

**RIPAMONTI PAOLO**

**Monitoraggio delle condizioni ambientali di un caseificio semi-industriale di montagna.**

**A.A. 2007-2008**

# Indice

|                                                              |        |
|--------------------------------------------------------------|--------|
| <b>Capitolo 1: Introduzione</b>                              | 1      |
| 1.1 Settore lattiero-caseario                                | 1      |
| 1.2 Progettazione nel settore alimentare                     | 2      |
| 1.2.1 Microclima                                             | 3      |
| 1.2.2 Temperatura dei locali                                 | 4      |
| 1.2.3 Umidità                                                | 4      |
| 1.2.4 Illuminazione naturale e artificiale                   | 4      |
| 1.2.5 Esposizione ad agenti biologici                        | 5      |
| 1.3 Soluzioni tecniche per l'edilizia dei caseifici          | 6      |
| 1.4 Problematiche di natura igienica                         | 7      |
| 1.4.1 Parametri batteriologici considerati                   | 8      |
| <br><b>Capitolo 2: Attività svolta</b>                       | <br>10 |
| <br><b>Capitolo 3: Materiali e metodi</b>                    | <br>11 |
| 3.1 Caseificio                                               | 11     |
| 3.1.1 Produzione                                             | 11     |
| 3.1.2 Caratteristiche del fabbricato                         | 12     |
| 3.2 Metodi utilizzati                                        | 18     |
| 3.2.1 Analisi del microclima                                 | 18     |
| 3.2.2 Illuminazione                                          | 19     |
| 3.2.3 Qualità microbiologica dell'ambiente di lavoro         | 20     |
| 3.2.4 Prelievi                                               | 21     |
| 3.2.5 Carica microbica degli ambienti di lavoro              | 22     |
| 3.2.5.1 Metodo delle spugnature                              | 22     |
| 3.2.5.2 Tecnica dei tamponi                                  | 23     |
| 3.2.5.3 Piastre contact                                      | 24     |
| 3.2.6 Analisi microbiologiche                                | 25     |
| 3.2.7 Terreni colturali utilizzati                           | 25     |
| 3.3 Isolamenti                                               | 26     |
| 3.3.1 Prove di classificazione                               | 27     |
| 3.4 Analisi fenotipica dei lieviti                           | 31     |
| 3.4.1 Utilizzo fonte di azoto e fermentazione degli zuccheri | 31     |
| 3.5 Analisi genotipica degli eucarioti                       | 32     |

|                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------|----|
| 3.5.1 Estrazione DNA dei lieviti                               | 32 |
| 3.5.2 Amplificazione della regione “ITSrDNA” di lieviti        | 34 |
| 3.5.3 Restrizione dell’amplificato ITS                         | 35 |
| 3.6 Analisi genotipica delle muffe – estrazione del DNA totale | 35 |
| 3.6.1 Amplificazione regione spaziatrice tra 18S e 28S         | 36 |
| 3.6.2 Sequenziamento                                           | 37 |
| <b>Capitolo 4: Risultati</b>                                   | 38 |
| 4.1 Microclima                                                 | 38 |
| 4.2. Illuminamento                                             | 44 |
| 4.3 Qualità microbiologica dell’ambiente                       | 44 |
| 4.3.1 Carica microbica aerodispersa e delle superfici          | 44 |
| 4.4 Classificazione Procarioti                                 | 47 |
| 4.5 Classificazione Eucarioti                                  | 48 |
| <b>Capitolo 5: Riassunto</b>                                   | 49 |
| <b>Capitolo 6: Conclusioni</b>                                 | 50 |
| <b>Bibliografia</b>                                            |    |

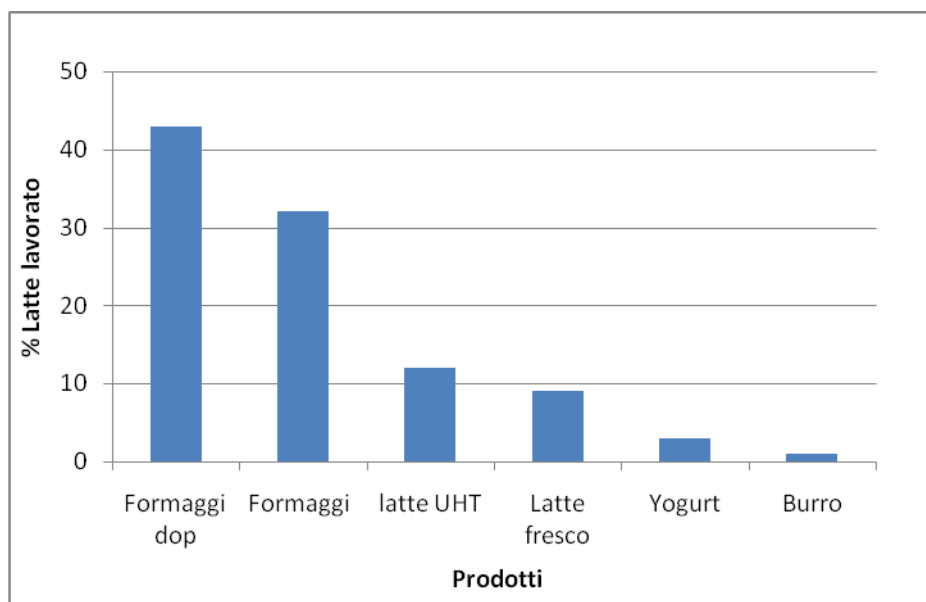
# 1. Introduzione

Il settore agro-alimentare in Italia ricopre uno spazio importante all'interno dell'economia nazionale; difatti rappresenta circa il 12% del prodotto interno lordo. Le industrie alimentari sono di dimensioni abbastanza ridotte: circa l'80% delle aziende ha meno di cinque addetti e il 90% meno di dieci. La Lombardia possiede la più alta concentrazione di aziende e di addetti a livello nazionale.

## 1.1 Settore lattiero-caseario

Analizzando i dati di "Assolatte" del 2004, emerge che il settore lattiero-caseario con un fatturato pari a 13,8 miliardi di euro. È il primo comparto agroalimentare italiano e rappresenta il terzo settore per dimensioni di aziende e per numero di operatori.

Annualmente sono lavorati 13,5 milioni di litri di latte, destinati per il 75% circa alla produzione di formaggi e formaggi DOP; la restante quota è commercializzata come latte alimentare fresco, UHT, sterilizzato e alla produzione di yogurt e burro (figura 1).



**Figura 1:** Principali prodotti del settore lattiero-caseario (Assolatte, 2004)

### **1.3 Progettazione nel settore alimentare**

Il settore alimentare è fortemente condizionato da un dettagliato ed approfondito pacchetto legislativo, che disciplina l'igiene del prodotto e degli operatori, nonché la sicurezza e il benessere dei lavoratori, la tutela ambientale, i criteri di costruzione e di manutenzione dei fabbricati. È necessario quindi che alla base della progettazione ci sia una visione di insieme di tutte le esigenze ed eventuali problematiche legate al processo produttivo. Per essere in grado di soddisfare le norme legislative, occorre una progettazione mirata, a partire dalla completa conoscenza del prodotto e delle sue problematiche, delle modalità operative e di tutti i parametri che concorrono al funzionamento aziendale. La qualità delle condizioni di lavoro è riportata e definita nella legge 626/94, ampliata, completata e sostituita dalla legge 81/2008, che costituisce l'attuazione dell'articolo 1 della legge del 3 agosto 2007, numero 123. Tale legge stabilisce i criteri di progettazione degli ambienti, partendo dalla definizione stessa di ambiente di lavoro: a tale proposito, così recita all'articolo 62:

*Per luoghi di lavoro si intendono:*

- a) I luoghi destinati a ospitare posti di lavoro, ubicati all'interno dell'azienda o dell'unità produttiva, nonché ogni altro luogo di pertinenza dell'azienda o dell'unità produttiva, accessibile al lavoratore nell'ambito del proprio lavoro;*
- b) I campi, i boschi e altri terreni facenti parte di un'azienda agricola o forestale.*

L'articolo 64 riporta i requisiti di salute e sicurezza, specificati poi in dettaglio nell'allegato IV della stessa legge. Tale allegato prende in considerazione tutti gli aspetti e le caratteristiche strutturali che devono essere soddisfatti nella progettazione di un'azienda, al fine di garantire ai lavoratori un ambiente igienico e sicuro, sia per quanto riguarda le condizioni di lavoro, sia per il benessere personale.

- Gli edifici che ospitano i luoghi di lavoro devono essere stabili ed avere una solidità coerente con il tipo di impiego e con le caratteristiche ambientali;
- Il datore di lavoro deve garantire la pulizia dei luoghi di lavoro, facendo eseguire la pulizia, per quanto possibile, fuori dall'orario di lavoro e in modo da ridurre al minimo il sollevamento delle polveri;

Sono inoltre stabiliti per legge i parametri di altezza, cubatura e superficie delle realtà operative; i limiti minimi dei locali chiusi destinati o da destinarsi al lavoro nelle aziende industriali che occupano più di cinque lavoratori sono:

- Altezza netta non inferiore ai 3 metri;
- Cubatura non inferiore ai 10 m<sup>3</sup>;

- Ogni lavoratore occupato in ciascun ambiente deve disporre di una superficie non inferiore ai 2 m<sup>2</sup>;
- Lo spazio destinato a ciascun addetto nei locali di lavorazione deve essere tale da consentire il normale movimento della persona, in relazione al compito da svolgere;

È inoltre vietato adibire a lavori continuativi locali chiusi che non corrispondono ai seguenti parametri:

- Essere ben difesi contro gli agenti atmosferici e provvisti di un isolamento termico e acustico sufficiente;
- Avere aperture sufficienti per un rapido ricambio d'aria;
- Essere ben asciutti e ben difesi contro l'umidità;
- Avere le superfici dei pavimenti, delle pareti, dei soffitti tali da potere essere pulite e deterse per ottenere condizioni adeguate di igiene;
- I pavimenti devono essere fissi, stabili ed antisdrucchiolevoli, nonché esenti da protuberanze, cavità o piani inclinati pericolosi;
- Le finestre, i lucernari e i dispositivi di ventilazione devono poter essere aperti, chiusi e regolati. Quando sono aperti, non devono costituire pericolo per i lavoratori;
- Le finestre e i lucernari devono essere concepiti congiuntamente con l'attrezzatura, o dotati di dispositivi che consentano la loro pulizia, senza costituire pericolo per i lavoratori che svolgano tale operazione;

Particolare attenzione è riportata nei confronti del microclima (punto 1.9), temperatura dei locali (punto 1.9.2), condizioni di umidità (punto 1.9.3) ed illuminamento (1.10).

### **1.3.1 Microclima**

- Nei luoghi di lavoro chiusi, è necessario far sì che i lavoratori abbiano aria salubre in quantità sufficiente, ottenuta preferenzialmente con aperture naturali o con impianti di aerazione;
- Nel caso sia utilizzato un impianto di aerazione, deve essere sempre mantenuto funzionante; gli impianti devono essere periodicamente sottoposti a controlli, manutenzione, pulizia e sanificazione, per la tutela dei lavoratori;
- Qualsiasi sedimento o sporcizia che potrebbe comportare un pericolo immediato per la salute dei lavoratori dovuto all'inquinamento dell'aria respirata, deve essere eliminato rapidamente.

### **1.3.2 Temperatura dei locali**

- La temperatura nei locali di lavoro deve essere adeguata all'organismo umano durante il tempo di lavoro, tenuto conto dei metodi di lavoro applicati e degli sforzi fisici imposti ai lavoratori.
- Per determinare la temperatura adeguata per i lavoratori, si deve tener conto dell'influenza che possono esercitare il grado di umidità e il movimento dell'aria concomitante;
- Le finestre, i lucernari e le pareti vetrate devono essere tali da evitare un'eccessiva esposizione al sole dei luoghi di lavoro;
- Quando non è conveniente modificare la temperatura di tutto l'ambiente, si deve provvedere alla difesa dei lavoratori contro le temperature troppo alte o troppo basse mediante misure tecniche localizzate o mezzi personali di protezione;

### **1.3.3 Umidità**

Nei locali chiusi di lavoro delle aziende industriali, nei quali l'aria è soggetta ad inumidirsi notevolmente per ragioni di lavoro, si deve evitare per quanto possibile, la formazione della nebbia, mantenendo la temperatura e l'umidità nei limiti compatibili con le esigenze tecniche.

### **1.3.4 Illuminazione naturale ed artificiale**

Sempre che non sia richiesto diversamente dalle necessità delle lavorazioni e salvo che non si tratti di locali sotterranei, i luoghi di lavoro devono disporre di sufficiente luce naturale. In ogni caso, tutti i predetti locali e luoghi di lavoro devono essere dotati di dispositivi che consentono un'illuminazione artificiale adeguata per salvaguardare la sicurezza, la salute e il benessere di lavoratori.

- Gli impianti di illuminazione dei locali di lavoro e delle vie di circolazione devono essere installati in modo che il tipo di illuminazione previsto non rappresenti un rischio di infortunio per i lavoratori;
- I luoghi di lavoro nei quali gli operatori sono particolarmente esposti a rischi in caso di guasto dell'illuminazione artificiale, devono disporre di un'illuminazione di sicurezza di sufficiente intensità;

- Le superfici vetrate ed i mezzi di illuminazione artificiale devono essere tenuti costantemente in buone condizioni di pulizia ed efficienza;
- Gli ambienti, i posti di lavoro ed i passaggi devono essere illuminati con luce naturale o artificiale in modo da assicurare una sufficiente visibilità.

### 1.3.5 Esposizione ad agenti biologici

La legge 81/2008, nell'articolo 267, definisce come "agente biologico" qualsiasi microrganismo anche geneticamente modificato, coltura cellulare ed endoparassita umano che potrebbe provocare infezioni, allergie o intossicazioni; nello stesso articolo si definisce come "microrganismo" qualsiasi entità microbiologica, cellulare o meno, in grado di riprodursi o trasferire materiale genetico.

Le colture cellulari sono invece definite come il risultato della crescita *in vitro* di cellule derivate da organismi pluricellulari.

