

Fattori che controllano lo sviluppo microbico negli alimenti

CAPITOLO 1

1.1 La temperatura

Ogni microorganismo è caratterizzato da un *valore ottimale* di temperatura per la crescita, da un valore *minimo* e un valore *massimo*, quando si trova in condizioni ideali di sviluppo relativamente agli altri fattori. Sulla base di questo parametro distinguiamo i microrganismi in:

| | Minimo (°C) | Optimum (°C) | Massimo (°C) |
|-------------|-------------|--------------|--------------|
| Psicrofili | - 5 | 0 | 30 |
| Psicrotrofi | 0 | 15-25 | 37 |
| Mesofili | 10 | 30-37 | 45 |
| Termotrofi | 20 | 45 | 50 |
| Termofili | 40 | 55 | 65 |

1.1.1 Alte temperature

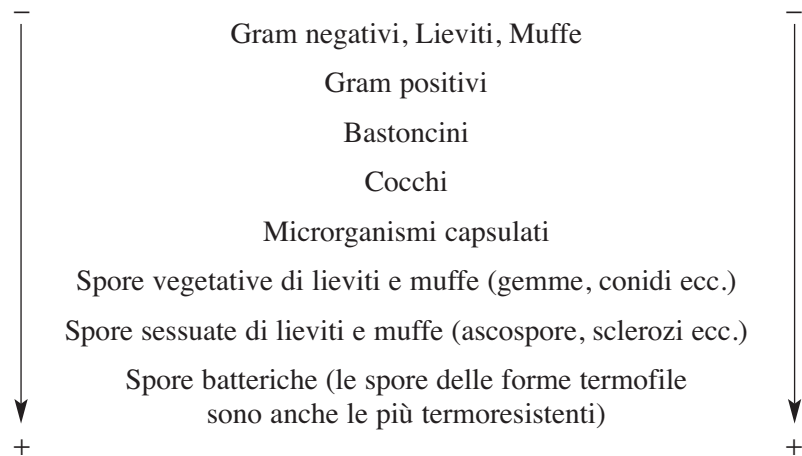
Le alte temperature, superiori ai massimi di crescita, esercitano un'azione microbica. La sensibilità dei microrganismi alle alte temperature, che rappresenta appunto la *termoresistenza*, varia in relazione ai più diversi fattori. Ricordiamo qui brevemente quelli di maggiore importanza.

- L'**acqua** e l'**acqua libera** (a_w): in assenza di acqua la termoresistenza aumenta perché le proteine non idratate richiedono una temperatura più elevata per la denaturazione.
- Il **pH**: i microrganismi sono più resistenti alle alte temperature al loro pH ottimale di crescita, che generalmente è intorno a 7; a pH acidi e alcalini la termoresistenza diminuisce.
- Le **sostanze** che esercitano un'azione protettiva, quali grassi, carboidrati, proteine, altri colloidali e sali, fanno aumentare la termoresistenza. Gli acidi grassi a lunga catena esercitano una protezione migliore nei confronti delle alte temperature di quelli a corta catena. Anche alcuni ioni, tra i quali gli ioni Mn^{++} , hanno questo effetto.

**fattori
di termoresistenza**

- Il **numero dei microrganismi**: maggiore è il numero dei microrganismi, più alto è il grado di termoresistenza, probabilmente a causa di un maggior contenuto in sostanze proteiche.
- L'**età della cellula**: la massima resistenza si ha all'inizio della *lag fase*. Le cellule in fase stazionaria sono più termoresistenti di quelle in fase logaritmica (cellule giovani).
- La **temperatura di crescita massima**: per uno stesso microrganismo la termoresistenza aumenta con l'aumentare della sua temperatura di crescita.
- Le **sostanze inibenti**: la termoresistenza diminuisce in presenza di inibenti (antibiotici, CO₂, SO₂ ecc.).

In una scala di resistenza alle alte temperatura possiamo così collocare i microrganismi (resistenza in ordine crescente):



La causa della termoresistenza delle spore va ricercata nello stato di disidratazione e nel contenuto di *dipicolinato di sodio*. Come regola generale i microrganismi *termofili* sono più termoresistenti dei *mesofili*, che a loro volta sono più resistenti degli *psicrofili*.

