

**Fattori
intrinseci**

pH
Attività dell'acqua (a_w)
Potenziale redox
Composizione chimica e struttura dell'alimento
Ossigeno
Antimicrobici naturali

**Fattori
estrinseci**

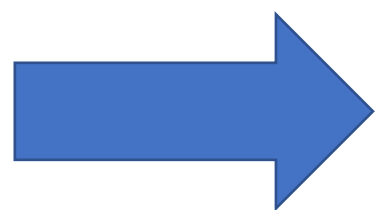
Temperatura
Umidità relativa

**Fattori
di processo**

Trattamenti termici
Trattamenti innovativi non termici
Packaging tradizionali e innovativi

**Fattori
impliciti**

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

Meccanismo

Esempio

Competizione

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

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

Amensalismo

Produzione di Antimicrobici: Accumulo di metaboliti che inibiscono altre popolazioni.

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

Tipo di Interazione

Definizione

Meccanismo Esemplare

Commensalismo

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

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

Mutualismo

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

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.

Protooperazione (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 **CO₂** 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),

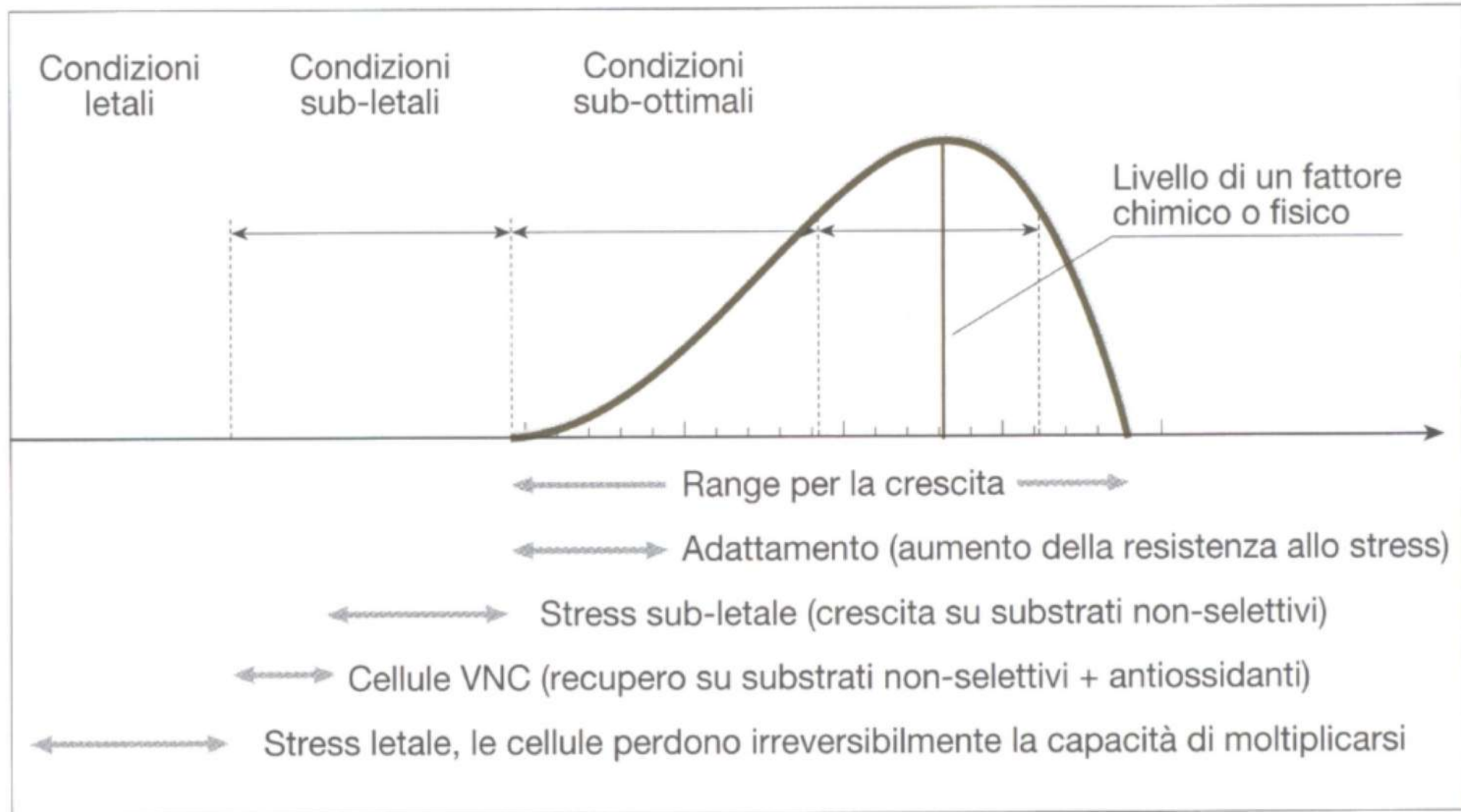
stazionaria (equilibrio)

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.

