

SANIFICAZIONE

Igiene delle attrezzature e degli ambienti di lavoro



Il biofilm è un aggregato di microrganismi che formano sottili pellicole aderenti ad una superficie, determinando un serio e crescente impatto su qualità e sicurezza di alimenti e bevande. In ambito alimentare, costituisce, infatti, un potenziale serbatoio di patogeni, tra i quali: *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* e *Listeria monocytogenes*. Rilevarne la presenza e rimuoverlo è molto complesso, a causa della sua struttura vischiosa difficile da penetrare e della sua forte resistenza ai prodotti sanificanti. In questo dossier, Rosaria Lucchini, ricercatrice presso la Struttura complessa territoriale SCT5-Trento dell'Istituto zooprofilattico sperimentale delle Venezie, Marilena Marino, docente del Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali dell'Università degli Studi di Udine, e Giorgia Spigno, ricercatrice del dipartimento Distas dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza, analizzano rispettivamente l'importanza dell'applicazione di corrette procedure di sanificazione e progettazione dell'impianto di produzione, i nuovi metodi per la riduzione del rischio di contaminazione crociata da biofilm microbici e i sistemi innovativi in studio per rallentare la loro formazione.

60

BIOFILM. L'IMPORTANZA DELLA SANIFICAZIONE – Rosaria Lucchini

66

LOTTA AL BIOFILM. LE STRATEGIE NON CONVENZIONALI – Marilena Marino

71

LOTTA AL BIOFILM. SISTEMI INNOVATIVI IN STUDIO – Giorgia Spigno

Biofilm

L'importanza della sanificazione

Sei le procedure da eseguire in sequenza

di Rosaria Lucchini

Struttura complessa territoriale SCT5-Trento, Istituto zooprofilattico sperimentale delle Venezie

Il biofilm è un aggregato di microrganismi che formano sottili pellicole aderenti ad una superficie, determinando un serio e crescente impatto sulla qualità e sicurezza di alimenti e bevande. Contrastarlo è possibile, applicando corrette procedure di sanificazione e progettazione dell'impianto di produzione, compresa la scelta dei materiali di costruzione, allo scopo di ridurre lo sviluppo

ce esocellulare EPS composta di varie sostanze, tra cui polisaccaridi, proteine, lipidi e acidi nucleici. Tale matrice circonda i batteri e conferisce caratteristiche uniche al biofilm, garantendo l'integrità della comunità microbica, oltre che favorire l'intrappolamento di sostanze nutritive e proteggere la comunità stessa (Figura 1).

Batteri produttori di biofilm (patogeni, contaminanti ambientali o alteranti di alimenti) possono diventare un problema molto grave nell'industria alimentare, poiché il biofilm conferisce loro resistenza alle condizioni ambientali avverse, li protegge dai comuni agenti sanificanti e consente loro di rimanere sulle superfici anche dopo i trattamenti igienizzanti.

Come descritto nella review di Coughlan¹, in assenza o scarsa disponibilità di nutrienti o in ambienti stressanti, alcuni germi sviluppano biofilm più spessi e più complessi rispetto a quelli prodotti in situazioni di crescita normali. È stato anche verificato che proprio la numerosità di cellule e, quindi, la velocità di formazione di biofilm in condizioni di crescita sfavorevoli risultano maggiori. Tali capacità, inoltre, sono geneticamente codificate e espresse da specifici ceppi batterici opportunamente stimolati. Non è noto completamente

Il biofilm è rappresentato da comunità microbiche derivanti dall'adesione a superfici solide di microrganismi capaci di produrre una matri-

¹ Coughlan, L.M., Cotter, P.D., Hill, C. e Alvarez-Ordóñez, A. (2016). *New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio)control of bacterial biofilms in the food industry*. *Frontiers in microbiology*. Doi: 10.3389/fmicb.2016.01641.

il complesso processo della formazione del biofilm batterico, né tanto meno i fattori predisponenti e, quindi, i fattori limitanti: per questo non sono noti agenti capaci per certo di eliminare il biofilm o di evitarne la formazione. Tuttavia, si sa che mediatori chimici, sostanze di diversa natura sintetizzate dagli "abitanti" del biofilm, sono basilari per la sua produzione e sono coinvolti nell'organizzazione della comunità microbica e nello sviluppo e nella maturazione del biofilm stesso (*quorum sensing*). Sulla base di queste conoscenze, si stanno studiando meccanismi d'azione per inibire la loro azione (*quorum quenching*), nel tentativo di contrastare la formazione del biofilm, fino a favorirne la disgregazione, come provato da Kim *et al.*² e da altri numerosi studiosi.

Il biofilm nell'industria lattiero-casearia

Nell'industria alimentare, la sopravvivenza e la persistenza di microrganismi sulle superfici a

contatto con gli alimenti, quali banchi di lavoro, tubature, caldaie, cisterne di conservazione, nastri trasportatori, affettatrici e altro, possono compromettere la sicurezza alimentare e la qualità delle produzioni. I biofilm possono essere costituiti da vari tipi di microrganismi e quindi agire da *reservoir* di microrganismi patogeni potenziali agenti di tossinfezione alimentare.

