

INDUSTRIE ALIMENTARI

FOLLOWUS

Pavimenti APS:
seguiteci verso
la qualità, la sicurezza,
il rispetto per l'uomo
e l'ambiente.



SOCIO DEL GBC ITALIA



ISO 9001
SISTEMI DI GESTIONE
PER LA QUALITÀ
E LA SICUREZZA
DELLE INFORMAZIONI
E LA PROTEZIONE
DELLA PRIVACY
E LA SICUREZZA
DELLA VITA
E LA SALUTE
E LA SICUREZZA
DELLA VITA
E LA SALUTE
E LA SICUREZZA
DELLA VITA
E LA SALUTE

Rivestimenti continui certificati per pavimentazioni



APS PRODOTTI SPECIALI

Photo: Italiane spa - Sped. in A.P. - D.L. 353/2003 (Conv. in L. 27/02/2004 n. 40 art. 1 comma 1) D.C.F. (O. n. 10/2009 - 1/P

CHIRIOTTI  EDITORI

10064 PINEROLO - ITALIA - TEL. 0121393127 - FAX 0121794480 E-mail: info@chiriottieditori.it

DINAMICA DI COMPORTAMENTO DI MICRORGANISMI PATOGENI NEL PROCESSO DI LAVORAZIONE E STAGIONATURA DEL BAGÒSS

VALENTINA DE NADAI - GUIDO FINAZZI* - PAOLO DAMINELLI - EMANUELA BONOMETTI - RENATO BERTOLASSI - PAOLO BONI
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna Reparto Microbiologia
Via Bianchi 7/9 - 25124 Brescia - Italia
*e-mail: guido.finazzi@izsler.it

Behavioural dynamics of several pathogen microorganisms during processing and ripening of Bagòss cheese

Parole chiave: Bagòss, stagionatura, *Salmonella typhimurium*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Staph. aureus*
Key words: Bagòss, ripening, *Salmonella typhimurium*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Staph. aureus*

SUMMARY

The aim of the survey was to evaluate the behaviour of the most common dairy pathogens in the Bagòss, a particular ripe cheese of the Bagolino area (Brescia). The milk has been contaminated with a three strains suspension of each of the investigated microorganism (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Staphylococcus aureus*), then processed and ripened in collaboration with the dairy. The cooking and next step of rest under curd whey were not able to determine any effect on pathogen concentration. But rather the ripening ensured the elimination of *Salmonella*, *E. coli* and *Staph. aureus* and the decrease of 4-5 log in the *Listeria* concentration. Challenge test data, therefore, permit to support Bagòss safety.

SOMMARIO

È stato valutato il livello di sicurezza nel

riguardi dei più comuni microrganismi patogeni riscontrabili nei prodotti lattiero-caseari del Bagòss, formaggio a latte crudo e lunga stagionatura tipico della zona di Bagolino (Provincia di Brescia). A tale scopo il latte destinato alla caseificazione è stato contaminato con una sospensione costituita da tre ceppi per ciascuno dei microrganismi studiati (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Staphylococcus aureus*) ed è stato poi trasformato e stagionato secondo le modalità previste dalla tecnica tradizionale di produzione. Le fasi di cottura e di successivo riposo sotto siero della cagliata non si sono dimostrate efficaci nell'abbattere le cariche contaminanti. È invece la stagionatura, di durata minima pari a 12 mesi secondo la metodologia tradizionale, a garantire l'eliminazione di *Salmonella*, *E. coli* e *Staph. aureus* e il decremento di 4-5 logaritmi della concentrazione di *Listeria*. I dati emersi dal challenge test permettono dunque di sostenere la sicurezza

alimentare del Bagòss e la sua capacità di contrastare i microrganismi patogeni eventualmente presenti nel latte all'origine o frutto di contaminazione ambientale.

