



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA**

**FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA**

**DOTTORATO DI RICERCA  
IN PRODUZIONI ANIMALI,  
BIOTECNOLOGIE VETERINARIE,  
QUALITÀ E SICUREZZA DEGLI ALIMENTI  
CICLO XXIV**

**CONTROLLO DELLA CONTAMINAZIONE  
MICROBICA NELLA FILIERA AVICOLA**

**COORDINATORE**

**Chiar.ma Prof.ssa Paola SUPERCHI**

**DOCENTE GUIDA**

**Chiar.ma Prof.ssa Adriana IANIERI**

**DOTTORANDO**

**Pierluigi Aldo DI CICCIO**

# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>4</b>
<b>CAPITOLO 1: OZONO</b>	
1.1 STORIA DELL'OZONO	7
1.2 OZONO	8
1.3 PROPRIETÁ FISICO-CHIMICHE	9
1.4 OZONIZZATORI	10
1.5 OZONO VERSUS MICRORGANISMI	12
1.6 MECCANISMI DI AZIONE	17
1.7 SICUREZZA E TOSSICITÁ	18
1.8 POSSIBILI APPLICAZIONI NEL SETTORE ALIMENTI	19
<b>CAPITOLO 2: BIOFILM</b>	
2.1 BIOFILM	22
2.2 PROCESSO DI FORMAZIONE BIOFILM	25
2.3 OZONO VERSUS BIOFILM	31
<b>PARTE SPERIMENTALE</b>	
I) OBIETTIVI DELLA RICERCA	35
II) MATERIALI E METODI	36
III) RISULTATI	52

<b>CONCLUSIONI</b>	<b>72</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>75</b>
<b>PUBBLICAZIONI TRIENNIO DOTTORATO</b>	<b>84</b>
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	<b>88</b>

# INTRODUZIONE

Negli ultimi anni il settore delle carni avicole ha fatto registrare un “*trend*” in continua crescita e questa tendenza è attribuita ad alcune peculiarità di queste carni tra cui il minor costo rispetto a quelle di altre specie zootecniche (bovino, suino), le favorevoli caratteristiche nutrizionali ed organolettiche ed il loro facile impiego come materia prima per la preparazione di prodotti elaborati. A fronte di questo incremento produttivo si è assistito ad un notevole sviluppo dell’industria delle carni avicole e alla nascita di grossi impianti di macellazione con annessi centri di sezionamento e/o lavorazione.

Sulla base dei dati, relativi al 2011, dell’unione nazionale dell’avicoltura esistono n. 4.970 allevamenti avicoli (di cui: n.2.225 allevano polli; n.750 tacchini e n.700 altre specie avicole) che riforniscono n.128 macelli, n.458 centri di sezionamento e n.78 laboratori adibiti alle successive fasi di lavorazione. La produzione nazionale di carni avicole nell’anno 2010 è risultata pari a 1.221.700 tonnellate (+2,0% rispetto al 2009); per quanto riguarda il commercio con l’estero (Paesi UE ed extra UE), le quantità esportate sono risultate in netto aumento (+25,6% rispetto al 2009) e le previsioni per il 2011 sembrano confermare tale andamento ([www.unionenazionaleavicoltura.it](http://www.unionenazionaleavicoltura.it)).

Il settore avicolo è, infatti, l’unico settore zootecnico nazionale, insieme a quello cunicolo, in grado di garantire l’autosufficienza produttiva al nostro Paese.

Importanti agenti responsabili di tossinfezioni alimentari quali *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* sono spesso veicolati attraverso le carni avicole.

Dall’ultimo *Scientific Report* (2011) sulle zoonosi e sulle epidemie di origine alimentare nell’Unione Europea pubblicato dall’Autorità Europea per la sicurezza alimentare (EFSA) e dal Centro Europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC), emerge che l’infezione da *Campylobacter* rappresenta la zoonosi più trasmessa all’uomo in Europa e che la fonte principale di infezioni da *Campylobacter* risulta essere la carne fresca di pollame.

Per quanto riguarda *Salmonella* nonostante l'alimento maggiormente coinvolto nelle infezioni alimentari da questo microrganismo siano le uova, è stata ritrovata molto spesso in carne fresca di pollo.

Le accresciute richieste dei consumatori in merito alla sanità degli alimenti e la preoccupazione del verificarsi di malattie alimentari hanno determinato un'intensificazione degli sforzi per ridurre la contaminazione delle carni crude, come evidenziato anche dalle disposizioni sulle carni di ungulati domestici e pollame, implementate nell'Unione Europea con il Regolamento 2073/2005 e successive modifiche. In parallelo si è comunque intensificato l'interesse per lo sviluppo e le applicazioni commerciali delle procedure di decontaminazione delle carni.

Numerosi sono i sistemi per la decontaminazione della cute e delle carcasse (acidi organici, perossido di idrogeno, fosfato trisodico, ozono ecc.) approvati dalla Food Safety and Inspection Service (FSIS) (2002) e che vengono comunemente impiegati nei Paesi extraeuropei. In Italia così come nel resto dei Paesi appartenenti all'Unione Europea, non è consentito l'utilizzo di sostanze diverse dall'acqua potabile per la decontaminazione delle carcasse. Negli ultimi anni e in particolare in Italia, l'attenzione verso lo sviluppo di procedure alternative per la decontaminazione delle carni è aumentato notevolmente e tra le sostanze innovative che hanno riscosso maggior interesse è da considerare l'ozono (O<sub>3</sub>).

Utilizzato da tempo per usi non alimentari, l'O<sub>3</sub> è stato riconosciuto come “*generally recognized as safe*” (GRAS) nel 2001 dalla *Food and Drug Administration* (FDA) e approvato come additivo, sia in fase gassosa che acquosa, per il trattamento e la conservazione di alimenti. L'efficacia disinfettante dell'ozono è stata, inoltre, dimostrata nei confronti di diversi microrganismi compreso i patogeni associati agli alimenti (Restaino *et al.*, 1995).

Considerato, quindi, il frequente consumo di carni avicole, l'ingente contaminazione che si verifica nel corso della macellazione e/o lavorazione e l'importante ruolo epidemiologico delle carni avicole nell'ambito delle tossinfezioni alimentari, gli obiettivi del presente lavoro sono stati:

- i) valutare l'efficacia del trattamento di decontaminazione con ozono gassoso nei confronti di microrganismi isolati da carni avicole e relativi stabilimenti di macellazione e lavorazione;

ii) valutare l'efficacia del trattamento di decontaminazione con ozono gassoso nei confronti dei suddetti microrganismi a tempi e concentrazioni applicabili nelle realtà produttive;

iii) valutare la capacità degli stessi ceppi a produrre biofilm e costituire così delle vere e proprie nicchie di sopravvivenza presso gli stabilimenti di macellazione e/o lavorazione;

iv) testare gli effetti dell'ozono gassoso sulla produzione e/o inattivazione del biofilm prodotto dai ceppi isolati.

Dati in letteratura sui rischi microbiologici legati ai materiali utilizzati nel "packaging" degli alimenti e in particolare per le carni di pollame sono scarsi e/o frammentari (Harrison *et al.*, 2001; Little *et al.*, 2005).

Si è ritenuto, pertanto, interessante:

v) valutare il rischio microbiologico in relazione a *Salmonella spp.* legato ai materiali comunemente impiegati nel "packaging" delle carni di pollame al fine di fornire all'industria delle carni avicole indicazioni scientifiche volte ad ottimizzare la scelta dei materiali a contatto con le carni fresche e/o preparazioni a base di carne di pollame

# CAPITOLO 1

## OZONO

### 1.1 STORIA DELL'OZONO

La scoperta dell'ozono si deve, al chimico Christian F. Schönbein (1799-1868) nel 1840, professore all'Università di Basilea, il quale intuì che l'odore aspro e pungente che l'aria acquistava al passaggio di un temporale era legato alla presenza nell'aria di un gas che si formava in seguito al rilascio di scariche elettriche nell'aria durante i temporali. All'epoca, Schönbein riteneva che questa molecola fosse monoatomica e solo nel 1866 il chimico francese Jacques Soret ne dimostrò la vera forma triatomica. L'ozono (dal greco *ozein*, odore) è pertanto una molecola costituita da 3 atomi di ossigeno (O<sub>3</sub>). Tale gas è un forte ossidante ed è un potente agente disinfettante. Numerosi sono, infatti, i campi di applicazione dell'ozono quali ad esempio l'igiene delle superfici, igiene degli impianti che trattano alimenti, il trattamento delle acque reflue ecc. La storia dell'ozono e delle sue applicazioni è stata ampiamente rivisitata. Negli Stati Uniti nel 1888, Fewson inventò un generatore di ozono per deodorare gas mefitici. In Germania, nel 1902, Siemens e Halske costruirono il primo impianto produttore di ozono a grandezza naturale per il trattamento delle acque. Più tardi, nel 1904, De la Coux riferì dell'ampio uso dell'ozono negli impianti di produzione di gelatina, caseina e albumina. Durante lo stesso anno a Nizza fu, per la prima volta, utilizzato l'ozono su scala commerciale per la potabilizzazione delle acque. Molti Paesi europei seguirono questo esempio e adottarono l'ozonizzazione come pratica *standard* per il trattamento e la disinfezione delle acque. Negli U.S.A. l'ozonizzazione dell'acqua potabile fu provata per la prima volta nel 1940 a Whiting in Indiana, e dal 1987 oltre 200 impianti adottano tale pratica. Tra il 1953 e il 1956 si riconobbe l'efficacia dell'uso di aria sotto pressione contenente ozono per la sterilizzazione di contenitori per alimenti vuoti e la tecnica fu adottata in Svizzera su bottiglie di vetro. L'ozonizzazione è inoltre un metodo relativamente recente per il trattamento degli alimenti. Per lungo tempo, esso è stato usato con sicurezza ed efficacia nel trattamento delle acque da bere. Negli U.S.A. è stato riconosciuto come

valido metodo: “*generally recognized as safe*” (GRAS) per il trattamento dell’acqua imbottigliata oltre che per gli impianti di imbottigliamento. Fu solo nel Giugno del 1997 quando un gruppo indipendente di esperti stabilì che l’ozono poteva essere impiegato come disinfettante per alimenti, che si spianò la strada per il suo utilizzo nell’industria alimentare. Nel 2001 la FDA (Food and Drug Administration) modificando le norme riguardanti gli additivi ha reso possibile l’uso dell’ozono, quale agente antimicrobico sia in fase acquosa che gassosa, nel trattamento, conservazione e trasformazione degli alimenti, comprese carni bovine e avicole (Yang and Chen, 1979; Sheldon and Brown, 1986; Chang and Sheldon, 1989).

## 1.2 OZONO

L’ozono è presente in natura come un gas blu dall’odore acre pungente e la sua concentrazione nell’atmosfera è di circa 0,04 ppm (1 ppm ~ 2 mg/m<sup>3</sup>). Tale gas si forma naturalmente nella stratosfera ed in particolare nell’ozonosfera, concentrandosi a circa 25 km al di sopra del livello del mare. La quantità di ozono è mantenuta costante mediante un equilibrio dinamico fra la reazione di formazione e quella di fotolisi. Potenti scariche elettriche e radiazioni UV ( $h\nu$ ) aventi lunghezza d’onda ( $\gamma$ ) inferiore ai 242 nm dissociano l’ossigeno molecolare, in ossigeno atomico mediante la reazione di Chapman ( $O_2+h\nu \rightarrow O+O$ ). L’ossigeno atomico si combina rapidamente con un’altra molecola di ossigeno formando la molecola triatomica dell’ozono ( $O_3$ ). L’effetto netto della reazione è la conversione di tre molecole di ossigeno in due molecole di  $O_3$ . Le molecole di  $O_3$  assorbono a loro volta la radiazione solare di lunghezza d’onda compresa fra 240 e 320 nm, subendo fotolisi e rilasciando ossigeno molecolare  $O_2$  ed ossigeno atomico. La grande reattività dell’ossigeno atomico fa sì che esso reagisca con altre molecole di  $O_2$  secondo la seguente reazione:  $O + O_2 \rightarrow O_3$ . La reazione di dissociazione a sua volta è causata dalle medesime radiazioni elettromagnetiche secondo la seguente reazione:  $O_2 + h\nu \rightarrow O_2 + O$ . Di conseguenza, le reazioni di formazione e fotolisi dell’ $O_3$  hanno come effetto quello di schermare la terra da più del 90% delle radiazioni UV dannose per la vita sul nostro pianeta. Tuttavia, in vicinanza della superficie terrestre, nella troposfera, i raggi UV con energia necessaria a formare l’ $O_3$  sono totalmente schermati, pertanto la reazione di formazione di  $O_3$  non avviene. I minimi livelli di

O<sub>3</sub> rilevabili a livello troposferico derivano dallo scambio tra ozonosfera e troposfera e dalla minima quantità prodotta dalle reazioni fotochimiche che coinvolgono direttamente l'ossigeno atmosferico. In particolare, il processo di formazione e dissociazione dell'ozono troposferico avviene principalmente mediante il ciclo fotolitico dell'azoto, secondo cui  $\text{NO}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{NO} + \text{O}_3$ . Tale reazione è amplificata dagli inquinanti immessi in atmosfera dall'uomo.

### 1.3 PROPRIETÀ CHIMICO-FISICHE

L'ozono (TABELLA 1) è un gas solubile in soluzione acquosa (~ 13 volte più dell'O<sub>2</sub> a 0-30°C) con una solubilità inversamente proporzionale alla temperatura ed al pH. Ad esempio, a pH 7,0, aumentando la temperatura da 15 °C a 30 °C, si osserva una riduzione dell'emivita dell'ozono da 30 a 12 minuti; a 21°C, a pH 6,0, l'emivita è di circa 20 minuti, riducendosi a 5 minuti a pH 8,0. Allo stato gassoso, la decomposizione è meno influenzata dalla temperatura; a 20°C, l'ozono possiede un'emivita di circa 20 minuti (Kim *et al.*, 1999). L'ozono è una molecola caratterizzata da un alto potenziale ossidativo (potenziale redox di +2.07 V) inferiore solo ad alcune sostanze, ma nettamente superiore a quello del cloro (TABELLA 2). Il forte potere ossidante dell'ozono consente al gas di ossidare ed inattivare numerosi composti organici (fenoli, benzene, triometani, pesticidi) ed inorganici (cianuri, solfiti, nitriti). L'ozono, inoltre, è in grado di ossidare il ferro, il manganese ed altri minerali, che soprattutto se complessati, possono essere molto difficili da rimuovere. A livello cellulare, anche i principali effetti tossici dell'ozono sono riconducibili al suo potere ossidativo e quindi alla capacità di ossidare e perossidare le biomolecole, sia direttamente che indirettamente (Khadre *et al.*, 2001).

L'ozono, infatti, decomponendosi rapidamente in fase acquosa può dare origine ad una serie di specie reattive dell'ossigeno, quali l'anione radicale superossido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), il radicale idrossilico (HO<sup>•</sup>) ed il perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), che causano alterazioni della struttura e funzione delle macromolecole biologiche (Laisik *et al.*, 1989; Sarti *et al.*, 2002).

**TABELLA 1: CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE DELL'OZONO**

punto di ebollizione	-111,9±0,3°C
Punto di fusione	-192,5±0,4°C
Temperatura critica	-12,1°C
Pressione critica	54,6atm

**TABELLA 2: OZONO VERSUS ALTRE MOLECOLE**

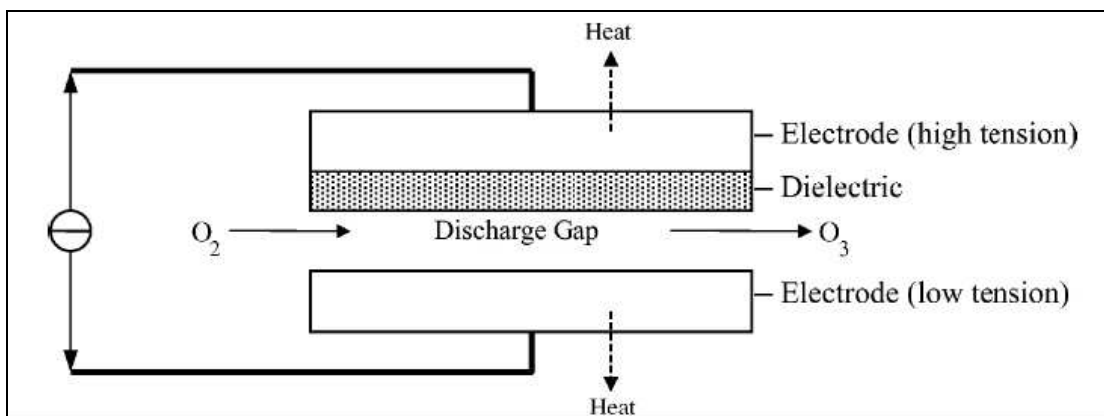
Agente Ossidante	Potenziale ossidativo (mV)
Fluoro	3,06
Ozono	2,07
Permanganato	1,67
Diossido di cloro	1,50
Acido ipocloroso	1,49
Cloro gas	1,36

## 1.4 OZONIZZATORI

La formazione d'ozono può avvenire anche industrialmente attraverso gli *ozonizzatori*, particolari strumenti che lo generano da una corrente gassosa ricca di ossigeno, cui viene apportata energia in forma elettrica, elettrochimica o fotochimica. Al fine di sintetizzare ozono, una molecola biatomica di ossigeno deve prima essere scissa. La circolazione dei risultanti radicali di ossigeno è quindi libera di reagire con un'altra molecola biatomica di ossigeno per formare la molecola triatomica di ozono. Tuttavia, al fine di spezzare il legame O-O è necessaria una grande energia. Radiazioni ultraviolette (188nm lunghezza d'onda), effetto corona, metodo fotochimico, elettrolitico e radiochimico possono essere utilizzati per avviare la formazione di radicali liberi dell'ossigeno e in tal modo generare ozono.

L'apparecchio per "l'effetto corona" (FIGURA 1) consta di due elettrodi , uno ad alta tensione e l'altro a bassa tensione (elettrodo di massa). Questi sono separati da un mezzo dielettrico di ceramica. Quando gli elettroni hanno sufficiente energia cinetica (circa il 6-7 eV) per dissociare la molecola di ossigeno, una certa frazione di queste collisioni si verificano e una molecola di ozono può essere formata da ogni atomo di ossigeno. Se l'aria viene fatta passare attraverso il generatore come un gas di alimentazione, può essere prodotto 1-3% di ozono, tuttavia, utilizzando ossigeno puro si può ottenere un rendimento di ozono fino al 6% (Rice *et al.*, 1981).

FIGURA 1: DIAGRAMMA DEL METODO CORONA



L'Ozono sotto forma di gas non può essere conservato in quanto degrada spontaneamente tornando ad atomi di ossigeno (Kogelschatz, 1988; Wickramanayaka, 1991; Coke, 1993). Con il metodo fotochimico, l'ozono si forma quando l'ossigeno è esposto a raggi UV con lunghezza d'onda pari a 140-190 nm. Lunghezze d'onda maggiori, intorno ai 250 nm, sono più efficaci per distruggere l'ozono piuttosto che produrlo. L'energia delle radiazioni ultraviolette scinde alcune molecole di  $O_2$  in due atomi di O che collidono con altre molecole di  $O_2$  producendo ozono. In questo sistema l'aria è soffiata in un cilindro posto attorno ad una lampada ad ultravioletti poiché le sorgenti di luce UV non sono monocromatiche, vengono generate onde di varia lunghezza cosicché l'ozono viene simultaneamente prodotto e distrutto. La concentrazione dell'ozono dipende dalla potenza delle lampade usate, dal diametro del cilindro che circonda la lampada, dalla temperatura, dall'umidità,

dall'ossigeno contenuto nell'aria e dalla quantità di aria che viene fatta passare attraverso il generatore.

Nel metodo elettrolitico l'ozono è generato dall'elettrolisi dell'acido solforico. Molti vantaggi sono associati a questo metodo, tra cui l'uso di bassi voltaggi di corrente, nessun bisogno di gas, apparecchiature di dimensioni ridotte, possibilità di produrre ozono ad alte concentrazioni e produzione nell'acqua. Gli svantaggi sono legati alla corrosione ed alla erosione degli elettrodi ed al bisogno di appositi elettroliti o di acqua a bassa conducibilità. Nel metodo radio-chimico l'ozono si forma tramite l'irradiazione ad alta energia di ossigeno con radiazioni radioattive. A causa della complessità del processo questo metodo non è stato usato nel trattamento delle acque.

## **1.5 OZONO VERSUS MICRORGANISMI**

L'azione ossidante esplicata dall'ozono ha fatto sì che sin dalla sua scoperta fosse utilizzato come agente battericida, fungicida e inattivante dei virus. Esso è stato utilizzato inizialmente come agente disinfettante nella produzione di acqua potabile, in Francia dal 1906 ed in Germania dal 1972. La scelta dell'ozono fu basata sul fatto che esso è più efficace di altri disinfettanti verso un più ampio spettro di microrganismi. Come precedentemente esposto, l'ozono è una molecola assai instabile composta da tre atomi di ossigeno. Il terzo atomo non è legato stabilmente e può staccarsi facilmente dalla molecola e reagire con altre molecole. Questo genera un sistema ossidante altamente reattivo. Particolare è, inoltre, la reattività rispetto al doppio legame C=C delle sostanze organiche insature ("ozonolisi").

I diversi batteri mostrano, comunque, una sensibilità variabile all'ozono. I Gram-negativi, infatti, sono meno sensibili dei Gram-positivi e i batteri sporigeni si dimostrano più resistenti dei non sporigeni (Kim *et al.*, 1999). Poiché il meccanismo con cui agisce l'ozono è la perossidazione lipidica, la causa della differente sensibilità sarebbe imputabile alla differente composizione lipidica della parete batterica (Hoff, 1986, Khadre *et al.*, 2001; Khadre and Yousef, 2001). Nei microrganismi l'azione dell'ozono si manifesta anche tramite l'attivazione della produzione di disinfettanti endogeni, quali acqua ossigenata, perossidi e ossigeno singoletto, attivazione della fagocitosi, attivazione delle citochine. Il tempo di

contatto e il dosaggio per la disinfezione con ozono sono molto bassi ed efficaci se comparati con altri disinfettanti. Gli effetti germicidi sono influenzati dal tempo di contatto, dalla temperatura, dal pH, e dalla presenza di materiale organico e inorganico nella soluzione. Una durata maggiore del tempo di contatto, un pH e una temperatura più bassa migliorano l'effetto battericida. L'efficacia dell'attività antimicrobica dell'acqua ozonizzata, su sospensioni di batteri e materiali contaminati è strettamente dipendente dalla concentrazione e dal tempo di esposizione. Gli effetti battericidi dell'ozono sono stati studiati e documentati su una vasta gamma di microrganismi, (Fetner and Ingols, 1956; Foegeding, 1985; Ishizaki *et al.*, 1986; Restaino *et al.*, 1995).

