

KLIN-AIR

PER L'ARIA PERFETTAMENTE LAVATA

RELAZIONI UNIVERSITARIE
UNIVERSITÀ DI PADOVA - MEDICINA AMBIENTALE
UNIVERSITÀ DI UDINE - SCIENZE DEGLI ALIMENTI



in collaborazione con



INDICE

	Pag.
UNIVERSITA' DI PADOVA - Medicina Ambientale	
❖ Relazione sull'attività microbica di ionizzatori dell'aria e misura delle emissioni di ozono	2
➤ Attività microbica	2
▪ Metodologia sperimentale adottata	2
▪ Risultati	5
▪ Discussione	6
➤ Misurazione dell'ozono	7
▪ Metodologia sperimentale adottata	7
▪ Risultati	7
▪ Discussione	7
➤ Conclusioni	7
❖ Prove in bianco per la ricerca di muffe nell'aria	8
❖ Prove di efficacia dello ionizzatore su legionella	9
❖ Foto riduzione del contenuto microbico inoculato in piastre esposte all'effetto dello ionizzatore di aria Bioxigen	10
UNIVERSITA' DI UDINE - Scienze degli alimenti	
❖ Decontaminazione di superfici di strutture e attrezzature utilizzate in aziende alimentari attraverso l'impiego di apparecchi ionizzatori	11
➤ Riassunto, summary, introduzione	11
➤ Materiali e metodi	14
▪ Prova trattamento ionizzante su pannello simulante la parete di celle utilizzate in ambito alimentare	14
▪ Trattamento di substrati simulanti superficie a diretto contatto con gli alimenti	14
➤ Risultati e discussione	15
▪ Prova trattamento ionizzante su pannello simulante la parete di celle utilizzate in ambito alimentare	15
▪ Trattamento di substrati simulanti superficie a diretto contatto con gli alimenti	16
➤ Conclusioni	18
➤ Bibliografia	19
❖ Impiego di apparecchio ionizzatore per la decontaminazione dell'aria	20
➤ Riassunto, summary, introduzione	20
➤ Materiali e metodi	23
➤ Risultati e considerazioni	23
➤ Conclusioni	25
▪ Tabelle fasi principali lavorazioni del prosciutto di San Daniele e percentuale microrganismi inattivati dopo trattamento con ionizzatore sistema Bioxigen	26
▪ Grafici variazioni medie concentrazioni	26
• lieviti e muffe	26
• batteri	26
➤ Bibliografia	28

Padova, 19 febbraio 2004

Spett.
Sital Klima
Via L. da Vinci, 26
31021 Mogliano Veneto (TV)

RELAZIONE SULLA ATTIVITA' MICROBICIDA DI IONIZZATORI DELL'ARIA E MISURA DELLA EMISSIONE DI OZONO

Alcune apparecchiature della Ditta sono state sottoposte a prova sperimentale al fine di valutare la loro attività microbica e per misurare la quantità di ozono eventualmente emessa.

In particolare si tratta di ionizzatori dell'aria aventi le seguenti caratteristiche:

Modello C, a 2 tubi con potenza per singolo tubo di 2 W (potenza complessiva 4W) ed alimentazione a 230 – 250 V, per la determinazione della produzione di ozono.

Per la determinazione dell'attività microbica si sono utilizzati i modelli F + C, numeri tubi 1 + 1 (potenza tubo F = 7 W e potenza tubo C = 2 W, con potenza totale di 9 W; alimentazione a 230 – 250 V.

METODOLOGIA SPERIMENTALE ADOTTATA

Attività microbica

Al fine di valutare l'attività microbica degli ionizzatori si è deciso di saggiare la loro efficacia su i seguenti ceppi microbici:

- Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- Escherichia coli* ATCC 25922
- Saccharomyces cerevisiae*

L'apparecchiatura è stata sistemata in una stanza, momentaneamente in disuso, del laboratorio di microbiologia del Dipartimento di Medicina Ambientale e Sanità pubblica, sede di Igiene, dell'Università degli Studi di Padova. La stanza ha una cubatura di circa 75 m³ ed è attrezzata con i classici arredi di laboratorio.

Lo ionizzatore è stato appeso, rovesciato, sopra un tavolo ad una distanza di circa un metro e mezzo dalla superficie del tavolo stesso. Sul tavolo venivano quindi esposte le piastre di Petri, aperte, contenenti un terreno di coltura sul quale erano stati posti i microrganismi.

I microrganismi venivano esposti all'azione dello ionizzatore per diversi periodi di tempo: per 3 ore, per 8 ore o per 24 ore.

Ogni prova prevedeva l'allestimento di piastre di Petri di controllo che, ovviamente, non venivano esposte alla ionizzazione ma restavano alle stesse condizioni ambientali e per lo stesso periodo di tempo delle prove in una stanza vicina, appoggiate e coperte su di un tavolo.

Per ogni prova e per ogni microrganismo venivano allestite 10 capsule di Petri per la esposizione alla ionizzazione più altre 10 per il controllo.

Le prove effettuate sono riassunte nel seguente schema:

Primo ciclo di prove

Ionizzatore modello F con manopola di intermittenza posizionata in posizione “minimo” e con finestre chiuse:

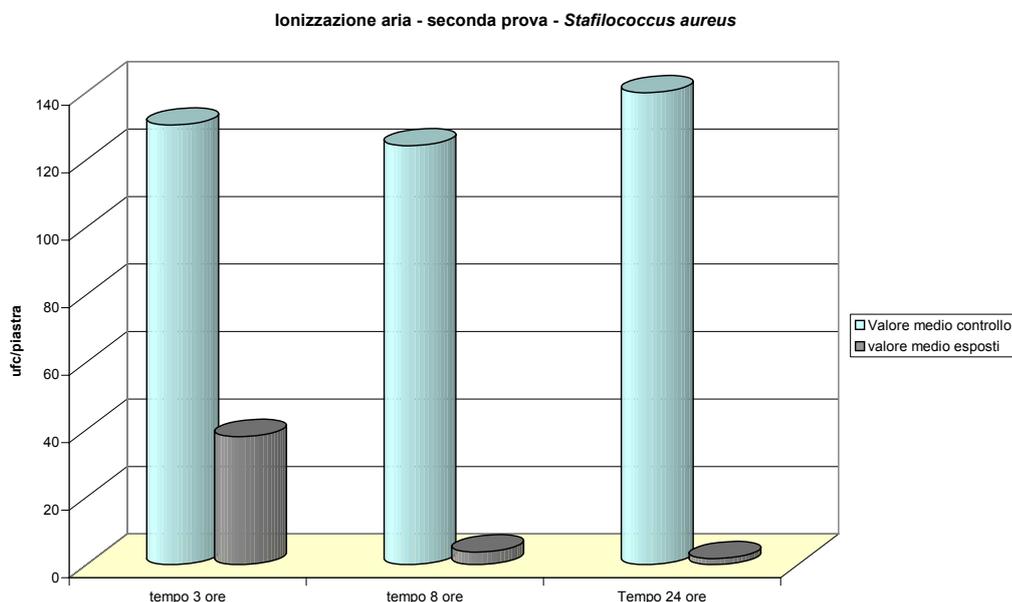
La tabella riporta i dati medi ottenuti alla prima prova. Il dimensionamento non corretto ha comportato un effetto non rilevabile.

Stafilococcus aureus	Valore medio controllo	valore medio esposti	Abbattimento %
Tempo 0	1,3	---	
tempo 3 ore	0,8	1,4	-75,00
tempo 8 ore	1,3	1,8	-38,46
Tempo 24 ore	0,7	1,7	-142,86
Escherichia coli	Valore medio controllo	valore medio esposti	Abbattimento %
Tempo 0	3,4	---	
Tempo 3 ore	3,9	3,9	0
Tempo 8 ore	4,8	4	16,67
Tempo 24 ore	2,9	2,3	20,69
Saccaromices cerevisiae	Valore medio controllo	valore medio esposti	Abbattimento %
Tempo 0	186,7	---	
Tempo 3 ore	98,5	113,5	-15,23
Tempo 8 ore	175,2	179,4	-2,40
Tempo 24 ore	110,2	109,1	1,00

Secondo ciclo di prove

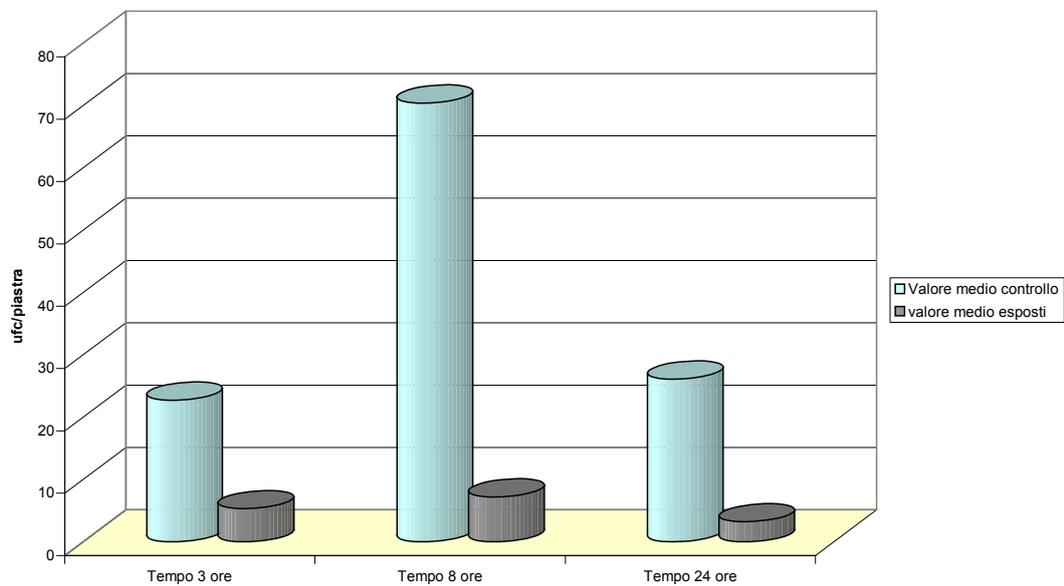
Potenziamento dello ionizzatore modello F con aggiunta di una seconda apparecchiatura, modello C. Una finestra è stata tenuta parzialmente aperta. I dati riportati rappresentano i valori medi ottenuti alla seconda prova dove è stato aggiunto uno strumento rispetto alla prova precedente; in questo caso è evidente il forte abbattimento ottenuto con tutti e tre i ceppi considerati

Stafilococcus aureus	Valore medio controllo	valore medio esposti	Abbattimento %
Tempo 0	122,4	---	
tempo 3 ore	130,2	37,9	70,89
tempo 8 ore	124,1	3,7	97,02
Tempo 24 ore	139,8	1,7	98,78



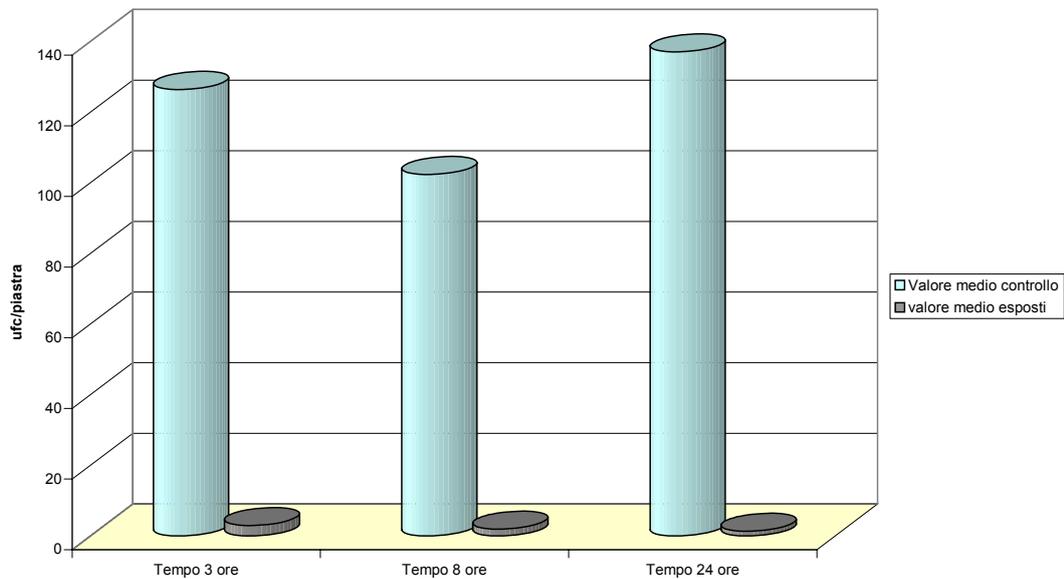
Escherichia coli	Valore medio controllo	valore medio esposti	Abbattimento %
Tempo 0	16,8	---	
Tempo 3 ore	22,7	5,3	76,65
Tempo 8 ore	70,4	7,2	89,77
Tempo 24 ore	26,1	3,2	87,74

Ionizzazione aria - seconda prova - E.coli



Saccaromices cerevisiae	Valore medio controllo	valore medio esposti	Abbattimento %
Tempo 0	116,2	---	
Tempo 3 ore	126,4	2,9	97,71
Tempo 8 ore	102,3	1,9	98,14
Tempo 24 ore	137	1,3	99,05

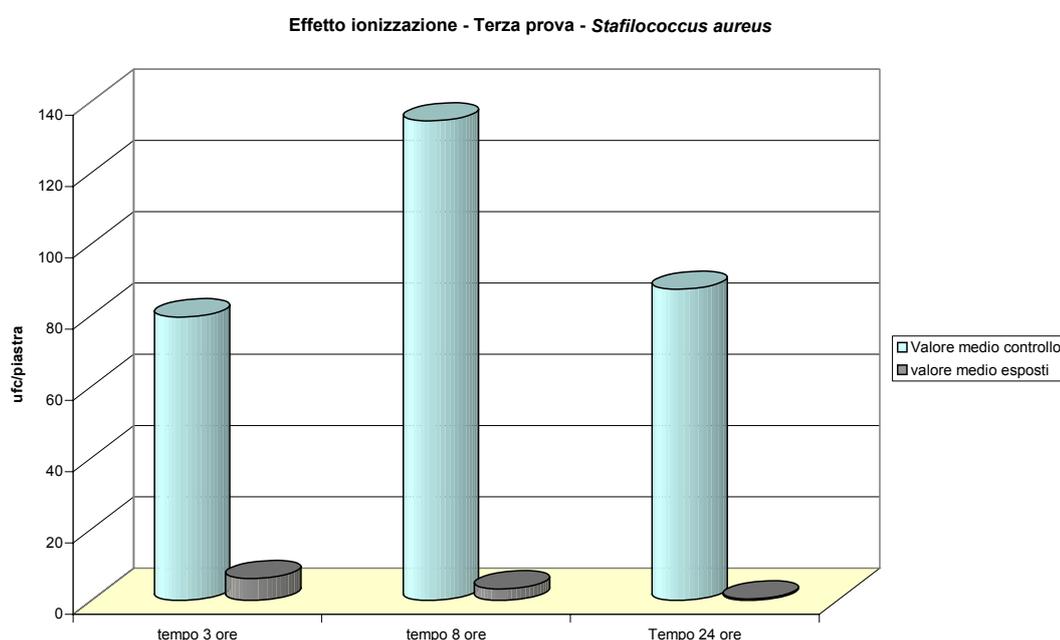
Ionizzazione aria - seconda prova - Saccaromices cerevisiae



Terzo ciclo di prove

Stesse condizioni dello ionizzatore del secondo ciclo ma con le finestre chiuse. La terza prova è stata effettuata solamente utilizzando lo stafilococcus aureus per verificare la seconda prova che aveva dato una riduzione dopo 3 ore in linea con gli altri ceppi microbici. Il forte tasso di abbattimento già dopo 3 ore è stato confermato.

