

# Effetto del trattamento con ozono su l'inattivazione di Escherichia coli e Listeria spp. su Spinaci

## Estratto:

L'efficacia dell'ozono gassoso nel ridurre la quantità e la ricrescita dei patogeni di natura alimentare (*E. coli* e *Listeria spp.*), sulle verdure a foglie, è stata testata su spinaci. Uno studio preliminare in vivo ha mostrato una riduzione di 1 ceppo in sei ceppi di *E. coli* e due specie di *Listeria spp.* su spinaci esposti a 1 ppm di ozono per 10 min. Una varietà di trattamenti ad ozono sono stati effettuati per inattivare questi batteri e preservare il colore del prodotto. L'esposizione a concentrazioni elevate di ozono per un periodo di tempo ridotto (10 ppm per 2 minuti) ha ridotto la presenza di *E. coli* e *Listeria* di un 1 ceppo e non vi è stata ricrescita dopo un periodo di 9 giorni. L'impatto dell'ozono a 1 o 10 ppm non è poi così diverso. Quasi il 10% dei patogeni è sopravvissuta al trattamento. Abbiamo ipotizzato che l'età delle cellule sia un fattore che influenza la resistenza al trattamento. Cellule *E. coli* più vecchie hanno dimostrato più resistenza in molteplici esperimenti. Nel complesso, ipotizziamo che il trattamento con ozono gassoso costituisca base per un metodo alternativo di facile uso per ridurre la contaminazione da patogeni alimentari vi è bisogno di una politica di sviluppo sostenibile.

## Introduzione:

Oltre a ridurre il deterioramento dei prodotti, l'aumento dell'incidenza dei focolai di malattie microbiche associate al consumo di prodotti a foglia grezzi ha accresciuto la necessità di trovare metodi alternativi per ridurre i carichi microbici [1]. Tutti i tipi di prodotti a foglia hanno il potenziale di ospitare agenti patogeni, come *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella spp.* e *Salmonella spp.* che sono responsabili in ultima analisi della maggior parte dei focolai di origine alimentare [2,3]. Contaminazione dei prodotti freschi con patogeni possono verificarsi sia pre-raccolto e/ o post-raccolta. Pre-raccolta fonti di patogeni generalmente includono fertilizzanti organici, acqua di irrigazione e suolo, mentre le fonti post-raccolto principalmente risultato delle procedure di movimentazione, comprese le attrezzature, i veicoli di trasporto e i container [4].

Una recente indagine sulle insalate a foglia al dettaglio ha rivelato la contaminazione di una percentuale significativa di *E. coli* e *L. monocytogenes* [5]. *E. coli* è un membro anaerobio Gram-negativo facoltativo della Famiglia delle enterobatteriacee. È comunemente presente nel tratto gastrointestinale di esseri umani e animali compresi i cervi, i bovini e i suini [6]. Sebbene la maggior parte degli *E. coli* siano innocui per l'uomo, l'indagine epidemiologica la ricerca ha documentato che l'assunzione di prodotti a foglia contaminati con *E. coli* O157:H7 e varianti una dose di almeno 10 cellule può costituire una grave minaccia per la salute umana [7]. *E. coli* che causano la malattia sono classificati sulla base di meccanismi patogeni, virulenza, e sindrome clinica. Ad esempio, *E. coli* O157:H7 appartiene al gruppo enteroemorragico (EHEC) [8]. L'infezione da *E. coli* O157:H7 provoca focolai gravi, particolarmente associati ai prodotti a foglia grezza [5]. Sebbene le superfici fogliari non siano un ambiente adatto per l'*E. coli*, possono sopravvivere a condizioni di conservazione dure e post-raccolta [5]. *L. monocytogenes* è un Gram-positivo, anaerobico facoltativo, non

