



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

PROVE DI DECONTAMINAZIONE
MICROBIOLOGICA DI VEGETALI
ATTRAVERSO METODI CHIMICO-FISICI

MICROBIOLOGICAL DECONTAMINATION
ASSAYS OF VEGETABLES THROUGH
CHEMYCAL-PHYSICAL METHODS

TIPO TESI: SPERIMENTALE

Studente:
FRANCESCA FORTUNA

Relatore:
PROF. ANDREA OSIMANI

Correlatore:
DOTT.SSA VESNA MILANOVIC

ANNO ACCADEMICO 2019-2020



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

PROVE DI DECONTAMINAZIONE
MICROBIOLOGICA DI VEGETALI
ATTRAVERSO METODI CHIMICO-FISICI

MICROBIOLOGICAL DECONTAMINATION
ASSAYS OF VEGETABLES THROUGH
CHEMYCAL-PHYSICAL METHODS

Studente:
FRANCESCA FORTUNA

Fortuna Francesca

Relatore:
PROF. ANDREA OSIMANI

Andrea Osimani

Correlatore:
DOTT.SSA VESNA MILANOVIC

Vesna Milanovic

ANNO ACCADEMICO 2019-2020
TIPO TESI: SPERIMENTALE

Alla mia famiglia.

SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE	6
ELENCO DELLE FIGURE.....	7
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI.....	8
1.INTRODUZIONE	9
1.1 FONTI DI CONTAMINAZIONE DA PARTE DI AGENTI PATOGENI, SU PRODOTTI FRESCHI, DURANTE LA COLTIVAZIONE IN CAMPO.....	9
1.2 PANORAMICA DELLE MALATTIE ALIMENTARI ASSOCIATE AI PRODOTTI	10
1.3 PRINCIPALI CAUSE E VIE DI CONTAMINAZIONE DA AGENTI PATOGENI PRECAUZIONI PER RIDURRE LA CONTAMINAZIONE BATTERICA DEI PRODOTTI IN CAMPO.....	11
1.3.1 Introduzione di agenti patogeni del suolo tramite letame.....	12
1.3.2 Contaminazione da parte di patogeni tramite l'acqua di irrigazione.....	13
1.4 SOPRAVVIVENZA DI AGENTI PATOGENI SU E ALL'INTERNO DI ALIMENTI.....	14
1.5 METODI PER PROLUNGARE LA SHELF-LIFE E MIGLIORARE LA SICUREZZA IGIENICA DEI PRODOTTI FRESCHI.....	15
1.6 ULTRASUONI: UNA TECNOLOGIA EMERGENTE PER L'ANALISI E IL CONTROLLO DELLA QUALITA' DEGLI ALIMENTI.....	17
1.6.1 Ultrasuoni e inattivazione microbica.....	18
1.6.2 Applicazione degli ultrasuoni su frutta e verdura.....	19
1.7 <i>CHALLENGE TEST</i>	19
1.7.1 Selezione dei microrganismi più idonei ai <i>challenge test</i>	20
1.7.2 Livello e preparazione dell'inoculo.....	22
1.7.3 Durata dello studio.....	22
1.7.4 Analisi del campione.....	23
1.8 INTERPRETAZIONE DEI DATI.....	24

1.SCOPO DELLA TESI.....	25
2.MATERIALI E METODI.....	26
2.1 PREPARAZIONE DELLA GIARDINIERA.....	26
2.2 ANALISI MICROBIOLOGICHE.....	28
2.2.1 Diluizioni scalari decimali.....	28
2.2.2 Conte vitali in piastra.....	28
2.3 <i>CHALLENGE TEST</i> SU <i>Listeria innocua</i>	29
2.3.1 Allestimento conta vitale in piastra preliminare per la valutazione della carica microbica.....	29
2.3.2 Allestimento <i>challenge test</i> con <i>Listeria innocua</i> in bagna bianca.....	30
2.3.3 Allestimento <i>challenge test</i> con <i>Listeria innocua</i> su soluzione fisiologica.....	32
2.3.4 Conta vitale in piastre su liquido di governo con <i>Listeria innocua</i>	32
3.RISULTATI E DISCUSSIONE.....	34
4.CONCLUSIONI.....	37
BIBLIOGRAFIA.....	39

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1.1: Panoramica delle epidemie di origine alimentare tra il 1997 e il 2017.....	11
Tabella 1.2: Tecniche comunemente usate per il miglioramento della shel-life dei prodotti freschi.....	16
Tabella 1.3: Patogeni che possono essere utilizzati nei challenge test per i vegetali.....	21
Tabella 3.1: Conte vitali peperoni rossi in bagna bianca.....	34
Tabella 3.2: Dati <i>challenge test</i> per peperoni rossi inoculati con <i>Listeria innocua</i> con liquido di governo.....	35
Tabella 3.3: Dati <i>challenge test</i> per peperoni rossi inoculati con <i>Listeria innocua</i> in soluzione fisiologica.....	35

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1.1: Fattori di rischio ambientale che causano la contaminazione.....	12
Figura 1.2: Fattori che influenzano la sopravvivenza dei patogeni.....	13
Figura 2.1: Esempio di peperone tagliato per giardiniera secondo le modalità indicate.....	27
Figura 2.2: Sacchetto sottovuoto per il sonicatore contenente i peperoni tagliati e il liquido di governo.....	28
Figura 2.3: Piastre Petri contenenti <i>Listeria innocua</i> su terreno Brain Heart Infusion Broth (BHI).....	30
Figura 2.4: Campioni di peperoni rossi con aggiunta di liquido di governo.....	31
Figura 2.5: Campioni inoculati con ansate di <i>Listeria innocua</i>	31

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

DS	DEVIAZIONE STANDARD
DW	PERCENTUALE DI PESO SECCO
EFSA	EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY
IFT	INSTITUTE OF SCIENCE AND FOOD TECHNOLOGISTS DEPARTMENT OF SCIENCE AND TECHNOLOGIST PROJECTS
OMS	ORGANIZZAZIONE MONDIALE DELLA SANITÀ
MAP	CONFEZIONAMENTO IN ATMOSFERA MODIFICATA
UE	UNIONE EUROPEA
USA	STATI UNITI D'AMERICA
KHz	KILOHEARTZ/ CHILOHEARTZ

1.INTRODUZIONE

1.1 Fonti di contaminazione da parte di agenti patogeni su prodotti freschi durante la coltivazione in campo

Le malattie d'origine alimentare sono molto diffuse nel mondo e in media ogni anno circa 1 persona su 10 si ammala a causa del consumo di cibo contaminato. Secondo l'Organizzazione mondiale della Sanità (OMS) dal 2015 a oggi, si sono verificati 420.000 decessi a causa di patologie determinate da organismi patogeni presenti nei vegetali, creando pressione sui servizi medici, aumento del disagio economico e politico e crescita della paura tra la popolazione.

Ci sono diversi agenti chimici, fisici e microbiologici che possono alterare i cibi in differenti fasi del processo produttivo, dalla preparazione fino alla messa in commercio del prodotto (Allos, *et al.*, 2004). Molti di questi agenti sono stati ampiamente caratterizzati e approfonditi, permettendo in tal modo di attuare strategie e stilare protocolli per la prevenzione dell'insorgenza di malattie legate al consumo di prodotti alimentari (Adzitey, *et al.*, 2013; Botana, 2014; Ehling-Schulz, *et al.*, 2004; Farber & Peterkin, 1991; Le Loir, *et al.*, 2003; Zhao, *et al.*, 2001);

Sebbene si pensi che il principale alimento veicolo di agenti patogeni sia la carne, soprattutto di pollo, anche le verdure sono state correlate all'insorgenza di diversi focolai di malattie d'origine alimentare (EFSA, 2013; Lynch, *et al.*, 2009; Westrell, *et al.*, 2009). L'aumento di questi casi è associato all'incremento del consumo di prodotti freschi, strettamente correlati all'idea di un'alimentazione sana, soprattutto nel caso di consumo di prodotti locali (Berger, *et al.*, 2010; Pittore, 2013; Pollack, 2011; Regmi, *et al.*, 2001).

I prodotti freschi vengono assunti principalmente crudi o previo minima lavorazione e per questo la contaminazione da agenti patogeni costituisce un rischio sanitario importante.

Ci sono numerosi fattori che contribuiscono a intaccare l'integrità microbiologica degli alimenti, dalla raccolta fino alla messa in commercio. Tuttavia i rischi principali sono stati individuati prima e durante il raccolto, in relazione al fatto che la contaminazione si può verificare, nella maggior parte dei casi, proprio in campo (Callejón, *et al.*, 2015; Li, *et al.*, 2017).

1.2 Panoramica delle malattie alimentari associate a prodotti freschi

Nell'ultimo ventennio, i benefici nutrizionali legati al consumo di frutta e verdure sono stati riconosciuti e ampiamente pubblicizzati, inducendo un cambiamento nelle abitudini alimentari dei consumatori (Beuchat, 2002).

L'incremento della domanda di prodotti freschi, e dunque della produzione mondiale di vegetali, ha determinato un maggiore utilizzo di fonti idriche alternative, inducendo cambiamenti sia alle pratiche agronomiche sia alla lavorazione industriale del prodotto (Beuchat, 2002).

Le fonti di contaminazione dei prodotti freschi possono essere svariate e per tal motivo numerosi approfondimenti sono stati effettuati per identificare il meccanismo con cui queste si possono instaurare (Lynch, *et al.*, 2009; Strausbaugh & Herwaldt, 2000). Ciò nonostante, in molti casi, le malattie alimentari associate alla contaminazione nei prodotti freschi non sono accertate oppure non ricevono particolare attenzione, in quanto non hanno gravi conseguenze sulla salute pubblica o si verificano sporadicamente (Scallan, *et al.*, 2011).

Sulla base di innumerevoli studi microbiologici è stato possibile identificare i principali agenti patogeni che sono causa di contaminazione di prodotti freschi come: *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Campylobacter* e *Listeria monocytogenes* (Beuchat, 2002; Callejón, *et al.*, 2015; Heaton & Jones, 2008; Jung, *et al.*, 2014; Brackett, 1994; Buck, *et al.*, 2003). La maggior parte degli studi ha evidenziato un numero considerevole di focolai di origine alimentare associati ai patogeni sopra citati, ma altri microrganismi o virus sono stati completamente sottovalutati (Jung, *et al.*, 2014).

In particolare, nella tabella 1.1 sono elencati i prodotti freschi, gli agenti eziologici e il numero di casi di malattie di origine alimentari verificatesi nei paesi industrializzati dal 1997 e il 2017 (Jung, *et al.*, 2014).

Sebbene dati e informazioni disponibili su focolai correlati a prodotti freschi siano diversi e contrastanti, le prove scientifiche ottenute indicano che il carico di malattie di origine alimentare, dovuto a prodotti contaminati, è aumentato negli ultimi anni (Jung, *et al.*, 2014).