Stafilococcus aureus	Valore medio controllo	valore medio esposti	Abbattimento %
Tempo 0	75,1	---	
tempo 3 ore	79,5	6,1	92,33
tempo 8 ore	134,5	3,2	97,62
Tempo 24 ore	87,3	0,4	99,54



Per la semina dei microrganismi sono stati prodotti brodi colturali in Tryptic Soy Broth per *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e in Sabouraud Broth per *Saccharomyces cerevisiae*. Sulla superficie delle piastre di Petri contenenti l'adatto terreno di crescita per i singoli microrganismi veniva distribuito 0.1 ml dello specifico brodo opportunamente diluito.

In particolare i terreni utilizzati sono stati il PCA (Plate Count Agar) per *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e Sabouraud Agar per *Saccharomyces cerevisiae*.

Al termine di ogni prova le piastre venivano incubate ad idonea temperatura in termostato: per *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* la temperatura era di 37°C, mentre per *Saccharomyces cerevisiae* era di 30°C.

RISULTATI

I risultati ottenuti dalla esposizione delle piastre di Petri contaminate con quantità controllate di microrganismi all'azione dello ionizzatore sono riassunti nelle tabelle allegate.

In particolare, nella Tabella 1 vengono riportati i risultati relativi al primo ciclo di prove effettuate rispettivamente con *Staphylococcus aureus* (pag. 1), *Escherichia coli* (pag. 2) e *Saccharomyces cerevisiae* (pag. 3).

Con riferimento al secondo ciclo di prove, in Tabella 2 vengono riportati i dati relativi a *Stapylococcus aureus* (pag 1), quelli relativi a *Escherichia coli* (pag. 2 e 3) e quelli relativi a *Saccharomices cerevisiae* (pag. 4 e 5).

Infine, in Tabella 3 sono descritti i risultati ottenuti con *Stapylococcus aureus* nel terzo ciclo di prove.

DISCUSSIONE

Primo ciclo di prove

Prima dell'inizio delle prove sono state esposte delle piastre di Petri contenenti Sabouraud Agar per la valutazione della presenza nell'ambiente di forme microbiche, con particolare attenzione alle muffe. I risultati di questa esposizione hanno evidenziato una presenza di muffe di circa 20 UFC in media per piastra tra muffe e colonie batteriche.

Successivamente si è proceduto alle prove di esposizione alla ionizzazione con le modalità sopra descritte.

Il primo ciclo di prove non ha dimostrato alcuna azione microbica apprezzabile da parte dello ionizzatore.

Infatti, considerando il conteggio delle colonie per i tre microrganismi testati non si osservano riduzioni quantitative tra i controlli e le piastre esposte: anzi, in qualche caso si osserva un aumento, anche se non sensibile, delle forme microbiche nelle piastre esposte.

Inoltre, nelle piastre esposte si è notata l'apporto di forme microbiche diverse da quelle testate, quali muffe e batteri di altre specie. Ciò porterebbe ad evidenziare una scarsa azione non solo sulle forme microbiche considerate ma anche su quelle ambientali.

Secondo ciclo di prove

Le condizioni sperimentali adottate per il secondo ciclo di prove sono state modificate mediante l'aumento di potenza dello ionizzatore utilizzato e l'aggiunta di una seconda macchina, per una potenza totale di 9 W. Inoltre, una finestra è stata tenuta parzialmente aperta al fine di consentire un sensibile ricambio d'aria.

I risultati ottenuti da queste prove hanno evidenziato, al contrario di quanto visto nelle prime prove, una notevole azione microbica delle macchine.

Infatti, come è evidente nella Tabella 2 (pag. 1, 2, 3, 4, 5), l'abbattimento di tutti e tre i microrganismi testati è risultato consistente, pari in alcuni casi a più del 90%.

Rimane comunque da segnalare, anche durante queste prove, un apporto di microrganismi ambientali sulle piastre esposte, andando così ad aumentare le forme microbiche presenti.

Comunque, tenendo anche conto di questi nuovi apporti, la differenza quantitativa tra le piastre di controllo e quelle esposte rimane consistente a favore di queste ultime.

Terzo ciclo di prove

Il terzo ciclo di prove ha considerato l'azione della ionizzazione su *Staphylococcus aureus* in condizioni identiche a quelle adottate nel secondo ciclo di prove con l'eccezione della finestra chiusa.

I risultati ottenuti confermano quanto visto nel secondo ciclo di prove.

Si sottolinea il fatto che con la finestra chiusa l'apporto di forme microbiche esogene è risultato sensibilmente minore, come si vede in Tabella 3.

Misurazione dell'ozono

METODOLOGIA SPERIMENTALE ADOTTATA

L'apparecchiatura Modello C è stata sistemata per la prima prova in una stanza della cubatura di circa 200 m³, adibita a studio e con la porta di ingresso aperta e, successivamente, per una seconda prova in una stanza più piccola (circa 60 m³) con la porta chiusa.

La determinazione dell'ozono è stata effettuata mediante l'esposizione negli ambienti considerati di tre campionatori per ambiente, costituiti da cartucce chemioadsorbenti Mod. Radiello (Fondazione Maugeri) e con successiva lettura spettrofotometrica.

Le prove sono state precedute dall'esposizione di tali campionatori in assenza di funzionamento della macchina, al fine di determinare il valore del fondo ambientale: sono state effettuate due prove, una per ogni stanza, ciascuna delle durata di 24 ore.

Successivamente si è proceduto alla rilevazione dell'ozono con la macchina in funzione nella prima stanza: il periodo di esposizione è stato di 20 ore. E' da sottolineare che la porta è rimasta aperta per sole quattro ore: successivamente, a causa dell'odore prodotto dall'apparecchiatura, la porta è stata chiusa.

La seconda prova, effettuata nell'ambiente chiuso e di dimensioni ridotte, ha avuto una durata di 24 ore.

RISULTATI

I risultati ottenuti, espressi come valori medi per il tempo di esposizione, sono illustrati nella tabella seguente:

Locale	Esposizione (ore)	Ozono $\mu\text{p}/\text{m}^3$
Stanza 1 (valore di fondo)	24	Non rilevabile
Stanza 1	20	60.8
Stanza 2 (valore di fondo)	24	Non rilevabile
Stanza 2	24	94.2

DISCUSSIONE

Le prove effettuate per la misurazione dell'ozono prodotto dalla apparecchiatura indicano una produzione non indifferente, anche se entro i limiti di legge.

CONCLUSIONI

Le apparecchiature testate hanno mostrato nelle prove successive al primo ciclo di prova una notevole azione di abbattimento delle cariche microbiche.

Probabilmente tale cambiamento è dovuto al potenziamento della macchina che ha consentito una più forte azione nei confronti dei microrganismi.

IL RESPONSABILE DELLE ANALISI
(Prof. Giorgio Moretti)

IL RESPONSABILE DELLA SEDE
(Prof. Giuseppe Rausa)



Padova, 24 marzo 2004

Spett.
Sital Klima
Via L. da Vinci, 26
31021 Mogliano Veneto (TV)

Oggetto: - Prove in bianco per la ricerca di muffe nell'aria
- Prove di efficacia dello ionizzatore su *Legionella*.

1. Prove in bianco per la ricerca di muffe nell'aria.

Sono state effettuate alcune misure al fine di valutare l'entità delle muffe presenti nell'aria della stanze dove si svolgevano le prove relative al funzionamento dello ionizzatore.

Nella stanza A, dove era stato posizionato lo ionizzatore, tenuto acceso in continuo e con la finestra della stanza aperta a battente per consentire il regolare flusso d'aria, sono state posizionate sei piastre Petri, aperte e contenenti il terreno Sabouraud Destrose Agar: dopo tre ore di esposizione, tre delle piastre esposte sono state prelevate, chiuse e poste in termostato a 30°C, mentre le altre tre sono state rimosse dopo un tempo di esposizione pari a 24 ore.

Nella stanza B, dove non era stato posto alcun ionizzatore, si è proceduto allo stesso modo di come è stato fatto nella stanza A: l'unica differenza era l'assenza di ionizzatore.

In Tabella 1 sono riportati i risultati ottenuti.

Stanza A con ionizzatore		Stanza B senza ionizzatore	
3h	24h	3h	24h
3m + 4b	20m	15m + 4b	17m + 4 b
9m	9m	16m + 3b	7m + 4b
1b	6m	11m + 4b	18m + 3b

m = muffe b = batteri

Tabella 1

Dai risultati si può notare come anche nella stanza in cui era in funzione lo ionizzatore si registra la presenza di muffe, anche se in quantità minore rispetto alla stanza B senza ionizzatore.

2. Prove di efficacia dello ionizzatore su *Legionella*.

E' stata allestita una prova sperimentale al fine di valutare l'efficacia dello ionizzatore nei confronti di *Legionella pneumophila* sospesa in ambiente acquoso.

Un litro di acqua è stato inquinato con *Legionella pneumophila ssp pneumophila* ATCC 33152 in quantità pari a 1.920.000 UFC/L.

Nell'acqua è stata inserita l'apparecchiatura, consistente nello ionizzatore, fornita dalla Ditta Sital Klima, e messa in funzione. Dopo 5, 15, 30 e 60 minuti sono state effettuate tre serie di prelievi di acqua nella misura di 0.1 ml ciascuno e quindi esaminati per la presenza di *Legionella* mediante semina in BCYE α Agar. Dopo una incubazione di sette giorni a 37°C in presenza di 2.5% CO₂, si è proceduto alla conta delle colonie.

Prima dell'inoculo di *Legionella* nell'acqua si è provveduto a verificare l'assenza di tale microorganismo nell'acqua stessa.

I risultati sono riassunti in Tabella 2.

	UFC/0.1 ml	UFC/L
Controllo negativo	0 - 0 - 0	0
Controllo positivo	191 - 217 168	1.920.000
Dopo 5'	180 - 164 -161	1.680.000
Dopo 15'	3 - 5 - 5	43.000
Dopo 30'	0 - 0 - 0	
Dopo 60'	0 - 0 - 0	

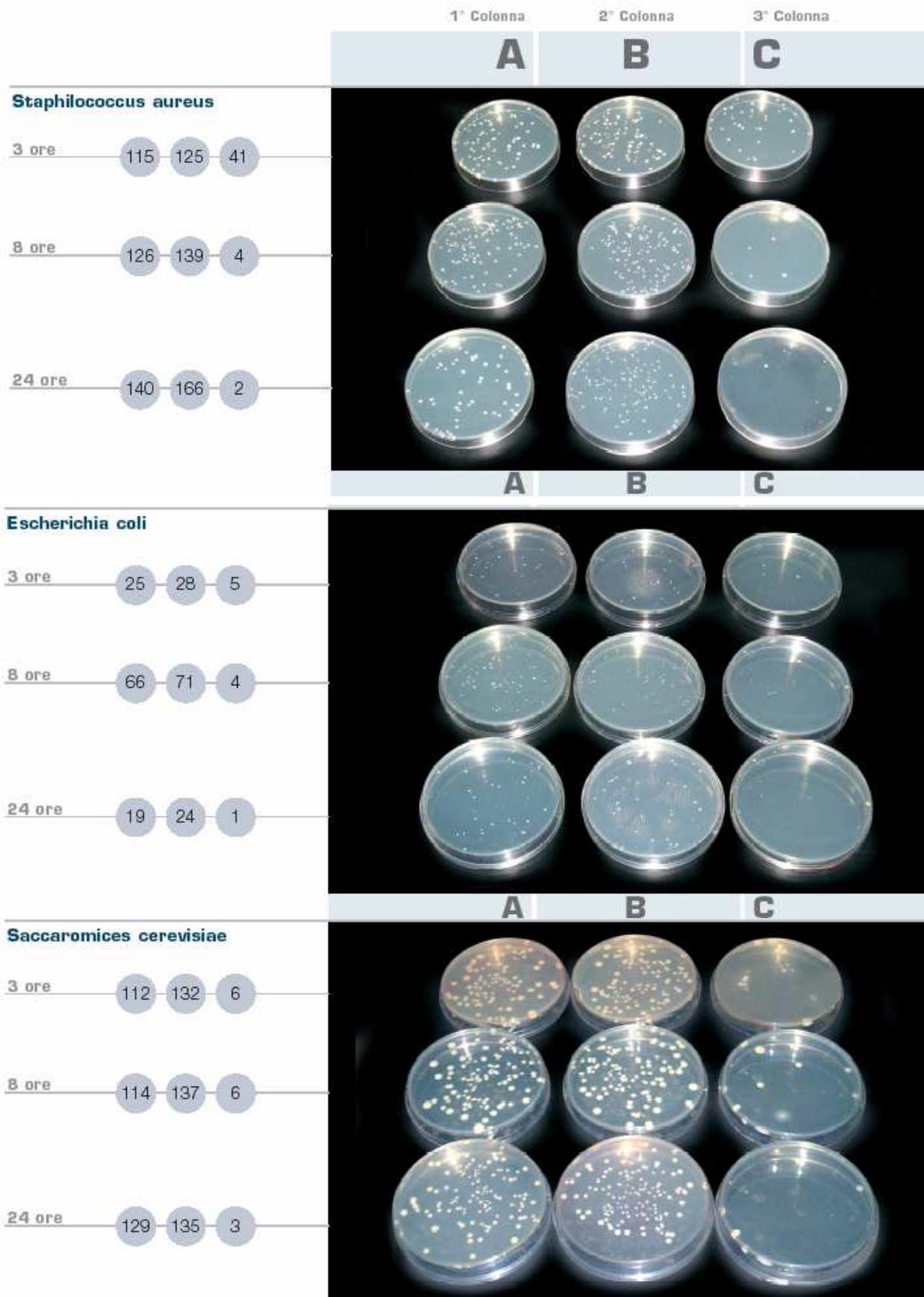
I risultati indicano una notevole e rapida diminuzione della carica microbica, tanto che dopo soli 30 minuti non è stata rilevata più la presenza di *Legionella* nei campioni esaminati.

IL RESPONSABILE DELLE ANALISI
(Prof. Giorgio Moretti)

IL RESPONSABILE DELLA SEDE
(Prof. Giuseppe Rausa)

Foto della riduzione del contenuto microbico inoculato in piastre esposte all'effetto dello ionizzatore di aria BIOXIGEN

- A** Piastra zero con UFC inoculate
- B** Piastra di controllo non esposta al trattamento
- C** Piastra esposta al trattamento BIOXIGEN





Università degli Studi di Udine

Decontaminazione di superfici di strutture e attrezzature utilizzate in aziende alimentari attraverso l'impiego di apparecchi ionizzatore.

Giuseppe Comi, Milena Osualdini, Marisa Manzano, Andrea Lovo¹, Nadia Bortolussi¹, Alessandro Berton² e Giacomina Bustreo²

Dipartimento Scienze degli Alimenti, Università degli Studi di Udine, via Marangoni 97, 33100 Udine.

¹Alimentaria srl, Via Rizzardi, 95, 30175 Venezia-Marghera (Venezia).

²Sistema Bioxigen, SitalKlima srl, Via L. da Vinci, 26, 31021 Mogliano Veneto (Treviso).

RIASSUNTO

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di ridurre la carica microbica di superfici di celle di stoccaggio di prodotti alimentari e di attrezzature per conservare e manipolare alimenti attraverso l'impiego di apparecchi ionizzatori statici e dinamici (sistema Bioxigen, SitalKlima). Il trattamento consisteva nella ionizzazione dell'aria di una cella in cui erano posti dei pannelli e delle stoviglie contaminate intenzionalmente e simulanti superfici di celle o attrezzature impiegate nell'industria alimentare. I microrganismi utilizzati nel test comprendevano *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Saccharomyces cerevisiae*. Dai dati è emerso che il trattamento produceva una diminuzione media in percentuale superiore al 99% delle popolazioni microbiche inoculate. Le conte post-trattamento permettevano di ottenere un grado di decontaminazione pari o superiore a 3-4 unità logaritmiche; la contaminazione residua, sempre inferiore a 1 unità log/cm², è ritenuta ottimale per le superfici di questi ambienti di produzione o di superfici a contatto con alimenti.