INTRODUZIONE

Il Bagòss (foto 1) è un formaggio semicotto, stagionato per almeno 12



Foto 1.

mesi, prodotto nel comune di Bagolino utilizzando latte crudo di vacche di razza Bruna allevate esclusivamente nella zona di produzione. Si tratta di un formaggio molto apprezzato anche all'estero che vanta decenni di tradizione. È proprio per valorizzare i prodotti tradizionali italiani e favorire la loro esportazione anche a livello extracomunitario, oltre che per ottemperare alle richieste dei regolamenti comunitari a tutela del consumatore (1,2), che si rende necessario condurre delle sperimentazioni che dimostrino in modo scientificamente sostenibile la sicurezza alimentare dei nostri processi produttivi. A tale scopo è stato valutato il comportamento dei patogeni *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Staphylococcus aureus* durante trasformazione e stagionatura di tale formaggio. Sono stati considerati questi microrganismi in quanto risultano essere quelli più spesso coinvolti in episodi di tossinfezioni alimentari causati dai prodotti lattiero-caseari (3), in modo particolare a latte crudo (4).

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici

Per ciascuna specie patogena è stata allestita una miscela di 3 diversi ceppi:

- *Listeria monocytogenes*: ceppo ATCC n. 19115, ceppo IZSLER n. 2007/34985-2 isolato da formaggio, ceppo IZSLER n. 2007/32929-2 isolato da formaggio;
- *Salmonella typhimurium*: ceppo ATCC n. 6994, ceppo IZSLER n. 2008/43259-2 isolato da latte crudo, ceppo IZSLER n. 2007/110870 isolato da prosciutto a base di carne;
- *Escherichia coli* O157:H7: ceppo ATCC n. 35150, ceppo IZSLER n. 2007/181181 isolato da latte, cep-

po IZSLER n. 2006/279534 isolato da burro;

- *Staph. aureus*: ceppo ATCC n. 25973, ceppo IZSLER n. 2008/15547-5 isolato da latte, ceppo IZSLER 2008/20060-1 isolato da latte.

Per la preparazione di ognuno dei ceppi sono state seminate 3 piastre di Agar sangue, poi incubate a 37°C per 24 ore. Le patine batteriche cresciute sono state raccolte mediante lavaggio delle piastre con soluzione fisiologica e 5 mL della soluzione così ottenuta sono stati trasferiti in un fermentatore contenente 1 L di brodo Brain Heart Infusion (BHI). Dopo incubazione in agitazione a 37°C per 24 ore, il brodo è stato centrifugato a 4.000 giri per 1 ora e il pellet formato è stato poi risospeso in 100 mL di soluzione fisiologica.

Modalità di contaminazione

Presso il Laboratorio di Trasformazioni Sperimentali del Reparto di Microbiologia dell'IZSLER è stata eseguita la trasformazione di latte crudo in formaggio Bagöss, nel rispetto della tecnologia tradizionale applicata direttamente dal responsabile di produzione del caseificio Stagnoli Giovanni di Bagolino. Circa 100 L di latte raccolti immediatamente dopo la mungitura e lasciati affiorare 12-36 ore a temperatura ambiente sono stati trasportati presso il laboratorio e trasferiti in caldaia. Mantenendo il latte in continua agitazione, sono state aggiunte le sospensioni di *Listeria*, *Salmonella*, *E. coli* e *Staphylococcus* atte a determinare una contaminazione nominale di 10⁷ ufc/mL. Dopo la contaminazione si è proceduto con le fasi tecnologiche previste dal processo di trasformazione, fino all'estrazione della cagliata e alla messa in forma. Durante tutte le fasi di lavorazione è stata monitorata la temperatura del latte e della cagliata mediante l'utilizzo di Data-logger

(Econorma FT-800/System) con registrazione del dato ogni minuto. La forma è stata poi trasferita in cella di stagionatura (Piardi tecnologie del freddo) presso il Laboratorio di Trasformazioni Sperimentali dell'IZSLER e mantenuta per circa un anno nel rispetto dei parametri di temperatura e umidità indicati dal produttore.

