

VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ BATTERICIDA DELL'EOW SU MATRICI ALIMENTARI CARNEE

BACTERICIDAL ACTIVITY OF ELECTROLYZED OXIDIZING WATER ON MEAT AND POULTRY

Serraino A., Giacometti F., Lugoboni B., Matera R., Gazzotti T., Riu R., Coccollone A., Rosmini R.
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna

SUMMARY

Electrolyzed oxidizing water (EOW) has potential application as a residue free sanitizing agent for food of animal origin. Meat and poultry were contaminated with microorganism, pathogens or not, and different types of electrolyzed oxidizing water treatment were investigated to evaluate the activity of each of these method. In detail, this study is aiming at evaluating the effectiveness of EOW in reducing microbial count, including total bacterial count, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* on meat and poultry. EOW has a very strong disinfectant activity which, along with its easy and safe use, makes a good alternative to many other more widely used disinfectants.

Key words

Electrolyzed oxidizing water, meat, poultry, pathogens, food.

INTRODUZIONE

Gli alimenti di origine animale possono essere una fonte di tossinfezione per l'uomo. Nella filiera di produzione delle carni diverse sono le fasi in cui può avvenire contaminazione del prodotto. In modo particolare, la macellazione degli animali è ritenuta un momento critico (1). La riduzione della contaminazione delle carcasse è fondamentale sia per ridurre la concentrazione di microrganismi sulle carni sia per limitare la cross-contaminazione delle carcasse (2, 3). Il lavaggio delle carni con acqua od altre soluzioni disinfettanti è un metodo utilizzato in vari paesi per assicurare il controllo della contaminazione di questi alimenti e la ricerca di prodotti sempre più efficaci è continua (4, 5). Il potere disinfettante dell'EOW è dovuto al suo pH acido e al suo ORP, nonché alla presenza di cloro libero e di acido ipocloroso (6, 7) e la sua applicazione è stata valu-

tata su superfici e su alimenti di diversa origine. Sulle superfici il suo potere disinfettante è stato numerose volte dimostrato (7, 8, 9) e la sua efficacia su matrici organiche è stata sperimentata in diversi lavori su vegetali (10, 11). In alimenti di origine animale, specialmente carni, la sua attività è stata timidamente segnalata (3, 4, 5, 12) ma necessita di ricerche orientate ad ottenere significativa conferma. Lo scopo del lavoro è di valutare l'efficacia dell'EOW come agente disinfettante su alimenti di origine animale quali carni fresche di bovino, suino e pollo.

MATERIALI E METODI

L'EOW è stata fornita da una ditta produttrice. All'atto della fornitura è stato verificato il pH e il potenziale di ossidoriduzione mediante pHmetro Hanna Instruments HI 98240 con elettrodi R334

(ORP) FC201D (pH). Per l'inoculo sperimentale è stata preparata una sospensione carica mesofila totale (CMT) a titolo 3 della scala di Mc Farland corrispondente a circa 9×10^8 UFC/ml. Per la preparazione dell'inoculo batterico di *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* ed *Escherichia coli* sono stati utilizzati i ceppi riportati in tabella 1.

In tutti i casi i ceppi sono stati moltiplicati separatamente, sospesi e miscelati in modo da ottenere una sospensione standard dell'inoculo pari a circa 10^7 UFC/ml. Sono stati quindi eseguiti tre tipi di test, inoculando le sospensioni batteriche in carni bovine, suine e avicole e trattandole per spruzzazione a 5^2 e 15^2 e per immersione. Le modalità di esecuzione dei test sono riportate in tabella 2.

Nel test di spruzzazione, per 5^2 e per 15^2 , a partire da tre matrici carnee (polpa di carne bovina e suina e cute di pollo per il test per 5^2 e polpa di carne bovina, pancetta fresca di carne suina e cute di pollo

per il test per 15^2), sono state delimitate 6 aree contigue di 10 cm^2 . (figura 1).