SUMMARY

Our aim was to decrease the microbial concentration of the surfaces of rooms or items of food factories, by a ionization system. The surfaces of these rooms or items were treated with ionizer machine (Sitalklima company for twenty-four hours. Suspensions of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Saccharomyces cerevisiae* were intentionally plated on different surfaces simulating the surfaces of rooms or items. After the treatment less than 1% of the initial microbial population added was detected. So after ionization, the concentration of these population on the surfaces was less than 1 log unity/cm², demonstrating that the treatment allowed to reach acceptable values of surface contamination for food industry.

INTRODUZIONE

La sanificazione delle attrezzature e degli ambienti di produzione è uno dei mezzi più efficaci per prevenire e ridurre il rischio di patologie prodotte dagli alimenti. Le tradizionali metodiche utilizzate consistono nell'applicazione di tecniche di pulizia-sanificazione basate sull'impiego di detergenti e di disinfettanti. In particolare i sanitizzanti vengono spruzzati sulle superfici di attrezzature e di ambienti e lasciati a contatto per tempi diversi a seconda della tipologia dell'agente microbico. Le attrezzature dopo detersione e risciacquo in acqua potabile possono anche essere completamente immerse nel disinfettante. In entrambi i casi il tempo di contatto dipende dalla concentrazione e dalla tipologia del disinfettante. Inoltre a fine contatto la superficie viene risciacquata con acqua potabile allo scopo di eliminare i residui di disinfettante; residui che potrebbero venire assorbiti dall'alimento e quindi essere ingeriti dall'uomo provocando così sindromi allergiche.

Tali tecniche pur essendo considerate efficaci ai fini di eliminare il livello di microrganismi e patogeni dagli ambienti di produzione possono presentare dei limiti dovuti a fattori intrinseci alla superficie da sanificare o al microrganismo. Infatti l'efficacia del sanitizzante è spesso legata alla composizione e alla tipologia della superficie (liscia, rugosa, incisa, o con abrasioni) e al microrganismo che può essere solo "appoggiato" sulla superficie o può aderirvi attraverso strutture proteiche, la capsula, le fimbrie, i pili o attraverso la produzione di glicocalice o biofilm (30). Microrganismi patogeni come *L.monocytogenes*, *Salmonella* spp. o *E.coli* O157H7 possono essere presenti e sviluppare in fessure, in abrasioni o su superfici rugose di attrezzature o strutture di laboratori alimentari. Talvolta i sanitizzanti distribuiti in fasi acquose su superfici con queste caratteristiche possono fallire il loro compito e cioè di raggiungere e inattivare i patogeni ivi localizzati. Di conseguenza la superficie diventa un veicolo di trasmissione di germi pericolosi all'alimento. In questi ultimi anni ha trovato largo impiego la tecnica della distribuzione degli agenti sanitizzanti attraverso aerosol.



Università degli Studi di Udine

L'aerosolizzazione è definita come la tecnica che consiste nel disperdere in aria un liquido o una soluzione in forma di piccolissime goccioline. Tale tecnica inizialmente era utilizzata a scopi terapeutici per combattere *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus fumigatus* (18,28,35,38) e per disinfettare ambienti (10,19). L'aerosolizzazione è una tecnica comunemente impiegata per disinfettare ambienti di produzione alimentare o di allevamento. Anzi in taluni casi il suo impiego ha permesso di ridurre le patologie legate agli alimenti e di incrementare la produttività negli allevamenti (10,34,37). Diversi autori (10,20) hanno ampiamente dimostrato che la diffusione di soluzioni di acido lattico attraverso aerosol in allevamenti permetteva il controllo di patologie infettive nel pollame. La spiegazione di tale efficacia sembra proprio legata alla tecnica dell'aerosol. Questa permette di distribuire l'antimicrobico sottoforma di piccole goccioline (< 2 µm) che raggiungono ogni zona del substrato da trattare anche quelle nascoste e più difficili da raggiungere anche con i sistemi che impiegano la spruzzazione. Oh et al., (30), attraverso la diffusione di una miscela di acido peracetico e acqua ossigenata tramite aerosol, riuscirono ad abbattere di diverse unità log popolazioni di microrganismi patogeni intenzionalmente inoculate su superfici simulanti ambienti di produzione alimentare. In particolare dimostrarono che "aerosolizzando" entrambi gli antimicrobici per circa un'ora sulle superfici potevano ridurre di circa 3.09 unità log la popolazione di *Bacillus cereus*, di 7.69 unità log la popolazione di *Listeria innocua*, di 6.93 unità log la popolazione di *Staphylococcus aureus*, di 8.18 unità log la popolazione di *Salmonella typhimurium*. Gli autori scelsero tali antimicrobici perché non corrosivi, per il loro ampio spettro d'azione e per la loro rapida decomposizione in acido acetico, ossigeno e acqua. Inoltre, ciò è importante, dimostrarono che l'effetto di tali antimicrobici era esaltato dall'impiego di un apparecchio ad aerosol che disperdeva le gocce in dimensioni di 2 µm.

Un altro potenziale mezzo per decontaminare aria e superfici è l'impiego di sanitizzanti gassosi. Tale tecnica è molto utilizzata ed efficace (14,15,16), anche se ha degli svantaggi quali l'impiego di apparati sofisticati per generare il gas e il ridotto numero di molecole utilizzabili. L'ozono rappresenta la innovativa molecola usata per decontaminare microrganismi patogeni o alteranti da superfici o da ambienti contaminati. Recentemente diversi autori hanno messo a punto metodiche implicanti l'ozono per inattivare forme vegetative o spore di diversi microrganismi di interesse alimentare (17,21,22,23,24,25). Infine anche la ionizzazione può essere considerata un sistema valido per decontaminare superfici di alimenti o ambienti di produzione alimentare. Recentemente l'impiego di un apparecchio ionizzatore ci ha permesso di ridurre la carica microbica dell'aria confinata in celle di sale, di prestagionatura e di stagionatura per la produzione del prosciutto di San Daniele (6). Il trattamento consisteva nella ionizzazione dell'aria di ogni cella per ventiquattrore con un ionizzatore statico Maia (sistema Bioxigen, SitalKlima). L'esperimento ha dimostrato che il trattamento produceva una netta diminuzione della popolazione fungina e batterica dell'aria confinata nelle celle considerate. Il decremento microbico era dipendente dalla carica iniziale e dall'ambiente considerato e comunque permetteva di ottenere una diminuzione media in percentuale del 47-52% della carica iniziale. Le conte post-trattamento permettevano di ottenere un grado di contaminazione inferiore a 200 UFC/m³; contaminazione ritenuta ottimale per questi ambienti di produzione.

Fasi principali di lavorazione del prosciutto di San Daniele

Percentuale di microrganismi inattivati dopo trattamento con ionizzatore sistema Bioxigen

Cella	Muffe / Lieviti	Batteri
Sale	49.0	50.0
Prestagionatura	49.5	48.0
Stagionatura	47.5	53.2

Descrizione operazioni	Locali di lavorazione		Durata media dei giorni di lavorazione	Durata media in giorni
	Temperatura	Umidità		
Rifilatura, pesatura e raffreddamento	2/3°C	90-95%	1	1
Salatura	2/3°C	90-95%	15	16
Pressatura	4/5°C	70%	2	18
Preriposo	4/6°C		21	39
Riposo (toielettatura, rinvenimento e lavaggio)	da 4/6°C a 8/10°C	70-75% 80-85%	54	93
Asciugamento	20/27°C	90%	8	101
Prestagionatura	12/14°C	85-80%	37.5	138.5
	14/19°C	75-70%		
Stagionature e stuccatura	15/22°C	70-80%	240	378.5



Università degli Studi di Udine

In base a questi dati abbiamo ritenuto opportuno valutare le possibilità di questo tipo di trattamento nei confronti della popolazione microbica localizzata sulla superficie di locali e attrezzature utilizzate per la produzione di alimenti. In particolare lo scopo era quello di ridurre o inattivare completamente ceppi di *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, inoculati intenzionalmente su superfici simulanti attrezzature o ambienti utilizzati per produrre alimenti. Lo studio degli effetti della ionizzazione nei confronti di *Listeria monocytogenes* è stato un obbligo poiché da diverso tempo il gruppo di ricerca che coordina sta cercando produrre e ottimizzare metodi efficaci, innocui e soprattutto permessi dalla legislazione italiana e CEE in grado di eradicare tale microrganismo da ambienti, attrezzature e prodotti alimentari. In particolare ci siamo focalizzati sullo sviluppo di metodi per eradicare *Listeria monocytogenes* dalla superficie di prosciutto di San Daniele, e da ambienti e attrezzature utilizzate per la sua produzione. Lo scopo era ed è di raggiungere il livello di tolleranza "0" come richiesto dalla legislazione USA (9,11) e CE (Italia compresa) prima del REG. CE n. 2073/2005 (15/11/05) GUCE L338/1 del 22/12/05. Ora in Europa con questo regolamento, infatti, il limite diventa di 100 *Listeria monocytogenes*/g a fine shelf-life del prodotto alimentare. Il prosciutto crudo non è un prodotto a rischio di listeriosi. Infatti durante la sua produzione, l'abbassamento lento e costante dell'*Aw* impedisce lo sviluppo di quei microrganismi quali *L.monocytogenes*, che sono accidentalmente presenti sulla superficie del prodotto. Procedendo la maturazione nel tempo tali microrganismi possono essere inattivati (7,13). Tuttavia *L.monocytogenes* può ricontaminare il prosciutto crudo durante le fasi che precedono la sua commercializzazione. In particolare è possibile che le tecniche di disosso o di affettamento, se eseguite in ambienti o con attrezzi non sufficientemente sanificati, possano favorire questa ricontaminazione. Tuttavia per la sua bassa *Aw* ($< 0.90 \pm 0.01$), il prosciutto crudo sia affettato che disossato, non è in grado di supportare la crescita di patogeni e di *L.monocytogenes* (7,13).

Per prevenire queste contaminazioni, le industrie alimentari hanno implementato severi piani sistemi HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point), GMP (Good Manufacturing Practise) e SSOP (Standard Sanification Organization Program) e ciò ha portato a un netto decremento della presenza di *L.monocytogenes* dagli ambienti di produzione e soprattutto dal prosciutto crudo (5, 9,11). L'efficacia e l'efficienza dei piani HACCP e SSOP è dimostrata dal fatto che la percentuale di isolamento di *L.monocytogenes* da alimenti è diminuita nel tempo e ciò ha permesso di abbassare ulteriormente la probabilità del rischio di produrre patologie nei consumatori. C'è però c'è ancora molto da fare poiché si è ancora ben lontani dalla sua eradicazione completa (4,9,11,13). L'ambiente di lavoro e le attrezzature rappresentano ancora una delle fonti principali di contaminazioni degli alimenti da parte di *L.monocytogenes*, e di altri patogeni. Di conseguenza i produttori richiedono da sempre la ricerca di tecniche di sanificazione innovative e più efficaci. Tali tecniche devono essere, però, produttive, devono presentare costi contenuti, un basso impatto ambientale e compatibile con la presenza di operatori. A tal proposito la ionizzazione sembra rispettare questi prerequisiti.

Fin'ora essa è stata prevalentemente impiegata per ionizzare l'aria confinata sia di case private, di case per comunità, sia di ambienti industriali. Gli ioni negativi prodotti hanno la funzione di eliminare particolato, pollini, microrganismi e inquinamento in genere (1,2,12,26,29,32,36). Di conseguenza essi svolgono un'influenza positiva sulla prevenzione di patologie quali asma, allergie (2,3,27,29,31,33,39). Inoltre essi influenzano anche l'umore delle persone. E' noto che depressione, nausea, insonnia, irritabilità, spossatezza, emicrania, attacchi d'asma sono causati dall'eccessiva presenza di ioni positivi nell'ambiente. Infatti spesso le persone metereopatiche mutano il loro umore in seguito a temporali e a presenza di venti caldi e secchi, che veicolano nell'aria ioni positivi (27,31,35). Secondo i medici e gli igienisti gli ioni negativi hanno queste funzioni: potenziano il sistema immunitario, aumentano la capacità del corpo ad usare l'ossigeno presente nell'aria, aumentano la capacità polmonare ad eliminare gli agenti inquinanti, fanno respirare più facilmente, migliorano il sonno, riducono lo stress, aumentano l'attenzione, diminuiscono l'aggregazione delle piastrine. Di conseguenza suggeriscono di vivere in ambienti disinquinati o utilizzare ionizzatori per decontaminare l'aria. A parte queste considerazioni e suggerimenti per migliorare la vita umana, nell'industria alimentare è di fondamentale importanza la decontaminazione microbica dell'aria. Essa può essere ottenuta attraverso l'impiego di camere chiuse dette camere bianche, dove l'aria insufflata è preventivamente sterilizzata tramite filtrazione oppure nel caso che l'ambiente confinato sia soggetto a frequenti contatti con l'esterno attraverso mezzi fisici quali l'impiego di vapore, di ionizzazione, di radiazioni ionizzanti, di raggi UVA e radiazioni infrarosse (26). In particolare Corry e Mead (11), suggeriscono che la ionizzazione dell'aria confinata di celle frigorifere abbia un'influenza positiva sulla carica microbica di carni. Essi, infatti, citano dati secondo i quali le carni conservate in celle con aria ionizzata presentavano cariche inferiori a quelle di carni conservate in celle non soggette ad alcun trattamento. Pertanto, proprio in base a queste considerazioni, abbiamo voluto verificare



Università degli Studi di Udine

se l'impiego di un ionizzatore d'aria (Bioxygen della Ditta SitalKlima) permetteva la riduzione della carica microbica di superfici di attrezzi e di ambienti utilizzati per produzioni alimentari.

MATERIALI E METODI

A) Prova trattamento ionizzante su pannello simulante la parete di celle utilizzate in ambito alimentare: La sperimentazione è stata replicata tre volte (tre prove).

E' stato preparato un pannello di circa 1500 cm² (30 x 50 cm). Il pannello è stato suddiviso in 15 quadrati di 100 cm² ciascuno, numerati da 1 a 15 (Fig.1) . I quadrati da 1 a 5 sono stati inoculati con una sospensione di *Listeria monocytogenes*, da 6 a 10 con una sospensione di *E.coli* e da 11 a 15 con una sospensione di *Saccharomyces cerevisiae*.

Preparazione delle sospensioni:

Listeria monocytogenes: Da coltura di *L.monocytogenes* di 18 ore su BHIagar (Oxoid, Italia) è stata prelevata un'ansata, che è stata diluita in acqua peptonata. Dopo omogenizzazione, 1 ml di una diluizione decimale della sospensione è stata inoculata sulla superficie dei quadri numerati da 1 a 5.

Valore finale 64.000 UFC/ cm².

E.coli: Da coltura di *E.coli* di 18 ore su BHIagar (Oxoid, Italia) è stata prelevata un'ansata, che è stata diluita in acqua peptonata. Dopo omogenizzazione, 1 ml di una diluizione decimale della sospensione è stata inoculata sulla superficie dei quadri numerati da 6 a 10. Valore finale 120.000 UFC/ cm².

Saccharomyces cerevisiae: Da coltura di *Saccharomyces cerevisiae* di 18 ore su Malt agar (Oxoid, Italia) è stata prelevata un'ansata, che è stata diluita in acqua peptonata. Dopo omogenizzazione, 1 ml di una diluizione decimale della sospensione è stata inoculata sulla superficie dei quadri numerati da 11 a 15. Valore finale 150.000 UFC/ cm².

Dopo inoculo il pannello è stato messo in cella di stoccaggio di 10 m³ di cubatura alla temperatura di 12°C e sottoposto a trattamento per 24 ore con apparecchio ionizzatore ventilato mod. Sfera posizionato a circa 1 m dal pannello stesso.

