

NECESSITA' DEL CONTROLLO MICROBIOLOGICO DEGLI ALIMENTI

Dott. Raffaele Marrone – PhD sezione ispezione alimenti

1. PROTEZIONE DELLA SALUTE DEL CONSUMATORE

- agenti patogeni responsabili di infezioni, tossine, virusi
- valutazione della sicurezza igienica (microbiologia analitica)

2. PROTEZIONE DELLA QUALITA' DEL PRODOTTO

- agenti non patogeni, ma causa di perdita di qualità nutrizionale e organolettica, e di conseguente ingente danno economico
- previsione della shelf-life dell'alimento

3. PROMUOVERE LA QUALITA' DEL PRODOTTO

- microrganismi come strumento di processo per la conservazione e/o la trasformazione dell'alimento
- microbiologia della fermentazione industriale (microbiologia di controllo di processo)

MICROORGANISMI

LIEVITI

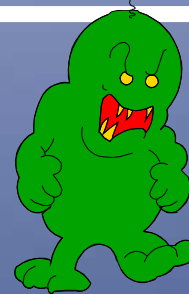
*possono essere
utili per l'uomo*

BATTERI

saprofiti

*indice di
inquinamento*

patogeni



MUFFE

*possono alterare gli
alimenti (solitamente
in modo visibile)*

SPORE

Forme di "resistenza" sviluppate da alcuni batteri in
condizioni ambientali sfavorevoli

possiedono involucri protettivi esterni

Classificazione dei microrganismi

- **Patogeni e alterativi:** responsabili di malattie dell'uomo, degli animali, delle piante
- **Innocui:** la maggior parte dei microrganismi
- **Utili:** (protecnologici) producono sostanze utili all'uomo

Il tipo e numero di microrganismi presenti negli alimenti dipendono dall'azione combinata di numerosi fattori

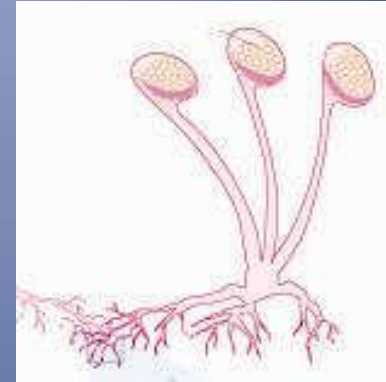
I batteri

- Alcuni batteri producono sostanze tossiche dette **tossine**:
 - **esotossine** → si liberano nell'ambiente come conseguenza dell'attività metabolica dei batteri
 - **endotossine** → si liberano nell'ambiente soltanto dopo la morte dei batteri

I funghi microscopici

- **Muffe**

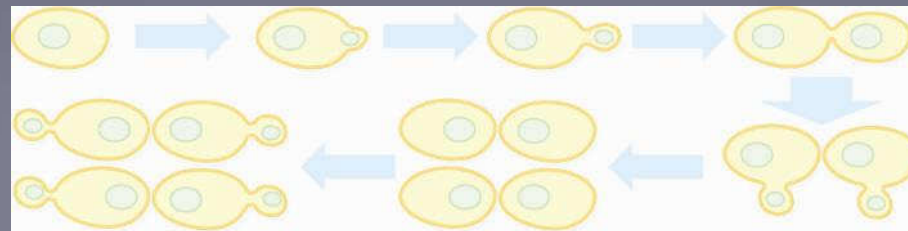
- Funghi pluricellulari
- Di interesse alimentare sono i generi *Penicillium* e *Aspergillus*
- In certe condizioni possono produrre **micotossine**
- Alcune muffe del genere *Penicillium* si impiegano per i formaggi erborinati



I funghi microscopici

- Lieviti

- Funghi unicellulari
- Nel campo alimentare sono di grande interesse i *saccaromiceti* perché responsabili della *fermentazione alcolica*
- Alcuni lieviti possono provocare alterazioni negli alimenti



I lieviti si riproducono per gemmazione

I MICRORGANISMI

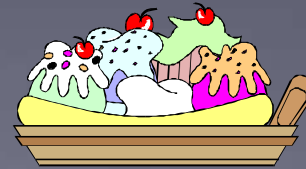
vivono e si moltiplicano in modo variabile

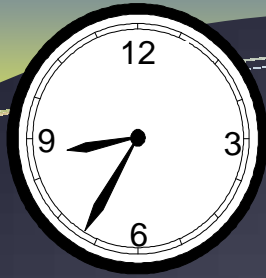
***i fattori che
influiscono
sono***

→ tempo

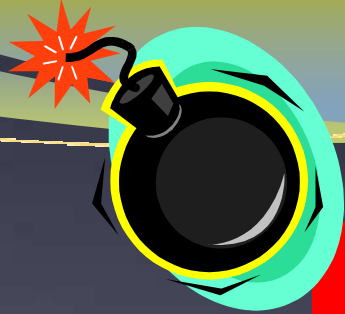


→ nutrimento





IL TEMPO



Moltiplicazione dei batteri in condizioni favorevoli (da M. Jacob)



IL NUTRIMENTO

Per vivere e moltiplicarsi, i batteri hanno bisogno di alimentarsi

Gli alimenti preferiti dai batteri, e spesso all'origine di tossinfezioni, sono quelli ricchi di proteine ed acqua

carne

→ arrosti, polpettone

pollame

→ rolate, insalate di pollo

uova

→ maionese, tiramisù, creme

latte

→ creme, panna



Gli alimenti sono degli ecosistemi .