Nell'articolo 268 sono invece classificati gli agenti biologici, secondo il rischio di infezione. Sono divisi nelle seguenti quattro classi:

- Agente biologico del gruppo 1: presenta poche probabilità di causare malattie in soggetti umani;
- Agente biologico del gruppo 2: un agente che può causare malattie in soggetti umani e costituire un rischio per i lavoratori; è poco probabile che si propaghi nella comunità; sono di norma disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche;
- Agente biologico del gruppo 3: un agente che può causare malattie gravi in soggetti umani e costituire un serio rischio per i lavoratori; l'agente biologico può propagarsi nella comunità, ma di norma sono disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche;
- Agente biologico del gruppo 4: un agente biologico che può provocare malattie gravi in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori; può presentare un elevato rischio di propagazione nella comunità; non sono disponibili, di norma, efficaci misure profilattiche o terapeutiche.

Nel caso in cui l'agente biologico oggetto di classificazione non possa essere attribuito in modo inequivocabile ad uno fra i due gruppi sopraindicati, è da classificare nel gruppo di rischio più elevato tra le due possibilità.

L'elenco degli agenti biologici classificati è riportato nell'allegato XLVI della medesima legge.

## **1.4 Soluzioni tecniche per l'edilizia dei caseifici**

La più recente normativa comunitaria (reg. CE n. 852) in materia di igiene dei prodotti alimentari, fissa regole e procedure cui devono sottostare gli operatori del settore alimentare, oltre a stabilire i requisiti strutturali degli ambienti produttivi. Il medesimo regolamento stabilisce che tutto questo può essere ottenuto attraverso l'analisi dei pericoli e dei punti critici di controllo, ovvero il sistema HACCP (Art. 5). Tale regolamento, nell'allegato II, specifica in dettaglio i requisiti generali e strutturali per gli ambienti destinati alla produzione di alimenti; tali specifiche sono di seguito riassunte:

1. *Pavimenti*: devono presentare un profilo di rugosità idoneo, per renderli facilmente pulibili ed, allo stesso tempo, anti scivolo. Esistono coefficienti di attrito determinati empiricamente. Inoltre devono essere resistenti agli acidi prodotti durante il processo produttivo (siero, acido lattico), ma anche a quelli utilizzati per la sanificazione e la disinfezione. Importante anche la resistenza alle alte temperature e alle sollecitazioni meccaniche. Inoltre devono essere inclinati, in modo tale che l'abbondante quantità di liquidi dispersa durante la produzione casearia non ristagni, causando la perdita di requisiti igienici. I materiali utilizzati maggiormente sono il klinker e le resine.
2. *Sistemi di drenaggio*: l'efficienza del sistema di drenaggio può essere modulata secondo le esigenze, in funzione della tipologia di raccolta (lineare o puntuale), della capacità drenante e della disposizione dei punti di scarico.
3. *Pareti*: devono essere facilmente pulibili, disinfettabili, resistenti e non assorbenti. Devono avere una superficie liscia fino a dove vi è la necessità di pulire il muro. È preferibile che siano rivestite con resine e vernici antimicrobiche, impermeabili all'esterno ma traspiranti all'interno, in modo da impedire il distacco dal supporto.
4. *Soffitti ed attrezzature sopraelevate*: devono essere realizzate in modo tale da evitare l'accumulo di sporcizia e di ridurre la formazione di condensa. Devono quindi essere privi di sporgenze e cavità.
5. *Serramenti*: devono essere concepiti in modo da essere facilmente lavabili. Le finestre devono essere facilmente lavabili ed essere munite di reti anti insetti facilmente amovibili e pulibili. Il materiale ideale per gli infissi è l'acciaio inossidabile, che a fronte di una bassa ritenzione batterica e una facile pulizia, è anche resistente ad agenti chimici e shock termici.
6. *Porte e portoni*: devono essere scelte in base al tipo di traffico, alla funzione e alle esigenze igieniche del locale. Per i locali di lavorazione si dovrebbero prediligere materiali

facilmente lavabili: acciaio inox per i telai e strutture in materiali leggeri ma resistenti agli urti e all'usura. È raccomandata una doppia viabilità per il traffico di pedoni e automezzi. Il numero e le dimensioni dei passaggi devono essere stabiliti in base al traffico ed al numero degli addetti, in modo da non creare ostacoli in caso di emergenza.

### ***1.5 Problematiche di natura igienica***

La creazione di layout inadeguati per l'industria alimentare, è un fattore che comporta l'insorgere di numerosi problemi igienici, poiché non sono in grado di offrire una sufficiente protezione dei locali di trasformazione. L'igiene dell'ambiente e della strumentazione incide poi in modo determinante sul livello di contaminazione degli alimenti e, quando le interazioni alimento/ambiente non sono adeguatamente monitorate, si possono creare condizioni che possono inficiare la stabilità degli alimenti stessi. Pratiche di pulizia non idonee e trascuratezza nelle abitudini igieniche del personale favoriscono l'accumulo di microrganismi che possono trasferirsi dall'ambiente all'alimento in cui possono moltiplicarsi e determinare modificazioni indesiderate sino a renderlo non più edibile. A tale proposito si può citare come esempio il problema della proliferazione microbica fra le fughe di superfici piastrellate: la mancata finitura con opportuni sigillanti di questi elementi diventa pertanto un punto di debolezza per la continuità di queste superfici. L'utilizzo di sola acqua per le operazioni di pulizia e di stracci per asciugare superfici, apparentemente pulite, favorisce cross-contamination, ovvero il trasferimento di microrganismi ad altre superfici o sulle mani degli operatori, favorendone la dispersione.

L'importanza di questi aspetti trova conferma anche nel sistema HACCP, in cui il percorso seguito dalle materie prime sino al prodotto finito e la sanificazione dell'ambiente, sono considerati punti critici da monitorare, al fine di garantire un prodotto finito di qualità, sia dal punto di vista sensoriale, sia della sicurezza.

In alcuni stabilimenti, come quelli in cui sono prodotti alimenti fermentati naturalmente, si può associare una flora batterica tipica dei prodotti, all'ambiente di lavorazione (strumentazione compresa). In generale, quando le interazioni alimento/ambiente sono monitorate correttamente, si realizzano condizioni che contribuiscono alla stabilità dei prodotti. Tuttavia, prescindendo da questi casi, il concetto di una popolazione batterica tipica dei piani di lavoro e delle attrezzature usate nelle lavorazioni è poco credibile. Fra le sorgenti di contaminazione degli alimenti, di particolare rilievo sono l'ambiente di lavoro e l'attrezzatura utilizzata. Nel caso in cui le pratiche di pulizia e le abitudini igieniche del personale non risultano soddisfacenti, è molto probabile che si verifichi un accumulo di microrganismi, che possono essere veicolati dall'ambiente all'alimento. In condizioni

opportune potrebbero moltiplicarsi, fino a raggiungere una determinata quantità in grado di provocare l'infezione o il deterioramento dell'alimento.

Questo fenomeno si può verificare senza un visibile aumento della sporcizia; ad esempio, è stato dimostrato che, attraverso gli stracci usati per asciugare superfici apparentemente pulite, sia possibile trasferire ad altre strumentazioni o alle mani degli operatori, microrganismi in quantità sufficiente da costituire un potenziale rischio, qualora entrino in contatto con gli alimenti.

Da ciò deriva l'esigenza di avere protocolli di pulizia ed eventualmente di disinfezione, che comprendano metodi, materiali usati e frequenza degli interventi. Anche dal punto di vista del sistema HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) la sanificazione ambientale è considerata un'operazione che controlla il rischio e che, pur non garantendo in modo assoluto (CP), è ugualmente indispensabile per salvaguardare qualità e salubrità degli alimenti. Poiché non è possibile misurare l'efficacia delle pratiche di pulizia e di sanificazione, è importante verificarne gli effetti. Un programma di monitoraggio microbiologico ambientale deve essere finalizzato a:

- Verificare l'efficacia del protocollo di pulizia e disinfezione;
- Determinare la frequenza dei cicli di pulizia;
- Valutare la presenza di microrganismi patogeni;
- Quantificare i microrganismi responsabili del deterioramento.

### **1.5.1 Parametri batteriologici considerati**

I parametri microbiologici principali utilizzati per comprendere la situazione igienica sono:

- Valutazione della carica batterica (conta dei batteri mesofili aerobi);
- Ricerca del gruppo dei coliformi totali e fecali;
- Ricerca di *Escherichia coli*, del gruppo degli enterococchi
- Ricerca di *Staphylococcus aureus*, indicatore di buone pratiche igieniche
- Ricerca di *Salmonella spp.* e di *Listeria monocytogenes*, come patogeni.

La carica batterica totale è determinata allo scopo di avere un quadro generale dello stato igienico. Inoltre è utilizzata per valutare l'efficacia dei metodi di pulizia nel contenere il livello di contaminazione e crescita batterica.

I coliformi sono oggetto di ricerca principalmente per due motivi: per avere un utile criterio di confronto e di valutazione della loro capacità di impiantarsi, sopravvivere e moltiplicarsi nelle

condizioni offerte dagli ambienti in esame e per ottenere informazioni di massima sulle condizioni igieniche.

*E. coli* è ricercato in quanto indicatore di contaminazione fecale; inoltre è un potenziale patogeno.

La valutazione della presenza degli enterococchi è in relazione alla loro riconosciuta resistenza di sopravvivere in condizioni ambientali difficili e come indicatori di contaminazioni di origine sia ambientale sia fecale.

La determinazione della presenza di *Staphylococcus aureus* è importante, poiché è indicatore di buone pratiche di pulizia ed è anche un potenziale patogeno.

L'assenza di *Salmonella* spp. è di fondamentale importanza. La legge stabilisce che nei prodotti alimentari deve essere assente in 25 g. È un patogeno enterico a larga diffusione, soprattutto negli alimenti di origine animale.

La presenza di *Listeria* spp. è valutata poiché è un microrganismo ad attitudine psicrotrofa. Inoltre la specie *L. monocytogenes* è patogena, responsabile di malattie trasmesse con gli alimenti. Anche questo microrganismo deve essere assente per legge in 25 g di alimento.

## **2. Attività svolta**

Il lavoro svolto nel corso del tirocinio è frutto di una collaborazione tra la sezione di Microbiologia Agraria Alimentare Ecologica del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari ed il Dipartimento di Ingegneria Agraria della Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Milano, finalizzato a monitorare le condizioni degli ambienti di lavoro di piccole e medie realtà casearie. La contaminazione ambientale è un aspetto spesso sottovalutato nell'industria agroalimentare, infatti l'attenzione è per lo più rivolta alla produzione, senza considerare il ruolo fondamentale assunto dall'ambiente produttivo nei confronti dell'igiene del prodotto finito.

Lo studio da me condotto ha riguardato il Caseificio "Alta Valsesia" sito nel Comune di Piode (VC). Si tratta di una realtà semi-industriale, che lavora giornalmente latte vaccino raccolto con proprie autobotti, proveniente da tutta la bassa e alta valle.

I rilievi hanno riguardato sia il monitoraggio del microclima e dell'illuminamento dei locali di lavorazione, sia la qualità microbiologica di aria e di superfici, per valutare il grado di benessere, sicurezza ed igiene in cui si trovano ad operare gli addetti.

I locali presi in considerazione sono stati: locale lavorazione del latte, locale salamoia e celle di stagionatura. Per il microclima sono stati monitorati più punti all'interno dei locali considerati. Il rilievo delle condizioni si è protratto per tutta la lavorazione, comprese le operazioni di pulizia.

