

## Application of microbiological method direct epifluorescence filter technique/aerobic plate count agar in the identification of irradiated herbs and spices

Maria Concetta Campagna,<sup>1</sup>  
 Maria Teresa Di Schiavi,<sup>1</sup> Marina Foti,<sup>2</sup>  
 Maria Cristina Mosconi,<sup>3</sup>  
 Giuseppina Mattiolo,<sup>3</sup> Roberta Cavallina<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma;  
<sup>2</sup>Microbiologia Alimentare, Laboratorio di Prevenzione ASL Milano; <sup>3</sup>Unità Operativa di Biologia ARPA Verona, Italy

### Abstract

Irradiation is a preservation technology used to improve the safety and hygienic quality of food. Aim of this study was to assess the applicability and validity of the microbiological screening method direct epifluorescence filter technique (DEFT)/aerobic plate count (APC) (EN 13783:2001) for the identification of irradiated herbs and spices. Tests on non-irradiated and irradiated samples of dried herbs and spices were performed. The method was based on the comparison of APC and count obtained using DEFT. In accordance with the standard reference, this method is not applicable to samples with APC < 10<sup>3</sup> colony forming units (CFU)/g and this is its main limit. The results obtained in our laboratories showed that in 50% of cases of non-irradiated samples and in 96% of the samples treated with ionising radiation, the method was not applicable due to a value of CFU/g < 10<sup>3</sup>.

### Introduzione

Irraggiamento rappresenta una tecnologia di conservazione che consiste nel sottoporre l'alimento a specifiche dosi di radiazioni ionizzanti (raggi x, raggi gamma o fasci di elettroni) che consentono di inattivare il materiale genetico delle cellule microbiche e inibire l'attività degli enzimi degradativi presenti negli alimenti; in questo modo è possibile migliorare la sicurezza e la qualità igienica degli alimenti e rallentare il deterioramento.

In Europa il trattamento con radiazioni ionizzanti è disciplinato dalle direttive quadro 1999/2/CE e 1999/3/CE (Commissione Europea, 1999a, 1999b) attuate nel nostro Paese mediante il DLvo 30 gennaio 2001, n° 94 (Repubblica Italiana, 2001). La Direttiva

1999/3/CE prevede l'adozione di un elenco comunitario di alimenti e loro ingredienti che ad esclusione di tutti gli altri, possono essere trattati con radiazioni ionizzanti e che tale elenco possa essere aggiornato gradualmente. Allo stato attuale tale elenco prevede una sola categoria di alimenti, *erbe, spezie e condimenti vegetali*, che possono essere irradiati ad una dose massima di 10 KGy. In attesa che l'elenco venga completato ogni stato membro può mantenere le autorizzazioni nazionali vigenti, a condizione che l'irraggiamento e l'immissione sul mercato dei prodotti alimentari abbia ricevuto il parere favorevole da parte del Comitato Scientifico dell'Alimentazione (Tabella 1). La direttiva quadro 1999/2/CE (Commissione Europea, 1999a) stabilisce che tutti gli alimenti e/o ingredienti sottoposti al trattamento con radiazioni ionizzanti, debbano riportare la dicitura *irradiato o trattato con radiazioni ionizzanti*: in etichetta, nel caso di prodotti o ingredienti confezionati o, qualora si tratti di prodotti sfusi, sui documenti che accompagnano tali prodotti. Ciascun stato membro è tenuto ad effettuare controlli sugli impianti di irraggiamento e sugli alimenti in fase di commercializzazione al fine di verificare che i prodotti irradiati rispettino le disposizioni della Direttiva. I controlli sugli alimenti irradiati devono essere effettuati mediante metodi analitici validati o quando possibile standardizzati conformi ai criteri stabiliti dalle norme europee. Nel 1993 la Commissione Europea ha dato mandato al Comitato Europeo di Normazione di standardizzare i metodi di analisi proposti a livello internazionale. Ad oggi sono stati standardizzati 10 metodi applicabili alla maggior parte degli alimenti autorizzati all'irraggiamento. Ciascuno di questi metodi è applicabile a specifiche categorie di alimenti (Tabella 2). Scopo del lavoro è stato quello di verificare l'applicabilità e l'efficacia del metodo di screening microbiologico per l'identificazione di erbe e spezie irradiate tramite *direct epifluorescence filter technique (DEFT)/aerobic plate count (APC)* (EN 13783:2001; ISO, 2001a) all'interno di diversi laboratori partecipanti al progetto, applicando tale metodo a campioni di erbe e spezie irradiate e non irradiate.