Nel ventennio dal 1997 al 2017, negli USA, sono stati identificati sette focolai epidemici associati all'assunzione di alimenti crudi di origine vegetale (Jung, *et al.*, 2014) e in particolare, negli USA, tra il 2006 e il 2014, l'insorgenza di circa il 40% dei focolai è stata associata al consumo di verdure a foglia larga, basilico, pomodori, meloni e cipolle (Jung, *et al.*, 2014). Mentre, in Germania, nel 2013, si sono verificati circa 11000 casi di infezione da

norovirus correlati al consumo di fragole contaminate (Mäde, *et al.*, 2013; Bernard, *et al.*, 2014).

Tabella 1.1: Panoramica dei focolai di origine alimentare tra il 1997 e il 2017

Alimento	Nazione	Patogeni	Casi	Reference
Fragole	Germania	Norovirus	Circa 11000	(Mäde, <i>et al.</i> , 2013); (Bernard, <i>et al.</i> , 2014);
Cipolle	Usa	Virus da Epatite A	43	(Dentinger, <i>et al.</i> , 2001); (Frank, <i>et al.</i> , 2007);
Melograno	Usa	Virus da Epatite A	>150	(CDC, 2013);
Mirtillo	Nuova Zelanda	Virus da Epatite A	81	(Calder, <i>et al.</i> , 2003);
Rucola	Svezia	Virus da Epatite A	54	(Nygård, <i>et al.</i> , 2001);
Melone	Messico	<i>Salmonella</i>	Ns	(CDC, 2017);
Basilico	Regno unito	<i>Salmonella</i>	32	(Warriner & Namvar, 2010)

1.3 Principali cause e vie di contaminazione da agenti patogeni e precauzioni per ridurre la contaminazione batterica dei prodotti in campo

Le fonti e le vie di contaminazione dei prodotti freschi sono varie e spesso si differenziano in base alla zona di produzione dell'alimento stesso. La principale causa che mina la sicurezza dei prodotti freschi è la vicinanza tra i campi usati per la produzione agricola e quelli sfruttati per l'allevamento (Strawn, *et al.*, 2013a; Strawn, *et al.*, 2013b) in particolare infatti, tipo di terreno, acqua d'irrigazione e presenza di letame sono i maggiori veicoli di contaminazione per i vegetali.

Nella Figura 1.1 vengono messe in evidenza le principali fonti di contaminazione di frutta e verdura prima della raccolta.

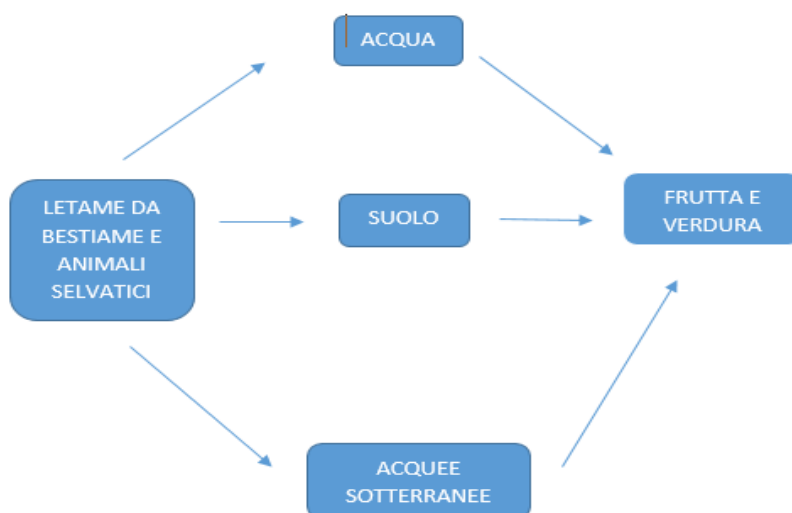


Figura 1.1: I fattori di rischio ambientale che causano la contaminazione prima della raccolta

Per garantire dunque un livello accettabile di sicurezza microbiologica dei vegetali freschi, è essenziale controllare i prodotti durante la fase di coltivazione e raccolta. In primo luogo, è importante considerare lo stato e la qualità dei campi utilizzati per la coltivazione; ad esempio, campi soggetti al pascolo di animali selvatici o domestici devono essere considerati potenzialmente contaminati e dunque non sfruttati per la produzione agricola (Turbé, *et al.*, 2010).

1.3.1 **Introduzione di agenti patogeni nel suolo tramite letame**

L'uso di escrementi di bestiame (letame) per la fertilizzazione del suolo è una pratica agricola piuttosto diffusa in varie aree geografiche (Avery, *et al.*, 2005; Goss, *et al.*, 2013) (Figura 1.2). Il letame può essere cosperso come materiale solido, semisolido o liquido, in tutto il campo o in porzioni delimitate di esso, a seguito di adeguati trattamenti, quali il compostaggio e/o l'invecchiamento (James, 2006; Jung, *et al.*, 2014; Olaimat & Holley, 2012).

Diverse ricerche hanno dimostrato lo stretto legame tra inadeguatezza dei trattamenti degli escrementi e l'insorgenza di contaminazioni nei prodotti freschi (James, 2006; Warriner, *et al.*, 2009). Il quantitativo di letame utilizzato è strettamente legato alle tecniche agricole applicate dal produttore, ma nei metodi di coltivazione biologica l'utilizzo di tale fertilizzante è largamente adottato e, proprio per questo motivo, la frutta e la verdura biologiche potrebbero essere più soggette a contaminazione da parte di agenti patogeni fecali (Maffei, *et al.*, 2016;

Warriner & Namvar, 2010; Loncarevic, *et al.*, 2005; Johannessen, *et al.*, 2005; Ivey & Melanie, 2011).

In particolare la contaminazione dei vegetali può verificarsi o attraverso il contatto diretto delle superfici vegetali con il letame o in modo indiretto attraverso la pioggia e/o i metodi di irrigazione a pioggia nei quali l'acqua cade dall'alto.

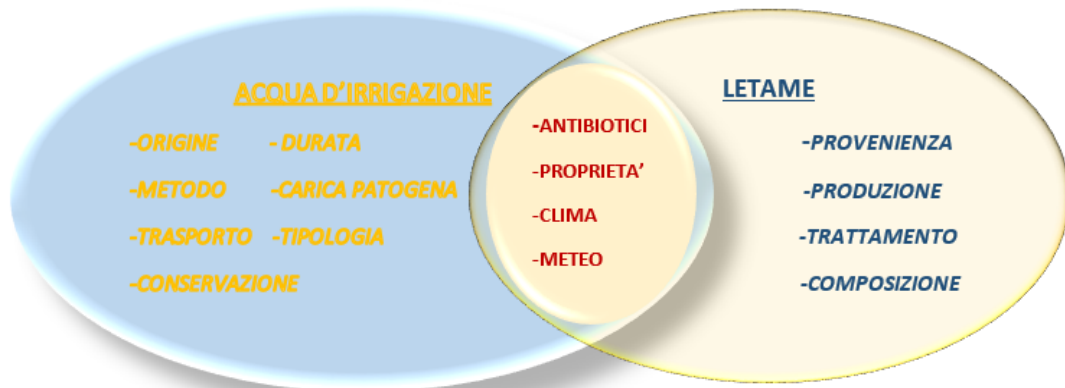


Figura 1.2: Fattori che influenzano la sopravvivenza dei patogeni

1.3.2 Contaminazione da parte di agenti patogeni tramite l'acqua d'irrigazione

L'acqua d'irrigazione è stata identificata come una delle principali fonti di contaminazione dei prodotti vegetali (Benjamin, *et al.*, 2013; Faour-Klingbeila, *et al.*, 2016; Uyttendaele, *et al.*, 2015) soprattutto se si utilizzano acque reflue non trattate o di cui non si conosce la provenienza (Figura 1.2).

In particolare, la fonte di origine dell'acqua, il metodo e la durata del processo d'irrigazione, nonché la tipologia di coltivazione e il tipo di suolo influenzano notevolmente l'insorgenza di contaminazioni (Pachepsky, *et al.*, 2011; Pereira, *et al.*, 2002; Olaimat & Holley, 2012). Ad esempio, nel 1986, in Germania, il consumo di lattuga (Seymour & Appleton, 2001) e cipollotti (Josefson, 2003) irrigati con acque reflue, è stato identificato come la causa di due focolai di epatite A.

Nei paesi in via di sviluppo, norme precise di sicurezza definiscono che l'irrigazione, preferibilmente con acqua potabile, deve essere sospesa prima della raccolta ed è consigliabile l'utilizzo di nebulizzatori o annaffiatori a goccia, i quali limitano al minimo la dispersione dell'acqua, in modo tale da ridurre la contaminazione batterica (Amoah, *et al.*, 2011; Keraita, *et al.*, 2007; Uyttendaele, *et al.*, 2015). L'implementazione di alcune pratiche può essere

costosa e avere impatti negativi sul paesaggio, ma sono delle misure di prevenzione necessarie per garantire la qualità e la sicurezza dei prodotti e aumentare la fiducia dei consumatori.

1.4 Sopravvivenza di agenti patogeni sui prodotti freschi

L'instaurarsi di una contaminazione alimentare è dovuta alla presenza di un agente patogeno in grado di sopravvivere e colonizzare la matrice fino al momento dell'uso da parte del consumatore (Harris, *et al.*, 2003).

La sopravvivenza e/o la crescita di agenti patogeni è influenzata da:

- tipologia del microrganismo;
- tipo di prodotto;
- condizioni ambientali;
- stato fisiologico del prodotto fresco;
- stato fisiologico del patogeno.

In particolare, nei prodotti vegetali l'instaurarsi di una contaminazione microbica è nettamente agevolata dalla presenza di lesioni e/o ferite a livello della superficie del vegetale stesso. Le possibili vie d'ingresso nei tessuti vegetali per un agente patogeno sono infatti le aperture naturali come stomi o lenticelle o lesioni accidentali causate da circostanze biotiche o abiotiche (Deering, *et al.*, 2012; Hirneisen, 2012; Steele & Odumeru, 2004).

Alla luce di tale evidenza risulta importante individuare la natura del microrganismo patogeno e la correlazione pianta-microrganismo, in modo tale da mettere in individuare l'adattamento, la crescita e la persistenza del microrganismo stesso sulla matrice vegetale.

1.5 Metodi per prolungare la *shelf-life* e migliorare la sicurezza in ambito di igiene dei prodotti freschi di origine vegetale

La *shelf-life* dei prodotti vegetali freschi è uno degli aspetti più importanti per la commercializzazione di questi prodotti che sono soggetti a fenomeni di degrado post-raccolta con repentini cambiamenti fisiologici e biochimici (Toivonen & Brummell, 2008).

Il consumatore è divenuto esigente e selettivo ma anche critico e competente. Infatti non ricerca soltanto prodotti di qualità e microbiologicamente sicuri, ma si concentra anche negli alimenti che presentano delle caratteristiche aggiuntive.

La crescente attenzione dei consumatori nei confronti di alimenti con elevata comodità d'uso e un packaging d'impatto che aumenti anche la conservazione del prodotto sta spingendo le industrie alimentari all'ottimizzazione di processi produttivi e pratiche agronomiche atte a garantire prodotti di ottima qualità e sicurezza alimentare con elevato valore nutrizionale (Llana-Ruiz-Cabello, *et al.*, 2015; Muriel-Galet, *et al.*, 2013; Stratakosa, *et al.*, 2016).