poroso formando asta, che è in grado di crescere a basse temperature. Questo patogeno è ampiamente presente nel suolo, piante e superfici idriche [9]. Esso causa meno dell'1% delle malattie di origine alimentare, ma è responsabile della causa della listeriosi in umano [10]. Negli individui sani, i sintomi principali sono febbre e diarrea, mentre nelle persone incinte donne, *L. monocytogenes* provoca setticemia, meningite, aborto, o nati morti [5,10]. *L. monocytogenes* è in grado di crescere a temperatura di refrigerazione e di sopravvivere anche nei siti di trasformazione dei prodotti alimentari [5]. La contaminazione microbica dei prodotti freschi da parte di microbi patogeni comporta non solo un rischio significativo per la salute pubblica, ma colpisce anche finanziariamente l'industria con conseguente ritiro di prodotti costosi. Ad esempio, Si stima che il recente focolaio di *E. coli* O157, prodotto dalla tossina Shiga, nel crescere richiamo di 200.000 articoli nel Regno Unito [11]. Focolai di origine alimentare sono comuni in molti paesi. Ciò potrebbe essere dovuto agli agenti patogeni che sviluppano la resistenza agli agenti igienizzanti tradizionali, così posando un rischio per la sicurezza dell'approvvigionamento alimentare [12]. L'ozono è stato utilizzato con successo come principale disinfettante per il trattamento delle acque potabili e comunali per 100 anni, ma di recente ha guadagnato l'attenzione nel settore alimentare e agricolo [13]. È ben noto per la sua forte capacità ossidante ed è stato riconosciuto come un potente agente antimicrobico, reazione con sostanze organiche circa 3000 volte più veloce del cloro [14]. L'ozono è in grado di microrganismi inattivati, compresi batteri gram positivi e gram negativi, spore batteriche, funghi, spore fungine, virus e protozoi [15]. Nel 1997, la Food and Drug Administration degli Stati Uniti (US-FDA) in unione con un gruppo di esperti assegnato ozono come GRAS (Generalmente riconosciuto come sicuro) stato [16], e nel 2003, ha ricevuto l'approvazione formale da parte della FDA degli Stati Uniti come "sanificazione degli alimenti a contatto diretto agente" [17]. Uno dei principali vantaggi del trattamento con ozono è il fatto che il gas non lascia residui rilevabili in/su prodotti trattati, in quanto l'ozono si decompone rapidamente in ossigeno a differenza di altri igienizzanti utilizzati in l'industria di trasformazione alimentare [13]. Data l'importanza di controllare la contaminazione patogena dei prodotti freschi a foglia, il presente studio finalizzato a determinare gli effetti antimicrobici dell'ozono per il controllo di diversi ceppi di *E. coli* e *Listeria spp.* e per osservare la ricrescita di questi batteri patogeni sui prodotti trattati con ozono durante stoccaggio di prodotti per nove giorni a 4 ( C. Studi precedenti hanno dimostrato l'impatto dell'ozono patogeni [14,18,19] ma non hanno studiato la ricrescita dopo il trattamento. Volevamo anche usare l'ozono livelli che non danneggiano producono, cioè, abbiamo studiato i livelli di ozono commercialmente rilevanti per la produzione trattamento. Ricerche precedenti hanno dimostrato che non tutti gli agenti patogeni sono uccisi dal trattamento con ozono [20] e un altro obiettivo di questo lavoro era quello di stabilire perché ciò possa verificarsi. Di conseguenza, abbiamo esaminato l'effetto di età cellulare su *E. coli* resistenza all'ozono. Spinaci è stato contaminato artificialmente inoculando con *E. coli* o *Listeria spp.* prima del trattamento con ozono. Sono stati utilizzati sei diversi ceppi di *E. coli* non patogeni come modello rappresentativo per *E. coli* O157:H7, in quanto non vi sono state segnalazioni che suggeriscono differenze nel modello di crescita e nella strategia di sopravvivenza tra *E. coli* non patogeno e patogeno *E. coli* O157:H7 [21]. Inoltre, *L. innocua* e *L. seeligeri* sono stati utilizzati come surrogati per *L. monocytogenes* perché questi offrono alternative sicure non patologiche per scopi sperimentali, mentre

che presentano caratteristiche di crescita e comportamento simili sui prodotti a foglia come *L. monocytogenes* [20,22].

## Risultati e Discussione

### 1. Effetto esposizione a ozono in vitro su batteria *E. Coli* e *Listeria* spp.

Il numero di colonie (CFU) di *E. coli* K12 e *L. innocua* in vitro è stato significativamente ridotto (pag.05) da tutti i trattamenti con ozono (figura 1), anche al livello più basso utilizzato (1 ppm per 10 min). Meno di 1 log riduzione è stata raggiunta quando le colonie su agar sono stati esposti a 1 ppm di ozono per 10 minuti, ma più di la riduzione di un log è stata raggiunta quando entrambi i ceppi di patogeni alimentari sono stati trattati con ozono concentrazioni di 10 e 50 ppm. Risultati simili sono stati osservati da Alwi [18], quando *E. coli* O157, *L. monocytogenes* e *Salmonella typhimurium* sono stati trattati in vitro con 0,1, 0,3, 0,5 e 1,0 ppm concentrazione di ozono per tempi di esposizione rispettivamente di 0,5, 3, 6 e 24 ore. Hanno anche osservato aumenti nella concentrazione di ozono, e il tempo di esposizione ha aumentato l'attività antibatterica. È interessante notare che il saggio in vitro dell'agar su agenti patogeni Gram-positivi e Gram-negativi non ha mostrato differenze significative nella conta delle colonie tra 10 ppm e 50 ppm di concentrazione di ozono trattamento. Questo è forse dovuto alle cellule di essere fisicamente protetti da altri sulla superficie dell'agar piastre, cioè, quando le cellule sono diffuse su agar alcune cellule non possono essere presenti come individui ma come gruppi che forniscono protezione fisica; ciò potrebbe ridurre l'efficacia del trattamento con ozono [18]. In alternativa, alcune cellule possono avere una resistenza intrinseca all'esposizione all'ozono, forse a causa della loro età e esposizione allo stress (si veda la sezione 2.6). Fan e colleghi [20] hanno riferito che la massima inattivazione delle cellule di *L. innocua* è stata osservata in meno di 2 ore e l'inattivazione ha raggiunto un plateau dopo 4 ore dal trattamento ad ozono gassoso in vitro.

