



Interreg

ALCOTRA

Fonds européen de développement régional
Fondo europeo di sviluppo regionale



UNION EUROPÉENNE
UNIONE EUROPEA



ESSICA

PROGETTO Alcotra n° 1733 ESSICA

WP3.1.5 Studio
bibliografico su
microrganismo e insetti di
maggiore interesse per le
specie aromatiche
individuate

23/11/2017



Le Terre
dei Savoia



DISAFA
Università degli studi di Torino



FranceAgriMer



CRIEPPAM

SOMMARIO

PREAMBOLO	3
[1]. MICROBIOLOGIA delle ERBE AROMATICHE	4
[2]. NORMATIVA relativa ai PARAMETRI MICROBIOLOGICI nelle ERBE AROMATICHE	6
[3]. NORMATIVA e APPLICAZIONI dell'OZONO in ambito ALIMENTARE.....	7
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	9

Preambolo

Negli anni, la consapevolezza del consumatore è aumentata in modo importante in ambito alimentare. L'acquirente è diventato sempre più esigente e alla ricerca di prodotti di qualità oltre che sicuri. Le erbe aromatiche sono attualmente oggetto di notevole interesse, da questo punto di vista, e il loro impiego in ambito alimentare ha portato la comunità scientifica ad una maggior attenzione nei riguardi della loro qualità organolettica e sicurezza microbiologica oltre che alla possibilità di prolungarne la *shelf-life*.

Se è vero che le erbe aromatiche, in stato di prodotto essiccato, presentano un rischio microbiologico contenuto grazie alla bassa attività dell'acqua, è anche vero che la materia prima fresca può rappresentare un bacino di contaminazione microbica importante, così come alcuni dei passaggi successivi di trasformazione, confezionamento e conservazione. Con la sperimentazione e messa a punto di tecniche innovative di trasformazione e confezionamento delle erbe aromatiche, questo progetto risponde alla richiesta, in particolare da parte degli operatori del settore, di aumentare la qualità e la sicurezza delle loro produzioni.

Il presente report sullo stato dell'arte attuale relativo agli aspetti microbiologici di alcune erbe aromatiche fresche ed essiccate, evidenzia come la sperimentazione e le informazioni a riguardo siano relativamente carenti. Nonostante infatti la maggior parte dei campioni oggetto di studio [1] siano risultati conformi rispetto alla normativa vigente in ambito Europeo e italiano [2], la scarsità di dati rende necessario un lavoro di approfondimento sia per arricchire le conoscenze relative al rischio microbiologico della materia prima, sia per valutare l'efficacia di tecniche innovative, quali l'essiccazione a freddo, sulla qualità microbiologica di questi vegetali.

In ultimo, nel presente report è stato approfondito lo stato dell'arte relativo all'utilizzo dell'ozono [3] ai fini di un contenimento delle cariche microbiche di erbe aromatiche e spezie, un aspetto di grande interesse e attualità in ambito alimentare. L'esiguità dei dati sperimentali presenti in bibliografia, per quanto incoraggianti a livello di risultati, rende necessario un approfondimento sperimentale adeguato per avvalorare o meno l'efficacia ed applicabilità dell'utilizzo di questo gas. Quanto noto e riportato, a questo proposito, deve quindi costituire un punto di partenza per l'ottimizzazione dei parametri da sperimentare e valutare nel presente progetto.

[1]. MICROBIOLOGIA delle ERBE AROMATICHE

Alcune erbe aromatiche quali basilico, timo, rosmarino, origano, menta, salvia sono state oggetto di studio per quanto riguarda la valutazione della carica dei principali gruppi microbici indicatori di qualità e/o della presenza di microrganismi patogeni. Qui di seguito, in tabella 1, vengono riassunti i principali risultati ottenuti.

Sulla base degli studi riportati in bibliografia, la carica mesofila aerobia delle erbe essiccate presenta cariche che variano tra 10^3 e 10^6 ufc/g mentre per quanto riguarda le erbe fresche le cariche in genere superano il valore di 10^6 ufc/g. In alcuni studi è stata valutata anche la carica termofila aerobia con valori di circa un log inferiori rispetto a quella mesofila delle stesse erbe.

