

I microrganismi e gli alimenti

M. Zavanella

Brescia

Generalità

Batteri, muffe e lieviti

Le malattie di origine alimentare

Fonti di contaminazione - Proprietà dei microrganismi a provocare malattie - Le misure preventive

Tossinfezioni alimentari, intossicazioni, infezioni

Salmonella - Shigella - Escherichia coli - Yersinia enterocolitica - Vibrio cholerae - Vibrioni alofili - Aeromonas e Plesiomonas - Campylobacter - Clostridium botulinum - Clostridium perfringens - Bacillus cereus - Staphylococcus aureus - Listeria monocytogenes - Brucella - Tossine diverse

Deterioramento degli alimenti

Vegetali - Formaggi - Carne - Salumi - Uova - Prodotti ittici - Bevande

Conservazione degli alimenti

Trattamenti fisici, chimici, biologici - I batteri lattici

I batteri negli alimenti e nelle acque

Latte - Derivati del latte (burro, yogurt, kefir, formaggi) - Carni - Salumi - Uova ed ovoidi - Prodotti ittici - Gelati - Paste alimentari - Prodotti di gastronomia - Semiconserve - Conserve - Vegetali - Prodotti di pasticceria - Alimenti per la prima infanzia - Dietetici - Bevande - Acque (potabile, minerali)

Igiene nella produzione degli alimenti

Requisiti igienici, controlli di laboratorio, HACCP, metodi d'analisi, valutazione dei risultati

Norme igieniche da osservare dopo la produzione

Educazione del consumatore

Bibliografia

Generalità

Questa sintesi tratta alcuni aspetti della convivenza, inevitabile in natura, tra microrganismi e alimenti, con particolare riguardo a quelli di origine animale.

Per microrganismi qui si intendono i batteri e i miceti (muffe + lieviti). Non vengono presi in considerazione i virus e i parassiti.

Le specie batteriche più diffuse negli alimenti sono riportate nella seguente tabella 1:

Tra i più importanti lieviti negli alimenti si trovano *Saccharomyces* (*S.cerevisiae* = lievito della birra) e *Candida* (*C.albicans* = lievito potenzialmente patogeno).

Le malattie di origine alimentare

Gli alimenti possono provocare forme tossiche quando contengono le seguenti sostanze in quantità sufficienti a determinare un quadro clinico:

- farmaci o stimolatori di crescita presenti nella carne e suoi derivati
- pesticidi, metalli pesanti, idrocarburi clorurati presenti nelle piante o negli animali
- conservanti non consentiti (come antibiotici, sodio azide, ecc)
- detergenti e disinfettanti
- tossine animali e vegetali
- parassiti
- microrganismi (batteri, funghi, virus)

Fonti di contaminazione

Possono esistere fonti di contaminazione primaria (come la contaminazione degli animali infetti) e di contaminazione secondaria, principalmente rappresentate da feci umane o animali, da mucose, capelli e ferite infette, da terriccio, polvere (come avviene per i germi del botulismo).

Proprietà dei microrganismi a provocare malattia

I microrganismi possono mantenere la propria infettività nell'alimento, moltiplicarsi, produrre tossine, attaccarsi alle cellule dell'ospite (adesività), diffondere nei tessuti (invasività).

Le **infezioni alimentari** sono provocate da microrganismi invasivi che raggiungono le cellule sensibili dell'ospite attraverso cibi inquinati (come il latte crudo o l'acqua).

Tra questi germi si ricordano *M.tuberculosis*, *Brucella*, *Listeria monocytogenes*.

I germi invasivi provocano infiammazioni localizzate oppure infezioni sistemiche generalizzate, che comportano la diffusione per via ematica, la febbre e la formazione di anticorpi.

Le **intossicazioni alimentari** sono provocate da tossine esterne al microrganismo (esotossine) che agiscono indipendentemente dalla presenza del germe (es. *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*).

Le **tossinfezioni alimentari** prevedono la presenza del germe e della sua tossina, come per i batteri gram-negativi (ad es. le Salmonelle) che possiedono

endotossine di origine polisaccaridica e lipidica; dopo la morte della cellula batterica le endotossine vengono liberate e si ha diarrea, febbre, ipotensione e altri disturbi.

I batteri gram-positivi (come lo *Staphylococcus aureus* o il *Clostridium botulinum*) formano delle esotossine che si localizzano nell'intestino o nel sistema nervoso. Alcune esotossine sono relativamente resistenti al calore.

Per avere malattia o intossicazione è necessario che si presentino alcune condizioni (virulenza del microrganismo, carica microbica, reazione difensiva dell'uomo, condizioni esterne).