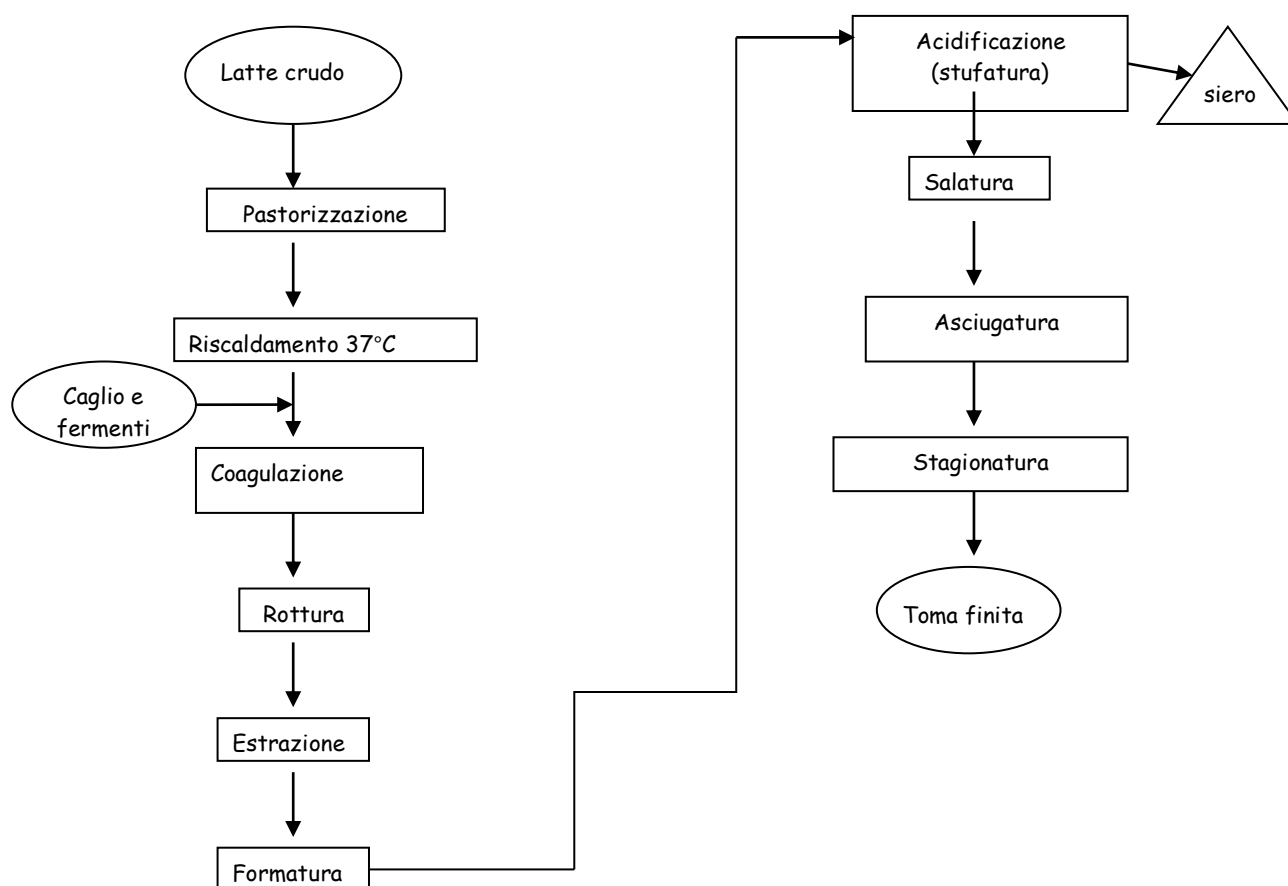
## 3. Materiali e metodi

### 3.1 Caseificio

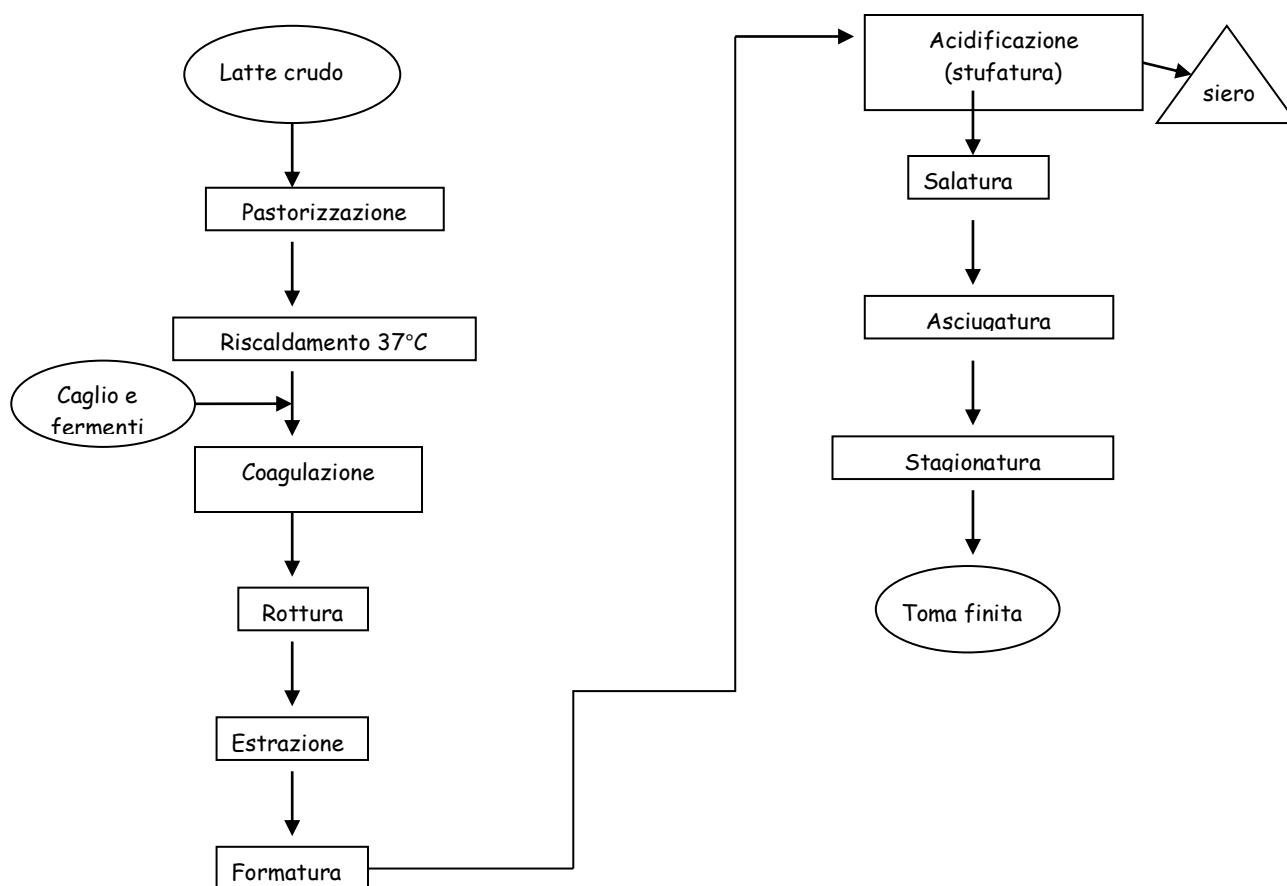
È stato oggetto di studio, dal punto di vista strutturale e d ambientale, un caseificio semi industriale di montagna. Il caseificio è ubicato nel comune di Piode (752 m s.l.m.) in provincia di Vercelli, nell'alta Valsesia.

#### 3.1.1 Produzione

Il latte è raccolto da tutta la vallata ed è totalmente destinato alla trasformazione. I prodotti sono: Toma della Valsesia, formaggi freschi denominati Piodini, ricotta e burro. Le figure 2 e 3 riportano i diagrammi di flusso per le principali lavorazioni del caseificio preso in esame.



**Figura 2:** Produzione della Toma Valsesia



**Figura 3:** Schema di produzione del prodotto fresco (Piodini)

### 3.1.2 Caratteristiche del fabbricato

Il caseificio è un prefabbricato in cemento armato, con tamponamenti verticali in blocchi di cemento, raggiungibile dalla strada statale mediante una via sterrata (figura 4).

L'edificio è disposto su un unico livello e comprende i locali di trasformazione latte (figura 5), burrificazione, salatura, diverse celle di stagionatura per formaggi freschi (Piodini) e stagionati (Toma Valsesia) di vacca e locali di servizio (servizi igienici, spogliatoi, lavaggio fascere).

La pavimentazione del locale di trasformazione del latte è in grès rosso (figura 6) e si trova in discrete condizioni di manutenzione. Le pareti sono rivestite con piastrelle 15x15 cm, di colore chiaro, fino a circa 3 metri di altezza (figura 7), punto in cui sono ubicate le finestre; i serramenti sono in alluminio, disposti a nastro lungo le pareti esterne del locale.

Il soffitto pendente è rivestito di pannelli di PVC. Le lampade al neon per l'illuminazione sono poste lungo le strutture portanti del tetto.

All'interno del locale di lavorazione sono ricavate, grazie all'utilizzo di pennellature in PVC, due zone distinte: una destinata alla burrificazione (figura 8); l'altra, contenente una caldaia in rame (utilizzata per la produzione di ricotta).

Il caseificio contiene inoltre:

- 3 tank refrigerati per lo stoccaggio del latte prima della lavorazione;
- 1 pastorizzatore con centrifuga;
- 1 caldaia polivalente in acciaio inox sopraelevata;
- 2 tavoli di acciaio inox per la raccolta e la formatura della cagliata;
- Diversi tavoli di acciaio inox per lo spurgo delle forme
- Vasche per il lavaggio degli stampi

Dal locale di lavorazione si accede alle celle refrigerate per la stagionatura di Piodini (figura 9) e Tome (figura 10); da queste si può entrare nel locale salamoia, dove sono alloggiate tre vasche di salatura in vetroresina (figura 11) e tre in acciaio inox, tutte in uso (figura 12).

I locali di stagionatura sono pavimentati e le pareti tinteggiate di bianco. Il locale salamoia ha le pareti rivestite di piastrelle di colore chiaro.

I locali di stagionatura non hanno finestre, presenti invece nel locale salamoia.



**Figura 4:** Area all'esterno del caseificio



**Figura 5:** Zona di lavorazione all'interno del caseificio



**Figura 6:** Particolare della pavimentazione e di un pozzetto di scarico reflui



**Figura 7:** Particolare della piastrellatura della parete portante



**Figura 8:** Area di produzione del burro, sullo sfondo si può notare la zangolatrice



**Figura9:** Cella refrigerata per la stagionatura del formaggio fresco



**Figura 10:** Cella di stagionatura delle Tome



**Figura 12:** Vasche di salatura in vetroresina dei Piodini



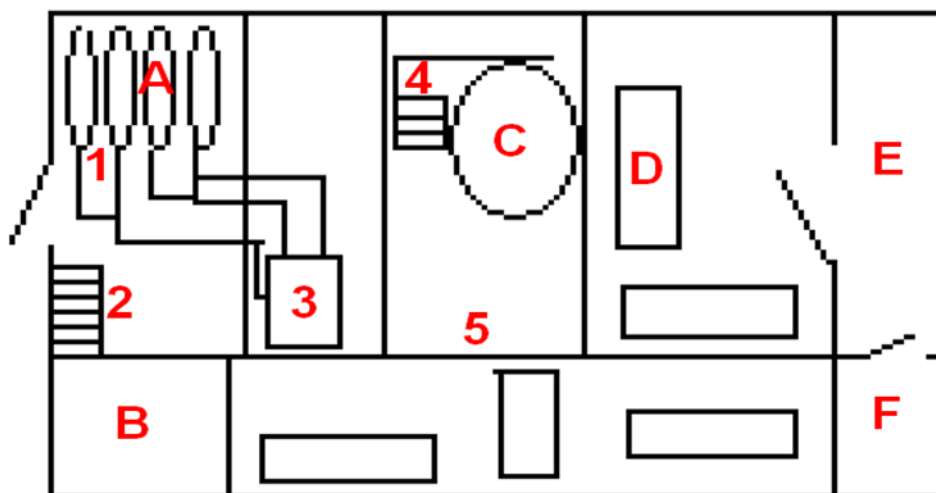
**Figura 12:** Vasche di salatura di acciaio inox per le Tome

## 3.2 METODI UTILIZZATI

### 3.2.1 Analisi del microclima

Le sonde sono state poste nel locale di lavorazione e nelle celle di stagionatura. La figura 13 riporta i punti di prelievo: i numeri rappresentano i punti di rilevazione, le lettere i macchinari più importanti.

Il monitoraggio microclimatico dei locali è stato effettuato con sonda igrometrica dotata di datalogger interno per l'acquisizione in continuo dei dati (figura 14 Delta Ohm, mod. HD 226-1).



**Figura 13:** Layout del caseificio con l'indicazione dei punti di prelievo

A: Serbatoi del latte

B: Ufficio sopraelevato

C: Caldaia sopraelevata

D: Tavoli d'acciaio per la lavorazione

E: Cella di stagionatura

F: Locale salamoia



**Figura 14:** Sonda igrometrica Delta Ohm, mod HD 226-1

### **3.2.2 Illuminamento**

Come precedentemente scritto, nella valutazione delle condizioni ambientali dei luoghi di lavoro è stato analizzato anche il livello di illuminamento presente in diversi punti del caseificio. Per allestire i rilievi e per effettuare la valutazione, si è fatto riferimento alle indicazioni della normativa UNI 12424 del 2004. Tale metodologia prevede che le misurazioni siano registrate mediante luxmetro. Lo strumento illustrato nella figura 15 è il luxometro mod. T10 Minolta, utilizzato per i rilevamenti.



**Figura 15:** Luxometro mod. T10 Minolta

### **3.2.3 Qualità microbiologica dell'ambiente di lavoro**

La valutazione della qualità microbiologica dell'ambiente di lavoro ha riguardato il monitoraggio della microflora aerodispersa e la qualità microbiologica delle superfici di lavoro.

#### **Carica microbica aerodispersa**

La tecnica per monitorare la carica microbica presente nell'aria prevede il campionamento delle cellule microbiche e la loro moltiplicazione su terreni colturali idonei così da poter conteggiare e identificare i microrganismi presenti.

Il monitoraggio dei locali di lavorazione è stato effettuato con un sistema di aspirazione attivo, che prevede il campionamento di grandi volumi di aria confinata, in modo da minimizzare le differenze di distribuzione delle cellule dovute alle correnti, alla temperatura e alle dimensioni degli aggregati dispersi. Per i rilievi è stato utilizzato il Surface Air Sistem (SAS, figura 16), un campionatore ad aspirazione monostadio a impatto ortogonale, in grado di aspirare volumi prestabiliti di aria. All'interno della testa dello strumento è alloggiata una piastra Petri, del diametro di 90 mm, contenente un terreno colturale specifico, sul quale l'aria impatta. Il terreno è scelto in funzione del gruppo microbico da ricercare. Successivamente le piastre sono poste a incubare, per tempi e temperature variabili secondo il tipo di microrganismo ricercato.

La concentrazione microbica è quindi calcolata mediante l'uso di una tabella di conversione, elaborata per lo specifico strumento (tabella 1); il numero di colonie cresciute dopo incubazione è moltiplicato per l'indice espresso in tabella, fornendo così il risultato finale.

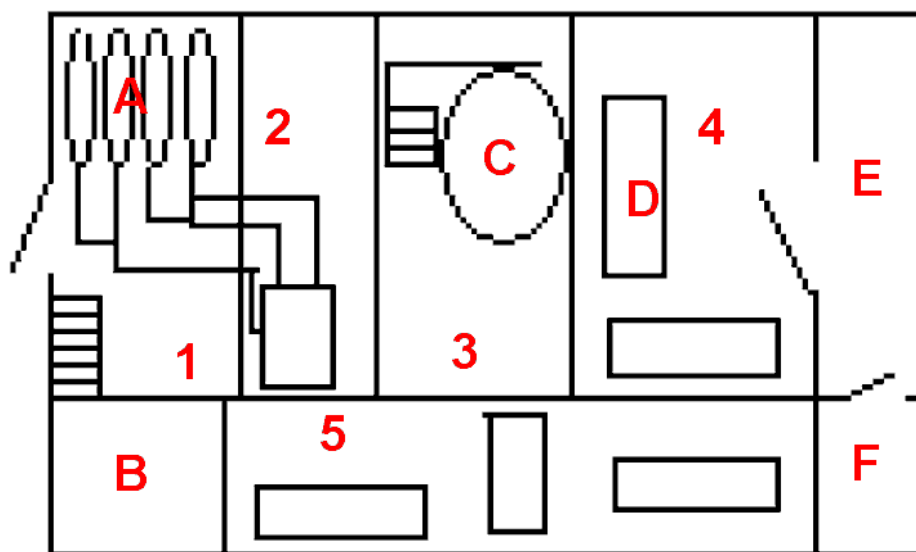
**Inserire tabella SAS**



**Figura 16:** Surface Air System per il monitoraggio dell'aria (Modello MAS-100)

### 3.2.4 Prelievi

I prelievi dell'aria sono stati svolti mediante l'aspirazione di 52 litri di aria; sono stati effettuati secondo lo schema riportato nella figura 17. Ogni prelievo è stato effettuato in doppio.



