

## **INDAGINE SULL'ATTIVITÀ DISINFETTANTE DEI PEROSSIDI IN PRESENZA DI SOSTANZE ORGANICHE E SU BIOFILM BATTERICI**

Giuliano Sansebastiano<sup>1</sup>, Sandra Mezzetta<sup>1</sup>, Alessia Giannoni<sup>1</sup>,  
Franco Brindani<sup>2</sup>, Cristina Bacci<sup>2</sup>, Silvia Bonardi<sup>2</sup>

### *INTRODUZIONE*

La pulizia e la disinfezione sono operazioni essenziali nei processi di lavorazione alimentare e la loro corretta esecuzione influisce in maniera significativa sulla qualità finale del prodotto (15).

Sulle superfici e sulle attrezzature utilizzate nella preparazione degli alimenti si annidano inevitabilmente materiale organico e microrganismi che devono essere rimossi. Il lavaggio e la disinfezione devono essere eseguiti con regolarità considerando anche il tipo di superficie da pulire, di sporco e di contaminazione e i materiali usati per la pulizia.

Per quanto riguarda la disinfezione nell'industria alimentare i composti più frequentemente usati sono sicuramente i perossidi e tra questi il perossido di idrogeno e l'acido peracetico.

Questi composti, anche se sono fortemente diluiti, mantengono la loro efficacia su un ampio spettro di microrganismi, sono relativamente poco tossici per l'uomo e gli animali e non provocano danni all'ambiente (4).

Il perossido di idrogeno è utilizzato nell'industria alimentare per il suo potere ossidante nel confezionamento asettico, con la combinazione di elevate temperature (80°C) ed alte concentrazioni (35%HP) per circa 3-9 secondi (3).

Negli ultimi tempi il perossido di idrogeno (HP) viene utilizzato nella sterilizzazione di serbatoi per latte e succhi di frutta e per decontaminare le mele: infatti un lavaggio effettuato con una soluzione di HP al 5% a 50° C porta ad una riduzione dei microrganismi di 3-4 unità logaritmiche (22).

L'acido peracetico (PAA) è un composto organico in fase liquida che viene utilizzato come sanificante soprattutto nelle industrie alimentari e farmaceutiche.

Possiede delle proprietà simili al perossido di idrogeno, ma con il vantaggio di essere maggiormente solubile nei lipidi e di non essere inattivato dalle catalasi e dalle perossidasi.

Il PAA nell'industria alimentare viene utilizzato per sterilizzare e disinfettare vasche in acciaio inossidabile ed in vetro, per tubazioni, per cisterne adibite al trasporto di sostanze alimentari (10); viene adottato inoltre per la pulizia degli impiant-

---

<sup>1</sup> Istituto di Igiene, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Parma.

<sup>2</sup> Dipartimento di Salute animale, Sez. di Ispezione degli Alimenti di origine animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma

ti di manipolazione di carne e pollame, negli stabilimenti per la conservazione di alimenti in scatola, nei caseifici, nelle fabbriche di birra, vino e bevande non alcoliche (10).

Il PAA è molto utile nei caseifici: a 150-300 ppm di concentrazione è efficace contro i batteriofagi attivi su starter per formaggi e yogurt.

L'azione microbica dei perossidi è influenzata da diversi fattori quali il pH, la temperatura e la presenza di sostanze organiche; un altro aspetto molto importante nell'industria alimentare è rappresentato dal tipo di substrato sul quale agisce il disinfettante quali ad esempio gli aggregati batterici misti a sostanze organiche e inorganiche che costituiscono il cosiddetto biofilm.

In natura i microrganismi sono attirati da superfici solide su cui si depositano e, trovando nutrienti sufficienti per vivere, vi aderiscono e si moltiplicano attivamente formando colonie. Questo accumulo di cellule può ingrandirsi a sufficienza per "intrappolare" detriti organici ed inorganici, nutrienti ed anche altri microrganismi formando, in tal modo, quell'entità che viene definita "biofilm", termine con cui si identifica un'attiva matrice biologica, adesa ad una superficie solida, costituita da cellule batteriche e da sostanze extracellulari (1).

Lo sviluppo di biofilm può verificarsi, praticamente, su qualsiasi superficie in cui siano presenti microrganismi vitali: per la maggior parte di questi, infatti, la presenza di un substrato solido cui aderire è fondamentale per la normale proliferazione. La formazione di un biofilm è, comunque, un processo dinamico e complesso che prevede un susseguirsi di fasi.

Il trasporto di sostanze alimentari all'interno di impianti industriali consente il contatto tra superfici, molecole organiche e microrganismi. L'accumulo di molecole sull'interfaccia liquido-solido determina una maggiore concentrazione di nutrienti rispetto alla fase liquida, favorendo la formazione di un film di "condizionamento" (15) che altera alcune caratteristiche fisico-chimiche della superficie quali idrofobicità e carica elettrostatica (9). La presenza di microscopiche soluzioni di continuità, anche in materiali come l'acciaio inox o il vetro, e la morbidezza di altri (teflon, nylon) favoriscono la ritenzione di cellule batteriche (13). Alcune proteine del siero di latte, inoltre, determinano un aumento dell'adesività ai materiali di cui sopra da parte di molti microrganismi (24).

Inizialmente, alla superficie "condizionata" aderiscono batteri i cui legami con il substrato sono deboli (forze di van der Waals, forze elettrostatiche, interazioni idrofobiche) e le cellule evidenziano ancora movimenti Browniani. A questo stadio l'adesione è ancora reversibile e per rimuovere i microrganismi è sufficiente un risciacquo (19). Successivamente, l'adesione dei batteri diviene molto tenace grazie alla presenza di appendici quali flagelli, fimbrie, pili, alla secrezione di fibrille di esopolisaccaridi nonché all'instaurarsi di legami dipolo-dipolo, legami idrogeno, ionici e covalenti (16). La rimozione delle cellule in questa fase è problematica e si rende necessario spazzolare e raschiare la superficie per ottenere qualche risultato. Le spore batteriche, in particolare, evidenziano una notevole capacità adesiva grazie alla loro elevata idrofobicità ed alla presenza di una struttura lassa e sottile: l'esosporio. Inoltre esse possono germinare, moltiplicarsi e produrre ulteriori quantitativi di esopolisaccaridi consolidando la formazione della pellicola.