Campionamento e analisi

Un primo campionamento è stato eseguito sul latte crudo prima della contaminazione per valutare le popolazioni lattiche, il pH e un'eventuale presenza di Stafilococchi coagulasi positivi e degli altri patogeni considerati. In seguito sono stati effettuati un prelievo immediatamente successivo all'aggiunta dei patogeni per stimare il livello di contaminazione ottenuto e una serie di campionamenti durante le fasi di cottura ed estrazione della cagliata al fine di valutare l'eventuale effetto delle fasi di trasformazione nel controllo dei patogeni. Altri 14 prelievi sono stati poi eseguiti durante il processo di stagionatura. Su ciascun campione sono state eseguite le seguenti analisi:

- numerazione dei Lattococchi e Lattococchi termofili su piastre di terreno M17 agar incubate in aerobiosi a 30° e 44°C per 48 ore;
- numerazione dei Lattobacilli mesofili o termofili su piastre di MRS agar incubate in microaerofilia a 37° e 44°C per 72 ore;
- numerazione di *Listeria monocytogenes* su piastre di Alca agar incubate in aerobiosi a 37°C per 48 ore (ISO 11290-1:1998/Amd1:2004);
- numerazione di *Salmonella typhimurium* su piastre di Hektoen agar incubate in aerobiosi a 37°C per 24 ore;
- numerazione di *E. coli* O157:H7 su piastre di CT-SMAR agar incubate in aerobiosi a 37°C per 24 ore;
- numerazione di *Staph. aureus* su pia-

stre di Baird Parker agar incubate in aerobiosi a 37°C per 48 ore;

- determinazione del pH mediante strumento con compensazione automatica della temperatura (Hanna Instruments HI 223);

- determinazione dell'acqua libera (A_w) mediante apparecchiatura della ditta Testo 650 con sonda fattore k (T 95).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Analisi chimico-fisiche

I dati registrati tramite l'utilizzo di Data logger hanno evidenziato il raggiungimento di una temperatura massima di 46°C durante la cottura della cagliata. Nella successiva fase di riposo sotto stierò la temperatura della cagliata diminuisce e già dopo 15 minuti risulta inferiore ai 42°C. Pertanto, come sperimentalmente verificato, il trattamento termico della cagliata previsto nel processo di produzione del Bagòss risulta inefficace nel modulare la presenza dei microrganismi contaminanti. Nella **fig. 1** è riportato l'andamento del pH durante le fasi di trasformazione e stagionatura del formaggio, si evidenzia un rapido calo di circa 1 punto dovuto alla presenza di elevate cariche di fermenti lattici: fino ad un valore di circa 5,5 che resta poi costante durante tutta la stagionatura del prodotto. I valori relativi all'attività dell'acqua (**fig. 2**) dimostrano una graduale diminuzione durante tutto il periodo di stagionatura. Il calo dell' A_w è considerato uno dei fattori che concorrono al controllo delle cariche patogene in prodotti a lunga stagionatura come il Bagòss (5,6).

Analisi microbiologiche

Profilo dei fermenti lattici

In **fig. 3** è riportato l'andamento dei la-

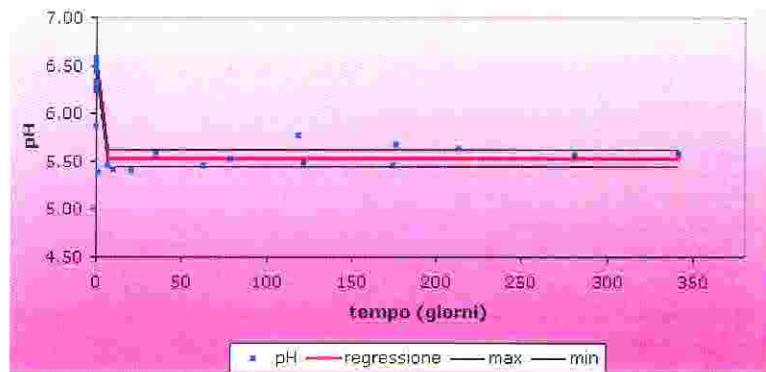


Fig. 1 - Andamento del pH nel Bagòss sperimentalmente contaminato.

