

INATIVAÇÃO DE *Escherichia coli* O157:H7 E *Bacillus subtilis* POR ÁGUA OZONIZADA

DANIEL AUGUSTO CAVALCANTE *
BRUNO RICARDO DE CASTRO LEITE JÚNIOR **
ALLINE ARTIGIANI LIMA TRIBST ***
MARCELO CRISTIANINI ****

O objetivo deste trabalho foi estudar a eficiência da água ozonizada para a inativação de *Escherichia coli* O157:H7 e *Bacillus subtilis*. O sanitizante foi utilizado nas concentrações de 0,6, 0,8 e 1,0 mg.L⁻¹ e tempos de contato de 1, 3 e 5 minutos. Avaliou-se a eficiência do sanitizante em função de contagens totais em placas para cada micro-organismo alvo. Obtiveram-se reduções decimais de 1,9, 3,9 e 6,6 para *E. coli* O157:H7 quando aplicado ozônio por 1 minuto nas concentrações de 0,6, 0,8 e 1,0 mg.L⁻¹, respectivamente. Para os demais tempos de exposição (3 e 5 minutos) e concentração de 1,0 mg.L⁻¹ não foi possível a recuperação de *E. coli* O157:H7, obtendo-se mais de 8 ciclos de redução decimal. Para o *B. subtilis*, no tempo de exposição de 1 minuto e com a concentração inicial de 10⁸ esporos.mL⁻¹, as reduções foram de 2,5 e 5,3 ciclos logarítmicos nas concentrações de 0,6 e 1,0 mg.L⁻¹, respectivamente. Para o tempo de 3 minutos, os esporos foram inativados em até 5,8 ciclos logarítmicos na concentração de 1,0 mg.L⁻¹. Os resultados demonstraram que a maior atividade do ozônio ocorre em até 1 minuto de contato, porém há atividade residual até 5 minutos, o que permite a utilização de concentrações menores (0,6 mg.L⁻¹) para se obter níveis seguros de inativação, desde que associados a maior tempo. O sanitizante mostrou-se eficaz na inativação de *E. coli* O157:H7 e esporos de *B. subtilis*.

PALAVRAS-CHAVE: SANITIZAÇÃO; OZÔNIO; *Escherichia coli* O157:H7; *Bacillus subtilis*; ÁGUA OZONIZADA.

- * Doutor em Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil (e-mail: cavalcante.dac@uol.com.br).
- ** Doutorando em Tecnologia de Alimentos, FEA, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil (e-mail: brunorclj@gmail.com).
- *** Doutora em Tecnologia de Alimentos, FEA, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil (e-mail: alline.lima.tribst@gmail.com).
- **** Professor, Doutor em Ciência de Alimentos, FEA, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil (e-mail: olecram@fea.unicamp.br).

1 INTRODUÇÃO

A ozonização tem sido utilizada na Europa para sanitizar água para o consumo humano (KIM, YOUSEF e DAVE, 1999). Outros usos comerciais incluem tratamento de piscinas, sanitização de galões de água, higienização de câmara-frias e equipamentos utilizados no processamento de alimentos, além da inativação da microbiota contaminante em produtos cárneos, derivados lácteos, aves, peixes, frutas e vegetais (SHARMA e DEMIRCI, 2003).

O ozônio, forte agente antimicrobiano, apresenta alta reatividade e decomposição espontânea na água em produtos não tóxicos (KIM, YOUSEF e CHISM, 1999; CHIATTONE, TORRES e ZAMBAZI, 2008). O Food and Drug Administration (FDA) regulamentou a utilização do ozônio nas formas aquosa ou gasosa como método seguro para desinfecção de alimentos e de unidades processadoras de alimentos, quando combinado com boas práticas de fabricação (GUZEL-SEYDIM, GREENE e SEYDIM, 2004; SHARMA e DEMIRCI, 2003).