### Materiali e Metodi

Sono stati acquistati presso punti vendita al dettaglio campioni di erbe e spezie essiccate, nello specifico: origano, pepe nero, peperoncino, menta, salvia, semi di finocchio, timo, thè nero, caffè macinato, cacao amaro, anice stellato e semi di sesamo. Tali matrici sono state esaminate nella forma non irradiata e poi fatte irradiare mediante un irraggiatore a raggi x a tre diverse dosi (3, 6, 10 KGy) per un totale di 14 campioni non irradiati e 100 campioni irra-

Correspondence: Maria Concetta Campagna, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma, via Appia Nuova 1411, 00178 Roma, Italy.  
 Tel. +39.067.9099323 - Fax: +39.067.9340724.  
 E-mail: mariacconceta.campagna@izslt.it

Key words: DEFT/APC, Irradiated food, Herbs, Spices, EN 13783:2001.

Acknowledgments: the authors would like to thank the Italian Ministry of Health for funding the present research through the LT 03/09 project.

Received for publication: 9 May 2013.  
 Revision received: 25 February 2014.  
 Accepted for publication: 25 February 2014.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 License (by-nc 3.0).

©Copyright M.C. Campagna et al., 2014  
 Licensee PAGEPress, Italy  
 Italian Journal of Food Safety 2014; 3:1650  
 doi:10.4081/ijfs.2014.1650

diati. I campioni sono stati suddivisi in aliquote omogenee, ciascuna analizzata con il metodo DEFT/APC dai diversi laboratori che hanno preso parte al progetto: Sezione microbiologia Alimentare, ASL Milano, Unità Operativa di Biologia ARPA Verona, Direzione Operativa Produzioni Zootecniche IZS Lazio e Toscana. Tutti i dati sono stati raccolti e confrontati.

Il metodo DEFT/APC (EN 13783:2001; ISO, 2001a) si basa sulla comparazione dei valori ottenuti tramite conta diretta su piastra dei batteri aerobi mesofili (APC) in base alla norma di riferimento ISO 4833 (ISO, 1991), e quelli ottenuti con la conta diretta su filtro con microscopio a epifluorescenza (DEFT). Nello specifico, si sfrutta il fenomeno per cui l'irraggiamento influenza la vitalità dei microrganismi (la carica batterica diminuisce) ma non la loro capacità di essere colorati con l'arancio di acridina.

Una porzione di 5 g di campione viene sospesa in 45 mL di acqua peptonata salina sterile, agitata vigorosamente per circa 30 secondi e poi filtrata attraverso carta filtro sterile. Vengono preparate diverse diluizioni del campione come indicato dalla Norma di riferimento EN 13783:2001 (ISO, 2001a).

Un volume di 2 mL di campione viene filtrato su una membrana, in modo da trattenere i microrganismi, poi trattata con il colorante arancio di Acridina il quale colora in maniera differenziale il materiale nucleare dei microrganismi. Al microscopio ad epifluorescenza con lunghezza d'onda compresa fra 450 e 490 nm le cellule batteriche vitali e quelle uccise dal trattamento irradiante, per cui attive prima del trattamento, mostrano una fluorescenza

arancione e giallo/arancione, mentre quelle che erano già morte prima del trattamento mostrano una fluorescenza verde e non vengono conteggiate.

In parallelo, una seconda porzione del campione in esame si utilizza per la conta diretta in piastra dei batteri aerobi mesofili in base alla norma di riferimento ISO 4833 (ISO, 1991), la quale prevede la semina del campione e sue diluizioni in terreno *plate count agar*, incubazione delle piastre a 30°C per 72 ore, lettura e calcolo delle unità formanti colonia (UFC)/g di campione. La conta APC in piastra fornisce il numero di microrganismi vitali dopo una possibile irradiazione mentre la conta DEFT il numero totale dei microrganismi presenti nel campione (vitali e non vitali). La differenza (Dc) tra i due conteggi (DEFT/g e UFC/g trasformati in Log) permette di distinguere le cellule che erano vitali prima del trattamento ma che sono state inattivate dal pro-

cesso irradiante. Valori superiori o uguali a 4 fanno sospettare un probabile trattamento con radiazioni ionizzanti. Tuttavia, come specificato nella norma di riferimento, il metodo DEFT/APC non è specifico per l'irraggiamento, tali differenze possono anche essere indotte da altri trattamenti (ad esempio trattamenti termici o affumicamento) che hanno come scopo l'uccisione dei batteri, ciò rende quindi necessaria la conferma dei risultati positivi tramite un altro metodo standardizzato per provare che le specie siano state effettivamente sottoposte ad irraggiamento (Tabella 2).

