

# **Attività dell'ozono sulla *Listeria*, la *Pseudomonas* e il *biofilm* per aumentare la bio sicurezza nella industria alimentare**

Claudia Catelani Cardoso<sup>1</sup>, Nicolo Dalpasso<sup>2</sup>, Gabriele Fortini<sup>3</sup>, Faical Boulomail<sup>4</sup>

1 Laboratorio Ambiente, Area Sostenibilità e Valorizzazione, Fondazione SSICA, Parma, Italia

2 Biotecnologo Industriale Parma Italia.

3 Perito Chimico Parma Italia

4 Ingegnere di Materiali Fononica Srl Torino Italia

Il presente studio ha dimostrato l'efficacia di un trattamento con ozono in soluzione acquosa su biofilm di *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa* adesi a superfici di acciaio o materiale plastico. L'azione dell'acqua ozonizzata (4ppm/1minuto) erogata in continuo mediante lancia a bassa pressione è risultata pari a **2,99 RD per *Listeria* e di 1,9 RD per *Pseudomonas*** mentre a concentrazioni inferiori (2ppm/1 minuto) il numero di riduzioni decimali era di poco superiore a 1Log per entrambe le specie. L'efficacia è risultata maggiore su *biofilm* invecchiati 3 giorni. All'analisi mediante **microscopio elettronico a scansione (SEM)** apparivano evidenti i segni dell'azione ossidante dell'ozono sulle cellule batteriche quali la comparsa di fessure e di distacco. **L'azione è risultata maggiore su *Listeria* rispetto a *Pseudomonas*.** Sulla base dei risultati ottenuti l'impiego dell'ozono nelle procedure di sanificazione, nella pratica industriale, dovrà prevedere, a fronte di una corretta e costante detersione per evitare la possibile formazione di *biofilm*, una **erogazione in continuo**. L'analisi sia in termini di costi, dei consumi e dell'efficienza del trattamento hanno infatti messo in luce che **l'impiego di ozono**, generato *in situ* tramite ozonizzatori, permette la **riduzione sia del tempo del processo di sanificazione da 4 a 2 fasi sia la riduzione della quantità di acqua necessaria nelle fasi risciacquo**. Questi risultati supportano la utilità della sanificazione tramite l'acqua ozonizzata per la riduzione della trans contaminazione e per aumentare la bio sicurezza nell'ambito alimentare.

## **INTRODUZIONE**

La capacità di molti batteri di aderire alle superfici e di formare *biofilm* ha molteplici implicazioni in moltissime industrie comprese quelle alimentari dove rappresentano una continua fonte di contaminazione. Il *biofilm* è una comunità di batteri che mostra un aumento di resistenza ed una risposta adattativa ad un'ampia varietà di fattori che incidono negativamente sulla loro attività (Kjelleberg e Givskov, 2007). Il *biofilm* può essere definito come **“una comunità strutturata di cellule batteriche racchiuse in una matrice polimerica**

**autoprodotta ed adesa ad una superficie inerte o vivente**". Tale definizione di Costerton (1999) è stata poi ripresa da Elder *et al.*, (1995) come "un consorzio funzionale di microrganismi all' interno di una matrice esopolimerica estensiva", mentre Carpentier e Cerf (1993) lo hanno definito come "una comunità di microrganismi immersa in una matrice polimerica organica, adesi ad una superficie" (Dunne, 2002). Nell'industria alimentare la sua formazione su attrezzature e sulle superfici a contatto con gli alimenti rappresenta un'ulteriore **sfida nella sanificazione** degli impianti e invita ad esplorare nuovi metodi e nuovi sanitizzanti per un'azione efficace. Questa matrice, costituita da diversi tipi di biopolimeri, definiti anche **sostanze extracellulari polimeriche (EPS)**, funge da impalcatura per un'organizzazione tridimensionale del *biofilm* ed è responsabile del processo di adesione di quest'ultimo ad una superficie (Flemming e Wingender, 2010). Nel 1969 Jones, in studi su sistemi di filtraggio delle acque, scoprì che i *biofilm* sono costituiti da una diversa varietà cellulare, tuttavia solo nel 1973 venne scoperto che le colonie incorporate all'interno di un **biofilm presentavano resistenza** nei confronti di numerosi agenti antimicrobici (Donlan, 2002). La "teoria sulla predominanza del biofilm" fu promulgata nel 1981 da Costerton (1981) e affermava che la maggior parte dei batteri si sviluppava in matrici, in grado di aderire a superfici appartenenti a qualsiasi ecosistema. Potenzialmente, qualsiasi superficie, può essere soggetta a colonizzazione batterica con formazione di un *biofilm* (Dunne, 2002).

A causa della difficoltà di rimuovere i *biofilm* e gli alti costi di interventi mirati alla prevenzione della sua formazione, un'**accurata disinfezione** rappresenta un modo pratico per **garantire la bio sicurezza** degli ambienti di lavorazione e dei alimenti processati. La bio sicurezza previene le tras contaminazioni, o dal inglese, le *crosss-contamination*. L'uso di **sanificanti** non è tuttavia esente da problemi quali la formazione di *byproducts* tossici come i triometani associati a *rischi alla salute umana e allo ambiente* (Hu *et al.*, 2019). Per l'impegno corretto dei prodotti chimici si dovrebbe considerare la presenza di sostanze organiche, la tipologia della superficie che deve essere sanificata così come il tipo di microrganismi verso cui è rivolta la sanificazione. I vantaggi acquisiti dai batteri nel vivere adesi ad una superficie sotto forma di *biofilm* sono di usufruire di una maggiore concentrazione di nutrienti, di promuovere uno scambio genetico e di incrementare la resistenza verso agenti inattivanti (Jefferson, 2004; Palmer *et al.*, 2007).

Attraverso l'impiego della microscopia si è evidenziato che i *biofilm* non risultano, nella maggior parte dei casi, organizzati in un monostrato cellulare omogeneo, ma sono **costituiti da una struttura multistratificata eterogenea** formata da colonie che costituiscono circa il 15% del volume e per l'85% da una matrice polisaccaridica.

Le superfici solide che possono ospitare *biofilm* negli impianti alimentari includono l'acciaio, il vetro, la gomma, il nylon, il teflon e materiale plastico in generale (PVC, PET). Le superfici che presentano alterazioni quali intercapedini e scanalature, risultano essere ottimali alla formazione di *biofilm* in quanto, essendo difficili da sanitizzare, favoriscono la colonizzazione cellulare (Deibel e Schoeni, 2003).

L'adesione dei batteri ai prodotti alimentari o alle superfici destinate a venire a contatto con gli alimenti può portare a problemi di carattere igienico ed economico conseguente all'alterazione degli alimenti stessi. L'interesse della industria alimentare per esempio nei confronti di *Listeria monocytogenes* è dovuto essenzialmente al potenziale tasso di **mortalità** legato al patogeno, alla **capacità del batterio di formare *biofilm*** e alle richieste della normativa statunitense di assenza del patogeno (tolleranza 0) in 25 g di un prodotto *ready-to-eat*. La *L. monocytogenes* fu isolata per la prima volta a Cambridge nel 1924 da Murray e collaboratori in conigli che morivano a causa di una **grave monocitosi**. Per tale motivo fu chiamato inizialmente *Bacterium monocytogenes* e solo nel 1940 Pirié diede al genere il nome *Listeria*, in onore del chirurgo inglese sir Joseph Lister. Data la loro grande diffusione nell'ambiente, le listerie possono facilmente inquinare le superfici di lavoro e gli utensili nelle industrie alimentari e questo giustifica l'isolamento del batterio anche da alimenti cotti e/o elaborati (McLauchlin *et al.* 2004).

Numerosi fattori ambientali quali la temperatura, la concentrazione di nutrienti (Moltz e Martin, 2005; Hanna e Wang, 2007), i valori di pH possono influenzare la formazione di *biofilm*. La *L. monocytogenes* è in grado di aderire e formare biofilm in diverse superfici presenti all'interno di un'industria alimentare e il suo sviluppo può determinare la contaminazione di alimenti. È stata riportata la capacità a formare *biofilm* in superfici in acciaio (Frank e Koffi, 1990, Somers e Wong, 2004), materiale presente abbondantemente in ambiente industriale, in gomma di butilnitrile, presente nelle guarnizioni della strumentazione (Somers e Wong, 2004), vetro, presente prevalentemente negli impianti di imbottigliamento ed infine teflon, presente nel nastro trasportatore e in numerose superfici di lavorazione degli alimenti (Bourion e Cerf, 1996).

L'altro genere di batteri di interesse è la *Pseudomonas* che sono batteri Gram negativi, di forma bastoncellare, con grande interesse a livello alimentare perché:

- Sono psicrotrofi e riescono a moltiplicare (se pure lentamente) fino a 3°C
- Sintetizzano molti enzimi e possono metabolizzare sia composti di basso peso molecolare sia molecole di grandi dimensioni, come proteine e acidi grassi,
- Sono mobili
- Sintetizzano pigmenti idrosolubili che possono diffondere negli alimenti

- Possono creare *biofilm*

La possibilità di creare *biofilm* permette alla *Pseudomonas* di **sopravvivere a condizioni sfavorevoli** rendendo i batteri **mille volte più resistenti** che nella forma planctonica (Boles *et al.*, 2004; Cleto *et al.*, 2012). La formazione di tali comunità, la relativa resistenza ad agenti antimicrobici, la motilità e l'azione antimicrobica di alcuni fotopigmenti giustificano il fatto che *Pseudomonas* possa essere presente in vari substrati e in diverse condizioni ambientali.

Un altro aspetto di interesse è che la presenza di specie patogene (*P. aeruginosa*) è in grado di infettare potenzialmente ogni distretto corporeo e è responsabile soprattutto di infezioni a livello cutaneo, delle vie urinarie e dell'apparato respiratorio.

Nell'industria lattiero-casearia i batteri maggiormente frequenti sono quelli appartenenti ai generi *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* e *Pseudomonas*. Tra questi la *Pseudomonas spp.* riveste un **importante** ruolo in quanto è tra i batteri che maggiormente **può causare un'alterazione dei prodotti caseari anche dopo i processi di pastorizzazione**.

Per lo sposto, questo studio ha obbiettivato verificare l'attività dell'ozono sulla *Listeria*, la *Pseudomonas* e il *biofilm* per aumentare la **bio sicurezza** nella industria alimentare

### L'Ozono come disinfettante

L'**ozono** (O<sub>3</sub>) è una molecola costituita da 3 atomi di ossigeno. Data la sua natura instabile, funge da forte ossidante. Viene impiegato **come agente disinfettante, per la potabilizzazione dell'acqua e in numerose pratiche industriali** quali l'igiene delle superfici, degli impianti nell'industria alimentare (Güzel-Seydim *et al.*, 2004, Bauman *et al.*, 2003, Segat *et al.*, 2014, Gonçalves, 2018 ), la produzione di acqua *standard farmaceutico* (Smeets *et al.*, 2003) e il trattamento delle acque reflue (**Tabella 1**) da **oltre 120 anni**.

Tabella 1. Breve storia dell'uso dell'ozono per acqua e prodotti alimentari (Gonçalves, 2018).

Anno	Evento
1886	Primo utilizzo sperimentale dell'ozono per la disinfezione dell'acqua a Meritence, Francia
1892	Diversi impianti sperimentali operanti in tutta Europa
1906	Primo impianto di ozono su larga scala di Marius Paul Otto a Bon Voyage, in Francia, utilizzato per fornire acqua potabile sicura
1910	Primo utilizzo dell'ozono in un impianto di confezionamento della carne in Germania
1911	Vengono avviati i generatori di ozono a San Pietroburgo, Kiev, Gorski e Mosca

1918	Ozono usato per sanificare le piscine negli Stati Uniti
1935	L'ozono aumenta la <i>shelf life</i> degli alimenti
1936	Ozono usato per trattare i crostacei in Francia
1940	Primo impianto di trattamento delle acque con ozono a Whiting, negli Stati Uniti
1942	Ozono utilizzato nei magazzini di uova e negli impianti di stoccaggio del formaggio negli Stati Uniti
1949	Trattamento dell'acqua potabile con ozono a Philadelphia, PA, USA
1950	136 impianti di ozono in Francia, Inghilterra e Germania che servono 8 milioni di persone
1972	Ozono utilizzato per purificare/lavorare l'acqua in Germania
1977	L'ozono utilizzato per ridurre la Salmonella nelle uova in guscio in Russia
1982	Ozono dichiarato GRAS ( <i>General Recognized As Safe</i> ) ovvero è stato riconosciuto come sicuro in linee generale per trattare le acque da imbottigliare negli Stati Uniti; (GRAS riaffermato nel 1995)
<b>1997</b>	<b>Il gruppo di esperti convocato dall'EPRI ha dichiarato l'ozono GRAS nella lavorazione degli alimenti negli Stati Uniti</b>
1998	Sistemi ad acqua refrigerata per pollame ozonizzati
2000	Petizione sugli additivi alimentari depositata presso la FDA, 15 agosto 2000
2001	La FDA riconosce l'ozono come additivo alimentare diretto secondario per abbattere patogeni di origine alimentare. Questa approvazione ha aperto la porte per i trasformatori alimentari autorizzandogli ad utilizzare l'ozono nei loro impianti. FDA ha ufficialmente approvato l'impiego dell'ozono nell'industria alimentare, anche per contatto diretto con prodotti alimentari, compresi pesce, carne e pollame (Registro Federale, vol. 66, n. 123, martedì 26 giugno 2000. Regolamento); l'11 settembre, il <b>servizio di sicurezza e ispezione alimentare (FSIS)</b> americana dichiara l'ozono accettabile nel pollame e nei prodotti a base di carne. Gli interessi nazionali nella sicurezza alimentare si spostano drasticamente verso un mandato nazionale in materia di sicurezza alimentare.
2002	24 giugno—La Ohio State University Research Foundation (OSURF), nei USA, rilascia una licenza esclusiva ad una nuova società, l'EggTech Ltd., che cerca la commercializzazione dei prodotti OSU con la tecnologia dell'ozono. EggTech investe \$75.000 direttamente nel progetto.

2004	Il 30 settembre i partner della EggTech Ltd. si incontrano all'Ohio State Food Science and Technology per celebrare la consegna del primo prototipo di macchina con tecnologia all'ozono per sanificare le uova . La domanda di brevetto è stata presentata da parte dello stesso team. L'ozono è elencato EPA come conforme a DBPR ( <i>Disinfection By-Product Rules</i> ) ovvero in regola riguardo i sottoprodotti della disinfezione.
2005	L'accordo di cooperazione FSIS fa avanzare la tecnologia delle uova sanificati con l'ozono per l'implementazione sul mercato. Il 5 ottobre, con il numero di brevetto U.S. 6.800.315 B2 l'ozono è stato riconosciuto come metodo per decontaminare le uova intere.

L'ozono è un gas solubile in soluzione acquosa (~ 13 volte più dell'O<sub>2</sub> a 0-30°C) e la sua stabilità sciolto risulta essere inversamente proporzionale alla temperatura ed al pH. Alcuni autori (Kim, 1998; Kim, *et al.*, 1999) riportano infatti che a pH 7,0, aumentando la temperatura da 15°C a 30 °C, si osserva una riduzione dell'emivita dell'ozono da 30 a 12 minuti mentre a pH 8 e 21°C l'emivita si riduce a circa 5 minuti. Allo stato gassoso, la decomposizione è meno soggetta alle variazioni di temperatura e, a temperatura ambiente, l'ozono possiede un'emivita di circa 20 minuti.

L'ozono è una molecola che presenta un potenziale di ossido riduzione di **+2,07 V** che gli consente di **ossidare ed inattivare numerosi composti organici e inorganici**. In soluzione acquosa, può reagire con i composti organici attraverso **reazione dirette**, con il coinvolgimento dell'ozono molecolare, o attraverso **reazioni indirette**, coinvolgendo reazioni tra i composti organici e le idrossile (OH•) formati dalla scomposizione del proprio ozono (Cho *et al*, 2010). L'ozono si trova normalmente in fase gassosa, questo ne favorisce l'impiego in numerose applicazioni sia in campo industriale che in campo igienico-alimentare. A differenza dei disinfettanti classici che rilasciano residui inquinanti, l'ozono decomponendosi spontaneamente ad ossigeno (Staehelin, J., & Hoigné, J.,1985, Pascual *et al.*, 2007) determina una riduzione nel costo del processo (Selma *et al.* 2008) sia di smaltimento sia un minor effetto inquinante sull'ambiente. Tuttavia, data la sua breve vita, **l'ozono non può essere prodotto e conservato**, ma è necessario che venga **generato *in situ*** al momento dell'utilizzo attraverso ozonizzatori.

I metodi principali di generazione di ozono sono mediante (Patil and Bourke, 2012):

- scarica corona
- raggi UV

- via elettrolitica
- plasma freddo
- chemionucleare

La produzione (o meglio la generazione) di ozono per **scarica corona** è la **più comune**. L'ozono è prodotto dall'ossigeno mediante scarica elettrica. Questa scarica elettrica rompe la molecola di ossigeno e forma due radicali dell'ossigeno (i *singlet*), i quali combinandosi con molecole di ossigeno molecolare sono responsabili della formazione di ozono. L'ozono può essere prodotto a partire da ossigeno oppure dall'ossigeno contenuto nell'aria (circa 21%): nel primo caso la concentrazione di O<sub>3</sub> raggiungibile è circa 5x di quella che si ha partendo da aria. È assai importante che l'aria impiegata nel processo di produzione dell'ozono sia secca. Questo aspetto è rilevante in quanto l'azoto presente nell'aria, soggetto al campo elettrico generato nell'ozonizzatore, può portare alla formazione di acido nitrico (NO<sub>x</sub>) che, in presenza di tracce di umidità, hanno la possibilità di attaccare profondamente la cella e gli organi a valle di essa. Un altro processo per produrre ozono impiega lampade a **raggi ultravioletti** con banda di emissione concentrata sugli **185 nm**. Queste presentano però una produttività **molto modesta**, oltre che un maggiore consumo di elettricità.

Ad oggi, in soluzione acquosa l'ozono è usato prevalentemente per la sanificazione dell'acqua (per uso alimentare, pratica sportiva, sistemi d'irrigazione; riuso) mentre in fase gassosa o disperso nell'ambiente, ovviamente rispettando le misure di sicurezza (Cardoso e Fortini, 2021; Kim et al., 1999), è utilizzato per la sanificazione e deodorizzazione dell'aria, la sanificazione e conservazione di alimenti e la deodorizzazione generale, tra tanti altri impieghi come nel settore medico ospedaliero (Moat *et al.*, 2009).

Esistono molti studi sulla rimozione dei pesticidi usando l'O<sub>3</sub> per la purificazione dell'acqua nelle acque reflue e in più ci sono diversi rapporti sull'uso dell'O<sub>3</sub> per rimuovere i pesticidi residui in frutta e verdura (Daidai *et al.*, 2007; Hwang *et al.*, 2001a ; Hwang *et al.*, 2001b; Hwang *et al.*, 2002; Karaca e Velioglu, 2007; Wu *et al.*, 2007a; Gabler *et al.*, 2010).

Un altro possibile impiego di ozono in soluzione acquosa è il sistema **Clean In Place** (CIP). Il CIP è un sistema di pulizia automatico che si articola in cicli di lavaggio e ricircolo con liquidi detergenti e soluzioni di risciacquo al fine rimuovere dagli impianti ed eventualmente dalle linee produttive contaminanti batterici e residui organici e inorganici di lavorazione.

Gli impianti CIP sono normalmente costituiti da serbatoi e pompe di ricircolo e le operazioni di ricircolo e risciacquo sono gestite elettronicamente evitando che il processo si riveli “time e

labour consuming” e consentendo la pulizia di attrezzature produttive senza che queste debbano essere spostate o disassemblate (Packman e Adam, 2005).

Il processo di pulizia viene normalmente eseguito tramite l’impiego di detergenti alcalini quali la soda o soluzioni acide o clorurate le quali, nonostante l’elevata efficienza, comportano un costo in termini di risciacquo per la completa rimozione dei detergenti. Il risciacquo è inoltre normalmente svolto mediante l’impiego di acqua calda contribuendo ad incrementare i costi in termini di consumo energetico e comportando un deterioramento nel tempo delle linee. Sistemi **CIP** che impiegano **acqua ozonizzata** offrono invece numerosi **vantaggi**:

- Possibilità di impiego di **acqua fredda**, essendo l’ozono maggiormente efficace a basse temperature
- **Assenza di residui** contaminanti dovuto alla decomposizione spontanea nel tempo dell’ozono in soluzione acquosa, aspetto che si rivela particolarmente importante per la sanitizzazione nelle industrie alimentari (Miller, 2013)
- **Minor consumo di acqua** nella fase di risciacquo
- **Riduzione dei rischi di infortunio** nella preparazione e stoccaggio di soluzioni chimiche ad azione antimicrobica
- **Miglioramento della qualità delle acque di scarico** in quanto priva di residui alogenati e clorurati e in seguito a decomposizione dell’ozono ad ossigeno migliore areazione che garantisce l’eliminazione di odori sgradevoli (Lagrange *et al.*, 2004)

Sebbene i numerosi vantaggi offerti dall’impiego di acqua ozonizzata, un limite potrebbe essere, data le proprietà ossidanti comune anche ad altri disinfettanti, un effetto corrosivo sugli impianti.

