



# scienza attiva®

EDIZIONE 2015/2016

AGRICOLTURA, ALIMENTAZIONE E SOSTENIBILITA'

***Il micro-mondo dei belli, brutti e cattivi:  
un occhio alla microbiologia degli  
alimenti.***

**Marianna Ruggirello**

***Università degli Studi di Torino, DISAFA***



*Documento di livello: B*

*B*

Un progetto di



agorà scienza  
centro interuniversitario



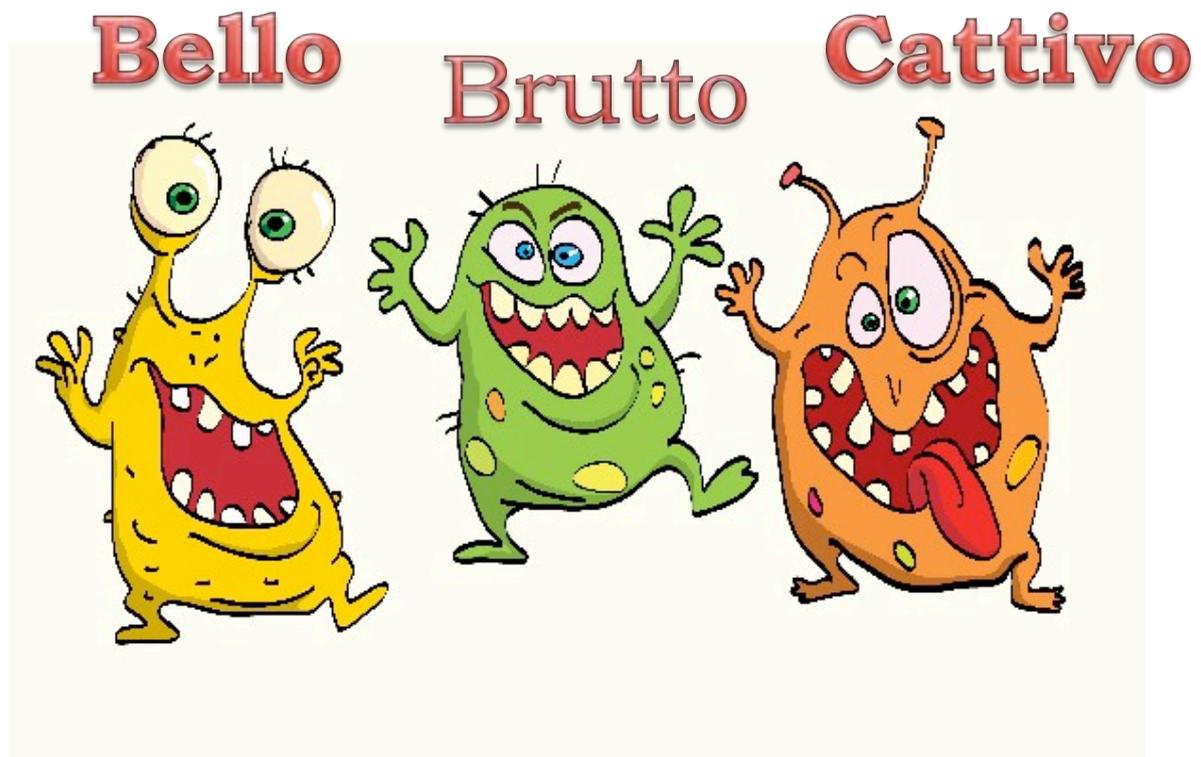
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO



scienza attiva®

## Sommario

<b>La Microbiologia: gocce di storia</b> .....	2
<b>La Microbiologi degli alimenti</b> .....	3
<b>Sicurezza alimentare: la qualità microbiologica di un alimento</b> .....	4
<b>Batteri patogeni trasmessi con gli alimenti, i più “famosi”</b> .....	7
<b>Un piccolo cenno ai sistemi di Autocontrollo e HACCP (Analisi dei Pericoli e dei Punti Critici di Controllo)</b> .....	14
<b>Microbiologia del formaggio</b> .....	15
<b>Dalla produzione ad un’analisi microbiologica del formaggio</b> .....	16
<b>Mini corso di Laboratorio di Microbiologia degli alimenti.</b> .....	22
<b>Bibliografia</b> .....	28



## La Microbiologia: gocce di storia

La Microbiologia è la Scienza che studia i più piccoli organismi viventi: i microbi (dal greco micros: piccolo e bios: vita).

**La teoria della generazione spontanea.** Fino al XVII secolo si pensava che gli organismi viventi potevano generarsi spontaneamente dalla materia in decomposizione.



Solo nel 1861, **Louis Pasteur**, fermo oppositore di questa teoria, col suo esperimento dei palloni a collo di cigno dimostrò che il contatto con l'aria di un liquido reso sterile da un trattamento termico, determinava la crescita microbica e l'intorbidamento di tale liquido.

Pasteur chiuse una controversia che procedeva da molti anni. Infatti prima di lui, altri come Redi o Spallanzani avevano confutato la teoria. Il primo pose della carne avariata in una serie di recipienti, alcuni

chiusi, altri aperti, e dimostrò che le larve nascevano solo dove le mosche avevano potuto depositare le uova. Spallanzani fece anche un altro esperimento simile ma che dimostrava che l'aria può dare origine ad alcuni organismi.

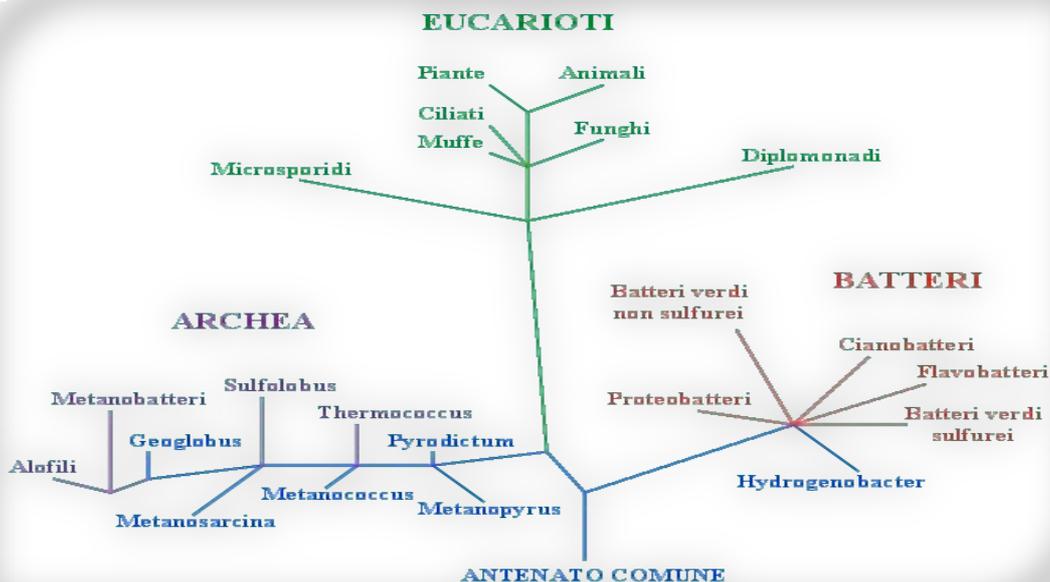


Figure 1: Albero filogenetico della vita

## La Microbiologia degli alimenti

Fornisce sia le conoscenze relative all'origine, alla biologia, all'ecologia, alle attività metaboliche e alla sistematica dei microrganismi presenti negli alimenti che quelle relative ai sistemi di identificazione, valutazione, monitoraggio e controllo dei pericoli microbiologici in tutte le fasi coinvolte nella produzione, trasformazione, conservazione, distribuzione ed uso dei prodotti alimentari al fine di garantirne la loro sicurezza. Essa copre essenzialmente 3 aree principali:

1. **Produzione, conservazione e miglioramento** della qualità degli alimenti con l'intervento dei microrganismi.
2. **Prevenzione** delle alterazioni degli alimenti dovute alle attività dei microrganismi.
3. **Protezione** del consumatore nei confronti delle malattie microbiche trasmesse attraverso gli alimenti.