### 2. Ottimizzazione della concentrazione di ozono su spinaci per non danneggiare aspetto esterno

L'aspetto visivo e la freschezza dei prodotti a foglia sono stati i principali criteri di valutazione per la distinzione di qualità all'acquisto o al consumo [23]. Non è stato osservato alcun danno all'ozono visivo quando gli spinaci sono stati trattati con 1 ppm di ozono gassoso, ma livelli più elevati, ad esempio 10 ppm per 10 minuti, hanno causato notevoli inestetismi visivi e scolorimento agli spinaci (figura 2A). Risultati simili sono stati osservati in precedenza su prodotti freschi come lattughe, spinaci e foglie di rucola se trattati con concentrazioni di ozono simili [24]. La figura 2B illustra la lesione da ozono/danni visivi degli spinaci esposti a una concentrazione di ozono di 10 ppm per 10 minuti. È evidente che l'impatto del trattamento con ozono sulla qualità dei prodotti a foglia dipende dalla concentrazione; l'applicazione dell'ozono può essere utile fino a un certo livello, mentre dopo un'accelerazione di livello critico delle reazioni di browning si tradurrà in qualità inferiore. Non sono stati osservati danni visivi all'ozono quando gli spinaci sono stati esposti a concentrazioni più elevate, come l'ozono 10, 15 e 20 ppm per periodi più brevi (tabella 1). Dopo sette giorni di conservazione, i prodotti trattati con ozono sembravano visivamente

freschi e attraenti quanto i prodotti non trattati (controllo). Lesioni da ozono/danni visibili sono stati osservati sugli spinaci esposti a una concentrazione di ozono di 25 ppm per tutte le durate esaminate (30 s, 45 s e 2 min).

Esperimenti successivi hanno esaminato l'effetto delle variazioni dei livelli di ozono e dei tempi di esposizione sugli agenti patogeni inoculati sulle superfici degli spinaci.

### 3. Effetto dell'esposizione all'ozono (1 ppm per 10 min) su diversi ceppi di *E. coli* inoculati su superfici a foglia di spinaci

Il numero di colonie (CFU) di tutti e sei i ceppi di *E. coli*, vale a dire *E. coli* O157:K88a, *E. coli* O25:H4, *E. coli* O128:K67, *E. coli* K12, *E. coli* O55:K59 ed *E. coli* O104:H12 ottenuti da foglie esposte all'ozono, sono stati significativamente ridotti ( $p < 0,05$ ) rispetto ai controlli non esposti all'ozono (Figure 3 e 4). Nessuna colonia di *E. coli* è stata isolata da foglie di spinaci non inoculate. In passato, il trattamento con ozono gassoso a 1 ppm per 5 minuti ha mostrato una riduzione di 3-5 log<sub>10</sub> di *E. coli* O157:H7 sugli spinaci dopo 24 ore di stoccaggio [25]. Un esperimento condotto nel raffreddamento sottovuoto in combinazione con gas ozono (10 ppm per un massimo di tre giorni) ha mostrato una riduzione di 1,4 log<sub>10</sub> di *E. coli* O157:H7 sugli spinaci [17]. Il trattamento con ozono gassoso si è inoltre dimostrato efficace nella riduzione dell'*E. coli* su molti prodotti quali lattuga [14], prezzemolo [17], funghi [19], mirtilli [26] e fichi secchi [27]. Singh et al. [14] hanno riferito che l'effetto battericida dell'ozono contro *E. coli* O157:H7 è aumentato con il tempo di esposizione e la concentrazione di ozono. Ad esempio, hanno osservato una riduzione di 0,79-1,79 log<sub>10</sub> CFU/g della popolazione di *E. coli* O157:H7 sulla lattuga esposta all'ozono per 15 minuti. Tuttavia, il trattamento con ozono per 5 o 10 minuti non ha diminuito la popolazione di *E. coli* O157:H7.

### 4. Impatto del trattamento con ozono su *Listeria innocua* e *L. seeligeri* inoculati su foglie di spinaci

Nel presente studio, *L. innocua* e *L. seeligeri* sono stati utilizzati come surrogato microbico di *L. monocytogenes*, in quanto sono indicatori utili di contaminazione e hanno anche dimostrato un comportamento simile a *L. monocytogenes* su prodotti freschi [28]. I risultati di spinaci contaminati artificialmente con *L. innocua* e *L. seeligeri* trattati con 1 ppm di ozono per un tempo di esposizione di 10 min hanno mostrato una riduzione di 1 log nel numero di colonie rispetto al controllo non trattato (figura 5). Karaca e il suo collega [17] hanno riferito una riduzione di *L. innocua* di 1,14 log<sub>10</sub> CFU/g sul prezzemolo a foglia piatta trattato con un'elevata concentrazione di ozono di 950 ppm per 20 minuti. Risultati simili sono stati ottenuti da ricerche precedenti su funghi, germogli di erba medica, semi di erba medica, e lattuga [19]. La crescita di *L. innocua* e *L. seeligeri* sugli spinaci è rimasta significativamente ridotta dopo il giorno 9 dello stoccaggio (Figura 5). Ciò può essere dovuto alle interazioni tra la microflora di fondo naturale degli spinaci e *L. innocua*, che possono influire sulla loro crescita e sopravvivenza [22]. O'Beirne e il suo collega [22] hanno riferito che i batteri dell'acido lattico e la popolazione mista di microflora naturale isolata dalla

lattuga tritata hanno ridotto la crescita di *L. innocua* nei media modello. Rodgers e colleghi [19] hanno dimostrato la completa inattivazione di *L. monocytogenes* sulla lattuga durante i nove giorni di conservazione, se trattati con ozono 3 ppm per 3 min.

