A circular inset image at the top of the page shows various pieces of laboratory glassware, including test tubes and beakers, some containing liquids, set against a dark background.

# Controllo della proliferazione microbiologica dei prodotti ortofrutticoli confezionati

A. Bevivino

I prodotti di IV gamma costituiscono, ad oggi, uno dei più promettenti ed innovativi comparti del settore ortofrutticolo. Si tratta di prodotti ortofrutticoli freschi, lavati, tagliati, confezionati e sigillati in vaschette o sacchetti e messi in vendita in banco frigo. Grazie all'elevato valore nutrizionale e ad una gradita immagine di freschezza e genuinità, questi prodotti hanno mostrato in questi ultimi dieci anni un trend di crescita di assoluto rilievo. Tra i prodotti di IV gamma, la lattuga rappresenta uno degli ortaggi più diffusi, ma anche quello più soggetto a variazioni di qualità durante la vita commerciale (*shelf life*), definita come l'intervallo di tempo in cui un alimento può essere tenuto in determinate condizioni di conservazione mantenendo ottimali la qualità e la sicurezza.

I prodotti vegetali freschi sono alimenti biologicamente dinamici per la loro attività metabolica e subiscono un decadimento qualitativo in parte dovuto all'attività microbica. La proliferazione microbica negli alimenti è influenzata da fattori intrinseci, correlati con l'alimento stesso, e da fattori estrinseci, legati all'ambiente in cui l'alimento è conservato. I microorganismi rappresentano fattori specifici che causano il deperimento degli alimenti, mentre diversi altri fattori (stress da manipolazione, umidità interna delle buste, processo di conservazione) contribuiscono a creare i presupposti per l'aumento della crescita microbica.

La microflora dei prodotti vegetali freschi, in genere costituita da microorganismi non patogeni per l'uomo, può contribuire ad affrettare il deperimento interagendo con il metabolismo dei vegetali. Il controllo della proliferazione microbica rappresenta, pertanto, un aspetto fondamentale per garantire la sicurezza alimentare dei prodotti vegetali freschi. Sebbene nella maggior parte dei casi lo sviluppo microbico non costituisca un vincolo per la *shelf life* dei prodotti di IV gamma, il mantenimento a livelli sotto le soglie di rischio [misurato sulla base del numero delle unità formanti colonia (ucf) pari a  $10^6$ - $10^8$  ucf per grammo di peso fresco] ed il controllo della proliferazione microbica sono un aspetto fondamentale per garantire la *safety* alimentare.

Bisogna tener presente che gli alimenti colonizzati dai microorganismi rappresentano dei veri e propri ecosi-

stemi la cui complessità è determinata dalle interazioni tra i fattori ambientali intrinseci ed estrinseci dell'alimento stesso. I microrganismi sono in grado di colonizzare la matrice alimentare e di crescere, come microcolonie o biofilm, in un ambiente eterogeneo in cui si possono instaurare interazioni polimicrobiche. La composizione microbiologica degli alimenti non è, a tutt'oggi, completamente conosciuta. Le cellule microbiche presenti negli alimenti possono trovarsi in uno stato vitale ma non coltivabile. È quindi possibile che alcuni patogeni degli alimenti non siano stati ancora identificati, basti pensare ai patogeni emergenti il cui ruolo è stato riconosciuto soltanto recentemente. Ne consegue che il controllo della proliferazione microbiologica effettuato soltanto sulle popolazioni microbiche isolate in coltura pura non consente di ottenere una completa conoscenza dei microorganismi presenti negli ecosistemi alimentari e, quindi, misurare l'evoluzione della flora microbica durante la *shelf life*. Pertanto, l'utilizzo di un approccio polifasico, che prevede l'uso di metodi coltura-dipendenti e tecniche metodologiche che prescindono dalla coltivabilità di un microorganismo, è di fondamentale importanza per il controllo della qualità e sicurezza microbiologica degli alimenti.

L'attività di ricerca del Laboratorio sostenibilità, qualità e sicurezza delle produzioni agroalimentari presso il Centro Ricerche ENEA Casaccia, svolta nell'ambito del progetto Industria 2015 FoodFlavour "Metodologie avanzate per garantire l'origine dei prodotti alimentari Made in Italy e studio di nuove tecnologie per il miglioramento della durata e delle qualità sensoriali", finanziato dal Ministero dello Sviluppo Economico (MISE) e coordinato dall'ENEA, è stata finalizzata a valutare le variazioni dei parametri microbiologici durante la conservazione a 8 °C in funzione delle diverse tipologie di packaging e del processo di lavorazione del lattughino di IV gamma (*Lactuca sativa*, varietà Babybel, Batavia bionda) (Daddiego et al. Indicatori di qualità per la IV gamma. In: Ingredienti alimentari, 2015, pp: 6-15). L'analisi della comunità microbica - a differenti giorni dal confezionamento - è stata effettuata mediante l'approccio polifasico illustrato in Figura 1 che ha previsto l'utilizzo di tecniche classiche e tecniche molecolari.

