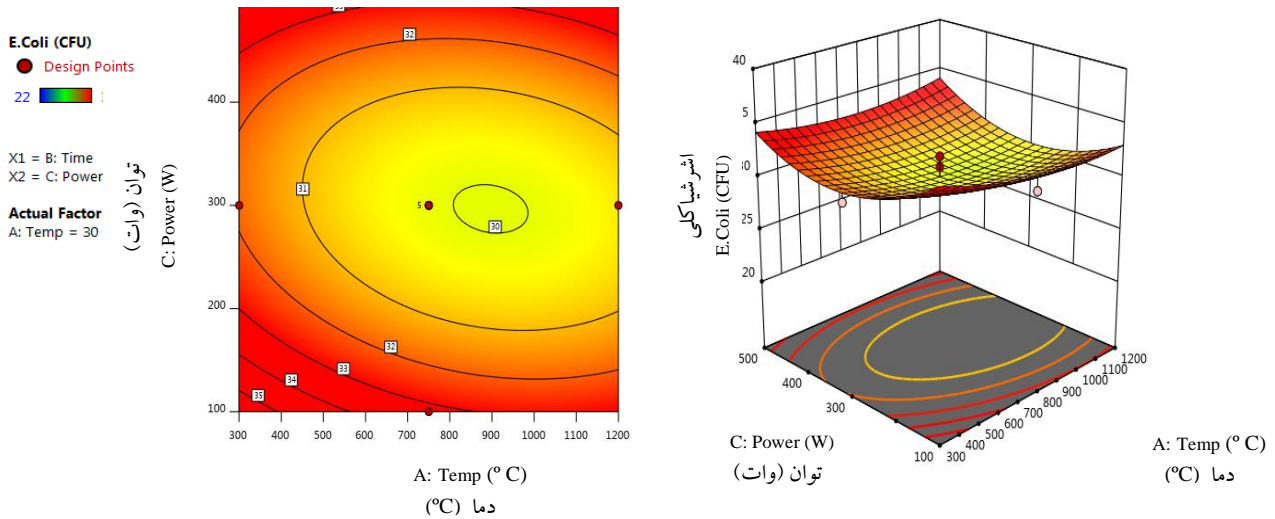
*استافیلوکوکوس اورئوس* موثرتر بود. در شکل ۳-ب) تغییرات پارامتر دما بر کاهش باکتری‌های *اشرشیاکلی* تاثیر گذارتر بود. در پایان برای تعیین نقطه بهینه و مقادیر بهینه پارامترهای مستقل آزمایش (توان فراصوت، زمان اعمال امواج فراصوت و دما) برای شرایطی که باعث بیشترین کاهش در تعداد باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* شود، از توابع هدف (رابطه ۲) و (رابطه ۳) استفاده شد.

صنعتی برای تولید آب گوجه فرنگی بدون تهیه کنسانتره استفاده کرد (۱۵). اثرات امواج فراصوت بر پوسیدگی میوه و کیفیت فیزیولوژیکی میوه توت فرنگی نیز مورد بررسی قرار گرفته است. توت فرنگی‌های تازه برداشت شده تحت تاثیر امواج ۰، ۲۵، ۲۸، ۴۰ یا ۵۹ کیلوهرتز در دمای ۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند و سپس در دمای ۵ درجه سلسیوس به مدت ۸ روز نگهداری شدند. نتایج نشان داد که تیمار فراصوت با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز به طور قابل توجهی میزان بروز پوسیدگی و تعداد میکروارگانیسم‌ها را کاهش داد. تیمارهای با امواج فراصوت ۲۵ و ۲۸ کیلوهرتز تاثیر قابل توجهی بر پوسیدگی میوه و بدتر شدن کیفیت میوه توت فرنگی نداشتند (۴).