Gli alimenti hanno caratteristiche tali da permettere la colonizzazione e lo sviluppo di un gran numero di microrganismi, alcuni dei quali **utili** (probiotici, batteri lattici, lieviti, etc.), altri **indesiderati**, sia **patogeni** (causano malattia) che **alterativi** (modificano così tanto l'alimento da renderlo inaccettabile al consumo umano).



## Sicurezza alimentare: la qualità microbiologica di un alimento

Questa è determinata dall'assenza di microrganismi patogeni e/o delle loro tossine e dal livello di microrganismi alterativi. Poiché risulta impossibile cercare tutti i patogeni presenti in un alimento, nella realtà, per accertarne sia la qualità microbiologica che la sicurezza, si fa ricorso alla ricerca di organismi in grado di indicare una situazione potenzialmente pericolosa, i cosiddetti **microrganismi marker**.

Insieme a questi si ricercano **organismi index**, cioè microrganismi patogeni la cui presenza in un alimento è ipotizzabile per il verificarsi di talune condizioni compositive, chimico-fisiche o epidemiologiche. Infine, gli **organismi indicatori**, non dannosi di per sé, ci danno informazioni sulle condizioni microbiologiche generali del prodotto.

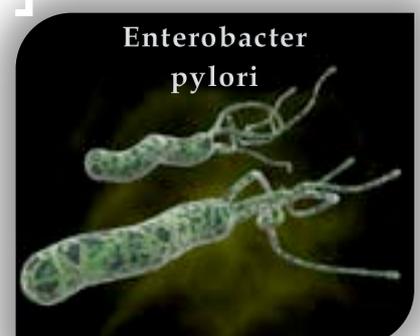
Poiché la perdita di qualità microbiologica di un prodotto nella maggior parte dei casi è dovuta all'azione contemporanea di una grande varietà di microrganismi, è più pratico determinare il numero di *gruppi* di microrganismi che più verosimilmente possono fornire indicazioni sullo stato microbiologico e sulle condizioni di processo dell'alimento.

I gruppi principalmente impiegati sono:

**Microrganismi aerobi totali.** Vengono contati sulla piastra Petri e riflettono la storia produttiva dell'alimento, condizionandone lo stato di conservabilità, la comparsa di fenomeni alterativi ed evidenziando le condizioni di trasformazione e di conservazione.

Quando si parla di microflora aerobia totale, si fa riferimento al numero totale di microrganismi in grado di svilupparsi in aerobiosi e in mesofilia (30°C) in un adatto terreno nutritivo.

***Enterobacteriaceae.*** La quantificazione delle *Enterobacteriaceae* risulta particolarmente utile come indicatore di processo per quegli alimenti che sono sottoposti a trattamenti in grado di controllare i



microrganismi patogeni, come trattamenti termici, congelamento prolungato, fermentazioni o additivi. La loro presenza può indicare, in questi casi, la non corretta applicazione della particolare tecnologia.

Queste possono essere classificate in 3 gruppi:

- Patogeni in “sensu stricto”: germi invasivi e germi enterotossici;
- Patogeni opportunisti: provocano malattia quando si riducono le difese dell'ospite;
- Bioindicatori della qualità e della sicurezza microbiologica degli alimenti. Gli enterobatteri di questo gruppo si ritrovano sia come saprofiti nell'ambiente che come componenti della flora commensale dell'intestino dell'uomo e degli animali.

**Lieviti e Muffe.** Crescono soprattutto quando le condizioni per la crescita dei batteri diventano meno favorevoli. Essi rappresentano un potenziale problema in prodotti caseari fermentati, pane, frutta, succhi di frutta e vegetali.



Le muffe possono essere contate direttamente mediante la cella Howard, utilizzata per rilevare frammenti di micelio fungino in pomodori e vegetali inscatolati o, insieme ai lieviti,

possono essere contate su terreni nutritivi specifici.

**\*Definizione e tecniche di conta sono trattate nel [“Mini Corso di Laboratorio”](#).**

**Quali sono le caratteristiche di un buon indicatore?** Dei buoni indicatori dovrebbero:

- essere consistentemente ed esclusivamente associati alla fonte del patogeni
- essere presenti in numero sufficiente a fornire un'accurata stima della loro densità
- essere facilmente rivelati e numerati e chiaramente distinguibili da altri microrganismi
- presentare resistenza a stress ambientali e ai disinfettanti
- essere sempre presenti quando il patogeno di interesse è presente

I più comuni microrganismi indicatori sono i *Coliformi* ed *Escherichia coli*, gli *Streptococchi fecali* e i *Clostridi Solfito Riduttori*.

### **1. COLIFORMI**

Fanno parte delle *Enterobacteriaceae* e quelli che mantengono le stesse proprietà anche a 44,5° C, sono definiti **coliformi fecali**.

I coliformi fecali sono facilmente distrutti dai trattamenti termici o durante il congelamento degli alimenti; infatti la loro presenza in cibi trattati al calore comunemente indica una contaminazione post-processo (attrezzi, utensili, personale, contaminazione crociata).

**AVVERTENZE:** Avvisare sempre le ASL in casi di dissenteria acuta e vomito, con o senza febbre (potrebbero essere causate da coliformi).

### **2. STREPTOCOCCHI FECALI**

Sono presenti nella flora microbica del tratto intestinale ma anche nell'ambiente grazie alla loro notevole resistenza in condizioni, anche le più stressanti, che in genere risultano sfavorevoli per altri microrganismi. *La loro presenza negli alimenti è indicatore di contaminazione fecale di acqua e alimenti*, anche per ri-contaminazioni post-processo per prodotti che abbiano subito trattamenti tecnologici inattivanti i microrganismi (calore, essiccazione, congelamento prolungato ecc.).

### **3. CLOSTRIDI SOLFITO RIDUTTORI**

Sono un gruppo di batteri di forma bastoncellare in grado di ridurre i composti ossidati dello zolfo (solfiti) a idrogeno solforato (solfuro); crescono in un range di temperatura compreso tra 0 e 50° C; si trovano comunemente nel suolo e nelle acque così come nel tratto intestinale dell'uomo e di animali e nelle feci.

A questo gruppo appartengono sia specie patogene per l'uomo e gli animali, come *Clostridium perfringens*, che specie responsabili di alterazioni putrefattive degli alimenti come *C. bifermentans*, *C. putrificum*, *C. paraputrificum*, *C. baratii*, *C. celatum*, *C. roseum*, *C. novyi* ed altre ancora. Le spore sono molto resistenti ai trattamenti tecnologici e possono sopravvivere nell'ambiente per lunghi periodi.

