

STUDIO DELL'UTILIZZO DELL'OZONO GASSOSO COME SANIFICANTE NELL'INDUSTRIA DELLE CARNI

USE OF GASEOUS OZONE AS A DISINFECTANT IN MEAT INDUSTRY

Ripamonti B., Bersani C., Pirani S., Stella S.

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza
Alimentare, Università degli Studi di Milano

SUMMARY - The aim of this study was to investigate the possible use of gaseous ozone as a disinfectant for meat industry environments. Firstly microbial inactivation trials were conducted in laboratory conditions on Petri plates inoculated with some microorganisms of importance to the food industry. The treatment with 1 ppm of ozone resulted to be effective in 1 h on the strains in use. Then similar trials were conducted in a meat industry, 1 ppm of ozone was supplied for 3 h. The results confirmed the antimicrobial efficacy of ozone even if it was less active than in laboratory conditions. A different sensibility among the microorganisms was observed, the most resistant being *P. fluorescens* and *B. thuringiensis*. Our results confirm the suitability of gaseous ozone as a disinfectant for meat industry environments and underline the need to calibrate ozone treatment parameters on the real environmental conditions of work-room.

KEY WORDS: gaseous ozone, antimicrobial activity, meat industry.

INTRODUZIONE - La preferenza dei consumatori per alimenti sempre meno trattati e privi di conservanti e l'identificazione di nuovi patogeni nei prodotti alimentari pongono l'esigenza di trovare sistemi alternativi per la garanzia della salubrità e della qualità microbiologica degli alimenti. I processi di sanificazione rivestono un ruolo centrale nel prevenire e limitare le contaminazioni da parte dei microrganismi patogeni ed alteranti: la FDA americana ha infatti inserito la sanificazione ambientale fra le "top 10" problematiche del settore alimentare (1). Tra le diverse cause di contaminazione vengono individuati tre differenti punti di criticità: scarsa efficacia dei disinfettanti utilizzati, corrosione dei materiali a contatto con gli alimenti e contaminazione dei prodotti alimentari con i residui di sanificazione. Recentemente, oltre alle metodiche di disinfezione già in uso, quali l'applicazione di trattamenti termici o composti chimici, è stato proposto in diverse realtà produttive l'utilizzo dell'ozono come principio di disinfezione alternativo.

L'ozono è un gas instabile composto da tre atomi di ossigeno (O₃) ed è presente allo stato naturale nell'atmosfera. È uno dei più potenti disinfettanti conosciuti ed ha il più alto potere ossidante (10 volte il cloro); è molto efficace anche a basse concentrazioni nei confronti di un'ampia gamma di microrganismi (5) e non lascia nessun residuo né sottoprodotto tossico. Restaino *et al.* (9) hanno verificato l'azione antimicrobica dell'acqua trattata

con l'ozono nei confronti dei batteri che contaminano gli alimenti ed hanno effettivamente riscontrato che questo composto è in grado di distruggere batteri Gram positivi e Gram negativi, lieviti e spore fungine. Inoltre, diversi studi hanno evidenziato l'efficacia antibatterica ed antimicotica dell'ozono gassoso come agente di disinfezione negli ambienti di lavorazione degli alimenti (8,11).

L'utilizzo dell'ozono può essere vantaggioso anche dal punto di vista economico se si considera che i costi per l'acquisto e la manutenzione delle unità di erogazione risultano più bassi rispetto al costo di approvvigionamento dei prodotti disinfettanti (3). Va anche sottolineato che l'impiego di prodotti chimici per la disinfezione nell'industria alimentare pone un problema di inquinamento dovuto al crescente accumulo ambientale, mentre l'ozono non lascia residui. La sua molecola si decompone spontaneamente a O₂ minimizzando i rischi per la salute umana, legati all'inalazione di elevate quantità di ozono (2,4). L'ozono ambientale residuo può essere eliminato posizionando delle ventole nei locali o utilizzando appositi strumenti "distruttori" (10).

Gli impieghi per i quali è suggerito nell'industria alimentare sono molteplici: il lavaggio delle derrate prima che vengano confezionate ed inviate a supermercati, ristoranti e negozi; il trattamento igienico delle superfici; la disinfezione delle attrezzature a contatto con gli alimenti; la disinfezione del materiale usato per il confezionamento e l'imballaggio; il riciclo dell'acqua di scarico (7,10).

Il nostro studio si inserisce nell'ambito di un progetto di ricerca che ha l'obiettivo di indagare il possibile utilizzo dell'ozono in diversi settori della produzione di alimenti di origine animale. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'ozonizzazione dell'aria come trattamento di disinfezione per le superfici e gli impianti nell'industria delle carni. Sono state effettuate delle prove di abbattimento microbico in laboratorio per stabilire le parametri di utilizzo nei locali aziendali; questi sono stati successivamente applicati in una struttura produttiva valutandone l'efficacia nelle condizioni di normale lavorazione.

