

# TERMORESISTENZA E CAPACITÀ DI ACCRESCIMENTO SUCCESSIVA A TRATTAMENTI TERMICI DI *BACILLUS COAGULANS* IN PASSATO DI POMODORO

Giuseppe Pirone, Liliana La Pietra e Maria Longo

È stata determinata la resistenza termica delle spore di due ceppi di *Bacillus coagulans* in passato di pomodoro a valori di pH di 4,30 e 4,45.

Inoltre, dopo l'applicazione di trattamenti termici di diversa entità, è stata valutata la capacità di sviluppo delle spore nello stesso prodotto, in funzione dell'entità dell'inoculo sporale e del pH.

Il tempo di riduzione decimale a 100°C ( $D_{100}$ ) è risultato uguale a 2,5 e 3,5 minuti e 2,6 e 3,6 minuti, rispettivamente ai valori di pH 4,30 e 4,45.

A pH pari a 4,45 sono stati osservati sviluppo delle spore e alterazione del prodotto solo quando  $10^4$  spore/g avevano subito un trattamento termico equivalente a una riduzione decimale; con inoculi di entità inferiore non è stato riscontrato sviluppo sporale.

A pH 4,30 non è stato osservato accrescimento delle spore nelle stesse condizioni sperimentali.

## HEAT RESISTANCE AND ABILITY OF *BACILLUS COAGULANS* TO GROW IN STRAINED TOMATOES FOLLOWING HEAT TREATMENTS

Heat resistance of spores of two *Bacillus coagulans* strains was determined in strained tomatoes at pH values 4.30 and 4.45. Moreover, spore outgrowth in strained tomatoes was examined, after various heat treatments, as a function of spore inoculum size and pH value.

Decimal reduction times at 100°C ( $D_{100}$ ) were found to be 2.5 and 3.5 minutes and 2.6 and 3.6 minutes at pH 4.30 and 4.45, respectively.

At pH 4.45 spore outgrowth and product spoilage occurred when a heat treatment equivalent to one decimal reduction was applied to  $10^4$  spore/g; growth was not observed when lower inoculum sizes were used.

Spore outgrowth was never observed at pH 4.30 under the same experimental conditions.

## INTRODUZIONE

In precedenti lavori (1-4) sono stati presentati e discussi i risultati di un'indagine sulla contaminazione del pomodoro da *Bacillus coagulans* e di ricerche sulla resistenza termica e sulla capacità di accrescimento in derivati del pomodoro di un ceppo di *B. coagulans* responsabile dell'alterazione di un campione di sugo al tonno a base di pomodoro. Particolarmente interessanti sono state la mancanza di sporificazione successiva all'accrescimento e la limitata sopravvivenza cellulare (1); queste caratteristiche potrebbero far ritenere il *B. coagulans* causa dell'alterazione di derivati del pomodoro in cui non siano stati rinvenuti microrganismi vitali all'esame colturale (5).

Usualmente i trattamenti termici impartiti ai derivati non concentrati del pomodoro sono calcolati in base alla resistenza termica e al livello d'inquinamento da spore di *Clostridium pasteurianum* (6-8); pertanto i trattamenti letali generalmente adottati, pur tenendo conto della modesta presenza di spore di *B. coagulans* (4), potrebbero

non essere sufficienti a stabilizzare tali prodotti. D'altro canto, i casi di alterazione da *B. coagulans* riscontrati negli ultimi decenni sono pochissimi. Si è quindi cercato di approfondire con il presente lavoro la possibilità che trattamenti termici subletali determinino l'inibizione dello sviluppo o l'inattivazione delle spore del ceppo di *B. coagulans* già indicato e di altri due ceppi isolati recentemente da passato e da triturato di pomodoro alterati. Contemporaneamente sono state valutate la resistenza termica e la capacità di accrescimento in passato di pomodoro in funzione del pH e del livello d'inoculo.

## MATERIALI E METODI

*Identificazione dei ceppi.* Gli isolati sono stati identificati secondo la metodica di Knight e Proom (9).