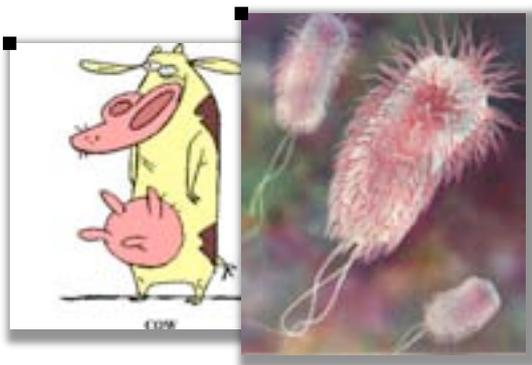
La loro presenza, in particolare quella di *C. perfringens*, negli alimenti e soprattutto nelle acque è indice di contaminazione fecale.

## Batteri patogeni trasmessi con gli alimenti, i più “famosi”

Una premessa importante da fare è quella di distinguere tra **l’infezione alimentare** e **l’intossicazione**. Mentre la prima è dovuta all’ingestione di alimenti contaminati da elevate quantità di microrganismi vivi e vitali che liberano le tossine al momento del loro passaggio nel tratto intestinale, la seconda deriva dall’ingestione di alimenti contenenti tossine prodotte da microrganismi i quali possono anche **NON** essere presenti al momento dell’ingestione dell’alimento.

Della famiglia delle *Enterobacteriaceae* troviamo:

**ESCHERICHIA COLI** di cui si sente spesso parlare per le ricorrenti epidemie dovute alla contaminazione, nella maggior parte dei casi, di **carne cruda, latte** o suoi **derivati**, oppure **acqua non potabilizzata**. Il batterio è comunemente presente nella flora batterica di persone sane; **solo alcuni ceppi sono patogeni**. Rimane l’indicatore microbiologico di contaminazione fecale più largamente usato.



La malattia gastrointestinale provocata da *E. coli* è detta generalmente “**malattia diarroica**”.

Serbatoio (habitat naturale dove il microrganismo vive) principale del batterio sono i bovini, anche se è stato isolato in altre specie animali come suini e pollame.

**SALMONELLE**. Le specie di Salmonella oggi ufficialmente riconosciute sono due, cioè *S. enterica* e *S. bongori*. La maggior parte di quelle patogene per l’uomo appartengono alla prima e sono: *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. schotmuelleri* (patogeni per l’uomo), *S. typhimurium*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis* (patogeni per

l'uomo e animali) *S. gallinarum* (patogeno per il pollame e solo raramente per l'uomo).

Le salmonelle possono causare nell'uomo due tipi fondamentali di malattie: **febbre tifoide** e **gastroenterite acuta**. Le persone più suscettibili sono neonati e bambini, anziani e individui immunocompromessi.



Il patogeno è suscettibile all'acidità gastrica (pH <3,5) che risulta letale per esso ma quando sono ingeriti alimenti contaminati e con alto contenuto di grassi, che possono proteggere il microrganismo dall'ambiente acido dello stomaco, la dose infettante minima (DIM) può risultare molto bassa.

Le epidemie di salmonellosi verificatesi nel mondo sono state imputate agli alimenti più vari, che vanno dai **prodotti carnei** (i più implicati) **alle uova, al latte e derivati, al cioccolato, così come i vegetali**. Un'importante fonte di contaminazione degli alimenti inoltre, sono gli operatori infetti o portatori sani con infezioni asintomatiche.

La crescita di Salmonella è ridotta a temperature minori di 15°C e prevenuta al di sotto dei 7°C. Si dovrebbe quindi fare attenzione a rispettare la “catena del freddo” degli alimenti e cuocerli a temperatura e per tempi adeguati ed evitare la contaminazione tra alimento crudo e cotto, tenendoli separati.

**SHIGHELLA**. Se ne possono distinguere 4 specie tra cui la maggiore incriminata di epidemie alimentari è la *S. sonni*.

Crescono a temperature comprese tra 7 e 47 °C con optimum a 35-37°C e sono responsabili di malattie del tratto gastrointestinale. La “**shigellosi**” è nota come “malattia delle mani sporche” o “dissenteria bacillare”.



Gli alimenti maggiormente coinvolti nelle epidemie sono le **insalate di patate e altri vegetali, di pesce, di pollo, acqua, carne, prodotti della pesca, latte e derivati.**

Le specie di *Shigella* non sono molto resistenti agli stress ambientali. Tuttavia il microrganismo sopravvive anche per lunghi periodi in vari alimenti e condizioni ecologiche. Serbatoio del batterio è l'uomo.



**YERSINIA ENTEROCOLITICA.** Tra le specie di *Yersinia*, solo *Y. enterocolitica* è di interesse per la microbiologia degli alimenti. Responsabile di enteriti nell'uomo, è poco esigente dal punto di vista nutrizionale; infatti colonizza, si moltiplica e sopravvive su una grande varietà di substrati alimentari

La si può trovare **in carcasse e carne di maiale, manzo, agnello, latte crudo di vacca, capra, cagliate di formaggi, vegetali, ostriche, gamberetti.** Serbatoio

del microrganismo sono i suini.

È un batterio *psicrotrofico* (vive bene alle basse temperature), il che gli permette di moltiplicarsi tra 0 e 42°C. Può svilupparsi in 2-5 giorni in alimenti refrigerati. Viene comunque eliminato con la pastorizzazione.

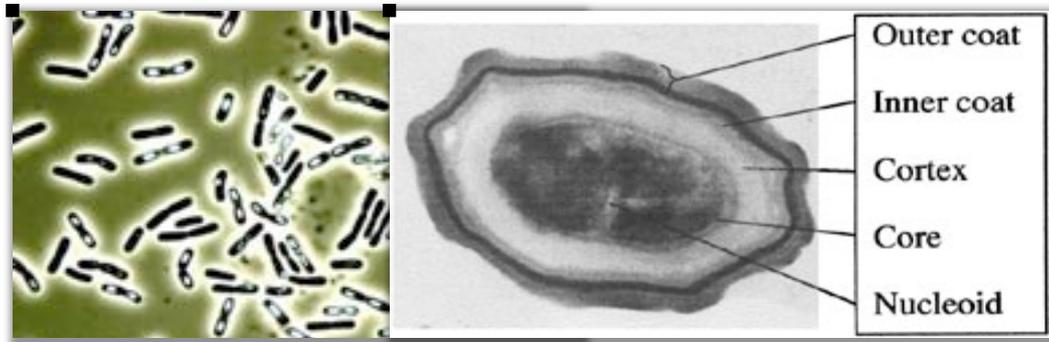
---

**Tra i batteri patogeni sporigeni (producono spore) troviamo:**

**BACILLUS.** I batteri del genere *Bacillus* crescono tra i 30 e i 55°C. Le spore hanno uno strato esterno di cheratina che le rende estremamente resistenti al calore, alle radiazioni, alla essiccazione, ai disinfettanti e ad altre sostanze chimiche, permettono al batterio di sopravvivere in condizioni estreme.

Il *Bacillus cereus* è ampiamente distribuito in natura, comune ospite del suolo, può ritrovarsi nel pulviscolo, nei vegetali, nei materiali fecali animali ed umani.