Per quanto riguarda invece i microrganismi indicatori di qualità quali lieviti e muffe, i primi sono stati rilevati, nella maggior parte degli studi, con cariche inferiori a 10 ufc/g mentre i funghi miceliari sono presenti, in genere, con cariche che variano tra 10 e 10^3 ufc/g. In ultimo, i coliformi sono stati isolati con cariche massime di 10^4 ufc/g nelle erbe fresche mentre il processo di essiccazione sembra abbattere le cariche a valori inferiori a 10 ufc/g.

La ricerca di microrganismi potenzialmente patogeni in erbe essiccate evidenzia come il rischio microbiologico, in questo tipo di matrice, sia relativamente contenuto. Negli studi riportati in tabella 3 *Salmonella* spp., *S. aureus*, *L. monocytogenes* ed *E. coli* sono risultati assenti nei campioni analizzati delle erbe in studio, fatta eccezione per *E. coli* isolato occasionalmente da campioni freschi di menta, salvia e coriandolo. Sempre da campioni freschi sono stati isolati *Cronobacter*, in basilico e prezzemolo, e *C. perfringens*, in menta, salvia e coriandolo con cariche inferiori a 10^2 ufc/g. *B. cereus* invece ha raggiunto cariche tra 10 e 10^2 ufc/g, più raramente tra 10^3 e 10^4 ufc/g in campioni di timo, rosmarino e basilico.

Tabella 1. Prospetto di alcuni degli studi sperimentali più recenti nell'ambito dello studio microbiologico delle erbe aromatiche.

BASILICO

RIFERIMENTO	TARGET MICROBICO	CARICA MICROBICA (UFC/g)	
Fogele, 2017	Muffe	Valore minimo LOG 1.20 ± 0.17	Valore massimo LOG 3.56 ± 0.09
	<i>B. cereus</i>	Valore minimo LOG 1.40 ± 0.17	Valore massimo LOG 2.98 ± 0.03
Garbowska, 2015	Microrganismi aerobi mesofili	> 10^5 - 10^6	
	<i>Cronobacter</i> spp.	presente	
Wojcik, 2009 (*)	Microrganismi aerobi mesofili	LOG 5.26	
	Microrganismi aerobi termofili	LOG 4.62	
	Muffe	5.2 x 10	
	Lieviti	< 3.0 x 10	
	Coliformi	> 0.1	
	<i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	assente	

* basilico essiccato

TIMO

RIFERIMENTO	TARGET MICROBICO	CARICA MICROBICA (UFC/g)	
Fogele, 2017	Muffe	Valore minimo 1.26 ± 0.24	Valore massimo 3.00 ± 0.05
	<i>B. cereus</i>	Valore minimo 1.94 ± 0.15	Valore massimo 2.24 ± 0.08
Garbowska, 2015	Microrganismi aerobi mesofili	>10 ³ -10 ⁴ (4 campioni) >10 ⁴ -10 ⁵ (2 campioni)	
Wojcik, 2009 (*)	Microrganismi aerobi mesofili	LOG 4.21	
	Microrganismi aerobi termofili	LOG 3.67	
	Muffe	< 10 UFC/g	
	Lieviti	< 10 UFC/g	
	Coliformi	> 0.1 (max livello registrato)	
	<i>Salmonella spp., E. coli, S. aureus</i>	assente	

*: timo essiccato

ROSMARINO

RIFERIMENTO	TARGET MICROBICO	CARICA MICROBICA (UFC/g)	
Fogele, 2017	Muffe	Valore minimo 1.10 ± 0.17	Valore massimo 1.76 ± 0.15
	<i>B. cereus</i>	Valore minimo 2.04 ± 0.04	Valore massimo 2.04 ± 0.04
Garbowska, 2015 (*)	Microrganismi aerobi mesofili	>10 ⁴ -10 ⁵	

