



INSERTO

# lab

- “Biofilm = tempo”, un’equazione da non dimenticare per una produzione alimentare sicura ..... 72
- labNews ..... 78



# **“Biofilm = tempo”, un’equazione da non dimenticare per una produzione alimentare sicura**

72



*Dato che uno dei principali obiettivi dell'industria alimentare è la produzione di alimenti sicuri, la formazione di biofilm è un argomento sempre in primo piano. Lab lo ha approfondito rivolgendo alcune domande a Mario Stanga, chimico industriale, responsabile di laboratorio per molti anni, autore di numerose pubblicazioni sull'argomento sanificazione e disinfezione nell'industria alimentare.*

a cura di Giovanni Abramo

Biologo

**lab: Per iniziare, cosa si intende per biofilm?**

**Mario Stanga:** Fino agli anni '80 del XX secolo, i microbiologi pensavano che i microbi fossero entità singole senza relazioni sociali. Tuttavia, si chiedevano anche come mai fosse più difficile disinfettare una superficie rispetto a un sistema disperso (planctonico). La ricerca ha scoperto che i microbi si comportano in modo differente quando si trovano in sospensione o su una superficie. Sulla superficie, i microbi smettono di essere "single" e cercano la socialità, emettendo segnali per individuare la presenza di altri microbi. Quando si trovano, modificano ancora il loro comportamento, producendo sostanze glico-proteiche-alginiche ovvero gli esopolisaccaridi (EPS), nei quali vivono e si difendono. Quindi, il biofilm non è uno strato microbico, ma un aggregato costituito essenzialmente di materiale organico costruito dai microbi stessi e che ingloba varie specie microbiche. Perciò il biofilm, prima di tutto, è una contaminazione organica (*biofouling*), che contiene al suo interno una innumerevole flora microbica.

**lab: Quali sono gli stadi o step di formazione di un biofilm?**

**MS:** Quando un microbo si deposita sulla superficie inizia quasi subito a emettere segnali proteici, che vanno alla ricerca della presenza di altri microbi. I batteri del genere *Pseudomonas*, ad esempio, impiegano solo una quindicina di minuti per sviluppare questa ricerca. Quando due segnali si incontrano, i microbi iniziano a costruire la loro casetta, fatta da materiale glico-proteico da loro secreto, che è definita biofilm. Questa casetta cresce (matura), permette ad altri microbi di insediarsi e di intrecciare ulteriori informazioni, relazioni e condivisione dello spazio, tanto da far nascere alla fine degli anni '90 una nuova disciplina: la socio-microbiologia. Quando maturo, il biofilm è definito "slime city". Infatti, dalla superficie si

protende una mucillagine che assomiglia a case e a grattacieli di una città con la possibilità che, per flussi o movimentazioni, dalle strutture si possano staccare pezzi che vanno a colonizzare altre aree. Da qui il concetto di evitare che il biofilm arrivi a maturazione con una corretta, programmata e adeguata pulizia e disinfezione delle superfici e dell'ambiente (*foto 1 e 2*).