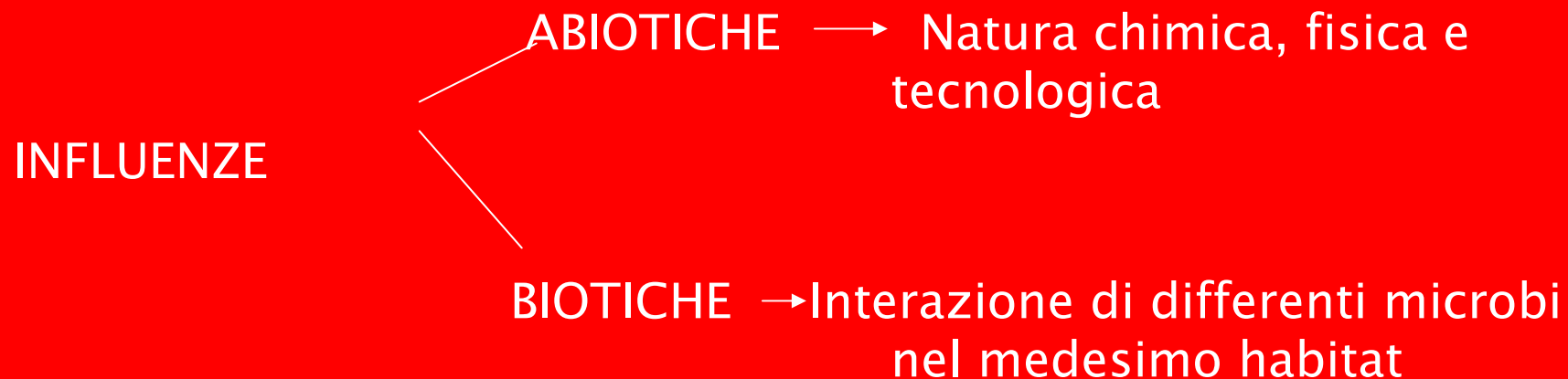
Le popolazioni microbiche inizialmente presenti nell'alimento variano in relazione all'azione selettiva svolta da determinati fattori ecologici che possiamo definire intrinseci, estrinseci, tecnologici che intervengono nelle varie fasi del processo di produzione e trasformazione

MOSSEL

(1983)

“La chiave del controllo microbiologico della sicurezza igienica così come della proliferazione microbica negli alimenti sta nella conoscenza ed applicazione dei principi dell'ecologia microbica”

ECOLOGIA MICROBICA: scienza delle relazioni tra microbi ed il loro ambiente, che determinano la loro crescita, la sopravvivenza o la morte.



PRINCIPI DI ECOLOGIA MICROBICA

Grande varietà di microflora iniziale



Pressione selettiva di fattori ecologici



Comunità microbica caratteristica per ciascun tipo di alimento



Associazione ecologica deterioramento specifico

FASI DELLA CRESCITA MICROBICA

FASE DI LATENZA O FASE LAG

Il n delle cellule in questa fase rimane costante in quanto i microrganismi mettono in atto meccanismi di adattamento all'ambiente.

La durata dipende da:

Composizione del substrato

Temperatura di incubazione

Stato fisiologico delle cellule al momento dell'inoculo

Atmosfera di incubazione

FASE ESPONENZIALE O FASE LOG

Le cellule batteriche iniziano a moltiplicarsi per scissione binaria (il n. raddoppia ad ogni divisione)

FASE STAZIONARIA

Il n delle cellule batteriche rimane più o meno costante in quanto si creano condizioni colturali non favorevoli

FASE DI DECLINO O MORTE

La morte delle cellule sopraggiunge per una serie di fattori tra i quali esaurimento delle risorse energetiche e la creazione di un ambiente sfavorevole

DETERIORAMENTO DEGLI ALIMENTI

La proliferazione microbica negli alimenti è influenzata da:

FATTORI INTRINSECI

correlati con l'alimento stesso

FATTORI ESTRINSECI

legati all'ambiente in cui il cibo è conservato

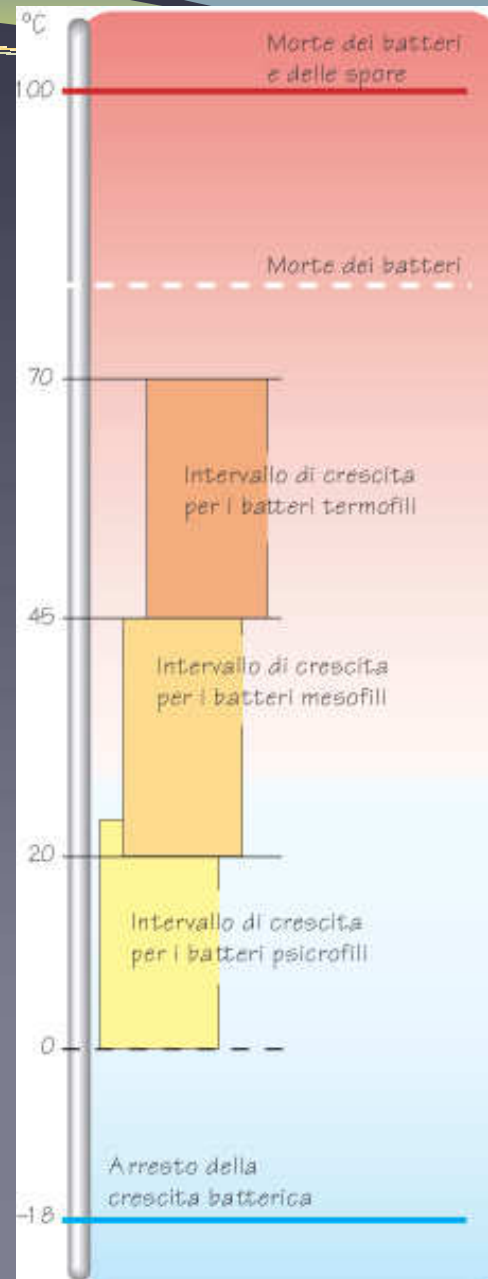
FATTORI INTRINSECI

- ✓ Sostanze nutritive
- ✓ pH
- ✓ Contenuto di umidità
- ✓ Attività dell'acqua
- ✓ Potenziale di ossido riduzione
- ✓ Struttura fisica dell'alimento
- ✓ Eventuale presenza di antimicrobici naturali (lisozima nel latte e nelle uova, alcune erbe e spezie)

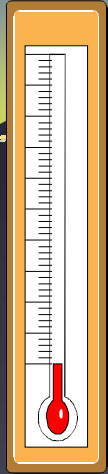
FATTORI ESTRINSECI

- ✓ Temperatura
- ✓ Presenza di gas (CO₂ e O₂)
- ✓ Tipo e numero di microrganismi presenti nell'alimento

I microrganismi e la temperatura



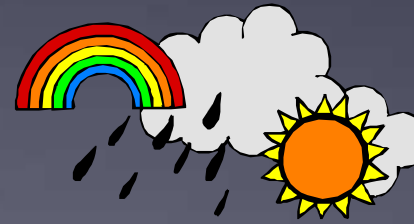
LA TEMPERATURA



I vari tipi di microrganismi gradiscono temperature diverse per il proprio habitat ottimale



Psicrofili



Mesofili



Termofili

prediligono

il freddo

temperatura
intermedia

il caldo

intervallo di crescita

0-25°C

20-45°C

45-70°C

temperatura ottimale

30-37°C

50-55°C

La temperatura esercita un'azione selettiva, le specie microbiche che si sviluppano a temperature prossime ai loro limiti massimi e minimi, presentano una lag fase e dei tempi di duplicazione molto più lunghi di quelli che si hanno alle temperature ottimali di crescita.

LIMITI INFERIORI DI CRESCITA

Batteri – 8°C

LIEVITI – 12°C

MUFFE – 17°C

Temperatura

Fattori che influenzano lo sviluppo dei microrganismi

TIPI DI BATTERI	TEMPERATURE DI CRESCITA (°C)		
	MINIMO	OPTIMUM	MASSIMO
Termofili	35 - 45	55 - 75	60 - 90
Mesofili	5 - 10	30 - 45	35 - 47
Psicrotrofi	-5 - 5	20 - 30	30 - 35
Psicrofili	-5 - 5	12 - 15	15 - 20