- 1- la **virulenza** è la capacità specifica con cui un agente patogeno scatena la malattia.
- 2- la **dose** infettante è la quantità minima di patogeno in grado di causare la malattia (per la *Salmonella* si ritiene occorrono più di 100 cellule, per il *B.cereus* 10.000, per il *Cl.perfringens* un milione).
- 3- le **reazioni difensive** dell'uomo sono costituite dalle mucose, dal succo gastrico, dalla flora intestinale, dal sistema immunitario. I fattori predisponenti sono costituiti dall'età (bambini e anziani sono gli individui più a rischio), dalle malattie, dalla denutrizione, dai trattamenti farmacologici, dalle variazioni climatiche. Alcuni microrganismi saprofiti possono diventare patogeni occasionalmente (come *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*).
- 4- le **condizioni esterne** comprendono la concentrazione delle produzioni alimentari, la ristorazione collettiva, il turismo. Le cause principali sono però legate alla cottura insufficiente, al mancato mantenimento dei cibi cotti a temperatura adeguata, cioè in frigorifero sotto i +4°C o in scaldavivande sopra i +65°C, alla scarsa igiene nelle cucine con conseguenti contaminazioni crociate tra alimenti crudi inquinati e cibi cotti pronti per il consumo.

Le misure preventive

Sono quattro i momenti da controllare:

- la salubrità dell'allevamento (nel caso di produzioni di animali da carne, latte, ecc)
- le contaminazioni crociate
- il trattamento termico (cottura, pasteurizzazione, sterilizzazione)
- la conservazione dell'alimento pronto (refrigerazione, congelamento, riscaldamento sopra i +65°C)

Un caso a parte è rappresentato dalla *Salmonella typhi* che provoca il tifo addominale, per il quale bastano poche cellule infettanti (100 -1000), la fonte è l'uomo, l'incubazione è di due settimane, il quadro clinico è grave (febbre a 40°C, interessamento del fegato e della milza), si formano anticorpi circolanti e lo stato di portatore può durare anni o tutta la vita. Negli altri casi la salmonellosi è solitamente un'infezione localizzata all'intestino e non provoca immunizzazione. La diagnosi viene fatta attraverso esami di laboratorio su feci, tamponi, alimenti.

Nel caso di feci o tamponi si usa un arricchimento in terreno liquido (brodo tetrationato, Rappaport, brodo selenito) per 24-48 ore a 37°C o a 42°C seguito da piastratura su terreni selettivi solidi (Hektoen, SS, BGA) da incubare a 37°C per 24 ore, trapianto delle colonie sospette su Kligler, identificazione biochimica e sierologica (tipizzazione in oltre 2000 sierotipi riuniti nello schema di Kauffmann-White secondo le combinazioni di antigeni somatici O e ciliari H).

Nel caso di alimenti si introduce il campione (25 gr) in pre-arricchimento (acqua peptonata tamponata in rapporto 1: 10) e si omogenizza. Dopo incubazione a 37°C per 18-24 ore si trapianta in arricchimento come sopra descritto.

Tossinfezioni da *Shigella*

In Europa si tratta prevalentemente di *S. sonnei* e *flexneri*. In altre parti del mondo si trovano *S. boydii* e *S. dysenteriae*.

Sono patogeni solo per l'uomo. La fonte è costituita dalle feci umane. Il contagio si trasmette da uomo a uomo anche a mezzo di oggetti, stoviglie, cibi contaminati o attraverso le mosche.

La via d'ingresso è la bocca. Il luogo di moltiplicazione è l'intestino crasso. L'incubazione dura 2-7 giorni. Provocano diarrea e talvolta complicazioni per la formazione di un'endotossina e di una esotossina (ulcerazioni della mucosa intestinale, peritonite).

La risposta immunitaria è scarsa e la diagnosi di laboratorio avviene dalle feci.

Le Shigelle sono germi gram-negativi, immobili, lattosio negativi, simili alle Salmonelle per esigenze culturali. Si usano gli stessi terreni delle Salmonelle. La *S. sonnei* è patogena in fase liscia (S) e muta rapidamente in fase rugosa (R) non patogena.

Malattie da *Escherichia coli*

L'*E. coli* è un patogeno facoltativo che alberga normalmente nell'intestino dell'uomo e degli animali. In caso di indebolimento nei bambini e negli anziani può provocare malattie diverse (infezioni delle vie

urinarie, biliari, peritoniti, meningiti, polmoniti, sepsi, diarree dissenteriche).

La virulenza dei ceppi è legata alla proprietà adesiva del germe (attraverso fimbrie) e alla proprietà invasiva. Vengono prodotte delle tossine.

ENTERITE DEI LATTANTI

È legata a ceppi enteroinvasivi (EIEC) e si trasmette con il latte e l'alimentazione.

DIARREA DEI VIAGGIATORI

Avviene attraverso acqua, verdure, alimenti contaminati da feci.

I ceppi che la provocano (detti ETEC) sono comuni all'uomo e agli animali giovani (vitelli, suinetti) e si fissano sulla mucosa del tenue con fimbrie o pili (proprietà adesiva) riuscendo a penetrare nelle cellule della mucosa (proprietà invasiva).

Producono due tipi di tossine (termostabile = ST e termolabile = LT). Le tossine stimolano l'adenilciclasi con perdita di liquidi dalla mucosa intestinale e diarrea.

La diagnosi di laboratorio dei ceppi produttori di tossina ST ed LT può essere effettuata con metodi immunoenzimatici (ELISA o Reverse Passive Agglutination Test).

