

La formazione di biofilm nell'industria alimentare

M. Marino

Introduzione

Uno dei principali obiettivi dell'industria alimentare è la produzione di alimenti sicuri, sani e con una buona qualità organolettica. Per raggiungere questo obiettivo è essenziale controllare la crescita dei microrganismi, al fine di minimizzare il rischio di contaminazioni dell'alimento stesso da parte di microrganismi presenti per esempio nell'ambiente di lavorazione.

In natura e nei sistemi alimentari i microrganismi sono in grado di attaccarsi alle superfici solide in cui siano presenti sostanze nutrienti, ioni e materiale organico (definiti genericamente "sudiciume") sufficienti a sostenere la loro sopravvivenza e moltiplicazione. Se il sudiciume non viene adeguatamente rimosso durante la sanificazione, il risultato è un accumulo di questo materiale sulle superfici e la formazione di *biofilm*, termine che si riferisce all'adesione di organismi viventi e alla loro crescita su superfici solide. Il biofilm è costituito da microrganismi e sostanze polimeriche, di solito esopolisaccaridi, prodotti dai microrganismi stessi. Lo scopo del biofilm è quello di proteggere i microrganismi negli ambienti ostili e di agire come una trappola per le sostanze nutritive.

I biofilm causano problemi in molte industrie, tra cui quella alimentare. Per esempio, quando un biofilm si forma all'interno di tubazioni si può assistere a una riduzione del flusso. In conseguenza di un accumulo di materiale biologico e organico si può inoltre avere una riduzione della trasmissione di calore all'interno di scambiatori termici, i prodotti alimentari possono subire delle contaminazioni e a causa della produzione di acido nei biofilm le superfici possono subire delle corrosioni. Questo è il motivo per cui la fase di pulizia è particolarmente importante, in quanto permette di evitare l'accumulo di materiale di origine organica. Va inoltre fatto notare che i microrganismi presenti nei biofilm solitamente sono più resistenti ai biocidi (es. sanificanti, antibiotici, ecc.) rispetto a quelli presenti in

forma dispersa. In realtà in questi casi non si tratta di fenomeni di resistenza intrinseca, cioè caratteristica del microrganismo, quanto piuttosto di adattamenti che fanno sì che venga limitata sia la penetrazione del biocida all'interno della matrice del biofilm che la sua azione chimica in seguito all'inattivazione da parte della matrice polisaccaridica del biofilm stesso.

Quando un biofilm si stacca da una superficie i microrganismi possono essere dispersi nell'ambiente. Nel settore delle carni il problema dei biofilm è piuttosto diffuso e può portare a gravi contaminazioni della carne cruda in seguito a una pulizia inadeguata. Per esempio, è stato dimostrato che il pollame può venire contaminato da microrganismi quali *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria* in seguito al contatto con biofilm microbici.

Colonizzazione delle superfici

La formazione di biofilm è un fenomeno che si può verificare su qualsiasi superficie che si trovi in un ambiente in cui siano presenti dei microrganismi vivi. Esso è un processo di tipo dinamico che coinvolge diverse fasi.

Condizionamento della superficie

Negli ambienti di un'industria alimentare, i batteri insieme a molecole organiche e inorganiche, come per esempio proteine derivanti dalla lavorazione di latte e carne, si adsorbono alla superficie formando il *film condizionante*. Queste molecole assieme ai microrganismi vengono veicolate sulla superficie per fenomeni di diffusione o in alcuni casi attraverso flussi turbolenti di un liquido. L'accumulo di molecole all'interfaccia solido-liquido causa un aumento della concentrazione di nutrienti rispetto alla fase liquida; inoltre anche il trasferimento di nutrienti è molto più rapido in un biofilm

rispetto a quello che avviene per le cellule microbiche sospese in un liquido. Queste condizioni favoriscono la formazione del biofilm alterando le proprietà chimico-fisiche della superficie e facilitando la sequenza degli eventi successivi.

In realtà il processo di condizionamento di una superficie non è indice di sicura formazione di biofilm. A questo proposito, la microtopografia della superficie è ugualmente importante nel favorire o meno la formazione di biofilm microbici, in particolare se la superficie ha molte fessure e canali che possono intrappolare i batteri. La microscopia elettronica a scansione ha dimostrato che molti microrganismi patogeni e alteranti degli alimenti sono in grado di aderire e di accumularsi come biofilm su superfici di acciaio inossidabile, alluminio, vetro, gomma, teflon e nylon, che sono materiali frequentemente impiegati nell'industria alimentare. È stato dimostrato che l'adsorbimento di alcuni tipi di proteine alle superfici gioca un ruolo importante nei processi di adesione microbica: per esempio, la presenza di caseina e β -lattoglobulina inibisce l'adesione di *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium* all'acciaio inossidabile e alla gomma, mentre altre proteine del latte sono in grado di favorire l'attaccamento di alcuni microrganismi.