Como sanitizante, o ozônio atua primeiramente na membrana celular reagindo com glicoproteínas ou glicolipídeos. Além disso, promove a oxidação das organelas citoplasmáticas e do DNA no núcleo, degradando purinas e pirimidinas do DNA que resulta na morte celular (MACEDO, 2004). É efetivo em baixas concentrações e necessita de pequeno tempo de contato para inativar bactérias, fungos, leveduras, parasitas e vírus (KIM, YOUSEF e DAVE, 1999). Estirpes patogênicas de *Escherichia coli* causam doenças que incluem desde diarreias mais brandas a casos mais graves, como a colite hemorrágica e a síndrome hemolítica urêmica (BOSILEVAC e KOOHMARAIE, 2011). Em países desenvolvidos, o sorotipo O157:H7 representa a principal causa de doenças em humanos (JURE *et al.*, 2010). Infecções causadas por *E. coli* O157:H7 são decorrentes do consumo de alimentos e água contaminados e do contato direto com fezes de animais infectados (BENTANCOR *et al.*, 2010).

Espécies como *Bacillus cereus*, *B. sporothermodurans* e *B. subtilis* são aeróbias, Gram positivas e formadoras de esporos, os quais são amplamente dispersos na natureza, sobrevivendo a processos térmicos e, por isso, importantes contaminantes dos alimentos (VAEREWIJK *et al.*, 2001). O *B. subtilis* tem sido utilizado como micro-organismo indicador de processos de sanitização química pela sua alta resistência frente a essas substâncias.

A efetividade da inativação microbiológica por água ozonizada mostrou-se diferente em função do tipo de micro-organismo avaliado e o conhecimento da cinética de inativação microbiana torna-se importante para determinar condições seguras do processo. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a inativação de *E. coli* O157:H7 e *B. subtilis* por meio de tratamento com água ozonizada em diferentes concentrações e tempos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório Fazenda da Aeronáutica de Pirassununga (SP). As culturas de *E. coli* O157:H7 ATCC 35150 e *B. subtilis* ATCC 6633 utilizadas foram obtidas na Seção de Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz e mantidas a 4 °C em rampa de Ágar Triptico Soja (TSA, Difco, USA) inclinado. As culturas foram repicadas semanalmente para manutenção da viabilidade das células (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1988). Para a preparação da suspensão de esporos empregou-se TSA adicionado de 3 % de sulfato de manganês (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1988).

2.1 PREPARO DO INÓCULO

Prepararam-se as suspensões dos micro-organismos em tubos contendo 10 mL de meio de cultura TSA inclinado, nos quais foram estriadas as estirpes de *E. coli* O157:H7 e *B. subtilis*, sendo os tubos incubados a 35 °C durante 24 horas. Empregando-se 3 mL de solução fisiológica estéril 0,1 %, as culturas de *E. coli* O157:H7 e *B. subtilis* crescidas foram transferidas para garrafa

de Roux contendo 250 mL do mesmo meio de cultura (TSA). Para *B. subtilis*, o meio foi adicionado de 3 % de sulfato de manganês. Incubou-se o frasco de Roux que continha *E. coli* O157:H7 a 35 °C por 24 horas e o que continha *B. subtilis* a 35 °C por 5 dias para garantia de esporulação do micro-organismo.

As culturas resultantes na superfície do meio foram lavadas com 50 mL de solução fisiológica 0,1 % estéril, com o auxílio de pérolas de vidro, obtendo-se a suspensão do micro-organismo. Ajustaram-se as diluições de *E. coli* O157:H7 e *B. subtilis* para obtenção de soluções com 60 % de transmitância em comprimento de onda de 580 nm, empregando espectrofotômetro de ultravioleta visível (UV/VIS). Tal transmitância equivale a 10^8 UFC.mL⁻¹ ou 10^8 esporos.mL⁻¹, verificada pelo método de contagem em placas. Enumerou-se a suspensão de *B. subtilis* após choque térmico (70 °C/30 minutos). A enumeração de ambos os micro-organismos ocorreu em meio TSA, mediante contagem em placas (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

2.2 GERADOR DE OZÔNIO

Utilizou-se equipamento para a produção de ozônio, fabricado pela empresa Panozon, constando de gerador de ozônio modelo PNZ 714, concentrador de oxigênio (90 a 95 % de pureza), tanque de contato e sistema de injeção com bomba para filtração. O sistema conta também com tanque de gaseificação para separar o ozônio que permaneceu na forma de gás, retirá-lo da tubulação e enviá-lo ao circuito interno para ser destruído (reduzido a oxigênio). A água ozonizada recircula na vazão de 20 L.min⁻¹ para cuba de aço inoxidável com capacidade de 50 litros. O equipamento permite o controle da concentração de ozônio produzido de 0,6 mg.L⁻¹ a 1,2 mg.L⁻¹.

