



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

**APPLICAZIONE DI TRATTAMENTI CHIMICO-FISICI PER
LA DECONTAMINAZIONE MICROBIOLOGICA DI
VEGETALI**

**APPLICATION OF CHEMICAL-PHYSICAL
TREATMENTS FOR MICROBIOLOGICAL
DECONTAMINATION OF VEGETABLES**

TIPO TESI: sperimentale



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

APPLICAZIONE DI TRATTAMENTI CHIMICO-FISICI
PER LA DECONTAMINAZIONE MICROBIOLOGICA
DI VEGETALI

APPLICATION OF CHEMICAL-PHYSICAL
TREATMENTS FOR MICROBIOLOGICAL
DECONTAMINATION OF VEGETABLES

TIPO TESI: sperimentale

Studente:

ROSSELLA LAMPONI

Relatore:

PROF. ANDREA OSIMANI

Correlatore:

DOTT.SSA VESNA MILANOVIĆ

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

A mio zio Giovanni.

INDICE

ELENCO DELLE TABELLE	3
ELENCO DELLE FIGURE	4
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI.....	5
1. INTRODUZIONE	6
1.1 FATTORI CHE INFLUENZANO LA SICUREZZA MICROBICA DEI PRODOTTI FRESCHI.....	6
1.2 FONTI DI AGENTI PATOGENI CHE CONTAMINANO I PRODOTTI FRESCHI.....	7
1.3 SOPRAVVIVENZA O CRESCITA DI AGENTI PATOGENI SU PRODOTTI FRESCHI.....	8
1.4 CONTROLLO DEI MICRORGANISMI PATOGENI.....	10
1.5 DECONTAMINAZIONE MEDIANTE L'UTILIZZO DI ULTRASUONI NELL'INDUSTRIA ORTOFRUTTICOLA	13
1.6 ULTRASUONI.....	14
1.7 CHALLENGE TEST	21
1.8 SELEZIONE DI MICRORGANISMI	22
1.9 LIVELLO DELL'INOCULO	24
1.10 PREPARAZIONE DELL'INOCULO E METODO DI INOCULAZIONE.....	25
1.11 ANALISI DEL CAMPIONE	26
1.12 INTERPRETAZIONE DEI DATI	27
2. SCOPO DELLA TESI	28
3. MATERIALI E METODI	29
3.1 PREPARAZIONE GIARDINIERA	29
3.2 ANALISI MICROBIOLOGICHE	32
3.2.1 <i>Diluizioni e conte vitali in piastra</i>	33
3.3 CHALLENGE TEST <i>SACCAROMYCES CEREVISIAE</i>	34
3.3.1 <i>Allestimento conta vitale in piastra preliminare per la valutazione della</i> <i>carica microbica</i>	34
3.3.2 <i>Allestimento challenge test per Saccaromyces cereviseae in bagna bianca</i>	35
3.4 CHALLENGE TEST CON <i>ESCHERICHIA COLI</i>	36
3.4.1 <i>Allestimento conta vitale in piastra preliminare per la valutazione della</i> <i>carica microbica</i>	36

3.4.2 <i>Allestimento challenge test con Escherichia coli in bagna bianca</i>	36
3.4.3 <i>Allestimento challenge test con Escherichia coli su soluzione fisiologica</i>	37
3.4.4 <i>Conta vitale in piastra su liquido di governo con E. coli</i>	38
3.5 ANALISI STATISTICA.....	38
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	39
CONCLUSIONI	45
BIBLIOGRAFIA	46

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1.1: Applicazioni ad ultrasuoni ad alta potenza (singole e combinate) e riduzioni microbiche nel processo di decontaminazione dell'acqua di lavaggio di alcuni tipi di frutta e verdura.	15
Tabella 1.2: Gli effetti dei trattamenti di decontaminazione singoli e combinati applicati nelle carote triturate pretagliate e post tagliate sulla riduzione (Log UFC/ g) delle conte di microrganismi totali mesofili (TVC) e di lieviti e muffe (YMC) (Alegria et al 2009).	17
Tabella 1.3: I valori di riduzione di diverse concentrazioni di biossido di cloro singolo e combinato con ultrasuoni su Salmonella spp. ed E. coli O157:H7 su campioni di mele e lattuga inoculate (Huang et al., 2006).	17
Tabella 1.4: Valori di riduzione microbica tramite applicazione di biossido di cloro singolo o combinati con ultrasuoni (US) su Salmonella spp. ed E. coli O157:H7 campioni di mele e lattuga inoculate (Huang et al., 2006).	18
Tabella 1.5: Effetto degli ultrasuoni (US), con perossido di idrogeno (HP) e acido peracetico (PAA) da soli e combinate nel ridurre le cariche dei mesofili totali (TVC), il conteggio di lieviti e muffe (YMC) e Salmonella Typhimurium nei pomodori ciliegini (São José e Vanetti, 2012).	19
Tabella 1.6: Riduzione di E. coli O157: H7 inoculato sulla superficie degli spinaci trattati con ultrasuoni (US, 21,2 kHz, 200 W/L, 2 min) in combinazione con disinfettanti selezionati (Zhou et al., 2009).	20
Tabella 1.7: Conte microbiche Log UFC/g) di prugne trattati con ClO ₂ combinato ad ultrasuoni (Chen e Zhu, 2011).	20
Tabella 4.1: Esito prova cavolo bianco in bagna rossa.	39
Tabella 4.2: Esito prova del cavolfiore bianco in bagna rossa.	39
Tabella 4.3: Dati challenge test su peperoni in bagna bianca.	40
Tabella 4.4: Esito challenge test con soluzione fisiologica.	41
Tabella 4.5: Determinazione dell'attività antimicrobica della bagna bianca su Escherichia coli	42

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 3.1: Esempio di cavolfiore bianco tagliato per la preparazione della Giardiniera. 30	
Figura 3.2: Esempio di peperone rosso tagliato per la preparazione della Giardiniera.....30	
Figura 3.3: Rapa privata della buccia esterna e divisa in parti.31	
Figura 3.4: Rapa sbucciata in liquido composto da acqua e aceto di vino bianco.31	
Figura 3.5: Rapa e liquido di governo sottovuoto dopo sonicazione.31	
Figura 3.6: Rapa separata dal liquido.31	
Figura 3.7: Rapa tagliata alla julienne.31	
Figura 3.8: Rapa tagliata alla julienne e liquido di governo rosso sottovuoto.31	
Figura 3.9: Peperoni tagliati in bagna bianca.32	
Figura 3.10: Cavolfiori bianco in bagna rossa.....32	
Figura 3.11: Coltura pura di <i>Saccaromyces cerevisiae</i>34	
Figura 3.12: Preparazione dei campioni inoculati con 10 ansate di <i>S. cerevisiae</i>35	
Figura 3.13: Cultura pure di <i>Escherichia coli</i>36	
Figura 3.14: Preparazione dei campioni inoculati con 10 ansate di <i>E. coli</i>37	

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

DS	Deviazione standard.
FAO	Food and Agriculture Organization.
FDA	Food and Drug Administration.
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points.
HP	Perossido di idrogeno.
IFT	Institute of Food Technologists.
LAB	Lactic Acid Bacteria.
MAP	Confezionamento in atmosfera controllata.
PAA	Acido paracetico.
TVC	Cariche mesofili totali.
UE	Unione Eutropea.
US	Ultrasuoni.
USDA	United States Department of Agriculture.
WHO	World Health Organisation.
YMC	Conteggio di lieviti e muffe.

1. INTRODUZIONE

1.1 Fattori che influenzano la sicurezza microbica dei prodotti freschi

Il consumo di prodotti freschi è aumentato negli ultimi due decenni per molte ragioni; ad esempio, i consumatori sono più preoccupati di mantenersi in salute e di mangiare correttamente e, in risposta a questa domanda, una grande varietà di prodotti nazionali e importati è diventata disponibile in tutte le stagioni (*Warriner et al., 2009*). A livello globale, il consumo di frutta e verdura è aumentato in media del 4,5% annuo tra il 1990 e il 2004 (*UE, 2007*).

Allo stesso tempo, sono aumentati i focolai di malattie di origine alimentare associate al consumo di prodotti freschi (*Warriner et al., 2009*). Questo aumento potrebbe essere dovuto a: cambiamenti nel consumo personale, aumento dell'intensità della produzione di bestiame vicino ad aree di produzione intensa di prodotti vegetali, maggiore disponibilità di prodotti vegetali in tutto il mondo e aumento del numero di consumatori immunocompromessi (*Beuchat, 2002*).

Poiché la maggior parte dei prodotti freschi riceve una lavorazione minima e viene spesso consumata cruda, la contaminazione da agenti patogeni può rappresentare un rischio serio. Inoltre, il taglio, l'affettatura o la pelatura causano danni ai tessuti vegetali che rilasciano nutrienti e facilitano la crescita di microrganismi (*Harris et al., 2003*). La contaminazione microbica può verificarsi durante una qualsiasi delle fasi della filiera alimentare, dal produttore al consumatore (produzione, raccolta, lavorazione, stoccaggio all'ingrosso, trasporto o vendita al dettaglio e manipolazione in casa) e questa contaminazione può derivare da fonti ambientali, animali o umane (*FDA, 2001; WHO / FAO, 2008*). Per ridurre il rischio di contaminazione da agenti patogeni, nel 1998 la FDA ha pubblicato una "Guida per ridurre al minimo i rischi per la sicurezza microbiologica alimentare per frutta e verdura fresca" che ha sottolineato i principali serbatoi di contaminazione da patogeni e i metodi necessari per il loro controllo (*FDA, 1998*). Il lavaggio post-raccolta di prodotti freschi, generalmente effettuato con cloro, è un metodo importante per la riduzione dei patogeni (*Warriner et al., 2009*); tuttavia, i fattori che ne limitano l'efficacia includono

l'internalizzazione dei patogeni all'interno del tessuto vegetale, la formazione di biofilm da parte dei batteri e l'idrofobicità delle superfici delle piante (Whipps *et al.*, 2008). Metodi alternativi qualora consentiti dalla legge, per il controllo dei patogeni sui prodotti freschi includono: irradiazione (Gomes *et al.*, 2009; Mahmoud, 2010); ozono (Najafi e Khodaparast, 2009; Selma *et al.*, 2007); applicazione di batteriofagi (Abuladze *et al.*, 2008; Kocharunchitt *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2009b); batteri antagonisti (Cooley *et al.*, 2003, 2006; Scolari e Vescovo, 2004; Trias *et al.*, 2008) e una combinazione di batteri antagonisti con batteriofagi (Ye *et al.*, 2009, 2010).

1.2 Fonti di agenti patogeni che contaminano i prodotti freschi

Sebbene il deterioramento da batteri, lieviti e muffe prevalga su frutta e verdura crude, l'isolamento di batteri patogeni, parassiti e virus non è raro (Beuchat, 1998). Questa contaminazione può avvenire sia prima che dopo la raccolta (Beuchat, 2002; Beuchat e Ryu, 1997). Le fonti di contaminazione pre-raccolta comprendono suolo, feci, acqua per l'irrigazione, fungicidi e insetticidi ricostituiti, polvere, insetti, letame, animali selvatici o domestici e manipolazione umana. La manipolazione umana può contribuire alla contaminazione post-raccolta insieme alle attrezzature di raccolta, ai contenitori di trasporto, agli insetti, alla polvere, all'acqua di risciacquo, al ghiaccio, ai veicoli di trasporto e alle attrezzature di trattamento (Beuchat, 2002).

Il suolo è un ambiente naturale per varietà di agenti patogeni umani tra cui *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* ed *Aeromonas* spp. ma questo elenco di agenti patogeni viene ampliato considerevolmente dall'aggiunta di rifiuti animali al suolo (Whipps *et al.*, 2008).

Le condizioni nel luogo di coltivazione sono i principali fattori che influenzano la sicurezza microbica dei prodotti vegetali freschi (Brackett, 1999). I campi che contengono letame animale hanno maggiori probabilità di essere contaminati da agenti patogeni enterici a causa della loro capacità di sopravvivere nei suoli per mesi o anni (Doyle ed Erickson, 2008).

I patogeni di origine alimentare possono sopravvivere a lungo nel letame animale a temperature fresche.

La qualità dell'acqua di irrigazione e il tipo di sistema di irrigazione influenzano la sicurezza microbica dei prodotti freschi (Aruscavage *et al.*, 2006; Brackett, 1999; Warriner *et al.*, 2009). L'irrigazione a sommersione e spray rappresenta il rischio maggiore poiché l'acqua contaminata può essere depositata direttamente sulle foglie commestibili (FDA, 1998). Solomon e collaboratori (2002) hanno studiato l'effetto dei tipi di irrigazione sulla presenza

di *Escherichia coli* O157:H7 e hanno scoperto che il 90% delle piante di lattuga che erano state irrigate a spruzzo con acqua contenente 7 Log UFC/ml di *E. coli* O157:H7 erano contaminate, mentre solo 19 % di piante sono state contaminate quando è stata utilizzata l'irrigazione di superficie con la stessa concentrazione di *E. coli* O157:H7.

Il costo e la scarsa disponibilità di acqua potabile in alcune regioni può portare al riutilizzo di acqua non potabile (grigia o di scarico) di qualità incerta per l'irrigazione, che può provocare la contaminazione del prodotto.

La raccolta e la lavorazione influenzano la sicurezza microbiologica dei prodotti freschi. Queste attività includono il contatto umano e meccanico, l'immersione in acqua e il taglio o l'affettatura, che non solo hanno il potenziale per contaminare i prodotti con agenti patogeni, ma possono anche migliorare la crescita batterica (Brackett, 1999; Doyle ed Erickson, 2008). L'igiene personale dei lavoratori agricoli è considerata un fattore importante che influenza il trasferimento di batteri patogeni ai prodotti freschi. I coliformi sono stati isolati dai prodotti freschi in diverse fasi della produzione e della trasformazione e, sebbene siano spesso considerati un indicatore della contaminazione fecale animale e umana, la loro presenza sui prodotti può essere ambigua (Johnston et al., 2005). Al contrario, i lavoratori infetti sono considerati la fonte primaria di virus che causano malattie di origine alimentare (Berger et al., 2010) e *Shigella* (Warriner et al., 2009).

Le condizioni di distribuzione dei prodotti freschi possono influire sulla sicurezza batterica facilitando o prevenendo la contaminazione crociata di prodotti freschi e quindi impedendo l'opportunità di moltiplicazione batterica mediante l'uso di temperature di conservazione adeguate.

È evidente che i patogeni che destano preoccupazione possono sopravvivere per lunghi periodi in ambienti in cui le piante vengono coltivate per uso alimentare.

1.3 Sopravvivenza o crescita di agenti patogeni su prodotti freschi

La sopravvivenza dei microrganismi nei prodotti freschi è influenzata dalla disponibilità di nutrienti, dalle radiazioni UV, dai composti tossici rilasciati dalla pianta, dalla competizione con altri microrganismi e dall'essiccamento (Whipps et al., 2008).