**tempo
di inattivazione
termica**

La termoresistenza di un microrganismo si indica con il *tempo di inattivazione termica*, che rappresenta il tempo necessario per uccidere a una determinata temperatura e in condizioni precisate (natura del terreno, età delle cellule ecc.) i microrganismi presenti in quel substrato. Il *tempo di riduzione decimale* di un microrganismo, che si indica con D (parametro di più largo impiego), è invece il tempo necessario per ridurre di 10 volte la popolazione microbica a una certa temperatura (tab. 1.1). È costante a una temperatura costante, è funzione della temperatura e si può esprimere in minuti o in secondi. Si calcola con la prima equazione di Bigelow:

**prima
equazione
di Bigelow**

$$\lg N_0/N = \vartheta D$$

dove N_0 è il numero iniziale di cellule, N quello finale e ϑ la temperatura. Lo z di un microrganismo, invece, è la variazione di temperatura da applicare per avere una variazione di 10 volte di D , cioè quell'aumento di tem-

Tabella 1.1 Esempi di tempo di riduzione decimale (D) di microrganismi calcolati a diverse temperature.

| | Temperatura (°C) | D (minuti) |
|--|------------------|------------|
| <i>Brucella</i> spp. | 65,5 | 0,1-0,2 |
| <i>Salmonella</i> spp. | 65,5 | 0,02-0,25 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 65,5 | 0,2-2 |
| <i>Salmonella seftenberg</i> 775W | 65,5 | 0,8-1 |
| Lieviti e muffe (forme vegetative) | 65,5 | 0,5-3 |
| Spore di <i>Bacillus</i> mesofili | 100 | |
| <i>B. cereus</i> | | 5 |
| <i>B. subtilis</i> | | 11 |
| <i>B. polymixa</i> | | 0,1-0,5 |
| Spore di anaerobi (clostridi) mesofili | | |
| <i>Cl. butyricum</i> | | 0,1-0,5 |
| <i>Cl. perfringens</i> | | 0,3-20 |
| <i>Cl. botulinum</i> | | |
| Tipo A e B | | 50 |
| Tipo E e ceppi non proteolitici A e B | 80 | 1 |
| Spore di <i>Bacillus</i> termofili | 120 | |
| <i>B. coagulans</i> | | 0,1 |
| <i>B. stearothermophilus</i> | | 4-5 |
| Spore di <i>Clostridium</i> termofili | | |
| <i>Cl. thermosaccharolyticum</i> | | 3-4 |
| <i>Cl. nigrificans</i> | | 2-3 |

peratura che determina un'accelerazione di 10 volte della velocità di distribuzione termica. Si calcola con la seconda equazione di Bigelow:

$$\lg D_1/D_2 = T_2 - T_1/z$$

dove D_1 e D_2 sono i tempi di riduzione decimale alle due temperature testate T_1 e T_2 .

Le spore batteriche sono molto resistenti al calore, e in base alla termoresistenza che mostrano in particolari condizioni (substrato a pH 6, con a_w 0,98 concentrazione pari a 10^6) possono essere suddivise come segue:

| | | | |
|----------------------|--------|--------|---|
| Bassa resistenza | 90 °C | 10 min | <i>Cl. botulinum</i> E, <i>B. macerans</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i> |
| Media resistenza | 100 °C | 30 min | <i>Cl. botulinum</i> A e B, la maggior parte delle specie di <i>Bacillus</i> |
| Alta resistenza | 120 °C | 10 min | <i>B. stearothermophilus</i> , <i>Cl. nigrificans</i> , <i>Cl. sporogenes</i> |
| Altissima resistenza | 120 °C | 45 min | <i>Cl. thermosaccharolyticum</i> |

seconda equazione di Bigelow

**trattamenti
termici per ridurre
la carica microbica**

In campo alimentare i trattamenti termici più utilizzati per ridurre la carica microbica sono rappresentati dalla *pastorizzazione* e dalla *sterilizzazione*.