Ore di esposizione	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Saccaromyces cerevisiae</i>
Tempo 0	1	6	11
Tempo 3	2	7	12
T 17.30	3	8	13
Tempo 21	4	9	14
Tempo 24	5	10	15

Tabella 1

Al tempo 0 tramite tampone sterile e a tempi di esposizione in ore 3, 17:30, 21 e 24 ore tramite piastre di contatto (24 cm²), i microrganismi inoculati sono stati recuperati e analizzati per la ricerca di eventuali cellule sopravvissute al trattamento ionizzante. I terreni utilizzati per valutare le cellule sopravvissute erano costituiti da Plate Count Agar (PCA, Oxoid, Italia) incubato a 30°C per 24 ore per i batteri e Agar Malto (Oxoid, Italia) incubato a temperatura ambiente per 3-5 giorni per *S.cerevisiae*. In particolare i quadri numerati 1, 6 e 11 sono stati analizzati al tempo 0; i quadri numerati 2, 7 e 12 sono stati analizzati a 3 ore; i quadri numerati 3, 8 e 13 sono stati analizzati a 17:30 ore, i quadri numerati 4, 9 e 14 sono stati analizzati a 21 ore; i quadri numerati 5, 10 e 15 sono stati analizzati a 24 ore del trattamento. E' stato eseguito anche un "bianco", che è consistito nell'inoculare un pannello della stessa composizione del precedente con le stesse quantità di microrganismi (100 cm² per ciascun microrganismo). Dopo inoculo il pannello è stato chiuso in un contenitore stagno, per impedire il trattamento ionizzante ed è stato posizionato nella stessa cella.

B) Trattamento di substrati simulanti superfici a diretto contatto con gli alimenti

In questo caso si è valutato gli effetti della ionizzazione nei confronti della sola *Listeria monocytogenes*; considerata il più tipico tra i microrganismi patogeni degli alimenti derivante da contaminazione ambientale.

I materiali utilizzati comprendevano bicchieri e piatti di plastica e confezioni di tetrapack. Inizialmente ciascun substrato (3 campioni per ogni tipologia) è stato sottoposto a conta batterica totale su terreno generico PCA, per



Università degli Studi di Udine

avere un'idea della sua contaminazione iniziale e valutare la possibilità che questa potesse influire negativamente sul recupero delle cellule del patogeno in studio. La carica batterica naturale era inferiore a 10 UFC/cm², di conseguenza essa non poteva avere influenza sulla sperimentazione.

1) Bicchieri e piatti di plastica: 6 piatti e 6 bicchieri di plastica sono stati inoculati con una sospensione di 10⁶ cellule/ml di *L. monocytogenes*, preparata come soprariportato.

Quindi sono stati posti in un frigorifero portatile accuratamente pulito con etanolo. Al suo interno è stato introdotto uno ionizzatore statico.

Lo ionizzatore è stato acceso e quindi il frigorifero è stato chiuso ermeticamente. La durata del trattamento ionizzante era di circa 24 ore. È stato eseguito anche un "bianco" costituito da 3 bicchieri e 3 piatti inoculati con la stessa sospensione, chiusi in un frigorifero portatile simile al precedente e lasciati per 24 ore nelle stesse condizioni dei campioni trattati.

Lo scopo era di confrontare l'effetto recupero con e senza trattamento. Il recupero delle cellule sopravvissute è stato effettuato mediante garze, inumidite in 10 ml di soluzione fisiologica, passate più volte sulla superficie inocolata. Le garze sono state manipolate con l'ausilio di pinze sterili. Ogni garza usata è stata introdotta in un sacchetto da stomaker (per i bicchieri) o in un provettone (per i piatti), contenenti 10 ml di acqua peptonata sterile (la stessa usata per bagnare la garza).

Il contenuto dei provettoni è stato vortexato, mentre il contenuto dei sacchetti è stato omogeneizzato a mano per far entrare in soluzione tutti i microrganismi presenti sulla garza. 1ml della sospensione così ottenuta è stato diluito in 9 ml di acqua peptonata e 0,1 ml sono stati spatolati su terreno selettivo (Palcam agar, Oxoid). Per ogni campione sono state effettuate 3 diluizioni. Le piastre sono state incubate a 37°C per 48 ore. Le colonie cresciute sono state contate e il risultato espresso in UFC/ml.

2) Confezioni in tetrapak. La stessa prova è stata ripetuta inoculando e campionando 6 confezioni in tetrapak. Ciascun campione è stato inoculato con una sospensione di 10⁶ UFC/ml di *Listeria monocytogenes*. Quindi i campioni sono stati trattati come i precedenti: chiusi in un frigor portatile ed esposti all'attività dello ionizzatore per 24 ore. Anche in questo caso è stato prodotto un "bianco", costituito da 6 tetrapack inoculati con 10⁶ UFC/ml di *L.monocytogenes*, messi in frigor portatile e lasciati senza trattamento ionizzante per 24 ore. Nei tetrapak, a differenza delle precedenti prove, l'inoculo non è avvenuto per spatolamento, ma semplicemente depositando la sospensione sotto forma di piccole goccioline.

Trascorso il periodo definito, i tetrapak sono stati introdotti in sacchetti da stomaker e addizionati di acqua peptonata sterile. Per recuperare il massimo numero di cellule il campione diluito è stato omogeneizzato per circa 5 minuti. Le cellule di *L.monocytogenes* sopravvissute sono state contate previo inoculo di circa 0.5 ml dell'omogenizzato direttamente in piastre di 15 cm di diametro contenenti Palcam agar, che è stato incubato a 37°C per 48 ore. L'impiego di tali piastre ha permesso di abbassare il limite soglia di rilevabilità del metodo (5 UFC/ml acqua peptonata).

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati delle sperimentazioni sono riportati nella figura 3 e in tabella 1. Come si osserva in tutte le sperimentazioni il trattamento ionizzante ha prodotto un netto decremento dei microrganismi inoculati sia sulle superfici simulanti le pareti di celle utilizzate per stoccare gli alimenti, sia su quelle utilizzate per simulare attrezzature a diretto contatto con gli alimenti.

A) Prova trattamento ionizzante su pannello simulante la parete di celle utilizzate in ambito alimentare.

Il trattamento ionizzante di 24 ore produceva una perdita superiore al 99% in tutti i microrganismi inoculati sui pannelli simulanti le pareti di celle. L'efficacia dello ionizzatore non sembra dipendere dal microrganismo saggiato. Le repliche eseguite (tre sperimentazioni diverse) hanno evidenziato risultati pressochè simili, dimostrando che l'efficacia del trattamento è ripetibile.

Il picco massimo di inattivazione veniva osservato già entro le tre ore dall'inizio del trattamento poi essa rallenta si osserva una diminuzione media di 3 – 4 unità log/cm² a seconda del microrganismo inoculato. Viceversa dalle campionature eseguite sui pannelli non trattati si osservava una riduzione del 22-30% rispetto alle cariche dei microrganismi inoculati (Tab.1) contro il 99% di riduzione sui pannelli trattati.



Università degli Studi di Udine

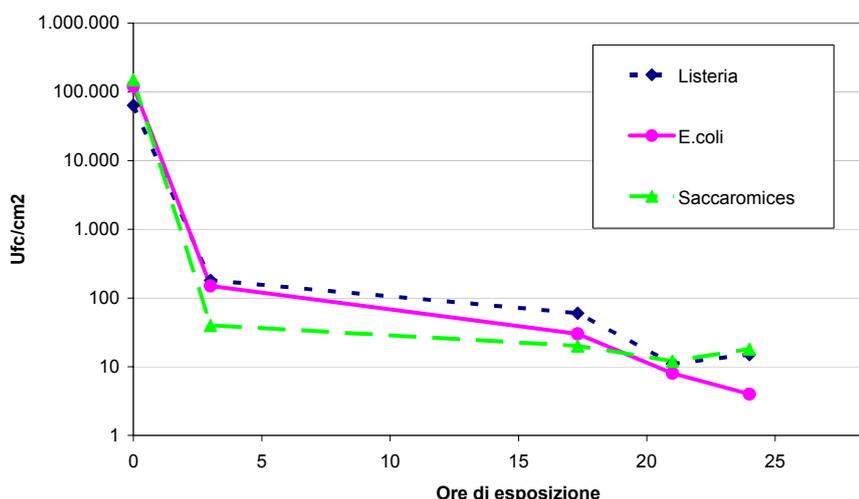
In tutte le repliche *Listeria monocytogenes* diminuiva di 2 unità log/cm² entro tre ore dall'inizio del trattamento. Dopo le tre ore e fino alla fine il decremento si manteneva costante a livello di 3 unità log/cm². *E.coli* diminuiva di 3-4 unità log/cm² entro tre ore.

Poi il decremento proseguiva fino a raggiungere 4-5 unità log/cm² a fine trattamento (24 ore). *Saccharomyces cerevisiae* diminuiva di 4 unità log entro tre ore dall'inizio del trattamento poi si osservava comunque una perdita della sua carica. Tuttavia alla fine del trattamento la perdita media in tutte le repliche era di 4 unità log.

PROVE SU SUPERFICI			a	b	c	d	e	Riduzione %
PROVA	Ore di esposizione	Unità mis.	0	3	17,30	21	24	
1	Listeria	ufc/cm2	64000	110	28	18	20	-99,83
	E.coli	ufc/cm2	120000	15	2	0	1	-99,99
	Saccaromices	ufc/cm2	150000	80	10	6	2	-99,95
2	Listeria	ufc/cm2	64000	180	60	11	15	-99,72
	E.coli	ufc/cm2	120000	150	30	8	4	-99,88
	Saccaromices	ufc/cm2	150000	40	20	12	18	-99,97
3	Listeria	ufc/cm2	64000	110	28	18	20	-99,83
	E.coli	ufc/cm2	120000	15	18	6	4	-99,99
	Saccaromices	ufc/cm2	150000	80	15	12	6	-99,95

Tab. 1 - NOTE: Prova condotta nello stesso locale inoculando 3 superfici diverse con 0,1 ml di inoculo su 100 cmq; E' stata titolata la sospensione batterica iniziale (vedi colonna a); Il bianco è stato eseguito su una superficie non esposta all'aria ionizzata dopo 24 ore; la superficie è nello stesso locale ma chiusa in un contenitore stagno di circa 1 m3; E' stata campionata con tamponcino tutta la superficie inoculata (100 cmq) Le prove a) è stata effettuate con tamponcino per raccogliere su 100 cmq; le prove b, c, d, e sono state eseguite mediante utilizzo piastre da contatto da 24 cmq.

Fig. 3 - Valutazione efficacia sistema di ionizzazione di aria Bioxigen



BIANCO	ufc/cm2
<i>Listeria ivanovii</i>	68.000
<i>E.coli</i>	110.000
<i>Saccaromices spp</i>	131.000

Locale di 10 m3, temperatura ambiente (12°C circa), assenza di ricambio di aria.

Ionizzatore utilizzato: modello sfera, posto nelle vicinanze della superficie. Il modello è ventilato e consigliato per ambienti di 30/75 m3 di aria.

B) Trattamento di substrati simulanti superfici a diretto contatto con gli alimenti:

1) Bicchieri e piatti in plastica

Il trattamento è stato condotto utilizzando *Listeria monocytogenes* inoculata su superfici plastiche, tenendo conto del fatto che essa è in grado di creare biofilm e di aderire alle più svariate superfici. Anche in questo caso è stato possibile trovare una differenza di due ordini di grandezza tra le UFC ricavate dai campioni trattati e non trattati, come descritto in tabella 3. Infatti come si può notare anche nei campioni non trattati si osservava una perdita media di circa 2 unità log/superficie totale prodotto (Tab. 2). Tale perdita può essere dovuta sia ad una inattivazione naturale del microorganismo nel tempo, cosa del resto non osservata nella sperimentazione precedente, sia a problemi di recupero del microorganismo dal substrato. Ci sembra che questa sia la



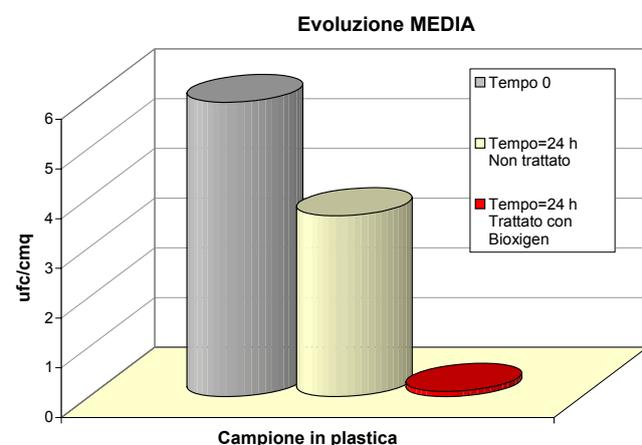
Università degli Studi di Udine

motivazione principale del mancato recupero dal substrato di gran parte delle cellule inoculate. Infatti la tecnica utilizzata non è a nostro avviso in grado di permettere un recupero totale delle cellule di *Listeria monocytogenes* dal substrato. È noto che l'impiego di garze umidificate o di spugnette umidificate con acqua peptonata non permette il massimo recupero dei microrganismi da un substrato indipendentemente dal fatto che tale tecnica sia considerata una delle migliori e proposta da numerosi interventi legislativi svolti a contare i microrganismi su superfici di attrezzature, di ambienti che di alimenti (carcasse animali).

In ogni caso, dalla stessa tabella 3 emerge che il trattamento permette l'abbattimento di circa 1-2 unità log/superficie totale del campione saggiato. Come si osserva i dati sono altamente ripetibili: in tutti i campioni il numero di cellule recuperato è stato al di sotto del limite di rilevabilità.

Tabella 2: Evoluzione di *L.monocytogenes* inoculata su superfici plastiche trattate con aria ionizzata

Campione	Tempo=0	Tempo=24 h Non trattato	Tempo=24 h con Bioxigen
Bicchiere 1	5,914	4	<2
Bicchiere 2	5,914	4,477	<2
Bicchiere 3	5,914	4,301	<2
Bicchiere 4	5,914	3,342	<2
Bicchiere 5	5,914	3,415	<2
Bicchiere 6	5,914	3,398	<2
piatto 1	5,914	3,204	<2
piatto 2	5,914	3,301	<2
piatto 3	5,914	3,415	<2
piatto 4	5,914	3,505	<2
piatto 5	5,914	3,477	<2
piatto 6	5,914	3,778	<2
MEDIA	5,914	3,635	<2



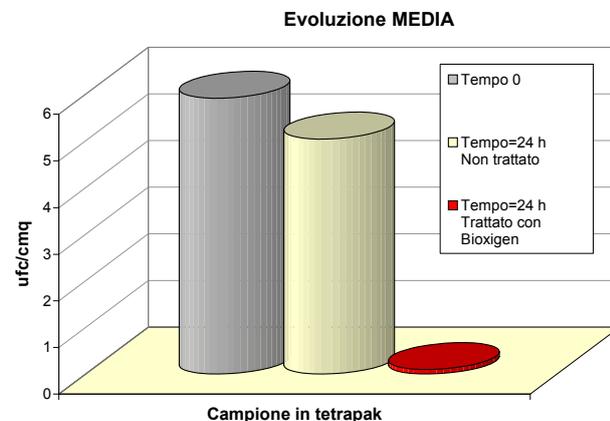
Dati: log UFC/superficie totale campione

2) Confezioni in tetrapak

Per la sperimentazione sono state utilizzate anche superfici in tetrapak. La modalità di inoculo è stata modificata. Invece della tecnica di spatolamento, l'inoculo è stato eseguito attraverso la deposizione della sospensione sottoforma di goccioline, distribuite casualmente sull'intera superficie, in modo da diminuire il livello di disidratazione cui vengono sottoposte le cellule. L'impiego di questa tecnica ha permesso di ottenere un abbattimento della carica inoculata superiore a 4 unità logaritmiche (Tab. 3). Come per le altre superfici trattate, il numero di cellule recuperate è stato inferiore alle 4 unità log nella prima serie di prove e a 3 unità log nella seconda serie di prove.