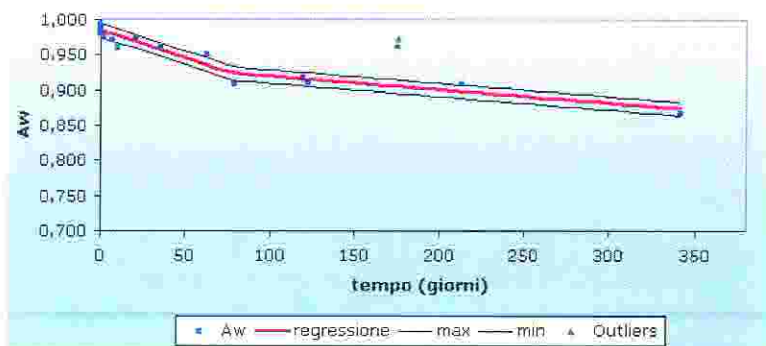


Fig. 2 - Andamento dell'attività dell'acqua nel Bagòss sperimentalmente contaminato.

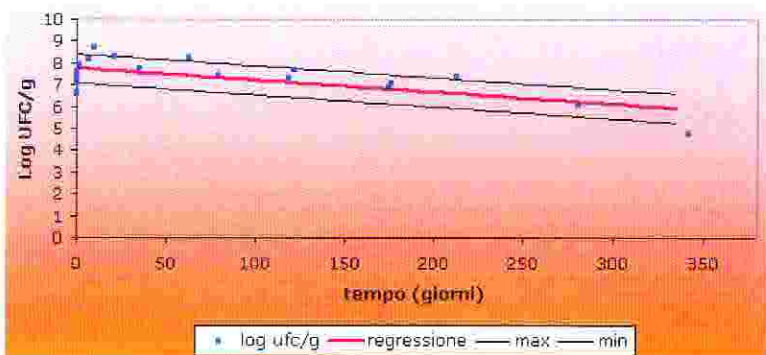
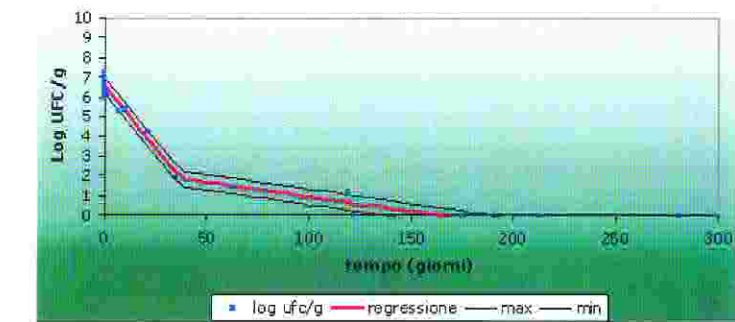


Fig. 3 - Comportamento della popolazione dei Lattobacilli mesofili nel Bagòss sperimentalmente contaminato.

robacilli mesofili. La carica presente inizialmente nel latte è di circa 1×10^7 ufc/mL. Nelle fasi di trasformazione si registra un aumento delle popolazioni lattiche che raggiungono una concentrazione di 8-9 logaritmi intorno al 10° giorno di maturazione, per poi diminuire progressivamente fino a circa 1×10^5 ufc/g al termine della stagionatura. Le altre popolazioni lattiche presentano curve molto simili e per brevità non sono state riportate. Pertanto durante tutto il processo di produzione del Bagòss si evidenzia la presenza di elevate concentrazioni di flore lattiche, popolazioni in grado di esercitare un'azione di competizione nei confronti dei microrganismi patogeni (7,8).