*: rosmarino essiccato

ORIGANO

RIFERIMENTO	TARGET MICROBICO	CARICA MICROBICA (UFC/g)	
Garbowska, 2015	Microrganismi aerobi mesofili	>10 ² -10 ³ (2 campioni) >10 ³ -10 ⁴ (2 campioni) >10 ⁵ -10 ⁶ (2 campioni)	
Wojcik, 2009 (*)	Microrganismi aerobi mesofili	LOG 3.48	
	Microrganismi aerobi mesofili	LOG 2.58	
	Muffe	< 10 UFC/g	
	Lieviti	assente	
	Coliformi	> 0.1 (max livello registrato)	
	<i>Salmonella spp., E. coli, S. aureus</i>	assente	

*: origano essiccato

ALTRE ERBE

RIFERIMENTO	ERBA	TARGET MICROBICO	CARICA MICROBICA
Garbowska, 2015	PREZZEMOLO	Microrganismi aerobi mesofili	>10 ³ -10 ⁴ (3 campioni) >10 ⁴ -10 ⁵ (2 campioni)
		<i>Cronobacter</i> spp.	presente
Sagoo, 2009	SALVIA	<i>Salmonella</i> spp.	assente
	CORIANDOLO	<i>E. coli</i>	<10 (22 campioni) >10 ² (1 campione)
	FIENO	<i>B. cereus</i>	<10 ³ (16 campioni) <10 ³ -10 ⁴ (5 campioni) ≥ 10 ⁴ (2 campioni)
	MENTA	<i>C. perfringens</i>	<10 ² (22 campioni) >10 ³ (1 campione)
Vitullo, 2011	ERBE FRESCHE (tra cui salvia)	<i>Salmonella</i> spp. <i>S. aureus</i> <i>L. monocytogenes</i>	assente
		Microrganismi aerobi mesofili	>10 ⁶ (29.4% dei campioni)
		Coliformi totali	<10 ⁴ UFC/g

[2]. NORMATIVA relativa ai PARAMETRI MICROBIOLOGICI nelle ERBE AROMATICHE

I criteri adottati, a livello italiano, per valutare la sicurezza e la qualità microbiologica delle erbe aromatiche, incluse le erbe essiccate, fanno riferimento principalmente alla normativa europea Racc. 2004/24/CE (allegato 1). I parametri presi in considerazione da tale normativa e i valori raccomandati sono riportati in tabella 2 e riguardano le *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus* presunto e *Clostridium perfringens*. In aggiunta, sulla base sia del Racc. 2004/24/CE sia dell'indagine condotta, nel 2004, dall'European Spice Association (ESA)(allegato 2), sono stati stabiliti i valori di sicurezza microbiologica relativi ad *Escherichia coli* (tabella 2). Per quanto riguarda *Listeria monocytogenes*, invece, la normativa italiana fa riferimento a quanto disposto dal Reg. CE 2073/05 (allegato 3) relativamente agli alimenti considerati non a rischio di contaminazione da parte di questo patogeno.

Poiché i regolamenti europei citati non fanno riferimento a parametri microbiologici legati alla qualità e *shelf-life* dell'erbe aromatiche, quali microrganismi mesofili aerobi e lieviti e muffe, a livello italiano e, nello specifico, la Regione Piemonte ha redatto delle Linee guida (D.D. n.780 del 18.11.2011)(allegato 4) per colmare la carenza normativa a riguardo. A seguito di un approfondimento scientifico infatti sono stati stabiliti del valori guida, per spezie ed erbe aromatiche, relativi alla carica dei microrganismi aerobi mesofili e delle muffe (tabella 2).

Tabella 2. Parametri microbiologici di riferimento per la valutazione della qualità e sicurezza microbiologica delle erbe aromatiche.