L'aderenza dei microrganismi è condizionata dal pH e dalla temperatura, rison-

trandosi un massimo di adesività quando i due parametri prima ricordati si avvicinano a quelli ottimali per una determinata specie.

Le cellule batteriche, adese irreversibilmente, si moltiplicano utilizzando le sostanze nutritive presenti nel film di condizionamento e nel fluido circostante formando delle microcolonie che si fondono tra loro e ricoprono, poco alla volta, tutta la superficie su cui poggiano. In questa fase sono prodotti ulteriori quantitativi di esopolisaccaridi, costituenti principali del glicocalice batterico, struttura che circonda la capsula e lo strato mucoso. Vengono, in tal modo, imbrigliati altri microrganismi facilitando l'ancoraggio delle cellule al substrato e rendendo le colonie meno sensibili alle fluttuazioni dell'ambiente circostante (5). Il glicocalice protegge, infatti, le cellule dalla disidratazione in quanto può trattenere quantitativi di acqua corrispondenti a parecchie volte il suo peso e cederla lentamente.

Un biofilm è, quindi, formato da cellule batteriche vitali in continua crescita, da esopolisaccaridi e da eventuali sostanze organiche o inorganiche intrappolate. La sua formazione è un processo lento, ma si può raggiungere anche lo spessore di qualche millimetro in pochi giorni (20). Generalmente i biofilm formati da colonie eterogenee sono più spessi e più stabili di quelli monospecie (23).

Dopo qualche tempo i batteri adesi al biofilm sono in grado di staccarsi, venendo a costituire una massa indipendente che periodicamente si sfoglia e, con la finalità di sopravvivere e di colonizzare altre nicchie, può dare origine alla formazione di un nuovo biofilm in un altro posto. Questo fenomeno può essere favorito dalle forze di scorrimento del fluido, dalla presenza di determinati composti o dalle caratteristiche delle singole specie batteriche (18, 20).

Nell'industria alimentare il biofilm causa, in genere, notevoli problemi di ordine tecnologico impedendo o rallentando il flusso di calore, aumentando la resistenza di un fluido allo scorrimento, favorendo la corrosione e determinando anche perdite di prodotto (6). Inoltre, dal punto di vista igienico-sanitario esso riduce sensibilmente l'efficacia di un disinfettante convenzionale che riesce a penetrare solo parzialmente nel fitto strato di polimeri per giungere a contatto con le cellule batteriche (7). Va tenuto presente, inoltre, che tali cellule non presentano solamente caratteristiche alterative, ma sono dotate spesso di elevate potenzialità patogene: non di rado viene segnalata la presenza nei biofilm di *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* ed *Escherichia coli* O157:H7 (8, 11, 17, 25)

Il presente lavoro è stato impostato per confrontare l'attività battericida del perossido di idrogeno e dell'acido peracetico nei confronti di *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* ed *Escherichia coli* in assenza e in presenza di sostanze organiche.

In via del tutto preliminare, è stata anche verificata l'azione dei due disinfettanti su biofilm batterici artificialmente preparati con sospensioni di *E. coli*.

## MATERIALI E METODI

### **Disinfettanti**

Sono state usate due preparazioni commerciali concentrate, una di PAA al 35% e l'altra di perossido d'idrogeno (HP) al 30% .

Le concentrazioni dei singoli prodotti sono state determinate con metodica iodometrica.

### ***Preparazione delle soluzioni***

Disinfettanti: tutte le prove sono state eseguite, ad un pH prossimo a 7, utilizzando la soluzione tampone di Sørensen (fosfato monopotassico 1/15 M e fosfato disodico 1/15 M) alla quale vengono aggiunti volumi variabili di PAA o HP a seconda della concentrazione da testare.

Per limitare il più possibile l'autodecomposizione dei principi attivi, le soluzioni sono state preparate pochi minuti prima della prova d'inattivazione, in vetreria lavata con biossido di cloro.

Sostanza organica: il latte, utilizzato come sostanza organica nelle prove di inattivazione, è stato preparato aggiungendo 100 ml di soluzione fisiologica sterile ad una quantità nota di latte in polvere per concentrazioni finali di 0.25%, 2,5% e 25%.

### ***Prove di inattivazione condotte su *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 ed *Escherichia coli* ATCC 25922***

#### ***Curva di taratura dei microrganismi***

Per standardizzare il titolo del microrganismo, dopo averlo fatto crescere in condizioni ottimali in TSB (Tryptone Soya Broth), sono state preparate le diluizioni per la lettura allo spettrofotometro a lunghezza d'onda fissa di 550 nm. Dalla relazione lineare tra i valori di assorbanza così ottenuti ed il titolo corrispondente del microrganismo in brodo (calcolato tramite semina e successiva conta su piastra per ciascun microrganismo di TSA-Tryptone Soya Agar), è stata tracciata una curva di taratura per ciascun microrganismo, da cui ricavare, successivamente, il titolo delle sospensioni batteriche da utilizzare nelle prove di inattivazione.

#### ***Preparazioni delle sospensioni batteriche***

I microrganismi sono stati seminati in TSB (Tryptone Soya Broth) e posti in termostato: *S. aureus* ed *E. coli* a 37°C per 24 ore, *L. innocua* a 32°C per 48 h in modo da ottenere batteri in fase esponenziale di crescita. Prima di sospendere il microrganismo si è proceduto alla lettura dell'assorbanza a 550 nm della sospensione intera o diluita in TSB fino ad ottenere il valore corrispondente al titolo di microrganismo richiesto. Tale corrispondenza è stata ricavata dalle rispettive curve di taratura precedentemente costruite.