Tabella 3: Evoluzione di *L.monocytogenes* inoculata su superfici in tetrapak trattate con aria ionizzata.

Campione	Tempo=0	Tempo=24 h Non trattato	Tempo=24 h con Bioxigen
Tetrapak 1	5,914	5,892	<1
Tetrapak 2	5,914	6,176	<1
Tetrapak 3	5,914	5,869	<1
Tetrapak 4	5,914	4,301	<1
Tetrapak 5	5,914	4	<1
Tetrapak 6	5,914	4	<1
MEDIA	5,914	5,04	<1



Dati: log UFC/superficie totale campione



Università degli Studi di Udine

CONCLUSIONI

E' stata valutata l'efficacia di ionizzatori (*sistema Bioxigen*) per decontaminare le superfici di substrati simulanti le pareti di celle di stoccaggio alimenti e di substrati a diretto contatto con gli alimenti. I microrganismi possono contaminare queste superfici perché veicolati dagli stessi alimenti, dall'uomo, dagli insetti o dall'aria confinata.

In particolare nell'aria di ambienti di laboratori alimentari essi sono presenti come "passeggeri" di particelle solide di polvere, di pelle, di capelli e vestiti di operatori che lavorano in questi ambienti. I microrganismi possono derivare anche da gocce dovute agli aerosol formati da impianti di pulizia o da condensa di condizionatori o di impianti che regolano la temperatura e l'umidità relativa delle celle. Di conseguenza l'utilizzo delle buone prassi igieniche applicate agli ambienti di lavorazioni o alle attrezzature a stretto o diretto contatto con gli alimenti permette di eliminare il rischio di contaminazioni, che influenzano la salubrità degli stessi. Le tecniche sanificanti si basano sull'impiego di detergenti/disinfettanti. Tali metodologie pur utilizzate su vasta scala non sempre portano a risultati soddisfacenti. Le soluzioni antimicrobiche impiegate, infatti, talvolta non riescono a raggiungere zone, rugosità o anfratti entro cui si localizzano i microrganismi. Spesso per eradicare microrganismi particolarmente "nascosti" occorre utilizzare sistemi spruzzanti o aerosolizzanti in grado di distribuire il sanitizzante in ogni anfratto della superficie. Tali sistemi sono a tuttora molto validi, di facile applicazione anche se presentano lo svantaggio di utilizzare principi attivi che sono guardati con sospetto dagli stessi addetti alle SSOP. In particolare l'uso dei sanificanti chimici è da sempre considerato un "male necessario". Le molecole utilizzate in soluzioni acquose, pur essendo riconosciute innocue, hanno da sempre prodotto preoccupazioni nell'uomo a causa della considerazione che comunque nell'ambiente alla lunga possano generare inquinamento. Di conseguenza gli igienisti sono da sempre alla ricerca di metodologie alternative e di basso impatto ambientale. Il trattamento considerato, basato sulla ionizzazione dell'aria o di superfici, risponde a queste richieste. Infatti il vantaggio fondamentale di questo trattamento rispetto alle tradizionali metodiche di detergenza e sanificazione è determinato dal fatto che il principio attivo a temperatura ambiente è un gas, che scompare nel tempo senza lasciare traccia e che può penetrare ovunque, anche in piccole fessure o scabrosità (che in un'industria alimentare dovrebbero essere poche) in cui detergenti e disinfettanti penetrano più difficilmente. E' noto che la produzione di ioni negativi e in particolare di un giusto rapporto ioni negativi/ioni positivi produca un decremento della contaminazione particellare, microbica e dell'odore nell'aria confinata di un ambiente. Dai dati è emerso che il trattamento con ioni utilizzati produceva anche una netta diminuzione della popolazione di *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Saccharomyces cerevisiae* da superfici simulanti ambienti di stoccaggio alimenti (celle) o da superfici a diretto contatto con gli alimenti. Il decremento microbico era dipendente dalla carica iniziale e dall'ambiente considerato e comunque permetteva di ottenere una diminuzione media in percentuale superiore del 99% dei microrganismi inizialmente inoculati.

Le conte post-trattamento permettevano di ottenere un grado di contaminazione inferiore o uguale a 1 unità log/cm²; contaminazione ritenuta ottimale per queste superfici. La presenza di una bassa carica microbica di pareti di celle o di attrezzi a diretto contatto con l'alimento può influenzare in positivo la qualità igienico-sanitaria del prodotto stesso. Poiché la buona prassi igienica e produttiva considera le superfici di ambienti di laboratori di produzione o di trasformazione di prodotti alimentari uno dei principali veicoli di diffusione dei microrganismi, suggeriamo l'impiego di apparecchiature di ionizzazione del sistema Bioxigen (SitalKlima) come mezzo per raggiungere livelli accettabili di contaminazione. Per ottimizzare il trattamento, l'apparecchio ionizzatore deve essere posizionato all'interno dell'ambiente da sanificare e lasciato sempre acceso per permettere di rilasciare in continuo gli ioni negativi. Questi, una volta liberati, agiscono sull'umore delle persone e inattivano gran parte dei microrganismi presenti nell'aria e sulle superfici. Lo ionizzatore, pertanto, può essere utilizzato per abbattere la carica microbica in alternativa all'impiego di un disinfettante o per rafforzare la sua attività. Non può sostituire l'impiego della detergenza. Questa deve essere comunque utilizzata ai fini di eliminare da superfici, biofilm o residui di materiale organico, utile per la crescita microbica. Solo parallelamente o successivamente a tale trattamento è possibile l'utilizzo dello ionizzatore.

Il diagramma di flusso della metodologia suggerita dovrebbe comprendere: pulizia della superficie tramite detergente, risciacquo della stessa e trattamento ionizzante. Per meglio sfruttare la potenzialità della tecnica occorre posizionare gli ionizzatori in ogni ambiente di lavoro e trattare in continuo gli stessi.



Università degli Studi di Udine

BIBLIOGRAFIA

- 1) A.A.V.V. I benefici degli ioni negativi. http://www.euodream.net/link_bib/benefici.htm.
- 2) Al-Dagal, M., D.Y.C. Fung (1990) Aeromicrobiology-a review. *Food Sci. and Nutrit.* 29 (5), 333-340.
- 3) Boutalov, P.C. (1968) Trattamento dell'asma bronchiale attraverso la ionizzazione negativa dell'aria. In "Bioclimatologia, Biometeorologia e Aerionoterapia" Ed. R. Gualtierotti et al., p.104 Carlo Erba, Milano.
- 4) Codex Alimentarius Commission "Proposed Draft Guidelines for the Control of *Listeria monocytogenes* in food" CX/FH03/8 October 2002.
- 5) Comi, G. e G.Duratti.(1999) Manuale pratico "Organizzazione funzionale e controllo dell'igiene e della sicurezza negli ambienti di lavorazione del prosciutto di San Daniele".Ed. Consorzio del Prosciutto San Daniele.
- 6) Comi, G., A.Lovo, N.Bortolussi, M.Paiani, A.Berton, G.Bustreo (2005a) Ionizzatori per decontaminare l'aria nei locali di produzione del prosciutto crudo di San Daniele. *Ind. Alim.*, XLIV, ottobre, 1-9.
- 7) Comi G., R.Urso, M.Paiani, S.Ottaviani (2005b) Prosciutto crudo stagionato e confezionato in atmosfera modificata o in sottovuoto. Effetto di diversi additivi e dell'Aw sul comportamento di *L. monocytogenes*. *Ind. Alim.*, XLIV, Marzo, 272-278.
- 8) Corry, M. and J.Mead (1996) cit. in Smulders, J.M., and M.Upmann (2001) Reduction of microbial contamination on fresh meat. *Fleischwirtschaft Int.* 2, 57-59.
- 9) FDA/FSIS "Control of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-eat Meat and Poultry Products" 9 CFR Part 430-2003.
- 10) Fiser, A. (1978) Disinfection of air and dust in fattening houses for chickens by lactic acid aerosol. *Acta Vet. Brun.* 47, 173-183.
- 11) Food and Drug Admin.Food Safety and Inspection Service (FDA-FSIS,10.02.2003)-Draft FSIS Risk Assessment for *Listeria* in Ready-to-eat-Meat and Poultry product.
- 12) Gabbay, J. (1990) Effect of ionization on microbial air pollution in the dental clinic. *Environm. Res.*, 52, 1-59.
- 13) Grisenti, M.S., D. Lori, L. Vicini, N. Bovis, B. Pedrelli e S. Barbuti (2004) Comportamento di *Listeria monocytogenes* in prosciutto crudo stagionato in rapporto all'atmosfera di confezionamento e alla temperatura di conservazione. *Ind. delle Conserve*, 79, 3-12.
- 14) Han, Y., L.D., Floros, R.H. Linton, S.S. Nielsen and P.E. Nelson (2000) Response surface modelling for the inactivation of *E.coli* O157:H7 on surface-uninjured and -injured green pepper (*Capsicum annuum* L.) by chlorine dioxide gas as demonstrated by confocal laser scanning microscopi. *Food Microbiol.*, 17, 643-655.
- 15) Han, Y., R.H. Linton, S.S. Nielsen and P.E. Nelson (2001a) Inactivation of *E.coli* O157:H7 on green pepper (*Capsicum annuum* L.) by chlorine dioxide gas treatment. *J. Food Protect.*, 64, 1128-1133.
- 16) Han, Y., R.H. Linton, S.S. Nielsen and P.E. Nelson (2001b) Reduction of *Listeria monocytogenes* on green pepper (*Capsicum annuum* L.) by gaseous and aqueous chlorine dioxide and water washing and its growth at 7°C. *J. Food Protect.*, 64, 1730-1738.
- 17) Harbold, K., B. Flemig, K. Botzenhart (1989) Comparison of ozone inactivation, in flowing water, of hepatitis A virus, poliovirus I, and indicator organisms. *Appl. Environm. Microbiol.*, 55, 2949-2953.
- 18) Hashimoto, S., E. Wolfe, B. Guglielmo, R. Shanks, J. Sundelof, J.F. Pitter, E.Thomas and J. Wiener-Kronish (1996) Aerosolization of imipenem/cilastatin prevents Pseudomonas-induced lung injury. *J. Antimicrob. Chemoter*, 38, 809-818.
- 19) Hiom, S.J. C. Lowe and M. Oldcorne (2003) Assessment of surface bioburden during hospital aseptic processing. *Int. J. Pharm. Prac.* September, R2.
- 20) Jarnych, V.S. (1972) Aerozoli v veterinarii. *Kolos, Moskwa*, 350 (citato da Oh et al., 2005)
- 21) Kadre, M.A. and A.E. Yousef (2001a) Sporocidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study. *Int. J. Food Microbiol.*, 71, 131-138.
- 22) Kadre, M.A. and A.E. Yousef (2001b) Decontamination of multilaminar aseptic food packaging material and stainless steel by ozone. *J. Food Saf.*, 21, 1-13.
- 23) Kim, J.G. (1998) Ozone as an antimicrobial agent in minimally processed foods. PhD thesis, The Ohio State University, Columbus Ohio (citato da Kadre and Yousef, 2001a).
- 24) Kim, J.G. and A.E.Yousef (2000) Inactivation kinetics of foodborne spoilage and pathogenic bacteria by ozone. *J. Food Sci.*, 65, 521-528.
- 25) Kim,J.G.,A.E.Yousef, G.W. Chism (1999) Use of ozone to inactivate microorganisms on lettuce.*J.Food Saf.*,19,17-34.
- 26) Kreuger, A.P., R.F. Smith et al., (1957) The action of air ions on bacteria. *J. Gen. Physiol.*, 41, 359-381.
- 27) Kreuger, A.P. (1962) Ioni dell'aria e funzionalità fisiologica. *Rivista di Medicina generale*, 45, Suppl. 233.
- 28) Maiz, L., R. Canton, N. Mir, F. Baquero and H. Escobar (1998) Aerosolized vancomycin for the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection in cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonol.* 26, 287-289.
- 29) Masino, A.M. e G. Terzani (2003) Attività biologica, antibatterica ed antivirale della ionizzazione negativa dell'aria. *Giorn. It. Mal. Tor.*, 57, 23-28.
- 30) Oh, S.-W.,P.M.Gray,R.H.Dougherty and D.-H. Kang 2005 Aerosolization as novel sanitizer delivery system to reduce food-borne pathogens.*Lett. Microbiol.*,41,56-60.
- 31) Palti, Y., E. De Nour e A. Abrahamov (1966) Gli effetti degli ioni atmosferici sul sistema respiratorio dei bambini. *Pediatria*, 38, 405.
- 32) Phillips, G., G.J. Harris, et al., (1963) The effects of ions on microorganisms. *Int. J. Biometereol.*, 8, 27-37.
- 33) Poole, T.G., M.F. Galla and J. Berrier (1981) The influence of negative air ions on human performance and mood. *Human Factor*, 23, 633-636.
- 34) Profè, D.and A.Steiger (1982) Aerosol distribution in the air on surfaces of the animal house.*Taguingshericht*,197, 113-120.
- 35) Purcell, I.F. and P.A. Corris (1995) Use of nebulised liposomal amphotericin B in the treatment of *Aspergillus fumigatus* empyema. *Thorax*, 50, 1321-1323.
- 36) Smulders, J.M., and M. Upmann (2001) Reduction of microbial contamination on fresh meat. *Fleischwirtschaft Int.* 2, 57-59.
- 37) Steiger, A., P. Trenner and D. Profè (1982) Technique of aerogenic disinfection during the service period in large animal houses. *Taguingshericht*, 197, 93-97.
- 38) Wanner, A. and A. Ran (1980) Clinical indication for the effects of bland, mucolytic and antimicrobial aerosols. *Am. Rev. Respir Dis*, 122, 79-87.
- 39) Zylberberg, B.E. and M.H. Loveless (1960) Esperimenti preliminari con l'aria ionizzata nell'asma. *La rivista dell'allergia*, 31, 370.



Università degli Studi di Udine

Impiego di apparecchio ionizzatore per decontaminare l'aria di celle per la produzione di prosciutto crudo di San Daniele

Giuseppe Comi, Andrea Lovo¹, Nadia Bortolussi¹, Mario Paiani², Alessandro Berton³ e Giacomina Bustreo³

Dipartimento Scienze degli Alimenti, Università degli Studi di Udine, via Marangoni 97, 33100 Udine.

¹Alimentaria srl, Via Rizzardi, 95, 30175 Venezia-Marghera (Venezia).

²ASL 4, Medio Friuli.

³ Sistema Bioxigen, Sital Klima srl, Via L. da Vinci, 26, 31021 Mogliano Veneto (Treviso).

RIASSUNTO

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di ridurre la carica microbica dell'aria confinata in celle di sale, di prestagionatura e di stagionatura per la produzione del prosciutto di San Daniele attraverso l'impiego di un apparecchio ionizzatore. Il trattamento consisteva nella ionizzazione dell'aria di ogni cella per ventiquattrore con un ionizzatore statico Maia (sistema Bioxigen, SitalKlima). Dai dati è emerso che il trattamento con ioni utilizzati produceva una netta diminuzione della popolazione fungina e microbica dell'aria confinata nelle celle considerate. Il decremento microbico era dipendente dalla carica iniziale e dall'ambiente considerato e comunque permetteva di ottenere una diminuzione media in percentuale del 47-52% della carica iniziale. Le conte post-trattamento permettevano di ottenere un grado di contaminazione inferiore a 200 UFC/m³; contaminazione ritenuta ottimale per questi ambienti di produzione.

SUMMARY

Our aim was to decrease the microbial concentration of the air of salt, pre-ripening and ripening rooms of a S. Daniele dry-cured ham factory by a ionization system. The air of these rooms was treated with a ionizer machine "Maia" of Sital Klima company for twenty-four hours. Data demonstrated that either moulds and yeasts or bacteria concentration decreased. After the treatment only the 48-53% of the initial microbial population was detected. So the value of the air pollution was less than 200 CFU/m³, demonstrating that the treatment allowed to reach acceptable values of air contamination for food industry.

