

Monitoraggio dei parametri microbiologici durante la *shelf life* di lattughino e rucola di IV gamma

Rita Di Bonito^{1*}, A. D'Alessio¹, M. Trupo² e U. De Corato³

¹ENEA, UTEE-AGR CR CASACCIA, Via Anguillarese 301, 00123 Santa Maria di Galeria (Roma)

²ENEA, UTTRI-BIOTEC - CR TRISAIA, S.S. 106 Jonica - km 419,500, 75026 Rotondella (MT)

³ENEA, UTEE-AGR - CCEI BARI, 70122 Bari

Monitoring of microbiological parameters during the shelf-life of bagged baby-leaf lettuce and rocket

Abstract. The microbiological parameters of packaged baby-leaf lettuce and rocket were monitored in order to evaluate the effect of the length of storage at the temperature of 7°C in two seasons. The count of total aerobic bacteria, coliforms, *E. coli*, yeasts and moulds was detected at the 2nd, 6th and 8th day of storage, in the spring and summer. The 2nd day the mean of bacteria was 4.49·10⁶ and 1.67·10⁷ cfu·g⁻¹ for lettuce and rocket respectively in the spring and 8.80·10⁶ and 0.98·10⁷ cfu·g⁻¹ respectively in the summer. A significant increase was observed at the 6th and 8th day of storage at 7°C in the spring, at the 8th day in the summer. The mean of coliforms the 2nd day was 8.8·10⁴ and 2.6·10⁴ cfu·g⁻¹ for lettuce and rocket with an increase during the storage. *E. coli* was detected from a group of lots (13.3% of total) independently from the storage. The count of yeasts and moulds did not change during the storage and the average of fungal contaminants was higher in rocket (10⁴ cfu·g⁻¹) than lettuce (10² cfu·g⁻¹).

Key words: Coliforms, *E. coli*, Moulds, Yeasts.

Introduzione

Le insalate di IV gamma soddisfano l'esigenza del consumatore per alimenti salutari e di rapida preparazione ma la loro deperibilità ne limita la conservazione per 6 giorni a 4°C. Durante la produzione i vegetali sono lavati con agenti sanitizzanti, tagliati, asciugati e confezionati in buste sigillate in atmosfera controllata. Poiché il prodotto confezionato è pronto per il consumo fresco, il controllo dei parametri microbiologici assume particolare importanza per la salute del consumatore. Numerosi episodi di patologie di origine batterica associate al consumo di vegetali freschi sono stati recentemente riportati in USA e UK (Sagoo *et al.*, 2003; Sivapalasingam *et al.* 2004; Greene *et al.*,

2007) ed hanno aumentato l'attenzione sulla sicurezza dei prodotti di IV gamma e la necessità di verificare le condizioni microbiologiche del prodotto nelle fasi post-produzione. Monitoraggi eseguiti in USA su insalate di IV gamma nei punti di confezionamento hanno rilevato una carica batterica mesofila nell'intervallo 10⁴-10⁸ ufc·g⁻¹ e presenza di *E. coli* nel 16.0% dei campioni (Valentin-Bon *et al.*, 2008). Indagini eseguite su campioni prelevati nei punti di vendita in Spagna hanno evidenziato elevati variabilità nei valori di carica batterica totale ed occasionale presenza di *E. coli*, *Salmonella* sp. and *Listeria* sp. (Abadidas *et al.*, 2008; Badosa *et al.*, 2008). Elevata contaminazione da funghi e lieviti è stata inoltre riportata in prodotti di IV gamma (Tournas, 2005; Abadidas *et al.* 2008).

Nel presente lavoro sono stati valutati l'effetto di periodi diversi di conservazione a 7°C e dalla stagione di raccolta sull'evoluzione dei parametri microbiologici di lotti di lattughino (*Lactuca sativa* L.) e rucola (*Diplotaxis* spp.) provenienti da diversi punti di vendita in Italia.

Materiali e metodi

Campionamento

Gruppi di campioni dello stesso lotto sono stati prelevati da 10 punti di vendita di tre regioni (Lazio, Puglia e Basilicata) e conservati a 7°C fino al momento dell'analisi. Per ogni lotto, le analisi sono state eseguite a 2, 6 e 8 giorni dal confezionamento in accordo alle etichette della confezione. Il monitoraggio è stato replicato in primavera ed in estate per un totale di 108 campioni che apparivano freschi e senza segni evidenti di decadimento al momento del prelievo.