Successivamente, per eliminare ogni traccia di sostanze organiche presenti nel brodo, la sospensione è stata centrifugata a 2000 rpm per 5 minuti per permettere la sedimentazione dei microrganismi sul fondo e quindi l'allontanamento del brodo. Si è ripreso il sedimento con soluzione fisiologica sterile con un volume sufficiente ad ottenere il titolo desiderato.

#### ***Prove di presenza o assenza***

In tali prove i titoli dei batteri sono risultati compresi tra  $10^6$  e  $10^7$  ufc/ml.

Le prove di presenza o assenza sono state effettuate, addizionando in beuta, 1 ml di sospensione batterica a titolo noto a 99 ml di soluzione contenente PAA o HP. Dopo 0, 5 e 15 minuti di contatto sono stati trasferiti 5 ml di tali soluzioni in provette contenenti 5 ml di terreno neutralizzante. Trascorsi 10 minuti, necessari per bloccare l'azione di PAA o di HP, si è seminato 1 ml della soluzione neutralizzata in provetta con 9 ml di TSB e 0,1 ml in piastra con TSA per determinare la crescita del bat-

terio. Dopo 24 h a 37°C, per *S. aureus* ed *E. coli*, o 48 h a 32°C per *L. innocua*, si è valutata la presenza/assenza di crescita microbica in piastra e la torbidità/limpidezza del brodo. Ai tempi t0 e t15 di ogni prova è stata effettuata contemporaneamente una titolazione iodometrica per determinare il potere ossidante delle soluzioni di perossidi.

#### *Prove di inattivazione in presenza di sostanze organiche*

In tali prove i titoli dei batteri sono risultati compresi tra  $10^8$  e  $10^9$  ufc/ml.

Le prove di inattivazione sono state condotte aggiungendo, in provetta, 0,25 ml di sospensione batterica a titolo noto a 25 ml di una soluzione costituita da una parte di PAA o di HP e da una parte di latte in polvere reidratato. Tutte le soluzioni sono state mantenute a contatto con i batteri per 0,5 minuti e 3 ore a temperatura ambiente (20°C).

Trascorso il tempo di contatto l'attività battericida è stata bloccata aggiungendo, in provetta, a 2,5 ml di soluzione di campione 2,5 ml di soluzione neutralizzante.

Per stabilire la sopravvivenza dei batteri, dopo l'azione neutralizzante, si è effettuata la semina delle soluzioni su piastre di TSA. Dopo le opportune incubazioni è stata valutata la crescita dei batteri.

Per ogni prova è stata effettuata una titolazione iodometrica ai tempi 0,5 minuti e 3 ore, per valutare il potere ossidante della soluzione di PAA o di HP.

#### *Prove di inattivazione dei biofilm*

Anche in queste prove sono stati utilizzati titoli batterici tra  $10^8$  e  $10^9$  ufc/ml.

Per permettere l'adesione dei microrganismi sono state inserite lastrine di acciaio inox (spessore=2 mm, larghezza=5.25 mm, lunghezza=390 mm), precedentemente sgrassate e sterilizzate, in provette contenenti sospensioni batteriche a titolo noto per 1 ora o 24 ore di contatto a temperatura ambiente, in condizioni statiche (19).

Trascorso il tempo stabilito per la formazione dei biofilm i "coupon" sono stati prelevati, con pinze sterili, risciacquati con acqua distillata sterile, per allontanare i microrganismi non adesi, e successivamente trasferiti in provette contenenti la soluzione disinfettante di PAA o di HP. Trascorsi 10 minuti di contatto il coupon è stato trasferito in soluzione neutralizzante per altri 10 minuti. Infine è stato estratto il coupon ed è stato raschiato con un tampone di cotone sterile che è stato successivamente seminato su TSA; su un'altra serie di piastre è stata posata direttamente la lastrina per evidenziarne la completa pulizia. Trascorsi i necessari tempi di incubazione è stato possibile valutare la crescita o meno del microrganismo trattato.

Dopo aver condotto parallelamente sia la raschiatura che la semina diretta del coupon si è scelto di procedere unicamente secondo quest'ultima procedura; con la raschiatura infatti non era possibile prelevare tutti i microrganismi adesi ed inoltre si è verificata la crescita dei microrganismi anche dove con lo striscio ne era risultata l'inattivazione.

#### *Controlli delle prove di inattivazione*

Per ogni prova sono stati eseguiti diversi controlli.

- a) Controllo dell'avvenuta neutralizzazione dell'acido peracetico e del perossido d'idrogeno

- b) Controllo dell'interferenza delle soluzioni tampone: questo controllo serve per valutare la presenza di un eventuale influenza della soluzione tampone sulla crescita batterica.
- c) Controllo della sterilità del latte: questo controllo è stato necessario per valutare la sterilità del latte in polvere utilizzato per le prove.
- d) Controllo dell'interferenza del latte: per ogni microrganismo in esame e per ogni diversa concentrazione di latte in polvere si esegue una prova, rispettando tempi e passaggi della procedura di inattivazione, senza utilizzare la soluzione disinfettante.
- e) Controllo della vitalità dei microrganismi nel biofilm formato dopo 1 o 24 ore di adesione:

## RISULTATI

### *Prove condotte in assenza di sostanze organiche*

Nelle tabelle da 1 a 6 sono riportati i risultati ottenuti sui 3 microrganismi con diverse concentrazioni di PAA e di HP a diversi tempi di contatto.