Si parla di **pastorizzazione** quando la temperatura rimane inferiore a 100 °C. Lo scopo principale è la distruzione dei microrganismi patogeni (naturalmente in forma vegetativa); oltre ai patogeni vengono uccisi anche molti Gram negativi e le forme vegetative di parecchi Gram positivi; rimangono vive le spore batteriche e spesso anche le spore sessuate degli Eumiceti. I microrganismi che resistono al trattamento di pastorizzazione prendono il nome di *termodurici*. Gli alimenti pastorizzati sono delle semiconservate e, per la loro conservazione molto limitata nel tempo, necessitano della catena del freddo.

La **sterilizzazione** prevede invece trattamenti a temperature superiori a 100 °C. In questo caso deve essere assicurata la distruzione di tutti i microrganismi, comprese le spore. La curva di sopravvivenza di un microrganismo a una determinata temperatura si identifica con una retta, pertanto, in termini matematici, la *sterilità biologica* o *assoluta* non esiste. La *sterilità commerciale*, comunque, è quel trattamento termico che permette la riduzione delle spore di un microrganismo molto termoresistente (*Clostridium botulinum*) di 12 cicli logaritmici in 1 minuto. Le eventuali spore rimaste devono risultare in stasi metabolica, cioè non essere in grado di germinare in condizioni di normale conservazione. Gli alimenti sterilizzati sono delle *conservate* che devono essere confezionate in contenitori a chiusura ermetica e mantenersi stabili a temperatura ambiente; fino a che rimangono chiuse non necessitano della *catena del freddo*.

Altri trattamenti termici sono rappresentati dalla *cottura in acqua, in forno a vapore, sulla griglia, in forno a microonde* (cfr. par. 1.2), e dalla *frittura*.

Non sempre all'interno dell'alimento si raggiungono i 100 °C, anche se le temperature all'esterno possono raggiungere valori molto elevati. Un trattamento con calore subletale può causare danni metabolici e strutturali ad alcuni microrganismi, che possono subire una riduzione della vitalità mostrando esigenze nutrizionali maggiori e quindi necessità di substrati ricchi e privi di agenti selettivi; le spore batteriche e fungine, invece, trattate con calore subletale possono accelerare la loro capacità di germinare in seguito, durante la conservazione.

tecnologie emergenti

Esistono altre tecnologie cosiddette *emergenti* che consentono di ridurre il numero dei microrganismi presenti in un alimento senza la necessità di operare a temperature elevate. Tra di esse meritano un cenno le *alte pressioni idrostatiche*, la *corrente elettrica ad alto voltaggio*, i *campi magnetici ad alta intensità* e la *manotermosonicazione*.

Fin dall'inizio del Novecento **pressioni idrostatiche** di 100 MPa erano state utilizzate per distruggere cellule vegetative; le spore possono resistere anche a pressioni superiori a 1200 MPa (1 MPa equivale a 9,87 atm). Oggi trattamenti analoghi possono venire utilizzati per la *sbattezzazione* di latte, succhi di frutta e verdura, marmellate, gelatine, semilavorati di frutta per yogurt e gelati, salse, condimenti e, da ultimo, anche di alimenti con pH vicino alla neutralità.

La pressione applicata è costante (processi freddi idrostatici o CIP), 400-800 MPa a 20 °C per tempi da 0,5 a 5 minuti e recipienti con volumi da 50-100 litri. Il processo è ancora *discontinuo*; contrariamente al calore non si ha un gradiente di trasmissione ma la pressione applicata viene tra-

smessa istantaneamente e uniformemente. Il prodotto da trattare viene chiuso in un involucro sigillato di materiale flessibile circondato da liquidi (acqua, olio da lubrificazione, anticorrosivi) e compresso fino all'80-90% del volume originale; al recedere della pressione si ha un ritorno immediato al volume originale.