2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE NEUTRALIZANTE DO TIOSSULFATO DE SÓDIO 10 %

A atividade neutralizante e a inocuidade da solução de tiossulfato de sódio a 10 % foram determinadas utilizando-se a estirpe de *E. coli* O157:H7, mais sensível à ação do ozônio que o *B. subtilis*.

A partir do inóculo de *E. coli* O157:H7 (obtido conforme o item 2.1) preparou-se solução de trabalho 1:100. Transferiu-se alíquota de 1 mL da suspensão bacteriana inicial para garrafa de diluição contendo 99 mL de soro fisiológico estéril e pérolas de vidro para facilitar a diluição, sendo sua população fixada em aproximadamente 10^6 UFC.mL⁻¹. A partir da solução obtida foram preparadas 4 soluções denominadas A, B, C e D, diluindo-se 1 mL em 100 mL de água destilada (Solução A), 100 mL de água destilada e 0,2 mL de tiossulfato de sódio 10 % (Solução B), 100 mL de água ozonizada e 0,2 mL de tiossulfato de sódio 10 % (Solução C) e 100 mL de água ozonizada (Solução D).

Após 3 minutos de preparo das soluções, os sobreviventes foram enumerados pelo método padrão de contagem (em placas) utilizando-se ágar TSA. Realizou-se o ensaio em triplicata e duas repetições de análise de forma a averiguar a repetibilidade do processo (TRIBST, CRISTIANINI e MASSAGUER, 2009).

2.4 INATIVAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS COM TRATAMENTO DE OZÔNIO

Utilizaram-se nos tratamentos de *E. coli* e *B. subtilis* concentrações de 0,6, 0,8 e 1,0 mg.L⁻¹ de ozônio e tempos de exposição de 1, 3 e 5 minutos. Efetuou-se a ozonização de água de abastecimento público, 22 °C e pH 7,6, transportada em *erlenmayer* de 500 mL. Determinou-se a concentração de ozônio livre por meio de fotometria, utilizando o Kit Ozônio 2 (Vacu-Vials) – CHEMetrics Inc., que consistiu na preparação de branco com água destilada, seguida de leitura da amostra de água ozonizada recolhida em cubeta do equipamento. A quantificação dos resultados ocorreu mediante leituras em fotômetro CHEMetrics Inc. – Ozone2 – Tipo I-2015.

Após as exposições dos micro-organismos à água ozonizada, interrompeu-se a ação

do ozônio com a adição de 0,1 mL de solução de tiosulfato de sódio 10 %. As amostras foram avaliadas mediante plaqueamento em TSA e o número de sobreviventes expressos em UFC.mL⁻¹ ou esporos.mL⁻¹. Efetuou-se a contagem da suspensão utilizada para determinação do número inicial de células. Os ensaios foram realizados em triplicata e as contagens em duplicata de forma a avaliar a repetibilidade dos resultados (DOWNES e ITO, 2001).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ATIVIDADE NEUTRALIZANTE DO TIOSSULFATO DE SÓDIO 10 %

A Tabela 1 apresenta os resultados que comprovam a eficiência e inocuidade do agente neutralizante tiosulfato de sódio. As concentrações iniciais para a primeira e a segunda repetições foram, respectivamente, $6,3 \times 10^6$ e $8,4 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹ e o tempo de exposição às suspensões de 3 minutos.

TABELA 1 - AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA E INOCUIDADE DO AGENTE NEUTRALIZANTE TIOSSULFATO DE SÓDIO EM RELAÇÃO À CEPA DE *E. coli* O157:H7

| AMOSTRA | Contagem de <i>E. coli</i> O157:H7 (UFC mL ⁻¹) 1ª Repetição | Contagem de <i>E. coli</i> O157:H7 (UFC mL ⁻¹) 2ª Repetição |
|---------|--|--|
| A | $5,6 \times 10^6$ | $2,9 \times 10^6$ |
| B | $4,2 \times 10^6$ | $6,3 \times 10^6$ |
| C | $3,7 \times 10^6$ | $5,1 \times 10^6$ |
| D | <10 | <10 |

A = Suspensão de células de *E. coli* O157:H7 em solução aquosa. B = Suspensão de células de *E. coli* O157:H7 em solução aquosa em presença de tiosulfato de sódio 10 %. C = Suspensão de células de *E. coli* O157:H7 em solução de água ozonizada (1 mg.L⁻¹) em presença de tiosulfato de sódio 10 %. D = Suspensão de células de *E. coli* O157:H7 em solução de água ozonizada (1 mg.L⁻¹).

