

<b>Fattori intrinseci</b>	pH Attività dell'acqua ( $a_w$ ) Potenziale redox Composizione chimica e struttura dell'alimento Ossigeno Antimicrobici naturali
<b>Fattori estrinseci</b>	Temperatura Umidità relativa
<b>Fattori di processo</b>	Trattamenti termici Trattamenti innovativi non termici Packaging tradizionali e innovativi
<b>Fattori impliciti</b>	Mutualismo Competizione Commensalismo Amensalismo

# **Fattori Impliciti: Interazioni Microbiche negli Alimenti**

I **Fattori Impliciti** sono il risultato delle **interazioni dinamiche** (sinergiche o antagonistiche) tra le diverse popolazioni microbiche che colonizzano un alimento, definite dalla combinazione dei fattori intrinseci, estrinseci e di processo.

## **Tipo di Interazione**

**Competizione**

**Amensalismo**

## **Meccanismo**

**Competizione per Risorse:** Contesa per nutrienti (es. zuccheri) o per spazio (siti di adesione).

**Produzione di Antimicobici:** Accumulo di metaboliti che inibiscono altre popolazioni.

## **Esempio**

Microrganismi con elevato potenziale metabolico esauriscono rapidamente le fonti nutritive, inibendo altre specie.

Batteri lattici e acetici producono acidi organici. Lieviti producono etanolo. Alcuni batteri producono batteriocine.

## **Tipo di Interazione**

### **Commensalismo**

### **Mutualismo**

## **Definizione**

Un microrganismo trae vantaggio dai prodotti del metabolismo di un altro, senza arrecare danno o vantaggio al secondo.

Un'associazione in cui entrambe le specie traggono un vantaggio reciproco dal rapporto.

## **Meccanismo Esemplare**

Un batterio utilizza un composto proteico parzialmente degradato da un altro microrganismo, che non ne trae beneficio.

**Protocooperazione:** Forma di mutualismo in cui le specie non sono in diretto contatto, ma si scambiano metaboliti essenziali.

## Relazione di Amensalismo nello Yogurt (Sicurezza)

Questo esempio mostra come la presenza di un microrganismo ne inibisca un altro, influenzando la sicurezza.

Produzione di yogurt fermentato con i fermenti starter tradizionali (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus**).

Durante la fermentazione, i batteri lattici producono grandi quantità di Acido Lattico e spesso anche sostanze antimicrobiche come le Batteriocine.

Effetto (Antagonismo): L'ambiente acido e la presenza delle batteriocine inibiscono la crescita di microrganismi patogeni (es. *Salmonella* o *Staphylococcus aureus*).

Impatto su Sicurezza: Questo antagonismo microbico è uno dei motivi per cui gli alimenti fermentati a basso pH hanno una *shelf-life* microbiologica (sicurezza) migliore rispetto agli alimenti freschi non acidificati.

## Protocooperazione (Yogurt)

L'interazione sinergica tra le colture starter è essenziale per la qualità e la velocità della fermentazione:

- *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*: Libera peptidi e amminoacidi essenziali.
- *Streptococcus thermophilus*: Utilizza questi composti e, in cambio, produce **acido folico, acido formico e CO<sub>2</sub>** che stimolano la crescita e il metabolismo del bacillo.

Relazioni simili si verificano tra lieviti e batteri lattici nelle **paste acide (sourdough)**.

## **Relazione di Sinergia nella Maturazione del Formaggio (Qualità)**

Questo esempio evidenzia come microrganismi diversi lavorino in *cooperazione* per creare le caratteristiche di qualità desiderate.

Batteri Lattici (che sopravvivono alla fermentazione iniziale), Muffe (es. *Penicillium* sulla crosta) e Lieviti.

Successione e Sinergia: I Batteri Lattici consumano il lattosio e producono acido. Successivamente, Lieviti e Muffe (più tolleranti a condizioni difficili) iniziano a crescere in superficie.

Le muffe decompongono le proteine e i grassi, rilasciando composti che danno l'aroma e la consistenza tipica.

I lieviti e alcune muffe consumano l'acido lattico, il che fa risalire leggermente il pH sulla crosta. Questo aumento del pH permette ad altri batteri (es. *Brevibacterium* per i formaggi rossi) di crescere, contribuendo ulteriormente alla formazione della crosta, del colore e dell'aroma caratteristico.

# **Stato fisiologico dei microrganismi e dinamiche microbiche**

Gli alimenti sono raramente omogenei, contenendo spesso microambienti diversi.

Questi sono considerati fattori ecologici chiave che ne determinano sicurezza e *shelf-life*.

I microrganismi presenti nell'alimento non sono statici. Possono presentare diversi stati fisiologici e fisici in risposta ai trattamenti produttivi e distributivi.

Ad esempio, un trattamento termico (fattore di processo) può danneggiare le cellule, rendendole non coltivabili (VNC - *Viable but Non Culturable*) o stressate chimicamente.

I processi fisiologici (acquisizione di energia, fermentazione, sintesi di macromolecole, escrezione di cataboliti) rappresentano le funzioni vitali della cellula.