Carica batterica totale e coliformi

Per ogni campione sono stati omogeneizzati 30 g in soluzione 0.85% NaCl - 0.1% peptone per 2 min utilizzando lo Stomacher® 400, Seward, Norfolk, UK e opportune diluizioni sono state eseguite in 0.05 M tampone fosfato pH 7.0 (PBS). La conta totale dei batteri aerobi è stata eseguita su piastre con Plate Count Agar (Biolife Italiana, Milano) incubate 48 ore a 30°C. La conta dei coliformi e *E. coli* è stata effet-

¹ rita.dibonito@enea.it

tuata su piastre Compact Dry EC MicroPlates™ (PBI International, Milano) incubate 24-48 a 37°C. I dati sono stati sottoposti ad analisi statistica utilizzando il programma SPSS 15.0 (SPSS Statistics Base™, Chicago, USA). È stata calcolata la carica batterica media per ogni campionamento, e la significatività delle differenze è stata valutata tramite il test “Independent Student’s T test” basato sull’analisi di coppie di medie. La conta dei coliformi totali è stata eseguita valutando soltanto l’effetto del periodo di conservazione per ogni specie e la significatività valutata confrontando ogni media rispetto al valore ottenuto al periodo di conservazione di due giorni.

Lieviti e muffe

La conta totale di lieviti e muffe è stata eseguita con metodi standard di micologia su piastre contenenti Saboraud Dextrose Agar (Sigma-Aldrich Italiana, Milan, Italy) e Compact Dry YM MicroPlates™ (PBI International). Le piastre inseminate sono state poi mantenute a 25°C per 7 giorni al buio. Le colonie cresciute sono state contate e differenziate in muffe e lieviti sulla base di caratteri morfologici e biometrici.

Risultati

Carica batterica totale e coliformi

La tabella 1 riporta i valori della carica batterica media in lattughino e rucola conservati a 7°C a tre tempi dal confezionamento, con i valori minimi e

massimi per ogni campionamento. In primavera, a due giorni di conservazione, è stata osservata una variabilità con valori compresi nell’intervallo $1.31 \cdot 10^5 - 1.33 \cdot 10^7$ ufc·g⁻¹ per lattughino e $1.0 \cdot 10^5 - 6.51 \cdot 10^7$ ufc·g⁻¹ per rucola, mentre in estate sono stati osservati valori variabili nell’intervallo $1.17 \cdot 10^4 - 3.8 \cdot 10^7$ ufc·g⁻¹ per lattughino e $6.67 \cdot 10^4 - 3.96 \cdot 10^7$ per rucola. I valori medi hanno riportato un aumento significativo nei campionamenti al sesto e all’ottavo giorno in entrambe le specie, sia in primavera che in estate. Per ogni campionamento, la carica batterica media è stata individualmente confrontata rispetto al valore ottenuto al tempo di conservazione di due giorni della corrispondente stagione, tramite l’Independent T-test di Student per la valutazione della significatività fra medie ($P \leq 0.05$). In lattughino, in primavera, i valori di carica media al sesto ed ottavo giorno di conservazione sono risultati significativamente più elevati rispetto al valore del secondo giorno, mentre in estate soltanto la media dell’ottavo giorno è risultata significativamente più elevata. La rucola ha presentato lo stesso andamento, con un aumento significativo sia della media del sesto giorno che dell’ottavo rispetto al valore del secondo giorno in primavera, ed un significativo aumento all’ottavo giorno in estate.

La conta dei coliformi totali e di *E. coli* è stata eseguita valutando soltanto l’effetto del periodo di conservazione per ogni specie, ed i risultati sono riportati nella tabella 2. Il secondo giorno, la carica media dei coliformi è stata $8.8 \cdot 10^4$ ufc·g⁻¹ per lattughino, con

Tab. 1 - Conta totale di batteri aerobi in campioni di lattughino e rucola conservati a 7°C per periodi diversi dal confezionamento in due stagioni diverse. La significatività della differenza di ogni media rispetto al valore del prelievo del secondo giorno è stata valutata tramite l’Independent T-test di Student.

Tab. 1 - Total count of aerobic bacteria on lettuce and rocket samples stored at 7°C for different periods after packaging in two different seasons. The significance of difference among each mean and the value detected at the second day was evaluated using the Student’s Independent T-test.