Tabella n. 1: Presenza o assenza di *L. innocua* con diverse concentrazioni di acido peracetico.

tempo (min)	6 mg/l	15 mg/l	25 mg/l	30 mg/l	50 mg/l	70 mg/l	90 mg/l
0	+	+	+	+	+	-	-
5	+	+	+	+	-	-	-
15	+	+	-	-	-	-	-

Tabella n. 2: Presenza o assenza di *L. innocua* con diverse concentrazioni di perossido di idrogeno.

tempo (min)	8 g/l	10 g/l	15 g/l	18 g/l	21 g/l	50 g/l
0	+	+	+	+	-	-
5	+	+	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-	-

Tabella n. 3: Presenza o assenza di *S. aureus* con diverse concentrazioni di acido peracetico.

tempo (min)	2 mg/l	6 mg/l	10 mg/l	15 mg/l	20 mg/l	30 mg/l	70 mg/l	80 mg/l
0	+	+	+	+	+	+	+	-
5	+	+	+	-	-	-	-	-
15	+	-	-	-	-	-	-	-

Tabella n. 4: Presenza o assenza di *S. aureus* con diverse concentrazioni di perossido di idrogeno.

tempo (min)	8 g/l	10 g/l	15 g/l	18 g/l	21 g/l	50 g/l
0	+	+	+	+	-	-
5	+	+	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-

Tabella n. 5: Presenza o assenza di *E. coli* con diverse concentrazioni di acido peracetico.

tempo (min)	2 mg/l	4 mg/l	10 mg/l	20 mg/l	25 mg/l
0	+	+	+	+	-
5	+	+	-	-	-
15	+	-	-	-	-

Tabella n. 6: Presenza o assenza di *E. coli* con diverse concentrazioni di perossido di idrogeno.

tempo (min)	0.5 g/l	1 g/l	1.5 g/l	1.8 g/l	5 g/l
0	+	+	+	+	-
5	+	+	+	-	-
15	+	+	-	-	-

Per *L. innocua* la inattivazione completa con PAA è stata ottenuta al tempo 0 con 70 mg/l; è stato peraltro riscontrato un buon andamento lineare tra numero di positività e concentrazione nell'intervallo di tempo 0-15 minuti ( $R^2= 0,93$ ,  $P= 0,001$ ); decisamente più elevata la concentrazione di HP necessaria per la completa inattivazione di *L. innocua* al tempo 0, 21g/l senza un andamento lineare significativo.

Per *S. aureus* la inattivazione completa con PAA è stata ottenuta con 80 mg/l al tempo 0; anche in questo caso è stato riscontrato un buon andamento lineare tra la positività e le concentrazioni nello stesso intervallo 0-15 minuti ( $R^2= 0,53$ ,  $P = 0,024$ ); con HP la completa inattivazione al tempo 0 è stata ottenuta con 21 g/l senza andamento lineare significativo.

*E. coli* è risultato il microrganismo più sensibile: con il PAA l'inattivazione al tempo 0 è stata raggiunta con 25 g/l e con HP con 5 g/l; in entrambi i casi è stato evidente un buon andamento lineare con  $R^2= 0,76$  per il PAA ( $P= 0,034$ ) e  $R^2=0,75$  per HP ( $P= 0,037$ ).

#### ***Prove condotte in presenza di sostanze organiche***

I risultati delle prove condotte in presenza di concentrazioni crescenti di latte in polvere sono riportati nelle tabelle 7-12.

Tabella n. 7: Presenza o assenza di *L. innocua* con diverse concentrazioni di PAA in presenza di percentuali crescenti di latte in polvere.

PAA mg/l	PAA			L1=0.25%			L2=2.5%			L3=25%		
	0	5 min	3 ore	0	5 min	3 ore	0	5 min	3 ore	0	5 min	3 ore
50	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
80	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
130	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
230	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabella n. 8: Presenza o assenza di *L. innocua* con diverse concentrazioni di HP in presenza di percentuali crescenti di latte in polvere.

HP g/l	HP			L1=0.25%			L2=2.5%			L3=25%		
	0	5 min	3 ore	0	5 min	3 ore	0	5 min	3 ore	0	5 min	3 ore
15	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabella n. 9: Presenza o assenza di *S. aureus* con diverse concentrazioni di PAA in presenza di percentuali crescenti di latte in polvere.

PAA mg/l	PAA			L1=0.25%			L2=2.5%			L3=25%		
	0	5 min	3 ore	0	5 min	3 ore	0	5 min	3 ore	0	5 min	3 ore
50	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
230	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Con il PAA, l'andamento delle inattivazioni per i tre microrganismi ha richiesto un deciso aumento delle concentrazioni del disinfettante per ottenere una completa assenza di crescita a tutti i tempi saggiati. Con concentrazioni di latte del 25% per *L. innocua* e *S. aureus* sono necessari 300 mg/l e per *E. coli* 580mg/l.

Decisamente diversa la situazione per HP che sembra risentire in misura minore della presenza della sostanza organica. Sia per *L. innocua* che per *S. aureus* si è osser-

Tabella n. 10: Presenza o assenza di *S. aureus* con diverse concentrazioni di HP in presenza di percentuali crescenti di latte in polvere.

HP g/l	HP			L1=0.25%			L2=2.5%			L3=25%		
	0	5 min	3 ore	0	5 min	3 ore	0	5 min	3 ore	0	5 min	3 ore
15	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabella n. 11: Presenza o assenza di *E. coli* con diverse concentrazioni di PAA in presenza di percentuali crescenti di latte in polvere.

PAA mg/l	PAA			L1=0.25%			L2=2.5%			L3=25%		
	0	5 min	3 ore	0	5 min	3 ore	0	5 min	3 ore	0	5 min	3 ore
15	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
25	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
230	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
580	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabella n. 12: Presenza o assenza di *E. coli* con diverse concentrazioni di HP in presenza di percentuali crescenti di latte in polvere.

HP g/l	HP			L1=0.25%			L2=2.5%			L3=25%		
	0	5 min	3 ore	0	5 min	3 ore	0	5 min	3 ore	0	5 min	3 ore
1.5	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

vata una completa inattivazione dopo 5 minuti di contatto in presenza di concentrazioni di latte dello 0,25, 2,5 e 25%, situazione del tutto sovrapponibile a quella verificatasi in assenza di latte.

Più resistente è *E. coli* la cui inattivazione è stata raggiunta dopo 3 ore di contatto.