Adesione delle cellule

La seconda fase nella formazione di un biofilm è l'ancoraggio dei microrganismi alla superficie condizionata. Questo processo può essere attivo, in quanto dovuto alla motilità batterica, o passivo, in funzione del libero movimento delle cellule dovuto alla gravità, alla diffusione o alle forze dinamiche del fluido che circonda le cellule. L'adesione batterica dipende anche dalla disponibilità di nutrienti e dalla fase di crescita della cellula. Questo processo avviene in due fasi, una reversibile e una irreversibile. Nella prima fase intervengono vari tipi di interazioni deboli, che possono essere facilmente superate da operazioni tecniche quali un semplice risciacquo. Nella seconda fase le cellule sono in contatto con la superficie attraverso appendici batteriche e polisaccaridi, che formano un ponte tra le cellule e la superficie stessa, e questo rende l'associazione irreversibile.

Il pH e la temperatura della superficie hanno una

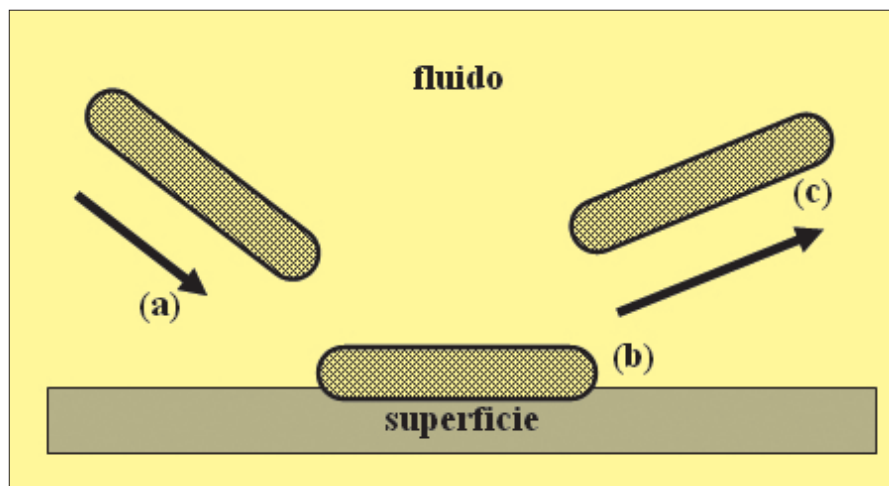


Figura 1 - Adesione reversibile: le cellule in sospensione nel fluido (a) vengono in contatto con la superficie solida (b), quindi si staccano e tornano in sospensione (c)

grande influenza sul grado di adesione dei microrganismi. Per esempio, *Pseudomonas fragi* presenta un piccolo massimo di adesione all'acciaio inox a un pH compreso tra 7 e 8, e *Yersinia enterocolitica* aderisce di più a 21 °C piuttosto che a 35 °C o a 10 °C.

Formazione di microcolonie

Le cellule attaccate irreversibilmente crescono e si moltiplicano utilizzando i nutrienti presenti nel film di condizionamento e nel fluido circostante: questo porta alla formazione di microcolonie, che si ingrandiscono e confluiscono fino a formare uno strato di cellule che ricopre la superficie. In questa fase le cellule adese producono ancora esopolisaccaridi che facilitano la stabilizzazione della colonia nonostante le fluttuazioni ambientali.

Formazione del biofilm

Il procedere dell'adesione delle cellule alla superficie e la conseguente crescita e produzione di esopolisaccaridi porta alla formazione del biofilm, all'interno del quale si formano molti strati di cellule batteriche intrappolate nella matrice polisaccaridica. Questo processo è piuttosto lento e, in funzione delle condizioni colturali, lo spessore del biofilm raggiunge qualche millimetro nel giro di qualche giorno. All'interno del biofilm la distribuzione dei microrganismi non è uniforme, e le cellule si distribuiscono in microcolonie disperse nella matrice percorsa da numerosi canali fortemente permeabili all'acqua. La dimensione del biofilm può aumentare in seguito alla deposizione sullo stesso di soluti di natura organica o inorganica dispersi nella matrice fluida circostante.