MATERIALI E METODI

Prove in laboratorio - Per le prove di abbattimento condotte in laboratorio sono state allestite delle brodocolture a concentrazione nota dei seguenti microrganismi: *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6358), *Bacillus thuringiensis* (collezione interna), *Escherichia coli* (ATCC 25988), *Pseudomonas fluorescens* (coll. interna) e *Saccharomyces cerevisiae* (coll. interna). Si è poi effettuata la semina delle brodocolture su terreni non selettivi mediante spatolamento. Le piastre sono state quindi sottoposte ad ozonizzazione per 1 ora collocandole in un contenitore ermetico delle dimensioni di 60x60x75 cm, collegato ad un generatore di ozono (effetto corona). La concentrazione media di ozono

all'interno della camera, monitorata in continuo con rilevatore portatile, era di 1 ppm, pari a 1.96 mg/m³, alla temperatura di circa 20°C con umidità relativa del 60%. Per *L. monocytogenes* si sono svolte prove supplementari applicando tempi scalari di esposizione al gas, fino ad un massimo di 2 ore. Una volta terminato il trattamento, i microrganismi sono stati messi in termostato a temperature/tempi di crescita ottimali e, al termine del periodo di incubazione, si è proceduto alla conta delle colonie. L'abbattimento microbico è stato espresso come differenza logaritmica tra il titolo iniziale (piastre non sottoposte ad ozonizzazione) ed il titolo rilevato al termine del trattamento.

Prove in azienda – I batteri usati per le prove in azienda, sono stati i medesimi sopra descritti, ad eccezione di *L. monocytogenes*, sostituita con un ceppo di *L. innocua* (ATCC 33090). Anche la preparazione delle sospensioni microbiche e delle piastre è stata effettuata secondo le stesse procedure utilizzate in laboratorio. Le piastre inoculate sono state trasportate presso l'azienda entro 3 ore mantenendole alla temperatura di 4°C. Per effettuare la sperimentazione si è scelto un locale di lavorazione con una superficie di 60 m² all'interno di un laboratorio di sezionamento carni. Le piastre sono state posizionate, aperte, su un tavolo di lavorazione e l'ozono è stato erogato nelle ore notturne ad una concentrazione di 1.1 ppm per 3 ore. Terminato il trattamento le piastre, portate in laboratorio, sono state incubate a temperature/tempi di crescita ottimali per i microrganismi testati. L'abbattimento microbico è stato espresso come differenza logaritmica tra il titolo iniziale e il titolo rilevato al termine della prova.

Le sperimentazioni condotte sia in laboratorio che in azienda sono state effettuate in triplo.

RISULTATI - Nelle seguenti tabelle sono riportati i risultati ottenuti dalle prove sperimentali condotte in laboratorio (tab. 1 e 2) ed in azienda (tab. 3). I dati riportati corrispondono al valore medio ottenuto dalle prove effettuate.

Tempo di erogazione (min)	Titolo <i>L. monocytogenes</i> (ufc/mL)	D.S.	Abbattimento medio (Δ Log)
0	2.1E+08	3.4E+07	//
10	3.2E+06	4.4E+05	1.8
20	4.6E+05	5.4E+04	2.7
30	3.3E+05	4.4E+04	2.8
45	1.6E+05	2.9E+04	3.1
60	1.2E+05	2.5E+04	3.3
120	5.7E+04	6.1E+03	3.6

Tab. 1: Abbattimento del titolo di *Listeria monocytogenes* dopo trattamento in laboratorio con 1 ppm di ozono a diversi tempi di applicazione.

Microrganismo testato	Titolo iniziale (ufc/ml)	D.S.	Titolo finale (ufc/ml)	D.S.	Δ Log
<i>L. monocytogenes</i>	6.3E+08	6.4E+07	2.2E+05	3.3E+04	3.5
<i>S. aureus</i>	4.5E+09	5.2E+08	3.9E+06	4.7E+05	3.1
<i>B. thuringiensis</i>	1.1E+08	2.4E+07	3.7E+05	4.5E+04	2.5
<i>E. coli</i>	1.8E+09	3.0E+08	2.9E+03	3.9E+02	5.8
<i>P. fluorescens</i>	2.4E+09	3.6E+08	5.6E+07	5.9E+06	1.6
<i>S. cerevisiae</i>	3.8E+07	4.6E+06	3.3E+03	4.2E+02	4.1

Tab. 2: Abbattimento del titolo dei microrganismi testati in laboratorio dopo il trattamento con 1 ppm di ozono per 1h.