Oltre che in ambito industriale in letteratura è riportata la possibilità di usare l’ozono anche in ambito sanitario e agricolo. Negli Stati Uniti è **stato approvato l’impiego di ozono come disinfettante per il trattamento delle acque di scarico** e per la **sterilizzazione degli strumenti medici (Dufresne, 2008)**. In particolar modo si è osservata la possibilità di utilizzare ozono per la disinfezione di apparecchiature dentistiche in vinilpolisilossano e resine acriliche utilizzate per la chirurgia orale (Ohkawa *et al.*, 2005).

**L’efficacia del trattamento con l’ozono** è stata dimostrata per numerose specie batteriche quali *Aspergillus niger*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogens* (Possa *et al.*, 2021).

Studi in letteratura (Ebihara *et al.*, 2008) riportano un potenziale uso di acqua ozonizzata per il **trattamento di suoli** destinati alla coltivazione.

**Attività antimicrobica dell’ozono**



L'inattivazione delle cellule da parte dell'ozono avviene in seguito all'ossidazione di vari componenti della membrana e della parete cellulare oltre che componenti intracellulari (enzimi, materiale genetico): può reagire con glicoproteine, glicolipidi ed enzimi di membrana oppure può modificare la struttura del DNA, determinando rotture/distorsioni della doppia elica o introdurre mutazioni per formazione di legami crociati tra le basi. (Alwi e Ali, 2014; Roy *et al.*, 1981). La superficie cellulare rappresenta il primo bersaglio, determinando la perdita di materiale ed eventualmente la lisi della cellula. Tuttavia, secondo Patil *et al.*, (2011) il principale bersaglio dell'ozono potrebbe essere il DNA .

I principali meccanismi con cui l'ozono esplica il suo potere battericida sono:

- ossidazione dei gruppi sulfidrilici e aminoacidici degli enzimi (peptidi e proteine). Gli amminoacidi più sensibili all'azione dei radicali liberi sono prolina, istidina, quelli contenenti gruppi tiolici (cisteina e metionina) e gruppi aromatici (fenilalanina, tirosina, triptofano) (Menzel *et al.*, 1971).
- ossidazione degli acidi grassi ad idroperossidi (O'Donnell *et al.*, 2012).

Quando i doppi legami degli acidi grassi insaturi e i gruppi sulfidrilici sono ossidati, viene alterato il normale funzionamento della cellula causandone la morte.

Non è chiaro se l'azione inattivante dei microrganismi sia dovuta alla molecola di ozono oppure ai prodotti della sua decomposizione ( $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{HO}_2\cdot$ ,  $\text{O}_2^-$ ) (O'Donnell *et al.*, 2012).

La sensibilità all'ozono varia in base al microrganismo e alle condizioni di trattamento.

In generale, i batteri sono più sensibili di lieviti e muffe; i gram-positivi sono più sensibili dei gram-negativi, mentre le spore sono molto più resistenti delle cellule vegetative (Pascual *et al.*, 2007).

I lieviti sembrano essere più sensibili delle muffe. Un trattamento per 5 minuti con acqua ozonizzata (0,188 mg/l) ha determinato più di 4,5 D per *Candida albicans* e *Zygosaccharomyces bailii*, mentre nelle stesse condizioni si ottenevano meno di una riduzione decimale per spore di *Aspergillus niger* (Restaino *et al.*, 1995)

Il trattamento con ozono determina la riduzione dello sviluppo micetico, misurato come dimensione della lesione (Forney *et al.*, 2003; Liew e Prange, 1994; Sharpe *et al.*, 2009).

Il trattamento sia con ozono gassoso che sciolto in acqua si è dimostrato efficace nell'inattivare spore di *Bacillus* sp. Khandre e Yousef (2001), hanno riportato che la suscettibilità delle spore variava a seconda della specie: spore di *B. stearothermophilus* erano molto più resistenti di quelle di *B. subtilis*.

L'ozono è un potenziale agente **virucida incluso sui SARS COVID-2**(Martins *et al.*, 2021), in particolare nei confronti di virus con envelope (Li and Wang, 2003, Kim *et al.*, 1999; Wells *et*

*al.*, 1991, Tizaoui 2020). Shin *et al.*, (2003), hanno riportato che era efficace nel ridurre rapidamente la carica di *Poliovirus 1*, *Norovirus* e colifago MS2.

Roy *et al.*, (1981) e Jiang *et al.* (2019) riscontrarono che su *Poliovirus*, l'ozono determinava l'alterazione delle proteine che costituiscono il capsido virale e il danneggiamento del genoma, causa principale dell'inattivazione.

Wells *et al.* (1991), hanno riportato che l'inattivazione del virus HIV-1 avveniva attraverso l'inibizione della trascrittasi inversa e/o della capacità del virus di legare il recettore sulla cellula bersaglio.

Wolf, Von Gunten, e Kohn (2018), hanno dimostrato che l'ozono è molto efficiente nel controllo dei virus enterici nell'acqua.

L'azione antimicrobica è influenzata da:

- ✓ Temperatura: l'abbassamento della temperatura determina un aumento della solubilità e stabilità dell'ozono in soluzione; mentre il suo incremento migliora la reattività dei residui di ozono (Kim *et al.*, 2003).
- ✓ pH: a bassi valori di pH l'ozono è più stabile e l'inattivazione dei microrganismi avviene principalmente per reazione con la molecola di O<sub>3</sub>; a valori di pH alti l'ozono si decompone e i radicali che ne risultano contribuiscono alla sua efficacia (Kim *et al.* 1999).
- ✓ Umidità: il trattamento con ozono gassoso richiede condizioni di elevata umidità per l'inattivazione dei microrganismi. L'optimum di umidità relativa (RH) è 90-95%, mentre si riscontra un minore effetto battericida da RH ≤ 50% (Kim *et al.*, 2003). Ozkan *et al.* (2011), hanno riportato che l'efficacia dell'ozono nei confronti di conidi di *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* e *Botrytis cinerea* dipendeva dall'umidità relativa; il trattamento con 200 ppm di ozono gassoso per 15 minuti era sufficiente per inibire la germinazione dei conidi quando l'umidità relativa era del 95%, mentre quando scendeva a valori di 75% e 35 % la dose di ozono richiesta per ottenere la stessa riduzione della carica doveva essere aumentata di due e dieci volte rispettivamente.
- ✓ Presenza di sostanza organica: l'ozono reagisce con tutta la sostanza organica presente nell'ambiente. Questo influenza la quantità necessaria affinché il trattamento possa essere efficace (Kim *et al.*, 1999).
- ✓ Stato fisiologico dei microrganismi: cellule in fase stazionaria sono più resistenti rispetto a quelle in fase esponenziale. Inoltre la microflora naturalmente presente sugli alimenti è più resistente dei microrganismi trattati in vitro. (Kim *et al.*, 2003).

L'ozono è stato utilizzato con successo per l'inattivazione della microflora presente su diversi

prodotti alimentari quali, carne, uova, pollame, pesce, vegetali e alimenti essiccati. L'efficacia è risultata variabile in base alla natura, alla composizione della superficie dell'alimento, al tipo di microrganismo presente, alla carica microbica iniziale e al grado di adesione del microrganismo all'alimento (Kim *et al.* 1999).

Kim (1998) in un sistema *batch* nel quale veniva applicato ozono a 1,5 ppm per 15 secondi ha ottenuto su *P. fluorescens*, *Leuconostoc mesenteroides* e *L. monocytogenes* riduzioni decimali da 1,5 a 5Log. *L. monocytogenes* è risultata essere la più sensibile al trattamento mentre *L. mesenteroides* si è rivelato il più resistente. Dosti *et al.* (2005) in uno studio condotto sull'impiego di ozono (0,6 ppm per 10 min) per il trattamento di *biofilm* batterici di *P. putida*, *P. fragi* e *P. fluorescens* cresciuti in un supporto metallico ha ottenuto sino a circa 4 Log di riduzione.

### **Impiego dell'ozono come disinfettante nell'industria alimentare**

In ambito alimentare è stato dimostrato che l'ozono può allungare i tempi di conservazione (Aafia *et al.*, 2018) di svariati alimenti attraverso la riduzione della carica microbica (Candia *et al.*, 2015). La tecnologia maggiormente utilizzata prevede l'uso di ozono in forma gassosa/atmosferica. Billion (1978) in una dettagliata indagine sulla durata di immagazzinamento, in atmosfera contenente ozono, di carne di manzo, di vitello, agnello, maiale, pollo e coniglio ha dimostrato un allungamento della shelf-life degli alimenti di circa 5-7 giorni rispetto al processo standard. Lo sviluppo infatti della microflora superficiale risultava ritardato con la refrigerazione e in presenza di ozono (Horvath *et al.*, 1985).

Per quanto riguarda i prodotti di origine vegetale, studi hanno evidenziato l'assenza di deterioramento su frutta quando l'ozono agisce sulla superficie. L'etilene prodotto del frutto durante la conservazione agisce normalmente sugli altri frutti promuovendone la maturazione e determinando l'imbrunimento della buccia, il rammollimento della polpa, e infine la putrefazione del frutto. L'impiego di ozono permetteva di evitare tale fenomeno. Al fine di evidenziare tuttavia se l'impiego di ozono fosse responsabile di un'alterazione a livello del valore nutritivo, campioni di patate, cavolo e carote sono stati analizzati in seguito a trattamento con ozono. Il trattamento non solo ne incrementava la conservabilità ma inoltre non venivano riscontrate alterazioni significative a livello di proteine ed amido nelle patate oltre che zuccheri e caroteni in cavolo e carote (Liew e Prange, 1994; Beltran *et al.* 2005)

Un medesimo studio è stato eseguito anche su pomodori, ciliegie e succhi di frutta; dalla valutazione organolettica non sono state riscontrate variazioni sostanziali rispetto a prodotti non trattati (Ogawa *et al.*, 1990; Perez *et al.*, 1999; Angelino *et al.*, 2003; Cullen *et al.*, 2010; Zambre *et al.*, 2010; O'Donnell *et al.*, 2012).

## Limiti nell'impiego dell'ozono

### □ Reattività

L'ozono è altamente instabile. Esiste la difficoltà di stabilire come l'ozono reagisca in presenza di materia organica: può infatti ossidare o ionizzare i composti organici oppure decomporsi spontaneamente a ossigeno e radicali liberi. Può essere pertanto difficile prevedere l'efficacia di una certa concentrazione di ozono nelle diverse matrici alimentari (Kim *et al.*, 1999).

### □ Perdita di qualità dell'alimento

La superficie degli alimenti può essere ossidata da un uso eccessivo di ozono, causando perdita di colore e formazione di odori indesiderati. La variazione nel colore sulla superficie dell'alimento è stata osservata in diversi vegetali, tra cui lattuga e carota (Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2013; Liew e Prange, 1994); **tuttavia, il fenomeno può essere controllato** diminuendo il tempo di trattamento e/o la concentrazione dell'ozono a livelli minimi sufficienti per ottenere l'inattivazione dei microrganismi (Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2013).

### □ Tossicità

L'ozono è un gas tossico che può causare danni alla salute ed anche la morte, se inalato in grandi quantità. I sintomi che si manifestano in seguito all'esposizione all'ozono variano in base alla concentrazione.

La tossicità dell'ozono dipende:

- dalla sua concentrazione nell'ambiente
- dalle condizioni d'uso
- dalla durata dell'esposizione

Livelli di ozono pari a 0,1 ppm causano una forte irritazione a naso e gola. Concentrazioni comprese tra 0,1 e 2 ppm possono determinare perdita della vista, tosse, mal di testa e dolore al petto. I principali danni sono stati osservati essere a carico delle vie respiratorie con alterazione della permeabilità degli epitelii. **L'esposizione a concentrazioni di ozono superiori a 50 ppm può risultare fatale** (Mahapatra *et al.*, 2005). L'ozono tuttavia, non risulta essere mutageno e cancerogeno e non si accumula nel tessuto adiposo o causa effetti cronici a lungo termine (Liangji Xu, 1999).

I valori limite di esposizione inalatoria ad agenti chimici sono regolati in Italia dal D.lgs. 81/2008 che è la normativa della sicurezza sul lavoro. L'individuazione dei valori riferiti all'esposizione inalatoria, per quanto riguarda l'ozono, devono essere in prima istanza ricercati nelle disposizioni normative del D.gv. 81/2008 negli allegati XXXVIII e XLII, qualora non presenti in questi allegati si deve far riferimento ai valori limite indicati dall'ACGIH (*American Conference of Governmental Industrial Hygenist*).

Il limite di sicurezza per i lavoratori esposti all'ozono come TLV- TWA<sup>1</sup> è relazionato all'attività fisica svolta in quanto cambiano i volumi di aria aspirata. I valori indicati dall'ACGIH sono:

- per il lavoro pesante, moderato o leggero svolto nell'arco temporale <2ore il TLV- TWA è di 0,2 ppm
- per il lavoro svolto oltre le 2 ore
  - per il lavoro leggero il TLV- TWA è di 0,1 ppm
  - per il lavoro moderato è di 0,08 ppm
  - per il lavoro pesante è di 0,05 ppm

Negli Stati Uniti, la Federal Occupational Safety and Health Administration (OSHA) ha stabilito i limiti di sicurezza per l'esposizione all'ozono: per un'esposizione continua di 8 ore il limite è di 0,1 ppm, mentre per 15 minuti è di 0,3 ppm (Pascual *et al.*, 2007).

### Normativa

*USA* – In seguito alla documentazione fornita dall'EPRI (*Electric Power Research Institute*), nel giugno 2001 la **FDA**, organismo della United States Department of Health and Human Services, ha ammesso, a convalida della compatibilità dell'ozono con le attività umane, l'impiego di ozono come **agente antimicrobico in fase gassosa o in soluzione acquosa nei processi produttivi (trattamento, lavorazione, conservazione) di alimenti come carne, uova, pesci, formaggi, frutta e verdura**. E' inoltre impiegato per **sanitizzazione dei materiali di packaging e delle superfici degli impianti di processo**. In particolare il documento 21 CFR parte 173.368 (registro n°00F-1482) ha etichettato l'ozono come elemento **GRAS (generally recognized as safe)** ossia un additivo alimentare secondario sicuro per la salute umana (CNSA 2010).

*Canada* – L'utilizzo dell'ozono come additivo alimentare è permesso in Canada in accordo con le disposizioni elencate in "Health Canada Food and Drug Regulation". Può essere utilizzato come **agente per l'invecchiamento di sidro e vino** e come **disinfettante nell'imbottigliamento di acque minerali e di sorgente e per le acque di lavaggio nelle industrie alimentari**, senza che ci sia contatto con il prodotto; è possibile l'uso di acqua debolmente ozonizzata (fino a 2 ppm) nella lavorazione di frutta e ortaggi freschi. L'utilizzo di basse concentrazioni di ozono (meno di 1 ppm) sono permesse per il controllo del

---

<sup>1</sup> **TLV-TWA** (time-weighted average): esprime la concentrazione limite, calcolata come media ponderata nel tempo (8 ore/giorno; 40 ore settimanali), alla quale tutti i lavoratori possono essere esposti, giorno dopo giorno senza effetti avversi per la salute per tutta la vita lavorativa.

deterioramento, durante la conservazione in ambiente refrigerato, dei vegetali freschi (O'Donnell *et al.* 2012).

*Comunità Europea* - In Europa l'utilizzo di ozono ai fini alimentari è stato introdotto nel 2003, per la **disinfezione e sterilizzazione durante i processi d'imbottigliamento dell'acqua**. Infatti, la Direttiva 2003/40/CE della commissione **EFSA** del 16 maggio 2003 oltre a stabilire i limiti di concentrazione e le indicazioni di etichettatura per i componenti delle acque minerali naturali, indica le condizioni d'utilizzazione dell'aria arricchita di ozono per il **trattamento delle acque minerali naturali e delle acque sorgive** (CNSA 2010).

E' da segnalare che **è stata presentata nel 2013** una proposta di inserire l'ozono tra le sostanze attive ai sensi del regolamento n 528/2012 (Biocidal Product Regulation-BPR). Per tale motivo è stata nominata una commissione al fine di valutare se l'ozono potesse essere considerato "sostanza attiva" (AS) secondo il EU Biocidal Products Regulation. La scadenza della consegna del dossier era fissata nel settembre 2016. In caso di esito favorevole con l'approvazione dell'ozono come AS (prevista per il 2018) e il suo inserimento nel elenco delle sostanze attive ammesse, si dovrà procedere con la richiesta di autorizzazione per i generatori di ozono *in situ*.

L'attuale processo di riconoscimento dell'ozono come sostanza attiva alla quale alcune industrie si stanno avvicinando, prospetta un suo utilizzo in modo più consapevole e responsabile.

*Italia* - In Italia, il Ministero della Sanità ha riconosciuto l'utilizzo dell'ozono per il trattamento dell'aria e delle acque in particolar modo per la disinfezione di bottiglie e contenitori, come alternativa alla fase di disinfezione chimica e termica di serbatoi, apparecchiature e tubazioni, per la disinfezione di pavimentazioni e superfici, per lavaggio e disinfezione di prodotti ortofrutticoli e per il lavaggio e disinfezione di carne, pollame e pesce. Inoltre è permessa l'ozonizzazione degli ambienti di stagionatura e/o stoccaggio dei formaggi, in assenza di alimenti (CNSA 2010).

*Australia e Nuova Zelanda* – Non esistono restrizioni nell'utilizzo di ozono, purché vengano rispettate le buone pratiche di produzione(GMP). E' inserito come disinfettante nel Food Standard Code (FSANZ 2006) Standard A16 (O'Donnell *et al.* 2012).

*Giappone* – L'utilizzo dell'ozono nell'industria alimentare è stato approvato nel 1990 (O'Donnell *et al.* 2012).

## **OBBIETTIVI**

Considerando che l'ozono riscuote in ambito scientifico un interesse crescente data la **facilità nel produrlo, la sua efficacia (sul inquinamento microbiologico e chimico) e l'assenza di residui (e quindi dei costi nel processo di smaltimento)** rispetto all'impiego di disinfettanti chimici, lo scopo principale del lavoro è stato di valutare l'effetto del trattamento con ozono su *biofilm* di *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* sia tramite una somministrazione statica sia in continuo tramite nebulizzazione attraverso una lancia a bassa pressione.

## **MATERIALI E METODI**

### **Preparazione delle colture batteriche**

I ceppi utilizzati nel presente studio *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Listeria monocytogenes* LM123 (appartenente alla collezione SSICA) sono conservati a -80°C in brodo colturale contenente glicerolo al 20% (v/v) (Merck).

Dopo aver risospeso i ceppi in brodo colturale Brain Heart Broth (BHI – OXOID) incubato a 30°C per 24h, sono stati effettuati isolamenti in piastre di terreno selettivo *Pseudomonas* Agar Base (PAB - Biolife) per *P. aeruginosa* e ALOA (Biolife) per *L. monocytogenes*. Le colonie isolate sono state inoculate in provette di terreno di crescita liquido Tryptone Soya Broth (TSB - OXOID). I brodi colturali sono stati incubati in termostato a 30° per 24h, fino al raggiungimento della fase stazionaria di crescita.

I ceppi impiegati sono stati conservati durante la durata dello studio a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  in *Tryptone soya agar* (TSA - OXOID) inclinato.

### **Preparazione dei *biofilm* in piastre *microtiter* e in piastre da 55 mm di diametro**

Per ogni microrganismo sono state allestite piastre multi pozzetto (12 pozzetti), ad ogni pozzetto venivano addizionati 2 ml di TSB.

Dalle brodocolture dei due microrganismi in analisi, aliquote da 100ul sono state trasferite in 11 dei 12 pozzetti della piastra, un pozzetto, destinato al controllo negativo, non è stato inoculato al fine di accertarsi che non vi fosse inquinamento da parte dell'operatore e che fosse mantenuta la sterilità durante il processo (Fig. 1). Il trasferimento dalla brodocoltura alla piastra *microtiter* e l'addizione del terreno di crescita sono state eseguite in condizioni di sterilità per evitare contaminazioni ambientali.

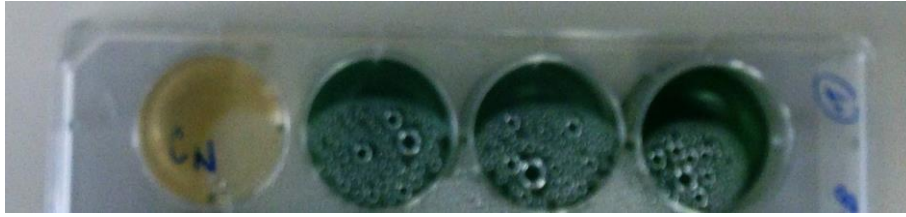


Fig. 1 – *Biofilm* di *P. aeruginosa* cresciuti in piastre multi pozzetto. 1 su 12 pozzetti non veniva inoculato e fungeva da controllo negativo.

Per la crescita di *biofilm* di 5 giorni la piastra *microtiter* è stata incubata a 30°C; dopo 72 ore 50% del terreno di crescita è stato sostituito con brodo colturale fresco al fine di mantenere una fase di crescita esponenziale della coltura batterica.