Zhang et al. (2009b) hanno studiato la sopravvivenza di *E. coli* O157:H7 inoculato su lattuga intatta, scoprendo che l'organismo è sopravvissuto per almeno 25 giorni sulla superficie delle foglie, con una maggiore sopravvivenza sul lato inferiore delle foglie rispetto al lato superiore. L'interazione di agenti patogeni enterici come *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* con le superfici delle piante può portare allo sviluppo di biofilm o all'internalizzazione nel tessuto

vegetale (Aruscavage et al., 2006); le fimbrie batteriche o i flagelli possono facilitare l'infezione delle piante.

Morris et al. (1998) hanno stimato che il 10% e 40% dei batteri sulla superficie del prezzemolo intatto e delle foglie di indivia erano associati a biofilm. Olmez e Temur (2010) hanno osservato l'inizio della formazione di biofilm da parte di *E. coli* e *L. monocytogenes* su superfici di lattuga intatte dopo 24 ore di incubazione a 10 °C.

Le aree più comuni di aggregazioni batteriche sulle piante erano alla base dei tricomi, intorno agli stomi e lungo le vene nelle foglie (Aruscavage et al., 2006). Queste regioni hanno un'elevata bagnabilità che promuove la disponibilità di acqua e la lisciviazione dei nutrienti che a loro volta supportano la crescita dei microrganismi (Brandl e Mandrell, 2002).

La capacità dei patogeni di legarsi ai prodotti freschi dipende da fattori intrinseci ed estrinseci tra cui la motilità dell'agente patogeno, la loro interazione con altri organismi e la lisciviazione dei nutrienti dalla pianta (Aruscavage et al., 2006; Frank, 2001). La motilità facilita l'ingresso di agenti patogeni in ferite, stomi o altre aperture (Cooley et al., 2003; Kroupitski et al., 2009).

I patogeni possono persistere nelle fessure della buccia del prodotto e contaminare le parti commestibili durante il taglio, l'affettatura e la pelatura, oppure i patogeni possono entrare e diffondersi all'interno del prodotto attraverso la cicatrice dello stelo (FDA, 2009b).

Generalmente, il pH della maggior parte delle verdure è adatto alla crescita di batteri patogeni (Beuchat, 2002) e anche se i prodotti danneggiati possono avere un pH più elevato rispetto ai prodotti non feriti (Dingman, 2000), questi cambiamenti non risultano inibire la crescita dei microorganismi.

Diversi studi hanno dimostrato che i patogeni umani possono entrare negli stomi e sulle superfici di taglio dei prodotti vegetali freschi (Gomes et al., 2009; Seo and Frank, 1999).

Al contrario, diversi studi hanno scoperto che l'internalizzazione dei patogeni umani nei prodotti freschi era rara ed era influenzata da numerosi fattori tra cui il tipo di prodotti freschi, il ceppo patogeno, il livello di contaminazione e la maturità delle piante (Dong et al., 2003; Golberg et al., 2011; Jablason et al., 2005; Mitra et al., 2009; Pu et al., 2009). Golberg et al. (2011) hanno esaminato la frequenza dell'internalizzazione di *Salmonella typhimurium* in diversi tipi di verdure intatte e foglie di erbe fresche durante uno studio di 2 anni. La frequenza variava in modo significativo tra le diverse piante inoculate. Le frequenze più alte sono state osservate nelle foglie di rucola (88%) e lattuga iceberg (81%) seguite da

basilico (46%), lattuga rossa (20%), lattuga romana (16%), prezzemolo (1,9%) e pomodoro (0,56 %).

È evidente che possono verificarsi infezioni delle piante da batteri zoonotici; tuttavia, è anche chiaro che il semplice contatto tra agenti patogeni e potenziali ospiti delle piante non significa che verrà stabilita un'infezione.

Inoltre, l'internalizzazione dei patogeni può essere transitoria e influenzata dalla maturità delle piante e dal tasso di maturazione. La potenziale infezione delle piante da parte di agenti patogeni umani è una preoccupazione per la sicurezza alimentare perché questi agenti patogeni hanno meno probabilità di essere rimossi o uccisi durante il lavaggio e la sanificazione dopo il raccolto rispetto ai contaminanti superficiali.

1.4 Controllo dei microrganismi patogeni

Nel 1998, la FDA ha sviluppato linee guida per ridurre al minimo i rischi microbici associati ai prodotti freschi basati sui seguenti principi:

1. prevenire la contaminazione dei prodotti freschi da parte dei batteri è meglio che dipendere da azioni correttive;
2. è necessario l'uso di buone pratiche agricole e gestionali;
3. i prodotti freschi possono essere contaminati in qualsiasi punto lungo la catena alimentare dalla fattoria alla tavola;
4. la potenziale contaminazione di acqua utilizzata con prodotti freschi deve essere minimizzata;
5. deve esserci un'adeguata gestione del letame utilizzato come fertilizzanti.

L'igiene dei lavoratori e le pratiche di buona prassi igienica svolgono un ruolo fondamentale nella sicurezza dei prodotti freschi.

Nel 2008 l'WHO e la FAO hanno sviluppato una vasta gamma di raccomandazioni per controllare i patogeni di origine alimentare e aumentare la sicurezza dei prodotti freschi prima o dopo il raccolto. Queste raccomandazioni includevano:

- l'uso di metodi efficaci per ridurre al minimo la contaminazione da agenti patogeni da parte della fauna selvatica nelle colture;
- lo svolgimento di valutazioni topografiche e del rischio climatico prima dello stabilimento e della piantagione delle aziende agricole;
- la prevenzione della contaminazione da inondazioni;
- la protezione delle aree di crescita delle colture dovrebbero essere protette dalla contaminazione fecale;

- il corretto compostaggio del letame in modo da inattivare i microrganismi patogeni;
- la protezione delle acque superficiali e le risorse idriche da qualsiasi potenziale fonte di contaminazione, compresi fauna selvatica, rifiuti animali, scarichi agricoli, attività umana, acque reflue o effluenti industriali;
- l'applicazione delle buone pratiche agricole e manifatturiere, in particolare le abitudini di salute accettabili del personale;
- l'accesso a strutture sanitarie adeguate e servizi igienici adeguati per le apparecchiature associate alla coltivazione e alla raccolta;
- l'adeguata formazione e istruzione dei lavoratori agricoli e dei consumatori; un'attenzione specifica dovrebbe essere prestata ai processi di raffreddamento e alla qualità dell'acqua utilizzata per il raffreddamento e l'imballaggio;
- l'implementazione di buone pratiche di produzione e igiene con procedure operative standard, come parte di un approccio basato sul sistema HACCP in tutte le fasi della produzione e della trasformazione;
- la classificazione e la selezione dei prodotti prima del confezionamento primario dovrebbero includere l'eliminazione delle piante danneggiate per ridurre la probabilità di agenti patogeni attaccati e internalizzati;
- particolare attenzione alle aree di lavorazione tra cui coltelli, lame, utensili, nastri trasportatori e altre superfici a contatto con alimenti in cui possono formarsi biofilm; il design e i materiali dell'imballaggio devono fornire un'adeguata protezione per ridurre al minimo la contaminazione dei prodotti e prevenire danni; e i materiali di imballaggio o i gas utilizzati devono essere atossici e non costituire una minaccia per la sicurezza e l'idoneità degli alimenti al consumo in determinate condizioni di conservazione e utilizzo.

Krtinic et al. (2010) hanno affermato che le rigide normative sulla qualità dell'acqua di irrigazione e sul controllo dei fertilizzanti sono importanti per la sicurezza dei prodotti.

Il lavaggio post-raccolta di prodotti freschi può essere una misura importante per ridurre la contaminazione da agenti patogeni. Tuttavia, non tutti i metodi di lavaggio e le soluzioni di lavaggio sono efficaci.

Quando i disinfettanti sono inefficaci, effettuare un lavaggio può ridistribuire gli agenti patogeni e causare contaminazione crociata.

Sebbene alcuni studi abbiano dimostrato che il cloro è inefficace nell'eliminazione dei patogeni, è l'agente igienizzante più utilizzato per prevenire la potenziale contaminazione

crociata durante il lavaggio. Le concentrazioni consigliate vanno da 50 a 200 ppm con un tempo di contatto di 1 e 2 min (Beuchat, 1998).

È stato confermato che l'acido perossiacetico ad una concentrazione di 80 ppm è efficace per la riduzione di agenti patogeni su diversi tipi di prodotti freschi (Rodgers et al., 2004). Park e Beuchat (1999) hanno riportato che l'acido perossiacetico a 40 e 80 ppm ha ridotto la popolazione di *Salmonella* ed *E. coli* O157:H7 su superfici di melone.

La sua efficacia dipendeva fortemente dal tipo di prodotti freschi: le riduzioni microbiche più elevate sono state ottenute con carote e cavoli bianchi (0,5 e 3,5 Log UFC/g) seguiti da lattuga iceberg (0,4 e 2,4 Log CFU/g), mentre la più bassa efficacia era per il porro fresco (0,4 e 1,4 Log UFC/g).

La FDA ha anche approvato il cloruro di sodio acidificato come spray o immersione nell'intervallo 500 e 1200 ppm (USDA, 2000a). Successivamente, è stato scoperto che il clorito di sodio acidificato ha un'azione battericida durante il lavaggio di diversi tipi di prodotti freschi (González et al., 2004; Inatsu et al., 2005; Ruiz-Cruz et al., 2007).

I lavaggi con perossido di idrogeno sono stati efficaci nel ridurre la vitalità dell'agente patogeno su uva intera, prugne, mele, arance, funghi, meloni, pomodori, peperoni rossi, lattuga, cetrioli, zucchine, peperoni e meloni (Artés et al., 2007).

Tuttavia, il perossido di idrogeno può perdere la sua efficacia antimicrobica a causa della reazione con terreno e superfici metalliche come l'acciaio inossidabile (Sapers e Sites, 2003).

Le nuove tecnologie chimiche mostrano risultati promettenti per l'igiene dei prodotti freschi per garantire la sicurezza. Harris et al. (1999) hanno testato una soluzione alcalina (acqua, acido oleico, glicerolo, etanolo, idrossido di potassio, bicarbonato di sodio, acido citrico e olio di pompelmo distillato) per rimuovere *Salmonella* dalle superfici di pomodoro intatte e hanno scoperto che questa soluzione ha ridotto la popolazione di 2 e 4 Log UFC /pomodoro.

La combinazione di acidi organici al 2% (acido malico, acido lattico e acido citrico) con ultrasuoni (40 kHz) ha ridotto il numero di *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium* e *L. monocytogenes* su foglie di lattuga intatte di 2,3 e 3,2 Log CFU/ g (Sagong et al., 2011).

L'applicazione di ozono nella fase post-raccolta è preziosa perché inattiva i batteri, previene la decomposizione da funghi, può causare la degradazione di pesticidi e residui chimici e controlla i parassiti di stoccaggio (Najafi e Khodaparast, 2009).

D'altra parte, l'uso dell'ozono come disinfettante presenta degli svantaggi, tra cui l'instabilità e la reattività con i materiali organici, e quindi l'eliminazione efficace dei microrganismi può richiedere concentrazioni elevate che possono causare difetti sensoriali nei prodotti freschi.

L'irradiazione ionizzante è stata identificata come agente altamente efficace per l'eliminazione di agenti patogeni di origine alimentare in diverse verdure e verdure a foglia verde (Gomes et al., 2009; Grasso et al., 2011; Mahmoud, 2010). Mahmoud (2010) ha studiato l'efficacia dei raggi X per l'eliminazione dei patogeni di origine alimentare dalla lattuga di iceberg triturata. La luce ultravioletta (UV) può essere divisa in tre classi in base alla sua lunghezza d'onda: UV-A (400 e 320nm), UV-B (320 e 280 nm) e UV-C (<280 nm) e la gamma più efficace per la decontaminazione dei prodotti è quella compresa tra i 200 e 280nm; inoltre è stato evidenziato che le spore batteriche e le cellule in fase stazionarie sono più resistenti ai raggi UV-C rispetto alle cellule in fase vegetativa ed esponenziale (Warriner et al., 2009).

L'uso di batteri antagonisti, in particolare i batteri lattici (Lactic Acid bacteria LAB), come agenti di biocontrollo contro agenti patogeni umani su prodotti freschi è stato valutato in numerosi studi (Teplitski et al., 2011).

I batteriofagi sono stati usati come metodi efficaci per controllare i patogeni nell'ambiente e sugli alimenti, compresi i prodotti vegetali freschi (Teplitski et al., 2011). I batteriofagi sono stati usati per controllare *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* e *Salmonella* su diversi tipi di prodotti freschi.

1.5 Decontaminazione mediante l'utilizzo di ultrasuoni nell'industria ortofrutticola

Oggi i processi di trattamento, lavorazione e trasporto nelle aziende alimentari sono sempre più complessi; anche per questo ottenere alimenti sicuri è sempre più difficile. La maggior parte delle sostanze e dei disinfettanti antimicrobici utilizzati dalle industrie alimentari per la conservazione e l'igiene risulta nociva per la salute dell'uomo e per l'ambiente. Negli ultimi anni la richiesta di disinfettanti antimicrobici sicuri nell'industria alimentare è notevolmente cresciuta (Lopez-Gomez et al. 2009). Così come è stato evidenziato un aumento della richiesta di frutta e verdura fresca e il cibo biologico.

Pertanto, si stanno cercando tecnologie di conservazione degli alimenti sempre nuove e complementari. Tra queste, è stata data particolare attenzione ai metodi fisici e alla biopreservazione per allungare i tempi di conservazione e bloccare microorganismi indesiderati, potendo così minimizzare l'impatto sulle proprietà nutrizionali e sensoriali degli alimenti.

Nessun trattamento o provvedimento igienico utilizzato ora nell'industria alimentare è stato ritenuto capace di inattivare quei microorganismi adesi al tessuto di frutta e verdura.

Pertanto, la tecnologia ad ultrasuoni descritta più in dettaglio nel paragrafo successivo è perlopiù combinata ad altri trattamenti di igienizzazione applicati durante il lavaggio di frutta e verdura.

Esiste solo uno studio che ha determinato la quantità microbica nell'acqua di lavaggio dopo un trattamento ad ultrasuoni. In questo studio, il trattamento ad ultrasuoni ha fornito una riduzione di circa 4.4 ordini logaritmici di *E. coli* O157:H7 nell'acqua di lavaggio (0.28 W/L, 20 kHz, 53 min, inoculo 10^6 CFU/mL) (Elizaquivel et al., 2011).

1.6 Ultrasuoni

L'applicazione degli ultrasuoni è una tecnologia non termica che può contribuire all'aumento della sicurezza microbica e prolunga la durata di conservazione, per gli alimenti sensibili al calore e con caratteristiche nutrizionali, sensoriali e funzionali specifiche (Alegria et al., 2009; Cao et al., 2010; O'Donnell et al., 2010; Wang et al., 2011; Bhat et al., 2011). Con ultrasuoni si intendono onde di pressione con una frequenza di 20 kHz; più in generale l'attrezzatura ad ultrasuoni usa solitamente frequenze dai 20 kHz a 10 MHz. L'ultrasuono ad alta potenza e basse frequenze (dai 20 ai 100 kHz), viene chiamato "power ultrasound" e può causare cavitazione, che serve per inattivare i microorganismi potenzialmente presenti nelle produzioni alimentari (Piyasena et al., 2003). Un grande vantaggio dell'ultrasuono rispetto ad altre tecniche dell'industria alimentare è che le onde sonore vengono generalmente considerate sicure, atossiche ed eco-compatibili (Kentish e Ashokkumar, 2011).

