

DINAMICA DI COMPORTAMENTO DI *LISTERIA MONOCYTOGENES*, *SALMONELLA TYPHIMURIUM* E *ESCHERICHIA COLI* O157: H7 DURANTE IL PROCESSO DI PRODUZIONE DELLA 'NDUJA

DYNAMICS OF LISTERIA MONOCYTOGENES, SALMONELLA TYPHIMURIUM ESCHERICHIA COLI O157: H7 DURING THE PRODUCTION OF 'NDUJA.

Oliverio E., Finazzi G., Daminelli P., Monastero P., Boni P.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
Reperto Microbiologia – Via Bianchi 7/9 – 25124 Brescia – Italia

SUMMARY

The aim of this survey was to evaluate *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 fate during production process of 'Nduja, traditional Italian Salami. For this purpose the kneading for processing provided by Salumificio artigianale F.lli Pugliese was contaminated with mixtures of these microorganisms, then bagged and seasoned according to the processing of the producer. The results of this challenge test showed that the seasoning of the product reduces the concentration of microorganisms artificially added.

KEYWORDS

'Nduja, food safety, seasoning

INTRODUZIONE

La 'nduja è un insaccato tradizionale, originario del Monte Poro (Vibo Valentia) e oggi diffuso su tutto il territorio calabrese. Fondamentalmente si presenta come una salsiccia spalmabile, di forma conico-cilindrica irregolare, schiacciata in senso latero-laterale, prodotta con le parti magre e grasse del suino, molto piccante, stagionata per almeno 60 giorni, ma talora anche per oltre un anno. Il peso è variabile, generalmente attorno a 1-1,5 chilogrammi (1). La 'nduja è caratterizzata da un'alta percentuale di grasso, presenta pH e tenore di Aw tendenzialmente bassi e viene considerata un prodotto microbiologicamente stabile. È classificabile tra gli alimenti "ready to eat" (RTE) e come tale è disciplinato dal Reg. 2073/2005CE modificato dal Reg. 1441/2007CE (2,3). Tale Regolamento demanda alle Ditte produttrici, o a consorzi di esse, la responsabilità di fornire elementi utili a

prevedere il comportamento di microrganismi potenzialmente patogeni in caso di contaminazione accidentale dei propri prodotti alimentari. Tali dati, come indica la stessa normativa, se non già presenti nella bibliografia internazionale possono derivare da prove sperimentali specifiche oppure dall'applicazione di modelli matematici basati sui criteri della microbiologia predittiva. Lo scopo della presente sperimentazione è stato di ottenere dati sul comportamento di alcuni dei principali microrganismi responsabili di tossinfezioni alimentari: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* O157:H7, durante la fase di preparazione e stagionatura della 'nduja. A tal fine l'impasto destinato alla trasformazione, fornito dalla Ditta Salumificio artigianale F.lli Pugliese, è stato contaminato con miscele dei differenti ceppi patogeni, quindi insaccato e stagionato secondo il protocollo di trasformazione previsto dalla Ditta produttrice ed i salami ottenuti sono stati periodicamente

campionati per un periodo di oltre 60 giorni.

MATERIALI E METODI

Alimento

E' stata prodotta 'nduja di circa 1,2-2,5 kg secondo le indicazioni e con materie prime rese disponibili dal Salumificio artigianale F.lli Pugliese di San Calogero (VV).

Ceppi batterici

Per la contaminazione sperimentale è stata preparata una miscela di diversi ceppi dei tre patogeni, di cui di seguito se ne riportano le principali caratteristiche, provenienti sia da collezioni internazionali che isolati da prodotti a base di carne.

- *Listeria monocytogenes*: ATCC 19115 (id. Riboprinter DUP1042); ceppo IZSLER. 2006/46113 (id. Riboprinter DUP 1042); ceppo IZSLER 2008/168629 (id. Riboprinter DUP 18596).
- *Salmonella typhimurium*: ATCC 6994; ceppo IZSLER 2008/240807; ceppo IZSLER 2008/287635.
- *E. coli* O157:H7: ceppo ATCC 675 (Id. Riboprinter DUP 3064); ceppo IZSLER 643 (id. Riboprinter DUP 3064); ceppo IZSLER 2008/181181 (id. Riboprinter DUP 3064).

Per ogni ceppo sono state seminate 3 piastre di agar sangue. Dopo incubazione a 37°C per 24 ore le patine batteriche sono state raccolte mediante lavaggio delle piastre con soluzione fisiologica (fino al raggiungimento di 100 ml) e trasferite in una bottiglia sterile. Le colture batteriche sono state fatte moltiplicare in agitazione a 37°C per 24 ore ognuna in un fermentatore contenente 1 litro di brodo BHI. Al termine dell'incubazione le colture sono state centrifugate a 4000 giri per 1 ora ed il pellet ottenuto è stato poi risospeso in soluzione fisiologica.