INFEZIONI DA *E. COLI* ENTEROEMORRAGICI

Si tratta di particolari sierotipi detti EHEC, tra i quali O157:H7, isolati da casi di colite emorragica e da sindrome emolitico-uremica (HUS) che sarebbero legati a carni, latte ed altri alimenti.

La diagnosi di laboratorio si avvale di particolari terreni, poichè questo germe sviluppa meglio a 37°C (e non a 44°C come i rimanenti *E. coli*) e non attacca i glucuronidi (non è fluorescente sui terreni che li contengono).

Tossinfezioni da *Yersinia enterocolitica*

È un germe psicrofilo (può sviluppare a temperatura di frigorifero) e proviene dalle feci dell'uomo e degli animali. È un batterio gram-negativo simile alle Enterobacteriacee, invasivo, capace di formare enterotossina.

Incubazione e sintomi sono molto simili alla salmonellosi. Tra le complicazioni si ha l'appendicite. Esistono diversi sierotipi e solo alcuni sono riconosciuti patogeni (O3 e O9 in Europa).

Per la diagnosi di laboratorio si coltiva il campione di feci o di alimento in brodo di arricchimento, seguito da trattamento con KOH e da piastratura su terreno solido (CIN Agar). L'identificazione delle colonie sospette si fa con tests biochimici.

- pesci marinati o fermentati (con spore e scarsa o troppo lenta acidificazione).

Le tossine sono proteine inattivabili dall'ebollizione (che tuttavia a 70-80°C resistono fino a 30') capaci di bloccare l'acetilcolina nel sistema nervoso periferico impedendo la trasmissione degli impulsi.

L'incubazione è di 12-36 ore (raramente da 4 ore a 4 giorni). I sintomi sono nausea, vomito, disturbi gastroenterici, diplopia, fotofobia, essiccamento delle mucose, blocco della salivazione, paralisi respiratoria e polmonite.

La diagnosi è soprattutto clinica e in laboratorio si pratica la ricerca della tossina nel siero, feci, vomito del malato oppure nell'alimento attraverso tests biologici su topo o tests sierologici (ELISA). Non serve la ricerca del germe essendo il *Cl. botulinum* ubiquitario.

Intossicazioni da *Clostridium perfringens*

Si presenta come gram-positivo anaerobio che vive nelle feci dell'uomo (fino a 10.000 germi/gr), degli animali e nel terreno. Forma spore che germinano a temperatura ambiente o dopo riscaldamento moderato (=shock termico) come avviene nei cibi preparati, lasciati fuori dal frigorifero e poi riscaldati.

Le cellule vegetative nate dalle spore raggiungono l'intestino col cibo inquinato, si moltiplicano a livello di mucosa e formano nuove spore. Nella sporulazione si producono enterotossine di natura proteica sierologicamente differenziate in A-D.

L'incubazione è di 8-20 ore con diarrea e dolori addominali.

La diagnosi consiste nella ricerca quantitativa del *Cl. perfringens* nelle feci o nell'alimento e risulta significativa se maggiore di 1 milione di germi/grammo. Si seminano diluizioni decimali del campione omogeneizzato su piastre di terreni selettivi come SFP o SPS da incubare a 37°C per 48 ore in anaerobiosi. L'identificazione del germe avviene per via biochimica.

Tossinfezioni da *Bacillus cereus*

È un germe aerobio a forma di grosso bastoncino gram-positivo che forma spore molto resistenti al calore. Sviluppa tra 10 e 48°C con optimum intorno a 30°C.

Il suo habitat è il terreno e gli alimenti più frequentemente inquinati, causa di tossinfezioni, sono i vegetali ricchi di amido (come il riso, le verdure, le spezie) specialmente se si tratta di piatti già cotti e lasciati raffreddare a temperatura ambiente, sottoposti ad un secondo riscaldamento che facilita la sporulazione.

Per avere intossicazione occorrono 10^5 - 10^6 germi per grammo di alimento.

L'incubazione è di 8-16 ore e la sintomatologia è di due tipi, con diarrea e con vomito (a seconda della presenza delle tossine diarroica oppure emetica). In quest'ultimo caso l'incubazione è brevissima (anche ½ ora e fino a 6 ore).

La diagnosi prevede la ricerca quantitativa del *B. cereus* da feci o da alimento su terreno selettivo solido (Cereus Selective Agar) con incubazione delle piastre a 30°C per 24 ore. Per l'identificazione servono prove microscopiche e biochimiche adatte a differenziare il *B. cereus* da altre bacillacee affini, come *Bacillus anthracis*, *thuringiensis*, *megaterium*, *mycoides*.

Intossicazioni da *Staphylococcus aureus*

Si presenta come un cocco sferico gram-positivo, immobile, che cresce fra 6,5 e 46°C con optimum attorno a 37°C. In brodocoltura in laboratorio forma caratteristici ammassi a grappolo.

È un germe piogeno che dà infiammazioni locali non gravi (foruncoli e ascessi), ma che talvolta provoca infezioni post-operatorie e infezioni generalizzate. Produce esotossine di natura proteica classificate da A ad E sierologicamente, molto resistenti al calore (un'ora a 100°C). La massima produzione di tossina si ha intorno ai 37°C e a pH 6-7.