Proprio per questo motivo, varie tecnologie vengono approfondite e studiate per aumentare la *shelf-life*, la stabilità microbica e la flessibilità dei prodotti freschi.

Alcune delle tecniche utilizzate per il miglioramento della *shelf-life* sono di seguito elencate e descritte (Tabella 1.2) (Santos, *et al.*, 2014a).

- disinfettanti come cloro o ipoclorito di sodio;
- basse temperature durante lo stoccaggio;
- tecnologie non termiche;
- confezionamento in atmosfera modificata.

Una delle procedure più innovative è rappresentata dai trattamenti non termici, fra i quali gli ultrasuoni.

Tabella 1.2: Tecniche comunemente utilizzate per il miglioramento della shelf life dei prodotti freschi

Tecniche	Condizioni	Vantaggi	Referenze
Disinfettanti	Varie concentrazioni di disinfettanti tra cui il cloro, ipoclorito di sodio, sono sfruttati per ridurre le popolazioni microbiche	Forte attività antimicrobica, ridotta conta microbica	(Issa-Zachariaa, <i>et al.</i> , 2011) (Char, <i>et al.</i> , 2012) (Chandra & Gang Kim, 2012)
Confezionamento in atmosfera modificata	Confezionato con diverse composizioni di gas Alta concentrazione di anidride carbonica, principalmente la più usata per il controllo dei patogeni	Efficace nel mantenimento dei valori di qualità, inibendo la crescita di agenti patogeni, <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>Listeria spp.</i> , <i>Salmonella</i>	(Arvanitoyannis, <i>et al.</i> , 2011); (Char, <i>et al.</i> , 2012); (González-Buesa, <i>et al.</i> , 2014)
Refrigerazione	Le temperature di refrigerazione utilizzati sono (4 - 7 °C)	Difficile capacità di riproduzione e mantenimento delle caratteristiche nutrizionali	(García-Gimeno & Zurera-Cosano, 1997); (Santos, <i>et al.</i> , 2014a)
Radiazioni	Vengono impiegati diverse tipologie di radiazioni per ridurre la carica microbica	Può essere eseguito prima o dopo l'imballaggio, mantiene la qualità dei prodotti, in particolare il colore, texture e attributi sensoriali, alta efficienza per eliminare i microbi patogeni	(Prakash, <i>et al.</i> , 2000)

1.6 Ultrasuoni: una tecnologia emergente per l'analisi e il controllo della qualità degli alimenti

Gli ultrasuoni sono onde acustiche con una frequenza tale da superare la soglia di udibilità dell'orecchio umano (superiore a 20 KHz) e rappresentano una tecnica emergente nella scienza e nella tecnologia alimentare. Gli ultrasuoni possono trovare diversa applicazione nei settori dell'analisi degli alimenti, della lavorazione e del controllo di qualità sulla base della loro frequenza. La semplicità, la portabilità e il basso costo dei dispositivi a ultrasuoni li rendono elementi versatili nei laboratori di ricerca, impianti pilota e grandi industrie alimentari (Knorr, *et al.*, 2011). Massimizzando la produzione, e risparmiando energia, l'ultrasuono è considerato una "tecnologia verde" con molte promettenti applicazioni nella lavorazione, conservazione e sicurezza degli alimenti (Gallego-Juárez, *et al.*, 2010).

Gli ultrasuoni si suddividono in:

- ultrasuoni a bassa frequenza, da 20 kHz a 100 kHz;
- ultrasuoni a media frequenza, da 100 kHz a 10 MHz;
- ultrasuoni ad alta frequenza, da 1 MHz a 10 MHz.

In particolare, gli ultrasuoni a bassa frequenza vengono utilizzati per monitorare le caratteristiche e le proprietà fisico-chimiche dei prodotti alimentari durante la lavorazione e lo stoccaggio (McClements, 1997). Inoltre, gli ultrasuoni a bassa frequenza non essendo onde acustiche invasive, sono stati usati per programmi di miglioramento genetico e per analisi sulla composizione di prodotti a base di carne cruda e fermentata, pesce e pollame. Questi vengono anche utilizzati per il controllo di qualità delle verdure fresche in pre- e post-raccolta, dei formaggi durante la lavorazione, degli oli da cucina commerciali, del pane e del miele (Gallego-Juárez, *et al.*, 2010).

Gli ultrasuoni ad alta frequenza, applicati utilizzando bagni di sonicazione o sonde ad ultrasuoni ad immersione, inducono cambiamenti meccanici, fisici e chimici/biochimici negli alimenti. Gli effetti chimici di questi ultrasuoni sono legati al fenomeno della cavitazione acustica che si basa sulla formazione, crescita e crollo implosivo di cavità (bolle di gas) nei liquidi, che rilasciano elevate quantità di energia altamente localizzata (Mason, *et al.*, 2011). L'effetto meccanico ha molte applicazioni come l'estrazione di aromi, il degasaggio, l'emulsione e il potenziamento della cristallizzazione (Higaki, *et al.*, 2001); mentre, gli effetti chimici e biochimici possono risultare efficaci per la sterilizzazione delle apparecchiature e delle superfici di lavorazione degli alimenti (Baumann, 2009).

1.6.1 *Ultrasuoni e inattivazione microbica*

La pastorizzazione e la sterilizzazione sono due trattamenti termici comunemente utilizzati per garantire la riduzione o la completa eliminazione dei microrganismi patogeni o alterativi presenti negli alimenti. Tali processi, a causa delle elevate temperature, possono determinare delle alterazioni delle proprietà funzionali, delle caratteristiche sensoriali (ad es. *off flavour*) e del valore nutrizionale dei prodotti alimentari (Lado & Yousef, 2002; Piyasena, *et al.*, 2003). In questo contesto gli ultrasuoni si sono dimostrati essere uno strumento potenzialmente utile nell'inattivazione microbica soprattutto nei confronti di microrganismi presenti sulle superfici a contatto con gli alimenti, agendo a livello sia delle forme vegetative sia dei biofilm (Baumann, 2009).

Molti studi sono stati condotti al fine di investigare il meccanismo d'azione degli ultrasuoni sulla riduzione della carica microbica negli alimenti, permettendo così di identificare nella cavitazione acustica la causa principale dell'inattivazione batterica (Alliger, 1975; Baumann, 2005; Bermudez-Aguirre, 2009; Garcia, *et al.*, 1989; Earnshaw, *et al.*, 1995; Guerrero, *et al.*, 2001; Guerrero, *et al.*, 2005; Hughes & Nyborg, 1962; Raso, *et al.*, 1998; Lo'pez-Malo, *et al.*, 1999). La frequenza applicata, l'ampiezza delle onde acustiche e il volume della sospensione batterica sono parametri che influenzano notevolmente l'efficienza del trattamento di sonicazione (Raso, *et al.*, 1998; Wrigley & Llorca, 1992).

In particolare, una frequenza di circa 20 kHz si è dimostrata efficiente nel determinare l'inattivazione microbica, seppur le spore e i batteri Gram-positivi sono risultati più resistenti al trattamento con ultrasuoni, rispetto alle forme vegetative e ai batteri Gram-negativi (Feng, *et al.*, 2008).

Per migliorare l'inattivazione microbica negli alimenti liquidi e per rendere il sistema economicamente più vantaggioso, gli ultrasuoni possono essere sfruttati in combinazione con altri trattamenti come la pressione (manosonica), il calore (termosonico), la pressione e il caldo assieme (manotermosonico) o in combinazione con sostanze antimicrobiche (Earnshaw, *et al.*, 1995; Lee, *et al.*, 2003; Lo'pez-Malo, *et al.*, 1999; Piyasena, *et al.*, 2003; Raso, *et al.*, 1998; Raso & Barbosa-Canovas, 2003; Villamiel & De Jong, 2000).

In uno studio condotto da Raso e collaboratori (1998) è stata analizzata l'influenza della temperatura e della pressione sull'efficienza degli ultrasuoni nei confronti della specie *Yersinia enterocolitica*. Nello studio è stato dimostrato che sebbene gli ultrasuoni avessero una bassa efficienza a temperatura e a pressione ambiente, i livelli di inattivazione microbica aumentavano notevolmente con l'incremento della pressione statica e/o della temperatura.

Analogamente a quanto identificato per *Y. Enterocolitica*, uno studio condotta da Knorr e collaboratori (2004) ha dimostrato un'elevata efficienza di inattivazione di *E. coli* attraverso

un trattamento combinato con ultrasuoni e calore, così come un analogo effetto è stato identificato per *Salmonella senftenberg* 775 W (Alvarez, *et al.*, 2006).

1.6.2 *Applicazione degli ultrasuoni su frutta e verdura*

Negli ultimi anni l'uso di ultrasuoni nell'industria alimentare, seppur in modo ancora limitato, ha trovato applicazione soprattutto per il trattamento di frutta e verdura fresca (Alegria, *et al.*, 2009; Alexandre, *et al.*, 2012; Alexandre, *et al.*, 2013; Cao, *et al.*, 2010; Elizaquivel, 2011; Gil, *et al.*, 2009; Huang, *et al.*, 2006; Knorr, *et al.*, 2004; Rivera, *et al.*, 2011; São José & Vanetti, 2012); (Sapers, 2001; Seymour, *et al.*, 2002; Zhou, *et al.*, 2009; Sagong, *et al.*, 2011). Infatti, anche se il lavaggio di frutta e verdura con agenti a base di cloro, biossido di cloro, cloruro di sodio acidificato, acido organico, disinfettanti a base alcalina, acqua ossigenata, acqua ozonizzata, acqua elettrolizzata, acido perossiacetico, sia ampiamente applicato per la riduzione della carica microbica naturale dei prodotti stessi (Sapers, 2001) metodi fisici quali ultrasuoni, raggi ultravioletti, campi magnetici oscillanti e alta pressione si sono dimostrati tecnologie innovative e utili per la riduzione della carica microbica senza determinare effetti negativi sul prodotto stesso (Gil, *et al.*, 2011).

1.7 *Challenge test*

I *challenge test* microbiologici sono test di laboratorio sfruttati per la determinazione della capacità di un alimento di supportare la crescita di microrganismi patogeni o degradativi.

Lo scopo dei *challenge test* è definire la conformità di uno specifico processo rispetto ad una *performance* standard. La progettazione, l'implementazione e la valutazione dei *challenge test* è strettamente correlata alla formulazione del prodotto alimentare, al processo produttivo, al confezionamento e alle modalità di distribuzione del prodotto stesso.

Risulta dunque fondamentale considerare per la progettazione del *challenge test* sia fattori specifici del prodotto sia i fattori ambientali, in modo tale da ottenere una valutazione il più possibile completa ed esaustiva sulla sicurezza dell'alimento.

I *challenge test* sono ampiamente sfruttati anche nella determinazione della *shelf-life* di alcuni cibi refrigerati o conservati a temperatura ambiente, mentre risulta inutile condurre *challenge test* su alimenti surgelati che non supportano la crescita di patogeni in corrette condizioni di conservazione, oppure su cibi in scatola che sono stati sottoposti a sterilizzazione commerciale. Dunque per la progettazione e la realizzazione del *challenge test* risulta

estremamente importante prendere in considerazione la probabilità di un alimento di essere un buon mezzo di crescita di un microrganismo patogeno.