Modalità di contaminazione

L'impasto di carne pronto per l'insacco è stato suddiviso in quattro parti, una da destinare al lotto di controllo, le altre 3 da contaminare ognuna con un patogeno in modo da ottenere una concentrazione del microrganismo di almeno 10⁶ ufc/g. Dopo l'insacco e la legatura i salami ottenuti sono stati posti in celle termostate e sottoposti a programma di asciugatura/ stagionatura seguendo i parametri di temperatura e umidità relativa previsti dalla Ditta produttrice..

Campionamento ed analisi

Si è proceduto a periodici campionamenti sia sui salami contaminati che sui controlli per valutare la dinamica dei microrganismi artificialmente aggiunti e delle flore lattiche

normalmente presenti. Oltre al campionamento eseguito sull'impasto (tempo 0) sono stati effettuati prelievi dopo 4, 7, 11, 15, 34, 42, 55 e 67 giorni di stagionatura. Su tali campioni sono state effettuate le seguenti determinazioni:

- Numerazione di *L. monocytogenes* su piastre di Aloa agar (ISO 11290-2) incubate in aerobiosi a 37°C per 48 ore;
- 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 dei Lattobacilli mesofili su piastre di MRS agar seminate per inclusione ed incubate in microaerofilia a 37°C per 72 ore;
- Determinazione del pH mediante strumento con compensazione automatica della temperatura (Hanna Instruments HI 223);
- Determinazione dell'acqua libera (Aw) mediante apparecchiatura Testo 650.

Per quanto concerne i parametri microbiologici, per ogni campionamento le analisi sono state eseguite in triplo (su tre diversi salami) nei lotti contaminati e in singolo sui controlli. La valutazione di pH e Aw è stata effettuata invece in singolo.

RISULTATI

Profilo del pH e dell'Aw

Il pH presenta un valore iniziale di 5,20 e nel corso del processo di stagionatura si ha un'acidificazione nelle prime due settimane con diminuzione di circa mezzo punto. Tale valore di acidità si mantiene poi costante fino al termine della stagionatura. Per quanto riguarda l'Aw, da un valore di partenza di 0,91 si osserva una progressiva diminuzione nel corso della stagionatura fino ad un valore medio finale di circa 0,85.

Profilo dei microrganismi lattici

La popolazione dei lattobacilli mesofili presenta una concentrazione elevata, circa 10⁶ ufc/g al tempo 0 e si mantiene sostanzialmente costante, manifestando la tendenza ad una lieve diminuzione nel corso della stagionatura.

Profilo di *Listeria monocytogenes*

In figura 1 è riportato l'andamento di *Listeria monocytogenes*. Si evidenzia che il microrganismo diminuisce nel corso della stagionatura della 'nduja con un tempo di riduzione decimale (valore D, ovvero il tempo richiesto per osservare la morte del 90% dei microrganismi presenti in un campione ad una determinata temperatura), pari a 23 giorni e 20

ore \pm 2 giorni e 19 ore (errore standard *SE*: 0,58). Considerando il tempo di stagionatura minimo previsto dalla Ditta produttrice per questa pezzatura del prodotto il decremento del patogeno risulta di oltre 2 logaritmi.

Profilo di *Salmonella typhimurium*

In Figura 2 è riportato il comportamento di *Salmonella typhimurium*. Si osserva la riduzione della concentrazione del patogeno con andamento bifasico: nella prima fase D è pari a 3 giorni e 3 ore \pm 10 ore; dopo circa 7 giorni e 21 ore si ha una fase di diminuzione più lenta con valore D pari a 11 giorni e 18 ore \pm 1 giorno e 3 ore (*SE* 0,37). Questo andamento comporta nel corso del periodo di stagionatura considerato un abbattimento di circa 7 logaritmi, tanto che nell'ultimo prelievo il microrganismo non risulta più numerabile tramite il metodo di semina diretta in piastra.

Profilo di *Escherichia coli* O157:H7

In Figura 3 è riportato l'andamento di *Escherichia coli* O157:H7. Come per *Salmonella* si evidenzia una diminuzione del microrganismo con andamento bifasico: nella prima fase D è pari a 2 giorni e 23 ore \pm 5 ore, mentre nella seconda fase, che inizia dopo circa 14 giorni, il valore D diventa 91 giorni e 23 ore \pm 69 giorni e 5 ore (*SE* 0,36). Dalla concentrazione iniziale si osserva a fine stagionatura una diminuzione pari a oltre 5 logaritmi.

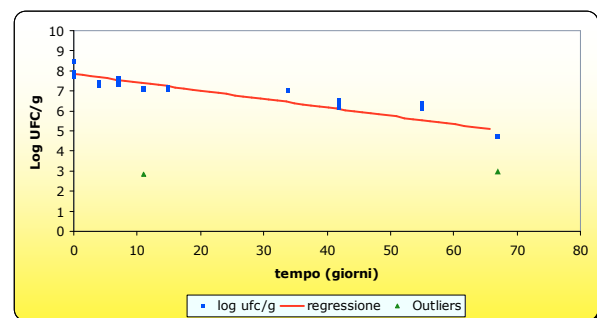
CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

I risultati di questo challenge test evidenziano che il normale processo di produzione della 'nduja è in grado di contrastare in maniera molto efficace alcuni agenti patogeni che potenzialmente possono essere presenti nella carne quali *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* O157:H7. La normale stagionatura del prodotto, protratta per almeno 60 giorni, grazie alla combinazione di diversi fattori: - la progressiva diminuzione dell'Aw.