Profilo di *Salmonella typhimurium*

In **fig. 4** è riportato l'andamento di *Salmonella typhimurium*. La curva presenta, rispetto ad un valore iniziale di 10^7 - 10^8 ufc/mL, un rapido calo della concentrazione del patogeno, non associato però alla fase di cottura della cagliata, con tempo di riduzione decimale D, ovvero tempo necessario per evidenziare la diminuzione del 90% di una popolazione microbica, pari a 7 giorni e 23 ore \pm 16 ore nelle prime fasi di stagionatura. Si registra poi un cambio di pendenza della curva intorno al 37° giorno con aumento di D che nella seconda fase risulta 67 giorni e 8 ore \pm 35 giorni e 8 ore (errore standard 0,40). Nell'ultima fase della stagionatura, dal prelievo effettuato al 281° giorno, *Salmonella* non è più rilevabile utilizzando il metodo di numerazione per semina diretta ma è stata evidenziata solamente tramite ricerca (metodo ISO 6579:2002/Cor1:2004), mentre nell'ultimo campionamento (342° giorno) è stato possibile rilevarne la presenza solo tramite metodica PCR. Dunque la concentrazione del patogeno diminuisce di



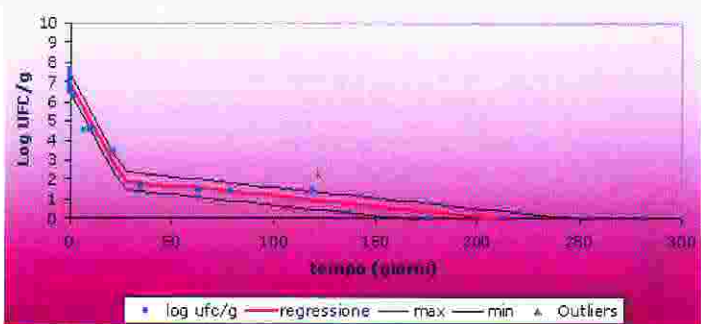
Inoculo iniziale (ufc/mL)	Log (ufc/mL)	Tempo di estinzione		Range (giorni)
		giorni	ore	
10.000.000	7	194	23	(168-222)
1.000.000	6	127	15	(101-154)
100.000	5	80	7	(37-87)
10.000	4	31	23	(29-35)
1.000	3	23	23	(21-27)
100	2	15	23	(13-19)
10	1	7	23	(5-11)

Fig. 4 - Andamento di *Salmonella typhimurium* nel Bagòss sperimentalmente contaminato.

4-5 logaritmi già nei primi due mesi di stagionatura e poi continua, seppur più lentamente, a calare con una riduzione complessiva pari a 7-8 logaritmi nel prodotto a 12 mesi.

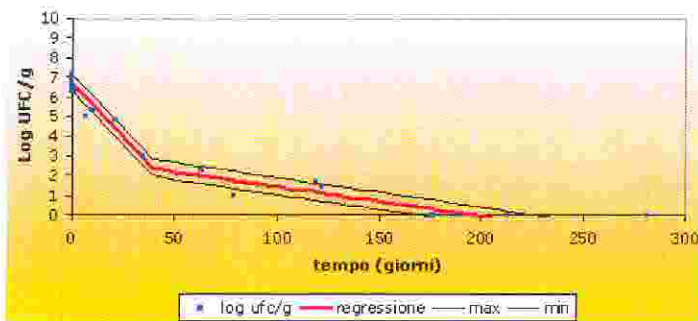
Profilo di *Escherichia coli* O157:H7

La curva relativa all'andamento di *E. coli* O157:H7 (**fig. 5**) presenta, rispetto ad una concentrazione iniziale di 10^7 -



Inoculo iniziale (ufc/mL)	Log (ufc/mL)	Tempo di estinzione		Range (giorni)
		giorni	ore	
10.000.000	7	219	14	(177-263)
1.000.000	6	126	22	(84-170)
100.000	5	34	6	(24-77)
10.000	4	21	9	(19-24)
1.000	3	15	1	(14-19)
100	2	10	17	(8-13)
10	1	5	8	(3-8)

Fig. 5 - Andamento di *Escherichia coli* O157:H7 nel Bagòss sperimentalmente contaminato.