**Figura 17:** Layout schematico del caseificio

Dove:

- 1: zona di prelievo dell'aria presso serbatoi
- 2: zona di prelievo dell'aria presso pastorizzatore
- 3: zona di prelievo dell'aria presso caldaia
- 4: zona di prelievo dell'aria presso lavorazione del prodotto
- 5: zona prelievo dell'aria presso area deposito-magazzino degli utensili
- A: Serbatoi del latte
- B: Ufficio sopraelevato
- C: Caldaia sopraelevata
- D: Tavoli d'acciaio per la lavorazione
- E: Cella di stagionatura
- F: Locale salamoia

### **3.2.5 Carica microbica delle superfici di lavoro**

Il controllo della contaminazione delle superfici di lavoro è stato effettuato principalmente utilizzando due tecniche per i prelievi dei campioni: le spugnature e i tamponi.

#### **Metodo delle spugnature**

Prevede l'utilizzo di spugne (4x8 cm, figura 18) poste in sacchetti sterili richiudibili, contenuti 100 ml di diluente sterile (sale triptone). Al momento dell'uso, la spugna è estratta con guanti sterili monouso, strizzata e sfregata su entrambi i lati sulla superficie da analizzare. Successivamente è reintrodotta nel sacchetto, che sarà richiuso, avendo cura di eliminare l'aria in esso contenuta. Il campione è mantenuto refrigerato fino al momento dell'analisi, che deve essere eseguita entro le 24 ore successive al prelievo.

L'analisi è effettuata in laboratorio, mediante la tecnica delle diluizioni decimali, utilizzando sale triptone (contenente: 1 grammo di triptone, 8,5 grammi di NaCl, 1000 ml di acqua distillata, pH 7; sterilizzato per 15 minuti ad 1 atmosfera) come diluente sterile; quindi le diluizioni prescelte sono seminate per diffusione in diversi terreni colturali e le piastre così ottenute poste a incubare per tempi e temperature variabili.

Il risultato ottenuto rappresenta la concentrazione microbica superficiale ( $UFC_{sup.}$ ) ed è espresso mediante la seguente equazione:

$$UFC_{sup.} = \frac{UFC}{d \cdot S}$$

Dove:

UFC = numero di colonie cresciute in piastra;

d = diluizione contata ( $10^{-n}$ )

S = superficie campionata ( $cm^2$ )

Il risultato è quindi espresso in  $UFC/cm^2$



**Figura 18:** Sacchetto richiudibile contenente spugnetta sterile per il campionamento

## Tecnica dei tamponi

È utilizzata quando vi è da determinare il grado di contaminazione di superfici difficilmente accessibili con le spugne. I tamponi (figura 19) sono costituiti da bastoncini sterili, dotati ad un'estremità di cotone idrofilo. Al momento dell'utilizzo è inumidito con sale triptone, e sfregato contro la superficie da analizzare; quindi reinserto nella provetta è conservato in una soluzione sterile a temperatura di refrigerazione fino al momento dell'analisi, da eseguire entro 24 ore. Anche in questo caso è necessario utilizzare la tecnica delle diluizioni decimali. Il numero di colonie cresciute nella piastra contenente la diluizione meno concentrata, rappresenta il risultato finale.

Nella tabella 2 sono riportati i punti di prelievo con il relativo strumento utilizzato.

| <b>Metodo di prelievo</b> | <b>Punto di prelievo</b>     | <b>Dimensioni</b>              |
|---------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Spugnette                 | Tubo scarico cagliata        | 7cm diametro, 4 cm lunghezza   |
| Spugnette                 | Cestello plastica pronto uso | 48,5cm X 29,5cm X 11,5 cm      |
| Spugnette                 | Cestello inox sporco         | 26,5cm diametro, 25 cm altezza |
| Spugnette                 | Panno plastica sporco        | 75cm X 50cm                    |
| Tamponi                   | Cestello plastica sporco     | 7,5cm diametro X 9,5 cm        |
| Tamponi                   | Cestello plastica pulito     | 7,5cm diametro X 9,5 cm        |

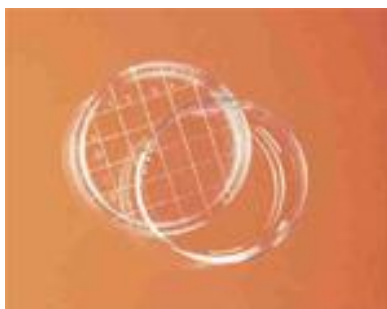
**Tabella 2:** Punti e metodi di prelievo all'interno del caseificio, con relative misurazioni metriche



**Figura 19:** Tamponi per il monitoraggio delle superfici

### **Piastre contact**

Le piastre contact (figura 20) consentono di eseguire facilmente il controllo dell'aria e delle superfici. Sono pronte all'uso e contengono un terreno colturale nutritivo per la crescita dei microrganismi. Hanno un fondo quadrettato che facilita la lettura dei risultati. Inoltre il terreno agarizzato sporge dal bordo della piastra, facilitando il contatto fra il terreno stesso e la superficie da analizzare.



**Figura 20:** Piastra contact priva di terreno colturale

### **3.2.6 Analisi microbiologiche**

Nell'aria e sulle superfici, al fine della definizione della qualità microbiologica, sono state effettuate le seguenti determinazioni:

CBT

Coliformi

Lieviti e muffe.

### **3.2.7 Terreni colturali utilizzati**

#### **Carica batterica mesofila aerobia (CBT)**

È stato utilizzato il terreno Agar Plate Count (APC)[2]:

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| Peptone di caseina          | 5 g     |
| Estratto di lievito         | 2,5 g   |
| Glucosio                    | 1 g     |
| Agar                        | 12,5 g  |
| H <sub>2</sub> O distillata | 1000 ml |
| pH                          | 7,0     |

Sterilizzato per 15 a 121°C

Semina per diffusione ed incubazione a 30°C per 48-72 ore.

#### ***Eumiceti totali***

È stato utilizzato il terreno Yeast Glucose Cloramphenicol (YGC)

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| Glucosio                    | 20 g    |
| Estratto di lievito         | 5 g     |
| Cloramfenicolo              | 0,1 g   |
| Agar                        | 15 g    |
| H <sub>2</sub> O distillata | 1000 ml |
| pH                          | 5,6     |

Sterilizzato per 15 a 121°C

Semina per spatolamento superficiale e incubazione a 30°C per 3-5 giorni

### ***Coliformi totali***

È stato utilizzato il terreno Violet Red Bile Agar (VRB)

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Estratto di lievito | 3 g     |
| Peptone             | 7 g     |
| Sali di bile        | 1,5 g   |
| NaCl                | 5 g     |
| Lattosio            | 10 g    |
| Agar                | 15 g    |
| Cristal violetto    | 0,002 g |

Data l'alta selettività del terreno, non occorre sterilizzare.

Semina per diffusione in doppio strato e incubazione a 37°C per 24-48 ore. Per la rilevazione dei coliformi fecali, si utilizza il medesimo terreno e le stesse caratteristiche di semina; le piastre sono però incubate ad una temperatura di 44°C per 24-48 ore.

### ***3.3 Isolamento e purificazione***

Dalle piastre dei vari campionamenti, si è proceduto con l'isolamento di colonie macroscopicamente differenti tra loro. Le colonie sono state prelevate con ansa sterile dalla piastra di origine e quindi trasferite in slant contenente terreno TSA (batteri) o YM (lieviti e muffe). Dopo incubazione e conseguente sviluppo, si è proceduto con la visione al microscopio, per verificarne la purezza e, allo stesso tempo, per verificarne la morfologia.

La purificazione dei ceppi è indispensabile per ottenere risultati attendibili durante i test successivi di classificazione. Di seguito sono riportati le composizioni dei terreni colturali usati per le purificazioni.

Trypticase Soy Agar (TSA)

|              |      |
|--------------|------|
| Tryptone     | 15 g |
| Soia Peptone | 5 g  |

|                  |         |
|------------------|---------|
| Sodio Cloruro    | 5 g     |
| Agar             | 15 g    |
| Acqua distillata | 1000 ml |

Agar Malto (YM)

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Glucosio            | 50 g    |
| Peptone             | 5 g     |
| Estratto di lievito | 3 g     |
| Estratto di malto   | 15 g    |
| Agar                | 15 g    |
| Acqua distillata    | 1000 ml |

### 3.3.1 Prove di classificazione

Dopo avere analizzato le colonie pure al microscopio, si è proceduto con alcune prove di classificazione, atte a determinare le caratteristiche fenotipiche di ognuno dei ceppi isolati. Per quanto riguarda i batteri, sono stati effettuati i seguenti test:

- Colorazione di Gram
- Test della catalasi
- Test dell'ossidasi
- Test per la definizione del metabolismo respiratorio

#### Colorazione di Gram

Questo test è utile per classificare i batteri in Gram positivi o negativi. La differenza sostanziale che permette questa divisione è rappresentata dalla diversa capacità di trattenere il colorante basico, legata alla quantità di peptidoglicano presente. Il saggio si basa sulle caratteristiche della membrana cellulare: i batteri Gram (+) presentano una membrana cellulare fosfolipidica, circondata da una parete cellulare costituita prevalentemente da peptidoglicano, il quale conferisce alla cellula elevata rigidità e resistenza alla disgregazione meccanica; i batteri Gram (-) hanno una parete cellulare con uno spessore minore e presentano una seconda membrana esterna.

Il saggio si divide in due parti:

#### Preparazione dei vetrini

- Lavaggio con acqua e sapone ed asciugatura

- Lavaggio con alcol e successivo passaggio sulla fiamma
- Raffreddamento e passaggio della patina microbica sul vetrino, con l'eventuale ausilio di acqua distillata
- Fissaggio della colonia sul vetrino grazie all'uso di una fiamma ossidante

### **Colorazione**

- Ricoprire il vetrino con violetto di Nicole per 3 minuti; quindi eliminare il liquido
- Cospargere il vetrino con Lugol per un minuto, quindi eliminare il liquido
- Risciacquo con alcol
- Lavaggio con acqua distillata
- Ricoprire il vetrino con safranina per 5 minuti
- Asciugamento

Successivamente il vetrino è sottoposto ad osservazione al microscopio ad immersione; batteri Gram positivi risulteranno colorati di blu, i Gram negativi risulteranno colorati di rosso.

### **Prova della catalasi**

La catalasi è un enzima in grado di detossificare la cellula dalle specie reattive dell'ossigeno, come, ad esempio, il perossido di idrogeno.

Il test consiste nel prelevare, mediante l'ausilio di un'ansa sterile, un'aliquota di patina microbica, posta successivamente su di una superficie di ceramica. Quindi, con una pipetta sterile, si lasciano cadere al di sopra dei microrganismi alcune gocce di acqua ossigenata. L'analisi risulta positiva se si nota la produzione di bolle.

### **Prova dell'ossidasi**

L'ossidasi è un enzima in grado di promuovere reazioni di tipo ossidativo.

Il test si effettua prelevando un'aliquota di patina batterica, ponendola successivamente su carta da filtro; infine si rovescia sulle cellule una goccia di reattivo di Kovacs, che è una soluzione composta da: Tetrametil 1,4 fenilendiammina all'1%, acido ascorbico allo 0,1% (per prevenire l'ossidazione) e acqua distillata.

La relazione è considerata positiva se la patina assume una colorazione rosso-violacea in pochi secondi.

## **Distinzione del metabolismo respiratorio**

Per quest'analisi si utilizza il terreno di Hugh Leifson[1], avente una diversa composizione per le forme Gram (+) e Gram (-).

### **a) Gram negativi:**

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| Peptone                         | 2 g     |
| NaCl                            | 5 g     |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0,3 g   |
| Glucosio                        | 10 g    |
| Blu di bromotimolo              | 0,09 g  |
| Agar                            | 3 g     |
| Acqua distillata                | 1000 ml |
| pH                              | 7,2     |

### **b) Gram positivi**

|                     |                     |
|---------------------|---------------------|
| Tryptone            | 1 g                 |
| Estratto di lievito | 0,1 g               |
| Glucosio            | 1 g                 |
| Bromocresolporpora  | 0,05 ml (sol. 1,6%) |
| Agar                | 0,2 g               |
| Acqua distillata    | 100 cc              |
| pH                  | 7,2                 |

Ogni ceppo è seminato in doppio. All'interno di una serie di provette si crea l'anaerobiosi, grazie all'utilizzo di uno strato di vaselina sterile; l'altra serie è incubata tal quale.

Le forme anaerobie facoltative cresceranno in entrambe le provette, causando il viraggio dell'indicatore (da verde a giallo per i Gram (-), da verde a blu per i Gram(+)); quelle aerobie si svilupperanno esclusivamente nelle provette prive di vaselina.

## **Verifica attività lecitinasica e coagulasica**

I cocci catalasi positivi ed anaerobi facoltativi, sono stati sottoposti alla verifica della presenza degli enzimi lecitinasi e coagulasi, entrambi associati alla patogenicità del ceppo.

### **Attività lecitinasica**

Per verificare questa capacità, tipica di *Staphylococcus aureus*, si utilizza il terreno Baird-Parker.

|                     |      |
|---------------------|------|
| Tryptone            | 10 g |
| Estratto di carne   | 5 g  |
| Piruvato di sodio   | 10 g |
| Estratto di lievito | 1 g  |
| Glicina             | 12 g |
| Cloruro di litio    | 5 g  |
| Agar                | 20 g |
| pH                  | 6,8  |

Al momento dell'utilizzo, quindi dopo la sterilizzazione del terreno, aggiungere 5 ml di emulsione di rosso d'uovo e di tellurito di potassio per ogni 100 ml di terreno.