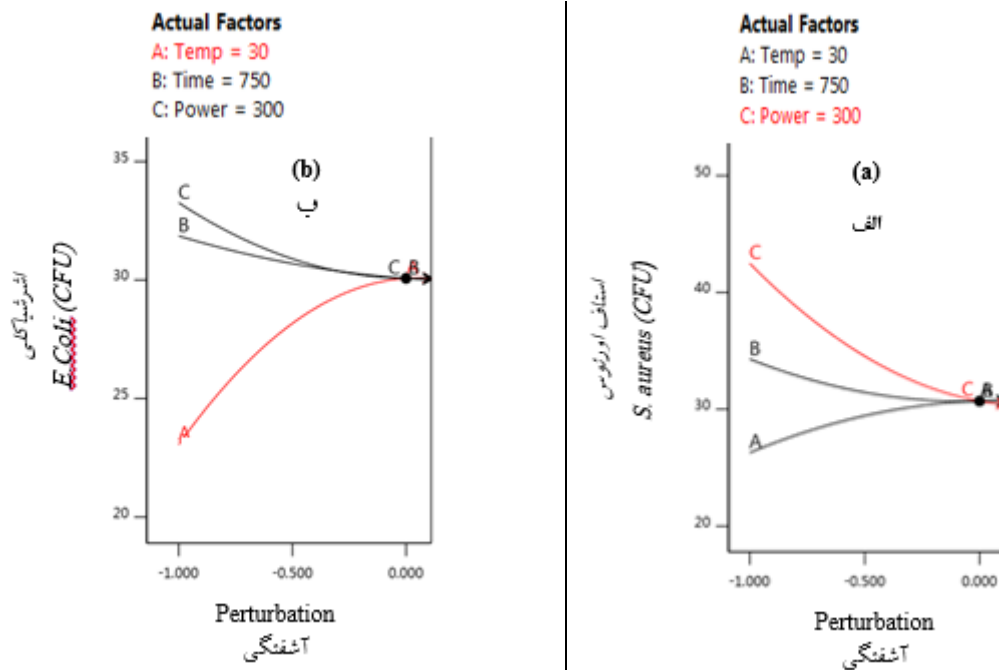
شکل (۲-الف) نمودارهای دوبعدی و سه بعدی و سه بعدی اثر گذاری زمان و توان در دمای ثابت ۳۰ درجه سلسیوس بر کاهش باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (کاهش تعداد CFU، معادل رنگ‌های سردتر در نمودار است)

Figure (2-a) 2D and 3D graphs of the effect of time and power at the constant temperature (30 °C) on the reduction of *S. aureus* (reduction in the CFU is equivalent with colder colors in the graph)



شکل (۲-ب) نمودارهای دوبعدی و سه بعدی و سه بعدی اثرگذاری زمان و توان در دمای ثابت ۳۰ درجه سلسیوس بر کاهش باکتری های اشرشیا کلی (کاهش CFU، معادل رنگ های سردتر در نمودار است)

Figure (2-b) 2D and 3D graphs of the effect of time and power at a constant temperature (30 °C) on the reduction of *Escherichia coli* (reduction in the number of CFU is equivalent with colder colors in the diagram)



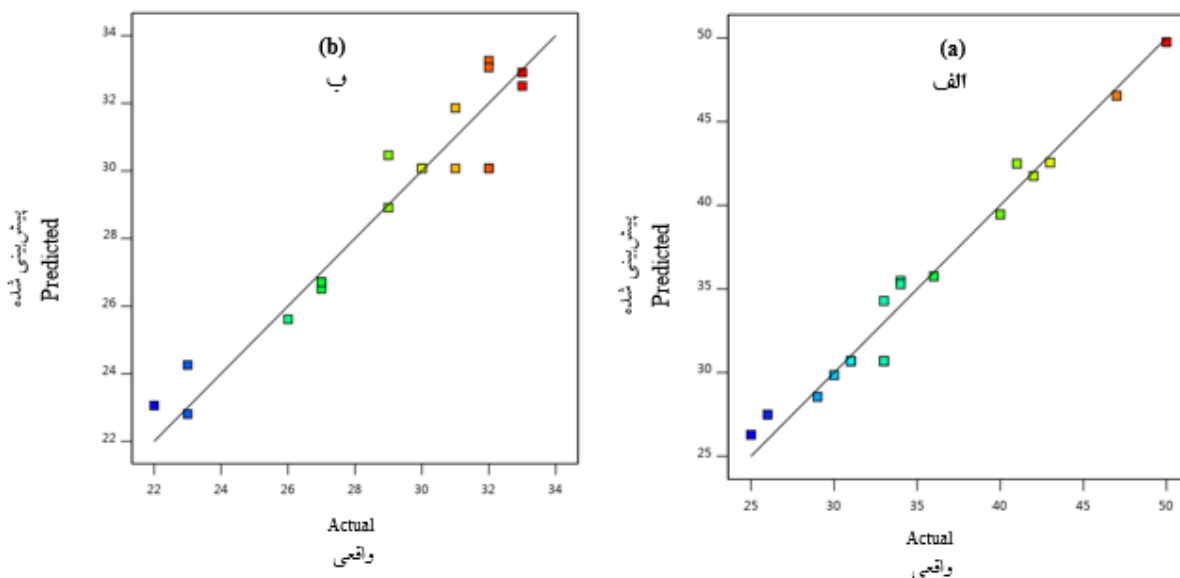
شکل (۳) اثرگذاری سه پارامتر دما، زمان و توان بر: (الف) *S.aureus* و (ب) *E.Coli*

Figure (3) Effect of three parameters of temperature, time, and power on the: (a) *S.aureus* and (b) *E.Coli*

پیش‌بینی یا برآورد تعداد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی سنجیده شد که به ترتیب در شکل ۴-الف) و ۴-ب) قابل مشاهده است.

