

Fonti di contaminazione batterica della carne

Carlo Cantoni

L.D. in Ispezione alimenti origine animale – via Corridoni, 41 – 20122 Milano

Le fonti di contaminazione batterica delle carni in un macello sono:

Tabella n. 1. *Fonti principali e vie di contaminazione dei microrganismi delle carni fresche (ICMSF, 1992).*

Coltello	Il dissanguamento con coltello a lama sottile può diventare una fonte di contaminazione se la lama non è sterile.
Pelle degli animali	I microrganismi presenti sulle pelli ($10^3 \times \text{cm}^2$ nel bovino e concentrazioni più elevate negli ovini e suini) contaminano le rispettive carcasse tramite i coltelli, la scuoiatura o quando la microflora batterica diventa trasportata per via aerea (air borne) e può contaminare le carcasse scuoiate.
Tratto gastrointestinale	Tramite lesioni o fuoriuscita di feci dall'ano, il contenuto intestinale con una elevata concentrazione di microrganismi può depositarsi sulla superficie delle carcasse durante il loro allestimento. Specialmente importante a questo riguardo è il contenuto ruminale, che contiene circa 10^6 ufc/g.
Mani dei lavoratori	Anche quando i lavoratori usano guanti, sono un importante fonte di contaminazione (soprattutto per quanto riguarda i patogeni nelle carni fresche, e la contaminazione può diffondersi ad altre carcasse).
Ambiente di lavorazione e di conservazione	La circolazione di aria può essere una significativa fonte di contaminazione della superficie delle carcasse.
Linfonodi	Essi contengono un elevato numero di batteri e possono diventare un problema quando vengono incisi durante i controlli ispettivi.

Substrati per la crescita e prodotti metabolici dei principali microrganismi alteranti la carne

I substrati presenti nella carne utilizzati dai microrganismi per molteplici casi nella carne sono riportati nella tabella n. 2.

Tabella n. 2. *Substrati per la crescita e metaboliti dei principali microrganismi alteranti le carni.*

Microrganismo	Substrato per la crescita		Metaboliti principali	
	aerobiosi	anaerobiosi	aerobiosi	anaerobiosi
<i>Pseudomonas</i>	glucosio, glucosio 6P	glucosio, ac. lattico, piruvato, aminoacidi	incontra solfuri, esteri, acidi, amine	esteri
<i>Acinobacter psychrobacter</i>	aminoacido, ac. lattico, glucosio	glucosio, aminoacidi	esteri, nitrili, solfuri	ossime
<i>Shewanella putrefaciens</i>	glucosio, aminoacidi, ac. lattico, piruvato, propinato, etanolo, acetato	glucosio formiato	solfuri volatili	H ₂ S
<i>Brochotrix thermosphacta</i>	glucosio, ribosio, glicero- lo	glucosio	ac. acetico, acetocina, ac. isovalerico, ac. isobutirrico	ac. lattico, ac. volatili
<i>Serratia</i>	glucosio, glucosio 6P, aminoacidi, ac. lattico	glucosio, glucosio 6P, aminoacidi	solfuri, amine	ac. lattico, H ₂ , H ₂ S, amine
Batteri lattici	glucosio, ribosio	glucosio, glucosio 6P, aminoacidi	come di lato	ac. lattico, ac. volatili
<i>Leuconostoc</i>	glucosio, ribosio, glucosio P	glucosio, ribosio, glucosio P	come di lato	CO ₂ , ac. lattico, ac. volatili, ac. butanoico
<i>Carnobacterium</i>	glucosio	glucosio P, glucosio	come di lato	ac. lattico, diacetile, acetato

Generi di batteri isolati da locali di macellazione

Da locali di macellazioni di bovini e suini prima della mattazione Maronani-Gadri e coll. (2009) hanno isolato i microrganismi elencati nella tabella n. 3.

