

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI
BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA
SCUOLA DI AGRARIA E MEDICINA VETERINARIA
CORSO DI LAUREA IN TECNOLOGIE ALIMENTARI

**USO DI ACQUA ELETTROLIZZATA
PER LA DECONTAMINAZIONE DI
MELE**

Relazione finale in
Microbiologia Industriale
(Microbiologia degli Alimenti, C.I.)

Relatore

Dott.ssa Lucia Vannini

Presentata da

Simone Mazzini

Correlatore

Dott.ssa Giorgia Gozzi

Sessione II
Anno Accademico 2014-2015

INDICE

CAPITOLO 1 - LA MELA	7
1.1 Origine e diffusione	7
1.2 Caratteristiche botaniche	9
1.3 Maturazione e raccolta	10
1.4 Composizione chimica di una mela matura	11
1.5 Informazioni nutrizionali.....	13
1.5.1 <i>Gli antiossidanti</i>	14
1.6 Microflora dei prodotti vegetali.....	17
1.6.1 <i>Microorganismi saprofiti</i>	19
1.6.2 <i>Microorganismi patogeni</i>	20
1.6.3 <i>Lieviti e muffe</i>	21
1.6.4 <i>Batteri degradativi (pectolitici)</i>	24
1.6.5 <i>Batteri lattici</i>	25
1.6.6 <i>Batteri acetici</i>	26
1.6.7 <i>Coliformi</i>	26
1.7 Principali malattie biotiche ed abiotiche delle pomacee	27
1.7.1 <i>Malattie biotiche di origine fungina e batterica delle pomacee</i>	27
1.7.2 <i>Fisiopatie abiotiche delle pomacee</i>	32
1.7.3 <i>Malattie biotiche di origine batterica</i>	36
CAPITOLO 2 - METODI DI SANITIZZAZIONE DEI PRODOTTI ORTOFRUTTICOLI	39
2.1 Metodi tradizionali per la sanificazione dei prodotti ortofrutticoli	42
2.1.1 <i>Composti del cloro</i>	46
2.2 Metodi innovativi per la sanificazione dei prodotti ortofrutticoli	52
2.2.1 <i>Il gas plasma</i>	52
2.2.2 <i>Perossido di idrogeno</i>	56
2.2.3 <i>Fosfato trisodico ed altri agenti di lavaggio alcalini</i>	57
2.2.4 <i>Acidi Organici</i>	58
2.2.5 <i>Ozono</i>	59
2.2.6 <i>Oli essenziali</i>	62
2.2.7 <i>Acqua elettrolizzata</i>	66

CAPITOLO 3 - LISTERIA MONOCYTOGENES	70
3.1 Caratteristiche generali.....	70
3.2 Fattori di virulenza di L. monocytogenes.....	72
3.3 Fattori di sviluppo di L. monocytogenes in alimenti.....	74
3.3.1 <i>Temperatura</i>	75
3.3.2 <i>Acidità</i>	78
3.3.3 <i>Attività dell'acqua e tolleranza al sale</i>	81
3.4 Epidemiologia.....	83
3.5 Criteri microbiologici, prevenzione e controllo nei processi alimentari per diminuire il rischio di listeriosi.....	86
3.6 Metodi di rilevamento di Listeria monocytogenes negli alimenti.....	87
CAPITOLO 4 – SCOPO DELLA TESI.....	93
CAPITOLO 5 - MATERIALI E METODI	96
5.1 Matrice alimentare utilizzata	96
5.2 Soluzioni sanizzanti utilizzate per il lavaggio delle mele	96
5.2.1 <i>Ipoclorito di sodio</i>	96
5.2.2 <i>Acqua elettrolizzata</i>	96
5.3 Valutazione dell'effetto sanizzante di lavaggi con acqua elettrolizzata ed ipoclorito di sodio di mele inoculate con Listeria monocytogenes	98
5.3.1 <i>Preparazione delle colture cellulari ed inoculo delle mele con L. monocytogenes 56Ly</i>	98
5.3.2 <i>Trattamento di sanizzazione delle mele</i>	100
5.3.3 <i>Analisi microbiologiche</i>	101
5.4 Valutazione dell'effetto di lavaggi con acqua elettrolizzata sulla microflora naturalmente contaminante la superficie delle mele	105
5.5 Valutazione dell'effetto dei lavaggi con sanizzanti sull'attività antiossidante e fenoli totali delle mele	106
5.5.1. <i>Preparazione dell'estratto con soluzione metanolica</i>	107
5.5.2. <i>Misura del potere antiossidante mediante test DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazile)</i>	108
5.5.3. <i>Analisi del contenuto in fenoli totali mediante il metodo di Folin–Ciocalteu (FC)</i>	109
5.6 Analisi chimiche delle soluzioni di lavaggio	110
5.6.1 <i>pH</i>	110
5.6.2 <i>Ioni nitrato</i>	111
5.6.3 <i>Cloro attivo</i>	112

CAPITOLO 6 - RISULTATI	113
6.1. Analisi chimiche dell'acqua elettrolizzata.....	113
6.2 Effetto dei lavaggi con acqua elettrolizzata od ipoclorito di sodio sulla microflora contaminante la superficie delle mele	114
6.3 Effetto dei lavaggi con acqua elettrolizzata od ipoclorito di sodio sul livello di <i>Listeria monocytogenes</i>	118
6.4 Effetto dei lavaggi con acqua elettrolizzata od ipoclorito di sodio sull'attività antiossidante e fenoli totali.....	128
CAPITOLO 7 - CONCLUSIONI.....	130
Bibliografia.....	133
Ringraziamenti.....	165

CAPITOLO 1 - LA MELA

La mela grazie alla sua forma sferica ha da sempre suggerito all'uomo la totalità del cielo e della terra come una sorta di simbolo dell'unione del terrestre con il divin . Questo frutto emblematico è presente in numerosi miti e tradizioni di diversi paesi: nella tradizione ebraico-cristiana il melo è l'albero del bene e del male, nella mitologia scandinava la mela è il cibo degli dei.

Nella mitologia greca troviamo tre mele d'oro che tentano Atalanta a fermarsi e a perdere la scommessa con Ippomene; è una mela d'oro che scatena la guerra di Troia; è una mela il frutto che, consacrato ad Afrodite, a partire dal 3° secolo d.C., in Grecia, venne gettato al giovanetto od alla fanciulla per scegliere il compagno di banchetto; sono mele i frutti dell'immortalità del giardino delle Esperidi che Ercole, nella sua undicesima immane fatica, riuscì a conquistare.

Nei secoli il frutto della tentazione ha continuato ad attirare scrittori ed artisti, a tal punto che lo si può ritrovare in innumerevoli quadri, fiabe e racconti, sino a tempi più recenti in varie pubblicità.

E così, partendo dal frutto che fece intuire a Newton il meccanismo gravitazione, sino al pomo che fece di Guglielmo Tell l'eroe nazionale del popolo svizzero, arriviamo alla simbologia moderna che, fra l'altro, la vuole citata nello slogan di una famosa ditta di costruttrice di motoscooter e come nome del primo personal computer a dimensioni ridotte.

1.1 Origine e diffusione

Il Melo è la specie frutticola per eccellenza e viene coltivata praticamente in tutti i continenti soprattutto nelle zone con clima temperato e freddo-temperato.

I terreni devono essere fertili, ben drenati e soleggiati.

La mela è originaria dell'Asia Minore, a sud del Mar Nero; attraverso l'Egitto e la Grecia si diffuse in Europa, dove, nell'Impero Romano veniva consigliata e raccomandata come diuretico o cura per diversi problemi all'apparato digerente.

In seguito, le invasioni barbariche causarono un profondo decadimento dell'agricoltura, che si protrasse per circa un millennio. L'uomo tornò a consumare frutti selvatici e preferì dedicarsi maggiormente alla produzione di cereali. I meli erano numerosissimi allo stato selvatico. Soltanto nel XV secolo, grazie a grandi opere di irrigazione e di bonifica, a fortunati innesti e nuovi sistemi di fertilizzazioni, si è tornati a produrre frutta di qualità pregevole.

E' in tutto questo periodo che, con la creazione di grandi frutteti in Italia ed in Europa, questa coltura si è rivelata anche una notevole fonte di guadagno.

Nel XVI secolo, la mela si è diffusa in America, rendendo tutto lo stato di New York famoso per l'ottima qualità dei suoi frutti. Contemporaneamente, le mele apparvero trionfanti nella pittura fiamminga, tedesca, italiana: i frutti bellissimi che appaiono nelle opere degli artisti testimoniano il progresso delle colture.

Da allora in poi la mela si diffuse sempre di più nell'uso popolare, non solo come frutto, ma anche come toccasana per la salute e la bellezza. In cucina poi, divenne ingrediente particolarmente delicato, oltre che per i dolci, anche per antipasti, primi e secondi piatti.

Ad oggi nel mondo si producono 564 milioni di quintali di mele. Il maggior produttore con 270 milioni di quintali è l'Asia, seguita, con 160 milioni di quintali, dall'Europa.

La produzione nell'Unione Europea è di 80 milioni di quintali, con l'Italia al primo posto, seguita da Francia, Germania, Spagna. Questi paesi insieme, concorrono al 70% della produzione totale dell'Unione Europea.

In Piemonte la pomicoltura vanta un'antica tradizione che risale a diversi secoli fa, praticata prevalentemente in zone di collina fino a metà degli anni Trenta. In seguito la coltivazione dei meli si diffuse nelle zone irrigue dalla pianura, con impianti specializzati e con varietà più moderne. In poco più di sessanta anni la pomicoltura piemontese è diventata all'avanguardia e ad oggi può essere collocata fra i primi posti a livello nazionale.

Le mele vengono suddivise in cultivar per rendere più facile una distinzione commerciale a seconda di colore, dimensione, composizione chimica.

Fra le più diffuse troviamo le Golden Delicious (gialle) (Figura 1) che coprono da sole quasi la metà della produzione europea, la Red Delicious (rosse), le

Renetta del Canada, le Jonathan, le Granny Smith (verdi), le Abbondanza, le Morgan, e le Annurca (queste ultime due di produzione esclusivamente italiana).



Figura 1: Mela Golden Delicious

1.2 Caratteristiche botaniche

Famiglia: *Rosaceae*

Sezione: *Pomoideae*

Genere: *Malus*

Specie: *Malus domestica*

Le principali varietà di mele sono:

- VARIETA' ESTIVE: Gruppo Gala, Ozark Gold, Gravenstein.
- VARIETA' AUTUNNO-VERNINE: Granny Smith, gruppo Renette, Annurca, Red Delicious, Golden Delicious, Rome Beauty, Imperatore, Jonathan, Gloster, Elstar, Idared.

Le principali regioni italiane di produzione delle mele sono il Piemonte, la Lombardia, il Veneto, il Trentino Alto Adige, l'Emilia Romagna e la Campania.

Le rese medie per ettaro (10.000 mq) delle mele sono di circa 250-300 q.li/ha.

Il melo è una pianta da frutto appartenente alla classe delle Dicotiledoni, della famiglia *Rosaceae*, genere *Malus*. Questo genere racchiude una trentina di specie, di cui solo poche sono di interesse agronomico, mentre le altre sono per lo più ornamentali.

Il melo è un piccolo albero deciduo di 5-12 metri di altezza, con una chioma densa ed espansa, con forma da globosa fino ad ombrello, ed un apparato radicale superficiale. La corteccia, di colore rosso-brunastro, con le lenticelle più o meno evidenti, invecchiando si screpola e schiarisce. Le foglie sono alterne e semplici, a lamina ovale, con apice acuto e base arrotondata, di 5 – 12 centimetri di lunghezza e 3 - 6 centimetri di larghezza, glabre superiormente e con una certa tomentosità sulla parte inferiore. I fiori sono ermafroditi di colore bianco-rosato esternamente e bianco internamente. Sono riuniti in infiorescenze a corimbo, in numero di 3 - 7. La fioritura si svolge in primavera, simultaneamente al germogliamento. L'impollinazione è entomofila ed essendo la specie caratterizzata da autoincompatibilità gameotofitica, è necessario associare due o più varietà intercompatibili ed a fioritura contemporanea per poter ottenere i frutti.

Il frutto è un falso frutto, detto pomo. La forma è assai variabile, così come il colore dell'epidermide. All'esame morfologico si distinguono due incavi: uno peduncolare, detto cavità peduncolare, in cui è inserito il peduncolo, ed uno calicino, detto cavità calicina, situato al polo opposto dove sono individuabili i residui dei sepali. La polpa è carnosa, croccante o farinosa, dolce od acidula e deriva dalla contemporanea crescita dei tessuti carpellari e del ricettacolo, ed avvolge i cinque carpelli.

1.3 Maturazione e raccolta

I frutti delle varie specie maturano scalarmente in un arco di tempo abbastanza ampio. Tale fenomeno può interessare una singola pianta od addirittura un singolo ramo. La maggior parte dei frutti può maturare sulla pianta; tuttavia, per motivi sia tecnologici, che economici e commerciali, alcuni frutti vengono spesso raccolti prima della completa maturazione. In quest'ultimo caso è necessaria,

durante il trasporto ed il magazzinaggio, la refrigerazione per evitare la maturazione, che riprenderà una volta riportati i frutti a temperatura ambiente. La maturazione “artificiale” dei frutti è indispensabile per l’importazione dei frutti tropicali o per prolungare il periodo di reperibilità sul mercato. I frutti giunti a maturazione si deteriorano facilmente, sia a causa di malattie fisiologiche, sia in seguito all’attacco da parte dei microrganismi (funghi e batteri). Di particolare importanza risulta essere la determinazione del momento più adatto per iniziare la raccolta.

Individuato il momento ottimale, si procede alla raccolta meccanizzata dei frutti. I frutti, una volta raccolti, vengono trasportati in magazzino e sottoposti ad operazioni atte ad aumentarne la conservabilità e diminuire le alterazioni dovute sia a muffe, che all’utilizzo di basse temperature per lunghi periodi (danno da raffreddamento). Una volta che i frutti giungono in magazzino, vengono sottoposti a cernita, lavati in acqua corrente addizionata con prodotti specifici per limitare il marciume ed i danni da raffreddamento durante la conservazione e quindi conservati in atmosfera ordinaria o controllata. Nel caso di atmosfera ordinaria, la frutta è posta in celle a temperature di 0-4° C ed umidità relativa di 85-90%. In questo modo il prodotto può conservare buone caratteristiche fino a tre mesi. Per conservare il prodotto per periodi più lunghi, si ricorre ad atmosfera controllata, che avviene in celle a tenuta stagna, a temperature di 1-3° C, con basse concentrazioni di ossigeno e concentrazioni inferiori al 10% di anidride carbonica. Così facendo la conservabilità dei frutti può aumentare fino ad un anno.

1.4 Composizione chimica di una mela matura

La mela è un frutto a basso contenuto energetico e la sua composizione è condizionata da molteplici fattori quali cultivar, clima, grado di maturazione e pratiche colturali (Lal Kaushal et al., 1995).

Gli zuccheri contribuiscono in modo determinante alla qualità sensoriale e nutrizionale delle mele e costituiscono la maggior parte delle sostanze solubili con un quantitativo che si aggira attorno al 7-14% del peso fresco (Tabella 1).

Tabella 1: Composizione chimica della mela.

Composizione % media		Composizione vitaminica per 100g di sostanza edibile		Elementi minerali su 100g di sostanza edibile	
Acqua	83.40	Vitamina B1	0.04 mg	Calcio	6.00 mg
Ceneri	0.30	Vitamina B2	0.03 mg	Cloro	4.00 mg
Zuccheri riducenti	8.00	Vitamina C	0.06 mg	Ferro	0.30 mg
Saccarosio	4.00	Vitamina A	0.03 mg	Fosforo	10.00 mg
Cellulosa	0.80	Vitamina B3	0.06 mg	Iodio	0.06 mg
Pentosomi	0.50	Vitamina PP	0.20 mg	Magnesio	6.00 mg
Lignina	0.40	Vitamina B6	0.02 mg	Potassio	116.00 mg
Acidi	0.80	Vitamina E	0.003 mg	Sodio	15.00 mg
Pectina	0.40	Vitamina H	0.009 mg	Zinco	0.07 mg
Lipidi	0.30			Zolfo	4.00 mg
Protidi	0.10				

www.rivistadiagraria.org

Tra gli zuccheri presenti si trovano: fruttosio, glucosio, saccarosio e tracce di carboidrati minori. La concentrazione di fruttosio e saccarosio aumenta marcatamente durante la maturazione dei frutti, mentre il glucosio tende a diminuire. La concentrazione dei tre zuccheri tende comunque ad aumentare durante lo stoccaggio in cella (Hulme, 1970). Sono presenti anche le pectine, complessi polimeri polisaccaridici che conferiscono stabilità e rigidità alle pareti cellulari e quindi al frutto stesso (funzionano come gel stabilizzante). Man mano che la maturazione procede si ha una costante diminuzione di tali composti, con conseguente variazione delle caratteristiche fisiche e strutturali che portano ad un sempre più pronunciato ammorbidimento del frutto.

Altri costituenti importanti sono gli acidi organici quali l'acido malico, presente in concentrazioni elevate, seguito dall'acido citrico, lattico ed ossalico (Lal Kaushal. *et al.*, 1995). Essi influenzano la qualità organolettica del frutto stesso.

1.5 Informazioni nutrizionali

Una mela di medie dimensioni pesa 180-200 grammi. La parte edibile è pari all'85-90% del prodotto, che corrisponde a circa 150-170 grammi; buccia e torsolo di una mela, complessivamente, pesano circa 20-30 grammi.

La mela ha un contenuto calorico pari a 50 kcal per 100 g di prodotto. È una buona fonte di fibra alimentare e fruttosio, che, essendo uno zucchero a basso indice glicemico, mantiene relativamente costante la glicemia e può così essere consumato anche dai soggetti diabetici. Ha un basso contenuto proteico, ma una quantità significativa di acidi organici quali malico, citrico, tartarico, tannico e salicilico; quest'ultimo non solo determina il sapore della mela, ma è dotato di capacità antimicrobica contro diversi microrganismi quali *L. monocytogenes* ed *E. coli* O157:H7 (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2009). Nella mela sono presenti anche diverse vitamine, quali A, B6, riboflavina, tiamina, che però sono in dosi insignificanti per l'apporto giornaliero raccomandato, a parte la vitamina C, che è presente con la quota di 0.06 ml di parte edibile. Inoltre contiene principi attivi ormonici ed enzimatici, sali minerali quali potassio, zolfo, fosforo, calcio, magnesio, sodio, ferro, ma il loro contenuto può variare nelle oltre 1000 qualità oggi presenti sul mercato internazionale.

Se consumata cruda la mela ha un'azione astringente, mentre mangiata cotta ha spiccate proprietà lassative grazie all'azione delle fibre e della pectina in essa contenute. Visto che buona parte della fibra è contenuta nella buccia, sarebbe buona regola mangiare il frutto intero senza sbucciarlo, prestando attenzione però alla sua provenienza visto il massiccio impiego in agricoltura di sostanze chimiche, specialmente nei paesi in via di sviluppo (Cina e Argentina *in primis*).

Ha anche discrete proprietà antiossidanti: si è dimostrato che il contenuto ed il tipo di polifenoli ad attività antiossidante contenuti nei frutti varia in funzione delle zone di coltivazione e delle cultivar (McGhie *et al.*, 2005). I composti fenolici più presenti sono flavonoli, antociani e tannini (Nicholas *et al.*, 1994). I flavonoidi come quercitina (Figura 2), epicatechina, cianidine e vitamina C contribuiscono significativamente all'attività antiossidante totale delle mele (Lee

et al., 2003). Questi frutti, inoltre, favoriscono la digestione e l'attività emolliente.

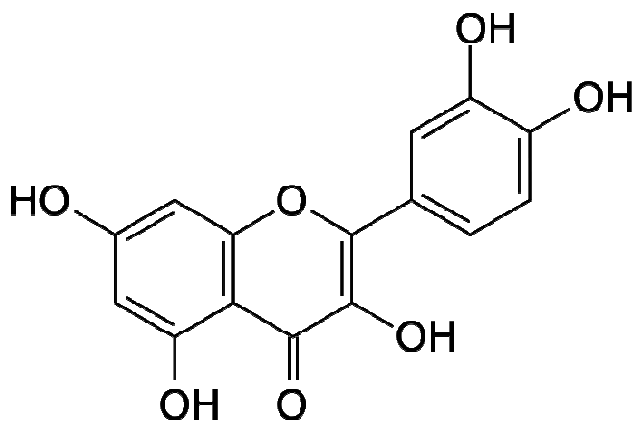


Figura 2: Quercitina

Il segreto delle straordinarie proprietà nutrizionali e salutistiche delle mele è in gran parte dietro legato ad una fibra solubile, la pectina, di cui sono particolarmente ricche. Questo polisaccaride indigeribile aiuta a controllare l'ipercolesterolemia, riducendo l'assorbimento del colesterolo (Fernandes *et al.*, 1994), contribuisce a regolarizzare la funzionalità intestinale e tiene sotto controllo l'appetito. La sua fermentazione da parte della flora microbica intestinale, origina acidi grassi a corta catena, che sembrano essere coinvolti nella protezione del colon contro il cancro. Una mela di media grandezza, se consumata insieme alla buccia, fornisce circa 4 g di fibre. Tuttavia, a differenza di quella presente in altri alimenti, come i cereali integrali e molte verdure, buona parte della fibra contenuta nella mela è solubile in acqua. Questa proprietà le consente di formare, all'interno del nostro intestino, una massa gelatinosa che intrappola al suo interno i lipidi e gli zuccheri in eccesso, ma anche alcune sostanze dannose, come ad esempio microrganismi patogeni e residui chimici di fitofarmaci.

1.5.1 Gli antiossidanti

Gli antiossidanti sono sostanze in grado di prevenire l'azione negativa dei radicali liberi, molecole altamente instabili e molto reattive, che hanno uno o più elettroni spaiati negli orbitali esterni e per completare il loro ottetto sottraggono

elettroni ad altre molecole, innescando così reazioni a catena con elevata produzione di molecole radicaliche. Quando la produzione di radicali è elevata, questi vanno ad interagire con le macromolecole danneggiandole, e provocando numerose alterazioni nella biochimica delle cellule che si ripercuotono dapprima sullo stato cellulare ed in seguito su quello tessutale. Proteine, lipidi, carboidrati, acidi nucleici sono tutti bersagli dell'azione lesiva dei radicali, considerati addirittura implicati nell'eziopatogenesi di diverse malattie.

Il sistema di difesa dai radicali liberi, secondo una suddivisione rilevante in campo nutrizionale, è classificabile in antiossidanti esogeni ed endogeni. Quest'ultimo gruppo comprende molecole e sistemi enzimatici biosintetizzati dall'organismo umano. I fattori esogeni comprendono, invece, composti antiossidanti non biosintetizzabili e che quindi devono essere assunti con la dieta. In questo gruppo si possono distinguere due categorie: quelli considerati nutrienti, vitamine e sali minerali, e altri che non sono considerati tali, ma che hanno tuttavia un ruolo nella difesa contro lo stress ossidativo, come i composti fenolici, i fitoestrogeni, i carotenoidi non vitaminici e i glucosinolati.

I carotenoidi

I carotenoidi sono i pigmenti delle piante più presenti in natura; sono localizzati nei cromoplasti cellulari dei tessuti fotosintetici, nei cromoplasti di fiori, radici. Sono stati individuati più di 700 tipi di carotenoidi e possono essere suddivisi in due gruppi:

- caroteni, senza presenza di ossigeno (α -carotene, β -carotene, licopene);
- xantofille, contengono ossigeno in gruppo alcolico o carbonilico (zeaxantina, luteina).

Sono composti terpenici, derivanti dalla condensazione di otto unità isopreniche, con una catena idrocarburica centrale a 22 atomi di carbonio, comprendente differenti doppi legami coniugati, e da due unità terminali che possono contenere diverse funzioni, come alcolica o chetonica. I doppi legami coniugati costituiscono il sistema cromoforo responsabile dell'intenso colore di queste sostanze. Oltre alla funzione fotosintetica nelle piante, i carotenoidi, sono fotoprotettori, infatti essi proteggono i cromoplasti dalla fotossidazione. Tuttavia

i carotenoidi sono sensibili all'esposizione alla luce, alle alte temperature e all'ossigeno. Per esposizione a questi agenti, tali composti, in cui i doppi legami non ciclici sono sempre nella configurazione trans, più stabile, possono trasformarsi in una miscela di stereoisomeri nei quali uno o più doppi legami si sono isomerizzati in posizione cis (isomerizzazione trans-cis). Il sistema cromoforo è infatti responsabile oltre che del colore anche della loro grande instabilità, ossidandosi facilmente all'aria e in presenza di luce.

Gli animali non sono in grado di sintetizzare carotenoidi, che sono quindi presenti solo negli alimenti vegetali. La composizione di carotenoidi delle specie vegetali è influenzata da una serie di fattori come la cultivar, la varietà, la parte della pianta in esame, grado di maturazione, clima e luogo di coltivazione, condizioni di raccolta e post raccolta, processi tecnologici e di conservazione (Rodriguez-Amaya, 1993).

Nonostante la mela sia considerata un frutto a basso contenuto di clorofilla e carotenoidi, tuttavia questi pigmenti contribuiscono alla colorazione interna ed esterna dei frutti: le differenze varietà esistenti presentano clorofilla a e b, luteina, violaxantina, neoxantina, neoxanthina e carotenoidi esterificati (Delgado-Pelayo *et al.*, 2014).

I fenoli

I composti fenolici rappresentano un gruppo di circa 800 metaboliti secondari, formati nelle piante, responsabili della colorazione dei frutti, agenti protettivi contro gli insetti, parassiti e raggi UV. Si trovano in frutti, vegetali, vino, tè, cacao. Possiedono una struttura fenolica comune, infatti sono derivati del benzene con più gruppi idrossilati associati all'anello. I polifenoli possono essere divisi in base al numero di anelli fenolici e agli elementi strutturali legati a tali anelli in acidi fenolici, flavonoidi, tannini, stilbeni e diferuloilmetani. *Gli acidi fenolici* derivano dagli acidi idrossibenzoici come l'acido gallico e da quelli idrossicinnamici come l'acido caffeico, il ferulico e il cumarico.

I flavonoidi si suddividono in flavonoli, flavoni, isoflavoni, antocianidine in base allo stato di ossidazione, al tipo di eterociclo e alla posizione dei vari sostituenti.

Il grado di ossidazione dell'anello eterociclico, il numero e le specifiche

posizioni dei gruppi OH o la natura dei gruppi funzionali, determinano la funzione dei flavonoidi come agenti antiossidanti, agenti antinfiammatori, agenti citotossici e agenti mutageni *in vitro* o *in vivo*, a dimostrazione di come piccole differenze di struttura determinano grandi diversità nelle attività biologiche (Carratù *et al.*, 2005). *Gli stilbeni* sono strutturalmente caratterizzati da un nucleo di 1,2-difeniletilene, con gli idrossili sull'anello aromatico ed esistono in forma monomericamente e polimerica. Vi sono anche *lignani* e lignine polimeriche. I *tannini* sono fenoli idrosolubili e sono divisi in tannini condensati e idrosolubili, ad alto peso molecolare e con proprietà colloidali. I *diferuloilmetani* sono un piccolo gruppo di composti con due anelli aromatici sostituiti con gruppi idrossilici. Tra i composti maggiormente presenti nelle mele troviamo epicatechine, procianidide e quercitina (Schieber *et al.*, 2003).

1.6 Microflora dei prodotti vegetali

Quando i prodotti vegetali vengono raccolti, si ha una perdita a livello qualitativo dovuta a modifiche fisiologiche. L'attività respiratoria che porta ad una diminuzione dei carboidrati da parte degli enzimi dei frutti, continua incrementando la velocità di maturazione. Anche se parte del deterioramento dei frutti deriva dalla presenza di enzimi amilolitici, la causa principale di tale fenomeno deriva dall'attività di microrganismi.

Tutte le piante possiedono una microflora presente sulla superficie di ogni loro tessuto vegetale che è influenzata da diversi fattori quali l'irrigazione, il suolo, l'inquinamento, gli insetti e gli animali presenti.

L'importanza di ogni singolo fattore dipende dalla struttura del vegetale: le foglie sono più esposte all'aria, mentre radici sono a contatto col terreno. La conta delle colonie di microrganismi aerobi risulterà pertanto utile nei vegetali in contatto con il suolo come l'aglio o che crescono sul terreno come gli spinaci. La microflora vegetale è sicuramente influenzata anche dall'attività umana come uso di pesticidi o tipo di raccolta: a seconda che essa sia manuale o meccanica può introdurre e distribuire i microrganismi in concavità e nicchie presenti nei

vegetali in cui prima erano assenti. La modalità con cui i microrganismi penetrano i tessuti non è stata ancora definita chiaramente; tuttavia la loro presenza nelle piante non è per loro deleteria poiché esiste un equilibrio di coesistenza tra pianta e microrganismi che, se viene interrotto, genera una contaminazione: la rottura dei tessuti durante la raccolta può incrementare la disponibilità di nutrienti e, conseguentemente, la crescita microbica.

La maggior parte dei microrganismi presenti sui vegetali freschi sono saprofiti come i batteri corineformi, batteri lattici, sporiformi, coliformi, micrococchi, *Pseudomonadaceae*, derivanti dal suolo, acqua e aria (Cupples *et al.*, 1974; Goverd *et al.*, 1979; Vaught *et al.*, 1952; Splittstoesser *et al.*, 1966).

I funghi presenti nei vegetali, quali ad esempio *Aureobasidium*, *Fusarium* e *Alternaria*, (Rubatzky *et al.*, 1999; Bari *et al.*, 2005) sono di solito in numero inferiore rispetto ai batteri. Ad oggi i microrganismi strettamente anaerobi che possono essere presenti non sono stati ancora caratterizzati a parte alcuni sporiformi resistenti al calore presenti nei vegetali in scatola. La flora predominante negli ortaggi freschi è costituita da batteri, anche se si possono trovare anche concentrazioni significative di muffe e lieviti: tra le muffe più comuni vi sono quelle del genere *Penicillium*, *Sclerotinia*, *Botrytis* e *Rhizopus* (Bari *et al.*, 2005). I batteri sono responsabili di un terzo di tutta la contaminazione microbica dei vegetali e causano marciumi molli, altri marciumi, macchie e piaghe. I marciumi molli sono di solito causati dai coliformi come *Erwinia carotovora* e certe *Pseudomonadaceae* come *Pseudomonas fluorescens* (*marginalis*) (Bartz *et al.*, 2002). Altri microrganismi che causano marciumi non molli sono riconducibili a *Corynebacterium*, *Xanthomonadaceae*, *Pseudomonadaceae* (Bartz *et al.*, 2002).

Un fattore intrinseco che è in grado di influenzare la flora microbica dei vegetali è il pH. Il basso pH di molti frutti (solitamente intorno o inferiore a 4) è uno dei fattori più importanti che influenza la loro microflora: di solito lieviti e muffe, microrganismi predominanti nei frutti, crescono meglio in condizioni di acidità. Solo pochi batteri sono in grado di crescere in tali condizioni.

Tabella 2: Principali Acidi presenti in diversi frutti

Fruit	pH	Nonvolatile Acids
Apple	3.3–4.1	Malic, citric, lactic
Banana	4.5–5.2	Citric, malic, tartaric
Blackberry	3.0–4.2	Malic, citric, isocitric
Cantaloupe	6.2–6.5	Citric, malic
Cherry	3.2–4.7	Malic, citric, isocitric
Cranberry	2.5–2.7	Citric, malic, quinic
Grapefruit	2.9–3.4	Citric
Grape	3.0–4.5	Tartaric, malic
Guava	3.0–3.2	Citric, malic, lactic
Lemon	2.2–2.4	Citric
Mango	3.3–3.7	Citric, tartaric
Orange	3.0–4.0	Citric, malic
Papaya	4.5–6.0	Citric, malic, ketoglutaric
Passion fruit	2.6–3.3	Citric, malic
Peach	3.1–4.2	Malic, citric
Pear	3.4–4.7	Malic, citric
Pineapple	3.2–4.0	Citric, malic
Plum	2.8–4.6	Malic, quinic
Watermelon	5.8–6.0	Citric, malic

(Worobo *et al.*, 2004)

1.6.1 Microrganismi saprofiti

I microrganismi che prevalgono nei frutti e nei vegetali sono di solito presenti in campo o in post raccolta e hanno origine dalla microflora epifitica, ovvero superficiale, della materia prima. *P. fluorescens*, *E. herbicola* ed *E. agglomerans* sono i principali componenti della flora epifitica della maggior parte dei vegetali (Geeson, 1979). Sono state ritrovate anche popolazioni di *Leuconostoc* spp. in concentrazione di 2.5×10^4 UFC/g ed è stata recentemente testata la sua attività antagonista nei confronti di *Listeria monocytogenes* (Trias *et al.*, 2008).

In frutti e vegetali, i lieviti possono raggiungere livelli di carica cellulare di circa 5-6 log UFC/g (Badosa *et al.*, 2008). Sono state identificate anche colonie di *P. fluorescens* ad attività pectolitica, *Xanthomonas* spp., *Cytophaga* spp. e *Flavobacterium* spp. (Liao *et al.* 1986; Liao *et al.* 1987; Liao *et al.*, 1987b). Generalmente le *Pseudomonadaceae* ad attività pectolitica sono conosciute per i

marciumi molli in ortaggi a foglia e rappresentano una parte molto significativa della flora epifitica: alcuni studi riportano cariche di 10^4 UFC/g su foglie di cavolo (Geeson, 1979).

Le popolazioni di coliformi sono ridotte dalla disinfezione dell'acqua di irrigazione, mentre i batteri pectolitici generalmente non ne risentono. La presenza di *Pseudomonadaceae* sui vegetali presumibilmente non deriva da una contaminazione esterna, perché sono batteri endemici. Al contrario, *Erwinia* spp., una delle principali cause dei marciumi molli nei vegetali è stata isolata sporadicamente da vegetali freschi minimamente processati. *P. cichorii*, agente degradativo di lattuga e cicoria, non è stato ritrovato in vegetali minimamente processati.

1.6.2 Microrganismi patogeni

I batteri patogeni generalmente ritrovati in vegetali e frutti contaminati includono *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (Beuchat, 1996). Diversi studi dimostrano come molti metodi di sanitizzazione quali il lavaggio con cloro, l'irradiamento e l'atmosfera modificata sono in grado di aumentare e conservare la shelf-life dei prodotti (Jacxsens *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005). D'altra parte è stato dimostrato che alcuni patogeni come *Aeromonas hydrophila* e *L. monocytogenes* sono in grado di sopravvivere o di crescere in atmosfera modificata (Garcia-Gimeno *et al.*, 1996; Jacxsens *et al.*, 1999). Recentemente per contrastare lo sviluppo di patogeni in prodotti ortofrutticoli sono stati individuati diversi microrganismi definiti come bioprotettivi: ad esempio *Pseudomonas* ha dimostrato di prevenire la crescita di *E. coli* nelle mele. Più recentemente ceppi di *Candida* sp., *Gluconobacter* sp., *Discosphaerina* sp. e *Metschnikowia* sp. hanno dimostrato avere attività antagonista contro *L. monocytogenes* e *Salmonella* enterica in mele fresche tagliate (Leverentz *et al.*, 2006). Anche alcune specie di batteri lattici sono state utilizzate per prevenire la crescita e l'attività di microrganismi indesiderati: il loro meccanismo d'azione include la produzione di acidi organici, batteriocine e produzione di composti antimicrobici a basso peso molecolare (Alakomi *et al.*, 2000; Cleveland. *et al.*, 2001).

1.6.3 Lieviti e muffe

Lieviti e funghi, solitamente microrganismi unicellulari, non rappresentano un gruppo tassonomico omogeneo. Si possono ritrovare 215 specie importanti negli alimenti (Deak *et al.*, 1987) e si stima che 32 generi sono associati ai frutti e solo pochi lieviti sono patogeni per gli uomini e gli animali (Pfaff *et al.*, 1978). I lieviti sono ampiamente presenti nell'ambiente, nelle piante e sono stati isolati dalle foglie, fiori ed essudati vegetali, come sulla superficie di frutti (Pfaff *et al.*, 1978). Sulle mele, ad esempio sono stati ritrovati in concentrazioni da 10^3 a 10^4 UFC/g (Swanson *et al.*, 1985). La crescita dei lieviti è condizionata dal tipo di substrato vegetale e dalla loro capacità di utilizzo del substrato stesso (Worobo *et al.*, 2004): lieviti altamente fermentativi come *Saccharomyces cerevisiae* possono determinare l'esplosione dei container dove i vegetali sono trasportati. La fermentazione alcolica dei lieviti sui prodotti vegetali può portare alla formazione di anidride carbonica ed etanolo; tuttavia si possono produrre anche glicerolo, acetaldeide, acido piruvico ed acido α -chetoglutarico. Alcune specie di lieviti ossidativi come *Brettanomyces* producono acido acetico nel vino ed in alcuni frutti. Alcuni lieviti posseggono enzimi idrolitici che degradano le pectine, amido e proteine (Pfaff *et al.*, 1978; Biely *et al.*, 1990).

Tabella 3: Principali lieviti in prodotti vegetali

Some Yeast Genera Associated with Fruit Products

Genus	Sexual Spores	Fermentative	Other Properties
<i>Brettanomyces</i>	—	+	Acetic acid produced
<i>Candida</i>	—	±	Pseudo and septate hyphae
<i>Citeromyces</i>	+	+	Warty ascospores
<i>Clavispora</i>	+	+	Clavate ascospores
<i>Cryptococcus</i>	—	—	Capsules, sometimes hyphae
<i>Debaromyces</i>	+	±	Warty ascospores
<i>Dekkera</i>	+	+	Ogival, acetic acid produced
<i>Endomyces</i>	+	±	Blasidiospores
<i>Endomycopsella</i>	+	—	Clavate conidia
<i>Filobasidiella</i>	+	±	Basidiospores
<i>Geotrichum</i>	—	±	Septate hyphae, arthrospores
<i>Hanseniaspora</i>	+	+	Lemon-shaped cells
<i>Hansenula</i>	+	±	Hat-shaped ascospores
<i>Issatchenkia</i>	+	+	Pseudohyphae
<i>Leucosporidium</i>	+	±	Teliospores, hyphae
<i>Lodderomyces</i>	+	+	Pseudohyphae
<i>Metschnikowia</i>	+	+	Club-shaped ascospores
<i>Nadsonia</i>	+	+	Bipolar budding
<i>Pichia</i>	+	±	Hat/saturn-shaped ascospores
<i>Rhodospidium</i>	+	—	Carotenoid pigments
<i>Rhodotorula</i>	—	—	Carotenoid pigments
<i>Saccharomyces</i>	+	+	Strong fermenters
<i>Saccharomycopsis</i>	+	±	Septate hyphae
<i>Schizosaccharomyces</i>	+	+	Cell fission, no budding
<i>Sporidioabolutus</i>	+	—	Dark teliospores
<i>Sporobolomyces</i>	—	—	Carotenoid pigments
<i>Torulasporea</i>	+	+	No hyphae
<i>Trichosporon</i>	—	—	Arthroconidia
<i>Wickerhamiella</i>	+	+	One rough ascospore
<i>Williopsis</i>	+	+	Ascospore saturn shaped
<i>Yarrowia</i>	+	—	Septate hyphae
<i>Zygosaccharomyces</i>	+	+	Preservative-resistant

Source: Barnett, J.A., Payne, R.W., and Yarrow, D. 1983. *Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.; Deak, T. and Beuchat, L.R. 1987. Identification of foodborne yeasts. *J. Food Prot.*, 50: 243-264.

(Barnett et al., 1987)

I funghi filamentosi o muffe rappresentano un gruppo importante nella microflora vegetale per una serie di ragioni: molte specie sono xerofile per cui sono agenti di potenziale contaminazione di alimenti con bassa a_w ; la crescita di muffe può portare a modifiche di flavour in vini, frutti ed altri prodotti derivanti da matrici vegetali; le ascospore prodotte sono molto resistenti al calore e possono rimanere anche dopo la pastorizzazione; i prodotti del metabolismo fungino sono tossici per molti animali tra cui l'uomo. Più di 100 metaboliti tossici vengono prodotti da più di 200 muffe differenti (Krogh, 1989). La patulina è la più comune micotossina nei frutti processati ed è prodotta da una serie di muffe come *Penicillium expansum*. Essa è la causa maggiore di marciume nelle mele ed è resistente a trattamenti termici e ai bassi pH (3.5 a 5.5). Tracce di tale composto sono comuni nei succhi di mela e nei prodotti a base di mela. Recentemente, la *Food and Drug Administration* (FDA) ha decretato che il Uso di acqua elettrolizzata per la decontaminazione di mele

massimo livello ammissibile di patulina nei prodotti finiti deve essere inferiore a 50 ppb per i succhi di mela (*Food and Drug Administration*, 2001).

Muffe resistenti al calore come *Byssochlamys*, *Eurotium*, *Neosartorya* e *Talaromyces* producono micotossine in numero elevato quando la crescita avviene in prodotti di frutta processati termicamente. La crescita di queste specie non dà tuttavia problemi alla salute umana. Il basso pH (< 4.5) della maggioranza dei frutti consente principalmente le contaminazioni di tipo fungino, mentre il pH degli ortaggi tra 5 e 7 porta ad una contaminazione anche batterica. I funghi possono essere divisi in due gruppi: i fitopatogeni, che infettano le piante prima della raccolta, ed i saprofiti che attaccano i prodotti in post raccolta. Un'importante peculiarità dei microrganismi infestanti, sia funghi che batteri, è l'abilità di secernere enzimi pectolitici in grado di disgregare i tessuti cellulari, causando talvolta la fuoriuscita di liquidi marcescenti. Questa contaminazione viene detta marciume. La differente nomenclatura dei diversi marciumi è indicata a seconda della loro diversa manifestazione visiva (Tabella 4).

Tabella 4: Principali funghi fitopatogeni

Mycotoxins Associated with Fruit Products

Fungus	Mycotoxin	Fruit	Reference
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxins	Figs	Sharman et al., 1991
<i>Byssochlamys</i>	Patulin	Canned juices, etc.	Davis and Diener, 1987
	Byssochlamic acid		
	Byssotoxin	Frisvad and Samson, 1991	
	Malformins		
	Patulin		
<i>Eurotium</i>	Physicon	Preserves	Frisvad and Samson, 1991
<i>Fusarium moniliforme</i>	Trichothecenes	Banana	Chakrabarti and Ghosal, 1986
	Zearalenone		
<i>Neosartorya</i>	Fumitremorgans	Canned juices, etc.	Frisvad and Samson, 1991
	Mevinolins		
	Terrein		
	Trypacidin		
	Tryptoquivalins		
	Verruculogen		
<i>Penicillium expansum</i>	Patulin	Apple juice	Liewen and Bullerman, 1992
<i>Talaromyces flavus</i>	Dehydroaltenusin	Canned juices, etc.	Frisvad and Samson, 1991
	Mitorubrins		
	Vermicelline		
	Vermistatine		
	Wortmannin		
	Wortmannolone		

(*Worobo et al., 2004*)

Un'importante causa di contaminazione è il *Penicillium*, di cui molte specie sono in grado di attaccare i frutti e più del 30% delle perdite sono attribuite a questo genere. Ortaggi e frutti come pomodori, cucurbitacee, patate e barbabietole sono suscettibili a tale microrganismo che si presenta come una colonia vellutata, con un centro blu-verde, con essudati giallastri e conferisce al prodotto un odore sgradevole. Un altro importante agente contaminante è il *Rhizopus*, che contamina diversi ortaggi e frutti, come patate e fragole, soprattutto durante il trasporto senza refrigerazione. Tale muffa determina sulla superficie dei prodotti vegetali aree pastose con miceli grigiastri.

Fusarium è un fungo presente nel terreno che sporula in inverno, con il clima freddo e si trova nell'erba e sulle piante. Si trova spesso nelle radici della banana ed altri frutti e vegetali come pomodori e melone.

Molte malattie sono causate da specie appartenenti ai generi *Basidiophora*, *Bremia*, *Peronospora*, *Phytophthora*, *Plasmopara*, *Pseudoperonospora* e *Sclerospora*. Esse formano per lo più macchie bianche, viola, blu o grigie sulle foglie in condizioni di notevole umidità climatica. Sulle foglie superficiali si ritrovano macchie dal verde chiaro al giallo o marrone.

1.6.4. Batteri degradativi (pectolitici)

I batteri sono una delle principali cause di degradazione di vegetali in campo ed in post raccolta. L'abilità dei batteri di degradare i tessuti delle piante è da attribuire alla loro capacità di degradare le sostanze pectiche presenti nei tessuti cellulari dei vegetali. Il maggiore costituente delle sostanze pectiche sono i ramno-galatturonani in cui una parte dei residui di acido galatturonico sono presenti sono forma di metil-esteri.