همان‌طور که در شکل ۴ الف) و ب) مشخص است، داده‌های پیش‌بینی شده *S.aureus* و *E.Coli* تقریباً بر روی خطوط راست قرار دارند که این موضوع مطلوب بودن ضریب همبستگی دو مدل پیشنهادی (مدل درجه دوم) را تایید می‌کند.

در محاسبه مطلوبیت نهایی، شرایط مرزی تعیین شده برای مقادیر متغیرهای مستقل کل محدوده مورد آزمایش در نظر گرفته شد و کمینه مقدار توابع هدف (جمعیت نهایی باکتریها پس از تیماردهی با فراصوت) انتخاب شد. به همهی متغیرهای مستقل و وابسته با فرض اهمیت یکسان، وزن یک داده شد و مقادیر بهینه به دست آمده برای توان فراصوت، زمان اعمال امواج فراصوت و دما به ترتیب ۳۰۰ وات، ۱۲۰۰ ثانیه و ۰ درجه سلسیوس برای کاهش همزمان باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی به دست آمد. در پایان میزان دقت مدل در



شکل (۴) مقایسه داده‌های واقعی و داده‌های پیش‌بینی شده توسط مدل برای هر یک از متغیرهای وابسته:

الف) *S.aureus* و ب) *E.Coli*

Figure(4) Comparison of the real and predicted data by the model for each of the dependent variables:  
(a) *S. aureus* and (b) *E. coli*

افزایش دما ابتدا موجب افزایش و سپس کاهش اثرگذاری امواج فراصوت در غیرفعال شدن باکتری‌ها می‌شود. تاثیر منفی افزایش دما را می‌توان به کاهش شدت انفجار حبابچه‌ها ارتباط داد. در دمای بالا، حلالیت گازها در مایعات کاهش می‌یابد و در نتیجه به هنگام تشکیل حبابچه‌ها در میدان فراصوت به جای گاز، فضای داخلی حباب را بخار آب پر می‌کند. این بخارها بخش زیاد انرژی ناشی از انفجار حباب را جذب کرده و موجب کاهش شدت انفجار می‌شود. بر اساس نتایج مذکور استفاده از امواج فراصوت به منظور کاهش بار میکروبی آب‌های آلوده به عنوان یک روش تکمیلی، مناسب است.

## نتیجه‌گیری

در پساب شستشوی گوجه‌فرنگی در کارخانه انواع متفاوت باکتری (گرم مثبت و منفی) وجود دارد و نیاز است باکتری‌های مختلف به طور همزمان ضد عفونی و گندزدایی شوند. در این پژوهش، تاثیر امواج فراصوت بر پساب شستشوی گوجه‌فرنگی در مقیاس کوچک بررسی شد. با افزایش توان امواج فراصوت، اثرگذاری امواج بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* افزایش یافت. هنگامی که موج فراصوت به مایع برخورد می‌کند، موج‌های طولی ایجاد می‌شود که تغییرات فشار را در محیط ایجاد می‌کنند و در نتیجه حباب‌های گاز در آن ایجاد می‌شوند. این حباب‌ها در چرخه انبساط، دارای سطح مقطع بزرگتری هستند که این باعث افزایش انتشار گاز و توسعه حباب‌ها می‌شود. وقتی حباب‌ها به نقطه بحرانی خود برسند، انرژی فراصوت کافی برای تبدیل شدن به بخار در حباب فراهم نیست و در نتیجه حالت منقبض شدن رخ می‌دهد. در نهایت، مولکول‌های منقبض شده با یکدیگر برخورد می‌کنند و موج‌های شوک مانند ایجاد می‌شود. این امواج شوک مانند، باعث ایجاد مناطقی با دمای بسیار بالا و فشار زیاد می‌شوند و مهم‌ترین تاثیر باکتریایی فراصوت، به دلیل تغییرات فشار حاصل از این شرایط است. همچنین، تعداد باکتری‌ها با افزایش میزان کاویتاسیون با شیب بیشتری کاهش می‌یابد. با افزایش زمان تیماردهی با امواج فراصوت، تعداد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در آب پس‌شستشو کاهش یافت و افزایش زمان و افزایش توان فراصوت، باعث کاهش باکتری‌های *اشرشیاکلی* در آب پس‌شستشو شد، زیرا افزایش زمان تیماردهی باعث افزایش تعداد دوره‌های جریان‌های صوتی در راکتور می‌شود که این موضوع باعث تاثیرگذاری بیشتر امواج فراصوت بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* می‌شود. دما و توان اثر هم‌افزایی داشتند، یعنی افزایش هر دو پارامتر موجب کاهش باکتری‌ها شد. مشاهدات نشان داد که