Quando si progetta e si allestisce un *challenge test* microbiologico, è necessario considerare importanti fattori quali (Vestergaard, 2001):

1. selezione dell'appropriato microrganismo patogeno o surrogato;
2. livello dell'inoculo nell'alimento sottoposto a *challenge test*;
3. preparazione e metodo dell'inoculo;
4. durata dello studio;
5. formulazione e condizioni di conservazione;
6. analisi dei campioni.

1.7.1 *Selezione dei microrganismi più idonei per l'allestimento del challenge test*

La conoscenza della formulazione e della storia dell'alimento, nonché l'associazione dello stesso con eventuali focolai epidemici, è fondamentale per la selezione dell'appropriato patogeno da sottoporre a *challenge test*.

Nella Tabella 1.3 sono mostrati i principali organismi patogeni utilizzati nell'allestimento di *challenge test* su varie matrici alimentari (Vestergaard, 2001).

In linea generale i microrganismi ideali per un *challenge test* sono quelli preventivamente isolati da un prodotto con una formulazione simile all'alimento oggetto di studio. Prima di condurre il *challenge test* i ceppi selezionati di un patogeno target (generalmente 5 o più) devono, comunque, essere saggiati per testare l'eventuale instaurarsi di fenomeni di antagonismo reciproco come si verifica ad esempio tra alcuni ceppi di *Listeria monocytogenes* o *Clostridium botulinum* e tra batteri lattici produttori di batteriocine (Vestergaard, 2001).

Parametro fondamentale da considerare prima dell'esecuzione di un *challenge test* riguarda il periodo di latenza, ovvero il periodo impiegato dal microrganismo per adattarsi all'alimento. Questo parametro varia notevolmente in funzione della temperatura di conservazione del prodotto e in funzione del microrganismo target stesso e pertanto è fondamentale conoscere tale valore al fine di definire le modalità corrette di inoculo.

I microrganismi utilizzati nei *challenge test* possono essere geneticamente modificati o surrogati, ma in questo caso questi microrganismi devono mantenere tutte le caratteristiche del microrganismo target ad eccezione della sua virulenza. In particolare, l'uso dei surrogati è limitato ai soli casi in cui lo specifico patogeno non può essere usato per ragioni di sicurezza. Generalmente i gruppi di microrganismi che vengono utilizzati per tali scopi devono avere le seguenti caratteristiche (Institute of Food Technologists, 2000):

- microrganismi non patogeni;
- caratteristiche d'inattivazione e cinetiche che possono essere usate per predire quelle del patogeno target;
- comportamento simile a quello del patogeno target in base alla tipologia di matrice e/o in base ai parametri di processo (stabilità al pH, sensibilità alla temperatura e tolleranza all'ossigeno);
- caratteristiche di crescita stabili e costanti;
- popolazione ad alta densità ed elevata stabilità;
- popolazione microbica facilmente determinabile con sistemi rapidi, sensibili e poco costosi;
- microrganismi agevolmente differenziabili dalla microflora presente nell'alimento;
- capacità di colonizzare il substrato analoga a quella del patogeno target;
- elevata stabilità genetica;
- suscettibilità alle lesioni simili a quelle del patogeno target.

Tabella 1.3: Patogeni che possono essere utilizzati nei challenge test per vari prodotti alimentari

Tipo di alimento	Tipo di organismo
Condimenti per insalate	Salmonelle, <i>Staphylococcus aureus</i> (Vestergaard, 2001)
Prodotti confezionati in atmosfere modificate (verdure, carni, pollame, pesce)	<i>Clostridium botulinum</i> (ceppi proteolitici e non proteolitici) e altri patogeni (per esempio, salmonelle, <i>Listeria monocytogenes</i> ed <i>Escherichia coli</i> enteroemorragico) (Vestergaard, 2001).
Prodotti da forno (prodotti ripieni, glassature, torte non di frutta)	Salmonelle, <i>S. aureus</i> (Vestergaard, 2001).
Prodotti lattiero-caseari	Salmonelle, <i>S. aureus</i> , <i>C. botulinum</i> , <i>E. coli</i> enteroemorragico, <i>L. monocytogenes</i> (Vestergaard 2001).
Prodotti di pasticceria	Salmonelle (Vestergaard, 2001).
Formulazioni con nuovi conservanti	Salmonelle, <i>S. aureus</i> , <i>C. botulinum</i> , <i>E. coli</i> enteroemorragico, <i>L. monocytogenes</i> (Vestergaard, 2001)
Condimenti e salse conservate a temperatura ambiente	Salmonelle, <i>S. aureus</i> (Vestergaard, 2001).

1.7.2 *Livello e preparazione dell'inoculo*

Il livello di inoculo usato in un *challenge test* microbiologico dipende dall'obiettivo dello studio e dunque varia nel caso in cui si debbano ottenere dati relativi alla determinazione della stabilità e della *shelf-life* del prodotto o nel caso in cui si debba validare la fase in un processo. Solitamente, un livello di inoculo tra 10^2 e 10^3 UFC/g di prodotto è usato per accertare la stabilità microbiologica di una formulazione, mentre un livello di inoculo più elevato pari a 10^6 e 10^7 UFC/g di prodotto è necessario per la determinazione dell'efficienza di un trattamento termico o fisico nel ridurre la carica microbica dell'alimento.

La preparazione dell'inoculo che deve essere usato in un *challenge test* microbiologico è una fase importante dell'intero protocollo operativo. Le colture microbiche saggiate devono essere nella fase esponenziale di crescita microbica e generalmente a tal scopo si usano colture cellulari rivitalizzate.

In relazione al tipo di alimento l'inoculo può essere eseguito in modo specifico e diversificato, ad esempio, in matrici liquido-acquose con livelli di a_w maggiori di 0,96, come salse o sughi, l'inoculo può avvenire direttamente nel prodotto usando una quantità minima di acqua sterile o di tampone.

La quantità di inoculo utilizzata in ogni *challenge test* deve essere sempre valutata in relazione al numero di repliche biologiche necessarie, considerando che un minimo di tre test vanno ripetuti per definire valida una procedura sperimentale. Il numero di repliche allestite può essere ridotto in caso di studi di validazione o in campioni di controllo non inoculati.

1.7.3 *Durata dello studio*

La durata di un *challenge test* deve generalmente corrispondere alla *shelf-life* dell'alimento in analisi o in alcuni casi prolungarsi almeno di un terzo rispetto il periodo di conservazione, al fine di stabilire la sicurezza per il consumatore in caso di assunzione del prodotto oltre la data di scadenza.

Un ulteriore fattore da tenere in considerazione, che impatta sulla durata del *challenge test*, è la temperatura di conservazione del prodotto. I prodotti refrigerati possono essere conservati per l'intera durata della *shelf-life* al di sotto della temperatura di conservazione target, ma se si trovano a temperature d'abuso (temperature più alte rispetto a quelle di corretta conservazione) la loro *shelf-life* si riduce drasticamente (Jay, 1996).

Tuttavia ci sono dei ristoranti che preferiscono tenere dei prodotti a temperatura ambiente in modo tale da avere una maggiore facilità d'uso di questi prodotti. Ad esempio, alcuni *fast food* lasciano le fette di formaggio a temperatura ambiente per più di 8 ore affinché queste possano sciogliersi più facilmente. Questa pratica però può determinare, a causa di *cross-contamination*, l'insorgenza di proliferazione batterica da parte di patogeni e quindi per questo motivo devono essere effettuati *challenge test* con una durata di almeno 12 ore (Jay, 1996). La frequenza dei test è influenzata dalla durata del *challenge test*, in particolare se la *shelf-life* è misurata in giorni, la frequenza dei test dovrebbe essere giornaliera, mentre se la *shelf-life* è considerata in settimane o mesi, la frequenza è generalmente settimanale.

1.7.4 *Analisi del campione*

Al fine di ottenere dei risultati affidabili ed attendibili per ogni *challenge test* è necessario avere campioni in doppio o in triplo per le analisi e nel caso in cui sia necessario ottenere livelli di affidabilità ancora più elevati, il numero di repliche dovrebbero essere incrementate. La selezione degli strumenti e della tecnica di conteggio più appropriata, conta in piastra o *Most Probable Number*, dipendono dal tipo di patogeno o surrogato usato nello studio.

Se il prodotto non presenta microflora autoctona possono essere usati strumenti non selettivi per la conta diretta, mentre per prodotti con livelli elevati di microflora autoctona risulta fondamentale analizzare la dinamica microbica durante tutta la *shelf-life* con strumenti selettivi e specifici (Jay, 1996). Nel caso in cui si debbano ricercare tossine, come per *Staphylococcus aureus* o *C. botulinum*, devono essere eseguiti dei test ad intervalli frequenti e altamente selettivi durante la *shelf-life*.

1.8 Interpretazione dei dati

L'analisi dei dati ottenuti con un *challenge test* attraverso l'uso di appositi strumenti e grafici permette di definire il comportamento dei microrganismi inoculati evidenziando in tal modo se si verifica un abbattimento totale o una ridotta variazione della carica microbica o addirittura un aumento o una non alterazione della carica microbica stessa.

Per ottenere una valutazione complessiva sulla stabilità microbiologica della formulazione, i dati quantitativi dell'inoculo relativi alla microflora autoctona e i valori riguardanti i parametri fisico-chimici del prodotto devono essere valutati assieme, al fine di operare miglioramenti

del processo o del prodotto e permettendo di garantire maggiore sicurezza alimentare (Vestergaard, 2001).

Quando viene sfruttato un *challenge test* microbiologico come parte del protocollo di validazione di un processo, le analisi dei dati forniti mostreranno se il processo è capace di conseguire il livello di abbattimento microbiologico richiesto.

I challenge test possono essere utilizzati per la conferma di modelli microbiologici già esistenti o per lo sviluppo di modelli microbiologici predittivi. Quest'ultimi sono programmi informatici che simulano e predicono come specifici organismi si comportano in una formulazione a specifiche condizioni (tolleranza all'ossigeno, pH, a_w).

Complessivamente, un *challenge test* microbiologico ben progettato, può fornire informazioni fondamentali sulla qualità, la sicurezza microbiologica e la stabilità di un alimento.

1.SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi anni il consumo di frutta e verdura nei paesi industrializzati, è aumentato in maniera considerevole.

Questo è dovuto principalmente alla promozione di un'alimentazione sana ed equilibrata e a un incremento del consumo di prodotti locali che permettono il contatto diretto tra consumatore e produttore (Berger, *et al.*, 2010; Pittore, 2013; Pollack, 2011; Regmi, *et al.*, 2001).

Ad un aumento dei consumi dei prodotti vegetali è associato un incremento dei focolai e dei casi di malattie di origine alimentare.

Lo scopo del presente lavoro di tesi sperimentale è stato dunque quello di valutare l'effetto antimicrobico della combinazione di ultrasuoni, metodi non termici e/o fisico-chimici sull'inattivazione microbica in vegetali freschi non trattati.

In particolare, lo studio ha riguardato un prodotto tipico della tradizione italiana la giardiniera di verdure, con principale riferimento alla valutazione microbiologica dei peperoni rossi.