## 5. Effetto del trattamento con ozono più elevato su *E. coli* e *Listeria sp.* Inoculato sulla superficie delle foglie di spinaci

I risultati di spinaci contaminati artificialmente con due ceppi di *E. coli* (*E. coli* O157:K88a ed *E. coli* O25:H4) e di *Listeria* (*L. innocua* e *L. seeligeri*) trattati con 10 ppm di concentrazione di ozono per 2 minuti sono indicati nella figura 6. Per *E. coli* O157:K88a ed *E. coli* O25:H4, trattamento con ozono significativamente ( $p < 0,05$ ) ridotto conteggi di 1-log rispetto al controllo non trattato (Figura 6A). L'ozono ha avuto meno dell'effetto 1-log su *L. innocua* e *L. seeligeri* (Figura 6B). Awli [18] ha ottenuto una riduzione del 2,89 e del 3,06 log<sub>10</sub> per *E. coli* O157 e *L. monocytogenes*, rispettivamente, sul peperone quando esposto a 9 ppm di ozono per 6 ore. Il loro lavoro ha soddisfatto le norme per un agente antimicrobico ottenendo una riduzione minima di 2 log<sub>10</sub> [18]. Riduzioni simili sono state osservate dall'applicazione di ozono 5 ppm per 3 minuti sul pomodoro intero [29]. Quando i risultati di questo lavoro (sui prodotti a foglia) vengono confrontati con altri prodotti resistenti, sembra che il trattamento con l'ozono abbia avuto meno successo. Ciò è probabilmente dovuto alla natura delicata dei prodotti a foglia, che limita l'uso di una maggiore concentrazione di ozono e del tempo di esposizione (risultati della sezione 2.2). Inoltre, i risultati ottenuti da questo trattamento, vale a dire 10 ppm per 2 min, non sono risultati significativamente più efficaci nel ridurre i conteggi batterici vitali rispetto al precedente trattamento con ozono utilizzato in questo studio, vale a dire 1 ppm per 10 min (dalle sezioni 2.3 e 2.4). L'ozono inattiva le cellule batteriche mediante l'ossidazione progressiva di importanti componenti cellulari [17], e i suggerimenti per l'obiettivo principale dell'ozonizzazione comprendono la superficie delle cellule batteriche. La morte delle cellule batteriche è stata osservata come conseguenza della rottura della membrana cellulare e della disintegrazione della parete cellulare per fungere da barriera [17,18,20]. L'*E. coli*, un batterio gram-negativo, è più suscettibile al trattamento con ozono perché ha una sottile lamella peptidoglicano che è ricoperta da una membrana esterna fatta di polisaccaridi e lipoproteine [30]. Al contrario, alcuni studi hanno sostenuto che i batteri gram-negativi sono più resistenti al trattamento con ozono rispetto ai batteri gram-positivi [31]. I risultati di questo studio dimostrano che il trattamento con ozono è stato efficace sia in *E. coli* che in *Listeria spp.* inattivazione ma *Listeria spp.* erano leggermente più resistenti. Questi risultati sono in linea con Yuk e colleghi [19], che hanno dimostrato che *E. coli* O157:H7 è più sensibile di *Listeria monocytogenes*. Per studiare gli effetti del trattamento dell'ozono sulla crescita degli agenti patogeni, gli spinaci contaminati artificialmente sono stati conservati a 7 C per nove giorni. La figura 7 mostra che le popolazioni di *E. coli* (*E. coli* O157:K88a e *E. coli* O25:H4) e di *Listeria sp.* (*L. innocua* e *L. seeligeri*) dopo nove giorni di stoccaggio non è ricrescita, in quanto è stata osservata una significativa riduzione del numero di colonie rispetto al controllo non trattato. Tuttavia, l'effetto di un trattamento con ozono più elevato sul recupero degli agenti patogeni non ha

mostrato una differenza significativa nel conteggio rispetto al trattamento con concentrazione di ozono più bassa.

## 6. Effetto dell'età sulla resistenza all'ozono di E. coli O157:K88a in Vitro

Nel corso dello studio, abbiamo osservato che una certa percentuale di cellule è sopravvissuta all'esposizione all'ozono e siamo stati interessati a condurre indagini iniziali sui potenziali meccanismi di resistenza all'ozono. Le cellule di E. coli di età crescente della colonia sono state esposte all'ozono (in vitro) e i risultati hanno dimostrato un chiaro aumento della resistenza all'ozono di E. coli O157:K88a con l'aumento dell'età della colonia. Ad esempio, sopravvivenza di E. coli O157:K88a è stato osservato essere maggiore (circa il 15%) dopo cinque giorni di crescita rispetto al giorno 1 punto di tempo. I livelli di sopravvivenza sono aumentati ulteriormente dal Giorno 7 (Figura 8) suggerendo che le cellule nelle colonie batteriche più vecchie sono più resistenti all'ozono rispetto alle cellule provenienti da colonie più giovani. Questo è forse perché le cellule più vecchie di E. coli possono essere nella loro fase stazionaria a lungo termine (quinta fase del ciclo di crescita batterica che sopravvive sul nutriente rilasciato dalla popolazione morta di batteri). Queste cellule più vecchie possono sopravvivere allo stress esterno a differenza delle cellule più giovani (probabilmente nella prima o seconda fase del ciclo di crescita batterica) e possono rimanere vitali per mesi o addirittura anni una volta entrati nella fase stazionaria a lungo termine [32]. Questa fase stazionaria è dominata dall'accumulo del fattore sigma RPO [32]. L'intera fisiologia cellulare di E. coli è influenzata da RPO che direttamente o indirettamente influisce sull'espressione del 10% dei geni di E. coli. Questi geni sono coinvolti in variazioni morfologiche all'interno della cellula e responsabili di aumentare la resistenza durante numerose condizioni di stress, ad esempio, stress ossidativo, stress osmotico, shock termico, ecc. [32].