Applicando una pressione vengono accelerate le reazioni con attivazione di volume negativa e ritardate quelle con attivazione di volume positiva. In una cellula microbica le reazioni che causano una diminuzione di volume comprendono:

- denaturazione delle proteine e quindi degli enzimi;
- gelificazione (alterazione materiale genetico, ribosomi);
- cambiamento di fase nei liquidi e quindi nella membrana citoplasmatica con conseguente stasi e morte della cellula.

Sono possibili effetti negativi sulla componente proteica dell'alimento, specie sulle proteine a elevato PM, ma non su molecole piccole quali gli aromi. Come per il calore, la mortalità non è lineare ma si hanno delle code. La pressione è anche influenzata dal tipo di alimento e nell'ambito della specie microbica varia anche da ceppo a ceppo.

Poiché le spore batteriche (disidratate) sono molto resistenti alle pressioni, è possibile trovare delle combinazioni pressione/temperatura in cui, soprattutto in assenza di nutrienti, viene provocata la germinazione delle spore e le cellule vegetative che si originano vengono poi inattivate dalla pressione stessa.

L'effetto è diverso da sporigeno a sporigeno: non si arriva mai a una distruzione completa ma si ottiene solo una parziale sbatterizzazione. Le cellule in fase logaritmica sono più sensibili alle pressioni di quelle in fase stazionaria. I Gram positivi sono più resistenti dei Gram negativi, i batteri capsulati di quelli non capsulati.

Tra i patogeni, la scala di resistenza può essere così rappresentata:

| | | |
|---|-----|---|
| — | | — |
| | | |
| | MPa | |
| | 170 | |
| | 200 | |
| | 200 | |
| | 300 | |
| | 300 | |
| | | |
| + | | + |

Molti microrganismi sembrano distrutti, ma in realtà sono solo stressati e non recuperabili direttamente nei loro terreni selettivi; infatti:

| | |
|-----------------|--|
| con 350-450 MPa | <i>L. monocytogenes</i> (apparente riduzione di 10^2) |
| con 600 MPa | <i>S. aureus</i> |
| con 800 MPa | <i>E. coli</i> O157:H7 |

Riduzioni superiori con il medesimo trattamento si hanno in *tampone fosfato*. La causa dello stress, oltre a fattori legati alla composizione chimica del

**reazioni con
attivazione
di volume**

tampone fosfato

substrato, può essere la presenza di batteriocine o di lisozima. I chitosani aumentano l'efficacia delle alte pressioni nei confronti di *E. coli*, *S. aureus* e *Sacc. cerevisiae*.

I microrganismi già stressati sono più sensibili alle alte pressioni, quelli che sopravvivono però diventano più resistenti (come per il calore del resto).

effetto letale degli impulsi bipolari

La **corrente elettrica ad alto voltaggio** (*elettroporazione*) sfrutta l'effetto letale degli impulsi bipolari, letali probabilmente perché la rapida inversione nella direzione delle molecole cariche causa maggiori danni alle membrane cellulari. La forza del campo elettrico che determina la differenza di potenziale che si sviluppa attraverso la membrana delle cellule è più importante della durata dell'impulso elettrico nel causare l'inattivazione.

Le tecniche più moderne usano campi pulsati con forza da 20 a 70 kVcm⁻¹ con durata degli impulsi tra 1 e 5 μsec. Le condizioni operative devono essere tali da ridurre il rialzo della temperatura e le camere di trattamento devono consentire che l'alimento riceva un trattamento uniforme con impulsi di breve durata ma di alta intensità, in modo da rendere minimi i fenomeni di elettrolisi.

permeabilizzazione della membrana

L'inattivazione microbica avviene a seguito della permeabilizzazione della membrana sottoposta continuamente e ripetutamente a colpi e che si rompe quando il voltaggio attraverso di essa raggiunge 1 volt lasciando fuoriuscire il materiale citoplasmatico.

Le cellule vegetative dei lieviti e delle muffe sembrano essere inattivate facilmente, mentre le spore batteriche e le ascospore dei lieviti sono molto più resistenti, anche fino a 30 kVcm⁻¹. Si riscontra grande diversità nella resistenza da microrganismo a microrganismo, tuttavia le cellule grosse (lieviti) sono più sensibili di quelle piccole (batteri).