La capacità dei batteri di rompere i tessuti delle piante risulta dalla loro capacità di produrre enzimi in grado di attaccare i polimeri tramite idrolisi, quali idrolasi o liasi. I batteri che hanno tale capacità sono *E. carotovora* ed alcune *Pseudomanadaceae* (*Pseudomonas marginalis*) (Nguyen *et al.*, 1994).

1994.). Questi microrganismi contribuiscono anche alla contaminazione dei prodotti preparati e *ready-to-eat* (Garcia-Gimeno *et al.*, 1997). Gli enzimi pectici sono prodotti anche in altre specie di *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*.
Uso di acqua elettrolizzata per la decontaminazione di mele
Simone Mazzini - 2015

Altri batteri causano il rammollimento dei tessuti come *Aeromonas liquefaciens*, associata al rammollimento delle olive (Vaughn *et al.*, 1969), oltre a *Cytophaga* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Leuconostoc mesenteroides*, *Agrobacterium tumefaciens*. Altri batteri risultano avere enzimi pectici, ma non causano il rammollimento dei tessuti, come *Flavobacterium* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Y. Enterocolitica*, *Rhizobium* spp., *Arthrobacter* spp. e *Bacteriocides* spp.

1.6.5 Batteri lattici

I batteri lattici (Tabella 5) sono microrganismi Gram positivi, catalasi negativi che crescono ottimamente in condizioni anaerobiche. I lattobacilli sono bastoncellari, mentre pediococchi e *Leuconostoc* sono presentano cellule di forma sferica. Le specie omofermentanti producono prevalentemente acido lattico e zuccheri esosi, mentre le forme eterofermentanti producono una molecola di acido lattico, una di diossido di carbonio ed uno o due composti carboniosi come acido acetico od etanolo. Gli streptococchi (*Lactococcus* e *Enterococcus*) sono generalmente poco presenti sui frutti ed ortaggi probabilmente perché sono meno acidotolleranti.

Tabella 5: Principali batteri lattici presenti nei frutti

Genus	Morphology	Fermentation	Species
<i>Lactobacillus</i>	Rods	Homofermentative	<i>L. plantarum</i>
<i>Lactobacillus</i>	Rods	Heterofermentative	<i>L. brevis</i> <i>L. collinoides</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. fructivorans</i> <i>L. hilgardii</i>
<i>Leuconostoc</i>	Cocci	Heterofermentative	<i>L. mesenteroides</i> <i>L. paramesenteroides</i> <i>L. oenos</i>
<i>Pediococcus</i>	Cocci-tetrad	Homofermentative	<i>P. pentosaceus</i>

(Worobo *et al.*, 2004)

I batteri lattici sono stati isolati in molti alimenti, incluso grano, frutta e vegetali ed è stata testata la loro capacità di inibire la crescita e lo sviluppo di patogeni come *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus* (Trias *et al.*, 2008).

1.6.6 Batteri acetici

I batteri acetici sono Gram negativi, aerobi, bastoncellari e sono separati in due generi: *Acetobacter* e *Gluconobacter*. Entrambi ossidano l'etanolo ad acido acetico in condizioni di acidità; *Acetobacter* ossida l'acido acetico ad anidride carbonica e per questo viene chiamato superossidante. I generi possono essere suddivisi anche a seconda del loro utilizzo del lattato. Il danneggiamento dei frutti avviene per fermentazione alcolica dai lieviti, seguita dalla crescita di batteri acetici. L'uva invasa da *Botrytis cinerea* può mostrarsi tramite un marciume acido esterno determinato da livelli di contaminazione di oltre 10⁶ UFC/g di *Acetobacter aceti* ed *A. pasteurianus* che sono le specie predominanti. Dal momento che questi batteri sono aerobi obbligati, si trovano in vino, sidro e succhi. La crescita in succhi che non contengono etanolo porta ad un'ossidazione degli zuccheri esosi in acido gluconico e ketogluconico (Drysdale. *et al.*, 1988). Altri prodotti del metabolismo sono il di-idrossiacetone, il 2,3 butandiolo e l'acetoino. Alcuni ceppi di *Acetobacter pasteurianus* e *Gluconobacter oxydans* producono microfibrille composte di cellulosa che portano alla formazione di flocculi in differenti succhi di frutta (Juven *et al.*, 1985).

1.6.7 Coliformi

Alcune specie di coliformi si possono ritrovare sulla superficie dei frutti. Numerosi coliformi ed altre specie di enterobatteri sono state isolate da numerosi frutti ed ortaggi (Goverd *et al.*, 1979). L'incremento di questi microrganismi può derivare da fenomeni di antibiotico resistenza e dalla fertilizzazione del terreno. Gli isolati da prodotti freschi includono specie appartenenti a *Klebsiella*, *Enterobacter* ed altri generi quali *Serratia*, *Citrobacter*, *Kluyvera*, *Pantoea*,

Flavimonas, *Hafnia*, e quattro identificati come *E. coli* (Falomir M.P. *et al.*, 2010).

1.7 Principali malattie biotiche ed abiotiche delle pomacee

Lo sviluppo e la produzione delle piante dipende dalla difesa delle stesse contro le eventuali avversità; tutto ciò che colpisce la salute delle piante ne colpisce lo sviluppo e la produzione, riducendone l'utilità nei confronti dell'uomo.

I microorganismi, tra i quali primeggiano per importanza i funghi ed i batteri, i virus e le sfavorevoli condizioni ambientali, sono le principali cause di malattie delle colture arboree.

1.7.1 Malattie biotiche di origine fungina e batterica delle pomacee

Marciume lenticellare

- *Neo fabrea alba* (forma sessuata)
- *Phlyctema vagabunda* (forma asessuata)

È un agente patogeno che crea forti perdite nel post-raccolta, è un marciume tipico delle *pomacee*, difficilmente si trova su altri frutti.



Figura 3: Marciume lenticellare

La malattia sui frutti si presenta con macchie circolari, di colore marrone, depresse, incentrate su una lenticella di colore più chiaro.

Sono aree marcescenti su cui compaiono successivamente cuscinetti biancastri di micelio; il marciume si presenta come un triangolo con la base che corrisponde all'epicarpo del frutto e la punta è rivolta verso il cuore del frutto.

Al momento della raccolta è impossibile verificarne la presenza, in quanto le infezioni latenti sui frutti si manifestano 3-4 mesi dopo la conservazione frigorifera.

Le varietà più sensibili sono la Pink lady, Golden, Red Delicious, mentre altre varietà come la Grammy Smith sono resistenti a questo patogeno. Il patogeno è presente nelle piante sotto forma di cancri o colonizza le foglie che poi successivamente cadono.

Presente sottoforma di micelio, con le prime piogge e l'abbassamento termico il patogeno si revitalizza, inizia la produzione di acervuli, i quali contengono spore, la pioggia veicola le spore verso il frutto che germinano sul suo epicarpo e penetrano all'interno attraverso le lenticelle. Il fungo non ha la possibilità di colonizzare il frutto acerbo, ma solo durante la maturazione.

Il frutto passa attraverso 3 fasi distinte:

- Fase 1 → Refrattarietà (frutto acerbo).
- Fase 2 → Colonizzazione del frutto se la lenticella viene schiacciata o danneggiata con successiva diffusione del marciume per danneggiamento dei tessuti.
- Fase 3 → Suscettibilità del frutto, la colonizzazione dipende dalla maturazione del frutto.

I trattamenti devono essere effettuati direttamente sul campo (lotta preventiva sul campo) e prevedono l'utilizzo di fungicidi di copertura con azione preventiva. I trattamenti in post-raccolta sono effettuati con fungicidi endoterapici, di cui il più comune è il TBZ (tiabendazolo).

Muffa verde-azzurra

È un fungo il quale rappresenta la maggior parte delle malattie delle *pomacee*.

- *Penicillium expansum*

Uso di acqua elettrolizzata per la decontaminazione di mele
Simone Mazzini - 2015

- *Penicillium comune*
- *Penicillium solitium*

Malattia biotica rappresentata da un fungo agamico che appartiene ai deuteromiceti (privi della forma sessuta); insieme ai marciumi lenticellari rappresentano la totalità dei marciumi delle *pomacee*.



Figura 4: *Penicillium* spp.

Il marciume si presenta rotondeggiante, molto molle, sempre centrato su di una ferita.

Penicillium è un patogeno tipico del post-raccolta; ha spore molto piccole e leggere ed è veicolato dall'aria, ma anche dall'acqua.

Questo fungo cresce su moltissimi substrati ed è quindi molto diffuso nell'ambiente.

È un patogeno tipico da ferita, ma può essere veicolato tramite contatto diretto con un frutto sano, nel quale l'alta concentrazione del patogeno produce enzimi litici i quali penetrano nella cuticola ed iniziano la colonizzazione.

Quando le spore giungono su di una ferita germinano e penetrano, nel giro di una settimana, colonizzando completamente il frutto; quando il frutto è completamente colonizzato il fungo produce 10^{10} spore e si diffonde sia nell'aria, che per contatto. Tale fungo non è in grado di penetrare la cuticola.

Come riportato precedentemente, il genere *Penicillium* produce la patulina, una micotossina cancerogena con effetti dannosi sul sistema cardio-circolatorio (De Cicco *et al.*, 2008). La legge ne ammette una concentrazione non superiore ai 50

μL nei succhi di frutta. Fino a 30 anni fa la concentrazione di patulina nei succhi era 10 volte superiore a quella attuale; la causa di tale contaminazione, è da attribuire all'utilizzo non regolamentato di frutti marci per la produzione dei trasformati.

La patulina è una micotossina termolabile; l'unico modo per distruggerla è la fermentazione ad opera dei saccaromiceti, con la quale si ha la produzione del sidro di mele.

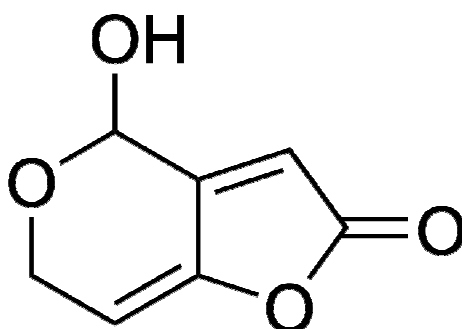


Figura 5: Patulina

Non esiste nessun fungicida efficace utilizzato in post-raccolta contro *Penicillium*; l'unico modo per combattere questo fungo è prevenire le ferite, le quali in prevalenza avvengono in magazzino ad opera delle lavorazioni. Un altro metodo per ritardare la colonizzazione di *Penicillium* consiste nel conservare i frutti a temperature inferiori ad 1°C .

Mucor piriformis

Fungo appartenente agli zygomyceti; non vi è un nome volgare, ma viene chiamato semplicemente "marciume da *Mucor*".

Tipico delle *pomacee*, meno nelle drupacee.

Il fungo è in grado di demolire i tessuti colonizzati, producendo enzimi molto attivi e potenti i quali distruggono le pareti cellulari con successiva fuoriuscita dei liquidi ed imbrattamento dei frutti sottostanti. Oltre a sporcare i frutti, l'imbrattamento è una via di propagazione ed inoculo del patogeno. I liquidi, infatti, contengono sostanze zuccherine che fungono da ottimo substrato per la

proliferazione di altri microorganismi. Tuttavia, se il frutto è acerbo la proliferazione è molto lenta.

Gli enzimi del *Mucor* sono termostabili, tollerano anche trattamenti a 120°C per 20 minuti.

La comparsa di questa malattia è legata a condizioni di campo poiché il fungo si conserva bene nel terreno.

L'utilizzo attuale di varietà di meli nani ha come conseguenza la presenza di alcuni frutti molto vicini al terreno con la probabile possibilità che il frutto si contaminino. Durante la fase di raccolta, inoltre, la terra che si attacca nel fondo del cassone può trasmettere il fungo durante il rovesciamento dei frutti nell'acqua di lavaggio. La disinfezione con acqua non è risolutiva anzi, spesso risulta essere il veicolo per l'inoculo.

Il *Mucor* non produce tossine, il micelio inizialmente bianco, diventa poi nero.

Muffa grigia

- *Botrytis cinerea* (agamica)
- *Botryotinia fuckeliana* (gamica)

Questo fungo non è considerato eccessivamente presente nelle *pomacee*; molti dei trattamenti che vengono fatti in campo proteggono l'ortofrutticolo da *Botrytis* anche in post-raccolta.

Botrytis penetra nel prodotto solo tramite ferita: l'area colpita si imbrunisce e quando il frutto è completamente distrutto compare un micelio di colore grigio (questo non succede nelle pere) o, in condizioni di buio e freddo (cella), bianco (dipende anche dal ceppo).

Sui frutti compaiono gli sclerozi, palline nere rotondeggianti, i quali sono organi di conservazione del fungo: si tratta ammassi di ife nere molto compatte, le quali permettono la sopravvivenza del fungo anche in condizioni molto avverse.

Botrytis è un fungo molto diffuso nell'ambiente: cresce su molti substrati vegetali ed è facilmente veicolato dall'aria e dall'acqua di lavaggio che diventa un veicolante del patogeno. La diffusione del patogeno può avvenire anche per contatto e come *Penicillium* può penetrare attraverso il gambo spezzato.

In post-raccolta non viene effettuata lotta in quanto non è molto presente nelle *pomacee*; inoltre i trattamenti in campo proseguono anche nelle fasi successive di post-raccolta.

Essendo un fungo psicrofilo, cresce anche a 4°C; l'unica prevenzione è la riduzione delle ferite durante la raccolta e lavorazione delle mele.

Alternaria alternata

Fungo delle *pomacee*, chiamato anche “marciume nero” a causa della presenza di un sottile marciume scuro nel suo micelio che lo distingue chiaramente da *Botrytis*.

Alternaria presenta delle spore molto grosse visibili con una semplice lente d'ingrandimento.

Alternaria penetra attraverso le ferite od il calice del frutto e produce lesioni circolari abbastanza ristrette di colore marrone-nero nella polpa. Dopo la contaminazione il tessuto appare disidratato. Colpisce molte derrate, anche se le dimensioni considerevoli delle spore ne impediscono una facile diffusione, mentre la veicolazione tramite acqua è la più frequente.

È un patogeno che compare molto saltuariamente; pertanto non si adottano strategie di lotta, inoltre la sua crescita è molto lenta.

1.7.2 Fisiopatie abiotiche delle pomacee

È importante prendere in considerazione le fisiopatie abiotiche in quanto degradando le pectine delle pareti cellulari, rendendo la mela una derrata facilmente attaccabile da microorganismi patogeni.

Riscaldamento superficiale

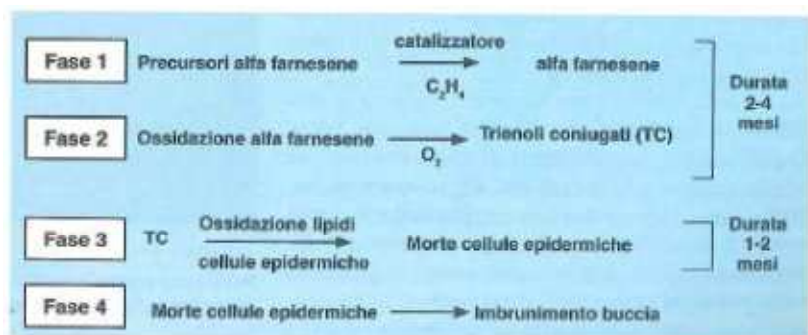
Il riscaldamento superficiale si manifesta tramite un imbrunimento della buccia, ed è una delle malattie più gravi che colpiscono le *pomacee*.

Si verifica un imbrunimento della buccia a chiazze, con forme irregolari sulla superficie del frutto; con il passare del tempo la macchia si scurisce e si disidrata.

Le cause sono l'eccessiva refrigerazione (stress da freddo) e gli sbalzi termici.

In tabella 6 sono riportate le principali reazioni biochimiche coinvolte in tale fenomeno.

Tabella 6: Reazioni biochimiche del riscaldamento superficiale



(De Cicco V. et al., 2008)

Il clima del campo è determinante: se la temperatura di giorno e di notte è alta, è più probabile che i frutti coltivati vadano incontro a questa fisiopatia. Anche l'epoca della raccolta incide sulla successiva formazione di riscaldamento superficiale poiché i frutti raccolti precocemente hanno una incidenza più elevata di riscaldamento mentre quelli più maturi, grazie alla presenza di antiossidanti come antocianine, tocofenoli e carotenoidi, sono più resistenti.

La varietà è molto soggettiva: la Royal Gala è molto tollerante, mentre la Red Delicious è molto sensibile.

Riscaldamento molle

È una fisiopatia relativa alle mele appartenenti al gruppo Golden Delicious, dovuta alla conservazione a basse temperature ($0^{\circ}C$).

Si nota un progressivo inscurimento della buccia fino ad un imbrunimento totale nella fase avanzata; l'unica prevenzione è l'utilizzo di temperature maggiori di $0^{\circ}C$ in fase di conservazione.



Figura 6: Riscaldo molle

Vitrescenza

All'apparenza i tessuti sembrano come ghiacciati, ma la colorazione vitrea che si genera è dovuta ai tessuti extracellulari idropici.

La mela presenta un sapore più zuccherino ed una acidità minore, ma se la vitrescenza è presente in quantità notevoli la conservazione del frutto è compromessa.

L'alterazione si manifesta nel mesocarpo con aree traslucide, di colore verde chiaro, di forma variabile, più o meno estese, localizzate inizialmente in corrispondenza dei fasci vascolari, che tendono espandersi verso le logge carpellari e l'emisfero calicino.



Figura 7: Vitrescenza

La vitrescenza è una fisiopatia che compare già nel campo ed in particolare quando si ritarda la raccolta del frutto.

Le condizioni che determinano la malattia sono le temperature elevate durante il periodo pre-raccolta (settembre) e l'elevata umidità; il frutto assorbe acqua, ma non vi è traspirazione con l'esterno e quindi essendoci un gradiente di concentrazione elevato, l'acqua in eccesso si riversa negli spazi intracellulari dando al frutto la caratteristica di vitrescenza.

Butteratura amara

Appare come una serie di depressioni di colorazione marrone, avvallamenti presenti principalmente verso l'estremità calicina del frutto.

In questa zona appare un tessuto suberoso, di sapore amaro piuttosto profondo.



Figura 8: Butteratura

Tali nuclei rendono poco appetibile il frutto con conseguente deprezzamento in fase di vendita. Questa fisiopatia è particolarmente negativa sia per quanto riguarda la vendita del prodotto fresco, sia per la trasformazione industriale; i nuclei amari vanno rimossi se si volesse utilizzare il frutto per la preparazione di omogeneizzati o puree in quanto conferirebbero qualità organolettiche decisamente negative.

La fisiopatia è già presente in campo, ma si ha un peggioramento delle condizioni del frutto durante la conservazione.

Le cause sono da ricercare negli squilibri nutrizionali da parte dei minerali e nello specifico uno scorretto rapporto tra calcio, magnesio e potassio.

Anche l'età della pianta influisce nella comparsa della bitteratura: infatti la fisiopatia compare quando la pianta è giovane, nei primi anni di produzione. Anche un diradamento poco efficace con successiva produzione di frutti grossi ed una eccessiva potatura, sono tutte cause che portano alla comparsa della bitteratura amara.

La fisiopatia compare prevalentemente nella zona dell'estremità calicina perché il calcio arrivando dal picciolo non riesce a raggiungere la parte inferiore.

L'equilibrio vegetativo della pianta tende a squilibrarsi nei primi anni di produzione, e per compensare questa cosa si effettuano 4/5 concimazioni fogliari con cloruro di calcio, ripetuti ad alternanza di 5 giorni.

1.7.3 Malattie biotiche di origine batterica

La capacità di batteri patogeni di aderire alla superficie dei frutti è un problema piuttosto ingente per la sicurezza alimentare. Infatti la superficie e le caratteristiche biochimiche dei frutti e dei batteri giocano un ruolo sostanziale per la loro colonizzazione. L'adesione batterica in frutti a superficie liscia come la mela rende disponibile una minor superficie di esposizione rispetto ai frutti rugosi per cui la contaminazione è favorita in prossimità del calice e dello stelo.

Una serie di marciumi portano a numerosi scarti post-raccolta, e nonostante la parte interna dei frutti sia considerata sterile, molti batteri tra cui *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Serratia* sono stati ritrovati nei frutti (Lund, 1979).

I cosiddetti marciumi molli possono essere causati da una serie di batteri inclusi *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Clostridium*, *Bacillus* e *Cytophaga*. Il marciume molle causato da *Erwinia* può essere provocato da tre specie: *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *E. carotovora* subsp. *atroseptica* e *E. chrysanthemi* che è la causa di contaminazione maggiore nei vegetali. La malattia non è facile da identificare prima che il marciume sia ormai in uno stadio avanzato. Il tessuto vascolare della radice scolorisce e subentra un marciume dalle tonalità del rosa fino al rossastro-marrone. Quando la malattia progredisce, la pianta avvizzisce. Occasionalmente si presentano lesioni marroni

umide sui piccioli e sulla corona, con formazione di schiuma dal centro della corona. *E. carotovora* subsp. *carotovora* si sviluppa principalmente in climi temperati, mentre *E. c. atroseptica* si manifesta nei climi più freddi. *E. chrysanthemi* si sviluppa maggiormente nei climi tropicali e subtropicali., *E. carotovora* è considerato il patogeno più distruttivo per la frutta e può essere isolato da piante, suolo e dall'erba, più raramente su foglie e frutti. Le specie di *Erwinia* hanno la capacità di produrre enzimi pectolitici come pectin-metilesterasi (PME), poligalatturonasi (PG) e pectin-liasi (PNL). Quest'ultimo ha dimostrato la maggior capacità di disintegrare i tessuti *in vitro* (Payne, 1987). I marciumi molli possono essere causati anche da *Pseudomonadaceae* ad attività pectolitica., tra cui *P. viridiflava* e *P. fluorescens*.

Questi microrganismi sono ampiamente presenti in natura e possono essere isolati da suolo, acqua di irrigazione, rizosfera e superficie di frutti. *Pseudomonas* spp. è responsabile di una buona parte del decadimento della frutta fresca o conservata a basse temperature. Le mele sono molto suscettibili all'attacco di *Pseudomonas syringae*: tale microrganismo supera l'inverno, colonizzando i germogli e si moltiplica sulla superficie fogliare in primavera. Le piogge conducono il batterio sui frutti, provocando maculature rossastre.

I batteri ad attività pectolitica possono favorire la penetrazione anche di patogeni per l'uomo, non propriamente presenti nei vegetali come *Salmonella*, *Lysteria monocytogenes* ed *E.coli* che si possono ritrovare nelle acque di irrigazione, nei residui organici animali, insetti, nelle acque di scarico e nell'ambiente (Beuchat, 1996) e, tramite queste aperture, possono penetrare nel frutto. È ormai noto scientificamente che microrganismi enterici patogeni possono sopravvivere a lungo su tali prodotti, soprattutto se minimamente processati (Alegre *et al.*, 2009) *Erwinia amylovora*, causa del cosiddetto fuoco batterico, è uno dei batteri più distruttivi per il melo: il patogeno penetra in fiori e germogli e spesso si manifesta in primavera come sperone sui fiori che diventano successivamente di colore scuro brunastro. Il batterio penetra nei frutti tramite il peduncolo ed esce intaccando le foglie che in breve diventano scure. Il ritrovamento di *Erwinia amylovora* ha rivelato la penetrazione di *Enterobacteriaceae* nel 5 % di alcune mele esaminate (Roberts *et al.*, 1989), tra cui è stata registrata anche

Capitolo 1 – La mela

l'internalizzazione di *E. coli* (Seo *et al.*, 1999). Altri batteri enterici possono trovarsi sulla superficie del frutto come *Enterobacter*, *Klebsiella*, e *Serratia*. La maggior parte dei batteri enterici non sono pectolitici, e quindi non causano la contaminazione interna dei frutti; tuttavia, questi influenzano la crescita o l'abbattimento di microrganismi patogeni o sporigeni, tramite la competizione per i nutrienti. Nel primo studio europeo effettuato sulla food safety di mele fresche, alcuni campioni di Golden Delicious sono stati analizzati per identificare la presenza di *Enterobacteriaceae*, coliformi termo tolleranti, *E. coli* ed *E.coli* O157:H7 e *Salmonella* spp. 36 campioni analizzati hanno dimostrato una conta di *Enterobacteriaceae* molto variabile. Ceppi di *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* ed *Escherichia* sono stati isolati dai campioni. (Abadias *et al.*, 2006). Una contaminazione da *E. coli* è molto rara e difficile da individuare: nessuno degli *E. coli* isolati ha dimostrato avere i geni patogeni per l'uomo e nessuno dei campioni è risultato positivo per *Salmonella* (Abadias *et al.*, 2006).

CAPITOLO 2 - METODI DI SANITIZZAZIONE DEI PRODOTTI ORTOFRUTTICOLI

La sanificazione è una procedura che ha per oggetto la progettazione, lo sviluppo, l'implementazione, il mantenimento, il ripristino e/o il miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie. In particolare si occupa delle operazioni necessarie per mantenere pulito e salubre l'ambiente in cui si producono, lavorano, preparano e conservano alimenti. Tuttavia, la sanificazione non concerne solo la pulizia: se compiuta in modo appropriato, può migliorare le condizioni igieniche e la qualità estetica di esercizi commerciali, strutture pubbliche ed abitazioni; può anche migliorare lo smaltimento dei rifiuti, contribuendo alla riduzione dell'inquinamento ed alla difesa dell'ambiente dal punto di vista ecologico.

Se correttamente applicate, le operazioni di sanificazione hanno quindi un effetto benefico sul nostro ambiente. La sanificazione è considerata una scienza applicata in quanto permettendo un controllo dei rischi microbiologici, chimici e fisici all'interno degli ambienti in cui vengono trattati alimenti, svolge un ruolo importante nella tutela della salute umana e nella gestione di fattori ambientali che la influenzano (Marriott *et al.*, 2008).

Come risposta alle sempre più crescenti richieste da parte dei consumatori di ridurre od eliminare gli additivi di sintesi chimica, numerosi sforzi sono stati condotti per trovare alternative naturali per prevenire la crescita di batteri e funghi nei prodotti alimentari minimamente processati. Diversi composti naturali con capacità antimicrobica come fenoli, chitosano, aldeidi ed acidi organici sono stati testati per dimostrare l'efficacia di questi trattamenti antimicrobici alternativi (Lanciotti *et al.*, 2004). A tale proposito sono stati studiati diversi composti naturali come oli essenziali di coriandolo, menta, vanillina, prezzemolo e buccia di agrumi, oltre a composti carbonilici, o isotiocianati ottenuti da diverse *Brassicaceae* (Gonzalez-Aguilar *et al.*, 2010). I limiti principali per il loro utilizzo sono dovuti a forti odori ed al gusto che possono conferire al prodotto.

Anche l'uso di antimicrobici alternativi, utilizzati con procedure di immersione, e l'impiego di rivestimenti edibili sono risultati utili nell'estendere la shelf-life di frutta fresca tagliata. Buoni risultati sono stati ottenuti anche attraverso l'applicazione di confezionamento in atmosfera modificata (MAP) e metodi fisici come la luce ultravioletta (UV), trattamenti termici ed irraggiamento (Abadias *et al.*, 2011).

La composizione e le proprietà chimico-fisiche della materia prima condizionano il carico microbiologico dei prodotti finali ed i trattamenti applicati sono fondamentali non solo per la riduzione di tale carica, ma devono anche prevenire la perdita di qualità durante la conservazione.

Diversi composti chimici sono stati utilizzati per ridurre le popolazioni batteriche sulla frutta e risultano ancora essere i trattamenti più utilizzati. In particolare, le sostanze chimiche a base di cloro, quali cloro liquido, ipoclorito e biossido di cloro, sono solitamente utilizzati a livelli di 50-200ppm di cloro libero e con tempi di contatto con il prodotto inferiori a 5 minuti. I trattamenti con acqua clorata vengono utilizzati per decontaminare i prodotti freschi, ma in alcuni paesi europei, tra cui Germania, Paesi Bassi, Svizzera e Belgio, il loro uso è vietato, per via della loro potenziale tossicità (Ölmez *et al.* 2009). Infatti, il cloro reagendo con la materia organica naturale forma dei sottoprodotti alogenati cancerogeni (Gil *et al.*, 2009). I conservanti alimentari chimici sono, inoltre, responsabili di occasionali reazioni allergiche in soggetti sensibili.

Recenti studi hanno anche dimostrato che queste sostanze chimiche sono in grado di rimuovere completamente o di inattivare i microrganismi presenti nei prodotti freschi.

Recentemente sono stati eseguiti diversi studi con lo scopo di sostituire il lavaggio con acqua clorata con altri metodi meno invasivi. Anino *et al.* (2006) hanno suggerito come metodo per ridurre le popolazioni microbiche e prolungare la shelf-life di frutta lavaggi con acqua e lattato di calcio. Sono state studiate anche le proprietà antibatteriche del propionato di calcio, in quanto è in grado di disaccoppiare i processi microbici di trasporto, e trattamenti per immersione in acqua ossigenata (H₂O₂) (Rico *et al.*, 2007).

Recentemente sono stati ottenuti risultati molto positivi sull'utilizzo di antimicrobici naturali per il lavaggio di vegetali. Una buona prova è fornita dallo studio di Roller e Seedhar (2002) che hanno evidenziato come il carvacrolo e l'acido cinnamico possano ritardare il deterioramento microbico di prodotti minimamente processati a base di melone e kiwi. I frutti sono stati pelati, tagliati a spicchi e successivamente immersi per 1 minuto in soluzioni contenenti 1, 5, 10 o 15 mM di carvacrolo o 1 mM di acido cinnamico. L'immersione del kiwi in soluzioni contenenti concentrazioni di carvacrolo di 5-15 mM ha portato ad una riduzione della carica microbica totale da 6.6 a meno di 2 log UFC/g dopo 21 giorni di conservazione a 4° C. Anche il trattamento con 1 mM di acido cinnamico ha ridotto la conta su entrambi i prodotti, estendendone notevolmente la conservazione.

Raybaudi-Massilia *et al.* (2007) hanno valutato l'estensione della *shelf-life* di mele di IV gamma a due stadi di maturazione (parzialmente mature e mature) impiegando sostanze naturali: questo studio ha dimostrato una riduzione del tasso di crescita ed un aumento della fase di latenza dei batteri mesofili e psicofili, lieviti e muffe, e ha portato ad una estensione di vita del prodotto di 13 giorni.

Un approccio interessante e più recente è stato proposto da D'Amato *et al.* (2010) che hanno esaminato l'attività di alcuni composti naturali per prolungare la vita commerciale di macedonie conservate a 4, 8 e 12° C. In particolare si è studiato l'effetto del chitosano, di miele e succo di ananas (utilizzata come soluzione di riempimento) sulla crescita di batteri mesofili, psicotrofi, lattici e lieviti. Il miele ha mostrato il massimo effetto antibatterico sui batteri mesofili e psicotrofi. L'attività antimicrobica del chitosano ha avuto effetto sulla crescita di tutti i gruppi microbici considerati, in particolare, in condizioni di conservazione refrigerate.

Tra i numerosi approcci "naturali", sono stati proposti, per ridurre la popolazione microbica, l'acido citrico ed ascorbico. L'azione antimicrobica di tali acidi è dovuta alla riduzione del pH dell'ambiente, all'interruzione del trasporto di membrana e/o la permeabilità, l'accumulo di anioni, od alla riduzione del pH intracellulare dovuto alla dissociazione degli ioni idrogeno dall'acido.

2.1 Metodi tradizionali per la sanificazione dei prodotti ortofrutticoli

Negli stabilimenti di produzione e/o trasformazione dei prodotti ortofrutticoli, un programma di sanificazione efficace richiede le stesse componenti di base necessarie nelle altre aziende alimentari: detergenti e disinfettanti appropriati, procedure di pulizia efficaci ed una corretta gestione del programma di sanificazione. L'obiettivo ultimo è garantire prodotti igienicamente sicuri e salubri.

Per un'efficace conservazione della frutta e della verdura è essenziale prevenire non solo la contaminazione da parte di microorganismi degradativi e patogeni durante la produzione, ma anche la loro proliferazione nelle successive fasi di lavorazione, stoccaggio e distribuzione. È importante ricordare che le materie prime rappresentano una possibile fonte di microorganismi degradativi e contribuiscono al pool microbico presente all'interno dello stabilimento.

In linea generale, per scegliere il disinfettante chimico più appropriato per una specifica applicazione, occorre conoscere e comprendere le caratteristiche di ciascun prodotto. Poiché i disinfettanti chimici possiedono mediamente una scarsa capacità di penetrazione, i microorganismi presenti in fessure, interstizi, nicchie e depositi di sporco inorganico possono non essere distrutti completamente.

L'efficacia dei disinfettanti chimici è influenzata da diversi fattori:

Tempo di esposizione: in generale la morte della popolazione microbica segue un modello logaritmico; ciò significa che il 90% della popolazione residua verrà eliminato nella successiva unità di tempo, lasciando solo l'1% della popolazione originaria. Il tempo necessario affinché un disinfettante svolga la propria azione dipende dalla carica microbica e dai diversi livelli di sensibilità al disinfettante della popolazione di cellule, a seconda dell'età, della formazione di spore e altri fattori fisiologici.

Temperatura: sia il tasso di crescita dei microorganismi, sia il loro tasso di mortalità dovuto all'applicazione di un prodotto chimico, aumentano con la temperatura. In genere, una temperatura più elevata riduce la tensione

superficiale e la viscosità, aumenta il pH e determina altri cambiamenti che possono favorire l'azione battericida. All'aumentare della temperatura, i disinfettanti chimici diventano più aggressivi nei confronti delle membrane cellulari; generalmente l'azione battericida è largamente superiore alla velocità di crescita dei batteri, quindi l'effetto complessivo di un aumento di temperatura è l'incremento del grado di distruzione dei microorganismi.

Concentrazione: una maggiore concentrazione del disinfettante aumenta il grado di distruzione dei microorganismi.

pH: l'attività di composti antimicrobici che si presentano in forme chimiche diverse all'interno di un determinato intervallo di pH può essere notevolmente influenzata da variazioni anche relativamente modeste del pH del mezzo in cui si trovano. Per esempio, il cloro ed i composti dello iodio perdono generalmente efficacia all'aumentare del pH.

Grado di pulizia: l'inadeguata pulizia della materia prima da trattare può ridurre l'efficacia di un disinfettante. Gli ipocloriti ed altri composti del cloro, i composti dello iodio e vari altri disinfettanti ossidanti possono infatti reagire con i residui di sporco di natura organica, rimasti su attrezzature e substrati da sanificare, riducendo la propria efficacia contro i microorganismi.

Durezza dell'acqua: l'attività dei disinfettati è influenzata dalla composizione dell'acqua; in particolare la durezza può inattivarli o diminuirne l'efficacia tamponando il pH. I composti dell'ammonio quaternario sono incompatibili con i sali di calcio e magnesio e non dovrebbero essere utilizzati con acqua contenente concentrazioni di calcio dell'ordine di a 200 ppm, senza l'impegno di un agente sequestrante o chelante; quanto maggiore è la durezza dell'acqua, tanto è minore l'efficacia di questi disinfettanti.

Popolazione microbica: i disinfettanti non possiedono tutti la stessa efficacia nei confronti di ogni tipo di microorganismo. Le spore batteriche sono più resistenti delle forme vegetative, ed i batteri che si trovano all'interno di un biofilm sono più resistenti in quelli in sospensione. Poiché un disinfettante è in grado soltanto di ridurre la carica microbica, quanto più elevato è il numero iniziale dei microorganismi, tanto maggiore sarà il numero dei sopravvissuti. Livelli di contaminazione molto elevati possono prevalere sull'azione dei disinfettanti.

Adesione batterica: é dimostrato che l'adesione di alcuni batteri alle superfici solide determina un aumento della loro resistenza nei confronti di composti sanitizzanti come il cloro (Le Chevalier *et al.*, 1988). Anche fattori limitanti, quali la carenza di nutrienti, determinano il medesimo effetto e, sommandosi all'adesione, causano un'ulteriore aumento della resistenza al cloro (Marriot *et al.*, 2008).

I fattori sopra elencati sono per la maggior parte correlati tra loro; perciò è in genere possibile compensarne uno modificandone un altro. Per esempio, se si prepara la soluzione di disinfettante con acqua fredda, è possibile aumentare la concentrazione od il tempo di contatto affinché l'efficacia risulti analoga a quella ottenibile con una soluzione preparata con acqua calda, usando una concentrazione minore od un tempo di contatto più breve.

Caratteristiche fondamentali di un disinfettante

Il disinfettante ideale dovrebbe avere le seguenti caratteristiche:

- Ampio spettro d'azione con uguale efficacia contro le forme vegetative e batteriche, lieviti e muffe; capacità di distruggere rapidamente i microorganismi;
- Buona resistenza ambientale (mantenimento dell'efficacia in presenza di materiale organico, residui di sapone ed altri detergenti, acqua dura e variazioni del pH);
- Buone proprietà detergenti;
- Assenza di tossicità e di azione irritante;
- Completa solubilità in acqua;
- Assenza od accettabilità di odore;
- Stabilità (sia concentrato sia diluito);
- Facilità di utilizzo;
- Facile disponibilità;
- Economicità;
- Facilità di dosaggio.

Tabella 7: Effetto battericida di alcuni disinfettanti

Gruppo	batteri Gram positivi	batteri Gram negativi	micobatteri	funghi	virus	rapidità d'azione	commenti
alcol	+++	+++	+++	+++	+++	immediata	Attività ottimale a concentrazioni di 60-90%. Nessuna attività residua
clorexidina (2% e 4% acquosa)	+++	++	+	+	+++	intermedia	Attività residua.Reazione allergica rara
composti iodati	+++	+++	+++	++	+++	intermedia	Induce bruciature cutanee.Troppo irritante per essere usato per l'igiene delle mani
iodofori	+++	+++	+	++	++	intermedia	Meno irritante rispetto ai composti iodati.Tolleranza variabile.
derivati fenolici	+++	+	+	+	+	intermedia	Attività neutralizzata dai surfattanti non ionici
Triclosan	+++	++	+	-	+++	intermedia	Accettabilità variabile
ammonii quaternari	+	++	-	-	+		Usati unicamente in combinazione con un derivato alcolico.Impatto ambientale

<http://www.swissnoso.ch/fr/bulletin/articles/article/igiene-delle-mani-nuove-raccomandazioni>

Un disinfettante chimico standard non può essere efficace per ogni tipo di esigenza. Per essere classificato come disinfettante, un prodotto chimico deve superare il Chambers test (Chambers, 1956), secondo il quale i disinfettanti devono distruggere il 99.999% di una popolazione microbica variabile da 75 a 125 milioni di *E. coli* e *S. aureus* entro 30 secondi dell'applicazione, a una temperatura di 20°C. I disinfettanti chimici vengono generalmente suddivisi a seconda del principio attivo.

Tabella 8: Punto critico di disinfezione

PUNTO CRITICO DI DISINFEZIONE					
<i>minima concentrazione di disinfettante (ppm) per inattivare 100.000 microrganismi/ml</i>					
DISINFETTANTE	Tempo di contatto	Punto critico di disinfezione a 4°C	Punto critico di disinfezione a 20°C	Punto critico di disinfezione a 37°C	Punto critico di disinfezione a 60°C
Cloroattivo	10'	375	175	100	instabile
Cloroattivo	20'	110	66	48	instabile
Cloroattivo	30'	50	50	25	instabile
Iodofori	10'	110	40	40	instabile
Iodofori	20'	40	40	40	instabile
Iodofori	30'	40	40	20	instabile
Biguanidi	10'	12600	6500	250	150
Biguanidi	20'	7500	2000	250	60
Biguanidi	30'	7500	2000	225	50

<http://www.ausl.mo.it/dsp/flex/cm/pages/ServeAttachment.php/L/IT/D/D.1cc6620337a43d4aa09c/P/BLOB%3AID%3D4/E/pdf>

2.1.1 Composti del cloro

Il cloro liquido, gli ipocloriti, le cloro ammine organiche ed inorganiche ed il biossido di cloro sono tutti impiegati come disinfettanti e mostrano un'azione antimicrobica variabile. Il cloro gassoso può essere insufflato lentamente in acqua per ottenere l'acido ipocloroso (HClO), che possiede proprietà antimicrobiche. Il cloro liquido è una soluzione acquosa di ipoclorito di sodio (NaClO).

A parità di concentrazione, l'efficacia disinfettante dell'acido ipocloroso è 80 volte superiore a quella dell'ipoclorito. La quantità di HClO che si forma a partire dall'ipoclorito di sodio quando disciolto in acqua dipende dal pH della soluzione: valori di pH più bassi incrementano la formazione di HClO e rendono il sanitizzante più efficace, ma la soluzione risulta meno stabile; quando il valore del pH scende al di sotto di 4.0, si formano quantità crescenti di cloro gassoso, tossico e corrosivo. A valori di pH elevati, la soluzione è più stabile, ma meno efficace (Anon, 2003).

L'acido ipocloroso che si forma dai detergenti a base di cloro uccide le cellule microbiche inibendo l'ossidazione del glucosio mediante ossidazione dei gruppi solfidrici di alcuni enzimi essenziali per il metabolismo dei carboidrati. Si ritiene che il punto chiave di questa azione sia rappresentato dall'aldolasi per il suo ruolo fondamentale nel metabolismo.

Le altre modalità ipotizzate per l'azione del cloro sono:

- Blocco della sintesi proteica;
- Decarbossilazione ossidativa degli aminoacidi in nitriti ed aldeidi;
- Reazioni con acidi nucleici, purine e pirimidine;
- Alterazione del metabolismo dovuto alla distruzione di enzimi chiave;
- Danni al DNA, con perdita della capacità di trasformazione;
- Inibizione del consumo di ossigeno e della fosforilazione ossidativa, associata alla perdita di alcune macromolecole;
- Formazione di derivati tossici (N-cloro) della citosina.

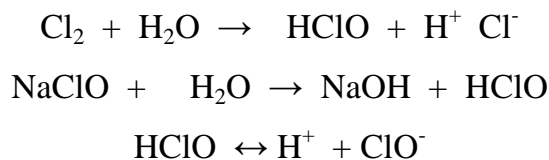
Le cellule vegetative assorbono il cloro libero ma non quello combinato. La formazione delle clorammine all'interno del protoplasma cellulare non provoca inizialmente alcuna distruzione. Alcuni studi, tuttavia, in cui il cloro è stato

marcato con ^{32}P hanno suggerito che all'interno delle cellule si verifica un'alterazione distruttiva della permeabilità della membrana cellulare impedendole quindi un corretto trasporto di nutrienti dall'esterno.

È noto che i composti che rilasciano cloro sono in grado di stimolare la germinazione delle spore e, successivamente, di inattivare le spore germinate.

I disinfettanti granulari a base di cloro sono costituiti principalmente da sali di un composto organico in grado di rilasciare ioni. Il dicloroisocianurato è un carrier del cloro altamente stabile e rapidamente solubile, che in soluzione acquosa rilascia uno dei due ioni cloruro formando NaClO . Gli agenti tampone, che nella formulazione di questi prodotti sono miscelati con il carrier di cloro, controllano il tasso di attività antimicrobica, la corrosività e la stabilità delle soluzioni disinfettanti, ottimizzandone il pH.

Quando il cloro liquido e gli ipocloriti vengono uniti all'acqua, questi composti si idrolizzano formando acido ipocloroso, che si dissocia formando uno ione idrogeno (H^+) ed uno ione ipoclorito (ClO^-). Quando il sodio si combina con l'ipoclorito per formare l'ipoclorito di sodio, si verificano le seguenti reazioni:



A bassi valori di pH l'efficacia antimicrobica dei composti del cloro aumenta, poichè predomina la presenza di acido ipocloroso. All'aumentare del pH, diventa predominante lo ione ipoclorito, che non ha la stessa efficacia battericida. Un altro composto del cloro, il biossido di cloro, non si idrolizza in soluzioni acquose; pertanto la sua azione sembra riconducibile alla molecola associata.

Il cloro è un efficace disinfettante delle superfici in acciaio inox lucidato meccanicamente, in acciaio inox non satinato lucidato elettronicamente ed in policarbonato, sulle quali riduce la carica microbica a meno di 1 LogUFC/cm²; risulta invece meno efficace sulle superfici in acciaio inox satinato lucidato elettronicamente ed in resina minerale, dove la popolazione residua è superiore a 1 Log UFC/cm² (Frank *et al.*, 1997).