Dal momento che può causare **broncopolmoniti, batteriemie, setticemie, meningiti, infezioni dell'orecchio** e delle **vie urinarie**, viene ritenuto un patogeno di una certa rilevanza. È inoltre uno dei microrganismi più pericolosi per **l'organo visivo**.



Pur essendo *mesofilo* (T di crescita ottimale tra i 25 e 45°C) è stata dimostrata la possibilità di crescita tra 4 e 37°C e tra 6 e 21°C e la germinazione delle spore avviene tra 5 e 50°C, con velocità massima a 30°C. *Bacillus cereus* causa due tipi di malattie, la **sindrome diarroica** e la **sindrome emetica**.

Gli alimenti maggiormente contaminati sono **il latte crudo, pastorizzato, UHT** (le spore possono sopravvivere ai trattamenti) **e in polvere, la carne cruda e congelata di bovino, suini e pollame, prodotti carnei freschi e stagionati, riso** (produzione di tossina emetica), **uova intere, crude e pastorizzate, prodotti da forno, spezie e le insalate**.

**CLOSTRIDIUM**. Il più conosciuto per la sua capacità patogena è il *Clostridium botulinum*. Il **botulismo** (dal latino “botulus”= salsiccia), la malattia causata dal *Clostridium*, può verificarsi per ingestione della tossina preformata nell'alimento (intossicazione) o per contatto da ferita, causato dall'organismo che si moltiplica e produce tossina nella ferita contaminata o ancora, il cosiddetto botulismo infantile, causato dalla produzione della tossina in seguito alla germinazione delle spore nell'intestino. Queste neurotossine hanno un effetto paralizzante.



I sintomi si manifestano fra le 2 e le 24 ore dopo l'ingestione dell'alimento contaminato e sono rappresentati **da paralisi oculare, disturbi dell'equilibrio, dilatazione delle pupille, visione doppia, carenza di salivazione, disturbi della deglutizione e fonazione, costipazione e spesso ritenzione di urina, paralisi dei muscoli respiratori.**

Gli alimenti maggiormente contaminati sono **frutta e vegetali, prodotti della pesca, condimenti, carne bovina, suina e pollame, latte e derivati.**

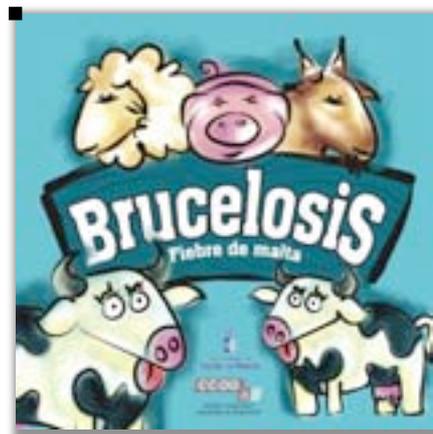
Per avere una riduzione delle spore del batterio è necessaria una sterilizzazione a 121°C per 2,5 min, il che, in molti casi, risulta impossibile. Si mira quindi, ad inibirne la crescita e la produzione di tossine negli alimenti giocando su diversi fattori (T, pH, conservanti, etc.).

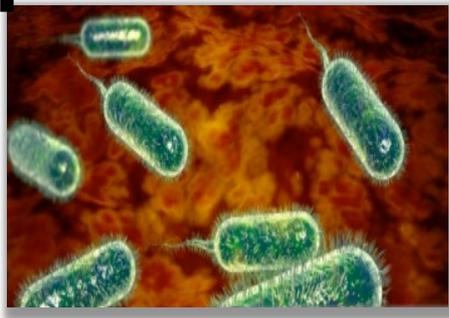
**CLOSTRIDIUM PERFRINGENS.** La tossinfezione causata da questa specie è principalmente associata al consumo **di carne rossa e pollame o alimenti poco cotti.** La macellazione è un momento quasi inevitabile di contaminazione.

---

**BRUCELLA.** La **brucellosi** è caratterizzata **da brividi, febbre e debolezza.** La febbre può avere un andamento intermittente: **“febbre ondulante”** o **“febbre maltese”**, febbre di Cipro, febbre Mediterranea, etc. La malattia ha molti sinonimi, derivati dalle regioni geografiche in cui è più diffusa.

I principali alimenti veicolo di diffusione della malattia sono il **latte crudo** e **prodotti derivati a latte crudo**, a causa della liberazione della *Brucella* da parte di animali malati o asintomatici. Il microrganismo è stato isolato da **carne e prodotti a base di carne** in casi molto rari. Una corretta acidificazione durante la fabbricazione dei formaggi contribuisce all'eliminazione del batterio dal prodotto, ma non garantisce la sua completa assenza.





**VIBRIO**. Della famiglia delle *Vibrionaceae*, almeno 12 delle 60 specie sono patogene per l'uomo. *Vibrio cholerae* è un normale abitante di acque dolci e marine (laghi, fiumi, coste) ed alcuni ceppi producono una tossina, causa di **diarrea** e **disidratazione**.

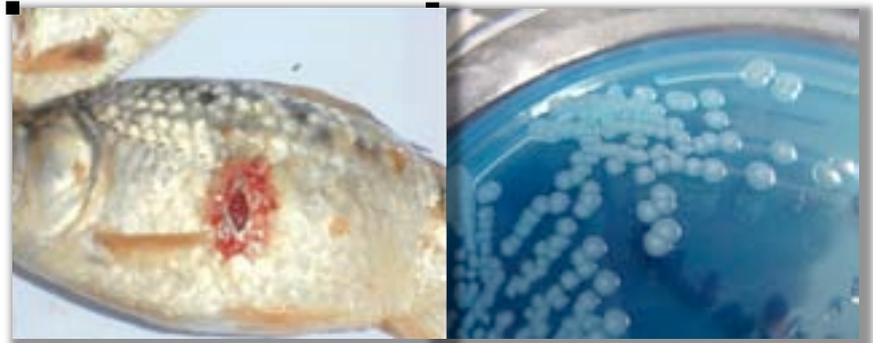
I principali alimenti veicoli di *V. cholerae* sono **l'acqua**, il **pesce**, i **molluschi**, i **crostacei**, il **riso**, la **carne di maiale**, **vegetali** e **frutta**.

*Vibrio parahaemolyticus* è causa enteriti i cui sintomi sono diarrea, crampi addominali, nausea, vomito e febbre.

Gli alimenti maggiormente implicati in episodi epidemici sono il **pesce**, **molluschi** e **crostacei**. In Giappone *V. parahaemolyticus* è la maggiore causa di malattie alimentari. I trattamenti termici eliminano il microrganismo.

### **AEROMONAS.**

*Aeromonas hydrophila* e *A. sobria* sono agenti di gastroenteriti umane. Le persone maggiormente predisposte sono i bambini di età inferiore a

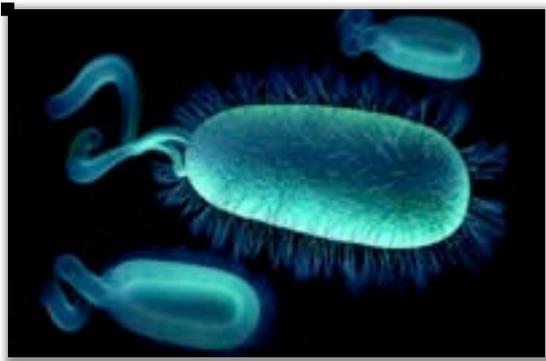


2 anni, gli adulti con più di 50 anni e persone immunocompromesse. I sintomi tipici sono **nausea**, **vomito** e **disidratazione** che possono durare da pochi giorni fino a qualche settimana. Le gastroenteriti più severe si manifestano con sintomi simili a quelli del colera.