Lo stafilococco riesce a produrre tossina da 10°C fino a 45°C e con pH basso fino a 4,8 oppure Aw ridotta fino a 0,86.

Inquina gli alimenti partendo generalmente da mani sporche, dal naso, dalla saliva, da ferite e suppurazioni, raramente da latte mastitico.

Gli alimenti che si inquinano più facilmente sono quelli contenenti uova, creme, salse, ripieni, formaggio (essendo ricchi di proteine e zuccheri), oppure i pesci e gli insaccati (prosciutto cotto, insaccati misti) che hanno un alto contenuto d'acqua.

L'incubazione è di 1-6 ore ed i sintomi sono nausea, vomito, diarrea, febbre.

La diagnosi si avvale del conteggio dello *Staphylococcus aureus* nell'alimento (significativo se $>10^6$ per gr) su terreno selettivo come il Baird-Parker Agar, seguito da prove indirette di patogenicità (test della coagulasi con plasma di coniglio e della DNA-si e/o termonucleasi).

Si ricorda tuttavia che ha valore indiscutibile per la diagnosi solamente la dimostrazione della presenza di tossina preformata nel campione di alimento, effettuabile con test immunoenzimatici tipo ELISA o

La diagnosi (dosaggio delle micotossine e delle ammine biogene come istamina e tirosina) avviene esclusivamente con metodi chimici.

Le analisi effettuabili in laboratorio per la diagnosi di malattie trasmesse con gli alimenti sono riassunte nella seguente tabella 3:

Tabella 3. Analisi effettuabili in laboratorio per la diagnosi di malattie trasmesse con gli alimenti

| Agente eziologico | Campioni clinici | Campioni alimentari |
|---|---|---|
| <i>S. aureus</i> | Conteggio nelle feci (poco significativo) Tossina nelle feci (idem) | Conteggio nell'alimento Tossina nell'alimento Tossina dal ceppo |
| <i>B. cereus</i> | Conteggio nelle feci | Conteggio nell'alimento Tossina dal ceppo |
| <i>E. coli enterotossici (ETEC)</i> <i>o enteroemorragici (EHEC)</i> | Isolamento dalle feci Tipizzazione ceppi | Conteggio nell'alimento Tossine dal ceppo Tipizzazione ceppi |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | | Ricerca qualitativa nell'alimento |
| <i>Cl. perfringens</i> | Conteggio nelle feci | Conteggio nell'alimento Tossina dal ceppo |
| <i>Cl. botulinum</i> | Tossina nelle feci, siero, vomito | Tossina nell'alimento |
| <i>Shigella</i> | Isolamento dalle feci | Ricerca nell'alimento Tossina dal ceppo |
| <i>V. cholerae</i> | Isolamento dalle feci | Ricerca nell'alimento Tossina dal ceppo |
| <i>C. jejuni e C. coli</i> | Isolamento dalle feci | Ricerca nell'alimento |
| <i>L. monocytogenes</i> | Anticorpi nel siero | Conteggio nell'alimento |
| <i>Salmonella</i> | Isolamento dalle feci | Ricerca nell'alimento |
| <i>S. typhi</i> | Anticorpi nel siero | Ricerca nell'alimento |
| <i>Brucella</i> | Anticorpi nel siero | Ricerca nell'alimento Prova biologica |
| <i>M. tuberculosis</i> | Prova allergica | Ricerca nell'alimento Prova biologica |

ciliege; *Penicillium* = marciume verde o azzurro degli agrumi; *Venturia* = ticchiolatura delle mele e delle pere; *Phytophthora* = peronospora delle fragole; *Aspergillus* = muffa nera dell'uva; *Rhizopus* = marciume delle fragole).

Nella verdura, che cresce vicina al suolo, si trovano normalmente streptococchi, clostridi (*Cl. botulinum*, *Cl. perfringens*), bacilli (*B. cereus*, lattobacilli) a cui si aggiungono, nella putrefazione, *Erwinia carotovora* (= marciume molle e marciume nero delle patate), *Xantomonas campestris* (= marciume nero del cavolo), *Phytophthora infestans* (= peronospora delle patate), *Fusarium solani* (= marciume secco delle patate).

ALTERAZIONI NEI FORMAGGI

Si possono avere rigonfiamenti precoci nei primi due giorni dalla produzione per insufficiente acidificazione e sviluppo di *Klebsiella aerogenes* o di *E. coli* oppure rigonfiamenti tardivi da spore di clostridi termodurici (*Cl. tyrobutyricum*) originate da insilati e sopravvissute alla pasteurizzazione del latte, con formazione di gas e di acido butirrico.

Alterazioni superficiali della crosta sono invece spesso causate da muffe.

DETERIORAMENTO DELLA CARNE

Essendo un terreno ideale per i germi, dopo la macellazione la carne deve essere trattata con precauzioni igieniche e rapido raffreddamento a cuore sotto i 4°C (entro 10-16 ore nei suini, 15-24 ore nei bovini). La conservazione dovrebbe avvenire da -1 fino a +2°C. Sono maggiormente sensibili alla proliferazione batterica le carni in pezzi, tritate, disossate meccanicamente.