Gli ipocloriti, in particolare quelli di calcio e di sodio, oltre ad essere i composti del cloro più attivi, sono anche i più utilizzati. Questi disinfettanti sono in grado di inattivare le cellule microbiche sospese nelle soluzioni acquose con un tempo di contatto che varia da 1.5 a 100 secondi circa. Per la maggior parte dei microorganismi, occorrono meno di 10 secondi per ottenere una riduzione del 90% della popolazione, con livelli relativamente bassi di cloro libero disponibile. Le spore batteriche sono più resistenti agli ipocloriti rispetto alle cellule vegetative ed il tempo necessario per ottenere una riduzione del 90% della carica microbica può variare da circa 7 secondi fino a più di 20 minuti. La concentrazione di cloro libero disponibile necessaria per inattivare le spore batteriche è da 1 a 1000 volte superiore (1000 ppm in confronto a circa 0.6 – 13 ppm) a quella occorrente per le cellule vegetative. Le spore di *Clostridium* spp. sono meno resistenti al cloro rispetto alle spore di *Bacillus* spp.. Questi dati suggeriscono che nella sanificazione, quando la concentrazione di acido ipocloroso è bassa ed il tempo di contatto è breve, gli effetti sulle spore batteriche sono limitati (Marriot *et al.*, 2008).

Gli ipocloriti di calcio e di sodio ed alcuni prodotti a base di fosfato trisodico clorurato possono essere impiegati come disinfettanti dopo la detersione.

Come già riportato, l'acido ipocloroso indissociato è presente alla massima concentrazione quando il pH è intorno a 4.0 e diminuisce rapidamente al crescere del pH; per valori di pH superiori a 5.0 l'ipoclorito (ClO^-) aumenta. Inoltre, quando il pH è inferiore a 4.0 aumenta lo sviluppo di cloro gassoso (Cl_2), che rappresenta un problema per la sicurezza. Poiché valori di pH superiori a 6.5 si formano notevoli quantità di acido ipocloroso, la disinfezione viene di norma eseguita con soluzioni a pH compreso tra 6.5 e 7.0.

Il tempo di reazione dei disinfettanti a base di cloro dipende dalla temperatura. Fino a 52°C, la velocità di reazione raddoppia ad ogni aumento di 10°C. Benché gli ipocloriti siano relativamente stabili, la solubilità del Cl_2 diminuisce rapidamente sopra i 50°C.

L'efficacia di una soluzione tamponata di ipoclorito di sodio nel controllo della contaminazione batterica è stata dimostrata da Park *et al.* (1991), che hanno evidenziato come questa soluzione disinfettante sia efficace nella riduzione di *Salmonella*. La loro ricerca non rilevò effetti indesiderati sulla funzionalità delle proteine, sull'ossidazione dei lipidi, né sulla degradazione degli amidi dopo esposizione degli alimenti alla soluzione disinfettante; tale soluzione, inoltre, non lascia film ed è priva di attività residua.

Le soluzioni di cloro attivo svolgono un'azione disinfettante molto efficace in soluzioni debolmente acide. Sembra che il meccanismo di azione di questi composti sia basato sulla denaturazione delle proteine e sull'inattivazione degli enzimi. I disinfettanti a base di cloro sono efficaci contro i batteri Gram-positivi e Gram-negativi e, in determinate condizioni, anche contro virus e altre spore; inoltre sono attivi anche a basse temperature. Il cloro disponibile derivato dall'ipoclorito e da altri composti che liberano cloro può reagire con le sostanze organiche residue, risultandone inattivato; è tuttavia possibile ottenere ugualmente un effetto disinfettante, usando i volumi e le concentrazioni raccomandati. Occorre impiegare esclusivamente soluzioni preparate al momento; le soluzioni rimaste inutilizzate o parzialmente usate non vanno conservate, in quanto perdono forza ed efficacia col tempo. Per verificare che la concentrazione di cloro attivo impiegata sia corretta e possibile misurarla tramite titolazione con tiosolfato di sodio (Marks *et al.*, 1991).

Per quanto concerne le clorammine inorganiche che si formano dalla reazione del cloro con ammine, immine e imide, è dimostrato che risultano attive dopo un tempo di trattamento più lungo rispetto agli ipocloriti nei confronti delle spore batteriche e delle cellule vegetative. L'effetto letale più lento della clorammina T sembra attribuibile ad un rilascio di cloro più graduale rispetto agli ipocloriti. D'altra parte in bibliografia è riportato che alcune clorammine hanno efficacia pari o superiore a quella degli ipocloriti nell'attivazione dei microorganismi (Marriot *et al.*, 2008); infatti, sebbene rilascino cloro lentamente ed abbiano quindi un tasso di letalità minore, proprio la ridotta attività del cloro ne consente una maggior penetrazione nella materia organica e ciò può risultare vantaggioso nell'impiego contro i biofilm (Eifert *et al.*, 2002).

Per quanto riguarda il dicloroisocianurato di sodio, questo composto è più efficace rispetto all'ipoclorito di sodio contro *E. coli*, *S. aureus* e altri batteri (Bloomfield *et al.*, 1979).

Gli effetti antimicrobici del biossido di cloro (ClO₂) sono meno noti rispetto a quelli degli altri composti del cloro; tuttavia, l'interesse nei confronti di questa molecola è aumentato. Le nuove formulazioni chimiche di questo composto consentono di impiegare il prodotto già pronto per l'uso, senza doverlo preparare sul posto; per tale motivo, viene sempre più utilizzato nell'industria alimentare. Il biossido di cloro ha un potere ossidante 2.5 volte superiore a quello del cloro. La sua efficacia è inferiore a quella del cloro a pH 6.5, ma nettamente superiore a pH 8.5; rispetto agli ipocloriti, il biossido di cloro sembra quindi essere meno influenzato degli ambienti alcalini e dalla presenza di sostanze organiche, ciò che lo rende particolarmente adatto al trattamento delle acque reflue (Marriot *et al.*, 2008).

Composti del cloro: vantaggi e svantaggi

Rispetto ad altri disinfettanti, i composti del cloro presentano i seguenti vantaggi:

- Sono efficaci contro un ampio spettro di batteri, funghi e virus;
- Comprendono composti ad azione rapida che superano il Chambers Test ad una concentrazione di 50 ppm nell'arco dei 30 secondi previsti;
- Sono i disinfettanti più economici (se si utilizzano disinfettanti poco costosi);
- Non richiedono il successivo risciacquo dell'attrezzatura (negli Stati Uniti) se si utilizzano concentrazioni non superiori ai 200 ppm;
- Sono disponibili in forma liquida e granulare;
- La loro azione non viene influenzata dalla durezza dell'acqua (salvo connesse variazioni connesse al pH);
- Concentrazioni elevate di cloro possono ammorbidire le guarnizioni e rimuovere il carbonio nei componenti in gomma delle attrezzature;
- Sono meno corrosivi del cloro.

Tuttavia presentano anche i seguenti svantaggi:

- Sono instabili e si alterano piuttosto rapidamente col calore o se vengono contaminati con sostanze organiche;
- La loro efficacia diminuisce all'aumentare del pH delle soluzioni;
- Hanno un effetto corrosivo sull'acciaio inox e su altri metalli;
- Si deteriorano durante lo stoccaggio se esposti alla luce od a temperature superiori a 60°C;
- Le soluzioni a basso pH possono dare origine a cloro gassoso (Cl₂), tossico e corrosivo;
- In forma liquida e concentrata possono esplodere;
- Il cloro è irritante per la pelle e le mucose;
- Hanno un impatto ambientale da non sottovalutare, a causa della formazione di sottoprodotto organo-clorurati pericolosi; infatti da numerose ricerche è risultato che il cloro reagisce con sostanze organiche presenti in natura, (gli acidi umici) dando luogo a composti come i trialometani, ritenuti cancerogeni.

Il ClO₂ viene usato nelle operazioni di sanificazione che impiegano schiuma (Meinhold 1991). Questo disinfettante viene prodotto combinando sali di cloro e cloro oppure ipoclorito e acido. Può essere prodotta una schiuma biodegradabile contenente da 1 a 5 ppm di ClO₂, che risulta efficace con un tempo di contatto più breve di quello richiesto per i composti di ammonio quaternario o per gli ipocloriti. Il biossido di cloro è efficace contro un ampio spettro di microorganismi, compresi batteri (anche sporigeni) e virus. Grazie alle sue proprietà ossidanti, l'attività residua inibisce significativamente la ripresa della crescita microbica. Il biossido di cloro presenta diversi vantaggi poiché mantiene inalterata la sua efficacia in un ampio intervallo di pH ed è più resistente del cloro all'inattivazione da parte delle sostanze organiche. Inoltre risulta meno corrosivo rispetto ad altri disinfettanti a base di cloro grazie al fatto che è efficace anche a basse concentrazioni; ed in fine comporta una minore produzione di composti organici clorurati indesiderati. D'altra parte i principali svantaggi sono rappresentati dal costo, dalla difficoltà di utilizzo, dalla sensibilità alla luce ed alla temperatura oltre ai rischi connessi alla sicurezza ed alla tossicità.

2.2 Metodi innovativi per la sanificazione dei prodotti ortofrutticoli

Le soluzioni al cloro rimangono tuttora le più efficaci, economiche e semplici da usare per la disinfezione in campo alimentare. Tuttavia, l'associazione di cloro alla possibile formazione di composti clorati cancerogeni nell'acqua e le restrizioni giuridiche riguardanti l'uso di cloro in campo alimentare ha stimolato la ricerca di metodi differenti alternativi per la decontaminazione di ortaggi freschi e frutta tagliata. Di conseguenza si sono sviluppati e messi a punto diversi approcci innovativi come l'utilizzo di acidi organici ed acqua elettrolizzata, oppure altre tecniche innovative come irraggiamento, l'ozono, l'atmosfera modificata, etc. (Ramos *et al.*, 2013; Rico *et al.*, 2007).

2.2.1 Il gas plasma

Il gas plasma è considerato il quarto stadio della materia, esso è un gas parzialmente ionizzato al quale è stata fornita energia, sotto forma di scariche elettriche. Una parte degli atomi che formano il gas plasma presenta una carica elettrica individuale positiva o negativa, attribuibile rispettivamente alla cessione o all'acquisto di elettroni. Dal punto di vista statico, il plasma è neutro, perché le cariche positive e negative si compensano. I primi tre stati della materia sono progressivamente solido, liquido, e gas (Figura 9).

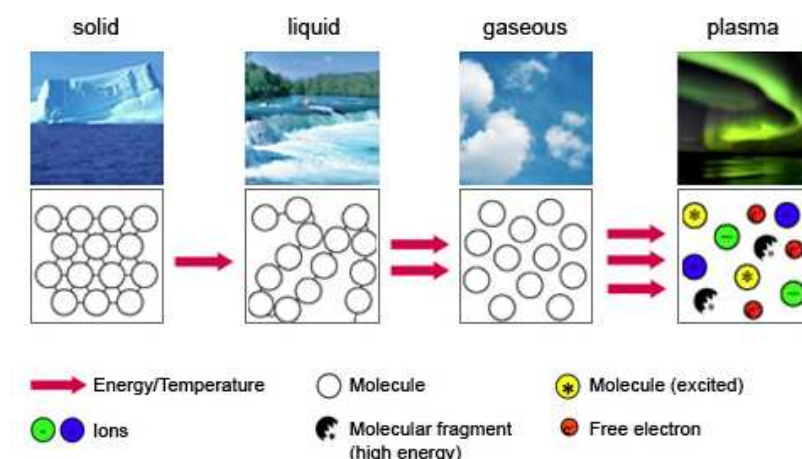


Figura 9: Stati della materia

Procedendo dallo stato solido fino allo stato gassoso, lo stato di plasma costituisce un'ulteriore avanzamento dello stato energetico all'interno della materia. Nello stato gassoso le interazioni fra le singole particelle possono essere rappresentate dall'effetto di urti reciproci e casuali tra i singoli atomi, ma nel caso dello stato di plasma le interazioni fra le particelle sono ancora più a lungo raggio, ed un eventuale contatto od "urto" fra di esse è ancora più raro. Nel plasma ogni particella carica elettricamente è influenzata da altre particelle di carica uguale o di carica opposta. Il plasma si comporta dunque come un fluido unitario elettricamente neutro. Nel momento in cui la ionizzazione dei gas causa la creazione di elettroni liberi e di ioni positivi tra gli atomi, il gas diventa elettricamente conduttivo con la capacità di trasportare corrente (Scholtz *et al.*, 2015).

I generatori di gas plasma artificiali vengono generalmente divisi in due categorie basandosi sulle temperature che si raggiungono per produrlo: gas plasma termico e non termico.

Negli ultimi dieci anni gli investimenti maggiori nel campo del gas plasma hanno riguardato quello non termico a pressione atmosferica; una delle ragioni è correlata alla vastità di applicazioni industriali, ed alla facilità di variare alcuni fattori:

- il gas di lavoro: la natura del gas (ad esempio O₂, N₂, aria, H₂, alogeni, N₂O, H₂O, H₂O₂, CO₂, SO₂, SF₆, aldeidi, acidi organici, ...) o della miscela di gas definisce le diverse specie chimiche che si generano nel plasma come elettroni, atomi, molecole, ioni e radicali;
- la pressione: da 0.1 Pa alla pressione atmosferica;
- la struttura del campo elettromagnetico e la sua frequenza;
- la configurazione ed il volume della scarica, ad esempio con o senza elettrodi;
- il comportamento temporale, per esempio il plasma pulsato.

Sulla base della modulazione di questi parametri multidimensionali, il plasma atmosferico può essere classificato in corrente continua (DC) a bassa frequenza, radiofrequenza e scariche a microonde .

Generalmente quando il gas viene sottoposto a sollecitazione a pressione atmosferica, ritorna lentamente al suo stato fondamentale a meno che il voltaggio

non sia estremamente alto. Questo è legato al numero di collisioni tra le molecole di gas. Per lavorare sulla superficie, il numero di collisioni deve essere infatti limitato. Tuttavia, se la pressione è troppo bassa, le molecole sono troppo lontane per sostenere il plasma.

Una volta che il plasma è stato creato, viene messo a contatto con la superficie da testare. In questa fase si hanno due fenomeni in competizione. Il primo è l'erosione fisica: gli ioni sono spinti verso la superficie e ne rompono i legami deboli. Gas inerti come argon ed elio non reagiscono con la superficie: essi semplicemente staccano la materia come ossido di alluminio. L'altro fenomeno è la reazione chimica in cui ioni e radicali reagiscono con i materiali sulla superficie. Per esempio l'ossigeno reagisce con il carbonio contenuto su materiale organico per formare monossido di carbonio e diossido di carbonio.

In campo tecnologico vi sono molti utilizzi del plasma. È risultato efficace anche nella decontaminazione in campo biomedico per la decontaminazione di materiale termosensibile (Sautter *et al.*, 2011). A tal proposito l'avvento negli ultimi vent'anni di una serie di metodi per creare gas plasma senza l'aumento della temperatura, a condizioni ambientali, preferiti al sottovuoto (Eliasson *et al.*, 1991) ha offerto un nuovo potenziale metodo per incrementare la sicurezza microbiologica di molti prodotti. Questi plasmi sono comunque altamente potenti poichè includono particelle cariche, specie reattive metastabili, radicali liberi, e fotoni UV, tutti in grado di generare energia a 10 eV, in grado di rompere legami molecolari e sono letali quindi anche per i microrganismi (Hermann *et al.* 1999; Montie *et al.*, 2000; Laroussi *et al.*, 2004). Inoltre, la combinazione di plasma ad alta energia con trattamenti non termici rende i gas plasma particolarmente adatti alla decontaminazione in ambienti sanitari e di trasformazione degli alimenti. Per questo motivo nell'ultimo decennio si è visto un notevole incremento del numero di studi scientifici su questa tecnica per l'inattivazione di vari microrganismi a differenti condizioni (Pointu *et al.*, 2005; Vleugels *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2005). Nonostante le sempre più numerose evidenze che attestano l'efficacia di plasma atmosferico per l'inattivazione microbica, si conosce poco relativamente alle specie chimiche responsabili o di riferimento. L'atomo di ossigeno, l'ossigeno metastabile e le sue molecole, come anche i fotoni UV e le particelle cariche,

sono state più volte considerate responsabili dell'effetto battericida del gas plasma (Pointu *et al.*, 2005). La situazione è comunque più complicata perché lo stato fisiologico delle cellule in molti studi non è controllata o specificata. Si conosce poco relativamente a come la densità cellulare incida sull'efficacia di inattivazione anche se probabilmente questo è un fattore cruciale nel trattamento delle superfici (Deng *et al.*, 2005). Un recente studio (Yu *et al.*, 2006) ha valutato alcuni dei fattori chiave che possono influenzare la capacità del plasma di inattivare cellule di *Escherichia coli*. Per rivelare il danno alle cellule trattate con plasma è stato utilizzato un metodo di lettura tramite microspia elettronica e spettroscopia ad emissione ottica per valutare quanto la temperatura influisse. Uno studio ulteriore ha valutato quanto il livello microbico superficiale e lo stato cellulare di *E. coli* ai differenti stadi di crescita incidessero sull'efficacia del plasma, utilizzando il metodo di inattivazione sul modello di Baranyi (Baranyi *et al.*, 1996) per analizzare la cinetica di inattivazione. Analizzando il grafico si nota la cinetica di inattivazione di cellule in fase stazionaria, aumentando la concentrazione superficiale da $2.8 \cdot 10^7$ a $2.2 \cdot 10^{11}$ UFC/g. Aumentando la concentrazione si ha una diminuzione dell'efficacia di inattivazione. A 2-5 minuti di trattamento si notano differenze di inattivazione di 7 cicli logaritmici tra la più bassa e la più alta concentrazione iniziale.

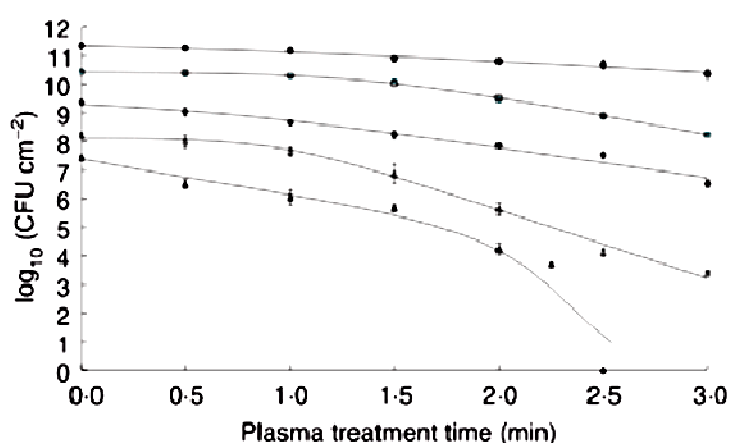


Figura 10: Curva di sopravvivenza per *E. coli* dopo 24 h di incubazione a partire da differenti densità cellulari iniziali (Yu *et al.*, 2006)

2.2.2. Perossido di idrogeno

Il perossido di idrogeno è un agente antimicrobico altamente efficace contro i batteri, ma è meno attivo contro lieviti, funghi e virus (Block, 1991). Il perossido di idrogeno può essere considerato come potenziale alternativa al cloro. Sebbene la sua azione come sanitizzante sia ampiamente riportata, la FDA non ne consente l'utilizzo ad ampio spettro come sanitizzante per alimenti. Per contro, l'Environmental Protection Agency statunitense ne consente l'impiego a concentrazioni dell'1% per il lavaggio di alcuni prodotti agricoli dopo la raccolta. Numerosi studi hanno dimostrato l'efficacia del perossido di idrogeno diluito come sanificante di prodotti freschi in quanto in grado di ridurre la carica microbica di funghi (Sapers 2001; Sapers. 1994), mele (Sapers *et al.*, 1999; Sapers. 2002; Sapers 2000), meloni (Sapers 2001; Ukuku *et al.*, 2001; Ukuku *et al.*, 2001; Ukuku *et al.*, 2004), melanzane e peperone rosso dolce (Fallik 1994). Sono stati posti a confronto i lavaggi con 200 ppm di cloro attivo e lavaggi dall'1 al 5 % di H₂O₂, da cui è emersa la parità di effetto antimicrobico (Sapers *et al.*, 2003; Sapers *et al.*, 1999). Da ulteriori sperimentazioni applicate in condizioni di agitazione vigorosa delle mele e temperatura della soluzione sanitizzante di 50-60°C, risulta una riduzione della carica microbica di 3 cicli logaritmici, senza causare un imbrunimento della buccia.

Trattamenti effettuati con perossido di idrogeno sono tuttavia risultati ininfluenti durante il trattamento di germogli di soia (Fett 2002).

Inoltre è stato sperimentato un tipo di trattamento che prevede l'utilizzo di vapore prodotto da H₂O₂ su prugne (Simmons, 1997), meloni (Aharoni, 1994) ed uva (Forney, 1991), ma i tempi di esposizione al vapore sono molto superiori all'utilizzo del perossido di idrogeno in forma liquida. I trattamenti con vapore sono risultati inefficaci sulle mele (Sapers, 2003). Il meccanismo che regola l'azione sanificante del perossido di idrogeno non è ancora chiaro. L'FDA riconosce l'H₂O₂ come prodotto GRAS classificandolo come agente sanificante per frutta e verdura in concentrazioni pari o inferiori a 59 ppm, una maggior concentrazione è vietata per scongiurare il rischio che rimangano residui sui vegetali. D'altra parte è da considerare anche il fatto che frutta e verdura

contengono catalasi in grado di scomporre il perossido residuo in acqua ed ossigeno.

2.2.3 Fosfato trisodico ed altri agenti di lavaggio alcalini

Il fosfato trisodico (TSP) è stato commercializzato da Rhodia come un risciacquo antimicrobico per ridurre specificatamente la carica cellulare di microrganismi patogeni umani per le carni lavorate e pollame.

Il TSP è classificato come GRAS dalla FDA (21CFR182.1778). L'attività antimicrobica del TSP probabilmente è dovuta al suo pH elevato (pH 12) che degrada la membrana citoplasmatica (Mendonca *et al.*, 1994; Sampathkumar *et al.*, 2003).

I lavaggi altamente alcalini effettuati con fosfato trisodico (pH 11-12) hanno determinato una riduzione di 3 cicli logaritmici della popolazione di *E. coli* inoculato sulla superficie di arance (Pao *et al.*, 2000).

Soluzioni di TPS al 12-15% hanno dimostrato avere una buona efficacia anche nel ridurre la contaminazione microbica in pomodori deliberatamente contaminati, ma non sono riuscite ad inattivare completamente tale organismo, probabilmente per l'infiltrazione batterica (Zhuang R.Y. *et al.*, 1997). Sapers (2000) ha riportato una riduzione di 2 log UFC/g di ceppi non patogeni di *E. coli* in mele inoculate e lavate con TSP al 4%. Inoltre, all'1%, il lavaggio con TPS riduce la popolazione di *E. coli* O157:H7 in fragole (Lukasik J. 2003). Trattamenti sulla lattuga con TPS al 2% non sono stati efficaci contro *L. monocytogenes* (Zhang *et al.*, 1996). Il TPS è risultato molto efficace per l'inattivazione di *E. coli* O157:H7 in biofilm ma meno efficace, sempre nei biofilm, contro *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* (Somers *et al.*, 1994).

È stato studiato l'effetto battericida di altre sostanze alcaline, ad esempio, un'immersione di 30 minuti in una soluzione al 0.25% di calcio calcinato, un altro prodotto altamente alcalino derivato da gusci di ostriche (pH 10), ha ridotto la popolazione batterica in cetrioli di circa 2 log (Isshiki *et al.*, 1995).

Uno studio recente condotto da Bari (2002) ha riportato una riduzione superiore a 5 log su pomodori, che erano stati deliberatamente inoculati in superficie con *E. coli* O157: H7, *Salmonella* e ceppi di *L. monocytogenes*, a seguito di un trattamento che prevedeva il lavaggio con una soluzione di calcio calcinato al

0.5%. Questa elevata riduzione può essere dovuta al breve periodo, 30 minuti, tra l'inoculo ed il trattamento utilizzato. Sapers (2002) ha ottenuto una riduzione di contaminazione di 3 log UFC/g su mele inoculate con *E. coli* (ATCC 25922), combinando un lavaggio con perossido di idrogeno al 5%, ed una spazzolatura del calice e dello stelo con pasta di calcio calcinato: la riduzione della popolazione microbica solo con lavaggio con perossido era stata inferiore a 2 log UFC/g.

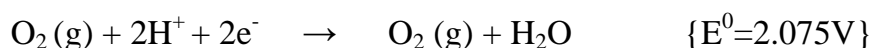
2.2.4 Acidi Organici

Gli acidi organici come acido lattico ed acetico sono efficaci agenti antibatterici (Foegeding et al., 1991) e sono stati classificati come GRAS dalla Food and Drug Administration (21CFR184.1005). Uno studio di Castillo (2001) ha ottenuto dei risultati di abbattimento di alcuni patogeni quali *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* e *Salmonella* incoraggiando spruzzando dell'acido lattico su carcasse di animali macellati. I risciacqui con acido lattico possono essere utilizzati per la decontaminazione di frutta e vegetali. È stato riportato che un lavaggio con acido acetico al 5% riduce la popolazione microbica di *E. coli* O157:H7 di 3 log UFC/g in mele inoculate (Wright, 2000). In un altro studio le mele inoculate con *E. coli* O157:H7 sono state trattate con acido acetico al 5% durante un trattamento termico a 55°C per 25 minuti. Mentre la popolazione di *E. coli* è stata sufficientemente ridotta nella buccia e nello stelo, una carica di circa 3-4 log UFC/g è sopravvissuta nei tessuti del calice (Delaquis et al., 2000). In un altro studio più recente, l'applicazione di acido acetico al 2.4% su fette di mela inoculate con *S. Typhimurium* ha determinato una riduzione di 1.4 log UFC/g (Liao et al., 2003). Nello stesso lavoro, inoltre la combinazione di acido acetico al 5% con il perossido di idrogeno ha portato ad una riduzione di 4 log UFC/g. Nonostante questi risultati molto positivi, non è stato ancora chiarito se i trattamenti con acidi organici possano determinare alcuni effetti negativi sulla qualità degli alimenti quali la produzione di off-flavours e la decolorazione dei prodotti.

2.2.5 Ozono

L'ozono è una forma dell'ossigeno contenente tre atomi di ossigeno che formano un triangolo tra loro con un angolo di 116.8° tra due atomi legati. Si trova naturalmente nella nostra atmosfera, ma può essere anche prodotto sinteticamente. L'ozono in forma liquida si trova a -111.9° a 1 atm ed in forma solida di colore blu-nero opaco a -192.7°C (Tabella 9). A temperatura ambiente è un gas instabile, parzialmente solubile in acqua ed è il più forte disinfettante correntemente presente per gli alimenti (Mahapatra *et al.*, 2005).

Il suo potenziale elettrochimico indica che l'ozono è un forte agente ossidante.



L'ozono viene creato esponendo l'aria, od un altro gas, ad un'alta fonte energetica: i metodi più utilizzati per creare ozono sono tramite scariche elettriche, metodi elettrochimici e radiazioni UV. Gli ultimi due metodi sono più economici in quanto consumano meno energia. Tramite questi metodi le molecole di O₂ vengono convertite in molecole di ozono (O₃).

La sua attività antimicrobica si basa sul principio che quando una cellula è posta sotto stress da un attacco virale, batterico o fungino il suo livello energetico è ridotto da una fuoriuscita di elettroni e diventa elettropositivo. L'ozono ha una piccola carica elettrica radicale nel terzo atomo di ossigeno che cerca di bilanciarsi tramite una carica opposta. Le cellule danneggiate, i virus, i batteri ed altri patogeni trasportano tale carica e così attraggono l'ozono. Le cellule in stato normale non possono reagire con l'ozono dal momento che hanno cariche bilanciate ed un potente sistema enzimatico. Grazie al suo alto potenziale di ossido-riduzione, l'ozono reagisce come un forte ossidante degli elementi costitutivi cellulari prima di penetrare nei microrganismi ed ossidare certi componenti essenziali come acidi grassi insaturi, acidi nucleici, enzimi, proteine. Quando un'ampia parte della membrana è distrutta, causando la fuoriuscita del contenuto cellulare, le cellule batteriche o protonate lisano, portando ad una graduale od immediata distruzione delle cellule stesse. Molti batteri di interesse alimentare, tra cui anche alcuni patogeni, sono suscettibili all'effetto ossidativo dell'ozono. La sensibilità dei microrganismi all'ozono dipende dal metodo di

applicazione ed alla specie microbica: la sensibilità è influenzata dallo stato fisiologico delle colture, dal pH del sistema, dalla temperatura, dall'umidità e dalla presenza di additivi come acidi, zuccheri e tensioattivi (Kim *et al.*, 2009). La sensibilità dei microrganismi è riassunta nella tabella 10.

Attualmente l'ozono è generalmente riconosciuto come e viene utilizzato negli Stati Uniti come agente sanitizzante nei processi di imbottigliamento dell'acqua (Food and Drug Administration, 1999). Nel giugno 1997 l'ozono ha ricevuto lo stato di GRAS come disinfettante per alimenti da un gruppo di esperti indipendente, sponsorizzato dall'istituto di Ricerca per energia elettrica (Electric Power Research Institute). Nel 2001 la FDA ha approvato l'uso dell'ozono come agente sanitizzante per alimenti a diretto contatto con essi (Hampson, 2001) e recentemente è stato approvato dalla FDA come agente antimicrobico. Questo ha incrementato l'uso di ozono nelle industrie agroalimentari dalle semplici operazioni di lavaggio sino alla sterilizzazione di prodotti ittici. Oggi vi sono più di 3000 trattamenti basati sull'utilizzo dell'ozono nel mondo e più di 300 trattamenti di potabilizzazione dell'acqua in America (Rice, 2000).

Tabella 9: Proprietà fisiche dell'ozono

Physical Properties of Ozone	
Physical Properties	Value
Boiling point, °C	-111.9
Density, kg/m ³	2.14
Heat of formation, kJ/mole	144.7
Melting point, °C	-192.7
Molecular weight, g/mole	47.9982
Oxidation strength, V	2.075
Solubility in water, ppm (at 20°C)	3
Specific gravity	1.658

(O'Donnell et al., 2001)

Tabella 10: Efficacia antimicrobica dell'ozono utilizzato nell'industria alimentare

Antimicrobial Spectrum and Sanitary Applications of Ozone in Food Industry

Sanitation	Dosage	Susceptible Microorganisms
Animal	>100 ppm	HVJ/TME/Reo type 3/murine hepatitis virus
Black berries	0.3 ppm	<i>Botrytis cinerea</i>
Cabbage	7–13 mg/m ³	Shelf life extension
Carrot	5–15 mg/m ³	Shelf life extension
	60 µl/L	<i>Botrytis cinerea/Scerotinia sclerotiorum</i>
Dairy	5 ppm	<i>Alcaligenes faecalis/P. fluorescens</i>
Fish	0.27 mg/L	<i>P. putida/B. thermospacta/L. plantarum/Shewanella putrefaciens/Enterobacter sp.</i>
	0.111 mg/L	<i>Enterococcus seriolicida</i>
	0.064 mg/L	<i>Pasteurella piscicida/Vibrio anguillarum</i>
Media	3–18 ppm	<i>E. coli</i> O157:H7
Peppercorn	6.7 mg/L	3–6 log reduction of microbial load
Potatoes	20–25 mg/m ³	Shelf life extension
Poultry	0.2–0.4 ppm	<i>Salmonella sp./Enterobacteriaceae</i>
Shrimp	1.4 ml/L	<i>E. coli/Salmonella typhimurium</i>
Water	0.35 mg/L	<i>A. hydrophila/B. subtilis/E. coli/V. cholerae/P. aeruginosa/L. monocytogenes/Salm. typhi/Staph. aureus/Y. enterocolitica</i>

(O'Donnell *et al.*, 2001)

Recenti studi hanno evidenziato che l'ozono ed il perossido di idrogeno hanno effetto inferiore nella riduzione della contaminazione batterica in carne rispetto ai metodi tradizionali. (Reagan *et al.*, 1996).

Silva *et al.* (1998) hanno analizzato l'attività antibatterica dell'ozono su cinque specie microbiche che si ritrovano frequentemente nei prodotti ittici, ed è stato riportato che l'ozono a concentrazioni relativamente basse (< 0.27 10⁻³ g/l) è un efficace battericida sulle cellule vegetative.

Nell'industria alimentare l'ozono è inoltre utilizzato normalmente per il lavaggio di frutta e verdura (Hampson *et al.*, 1996) prima del confezionamento. Attualmente è il metodo sanitizzante più efficace disponibile sul mercato per il lavaggio di frutta e verdura, con un tasso di uccisione batterica del 99.9% (O'Donnell *et al.*, 2008).

Inoltre i produttori che raffreddano in post-raccolta frutta e verdura utilizzando acqua a circa 1°C possono inserire ozono nell'acqua per prevenire la contaminazione dei prodotti, poiché i sistemi di processo per frutta e verdura che incorporano una tecnologia di produzione di ozono sono in grado di produrre prodotti più puliti e di utilizzare meno acqua, senza residui tossici. Infatti l'ozono si esaurisce in pochi minuti dopo il lavaggio.

Recenti studi riguardanti l'uso di ozono in prodotti secchi hanno dimostrato che è in grado di ridurre *Bacillus* spp. e *Micrococcus* nei cereali, in piselli e in fagioli fino a 3 log UFC/g, modulando la sua concentrazione, la temperatura e l'umidità relativa (Naitoh *et al.*, 1987).

2.2.6 Oli essenziali

Gli oli essenziali sono composti volatili, sintetizzati dalle piante aromatiche come metaboliti secondari, caratterizzati da un forte aroma. Essi contengono 20-60 componenti in diverse concentrazioni. In particolare sono caratterizzati da due o tre componenti maggiori (20-70%) ed altri minori. Ad esempio carvacrolo (30%) e timolo (27%) sono i principali componenti di *Origanum Compactum*; il linalolo (68%) è il componente essenziale dell'olio di *Coriandrum sativum*. Generalmente i componenti maggiori influenzano le proprietà degli oli essenziali e questi possono essere suddivisi in due gruppi di differente origine biosintetica (Pichersky *et al.*, 2006). Il gruppo principale è composto da terpeni e terpenoidi, e l'altro da composti aromatici ed alifatici, tutti caratterizzati da un basso peso molecolare (Figura 11).

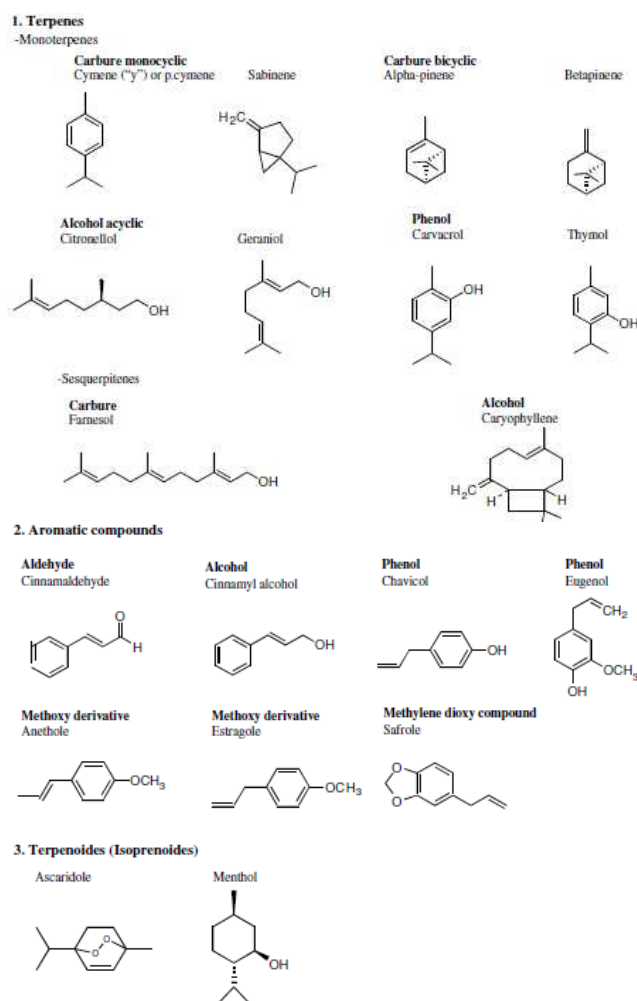


Figura 11: composti terpenici e aromatici costituenti gli oli essenziali (Bakkali et al., 3006)

L'attività antimicrobica degli oli delle piante ha fatto sì che abbiano trovato utilizzo in una serie di applicazioni nel settore farmaceutico, come medicinali alternativi e terapie naturali (Reynolds, 1996). Gli oli, ad esempio, sono stati utilizzati per anni per guarire le infezioni al tratto respiratorio e lo sono tuttora. In generale nelle ultime due decadi gli oli essenziali (EO) ed i loro componenti sono stati ampiamente studiati per le loro proprietà antimicrobiche, antiossidanti e antitumorali (Khan *et al.*, 2014). La loro capacità antiossidante è una delle più studiate poiché l'ossidazione causa danni biologici di varia entità e conseguentemente varie patologie come tumori, morbo di Parkinson, sindrome di Alzheimer, diabete. Molte ricerche stanno studiando le potenziali proprietà antiossidanti degli EO per trovare nuovi antiossidanti di origine naturale (Patrignani *et al.*, 2015) da impiegarsi anche nel settore alimentare.

Numerose ricerche hanno provato che essi possono essere utili anche per prolungare la shelf-life degli alimenti (Belletti *et al.*, 2008), ad esempio attraverso il cosiddetto packaging attivo: tali oli sono assorbiti dai materiali d'imballaggio e possono essere rilasciati nell'atmosfera come agenti di conservazione degli alimenti stessi. Il cosiddetto packaging attivo antimicrobico si vuole estendere anche a prodotti vegetali per incrementare la sicurezza dei consumatori e ridurre il rischio di contaminazione da muffe e batteri negli alimenti (Khan *et al.*, 2014). Tuttavia la maggior parte degli esperimenti riportati in letteratura riguardano l'attività antimicrobica degli EO *in vitro*, mentre l'applicazione degli EO in sistemi reali è tuttora limitata su scala di laboratorio in prodotti da forno, (Nielsen *et al.*, 2000), prodotti ittici (Kykkidou *et al.*, 2008), frutta e verdura minimamente processati (Lanciotti *et al.*, 2004; Siroli *et al.*, 2014, Siroli *et al.*, 2015a; Siroli *et al.*, 2015b; Siroli *et al.*, 2015c).

Il loro meccanismo d'azione consiste nel fatto che essendo lipofili, passano attraverso le membrane citoplasmatiche, distruggono le strutture polisaccaridiche, gli acidi grassi ed i fosfolipidi di membrana. Nei batteri la permeazione delle membrane è associata alla perdita di ioni ed alla riduzione del potenziale di membrana, il collasso della pompa protonica e l'esaurimento di ATP (Turina *et al.*, 2006). Gli oli essenziali possono coagulare il citoplasma e danneggiare i lipidi e proteine di membrana (Burt, 2004). Il danno delle pareti cellulari può provocare la dispersione delle macromolecole e la lisi cellulare (Oussalah *et al.*, 2006-2). Negli eucarioti gli oli essenziali possono portare alla depolarizzazione delle membrane mitocondriali tramite il decremento del potenziale di membrana, influenzando lo scambio di Ca^{2+} (Novgorodov *et al.*, 1996-2) ed altri canali ionici e riduce il gradiente di pH, influenzando come per i batteri, la pompa protonica.

Gli oli modificano la fluidità di membrana, che diventano normalmente permeabili, portando ad una dispersione di radicali, citocromi, ioni di calcio e proteine. La permeazione delle membrane mitocondriale lede le cellule e ne causa la necrosi.

A discapito dell'attività antimicrobica contro i patogeni negli alimenti e muffe mostrata dagli oli essenziali, (Oussalah *et al.*, 2007), la loro applicazione pratica

può essere limitata per il loro forte impatto sensoriale e per le modifiche apportate sui prodotti alimentari (Gutierrez *et al.*,2008).

Un’ampia letteratura mostra il potenziale antimicrobico degli EO derivanti da scorza di agrumi (Espina *et al.*, 2011), in particolare il citrale (3,7-dimetil-2-7-ottadienale), aldeide monoterpenica aciclica insatura che si trova nelle arance, nel cedro e nella citronella. Gli oli essenziali di citrale, a concentrazioni compatibili con le caratteristiche sensoriali della frutta, sono in grado di prolungare sensibilmente la shelf-life degli alimenti (Belletti *et al.*, 2008) e la stabilità di bevande a base di frutta (Belletti *et al.*, 2007). Inoltre l’esanale ed il 2-esanale, incrementano la sicurezza di alimenti vegetali minimamente trattati (Lanciotti *et al.*, 2004). Queste aldeidi hanno dimostrato un buon potenziale antimicrobico contro patogeni come *Salmonella* spp., *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Kubo *et al.*, 2001).

Tabella 11: Risultati di test effettuati per valutare l’attività antimicrobica di oli essenziali in frutta e verdura minimamente trattata

Table 1. Overview of cases testing the antimicrobial activity of essential oils (EO) or their components in minimally processed fruits and vegetables.						
Food	EO or component	Concentration applied	Microbial targets	References		
Fruits	<i>Kiwifruits</i>	Carvacrol	1 mM in dipping solution	Natural microflora		
	<i>Honeydew melon</i>	Carvacrol and cinnamic acid	1 mM in dipping solution	Natural microflora		
	<i>Fresh sliced apples</i>	Hexanal, hexyl acetate, E(2) hexenal	50–250 ppm	<i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	Lanciotti <i>et al.</i> , 2003	
	<i>Sweet cherries</i>	Eugenol, thymol, menthol, eucalyptol	1000 µL in gas used for MAP	Natural microflora	Serrano <i>et al.</i> , 2005	
	<i>Table grape</i>	Eugenol thymol	75-150 µL in gas used for MAP	Natural microflora	Valero <i>et al.</i> , 2006	
	<i>Fresh sliced apples</i>	Oregano, Lemongrass, vanillin used encapsulated	1.1 and 0.5% (w/w) 1 and 1.5% (w/w) 2.2 and 0.6% (w/w)	Natural microflora and inoculated <i>L. innocua</i>	Rojas-Crau <i>et al.</i> , 2007	
	<i>Fruit salads</i>	Citral	25–125 ppm	<i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	Belletti <i>et al.</i> , 2008	
	<i>Fresh cut apples</i>	Citron EO	300–600 ppm	<i>E. coli</i> O157:H7 <i>Listeria</i> spp	Abadias <i>et al.</i> 2011	
	<i>Avocado</i>	Vanillin	12 g/L	Natural microflora	Sellamuthu, Mafune, Sivakumar, & Soundy, 2013	
	<i>Fresh cut apples in MAP</i>	Thyme EO in MAP	75 µL in filter	Natural microflora	Siroti <i>et al.</i> , 2014; Siroti, Patrignani, Serrazanetti, Tabanelli, <i>et al.</i> , 2015a;	
	Vegetables	<i>Lettuce</i>	Citron EO, Hexanal, E(2)hexenal, Citral, carvacrol	Alone 250 mg/L Combination 125 mg/L	Natural microflora <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enteritidis</i>	
		<i>Lettuce</i>	Thyme EO	0.1–10 mL/L	<i>E. coli</i> O157:H7	Singh <i>et al.</i> , 2002
<i>Carrots</i>		Thyme EO	0.1–10 mL/L	<i>E. coli</i> O157:H7	Singh <i>et al.</i> , 2002	
<i>Eggplant salad</i>		Oregano EO	0.7–2.1% v/w	<i>E. coli</i> O157:H7	Skandamis & Nychas, 2000	
<i>Lettuce and carrots</i>		Oregano and thyme EOs	Alone 250 mg/L Combination 125 mg/L	Natural microflora	Gutierrez <i>et al.</i> , 2009	
<i>Lettuce</i>		Oregano EO	25-75 mg/L	<i>Salmonella tiphymurium</i>	Gunduz <i>et al.</i> , 2010	
<i>Iceberg lettuce</i>		Oregano and rosemary	0.003–80 µL/m	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> and <i>Aeromonas hydrophilla</i>	de Azeredo <i>et al.</i> , 2011	
<i>Four season salad</i>		Oregano EO and citral in packaging	7.5% w/w	Natural microflora	Muriel-Galet <i>et al.</i> , 2013	
<i>Lamb's lettuce</i>		Oregano and Thyme EOs	250 mg/L	Natural microflora <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i>	Siroti, Patrignani, Serrazanetti, Tabanelli, <i>et al.</i> , 2015c; Siroti, Patrignani, Serrazanetti, Tappi, <i>et al.</i> , 2015b	

(Patrignani *et al.*, 2015)

2.2.7 Acqua elettrolizzata

L'acqua elettrolizzata è stata inizialmente sviluppata in Giappone (Shimizu *et al.* 1992) ed è stata riconosciuta per avere un forte effetto battericida sui principali patogeni alimentari.