INTRODUZIONE

Il prosciutto è un prodotto di salumeria costituito da carne di suino (coscia) salata e lasciata maturare nel tempo per acquisire aroma e sapore. E', con la salsiccia, il più antico prodotto di carne a noi tramandato perché veniva preparato e consumato in Cina ed in Europa già 2500 anni fa. Il nome evolve dal latino (classico) prae exuctus, molto asciutto, essiccato, nel volgare perexuctus, in prosciutto (toscano) e prosciutto (italiano). Esso rappresenta un autentico legame storico-culturale-economico per l'intera Europa continentale, procedendo la sua affermazione produttiva dalla Penisola Iberica, all'Italia, alla Francia, a tutta l'Europa centro-occidentale.

Il prosciutto di San Daniele è un tipico prodotto della salumeria italiana, considerato da tutti una prelibatezza perché caratterizzato da uno specifico e particolare aroma e sapore. La sua popolarità in Europa e nel mondo è in continuo aumento. Lo stato italiano ha promosso una tutela organica di questo prodotto fin dal 1970, e nel 1990, ha approvato una nuova legge di tutela – n. 30 del 14 febbraio 1990.

Attualmente col regolamento (CEE) n. 1017/96 del 12 giugno 1996, l'Unione Europea ha registrato la DOP (Denominazione di Origine Protetta) del prosciutto di San Daniele ai fini del Regolamento (CEE) n. 2081/92 (che istituisce la tutela comunitaria per i prodotti agro-alimentari a denominazione d'origine). Le fasi di lavorazione sono riportate nel regolamento della legge di tutela L. 14/02/1990 n.30 e dal decreto ministeriale del 16 febbraio 1993, n. 298. Esse derivano dalla tradizione artigianale. La moderna industria ha solo cercato di organizzare i diversi passaggi in una forma migliore proprio per dare risalto alle operazioni che caratterizzano il prosciutto di San Daniele. Gli stadi di processo consistono in: scelta delle carni, raffreddamento, rifilatura, massaggiatura, salatura, pressatura, preriposo e riposo, toelettatura, rinvenimento e lavaggio, asciugamento, prestagionatura, stuccatura e sugnatura e stagionatura (3,8,9,28).

Le cosce fresche di suino pesante vengono ricevute direttamente nello stabilimento di produzione e provengono esclusivamente dalle regioni Friuli Venezia Giulia, Veneto, Lombardia, Piemonte, Emilia



Università degli Studi di Udine

Romagna, Umbria, Toscana, Marche, Abruzzo e Lazio, complete di piedino o zampetto, che verrà lasciato anche sul prodotto finito, costituendo una caratteristica del prosciutto di San Daniele (8,9). Al momento del ricevimento le cosce vengono sottoposte a controlli veterinari e del personale del Consorzio che appone su quelle ritenute idonee un premarchio, un sigillo a fuoco che riporta la dicitura DOT e la data completa di inizio produzione. Di seguito riportiamo le diverse fasi produttive.

Scelta delle carni: Consiste nell'ispezione visiva del prodotto, nel controllo dei certificati di accompagnamento, del carico microbico, della temperatura, del pH delle cosce e del peso, che non deve essere inferiore a Kg 11. L'ispezione visiva delle cosce serve ad accertare se queste abbiano subito danni da trasporto, imbrattamenti da terra o altro, verificare la presenza di ematomi, di colorazioni anomale o l'eccessiva presenza di grasso intramuscolare e valutare le loro qualità commerciali. Il numero totale dei germi all'interno delle cosce dovrebbe essere inferiore ai 100 UFC/g. Deve essere severamente controllata la presenza di Enterobacteriaceae psicotrofe, che possono causare perdite di produzione. Una carica così bassa viene ottenuta solo in cosce di suini macellati in condizioni igieniche ottimali (8,9,10,28).

Massaggiatura: Tale operazione viene effettuata facendo passare le cosce attraverso dei rulli che hanno la funzione di massaggiare e di conferire una leggera pressione al prodotto in modo da permettere la fuoriuscita di sangue residuo dai vasi sanguigni in quanto il ristagno di esso, potrebbe favorire lo sviluppo di microrganismi.

Salatura: Il sale è aggiunto in quantità sufficiente, in modo tale che si ottenga una concentrazione salina non superiore al 6%. La "regola aurea" derivante dalla tradizione prescrive che la coscia resti "sotto sale" un giorno per ogni chilogrammo di peso.

Pressatura: Operazione che favorisce la fuoriuscita di liquidi dall'arteria femorale, dalle sue derivazioni venose e dalle parti di maggior sgrondo della coscia (zona dell'anchetta). Inoltre conferisce alla coscia la tipica forma a chitarra.

Preriposo e Riposo: La fase di preriposo deve essere rigorosamente effettuata a temperature comprese tra i 4 e i 6°C, a U.R. comprese tra il 70-75% o 80-85% a seconda della pezzatura delle cosce. La sua durata media è di 21 giorni ed ha lo scopo di continuare la disidratazione iniziata con la salatura. La fase di riposo viene effettuata a 4-8°C e ad U.R. del 70-75% o 80-85% per 60 giorni e cioè il tempo necessario al raggiungimento di una concentrazione salina interna del 4.0-4.5%. Importante in queste fasi il controllo delle temperature e delle umidità relative, che se troppo alte, possono favorire lo sviluppo di ammuffimenti superficiali (3,7,8, 27).

Toelettatura: Operazione che viene eseguita manualmente attraverso l'ausilio di apparecchi elettrici o di coltelli e che ha lo scopo di asportare e rifilare la parte sporgente dell'anchetta, di ripulire la zona circostante la testa del femore e di favorire la fuoriuscita di umidità.

Rinvenimento e Lavaggio: Operazioni consistenti in una doccia della durata di 2/3 ore con acqua e aria miscelate e nebulizzate (120 Atm, 50°C). Il loro scopo è di asportare la patina superficiale, la "molliga", il prodotto di spurgo della carne, che ricopre la superficie, e di ammorbidire la superficie esterna.

Asciugamento: Operazione effettuata a 20-27°C, a U.R. del 90% per 7 giorni, durante i quali si deve fare attenzione che i punti di sgrondo siano asciutti per favorire la disidratazione.

Pre-stagionatura: Tale fase dura 35-40 giorni; le temperature impiegate dipendono dalle dimensioni dei prosciutti e comunque sono comprese tra i 12 e i 19°C, mentre le U.R. tra 75 e 90%.

Stuccatura e Sugnatura: Operazioni che vengono effettuate verso il settimo mese dalla salatura e consistono nel distribuire sulla superficie piatta della coscia, nelle screpolature e nella fascia muscolare scoperta, un preparato a base di strutto e sugna addizionati di cloruro di sodio, pepe, paprica e farina di cereali. Sugna e stucco sono due impasti che si differenziano tra loro solo per il contenuto in grasso che è maggiore nella sugna. Detti impasti hanno il compito di ammorbidire la superficie esposta del muscolo in modo tale da assicurare un processo osmotico tra questa e l'ambiente esterno.

Stagionatura: Fase delicata perché favorisce la maturazione ed il raggiungimento di una buona aromatizzazione del prodotto, attraverso un processo tecnologico che implica variazioni di umidità, di temperature e ricambi d'aria. Operazione eseguita in locali arieggiati naturalmente oppure forniti d'impianti di climatizzazione e dura dagli 8 ai 16 mesi.

Disossatura: L'operazione ha lo scopo di eliminare "l'osso" del prosciutto e predisporli all'affettamento. Dopo disosso vengono sottoposti al confezionamento sottovuoto (8,9,10).

Confezionamento e imballaggio: I prosciutti vengono commercializzati in toto o confezionati sottovuoto dopo disosso oppure affettati e confezionati in atmosfera modificata.

La qualità del prodotto, pertanto, dipende dalla composizione, dalla scelta e dalle condizioni igienico-sanitarie delle materie prime, dalla tecnologia di produzione, dagli impianti e dall'ambiente di produzione ed infine dalle



Università degli Studi di Udine

condizioni di conservazione del prodotto (7,8,9,10,28). Ogni punto debole della catena ne può condizionare l'efficienza. Per questo motivo risulta molto importante seguire correttamente ogni fase di produzione e soprattutto osservare le norme igieniche onde evitare la messa in commercio di prodotti di basso valore organolettico e di qualità igienica scadente.

Le materie prime sono dei substrati ottimali per lo sviluppo dei germi in quanto la loro composizione chimica, il loro potenziale redox, il loro pH, l' a_w e la loro umidità non costituiscono un impedimento per la proliferazione batterica.

Le fonti di contaminazione sono rappresentate da tutto quello che viene a contatto con l'alimento durante il processo tecnologico e in particolare da: impianti di produzione, superfici e utensili, aria confinata dell'ambiente ed il suo grado d'umidità, acqua impiegata, addetti alla produzione (3,9,10,16). L'aria confinata nelle celle di lavorazione ha una grande influenza sulla carica microbica del prodotto, quando questa è presente sia sottoforma di materia prima di intermedio o di prodotto finito. Infatti alcune alterazioni quali fermentazioni acide e fermentazioni putride sono causati da difetti tecnologici e contaminazioni massive proprie della carne o derivanti dall'ambiente.

In particolare durante le fasi di salatura, di stagionatura e di stagionatura è possibile che le attrezzature, le bilancelle, le grate su cui sono posti i prosciutti a maturare e le pareti dei locali e l'aria confinata veicolino sul prodotto microrganismi patogeni e alteranti, il cui sviluppo però poi rimane strettamente legato alla temperatura, alla concentrazione del sale e al grado di a_w .

Le muffe derivanti dall'aria e dall'ambiente delle celle potrebbero svilupparsi in tali prodotti durante la stagionatura o la stagionatura e produrre dei difetti denominati di acido fenico (5,7,17,27) o produrre infestazioni di acari. Tra i microrganismi derivanti dall'aria oltre che dalla materia si annovera *Listeria monocytogenes*. Questa non sviluppa sui prosciutti crudi a causa della presenza di sale e del grado di a_w che è inferiore o uguale a 0.92 unità. Infatti le cosce di suino, la materia prima del prosciutto crudo, vengono salate, disidratate e stagionate per più di un anno fino a quando l' A_w risulta pari o inferiore a 0.92. L'abbassamento lento e costante dell' a_w impedisce lo sviluppo e può produrre la morte dei microrganismi contaminanti e di conseguenza patogeni, quali *L.monocytogenes*, non possono sviluppare; anzi nel tempo si possono inattivare (10,16). Tuttavia *L.monocytogenes* può ricontaminare il prosciutto crudo durante le fasi che precedono la sua commercializzazione. In particolare è possibile che le fasi di disosso o di affettamento, se eseguite in ambienti o con attrezzi non sufficientemente sanificati, possano favorire questa ricontaminazione. Tuttavia per la sua bassa A_w ($< 0.90 \pm 0.01$), il prosciutto crudo sia affettato che disossato, non è in grado di supportare la crescita di patogeni e di *L.monocytogenes* (10,16).

In molte nazioni, tra cui l'Italia e gli USA, per questo microrganismo viene richiesta tolleranza "0" sui prosciutti nonostante non sia stata stabilita la dose minima infettante (6,10,13,14,16) e nonostante a tuttora i prodotti alimentari pronti al consumo, pur commercializzati da anni su vasta scala, abbiano provocato un esiguo numero di casi da listeriosi (16).

Per prevenire queste contaminazioni, i prosciuttifici hanno implementato severi piani sistemi HACCP (Hazard analysis critical control point), GMP (Good Manufacturing Practise) e SSOP (Standard Sanification Organization Program) e ciò ha portato a un netto decremento della presenza di *L.monocytogenes* dagli ambienti di produzione e soprattutto da prosciutto crudo. L'efficacia e l'efficienza dei piani HACCP e SSOP è dimostrata dal fatto che la percentuale di isolamento di *L.monocytogenes* da prosciutti crudi interi, in pezzi, disossati o a fette, è da anni inferiore allo 0.3%. Ciò ha permesso di abbassare ulteriormente la probabilità del rischio di produrre patologie nei consumatori, come del resto dimostrato dalla mancanza di denunce di casi di listeriosi inseguito al consumo di questo prodotto. Però c'è ancora molto da fare poiché si è ancora ben lontani dalla sua eradicazione completa (9).

Poiché una delle fonti di contaminazioni del prosciutto di *L.monocytogenes*, di muffe e di microrganismi è l'aria con questo lavoro abbiamo voluto valutare l'impiego di un apparecchio ionizzatore in celle di sale, di stagionatura e di stagionatura allo scopo di ridurre la carica microbica dell'aria ivi confinata. La ionizzazione dell'aria confinata trova da anni largo impiego sia a livello di case private, che case per comunità che in industrie. Gli ioni negativi prodotti hanno la funzione di eliminare particolato, pollini, microrganismi e inquinamento in genere (1,15,18,21,23). Di conseguenza essi svolgono un'influenza positiva sulla prevenzione di patologie quali asma, allergie (4,19,21,22,24,29). Inoltre essi influenzano anche l'umore delle persone. E' noto che depressione, nausea, insonnia, irritabilità, spossatezza, emicrania, attacchi d'asma sono causati dall'eccessiva presenza di ioni positivi nell'ambiente. Infatti spesso le persone metereopatiche mutano il loro umore in seguito a temporali a presenza di venti caldi e secchi, che veicolano nell'aria ioni positivi (19,22,24).



Università degli Studi di Udine

Secondo i medici e gli igienisti gli ioni negativi hanno queste funzioni: potenziano il sistema immunitario, aumentano la capacità del corpo ad usare l'ossigeno presente nell'aria, aumentano la capacità polmonare ad eliminare gli agenti inquinanti, fanno respirare più facilmente, migliorano il sonno, riducono lo stress, aumentano l'attenzione, diminuiscono l'aggregazione delle piastrine.

Di conseguenza suggeriscono di vivere in ambienti disinquinati o utilizzare ionizzatori per decontaminare l'aria. A parte queste considerazioni e suggerimenti per migliorare la vita umana, nell'industria alimentare è di fondamentale importanza la decontaminazione microbica dell'aria. Essa può essere ottenuta attraverso l'impiego di camere chiuse dette camere bianche, dove l'aria insufflata è preventivamente sterilizzata tramite filtrazione oppure nel caso che l'ambiente confinato sia soggetto a frequenti contatti con l'esterno attraverso mezzi fisici quali l'impiego di vapore, di ionizzazione, di radiazioni ionizzanti, di raggi UVA e radiazioni infrarosse (26). In particolare Corry e Mead (11), suggeriscono che la ionizzazione dell'aria confinata di celle frigorifere ha un'influenza positiva sulla carica microbica di carni. Essi, infatti, citano dati secondo i quali le carni conservate in celle con aria ionizzata presentavano cariche inferiori a quelle di carni conservate in celle non soggette ad alcun trattamento.

Pertanto, proprio in base a queste considerazioni, abbiamo voluto verificare se l'impiego di un ionizzatore d'aria (Bioxigen della ditta Sital Klima) permetteva la riduzione della carica microbica dell'aria di celle utilizzate per la produzione del prosciutto di San Daniele.

MATERIALE E METODI

E' stata campionata l'aria prima e dopo trattamento di tre celle: cella sale (C1), cella pre-stagionatura (C2) e cella stagionatura (C3) per la produzione di prosciutti in un prosciuttificio di dimensioni artigianali sito in San Daniele. La prima cella (C1) aveva dimensioni di circa 120 m³, la seconda cella (C2) di circa 150 m³ e la terza cella (C3) di circa 180 m³. L'aria di ogni cella è stata campionata in 5 diversi punti. Quattro punti di campionamento erano rappresentati dagli angoli della cella a distanza di circa 1 m dallo spigolo, mentre il 5 punto di campionamento era costituito dal centro della cella.

I prelievi dell'aria erano eseguiti tramite un campionatore SAS (SAS - Super 100 - PBI International) impostato con un flusso di aspirazione di 100 l/min.