Tabella n. 3. *Batteri aerobi mesofili isolati da locali di macellazione.*

	Locale di mattazione	Locale di sezionamento	Locale raccolta ossa
Gram negativi	<i>Aeromonas</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Shewanella</i> <i>Cornamonas</i> <i>Arcobacter</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>Sreratia</i> <i>Pantola</i>	<i>Pseudomonas</i>
Gram positivi	<i>Micrococcus</i> <i>Brevibacterium</i> <i>Kocuria</i> <i>Arthrobacter</i> <i>Cellulomonas</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Bacillus</i> <i>Aerococcus</i>	<i>Corynebacterium</i> <i>Brevibacterium</i> <i>Micrococcus</i> <i>Aureobacterium</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Listeria</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Bacillus</i>	<i>Micrococcus</i>

Dalle carni rosse e dal pollame macellato il numero dei microrganismi isolati è assai più elevato in conseguenza delle operazioni di uccisione, scuoiatura, sezionamento ed ??? come evidenziato dall'elenco dei generi di microrganismi riportati nella tabella n. 4.

Tabella n. 4. Genere di batteri isolati da carni e carcasse di polli.

<i>Achromobacter</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Pantoea</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Carnobacterium</i>	<i>Kluyvera</i>	<i>Proteus</i>
<i>Aerobacter</i>	<i>Chromobacterium</i>	<i>Kocuria</i>	<i>Providencia</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Kurthia</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Shewanella</i>
<i>Alteromonas</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Alteromonas</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Listeria</i>	<i>Weissella</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Yersinia</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Micrococcus</i>	
<i>Brochotrix</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Moraxella</i>	
<i>Campylobacter</i>	<i>Janthinobacterium</i>	<i>Paenibacillus</i>	

(da Nychos e coll., 2008)

Fra tutti questi microrganismi alcuni riescono patogeni per il consumatore e altri fungono come alteranti. Nella tabella n. 5 sono riportati degli episodi di tossinfezioni da alimenti contaminati dopo la loro preparazione.

Tabella n. 5. Esempi di tossinfezioni da alimenti contaminati da batteri dopo la loro preparazione.

Patogeno	Cibo responsabile	Probabile fonte
<i>Campylobacter jejuni</i> (0.33)	insalata di tonno	probabilmente pollame lavorato ivi
<i>Cryptosporium parvum</i> (°)	cibi differenti	mani infette dei lavoratori
<i>Cryptosporium parvum</i> (°)	acqua	contaminazione secondaria dell'acqua potabile
<i>E. coli</i> 0157:H7	yogurth aromatizzato	pompa usata per la raccolta di latte non pastorizzato
<i>E. coli</i> 0157:H7	carne trita (hamburger)	pratiche non igieniche di preparazione
<i>E. coli</i> 0157:H7	vari alimenti	affettamento e manipolazione utensile supermarket
<i>L. monocytogenes</i>	burro	ambiente di lavorazione
<i>L. monocytogenes</i>	carne cotta	affettatrice
<i>L. monocytogenes</i>	hot dog	ambiente
<i>L. monocytogenes</i>	verdure	ambiente
<i>Norwalk like virus</i> (SRSV)	vari alimenti	operatori alimentari
<i>Salmonella serovars</i>	patate al paprika	polvere di paprika contaminata
<i>S. agona</i>	cereali per colazione	ambiente di lavorazione
<i>S. berta</i>	formaggio fresco	cassette di trasporto usate in precedenza per trasporto pollame
<i>S. ealing</i>	alimenti per bambini	linee di produzione
<i>S. enteritidis</i>	gelati	tanker usato per il trasporto in precedenza usato per trasporto uova
<i>S. enteritidis</i> PT	pasticcio d icarne	ingredienti

<i>S. typhimurium</i> DT170	kebab	dalle carni usate
<i>Shigella flexneri</i>	insalate miste di verdura e carne	operatori alimentari
<i>Yersinia enterocolitica</i>	cioccolato	materia prima
<i>Yersinia enterocolitica</i>	latte pastorizzato	contaminazione ambientale post lavorazione

Attività negative di microrganismi nei confronti delle carni dopo la macellazione

Tabella n. 6. Processi alterativi delle carni fresche tenute a 0-4°C in differenti atmosfere gassose.

Gas	Carne e pollame
aria	<i>Pseudomonas</i>
>50% CO ₂ con O ₂	<i>Brochotrix thermosphacta</i>
50% CO ₂	<i>Enterobacteriaceae</i> , batteri lattici
<50% CO ₂ con O ₂	<i>B. thermosphacta</i> , batteri lattici
100% CO ₂	Batteri lattici
sottovuoto	<i>Pseudomonas</i> , <i>B. thermosphacta</i> , <i>Leuconostoc</i> , clostridi psicrotrofi

Tabella n. 7. Comuni alterazioni delle carni e batteri responsabili.