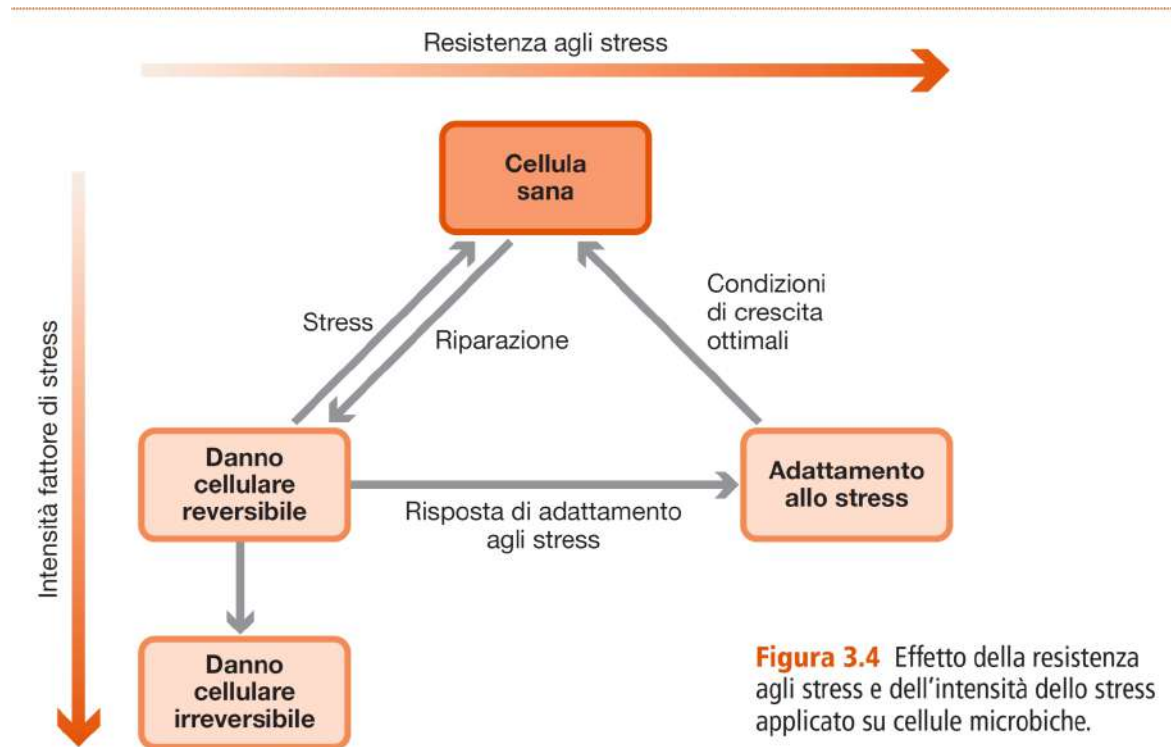


Figura 3.4 Effetto della resistenza agli stress e dell'intensità dello stress applicato su cellule microbiche.

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 **sovrastimare** 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 colturali) 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 antimicrobici 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 sanificanti.
- **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 antimicrobici 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:

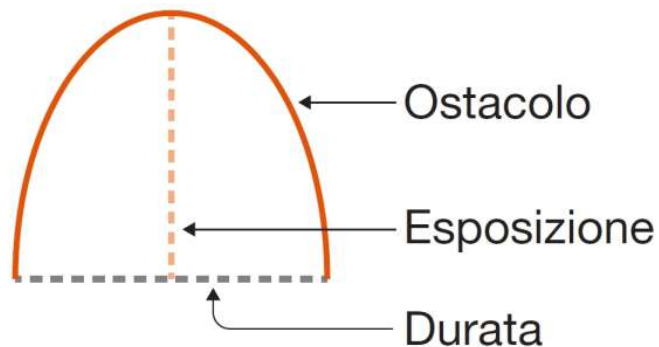
- migliorare fermentazioni,
- incrementare la sicurezza microbica,
- prolungare la shelf-life.

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.

