

# STUDIO DEI PERICOLI MICROBIOLOGICI NELLA PRODUZIONE DELLA MOZZARELLA DI BUFALA CAMPANA

## **STUDY OF THE MICROBIOLOGICAL HAZARDS IN THE PRODUCTION OF THE MOZZARELLA BUFFALO CHEESE**

Zottola T., Briganti P., Cuoco E., D'Amici L., De Gregorio A.<sup>1</sup>, Guzzon L., Manocchio A., Mancuso M., Condoleo R. U.

Istituto Zooprofilattico delle regioni Lazio e Toscana – sezione di Latina, <sup>1</sup> Servizio Veterinario Azienda USL Latina

### **SUMMARY**

Water Buffalo Mozzarella is a typical Italian product certificated with the European Protected Designation of Origin (DOP). Cheese-associated food poisoning outbreaks have been reported worldwide but are not common if pasteurised milk is used and hygienic measures are applied during cheese processing.

The study reports data of a survey on the hygienic (Aerobic mesophilic plate count, *E. coli* glucuronidase – positive, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae* and Staphylococci coagulase - positive) and sanitary quality (detection of *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *E. coli* O:157 and staphylococcal enterotoxins) of the production Water Buffalo Mozzarella. Our results are: no *Salmonella spp.*, nor *Listeria spp.* and *E.coli* O:157 were found in all samples, but some samples of the rennet and the curd showed Staphylococci coagulase – positive. *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Trichosporon asahii*, *Cryptococcus humicola*, *Staphylococcus aureus* were found in the hands of the workers. The microbiological monitoring is necessary to assess biological risk and to set preventive measures.

### **Key words**

Water Buffalo Mozzarella, hazard, microbiological analysis.

### **INTRODUZIONE**

La Mozzarella di Bufala Campana è un formaggio fresco a pasta filata prodotto in un areale ben definito delle regioni Campania, Lazio, Puglia e Molise. Dal 1996 è registrato nell'elenco comunitario delle denominazioni di origine protetta (DOP) e le modalità di produzione sono sancite nel disciplinare allegato al Decreto MiPAF 18 settembre 2003 (1).

In tale disciplinare sono illustrate le caratteristiche merceologiche del prodotto, ma non sono indicati i requisiti di igiene e di sanità.

Il Reg. CE 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, definisce sanitarmente ed igienicamente accettabili i formaggi che presentano *Salmonella* ed enterotossine stafilococche assenti, *E. coli* beta glucoronidasi positivi non

>10<sup>3</sup> ufc/g, *Stafilococchi coagulasi positivi* non >10<sup>5</sup> ufc/g per i formaggi a base di latte crudo, *Stafilococchi coagulasi positivi* non >10<sup>2</sup> ufc/g per i formaggi ottenuti da latte pastorizzato (2).

Durante il processo produttivo si sviluppano popolazioni microbiche specifiche che influenzano le caratteristiche di identità, variabilità e qualità del prodotto. I contaminanti microbici di origine ambientale, umana ed animale e le modalità di produzione influenzano i livelli di rischio igienico e sanitario dell'alimento.

Scopo del presente lavoro è indagare sulla sicurezza e sulla igienicità della produzione della Mozzarella di Bufala Campana DOP al fine di identificare i rischi microbiologici connessi alla sua produzione e favorire azioni correttive dei processi e dei singoli fattori produttivi.

## MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto in uno stabilimento di tipo industriale in cui si trasforma latte proveniente da allevamenti bovini e bufalini insistenti nel raggio di 10 km dal caseificio. In particolare, il latte di bufala proviene da 11 allevamenti siti nel territorio dei comuni di Pontinia, Sabaudia e Terracina, in provincia di Latina, per un totale di circa 3.000 litri conferiti giornalmente e provenienti dalla mungitura del mattino e da quella serale del giorno prima. Nel caseificio si producono prodotti a base di latte pastorizzato, freschi conservati in liquido di governo, a breve e a media stagionatura, alimenti le cui caratteristiche intrinseche consentono lo sviluppo di microrganismi potenzialmente pericolosi.

I prodotti sono venduti al consumatore in pezzature diverse, preconfezionati e sfusi. La loro commercializzazione avviene in ambito regionale nelle province di Latina e di Roma ed in ambito comunitario (Germania ed Irlanda). Il numero degli addetti è di circa 20 unità con un turnover abbastanza frequente in conseguenza dell'organizzazione del lavoro.