#### **Prove sui biofilm**

Le prove sono state condotte su biofilm di 1 ora o di 24 ore di *E. coli*.

Decisamente buona l'azione del PAA con una inattivazione completa sul biofilm di 1 ora dopo 15 minuti di contatto con 10 mg/l; sul biofilm di 24 ore la concentrazione sale a 14 mg/l; tali dati sono del tutto simili a quelli ottenuti con la sospensione batterica.

Più debole l'azione del HP; per la completa inattivazione sia sul biofilm di 1 ora sia sul biofilm di 24 ore è stato necessario impiegare una concentrazione di 8 g/l, superiore a quella necessaria per l'inattivazione di *E. coli* in sospensione.

## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

### **Attività battericida dei perossidi**

Dalle prove di presenza o assenza si è evidenziato che il PAA è più efficace sui batteri Gram negativi che sui batteri Gram positivi: per determinare l'abbattimento di circa 7 unità logaritmiche al tempo 0 sono stati necessari 80 mg/l per *S. aureus* e 70 mg/l per *L. innocua* contro i 25 mg/l sufficienti per *E. coli*.

E' inoltre indubbio come, con il trascorrere del tempo, aumenti anche l'effetto del disinfettante; con 5 minuti di contatto la concentrazione minima battericida di PAA per *L. innocua* scende da 70 a 50 mg/l e a 25 mg/l con 15 minuti: riduzioni pari al 29% (tra t0 e t5) e al 64% (tra t0 e t15) rispettivamente.

L'assenza di *S. aureus*, che si verifica dopo 5 minuti con 15 mg/l, a 15 minuti si osserva con 6 mg/l; la riduzione della concentrazione battericida è del 12,5% nei primi 5 minuti di contatto (tra t0 e t5) ed addirittura del 92,5% dopo 15 minuti (tra t0 e t15).

Per *E. coli* sono sufficienti concentrazioni di PAA decisamente inferiori che diminuiscono ulteriormente con il passare del tempo, da 25 mg/l al tempo 0 si passa a 10 mg/l a 5 minuti ed a 4 mg/l a 15 minuti: la concentrazione di inattivazione cala quindi del 60% nel primo caso e dell'84% nel secondo caso .

Andamento simile ha mostrato l'HP, dopo 5 minuti di contatto, la concentrazione per eliminare *L. innocua* e *S. aureus* scende da 21 g/l a 15 g/l ed addirittura a 8 g/l dopo 15 minuti. Si tratta di diminuzioni rispettivamente del 28,5% e del 62%. Si riscontra l'assenza di *E. coli* dopo 5 minuti di contatto già con 1,8 g/l di HP e dopo 15 minuti con 1,5 g/l, abbassamenti del 64% tra 0 e 5 minuti e del 70% tra 0 e 15 minuti.

Dai risultati ottenuti si può notare la maggiore attività microbica dell'acido peracetico rispetto a quella del perossido d'idrogeno: per una riduzione di 7 unità logaritmiche al tempo 0 sia di *L. innocua* che di *S. aureus* si sono impiegati 21 g/l di HP contro 70-80 mg/l di PAA; lo stesso avviene per *E. coli* per il quale si sono dovuti usare 5 g/l di HP contro i 25 mg/l di PAA.

Da rilevare anche che esiste un intervallo di concentrazioni all'interno del quale i risultati sono simili e il loro incremento non porta ad un miglioramento dell'effetto microbica.

### **Attività dei perossidi in presenza di sostanze organiche**

Sia il PAA sia l'HP stati testati con aggiunta di latte in polvere, a concentrazioni dello 0,25% (L1), del 2,5% (L2) e del 25% (L3).

Dai risultati ottenuti emerge che l'azione del PAA viene notevolmente influenza-

ta dalla presenza di sostanze organiche. L'aumento del suo effetto col passare del tempo resta comunque inalterato, ma le concentrazioni di utilizzazione diventano più elevate in proporzione alle aggiunte di latte eseguite. Per l'inattivazione della *L. innocua* a 5 minuti infatti bastano 50 mg/l di PAA, che però non sono sufficienti in presenza sia di L1 che di L2, con i quali sono necessari 80 mg/l. Il latte allo 0,25% è comunque meno influente, infatti a questa concentrazione l'inattivazione si ottiene anche al tempo 0, mentre con L2 le piastre sono ancora positive.

L'aggiunta di L3 limita fortemente l'azione del PAA e per abbattere il microrganismo bisogna salire fino a 300 mg/l.

*S. aureus* si comporta approssimativamente come *L. innocua*; su entrambi i microrganismi sono state testate, con poche eccezioni, le stesse concentrazioni. Anche in questo caso per l'eliminazione del microrganismo in presenza di L1 e di L3 a t5 si deve passare da 50 mg/l, necessari in assenza di latte, a, rispettivamente, 70 mg/l e 300 mg/l. L'unica differenza tra i due batteri si nota in presenza di L2; in que-

Tabella n. 13: Concentrazioni di PAA utilizzate per l'inattivazione del biofilm.

<b>PAA mg/l</b>	<b>Biofilm 1h</b>	<b>Biofilm 24h</b>
<b>0</b>	+	+
<b>5</b>	+	+
<b>10</b>	-	+
<b>14</b>	-	-
<b>20</b>	-	-
<b>21</b>	-	-
<b>28</b>	-	-
<b>30</b>	-	-
<b>40</b>	-	-
<b>50</b>	-	-

Tabella n. 14: Concentrazioni di HP utilizzate per l'inattivazione del biofilm.

<b>HP g/l</b>	<b>Biofilm 1h</b>	<b>Biofilm 24h</b>
<b>0</b>	+	+
<b>0.6</b>	+	+
<b>1</b>	+	+
<b>2</b>	+	+
<b>3</b>	+	+
<b>4</b>	+	+
<b>8</b>	+	+/-
<b>10</b>	-	-
<b>12</b>	-	-
<b>14</b>	-	-
<b>20</b>	-	-

ste condizioni infatti *S. aureus* viene inattivato con 70 mg/l a t0, mentre per avere lo stesso effetto su *L. innocua* occorrono circa 100 mg/l.