Utilizzando un valore limite di 4 log, la probabilità di avere dei campioni falsamente positivi è bassa; è stato però dimostrato con campioni di basilico che tale valore può dare risultati falsamente negativi. Va inoltre fatto presente che nel caso in cui la carica batterica mesofila del campione risulti essere  $<10^3$  UFC/g, il metodo non può essere applicato.

## Risultati

Il 50% dei campioni non sottoposti al trattamento di irraggiamento, analizzati con il metodo DEFT/APC, sono risultati effettivamente non irraggiati; per il restante 50% il metodo è risultato non applicabile in base alla norma EN 13783:2001 (ISO, 2001a), a causa di un valore UFC/g  $<10^3$  nel conteggio APC. Per i campioni irradati sperimentalmente, il metodo è risultato non applicabile (UFC/g  $<10^3$ ) per il 96% dei casi, per il 4% ha dato invece dei falsi negativi (Dc $<4$ ): 1 campione di menta irraggiato a 3 KGy, 1 campione di peperoncino irraggiato a 3 KGy, e 2 campioni di peperoncino irraggiati a 6 KGy.

Tabella 1. Lista dei cibi e degli ingredienti che possono essere trattati con irraggiamento nei Paesi europei.

Prodotti	Dose di irraggiamento massima consentita (KGy)						
	Belgio	Repubblica Ceca	Francia	Italia	Paesi Bassi	Polonia	Gran Bretagna
Erbe aromatiche congelate	10	10	10				
Patata	0,15	0,2		0,15		0,1	0,2
Patata dolce		0,2					0,2
Cipolla	0,15	0,2	0,075	0,15		0,06	0,2
Aglio	0,15	0,2	0,075	0,15		0,15	0,2
Scalogno	0,15	0,2	0,075				0,2
Verdure	1	1					1
Legumi secchi		1			1		
Frutta (inclusi funghi, pomodoro, rabarbaro)	2	2					2
Fragole	2	2					
Verdura e frutta essicate	1	1	1		1		
Cereali	1	1					1
Frutta secca		1					
Fiocchi e germi di cereali per prodotti della prima colazione	10	10	10				
Fiocchi di cereali		1			1		
Farina di riso	4	4	4				
Gomma arabica	3	3	3		3		
Carne di pollo		7			7		
Selvaggina	5	5	5				
Selvaggina (pollo ruspante, anatra, faraona, piccione, quaglia, and tacchino)	7	7					7
Pollame ricavato meccanicamente	5	5	5				
Frattaglie di selvaggina	5	5	5				
Zampe di rana congelate	5	5	5		5		
Sangue, plasma, coagulati disidratati	10	10	10				
Pesce e molluschi (inclusi anguilla e crostacei)	3	3					3
Gamberi spellati o privati della testa e congelati	5	5	5				
Gamberi					3		
Uova bianche	3	3	3		3		
Derivati del latte	6	6	6				

Tabella 2. Metodi standardizzati dal Comitato Europeo di Normazione per la rilevazione di alimenti trattati con radiazioni ionizzanti.

Norma	Metodo	Alimenti
EN 13783:2001 (ISO, 2001a)	Metodi di screening	Erbe e spezie
EN 13784:2001 (ISO, 2001b)	Conta diretta su filtro in epifluorescenza/conta in piastra	Vari tipi di carni, semi, frutta secca e spezie
EN 13751:2002 (ISO, 2002)	DNA comet assay	Molluschi, crostacei, erbe, spezie e condimenti
EN 14569:2004 (ISO, 2004)	Luminescenza stimolata otticamente	Carne di pollo
EN 1784:2003 (ISO, 2003a)	LAL/conta gram negativi	Pollo, maiale e manzo, camembert, avocado, papaia e mango
EN 1785:2003 (ISO, 2003b)	Metodi di conferma	Pollo e maiale, uova
EN 1786:1996 (ISO, 1996)	Gasromatografia degli idrocarburi	Pollo, manzo, trote contenenti osso
EN 1787:2000 (ISO, 2000)	Gasromatografia/spettrometria di massa dei 2-alchilciclobutanoni	Pistacchi, paprika e fragole
EN 1788:2001 (ISO, 2001c)	Risonanza di spin elettronico dell'idrossiapatite	Erbe, spezie, gamberetti, patate, frutta e vegetali
EN 13708:2001 (ISO, 2001d)	Risonanza di spin elettronico della cellulosa	Fichi, mango, papaia essiccati
	Termoluminescenza	
	Risonanza di spin elettronico degli zuccheri	

## Discussione

Dall'analisi dei dati raccolti dai tre gruppi di ricerca partecipanti al lavoro si è potuto riscontrare in generale che il valore DEFT Log risulta più o meno simile non solo se si aumenta la dose di irraggiamento, in accordo con il metodo ufficiale, ma anche per lo stesso campione non irradiato. La carica batterica, al contrario, tende a diminuire all'aumentare della dose di irraggiamento. Dai nostri dati si evince che già una dose di trattamento di 3 KGy è sufficiente ad abbassare la carica batterica del prodotto molto al di sotto del limite stabilito dalla norma EN 13783:2001 (ISO, 2001a).