L'acqua elettrolizzata è generata mediante un processo di elettrolisi diaframmatica controllata (Figura 10), prodotta tramite il passaggio di una soluzione salina attraverso una cella elettrolitica, in cui l'anodo ed il catodo sono separati tramite una membrana. Sottoponendo gli elettrodi a corrente diretta, gli ioni negativi come l'idrossido (HO^-) ed il cloro (Cl^-) nella soluzione di sale diluita si spostano verso l'anodo rilasciando elettroni e diventando ossigeno gassoso (O_2), cloro in forma gassosa (Cl_2), ione ipoclorito (OCl^-), acido ipocloroso (HClO) ed acido cloridrico (HCl), mentre le cariche positive come idrogeno (H^+) e sodio (Na^+) si spostano verso il catodo per legarsi agli elettroni dando origine ad idrogeno gassoso (H_2) e sodio idrossido (NaOH) (Hsu, 2005).

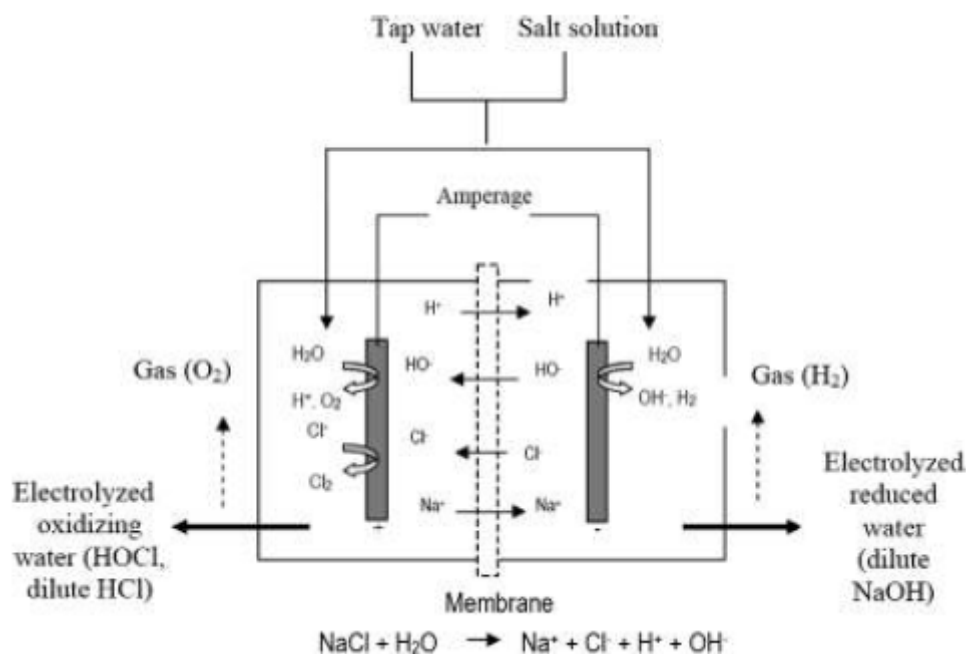
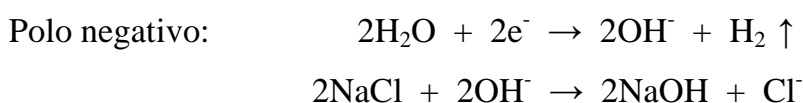
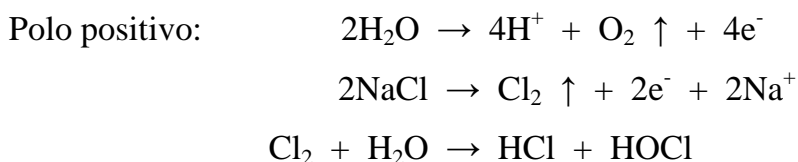


Figura 12: Schema di produzione dell'acqua elettrolizzata (Huang *et al.*, 2008)

Nell'anodo si ha quindi come risultato una soluzione ossidante, che ha perso gli ioni idrogeno e sodio, denominata Anolyte (Redox: +900 mV, pH= 7,00), mentre

al catodo viene prodotta una soluzione riducente, con eccesso di sodio ed idrogeno, detta Catolyte (Redox: - 835mV, pH=11,00).

Le reazioni su cui si basa la formazione di acqua elettrolizzata sono le seguenti:



Hsu (2003) ha analizzato la relazione che intercorre tra la velocità del flusso d'acqua, la temperatura e la concentrazione di sale sull'efficacia di elettrolisi e di separazione su un generatore di EO (Electrolyzed Oxidizing). Si è concluso che il potenziale elettrico (7.9–15.7 V) e il consumo di energia (16–120 W) della cella di elettrolisi non sono influenzati da questi parametri; al contrario la corrente elettrica cambia con la temperatura dell'acqua e la velocità del suo flusso. Inoltre l'efficienza di elettrolisi della cella e l'efficienza di separazione degli ioni scambiati attraverso la membrana diminuiscono significativamente con l'incremento della velocità del flusso d'acqua e della concentrazione di sale nella soluzione (Deza *et al.*, 2003).

Il maggiore vantaggio dell'acqua elettrolizzata è la sua sicurezza. Essa, che è anche un acido forte, è differente dall'acido cloridrico o dall'acido solforico che non è corrosivo nei confronti delle membrane o materiali organici. L'acqua elettrolizzata non sembra avere problemi di tossicità come altri sanitizzanti quali l'ipoclorito di sodio, la formaldeide e la glutaraldeide. Inoltre l'acqua elettrolizzata non solo è un mezzo di pulizia del tutto paragonabile alle altre tecniche di disinfezione tradizionali, ma riduce i tempi di pulizia, è facile da utilizzare, ha pochi effetti collaterali ed è economica (Tanaka *et al.*, 1999). Sfortunatamente però la soluzione perde velocemente la sua attività

antimicrobica se l'acqua elettrolizzata non è continuamente alimentata con H^+ , HOCl e Cl_2 tramite elettrolisi (Kiura *et al.*, 2002). Inoltre non sono da sottovalutare alcuni problemi come l'emissione di acido clorico, la corrosione metallica e la degradazione delle resine sintetiche, attribuita alla sua forte acidità ed al contenuto di cloro libero. L'acqua elettrolizzata possiede attività antimicrobica contro *Pseudomonas aeruginosa* (Kiura *et al.*, 2002; Vorobjeva *et al.*, 2003), *Staphylococcus aureus* (Park *et al.*, 2002b; Vorobjeva *et al.*, 2003), *S. epidermidis*, *E. coli* O157:H7 (Kim *et al.*, 2000a, 2000b; Park *et al.*, 2004); *Salmonella* Enteritidis (Venkitanarayanan *et al.*, 1999b), *Salmonella* Typhimurium (Fabrizio *et al.*, 2003), *Bacillus cereus* (Len *et al.*, 2000; Sakashita *et al.*, 2002; Vorobjeva *et al.*, 2003), *Listeria monocytogenes* (Fabrizio *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2004; Vorobjeva *et al.*, 2003), *Mycobacterium tuberculosis* (Iwasawa *et al.*, 1993), *Campylobacter jejuni* (Park *et al.*, 2002a), *Enterobacter aerogenes* (Park *et al.*, 2002b) e *Vibrio parahaemolyticus* (Huang *et al.*, 2006a; Kimura *et al.*, 2006). L'acqua elettrolizzata può inoltre ridurre la germinazione di specie fungine come *Alternaria* spp., *Bortrytis* spp., *Cladosporium* spp., *Colletotrichum* spp., *Curvularia lunata*, *Didymella bryoniae*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium* spp., *Helminthosporium* spp. (Buck *et al.*, 2002), *Aspergillus* spp. (Buck *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2002a), *Monilinia fructicola* (Al-Haq *et al.*, 2001; Buck *et al.*, 2002), *Penicillium expansum* (Okull *et al.*, 2004).

Generalmente la maggior parte dei batteri cresce in un range di pH tra 4 e 9. I batteri aerobi crescono principalmente a un potenziale redox tra 200 e 800 mV, mentre i batteri anaerobi crescono meglio tra -700 e 200 mV. L'alto potenziale redox dell'acqua elettrolizzata causa una modifica dei flussi metabolici e della produzione di ATP, probabilmente a causa dello scambio nel flusso di elettroni delle celle.

Il basso pH può sensibilizzare la membrana esterna delle cellule batteriche rendendola più sensibile al cloro attivo "sensibilizzando" la membrana esterna all'entrata del HOCl nelle cellule stesse (McPherson, 1993). L'HOCl, il più attivo dei composti al cloro, sembra uccidere la cellula microbica tramite l'inibizione di alcune vie metaboliche chiave (ossidazione del glucosio tramite l'ossidazione dei gruppi sulfidrici di alcuni enzimi presenti nel metabolismo dei

carboidrati). L'azione del cloro è data anche dalla distruzione delle proteine di sintesi, dalla decarbossilazione ossidativa degli amino acidi a nitriti ed aldeidi; dalle reazioni con acidi nucleici, purine e pirimidine; dallo sbilanciamento metabolico dopo la distruzione degli enzimi chiave con conseguente induzione di lesioni al DNA con la perdita dell'abilità di trasformazione del DNA, inibizione della fosforilazione ossidativa, la formazione di derivati della citosina tossici del cloro e la creazione dell'aberrazione cromosomiale (Marriott *et al.*, 2006). Una ipotesi alla base dell'inattivazione di batteri basata sull'alto potenziale di ossidazione dell'acqua elettrolizzata, che causa diversi danni alle membrane cellulari, è stata riportata da Liao *et al.*, (2007).

Il processo chimico dell'ossidazione si verifica quando l'ossigeno viene a contatto con altri composti causando la loro perdita di elettroni e la scissione dei composti che in questo modo cambiano le loro funzioni. Nel caso dei microrganismi, l'ossidazione può danneggiare le membrane cellulari, può interferire e/o inibire alcuni processi metabolici e quindi, in sostanza, uccidere le cellule microbiche stesse.

L'effetto battericida dell'acqua elettrolizzata su *Staphylococcus saprophyticus*, *Micrococcus luteus* e *Bacillus sphaericus* è stato osservato tramite l'utilizzo di microscopio elettronico da Osafune *et al.* (2006). Le cellule trattate con acqua acida elettrolizzata avevano pareti cellulari rugose con pori rotondi in cui si erano disintegrate le strutture citoplasmatiche.

In una ricerca Kim *et al.* 2000a hanno riportato gli effetti del cloro, del pH e dei valori del potenziale redox dell'acqua elettrolizzata sull'inattivazione di patogeni. Kim *et al.* (2000a) sono riusciti ad ottenere delle acque chimicamente modificate a partire da acqua deionizzata che avevano le stesse proprietà (pH, cloro e potenziale redox) dell'acqua elettrolizzata senza l'impiego dell'elettrolisi.

CAPITOLO 3 - *LISTERIA MONOCYTOGENES*

3.1 Caratteristiche generali

Il genere *Listeria* fa parte, dal punto di vista tassonomico, del phylum *Firmicutes* a cui appartengono batteri Gram-positivi, e fa parte della famiglia delle *Listeriaceae*, di cui è membro anche il genere *Bochothrix*. Può essere distinta per la morfologia cellulare, la motilità e la manifestazione delle colonie di colore blu-verde quando osservate tramite luce bianca in obliquo. *Listeria* è un batterio aerobio-anaerobio facoltativo, con un optimum di temperatura tra 30-37°C, ma è in grado di crescere in un intervallo tra <0°C-45°C.

Il genere *Listeria* è composto da sei specie: *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. ivanovii* (subspecie *ivanovii* e subspecie *londoniensis*), *L. marthii* e *L. rocourtiae*. Due specie sono patogene: *L. ivanovii*, patogena solo per gli animali, e *L. monocytogenes* che invece è patogena per animali e gli uomini. Lo stesso nome *Listeria monocytogenes* è correlato alla sua capacità di sopravvivere nei monociti e causare monocitosi negli animali.

Queste due specie contengono il gene per la virulenza, associato al fatto che tali batteri entrano nella cellula ospite grazie alla listeriolisina (proteina codificata dal gene *hly*), la fosfatidilinositol-fosfolipasi C (PI-PLC), codificata dal gene *plcA* e la fosfatidilcolina-fosfolipasi C (PC-PLC), codificata dal gene *plcB* (Schmid *et al.*, 2005; Liu, 2006).

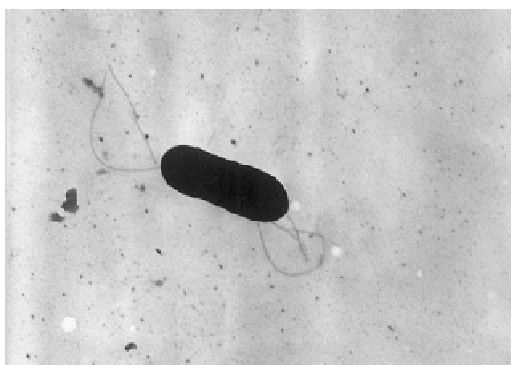


Figura 13: Cellula di *Listeria monocytogenes* al microscopio elettronico.

I batteri del genere *Listeria* crescono ranghi un intervallo di pH tra 6 e 9; tutte le specie crescono con 10% NaCl ed alcuni ceppi possono tollerare fino al 20% di NaCl, mentre tutti i tipi crescono in presenza di bile dal 10 al 40% (McLauchlin *et al.*, 2009). *Listeria* è un microrganismo anaerobio facoltativo e richiede fonte di carbonio, quali carboidrati per crescere. Dal glucosio e da altri zuccheri vengono prodotti acidi e non gas. È un batterio catalasi positivo, ossidasi negativo, rosso-metile positivo, non idrolizza l'urea, la caseina, la gelatina ed il latte, mentre idrolizza l'ippurato di sodio. Tale batterio idrolizza l'esculina (McLauchlin *et al.*, 2009), un glucoside naturale usato per determinare la presenza dell'enzima glucosidasi (esculinasi). Il prodotto dell'idrolisi dell'esculina, esculentina, può essere individuato nei terreni contenenti sali di ferro tramite la diffusione di complessi nero-marroni. L'esculina è il substrato più sfruttato per la glucosidasi nei terreni, ma sono disponibili anche glucosidi sintetici. *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri* hanno attività emolitica in agar con plasma. Le zone in cui avviene l'emolisi ad opera di *L. monocytogenes* e *L. seeligeri* sono limitate, mentre *L. ivanovii* produce zone più ampie di emolisi. Per la sua relativamente debole emolisi, è consigliato l'utilizzo di terreno stratificato con plasma (McLauchlin *et al.*, 2009). Il test CAMP (Christie-Atkins-Munch-Peterson) è utilizzato per vedere l'incremento di emolisi in presenza di *Staphylococcus aureus* e *Rhodococcus equi*.

Tabella 12: Caratteristiche delle specie di *Listeria*

Characteristic	<i>L.monocytogenes</i>	<i>L.grayi</i>	<i>L.innocua</i>	<i>L.ivanovii</i>	<i>L.seeligeri</i>	<i>L.welshimeri</i>
β-hemolysis	+	-	-	+	+	-
CAMP Test – <i>S. aureus</i>	+	-	-	-	+	-
CAMP Test – <i>R. equii</i>	-	-	-	+	-	-
Lecithinase	+	-	-	+	d	-
Catalase	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	-
Esculin hydrolysis	+	+	+	+	+	+
Growth on bile agar	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction to nitrite	-	^a	-	-	-	-
Acid from D-mannitol	-	+	-	-	-	-
Acid from D-xylose	-	-	-	+	+	+
Acid from L-rhamnose	+	+	d	-	-	d
Acid from α-D-mannoside	+	+	+	-	-	+

Symbols: +, more than 85% of the strains positive; d, different strains give different reactions (16–84% positive); -, 0 to 15% of the strains positive.

^a Nitrate reduced to nitrite by *L. grayi* subsp. *murnayi*.

(McLauchlin et al., 2009).

L. monocytogenes e *L. seeligeri* mostrano un incremento di emolisi (CAMP positivi) con *S. aureus* ma non con *R. equi*. *L. ivanovii* è CAMP positivo con *R. equi*, ma non con *S. aureus*. *L. grayi*, *L. innocua* e *L. welshimeri* sono CAMP negativi (McLauchlin et al., 2009).

Listeria monocytogenes ha cellule di forma bastoncellari, mobili a 28° C per la presenza di flagelli peritrichi (da 1 a 5), e, come le altre specie di *Listeria*, è catalasi positivo, ma ossidasi negativo ed è un patogeno che si trova principalmente negli animali e viene trasmesso agli uomini tramite alimenti e bevande contaminate.

Come le altre specie del genere *Listeria*, cresce in un range di temperatura molto ampio (tra i 3° C e i 45° C) con un optimum tra i 30° e i 38° C. Esso si mantiene vitale anche a 0° C e fino a temperature prossime a quelle usate per la pastorizzazione.

3.2 Fattori di virulenza di *L. monocytogenes*

Le manifestazioni maggiori derivanti da infezioni da *L. monocytogenes* sia per animali, che umani sono di tipo gastrointestinale, dove, dopo l'assunzione di alimenti contaminati, il batterio induce il proprio assorbimento invadendo

l'intestino tramite gli enterociti. Da qui *L. monocytogenes* può diffondersi nelle cellule vicine e nel flusso sanguigno, raggiungendo fegato e milza. Se il sistema fisiologico è in condizioni normali, i macrofagi epatici e splenici uccidono il battere invasore, ma se l'individuo è immuno-depresso, *L. monocytogenes* causa bacteremia e si diffonde negli altri organi, prevalentemente la placenta, il sistema nervoso centrale, collegato a meningiti, encefaliti e infezioni materno-infantili (Oevermann *et al.*, 2010). I principali fattori di virulenza sono internalina A (InlA), internalina B (InlB), listeriolisina (LLO), fosfolipasi C e Actina A (ActA). L'InlA è una proteina fondamentale per il passaggio intestinale delle cellule epiteliali, riconosce e si lega al recettore umano proteina E-caderina presente nella membrana cellulare dell'ospite. La E-caderina è presente nelle membrane intestinali, placentali ed in quelle del cervello (Lecuit, 2005): questo legame stimola la cellula ospite a fagocitare e quindi introdurre all'interno di sé la cellula di *L. monocytogenes*. Differenti tipi di cellule ospite come epatociti, cellule epiteliali, endoteliali possono essere invase tramite la proteina Internalina B (InlB) che interagisce con il fattore di crescita dell'epatocita "Met".

Nella fagocitosi da parte della cellula ospite il batterio è avvolto in un vacuolo fagocitico con una membrana a singolo strato nella cellula (fagosoma). La listeriolisina, che è responsabile della proprietà emolitica di *L. monocytogenes*, crea pori nella membrana fagosomiale: questo blocca l'acidificazione di questo compartimento e previene la sua fusione con i lisosomi (Shaughnessy *et al.* 2006), consentendo così al battere di fuoriuscire nel citoplasma della cellula ospite.

Due differenti fosfolipasi C sono collegate all'invasione da parte di *Listeria* verso la cellula ospite: fosfatidil-inositol fosfolipasi C (PI-PLC) e fosfatidil-colina fosfolipasi C (PCPLC) che, insieme alla listeriolisina (LLO), facilitano la fuoriuscita di *L. monocytogenes* dal primo fagosoma, il passaggio da cellula a cellula e la creazione del secondo fagosoma. Non appena il batterio fuoriesce dal primo fagosoma nel citoplasma della cellula ospite, inizia a moltiplicarsi rapidamente e per essere in grado di muoversi in altre cellule, una proteina superficiale Actina A (Act A) induce la polimerizzazione delle molecole di actina del citoscheletro della cellula ospite sulla superficie del batterio. Dopo tre o

quattro ore dall'inizio dell'infezione si crea un lungo filamento di actina che si presenta come una "coda batterica", che spinge *L. monocytogenes* attraverso il citoplasma verso le cellule vicine: parte della membrana della cellula ospite si rigonfia mentre la membrana della cellula vicina si curva internamente. Quindi il vacuolo a doppia membrana che ospita la cellula batterica viene fagocitato dalla cellula vicina, ed in questo modo si crea un secondo fagosoma. Questo fagosoma è lisato da LLO e PC-PLC, dando inizio ad una nuova infezione.

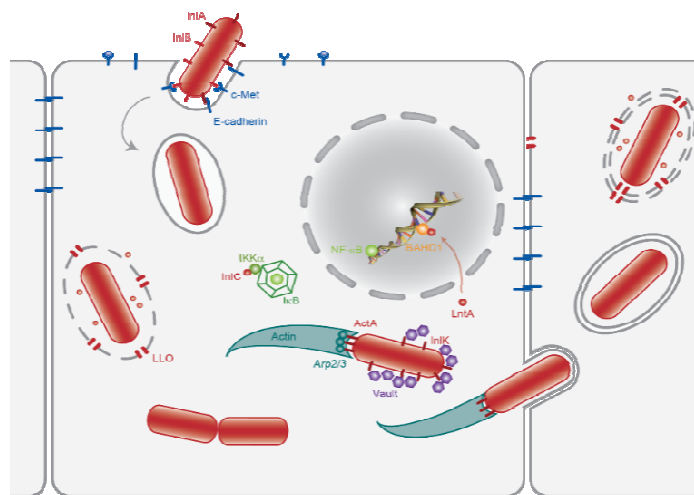


Figura 14: Ciclo di infezione intracellulare di *Listeria monocytogenes*

Una volta fagocitate, le cellule di *Listeria*, non vengono mai portate al di fuori della cellula e diventano parassiti intra-citoplasmatici come *Shigella flexneri* e *Rickettsia rickettsii*. Questo processo spinge il batterio a muoversi da una cellula all'altra senza lasciare lo spazio intracellulare così da non avere relazioni con il sistema immunitario.

3.3 Fattori di sviluppo di *L. monocytogenes* in alimenti

I fattori che maggiormente influenzano lo sviluppo e la crescita di *L. monocytogenes* negli alimenti sono la temperatura, le condizioni di pH ed attività dell'acqua (a_w) presenti nella matrice alimentare.

3.3.1 Temperatura

La temperatura a cui gli alimenti vengono esposti può favorire, preservare od annientare lo sviluppo del microrganismo. A 0-45°C il batterio cresce a livelli differenti a seconda poi del substrato di crescita. Temperature sotto i 0°C congelano la coltura o l'alimento e preservano od inattivano moderatamente il patogeno, mentre temperature sopra i 50°C sono letali.

Il patogeno mantiene le sue funzioni fisiologiche in ambienti freddi dal momento che i suoi fosfolipidi di membrana rimangono in uno stato liquido-cristallino per mantenere un adeguato livello di fluidità della membrana stessa, garantendone in tal modo la possibilità di crescere a basse temperature. La membrana di *L. monocytogenes* contiene più del 95 % di acidi grassi in forma di catene ramificate (Annous *et al.*, 1997) composte a 37°C da un maggior quantitativo di acidi grassi *anteiso* C15:0, C17:0 ed *iso* C15:0, che sono acidi grassi derivanti da insaturazione ed idrossilazione.

Quando la temperatura viene portata a 5°C, la forma predominante diventa quella *anteiso* C15:0 (65-85% del totale degli acidi grassi) con la riduzione in proporzione delle lunghe catene alifatiche C17:0 (Annous *et al.*, 1997) e l'aumento di ramificazioni asimmetriche che riduce i legami di Van der Waals tra i costituenti di membrana. Essendo ridotto l'impaccamento degli acidi grassi a basse temperature, a queste condizioni aumenta anche la fluidità di membrana del patogeno.

Inoltre *Listeria monocytogenes* per resistere a basse temperature produce le proteine “*cold shock proteins*” (Csps), utilizzate nel caso di shock termici repentini, e le “*acclimation proteins*” (Caps), sintetizzate durante la fase di bilanciamento della crescita a basse temperature (Bayles *et al.*, 1996).

L. monocytogenes è inoltre in grado di accumulare soluti compatibili con il citoplasma come glicina, betaina e carnitina, composti che assumono un ruolo di crioprotettori: questi esplicano un ruolo diretto sulla membrana cellulare, modificano l'ambiente intra ed extracellulare, si sostituiscono all'acqua diminuendo così la formazione di cristalli di ghiaccio od abbassando il punto di congelamento.

L. monocytogenes sopravvive anche ai normali processi di pastorizzazione (71°C per 15 secondi): si è osservato un aumento di 7 volte della termo-tolleranza in seguito ad una esposizione a temperature superiori a 45°C per 180 minuti (Pagà *et al.*, 1997). Anche il grado di esposizione e la matrice influenzano largamente il grado di termo-tolleranza di *L. monocytogenes* (Linton *et al.*, 1998). Il patogeno tollera alte temperature attraverso la sintesi di proteine come DnaK, GroES e GroEL (chaperonine) che mantengono la struttura delle proteine della cellula assicurando il raggiungimento ed il mantenimento del corretto stato conformazionale delle catene polipeptidiche sintetizzate, dirigono l'assemblaggio di complessi multi enzimatici, contribuiscono al mantenimento od alla creazione di uno stato di parziale denaturazione delle proteine che così sono più facilmente trasportabili attraverso le membrane dei mitocondri e stabilizzano le proteine danneggiate facilitandone la rinaturazione e/o la degradazione. Esiste inoltre un enzima proteolitico Clp in grado di proteggere i batteri sia Gram-positivi, che quelli Gram-negativi, ed in *L. monocytogenes* questa famiglia di proteasi assume un ruolo fondamentale nella resistenza a varie condizioni di stress ambientale (Hill *et al.* 2002).

Secondo Tienungoon *et al.* (2000) la minima temperatura di crescita, in condizioni di pH ottimali, è tra -1.6 e 0.41 °C per *L. monocytogenes*. I limiti di crescita a temperatura di refrigerazione, quindi, dipendono fortemente dal pH (Tienungoon *et al.*, 2000).

I microrganismi cresciuti nelle loro condizioni ottimali mostrano una breve fase di latenza (fase lag), un breve tempo di generazione durante la fase di crescita esponenziale ed un'alta concentrazione microbica in fase stazionaria. La velocità specifica di sviluppo (μ) di ogni microrganismo raggiunge un picco massimo (μ_{max}) nella fase esponenziale di crescita, ed è inversamente proporzionale al tempo di generazione:

$$\text{Tempo di generazione} = 0.693/\mu$$

Dal momento che la temperatura ottimale di crescita per *L. monocitogenes*, come riportato in letteratura, si aggira tra i 30 e i 37°C, la determinazione della sua cinetica di sviluppo in alimenti ha prodotto quindi risultati differenti. Alcuni ricercatori hanno creato modelli sulla velocità di sviluppo di *L. monocytogenes* in

brodo di coltura a differenti condizioni (Eastern Regional Research Center. 2003. USDA. Pathogen Modeling Program, ERRC, 2003) e, seguendo questo modello, la fase lag ed il tempo di generazione sono più brevi da 1.7 a 0.3 ore, quando il battere è incubato in anaerobiosi a 37°C con a_w media 0.997 e pH iniziale di 7. Abbassando progressivamente la temperatura, questi due parametri crescono.

Robinson *et al.* (1998) hanno osservato una fase lag più breve a 15°C rispetto a 20 o 25°C. In generale si può affermare che il tempo di generazione di *L. monocytogenes* decresce sostanzialmente quando la temperatura incrementa da -1.5 a 30°C. Ad esempio è stato osservato che tale patogeno è in grado di sviluppare in roast-beef conservato sottovuoto a -1.5°C seppure con un tempo di generazione calcolato di 100 ore (Hudson *et al.*, 1994): infatti il mantenimento dei prodotti a temperature di refrigerazione ritarda, ma non previene lo sviluppo di *Listeria*. Ad ulteriore dimostrazione di ciò si è visto che il tempo di generazione in prodotti caseari incrementa a temperatura di refrigerazione, ma, tuttavia non impedisce la crescita del patogeno: in particolare sono stati rilevati tempi di generazione da 28.5 a 46 ore, 1.8 ore e 0.7 ore quando il patogeno è stato incubato a temperature rispettivamente di 4, 21, o 35°C (Rosenow *et al.*, 1987). In assenza di antimicrobici portare gli alimenti da 20 a 43°C supporta una veloce crescita del patogeno.

La relazione tra la temperatura di incubazione ed il tempo di generazione può essere utile per studi di analisi del rischio, anche se sono state osservate variazioni a diverse temperature: alcuni studi (Rosenow *et al.*, 1987) mostrano una relazione lineare tra la radice quadrata del massimo valore specifico di crescita e la temperatura di incubazione (Figura 15), mentre altri lavori hanno evidenziato una relazione non lineare tra i due parametri, mostrando un plateau di crescita una volta raggiunto l'optimum di temperatura (Robinson *et al.*, 1998). Un' alta concentrazione di sale (4.5 al 7.5%) può mascherare gli effetti della temperatura sulla crescita incrementando il tempo di generazione e contribuendo quindi ad una deviazione della retta dalla linearità.

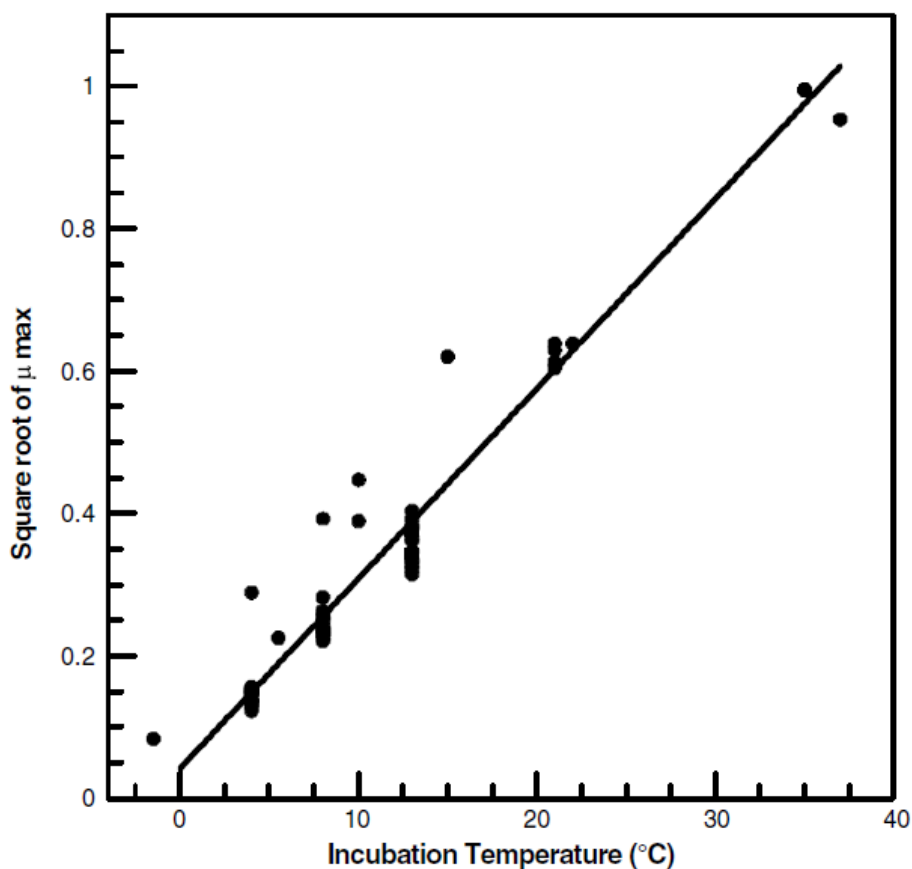


Figura 15: Relazione lineare tra la temperatura di incubazione e la radice quadrata della velocità massima di crescita ($\sqrt{\mu_{max}}$) di *L. monocytogenes* in vari alimenti, considerando come tempo minimo di generazione $\sqrt{\mu_{max}} = 0.693/\text{tempo di generazione}$ (Hudson et al., 1994)

Alcuni ceppi di *L. monocytogenes* hanno una fase lag a 4°C che varia da 70 a 270 ore, e da 36.5 a 70 ore a 10°C in brodo di coltura *Tryptone soy broth* con 0.6% di estratto di lievito (Barbosa et al., 1994). La variabilità tra i vari ceppi dimostra l'importanza di selezionarne un target da utilizzare nei challenge test: la selezione di un ceppo che cresce rapidamente ed è resistente ai trattamenti è importante per incrementare la ricerca riguardo l'ottimizzazione dei trattamenti stessi sugli alimenti, evidenziando il fallimento di un processo quando il patogeno riesce a sopravvivere durante la conservazione.

3.3.2. Acidità

L. monocytogenes sviluppa molto bene in condizioni di pH vicine alla neutralità; tuttavia sono state riportate crescite del microrganismo tra valori di pH di 4 e 9.6

(Petran *et al.*, 1989; Phan-Thanh, 1998). In assenza di altri fattori limitanti, la densità cellulare finale più alta è stata riscontrata tra pH 6 e 8 (Buchanan *et al.*, 1994). Il microrganismo tollera valori di pH bassi mediante una serie di meccanismi di adattamento che includono la modificazione degli scambi ionici della membrana cellulare oppure l'azione del sistema della glutammato-decarbossilasi. Infatti la vitalità batterica dipende dall'abilità delle cellule di mantenere un pH intorno alla neutralità, eliminando i protoni in eccesso dal citoplasma quando vi sono condizioni di media acidità. Sotto ad una certa soglia di pH, le cellule non sono più in grado di espellere velocemente protoni che quindi si accumulano al suo interno: l'acidificazione del citoplasma riduce la forza della membrana che spinge all'esterno i protoni, privando le cellule dell'energia essenziale per il loro metabolismo. L'eccesso di ioni H⁺ altera l'attività enzimatica e può denaturare le proteine (Stratford *et al.*, 1998); quindi, a seconda della composizione dell'alimento, delle condizioni di conservazione e del processo produttivo, il basso pH può essere "listericida" o "listeriostatico". Il glutammato contenuto in molti alimenti come maionese, insalate, succhi di frutta e yogurt può incrementare la sopravvivenza del patogeno a condizioni di acidità: l'internalizzazione del glutammato da parte della cellula batterica svolge una funzione di lavaggio protonico, prevenendo così l'acidificazione citoplasmatica.

L. monocytogenes, inoltre, in condizioni acide, va incontro a molti cambiamenti riguardanti l'espressione genica, incrementando o diminuendo la sintesi di molte proteine: in particolare si è riscontrata l'induzione di 47 e 37 proteine in terreni con aggiunta di acido cloridrico fino ad valori di pH di 3.5 e 5.5 rispettivamente; tali proteine sono state sequenziate e identificate da Hill *et al.* (2002).

La fase lag ed il tempo di generazione crescono considerabilmente alla diminuzione di pH al di sotto di un valore di 6.5 (ERRC, 2003): infatti *Listeria monocytogenes* può crescere in prodotti a bassa acidità, inclusi prodotti fermentati in relazione ad a_w e fattori intrinseci. Sebbene non sia stata documentata crescita di *L. monocytogenes* a pH<4, sembra che questo microrganismo sia acido-tollerante, sopravvivendo in succhi d'arancia con pH 3.6 per 1-4 giorni a 4°C (Parish *et al.*, 1989), e per più di 200 giorni e 365 giorni in formaggi Cheddar (pH 5.1) conservati a 13 e 6°C rispettivamente (Ryser *et al.*,

1987). L'effetto del pH sulla vitalità cellulare dipende fortemente da altri fattori ambientali e dallo stato fisiologico del microrganismo. Ad esempio sono stati osservati l'assenza di crescita ed il decremento della vitalità cellulare a pH 5.5 quando le condizioni di temperatura non erano ottimali per la sopravvivenza del patogeno. All'interno di un range di pH tra 3.2 e 4.4 (ERRC, 2003) in cui è stato stimato un decremento di concentrazione in brodo di coltura, il valore predetto di D (temperatura di riduzione decimale) decresce con il pH con andamento non lineare (Figura x). Questo decremento di D è inoltre molto rimarcato quando la temperatura passa da 4 a 35°C.

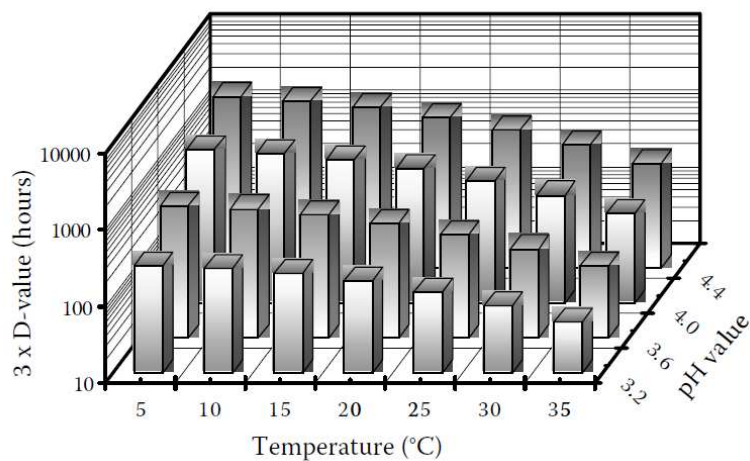


Figura 16: Tempo di esposizione sotto condizioni letali di acidità, necessarie per diminuire *L. monocytogenes* di 3 log ($D=3$). (ERRC, 2003)

La refrigerazione inibisce la crescita di *L. monocytogenes*, ma comunque permette la sopravvivenza del patogeno. Latte inoculato con *Listeria monocytogenes* ed addizionato a yogurt ne ha permesso ad esempio la sopravvivenza per 27 giorni a 4°C (Choi *et al.*, 1988). Un altro studio ha evidenziato la capacità di questo patogeno di sopravvivere anche in fiocchi di latte per più di 35 giorni a 5°C (Piccinin *et al.*, 1995). Questi lavori suggeriscono, quindi, che i prodotti acidi refrigerati possono essere considerati un possibile veicolo di infezione di listeriosi. La temperatura influenza significativamente la crescita del patogeno in condizioni di acidità che viene inibita maggiormente a basse condizioni di entrambe i fattori, ad esempio 5°C e pH 4.5 (ERRC, 2003).

La sensibilità di *L. monocytogenes* a condizioni di alta acidità (pH <4.5) incrementa con la temperatura, soprattutto quando il substrato di crescita non

contribuisce allo sviluppo del patogeno e, inoltre, la resistenza varia sostanzialmente con le condizioni fisiologiche del microrganismo stesso. Ad esempio, l'esposizione della cellula a stress ambientali può indurre un meccanismo di adattamento che incrementa l'acido-tolleranza da parte di *Listeria monocytogenes*: infatti a pH 3.5 si è vista una concentrazione cellulare più alta di 3.1-6.4 volte rispetto ai controlli non sottoposti a stress (Lou *et al.*, 1996).

3.3.3 Attività dell'acqua e tolleranza al sale

Listeria monocytogenes è in grado di crescere in ambienti con bassi valori di a_w ed in particolare con concentrazioni di NaCl superiori al 10%.

Per fare ciò questi microrganismi producono due importanti proteine denominate “*salt shock protein*” (Ssp) e “*stress acclimation protein*” (Sap) per la loro stretta somiglianza a quelle per lo shock termico, Csp e Cap: le prime vengono indotte rapidamente, ma vengono sovra-esprese solo per un breve periodo, mentre le seconde continuano ad essere espresse per ore dopo che le condizioni tornano ottimali (Duche *et al.* 2002).

Un altro meccanismo alla base della resistenza agli stress osmotici prevede la capacità di *L. monocytogenes* di assimilare composti osmoprotettivi, cioè altamente solubili (come glicina betaina, prolina betaina, acetil carnitina) che, non avendo carica elettrica, a pH fisiologico possono essere accumulati all'interno della cellula senza intaccarne le funzioni, cosicché questa possa rispondere allo stress osmotico (Bayles *et al.*, 2000).

L'alta osmolarità, intesa come bassa attività dell'acqua, in una cellula batterica decresce la pressione di turgore, che è quella forza che incrementa il grado di espansione cellulare e quindi contribuisce alla crescita ed alla divisione delle cellule stesse. Una riduzione del turgore inibisce quindi la crescita batterica (Amezaga *et al.*, 1995).

La maggior parte dei prodotti alimentari freschi hanno un'attività dell'acqua > 0.98 (ERRC, 2003). L'essiccamento e l'incremento di sale o di zucchero sono metodi tradizionali per abbassare l' a_w . *Listeria monocytogenes* sopravvive a basse a_w con uno sviluppo ottimale a 0.97 (Petran *et al.*, 1989), anche se è in

grado di crescere fino a valori di a_w di 0.90. I valori di a_w più bassi che permettono comunque la crescita fino a livelli di 6.5 log UFC/mL in presenza di glicerolo (30%), saccarosio (39.4%), NaCl (11.5%) e propilen-glicole (16.7%) sono rispettivamente 0.90, 0.92, 0.92, 0.97 (Miller *et al.*, 1992; Nolan *et al.*, 1992). La fase lag di crescita ed il tempo di generazione incrementano quando l' a_w decresce; anche se non sembra che *Listeria monocytogenes* cresca ad $a_w < 0.90$, il batterio sopravvive nell'ambiente, in particolare in condizioni di refrigerazione per lunghi periodi in alimenti come salami (a_w 0.79 - 0.86) a 4°C per 84 giorni (Johnson *et al.*, 1988). Valori di $a_w < 0.90$ hanno un'azione batteriostatica nei confronti di *L. monocytogenes*, ma appena tali valori incrementano, può riniziare lo sviluppo microbico. L'effetto combinato di a_w e temperatura di crescita è fondamentale: infatti la maggiore inibizione è stata osservata quando sia la temperatura, che l' a_w sono ai loro valori minimi (Figura 17).

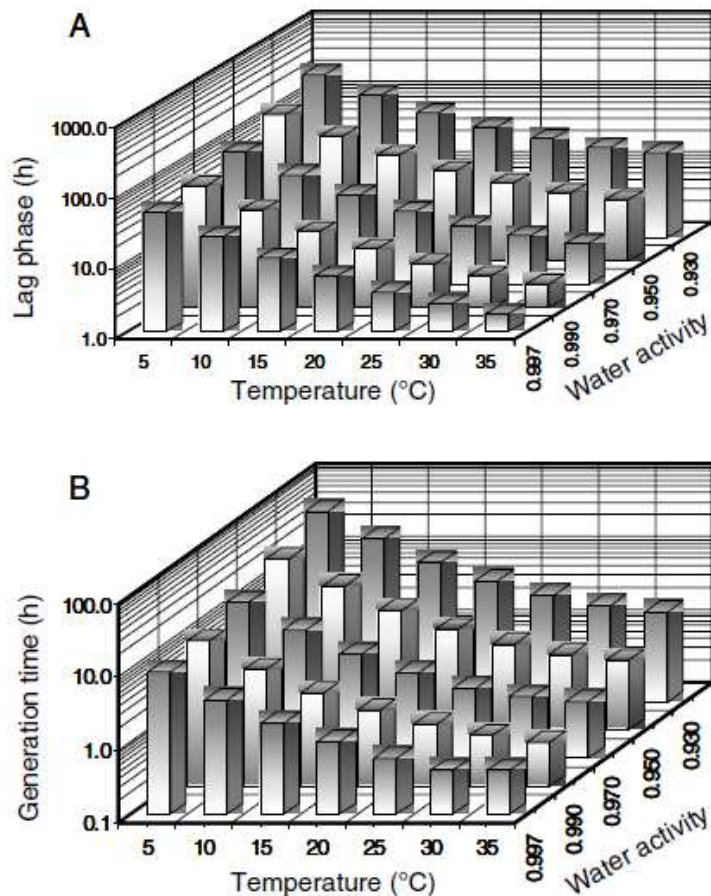


Figura 17: Cambiamento di fase lag (A) e di tempo di generazione (B) di *L. monocytogenes* a differenti valori di a_w e temperature di incubazione (pH 7). (ERRC, 2003)

3.4 Epidemiologia

Tutte le specie del genere *Listeria* sono ben distribuite in natura (suolo, vegetazione, acqua, alimentazione animale, pollame fresco e congelato, scarti di macelli e feci anche umane). Ad esempio gli ambienti che circondano gli animali per la produzione di latte sono facilmente contaminati da feci, ed il latte può essere facilmente contaminato con *L. monocytogenes* durante la produzione poichè il batterio può passare dal bestiame agli edifici di produzione tramite guanti e scarpe. Nei macelli, le carcasse e la carne possono essere contaminate dal contenuto intestinale. In 2056 campioni fecali, ambientali ed alimentari raccolti presso alcune fattorie bovine, Nightingale *et al.* (2004) hanno trovato il 20.1% dei campioni positivi a *L. monocytogenes*. Inoltre, in 1805 campioni di

suolo, acqua e campioni di terreno da ambiente urbano od a basso contatto diretto con animali e uomini, come parchi e foreste, la percentuale positiva è stata del 7.3% da aree urbane e l'1.3% da ambienti naturali (Nightingale *et al.*, 2004).