La loro velocità è cruciale: essa determina la capacità del microrganismo di alterare l'alimento.

I **microrganismi che prevalgono** sono quelli in grado di modificare **rapidamente** l'ambiente intracellulare in risposta agli stimoli esterni (cambiamenti di temperatura, pH, ecc.), mantenendo le proprie condizioni chimico-fisiche interne stabili.

Queste risposte dinamiche e le complesse relazioni (come le successioni temporali) che si stabiliscono tra le diverse popolazioni microbiche hanno un impatto diretto sulla sicurezza (es. crescita di patogeni) e sulla qualità (es. alterazione organolettica) degli alimenti durante l'intera catena produttiva e di conservazione.

## Dinamiche e Fattori Ecologici nell'Ecosistema Alimento

In un sistema chiuso come l'alimento, la crescita microbica segue una curva tipica in cui i nutrienti vengono consumati e si accumulano metaboliti potenzialmente inibitori.

Le fasi sono:

latenza (adattamento),

crescita esponenziale (massima replicazione),

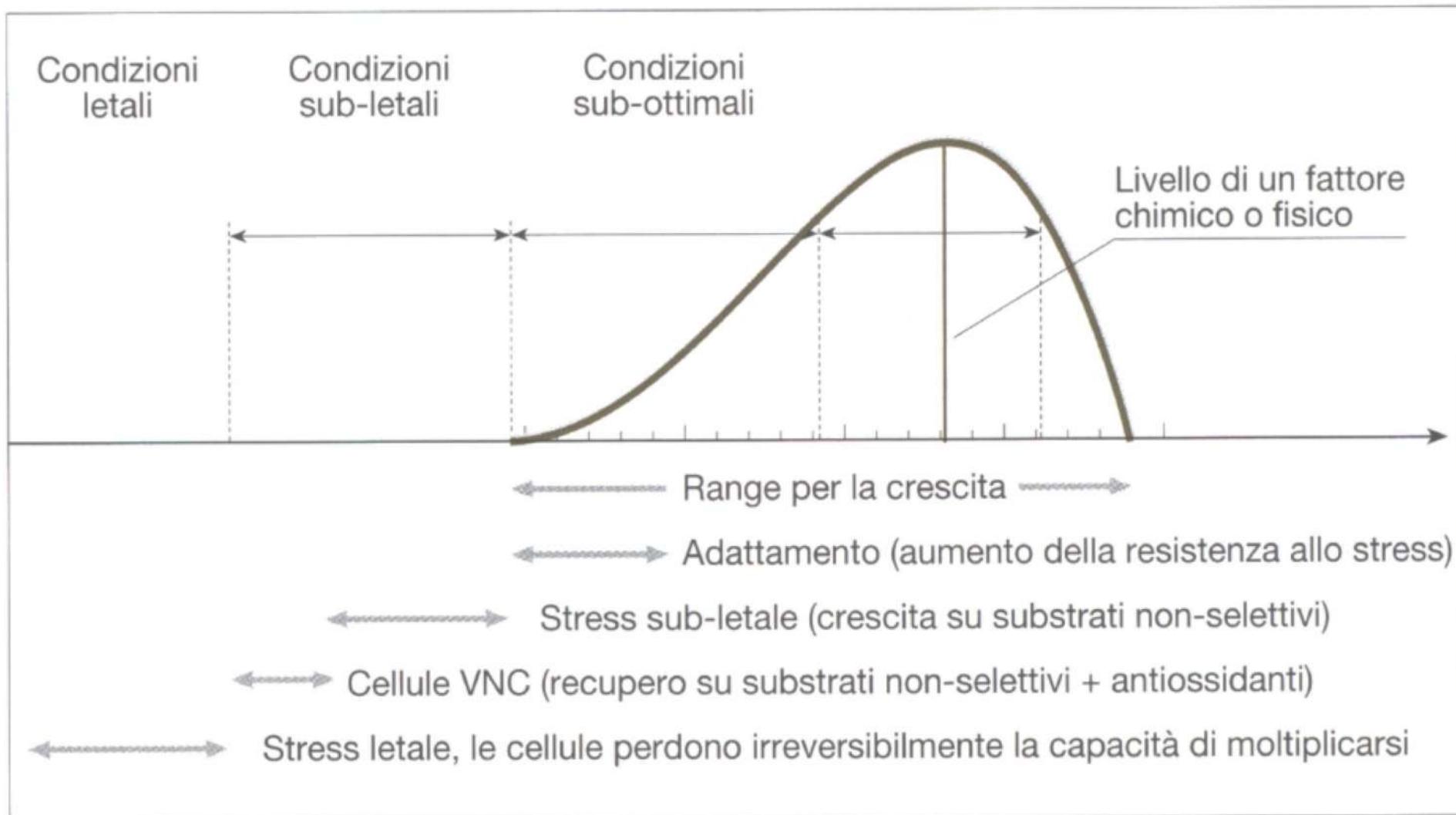
stazionaria (equilibrio)

morte (esaurimento risorse/accumulo tossico).

Per adattarsi e sopravvivere, specialmente in condizioni di stress (subletale), i microrganismi attivano complessi meccanismi a livello proteomico, trascrittomico e fenotipico.