Batteri psicrotrofi

Gram -

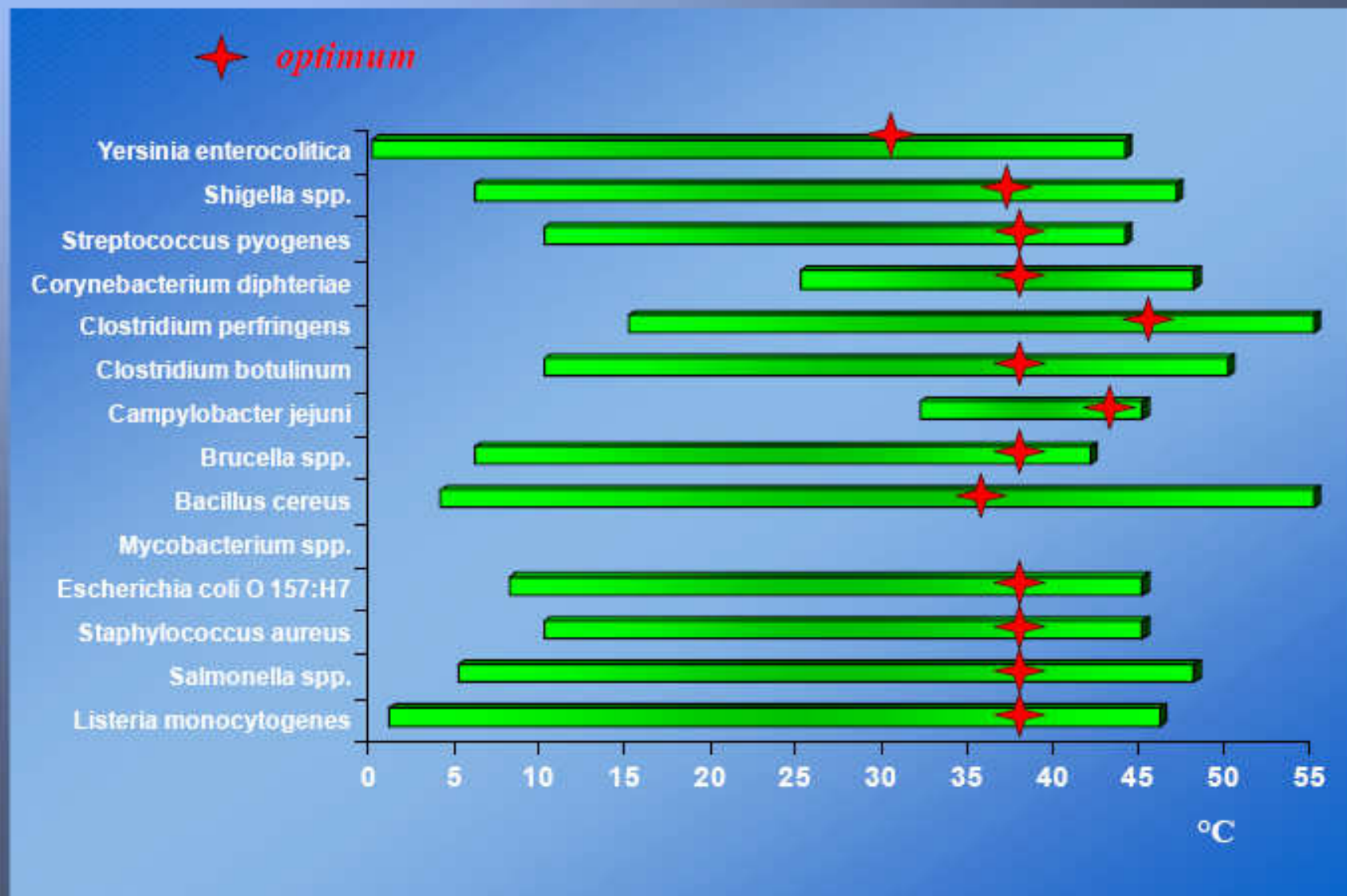
Aeromonas
Alcaligenes
Alteromonas
Acinetobacter
Pseudomonas
Flavobacterium
Xantomonas
Serratia
Vibrio

Gram +

Bacillus
Corynebacterium
Microstaphylococci
Lactobacillus
Streptococcus
Yersinia
Listeria



Parametri di crescita dei patogeni alimentari: Temperatura



L'IMPORTANZA DELL'OSSIGENO

I microrganismi si suddividono in:



Aerobi

vivono solo in presenza di ossigeno come l'uomo e gli animali



Anaerobi

vivono solo in assenza di ossigeno; per loro l'ossigeno è dannoso



**Aerobi o
anaerobi
facoltativi**

possono vivere sia in presenza che in assenza di ossigeno

FATTORI ECOLOGICI INTRINSECI

PARAMETRI CHIMICO - FISICI



Dipendono dalle caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche dell'alimento

pH

ATTIVITA' DELL'ACQUA (aW)

POTENZIALE DI OSSIDO-RIDUZIONE

STRUTTURE E NUTRIENTI

ANTIMICROBICI



PH

Definizione di pH

Quando l'acqua ionizza sono prodotte uguali concentrazioni di ioni H^+ e OH^-



$$[H^+] = [OH^-] = 1 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$$

Il pH è il logaritmo negativo della concentrazione idrogenionica.

Azione del pH sulla cellula microbica

Il pH interno delle cellule è vicino alla neutralità.

Le membrane cellulari sono impermeabili agli ioni H^+ e OH^- .

Cellula in ambiente a pH sub-ottimale.

Gli ioni H^+ e OH^- influenzano lo stato esterno della cellula senza modificare il pH interno. Conseguenze possono riguardare le seguenti attività:

funzionamento delle permeasi (che sono saturate con ioni H^+ o OH^-) deputate al trasporto all'interno della cellula di nutrienti;
produzione e attività di enzimi extracellulari;
meccanismi di produzione di ATP a livello della membrana.

Cellula in ambiente a pH estremi.

La membrana cellulare viene danneggiata e gli ioni H^+ e OH^- possono penetrare all'interno della cellula:
le proteine e gli acidi nucleici sono denaturati;
la cellula muore.



PH

L'attività del pH non si esprime solo per inibirne lo sviluppo

A determinati pH alcuni microrganismi pur essendo in grado di svilupparsi perdono la capacità di produrre determinati metaboliti (es. tossina botulinica)

Le variazioni di pH del mezzo (alimento) selezionano le specie microbiche in esso contenute portando anche alla scomparsa di specie microbiche che hanno contribuito a determinare questi cambiamenti di pH



PH

I batteri preferiscono un pH vicino alla neutralità anche se esistono specie, come i produttori di acidi le quali sono favorite nello sviluppo da una certa acidità del substrato, ed altre come i proteolitici, le quali possono sviluppare in ambienti fortemente alcalini, come si verifica nell'albume d'uovo.