Le alterazioni si producono inizialmente in superficie (l'interno del muscolo è di norma sterile) ad opera di gram-negativi come *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus* e di gram-positivi come *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* e successivamente in profondità per invasione di germi gram-positivi come *Cl. perfringens*, *Cl. histolyticum*, *Cl. sporogenes*, *Streptococcus*, *Bacillus* e in minore misura gram-negativi (*Proteus*).

Le carni di animali stressati prima della macellazione (scure, dure, secche = DFD), sono soggette ad alterazioni precoci dovute a batteri lattici, *Serratia*, *Brochothrix thermosphacta*.

Sulle carni congelate sfuse si possono produrre macchie bianche, scure o azzurre dovute a muffe (*Penicillium*, *Cladosporium*, *Sporotrichum*).

DETERIORAMENTO DEI SALUMI

Negli insaccati crudi (freschi e stagionati) i germi maggiormente responsabili di alterazioni sono gli

enterobatteri (che danno putrefazione interna e sviluppo di gas), gli stafilococchi e i lattobacilli eterofermentanti, le muffe (che danno alterazioni superficiali del budello).

Nei prosciutti crudi le alterazioni possono derivare da moltiplicazione, in prossimità dell'osso, di Enterobatteri (*Proteus*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*) che provocano putrefazione e formazione di idrogeno solforato (se in concentrazione superiore a 10⁶ per grammo) e di clostridi.

DETERIORAMENTO DELLE UOVA

Può dipendere dal passaggio di germi (*Pseudomonas*, enterobatteri) dall'esterno del guscio all'interno dell'uovo, attraverso screpolature o microfessure originate dalla raccolta o durante il trasporto.

L'uso di conservare le uova a temperatura ambiente è inoltre alla base della possibile moltiplicazione batterica di eventuali *Salmonelle* all'interno.

DETERIORAMENTO DEI PRODOTTI ITTICI

L'alterazione del pesce è primariamente dovuta a *Shewanella putrefaciens* e *Pseudomonas*. Altri germi dannosi alla conservazione sono *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Bacillus* e *Micrococcus*.

I batteri demoliscono le proteine con formazione di ammoniaca, acido solfidrico e ammine dall'odore sgradevole (trimetilammina) già a partire da 10⁶ germi per grammo.

DETERIORAMENTO DELLE BEVANDE

Il caso più importante è l'alterazione dei succhi di frutta per sviluppo di lieviti appartenenti al genere *Saccharomyces* che sono in grado di far fermentare con sviluppo di gas le bevande a scarsa acidità.

Conservazione degli alimenti

Gli alimenti non trattati tenuti a circa +4°C nel frigorifero domestico hanno un tempo di conservazione limitato (carne trita e pesce 1 giorno, carni in genere, insalata, latte e panna 2-5 giorni, frutta 2-10 giorni, uova 3-4 settimane, semiconserve 6 settimane).

Un prolungamento della conservazione si ottiene con la cottura e successiva conservazione in frigorifero. Tuttavia per conservare a media e lunga distanza si usano procedimenti diversi :

- FISICI (pasteurizzazione, sterilizzazione, congelamento, essiccamento, radiazioni).
- CHIMICI (conservanti, salatura, zucchero, affumicatura, atmosfera modificata).
- BIOLOGICI (fermentazioni).

10. MODIFICAZIONI DELL'ATMOSFERA

Il trattamento sottovuoto esclude l'ossigeno, mentre il confezionamento in atmosfera modificata comporta la sostituzione dell'aria con miscele di gas (anidride carbonica, azoto, ossigeno).

Si usa per frutta, pane, carni fresche e altri prodotti. Questi trattamenti inibiscono la crescita dei germi aerobi (*Pseudomonas*, *Bacillus*, muffe), mentre possono resistere i batteri anaerobi facoltativi (lattobacilli, ecc).

Effetto dei trattamenti biologici sui microrganismi

Alimenti come i formaggi, i salumi, lo yogurt vengono prodotti mediante l'aggiunta intenzionale di microrganismi.

Mentre i vegetali vanno incontro a fermentazioni per la flora batterica delle piante, i prodotti di origine animale necessitano per ottenere gli stessi effetti dell'aggiunta di colture batteriche apposite dette "starter".

Tra i germi più importanti si ricordano i lattobacilli e le muffe per la produzione di formaggi, i lattobacilli, i pediococchi e *Leuconostoc* per le fermentazioni degli insaccati stagionati, i lattobacilli, gli streptococchi e i bifidobatteri per la preparazione dello yogurt, i lattobacilli e i lieviti per il pane.

Rientrano nelle modificazioni intenzionali degli alimenti mediante l'uso di microrganismi aggiunti anche la fermentazione alcolica e acetica.

L'attività benefica dei microrganismi aggiunti si manifesta con un'inibizione dei germi degradanti, degli eventuali patogeni e loro tossine (azione antagonista), con un miglioramento della digeribilità dell'alimento (azione demolitiva dei polimeri), con la produzione di aromi e di vitamine.