Alterazione	Prodotto carneo	Batteri
mucosità	carni	<i>Pseudomonas</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Weissella</i> , <i>Brochotrix</i>
inverdimento H ₂ O ₂	carni conservate	<i>Weissella</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i>
H ₂ S + inverdimento	sottovuoto	<i>Shewanella</i>
H ₂ S	carni conservate	<i>Lactobacillus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Vibrio</i>
odore solforoso	carni sottovuoto	<i>Clostridia</i> , <i>Hafnia</i> , <i>Serratia</i> , <i>Raoultella</i>
odore di cavolo	bacon	<i>Providencia</i>
putrefazioni	tutte	enterobatteri, clostridi
acidificazione	prosciutti	batteriolattici

Il confezionamento delle carni in confezioni di materiale plastico sottovuoto ha facilitato la conservazione e la distribuzione di tagli carnei in quanto le carni con un pH inferiore a 6 possono avere una vita commerciale superiore a 10 settimane, sempre che siano sezionate in corrette condizioni igieniche e di refrigerazione impiegando un materiale di confezionamento altamente impermeabile all'ossigeno (Egan e coll., 1987).

Tale pratica non è tuttavia esente da inconvenienti, infatti, a cominciare dagli anni 1980 casi di alterazioni, dovute alla formazione odori anomali e di rigonfiamenti gassosi consistenti (bombaggi), con presenza di odori sgradevoli (solforosi, fruttati, di formaggio), si sono manifestati in carni bovine confezionate (Dainty e coll., 1989) e, in tempi susseguenti, anche in confezioni di carni ovine, equine e suine.

Gas come idrogeno (H₂), anidride carbonica (CO₂) più idrogeno solforato (H₂S) e altri solfuri, acidi organici (ac. butirrico, isoalderico, acetico), alcoli, sono formati nelle confezioni come composti finali di alcuni gruppi di microrganismi sviluppatasi nelle carni confezionate e conservate in stato di refrigerazione.

Microrganismi

I microrganismi responsabili delle alterazioni delle carni confezionate sottovuoto refrigerate appartengono ai generi *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Hafnia*, *Serratia*, *Raoultella*, *Pantoea*.

Le specie batteriche appartenenti ai generi elencati, in base alla temperatura di crescita allo stato refrigerato si dividono in due gruppi:

- 1) psicofili (crescono a temperature inferiori tra 0 e 16°C) (freddo tolleranti);
- 2) psicrotrofi (crescono a temperatura tra 4 fino a 37°C).

Negli ultimi anni le alterazioni delle carni sottovuoto sono diventate sempre più frequenti tanto da diventare un vero problema per i responsabili dei laboratori di confezionamento.

Naturalmente le alterazioni si presentano con rigonfiamenti più o meno evidenti a partire da 15 gg o più dal momento iniziale del rigonfiamento.

Ruolo dei clostridi

I clostridi sono batteri Gram positivi sporigeni, anaerobi obbligati, facenti parte del genere *Clostridium*, famiglia *Clostridiaceae*, ordine *Clostridiales*, classe: *Clostridia*; phylum; *Firmicutes*.

I clostridi responsabili delle alterazioni sono comprese nel cluster I (clostridi senso stricto sec. Collins, 1994).

Le prime segnalazioni in proposito cominciano ad essere note a partire dal 1989 e la cronologia dei bombaggi (rigonfiamenti con relativa descrizione degli stessi è la seguente.

Tabella n. 8. *Tipi di caratteristiche alterazioni di carni refrigerate e confezionate sottovuoto.*