Restaino *et al.*, (1995) hanno esaminato l'effetto antimicrobico dell'acqua ozonizzata verso i microrganismi responsabili di tossinfezioni alimentari e hanno dimostrato che l'ozono risulta efficace contro i batteri Gram-positivi quali *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, e batteri Gram-negativi quali *Pseudomonas aeruginosa*, e *Yersinia enterocolitica*. Gli stessi autori, inoltre, hanno dimostrato l'efficacia dell'ozono nel distruggere lieviti quali *Candida albicans* e *Zygosaccharomyces* e bacilli e spore di *Aspergillus niger*. La distruzione dei batteri da parte dell'ozono è dovuta all'attacco delle glicoproteine di membrana batterica e/o glicolipidi. Khadre e Yousef (2001) confrontando gli effetti dell'ozono e del perossido di idrogeno sulle spore di *Bacillus spp.* in diverse matrici alimentari, hanno dimostrato che l'ozono è più efficace del perossido di idrogeno. Guzel-Seydem e Beverand Greene (2004), invece, hanno valutato l'efficacia dell'ozono nel ridurre le popolazioni batteriche in diversi substrati: tampone sterile, crema di latte, panna da montare, soluzioni all'1% di farina di semi di carrube, amido solubile e caseinato di sodio in acqua distillata deionizzata sterile. Questi substrati sono stati inoculati con spore di *Bacillus stearothermophilus orvegeta* e cellule vegetative di *Escherichia coli* (*E.coli*) e *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) e, in seguito sottoposti all'azione dell'ozono. Le popolazioni di spore a 10 min sono state ridotte di 4,93 Log cicli in buffer, 4,56 in amido, 0,95 in farina di semi di carrube e 0,24 in caseinato. Non vi è stata una significativa riduzione della popolazioni batteriche in crema di latte. Statisticamente significativa, invece, è stata la riduzione nella popolazione di *E. coli* a 10 minuti in tampone sterile, amido, farina di semi di carrube, caseinato e panna da montare. Per lo *S.aureus*, riduzioni statisticamente significative sono state rilevate a

10 minuti in buffer, amido, farina di semi di carrube, caseinato e panna montata. E' interessante sottolineare che la farina di semi di carrube ha fornito un livello intermedio di protezione, mentre il caseinato e la panna da montare hanno dato i massimi livelli di protezione alle popolazioni batteriche. Sono stati inoltre comparati i valori di riduzione ed eliminazione di batteri patogeni quali l'*E.coli* enterotossigeno *O157:H7* dopo irradiazione con raggi gamma e trattamento con ozono. Le cellule in fase logaritmica di crescita sono risultate più sensibili ai raggi gamma rispetto alle stesse cellule in fase stazionaria. L' *E. coli O157:H7* è risultato più resistente alle radiazioni a  $-18^{\circ}\text{C}$  che a  $20^{\circ}\text{C}$ . I valori , per questo microrganismo, esposto all'azione dell'ozono, in agar soia sono superiori a quelli ottenuti nelle stesse condizioni sperimentali in una soluzione tampone a base di fosfato. In definitiva è stato dimostrato che sono necessari una dose di radiazioni gamma di 1.5 kGy o un trattamento da 3 a 18 ppm di ozono, per una durata di 20 - 50 minuti, per garantire l'eliminazione dell' *E.Coli O157:H7* ( Byun *et al.*, 1998). L'attività battericida dell'ozono gassoso è stata inoltre esaminata anche nei prodotti ittici in particolare su cinque specie di batteri (*Pseudomonas putrida*, *Shewanella putrefaciens*, *Brochothrix thermosphacta*, *Enterobacter sp.*, e *Lactobacillus plantarum*) presenti nei pesci. Diverse specie ittiche sono state inoculate ed esposte ad ozonizzazione di diversa durata in camere contenenti gas. Concentrazioni relativamente basse ( $<0.27$  mg/L) di ozono hanno dimostrato una potente attività battericida verso cellule in fase vegetativa di tutte le cinque specie batteriche saggate. L'efficacia dell'ozono è stata dimostrata anche nei confronti di *Staphilococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA); un microrganismo che, negli ultimi anni, è diventato un importante problema di salute pubblica e che, spesso, risulta resistente ai comuni disinfettanti (Yamayoshi and Tatsumi, 1993).

L'inattivazione dei virus è stata finora meno studiata di quella dei batteri; è comunque noto che anch'essa avviene rapidamente in seguito ad ozonizzazione, anche se richiede una somministrazione di gas a concentrazioni superiori rispetto a quella necessaria per distruggere i batteri (Kim *et al.*, 1999). Diversi studi volti a valutare la sensibilità dei virus all'ozono hanno dimostrato che i virus provvisti di membrana sono nettamente più sensibili di quelli che ne sono sprovvisti. Il meccanismo d'azione dell'ozono sui virus non è sicuramente quello di una distruzione, come nel caso dei batteri, ma di un'inattivazione; l'azione dell'ozono,

infatti, consisterebbe in un'ossidazione con conseguente inattivazione dei recettori virali specifici utilizzati da virus stesso per invadere le cellule *target*. Verrebbe così bloccato il meccanismo di riproduzione virale a livello della sua prima fase: l'invasione cellulare.

Per quanto riguarda l'attività anti-protozoaria dell'ozono, è stato ampiamente dimostrato che le oocisti di *Cryptosporidium parvum* sono sensibili all'azione dell'ozono (Peeters *et al.*, 1989). A tal proposito lo studio effettuato da Korich *et al.* (1990) ha dimostrato che basta una concentrazione di ozono in soluzione acquosa pari a 1mg/L per inattivare il 90% della popolazione di criptosporidi in meno di un minuto. Effetti positivi dell'ozono si sono osservati anche sulle cisti di *Naegleria gruberi* e di *Giardia muris* (Wickramanayake, 1991).

L'azione dell'ozono è efficace anche contro i miceti. E' stato dimostrato, infatti, che lo sviluppo di muffe in condizioni di umidità elevate, risulta essere impedito dalla presenza di ozono. Ewell (1946) ha dimostrato che concentrazioni di ozono tra 0,6 e 1,5 ppm inibiscono la crescita di muffe su uova conservate con un'umidità relativa del 90% e ad una temperatura di 0,6°C, mentre concentrazioni di ozono tra 2,5 e 3 ppm contrastano lo sviluppo di muffe sulla carne di manzo immagazzinata alle medesime condizioni di temperatura (0,6°C) e umidità relativa (90%).

L'ozono è anche in grado di inattivare i lieviti. Farooq e Akhlaque, (1983) sottoponendo, infatti, una popolazione di *Candida parapsilosis* a trattamento con 0,23-0,26 mg/L di ozono, è stato dimostrato che la coltura diminuiva di 2 Log in 1,67 minuti. In acqua ozonizzata, infine, è stato dimostrato che popolazioni di 4,5 Log di *Candida albicans* e *Zigosaccaromyces bailii* venivano distrutte istantaneamente. E' importante sottolineare che le diverse specie di lieviti quali *Hansenula anomala*, *saccaromyces rosei*, *Pichia farinosa*, *Candida parapsilosis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Debaromyces hansenii*, presentano una sensibilità variabile all'azione dell'ozono in fase gassosa (Naitoh, 1992). I lieviti suddetti sono stati sottoposti a trattamento con ozono gassoso a 4-5 ppm per 1-5ore a 30-60°C e con un umidità relativa tra 25-90%. Dopo 5 h di trattamento: *C. parapsilosis* e *K. marxianus* sono stati ridotti di 1 Log mentre gli altri lieviti non sono diminuiti in modo apprezzabile. L'azione dell'ozono è aumentata con il crescere della temperatura, dell'umidità relativa, e del tempo di trattamento. L'ozono ha, inoltre, aumentato la lag-fase e ha

rallentato la fase esponenziale di crescita di *H. anomala* e *K. marxianus*, rispettivamente da 1,5 a 4 ore da 1,4 a 6,7 ore.

Rayner *et al.*, (1971), hanno, infine, individuato l'ozonizzazione dell'acqua di cottura come una tecnica possibile per ridurre la presenza di aflatossine nei semi di cotone e nelle arachidi. Questi ed altri studi hanno, pertanto, dimostrato che l'azione antimicrobica dell'ozono, sia in fase acquosa che gassosa, potrebbe essere sfruttata nella lavorazione e nella conservazione degli alimenti (Kuprianoff, 1953; Broadwater *et al.*, 1973). E' stato, infatti, dimostrato che il trattamento con acqua ozonizzata prolunga la conservabilità dei prodotti ittici di 5 giorni (Violle *et al.*, 1929). Successivi esperimenti hanno dimostrato, inoltre, che né l'aspetto, né il sapore degli alimenti viene alterato dall'ozonizzazione (Kuorianoff, 1953; Kim *et al.*, 1999). E' doveroso sottolineare che già nel 1910, le industrie alimentari tedesche utilizzavano l'ozono per la conservazione della carne e delle uova, dimostrando che l'uso di ozono in fase gassosa nella conservazione refrigerata poteva prevenire la crescita dei funghi e delle muffe.

Nella TABELLA 3 sono riportati i tempi indicativi per l'eliminazione di alcuni agenti patogeni.

**TABELLA 3: INATTIVAZIONE DI BATTERI, VIRUS, FUNGHI, MUFFE ED INSETTI IN SEGUITO AD OZONIZZAZIONE**

ORGANISMO	CONCENTRAZIONE	TEMPO DI ESPOSIZIONE
<b>BATTERI</b> ( <i>E. Coli, Legionella, Mycobacterium, Fecal Streptococcus</i> )	0,23 ppm - 2,2 ppm	< 20 minuti
<b>VIRUS</b> ( <i>Poliovirus type-1, Human Rotavirus, Enteric virus</i> )	0,2 ppm - 4,1 ppm	< 20 minuti
<b>MUFFE</b> ( <i>Aspergillus Niger, vari ceppi di Penicillum, Cladosporium</i> )	2ppm	60 minuti
<b>FUNGHI</b> ( <i>Candida Parapsilosis, Candida Tropicalis</i> )	0,02 ppm - 0,26 ppm	< 1,67 minuti
<b>INSETTI</b> ( <i>Acarus Siro, Tyrophagus Casei, Tyrophagus Putrescentiae</i> )	1,5 - 2 ppm	30 minuti?

(Edelstein *et al.*, 1982; Joret *et al.*, 1982; Farooq and Akhlaque,1983; Harakeh and Butle, 1985; Kawamuram *et al.* 1986)

## 1.6 MECCANISMI DI AZIONE DELL' OZONO VERSUS MICRORGANISMI

Il principale meccanismo di azione dell'ozono, e più in particolare delle specie reattive dell'ossigeno, è la perossidazione lipidica, che genera composti biologicamente attivi che a livello cellulare causano danni ai fosfolipidi di membrana. La tossicità dell'ozono dipende, inoltre, dalla sua capacità di ossidare gli amminoacidi alterando irreversibilmente la struttura e la funzione delle proteine. Gli amminoacidi più sensibili all'azione dei radicali liberi sono prolina, istidina, quelli contenenti gruppi tiolici (cisteina e metionina) e gruppi aromatici (fenilalanina, tirosina, triptofano) (Menzel *et al.*, 1991).

Infine, una delle conseguenze più gravi legate all'attività dei radicali liberi derivanti dall'ozono è quella che si esplica a livello del DNA. I radicali liberi producono una serie di lesioni al DNA, causando rotture, distorsioni della doppia elica e legami crociati fra le basi azotate (Roy *et al.*, 1981).

L'ozono distrugge i microrganismi ossidando progressivamente i componenti vitali della cellula. La superficie della cellula batterica è stata indicata come l'obiettivo primario dell'ozonizzazione.

Sono stati identificati due principali meccanismi d'azione dell'ozono nella distruzione dei microrganismi (Victorin, 1992).

1. l'ozono ossida i gruppi sulfidrilici e gli aminoacidi degli enzimi e le proteine in peptidi più brevi;
2. l'ozono ossida gli acidi grassi polinsaturi in perossidi acidi (Victorin, 1992); determina la rottura dei lipidi insaturi dell'envelope con successiva fuoriuscita del contenuto cellulare.

Il doppio strato dei lipidi insaturi è particolarmente vulnerabile all'attacco dell'ozono. Nei batteri Gram-negativi, le lipoproteine e i lipopolisaccaridi sono i primi siti di distruzione con conseguente aumento della permeabilità cellulare e, infine, la lisi cellulare (Kim *et al.*, 1999).

Mentre il cloro distrugge selettivamente alcuni sistemi enzimatici intracellulari; l'ozono causa l'ossidazione diffusa delle proteine cellulari determinando la morte delle cellule più rapidamente (Mudd *et al.* 1969; Hinze *et al.*, 1987; Takamoto *et al.*, 1992). La morte cellulare può anche derivare dalla distruzione o dal danneggiamento degli acidi nucleici. La timina è più sensibile all'ozono rispetto alla citosina e all'uracile. L'ozono distrugge anche l'RNA virale e altera le catene polipeptidiche delle proteine virali (Kim *et al.*, 1999).

## **1.7 SICUREZZA E TOSSICITÀ**

La caratteristica predominante dell'ozono è che in condizioni atmosferiche *standard* è in fase gassosa, favorendo numerose applicazioni in campo igienico-alimentare. A differenza dei disinfettanti classici, (es. il cloro) che rilasciano residui inquinanti, l'ozono si decompone ad ossigeno; ciò potrebbe rappresentare un vantaggio per l'ambiente e per la salute evitando gli effetti collaterali. Grandi città quali Mosca,

Parigi, Bologna e Firenze possiedono impianti che forniscono acqua potabile prelevata da fiumi e trattata con ozono. Vista la sua breve emivita, l'ozono non può essere prodotto e conservato, ma è necessario che venga generato *in situ* al momento dell'utilizzo attraverso gli ozonizzatori.

L'ozono è un agente ossidante altamente reattivo con una forte tossicità per animali, piante e altri organismi viventi. Molti ossidanti fotochimici, dovuti all'inquinamento e presenti nell'aria provengono dall'ozono. La tossicità dell'ozono dipende dai suoi livelli nell'ambiente e dalle condizioni d'azione come la durata dell'esposizione.

I principali danni sono a carico delle vie respiratorie per alterazione della permeabilità degli epiteli, con conseguente riduzione della funzionalità polmonare (fino ad edema); può inoltre determinare un peggioramento in soggetti con bronchite od asma. L'ozono è anche causa di altri disturbi quali bruciore agli occhi, mal di testa e debolezza.

La tossicità dell'ozono, pertanto, richiede che gli addetti al suo utilizzo siano continuamente monitorati e protetti. In linea generale, in soluzione acquosa è usato per la sanificazione dell'acqua per uso alimentare, per piscine, docce, sistemi d'irrigazione ed impianti di depurazione idrica; mentre in fase gassosa è utilizzato per la distruzione di tossine disperse nell'aria e la deodorizzazione delle fognie.

## **1.8 POSSIBILI APPLICAZIONI NEL SETTORE ALIMENTARE**

Attualmente, le applicazioni dell'ozono sono numerose. È stato dimostrato che l'ozono può allungare i tempi di conservazione di svariati alimenti in primo luogo attraverso la riduzione della carica microbica superficiale. La tecnologia maggiormente utilizzata prevede l'uso di ozono in forma gassosa. In pratica tale tipo di conservazione prevede la sterilizzazione dell'aria immessa nei locali di immagazzinamento con una quantità di ozono sufficiente all'eliminazione dei microrganismi. Billion (1975) ha condotto una dettagliata indagine sulla durata di immagazzinamento, in atmosfera contenente ozono, di carne di manzo, di vitello, agnello, maiale, pollo, e coniglio. L'atmosfera ozonizzata accresce la durata dell'immagazzinamento di tutti gli alimenti studiati di sette giorni rispetto alla

normale atmosfera. Generalmente lo sviluppo della microflora superficiale: *Pseudomonas sp.*, sporigeni, *Salmonelle*, e stafilococchi è risultata ritardata con la refrigerazione e in presenza di ozono (Horvath et al., 1985). L'ozono è stato utilizzato per la disinfezione di pollame con acqua fredda riciclata e la disinfezione delle carcasse di pollo (Sheldon and Brown, 1986).

Forsythe e Miller (1993) hanno esaminato l'uso di ozono per il riciclo delle acque di pollame e hanno dimostrato l'efficacia dell'ozono per la disinfezione dell'acqua di riciclaggio del pollame. Sheldon and Brown (1986) applicarono l'ozono direttamente sulle carcasse di pollame. L'ozono ha distrutto più di 2 Log unità di tutti i microrganismi presenti sulla carcassa senza l'ossidazione significativa dei lipidi, sviluppo di sapori o perdita di colore della pelle delle carcasse. Per quanto riguarda i prodotti di origine vegetale, gli effetti dell'ozono sul metabolismo sono anche una conseguenza della sua grande attività ossidante. Non si osserva alcun deterioramento della frutta quando l'ozono agisce sulla sua superficie. Durante la conservazione, la respirazione e il processo di maturazione della frutta si intensifica. L'etilene prodotto durante la conservazione agisce sugli altri frutti e promuove la maturazione. I segni esteriori di questo processo sono rappresentati dall'imbrunimento della buccia, rammollimento della polpa, e infine dalla putrefazione del frutto. Questo processo può essere controllato dall'ozono grazie all'ossidazione dei metaboliti, in tal modo viene ridotta l'azione sugli altri frutti. Il valore nutritivo di patate, cavolo e carote è stato studiato dopo trattamento con ozono al fine di prolungarne la conservabilità nel tempo. Il trattamento con ozono non ha alterato significativamente proteine ed amido nelle patate; zuccheri e caroteni in cavolo e carote. La valutazione organolettica non ha indicato nessuna variazione rispetto a patate e verdure non trattate. Tuttavia l'ozonizzazione ha determinato una diminuzione dell'acido ascorbico dal 16 al 25%. Il trattamento di mele con l'ozono ha causato perdita di peso e un minore deterioramento. Un aumento della *shelf-life* di mele e arance con ozono è stata attribuita alla ossidazione dell'etilene. Funghi deterioranti sono diminuiti su more e uva dopo ozonizzazione (Beuchat, 1992). In cipolle trattate con ozono durante la conservazione, muffe e conta batterica sono notevolmente diminuite, senza alcun cambiamento di qualità nella composizione chimica e/o sensoriale (Song *et. al.*, 2000). L'ozono è stato utilizzato sperimentalmente come sostituto dell'ossido di etilene per la decontaminazione del pepe nero in grani e pepe nero macinato (Zhao

and Cranston, 1995). Il trattamento ha portato una leggera ossidazione dei componenti dell'olio volatile, ma l'ozono non ha avuto alcun effetto significativo sugli oli volatili di tutto il pepe. Poiché l'ozonizzazione è riuscita a ridurre la carica microbica e non causare una significativa ossidazione degli oli volatili di tutto il pepe nero in grani, questo metodo è stato raccomandato per il trattamento industriale delle spezie (Zhao and Cranston, 1995).

In linea generale, i benefici che l'ozono gassoso apporta in avicoltura, nella fase di accrescimento degli animali sono: sanificazione dell'ambiente mantenuto esente da microrganismi patogeni; distruzione delle emanazioni ammoniacali; deodorazione dell'ambiente; maggiore ossigenazione del microclima ambientale; miglioramento del mangime con conseguente miglioramento della digestione ed incremento del peso dell'animale e minori rischi di contagio incrociato. Il Ghiaccio ozonizzato o combinazione di refrigerazione e ozono vengono utilizzati per la conservazione di prodotti ittici con i seguenti vantaggi: diminuzione della carica batterica sul prodotto, nel microclima e sulle pareti della cella e prolungamento dei tempi di conservazione del prodotto. L'ozono controlla efficacemente la formazione di muffe e batteri nelle celle frigorifere destinate alla conservazione delle carni; in particolare, il tasso di umidità può essere mantenuto ad una gradazione più elevata, attenuando il calo di peso e la perdita di aroma; inoltre, distruggendo gli odori, evita il passaggio di aromi non graditi da un prodotto all'altro. Tuttavia si è visto che il trattamento con ozono può aumentare significativamente la perossidazione lipidica. Non è ancora chiaro se concentrazioni di ozono sufficienti per l'effetto battericida, portino anche ad aumento significativo dell'ossidazione dei grassi (Smith *et al.*, 2001).

L'ozono in fase gassosa viene utilizzato per la conservazione nei silos di riso, mais, soia e grano. In particolare, riduce la crescita di *Tribolium confusum* e *Sitophilus granarius*, insetti che infestano i cereali immagazzinati. Inoltre, permette l'abbattimento delle muffe appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, che generano l'aflatossina B1.

## CAPITOLO 2

### BIOFILM

#### 2.1 BIOFILM

L'abilità a formare strutture associate a superfici e consorzi co-operativi (riferiti come biofilm), è una delle più eccezionali caratteristiche dei batteri. Il biofilm è una comunità sessile di batteri che mostra un aumento di resistenza ed è una risposta adattativa ad un'ampia varietà di fattori che incidono negativamente sulla loro attività (Kjelleberg e Givskov, 2007).

Il biofilm può essere definito come “una comunità strutturata di cellule batteriche racchiuse in una matrice polimerica autoprodotta ed adesa ad una superficie inerte o vivente” (FIGURA 2).

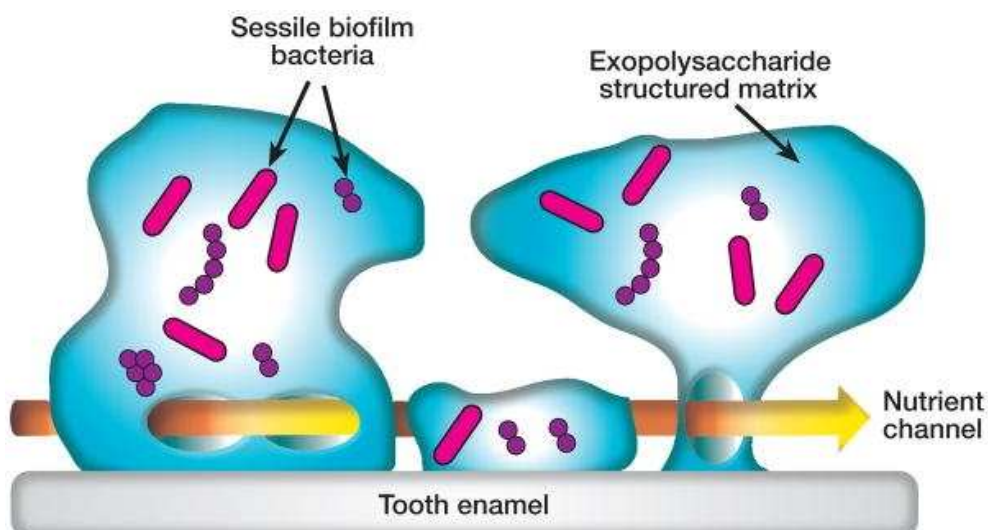
Tale definizione di Costerton è stata poi descritta in termini più cooperativi da Elder e collaboratori come “un consorzio funzionale di microrganismi all'interno di una matrice esopolimerica estensiva”, mentre Carpentier e Cerf hanno semplificato il concetto come “una comunità di microrganismi immersa in una matrice polimerica organica, adesi a superficie” (Dunne, 2002). Questa matrice consiste in una conglomerazione di differenti tipi di biopolimeri, conosciuti come sostanze extracellulari polimeriche (EPS), che formano l'impalcatura per l'architettura tridimensionale del biofilm ed è inoltre responsabile dell'adesione alla superficie e della coesione di questa struttura (Flemming and Wingender, 2010). La prima osservazione del biofilm risale a fine 1600, quando Antonie van Leuwenhoek esaminò al microscopio un campione proveniente da uno striscio dei suoi denti ed evidenziò la presenza di microrganismi. Successivamente Heukelekian e Heller nel 1940 osservarono il cosiddetto “*bottle effect*” che dimostrava come la crescita e l'attività batterica venivano sostanzialmente migliorate a seguito dell'incorporazione di una superficie sulla quale questi microrganismi potevano aderire. Di seguito Zobell nel 1943 dimostrò che il numero di microrganismi su una superficie era drammaticamente più elevato rispetto a quelli liberi nel mezzo (Kjelleberg e Givskov, 2007). Nel 1969 Jones, studiando i sistemi di filtraggio delle acque con

l'aiuto della microscopia elettronica, scoprì che i biofilm sono dotati di una diversa varietà di cellule. La scoperta che le colonie batteriche non erano solo tenaci, ma resistenti agli agenti antimicrobici, arriva nel 1973 grazie a studi fatti da Characklis su fanghi industriali (Donlan, 2002). In realtà però, la teoria sulla predominanza del biofilm fu promulgata nel 1978 da Costerton. Tale teoria afferma che la maggior parte dei batteri si sviluppa in matrici circoscritte, adesi a superfici appartenenti a qualsiasi ecosistema acquatico e che le cellule batteriche adese differiscono alquanto dalle loro corrispondenti forme planctoniche. Ciò deriva da studi basati sull'osservazione di ecosistemi acquatici naturali, in cui si è visto che inequivocabilmente più del 99,9% dei batteri si sviluppano in biofilm adesi su un'ampia varietà di superfici (Donlan e Costerton, 2002). Virtualmente infatti, qualsiasi superficie, animale minerale o vegetale, ovvero vivente o inerte, può essere propizia per la colonizzazione batterica e per la formazione del biofilm, inclusi lenti a contatto, scafi delle navi, caseifici, oleodotti petroliferi, rocce nei corsi d'acqua, e tutte le varietà di impianti biomedici e dispositivi permanenti transcutanei (Dunne, 2002). Tra i dispositivi medici ricordiamo tubi per le procedure di intubazione, cateteri, valvole cardiache artificiali ma anche strumenti chirurgici (Tomaras et al., 2003). I vantaggi acquisiti dai batteri nel vivere adesi ad una superficie sono di includere una maggiore concentrazione di nutrienti che si trovano vicini alla superficie, promuovendo lo scambio genetico e per i patogeni, incrementare la protezione verso il sistema immune dell'ospite (Palmer et al., 2007).