In campo alimentare si riscontra anche che:

- l'inattivazione aumenta con l'aumentare della temperatura;
- una debole forza ionica pare favorire l'inattivazione;
- così pure la diminuzione del pH;
- le cellule in fase logaritmica sono più sensibili.

Nei prodotti liquidi questo processo funziona bene per le cellule vegetative e raggiunge lo stesso risultato della pastorizzazione (succhi di frutta). Le cellule sottoposte a questo trattamento diventano però più sensibili alle batteriocine.

cambiamento della fluidità della membrana

Ancora ignoto è il meccanismo d'azione dei **campi magnetici ad alta intensità** che determina un debole rialzo di temperatura. Si suppone che l'energia magnetica agisca sulle molecole bipolari cambiando la fluidità della membrana e quindi alterando il flusso di ioni che la attraversano. Non si conosce azione diretta sulle spore.

Le riduzioni sulle cellule vegetative sono di 10² cicli nelle prove sperimentali condotte in latte (con *Streptococcus thermophilus*) e succo d'arancia (*Sacc. cerevisiae*) e pane a cassetta (muffe varie). Le applicazioni sono ancora limitate.

calore e ultrasuoni

La **manotermosonicazione** prevede l'uso simultaneo di calore e ultrasuoni a bassissime sovrappressioni, mai oltre 10 atm, per potenziare l'azione degli ultrasuoni. Gli ultrasuoni da soli causano fasi alterne di compressio-

ne e decompressione nel materiale sottoposto a trattamento e fenomeni di cavitazione che catalizzano reazioni chimiche le quali portano alla distruzione cellulare. Le cellule di grosse dimensioni (lieviti e muffe) sono più sensibili a questi fenomeni di quelle piccole (batteri), i cocci più resistenti dei bastoncini, i Gram positivi dei Gram negativi, le spore sono resistentissime e indistruggibili in questo modo. È prevista la possibilità di utilizzo per succhi di frutta, salse, condimenti con ridotto danno termico.

Classificazione degli alimenti in base alla conservabilità microbiologica dopo trattamento stabilizzante

Conservas. Hanno subito un trattamento tecnologico di stabilizzazione (termico o altro trattamento autorizzato) in grado di inattivare gli enzimi e di distruggere i microrganismi presenti e le eventuali tossine; sono confezionate in recipienti ermetici ai gas e ai microrganismi nelle normali condizioni di impiego. Devono presentare i requisiti di sterilità commerciale, cioè assenza di sviluppo microbico nelle normali condizioni di conservazione. I microrganismi eventualmente rimasti vivi dopo il trattamento devono trovarsi in stasi metabolica e rimanervi per tutta la vita commerciale. In genere, se la materia prima è di buona qualità microbiologica (cioè a carica bassa), si può raggiungere nell'ambito della confezione anche la sterilità biologica, cioè avere totale assenza di microrganismi.

sterilità
commerciale

sterilità
biologica

La durata delle conserve è in relazione alla loro composizione chimica e va da alcuni mesi fino ad alcuni anni. Per alcune conserve è richiesta la sterilità biologica: si tratta delle conserve di carne e di pesce sia al naturale sia sott'olio. Si distinguono conserve con $\text{pH} > 4,5$ e $< 4,5$; queste ultime sono le più sicure, dato che a questo pH viene impedita la germinazione di eventuali spore batteriche sopravvissute, soprattutto dei Clostridi (*Cl. botulinum*).

Semiconservas. Sono prodotti che hanno subito un trattamento tecnologico tale per cui risultano esenti da forme patogene e loro tossine, ma che mantengono viva una gran parte della loro microflora: non sono quindi stabili nel tempo alle ordinarie condizioni di conservazione. Per mantenersi in buone condizioni necessitano della catena del freddo. Anche in questo caso, però, la loro durata è limitata nel tempo ed è in relazione alla carica residua (numero e attività metabolica e capacità moltiplicativa). Per queste loro caratteristiche le semiconservas non necessitano del confezionamento asettico, anche se l'uso di tale pratica ne migliora sensibilmente la conservabilità. La vita commerciale di questi prodotti è pertanto in relazione alla carica microbica residua, a sua volta collegata con l'intensità del trattamento subito e/o alla presenza di additivi, all'entità della contaminazione che si realizza in fase di confezionamento, alle modalità di conservazione ecc.

catena
del freddo

Non conservati o freschi. Non subiscono alcun trattamento stabilizzante. La *shelf-life* è legata a numerosi fattori intrinseci ed estrinseci altamente variabili e difficilmente standardizzabili.