I disturbi sono principalmente trasmessi da alimenti contaminati da *L. monocytogenes* (McLauchlin *et al.*, 2009). La via di trasmissione cutanea è più rara e causa dermatiti. La prima epidemia che identificò *L. monocytogenes* come agente trasmesso dagli alimenti colpì 41 pazienti di cui 17 morirono in Nuova Scozia, in Canada nel 1981. Il veicolo d'infezione era costituito da insalata di cavolo. Nei paesi civilizzati, dove la listeriosi viene documentata, l'incidenza è circa di 0.3% sulla popolazione (Todd *et al.*, 2011) con un'incidenza maggiore nei paesi scandinavi probabilmente per il maggiore consumo di pesce affumicato (Todd *et al.*, 2011). Dal 2005 in Svezia c'è stato un incremento dei casi di listeriosi fino al 2009 con il raggiungimento di 0.78% di casi nella popolazione, il numero più alto mai riportato (SMI 2012). Il batterio è stato isolato da circa il 20% dei prodotti contaminati di salmone affumicato venduto in Svezia con livelli di contaminazione compresi in un intervallo da < 100 a 1500 UFC/g (Peiris *et al.*, 2009). Dal 2001 al 2007 l'incidenza di listeriosi in pazienti oltre i 60 anni in Gran Bretagna e Galles è duplicato: tali individui avevano consumato carne cotta (bistecche di manzo, prosciutto, carne di maiale), pesce cotto (specialmente salmone affumicato), crostacei, come gamberi, e prodotti pronti come insalate (Gillespie *et al.*, 2009).

Un'incidenza maggiore di listeriosi batterica tra gli anziani, dovuta anche alla conservazione degli alimenti tramite congelamento inadeguato, è stata riportata in Scozia, Irlanda, Germania, Belgio, Francia, Lituania, Olanda e Spagna. A questi pazienti anziani venivano somministrate terapie immunosoppressive per malattie croniche, che di conseguenza avevano incrementato il rischio di listeriosi (ACSMF, 2009).

Quindi un'ampia gamma di alimenti può essere contaminata da *L. monocytogenes*, inclusi latte e derivati (latte crudo e pastorizzato, formaggi molli stagionati, gelati), carne e derivati (carne cruda, carne cruda fermentata, pollame crudo e cotto), pesce crudo e vegetali crudi. Le epidemie sono però associate prevalentemente al consumo di alimenti *ready-to-eat* poiché *L. monocytogenes* è

un microrganismo psicrotrofo e può resistere a condizioni sfavorevoli, stabilizzandosi negli impianti di produzione alimentare: infatti numerosi casi di listeriosi sono collegati a questi alimenti pronti all'uso, consumati senza idonei metodi di controllo come un'adeguata cottura (Todd *et al.*, 2011). Il tenore di vita dei consumatori durante gli anni è cambiato ed anche il tempo a disposizione che hanno per preparare alimenti in casa. Nel mondo, a causa di questo cambiamento radicale delle abitudini di vita, sono cambiate anche le abitudini alimentari con un incremento degli alimenti *ready-to-eat* che nell'industria alimentare sono sempre più in espansione. Questo ha portato le stesse industrie ad avere più preoccupazione nei confronti della listeriosi che richiede molta attenzione per questo tipo di processo produttivo (Alleberger *et al.*, 2010). Per controllare *L. monocytogenes* nei prodotti *ready-to-eat* sono state incrementate le misure di sicurezza anche verso il consumatore, incrementando le indicazioni in etichetta di tempo e temperatura di conservazione.

In particolare gli alimenti prevalentemente contaminati in Gran Bretagna sono i sandwiches pre-confezionati, insalate miste che talvolta eccedono il limite di 100 UFC/g, specialmente se contengono insalata.

I sintomi iniziali di disturbi nell'uomo derivanti da alimenti contaminati da *Listeria monocytogenes* sono influenza, incluse febbri persistenti. La manifestazione dell'infezione può essere limitata da sintomi gastro-intestinali come nausea, vomito, diarrea o può avanzare verso infezioni più serie sistemiche e con rischio di mortalità, come setticemia, meningite, encefalite, infezioni intrauterine o cervicali in donne incinte, che portano ad aborto spontaneo (FDA, 2009).

Non si conosce né la dose infettante, che si stima essere inferiore a 10^3 UFC/g, né il tempo di incubazione, che probabilmente è superiore a 12 ore. Il tempo di incubazione per i disturbi più gravi è sconosciuto, ma può essere da pochi giorni a tre settimane. Il tasso di mortalità è alto per meningiti (70%), setticemia (50%) ed infezioni neonatali e perinatali (80%) (FDA, 2009).

I gruppi di popolazione a rischio includono donne incinte ed il feto, e persone immunodepresse. Gli anziani, i diabetici, gli asmatici ed i pazienti con ulcere e coliti sono spesso infettati, altre volte meno frequentemente (FDA, 2009).

3.5 Criteri microbiologici, prevenzione e controllo nei processi alimentari per diminuire il rischio di listeriosi

Uno degli aspetti dibattuti dei criteri microbiologici per *Listeria monocytogenes* è il problema se il target negli alimenti debba essere l'assenza di *L. monocytogenes* o se possono essere accettati bassi livelli di concentrazione di tale microrganismo, come ad esempio la possibilità di avere un limite di 100 UFC/g in prodotti a fine shelf-life. Alcuni paesi richiedono l'assenza del patogeno nei prodotti *ready-to-eat* in 25 g di prodotto destinati ai bambini ed altri gruppi di popolazione vulnerabili, ed alimenti pronti all'uso che favoriscono la crescita di *L. monocytogenes* come gli alimenti refrigerati *ready-to-eat* con lunga shelf-life come panini pre-confezionati, carne in scatola, formaggi molli e pesce affumicato e marinato. Livelli di 100 UFC/g sono permessi quando la crescita dovrebbe essere molto lenta o sfavorita nel substrato alimentare.

Le listeriosi derivanti da alimenti possono essere prevenute in due modi: tramite il controllo dell'organismo nell'ambiente di lavorazione, e tramite un'altissima attenzione alla preparazione domestica degli alimenti poiché, sebbene la cottura e la pastorizzazione eliminano il rischio delle listeriosi alimentari interamente, le moderne preferenze alimentari esaltano la "salubrità" di alimenti crudi e minimamente processati come parte di una dieta corretta (Schlech, 2000).

Ricordando che *L. monocytogenes* può sviluppare in presenza di alte concentrazioni di sale (10% NaCl) ed in un vasto range di pH (pH 4.5–9) e temperatura (0–45°C) (Velge *et al.*, 2010), gli alimenti che non supportano la crescita del microrganismo hanno un $\text{pH} \leq 4.4$ od $a_w \leq 0.92$: a tale proposito, se un prodotto ha un $\text{pH} \leq 5.0$, l' a_w deve essere ≤ 0.94 o *vice versa* (EC No. 2073/2005). Sono presenti una serie di linee guida per le industrie poiché, sebbene la cottura uccida il batterio, esso può essere potenzialmente presente in alimenti crudi o pronti all'uso: in questi prodotti i produttori devono verificare dove *Listeria monocytogenes* può crescere e dove no per prevenire la contaminazione e la crescita. Anche la determinazione di un'adeguata *shelf-life* è fondamentale per controllare questi alimenti. In Canada è prevista una combinazione di controlli nell'industria, nell'ambiente e sul prodotto finito.

L'intento di controllo sull'ambiente, in particolare sulle superfici a contatto con gli alimenti, è di monitorare l'effettiva sanitizzazione e le buone pratiche di lavorazione (GMP, *Good Manufacturing Practice*). Le aziende sono altamente esortate ad effettuare controlli sugli ambienti di lavoro a contatto o meno con gli alimenti in cui si possono creare potenziali nicchie e siti di contaminazione e sviluppo per *Listeria* spp.: negli impianti, in particolare le affettatrici possono essere una fonte di disseminazione del patogeno tramite contaminazione crociata. I prodotti crudi che entrano nella linea produttiva possono essere contaminati per cui è bene effettuare trattamenti adeguati come affumicatura e cottura poiché senza trattamenti il patogeno entra a far parte della flora microbica domestica e sopravvive per lunghi periodi.

3.6 Metodi di rilevamento di *Listeria monocytogenes* negli alimenti

I metodi raccomandati dalle diverse autorità normative per la rilevazione di *L. monocytogenes*, anche se questi hanno variazioni nella selezione delle colture e nella preparazione dei campioni, seguono tutti gli stessi procedimenti e mezzi che possono essere applicati ad ogni alimento. I procedimenti ed i materiali previsti dalla *Food and Drug Administration* (FDA), da *United States Department of Agriculture* (USDA) e da *International Organization for Standardization* (ISO) sono indicati nella tabella seguente.

Tabella 13: mezzi e condizioni di incubazione raccomandati da ISO, FDA e USDA per la ricerca di *Listeria monocytogenes* negli alimenti.

Method ^a	Primary enrichment ^b	Secondary enrichment ^b	Selective-differential plating ^b
BAM/FDA 2011	BLEB without selective agents at 30°C/4 h	BLEB - add selective agents and continuing incubating for a total time of 48 h at 30°C	OXA, Palcam or MOX at 35°C/24–48 h or LPM plus esculin and Fe ³⁺ at 30°C/24–48 h
MLG/FSIS/USDA 2009	UVM at 30 ± 2°C/22 ± 2 h	Fraser Broth at 35 ± 2°C/26–48 ± 2 h or MOPS-BLEB at 35 ± 2°C/18–24 h	MOX at 35 ± 2°C/26–52 ± 2 h
ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004	Half-Fraser Broth at 30 ± 1°C/24 h ± 2 h	Fraser Broth at 35 ± 1°C/48 h or 37 ± 1°C/48 h	ALOA at 37 ± 1°C/24 ± 3 h to 48 ± 6 h and a 2 nd medium optional ^c
ISO 11290-2:1998/Amd.1:2004	–	–	ALOA at 37 ± 1°C/24 ± 3 h to 48 ± 6 h (Spread plate)

Aloa: Agar *Listeria* Ottaviani & Agostini; **BLEB:** Brodo di arricchimento per *Listeria tamponato*; **BPW:** Acqua Peptonata Tamponata; **MOPS-BLEB:** Brodo di

Arricchimento per *Listeria* Tamponato con AcidoMorfolinePropaneSulfonico; MOX: Oxford Agar Modificato; OXA: Oxford Agar; PALCAM: Agar Selettivo per *Listeria* Palcam; UVM: Brodo modificato dell'Università del Vermont. (Da Silva et al., 2013.)

I mezzi utilizzati si basano su una serie di agenti selettivi come acriflavina, cloruro di litio, colistina, cefotetan, moxalactam ed acido nalidixico. L'idrolisi dell'esculina effettuata dalla glucosidasi (esculinasi) è l'attività selettiva più utilizzata per effettuare lo screening su colonie sospette. Anche se tutte le specie di *Listeria* sono positive all'idrolisi dell'esculina, i mezzi utilizzati per tale attività non sono caratteristici per *L. monocytogenes*.

In ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004 viene utilizzato un mezzo selettivo per *L. monocytogenes* cromogenico, ALOA (Agar *Listeria* Ottaviani e Agosti), per eseguire lo screening su colonie sospette. Il terreno ALOA utilizza due substrati differenti: X-Glu (5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucopiranoside), cromogenico per l'enzima glucosidasi, e L- α - fosfatidilinositolo, non cromogenico, per l'enzima fosfatidilinositolo-fosfolipasi (PI-PLC). Lo sfaldamento del substrato cromogenico dall'enzima glucosidasi si manifesta tramite colonie blu, che indicano quindi la presenza di *Listeria* spp. Lo sfaldamento del substrato di PI-PLC si manifesta con un alone bianco precipitato attorno alla colonia, che indica la presenza di *Listeria* patogena (*L. monocytogenes* e/o *L. ivanovii*). ALOA presenta fosfatidilinositolo come substrato per determinare la presenza dell'enzima PI-PLC (OCLA *Differential Supplement* SR0244, Oxoid) o lecitina (*Brilliance Listeria Differential Supplement* SR0228, Oxoid) per PC-PLC. La *Food and Drug Administration* raccomanda inoltre l'uso di un mezzo cromogenico in aggiunta all'agar selettivo contenente esculina, inclusi ALOA, CHROMagar, BCMR o RAPID'Lmono (Hitchins, 2011).

Un diagramma di flusso generale per l'individuazione di *L. monocytogenes* negli alimenti prevede il metodo di presenza/assenza. Le varie fasi sono le seguenti.

- 1- Pre-arricchimento ed arricchimento selettivo: si omogenizzano 25 g di alimento, o 25 ml di campione, con 225 ml di brodo di arricchimento tamponato (*Buffered Listeria Enrichment Broth*- BLEB), contenente sodio piruvato, senza agenti selettivi (acriflavina HCl, acido nalidixico e cicloesimide). Viene effettuata l'incubazione a 30°C (pre-arricchimento) e

in seguito si aggiungono gli agenti selettivi, continuando ad incubare a 30°C per un tempo totale di 48 ore (arricchimento selettivo). Se non è disponibile il cicloesimide, si può utilizzare pimaricina (25 mg/l). Se nel campione si ha una bassa quantità di lieviti e muffe, questi agenti antifungini sono richiesti.

- 2- Piastre selettive-differenziali: dalle colture ottenute dal BLEB ottenute dopo 24-48 ore di incubazione, si striscia un'ansata su una piastra di agar selettivo contenente esculina. Per ogni terreno selettivo utilizzato viene effettuata l'incubazione nelle opportune condizioni: OXA (*Oxford Agar*) MOX (*Modified Oxford Agar*) e *Palcam Listeria Selective Agar* sono incubati a 35°C per 24-48 ore; LPM (*Lithium Chloride Phenyethanol Moxalactam*) con aggiunta di esculina e Fe³⁺ è incubato a 30°C per 24-48 ore. Le colonie di *Listeria* sono nere con un alone nero, che indica l'idrolisi dell'esculina.
- 3- Conferma: da ogni piastra contenente agar selettivo, vengono selezionate cinque o più colonie tipiche per confermare che si tratti effettivamente di *L. monocytogenes*. La coltura viene purificata tramite strisciamento di un'ansata su *Trypticase Soy Agar* con 0.6% di estratto di lievito (TSA-YE). Viene incubato a 30°C/24-48 ore. Ulteriori test di conferma che vengono utilizzati, determinati dall'isolamento di una colonia da TSA, sono quello della catalasi, la colorazione di Gram e la motilità a fresco: si osserva la motilità tramite immersione in olio, al microscopio. Tutte le specie di *Listeria* mostrano motilità.

Tramite la preparazione di una brodo-coltura Trypticase Soy broth (TSB) si può determinare la motilità con un metodo semi-solido: da tubi inoculati di TSB si aggiunge Indolo Sulfide (SIM). Dopo incubazione a 25°C per sette giorni si osserva la crescita giornalmente: le colonie di *Listeria* presentano una crescita simile ad un ombrello in quanto sono dotate di motilità. Può essere effettuato anche il test per l'emolisi: viene contrassegnata una griglia di 20-25 sezioni sul fondo di una piastra con Agar con plasma di pecora. Dalle colonie del TSA viene inoculata una coltura per sezione tramite spatola. Si inoculano controlli positivi e

negativi (positivi = *L. ivanovii* e *L. monocytogenes*, negativi = *L. innocua*) in parallelo che si esaminano dopo un'incubazione a 35°C/24–48 ore. *L. monocytogenes* e *L. seeligeri* producono una leggera emolisi con un alone attorno alla colonia. *L. innocua* non mostra attività emolitica e *L. ivanovii* produce un ben definito alone attorno alla colonia. Dalla coltura in TSB-YE si può determinare anche la fermentazione dei carboidrati tramite l'inoculo per 7 giorni a 37°C dei tubi di brodo viola (Purple Broth) con 0.5% di carboidrati (destrosio, esculina, maltosio, mannitolo, xilosio). La variazione di colore da viola a giallo indica un indice positivo all'utilizzo degli zuccheri, tramite la produzione di acidi, mentre l'assenza di cambiamento di colore indica attività negativa per gli zuccheri. Tutte le specie di *Listeria* sono negative alla produzione di gas, positive per la produzione di acidi da destrosio, esculina e maltosio. *L. monocytogenes* fermenta il ramnosio, mentre è negativa per lo xilosio ed il mannitolo (Da Silva *et al.*, 2013).

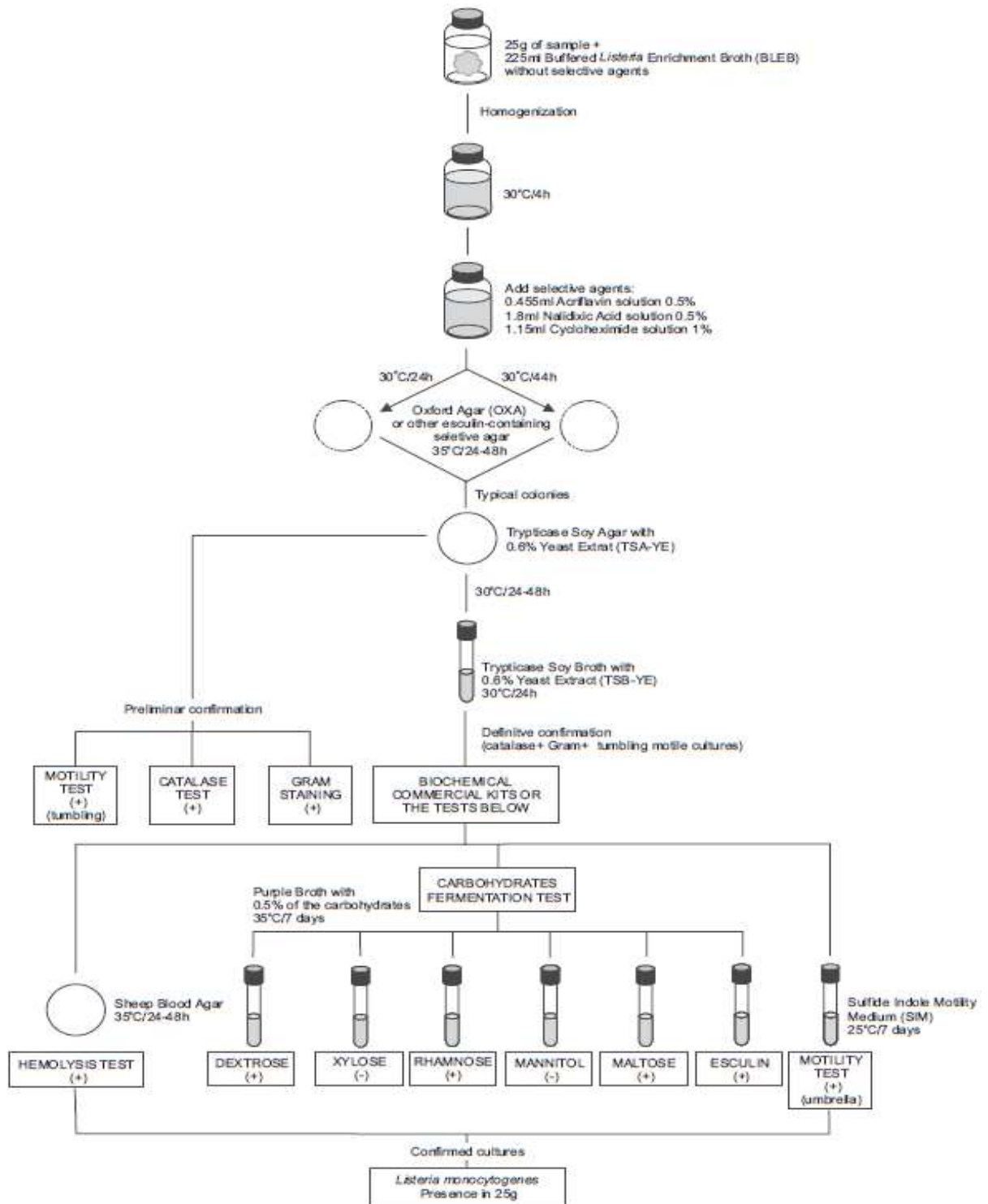


Figura 18: Schema di analisi per l'individuazione di *L. monocytogenes* negli alimenti usando il metodo di presenza/assenza (Hitchins, 2011).

Nuove tecniche molecolari sono sempre più utilizzate per la determinazione, la quantificazione e lo studio di popolazioni microbiche negli alimenti o durante i

Capitolo 3 –*Listeria monocytogenes* 91

processi di trasformazione. Tra questi metodi, la tecnica basata sulla PCR (*Polymerase Chain Reaction*) è stata notevolmente considerata in quanto utilizza primer nucleotidici che individuano i fattori di virulenza e non virulenza come hemolisina (*hly*), proteine associate all'invasione (*iap*), e geni che codificano per 16S rRNA. La *Real-time* PCR, anche chiamata *Real-time* PCR (qPCR) quantitativa è una tecnica molecolare che viene utilizzata per amplificare e simultaneamente quantificare una precisa molecola di DNA dal momento che la reazione prosegue in tempo reale ed ogni nuovo frammento di DNA creato viene reso fluorescente tramite una particolare molecola fluorofora (*Sybr green*) rendendo così quantificabile la concentrazione di un certo DNA o RNA in un gruppo di cellule batteriche. Questo metodo è molto veloce ed è richiesto meno tempo per ottenere risultati poiché sono necessari solo due giorni di analisi anziché sette, come nel processo tradizionale. Tuttavia, nella fase di arricchimento non è possibile quantificare il livello di contaminazione iniziale (Postollec *et al.*, 2011).

CAPITOLO 4 – SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi anni si è assistito, sia negli stati Uniti, che in Europa, ad un numero sempre più frequente di casi di tossinfezioni alimentari associate al consumo di prodotti ortofrutticoli freschi. In particolare alcuni vegetali freschi e prodotti minimamente trattati sono stati legati a casi di tossinfezioni causate da *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* (Abadias *et al.*, 2011). Infatti gli ortaggi e la frutta sono spesso caratterizzati da elevate contaminazioni microbiche (4-7 log UFC/g) poiché, durante la produzione in campo od in fase di post-raccolta, vengono a contatto con il suolo, insetti o contaminazioni di origine umana (Beuchat, 1998; Abadias *et al.*, 2011). Indipendentemente dal rischio associato alla presenza di microrganismi patogeni, il microbiota dei prodotti ortofrutticoli freschi è costituito da microrganismi degradativi, e prevalentemente da batteri Gram-negativi, quali *Pseudomonas* spp., *Erwinia herbicola*, *Flavobacterium agglomerans*, *Xanthomonas* ed *Enterobacter* (Tournas, 2005), oltre che da batteri lattici quali *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus* spp. Inoltre anche lieviti (*Torulopsis*, *Saccharomyces* e *Candida*) e varie muffe (*Alternaria*, *Penicillium*, *Fusarium* ed *Aspergillus*) possono proliferare limitando così la shelf-life della frutta fresca (Caponigro *et al.*, 2010; de Azeredo *et al.*, 2011; Pianetti *et al.*, 2008).

Il lavaggio è pertanto una delle fasi più importanti nel processo produttivo non solo dei prodotti di IV gamma, ma anche per quelli ortofrutticoli commercializzati freschi in quanto consente la rimozione di residui organici (terra, suolo,...) e delle cellule microbiche dalla superficie dei prodotti. Tra i vari sanitizzanti disponibili in commercio, i derivati del cloro sono sicuramente quelli che trovano il maggior impiego nel settore agro-alimentare, soprattutto sotto forma di ipoclorito di sodio o di calcio. In particolare l'efficacia dell'ipoclorito dipende da numerosi parametri includenti, oltre la concentrazione ed il tempo di esposizione, anche il pH, la temperatura, la presenza di materiale organico e le caratteristiche intrinseche dei microrganismi patogeni o degradativi presenti sulla superficie dei prodotti da decontaminare (Boyette *et al.*, 1993). Quando

Capitolo 4 – Scopo della tesi

L'ipoclorito di sodio viene aggiunto all'acqua, genera acido ipocloroso (HOCl) che è in forma indissociata e che rappresenta il componente attivo responsabile dell'attività battericida. A seconda del pH della soluzione si forma prevalentemente acido ipocloroso (a pH acido) o lo ione ipocloroso (pH alcalino) la cui attività è però meno marcata.

L'efficacia dell'ipoclorito nei confronti di differenti specie microbiche è ampiamente documentata, il che lo rende, unitamente alla semplicità d'uso ed economicità, il trattamento maggiormente impiegato (a concentrazioni da 50 a 200 mg/L e con tempi di contatto di qualche minuto) per ridurre/eliminare i microrganismi presenti sulla superficie di frutta e prodotti vegetali (Ramos *et al.*, 2013). Tuttavia, l'uso del cloro presenta problemi a livello ambientale e rischi per la salute umana connessi alla formazione di composti tossici, quali i tri-alometani, che si formano per reazione del cloro con i residui di materiale organico (Gil *et al.*, 2009). Inoltre, le restrizioni a livello legislativo in relazione all'uso del cloro spingono l'industria alimentare a trovare soluzioni alternative per la decontaminazione di prodotti ortofrutticoli da commercializzare freschi o da utilizzarsi come materie prime per i prodotti di IV gamma. Di conseguenza, diversi approcci alternativi all'ipoclorito sono stati proposti, e tra i più studiati vi sono l'ozono, l'irraggiamento, gli acidi organici, il confezionamento in atmosfera modificata, i conservanti naturali tra cui estratti ed oli essenziali.... (Ramos *et al.*, 2013; Rico *et al.*, 2007).

In questo contesto, anche l'acqua elettrolizzata (AE), sia acida che neutra, è stata studiata per valutarne le potenzialità come sanitizzante per l'industria alimentare. Infatti l'AE contiene una miscela di ossidanti inorganici, quali HClO, OCl⁻, Cl₂, OH, e O₃, che possono agire danneggiando le cellule microbiche. Diversi studi hanno infatti dimostrato l'efficacia dell'acqua elettrolizzata acida per la decontaminazione di diversi vegetali quali lattuga, carote, cavolo, (Yang *et al.*, 2003; Koide *et al.*, 2011; Mansur e Oh, 2015). Più recentemente è stata presa in esame anche l'acqua elettrolizzata neutra che presenta la caratteristica di aver attività antimicrobica sebbene il contenuto in cloro attivo sia inferiore rispetto all'AE acida, con conseguenti minor danni per la salute umana e per l'ambiente (Lee *et al.*, 2014).

L'obiettivo generale di questo elaborato finale è stato quello di valutare le potenzialità dell'uso di acqua elettrolizzata neutra per la decontaminazione superficiale di mele *Golden Delicious*. Più precisamente si è prodotta acqua elettrolizzata neutra, con un generatore EVA SYSTEM® 100 fornito da Industrie De Nora S.p.A., e la si è utilizzata per effettuare lavaggi di differente durata delle mele. L'efficacia dei trattamenti con acqua elettrolizzata è stata confrontata con quella di soluzioni di ipoclorito di sodio a differente contenuto di cloro attivo (50, 100 e 200 ppm) valutando la riduzione del livello di contaminazione sia della microflora naturalmente presente sulle mele, che di un microrganismo patogeno, *Listeria monocytogenes* 56 Ly, deliberatamente inoculato sulla superficie della frutta. Infine si è verificato se le condizioni di lavaggio adottate possano influenzare un parametro qualitativo/nutrizionale delle mele quali il potere antiossidante ed il contenuto in fenoli totali della buccia.

CAPITOLO 5 - MATERIALI E METODI

5.1 Matrici alimentare utilizzata

Per questo lavoro si sono utilizzate mele “*Golden Delicious*” acquistate dalla azienda agricola di Cesena “Apofruit”. Le mele utilizzate per le nostre analisi erano prive di cera aggiuntiva e sono state conservate in azienda in celle ad una temperatura di 0°C.

5.2 Soluzioni sanitizzanti utilizzate per il lavaggio delle mele

5.2.1 Ipoclorito di sodio

Le soluzioni di ipoclorito di sodio utilizzate sono state preparate diluendo Amuchina® (11000 ppm di cloro attivo) in acqua distillata. Più precisamente si sono preparate soluzioni a differente concentrazione di cloro attivo - 50, 100, 200 ppm ,- definito come la quantità di cloro gassoso che una soluzione di ipoclorito può sviluppare qualora venga trattata con un acido forte.



Figura 19: Amuchina® soluzione disinfettante

5.2.2 Acqua elettrolizzata

L’acqua elettrolizzata è stata generata mediante elettrolisi con apparecchiatura EVA SYSTEM® 100 di Industrie De Nora S.p.A in dotazione all’Università di

Bologna, progettato nell'ambito del progetto Verdenora®, di Via Leonardo Bistolfi, 35 - 20134 Milano (MI) (Figura X).

Per la produzione dell'acqua elettrolizzata si è proceduto come riportato dal protocollo di utilizzo del macchinario.

Dopo l'accensione dell'elettrolizzatore, 200 g di sale fornito in dotazione con lo strumento sono stati aggiunti ad 1 L di acqua distillata sotto agitazione fino ad ottenere una soluzione lattiginosa e satura di sale. Dopodiché si è versata all'interno del macchinario la soluzione satura di sale ed acqua distillata fino al riempimento del serbatoio (20 L). Si è in seguito proceduto all'avviamento del ciclo produttivo: la corrente è passata da 0 A a 9.5–10 A in 1 minuto ed è stata mantenuta a 10 A per 1 ora. Durante questo periodo la tensione si è stabilizzata passando da un valore iniziale di 30–31 V a circa 27–28 V. La parte gassosa della soluzione è fuoriuscita dal tubo centrale producendo un movimento circolatorio all'interno del serbatoio. Trascorso questo periodo, la corrente si è ridotta gradualmente a 0 A, ed un segnale acustico ha indicato il termine del ciclo di elettrolisi.

Analogamente all'ipoclorito di sodio, anche l'acqua elettrolizzata è stata diluita in modo da ottenere tre concentrazioni finali di cloro attivo pari a 50, 100 e 200 ppm.



Figura 20: Generatore di acqua elettrolizzata

5.3 Valutazione dell'effetto sanitizzante di lavaggi con acqua elettrolizzata ed ipoclorito di sodio di mele inoculate con *Listeria monocytogenes*

Al fine di valutare l'azione decontaminante delle soluzioni oggetto di studio, è stato effettuato un Challenge test in cui *Listeria monocytogenes* 56 Ly è stata utilizzata per contaminare, a differenti livelli di inoculo ($\sim 10^3$, 10^5 e 10^7 UFC/frutto), la superficie di mele *Golden Delicious*.

5.3.1 Preparazione delle colture cellulari ed inoculo delle mele con *L. monocytogenes* 56Ly

Il ceppo di *Listeria monocytogenes* 56Ly utilizzato in queste prove è stato isolato dal laboratorio di Microbiologia degli Alimenti del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari (DISTAL) dell'Università di Bologna da acque reflue del processo di lavaggio di carne suina. Questo ceppo è stato scelto per il Challenge test perché è risultato essere molto resistente a diversi stress come ad esempio le alte e basse temperature utilizzate rispettivamente per il trattamento termico e lo stoccaggio di alimenti, oltre a trattamenti di alta pressione di omogeneizzazione o al plasma.

Per la preparazione del preinoculo, è stata prelevata un'aliquota di 1 ml di *Listeria monocytogenes* 56Ly dalle colture stock conservate a -80°C . *Listeria monocytogenes* 56Ly è stato di seguito ripreso in provetta al cui interno erano presenti 7 mL di Brain Heart Infusion ([BHI](#), Infuso di cervello (solido) 12.5 g/L, Infuso di cuore di bue (solido) 5.0 g/L, Proteose peptone 10.0 g/L, Destrosio 2.0 g/L, Cloruro di sodio 5.0 g/L, Sodio fosfato monoacido 2.5 g/L; Oxoid) che sono stati posti ad incubare a 37°C per 20 ore. Trascorso tale periodo in cui il patogeno raggiunge una carica di circa 9 Log UFC/ml, si è prelevato 1 ml della brodo-coltura e si sono eseguite diverse diluizioni seriali decimali fino a raggiungere livelli di carica cellulare di 8, 6 o 4 Log UFC/ml in una beuta contenente 5 L di soluzione fisiologica sterile (Figura X). Tali sospensioni cellulari sono state successivamente utilizzate per realizzare livelli di inoculo sulla superficie delle mele rispettivamente di 7, 5 e 3 Log UFC/frutto. A tale scopo, le

Uso di acqua elettrolizzata per la decontaminazione di mele
Simone Mazzini - 2015

sospensioni sono state trasferite in un sacchetto per autoclave contenente un cestello forato in cui sono state poste 15 mele. Le mele sono rimaste in immersione nelle soluzioni contenenti *Listeria monocytogenes* 56Ly per 2 minuti sotto agitazione (Figura X), in modo che le cellule microbiche potessero aderire alla superficie. Trascorso tale periodo, le mele sono state raccolte e lasciate ad asciugare per circa mezzora in vaschette di alluminio poste sotto cappa chimica. Quando le mele sono risultate asciutte, si è proceduto alla analisi microbiologica del campione il controllo, costituito da 3 mele, per verificare l'effettiva adesione del patogeno sulla superficie della mela; contestualmente si sono realizzati i trattamenti di decontaminazione mediante lavaggio con le soluzioni sanitizzanti.



Figura 21: Beuta con la brodo-coltura di *L. monocytogenes* 56 Ly utilizzata per l'inoculo delle mele



Figura 22: Fase di inoculo delle mele con L. monocytogenes 56Ly

5.3.2 Trattamento di sanitizzazione delle mele

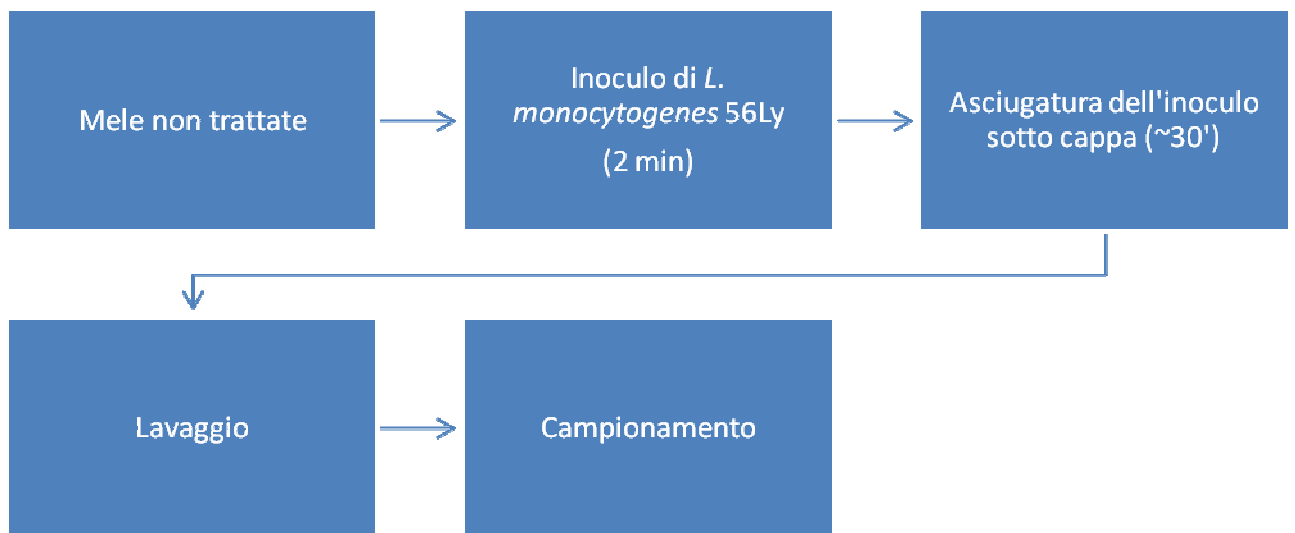
I trattamenti di decontaminazione delle mele *Golden Delicious* deliberatamente contaminate con *Listeria monocytogenes* 56 Ly a livelli di ~ 3, 5 e 7 Log UFC/frutto, sono stati fatti mediante lavaggi in immersione nelle seguenti soluzioni:

- soluzione di ipoclorito di sodio con un contenuto di cloro attivo pari a 50, 100 e 200 ppm.
- acqua elettrolizzata con un contenuto di cloro attivo pari a 50, 100 e 200 ppm.

In 10L di ogni soluzione sono state inserite 12 mele che sono state mantenute in immersione a temperatura ambiente per 5, 10, 20 o 30 minuti (Figura X). Trascorso tale tempo si è proceduto all'analisi microbiologica di 3 mele per ogni condizione di lavaggio.



Figura 23: Fase di lavaggio mediante immersione in soluzione sanizzante a base di ipoclorito di sodio o acqua elettrolizzata



5.3.3 Analisi microbiologiche

Al fine di valutare l'effetto dei diversi trattamenti di sanitizzazione sulle mele deliberatamente inoculate con *Listeria monocytogenes* 56Ly, ogni frutto è stato posto in 50 ml di una soluzione fisiologica sterile (0.9% NaCl, p/v) ed è stato massaggiato manualmente per 2 minuti in modo che le cellule di *L. monocytogenes* adese alla superficie delle mele potessero staccarsi, permettendone così la dispersione nella soluzione ed il successivo prelievo per l'analisi. Per valutare il numero di cellule vitali presenti, dalla sospensione

cellulare così preparata (corrispondente alla diluizione 10^{-1} ; Figura XX), sono state allestite delle diluizioni seriali decimali in provette contenenti 9 ml di soluzione fisiologica sterile.

Le opportune diluizioni sono state inoculate in piastre Petri contenenti *Listeria Selective Agar Base* (formulazione di Oxford, Oxoid; Tabella 14) agarizzato ed addizionato del corrispondente supplemento selettivo (Tabella 15). Le piastre sono state quindi incubate a 37°C per 48 ore a seguito delle quali si è proceduto al conteggio delle colonie con morfologia tipica di *L. monocytogenes* (Figura 25). I risultati sono riportati come valore medio e corrispondente deviazione standard delle analisi effettuate su 3 mele.

Tabella 14: Composizione del terreno di coltura *Listeria Selective Agar Base* (formulazione di Oxford)

Columbia Blood Agar Base	39.0 g/L
Esculina	1.0 g/L
Ferro (ico) ammonio citrato	0.5 g/L
Litio cloruro	15.0 g/L

Tabella 15: Composizione di un flacone di *Listeria Selective Supplement* (Oxford)

Cicloesimide	200.0 mg
Colistina solfato	10.0 mg
Acriflavina	2.5 mg
Cefotetan	1.0 mg
Fosfomicina	5.0 mg

Il terreno *Listeria Selective Agar Base* (Oxford) è basato sulla formulazione descritta da Curtis *et al.* 1989 ed è raccomandato per la ricerca di *L. monocytogenes* in alimenti e campioni clinici. Per l'isolamento e per la differenziazione di *L. monocytogenes*, questo terreno utilizza cloruro di litio, acriflavina, colistina solfato, cefotetan, cicloesimide e fosfomicina

come agenti inibitori selettivi, ed esculina e citrato ferrico come indicatori. *L. monocytogenes* idrolizza l'esculina e produce colonie circondate da un alone nero, dovuto alla formazione di composti ferro fenolici di colore nero, derivanti dall'aglicone (Figura Z). I batteri Gram negativi risultano completamente inibiti, mentre la maggior parte delle specie Gram positive non desiderate subiscono un arresto della crescita: solo alcuni ceppi di enterococchi mostrano uno sviluppo scarso ed una debole reazione all'esculina, generalmente dopo 40 ore di incubazione. Possono svilupparsi anche alcuni stafilococchi con colonie esculina-negative. Le colonie tipiche di *L. monocytogenes* risultano quasi sempre evidenti dopo 24 ore. Si raccomanda, tuttavia, di prolungare l'incubazione per ulteriori 24 ore, per permettere il recupero dei ceppi a lenta crescita. Le tecniche di isolamento variano a seconda degli autori e dipendono dal tipo di materiale da esaminare. L'arricchimento selettivo e l'arricchimento a freddo hanno dimostrato di essere in grado di aumentare in modo significativo la percentuale di isolamento da tutti i tipi di campione. L'efficacia di *Listeria Selective Medium (Oxford)* è stata dimostrata per molte matrici alimentari anche da altri autori, che hanno seguito i metodi ed utilizzato i terreni di arricchimento selettivo descritti in letteratura.

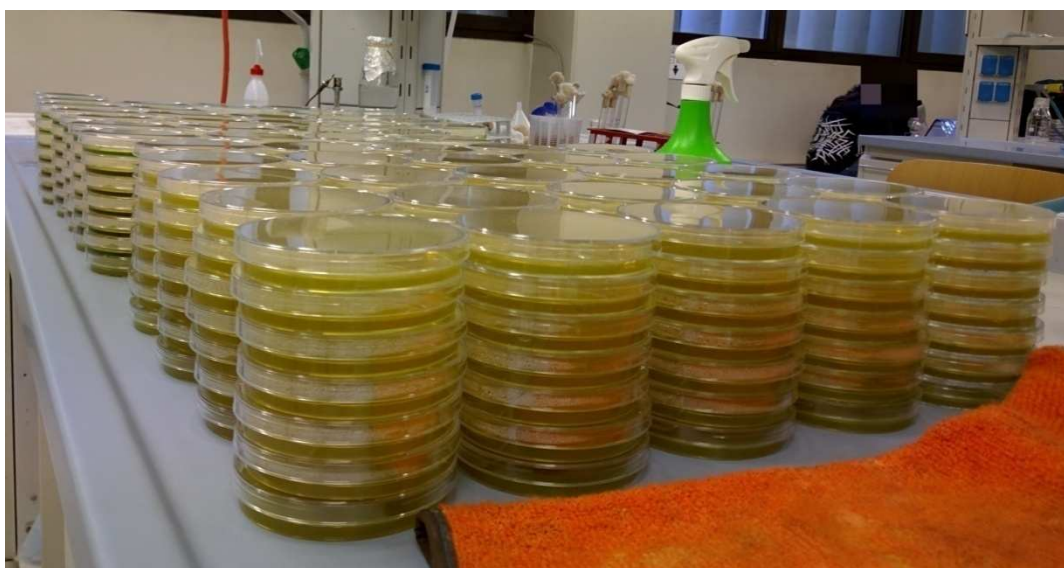


Figura 24: piastre contenenti terreno selettivo LSA

Tipica colonia di *L. monocytogenes* con cratere centrale

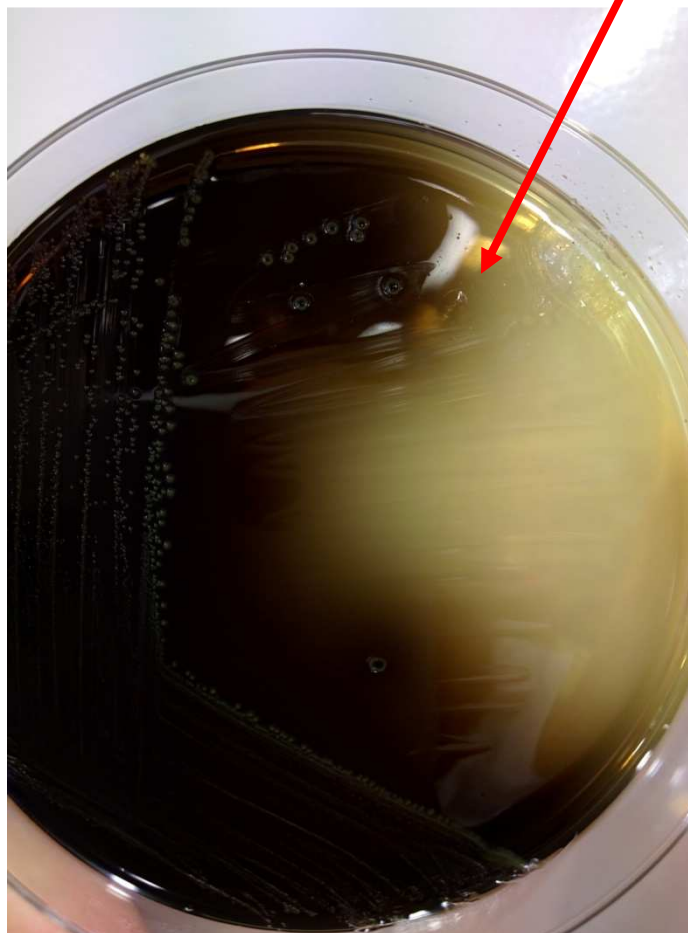


Figura 25: Colonie di *L. monocytogenes* cresciute su terreno *Listeria Selective Agar Base* (formulazione di Oxford)

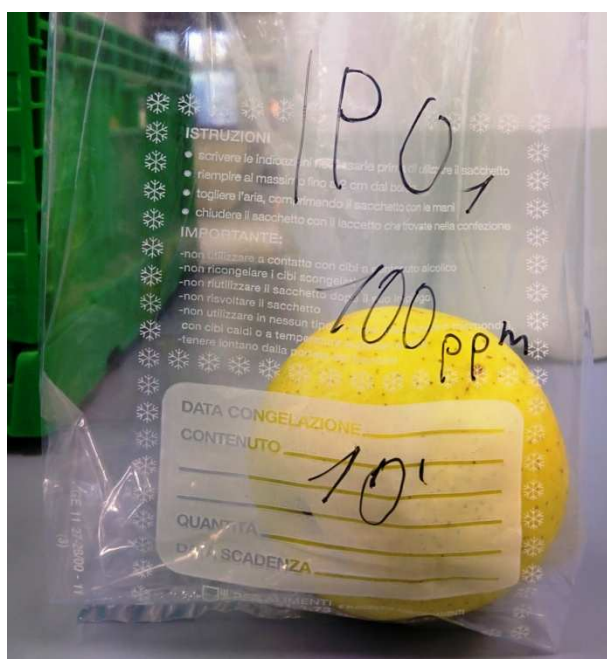


Figura 26: Campione di mela in soluzione fisiologica (10^1 UFC/ml)

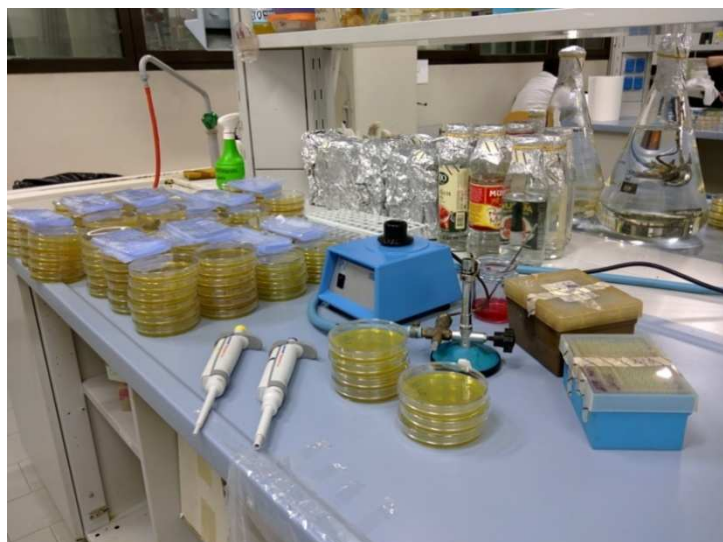


Figura 27: Banco di lavoro per campionamento microbiologico

5.4 Valutazione dell'effetto di lavaggi con acqua elettrolizzata sulla microflora naturalmente contaminante la superficie delle mele

Al fine di valutare l'effetto di trattamenti sanitizzanti con acqua elettrolizzata sulla microflora naturalmente presente sulla superficie di mele *Golden Delicious*, si è proceduto con lavaggi che prevedevano l'uso delle seguenti soluzioni:

- soluzione di ipoclorito di sodio con contenuto di cloro attivo pari a 50, 100 e 200 ppm.
- soluzione di ipoclorito di sodio con contenuto di cloro attivo pari a 50, 100 e 200 ppm.