Não foi observada diferença entre as amostras A, B e C, indicando que o tiosulfato não inibe *E. coli* O157:H7 e também sua capacidade de neutralizar o ozônio. Já na suspensão D (solução de água ozonizada 1 ppm), o sanitizante sem a presença do tiosulfato de sódio inativou o micro-organismo. A utilização do tiosulfato de sódio assume extrema importância para neutralizar o ozônio e, com isso, verificar a eficiência do sanitizante no período de tempo especificado sem incorrer no erro do fator residual.

Os resultados apresentados estão de acordo com os observados por Khadre, Yousef e Kim (2001) que utilizaram em trabalho de inativação de micro-organismos com água ozonizada, os mesmos parâmetros de neutralização para interromper a ação do tratamento nos tempos determinados.

3.2 INATIVAÇÃO DE *E. Coli* O157:H7 E *B. subtilis* POR ÁGUA OZONIZADA

A Figura 1 mostra a contagem de *E. coli* O157:H7 por mL de suspensão após ozonização em diferentes condições.

Os dados demonstram que a efetividade da ação do ozônio ocorre em função do tempo de exposição do micro-organismo ao sanitizante, sendo a maior taxa de redução observada após o primeiro minuto de contato, independentemente da concentração de ozônio utilizada. Verificou-se que nesse tempo o ozônio foi capaz de promover mais de 5 reduções decimais, mostrando excelente

performance de inativação. Para a concentração de ozônio de 0,8 mg.L⁻¹, o contato por 3 minutos foi capaz de garantir o mesmo nível de inativação. Na concentração de 0,6 mg.L⁻¹, apenas 4 reduções decimais foram observadas mesmo após 5 minutos de contato. Nenhuma diferença foi constatada entre a amostra tratada após 3 e 5 minutos na menor concentração avaliada, indicando que a parcial degradação do ozônio após 3 minutos de contato resultou na redução da concentração abaixo do limite mínimo para a efetividade do sanitizante. Resultados obtidos por outros autores mostraram 2,6 e 3,7 reduções decimais de *E. coli* O157:H7 em maçãs após 3 minutos de contato com ozônio nas concentrações de 22 e 24 mg.L⁻¹, respectivamente (ACHEN e YOUSEF, 2001). A diferença dos níveis de inativação reside no fato do trabalho citado ter sido realizado com fruto, cuja presença de matéria orgânica é responsável pelo consumo parcial do ozônio adicionado e também pela possível infiltração do micro-organismo no fruto, o que reduz a eficácia da desinfecção superficial realizada pelo ozônio. Kim e Yousef (2000), por outro lado, constataram 1,3 e 3,8 reduções decimais de *E. coli* O157:H7 em água após a aplicação das concentrações de 0,3 e 1,0 mg.L⁻¹ de ozônio por 25 segundos. Esses resultados demonstram a efetividade do ozônio na inativação de *E. coli* O157:H7 presente na água e que o desafio de inativação em alimentos é maior, devendo-se avaliar o processo caso a caso.