PARAMETRI	VALORI GUIDA CONSIGLIATI (ufc/g)	RIFERIMENTI
Microrganismi mesofili aerobi	Soddisfacente: $<5 \times 10^5$ Accettabile: $5 \times 10^5 \leq x < 5 \times 10^6$ Non soddisfacente: $\geq 5 \times 10^6$	Regione Piemonte (D.D. n.780 del 18.11.2011) Ottaviani (1996)
Muffe	Soddisfacente: $<10^3$ Accettabile: $10^3 < x < 10^4$ Non soddisfacente: $\geq 10^4$	Regione Piemonte (D.D. n.780 del 18.11.2011) IFST (1997)
<i>Enterobacteriaceae</i> n = 5 c = 1 m = 10 ufc/g M = 100 ufc/g	Soddisfacente: <10 Accettabile: $10 \leq x < 10^2$ Non soddisfacente: $\geq 10^2$	Racc. 2004/24/CE
<i>Escherichia coli</i> n = 5 c = 1 m = 10 ufc/g M = 100 ufc/g	Soddisfacente: <10 Accettabile: $10 \leq x < 10^2$ Non soddisfacente: $\geq 10^2$	Racc. 2004/24/CE ESA 2004
<i>Clostridium perfringens</i> n = 5 c = 1 m = 100 ufc/g M = 1000 ufc/g	Soddisfacente: $<10^2$ Accettabile: $10^2 < x < 10^3$ Non soddisfacente: $\geq 10^3$	Racc. 2004/24/CE
<i>Bacillus cereus</i> n = 5 c = 1 m = 1000 ufc/g M = 10000 ufc/g	Soddisfacente: $<10^3$ Accettabile: $10^3 \leq x < 10^4$ Non soddisfacente: $\geq 10^4$	Racc. 2004/24/CE
<i>Salmonella</i> spp. n = 5 c = 0	Soddisfacente: assente in 25 g	Racc. 2004/24/CE
<i>Listeria monocytogenes</i> n = 5 c = 0	Soddisfacente: ≤ 100	Reg. 2073/05/CE

m: valore limite del numero di batteri; il risultato è considerato soddisfacente se il numero di batteri in tutte le unità campionarie analizzate è inferiore ad *m*;

M: valore massimo del numero di batteri tollerato; il risultato è considerato insoddisfacente se il numero di batteri in una o più delle unità campionarie analizzate è superiore ad *M*;

c: numero delle unità campionarie il cui valore può essere compreso tra *m* ed *M*; il campione viene considerato ancora accettabile se il numero di batteri delle altre unità campionarie è pari o inferiore ad *m*.

[3]. NORMATIVA e APPLICAZIONI dell'OZONO in ambito ALIMENTARE

Per quanto riguarda l'impiego dell'ozono in ambito alimentare, a livello italiano, il Ministero della Sanità, con protocollo del 31 Luglio 1996 n°24482, ha riconosciuto l'utilizzo dell'ozono nel trattamento dell'aria e dell'acqua, come presidio naturale per la sterilizzazione di ambienti contaminati da batteri, virus, spore, muffe ed acari. Poiché l'ozono non lascia residui, il suo utilizzo è quindi permesso se pur nel rispetto delle norme H.A.C.C.P. e D.Lgs. 626/94 che ne limitano le concentrazioni di utilizzo. Infatti, ad

alte concentrazioni, l'ozono può causare danni all'operatore a carico delle vie respiratorie per alterazione della permeabilità degli epitelii, con conseguente riduzione della funzionalità polmonare. In conformità alle norme H.A.C.C.P. e D.Lgs. 626/94, quindi, chi ne fa utilizzo non deve essere esposto a più di 0,1 ppm di ozono in 8 ore o più di 0,3 ppm due volte/die per 15 minuti.

L'impiego dell'ozono come strumento di abbattimento della carica microbica in erbe aromatiche è stato oggetto di alcune indagini scientifiche riassunte in tabella 3. Tra le ricerche più interessanti quella di Kazi et al. (2017) i quali hanno utilizzato l'ozono (4 ppm per 30 e 60 min) su origano e timo essiccati ottenendo un decremento di carica microbica sia per quanto riguarda i batteri sia i lieviti e le muffe, mentre le spore sono risultate resistenti al trattamento. L'origano essiccato è stato nuovamente oggetto di studio di Torlak et al. (2013) che hanno valutato efficace il trattamento con 2.8 e 5.3 ppm per 120 min per contenere lo sviluppo di *Salmonella* spp. Interessante anche lo studio di Akbas et al. (2008), condotto non su erbe ma su peperoncino rosso essiccato, in cui l'ozono è risultato efficace contro le cellule vegetative di *E. coli* e *B. cereus* nella concentrazione di 1 ppm per un trattamento di 360 min mentre per le spore di *B. cereus* è stato necessario utilizzare dosi di 5 ppm. In ultimo, merita una citazione lo studio di Sengun et al. (2013) in cui l'ozono è stato utilizzato sotto forma di acqua ozonizzata ed è risultato attivo alla concentrazione di 1.5 ppm per 5 min contro *S. typhimurium*.