Conservazione	Primavera			Estate		
	Campioni (n)	Media (ufc·g ⁻¹)	Intervallo	Campioni (n)	Media (ufc·g ⁻¹)	Intervallo
Lattughino						
2 giorni	9	$4.49 \cdot 10^6$	$1.31 \cdot 10^5 - 1.33 \cdot 10^7$	9	$8.80 \cdot 10^6$	$1.17 \cdot 10^4 - 3.18 \cdot 10^7$
6 giorni	9	$5.61 \cdot 10^7$ *	$8.5 \cdot 10^6 - 1.39 \cdot 10^7$	9	$5.52 \cdot 10^7$ °	$2.57 \cdot 10^6 - 2.93 \cdot 10^8$
8 giorni	9	$1.40 \cdot 10^8$ *	$8.43 \cdot 10^6 - 4.33 \cdot 10^8$	9	$9.38 \cdot 10^7$ °	$2.30 \cdot 10^5 - 4.93 \cdot 10^8$
Rucola						
2 giorni	8	$1.67 \cdot 10^7$	$1.0 \cdot 10^5 - 6.51 \cdot 10^7$	8	$0.98 \cdot 10^6$	$6.67 \cdot 10^4 - 3.96 \cdot 10^7$
6 giorni	8	$2.27 \cdot 10^7$	$1.14 \cdot 10^6 - 4.80 \cdot 10^7$	8	$6.09 \cdot 10^7$	$9.23 \cdot 10^5 - 2.88 \cdot 10^8$
8 giorni	8	$4.36 \cdot 10^7$ *	$9.30 \cdot 10^5 - 6.6 \cdot 10^7$	8	$7.81 \cdot 10^7$ °	$2.33 \cdot 10^5 - 2.54 \cdot 10^8$

* Significativamente differente ($P \leq 0.05$) rispetto al valore del secondo giorno della stessa specie in primavera

° Significativamente differente ($P \leq 0.05$) rispetto al valore del secondo giorno della stessa specie in estate.

Monitoraggio dei parametri microbiologici durante la *shelf life* di lattughino e rucola di IV gamma

Tab. 2 - Conta totale di coliformi e E.coli in campioni di lattughino e rucola conservati a 7 °C per periodi diversi dal confezionamento.
 Tab. 2 - Total count of coliforms and E.coli on lettuce and rocket samples stored at 7 °C for different periods after packaging.

Conservazione	Campioni (n)	Coliformi		E. Coli	
		Media (ufc·g ⁻¹)	Intervallo (ufc·g ⁻¹)	Campioni positivi %	Intervallo (ufc·g ⁻¹)
Lattughino					
2 giorni	17	8.8·10 ⁴	0 - 3.6·10 ⁵	23,5	2.30 ·10 - 2.37 ·10 ³
6 giorni	17	2.1·10 ⁵ *	0 - 9.2·10 ⁵	17,6	6.60 ·10 - 2.60 ·10 ³
8 giorni	17	9.6·10 ⁵ *	0 - 4.5·10 ⁶	23,5	6.90 ·10 - 2.69 ·10 ³
Rucola					
2 giorni	13	2.6 ·10 ⁴	0 - 1.9·10 ⁵	7,6	1.7·10
6 giorni	13	2.0 ·10 ⁵ *	0 - 1.18·10 ⁶	7,6	1.4·10 ²
8 giorni	13	3.8 ·10 ⁵ *	0 - 2.81·10 ⁶	15,2	1.20·10 - 8.30 ·10 ³

* Significativamente differente rispetto al valore del 2° giorno della rispettiva specie (T-test di Student, $P \leq 0.05$).

valori compresi tra 0 e 3.6 10⁴ ufc·g⁻¹, mentre la rucola ha presentato una media di 2.6 10⁴ ufc·g⁻¹ con valori compresi tra 0 e 1.9 10⁵ ufc·g⁻¹. Per entrambe le specie, i valori medi riportati al sesto ed ottavo giorno sono risultati significativamente superiori, quando individualmente confrontati con il valore riportato al secondo giorno (Independent T-test di Student ($P \leq 0.05$)). La presenza di *E. coli* è stata riscontrata in entrambi i tipi di prodotto, non riscontrando alcuna relazione con il periodo di conservazione. La carica *E. coli* è risultata compresa tra i valori 1.20·10 e 8.30 10³ con una frequenza dal 23.5% al 17.6% in lattughino e dal 15.2% al 7.6% in rucola tra i gruppi con periodi diversi di conservazione.