**lab: Quindi, il problema biofilm risulta essere strettamente legato alle procedure di**

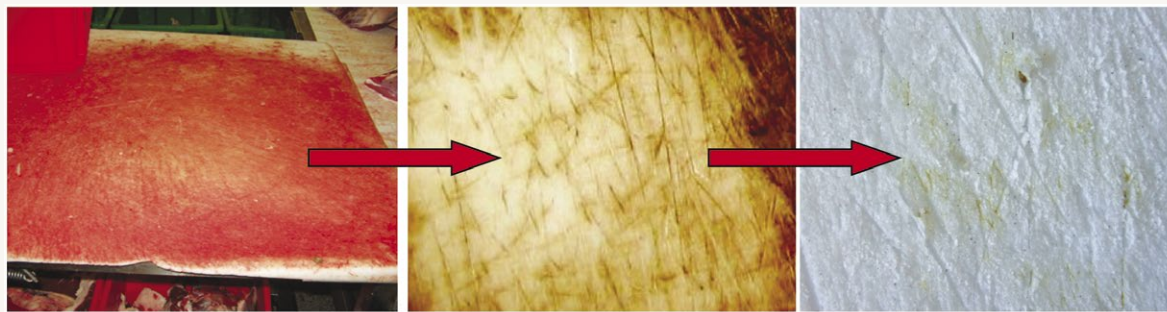


**Foto 1.** Biofilm su filtri in un impianto di lubrificazione con lubrificante amminico.



**Foto 2.** Biofilm in un pastorizzatore a tunnel per la pastorizzazione di bottiglie di birra.





**Foto 3.** La contaminazione a fine lavorazione non è biofilm. Il biofilm si forma col tempo dai residui non rimossi dal tavolo di lavoro.

### sanificazione o a comportamenti errati da parte del personale?

**MS:** Dipende da entrambi. Occorre avere ben chiaro che il biofilm è una contaminazione organica che contiene microbi e non è costituita solo da microbi da eliminare. Il materiale organico annulla l'attività dei disinfettanti prima che questi abbiano distrutto tutta la popolazione microbica. Perciò, per risolvere il problema biofilm, si deve prima pulire e poi disinfettare quello che rimane dei microbi oppure pulire e disinfettare contemporaneamente con un forte detergente, che abbia anche azione disinfettante, ad esempio un detergente alcalino clorinato. Inoltre, quando si pulisce occorre rimuovere tutta la contaminazione e non sempre si riesce. Ne è un esempio la contaminazione all'interno dei tagli e delle rugosità presenti sul tavolame di lavoro in materiale plastico. Se rimangono residui, pure in traccia, da essi riparte la costruzione del biofilm da parte dei microbi presenti. Tuttavia, non tutto è biofilm, come invece attualmente sembra lasciare intuire chi parla sull'argomento. Il residuo o contaminazione alla fine della produzione asportato dalla sanificazione quotidiana non è biofilm, anche se contiene microbi (foto 3). Il biofilm non è il residuo di produzione ma è un sistema costruito dai microbi stessi. Si forma da contaminazione che rimane dopo la detersione o da contaminazione trascurata o da contaminazione rimossa solo periodicamente (manutenzione periodica). Quindi si può scrivere l'equazione "biofilm = tempo". Non pulire bene significa dare ai microbi residui il tempo di costruirsi la casetta rifugio, ovvero di sviluppare biofilm. Perciò, per tenere sotto controllo la crescita del biofilm, diventano fondamentali sia una corretta sanificazione sia un'adeguata formazione dell'operatore. Un esempio di tempistica di sanificazione che può influire sulla crescita di biofilm e sull'organolettica (estetica) dell'alimento è la periodicità della manutenzione igienica della linea

di captazione e del serbatoio di accumulo delle acque imbottigliate. Nell'acqua, vi sono svariati microbi non obbligatoriamente patogeni, ma che sono in grado di alterarne l'organolettica con produzione di specifici metaboliti. Ad esempio, gli actinobatteri e i cianobatteri sviluppano geosmina e metilisoborneolo (MIB), che rilasciano odore di terra, fungo e muffa; i solfato riduttori rilasciano odori di uova marce, latte bruciato, cavolo cotto e torba; i seleniati e seleniti riduttori (il selenio ha una chimismo simile allo zolfo) rilasciano tipici odori di aglio (*garlic breath*), con tutte le sue varianti percepibili. Quindi, se nella percezione del consumatore di acqua in bottiglia si combinano odore di terra, fungo e muffa, uova marce, latte bruciato, cavolo cotto, torba, aglio e sue varianti è facile pronosticare che rigetterà l'acqua e cambierà fornitore. La domanda ovvia è: "Qual è l'origine di tutti questi eventi?". La risposta non può che provenire da un biofilm consolidato in qualche zona del processo e in particolare in due settori a rischio: da ciò che l'acqua può assorbire dalla microbiologia di produzione e da ciò che può consolidarsi nella linea di captazione e del serbatoio di accumulo. Spesso si interviene quando un effetto negativo è diventato evidente nell'acqua in bottiglia e segnalato dal consumatore (foto 4). Perciò, uno dei fattori di prevenzione dell'instaurazione del biofilm nella linea di captazione e del serbatoio di accumulo risiede nel programmare la manutenzione, stabilendo tempistica e procedura operativa di prevenzione documentata, ed essere in tempo utile prima dello scatenarsi del problema.