Per la crescita di *biofilm* di 3 giorni la piastra veniva lasciata in termostato a 30 °C per 72 ore.

Per la crescita di *biofilm* in piastre da 55 mm di diametro, un'aliquota (100ul) di brodo coltura batterica, precedentemente lasciata crescere in termostato a 30 °C per 24 ore, veniva addizionata a 5 ml di terreno di crescita liquido TSB. Il quantitativo di terreno era in relazione al diametro della piastra utilizzata, al fine di garantire una completa copertura del fondo per favorire la formazione di *biofilm* batterico in modo uniforme. Per la produzione dei *biofilm* di 5 e 3 giorni sono state seguite le modalità riportate in precedenza.

### **Preparazione dei *biofilm* su *carrier* d'acciaio e di materiale plastico**

La metodica adottata per la crescita su *carrier* in acciaio e materiale plastico prevedeva un pre-trattamento iniziale del supporto al fine di garantirne la sterilità.

I *carrier* in acciaio sono stati inizialmente sterilizzati tramite immersione in etanolo 96% e successiva flambatura.

Per i *carrier* in materiale plastico è stata effettuato un pretrattamento tramite etanolo 96% senza flambatura e successivamente sono stati posti sotto cappa a flusso laminare fino al completo asciugamento.

I *carrier* venivano successivamente marcati tramite incisione al fine di identificare la faccia sul quale veniva fatto crescere il *biofilm* e poi singolarmente posizionati sul fondo dei pozzetti di una piastra *microtiter*. In ogni pozzetto venivano addizionati 2 ml di TSB e 100 ul di brodocoltura dei due ceppi utilizzati. La piastra *microtiter* è stata successivamente incubata a 30°C per 5 o 3 giorni.

Per la produzione dei *biofilm* di 5 e 3 giorni sono state seguite le modalità riportate in precedenza.

### **Valutazione dei *biofilm***



Per l'enumerazione di *biofilm*, in letteratura scientifica (Kumar e Anand, 1998), sono riportate differenti metodiche, da quelle semi-quantitative, quali la *Microtiter plate assay* che prevede l'impiego di Cristalvioletto e di uno spettrofotometro, a metodiche puramente quantitative quali conteggio in piastra ad altre invece puramente qualitative, quali l'impiego della microscopia elettronica a scansione, confocale laser o a fluorescenza

Nel seguente lavoro per l'analisi quantitativa si è utilizzata una variazione della metodica proposta da Frank e Koffi (1990) e Robbins (2004) mentre per le analisi qualitative si è provveduto ad impiegare colorazione tramite Cristalvioletto e microscopia e scansione elettronica.

### **Analisi qualitativa mediante colorazione tramite Cristalvioletto**

La formazione dei *biofilm* batterici è stata inizialmente valutata a livello qualitativo tramite colorazione con il Cristalvioletto. La metodica adottata è stata modificata da quella proposta da O'Toole (2011) poiché è stata adattata a piastre *microtiter* da 12 pozzetti in quanto la metodica originale prevedeva colorazione su piastre *microtiter* da 96 pozzetti. Dopo incubazione per 5 o 3 giorni il surnatante è stato eliminato, tramite rovesciamento della piastra, al fine di rimuovere la maggior parte delle cellule planctoniche o debolmente adese alla matrice esopolisaccaridica del *biofilm*. Successivamente sono stati effettuati 3 risciacqui con soluzione fisiologica peptonata (SOLP). Alla fase di risciacquo seguiva la fase di asciugatura: il campione veniva lasciato per 15 minuti, all'interno di una cappa a flusso laminare; trascorso tale tempo sul fondo del pozzetto si osservava la comparsa di un alone opaco. Ad ogni pozzetto erano addizionati 2 ml di Cristalvioletto (2%), al fine di garantire una completa copertura del pozzetto ed il tempo di contatto era di 15 minuti. Il campione veniva sempre mantenuto sotto cappa chimica. Al termine dei 15 minuti, la piastra *microtiter* veniva nuovamente risciacquata tramite SOLP 5 volte al fine di rimuovere il colorante in eccesso. Ad ogni risciacquo la piastra *microtiter* veniva delicatamente agitata al fine di favorire l'eliminazione del colorante e successivamente svuotata tramite l'ausilio di una micropipetta. La fase di asciugatura aveva una durata di 20 minuti sotto cappa.

La valutazione della presenza di *biofilm* era effettuata mediante controllo visivo.

### **Analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM)**

I *carrier* in acciaio o materiale plastico, dopo incubazione per 5 o 3 giorni, sono stati prelevati dai pozzetti, sciacquati per 3 volte con SOLP e posizionati ad asciugare sotto cappa a flusso laminare per 10 min.

I *biofilm* su *carrier* sono stati successivamente trattati mediante glutaraldeide 2,5% per la fissazione del campione.

Il protocollo utilizzato ([http://www.users.unimi.it/citratriz/micro\\_elettr/lobro/fissazione.htm](http://www.users.unimi.it/citratriz/micro_elettr/lobro/fissazione.htm)) ha previsto un'iniziale diluizione decimale della glutaraldeide 25% con tampone fosfato 0,2 M (pH 7,2 ± 0,2) precedentemente diluito 1:1 in H<sub>2</sub>O distillata, al fine di raggiungere una concentrazione del 2,5%.

Il tampone fosfato era ottenuto mediante miscelazione di una soluzione fosfata monosodica 0,2 M in una soluzione di fosfato bisodico 0,2 M (pH 9,2) sino al raggiungimento di un pH di 7,2 ± 0,2.

Il campione veniva immerso per 1 ora a 4°C in 10 ml di glutaraldeide, seguivano 4 lavaggi mediante tampone fosfato diluito della durata di 10 minuti ciascuno al fine di eliminarne la quantità in eccesso. Data l'elevata tossicità della glutaraldeide il trattamento veniva svolto sotto cappa sterile e prevedeva l'impiego di guanti in nitrile, non soggetti a degradazione da vapori. La fissazione permetteva di impedire la parziale degradazione delle strato esopolisaccaridico che normalmente riveste un *biofilm* batterico.

Seguiva un processo di disidratazione che prevedeva lavaggi a concentrazione crescente di etanolo 99,96%.

Nel nostro caso sono stati eseguiti trattamenti per immersione in etanolo della durata di 10 minuti inizialmente al 50% - 60% - 70% - 80% - 95% e 100%. Il passaggio da una concentrazione a quella successiva veniva svolto sotto cappa. L'immersione veniva effettuata all'interno di piastre Petri. Alla concentrazione del 100% il campione veniva lasciato 20 minuti. Il campione veniva successivamente posto in un Critical Point Dryer CPD 030 (Balzers 1989) nel quale venivano svolti 5 cicli di trattamento in presenza di CO<sub>2</sub> che, convertita allo stato supercritico, andava a sostituire le molecole di etanolo presenti nel campione. La scelta di anidride carbonica permetteva di utilizzare temperatura e pressione ridotte (31°C e 73,8 bar per CO<sub>2</sub>). Tale metodica è stata impiegata al fine di migliorare la qualità dell'immagine.

I campioni dopo essere stati collocati in supporti idonei denominati Stub venivano posti in un essiccatore e successivamente metallizzati, ovvero rivestiti di una lamina d'oro tramite "Sputter Coater" (AGAR), ed osservati al microscopio elettronico a scansione JSM – IT300 (JEOL).

I campioni sono stati osservati ad ingrandimenti crescenti al fine di mettere in evidenza le caratteristiche strutturali e biologiche dei *biofilm* formati per i microrganismi di interesse.

L'analisi mediante microscopia elettronica è stata effettuata inizialmente sui *biofilm* adesi ai *carrier* e successivamente dopo trattamento con acqua ozonizzata.

### **Analisi quantitativa dei *biofilm***

Al fine di quantificare le cellule costituenti il biofilm si è provveduto ad eseguire delle conte microbiche tramite diluizioni seriali decimali.

Il *biofilm*, una volta sciacquato con SOLP, veniva staccato mediante raschiamento tramite spatola in plastica sterile e risospeso in 1 ml di SOLP. Il raschiamento veniva eseguito delicatamente al fine di prevenire la rottura delle cellule ed inoltre la piastra veniva agitata delicatamente al fine di favorire il passaggio in soluzione del *biofilm*. Seguiva il trasferimento in una provetta contenente 4 ml di SOLP, considerata la diluizione 0.

Le analisi microbiologiche sono state eseguite, a seguito di opportune diluizioni decimali, su terreni agarizzati generici per la carica microbica totale e terreni differenziali e/o selettivi per la ricerca di microrganismi specifici.

Al termine dei rispettivi periodi di incubazione è stata effettuata una valutazione quantitativa dei microrganismi presenti, espressa in ufc/mL. La conta in piastra o conta delle colonie, consiste nel determinare il numero delle cellule in grado di formare colonie su un opportuno terreno agarizzato. Il presupposto è che ogni colonia sia originata da una singola cellula vitale. E' buona prassi contare piastre che contengano un numero di colonie compreso tra 15 e 300.

### **Produzione di acqua ozonizzata**

È stato utilizzato un generatore di ozono modello WATER PROOF (MET Srl Bologna) da 16g/h costituito da due reattori con un voltaggio di 220 V/50 Hz abbinato alla MOW (MET Srl Bologna) cioè un sistema composto da una pompa, un sistema di arricchimento (torre di contatto), un sistema di misurazione in line (ORP). Per produrre l'ozono l'aria veniva purificata e concentrata tramite un concentratore di ossigeno. L'ozono prodotto veniva erogato con un flusso di 1 L/min (Fig. 2).

Dato che la concentrazione di ozono disciolta variava a seconda della temperatura e della qualità della acqua rifornita al sistema, il funzionamento della macchina WATER PROOF era calibrato tramite un potenziometro, impostato prima delle prove in funzione delle misure fatte con il metodo ufficiale "Indigo".

Allo strumento è stata collegata una lancia a bassa pressione attraverso la quale l'acqua ozonizzata è stata erogata da un apposito ugello.



Fig.2 – Generatore di ozono modello WATER PROOF e sistema di ricircolo e arricchimento dell'acqua con l'ozono modello MOW (MET Srl, Bologna)

### **Valutazione del decadimento dell'ozono in soluzione acquosa**

La concentrazione di ozono è stata calcolata attraverso il metodo “*Standard Methods 4500-O3 B Indigo Colorimetric*”. La metodica si basa sull'impiego di reagenti che in soluzione acida vanno incontro a decolorazione in seguito a contatto con ozono, la lettura è stata eseguita tramite spettrofotometro DR5000. La diminuzione dell'assorbanza è direttamente proporzionale all'aumento della concentrazione dell'ozono.

I reagenti utilizzati per la valutazione della concentrazione di ozono sono stati:

- ❖ Indigo soluzione madre: in un matraccio tarato da 1 L sono stati aggiunti 500 ml di acqua, 1 ml di acido fosforico concentrato e 770 mg di Potassio indigo trisulfonate, ( $C_{16}H_7N_2 O_{11}S_3K_3$ ), il tutto riportato a volume con acqua. La diluizione 1:100 aveva un'assorbanza di  $0,20 \pm 0,0010$  a 600 nm.
- ❖ Indigo reagente I: in un matraccio da 1 L sono stati aggiunti 20 ml di soluzione madre (a), 10 g di sodio di idrogeno fosfato ( $NaH_2PO_4$ ) e 7 ml di acido fosforico concentrato e portati a volume con acqua.
- ❖ Indigo reagente II: si è proceduto come per il reagente b (Indigo reagente I) ma sono stati aggiunti 100 ml di soluzione madre anziché 20 ml.

Per la lettura spettrofotometrica sono stati aggiunti 10mL di soluzione di Indigo reagente II ad un cilindro graduato da 100 mL, 5 mL del campione di acqua ozonizzata e portati a volume con acqua milli-Q (purificata e deionizzata). Dopo omogeneizzazione è stata eseguita la lettura mediante spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 600 nm.

La lettura è stata ripetuta ogni 10 minuti al fine di verificare la concentrazione di ozono residua. Il tempo complessivo scelto per la valutazione della stabilità dell'ozono in soluzione acquosa è stato di 60 minuti.

Il calcolo della concentrazione di ozono è stato effettuato secondo la formula:

$$\text{mg O}_3/\text{L} = \frac{100 \times \Delta A}{f \times b \times V}$$

Dove:

$\Delta A$  = differenza in assorbanza tra il campione e il bianco (nm)

$b$  = cammino ottico (cm)

$V$  = volume del campione (mL)

$f$  = 0,42 coefficiente di assorbimento per l'ozono acquoso

### **Trattamento di *biofilm* con ozono in soluzione acquosa**

L'ozono prodotto veniva erogato con un flusso di 1L/min. Il funzionamento della macchina veniva gestito da un PLC industriale al fine di controllare la produzione di ozono, la concentrazione e di un timer per monitorare le tempistiche di trattamento. L'acqua ozonizzata, a concentrazione di 2 e 4 ppm e per tempi di trattamento di 10, 15 e 30 minuti è stata microiniettata sulla superficie dei *biofilm*, adesi al fondo del pozzetto. Per ogni combinazione di microrganismo saggiato, concentrazione di Ozono, volume di acqua ozonizzata e tempo di contatto è stata allestita una piastra a 12 pozzetti. L'ozono è stato iniettato in 9 pozzetti mentre i rimanenti 3, non trattati, costituivano il controllo negativo. L'eliminazione dell'acqua ozonizzata avveniva per rovesciamento della piastra. Dopo trattamento i *biofilm* erano staccati dal fondo del pozzetto mediante spatola e successivamente venivano sottoposti ad analisi quantitativa.

### **Trattamento di *biofilm* con acqua ozonizzata attraverso nebulizzazione mediante lancia a bassa pressione**

Il trattamento di nebulizzazione prevedeva l'ausilio di una lancia a bassa pressione tramite la quale l'acqua ozonizzata veniva diretta, a pressione controllata, verso il campione posto all'interno di una cappa chimica. Il campione, costituito da *biofilm* adesi al fondo di una piastra da 55 mm, veniva fissato verticalmente a un supporto metallico, al fine di simulare l'angolatura con la quale viene normalmente applicata in ambienti industriali ed evitare la stagnazione di acqua ozonizzata all'interno del campione. La distanza fra il campione e la lancia è stata mantenuta costante per tutte le prove effettuate (Fig. 3).

L'acqua ozonizzata veniva applicata per 1 minuto. Dopo trattamento i *biofilm* erano staccati dal fondo della piastra mediante spatola e successivamente venivano sottoposti ad analisi quantitativa.



Fig. 3 – Nebulizzazione tramite lancia a bassa pressione su *biofilm* cresciuti su piastre da 55 mm di diametro

Per il trattamento dei *carrier*, questi venivano attaccati a una piastra Petri mediante nastro biadesivo prestando attenzione alla faccia esposta nel quale era cresciuto il biofilm. L'intera piastra veniva fissata verticalmente su supporto metallico. L'acqua ozonizzata veniva somministrata mediante lancia a pressione, a concentrazione e tempistiche definite (Fig. 4).

Nel caso di trattamento con acqua ozonizzata “spraizzata” è stato opportuno valutare anche l'influenza della forza meccanica (pressione dell'acqua) sul distacco fisico del biofilm dalle piastre. Per tale motivo alcune piastre, fatte crescere con la medesima brodocoltura e alle medesime condizioni di crescita, venivano trattate unicamente con acqua.

La differenza tra la riduzione decimale ottenuta mediante ozono spruzzato e quella ottenuta mediante acqua spruzzata ha permesso di valutare l'azione effettiva dell'ozono sui *biofilm*.

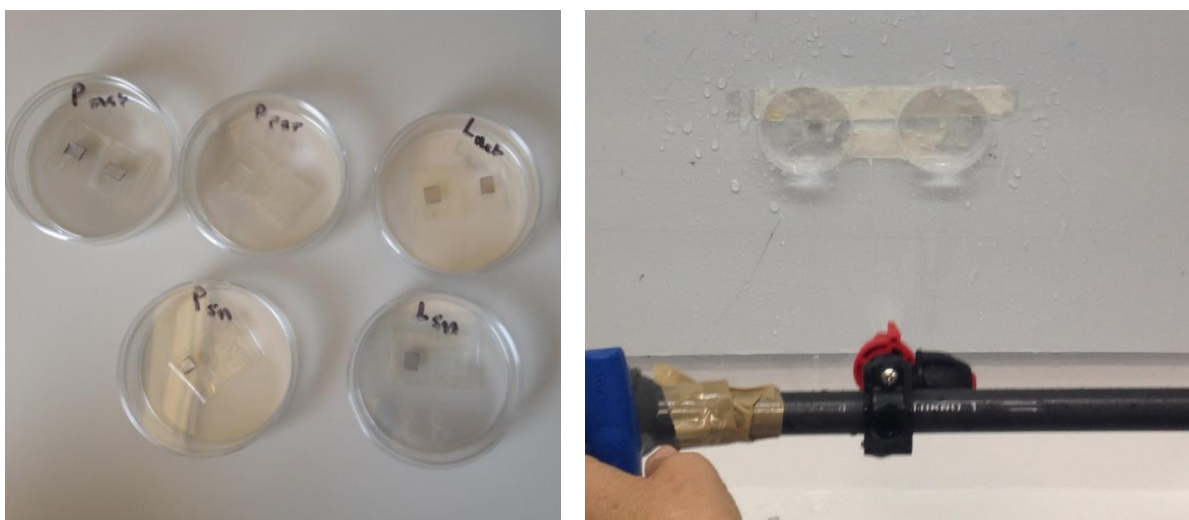


Fig. 4 – trattamento di biofilm su carrier di acciaio e di materiale plastico con ozono nebulizzato tramite lancia a bassa pressione

## **Analisi dei risultati microbiologici e analisi statistica dei risultati**

In ambito microbiologico l'obiettivo della misurazione è la determinazione, mediante il metodo di conta delle colonie microbiche su piastre Petri, del numero N di microrganismi presenti in un campione. Il conteggio, come indicato nella ISO 7218, è ottenuto mediante il calcolo della media ponderata delle conte di due diluizioni successive, in cui almeno una piastra contenga 15 colonie, mediante la relazione:

$$N = (\Sigma C) / (V \cdot (n1 + 0,1 \cdot n2) \cdot d)$$

Dove:

- N = numero di microrganismi presenti nel campione
- $\Sigma C$  = somma delle conte delle colonie in tutte le piastre considerate alle due successive diluizioni;
- V = volume di inoculo per ciascuna piastra Petri;
- n1 = numero delle piastre alla prima diluizione considerata;
- n2 = numero delle piastre alla seconda diluizione considerata;
- d = diluizione dell'inoculo distribuito nella prima piastra presa in considerazione nella conta

I risultati dei conteggi sono stati trasformati in scala logaritmica per la normalizzazione della distribuzione. Nell'analisi quantitativa in caso di risultato inferiore al limite analitico di rilevazione, per l'elaborazione si è convenuto di considerare la metà del limite stesso (Nutsch *et al.*, 1998).

Per la valutazione dell'efficacia dei trattamenti con ozono i dati sono stati raccolti utilizzando Excel 2013.ink (Microsoft Office standard 2013). Tutti i conteggi trasformati in logaritmi sono stati elaborati come media, deviazione standard e sono stati calcolati i valori di riduzioni decimali mediante la formula:

$$\text{Riduzione Decimali} = \text{Log}_{10} (A) - \text{Log}_{10} (B)$$

è stata inoltre calcolata la riduzione percentuale mediante la seguente formula

$$\text{Riduzioni percentuale} = \frac{(A-B) \times 100}{A}$$

Dove:

A = numero di cellule batteriche vitali prima del trattamento

B = numero di cellule batteriche vitali dopo il trattamento

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

## Formazione di *Biofilm* in piastre *microtiter* e piastre da 55 mm, su *carrier* di acciaio e di materiale plastico

All'interno della singola specie e per ogni tempo di incubazione i risultati, delle diverse prove, hanno evidenziato una discreta uniformità nella formazione dei biofilm sia per *Listeria* che per *Pseudomonas* rilevata dai valori contenuti delle deviazioni *standard*.

Dai risultati ottenuti nelle diverse prove con piastre multipozzetto (tabelle 1 e 2) si è evidenziato che la formazione di *biofilm* in termini quantitativi aumenta in relazione con i tempi di incubazione in modo significativo ( $p \geq 0,05$ ) per *L.monocytogenes* mentre per *P. aeruginosa* pur osservando valori tendenzialmente maggiori per incubazioni di 5 giorni, le concentrazioni cellulari non erano significativamente diverse rispetto a quelle di 3 giorni.