Il gruppo più interessante dal punto di vista tecnologico è quello dei batteri lattici.

I batteri lattici

Sono germi gram-positivi, immobili, catalasi-negativi, aerobi facoltativi che sviluppano meglio in atmosfera contenente il 5-10 % di CO₂.

Comprendono bastoncini del genere *Lactobacillus* e cocci dei generi *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*.

Il genere *Streptococcus* è diverso dagli streptococchi intestinali che vengono chiamati *Enterococcus*.

Affini ai lattobacilli sono considerati i Bifidobatteri (bastoncini gram-positivi anaerobi a forma di X o di Y).

I batteri lattici si trovano in natura sui vegetali e nell'intestino degli animali; hanno la caratteristica di demolire gli zuccheri con formazione di acido lattico

(batteri omofermentanti) oppure, in aggiunta, anche acido acetico e alcool etilico (batteri eterofermentanti).

Tra i batteri lattici sono importanti nell'industria casearia i Lattobacilli *acidophilus*, *bulgaricus*, *helveticus*, *casei*, *delbrueckii*, gli Streptococchi *thermophilus* e *lactis*, il *Bifidobacterium bifidum* e nell'industria delle carni insaccate i Lattobacilli *sake*, *curvatus*, *plantarum*.

Altri microrganismi usati nelle fermentazioni sono i miceti (*Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus*) impiegati nei paesi asiatici (Indonesia, Cina, Giappone) per la produzione di numerosi alimenti a base di soia e di altri cereali (koji =riso fermentato; sufu=formaggio di soia).

I batteri negli alimenti e nelle acque

AVVERTENZA - Vengono riportati qui di seguito i più comuni contaminanti microbici presenti negli alimenti, le ricerche di laboratorio ed i criteri interpretativi per i valori trovati con le analisi.

Sono segnate le analisi contemplate dalla normativa vigente in Italia, con i relativi livelli di accettabilità. Diversamente, le ricerche e i dati presentati sono da intendersi solo come indicativi.

I metodi di analisi sono desumibili da bollettini ufficiali o dalla letteratura edita da organismi internazionalmente riconosciuti (ISO, FIL, ICMFS).

Attualmente si usa fornire inoltre indicazioni per il campionamento. Si tratta di piani di campionamento a due o tre classi, dove *n* corrisponde al numero di unità campionarie da analizzare.

I limiti di carica imposti per i vari alimenti sono nella fattispecie espressi con due valori, di cui il primo (m) corrisponde al livello di accettabilità ed il secondo (M) alla tolleranza ammessa entro una fascia compresa tra (m) ed (M).

Generalmente le unità campionarie da analizzare per le varie ricerche sono cinque (anche per le Salmonelle) e la tolleranza (salvo diversa indicazione) riguarda generalmente 2 unità campionarie su 5 analizzate (c = 2).

Questa procedura trova pratica attuazione nell'ambito delle analisi "normate", cioè contenute in disposizioni ufficiali con valore di legge.

LATTE

Nel latte crudo alla raccolta si trovano normalmente micrococchi, stafilococchi, corinebatteri, bacilli gram-negativi (*Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*), lattobacilli, bacilli, clostridi, lieviti e muffe.

Il latte può essere contaminato da germi patogeni,

La stessa evoluzione della flora batterica si manifesta, seppure ritardata, nella carne posta sotto vuoto o in atmosfera modificata.

La carne trita, presentando una superficie esposta maggiore, va incontro ad aumento rapidissimo della carica microbica, per cui la sua durata è limitata a 1 giorno in frigorifero a temperatura tra 0 e +2°C.

La carica microbica totale della carne può arrivare fino a 10^6 germi/gr senza apprezzabili variazioni organolettiche. Si manifesta la comparsa dell'odore sgradevole in presenza di CBT superiore a 10^7 germi/gr, mentre con 10^8 germi/gr si nota la formazione di mucillagine superficiale.

Le carni trite sono regolamentate come segue: carica batterica totale 500.000 - 5.000.000 germi/gr, *E. coli* 50 - 500, *S. aureus* 100 - 1000 (tolleranza in 2 unità campionarie su 5 analizzate), *Salmonella* assente in 10 gr.

Nelle preparazioni di carne (hamburger, spiedini, ecc) sono ammessi, invece, 500 - 5000 *E. coli* e *S. aureus*/gr (tolleranza in 2 unità campionarie su 5 esaminate), *Salmonella* assente in 1 gr.

La carica batterica totale (CBT) viene allestita in laboratorio seminando diluizioni decimali del campione in doppio su piastre di Plate Count Agar da incubare a 37°C per 48 ore.

La conta dei germi anaerobi solfito-riduttori viene allestita su piastre di terreno selettivo (SFP agar) previa pasteurizzazione dell'omogenato del campione a 80°C per 10', con incubazione in anaerobiosi a 37°C per 48 ore.