Un biofilm può essere formato sia da una comunità della stessa specie che da più specie, ognuna delle quali mostra la stessa organizzazione (Blaschek et al., 2007). Quando un biofilm è costituito da specie eterogenee (che in natura sono più probabili), i sottoprodotti metabolici di un organismo possono servire per sostenere la crescita di un altro, mentre l'adesione di una specie potrebbe fornire dei ligandi che permettono il fissaggio di altre. Al contrario, la competizione per i nutrienti e l'accumulo di sottoprodotti tossici generati dai colonizzatori primari, possono limitare la diversità delle specie all'interno del biofilm (Dunne, 2002). Grazie all'utilizzo della microscopia si è visto che il biofilm non è organizzato come un monostrato omogeneo di cellule, ma è una struttura eterogenea formata da microcolonie che sono l'unità base del biofilm, costituito per il 15% del suo volume da cellule e per l'85% da matrice. All'interno di questa struttura sono intervallati dei

canali per l'acqua; questi canalicoli trasportano i nutrienti e l'ossigeno alle cellule delle microcolonie intrappolate all'interno. Questo scambio di nutrienti permette alla struttura del biofilm di sviluppare un alto grado di densità e complessità. Ogni cellula viene mantenuta nelle condizioni ottimali in ogni parte della struttura (Blaschek *et al.*, 2007). Attraverso delle misurazioni con microelettrodi però, si è visto che il pH e la dissoluzione dell'ossigeno contenuto nel biofilm si riducono nelle vicinanze del substrato (Watnick e Kolter, 2000). Non c'è dubbio comunque che questa struttura conferisce ai batteri una maggior resistenza verso gli antibiotici e le risposte immuni dell'ospite. Si è stimato che le cellule batteriche in stato di biofilm sintetizzano oltre 90 tipi di proteine in più rispetto alle loro consimili in stato planctonico. Molte di queste proteine sono molecole specificatamente coinvolte nei meccanismi di resistenza agli *stress*, alla sintesi di proteine e alle funzioni di omeostasi cellulare, quali le proteine da shock acido o da shock termico. In altri termini, il passaggio dallo stato di vita planctonico a quello sessile fa sì che i batteri riescano a sopportare meglio condizioni ambientali (Giaccone, 2007).

FIGURA 2: RAPPRESENTAZIONE DELLA STRUTTURA DI UN BIOFILM



## 2.2 PROCESSO DI FORMAZIONE DEL BIOFILM

È ormai noto che ovunque vi sia un flusso d'acqua, dei microrganismi e una superficie solida, può formarsi un biofilm. Le superfici solide che possono ospitare biofilm negli impianti alimentari includono l'alluminio, l'acciaio, il vetro, il nylon, Buna-n e teflon. Le superfici graffiate, screpolate o che presentano intercapedini, rappresentano una ottima opportunità per intrappolare residui organici e batteri che portano all'evento iniziale del biofilm. Questi punti sono difficili da raggiungere e conferiscono una condizione ottimale per la formazione e lo sviluppo del biofilm poiché forniscono una protezione verso i disinfettanti, mentre sono esposti al flusso d'acqua e di nutrienti (Deibel, 2003). L'impianto e lo sviluppo del biofilm è un processo multifattoriale e dinamico governato da un sistema di controllo regolato sia da elementi ambientali che genetici (Lens *et al.*, 2003). Affinchè ciò accada i microrganismi devono prima di tutto raggiungere la prossimità della superficie in questione e poi aderire su tale superficie (FIGURA 3). I batteri possono essere trasportati sulla superficie in vari modi, quali la sedimentazione, mediante forze dinamiche di fluidi, attraverso la motilità, spinti dall'attrazione verso fattori chemiotattici o mediante forze passive quali il moto browniano e l'idrofobicità superficiale delle cellule. Fu per primo Zobell nel 1943 a notare che l'adesione alla superficie da parte dei microrganismi era probabilmente un processo formato da due fasi: una primaria ma reversibile attrazione alla superficie, seguita da una più tardiva ma tenace e irreversibile: adesione.

L'adesione ad un substrato può essere attiva o passiva a seconda della motilità della cellula. Quella passiva è guidata dalla gravità, dalla diffusione e dalla dinamica dei fluidi. Nell'adesione attiva, la superficie della cellula batterica facilita la fase di attacco iniziale. Le strutture che si riscontrano sulla superficie cellulare, quali flagelli, pili, adesine, capsula e carica superficiale, influenzano l'adesione. I flagelli permettono al batterio di muoversi verso uno specifico sito di attacco, mentre i cambiamenti che avvengono nella fisiologia cellulare incidono sull'adesione, andando ad influenzare la chimica di alcune strutture quali la membrana superficiale e le proteine di superficie (adesine e pili). Inoltre l'adesione stimola la sintesi di polisaccaridi e l'aggregazione cellulare. Ciò avviene in due fasi: quella dell'adesione reversibile seguita dalla fase irreversibile. Lo stadio reversibile rappresenta l'iniziale

fase di debole interazione dei batteri con il substrato e coinvolge forze di van der Waals, elettrostatiche ed interazioni idrofobiche. Durante l'adesione reversibile i batteri mostrano ancora un moto browniano e vengono facilmente rimossi dall'applicazione di operazioni tecniche quali un semplice risciacquo. La fase irreversibile deriva invece dall' ancoraggio di appendici e/o dalla produzione di polimeri extracellulari. In genere le forze repulsive prevengono il contatto diretto tra i batteri e la superficie, poiché di solito entrambi sono cariche negativamente. L'ancoraggio tra le appendici batteriche e il substrato coinvolge forze a breve raggio come le interazioni dipolo-dipolo, legami idrogeno, forze idrofobiche e legami covalenti. In questo caso la rimozione è più difficoltosa e richiede l'applicazione di forze più efficaci, quali strofinamento o raschiamento oppure la rottura chimica dei legami attraverso l'applicazione di enzimi, detergenti, surfactanti, disinfettanti e/o del calore (Chmielewski and Frank, 2003). L'interfaccia solido-liquida tra una superficie e un medium acquoso quale può essere l'acqua o il sangue, fornisce un ambiente ideale per l'attacco e la crescita dei microrganismi (Donlan, 2002). Non appena un materiale solido è immerso in un liquido, nel giro di frazioni di secondo le molecole solubili in quel liquido si concentrano sulle superficie del solido e formano quello che si chiama un “film condizionante”, che nelle superfici inerti costituisce la base originaria di adesione dei microrganismi, poiché altrimenti i batteri avrebbero bisogno di più tempo per aderire (Giaccone, 2007). Negli ambienti di un' industria alimentare, infatti, i batteri insieme a molecole organiche ed inorganiche, come per esempio proteine derivate dalla lavorazione di latte e di carne o più in generale residui lasciati dagli alimenti stessi, si adsorbono sulla superficie formando il “film condizionante”. Queste molecole assieme ai microrganismi vengono veicolate sulla superficie per fenomeni di diffusione o in alcuni casi attraverso flussi turbolenti di liquidi. L'accumulo di molecole all'interfaccia solido-liquido, causa un aumento della concentrazione di nutrienti rispetto alla fase liquida; inoltre anche il trasferimento di nutrienti è molto più rapido in un biofilm rispetto a quello che avviene nelle cellule microbiche sospese in un liquido. Queste condizioni favoriscono la formazione del biofilm alterando le proprietà chimico fisiche della superficie e facilitando la sequenza degli eventi successivi. In realtà, il processo di condizionamento di superficie non è indice di sicura formazione di biofilm. A questo proposito, la microtopografia della superficie è ugualmente importante nel favorire o meno la

formazione dei biofilm microbici, in particolare se la superficie ha molte fessure e canali che possono intrappolare i batteri (Marino, 2008).

Sono state riconosciute e dimostrate evidenti correlazioni tra tipo di materiale utilizzato per formare le superfici di lavoro e il tipo di alimenti che vi si lavorano. Un materiale idrofobico (es. teflon e materiali plastici), che tende a respingere tutto ciò che è acqua avrà un'alta affinità per tutte le componenti grasse presenti negli alimenti processati. Viceversa un materiale molto idrofilico (es. vetro e metallo) avrà maggiore affinità per i componenti proteici e zuccherini mentre respingerà i grassi. Di conseguenza se in uno stabilimento predominano materiali di costruzione idrofobici probabilmente lo strato condizionante che si creerà sulla loro superficie conterrà una grande quantità di grassi e se in quella azienda non si utilizzano sostanze grasse, il rischio della formazione di biofilm sarà relativamente basso. Il ragionamento può essere fatto al contrario se all'interno dell'azienda predominano materiali che attirano i grassi e respingono le proteine. Ciò significa che la scelta dei materiali da costruzione delle superfici di lavoro all'interno dell'industria alimentare dovrebbe tener conto, nei limiti del possibile, della natura degli alimenti che vi si intendono produrre (Giaccone, 2007). Generalmente si crede che i microrganismi aderiscono più rapidamente su superfici idrofobiche apolari rispetto ai materiali idrofilici (Mazumder et al., 2010). L'idrofobicità della superficie cellulare, la presenza di fimbrie e flagelli e la produzione di EPS, facilita la velocità e il grado di attacco delle cellule microbiche (Donlan, 2002). Anche l'idrofobicità della superficie cellulare batterica, così come quella della superficie solida è importante durante l'adesione in quanto le interazioni idrofobiche tendono ad aumentare all'incremento della natura non polare di una o entrambe le superfici in questione (Donlan, 2002; Simoes et al., 2010). La maggior parte dei batteri, infatti, sono carichi negativamente ma contengono una componente idrofobica, ovvero le fimbrie. La maggior parte delle fimbrie che sono state esaminate contengono un'alta percentuale di residui di amminoacidi idrofobici, e perciò giocano un ruolo fondamentale nel superare la barriera di iniziale repulsione idrostatica che esiste tra la cellula e il substrato. Altre proprietà della superficie cellulare possono facilitare l'adesione. Diversi studi hanno dimostrato che il trattamento di cellule adsorbite con enzimi proteolitici, causa un marcato rilascio di batteri adesi alla superficie, fornendo la prova del ruolo importante svolto dalla componente proteica durante l'adesione. È stato inoltre visto

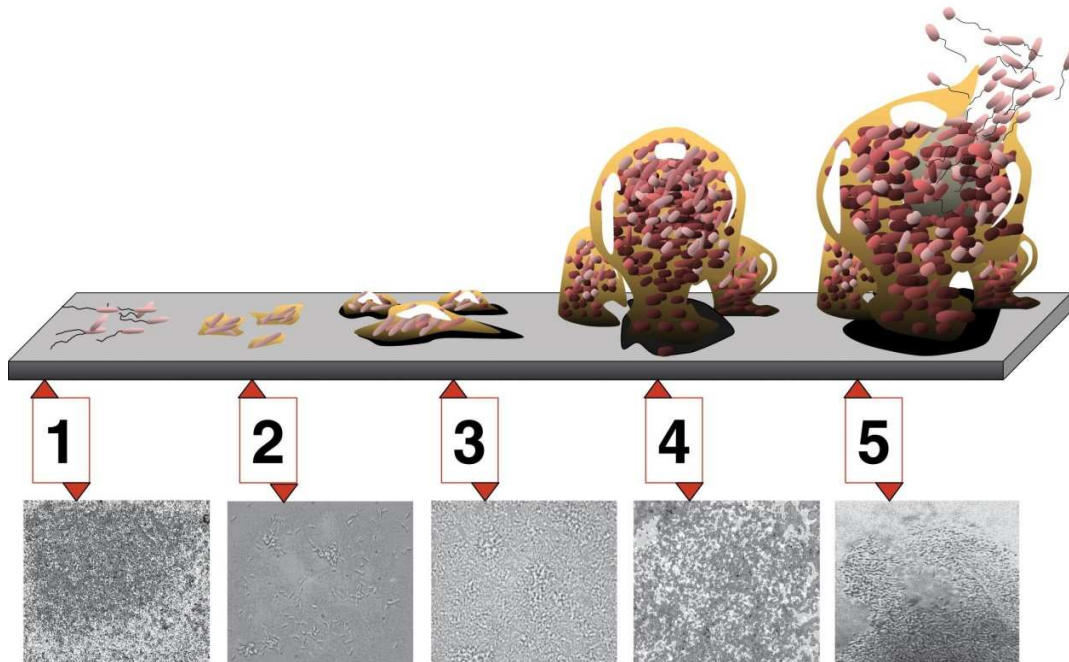
che microrganismi contenenti acidi micolici, quali ad esempio i micobatteri, erano più idrofobici rispetto a batteri non contenenti tali acidi, e ad un aumento della lunghezza degli acidi micolici corrispondeva un aumento della idrofobicità. Per la maggior parte dei ceppi testati, l'adesione è stata maggiore sui materiali idrorepellenti. L'antigene O, componente dei lipopolisaccaridi (LPS) ha anche dimostrato di conferire proprietà idrofile ai batteri gram negativi (Donlan, 2002). La formazione delle microcolonie segue la fase dell'adesione irreversibile, date le condizioni di crescita ottimali. Tali strutture risultano dalla simultanea aggregazione e crescita di microrganismi e si accompagna alla produzione di EPS (Chmielewski e Frank, 2003). Le microcolonie si ingrandiscono e confluiscono fino a formare uno strato di cellule che ricopre la superficie. La produzione di esopolisaccaridi facilita la stabilizzazione della colonia nonostante le fluttuazioni ambientali (Marino, 2008).

Gli EPS, ovvero sostanze polimeriche extracellulari che consistono in conglomerati di differenti tipi di biopolimeri, sono una componente fondamentale della matrice, che forma l'impalcatura per l'architettura tridimensionale del biofilm maturo, ed è inoltre responsabile dell'adesione alla superficie e della coesione stessa del biofilm. Gli EPS immobilizzano le cellule all'interno del biofilm, tenendole vicine, e permettono così delle intense interazioni comprese le comunicazioni tra cellula e cellula e la formazione di un microconsorzio sinergico (Flemming e Wingender, 2010). La composizione generale dell'EPS, comprende polisaccaridi, proteine, acidi nucleici, lipidi e fosfolipidi: proteine e polisaccaridi formano il 75-89% della composizione della matrice e ciò indica che sono la maggior componente (Simoes *et al.*, 2010). A seguito della ritenzione di enzimi extracellulari, la matrice svolge il ruolo di sistema digestivo esterno, per sequestrare nutrienti particolati e disciolti nella fase liquida, permettendo loro di essere utilizzati come fonte di energia. Inoltre agisce come centro di riciclo, rendendo disponibili tutti i componenti delle cellule lisate, tra cui il DNA che rappresenta una riserva di geni per il trasferimento di informazioni orizzontale. Inoltre la matrice protegge i microrganismi dall'essiccamento, dall'ossidazione da alcuni antibiotici e metalli cationici, dalle radiazioni ultraviolette, e dalle difese dell'ospite. Gli EPS sono stati chiamati “the dark matter of biofilms” proprio per sottolineare il vasto range di biopolimeri e la difficoltà nell'analizzarli (Flemming e Wingender, 2010). Gli EPS determinano le immediate condizioni di vita delle cellule appartenenti a questo microambiente

influenzando la porosità, la densità, il contenuto d'acqua, la carica, le proprietà assorbenti, l'idrofobicità e la stabilità (Flemming *et al.*, 2007). Il procedere dell'adesione delle cellule alla superficie e la conseguente crescita e produzione di esopolisaccaridi porta alla formazione del biofilm, all'interno del quale si formano molti strati di cellule batteriche intrappolate nella matrice polisaccaridica (Marino, 2008). Il biofilm maturo può essere composto da un singolo strato di cellule o da un multistrato poco compresso di microcolonie tenute insieme dagli EPS e alternate a canali d'acqua (Chmielewski e Frank, 2003). Man mano che il biofilm “invecchia”, i batteri attaccati, per sopravvivere e colonizzare nuove nicchie possono staccarsi singolarmente o in gruppi e disperdersi nell'ambiente (Marino, 2008). La colonizzazione di nuove superfici è un vincolo fondamentale per la vita degli organismi sessili (Webb, 2009). Infatti il termine “distacco” viene riconosciuto come una parte del ciclo di vita del biofilm. Un bilanciamento tra adesione, crescita e distacco è importante per la produzione e il mantenimento di una comunità funzionale all'interno del biofilm. I fattori che influenzano la dispersione possono essere sia abiotici che biotici. Tra i fattori abiotici sono comprese le forze di taglio, che influenzano la struttura, la densità e la stabilità della matrice, e i fattori chimici, come la concentrazione di nutrienti e la loro disponibilità importanti, per la crescita del biofilm. I fattori biotici, quali l'attività metabolica dei microrganismi e la loro espressione genica, influenzano direttamente il comportamento del distacco del biofilm. La dispersione è stata divisa in 4 fasi : l'erosione, l'abrasione, la separazione, colonizzazione di nuove superfici (Garny *et al.*, 2008).

**FIGURA 3 FASI DI FORMAZIONE DEL BIOFILM:**

- 1) CONDIZIONAMENTO DI SUPERFICIE;
- 2) FASE DI ADESIONE REVERSIBILE;
- 3) FASE DI ADESIONE IRREVERSIBILE;
- 4) BIOFILM MATURO;
- 5) FASE DI DISTACCO E DISPERSIONE



L'adesione dei batteri ai prodotti alimentari o alle superfici destinate a venire a contatto con gli alimenti può portare a seri problemi di carattere igienico e a forti perdite economiche conseguenti all'alterazione degli alimenti stessi. Oltre a questo, sono documentati molti casi di persistenza sulle superfici di patogeni alimentari quali *Listeria monocytogenes*, *Campilobacter Jejuni*, *S. aureus* ed *E. coli* O157:H7 (Marino, 2008). Uno dei principali obiettivi dell'industria alimentare è la produzione di alimenti sicuri, sani e con una buona qualità organolettica. Per raggiungere questo obiettivo è essenziale controllare la crescita dei microrganismi, al fine di minimizzare il rischio di contaminazioni dell'alimento stesso da parte dei microrganismi presenti per esempio nell'ambiente di lavorazione. Se sulle superfici solidi si viene a formare il “sudiciume” e questo non viene adeguatamente rimosso durante le operazioni di sanificazione, il risultato è un accumulo di questo materiale sulle superfici e la formazione di biofilm (FOTO 1). Questo è il motivo per cui la fase di pulizia è particolarmente importante (Marino, 2008). La limitazione dei

nutrienti e dell'acqua, il *design* delle attrezzature e il rispetto delle temperature di lavorazioni sono fondamentali per il controllo del biofilm. Una volta che il biofilm si è formato, pulire le superfici è più difficoltoso (Chmielewski e Frank,2003).

## **2.2 OZONO VERSUS BIOFILM**

Se il processo di pulizia è inefficace, i microrganismi possono formare un biofilm sulle superfici delle attrezzature (FOTO 1), dove proliferano e si accumulano. Una volta integrati in questa matrice, i microrganismi spesso diventano resistenti all'azione dei disinfettanti (Di Ciccio *et al.*, 2012)

Vi sono molte strategie per rimuovere un biofilm e queste sono: i) la pulizia meccanica , ii) l'uso di agenti antimicrobici, iii) la rimozione dei nutrienti per evitare la crescita del biofilm, iv) l'inibizione dell'adesione microbica alle superfici, v) promozione del distacco della biomassa (Xavier *et al.*, 2005).

In linea generale possono essere distinti in metodi fisici, biologici e chimici.

Tra i metodi fisici abbiamo l'utilizzo di radiazioni ionizzanti che Niemira e Solomon (2005) trovarono più efficaci contro le Salmonelle organizzate in biofilm piuttosto che le rispettive forme planctoniche.

Recentemente, inoltre, è stata messa a punto una nuova tecnica chiamata inattivazione con plasma atmosferico che si avvale dell'uso di specie reattive dell'ossigeno e radicali generati da scariche di bagliori di pressione atmosferica ad alto voltaggio per inattivare i microrganismi.

Oulahal-Lagsir *et al.*, nel 2003, inoltre, hanno utilizzato un trattamento combinato di ultrasuoni ed enzimi per ottenere una consistente rimozione (Van Houdt e Michiels, 2010).

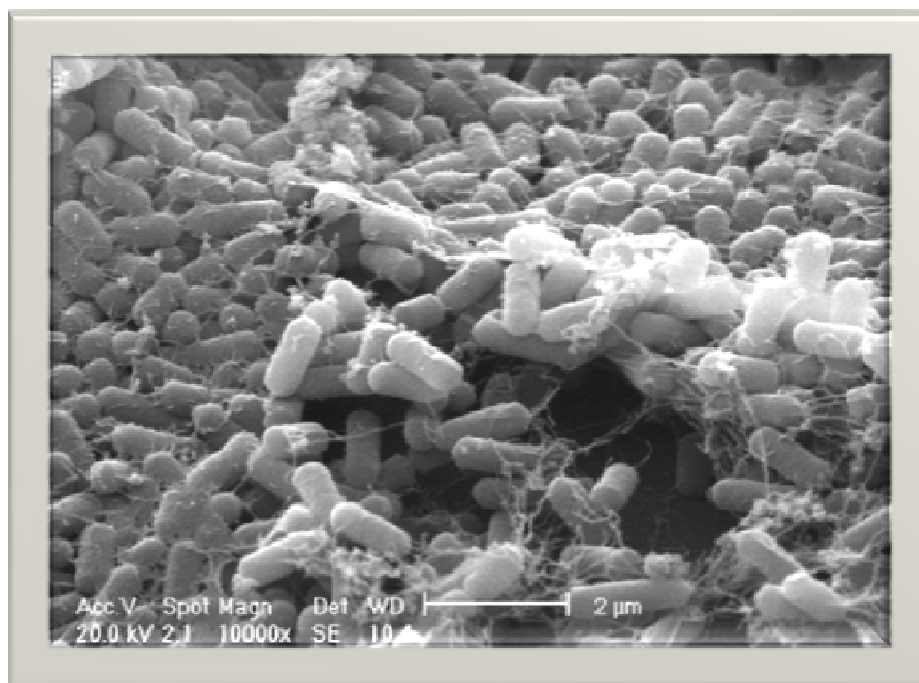
Tra i metodi biologici troviamo l'incorporazione di sostanze bioattive come le batteriocine, allo scopo di inibire l'adesione dei batteri alla superficie. Inoltre gli enzimi sono un'altra categoria di molecole in grado di migliorare l'efficacia della pulizia favorendo la disgregazione dei polimeri extracellulari. Di recente studio è invece l'utilizzo di batteriofagi utilizzati per infettare le cellule all'interno del biofilm e permettere la disgregazione dei componenti della matrice esopolisaccaridica (Azeredo and Sutherland, 2008).