La maggior parte dei dati pubblicati indica che il rendimento antimicrobico dell'ultrasuono è relativamente basso in alcune condizioni e che quindi l'ultrasuono potrebbe diventare una vera ed efficace alternativa nel processo di decontaminazione solo in situazioni particolari (Arce-Garcia et al., 2002; Guerrero et al., 2005; López-Malo et al., 2005).

Nella tecnologia ad ostacoli, l'azione di unire diversi fattori con l'ultrasuono ha importanti effetti sinergici sui microorganismi (McClements, 1995; Leistner, 2000). La combinazione dell'ultrasuono con alcune metodiche che ostacolano la crescita, fornisce un approccio interessante per migliorare l'inattivazione microbica, come hanno dimostrato dei precedenti studi sull'effetto degli ostacoli in diverse tipologie di frutta e verdura come: prugne (Chen e Zhu, 2011), fragole (Cao et al., 2010; Alexandre et al., 2012), semi di erba medica (Scouten e Beuchat, 2002), succhi di frutta e verdura (Kuldiloke, 2002), mele e lattuga (Huang et al., 2006) e i peperoni rossi (Alexandre et al., 2013).

L'applicazione di ultrasuoni nel lavaggio di frutta e verdura è quindi uno dei metodi alternativi applicabile nell'industria alimentare (Sapers, 2001; Seymour et al., 2002; Huang et al., 2006; Knorr et al., 2004; Alegria et al., 2009; Cao et al., 2010; Zhou et al., 2009; Elizaquivel et al., 2011; Rivera et al., 2011; Sagong et al., 2011; Sao José e Vanetti, 2012; Alexandre et al., 2012, 2013). La limitata ricerca, portata avanti fino ad oggi, riguardante gli impianti ad ultrasuoni nel lavaggio di frutta e verdura è riassunta nella TAB 1.1.

Tabella 1.1: Applicazioni ad ultrasuoni ad alta potenza (singole e combinate) e riduzioni microbiche nel processo di decontaminazione dell'acqua di lavaggio di alcuni tipi di frutta e verdura.

Prodotto	Parametri degli ultrasuoni (US)	Trattamenti	Riduzione microbica * (Log UFC/g)	Riferimenti
Fragola	350W/L, 40 kHz, 20°C, 10 min	US	TVC:0.6 YMC:0.5	Cao et al. (2010)
Lattuga	280W/L, 20 kHz, 53 min	US	<i>E. coli</i> O157:H7: 4.4 in acqua di lavaggio	Elizaquivel et al. (2012)
Fragola	120W, 35 kHz, 15°C campione/acqua:1/25	US	TVC:0.6 YMC:1.4	Alexandre et al (2012)
Peperone rosso	120W, 35 kHz, 15°C campione/acqua:1/25	US	<i>L. innocua</i> : 1.98	Alexandre et al. (2013)
Insalata Iceberg	10 W/L, 32-40 kHz, 10 min campione/acqua:1/20	US US + acqua clorata (25 ppm di cloro libero)	<i>S. typhimurium</i> : 1.5 <i>S. typhimurium</i> : 2.7	Seymour et al. (2002)
Carote tritate	45 kHz, 1 min	US US + acqua clorata (200ppm di cloro libero)	TVC: 1.3 YMC:0.9 TVC:1.0 YMC:0.9	Alegria et al. (2009)
Pomodori ciliegini	45 kHz, 10 min, 25°C	US US+ acido peracetico (40 mg/L)	<i>S. enterica typhimurium</i> : 0.8 <i>S. enterica typhimurium</i> : 3.9	São José and Vanetti (2012)
Lattuga	170 kHz, 6-10 min	US+ ClO ₂ (5 e 10 ppm)	<i>Salmonella spp.</i> : 2.2-2.9 <i>E. coli</i> O157:H7: 1.3-2.2 <i>Salmonella spp.</i> : 3.1-4.2	Huang et al. (2006)
Mela	170 kHz, 6-10 min	US+ ClO ₂ (5 e 10 ppm)	<i>Salmonella spp.</i> : 3.1-4.2 <i>E. coli</i> O157:H: 2.2 - 3.8	Huang et al. (2006)
Spinaci in foglia	200 W/L, 21.2 kHz, 2 min	US + cloruro di sodio acidificato (200 mg/L)	<i>E. coli</i> O157:H7: 4	Zhou et al. (2009)
Lattuga	30 W/L, 40 kHz, 5 min	US + acido lattico/citrico/malico (2%)	<i>E. coli</i> O157:H7: 2.7 <i>S. typhimurium</i> : 3.2	Sagong et al. (2011)
Tartufi	35 kHz, 4 °C, 10 min	US + etanolo (70%)	TVC: 4 Muffe: <1.7 Lieviti: b0.5 <i>Pseudomonas spp.</i> : >4	Rivera et al. (2011)

Prugna	100 W, 40 kHz, 20 °C, 10 min campione/acqua: 1/5	US + ClO ₂ (40 mg/L)	Enterobacteriaceae: 3.6	<i>Chen and Zhu (2011)</i>
		US + acido peracetico (40 mg/L)	Batteri lattici: 3.5 TVC(mesofili):3 TVC(psicrotofi):2.9 YMC: 2	

* Le riduzioni microbiche in un determinato intervallo sono cambiate a seconda delle concentrazioni chimiche.

Alegria et al. (2009) hanno valutato processi di decontaminazione alternativi per carote tritate e hanno usato i seguenti processi: clorurazione (50 o 200 ppm /1 min a 5°), ozonizzazione (1 ppm/5 min, 5°), acqua calda (100°/45 sec) e ultrasuoni (45 kHz/1 min). La riduzione del carico microbico iniziale delle carote tritate dopo i trattamenti di decontaminazione singoli e combinati vengono mostrati nella TAB 1.2. Come mostrano le TAB 1.1 e 1.2, è stato osservato che le riduzioni logaritmiche di 1,3 e 0,9 in trattamenti a ultrasuoni rispettivamente per TVC e YMC. In alcuni studi riguardanti la decontaminazione, i trattamenti ad ultrasuoni con cloro non sono stati più efficaci della singola applicazione ad ultrasuoni, il che è un ottimo risultato dal punto di vista dell'effetto antimicrobico degli ultrasuoni. In entrambi i trattamenti con o senza cloro il numero dei microorganismi si è ridotto di circa 1 ordine logaritmico.

Huang et al. (2006) hanno usato una combinazione di diossido di cloro e ultrasuoni per ridurre la concentrazione *Salmonella enterica* resistente all'acido nalidixico, sierotipi *enteriditis*, *typhumurium* e *mission* e *E. coli* O157:H7 resistente all'acido nalidixico-novobiocina su mele e lattuga. Per quanto riguarda questi campioni, gli studi riguardanti la riduzione microbica con diossido di cloro a 0,5, 10, 20 e 40 ppm con e senza trattamento a ultrasuoni a 170 kHz per 10 minuti sono mostrati nella TAB 1.3. I risultati di *Huang et al. (2006)*, dimostrano che il diossido di cloro può ridurre efficacemente la quantità di microrganismi in esame dai campioni, e che l'applicazione di ultrasuoni può promuovere l'effetto antimicrobico del diossido di cloro su campioni di mele e lattuga inoculate con *Salmonella* e *E. coli* O157:H7. In particolare un solo trattamento ad ultrasuoni ha causato un'ulteriore riduzione di 1,2-1,9 Log UFC/g nei campioni. Il risultato delle decontaminazioni con il diossido di cloro unito ad ultrasuoni e applicato a entrambi gli organismi in esame ha mostrato che i campioni di mela inocolata avevano tassi di decontaminazione più alti rispetto alla lattuga inocolata. Questo risultato potrebbe significare che le differenze strutturali e le superfici irregolari della lattuga potrebbero fornire una qualche protezione dalle cellule microbiche. Come mostrato nella TAB 1.4, è stata ottenuta un'ulteriore riduzione di 1,52

Log UFC/g con un'applicazione ultrasuoni su mele inoculate con *E. coli* O157:H7; negli esperimenti che univano gli ultrasuoni al diossido di cloro, i valori di riduzione sono ulteriormente aumentati sulla scala da 0,6-2,4 Log UFC/g a seconda delle concentrazioni di diossido di cloro (5-40 ppm). Negli esperimenti con la lattuga, è stato determinato che è stata ottenuta un'ulteriore riduzione di *Salmonella* spp. tra 0,3 e 0,65 Log UFC/g usando il trattamento a ultrasuoni.

Tabella 1.2: Gli effetti dei trattamenti di decontaminazione singoli e combinati applicati nelle carote triturate pretagliate e post tagliate sulla riduzione (Log UFC/ g) delle conte di microrganismi totali mesofili (TVC) e di lieviti e muffe (YMC) (Alegria et al 2009).

Trattamenti	Pre-taglio		Post-traglio	
	TVC	YMC	TVC	YMC
Ultrasuoni US (45 kHz, 1min)	1.3 ^b	0.9 ^e	0.5 ^a	0.5 ^c
Applicazioni combinate				
Acqua clorata (200 ppm di cloro libero 75min, 5°C) + US (45 kHz, 1 min)	1.0 ^b	0.9 ^e	0.9 ^b	0.8 ^{de}
Acqua ozonizzata (1 ppm/ 5 min, 5°C) + US (45 kHz, 1min)	0.2 ^a	0.5 ^c	0.4 ^a	0.6 ^{cd}

I dati sono espressi come media \pm DS con lettere diverse nella stessa colonna.

a, b: lettere minuscole diverse rappresentano differenze significative ($P < 0,05$) per TVC.

c, d, e: lettere maiuscole diverse rappresentano differenze significative ($P < 0,05$) per YMC.

Tabella 1.3: I valori di riduzione di diverse concentrazioni di biossido di cloro singolo e combinato con ultrasuoni su *Salmonella* spp. ed *E. coli* O157:H7 su campioni di mele e lattuga inoculate (Huang et al., 2006).

Riduzione ceppi di <i>Salmonella</i> (Log UFC/g di campione)				
Concentrazione (ClO ₂ -ppm)	Mele		Lattuga	
	ClO ₂	ClO ₂ + US	ClO ₂	ClO ₂ + US
5	2.5 ^a	3.7 ^b	1.7 ^a	1.7 ^a
10	2.5 ^a	3.9 ^b	2.1 ^a	2.2 ^b
20	2.5 ^a	3.7 ^b	2.1 ^a	3.0 ^c
40	2.5 ^a	4.2 ^b	2.2 ^a	3.6 ^d

Riduzione <i>E. coli</i> O157: H7 (Log UFC/g di campione)				
Concentrazione(ClO ₂ -ppm)	Mele		Lattuga	
	ClO ₂	ClO ₂ + US	ClO ₂	ClO ₂ + US
5	1.7 ^a	3.2 ^b	1.5 ^a	1.7 ^a
10	1.8 ^a	3.1 ^b	1.7 ^a	1.7 ^a
20	1.8 ^a	3.7 ^b	2.3 ^a	1.8 ^a
40	2.2 ^a	3.8 ^b	2.4 ^a	1.9 ^a

a, b, c, d I dati sono espressi con \pm DS con lettere diverse nella stessa colonna sono significativamente differenti (Pb <0,05).

Stati Uniti: applicazione ad ultrasuoni (170 kHz, 10 min).

Sao José e Vanetti (2012) hanno condotto uno studio per la valutazione dell'effetto degli ultrasuoni (45 kHz, 10 min, 25°) associato ad una concentrazione del 5% di perossido di idrogeno e 40 mg/L di acido peracetico sui pomodorini. Nello studio è stata evidenziata una riduzione della carica microbica, di lieviti e muffa, una riduzione di *S. typhimurium* inoculato che si è attaccato alla superficie dei pomodori (TAB 1.5). I trattamenti fatti solamente con ultrasuoni, 5% di perossido di idrogeno e 40 mg/L di acido peracetico hanno portato ad una riduzione rispettivamente di 1,2 2,1 e 2,6 Log UFC/g (TVC) e 0,7 2,3 e 3,3 Log UFC/g (YMC). Nelle applicazioni con perossido di idrogeno e acido peracetico con ultrasuoni, i valori della riduzione causata dagli ultrasuoni sono aumentati di 0,5-0,8 Log UFC/g (TVC) e 0,2-1,1 Log UFC/g (YMC) (TAB 1.5).

Zhou et al. (2009) hanno valutato la carica microbica delle foglie degli spinaci e hanno affermato che il cloruro di sodio acidificato ha ridotto *E. coli* O157:H7 di 2,1 Log UFC/g più dell'acqua di lavaggio, mentre la riduzione con altri igienizzanti come cloro, acido peracetico e acqua acida elettrolizzata è stata di 1-1,2 Log UFC/g (TAB 1.6).

Tabella 1.4: Valori di riduzione microbica tramite applicazione di biossido di cloro singolo o combinati con ultrasuoni (US) su *Salmonella* spp. ed *E. coli* O157:H7 campioni di mele e lattuga inoculate (Huang et al., 2006).

Applicazioni	Campione	Microrganismo	Riduzione (Log UFC/g di campione)
Lavaggio con acqua (10 min)	Mele	<i>E. coli</i> O157:H7	0.97 ^a
US (170 kHz-10 min)	Mele	<i>E. coli</i> O157:H7	1.52 ^a
ClO ₂ (5-40 ppm)	Lattuga	<i>Salmonella</i> spp.	~1.97-2.35 ^{b1}
ClO ₂ (5-40 ppm) + US (170 kHz,10 min)	Lattuga	<i>Salmonella</i> spp	~2.26-3.00 ^{b1}
ClO ₂ (5-40 ppm) + US (170 kHz,10 min)	Mele	<i>E. coli</i> O157:H7	~ 2.14-3.90 ^{c1}

*I valori di riduzione sono indicati come mezzo di riduzione del registro \pm DS.

1 I valori nell'intervallo dato sono cambiati in base alle concentrazioni di ClO₂ (5-40 ppm).

a, b, c Le lettere nella stessa colonna sono significativamente diverse (P < 0.05).

Tabella 1.5: Effetto degli ultrasuoni (US), con perossido di idrogeno (HP) e acido peracetico (PAA) da soli e combinate nel ridurre le cariche dei mesofili totali (TVC), il conteggio di lieviti e muffe (YMC) e Salmonella Typhimurium nei pomodori ciliegini (São José e Vanetti, 2012).