**lab:** Oltre a rappresentare un problema per gli impianti di produzione, la formazione di biofilm rappresenta anche un problema per la salute pubblica?

**MS:** Ovviamente sì. All'interno del biofilm vi sono microbi buoni, neutri (alteranti) e cattivi

(patogeni). La microbiologia è sostanzialmente una scienza statistica. Il significato dei limiti microbici da non superare non è altro che l'evidenza che se si rimane con una carica microbica bassa è statisticamente probabile che non ci siano microbi patogeni o, se ci sono, siano in quantità "non pericolosa". Lasciare maturare un biofilm, statisticamente, significa avere al suo interno sicuramente microbi patogeni (*Listeria*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, coliformi ecc.). Rimuovere la contaminazione con sanificazione metodica e puntuale e controllare adeguatamente il biofilm (non farlo maturare) con procedure e tempistica idonee coincidono con un lavoro sicuro in produzione e, a cascata, con la sicurezza per il consumatore.

**lab:** Ad oggi, in base alla sua esperienza, quali strumenti abbiamo per rilevare la formazione di biofilm all'interno degli impianti di produzione e quali mezzi per eradicarlo?

**MS:** Vi sono evidenze logiche di buon senso, come il rimuovere completamente la contaminazione per non dare ai microbi il tempo di costruirsi la casetta rifugio sugli impianti di produzione e al loro contorno (ambiente, zone nascoste, zone cui non si pensa o trascurate). Vi sono anche analisi documentabili che dimostrano immediatamente la presenza di biofilm. La risposta immediata dell'analisi è fattore determinante per produrre in sicurezza. Le analisi microbiologiche tradizionali richiedono un tempo relativamente lungo (uno

#### DALLE AZIENDE

### Temperatura al cuore del prodotto in tempo reale, wireless o con data logger

Econorma ha introdotto nella propria produzione anche una tipologia di sonda di temperatura con punta in acciaio inox, che l'operatore ha la possibilità di introdurre nel cuore del prodotto.

Nel settore produttivo alimentare ed in particolare per chi lavora con la pastorizzazione, tale sonda garantisce in modo ottimale la rilevazione della temperatura. Può inoltre essere collegata ai data logger della serie FT-90/USB oppure ad un sistema wireless FT-105/RF-mini-PT1.

Quest'ultimo sistema di monitoraggio via radio visualizza in tempo reale sia la temperatura sia il grafico con l'andamento della pastorizzazione/sterilizzazione oppure della cottura del prodotto, con possibilità di stampa e certificazione del lotto di produzione.

Il modulo radio con il sensore della temperatura infilato nel prodotto alimentare, in una pastorizzazione su tunnel, percorre tutto il tragitto all'interno di una barriera termica in inox ed invia i dati ad un ricevitore collegato al pc. Il vantaggio di seguire l'andamento della temperatura in tempo reale garantisce la possibilità di ottimizzare il processo. Il software, inoltre, dà la possibilità di correggere, con un offset di calibrazione, i valori di temperatura rilevati, operazione molto utile per le calibrazioni periodiche Accredia delle sonde.



La sonda di temperatura con punta in acciaio inox può essere collegata anche ai data logger della serie FT-90/USB.

Il programma consente di analizzare successivamente le variazioni dei valori "F0" e "U.P." e dell'effetto letale "L" del processo, consentendo di individuare così il momento in cui il prodotto ha raggiunto la temperatura di pastorizzazione senza eccedere oltre nel tempo, aumentando ed ottimizzando la qualità della produzione.