## Sezione Sperimentale

### 1. Sistema fumigazione ozono

Un sistema di fumigazione dell'ozono progettato appositamente (figura 9) era alloggiato in una cappa di aspirazione e costruito in acciaio inossidabile (diametro 35 cm). Un tubo di ingresso è stato utilizzato per aggiungere l'ozono generato dalla scarica elettrica dell'ossigeno (modello SGA 01 Pacific Ozone Technology Inc., Brentwood, CA, USA), e l'introduzione dell'ozono è stato controllato manualmente tramite valvole a spillo in acciaio inox/ misuratori di portata gap. Una volta raggiunta la concentrazione desiderata di ozono, le piastre/i prodotti di Petri da esporre all'ozono sono stati posti sul fondo del sistema e il sistema di fumigazione è stato chiuso con la copertura di Pyrex (figura 9). La concentrazione di ozono nel sistema è stata registrata utilizzando un analizzatore fotometrico (modello 450, prodotto dalla Advanced Pollution Instrumentation Division, 9480 Carroll Park Drive, San Diego, CA, USA). Il monitor dell'ozono impiegato in questi studi è stato revisionato settimanalmente e calibrato di routine rispetto agli standard utilizzando un'unità Dasibi 1008 PC.

## 2. Valutazione dell'impatto del trattamento con ozono sugli agenti patogeni alimentari E. coli e L. innocua in Vitro

E. coli K12 e L. innocua sono stati ottenuti da una collezione di colture gestita da Genius Laboratories Ltd. (44 Colbourne Crescent, Nelson Park, Cramlington, Regno Unito). Queste colture sono state subcolturate mediante placcatura su agar nutriente (NA) e agar listeria secondo le piastre agar di Ottaviani e Agosti (ALOA), rispettivamente. Una singola colonia è stata isolata da ogni piastra di coltura dopo l'incubazione a 37 C per 24 ore e 30 C per 48 ore, rispettivamente, e trasferita al diluente di recupero minimo (MRD). Una concentrazione standardizzata di 10<sup>4</sup> cellule per mL (100 µL) di ogni coltura è stata diffusa rispettivamente su piastre NA e ALOA agar sterili. Queste piastre sono state quindi esposte a 1 ppm, 10 ppm, 50 ppm concentrazione di ozono, o carbone filtrato "aria pulita" (controlli) per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo il trattamento, Le piastre di agar NA e ALOA sono state incubate a 37 C per 24 ore e 30 C per 48 ore, rispettivamente. Il numero di colonie prodotte su piastre di controllo (non esposte all'ozono) è stato confrontato con i numeri rilevati sulle piastre trattate con ozono sulla base di tre osservazioni replicate.

## 3. Ottimizzazione dei livelli di esposizione all'ozono (concentrazione e durata) per trattare le insalate a foglia senza causare danni visivi ai prodotti

Questo esperimento si è concentrato sull'ottimizzazione della concentrazione e della durata del l'esposizione al l'ozono a cui i prodotti freschi potrebbero essere esposti senza causare danni/deterioramento visibili. Per determinare l'impatto sulla qualità visiva del prodotto, gli spinaci sono stati ricevuti da Vitacress Ltd. (Hampshire, UK) e poi esposti a 1, 10, 25, 50 ppm di ozono o "aria pulita" (controlli) per diversi periodi di tempo (1-60 min). Dopo l'esposizione all'ozono, il prodotto è stato poi confezionato in un sacchetto sterile auto-guarnizione e mantenuto a 4 C in condizioni di oscurità. Il danno da ozono è stato valutato visivamente confrontando i prodotti esposti all'ozono con quelli di controllo (non esposti all'ozono) e producendo ogni giorno alternato per sette giorni.

## 4. Resistenza all'ozono di diversi ceppi di E. coli: inoculazione di E. coli su foglie di spinaci e condizioni di esposizione all'ozono

Sei ceppi di E. coli (E. coli O157:K88a, E. coli O25:H4, E. coli O128:K67, E. coli K12, E. coli O55:K59 ed E. coli O104:H12) sono stati ottenuti da una collezione di colture gestita da Genius Laboratories Ltd. (Nelson Park, Cramlington, UK). Le colture sono state immagazzinate a 4 C sui piatti di agar di Luria-Bertani (LB) ed attivate in brodo di LB a 37 C. Gli spinaci del bambino-foglio sono stati comprati da un rivenditore locale ed asetticamente hanno tagliato in dischi che misurano 1.13 cm<sup>2</sup> usando un borer sterile del sughero. Una sospensione di E. coli (coltura notturna, 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> CFU/mL LB di brodo) è stata applicata direttamente al disco fogliare in aliquote di 300 µL, e poi le foglie inoculate sono state conservate per una notte a 7 ( C per simulare le condizioni di conservazione dei prodotti e per consentire l'attecchimento di E. coli alla superficie fogliare. Le foglie inoculate sono state esposte a 1 ppm di ozono o a "aria pulita" filtrata con carbone per 10 minuti a

temperatura ambiente. Per determinare il numero di E. coli rimanendo (controllo ed esposizione all'ozono), i dischi fogliari sono stati agitati vigorosamente in MRD per 2 minuti e poi diluiti in serie con MRD, seguiti dalla tecnica della piastra di colata con piastre di agar Tryptone Bile X-Glucuronide (TBX) . Le piastre sono state incubate a 44 C per 24 ore, e le colonie presunte sono state contate sulla base di tre osservazioni replicate.