Carne bovina sottovuoto	Grosso rigonfiamento della confezione, all'apertura odore solforoso, poi fruttato, quindi simile al solvente, infine "di formaggio". H ₂ e CO ₂ sono i gas maggiore componente dello spazio di testa (Dainty e coll., 1989)
Carne bovina refrigerata fresca e roast-beef sottovuoto	Grosso rigonfiamento della confezione, odore di H ₂ S, colorazione verde del liquido fuoriuscito dalle carni. Odore di ac. butirrico (Kaichayanan e coll., 1993)
Carne suina cotta refrigerata sottovuoto	Grosso rigonfiamento della confezione, colore rosso-verde della carne, presenza di liquido, odore solforoso all'apertura della confezione, odore di formaggio dopo contatto con l'aria (Broda e coll., 1996 a,b)
Carne bovina refrigerata sottovuoto	Grosso rigonfiamento della confezione, proteolisi con colorazione verde della carne, odore putrido, liquido in notevole quantità (Broda e coll., 1966 a,b)
Carne bovina e di pecora refrigerate sottovuoto	Grosso rigonfiamento della confezione e alterazioni simili alle precedenti, CO ₂ e H ₂ (Broda e coll., 1996 a,b)
Petto di tacchino fresco e roast-beef refrigerati sottovuoto	Grosso rigonfiamento della confezione. Odore di H ₂ S all'apertura, CO ₂ e H ₂ . Presenza di liquido (Kolinowski e coll., 1999)
Lombate di cervo sottovuoto	Grosso rigonfiamento della confezione, estesa proteolisi del tessuto muscolare, notevole quantità di liquido (Broda e coll., 1996 a,b)
Lombate bovine refrigerate sottovuoto	Rigonfiamenti dell'involucro, proteolisi del tessuto muscolare con colorazione verde, liquido elevato, odore putrido (Broda e coll., 1996 a,b)
Carne per cani refrigerate sottovuoto	Grosso rigonfiamento, macchie localizzate annerite, acido, odore di latte cagliato (Broda e coll., 1996 a,b)
Carne refrigerata bovina confezionata sottovuoto	Grosso rigonfiamento con odore di acido butirrico (Cantoni e coll., 2008)

I clostridi psicrofilo finora identificati sono: *C. estertheticum* a) sub specie *estertheticum*, b) sub specie *lameraniense* e *C. gasigenes*.

Altri clostridi psicrofilo sono: *C. acidisolis*, *C. articum*, *C. vincentii*, *C. frigoris*, *C. lacusfryxellense*, *C. bowmani*, *C. frigoriphilum*, *C. schirmacherense*, *C. psychrophilum*, *C. algoriphilum*.

Nelle carni sottovuoto refrigerate sono stati isolati i primi tre e il *C. frigoriphilum* (Cantoni e coll., 2008).

I clostridi psicrotrofi causa del rigonfiamento di confezioni di carne refrigerata sottovuoto finora identificati sono:

- *C. algidicarnis* (Lawson e coll., 1994),
- *C. frigidicarnis* (Broda e coll., 1999),
- *C. algidixilanolitium* (Broda e coll., 2000 a,b).

Altri clostridi psicrotrofi sono: *C. akagi*, *C. acidi soli* e *C. lituseburensis* (cluster XIVa).

I singoli ceppi elaborano varie sostanze volatili quali:

- *C. estertheticum*: butanolo, ac. butirrico, ac. acetico e butilesteri + H₂S.
- *C. estertheticum* subsp. *lameraniense*: ac. acetico (72,4%), ac. butirrico (26,4%), ac. propionico (0,3%), ac. isobutirrico (0,9%) + H₂S.
- *C. frigoriphilum*: ac. butirrico + etanolo.
- *C. gasigenes*: etanolo, acetato, butirrato, butanolo.
- *C. algidocarnis*: ac. butirrico (++++), ac. acetico (++++), ac. 2-metilpropionico (+), ac. 2-metilbutirrico (+), ac. 3-metilbutirrico (+).
- *C. frigidicarnis*: ac. acetico (43-45 mM), etanolo (19-20 mM), ac. butirrico (18-20 mM), ac. isovalerico (6-7 mM), butanolo (4-5 mM).
- *C. algidixilanolitium*: ac. acetico, ac. formico, etanolo, ac. butirrico, butanolo.

Substrati utilizzati dai clostridi per la produzione di gas e loro origine

I clostridi utilizzano per la loro crescita gli zuccheri (pentosi ed esosi) presenti nella carne e derivanti dalla scissione del glicogeno. Quando gli zuccheri sono metabolizzati con produzione di CO₂ i germi metabolizzano il lattato formatosi dalla glicolisi post-mortale. Durante la fermentazione del lattato i maggiori prodotti formati sono, in genere, ac. butirrico e butanolo. L'eventuale presenza di idrogeno solforato è dovuta alla metabolizzazione degli aminoacidi solforati ad opera dei clostridi stessi.