In 10L di ogni soluzione sono state immerse 12 mele che sono state prelevate dopo 5, 10, 20 e 30 minuti di lavaggio. Per ogni condizione (tempo di immersione e concentrazione in cloro attivo della soluzione) si sono analizzate 3 mele.

Ogni frutto è stato trasferito in sacchetti sterili contenenti 50 ml di soluzione fisiologica sterile (0.9% NaCl, p/v), ed è stato massaggiato manualmente per 2 minuti in modo che i microrganismi adesi alle superfici

delle mele potessero staccarsi, permettendone così la dispersione nella soluzione ed il successivo prelievo per l'analisi. Per valutare il numero di cellule vitali presenti nelle sospensioni cellulari così preparate (corrispondenti alla diluizione 10^{-1}), sono state allestite delle diluizioni seriali decimali in provette contenenti 9 ml di soluzione fisiologica sterile. Le opportune diluizioni sono state inoculate in piastre Petri contenenti il terreno *Plate Count Agar* (Peptone universale 5g/L, estratto di lievito 2.5g/L, glucosio 1g/L, agar 17g/L, Oxoid). Dopo incubazione delle piastre a 25°C per 48 ore, si è contato il numero di colonie sviluppatesi corrispondenti ai batteri mesofili aerobi totali ed alle muffe (Figura 28).

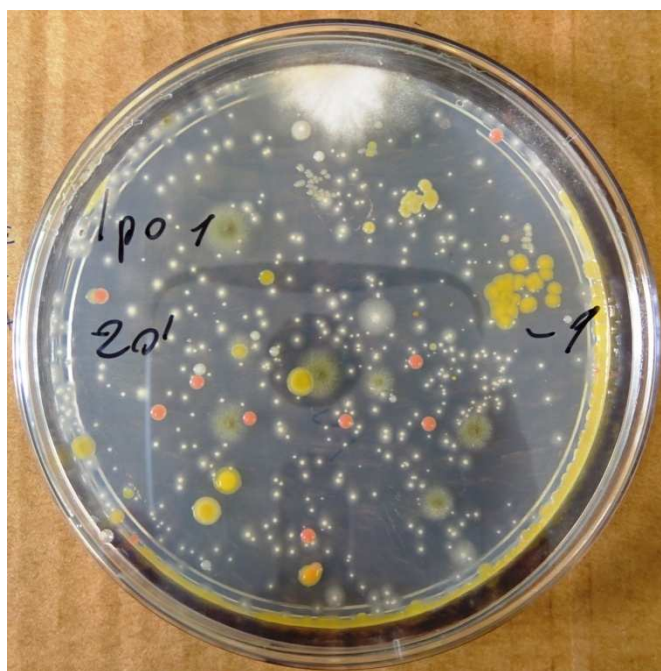


Figura 28: Terreno agarizzato in piastra in cui si sono sviluppate colonie di batteri mesofili totali

5.5 Valutazione dell'effetto dei lavaggi con sanizzanti sull'attività antiossidante e fenoli totali delle mele

Al fine di valutare le possibili modificazioni indotte dai lavaggi con acqua elettrolizzata ed ipoclorito di sodio su alcune proprietà funzionali delle

mele, si è misurato il potere antiossidante mediante test del DPPH (Brand-Williams *et al.*, 1995) ed il contenuto in fenoli totali mediante il metodo di Folin-Ciocalteu (Slinkard *et al.*, 1977). Queste determinazioni sono state fatte sulla buccia di frutta esposta alle seguenti condizioni di trattamento:

- Lavaggio in acqua elettrolizzata per 5 minuti con contenuto in cloro attivo pari a 200 ppm.
- Lavaggio in acqua elettrolizzata per 20 minuti con contenuto in cloro attivo pari a 200 ppm.
- Lavaggio in acqua elettrolizzata per 5 minuti con contenuto in cloro attivo pari a 50 ppm.
- Lavaggio in acqua elettrolizzata per 20 minuti con contenuto in cloro attivo pari a 50 ppm.
- Lavaggio con ipoclorito di sodio per 5 minuti con contenuto in cloro attivo pari a 200 ppm.
- Lavaggio con ipoclorito di sodio per 20 minuti con contenuto in cloro attivo pari a 200 ppm.
- Lavaggio con ipoclorito di sodio per 5 minuti con contenuto in cloro attivo pari a 50 ppm.
- Lavaggio con ipoclorito di sodio per 20 minuti con contenuto in cloro attivo pari a 50 ppm.

5.5.1. Preparazione dell'estratto con soluzione metanolica

A seguito dei diversi trattamenti di lavaggio, la buccia delle mele è stata raccolta, pesata, congelata a -80°C e liofilizzata. Dopo aver subito il processo di liofilizzazione le bucce sono state sminuzzate tramite frullatore ad immersione.

Una volta sminuzzate, si è pesato 1 g di campione che è stato trasferito in falcon ed è stato addizionato di metanolo al 70% (v/v) in rapporto 1:10 (p/v). La miscela è stata posta in agitazione per 1 ora a temperatura

ambiente e successivamente si è proceduto alla filtrazione utilizzando filtri di carta Whatman n.1. Il filtrato è stato raccolto in falcon da 15 ml ed analizzato immediatamente.

5.5.2. Misura del potere antiossidante mediante test DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazile)

Per il saggio del DPPH è stato utilizzato il metodo modificato di Brand-Williams *et al.* (1995). È stata preparata una soluzione metanolica 0.1m M di DPPH• (2,2-difenil-1-picrilidrazile, Sigma- Aldrich) lo stesso giorno dell'analisi. A questo proposito si sono pesati 0.0078 g di DPPH e si sono diluiti in 250 mL di metanolo puro; la soluzione è stata posta al buio ed in frigo fino al momento del suo utilizzo. Per l'analisi si è proceduto con la preparazione di un bianco, costituito da 2.9 ml di DPPH 0.1 mM e 0.1 ml di acqua distillata, e dei campioni, preparati aggiungendo a 2.9 ml di DPPH 0.1mM, 0.1 ml dell'estratto metanolico. I campioni così preparati sono stati posti al buio per 30 minuti, dopodiché è stata misurata l'assorbanza a 515 nm con uno spettrofotometro 6705 UV-Vis (JENWAY).

Lo strumento è stato precedentemente tarato con 3 ml di metanolo puro.

L'attività anti-radicalica è stata calcolata come valore percentuale attraverso la formula seguente:

$$\% \text{ DPPH} = (1 - (\text{Abs bianco} - \text{Abs campione}) / \text{Abs bianco}) \times 100$$

dove: *Abs bianco* è il valore di assorbanza della soluzione di riferimento contenente 100 µl di acqua bi-distillata, mentre *Abs campione* è quello della soluzione di DPPH con 100 µl di campione dopo i 30 minuti di incubazione. I dati sono la media di 2 ripetizioni.

5.5.3. Analisi del contenuto in fenoli totali mediante il metodo di Folin-Ciocalteu (FC)

Il contenuto fenolico totale è stato determinato secondo il metodo FC (Slinkard *et al.*, 1977) con le seguenti modifiche. In un matraccio da 10 ml sono stati aggiunti 100 µl di estratto metanolico del campione e 500 µl del reattivo di FC (Sigma-Aldrich). Successivamente sono stati aggiunti 6 ml di acqua bi-distillata ed è stata agitata la soluzione. Dopo 5 minuti sono stati aggiunti 400 µl di Na₂CO₃ (7.5%, p/v) e si è portato a volume con acqua bi-distillata. I campioni sono stati lasciati riposare al buio per 120 minuti. Per la preparazione del bianco sono stati utilizzati 500 µl di reattivo di FC, 400 µl di Na₂CO₃ (7.5%, p/v) e 9.1 ml di acqua. Successivamente è stata misurata l'assorbanza a 765 nm con uno spettrofotometro 6705 UV-Vis (JENWAY). Per il calcolo del contenuto in fenoli totali, espressi come mg/g di sostanza secca, è stata costruita una retta di taratura con concentrazioni note di acido gallico (Figura X). I risultati sono la media di 2 ripetizioni.

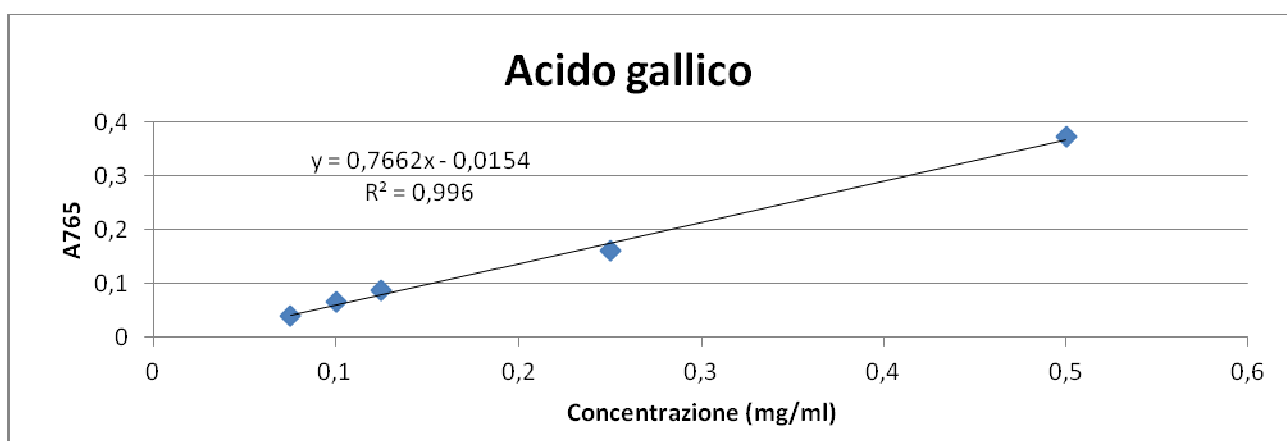


Figura 29 : Retta di taratura con acido gallico utilizzata per la determinazione del contenuto in fenoli totali

5.6 Analisi chimiche delle soluzioni di lavaggio

Al fine di caratterizzare in termini chimici le soluzioni utilizzate per il lavaggio delle mele e di valutarne eventuali modificazioni al termine del trattamento della frutta, sono state effettuate le analisi chimiche per la determinazione di:

- pH
- ioni nitrato
- cloro attivo.

Tali analisi chimiche sono state effettuate su:

- Acqua distillata utilizzata per la produzione dell'acqua elettrolizzata e per la diluizione delle soluzioni di lavaggio
- Acqua elettrolizzata prodotta dall'elettrolizzatore EVA SYSTEM® 100 (non diluita).
- Soluzione sanitizzante di *Acqua Elettrolizzata* diluita per avere differenti concentrazioni di cloro attivo (50, 100 e 200 ppm) ed analizzata prima e dopo il lavaggio delle mele.
- Soluzione sanitizzante di *Ipoclorito di Sodio* a differenti concentrazioni di cloro attivo (50, 100 e 200ppm) analizzata prima e dopo il trattamento di lavaggio delle mele.

5.6.1 pH

Per questa analisi è stato prelevato 1 ml di campione, lo si è posto in tubi Eppendorf (Figura X) e si è proceduto alla misurazione analitica tramite pHmetro BasiC 20 (Crison Instruments, Italia). Il dispositivo è stato calibrato con tamponi a pH 7.0 e 9.0. Per ciascun campione è stata calcolata la media di tre ripetizioni indipendenti.



Figura 30: Eppendorf tubes 3810X

5.6.2 Ioni nitrato

Dopo aver preparato una retta di calibrazione con soluzioni acquose di NaNO_3 a 20, 15, 10, 5 ppm, che in termini di ione nitrato equivalgono a 3.3, 2.48, 1.65 e 0.825 ppm rispettivamente (figura X), per questa analisi si sono prelevati 50 ml di soluzione (rappresentata dalle soluzioni standard o dalle soluzioni di lavaggio delle mele) che sono stati diluiti 1:50 con acqua distillata ed a cui si è aggiunto 1 ml di HCl 1N. Si è proceduto all'analisi allo spettrofotometro UV/VIS tarandolo con il bianco (costituito da 50 ml di acqua distillata ed 1 ml di HCl 1N), a lunghezze d'onda di 220 e 275 nm. Per ogni campione sono stati aliquotati in cuvette di quarzo 3 ml della soluzione precedentemente preparata e se ne è misurata la densità ottica.

Per ciascun campione è stata calcolata la media di due ripetizioni indipendenti. La concentrazione in nitrati (espressa come ppm di NO_3^-) è stata calcolata attraverso la formula seguente:

$$x = \left\{ [(Y-Q/M) * 50] / 14.0067 \right\} * 62.004$$

dove: Y è la lettura dell'assorbanza a 275nm a cui è stata sottratta la lettura a 220 nm secondo la formula $y = (A_{275\text{nm}} - 2 * A_{220\text{nm}})$; Q è l'intercetta dell'asse delle ordinate della retta di taratura; M è il coefficiente angolare della retta di taratura; 50 si riferisce alla diluizione effettuata sul campione; 14.0067 g/mol è il peso molecolare dell'azoto; 62.004 g/mol è il peso molecolare dello ione nitrato.

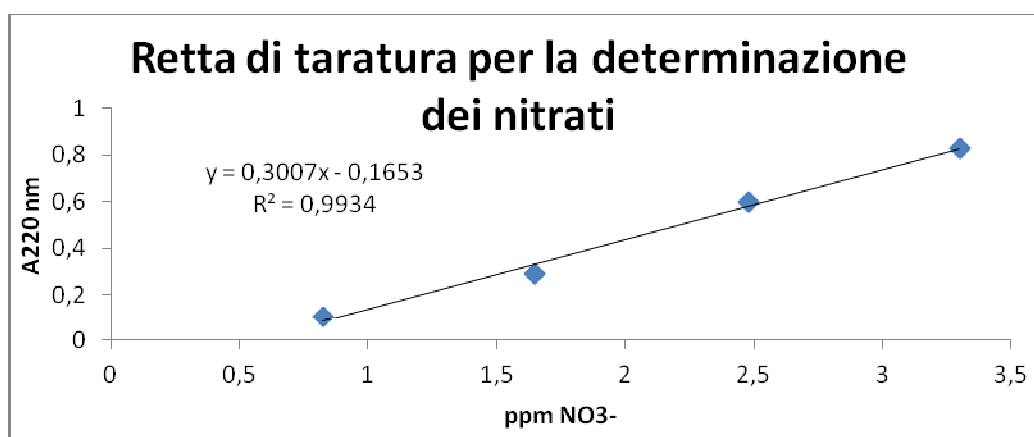


Figura 31: Retta di taratura utilizzata per la determinazione del contenuto in ione nitrato delle soluzioni di lavaggio delle mele prese in esame.

5.6.3 Cloro attivo

Questa analisi si basa su una titolazione iodometrica che utilizza come titolante il tiosolfato di sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0.1 M, Fluka). In una beuta da 100 ml si sono posti 10 ml di campione, 5 ml di CH_3COOH al 10% (v/v) e 5 ml di KI al 10% (p/v). Il volume di titolante è stato misurato quando, in condizioni di equilibrio, si è rilevato un viraggio di colore della soluzione da rosso/giallo ad incolore (Willson, 1935). Per ciascun campione è stata calcolata la media di due ripetizioni indipendenti. La concentrazione di cloro attivo (espresso in mg/l) è stata ottenuta utilizzando la seguente formula:

$$X \text{ ml titolante} * 35.45 * (1000/100) = \text{mg cloro attivo/l di soluzione.}$$

Dove: X sono i millilitri di tiosolfato di sodio (0.1M) utilizzati per portare la soluzione da rosso ad incolore; 35.45 è il peso equivalente del cloro attivo in grammi; 100 deriva dal fatto che si sono utilizzati 10 ml di campione e non 1l per cui è necessario tenere conto di un fattore moltiplicativo di 10^2 ; 1000 deriva dal fatto che l'unità presente nei ppm sono i mg, per cui esiste un altro fattore moltiplicativo di 10^3 : in totale il fattore moltiplicativo risultante è 10.

CAPITOLO 6 - RISULTATI

In questo lavoro si è voluto valutare se soluzioni di acqua elettrolizzata neutra (AE) possano essere impiegate come sanitizzanti per la decontaminazione di mele *Golden Delicious*. A tale scopo si sono effettuati lavaggi delle mele per immersione in AE a differente contenuto di cloro attivo (50, 100 e 200 ppm) verificando la riduzione della contaminazione superficiale rispetto sia alla microflora naturalmente presente, sia ad un patogeno deliberatamente inoculato sul prodotto, *Listeria monocytogenes* ceppo 56 Ly. A tale proposito si è voluto anche valutare l'effetto del livello di contaminazione iniziale di *L. monocytogenes* sull'efficacia dei lavaggi confrontandola con quella ottenuta con soluzioni di ipoclorito di sodio. Infine si è verificato se il potere antiossidante ed il contenuto in fenoli totali della buccia subiscono modificazioni a seguito dei lavaggi con AE neutra od ipoclorito di sodio alle condizioni adottate.

6.1. Analisi chimiche dell'acqua elettrolizzata

Al fine di valutare le principali caratteristiche e componenti chimiche dell'acqua elettrolizzata, si sono effettuate analisi per la determinazione del pH, contenuto in cloro attivo e dello ione nitrato.

Dall'analisi dei dati riassunti in tabella 16 si può chiaramente notare come, alle condizioni di processo adottate, l'elettrolisi abbia determinato dei significativi cambiamenti. Infatti il pH è aumentato significativamente passando dai valori iniziali di 6.4 a 8.9. Inoltre si è registrato un drastico incremento del cloro attivo che, mediamente, ha presentato valori di circa 2000 ppm. Per contro le variazioni in termini di ione nitrato sono risultate più limitate sebbene si sia comunque avuto un aumento di tale specie chimica di circa il 20%.

Per le successive prove di lavaggio delle mele, l'AE è stata opportunamente diluita in modo da avere soluzioni con un titolo in cloro attivo di 50, 100 e 200 ppm. Il confronto dei dati relativi al pH, concentrazione dello ione nitrato e cloro attivo delle soluzioni diluite così preparate e di quelle di ipoclorito di sodio

utilizzate come riferimento mostrano che i due tipi di soluzioni sanitizzanti presentano sostanzialmente caratteristiche simili (tabella 17).

Tabella 16: Caratterizzazione chimica dell'acqua elettrolizzata ottenuta mediante generatore EVA SYSTEM® 100 (Industrie De Nora S.p.A.)

Soluzione	pH	Cloro attivo (mg/l)	Ione nitrato (ppm)
Acqua*	6.39 ± 0.31	**	121.74 ± 0.01
Acqua elettrolizzata	8.86 ± 0.32	2330.8 ± 12.5	145.7 ± 4.3

**Utilizzata per la generazione di acqua elettrolizzata.*

***Non rilevabile*

Tabella 17: Caratterizzazione chimica dell'acqua elettrolizzata e delle soluzioni di ipoclorito di sodio utilizzate per il lavaggio delle mele

Soluzione	pH	Cloro attivo (mg/l)	Ione nitrato (ppm)
Acqua elettrolizzata			
50 ppm	8.39 ± 0.21	46.09 ± 2.1	123.6 ± 3.5
100 ppm	8.63 ± 0.23	105.5 ± 1.3	141.4 ± 16.0
200 ppm	8.47 ± 0.07	202.1 ± 10.0	125.9 7.2±
Soluzione di ipoclorito			
50 ppm	8.26 ± 0.17	53.7 ± 1.9	121.7 ± 2.6
100 ppm	8.95 ± 0.21	104.8 ± 1.4	137.2 ± 23.1
200 ppm	8.82 ± 0.09	203.84 ± 12.5	123.9 ± 3.8

6.2 Effetto dei lavaggi con acqua elettrolizzata od ipoclorito di sodio sulla microflora contaminante la superficie delle mele

Al fine di valutare le potenzialità dell'acqua elettrolizzata per la riduzione della contaminazione superficiale delle mele, si sono effettuati lavaggi in soluzioni caratterizzate da differente contenuto di cloro attivo compreso tra 50 e 200 ppm. Tali valori sono stati definiti tenendo conto delle condizioni a cui viene generalmente utilizzato nell'industria alimentare l'ipoclorito di sodio che è stato scelto come trattamento di riferimento. Per quanto riguarda i tempi di lavaggio, si è deciso di adottare condizioni non completamente corrispondenti a quelle

utilizzate nell'industria alimentare, estendendo il trattamento fino a 30 minuti, in modo da poter meglio valutare le dinamiche di inattivazione e la presenza di una popolazione microbica resistente alle condizioni di lavaggio adottate.

Le analisi microbiologiche effettuate sulla mele utilizzate per tale sperimentazione hanno evidenziato come tale frutta presenti un livello iniziale della popolazione microbica abbastanza alto con valori pari a circa 5-6 Log UFC/frutto per i batteri mesofili totali e di ~6 Log UFC/frutto per le muffe. Il lavaggio realizzato con AE alla concentrazione di cloro attivo più bassa (50 ppm) ha determinato una riduzione del livello dei batteri mesofili totali di quasi 1 ciclo logaritmico già dopo 5 minuti di trattamento analogamente a quanto ottenuto con la soluzione di ipoclorito (figura 32). Tuttavia, il prolungamento del tempo di trattamento fino a 30 minuti non ha determinato un significativo miglioramento dell'efficacia del lavaggio. Va comunque evidenziato che un fenomeno analogo si è avuto in presenza di ipoclorito di sodio.

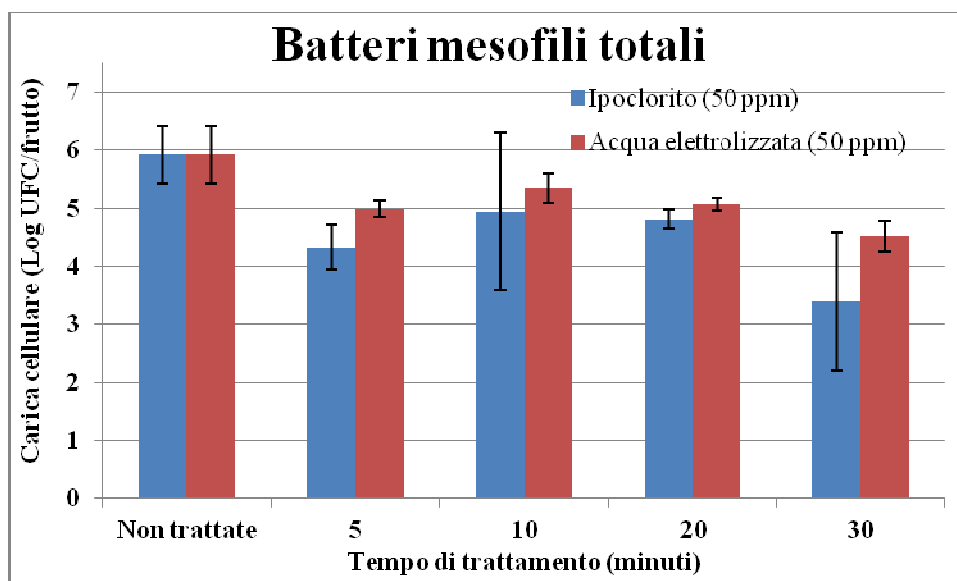


Figura 32:. Valori di carica cellulare (Log UFC/frutto) relativi batteri mesofili aerobi totali di mele prima e dopo il lavaggio con soluzioni acquose di ipoclorito o acqua elettrolizzata aventi un contenuto di cloro attivo di 50 ppm

L'aumento della concentrazione di cloro attivo nella soluzione di lavaggio a 100 ppm non ha comportato un sostanziale miglioramento dell'azione decontaminante indipendentemente dal tipo di sanizzante utilizzato: infatti, sia con AE, che con l'ipoclorito di sodio i valori di riduzione della carica cellulare

dei batteri mesofili totali non hanno superato 1 Log UFC/frutto anche estendendo il tempo di immersione della frutta fino a 30 minuti (figura 33).

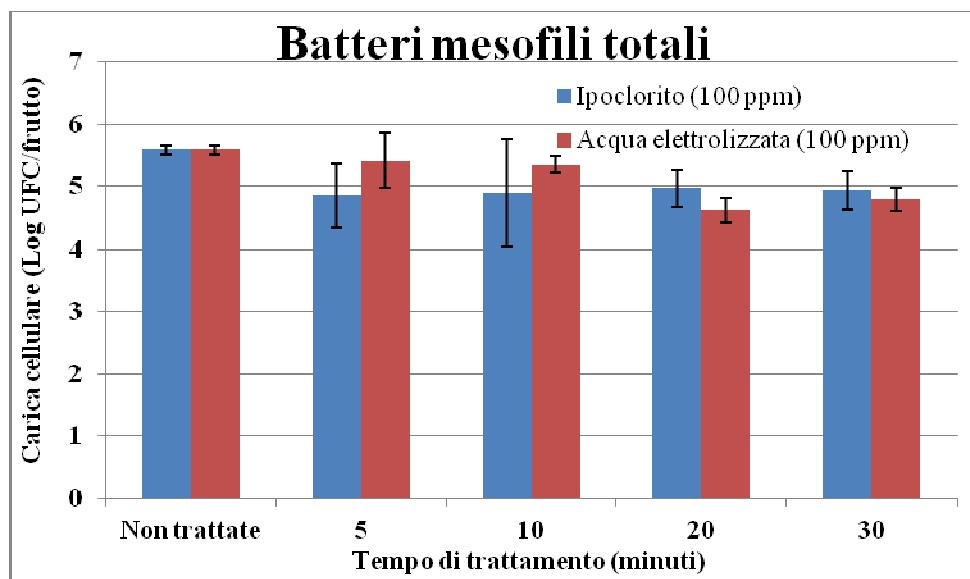


Figura 33: Valori di carica cellulare (Log UFC/frutto) relativi batteri mesofili aerobi totali di mele prima e dopo il lavaggio con soluzioni acquose di ipoclorito o acqua elettrolizzata aventi un contenuto di cloro attivo di 100 ppm

Solamente in presenza del contenuto massimo di cloro attivo (200 ppm) l'efficacia del lavaggio è aumentata determinando una riduzione massima della contaminazione di quasi 2 cicli logaritmici (figura 34). Questo risultato è stato ottenuto dopo 30 minuti sia con l'AE, che con l'ipoclorito.

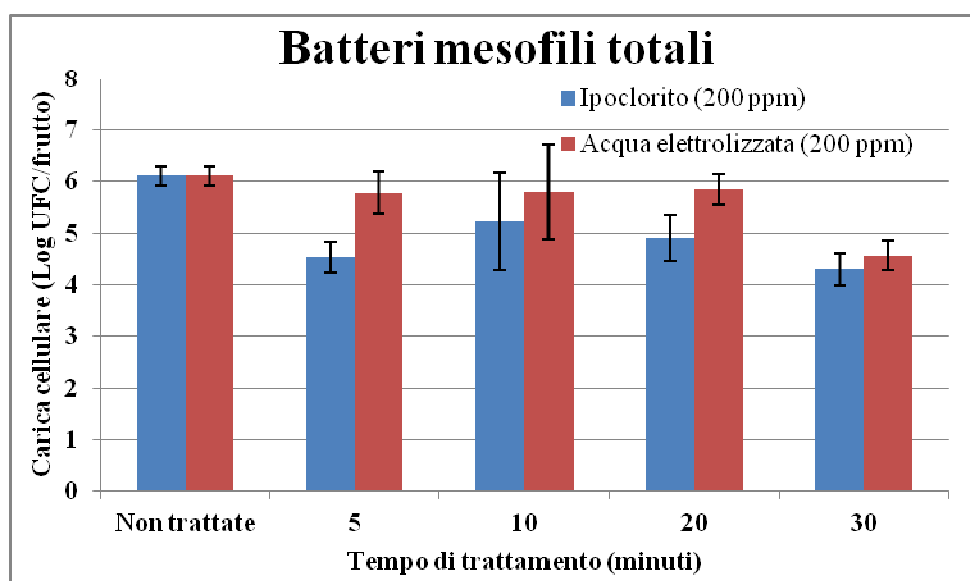


Figura 34: Valori di carica cellulare (Log UFC/frutto) relativi ai batteri mesofili aerobi totali di mele prima e dopo il lavaggio con soluzioni acquose di ipoclorito o acqua elettrolizzata aventi un contenuto di cloro attivo di 200 ppm

A differenza dei batteri mesofili totali, le muffe contaminanti la superficie delle mele sembrano essere maggiormente sensibili ai lavaggi con i due sanizzanti. Infatti utilizzando la concentrazione più bassa di cloro attivo, si sono avute riduzioni di vitalità di circa 1.5 e 2 Log UFC/frutto rispettivamente per l'AE e l'ipoclorito già dopo 5 minuti di lavaggio (figura 35).

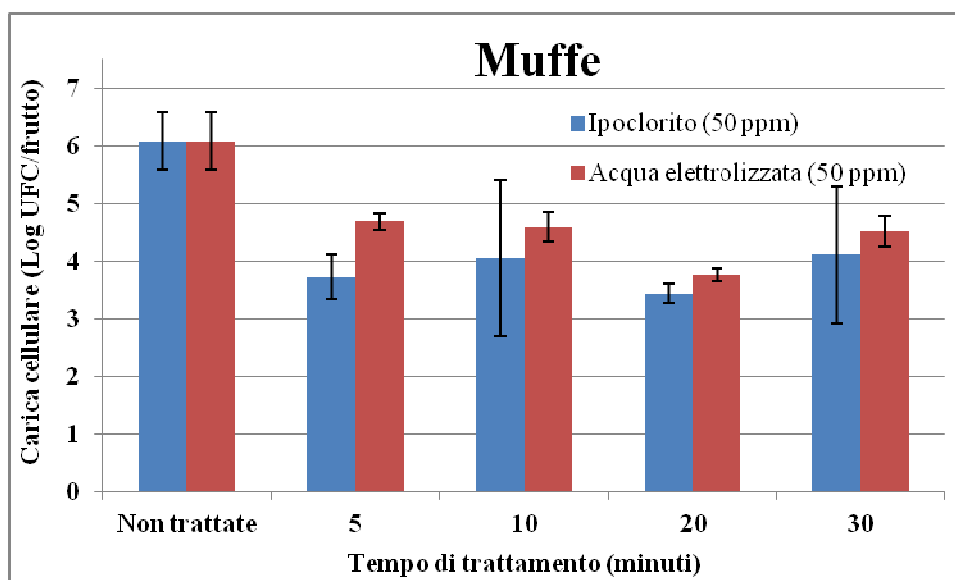


Figura 35: Valori di carica cellulare (Log UFC/frutto) relativi alle muffe di mele prima e dopo il lavaggio con soluzioni acquose di ipoclorito o acqua elettrolizzata aventi un contenuto di cloro attivo di 50 ppm

Analogamente a quanto osservato per la contaminazione batterica, anche nel caso delle muffe il prolungamento del tempo di lavaggio non ha migliorato l'effetto decontaminante di tale operazione indipendentemente dal sanizzante utilizzato. Il parametro che sembra influire maggiormente sull'efficacia è invece la concentrazione del cloro attivo come risulta abbastanza chiaramente dal confronto con le figure relative ai trattamenti in presenza di 100 (figura 36) e 200 (figura 37) ppm di cloro. Infatti in entrambe le condizioni si sono avuti livelli medi di riduzione delle muffe di oltre 2 unità logaritmiche dopo il trattamento più breve (5 minuti). E' inoltre interessante rilevare che l'AE ha mostrato un comportamento del tutto analogo alla soluzione di ipoclorito.

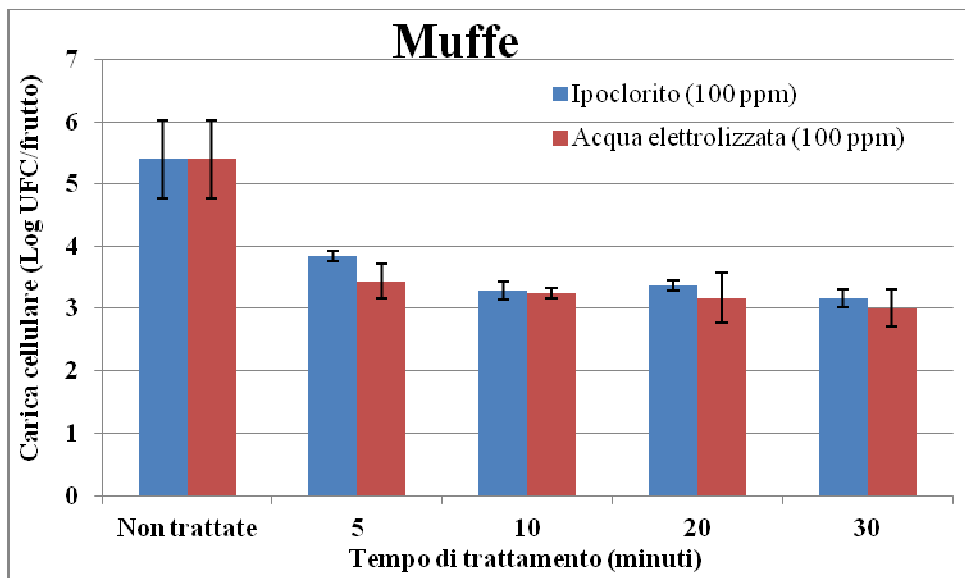


Figura 36: Valori di carica cellulare (Log UFC/frutto) relativi alle muffe di mele prima e dopo il lavaggio con soluzioni acquose di ipoclorito o acqua elettrolizzata aventi un contenuto di cloro attivo di 100 ppm

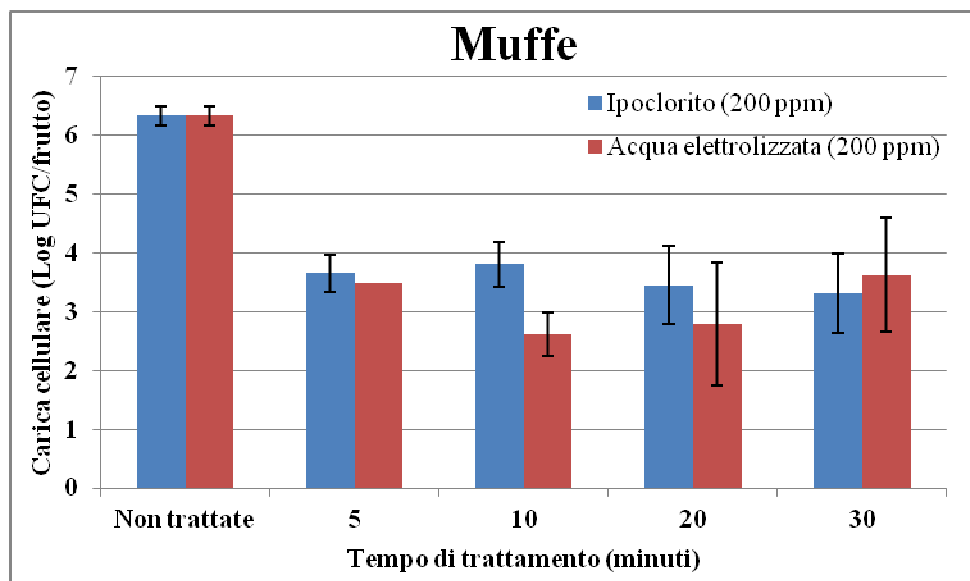


Figura 37: Valori di carica cellulare (Log UFC/frutto) relativi alle muffe di mele prima e dopo il lavaggio con soluzioni acquose di ipoclorito o acqua elettrolizzata aventi un contenuto di cloro attivo di 200 ppm

6.3 Effetto dei lavaggi con acqua elettrolizzata od ipoclorito di sodio sul livello di *Listeria monocytogenes*

Nella successiva parte della ricerca si è valutata l'efficacia dell'AE nei confronti di un patogeno, *Listeria monocytogenes* ceppo 56Ly, frequentemente ritrovato in diversi prodotti alimentari tra cui frutta e vegetali freschi. A tale scopo questo

microorganismo è stato deliberatamente inoculato sulla superficie delle mele a tre differenti livelli di contaminazione: ~ 7, 5-6 e 3 Log UFC/frutto. Sebbene i livelli più alti non siano rappresentativi di condizioni reali, il loro utilizzo si rende necessario per meglio evidenziare l'eventuale relazione tra l'efficacia del sanizzante e grado contaminazione del microorganismo target.

Dall'analisi della figura 38, che fa riferimento alle prove in cui *L. monocytogenes* 56 Ly è stata inoculata al livello maggiore (~ 7 Log UFC/frutto), si può notare come tale microorganismo sia sensibile all'AE anche quando utilizzata alla massima diluizione (corrispondente a 50 ppm di cloro libero): infatti dopo 5 minuti di trattamento si è avuta una perdita di vitalità di oltre 2 cicli logaritmici. Analogamente a quanto osservato per la microflora contaminante le mele, il prolungamento del lavaggio fino a 30 minuti non ha comportato alcun miglioramento in termini di decontaminazione. Questo stesso risultato, tuttavia, si è avuto anche per il sanizzante di riferimento, l'ipoclorito di sodio.

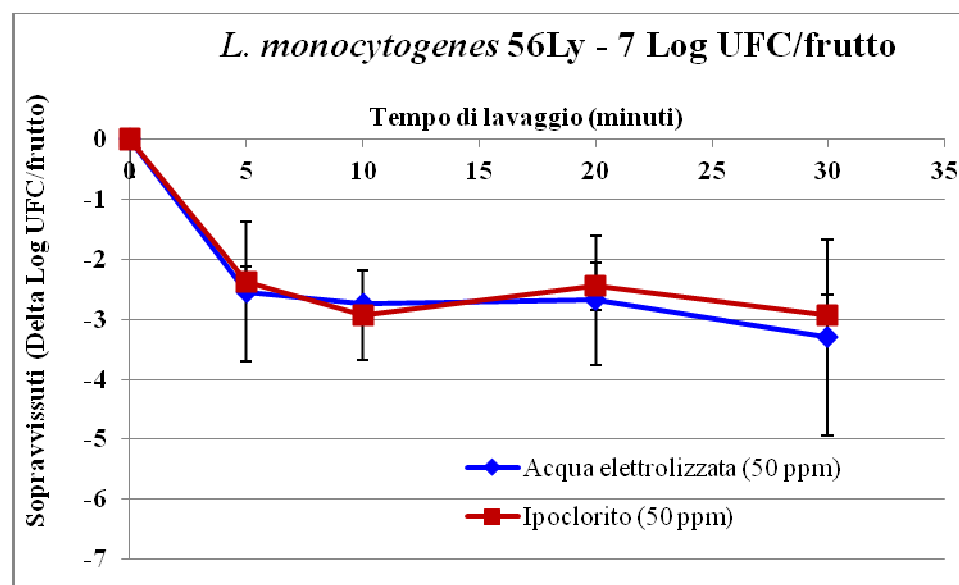


Figura 38: Curve di sopravvivenza di *L. monocytogenes* 56 Ly deliberatamente inoculata in mele (inoculo: 6.9 Log UFC/frutto) sottoposte a lavaggio con acqua elettrolizzata o ipoclorito di sodio aventi un contenuto di cloro attivo di 50 ppm

All'aumentare del cloro attivo nelle soluzioni alla concentrazione di 100 ppm, l'efficacia del lavaggio con AE, a parità di grado di contaminazione iniziale (~ 7 Log UFC/frutto), è migliorata: infatti la massima riduzione di vitalità è stata di

circa 4 cicli logaritmici, peraltro registrata già dopo 5 minuti di immersione delle mele (figura 39).

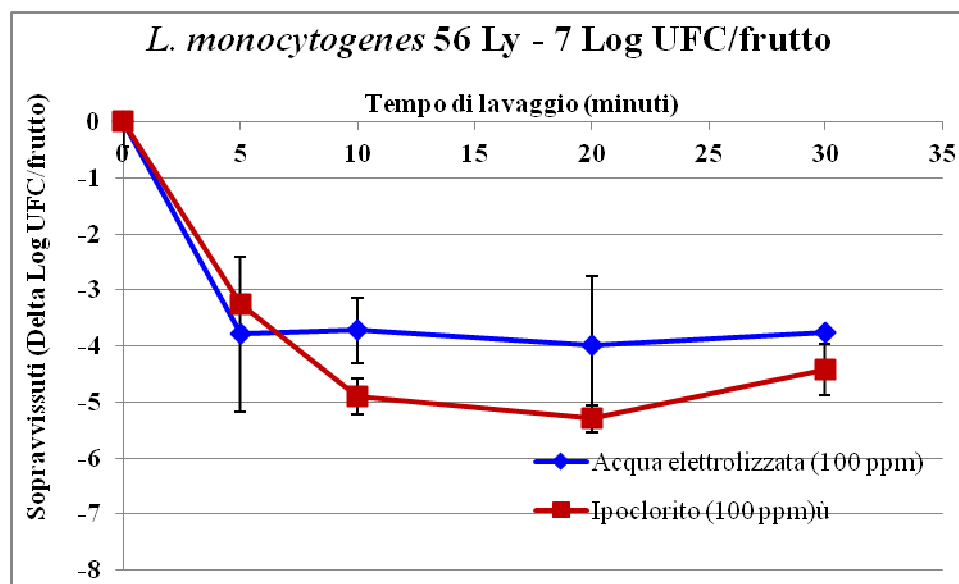


Figura 39: Curve di sopravvivenza di *L. monocytogenes* 56 Ly deliberatamente inocolata in mele (inoculo: 7.2 Log UFC/frutto) sottoposte a lavaggio con acqua elettrolizzata o ipoclorito di sodio aventi un contenuto di cloro attivo di 100 ppm

A questa stessa concentrazione l'ipoclorito sembra essere caratterizzato da un'efficacia superiore (di circa 1 unità logaritmica), anche se va sottolineato che i dati sperimentali hanno presentato una notevole variabilità. La sensibilità di *L. monocytogenes* 56 Ly al contenuto di cloro attivo nella soluzione di lavaggio è evidenziabile anche dalla figura 40 relativa alle soluzioni a 200 ppm.