Inoculo iniziale (ufc/mL)	Log (ufc/mL)	Tempo di estinzione		Range (giorni)
		giorni	ore	
10.000.000	7	215	18	(187-245)
1.000.000	6	149	13	(120-179)
100.000	5	83	8	(54-112)
10.000	4	36	17	(33-46)
1.000	3	27	13	(23-32)
100	2	18	8	(14-22)
10	1	9	4	(5-13)

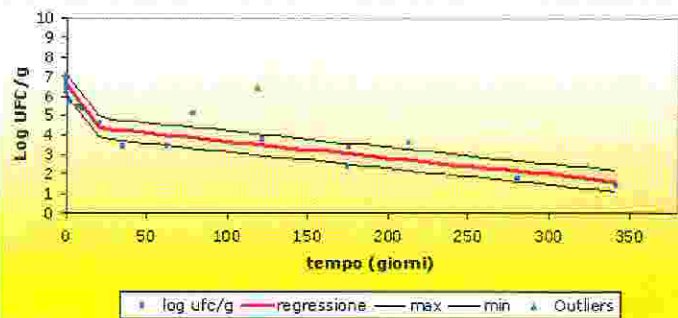
Fig. 6 - Andamento di *Staphylococcus aureus* nel Bagòss sperimentalmente contaminato.

10^8 ufc/mL, una prima fase di rapido decremento con D pari a 5 giorni e 8 ore \pm 14 ore che porta a una riduzione di circa 5 logaritmi della concentrazione del patogeno già nel primo mese di stagionatura. Segue una seconda fase caratterizzata da D pari a 92 giorni e 15 ore \pm 36 giorni e 13 ore (errore standard 0,46). Nell'ultimo prelievo (giorno 342) la presenza del patogeno risulta non più dimostrabile anche utilizzando la metodica PCR.

Profilo di *Staph. aureus*

La fig. 6 riporta la curva di morte di *Staph. aureus* che, rispetto ad una concentrazione iniziale di 10^7 ufc/mL, presenta andamento bifasico con cambio di pendenza stimato a 39 giorni e 20 ore. La prima fase presenta un D pari a 9 giorni e 4 ore \pm 23 ore, mentre la seconda fase ha un D di 66 giorni e 5 ore \pm 22 giorni e 2 ore (errore standard 0,44). Lo *Stafilococco* presenta quindi un andamento simile a quello della *Sal-*

monella, con un abbassamento della concentrazione di 4-5 logaritmi nei primi due mesi di stagionatura e un ulteriore calo in quelli successivi.



Inoculo iniziale (ufc/mL)	Log (ufc/mL)	Tempo di estinzione		Range (giorni)
		giorni	ore	
10.000.000	7	591	19	(528-656)
1.000.000	6	472	15	(409-537)
100.000	5	353	11	(290-417)
10.000	4	234	7	(170-298)
1.000	3	115	3	(51-179)
100	2	19	16	(14-60)
10	1	9	20	(5-15)

Fig. 7 - Andamento di *Listeria monocytogenes* nel Bagòss artificialmente contaminato.

Profilo di *Listeria monocytogenes*

In fig. 7 è riportato l'andamento di *Listeria monocytogenes*: si osserva che il microorganismo, rispetto ad una concentrazione di partenza superiore a 10^7 ufc/mL, presenta inizialmente un rapido decremento caratterizzato da D pari a 9 giorni e 20 ore \pm 2 giorni e 8 ore, ma già dal 21° giorno di stagionatura del prodotto la velocità di morte subisce un netto rallentamento con D pari a 119 giorni e 4 ore \pm 26 giorni e 8 ore (errore standard 0,54). *Listeria* mostra pertanto una maggiore capacità di sopravvivenza nel prodotto rispetto agli altri patogeni analizzati, come evidenziato anche in altri lavori scientifici (9). Considerando tuttavia l'intero periodo di stagionatura del Bagòss si rileva una riduzione della concentrazione del patogeno di 4-5 logaritmi, che può essere considerata comunque sufficiente a soddisfare i requisiti di sicurezza richiesti dai trattati internazionali che attualmente regolano l'esportazione di alimenti (10, 11, 12).