Ai sensi delle Linee guida della regione Lazio per il controllo ufficiale veterinario (3), lo stabilimento è stato inserito, per l'anno 2007, nella categoria *rischio medio*, sulla base di criteri di valutazione delle caratteristiche strutturali dello stabilimento, dell'entità produttiva, dei prodotti, dell'igiene della produzione, del sistema di autocontrollo e dei dati storici.

A partire da febbraio 2007, abbiamo effettuato, a cadenza bimensile, n. 5 sopralluoghi nello stabilimento, assistendo al processo produttivo della Mozzarella di Bufala Campana DOP e prelevando sterilmente, nel corso della lavorazione, campioni ambientali e di matrici alimentari.

I campioni ambientali sono stati effettuati sulle seguenti attrezzature: caldaia di coagulazione del latte, spino metallico per la rottura della cagliata, vasca di fermentazione, macchina di filatura (zona uscita pasta filata) e formatrice, utilizzando spugnette sterili imbibite di 10 ml di BPW su una superficie di 100 cm<sup>2</sup>. Per lo spino metallico e la formatrice, a causa della tipologia dell'attrezzatura, il calcolo della superficie di campionamento è stato approssimativo. Su tali campioni sono state eseguite ricerche per *Salmonella spp* (ISO 6579:2002/Cor 1 2004) e *Listeria spp* (ISO 11290-1:2005).

I campioni di matrici alimentari hanno riguardato il latte pastorizzato all'uscita dal pasteurizzatore; il sieroinnesto naturale derivante dal processo di lavorazione del giorno precedente e conservato in

cella frigo a +4°C; la cagliata dopo la rottura con lo spino; la cagliata pronta per la filatura; la mozzarella dopo il rassodamento; la salamoia al 2% di NaCl preparata estemporaneamente; la salamoia al 5% di NaCl invecchiata di un giorno, utilizzata per le produzioni destinate al mercato estero; la mozzarella confezionata in liquido di governo. Del prodotto preconfezionato, sono stati prelevati per ogni lotto di produzione n. 5 campioni, di cui il primo è stato analizzato nello stesso giorno del campionamento, gli altri quattro successivamente, dopo 4, 10, 14 e 18 giorni previa conservazione a temperatura di + 4°C ± 2. Il produttore indica in etichetta 10 giorni quale data di scadenza.

I campioni sono stati trasportati in cassetta refrigerata in laboratorio e subito processati per le seguenti determinazioni: *Carica mesofila* in MA a +30°C per 72 h (ISO 4833-2003); *Enterobacteriaceae* in VRBGA a +37°C per 24 h (ISO 21528-2:2004); *Escherichia coli glucuronidasi positivi* in TBX a +44°C per 24 h (ISO 16649-2:2004); *Escherichia coli O:157* metodo ELFA (AFNOR BIO 12/8-07/00); *Stafilococchi coagulasi positivi* in RPF addizionato di plasma di coniglio a +37°C per 24 - 48 h (ISO 6882-2:1999); *Listeria monocytogenes* in HFSB a +37°C per 24 h, FSB a +37°C per 48 h, ALOA e LSM a +37°C per 24-48 h (ISO 11290-1:2005); *Salmonella* in BPW a +37°C per 24 h, RVS a +41,5°C per 24 h e MKTTn a +37°C per 24 h, SS e XLD a +37°C per 24 h (ISO 6579:2002); *Muffe e lieviti* in SABOURAUD a +30°C per 72 h, DMT agar per 10 gg, identificazione biochimica con API ID 32C (bioMerièux); pH (metodo potenziometrico pHmetro da banco Orion).

L'identificazione delle enterotossine stafilococche tipo A, B, C, D è stata effettuata mediante agglutinazione passiva inversa al lattice.

## RISULTATI

I patogeni *Salmonella spp.* e *Listeria spp.* sono risultati costantemente assenti sia sulle attrezzature analizzate, sia nelle matrici alimentari, in cui anche *E. coli O:157* non è stato mai rilevato.

I dati relativi alla crescita della microflora presente nei campioni sono riportati nelle tabelle 1 e 2.

Dalle matrici alimentari sono stati isolati *Stafilococchi coagulasi positivi*: dal sieroinnesto (1,1x10<sup>3</sup> ufc/g), dalla cagliata dopo rottura con lo spino (1,9x10<sup>3</sup> ufc/g), e dalla cagliata pronta per la filatura (2,3x10<sup>3</sup> ufc/g) del III lotto e dalla cagliata pronta per la filatura del IV lotto (6x10 ufc/g).