Semina per spatolamento superficiale e incubazione a 37°C per 24-48 ore.

Gli stafilococchi cresceranno formando colonie nere; quelle potenzialmente patogene, in grado di idrolizzare la lecitina, formeranno un alone di illimpidimento intorno alla colonia. Le colonie sospette sono sottoposte al test per verificare la presenza dell'enzima coagulasi.

### **Attività coagulasica**

La coagulasi è un enzima che ha l'abilità di coagulare il plasma. *Staphylococcus aureus* produce due tipi di enzima: coagulasi libera, che è un enzima extracellulare, e la coagulasi "legata", che si trova sulla superficie della parete cellulare. Con questo test è possibile identificarli entrambi. sospese in 3ml di acqua distillata. Prima di iniziare il test, occorre effettuare un passaggio fresco dei microrganismi sospetti. Le colonie sono prelevate dalle piastre di Baird-Parker e sospese in terreno

Brain Heart Broth (BHI). Successivamente è possibile inoculare le cellule nel terreno di prova. Sono state utilizzate fiale pronto uso, contenenti 3ml di plasma liofilizzato di coniglio ed EDTA, da sospendere in 3 ml di acqua distillata. Sono stati inoculati 0,3ml di brodo colturale. Le fiale così ottenute sono poste ad incubare a 37°C, per 4-6 ore. Se l'analisi risulta negativa, si procede con l'incubazione fino 24 ore. Il test è positivo se la soluzione solidifica in parte o totalmente.

### **3.4 Analisi fenotipica dei lieviti**

Si è proceduto con alcuni test anche su ceppi selezionati e purificati di lieviti. Le analisi sono state le seguenti:

- Verifica dell'utilizzo dei nitrati
- Verifica della fermentazione del glucosio

L'analisi fenotipica dei lieviti è stata effettuata al fine di effettuare un primo raggruppamento tra ceppi che presentavano una serie di prove morfologico - fermentative uguali.

#### **3.4.1 Utilizzo fonte di azoto e fermentazione di zuccheri**

##### **Fase preliminare**

Prima di effettuare le prove di utilizzo dei nitrati e di fermentazione degli zuccheri è necessaria una fase di lavaggio delle cellule cresciute in slant. Questa procedura è effettuata in più passaggi: inizialmente si usa acqua distillata e, dopo centrifugazione, (3500 giri per 15 min) il fondello creatosi è sospeso in 5 ml di sale triptone. Quindi si esegue una seconda centrifugazione e si sospende di nuovo il fondello in 5 ml di sale triptone. Questa sospensione di lieviti sarà quella utilizzata per le prove di utilizzo dei nitrati e fermentazione degli zuccheri.

##### **Utilizzo fonte di azoto**

- sterilizzare due provette piccole per ogni ceppo di lievito, contenenti ognuna 4,5 ml di acqua distillata;
- preparare 100 ml di acqua distillata con 11,7 g di Yeast Carbon Base (YCB), sterilizzare per filtrazione;

- preparare 100 ml di acqua distillata con 11,7 g di YCB + 0,78 g di  $\text{KNO}_3$ , sterilizzare per filtrazione;
- mettere in una serie di provette 0,5 ml di YCB e nell'altra serie 0,5 ml di YCB +  $\text{KNO}_3$ ;
- inoculare 0,1 ml di ogni ceppo in due provette (una solo con YCB e l'altra con YCB+ $\text{KNO}_3$ );
- incubare a 25°C per 3-4 giorni.

Il nitrato è la base azotata più discriminante. Si potrebbero comunque fare delle prove utilizzando  $\text{NO}_2$ , cadaverina, glucosammina, ecc.

## **Fermentazione zuccheri**

E' stata testata la capacità fermentativa dei ceppi di lievito nei confronti del glucosio e del lattosio.

La procedura è stata così eseguita:

- preparare due soluzioni zuccherine distinte al 20%: una con glucosio e l'altra con lattosio. Sterilizzazione per filtrazione amicrobica;
- preparare il terreno Yeast Nitrogen Base (YNB) sciogliendone 6,7 g in un litro di acqua distillata e distribuirne 9 ml in provette con campanella; sterilizzare in autoclave a  $\frac{1}{2}$  atm per 30 min;
- aggiungere nella prima serie di provette 1 ml di soluzione di glucosio al 20% e nella seconda serie 1 ml di soluzione di lattosio sempre al 20% precedentemente sterilizzato;
- inoculare sterilmente una sospensione del lievito lavata con acqua distillata sterile per almeno due volte;
- incubare a 25-28°C per una settimana.

La lettura delle provette è poi eseguita nel seguente modo: il ceppo risulta in grado di fermentare uno zucchero se la soluzione risulta torbida(crescita del lievito) e se la campanella contiene gas (avvenuta fermentazione dello zucchero).

### **3.5 Analisi genotipica di lieviti e muffe**

#### **Estrazione DNA eucarioti**

L'estrazione del DNA da ceppi puri di lieviti è stata eseguita con la seguente procedura:

- Prelevare con l'ansa la patina di una muffa o di un lievito e risospenderla in 5 ml di terreno YEPD. Incubare una notte a 25°C.
- Prelevare 5 ml di brodo cultura e porla in provette sterili adatte alla centrifugazione. Centrifugare per 15 minuti a 3500 rpm.
- Eliminare il surnatante. Risospendere il pellet in 500 microL di enzima litico Zymoliasi. Incubare a 30°C per 90 minuti.
- Centrifugare per 15 minuti a 3500 rpm. Eliminare il surnatante. Risospendere il pellet in 500 microL di soluzione "B".
- Aggiungere 50 microL di SDS 10% P\V. Blanda agitazione ed incubare a 65°C a bagnomaria per 30 min. Contemporaneamente mettere nel ghiaccio potassio acetato 3M per 30 min.
- Passati i 30 minuti aggiungere subito 200 microL potassio acetato freddo e lasciare le provette nel ghiaccio per 30 min.
- Trasferire tutto ciò che si riesce in eppendorf da 2 ml. Centrifugare per 5 min a 14000rpm. Trasferire il surnatante in nuove eppendorf. Aggiungere 800 microL di isopropanolo. Lasciare a temperatura ambiente per 5 minuti rovesciando delicatamente le provette per alcune volte.
- Centrifugare per 10 min a 14000rpm. Eliminare il surnatante. Aggiungere al pellet di DNA 1 ml etanolo a 70%v\ v agitare delicatamente.
- Centrifugare per 5 min a 14000rpm. Eliminare il surnatante e lasciare asciugare il pellet a 45°C per 15-30 min.
- Risospendere il pellet in 50-70 microL di acqua sterile mMQ.
- Lasciare a 4°C per una notte. Conservare in seguito il DNA a -20°C.

Zymoliasi:

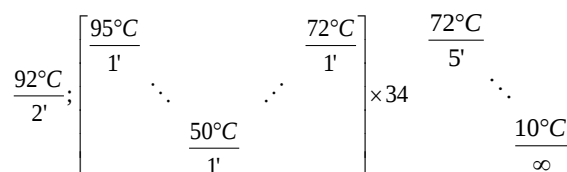
- Soluzione “A”: 0.9 M di sorbitolo + 0.1 M di EDTA : pH 7.5
- 1 microL/ml di B-mercaptoetanolo 14mM
- Filtrare con siringhe e filtro da 0.2 microm.
- Eventualmente stoccare a -20°C,
- Soluzione da utilizzare: 10 ml di sol. A + 0.005 g di Zymoliasi + 10 microL di B-mercaptoetanolo.

Soluzione “B”:

- 0.05 M di Tris HCl
- 0.02 M EDTA
- pH 7.4

### 3.5.1 Amplificazione della regione “ITSrDNA” di lieviti

Dopo l'estrazione del DNA dei lieviti si è proceduto all'amplificazione, tramite PCR, della regione spaziatrice compresa tra il 26S e il 18S rDNA (ITS). La reazione di amplificazione è condotta su un volume finale di 50 µl in provette eppendorf da 150 µl. La miscela di reazione è approntata nel seguente modo: Acqua milli-Q: 38,1 µl; Buffer 10x: 5,0 µl; MgCl<sub>2</sub> 25 mM: 5,0 µl; dNTPs 10 mM: 1,0 µl; Primer (ITSL1+ITSL2, tabella 3) 100 µM: 0,5+0,5 µl; Taq polymerase 5 U/µl: 0,2 µl; DNA: 1 µl. Dopo aver aggiunto 10 µl di template la soluzione ottenuta è sottoposta ad amplificazione mediante PCR Biometra TGradient (Germany) il seguente ciclo termico illustrato nella figura 21.



**Figura 31:** Ciclo termico utilizzato per l'analisi dei lieviti

| Primer (*) | Sequenza (5'→3')      | Regione amplificata |
|------------|-----------------------|---------------------|
| ITSL1      | GTTTCCGTAGGTGAACCTGC  | 18S -28S rDNA       |
| ITSL2      | ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT |                     |

**Tabella 3:** Sequenza nucleotidica dei primer utilizzati per l'analisi dei lieviti

### 3.5.2 Restrizione dell'amplificato ITS

Dopo aver valutato l'avvenuta amplificazione della regione ITS attraverso un gel elettroforetico, l'amplificato è stato sottoposto a digestione attraverso l'ausilio di un enzima di restrizione *Hin6I* al fine di ottenere una più certa discriminazione a livello di ceppo dei lieviti isolati.

Soluzione di restrizione: Acqua milli-Q: 7,2 µl; Tango Buffer: 1,5 µl; Enzima *Hin6I*: 0,3 µl; Amplificato ITS: 6 µl.

La soluzione è sottoposta ad incubazione per 2 ore a 37°C. Successivamente i frammenti di DNA sono osservati attraverso una corsa elettroforetica ottenuta grazie ad un gel di agarosio al 2,5%.

Cepi che hanno mostrato un profilo ITS uguale e una restrizione differente sono da considerare diversi e quindi risultano da sequenziale entrambi.

### 3.6 Analisi genotipica delle muffe – estrazione del DNA totale

Il protocollo cui si è fatto riferimento è il seguente:

- Inoculare le muffe in uno specifico terreno ed incubare a 30°C per diversi giorni.
- prelevare sterilmente da ogni ceppo una porzione di micelio e stemperare accuratamente in 3ml di soluzione tampone 1x a pH8 (0,01M TRIS, 0,001M EDTA).
- Centrifugare a 3500 rpm per 15 minuti.
- Eliminare il surnatante ed aggiungere 0,4 ml di enzima litico Zymoliasi.

- Incubare la soluzione in termostato basculante a 30°C per 2ore.
- Centrifugare la sospensione a 9000 rpm per 10 minuti a 4°C ed eliminare il surnatante. Aggiungere 0,5 ml di tampone (50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7,4) e 0,05 ml di SDS 10% p/v.
- Dopo agitazione incubare a 65°C per 30 minuti a bagnomaria.
- Aggiungere 0,2 ml acetato di potassio 5 mM (permette la precipitazione delle proteine presenti).
- Porre le eppendorf in ghiaccio per 30 minuti e quindi centrifugare a 15800 rpm per 5 minuti a 4°C.
- Separare il surnatante e ripetere quest'ultima operazione per eliminare completamente i solidi presenti.
- Trasferire il surnatante in eppendorf da 1,5 ml ed aggiungere un isovolume di propanolo.
- Agitare gentilmente ed incubare a temperatura ambiente per 5 minuti. Centrifugare a 15800 rpm per 10 minuti; quindi eliminare il surnatante.
- Aggiungere 0,5 ml di etanolo al 70% v/v e centrifugare a 15800 rpm per 5 minuti.
- Eliminare il surnatante ed asciugare il pellet in centrifuga sotto vuoto.
- Risospendere in 50 µl di TE pH 7,4.

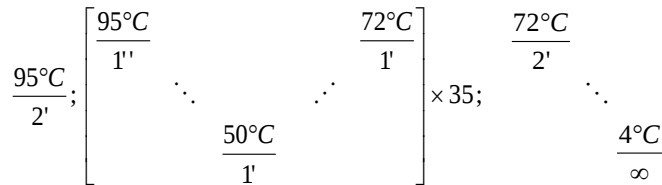
Il metodo seguito è riconducibile alla tecnica formulata da Querol per l'analisi di restrizione del DNA mitocondriale di lieviti, pur presentando una modifica riguardante il trattamento con enzima litico da *Rhizoctonia solani* invece che il trattamento con Lyticase. Ciò consente di ottenere un titolo di DNA di maggiore purezza.

### 3.6.1 Amplificazione regione spaziatrice tra 18S e 28S

La reazione di amplificazione è condotta su un volume finale di 50 µl in provette eppendorf da 150 µl. La miscela di reazione è approntata nel seguente modo:

- 5 µl di tampone di reazione 10X (Amersham Biosciences);
- 1µl miscela di dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) fino ad arrivare ad una concentrazione finale pari a 10mM (Amersham Biosciences);
- Primer NL1 e NL4 ciascuno ad una concentrazione finale di 10 µM (tabella 4);
- 5µl di MgCl<sub>2</sub>
- DNA Taq polimerasi (Amersham Biosciences) in ragione di 0,2µl;
- acqua bidistillata sterile (HPLC grade) ad un volume finale di 35 µl;

Dopo aver aggiunto 10 µl di templatato la soluzione ottenuta è sottoposta ad amplificazione mediante PCR Biometra TGradient (Germany) seguendo il ciclo termico illustrato nella figura 22.



**Figura 22:** Profilo termico utilizzato per l’analisi delle muffe

| Primer (*) | Sequenza (5’→3’)      | Regione amplificata |
|------------|-----------------------|---------------------|
| NL 1       | GTTTCCGTAGGTGAACCTGC  | 18S -28S rDNA       |
| NL 4       | ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT |                     |

**Tabella 4:** Sequenza nucleotidica dei primer utilizzati per l’identificazione delle muffe

(\*): Nomenclatura assegnata all’oligonucleotide come suggerito da Montrocher.