Trattamenti	Riduzione (Log UFC/g di campione)		
	TVC (mesofili)	YMC	Salmonella
US	1.2 ^a	0.7 ^a	0.8 ^a
HP (5%)	2.1 ^b	2.3 ^b	nd
HP (5%) +US (45 kHz, 25°C, 10 min)	2.6 ^b	2.5 ^b	nd
PAA (40 mg/L)	2.6 ^b	3.3 ^b	nd
PAA (40 mg/L) +US (45 kHz, 25°C, 10 min)	3.4 ^c	4.4 ^c	3.9 ^c

Tutti i dati sono determinati con deviazione standard (\pm).

a, b, c I trattamenti indicati con la stessa lettera non differivano ($P > 0,05$) tra di loro.

nd: non determinato.

La tecnologia a ultrasuoni (21,2 kHz, 200 W/L, 2 min) ha aumentato significativamente la riduzione di *E. coli* O157:H7 negli spinaci con tutti i trattamenti da 0,7 fino a 1,1 Log UFC/g rispetto ai lavaggi con i soli igienizzanti ($P < 0,05$).

Per provare gli effetti degli ultrasuoni sulle prugne, gli effetti combinati di questa tecnica con il diossido di cloro sono stati anch'essi riportati da *Chen e Zhu (2011)*. La quantità di microrganismi è diminuita applicando i tre trattamenti elencati sotto:

- Lavaggio con acqua del rubinetto senza US (Controllo),
- ClO₂ (40 mg/L) + US in soluzioni ClO₂ (40 kHz, 20°, 10 min, 100 W) (Trattamento I)
- ClO₂ (40 mg/L) + US nell'acqua del rubinetto (40 kHz, 20°, 10 min, 100 W) (Trattamento II)

I trattamenti ad ultrasuoni e diossido di cloro (I e II) hanno ridotto significativamente la carica batterica totale e la quantità di lieviti e muffa nelle prugne rispettivamente di 2,3-3,0 e 1,4-2,0 Log UFC/g ($P < 0,05$ – TAB 1.7) se li confrontiamo con il controllo. Quando gli ultrasuoni sono stati applicati nell'acqua, è stata rilevata una riduzione microbica più alta (circa 0,7 Log UFC/g per TVC e YMC) rispetto agli ultrasuoni nel diossido di cloro.

In conseguenza di questo studio, viene consigliata l'applicazione combinata di sostanze chimiche e ultrasuoni su frutta e verdura e si nota che le onde ultrasoniche simultanee e la cavitazione hanno migliorato sinergicamente gli effetti antimicrobici dei trattamenti chimici rispetto a quando venivano usati in maniera progressiva. I dati dello studio di *Chen e Zhu (2011)* mostrano che avviene un effetto sinergetico rafforzato di circa 0,7-1,7 unità logaritmiche nella riduzione di TVC, YMC, *E. coli* O157:H7 e *Salmonella*, quando gli

ultrasuoni vengono uniti ad agenti chimici antimicrobici, a seconda delle concentrazioni usate, le condizioni sperimentali degli ultrasuoni, i tipi di microorganismi, e il tipo di verdura. Esistono ricerche limitate che sono riuscite a determinare l'effetto antimicrobico dei soli ultrasuoni, nelle quali sono state riportate riduzioni da 0,6-1,5 Log UFC/g.

Tabella 1.6: Riduzione di *E. coli* O157: H7 inoculato sulla superficie degli spinaci trattati con ultrasuoni (US, 21,2 kHz, 200 W/L, 2 min) in combinazione con disinfettanti selezionati (Zhou et al., 2009).

Disinfettante	Riduzione (Log UFC/g di campione)	
	Disinfettato solamente	Disinfettato + US (21.2 kHz, 200 W/L, 2 min)
Acqua	1.0 ^a	2.1 ^b
Acqua clorata (200 m/L)	2.0 ^b	3.1 ^c
Acido perossiacetico (80 mg/L)	2.2 ^b	3.1 ^c
Acido perossiacetico (80 mg/L)	2.2 ^b	2.9 ^c
Clorito di sodio acidificato (200 mg/L)	3.1 ^c	4.0 ^d

a, b, c, d I dati sono determinati con \pm DS con lettere diverse nella stessa colonna sono significativamente differenti ($P < 0,05$).

Tabella 1.7: Conte microbiche Log UFC/g di prugne trattati con ClO₂ combinato ad ultrasuoni (Chen e Zhu, 2011).

Trattamento	Numero microrganismi (Log UFC/g di campione)		
	TVC (mesofili)	TVC (psicotofi)	YMC
Controllo (lavaggio con acqua di rubinetto, senza US)	3.9 ^a	3.7 ^a	2.7 ^a
ClO ₂ (40 mg/L) + US in soluzione di ClO ₂ (40kHz, 20°C, 10 min, 100 W)	1.6 ^b	1.5 ^b	1.3 ^b
ClO ₂ (40 mg/L) + US in acqua di rubinetto (40 kHz, 20 °C, 10 min, 100 W)	0.9 ^c	0.8 ^c	0.7 ^c

a, b, c I dati sono determinati mediante \pm DS con lettere diverse nella stessa colonna sono significativamente differenti ($P < 0,05$).

TVC: conta vitale totale.

YMC: conta di lieviti e muffe.

La riduzione microbica fatta con ultrasuoni è molto importante dal punto di vista di una decontaminazione green e il concetto a ostacoli dei metodi di inibizione e eliminazione per le diverse tecnologie di conservazione degli alimenti nell'ambito di frutta e verdura. Inoltre, consultando la bibliografia disponibile, è possibile concludere che questi risultati potrebbero essere d'aiuto per poter stimare l'effetto di decontaminazione degli ultrasuoni e il possibile uso della tecnologia ad ultrasuoni in diversi processi in alternativa o combinazione ad agenti chimici antimicrobici nei processi di lavaggio di frutta e verdura.

1.7 Challenge test

I challenge test sono stati e continuano ad essere uno strumento utile per determinare la capacità di un alimento di sostenere la crescita di organismi o agenti patogeni che causano deterioramento o problemi di sicurezza. Tali test, svolgono anche un ruolo importante nella validazione di processi che hanno lo scopo di fornire un certo grado di letalità contro un organismo bersaglio o un gruppo di organismi bersaglio. Molto spesso, quest'ultimo scopo, è associato a degli standard che il processo deve offrire (ad esempio, una riduzione di 5 Log di *E. coli* O157:H7 per le carni fermentate). Un challenge test deve essere progettato in modo appropriato, servirà per convalidare un processo specifico che dovrà essere conforme allo standard prestabilito. La progettazione, l'implementazione e la valutazione degli studi microbiologici sui challenge test è un compito complesso che dipende da fattori correlati alla formulazione del prodotto, alla trasformazione, al confezionamento, alla distribuzione, alla preparazione e alle modalità di consumo dello stesso. Un microbiologo esperto deve considerare i fattori rilevanti e progettare uno studio che valuti al meglio la sicurezza alimentare del prodotto. La mancata considerazione di specifici aspetti e fattori ambientali nella progettazione del test potrebbe portare a conclusioni errate.

Questi studi sono utili anche per determinare la potenziale shelf-life di alcuni alimenti refrigerati o conservati a temperatura ambiente. È necessario stabilire se i challenge test siano appropriati o utili prendendo in considerazione fattori quali la probabilità del prodotto di supportare la crescita di organismi o agenti patogeni del deterioramento o la conoscenza della storia precedente del prodotto. Ad esempio, non è utile condurre challenge test su prodotti congelati perché non hanno condizioni favorevoli per la crescita dei microrganismi; né sarebbe particolarmente utile condurre test di prova su alimenti in scatola sterilizzati. Tuttavia, nell'esempio del cibo in scatola, può essere appropriato condurre questi studi, utilizzandoli come parte del protocollo per la validazione del processo. Il test microbiologico di verifica è molto utile per i prodotti alimentari che possono sostenere la crescita di organismi patogeni e che sono conservati a temperatura refrigerata, a temperatura elevata o a temperatura ambiente e che sono vulnerabili alla crescita di microrganismi.

Quando si esegue un challenge test, è necessario considerare una serie di fattori (*Vestergaard 2001*), quali:

1. la selezione di patogeni o surrogati appropriati,
2. il livello dell'inoculo,

3. la preparazione dell'inoculo e il metodo di inoculo,
4. la durata dello studio,
5. i fattori di formulazione e condizioni di conservazione,
6. le analisi dei campioni.

L'interpretazione dei dati e la definizione di criteri per la definizione dell'idoneità o non idoneità sono fondamentali per valutare se un alimento ha bisogno di controllo tempo/temperatura, per la sicurezza del consumatore

Mentre i challenge test sono utili per determinare il potenziale di deterioramento di una formulazione del prodotto.

1.8 Selezione di microrganismi

La conoscenza della formulazione e della storia del prodotto alimentare è essenziale nella scelta dei patogeni appropriati. Ad esempio, *C. botulinum* potrebbe destare preoccupazione in alcuni prodotti confezionati in atmosfera modificata (MAP) e *Staphylococcus aureus* potrebbe essere fonte di preoccupazione negli alimenti con scarsa microflora competitiva e in prodotti con a_w ridotta.

Gli organismi ideali per i challenge test sono quelli che sono stati precedentemente isolati da formulazioni simili. Inoltre, dovrebbero essere inclusi agenti patogeni da epidemie di origine alimentare note, per garantire che la formulazione sia abbastanza solida da inibire anche quegli organismi.

Molteplici ceppi patogeni target dovrebbero essere inclusi nello studio. È tipico inoculare una formulazione alimentare con un "cocktail" o una miscela di più ceppi al fine di tenere conto della potenziale variazione di ceppo. Non è insolito avere un "cocktail" di 5 o più ceppi di ciascun patogeno bersaglio durante un challenge test. Prima di condurre lo studio, i ceppi selezionati dovrebbero essere sottoposti a screening per l'antagonismo reciproco. Ad esempio, in bibliografia sono riportati casi di antagonismo tra alcuni ceppi di *L. monocytogenes*, tra ceppi di *C. botulinum* e tra batteri lattici produttori di batteriocine. Se questi non sono compatibili quando utilizzati come parte di un "challenge cocktail", potrebbero derivarne risultati errati.

È anche importante incubare e preparare la sospensione del challenge test in condizioni specifiche standardizzate. È stato dimostrato che i cambiamenti nella temperatura di incubazione utilizzati per propagare i microrganismi oggetto del challenge test e la temperatura di conservazione del prodotto modificano la durata del periodo dello studio

(Curiale 1991). Si deve tenere anche in considerazione il periodo di adattamento della sospensione microbica utilizzata per il test, prima dell'inoculazione. Ad esempio, l'adattamento ad ambienti acidi di *E. coli* O157:H7 o di *Salmonella* spp. prima dell'inoculo possono influenzare notevolmente la loro capacità di sopravvivere se inoculate in un alimento acido.

Infine, l'uso di strumenti di caratterizzazione genetica può aiutare notevolmente a determinare quali ceppi utilizzati nello studio sono i più dominanti per la durata dello studio. I microrganismi utilizzati nel challenge possono anche essere geneticamente modificati per portare un marcatore che aiuta a distinguerli da altri ceppi e aiuta a rilevarli nella matrice alimentare stessa. Ovviamente, l'organismo geneticamente modificato deve avere caratteristiche fisiologiche paragonabili al ceppo selvaggio o genitore.

Per alcune applicazioni, i microrganismi surrogati possono essere utilizzati nei challenge test al posto di agenti patogeni specifici. Ad esempio, di solito non è possibile introdurre agenti patogeni in una struttura di elaborazione; pertanto, in questi casi è auspicabile utilizzare microrganismi surrogati. Un surrogato ideale è rappresentato da un ceppo del patogeno target che mantiene tutte le caratteristiche tranne la sua virulenza. In pratica, molti surrogati sono strettamente correlati ma non necessariamente le stesse specie dell'agente patogeno bersaglio. Esempi tradizionali includono l'uso di *Clostridium sporogenes* come sostituto di *C. botulinum*, *Listeria innocua* come surrogato di *L. monocytogenes* e ceppi generici di *E. coli* come sostituti di *E. coli* O157:H7. In particolare, poiché i ceppi generici di *E. coli* non hanno lo stesso livello di resistenza agli acidi di *E. coli* O157: H7 nei challenge test allestiti per la valutazione dell'impatto di processi termici o di sistemi di conservazione in alimenti ad alto pH, l'uso di ceppi generici non risulta appropriato e dunque non può essere operata questa sostituzione di microrganismi. Generalmente, i surrogati sono scelti da un gruppo di organismi ben caratterizzati e hanno i seguenti attributi desiderabili (IFT 2000):

- non patogeno,
- caratteristiche di inattivazione e cinetica che possono essere utilizzate per prevedere quelle del patogeno bersaglio,
- comportamento simile al patogeno bersaglio se esposto a parametri di formulazione e/o elaborazione (ad esempio stabilità ad un dato pH, sensibilità alla temperatura e tolleranza all'ossigeno),
- caratteristiche stabili e coerenti della crescita,
- facile coltivazione in vitro per produrre popolazioni ad alta densità.

- stabilità della popolazione microbica fino al momento dell'applicazione sperimentale
- semplice da enumerare con metodi rapidi, sensibili e sistemi di rilevamento poco costosi,
- facilmente differenziato dalla microflora di fondo,
- caratteristiche di attacco che imitano quelle dell'agente patogeno bersaglio,
- geneticamente stabile in modo che i risultati possano essere replicati indipendentemente dal laboratorio o dal momento dell'esperimento,
- senza attività alterativa degli alimenti quando utilizzato in un'area di produzione,
- suscettibilità a stress esterni simile a quella dell'agente patogeno bersaglio.

Se un ceppo surrogato deve essere utilizzato in un challenge test, è necessario eseguire un lavoro preliminare per caratterizzare bene il ceppo prima dell'uso nello studio. L'uso di surrogati dovrebbe essere comunque limitato ai soli casi in cui agenti patogeni specifici non possono assolutamente essere utilizzati per motivi di sicurezza del prodotto o del personale.

1.9 Livello dell'inoculo

Il livello di inoculo utilizzato nei challenge test dipende dal fatto che l'obiettivo dello studio sia di determinare la stabilità del prodotto e la durata di conservazione o convalidare una fase del processo progettata per ridurre le cariche microbiche. Tipicamente, un livello di inoculo compreso tra 10^2 e 10^3 cellule/g di prodotto viene utilizzato per accertare la stabilità microbiologica di una formulazione. Livelli di inoculo più elevati possono essere appropriati per altri prodotti. A seconda della formulazione del prodotto, una parte dell'inoculo può scomparire inizialmente prima di adattarsi all'ambiente. Se si utilizza un livello di inoculo troppo basso, si potrebbe ipotizzare erroneamente che il prodotto sia stabile quando non lo è. Viceversa, se il livello di inoculo è troppo alto per questo scopo, il sistema di conservazione o ostacoli alla crescita possono essere sopraffatti dalle dimensioni inadeguate dell'inoculo, portando alla conclusione errata che la formulazione non è stabile. Quando si convalida una fase di letalità del processo come il processo di riscaldamento, l'elaborazione ad alta pressione o l'irradiazione, tuttavia, è di solito necessario utilizzare un livello di inoculo elevato (ad esempio, 10^6 - 10^7 cellule/g di prodotto) per dimostrare l'entità della riduzione degli organismi dei challenge.