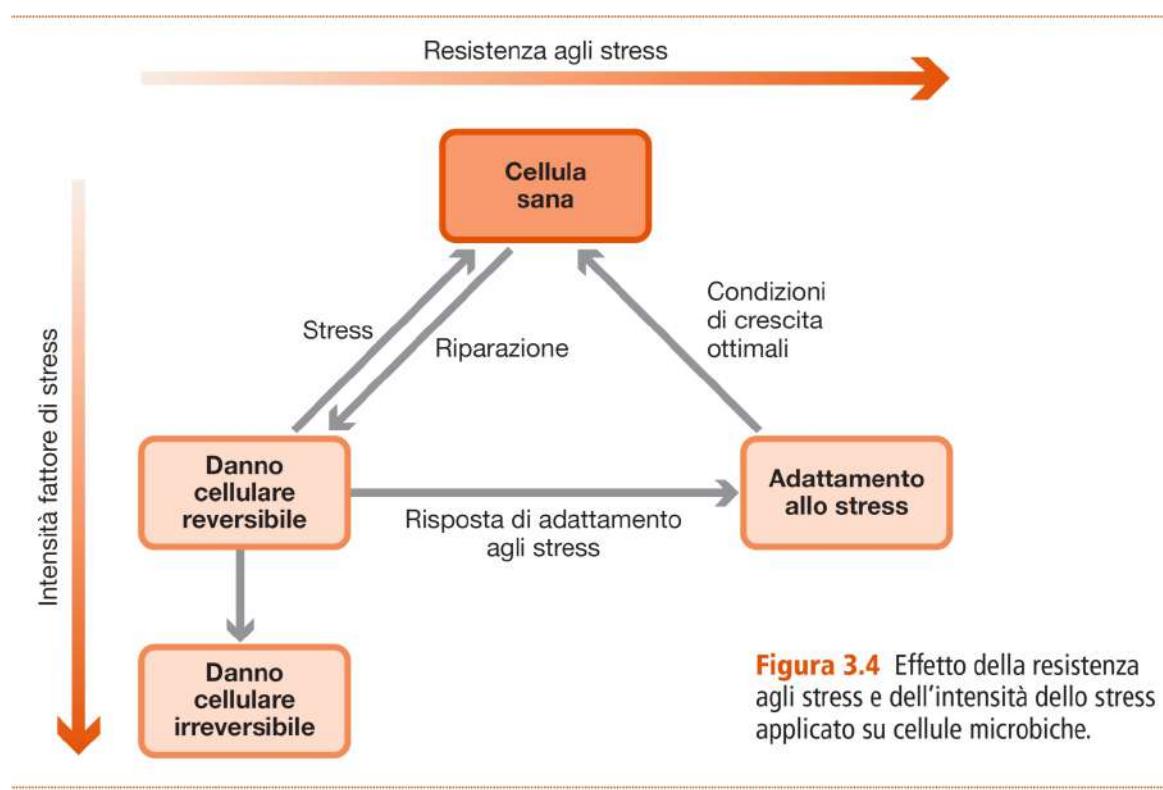
Comprendere questi meccanismi di adattamento è fondamentale sia per controllare microrganismi alteranti e patogeni, sia per sfruttare il potenziale di quelli utili (fermenti, probiotici).

**Relazioni fra crescita, stress e sopravvivenza in funzione della concentrazione o intensità di un fattore fisico o chimico. VNC = cellule vitali ma non coltivabili.**



# Lo Stato Fisiologico dei Microrganismi

La presenza di fattori di stress (chimici, fisici, naturali) negli alimenti induce risposte variabili nei microrganismi, portandoli a stati fisiologici diversi dalla crescita ottimale o dalla morte immediata.



**Figura 3.4** Effetto della resistenza agli stress e dell'intensità dello stress applicato su cellule微生物.

## Cellule Danneggiate (Reversibili)

Le cellule danneggiate sono quelle esposte a **stress subletali** (es. calore, sanificanti, acidi organici) che subiscono danni, ma conservano la capacità di recupero e crescita.

Perdono la capacità di crescere su terreni selettivi a causa della maggiore sensibilità agli agenti di selezione. Sono ancora in grado di moltiplicarsi in mezzi di coltura non selettivi.

- **Riprogrammazione:** Il danno (es. depolarizzazione della membrana) induce una **riprogrammazione genica**, permettendo la riparazione e il recupero.
- **Rischio di Sottostima:** Test basati solo su terreni selettivi per valutare l'efficacia di biocidi o trattamenti possono **sovrestimare** la disattivazione microbica, non rilevando le cellule danneggiate che possono ancora recuperare nell'alimento.

## Cellule Vitali ma Non Coltivabili (CVNC)

Rappresenta una fase fisiologica distinta dalle cellule danneggiate reversibilmente.

Cellule che sono vive e metabolicamente attive, ma non sono in grado di svilupparsi su *nessun* terreno di coltura tradizionale.

Sebbene non crescano, il loro destino è incerto: possono tornare a crescere in determinate condizioni (resuscitare) o morire definitivamente.