Solo pochi casi sono, però, associati agli alimenti, che sono risultati quasi sempre **pesce** e **molluschi**.

**CAMPYLOBACTER.** Fa parte della famiglia delle *Campylobacteriaceae* che raggruppa batteri con diverse esigenze di crescita. Tutte crescono a 37°C, alcuni anche a 25°C, altre anche a 42°C. La **campylobacteriosi** (enterocolite acuta) presenta sintomi come **malessere generale, dolori muscolari, febbre, crampi addominali, diarrea profusa con feci acquose o mucose, con leucociti e sangue**; i dolori addominali possono persistere da 3 gg fino a 3 settimane.

I principali alimenti veicolo di *Campylobacter* sono il **latte crudo** (contaminazione fecale e da animali mastitici), il **pollame** (carne poco cotta), le altre **carni** come **maiale, manzo, agnello** (rari casi), **verdura** e **frutta** (fertilizzazioni organiche o irrigazione con acque contaminate) e **acqua** da bere (contaminazione fecale). La sopravvivenza del microrganismo inoltre è migliore in alimenti refrigerati rispetto a quelli conservati a temperatura ambiente.



La sopravvivenza del microrganismo inoltre è migliore in alimenti refrigerati rispetto a quelli conservati a temperatura ambiente.

**LISTERIA.** Il genere noto per il suo potere patogeno è *Listeria monocytogenes* e la **listeriosi** in Italia è stata inclusa tra le “**malattie infettive e diffuse soggette a notifica**” alla fine del 1990. Può colpire praticamente tutti gli apparati del corpo umano. Tra le manifestazioni cliniche più severe abbiamo **meningite e meningoencefalite**. Sono colpite tutte le fasce di età, ma in modo particolare i bambini piccoli e gli anziani. La listeriosi materno-neonatale causa invece sindrome simil-influenzale, meningite e aborto (madre), setticemia, meningite e polmonite (neonato).

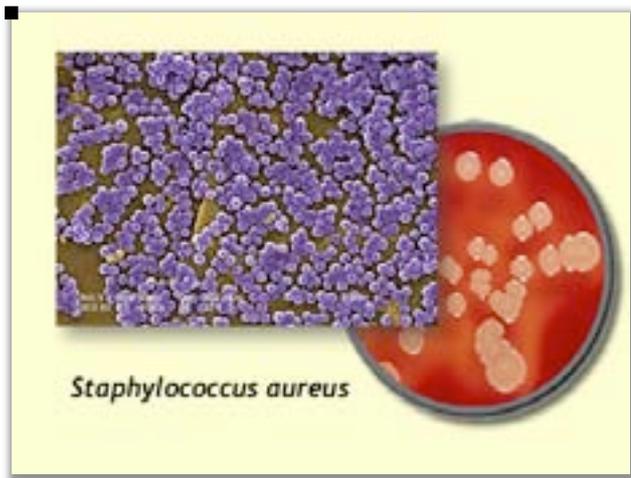


Negli alimenti essa presenta una certa tolleranza ai trattamenti termici, è in grado di moltiplicarsi a temperature di frigorifero, in presenza di cloruro di sodio (sale

da cucina) e nitrati (conservanti). Viene comunque eliminata dalla pastorizzazione nel latte a 71,7°C per 1 sec. La sua refrigerazione, invece, non è in grado di distruggerla ma solo di rallentarne lo sviluppo. Il batterio è stato frequentemente isolato da **formaggi** e altri **derivati del latte**, da **carne** e **prodotti carnei**.

**STAPHYLOCOCCUS**. *Staphylococcus aureus* produce tossine termostabili ed è responsabile di **suppurazioni, setticemie** e **tossinfezioni alimentari**. Queste ultime si manifestano con **nausea, vomito, crampi addominali, diarrea, prostrazione, apiressia**.

Alimenti principalmente coinvolti sono i **prodotti di pasticceria (crema), carne e prodotti carnei (prosciutto, roast-beef, polpette), latte e derivati**, preparazioni a base di **uova, maionese**.



### **Un piccolo cenno ai sistemi di Autocontrollo e HACCP (Analisi dei Pericoli e dei Punti Critici di Controllo).**

Si cade spesso nell'errore di confondere il termine Autocontrollo con quello di HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*) essi **NON** sono sinonimi. Il termine **autocontrollo** ha una valenza più ampia, che discende dalla responsabilizzazione dell'operatore del settore alimentare (OSA) in materia di igiene e sicurezza degli alimenti, ed è **obbligatorio** per tutti gli operatori coinvolti in qualunque livello nella filiera della produzione alimentare. L'**HACCP** è invece un sistema che consente di **applicare l'autocontrollo** in maniera razionale e organizzata. È obbligatorio solo per gli operatori dei settori post-primari. Il sistema HACCP è quindi uno strumento teso ad aiutare gli OSA a conseguire un livello più elevato di sicurezza alimentare.

Nasce negli anni '60 negli USA, grazie alla NASA, per la prevenzione della sicurezza di alimenti destinati agli astronauti ed arriva a noi negli anni Novanta.

Per approfondimenti rimando al sito del Ministero della Salute: [HACCP, Ministero della Salute](#)



## Microbiologia del formaggio

Come abbiamo potuto vedere nei capitoli precedenti, il latte e i formaggi sono tra gli alimenti che maggiormente possono veicolare batteri patogeni per l'uomo. Le caratteristiche chimiche e chimico-fisiche di questi prodotti, però, sono tali da favorire la crescita di una vasta gamma di microrganismi "buoni". In questa sezione cercheremo di approfondire quali eventi microbiologici interessano il processo di produzione del formaggio.

### ***Dove nasce il formaggio?***

La storia ci dice che furono gli antichi greci a coniarne il termine. Infatti, il "formos" era il paniere di vimine dove veniva depositato il latte cagliato per dargli forma. Il "formos" divenne poi la "forma" dei romani, quindi il "fromage" dei francesi, per arrivare all'italianissimo "formaggio".

Per quanto riguarda la nascita del formaggio, invece, la leggenda narra che un mercante arabo, nell'attraversare il deserto, portò con sé, come pietanza, del latte contenuto in una bisaccia ricavata dallo stomaco di una pecora. Il caldo, gli enzimi della bisaccia e l'azione del movimento acidificarono il latte trasformandolo in "formaggio".

Il ritrovamento più antico di formaggio è relativo a 10 mummie ritrovate nella parte nordoccidentale della Cina risalente al 1615 a.C.

Secondo la definizione data dal legislatore *dell'Art. 32, del R.D.L. 15/10/25*: **"Il nome di formaggio o cacio è destinato al prodotto che si ricava dal latte**

**intero, ovvero parzialmente o totalmente scremato, oppure dalla crema, in seguito a coagulazione acida o presamica, anche facendo uso di fermenti e di sale da cucina”.**

Il formaggio, quindi, *si fa solo con il latte o con la panna* e qualsiasi etichetta che non riporti queste due materie prime, da sole o insieme, non indica un formaggio.