1.10 Preparazione dell'inoculo e metodo di inoculazione

La preparazione dell'inoculo da utilizzare nei challenge test è una componente importante del protocollo generale. Tipicamente, per le cellule vegetative vengono utilizzate colture provenienti da brodi refrigerati o da colture conservate in glicerolo, rivitalizzate da 18 a 24 ore. Queste colture devono essere coltivate in mezzo di coltura e condizioni idonee per una crescita ottimale. In alcuni studi, specifici microrganismi inoculati per il challenge test, possono essere adattati a determinate condizioni. Tale adattamento sarà correlato al cibo specifico. Ad esempio, *E. coli* O157:H7 può essere adattato all'acido mediante uso di agenti acidificanti appropriati prima della sua applicazione in challenge test su prodotti acidi.

Le sospensioni di spore batteriche possono essere conservate in acqua refrigerata o congelate in glicerolo, devono essere diluite in acqua sterile e sottoposte a shock termico immediatamente prima dell'inoculo. Vengono determinate delle concentrazioni del microrganismo utilizzato per il challenge test, in modo da calcolare le diluizioni necessarie per raggiungere l'inoculo target nel prodotto utilizzato per lo studio. Procedure appropriate e strutture di contenimento devono essere utilizzate durante l'esecuzione dei challenge test con determinati agenti patogeni.

Altro aspetto estremamente importante nell'allestimento di challenge test e più in generale di studi microbiologici è la definizione del metodo di inoculo del microrganismo target. L'inoculo deve essere operato in modo specifico in base al tipo di prodotto in analisi. In matrici liquide acquose come salse e sughi con elevata a_w ($> 0,96$), l'inoculo può avvenire direttamente nel prodotto, utilizzando una quantità minima di acqua sterile o tampone come vettore. Negli studi in cui il livello di umidità è una delle variabili sperimentali, l'inoculo può essere sospeso nell'acqua o nel liquido utilizzato per regolare il livello di umidità della formulazione. Negli studi dove l'umidità non è una variabile, l'inoculo può essere aggiunto direttamente al prodotto in un contenitore di miscelazione. Per singole applicazioni in confezione, l'inoculo può essere iniettato in modo asettico usando una siringa sterile attraverso la parete del pacchetto contenente un setto di gomma. In matrici solide con $a_w > 0,96$, come pasta cotta o superfici di carne, un'alternativa al metodo della siringa può essere l'uso di un atomizzatore. Un atomizzatore spruzza l'inoculo, che è sospeso in acqua sterile o tampone, nel prodotto macinato o sulla superficie del prodotto. In tutte queste applicazioni, deve essere utilizzata la minima quantità di acqua per la sospensione dell'inoculo. È necessario effettuare analisi preliminari per garantire che il livello di umidità della

formulazione in esame non venga modificato dopo l'inoculazione. Prodotti o componenti con $a_w < 0,92$ possono essere inoculati utilizzando il metodo dell'atomizzatore con un volume minimo di acqua o tampone di trasporto. Ancora una volta, il prodotto deve essere sempre controllato per assicurarsi che il prodotto finale o il livello di umidità non siano stati modificati. Prima dell'imballaggio finale potrebbe essere necessario un breve periodo di asciugatura post-inoculazione per alcuni prodotti. La cultura liofilizzata può anche essere usata per alcune applicazioni. La vitalità dell'inoculo e i livelli di popolazione devono essere determinati prima dello studio.

È necessario inoculare un numero sufficiente di prodotti in modo tale che durante lo studio sia disponibile un minimo di tre replicati per tempo di campionamento. In alcuni casi, come in alcuni studi di riconvalida e per campioni di controllo non inoculati, possono essere utilizzati meno replicati.

1.11 Analisi del campione

Tipicamente, in un challenge test, i livelli di del microrganismo inoculato in vivo sono situati in diversi punti del campione. Generalmente, è auspicabile avere dei duplicati o preferenzialmente dei triplicati dei campioni in analisi; tuttavia, in studi dove il livello di sicurezza deve essere particolarmente elevato, il numero delle repliche deve essere notevolmente aumentato o in alternativa deve essere replicato l'intero piano sperimentale. La selezione dei metodi e dei terreni di coltura per la crescita e l'enumerazione dei microrganismi è strettamente correlata al tipo di agente patogene o surrogato utilizzato nello studio. Se il prodotto non ha una microflora spontanea elevata, è possibile utilizzare supporti non selettivi per l'analisi diretta. Nei casi in cui vengono utilizzati organismi che producono tossine (ad esempio, *S. aureus* o *C. botulinum*), è necessario eseguire appropriati test delle tossine in ogni momento utilizzando il metodo validato più recente.

Per effettuare un'analisi accurata, bisogna analizzare campioni pre-inoculazione, quindi andar a controllare la microflora pre-esistente nel prodotto, il campionamento deve esser effettuato in diversi punti per monitorare il comportamento dei microrganismi già presenti, durante la shelf-life. Ad esempio, se un prodotto ha una microflora interna elevata, può sopprimere la crescita dell'inoculo. In altre situazioni, la microflora interna potrebbe non essere universalmente presente, portando a un senso di sicurezza potenzialmente falso. Inoltre, in alcune circostanze, i microrganismi già presenti nel prodotto possono modificare i

parametri di formulazione nel prodotto per favorire o inibire la crescita dell'inoculo nel tempo (ad esempio, le muffe possono aumentare il pH del prodotto; i lattobacilli possono ridurre il pH del prodotto).

È anche importante tenere traccia dei parametri fisico-chimici pertinenti del prodotto durante il periodo di validità per vedere come potrebbero cambiare e influenzare il comportamento dell'agente patogeno. Bisogna prendere in considerazione alcuni fattori come a_w , umidità, livello di sale, pH, concentrazioni di gas MAP, livelli di conservanti e altre variabili. Valutare il comportano di tali parametri durante la shelf-life del prodotto è fondamentale per comprendere la stabilità microbiologica del prodotto.

1.12 Interpretazione dei dati

Una volta completato i challenge test, i dati dovrebbero essere analizzati per vedere come si sono comportati i patogeni nel tempo. L'analisi delle tendenze e la rappresentazione grafica appropriata (ovvero i grafici semi-Log) dei dati mostreranno se i microrganismi inoculati sono morti, sono rimasti stabili o sono aumentati nel tempo. La combinazione dei dati quantitativi dell'inoculo per ciascun punto temporale con i dati sulla microflora interna del prodotto e i parametri fisico-chimici rilevanti fornisce una rappresentazione ampia e potente della stabilità microbiologica della formulazione in esame. Sulla base di questi dati, è possibile stabilire una durata di conservazione ragionevole o apportare modifiche alla formulazione in modo che sia meno suscettibile alla crescita del patogeno.

Quando si utilizzano i test microbiologici di prova, nell'ambito di un protocollo di convalida del processo, l'analisi dei dati mostrerà se il processo è in grado di fornire il livello richiesto di letalità (cioè conforme allo standard prestazionale prestabilito). Sulla base di queste informazioni, se necessario, è possibile apportare modifiche al processo al fine di soddisfare i requisiti di mortalità.

Complessivamente, challenge test ben progettati possono fornire informazioni critiche sulla sicurezza microbiologica e sulla stabilità di una formulazione alimentare. Sono anche preziosi per convalidare la letalità o i punti di controllo microbiologici in un processo.

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della presente tesi è stato quello di valutare l'effetto antimicrobico della combinazione di ultrasuoni e metodi non termici e/o fisico-biologici sull'inattivazione microbica in vegetali freschi.

A tale scopo verrà valutata la carica microbica di vegetali freschi non sottoposti a trattamenti disponibili sul mercato. Successivamente verranno valutati gli effetti dei trattamenti applicati sugli stessi vegetali.

Al fine di ottenere informazioni che non risentano degli effetti della contaminazione naturale dei vegetali, verrà inoltre predisposto un challenge test al fine di valutare la capacità antimicrobica degli stessi trattamenti, utilizzando come modello ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* ed *Escherichia coli*, inoculati con cariche note nei substrati da analizzare.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Preparazione giardiniera

La giardiniera è una classica conserva composta da un mix di verdure e liquido di governo; la cui preparazione prevede l'utilizzo di varie verdure quali:

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

In particolare, nel presente studio sono state prese in considerazione:

- cavolfiore bianco in bagna rossa
- peperoni rossi in bagna bianca

Le verdure, acquistate in differenti supermercati, dopo esser state lavate in acqua corrente, sono state private di foglie, peduncoli e di eventuali porzioni con imperfezioni dello strato superficiale e successivamente tagliate rispettando parametri geometrici ben precisi e definiti:

- cavolfiore bianco: singolo ciuffetto tagliato alla base con il lato di circa 1 cm e altezza di circa 2 cm (figura 3.1).
- peperone rosso: tagliato a forme romboidali con il lato di 2 cm e spessore di circa 1 cm (figura 3.2).



Figura 3.1: Esempio di cavolfiore bianco tagliato per la preparazione della Giardiniera.



Figura 3.2: Esempio di peperone rosso tagliato per la preparazione della Giardiniera.

Le verdure così tagliate sono state successivamente introdotte in un sacchetto idoneo all'utilizzo del sonicatore e aggiunte di una bagna o liquido di governo in ragione di 100 gr di liquido ogni 50 gr di verdura.

Nel dettaglio, due differenti tipologie di liquido di governo sono state preparate in un'unica soluzione.

In particolare, per il cavolfiore bianco è stato preparato un liquido di governo definito "bagna rossa" ottenuto dall'estrazione del liquido della rapa rossa, mediante l'utilizzo della macchina a ultrasuoni, la cui composizione è di seguito riportata:

- 100 gr rapa rossa sbucciata
- 20 gr aceto di vino bianco
- 100 gr acqua

Per la preparazione la rapa rossa, lavata in acqua corrente e privata della buccia esterna (Figura 3.3), è stata posta con la componente liquida in un sacchetto sigillato attraverso macchina per sottovuoto (Figura 3.4) e successivamente trattata per 90 minuti con la macchina ad ultrasuoni (Figura 3.5). Alla fine del processo le rape sono state allontanate dalla componente liquida, che avrà assunto una colorazione rossastra (Figura 3.6), e tagliate alla julienne (Figura 3.7). Le rape rosse sono state dunque poste in un nuovo sacchetto

contenente il liquido ottenuto durante il trattamento con gli ultrasuoni, sigillate sottovuoto (Figura 3.8) e poste a riposare per 4 giorni a 4° C.



Figura 3.3: Rapa privata della buccia esterna e divisa in parti.



Figura 3.4: Rapa sbucciata in liquido composto da acqua e aceto di vino bianco.



Figura 3.6: Rapa e liquido di governo sottovuoto dopo sonicazione.

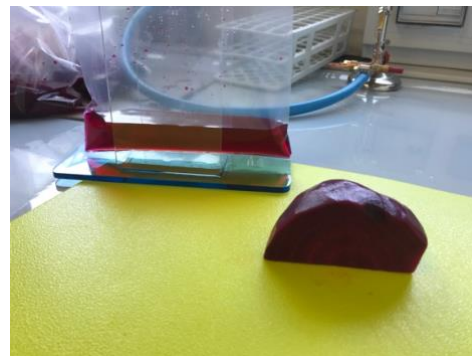


Figura 3.5: Rapa separata dal liquido.



Figura 3.8: Rapa tagliata alla julienne.



Figura 3.7: Rapa tagliata julienne e liquido di governo rosso sottovuoto.

Per i campioni di peperone rosso è stato preparato un liquido di governo, definito “bagna bianca”, rappresentato da una soluzione acida con sale bilanciato composta da:

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

I sacchetti contenenti liquido di governo e verdura, sia di cavolfiore bianco (Figure 3.10) sia di peperoni rossi (Figura 3.9) sono stati dunque sigillati sottovuoto e successivamente posti all'interno del sonicatore del quale non verranno fornite le caratteristiche costruttive per motivi di brevetto della Ditta produttrice.



Figura 3.9:Peperoni tagliati in bagna bianca.



Figura 3.10:Cavolfiori bianco in bagna rossa.

A seguito dell'inserimento di tutti i campioni all'interno del dispositivo ad ultrasuoni viene selezionato il ciclo di trattamento come segue:

- Impregnazione cavolfiore bianco in liquido di governo acido rapa rossa: 120 min
- Impregnazione peperoni in liquido di governo acido bilanciato: 20 minuti

3.2 Analisi microbiologiche

Per la valutazione dell'impatto del trattamento con ultrasuoni sulla carica microbica, aliquote di liquido di governo delle verdure non trattate con ultrasuoni e delle verdure trattate con

ultrasuoni sono state utilizzate per l'allestimento di conte vitali in piastra al fine di valutare i seguenti gruppi microbici:

- mesofili aerobi totali
- lattobacilli mesofili
- eumiceti
- sporigeni
- Pseudomonadaceae
- Enterobacteriaceae

Le analisi sono state effettuate in doppio su 2 batch produttivi.

3.2.1 *Diluizioni e conte vitali in piastra*

Per l'enumerazione dei gruppi microbici di interesse, un'aliquota di 1 mL di liquido di governo è stata utilizzata per l'allestimento di diluizioni scalari decimali in soluzione peptonata sterile (0,1 % peptone, p/v) (WVR Chemicals). Per l'enumerazione dei microrganismi sporigeni aliquote di liquido di governo sono state preventivamente sottoposte ad un trattamento a 80 °C per 10 minuti (Thermobloch FALC).

Aliquote di 1 mL di ciascuna diluizione scalare sono state quindi seminate in doppio per inclusione nei terreni:

- *Plate Count Agar (PCA)* (WVR Chemicals) 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⁻¹) (WVR Chemicals) per la determinazione dei lattobacilli incubato a 30 °C per 48 h-72 h;
- *Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA)* (WVR Chemicals), per la determinazione delle enterobacteriaceae incubato a 37°C per 24 h;

Mentre, al contrario, aliquote di 100 µL di ciascuna diluizione scalare sono state quindi seminate per spatolamento in doppio su terreno:

- *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)* (VWR Chemicals), per la determinazione dei microrganismi sporigeni incubato a 30 °C per 48 h;

La carica dei microorganismi in studio è stata espressa come valore medio del Log delle Unità Formanti Colonia (CFU) su mL di liquido di governo analizzato \pm deviazione standard.