La loro presenza richiede l'ottimizzazione dei processi e l'uso di metodi analitici metabolici (non solo culturali) per evitare di sottostimare il rischio per la sicurezza e la *shelf-life*.

## **Adattamento e Modulazione (Risposta allo Stress)**

I microrganismi sono in grado di modificare la loro fisiologia per resistere a stress successivi.

### **Preadattamento e Resistenza**

L'esposizione graduale o l'esposizione a livelli subletali di uno stress (es. calore, acidità media) attiva geni specifici (es. geni *heat shock* o risposta all'acidità) che incrementano la resistenza a stress più estremi.

## **Ruolo Chiave della Membrana**

**La modulazione della composizione degli acidi grassi della membrana citoplasmatica è il meccanismo cruciale per l'adattamento.**

**Gli Acidi Grassi Insaturi (PUFA)** svolgono un ruolo fondamentale nel mantenere la **fluidità** e l'integrità della membrana in risposta a stress (basse/alte temperature, alte pressioni, etanolo, acidità).

## Impatto sulla Patogenicità

Lo stress subletale non solo induce resistenza, ma può anche influire sulla **virulenza** dei patogeni.

In *Listeria monocytogenes*, l'esposizione ad alcuni antimicobici naturali (etanolo, citrale) o ad alta pressione idrostatica (HHP) può attivare geni che aumentano la tolleranza alla bile e la patogenicità, fattori cruciali per la sopravvivenza nell'ospite.

# **Dinamiche Microbiche & Comunicazione batterica**

# Quorum Sensing (QS)

Meccanismo di comunicazione cellula-cellula tra batteri, basato sulla produzione e rilevazione di *molecole segnalatrici* (autoinduttori).

permette alla popolazione microbica di percepire la densità cellulare e coordinare comportamenti collettivi (es. virulenza, biofilm, produzione enzimatica).

Classe	Tipo di batteri	Funzione/Comunicazione
AI-1 (acil monoserina lattoni)	Gram negativi	Comunicazione intraspecie
AI-2 (furanosil borati)	Gram + e Gram –	Segnale “universale” interspecie
AI-3	<i>E. coli</i> enteroemorragici (EHEC)	Attiva geni di virulenza
AIP (peptidi autoinducenti)	Gram positivi	Comunicazione intraspecie

## Meccanismo

Le cellule producono l'autoinduttore.

A basse densità cellulari → la molecola si disperde.

Quando la popolazione cresce → l'autoinduttore si accumula.

Raggiunta una concentrazione soglia (*Quorum*)→ attivazione genica coordinata.

## **Implicazioni alimentari**

- **Biofilm:** regolano densità e attività metabolica delle cellule nel biofilm → impatto sulla contaminazione e resistenza ai sanitizzanti.
- **Shelf-life:** il QS controlla enzimi deteriorativi (proteasi, lipasi, chitinasi, nucleasi). Interrompere il QS può rallentare il deterioramento.
- **Prodotti fermentati:** il QS può favorire *autolisi* delle colture starter e il rilascio di enzimi utili alla *maturazione dei formaggi*.
- **Molecole chiave:** DMHF e MHF, coinvolte nella maturazione aromatica e sensoriale dei formaggi stagionati.

- **Inibitori del QS (“quorum quenching”)** in ricerca per prolungare la shelf-life e ridurre la virulenza (es. estratti di aglio, oli essenziali, lattoni naturali).
- **Starter lattici** (*Lactococcus*, *Streptococcus*) studiati per regolare via QS la liberazione di peptidasi durante la stagionatura dei formaggi.

# Biofilm

## Definizione e formazione

- Strutture complesse di cellule microbiche aderenti a superfici solide, immerse in una matrice di *polisaccaridi, proteine e DNA extracellulare (eDNA)*.
- Adesione iniziale (legami deboli, reversibili).
- Produzione di biopolimeri (ancoraggio stabile).
- Formazione di microcolonie e canali di flusso.
- Maturazione (alta densità cellulare, QS attivo).
- Dispersione (rilascio di cellule verso nuove superfici).

## Fattori che influenzano il biofilm

**pH** → influenza adesione e resistenza; usato nei detergenti

**Temperatura** → biofilm più stabile a basse T°;  
disorganizzato a T° elevate.

**Nutrienti e flusso dei fluidi** → modulano crescita e struttura.

**Superficie di adesione** → acciaio, plastica, gomma, vetro,  
materiali organici.

## ⚠️ Impatto sulla sicurezza alimentare

Le cellule nel biofilm sono  $100\times$  più resistenti a disinfettanti, calore e antimicobici rispetto alle cellule libere.

Fonte di contaminazioni crociate in impianti di trasformazione (aria, superfici, imballaggi).

- Esempi di patogeni biofilm-forming:
  - *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*.

## **Strategie di controllo**

**Sanitizzanti:** fosfato trisodico, acido peracetico, ipoclorito di sodio (efficaci solo su biofilm giovani).

- **Nuove tecnologie:**

- uso combinato di batteriofagi + detergenti alcalini;
- ultrasuoni, campi magnetici/elettrici pulsati;
- enzimi proteolitici/glicolitici per degradare la matrice;
- superfici autopulenti o rivestimenti antimicrobici (es. nanoparticelle d'argento).