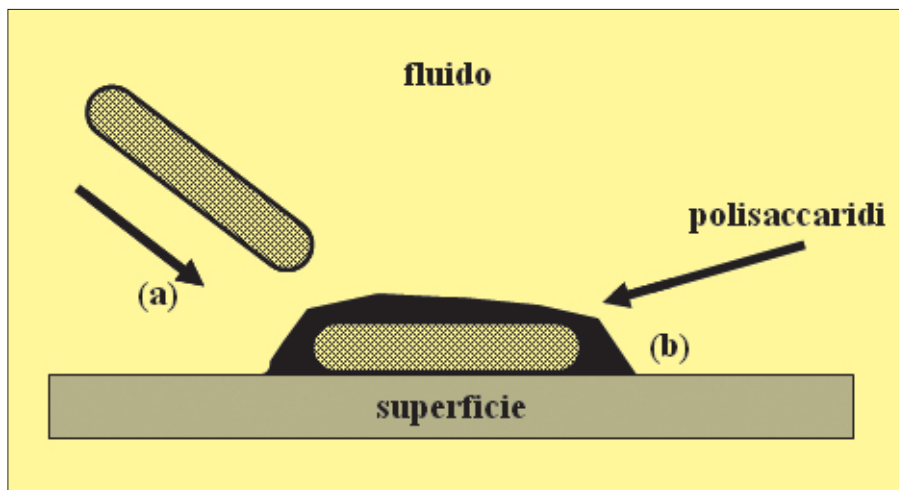


Figura 2 - Adesione irreversibile: le cellule in sospensione nel fluido (a) vengono in contatto con la superficie solida. Se le forze che trattengono le cellule sulla superficie sono sufficientemente forti le cellule non si staccano e possono produrre esopolimeri che aiutano l'ancoraggio della cellula alla superficie (b)

Distacco e dispersione del biofilm

Man mano che il biofilm “invecchia” i batteri attaccati, per sopravvivere e colonizzare nuove nicchie possono staccarsi singolarmente o in gruppi e disperdersi nell'ambiente. Questo distacco è un processo discontinuo e occasionale e dipende da vari fattori, quali per esempio variazioni di flusso del liquido circostante, presenza di sostanze chimiche o modificazioni delle proprietà di superficie delle cellule o del substrato colonizzato. I batteri che si staccano possono essere trasportati nell'ambiente circostante e avviare nuovamente il processo di formazione di biofilm.

Biofilm nell'industria alimentare

L'adesione dei batteri ai prodotti alimentari o alle superfici destinate a venire a contatto con gli alimenti può portare a seri problemi di carattere igienico e a forti perdite economiche conseguenti all'alterazione degli alimenti stessi. Oltre a questo, sono documentati molti casi di persistenza sulle superfici di molti noti patogeni alimentari quali *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus* ed *Escherichia coli* O157:H7.

Nell'industria lattiero-casearia le attrezzature non sufficientemente sanificate e la microflora presente nell'aria confinata sono le più frequenti fonti di contaminazione del latte e dei prodotti lattiero-caseari. Molto spesso le linee di questo tipo di industria vengono sanificate attraverso procedure CIP (*Cleaning In Pla-*

ce), il cui limite è tuttavia quello di permettere l'accumulo di microrganismi sulle superfici, il che può portare alla formazione di biofilm. L'effetto conseguente di ciò è la contaminazione post-processo oppure la trasmissione di patogeni attraverso gli aerosol che si producono durante la sanificazione delle superfici. Altre fonti di contaminazione coinvolte nell'accumulo di biofilm possono essere i pavimenti, le tubazioni delle acque reflue, le curve a gomito nelle tubature, le guarnizioni in gomma e in teflon, i nastri trasportatori e le superfici in acciaio inox.

Di recente nell'industria alimentare si è cominciato a far uso di tecnolo-

gie quali l'ultrafiltrazione e l'osmosi inversa per il trattamento degli alimenti e per i processi a carico delle acque reflue. La formazione di biofilm in questo tipo di impianti può provocare delle significative riduzioni del flusso del liquido trattato e uno scadimento generale delle *performance* delle membrane. La formazione di biofilm è un problema che colpisce anche l'industria delle carni fresche e del pollame, ed ha come conseguenza principale la contaminazione crociata delle carcasce.