Le prove condotte su *E. coli* hanno dato risultati diversi: 15 mg/l di PAA sono serviti per abbattere la carica batterica a t5, 25 mg/l per lo stesso effetto con L1 e 70 mg/l con L2; quest'ultima concentrazione è ben superiore a quelle impiegate sempre con lo stesso microrganismo nelle prove in assenza di sostanze organiche e si avvicina molto a quelle usate per i Gram positivi. E' interessante come in presenza di L3 per ottenere l'eliminazione della carica microbica sia stato necessario impiegare 580 mg/l di PAA, si tratta quindi di un incremento notevole della minima concentrazione battericida per l'inattivazione al tempo 0 rispetto a quella utilizzata in assenza di latte; questa concentrazione supera notevolmente quelle usate per gli altri due batteri, che invece in assenza di latte si erano dimostrati meno sensibili all'azione del disinfettante.

Eseguito queste prove, ad ogni concentrazione e ad ogni intervallo di tempo è stata eseguita una titolazione iodometrica; dai calcoli sull'ossigeno liberato si è potuto notare che il consumo di ossidante cresce all'aumentare della percentuale di latte aggiunto e col trascorrere del tempo di contatto, mentre diminuisce all'aumentare della concentrazione di acido peracetico impiegato.

I risultati ottenuti con il perossido d'idrogeno indicano che l'azione di questo composto non è particolarmente influenzata dalla presenza di sostanze organiche. Si nota infatti che *L. innocua* e *S. aureus* vengono inattivati con 15 g/l di HP a 5 minuti e con 20 g/l al tempo 0 sia senza aggiunta di latte sia in presenza di L1, L2 ed L3. La carica batterica di *E. coli* viene azzerata con 1,5 g/l in 3 ore di contatto, ma già con 2 g/l è abbattuta al tempo 0 indifferentemente dalla presenza o meno di materiale organico.

Le concentrazioni di utilizzo dell'HP restano comunque molto superiori a quelle di PAA, ma, diversamente da questo, il suo effetto non sembra risentire delle eventuali condizioni di sporcizia.

Essendo nota l'etichetta nutrizionale del prodotto si possono ricondurre le percentuali di latte aggiunto a valori precisi di proteine: L1=0.03% di proteine, L2=0,3% e L3=3%, valori già riportati in letteratura per la simulazione di condizioni di sporcizia (2).

L'influenza del carico proteico è già stata provata ed inoltre si è dimostrato come l'influenza delle proteine cambi molto a seconda della categoria di disinfettante usato e del tipo di microrganismo (14).

Dai risultati ottenuti dalle inattivazioni con PAA si è calcolato il Protein Load Factor (PLF) (Tab.15), rapporto tra la concentrazione minima battericida impiegata

Tabella n. 15: Valori di PLF con diverse percentuali di proteine a due tempi di contatto.

Proteine %	<i>L. innocua</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	0	3ore	0	3ore	0	3ore
<b>0.03%</b>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<b>0.3%</b>	1.25	1.60	1.00	1.40	2.80	4.67
<b>3%</b>	3.75	6.00	4.29	6.00	23.20	38.67

in condizioni di sporco e quella in condizioni di pulizia, seguendo il modello proposto da Bessems (1998), per avere una misura dell'influenza del carico di proteine, cioè dal carico di sostanze organiche sull'attività del disinfettante (14).

Si può notare che con L1 il PLF è uguale a 1 sia a t0 che a t3 con tutti e tre i microrganismi, l'apporto dello 0.03% di proteine non sembra influenzare l'azione dell'acido peracetico. Con l'aggiunta di L2 con *L. innocua* e *S. aureus* il PLF aumenta di poco soprattutto dopo 3 ore di contatto mantenendosi comunque al di sotto di 1,6, mentre con *E. coli* il PLF è uguale a 2,8 a t0 e a 4,67 a t3, quindi le concentrazioni da utilizzare devono essere notevolmente aumentate con un apporto dello 0,3% di proteine.

La presenza del 3% di proteine influisce ulteriormente sulle concentrazioni di disinfettante da usare con un aumento per *L. innocua* e *S. aureus* di almeno 5 volte; per *E. coli* gli incrementi di concentrazione sono decisamente superiori, il PLF è uguale a 23,2 al tempo 0 e a 38,67 a 3 ore.

L'aumento delle concentrazioni di disinfettante (e di conseguenza del PLF) sembra essere correlato linearmente con l'incremento delle percentuali di latte addizionato ( $R^2$  compresi tra 99.92% e 100%).

È interessante notare inoltre che la più alta percentuale di proteine sembra annullare l'effetto legato al tempo di contatto; infatti la concentrazione minima battericida è risultata uguale sia al tempo 0 e al tempo 3 ore, diversamente da quanto rilevato in assenza di latte e con le percentuali più basse, anche se non è da escludere che tale situazione possa essere dovuta alla elevata variabilità delle concentrazioni testate.

Per il perossido d'idrogeno il PLF è risultato uguale a 1 a qualsiasi concentrazione di proteine e con qualsiasi microrganismo, confermando la non influenza del carico organico sull'attività microbica.

Per una buona disinfezione è quindi necessario condurre le operazioni di pulizia preliminare nel modo più adeguato ed accurato possibile, in modo da limitare l'apporto di sostanze organiche, che a bassi livelli non risultano comunque compromettere l'effetto dell'acido peracetico. L'utilizzo di questo composto, nonostante sia così sensibile alla presenza di sporcizia, sembra sempre preferibile considerate le minori concentrazioni minime battericide rispetto a quelle richieste per il perossido d'idrogeno.