Nell'industria lattiero-casearia è nota un'ampia varietà di microrganismi termofili e psicrofili capaci di colonizzare le attrezzature e le superfici di lavoro lungo tutto il processo. Per esempio, le spore di *Bacillus cereus* sono in grado di aderire alla superficie di lavoro (come all'interno della cisterna o nelle tubature del latte) e possono creare film condizionante, che favorisce l'adesione successiva di cellule batteriche accidentalmente introdotte nell'impianto di lavorazione. Spesso le procedure di sanificazione sono sviluppate per contrastare la presenza di cellule batteriche planctoniche (cioè le forme circolanti), ma talvolta risultano inefficaci contro le forme sessili (cioè le cellule batteriche adese alla superficie).

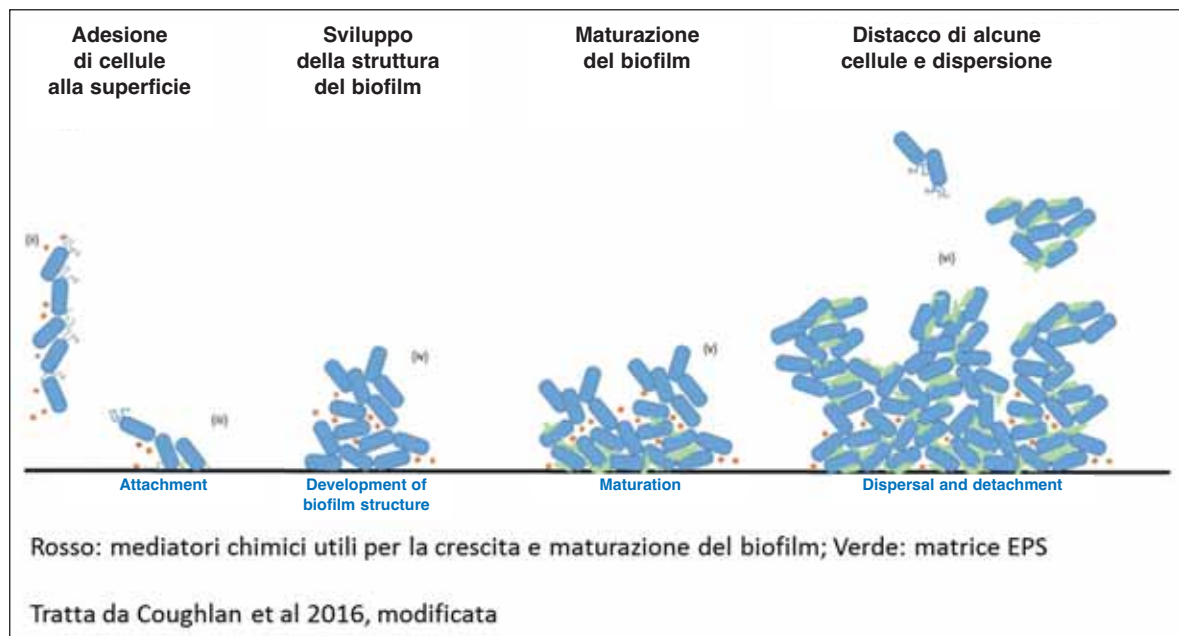


Figura 1 – Il biofilm è rappresentato da comunità microbiche derivanti dall'adesione a superfici solide di microrganismi capaci di produrre una matrice esocellulare EPS, che garantisce l'integrità della comunità microbica e favorisce l'intrappolamento di sostanze nutritive.

² Kim, S.H., Park, C., Lee, E.J., Bang, W.S., Kim, Y.J., Kim, J.S. (2017). *Biofilm formation of Campylobacter strains isolated from raw chickens and its reduction with DNase I treatment*. Food Control. Doi: 10.1016/j.foodcont.2016.06.38

Pseudomonas spp. sono comuni batteri ambientali che vivono e si moltiplicano a basse temperature e spesso sono isolati anche nell'industria del latte.

Si moltiplicano e sviluppano biofilm producendo colonie molto numerose, per esempio nelle vasche di refrigerazione per la conservazione del latte e nelle tubature per il trasporto del latte e dell'acqua.

Nell'industria alimentare, la sopravvivenza e la persistenza di microrganismi sulle superfici a contatto con gli alimenti possono compromettere la sicurezza alimentare e la qualità delle produzioni

Possono inoltre produrre enzimi proteolitici e lipolitici resistenti al trattamento termico, principali responsabili del decadimento organolettico del latte UHT, e biofilm multispecie in associazione con altri microrganismi, alcuni patogeni come *Listeria monocytogenes*. Va infatti ricordato che in natura e nell'industria alimentare generalmente i biofilm sono multispecie, a differenza dei biofilm monospecie prodotti e studiati in laboratorio. La convivenza in comunità multispecie è molto vantaggiosa poiché fornisce maggiore protezione e promuove maggior resistenza nei confronti di sostanze antibatteriche e di avverse condizioni ambientali, rispetto ai biofilm monospecie.

Parola d'ordine: sanificare

Come ricorda Coughlan nella sua *review*, la lotta al biofilm si esercita mediante applicazione di corrette procedure di sanificazione (pulizia e disinfezione) e progettazione dell'impianto di produzione, compresa la scelta dei materiali di costruzione, allo scopo di ridurre lo sviluppo.