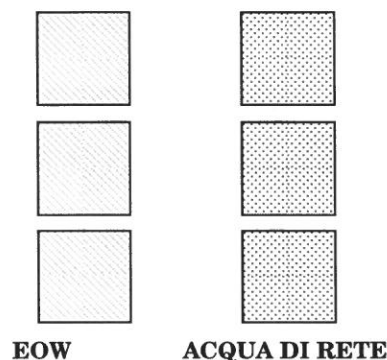


Figura 1: schema di delimitazione delle aree utilizzato in ciascun test: le aree da 1 a 3 sono state sottoposte a trattamento con EOW (spray 5^2 e 15^2 e immersione 1, 2 e 10 min). Le corrispondenti aree da 4 a 6 sono state sottoposte a trattamento di controllo.

Tabella 1: Ceppi dei batteri patogeni impiegati nei test.

Ceppi utilizzati			
S. Typhimurium	ATCC 14028	Ceppo di campo da carni avicole	Ceppo di campo da carni suine
S. aureus	ATCC 25923	Ceppo di campo da latte bovino	Ceppo di campo da carni avicole
L. monocytogenes	ATCC 7644	Ceppo di campo da carni suine	Ceppo di campo da feci bovine
E. coli	ATCC 700927	Ceppo di campo (O157:H7) da carni bovine	

Nel test a 5^2 le aree sono state sottoposte a decontaminazione mediante immersione in alcool etilico assoluto, evaporazione e trattamento con raggi UV per una notte e quindi a contaminazione sperimentale. Nel trattamento a 5^2 l'inoculo è stato preparato sospendendo la CMT e il patogeno testato in modo da ottenere una concentrazione pari a circa 10^6 UFC/cm² di mesofila e 10^4 UFC/cm² di *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* ed *Escherichia coli*. Per il test di spruzzazione per 15^2 i pezzi o tagli, non decontaminati sono stati inoculati con il patogeno testato in modo da ottenere una concentrazione pari a circa 10^5 UFC/cm² di *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* ed *Escherichia coli*. Tutte le sospensioni batteriche sono state lasciate asciugare a temperatura ambiente prima di procedere al trattamento delle carni. In totale sono state inoculate 12 aree per ciascuno degli 8 inoculi

precedentemente riportati. I pezzi dopo escissione sono stati suddivisi e, per ciascun inoculo, 3 sono stati sottoposti a trattamento per spruzzazione a bassa pressione per 5^2 e per 15^2 con acqua di rete (controllo) e 3 con EOW.

Nel test di immersione, su ciascun campione (carcasse di pollo) sono state delimitate ed escisse 6 aree di 10 cm^2 , tre per ogni emicarcassa, da inoculare e sottoporre al trattamento. Le matrici carnee sono state contaminate con gli inoculi precedentemente descritti per il test di spruzzazione per 15^2 . Per ogni tipo di contaminazione, 3 aree sono state immerse in un bagno contenente 6 litri di acqua elettrolizzata alcalina e in seguito immersi in un bagno contenente 6 litri di acqua elettrolizzata acida a tre tempi (1, 2 e 5 min.) e le altre 3 aree sono state immerse in un bagno contenente 6 litri di acqua di rete per un tempo complessivo di 2, 4 e 10 min.

Dopo i rispettivi trattamenti, le aree delimitate

sono state prelevate e si è proceduto all'isolamento e alla conta dei microrganismi utilizzando PCA (Oxoid) incubato a 30°C per 72 ore per la CMT, XLD Medium (Oxoid) incubato a 37°C per 24 h per *Salmonella Typhimurium*, Baird -Parker Agar (Difco) incubato a 37°C per 24 – 48 h per *Staphylococcus aureus*, Selective Agar Oxford Formulation (Oxoid) incubato a 37°C per 48 h per *Listeria monocytogenes* e Sorbitol MacConkey Agar (Oxoid) incubato a 37°C per 24h per *Escherichia coli*.

