

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie

Corso di Laurea Magistrale in

Sicurezza e Qualità delle Produzioni Animali

Tesi di Laurea in

Sicurezza Degli Alimenti Di Origine Animale

**EFFETTI DELL'ACQUA ALCALINA
ELETTROLIZZATA SULLA CARICA BATTERICA DI
SUPERFICI A CONTATTO CON GLI ALIMENTI**

Candidato

Walter Lodato

Relatore

Prof. Marco Tassinari

Correlatore

Prof. Andrea Serraino

Anno accademico 2020/2021

INDICE

ABSTRACT	3
INTRODUZIONE	4
Capitolo 1	9
<i>1.1 LA SANIFICAZIONE NELL'INDUSTRIA ALIMENTARE E NEGLI ALIMENTI</i>	10
<i>1.2 PRODOTTI/MOLECOLE PER LA DISINFEZIONE</i>	12
<i>1.2.1 DETERGENTI</i>	13
<i>1.2.2 DISINFETTANTI CHIMICI</i>	14
<i>1.2.3 RESIDUI E DEPURAZIONE</i>	16
<i>1.3 ALTERNATIVE AI DISINFETTANTI TRADIZIONALI</i>	17
<i>1.3.1 ACQUA ELETTROLIZZATA</i>	17
<i>1.3.1.1 VANTAGGI E SVANTAGGI DELL'ACQUA ELETTROLIZZATA ACIDA (AEW)</i>	20
<i>1.3.1.2 ACQUA ELETTROLIZZATA ALCALINA (BEW)</i>	21
Capitolo 2	25
<i>2.1 OBIETTIVI DELLA RICERCA</i>	25
<i>2.2 AQUASOL</i>	26
<i>2.2.1 CARATTERISTICHE E PROPRIETÀ DI AQUASOL</i>	27
<i>2.2.2 SETTORI DI APPLICAZIONE</i>	28
<i>2.3 MATERIALI E METODI</i>	29
<i>2.4 RISULTATI</i>	32
<i>2.5 DISCUSSIONE</i>	34
<i>2.6 CONCLUSIONI</i>	36
BIBLIOGRAFIA	39

ABSTRACT

L'acqua alcalina elettrolizzata (BEW) è nota per la sua azione detergente. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di testare l'effetto antibatterico di BEW (o REW). Per far ciò si è valutata l'efficacia di BEW nel ridurre la carica microbica su delle superfici destinate al contatto con gli alimenti. Per il test sono state utilizzate delle piastre in acciaio inossidabile, le quali sono state contaminate sperimentalmente, e l'inattivazione batterica è stata testata prima e dopo il trattamento con REW. Il trattamento con REW è stato operato spruzzando l'acqua alcalina sulle piastre contaminate, attendendo fino all'essiccazione per poter poi tamponare le superfici. In particolare, si è valutata l'efficacia di BEW nel ridurre la carica batterica delle piastre contaminate da *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus* ed *Escherichia coli*. Il trattamento ha rivelato diversi gradi di attività igienizzante di REW sulle diverse specie batteriche, con maggiore efficacia su *E. coli* e *Salmonella spp.* (Gram -) rispetto a *S. aureus* e *Listeria spp.* (Gram +). L'analisi statistica ha rivelato una significativa riduzione della carica microbica ($p < 0.01$) dopo il trattamento con REW, suggerendo che ha una buona attività disinfettante, in particolar modo contro i batteri Gram -. Oltre all'effetto antibatterico bisogna però considerare anche il fatto che BEW sia costituito quasi totalmente da acqua pura, il che lo rende scaricabile in falda una volta utilizzato, senza richiedere nessuna autorizzazione speciale, non andando ad aver alcun tipo di impatto sulle falde e sull'ambiente, oltre a non rappresentare un pericolo per il personale che lo utilizza. Considerando quindi il già testato effetto detergente e sgrassante e i risultati di questo studio, insieme al suo utilizzo facile e sicuro e all'aspetto ecologico, BEW può essere considerata una valida alternativa a molti altri disinfettanti più diffusi a base chimica.

INTRODUZIONE

Uno degli aspetti principali, se non il più importante, nel settore alimentare è sicuramente quello riguardante l'igiene dei prodotti, del personale ma anche delle attrezzature e dei locali.

Attualmente si stima che i patogeni di origine alimentare siano responsabili di un terzo delle malattie umane nel mondo sviluppato. In Europa, nel 2019, 27 Stati membri hanno segnalato 5.175 focolai di origine alimentare che hanno coinvolto 49.463 casi di malattie, 3.859 ricoveri e 60 decessi: il 45,7% sono stati causati da batteri e tossine batteriche e principalmente legati al consumo di alimenti di origine animale. (EFSA e ECDC, 2021).

Al fine di prevenire il rischio alimentare è importante che le strutture destinate agli alimenti mantengano elevati standard di pulizia e disinfezione, per evitare o ridurre al minimo le probabilità di contaminazione, di contatto con materiali tossici e la formazione di condensa e muffa. (QSM, 2019)

Secondo uno studio stilato dal Servizio Igiene degli Alimenti e della Nutrizione (SIAN), il 76% delle irregolarità contestate alle aziende alimentari nel 2014 riguardavano l'igiene e la sanificazione delle aree di produzione. Dallo stesso report, risulta che solo il 50% di queste aziende aveva eseguito controlli sulla pulizia degli stabilimenti (SIAN, 2015).

La corretta sanificazione dei luoghi deputati alla produzione, alla trasformazione, al trasporto e alla vendita di alimenti è assolutamente fondamentale per garantire la sicurezza alimentare, tant'è che la legislazione europea prevede obblighi molto stringenti al riguardo - il cosiddetto "pacchetto igiene" - e in particolare l'analisi dei rischi e dei punti critici di controllo, tramite il protocollo HACCP, ovvero Hazard Analysis and Critical Control Points (Intra-group, 2020).

Secondo quanto riportato dal Reg. UE 2073/2005 del 15 novembre 2005 (sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari) "i rischi microbiologici dei prodotti alimentari costituiscono una delle principali fonti di malattie umane causate dagli alimenti. I prodotti alimentari non devono contenere microrganismi, né loro tossine o metaboliti, in quantità tali da rappresentare un rischio inaccettabile per la salute umana".

Nello specifico, per quanto riguarda gli alimenti di origine animale bisogna fare particolare attenzione ad alcune specie batteriche patogene, ovvero quelle in grado di causare malattia nell'uomo, quali: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes* e *Campylobacter jejuni* (Fabrizio e Cutter, 2003; Kim *et al.*, 2000a; Kim *et al.*, 2000b; Park *et al.*, 2002a; Park *et al.*, 2002b; Park *et al.*, 2004; Stevenson *et al.*, 2004; Venkitanarayanan *et al.*, 1999a).

L'azione nociva dei microrganismi può essere causata o dall'ingestione del microrganismo insieme all'alimento (in questo caso si avrà una tossinfezione alimentare), oppure dalle tossine da essi prodotte (si avrà allora una intossicazione alimentare); le tossinfezioni alimentari più frequenti nel nostro Paese sono le tossinfezioni da *Salmonelle*, da *Clostridium perfringens*, da *Bacillus cereus*; mentre le intossicazioni alimentari più frequenti sono: il botulismo e le intossicazioni da *Staphylococcus aureus* (Ministero della Salute).

In tal senso, il Reg. UE 2073/2005 sancisce dei criteri microbiologici, intendendo per criterio microbiologico “un criterio che definisce l'accettabilità di un prodotto, di una partita di prodotti alimentari o di un processo, in base all'assenza, alla presenza o al numero di microrganismi e/o in base alla quantità delle relative tossine/metaboliti, per unità di massa, volume, area o partita”.

Questi criteri permettono quindi di valutare l'accettabilità di un prodotto alimentare e dei relativi processi di lavorazione, manipolazione e distribuzione, distinguendo:

- **criteri di sicurezza alimentare**, ovvero “un criterio che definisce l'accettabilità di un prodotto o di una partita di prodotti alimentari, applicabile ai prodotti immessi sul mercato”. Individuando, quindi, una soglia di contaminazione oltre la quale il prodotto non può più essere definito sicuro per la salute del consumatore.
- **criteri di igiene del processo**, ovvero “un criterio che definisce il funzionamento accettabile del processo di produzione”. Questo criterio, che non si applica ai prodotti immessi sul mercato, fissa un valore indicativo di contaminazione al di sopra del quale sono necessarie misure correttive volte a mantenere l'igiene del

processo di produzione in ottemperanza alla legislazione in materia di prodotti alimentari.

Nelle Tabella 1 sono riportati i criteri di Sicurezza alimentare e nella Tabella 2 i criteri di igiene del processo, con le fasi a cui si applica il criterio ed i piani di campionamento previsti dal Reg. 2073/2005.

Tabella 1: Criteri di Sicurezza alimentare (da Reg. 2073/2005, Allegato 1 - Criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari)

Tabella 1. Criteri di sicurezza alimentare

Categoria alimentare	Microorganismi/loro tossine, metaboliti	Piano di campionamento (1)		Limiti (2)		Metodo d'analisi di riferimento (3)	Fase a cui si applica il criterio
		n	c	m	M		
1.1. Alimenti pronti per lattanti e alimenti pronti a fini medici speciali (4)	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	Assente in 25 g		EN/ISO 11290-1	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.2. Alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>Listeria monocytogenes</i> diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g (5)		EN/ISO 11290-2 (6)	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
		5	0	Assente in 25 g (7)		EN/ISO 11290-1.	Prima che gli alimenti non siano più sotto il controllo diretto dell'operatore del settore alimentare che li produce
1.3. Alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>Listeria monocytogenes</i> , diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali (4) (8)	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g		EN/ISO 11290-2 (6)	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.4. Carne macinata e preparati a base di carne destinati ad essere consumati crudi	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.5. Carne macinata e preparazioni a base di carne di pollame destinate ad essere consumate cotte	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.6. Carne macinata e preparazioni a base di carne di animali diversi dal pollame destinate ad essere consumate cotte	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 10 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.7. Carni separate meccanicamente (CSM) (9)	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 10 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità

Categoria alimentare	Microorganismi/loro tossine, metaboliti	Piano di campionamento (1)		Limiti (2)		Metodo d'analisi di riferimento (3)	Fase a cui si applica il criterio
		n	c	m	M		
1.9 Prodotti a base di carne di pollame destinati ad essere consumati cotti	<i>Salmonella</i>	5	0	Dall'1.1.2006 Assente in 10 g Dall'1.1.2010 Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.10 Gelatina e collagene	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.11 Formaggi, burro e panna ottenuti da latte crudo o da latte sottoposto a trattamento termico a temperatura più bassa della pastorizzazione (19)	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.12 Latte in polvere e siero di latte in polvere (20)	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.13 Gelati (21), esclusi i prodotti per i quali il procedimento di lavorazione o la composizione del prodotto eliminano il rischio di salmonella	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.14 Prodotti a base di uova, esclusi i prodotti per i quali il procedimento di lavorazione o la composizione del prodotto eliminano il rischio di salmonella	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.15 Alimenti pronti contenenti uova crude, esclusi i prodotti per i quali il procedimento di lavorazione o la composizione del prodotto eliminano il rischio di salmonella	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 25 g o ml		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.16 Crostacei e molluschi cotti	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.17 Molluschi bivalvi vivi ed echinodermi, tunicati e gasteropodi vivi	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità

Categoria alimentare	Microorganismi/loro tossine, metaboliti	Piano di campionamento (1)		Limiti (2)		Metodo d'analisi di riferimento (3)	Fase a cui si applica il criterio
		n	c	m	M		
1.18 Semi germogliati (pronti al consumo) (22)	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.19 Frutta e ortaggi pretagliati (pronti al consumo)	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.20 Succhi di frutta e di ortaggi non pastorizzati (pronti al consumo)	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.21 Formaggi, latte in polvere e siero di latte in polvere, come indicati nei criteri relativi agli stafilococchi coagulasi-positivi nel capitolo 2, punto 2, del presente allegato	Enterotossine stafilococche	5	0	Non rilevabili in 25g		Metodo europeo di screening del LCR per il latte (23)	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.22 Alimenti in polvere per lattanti e alimenti dietetici in polvere a fini medici speciali destinati ai bambini di età inferiore ai 6 mesi, come indicati nel criterio relativo alle enterobatteriacee nel capitolo 2, punto 2, del presente allegato	<i>Salmonella</i>	30	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.23 Alimenti in polvere per lattanti e alimenti dietetici in polvere a fini medici speciali destinati ai bambini di età inferiore ai 6 mesi, come indicati nel criterio relativo alle enterobatteriacee nel capitolo 2, punto 2, del presente allegato	<i>Enterobacter sakazakii</i>	30	0	Assente in 10 g		ISO/DTS 22964	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.24 Molluschi bivalvi vivi ed echinodermi, tunicati e gasteropodi vivi	<i>E. coli</i> (24)	1 (25)	0	230 MPN/100 g di carne e liquido intravalvare.		ISO TS 16649-3	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.25 Prodotti della pesca ottenuti da specie ittiche associate con un tenore elevato di istidina (26)	Istamina	9 (27)	2	100 mg/kg	200 mg/kg	HPLC (28)	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità

Tabella 2: Criteri di igiene del processo (da Reg. 2073/2005, Allegato 1 - Criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari)

Tabella 2. Criteri di igiene del processo

2.1. Carne e prodotti a base di carne

Categoria alimentare	Microorganismi	Piano di campionamento (°)		Limiti (°)		Metodo d'analisi di riferimento (°)	Fase a cui si applica il criterio	Azione in caso di risultati insoddisfacenti
		n	c	m	M			
2.1.1 Carcasse di bovini, ovini, caprini ed equini (°)	Conteggio delle colonie aerobiche			3,5 log ufc/cm ² log medio giornaliero	5,0 log ufc/cm ² log medio giornaliero	ISO 4833	Carcasse dopo la macellazione, ma prima del raffreddamento	Miglioramento delle condizioni igieniche nella procedura di macellazione e revisione dei controlli del processo
	Enterobatteriacee			1,5 log ufc/cm ² log medio giornaliero	2,5 log ufc/cm ² log medio giornaliero	ISO 21528-2	Carcasse dopo la macellazione, ma prima del raffreddamento	Miglioramento delle condizioni igieniche della macellazione e revisione dei controlli del processo
2.1.2 Carcasse di suini (°)	Conteggio delle colonie aerobiche			4,0 log ufc/cm ² log medio giornaliero	5,0 log ufc/cm ² log medio giornaliero	ISO 4833	Carcasse dopo la macellazione, ma prima del raffreddamento	Miglioramento delle condizioni igieniche della macellazione e revisione dei controlli del processo
	Enterobatteriacee			2,0 log ufc/cm ² log medio giornaliero	3,0 log ufc/cm ² log medio giornaliero	ISO 21528-2	Carcasse dopo la macellazione, ma prima del raffreddamento	Miglioramento delle condizioni igieniche della macellazione e revisione dei controlli del processo
2.1.3 Carcasse di bovini, ovini, caprini e equini	<i>Salmonella</i>	50 (°)	2 (°)	Assente nell'area esaminata per carcassa		EN/ISO 6579	Carcasse dopo la macellazione, ma prima del raffreddamento	Miglioramento delle condizioni igieniche della macellazione, revisione dei controlli del processo e dell'origine degli animali
2.1.4 Carcasse di suini	<i>Salmonella</i>	50 (°)	5 (°)	Assente nell'area esaminata per carcassa		EN/ISO 6579	Carcasse dopo la macellazione, ma prima del raffreddamento	Miglioramento delle condizioni igieniche della macellazione e revisione dei controlli del processo, dell'origine degli animali e delle misure di biosicurezza nelle aziende di origine
2.1.5 Carcasse di pollame (broilers e tacchini)	<i>Salmonella</i>	50 (°)	7 (°)	Assente in 25 g di un campione aggregato di pelle del collo		EN/ISO 6579	Carcasse dopo il raffreddamento	Miglioramento delle condizioni igieniche della macellazione e revisione dei controlli del processo, dell'origine degli animali e delle misure di biosicurezza nelle aziende di origine

Categoria alimentare	Microorganismi	Piano di campionamento (°)		Limiti (°)		Metodo d'analisi di riferimento (°)	Fase a cui si applica il criterio	Azione in caso di risultati insoddisfacenti
		n	c	m	M			
2.1.6 Carne macinata	Conteggio delle colonie aerobiche (°)	5	2	5x10 ⁵ ufc/g	5x10 ⁶ ufc/g	ISO 4833	Fine del processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione e miglioramento della scelta e/o dell'origine delle materie prime
	<i>E. coli</i> (°)	5	2	50 ufc/g	500 ufc/g	ISO 16649-1 o 2	Fine del processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione e miglioramento della scelta e/o dell'origine delle materie prime
2.1.7 Carni separate meccanicamente (CSM) (°)	Conteggio delle colonie aerobiche	5	2	5x10 ⁵ ufc/g	5x10 ⁶ ufc/g	ISO 4833	Fine del processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione e miglioramento della scelta e/o dell'origine delle materie prime
	<i>E. coli</i> (°)	5	2	50 ufc/g	500 ufc/g	ISO 16649-1 o 2	Fine del processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione e miglioramento della scelta e/o dell'origine delle materie prime
2.1.8 Preparazioni a base di carne	<i>E. coli</i> (°)	5	2	500 ufc/g o cm ²	5 000 ufc/g o cm ²	ISO 16649-1 o 2	Fine del processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione e miglioramento della scelta e/o dell'origine delle materie prime

Capitolo 1

1. PULIZIA E DISINFEZIONE NEL SETTORE AGRO ALIMENTARE

Abbiamo appena visto come sia importante rispettare le norme igieniche per poter soddisfare i limiti stabiliti dal Reg. 2073 in merito ai criteri di sicurezza ed ai criteri di igiene del processo.

La disinfezione delle superfici di lavorazione degli alimenti è una procedura chiave per ridurre e, persino, eliminare la contaminazione batterica che potrebbe causare modifiche alle caratteristiche sensoriali degli alimenti o essere responsabile di epidemie di malattie di origine alimentare (Park *et al.*, 2002b). Nell'industria alimentare, i prodotti sono spesso contaminati biologicamente attraverso il contatto con le superfici di attrezzature, trituratorie, affettatrici e taglieri (Fukuzaki *et al.*, 2004; Serraino *et al.*, 2010). La contaminazione crociata tramite superfici inanimate è, infatti, un fattore importante nelle infezioni di origine alimentare (Deza *et al.*, 2005). È stato dimostrato che le apparecchiature negli impianti di lavorazione degli alimenti, così come gli indumenti protettivi ed i guanti indossati durante le attività lavorative, sono vettori di agenti patogeni di origine alimentare (Liu e Su, 2006). Inoltre, le superfici delle aree pubbliche (toilette, laboratori, strumenti ospedalieri) trasportano alti livelli di batteri e agenti patogeni (Park *et al.*, 2002).

Le procedure atte a ridurre o addirittura eliminare i patogeni dalle superfici sono tra i punti chiave di un efficace programma HACCP nell'industria alimentare e nel controllo della contaminazione degli alimenti nelle case, nei mercati alimentari, nei ristoranti, nelle strutture sanitarie e nelle aree pubbliche (Venkitanarayanan *et al.*, 1999a).

A tal proposito, secondo quanto sancito dal Capitolo II dell'Allegato II del Reg 852/2004, i locali dove gli alimenti sono preparati, lavorati o trasformati devono essere progettati e disposti in modo da consentire una corretta prassi igienica impedendo anche la contaminazione tra e durante le operazioni.

In particolare:

a) i pavimenti devono essere mantenuti in buone condizioni, essere facili da pulire e, se necessario, da disinfettare; ciò richiede l'impiego di materiale resistente, non assorbente, lavabile e non tossico;

b) le pareti devono essere mantenute in buone condizioni ed essere facili da pulire e, se necessario, da disinfettare; ciò richiede l'impiego di materiale resistente, non assorbente, lavabile e non tossico e una superficie liscia fino ad un'altezza adeguata alle operazioni;

c) le superfici (comprese quelle delle attrezzature) nelle zone di manipolazione degli alimenti e, in particolare, quelli a contatto con questi ultimi devono essere mantenute in buone condizioni ed essere facili da pulire e, se necessario, da disinfettare; a tal fine si richiedono materiali lisci, lavabili, resistenti alla corrosione e non tossici.

Tutto il materiale, l'apparecchiatura e le attrezzature che vengono a contatto con gli alimenti devono essere efficacemente puliti e, se necessario, disinfettati. La pulizia e la disinfezione devono avere luogo con una frequenza sufficiente ad evitare ogni rischio di contaminazione.

1.1 LA SANIFICAZIONE NELL'INDUSTRIA ALIMENTARE E NEGLI ALIMENTI

Una superficie può essere considerata pulita quando è priva di tracce di contaminanti, non è untuosa al tatto, è inodore, non annerisce un fazzoletto di carta bianco strisciato e quando l'acqua versata cola uniformemente senza separarsi in goccioline.

La sanificazione prevede tutti quei trattamenti di natura fisica e chimica effettuati affinché una superficie risulti pulita dal punto di vista: fisico, cioè priva di sporco visibile; chimico, ovvero priva di residui di sostanze utilizzate nel trattamento; biologico, cioè che il numero e il tipo di microrganismi inizialmente presenti siano stati ridotti a un livello accettabile.

Le operazioni di sanificazione, se condotte in modo appropriato, consentono di eliminare una parte notevole di microrganismi le cui cellule e spore trovano, anche grazie ai residui di lavorazione, condizioni favorevoli alla loro sopravvivenza ed alla loro proliferazione.

La colonizzazione delle superfici di lavoro da parte dei batteri avviene in quattro stadi:

1. condizionamento della superficie: quando un materiale solido è posto in un liquido, le molecole organiche, inorganiche e i batteri in esso presenti si concentrano sulla superficie, formando un “film di condizionamento”; ciò comporta, a livello dell’interfaccia solido-liquido, un accumulo di tali molecole ed una più elevata concentrazione di nutrienti rispetto alla fase fluida;
2. adsorbimento al substrato: fase reversibile, caratterizzata da interazioni deboli, a lungo raggio, tra le cellule batteriche e il substrato (forze di Van der Waals, forze elettrostatiche, donatori-accettori di elettroni); durante questa fase i batteri possono essere facilmente rimossi dal risciacquo;
3. adesione delle cellule batteriche: fase irreversibile in cui le forze elettrostatiche tendono, per lo più, ad ostacolare il contatto diretto tra cellula batterica e superficie, entrambe cariche negativamente; tuttavia, esso si verifica ugualmente grazie alla presenza di appendici superficiali della cellula quali flagelli, fimbrie, pili e fibrille di esopolisaccaridi. In questa fase sono coinvolte forze a corto raggio, quali: interazioni dipolo-dipolo, forze idrofobiche e legami idrogeno, ionici e covalenti. La rimozione delle cellule richiede interventi più energici come lo spazzolamento e il raschiamento. I batteri adesi irreversibilmente crescono e si moltiplicano utilizzando i nutrienti presenti, ciò consente la formazione di microcolonie. In questo stadio sono prodotti ulteriori quantitativi di esopolimeri che facilitano l’ancoraggio delle cellule al substrato;
4. colonizzazione: le microcolonie si espandono e si fondono tra loro formando uno strato di cellule che ricopre tutta la superficie. Se le superfici sono pulite e disinfettate regolarmente, il biofilm è inframmezzato da canali molto permeabili all’acqua; viceversa, un insufficiente trattamento determina una confluenza delle colonie fino a formare una vera e propria pellicola.

La formazione del biofilm è un processo lento, anche se può raggiungere lo spessore di qualche millimetro in pochi giorni: determinanti sono la scabrosità della superficie, la presenza di residui proteici e la tipologia di microrganismi coinvolti.

La sopravvivenza delle cellule microbiche, che restano adese alle superfici dopo la detersione, e la possibilità che tali cellule proliferino e colonizzino l’impianto produttivo

rendono indispensabile un trattamento complementare alla deterzione, per ridurre i microrganismi a livelli infinitesimali: la disinfezione.

Pertanto, la sanificazione consta di due fasi in successione:

- Deterzione → allontanamento dello sporco, per sottrarre ai microrganismi il loro terreno di sviluppo; per rimuovere lo sporco occorre fornire energia al sistema e tale energia può essere di tipo fisico (meccanico), chimico o termico (calore).
- Disinfezione → impiego di agenti fisici o di molecole in grado di uccidere i microrganismi.

Lo scopo della sanificazione deve essere quindi quello di distruggere tutti i batteri patogeni eventualmente presenti e ridurre al minimo la contaminazione batterica generica (Cardini *et al.*, 2017).

Le superfici contaminate possono fungere da serbatoi di agenti patogeni e trasferire malattie tramite il contatto mano-superficie. Le infezioni acquisite in ospedale si sono verificate frequentemente anche attraverso la trasmissione di agenti patogeni come *Staphylococcus aureus* ed *Enterobacter aerogenes* da superfici scarsamente igienizzate (Davin-Regli *et al.*, 1996; Emori e Gaynes, 1993). Pertanto, lo sviluppo di un igienizzante efficace è necessario per ridurre o eliminare le popolazioni batteriche su diverse superfici (Park *et al.*, 2002b).

1.2 PRODOTTI/MOLECOLE PER LA DISINFEZIONE

Per le operazioni di deterzione e disinfezione si utilizzano diverse molecole, di diversa natura e con diversi principi attivi.

Nello specifico per le operazioni di deterzione si utilizzano i detersivi, generalmente chimici, ovvero sostanze in grado di ridurre l'energia meccanica richiesta dal processo di deterzione; mentre per quelle di disinfezione vengono utilizzati i disinfettanti, ovvero sostanze capaci di distruggere i microrganismi nocivi (Cardini *et al.*, 2017).

1.2.1 DETERGENTI

Generalmente un detergente è formato da tensioattivi (10-15 %) e prodotti complementari.

Per tensioattivi si intendono quelle sostanze in grado di aumentare il potere bagnante dell'acqua (cioè la capacità di penetrazione del detergente nei punti altrimenti difficilmente accessibili e all'interno delle particelle di sudiciume) in modo da rimuovere le particelle dalla superficie e portarle in sospensione.