### 3.6.2 Sequenziamento

Il sequenziamento del DNA amplificato è stato realizzato presso i laboratori della ditta PRIMM di Milano. La sequenza riscontrata per ogni ceppo isolato di lievito e muffa è stata elaborata con CHROMAS 2.13. I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli presenti nella banca dati online ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

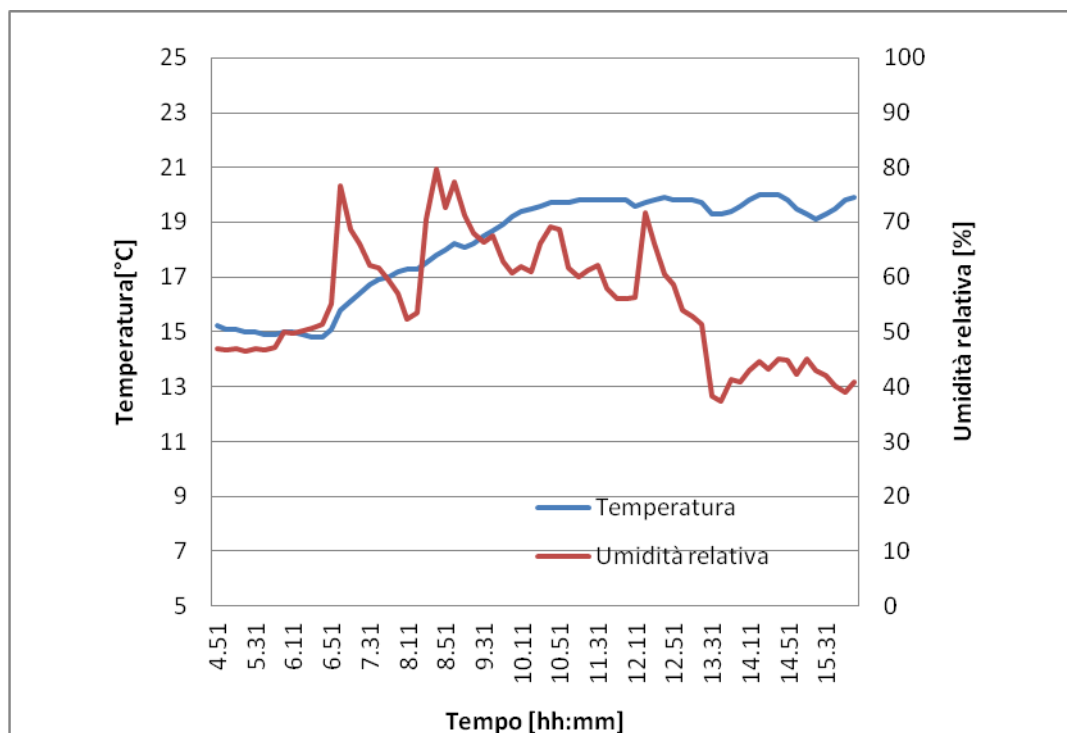
## 4. Risultati

### 4.1 Microclima

I rilevamenti hanno riguardato diversi punti del caseificio. In particolare le sonde sono state posizionate in modo da ricoprire tutto il locale, prediligendo le postazioni di lavoro. Le registrazioni sono state effettuate sia a macchinari in funzione, sia fermi.

#### Zona caldaia

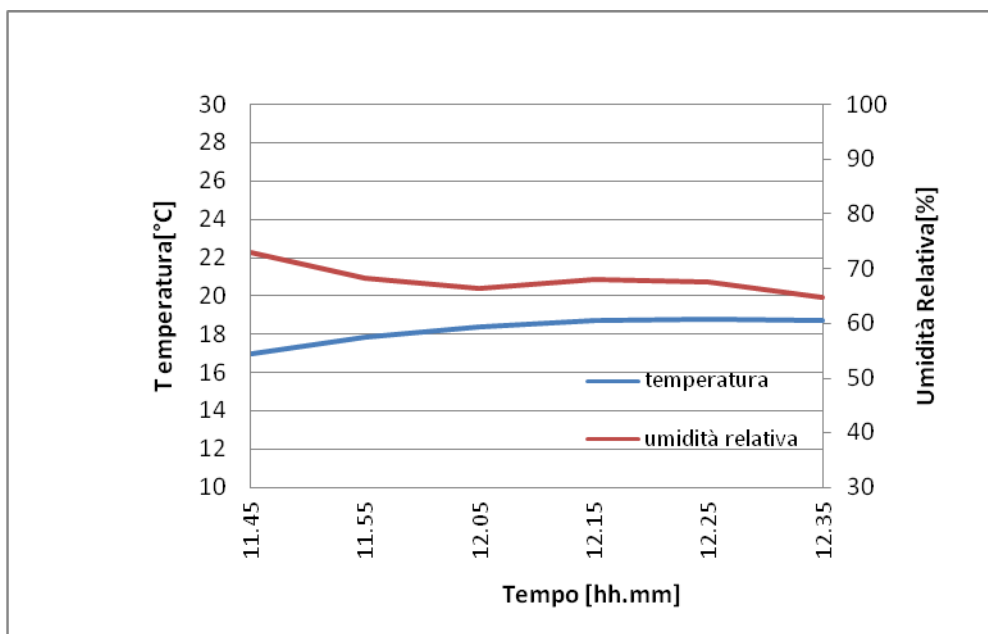
Le registrazioni sono proseguite per un'intera giornata lavorativa, acquisendo i dati ogni dieci minuti. Dalla figura 23, si può osservare che, a fronte di una temperatura iniziale di 15°C, all'inizio dell'attività lavorativa, si registra un lento, ma continuo incremento, particolarmente accelerato tra le 7:00 e le 10:00, quando l'attività produttiva è al massimo dell'intensità e il numero di addetti impegnati è massimo. Nelle ore successive quando ormai le attività lavorative sono ridotte, la temperatura torna a stabilizzarsi intorno ai 16-17°C. I livelli di umidità relativa subiscono importanti variazioni, coincidenti proprio con le ore di lavoro più intenso all'interno del caseificio. In particolare sono raggiunti valori massimi dell'80%, in corrispondenza del funzionamento delle caldaie e del pastorizzatore.



**Figura 23:** Livelli di umidità relativa e di temperatura rilevati con caldaia in funzione

Il contributo del funzionamento degli impianti e la presenza degli addetti nell'influenzare i parametri di umidità e temperatura, sono evidenti nella figura 24 in cui è illustrata la situazione nella medesima zona, ma con caldaia spenta. Come si può notare, i livelli presi in esame risultano

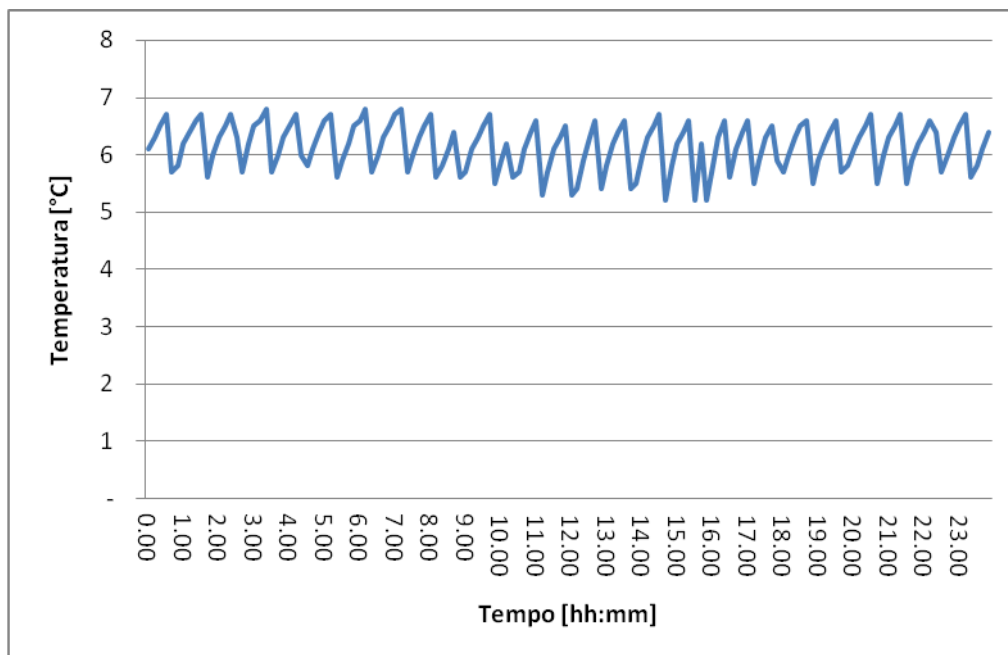
molto più stabili. La temperatura si attesta su valori prossimi ai 20°C, mentre l'umidità relativa oscilla fra il 65% e il 70%. La registrazione è cominciata subito dopo la fine della lavorazione. Il picco di umidità relativa si è avuto durante le operazioni di lavaggio e sanificazione della caldaia.



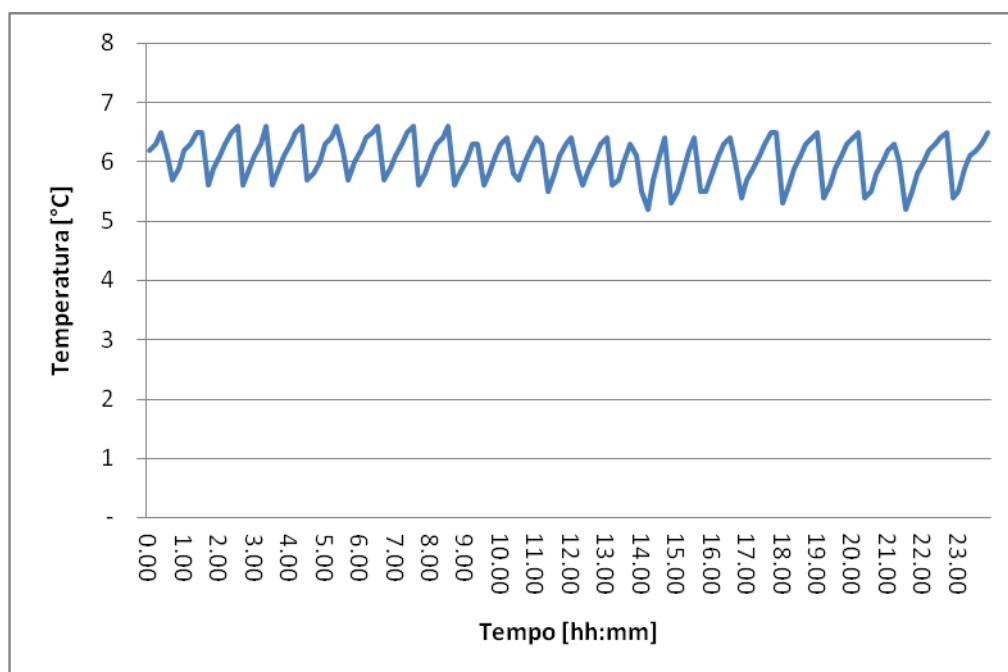
**Figura 24:** Livelli di umidità relativa e di temperatura rilevati con caldaia spenta

## Cella di stagionatura

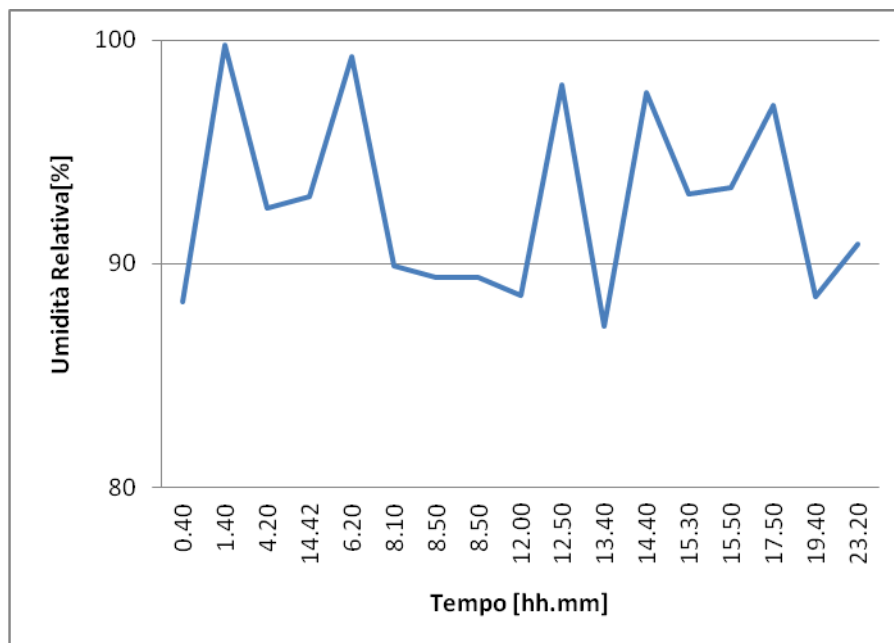
Le rilevazioni ambientali, temperatura ed umidità, all'interno della cella di stagionatura delle Tome sono illustrate nelle figure 25, 26, 27 e 28, che riportano le variazioni di temperatura ed umidità relativa nell'arco di due giornate distinte. Le acquisizioni sono state compiute ogni dieci minuti per un periodo complessivo di due mesi (8485 rilevazioni). Il periodo preso in esame quindi è stato da febbraio, quando la temperatura esterna scende sotto gli 0°C, ad aprile, quando il clima è notevolmente più mite. Nella cella la temperatura media è pari a 6,1°C, oscillando da un valore minimo di -1.7°C, a un valore massimo di 11.7°C; entrambi questi valori sono stati registrati nell'arco della medesima giornata, quando, molto probabilmente, sono stati effettuati numerosi spostamenti di prodotti e la porta della cella è stata per lungo tempo aperta. Nei grafici sono riportati a titolo di esempio solo i valori di una giornata. Discreta stabilità si osserva per l'umidità relativa, il cui valore a prescindere dal cambio stagionale, oscilla, per tutta la durata della prova, tra il 92% e il 99%.