- la rapida discesa del pH al di sotto di 5.
- la contemporanea presenza di popolazioni lattiche tra le quali ceppi in grado di biocompetere nei confronti dei microrganismi patogeni, in elevata concentrazione già nelle prime fasi di lavorazione, si traduce in un abbattimento di oltre 5 logaritmi per *E. coli* e circa 7 logaritmi per *Salmonella*. In questo lavoro non è stata fatta una valutazione mirata sull'eventuale azione antibatterica specifica del peperoncino come riportato in alcuni precedenti lavori scientifici. (4, 5), ma ci si

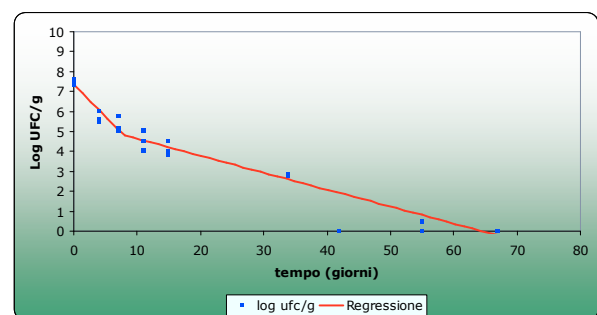
propone uno studio apposito in cui nell'impasto saranno previste concentrazioni diverse di tale ingrediente per valutarne l'efficacia. Anche relativamente a *Listeria monocytogenes*, si osserva una diminuzione nel corso della stagionatura quantificabile in un valore di circa 2 logaritmi. Considerato che *L. monocytogenes* è in grado di sopravvivere e moltiplicarsi in condizioni microambientali che per altri microrganismi risultano critiche, è da sottolineare l'importanza dell'applicazione di scrupolose procedure igienico sanitarie di sanificazione dei locali e degli strumenti di lavorazione e osservare comportamenti che limitino al massimo la possibilità di ricontaminazione durante il processo produttivo.

Figura 4. Andamento e tempi di estinzione di *Listeria monocytogenes* nella 'nduja sperimentalmente contaminata



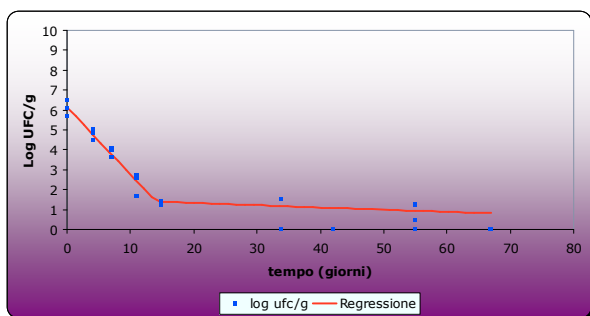
Inoculo iniziale (ufc/g)	Log (ufc/g)	Tempo di estinzione		Range giorni
		giorni	ore	
10000000	7	166	17	(153-180)
1000000	6	142	22	(129-157)
100000	5	119	2	(105-133)
10000	4	95	6	(82-109)
1000	3	71	11	(58-85)
100	2	47	15	(34-61)
10	1	23	20	(10-38)

Figura 5. Andamento e tempi di estinzione di *Salmonella typhimurium* nella 'nduja sperimentalmente contaminata



Inoculo iniziale (ufc/g)	Log (ufc/g)	Tempo di estinzione		range giorni
		giorni	ore	
10000000	7	60	9	(56-65)
1000000	6	48	16	(44-53)
100000	5	36	22	(33-41)
10000	4	25	4	(21-30)
1000	3	13	10	(9-18)
100	2	6	6	(5-7)
10	1	3	3	(2-4)

Figura 6. Andamento di E. coli O157:H7 nella 'nduja sperimentalmente contaminata



Inoculo iniziale (ufc/g)	Log (ufc/g)	Tempo di estinzione		Range giorni
		giorni	ore	
10000000	7	220	23	(188-254)
1000000	6	129	0	(96-162)
100000	5	37	1	(14-70)
10000	4	11	20	(11-13)
1000	3	8	21	(8-10)
100	2	5	22	(5-7)
10	1	2	23	(2-4)

BIBLIOGRAFIA

1. www.ars-alimentaria.it
2. Regolamento CE 2073/2005 della Commissione del 15 Novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.
3. Regolamento CE 1441/2007 della Commissione del 5 Dicembre 2007 che modifica il Regolamento CE 2073/2005 della Commissione del 15 Novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.
4. Dorantes L., Fernandez E., Hernandez-Sanchez H., Mota L., "Antimicrobial activity of *Capsicum* extracts against some pathogenic bacteria" Proceedings of the 16th International Pepper Conference Tampico, Tamaulipas, Mexico November 10-12/2002.
5. Dorantes L., Colmenero R., Hernandez H., Mota L., Jaramillo M.E., Fernandez E., Solano E. "Inhibition of growth of some food borne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts" International Journal of Food Microbiology. **57**:125-128 (2000).