## Dalla produzione ad un'analisi microbiologica del formaggio

### **La materia prima, il LATTE.**

Il Regolamento (CE) n. 853/2004 riporta i criteri per il latte crudo di vacca destinato alla produzione di prodotti lattiero-caseari:

1. il latte crudo di vacca utilizzato per fabbricare i prodotti lattiero-caseari deve avere un tenore di **germi a 30 °C inferiore a 300.000 per ml**;
2. il latte di vacca trasformato utilizzato per fabbricare i prodotti lattiero-caseari deve avere un tenore di **germi a 30°C inferiore a 100.000 per ml**.
3. Se il latte non risponde ai criteri di cui al punto 1, gli operatori del settore alimentare devono informare l'autorità competente e prendere misure volte a correggere la situazione.

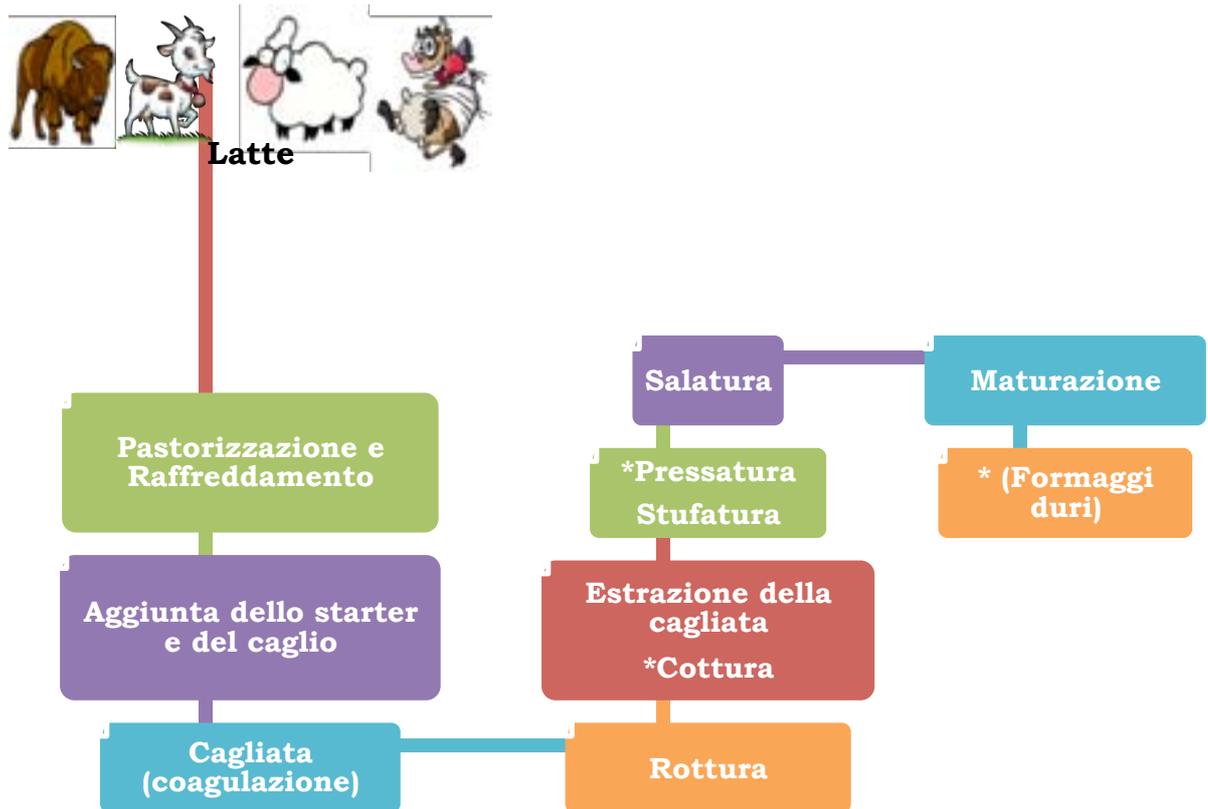


Figure 2: Fasi generali di produzione del formaggio

**1. Il latte:** all'interno della mammella è **sterile**, non contiene quindi alcun microrganismo. Appena fuori dalla mammella, con la mungitura, viene a contatto con i microrganismi (microrganismi commensali della mammella) tramite l'aria o il contatto con le tettarelle che mungono precedentemente toccate delle mani dell'operatore. Queste prime contaminazioni sono normalmente utili alla caseificazione. Fare il formaggio con latte crudo (non riscaldato sopra i 40°C) significa mantenere tutte le caratteristiche microbiologiche che sono parte fondamentale della nascita dei formaggi tipici.

**Pastorizzazione:** è un trattamento termico che serve ad abbattere la carica batterica **patogena** del latte, dannosa al nostro organismo, salvaguardando la **carica utile** alla caseificazione. La pastorizzazione è sovente praticata per guidare meglio le fermentazioni che avvengono con l'innesto di batteri

conosciuti. **Si ottiene portando il latte alla temperatura di 72° C e mantenendola costante per 15 secondi.** E' una tecnica adatta alla trasformazione del latte in formaggi che non superino i 60 giorni di maturazione; non è necessaria per i formaggi D.O.P., anche se in alcuni casi è concessa.

**2. Latte in caldaia ed innesto di fermenti lattici:** il riscaldamento del latte serve a mantenere una carica batterica utile alle fermentazioni che avvengono nelle varie fasi della vita del formaggio. Partendo dal latte crudo, il casaro può decidere di innestare ugualmente per aumentare la carica batterica. Per fare questo si può aggiungere il lattoinnesto, per ottenere formaggi a pasta semidura e dura, o il sieroinnesto, per ottenere formaggi a pasta dura. Nel caso del latte pastorizzato, c'è la possibilità di innestare il lattinnesto, il sieroinnesto oppure **fermenti lattici liofilizzati o congelati**. Insieme all'inoculo dei fermenti lattici è possibile, per quei formaggi che lo richiedono, innestare le **muffe** classiche dei formaggi a crosta fiorita o erborinati: il *Penicillium candidum* o il *Penicillium roquefort*.

**3. Coagulazione (acida o presamica):** è il processo di ottenimento della cagliata per cui il latte diventa della consistenza di una gelatina. Per centrare questo risultato bisogna aggiungere al latte una dose di caglio o coagulante (*coagulazione presamica*). Il caglio è di origine animale, viene estratto dal quarto stomaco dei lattanti di origine bovina, ovina e caprina; animali quindi che non hanno ancora assunto erba come alimento. I coagulanti, invece, possono essere estratti da vegetali come il fico, la papaya, il cardo, etc; possono essere anche di origine microbica o fungina. Hanno la stessa funzione del caglio, ma agiscono in modo più blando. Gli enzimi del caglio rompono le proteine del latte (caseine) che, in ambiente acido, precipitano. La cagliata racchiude all'interno del reticolo caseinico i globuli di grasso e l'acqua, capace di mantenere in soluzione i sali minerali e le vitamine. Nel caso invece di una *coagulazione acida*, il caglio **NON** viene aggiunto: il latte viene lasciato in piccoli contenitori, detti "bicchieri", il tempo necessario affinché l'acidità consenta una coagulazione naturale. Infatti, dopo un lungo periodo che varia dalle 16 alle 48 ore, a una temperatura fra i 22 e i 28°, le proteine del latte si demineralizzano e

precipitano, determinando un coagulo fragile (generalmente formaggi morbidi da consumare entro 20 giorni).