Le muffe, pur preferendo un ambiente alcalino possono sviluppare in un range vasto da 2,0 a 8,5.

I lieviti preferiscono un ambiente acido intorno a 4,0 – 4,5 e non sviluppano in ambiente alcalino.



PH

pH acido favorisce la crescita di muffe e lieviti
pH neutro o alcalino i batteri responsabili del
deterioramento e della putrefazione

macinazione o impastamento aumenta la superficie esposta
alla contaminazione e distribuisce i microrganismi contaminanti
in tutto l'alimento

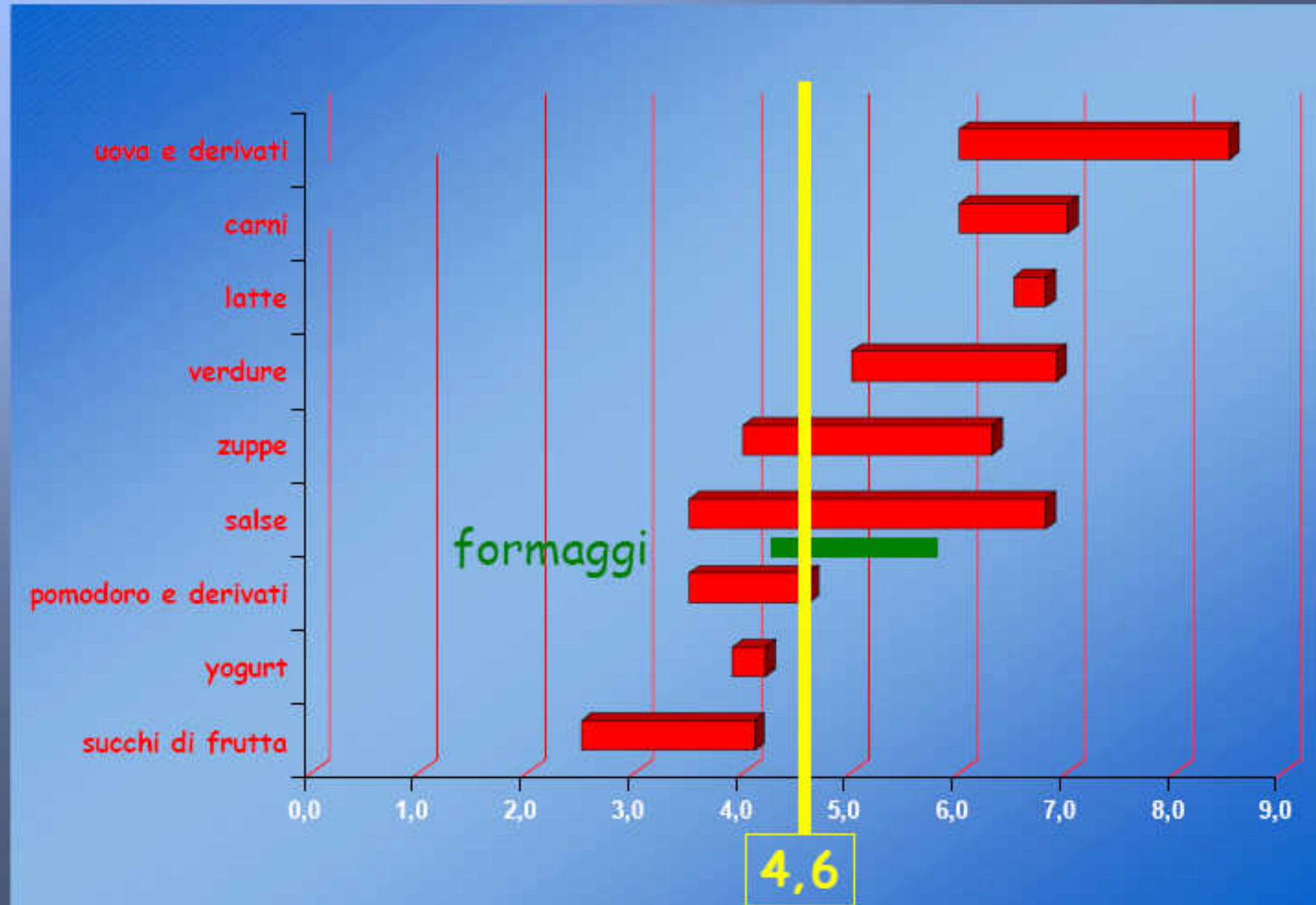
Valori minimi e massimi di pH per lo sviluppo dei microrganismi

Microrganismi (esempi)	Minimo pH	Massimo pH	Acido-resistenza
Micrococcus sp.	5,6	8,1	Bassa acido- resistenza pH min > 5,0
Pseudomonas aeruginosa	5,6	8,0	
Bacillus stearothermophilus	5,2	9,2	
Clostridium botulinum Tipo E	5,0-5,2		Media acido- resistenza pH min 5,0-4,0
Clostridium sporogens	5,0	9,0	
Bacillus cereus	4,9	9,3	
Vibrio Parahaemolyticus	4,8	11,0	
Clostridium botulinum Tipo A, B	4,5	8,5	
Staphylococcus aureus			
Salmonelle	4,0	9,8	
Escherichia coli	4,0-4,5	8-9,6	
Proteus vulgaris	4,4	9,0	
Streptococcus lactis	4,4	9,2	
Becillus cereus	4,3-4,8	9,2	
	4,3-4,9		
Lactobacillus spp.	3,8-4,4	7,2	Forte acido- resistenza pH min 4,0
Acetobacter acidophilus	2,6	4,3	
Saccharomices cerevisiae	2,3	8,6	
Penicillium italicum	1,9	9,3	
Aspergillus oryzae	1,6	9,3	

Alimenti

ad alta acidità

a bassa acidità





ACQUA LIBERA (Aw – activity water)

Ogni substrato per consentire la crescita microbica deve presentare una fase acquosa che funge da solvente per le sostanze nutritive.