Lieviti e muffe

I valori della conta di lieviti e muffe sono riportati nella tabella 3. Il secondo giorno, la carica media delle muffe è stata 10² e 10⁴ ufc·g⁻¹ in lattuga e rucola rispettivamente, e per i lieviti è risultata compresa fra 4·10³ e 5·10⁴ ufc·g⁻¹ in lattuga e rucola rispettivamente, senza variazioni significative nei successivi tempi

di conservazione. Il lattughino ha presentato una contaminazione da muffe nel 30% dei campioni in primavera e nel 100% in estate, mentre i lieviti sono stati rilevati in tutti i campioni analizzati. La rucola ha mostrato invece contaminazioni da lieviti e muffe sul 100% dei campioni considerati.

Conclusioni

Il presente lavoro ha avuto lo scopo di valutare l'effetto del periodo di conservazione sulla carica batterica totale, sulla presenza di coliformi, lieviti e muffe in campioni di lattughino e rucola di IV gamma conservati alla temperatura di 7°C che, sebbene risulti leggermente superiore a quella consigliata (4°C), tuttavia è molto vicina a quella realmente misurata durante la shelf-life nei punti di vendita e nei refrigeratori domestici.

I risultati ottenuti hanno mostrato variabilità nei valori iniziali di carica batterica totale e di coliformi il secondo giorno dopo il confezionamento, ed un incremento significativo durante la conservazione al sesto

Tab. 3 - Valutazione di muffe e lieviti tramite conta su piastra su campioni di IV gamma di lattughino e rucola conservati a 7°C per 2, 6 e 8 giorni dopo il confezionamento.

Tab. 3 - Evaluation of moulds and yeasts obtained by plate count on bagged lettuce and rocket samples stored at 7°C at the 2nd, 6th and 8th day after packaging.

Campioni	2° giorno				6° giorno				8° giorno			
	Muffe (ufc·g ⁻¹)		Lieviti (ufc·g ⁻¹)		Muffe (ufc·g ⁻¹)		Lieviti (ufc·g ⁻¹)		Muffe (ufc·g ⁻¹)		Lieviti (ufc·g ⁻¹)	
	Media	Intervallo	Media	Intervallo	Media	Intervallo	Media	Intervallo	Media	Intervallo	Media	Intervallo
Lattughino	10 ²	0 - 10 ³	4×10 ³	4×10 ² - 2×10 ⁴	10 ²	10 - 10 ³	7×10 ³	6×10 ² - 2×10 ⁴	10 ²	0 - 10 ³	8×10 ³	5×10 ² - 10 ⁵
Rucola	10 ⁴	2×10 ² - 5×10 ⁴	5×10 ⁴	2×10 ³ - 2×10 ⁵	10 ⁴	4×10 ² - 6×10 ⁴	10 ⁵	6×10 ² - 4×10 ⁵	4×10 ⁴	3×10 ² - 4×10 ⁵	2×10 ⁵	3×10 ² - 4×10 ⁵

e ottavo giorno in primavera, ed all'ottavo giorno in estate, per entrambi i tipi di prodotto. Considerando le linee guida utilizzate in U.K. (Gilbert *et al.*, 2000) che fissano a 10^7 ufc·g⁻¹ la carica batterica totale accettabile, i campioni di lattughino e rucola non conformi al secondo giorno sono stati rispettivamente il 16.6% e 31.3% del totale e tali valori hanno raggiunto il 77.7% e 62.5% il sesto giorno, che corrispondeva al giorno della scadenza. Tali risultati sono in accordo con uno studio effettuato da Pianetti *et al.* (2008) che riporta un aumento di carica batterica totale durante la shelf-life di prodotti in Italia e rientrano nell'intervallo di valori riportati in indagini eseguite su campioni prelevati da punti di vendita di paesi europei e USA (Badosa *et al.*, 2008; Valentin-Bon *et al.*, 2008). Poiché la temperatura di conservazione superava di pochi gradi quella raccomandata, si conclude che il rigido controllo di tale parametro, non solo durante la produzione, ma soprattutto nelle fasi di trasporto e conservazione, sia necessario per conservare la qualità microbiologica del prodotto. La presenza di *E. coli* non è risultata invece dipendente dal periodo di conservazione, ma limitata ad un piccolo gruppo di lotti (13.3% del totale) dove tutti i campioni sono risultati contaminati e non soddisfacenti secondo le linee guida della Comunità Europea (EC Commission Regulation on Microbiological Criteria for Food Stuff, 2007). La presenza di *E. coli* rilevata solo in alcuni lotti indica la necessità di contenere la contaminazione fecale iniziale tramite l'applicazione di buone pratiche agricole secondo le norme adottate dal Codex Alimentarius (FAO, 2003) oltre che applicare rigorose procedure di sanitizzazione, allo scopo di garantire la sicurezza del prodotto confezionato.