Quanto alle fonti di origine dei clostridi e alla contaminazione delle carcasse si conosce poco; la maggior parte dei batteri alteranti le carni confezionate sottovuoto origina dall'ambiente di lavorazione (Gill., 1982).

Nei locali di macellazione, suolo e feci animali sono adesi alla cute degli animali e quindi la pelle dell'animale è considerata la prima diretta contaminazione delle carcasse dei batteri citati (Bell, 1997; McEvoy e coll., 2001).

Durante il sezionamento e il confezionamento altre fonti di contaminazioni sono le attrezzature e gli utensili a loro volta contaminati.

La seconda fonte di contaminazione, forse più importante della precedente è rappresentata dalle feci, a loro volta contaminate tramite i foraggi e i mangimi.

L'uso di cereali, soprattutto di mais, sembra favorire la diffusione di clostridi psicrofilo e psicrotrofi.

Batteri tolleranti il freddo (in questo caso i clostridi) sono stati isolati per la prima volta dagli ambienti freddi dell'Artico e dell'Antartico (Jordan e coll., 1979; Montfort e coll., 1997) e, per la loro capacità di tollerare temperature più elevate, dagli ambienti e località con inverni freddi. Sebbene i clostridi psicrofilo siano incapaci di moltiplicarsi a temperature superiori a 22°C, le loro spore sopravvivono in condizioni sub ottimali ambientali anche a temperature elevate. Quindi quando queste spore entrano nei mattatoi perché presenti sulla cute e nelle feci degli animali, l'ambiente di mattazione, di sezionamento, le attrezzature e gli utensili diventano fonti potenziali di contaminazione.

Con carni contaminate, il confezionamento e la successiva lunga conservazione a temperature di refrigerazione creano le condizioni ideali per lo sviluppo dei clostridi con conseguente rigonfiamento delle confezioni. Il danno economico conseguente è mitigato dal fatto che i bombaggi, di solito, colpiscono solo alcune confezioni rispetto al totale, ma la situazione è in peggioramento, soprattutto in questi ultimi tempi e, al momento, non si sa come impedirla.

In proposito è desiderabile poter condurre studi accurati in proposito.

Ruolo dei batteri Gram positivi non sporigeni

I batteri responsabili Gram positivi appartengono ai generi *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Brochotrix* e sono tutti psicrotrofi. Sono compresi nel gruppo degli etero fermentanti in quanto producono ac. lattico, ac. acetico, etanolo e anidride carbonica e acetoina.

Genere *Leuconostoc*

I batteri del genere *Leuconostoc* appartengono alla famiglia delle *Leuconostocaceae*, ordine *Lactobacillales*, phylum *Firmicutes*.

Le cellule sono sferiche e spesso lenticolari, si presentano in catenelle. Sono germi facoltativamente anaerobi. Si sviluppano da 1°C con temperature ottimali di crescita di 20-30°C. Lo sviluppo di questi batteri è strettamente legato alla presenza nel substrato di ac. micotico, tiamina, biotina, ac. pantotenico e altri acidi derivati.

I batteri lattici in genere sono i microrganismi predominanti e responsabili delle alterazioni delle carni confezionate sottovuoto o in atmosfera modificata (MAP) (Borch e coll., 1996; Korkeala e coll., 1997). La anaerobiosi e le temperature di refrigerazione dovrebbero impedire lo sviluppo dei batteri alteranti Gram negativi. Poiché i *Leuconostoc* sono resistenti alla inibizione esercitata dal nitrito, dal fumo e sono in grado di crescere in presenza di elevate concentrazioni di sale (Castellani e coll., 1955; Dodds e coll., 1984; Delaquis, 1988; Korkeala e coll., 1992) essi sono in grado di svilupparsi nella carne e nei prodotti crudi e cotti.

Il rapido sviluppo delle tecniche del confezionamento sottovuoto, della refrigerazione con conseguente allungamento del tempo di conservazione dei prodotti carnei confezionati hanno prodotto un nuovo ecosistema per gli alimenti confezionati con conseguenti condizioni ideali di sviluppo per questi microrganismi (Bjorkroth e coll., 2006).