Al fine di validare il risultato analitico ottenuto è stato allestito un *challenge test* con la specie *Listeria innocua* inoculata su campioni sterili delle verdure in esame.

2.MATERIALI E METODI

2.1 Preparazione della giardiniera

La giardiniera è un alimento tipico della tradizione italiana a base di verdure tagliate con forme geometriche definite e poste in un liquido di governo che ne permette la conservazione e quindi il consumo nei mesi in cui alcuni ortaggi non sono naturalmente disponibili.

Le verdure normalmente utilizzate in questa preparazione sono:

- cavolfiore bianco;
- cavolfiore viola (cavolo siciliano);
- daykon (cavolo cinese);
- carote;
- sedano;
- peperoni rossi.

In questo studio, è stata posta l'attenzione principalmente su:

- peperoni rossi in bagna bianca.

I peperoni rossi acquistati in supermercati locali sono stati lavati in acqua corrente e privati dei peduncoli e di eventuali imperfezioni naturali.

In particolare, i vegetali sono stati tagliati secondo parametri ben specifici in modo tale da definire delle forme romboidali con i lati di 2 cm e lo spessore di circa 1 cm (Figura 2.1).



Figura 2.1: Esempio di peperone tagliato per la preparazione della giardiniera secondo le modalità indicate

Le verdure così tagliate sono state inserite, in ragione di 50 gr, in sacchetti sterili idonei al trattamento con sonicatore e aggiunte di 100 gr di una bagna o liquido di governo, rappresentata da una soluzione acquosa composta da:

- 500 gr acqua;
- 500 gr vino bianco;
- 250 gr aceto di vino bianco;
- 100 gr zucchero semolato;
- 30 gr sale fino.

I sacchetti sono stati dunque sigillati utilizzando un dispositivo per il confezionamento sottovuoto (Figura 2.2) e successivamente trattati per 20 minuti con sonicatore seguendo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice.

Le informazioni inerenti le caratteristiche tecniche e i parametri di processo non saranno in questa tesi discussi per motivi di riservatezza legati al brevetto della ditta costruttrice.

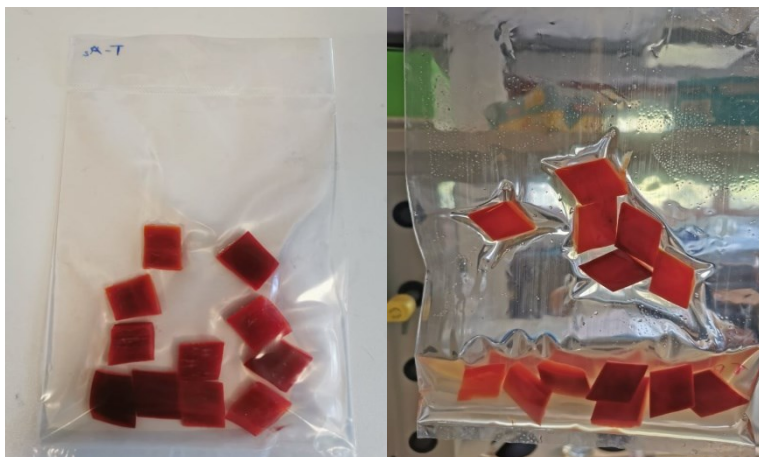


Figura 2.2: *Sacchetto sottovuoto idoneo al trattamento con sonicatore contenente i peperoni tagliati e il liquido di governo*

2.2 Analisi microbiologiche

2.2.1 *Diluizioni scalari decimali*

Aliquote di 1 mL di liquido di governo di peperoni rossi non trattati e peperoni sottoposti a trattamento di sonicazione sono state utilizzate per l'allestimento di diluizioni scalari decimali in 9 mL acqua peptonata sterile (0,1% peptone p/v) (WVR Chemicals).

Le successive diluizioni seriali sono state allestite fino ad una diluizione pari a 10^{-7} .

2.2.2 *Conte vitali in piastra*

Per l'allestimento delle conte vitali in piastra per inclusione, aliquote di 1 mL di ciascuna diluizione scalare sono state sfruttate per la determinazione dei gruppi microbici di interesse attraverso i seguenti terreni di coltura:

- *Plate Count Agar* (PCA) (WVR Chemicals) terreno selettivo per la determinazione dei microrganismi mesofili aerobi totali incubato a 30 °C per 48 h;
- *De Man Rogosa e Sharpe* (MRS) (WVR Chemicals), addizionato di cicloesimide (100 mg L) (WVR Chemicals) per la determinazione dei lattobacilli incubato a 30 °C per 48h-72 h;
- *Violet Red Bile Glucose Agar* (VRBGA) (WVR Chemicals), per la determinazione delle enterobacteriaceae incubato a 37°C per 24 h.

Per l'allestimento delle conte vitali in piastra con la tecnica della semina per spandimento, aliquote di 100 µL di ciascuna diluizione scalare sono state sfruttate per la determinazione dei gruppi microbici di interesse attraverso i seguenti terreni di coltura:

- *Pseudomonas Agar Base* (PAB) (WVR Chemicals), con aggiunta di CFC supplement per la determinazione delle Pseudomonadaceae incubato a 30°C per 48-72 h;
- *Rose Bengal Chloranphenicol Agar* (RBA) (WVR Chemicals), per l'enumerazione degli eumiceti incubato a 25°C per 48-96 h;
- *Plate Count Agar* (PCA) (WVR Chemicals), per la determinazione dei microrganismi sporigeni incubato a 30 °C per 48 h.

In dettaglio, per l'enumerazione dei microrganismi sporigeni aliquote di 1 mL di liquido di governo sono state sottoposte a incubazione a 80 °C per 15 minuti in Thermobloch (FALC) seguito da shock termico (5 minuti in ghiaccio) al fine di indurre la germinazione delle spore e la disattivazione delle forme vegetative (Milanovic, *et al.*, 2017).

La carica microbica è stata espressa come valore medio dei Log delle Unità Formanti Colonia (UFC) su mL di liquido di governo analizzato ± deviazione standard.

2.3 Challenge test su *Listeria innocua*

2.3.1 Allestimento conte vitali in piastra preliminare per la valutazione della carica microbica

Una coltura pura di *L. innocua* appartenente alla Collezione di microrganismi del Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari dell'Università degli studi di Torino è stata sfruttata per l'allestimento dei *challenge test*.

La coltura mantenuta in glicerolo (1:1 glicerolo - acqua) a -80°C è stata posta su terreno *Brain Heart Infusion Agar* (BHI) per 24 h a 37 °C al fine di rivitalizzare la coltura stessa.

A seguito di tale processo al fine di ottenere una coltura pura in fase esponenziale di crescita la coltura è stata trasferita mediante striscio di purificazione su nuovo terreno BHI ed incubata per 24 h a 37 °C.

La coltura pura così ottenuta è stata successivamente utilizzata per l'allestimento del *challenge test* (Figura 2.3).



Figura 2.3: Piastra Petri contenente *Listeria innocua* su terreno *Brain Heart Infusion agar*

2.3.2 Allestimento *challenge test* con *Listeria innocua* su peperoni rossi in bagna bianca

Peperoni rossi tagliati come descritto nel paragrafo 2.1, sono stati suddivisi in 4 sacchetti monouso sterili in ragione di 50 gr caduno e lavati con una soluzione di etanolo al 90% v/v agitando manualmente in modo continuativo per 2 minuti in condizioni di sterilità sotto cappa a flusso laminare (GELAIRE HF48). A seguito dell'allontanamento della soluzione di etanolo, i campioni sono stati risciacquati con acqua deionizzata sterile per 4 volte al fine di rimuovere completamente eventuali residui di etanolo (Figura 2.4)



Figura 2.4: Campioni di peperoni rossi con aggiunta di liquido di governo

In ognuno dei 4 campioni di peperoni rossi sterili sono stati aggiunti 100 mL di liquido di governo sterile e trattati sulla base del seguente protocollo sperimentale:

- 2 campioni sono stati inoculati con 10 ansate di *L. innocua* al fine di ottenere una carica microbica di $\sim 10^{-7}$ (Figura 2.5);
- 2 campioni non sono stati inoculati.



Figura 2.5: Campioni inoculati con ansate di *L. innocua*

Per tutti i campioni 1 mL di liquido di governo è stato prelevato e sfruttato per l'allestimento di diluizioni scalari decimali e successive conte vitali in piastra su BHI inoculato per 24 h a 37 °C per la valutazione della sterilità dei campioni non sottoposti ad inoculo (campione di controllo) e contestualmente per la valutazione dell'inoculo effettuato.

A seguito di tale operazione, i campioni sigillati sono stati sottoposti a trattamento con sonicatore per 20 minuti a temperatura ambiente.

I campioni post-sonicazione sono stati analizzati, mediante l'allestimento di diluizioni decimali seriali e conte vitali in piastra su terreno BHI per la valutazione l'effetto del trattamento stesso.

2.3.3 Allestimento challenge test con *Listeria innocua* su peperoni rossi in soluzione fisiologica

Per il challenge test con soluzione fisiologica i peperoni rossi tagliati come descritto nel paragrafo 2.1 sono stati aggiunti di 100 mL di soluzione fisiologica allo 0,9% di NaCl e trattati sulla base del seguente protocollo sperimentale:

- 2 campioni sono stati inoculati con 10 ansate di *L. innocua* al fine di ottenere una carica microbica di $\sim 10^{-7}$;
- 2 campioni non sono stati inoculati.

Analogamente a quanto descritto nel paragrafo 2.3.2 tutti i campioni sono stati sfruttati per l'allestimento di diluizioni scalari decimali e conte vitali in piastra su terreno BHI prima e dopo il trattamento con sonicatore per 20 minuti a temperatura ambiente.

2.3.4 Allestimento challenge test con Listeria innocua in liquido di governo

Al fine di valutare la vitalità cellulare di *L. innocua* in liquido di governo è stato allestito un *challenge test* di verifica.

In dettaglio, una coltura cellulare pura di *L. innocua*, incubata a 37 °C per 24 h su terreno di crescita BHI, è stata utilizzata per inoculare 50 mL di liquido di governo mediante ansa monouso sterile da 1 µL, in ragione di un'ansata ogni 10 mL di liquido di governo.

Il liquido di governo così inoculato è stato immediatamente analizzato mediante allestimento di diluizioni seriali decimali e successive conte vitali in piastra. Contestualmente il liquido di governo inoculato è stato mantenuto per 20 minuti a temperatura ambiente e al termine del periodo di incubazione il campione è stato sottoposto ad analisi microbiologiche mediante allestimento di diluizioni seriali decimali e successive conte vitali in piastra su mezzo di coltura BHI.

3.RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati delle conte vitali in piastra allestite per i campioni di peperoni rossi in liquido di governo prima e dopo il trattamento di sonicazione sono mostrati in Tabella 3.1

Tabella 3.1. Conte vitali peperoni in liquido di governo.