SALUMI

La conservazione prolungata dei prodotti genericamente chiamati salumi o insaccati viene ottenuta con la salatura (sodio cloruro 3%, nitrato, nitrito di sodio), l'aggiunta di droghe, la riduzione dell'Aw nella stagionatura, le modificazioni della flora microbica nel corso della maturazione della carne con abbassamento del pH (eventualmente favorito da aggiunta di zucchero), la cottura o l'affumicamento.

I salumi vengono classificati in freschi (salsicce, cottechini), stagionati (prosciutto crudo, salame, speck) e cotti (wurstel, mortadella).

Nella preparazione dei salumi stagionati vengono impiegati starter microbici (*Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*) oltre a lieviti per la formazione di aromi particolari e muffe (*Penicillium nalgiovense*) per la formazione dello strato superficiale bianco.

I germi aggiunti hanno la capacità di favorire la conservazione (per antagonismo con la flora originale della carne), creare l'aroma e migliorare il colore.

In particolare, i lattobacilli e i micrococchi si moltiplicano rapidamente nell'impasto di carne per la produzione dei salumi e sostituiscono le

Enterobacteriaceae durante le 4-8 settimane di stagionatura a condizioni di temperatura decrescente (20-18-13°C) e umidità appropriata (90-85-80%). L'aggiunta di nitrati impedisce la moltiplicazione del *Cl. botulinum*.

Al termine della stagionatura questi prodotti possono presentare una Aw di 0,90-0,80 ed un pH di 5,7 - 5,9.

Nei prosciutti crudi (ad eccezione del prosciutto di Parma e di S.Daniele) vengono impiegate salamoie contenenti sodio cloruro al 20%, nitrati, nitriti, acido ascorbico, polifosfati, zucchero. La flora microbica durante tali trattamenti (che possono durare da pochi giorni fino a 2 mesi a temperatura <5°C) è composta da lattobacilli, micrococchi, vibriani alofili, lieviti, *Enterococcus faecium*, alcuni gram-negativi.

Dopo una fase di asciugatura (che può durare 1 mese), subentra la fase di stagionatura (della durata da 9 mesi a 2 anni), con il raggiungimento di un'Aw ridotta a 0,96.

Nel prosciutto cotto il trattamento termico raggiunge circa 68°C (seguito da rapido raffreddamento a -1°C); possono sopravvivere batteri gram-negativi e streptococchi.

Nella mortadella (preparata con carne suina, bovina, polvere di latte, sale, nitrato, nitrito, spezie, fosfati) il trattamento termico raggiunge 78°C per 16-18 ore e l'Aw finale è di 0,95-0,94. Possono sopravvivere al centro della massa lattobacilli, streptococchi fecali, bacilli gram-positivi e alcuni germi gram-negativi.

UOVA ED OVOPRODOTTI

Le uova possono essere contaminate sul guscio da Salmonelle, mentre internamente solo in caso di trasmissione verticale dall'ovaio possono contenere *S.gallinarum-pullorum*, *S.enteritidis* e poche altre Salmonelle (tuttavia in numero esiguo e in proporzione di 1 : 15.000 uova durante la deposizione in allevamenti infetti).

Il problema delle tossinfezioni da Salmonella con le uova è legato soprattutto al fatto che le uova non vengono conservate refrigerate e che prodotti derivati possono contenere un elevato numero di Salmonelle (creme crude, salse, maionese, tiramisù) in seguito a mancato rispetto di buone pratiche di preparazione e di conservazione.

Gli ovoprodotti (misto d'uovo, tuorlo, albume) possono aumentare il rischio di contaminazione da Salmonelle provenienti dalla sgusciatura se non sono stati sottoposti a pasteurizzazione (65°C per 2,5-3 minuti) e successiva conservazione in frigorifero.

Il controllo preventivo delle tossinfezioni da uova inquinate è basato sul controllo veterinario degli allevamenti di ovaiole, integrato da esami di laboratorio sugli animali morti, sulle feci e sulle uova.

bia mesofila, del contenuto di spore aerobiche e di spore anaerobiche.

Altre tre scatole vengono incubate a 37° C per 14 giorni (se con pH <4,5) o per 21 giorni (se con pH >4,5).

Al termine dell' incubazione vengono rifatte le determinazioni di cui sopra.

Dal confronto dei risultati prima e dopo l' incubazione delle scatole si ha esito sfavorevole qualora uno dei parametri dopo incubazione sia 100 volte superiore al corrispettivo misurato prima dell' incubazione.

VEGETALI

Per legumi, ortaggi, radici e tuberi le ricerche suggerite riguardano : *E.coli* (numerazione), miceti (numerazione), *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*.

PRODOTTI DI PASTICCERIA

Sono interessati i prodotti di pasticceria deperibili. Le analisi consigliate sono : CBT mesofila e psicofila, conteggio di coliformi, *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, miceti e la ricerca di *Salmonella*.

ALIMENTI PER LA PRIMA INFANZIA

Sono considerate adatte le numerazioni di coliformi, *S. aureus*, clostridi solfito-riduttori, miceti e la ricerca di *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*.