CONCLUSIONI

I dati sperimentali ottenuti analizzando il comportamento dei patogeni artificialmente aggiunti al latte prima della lavorazione permettono di conoscere l'andamento di tali microrganismi nel caso di contaminazioni naturali. Contrariamente a quanto riscontrato in uno studio simile condotto sul Grana Padano DOP (13), le fasi di cottura della cagliata e il successivo riposo sotto stiera non sono sufficienti nel caso del Bogòss a determinare una riduzione significativa della concentrazione dei patogeni considerati. È invece la fase di stagionatura a garantire il controllo delle cariche patogene, grazie all'azione combinata di cambiamenti dello stato chimico-fisico del prodotto come l'abbassamento di pH e A_w , associati alla presenza di elevate concentrazioni di flore lattiche. Relativamente a *Salmonella typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *Staph. aureus* si evidenzia un significativo abbassamento della concentrazione già nelle prime fasi di stagionatura; per una pari riduzione di *L. monocytogenes* si sono dimostrati necessari tempi maggiori, ma comunque comparibili con gli usuali tempi di maturazione di questo formaggio. I 12 mesi minimi di stagionatura previsti dalla metodologia

tradizionale di produzione del Bogòss risultano quindi ampiamente sufficienti a garantire la sicurezza del prodotto nel caso di contaminazione da parte dei più comuni microrganismi patogeni coinvolti in episodi di tossinfezioni alimentari.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Caseificio Stagnoli Giovanni di Bagolino (BS) per il supporto prestato nello svolgimento della presente sperimentazione.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Regolamento CE 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005.
- 2) Regolamento CE 1831/2003 della Commissione del 5 dicembre 2007.
- 3) Ficolini D., Fusco V., Blaiotta G., Sarghini F., Cappola S., "Response of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Staphylococcus aureus* to the thermal stress occurring in model manufactures of Grana Padano cheese". *J. Dairy Sci.* 88: 3818-3825 (2005).
- 4) De Reu K., Debeuckelaere W., Batteldoorn N., De Block J., Herman L., "Hygienic parameters, toxins and pathogen occurrence in raw milk cheeses". *Journal of Food Safety* 22: 183-196 (2002).
- 5) Yulkov P., "Water activity concept for safety food storage". Proceedings of the 3rd Central European Congress of Food, CE Food Organising Committee, Sofia (Bulgaria) 22-24 May 2006, pp. 1-8.
- 6) Fox P.F., Guinee T.M., Cogan M., McSweeney P.L.H., "Fundamentals of cheese science", Gaithor, MD: Aspen Pub, 2000, pp. 207-209.
- 7) Halander I.M., von Wright A., Marilla-Sandholm T.M., "Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria". *Trends in Food Science & Technology*, 8 (5): 146-150 (1997).
- 8) Vandenberg P.A., "Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth". *FEMS Microbiology Reviews*, 12 (1-3): 221-237 (1993).
- 9) Bachmann H.P., Spahr U., "The fate of potentially pathogenic bacteria in Swiss, hard and semi-hard cheeses made from raw milk". *J. Dairy Sci.* 78(3): 476-483 (1995).
- 10) Daminelli P., Bertasi B., Finazzi G., Losio M.N., Ferrari M., Boni P., "Listeria monocytogenes in alimenti ready-to-eat: la normativa comunitaria e la regolamentazione per l'esportazione verso gli USA". *Industria Alimentari XLVI*: 1254-1259 (2007).
- 11) Code of Federal Regulations: Titolo 9, Parte 430, Capitolo III (1-1-05 Edition).
- 12) Proposed regulatory framework for unpasteurized milk products. NZFSA Public Discussion Paper N. 02/09, May 2009.
- 13) Boni P., Daminelli P., Cossiani Cunico E., Manastero P., Bertasi B., Rossi F., Bortolotti L., "Analysis of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and enteritidis and *Staphylococcus aureus* death rate in Grana Padano DOP Cheese". *Veterinary Public Health and Food Safety*, Roma 22: 23/11/2004.



www.bs.izs.it

**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA "Bruno Ubertini"**

REPARTO DI MICROBIOLOGIA

Responsabile Dott. Paolo Boni
Via Bianchi 7/9 - 25124 Brescia
Tel. 030 2290543 - Fax 030 2290556 - E-mail: sivars@bs.izs.it



www.ars-alimentaria.it