Essi sono composti da una parte idrofoba (che si lega allo sporco organico ma non all'acqua) e da una parte idrofila (che si lega all'acqua ma non allo sporco organico) facendo così passare le micelle nel solvente (solubilizzazione).

I detergenti possono essere distinti in base alla reattività chimica in:

- Detergenti acidi:
 - composti da → acido cloridrico, acido fosforico, acidi organici;
 - impiego → rimozione delle incrostazioni inorganiche dalle superfici. Sono prodotti aggressivi e come tali usati con attenzione (mai su marmo, granito, pietre naturali, zinco, stagno). Da preferire sono sempre i prodotti contenenti acido fosforico e citrico con i quali si possono pulire i sanitari e le apparecchiature in acciaio inox.
- Detergenti neutri o debolmente alcalini:
 - agiscono sullo sporco pigmentato, agglomerato e grasso leggero.
- Detergenti alcalini:
 - composti da → tensioattivi (anionici/non ionici), sequestranti/chelanti, alcali (prodotti sgrassanti), ossidanti (prodotti disinfettanti), solventi (prodotti senza risciacquo);
 - impiego → rimozione dello sporco organico, sono i detergenti più usati.
- Detergenti caustici:
 - composti da → idrossido di sodio;
 - impiego → disgregazione di sporco particolarmente ostinato.

(Cardini *et al.*, 2017).

1.2.2 DISINFETTANTI CHIMICI

- Acidi forti → quali acido solforico, nitrico, fosforico, cloridrico. Hanno un'attività microbica totale, risultano tossici, caustici e corrosivi ad altissimo grado. Vengono comunque utilizzati esclusivamente nel settore della mungitura meccanica.
- Acidi organici → quali l'acido citrico e il lattico. Hanno una discreta attività antibatterica; non sono tossici, caustici o corrosivi, ma hanno un costo elevato. L'acido citrico in particolare veniva utilizzato negli impianti di mungitura per rimuovere le concrezioni che si venivano a formare nei giunti e nei gomiti.
- Acido peracetico → molto efficace nei confronti di tutti i patogeni, indicato soprattutto per inattivare le spore carbonchiose. Non risulta tossico ma irritante e corrosivo. Utilizzato per trattare le stalle ed i liquami.
- Cloroderivati → I disinfettanti a base di cloro sono i più impiegati nell'industria alimentare e si dividono in inorganici (più usati) ed organici (più stabili) a seconda che provengano da sali a base di cloro o da molecole più complesse.
- Quaternari d'ammonio → Si tratta di tensioattivi (surfactants) cationici. Le caratteristiche chimico-strutturali dei composti dell'ammonio quaternario ne definiscono l'impiego e dipendono dal tipo e dal numero di radicali alchilici e arilici presenti nella molecola. I più impiegati a livello industriale sono il benzalconio cloruro ed il cloruro di dimetildidecilammonio; fanno parte di questo gruppo anche il benzoxonio e la cetrimide.
- Sali di Calcio → quali ossido e idrossido di calcio. Il primo ha una scarsa attività disinfettante; il secondo ha una maggiore attività battericida e virucida, ma dopo la preparazione deve essere immediatamente utilizzato, per evitare che si inattivi.
- Carbonato di sodio → presenta un notevole potere disinfettante nei confronti dei virus ma una scarsa attività battericida. Presenta anche una buona attività detergente.
- Idrossido di sodio → presenta un ottimo effetto virucida, un buon effetto battericida ed un discreto effetto sporicida, inattivo invece su micobatteri e miceti. Dopo l'utilizzo rilascia una pellicola che mantiene nel tempo l'effetto

disinfettante ma risulta caustica e scivolosa, richiedendo profonde operazioni di risciacquo.

- Ipoclorito di sodio → attivo su batteri e miceti. Risulta tossico, irritante e corrosivo.
- Sali di metalli pesanti → quali i sali di mercurio, rame, argento, zinco, ecc... La loro attività antimicrobica è legata alla capacità di denaturare e coagulare le proteine.
- Iodofori → attivi su batteri e virus. Non risultano tossici o corrosivi. Non agiscono in ambienti sporchi.
- Clorammine → le principali sono la clorammina T e la diclorammina T.
- Clorexidina → attiva nei confronti di batteri, lieviti e muffe, ma non nei confronti di virus e spore. Non risulta tossica, irritante o corrosiva. Ottima alternativa ai quaternari d'ammonio.
- Creolina → ha una buona attività battericida e micobattericida ma una scarsa attività virucida. Ad alte concentrazioni risultano tossiche, irritanti e corrosive.
- Fenolo → acido fenico, risulta attivo sui gram+, ma non su gram-, spore, virus e miceti.
- Aldeidi → quali formaldeide, paraformaldeide, glutaraldeide:
 - La formaldeide è attiva su batteri, miceti e alcuni virus. Utilizzabile in soluzione acquosa o per fumigazione. Risulta tossica ed irritante ma non corrosiva. È parzialmente inattivata dalla materia organica. Da recenti studi si è però evidenziato un suo effetto cancerogeno, motivo per il quale il suo impiego si sta via via abbandonando.
 - La paraformaldeide viene ottenuta per concentrazione della formaldeide. Presenta le stesse caratteristiche della formaldeide gassosa.
 - La glutaraldeide è attiva su tutti i patogeni, compresi virus e spore.

I disinfettanti chimici mostrano però dei limiti importanti sia dal punto di vista agro-alimentare che dal punto di vista ambientale: questi, infatti, rilasciano residui negli impianti di lavorazione, andando ad influenzare la crescita della flora microbica desiderata (come, ad esempio, nei processi di caseificazione) e richiedono, inoltre, particolari attenzioni durante le fasi di smaltimento (Cardini *et al.*, 2017).

1.2.3 RESIDUI E DEPURAZIONE

Nel caso dei residui occorre anche considerare il differente grado di persistenza delle sostanze attive: massimo per i quaternari, medio negli iodofori e virtualmente assente nel caso dell'acqua ossigenata. Per i quaternari basta un modesto residuo di principio attivo per causare modificazioni indesiderate (Cardini *et al.*, 2017).

Tuttavia, alcuni disinfettanti si caratterizzano per un elevato margine di sicurezza: la concentrazione di cloroattivi e di iodofori in grado di inibire i fermenti lattici e di causare problemi organolettici è significativamente diversa dalla concentrazione di impiego del disinfettante, a significare che potranno comparire effetti indesiderati solo se la superficie non è stata assolutamente risciacquata. I problemi tossicologici posti dai residui dei disinfettanti sono quasi trascurabili ad eccezione di quelli legati all'eccessivo passaggio di iodio dalle superfici agli alimenti (Cardini *et al.*, 2017).

Per quanto riguarda lo smaltimento si dovrà fare attenzione a non inibire l'attività del depuratore biologico: in tal senso bisognerà attenzionare il dosaggio dei donatori di cloro e degli iodofori.

I detergenti determinano seri inconvenienti agli impianti di depurazione, quali: riduzione della sedimentazione primaria per l'azione disperdente esplicata, riduzione dell'ossidazione biologica per l'inibizione della nitrificazione, riduzione dell'attività dei fanghi attivi per la distruzione dei protozoi ed aumento della schiuma; per questi motivi è opportuno, nell'uso di notevoli quantità di tali prodotti, evitarne l'immissione in impianti di depurazione, specie se di tipo aerobio (Cardini *et al.*, 2017).

Bisogna anche considerare che molti detergenti disinfettanti commerciali, come persolfato di potassio, isopropanolo, perossido di idrogeno, dicloroisocianurato di sodio, etanolo e derivati del fenolo, composto di ammonio quaternario e cloro, si sono dimostrati meno efficaci contro i patogeni di origine alimentare attaccati alle superfici, rispetto ai loro omologhi a vita libera, in quanto i disinfettanti hanno una capacità limitata di penetrare nello strato protettivo dei polimeri microbici (Frank e Koffi, 1990; Lee e Frank, 1991; Park *et al.*, 2002b).

1.3 ALTERNATIVE AI DISINFETTANTI TRADIZIONALI

Nell'ultimo decennio, visti i vari limiti legati ai disinfettanti e detergenti tradizionali, si è cercato di trovare soluzioni alternative per evitare di utilizzare prodotti chimici con il rischio di residui nelle derrate alimentari, oltre ai limiti legati al loro smaltimento. In quest'ottica sta sempre di più aumentando l'interesse verso l'impiego di acqua elettrolizzata, ovvero una normalissima acqua trattata in modo da modificarne il pH e, di conseguenza, conferirne un effetto detergente ed antibatterico.

1.3.1 ACQUA ELETTROLIZZATA

L'acqua ossidante elettrolizzata (Electrolyzed Oxidising Water, EOW, EO) è stata ampiamente utilizzata in Giappone e Russia in una varietà di applicazioni antimicrobiche odontoiatriche e mediche (Horiba *et al.*, 1999; Middleton *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2000; Vorobjeva *et al.*, 2004). La produzione di acqua EO comporta l'elettrolisi di una soluzione salina diluita in una camera in cui gli elettrodi dell'anodo e del catodo sono separati da una membrana bipolare carica. Applicando una corrente agli elettrodi si producono due tipi caratteristici di acqua: il catodo produce acqua EO basica (Basic Electrolyzed Water, BEW) contenente idrossido di sodio, che conferisce all'acqua un pH >11 e avente un potenziale di ossidoriduzione (ORP) di circa -800 mV, mentre l'anodo produce acqua EO acida (Acid Electrolyzed Water, AEW) contenente acido ipocloroso, che fa sì che l'acqua abbia un pH <2.7, e da 10 a 100 ppm di cloro libero, mentre mostra un ORP >1.100 mV (Bach *et al.*, 2006, Fabrizio e Cutter, 2003; Kim *et al.*, 2000a).

L'acqua acida EO (AEW) ha attirato l'attenzione dell'industria alimentare a causa dei suoi forti effetti battericidi contro molti agenti patogeni umani, tra cui *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes* e *Campylobacter jejuni* (Fabrizio e Cutter 2003, Kim *et al.*, 2000a; Kim *et al.*, 2000b; Park *et al.*, 2002a; Park *et al.*, 2002b; Park *et al.*, 2004; Stevenson *et al.*, 2004; Venkitanarayanan *et al.*, 1999a).

È noto che la proprietà antimicrobica dell'acqua EO è correlata al cloro disponibile, all'alto ORP e al basso pH. Tuttavia, non è chiaro quale di loro svolga il ruolo principale nell'inattivazione dei batteri. Gli studi condotti da Kim *et al.* (2000b) hanno suggerito

che l'ORP abbia svolto un ruolo primario nella capacità di disinfezione dell'acqua EO, mentre altri studi hanno riportato che il cloro disponibile (Cl_2 , HOCl e OCl^-) nell'acqua EO fosse la componente principale per la sua attività antimicrobica (Oomori *et al.*, 2000). Lo studio di Liu *et al.* (2006) ha mostrato che l'effetto battericida dell'acqua EO contro *L. monocytogenes*, oltre all'alto ORP, era correlato positivamente con il contenuto di cloro (Tabella 3).

Tuttavia, è chiaro che l'acqua EO non potrebbe esibire i più forti effetti battericidi senza il cloro disponibile, l'alto ORP e i bassi valori di pH (Tabella 4); infatti, senza un valore ORP elevato, l'acqua EO modificata è risultata meno efficace nel ridurre *L. monocytogenes* su superfici contaminate (Liu *et al.*, 2006).

Tabella 4: Effetti del pH e dell'ORP di EOW sull'inattivazione di *Listeria monocytogenes* su superfici di acciaio inossidabile. (Liu *et al.*, 2006)

Treatments	Chemical properties			Bacterial populations (log CFU/chip) ^a	
	Chlorine (ppm)	ORP (mV)	pH	Clean surface	Dirty surface
No treatment				5.76±0.23A	7.11±0.12A
Tap water	0	541	6.85	4.96±0.09B (0.80) ^b	6.08±0.17B (1.03)
Acidic water	0	630	2.65	4.35±0.14C (1.41)	5.54±0.33BC (1.57)
Modified EO water	40	561	2.51	4.21±0.26C (1.55)	5.57±0.16BC (1.54)
Chlorine water	40	1033	3.43	1.53±0.17D (4.23)	5.66±0.25BC (1.45)
EO water	40	1155	2.65	ND ^c E (>4.76)	5.20±0.29 C (1.91)

^a media dei triplicati ± deviazione standard. La media con la stessa lettera nella stessa colonna non mostra differenze significative (P>0.05)

^b riduzione (log CFU/chip) di *L. monocytogenes* dopo il trattamento.

^c non rilevabile dal metodo della conta dei piatti con un limite di rilevamento di <10 CFU/chip.

^b riduzione (log CFU/chip) of *L. monocytogenes* dopo il trattamento

^c non rilevabile con metodo della conta delle piastre con un limite di rilevabilità di <10 CFU/chip.

In tal senso lo studio di Bach *et al.* (2006) ha dimostrato che un ORP di 650 mV determina la distruzione immediata di *E. coli* indipendentemente dal pH o dalla concentrazione di cloro, indicando come l'ORP possa essere un maggiore determinante dell'inattivazione microbica indipendentemente dal pH e dalla concentrazione di cloro. Inoltre, per quanto riguarda l'Electrolyzed Oxidizing Water (EOW) sono state condotte diverse prove su matrici e materiali diversi anche con modalità differenti.