I tempi di prelievo erano i seguenti: Tempo 0 e tempo 24 ore. Tra il prelievo a tempo 0 e quello dopo 24 ore, l'aria della cella era trattata con un apparecchio ionizzatore modello Maia (Bioxigen-Sital-Klima). Dopo il primo prelievo al centro della cella era sistemato l'apparecchio ionizzatore. Questo era acceso e lasciato in funzione nella cella chiusa per 24 ore. Passato tale periodo l'aria della cella era nuovamente campionata.

Le analisi microbiologiche comprendevano la valutazione della carica dei batteri totali e delle muffe. La conta totale era eseguita in Plate Count Agar (Oxoid, Italia), incubato a 30°C per 24 ore. La ricerca di muffe e lieviti era eseguita in Agar Malto (Oxoid, Italia) incubato a temperatura ambiente per 3-5 giorni. Sono state utilizzate piastre a contatto da 55 mm, con 2 diversi terreni selettivi e adatte ad essere utilizzate con lo strumento SAS Super 100 (PBI). I risultati sono stati definiti in UFC/m³ di aria. Ai fini di elaborare i dati è stata condotta l'analisi della varianza (ANOVA) a una via. Per i dati osservati sono state calcolate le medie e le deviazioni standard, e le differenze significative (valutate per $p < 0.05$) sono state determinate mediante l'*Honest Significant Difference Test* (HSD test) di Tukey.

Il modello di ionizzatore Maia, così come il modello Mistral (Bioxigen-Sital Klima) possono essere dimensionati correttamente in base al cubaggio delle celle, al contenuto microbico dell'ambiente, alla quantità e tipologia della merce stoccata, alle persone che entrano nella cella durante la giornata, ad eventuali ricambi d'aria e all'abbattimento microbico che si vuole ottenere. Nel caso particolare l'apparecchiatura (ionizzatore Maia) utilizzata risulta essere sottodimensionata rispetto allo standard normale.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI

I risultati della sperimentazione sono riportati nei grafici 1,2,3,4,5,6. Come si osserva in tutti gli ambienti considerati la carica delle muffe, dei lieviti e dei batteri dell'aria subisce un netto decremento dopo il trattamento di ionizzazione. La diminuzione per entrambi i gruppi microbici risulta compresa tra il 47 e il 53% (tabella 2). Dai dati emerge che le concentrazioni delle diverse popolazioni microbiche presenti prima del trattamento differiscono significativamente da quelle dopo trattamento ($p < 0.05$), a dimostrazione che l'impiego di uno ionizzatore (sistema Bioxigen) è uno dei metodi più efficaci per decontaminare l'aria da pulviscolo, particelle e microrganismi.



Università degli Studi di Udine

La campionatura dell'aria è stata eseguita in cinque punti diversi al centro e agli angoli di ogni cella considerata. La cella sale era di tipo statico, mentre le altre due di tipo dinamico. Ciononostante dai dati emergeva sia una certa omogeneità nelle concentrazioni delle popolazioni microbiche osservate nei cinque punti di prelievo dell'aria, sia una diminuzione in percentuale pressoché simile.

La cella del sale (C1) conteneva inizialmente una carica fungina media di 188 UFC/ m³; carica che dopo trattamento si aggirava attorno a 95 UFC/m³. Non sembrava esistere una grossa differenza tra le diverse cariche osservate a livello dei punti considerati, a dimostrazione di una omogenea distribuzione di questi microrganismi nell'ambiente. In ogni caso il trattamento di ionizzazione produceva una perdita del 49% della flora fungina iniziale. Stesse considerazioni devono essere fatte per la carica batterica presente in questa sala. Infatti mediamente l'aria conteneva circa 113 batteri/ m³. Dopo il trattamento tale carica media era pari a 56 UFC/ m³. La diminuzione si aggirava attorno al 50% del totale iniziale (tabella 2).

L'aria della cella del sale è importante ai fini della contaminazione del prodotto ivi stoccato; più questa è bassa meno probabilità ha il prodotto di risultare contaminato. La salatura delle cosce è infatti una fase delicata in quanto il prodotto è fresco e di conseguenza presentando un a_w superiore a 0.96 unità può essere in grado di supportare lo sviluppo di microrganismi provenienti dalla materia prima o dall'ambiente dove viene salato. Infatti tale fase viene controllata dall'impiego di temperature comprese tra 2 e 4°C e dalla presenza del sale sul muscolo esposto e in parte sulla cotenna della coscia. La bassa temperatura favorisce una lenta ma omogenea penetrazione del sale e il blocco di ogni attività batterica. Tuttavia in questa fase occorre evitare contaminazioni microbiche di origine ambientale, perché queste una volta, che si fissano superficialmente e si adattano a vivere in condizioni di presenza di sale e di bassa temperatura, potrebbero poi sviluppare nelle fasi successive. In particolare nelle fasi a valle della salatura e denominate "fuori sale" e riposo, quando la temperatura ambientale inizia ad essere superiore agli 8°C, questa popolazione microbica potrebbe instaurare fermentazioni anomale o produrre patine superficiali.

La cella di stagionatura (C2) presentava una carica fungina e batterica media rispettivamente di 213 e 116 UFC/ m³; carica che diminuiva dopo il trattamento di ionizzazione. Dopo il trattamento dell'aria di questo ambiente per ventiquattro ore con l'ionizzatore Maia, infatti, la carica fungina residua era pari a 108 UFC/ m³, mentre quella batterica a 60 UFC/ m³. Si osservava pertanto un decremento del 49% della carica fungina e del 48% di quella batterica (tabella 2). Anche in questo caso la buona prassi igienica e di produzione suggerisce di evitare di portare contaminazioni sui prosciutti.

Il prosciutto, ormai, è salato, ha un grado di a_w pari o inferiore a 0.94 e di conseguenza non è più in grado di supportare una crescita microbica. Tuttavia le temperature comprese tra 14 e 19°C e le umidità relative di questa cella comprese tra 70 e 80% erano ottimali per lo sviluppo in superficie di muffe, lieviti e batteri alotolleranti. Inoltre tale crescita potrebbe essere favorita proprio dal mancato controllo della temperatura e dell'umidità relativa. E' noto che durante la fase di stagionatura e di stagionatura si possono osservare sui prosciutti patine superficiali dovute a sviluppi incontrollati di muffe. Ciò comporta la presenza di difetti quali quelli detti di acido fenico (27) e in quegli stabilimenti dove le strutture sono ancora in legno, la presenza di acari, che si cibano dei miceli delle muffe. Pertanto anche nelle celle di stagionatura il controllo della carica dell'aria riveste una fondamentale importanza nell'andamento del processo di maturazione del prosciutto.

L'aria della cella di stagionatura (C3), come ci si aspettava, risultava la più contaminata degli ambienti considerati. La concentrazione media iniziale della carica fungina si aggirava attorno a 332 UFC/m³, mentre quella batterica attorno a 155 UFC/ m³. Il trattamento di ionizzazione produceva decrementi del 47% della carica fungina e del 53% di quella microbica.

In particolare dopo trattamento la carica media dei lieviti e delle muffe era di 174 UFC/m³, mentre quella batterica di 72 UFC/m³. A questo punto il prosciutto ha un valore di a_w pari o inferiore a 0.93 e di conseguenza non supporta lo sviluppo di microrganismi. Tuttavia il mancato controllo della temperatura e soprattutto dell'umidità relativa ambientale potrebbe favorire lo sviluppo superficiale di microrganismi alotolleranti e di muffe, con le note conseguenze precedentemente descritte. Infatti la temperatura (15-22°C) e l'umidità relativa (70-80%) di questa cella sono ottimali per lo sviluppo microbico. In caso di mancato controllo di questi parametri e in particolare l'impiego di valori di umidità relativa superiori a 80% è possibile che l'acqua condensata sulla cotenna favorisca lo sviluppo incontrollato di muffe derivanti dall'ambiente. Di conseguenza, anche se con ciò si scopre l'acqua calda, è importante che, in questa sala, l'aria confinata contenga una carica fungina e batterica inferiore a 200 UFC/m³; carica del resto ottenuta dopo trattamento.

Tutte le celle considerate già in partenza contenevano una popolazione microbica accettabile e inferiore a quella, che di solito si osservava in industrie di prodotti carnei e preparazioni a base di carne. Infatti come



Università degli Studi di Udine

emerge dai dati la più alta carica fungina riscontrata era pari a 350 UFC/m³, mentre la più alta carica batterica era pari a 180 UFC/m³. Entrambe erano osservate, come ci si doveva aspettare, in cella di stagionatura ed erano 10 volte inferiori a quelle riscontrate da laboratori di produzione/trasformazioni delle carni da diversi autori (12, 20). Questi osservarono che la contaminazione dell'aria confinata può differire da locale a locale e può essere compresa tra 2 e 3 unità log/m³ a seconda dell'impianto di produzione considerato. Tale variabilità di carica può essere attribuita all'alimento prodotto, al tipo e al disegno dell'impianto, alle procedure di pulizia, all'attività umana, alla stagione considerata (2, 25).

In particolare è noto che in estate i microrganismi possono moltiplicarsi in tutte le nicchie umide dell'impianto e da lì, in seguito all'evaporazione dell'umidità e alla produzione di polvere, possono portarsi nell'aria confinata contaminandola. Di conseguenza è possibile osservare differenze di 0.5 o 1.0 unità log/m³ tra la carica dell'aria di stagioni fredde e quelle di stagioni calde. In questo lavoro la sperimentazione è stata eseguita durante il periodo inverno/primavera e tuttavia la bassa carica microbica riscontrata non poteva essere attribuita alla stagione in quanto i locali considerati erano condizionati.

Di conseguenza il clima o la temperatura esterna non sembra abbia potuto avere alcuna influenza sulla contaminazione dell'aria confinata dei locali. Probabilmente il basso livello iniziale della contaminazione dell'aria nei locali considerati può essere attribuito alle strutture, che sono di recente costruzione, alla manutenzione delle stesse e soprattutto alla limitata presenza in essi di lavoratori durante tutto l'arco della giornata.

CONCLUSIONI

E' stata valutata l'efficacia di uno ionizzatore (*sistema Bioxigen*) per decontaminare l'aria confinata di celle di un impianto di produzione del prosciutto di San Daniele. I microrganismi esistono nell'aria di ambienti di lavorazione come "passeggeri" di particelle solide di polvere, di pelle, di capelli e vestiti di operatori che lavorano in questi ambienti.

Essi possono essere presenti in gocce dovute agli aerosol formati da impianti di pulizia o da condensa di condizionatori o di impianti che regolano la temperatura e l'umidità relativa delle celle. Gli ambienti considerati comprendevano cella sale, cella prestagionatura e stagionatura. Il trattamento consisteva nella ionizzazione dell'aria di ogni cella per ventiquattrore con un ionizzatore statico Maia (sistema Bioxigen della ditta Sital Klima).

E' noto che la produzione di ioni negativi e in particolare di un giusto rapporto ioni negativi/ioni positivi produca un decremento della contaminazione particellare, microbica e dell'odore nell'aria confinata di un ambiente. Dai dati è emerso che il trattamento con ioni utilizzati produceva una netta diminuzione della popolazione fungina e microbica dell'aria confinata nelle celle considerate. Il decremento microbico era dipendente dalla carica iniziale e dall'ambiente considerato e comunque permetteva di ottenere una diminuzione media in percentuale del 47-52% della carica iniziale.

Le conte post-trattamento permettevano di ottenere un grado di contaminazione inferiore a 200 UFC/m³; contaminazione ritenuta ottimale per questi ambienti di produzione.

La presenza di una bassa carica microbica nell'aria di questi ambienti può influenzare in positivo la qualità igienico-sanitaria del prodotto e può evitare contaminazioni microbiche massive superficiali dei prosciutti; contaminazioni microbiche che in caso di sviluppo possono causare alterazioni e odori e sapori anormali dello stesso.

Poiché la buona prassi igienica e produttiva considera l'aria confinata in un laboratorio di produzione o di trasformazione di prodotti alimentari uno dei principali veicoli di diffusione dei microrganismi, suggeriamo l'impiego di apparecchiature di ionizzazione del sistema Bioxigen (Sital Klima) come mezzo per raggiungere livelli accettabili di contaminazione.



Università degli Studi di Udine

Fasi principali di lavorazione del prosciutto di San Daniele

Percentuale di microrganismi inattivati dopo trattamento con ionizzatore sistema Bioxigen

Cella	Muffe / Lieviti	Batteri
Sale	49.0	50.0
Prestagionatura	49.5	48.0
Stagionatura	47.5	53.2

Descrizione operazioni	Locali di lavorazione		Durata media dei giorni di lavorazione	Durata media in giorni
	Temperatura	Umidità		
Rifilatura, pesatura e raffreddamento	2/3°C	90-95%	1	1
Salatura	2/3°C	90-95%	15	16
Pressatura	4/5°C	70%	2	18
Preriposo	4/6°C	70-75% 80-85%	21	39
Riposo (toielettatura, rinvenimento e lavaggio)	da 4/6°C a 8/10°C		54	93
Asciugamento	20/27°C	90%	8	101
Prestagionatura	12/14°C	85-80%	37.5	138.5
	14/19°C	75-70%		
Stagionature e stuccatura	15/22°C	70-80%	240	378.5

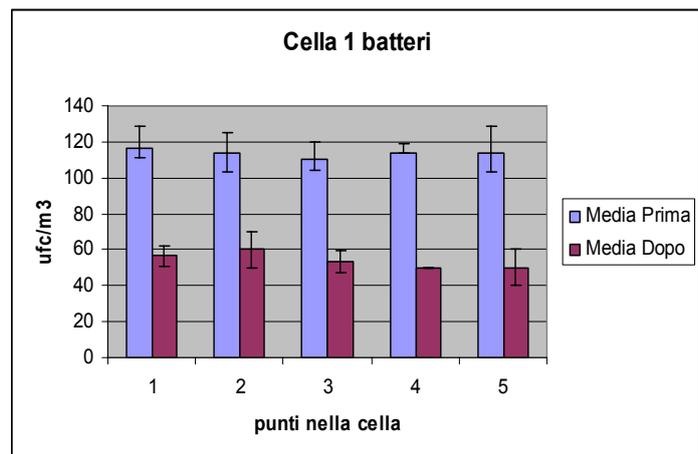
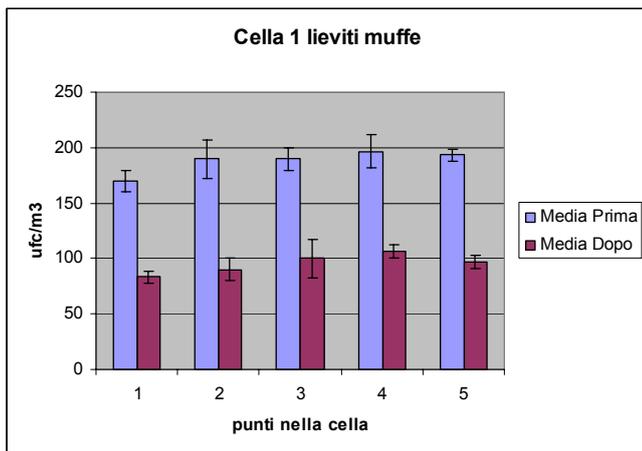


Grafico 1: Variazione media della concentrazione dei lieviti e delle muffe prima e dopo il trattamento con ionizzatore

Grafico 2: Variazione media della concentrazione dei batteri prima e dopo il trattamento con ionizzatore.