I metodi chimici sono certamente quelli più utilizzati. I disinfettanti utilizzati nelle industrie alimentari possono essere suddivisi in gruppi in base al meccanismo di azione. Vi sono gli agenti ossidanti, quali composti a base di cloro, perossido di idrogeno e ozono; composti attivi sulla superficie quali composti di ammonio quaternari e acidi anionici; infine vi sono gli iodofori. L'efficienza della disinfezione si basa su parametri quali il pH, la temperatura, la concentrazione del disinfettante, il tempo di contatto e la quantità di sostanze organiche che interferiscono con l'azione del disinfettante stesso (Van Houdt and Michiels, 2010).

Già nel 1993 Greene *et al*, avevano dimostrato l'efficacia disinfettante dell'acqua ozonizzata per la disinfezione delle superfici di acciaio inossidabile inoculate con *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 949) e *Alcaligenes faecalis* (ATCC 337). Successivamente Guzel-Seydim *et al* (2000) hanno studiato l'uso di acqua ozonizzata nelle apparecchiature lattierocasearie. Degli utensili in acciaio inox sporchi sono stati trattati con un pre-risciacquo di acqua ozonizzata. I risultati dimostrano che il trattamento con l'ozono ha rimosso l'84% dei residui della lavorazione lattierocasearia, rispetto al 51% dell'acqua calda (40°C). Dai risultati di questo esperimento, si è ipotizzato che l'uso di ozono nella fase di pre-risciacquo può consentire una diminuzione nell'utilizzo dei detergenti nella pulizia

Dosti, (1998) ha testato l'ozono contro i batteri che sono in grado di formare biofilm, *P. fluorescens* (ATCC 948), *P. fragi* (ATCC 4973) e *P. putida* (ATCC 795) per 24-72 h. Dopo la formazione del biofilm, il metallo SS è stato sciacquato con una soluzione salina buffer fosfato (1 min) ed esposto ad ozono (0.6 ppm per 10 min) e cloro (100 ppm di *per 2 minuti*). I risultati hanno indicato che entrambi, ozono e cloro, hanno ridotto significativamente il biofilm formato dai batteri sulla superficie del metallo SS rispetto al controllo. Tuttavia, non c'era una differenza significativa di inattivazione dei batteri tra ozono e cloro con l'eccezione di *P. putida*. L'ozono ha ucciso *P. putida* in modo più efficace rispetto al cloro (Dosti, 1998).

**FOTO 1:** Microscopio elettronico a scansione (SEM): immagine del biofilm



(Ianieri *et al.* 2006)

## PARTE SPERIMENTALE



## 1) OBIETTIVI DEL PROGRAMMA DI RICERCA:

- Valutare l'efficacia del trattamento di decontaminazione con ozono gassoso nei confronti di microrganismi isolati da carni avicole e relativi impianti di macellazione e lavorazione.
- Valutare l'efficacia del trattamento di decontaminazione con ozono gassoso nei confronti di microrganismi isolati da carni avicole e relativi stabilimenti di macellazione e lavorazione a tempi e concentrazioni applicabili nelle Realtà Produttive.
- Valutare la capacità dei ceppi isolati a produrre Biofilm.
- Testare gli effetti dell'ozono gassoso sulla produzione e/o inattivazione del Biofilm prodotto dai ceppi isolati.
- Valutare la sopravvivenza e persistenza di *Salmonella spp.* sui materiali a contatto con le carni di pollame

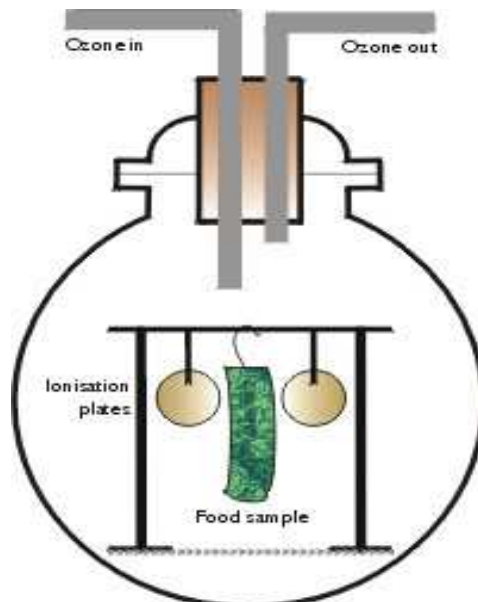
## 2) MATERIALI E METODI

Sono stati individuati n.2 mattatoi avicoli con annesso centro di sezionamento e confezionamento.

In ciascun impianto sono stati effettuati n.3 sopralluoghi. Nel corso di ciascun sopralluogo sono stati effettuati prelievi sia dalle matrici alimentari lungo la linea di lavorazione sia dalle superfici, utensili ed attrezzature utilizzate per la lavorazione degli alimenti.

Sono stati raccolti in totale 112 campioni di cui n.32 campioni da matrice alimentare e n.80 campioni da ambienti di produzione.

I campionamenti ambientali sono stati effettuati secondo la metodica *ISO 18593/2002*.



## 2.1 Isolamenti

I campioni trasportati in laboratorio a temperatura di refrigerazione sono stati immediatamente processati e sottoposti ad analisi microbiologica.

Le determinazioni microbiologiche effettuate secondo metodiche validate hanno incluso: *Listeria monocytogenes* (*L.m*), *Staphylococcus aureus* (*S.a*), *Salmonella* spp. La ricerca di *L.m* è stata effettuata secondo la metodica *UNI EN ISO 11290-1*. I ceppi isolati dopo le consuete prove di “*screening*” quali esame microscopico previa colorazione gram e prova della catalasi sono stati identificati in micrometodo mediante sistema *API Listeria* (bioMèrieux Italia S.p.A., Roma). Gli isolati *Listeria* sono stati successivamente analizzati mediante *PCR multiplex* secondo il protocollo messo a punto nella nostra Sezione (Conter *et al.*, 2009). Per il rilevamento del gene *rrn* (16S rRNA) (specifico per il genere *Listeria*) sono stati utilizzati i *primers* LI1 e U1; mentre per il rilevamento del gene *hlyA* (listeriolisina O) (specifico per *L.monocytogenes*) sono stati utilizzati i *primers* LM1 e LM2.

La ricerca di *S.a* è stata effettuata secondo la metodica *UNI EN ISO 6888-2*. I ceppi coagulasi positivi, dopo le consuete prove di “*screening*” (colorazione di gram, prova della catalasi) sono stati identificati fenotipicamente in micrometodo (Api *Staph* e Vitek – bioMèrieux Italia S.p.A., Roma) ed infine sottoposti a *PCR multiplex* per la ricerca del 16s *rrna* (*Staphylococcus* genere/specifico) e del gene *nuc* (*S.aureus* specie-specifico). La ricerca di *Salmonella* spp., è stata eseguita secondo la metodica *UNI EN ISO 6579/2002*.



Colonie di *L.m*



Colonie di *S.a*



Colonie di *Salmonella* spp

## **2.2 Prove di abbattimento microbico con ozono in fase gassosa**

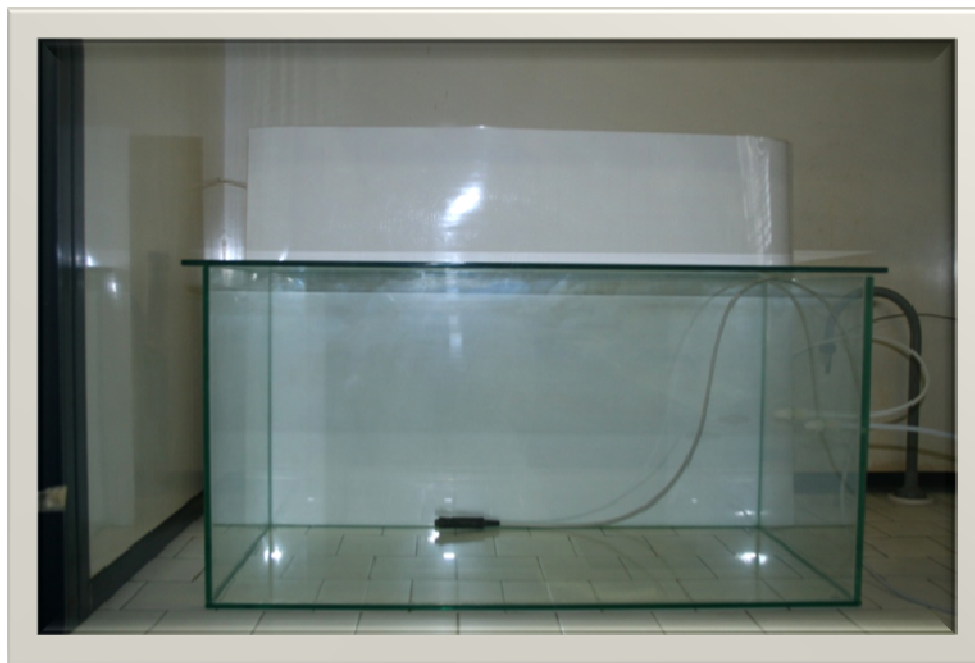
Le prove di inattivazione microbica sono state condotte mediante l'impiego di un apparecchio erogatore di ozono con annessa camera di prova che permetteva di esporre i ceppi *target* a concentrazioni note di ozono gassoso.

La messa a punto dell'apparecchio erogatore di ozono (FIGURA 4) ha riguardato: la scelta di materiale "non reattivo"; l'acquisizione di un rilevatore di ozono all'interno della camera di prova nei diversi tempi di applicazione ; la standardizzazione delle concentrazioni di ozono.

La messa a punto del protocollo sperimentale si è concretizzato mediante l'esecuzione di numerose prove di abbattimento (Fase 1-2-3) utilizzando ozono in fase gassosa a tempi e concentrazioni diversi, al fine di stabilire i parametri di utilizzo per le successive sperimentazioni.

**FIGURA 4:**  
CAMERA DI PROVA (A);  
RILEVATORE CONCENTRAZIONE DI OZONO (B)

**A**



**B**



- **Test di abbattimento microbico - FASE 1:**

L'attività di ricerca della prima fase del progetto era rivolta a valutare l'efficacia dell'ozono gassoso nei confronti dei ceppi isolati nel corso dei sopralluoghi dai campionamenti effettuati nei mattatoi avicoli con annesso centro di sezionamento e confezionamento.

In questa prima fase sono state impiegate concentrazioni di 1460 ppm (pari a 2,3 g/Nm<sup>3</sup>), superiori a quelle utilizzabili in campo. Per i test di abbattimento sono stati utilizzati n.4 ceppi di *S.a* (n.1 ATCC, n.3 isolati da prodotti a base di carne avicola). Dai ceppi suddetti sono state allestite delle brodo colture a concentrazione nota (10<sup>8</sup> ufc/ml) degli isolati; si è poi effettuata la semina della brodocoltura (0,1ml) su piastre TSA (Oxoid) mediante spatolamento. Gli schemi sperimentali utilizzati sono stati i seguenti:

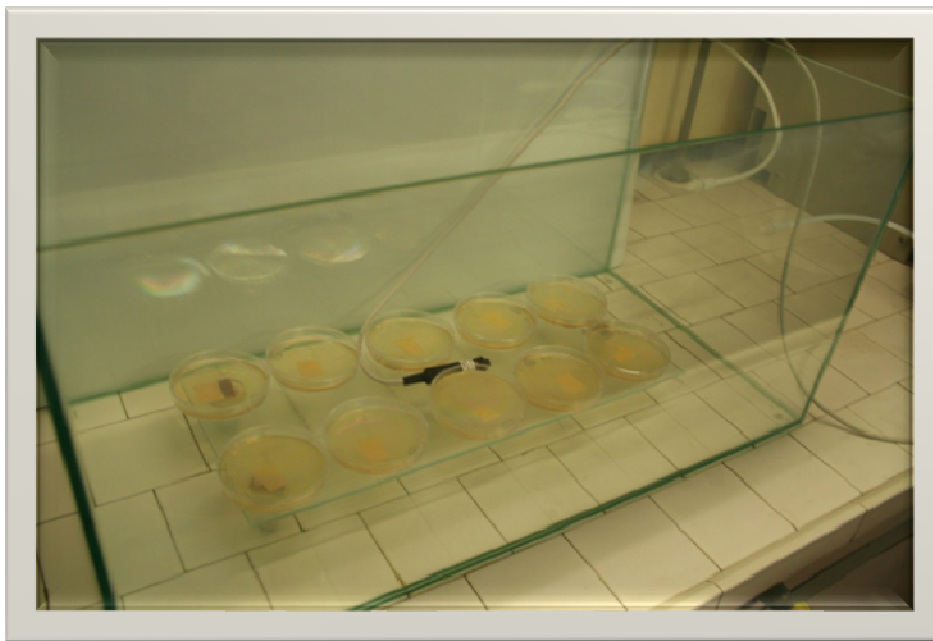
1) **prima sperimentazione:** le piastre sono state sottoposte ad ozonizzazione per 1'' - 2'' - 4'' - 10'' - 20'' (FIGURA 5). La concentrazione media di ozono all'interno della camera era di 2,3g/Nm<sup>3</sup> (1460 ppm). Terminato il trattamento, le piastre sono state poste in termostato a 37°C per 24h. Al termine dell'incubazione si è proceduto ad effettuare la conta delle colonie. L'abbattimento microbico è stato espresso come differenza logaritmica tra il titolo iniziale (piastre non sottoposte ad ozonizzazione) ed il titolo rilevato al termine del trattamento

2) **seconda sperimentazione:** le piastre sono state sottoposte ad ozonizzazione per 1' - 2' - 5' - 20' (FIGURA 5). La concentrazione media di ozono all'interno della camera era sempre pari a 2,3g/Nm<sup>3</sup> (1460 ppm). Le successive fasi sono state condotte secondo le modalità procedurali già descritte per la prima sperimentazione. Tutte le determinazioni sono state effettuate in doppio.

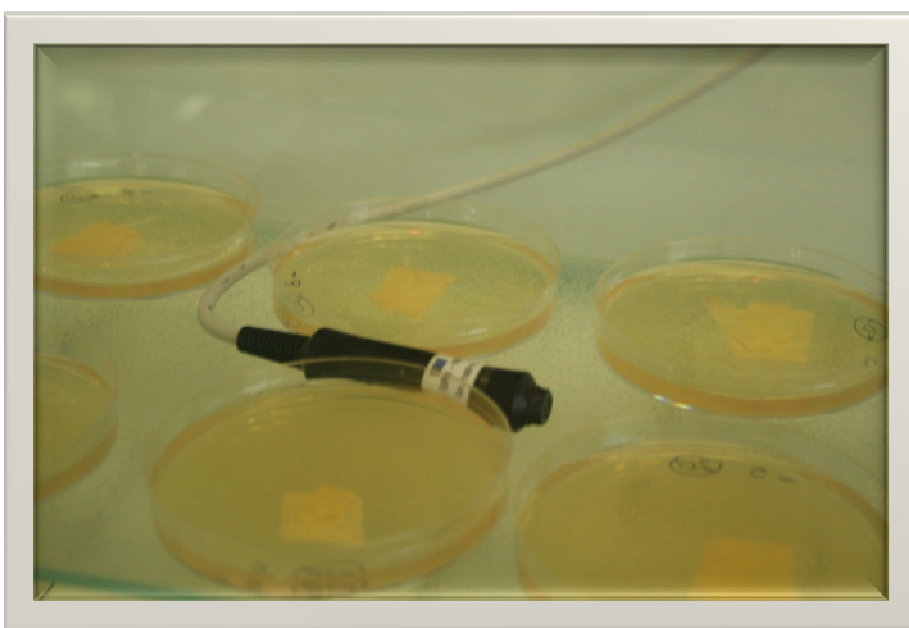
**FIGURA 5**

PIASTRE INOCULATE E SOTTOPOSTE AD OZONIZZAZIONE (A);  
PARTICOLARE: SONDA (B)

**A**



**B**



- **Test di abbattimento microbico - FASE 2:**

Nella seconda fase dell'attività di ricerca, invece, si è voluti valutare l'efficacia del trattamento di decontaminazione con ozono gassoso nei confronti dei microrganismi isolati nel corso dei sopralluoghi a tempi e concentrazioni applicabili nelle Realtà Produttive. In questa fase per le prove di decontaminazione con ozono in fase gassosa sono state allestite delle brodoculture a concentrazione nota degli isolati si è poi effettuata una semina della brodocultura (0.1 ml) su TSA (Oxoid). Come germi target sono stati utilizzati n.1 ATCC *S.a* e n.1 ATCC *L.m* per la loro diffusione negli impianti avicoli e per le note proprietà di produzione biofilm. Le piastre sono state sottoposte ad ozonizzazione per 2, 5, 10, 20 minuti (FIGURA 6 - 7):

- 1) **prima sperimentazione:** la concentrazione media dell'ozono all'interno della camera era di 0,5 ppm (flusso 1L/minuto).
- 2) **seconda sperimentazione:** la concentrazione media dell'ozono all'interno della camera era di 2,5 ppm (flusso 1L/minuto).

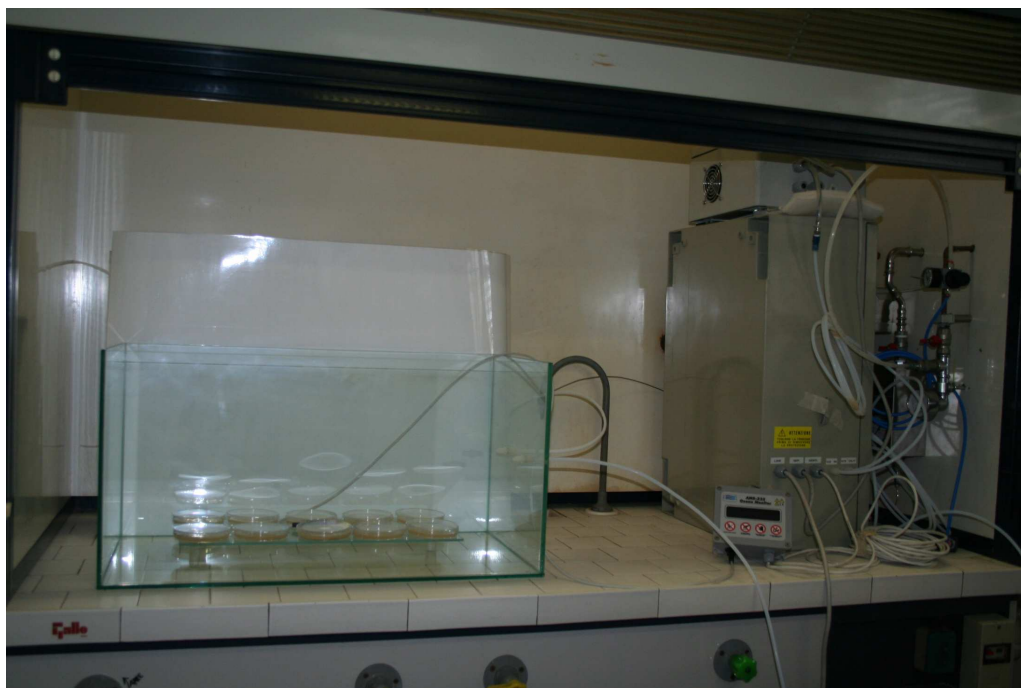
Dopo incubazione delle piastre a 37°C per 24/48h si è proceduto ad effettuare la conta delle colonie.

L'abbattimento microbico è stato espresso come differenza logaritmica tra il titolo iniziale (piastre non sottoposte ad ozonizzazione) ed il titolo rilevato al termine del trattamento. Tutte le determinazioni sono state effettuate in doppio.

Per i successivi test di abbattimento sono stati utilizzati: n. 4 ceppi di *S.a* isolati da carne avicola e n. 2 ceppi di *L.m* isolati sempre da carne avicola. Così come descritto in precedenza sono state allestite delle brodoculture a concentrazione nota degli isolati e si è poi effettuata una semina della brodocultura su TSA (Oxoid). Le piastre sono state sottoposte ad ozonizzazione per 20'; la concentrazione media di ozono all'interno della camera era di 2.5 ppm. Dopo incubazione delle piastre a 37°C per 24 /48h si è proceduto ad effettuare la conta delle colonie e l'abbattimento microbico è stato espresso come differenza logaritmica tra il titolo iniziale (piastre non sottoposte ad ozonizzazione) ed il titolo rilevato al termine del trattamento.

**FIGURA 6:**  
APPARECCHIO EROGATORE DI OZONO (A);  
RILEVATORE CONCENTRAZIONE DI OZONO (B)

A



B



- **Test di abbattimento microbico - FASE 3:**

In questa fase sono stati apportati dei miglioramenti al sistema modello, installando un nuovo sensore e migliorando il controllo del flusso. L'installazione del nuovo sensore ha permesso di rilevare la concentrazione di ozono non solo a livello delle piastre inoculate e sottoposte ad ozonizzazione ma anche all'interno di tutta la camera di prova (FIGURA 7).

Tutte le prove di inattivazione microbica mediante ozono gassoso sono state condotte utilizzando le concentrazioni che nelle prove precedenti avevano fornito i risultati migliori: ozono ad una concentrazione di 2,5 ppm e con un tempo di applicazione di 20 minuti.

Secondo le modalità procedurali descritte in precedenza, le prove di abbattimento sono state eseguite su: n. 6 ceppi *S.a*; n. 4 ceppi *L.m* ; n. 3 ceppi *Salmonella spp*. Le piastre inoculate sono state quindi sottoposte ad ozonizzazione, collocandole nella camera di decontaminazione. Una volta terminato il trattamento, le piastre sono state poste in termostato a temperature e tempi di crescita ottimale (37°C per 24/48h). Al termine dell'incubazione si è proceduto ad effettuare la conta delle colonie. L'abbattimento microbico è stato espresso come differenza logaritmica tra il titolo iniziale (piastre non sottoposte ad ozonizzazione) ed il titolo rilevato al termine del trattamento.

**FIGURA 7:**

APPARECCHIO EROGATORE DI OZONO (A)

RILEVATORE CONCENTRAZIONE DI OZONO (B)

**A**



**B**



### 2.3 Test di espressione fenotipica del biofilm

I test di espressione fenotipica del biofilm sono stati condotti su: n. 15/22 ceppi di *L.m* (n.1 ATCC; n. 6 ceppi isolati da carne avicola; n. 8 ceppi isolati da ambienti di lavorazione); n. 39/78 ceppi di *S.a* (n.1 ATCC; n. 33 ceppi isolati da ambienti di lavorazione; n. 5 ceppi isolati da carne avicola).

- **Preparazione substrati**

Per il saggio di produzione di biofilm sono stati utilizzati i seguenti substrati che presentano caratteristiche chimico-fisiche differenti: dischetti in acciaio inox (AISI 304) e piastrine di polistirene sterili (35 mm di diametro) (Iwaki, Barloworld Scientific Italia S.r.l., Milano). I dischetti di acciaio sono stati sgrassati prima dell'uso mediante immersione *overnight* in etanolo e sono stati successivamente lavati in acqua distillata ed autoclavati a 121° C per 15 min.