Per ciascuna matrice, n. 5 ceppi di *Stafilococco coagulasi positivo* sono stati sottoposti a tests bio-

Matrice	I lotto ufc/g			II lotto ufc/g			III lotto ufc/g			IV lotto ufc/g			V lotto ufc/g		
	Enterobatteri	E.coli beta gluc pos	Staph coag pos	Enterobatteri	E.coli beta gluc pos	Staph coag pos	Enterobatteri	E.coli beta gluc pos	Staph coag pos	Enterobatteri	E.coli beta gluc pos	Staph coag pos	Enterobatteri	E.coli beta gluc pos	Staph coag pos
Latte pastorizzato	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Sieroinnesto	4x10 <sup>5</sup>	3,7x10 <sup>5</sup>	20	8,7x10 <sup>2</sup>	6,5x10 <sup>2</sup>	1,1x10 <sup>3</sup>	1,6x10 <sup>7</sup>	1,4x10 <sup>7</sup>	1,1x10 <sup>3</sup>	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Cagliata dopo rottura con lo spino	2x10 <sup>5</sup>	1,2x10 <sup>5</sup>	<10	2,1x10 <sup>5</sup>	1,5x10 <sup>5</sup>	<10	7,5x10 <sup>6</sup>	7x10 <sup>6</sup>	1,9x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>3</sup>	<10	<10	<10	<10	<10
Cagliata pronta per la filatura	2,9x10 <sup>5</sup>	2,9x10 <sup>5</sup>	<10	2,3x10 <sup>5</sup>	1,9x10 <sup>5</sup>	<10	6,1x10 <sup>6</sup>	1,1x10 <sup>6</sup>	2,3x10 <sup>3</sup>	1,9x10 <sup>2</sup>	60	<10	<10	<10	<10
Mozzarella dopo il rassodamento	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Salamoia 2% NaCl	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Salamoia 5% NaCl	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Mozzarella dopo il confezionamento	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Mozzarella al 4° giorno dal conf.	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Mozzarella al 10° giorno dal conf.	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Mozzarella al 14° giorno dal conf.	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Mozzarella al 18° giorno dal conf.	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10

Tabella n. 2 - Cariche microbiche di *Carica mesofila*, *Enterococchi* e valori di pH nei 5 lotti di Mozzarella di Bufala Campana DOP esaminati.