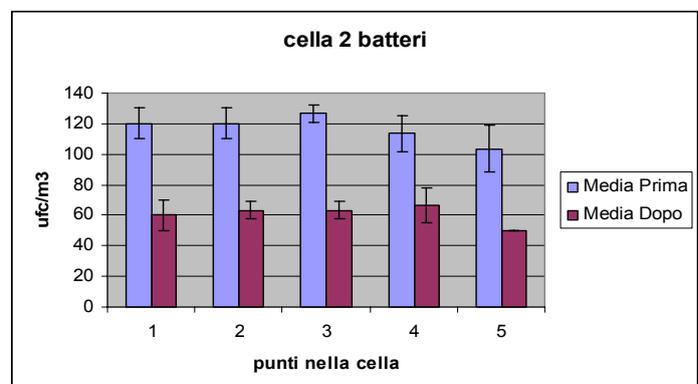
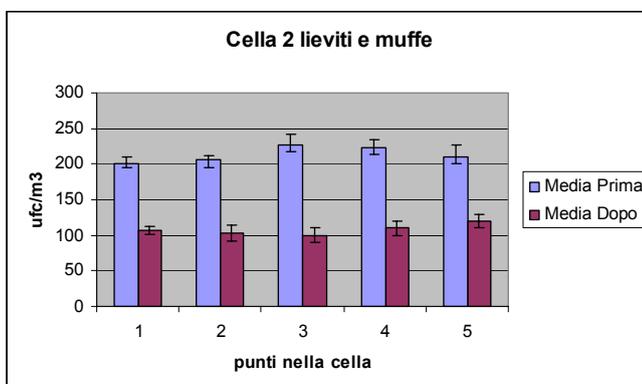


Grafico 3: Variazione media della concentrazione dei lieviti e delle muffe prima e dopo il trattamento con ionizzatore

Grafico 4: Variazione media della concentrazione dei batteri prima e dopo il trattamento con ionizzatore



Università degli Studi di Udine

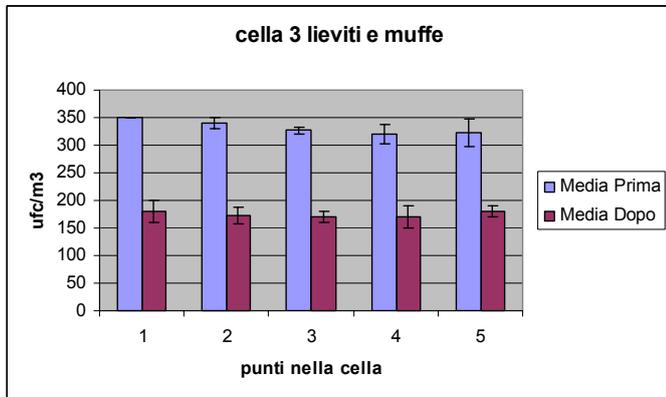


Grafico 5: Variazione carica media della oncentrazione dei lieviti e delle muffe prima e dopo il trattamento con ionizzatore

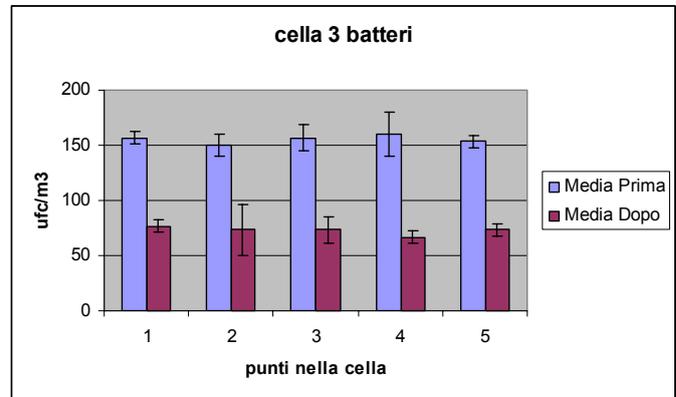


Grafico 6: Variazione media della concentrazione dei batteri prima e dopo il trattamento con ionizzatore

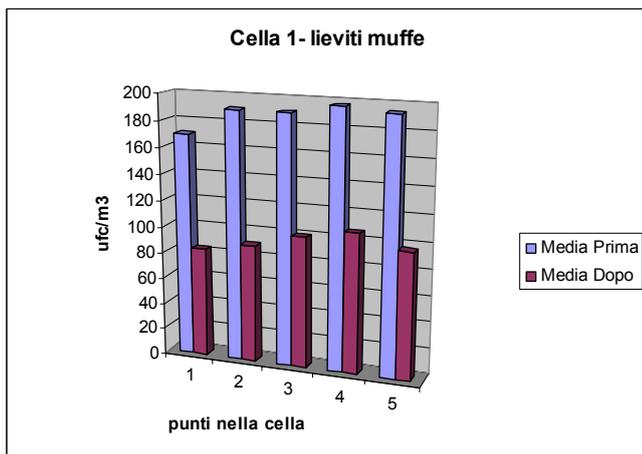


Grafico 1: Variazione media della concentrazione dei lieviti e delle muffe prima e dopo il trattamento con ionizzatore

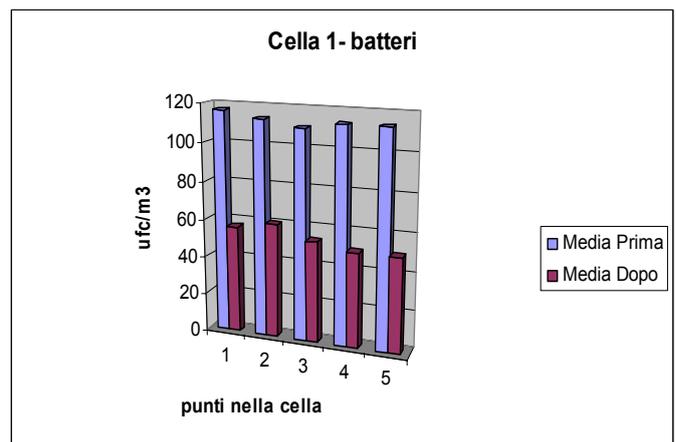


Grafico 2: Variazione media della concentrazione dei batteri prima e dopo il trattamento con ionizzatore

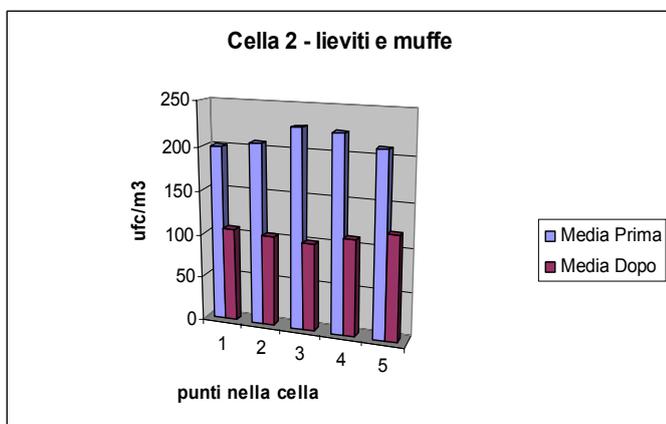


Grafico 3: Variazione media della concentrazione dei lieviti e delle muffe prima e dopo il trattamento con ionizzatore

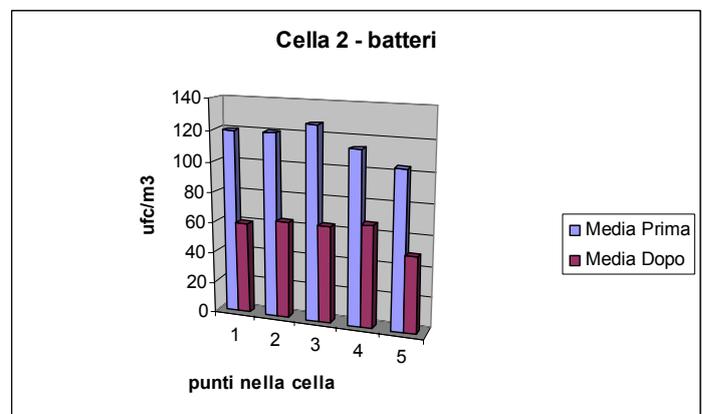


Grafico 4: Variazione media della concentrazione dei batteri prima e dopo il trattamento con ionizzatore



Università degli Studi di Udine

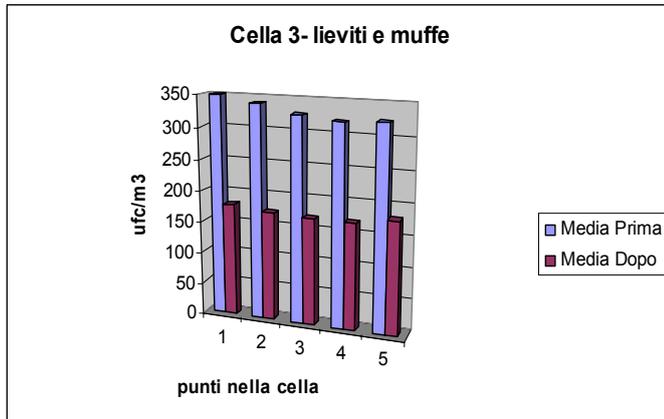


Grafico 5: Variazione carica media della concentrazione dei lieviti e delle muffe prima e dopo il trattamento con ionizzatore

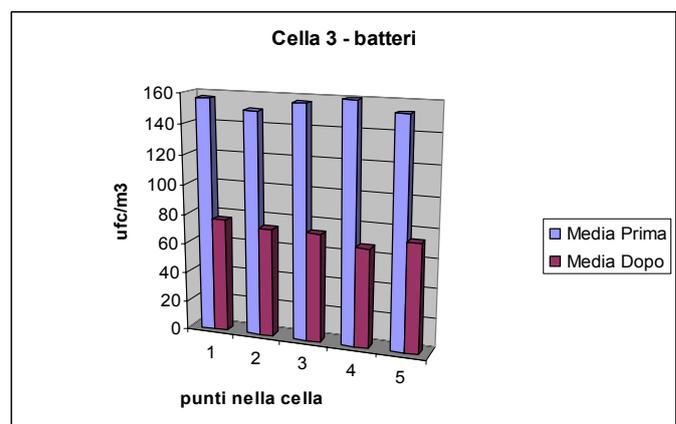


Grafico 6: Variazione media della concentrazione dei batteri prima e dopo il trattamento con ionizzatore

Bibliografia

- 1) A.A.V.V. I benefici degli ioni negativi. http://www.eurodream.net/link_bib/benefici.htm.
- 2) Al-Dagal, M., D.Y.C. Fung (1990) Aeromicrobiology-a review. Food Sci. and Nutrit. 29 (5), 333-340.
- 3) Baldini, P. (1996). "Tecniche di preparazione del prosciutto stagionato". Tecnologie Alimentari. 2, 65-71.
- 4) Boutalov, P.C. (1968) Trattamento dell'asma bronchiale attraverso la ionizzazione negativa dell'aria. In "Bioclimatologia, Biometeorologia e Aerionoterapia" Ed. R. Gualtierotti et al., p.104 Carlo Erba, Milano.
- 5) Casado Volitiva M.J., M.A.Diaz Borrás and R.V. Aguilar (1991) Fungal flora present on the surface of cured spanish ham. Fleirtwirtschaft, 71 (11) 1300-1302.
- 6) Codex Alimentarius Commission "Proposed Draft Guidelines for the Control of *Listeria monocytogenes* in food" CX/FH03/8 October 2002.
- 7) Comi, G., S.Orlic, S. Redzepovic, R.Urso and L.Iacumin (2004) Moulds isolated from Istrian dried ham at the pre-ripening and ripening level. Int. J. Food Microbiol., 96,29-34.
- 8) Comi, G. (1997). "Il prosciutto: un alimento moderno di origine antica". Da "Le cucine della memoria". FORUM. Ed. Eurostampa. San Daniele del Friuli (UD). 184-194.
- 9) Comi, G. e G.Duratti. Manuale pratico "Organizzazione funzionale e controllo dell'igiene e della sicurezza negli ambienti di lavorazione del prosciutto di San Daniele". Ed. a cura del Consorzio del Prosciutto di San Daniele.
- 10) Comi G., R.Urso, M.Paiani, S.Ottaviani (2005) Prosciutto crudo stagionato e confezionato in atmosfera modificata o in sottovuoto. Effetto di diversi additivi e dell'Aw sul comportamento di *L. monocytogenes*. Ind. Alim., XLIV, Marzo, 272-278.
- 11) Corry, M. and J.Mead (1996) cit. in Smulders, J.M., and M.Upmann (2001) Reduction of microbial contamination on fresh meat. Fleischwirtschaft Int. 2, 57-59.
- 12) den Aantrekker, E.D., R.R. Beumer, S.J.C. van Gerwen, M.H. Zwietering, M. van Schothorts, R.M. Boom (2003) Estimating the probability of recontamination via the air using Monte Carlo simulations. Int. Food Microbiol.,87,1-15.
- 13) FDA/FSIS "Control of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-eat Meat and Poultry Products" 9 CFR Part 430 June 2003.
- 14) Food and Drug Administration Food Safety and Inspection Service (FDA-FSIS, February, 10th, 2003) – Draft FSIS Risk Assessment for *Listeria* in Ready-to-eat-Meat and Poultry product.
- 15) Gabbay, J. (1990) Effect of ionization on microbial air pollution in the dental clinic. Environm. Res., 52, 1-59.
- 16) Grisenti, M.S., D. Lori, L. Vicini, N. Bovis, B. Pedrelli e S. Barbuti (2004) Comportamento di *Listeria monocytogenes* in prosciutto crudo stagionato in rapporto all'atmosfera di confezionamento e alla temperatura di conservazione. Ind. delle Conserve, 79, 3-12.
- 17) Grisenti, M.S., E. Rastelli, P. Mutti, S. Quintavalla, S. Barbuti (2001) Flora microbica superficiale del prosciutto crudo. Ind. delle Conserve, 76, 269-274.
- 18) Kreuger, A.P., R.F. Smith et al., (1957) The action of air ions on bacteria. J. Gen. Physiol., 41, 359-381.
- 19) Kreuger, A.P. (1962) Ioni dell'aria e funzionalità fisiologica. Rivista di Medicina generale, 45, Suppl. 233.
- 20) Kotula, A.W., B.S. Emswiler-Rose (1988) Airborne microorganisms in a pork processing establishment. J. Food Protect., 51 (12), 935-937.
- 21) Masino, A.M. e G. Terzani (2003) Attività biologica, antibatterica ed antivirale della ionizzazione negativa dell'aria. Giorn. It. Mal. Tor., 57, 23-28.
- 22) Palti, Y., E. De Nour e A. Abrahamov (1966) Gli effetti degli ioni atmosferici sul sistema respiratorio dei bambini. Pediatria, 38, 405.
- 23) Phillips, G., G.J. Harris, et al., (1963) The effects of ions on microorganisms. Int. J. Biometeorol., 8, 27-37.
- 24) Poole, T.G., M.F. Galla and J. Berrier (1981) The influence of negative air ions on human performance and mood. Human Factor, 23, 633-636.
- 25) Ren, T.J. and J.F. Frank (1992) Sampling of microbial aerosols at various location in fluid milk and ice cream plants. J.- Food Protect. 55 (4), 279-283.
- 26) Smulders, J.M., and M. Upmann (2001) Reduction of microbial contamination on fresh meat. Fleischwirtschaft Int. 2, 57-59.
- 27) Spotti, E., P. Mutti e M. Campanini (1988) Indagine microbiologica sul "Difetto dell'acido fenico" del prosciutto durante la stagionatura. Ind. Conserve, 63, 343-346.
- 28) Zacchi Cossetti L. (1985). "La lavorazione e le caratteristiche del prosciutto di San Daniele". Da Seminari di Aggiornamento della Camera di Commercio, Industria e Artigianato. Udine.
- 29) Zylberberg, B.E. and M.H. Loveless (1960) Esperimenti preliminari con l'aria ionizzata nell'asma. La rivista dell'allergia, 31, 370.

KLIN-AIR

PER L'ARIA PERFETTAMENTE LAVATA

in collaborazione con **Bioxigen®**

Klimagiel s.r.l.

Via Mezzacampagna 52 int.37, 37135 Verona, Italia

P.Iva 02868700234

www.klimagiel.it

tel. +39 045 916672