La miglior strategia per eradicare i biofilm bat-

terici dalle aree di lavorazione degli alimenti consiste nel prevenirne la formazione, in particolare evitare l'instaurarsi delle condizioni predisponenti soprattutto nelle aree più critiche (aree di confezionamento, pastorizzazione, affettatura o porzionatura e confezionamento di alimenti pronti per il consumo). Tuttavia, è da considerare che nelle industrie alimentari, a parte alcune aree bianche e in linee produttive molto particolari, l'ambiente comunemente non è sterile, per cui le misure adottate mirano a ridurre il numero di batteri pericolosi sulle superfici e la presenza di biofilm nelle aree di produzione.

Le procedure di sanificazione sono condotte giornalmente in tutte le aziende alimentari, dalle grandi industrie alle microimprese, proprio con lo scopo di rimuovere lo sporco, la contaminazione batterica e prevenire forme persistenti nelle aree di lavorazione alimenti.

Ecco l'importanza delle procedure di sanificazione, che devono essere predisposte appositamente per l'azienda alimentare, tenendo conto della natura di materie prime, lavorazioni, attrezzature e ambienti, devono essere applicate correttamente da personale qualificato e devono integrarsi nel layout produttivo, al fine di prevenire l'introduzione di microbi non desiderati nelle aree di produzione, confezionamento e spedizione/vendita.

Non si deve dimenticare che le procedure di sanificazione devono comprendere sempre sei fasi, da svolgere in sequenza:

- rimozione dello sporco grossolano;
- lavaggio con detergenti idonei per gli alimenti e i materiali delle superfici e attrezzature;
- risciacquo con acqua potabile;
- applicazione di disinfettante scelto in funzione della contaminazione batterica da contrastare;
- risciacquo con abbondante acqua potabile;
- asciugatura.

Sebbene molti prodotti sanificanti possiedono l'azione combinata di detergente e disinfettante, la bibliografia scientifica suggerisce che per aumentare l'azione di rimozione/contenimento dei biofilm batterici sia importante tenere separati i processi di detersione e sanifi-

cazione con una fase di risciacquo intermedio. L'ultimo risciacquo svolto con acqua bollente contribuisce ad allontanare residui di prodotti di pulizia e sanifica per azione del calore. La sanificazione, quindi, deve incorporare sempre un processo meccanico, che contribuisce alla rimozione dello sporco e di eventuali film batterici, uno chimico e uno termico ad azione antimicrobica.

Per aumentare l'azione di rimozione/contenimento dei biofilm batterici è importante tenere separati i processi di deterzione e sanificazione con una fase di risciacquo intermedio

I detergenti possono essere applicati per immersione, in forma di schiuma o aerosol spray, ma è sempre necessario rispettare l'appropriata concentrazione e l'adeguato tempo di contatto con le superfici, oltre che la temperatura, come indicato nelle istruzioni, al fine di assicurare un'efficace azione. Sono comunemente utilizzati prodotti alcalini o acidi. I primi hanno dimostrato di agire con successo nella rimozione di biofilm da *Pseudomonas putida* da superfici di acciaio inox.

Anche nella fase di disinfezione è necessario rispettare la temperatura di esercizio e il tempo di contatto tra soluzione disinfettante e superficie, al fine di massimizzare l'effetto biocida. Coughlan conferma che i più comuni disinfettanti utili a contenere o ridurre la persistenza di biofilm sulle superfici dell'industria alimentare sono: perossido di idrogeno, ipoclorito di sodio (varechina), ozono e acido peracetico.

È altrettanto noto che l'applicazione regolare delle procedure di sanificazione tende a ridurre la popolazione microbica e a eliminare forme batteriche non desiderate, ma spesso non garantisce la rimozione del film maturo. Oltre tutto, l'uso di disinfettanti in presenza di biofilm può contribuire alla selezione di forme mi-

crobiche resistenti. È stato dimostrato, infatti, che i batteri residenti nella comunità batterica del biofilm presentano resistenze al processo di sanificazione fino a 100-1000 volte maggiori rispetto agli stessi batteri che vivono in soluzione, non adesi alla superficie, e che l'azione ossidante di perossido di idrogeno o ozono agisce inibendo la formazione di biofilm da *Vibrio* spp, negli impianti di lavorazione, trasformazione e distribuzione di prodotti ittici. L'acido peracetico è noto essere attivo contro i biofilm di *Listeria monocytogenes*.

In alcune sperimentazioni l'associazione di due o più composti disinfettanti ha consentito di dimostrare l'efficacia, per esempio, di perossido di idrogeno e ipoclorito di sodio nel rimuovere matrice EPS e biofilm costituito da *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. La miscela di ipoclorito di sodio e un sale di ammonio quaternario (comune disinfettante) risulta essere molto efficace nei confronti di biofilm da *Bacillus cereus*.

Studi recenti dimostrano l'efficacia dell'utilizzo di detergenti contenenti enzimi usati per migliorare la rimozione di biofilm batterici, degradando i composti della matrice EPS, favorendo la separazione delle cellule batteriche tra loro e, quindi, indebolendo l'integrità del biofilm e portandolo a disgregazione. Il disinfettante, applicato successivamente, può così agire direttamente sulle cellule batteriche non più immerse nella matrice del biofilm e, pertanto, svolgere la propria azione.

È quindi necessario conoscere i meccanismi alla base dello sviluppo di biofilm per poter progettare strategie finalizzate a impedirne la formazione e per rimuovere quello maturo.