Non tutta l'acqua degli alimenti è disponibile per i microrganismi

L'acqua libera rappresenta la quota d'acqua del substrato che i microrganismi possono utilizzare per il loro metabolismo.

ATTIVITA' DELL'ACQUA

attività dell'acqua (a_w) esprime il grado di disponibilità dell'acqua

è il rapporto tra la tensione di vapore
acqueo di una soluzione e quella dell'acqua
pura alla stessa temperatura

$$a_w = p_{\text{sol.}} / p_{\text{water}}$$

$$0 < a_w < 1$$

$$A_w = p/p_0$$

p = tensione di vapore dell'acqua del substrato.

p_0 = tensione di vapore dell'acqua pura.

Nell'acqua pura $p = p_0$ e quindi $a_w = 1$

L'aggiunta di uno o più soluti abbassa la tensione di vapore dell'acqua del substrato e quindi a_w diventa inferiore a 1.

Attività dell'acqua (a_w) e microrganismi

L' a_w può assumere solo valori compresi tra 1 [(la pressione di vapore dell'acqua dell'alimento è uguale a quella dell'acqua pura ($P=P_0=1$))] e 0 [(in materiali molto secchi non vi sono molecole di acqua in grado di esercitare una pressione di vapore ($P=0$))]. In realtà nessun alimento può avere una a_w uguale ad 1 o a 0.

Attività dell'acqua (a_w) e microrganismi
MISURA L'attività dell'acqua può essere
calcolata mediante la legge di Raoult:

$n_1 =$ n° di molecole di soluto

$n_2 =$ n° di molecole di solvente

Attualmente esistono strumenti in
grado di misurare in maniera precisa e
veloce l' a_w di un alimento mediante la
misura della pressione del vapore
d'acqua sopra l'alimento

Legge di Raoult

$$a_w = \frac{n_2}{n_1 + n_2}$$

Umidita' (Ambiente che circonda l'alimento)

Influenza :
l'aW dell'alimento

Favorisce :
Lo sviluppo superficiale dei microrganismi

- Ciascuna specie microbica ha un proprio ambito ottimale di a_w
- Valori sfavorevoli di a_w determinano una riduzione dei processi metabolici
- Più bassi sono i valori di a_w del substrato maggiore sarà il tempo per lo sviluppo e germinazione delle spore
- microrganismi che si possono sviluppare in substrati con concentrazioni elevate di soluti hanno richieste di a_w molto basse

L'acqua in un alimento è resa indisponibile.

- AUMENTANDO LA CONCENTRAZIONE DEI SOLUTI (ambiente con umidità molto bassa; aggiunta di sale o zucchero;)
- PRESENZA DI COLLOIDI IDROFILI (rendono l'acqua inutilizzabile)
- CRISTALLIZZAZIONE DELL'ACQUA (Congelamento)

Valori minimi approssimativi di A_w per la crescita dei microrganismi

A_w
Attività dell'acqua
o
Acqua libera

Batteri	0.91
Lieviti	0.88
Muffe	0.80
Batteri alofili	0.75
Muffe xerofile	0.65
Lieviti osmofili	0.60

Xerofilo: capace di vivere a basse A_w e ad alte conc. saline

Alofilo: capace di vivere ad alte concentrazioni saline

Alodurico: capace di sopportare alte concentrazioni di sale ma non di sviluppare in esse

Osmofilo: capace di vivere ad alte concentrazioni di zuccheri

VALORI DI a_w DEGLI ALIMENTI E LORO FLORA MICROBICA

a_w	Alimenti	Flora microbica
> 0.98	Carne fresca Pesce fresco Frutta fresca Vegetali freschi Conserven vegetali in acqua e sale Conserven di frutta in sciroppo leggero (< 3,5% sale, 26% zucchero)	(<i>C. perfringens</i> <i>Salmonella</i>) (<i>Pseudomonas</i>)
0.93-0.98	Salsicce fermentate Formaggio stagionato Pane Latte evaporato Conserva di pomodoro (10% sale, 50% zucchero)	(<i>B. cereus</i> , <i>C. botulinum</i> , <i>Salmonella</i>) lattobacilli, bacilli e micrococchi

a_w	Alimenti	Flora microbica
0.85-0.93	Salsicce essiccate e fermentate Prosciutto crudo (17% sale, saturato con saccarosio) Frutta secca	<i>S. aureus</i> Muffe che producono micotossine; lieviti alteranti e muffe
0.6-0,85	Farina Cereali Pesce sotto sale Nocciole	Funghi xerofili Alofili Lieviti osmofili
< 0.6	Dolciumi Miele Uova e latte in polvere Tagliatelle	Nessuna crescita ma rimane vitale

Le tecnologie alimentari - parte III - 8

Ad $a_w < 0.6$ gli alimenti iniziano ad essere stabilizzati, poiché non vi è crescita microbica anche se i microrganismi rimangono vitali.