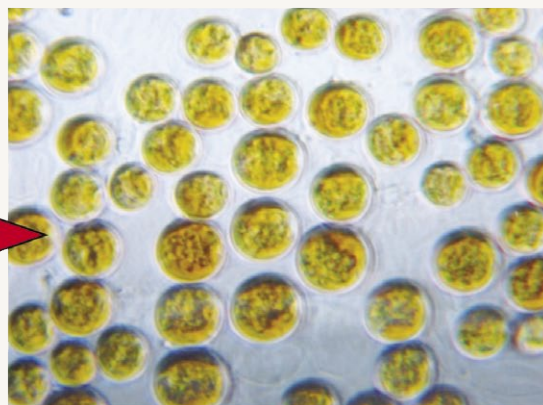
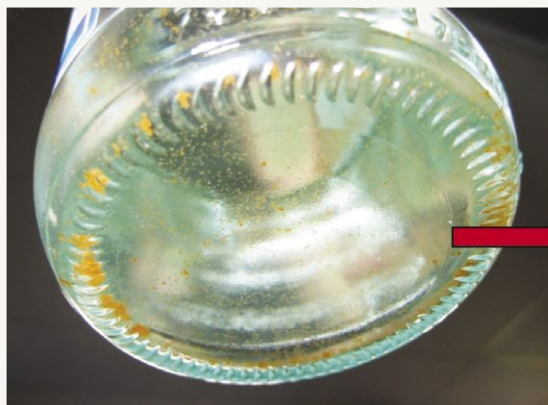
Nel caso si usi il data logger FT-90-USB, il file che viene salvato con il software di base può essere ripreso off-line dal programma FT-Graph-2, che elabora i dati e dà la possibilità di visualizzare e stampare i grafici, mostrando l'andamento del trattamento termico e dei relativi valori di F0 ed effetto letale L.



**Econorma S.a.s.**

Prodotti e Tecnologie per l'Ambiente

Via Olivera, 52 – 31020 S. Vendemiano (TV) - Tel. 0438 409049  
info@econorma.com - www.econorma.com



**Foto 4.** Biofilm da alghe (*Chlorella*) in bottiglia di acqua minerale.

o più giorni) e sono utili come conferme a dati ottenuti con modalità più rapide, anche se meno precise. Il bioluminometro è ormai imprescindibile, anche se dà risposte per eccesso (tutte le cellule contengono ATP, indipendentemente dall'essere microbi o no). Il kit che rivela le proteine a livelli di 50  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  collega proteine a biofilm. A ogni biofilm è associata la presenza di proteine, ma vale anche il contrario: se rilevo materiale proteico sicuramente vi sono anche microbi. È anche utile sfruttare lampade UV. Il materiale organico, cellule microbiche comprese, rispondono alla luce UV con emissione di luce violetta. Una superficie con una simile risposta fa presupporre presenza microbica. Un altro approccio è la colorazione della superficie con specifici coloranti, come il *crystal violet*, che porta a colorare il biofilm presente sulla superficie. Una volta individuato o presunto essere presente, il biofilm si rimuove con detergenza alcalina (pulizia), fatta seguire da disinfezione (ad esempio, cloro, acido peracetico, glutaraldeide, derivati cationici), e anche con detergenza e disinfezione (abituamente, alcalino clorinati) contemporanee, inserite in procedure da applicare con costanza e in "tempo utile". Su specifici biofilm, è efficace anche la detergenza enzimatica. Si sottolinea di pulire prima di disinfettare o, comunque, che vi sia contemporanea detergenza e disinfezione. Pensare solo di disinfettare è un approccio sbagliato alla sanificazione su biofilm. Si sottolinea anche "in tempo utile". L'equazione "biofilm = tempo" è da tenere scolpita in mente come concetto basilare per prevenire la maturazione del biofilm e per definire la tempistica della sanificazione periodica.

**lab:** Quali consigli si sente di dare agli operatori dell'industria alimentare per evitare casi

**quali la mozzarella blu, il prosciutto crudo contaminato da *Listeria monocytogenes*, la produzione di lotti di gelato contaminati da *Enterobacteriaceae* ecc.?**