Controllo e rimozione dei biofilm

In linea generale un programma di detersione e disinfezione corretto e applicato fin dall'inizio della linea produttiva è in grado di inibire l'accumulo di residui e di microrganismi sulle superfici e di conseguenza la formazione di biofilm. Tuttavia, se queste procedure non sono applicate in maniera corretta il potenziale di trasferimento di contaminazioni aumenta. Anche la progettazione delle attrezzature destinate a venire in contatto con gli alimenti è importante al fine di assi-

Tabella 1 - Capacità dei biocidi di rimuovere i biofilm

Performance del biocida	Principio attivo
ottima	perossiacidi
	iodofori
	biguanidi
	cloro
	anfoteri
pessima	quaternari d'ammonio

Tabella 2 - Capacità di diversi materiali di supportare la crescita di biofilm microbici

Capacità di supporto di biofilm	Materiale
pessima	vetro
	acciaio inox
	polipropilene
	PVC
ottima	polietilene
	lattice

curare una buona sanificabilità degli impianti una volta che un biofilm si è formato. Studi di tipo comparativo hanno dimostrato che materiali quali acciaio inox, vetro, nylon e materie plastiche presentano caratteristiche di pulibilità molto simili quando le superfici sono nuove, tuttavia con il passare del tempo alcuni materiali resistono meglio ai danni meccanici dovuti ai ripetuti processi di sanificazione e alla corrosione causata dai residui di sostanze chimiche utilizzate nei processi di pulizia e disinfezione. Nel caso in cui su una superficie si sia stabilito un biofilm, al fine di evitare contaminazioni crociate degli alimenti è necessario procedere all'eliminazione dello stesso attraverso procedure meccaniche quali l'utilizzo di spazzole e raschiamento, o procedure di tipo fisico, chimico e biologico.

Metodi fisici

I più innovativi metodi di natura fisica finalizzati alla rimozione dei biofilm includono l'applicazione di campi magnetici ad alta frequenza, il trattamento ad ultrasuoni, l'applicazione di campi elettrici pulsati ad alta frequenza utilizzati da soli o in combinazione con acidi organici e l'utilizzo di campi elettrici a bassa frequenza per aumentare l'effetto dei biocidi. Recentemente, l'utilizzo di campi elettrici associati agli antibiotici si è dimostrato efficace nel controllo dei biofilm da *Pseudomonas*.

MO·ED·CO S.r.l.
ha trasferito i suoi uffici in
Via San Martino 11/C - 20122 Milano
I nostri nuovi numeri sono: **TELEFONO**
02 58316074
02 58315554
02 58316121
TELEFAX
02 58322564
E-mail
info@moedco.it
Internet
www.moedco.it

Metodi chimici

È stato più volte dimostrato che prima dell'applicazione di un disinfettante è importante eliminare quanto più possibile i microrganismi, che diventano molto più sensibili ai disinfettanti quando il biofilm viene staccato dalla superficie alla quale esso aderisce. Anche la rottura meccanica o chimica della matrice polisaccaridica è importante per il controllo dell'eliminazione dei biofilm, dato che essa solitamente protegge i microrganismi dall'effetto di detergenti e disinfettanti. Tra i detergenti, quelli che permettono una più efficace eliminazione dei biofilm vanno ricordati i chelanti, tra cui l'EDTA e l'EGTA, che destabilizzano la membrana esterna delle cellule batteriche e facilitano la rimozione del biofilm. Alcuni disinfettanti ad attività ossidante tra cui l'acido peracetico, il cloro, lo iodio e l'idrogeno perossido sono in grado di depolimerizzare gli esopolisaccaridi, permettendo il distacco dei biofilm dalle superfici. L'utilizzo di monolaurina, da sola o in combinazione con un trattamento a 65 °C o acido acetico, si è dimostrato molto efficace nell'eliminazione dei biofilm di *Listeria monocytogenes*, mentre il cetilpiridinio-cloruro (CPC) rimuove con molta efficienza i biofilm di *Salmonella* che si formano sulla superficie esterna del pollame. Alcuni metodi innovativi prevedono l'impregnazione dei materiali (superfici, materiale di confezionamento) con sostanze (es. argento, sostanze antifungine, anidridi) in grado di controllare i biofilm, soprattutto quelli prodotti da muffe sulla superficie degli alimenti.

Metodi biologici

Una strategia innovativa per il controllo dei biofilm consiste nell'adsorbimento di molecole bioattive, come per esempio le batteriocine e gli enzimi, sulle superfici destinate a venire a contatto con gli alimenti. Per esempio, la nisina si è dimostrata efficace nella riduzione dell'incidenza dell'adesione di *Listeria monocytogenes* alle superfici; l'applicazione di adeguate colture di batteri lattici e loro estratti permette invece l'inibizione dell'adesione di alteranti e patogeni sulla superficie del pollame. Per quanto riguarda gli enzimi, essi si sono dimostrati molto efficienti come detergenti, in quanto inattivano i polimeri esocellulari che formano la matrice e permettono una più efficace rimozione dei biofilm.

Marilena Marino
Dipartimento di Scienze degli Alimenti
Università degli Studi di Udine

Bibliografia disponibile presso l'Autore.