

## IL TEMPO DI RIDUZIONE DECIMALE

### ***Sensibilità al calore dei microrganismi***

In generale i batteri psicotrofi sono meno resistenti dei mesofili che lo sono meno dei termotrofi. I Gram negativi sono meno resistenti dei Gram positivi. Poiché la maggior parte delle forme vegetative dei batteri sono uccise istantaneamente a 100°C i valori D sono misurati ed espressi a temperature di pastorizzazione (Tabella 1 da Adams e Moss, 1995). Il valore “D” indica il tempo necessario, a una data temperatura, per ridurre la carica batterica del 90%, mentre il valore “z” indica l’aumento di temperatura che consente di diminuire del 90% il tempo di un trattamento (Mossel et al., 1995).

**Tabella 1.** Resistenza al calore dei microrganismi.

<i>Vegetative organisms (z ~ 5 °C)</i>	<i>D (mins)</i>
<i>Salmonella</i> sp.	D <sub>65</sub> 0.02-0.25
<i>Salmonella senftenberg</i>	D <sub>65</sub> 0.8-1.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	D <sub>65</sub> 0.2-2.0
<i>Escherichia coli</i>	D <sub>65</sub> 0.1
Yeasts and moulds	D <sub>65</sub> 0.5-3.0
<i>Listeria monocytogenes</i>	D <sub>60</sub> 5.0-8.3
<i>Campylobacter jejuni</i>	D <sub>55</sub> 1.1
<b>Bacterial Endospores</b>	<b>D<sub>121</sub></b>
<b>(z ~ 10 °C)</b>	
<i>B. stearothermophilus</i>	4-5
<i>C. thermosaccharalyticum</i>	3-4
<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	2-3
<i>B. coagulans</i>	0.1
<i>C. botulinum</i> types A & B	0.1-0.2
<i>C. sporogenes</i>	0.1-1.5
<i>C. botulinum</i> type E	D <sub>80</sub> 0.1-3.0
	D <sub>110</sub> < 1 second

Le spore batteriche sono più resistenti delle forme vegetative per il basso contenuto di acqua nel citoplasma. Maggiore il contenuto di acqua, minore la resistenza. In fase stazionaria le cellule sono più resistenti che in fase esponenziale di crescita. C'è maggiore sensibilità se il pH è maggiore di 8 o minore di 6, mentre la presenza di grasso aumenta la resistenza. Bassi valori di aw aumentano la resistenza. Prodotti grassi e dolci (per es. gelati, bevande dolci) richiedono trattamenti di pastorizzazione più intensi. L'implicazione pratica si ha nelle severe condizioni di pastorizzazione, usate per molti zuccheri e grassi, nonché per prodotti come gelati e creme oltre che per il latte.

Questo effetto si ha ad esempio nel latte al cioccolato dove il valore D70 di *Salmonella senftenberg* 775W era stato misurato tra 6 ed 8 ore, mentre è di pochi secondi nel latte (Adams e Moss, 1995).

Un altro esempio di sensibilità media al calore si ha nella fabbricazione della birra dove l'etanolo contenuto nella birra ha un profondo effetto nella sensibilità al calore e al deterioramento di

*Lactobacillus* spp.: questa osservazione è importante nella pastorizzazione di birra poco alcolica (Adams e Moss, 1995).

Molte forme vegetative sono uccise pressoché istantaneamente a 100°C e il loro valore D è misurato ed espresso a temperature appropriate alla pastorizzazione. La resistenza al calore esibita dalle spore è dovuta alla loro abilità di mantenere un contenuto di acqua basso nel DNA contenuto nel protoplasto; le spore con un elevato contenuto di acqua presentano una bassa resistenza al calore. La relativa disidratazione del protoplasto è dovuta alla corteccia delle spore, che è formata da peptidoglicano elettronegativo, che sono anche responsabili della resistenza in natura delle spore; l'esatto meccanismo con cui attuano questo non si conosce. Col dissolvimento della corteccia durante la germinazione e la reidratazione del protoplasto, anche la resistenza al calore diminuisce.