#### 5. Impatto del trattamento con ozono su *L. innocua* e *L. seeligeri* inoculati su foglie di spinaci

Due ceppi di *Listeria* (*L. innocua* e *L. seeligeri*) sono stati ottenuti da una collezione di colture mantenute da Geneius Laboratories Ltd. Culture e conservati a 4 C su piastre di agar ALOA. Le foglie di spinaci sono state poi tagliate asepticamente in dischi di 1,13 cm<sup>2</sup> utilizzando una sonda sterile in sughero. Una sospensione di *Listeria* sp. (107-108 CFU/mL MRD) è stato applicato direttamente sul disco fogliare in aliquote di 300 µL, e le foglie inoculate sono state mantenute a 7 ( C per simulare le condizioni di stoccaggio del prodotto per 2 ore per consentire il fissaggio di *Listeria* sp. alla superficie del foglio. Le foglie inoculate sono state esposte a 1 ppm di ozono o a carbone di legna filtrato "aria pulita" per 10 minuti a temperatura ambiente e tasso di sopravvivenza enumerato (vedi sotto). Per determinare la sopravvivenza e la crescita di *Listeria* sp. durante l'immagazzinamento, una parte delle foglie inoculate trattate e non trattate sono state mantenute a 7 C per altri nove giorni. Il numero di colonie rimaste (controllo ed esposizione all'ozono) nei giorni 0 e 9 è stato determinato agitando vigorosamente il disco fogliare in MRD per 2 minuti dopo 1 ora di incubazione a temperatura ambiente e poi diluendo in serie in MRD seguita da una tecnica di diffusione standard su piastre di agar ALOA. Le piastre sono state incubate a 30 C per 48 ore, e le colonie sono state contate.

#### 6. Fumigazione dell'ozono modificata Sistema-Consegna di alte concentrazioni di ozono per brevi durate di tempo (secondi)

Un sistema modificato di fumigazione dell'ozono è stato progettato per migliorare l'applicazione dell'ozono per produrre superfici e per ridurre il tempo necessario per accumulare le concentrazioni di ozono desiderate necessarie per produrre il trattamento. L'obiettivo era quello di sviluppare un sistema che permettesse l'applicazione di concentrazioni di ozono più elevate per periodi più brevi per ottenere una migliore uccisione batterica senza danneggiare i prodotti. Questo sistema è stato sviluppato dopo discussioni/incontri con partner industriali che idealmente volevano essere in grado di esporre rapidamente i prodotti all'ozono durante le loro procedure di raccolta e trasformazione. L'apparecchio modificato per l'esposizione all'ozono era alloggiato in una cappa aspirante e costruito con perspex da 20 cm<sup>2</sup>. Il prodotto è stato posto su una rete di acciaio in un vassoio di 2 cm di profondità all'interno della scatola e il prodotto è stato poi esposto all'ozono una volta raggiunta la concentrazione desiderata (figura 10). Un tubo di ingresso è stato utilizzato per aggiungere l'ozono generato da scarica elettrica da ossigeno, con l'introduzione di ozono controllato manualmente. La concentrazione di ozono è stata registrata da un analizzatore fotometrico (modello 450, prodotto da Advanced Pollution Instrumentation Inc., San Diego, CA, USA). Il monitor dell'ozono impiegato in questi studi è stato revisionato di routine.



## 7. Esplorazione di livelli di esposizione all'ozono più elevati per trattare gli spinaci senza causare danni visivi

Questo esperimento mirava a determinare la massima concentrazione di ozono e il tempo di esposizione che potevano essere utilizzati sugli spinaci organici senza causare danni/deterioramento visibili al prodotto. Il prodotto è stato esposto a 10, 15, 20, 25 ppm di ozono o "aria pulita" (controlli) per vari periodi di tempo che vanno da 30 s a 2 min. In seguito all'esposizione all'ozono, il prodotto è stato poi imballato in un sacchetto sterile auto-guarnizione e mantenuto a 4 C al buio. Il danno da ozono è stato valutato visivamente confrontando i prodotti esposti all'ozono con quelli di controllo (non esposti all'ozono) e producendo ogni giorno alternato per sette giorni.

## 8. Impatto di concentrazioni di ozono più elevate/aumentate su due ceppi di *E. coli* e *Listeria* inoculati su foglie di spinaci

This experiment aimed to use the highest ozone exposure levels that did not cause produce damage (data obtained from Section 3.7—Result Section 2.2) to try and achieve higher reductions in pathogenic bacteria on the surface of baby spinach leaves. Two strains of *E. coli* (*E. coli* O157:K88a and *E. coli* O25:H4) and *Listeria* (*L. innocuous* and *L. seeligeri*) were inoculated onto spinach leaves as described in Sections 3.4 and 3.5, respectively. Inoculated leaves were either treated with 10 ppm ozone concentration or charcoal filtered “clean air” for 2 min. The number of *E. coli* and *Listeria* sp. remaining (control and ozone exposed) was determined as described above (Sections 3.4 and 3.5). Per determinare l'impatto dei più alti livelli di esposizione all'ozono sulla sopravvivenza e la crescita di *E. coli* (*E. coli* O157:K88a e *E. coli* O25:H4) e *Listeria* (*L. innocua* e *L. seeligeri*) durante lo stoccaggio, le foglie inoculate sono state trattate come indicato nella sezione 3.5. Dopo il trattamento, le foglie inoculate e di controllo sono state mantenute a 7 C per nove giorni. Il numero di colonie rimaste (controllo ed esposizione all'ozono) il giorno 9 è stato determinato come indicato nella sezione 3.5.