Peperoni rossi controllo		Peperoni rossi trattamento con sonicazione	
Gruppo microbico	Log UFC/ml	Gruppo microbico	Log UFC/ml
Mesofili aerobi totali	1,22 ± 0,11	Mesofili aerobi totali	1,12 ± 0,11
Lattobacilli mesofili	<1	Lattobacilli mesofili	<1
Eumiceti	<1	Eumiceti	<1
Sporigeni	1,39 ± 0,12	Sporigeni	1,36 ± 0,26
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1	<i>Enterobacteriaceae</i>	<1
<i>Pseudomonadaceae</i>	<1	<i>Pseudomonadaceae</i>	<1

La carica microbica è espressa come media dei Log UFC g⁻¹ ± deviazione standard.

Dalle analisi microbiologiche si evince una carica batterica estremamente bassa per tutti i gruppi microbici di interesse con valori inferiori a 1 Log UFC/mL, fatta eccezione per i mesofili aerobi totali caratterizzati da una carica pari a 1,22 ± 0,11 Log UFC/mL e i batteri sporigeni presenti con una carica di 1,39 ± 0,12 Log UFC/mL.

Dai dati ottenuti dalle conte vitali in piastra a seguito del trattamento di sonicazione è inoltre possibile evidenziare, esclusivamente per i due gruppi batterici rilevati, una sostanziale stabilità della carica microbica, indicando in tal senso una potenziale inefficienza del trattamento con sonicatore.

In relazione ai risultati ottenuti dal trattamento di peperoni rossi in liquido di governo, sono stati allestiti dei *challenge test* su ceppi microbici di riferimento legati all'insorgenza di focolai epidemici e in particolare sulla specie *L. monocytogenes*, sfruttando come surrogato microbico la specie *L. innocua* per la valutazione dell'attività antimicrobica del trattamento con ultrasuoni e del liquido di governo, considerati singolarmente e in associazione.

I risultati del challenge test eseguito su peperoni rossi in bagna bianca inoculati con una coltura pura di *L. innocua* sono mostrati in Tabella 3.2. In particolare, è stata evidenziata una carica microbica di 7,90 ± 0,02 Log UFC/mL prima del trattamento con sonicatore, mentre a seguito del trattamento con sonicatore, per 20 minuti a temperatura ambiente, la carica microbica si è attestata attorno ad un valore di 5,34 ± 1,04 Log UFC/mL. I campioni di peperoni rossi non

inoculati hanno invece mostrato una carica microbica pari a 0 Log UFC/mL sia prima che dopo il trattamento con sonicatore a conferma dell'efficacia dell'operazioni di lavaggio con etanolo e quindi sull'efficacia del raggiungimento della condizione di sterilità del campione sottoposto a *challenge test*.

Tabella 3.2: Dati challenge test per peperoni rossi inoculati con *Listeria innocua* con liquido di governo

	Peperoni rossi in bagna bianca Non inoculati Log UFC/mL	Peperoni rossi in bagna bianca Inoculati con <i>L. innocua</i> Log UFC/mL
Pre-trattamento	0	7,90 ± 0,02
Post-trattamento	0	5,34 ± 1,04

La carica microbica è espressa come media dei Log UFC g⁻¹ ± deviazione standard

Per definire se la riduzione di carica evidenziata dal *challenge test*, pari a circa 2 ordini logaritmici, sia imputabile all'attività antimicrobica del trattamento con sonicatore è stato condotto un secondo *challenge test* nel quale i peperoni rossi saggiati sono stati posti in soluzione fisiologica sterile, inoculati analogamente a quanto operato in precedenza e trattati mediante sonicatore per 20 minuti a temperatura ambiente.

Dall'analisi dei dati riportati in Tabella 3.3 si evince che il trattamento di sonicazione non è in grado di determinare una riduzione della carica microbica di *L. innocua*. Le conte vitali su BHI, infatti, hanno evidenziato una carica pari a 8,43 ± 0,15 Log UFC/mL prima del trattamento di sonicazione e una carica di 8,34 ± 0,04 Log UFC/mL dopo il trattamento, che risulta dunque sostanzialmente invariata.

L'apparente inefficienza del trattamento di sonicazione evidenziato da questa prova sperimentale può essere imputabile alla maggiore resistenza evidenziata per i batteri Gram-positivi nei confronti del trattamento con ultrasuoni rispetto ai batteri Gram-negativi; (Piyasena, *et al.*, 2003; Ulusoy, *et al.*, 2007). I dati ottenuti nel presente lavoro di tesi infatti risultano in accordo con quanto descritto da Ulusoy e collaboratori (2007) sulla resistenza di *L. monocytogenes* al trattamento con ultrasuoni soprattutto se sfruttati come unica tecnica di inattivazione microbica.

Tabella 3.3: Dati challenge test per peperoni rossi inoculati con *Listeria innocua* con soluzione fisiologica

	Peperoni rossi in soluzione fisiologica Non inoculati Log UFC mL ⁻¹	Peperoni rossi in soluzione fisiologica Inoculati con <i>L. innocua</i> Log UFC mL ⁻¹
Pre-trattamento	0	8,43 ± 0,15

Post-trattamento	0	8,34 ± 0,04
------------------	---	-------------

I valori sono espressi come media dei logaritmi delle UFC ± deviazione standard

Alla luce di questi dati sperimentali e delle conoscenze bibliografiche è stato allestito un ulteriore *challenge test* al fine di definire l'impatto della bagna bianca sulla vitalità cellulare di *L. innocua* in relazione alla presenza di acido acetico (0,9%) e etanolo (1,8%).

A tal fine dunque peperoni rossi lavati e sterilizzati come descritto sono stati posti in bagna bianca e il campione è stato inoculato, sulla base del metodo utilizzato per gli altri due *challenge test*, e lasciato a temperatura ambiente per 20 minuti.

Dalle analisi si evince che il liquido di governo determina una riduzione di carica microbica di *L. innocua* pari a circa 2 ordini logaritmici analogamente a quanto identificato con il primo *challenge test*, indicando quindi un'azione antimicrobica del liquido di governo stesso. In dettaglio, infatti, la carica microbica si è attestata attorno a $7,70 \pm 0,17$ Log UFC/mL subito dopo l'inoculo di *L. innocua* scendendo dopo 20 minuti ad un valore di $5,27 \pm 1,20$ Log UFC/mL.

Nell'ultimo ventennio, molti studi sono stati condotti al fine di identificare gli effetti antimicrobici del trattamento con ultrasuoni, identificando nella cavitazione acustica intracellulare la principale responsabile dell'efficienza di tale trattamento (Butz & Tauscher, 2002; Fellows, 2000; Suslick, 1998).

In relazione alle difficoltà di ottenere risultati univoci e coerenti, molti studi sono stati condotti al fine di valutare l'effetto combinato del trattamento con ultrasuoni e altri fattori quali composti chimici come disinfettanti commerciali, acidi organici e agenti antimicrobici (Huang, *et al.*, 2006; Rivera, *et al.*, 2011; São José & Vanetti, 2012; Seymour, *et al.*, 2002; Zhou, *et al.*, 2009; Sagong, *et al.*, 2011). In particolare, uno studio condotto da Sagong e collaboratori (2011) su campioni di prezzemolo, lattuga, cavolo, carota, cetriolo, fragola, cipolla e peperone ha dimostrato l'efficienza di trattamenti con ultrasuoni in associazione con acidi organici. L'effetto combinato del trattamento con ultrasuoni per 5 minuti e 2% di acido organico ha mostrato la massima efficienza di riduzione nei confronti delle specie *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium* e *L. monocytogenes*.

In relazione alle evidenze scientifiche e ai dati ottenuti dal presente lavoro di tesi sperimentale è possibile definire la necessità di condurre ulteriori studi sperimentali con lo scopo di definire in modo più dettagliato e specifico l'azione degli ultrasuoni sui vegetali freschi e l'interazione di questo trattamento con il liquido di governo.

4. CONCLUSIONI

Fino ad oggi i risultati ottenuti da diversi studi condotti su matrici alimentari utilizzando trattamenti di sonicazione, sono estremamente variabili.

Infatti le informazioni individuate sono complicate da confrontare perché ottenute sfruttando parametri diversi, come frequenza o efficienza degli ultrasuoni, tempo di trattamento, temperatura, diverse specie come *E. coli*, *S. typhimurium*, *L. innocua* e svariate tipologie di frutta e verdura.

Di conseguenza, trovare le migliori condizioni, dosi e combinazioni dei trattamenti per le diverse tecnologie di decontaminazione rappresenta un'ulteriore sfida per l'adattamento commerciale degli ultrasuoni.

Saranno fondamentali, ulteriori studi per approfondire la capacità degli ultrasuoni, di ridurre la carica microbica contenuta negli alimenti, proprio perché si dimostrano una delle migliori "tecnologie verdi" applicabili nel futuro dell'industria alimentare.

Infatti, gli ultrasuoni non sono solo versatili ed ecologici, ma comportano un dispendio economico minimo e permettono di preservare le caratteristiche chimiche del prodotto stesso. Per quanto riguarda l'inattivazione microbica associata alla sonicazione, la presente tesi sperimentale ha permesso di mettere in luce come l'uso degli ultrasuoni applicati ai prodotti vegetali non abbia un effetto antimicrobico evidente e quindi non comporta effettivamente, una diminuzione della flora microbica.

La riduzione dei microrganismi contenuti nell'alimento è maggiormente causata da composti, come l'acido acetico e l'etanolo, che risultano essere presenti nella composizione del liquido di governo.

È necessario dunque effettuare ulteriori test per capire se la diminuzione della carica microbica è data dall'utilizzo di ultrasuoni oppure grazie alla presenza di composti organici nell'alimento, al fine di confrontare l'efficienza di questi trattamenti rispetto a trattamenti termici normalmente applicati per la riduzione della carica microbica.

BIBLIOGRAFIA

- Adzitey, F., Huda, N. & Ali, G., 2013. Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks. *Biotech*, p. 9.
- Alegria, C., Pinheiro, J., Gonçalves, E.M., Fernandes, I., Moldao, M. & Ambreu, M., 2009. Quality attributes of shredded carrot (*Daucus carota* L. cv. Nantes) as affected by alternative decontamination processes to chlorine.. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, p. 19.
- Alliger, H., 1975. Ultrasonic disruption. *American Laboratory*, 10 (75), p. 18.
- Allos, B., Moore, M.P., Griffin, P.M. & Taure, P.V., 2004. Surveillance for sporadic foodborne disease in the 21st century: the FoodNet perspective. *Clinical Infectet District*, 33(3), p. 9.
- Alexandre, E., Brandao, T. & Silva, C., 2012. Efficacy of non-thermal technologies and sanitizier solutions on microbial load reduction and quality retention of strawberries.. *Journal of Food Engineering*, Issue 108, p. 19.
- Alexandre, E., Brandao, T. & Silva, C., 2013. Impact of non-thermal technologies and sanitizier solutions on microbial load reduction and quality factor retention of frozen red bell peppers. *Innovative Food science and Emerging Tecnologies*, 22 (109), p. 19.
- Alvarez, I., Manas, P., Virto, R. & Condon, S., 2006. Inactivation of Salmonella Senftenberg 775W by ultrasonic waves under pressure at different water activities.. *International Journal of Food Microbiology*, 2 (108), p. 19.
- Amoah, P., Keraita, B., Akple, M., Drechsel, P., Abaidoo, R.C. & Konradsen, F., 2011. Low-cost Options for Reducing Consumer Health Risks from Farm to Fork where Crops Are Irrigated with Polluted Water in West Africa. *IWMI Research Report*, 41, p. 13.