### **Descrizione del trattamento termico**

I trattamenti termici non sono né uniformi, né istantanei. Per poter valutare l'effetto di differenti trattamenti è necessaria un'unità di misura. Per l'appertizzazione è utilizzato il valore F che esprime l'effetto letale in minuti a una data temperatura. Per esempio un trattamento con  $F_{121}=4$  corrisponde a un riscaldamento istantaneo a 121°C, al mantenimento di questa temperatura per 4 minuti e al raffreddamento istantaneo. Ciò non implica necessariamente che il prodotto ha raggiunto i 121°C.

### **Esempio per le spore e prodotti in scatola con pH>4,5 (Clostridium botulinum).**

Per le spore  $z=10$  e  $F_{121}$  determinato con questo valore è indicato come  $F_0$ . Per determinare il valore  $F_0$  necessario in un determinato trattamento è necessario conoscere il valore  $D_{121}$  del microrganismo e il numero di riduzioni decimali necessarie [nel caso della pastorizzazione la temperatura di riferimento è 60°C. Pertanto  $P_{60} = D_{60}(\log N_0 - \log N)$ ]

$$F = D_{121}(\log N_0 - \log N)$$

Concetto comunemente accettato è che i trattamenti termici applicati a prodotti in scatola producano perlomeno 12 riduzioni

decimali al numero di spore di *Cl. botulinum* ( $\log N_0 - \log N = 12$ ). Tale valore è noto come 12D o “*botulinum cook*” (Adams e Moss, 1995)..

Applicando  $D_{121} = 0,2$  (vedi tabella sopra) il trattamento termico avrà un  $F_0 = 0,2 \times 12 = 2,4$  minuti. Considerazione pratica è che a un tale trattamento, nel caso che ogni scatoletta contenga una spora di *Cl. botulinum* ( $N_0 = 1$ ), sopravviverà una spora ogni 1000 miliardi di scatolette.

Nella decisione del tipo di trattamento termico da adottare, tre sono i quesiti fondamentali:

- 1) costo di eventuali alterazioni;
- 2) costo del trattamento supplementare necessario a ridurre le alterazioni;
- 3) quale diminuzione della qualità può derivare dal trattamento supplementare.

Si considera accettabile un tasso di alterazione, dovuto a trattamenti insufficienti, di una scatoletta ogni milione. Ciò può essere ottenuto attraverso un 5 riduzioni decimali nel numero di spore con potenziale effetto alterante.

*Clostridium sporogenes* (un suo particolare stipite: PA3679) viene utilizzato come indicatore. Ha un valore  $D_{121} \cong 1$  minuto.

Pertanto:

$$F_0 = 1 \times 5 = 5;$$

Applicando  $F_0 = 5$  alla formula:

$$F = D_{121}(\log N_0 - \log N)$$

nel caso di *Cl. botulinum* ( $D_{121} = 0,2$ ), si ottiene:

$$5 = 0,2 (\log N_0 - \log N), \text{ da cui}$$

$$\log N_0 - \log N = 5/0,2 = 25.$$

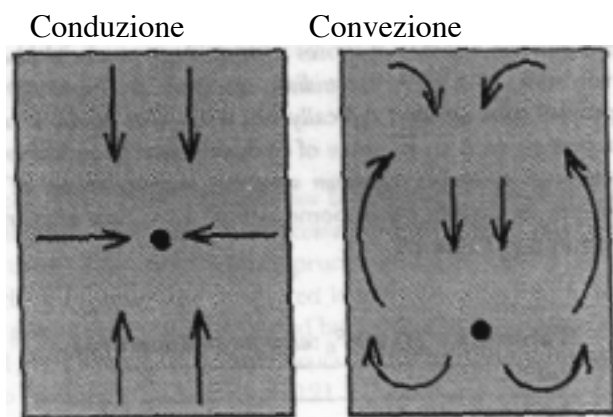
Cioè un trattamento in grado di produrre un riduzione nel numero delle spore di *Cl. botulinum* di ben 25 riduzioni decimali, ampiamente in eccesso rispetto al “*botulinum cook*” di 12 (Adams e Moss, 1995).