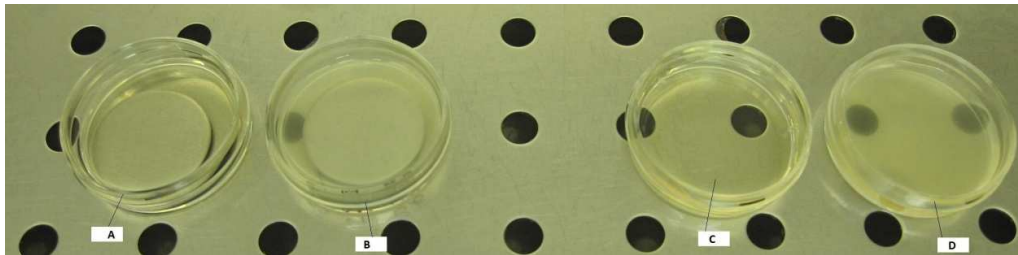
- **Preparazione dei ceppi**

Dai microrganismi è stata allestita una coltura *overnight* con successivo passaggio in brodo BHI (Oxoid) per circa 4 ore al fine di prelevare i microrganismi nella LOG fase in modo tale da avere circa  $10^{10}$  batteri per ml. La lettura è stata eseguita con lo spettrofotometro (Shimadzu UV mini-1240). È stato effettuato il passaggio in piastre di TSA, e incubate a 37° C per 24 ore. Dalla piastra di TSA, sono state prelevate circa 2-3 colonie di *S.aureus* e seminate in 20 ml di Trypticase Soy Broth (TSB) utilizzando della Falcon da 50 ml e poste ad incubare in termostato a 37°C per 18-24 ore. Successivamente la brodocoltura è stata centrifugata per 10 minuti a 4000 rpm e al termine è stato eliminato il surnatante ed eseguito il lavaggio del pellet con 20 ml di PBS (Phosphate Buffered Saline). Il pellet è stato quindi riportato in sospensione mediante vortex e centrifugato nuovamente per 10 minuti a 4000 rpm. Il lavaggio è stato così ripetuto per 3 volte in modo da rendere limpido il surnatante. Al termine del terzo lavaggio il surnatante è stato eliminato e sono stati aggiunti 20 ml di TSB e sono stati riportati in sospensione i batteri con il vortex. È stata quindi calcolata la concentrazione O.D. (Optical Density) mediante spettrofotometro fino ad arrivare a O.D. 0,125, dopo aver programmato la lunghezza d'onda a 550 nm.

- **Saggio di produzione del biofilm**

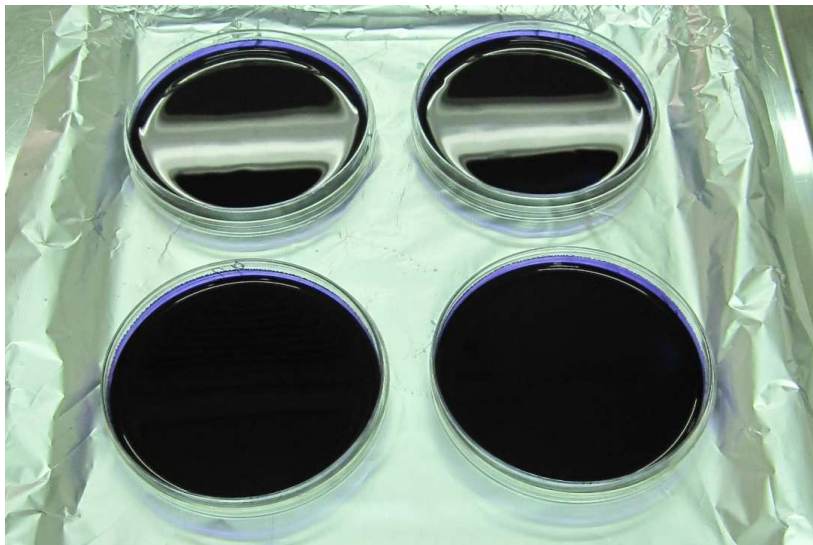
Per l'allestimento del biofilm si è partiti da un inoculo standardizzato mediante lettura spettrofotometrica (circa  $10^8$  ufc/ml) in TSB. Ciascun substrato (acciaio inox e polistirene) è stato quindi esposto all'inoculo (3 ml), e posto ad incubare per 24 ore a differenti temperature: 37°C e 12°C (FIGURA 8).

**FIGURA 8** SUBSTRATI ESPOSTI ALL'INOCULO DI 3mL.



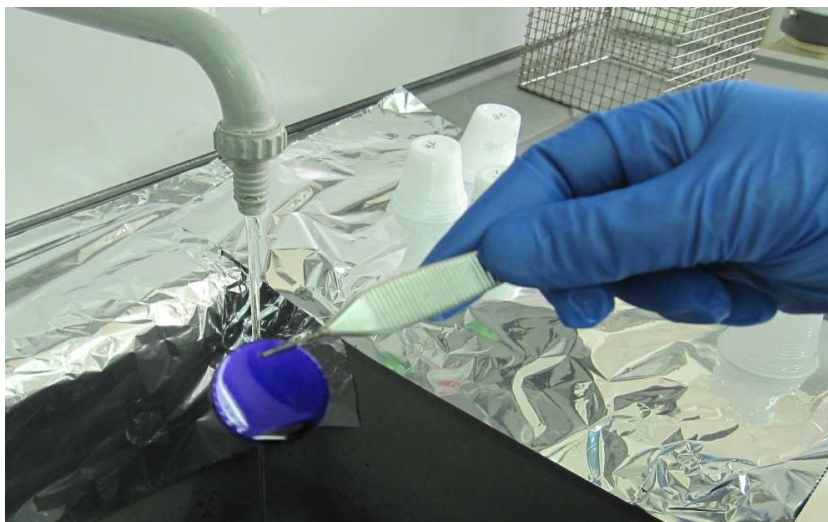
Ogni campione è stato analizzato in triplicato. Terminata l'incubazione è stato effettuato il lavaggio in PBS sterile per rimuovere le forme non adese. Sono stati eseguiti 3 lavaggi per immersione di ciascun substrato in 30 ml di PBS. I campioni sono stati fissati per 1 ora in stufa a 60°C e poi colorati per 20 minuti con il cristalvioletto al 2% utilizzando una soluzione con etanolo al 95%. Alle piastrine di polistirene sono stati aggiunti 3 ml di cristalvioletto, mentre i dischetti di acciaio sono stati posti in piastre petri e ricoperti con 12 ml di cristalvioletto per campione eseguito in triplicato (FIGURA 9).

**FIGURA 9:** CAMPIONI POSTI IN PIASTRE PETRI E RICOPERTI DA 12 mL DI CRISTALVIOLETTO



È stato poi eseguito il lavaggio dei substrati in acqua distillata per eliminare la quantità di colorante in eccesso (FIGURA 10) e sono stati poi lasciati ad asciugare in stufa a 37°C (FIGURA 11).

**FIGURA 10** RISCIAQUO DEI CAMPIONI



**FIGURA 11:** CAMPIONI POSTI IN STUFA A 60°C



Si è passati poi all'estrazione del colorante mediante l'utilizzo di 3 ml di acido acetico al 33%, in modo da effettuare l'analisi quantitativa del biofilm prodotto. Successivamente 200 µl di ogni campione sono stati trasferiti all'interno di piastre microtiter a 96 pozzetti (Bibby Sterilin) e la quantità di colorante estratto è stata misurata mediante lettore ad assorbanza sunrise (TECAN), alla densità ottica di 492 nm. Viste le diverse superfici di accrescimento dei supporti utilizzati (polistirene: 961 mm<sup>2</sup> e acciaio: 530 mm<sup>2</sup>), si è proceduto alla normalizzazione dei risultati calcolando l'indice di produzione del biofilm (IPB) = [OD biofilm medio/superficie (mm<sup>2</sup>)] x 1.000.

## **2.4 Saggio di produzione di biofilm dopo trattamento con ozono**

La valutazione della produzione di biofilm dopo trattamento con ozono è stata condotta su:

n. 1 ATCC *S.a* e n. 5 ceppi di *S.a* isolati da carne avicola;

n. 1 ATCC *L.m* e n. 3 ceppi di *L.m* isolati da carne avicola.

I ceppi ottenuti da coltura “*overnight*” sono stati seminati su piastre TSA, trattate con ozono come precedentemente descritto (20 minuti ad una concentrazione di 2,5 ppm); le piastre, incubate a 37°C per 24 ore sono state utilizzate per ottenere l’inoculo standardizzato come descritto in precedenza e per testare la produzione di biofilm secondo la metodica descritta precedentemente su acciaio a 12°C.

## 2.5 Test di sopravvivenza e persistenza di *Salmonella* spp. sui materiali a contatto con le carni di pollame

### ➤ Preparazione dell'inoculo (mix di n. 7 ceppi di *Salmonella*):

sono state allestite brodocolture in 10 ml di tryptic soy broth (TSB - 35°C, 22 h) di n. 7 ceppi di *Salmonella* spp. isolati da carni di pollo; le brodocolture sono state centrifugate (4,629×g, 15 min, 4°C) e dopo eliminazione del surnatante, lavate con 10 ml phosphate-buffered saline (PBS - pH 7.4), risospese in 10 ml di omogenato sterile di carne di pollo e incubate a 4°C per 72h; dopo incubazione i ceppi sono stati combinati e sono state allestite delle diluizioni fino a raggiungere una concentrazione di 4 log CFU/ml.

### ➤ Preparazione dei substrati:

sono stati utilizzati n.5 materiali di comune impiego per il *packaging* delle carni di pollame: cartone, pellicola per alimenti, carta da banco macelleria, alluminio e sacco x il vuoto; i singoli substrati (5x5 cm) sono stati inoculati con 0.5 ml del mix di *Salmonelle* in modo da raggiungere un “*target level*”: 2-3 log CFU/cm<sup>2</sup> i campioni inoculati sono stati infine messi ad incubare a 4 e 25 °C

### ➤ Analisi microbiologiche:

le determinazioni microbiologiche hanno incluso la carica mesofila totale (CMT) e *Salmonella* spp; i campioni sono stati periodicamente analizzati (ogni 7 giorni), fino a 123 giorni; dai campioni trasferiti in buste da stomacher con 10 ml di PBS (stomacher per 90”) si è proceduto ad allestire diluizioni logaritmiche in Buffered Peptone Water (BPW) e infine alla semina in piastre di xylose lysine desoxcholate (XLD) e agar e tryptic soy agar (TSA); dopo incubazione (piastre XLD a 35°C per 24h; piastre di TSA a 25°C per 72h) si è proceduto ad effettuare le conte. I risultati sono stati espressi in log CFU/cm<sup>2</sup>.

Tutte le determinazioni sono state effettuate in doppio.

## **3) RISULTATI**

### **3.1 Isolamenti**

n.14 ceppi isolati da campioni di matrice alimentare prelevati durante le diverse fasi di lavorazione sono stati identificati come *Listeria monocytogenes (L.m)*; dagli ambienti di lavorazione sono stati isolati n.8 ceppi di *L.m*. L'identificazione fenotipica e biomolecolare hanno dato risultati sovrapponibili;

n.78 ceppi sono stati identificati come *S.a* di cui n.19 ceppi isolati da campioni di matrice alimentare lungo la linea di produzione e n.59 ceppi dagli ambienti di lavorazione; Anche per *S.a*, l'identificazione fenotipica e quella biomolecolare hanno dato risultati sovrapponibili;

n.7 ceppi isolati da campioni di matrice alimentare durante le diverse fasi di lavorazione sono stati identificati come *Salmonella* spp.

### **3.1 Test di abbattimento microbico - FASE 1**

Per quanto riguarda i test di decontaminazione con ozono gassoso, nella prima sperimentazione effettuata, i tempi di applicazione utilizzati sono risultati insufficienti a determinare significative riduzioni della carica microbica. Nella seconda Sperimentazione l'applicazione per tempi pari a 1 e 2 minuti non ha ridotto significativamente la carica microbica mentre riduzioni significative (7 Log) sono state ottenute protraendo il trattamento per 5 e 20 minuti. Non è stata evidenziata, inoltre, una differenza statisticamente significativa per i tempi di applicazione di 5 e 20 minuti.

### **3.3 Test di abbattimento microbico - FASE 2:**

L'applicazione per tempi pari a 2, 5, 10 e 20 minuti ha determinato un abbattimento della carica microbica pari a 0,5 Log; riduzioni pari a 1,5 Log sono state ottenute protraendo il trattamento per 20 minuti; non è stata evidenziata una differenza statisticamente significativa per tempi di applicazione di 2, 5 e 10 minuti e alle diverse concentrazioni utilizzate (0,5 ppm; 2,5 ppm).

L'applicazione di ozono gassoso a concentrazioni pari a 2,5 ppm per 20' hanno determinato un abbattimento della carica microbica tra 0.3 – 0.5 Log per gli isolati di *S.a.*; riduzioni pari a 1.5 Log sono state ottenute per gli isolati di *L.m.*

### **3.4 Test di abbattimento microbico - FASE 3:**

Per *S.a* la riduzione media è stata di 0,82 Log, con una maggior frequenza per riduzioni di 1 Log. Un solo ceppo si è discostato per avere una riduzione di 0,3 Log (ATCC = 1.5 Log; n. 1 ceppo=0.3 Log; n. 1 ceppo= 0.8 Log; n. 3 ceppi= 1 Log);

per *L.m* la riduzione media è stata di 1,2 Log, con valori più frequenti collocati per 1,5 Log. Un ceppo ha mostrato una maggior resistenza all'ozono, evidenziando una riduzione di 0,8 Log (ATCC=1.5 Log; n. 1 ceppo=1.5 Log; n. 1 ceppo= 0.8 Log; n.1 ceppo=1 Log);

per *Salmonella* spp. la riduzione media è stata di 0,8 Log, con 1 Log quale risultato più frequentemente ottenuto. Un ceppo ha mostrato una maggior resistenza all'ozono, evidenziando una riduzione di 0,2 Log (n.1 ceppo= 0.2 Log; n.1 ceppo= 1.3 Log; n.1 ceppo= 1 Log).

### **3.5 Test di espressione fenotipica di biofilm:**

I risultati relativi alla produzione di biofilm, espressi in IPB, alle due temperature saggiate sono riassunti nelle TABELLE da 4 a 11 e nei GRAFICI da 1 a 8 (FIGURE 12 – 13 – 14- 15).

**TABELLA 4: INDICE DI PRODUZIONE DI BIOFILM DI CEPPI *L.m* A 37°C CARNA AVICOLA**

37°C	POLISTIRENE	ACCIAIO
<i>L. m.</i> ATCC 19111 (Pollame)	0,372	0,271
<i>L. m.</i> (Carne avicola)	1,275	0,447
<i>L. m.</i> (Carne avicola)	0,362	0,529
<i>L. m.</i> (Carne avicola)	1,023	0,415
<i>L. m.</i> (Carne avicola)	0,406	0,558
<i>L. m.</i> (Carne avicola)	0,352	0,404
<i>L. m.</i> (Carne avicola)	0,359	0,460
<b>BIOFILM MEDIO</b>	<b>0.629</b>	<b>0,468</b>

**GRAFICO 1**

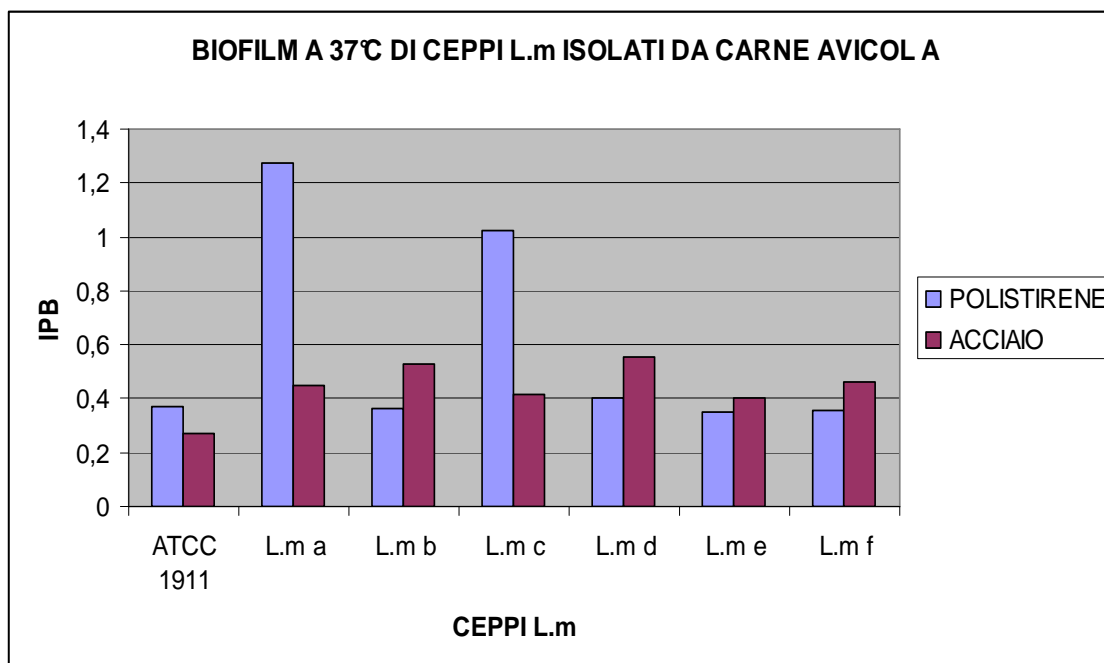
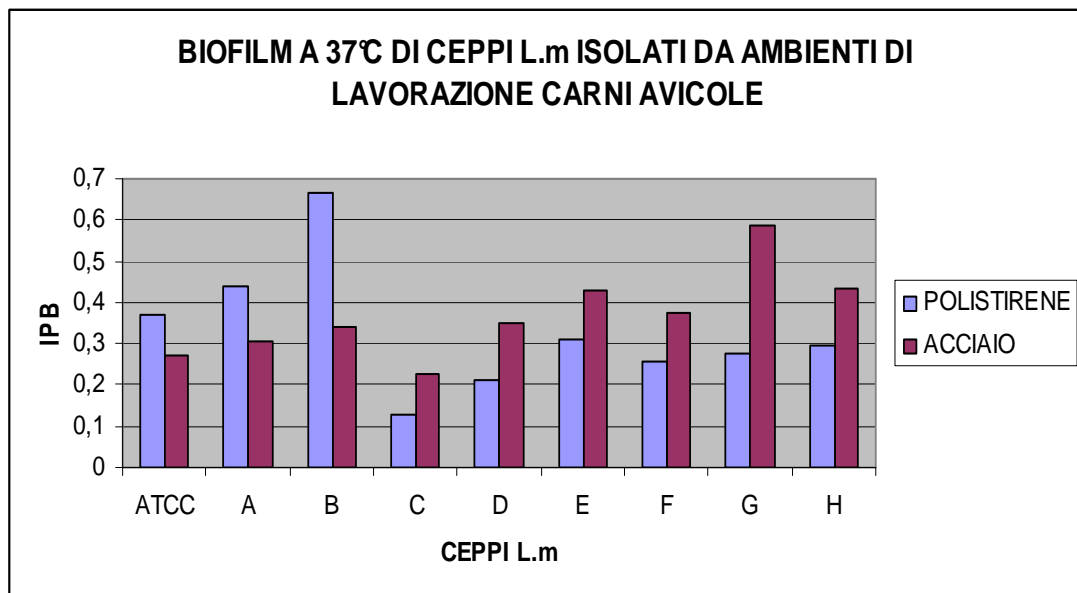


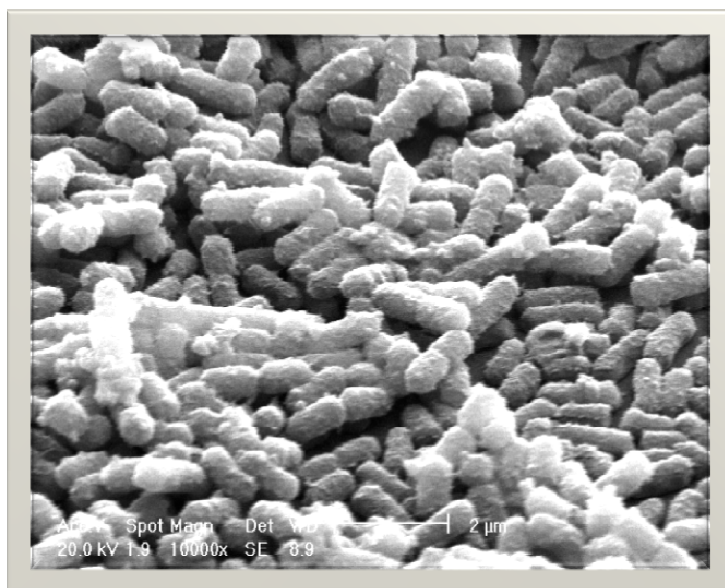
TABELLA 5: INDICE DI PRODUZIONE DI CEPPI LM 37°C AMBIENTI LAVORAZIONE

37°C	POLISTIRENE	ACCIAIO
<b><i>L. m. ATCC 19111</i></b>	<b>0,372</b>	<b>0,271</b>
<i>L. m. A</i>	0,437	0,306
<i>L. m. B</i>	0,666	0,340
<i>L. m. C</i>	0,130	0,228
<i>L. m. D</i>	0,211	0,348
<i>L. m. E</i>	0,312	0,430
<i>L. m. F</i>	0,258	0,374
<i>L. m. G</i>	0,276	0,589
<i>L. m. H</i>	0,298	0,432
<b>BIOFILM MEDIO</b>	<b>0.323</b>	<b>0,380</b>

GRAFICO 2

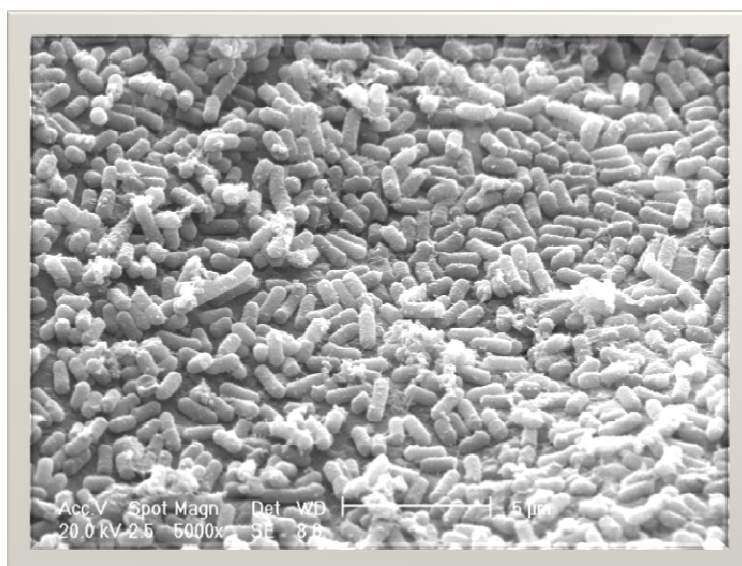


**FIGURA 12** Microscopio elettronico a scansione (SEM): immagine del biofilm di L.m a 37°C su polistirene



(Vergara *et al* 2009)