Se pure la bibliografia scientifica è ancora piuttosto povera, queste prime indagini forniscono una prima fotografia di quelli che possono essere i valori di concentrazione e di durata dei trattamenti da cui partire per le prove sperimentali descritte e previste nel WP3.

Tabella 3. Parametri tratti da studi scientifici relativi all'utilizzo dell'ozono nel contenimento della carica microbica in erbe aromatiche e spezie.

RIFERIMENTO	MATRICE ALIMENTARE	OZONO GASSOSO	ACQUA OZONIZZATA	TARGET MICROBICO
Kazi, 2017	Origano e timo essiccati	4 ppm per 30- 60 min	-	Batteri Lieviti Muffe
Torlak, 2013	Origano essiccato	2.8-5.3 ppm per 120 min	-	<i>Salmonella</i> spp.
Akbas, 2008	Peperoncino rosso essiccato	1.0 ppm x 360 min	-	<i>E. coli</i> <i>B. cereus</i>
		5.0 ppm x 360 min	-	Spore di <i>B. cereus</i>
Sengun, 2013	Prezzemolo	-	1.5 ppm per 5 min	<i>S. typhimurium</i>
Brodowska, 2014	Cardamomo	160-165 ppm x 30 min	-	Carica mesofila microbica Funghi Enterobatteri

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Akbas M. e Ozdemir, M. (2008). Effect of gaseous ozone on microbial inactivation and sensory of flaked red peppers. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(9), 1657-1662.
- Brodowska J.A., Śmigielski K., Nowak A., Brodowska K., Catthoor R. e Czyżowska A. (2014). The Impact of ozone treatment on changes in biologically active substances of cardamom seeds. *Journal of Food Science*, 79(9), 1649-1655.
- Fogele B., Granta R., Valcina O., Bērziņš A., (2017). Occurrence and diversity of *Bacillus cereus* and moulds in spices e herbs. *Food Control*, in press.
- Garbowska M., Berthold-Pluta A., Stasiak-Róžańska, L. (2015). Microbiological quality of selected spices and herbs including the presence of *Cronobacter* spp. *Food Microbiology*, 49, 1-5.
- Kazi M., Parlapani F., Boziaris I., Vellios E. e Lykas C. (2017). Effect of ozone on the microbiological status of five dried aromatic plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, DOI 10.1002/jsfa.8602.
- Sagoo S., Little C., Greenwood M., Mithani V., Grant K., Mclauchlin J., Depinna E., Threlfall E. (2009). Assessment of the microbiological safety of dried spices and herbs from production and retail premises in the United Kingdom. *Food Microbiology*, 26(1), 39-43.
- Sengun, I. (2013). Effects of ozone wash for inactivation of *S. typhimurium* and background microbiota on lettuce and parsley. *Journal of Food Safety*, 33(3), 273-281.
- Torlak E., Sert D. e Ulca, P. (2013). Efficacy of gaseous ozone against *Salmonella* and microbial population on dried oregano. *International Journal of Food Microbiology*, 165(3), 276-280.
- Vitullo M., Ripabelli G., Fanelli I., Tamburro M., Delfino S., Sammarco M. (2011). Microbiological and toxicological quality of dried herbs. *Letters in Applied Microbiology*, 52(6), 573-580.
- Wójcik-Stopczyńska B., Jakubowska B., Reichelt M., (2009). Microbiological contamination of dried culinary herbs. *Herba Polonica*, 55 (3), 207-213.