Serraino *et al.* (2010) hanno testato l'efficacia dell'acqua EO come disinfettante delle superfici di lavorazione (teflon, acciaio inossidabile e ceramica) degli alimenti. L'inattivazione batterica è stata testata tramite il contatto diretto di EOW con sospensioni batteriche di batteri mesofili e per *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 verotossigeno e *Staphylococcus aureus*.

Per verificare ciò sono stati condotti differenti test: per contatto (30s); per trattamento su superfici contaminate, considerando la contaminazione delle superfici anche dopo il trattamento; ed infine è stato valutato come la pressione della spruzzatura influenzasse l'attività antibatterica. Si sono ottenuti buoni risultati sia nel test di contatto (riduzione di 8 log nelle popolazioni batteriche) sia nei test per spruzzatura, indicando quindi come l'EOW possa effettivamente essere considerata una valida alternativa ai disinfettanti chimici.

L'efficacia di EOW è stata testata anche su prodotti vegetali (Guentzel *et al.*, 2008), notando come l'aumento del tempo di contatto per i trattamenti per immersione e l'agitazione più vigorosa possano aumentare l'efficacia dell'acqua EO quasi neutra. Sharma e Demirci (2003), infatti, hanno riportato una riduzione di *E. coli* sui germogli di erba medica in funzione dell'aumento del tempo di contatto utilizzando acqua EO acida a una concentrazione di 76 ppm TRC. Mentre Deza *et al.* (2003) hanno rilevato riduzioni di 4,4-5,01 log₁₀ CFU/cm² di *E. coli*, *S. enteritidis* e *L. monocytogenes*, dopo un trattamento di 60 s con acqua EO leggermente alcalina (pH 8; 89 ppm TRC) su superfici lisce di pomodoro.

Yang *et al.* (2003) hanno riportato una riduzione di 2.0 log₁₀ CFU/g di *S. typhimurium*, *E. coli* e *L. monocytogenes* sulle superfici della lattuga romana dopo un'immersione di 5 minuti in acqua EO neutra (pH 7; 300 ppm TRC).

Inoltre, se n'è valutato l'effetto su prodotti ittici (Liu *et al.*, 2006), per la riduzione di *L. monocytogenes* nel salmone affumicato (Shiroodi *et al.*, 2016), per ridurre la contaminazione batterica nei molluschi (Al-Qadiri *et al.*, 2016) ed in ambienti di lavorazione come macelli e stabilimenti di trasformazione della carne, confrontandola con disinfettanti tradizionali come lo iodoforo Mirkoklene (Bach *et al.*, 2006), disinfettante utilizzato nell'America del Nord. In particolare, in questo studio si è valutata la capacità delle due sostanze di inattivare batteri aerobi, coliformi ed *Escherichia Coli*; notando come i batteri aerobi fossero inferiori nei campioni trattati con AEW rispetto a quelli trattati con iodofori, stessi risultati ottenuti anche per i batteri coliformi e le popolazioni di *Escherichia Coli*. Potendo quindi affermare, in sintesi, che il trattamento con AEW può essere considerato come un'ottima alternativa ai

disinfettanti tradizionali, notando come in questo caso, nel confronto con gli iodofori, sia stato addirittura più efficace (Bach *et al.*, 2006).

Inoltre, è stato riscontrato che l'uso di acqua EO a temperature più elevate riduce il tempo di esposizione necessario per ottenere riduzioni delle conte microbiche simili a quelle ottenute con un'esposizione prolungata ma ad una temperatura più bassa (Venkitanarayanan *et al.*, 1999b). Indicando quindi come l'AEW utilizzata ad una concentrazione più elevata ed applicata ad una temperatura superiore a quella ambiente, possa comportare una riduzione ancora più significativa dei microrganismi (Bach *et al.*, 2006).

1.3.1.1 VANTAGGI E SVANTAGGI DELL'ACQUA ELETTROLIZZATA ACIDA (AEW)

Vantaggi

L'AEW è ecosostenibile in quanto è generata dall'elettrolisi di sola acqua e una soluzione salina diluita (Kim *et al.*, 2000b; Koseki *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2005); inoltre, dopo l'uso, AEW torna allo stato iniziale (Al-Haq *et al.*, 2005; Bonde *et al.*, 1999). Pertanto, non è necessaria alcuna manipolazione, stoccaggio o trasporto speciale di sostanze chimiche concentrate che rappresentano un potenziale pericolo per la salute (Al – Haq *et al.*, 2005). A causa delle sue proprietà antimicrobiche non selettive, l'AEW non promuove lo sviluppo della resistenza batterica (Al-Haq *et al.*, 2005; Vorobjeva *et al.*, 2003). L'uso di AEW su vari prodotti alimentari (ad esempio, prodotti agricoli e pesce) non ha influenzato negativamente le proprietà organolettiche di colore, profumo, sapore o consistenza (Achiwa *et al.*, 2003; Al-Haq *et al.*, 2005; Hara *et al.*, 2003a; Hara *et al.*, 2003b; Kim *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 1996; Mahmoud, 2007). Molti tipi di macchine per la produzione di EOW ne consentono la produzione in loco e i costi operativi sono bassi perché è necessario solo il sale per generare la soluzione igienizzante (Al-Haq *et al.*, 2005; Bonde *et al.*, 1999).

Svantaggi

I costi iniziali per l'acquisto delle apparecchiature necessari ai processi di elettrolisi possono essere elevati (Al-Haq *et al.*, 2005); alcune macchine possono formare gas di cloro e causare disagio all'operatore (Al-Haq *et al.*, 2001; Al-Haq *et al.*, 2002); AEW

potrebbe essere corrosivo (Liu *et al.*, 2006; Hricova *et al.*, 2008, Ayebah *et al.*, 2006; Oomori *et al.*, 2000), irritante per le mani e fitotossico a causa del suo elevato ORP o della presenza di cloro libero (Grech e Rijkenberg, 1992; Len *et al.*, 2002; Nagamatsu *et al.*, 2002; Schubert *et al.*, 1995); l'attività antimicrobica di AEW può risultare meno efficace su utensili, superfici e prodotti alimentari soprattutto in relazione alla presenza di materia organica o a seguito di uno stoccaggio inadeguato (Ayebah *et al.*, 2006; Bonde *et al.*, 1999; Koseki e Itoh, 2001; Liu *et al.*, 2006; Hricova *et al.*, 2008; Oomori *et al.*, 2000; Shimada, 1997).

Di conseguenza si è iniziati ad utilizzare l'AEW in combinazione con la BEW (Hricova *et al.*, 2008; Ayebah *et al.*, 2005; Ayebah *et al.*, 2006), o quest'ultima individualmente, in modo da ridurre l'effetto corrosivo ed aumentare la capacità di rimozione del biofilm (Ayebah *et al.*, 2005).

Su alcuni prodotti alimentari il trattamento con BEW (Basic Electrolyzed Water) seguito da AEW ha prodotto riduzioni maggiori rispetto al solo trattamento con AEW (Hricova *et al.*, 2008).

In particolare, si è visto come utilizzando EOW alcalina ed acida in combinazione si riesca effettivamente ad ottenere un miglior risultato nell'inattivazione dei biofilm di *Listeria monocytogenes* su superfici in acciaio inossidabile (Ayebah *et al.*, 2005).

1.3.2 ACQUA ELETTROLIZZATA ALCALINA (BEW)

Come già detto, dalla produzione dell'acqua elettrolizzata è possibile ottenere un'acqua acida con valori di pH <2,7 e un'acqua basica con valori di pH >11 (Bach *et al.*, 2006). Nello specifico per quanto riguarda l'acqua basica elettrolizzata (BEW) si è notato un minore effetto corrosivo ed una maggiore attività detergente, limitando la perdita di efficacia in presenza di materia organica (Ayebah *et al.*, 2005). Limite invece evidenziato nell'utilizzo dell'acqua elettrolizzata acida (EO) (Liu *et al.*, 2006; Hricova *et al.*, 2008, Ayebah *et al.*, 2006; Oomori *et al.*, 2000).

Inoltre, si è evidenziata un'importante attività antiossidante della BEW; alcuni studi hanno, infatti, dimostrato come la BEW riduca il danno ossidativo nei confronti di DNA, RNA e proteine (Lee *et al.*, 2006; Athayde *et al.*, 2017).

Si è anche osservato come il potenziamento dell'attività antiossidante dell'acido ascorbico disciolto nell'acqua elettrolizzata fosse circa tre volte superiore a quello dell'acido ascorbico disciolto nell'acqua deionizzata (Lee *et al.*, 2006).

Athayde *et al.* (2017) hanno voluto testarne l'efficacia direttamente sul campo, spruzzando su delle lonze di suino diversi tipi di EW (leggermente acida, acida e basica) e combinazioni tra loro, applicati a due temperature (18° e 30°C) e pressioni (30 e 45psi), andando a valutare poi le qualità microbiologiche ed ossidative durante la conservazione refrigerata.

In particolare, è stato evidenziato come l'applicazione di EW acida (AEW) da sola o in combinazione con EW basica (BEW) abbia ridotto la conta microbica poco dopo la spruzzatura, ma anche la conta dei batteri mesofili e psicrotrofi durante la conservazione refrigerata.

Dal punto di vista dell'ossidazione, nei campioni spruzzati con AEW ed EW leggermente acida (SAEW), è stata osservata un'elevata ossidazione proteica, indicata dall'aumento dei gruppi carbonilici, fenomeno spiegabile per la presenza di specie molecolari come HCl, Cl₂ e HOCl che favoriscono la produzione di proteine carbonilate (Stadtman e Levine, 2003). L'applicazione di BEW da sola o in combinazione con AEW e SAEW non ha portato ad un aumento dei valori di carbonile durante lo stoccaggio rispetto al controllo (figura 1). Questo fatto suggerisce che BEW abbia esercitato un effetto antiossidante, andando quindi a confermare quanto dimostrato da Lee *et al.* (2006), che hanno riscontrato l'effetto antiossidante di BEW su diversi tipi di proteine.

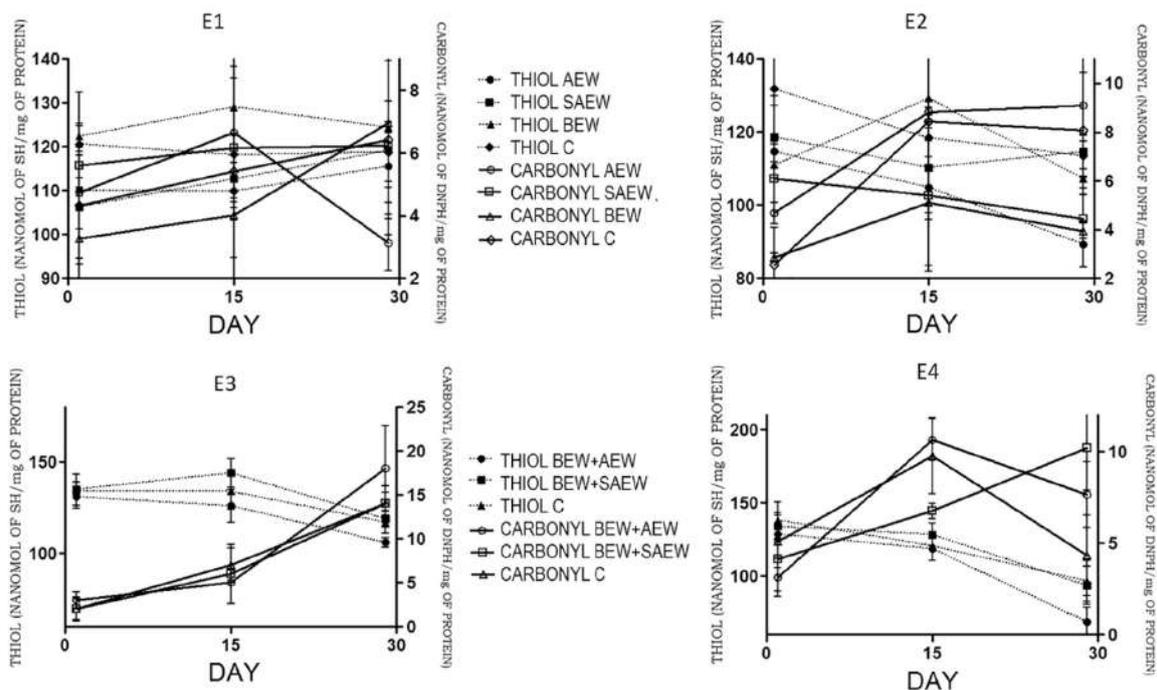


Fig. 1. Relazione tra tioli e carbonili durante il tempo di conservazione su lombi di maiale sottoposti a differenti tipi di acqua elettrolizzata ed a diverse pressioni di spruzzazione (E1, E2, E3, ed E4), confezionati sottovuoto e refrigerati a $4^{\circ}\text{C} \pm 1$. **E1**: applicazione di AEW, SAEW e BEW singolarmente, a 18°C e 30 psi per 40''; **E2**: applicazione di AEW, SAEW e BEW singolarmente a 30°C e 30psi per 40''; **E3**: applicazione di BEW per 20'' + AEW per 20'' (BEW + AEW) o applicazione di BEW per 2'' + SAEW per 20'' (BEW + SAEW) a 18°C e 30psi; **E4**: applicazione di BEW per 20'' + AEW per 20'' (BEW + AEW) o applicazione di BEW per 20'' + SAEW per 20'' (BEW + SAEW) a 18°C e 45psi. Ogni 20'' di spray corrispondono a 100 mL di EW, il controllo è stato effettuato utilizzando acqua deionizzata con condizioni di tempo, temperatura e pressione simili al trattato. (Athayde *et al.*, 2017)

Non si sono invece notate differenze significative per quanto riguarda l'ossidazione lipidica; i risultati di TBARS durante lo stoccaggio hanno suggerito che l'applicazione di AEW, SAEW e BEW non accelerano l'ossidazione dei lipidi nei lombi di maiale (Tabella 5).