## References

1. Acher, A., Fischer, E., Turnheim, R., and Manor, Y. 1997. Ecologically friendly wastewater disinfection techniques. *Water research*, 31(6), pp.1398-1404.
2. Baniadayan, M., Ebrahimi, A., and Aflakian, F. 2015. 'Investigation of microbial contamination in different sections of dairy factories', *Journal of Food Science & Technology*, 13(57), p.2008-8787, (In Persian with English abstract).
3. Bhat, R., Kamaruddin, N. S. B. C., Min-Tze, L., and Karim, A. 2011. Sonication improves kasturi lime (*Citrus microcarpa*) juice quality. *Ultrasonics sonochemistry*, 18, pp.1295-1300.
4. Cao, S., Hu, Z., Pang, B., Wang, H., Xie, H., and Wu, F., 2010. Effect of ultrasound treatment on fruit decay and quality maintenance in strawberry after harvest. *Food Control*, 21(4), pp.529-532.
5. Fallah, M., Bastami-Nezhad, M., Maqsood, A., Rahmani, A., Kakayi, H., and Akbari, A. 2013. Investigation of *Giardia* and *Cryptosporidium* in drinking water sources of the city. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*, 25(5), pp.38-42, (In Persian with English abstract).
6. Fatima, D., Mebrouk, K., and Miloud, H. 2015. Control of *E. coli* and spoilage microorganisms in tomato sauce and paste using a synergistic antimicrobial formula. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(5), pp. 1352-1360.
7. Ghernaout, D., and N. Elboughdiri. 2019. Water Disinfection: Ferrate (VI) as the Greenest Chemical-A Review. *Applied Engineering*, 3, pp.171-180.
8. Jay, J.M., and Loessner, M.J., and Golden, D.A. 2008. *Modern food microbiology*. Springer Science & Business Media, 52, pp.48-63.
9. Jihad-e-Keshavarzi Statistical Yearbook., 1398, (In Persian).
10. Kuldiloke, J., 2002. Effect of ultrasound, temperature and pressure treatments on enzyme activity and quality indicators of fruit and vegetable juices (M.Sc. Thesis). Institute of Food Technology, Food Biotechnology and Process Technology, The Technical University of Berlin.
11. Lanrewaju, A.A., Enitan-Folami, A.M., Sabiu, S. and Swalaha, F.M. 2022. A review on disinfection methods for inactivation of waterborne viruses. *Frontiers in Microbiology*, 13, p.991856.
12. Malik, M.A. 2010. Water purification by plasmas: Which reactors are most energy efficient? *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 30(1), pp.21-31.
13. Mehrdadi, N., Bidehendi, G. N., Zahedi, A., Mohammadi Aghdam, A. R., and Aghajani Yasini, A. 2012. Application of ultrasonic wave irradiation in wastewater treatment. Tehran University Publisher. (In Persian with English abstract).
14. Rashidi Mehrabad, A., and Tarabian, A. 1384. Evaluation of the efficiency of direct filtration in removing free-living nematodes from water. *Environmental Science Journal*, 39, pp.75-82, (In Persian with English abstract).
15. Starek, A., Kobus, Z., Sagan, A. Chudzik, B., Pawłat, J., Kwiatkowski, M., Terebun, P., and Dariusz Andrejko, D. 2021. Influence of ultrasound on selected microorganisms, chemical and structural changes in fresh tomato juice. *Scientific Reports*, 11, 3488.
16. Valero, M., Recrosio, N., Saura, D., Munoz, N., Marti, N., and Lizama, V. 2007. Effect of ultrasonic treatments in orange juice processing. *Journal of Food Engineering*, 80, pp.509-516.

17. Wang, J., and Wu, Z. 2023. Minimal processing of produce using a combination of UV-C irradiation and ultrasound-assisted washing, *LWT (Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie)*, 182, 114901.
18. Wu, J., Gamage, T., Vilku, K., Simons, L., and Mawson, R. 2009. Effect of thermosonication on quality improvement of tomato juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, pp.186-195.
19. <https://www.medicalnewstoday.com/articles/gram-positive-vs-gram-negative#gram-negative-types>
20. Zhang, H., Wang, S., Kasey Goon, K., Gilbert, A., Huu, C., N., Walsh, M., Nitin, N., Wrenn, S., and Tikekar, R. V. 2020. Inactivation of foodborne pathogens based on synergistic effects of ultrasound and natural compounds during fresh produce washing, *Ultrasonics Sonochemistry*, 64, 104983