## 9. Età Effetti sulla resistenza all'ozono di *E. coli* in Vitro

Per determinare se l'età delle cellule ha influenzato la resistenza all'ozono dei batteri, una colonia di *E. coli* O157:K88a ottenuta da una collezione di colture gestita da Geneius Laboratories Ltd. è stata subcolturata su piastre NA e incubata a 37 C per sette giorni. Una singola colonia è stata isolata il primo, il terzo, il quinto e il settimo giorno dell'incubazione e trasferita a MRD. Una concentrazione standardizzata di 104 cellule per mL (100 µL) di ogni età cellulare è stata diffusa su piastre NA sterili e queste piastre sono state poi esposte a 10 ppm di concentrazione di ozono o carbone filtrato "aria pulita" per 2 min. Il conteggio delle colonie è stato determinato dopo l'incubazione di piastre NA a 37 C per 24 h.

## 10. Analisi statistiche

I dati sono stati analizzati utilizzando SPSS (IBM SPSS Statistics 19 64 bit) e grafici sono stati prodotti utilizzando Microsoft Office Excel 2010 e Sigmaplot 12.5. La distribuzione normale dei dati è stata testata utilizzando una prova di normalità e sono state verificate

differenze significative tra i valori medi utilizzando l'LSD (p 0.05) seguendo l'ANOVA unidirezionale.

## Conclusione

Esposizione a 1 ppm e 10 ppm di ozono gassoso trattamento per 10 e 2 min, rispettivamente, significativamente ridotto E. coli e Listeria spp. popolazioni sugli spinaci. Inoltre, gli agenti patogeni non sono ricresciuti dopo il trattamento, cioè in un periodo di conservazione di nove giorni. Anche se il trattamento con ozono ha ridotto i carichi batterici di 1 ceppo, esiste ancora un potenziale commerciale, poiché l'ozono è facile da produrre in loco e si applica a livelli che non danneggiano i prodotti fogliari sensibili. I risultati di questo studio mostrano che alcuni batteri nelle popolazioni sono resistenti al trattamento con ozono e l'aumento delle cellule (colonia) di età di E. coli è stato dimostrato di essere legato a una maggiore resistenza all'ozono. Ulteriori lavori sono necessari per comprendere meglio l'esatto meccanismo di resistenza, e questo può portare a determinare i metodi che possono superare la resistenza. Tali applicazioni potrebbero fornire enormi vantaggi potenziali per l'uso commerciale e migliorare la salute pubblica.

## Riconoscimenti

Questo studio è stato sostenuto dalla ADHB/Horticultural Development Company (HDC) (FV 386) attraverso l'assegnazione di un dottorato di ricerca a Shreya Wani. Tutti i ceppi di E. coli e Listeria spp. sono stati gentilmente forniti dai laboratori Geneius Ltd. ([www.geneiuslabs.com](http://www.geneiuslabs.com)). Ringraziamo Matthew Peake per l'aiuto tecnico e Alan Craig per aver mantenuto e calibrato la fumigazione dell'ozono.

## Contribuzioni autore

Il lavoro presentato fa parte di un progetto di dottorato finanziato dal UK-ADHB/HDC; i dati sono stati gestiti, progettato, raccolto e analizzato da Shreya Wani che ha preso l'iniziativa di scrivere il manoscritto. Ian Singleton e Jeremy Barnes hanno supervisionato il lavoro, assistito nella progettazione sperimentale e nell'interpretazione dei dati, e hanno vinto il premio. Joseph Thompson era un tirocinante estivo e ha assistito con alcuni lavori sperimentali in laboratorio. Jagpreet Maker era uno studente post-laurea che ha contribuito alla redazione e all'approvazione del manoscritto.