L'elaborazione dei dati è stata effettuata mediante test statistici parametrici utilizzando il T student con il programma SPSS, confrontando le popolazioni batteriche residue a seguito del trattamento con EOW e acqua di rete.

Il test organolettico, per valutare l'effetto dell'applicazione dell'EOW alla carne, è stato eseguito tramite un test triangolare a 24 panelisti. Il numero dei partecipanti al test è stato scelto basandosi sulle indicazioni riportate da ISO-4120 considerando un alfa-rischio=0,05 e un beta-rischio= 0,05. Un pezzo di carne di pollo di 180 g è stato immerso in 6 litri di EOW per un minuto. Un secondo pezzo di carne di 180 g, usato come controllo, è stato invece trattato con acqua di rete. Entrambi i pezzi sono stati macinati separatamente e sono state preparate delle polpette di carne macinata di 10 g ciascuna. Ogni polpetta è stata cotta in microonde dentro una capsula petri di vetro per 1 minuto a 450W al fine di otte-

nere un campione cotto di una temperatura a cuore di 71°C.

RISULTATI

L'EOW utilizzata presentava le seguenti caratteristiche: pH 2,69, ORP 1.135 mV. Nelle tabelle 3 e 3A, 4 e 4A, 5 e 5A sono rispettivamente riportati i dati relativi alla carica batterica residua e all'abbattimento della popolazione batterica dopo trattamento per spruzzazione per 5² e 15² e per immersione. L'elaborazione statistica dei dati evidenzia sia una differenza significativa ($p < 0,001$) nella carica batterica residua sia una maggior riduzione della popolazione batterica di almeno un Log a seguito di applicazione dell'EOW rispetto all'applicazione di acqua di rete. L'analisi dei dati non evidenzia una tendenza ad una maggiore riduzione della popolazione batterica all'aumentare del tempo di applicazione. Il test organolettico ha evidenziato, sia nel primo test triangolare, atto a valutare differenze di odore fra i campioni di carne, sia nel secondo test triangolare, atto a valutare differenze di gusto, che esiste una differenza fra il campione trattato e quello di controllo (15 panelisti nel primo test e 13 nel secondo). I risultati del test di determinazione del numero di perossidi (tabella 6) non ha evidenziato un trend comune di modificazione nelle diverse matrici carnee trattate.

Tabella 2: Schema di esecuzione dei test.

	Spruzzazione 5"	Spruzzazione 15"	Immersione
Materiale inoculato	Polpa di carne bovina Pancetta fresca di carne suina Cute di pollo	Polpa di carne bovina Pancetta fresca di carne suina Cute di pollo	Carcasse di pollo
Decontaminazione	Immersione in alcool etilico assoluto, evaporazione e trattamento con raggi UV per una notte	No	No
Aree di inoculo	6 aree contigue di 10 cm ²	6 aree contigue di 10 cm ²	6 aree contigue di 10 cm ² (3 per ogni emicarca)
Inoculo	Mix 10 ⁶ UFC/cm ² di mesofila e 10 ⁴ UFC /cm ² del patogeno testato	10 ⁵ UFC /cm ² del patogeno testato	10 ⁵ UFC /cm ² del patogeno testato
Tipologia di trattamento	Spruzzazione, per 5 ² a bassa pressione a 30 cm di distanza	Spruzzazione, per 15 ² a bassa pressione a 30 cm di distanza	Immersione in 6 litri di acqua elettrolizzata alcalina e successiva immersione in 6 litri di acqua elettrolizzata acida a tre tempi (1, 2 e 5 min.)