**Tabella 2.** Alcuni  $F_0$  di alimenti in scatola (da Adams e Moss, 1995).

Alimento	$F_0$
Sugo con fagioli	2-4
Piselli	4-6
Sugo di carne	8-10
Sardine	3-4

Stabilito il valore  $F$  è necessario sapere se il valore applicato avrà l'effetto desiderato. E' importante conoscere come l'alimento si riscalda. In Tabella 2 sono indicati i valori  $F$  di alcuni alimenti in scatola. Si ricorre a termocoppie poste in vari punti (Figura 1).

**Figura 1.** Riscaldamento per conduzione e per convezione.



La parte che si riscalda più lentamente nel riscaldamento per conduzione è il centro geometrico; mentre per convezione è parte lungo l'asse mediano prossima alla base (Mossel et al., 1995).

## ESERCITAZIONI 1 e 2: calcoli

L'uso del foglio elettronico nel laboratorio di ispezione degli alimenti.

Funzioni utilizzate negli esercizi e traduzione in inglese americano per l'utilizzo su computer con sistema operativo e applicazioni in inglese.

<b>ITALIANO</b>	<b>INGLESE</b>
PENDENZA	SLOPE
ASS	ABS
RIGA	ROW
COLONNA	COLUMN

# ESERCIZIO # 1

## DETERMINAZIONE DEL TEMPO DI RIDUZIONE DECIMALE

Nel corso di un trattamento termico, il calore è applicato all'alimento per l'eliminazione dei microrganismi. Il numero di batteri che sopravvivono al trattamento è necessario per determinare il tempo di riduzione decimale, comunemente noto come "valore D". Il valore D è il tempo necessario a ridurre la batterica del 90%. La distruzione batterica è avviene in maniera esponenziale: se si mette in un grafico il numero dei microrganismi sopravvissuti (ordinate) e il tempo (ascisse) la curva che ne deriva è una retta. In questa retta, il tempo necessario per ottenere una riduzione della popolazione batterica di un logaritmo fornisce il valore D perché un ciclo logaritmico indica una variazione del 90%.

In questo paragrafo sarà utilizzato un foglio elettronico per determinare il valore D da dati sperimentali, ottenuti sul numero di batteri sopravvissuti dopo trattamenti termici di durata variabile.

I seguenti dati sono stati ottenuti trattando a 60°C una brodocoltura di *S. aureus* (Tabella 3).

**Tabella 3.** Tempo e carica batterica residua di *S. aureus* a 60°C

Tempo (min)	Sopravvissuti
0	2000
5	1100
10	750
20	275
30	90
40	32
50	11
60	4

Il primo passo consiste nel determinare il Log10 dei batteri sopravvissuti ad ogni istante di prelievo, successivamente dal diagramma del Log dei sopravvissuti nel tempo si determina l'incidenza della retta: l'inverso della pendenza dà il valore "D".

La formula per calcolare il valore "D" utilizzata è quella descritta da Singh e Heldman (1993).

$$D = t / \log N_0 - \log N,$$

dove  $t$  è il tempo necessario a ridurre la popolazione batterica del 90%,  $N_0$  e  $N$  rappresentano la popolazione batterica prima e dopo la riduzione di un ciclo logaritmico. Il denominatore sarà pertanto 1 e  $t$  corrisponderà al valore "D".

La programmazione del foglio elettronico prevede le seguenti fasi:

1. nelle celle da A1 a C2 e da A3 ad A10 e da A12 a A14 inserire le intestazioni come mostrato in Figura 2.