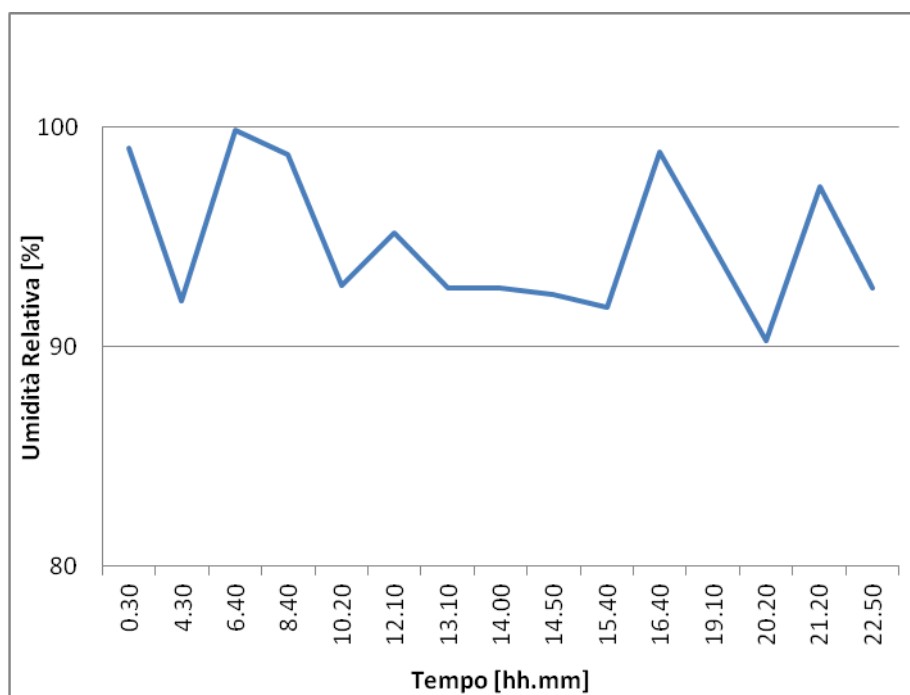
**Figura 25:** Andamento della temperatura all'interno della cella di stagionatura (febbraio 2008)



**Figura 26:** Andamento della temperatura all'interno della cella di stagionatura (aprile 2008)



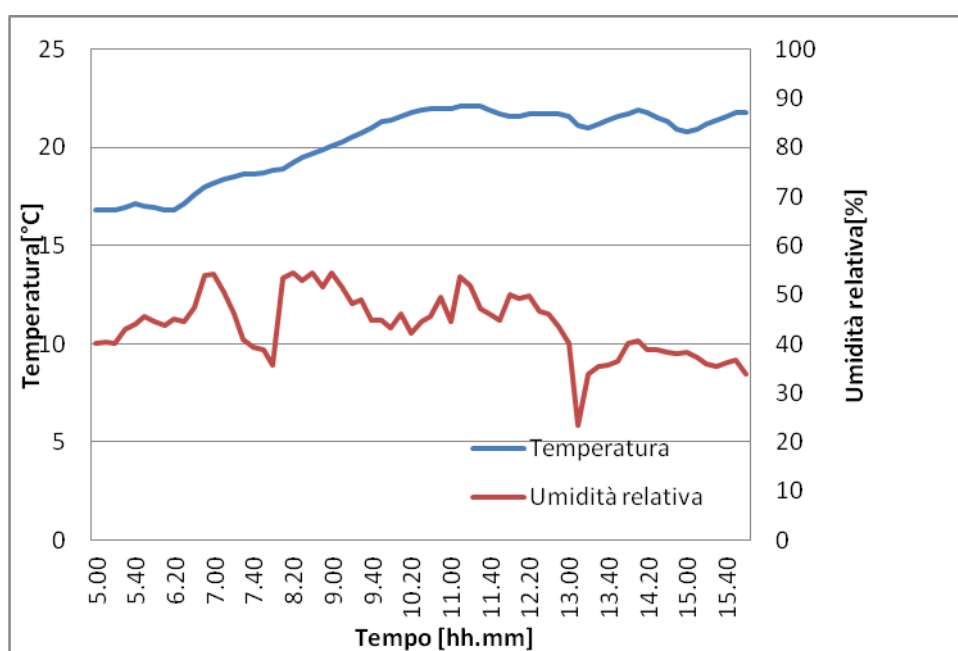
**Figura 27:** Andamento dell'umidità riguardante l'interno della cella di stagionatura (febbraio 2008)



**Figura 28:** Andamento dell'umidità riguardante l'interno della cella di stagionatura (aprile 2008)

## Zona servizi

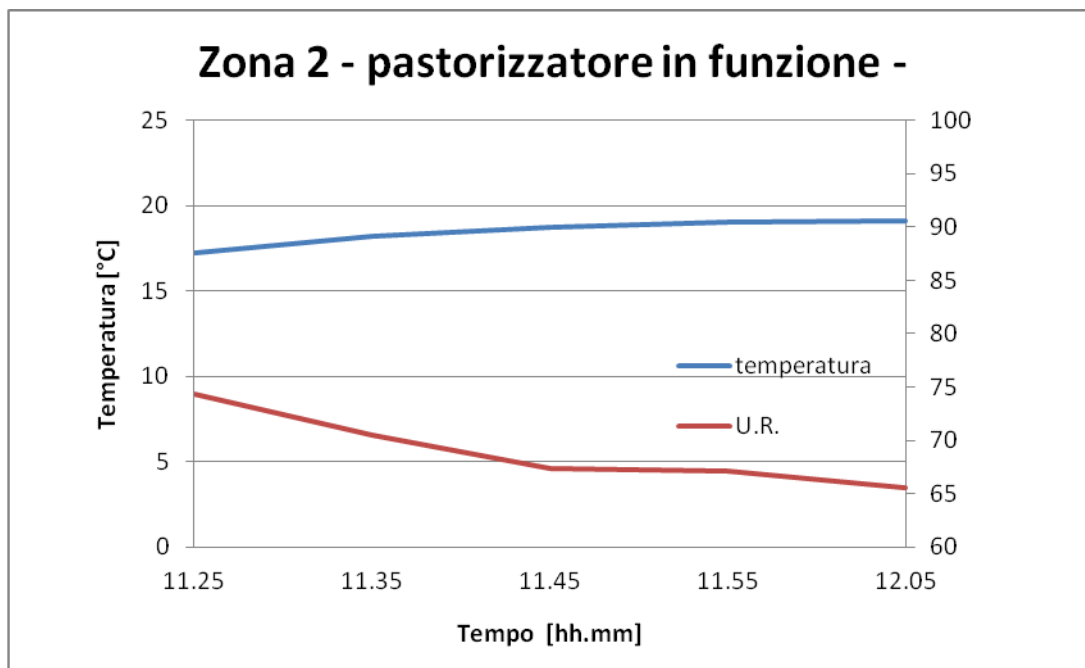
Si tratta di un'area del caseificio situata di fronte alla caldaia poco coinvolta nelle attività lavorative, attraverso la quale si accede agli uffici; in essa sono alloggiati alcuni tavoli, fascere e altri piccoli strumenti di lavoro. Dall'andamento della temperatura registrato ed illustrato nella figura 29 non si osservano particolari differenze rispetto alla zona caldaia. Certamente più variabile appare l'umidità relativa; dal grafico sottostante possiamo notare che gli aumenti più significativi si hanno in corrispondenza con le ore di maggiore attività all'interno del caseificio. Al termine delle lavorazioni intense, l'umidità relativa subisce una netta diminuzione.



**Figura 29:** Livelli di umidità relativa e di temperatura rilevati nell'area di fronte alla caldaia

## Area pastorizzatore

I dati del microclima sono stati raccolti in un unico giorno, con il pastorizzatore in funzione. Dalla figura 30 si può notare come la temperatura rimanga pressoché costante. L'umidità relativa, prima di assestarsi su valori prossimi al 65%, ha un incremento significativo sino a 75%.



**Figura 30:** Livelli di umidità relativa e di temperatura rilevati con pastorizzatore in funzione

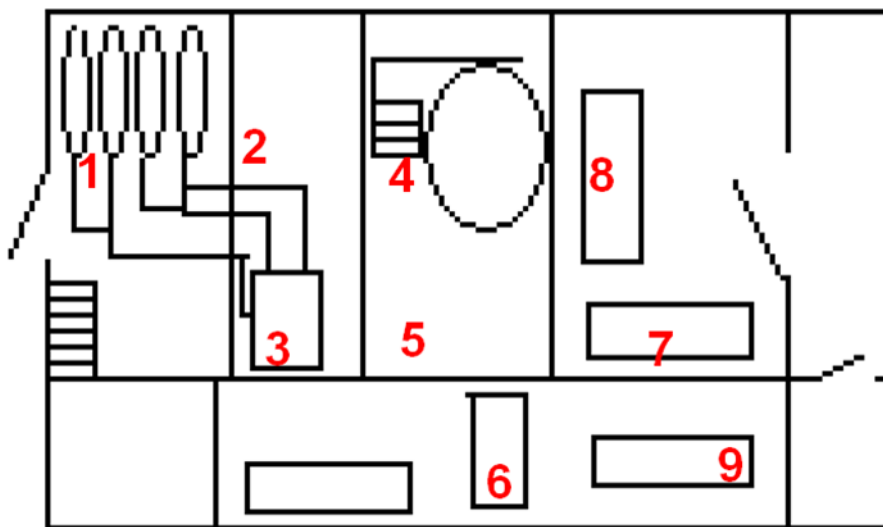
Complessivamente, i dati raccolti non hanno evidenziato particolari situazioni di disagio microclimatico per gli operatori. Durante la lavorazione l'umidità relativa non raggiunge valori elevati grazie al funzionamento degli aspiratori presenti (figura 31).



**Figura 31:** Impianto di aerazione all'interno del caseificio

## 4.2 Illuminamento

La figura 32 riporta i punti di prelievo ed i valori ottenuti. La differenza dei valori rilevati è da attribuire alla presenza della finestratura a nastro lungo solamente su due lati dell'edificio; questo spiega l'elevata illuminazione riscontrata (maggiore di 1500 lux) nella zona dei serbatoi del latte e la progressiva diminuzione dei valori verso il lato opposto del locale. L'illuminamento medio della sala di lavorazione è risultato pari a 1053 lux, ma non è un dato particolarmente rappresentativo della situazione reale. Escludendo i parametri rilevati vicino alle finestre, l'illuminamento medio è pari a 250 lux. Questo valore è inferiore a quanto raccomandato dalla normativa UNI per l'industria casearia. L'illuminazione media nella cella di stagionatura è di 130 lux, con un massimo di 150 lux ed un minimo di 4 lux, rilevato in fondo al locale, sprovvisto in quel punto di illuminazione artificiale.



**Figura 32:** Punti di misurazione dei livelli di illuminamento

## 4.3 Qualità microbiologica ambiente

### 4.3.1 Carica microbica aerodispersa

Attualmente non esistono riferimenti normativi relativi al livello di contaminazione microbiologica degli ambienti e pertanto occorre rifarsi ad alcuni parametri indicati in letteratura. La Commissione della Comunità Europea propone fasce orientative di contaminazione, il cui superamento non implica però l'instaurarsi di condizioni di pericolo o insalubrità. (Tabella 5).

| <b>Contaminazione Ambientale</b> | <b>Carica batterica (ufc/m<sup>3</sup>)</b> |                             | <b>Carica micetica (ufc/m<sup>3</sup>)</b> |                             |
|----------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------|
|                                  | <b>Ambienti residenziali</b>                | <b>Ambienti industriali</b> | <b>Ambienti residenziali</b>               | <b>Ambienti industriali</b> |
| Molto Bassa                      | <100                                        | <50                         | <50                                        | <25                         |
| Bassa                            | <500                                        | <100                        | <200                                       | <100                        |
| Media                            | <2500                                       | <500                        | <1000                                      | <500                        |
| Alta                             | <10000                                      | <2000                       | <10000                                     | <2000                       |
| Molto Alta                       | >10000                                      | >2000                       | >10000                                     | >2000                       |

**Tabella 5:** Livelli di carica microbica aerodispersa, utili per la valutazione della contaminazione di ambienti confinati

La situazione igienica a livello aria (tabella 6) nel caseificio da noi preso in esame è apparsa nel complesso discreta: non sono, infatti, mai stati ritrovati microrganismi indicatori di contaminazione fecale (coliformi). Nel locale di lavorazione domina una muffa nera, ritrovata anche nelle celle di stagionatura, che tende a prevalere su tutti gli altri indici microbici ricercati.