Tab. 1 - Biofilm *Listeria monocytogenes* in piastra *microtiter*

Campioni	5 giorni		3 giorni	
	ufc/pozzetto	Log ufc/pozzetto	ufc/pozzetto	Log ufc/pozzetto
1	7,00E+06	6,85	4,00E+05	5,60
2	4,60E+06	6,66	4,10E+06	6,61
3	8,00E+06	6,90	8,80E+05	5,94
4	9,30E+05	5,97	9,30E+05	5,97
5	2,00E+06	6,30	1,40E+06	6,15
6	9,00E+05	5,95	7,40E+05	5,87
7	8,30E+06	6,92	1,30E+06	6,11
8	7,30E+06	6,86	2,30E+06	6,36
9	1,00E+06	6,00	1,00E+06	6,00
10	8,00E+06	6,90	8,00E+05	5,90
Media $\pm$ dEv.st		6,53 $\pm$ 0,43		6,05 $\pm$ 0,28

Tab. 2 - Biofilm *Pseudomonas aeruginosa* in piastra *microtiter*

Campioni	5 giorni		3 giorni	
	ufc/pozzetto	Log ufc/pozzetto	ufc/pozzetto	Log ufc/pozzetto
1	1,20E+07	7,08	4,10E+06	6,61
2	2,12E+07	7,33	6,10E+06	6,79
3	7,40E+06	6,87	6,40E+06	6,81
4	9,60E+06	6,98	9,60E+05	5,98
5	3,10E+07	7,49	1,00E+07	7,00
6	2,70E+06	6,43	5,70E+06	6,76
7	2,00E+07	7,30	8,00E+06	6,90
8	9,00E+06	6,95	9,00E+06	6,95
9	2,00E+07	7,30	1,30E+07	7,11
10	1,70E+07	7,23	1,00E+07	7,00
Media $\pm$ dev.st		7,09 $\pm$ 0,30		6,79 $\pm$ 0,32



Per *Listeria* la concentrazione raggiunta era di circa  $10^6$  ufc/pozzetto mentre per *Pseudomonas* la concentrazione si è assestata intorno a  $10^7$  ufc/pozzetto.

La formazione di *biofilm* è stata valutata anche su piastre da 55 mm di diametro, impiegate per il trattamento mediante acqua ozonizzata da vaporizzare mediante lancia a bassa pressione. La superficie più ampia di crescita ha determinato il raggiungimento di concentrazioni più elevate, mediamente intorno a  $10^7$  ufc/piastra, rispetto a quelle riscontrate nei pozzetti della piastra *microtiter* e non sono state rilevate differenze significative nelle concentrazioni né per quanto riguarda i microrganismi saggiati né relativamente ai giorni di incubazione (Tabelle 3 e 4).

Dopo asciugamento della piastra risultava evidente, anche ad osservazione visiva diretta, come le cellule fossero maggiormente concentrate al centro della piastra (Fig. 5).



Fig. 5 – *Biofilm* di *Pseudomonas aeruginosa* in piastre da 55mm dopo asciugamento

Tab. 3 - *Biofilm Listeria monocytogenes* in piastra da 55 mm

Campioni	Tempo di incubazione			
	5 giorni		3 giorni	
	ufc/pozzetto	Log ufc/pozzetto	ufc/pozzetto	Log ufc/pozzetto
1	2,00E+07	7,30	3,00E+07	7,48
2	4,50E+07	7,65	1,00E+07	7,00
3	1,50E+07	7,18	2,00E+07	7,30
4	4,00E+07	7,60	6,00E+07	7,78
5	5,00E+07	7,70	2,20E+07	7,34
6	6,10E+07	7,79	3,80E+07	7,58
7	2,30E+07	7,36	1,20E+07	7,08
Media ± dev.st		7,51 ± 0,23		7,36 ± 0,23

Tab. 4 - *Biofilm Pseudomonas aeruginosa* in piastra da 55 mm

Campioni	Tempo di incubazione			
	5 giorni		3 giorni	
	ufc/pozzetto	Log ufc/pozzetto	ufc/pozzetto	Log ufc/pozzetto
1	2,00E+07	7,30	2,12E+07	7,33
2	1,20E+07	7,08	3,10E+07	7,49
3	1,50E+07	7,18	1,70E+07	7,23
4	2,25E+07	7,35	3,25E+07	7,51
5	2,50E+07	7,40	1,50E+07	7,18
6	1,80E+07	7,26	1,00E+07	7,00
7	3,00E+07	7,48	1,30E+07	7,11
Media ± dev.st		7,30 ± 0,13		7,26 ± 0,19

Per poter effettuare valutazioni dell'effetto dell'ozono su superfici in acciaio o in materiale plastico mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) sono stati allestiti anche *biofilm* su *carrier* di entrambi i materiali. Anche in questo caso si è valutata la concentrazione, per i batteri oggetto dello studio, raggiunta dopo 3 e 5 giorni di incubazione.

I *biofilm* fatti crescere su *carrier* hanno evidenziato una **maggiore concentrazione cellulare su materiale plastico rispetto a quello prodotto su carrier in acciaio**. La natura del materiale influenza infatti la formazione del *biofilm* in quanto coinvolge le interazioni che si sviluppano durante il processo di adesione tra microrganismo e superficie (Tabelle 5, 6, 7 e 8). *Pseudomonas* presenta infatti una superficie cellulare idrofobica la quale contribuisce a farla aderire con maggiore facilità a carrier in PET rispetto a quelli in acciaio (Dutta *et al.*, 2012). Una **minore** densità cellulare su *carrier* in **acciaio** rispetto a quelli in PET per quanto riguarda *Listeria* è da attribuirsi alla sua **idrofilia**, essendo la sua superficie **carica negativamente** come quella dell'acciaio (punto isoelettrico intorno al 4) determina l'instaurarsi di una repulsione elettrostatica tra batterio e supporto, riducendone il fenomeno di adesione su materiale idrofilico rispetto a quello idrofobico (Briandet *et al.*, 1999)

Tab. 5 - *Biofilm L. monocytogenes* su *carrier* acciaio

Campioni	Tempo di incubazione			
	5 giorni		3 giorni	
	ufc/pozzetto	Log ufc/pozzetto	ufc/pozzetto	Log ufc/pozzetto
1	1,10E+07	7,02	4,00E+06	6,60
2	2,10E+07	7,32	1,30E+06	6,11
3	1,00E+07	7,00	1,00E+06	6,00
4	8,80E+06	6,94	1,90E+06	6,28
Media ± dev.st		7,04 ± 0,15		6,24 ± 0,17

Tab. 6 - *Biofilm L. monocytogenes* su carrier di materiale plastico

Campioni	Tempo di incubazione			
	5 giorni		3 giorni	
	ufc/pozzetto	Log ufc/pozzetto	ufc/pozzetto	Log ufc/pozzetto
1	1,10E+07	7,04	4,60E+06	6,66
2	9,10E+06	6,96	5,30E+06	6,72
3	2,00E+07	7,30	4,70E+06	6,67
4	9,80E+06	6,99	6,40E+06	6,81
Media ± dev.st		7,06 ± 0,15		6,71 ± 0,06

Tab. 7 - *Biofilm P. aeruginosa* su carrier d'acciaio

Campioni	Tempo di incubazione			
	5 giorni		3 giorni	
	ufc/pozzetto	Log ufc/pozzetto	ufc/pozzetto	Log ufc/pozzetto
1	2,00E+07	7,30	8,00E+06	6,90
2	1,30E+07	7,11	1,00E+07	7,00
3	1,50E+07	7,18	7,10E+06	6,85
4	1,00E+07	7,00	3,00E+06	6,48
Media ± dev.st		7,14 ± 0,12		6,80 ± 0,23

Tab. 8 - *Biofilm P. aeruginosa* su carrier di materiale plastico

Campioni	Tempo di incubazione			
	5 giorni		3 giorni	
	ufc/pozzetto	Log ufc/pozzetto	ufc/pozzetto	Log ufc/pozzetto
1	2,20E+07	7,34	8,00E+06	6,90
2	1,80E+07	7,26	1,10E+07	7,04
3	2,20E+07	7,34	9,20E+06	6,96
4	1,00E+07	7,00	7,60E+06	6,88
Media ± dev.st		7,22 ± 0,15		6,94 ± 0,06

Per meglio mettere in evidenza le concentrazioni raggiunte e le differenze riscontrate nella formazione dei *biofilm* nelle diverse condizioni nelle figure 6 e 7 sono riassunti tutti i risultati dei conteggi effettuati sui *biofilm* per *Listeria* e *Pseudomonas*, rispettivamente, sui diversi substrati testati.

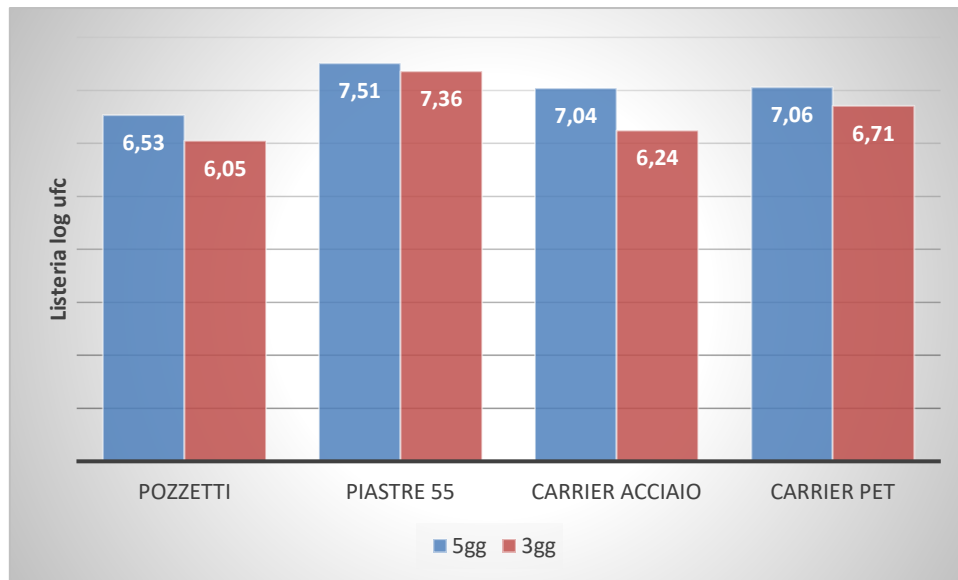


Fig. 6 – Analisi quantitativa dei *biofilm* di *Listeria* su differenti substrati

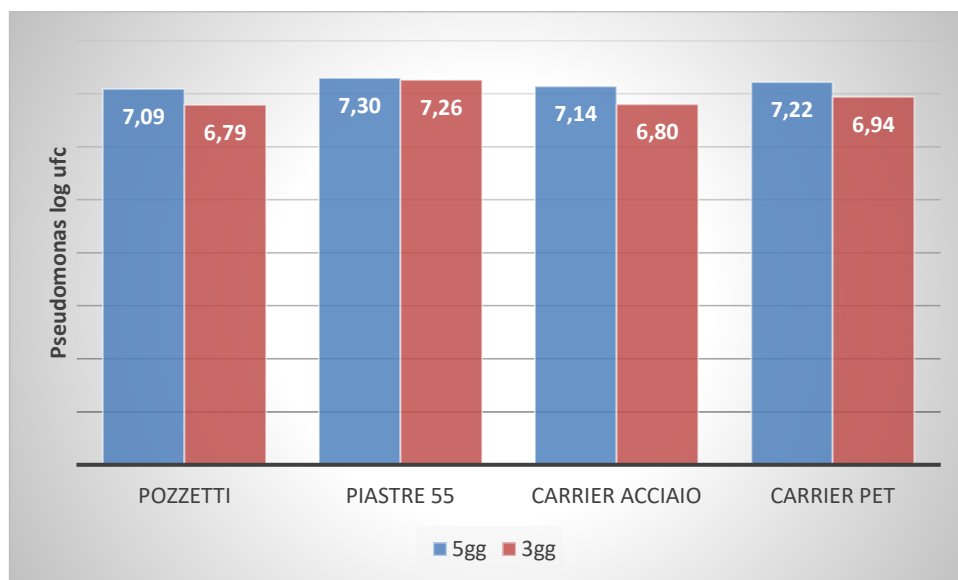


Fig. 7 – Analisi quantitativa dei *biofilm* di *Pseudomonas* su differenti substrati

Analizzando la crescita di *biofilm* in funzione del ceppo utilizzato si può osservare che per la *Listeria* la formazione di *biofilm* sia maggiormente soggetta al tempo di incubazione ed alla

natura del supporto al contrario di *Pseudomonas* in cui la crescita di *biofilm* non risulta essere condizionata né dal tempo di incubazione né dal supporto impiegato.

### Valutazione della distribuzione dei batteri con Cristalvioletto

Al fine di valutare, a livello qualitativo, la formazione e la distribuzione dei *biofilm* si è provveduto ad eseguire una colorazione tramite Cristalvioletto (Fig. 8). Attraverso una valutazione visiva diretta si è messa in evidenza una distribuzione sulla superficie non uniforme con una densità maggiore a livello periferico sia sul fondo dei pozzetti che sui carrier. L'intensità di colore differente è probabilmente da attribuire alla natura del *biofilm* che normalmente risulta essere multistratificato. Come riportato da Larimer *et al.*, (2016) l'intensità di colore è direttamente proporzionale allo spessore e alla densità cellulare del *biofilm*.

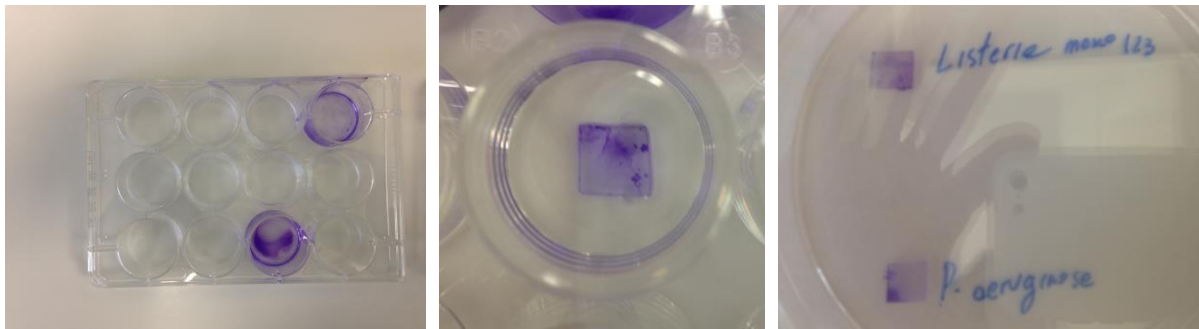


Fig. 8 - Colorazione *biofilm* in piastre *microtiter* e su *carrier* tramite cristalvioletto.

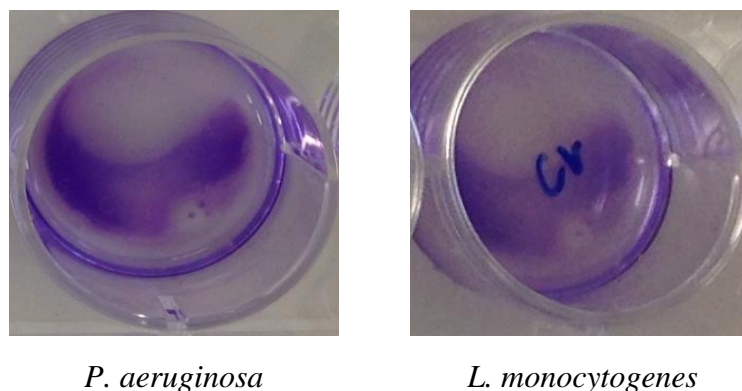


Fig. 9 - Colorazione *biofilm* fondo pozzetti piastra *microtiter*

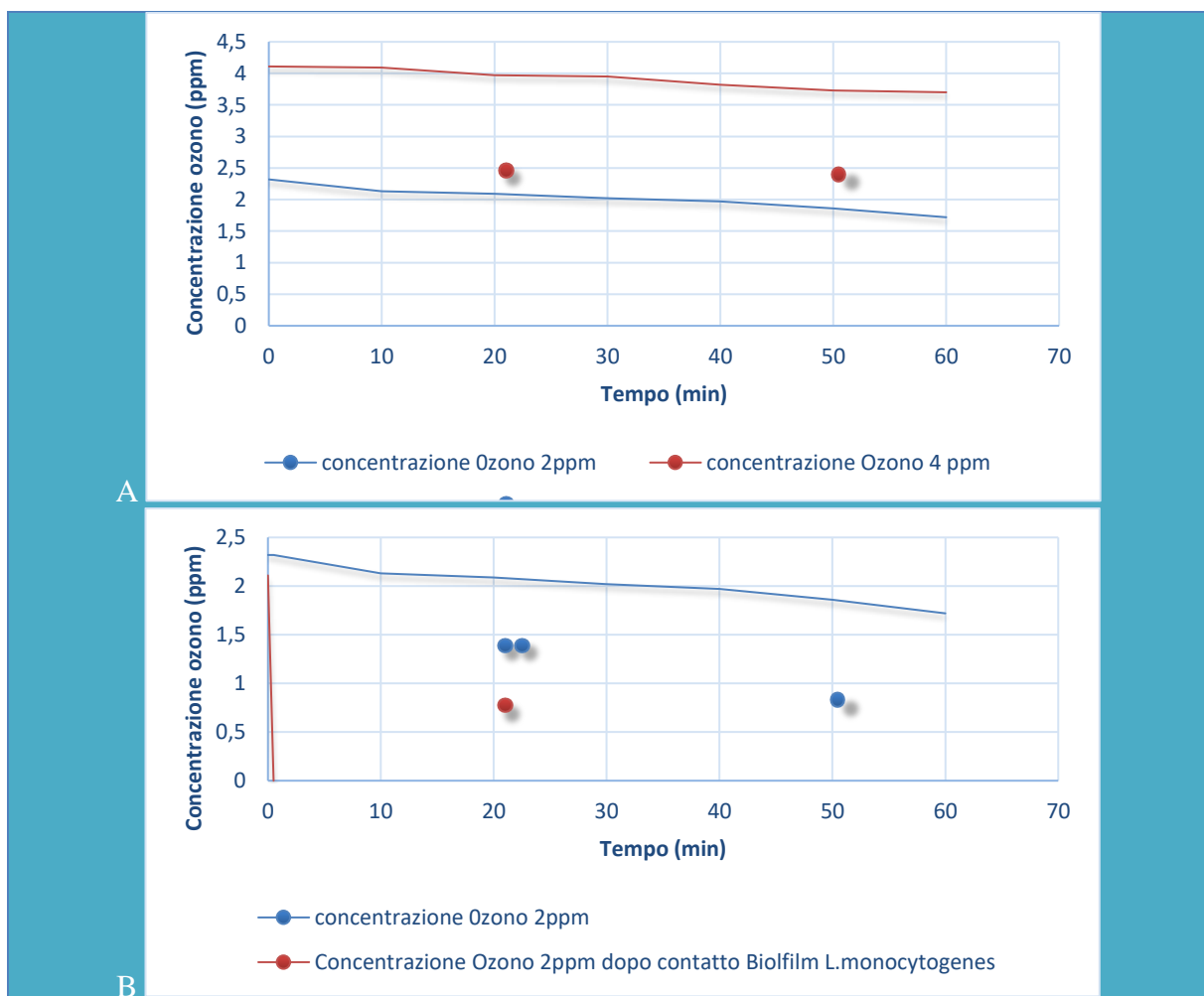
Dai risultati si può osservare che la tendenza a formare *biofilm* sia maggiore in *Pseudomonas* rispetto a *Listeria* (Fig. 9), ciò evidenziato anche dal distribuzione all'interno della piastra *microtiter* **non solo sul fondo del pozzetto ma anche lungo le pareti laterali** del supporto. La capacità di adesione a una superficie è influenzata dalla natura del batterio, in particolar modo dall'idrofobicità della membrana del batterio. Come riportato in letteratura, **microrganismi**

**idrofobici tendono ad aderire in numero maggiore a un supporto rispetto a batteri idrofilici** (Dutta *et al.*, 2012). Questo contribuisce a spiegare come *Pseudomonas* tenda a formare **biofilm** con una densità cellulare maggiore rispetto a *Listeria*.

### **Deplezione dell'ozono in soluzione acquosa a temperatura ambiente ed in presenza di *biofilm* in piastre *microtiter***

L'azione dell'acqua ozonizzata su *biofilm* (nelle prove laboratoriale preliminare) ha dimostrato un ridotto effetto, inferiore ad 1 Log di riduzioni decimali, sebbene siano state effettuate prove per tempi, volumi e concentrazioni differenti.

Si è cercato, quindi, di verificare se la presenza di *biofilm* avesse un effetto sull'emivita dell'ozono applicato in soluzione acquosa. Per accertarsi di ciò, si è provveduto a valutare l'emivita dell'acqua ozonizzata in assenza e presenza di *biofilm* (Fig. 10).