- 4. Rottura della cagliata:** permette alla cagliata di spurgare il siero. Viene fatta impiegando attrezzi taglienti come lo spino o altri strumenti tipici in legno.



Figure 3: Rottura della cagliata con lo spino.

Dopo aver rotto la cagliata in granuli di dimensioni variabili (da quelle di un mandarino fino a quelle di un chicco di miglio) in base al formaggio da produrre, la massa può subire un trattamento termico determinato dalla necessità di spurgare, cioè di far asciugare la pasta ottenuta. Tale trattamento si definisce semi-cottura se si raggiunge la temperatura di riscaldamento a 45-46°, cottura se si oltrepassa questa temperatura.

- 5. Estrazione e asciugatura della cagliata:** per eseguire questa operazione i metodi sono tanti. Vanno dall'estrazione manuale con secchi a quella con teli, oppure con caduta delle polivalenti che, sopraelevate dal pavimento, consentono la fuoriuscita della pasta, tramite tubazione, direttamente sul tavolo spersore.



Figure 4: Drenaggio della cagliata.

In tutti i casi, la pasta che sta per diventare formaggio viene poi posta dentro fuscelle in giunco o in plastica, oppure in fascere di legno o in teflon. Molti formaggi, in particolare quelli a pasta molle, a questo punto devono stufare, ovvero rimanere al caldo umido per un determinato tempo. Altri, in particolare quelli a pasta semidura o dura, vengono pressati con pesi, presse meccaniche o idrauliche. Tutti i formaggi, salvo qualche piccola eccezione, verranno poi salati in salamoia o a secco.

**6. Stagionatura:** è una delicata fase tecnica della produzione casearia che si può definire come processo di invecchiamento del formaggio, diverso da tipologia a tipologia. In questa fase avvengono trasformazioni enzimatiche (fenomeni di autolisi batterica e rilascio di enzimi) a carico dei costituenti della cagliata formata e conservata per tempi variabili in condizioni controllate di temperatura ed umidità. **Durante questo periodo avvengono una serie di eventi causati da batteri, lieviti e muffe, che danno vita alle caratteristiche finali di ogni singolo prodotto.**

Abbiamo quindi visto che, durante la produzione del formaggio, intervengono microrganismi, come le colture starter o lieviti e muffe, che forniscono un vantaggio al prodotto. Le **colture starter e/o protettive** sono delle preparazioni che contengono microrganismi vivi e vitali, impiegate con l'obiettivo di sfruttare il metabolismo di questi microrganismi per assicurare il conseguimento di specifici obiettivi industriali e contribuire al controllo di microrganismi indesiderati, sia alterativi che patogeni.

Facciamo anche un piccolo accenno ai tanto famosi **probiotici**. Questi sono microrganismi che esercitano effetti positivi sulla salute umana e devono avere **PRECISE** caratteristiche:

- vivi e vitali
- non inattivati
- presenti in alto numero (intorno a  $10^9$  UFC al giorno).

Inoltre è necessario che i benefici sulla salute siano dimostrati scientificamente da studi clinici sull'uomo. Essi appartengono principalmente ai generi del *Lactobacillus* e del *Bifidobacterium*. I **prebiotici** invece, sono gli ingredienti

alimentari, non digeribili da parte dell'uomo, di cui si nutrono i batteri "buoni" della microflora ed hanno l'obiettivo di "modulare il livello e le attività di differenti gruppi di microrganismi endogeni intestinali".



### **Piccola chicca.**

Il Santo Protettore dei formaggiai e dei mandriani è **San Lucio martire**. Secondo la tradizione era un pastore che curava gli armenti del suo padrone e offriva ai poveri il formaggio avuto come paga. Poiché questo formaggio **si moltiplicava**, il suo padrone si adirò a tal punto che finì per uccidere Lucio. Ma qual era il segreto di Lucio? .....

## Mini corso di Laboratorio di Microbiologia degli alimenti.



**L'analisi microbiologica.** Fondamentalmente mira ad accertare che l'alimento rispetti determinati criteri microbiologici, i quali stabiliscono *i limiti* della presenza o assenza di specifici microrganismi o loro tossine negli alimenti (Regolamento (CE) n. 2073/2005).

**Essa può anche essere usata ai fini della ricerca scientifica, per lo studio di popolazioni microbiche, etc.**

Quando facciamo un'analisi di questo tipo dobbiamo tener conto dell'ecologia microbica dell'alimento. La distribuzione dei microrganismi nei cibi è imprevedibile e nella maggioranza dei casi essi sono distribuiti in maniera casuale, con stratificazioni microscopiche e spaziali. La *microflora* di un alimento presenta inoltre un carattere dinamico, potendo aumentare o diminuire di numero durante le varie fasi di un processo produttivo in funzione delle condizioni ecologiche che si realizzano.

**Campionamento microbiologico: gli step principali.** Un "*campione*" è una porzione di materia selezionata tramite modi diversi in una popolazione destinata a fornire informazioni su una determinata caratteristica della popolazione o della materia oggetto di studio. Esso deve essere "*rappresentativo*" e cioè mantenere le caratteristiche della partita dalla quale è prelevato, in particolare nel caso di un campionamento casuale semplice, dove ciascun componente o aliquota della partita ha la stessa probabilità di figurare nel campione. Esso deve quindi tener conto della distribuzione e della stratificazione microbica e dell'influenza dell'errore analitico.

1. Diluizione del campione solido. I campioni alimentari solidi, prima di essere analizzati, vanno



omogeneizzati in un adatto diluente, al fine di disperdere i microrganismi nella fase liquida che può essere facilmente manipolata per l'analisi. Il diluente non deve danneggiare le cellule microbiche e deve quindi rispettare alcuni criteri (isotonicità, assenza di componenti nutritivi, etc.).

2. Determinazione del metodo di conta dei microrganismi. Quelli maggiormente utilizzati sono:

- a. Conteggio standard di cellule vitali su piastra (Standard Plate Counts, SPC);
- b. metodo del numero più probabile di microrganismi (Most probable number, MPN) per la determinazione statistica delle cellule vitali;
- c. conteggio diretto microscopico, per cellule vitali e non;
- d. tecniche che sfruttano la riduzione di coloranti per stimare il numero di microrganismi che possiedono capacità riduttive.

### **Conteggio su piastra.**

La piastra di Petri è un supporto dentro cui viene versato un terreno di coltura che permette la crescita dei batteri. Questo rappresenta l'ambiente nutritivo artificiale creato in laboratorio ottimale per un certo tipo di microrganismo.



I terreni di coltura possono avere una *composizione chimica definita* (se ne conosce l'esatta composizione percentuale delle sostanze chimiche, organiche e inorganiche, utilizzate per la loro formulazione) o *una composizione indefinita* (nella loro formulazione contengono sostanze di origine varia e, nella maggior parte dei casi, di derivazione naturale, animale e vegetale, di cui non è nota la precisa composizione dei nutrienti).