**FIGURA 13** Microscopio elettronico a scansione (SEM): immagine del biofilm di L.m a 37°C su acciaio

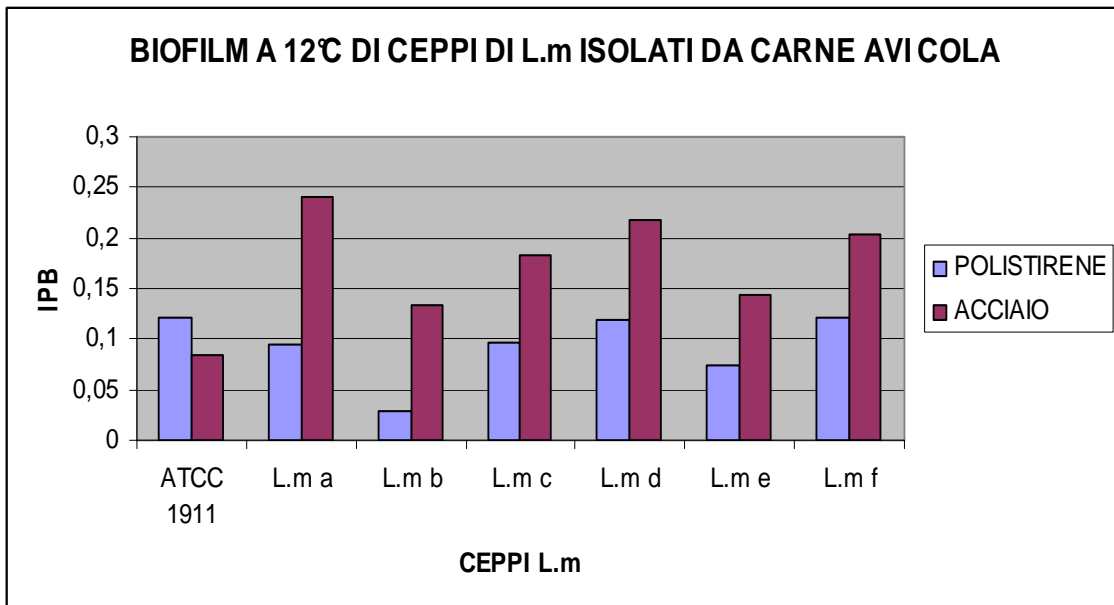


(Vergara *et al* 2009)

**TABELLA 6:** INDICE DI PRODUZIONE DI BIOFILM (IPB) DEI CEPPI DI *L.m* ISOLATI DA CARNE AVICOLA ALLA TEMPERATURA DI 12°C

12°C	POLISTIRENE	ACCIAIO
<i>L. m.</i> ATCC 19111 (Pollame)	0,121	0,085
<i>L. m.</i> (Carne avicola)	0,095	0,240
<i>L. m.</i> (Carne avicola)	0,028	0,133
<i>L. m.</i> (Carne avicola)	0,096	0,183
<i>L. m.</i> (Carne avicola)	0,120	0,217
<i>L. m.</i> (Carne avicola)	0,073	0,143
<i>L. m.</i> (Carne avicola)	0,122	0,204
<b>BIOFILM MEDIO</b>	<b>0,089</b>	<b>0,186</b>

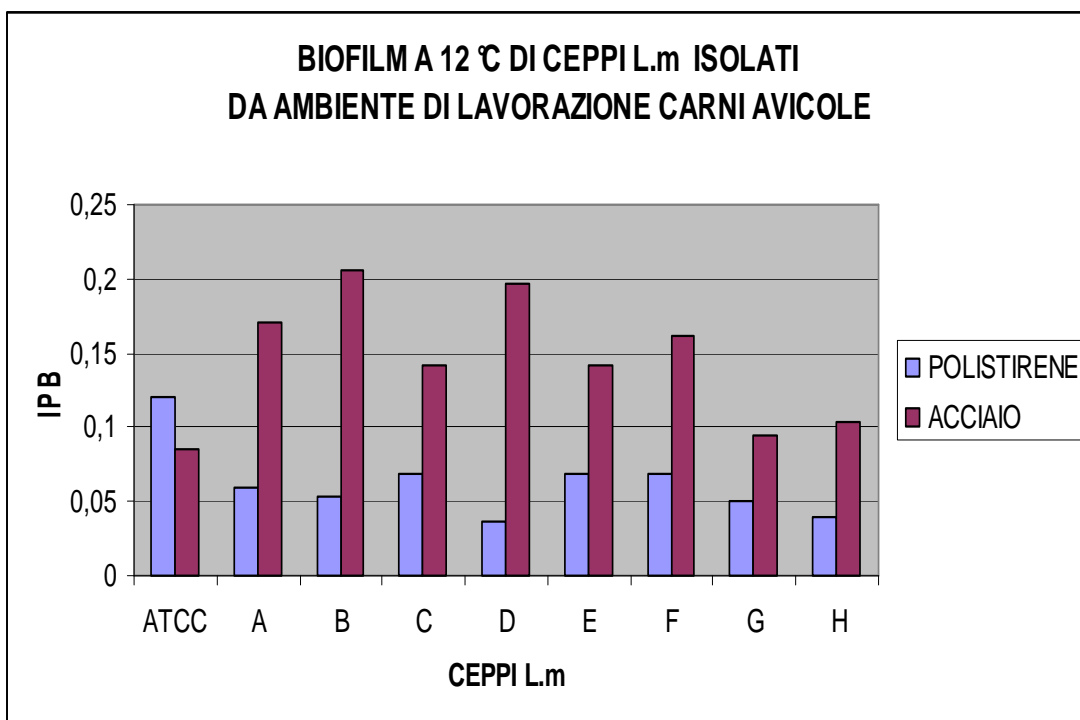
**GRAFICO 3**



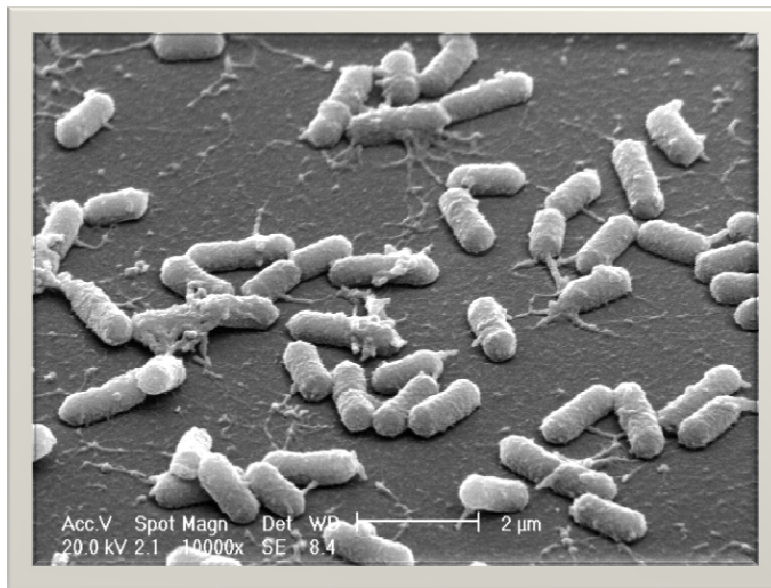
**TABELLA 7:** INDICE DI PRODUZIONE DI BIOFILM (IPB) DEI CEPPI DI *L.m* ISOLATI DA AMBIENTI DI LAVORAZIONE ALLA TEMPERATURA DI 12°C

12°C	POLISTIRENE	ACCIAIO
<b><i>L. m.</i> ATCC 19111</b>	<b>0,121</b>	<b>0,085</b>
<i>L. m.</i> A	0,060	0,170
<i>L. m.</i> B	0,053	0,206
<i>L. m.</i> C	0,068	0,142
<i>L. m.</i> D	0,036	0,196
<i>L. m.</i> E	0,068	0,142
<i>L. m.</i> F	0,069	0,161
<i>L. m.</i> G	0,050	0,094
<i>L. m.</i> H	0,039	0,103
<b>BIOFILM MEDIO</b>	<b>0,114</b>	<b>0,151</b>

**GRAFICO 4**

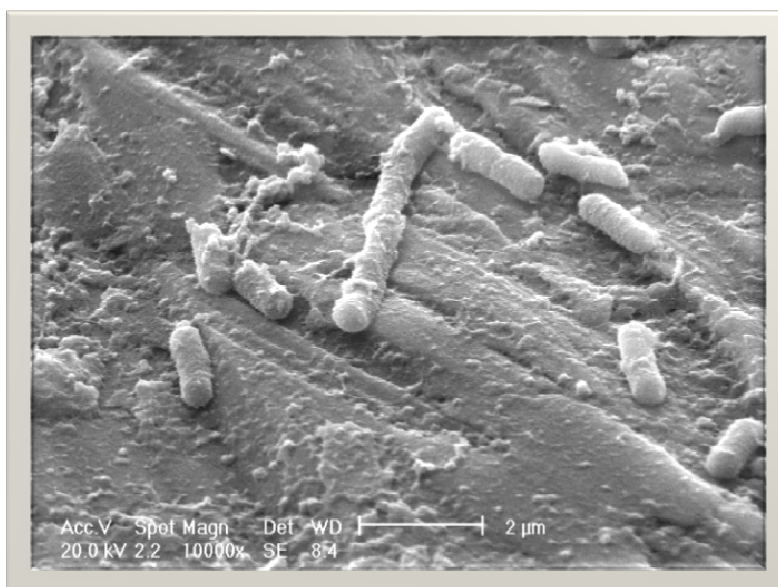


**FIGURA 14** Microscopio elettronico a scansione (SEM): immagine del biofilm di L.m a 12°C su polistirene



(Vergara *et al* 2009)

**FIGURA 15** Microscopio elettronico a scansione (SEM): immagine del biofilm di L.m a 12°C su acciaio

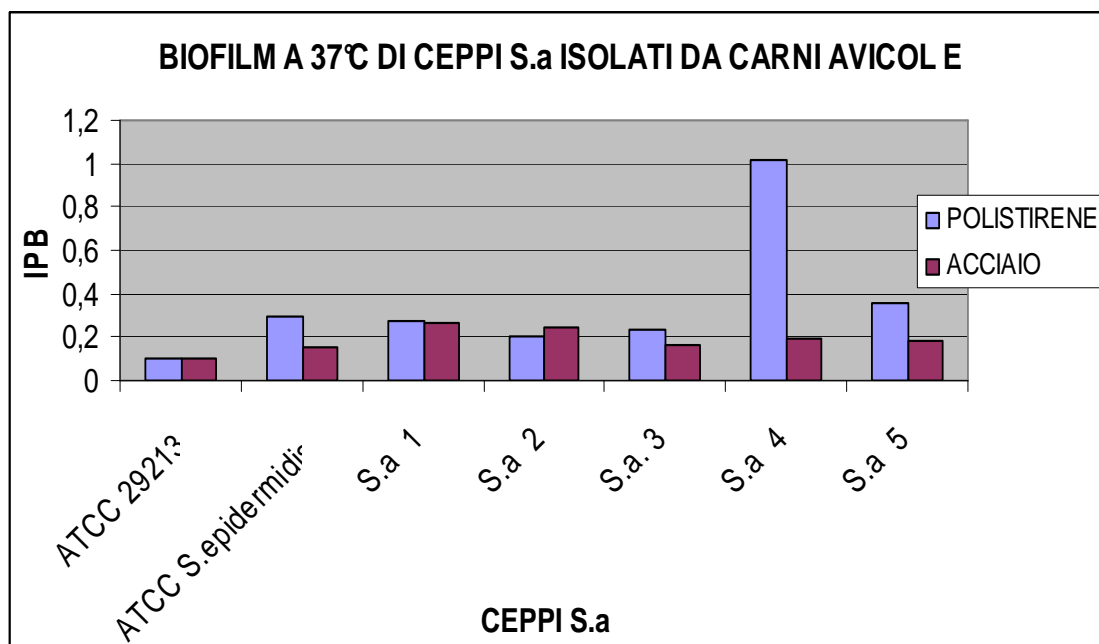


(Vergara *et al* 2009)

**TABELLA 8:** INDICE DI PRODUZIONE DI BIOFILM (IPB) DEI CEPPI DI *S.a* ISOLATI DA CARNE AVICOLA ALLA TEMPERATURA DI 37°C

37°C	POLISTIRENE	ACCIAIO
ATCC 29213	0,103	0,102
ATCC12228 <i>S.epidermidis</i>	0,294	0,149
S.a 1	0,276	0,262
S.a 2	0,200	0,245
S.a. 3	0,236	0,159
S.a 4	1,019	0,198
S.a 5	0,352	0,182
<b>BIOFILM MEDIO</b>	<b>0,416</b>	<b>0,209</b>

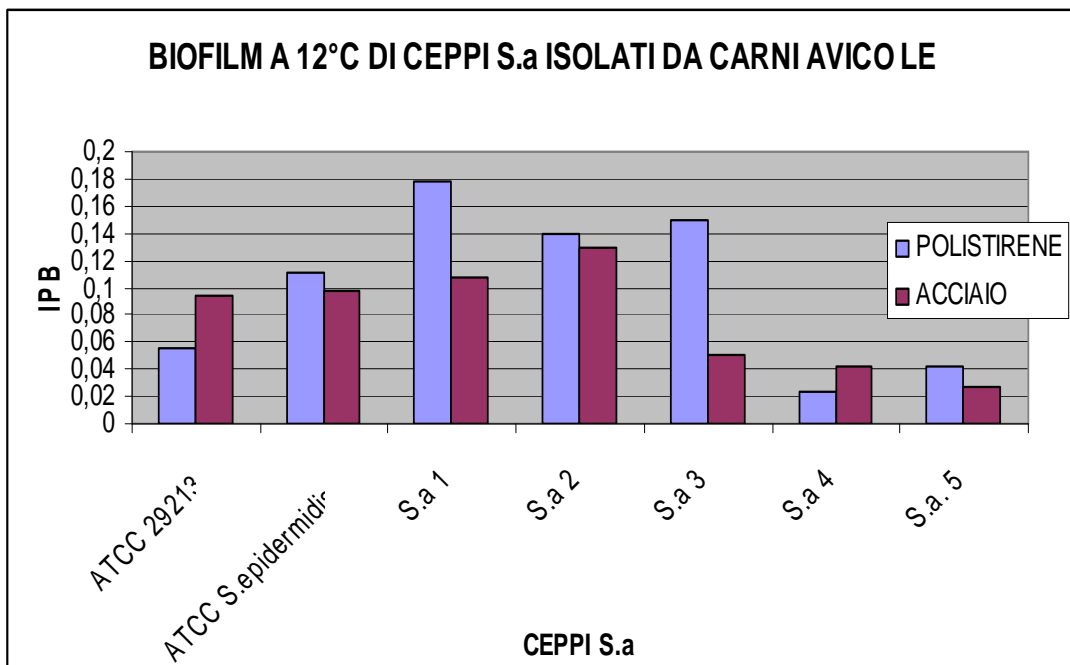
**GRAFICO 5**



**TABELLA 9:** INDICE DI PRODUZIONE DI BIOFILM (IPB) DEI CEPPI DI *S.a* ISOLATI DA CARNE AVICOLA ALLA TEMPERATURA DI 12°C

12°C	POLISTIRENE	ACCIAIO
<b>ATCC 29213</b>	<b>0,056</b>	<b>0,094</b>
<b>ATCC 12228 <i>S.epidermidis</i></b>	<b>0,111</b>	<b>0,097</b>
<i>S.a</i> 1	0,178	0,108
<i>S.a</i> 2	0,140	0,130
<i>S.a</i> 3	0,150	0,050
<i>S.a</i> 4	0,024	0,042
<i>S.a</i> 5	0,042	0,027
<b>BIOFILM MEDIO</b>	<b>0,106</b>	<b>0,071</b>

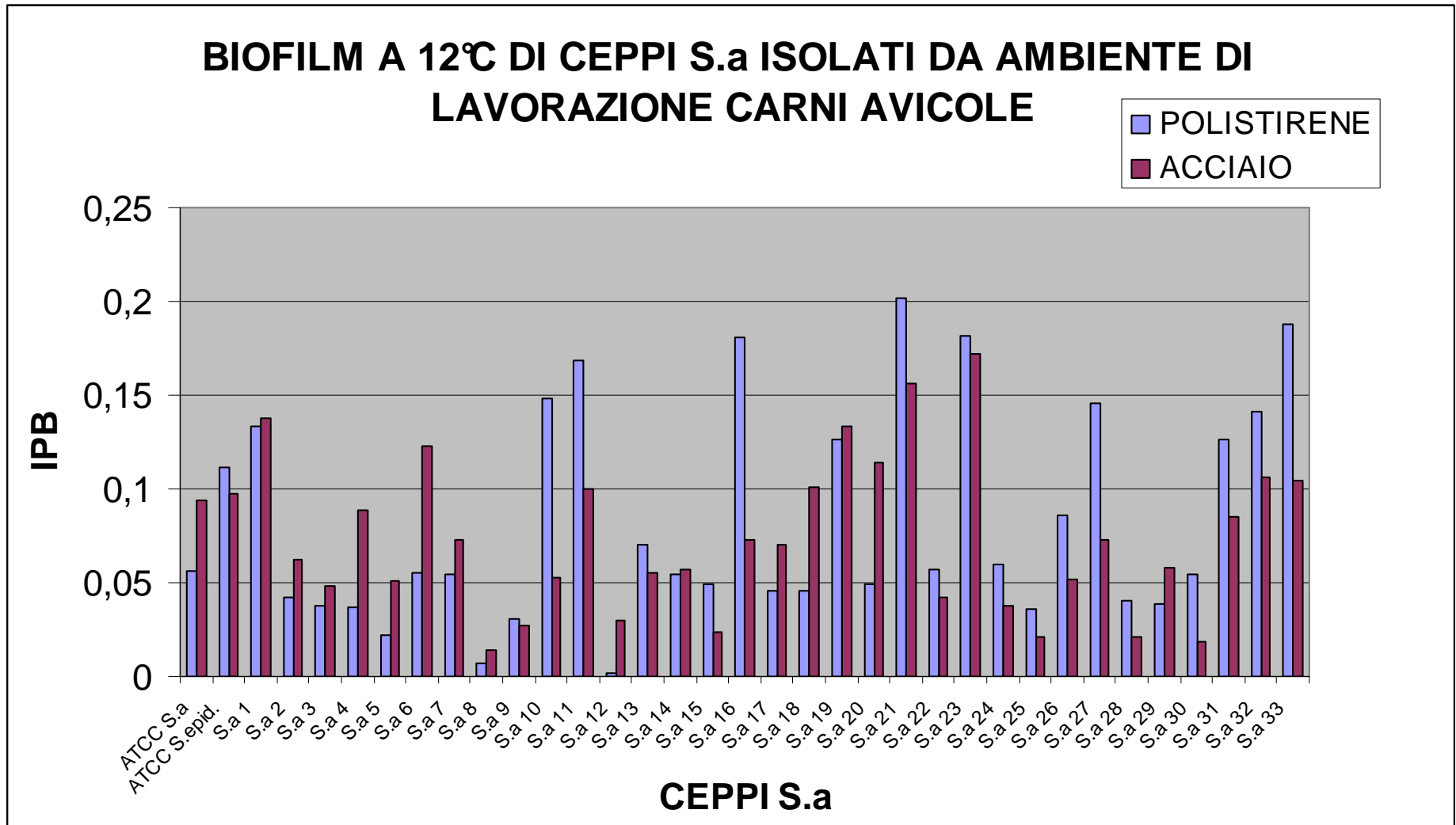
**GRAFICO 6**



**TABELLA 10:** INDICE DI PRODUZIONE DI BIOFILM (IPB) DEI CEPPI DI *S.a* ISOLATI DA AMBIENTI DI LAVORAZIONE ALLE TEMPERATURA DI 12°C

12°C	POLISTIRENE	ACCIAIO
ATCC 29213 <i>S.a</i>	0,056	0,094
ATCC 12228 <i>S.epidermidis</i>	0,111	0,097
<i>S.a</i> 1	0,133	0,138
<i>S.a</i> 2	0,042	0,062
<i>S.a</i> 3	0,038	0,048
<i>S.a</i> 4	0,037	0,089
<i>S.a</i> 5	0,022	0,051
<i>S.a</i> 6	0,055	0,123
<i>S.a</i> 7	0,054	0,073
<i>S.a</i> 8	0,007	0,014
<i>S.a</i> 9	0,031	0,027
<i>S.a</i> 10	0,148	0,053
<i>S.a</i> 11	0,168	0,100
<i>S.a</i> 12	0,002	0,030
<i>S.a</i> 13	0,070	0,055
<i>S.a</i> 14	0,054	0,057
<i>S.a</i> 15	0,049	0,024
<i>S.a</i> 16	0,181	0,073
<i>S.a</i> 17	0,046	0,070
<i>S.a</i> 18	0,046	0,101
<i>S.a</i> 19	0,126	0,133
<i>S.a</i> 20	0,049	0,114
<i>S.a</i> 21	0,202	0,156
<i>S.a</i> 22	0,057	0,042
<i>S.a</i> 23	0,182	0,172
<i>S.a</i> 24	0,060	0,038
<i>S.a</i> 25	0,036	0,021
<i>S.a</i> 26	0,086	0,052
<i>S.a</i> 27	0,146	0,073
<i>S.a</i> 28	0,040	0,021
<i>S.a</i> 29	0,039	0,058
<i>S.a</i> 30	0,054	0,018
<i>S.a</i> 31	0,126	0,085
<i>S.a</i> 32	0,141	0,106
<i>S.a</i> 33	0,188	0,104
<b>Biofilm medio</b>	<b>0,082</b>	<b>0,072</b>

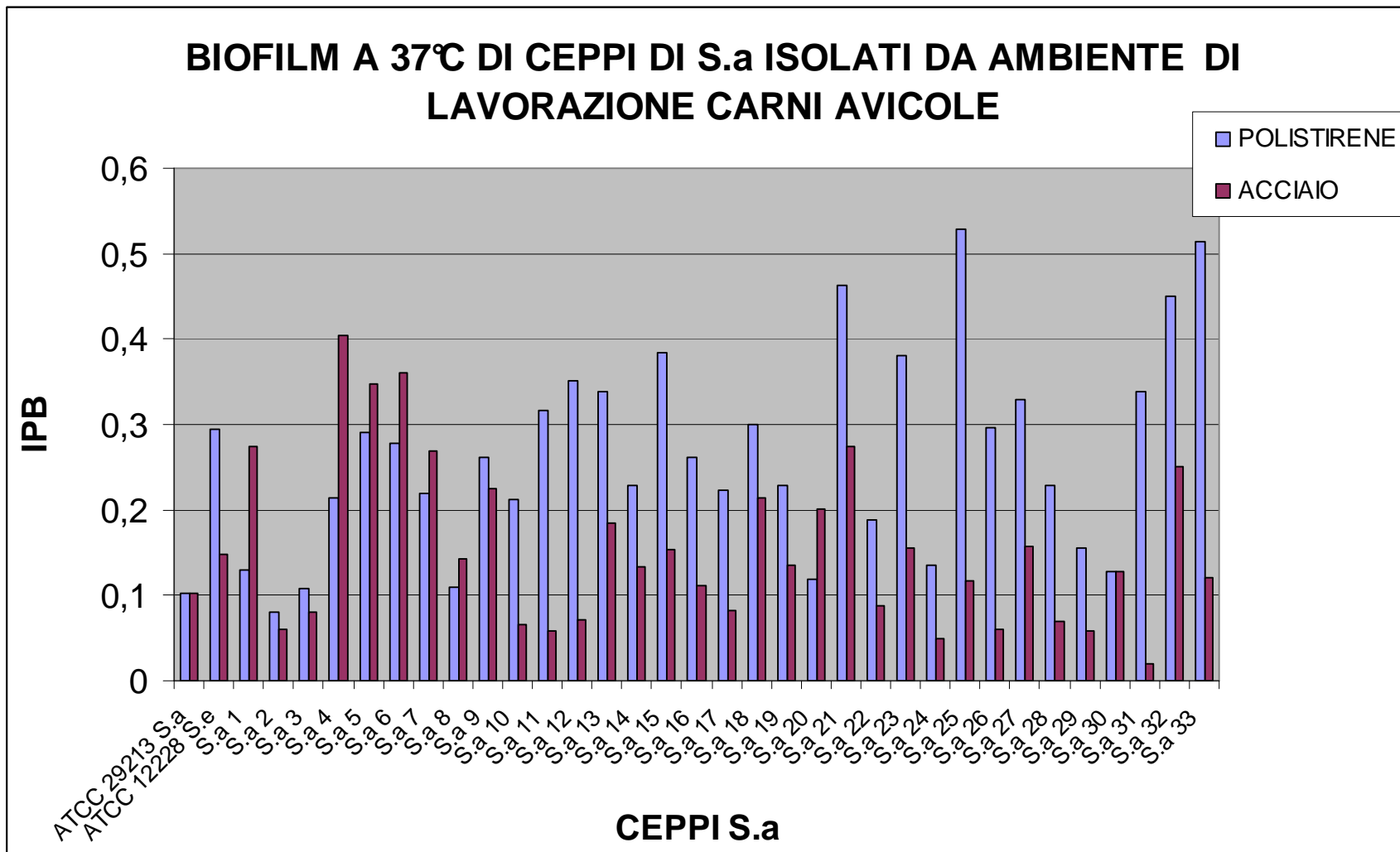
GRAFICO 7



**TABELLA 11:** INDICE DI PRODUZIONE DI BIOFILM (IPB) DEI CEPI DI *S.a* ISOLATI DA AMBIENTI DI LAVORAZIONE ALLE TEMPERATURA DI 37°C