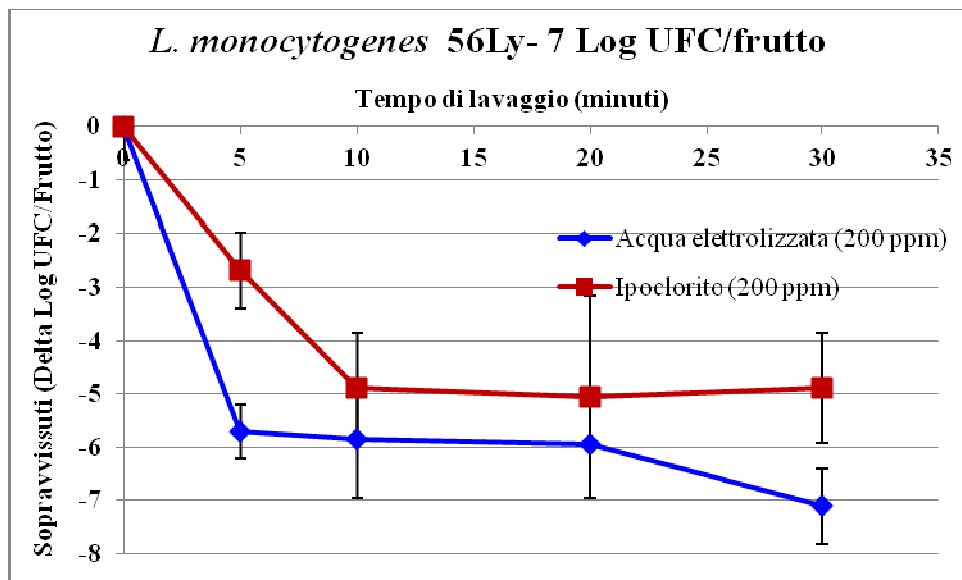


Figura 40: Curve di sopravvivenza di *L. monocytogenes* 56 Ly deliberatamente inocolata in mele (inoculo: 7.1 Log UFC/frutto) sottoposte a lavaggio con acqua elettrolizzata o ipoclorito di sodio aventi un contenuto di cloro attivo di 200 ppm

Infatti, dopo il lavaggio più breve (5 minuti), l'uso di AE ha portato ad un livello di inattivazione di circa 6 cicli logaritmici che si è mantenuto pressoché invariato anche per i lavaggi più prolungati. Per contro, con l'ipoclorito si è raggiunta una riduzione massima di circa 5 cicli logaritmici.

I trattamenti su frutta con un minor livello di contaminazione iniziale (5-6 Log UFC/frutto) di *L. monocytogenes* 56 Ly hanno mostrato che l'uso di una soluzione di AE con 50 ppm di cloro attivo determina una dinamica di inattivazione di *L. monocytogenes* 56Ly (figura 41) sostanzialmente simile a quella registrata con frutta avente la più alta contaminazione iniziale (figura 38), raggiungendo, in entrambi i casi, valori di abbattimento di circa 3 cicli logaritmici.

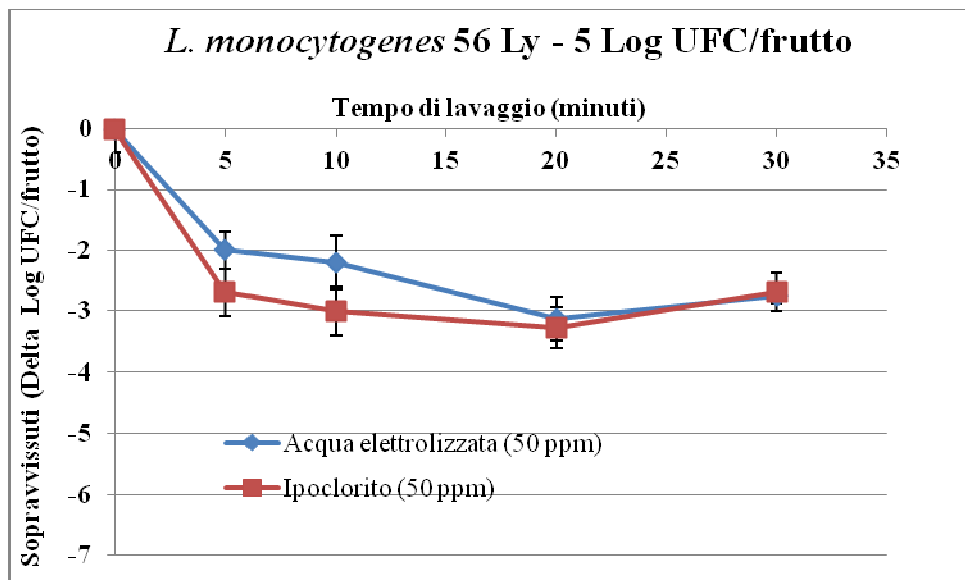


Figura 41: Curve di sopravvivenza di *L. monocytogenes* 56 Ly deliberatamente inoculata in mele (inoculo: 5.6 Log UFC/frutto) sottoposte a lavaggio con acqua elettrolizzata o ipoclorito di sodio aventi un contenuto di cloro attivo di 50 ppm

Analogamente, anche in presenza di soluzioni di AE, così come di ipoclorito, con 100 ppm di cloro disponibile l'efficacia dei lavaggi è risultata confrontabile (figura 42) con quella ottenuta con mele inoculate con *L. monocytogenes* ad un livello di 7 Log UFC/frutto (figura 39): in entrambe le prove infatti la massima disattivazione raggiunta è stata di 4-5 unità logaritmiche.

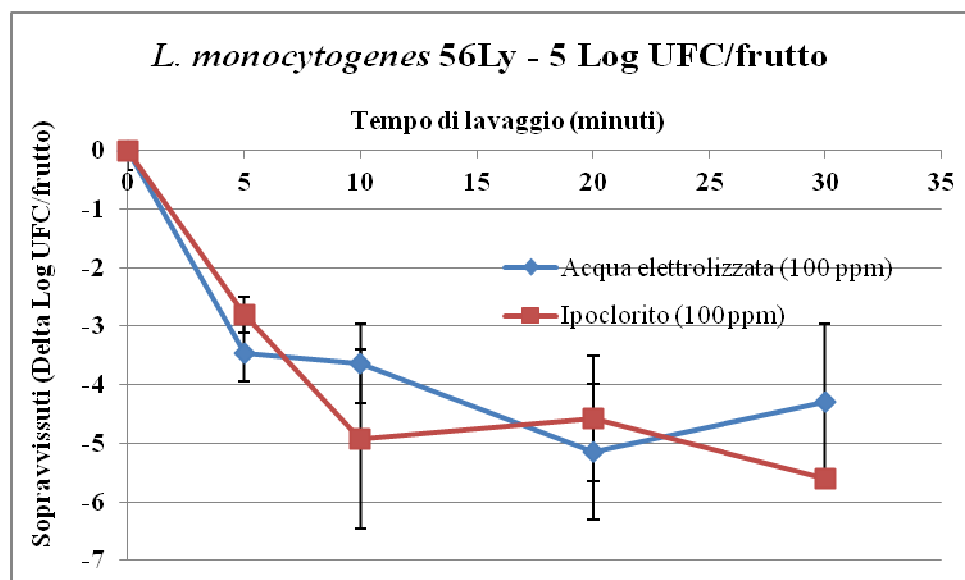


Figura 42: Curve di sopravvivenza di *L. monocytogenes* 56 Ly deliberatamente inoculata in mele (inoculo: 5.8 Log UFC/frutto) sottoposte a lavaggio con acqua elettrolizzata o ipoclorito di sodio aventi un contenuto di cloro attivo di 100 ppm

Nell'ultima serie di prove che sono state effettuate si sono utilizzate mele inoculate con *L. monocytogenes* 56 Ly ad un livello maggiormente rispondente a situazioni reali, ~ 3 Log UFC/frutto. Dai risultati riportati in tabella 18 si può notare come il lavaggio con AE abbia determinato la completa inattivazione di *L. monocytogenes* 56 Ly, anche in presenza del minor contenuto di cloro attivo (50 ppm), già dopo 2 minuti di trattamento.

Tabella 18: Effetto di trattamenti di lavaggio con soluzioni di ipoclorito od acqua elettrolizzata a differente contenuto di cloro attivo (50, 100, 200 ppm) sul numero di cellule vitali di *L. monocytogenes* 56Ly (Log UFC/frutto) deliberatamente inculata sulla superficie di mele Golden Delicious ad un livello di ~3 Log UFC/frutto.

Campione/ tempo di lavaggio (minuti)	50 ppm		100 ppm		200 ppm	
	Ipoclorito	Acqua elettrolizzata	Ipoclorito	Acqua elettrolizzata	Ipoclorito	Acqua elettrolizzata
Controllo (Non trattato)	3.17 ± 0.23		3.02 ± 0.40		2.64 ± 0.24	
2	<1	<1	<1	<1	<1	<1
5	<1	<1	<1	<1	<1	<1
7	<1	<1	<1	<1	<1	<1
15	<1	<1	<1	<1	<1	<1

Questi dati suggeriscono pertanto che in condizioni reali, l'acqua elettrolizzata può rappresentare una buona soluzione alternativa all'ipoclorito per prevenire il rischio legato alla sopravvivenza di *L. monocytogenes*.

Un altro aspetto interessante in previsione di una futura applicazione è che le caratteristiche chimico-fisiche prese in esame per l'AE (pH, contenuto di ione nitrato e cloro attivo) rimangono sostanzialmente immutate a seguito dell'utilizzo per il lavaggio delle mele, anche per il tempo più prolungato, analogamente a quanto rilevato per la soluzione di ipoclorito (figure da 43 a 51).

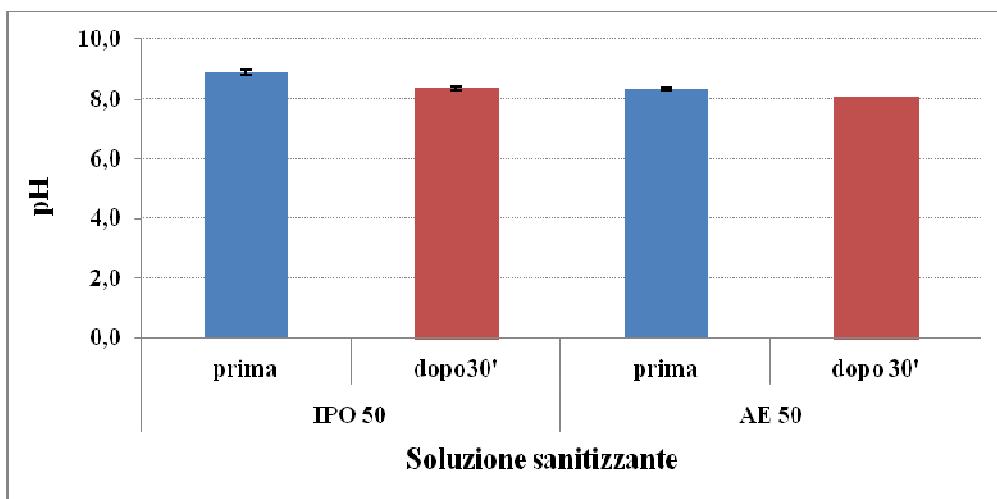


Figura 43: Valori di pH della soluzione di ipoclorito (IPO) e dell'acqua elettrolizzata (AE) prima e dopo il lavaggio delle mele. La concentrazione iniziale di cloro attivo di entrambe le soluzioni sanitizzanti è di ~50 ppm

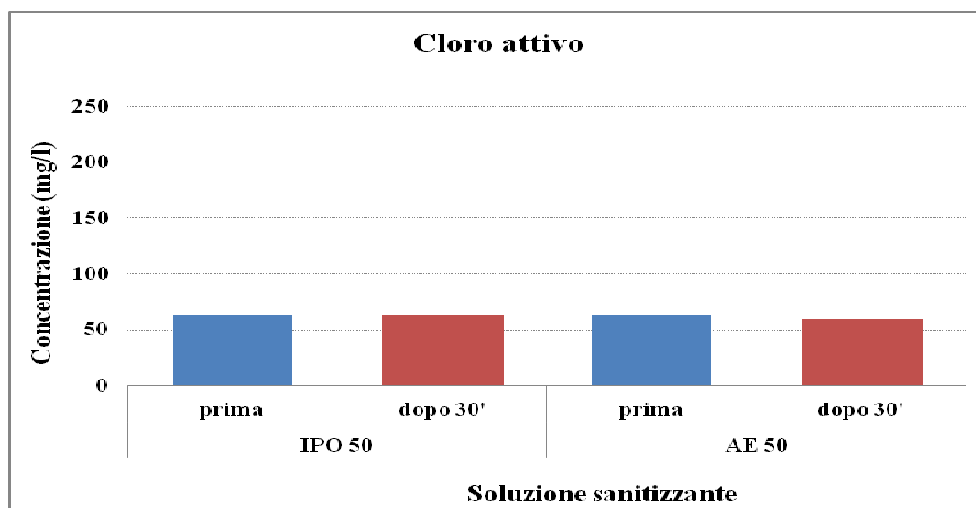


Figura 44: Contenuto in cloro attivo della soluzione di ipoclorito (IPO) e dell'acqua elettrolizzata (AE) prima e dopo il lavaggio delle mele. La concentrazione iniziale di cloro attivo di entrambe le soluzioni sanitizzanti è di ~50 ppm

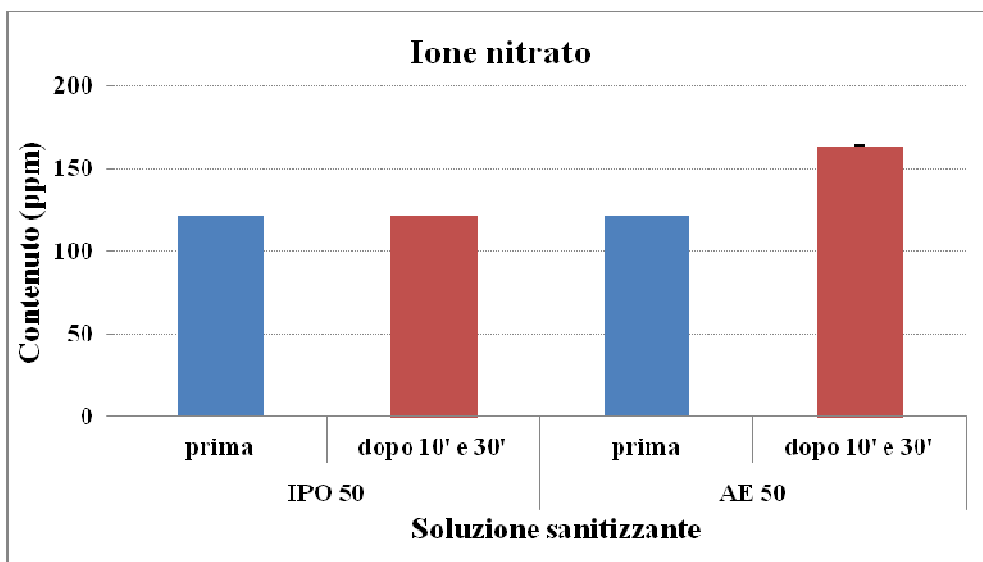


Figura 45: *Contenuto in ione nitrato della soluzione di ipoclorito (IPO) e dell'acqua elettrolizzata (AE) prima e dopo il lavaggio delle mele. La concentrazione iniziale di cloro attivo di entrambe le soluzioni sanitizzanti è di ~50 ppm*

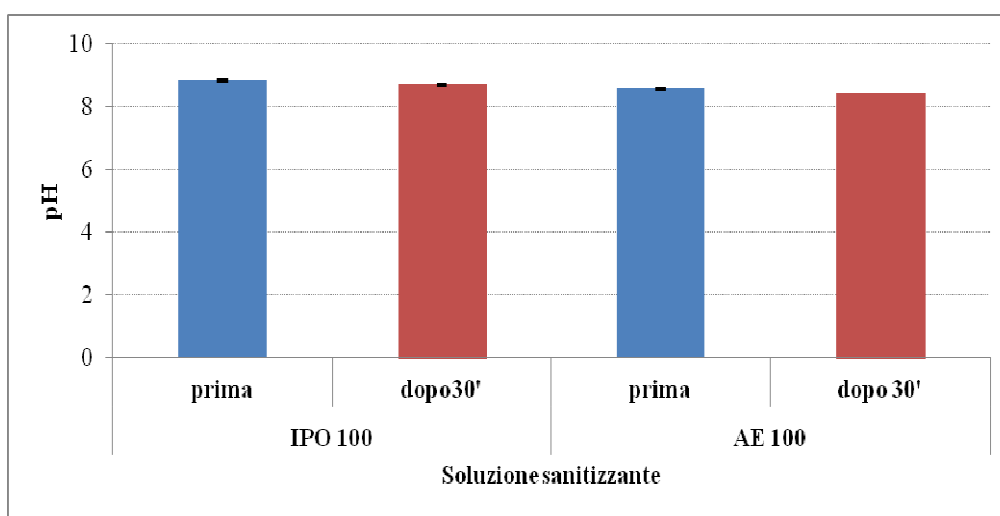


Figura 46: *Valori di pH della soluzione di ipoclorito (IPO) e dell'acqua elettrolizzata (AE) prima e dopo il lavaggio delle mele. La concentrazione iniziale di cloro attivo di entrambe le soluzioni sanitizzanti è di ~100 ppm*

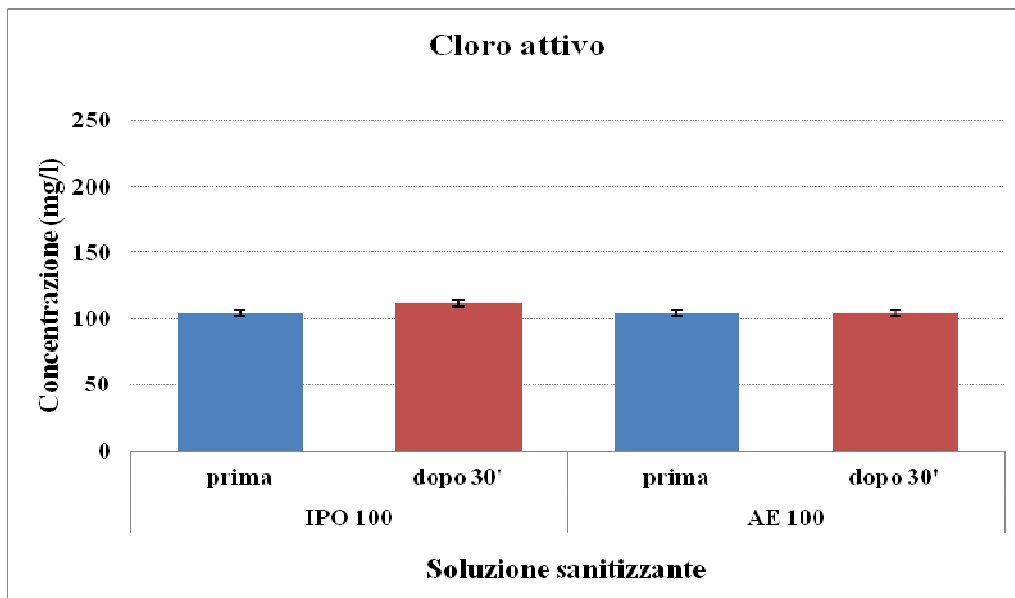


Figura 47: *Contenuto in cloro attivo della soluzione di ipoclorito (IPO) e dell'acqua elettrolizzata (AE) prima e dopo il lavaggio delle mele. La concentrazione iniziale di cloro attivo di entrambe le soluzioni sanitizzanti è di ~100 ppm*

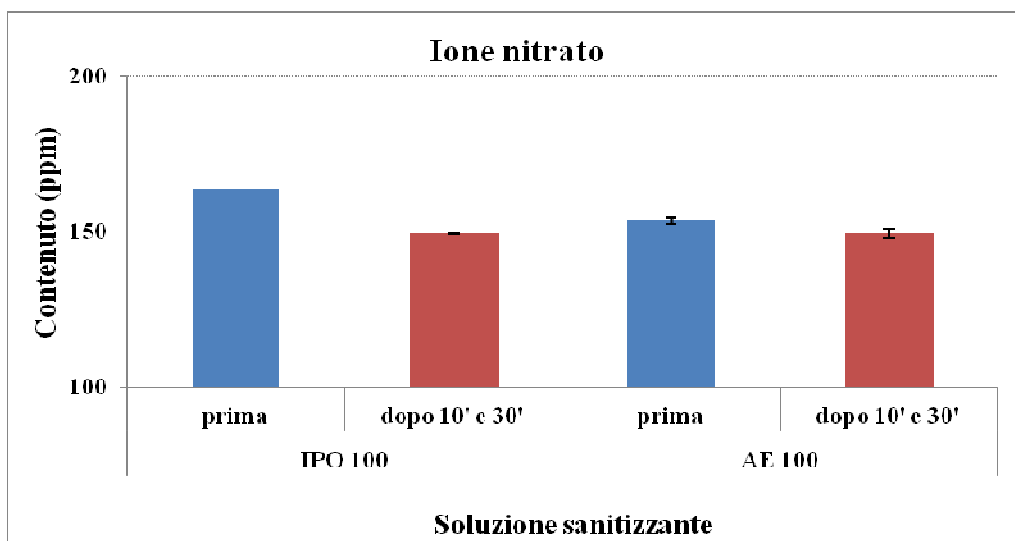


Figura 48: *Contenuto in ione nitrato della soluzione di ipoclorito (IPO) e dell'acqua elettrolizzata (AE) prima e dopo il lavaggio delle mele. La concentrazione iniziale di cloro attivo di entrambe le soluzioni sanitizzanti è di ~100 ppm*

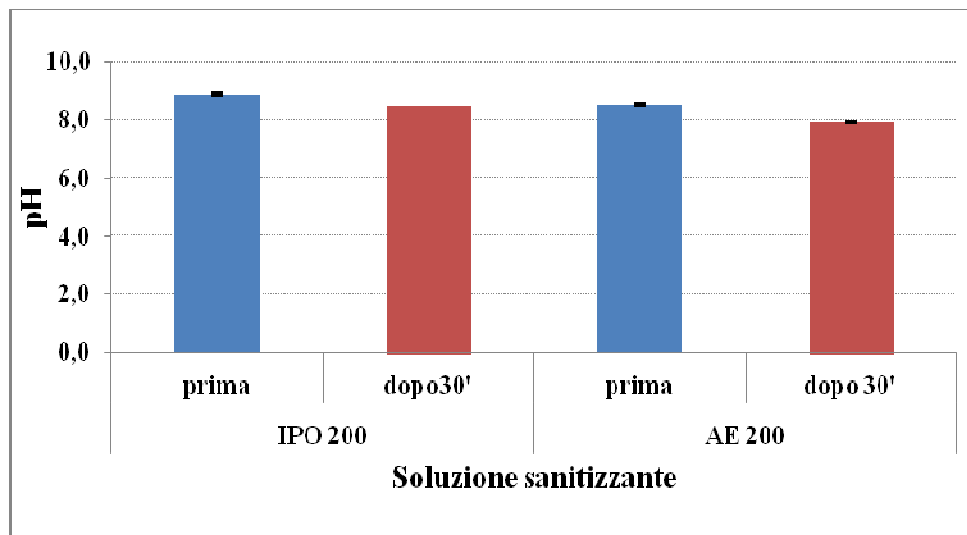


Figura 49: Valori di pH della soluzione di ipoclorito (IPO) e dell'acqua elettrolizzata (AE) prima e dopo il lavaggio delle mele. La concentrazione iniziale di cloro attivo di entrambe le soluzioni sanizzanti è di ~200 ppm

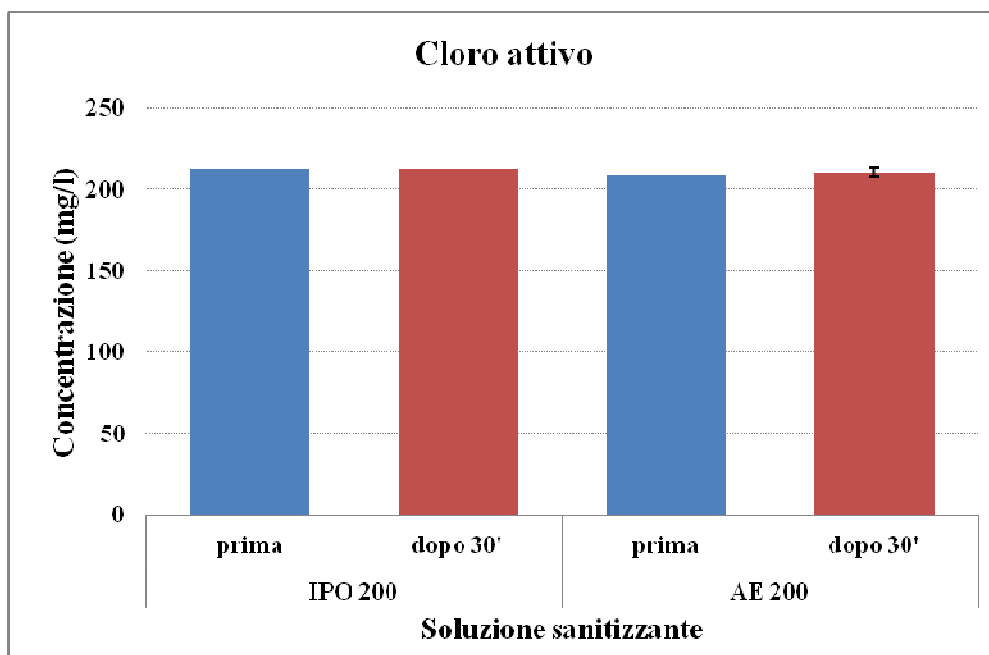


Figura 50: Contenuto in cloro attivo della soluzione di ipoclorito (IPO) e dell'acqua elettrolizzata (AE) prima e dopo il lavaggio delle mele. La concentrazione iniziale di cloro attivo di entrambe le soluzioni sanizzanti è di ~200 ppm

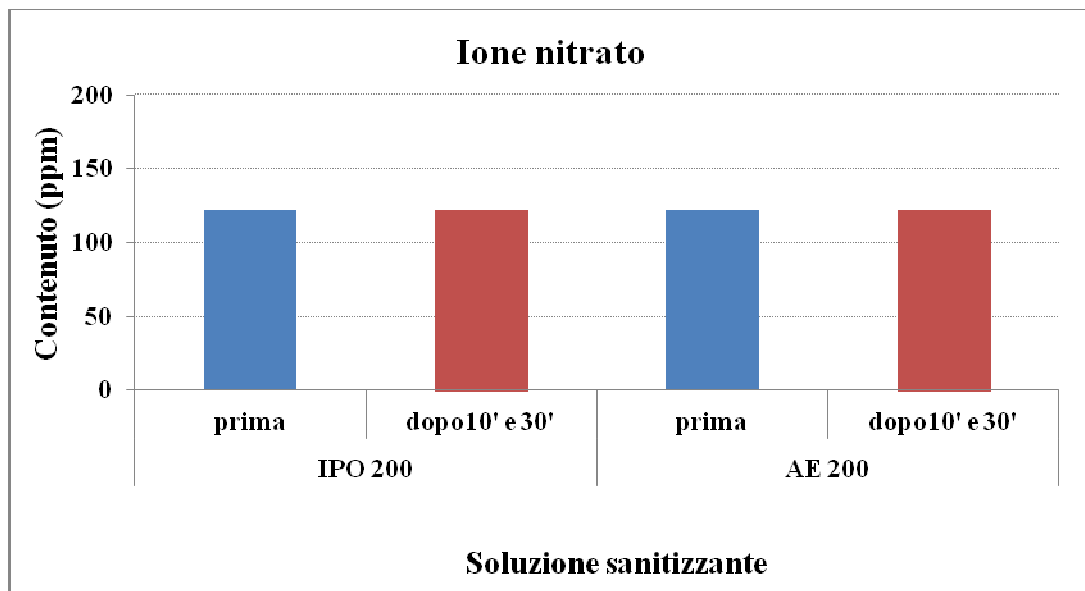


Figura 51: Contenuto in ione nitrato della soluzione di ipoclorito (IPO) e dell'acqua elettrolizzata (AE) prima e dopo il lavaggio delle mele. La concentrazione iniziale di cloro attivo di entrambe le soluzioni sanitizzanti è di ~200 ppm

6.4 Effetto dei lavaggi con acqua elettrolizzata od ipoclorito di sodio sull'attività antiossidante e fenoli totali

Al fine di verificare se l'uso di AE per la decontaminazione superficiale delle mele possa influenzare anche alcuni proprietà qualitative del prodotto, si sono effettuate determinazioni del dell'attività antiossidante (mediante test DPPH) e dei fenoli totali della buccia di frutta immediatamente dopo il lavaggio con soluzioni di AE ed ipoclorito di sodio contenuti 50 e 200 ppm di cloro attivo. Dai risultati riportati nella figura 52 si può osservare come nessuna delle condizioni di lavaggio adottate, sia in termini di tempo, che di concentrazione di cloro disponibile, abbia indotto variazioni significative dell'attività antiradicalica.

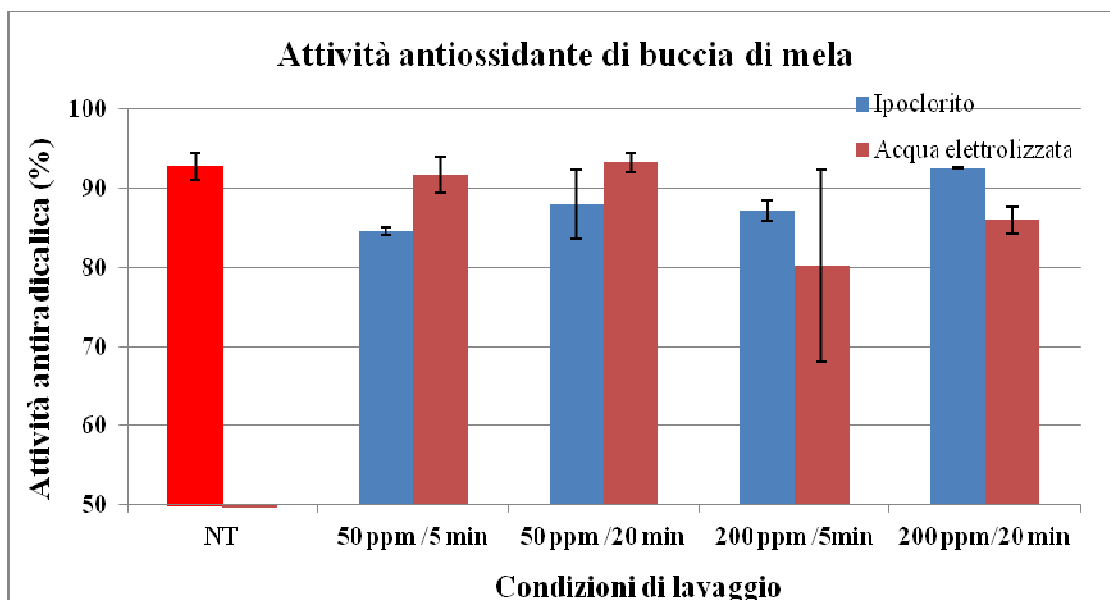


Figura 52: Attività antiossidante (DPPH) della buccia di mele sottoposte a lavaggio con soluzioni di ipoclorito od acqua elettrolizzata a diverso contenuto di cloro attivo (50 o 200 ppm) per 5 o 20 minuti

Per contro, si è registrata una sensibile diminuzione del contenuto in fenoli a seguito dei lavaggi che, tuttavia, è stata del tutto confrontabile con quella determinato dall'ipoclorito (figura 53).

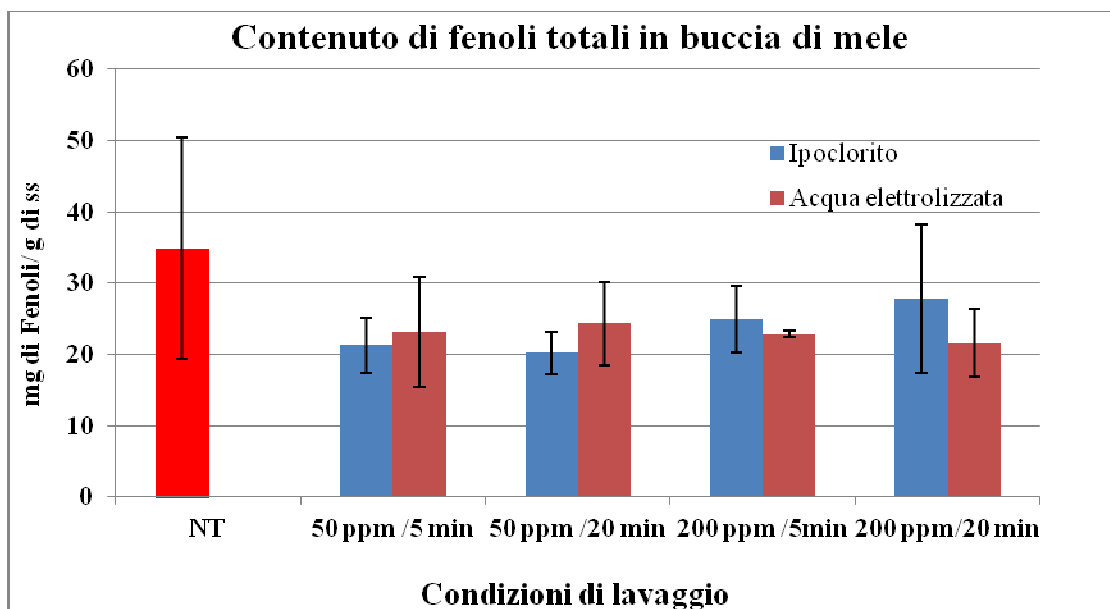


Figura 53: Contenuto in fenoli totali della buccia di mele sottoposte a lavaggio con soluzioni di ipoclorito od acqua elettrolizzata a diverso contenuto di cloro attivo (50 o 200 ppm) per 5 o 20 minuti

CAPITOLO 7 - CONCLUSIONI

L'obiettivo principale di questa sperimentazione è stato quello di valutare l'efficacia di soluzioni di acqua elettrolizzata da utilizzarsi per la decontaminazione di mele mediante lavaggio per immersione.

In generale tale tecnica di disinfezione ha dato buoni risultati in termini di riduzione di vitalità sia della microflora naturalmente presente sulla superficie delle mele, che di un patogeno target, *Listeria monocytogenes*, deliberatamente inoculato sulla frutta. Infatti, anche a seguito di lavaggi più brevi (5 minuti) e nelle condizioni più blande (50 ppm di cloro attivo) si sono ottenuti livelli medi di abbattimento di 1 ciclo logaritmico della popolazione batterica mesofila.

Se da un lato tali valori possono sembrare limitati, dall'altro va considerato che gli stessi risultati sono stati ottenuti con la soluzione di ipoclorito, scelto come sanitizzante di riferimento. Inoltre, è ampiamente riportato dalla letteratura internazionale che i microrganismi riescono ad infiltrarsi attraverso le lenticelle della superficie dei frutti, oltre al fatto che possono formare biofilm batterici o, quantomeno, aderire alla superficie formando una comunità microbica ben consolidata e di difficile rimozione.

Tali condizioni riducono in modo significativo l'efficacia dei trattamenti con sanitizzanti chimici (Burnett *et al.*, 2000), così come dei trattamenti fisici o di altri metodi adottati per ridurre o rimuovere i microrganismi.

Per contro, i risultati ottenuti in questa sperimentazione hanno evidenziato che la popolazione fungina è più sensibile, rispetto a quella batterica, ai lavaggi sia con l'acqua elettrolizzata, che con la soluzione di ipoclorito. Complessivamente si è infatti raggiunta una perdita di vitalità compresa tra 1.5 e 2 cicli logaritmici utilizzando soluzioni di acqua elettrolizzata con una concentrazione di cloro attivo di 100 e 200 ppm: tali valori sono risultati del tutto simili a quelli del sanitizzante di controllo.

Un altro aspetto che è emerso dal confronto dei risultati ottenuti alle diverse condizioni prese in esame è che, in generale, l'efficacia dei trattamenti sanitizzanti è influenzata soprattutto dalla concentrazione del cloro attivo, mentre

il tempo di trattamento non sembra essere un parametro di rilievo. Questa considerazione trova riscontro sia nei dati relativi alla microflora batterica e fungina naturalmente presente sulle mele, che nelle prove in cui la frutta è stata deliberatamente inoculata con *Listeria monocytogenes*.

Per questo microrganismo si sono ottenuti livelli massimi di abbattimento compresi tra 3 e 5-6 cicli logaritmici in funzione del contenuto in cloro, oltre che del livello di contaminazione iniziale. Graça *et al.* (2011) hanno riportato livelli medi di inattivazione di patogeni quali *Listeria innocua*, *E. coli* e *Salmonella choleraesuis* compresi tra 1.2 e 2.4 unità logaritmiche di mele in pezzi a seguito di lavaggi della durata di 30 minuti con acqua elettrolizzata acida, mentre per quella neutra l'azione battericida è risultata di minore entità.

D'altra parte riduzioni della carica batterica totale non eccedenti 1 ciclo logaritmico sono state osservate da Tomás-Callejas *et al.* (2011) per mizuna minimamente trattata a seguito di lavaggio per 3 minuti con acqua elettrolizzata neutra.

Le notevoli differenze evidenziate in termini di efficacia dei lavaggi con acqua elettrolizzata delle mele deliberatamente inoculate con *L. monocytogenes* e della frutta contaminata dalla microflora naturale, possono essere ricondotte a differenti fattori quali: una intrinseca e naturale differenza nella sensibilità a condizioni di stress chimico-fisico di specie microbiche differenti più o meno adattate al sistema oggetto di studio; la presenza di una comunità microbica complessa, rispetto ad una singola specie/ceppo deliberatamente inoculato nella matrice oggetto di studio, che aumenta statisticamente la probabilità di avere microrganismi dotati di elevata resistenza; la maggiore adesione e/o formazione di biofilm sulla superficie del frutto precedentemente riportata.

Tutti questi aspetti critici devono essere ben chiari e tenuti in considerazione qualora si debba procedere all'ottimizzazione delle condizioni di processo al fine di garantire l'ottenimento di alimenti sicuri da un punto di vista microbiologico. Ciononostante, i risultati di questa sperimentazione, sebbene preliminari, hanno evidenziato che l'acqua elettrolizzata può essere considerata una tecnica di decontaminazione promettente: infatti oltre ad avere un'azione sanitizzante simile all'ipoclorito nei confronti della microflora naturale, e di ridurre il rischio

associato alla presenza di *L. monocytogenes*, non ha indotto modificazioni significative di un parametro qualitativo che caratterizza tale frutto quale l'attività antiossidante determinata, in larga misura, dall'elevato contenuto in fenoli.

Bibliografia

- **Code of Federal Regulations No 21CFR173.315.** *Chemicals used in washing or to assist in the peeling of fruits and vegetables.* Title 21, Part 173, Section 173.315.
- **Code of Federal Regulations No 21CFR182.1778.** *Sodium phosphate.* Title 21, Part 182, Section 182.1778.
- **Code of Federal Regulations No 21CFR184.1005.** *Direct food substances affirmed as Generally Recognized as Safe, listing of specific substances affirmed as GRAS, Acetic Acid.* Title 21, Part 184, Subpart B, Section 184.1005.
- **Abadias M.,** Alegre I., Usall J., Torres R., Vinas I. *Evaluation of alternative sanitizers to chlorine disinfection for reducing foodborne pathogens in fresh-cut apple.* *Postharvest Biology and Technology.* 2011, 59: 289-297.
- **Abadias M.,** Cañamas T.P., Asensio A., Anguera M., Viñas I. *Microbial quality of commercial “Golden Delicious” apple throughout production and shelf-life in Lleida (Catalonia, Spain).* *International Journal of Microbiology.* 2006, 108: 404-409.
- **Abadias M.,** Alegre I., Usall J., Torres R., Vinas I. *Evaluation of alternative sanitizers to chlorine disinfection for reducing foodborne pathogens in fresh-cut apple.* *Postharvest Biology and Technology.* 2011, 59: 289-297.

- **Advisory Committee on the Microbiological Safety on Food (MSF).** *Ad hoc group on vulnerable groups. Report on the increased incidence of listeriosis in the UK.* Food Standards Agency. 2009.

- **Aharoni Y.,** Copel A., Fallik E. *The use of hydrogen peroxide to control postharvest decay on “Galia” melons.* Annals of Applied Biology. 1994, 125(1): 189-193.

- **Alakomi H.L.,** Skyttä E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K., Helander I.M. *Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane.* Applied and Environmental Microbiology. 2000, 66: 2001–2005.

- **Alegre I. ,**Abadias M., Anguera M., Oliveira M., Viñas I. *Factors affecting growth of foodborne pathogens on minimally processed apples.* Food Microbiology. 2009, 27: 70–76.

- **Al-Haq M.I.,** Seo Y., Oshita S., Kawagoe Y. *Fungicidal effectiveness of electrolyzed oxidizing water on post harvest brown rot of peach.* Horticultural Science. 2001, 36: 1310–1314.

- **Allerberger F.,** Wagner M. *Listeriosis: a resurgent foodborne infection.* Clinical Microbiology and Infection. 2010, 16(1): 16–23.

- **Amezaga M.R.,** Davidson I., McLaggan D., Verheul A., Abee T., Booth I.R. *The role of peptide metabolism in the growth of Listeria monocytogenes ATCC 23074 at high osmolarity.* Microbiology. 1995, 141: 41–49.

- **Anino S.V.,** Salvatori D.M., Alzamora S.M. *Changes in calcium level and mechanical properties of apple tissue due to impregnation with calcium salts.* Food Research International. 2006, 39: 154-164.

- **Annous B.A.**, Becker L.A., Bayles D.O., Labeda D.P., Wilkinson B.J. *Critical role of anteiso-C15:0 fatty acid in the growth of Listeria monocytogenes at low temperatures*. Applied and Environmental Microbiology. 1997, 63: 3887–3894.

- **Badosa E.**, Trias R., Parés D., Pla M., Montesinos E. *Microbiological quality of fresh fruit and vegetable products in Catalonia (Spain) using normalised plate-counting methods and real time polymerase chain reaction (QPCR)*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2008, 88: 605-611.

- **Bakkali F.**, Averbeck S., Averbeck D., Zhiri A., Baudoux D., Idaomar M. *Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (Saccharomyces cerevisiae) after treatments with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS*. Mutation Research. 2006, 606: 27–38.

- **Baranyi J.**, Jones A., Walker C., Kaloti A., Rabinson T.P., Mackey, B.M. *A combined model for growth and subsequent thermal inactivation of Brochothrix thermosphacta*. Applied and Environmental Microbiology. 1996, 62: 1029–1035.

- **Barbosa W.B.**, Cabedo L., Wederquist H.J., Sofos J.N., Schmidt G.R. *Growth variation among species and strains of Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection. 1994, 57(9): 765–769.

- **Bari M.L.**, Inatsu Y.; Kawasaki S.; Nazuka E.; Isshiki, K. *Calcinated calcium killing of Escherichia coli O157:H7, Salmonella, and Listeria monocytogenes on the surface of tomatoes*. Journal Food Protection. 2002, 65: 1706-1711.

- **Bayles D.O.**, Wilkinson B.J. *Osmoprotectants and cryoprotectants for Listeria monocytogenes*. Letters in Applied Microbiology. 2000, 30(1): 23-27.

- **Bayles M.**, Darrell O., Bassam A., Annous B., Wilkinson J. *Cold stress proteins induced in Listeria monocytogenes in response to temperature downshock and growth at low temperatures*. Applied and Environmental Microbiology. 1996, 62(3): 1116-1119.

- **Belletti N.**, Lanciotti R., Patrignani F., Gardini F. *Antimicrobial efficacy of citron essential oil on spoilage and pathogenic microorganisms in fruit-based salads*. Journal of Food Science, 2008, 73: 331-338.

- **Belletti N.**, Sado Kamdem S., Patrignani F., Lanciotti R., Covelli, A., Gardini, F. *Antimicrobial activity of aroma compounds against Saccharomyces cerevisiae and improvement of microbiological stability of soft drinks as assessed by logistic regression*. Applied and Environmental Microbiology. 2007, 73: 5580-5586.

- **Beuchat L.** *Pathogenic microorganisms associated with fresh produce*. Journal of Food Protection. 1996, 59(2): 204-216.

- **Beuchat L.R.** *Listeria monocytogenes: incidence on vegetables*. Food Control. 1996, 7: 223–228.

- **Beuchat L.R.** *Surface decontamination of fruit and vegetables eaten raw: a review*. Food Safety Unit, World Health Organization. WHO/FSF/FOS/98.2. 1998.

- **Biely P.**, Slavikova E. *Distribution of pectin-degrading activities among yeasts*. Zentralblatt für Mikrobiologie. 1990, 145: 345–351.