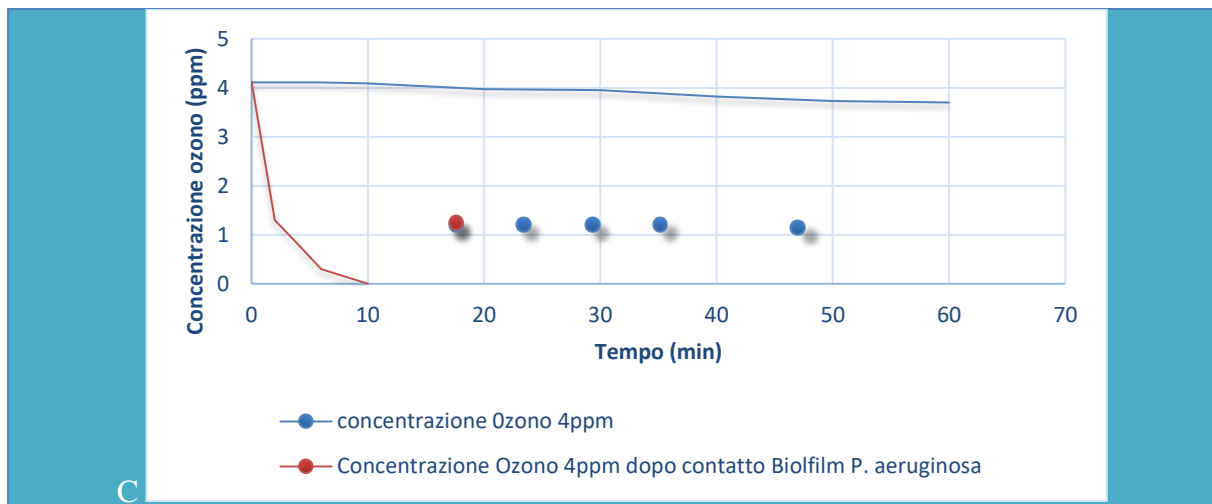


Fig. 10 - Valutazione del consumo di ozono in soluzione acquosa senza la presenza di *biofilm* (A) in presenza di un *biofilm* di *Listeria* (B) ed in presenza di un *biofilm* di *Pseudomonas* (C)

**L'ozono in soluzione acquosa ed in assenza di batteri e del biofilm** la concentrazione di ozono, sia a 2 che a 4 ppm, **si manteneva costante per circa 30 minuti** mentre in presenza di *Listeria* (*biofilm* con  $10^7$  ufc/pozzetto) la concentrazione di 2 ppm rimaneva per circa 30 secondi ed entro 1 minuto si osservava la completa scomparsa di ozono. A concentrazione di 4 ppm ed in presenza di un *biofilm* di *Pseudomonas* ( $10^7$  ufc/pozzetto) **il consumo dell'ozono avveniva dopo 4-6 minuti** dalla sua somministrazione.

**Il consumo di ozono, pertanto, risultava essere immediato data l'elevata concentrazione di strutture di natura lipidica sullo strato exopolisaccaridico in cui le cellule risultano immerse.**

Come riportato in letteratura infatti, l'ozono agisce prevalentemente sugli acidi grassi saturi ossidandoli a perossidi acidi, promuovendo la disgregazione della matrice del *biofilm* (Menzel 1984).

Robbins *et al.* (2004) ha studiato l'acqua ozonizzata nel trattamento su *biofilm* di *L. monocytogenes* evidenziavano un numero di riduzioni decimali pari a 4,51 Log per il ceppo Scott A e 3,97 Log per il ceppo 10403S a concentrazioni di 2 ppm e 8,07 Log per Scott A e 7,47 Log per 10403S a concentrazione di 4ppm.

**In base ai tempi di emivita dell'ozono riscontrati in presenza di *biofilm* batterici si poteva supporre che la mancata inattivazione dei batteri fosse da attribuire alla metodica di somministrazione dell'ozono, in quanto senza una rigenerazione continua, l'ozono viene assorbito dalla matrice extracellulare perdendo completamente la sua azione ossidante.**

Alla luce dei risultati ottenuti si è ipotizzato di valutare l'influenza dell'ozono mediante una applicazione continua nel tempo con mantenimento di concentrazioni di ozono costanti.

### Effetto dell'ozono nebulizzato mediante lancia a bassa pressione su *biofilm* in piastre da 55 mm

Si è provveduto ad utilizzare acqua ozonizzata a spruzzo al fine di simulare una possibile applicazione di sanificazione industriale ed osservare se tramite nebulizzazione fosse riscontrabile una maggiore azione dell'ozono sull'abbattimento della concentrazione batterica in un *biofilm*. Data la natura dell'esperimento sono state utilizzate piastre di 55 mm di diametro che venivano fissate tramite nastro a un supporto metallico. La scelta di simili piastre rispetto all'impiego di piastre *microtiter* da 12 pozzetti è risultata necessaria al fine di evitare la formazione di acqua stagnante contenente ozono all'interno dei pozzetti per un tempo di esposizione superiore a quello concordato (1 minuto) e per massimizzare la superficie di contatto del *biofilm* all'acqua ozonizzata (Fig.11).



Fig. 11 - Trattamento con Ozono, “spraizzato” con lancia a bassa pressione, di *biofilm* in piastre da 55 mm

I risultati ottenuti dopo trattamento per **1 minuto con 4 ppm di ozono**, in quattro prove effettuate in parallelo, hanno mostrato un numero di **riduzioni decimali pari a 2,99 Log** (Tab. 9)

Tab. 9 – Effetto dell'ozono (**4 ppm**) nebulizzato mediante lancia a bassa pressione per 1 minuto su *biofilm* (5 gg) di *L. monocytogenes*. Per le prove 1, 2 e 3 i valori rappresentano la media di 5 campioni mentre per la prova 4 di 12 campioni.

	Prove				Media $\pm$ Dev. St.	N.R.D.
	1	2	3	4		
Controllo	7,88	7,76	8,28	7,69	7,90 $\pm$ 0,26	
O <sub>3</sub>	5,39	4,70	4,90	4,64	4,91 $\pm$ 0,34	2,99



Analogamente la prova è stata condotta anche su *biofilm* di *P. aeruginosa* in quattro prove replicate al fine di massimizzare i risultati e poter valutare correttamente l'azione dell'acqua ozonizzata.

I risultati hanno mostrato un numero di **riduzioni decimali pari a 1,9 Log** (Tab. 10)

Tab. 10 – Effetto dell'ozono (**4 ppm**) nebulizzato mediante lancia a bassa pressione per 1 min su *biofilm* (5 gg) di *P. aeruginosa*. Per le prove 1 e 2 i valori rappresentano la media di 5 campioni mentre per la prova 3 di 12 campioni.

	Prove			Media ± Dev. St.	N.R.D.
	1	2	3		
Controllo	7,38	7,38	7,26	7,43 ± 0,19	
O <sub>3</sub>	5,18	5,12	5,96	5,82 ± 0,88	1,9

Il processo di nebulizzazione di acqua ozonizzata a 4ppm è stato effettuato anche su *biofilm* cresciuti 72 ore sia per *Listeria* che *Pseudomonas*.

La scelta di produrre *biofilm* di 72 ore è stata decisa al fine di poter mimare una possibile formazione in ambienti di lavorazione industriali nei quali il processo di sanificazione giornaliero impedisce normalmente la formazione di **biofilm di 5 giorni**, se non in luoghi difficili da raggiungere. La chiusura dell'industria durante il fine settimana e un grossolano processo di sanificazione potrebbero invece permettere la formazione di *biofilm* in tempi equivalenti ad un **fine settimana**.

Come si può dedurre dai valori riportati in Tab. 11, l'effetto dell'ozono è risultato maggiore pari a **3,99 riduzioni decimali**.

Tab. 11 – Effetto dell'ozono (**4 ppm**) nebulizzato mediante lancia a bassa pressione per 1 min su *biofilm* (3 gg) di *L. monocytogenes*. Per le prove 1 e 2 i valori rappresentano la media di 5 campioni

	Prove		Media ± Dev. St.	N.R.D.
	1	2		
Controllo	8,51	8,49	8,50 ± 0,01	
O <sub>3</sub>	4,60	4,42	4,51 ± 0,09	3,99

Il processo di nebulizzazione è stato effettuato anche su *biofilm P. aeruginosa* in numerosi replicati al fine di massimizzare i risultati. In questa prova l'inattivazione ha dato un numero di riduzioni decimali pari a **2,78 Log** (Tab. 12)

Tab. 12– Effetto dell’ozono (**4 ppm**) nebulizzato mediante lancia a bassa pressione per 1 min su biofilm (3 gg) di *P. aeruginosa*, Per le prove 1, 2 i valori rappresentano la media di 6 campioni mentre per la prova 3 di 10 campioni

	Prove			Media ± Dev. St.	N.R.D.
	1	2	3		
Controllo	7,85	7,67	8,49	8,00 ± 0,43	
O <sub>3</sub>	5,43	5,82	4,42	5,22 ± 0,72	2,78

Sebbene esistano limiti (0,2 ppm) per la salute e la sicurezza degli operatori per quanto riguarda l’impiego dell’ozono gassoso (Anon 1998), questi non sono applicati nell’uso dell’ozono in soluzione acquosa. Questo permetterebbe l’impiego, sia in termini di sicurezza che legali, di concentrazioni più elevate ma va comunque valutato il possibile passaggio dell’ozono allo stato gassoso, specialmente se la soluzione viene “spraizzata”.

Studi effettuati dalla FTF Company (Rice e Wrenn, 2007) per valutare la concentrazione massima da impiegare, ad esempio nella pulizia mediante **spraizzazione** di macchinari e di ambienti di lavorazione di alimenti, hanno dimostrato che per il rispetto delle normative era **necessario impiegare concentrazioni < 2,5 ppm**.

A seguito di tali considerazioni sono state effettuate prove di acqua ozonizzata a concentrazione di 2 ppm.

I risultati riportati nelle Tabelle 13 e 14 dimostrano che, per *Listeria*, l’azione dell’ozono risultata maggiore su un *biofilm* cresciuto per 5 giorni rispetto a quello cresciuto 3 giorni mentre, per *Pseudomonas*, l’effetto di 2 ppm di ozono è stato di circa 2,5 riduzioni decimali indipendentemente dalla età del *biofilm*.

Tab. 13 – Effetto dell’ozono (**2 ppm**) nebulizzato mediante lancia a bassa pressione per 1 min su biofilm di *L. monocytogenes*

Tempo di incubazione	Prove	Campioni				Media ± Dev. St.	N.R.D.
		1	2	3	4		
3 giorni	Controllo	7,90	7,82	7,86		7,86 ± 0,05	-
	O <sub>3</sub>	5,28	4,95	5,86	5,13	5,30 ± 0,39	2,56
5 giorni	Controllo	7,86	7,82	7,84		7,84 ± 0,03	-
	O <sub>3</sub>	4,70	4,95	4,60		4,75 ± 0,18	3,09

Tab. 14 – Effetto dell’ozono (**2 ppm**) nebulizzato mediante lancia a bassa pressione per 1 min su biofilm di *P. aeruginosa*

Tempo di incubazione	Prove	Campioni						Media ± Dev. St.	N.R.D.
		1	2	3	4	5	6		
3 giorni	Controllo	7,72	7,93	7,81				7,82 ± 0,15	
	O <sub>3</sub>	5,36	4,49	5,59	5,72	4,99		5,23 ± 0,50	2,59
5 giorni	Controllo	7,85	7,95	7,90				7,90 ± 0,07	
	O <sub>3</sub>	5,39	5,13	5,83	5,56	5,40	5,37	5,45 ± 0,23	2,45

Le prove sono state effettuate valutando anche l’incidenza della forza meccanica dell’acqua erogata tramite lancia sull’abbattimento microbico al fine di calcolare l’effettivo contributo dell’ozono nella riduzione del biofilm.

Dal grafico (Fig. 12) si può osservare l’**influenza media della pressione esercitata dall’acqua** su *biofilm* lasciati crescere per 3 e 5 giorni per entrambi i ceppi presi in esame.

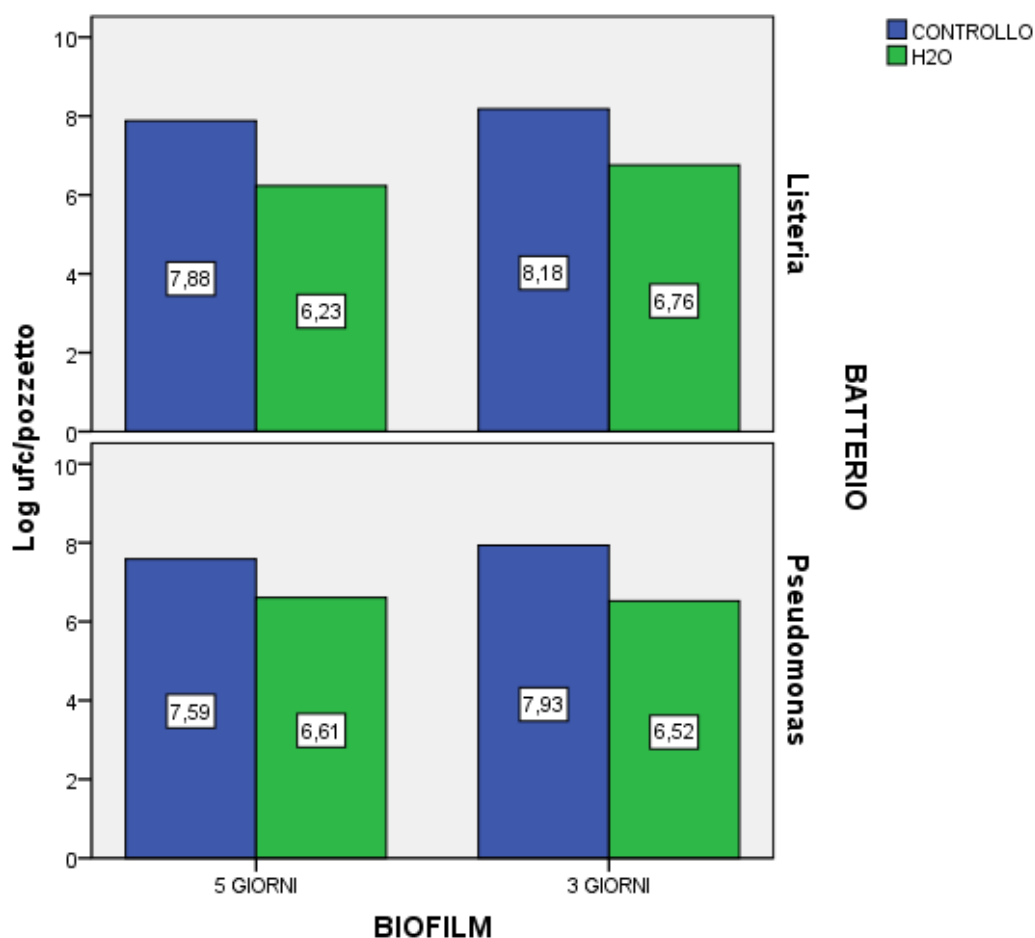


Fig. 11 – Contributo dell’acqua sul distacco dei biofilm di *Pseudomonas* e *Listeria* cresciuti in piastre da 55 mm di diametro

Il contributo nella riduzione di un *biofilm* della pressione esercitata dalla lancia risulta essere **tendenzialmente superiore in *biofilm* di 5 giorni rispetto a *biofilm* di 3 giorni**. Su *biofilm* di 3 giorni la riduzione decimale, per *Listeria*, è di 1,42 log mentre per *Pseudomonas* di 1,41 log.

**Per *biofilm* di 5 giorni la riduzione è rispettivamente di 1,65 Log per *Listeria* e 0,98 Log per *Pseudomonas*.**

I risultati sono in accordo con Piciooreanu *et al.* (2001) il quale afferma che, **a parità di condizioni idrodinamiche, *biofilm* cresciuti per un periodo prolungato sono maggiormente soggetti ad instabilità e a distacco.**

La valutazione dell'effettivo contributo dell'ozono sull'inattivazione delle cellule batteriche organizzate in *biofilm* è riportata nelle Figure 13 e 14.

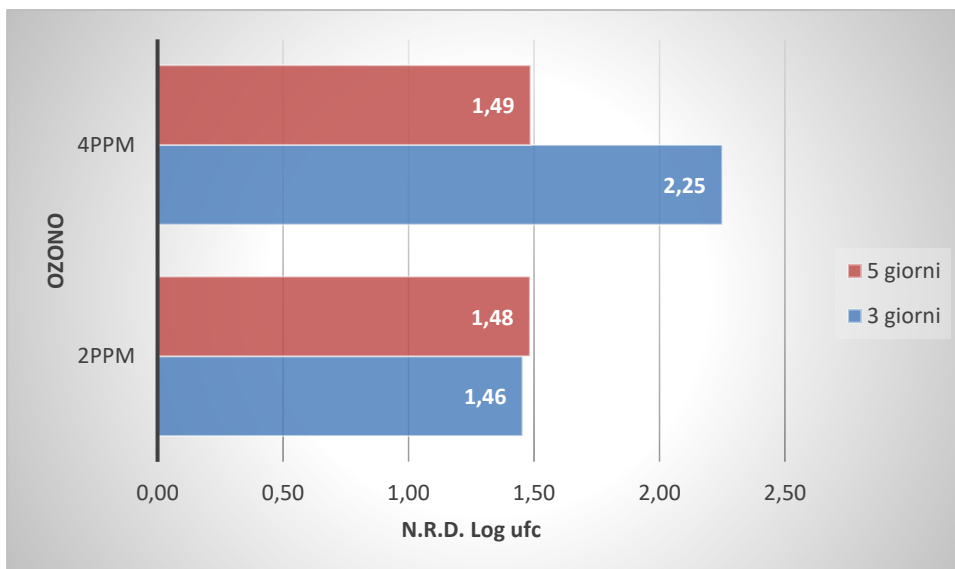


Fig. 13 – effetto dell'ozono (2 e 4 ppm) sull'inattivazione di *biofilm* di 5 o 3 giorni di *L. monocytogenes*

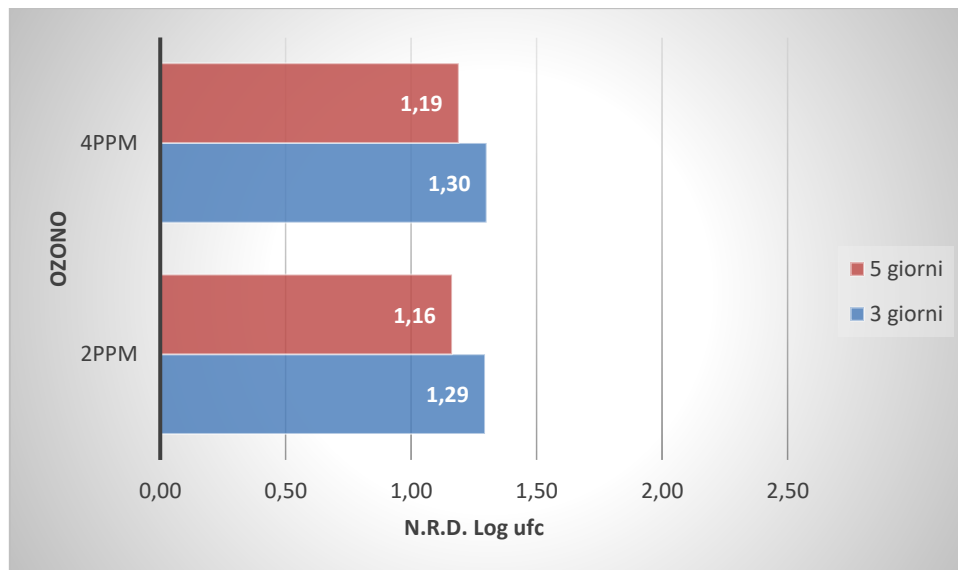


Fig. 14 – effetto dell’ozono (2 e 4 ppm) sull’inattivazione di *biofilm* di 5 o 3 giorni di *P. aeruginosa*

In relazione alla specie batterica, l’ozono ha agito maggiormente su *Listeria* rispetto a *Pseudomonas*, sia in *biofilm* lasciati crescere per 5 giorni che per 3 giorni.

È noto che l’azione battericida dell’ozono varia in funzione dei microrganismi. A basse concentrazioni danneggia la membrana esterna dei batteri Gram negativi causando cambiamenti irreversibili nella struttura cellulare. La parete cellulare dei batteri Gram positivi è meno danneggiata dall’ozono ma questo provoca danni intracellulari che determinano l’inattivazione delle cellule. In generale, il fenomeno è da attribuirsi alla diversa struttura della parete cellulare dei batteri Gram positivi e Gram negativi. La parete cellulare dei Gram positivi è costituita da molti strati di peptidoglicano che formano una struttura spessa e rigida mentre nei Gram negativi consiste di una membrana esterna che contiene lipoproteine, lipopolisaccaridi e pochi strati di peptidoglicano (Komanapalli e Lau, 1998).

Una possibile spiegazione potrebbe essere collegata alle caratteristiche di resistenza legate ai ceppi impiegati nello studio; come riportato da Bialoszewski *et. al.* (2011) ceppi di *Pseudomonas* possono tollerare concentrazioni di ozono maggiori rispetto a quelle che mostrano un’azione inattivante sui batteri Gram positivi.

A livello della matrice dei *biofilm* studi di Colagiorgi *et al.* (2016) su *Listeria* e di Czaczyk e Myszka (2007) su *Pseudomonas* hanno evidenziato la presenza di molecole differenti che potrebbero essere soggette in maniera diversa all’azione dell’ozono. *Pseudomonas* risulta essere **ricca in alginati** e DNA extracellulare che non solo garantiscono la trasmissione orizzontale dell’informazione genetica ma favoriscono l’interazione tra cellule fungendo da

ponte, in *Listeria* invece sono stati ritrovati prevalentemente acidi teicoici e esopolisaccaridi coinvolti nell'adesione a un substrato.