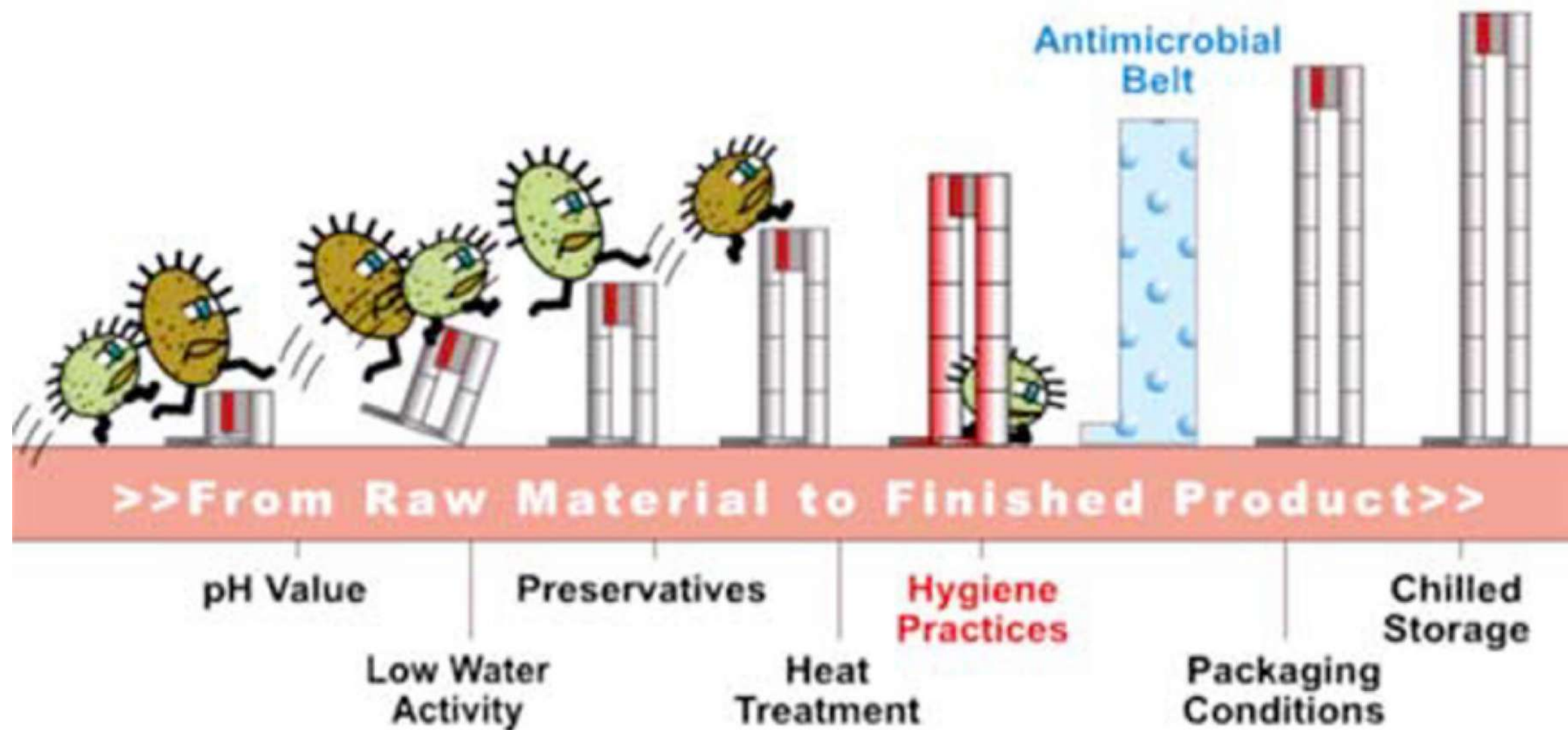
Vantaggi??



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 solfiti)