- **Block, S.S.**, *Peroxygen compounds, in disinfection, sterilization, and preservation*. 4th ed. Ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1991, capitolo. 9.
- **Bloomfield S.F.**, Miles G.A. *The antibacterial properties of sodium dichloroisocyanurate and sodium hypochlorite formulations*. Journal of Applied Bacteriology. 1979, 46: 65-73.
- **Boyette M.D.**, Ritchie D.F., Carballo S.J., Blankenship S.M., Sanders D.C. *Chlorination and postharvest disease control*. Hort Technology. 1993, 3: 395-400.
- **Brand-Williams W.**, Culivier M.E., Berset C. *Use of free radical method to evaluation of antioxidant activity*. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie - Food Science and Technology. 1995, 28(1): 25–30.
- **Bruni R.**, Medici A., Andreotti E., Fantin C., Muzzoli M., Dehesa M. *Chemical composition and biological activities of Isphingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from Ocotea quixos (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices*. Food Chemistry. 2003, 85: 415-421.
- **Buchanan R.L.**, Golden M.H., Whiting R.C., Philips J.G., Smith J.L. *Nonthermal inactivation models for Listeria monocytogenes*. Journal of Food Science. 1994, 59: 179–188.
- **Buck J.W.**, Iersel M.W., Oetting R.D., Hung Y.C. *In vitro fungicidal activity of acidic electrolyzed oxidizing water*. Plant Disease. 2002, 86: 278–281.
- **Burnett S.L.**, Chen J., Beuchat L.R. *Attachment of Escherichia coli O157:H7 to the surfaces and internal structures of apples as detected by*

- confocal scanning laser microscopy*. Applied and Environmental Microbiology. 2000, 66(11): 4679-4687.
- **Burt S.** *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review*. International Journal of Food Microbiology, 2004, 94: 223-253.
 - **Caponigro V.,** Ventura M., Chiancone I., Amato L., Parente E., Piro F. *Variation of microbial load and visual quality of ready-to-eat salads by vegetable type, season, processor and retailer*. Food Microbiology. 2010, 27(8): 1071–1077.
 - **Carratu B.,** Sanzini E. *Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale*. Annuario istituto superiore della sanità. 2005, 41:7-16.
 - **Castillo A.,** Lucia LM, Roberson DB, Stevenson TH, Mercado I, Acuff GR. *Lactic acid sprays reduce bacterial pathogens on cold beef carcass surfaces and in subsequently produced ground beef*. Journal Food Protection. 2001, 64(1): 58-62.
 - **Chambers C.W.,** *A procedure for evaluating the efficiency of bacteria agent*. Milk Food Technology. 1956, 19: 183-187.
 - **Chand-Goyal T.,** Spotts R.A. *Postharvest biological control of blue mold of apple and brown rot of sweet cherry by natural saprophytic yeasts alone or in combination with low doses of fungicides*. Biological Control. 1996, 6: 253-259.
 - **Choi H.K.,** Schaack M.M., Marth E.H. *Survival of Listeria monocytogenes in cultured buttermilk and yogurt*. Milchwissenschaft. 1988, 43: 790–792.

- **Cleveland J.**, Montville T.J., Nes I.F., Chikindas M.L. *Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation*. International Journal of Food Microbiology. 2001, 71: 1–20.

- **Commissione Europea (EC) Regolamento No 2073/2005** del 15 Novembre 2005 sui criteri microbiologici per gli alimenti. Official Journal of the European Union. 2005, 338:1-26.

- **Curtis G.D.W.** *A selective differential medium for the isolation of Listeria monocytogenes*. Letters in Applied Microbiology. 1989, 8: 95-98.

- **D’Amato D.**, Sinigaglia M., Corbo M.R. *Use of chitosan, honey and pineapple juice as filling liquids for increasing the microbiological shelf life of a fruit-based salad*. International Journal of Food Science and Technology. 2010, 45: 1033-1041.

- **Da Silva N.**, Taniwaki M.H., Junqueira C.A., De Arruda Silvera N., Donascimento M., Gomes R.A. *Listeria monocytogenes microbiological examination methods of food and water*. Institute of Food Technology. 2013, 197-215.

- **De Azeredo G.A.**, Stamford T.L.M., Nunes P.C., Gomes Neto N. J., de Oliveira M.E.G., de Souza E. L. *Combined application of essential oils from Origanum vulgare L. and Rosmarinus officinalis L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables*. Food Research International. 2011, 44(5): 1541–1548.

- **De Cicco V.**, Bertolini P., Salerno M.G. *Patologia post-raccolta dei prodotti vegetali*. Ed. Piccin-Nuova Libreria. 2008.

- **De Oliveira M. A.**, Abeid Ribeiro E.G., Morato Bergamini A.M., Pereira De Martinis E.C. *Quantification of Listeria monocytogenes in minimally processed leafy vegetables using a combined method based on enrichment and 16S rRNA real-time PCR*. Food Microbiology. 2010, 27: 19–23.

- **Deak, T.**, Beuchat L.R. *Identification of foodborne yeasts*. Journal of Food Protection. 1987, 50: 243–264.

- **Delaquis P.J.**, Ward S.M., Stanich, K. *Evaluation of pre-pressing sanitary treatments for the destruction of Escherichia coli O157:H7 on apples destined for production of unpasteurized apple juice*. Technical Report No. 9901. Agriculture and Agri-Food Canada. Pacific Agri-Food Research Centre, Summerland. 2000, BC V0H 1Z0.

- **Delgado-Pelayo R.**, Gallardo-Guerrero L., Hornero-Méndez D. *Chlorophyll and carotenoid pigments in the peel and flesh of commercial apple fruit varieties*. Food Research International. 2014, 65: 272-281.

- **Deng X.T.**, Shi J.J., Shama G., Kong M.G. *Effects of microbial loading and sporulation temperature on atmospheric plasma inactivation of Bacillus subtilis spores*. Applied Physics Letters. 2005, 87: 153901.

- **Deza M.A.**, Araujo M., Garrido M.J. *Inactivation of Escherichia coli O157: H7, Salmonella enteritidis and Listeria monocytogenes on the surface of tomatoes by neutral electrolyzed water*. Letters in Applied Microbiology. 2003, 37(6): 482-487.

- **Drysdale G.S.**, Fleet G.H. *Acetic acid bacteria in winemaking: A review*. American Journal of Enology and Viticulture. 1988, 39: 143–154.

- **Duché O.**, Trémoulet F., Glaser P., Labadie J. *Salt stress proteins induced in Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology. 2002, 68(4): 1491-1498.
- **Eastern Regional Research Center (ERRC)**, United State of Department of Agriculture (USDA). *Pathogen Modeling Program*. 2003.
- **Eifert J.D.**, Sanglay G.C. *Chemistry of chlorine sanitizer and food processing*. Dairy, Food and Environmental Sanitation. 2002, 22(7): 534-538.
- **Eliasson B.**, Kogelschatz U. *Nonequilibrium volume plasma chemical processing*. IEEE Transactions on Plasma Science. 1991, 19: 1063–1077.
- **Espina L.**, Somolinos M., Loran S., Conchello P., Garcia D., Pagan R. *Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes*. Food Control. 2011, 22: 896-902.
- **Fabrizio K.A.**, Cutter C.N. *Stability of electrolyzed oxidizing water and its efficacy against cell suspensions of Salmonella Typhimurium and Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection. 2003, 66: 1379–1384.
- **Fallik E.** *Postharvest hydrogen peroxide treatment inhibits decay in eggplant and sweet red pepper*. Crop Protection. 1994, 13: 451-454.
- **Falomir M.P.**, Gozalbo D., Rico H. *Coliform bacteria in fresh vegetables: from cultivated lands to consumers*. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. 2010, 2: 1175-1181.

- **Fett W.F.** *Reduction of native microflora on alfa sprouts during propagation by addition of antimicrobial compounds to the irrigation water.* International Journal of Food Microbiology. 2002, 72: 13-18.

- **Foegeding P.M., Busta F.F.** *Chemical food preservatives, in disinfection, sterilization, and preservation.* 4th ed., Block, S.S., Ed., Lea & Febiger, Philadelphia. 1991, chap. 47.

- **Food & Drug Administration (FDA),** Center for Food Safety & Applied Nutrition (CFSAN). *Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook (The Bad Bug Book).*2009.

- **Food & Drug Administration (FDA).** *Beverages: Bottled water, final rule.* Federal Register. 1995, 60: 57075–130.

- **Forney C.F.** *Vapor phase hydrogen peroxide inhibits postharvest decay of table grapes.* Horticultural Science. 1991, 26: 1512.

- **Frank J.F.,** Chmielewski R.A.N. *Effectiveness of sanitation whit quaternari ammonium compound vs. chorine on stainless steel and other food preparation surface.* Journal of Food Protection. 1997, 60: 43.

- **Frohlich E.** *Lavender oil; review of clinical, pharmacological and bacteriological studies. Contribution to clarification of the mechanism of action.* Wiener Medizinische Wochenschrift. 1968, 118: 345–450.

- **Geeson, J.D.** *The fungul and bacterial flora of stored white cabbage.* Journal of Applied Bacteriology. 1979, 46: 189.

- **Gil M.I.,** Selma M.V., López-Gálvez F., Allende A. *Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions.* International Journal of Food Microbiology. 2009, 134: 37-45.

- **Gillespie I.A.**, McLauchlin C.L. Little, Penman P., Mook K. Grant and S.J. O'Brien. *Disease presentation in relation to infection foci for non-pregnancy-associated human listeriosis in England and Wales, 2001 to 2007*. Journal of Clinical Microbiology. 2009, 47: 3301–3307.

- **Gonzalez-Aguilar G.A.**, Ayala-Zavala J.F., Olivas G.I., de la Rosa L.A., Alvarez-Parrilla E. *Preserving quality of fresh-cut products using safe technologies*. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. 2010, 5: 65-72.

- **Graça A.**, Abadias M., Salazar M., Nunes C. *The use of electrolyzed water as a disinfectant for minimally processed apples*. Postharvest Biology and Technology. 2011, 61:172–177.

- **Gutierrez J.**, Bourke P., Lonchamp J., Barry-Ryan C. *Impact of plant essential oils on microbiological, organoleptic and quality markers of minimally processed vegetables*. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2009, 10: 195-202.

- **Hampson B.C.** *Emerging technology — Ozone*. Presented at the IFT Annual Meeting. New Orleans, LA. 2001.

- **Hampson B.C.**, Montevalco J., Williams D.W. *Regulation of ozone as a food sanitizing agent: Application of ozonation in sanitizing vegetable process wash waters*. Presented at the IFT Annual Meeting, Book of Abstracts. Chicago. 1996, IL, 140–42.

- **Hermann H.W.**, Henins I., Par, J., Selwyn G.S. *Decontamination of chemical and biological warfare (CBW) agents using an atmospheric pressure plasma jet (APPJ)*. Physics of Plasmas. 1999, 6: 2284–2289.

- **Hill C.,** Cotter P. D., Sleator R. D., Gahan C. G. *Bacterial stress response in Listeria monocytogenes: jumping the hurdles imposed by minimal processing.* International Dairy Journal. 2002, 12(2): 273-283.

- **Hitchins A.D.** *Detection and enumeration of Listeria monocytogenes.* In: FDA (ed.) Bacteriological Analytical Manual, Chapter 10. [Online] Silver Spring, Food and Drug Administration. 2011.

- **Hitchins A.D.** *Detection and enumeration of Listeria monocytogenes .* In: FDA (ed.) Bacteriological Analytical Manual. 2011.

- **Hsu S.Y.** *Effect of water flow rate, salt concentration and water temperature on efficiency of an electrolyzed oxidizing water generator.* Journal of Food Engineering. 2003, 60: 469–473.

- **Hsu S.Y.** *Effects of flow rate, temperature and salt concentration on chemical and physical properties of electrolyzed oxidizing water.* Journal of Food Engineering. 2005, 66: 171–176.

- **Huang Y.R.,** Hsieh H.S., Lin S.Y., Lin S.J., Hung Y.C., Hwang, D.F. *Application of electrolyzed oxidizing water on the reduction of bacterial contamination for seafood.* Food Control. 2006, 17: 987–993.

- **Huang Y.R.,** Hung Y.C., Hsu S.Y., Huang Y.W., Hwang D.F. *Application of electrolyzed water in the food industry.* Food Control. 2008, 19(4): 329-345.

- **Hudson J.,** Andrew J., Mott C., Nicholass P. *Growth of Listeria monocytogenes, Aeromonas hydrophila, and Yersinia enterocolitica on vacuum and saturated carbon dioxide controlled atmosphere-packaged sliced roast beef.* Journal of Food Protection. 1994, 57(3): 204-208.

- **Hulme A.C.** *The biochemistry of pome fruits in the biochemistry of fruits and their products, Vol.2.* Academic Press: New York. 1970, 33: 6-357.
- **Isshiki K., Azuma, K.** *Microbial growth suppression in food using calcinated calcium.* Japan Agricultural Research Quarterly. 1995, 29: 269.
- **Iwasawa A., Nakamura Y.** *Antimicrobial activity of aqua oxidizing water.* Clinical Bacteriology. 1993, 20: 469–473.
- **Jacxsens L., Devlieghere F., Debevere J.** *Predictive modelling for packaging design: equilibrium modified atmosphere packages of fresh-cut vegetables subjected to a simulated distribution chain.* International Journal of Food Microbiology. 2002, 73: 331–341.
- **Johnson J.L., Doyle M.P., Cassens R.G., Schoeni J.L.** *Fate of Listeria monocytogenes in tissues of experimentally infected cattle and in hard salami.* Applied and Environmental Microbiology. 1988, 54: 497–501.
- **Juven B.J., Shomer I.** *Spoilage of soft drinks caused by bacterial flocculation.* Journal of Food Protection. 1985, 48: 52–53.
- **Khan A., Huq T., Khan R.A., Riedl B., Lacroix, M.** *Nanocellulose-based composites and bioactive agents for food packaging.* Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2014, 54: 163-174.
- **Kim C., Hung Y.C., Brachett R.E.** *Efficacy of electrolyzed oxidizing (EO) and chemically modified water on different types of food-borne pathogens.* International Journal of Food Microbiology. 2000a, 61: 199–207.
- **Kim C., Hung, Y.C., Brachett R.E.** *Roles of oxidation– reduction potential in electrolyzed oxidizing and chemically modified water for*

- inactivation of food-related pathogens*. Journal of Food Protection. 2000b, 63: 19–24.
- **Kim G.J**, Yousef A.E., Dave S. *Application of ozone for enhancing safety and quality of foods: A review*. Journal of Food Protection. 1999, 62: 1071–1087.
 - **Kim J.H.**, Lee J.W., Kim J.H., Seo J.H., Han S.B., Chung H.J., Byun M.W. *Effect of gamma irradiation on Listeria ivanovii inoculated to Iceberg lettuce stored at cold temperature*. Food Control. 2005, 17: 397–401.
 - **Kimura M.**, Mikami K., Hoshikawa H., Mori T., Kasai H., Yoshimizu M. *Effect of rearing using an electrolyzed seawater on reduction of Vibrio parahaemolyticus from sea urchin*. Nippon Suisan Gakkaishi. 2006, 72: 1–5.
 - **Kiura H.**, Sano K., Morimatsu S., Nakano T., Morita C., Yamaguchi M. *Bactericidal activity of electrolyzed acid water from solution containing sodium chloride at low concentration, in comparison with that at high concentration*. Journal of Microbiological Methods. 2002, 49(3): 285–293.
 - **Koide S.**, Shitanda D., Note M., Cao W. *Effects of mildly heated, slightly acidic electrolyzed water on the disinfection and physicochemical properties of sliced carrot*. Food Control. 2011, 22: 452-456.
 - **Krogh P.** *The role of mycotoxins in disease of animals and man*. Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement. 1989, 18: 99–104.
 - **Kubo I.**, Fujita K. *Naturally occurring anti-Salmonella agents*. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 2001, 49: 5750-5754.

- **Kykkidou S.**, Giatrakou V., Papavergou A., Kontominas M. G., Savvaidis, I. N. *Effect of thyme essential oil and packaging treatments on fresh Mediterranean swordfish fillets during storage at 4 °C*. Food Chemistry. 2008, 115:169-175.

- **Lal Kaushal B.B.**, Sharma P. C. *Handbook of fruit science and technology*. Apple Salunkhe, M.Dekker: New York. 1995, 91-122.

- **Lanciotti R.**, Gianotti A., Patrignani F., Belletti N., Guerzoni M. E., Gardini F. *Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits*. Trends in Food Science & Technology. 2004, 15: 201-208.

- **Lanciotti R.**, Gianotti F., Patrignani F., Belletti N., Guerzoni M.E. , Gardini F. *Use of natural aroma compounds to improve shelf life and safety of minimally processed fruits*. Trends in Food Science and Technology. 2004, 15: 201-208.

- **Laroussi M.**, Leipold F. *Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure*. International Journal of Mass Spectrometry. 2004, 233: 81–86.

- **Lawless J.** *The illustrated encyclopedia of essential oils*. Shaftesbury, UK: Element Books Ltd, 1955.

- **Le Chevalier M.W.**, Cawthon C.D., Lee R.G. *Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies*. Applied and Environmental Microbiology. 1988, 54: 649.

- **Lecuit M.** *Understanding how Listeria monocytogenes targets and crosses host barriers.* Clinical Microbiology and Infection. 2005, 11: 430–436.
- **Lee K.W.,** Kim Y. J., Kim D. O., Lee H. J., Lee C. Y. *Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity.* Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003, 51: 6516-6520.
- **Lee N.Y.,** Kim N.H., Jang I.S., Jang S.H., Lee S.H., Hwang I.G., Rhee M.S. *Decontamination efficacy of neutral electrolyzed water to eliminate indigenous flora on a large-scale of cabbage and carrot both in the laboratory and on a real processing line.* Food Research International. 2014, 64: 234–240.
- **Len S.V.,** Hung Y.C., Erickson M., Kim C. *Ultraviolet spectrophotometric characterization and bactericidal properties of electrolyzed oxidizing water as influenced by amperage and pH.* Journal of Food Protection. 2000, 63: 1534–1537.
- **Leverentz B.,** Conway W.S., Janisiewicz W., Abadias M., Kurtzman C.P., Camp M.J. *Biocontrol of the foodborne pathogens Listeria monocytogenes and Salmonella enterica serovar Poona on fresh-cut apples with naturally occurring bacteria and yeast antagonists.* Applied and Environmental Microbiology. 2006, 72: 1135–1140.
- **Liao C.H.,** Shollenberger L.M., Phillips J.G. *Lethal and sublethal action of acetic acid on Salmonella in vitro and on cut surfaces of apple slices.* Journal of Food Science. 2003, 68: 2793.
- **Liao L. B.,** Chen W.M., Xiao X.M. *The generation and inactivation mechanism of oxidation–reduction potential of electrolyzed oxidizing water.* Journal of Food Engineering. 2007, 78: 1326–1332.

- **Lin C.M.** *Inactivation of Escherichia coli O157:H7, Salmonella enterica Serotype Enteritidis, and Listeria monocytogenes by hydrogen peroxide and lactic acid and by hydrogen peroxide with mild heat.* Journal of Food Protection. 2002, 65: 1215.
- **Lukasik J.** *Reduction of poliovirus 1, bacteriophages, Salmonella Montevideo, and Escherichia coli O157:H7 on strawberries by physical and disinfectant washes.* Journal of Food Protection. 2003, 66: 188.
- **Mansur A.R.,** Oh D.H. *Combined effects of thermosonication and slightly acidic electrolyzed water on the microbial quality and shelf life extension of fresh-cut kale during refrigeration storage.* Food Microbiology. 2015, 51: 154- 162.
- **Mahapatra A.K.,** Muthukumarappan K., Julson J.L. *Applications of ozone, bacteriocins and irradiation in food processing: A review.* Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2005, 45: 447–461.
- **Marks H.C.,** Glass J.R. *A new method of determining residual chlorine.* Journal of American Water Works Association. 1942, 1227-1240.
- **Marriott N.,** Gravani R.B., *Sanificazione nell'industria alimentare.* Ed. Springer-Verlag. 2008.
- **Marriott N.G.,** Gravani R.B. *Principles of food sanitation* (5th edition.). New York: Springer. 2006.
- **McGhie T.K.,** Hunt M., Barnett L.E. *Cultivar and growing region determine the antioxidant polyphenolic concentration and composition of apples grown in New Zealand.* Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005, 53: 3065-3070.

- **McLauchlin J. , Rees C.E.D.** *Genus I. Listeria Pirie 1940a 383AL*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2a edizione, volume 3 (*The Firmicutes*). Edited by De Vos P. , Garrity G. M. , Jones D. , Krieg N. R. , Ludwig W. , Rainey F. A., Schleifer K. H. , Whitman W. B. New York: Springer. 2009, 3:244–257.
- **McPherson L.L.** *Understanding ORP's in the disinfection process*. Water Engineering and Management. 1993, 140: 29–31.
- **Meinhold N.M.**, *Chlorine dioxide foam effective against Listeria-less contact time needed*. Food Processing. 1991, 2: 86.
- **Mendonca A.F.**, Amoroso, T.L., Knabel, S.J. *Destruction of Gram negative food-borne pathogens by high pH involves disruption of the cytoplasmic membrane*. Applied and Environmental Microbiology. 1994, 60: 4009-4014.
- **Miller A.J.** *Combined water activity and solute effects on growth and survival of Listeria monocytogenes Scott A*. Journal of Food Protection. 1992, 55: 414–418.
- **Montie T.C.**, Kelly-Wintenberg K., Roth J.R. *An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP) for sterilization of surfaces and materials*. IEEE Transactions on Plasma Science. 2000, 28: 41–50.
- **Mori Y.**, Komatsu S., Hata Y. *Toxicity of electrolyzed strong acid aqueous solution-subacute toxicity test and effect on oral tissue in rats*. Odontology. 1997, 84: 619–626.
- **Naitoh S.**, Okada Y., Sakai T. *Studies on utilization of ozone in food preservation: III. Microbicidal properties of ozone on cereal grains*,

- cereal grain powders, peas, beans and whole spices*. Journal of Japanese Society of Food Science and Technology. 1987, 34: 788–793.
- **Nicholas J. J.**, Richard Forget F. C., Goupy P. M., Amiot M. J. Aubert S.Y. *Enzymatic browning reactions in apple and apple products*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition.. 1994, 34(2): 109-157.
 - **Nielsen P. V.**, Rios, R. *Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from species and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil*. International Journal of Food Microbiology. 2000, 60: 130 – 132.
 - **Nightingale K.K.**, Schukken Y.E., Nightingale C.R., Fortes E.D., Ho A.J., Her Z., Grohn Y.T., McDonough P.L., Wiedmann M. *Ecology and transmission of Listeria monocytogenes infecting ruminants and in the farm environment*. Applied and Environmental Microbiology. 2004, 70: 4458–4467.
 - **Norma ISO 11290-1:1996**. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes – Part 1: detection method*. 1a Edizione: 1996, Emendamento 1: 2004.
 - **Novgorodov S.A.**, Gudz T.I. *Permeability transition pore of the inner mitochondrial membrane can operate in two open states with different selectivities*. Journal of Bioenergetics and Biomembranes. 1996, 28: 139–146.
 - **O'Donnell C.P.**, Cullen P.J., Muthukumarappan K. *Ozone treatment of food materials in food antimicrobials for food preservation*. International Journal of Food Microbiology. 2001, 71: 1–20.

- **Oevermann A.**, Zurbriggen A., Vandeveld M. *Rhombencephalitis caused by Listeria monocytogenes in humans and ruminans: A zoonosis on the rise?* Interdisciplinary Perspectives of Infective Diseases. 2010, article n° 632513,.

- **Okull D.O.**, Laborde L.F. *Activity of electrolyzed oxidizing water against Penicilium expansum on suspension and on wounded apples.* Journal of Food Science. 2004, 69: 23–27.

- **Ölmez H.**, Kretzschmar U. *Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact.* Food Science and Technology. 2009, 42:686–693.

- **Osafune T.**, Ehara T., Ito T. *Electron microscopic studies on bactericidal effects of electrolyzed acidic water on bacteria derived from kendo protective equipment.* Environmental Health and Preventive Medicine. 2006, 11: 206–214.

- **Oussalah M.**, Caillet S., Lacroix M. *Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes.* Journal of Food Protection. 2006, 69: 1046–1055.

- **Pagán R.**, Condón S., Sala F. J. *Effects of several factors on the heat-shock-induced thermotolerance of Listeria monocytogenes.* Applied and Environmental Microbiology. 1997, 63,8: 3225-3232.

- **Pao S.**, Davis C.L., Kelsey D.F. *Efficacy of alkaline washing for the decontamination of orange fruit surfaces inoculated with Escherichia coli.* Journal of Food Protection. 2000, 63: 961.

- **Park C.M.,** Hung Y.C., & Brackett, R. E. *Antimicrobial effect of electrolyzed water for inactivating Campylobacter jejuni during poultry washing.* International Journal of Food Microbiology. 2002a, 72: 77–83.

- **Park D.L.,** Rua S.M. Jr, Acker R.F. *Direct application of a new chlorite sanitizer for reducing bacterial contamination on food.* Journal of Food Protection. 1991, 54: 960.

- **Park H.,** Hung Y.C., Chung, D. *Effects of chlorine and pH on efficacy of electrolyzed water for inactivating Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes.* International Journal of Food Microbiology. 2004, 91: 13–18.

- **Park H.,** Hung Y.C., Kim C. *Effectiveness of electrolyzed water as a sanitizer for treating different surfaces.* Journal of Food Protection. 2002b, 65: 1276–1280.

- **Patrignani F.,** Siroli L., Serrazanetti D.I., Gardini F., Lanciotti R. *Innovative strategies based on the use of essential oils and their components to improve safety, shelf-life and quality of minimally processed fruits and vegetables.* Trends in Food Science and Technology, 2015, 1-12.

- **Payne J.H.** *Multiplication and virulence in plant tissue of Escherichia coli clones producing pectate lyase isozymes PLb and PLe at high levels and an Erwinia chrysanthemi mutant deficient in PLe.* Applied and Environment of Microbiology. 1987, 53: 2315.

- **Peiris W.I.P.,** Lopez-Valladares G., Parihar V.S., Helmersson S., Barbuddhe S.B., Tham W., Danielsson-Tham M.L. *Gravad (Gravlax) and*

- cold-smoked salmon (salmo salar), a potential source of listeriosis.* Journal of Food Service. 2009, 20: 15–20.
- **Petran R.L.**, Zottola E.A. *A study of factors affecting growth and recovery of Listeria monocytogenes Scott A.* Journal of Food Science. 1989, 54: 458–460.
 - **Pfaff H.J.**, Miller M.W., Mrazek E.M. *The Life of Yeasts.* 2nd ed. Harvard University Press, Cambridge, MA. 1978.
 - **Phan-Thanh L.** *Physiological and biochemical aspects of the acid survival of Listeria monocytogenes.* Journal of General and Applied Microbiology. 1998, 44:183–191.
 - **Pianetti A.**, Sabatini L., Citterio B., Pierfelici L., Ninfali P., Bruscolini E. *Changes in microbial populations in ready-to-eat vegetable salads during shelflife.* Italian Journal of Food Science. 2008, 20(2): 245–254.
 - **Piccinin D.M.**, Shelef L.A. *Survival of Listeria monocytogenes in cottage cheese.* Journal of Food Protection. 1995, 58: 128–131.
 - **Pichersky E.**, Noel J.P., Dudareva N. *Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity.* Science. 2006, 311: 808–811
 - **Pointu A.M.**, Ricard A., Dodet B., Odic E., Larbre J., Ganciu, M. *Production of active species in N₂-O₂ flowing post-discharges at atmospheric pressure for sterilization.* Journal of Physics D: Applied Physics. 2005, 38: 1905–1909.
 - **Postollec F.**, Falentin H., Pavan S., Combrisson J., Sohier D. *Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology.* Food Microbiology. 2011, 28: 848–861.

- **Ramos B.**, Miller F.A., Brandão T.R.S., Teixeira P., Silva C.L.M. *Fresh fruits and vegetables-An overview on applied methodologies to improve its quality and safety*. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 2013, 20: 1–15.

- **Raybaudi-Massilia R. M.**, Mosqueda-Melgar J., Sobrino-López A., Soliva-Fortuny R., Martín-Belloso O. *Shelf-life extensión of fresh-cut Fuji apples at different ripeness stages using natural substances*. Postharvest Biology and Technology. 2007, 45: 265-275.

- **Raybaudi-Massilia R.M.**, Mosqueda-Melgar J., Martín-Belloso O. *Antimicrobial activity of malic acid against Listeria monocytogenes, Salmonella Enteritidis and Escherichia coli O157: H7 in apple, pear and melon juices*. Food Control. 2009, 20: 105-112.

- **Reagan J.O.**, Acuff G.R., Bueye D.R., Buyck M.J., Dickson J.S., Kastner C.L., Marsden J.L. *Trimming and washing of beef carcasses as a method of improving the microbiological quality of meat*. Journal of Food Protection. 1996, 59: 751–56.

- **Reynolds J.E.F.** *Martindale – the Extra Pharmacopoeia* 31st edn. London: Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, 1996.

- **Rice R.G.**, P Overbeck P., Larson K.A. *Costs of ozone in small drinking water systems*. NSF International. 2000, 27–31.

- **Rico D.**, Martin-Diana A.B., Barat J.M., Barry-Ryan C. *Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: A review*. Trends in Food Science and Technology. 2007, 18 (7): 373–386.

- **Roberts R.G.**, Reymond S.T., Mclaughlin R.J. *Evaluation of mature apple fruit from Washington State for the presence of Erwinia amylovora*. Plant Diseases. 1989, 73: 917.
- **Robinson T.P.**, Ocio M.J., Kaloti A., Mackey B.M. *The effect of the growth environment on the lag phase of Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology. 1998 44: 83–92.
- **Robinson T.P.**, Ocio M.J., Kaloti A., Mackey B.M. *The effect of the growth environment on the lag phase of Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology. 1998, 44: 83–92.
- **Rodriguez-Amaya D.B.** *Nature and distribution of carotenoids in foods*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers. 1993, p. 547.
- **Roller S.**, Seedhar P. *Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwifruit at 4° and 8°C*. Letters in Applied Microbiology. 2002, 35: 390-394.
- **Rosenow E.M.**, Marth E.H. *Growth of Listeria monocytogenes in skim, whole and chocolate milk, and in whipping cream during incubation at 4, 8, 13, 21, and 35°C*. Journal of Food Protection. 1987, 50: 452–457.
- **Russell S. M.** *The effect of electrolyzed oxidative water applied using electrostatic spraying on pathogenic and indicator bacteria on the surface of eggs*. Poultry Science. 2003, 82: 158–162.
- **Ryser E.T.**, Marth E.H. *Behavior of Listeria monocytogenes during the manufacture and ripening of cheddar cheese*. Journal of Food Protection. 1987, 50: 7–13.

- **Sakashita M.**, Iwasawa A., Nakamura Y. *Antimicrobial effects and efficacy on habitually hand-washing of strong acidic electrolyzed water – A comparative study of alcoholic antiseptics and soap and tap water.* Journal of Japanese Association of Infectious Diseases. 2002, 76: 373–377.

- **Sakurai Y.**, Nakatsu M., Sato Y., Sato K. *Endoscope contamination from HBV- and HCV-positive patients and evaluation of a cleaning/disinfecting method using strongly acidic electrolyzed water.* Digestive Endoscopy. 2003, 15: 19–24.

- **Sampathkumar B.**, Khachatourians G.G., Korbe, D.R. *High pH during trisodium phosphate treatment causes membrane damage and destruction of Salmonella enterica Serovar Enteritidis.* Applied and Environmental Microbiology. 2003, 69: 122.

- **Sapers G.M.** *Anti-microbial treatments for minimally processed cantaloupe melon.* Journal of Food Science. 2001, 66: 345.

- **Sapers G.M.** *Enzymatic browning control in minimally processed mushrooms.* Journal of Food Science. 1994, 59: 1042.

- **Sapers G.M.** *Factors limiting the efficacy of hydrogen peroxide washes for decontamination of apples containing Escherichia coli.* Journal of Food Science. 2000, 65: 529.

- **Sapers G.M.** *Hydrogen peroxide as an alternative to chlorine for sanitizing fruits and vegetables.* FoodInfo Online Features. IFIS Publishing. July 23, 2003.

- **Sapers G.M.** *Improved anti-microbial wash treatments for decontamination of apples.* Journal of Food Science. 2002, 67: 1886.

- **Sapers G.M.** *Shelf-life extension of fresh mushrooms (agaricus bisporus) by application of hydrogen peroxide and browning inhibitors.* Journal of Food Science. 2001, 66: 362.
- **Sapers G.M.** *Vapor-phase decontamination of apples inoculated with Escherichia coli.* Journal of Food Science. 2003a, 68: 1003.
- **Sapers G.M.** *Washing and sanitizing treatments for fruits and vegetables.* Microbiology of Fruits and Vegetables. 2005, 375-400 .
- **Sapers G.M.,** Sites J.E. *Efficacy of 1% hydrogen peroxide wash in decontaminating apples and cantaloupe melons.* Journal of Food Science. 2003b, 68: 1793.
- **Sapers G.M.,** Miller R.L., Matrazzo A.M. *Effectiveness of sanitizing agents in inactivating Escherichia coli in Golden Delicious apples.* Journal of Food Science. 1999, 64: 734.
- **Sautter K.,** Moffat W. *Handbook for critical cleaning.* 2011: 425 -431.
- **Schieber A.,** Hilt P., Streker P., Endre H.U., Rentschler C., Carle, R. *A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace.* Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2003, 4: 99-107.
- **Schlech III W.F.** *Foodborne listeriosis.* Clinical Infectious Disease. 2000, 31: 770–775.
- **Sekiya, S.,** Ohmori K., Harii K. *Treatment of infectious skin defects or ulcers with electrolyzed strong acid aqueous solution.* Artificial Organs. 1997, 21: 32–38.

- **Seo K.H.**, Frank J.F. *Attachment of Escherichia coli O157:H7 to lettuce leaf surface and bacterial viability in response to chlorine treatment as demonstrated by using confocal scanning laser microscopy.* Journal of Food Protection. 1999, 62: 3.

- **Sfeir J.**, Lefrançois C., Baudoux D., Derbré S., Licznar P. *In Vitro antibacterial activity of essential oils against Streptococcus pyogenes.* Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013, 26916:1-9.

- **Shaughnessy L.M.**, Hoppe A.D., Christensen K.A., Swanson J.A. *Membrane perforations inhibit lysosome fusion by altering pH and calcium in Listeria monocytogenes vacuoles.* Cellular Microbiology. 2006, 8: 781–792.

- **Shigeto S.**, Matsumoto K., Yaguchi H., Okuda T., Miyajima S., Negi A. *Acidic electrolyzed water in the disinfection of the ocular surface.* Experimental Eye Research. 2000, 70: 1–6.

- **Shimizu Y.**, Hurusawa T. *Antiviral, antibacterial, and antifungal actions of electrolyzed oxidizing water through electrolysis.* Dental Journals. 1992, 37: 1055–1062.

- **Silva M.V.**, Gibbs P.A., Kirby R.M. *Sensorial and microbial effects of gaseous ozone on fresh scad (Trachurus trachurus).* Journal of Applied Microbiology. 1998, 84: 802–10.

- **Simmons G.F.** *Reduction of microbial populations on prunes by vaporphase hydrogen peroxide.* Journal of Food Protection. 1997, 60: 188.

- **Siroli L.**, Patrignani F., Serrazanetti D. I., Tabanelli G., Montanari C., Gardini F., Lanciotti R. *Lactic acid bacteria and natural antimicrobials to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples and lamb's lettuce*. Food Microbiology, 2015c, 47: 74-84.

- **Siroli L.**, Patrignani F., Serrazanetti D. I., Tabanelli G., Montanari C., Tappi S., Rocculi P., Gardini F., Lanciotti R. *Potential of natural antimicrobials for the production of minimally processed fresh-cut apples*. Journal of Food Processing & Technology. 2015a, 6: 1-9.

- **Siroli L.**, Patrignani F., Serrazanetti D. I., Tabanelli, G., Montanari C., Tappi, S., Rocculi P., Gardini F., Lanciotti R. *Efficacy of natural antimicrobials to prolong the shelf-life of minimally processed apples packaged in modify atmosphere*. Food Control. 2014, 46: 1-9.

- **Siroli L.**, Patrignani F., Serrazanetti D. I., Tappi S., Rocculi P., Gardini F., Lanciotti R. *Natural antimicrobials to prolong the shelf-life of minimally processed lamb's lettuce*. Postharvest Biology & Technology. 2015b, 103: 35-44.

- **Slinkard K.**, Singleton V.L. *Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods*. American Journal of Enology and Viticulture. 1977, 28(1): 49–55.

- **Smittskyddsinstitutet (SMI)**. <http://www.smittskyddsinstitutet.se/>. 22 Augusti 2012.

- **Somers E.B.**, Schoeni J.L., Wong A.C.L. *Effect of trisodium phosphate on biofilm and planktonic cells of Campylobacter jejuni, Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes and Salmonella typhimurium*. International Journal Food Microbiology. 1994, 22: 269.

- **Stratford M.**, Anslow P.A. *Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic “weak acid preservative.”* Letters in Applied Microbiology. 1998, 27: 203–206.
- **Suzuki T.**, Itakura J., Watanabe M., Ohta M. *Inactivation of Staphylococcal enterotoxin-A with an electrolyzed anodic solution.* Journal of Agricultural Food Chemistry. 2002a, 50: 230–234.
- **Swanson K.M.J.**, Leasor S.B., Downing D.L. *Aciduric and heat resistant microorganisms in apple juice and cider processing operations.* Journal of Food Science. 1985, 50: 334–339.
- **Tanaka N.**, Fujisawa T., Daimon T., Fujiwara K., Tanaka N., Yamamoto M. *The effect of electrolyzed strong acid aqueous solution on hemodialysis equipment.* Artificial Organs. 1999, 23: 1055–1062.
- **Tienungoon S.**, Ratkowsky D.A., McMeekin T.A., Ross T. *Growth limits of Listeria monocytogenes as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid.* Applied and Environmental Microbiology. 2000, 66: 4979–4987.
- **Todd E.C.D.**, Notermans S. *Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, Listeria monocytogenes.* Food Control. 2011, 22: 1484–1490.
- **Tomás-Callejas A.**, Martínez-Hernández G.B., Artés F., Artés-Hernández F. *Neutral and acidic electrolyzed water as emergent sanitizers for fresh-cut mizuna baby leaves.* Postharvest Biology and Technology. 2011, 59: 298–306.
- **Tournas V.H.** *Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables, and sprouts.* International Journal of Food Microbiology. 2005, 99(1): 71–77.

- **Trias R.**, Badosa E., Montesinos E., Bañeras L. *Bioprotective Leuconostoc strains against Listeria monocytogenes in fresh fruits and vegetables*. International Journal of Food Microbiology. 2008a, 127: 91-98.

- **Trias R.**, Bañeras L., Badosa E., Montesinos E. *Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria*. International Journal of Food Microbiology. 2008b, 123: 50-60.

- **Turina A.V.**, Nolan M.V., Zygadlo J.A., Perillo M.A. *Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning*. Biophysical Chemistry. 2006, 122: 101–113.

- **Ukuku D.O.**, Pilizota V., Sapers G.M. *Influence of washing treatment on native microflora and Escherichia coli population of inoculated cantaloupes*. Journal of Food Safety. 2001, 21: 31.

- **Ukuku D.O.**, Pilizota V., Sapers, G.M. *Effect of hot water and hydrogenperoxide treatments on survival of Salmonella and microbial quality of whole and fresh-cut cantaloupe*. Journal of Food Protection. 2004, 67: 432.

- **Ukuku D.O.**, Sapers G.M. *Effect of sanitizer treatments on Salmonella Stanley attached to the surface of cantaloupe and cell transfer to fresh-cut tissues during cutting practices*. Journal Food Protection. 2001, 64: 1286.

- **Vaughn R.H.**, King D., Nagel C.W., NG H., Levin R.E., Macmillan J.D., York G.K. *Gram-negative bacteria associated with sloughing, a softening of California ripe olives*. Journal of Food Science. 1969, 34: 224-227.

- **Velge P.,** Marie-Roche S. *Variability of Listeria monocytogenes virulence: a result of the evolution between saprophytism and virulence?* Future Microbiology. 2010, 5: 1799–1821.

- **Venkitanarayanan K.S.,** Ezeike G.O., Hung Y.C., Doyle M.P. *Efficacy of electrolyzed oxidizing water for inactivating Escherichia coli O157:H7, Salmonella Enteritidis and Listeria monocytogenes.* Applied and Environmental Microbiology. 1999, 65: 4276–4279.

- **Vleugels M.,** Shama G., Deng X.T., Greenacre E., Brocklehurst T., Kong M.G. *Atmospheric plasma inactivation of biofilm-forming bacteria for food safety control.* IEEE Transactions on Plasma Science. 2005, 33: 824–828.

- **Vorobjeva N.V.,** Vorobjeva L.I., Khodjaev E.Y. *The bactericidal effects of electrolyzed oxidizing water on bacterial strains involved in hospital infections.* Artificial Organs. 2003, 28: 590–592.

- **Willson V.A.** *Determination of available chlorine in hypochlorite solutions by direct titration with sodium thiosulfate.* Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition. 1935, 7(1): 44-45.

- **Worobo R.W.,** Splittstoesser D.F. *Microbiology in Fruit Products - Processing Fruits, Science and Technology.* Second Edition, Ed. Diane M. Barrett , Laszlo P . Somogyi, and Hosahalli S. Ramaswamy. 2004.

- **Wright J.R.** *Reduction of Escherichia coli O157:H7 on apples using wash and chemical sanitizer treatments.* Dairy, Food and Environment Sanitation. 2000, 20: 120.

- **Yang H.**, Swem B.L., Li Y. *The effect of pH on inactivation of pathogenic bacteria on fresh-cut lettuce by dipping treatment with electrolyzed water.* Journal of Food Science. 2003, 68(3): 1013-1017.

- **Yu H.**, Perni, S., Shi J. J., Wang, D. Z., Kong M. G., Shama G. *Effects of cell surface loading and phase of growth in cold atmospheric gas plasma inactivation of Escherichia coli K12.* Journal of Applied Microbiology. 2006, 101: 1323-1330.

- **Yu H.**, Xiu Z.L., Ren C.S., Zhang J.L., Wang D.Z., Wang Y.N., Ma, T.C. *Inactivation of yeast by dielectric barrier discharge plasma in helium at atmospheric pressure.* IEEE Transactions on Plasma Science. 2005, 33: 1405–1409.

- **Zhang S.**, Farber J.M. *The effects of various disinfectants against Listeria monocytogenes on fresh-cut vegetables.* Food Microbiology. 1996, 13: 311.

- **Zhuang R.Y.**, Beuchat L.R. *Effectiveness of trisodium phosphate for killing Salmonella Montevideo on tomatoes.* Letters in Applied Microbiology. 1996, 232: 97.

- **<http://www.sciencedirect.com/>**

Ringraziamenti

Sono arrivato alla fine, questo è il capitolo più difficile. Sono finite le ricerche in letteratura, le citazioni bibliografiche, questo capitolo è solo farina del mio sacco.

Inizio da chi ha contribuito maggiormente alla realizzazione di questo elaborato, la Prof.ssa Lucia Vannini, relatrice di questo elaborato, a cui devo il merito della possibilità di esser qui ed avermi aiutato a concludere il mio percorso di studi. Un grazie alla Dott.ssa Giorgia Gozzi, la mia correlatrice, lei materialmente mi ha supportato e sopportato durante i mesi di laboratorio, si è subito la revisione dei miei lunghi capitoli nonostante il lavoro da fare. Grazie ad entrambe per il tempo dedicatomi.

Grazie a tutte le persone che hanno contribuito alla realizzazione della mia tesi in particolare a chi ha massaggiato insieme a me centinaia di mele.

Ringrazio l'associazione studentesca MyS.T.A. e tutti i suoi attivisti per le attività che abbiamo svolto in questi anni difficili ma intensi, i progetti e tutti gli eventi svolti insieme sono stato un'ottima distrazione dagli studi (in senso positivo).

Un ringraziamento alla mia famiglia, Angela, Daniele, Alessandro, nonna Anna e gli altri nonni che sono venuti a mancare nel corso di questi anni, zii e cugine, a loro devo ringraziare per avermi dato la possibilità concreta di iniziare il percorso di studi nonostante la veneranda età, un grazie per aver avuto fiducia in me.

Grazie a mia sorella Giulia e mio fratello Davide, tasselli indispensabili della mia vita.

Un grazie a Marina, Giovanni, Lorenzo, Giacomo, Francesca e GianMarco, esempi, guide e amici per me e tanti ragazzi.

Un grazie a Davide, Teo, Luca, Matia e Gabriele, Michele, Fabio e Max, colleghi e amici, grazie per non esservi mai tirati indietro nell'aiutarmi.

Ringrazio anche gli amici più lontani fisicamente ma non per questo meno importanti, indirettamente avete contribuito anche voi a far sì che sia qui.

Un grazie a Daniela e Paolo, grazie per avermi accolto come fossi un figlio.

Giulia, collega, amica, compagna. Grazie per la pazienza di tutti i giorni nello starmi vicino.

Grazie per la forza che mi trasmetti, gran parte del merito per essere diventato quello che sono va a te.

*Infine, ringrazio chi non credeva che ci sarei riuscito,
non per cattiveria, ma solo per esperienza.*

*Grazie per avermi fatto uscire quel pizzico di orgoglio,
magari determinante senza il quale, forse, oggi non sarei qui.*