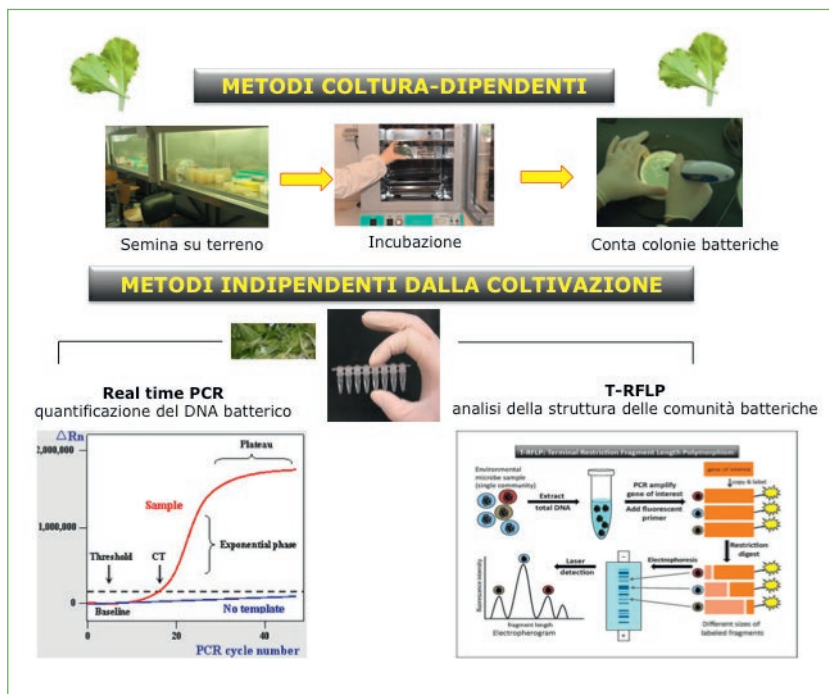


Figura 1  
Approccio polifasico per l'analisi della comunità batterica

Le tecniche classiche sono basate sulla coltivabilità dei microorganismi (che consentono la caratterizzazione della frazione coltivabile presente in un campione), mentre quelle molecolari sono rappresentate da Real-Time PCR e T-RFLP. La prima è una metodica sensibile ed accurata, che permette l'identificazione, in tempo reale, di uno specifico target molecolare e la quantificazione della comunità batterica totale, mentre la T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) è una tecnica rapida e sensibile che misura il polimorfismo di lunghezza dei frammenti terminali di restrizione di un marker genetico amplificato mediante PCR, permettendo di analizzare la struttura delle comunità microbiche indipendentemente dalla fase d'isolamento, allo scopo di caratterizzarle nel loro insieme e di seguire le dinamiche di popolazione delle comunità microbiche presenti.

I risultati ottenuti suggeriscono che lo studio dei microrganismi con i tradizionali metodi di coltivazione consente di ottenere solo una descrizione parziale della diver-

sità microbica degli alimenti. Infatti, se da una parte il metodo coltura-dipendente non ha permesso di evidenziare significative differenze nella carica batterica dei campioni di lattughino confezionati in diverse tipologie di packaging industriali (in film di propilene standard e innovativo), l'analisi molecolare ha evidenziato una diversa struttura della comunità batterica tra i packaging innovativi e il packaging di riferimento (Di Carli et al., manoscritto accettato per la pubblicazione dalla rivista *FEMS Microbiology Letters*).

L'innovazione introdotta nel processo di lavorazione del lattughino di IV gamma ha avuto un effetto migliorativo rispetto al processo tradizionale, deducibile dalla minore carica batterica iniziale rilevata dalla Real-Time PCR e dalle differenze rilevate nella struttura e composizione tassonomica della comunità microbica. Entrambi gli

approcci molecolari di Real-Time PCR e T-RFLP si dimostrano validi per evidenziare variazioni, anche piccole, nella comunità microbica ed il loro utilizzo sembra quindi promettente nell'industria alimentare.

L'applicazione dei principi dell'ecologia microbica in campo alimentare, mediante l'utilizzo di un approccio integrato, rappresenta quindi la chiave del controllo microbiologico della sicurezza igienica e della proliferazione microbica negli alimenti, fornendo un riferimento utile per la definizione della *shelf life*. L'applicazione di metodologie classiche e molecolari ha permesso di ottenere una visione più ampia e completa della struttura delle comunità microbiche, identificando e quantificando le classi di microorganismi che possono contribuire alla valorizzazione di prodotti alimentari, ma anche causarne la deperibilità o alterarne la sicurezza.

Per approfondimenti: [annamaria.bevivino@enea.it](mailto:annamaria.bevivino@enea.it)

Annamaria Bevivino  
ENEA, Divisione Biotecnologie e agroindustria