Attualmente i *Leuconostoc* rappresentano il gruppo di batteri lattici più problematico per la conservazione dei prodotti carnei. La capacità dei *Leuconostoc* di svilupparsi più vigorosamente rispetto agli altri lattici (*Leuconostoc*, *Carnobacterium*) è spiegata dalla loro capacità di fermentare i carboidrati presenti nella carne (glucosio) e pentosi come il ribosio e lattato favoriti dalla refrigerazione e dal ridotto potenziale redox e da un loro migliore adattamento al substrato carneo (Reuter, 1981; Holzapfel, 1998).

I composti volatili responsabili dell'odore delle confezioni di carne è acidulo e il gas è CO₂. Recentemente abbiamo più volte riscontrato un odore tipico di "formaggio", dovuto a produzione di ac. butirrico, in confezioni di tagli carnei bovini e di equino con contemporanea presenza di concentrazioni di 10⁸ ufc/g di *Leuconostoc gasicomitatum* e di *Ln. mesneteroides* con assenza di clostridi (Cantoni e coll., in corso di stampa).

Attualmente si attribuiscono 10 specie sensu stricto. Esse sono: *Ln. argentinum*, *Ln. carnosum*, *Ln. citeun*, *Ln. gasicomitatum*, *Ln. fallax*, *Ln. gelidum*, *Ln. kimchii*, *Ln. lactis*, *Ln. mesneteroides*, *Ln. pseudomesneteroides* (Bjorkroth e coll., 2006). Delle 10 specie, *Ln. mesneteroides* e *Ln. gasicomitatum* sono quelle resisi responsabili più frequentemente delle alterazioni delle carni e prodotti derivati confezionati.

Genere *Lactobacillus*

Il *Lactobacillus* è un genere di batteri Gram positivi anaerobi facoltativi o microaerofili di forma bastoncellare.

Il genere appartiene alla famiglia delle *Lactobacillaceae*, ordine: *Lactobacillales*, classe Bacilli, phylum: *Firmicutes*.

Sono germi catalasi negativi, asporigeni, immobili, salvo alcune eccezioni. Le cellule sono di forma regolare, allungate, sottili, possono essere avvolte, corte e ricurve, formano lunghe catene. Sono microrganismi etero fermentanti ed omofermentanti. Il genere comprende differenti specie suddivise in 3 gruppi:

- 1) Lattobacilli omofermentanti: usano come fonte di energia la fermentazione degli esosi e non fermentano i pentosi.
- 2) Lattobacilli omofermentanti, etero fermentanti facoltativi: in certe condizioni oltre all'ac. lattico producono ac. acetico, etanolo e ac. formico. Fermentando anche i pentosi formando ac. lattico e ac. acetico. Possono produrre CO₂.
- 3) Lattobacilli etero fermentanti obbligati: producono ac. lattico, ac. acetico, etanolo e CO₂. Fermentano i pentosi.

I lattobacilli alteranti le carni e i prodotti derivati confezionati sottovuoto sono psicrotrofi e tollerano elevate tensioni di CO₂, il nitrito, il sale e bassi valori di pH.

Nelle carni soltanto le specie predominanti sono *L. sakei* e *L. curvatus*.

Lattobacilli in grado di produrre H₂S sono stati isolati da carne confezionata sottovuoto. La informazione genetica per la produzione di CO₂ è codificata da un plasmide (Shay e coll., 1982; Shay e coll., 1988). La formazione di H₂S e di metilmercaptano dai lattobacilli è stata descritta per la prima volta a Cantoni e coll. (1969). Il lattobacillo responsabile è stato identificato come *L. sakei* (Shay e coll., 1981; Eagon e coll., 1989).

Le alterazioni prodotte da questo lattobacillo, con altri etero fermentanti, è rappresentato da rigonfiamento delle confezioni per produzione di CO₂ e odori acidi, o acidi con odori solforosi. Il numero di lattici nelle carni sottovuoto alterate è di 10⁷-10⁸ ufc/g.