Possono essere inoltre *liquidi* (brodi), preparati sciogliendo in acqua tutti i componenti necessari o *solidi*, ottenuti aggiungendo una sostanza

gelificante come l'agar. Questo è estratto da alghe rosse e una volta fluidificato a temperature superiori a 85°C, solidifica quando viene lasciato raffreddare a temperature inferiori a 45°C.

In base alla composizione in nutrienti, i terreni possono essere:

1. *per uso generale*: quando soddisfano la crescita della maggior parte dei microrganismi di uno specifico gruppo (batteri, lieviti e muffe);
2. *selettivi*: quando, oltre ai normali componenti nutritivi, contengono sostanze chimiche che esercitano un'azione inibente nei confronti di alcuni microrganismi o gruppi di microrganismi, senza interferire, nelle dosi di utilizzo, con l'organismo da isolare;
3. *selettivi e differenziali*: sono terreni selettivi ai quali sono aggiunte particolari sostanze chimiche che determinano una modificazione del terreno come conseguenza di una particolare attività metabolica del microrganismo da isolare, differenziandolo dalle specie che non sono in grado di utilizzare il composto differenziale (ad esempio la capacità del microrganismo di fermentare un particolare carboidrato o di produrre particolari metaboliti che rendono "caratteristica" la colonia microbica da isolare).

### **Preparazione del terreno.**

Seguendo la ricetta, si pesano i componenti del terreno ai quali si aggiunge acqua distillata nella misura richiesta. Gli ingredienti vanno riscaldati fino a 40-50°C per i terreni liquidi e fino all'ebollizione per i terreni contenenti agar. Dopo aver

dispensato il terreno in bottiglie o provette munite di tappo, questo viene sterilizzato in autoclave a 121°C per 15 minuti, in modo da eliminare tutti i microrganismi, sporigeni e non e contaminanti. Alcuni terreni vanno solo riscaldati fino ad ebollizione oppure sterilizzarli per filtrazione.



Se necessario, si possono aggiungere al terreno sterile e raffreddato a 45-47°C eventuali supplementi selettivi sterili. A questo punto il terreno agarizzato può essere dispensato in piastre di Petri oppure in tubi per batteriologia lasciati solidificare in posizione verticale oppure inclinata (agar a becco di clarino o agar slant).

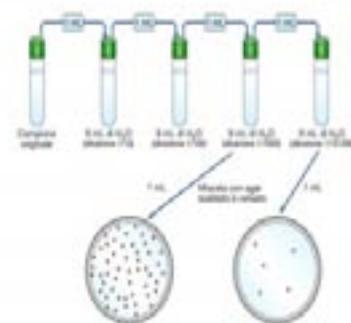


### **Teoria delle diluizioni decimali.**

Solitamente la concentrazione di microrganismi in un alimento è molto elevata, il che rende impossibile la conta dei microrganismi su piastra. Avremmo, infatti, non delle singole colonie formanti unità (CFU) ma una massa di batteri non facilmente distinguibili ed enumerabili gli uni dagli altri. Per ovviare a questo problema, si realizzano delle diluizioni decimali seriali del campione (ad es. 1 ml di campione in 9 ml di diluente sterile o 10 ml in 90 ml), operando così una diluizione del numero di microrganismi inizialmente presenti nell'alimento.

Il numero di diluizioni da realizzare può scaturire da una serie di considerazioni dettate dai criteri microbiologici da soddisfare per accertare se un campione risulta accettabile o da precedenti esperienze di analisi condotte su prodotti simili considerando la natura del campione, il tipo di processo tecnologico cui è stato sottoposto, le condizioni in cui viene conservato, etc. Quando invece non si hanno notizie sufficienti sul campione per poter prevedere il numero potenziale di microrganismi in esso contenuto, allora è necessario diluire il campione almeno fino alla  $10^{-8}$ - $10^{-9}$ , considerando che 1 ml o 1 g di alimento contiene in genere non più di  $10^9$ - $10^{10}$  microrganismi.

### **Semina per inclusione dopo diluizione del campione**



## **Tecniche di semina in piastra**

1. **Tecnica Pour Plate** o **semina in piastra per inclusione**: si versa, in una piastra Petri sterile e vuota, prima la sospensione del campione da analizzare (1 ml di inoculo) e successivamente il substrato agarizzato (12-15 ml) mantenuto in fusione a 45-46°C. Fatto ciò, si rotea la piastra per spalmare omogeneamente il campione e si lascia solidificare.

2. **Tecnica Spread Plate** o per **semina in piastra per spatolamento**: le piastre vengono preparate precedentemente all'operazione di inoculo. Il terreno viene versato in piastra in fase di fusione e le piastre vengono fatte solidificare. Le piastre pronte possono essere conservate a 4°C anche per una settimana prima dell'uso. L'inoculo (0,1 ml) viene depositato sulla superficie dell'agar già solidificato nelle piastre Petri e distribuito con una bacchettina a forma di L.

NB: La prima diluizione ( $10^{-1}$ ) può essere lasciata a riposo, per favorire la decantazione di particelle grossolane e la dispersione di microrganismi nel diluente. In ogni modo, l'intervallo di tempo tra la preparazione della prima diluizione e quelle successive non dovrebbe mai superare i 15 minuti mentre la semina in piastra delle diluizioni preparate deve avvenire al massimo entro 20-30 minuti dalla preparazione della diluizione iniziale.

## **Incubazione**

Dopo la semina le piastre vengono incubate capovolte (per evitare che si formi condensa sotto il coperchio) in un termostato per tempo, temperatura e atmosfera adatti al tipo di microrganismo o popolazione microbica che si vuole numerare.

## **Conta delle colonie.**

Se l'inoculo è distribuito omogeneamente nel substrato, teoricamente ogni cellula presente nel campione iniziale dovrebbe dare origine, in seguito a moltiplicazione,



ad una colonia singola visibile ad occhio nudo. Per la conta, si prendono in considerazione le piastre con un numero di colonie tra 30 e 300 (o 25 e 250). Numeri più bassi potrebbero essere poco accurati statisticamente mentre un numero di colonie superiore a 300 potrebbe risultare difficile da contare. Il numero delle colonie su una piastra è moltiplicato per il numero di volte per cui è stato diluito il campione iniziale.

**Facciamo un esempio:** se su una piastra in cui abbiamo inoculato 1 ml della diluizione 1:100 del campione iniziale contiamo 30 colonie, significherà che 30 rappresenta 1/100 del numero di colonie presenti in 1 g o 1 ml del campione iniziale. Dunque, il numero di colonie per g o ml del campione sarà calcolato moltiplicando  $30 \times 100 = 5 \times 10^3$  (100 rappresenta il fattore della diluizione 1/100, che rappresenta l'inverso della diluizione)

## **Bibliografia:**

### [Formaggio.it](#)

Galli A. (2012). Igiene degli alimenti e HACCP. Tecniche nuove, Milano.

Galli Volonterio A. (2005). Microbiologia degli alimenti. Casa Editrice Ambrosiana, Milano.

Jay JM. (2005). Modern Food Microbiology. Springer, USA.

### [Ministero della Salute](#)

Ray B. (2004). Fundamental of Food Microbiology. CRC Press, London.

### [Regolamento 853/2004](#)

Tiecco G. (2001). Igiene e Tecnologie degli alimenti. Edagricole, Bologna.