Infine, a parità di tutte le altre condizioni, la rucola ha mostrato una più elevata contaminazione fungina (muffe + lieviti) rispetto al lattughino. Tali dati sono in accordo con quelli di letteratura che riportano un'ampia variabilità tra vegetali per ciò che riguarda la carica fungina (Tournas, 2005).

Riassunto

I parametri microbiologici di lattughino e rucola di IV gamma sono stati valutati in relazione alla lunghezza della conservazione a 7 °C in due stagioni. La conta totale di batteri aerobi, coliformi, *E. coli*, lieviti e muffe è stata ottenuta al secondo, sesto, e ottavo giorno di conservazione in primavera ed in estate. Il secondo giorno la carica batterica media è stata $4.49 \cdot 10^6$ e $1.67 \cdot 10^7$ ufc·g⁻¹ per lattughino e rucola rispettivamente in primavera e $8.80 \cdot 10^6$ and $0.98 \cdot 10^7$

cfu·g⁻¹ in estate. Un aumento significativo è stato osservato al sesto e ottavo giorno di conservazione in primavera ad all'ottavo in estate per entrambi le specie. La media dei coliformi è stata $8.8 \cdot 10^4$ e $2.6 \cdot 10^4$ ufc·g⁻¹ per lattughino e rucola con un aumento ai successivi tempi di campionamento. Presenza di *E. coli* è stata riscontrata in un gruppo di lotti (13%) indipendentemente dalla conservazione. La carica di lieviti e muffe non ha presentato variazioni durante la conservazione e la contaminazione fungina media è risultata più elevata in rucola (10^4 ufc·g⁻¹) rispetto alla lattuga (10^2 ufc·g⁻¹).

Parole chiave: coliformi, *E. coli*, lieviti, muffe.

Ricerca svolta con il supporto finanziario del Progetto Nazionale Me.Di.T.A. (MIUR n° 9038).

Bibliografia

- ABADIAS M., USALL J., ANGUERA M., SOLSONA C., VIÑAS I., 2008. *Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments*. Int. J. Food Microb. 123: 121–129.
- BADOSA E., TRIAS R., PARÉS D., PLA M., MONTESINOS E., 2008. *Microbiological quality of fresh fruit and vegetable products in Catalonia (Spain) using normalised plate-counting methods and real time polymerase chain reaction (QPCR)*. J. Sci. Food Agric. 88: 605–611.
- EC, 2007. *Commission Regulation N°1441 /2007 on Microbiological Criteria for Food Stuff* Official J. European Union.
- FAO, 2003. *Recommended international code of practice general principles of food hygiene*, CAC/RCP 1-1969, Rev. 4.
- GREENE S.K., DALY E.R., TALBOT E.A., DEMMA L.J., HOLZBAUER S., PATEL N.J., HILL T.A., WALDERHAUG M.O., HOEKSTRA R.M., LYNCH M.F., PAINTER J.A., 2008. *Recurrent multistate outbreak of Salmonella Newport associated with tomatoes from contaminated fields, 2005*. Epidemiol. Infect. 136: 157–165.
- GILBERT R.J., DE LOUVOIS J., DONOVAN T., LITTLE C., NYE K., RIBEIRO C.D., RICHARDS J., ROBERTS D., BOLTON F.J., 2000. *Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat food samples at the point of sale*. Comm. Dis. Public Health 3: 163:167.
- PIANETTI A., SABATINI L., CITTERIO B., PIERFELICI L., NINFALI P., BRUSCOLINI E., 2008. *Changes in microbial populations in ready-to-eat vegetable salads during shelf-life*. Italian J. Food Sci. 20: 245–254.
- SAGOO S.K., LITTLE C.L., WARD L., GILLESPIE I.A., MITCHELL, R.T., 2003. *Microbiological study of ready-to-eat salad vegetables from retail establishments uncovers a national outbreak of salmonellosis*. J. Food Prot. 66: 403–409.
- SIVAPALASINGAM, S., FRIEDMAN C.R., COHEN L., TAUXE R.V., 2004. *Fresh produce: a growing cause of outbreaks of food-borne illness in the United States, 1973 through 1997*. J. Food Prot. 67: 2342–2353.
- TOURNAS, V.H., 2005. *Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables and sprouts*. Int. J. Food Microbiol. 99: 71–77.
- VALENTIN-BON I., JACOBSON A., MONDAY S.R., FENG P.C.H., 2008. *Microbiological quality of bagged cut spinach and lettuce mixes*. Appl. Environ. Microbiol. 74: 1240–1242.