## Aspetto positivo

Biofilm benefici (es. microrganismi lattici o acetificanti) possono essere sfruttati per:

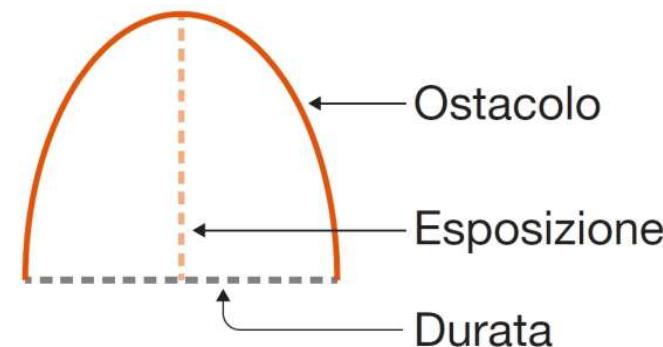
- migliorare fermentazioni,
- incrementare la sicurezza microbica,
- prolungare la shelf-life.

# **Sicurezza e la stabilità microbiologica di un alimento**

# Teoria degli ostacoli

La Teoria degli ostacoli (TO) si basa sull'idea che la sicurezza e la stabilità microbiologica di un alimento non devono essere garantite da un singolo trattamento molto intenso, ma da più fattori ("ostacoli") applicati insieme. Questi ostacoli possono agire in modo cumulativo o sinergico per impedire crescita, inibire o inattivare microrganismi.

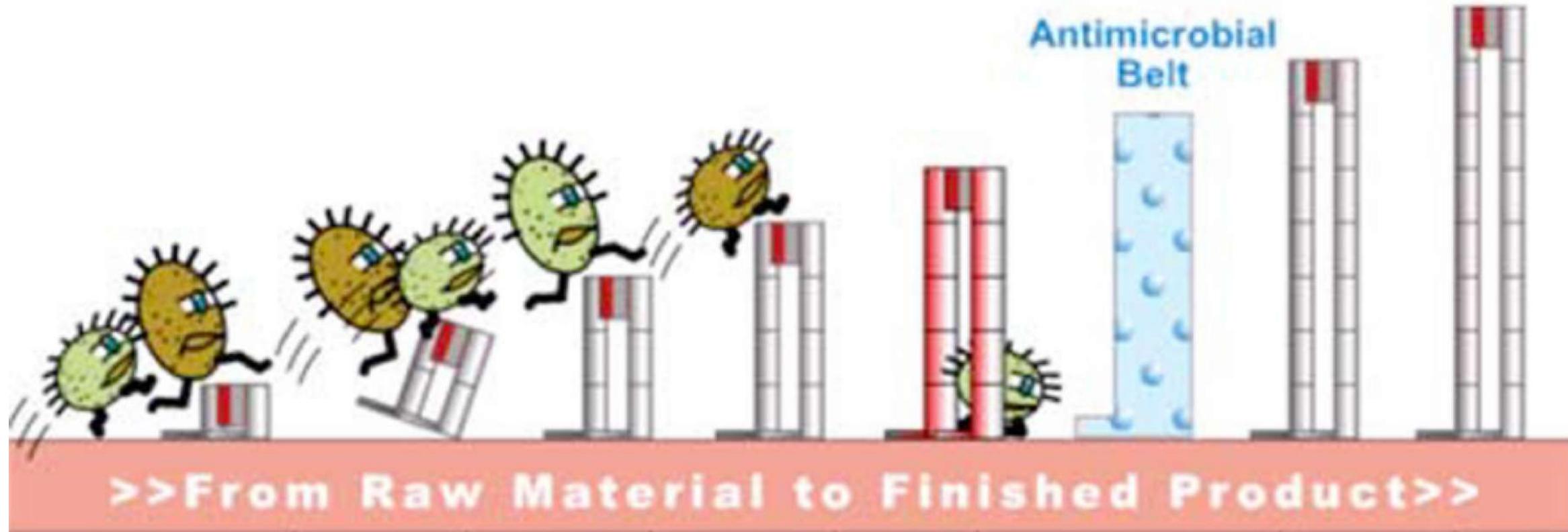
Vantaggi??



b) I parametri dell'ostacolo

Combinazione di tecniche di conservazione, convenzionali o alternative, al fine di stabilire una serie di impedimenti (ostacoli) che i microrganismi non sono in grado di superare

- Dato l'effetto d'insieme, in alcuni casi sinergico, gli ostacoli considerati possono essere usati con una intensità minore
- La combinazione di ostacoli più frequentemente utilizzati sono le alte temperature, basse temperature, bassa aw, acidità, potenziale redox basso, microrganismi competitivi (come batteri lattici) e conservanti (come nitriti, sorbati e sulfiti)



pH Value

Low Water Activity

Preservatives

Heat Treatment

Hygiene Practices

Packaging Conditions

Chilled Storage

## **Sinergia**

la TO punta a ottenere sinergia per aumentare l'efficacia con intensità minori; più bersagli cellulari

## **Limiti**

possibile adattamento microbico e cross-protection se gli ostacoli sono subletali; scelta e intensità devono essere validate per ogni prodotto e per il livello di contaminazione iniziale.