Microrganismo testato	Titolo iniziale (ufc/ml)	D.S.	Titolo finale (ufc/ml)	D.S.	Δ Log
<i>L. innocua</i>	9.8E+07	8.6E+06	7.0E+05	1.9E+05	2.1
<i>S. aureus</i>	7.0E+09	7.4E+08	3.0E+06	1.2E+06	3.4
<i>B. thuringiensis</i>	2.2E+08	3.6E+07	2.8E+06	4.1E+05	1.9
<i>E. coli</i>	1.1E+09	9.2E+07	8.9E+05	8.3E+04	3.1
<i>P. fluorescens</i>	2.2E+09	1.6E+08	3.5E+08	4.5E+07	0.8
<i>S. cerevisiae</i>	1.1E+07	9.1E+05	9.2E+03	8.3E+02	3.1

Tab. 3: Abbattimento dei microrganismi testati in azienda dopo il trattamento con 1.1 ppm di ozono per 3h.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI - Le prove sperimentali fino ad ora condotte hanno dimostrato l'efficacia del trattamento sanificante con ozono sui microrganismi da noi testati. Le prove in laboratorio su *L. monocytogenes* sono state eseguite in modo tale da poter ottenere una curva di efficacia in condizioni controllate. Si è osservato come a 1 ppm l'ozono gassoso sia già efficace dopo 10 minuti e porti ad una decisa diminuzione del titolo dopo 2 ore (3.6 Log). Anche sugli altri batteri testati i dati ottenuti in laboratorio con l'erogazione di 1 ppm di ozono per 1 ora mostrano una buona azione microbica del gas, evidenziando comunque una diversa sensibilità fra le specie. I microrganismi più resistenti all'azione dell'ozono sono risultati *B. thuringiensis* e, in particolare, *P. fluorescens*.

Alla luce dei risultati ottenuti nella prima fase e considerando la notevole influenza che le condizioni ambientali (temperatura/umidità) rivestono sulla suscettibilità dei microrganismi all'ozono (6), in azienda il trattamento è stato prolungato fino a 3 ore. L'uso della semina per spatolamento ha permesso di simulare l'inquinamento batterico delle superfici di lavoro e si è

rivelato un sistema agevole per effettuare una sperimentazione idonea ad una struttura produttiva. I test sono stati condotti nelle ore notturne poiché alla ripresa del lavoro la quantità di ozono ambientale deve, per motivi legati alla sicurezza del personale, risultare inferiore a 0.03 ppm: questo ha influenzato la scelta del tempo massimo di erogazione consentito. Il trattamento è risultato efficace anche nell'applicazione in azienda; gli abbattimenti ottenuti sono stati, come ci aspettavamo, di entità inferiore rispetto a quelli riscontrati in laboratorio, a causa delle diverse condizioni ambientali. Anche in questo caso, è stata confermata la differente sensibilità delle specie microbiche utilizzate, con una maggiore resistenza da parte di *B. thuringiensis* e *P. fluorescens*.

L'ozono risulta quindi essere un efficace metodo di disinfezione degli ambienti di lavorazione delle carni, presentando una buona attività microbica nei confronti dei principali alteranti e patogeni. I risultati ottenuti nelle prove effettuate dimostrano la necessità di adattare i parametri del trattamento con ozono alle diverse condizioni ambientali presenti nella realtà produttiva; inoltre nella definizione dei dosaggi sarà necessario considerare ulteriori variabili quali la presenza di biofilm sulle superfici di lavoro che, come già evidenziato in precedenti ricerche (11), contribuisce ad aumentare notevolmente la resistenza microbica all'ozono richiedendone un ulteriore incremento.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ERG - Eastern Research Group (2004) Good Manufacturing Practices (GMPs) for the 21st century – Food processing *Final Report prepared for U.S. Food and Drug Administration*.
- 2) Greenberg A.E. (1980) Public health aspects of alternative water disinfectants. *Semin. Proc. N. 20152 Am. Water Works Assoc.* Atlanta GA.
- 3) Greene A.K., Few B.K. and Serafini J.C. (1993) A comparison of ozonation and chlorination for the disinfection of stainless steel surfaces. *J. Dairy Sci.*; 76, 3617-3620.
- 4) Horvath M., Bilitzky L. and Huttner J. (1985) Fields of utilization of ozone. R.J.H. Clark (ed.) *Ozone*. Elsevier Science Publishing Co., Inc., NY. p 257-316.
- 5) Khadre M.A. and Yousef A.E. (2001) Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study. *Int. J. Food Microbiol.*; 71, 131-138.
- 6) Kim J.G., Yousef A.E. and Dave S. (1999) Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: A review. *J. Food Protect.*; 62, 1071-1087.
- 7) Majchrowicz A. (1998) Food safety technology: a potential role for ozone? *Agricultural Outlook*, Economic research Service/USDA; pp. 13-15.
- 8) Moore G., Griffith C. and Peters A. (2000) Bactericidal properties of ozone and its potential application as a terminal disinfectant. *J. Food Protect.*; 63, 1100-1106.
- 9) 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.
- 10) Rice R.G., Farquhar J.W. and Bollyky L.J. (1982) Review of the applications of ozone for increasing storage times of perishable foods. *Ozone Sci. Eng.*; 4, 147-163.
- 11) Robbins J.B., Fisher C.W., Moltz A.G. and Martin S.E. (2004) Elimination of *Listeria monocytogenes* biofilms by ozone, chlorine, and hydrogen peroxide. *J. Food Protect.*; 68, 494 -498.