Tabella 3: Efficacia di EOW su una popolazione di carica mesofila totale e patogeni dopo spruzzazione per 5²

	Popolazione batterica (log ₁₀ CFU/cm ²) ^a					
	Suino		Bovino		Carne avicola	
	Acqua 5 s	EO 5 s	Acqua 5 s	EO 5 s	Acqua 5 s	EO 5 s
Carica mesofila totale ^a	8,87±0,84	8,39±1,13	9,15±0,79	8,64±1,2	9,15±0,71	8,79±0,91
<i>S. Typhimurium</i> ^b	3,34±0,61	2,95±0,43	3,27±0,69	2,67±0,28	1,10±1,9 ^c	N.D. ^c
<i>S. aureus</i> ^b	2,74±0,28	1,53±1,36 ^c	2,61±0,15	2,31±0,27	2,56±0,07	0,76±1,32 ^c
<i>L. monocytogenes</i> ^b	2,78±0,68	1,69±1,56 ^c	2,88±0,03	1,69±1,48 ^c	3,56±0,22	2,25±0,44
<i>E. coli</i> ^b	3,44±0,63	2,86±0,41	3,15±0,65	2,51±0,12	2,34±0,17	1,23±0,43

^a media di dodici prove ± deviazione standard^b media di tre prove ± deviazione standard^c nessuna cellula vitale evidenziata tramite la semina in piastra in uno o due testTabella 3A: Abbattimento della popolazione di carica mesofila totale e patogeni dopo spruzzazione per 5²

	Riduzione della popolazione batterica (log ₁₀ CFU/cm ²)		
	Suino	Bovino	Carne avicola
Carica mesofila totale ^a	0,47	0,64	0,93
<i>S. Typhimurium</i> ^b	0,38	0,60	1,10
<i>S. aureus</i> ^b	1,20	0,30	1,79
<i>L. monocytogenes</i> ^b	1,09	1,19	1,30
<i>E. coli</i> ^b	0,58	0,64	1,11

^a media di dodici prove ± deviazione standard^b media di tre prove ± deviazione standardTabella 4: Efficacia di EOW su una popolazione di CMT e patogeni dopo spruzzazione per 15²

	Popolazione batterica residua (log ₁₀ CFU/cm ²) ^b					
	Suino		Bovino		Carne avicola	
	Acqua 5 s	EOW 5 s	Acqua 5 s	EOW 5 s	Acqua 5 s	EOW 5 s
<i>S. Typhimurium</i>	5,96±0,11	5,32±0,40	6,34±0,01	6,10±0,05	4,86±0,03	4,43±0,24
<i>S. aureus</i>	6,71±0,01	5,67±1,10	6,77±0,00	6,55±0,08	6,70±0,01	5,67±0,11
<i>L. monocytogenes</i>	5,79±0,12	5,32±0,40	6,69±0,00	6,39±0,07	5,76±0,12	4,42±0,24
<i>E. coli</i>	5,44±0,73	4,86±0,31	6,72±0,02	6,51±0,07	4,52±0,17	3,93±0,41

^b media di tre prove ± deviazione standard

Tabella 4A: Abbattimento della popolazione di carica mesofila totale e patogeni dopo spruzzazione per 15²

	Riduzione della popolazione batterica (log ₁₀ CFU/cm ²)		
	Suino	Bovino	Carne avicola
<i>S. Typhimurium</i> ^b	0,64	0,24	0,43
<i>S. aureus</i> ^b	1,04	0,21	1,03
<i>L. monocytogenes</i> ^b	0,46	0,30	1,34
<i>E. coli</i> ^b	0,58	0,21	0,59

^b media di tre prove ± deviazione standard

Tabella 5: Efficacia di EOW su una popolazione di microrganismi patogeni immersione

	Popolazione batterica residua (log ₁₀ CFU/cm ²) ^b					
	1 minuto		2 minuti		10 minuti	
	Acqua 5 s	EO 5 s	Acqua 5 s	EO 5 s	Acqua 5 s	EO 5 s
<i>S. Typhimurium</i>	6,17±0,08	5,69±0,00	6,37±0,13	5,83±0,15	6,50±0,02	5,75±0,11
<i>S. aureus</i>	6,51±0,02	5,67±0,01	6,45±0,04	4,655±0,09	6,57±0,02	5,19±0,11
<i>L. monocytogenes</i>	6,85±0,01	5,77±0,13	6,63±0,17	6,93±0,07	6,61±0,08	5,87±0,10
<i>E. coli</i>	6,61±0,12	5,86±0,01	6,44±0,23	5,73±0,23	6,20±0,02	5,63±0,51