# **Fattori da considerare nella progettazione di una strategia a ostacoli**

**Contaminazione iniziale**

**Target microbiologico**

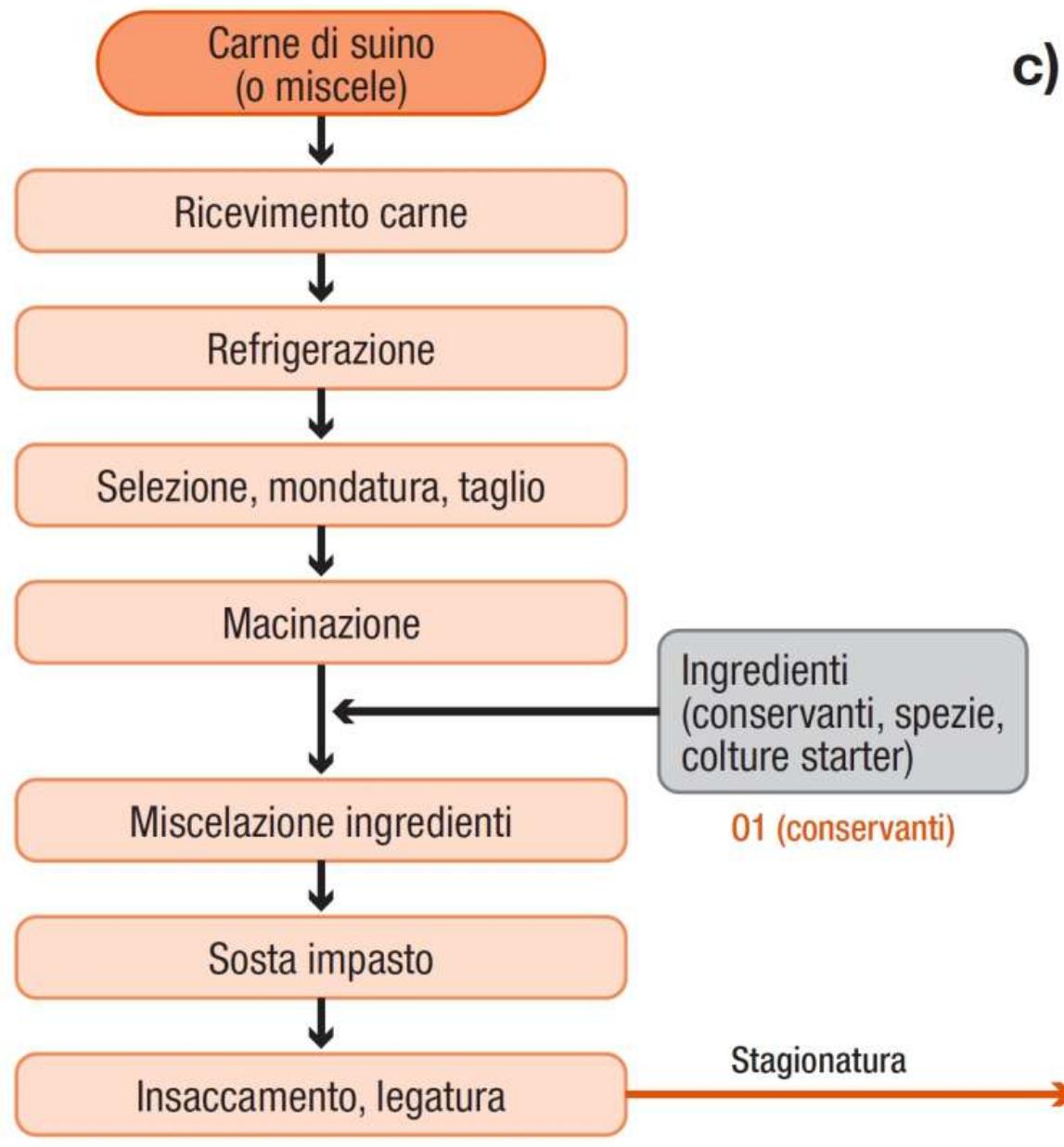
**Caratteristiche dell'alimento**

**Stato fisiologico del microrganismo**

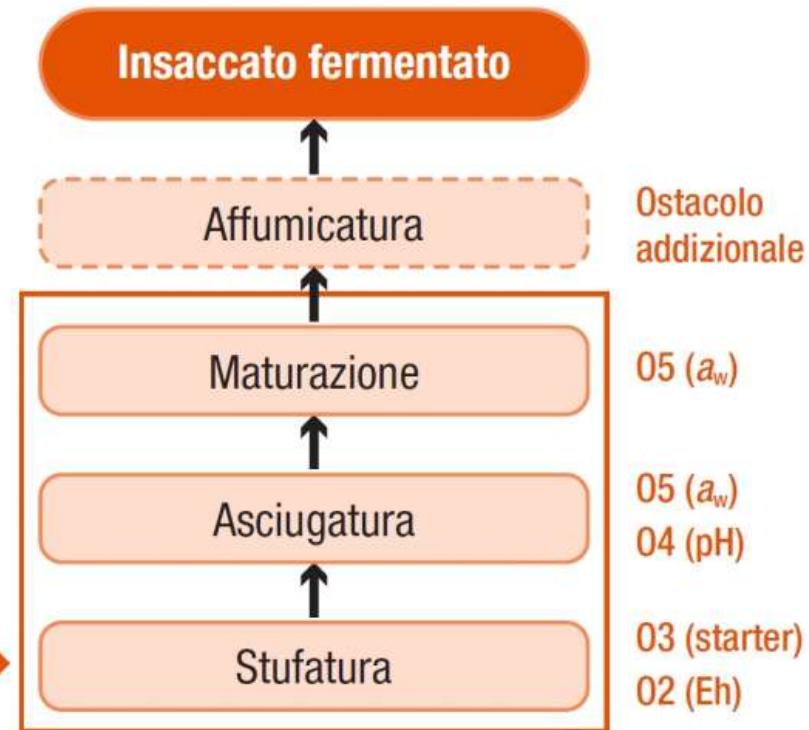
**Stoccaggio e variabilità nel tempo:** alcuni ostacoli possono diminuire durante shelf-life (es. consumo di nitriti → perdita di efficacia).

**Possibilità di adattamento**

**Aspetti sensoriali, nutrizionali e normativi:** non peggiorare qualità o superare limiti legislativi.



**c) La teoria degli ostacoli  
nella produzione  
di un insaccato fermentato**



## **Ready-To-Eat (RTE) (es. insalate confezionate)**

Ostacoli: refrigerazione + MAP + lavaggi con antimicobici + colture bioprotettive (batteriocine) + packaging attivo.

## **Frutta secca**

Ostacoli: ridotta *aw* (essiccazione o osmotica) + trattamenti superficiali (plasma, microonde) + packaging.

# Esempio di strategia degli ostacoli debole

gii  
ole



## 1996. L'ISS blocca il mascarpone killer

Giovanna Franciosa<sup>1,5</sup>, Manoocheher Pourshaban<sup>2</sup>, Monica Gianfranceschi<sup>1</sup>, Antonietta Gattuso<sup>1</sup>, Lucia Fenicia<sup>5</sup>, Anna Maria Ferrini<sup>1</sup>, Veruscka Mannoni<sup>3</sup>, Donato Greco<sup>4</sup>, Paolo Aureli<sup>5</sup>