Ciò rappresenta il limite principale di questo metodo. Nella maggior parte dei casi infatti, anche per campioni non irradiati, in base alla norma EN 13783:2001 (ISO, 2001a), il metodo non è risultato applicabile a causa di una carica batterica bassa all'interno del campione ( $UFC/g < 10^6$ ); Contestualmente si sono verificati casi in cui il valore  $D_c$ , a dosi di irraggiamento di 3 e 6 KGy, è risultato  $< 4$  a rappresentare un altro dei limiti di questo metodo e cioè la possibilità che si verificano casi di falsi negativi.

## Conclusioni

In relazione al lavoro da noi svolto sarebbe interessante verificare in un futuro l'applicabilità del metodo anche nei casi in cui la carica batterica risulti  $< 10^3$  UFC/g. Abbiamo infatti notato che un approccio di questo genere potrebbe essere ben applicato nel caso di campioni non irraggiati dove, in base ai nostri dati, aumenta il numero di campioni correttamente identificati ed i possibili falsi positivi verrebbero comunque sottoposti ad analisi di conferma come stabilito dalla norma di riferimento del metodo. Allo stesso tempo però, per i campioni irraggiati, si è verificato un aumento del numero di falsi negativi. In conclusione, allo

stato attuale, le problematiche di cui sopra limitano molto l'applicabilità del metodo DEFT/APC, nonostante la sua facilità di esecuzione e i bassi costi.

## Bibliografia

- Commissione europea, 1999a. Direttiva del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 febbraio 1999 relativo al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri concernenti gli alimenti e i loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti, 1999/2/CE. In: Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee, L 066, 13/03/1999, pp 16-23.
- Commissione europea, 1999b. Direttiva del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 febbraio 1999 che stabilisce un elenco comunitario di alimenti e loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti, 1999/3/CE. In: Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee, L 066, 13/03/1999, pp 24-25.
- ISO, 1991. Microbiology. General guidance for the enumeration of microorganisms. Colony count technique at 30°C. Norma ISO 4833:1991. Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione, Ginevra, Svizzera.
- ISO, 1996. Foodstuffs. Detection of irradiated food containing bone. Method by ESR spectroscopy. Norma ISO 1786:1996. Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione, Ginevra, Svizzera.
- ISO, 2000. Foodstuffs. Detection of irradiated food containing cellulose Method by ESR spectroscopy. Norma ISO 1787:2000. Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione, Ginevra, Svizzera.
- ISO, 2001a. Foodstuffs. Detection of irradiated food using Direct Epifluorescent Filter Technique/Aerobic Plate Count (DEFT/APC). Screening method. Norma ISO 13783:2001. Organizzazione

Internazionale per la Standardizzazione, Ginevra, Svizzera.

ISO, 2001b. Foodstuffs. DNA Comet Assay for the detection of irradiated foodstuffs. Screening method. Norma ISO 13784:2001. Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione, Ginevra, Svizzera.

ISO, 2001c. Foodstuffs. Thermoluminescence detection of irradiated food from which silicate minerals can be isolated. Norma ISO 1788:2001. Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione, Ginevra, Svizzera.

ISO, 2001d. Foodstuffs. Detection of irradiated food containing crystalline sugar by ESR spectroscopy. Norma ISO 13708:2001. Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione, Ginevra, Svizzera.

ISO, 2002. Foodstuffs. Detection of irradiated food using photostimulated luminescence. Norma ISO 13751:2002. Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione, Ginevra, Svizzera.

ISO, 2003a. Foodstuffs. Detection of irradiated food containing fat. Gas chromatographic analysis of hydrocarbons. Norma ISO 1784:2003. Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione, Ginevra, Svizzera.

ISO, 2003b. This document supersedes EN 1785:1996. Norma ISO 1785:2003. Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione, Ginevra, Svizzera.

ISO, 2004. Foodstuffs. Microbiological screening for irradiated food using LAL/GNB procedures. Norma ISO 14569:2004. Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione, Ginevra, Svizzera.

Repubblica Italiana, 2001. Deceto Legislativo 30 gennaio 2001, n. 94. Attuazione delle direttive 1999/2/CE e 1993/3/CE concernenti gli alimenti e i loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti. In: Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, n. 79, 04/04/2001.