- Arvanitoyannis, I. S., Bouletis, A. D. & Papa, E. A. & Gragtiz D. C., 2011. Microbial and sensory quality of “Lollo verde” lettuce and rocket salad stored under active atmosphere packaging. *Anaerobe*, 17(6), p. 16.
- Avery, M., Killman, K. & Jones, L., 2005. Survival of E. coli O157:H7 in organic wastes destined for land application. *Journal of Applied Microbiology*, 98(4), p. 12.
- Baumann, A. R., Martin S. E. & Feng. H., 2005. Power ultrasound treatment of *Listeria monocytogenes* in apple cider.. *Journal of Food Protection*, 68(11), p. 18.
- Baumann, A. R., Martin S. E. & Hao F., 2009. Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms from stainless steel by use of ultrasound and ozone.. *Journal of Food Protection*, 72(6), p. 17/18.
- Benjamin, L., Atwill, E.R., Russell, M.J., Cooley, M., Carychao, D., Gorski, L.,Mandrell, R.E., 2013. Occurrence of generic *Escherichia coli*, *E. coli* O157 and *Salmonella* spp. in water and sediment from leafy green produce farms and streams on the Central California coast. *International Journal of Food Microbiology*, 165(1), p. 13.
- Berger, C., Sodha, S.V., Shaw, R.K., Griffin, P.M., Pink, D., Hand, P., Frankel, G., 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology*, 12(9), p. 9.
- Bermudez-Aguirre, D., Corradini, M.G., Mawson, R., & Barbosa-Canovas, G.V., 2009. Microstructure of fat globules in whole milk after thermosonication treatment.. *Journal of Food*, 73(7), p. 18.
- Bernard, M., Faber, M., Wilking, H., Haller, S., Höhle, M., Schielke, A., Hamouda, O., 2014. Large multistate outbreak of norovirus gastroenteritis associated with frozen strawberries, Germany, 2012. *Surveillance and outbreak reports*, 19(8), p. 11.
- Beuchat, L., 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*, 4(4), p. 10.
- Botana, L., 2014. Seafood and Freshwater Toxins. *Pharmacology, Physiology, and Detection*, p. 9.
- Brackett, R., 1994. Microbiological spoilage and pathogens in minimally processed refrigerated fruits and vegetables. *Minimal Process Refrigerate Fruits Vegetables*, p. 10.
- Buck, J., Walcott, R. & Beuchat, L., 2003. Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. *Plant Health Progress*, 10(1), p. 10.

- Butz, P. & Tauscher, B., 2002. Emerging technologies: chemical aspects.. *Food Research International* , 35(2/3), p. 35.
- Calder, L., Simmons, G., Thornley, C., Taylor, P., Pritchard, K., Greening, G., Bishop, J., 2003. An outbreak of hepatitis A associated with consumption of raw blueberries. *Epidemiology and Infection*, 131(1), p. 11.
- Callejón, R.M., Rodríguez-Naranjo, M.I., Ubeda, C., Hornedo-Ortega, R., Garcia-Parrilla, M.C., Troncoso, A.M., 2015. Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the united states and European Union: Trends and causes. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(1), p. 9.
- Cao, S., Hu, Z., Pang, B., Wang, H., Xie, H., Wu, F., 2010. Effect of ultrasound treatment on fruit decay and quality maintenance in strawberry after harvest. *Food Control*, 21(4), p. 19.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention, 2013. Multistate Outbreak of Hepatitis a Virus Infections Linked to Pomegranate Seeds from Turkey. p. 11.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention, 2017. List of Selected Multistate Foodborne Outbreak Investigations. *Centers for Disease Control and Prevention*, p. 11.
- Chandra, D., Gang Kim, J. & Yong. P.K., 2012. Changes in microbial population and quality of microgreens treated with different sanitizers and packaging films. *Research Report*, 53(32), p. 16.
- Char, C., Silveira, A.C., Inestroza-Lizardo, C., Hinojosa, A., Machucaad, A., Escalonaa, V.H., 2012. Effect of noble gas-enriched atmospheres on the overall quality of ready-to-eat arugula salads. *Postharvest Biology and Technology*, 73(50), p. 16.
- Deering, A., Mauer, L. & Pruitt, R., 2012. Internalization of E. coli O157:H7 and Salmonella spp. in plants: A review. *Food Research International*, 45(2), p. 14.
- Dentinger, C., Bower, W.A., Nainan, O.V., Cotter, S.M., Myers, G., Dubusky, L.M., Fowler, S., Salehi, E.D.P., Bell, B.P., 2001. An outbreaks of hepatitis A associated with green onions. *Journal Infectd District*, 183(8), p. 11.
- Earnshaw, R., Appleyard, J. & Hurst, R., 1995. Understanding physical inactivation processes: Combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 28(2), p. 18.

- EFSA, European Food Safety Authority, 2013. Scientific opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1: outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations. *EFSA Journal*, 11(1), p. 9.
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M. & Scherer, S., 2004. Bacillus cereus, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Molecular Nutrition and Food Research*, 48(4), p. 9.
- Elizaquivel, P., Sanchez, G. Selma. M.V., R., Aznar.,2011. Application of propidium monoazide-qPCR to evaluate the ultrasonic inactivation of Escherichia coli O157: H7 in fresh-cut vegetable wash water. *Food Microbiology*, p. 19.
- Faour-Klingbeila, D., Murtadab, M., V., Kuri, & Todd, C.D.E., 2016. Understanding the routes of contamination of ready-to-eat vegetables in the Middle East. *Food Control*, Volume 62, p. 13.
- Farber, J. & Peterkin, P., 1991. Listeria monocytogenes, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, 55(3), p. 9.
- Fellows, P., 2000. Food processing technology: principles and practice. 2nd ed. CR Press New York, p. 35.
- Feng, H., Yang, W. & Hielscher, T., 2008. Power ultrasound.. *Food Science and Technology International*, 14(5), p. 18.
- Frank, C. Semenov, A.V., Termorshuizen, A.J., De Vos, O.J., Bokhorst, J.G., Van Bruggen, A.H.C., 2007. Major outbreak of hepatitis A associated with orange juice among tourists, Egypt, 2004. *Emerging Infectious Diseases*, 13(1), p. 11.
- Gallego-Juárez, J., Rodriguez, G., Acosta, V. & Riera, E., 2010. Power ultrasonic transducers with extensive radiators for industrial processing.. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(6), p. 17.
- García-Gimeno & Zurera-Cosano, 1997. Determination of ready-to-eat vegetable salad shelf-life. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), p. 16.
- Garcia, M. L., Burgos, J., Sanz, B. & Ordonez, J., 1989. Effect of heat and ultrasonic waves on the survival of two strains of Bacillus subtilis.. *The Journal of applied bacteriology*, 77(6), p. 18.
- Gil, M., Allende, A. & Selma, M., 2009. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 134(1/2), p. 19.

- Gil, M., Selma, M., Lopez-Galvez, F. & Allende, A., 2011. Treatments to assure safety of fresh-cut fruits and vegetables. *Advances in Fresh-cut Fruit and Vegetables Processing*, p. 19.
- González-Buesa, J., Page, N., Kaminski, C., Ryserc, E.T., Beaudry, R., Almenara, E. 2014. Effect of non-conventional atmospheres and bio-based packaging on the quality and safety of *Listeria monocytogenes*-inoculated fresh-cut celery (*Apium graveolens* L.) during storage. *Postharvest Biology and Technology*, Volume 93, p. 16.
- Goss, M., Tubeileh, A. & Goorahoo, D., 2013. A Review of the Use of Organic Amendments and the Risk to Human Health. *Advances in Agronomy*, Volume 120, p. 12.
- Guerrero, S., López-Malo, A. & Alzamora, S., 2001. Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae*: Influence of temperature, pH and amplitude.. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2(1), p. 18.
- Guerrero, S., Tognon, M. & Alzamora, S. M., 2005. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to the combined action of ultrasound and low weight chitosan.. *Food Control*, 16(2), p. 18.
- Harris, L. Farber, J.N., Beuchat, L.R., Parish, M.E., Suslow, T.V., Garrett, E.H., Busta, F.F., 2003. Outbreaks Associated with Fresh Produce: Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and in Food Safety*, 2(1), p. 14.
- Heaton, J. & Jones, K., 2008. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *Journal of Applied Microbiology*, 104(8), p. 10.
- Higaki, K., Ueno, S., Koyano, T. & Sato, K., 2001. Effects of ultrasonic irradiation on crystallization behavior of tripalmitoylglycerol and cocoa butter.. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(5), p. 17.
- Hirneisen, H., 2012. Enteric viral interactions on fresh produce. *University of Delaware*, p. 14.
- Huang, T., Xu, C., Walker, K., West, P., Zhang, S., Weese, J., 2006. Modified Nuss Operation for Pectus Excavatum: Design for Decreasing Cardiopulmonary Complications. *Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York*, p. 19/35.
- Hughes, D. & Nyborg, W., 1962. Cell disruption by ultrasound.. *Science*, 138(3457), p. 18.

- (IFT) Institute of Food Technologists, Department of Science and Food Technologies, 2000. Special supplement: Kinetics of microbial inactivation for alternative food. (*Journal of Food Science*, 65(8), p. 20.
- Issa-Zachariaa, A., Kamitani, Y., Happiness, N. & KoichiIwasakic, M., 2011. Application of slightly acidic electrolyzed water as a potential non-thermal food sanitizer for decontamination of fresh ready-to-eat vegetables and sprouts. *Food Control*, 22(3/4), p. 16.
- Ivey, L. & Melanie, L., 2011. Assessing Microbial Risks and Management Strategies in Vegetables. *Ohio link*, p. 13.
- James, J., 2006. Overview of microbial hazards in fresh fruit and vegetables operations. *Microbiological Hazard of identification Fresh Fruit*, p. 12.
- Jay, J., 1996. Modern food microbiology.. 5th ed. New York: Chapman & Hall., p. 22/23.
- Johannessen, G.s, Bengtsson, G.B., Heier, B.T., Bredholt, S., Wasteson, Y., Rørvik, L.M., 2005. Potential uptake of Escherichia coli O157:H7 from organic manure into crisphead lettuce. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), p. 13.
- Josefson, D., 2003. Three die in US outbreak of hepatitis A.. *Clinical Research Ed.*, p. 13.
- Jung, Y., Jang, H. & Matthews, K., 2014. Effect of the food production chain from farm practices to vegetable processing on outbreak incidence. *Microbial Biotechnology*, 7(6), p. 10.
- Keraita, B., Konradsen, F., Drechsel, P. & Abaidoo R.C., 2007. Reducing microbial contamination on wastewater-irrigated lettuce by cessation of irrigation before harvesting. *European Journal*, 12(2), p. 13.
- Knorr, D., Froehling, A., Jaeger, H., Reineke, K., Schlueter, O., & Schoessler, K., 2011. Emerging technologies in food processing.. *Annual Review of Food Science and Technology*, Volume 2, p. 17.
- Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V. & Lee, D. U., 2004. Applications and potential of ultrasonics in food processing.. *Trends in Food Science & Technology*, 15(5), p. 18.
- Lado, B. H. & Yousef, A. E., 2002. Alternative food-preservation technologies: Efficacy and mechanisms.. *Microbes and Infection*, 2(2), p. 18.
- Le Loir, Y., Baron, F. & Gautier, M., 2003. Staphylococcus aureus and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2(1), p. 9.