Per poter progettare strategie finalizzate a impedire la formazione di biofilm e per rimuovere quello maturo, è necessario conoscere i meccanismi alla base del suo sviluppo

Lotta al biofilm

Le strategie non convenzionali

Si tratta di metodiche basate sostanzialmente sulla prevenzione

di *Marilena Marino*

Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali, Università degli Studi di Udine

**Nuove armi
per combattere
i vecchi nemici:
metodi innovativi
per la riduzione del rischio
di contaminazione crociata
da biofilm microbici
sulle superfici**

Nella moderna produzione alimentare è considerato un prerequisito fondamentale, da cui non si può prescindere, la riduzione al minimo del rischio di contaminazione e conseguente alterazione degli alimenti: ciò si può ottenere attraverso un'efficace rimozione dei batteri vegetativi o delle loro spore, nonché dei lieviti e delle muffe che possono aderire alle superfici di attrezzature per la lavorazione e la movimentazione dei prodotti, e successivamente entrare a contatto con gli alimenti.

I trattamenti termici tradizionali effettuati per sanificare le superfici, basati, ad esempio, sullo scorrimento di acqua calda nelle tubature oppure sull'utilizzo di vapore acqueo, richiedono in genere un elevato consumo di energia e tempi di trattamento considerevolmente lunghi. In tutti questi casi, inoltre, è necessario che tutte le

parti sottoposte a trattamento, compresi raccordi, valvole e guarnizioni, siano fatti di materiali con un'adeguata resistenza termica. D'altro canto, la sanificazione convenzionale effettuata per via chimica e/o meccanica tende a essere eccessivamente aggressiva dal punto di vista dell'impatto ambientale e impegnativa in termini di tempo, nonché rischiosa per la salute, in quanto sulle superfici trattate possono rimanere dei residui di sanificante che potrebbero entrare a contatto con gli alimenti.

Per queste ragioni, la ricerca mette costantemente a disposizione dell'industria strategie nuove per la riduzione del rischio che i biofilm microbici diventino causa di contaminazione crociata da microrganismi patogeni o potenzialmente alteranti. Tali strategie si basano sostanzialmente sulla prevenzione della formazione dei biofilm attraverso l'utilizzo di materiali appositamente modificati nonché sull'inattivazione dei biofilm attraverso approcci enzimatici, chimici, biologici e fisici.

Superfici modificate

Negli ultimi decenni, i ricercatori hanno rivolto l'attenzione verso lo sviluppo di superfici antibatteriche finalizzate a ridurre il rischio di formazione del biofilm. Esistono due categorie princi-

pali di superfici: quelle che prevengono la formazione di biofilm uccidendo i microrganismi (materiali attivi) e quelle che impediscono l'adesione dei microrganismi alle superfici stesse (materiali passivi).

Tra i materiali attivi si possono elencare quelli che contengono:

- polimeri cationici (ad esempio, il chitosano e la polietilenimina): materiali carichi positivamente che interagiscono con la membrana cellulare microbica, carica negativamente, e di conseguenza uccidono i microrganismi;
- peptidi antimicrobici: molecole naturali di varia origine, che distruggono le membrane dei microrganismi uccidendoli;
- antibiotici, che inattivano i microrganismi esattamente come avviene in terapia medica;
- argento e suoi derivati, rame e suoi derivati e ossido nitrico, che uccidono i batteri attraverso diversi meccanismi.

Tra i materiali passivi, invece, si trovano:

- polietilenglicol (PEG) e suoi derivati, che possono ridurre l'adesione batterica fino al 99,7%;
- polimeri zwitterionici e derivati, che contengono molti gruppi funzionali carichi positivamente o negativamente e che hanno dimostrato di poter resistere all'adesione di *Pseudomonas* fino a 240 ore a 25 °C;
- nuovi polimeri, che inibiscono l'adesione microbica grazie a particolari caratteristiche di idrofobicità o rugosità.

Entrambi i tipi di materiali hanno dimostrato di essere efficaci come strategia anti-biofilm, anche se difficilmente possono raggiungere il 100% di riuscita proteggendo le superfici in modo permanente; hanno dimostrato, invece, di poter ritardare, piuttosto che completamente impedire, la formazione di biofilm.

Nuove strategie chimiche

L'ozono è un sanificante che può essere utilizzato su superfici difficilmente accessibili. È infatti un forte ossidante e si è dimostrato molto

efficace nel disaggregare la matrice che ricopre il biofilm, liberando le cellule e inattivandole anche a concentrazioni basse. Nella forma gassosa, l'ozono ha una blanda attività antimicrobica nei confronti dei biofilm di *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria monocytogenes*, mentre è molto più efficace in forma acquosa (ozono generato direttamente in acqua o fatto gorgogliare in acqua).

L'ozono è un sanificante che può essere utilizzato su superfici difficilmente accessibili e che si è dimostrato molto efficace nel disaggregare la matrice che ricopre il biofilm

L'acqua elettrolizzata, prodotta dall'elettrolisi di una soluzione acquosa di cloruro di sodio in acido ipocloroso e idrossido di sodio, ha riscosso notevole interesse come sanificante efficace, che trova applicazione in medicina, agricoltura e nell'industria alimentare. Essa possiede una forte attività antimicrobica e anti-biofilm, con effetto sui principali agenti patogeni di origine alimentare. Ad esempio, un biofilm di *Listeria monocytogenes* su acciaio inossidabile è stato inattivato usando acqua elettrolizzata, anche se in presenza di sostanza organica. Gli svantaggi di questa tecnica sono l'instabilità della sostanza, che porta a perdita di efficacia dopo un breve periodo.