**MS:** Escludendo camere bianche e aettiche, tutto è immerso e circondato da una nuvola costante di microbi. Nel processo produttivo, la sanificazione è vista frequentemente come un evento estraneo alla produttività, quasi un dovere fastidioso da eseguire a ogni produzione. Buoni detergenti e disinfettanti, oculare procedure e metodicità nelle loro applicazioni, costante e mirata formazione del personale sono scelte fondamentali per tenere sotto controllo il biofilm ed evitare le poche evidenze eclatanti esterne e gli innumerevoli problemi quotidiani interni alla fabbrica. È inutile fare ottimi HACCP se poi il comportamento indica che si è prodotto solo un'immagine da presentare agli ispettori. L'HACCP non è un'ulteriore imposizione da osservare, ma il passaporto per essere e rimanere a lungo sul mercato. Questo vale per il processo produttivo, ma è anche applicabile all'igiene personale dell'operatore. Una persona, normalmente pulita e che si muove rilascia nell'ambiente  $3 \times 10^6$  particelle di dimensioni inferiori a 10 micron al minuto. Considerando che su ogni particella possono essere presenti 3-4 microbi, è conseguenziale riflettere su quanto sia cruciale anche l'igiene personale. Pretendere che l'operatore lavori in condizione di personale pulizia e dare a lui regole da osservare obbligatoriamente sono attenzioni vincolanti, soprattutto in chi trasforma manualmente l'alimento. I microbi ci sono e sappiamo che vivono in modo sociale. Impedire con ogni accorgimento che crescano in modo casuale significa impedire che formino o che arrivino a maturare un biofilm.



# ----- Igiene delle superfici -----

## **Sistemi e kit per verificare il livello di igiene e comprovare la pulizia di superfici e strumenti di lavoro.**

Kairosafe offre una rosa di prodotti per effettuare controlli sulla presenza di residui, allergeni, carica batterica, microrganismi specifici ecc (visita [www.kairosafe.it](http://www.kairosafe.it)).

### **Bioluminometro**

E' uno strumentino portatile che rileva in tempo reale la contaminazione da ATP+AMP+ADP e quindi il grado di pulizia delle superfici. Kairosafe propone il Lumitester PD-30 abbinato ai tamponi Lucipac. Il test è rapido e preciso ed è utilizzabile anche da personale non strutturato.

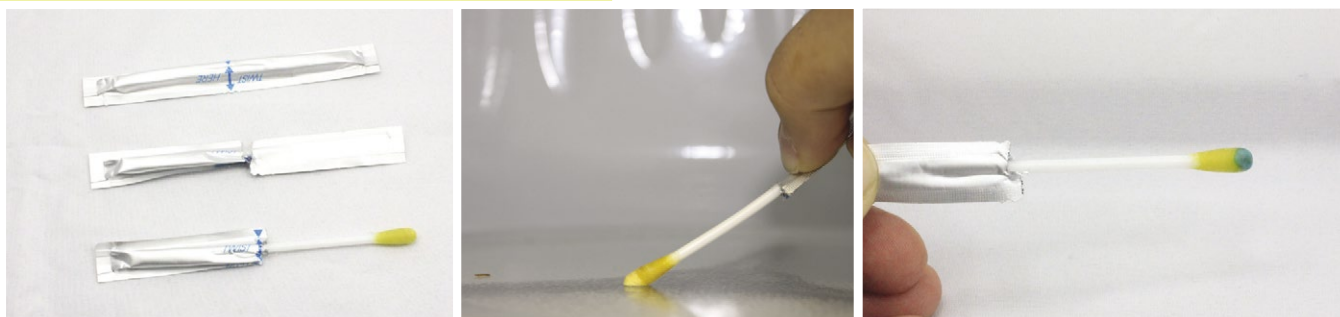
Codice prodotto: 1402653-60486 (Lumitester)  
1702671-60361 (Lucipac)



### **Pro-Check**

Tamponcino che permette di verificare in modo semplice e immediato la presenza di residui proteici. Il risultato può essere valutato subito poiché il viraggio da giallo a verde chiaro indica la presenza di più di 20 µg di proteine. Il viraggio al verde scuro indica la presenza di più di 150 µg.