3.3 Challenge test *Saccharomyces cerevisiae*

3.3.1 *Allestimento conta vitale in piastra preliminare per la valutazione della carica microbica*

Una coltura pura di *S. cerevisiae* CBS1171 appartenente alla collezione interna al laboratorio dell'area di Microbiologia del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali (D3A), dell'Università Politecnica delle Marche è stata posta in terreno *Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) Agar* composto da:

- 10g/L di yeast extract 1% (Liofilmchem)
- 20g/L di peptone 2% (VWR Chemicals)
- 20g/L glucose 2% (Merk)
- 18g/L di agar 1,8% (VWR Chemicals)

Il terreno a seguito della semina per spatolamento è stato incubato a 25 °C per 48-96 h al fine di ottenere una coltura pura in fase esponenziale di crescita per le successive conte preliminari. (Figura 3.11)

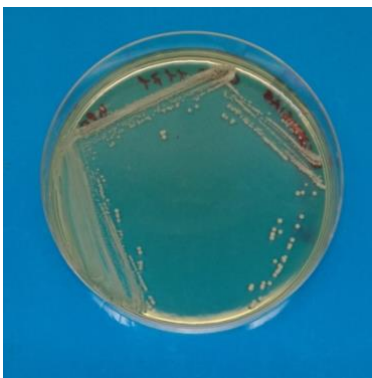


Figura 3.11: *Coltura pura di Saccharomyces cerevisiae.*

Attraverso l'uso di un'ansa monouso sterile da 10 µL è stata prelevata una quantità definita di pre-coltura e stemperata in 10 ml di acqua peptonata sterile (0,1 % peptone, p/v) dell'azienda WVR Chemicals, al fine di allestire le successive diluizioni decimali seriali fino ad una diluizione pari a 10^{-7} . Le diluizioni così ottenute sono state seminate in piastra su terreno YPD e incubate a 25 °C per 48-96 h.

3.3.2 *Allestimento challenge test per Saccharomyces cerevisiae in bagna bianca*

Peperoni rossi acquistati in un supermercato locale sono stati tagliati come descritto nel paragrafo 1.1 “preparazione giardiniera” e suddivisi in 4 sacchetti monouso sterili in ragione di 50 gr caduno. I peperoni sono stati dunque lavati con una soluzione di etanolo (Fluka) al 90% v/v agitando in modo continuativo per 2 minuti in condizioni di sterilità sotto cappa a flusso laminare (GELAIRE HF48). La soluzione di etanolo è stata allontanata ed i campioni sono stati risciacquati con acqua deionizzata sterile per 4 volte al fine di rimuovere completamente eventuali residui di etanolo.

In ognuno dei 4 campioni di peperoni rossi sterili sono stati aggiunti 100 mL di liquido di governo sterile (bagna bianca) e suddivisi nel seguente modo:

- 2 campioni sono stati inoculati con 10 ansate di *S. cerevisiae* (Figura 3.12)
- 2 campioni non sono stati inoculati.



Figura 3.12: Preparazione dei campioni inoculati con 10 ansate di *S. cerevisiae*.

Per tutti i campioni sono state allestite diluizioni seriali e conte vitali in piastra su terreno YPD al fine di valutare l'inoculo eseguito e la sterilità dei campioni di controllo.

A seguito dell'allestimento delle diluizioni seriali i campioni sono stati sigillati con macchina per sottovuoto e sottoposti a trattamento con macchina ad ultrasuoni con ciclo di maturazione spinta per 20 minuti a temperatura ambiente.

Tutti i campioni sono stati analizzati a seguito del trattamento attraverso l'allestimento di diluizioni seriali e conte vitali in piastra su terreno YPD al fine di valutare l'eventuale effetto del trattamento eseguito.

3.4 Challenge test con *Escherichia coli*

3.4.1 *Allestimento conta vitale in piastra preliminare per la valutazione della carica microbica*

Una coltura pura di *E. coli* ATCC 25922 appartenente alla collezione di microrganismi dell'istituto Zooprofilattico dell'Umbria e delle Marche sezione di Ancona, è stata posta in terreno *Tryptic Soy Agar* (TSA) dell'azienda Fluka e posto ad incubare a 37°C per 24-48 h al fine di ottenere una coltura pura in fase esponenziale di crescita per le successive conte preliminari. (Figura3.13)

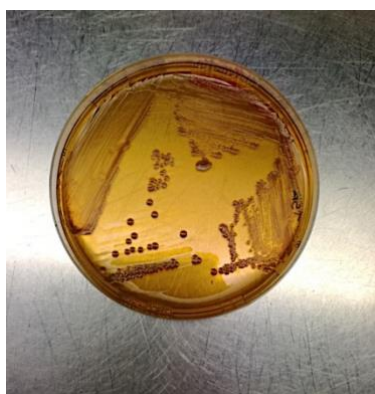


Figura 3.13: *Cultura pure di Escherichia coli.*

Attraverso l'uso di un'ansa monouso sterile da 1 μ L è stata prelevata una quantità definita di precultura e stemperata in 10 ml di acqua peptonata sterile (0,1 % peptone, p/v) dell'azienda WVR Chemicals, al fine di allestire le successive diluizioni seriali fino ad una diluizione pari a 10^{-7} . Le diluizioni così ottenute sono state seminate in piastra su terreno TSA e incubate a 37 °C per 24-48h.

3.4.2 *Allestimento challenge test con Escherichia coli in bagna bianca*

Peperoni rossi tagliati come descritto ne paragrafo 3.4.1, suddivisi in 4 sacchetti monouso sterili in ragione di 50 gr caduno sono stati lavati con una soluzione di etanolo al 90% v/v come descritto nel paragrafo 3.4.2. Analogamente a quanto descritto precedentemente, 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.

In ognuno dei 4 campioni di peperoni rossi sterili sono stati aggiunti 100 mL di liquido di governo sterile (bagna bianca) e suddivisi nel seguente modo:

- 2 campioni sono stati inoculati con 10 ansate di *E. coli* (Figura 3.14)
- 2 campioni non sono stati inoculati.



Figura 3.14: Preparazione dei campioni inoculati con 10 ansate di *E. coli*.

Per tutti i campioni sono state allestite diluizioni seriali e successive conte vitali in piastra su terreno TSA, per valutare la sterilità dei campioni di controllo e l'inoculo effettuato.

Dopo le diluizioni i campioni sigillati sono stati sottoposti a sonicazione con ciclo di maturazione spinta per 20 minuti a temperatura ambiente.

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

3.4.3 Allestimento challenge test con *Escherichia coli* su soluzione fisiologica

Peperoni rossi acquistati in un supermercato sono stati tagliati come descritto nel paragrafo 1.1 "preparazione giardiniera" e preparati per il challenge test come descritto nel paragrafo 3.4.2.

In ognuno dei 4 campioni di peperoni rossi sterili sono stati aggiunti 100 mL di soluzione fisiologica allo 0,9% e suddivisi nel seguente modo:

- 2 campioni sono stati inoculati con 10 ansate di *E. coli*
- 2 campioni non sono stati inoculati.

Tutti i campioni sono stati sottoposti a diluizioni seriali e conte vitali in piastra su terreno TSA al fine di valutare l'inoculo eseguito e la sterilità dei campioni di controllo.

In seguito sigillati e sottoposti a sonicazione con ciclo di maturazione spinta per 20 minuti a temperatura ambiente, dopo il trattamento sono state allestite delle diluizioni seriali e conte vitali su terreno TSA.

3.4.4 *Conta vitale in piastra su liquido di governo con E. coli*

Esclusivamente per *E. coli* è stato allestito un test di verifica per la valutazione della vitalità del microrganismo in liquido di governo. A tal fine, una coltura cellulare pura di *E. coli*, incubata a 37 °C per 24-48h su terreno di crescita TSA, è stata utilizzata per inoculare 50 mL di bagna bianca 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 in piastra e successivamente incubato per 20 minuti a temperatura ambiente. Al termine del periodo di incubazione il campione è stato sottoposto ad analisi microbiologica mediante allestimento di diluizioni seriali decimali e successive conte in piastra su mezzo di coltura TSA.

3.5 Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati relativi alle conte microbiche è stata condotta utilizzando il software JMP Versione 11.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC). L'analisi della varianza ad una via (ANOVA) è stata condotta allo scopo di evidenziare differenze significative sull'effetto dei diversi trattamenti. Le differenze sono state ritenute significative per $P < 0,05$.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati ottenuti dal trattamento con sonicatore su cavolo bianco in bagna rossa trattato per 20 minuti a temperatura ambiente sono di seguito riportati nelle tabelle 4.1 e 4.2.

Tabella 4.1: Esito prova cavolo bianco in bagna rossa.

Cavolfiore bianco in bagna rossa* (auchan) Controllo		Cavolfiore bianco in bagna rossa* (auchan) Trattato mediante sonicazione	
Gruppo microbico	Log UFC/mL	Gruppo microbico	Log UFC/mL
Mesofili aerobi totali	4,16±0,39 ^a	Mesofili aerobi totali	3,12±0,17 ^a
Lattobacilli	<1 ^a	Lattobacilli	<1 ^a
Eumiceti	<1 ^a	Eumiceti	<1 ^a
Sporigeni	<1 ^a	Sporigeni	<1 ^a
Enterobacteriaceae	<1 ^a	Enterobacteriaceae	<1 ^a
Pseudomonadaceae	<1 ^a	Pseudomonadaceae	<1 ^a

*realizzata con rape rosse biologiche. Impresa individuale "Maricotti Sauro"

Per ciascuna riga medie seguite da lettere differenti sono significativamente differenti per $P < 0.05$.

I valori rappresentano la media ± deviazione standard di due esperimenti indipendenti.

Tabella 4.2: Esito prova del cavolfiore bianco in bagna rossa.

Cavolfiore bianco in bagna rossa* (oasi) Controllo		Cavolfiore bianco in bagna rossa* (oasi) Trattato mediante sonicazione	
Gruppo microbico	Log UFC/mL	Gruppo microbico	Log UFC/mL
Mesofili aerobi totali	2,89±0,21 ^a	Mesofili aerobi totali	2,66±0,09 ^a
Lattobacilli mesofili	<1 ^a	Lattobacilli mesofili	<1 ^a
Eumiceti	<1 ^a	Eumiceti	<1 ^a
Sporigeni	<1 ^a	Sporigeni	<1 ^a
Enterobacteriaceae	<1 ^a	Enterobacteriaceae	<1 ^a
Pseudomonadaceae	<1 ^a	Pseudomonadaceae	<1 ^a

*realizzata con rape rosse biologiche. Impresa individuale "Maricotti Sauro"

Per ciascuna riga medie seguite da lettere differenti sono significativamente differenti per $P < 0.05$.

I valori rappresentano la media ± deviazione standard di due esperimenti indipendenti.

La ricerca dei gruppi microbici lattobacilli mesofili, eumiceti, sporigeni, Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae ha permesso di evidenziare nel cavolfiore bianco in bagna rossa non trattato una carica microbica inferiore al limite di rilevazione (1 Log UFC/mL), impedendo in tal modo di determinare l'effetto del trattamento di sonicazione su questi gruppi microbici, come mostrato nelle tabelle 4.1 e 4.2.

Per quanto riguarda invece i microrganismi mesofili aerobi totali, è stata riscontrata nei cavolfiori (AUCHAN) pre-trattamento una carica pari a 4,16±0,39 Log UFC/mL e nei cavoli post-trattamento una carica pari a 3,12±0,17 Log UFC/mL, evidenziando una riduzione di circa 1 log dopo il trattamento, sebbene non statisticamente significativa.

Nei cavolfiori (OASI) le analisi hanno permesso di rilevare una carica per i mesofili aerobi totali pre-trattamento pari a $2,89 \pm 0,21$ Log UFC/mL e post-trattamento pari a $2,66 \pm 0,09$ Log UFC/mL, con una riduzione pressoché nulla della carica microbica.

Confrontando i risultati con quelli ottenuti da Rivera e suoi collaboratori (2011) su campioni di tartufo, mediante l'applicazione di ultrasuoni combinata con l'ipoclorito di sodio (500 ppm), il perossido d'idrogeno (500 ppm) e 70% di etanolo, si osserva che la sola applicazione di ultrasuoni ha portato ad una riduzione di microrganismi mesofili di 1 Log UFC/g. Lo studio, condotto da Rivera *et al.*, inoltre, ha evidenziato come il trattamento con ultrasuoni abbia determinato una riduzione pari a 1,6 Log UFC/g per *Pseudomonas* spp.

Invece per quanto riguarda la conta delle Enterobatteriacee, batteri lattici, muffe e lieviti anche in questo caso Rivera *et al.* (2011) non hanno evidenziato variazione della carica microbica.

Rivera *et al.* (2011) hanno osservato un'ulteriore riduzione di circa 1 Log UFC/g quando gli ultrasuoni sono stati combinati all'ipoclorito di sodio e al perossido d'idrogeno, verosimilmente a causa della presenza di questi ultimi due composti.

In relazione ai risultati ottenuti dal trattamento del cavolfiore bianco in bagna rossa, sono stati allestiti dei challenge test al fine di valutare l'effetto del trattamento di sonicazione su ceppi microbici di riferimento

In particolare, i risultati ottenuti dal trattamento di sonicazione su peperoni rossi in bagna bianca trattati per 20 min a temperatura ambiente con trattamento di maturazione spinta sono riportati in tabella 4.3.

Tabella 8: Dati challenge test su peperoni in bagna bianca.

Peperone in bagna bianca Non trattato		Peperone in bagna bianca Trattato	
Gruppo microbico	Log UFC/mL	Gruppo microbico	Log UFC/mL
<i>Saccaromyces cerevisiae</i>	$7,78 \pm 0,16$ a	<i>Saccaromyces cerevisiae</i>	$7,54 \pm 0,04$ a
<i>Escherichia coli</i>	$7,76 \pm 0,02$ a	<i>Escherichia coli</i>	<1 b

Per ciascuna riga medie seguite da lettere differenti sono significativamente differenti per $P < 0.05$.

I valori rappresentano la media \pm deviazione standard di due esperimenti indipendenti.

L'analisi dei dati ottenuti ha permesso di evidenziare una riduzione minima o nulla della carica microbica di *S. cerevisiae* che mostrava una carica di circa $7,78 \pm 0,16$ Log UFC/mL prima del trattamento di sonicazione e una carica di circa $7,54 \pm 0,04$ Log UFC/mL dopo il trattamento di sonicazione con una riduzione apparente della carica di circa 0,24 Log UFC/mL che risultata statisticamente non significativo.

Al contrario, l'analisi dei dati ottenuti per *E. coli* ha permesso di evidenziare una riduzione di circa 8 ordini logaritmici sulla carica microbica post-trattamento di sonicazione rispetto alla carica identificata pre-trattamento, passando da una popolazione microbica di circa $7,76 \pm 0,02$ Log UFC/mL prima del trattamento ad una carica inferiore ad 1 Log UFC/mL a seguito del trattamento. L'elevata riduzione della carica microbica di *E. coli*, potrebbe essere data dall'accoppiamento degli ultrasuoni e liquido di governo, perché composto da circa 0,9 % di acido acetico (agente antimicrobico), oltre che da etanolo circa 1,8%, anch'esso con azione antimicrobica.