### **Attività dei perossidi sul biofilm**

Questo studio, ancora in fase preliminare, è stato condotto per valutare l'efficacia dei due perossidi nell'inattivare biofilm formati da *E. coli* su coupon di acciaio inox.

Le concentrazioni di 10 mg/l e 14 mg/l di PAA, rispettivamente impiegate nelle prove per eliminare il biofilm formatosi in un'ora e in 24 ore, sono risultate di poco superiori a quelle utilizzate nelle prove sui batteri in sospensione a 5 e a 15 minuti, confermando che la presenza del coupon non crea interferenze con il PAA.

L'HP all'1% è necessario, invece, per l'inattivazione sia del biofilm di un'ora sia di quello di 24 ore; lo 0,8% può essere considerata la concentrazione limite per eliminare il biofilm di 24 ore. Con questo disinfettante la minima concentrazione battericida è più elevata di quella per le prove di presenza o assenza, nelle quali con 5 g/l si era raggiunto l'abbattimento totale al tempo 0.

Dai risultati ottenuti l'acido peracetico mostra avere una migliore azione sui biofilm rispetto al perossido d'idrogeno che, non solo deve essere utilizzato a concentrazioni superiori, ma anche a concentrazioni ancora più elevate rispetto alle prove condotte su sospensioni batteriche secondo gli European Suspension Test, ai quali normalmente si fa riferimento per la scelta delle quantità di utilizzo dei disinfettanti; mentre positiva sembra la simile efficacia dell'HP applicato sui biofilm formati in tempi diversi.

Le minime concentrazioni battericida impiegate su biofilm di 1 e di 24 ore di contatto non hanno valori significativamente diversi.

I perossidi hanno dimostrato come, in assenza di sostanze organiche, la loro efficacia aumenti con il tempo di contatto e come sia diversa la loro attività su batteri Gram positivi e Gram negativi, questi ultimi risultano infatti molto più sensibili dei primi, come già riportato in letteratura (3). Sono consigliate quindi concentrazioni battericida intorno ai 100 mg/l per i Gram positivi, da noi testati, e molto inferiori (30 mg/l) per i Gram negativi, come *E. coli*.

Se si opera in condizioni di "sporcizia", condizioni simulate in laboratorio aggiungendo proteine a diverse percentuali, si verifica la minore efficacia dell'acido peracetico: con l'aggiunta di percentuali crescenti di latte, la concentrazione minima battericida deve essere aumentata notevolmente, addirittura di 38 volte per eliminare *E. coli*, che si è rilevato molto più resistente che in assenza di latte. Si nota inoltre con la maggiore concentrazione di proteine una minore rilevanza "dell'effetto tempo di contatto": il materiale organico sembra infatti consumare il potere ossidante del PAA nel tempo impedendogli di inattivare il microrganismo, per cui se questo è presente a t0 lo sarà anche a t3. Ciò si osserva fino ad una concentrazione limite oltre la quale si ha già l'abbattimento a t0. Questo risultato comunque potrebbe anche dipendere dagli scarti tra le concentrazioni testate, piuttosto elevati.

In un'ulteriore simulazione delle condizioni che si possono incontrare in industria, come la formazione di patine all'interno di impianti ed attrezzature, è emersa la buona attività microbica, già riportata in letteratura (21), dell'acido peracetico su tali superfici: per eliminare il biofilm sono state utilizzate le stesse concentrazioni di PAA delle prove su sospensioni batteriche, mentre con HP si è dovuto ricorrere a dosaggi del disinfettante decisamente superiori.

Sarà interessante cercare di determinare anche l'efficacia dei perossidi su altri microrganismi, che frequentemente si ritrovano come contaminanti nelle industrie alimentari correlati alla formazione di biofilm, per migliorare la fase di disinfezione, operazione indispensabile in questo campo per ottenere prodotti commerciali dalle buone qualità microbiologiche. Viene comunque confermato, dagli studi finora svolti, la necessità di fare precedere alla disinfezione una idonea fase di pulizia in modo da ridurre il dosaggio del disinfettante. Inoltre è ribadita, in particolare, in assenza di sporco e su biofilm, l'efficacia dei composti perossidi, dei quali è nota la minore tossicità rispetto ai prodotti a base di cloro che, pur essendo maggiormente attivi, possono determinare la formazione di sottoprodotti tossici.

**Parole chiave:** Acido Peracetico, Idrogeno Perossido, Biofilm

**Key words:** Peracetic Acid, Hydrogen Peroxide, Biofilm

**Stichwörter:** Peressigsäure, Wasserstoffperoxid, Biofilm

**RIASSUNTO** - E' stato condotto uno studio sulla attività battericida dell'acido peracetico e del perossido di idrogeno nei confronti di *L. innocua*, *S. aureus* ed *E. coli*. Le prove sono state condotte su sospensioni batteriche in assenza di sostanze organiche e comparativamente in presenza di concentrazioni crescenti di sostanze organiche, latte in polvere allo 0.025, 0.25 e 2.5%. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza un netto incremento delle concentrazioni di acido peracetico necessarie per l'inattivazione dei tre microrganismi saggiati in presenza della più alta percentuale di latte, da 300 a 580 mg/l. Nessuna particolare influenza del carico organico sull'azione del perossido di idrogeno.

In via del tutto preliminare sono state effettuate prove di inattivazione di biofilm batterici di *E.coli* formati dopo 1 e 24 ore di contatto su piccoli "coupon" di acciaio. L'acido peracetico ha presentato sui biofilm la stessa attività battericida evidenziata sui batteri in sospensione mentre il perossido di idrogeno è risultato molto meno efficace.