## Riferimenti

1. Burnett, S.L.; Beuchat, L.R. Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*
2. Abadias, M.; Usall, J.; Anguera, M.; Solsona, C.; Vinas, I. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *123*, 121–129.
3. Velusamy, V.; Arshak, K.; Korostynska, O.; Oliwa, K.; Adley, C. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 232–254.
4. Olaimat, A.N.; Holley, R.A. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. *Food Microbiol.* **2012**, *32*, 1–19.
5. Engels, C.; Weiss, A.; Carle, R.; Schmidt, H.; Schieber, A.; Ganzle, M.G. Effect of gallotannin treatment on attachment, growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on spinach and lettuce. *Eur. Food Res. Technol.* **2012**, *234*, 1081–1090.
6. Griffin, P.M.; Tauxe, R.V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E.coli*, and the associated Hemolytic Uremic Syndrome. *Epidemiol. Rev.* **1991**, *13*, 60–99.
7. Tomas-Callejas, A.; Lopez-Velasco, G.; Camacho, A.B.; Artes, F.; Artes-Hernandez, F.; Suslow, T.V. Survival and distribution of *Escherichia coli* on diverse fresh-cut baby leafy greens under preharvest through postharvest conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *151*, 216–222.
8. Coia, J.E. Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **1998**, *20*, 1–9.
9. Farber, J.M.; Peterkin, P.I. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne pathogen. *Microbiol. Rev.* **1991**, *55*, 476–511.
10. Notermans, S.; Todd, E.C.D. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Food Control* **2011**, *22*, 1484–1490.
11. Launders, N.; Byrne, L.; Adams, N.; Glen, K.; Jenkins, C.; Tubin-Delic, D.; Locking, M.; Williams, C.; Morgan, D.; Outbreak Control Team. Outbreak of Shiga toxin-producing *E.coli* O157 associated with consumption of watercress, United Kingdom, August to September 2013. *Euro Surveill.* **2013**, *18*, doi:10.2807/1560-7917.ES2013.18.44.20624.
12. Bower, C.K.; Daeschel, M.A. Resistance responses of microorganisms in food environments. *Int. J. Food Microbiol.* **1999**, *50*, 33–44.
13. Mahapatra, A.K.; Muthukumarappan, K.; Julson, J.L. Applications of ozone, bacteriocins and irradiation in food processing: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2005**, *45*, 447–461.
14. Singh, N.; Singh, R.K.; Bhunia, A.K.; Strohshine, R.L. Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli*

O157:H7 on lettuce and baby carrots. *LWT Food Sci. Technol.* **2002**, *35*, 720–729.

15. Goncalves, A.A. Ozone—An emerging technology for the seafood industry. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2009**, *52*, 1527–1539.

16. Tzortzakis, N.; Borland, A.; Singleton, I.; Barnes, J. Impact of atmospheric ozone-enrichment on quality-related attributes of tomato fruit. *Postharvest Biol. Technol.* **2007**, *45*, 317–325. 17. Karaca, H.; Velioglu, Y.S. Effects of ozone treatments on microbial quality and some chemical properties of lettuce, spinach, and parsley. *Postharvest Biol. Technol.* **2014**, *88*, 46–53. 18. Alwi, N.A.; Ali, A. Reduction of *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* sv. Typhimurium populations on fresh-cut bell pepper using gaseous ozone. *Food Control* **2014**, *46*, 304–311.

*Agriculture* **2015**, *5* 169

19. Yuk, H.G.; Yoo, M.Y.; Yoon, J.W.; Marshall, D.L.; Oh, D.H. Effect of combined ozone and organic acid treatment for control of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on enoki mushroom. *Food Control* **2007**, *18*, 548–553.

20. Fan, L.; Song, J.; McRae, K.B.; Walker, B.A.; Sharpe, D. Gaseous ozone treatment inactivates *Listeria innocua* in vitro. *J. Appl. Microbiol.* **2007**, *103*, 2657–2663.

21. Gleeson, E.; O’Beirne, D. Effects of process severity on survival & growth of *Escherichia coli* & *Listeria innocua* on minimally processed vegetables. *Food Control* **2005**, *16*, 677–685. 22. O’Beirne, D.; Francis, A.G. Effects of the indigenous microflora of

minimally processed lettuce on the survival and growth of *Listeria innocua*. *Int. J. Food Sci. Technol.* **1998**, *33*, 477–488. 23. Rico, D.; Martín-Diana, A.B.; Barat, J.M.; Barry-Ryan, C.

Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2007**, *18*, 373–386. 24. Alexopoulos, A.; Plessas, S.; Ceciu, S.; Lazar, V.; Mantzourani, I.; Voidarou, C.; Stavropoulou, E.; Bezirtzoglou, E. Evaluation of ozone efficacy on the reduction of microbial population of fresh cut lettuce (*Lactuca sativa*) and green bell pepper (*Capsicum annuum*). *Food Control* **2013**, *30*, 491–496.

25. Klockow, P.A.; Keener, K.M. Safety and quality assessment of packaged spinach treated with a novel ozone-generation system. *LWT Food Sci. Technol.* **2009**, *42*, 1047–1053. 26.

Bialka, K.L.; Demirci, A. Decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on blueberries using ozone and pulsed UV-light. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, 391–396.

27. Akbas, M.Y.; Ozdemir, M. Application of gaseous ozone to control populations of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Bacillus cereus* spores in dried figs. *Food Microbiol.* **2008**, *25*, 386–391. 28. Scifò, G.O.; Randazzo, C.L.; Restuccia, C.; Fava, G.; Caggia, C.

*Listeria innocua* growth in fresh cut mixed leafy salads packaged in modified atmosphere. *Food Control* **2009**, *20*, 611–617. 29. Bermúdez-Aguirre, D.; Barbosa-Cánovas, G.V.

Disinfection of selected vegetables under nonthermal treatments: Chlorine, acid citric, ultraviolet light and ozone. *Food Control* **2013**, *29*, 82–90. 30. Zuma, F.; Lin, J.;

Jonnalagadda, S.B. Ozone-initiated disinfection kinetics of *Escherichia coli* in water. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* **2009**, *44*, 48–56. 31. Vaz-Velho,

M.; Silva, M.; Pessoa, J.; Gibbs, P. Inactivation by ozone of *Listeria innocua* on

salmon-trout during cold-smoke processing. *Food Control* **2006**, *17*, 609–619. 32. Navarro Llorens, J.M.; Tormo, A.; Martinez-Garcia, E. Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **2010**, *34*, 476–495.