**Figura 2.** Foglio elettronico per il calcolo del valore "D"

	A	B	C
1	Dato:		
2	Tempo (min)	Sopravvissuti	Log sopravvissuti
3	0	2000	3.301
4	5	1100	3.041
5	10	750	2.875
6	20	275	2.439
7	30	90	1.954
8	40	32	1.505
9	50	11	1.041
10	60	4	0.602
11			
12	Risultato:		
13	Pendenza	-0.045	
14	valore D (min)	22.217	

2. nella cella C3 inserire la formula **=LOG(B3)** e copiarla nella celle C4:C10 usando il menu "Modifica" e selezionando "Effetti di riempimento → In basso".

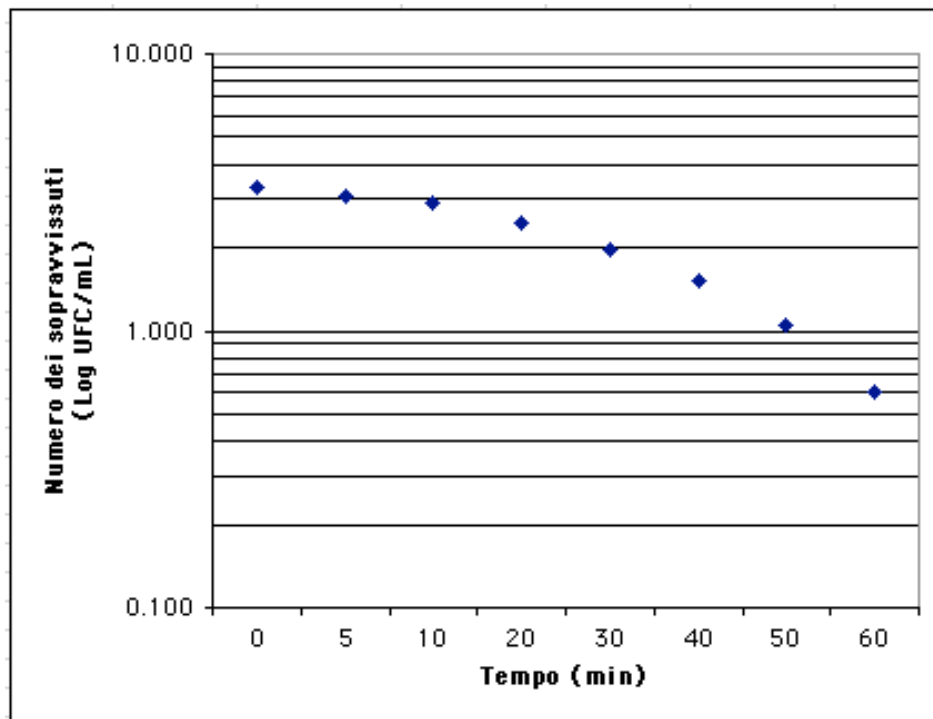
3. nella cella B13 inserire la formula **=PENDENZA(C3:C10,A3:A10)** per il calcolo del coefficiente angolare della retta di regressione tempo/sopravvissuti.



4. nella cella B14 inserire la formula **=ASS(1/B13)**, per il calcolo del reciproco in valore assoluto, cioè del valore “D” che risulta uguale a 22,22 minuti.

5. selezionare le celle A3:A10 e C3:C10 e scegliere “Autocomposizione grafico” per creare un grafico con il tempo sulle ascisse e il Log dei sopravvissuti sulle ordinate (Figura 3).

**Figura 3.** Curva di riduzione decimale.



## ESERCIZIO # 2

### IL FATTORE DI RESISTENZA TERMICA, VALORE “Z” NEI TRATTAMENTI TERMICI.

L'effetto della temperatura sul tasso di distruzione batterica è espresso dal fattore di resistenza termica, comunemente chiamato valore “z”. Il valore “z” è unico per ciascun microrganismo. Tutti gli esperimenti tesi a determinare la resistenza di un germe ai trattamenti termici prevedono, in primo luogo, la determinazione del numero dei sopravvissuti nel tempo a diverse temperature. Questi dati, a ciascuna temperatura, sono quindi analizzati con le modalità mostrate nel paragrafo precedente per ottenere i valori “D” alle singole temperature. I valori D sono quindi analizzati nei confronti della temperatura: il coefficiente angolare della retta risultante, consente di determinare il valore z.