Anche l'utilizzo di estratti vegetali naturali rappresenta una potenziale arma per combattere i biofilm, tanto più che questi composti sono generalmente non tossici e con una percezione generalmente positiva da parte del consumatore, quindi completamente accettabili. Gli estratti di piante non solo possiedono attività antimicrobica, ma hanno anche proprietà anti-biofilm. Alcuni studi hanno dimostrato la capacità di erbe eduli e piante medicinali, quali, ad esempio, la citronella, di inibire il biofilm di *Listeria monocytogenes*. Anche gli oli essenziali,

che sono composti fenolici volatili prodotti come metaboliti secondari da piante aromatiche come timo, citronella e origano, possiedono proprietà antimicrobiche e anti-biofilm.

Enzimi

I detergenti a base enzimatica vengono utilizzati per migliorare l'efficacia dei disinfettanti nei confronti dei biofilm microbici. Gli enzimi possono colpire il biofilm a livello della matrice, rendendola più flessibile e rompendola, oppure possono innescare azioni di rilascio delle cellule avvolte dal biofilm, rendendole quindi più facilmente attaccabili dai disinfettanti. La funzione principale degli enzimi è in generale quella di degradare i lipidi, i carboidrati e i componenti del DNA presenti nella matrice del biofilm, causando una rapida distruzione dell'integrità del biofilm.

I disinfettanti possono quindi agire in modo più efficace per uccidere le cellule incorporate nella matrice del biofilm.

Gli enzimi comunemente impiegati includono proteasi, cellulasi, polisaccaride-depolimerasi, alginato liasi, dispersin B e DNAsi. Quando si utilizzano prodotti a base di enzimi, si deve considerare la possibile interazione degli stessi con prodotti o residui alimentari, che potrebbero comprometterne l'attività. La combinazione di enzimi proteolitici con tensioattivi aumenta la bagnabilità dei biofilm e di conseguenza può migliorare l'efficienza della sanificazione.

La specificità nella modalità d'azione degli enzimi li rende di difficile applicazione, in quanto risulta problematico identificare quelli efficaci contro tutti i diversi tipi di biofilm. Le formulazioni contenenti diverse tipologie di enzima sembrano essere una strategia fondamentale per il controllo dei biofilm. Va detto che l'uso di enzimi nel controllo dei biofilm è ancora

piuttosto limitato anche a causa dei bassi prezzi dei prodotti chimici rispetto al costo degli enzimi. In effetti, la tecnologia e la produzione degli enzimi e dei detergenti a base di enzimi sono per lo più protetti da brevetti. Inoltre, anche la ridotta accessibilità commerciale dei prodotti enzimatici ne limita l'uso.

Strategie biologiche

I batteriofagi (virus dei batteri) sono killer naturali dei batteri e per questa ragione sono potenzialmente utilizzabili nella lotta ai batteri nel contesto alimentare. Sebbene identificati più di cento anni fa, l'interesse per i fagi si è riaperto solo recentemente in seguito all'aumento dell'incidenza dell'antibiotico-resistenza tra i batteri.

L'utilizzo dei fagi nel contesto alimentare include la decontaminazione delle carcasse di carne dopo la macellazione e l'inattivazione mirata di batteri patogeni e deterioranti sulle superfici a contatto con gli alimenti, nonché sulle superfici di prodotti pronti per il consumo e durante il confezionamento e lo stoccaggio. Per quanto riguarda i biofilm, essi sono in grado di penetrare nella matrice e diffondersi attraverso il biofilm maturo e, una volta dentro, esprimere le loro proprietà antibatteriche. Seb-



I detergenti a base enzimatica vengono utilizzati per migliorare l'efficacia dei disinfettanti nei confronti dei biofilm microbici.

bene da un punto di vista terapeutico i batteriofagi si siano dimostrati piuttosto efficaci, nel settore alimentare ci sono alcune problematiche che ne limitano l'utilizzo e che sono legate, ad esempio, alla composizione e alla struttura del biofilm, alla temperatura e alla presenza di residui alimentari.

Esiste una notevole quantità di studi scientifici condotti sulla capacità dei batteriofagi di inattivare *Listeria monocytogenes* e attualmente esistono due prodotti commerciali approvati per uso alimentare fin dal 2006.

Per quanto riguarda i biofilm, la maggior parte delle ricerche riporta una riduzione minima del 90% della vitalità cellulare, anche se permangono dubbi circa la capacità di questi prodotti di agire nelle fessurazioni dei materiali.

Un altro strumento di origine biologica che può essere utilizzato come arma per combattere i biofilm è costituito dalle batteriocine, sostanze termostabili prodotte da alcuni batteri e che sono in grado di uccidere altri batteri. Sembra che la maggior parte dei batteri produca almeno una batteriocina e i batteri lattici sono noti per essere produttori prolifici di questi composti.

Tra le batteriocine ad oggi più caratterizzate e di successo c'è la nisina, una batteriocina attiva contro *Listeria monocytogenes* e il cui uso è stato approvato negli alimenti. Gli studi relativi alla possibilità di utilizzare le batteriocine per inattivare i biofilm microbici stanno dando risultati promettenti.