**DECINE DI PERSONE SI RIVOLGONO AI PRONTO SOCCORSI  
CENTINAIA DI CAMPIONI BIOLOGICI VENGONO RICEVUTI ED  
ANALIZZATI DAL CENTRO NAZIONALE DI RIFERIMENTO DEL BOTULISMO DELL'ISS**

The collage includes several newspaper snippets and headlines:

- A headline from "L'Espresso" (Milan): "In fin di vita dopo la scorpacciata" (Francesco, sei anni, lotta «intubato»: non ha l'età neppure per il siero)
- A snippet from "L'Espresso" (Milan): "Botulismo: colpevole il mascarpone" (Trovata la tossina killer in un altro campione.)
- A snippet from "L'Espresso" (Milan): "ITALIE: CAS DE BOTULISME DANS LE MASCARPONE"
- A snippet from "L'Espresso" (Milan): "Mascarpone killer: è psicosi, e i Verdi accusano"
- A snippet from "Il Corriere della Sera" (Milan): "Mascarpone-killer, l'inchiesta si allarga a tutta l'Italia"
- A snippet from "Il Corriere della Sera" (Milan): "Botulismo: il gioco del block out"
- A snippet from "Il Corriere della Sera" (Milan): "FDA warning to importers: Mascarpone cream cheese"
- A snippet from "CNN International": "Il mascarpone killer colpisce ancora: paura, sequestri a raffica"
- A snippet from "Il Corriere della Sera" (Milan): "Botulismo: grave un bambino. Satto inchiesta l'azienda produttrice. All'estero bloccano le importazioni"