Tabella 5. Valori di TBARS (MDA/Kg campione) durante la conservazione refrigerata ($4^{\circ}\text{C} \pm 1$) su lombi di maiale spruzzati con diversi tipi di acqua elettrolizzata e spruzzati a pressioni differenti. (Athayde *et al.*, 2017)

		Days		
		1	15	29
E1	AEW	0.235 ^{ba} (0.061)	0.173 ^{ba} (0.081)	0.385 ^{aA} (0.130)
	SAEW	0.165 ^{bb} (0.092)	0.202 ^{baB} (0.040)	0.315 ^{aA} (0.017)
	BEW	0.331 ^{abA} (0.125)	0.202 ^{ba} (0.040)	0.312 ^{aA} (0.057)
	Control	0.424 ^{aA} (0.029)	0.404 ^{aA} (0.000)	0.385 ^{aA} (0.021)
E2	AEW	0.178 ^{aA} (0.016)	0.063 ^{ab} (0.032)	0.265 ^{ca} (0.066)
	SAEW	0.226 ^{abB} (0.032)	0.151 ^{ab} (0.150)	0.345 ^{bca} (0.037)
	BEW	0.226 ^{ab} (0.008)	0.102 ^{ab} (0.064)	0.438 ^{abA} (0.108)
	Control	0.257 ^{ab} (0.098)	0.110 ^{ab} (0.076)	0.504 ^{aA} (0.036)
E3	BEW + AEW	0.304 ^{aA} (0.093)	0.346 ^{aA} (0.152)	0.096 ^{ab} (0.021)
	BEW + SAEW	0.312 ^{aA} (0.109)	0.270 ^{aA} (0.034)	0.058 ^{ab} (0.049)
	Control	0.234 ^{abB} (0.111)	0.347 ^{aA} (0.115)	0.119 ^{ab} (0.077)
E4	BEW + AEW	0.238 ^{ba} (0.055)	0.243 ^{ba} (0.030)	0.294 ^{aA} (0.174)
	BEW + SAEW	0.322 ^{bb} (0.064)	0.441 ^{aA} (0.022)	0.131 ^{ac} (0.012)
	Control	0.602 ^{aA} (0.149)	0.296 ^{bb} (0.038)	0.252 ^{ab} (0.074)

Altri studi hanno evidenziato come l'effetto antiossidante di BEW possa anche avere efficacia contro il diabete mellito in animali da esperimento (Li *et al.*, 2011), andando a prevenire l'apoptosi delle cellule β pancreatiche e lo sviluppo di sintomi nei topi modello di diabete di tipo 1, alleviando la generazione di specie reattive dell'ossigeno derivata dall'allossana (composto eterociclico, derivato dell'ossigenato della pirimidina, ureide dell'acido mesossalico).

O ancora è stato dimostrato un effetto della BEW sulla longevità di *Caenorhabditis elegans*, senza andarne a modificare la prolificità (Park e Park, 2013), cosa che invece è stata constatata in seguito a trattamenti genetici ed ambientali finalizzati ad allungarne la longevità (Hughes *et al.*, 2007; Larsen *et al.*, 1995).

Nello specifico si è confrontata la durata della vita e la fertilità dei vermi in terreni preparati con acqua distillata e BEW. BEW ha aumentato il numero di prole prodotta ed ha esteso significativamente la durata della vita, mostrando una maggiore resistenza a vari fattori di stress ambientale, tra cui stress ossidativo, stress da calore e irradiazione ultravioletta (Park *et al.*, 2012).

Capitolo 2

2.1 OBIETTIVI DELLA RICERCA

La bibliografia consultata evidenzia gli studi effettuati con l'acqua elettrolizzata acida (AEW) e la sua applicazione nell'industria alimentare (Hricova *et al.*, 2008).

Poco studi, invece, sono stati condotti sulle proprietà antibatteriche dell'acqua basica elettrolizzata utilizzata singolarmente (BEW).

L'obiettivo del nostro studio è stato quindi quello di valutare l'attività antibatterica dell'acqua alcalina elettrolizzata, testandone l'efficacia, su superfici d'acciaio, contro ceppi di *Escherichia Coli*, *Salmonella*, *Listeria Monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Andando poi a valutare la conta microbica post-spruzzatura ed asciugamento della superficie.

Per far ciò abbiamo utilizzato l'acqua alcalina denominata "AQUASOL" a pH 12.5.

2.2 AQUASOL

I prodotti AQUASOL, come mostrato in figura 2, sono composti al 99,83% da acqua pura ed allo 0,17% da idrossido di potassio KOH, con un pH che può variare da 11 a 13,5 ed un forte potenziale di ossidoriduzione (ORP). Sono generati attraverso un processo elettrochimico a tre stadi che utilizza acqua di rete idrica resa pura a seguito di pretrattamenti decalcificanti e di osmosi inversa (RO), e successivamente processata utilizzando come elettrolita il carbonato di potassio (K_2CO_3).

	AQUASOL (range PH 11 – 12,5)	Revisione n. 1
		Data revisione 26/07/2019
		Nuova emissione
		Stampata il 26/07/2019
		Pagina n. 1/8

Scheda Informativa

SEZIONE 1. Identificazione della sostanza/miscela e della società/impresa

1.1. Identificatore del prodotto

Codice: AQUASOL (range Ph 11 – 12,5)
Denominazione: AQUASOL

1.2. Usi identificati pertinenti della sostanza o della miscela e usi sconsigliati

Descrizione/Utilizzo: Detergente multiuso, sgrassante, disoleante e antiodore.
Trattamento di pulizia pre-verniciatura
Disoleazione manuale settori automotive, elettronica di precisione, meccatronica, fluidodinamica.
Degrassaggio e pulizia tecnica nel food processing
Pulizie di tutti gli ambienti (Facility Management)

1.3. Informazioni sul fornitore della scheda di dati di sicurezza

Ragione Sociale: AQUASOL SRL
Indirizzo: Via San Mamolo, 45 40136
Località e Stato: Bologna, Italia

1.4. Numero telefonico di emergenza

Per informazioni urgenti rivolgersi ad Aquasol Srl Cell 328 1347324



ACQUA IONIZZATA SUPER ALCALINA
Soluzione acquosa di idrossido di potassio

AQUASOL

H₂O KOH
99,83% 0,17%

Figura 2. Scheda tecnica AQUASOL

Il prodotto, ai sensi delle disposizioni di cui al Regolamento (CE) 1272/2008 (CLP) (e successive modifiche ed adeguamenti), non è classificato pericoloso né contiene sostanze classificate come pericolose per la salute o per l'ambiente.

In base ai dati disponibili il prodotto non contiene sostanze PBT (Persistente, Bioaccumulante e Tossico) o vPvB (molto Persistente e molto Bioaccumulante) in percentuale superiore a 0,1%.

Considerando queste informazioni il prodotto è abbastanza sicuro e facilmente stoccabile e manipolabile; in tal senso per la manipolazione non è richiesto nessun DPI specifico se non un paio di guanti da lavoro di categoria I CE.

Il prodotto può essere conservato in qualsiasi luogo fresco, asciutto, ventilato ed al chiuso.

L'unico limite è il contatto, in particolare se prolungato, con materiali incompatibili come acidi, calce, alluminio, ottone, bronzo, rame, piombo, stagno, zinco.

Anche per lo smaltimento non vi sono particolari limiti. I residui del prodotto tal quali non sono da considerarsi rifiuti speciali e non sono pericolosi. Gli imballaggi contaminati devono essere inviati a recupero o smaltimento nel rispetto delle norme nazionali sulla gestione dei reflui.

Se opportunamente lavati con acqua di rete possono essere riutilizzati.

In presenza di autorizzazione allo scarico, se diluito con acqua di rete, il prodotto può essere smaltito in fognatura.

2.2.1 CARATTERISTICHE E PROPRIETÀ DI AQUASOL



Figura 3. Caratteristiche e proprietà di AQUASOL

AQUASOL presenta diversi vantaggi, sia in termini di funzionalità pratica sia in termini di sostenibilità (figura 3).

Il prodotto, infatti, non contiene inquinanti ambientali come BOD (Biochemical Oxygen Demand) o COD (Chemical Oxygen Demand) etc..

È esente da varie restrizioni, ad esempio SVHC (Registro delle sostanze inquinanti e tossiche), VOC (composti organici volatili), direttiva solventi e antincendio.

Non causa contaminazione del sottosuolo o inquinamento dell'acqua.

Elimina il rischio da esposizione a VOC tutelando la salute del lavoratore e l'ambiente.

Non è quindi necessario indossare DPI a protezione delle vie respiratorie aumentando così la produttività. Pur avendo un alto pH, non causa irritazione della pelle o ustioni chimiche.

Non aumenta il carico di incendio perché non infiammabile.

Non richiede il trasporto in ADR.

Con AQUASOL, grazie al suo alto pH, Virus e batteri non possono sopravvivere prevenendo la contaminazione batterica e sanificando le superfici.

2.2.2 SETTORI DI APPLICAZIONE

Per le sue caratteristiche “sgrassanti” AQUASOL trova applicazione in vari settori:

- INDUSTRIAL SECTOR → può essere utilizzata in una vasta gamma di industrie, dalla pulizia di precisione nel campo dell'elettronica e del vetro, al degrassaggio dei pezzi meccanici nelle industrie di lavorazione dei metalli, nella verniciatura industriale in sostituzione del diluente normalmente utilizzato nella pulizia del pezzo destinato alla verniciatura, nella oleodinamica e nel settore automotive.
- FOOD SECTOR → è versatile e con elevate proprietà detergenti, sgrassanti, sanificanti e antiodoranti. È incolore, inodore e non irritante. Trova la sua applicazione nella pulizia dei macchinari di lavorazione nelle industrie alimentari, nei supermercati, alberghi, servizi di ristorazione, in linea con il regolamento HACCP. Può anche essere utilizzato nella pulizia dei banchi di lavorazione di carne e pesce, comportando dei vantaggi in termini di: tempo, in quanto non necessita di risciacquo; sicurezza, dal momento che non presenta contaminanti chimici e non rilascia residui su attrezzature, inoltre richiede Zero VOC per la sicurezza dell'operatore.
- FACILITIES SECTOR → è utilizzabile per la pulizia e la sanificazione di edifici, centri commerciali, club sportivi, strutture per il tempo libero, strutture dell'infanzia ed in altre scuole. Non contiene tensioattivi o sostanze chimiche tossiche. Non è necessario utilizzare ulteriori detergenti e non lascia schiuma, quindi non necessita di risciacquo. Particolarmente indicato per il settore nautico. Per quanto riguarda la pulizia delle corsie con macchina lavapavimenti, presenta numerosi vantaggi in quanto è utilizzabile in qualsiasi macchina lavapavimenti, garantendo ottimi risultati con diluizione del prodotto 1:10. La totale assenza di solventi e tensioattivi rende la risulta delle macchine lavapavimenti scaricabile in fogna (con autorizzazione allo scarico e controllo preventivo dei parametri pH per norma) e quindi non vi è la necessità di stoccaggio e smaltimento a rifiuto speciale con importanti vantaggi economici.

2.3 MATERIALI E METODI

L'acqua alcalina elettrolizzata (BEW o REW) è stata ottenuta da AQUASOL S.r.l (Bologna, Italia), generata attraverso un processo elettrochimico a tre stadi che utilizza acqua di rete idrica resa pura a seguito di pretrattamenti decalcificanti e di osmosi inversa (RO), e successivamente processata utilizzando come elettrolita il carbonato di potassio (K_2CO_3). Il processo di trattamento fa sì che BEW sia composta per il 99,83% di acqua pura e per lo 0,17% da idrossido di potassio (KOH) con un pH che varia in un intervallo compreso tra 11 e 12,5 e un potenziale di ossidoriduzione di - 40/90 mV.



Figura 4. Misurazione pH ed ORP.

Tutte le prove svolte con BEW (AQUASOL) sono state effettuate presso i laboratori di Sicurezza Alimentare dello SPASA (Servizio Produzioni Animali e Sicurezza Alimentare del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Alma Mater Studiorum, Università di Bologna).

Le caratteristiche chimiche, come il pH e il potenziale di ossidoriduzione (ORP), sono state misurate con un pHmetro (FiveGo F2, Mettler – Toledo, Greifensee, Svizzera), utilizzando elettrodi LE427 e LE510 per misurare rispettivamente pH e ORP.