Approcci fisici

Diverse strategie di tipo fisico possono essere utilizzate per ridurre il rischio di biofilm microbici nel contesto alimentare, apportando un miglioramento dei protocolli di sanificazione. Ad esempio, il ghiaccio secco può essere utilizzato per rimuovere dalle superfici il particolato e le impurità solide: in questo processo si utilizza un getto ad alta velocità di particelle di una specifica dimensione di anidride carbonica allo stato solido, che rimuove le impurità principalmente per effetto meccanico e per un blando effetto di scioglimento.

L'*ice-pigging* è una procedura in cui una mi-

sceia ghiaccio/acqua è forzata a passare attraverso tubi, scambiatori di calore o altre attrezzature.

Un altro metodo fisico di pulizia, utilizzato principalmente nel contesto della filtrazione a membrana, consiste nell'utilizzo degli ultrasuoni, molto efficaci nella riduzione del biofilm e nella stabilizzazione del flusso di permeato. I trattamenti a plasma freddo sono un'altra promettente tecnologia per la pulizia e disinfezione di superfici.

Sono diverse le strategie di tipo fisico che possono essere utilizzate per ridurre il rischio di biofilm microbici nel contesto alimentare, apportando un miglioramento dei protocolli di sanificazione

Conclusioni

I biofilm batterici sono un dato di fatto e sono onnipresenti in natura, e gli ambienti di lavorazione degli alimenti non sono esenti dalla loro presenza. L'industria alimentare li ha definitivamente riconosciuti come un problema emergente quasi 30 anni fa, sottolineando la necessità di sviluppare, testare e valutare metodi nuovi ed innovativi per combatterli.

L'industria alimentare ha fatto molta strada dalla prima ammissione del problema, ma deve continuare a investire sullo sviluppo di nuovi protocolli per la pulizia e la sanificazione basati su una conoscenza accurata delle aree più inclini alla formazione di biofilm.

L'industria dovrebbe anche investire nella ricerca di base, per approfondire la conoscenza dei meccanismi molecolari e cellulari che causano la formazione di biofilm: tale conoscenza potrà condurre all'applicazione di nuovi protocolli e alla messa a punto di nuovi materiali, il che alla fine potrà ridurre al minimo il problema della formazione di biofilm nel contesto alimentare, prevenendo così le contaminazioni e salvaguardando la salute del consumatore.

Lotta al biofilm

Sistemi innovativi in studio

Ancora necessaria un'attività di ricerca di medio o lungo periodo

di *Giorgia Spigno*

Dipartimento di Scienze e Tecnologie alimentari per una filiera agroalimentare sostenibile (DiSTAS),
Università Cattolica del Sacro Cuore

Le esigenze di sostenibilità richiedono lo sviluppo di approcci innovativi ed eco-sostenibili per la pulizia e sanitizzazione degli ambienti e degli impianti industriali. Alcune strategie percorribili

I primi anni di ricerca di chi scrive sono stati dedicati allo studio e sviluppo di bioreattori per la degradazione di composti inquinanti in fase gassosa e liquida¹. Nei bioreattori, l'obiettivo è quello di raggiungere lo sviluppo di un biofilm compatto, stazionario ed in grado di sopravvivere anche in condizioni ambientali avverse, soprattutto in termini di scarsità di substrato di crescita.

In tutti gli ambienti e sistemi destinati a contenere o lavorare alimenti, compresi quindi pareti,

serbatoi ed impianti, invece, lo sviluppo di biofilm stabili è uno degli eventi più temuti. I biofilm, infatti, sono molto difficili da rimuovere in quanto, al loro interno, i microorganismi presentano una maggiore resistenza, diventando così una pericolosa fonte di contaminazione alimentare.

I processi di detergenza e sanitizzazione nell'industria alimentare sono di primaria importanza per evitare la formazione di biofilm. Questi processi utilizzano generalmente diverse tecniche chimiche e fisico-chimiche, alcune delle quali, però, presentano numerosi svantaggi in termini di costi, residui chimici, bassa efficienza, impatto negativo sugli alimenti e sull'ambiente. Anche in questo settore, le sempre più imperative esigenze di sostenibilità richiedono lo sviluppo di approcci innovativi ed eco-sostenibili per la pulizia e sanitizzazione degli ambienti e degli impianti. Questi approcci comprendono la ricerca e messa a punto di tensioattivi e biocidi naturali di provata efficacia (a bassi dosaggi, ma privi di effetti di tossicità per l'uomo e l'ambiente e che non svilup-

¹ Spigno, G., De Faveri, D.M. (2005). *Modeling of a vapor-phase fungi bioreactor for the abatement of hexane: Fluid dynamics and kinetic aspects*. Biotechnology and Bioengineering, 89(3), 319-328.

pino resistenza al principio attivo nei microrganismi), ma anche lo studio di nuovi materiali resistenti all'adesione e allo sviluppo di biofilm.

Lievito *Saccharomyces cerevisiae*

È noto come gli stessi microorganismi siano in grado di produrre delle sostanze tossiche per altri microorganismi, che potrebbero essere sfruttate come biocidi naturali. Ad esempio, il lievito *Saccharomyces cerevisiae* è in grado di esercitare un'azione antagonista nei confronti di altri lieviti e batteri durante la fermentazione alcolica del vino, grazie alla secrezione di peptidi antimicrobici (AMPs) derivati dall'enzima glicolitico gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi, un enzima che oltre al ruolo glicolitico può, in realtà, svolgere diverse attività in funzione dell'origine e del contesto.

Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* è in grado di esercitare un'azione antagonista nei confronti di altri lieviti e batteri durante la fermentazione alcolica del vino

Branco *et al.* (2017)² hanno studiato una frazione di AMPs (saccaromicina) prodotta da un ceppo di *S. cerevisiae*, confrontandola con le due frazioni bioattive identificate e sintetizzate in laboratorio. I risultati hanno mostrato una maggiore attività antimicrobica della frazione nativa rispetto alle due frazioni di sintesi, ma anche un'azione coniugata di queste ultime. La frazione attiva, ma non le equivalenti di sintesi, è inoltre risultata attiva a pH 3.5, suggerendo che nel biocida naturale si formino degli

aggregati di diversi peptidi solubili in ambienti acidi. Il meccanismo alla base della morte cellulare osservata su lieviti non-*Saccharomyces* coinvolge un'interazione degli AMPs con le membrane cellulari che diventano più permeabili, permettendo agli AMPs di traslocare attraverso la membrana e agire su bersagli citoplasmatici (DNA, RNA, proteine cellulari). La presenza di cationi metallici può favorire l'azione antimicrobica degli AMPs anionici, promuovendone il legame con la parete cellulare di carica negativa.

Altri biocidi naturali possono, invece, non essere di origine batterica, ma derivare da fonti vegetali, come il caso degli oli essenziali.

Biocidi di sintesi a confronto con biocidi a base naturale

Lo studio di Gomes *et al.* (2016)³ ha confrontato alcuni biocidi di sintesi comunemente impiegati (glutaraldeide, acido peracetico, cloruro di benzalconio e ortoftaldeide) con tre biocidi a base naturale derivanti dal metabolismo secondario di vegetali: cuminaldeide (dal cumino), eugenolo (da olio essenziale di aglio) e indolo-3-carbinolo (da crocifere). Il confronto è stato basato sull'efficacia disinfettante di superfici di silicone o acciaio inossidabile inoculate con ceppi di *Staphylococcus aureus*. Come prevedibile, è stato più semplice disinfettare l'acciaio rispetto al silicone, materiale più poroso, che facilita l'adesione dei microorganismi. Nel caso dell'acciaio, i biocidi naturali sono risultati efficaci alle concentrazioni tipiche d'uso per i biocidi tradizionali, mentre, nel caso del silicone, l'unico biocida promettente è risultato il carbinolo. Tuttavia, il meccanismo di azione dell'eugenolo, basato sulla permeabilizzazione aspecifica delle membrane citoplasmatiche, lo rende comunque interessante per applicazioni di disinfezione nonostante l'efficacia solo ad alte concentrazioni.

² Branco, P., Francisco, D., Monteiro, M., Almeida, M.G., Caldeira, J., Arneborg, N., Prista, C., Albergaria, H. (2017). *Antimicrobial properties and death-inducing mechanisms of saccharamycin, a biocide secreted by Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology & Biotechnology, 101, 159-171.

³ Gomes, I.B., Malheiro, J., Mergulhão, F., Maillard, J.-Y., Simões, M. (2016). *Comparison of the efficacy of natural-based and synthetic biocides to disinfect silicone and stainless steel surfaces*. FEMS Pathogen and Disease, 74, ftw014.

Isoeugenolo e chitosano

L'isoeugenolo, a differenza della maggior parte degli oli essenziali, è più efficace contro batteri Gram-negativi rispetto ai Gram-positivi. La sua azione consiste in una destabilizzazione delle membrane attraverso un'azione reversibile simile a quella dei detergenti che aumentano la fluidità delle membrane. Da questo punto di vista, i Gram-negativi sono più sensibili perché l'isoeugenolo può agire sia sulle membrane interne che esterne. Le membrane dei Gram-negativi, inoltre, consistono essenzialmente in fosfolipidi zwitterionici, mentre quelle dei Gram-positivi in fosfolipidi anionici.

L'utilizzo di chitosano non ha portato ad alcun effetto addizionale a causa della formazione di aggregati che ostacola l'interazione con il biofilm

Come tutti gli oli essenziali, però, anche l'isoeugenolo presenta elevata volatilità e limitata solubilità in ambienti acquosi, per cui è necessario sviluppare delle formulazioni che ne aumentino la stabilità prima dell'impiego e l'efficacia al momento dell'uso. Nielsen *et al.* (2017)⁴ hanno studiato la formulazione di isoeugenolo sotto forma di emulsione acquosa (con un amido modificato e con sciroppo di glucosio) e successivo incapsulamento mediante essiccamento spray con chitosano. L'emulsione, incapsulata e non, è stata testata per l'attività antimicrobica contro biofilm di alcuni tipici patogeni alimentari (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* e *Leuconostoc mesenteroides*) sia

in terreno di crescita sintetico, sia in succo di carota (come alimento modello). L'incapsulamento ha, in effetti, permesso di aumentare l'efficacia dell'emulsione su biofilm di Gram-positivi, favorendo l'interazione dell'isoeugenolo incapsulato con la matrice biofilm. Il maggiore effetto si è avuto, però, solo su terreno sintetico e non in succo di carota, probabilmente per il pH più acido di quest'ultimo.