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

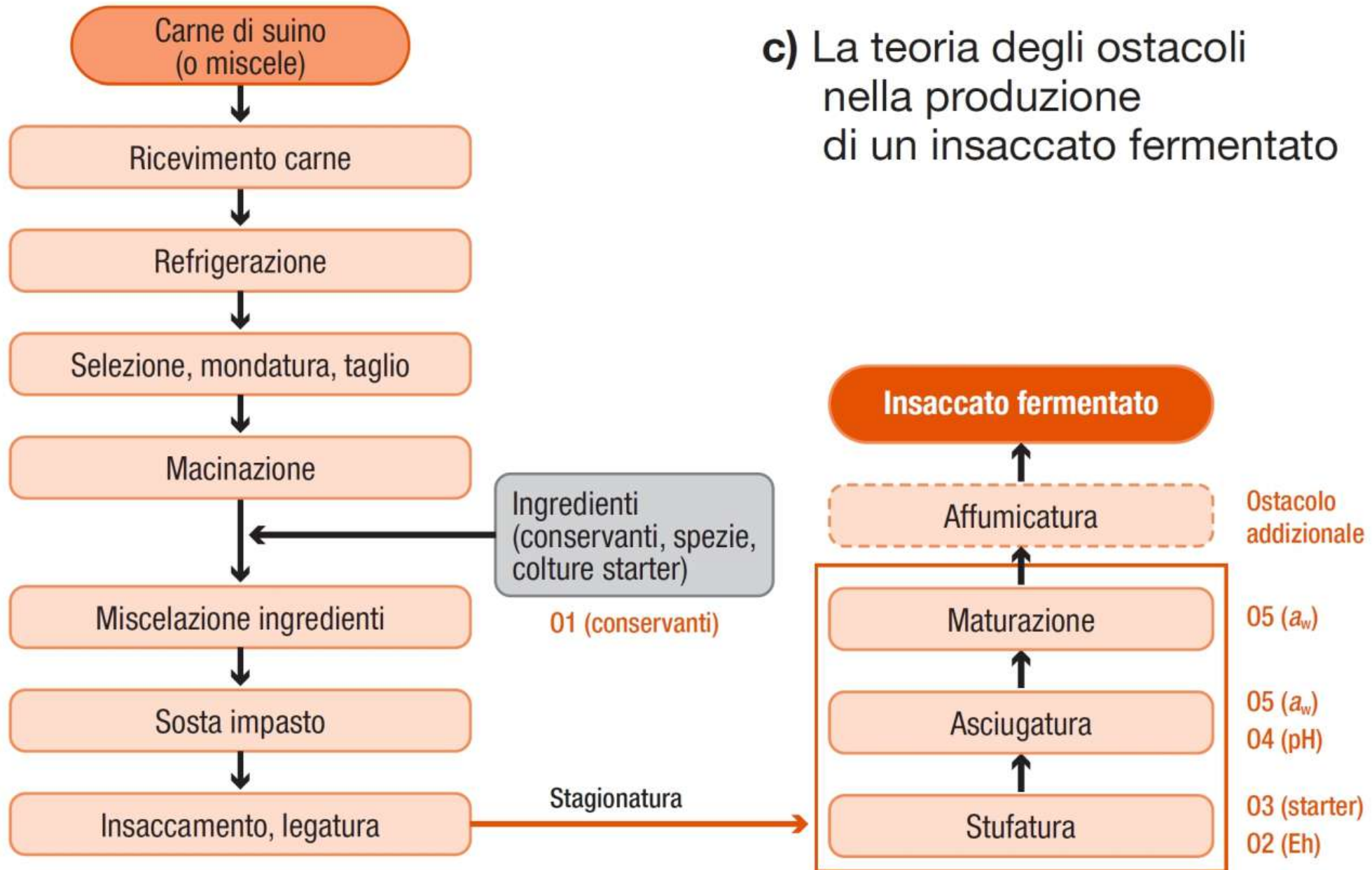
Stato fisiologico del microrganismo

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 antimicrobici + colture bioprotettive (batteriocine) + packaging attivo.

Frutta secca

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

Esempio di strategia degli ostacoli debole

gli
ole



1996. L'ISS blocca il mascarpone killer

Giovanna Franciosa^{1,5}, Manoocheher Pourshaban², Monica Gianfranceschi¹, Antonietta Gattuso¹, Lucia Fenicia⁵, Anna Maria Ferrini¹, Veruscka Mannoni³, Donato Greco⁴, Paolo Aureli⁵

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

**Il pronto soccorso
entrate di tirandosi**

'Botulismo: colpevole il mascarpone

Trovata la tossina killer in un altro campione.

In fin di vita dopo la scorpacciata

Francesco, sei anni, lotta «intubato»: non ha l'età neppure per il siero

Il mascarpone killer colpisce ancora: paura, sequestri a raffica

FDA warning on imported
Mascarpone cream cheese

ITALIE: CAS DE BOTULISME DANS LE MASCARPONE

C'era il bacillo nelle confezioni sospette. Pecoraro Scanio: allarmi già ad agosto
Mascarpone killer: è psicosi, e i Verdi accusano

Mascarpone-killer, l'inchiesta si allarga a tutta l'Italia

Corriere della Sera

CRONACHE ITALIANE

Alla versione del ministero replica l'azienda: la parola ai magistrati. I dubbi dei consumatori sul latte unto
Botulismo, il giallo del blackout