37°C	POLISTIRENE	ACCIAIO
ATCC 29213 <i>S.a</i>	0,103	0,102
ATCC 12228 <i>S.e</i>	0,294	0,149
<i>S.a</i> 1	0,130	0,275
<i>S.a</i> 2	0,080	0,060
<i>S.a</i> 3	0,108	0,081
<i>S.a</i> 4	0,214	0,404
<i>S.a</i> 5	0,290	0,348
<i>S.a</i> 6	0,278	0,360
<i>S.a</i> 7	0,220	0,269
<i>S.a</i> 8	0,109	0,143
<i>S.a</i> 9	0,262	0,225
<i>S.a</i> 10	0,213	0,065
<i>S.a</i> 11	0,316	0,059
<i>S.a</i> 12	0,352	0,071
<i>S.a</i> 13	0,339	0,185
<i>S.a</i> 14	0,229	0,133
<i>S.a</i> 15	0,384	0,153
<i>S.a</i> 16	0,262	0,112
<i>S.a</i> 17	0,224	0,082
<i>S.a</i> 18	0,300	0,214
<i>S.a</i> 19	0,228	0,136
<i>S.a</i> 20	0,118	0,202
<i>S.a</i> 21	0,463	0,275
<i>S.a</i> 22	0,188	0,087
<i>S.a</i> 23	0,381	0,155
<i>S.a</i> 24	0,136	0,050
<i>S.a</i> 25	0,529	0,117
<i>S.a</i> 26	0,296	0,060
<i>S.a</i> 27	0,330	0,158
<i>S.a</i> 28	0,228	0,070
<i>S.a</i> 29	0,155	0,058
<i>S.a</i> 30	0,128	0,128
<i>S.a</i> 31	0,339	0,020
<i>S.a</i> 32	0,450	0,251
<i>S.a</i> 33	0,514	0,121
<b>Biofilm medio</b>	<b>0,266</b>	<b>0,161</b>

GRAFICO 8



### 3.6 Test di espressione fenotipica di biofilm dopo trattamento con ozono

I risultati relativi alla produzione di biofilm dei ceppi di *L.m* e *S.a*, espressi in IPB, alle due temperature saggiate dopo trattamento con ozono sono riassunti nelle

TABELLE 12 E 13 e nel GRAFICO 9

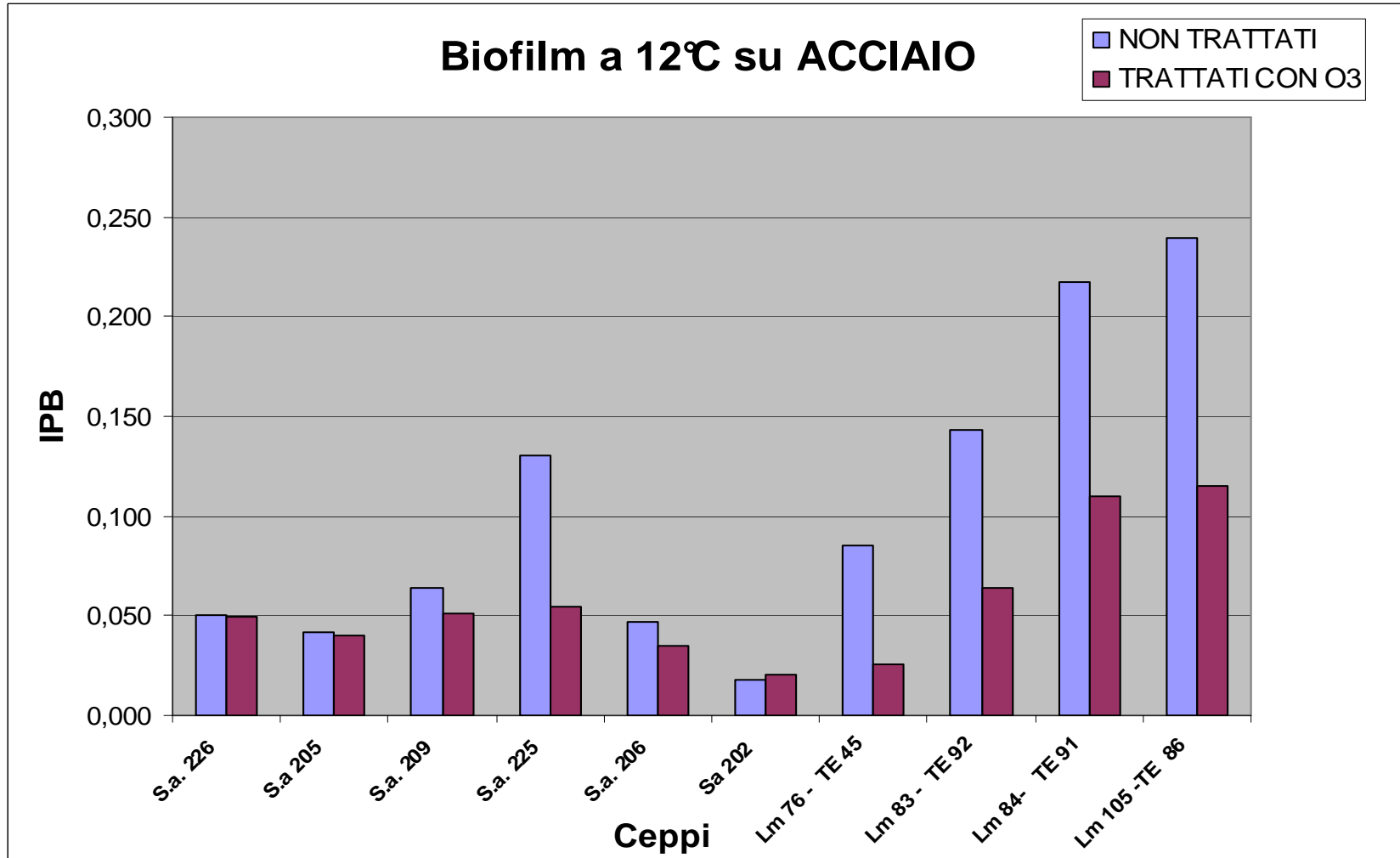
**TABELLA 12** :INDICE DI PRODUZIONE DI BIOFILM (IPB) DEI CEPPI DI *L.m* ISOLATI DA CARNE AVICOLA DOPO TRATTAMENTO CON OZONO ALLA TEMPERATURA DI 12°C SU ACCIAIO

CEPPI	NON TRATTATI	TRATTATI CON O <sub>3</sub>	ABBATIMENTO CON O <sub>3</sub>
<i>L.m</i> 76-TE 45 (ATCC 19111)	0,085	0,026	1.5 LOG
<i>Lm</i> 83-TE 92	0,143	0,064	1.5 LOG
<i>Lm</i> 84 –TE 91	0,217	0,110	1 LOG
<i>Lm</i> 105 – TE 86	0,240	0,115	0.8 LOG
<b>BIOFILM MEDIO</b>	<b>0,171</b>	<b>0,079</b>	

**TABELLA 13:** INDICE DI PRODUZIONE DI BIOFILM (IPB) DEI CEPPI DI *S.a* ISOLATI DA CARNE AVICOLA DOPO TRATTAMENTO CON OZONO ALLA TEMPERATURA DI 12°C SU ACCIAIO

<b>CEPPI</b>	<b>NON TRATTATI</b>	<b>TRATTATI CON O<sub>3</sub></b>	<b>ABBATTIMENTO CON O<sub>3</sub></b>
<b><i>S.a</i> 202 (ATCC 29213)</b>	<b>0,018</b>	<b>0,020</b>	<b>1.5 LOG</b>
<i>S.a</i> 226	0,050	0,049	1 LOG
<i>S.a</i> 205	0,042	0,040	1 LOG
<i>S.a</i> 209	0,064	0,051	1 LOG
<i>S.a</i> 225	0,130	0,055	0.3 LOG
<i>S.a</i> 206	0,047	0,035	0.8 LOG
<b>BIOFILM MEDIO</b>	<b>0,103</b>	<b>0,057</b>	

GRAFICO 9



### 3.7 Test di sopravvivenza e persistenza di *Salmonella spp.* sui materiali a contatto con le carni di pollame

I risultati relativi ai test di sopravvivenza e persistenza di *Salmonella* sui diversi materiali usati nel *packaging* delle carni di pollame alle due temperature saggiate (25°C e 4°C) sono espressi nelle TABELLE 14 E 15 e nei GRAFICI 10 e 11.

**TABELLA 14:** SALMONELLA SPP. (MEAN ± STANDARD DEVIATION; LOG CFU/CM<sup>2</sup>) SUI DIVERSI SUBSTRATI (A=SACCO PER IL VUOTO; B=PELLICOLA ALIMENTI; C=ALLUMINIO; D=CARTONE; E=CARTA DA BANCO) INCUBATI A 25°C PER 123 GIORNI

GIORNI	SUBSTRATI				
	A	B	C	D	E
0	2.95 ± 0.32	2.79 ± 0.26	2.80 ± 0.16	2.27 ± 0.14	2.48 ± 0.18
4	4.48 ± 0.48	3.69 ± 2.05	5.04 ± 0.94	1.91 ± 1.94	5.10 ± 0.93
11	4.20 ± 0.08	4.70 ± 0.57	5.67 ± 0.25	1.55 ± 1.26	5.39 ± 0.73
18	4.64 ± 1.39	4.64 ± 0.70	5.24 ± 0.51	2.16 ± 1.67	3.33 ± 2.74
25	4.11 ± 2.31	3.51 ± 1.94	4.86 ± 0.26	1.73 ± 1.56	5.74 ± 0.53
32	2.93 ± 2.60	2.57 ± 2.32	5.00 ± 0.75	2.66 ± 1.80	5.96 ± 0.49
39	3.08 ± 2.31	4.33 ± 0.88	4.53 ± 0.16	2.20 ± 1.69	5.86 ± 0.76
46	2.84 ± 1.66	4.09 ± 1.13	4.70 ± 0.78	<1.07 ± 1.51	4.40 ± 2.40
53	3.50 ± 1.99	2.38 ± 2.23	4.61 ± 0.62	1.81 ± 1.69	5.65 ± 0.68
60	3.19 ± 1.65	4.18 ± 0.40	4.99 ± 0.55	1.74 ± 0.99	5.37 ± 0.67
67	2.98 ± 2.05	2.98 ± 1.31	4.64 ± 0.45	1.68 ± 0.26	5.63 ± 0.42
74	3.69 ± 0.62	2.89 ± 0.68	4.94 ± 0.50	1.74 ± 0.99	5.83 ± 0.58
81	4.66 ± 0.65	3.89 ± 0.55	4.38 ± 0.65	1.68 ± 1.03	5.22 ± 0.82
88	4.18 ± 0.94	3.32 ± 0.64	4.20 ± 0.70	0.91 ± 1.29	5.18 ± 0.32
123	2.44 ± 1.69	2.23 ± 2.07	3.99 ± 0.55	<0.82 ± 1.09	4.79 ± 0.70

**TABELLA 15:** SALMONELLA SPP. (MEAN  $\pm$  STANDARD DEVIATION; LOG CFU/CM<sup>2</sup>) SUI DIVERSI SUBSTRATI (A=SACCO PER IL VUOTO; B=PELLICOLA ALIMENTI; C=ALLUMINIO; D=CARTONE; E=CARTA DA BANCO) INCUBATI A 4°C PER 123 GIORNI

GIORNI	SUBSTRATI				
	A	B	C	D	E
0	2.95 $\pm$ 0.32	2.79 $\pm$ 0.26	2.80 $\pm$ 0.16	2.27 $\pm$ 0.14	2.48 $\pm$ 0.18
4	1.73 $\pm$ 0.65	2.06 $\pm$ 0.62	2.17 $\pm$ 0.50	<-0.35 $\pm$ 0.12	2.28 $\pm$ 0.27
11	0.10 $\pm$ 0.41	<-0.19 $\pm$ 0.24	0.14 $\pm$ 0.42	<-0.40	0.12 $\pm$ 0.17
18	<-0.35 $\pm$ 0.12	<-0.17 $\pm$ 0.38	<-0.40	<-0.40	<-0.09 $\pm$ 0.26
25	<-0.25 $\pm$ 0.37	<-0.27 $\pm$ 0.21	<-0.12 $\pm$ 0.25	<-0.35 $\pm$ 0.12	<-0.17 $\pm$ 0.38
32	0.78 $\pm$ 0.84	<-0.40	<-0.40	1.54 $\pm$ 2.13	<-0.40
39	<-0.40	<-0.40	<-0.40	<-0.40	<-0.40
46	<-0.40	0.36 $\pm$ 1.22	<-0.27 $\pm$ 0.21	<-0.40	0.20 $\pm$ 0.48
53	<-0.40	<-0.40	<-0.40	<-0.40	0.10 $\pm$ 0.25
60	<-0.40	<-0.40	<-0.40	<-0.40	<-0.30 $\pm$ 0.25
67	<-0.40	<-0.40	<-0.30 $\pm$ 0.16	<-0.40	0.13 $\pm$ 0.67
74	<-0.40	<-0.40	<-0.40	<-0.40	0.14 $\pm$ 0.45
81	<-0.40	<-0.40	<-0.40	<-0.40	<-0.32 $\pm$ 0.19
88	<-0.20 $\pm$ 0.49	<-0.40	<-0.40	<-0.40	<-0.32 $\pm$ 0.19
123	<-0.30 $\pm$ 0.25	<-0.40	<-0.30 $\pm$ 0.16	<-0.40	<-0.40

GRAFICO 10

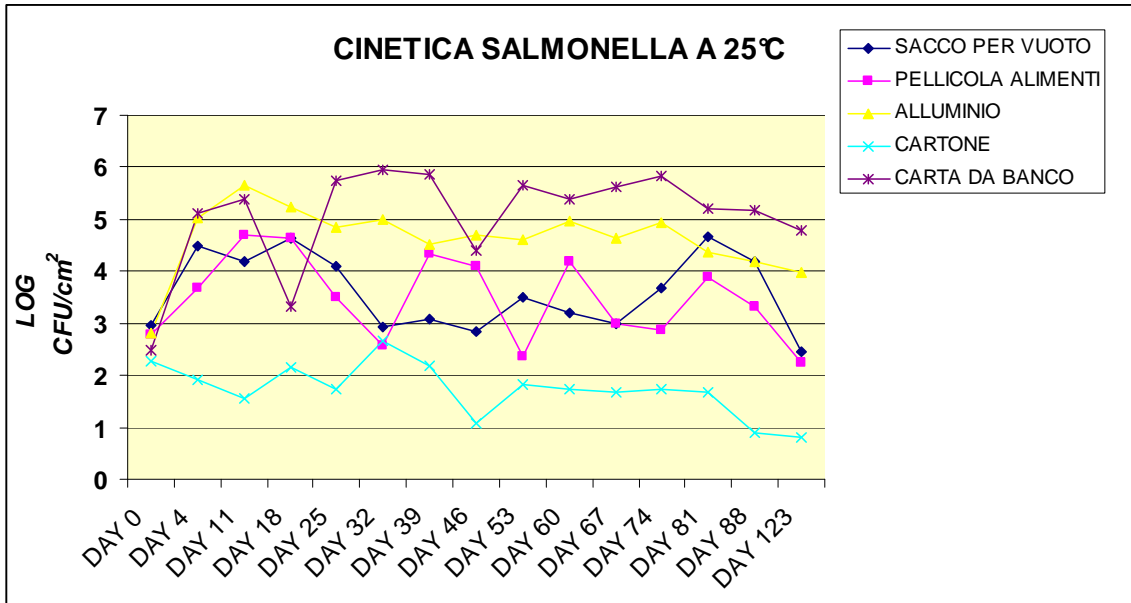
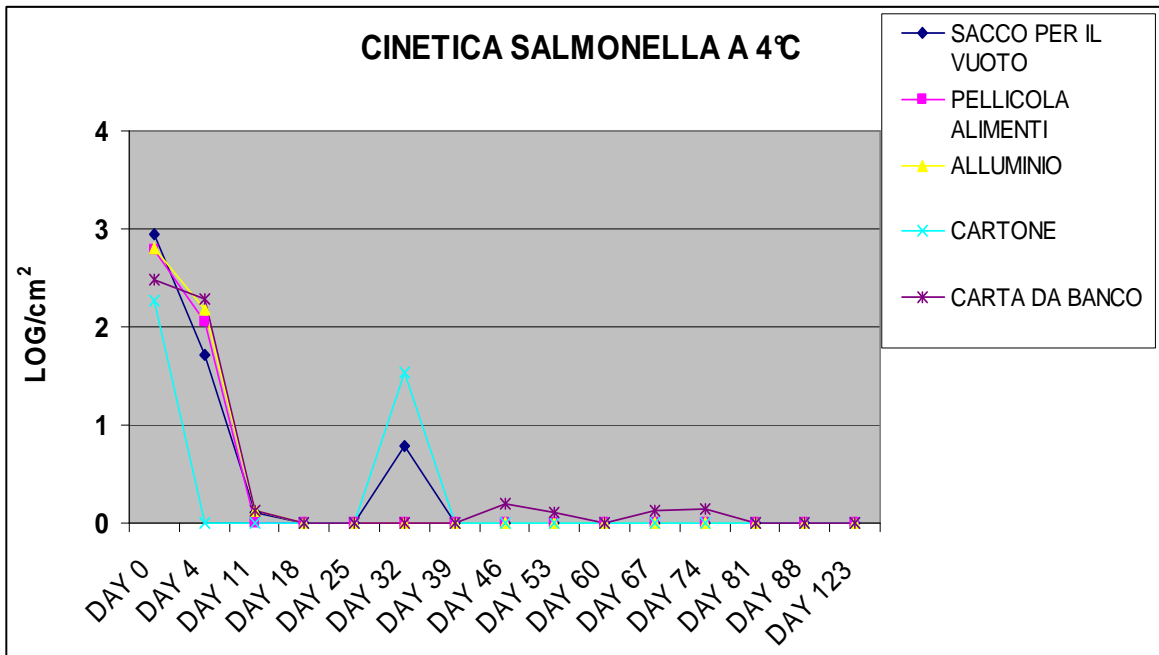


GRAFICO 11



## CONCLUSIONI

L'uso di trattamenti di decontaminazione è osteggiato dalla politica comunitaria sulla sicurezza alimentare, in quanto si ritiene di dover insistere sulla corretta applicazione delle buone norme di produzione (GMP) e di altri sistemi di gestione della sicurezza degli alimenti (HACCP).

Nonostante la maggiore responsabilizzazione e l'accresciuto coinvolgimento degli operatori del settore alimentare (OSA); per talune linee produttive, quali quella della lavorazione del pollame, gli sforzi messi in atto mediante una puntuale applicazione e implementazione delle GMP, delle procedure di corretta prassi igienica (GHP) e dei piani HACCP, non sono, sempre, in grado di fornire sufficienti garanzie igienico-sanitarie. Tale problematica ha accresciuto, pertanto, l'esigenza da parte degli OSA di trovare sistemi alternativi per la garanzia della salubrità e della qualità microbiologica delle carni avicole.

E' importante sottolineare, inoltre, che Il Regolamento CE n. 854/2004 fornisce le basi legali per l'utilizzo di sostanze diverse dall'acqua potabile e/o pulita, ma l'autorizzazione di qualsiasi sostanza e/o trattamento diverso dall'acqua potabile, deve necessariamente comportarne la valutazione dell'efficacia e della sicurezza, ed essere basata sull'analisi del rischio.

Allo stato attuale, dati in letteratura su trattamenti di decontaminazione mediante l'applicazione dell'ozono in fase gassosa in diverse concentrazioni sono scarsi e/o frammentari.

I risultati ottenuti nel corso della presente ricerca dimostrano che il trattamento con ozono gassoso, in linea generale, si è dimostrato valido nel determinare un abbattimento microbico di batteri potenzialmente patogeni quali *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella spp.*

In particolare, utilizzando ozono gassoso a tempi e concentrazioni applicabili nelle realtà produttive, la riduzione media è stata di 1,2 Log; 0,82 Log e 0,8 Log rispettivamente per *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella spp.* In accordo ad altri autori, inoltre, i singoli ceppi di una stessa specie hanno mostrato un abbattimento microbico variabile.

Difficile è risultata una comparazione con i dati estrapolati dalla bibliografia nazionale ed internazionale a causa delle diversità nelle modalità di applicazione

(ozono in fase acquosa o gassosa), dei tempi di esposizione all'ozono e delle concentrazioni utilizzate nel corso delle varie sperimentazioni effettuate.

Alla luce dei risultati ottenuti è possibile concludere che il ricorso all'ozono in fase gassosa per ridurre il numero e/o la prevalenza di microrganismi patogeni quali *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella spp.*, può essere considerato come una misura supplementare, e chiaramente non sostitutiva, rispetto all'applicazione e all'implementazione delle GMP.

Per quanto riguarda i test di espressione fenotipica di biofilm, dai risultati ottenuti viene confermata la capacità di *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* di aderire e produrre biofilm sui substrati comunemente impiegati nelle industrie alimentari, indipendentemente dalla temperatura considerata. In accordo con quanto riportato da altri autori, i ceppi esibiscono comportamenti variabili durante il processo di formazione del biofilm. La temperatura di crescita, il substrato e il ceppo esaminato sono le 3 variabili in funzione delle quali si nota la differenza di sviluppo di biofilm. Il biofilm prodotto da *Listeria monocytogenes* sembra tendenzialmente essere maggiore rispetto a quello prodotto da *Staphylococcus aureus*. In particolare, le indagini effettuate a 12°C mostrano una maggiore attitudine dei ceppi di *Listeria monocytogenes* esaminati a produrre biofilm sull'acciaio inox piuttosto che sul polistirene. I ceppi di *Staphylococcus aureus*, invece, sembrano mostrare una maggiore attitudine a produrre biofilm sul polistirene per entrambe le temperature considerate.

Il valore medio di produzione di biofilm, inoltre, sia per *Listeria monocytogenes* che per *Staphylococcus aureus* è risultato inferiore nei ceppi sottoposti a *stress* ossidativo rispetto a quelli non trattati. Per una maggiore significatività dei risultati ottenuti bisognerebbe, comunque, ampliare il numero dei ceppi da sottoporre a questo tipo di analisi.

In linea generale, l'ozono in fase gassosa per la sua attività microbica nei confronti dei principali patogeni e per la sua azione inattivante sulla produzione di biofilm, potrebbe essere impiegato come metodo di disinfezione degli ambienti di lavorazione. E' doveroso sottolineare che in quest'ultimo caso i parametri di trattamento devono essere, necessariamente, adattati alle diverse condizioni ambientali delle realtà produttive considerate.