Matrice	I lotto ufc/g			II lotto ufc/g			III lotto ufc/g			IV lotto ufc/g			V lotto ufc/g		
	Carica mesofila	Enterococchi	pH	Carica mesofila	Enterococchi	pH									
Latte pastorizzato	3,7x10 <sup>5</sup>	<100	6,99	5,2x10 <sup>5</sup>	1,1x10 <sup>3</sup>	7,01	3,4x10 <sup>5</sup>	<100	6,97	6x10 <sup>5</sup>	1,7x10 <sup>3</sup>	6,99	4,7x10 <sup>5</sup>	<100	6,85
Sieroinnesto	2x10 <sup>6</sup>	1,9x10 <sup>3</sup>	4,98	2,1x10 <sup>6</sup>	1,8x10 <sup>5</sup>	5,04	2,4x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>6</sup>	5,27	1,9x10 <sup>6</sup>	<100	5,75	2,1x10 <sup>6</sup>	1,7x10 <sup>6</sup>	5,06
Cagliata dopo rottura con lo spino	1,8x10 <sup>5</sup>	1,7x10 <sup>3</sup>	5,74	9,1x10 <sup>6</sup>	2,7x10 <sup>7</sup>	5,42	1,3x10 <sup>7</sup>	1,5x10 <sup>7</sup>	5,41	3x10 <sup>6</sup>	7x10 <sup>3</sup>	5,38	3,6x10 <sup>6</sup>	1,5x10 <sup>5</sup>	5,33
Cagliata pronta per la filatura	2,6x10 <sup>6</sup>	1,5x10 <sup>4</sup>	5,31	1,6x10 <sup>7</sup>	2,9x10 <sup>5</sup>	5,29	2,7x10 <sup>7</sup>	2,6x10 <sup>7</sup>	5,19	2,8x10 <sup>6</sup>	2,4x10 <sup>4</sup>	5,11	1,7x10 <sup>6</sup>	1,3x10 <sup>5</sup>	5,16
Mozzarella dopo il rassodamento	1,9x10 <sup>7</sup>	<100	5,63	1,2x10 <sup>5</sup>	1,9x10 <sup>3</sup>	5,69	2,5x10 <sup>6</sup>	<100	5,41	2,9x10 <sup>3</sup>	<100	5,48	2,3x10 <sup>3</sup>	<100	5,72
Salamoia 2% NaCl	10	<100	3,45	70	<100	3,76	1,1x10 <sup>2</sup>	<100	3,16	20	<100	3,39	20	<100	3,77
Salamoia 5% NaCl	8,9x10 <sup>5</sup>	<100	3,48	3x10 <sup>5</sup>	<100	3,85	3x10 <sup>6</sup>	<100	3,18	3x10 <sup>6</sup>	<100	3,30	1,4x10 <sup>6</sup>	<100	3,79
Mozzarella dopo il confezionamento	1,5x10 <sup>7</sup>	<100	5,63	6,2x10 <sup>4</sup>	1,7x10 <sup>3</sup>	5,63	2,6x10 <sup>6</sup>	<100	4,07	2,4x10 <sup>5</sup>	<100	5,46	6,4x10 <sup>3</sup>	<100	5,59
Mozzarella al 4° giorno dal conf.	1,2x10 <sup>5</sup>	<100	6,11	1,3x10 <sup>5</sup>	<100	5,58	6,4x10 <sup>5</sup>	<100	4,79	2,1x10 <sup>5</sup>	<100	5,23	1x10 <sup>3</sup>	<100	5,79
Mozzarella al 10° giorno dal conf.	3,4x10 <sup>6</sup>	<100	5,88	2,4x10 <sup>4</sup>	<100	5,70	1,6x10 <sup>5</sup>	2,6x10 <sup>2</sup>	5,47	1,3x10 <sup>5</sup>	1,6x10 <sup>3</sup>	5,21	1,1x10 <sup>4</sup>	2x10 <sup>3</sup>	5,58
Mozzarella al 14° giorno dal conf.	1,5x10 <sup>4</sup>	<100	5,87	1,1x10 <sup>4</sup>	<100	5,33	1,2x10 <sup>6</sup>	2,3x10 <sup>4</sup>	5,13	1,5x10 <sup>5</sup>	60	5,28	3,51x10 <sup>5</sup>	<100	5,53
Mozzarella al 18° giorno dal conf.	6,2x10 <sup>7</sup>	<100	4,70	1,9x10 <sup>4</sup>	<100	5,46	2,3x10 <sup>6</sup>	1,6x10 <sup>3</sup>	5,65	3x10 <sup>6</sup>	<100	5,28	1,4x10 <sup>7</sup>	<100	5,36

Tabella n. 1 - Cariche microbiche di *Enterobacteriaceae*, *E. coli beta glucuronidasi positivi* e *Stafilococchi coagulasi positivi* nei 5 lotti di Mozzarella di Bufala Campana DOP esaminati.

chimici miniaturizzati API STAF (bioMerièux) ed identificati come *S. aureus*. Tali ceppi sono stati saggiati anche per la produzione di enterotossine. I ceppi isolati dalle matrici del III lotto sono risultati non produttori di enterotossine, mentre da tutti i brodi colturali dei ceppi isolati dalla cagliata pronta per la filatura del IV lotto, è stata rilevata la presenza di enterotossine A e D; la ricerca delle enterotossine nell'alimento ha dato esito negativo.

A completamento dell'indagine sono stati effettuati, a carico delle maestranze, tamponi sulle mani (palmo, dorso ed unghie) per la ricerca di *S. aureus* e di *miceti*. I due addetti alla caseificazione ed un operaio sono risultati positivi a *S. aureus* non produttore di enterotossine. Contestualmente sono stati isolati *Candida krusei* e *Trichosporon asahii* dalle mani del primo casaro e *Candida albicans* e *Cryptococcus humicola* da quelle del secondo, quest'ultimi isolati anche dalle mani dell'operaio positivo a *S. aureus*. È stata isolata *Candida albicans* anche dalle mani di un addetto all'imballaggio. Il personale è stato sottoposto a visita dermatologica cui è seguita la prescrizione di una terapia antibiotica ed antimicotica. Ad un nuovo controllo, effettuato a 5 mesi di distanza, l'esame batteriologico dei tamponi delle mani dei 4 operai positivi in prima istanza, ha dato esito negativo. Di contro, altri 3 operai sono risultati positivi a *S. aureus*, due a *S. aureus* potenzialmente produttore di enterotossina B ed uno a *S. aureus* non produttore di enterotossina.

## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

L'esito dello studio rivela che il sieroinnesto naturale rappresenta un punto critico nel processo di produzione della Mozzarella di Bufala Campana DOP. Derivante dal siero di fine caseificazione del giorno precedente, se non debitamente e prontamente refrigerato, rappresenta un pabulum di sviluppo ideale per la flora microbica contaminante. In esso, infatti, abbiamo riscontrato concentrazioni anche fino a  $10^7$  ufc/g di *Enterobacteriaceae* e di *E. coli beta gluconidasi positivi* e  $10^3$  ufc/g di *Stafilococchi coagulasi positivi* che hanno contaminato l'alimento nelle successive fasi di lavorazione superando i limiti fissati dal Reg. CE 2073/2005 per la valutazione dell'igiene di processo. Le operazioni di filatura della cagliata, effettuate con acqua calda a temperatura di circa 90°C, hanno poi prodotto l'abbattimento totale di essi. Difatti, l'entità di questi microrganismi a partire dalla fase di rassodamento della mozzarella in acqua fredda e fino a 18 giorni dalla produzione, è stata costantemente inferiore a

10 ufc/g, anche dopo il superamento della shelf life della mozzarella diventata ampiamente morbida e stracchinata. Durante la filatura, la cagliata fusa ha presentato a cuore temperature medie di 70,2°C e la cagliata stirata, prima della formatura, di 67,4°C. Il raggiungimento di tali temperature ha garantito una sanificazione del prodotto. Gli effetti della filatura potrebbero essere paragonabili a quelli della pastorizzazione. L'USDA ritiene sufficiente un trattamento di 3,83 minuti a 62,8°C o di 0,383 minuti a 68,3°C per considerare il trattamento termico equivalente alla pasteurizzazione (4). Riteniamo però non idoneo considerare la filatura ed il conseguente stress termico del rassodamento, un metodo correttivo delle criticità microbiologiche. La filatura della cagliata ha il ruolo principale di conferire alla mozzarella la tipica e particolare struttura e non di igienizzarla.

Riguardo la *carica mesofila*, rileviamo costante stabilità durante tutte le fasi della produzione e della conservazione del prodotto. Il latte pastorizzato ha presentato sempre cariche mesofile di  $10^5$  ufc/ml che riteniamo si siano mantenute tali, durante tutta la lavorazione e la conservazione in liquido di governo, per l'applicazione di buone pratiche di fabbricazione.

La salamoia al 2 % di NaCl che viene utilizzata per la salagione della Mozzarella di Bufala Campana, viene sempre preparata estemporaneamente, quella al 5%, tre volte a settimana, ed è utilizzata anche per tutte le altre produzioni comprese quelle a base di latte bovino. Seppur questa salamoia abbia una concentrazione doppia di sale, subisce molto presto gli effetti dell'uso, con un invecchiamento precoce denotato da cariche mesofile di  $10^5$  -  $10^6$  ufc/ml ad appena 24 ore dalla preparazione.

Circa la shelf life del prodotto, al 10° giorno di conservazione, *Enterobacteriaceae*, *E. coli beta gluconidasi positivi* e *Stafilococchi coagulasi positivi* sono risultati sempre <10 ufc/g, mentre sono stati rilevati *Enterococchi* con cariche di  $10^2$ - $10^3$  ufc/g.

In conclusione, quale esito preliminare dello studio, possiamo ritenere che, nella produzione della Mozzarella di Bufala Campana DOP, secondo tecnica industriale, i pericoli microbiologici possono essere prevenuti, controllati ed eliminati con la selezione dei fornitori del latte bufalino, l'adeguatezza dei processi tecnologici, la pulizia e la sanificazione degli ambienti e delle attrezzature e soprattutto l'igiene del personale. Il monitoraggio di tali elementi è determinante nel ridurre l'impatto della contaminazione microbica responsabile della igienicità del processo produttivo.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Decreto MIPAF 18.09.2003. Protezione transitoria accordata a livello nazionale alla modifica del disciplinare di produzione della denominazione di origine protetta «Mozzarella di Bufala Campana» registrata con regolamento CE n. 1107/96 della Commissione del 12 giugno 1996. *Gazzetta Ufficiale Rep. Italiana n. 258 del 06.11.2003.*
- 2) Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione del 15.11.2005. Criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L 338 del 22.12.2005.*
- 3) Determinazione Reg. Lazio n. D4592 del 18.12.2006. Linee guida regionali per il controllo ufficiale presso gli stabilimenti soggetti a riconoscimento.
- 4) Muchetti, G, Neviani, E. (2006) *Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia*. Tecniche nuove.