**In relazione al tempo di crescita**, si può osservare che l'ozono ha avuto un **maggior potere inattivante in *biofilm***, all'interno della stessa specie, **creciuti per 72 ore**, dovuto alla differente struttura esopolisaccaridica. Questa non essendosi ancora completamente formata è maggiormente soggetta all'azione di sanificanti.

A concentrazione di 2 ppm di acqua ozonizzata nebulizzata non sono state evidenziate differenze sostanziali né in funzione dei ceppi utilizzati né dei tempi di invecchiamento dei *biofilm* (Tab 13 e 14). A concentrazioni di 4 ppm l'ozono ha agito maggiormente in *biofilm* di 3 giorni rispetto a 5 giorni, questo è particolarmente evidente in *Listeria* dove si ha avuto un abbattimento della carica microbica equivalente a 3,99 Log (Tab.11) mentre nel *biofilm* lasciato crescere 5 giorni la sua azione si è ridotta a 2,99 Log (Tab.9).

Per la *Pseudomonas* i risultati osservati sono in linea con quelli ottenuti con *Listeria*. L'azione dell'ozono risulta essere maggiore per *biofilm* lasciati crescere 3 giorni e la riduzione maggiore si è ottenuta a una concentrazione di 4 ppm in cui l'ozono ha determinato 2,78 riduzioni decimali (Tab.12). A 2 ppm tuttavia l'azione dell'ozono su *biofilm* di 3 e 5 giorni è apparsa pressoché uguale ed è di poco superiore a 1 riduzione decimale (Tab.14). Il ridotto contributo potrebbe essere spiegato in funzione della bassa concentrazione di acqua ozonizzata impiegata.

Per visualizzare più chiaramente l'effetto dei trattamenti di sanificazione in funzione della concentrazione di ozono sui *biofilm* di *Listeria* e *Pseudomonas* i risultati sono stati espressi anche in termini di riduzioni percentuali.

Dal grafico (Fig. 15) si evince che l'azione dell'ozono in soluzione acquosa per *Listeria* varia in funzione dell'età del *biofilm*. **Per *biofilm* di 5 giorni la riduzione percentuale si aggira sul 96 - 97%, indipendente dalla concentrazione applicata. Su *biofilm* di 3 giorni invece l'azione massima si osserva alla concentrazione di 4 ppm con una riduzione percentuale del 99,44 delle cellule batteriche mentre a 2 ppm questa si mantiene sul 96%.**

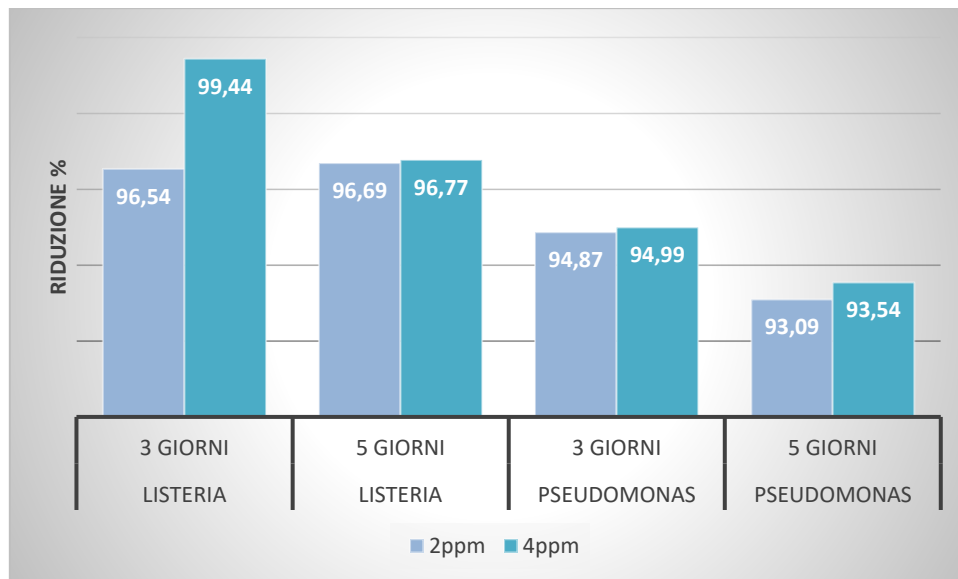


Fig. 15 – Effetto dell’ozono (2 e 4 ppm) sull’inattivazione di *biofilm* di 3 o 5 giorni di *L.monocytogenes* e *P. aeruginosa* espresso come riduzione percentuale

Anche per *Pseudomonas* si può osservare che la **riduzione percentuale è prevalentemente influenzata dal tempo di crescita del *biofilm*, aggirandosi al 94 - 95% per *biofilm* di 3 giorni e di poco inferiore, circa 93% per *biofilm* di 5 giorni.** In riferimento alle concentrazioni di ozono impiegate si può osservare che sia su *biofilm* lasciati crescere 3 o 5 giorni, la riduzione percentuale non mostri differenze.

#### **Effetto dell’ozono spruzzato su *biofilm* su *carrier* in acciaio e materiale plastico mediante analisi microscopica a scansione (SEM)**

Nel presente studio la valutazione dell’effetto dell’ozono su *biofilm* di *Listeria* e *Pseudomonas* è stata valutata principalmente calcolando il numero di riduzioni decimali ottenute da conteggio su terreno colturale mentre attraverso la **microscopia elettronica è stato valutato l’impatto dell’ozono sulla loro struttura morfologica.**

L’analisi con SEM (Fig. 16 e 17) ha evidenziato che i ***biofilm* di *Listeria* tendono ad organizzarsi come un monostrato cellulare immerso in una matrice polisaccaridica.** Presentano inoltre una ridotta produzione di polimeri EPS durante le prime 72 ore mentre dopo 5 giorni la produzione diventa più marcata. La produzione di EPS è direttamente proporzionale alla densità cellulare del *biofilm*.

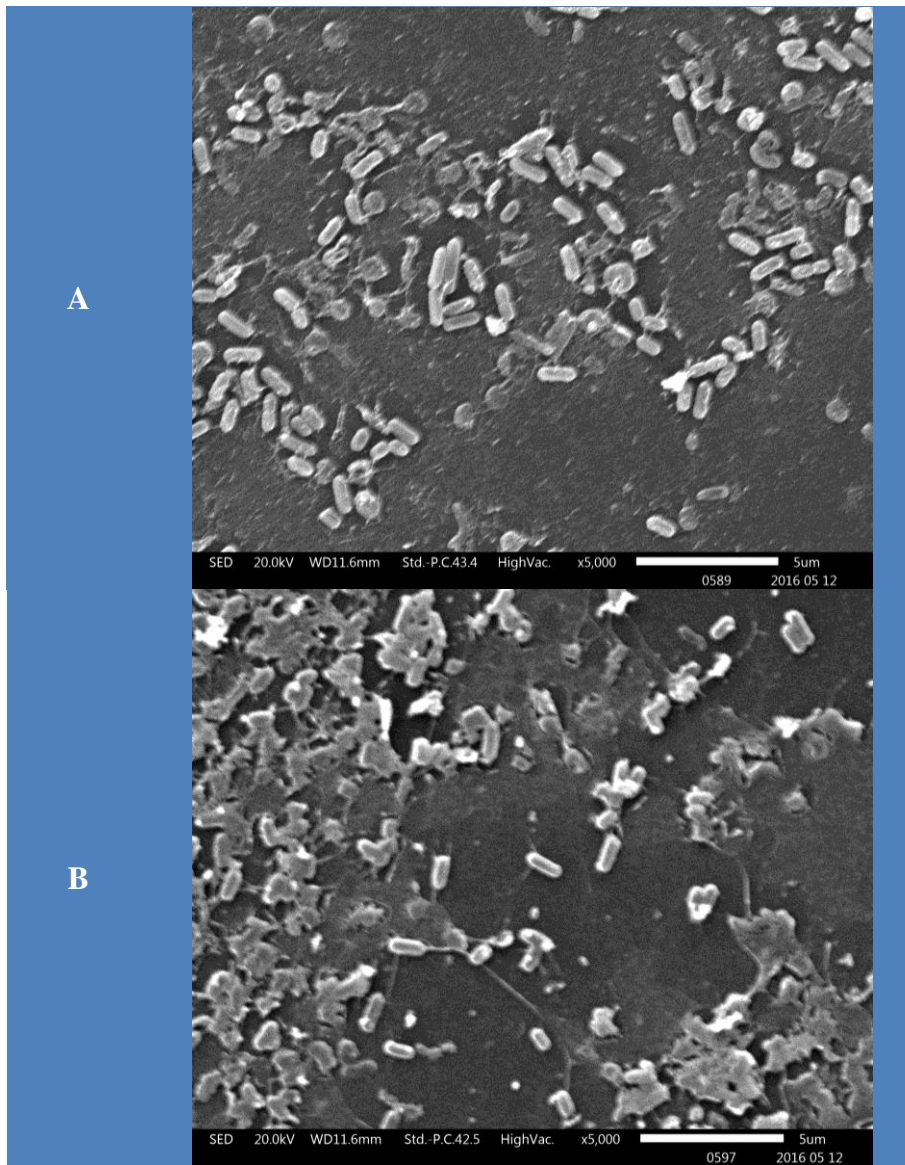


Fig. 16 – *biofilm* di *Listeria* su *carrier* di materiale **plastico** dopo 3 giorni (A) e 5 giorni (B) di accrescimento



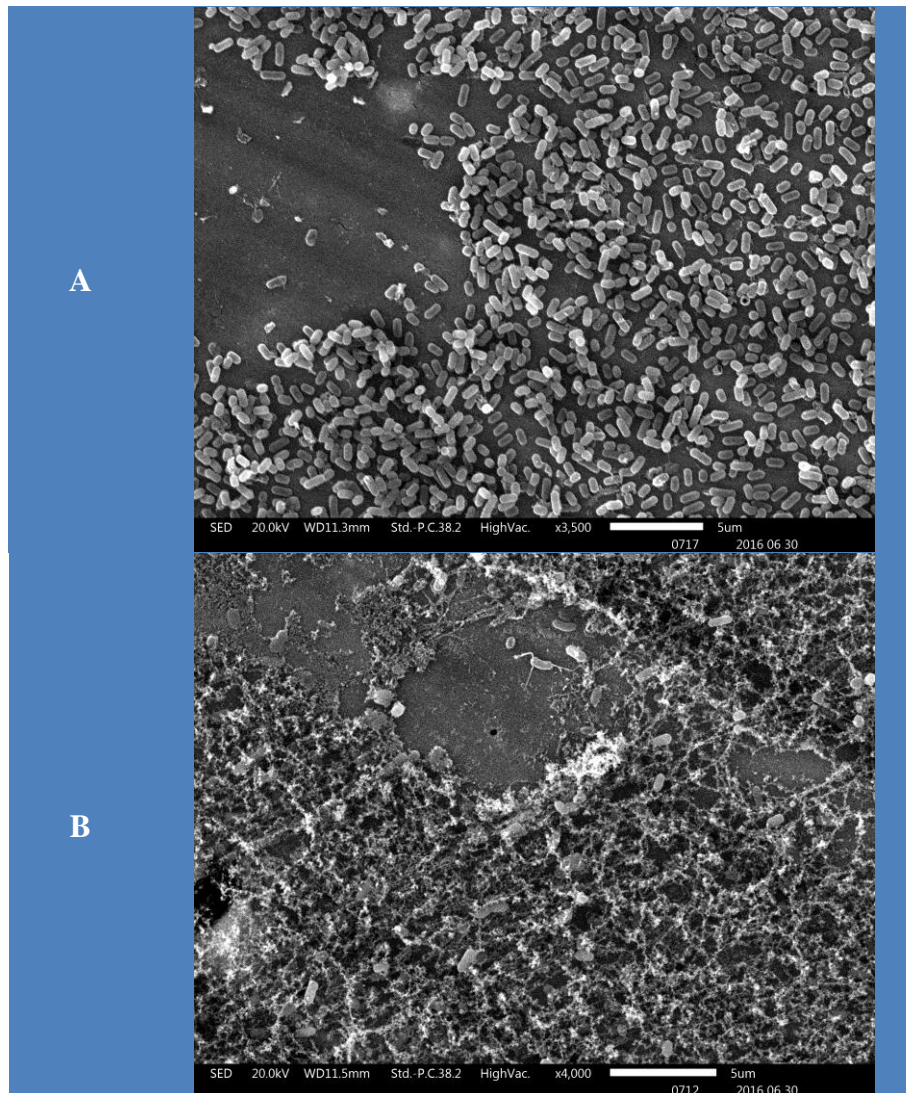


Fig. 17 – *biofilm* di *Listeria* su *carrier* di **acciaio** dopo 3 giorni (A) e 5 giorni (B) di accrescimento

***biofilm* di *Pseudomonas***, contrariamente a *Listeria*, sono costituiti da **aggregazioni cellulari multistratificate**(Fig.18 e 19) La produzione di polimeri extracellulari che costituiscono il supporto strutturale alla formazione del *biofilm* è maggiore rispetto a *Listeria* e questo **può giustificare la ridotta efficacia antimicrobica dell’ozono su questo microrganismo**. Sono inoltre evidenziabili la presenza di **fessure e canali** che permettono scambi con l’esterno di fluidi e nutrienti.

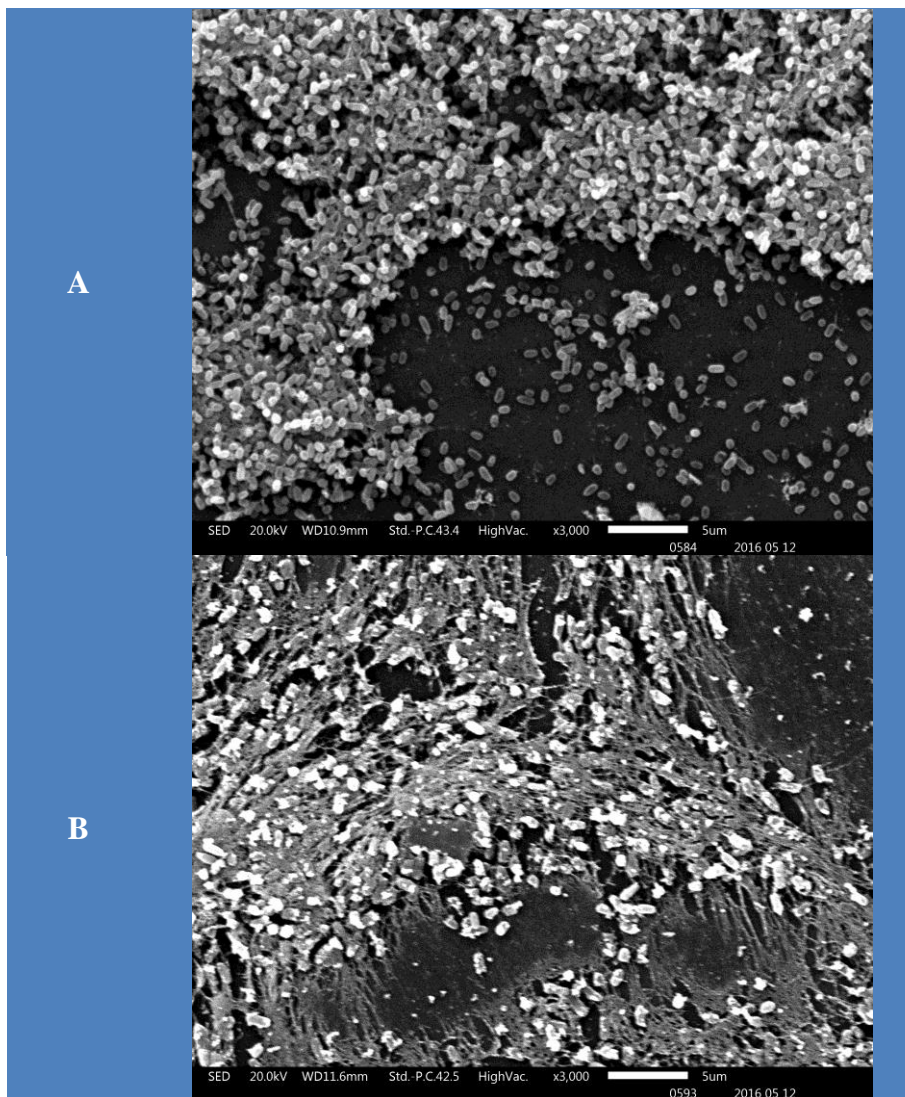


Fig. 18 – biofilm di *Pseudomonas* su carrier di materiale **plastico** dopo 3 giorni (A) e 5 giorni (B) di accrescimento

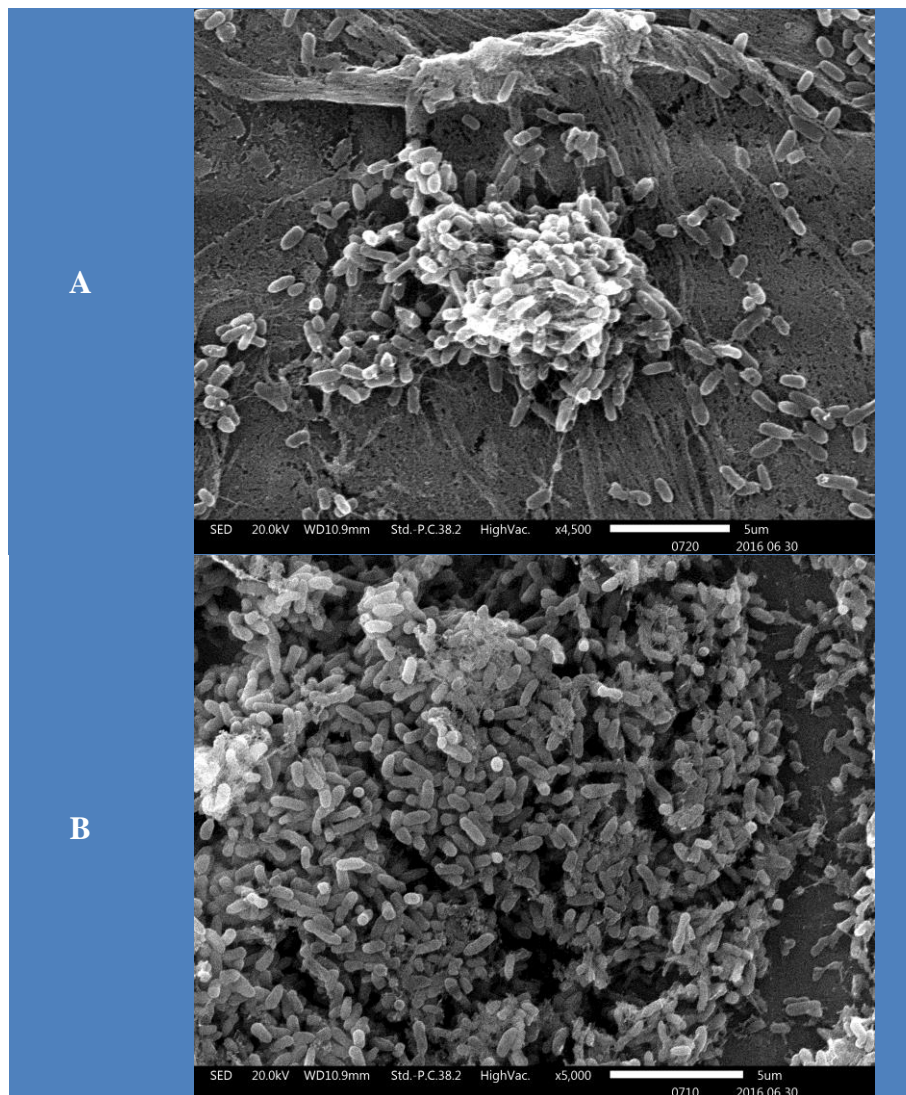


Fig. 19 – biofilm di *Pseudomonas* su carrier di **acciaio** dopo 3 giorni (A) e 5 giorni (B) di accrescimento

Sebbene le specie in esame dovrebbero formare *biofilm* con maggiore facilità su superfici idrofobiche una possibile spiegazione del risultato osservato tramite SEM può essere attribuito alle proprietà intrinseche dei *carrier* in acciaio impiegati, quali la ruvidità e la presenza di irregolarità superficiali, che possono influenzare l'adesione batterica. Un simile risultato era stato osservato anche da Botticella *et al.* (2013) il quale in studi sulla colonizzazione batterica in ambito lattiero-caseario aveva evidenziato come il PET fosse meno favorevole alla formazione di *biofilm* rispetto all'acciaio. Questo era proprio dovuto alla natura della superficie in quanto essendo la superficie del metallo più ruvida rispetto a quella del PET (liscia) era soggetta con maggiore probabilità alla formazione di *biofilm* condizionale.