^b media di tre prove ± deviazione standard

Tabella 5A: Abbattimento della popolazione di microrganismi patogeni dopo immersione

	Riduzione della popolazione batterica (log ₁₀ CFU/cm ²)		
	1 minuto	2 minuti	5 minuti
<i>S. Typhimurium</i> ^b	0,47	0,54	0,75
<i>S. aureus</i> ^b	0,84	1,80	1,38
<i>L. monocytogenes</i> ^b	1,07	0,70	0,73
<i>E. coli</i> ^b	0,89	1,07	0,89

^b media di tre prove ± deviazione standard

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

I dati raccolti nei test effettuati sui microrganismi, patogeni e non, inoculati in matrici carnee confermano la spiccata attività battericida dell'acqua elettrolizzata.

I livelli di abbattimento rilevati sono sicuramente inferiori a quelli riportati sulle superfici e ciò può essere correlato sia alla presenza di materiale organico in abbondanza, che tende a rendere meno efficace l'azione battericida, sia alla anfrattuosità

delle matrici carnee che proteggono meccanicamente i microrganismi.

L'applicazione in sequenza di acqua elettrolizzata alcalina e acida sembra determinare un aumento dell'efficacia dell'azione battericida; tale aspetto, riportato in altri studi (14) per quanto riguarda la disinfezione di superfici, è da correlare all'azione saponificante della frazione alcalina che reagendo con grassi e proteine che possono fungere da protettivi per i batteri presenti, facilitano il contatto tra la frazione acida, che costituisce la componente attiva, e il batterio.

L'efficacia dell'EOW nell'inattivazione di microrganismi patogeni su matrici alimentari è stata testata in alcune matrici carnee da differenti autori (2, 3, 4, 5, 7). Fabrizio e Cutter (5) hanno dimostrato l'efficacia dell'EOW nell'inattivazione di *Campylobacter coli* ma non di *Salmonella Typhimurium* e *Listeria monocytogenes* a seguito di applicazione per spruzzazione per 15' di carne suina. Nel nostro studio non è stata testata l'efficacia su *Campylobacter coli*, ma l'efficacia sia su *Listeria monocytogenes* che, in maniera più contenuta, su *Salmonella Typhimurium* si è dimostrata significativa. In altri studi, effettuati per valutare l'efficacia dell'EOW nei macelli avicoli, Park *et al.* (3) hanno dimostrato che il lavaggio di carcasse di pollo con EOW determina una riduzione di 3 Log della carica di *Campylobacter jejuni*, mentre Hinton *et al.* (15) hanno dimostrato una riduzione della popolazione dei batteri alteranti e dei lieviti e Northcutt *et al.* (16) anche nei confronti dei batteri aerobici totali, di *E.coli* e *Salmonella spp.*

L'efficacia dell'EOW nel ridurre la carica batterica presente sulle carni è stata confrontata con quella dell'acqua clorata, dell'acqua ozonata, dell'acido acetico e del trisodio fosfato (2, 4, 5) dimostrando un'efficacia comparabile ad altri tipi di trattamento. L'EOW presenta rispetto all'acqua clorata, ai fini del contenimento delle cross-contaminazioni che possono avvenire a seguito di lavaggi sequenziali di numerose carcasse, il vantaggio che possedendo un pH estremamente basso determina una più efficace inattivazione dei microrganismi che, rimossi dalle carni si trovano in sospensione (4).

I test organolettici hanno evidenziato una percezione da parte dei panelisti del trattamento effettuato; va tuttavia considerato che le prove organolettiche sono state effettuate immediatamente dopo il trattamento e che la cottura immediata delle carni trattate, con conservazione in capsula di vetro simulano le condizioni più vantaggiose possibili ai fini del riconoscimento delle carni trattate; nonostante questo appena 15 e 13 panelisti su 24 hanno correttamente identificato il prodotto trattato.