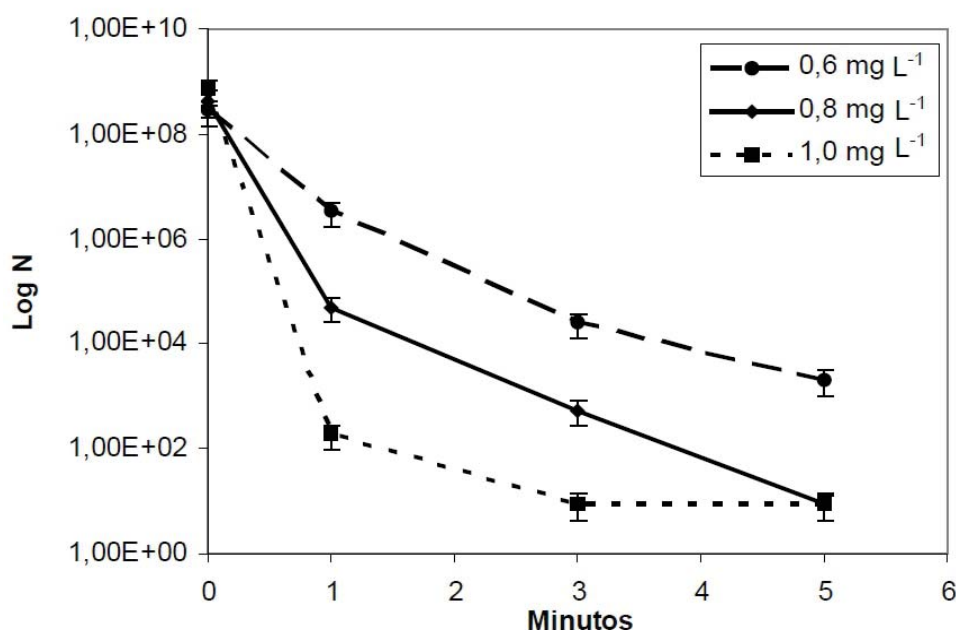


FIGURA 1 – CONTAGEM DE *E. coli* O157:H7 EM FUNÇÃO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO ÀS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁGUA OZONIZADA

A Figura 2 mostra a contagem de *B. subtilis* por mL de suspensão após ozonização em diferentes condições.

A avaliação dos resultados demonstrou novamente que o processo foi mais efetivo no primeiro minuto de contato, obtendo-se proporcionalmente os maiores níveis de redução. As várias concentrações de ozônio avaliadas também mostraram diferentes níveis de inativação. As amostras tratadas com 0,8 e 1,0 mg.L⁻¹ de ozônio, após 5 minutos de contato, resultaram em cerca de 7 reduções, enquanto a amostra tratada com 0,6 mg.L⁻¹ de ozônio evidenciou 5 reduções decimais. Os resultados obtidos mostraram-se semelhantes aos encontrados por Macedo (2004), que relatou a utilização de ozônio em amostras de água inoculadas com populações de 10⁶ esporos.mL⁻¹ de *B. subtilis* e constatou redução de 3,0 ciclos logarítmicos para concentrações de 0,35 a 0,70 mg.L⁻¹.

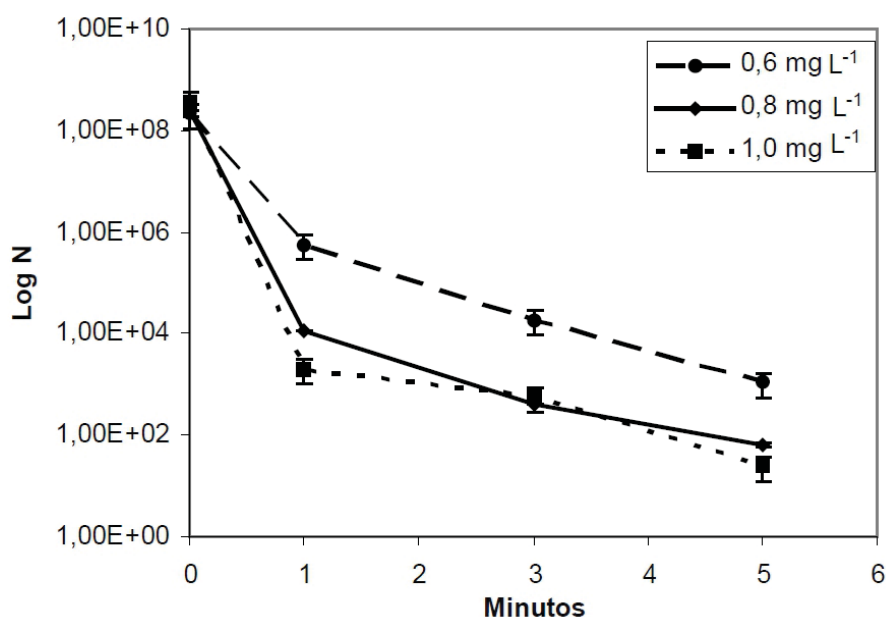


FIGURA 2 – CONTAGEM DE *B. subtilis* EM FUNÇÃO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO ÀS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁGUA OZONIZADA