1.1.2 Basse temperature

Si distinguono in *temperature di refrigerazione* (tra 0 e +5 °C) e di *congelamento* (tra -40 e 0 °C e più). Le basse temperature esercitano sui microrganismi azione prevalentemente batteriostatica e solo in piccola parte battericida. La diminuzione della temperatura rallenta la crescita ed eventual-

azione
batteriostatica

**azione
battericida**

mente la ferma, quando si arresta per la diminuzione di acqua l'attività degli enzimi (tab. 1.2). L'azione battericida è da ascrivere ad alterazioni irreversibili della cellula microbica dovute alla formazione di cristalli di ghiaccio con conseguente aumento del volume e rottura della parete cellulare, o a fenomeni di crioconcentrazione con precipitazione dei colloidali plasmatici o ad alterata permeabilità cellulare. In una popolazione microbica mista le basse temperature, soprattutto quelle tra 0 e +5 °C, hanno un'azione selettiva e durante la conservazione possono portare a un'importante variazione sia qualitativa sia quantitativa dei microrganismi presenti.

**abbassamento
della temperatura
tra 0 e 5-7 °C**

La **refrigerazione** ha solo una blanda azione batteriostatica, poiché l'abbassamento della temperatura tra 0 e 5-7 °C rallenta solo lo sviluppo microbico e in maniera selettiva. È utilizzata per una breve conservazione dei prodotti alimentari e per favorire alcuni processi utili come la frollatura delle carni, la maturazione di formaggi e salami ecc. I batteri Gram positivi sono più inibiti dalle basse temperature rispetto ai Gram negativi. Molte cellule microbiche, soprattutto quelle degli psicrotrofi, che comunque vengono solo rallentati nel loro sviluppo, subiscono alle basse temperature alcune modificazioni morfologiche (aumento delle dimensioni della cellula, formazione di filamenti, di doppia parete, aumento del numero dei flagelli) e fisiologiche (della produzione di alcuni enzimi come lipasi e proteasi negli *Pseudomonas*, di alcuni pigmenti carotenoidi e fluorescenti, di polisaccaridi extracellulari). In genere aumenta la lag fase.

Si verificano anche delle modificazioni strutturali, tra le quali il cambiamento nella composizione dei lipidi e un aumento degli acidi grassi insaturi. Gli psicrofili veri, grazie a una o più di queste possibilità legate al loro corredo genetico, non subiscono alcuna inibizione da parte delle temperature di refrigerazione, anzi crescono meglio.

Tabella 1.2 Minimi di temperatura di crescita di alcuni microrganismi di interesse alimentare.

| | °C |
|---------------------------------|--------------|
| Alcuni lieviti | da -34 a -18 |
| Alcune muffe | -12 |
| <i>Vibrio</i> spp. | -5 |
| <i>Y. enterocolitica</i> | -2 |
| Alcuni coliformi | -2 |
| <i>Enterococcus</i> spp. | 0 |
| <i>Brochothrix termosphaeta</i> | -1 |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | -1 |
| <i>Leuc. carnosus</i> | +1 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 0 |
| <i>Lb. sake</i> | +2 |
| <i>Salmonella panama</i> | +4 |
| <i>Salmonella heidelberg</i> | +5,3 |
| <i>Salmonella tiphymurium</i> | +6,2 |
| <i>Cl. botulinum</i> E | +3,3 |
| <i>Serratia liquefaciens</i> | +4 |
| <i>Pediococcus</i> spp. | +6 |
| <i>Bacillus</i> spp. | +7 |