Sono stati eseguiti quattro test per valutare l'attività di riduzione della carica batterica di *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus* ed *Escherichia coli*.

Per ogni test è stato utilizzato un mix di tre diversi ceppi (Tabella 6), selezionati dalla ceppoteca SPASA, tra cui un ceppo di riferimento ATCC e due ceppi isolati da campo, quindi dalla catena di produzione animale.

Tabella 6. Identificazione dei ceppi utilizzati e loro collocazione nella ceppoteca SPASA. (Tomasello *et al.*, 2021)

Microorganism species	Strain	Biological matrices of origin
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	
<i>Escherichia coli</i>	VeLaBac 444	Bovine faeces
<i>Escherichia coli</i>	VeLaBac 445	Meat
<i>Salmonella Thyphimurium</i>	ATCC 14020	
<i>Salmonella Thyphimurium monophasic</i>	118174/1	Pork sausage
<i>Salmonella Derby</i>	106463/1	Pork meat
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313	
<i>Listeria innocua</i>	257529/1	Pork sausage
<i>Listeria innocua</i>	257529/2	Pork meat
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	
<i>Staphylococcus aureus</i>	B/122/2	Raw milk
<i>Staphylococcus aureus</i>	22-7-16/2	Goat skin

I tre ceppi sono stati poi seminati singolarmente su una piastra TSA ed incubati per il tempo e alla temperatura richiesta dal microorganismo considerato. Dopo il tempo di incubazione prestabilito si è passati all'identificazione dei ceppi tramite Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight (MALDI-TOF, Bruker, Massachusetts, USA).

Successivamente è stata preparata una sospensione batterica, prelevando colonie batteriche dei tre microrganismi selezionati per ogni genere e sospendendole in soluzione salina (NaCl 0.9%), ottenendo così una sospensione mista ad una concentrazione batterica di circa 10^{11} CFU/ml.

La concentrazione batterica ottenuta è stata valutata tramite diluizioni seriali 1:10 e semina per spatolamento su Plate Count Agar (PCA).

Per ogni test sono state utilizzate otto piastre in acciaio inossidabile, rappresentanti otto ripetizioni per microorganismo: sulle piastre precedentemente sterilizzate, è stata definita un'area di 100 cm², la quale è stata contaminata con la sospensione dei vari microrganismi.

Le piastre sono state contaminate utilizzando un tampone sterile, imbibito della sospensione batterica, strofinato rispettivamente due volte in senso verticale ed orizzontale per l'intera area, ottenendo così una carica totale di circa 10^4 UFC/cm².

Dopo la contaminazione della piastra, l'area di 100 cm² è stata idealmente divisa in due sezioni e, dopo essiccamento della sospensione, la metà sinistra della piastra è stata immediatamente campionata con una spugna sterile (Nasco Whirl-Pak®, "Speci-Sponge®" bags, Madison, Wisconsin, USA) strofinata per 10 volte, in modo da poterne valutare la carica microbica pretrattamento. La spugna, una volta campionata la superficie, è stata riposta nel sacchetto di plastica sterile in cui sono stati aggiunti 100 ml di soluzione salina sterile (NaCl 0.9%).

Subito dopo è stato effettuato il trattamento con BEW, applicando quest'ultima tramite una pompa a bassa pressione, posta a circa 30 cm di distanza dalla piastra; dopo l'applicazione la piastra è stata lasciata asciugare per circa 15 minuti, procedendo poi al campionamento della seconda metà della piastra, con le stesse modalità sopra descritte. Le spugnette sono state sottoposte ad omogeneizzazione tramite Stomacher (BagMixer®, Interscience, St Nom, Francia) per 60 secondi, e da questa sospensione di partenza è stata eseguita una diluizione seriale 1:10.

Sono stati poi seminati, per spatolamento su PCA, 0,1 ml in doppio rispettivamente della sospensione di partenza e della diluizione. Le piastre, dopo essere state seminate, sono state incubate a 37°C per 24/48h (Tabella 7).

Dopo l'incubazione, le colonie sono state identificate tramite MALDI-TOF e contate. I risultati sono stati espressi come log UFC/cm² e l'analisi statistica è stata effettuata mediante T-test per dati appaiati, one-way ANOVA e Tukey post-hoc test considerando significativo un $p \leq 0.01$.

Tabella 7. Temperature (°C) e tempo di incubazione delle singole specie batteriche

Microrganismo	T di incubazione (°C)	Tempo di incubazione
<i>E. coli</i>	37	24 ore
<i>Salmonella</i>	37	24 ore
<i>Listeria</i>	37	48 ore

2.4 RISULTATI

Il trattamento con BEW di superfici contaminate artificialmente ha rivelato diversi gradi di riduzione della carica microbica in diversi test. Complessivamente, è stata osservata una riduzione di 2,64 ($\pm 1,52$ DS) log UFC/cm², con conseguente riduzione microbica significativa ($p < 0,01$). Un minimo di 0,43 log UFC/cm² in uno degli otto test per *S. aureus* e un massimo di 5,63 log UFC/cm² in uno degli otto test per *Salmonella spp.*. In dettaglio, in media, *Salmonella spp.* è stata ridotta di 3,70 ($\pm 1,35$ SD) log UFC/cm², *E. coli* di 3,29 ($\pm 1,35$ SD) log UFC/cm², *Listeria spp.* di 2,41 ($\pm 1,22$ SD) log UFC/cm², *S. aureus* di 1,16 ($\pm 0,90$ SD) log UFC/cm². I dettagli dei risultati sono riportati nella Tabella 8 e nella Figura 6.

Tabella 8. Conta batterica prima e dopo il trattamento con BEW, riduzione microbica espressa come media (\pm SD), minimo e massimo (Δ log CFU/cm²). (Tomasello *et al.*, 2021)

Microorganism	Pre - treatment Log UFC/ cm ² mean (\pm SD)	Post- treatment Log UFC/ cm ² mean (\pm SD)	Microbial reduction $\bar{\Delta}$ Log UFC/ cm ² mean (\pm SD)	Minimum microbial reduction Δ Log UFC/ cm ²	Maximum microbial reduction Δ Log UFC/ cm ²
<i>Escherichia coli</i>	3.64 (± 0.79)	0.35 (± 0.98)	3.29 (± 1.35)	0.81	4.95
<i>Salmonella spp.</i>	4.80 (± 1.29)	1.10 (± 1.58)	3.70 (± 1.35)	1.86	5.63
<i>Listeria spp.</i>	3.85 (± 0.49)	1.45 (± 1.61)	2.41 (± 1.22)	0.64	3.94
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.20 (± 0.20)	3.04 (± 0.90)	1.16 (± 0.90)	0.43	2.75

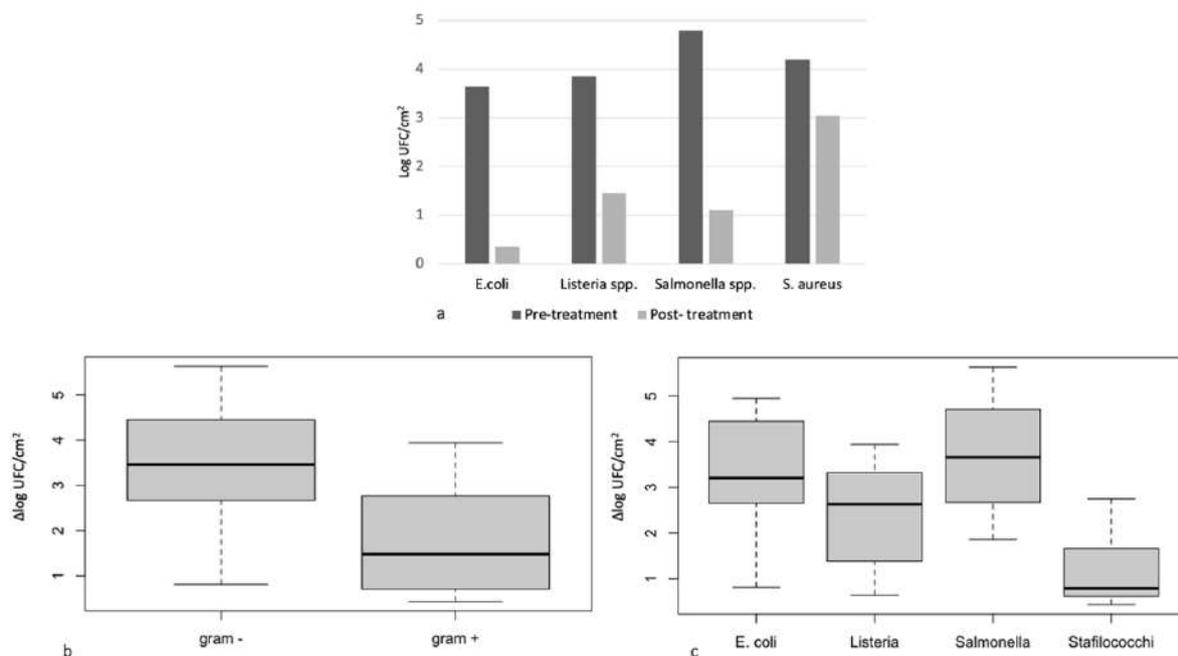


Figura 6. a) Conta batterica media prima e dopo il trattamento con REW per ogni microorganismo e riduzione media dei valori di carica (Δ log UFC/cm²) per b) batteri Gram-negativi e Gram-positivi, e c) per ogni microorganismo (Tomasello *et al.*, 2021)

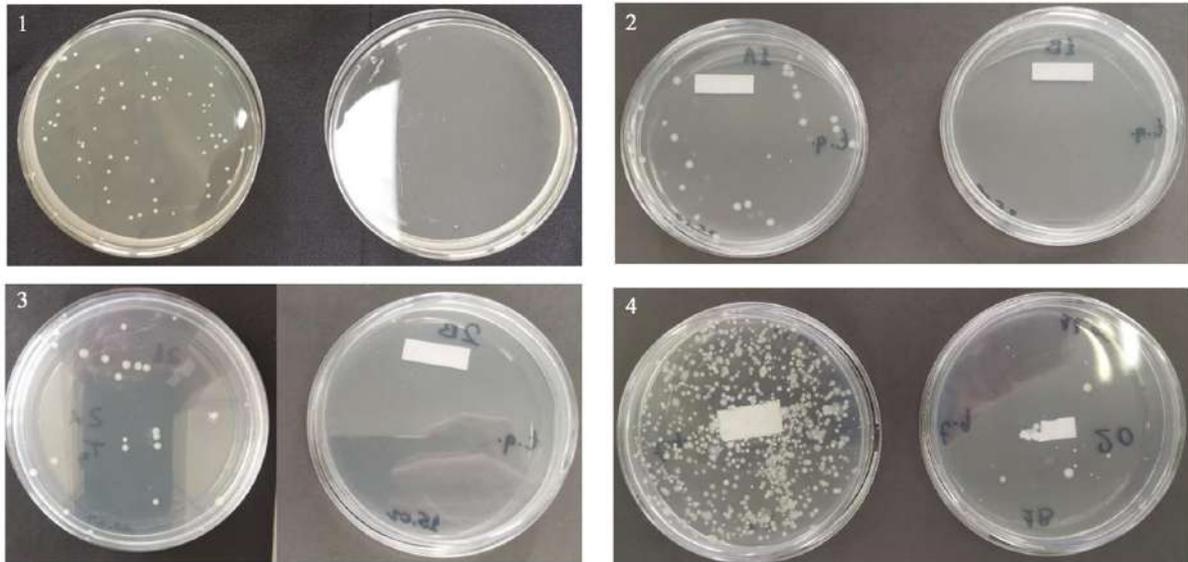


Figura 5. Confronto, pre e post trattamento, crescita microbica su piastra Petri delle specie batteriche testate.

1: Confronto crescita *Listeria spp.* Piastra sx: crescita microbica da tamponamento di piastra d'acciaio prima del trattamento. Piastra dx: crescita microbica da tamponamento di piastra d'acciaio dopo il trattamento.

2: Confronto crescita *Salmonella spp.* Piastra sx: crescita microbica da tamponamento di piastra d'acciaio prima del trattamento. Piastra dx: crescita microbica da tamponamento di piastra d'acciaio dopo il trattamento.

3. Confronto crescita *E. Coli.* Piastra sx: crescita microbica da tamponamento di piastra d'acciaio prima del trattamento. Piastra dx: crescita microbica da tamponamento di piastra d'acciaio dopo il trattamento.

4. Confronto crescita *S. aureus.* Piastra sx: crescita microbica da tamponamento di piastra d'acciaio prima del trattamento. Piastra dx: crescita microbica da tamponamento di piastra d'acciaio dopo il trattamento.