Questo significa che non appena viene aggiunta acqua all'alimento deidratato, devono essere adottate le precauzioni richieste per un alimento fresco, poiché i microrganismi sopravvissuti possono nuovamente svilupparsi.

a_w

Gruppo di microrganismi

La maggior parte dei Gram-negativi

La maggior parte dei Gram-positivi

La maggior parte dei lieviti

La maggior parte dei funghi filamentosi

Batteri alofili

Funghi xerofili

Minimum a_w

0,97

0,90

0,88

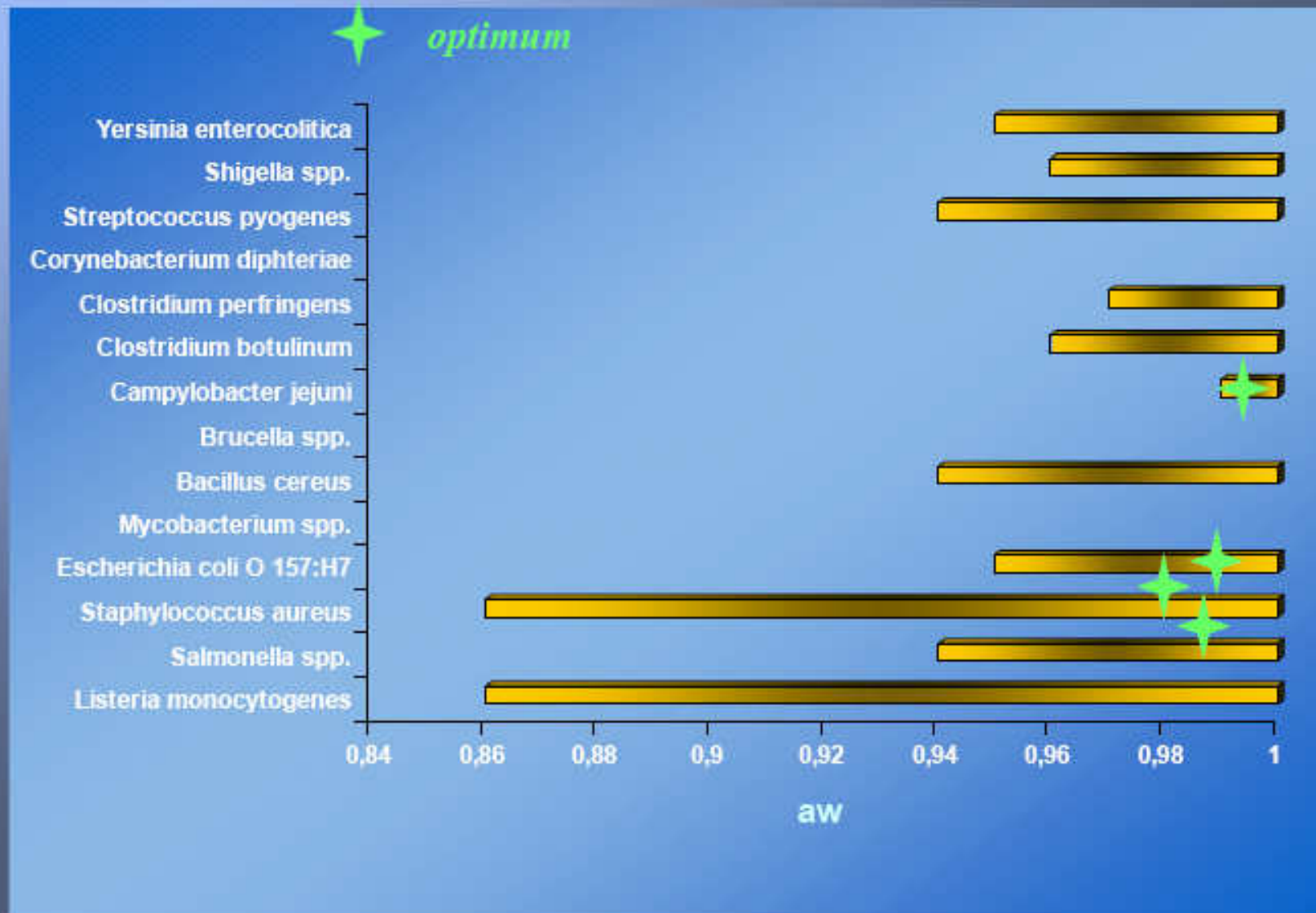
0,80

0,75

0,61



Parametri di crescita dei patogeni alimentari: Attività dell'acqua (a_w)



Il potenziale di ossido-riduzione

Definizione: il potenziale di ossido-riduzione o redox (Eh) può essere definito come una misura della tendenza di un substrato ad acquisire elettroni (diventando RIDOTTO) o a cedere elettroni (diventando OSSIDATO).