E' noto che la formazione di *biofilm* è fortemente condizionata dall'instaurarsi di interazioni, idrofiliche o idrofobiche, tra la membrana cellulare del batterio e la superficie di contatto. Per tale motivo in ambito alimentare **la scelta del materiale da utilizzare nei processi di lavorazione riveste un ruolo cruciale per ridurre la formazione di *biofilm***. Numerosi autori stanno tutt'ora investigando la relazione tra la formazione di *biofilm* e il supporto al fine di ridurre il rischio di contaminazione microbica, tuttavia ad oggi i risultati appaiono ancora divergenti, probabilmente dovuto a diversi fattori quali la metodica di formazione di *biofilm* e le metodiche di misurazione/rilevazione applicate. Rodríguez *et al.* (2008) hanno infatti mostrato come *Listeria* tendesse ad aderire con maggiore facilità a superfici idrofobiche rispetto a quelle idrofiliche mentre Di Bonaventura *et al.* (2008) evidenziavano, in studi fatti per mettere in relazione la formazione di *biofilm* di *Listeria*, in funzione del supporto e della temperatura di incubazione, come il livello di *biofilm* prodotto fosse significativamente superiore in vetro e acciaio rispetto al polistirene. Gli stessi autori riportavano inoltre come la temperatura potesse influenzare le proprietà chimiche e fisiche della membrana alterando il processo di adesione mentre Briandet *et al.* (1999) sottolineavano che il maggiore responsabile nell'instaurare un contatto tra un batterio e un supporto fosse il pH in quanto influenzava lo stato di protonazione e deprotonazione delle molecole di superficie coinvolte nell'adesione. Da questo si evince che il processo di adesione a una superficie responsabile della formazione di *biofilm* sia un fenomeno multifattoriale ad oggi ancora non del tutto compreso in ogni suo aspetto (Botticella *et al.*, 2013).

Biofilm fatti crescere, per entrambe le specie in esame, su *carrier* sia in metallo che in materiale plastico **a seguito di un trattamento con 2 ppm di acqua ozonizzata nebulizzata tramite lancia a bassa pressione mostrano alcune caratteristiche peculiari a livello morfologico.**

Biofilm cresciuti in **materiali plastico trattati con 2ppm di ozono sciolto** mostrano un aspetto simile a un **fenomeno di disidratazione con formazioni di crepe lungo la matrice e mostrano evidenti segni di disgregazione sia a livello delle cellule che della matrice EPS**(Fig. 20).

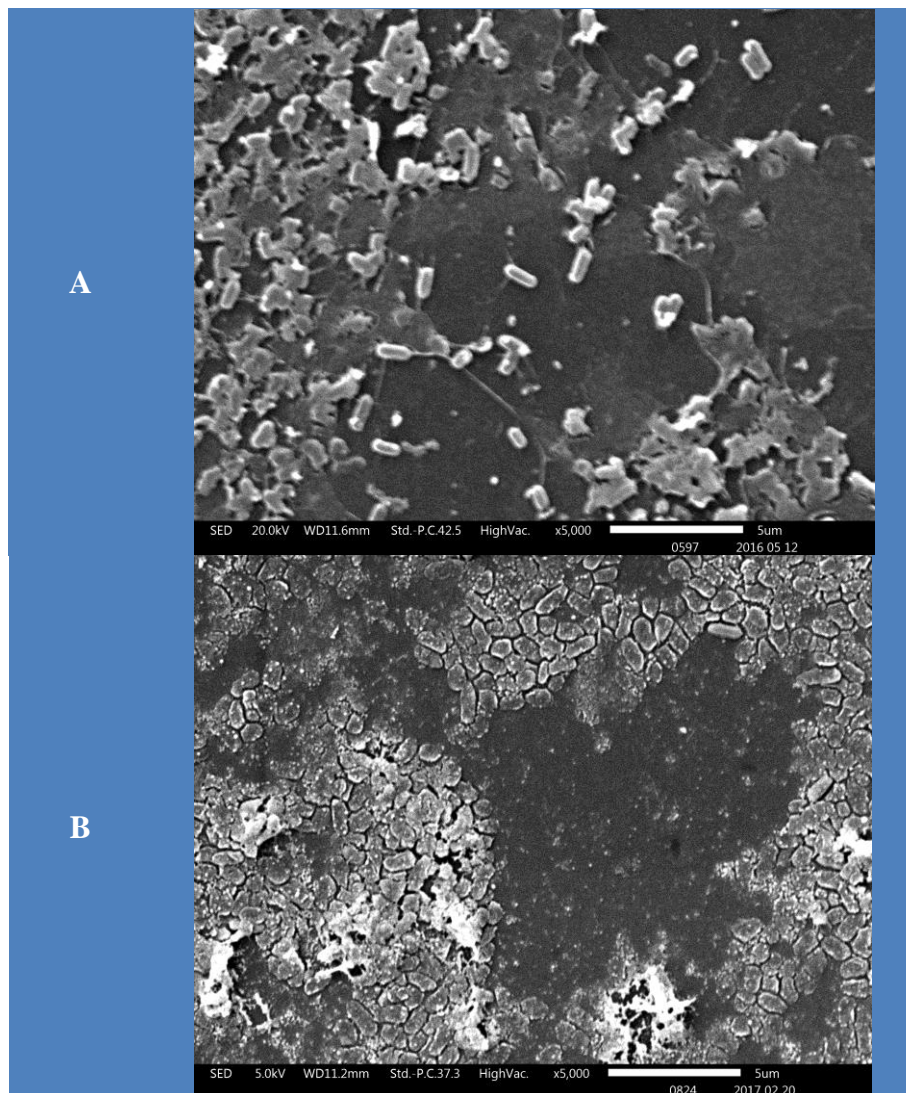


Fig. 20 – comparazione di immagini di Biofilm (5 giorni) di *Listeria* su carrier di materiale plastico non trattato (A) e trattato con 2 ppm di ozono (B).

Lo stress cellulare è particolarmente visibile in *Listeria* dove sono evidenziabili la presenza di fori nella matrice dei *biofilm* fatti crescere in un supporto metallico (Fig.21).

La superficie, per entrambe le specie appare, come riportato in letteratura (Nicholas *et al.*, 2013) liscia, appiattita e parzialmente danneggiata, con evidente distacco di porzioni polimeriche.

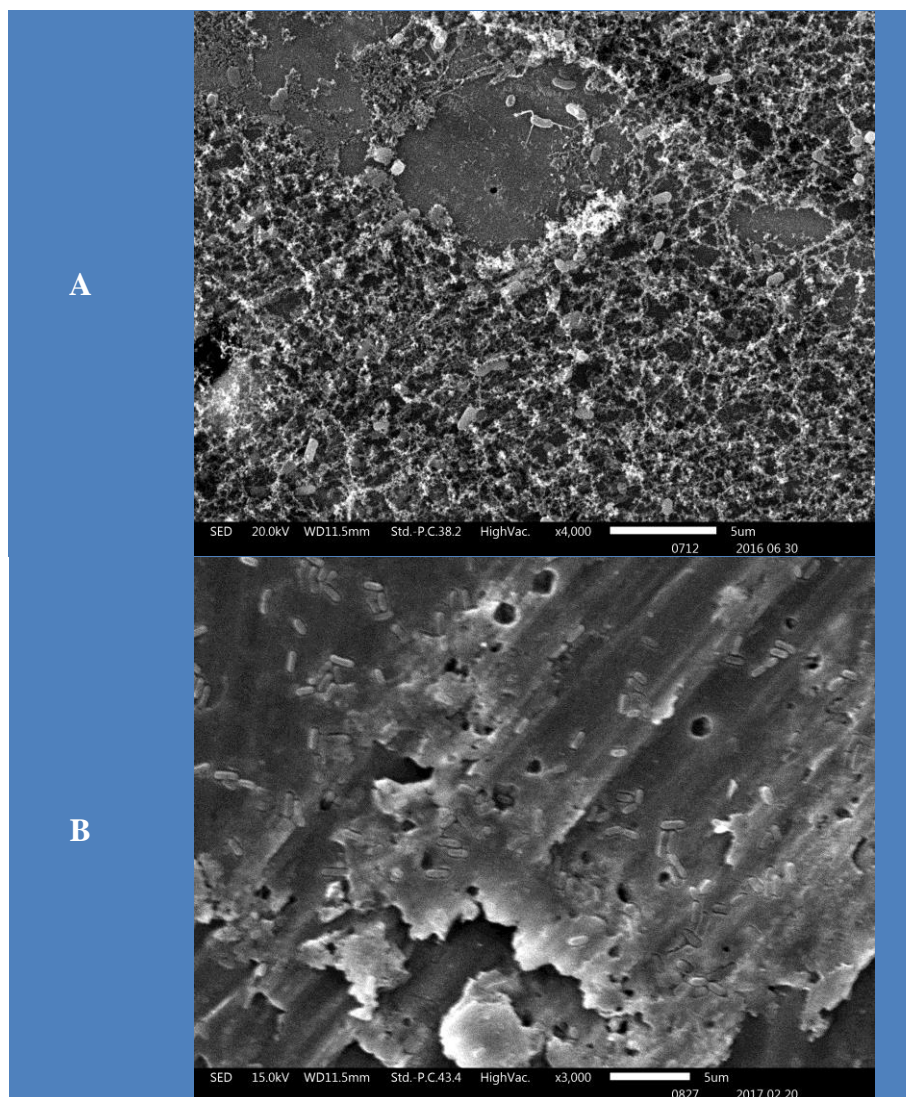


Fig. 21 – comparazione di immagini di Biofilm (5 giorni) di *Listeria* su *carrier* di acciaio non trattato (A) e trattato con 2 ppm di ozono (B).

I risultati ottenuti riflettono quanto già osservato da altri Autori (Thanomsub *et al.*, 2002; Diao *et al.*, 2004) che hanno evidenziato **la rottura della membrana cellulare e lisi, con conseguente inattivazione dei batteri, a seguito di un trattamento con ozono (Fig. 22)**. Altri studi precedentemente effettuati avevano trovato che il trattamento con ozono era in grado di danneggiare la membrane cellulare, facilitare la denaturazione delle proteine ed anche distruggere l'attività enzimatica (Scott e Lesher 1963; Murray *et al.*, 1965; Kim *et al.*, 1999; Guzel-Seydim *et al.* 2004; Cho *et al.* 2010).



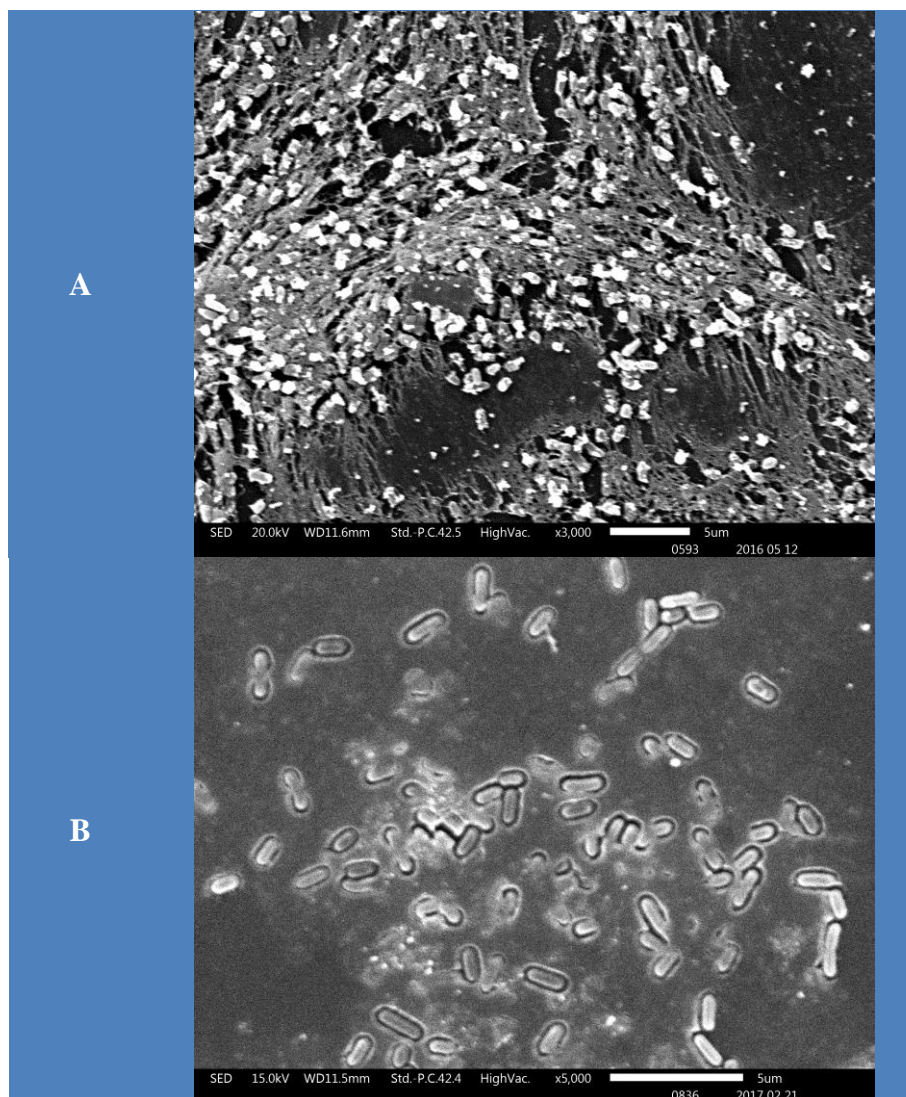


Fig. 22 – comparazione di immagini di Biofilm (5 giorni) di *Pseudomonas* su carrier di materiale plastico non trattato (A) e trattato con 2 ppm di ozono (B).

**Dall’analisi si evidenzia come l’ozono sia in grado di distruggere i batteri con il vantaggio di un tempo di contatto di 4 – 5 volte inferiore a quello ad esempio del cloro (Zuma *et al.* 2009; Zuma e Jonnalagadda 2010).**

## CONONCLUSIONI

Il presente studio ha valutato l’efficacia di un trattamento con ozono in soluzione acquosa su *biofilm* di *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa* adesi a superfici di acciaio o materiale plastico. L’azione biocida dell’acqua ozonizzata (4ppm/1minuto) erogato in continuo mediante lancia a bassa pressione è risultata pari a 3,99 RD per *Listeria* anziché 1,42 RD con l’acqua **non ozonizzata** nelle stesse condizioni e di 2,78RD anziché 1,41RD con l’acqua non ozonizzata

nelle stesse condizioni per *Pseudomonas* mentre a concentrazioni inferiori (2ppm) il numero di riduzioni decimali era di poco superiore a 1Log per entrambe le specie. L'efficacia è risultata maggiore su *biofilm* invecchiati 3 giorni.

Il tempo di contatto di 1 minuto, utilizzato nel presente studio, è stato scelto in quanto nella pratica industriale la disinfezione di ambienti di lavorazione avviene in lasso di tempo variabile tra i 15 e i 30 min, in base alla dimensione degli ambienti, e pertanto il tempo di contatto effettivo per mq raramente sarebbe superiore al minuto.

All'analisi mediante **microscopia elettronica** (SEM) apparivano **evidenti i segni dell'azione** ossidante dell'ozono sulle cellule batteriche quali la **comparsa di fori e di distacco**.

L'**ozono** in soluzione acquosa può rappresentare una soluzione efficace per **distruggere i *biofilm*** batterici. **L'azione è risultata maggiore su *Listeria* rispetto a *Pseudomonas***.

Sulla base dei risultati ottenuti l'impiego dell'ozono nelle procedure di sanificazione, nella pratica industriale, dovrà prevedere, a fronte di una corretta e costante detersione per evitare la possibile formazione di *biofilm*, una **erogazione in continuo**.

L'analisi sia in termini di costi, dei consumi e dell'efficienza del trattamento hanno infatti messo in luce che **l'impiego di ozono**, generato in situ tramite ozonizzatori, permette la **riduzione sia del tempo del processo di sanificazione da 4 a 2 fasi sia la riduzione della quantità di acqua necessaria nelle fasi risciacquo**.

Inoltre dal momento che l'ozono non richiede stoccaggio o particolare attenzione nella manipolazione l'uso come sanificante in ambito alimentare sta mostrando un interesse crescente. Il suo impiego offrirebbe infatti diversi vantaggi quali l'assenza di residui, al contrario degli altri disinfettanti chimici, il risparmio in termini di consumo, potendo essere rimossa la fase di risciacquo finale e la possibilità di riutilizzo dell'acqua ozonizzata anche per le fasi di risciacquo iniziali.

## **BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA**

Aafia, S., Rouf, A., Kanojia, V. and Ayaz, Q., Ozone Treatment in Prolongation of Shelf Life of Temperate and Tropical Fruits, *Int. J. Pure App. Biosci.* **6(2)**: 298-303 (2018). doi: <http://dx.doi.org/10.18782/2320-7051.6289>



Alwi A. N., Ali A. (2014). Reduction of *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* sv. Typhimurium populations on fresh-cut bell pepper using gaseous ozone – *Food Control* **46**: 304-311.

Angelino P. D., Golden A., Mount J. R. (2003). Effect of ozone treatment on quality of orange juice. - *IFT annual meeting book of abstracts*.

Anonymous (1998). Ozone: health hazards and precautionary measures. Guidance Note EH 38 (revised). Health and Safety Executive: UK.

Ayebah B., Hung Y. C., Kim C., Frank J. F. (2006). Efficacy of electrolyzed water in the inactivation of planktonic and biofilm *Listeria monocytogenes* in the presence of organic matter. - *J. Food Prot.* **69**: 2143-2150.

Baumann, A. R., Martin, S. E., and Feng, H. (2009). Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms from stainless steel by use of ultrasound and ozone. *J. Food Prot.* **72**, 1306–1309. doi: 10.4315/0362-028X-72.6.1306.

Beltran D., Selma M. V., Tudela J. A., Gil M. I. (2005). Effect of different sanitizers on microbial and sensory quality of fresh-cut potato strips stored under modified atmosphere or vacuum packaging. - *Postharvest Biol. Technol.* **37**: 37-46.

Bermúdez-Aguirre D., Barbosa-Cánovas G. V. (2013). Disinfection of selected vegetables under nonthermal treatments: chlorine, acid citric, ultraviolet light and ozone. - *Food Control* **29**: 82-89.

Bialoszewski D., Pietruczuk-Padzik A., Kalicinska A., Bocian E., Czajkowska M., Bukowska B. (2011). Activity of ozonated water and ozone against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. – *Med. Sci. Monit.* **17**: 339–344.

Billion J. (1978). The action of ozone in preservation of meat products. - *Revue Technique Veterinaire de L'alimentation* **16**: 41-45.

Blaschek H. P., Wang H. H, Agle M. G. (2007). Biofilms in the Food Environment. ITF Press - Willey - Blackwell Publishing.

Boles R., Thoendel M., Singh P. K. (2004). Self-generated diversity produces “insurance effects” in biofilm communities. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 16630-16635.

Botticella G., Russo P., Capozzi V., Amodio M. L., Massa S., Spano G., Beneduce L. (2013). *Listeria monocytogenes*, biofilm formation and fresh cut produce - Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. - A. Méndez-Vilas.

- Bourion, F. and Cerf, O. (1996). Disinfection efficiency against pure culture and mixed-population biofilms of *Listeria innocua* and *Pseudomonas aeruginosa* on stainless steel, Teflon and rubber. - *Sciences des Aliments* **16**: 151–166.
- Briandet R., Meylheuc T., Maher C., Bellon-Fontaine M. N. (1999). *Listeria monocytogenes* Scott A: Cell Surface Charge, Hydrophobicity, and Electron Donor and Acceptor Characteristics under Different Environmental Growth Conditions. - *Appl Environ Microbiol.* **65**: 5328–5333.
- Candia S, Morea M, Baruzzi F. (2015). Eradication of high viable loads of *Listeria monocytogenes* contaminating food-contact surfaces. *Front Microbiol.* Jul 16;6: 733. doi: 10.3389/fmicb.2015.00733. PMID: 26236306; PMCID: PMC4503923.
- Carpentier, B., Cerf O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. - *J. Appl. Bacteriol.* **75**: 499-511.
- Chmielewski R. A. N., Frank J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. - *Com. Rev. Food Sci. Food S.* **2**: 22-32.
- Cho M., Kim J., Kim J. Y., Yoon J., Kim, J. H. (2010). Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants. - *Water Res.* **44**: 3410–3418.
- Cleto S., Matos S., Kluskens L., Vieira M. J. (2012). Characterization of Contaminants from a Sanitized Milk Processing Plant - *PLoS ONE* **7**(6): e40189. doi:10.1371/journal.pone.0040189.
- CNSA, (2010). Parere del CNSA sul trattamento con ozono dell'aria negli ambienti di stagionatura dei formaggi, *Ministero della Salute*, 27 ottobre 2010.
- Colagiorgi A., Ciccio P., Zanardi E., Ghidini S., Ianieri A. (2016). A Look inside the *Listeria monocytogenes* biofilms extracellular matrix. - *Microorganisms* **4**: 22.
- Costerton, J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. - *Science* **284**: 1318-1322.
- Costerton, J. W., Irvin R. T. (1981). The bacterial glycocalyx in nature and disease. - *Annu. Rev. Microbiol.* **35**: 299-324.
- Cullen P. J., Valdramidis V. P., Tiwari B. K., Patil S., Bourke P., O'Donnell C. P. (2010). Ozone processing for food preservation: an overview on fruit juice treatments. - *Ozone Sci. Eng.* **32**: 166-179.
- Czaczyk, K., Myszka, K. (2007). Biosynthesis of Extracellular Polymeric Substances (EPS) and Its Role in Microbial Biofilm Formation. - *Polish Journal of Environmental Studies* **16**: 799-806.