Il trattamento delle carni con EOW, quindi, può essere considerato una valida alternativa al trattamento con altri prodotti per il contenimento delle cariche batteriche e l'eliminazione dei microrganismi patogeni.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Biss M.E., Hathaway S.C. (1998). A HACCP-based approach to hygienic slaughter and dressing of lamb carcasses. *N Z Vet J.*, 46(5), 167-172.
- 2) Bosilevac J.M., Shackelford S.D., Brichta D.M., Koohmaraie M. (2005). Efficacy of ozonated and electrolyzed oxidative waters to decontaminate hides of cattle before slaughter. *J. Food Prot.*, 68(7), 1393-1398.
- 3) Park H., Hung Y.C., Brakett R.E. (2002). Antimicrobial effect of electrolyzed oxidizing water for inactivating *Campylobacter jejuni* during poultry washing. *Int. J. Food Microbiol.*, 72,77-83.
- 4) Fabrizio K.A., Sharma R.R., Demirci A., Cutter C.N. (2002). Comparison of electrolyzed oxidizing water with various antimicrobial interventions to reduce *Salmonella* species on poultry. *Poultry Science*, 81, 1598-1605.
- 5) Fabrizio K.A., Cutter C.N. (2004). Comparison of electrolyzed oxidizing water with other antimicrobial interventions to reduce pathogens on fresh pork. *Meat Science*, 68, 463-468.
- 6) Sharma R.R., Demirci A. (2003). Treatment of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated alfalfa seeds and sprouts with electrolyzed oxidizing water. *Int. J. Food Microbiol.*, 86, 231-237.
- 7) Park H., Hung Y.C., Kim C. (2002). Effectiveness of electrolyzed oxidizing water for as a sanitizer for treating different surfaces. *J. Food Prot.*, 65(8), 1276-1280.
- 8) Liu C., Duan J., Su Y.C. (2005). Effect of electrolyzed oxidizing water on reducing *Listeria monocytogenes* contamination on seafood processing surfaces. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 231-237.
- 9) Serraino A., Veronese G., Matera R., Lugoboni B., Pallotti A., Alonso S., Rosmini R. (2006). Efficacia dell'acqua ossidante elettrolizzata per la disinfezione di superfici destinate a venire a contatto con alimenti. Atti del XVI Convegno Nazionale Associazione Italiana Veterinari Igienisti, 278-283.
- 10) Izumi H. (1999). Electrolyzed water as disinfectant for fresh cut vegetables. *J. Food Sci.*, 64(3), 536-539.
- 11) Casadiego P., Cuartas R., Mercado M., Diaz M., Carrascal A.K. (2005). Effectiveness of electrolyzed oxidizing water for inactivating *Listeria monocytogenes* in lettuce. *Revista de la Facultad de Ciencias Pontificia Universidad Javeriana*, Vol 10(1), 97-108.
- 12) Park C.M., Hung Y.C., Lin C.S., Brackett R. (2005). Efficacy of electrolyzed oxidizing water in inactivating *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on shell eggs. *J. Food Prot.*, 68(5), 986-990.
- 13) Ayebah B., Hung Y.C., Frank J.F. (2005). Enhancing the bactericidal effect of electrolyzed oxidizing water on *Listeria monocytogenes* biofilms formed on stainless steel. *J. Food Prot.*, 68(7), 1375-1380.
- 14) Northcutt J., Smith D., Ingram K.D., Hinton A.Jr., Musgrove M. (2007). Recovery of bacteria from broiler carcasses after spray washing with acidified electrolyzed water or sodium hypochlorite solutions. *Poult. Sci.*, 86(10), 2239-44.
- 15) Hinton A.Jr., Northcutt J.K., Smith D.P., Musgrove M.T., Ingram K.D. (2007). Spoilage microflora of broiler carcasses washed with electrolyzed oxidizing or chlorinated water using an inside-outside bird washer. *Poult. Sci.* 86(1),123-7.