L. sakei è un lattico con un comportamento alquanto singolare perché è ritenuto il lattico più nocivo per la conservabilità delle carni conservate sottovuoto. D'altra parte il microrganismo è la specie più importante usata come coltura starter per la produzione di insaccati fermentati (Hammes e coll., 1990; 1998) e possiede un elevato potenziale di biopreservazione delle carni sottovuoto impedendo la crescita delle *Enterobacteriaceae* alteranti e di *Listeria monocytogenes* (Bredholt e coll., 1999; 2001) insieme con *L. curvatus* (Castellano e coll., 2008; Fadda e coll., 2008). L'utilità dell'impiego di questi due ceppi è stata dimostrata valida per l'inibizione di germi patogeni dai due ricercatori argentini citati).

La identificazione di queste due specie è stata controversa ed esse sono state divise in due sottospecie (Klein e coll., 1996; Torriani e coll., 1996).

Tuttavia, recentemente, il *L. curvatus* subsp. *melibiosus* è stata dimostrata corrispondere a *L. sakei* subsp. *carneus* (Koort e coll., 2004).

Al momento, solo *L. sakei* è diviso in due sub specie:

– *L. sakei* subsp. *sakei*,

– *L. sakei* subsp. *carneus*.

Studi recenti su ceppi di *L. sakei* (McLeod e coll., 2008) hanno confermato diversità metaboliche tra i ceppi di *L. sakei*, fornendo così la giustificazione del doppio ruolo di ceppi *L. sakei*, cioè come alteranti e biopreservanti.

Enterobacteriaceae: Genus Serratia, Hafnia alvei e Raoultella

La famiglia delle *Enterobacteriaceae* comprende almeno 56 specie. Appartiene all'ordine delle *Enterobacteriales*, classe: *Gammaproteobacteria*; phylum: *Proteobacteria*.

Gli enterobatteri sono germi Gram negativi, con forma bastoncellare. Sono anaerobi facoltativi, ossidasi negativi, non formano spore. Molti sono mobili per mezzo di flagelli, altri sono immobili. Sono diffusi nell'ambiente e presenti nell'intestino di esseri umani ed animali.

Solo le specie *Serratia liquefaciens*, *Hafnia alvei* e *Pantoea agglomerans* sono psicrotrofe, potendo crescere a 3/4°C. Fermentano il glucosio o producendo ac. lattico e altri prodotti finali tra i quali CO₂. A queste va aggiunta *Rhanella aquatilis* non produttrice di CO₂.

Nelle carni confezionate sottovuoto e mantenute allo stato refrigerato, il loro sviluppo è impedito da quello dei lattobacilli, talvolta aggiunti come starter, per tale scopo. Nella carne con pH elevato, per mancanza di sviluppo dei lattobacilli, le tre specie citate possono moltiplicarsi dando origine a composti solforati di odore sgradevole come solfuri, dimetilsolfuro, dimetildisolfuro, metilmercaptano, metantiolo, idrogeno solforato e dimetiltrisolfuro oltre a alcoli e ad ammine biogene.

L'alterazione delle carni sottovuoto da *Enterobacteriaceae* è stata osservata nelle carni importate da Argentina e Brasile, la cui conservazione è garantita anche per 4-5 mesi allo stato refrigerato. Nelle confezioni di carne i germi producono odori sgradevoli, dovuti ai composti citati e rigonfiamento moderato per produzione di CO₂.

Fonti delle contaminazioni

Le attuali modalità di macellazione, sezionamento e confezionamento anche condotte con le più accurate modalità igieniche riescono a contenere ma non ad impedire la contaminazione batterica, così come le tecniche di confezionamento non possono impedire lo sviluppo di germi alteranti.

Anche la contaminazione naturale dei mangimi con germi alteranti contribuisce a rendere più difficile le operazioni di contenimento.

Per quanto riguarda gli interventi nei laboratori di sezionamento è necessario provvedimenti assolutamente idonei ad ottenere una igienizzazione sicura. Nei locali di lavorazione delle carni i microrganismi aderiscono alle superfici solide sulle quali siano presenti sostanze nutrienti, ioni e materiale organico, visibili o invisibili, in grado di permettere la loro moltiplicazione. Se la sanificazione è insufficiente i batteri si organizzano nei cosiddetti biofilms. Questi sono costituiti dai batteri e da polisaccaridi elaborati dai microrganismi stessi. Il biofilm protegge i microrganismi dagli agenti, fisici e chimici, ostili. La formazione di biofilms è un avvenimento frequente negli ambienti di lavorazione della carne ed essi sono prodotti sulle superfici di lavorazione costituite da acciaio inossidabile, alluminio, vetro, gomma, teflon e nylon, cioè nei materiali in uso nell'industria alimentare.