Os esporos de bactérias apresentaram maior resistência ao ozônio quando comparados a células vegetativas. A *E. coli* O157:H7 evidenciou redução de 6,6 ciclos logarítmicos no tempo de 1 minuto na concentração de 1 mg.L⁻¹, enquanto o *B. subtilis* apresentou redução de 5,3 ciclos logarítmicos nas mesmas condições. Para os tempos de 3 a 5 minutos, na concentração de 1 mg.L⁻¹, a *E. coli* O157:H7 mostrou reduções superiores a 8 ciclos logarítmicos e o *B. subtilis* 5,8 e 7,2 ciclos logarítmicos, respectivamente. Pode-se considerar o ozônio como método efetivo para a inativação de *B. subtilis* em água, apesar dos menores níveis de inativação.

Outros autores demonstraram 3 reduções decimais de *B. subtilis* em água ozonizada a 0,35 mg.L⁻¹ (MACEDO, 2004) e 2 reduções decimais de *Bacillus* sp. em água ozonizada a 0,12 mg.L⁻¹ após 5 minutos de contato (BROADWATER, HOEHN e KING, 1973), sendo os resultados do presente trabalho compatíveis com os previamente obtidos. Khadre e Yousef (2001) compararam a ação do peróxido de hidrogênio e da água ozonizada e observaram que o tratamento com água ozonizada (11 mg.L⁻¹/ 1 minuto) inativou até 6,1 ciclos logarítmicos de diferentes espécies de *Bacillus*. Nas mesmas condições, o peróxido de hidrogênio a 10 % resultou em apenas 1,6 reduções decimais. Tais resultados indicam que o ozônio apresenta ação microbicida muito superior à do peróxido de hidrogênio.

4 CONCLUSÃO

A água ozonizada nas concentrações de 0,6, 0,8 e 1,0 mg.L⁻¹ nos tempos de contato de 1, 3 e 5 minutos resultou em diferentes níveis de inativação de *E. coli* O157:H7 e de esporos de *B. subtilis* em água. Foram obtidas mais de 6 reduções decimais para *E. coli* O157:H7 quando utilizadas concentrações de ozônio de 0,8 mg L⁻¹/3 minutos ou 1 mg L⁻¹/1 minuto de contato e para *B. subtilis* em concentrações de ozônio de 0,8 ou 1 mg L⁻¹ por 5 minutos de contato.

Observou-se resistência ligeiramente maior dos esporos de bactérias ao ozônio, quando comparados a células vegetativas e que o tiosulfato de sódio constitui excelente substância para ser utilizada como neutralizante da ação do ozônio.

ABSTRACT

INACTIVATION OF *Escherichia coli* O157: H7 AND *Bacillus subtilis* BY OZONATED WATER

The objective of this work was to evaluate the efficacy of ozonized water on the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Bacillus subtilis*. The sanitizer was evaluated at concentrations of 0.6, 0.8 and 1.0 mg.L⁻¹ applying contact time of 1, 3 and 5 minutes. The ozone efficacy was evaluated through the enumeration of microorganisms before and after processing. *E. coli* O157:H7 decimal reductions varied from 1.9 to 6.6 after 1 minute of contact time at concentrations of 0.6, 0.8 and 1.0 respectively. At other exposure time evaluated (3 and 5 minutes) a total *E. coli* O157:H7 inactivation (> 8 decimal reductions) was reached. For *Bacillus subtilis*, after the first minute of contact, at a concentration of 108 spores mL⁻¹, decimal reductions varied from 2.5 to 5.3 at concentrations of 0.6 e 1.0 mg.L⁻¹ respectively. After 3 minutes of contact time spores were inactivated within 5.8 log cycles at a 1.0 mg.L⁻¹ concentration. The results showed that the main ozone activity occurs up to one minute of contact, however, it have an residual activity up to 5 minutes, which allows the application of lower ozone concentration (0.6 mg.L⁻¹) to reach safe levels of microbial inactivation combined to longer periods of exposure. The ozonized water has proved to be an effective sanitizer for the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Bacillus subtilis*.