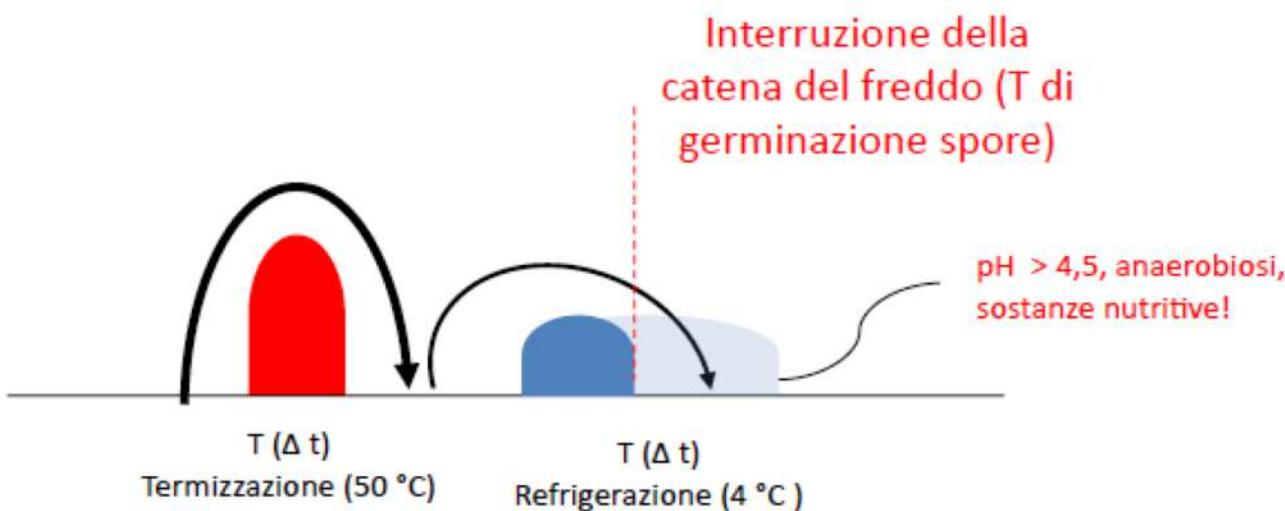
**RISULTATI: ELEVATA PERCENTUALE DI POSITIVITA'**

**NEGLI ULTIMI CINQUANT'ANNI NESSUN CASO DI BOTULISMO ERA STATO  
ASSOCIAATO AL CONSUMO DI LATTICINI**

CHE COSA E' SUCCESSO CON IL MASCARPONE?



**I DATI SUGGERISCONO CHE  
LA MATERIA PRIMA (CREMA DI LATTE) USATA per la produzione del lotto  
incriminato fosse CONTAMINATA con spore di *C. botulinum***



**I DATI SUGGERISCONO CHE  
LA MATERIA PRIMA (CREMA DI LATTE) USATA per la produzione del lotto  
incriminato fosse CONTAMINATA con spore di *C. botulinum***

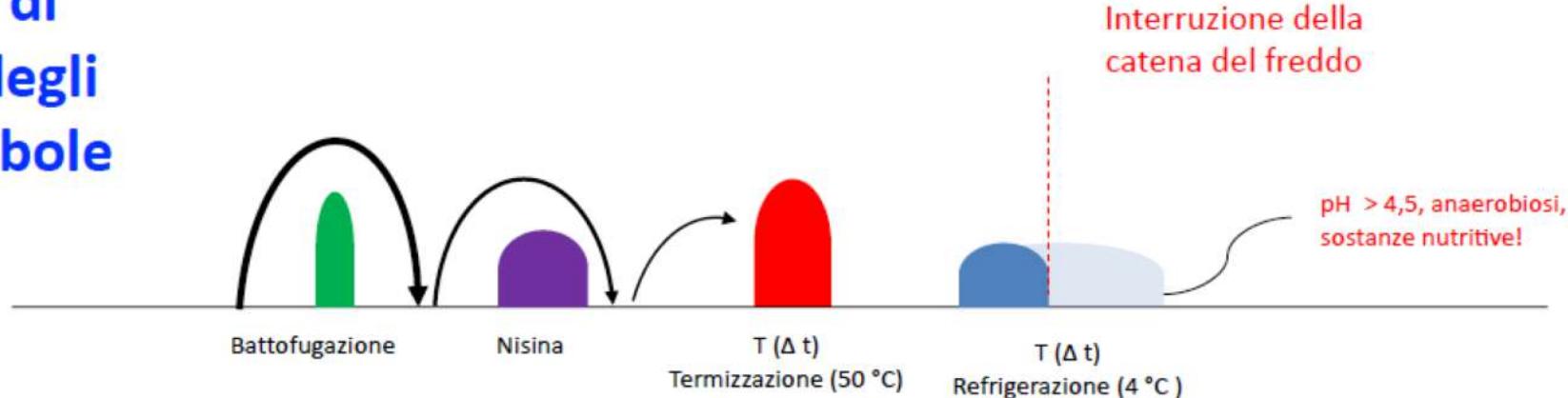
*Nessuno step del processo produttivo poteva inattivare le spore del *C. botulinum**

*La conservazione refrigerata del prodotto era l'unica misura in grado di ostacolare  
la crescita di *C. botulinum**



**FATTORE CAUSALE : INTERRUZIONE NELLA CATENA DEL FREDDO  
(sosta prolungata a temperatura ambiente nel mese di agosto)**

## Esempio di strategia degli ostacoli deboli



### Il mascarpone oggi

...è un alimento più sicuro. In seguito all'accurata indagine del 1996, che ha visto impegnati in sinergia ISS, Ministero della Salute e industria, sono state apportate opportune modifiche al processo produttivo, tra le quali:

- Battofugazione del latte (processo molto più drastico della centrifugazione, in grado di eliminare le spore microbiche dal latte)
- Aggiunta di nisina, una sostanza antibatterica naturale in grado di contrastare l'accrescimento del *Clostridium botulinum*