Questo dato risulta in linea con quanto identificato da *Sagong et al. (2011)*, nello studio, condotto per la comparazione dell'efficacia di trattamenti combinati ultrasuoni e acidi organici sono state evidenziate riduzione di cariche microbiche per quanto riguarda le specie *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium* e *L. monocytogenes*. In particolare, *Sagong* e collaboratori hanno dimostrato come trattamenti con ultrasuoni condotti con frequenze e tempistiche specifiche (30 W/L, 40 kHz, 5-10 min.) in relazione a concentrazioni variabili di acidi organici quali acido malico, citrico e acido lattico per tempi di trattamento specifici (5, 10, 20, 30 e 60 min) sono in grado di definire una riduzione della carica batterica dei microrganismi target analizzati. In dettaglio, la massima riduzione di *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium* e *L. monocytogenes* sono state rispettivamente di 2,7 (acido lattico), 3,2 (acido citrico) e 2,9 (acido malico) Log UFC/g, dopo un trattamento di ultrasuoni con il 2% di acido organico per 5 min. ($P < 0,05$). Dati simili ottenuti dai diversi studi suggeriscono che l'effetto di riduzione ottenuto con il trattamento con ultrasuoni avviene principalmente nei primi 5 min e non aumenta neanche dopo 10 minuti di trattamento in diversi campioni come prezzemolo, lattuga, cavolo, carota, cetriolo, fragola, cipolla e peperone (*Seymour et al., 2002; Sagong et al., 2011*).

I risultati ottenuti dai challenge test hanno determinato la necessità di verificare quale fosse l'effettivo contributo della sonicazione a tale riduzione, per tale motivo sono stati condotti ulteriori challenge test, sostituendo il liquido di governo con soluzione fisiologica sterile

Tabella 4.4: Esito challenge test con soluzione fisiologica.

Peperone in soluzione fisiologica N Non trattato		Peperone in soluzione fisiologica Trattato	
Gruppo microbico	Log UFC/mL	Gruppo microbico	Log UFC/mL
<i>Escherichia coli</i>	$8,31 \pm 0,17$ ^a	<i>Escherichia coli</i>	$7,95 \pm 0,32$ ^a

Per ciascuna riga medie seguite da lettere differenti sono significativamente differenti per $P < 0.05$.

I valori rappresentano la media \pm deviazione standard di due esperimenti indipendenti.

L'analisi dei dati ottenuti dopo trattamento con sonificatore su peperoni rossi inoculati con *E. coli* su soluzione fisiologica (Tabella 4.4) ha permesso di evidenziare una carica microbica pari a circa $8,31 \pm 0,17$ log UFC/mL prima del trattamento e una carica microbica di circa $7,95 \pm 0,32$ log UFC/mL dopo il trattamento con ultrasuoni. Tale dato sembra dunque evidenziare un effetto minimo, apparentemente quasi nullo del trattamento di sonicazione sulla vitalità cellulare del microrganismo in esame.

Infine i dati relativi alla valutazione della vitalità cellulare di *E. coli* su bagna bianca riportati in tabella 4.5 mostrano come l'incubazione per 20 minuti a temperatura ambiente determina una riduzione statisticamente significativa di circa 8 ordini logaritmici della carica microbica di *E. coli* passando da una carica iniziale di circa $7,63 \pm 0,08$ Log UFC/ml ad una carica finale inferiore ad 1 Log UFC/ml, in assenza di trattamento di sonicazione.

Tabella 4.5: Determinazione dell'attività antimicrobica della bagna bianca su *Escherichia coli*.

Bagna bianca (+peperoni) Pre-incubazione		Bagna bianca (+peperoni) Post-incubazione 20 minuti temperatura ambiente	
Gruppo microbico	Log UFC/ml	Gruppo microbico	Log UFC/ml
<i>Escherichia coli</i>	$7,63 \pm 0,08$ ^a	<i>Escherichia coli</i>	<1 ^b

Per ciascuna riga medie seguite da lettere differenti sono significativamente differenti per $P < 0.05$.

I valori rappresentano la media \pm deviazione standard di due esperimenti indipendenti.

Dalla letteratura scientifica emerge che i principali effetti antimicrobici del trattamento a ultrasuoni dovrebbero essere attribuiti alle cavitazioni acustiche intracellulari, le quali causano: un aumento della permeabilità delle membrane e bassa selettività, l'assottigliamento delle membrane cellulari (*Sams e Feria, 1991*), il riscaldamento localizzato (*Suslick, 1998*) e la produzione di radicali liberi (*Fellows, 2000; Butz e Tauscher, 2002*). Le onde d'urto emanate dalle bolle di cavitazione in collasso potrebbero essere abbastanza forti da tagliare e rompere il muro cellulare e le strutture della membrana.

Il secondo effetto antimicrobico potrebbe provenire dall'effetto chimico degli ultrasuoni, mediante sonolisi che incrementa la inattivazione di microrganismi grazie all'attività antimicrobica dei radicali idrossilici che si formano durante questo trattamento (*Suslick, 1998; Phull e Mason, 1999; Butz e Tauscher, 2002; Kadkhodae e Povey, 2008*). Alcuni studi hanno mostrato che gli ultrasuoni generano un aumento di temperatura a livelli localizzati dentro la bolla in collasso che genera radicali idrossilici primari (*Makino et al., 1983; Suslick, 1989; Ashokkumar e Mason, 2007; Kentish e Ashokkumar, 2011*). Tutti gli effetti chimici della cavitazione includono la creazione di radicali liberi e comportano il trasferimento di un singolo elettrone durante la fase di raffreddamento; quindi gli atomi di idrogeno e i radicali idrossilici si uniscono per formare il perossido di idrogeno (H_2O_2), il

quale ha importanti proprietà battericide (*Lee e Feng, 2011*). Se venissero aggiunti altri composti all'acqua irradiata da ultrasuoni ciò, potrebbe provocare una vasta gamma di reazioni secondarie tali da condurre all'ossidazione o riduzione (*Suslick, 1989*).

Molti studi sono riportati in bibliografia, sulle varie applicazioni degli ultrasuoni ad alta potenza (bassa frequenza) nella scienza e tecnologia alimentare. Tutte queste applicazioni sono state esaminate da *Awad et al. (2012)*, *Carcel et al. (2012)* e *Chandrapala et al. (2012)*. I ricercatori, negli ultimi decenni, sono stati capaci di ottimizzare molte applicazioni ad ultrasuono sia per testare sia per lavorare i prodotti alimentari. Inoltre, le applicazioni commerciali degli ultrasuoni esistevano per emulsioni, estrazioni, decontaminazione, estrusione, trattamento delle acque di scarico, per ammorbidire la carne e come antischiuma (*Cardoni e Lucas, 2005; Clark, 2008; Patist e Bates, 2008; Awad, 2011; Chemat et al., 2011; Quan, 2011; Anon, 2012*). Per scopi antimicrobici, gli ultrasuoni vengono usati principalmente per pulire o disinfettare le superfici delle industrie alimentari

Recentemente molti studi sono stati condotti al riguardo dell'appropriato sistema di rilevamento o elaborazione degli ultrasuoni in termini di design, geometria e caratteristiche della sonda (per esempio frequenza), oltre a condizioni di funzionamento che rispondano alle esigenze degli specifici impianti nei diversi materiali alimentari o che forniscano risultati ottimali per ogni singolo impianto. Perciò, si può dire che l'efficacia della tecnologia ad ultrasuoni è rilevante al fine di assicurare la solidità di questo metodo in eventuali aree di trattamento negli impianti industriali (*Patist e Bates, 2010; Soria e Villamiel, 2010; Knorr et al., 2011; Awad et al., 2012*).

C'è però la necessità di condurre ricerche per lo sviluppo di sistemi funzionali in grado di rispondere alle problematiche delle diverse linee produttive. E' infatti vero che dai dati emersi nella presente sperimentazione non si evidenzia un effetto decontaminante in quanto le differenze emerse fra i campioni trattati e non trattati soggetti a challenge test sono verosimilmente da imputarsi all'effetto della bagna che contiene sostanze a riconosciuto effetto antimicrobico quali, l'acido acetico (contenuto nell'aceto) e l'etanolo (contenuto nel vino).

Attualmente, per diminuire la carica microbica di frutta e verdura fresca, vengono applicate tecniche di decontaminazione basate su un metodo o una combinazione di metodi abbinati a diversi agenti antimicrobici, tra i quali: cloro, diossido di cloro, cloruro di sodio acidificato, formulazioni di acido organico, igienizzanti a base alcalina, perossido di idrogeno, acqua ozonizzata, acqua elettrolizzata, acido peracetico e trattamenti a calore combinati ad altri metodi fisici che includono ultrasuoni, radiazioni ultraviolette, campo elettrico pulsato,

campo magnetico oscillante e alta pressione, ove permessi dalla legislazione (*Gil et al., 2011*).

CONCLUSIONI

La combinazione di ultrasuoni e metodi non termici e/o fisico-biologici può risultare una strategia interessante per rendere più efficace l'eliminazione e la inattivazione microbica nei vegetali. Dal punto di vista delle richieste del consumatore, l'ultrasuono e i processi fisico-biologici mostrano un potenziale per ulteriori ricerche e applicazioni su scala industriale.

Tuttavia, sulla base delle evidenze ottenute nella presente tesi i risultati dei trattamenti chimico-fisici applicati ai vegetali crudi sembrano affermare che gli ultrasuoni non esercitino nelle condizioni applicate un effetto apprezzabile sulla riduzione delle cariche microbiche che risultano altresì influenzate dai composti chimici (acido acetico e etanolo) presenti nelle rispettive bagne.

Sono quindi necessari ulteriori studi al fine di verificare l'opportunità di modificare le frequenze del trattamento ad ultrasuoni e il loro effetto sinergico quando applicate a trattamenti chimici.

BIBLIOGRAFIA

- Abuladze, T., Li, M., Menetrez, M.Y., Dean, T.M., Senecal, A., Sulakvelidze, A., 2008.** Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6230e6238.
- Alegria, C., Pinheiro, J., Gonçalves, E.M., Fernandes, I., Moldao, M., Abreu, 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* 10, 61–69.
- Alexandre, E.M.C., Brandao, T.R.S., Silva, C.L.M., 2012.** Efficacy of non-thermal technologies and sanitizer solutions on microbial load reduction and quality retention of strawberries. *Journal of Food Engineering* 108, 417–426.
- Alexandre, E.M.C., Brandao, T.R.S., Silva, C.L.M., 2013.** Impact of non-thermal technologies and sanitizer solutions on microbial load reduction and quality factor retention of frozen red bell peppers. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 17, 199–205.
- Anon., 2012.** Extraction of palm oil. <http://www.cavitus.com/products/Extraction/palm-oil>.
- Arce-Garcia, M.R., Jimenez-Munguia, M.T., Palou, E., Lopez-Malo, A., 2002.** Ultrasound treatments and antimicrobial agents effects on *Zygosaccharomyces rouxii*. IFT Annual Meeting Book of Abstracts 2002, Session 91E-18.
- Artés, F., Gómez, P., Artés-Hernández, F., Aguayo, E., Escalona, V., 2007.** Improved strategies for keeping overall quality of fresh-cut produce. *Acta Hortic.* 746, 245e258.
- Aruscavage, D., Lee, K., Miller, S., LeJeune, J.T., 2006.** Interactions affecting the proliferation and control of human pathogens on edible plants. *J. Food Sci.* 71, R89eR99.
- Ashokkumar, M., Mason, T.J., 2007.** Sonochemistry. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. Wiley, New York, NY.

- Awad, S., 2011.** High power ultrasound in surface cleaning and decontamination. In: Feng, H., Barbosa-Canovas, G., Weiss, J. (Eds.), *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. Springer, London, pp. 545–558.
- Awad, T.S., Moharram, H.A., Shaltout, O.E., Asker, D., Youssef, M.M., 2012.** Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: a review. *Food Research International* 48, 410–427.
- Berger, C.N., Sodha, S.V., Shaw, R.K., Griffin, P.M., Pink, D., Hand, P., Frankel, G., 2010.** Fresh fruits and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ. Microbiol.* 12, 2385e2397.
- Beuchat, L.R., 1998.** Surface Decontamination of Fruits and Vegetables Eaten Raw: A Review, Food Safety Issues, Food Safety Unit. World Health Organization, Geneva. WHO/FSF/FOS/98.2. Available at: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/surface_decon.pdf (accessed 19.08.11).
- Beuchat, L.R., 2002.** Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes Infect.* 4, 413e423.
- Beuchat, L.R., Ryu, J., 1997.** Produce handling and processing practices. *Emerg. Infect. Dis.* 3, 459e465.
- Bhat, R., Kamaruddin, C.N.S.B., Liong, M.T., Karim, A.A., 2011.** Sonication improves kasturi lime (*Citrus microcarpa*) juice quality. *Ultrasonic Sonochemistry* 18, 1295–1300.
- Brackett, R.E., 1999.** Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce. *Postharvest Biol. Technol.* 15, 305e311.
- Brandl, M.T., Mandrell, R.E., 2002.** Fitness of *Salmonella enterica* serovar Thompson in the cilantro phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3614e3621.
- Butz, P., Tauscher, B., 2002.** Emerging technologies: chemical aspects. *Food Research International* 35 (2/3), 279–284.
- 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), 529–532.
- Carcel, J.A., Garcia-Perez, J.V., Benedito, J., Mulet, A., 2012.** Food process innovation through new technologies: use of ultrasound. *Journal of Food Engineering* 110, 200–207.

- Cardoni, A., Lucas, M., 2005.** Strategies for reducing stress in ultrasonic cutting systems. *Strain* 41 (1), 11–18.
- Chandrapala, J., Oliver, C., Kentish, S., Ashokkumar, M., 2012.** Ultrasonics in food processing. *Ultrasonics Sonochemistry* 19, 975–983.
- Chemat, F., Zill-e-Huma, Khan, M.K., 2011.** Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry* 18, 813–835.
- Chen, Z., Zhu, C., 2011.** Combined effects of aqueous chlorine dioxide and ultrasonic treatments on postharvest storage quality of plum fruit (*Prunus salicina* L.). *Postharvest Biology and Technology* 61, 117–123.
- Clark, P., 2008.** An update on ultrasonics. *Food Technology* 26, 75–77.
- Cooley, M.B., Chao, D., Mandrell, R.E., 2006.** *Escherichia coli* O157:H7 survival and growth on lettuce is altered by the presence of epiphytic bacteria. *J. Food Prot.* 69, 2329e2335.
- Cooley, M.B., Miller, W.G., Mandrell, R.E., 2003.** Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by *Enterobacter asburiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4915e4926.
- Curiale MS. 1991.** Shelf-life evaluation analysis. *Dairy Food Environ Sanit* 11(4):364-9.
- Dingman, D.W., 2000.** Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in bruised apple (*Malus domestica*) tissue as influenced by cultivar, date of harvest, and source. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1077e1083.
- Dong, Y., Iniguez, A.L., Ahmer, B.M., Triplett, E.W., 2003.** Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1783e1790.
- Doyle, M.P., Erickson, M.C., 2008.** Summer meeting 2007dthe problems with fresh produce: an overview. *J. Appl. Microbiol.* 105, 317e330.
- Elizaquivel, P., Sanchez, G., Selma, M.V., Aznar, R., 2011.** Application of propidium monoazide-qPCR to evaluate the ultrasonic inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-cut vegetable wash water. *Food Microbiology* 30, 316–320.