I risultati ottenuti dallo studio sul rischio microbiologico rappresentato da *Salmonella spp.* e legato ai materiali impiegati nel *packaging* delle carni di pollame hanno dimostrato come *Salmonella spp.* riesca a sopravvivere sui materiali di confezionamento comunemente utilizzati dalle industrie del settore per un periodo piuttosto lungo.

In particolare, sull'alluminio e sulla carta da banco a 25°C, le conte del microrganismo, dopo 123 giorni, sono state di 1-2 Log CFU/cm<sup>2</sup> più elevate rispetto al livello iniziale (2-3 Log CFU/cm<sup>2</sup>); mentre sul sacco per il vuoto, la pellicola per alimenti e il cartone sono state da 0.5 a 1.5 Log CFU/cm<sup>2</sup> più basse rispetto al livello iniziale.

Al contrario, *Salmonella spp.* decresce rapidamente su tutti i substrati stoccati a 4°C, raggiungendo valori al di sotto della soglia di rilevabilità del metodo dopo 39 giorni sul cartone, 53 giorni sulla pellicola per alimenti e 123 giorni sulla carta da banco; tuttavia, bassi livelli di sopravvivenza sono stati riscontrati dopo 123 giorni sull'alluminio e sul sacco per il vuoto.

La sopravvivenza di *Salmonella spp.* sui materiali comunemente impiegati per il confezionamento delle carni di pollame non è da sottovalutare. Le confezioni, infatti, potrebbero rappresentare delle fonti di cross/contaminazione.

Sebbene il rischio di cross/contaminazione potrebbe essere basso, i risultati di questo studio dimostrano che il materiale di confezionamento potrebbe essere implicato nella trasmissione di *Salmonella spp.* e rappresentare, quindi, un rischio per i consumatori soprattutto in ambito domestico.

In conclusione, è necessario condurre indagini più approfondite sul rischio microbiologico legato ai diversi materiali utilizzati per il confezionamento degli alimenti al fine di comprendere pienamente il ruolo da essi svolto nella trasmissione di malattie alimentari.

## BIBLIOGRAFIA

Azeredo J., Sutherland I.W. “The use of phages for the removal of infectious biofilms” *Current Pharmaceutical Biotechnology* (2008), 9(4), 261-266.

Food Safety and Inspection Service United States Department of Agriculture Washington “Backgrounder: new measures to address E.coli O157:H7 contamination” D.C. 20250-3700 (2002).

Beuchat L.R. “Surface disinfection of raw produce” *Dairy, Food and Environmental Sanitation* (1992), 12(1), 6–9.

Blaschek H.P., Wang H., Agle M.E. “Biofilm in the food environment” Blackwell Publishing, Oxford (2007)

Broadwater W.T., Hoehn R.C., King P.H. “Sensitivity of three selected bacterial species to ozone” *Applied Microbiology*. (1973), 26(3), 391-3.

Byun M.W., Kwon O.J., Yook H. S., Kim K.S. “Gamma-irradiation and ozone treatment for inactivation of Escherichia coli O157:H7 in culture media” *Journal of Food Protection* (1998), 61, 728-730.

Chang Y.H., Sheldon B.W. “Application of ozone with physical waste water treatments to recondition poultry process waters” *Poultry Science* (1989), 68, 1078–1087.

Chmielewski R.A.N., Frank J.F. “Biofilm formation and control in food processing facilities” *Comprehensive reviews in food science and food safety* (2003), 2, 22-32.

Coke A.L. “Mother nature’s best remedy: Ozone” *Water Conditioning and Purification* (1993), 48–51.

Coll Cárdenas F., Andrés S., Giannuzzi L., Zaritzky N. “Antimicrobial action and effects on beef quality attributes of a gaseous ozone treatment at refrigeration temperatures” *Food Control* (2011), doi: 10.1016/j.foodcont.2011.03.006.

Conter M., Paludi D., Zanardi E., Ghidini S., Vergara A., Ianieri A. “Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*” *International Journal of Food Microbiology* (2009), 15;128(3), 497-500.

Deibel V. “Biofilms” *Internet Journal of Food Safety* (2003), 1, 6-7.

Di Ciccio P., Conter M., Zanardi E., Ghidini S., Vergara A., Paludi D., Festino A.R., Ianieri A. “*Listeria monocytogenes*: biofilm in food processing” *Italian Journal of Food Science* (2012) – in Press

Donlan R.M. “Biofilm: microbial life on surfaces” *Emerging Infectious Diseases* (2002), 8(9): 881-890.

Donlan R.M., Costerton J.W. “Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms” *Clinical microbiology review* (2002), 15 (2), 167-193.

Dosti B. “Effectiveness of ozone, heat and chlorine for destroying common food spoilage bacteria in synthetic media and biofilms” Thesis (1998). Clemson University, Clemson, SC, 69.

Dunne W.M. Jr. “Bacterial adhesion: seen any good biofilm lately?” *Clinical Microbiology Reviews* (2002), 15 (2), 155-166.

Edelstein P.H., Whittacker R.E., Kreiling R.I., Howell C.I. “Efficacy of Ozone in eradication of *Legionella pneumophila* from hospital plumbing fixtures” *Applied Environmental Microbiology* (1982), 44, 1330-1331.

Ewell “Recent ozone investigation” *Journal of Applied Physics* (1946),17, 908-11.

Farooq S., Akhlaque S. “Comparative response of mixed cultures of bacteria and virus to ozonation” *Water Research* (1983), 17, 309.

Fetner R.H., Ingols R.S. “A comparison of the activity of ozone and chlorine against *E. coli*” *Journal of General Microbiology* (1956), 15, 381–385.

Flemming H.C., Neu T.R., Wozniak D. “The EPS matrix: the house of biofilm cells” *Journal of Bacteriology* (2007), 189 (22), 7945-7947.

Flemming H.C., Wingender J. “The biofilm matrix” *Nature reviews microbiology* (2010), 8, 623-633.

Foegeding P.M. “Ozone inactivation of *Bacillus* and *Clostridium* spore populations and the importance of the spore coat to Resistance” *Food Microbiology* (1985), 2, 123–134.

Giaccone V. “Biofilm microbici e igiene degli alimenti” (2007), [http://.ausl.fo.it/Portals/0/Eventi/2007/BiofilmMicrobici\\_21-09-2007.pdf](http://.ausl.fo.it/Portals/0/Eventi/2007/BiofilmMicrobici_21-09-2007.pdf).

Garny K., Horn H., Neu T.R. “Interaction between biofilm development, structure and detachment in rotating annular reactors” *Bioprocess and Biosystems Engineering* (2008), 31, 619-629.

Greene A.K., Few B.K., Serafini J.C. “Ozonated vs chlorinated sanitization of stainless steel surfaces soiled with milk spoilage organisms” *Journal of Dairy Science* (1993), 76, 3617–3620.

Guzel-Seydim Z., Bever P., Greene A.K. “Efficacy of ozone to reduce bacterial populations in the presence of food components” *Food Microbiology* (2004), 21 (4), 475-479.

Harakeh M.S. and Butler M. “Factors influencing the ozone inactivation of enteric

viruses in effluent” *Ozone Science and Engineering* (1985), 6, 235-243.

Harrison W.A., Griffith C.J., Tennant D., Peters A.C. “Incidence of *Campylobacter* and *Salmonella* isolated from retail chicken and associated packaging in South Wales” *Letters in Applied Microbiology*. (2001), 33, 450-454.

Hinze H., Prakash D., Holzer H. “Effect of ozone on ATP, cytosolic enzymes and permeability of *Saccharomyces cerevisiae*” *Archives of Microbiology* (1987), 147, 105–108.

Hoff, J.C. “Inactivation of microbial agents by chemical disinfectants” EPA/600/2-86/067 U.S. (1986), Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio.

Horvath M, Bilitzky L, Huttner J. “Ozone” (1985) New York: Elsevier, 350.

Ishizaki K., Shinriki N., Matsuyama H. “Inactivation of *Bacillus* spores by gaseous ozone” *Journal of Applied Microbiology* (1986), 60, 67–72.

Joret J.C., Block J.C., Hartemann Richards Y. “Wastewater disinfection; Elimination of fecal bacteria and enteric viruses by Ozone” *Ozone: Science and Engineering*, 4, 91-99.

Khadre M.A., Yousef A.E., Kim J.G. “Microbiological aspects of ozone applications in food: a review”. *Journal of Food Science* (2001), 66, 1242-1252.

Khadre M.A. and Yousef A.E. “Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: A comparative study” *International Journal of Food Microbiology* (2001), 71(2-3), 131–138.

Kawamuram K., Kanckom M., Hiratam T., Taguchim K. “Microbial indicators for the efficiency of disinfection processes” *Water Science and Technology* (1986), 18, 175-184.

Kim J.G., Yousef A.E., Dave S. “Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: A review” *Journal of Food Protection* (1999), 62(9), 1071–1087.

Staffan K. and Michael G. “The biofilm mode of life: mechanisms and adaptations” *Horizon Bioscience* 32 Hewitts Lane, Wymondham (Ed. 2007), Norfolk NR 180JA.

Kogelschatz U. “Advanced Ozone Generation, in: *Process Technologies for Water Treatment*” S. Stucki (Ed. 1988), Plenum Press, 87-120.

Korich D.G., Mead J.R., Sadore M.S., Sinclair N.A., Sterling C.R. “Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability” *Applied and Environmental Microbiology* (1990), 56(5), 1423–1428.

Kuprianoff F. “The use of ozone for the cold storage of fruit” *Z. Kaltentech* (1953), 10, 1-4.

Laisk A., Kull O., Moldau H. “Ozone concentration in leaf intercellular air spaces is close to zero” *Plant Physiology* (1989), 90, 1163-1167.

Lens P., O’Flaherty V., Moran A.P., Stoodley P., Mahony T. “Biofilm in medicine, industry and environmental biotechnology” Published by IWA Publishing, Alliance House, 12 Caxton Street, London SW1H 0QS, UK (2003).

Little C.L., Allen G. Williamson K., Mitchell R.T. “Prevalence of *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* on the external packaging of raw meat” *Journal of Food Protection* (2005) 68, 469-475.

Mazumder S., Falkinham J.O. 3rd, Dietrich A.M., Puri I.W. “Role of hydrophobicity in bacterial adherence to carbon nanostructures and biofilm formation” *Biofouling* (2010), 26 (3), 333-339.

Marino M. “La formazione di biofilm nell’industria alimentare” Igiene alimenti - Disinfestazione e Igiene Ambientale (2008).

Menzel D.B. “Oxidation of biologically active reducing substances by ozone” Archives of Environmental Health. (1971), 23(2), 149-53.

Mudd J.B., Leavitt R., Ongun A., Mcmanus T.T. “Reaction of ozone with amino acids and proteins” Atmospheric Environment (1969), 3, 669–682.

Naitoh S. “Synergistic sporicidal effect of gaseous ozone and UV on Bacillus and Clostridium spores” Bokin Bobai (1992), 20, 293–300.

Niemira B.A., Solomon E.B. “Sensitivity of planktonic and biofilm-associated Salmonella spp. to ionizing radiation” Applied and Environmental Microbiology (2005), 71, 2732–2736.

Palmer J., Flint S., Brooks J. “Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm” Journal of Industrial Microbiology Biotechnology (2007), 34, 577-588.

Peeters J.E., Mazas E.A., Masschelein W.J., Martinez De Maturana I.V., Debacker, E. “Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of Cryptosporidium parvum oocysts” Applied and Environmental Microbiology (1989), 55(6), 1519–1522.

Victorin, K. “Review of the genotoxicity of ozone” Mutation Research (1992), 277, 221–238.

Regolamento CE 853/2004 “norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale” G.U.L. n. 139 del 30/04/2004.

Restaino L., Frampton E.W., Hemphill J.B, Palnikar P. “Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms” Applied and Environmental Microbiology (1995), 61(9), 3471–3475.

Rice R.G., Robson C.M., Miller G.W., Hill A.G. “Uses of ozone in drinking water treatment” *Journal of the American Water Works Association* (1981), 73(1), 44–57.

Roy D., Wong P.K., Engelbrecht R.S., Chian E.S. “Mechanism of enteroviral inactivation by ozone” *Applied of Environmental Microbiology* (1981), 41(3), 718-23.

Sarti P., Avigliano L., Görlach A., Brüne B. “Superoxide and nitric oxide participation in cell communication” *Cell Death and Differtiation* (2002), 9(10), 1160-2.

Scientific Report of European Food Safety Authority (EFSA) “The European Union summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009” *Efsa Journal* (201), 9(3), 2090.

Sheldon B.W. and Brown A.L. “Efficacy of ozone as a disinfectant for poultry carcasses and chill water” *Journal of Food Science* (1986), 51(2), 305–309.

Simoes M., Simoes C.L., Vieira M J. “A review of current and emergent biofilm control strategy” *Food science and technology* (2010), 43, 573-583.

Smith R.C., Prézelin B.B., Baker K.S., Bidigare R.R. “Ozone depletion: ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic waters” *Science* (1992), 255, 952–958.

Song J., Fan L., Hildebrand P.D., Forney C.F. “Biological effects of corona discharge on onions in a commercial storage facility” *Horticulture Technology* (2000), 10(3), 608–612.

Takamoto Y., Maeba H., Kamimura M. “Changes in survival rate enzyme activities and in *E. coli* with ozone” *Applied Microbiology and Biotechnology* (1992), 37, 393–395.

Tomaras A.P., Dorsey C.W., Edelman R.E., Actis L. A. “Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system” *Microbiology* (2003), 149, 3473-3484.

Van Houdt R., Michels C.W. “Biofilm formation and the food industry, a focus on bacterial outer surface” *Journal of Applied Microbiology* (2010), 109, 1117-1131.

Violle H. “De la sterilization de l’eau de mer par ozone: applications de cette methode pour le perufucation des coquillages contamines” *Rev. Hyg. Med. Prev.* (1929) 51, 42–46.

Xavier J.B., Picioreanu C., Rani S.A., van Loosdrecht M.C.M., Stewart P.S. “Biofilm-control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix- a modelling study” *Microbiology* (2005), 151, 3817-3832.

Yang P.P.W., Chen T.C. “Effects of ozone treatment on microflora of poultry meat” *Journal of Food Processing and Preservation* (1979), 3, 177–185.

Yamayoshi T., Tatsumi N. “Microbicidal effects of ozone solution on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*” *Drugs Experimental and Clinical Research* (1993), 19, 59-64.

Watnick P. and Kolter R. “Biofilm city of microbes” *Journal of Bacteriology* (2000), 182 (10), 2675-2679.

Webb J.S. “Differentiation and dispersal in biofilm. mechanism and adaptation” Cap. 9: 164-174, <http://www.open-access-biology.com/biofilms/biofilmsch9.pdf> (2009).

Wickramanayake G.B. “Disinfection and sterilization by ozone. In *Disinfection, Sterilization, and Preservation.*’ (Ed. SS Block - 1991), 182–190.

[www.unionenazionaleavicoltura.it](http://www.unionenazionaleavicoltura.it)

Guzel-Seydima Z.B., Greene A.K., Seydim A.C “Use of ozone in the food industry. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* (2004), 37, 453–460

Zhao J., Cranston P.M. “Microbial decontamination of black pepper by ozone and the effect of the treatment on volatile oil constituents of the spice” *Journal of Science Food and Agriculture* (1995), 68, 11–18.

## **PUBBLICAZIONI TRIENNIO DOTTORATO (2009 – 2011):**

1) CONTER M., VERGARA A., **DI CICCIO P.**, ZANARDI E., GHIDINI S. AND IANIERI A. (2010)

“POLYMORPHISM OF ACTA GENE IS NOT RELATED TO *IN VITRO* VIRULENCE OF *LISTERIA MONOCYTOGENES*”

*INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY* VOLUME 137, ISSUE 1 PAGES 100-105

2) PALUDI D., VERGARA A., FESTINO A. R., **DI CICCIO P.**, COSTANZO C., CONTER M., ZANARDI E., GHIDINI S. AND IANIERI A. (2011)

“ANTIMICROBIAL RESISTANCE PATTERN OF METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN THE FOOD INDUSTRY”

JOURNAL OF BIOLOGICAL REGULATORS & HOMEOSTATIC AGENTS – IN PRESS

3) **DI CICCIO P.A.**, GEORNARAS I. , NUNNELLY M.C., ZANARDI E. , IANIERI A. AND SOFOS J.N. (2011) “SURVIVAL OF *SALMONELLA* IN DRIED CHICKEN MEAT RESIDUES ON THE SURFACE OF PACKAGING MATERIALS”

57<sup>TH</sup> INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, GHENT-BELGIUM

4) VERGARA A., PALUDI D. , D'ORIO V., **DI CICCIO P.**, FESTINO A.R.,  
CONTER M., IANIERI A. (2009) “PRODUZIONE DI BIOFILM DA CEPPI DI  
*LISTERIA MONOCYTOGENES*”.

INGEGNERIA ALIMENTARE 26, 42-44

5) **DI CICCIO P.**, CONTER M., D'ORIO V., VERGARA A., IANIERI A. (2009)  
“PATOGENICITÀ E FATTORI DI VIRULENZA DI *LISTERIA  
MONOCYTOGENES*”.

INDUSTRIE ALIMENTARI XLVIII, 35-39

6) VERGARA A. , FESTINO A.R., **DI CICCIO P.**, PENNISI L., CONTER M.,  
COSTANZO C. AND IANIERI A (2009)  
“LA GESTIONE DELLA REFRIGERAZIONE DOMESTICA:  
CARATTERISTICHE IGIENICO-SANITARIE DI FRIGORIFERI DELL'ITALIA  
CENTRO-SETTENTRIONALE”

A.I.V.I. GIUGNO 2010 N.8. 13. PAGE 2

7) **DI CICCIO P.**, FESTINO A.R., CONTER M., PALUDI D., D'ORIO V.,  
COSTANZO C., VERGARA A., IANIERI A. (2009)  
“RICERCA DI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILLINO-RESISTENTE  
(MRSA) IN OPERATORI DI INDUSTRIE ALIMENTARI”

VII WORKSHOP NAZIONALE ENTER-NET ITALIA SISTEMA DI  
SORVEGLIANZA DELLE INFEZIONI ENTERICHE, INFEZIONI TRASMESSE

DA ALIMENTI E ACQUA: DIAGNOSTICA ED EPIDEMIOLOGIA REGIONE LAZIO - ROMA

8) CONTER M., POJANI L., CORTIMIGLIA C., **DI CICCIO P.**, GHIDINI S., ZANARDI E. AND IANIERI A. (2010) “FOOD MANAGEMENT AT HOME AND FOOD SAFETY”.

ANNALI DELLA FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA, DIPARTIMENTO DI PRODUZIONI ANIMALI, BIOTECNOLOGIE VETERINARIE, QUALITÀ E SICUREZZA DEGLI ALIMENTI, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

9) CONTER M., VERGARA A., FESTINO A.R., D’ORIO V., **DI CICCIO P.**, IANIERI A. (2009)

“ANTIMICROBIAL RESISTANCE PROFILE OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATED FROM MEAT: A RESEARCH FOR METHICILLIN (OXACILLIN)-RESISTANT *S. AUREUS* (MRSA)”.

EFFOST CONFERENCE, NEW CHALLENGES IN FOOD PRESERVATION: PROCESSING - SAFETY - SUSTAINABILITY – BUDAPEST

10) PALUDI D., **DI CICCIO P.**, FESTINO A.R., CONTER M., COSTANZO C., D’ORIO V., NICOLAU-SOLANO S.I., VERGARA A. and IANIERI A. (2010)

“INFLUENCE OF TEMPERATURES AND FOOD-CONTACT SURFACES ON BIOFILM FORMATION BY STAPHYLOCOCCUS AUREUS: RELATIONSHIPS WITH *ica-A* GENE .

EFFOST CONFERENCE, FOOD AND HEALTH - DUBLINO (IRLANDA)

11) CONTER M., **DI CICCIO P.**, FESTINO A.R., GHIDINI S., ZANARDI E.,  
BORRACCI G., VERGARA A., DECASTELLI L. and IANIERI A. (2010)

“METHICILLIN (OXACILLIN)-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS  
(MRSA) IN THE PIG PRODUCTION CHAIN”

*EFFOST* CONFERENCE, FOOD AND HEALTH - DUBLINO (IRLANDA)

12) **DI CICCIO P.**, VERGARA A., GHIDINI S., ZANARDI E. AND IANIERI A.  
(2011)

“STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILLINO - RESISTENTI (MRSA) NELLA  
FILIERA SUINA”

INDUSTRIE ALIMENTARI – IN PRESS

13) CONTER M., **DI CICCIO P.**, ZANARDI E., GHIDINI S., BORRACCI G.,  
VERGARA A. and IANIERI A. (2011)

“STUDIO PRELIMINARE SULLA DIFFUSIONE DI STAPHYLOCOCCUS  
AUREUS METICILLINO-RESISTENTE NELLA FILIERA SUINA”

*A.I.V.I.* – IN PRESS

14) **DI CICCIO P.** , CONTER M., ZANARDI E., GHIDINI S., VERGARA A.,  
PALUDI D., FESTINO A.R. AND IANIERI A. (2012)

“*LISTERIA MONOCYTOGENES*: BIOFILM IN FOOD PROCESSING”

ITALIAN JOURNAL OF FOOD SCIENCE – IN PRESS

## **RINGRAZIAMENTI**

*Dieci pagine di ringraziamento non sarebbero sufficienti per ringraziare la Prof.ssa Adriana Ianieri che in questi 10 anni mi ha “cresciuto” professionalmente e che con la sua carica d’entusiasmo ed energia ha fatto sbocciare in me la passione per il mondo della ricerca scientifica.*

*Una Prof.ssa davvero fuori dal comune, che ho avuto la fortuna di incontrare durante il mio percorso di studi universitari e che da allora è stata per me una guida insostituibile per competenza, professionalità e grande umanità.*

*“Grazie mia cara Prof. per tutto l’insegnamento da Lei ricevuto, per tutti i sorrisi e i rimproveri che mi ha regalato, e per aver creduto in me quando anche io stentavo a farlo... Grazie di cuore!”*

*Un sentito Grazie va alla Dr.ssa Emanuela Zanardi, al Dr. Sergio Ghidini e al Dr. Mauro Conter per l’aiuto, la disponibilità e la cortesia avute nei miei confronti e per avermi supportato e soprattutto sopportato durante il triennio di dottorato.*

*Desidero esprimere tutta la mia gratitudine al Prof. Alberto Vergara e a tutto lo staff della Sezione di Ispezione e Controllo degli Alimenti di O.A. (Università degli Studi di Teramo) per essere stati sempre al mio fianco nonostante le distanze geografiche.*

*Un Grazie davvero speciale al Dr. Giuseppe Borracci per tutti i momenti condivisi di lavoro, di risate, di sconforto e di vita mondana. Un amico insostituibile che mi ha aiutato ed incoraggiato soprattutto in occasione di alcuni momenti difficili.*

*“Grazie per avermi sopportato nei peggiori momenti, strappandomi dei grossi sorrisi!”*

*Un doveroso ringraziamento al Prof. J.N. Sofos e alla Dr.ssa I. Geornaras del Center for Meat Safety and Quality, Department of Animal Sciences, Colorado State University, USA, per la loro ospitalità e per avermi dato l’opportunità di fare una grande “esperienza di vita” negli States.*

*Un particolare ringraziamento ai miei genitori e alle mie sorelle per la loro incrollabile fiducia in me e per il loro amore incondizionato. Mi hanno sempre supportato, soprattutto moralmente, affrontando con me momenti particolarmente critici. Con la speranza che mi sopportino per molto ancora...concludo così:*

*“Vi voglio un mondo di Bene...Grazie!”*