2.5 DISCUSSIONE

È ben noto l'effetto detergente e sgrassante di BEW. Ma alcuni autori hanno suggerito che l'utilizzo di BEW come pretrattamento prima di utilizzare disinfettanti tradizionali potrebbe potenziare l'azione di questi ultimi (Ayebah *et al.*, 2005; Fabrizio *et al.*, 2002; Jiménez-Pichardo *et al.*, 2016), in quanto l'azione di pulizia di BEW potrebbe migliorare l'efficacia dell'azione antimicrobica del disinfettante tradizionale rimuovendo il materiale organico che potrebbe ospitare microrganismi. In questo lavoro, il trattamento con BEW ha portato ad una significativa ($p < 0.01$) riduzione complessiva della carica microbica rispetto ai campioni non trattati. I risultati hanno mostrato diversi gradi di riduzione della carica microbica su diverse specie batteriche. Nello specifico, BEW ha mostrato di essere significativamente ($p < 0.01$) efficace su *Salmonella spp.*, *E. coli*, *S. aureus* e *Listeria spp.*, con una riduzione microbica media di 3,49 ($\pm 1,31$ DS) log UFC/cm² e un'elevata frequenza (75%) di assenza di crescita microbica dopo il trattamento; in particolare, però, è risultata meno efficace sui microrganismi gram-positivi (*S. aureus* e *Listeria spp.*) con riduzione microbica media di 1,78 ($\pm 1,21$ SD) log UFC/cm². Ci sono, infatti, ampie prove in letteratura della maggiore resistenza dei batteri Gram positivi ai trattamenti igienizzanti rispetto ai batteri Gram negativi, ed essendo lo spessore della parete cellulare la grande differenza tra i due gruppi (Sizar e Unakal, 2021; Silhavy *et al.*, 2010; Tripathi e Saprà, 2021), responsabile della preservazione dell'integrità della cellula, anche i risultati di questo lavoro suggeriscono che questo aspetto può giocare un ruolo nell'efficacia dell'inattivazione dei batteri da parte di BEW, come riportato da alcuni autori (Koike *et al.*, 2009; Mai-Prochnow *et al.*, 2016; Vollmeret *et al.*, 2008). Altri autori hanno trovato risultati simili quando si testavano l'acqua elettrolizzata leggermente acida (SAEW) e l'acqua elettrolizzata fortemente alcalina (BEW), con batteri Gram positivi che mostrano una resistenza relativamente maggiore al trattamento rispetto ai batteri Gram negativi (Issa-Zacharia *et al.*, 2010; Koike *et al.*, 2009; Tango *et al.*, 2015). Inoltre, diversi microrganismi possono avere una diversa sensibilità ai disinfettanti, ad esempio *Listeria spp.* è generalmente più resistente al cloro rispetto a *Salmonella spp.* ed *E. coli* (Burnett e Beuchat, 2000). In letteratura, seppur sono presenti studi che analizzano l'attività antiossidante di BEW o l'effetto antibatterico di BEW in combinazione con AEW (Hricova *et al.*, 2008; Ayebah *et al.*,

2005; Ayebah *et al.*, 2006), testimoniando un aumento dell'efficacia di quest'ultimo, grazie alla maggiore capacità della prima di ridurre il biofilm (Ayebah *et al.*, 2005), nessun altro lavoro ha valutato l'efficacia della sola BEW nel ridurre la carica microbica sulle superfici in acciaio inossidabile. Altri autori hanno valutato la sua efficacia in associazione con SAEW e ultrasuoni per migliorare la sanificazione dei coltelli nell'industria della carne, ma a causa dei diversi trattamenti applicati non è stato possibile confrontare i dati (Brasil *et al.*, 2020).

È importante notare che le prove da noi effettuate sono state sottoposte a condizioni di carica microbica non tipiche delle condizioni di lavoro. Infatti, i livelli di contaminazione nell'industria alimentare sono generalmente molto inferiori a quelli considerati in questo lavoro, soprattutto considerando i microrganismi patogeni. Inoltre, in questa ricerca è stata considerata solo l'azione BEW, mentre in condizioni operative potrebbe essere associata ad un'azione di rimozione meccanica batterica, che potrebbe rendere il trattamento ancora più efficace.

Economicamente BEW può essere competitiva con i più comuni sanificanti commerciali, considerando soprattutto che oltre alla sua efficacia come detergente e disinfettante, BEW è sicura da maneggiare, senza rischi per gli utilizzatori ed ha un basso impatto ambientale, essendo composto da 99,83% di acqua pura e 0,17 % di idrossido di potassio (KOH), non contendo quindi inquinanti ambientali. Inoltre, la sua instabilità rende superfluo il risciacquo con acqua delle superfici dopo il suo utilizzo, comportando quindi un risparmio di tempo durante le attività lavorative (Athayde *et al.*, 2018; Fabrizio *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2008). Tutto ciò rende BEW una valida alternativa alle più comuni formulazioni commerciali da utilizzare in alcuni particolari processi produttivi, soprattutto nell'industria alimentare data la sicurezza di non avere nessun tipo di residuo chimico e nessun odore particolare.

2.6 CONCLUSIONI

In conclusione, possiamo quindi considerare il prodotto di AQUASOL un'ottima alternativa ai detergenti tradizionali; inoltre, alla luce dei risultati ottenuti dalla nostra ricerca non è da sottovalutare neanche l'effetto antibatterico. Ma sicuramente ciò che rende questo prodotto un'ottima alternativa ai disinfettanti e detergenti tradizionali è ciò che sta a monte ed a valle del semplice utilizzo del prodotto, ovvero l'intero processo di produzione e le fasi di scarico della risulta dell'acqua, che lo rendono un prodotto ecologico.

BEW prodotta da AQUASOL mostra interessantissime caratteristiche in termini di sostenibilità e facilità d'impiego. Il prodotto viene, infatti, ottenuto grazie all'elettrolisi di semplice acqua pervenuta dalla rete idrica, ottenendo alla fine del processo un'acqua elettrolizzata composto per il 99,87% da acqua pura, senza quindi nessun agente chimico all'interno della sua composizione. Ciò comporta quindi in un processo di produzione che non prevede l'utilizzo di alcun composto chimico, andando quindi ad avere un impatto ambientale pari a zero. I tradizionali detergenti e disinfettanti chimici, infatti, non rappresentano un problema ambientale solamente al momento dello scarico, ma anche in fase di produzione, in quanto i componenti chimici richiesti, i cosiddetti petrolati, derivano molto spesso dalla lavorazione e raffinazione del petrolio, con conseguente emissione di fumi e percolamento di acque in falda, le quali potrebbero essere pertanto contaminate.

La totale assenza di componenti chimici si traduce, quindi, in numerosi vantaggi anche in fase di utilizzo, in quanto non vengono richiesti particolari accorgimenti agli operatori, quali ad esempio utilizzo di DPI o attenzione nei materiali su cui è possibile effettuare il trattamento, in quanto non si ha effetto corrosivo. Inoltre, l'assenza di composti chimici e sostanze alcoliche permette, agli operatori del settore alimentare, di non attendere necessariamente il periodo di tempo utile all'evaporazione delle sostanze alcoliche, e quindi di tutti quegli odori sicuramente sgradevoli se trasferiti agli alimenti. Da ciò ne consegue una maggior facilità d'impiego soprattutto durante l'attività lavorativa, potendo quindi garantire anche una maggior sicurezza alimentare al consumatore. Molto spesso infatti, visti i limiti di tempo ed impiego imposti dai comuni detergenti ed antibatterici, molti operatori del settore non possono eseguire le operazioni

di pulizia tra una processo e l'altro, quali, ad esempio, possono essere, nel caso della macelleria, la pulizia degli utensili tra una lavorazione e l'altra; operazioni molto importanti soprattutto se si trattano tagli provenienti da animali di diversa specie, o ancora nel caso in cui si debbano effettuare preparazioni di prodotti da consumare crudi, quali possono essere tartare e carpacci.

Oltre a questi aspetti fondamentali, che portano vantaggi sia agli operatori del settore che al consumatore finale, un altro aspetto da non sottovalutare è quello legato alla sostenibilità ambientale di questo prodotto: per la sua composizione non richiede, infatti, nessuna particolare attenzione o autorizzazione. Inoltre, per quanto riguarda lo smaltimento può tranquillamente essere smaltita negli scarichi urbani, senza alcun pretrattamento in depuratore, non comportando quindi un pericolo per le falde, a differenza dei detersivi e disinfettanti tradizionali, i quali, vista la loro composizione, potrebbero causare il fenomeno dell'eutrofizzazione delle acque, dal momento che queste sostanze sono costituite da grandi quantità di sostanze derivate da zolfo, fosforo ed azoto.

L'utilizzo di questo prodotto non è però solo limitato al settore alimentare ed in particolare ai processi di trasformazione, ma le sue caratteristiche lo rendono ideale anche per il settore meccanico, sfruttando il potente effetto sgrassante e detergente, o ancora per il settore sanitario, così come per quello scolastico o casalingo.

Ad oggi però, l'acqua alcalina elettrolizzata non può essere iscritta al registro dei biocidi e dei presidi medico-chirurgici del Ministero della Salute in quanto il Regolamento UE n 528/2012 prevede che possano essere autorizzati, e quindi immessi in commercio, solo prodotti biocidi contenenti sostanze attive che siano state soggette a revisione ed approvazione a livello europeo.

Mentre il prodotto può tranquillamente essere commercializzato come detergente dal momento che a livello normativo non è prevista nessuna limitazione nella loro composizione. L'art 2.1 del Reg (CE) n.648/2004, infatti, definisce detersivi o miscele di esse, quali elementi chimici e loro componenti allo stato naturale, prodotti destinati ad effettuare un'attività di lavaggio e pulizia, dove per lavaggio e pulizia si intende un processo mediante il quale un deposito indesiderato viene staccato da un altro substrato o dall'interno di esso, e viene posto in soluzione o dispersione.

Da ciò ne consegue quindi che il prodotto può tranquillamente essere registrato come un detergente all'interno del registro dei prodotti di pulizia usati nei locali di trasformazione, ma potendone sfruttare anche gli effetti antimicrobici, con tutti i vantaggi sopra descritti.

In conclusione, visti gli interessantissimi risultati ottenuti dalle nostre prove, non è da trascurare l'interesse su questo prodotto, approfondendone le ricerche e valutandone ulteriori effetti oltre, naturalmente, a comprendere meglio i risultati già riscontrati.

BIBLIOGRAFIA

- Achiwa N, Nishio T. 2003. The use of electrolyzed water for sanitation control of eggshells and GP center. *Food Science and Technology Research* 9, 100–103.
- Al-Haq MI, Seo Y, Oshita S, Kawagoe Y. 2001. Fungicidal effectiveness of electrolyzed oxidizing water on postharvest brown rot of peach. *HortScience* 36, 1310–1314.
- Al-Haq MI, Seo Y, Oshita S, Kawagoe Y. 2002. Disinfection effects of electrolyzed oxidizing water on suppressing fruit rot of pear caused by *Botryosphaeria berengeriana*. *Food Research International* 35, 657–664.
- Al-Haq MI, Sugiyama J, Isobe S. 2005. Applications of electrolyzed water in agriculture & food industries. *Food Science and Technology Research* 11, 135–150.
- Al-Qadiri HM, Al-Holy MA, Shiroodi SG, Ovissipour M, Govindan BN, Al-Alami N, Sablani SS, Rasco B. 2016. Effect of acidic electrolyzed water-induced bacterial inhibition and injury in live clam (*Venerupis philippinarum*) and mussel (*Mytilus edulis*). *International Journal of Food Microbiology* 231, 48–53.
- Athayde DR, Flores DRM, da Silva JS, Genro ALG, Silva MS, Klein B, Mello R, Campagnol PCB, Wagner R, de Menezes CR, Barin JS, Cichoski AJ. 2017. Application of electrolyzed water for improving pork meat quality. *Food Research International* 100, 757–763.
- Athayde DR, Flores DRM, Silva JS, Silva MS, Genro ALG, Wagner R, Campagnol PCB, Menezes CR, Cichoski AJ. 2018. Characteristics and use of electrolyzed water in food industries. *International Food Research Journal* 25.
- Authority EFSA, European Centre for Disease Prevention and Control, 2021. The European Union One Health. 2019, Zoonoses Report. EFSA Journal 19, e06406.
- Ayebah B, Hung YC, Frank JF. 2005. Enhancing the bactericidal effect of electrolyzed water on *Listeria monocytogenes* biofilms formed on stainless steel. *Journal of Food Protection* 68, 1375–1380.

- Ayebah B, Hung YC, Kim C, Frank JF. 2006. Efficacy of electrolyzed water in the inactivation of planktonic and biofilm *Listeria monocytogenes* in the presence of organic matter. *Journal of Food Protection* 69, 2143–2150.
- Bach SJ, Jones S, Stanford K, Ralston B, Milligan D, Wallins GL, Zahiroddini H, Stewart T, Giffen C, McAllister TA. 2006. Electrolyzed oxidizing anode water as a sanitizer for use in abattoirs. *Journal of Food Protection* 69, 1616–1622.
- Bonde MR, Nester SE, Khayat A, Smilanick JL, Frederick RD, Schaad NW. 1999. Comparison of effects of acidic electrolyzed water and NaOCl on *tilletia indica* teliospore germination. *Plant Disease* 83, 627–632.
- Brasil CCB, de Menezes CR, Jacob-Lopes E, Barin JS, Zepka LQ, Campagnol PCB, Wagner R, Cichoski AJ. 2020. Combined application of electrolysed water and ultrasound to improve the sanitation of knives in the meat industry. *International Journal of Food Science & Technology* 55, 1136–1144.
- Burnett SL, Beuchat LR. 2000. Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 25, 281–287.
- Cardini M, Piumi M, Seghedoni R, Stefani E. 2017. La Sanificazione nell'industria alimentare e negli allevamenti. *Quaderno di disinfezione*, Servizio Sanitario Regionale Emilia-Romagna.
- Regulation (EC) N. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*
- Davin-Regli A, Monnet D, Saux P, Bosi C, Charrel R, Barthelemy A, Bollet C. 1996. Molecular epidemiology of *Enterobacter aerogenes* acquisition: one-year prospective study in two intensive care units. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 1474–1480.