KEY-WORDS: SANITIZER; OZONE; *Escherichia coli* O157:H7; *Bacillus subtilis*; OZONATED WATER.

REFERÊNCIAS

- 1 ACHEN, M.; YOUSEF A.E. Efficacy of ozone against *Escherichia coli* O157:H7 on apples. **Journal of Food Science**, v.66, n.9, p.1380-1384, 2001.
- 2 BENTANCOR, A.; VILTE, D.A.; RUMI, M.V.; CARBONARI, C.C.; CHINEN, I.; LARZÁBAL, M.; CATALDI, A.; MERCADO, E.C. Characterization of non -Shiga toxin- producing *Escherichia coli* O157 strains isolated from dogs. **Revista Argentina de Microbiología**, v.42, p.46-48, 2010.
- 3 BOSILEVAC, J.M.; KOOHMARAI, M. Prevalence and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from commercial ground beef in the United States. **Applied and Environment Microbiology**, v.77, n.6, p.2103-2112, 2011.
- 4 BROADWATER, W.T.; HOEHN, R.C.; KING, P.H. Sensitivity of three selected bacterial species to ozone. **Applied Microbiology**, v.26, p.391-393, 1973.
- 5 CHIATTONE, P.V.; TORRES, L.M.; ZAMBIAZI, R.C. Application of ozone in industry of food. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.3, p.341-349, jul./set. 2008.
- 6 DOWNES, F. P.; ITO, K. (ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of food**. 4th ed. Washington: APHA, 2001.
- 7 FARMACOPEIA Brasileira. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
- 8 GUZEL-SEYDİM, Z.B.; GREENE, A.K.; SEYDİM, A.C. Use of ozone in the food industry. **Lebensm.-Wiss, u.-Technology**, v.37, p.453-460, 2004.
- 9 JURE, M.A.; CONDORÍ, S.; LEOTTA, G.A.; CHINEN, I.; MILIWEBSKY, E.; ALLORI, C.; AULET, O.; DE CASTILLO, M.C. Detección, aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de carne molida fresca proveniente de carnicerías de Concepción, provincia de Tucumán. **Revista Argentina de Microbiología**, v.42, n.4, p.284-287, 2010.
- 10 KHADRE, M.A.; YOUSEF, A.E. Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.131-138, 2001.
- 11 KHADRE, M.A.; YOUSEF, A.E.; KIM, J.G. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. **Journal of Food Science**, v.66, n.9, p.1242-1252, 2001.
- 12 KIM, J.G.; YOUSEF, A.E.; CHISM, G.W. Use of ozone to inactivate microorganisms on lettuce. **Journal of Food Safety**, v.19, p.17-37, 1999.
- 13 KIM, J.G.; YOUSEF, A.E.; DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. **Journal of Food Protection**, v.62, n.9, p.1071-1087, 1999.
- 14 KIM, J.G.; YOUSEF, A.E. Inactivation kinetics of foodborne spoilage and pathogenic bacteria by ozone. **Journal of Food Science**, v.65, n.3, p.521-528, 2000.

- 15 MACEDO, J.A.B. **Águas e águas**. Belo Horizonte: Conselho Regional de Química, 2004. 977 p.
- 16 SHARMA, R.R.; DEMIRCI, A. Application of ozone for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on inoculated alfafa sprouts. **Journal of Food Processing Preservation**, v. 27, p.51-64, 2003.
- 17 TRIBST, A. A. L.; CRISTIANINI, M.; MASSAGUER, P. R. Metodologia para limpeza no local em equipamento de alta pressão dinâmica. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.12, n.1, p.43-52, 2009.
- 18 VAEREWIJCK, M. J. M.; DE VOS, P.; LEBBE, L.; SCHEDEMAN, P.; HOTE, B.; HEYNDRIKX, M. Occurrence of *Bacillus sporothermodurans* and other aerobic spore-forming species in feed concentrate for dairy cattle. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.1074-1084, 2001.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fazenda da Aeronáutica de Pirassununga (SP) pela disponibilidade do laboratório e doação dos reagentes e meio de cultura.