Il donatore di elettroni riducendo una sostanza ossidata è detto anche AGENTE RIDUCENTE (o ANTIOSSIDANTE).

L'accettore di elettroni ossidando una sostanza ridotta è detto anche AGENTE OSSIDANTE.

Il potenziale redox di un materiale è misurato in unità elettriche espresse in millivolt (mV) con un elettrodo standard di riferimento (0 mV) di platino/idrogeno collegato ad un Voltmetro.

Le sostanze nel loro stato ossidato producono corrente con valore positivo (+ mV), mentre nel loro stato ridotto danno un valore negativo (-mV).

Fattori che influenzano il potenziale di ossido-riduzione degli alimenti

Il potenziale redox di un materiale può assumere valori che vanno da -421 a $+816$ mV.

Più ossidato è un substrato maggiormente positivo è il suo Eh; più ridotto è un substrato maggiormente negativo è il suo Eh.

Il potenziale redox di un alimento è determinato da:

- 1.valore presentato in origine dall'alimento;
- 2.concentrazione (tensione) di ossigeno dell'atmosfera circostante;
- 3.grado di accesso dell'atmosfera nell'alimento;
- 4.processi di trasformazione a cui l'alimento è sottoposto;
- 5.metabolismo microbico;
- 6.capacità dell'alimento di resistere a cambiamenti di Eh.

Fattori che influenzano il potenziale di ossido-riduzione degli alimenti

Influenza di operazioni tecnologiche

Omogeneizzazione: la miscelazione di materie prime in presenza di aria aumenta il loro Eh (latte durante la produzione e l'imbottigliamento).

Macinazione: la macinazione aumenta la superficie di esposizione dell'alimento all'aria aumentandone il suo Eh. La carne macinata presenta un Eh di + 200 mV comparata con la carne della carcassa (Eh da -150 a -200 mV).

Trattamenti termici: il riscaldamento scaccia l'ossigeno determinando una riduzione dell'Eh (per es. gli alimenti in scatola hanno Eh negativo).

Presenza naturale di sostanze riducenti

Acido ascorbico in vegetali e frutta

Zuccheri riduttori in frutta

Gruppi -SH associati alle proteine della carne

LE ALTERAZIONI DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE MICROBICA DIPENDONO:

- specie microbica contaminante
 - entità della contaminazione
 - modalità di conservazione
 - natura dell'alimento
-
- ALTERAZIONI PRIMARIE
 - ALTERAZIONI SECONDARIE

Deterioramento degli alimenti

qualunque modifica dell'aspetto, dell'odore o del sapore di un prodotto alimentare che lo renda inaccettabile al consumatore

In alcuni casi il deterioramento può essere causato da microrganismi **PATOGENI**



Lo sviluppo dei microrganismi negli alimenti segue gli standard della crescita microbica



La velocità di crescita durante la fase esponenziale dipende dalla temperatura e dalle proprietà nutritive dell'alimento

INATTIVAZIONE DEI MICRORGANISMI

TRADIZIONALMENTE interpretata come incapacità dei microrganismi a crescere su un “substrato permissivo”

Oggi è noto che la capacità di non crescere sui substrati permissivi non implica la perdita di vitalità

Può manifestarsi successivamente una fase di crescita

STRESS NELLE CELLULE MICROBICHE

Esposizione a condizioni nutrizionali sfavorevoli, sostanze chimiche tossiche o condizioni fisiche subottimali

(Neidart e VanBogelen 2000)

CONDIZIONI DI STRESS

Producono reazioni che generalmente mirano a garantire la sopravvivenza nelle nuove condizioni microambientali:

Stress da carenza di nutrienti o di fattori di crescita

Stress termico

Stress acido (ac.acido acetico)

Stress ossidativo (es :H₂O₂)

Stress osmotico (es: sale)

LE CELLULE MICROBICHE

Tra la vita e la morte

➤ VITALI

Assenza di stress

crescita regolare e vitalità cellulare

➤ STRESSATE

Stress lieve

crescita rallentata o bloccata ma cellule vitali

➤ DANNEGGIATE

Stress moderato

crescita bloccata e diminuzione vitalità

➤ MORTE

Stress estremo
popolazione

inattivazione della maggior parte della

➤ ADATTATE ALLO STRESS

Stress superato

risposte adattative con >tolleranza allo stress

➤ SUICIDATE

Stress lieve/moderato

autolisi per > metabolismo futile

CELLULE VNC

LE CELLULE VITALI NON COLTIVABILI

CELLULE VNC: condizione di vitalità con perdita di coltivabilità (viable not culturable)

Strategia di sopravvivenza in batteri non sporigeni.

Dimostrata in SALMONELLA, CAMPYLOBACTER, ESCHERICHIA, VIBRIO, STREPTOCOCCUS, MICROCOCCUS, ma anche sporigeni come BACILLUS subtilis

TRANSIZIONE DA VNC A COLTIVABILI E VICEVERSA

Passaggio a VNC indotta da: carenza di nutrimento, cambiamenti di temperature (es refrigerazione), esposizione a ipoclorito o modificazione della % di NaCl

Ripristino della coltivabilità (“resuscitation”): può essere indotta da un aumento delle temperature o da un graduale aumento delle % nutrienti .