- Deza MA, Araujo M, Garrido MJ. 2003. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on the surface of tomatoes by neutral electrolyzed water. *Letters in Applied Microbiology* 37, 482–487.
- Deza MA, Araujo M, Garrido MJ. 2005. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces by neutral electrolysed water. *Letters in Applied Microbiology* 40, 341–346.
- Emori TG, Gaynes RP. 1993. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clinical microbiology reviews* 6, 428–442.
- Fabrizio KA, Sharma RR, Demirci A, Cutter CN. 2002. Comparison of electrolyzed oxidizing water with various antimicrobial interventions to reduce *Salmonella* species on poultry. *Poultry Science* 81, 1598–1605.
- Fabrizio KA, Cutter CN. 2003. Stability of electrolyzed oxidizing water and its efficacy against cell suspensions of *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 66, 1379–1384.
- Frank JF, Koffi RA. 1990. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *Journal of Food Protection* 53, 550–554.
- Fukuzaki S, Hiratsuka H, Takehara A, Takahashi K, Sasaki K, 2004. Efficacy of electrolyzed water as a primary cleaning agent. *Biocontrol Science* 9, 105–109.
- Grech NM. 1992. injection of electrolytically generated chlorine into citrus microirrigation systems for the control of certain waterborne root pathogens. *Plant Disease*. 76, 457.
- Guentzel JL, Liang Lam K, Callan MA, Emmons SA, Dunham VL. 2008. Reduction of bacteria on spinach, lettuce, and surfaces in food service areas using neutral electrolyzed oxidizing water. *Food Microbiology* 25, 36–41.

- Hara Y, Matsuda H, Arai E. 2003. Effects of weakly electrolyzed water on properties of tofu (soybean curd). *Food Science and Technology Research* 9, 332–337.
- Horiba N, Hiratsuka K, Onoe T, Yoshida T, Suzuki K, Matsumoto T, Nakamura H. 1999. Bactericidal effect of electrolyzed neutral water on bacteria isolated from infected root canals. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 87, 83–87.
- Hricova D, Stephan R, Zweifel C. 2008. Electrolyzed water and its application in the food industry *Journal of Food Protection* 71, 1934–1947.
- Huang YR, Hung YC, Hsu SY, Huang YW, Hwang DF. 2008. Application of electrolyzed water in the food industry. *Food Control* 19, 329–345.
- Hughes SE, Evason K, Xiong C, Kornfeld K. 2007. Genetic and pharmacological factors that influence reproductive aging in nematodes. *PLOS Genetics* 3, e25.
- Issa-Zacharia A, Kamitani Y, Morita K, Iwasaki K. 2010. Sanitization potency of slightly acidic electrolyzed water against pure cultures of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, in comparison with that of other food sanitizers. *Food Control* 21, 740–745.
- Intra-group. 2020. L'importanza della sanificazione nell'industria alimentare: <https://www.intra-group.it/blog/limportanza-della-sanificazione-nellindustria-alimentare>. Consultato il 17/10/2021
- Jiménez-Pichardo R, Regalado C, Castaño-Tostado E, Meas-Vong Y, Santos-Cruz J, García-Almendárez BE. 2016. Evaluation of electrolyzed water as cleaning and disinfection agent on stainless steel as a model surface in the dairy industry. *Food Control* 60, 320–328.
- Kenji K, Noriteru T, Yasuo H, Shuji H. 1996. An examination of cooked rice with electrolyzed water. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 43, 930–938.

- Kim C, Hung YC, Brackett RE. 2000a. Efficacy of electrolyzed oxidizing (EO) and chemically modified water on different types of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 61, 199–207.
- Kim C, Hung YC, Brackett RE. 2000b. Roles of oxidation-reduction potential in electrolyzed oxidizing and chemically modified water for the inactivation of food-related pathogens. *Journal of Food Protection* 63, 19–24.
- Kim C, Hung YC, Brackett RE, Lin CS. 2003. Efficacy of electrolyzed oxidizing water in inactivating *Salmonella* on alfalfa seeds and sprouts. *Journal of Food Protection* 66, 208–214.
- Koike M, Kitamura T, Todo H, Tokudome Y, Hashimoto F, Isshiki Y, Kondo S, Sugibayashi K. 2009. Bactericidal activities of several electrolyzed waters. *Journal of Society of Cosmetic Chemists of Japan* 43, 101–106.
- Koseki S, Itoh K. 2001. Prediction of microbial growth in fresh-cut vegetables treated with acidic electrolyzed water during storage under various temperature conditions. *Journal of Food Protection* 64, 1935–1942.
- Koseki S, Fujiwara K, Itoh K. 2002. Decontaminative effect of frozen acidic electrolyzed water on lettuce. *Journal of Food Protection* 65, 411–414.
- Larsen PL, Albert PS, Riddle DL. 1995. Genes that regulate both development and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 139, 1567–1583.
- Lee MY, Kim YK, Ryoo KK, Lee YB, Park EJ. 2006. Electrolyzed-reduced water protects against oxidative damage to DNA, RNA, and protein. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 135, 133–144.
- Lee SH, Frank JF. 1991. Inactivation of surface-adherent *Listeria monocytogenes* hypochlorite and heat. *Journal of Food Protection* 54, 4–6.

- Len SV, Hung YC, Chung D, Anderson JL, Erickson MC, Morita K. 2002. Effects of storage conditions and pH on chlorine loss in electrolyzed oxidizing (EO) water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 209–212.
- Li Y, Hamasaki T, Nakamichi N, Kashiwagi T, Komatsu T, Ye J, Teruya K, Abe M, Yan H, Kinjo T, Kabayama S, Kawamura M, Shirahata S. 2011. Suppressive effects of electrolyzed reduced water on alloxan-induced apoptosis and type 1 *diabetes mellitus*. *Cytotechnology* 63, 119–131.
- Liu C, Duan J, Su YC. 2006. Effects of electrolyzed oxidizing water on reducing *Listeria monocytogenes* contamination on seafood processing surfaces. *International Journal of Food Microbiology* 106, 248–253.
- Liu C, Su YC. 2006. Efficiency of electrolyzed oxidizing water on reducing *Listeria monocytogenes* contamination on seafood processing gloves. *International Journal of Food Microbiology* 110, 149–154.
- Mahmoud BS. 2007. Electrolyzed water: a new technology for food decontamination-A review. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 103, 212–221.
- Mai-Prochnow A, Clauson M, Hong J, Murphy AB. 2016. Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Scientific Reports* 6, 38610.
- Middleton AM, Chadwick MV, Sanderson JL, Gaya H. 2000. Comparison of a solution of super-oxidized water (Sterilox®) with glutaraldehyde for the disinfection of bronchoscopes, contaminated *in vitro* with *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-intracellulare in sputum*. *Journal of Hospital Infection* 45, 278–282.
- Nagamatsu Y, Chen KK, Tajima K, Kakigawa H, Kozono Y. 2002. Durability of bactericidal activity in electrolyzed neutral water by storage. *Dental Materials Journal* 21, 93–104.

- Oomori T, Oka T, Inuta T, Arata Y. 2000. The efficiency of disinfection of acidic electrolyzed water in the presence of organic materials. *Analytical Sciences* 16, 365–369.
- Park CM, Hung YC, Lin CS, Brackett RE. 2005. Efficacy of electrolyzed water in inactivating *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on shell eggs. *Journal of Food Protection* 68, 986–990.
- Park H, Hung YC, Brackett RE. 2002a. Antimicrobial effect of electrolyzed water for inactivating *Campylobacter jejuni* during poultry washing. *International Journal of Food Microbiology* 72, 77–83.
- Park H, Hung YC, Kim C. 2002b. Effectiveness of electrolyzed water as a sanitizer for treating different surfaces. *Journal of Food Protection* 65, 1276–1280.
- Park H, Hung YC, Chung D. 2004. Effects of chlorine and pH on efficacy of electrolyzed water for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 91, 13–18.
- Park Seul-Ki, Kim JJ, Yu AR, Lee MY, Park Sang-Kyu. 2012. Electrolyzed-reduced water confers increased resistance to environmental stresses. *Molecular & Cellular Toxicology* 8, 241–247.
- Park Seul-Ki, Park Sang-Kyu. 2013. Electrolyzed-reduced water increases resistance to oxidative stress, fertility, and lifespan via insulin/IGF-1-like signal in *C. elegans*. *Biological Research* 46, 147–152.
- Regulation (EC) N. 648/2004 of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 on detergents. *Official Journal of the European Union*.
- Regulation (EC) N. 852/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on the hygiene of foodstuffs. *Official Journal of the European Union*.

Regulation (EC) N. 2073/2005 of the European Parliament and of the Council of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*

Regulation (EC) N. 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on the classification, labeling and packaging of substances and mixtures. *Official Journal of the European Union*

Regulation (EU) N. 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products. *Official Journal of the European Union*.

Schubert U, Wisanowsky L, Kull U. 1995. Determination of phytotoxicity of several volatile organic compounds by investigating the germination pattern of tobacco pollen. *Journal of Plant Physiology* 145, 514–518.

Serraino A, Veronese G, Alonso S, Matera R, Lugoboni B, Giacometti F. 2010. Bactericidal activity of electrolyzed oxidizing water on food processing surfaces. *Italian Journal of Food Science* 22, 222–228.

Servizio Igiene Nutrizione e Alimenti (SIAN). 2015. <https://sian.aulss9.veneto.it/>. Consultato il 17/10/2021

Sharma RR, Demirci A. 2003. Treatment of Escherichia coli O157:H7 inoculated alfalfa seeds and sprouts with electrolyzed oxidizing water. *International Journal of Food Microbiology* 86, 231–237.

Shimada K. 1997. Changes in the properties of soft and hard oxidized waters under different storage conditions and when in contact with saliva. *The Japanese Society of Periodontology*. 39, 104–112.

Shiroodi SG, Ovissipour M, Ross CF, Rasco BA. 2016. Efficacy of electrolyzed oxidizing water as a pretreatment method for reducing *Listeria monocytogenes* contamination in cold-smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Food Control* 60, 401–407.

- Sicurezza alimentare: l'importanza dell'HACCP • QSM, 2019.
<https://www.qsm.it/organizzazione-aziendale-la-gestione-degli-stakeholder/>.
Consultato il 17/10/2021
- Silhavy, T.J., Kahne, D., Walker, S., 2010. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, a000414.
- Sizar O, Unakal CG. 2021. Gram Positive Bacteria. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Stadtman ER, Levine RL. 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25, 207–218.
- Stevenson SML, Cook SR, Bach SJ, McAllister TA. 2004. Effects of water source, dilution, storage, and bacterial and fecal loads on the efficacy of electrolyzed oxidizing water for the control of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection* 67, 1377–1383.
- Tanaka N, Tanaka N, Fujisawa T, Daimon T, Fujiwara K, Yamamoto M, Abe T, 2000. The use of electrolyzed solutions for the cleaning and disinfecting of dialyzers. *Artificial organs* 24, 921–928.
- Tango CN, Mansur AR, Oh DH. 2015. Fumaric acid and slightly acidic electrolyzed water inactivate gram positive and gram negative foodborne pathogens. *Microorganisms* 3, 34–46.
- Tripathi N, Sapra A. 2021. Gram Staining. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Tomasello F, Pollesel M, Mondo E, Savini F, Scarpellini R, Giacometti F, Lorito L, Tassinari M, Cuomo S, Piva S, Serraino A. 2021. Effectiveness of alkaline electrolyzed water in reducing bacterial load on surfaces intended to come into contact with food. *Italian Journal of Food Safety* 10, 9988.
- Venkitanarayanan KS, Ezeike GO, Hung YC, Doyle MP. 1999a. Efficacy of electrolyzed oxidizing water for inactivating *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*,

and *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4276–4279.

Venkitanarayanan KS, Ezeike GO, Hung YC, Doyle MP. 1999b. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on plastic kitchen cutting boards by electrolyzed oxidizing water. *Journal of Food Protection* 62, 857–860.

Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA. 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 149–167.

Vorobjeva NV, Vorobjeva LI, Khodjaev EY. 2004a. The bactericidal effects of electrolyzed oxidizing water on bacterial strains involved in hospital infections. *Artificial Organs* 28, 590–592.

Vorobjeva NV, Vorobjeva LI, Khodjaev EY. 2004b. The bactericidal effects of electrolyzed oxidizing water on bacterial strains involved in hospital infections. *Artificial Organs* 28, 590–592.

Yang H, Swem BL, Li Y. 2003. The effect of pH on inactivation of pathogenic bacteria on fresh-cut lettuce by dipping treatment with electrolyzed water. *Journal of Food Science* 68, 1013–1017.