- European Union (EU), 2007.** Agricultural commodity markets past developments fruits and vegetables, An analysis of consumption, production and trade based on statistics from the Food and Agriculture Organization (FAO), Economic analyses and evaluation G.5, Agricultural trade policy analysis, European Commission Directorate-General for Agriculture and Rural Development Directorate G. 17 July 2007.
- Fellows, P., 2000.** Food Processing Technology: Principles and Practice, 2nd ed. CRC Press, New York.
- Food and Drug Administration (FDA), 1998.** Guidance for industry, guide to minimize microbial food safety hazards for fresh fruit and vegetables. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ProduceandPlanProducts/UCM169112.pdf> (accessed 22.08.11).
- Food and Drug Administration (FDA), 2001.** Analysis and evaluation of prevention control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce, Center for Food Safety and Applied Nutrition. Available at: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/default.htm> (accessed 21.08.11)
- Frank, J.E., 2001.** Microbial attachment to food and food contact surfaces. *Adv. Food Nutr. Res.* 43, 319e370.
- Gil, M.L., Allende, A., Selma, M.V., 2011.** Treatments to assure safety of fresh-cut fruits and vegetables. In: Martin-Belosa, O., Soliva-Fortuny, R. (Eds.), *Advances in Fresh-cut Fruit and Vegetables Processing*. CRC Press, USA, pp. 211–223.
- Golberg, D., Kroupitski, Y., Belausov, E., Pinto, R., Sela, S., 2011.** Salmonella Typhimurium internalization is variable in leafy vegetables and fresh herbs. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 250e257.
- Gomes, C., Da Silva, P., Moreira, R.G., Castell-Perez, E., Ellis, E.A., Pendleton, M., 2009.** Understanding E. coli internalization in lettuce leaves for optimization of irradiation treatment. *Int. J. Food Microbiol.* 135, 238e247.
- González, R.J., Luo, Y., Ruiz-Cruz, S., McEvoy, J.L., 2004.** Efficacy of sanitizers to inactivate Escherichia coli O157:H7 on fresh-cut carrot shreds under simulated process water conditions. *J. Food Prot.* 67, 2375e2380.

- Grasso, E.M., Uribe-Rendon, R.M., Lee, K., 2011.** Inactivation of *Escherichia coli* inoculated onto fresh-cut chopped cabbage using electron-beam processing. *J. Food Prot.* 74, 115e118.
- 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), 131–139.
- Harris, L.J., Beuchat, L.R., Kajs, T.M., Ward, T.E., Taylor, C.H., 1999.** Efficacy and reproducibility of a produce wash in killing *Salmonella* on the surface of tomatoes assessed with a proposed standard method for produce sanitizers. *J. Food Prot.* 64, 1477e1482.
- Harris, L.J., 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. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety* 2, 78e141.
- Huang, T., Xu, C., Walker, K., West, P., Zhang, S., Weese, J., 2006.** Decontamination efficacy of combined chlorine dioxide with ultrasonication on apples and lettuce. *Journal of Food Science* 71 (4), 134–139.
- Inatsu, Y., Maeda, Y., Bari, M.L., Kawasaki, S., Kawamoto, S., 2005.** Prewashing with acidified sodium chlorite reduces pathogenic bacteria in lightly fermented Chinese cabbage. *J. Food Prot.* 68, 999e1004.
- Institute of Food Technologists, Dept. of Science and Technology Projects. 2000 (IFT).** Special supplement: Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. Barach JT, Barbosa-Canovas GV, Busta FF, Datta AK, Davidson PM, Farkas DF, Heldman DR, Hoover DG, Kokini JL, Pflug IJ, Pierson MD, Sastry SK, Schaffner DW, Zhang QH, editors. Chicago: IFT. [108] p. (*Journal of Food Science*; vol. 65, no.8, suppl).
- Jablasone, J., Warriner, K., Griffiths, M., 2005.** Interactions of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* on plants cultivated in a gnotobiotic system. *Int. J. Food Microbiol.* 99, 7e18.
- Johnston, L.M., Jaykus, L., Moll, D., Martinez, M., Anciso, J., Mora, B., Moe, C., 2005.** A field study of the microbiological quality of fresh produce. *J. Food Prot.* 68, 1840e1847.

- Kadkhodae, R., Povey, M.J.W., 2008.** Ultrasonic inactivation of *Bacillus* α -amylase I effect of gas content and emitting face of probe. *Ultrasonic Sonochemistry* 15, 133–142.
- Kentish, S., Ashokkumar, M., 2011.** The physical and chemical effects of ultrasound. In: Feng, H., Barbosa-Cánovas, G.V., Weiss, J. (Eds.), *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. Springer, London, pp. 1–12.
- 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* 2, 203–235.
- Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., Lee, D., 2004.** Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science and Technology* 15, 261–266.
- Kocharunchitt, C., Ross, T., McNeil, D.L., 2009.** Use of bacteriophages as biocontrol agents to control *Salmonella* associated with seed sprouts. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 453e459.
- Kroupitski, Y., Golberg, D., Belausov, E., Pinto, R., Swartzberg, D., Granot, D., Sela, S., 2009.** Internalization of *Salmonella enterica* in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6076e6086.
- Krtinic, G., Duric, P., Ilic, S., 2010.** Salmonellae in food stuffs of plant origin and their implications on human health. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29, 1321e1325.
- Kuldiloke, J., 2002.** Effect of Ultrasound, Temperature and Pressure Treatments on Enzyme Activity and Quality Indicators of Fruit and Vegetable Juices. (Ph.D. Thesis) Technische Universität Berlin.
- Lee, H., Feng, H., 2011.** Effect of power ultrasound on food quality. In: Feng, H., Barbosa-Cánovas, G.V., Weiss, J. (Eds.), *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. Springer, London, pp. 559–582.
- Leistner, I., 2000.** Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* 55, 181–186.

- Lopez-Gomez, P.S., Palop, F.A., Periago, P.M., Martinez-Lopez, A., Marin-Iniesta, F., Barbosa-Canovas, G.V., 2009.** Food safety engineering: an emergent perspective. Buck, J.W., Walcott, R.R., Beuchat, L.R., 2003. Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. Online. Plant Health Progress. <http://dx.doi.org/10.1094/PHP-2003-0121-01-RV>.
- López-Malo, A., Palou, E., Jiménez-Fernández, M., Alzamora, S.M., Guerrero, S., 2005.** Multifactorial fungal inactivation combining thermosonication and antimicrobials. *Journal of Food Engineering* 67 (1–2), 87–93.
- Mahmoud, B.S.M., 2010.** Effects of X-ray radiation on *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Shigella flexneri* inoculated on shredded iceberg lettuce. *Food Microbiol.* 27, 109e114.
- Makino, K., Mossoba, M.M., Riesz, P., 1983.** Chemical effects of ultrasound on aqueous solutions. Formation of hydroxyl radicals and hydrogen atoms. *Journal of Physical Chemistry* 87 (8), 1369–1377.
- McClements, D.J., 1995.** Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science and Technology* 6 (9), 293–299.
- Mitra, R., Cuesta-Alonso, E., Wayadande, A., Talley, J., Gilliland, S., Fletcher, J., 2009.** Effect of route of introduction and host cultivar on the colonization, internalization, and movement of the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7 in spinach. *J. Food Prot.* 72, 1521e1530.
- Morris, C.E., Monier, J.-M., Jacques, M.-A., 1998.** A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4789e4795.
- Najafi, M.B.H., Khodaparast, M.H.H., 2009.** Efficacy of ozone to reduce microbial populations in date fruits. *Food Control* 20, 27e30.
- Najafi, M.B.H., Khodaparast, M.H.H., 2009.** Efficacy of ozone to reduce microbial populations in date fruits. *Food Control* 20, 27e30.
- O'Donnell, C.P., Tiwari, B.K., Bourke, P., Cullen, P.J., 2010.** Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends in Food Science and Technology* 21 (7), 358–367.

- Olmez, H., Temur, S.D., 2010.** Effects of different sanitizing treatments on biofilms and attachment of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on green leaf lettuce. *LWT Food Sci. Technol.* 43, 964e970.
- Park, C.M., Beuchat, L.R., 1999.** Evaluation of sanitizers for killing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and naturally occurring microorganisms on cantaloupes, honeydew melons, and asparagus. *Dairy Food Environ. Sanit.* 19, 842e847.
- Patist, A., Bates, D., 2008.** Ultrasonic innovations in the food industry: from the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 147-154.
- Patist, A., Bates, D., 2010.** Industrial applications of high power ultrasonics. In: Feng, H., Barbosa-Canovas, G., Weiss, J. (Eds.), *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. Springer, London, pp. 598–619.
- Phull, S.S., Mason, T.J., 1999.** The use of ultrasound in microbiology. In: Mason, T.J. (Ed.), *Advances in Sonochemistry*, vol. 5. JAI Press, USA, p. 197.
- Piyasena, P., Mohareb, E., McKellar, R.C., 2003.** Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology* 87 (3), 207–216.
- Pu, S., Beaulieu, J.C., Prinyawiwatkul, W., Ge, B., 2009.** Effects of plant maturity and growth media bacterial inoculum level on the surface contamination and internalization of *Escherichia coli* O157:H7 in growing spinach leaves. *J. Food Prot.* 72, 2313e2320.
- Quan, K., 2011.** Novel application of power ultrasonic spray. In: Feng, H., Barbosa-Canovas, G., Weiss, J. (Eds.), *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. Springer, London, pp. 535–544.
- Rivera, C.S., Venturini, M.E., 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), 626–632.
- Rodgers, S.L., Cash, J.N., Siddiq, M., Ryser, E.T., 2004.** A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe. *J. Food Prot.* 67, 721e731.

- Ruiz-Cruz, S., Acedo-Félix, E., Díaz-Cinco, M., Islas-Osuna, M.A., González- Aguilar, G.A., 2007.** Efficacy of sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* populations on fresh-cut carrots. *Food Control* 18, 1383e1390.
- Sagong, H.G., 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 (1), 287–292.
- Sams, A.R., Feria, R., 1991.** Microbial effects of ultrasonication of broiler drumstick skin. *Journal of Food Science* 56 (1), 247–248.
- São José, J.F.B., Vanetti, M.C.D., 2012.** Effect of ultrasound and commercial sanitizers in removing natural contaminants and *Salmonella enterica* Typhimurium on cherry tomatoes. *Food Control* 24 (1–2), 95–99.
- Sapers, G.M., 2001.** Efficacy of washing and sanitizing methods of disinfection of fresh fruit and vegetable products. *Food Technology and Biotechnology* 39 (4), 305–311.
- Sapers, G.M., Sites, J.E., 2003.** Efficacy of 1% hydrogen peroxide wash in decontaminating apples and cantaloupe melons. *J. Food Sci.* 68, 1793e1797.
- Scolari, G., Vescovo, M., 2004.** Microbial antagonism of *Lactobacillus casei* added to fresh vegetables. *Ital. J. Food Sci.* 16, 465e475.
- Scouten, A.J., Beuchat, L.R., 2002.** Combined effects of chemical, heat and ultrasound treatments to kill *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. *Journal of Applied Microbiology* 92, 668–674.
- Selma, M.V., Beltra, D., Allende, A., Chacón-Vera, E., Gill, M.I., 2007.** Elimination by ozone of *Shigella sonnei* in shredded lettuce and water. *Food Microbiol.* 24, 492e499.
- Seo, K.H., Frank, J.F., 1999.** Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to lettuce leaf surface and bacterial viability in response to chlorine treatment. *J. Food Prot.* 62, 3e9.
- Sharma, M., Patel, J.R., Conway, W.S., Ferguson, S., Sulakvelidze, A., 2009b.** Effectiveness of bacteriophages in reducing *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut cantaloupes and lettuce. *J. Food Prot.* 72, 1481e1485.

- Solomon, E.B., Yaron, S., Mathews, K.R., 2002.** Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 397e400.
- Soria, A.C., Villamiel, M., 2010.** Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science and Technology* 21, 323–331.
- Suslick, K.S., 1989.** The chemical effects of ultrasound. *Scientific American* 80–87.
- Suslick, K.S., 1998.** Sonochemistry, 4th ed. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, vol. 26. J. Wiley Sons, New York, pp. 517–541
- Teplitski, M., Warriner, K., Bartz, J., Schneider, K.R., 2011.** Untangling metabolic and communication networks: interactions of enterics with phytobacteria and their implications in produce safety. *Trends Microbiol.* 19, 121e127.
- Trias, R., Bañeras, L., Badosa, E., Montesinos, E., 2008.** Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 123, 50e60.
- United States Department of Agriculture (USDA), 2000a.** Acidified sodium chlorite solutions, Code of Federal Regulations 21 CFR 173.325, Office of the Federal Register. Available at: <http://cfr.vlex.com/vid/173-325-acidified-chlorite-solutions-19706225> (accessed 20.08.11).
- Vestergaard EM. 2001.** Building product confidence with challenge studies. *Dairy Food Environ Sanit* 21(3):206-9.
- Wang, Y., Hu, Y., Wang, J., Liu, Z., Yang, G., Geng, G., 2011.** Ultrasound-assisted solvent extraction of swainsonine from *Oxytropis ochrocephala* Bunge. *Journal of Medicinal Plants Research* 5 (6), 890–894.
- Warriner, K., Huber, A., Namvar, A., Fan, W., Dunfield, K., 2009.** Recent advances in the microbial safety of fresh fruits and vegetables. *Adv. Food Nutr. Res.* 57, 155e208.
- Whipps, J.M., Hand, P., Pink, D.A., Bending, G.D., 2008.** Human pathogens and the phyllosphere. *Adv. Appl. Microbiol.* 64, 183e221.
- World Health Organisation/Food and Agriculture Organization (WHO/FAO), 2008.** Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs, Microbiological risk assessment series, Meeting Report. 20, Avenue Appia CH-1211 Geneva 27, Switzerland.

- Ye, J.X., Kostrzynska, M., Dunfield, K., Warriner, K., 2009.** Evaluation of a biocontrol preparation consisting of *Enterobacter asburiae* JX1 and a lytic bacteriophage cocktail to suppress the growth of *Salmonella Javiana* associated with tomatoes. *J. Food Prot.* 72, 2284e2292.
- Ye, J.X., Kostrzynska, M., Dunfield, K., Warriner, K., 2010.** Control of *Salmonella* on sprouting mung bean and alfalfa seeds by using a biocontrol preparation based on antagonistic bacteria and lytic bacteriophages. *J. Food Prot.* 73, 9e17.
- Zhang, G., Ma, L., Beuchat, L.R., Erickson, M.C., Phelan, V.H., Doyle, M.P., 2009b.** Lack of internalization of *Escherichia coli* O157:H7 in lettuce (*Lactuca sativa* L.) after leaf surface and soil inoculation. *J. Food Prot.* 72, 2028e2037.
- Zhou, B., Feng, H., Luo, Y., 2009.** Ultrasound enhanced sanitizer efficacy in reduction of *Escherichia coli* O157:H7 population on spinach leaves. *Journal of Food Science* 74 (6), 308–313.