Per il latte in polvere per la prima infanzia la normativa prevede i seguenti limiti batteriologici su 5 unità campionarie : CBT < 10⁴ per gr, coliformi e *S. aureus* assenti in 1 gr, *Salmonella* assente in 25 gr (ricerca su 10 unità campionarie).

DIETETICI

Si raccomanda la quantificazione di *E. coli*, *S. aureus*, clostridi solfito-riduttori, miceti e la ricerca della *Salmonella*.

BEVANDE

Relativamente ai succhi e nettari di frutta non sterilizzati si raccomanda la determinazione quantitativa di: CBT mesofila, *E. coli*, miceti.

Il controllo microbiologico dell'acqua

ACQUA POTABILE

I parametri microbiologici da rispettare sono : carica batterica totale <10 germi/ml con incubazione delle piastre a 37°C per 48 ore e <100 germi/ml con incubazione a 22°C per 72 ore; coliformi, coliformi fecali, streptococchi fecali, spore di anaerobi solfito-riduttori assenti in 100 ml di acqua.

Le determinazioni vengono effettuate in laboratorio con il metodo tradizionale della semina in profondità di 1 ml del campione su piastre di terreno PCA

per la conta microbica totale, mentre le successive tre determinazioni vengono fatte con il metodo della filtrazione su membrana e coltivazione della stessa su appositi terreni solidi in piastra (M-Endo agar per i coliformi, FC-agar per i coliformi fecali, KF Streptococcus agar per gli streptococchi fecali).

Per la conta delle spore degli anaerobi solfito-riduttori, dopo pasteurizzazione del campione a 80°C per 10 minuti, si seminano con aliquote da 10 ml ciascuna 10 provette con terreno SPS fuso, da far solidificare a incubare a 37°C per 24 ore con overlay.

ACQUE MINERALI

Si richiede l'assenza in 250 ml di: *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, Clostridi solfito-riduttori; in 1000 ml di *Salmonella*, esaminando 3 unità campionarie per ogni lotto. Si richiede inoltre un contenuto di *Aeromonas* inferiore a 10 per 100 ml.

La determinazione di *Pseudomonas aeruginosa* richiede la filtrazione dell' acqua su membrana e l' uso di appropriati terreni selettivi antibiotati, sul tipo di Pseudomonas Agar o di Cetrimide Agar, con incubazione a 42° C per 48 ore.

La ricerca dell' *Aeromonas* è analoga, ma avviene su Aeromonas Agar a 30 °C per 24 ore.

Igiene nella produzione degli alimenti

Come per ogni prodotto, si esige anche per un alimento la buona qualità, che si esprime attraverso soddisfacenti caratteristiche organolettiche (colore, odore, sapore) e assenza di sostanze pericolose (chimiche e biologiche).

Un alimento per essere considerato di buona qualità microbiologica deve contenere un numero ridotto di microrganismi ed essere esente da germi patogeni e da tossine.

La garanzia della buona qualità microbiologica non può derivare dal controllo dei prodotti finiti (impossibile per sproporzione tra campioni esaminabili e quantità di alimenti prodotti e per la durata degli accertamenti analitici).

La qualità microbiologica migliora solo attraverso norme igieniche preventive da applicare nella programmazione della produzione (industrialmente intesa, data la prevalente concentrazione delle preparazioni alimentari non più familiari o artigianali) e norme igieniche da applicare nel corso della produzione.

In sintesi, nella programmazione della produzione sono importanti:

- 1- la costruzione dei locali (pavimenti e pareti lavabili, porte e finestre a tenuta, illuminazione suffi-

Bibliografia

Balows A. e Coll. Manual of Clinical Microbiology. 5th ed., ASM, Washington, USA, 1991.

B.U.R.L. Bollettino Ufficiale Regione Lombardia, suppl. straordinario n° 10 del 07.03.97.

Carter G. R. e Coll. Diagnostic Procedures in Veterinary Microbiology and Mycology, 5th ed., Academic Press, San Diego, CA, USA, 1990.

De Felip G. Igiene e Microbiologia alimentare, SEF, Milano, 1991.

FDA Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual, 8th ed., AOAC, Gathersburg, USA, 1995.

ICMFS Microorganisms in Foods 1 - 2. 2nd edition, Toronto Univ. Press, Toronto, Canada, 1978.

Jay M. Modern Food Microbiology, Van Nostrand, New York, USA, 1970.

Kramer J. Cantoni C. Alimenti - Microbiologia e igiene, OEMF, Milano, 1990.

Murray P. R. e Coll. Manual of Clinical Microbiology, 6th ed., ASM, Washington, USA, 1995

Reed G. H. Dairy, Food and Environmental Sanitation, 14, 16-17, 87, 161-162; 210-211, 268-269, 329-330, 482-483, 536, 591, 1994.

Shapton D. A. e Coll. Safe processing of Foods, Butterworth-Heinemann, Oxford, England, 1991

Sharf J.M. Recommended Methods for the Microbiological Examination of Foods, APHA, New York, USA, 1966.

Tiecco G. Microbiologia degli alimenti di origine animale, Edagricole, Bologna, 1987.

Vanderzant D. A. e Coll. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, APHA, New York, USA, 1992.