- Lee, D., Heinz, V. & Knorr, D., 2003. Effects of combination treatments of nisin and high-intensity ultrasound with high pressure on the microbial inactivation in liquid whole egg.. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2(2), p. 18.
- Li, K. Weidhaas, J., Lemonakis, L., Khouryieh, H., Stone, M., Jones, L., Shen, C., 2017. Microbiological quality and safety of fresh produce in West Virginia and Kentucky farmers' markets and validation of a post-harvest washing practice with antimicrobials to inactivate Salmonella and Listeria monocytogenes. *Food Control*, Volume 17, p. 9.
- Llana-Ruiz-Cabello, S., Baños, P.A., Núñez, C., Bermúdez, J.M., Guillamón. E., Aucejo, S., Cameán, A.M., 2015. Characterisation and evaluation of PLA films containing an extract of Allium spp. to be used in the packaging of ready-to-eat salads under controlled atmospheres. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), p. 15.
- Loncarevic, S., Johannessen, G. & Rørvik, L., 2005. Bacteriological quality of organically grown leaf lettuce in Norway. *Letters in Applied Microbiology*, 41(2), p. 13.
- Lo'pez-Malo, A., Guerrero, S. & Alzamora, S., 1999. Saccharomyces cerevisiae thermal inactivation kinetics combined with ultrasound.. *Journal of Food Protection*, 62(10), p. 18.
- Lynch, M., Tauxe, R. & Hedberg, C., 2009. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: Risks and opportunities. *Epidemiology and Infection*, 137(3), p. 9.
- Mäde, D., Trübner, K., Neubert, E., Höhne, M., Johne, R., 2013. Detection and Typing of Norovirus from Frozen Strawberries Involved in a Large-Scale Gastroenteritis Outbreak in Germany. *Original Paper*, p. 11.
- Maffei, D., Batalha, B. L. M., Schaffner, D.W. & Franco M., B., 2016. Microbiology of organic and conventionally grown fresh produce. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), p. 13.
- Mason, J., Chemat, F. & Vinatoru, M., 2011. The extraction of natural products using ultrasound or microwaves.. *Current Organic Chemistry*, 15(2), p. 17.
- McClements, D. J., 1997. Ultrasonic characterization of foods and drinks: Principles, methods, and applications.. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37(1), p. 17.

- Milanovic, V., Osimani, O., Taccari, M. & Garofalo, C., 2017. Insight into the bacterial diversity of fermentation woad dye vats. *Society for Industrial Microbiology and Biotechnology*, p. 29.
- Muriel-Galeta, V., Cerisuelo, J., López-Carballo, G., Aucejo, S., Gavara, S., Hernández-Muñoz, P., 2013. Evaluation of EVOH-coated PP films with oregano essential oil and citral to improve the shelf-life of packaged salad. *Food Control*, 30(1), p. 15.
- Nygård, K. Andersson, Y., Lindkvist, P., Ancker, P., Asteberg, I., Dannetun, E., Eitrem, R., Hellström, L., Insulander, M., Skeddebrant, S., Stenqvist, T., Giesecke, J., 2001. Imported rocket salad partly responsible for increased incidence of hepatitis A cases in Sweden, 2000-2001.. *Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 6(10), p. 11.
- Olaimat, A. & Holley, R., 2012. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. *Food Microbiology*, 32(1), p. 12.
- Pachepsky, P., Blaustein, R., Whelan, R. & Shelton, D., 2011. Comparing temperature effects on Escherichia coli ,Salmonella , and Enterococcus survival in surface waters. *Letters in Applied Microbiology*, 59(3), p. 13.
- Pereira, L., Oweis, T. & Zairi, A., 2002. Irrigation management under water scarcity. *Agricultural Water Management*, 57(3), p. 13.
- Pittore, J., 2013. Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998–2008. *Emergency Infected Districy* , 19(3), p. 10/25.
- Piyasena, P., Mohareb, E. & McKellar, R. C., 2003. Inactivation of microbes using ultrasound: A review.. *International Journal of Food Microbiology*,, 87(3), p. 18/34.
- Pollack, S., 2011. Consumer demand for fruit and vegetables: the U.S. example. *Changing Structure of Global Food Consumption and Trade*, p. 9/25.
- Prakash, A., Guner, A., Caporaso, F. & D.M., F., 2000. Effects of Low-dose Gamma Irradiation on the Shelf Life and Quality Characteristics of Cut Romaine Lettuce Packaged under Modified Atmosphere. *Journal of Food Science*, 65(3), p. 16.
- Raso, J. & Barbosa-Canovas, G. V., 2003. Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques.. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*,, 43(3), p. 18.

- Raso, J., Pagan, R., Condon, S. & Sala, F. J., 1998. Influence of temperature and pressure on the lethality of ultrasound.. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), p. 18.
- Regmi, A., Deepak, M., Seale Jr, J. & Bernstein, J., 2001. Cross-country Analysis of Food Consumption Patterns. *Agriculture and Trade Report*, p. 9/25.
- Rivera, C., Venturini, M., Oria, R. & Blanco, D., 2011. Selection of a decontamination treatment for fresh Tuber aestivum and Tuber melanosporum truffles packaged in modified atmospheres. *Food Control*, 22(3/4), p. 19/35.
- Sagong, H., Lee, S.Y., Chang, P.S., Heu, S., Ryu, S., Choi, Y.J.,2011. Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce Escherichia coli O157:H7, Salmonella Typhimurium, and Listeria monocytogenes on organic fresh lettuce. *International Journal of Food Microbiology*, 145(3), p. 19/35.
- Santos, J., Herrero M., Mendiola, J.A, Oliva-Teles, M.T., Ibáñez, E., Delerue-Matos, C., Oliveira, M.P.P.B., 2014a. Assessment of nutritional and metabolic profiles of pea shoots: The new ready-to-eat baby-leaf vegetable. *Food Research International*, Volume 58, p. 15.
- São José, J. & Vanetti, M., 2012. Effect of ultrasound and commercial sanitizers in removing natural contaminants and Salmonella enterica Typhimurium *Food Control*, 24(1/2), p. 19/35.
- Sapers, G., 2001. Efficacy of Washing and Sanitizing Methods for Disinfection of Fresh Fruit and Vegetable Products. *Food Technology and Biotechnology*, 39(4), p. 19.
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.-A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M., 2011. Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), p. 10.
- Seymour, I. & Appleton, H., 2001. Foodborne viruses and fresh produce. *Journal of Applied Microbiology*, 91(5), p. 13.
- Seymour, I., Burfoot, D., Smith, R.L., Cox, L.A., & Lockwood, A., 2002. Ultrasound decontamination of minimally processed fruits and vegetables.. *International Journal of Food Science & Technology*,, 37(5), p. 19/35.
- Steele, M. & Odumeru, J., 2004. Irrigation water as source of foodborne pathogens on fruit and vegetables. *Journal of Food Protection*, 67(12), p. 14.

- Stratakosa, C., Linton, M., Patterson, F., Koidisa, A., 2016. Effect of high pressure processing in combination with *Weissella viridescens* as a protective culture against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat salads of different pH. *Food Control*, Volume 61, p. 15.
- Strausbaugh, L. & Herwaldt, B., 2000. *Cyclospora cayetanensis*: a review, focusing on the outbreaks of cyclosporiasis in the 1990s. *Clinical Infectious Diseases*, 31(4), p. 10.
- Strawn, L. Fortes, E.D., Bihn, E.A., Nightingale, K.K., Gröhn, Y.T., Worobo, R.W., Wiedmann, M., Bergholz, P.W., 2013b. Landscape and meteorological factors affecting prevalence of three food-borne pathogens in fruit and vegetable farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(2), p. 11.
- Strawn, L., Gröhn, Y.T., Warchocki, S., Worobo, R.W., Bihn, E.A., Wiedmann, M., 2013a. Risk factors associated with *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* contamination of produce fields. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24), p. 11.
- Suslick, K., 1998. Sonochemistry, *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, p. 35.
- Toivonen, P. & Brummell, D., 2008. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 48(1), p. 14.
- Turbé, A., De Toni, A., Benito, P., Lavelle, P., Camacho, N.R., Van Der Putten, V.H., Labouze, E., Mudgal, S., 2010. Soil biodiversity: functions, threats and tools for policy makers. *Bioemco*, p. 12.
- Ulusoy, B., BarisBingol, E. & Colak, H., 2007. Presence of *Listeria monocytogenes* in Turkish style fermented sausage (sucuk). *Food Control*, 18(1), p. 34.
- Uyttendaele, M., Jaykus, L.A., Amoah, P., Chiodini, A., Cunliffe, D., Jacxsens, L., Holvoet, K., Korsten, L., Lau, M., McClure, P., 2015. Microbial Hazards in Irrigation Water: Standards, Norms, and Testing to Manage Use of Water in Fresh Produce Primary Production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Technologies*, 14(4), p. 13.
- Vestergaard, E., 2001. Building product confidence with challenge studies.. *Dairy Food Environ Sanit*, 21(3), p. 20/21/24.
- Villamiel, M. & De Jong, P., 2000. Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* and *Streptococcus thermophilus* in Trypticase® Soy Broth and total bacteria in milk by continuous-flow ultrasonic treatment and conventional heating.. *Journal of Food Engineering*, 45(3), p. 18.

- Warriner, K., Huber, A., Namvar, A., Fan, W., Dunfield, K., 2009. Chapter 4 Recent Advances in the Microbial Safety of Fresh Fruits and Vegetables. *Advances in Food and Nutrition Research*, Volume 57, p. 12.
- Warriner, K. & Namvar, A., 2010. The tricks learnt by human enteric pathogens from phytopathogens to persist within the plant environment. *Current Opinion Biotechnology*, 21(2), p. 11.
- Westrell, T., Ciampa, T., Boelaert, F., Helwich, B., Korsgaard, H., Chriél, M., Mäkelä, P., 2009. Zoonotic infections in Europe in 2007: a summary of the EFSA-ECDC annual report. *Euro Surveill.: Bulletin Europeen sur les maladies transmissibles= Eur.*, 14(3), p. 9.
- Wrigley, D. & Llorca, N., 1992. Decrease of Salmonella typhimurium in skim milk and egg by heat and ultrasonic wave treatment.. *Journal of food protection (USA)*, Volume 55, p. 18.
- Zhao, B., Basir, O. A. & Mittal, G. S., 2001. Detection of occluded small objects in glass bottles filled with beverages via ultrasound center frequency tracing.. *LWT— Food Science and Technology*, 42(1), p. 9.
- Zhou, B., Feng, H. & Luo, Y., 2009. Publications on Thermal Stresses. *Journal of Thermal Stresses*, 39(2), p. 19/35.