Il biofilm si forma in quattro momenti rappresentati rispettivamente: 1) dal film condizionante, 2) dall'adesione delle cellule batteriche al film, che avviene in due fasi, una reversibile e una irreversibile. Nella prima fase le interazioni tra film condizionanti e batteri sono deboli e possono essere rimosse con semplici interventi sanificanti (ad esempio lavag-

gio). Nella seconda fase le cellule sono inglobate nella loro sostanza polisaccaridica che funge da collante per cui l'associazione diventa irreversibile. La terza fase prevede la formazione di biofilm con potenziamento della produzione di esopolisaccaridi. La quarta fase porta alla formazione del biofilm, che può raggiungere anche un millimetro di spessore. All'interno del biofilm le cellule si dispongono in micro colonie localizzate nella matrice polisaccaridica attraversata da numerosi canali permeabile all'acqua.

Dal biofilm originario i batteri possono distaccarsi e dar luogo ad altri biofilm.

I batteri in grado di formare biofilms sono numerosi e appartengono ai generi:

- *Actinomyces*,
- *Burkholderia*,
- *Candida*,
- *Enterococcus*,
- *Enterobacteria (E. coli)*,
- *Fusobacterium*,
- *Lactobacillus*,
- *Leuconostoc*,
- *Listeria*,
- *Pseudomonas*,
- *Staphylococcus*.

Le strutture batteriche responsabili dei fenomeni di adesione superficiale sono i seguenti:

Tabella n. 9. Strutture batteriche responsabili dei fenomeni di adesione superficiale.

	Tipo	Natura chimica	Organizzazione
ADESINE	strutture pilo simili	proteine	Appendici filamentose tipiche dei batteri Gram - (ceppi enterotossigeni di <i>E. coli</i>).
	fimbrie (pili comuni)	proteine	Strutture tubulari cave con specifica funzione adesiva (abbondanti nei batteri Gram -).
	glicocalice	polisaccaridi	Fibrille a struttura lassa che favoriscono l'adesione alle superfici e tra i batteri.
	lanuggine (fibrille)	polisaccaridi	Appendici filamentose molto più numerose delle strutture pilo simili che circondano a raggiera la parete batterica (tipiche dei batteri Gram +: <i>Streptococchi A</i> e <i>S. aureus</i>).
	strato mucoso	polipeptidi, polisaccaridi	Materiale a struttura lassa secreto verso l'esterno dalla cellula batterica.
	capsula	complessi di polipeptidi e polisaccaridi	Materiale a struttura compatta secreto verso l'esterno dalla cellula batterica (vi aderisce saldamente).

Oltre che sulle superfici di lavorazione, biofilms possono venir formati anche sulle superfici dei tagli carni.

In base a quanto riportato la eliminazione dei microrganismi e dei biofilms diventa un requisito essenziale per la conservabilità della carne confezionata.

La sanificazione deve essere effettuata in due tempi precedenti dapprima con la detersione con detergente alcalino, con temperatura dell'acqua a 45-50°C, e con un tempo di contatto di 5-20 minuti. Trascorso il tempo di contatto associato ad un intervento meccanico di spazzolatura, deve essere effettuato il risciacquo. Con questo sistema applicativo si distrugge e si stacca il biofilm.

Dopo questa operazione, la seconda fase è quella della igienizzazione, cioè la distruzione del maggior numero possibile dei microrganismi contaminanti.

La capacità dei disinfettanti per eliminare i germi contaminanti è ottima per gli ossiacidi e i composti del cloro.

I composti con H₂O₂ al 5% con acido perossiacetico sono quelli più efficaci, è un prodotto con una composizione corrispondente a

ac. perossiacetico	5,1% p/v
H ₂ O ₂	21,7%
altro	73,2%
	100

è particolarmente efficace e di uso raccomandabile

I disinfettanti a base di ac. per acetico, ac. acetico e H₂O₂ sono disponibili in commercio in soluzione al 40% vanno applicati a temperature inferiori a 40°C.