Daidai M., Kobayashi F., Mtsui G., Nakamura Y. (2007). Degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) by ozonation and TiO<sub>2</sub>/UV treatment, *Journal Chemical Engineering Japan*, 40(9) September.

Deibel V., Schoeni J. (2003). Biofilms: Forming a Defense Strategy for the Food Plant - *Food Safety Magazine* **8**: 49-54.

Di Bonaventura G., Piccolomini R., Paludi, D., D'Orio V., Vergara A., Conter M., Ianieri A. (2008). Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. - *J. Appl. Microbiol.* **104**: 1552–1561.

Di Ciccio P. A. (2012). Elaborato di dottorato: Controllo della contaminazione microbica nella filiera avicola. Università di Parma.

Diao H. F., Li X. Y., Gu J. D., Shi H. C., Xie Z. M. (2004). Electron microscopic investigation of the bactericidal action of electrochemical disinfection in comparison with chlorination, ozonation and Fenton reaction. - *Process Biochem* **39**: 1421–1426.

Dogan B., Boor K. J. (2003). Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. - *Appl Environ. Microbiol.* **69**: 130–138.

Domenicali G. (2011). Elaborato di Tesi: uso dell'ozono nel trattamento di percolato di discarica. Università di Padova.

Donlan R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. - *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 881-890.

Donlan R. M., Costerton J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. - *Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 167–193.

Dosti B., Güzel-Seydim Z. B., Wiffels J. T., Greene A. K. (2005). Effectiveness of ozone, heat and chlorine for destroying common food spoilage bacteria in synthetic media and biofilm. - *Int. Journal of Dairy Technology* **58**: 19-24.

Dufresne S, Leblond H, Chaunet, Marc. Relationship between lumen diameter and length sterilized in the 125L ozone sterilizer. *American journal of infection control* [online]. 2008; 36(4): 291-297.

Dunne, W. M Jr. (2002). Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? - *Clin Microbiol Rev* **15**: 155-166.

Dutta D., Cole N., Willcox M. (2012). Factors influencing bacterial adhesion to contact lenses. - *Mol Vis.* **18**: 14–21.

Ebihara K., Ikegami T., Mitsugi F., Ikegami T., Stryczwska D. H., Gyoutoku Y. (2008). Gaseous ozone soil sterilization and biological properties - The Symposium on the

Applications of Plasma to Bio-Medical Engineering, Lunghwa University of Science and Technology, Taiwan: 21-24.

Elder, M. J., Stapleton F., Evans E., J. Dart K. G (1995). Biofilm-related infections in ophthalmology - *Eye* 9: 102-109.

Eriksson M. (2005). Ozone chemistry in aqueous solution: Ozone decomposition and stabilization - Licentiate Thesis.

Flemming H. C. (2007). The EPS matrix: the "House of biofilm cells" - *J Bacteriol* **189**: 7945-7947.

Flemming H. C., Wingender J. (2010). The biofilm matrix. - *Nat Rev Microbiol.* **8**: 623-633.

Forney C. F., Song J., Fan L., Hildebrand P. D., Jordan M. A. (2003). Ozone and 1-methylcyclopropene alter the postharvest quality of broccoli. - *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **128**: 403-408.

Frank, J. F., Koffi R. A. (1990). Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. - *J. Food Prot.* **53**: 550-554.

Gahan C. G., O'Driscoll B., Hill C. (1996). Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. - *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3128-3132.

Gandhi M., Chikidas M.L. (2007). *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive - *Int. J. Food Microbiol.* **113**: 1-15.

Gabler F. M., Smilanick J. L., Mansour M. F. and Karaca H. (2010). Influence of fumigation with high concentrations of ozone gas on postharvest gray mold and fungicide residues on table grapes, *Postharvest Biology and Technology*, 55(2) February 2010, 85900925-5214.

Garrity G. M., Bell J. A., Lilburn T. (2005). Family *Pseudomonadaceae*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 2, New York, Springer: 323.

Gennari M., Dragotto F. (1992). A study of the incidence of different fluorescent *Pseudomonas* spp. and biovars in the microflora of fresh and spoiled meat and fish, raw milk, cheese, soil and water. - *J. Appl. Bacteriol.* **72**: 281-288.

Gibson, H., Taylor; J. H., Hall K. E. and Holah J. T. (1999). Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. - *J. Appl. Microbiol.* **87**: 41-48

Gibson, H., Taylor, J. H., Hall, K. E., Holah, J. T. (1995). Biofilms and their detection in the food industry - R&D Report No. 1. Chipping Campden, UK: Campden and Chorleywood Food Research Association

Gualandi G. (2004). *Listeria*. In Trattato di Malattie Infettive Degli Animali, seconda edizione, a cura di Renato Farina, Franco Scamozza, UTET, 22: 285-293

Gonçalves, A.A. (2016). Ozone as a Safe and Environmentally Friendly Tool for the Seafood Industry. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25:2,210-29, DOI:10.1080/10498850.2013.841785

Gunduz G. T., Tuncel G. (2006). Biofilm formation in an ice cream plant - *Antonie Van Leeuwenhoek* 89: 329-36.

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

Hanna Scott E., Wang Hua H. (2007). Biofilm development by *Listeria monocytogenes*. In *Biofilm in the food environment*, Blackwell Publishing IFT press, 47-71

Hefford M.A., S. D'Aoust, T.D. Cyr, Austin J.W., Sanders G., Kheradpir E., Kalmokoff M.L. (2005). Proteomic and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* 568 - *Canadian Journal of Microbiology* 51:197:208

Horvath M., Bilitzky L. D., Huttner J. (1985). Ozone – *Elsevier*.

Hwang E.S., Cash J. N. AND Zabik M. J. (2002). Degradation of Mancozeb and Ethylenethiourea in apples due to postharvest treatments and processing, *Journal of Food Science*, 679 November 2002).

Hwang E.S., Cash J. N. and Zabik, M. J. (2001a). Postharvest treatments for the reduction of Mancozeb in fresh apples, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 496 May 2001).

Hwang E.S., Cash J. N. and Zabik M. J. (2001b). Ozone and hydrogen peroxyacetic acid treatment to reduce or remove EBDCs and ETU residues in solution, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4911 November 2011).

Hu, H., Cai, L., Dong, Y., *et al.* (2019). Modeling the degradation of acidic electrolyzed water and its ability to disinfect a dual-species biofilm, *LWT*, Volume 104, 159-164, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.029>.

Jefferson K. K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? - *FEMS Microbiology Letters*, 236: 63-173

Jiang, H. J., N. Chen, Z. Q. Shen, J. Yin, Z. G. Qiu, J. Miao, Z. W. Yang, D. Y. Shi, H. R. Wang, X. W. Wang, *et al.* (2019). "Inactivation of Poliovirus by Ozone and the Impact of

Ozone on the Viral Genome.” *Biomedical and Environmental Sciences* 32 (5):324–33. doi:10.3967/bes2019.044.

Jones H. C., Roth I. L., Sanders W. M. (1969).<sup>3rd</sup> Electron microscopic study of a slime layer. – *J. Bacteriol.* **99**: 316–325

Kaplan J. B. (2010). Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses - *J. Dent. Res.* **89**: 205–218

Karaca H. and Velioglu Y. S. (2007). Ozone applications in fruit and vegetable processing, *Food Reviews International*, 23 February 2007.

Khadre M. A., Yousef A. E. (2001). Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study. - *Int. J. Food Microbiol.* **71**: 131-138

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

Kim J. G. (1998). Ozone as antimicrobial agent in minimally processed foods. – (PhD. thesis) 50-199

Kim J. G., Yousef A. E., Dave S. (1999). Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of food: A review - *J. Food Protect.* **62**: 1071-1087

Kim J. G., Yousef A. E., Khandre M. A. (2003). Ozone and its current and future application in food industry. - *Advances in food and nutrition research* **45**: 168-218

Kjelleberg S., Givskov M. (2007). *The Biofilm Mode of Life: Mechanisms and Adaptations* Horizon Bioscience: Norfolk, UK.

Komanapalli I. R., Lau B. H. (1998). Inactivation of Bacteriophage lambda, *Escherichia coli*, and *Candida albicans* by ozone. – *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 766-9

Koutsoumanis K., Sofos J. N. (2005). Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and aw limits for growth of *Listeria monocytogenes*. - *Int. J. Food Microbiol.* **104**: 83-91

Kumar C.G., Anand S.K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review - *Int. J. Food Microbiol.* **42**: 9–27

Lagrange F., Reiprich W., Hoffmann M. (2004). CIP-Cleaning and disinfection with ozone water – *Fleischwirtschaft.* **84**: 112-114

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

- Larimer, C., Winder, E., Jeters, R., Prowant M., Nettleship I., Addleman R. S. (2016). Method for rapid quantitative assessment of biofilms with biomolecular staining and image analysis - *Anal. Bioanal. Chem.* **408**: 999-1008
- Leriche V. and Carpentier B. (2000). Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms, - *J. Applied Microbiol.* **88**: 594-605
- Liangji Xu (1999) Use of ozone to improve safety of fresh fruits and vegetables. - *Food Technology* **53**: 58-62.
- Li, C. S., and Y. C. Wang. (2003). "Surface Germicidal Effects of Ozone for Microorganisms." *American Industrial Hygiene Association Journal* 64 (4):533-37. doi:10.1080/15428110308984851.
- Liew C. L., Prange R. K. (1994). Effect of ozone and storage temperature on postharvest diseases and physiology of carrots (*Daucus carota* L.) - *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **119**: 563-567
- Mahapatra A. K., Muthukumarappan K, Julson J. L. (2005). Applications of Ozone, Bacteriocins and Irradiation in Food Processing: A Review. - *Food Science and Nutrition* **45**: 447-461
- Martins R. B., Castro, I. A. Pontelli M. et al. (2021). SARS-CoV-2 Inactivation by Ozonated Water: A Preliminary Alternative for Environmental Disinfection, *Ozone: Science & Engineering*, 43:2,108-111, DOI: 10.1080/01919512.2020.1842998
- Mastronicolis S. K., Berberi A., Diakogiannis I., Petrova E., Kiaki I., Baltzi T., Xenikakis P. (2010). Alteration of the phospho- or neutral lipid content and fatty acid composition in *Listeria monocytogenes* due to acid adaptation mechanisms for hydrochloric, acetic and lactic acids at pH 5.5 or benzoic acid at neutral pH - *Antonie Van Leeuwenhoek* **98**: 307-316.
- Mastronicolis S. K., Boura A., Karaliota A., Magiatis P., Arvanitis N., Litos C., Tsakirakis A., Paraskevas P., Moustaka H., Heropoulos G. (2006). Effect of cold temperature on the composition of different lipid classes of foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*: focus on neutral lipids. - *Food Microbiol.* **23**: 183-194
- Mazumder S., Falkinham III J. O., Dietrich A. M., Puri I. K. (2010). Role of hydrophobicity in bacterial adherence to carbon nanostructures and biofilm formation - Biofouling: *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research* **26**: 333-339
- McLauchlin J., Rees C. E. D. (2005). Genus *Listeria* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 3, New York, Springer: 244
- McLauchlin J., Mitchell R. T., Smerdon W. J., Jewell K. (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods - *Int. J. Food Microbiol.* **92**: 15-33

- Menzel D. B. (1971).Oxidation of biologically active reducing substances by ozone - *Archives of Environmental Health* **23**: 149-53
- Menzel D. B. (1984).Ozone: an overview of its toxicity in man and animals – *J. Toxicol. Environ. Health* **13**: 183-204
- Miller F. A., Silva C. L., Brandão T. R. (2013). A review on ozone-based treatments for fruit and vegetables preservation. *Food Eng. Rev.* 5 77–106. 10.1007/s12393-013-9064-5
- Moat, J., Cargill, J., Shone, J., and Upton, M. (2009). Application of a novel decontamination process using gaseous ozone. *Can J Microbiol* 55, 928.
- Moltz A. G., Martin S. E. (2005). Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. - *J. Food Prot.* **68**: 92-97.
- Mosteller T. M., Bishop J. R. (1993). Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. - *J. Food Prot.* **56**:34–41.
- Murray R. G. E., Steed P., Elson H. E. (1965).The location of mucopeptide of selection of the cell wall of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. – *Can. J. Microbiol.* **11**: 547–560
- Nicholas R., Dunton P., Tatham A. and Fielding L. (2013).The effect of ozone and open air factor on surface-attached and biofilm environmental *Listeria monocytogenes*. – *J. Appl. Microbiol.* **115**: 555-564
- Norwood D. E., Gilmour A. (2000).The growth and tolerance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. - *J. Appl. Microbiol.* **88**: 512-520.
- Nutsch L. A., Phebus R. K., Riemann M. J., Kotrala J. S., Wilson R. C. (1998).Steam pasteurization of commercially slaughtered beef carcasses: evaluation of bacterial population at five anatomical locations. - *J. Food Prot.* **61**: 571.
- O'Donnell C., Tiwari B. K. , Cullen P. J., Rice R. G. (2012).Ozone in Food Processing - Wiley-Blackwell
- O'Driscoll B., Gahan C. G., Hill C. (1996).Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant that demonstrates increased virulence. – *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1693–1698
- Ogawa J. M., Feliciano A. J., Manji B. T. (1990).Evaluation of ozone as a disinfectant in postharvest dump tank treatments for tomato. - *Phytopathology* **80**: 1020
- Ohkawa, H., Tsuji, M., Ohtsuki, K., Ohnishi, M. and Akitsu, T. (2005).High Density Ozone Disinfection of Medical-Care Materials for Dental Surgery. - *Plasma Processes and Polymers* **2**: 112-119



- Oner M.E., Walker P. N., Demirci A. (2011).Effect of in-package gaseous ozone treatment on shelf life of blanched potato strips during refrigerated storage - *International Journal of Food Science & Technology* **46**: 406-412
- O'Toole G. A. (2011).Microtiter dish biofilm formation assay. - *J. Vis. Exp.* **30**: 2437
- Ozkan R., Smilanick J. L., Karabulut O. A. (2003).Toxicity of ozone gas to conidia of *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, and *Botrytis cinerea* and control of gray mold on table grapes. - *Postharvest Biol. Tec.* **60**: 47–51
- Packman R., Adam D. (2005).Resolving the rising cost of water effluent. - *International Food Hygiene* **16**: 5-8.
- Palmer J., Flint S., Brooks J. (2007).Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. - *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 577–58
- Pascual A., Llorca I., Canut A. (2007).Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities, *Trends in Food Science & Technology*, **18**:29-35.
- Patil, S., Valdramidis, V. P., Karatzas, K. A. G., Cullen, P. J., Bourke P. (2011).Assessing the microbial oxidative stress mechanism of ozone treatment through the responses of *Escherichia coli* mutants. – *J. Appl. Microbiol.* **111**: 136–144.
- Possas, A., Perez-Rodrigues, F. Tarlak, F and Garcia-Gimeno, R.(2021). Quantifying and modelling the inactivation of *Listeria monocytogenes* by electrolyzed water on food contact surfaces. *Journal of Food Engineering* 290. doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110287
- Perez A.G., Sanz C, Rios J. J., Olias R, Olias J. M. (1999).Effects of ozone treatment on postharvest strawberry quality. – *J. Agric. Food Chem.* **47**: 1652-1656
- Picioreanu C., Van Loosdrecht M. C. M., Heijnen J. J. (2001). Two-dimensional model of biofilm detachment caused by internal stress from liquid flow. -*Biotechnol Bioeng.* **72**: 205-218.
- Segat, A., Biasutti, M., Iacumin, L., Comi, G., Baruzzi, F., Carboni, C., *et al.* (2014). Use of ozone in production chain of high moisture Mozzarella cheese. *LWT – Food Sci. Technol.* **55**, 513–520. doi: 10.1016/j.lwt.2013.10.029.
- Selma, M. V., Allende, A., López-Gálvez, F., Conesa, M. A., & Gil, M. I. (2008). Disinfection potential of ozone, ultraviolet-C and their combination in wash water for the fresh-cut vegetable industry. *Food Microbiology*, **25**, 809e814.

Smeets E, Kooman J, van der Sande F, Stobberingh E, Frederik P, Claessens P, *et al.* (2003). Prevention of biofilm formation in dialysis water treatment systems. *Kidney Int*; **63**:1574-6.

Restaino L., Frampton E.W., Hemphill J.B. and Palnikar P. (1995). Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. - *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3471-3475

Rice G., Wrenn R. H., (2007). Improving Fish Quality By Means of Ozone at Fresher than Fresh, Inc. – in Proceedings of IOA Conference and Exhibition Valencia, Spain - October 29 – 31.

Robbins J. B., Fisher C. W., Moltz A. G., Martin S.E. (2004) Elimination of *Listeria monocytogenes* biofilms by ozone, chlorine, and hydrogen peroxide. - *J. Food Protect.* **68**: 494 -498

Rodríguez A., Autio W. R., McLandsborough, L. A. (2008). Effect of surface roughness and stainless steel finish on *Listeria monocytogenes* attachment and biofilm formation. - *J. Food Prot.* **71**: 170-175

Roy D., Wong P. K., Engelbrecht R. S., Chian E. S. (1981) Mechanism of enteroviral inactivation by ozone – *Appl. Environ. Microbiology* **41**: 718-723

Roy, D., Englebrecht, R. S., & Chian, E. S. K. (1982) Comparative inactivation of six enteroviruses by ozone. - *Journal of the American Water Works Association* **74**: 660-664.

Selma, M. V., Allende, A., López-Gálvez, F., Conesa, M. A., & Gil, M. I. (2008). Disinfection potential of ozone, ultraviolet-C and their combination in wash water for the fresh-cut vegetable industry. *Food Microbiology*, **25**, 809e814.

Scott, D. B. M., Leshner, E. C. (1963) Effect of ozone on survival and permeability of *Escherichia coli*. – *J. Bacteriol.* **85**: 567–576

Sharpe D., Fan L., McRae K., Walker B., MacKay R., Doucette C. (2009). Effects of ozone treatment on *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* in relation to horticultural product quality. - *Journal of Food Science* **74**: 250-257

Shin G., Sobsey M. D. (2003). Reduction of Norwalk Virus, Poliovirus 1, and Bacteriophage MS2 by Ozone Disinfection of Water. - *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 3975-3978

Simões M., Simões L., Vieira A. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. - *Food Science and Technology* **43**: 573-583.

Somers E. B., Wong A. C. (2004). Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. – *J. Food Prot.* **67**: 2218-29.

Staelin, J., & Hoigné, J. (1985). Decomposition of ozone in water in the presence of organic solutes acting as promoters and inhibitors of radical chain reactions. *Environmental Science & Technology*, 19, 1206-1213.

Thanomsub B., Anupunpisit V., Chanphetch S., Watcharachaipong T., Poonkhum R., Srisukonth C. (2002). Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. – *J. Gen. Appl. Microbiol.* **48**: 193–199.

Tizaoui, C. 2020. “Ozone: A Potential Oxidant for COVID-19 Virus (Sars-cov-2).” *Ozone: Science and Engineering* 42(5):378–85. doi:10.1080/01919512.2020.1795614.

Wells K. H., Latino J., Gavalchin J., Poiesz B. J. (1991). Inactivation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 by Ozone *In Vitro*. - *Blood* **78**: 1882-1890

Wiedmann M., Weilmeier D., Dineen S.S., Ralyea R., Boor K. (2000). Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. – *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2085–2095.

Wolf, C.; von Gunten, U.; Kohn, T., Kinetics of Inactivation of Waterborne Enteric Viruses by Ozone. *Environ. Sci. Technol.* **2018**, 52, 2170-2177

Wu J. G., Luan T., Lan C., Lo T. W. H. and Chan G. Y. S. (2007). Removal of residual pesticides on vegetable using ozonated water, *Food Control*, 185May 2007), 4664720956-7135

Zambre S. S., Venkatesh K. V., Shah N. G. (2010). Tomato redness for assessing ozone treatment to extend the shelf life. – *J. Food. Eng.* **96**: 463-468

Zobell C. E., Grant C. W. (1943). Bacterial Utilization of Low Concentrations of Organic Matter. - *J. Bacteriol.* **45**: 555–564

Zuma F. N., Jonnalagadda S. B. (2010). Studies on the O<sub>3</sub>- initiated disinfection from Gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* in aquatic systems. – *J. Environ. Sci. Heal.* **45**: 224–232

Zuma F., Lin J., Jonnalagadda S. B. (2009). Ozone-initiated disinfection kinetics of *Escherichia coli* in water. – *J. Environ. Sci. Heal.* **44**: 48–56

[Http://www.sepra.it/static-26-generalita-sullozono-c-ozono-6.html](http://www.sepra.it/static-26-generalita-sullozono-c-ozono-6.html)

[Http://www.users.unimi.it/citratriz/micro\\_elettr/lobro/fissazione.htm](http://www.users.unimi.it/citratriz/micro_elettr/lobro/fissazione.htm)

<https://www.georgofili.info/contenuti/sanificazione-ambientale-con-lozono-nell-industria-alimentare/15621>