I dati contenuti nella tabella che segue (Tabella 4) sono stati ottenuti sperimentalmente sottoponendo a diverse temperature una brodocoltura di *Bacillus subtilis*.

**Tabella 4.** Numero dei sopravvissuti a diverse temperature.

Tempo	120°C	122°C	124°C	126°C	128°C
0	10000000	10000000	10000000	10000000	10000000
2	6800000	5440000	3800000	2165000	887000
4	4640000	2960000	1450000	470000	78800
6	3160000	1610000	550000	101500	7000
8	2150000	877000	210000	22000	620
10	1460000	477800	80000	4700	55

Per la determinazione del valore z è necessario, inizialmente i valori D. La formula utilizzata per calcolare i valori z, conoscendo i valori D è quella proposta da Sing e Hedelman (1993):

$$z = \frac{T_2 - T_1}{\log D_{T_1} - \log D_{T_2}}$$

dove  $T_1$  e  $T_2$  sono temperature prima e dopo la riduzione del 90% del valore D (da  $D_{T_1}$  a  $D_{T_2}$ ).

La programmazione del foglio elettronico prevede le seguenti fasi:

1. more solito, impostare le intestazioni come indicato in Figura 4.

**Figura 4.** Valore z.

valore Z											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Dato:					Temperatura					
2	Tempo	120		122		124		126		128	
3	0	10000000	7.000	10000000	7.000	10000000	7.000	10000000	7.000	10000000	7.000
4	2	6800000	6.833	5440000	6.736	3900000	6.580	2165000	6.335	887000	5.948
5	4	4640000	6.667	2960000	6.471	1450000	6.161	470000	5.672	78800	4.897
6	6	3160000	6.500	1610000	6.207	550000	5.740	101500	5.006	7000	3.845
7	8	2150000	6.332	877000	5.945	210000	5.322	22000	4.342	620	2.792
8	10	1460000	6.164	477800	5.679	80000	4.903	4700	3.672	55	1.740
9	Pendenza		-0.084		-0.132		-0.210		-0.333		-0.526
10	D		11.975		7.571		4.769		3.006		1.901
11	Log(D)		1.078		0.879		0.678		0.478		0.279
12											
13	pendenza di Log(D) nei confronti della temperatura				-0.100						
14	z=				<b>10.00</b>						

2. nelle colonne B, D, F, H e J inserire i dati della tabella 4 e nelle colonne C, E, G, I, K la formula **=LOG(casella adiacente a sinistra)** con le modalità del paragrafo precedente.

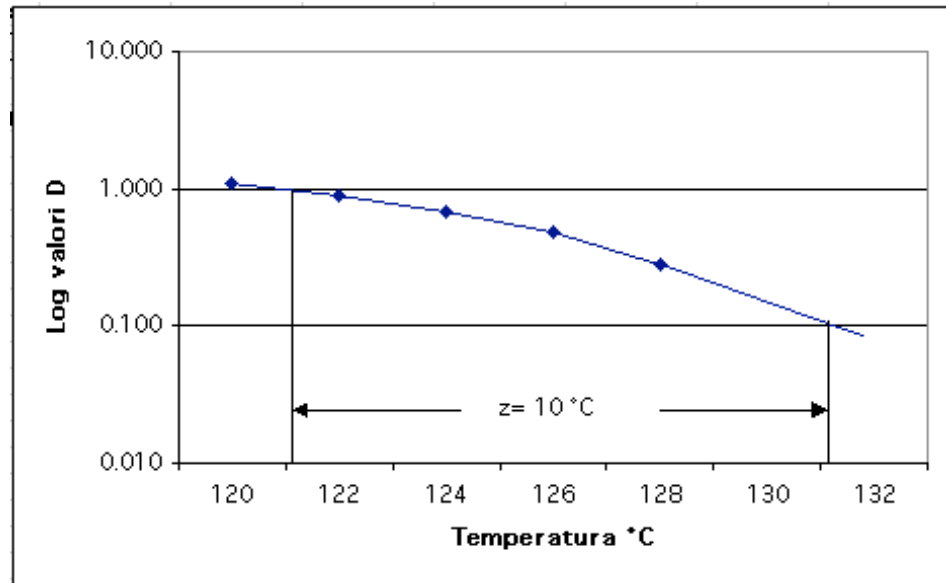
3. nella cella C9 inserire la formula **=PENDENZA(C3:C8,\$A\$3:\$A:\$8)** e quindi copiarne il contenuto nelle celle E9, G9, I9 e K9.