**SUMMARY** - It was carried out a study on peracetic acid and hydrogen peroxide bactericidal activity versus *L. innocua*, *S. aureus* and *E. coli*. The trials were carried out on bacteric suspensions free of organic substances and comparatively in presence of organic substances increasing concentrations, powdered milk at 0.025, 0.25 and 2.5%. The obtained results pointed out a clear increase of the peracetic acid concentrations necessary to the inactivation of the three microorganisms tested in presence of the highest percentage of milk, 300 to 580 mg/l. No particular influence of the organic load on the hydrogen peroxide action. As quite preliminarily were carried out inactivation trials of bacteric biofilms of *E. coli* formed after 1 and 24 contact hours on little steel "coupons". The peracetic acid showed on the biofilms the same bactericidal activity pointed out on the bacteria in suspension meanwhile the hydrogen peroxide resulted much less effective.

**ZUSAMMENFASSUNG** - Die bakterizide Wirkung von Peressigsäure und Wasserstoffperoxid gegen *L. innocua*, *S. aureus* und *E. coli* wurde geforscht. Die Untersuchungen wurden auf Bakteriensuspensionen ohne organischen Stoffen und vergleichend mit steigenden Konzentrationen von organischen Stoffen - Milchpulver zu 0.025, 0.25 und 2.5% - durchgeführt. Aus den Ergebnissen stellte sich heraus, dass die für die Inaktivierung der 3 untersuchten Mikroorganismen erforderliche Peressigsäurekonzentration mit der höchsten Milchkonzentration entschieden steigt - von 300 auf 580 mg/l. Kein besonderer Einfluss der organischen Konzentration auf die Wirksamkeit von Wasserstoffperoxid wurde festgestellt. Einleitend wurden Inaktivierungstests von *E.coli* Bakterienfilmen durchgeführt, die nach 1 bzw. 24 Stunden Berührung auf kleinen Stahl-Probepplatten sich geformt hatten. Peressigsäure hatte auf die Biofilmen dieselbe bakterizide Wirkung wie auf die Bakterien in Suspension, während Wasserstoffperoxid zeigte sich deutlich weniger wirksam.

## BIBLIOGRAFIA

1. BAKKE R., TRULEAR M.G., ROBINSON J.A., CHARACKLIS W.G. (1984): Activity of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms: steady state. *Biotechnol. Bioeng.* **26**:1418-1424.
2. BESSEMS E. (1998): The effect of practical conditions on the efficacy of disinfectants. *International Biodeterioration & Biodegradation* **41**:177-183.
3. BLOCK S.S. (1991): Disinfection, sterilization and preservation. Ed. Lea and Febiger, Philadelphia-London.
4. CAVADORE A, MASSA G., BIENTINESI P., MARTIGNONI P. (1993): Acido peracetico-Oxymaster: disinfezione acque reflue urbane di un depuratore cittadino – esperienze industriali all’impianto di Cesena. *Ingegneria Sanitaria-Ambientale* 23-7.
5. CHARACKLIS W.G., MARSHALL K.C. (1990): *Biofilms*. John Wiley, New York, USA.
6. CRIADO M.T., SUAREZ B., FERREIROS C.M. (1994): The importance of bacterial adhesion in the dairy industry. *Food Technol.* **48**:123-126.
7. DE BEER D., SRINIVAN R., STEWART S. (1994): Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl. Environ. Microbiol. Hyg. B* **183**:549-563.
8. DEVANTII R., WONG A.C.L. (1995). Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *Int. Food Microbiol.*, **26**, 147-164.
9. DICKSON J.S., KOOHMARAIE M. (1989): Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:832-836.
10. DYEHDALA G.R. (1988): New Hydrogen peroxide-peroxyacetic acid disinfectant. Proc. 4<sup>th</sup> Conf. Prog. Chem. Disinfection, Binghamton, NY, 315-42. In Block S.S. (1991): Disinfection, sterilization and preservation. Ed. 1991, Lea and Febiger, Philadelphia-London.
11. FARBER J.M., PETERKIN P.I. (1991). *Listeria monocytogenes* a food borne pathogen. *Microbiol. Rev.*, **55**:476-571.
12. FORSYTE S.J., HAYES P.R. (1998): Food hygiene microbiology and HACCP. Chapman & Hall food science book, Aspen publisher inc., Gaithersburg, Maryland.
13. GANESH KUMAR C., ANAND S.K. (1998): Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* **42**:9-27.
14. HOLTON J., NYE P., McDONALD V. (1994): Efficacy of selected disinfectants against mycobacteria and cryptosporida. *J. Hosp. Infect.* **27**(2) :105-115.
15. HOOD S.H. ZOTTOLA E.A. (1997): Growth media and surface conitioning influence the adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* cells to stainless steel. . *J. Food Prot.* **60**:1034-1037.
16. JONES G.W., ISAACSON R.E. (1983): Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **10**:229-260.

17. Kumar C.G., Singh R.S. (1994). *Yersinia enterocolitica*, as an emerging foodborne pathogen – a review. *Indian J. Dairy Sci.*, **47**, 537-544.
18. MARSHALL K.C. (1992): Biofilms: an overview of bacteria adhesion, activity and control at surfaces. *Am. Soc. Microbiol. News* **58**:202-207.
19. MARSHALL K.C., STOUT R., MITCHELL R. (1971): Mechanisms of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *J. Gen. Microbiol.* **68**:337-348.
20. MELO L.F., BOTT T.R., FLETCHER M., CAPDEVILLE B. (1992): Biofilms: Science and Technology. In: NATO ASI series E, Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.
21. ROSSONI E.M.M., GAYLARDE C.C. (2000): Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents fo stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *International Journal of Food microbiology* **61**:81-85.
22. SAPERS GM. (1999): Research on decontamination of apples by washing with detergents and sanitizing agents. FDA/Center for Food Safety & Applied Nutrition.
23. SIEBEL M.A., CHARACKLIS W.G. (1991): Observations of binary population biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* **37**:778-789.
24. SPEERS J.G.S., GILMOUR A. (1985): The influence of milk and milk coponents on the attachment of bacteria to farm dairy equipment surfaces. *J. Appl. Bacteriol.* **59**:325-332.
25. Stern N.J., Kazmi S.U. (1989). *Campylobacter jejuni*. In: Doyle M.P. (Ed.), *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, New York, pp.71-110.