L'utilizzo di chitosano, a sua volta noto per le attività antimicrobiche, non ha portato ad alcun effetto addizionale a causa della formazione di aggregati che ostacola l'interazione con il biofilm. Un altro risultato molto interessante di questo studio è stato che l'aggiunta di un tensioattivo ad uso alimentare (Tween 80) con l'obiettivo di migliorare la dispersione dell'isoeugenolo idrofobico in acqua e, quindi, la sua efficienza, ha ridotto l'attività antimicrobica. Le possibili cause sono una eccessiva solubilizzazione del principio attivo, che ne previene la penetrazione nelle membrane cellulari, oppure un effetto del tensioattivo sulle proteine di membrana rese più idrofiliche e, quindi, meno capaci di interagire con l'olio essenziale.

Acqua elettrolizzata

Un'altra tecnologia innovativa sempre più studiata è quella che prevede l'impiego di acqua elettrolizzata (*electrolyzed water* (EW), prodotta a partire da NaCl e acqua distillata) come agente sia pulente, sia sanificante⁵. La EW non ha effetti tossici sull'uomo (salvo ingestione e contatto con gli occhi), ma è attiva contro un ampio spettro di batteri senza associato sviluppo di resistenza e senza effetti sensoriali sugli alimenti.

Ci sono, ovviamente, degli svantaggi in termini di investimento iniziale per le attrezzature necessarie, velocità di perdita del potere antimicrobico o effetto corrosivo in caso di impiego di EW acida.

⁴ Nielsen, C.K., Kjems, J., Mygind, T., Snabe, T., Schwarz, K., Serfert, Y., Meyer, R.L. (2017). *Antimicrobial effect of emulsion-encapsulated isoeugenol against biofilms of food pathogens and spoilage bacteria*. International Journal of Food Microbiology, 242, 7-12.

⁵ Stoica, M. (2018). *Sustainable sanitation in the food industry*. In: Sustainable Food Systems from Agriculture to Industry – Improving Production and Processing, Ed. C. Galanakis, Academic Press.

L'acqua elettrolizzata è attiva contro un ampio spettro di batteri, senza associato sviluppo di resistenza ed effetti sensoriali sugli alimenti

In Europa, la EW può essere applicata solo per l'acqua potabile mentre l'impiego su prodotti alimentari quali carne e pesce non è consentito per la sua capacità di inattivazione proteica.

Strategie "green"

Infine, come anticipato, una delle altre frontiere nello sviluppo di strategie "green" di sanificazione lavora sulla messa a punto di nuovi materiali resistenti all'adesione e allo sviluppo di biofilm. Alcuni esempi dalla letteratura riportano la produzione di materiali plastici oleofinici (a base di polietilene ad alta densità) antibatterici grazie ad una combinazione di proprietà biocide e antiadesive⁶. In questo caso, la proprietà antiadesiva è data da uno strato pre-immobilizzato di acido ialuronico (un polisaccaride anionico idrofilico), mentre quella antibatterica è data da dei peptidi antimicrobici ancorati mediante legami covalenti allo strato di ialuronico.

De Faria *et al.* (2014)⁷, invece, hanno ottenuto un nanocomposito ad elevata attività biocida (contro *Pseudomonas aeruginosa* ad una concentrazione di nanocomposito tra 2.5 e 5.0 µg/mL e con un tempo di contatto di almeno un'ora), combinando dei foglietti di ossido di grafene con nanoparticelle di argento che, in questo modo, risultano immobilizzate (dimensione media finale delle nanoparticelle ottenute pari a 7.5 nm), aumentando la biocompatibilità del materiale.

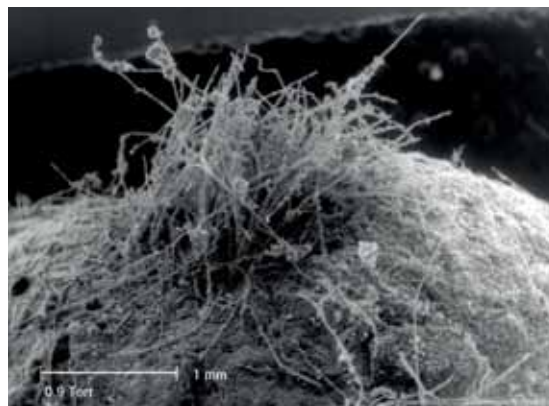


Figura 1 – Osservazione al microscopio elettronico a scansione di un biofilm fungino sviluppato all'interno di un bioreattore per la degradazione di esano in fase gas.



Figura 2 – Valutazione della resistenza alla muffa di un prodotto verniciante ad attività biocida (a sinistra) e di un prodotto non resistente (a destra).

Gli studi presentati in questo articolo hanno permesso di esemplificare alcune strategie innovative percorribili per migliorare la sostenibilità dei processi di detergenza e sanificazione nell'industria alimentare. Queste soluzioni possono richiedere ancora attività di ricerca di medio o lungo periodo, per potere, ad esempio, essere adattate ai sistemi di pulizia correnti e risolvere problemi di costi e compatibilità con il settore alimentare e la relativa normativa vigente, ma sono sicuramente soluzioni che vale la pena portare avanti.

⁶ Paris, J.B., Seyer D., Jouenne T., Thébault P. (2017). *Elaboration of antibacterial plastic surfaces by a combination of antiadhesive and biocidal coatings of natural products*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 156, 186-193.

⁷ De Faria, A.F., Martinez, D.S.T., Meira, S.M.M., De Moraes, A.C.M., Brandelli, A., Filho, A.G.S., Alves, O.L. (2014). *Anti-adhesion and antibacterial activity of silver nanoparticles supported on graphene oxide sheets*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 113, 115-124.