4. nella cella C10, come nel paragrafo precedente si calcola il reciproco della pendenza, che è il valore D. La stessa formula va incollata nelle celle E10, G10, I10 e K10, mentre nelle celle sottostanti (rispettivamente C11, E11, G11, I11 e K11) se ne calcola il Log.

5. nella cella E13 si inserisce la formula **=PENDENZA(C11:K11,B2:J2)** per calcolare il coefficiente di regressione dei valori D al variare della temperatura, mentre nella cella sottostante se ne calcola il reciproco che è il valore z.

6. more solito, si crea il grafico (Figura 5) dal quale appare evidente come, aumentando la temperatura di 10°C (valore z), si ottiene una riduzione del tempo del 90%.

**Figura 5.** Valore z.



## ESERCIZIO # 3

### IL CAMPIONAMENTO CHE GARANTISCE CHE LA PERCENTUALE DI CAMPIONI CONTAMINATI IN UN LOTTO NON SUPERI IL VALORE PRESTABILITO

Nel corso del campionamento di un lotto per analisi del tipo presenza/assenza di contaminazione è assai utile sapere quanti campioni andrebbero analizzati. L'analisi statistiche con la distribuzione binomiale ci consente di determinare il numero di campioni necessari a tale scopo. Per esempio può essere necessario avere il 90, oppure il 95 o il 99% di probabilità che non più dello 0,1, o dell'1, o del 2 o del 5% sia contaminato. Si ricorre all'equazione di Jarvis (1989):

$$n = \log_{10}(1-P) / \log_{10}(1-d)$$

in cui  $n$  è il numero dei campioni,  $P$  è la probabilità in decimali,  $d$  è la percentuale di campioni contaminati. Nel nostro caso sono state condotte analisi con  $d = 0,0001, 0,01, 0,02$  e  $0,05$ .

La programmazione del foglio elettronico prevede le seguenti fasi:

1. more solito, impostare le intestazioni come indicato in Figura 6.
2. in questo calcolo è sufficiente individuare i due valori intermedi (0,95% e 1 lotto contaminato su 100), per calcolare automaticamente gli altri valori. La formula chiave va inserita nella cella A7: **=LOG(1-B2)/LOG(1-B3/100)**, facendo quindi ricordo al menu "Dati" → "Tabella" (selezionando le celle A7:D12) e indicando la cella B2 per le righe e la cella B3 per le colonne, avendo l'accortezza di indicarle come assolute e non come relative, inserendo il segno del dollaro (\$).

Il risultato indica che per determinare, con il 90% di probabilità che un lotto deve avere meno dello 0,5% di campioni contaminati è necessario che 459 campioni siano negativi.

**Figura 6.** Numero di lotti contaminati.

<b>Lotto e prelievo</b>				
	A	B	C	D
1	Dato:			
2	Probabilità che si verifichi l'evento	0.95		
3	Percentuale di lotti non contaminati	0.1		
4				
5	Risultato:	Numero di campioni che devono essere negativi		
6	Percentuale di contaminati (su 100)	Livelli di probabilità		
7	2994.234158	<b>0.9</b>	<b>0.95</b>	<b>0.99</b>
8	<b>0.1</b>	2301	2994	4603
9	<b>0.5</b>	459	598	919
10	<b>1</b>	229	298	458
11	<b>2</b>	114	148	228
12	<b>5</b>	45	58	90
13				