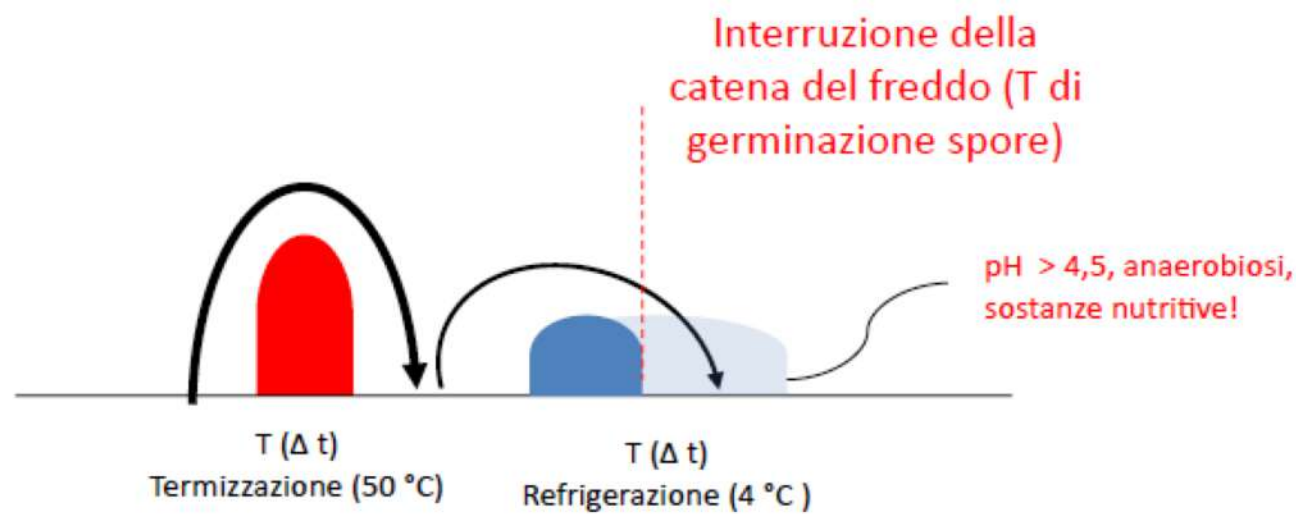
RISULTATI: ELEVATA PERCENTUALE DI POSITIVITA'

NEGLI ULTIMI CINQUANT'ANNI NESSUN CASO DI BOTULISMO ERA STATO ASSOCIATO 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***

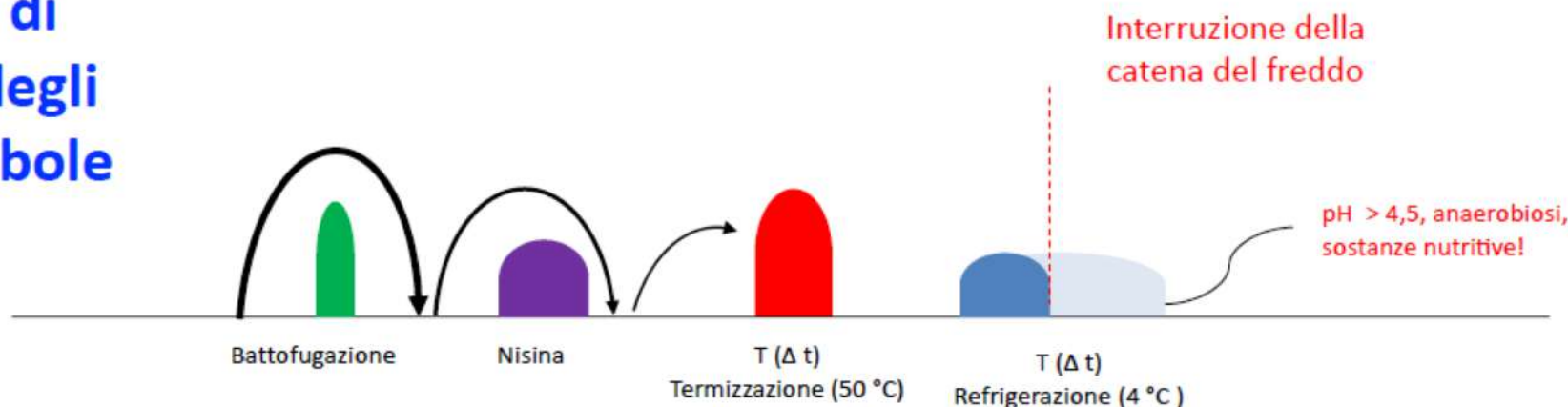
Nessuno step del processo produttivo poteva inattivare le spore del *C. botulinum*

***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 debole



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*