Codice prodotto: CC-4008



*Visita il nostro e-shop e scarica gli approfondimenti tecnici*

## ► ATTIVITÀ anti- **BIOFILM** di un nuovo **ESOPOLISACCARIDE** prodotto da **Lactobacillus**

Un recente studio<sup>1</sup> ha valutato la capacità di inibire la formazione di biofilm da parte di un nuovo esopolisaccaride (EPS) di *Lactobacillus coryniformis* NA-3, isolato da crauti cinesi. Precedenti ricerche avevano dimostrato che l'EPS di *L. plantarum* possiede attività anti-biofilm nei confronti di *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, mentre l'EPS di *Lactobacillus fermentum* S1 ha una buona attività anti-biofilm per *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

In questo studio, i ricercatori hanno osservato che la formazione di biofilm prodotti da agenti patogeni viene ostacolata dalla presenza di una soluzione EPS-NA3. Più in particolare, l'EPS-NA3 ha un'elevata capacità di inibizione e dispersione dei biofilm di *B. cereus* (Gram positivo), pari all'80 e al 90%, rispettivamente, capacità che non è risultata dose-dipendente. Al contrario, l'inibizione della formazione di biofilm da parte di *S. typhimurium* è risultata dipendente dalla concentrazione; una maggiore concentrazione ha portato a una maggiore efficacia inibitoria, con una inibizione massima del 40% a una concentrazione di EPS di 500 µg/mL. Sempre per *S. typhimurium*, la capacità di dispersione di EPS-NA3 di biofilm già formati si è dimostrata pari al 20% e, anche in questo caso, dose-dipendente. Questi risultati indicano che l'EPS-NA3 ha agito anche su alcuni biofilm formati da batteri Gram negativi, in accordo con precedenti risultati sperimentali. Nel complesso, l'EPS-NA3 ha avuto un effetto più marcato nei confronti dei biofilm di *B. cereus* rispetto a quelli di *S. typhimurium*. Ulteriori ricerche potrebbero ulteriormente caratterizzare i meccanismi alla base dell'attività

di EPS-NA3 e ottimizzare la sua produzione per potenziali applicazioni come agente anti-biofilm nelle industrie alimentari.

1. Xu X., Peng Q., Zhang Y., Tian D., Zhang P., Huang Y., Ma L., Qiao Y., Shi B.A novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus coryniformis* NA-3 exhibits antioxidant and biofilm-inhibiting properties in vitro. *Food Nutr. Res.*, 2020; doi: 10.29219/fnr.v64.3744



## Oli essenziali di **AGLIO**, **CIPOLLA** e **CANNELLA** nella lotta ai **BIOFILM** di **Listeria monocytogenes**

*Listeria monocytogenes* è comunemente presente nell'ambiente e nelle strutture destinate alla lavorazione degli alimenti, dove può sopravvivere fino a 10 anni, formando biofilm difficili da eliminare durante il processo di pulizia e disinfezione. Un team di ricercatori ha concentrato l'attenzione sull'attività anti-biofilm formati da *L. monocytogenes* degli oli essenziali di aglio, cipolla e cannella<sup>1</sup>. Dall'analisi è emerso che i solfuri sono i composti più abbondanti negli oli essenziali di cipolla e aglio, mentre l'aldeide cinnamica è predominante nell'olio essenziale di cannella. I ricercatori hanno determinato la concentrazione minima inibente (MIC) degli oli oggetto di test e ne hanno valutato l'effetto sull'adesione iniziale di *L. monocytogenes* e su biofilm già formati da 6 ore. L'olio essenziale di cipolla ha inibito l'attacco cellulare iniziale del 77% a dosi pari alla metà della MIC, mentre alla MIC gli oli di cannella e aglio hanno inibito completamente l'adesione microbica iniziale. Tutti e tre gli oli essenziali hanno completamente inibito l'adesione iniziale quando applicati a dosi pari al doppio della MIC. Al contrario, i biofilm preformati erano più resistenti e il tasso di inibizione variava dal 33% al 78%. In sintesi, questa indagine ha rivelato che gli oli essenziali di aglio, cipolla e cannella promettono alternative antimicrobiche naturali per le strutture di trasformazione degli alimenti.

1. Somrani M., Inglés M.C., Debbabi H., Abidi F., Palop A. Garlic, Onion, and cinnamon essential oil anti-biofilms' effect against *Listeria monocytogenes*. *Foods*, 2020; doi: 10.3390/foods9050567..