Nelle celle di stagionatura per la Toma, come prevedibile, dominano le muffe che sono state isolate e sottoposte ad identificazione.

| <b>Locale</b>       | <b>Posizione</b>       | <b>Aria (ufc/m<sup>3</sup>)</b> |                |              |
|---------------------|------------------------|---------------------------------|----------------|--------------|
|                     |                        | <b>CBT</b>                      | <b>Lieviti</b> | <b>Muffe</b> |
| Lavorazione         | Zona serbatoi          | N.r.                            | N.r.           | Muffa nera   |
| Lavorazione         | Zona pastorizzatore    | N.r.                            | N.r.           | Muffa nera   |
| Lavorazione         | Zona caldaie           | N.r.                            | N.r.           | Muffa nera   |
| Lavorazione         | Zona lavorazione       | N.r.                            | N.r.           | Muffa nera   |
| Lavorazione         | Zona magazzino         | N.r.                            | N.r.           | Muffa nera   |
| Lavorazione Burro   | Zona lavorazione Burro | N.r.                            | N.r.           | Muffa nera   |
| Salamoia            | Centro locale          | 0,2                             | 0,1            | 0,25         |
| Salamoia            | Centro locale          | 0,3                             | N.c.           | 0,6          |
| Stagionatura Tomini | Centro locale          | 0,1                             | 0,2            | 0,7          |
| Stagionatura        | Centro locale          | 0,2                             |                | 0,15         |
| Stagionatura        | Centro locale          | Muffa                           | Muffa          | Muffa        |

**Tabella 6:** contaminazione microbica aerodispersa nel mese di febbraio 2008

| Locale       | Posizione            | Aria (ufc/m <sup>3</sup> ) |         |       |
|--------------|----------------------|----------------------------|---------|-------|
|              |                      | CBT                        | Lieviti | Muffe |
| Lavorazione  | Zona serbatoi        | 3,8                        | 19      | 19    |
| Lavorazione  | Zona pastorizzazione | 8,9                        | 25      | 25    |
| Lavorazione  | Zona caldaie         | 7,1                        | 7       | 8     |
| Lavorazione  | Zona lavorazione     | 7,2                        | 10      | 7     |
| Lavorazione  | Zona magazzino       | 8,4                        | 25      | 25    |
| Salamoia     | Centro locale        | 3,5                        | 0,2     | 0,6   |
| Stagionatura | Centro locale        | 5,8                        | 0,15    | 50    |

**Tabella 8:** Risultati delle analisi microbiologiche sulle superfici del mese di aprile

Il prelievo dell'aria è stato ripetuto nel mese di aprile, è interessante osservare che la situazione critica rilevata durante il primo prelievo effettuato (Febbraio 2008), appare decisamente migliore nelle verifiche effettuate nel mese di aprile (tabelle 8 e 9). La CBT non supera mai le dieci ufc/m<sup>3</sup> di aria, lievemente superiori appaiono gli eumiceti ritrovati comunque a valori non preoccupanti. Questa differenza tra i due prelievi è da attribuire principalmente alle differenti modalità di pulizia predisposte. In Aprile è stato infatti attivato settimanalmente un sistema di lavaggio a schiuma dell'ambiente.

#### 4.3.2 Carica microbica delle superfici di lavoro

Anche per le superfici e le attrezzature non ci sono parametri di legge, è possibile ancora riferirsi ai valori proposti dalla Comunità europea di seguito riportati

|                                |                                        |
|--------------------------------|----------------------------------------|
| Sanificazione corretta         | < 50 CFU/cm <sup>2</sup> per TBC       |
|                                | < 50 CFU/cm <sup>2</sup> per coliforms |
| Sicurezza alimentare a rischio | > 104 CFU/cm <sup>2</sup> per TBC      |

I risultati dei prelievi microbici effettuati dalle diverse superfici di lavoro sono riportati nelle tabelle 7 e 8 nel mese di febbraio e di aprile rispettivamente. Nel prelievo di febbraio similmente all'aria nelle diverse aree analizzate è stata ritrovata la medesima muffa associata, in questo caso, a tre diverse tipologie di lievito: due di colore rosa ed uno bianco. I batteri sono stati ritrovati solo sulle piastrelle di ceramica, comunque in quantità non rilevante per cm<sup>2</sup> di superficie

| <b>Zona di prelievo</b>                                 | <b>CBT</b>        | <b>Coliformi</b> | <b>Lieviti</b>      | <b>Muffe</b> |
|---------------------------------------------------------|-------------------|------------------|---------------------|--------------|
| Tubo scarico<br>cagliata                                | N.R               | assenti          | N.R.                | N.R.         |
| Cestello plastica<br>sporco                             | N.R               | N.R              | N.R                 | N.R          |
| Cestello plastica                                       | 2x10 <sup>3</sup> | N.r.             | <1000               | <1000        |
| Cestello inox<br>sporco                                 | 5x10 <sup>5</sup> | N.r.             | 6,4x10 <sup>4</sup> | <1000        |
| Cestello inox<br>pulito                                 | <1000             | N.R              | 6,4x10 <sup>4</sup> | <1000        |
| Panno plastica<br>vassoi trasporto                      | N.R.              | N.R              | N.R.                | N.R.         |
| Cassetta plastica<br>pronto uso                         | N.R               | assenti          | nd                  | nd           |
| Piastrella<br>ceramica 15x15<br>(locale<br>lavorazione) | CC                | N.R              | 3x10 <sup>3</sup>   | nd           |
| Superficie PVC                                          | CC                | N.R.             | CC                  | Muffa Nera   |
| Caldaia in rame                                         | Lieviti           | assenti          | 2,6x10 <sup>3</sup> | Muffa nera   |

CC: **crescita confluyente (colonie >300ufc)**; Nr: **non rilevabile, l'indice ricercato è coperto da muffa**  
Nd= non determinato

**Tabella7:** risultati delle analisi microbiologiche sulle superfici del mese di febbraio 2008. Risultati espressi come ufc/cm<sup>2</sup>

Importante ed apprezzabile l'assenza di coliformi fecali. Le differenti modalità di pulizia degli utensili (cestelli, forme, teli, ecc.), adottate nel mese di aprile hanno influenzato positivamente la qualità microbiologica. In particolare i vari utensili sono sottoposti a un bagno acido caldo (70°C), seguito da un trattamento alcalino ed infine risciacquato.

Dai risultati ottenuti si può dedurre che il trattamento di sanificazione degli utensili è sufficientemente efficace; la carica batterica ed eumicetica mostra un brusco abbattimento dopo tali lavaggi.

| <b>Zona di prelievo</b>     | <b>CBT</b>          | <b>Coliformi</b> | <b>Lieviti</b> | <b>Muffe</b> |
|-----------------------------|---------------------|------------------|----------------|--------------|
| Tubo scarico<br>cagliata    | 5,3x10 <sup>3</sup> | Assenti          | 66             | <10          |
| Cestello plastica<br>sporco | 1x10 <sup>4</sup>   | 5                | 46             |              |

|                                    |                     |         |         |         |
|------------------------------------|---------------------|---------|---------|---------|
| Cestello plastica                  | 23                  | Assenti | 8       | <10     |
| Cestello inox sporco               | 36                  | 3       | Assenti | Assenti |
| Cestello inox pulito               | 8                   | Assenti | Assenti | Assenti |
| Panno plastica<br>vassoi trasporto | 6,2x10 <sup>4</sup> | 1       | 93      | Assenti |
| Cassetta plastica<br>pronto uso    | 59                  | Assenti | 0,8     | Assenti |

**Tabella8:** risultati delle analisi microbiologiche sulle superfici del mese di aprile 2008. Risultati espressi come ufc/cm<sup>2</sup>

#### 4.4 Classificazione

Tutti i batteri isolati sono stati sottoposti ad identificazione, limitatamente al fenotipo. La componente batterica è risultata essere composta quasi esclusivamente (90%) da cocchi Gram +, anaerobi facoltativi, catalasi positivi, appartenenti dunque al genere *Staphylococcus*; solo un 10% è risultato essere aerobia, appartenente al genere *Micrococcus*. Tutti gli isolati collocati nel genere *Staphylococcus*, in quanto potenziale produttore di enterotossina, sono stati testati per le attività enzimatiche associate alla patogenicità. Nessuno presentava attività coagulastica, mentre solo uno è risultato positivo al test dell'attività lecitinasica. I Gram - ritrovati nell'ambiente sono risultati bastoncini catalasi positivi e ossidasi positivi, appartenenti alla famiglia delle Pseudomonadaceae; solo un 12% è risultato ossidasi negativo e fermentante collocabile nella famiglia delle Enterobacteriaceae. Per quanto concerne la componente eumicetica, la classificazione è stata compiuta mediante tecniche molecolari.

I risultati dell'identificazione sono riportati in tabella

Nel locale di lavorazione la specie fungina isolata più frequentemente nel primo periodo è risultata essere un *Mucor racemosus* specie ritrovata anche nella cella di stagionatura sia a livello dell'aria che dei piani di legno su cui poggiano le forme a maturare, seguita da *Trichosporon insectorum*. Tra i lieviti ritrovati *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula* spp., *Cryptococcus curvatus* *Candida pararugosa*, tutti rinvenuti poi sulle superfici, soprattutto a livello di cestelli e contenitori in plastica ed acciaio.

Nella cella di stagionatura come prevedibile dominano le muffe ancora con la specie *Mucor racemosus* e, seguito da specie del genere *Penicillium* ed *Aspergillus*

Interessante sulle assi di maturazione insieme alle precedenti muffe e a *Yarrowia lipolytica* e *Debaryomyces hansenii* sono stati ritrovati *Schizophyllum commune* e *Phialophora* spp entrambi tipici del legno e la seconda in particolare caratterizzata da attività fitopatogena.

|                              |                                |
|------------------------------|--------------------------------|
| <b>Locale di lavorazione</b> | <i>Debaryomyces hansenii</i>   |
|                              | <i>Trichosporon insectorum</i> |
|                              | <i>Candida pararugosa</i>      |
|                              | <i>Cryptococcus curvatus</i>   |
|                              | <i>Rhodotorula spp</i>         |
| <b>Cella stagionatura</b>    | <i>Candida sorbophila</i>      |
|                              | <i>Yarrowia lipolitica</i>     |
|                              | <i>Yarrowia lipolitica</i>     |
|                              | <i>Phialophora spp.</i>        |
|                              | <i>Mucor racemosus</i>         |
|                              | <i>Schyzophyllum commune</i>   |
|                              | <i>Aspergillus spp.</i>        |
|                              | <i>Penicillum spp.</i>         |

## CONCLUSIONI

I risultati del monitoraggio ambientale effettuato, hanno permesso di trarre le seguenti conclusioni:

- ✓ La situazione igienico sanitaria degli ambienti è apparsa nel complesso più che confortante. Sempre assenti o comunque ritrovati solo occasionalmente e a bassi valori gli indicatori di contaminazione fecale.
- ✓ La presenza di muffe nel locale di lavorazione è stata recepita dai responsabili che di fatto hanno attivato un nuovo sistema di sanificazione dell'ambiente sostituendo le manuali con interventi di lavaggio a schiuma e con sistemi di lavaggio per gli utensili automatizzati
- ✓ Per quanto concerne le condizioni microclimatiche, umidità e temperatura le rilevazioni hanno evidenziato una discreta costanza, fermo restando che in prossimità delle ore di maggiore attività lavorativa e di concentrazione umano entrambi i parametri risentono di un minimo di variazione.
- ✓ La cella è apparsa estremamente stabile indipendentemente dalle condizioni esterne.
- ✓ L'illuminazione è apparsa complessivamente buona.

## BIBLIOGRAFIA

Sangiorgi Franco e Dioguardi Loredana La progettazione integrata nell'industria alimentare. Criteri progettuali e gestionali per il settore caseario. Fiordo s.r.l. Galliate (NO), 2006.

DECRETO LEGISLATIVO 9 aprile 2008 , n. 81 Attuazione dell'articolo 1 della legge 3 agosto 2007, n. 123, in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro.

Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea Regolamento CE n. 852/2004 ddel Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 sull'igiene dei prodotti alimentari

Dioguardi L., Franzetti L. Indagine sulle condizioni di lavoro e qualità igienica degli ambienti di piccoli caseifici e malghe nel nord Italia. Ind. Al. 45(463): 41-46, 2006

Biblio APC  
VRB  
YGC  
BP  
GRAM  
CATALAS  
OSSIDASI  
HL

42. Querolo *et.al.* 1992. Molecular monitoring of wine fermentation conducted by active dry yeast sistem appl.envron. microb. 58(9) : 2948-2953.

43. L. Ranjard,<sup>1</sup> F. Poly,<sup>1</sup> J.-C. Lata,<sup>1</sup> C. Mougel,<sup>1†</sup> J. Thioulouse,<sup>2</sup> and S. Nazaret<sup>1\*</sup> 2001Characterization of Bacterial and Fungal Soil Communities by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints: Biological and Methodological Variability Appl Environ Microbiol., 67(10): 4479–4487.

## Riassunto

Il lavoro svolto nel corso del tirocinio è frutto di una collaborazione tra la sezione di Microbiologia Agraria Alimentare Ecologica del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari ed il Dipartimento di Ingegneria Agraria della Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Milano, finalizzato a monitorare le condizioni degli ambienti di lavoro di piccole e medie realtà casearie.

In particolare lo studio ha riguardato il Caseificio "Alta Valsesia" sito nel Comune di Piode (VC). Si tratta di una realtà semi-industriale, che lavora giornalmente latte vaccino raccolto con proprie autobotti, proveniente da tutta la bassa e alta valle.

I rilievi hanno riguardato sia il monitoraggio del microclima e dell'illuminamento dei locali di lavorazione, sia la qualità microbiologica di aria e di superfici, per valutare il grado di benessere, sicurezza ed igiene in cui si trovano ad operare gli addetti.

I locali presi in considerazione sono stati: locale lavorazione del latte, locale salamoia e celle di stagionatura. Per il microclima sono stati monitorati più punti all'interno dei locali considerati. Il rilievo delle condizioni si è protratto per tutta la lavorazione, comprese le operazioni di pulizia. I valori rilevati non hanno complessivamente evidenziato situazioni climatiche di sfavorevoli per il personale.

Grazie alla finestratura perimetrale e all'orientamento del caseificio, che permettono una illuminazione naturale dell'edificio buona, i livelli di illuminamento risultano essere ottimali. Durante la lavorazione è comunque presente l'illuminazione artificiale.

I campioni per le analisi microbiologiche sono stati raccolti in due periodi differenti dell'anno, in modo da stabilire eventuali influenze da parte del cambiamento di stagione.

Le analisi microbiologiche hanno riguardato la ricerca dei seguenti indici: Carica Batterica Totale, eumiceti totali, coliformi totali e fecali. Successivamente, dopo avere isolato colonie di diverso aspetto, si è proceduto alla classificazione. Per quanto riguarda la componente batterica, ci si è limitati alla determinazione del genere, mediante tecniche basate sul riconoscimento del fenotipo. Lieviti e muffe, provenienti per lo più dalle celle di stagionatura, sono stati invece sottoposti ad identificazione mediante tecniche molecolari.

Dal punto di vista microbiologico la qualità dell'aria e delle superfici è apparsa nel complesso accettabile. In particolare si è osservato un netto miglioramento tra il primo ed il secondo prelievo. Ciò è da attribuire al cambiamento effettuato all'interno dell'azienda delle modalità di pulizia, sia dell'ambiente, sia delle superfici.