*Sporificazione.* Le spore dei ceppi di *B. coagulans* sono state ottenute su Tryptone soy agar (Oxoid), addizionato di  $Mn^{++}$  (1 ppm), a 44°C dopo tre subcolture in Tryptone soy broth (Oxoid) a 44°C per 24 h ciascuna. Dalle piastre

incubate per sette giorni le spore sono state raccolte con acqua distillata sterile, lavate e centrifugate tre volte per 20 min a 4000 giri/min. Quindi sono state pastorizzate a 80°C per 20 min e conservate a 2-4°C.

**Termoresistenza.** Sono state preparate bustine (8 x 5 cm) di materiale plastico contenenti 3 ml di passato di pomodoro a R.O. 8° Brix e pH 4,30 e 4,45, inoculato con sospensioni di spore.

Dopo trattamento in bagno termostato a 88,5, 91, 93, 96 e 99°C le bustine sono state raffreddate rapidamente. Il conteggio delle spore sopravvivenenti è stato eseguito in TSA (Oxoid) a 37°C per 3-5 giorni.

I dati riportati sono la media di almeno due prove.

**Capacità di accrescimento ai diversi pH.** È stata determinata la capacità dei tre ceppi a pH 4,30 e 4,45 in funzione dell'entità dell'inoculo.

Nel caso dei ceppi 114 e 1046 sono state inoculate 10<sup>1</sup>-10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> spore/g, mentre per il ceppo 1881 ne sono state inoculate solo 10<sup>1</sup>/g, poiché per quest'ultimo è già stata di-

*Termoresistenza*

L'inattivazione termica delle spore presentava un andamento esponenziale a tutte le temperature di trattamento considerate. In una precedente ricerca sulla termoresistenza di *B. coagulans* (ceppo 1881) era stata invece riscontrata una curva d'inattivazione non esponenziale a 88°C. Peraltro, anche in questo caso è stata osservata una piccola diminuzione dei valori dei tempi di riduzione decimale (*D*) passando da pH 4,45 a 4,30.

Nella tabella 1 sono riportati i valori di *D* ai due pH e alle temperature considerate, nonché i valori di *z*.

TAB. 1 - Valori del tempo di riduzione decimale alle temperature di 88,5 - 91 - 93 - 96 - 99°C a pH 4,3 e 4,45 e relativi valori di *z*.

Ceppo	pH	<i>D</i> <sub>88,5</sub>	<i>D</i> <sub>91</sub>	<i>D</i> <sub>93</sub>	<i>D</i> <sub>96</sub>	<i>D</i> <sub>99</sub>	<i>z</i>
114	4,30	37,4	22,9	9,7	6,5	3,2	9,8
	4,45	39,3	24,0	10,1	6,7	3,3	9,8
1046	4,30	38,0	26,9	15,3	8,4	4,0	10,6
	4,45	39,9	28,0	16,0	8,7	4,2	10,6

mostrata la possibilità di sviluppo di 10<sup>2</sup> spore/g ai due pH di lavoro (1).

Le spore, già sottoposte a shock termico a 80°C per 10 min, sono state inoculate in passato di pomodoro a R.O. 8° Brix e pH 4,30 e 4,45, confezionato a freddo in vasetti di vetro della capacità di 100 g (60 mm di altezza e provvisti di capsula twist-off) preventivamente sterilizzati a 121°C per 15 min.

Il grado di vuoto è stato portato a 470-480 mm Hg con capsulatrice da laboratorio REV-MEC ed è stato misurato con vuotometro a doppia camera Budenberg.

Le confezioni sono state incubate a 37°C e controllate a intervalli settimanali per quattro settimane.

**Trattamenti termici subletali in vasetti di vetro.** Vasetti di vetro sono stati confezionati con passato di pomodoro come precedentemente descritto; in questo caso gli inoculi erano tali da ottenere concentrazioni finali di 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> spore/ml. Successivamente le confezioni sono state sottoposte a trattamenti termici subletali in bagno aperto alla temperatura di 96-97°C tali da determinare, all'incirca, una riduzione decimale delle spore nel prodotto inoculato con 10<sup>2</sup> spore/ml, una o due riduzioni decimali in quello contenente 10<sup>3</sup> spore/ml e una, due o tre riduzioni in quello con 10<sup>4</sup> spore/ml.

I valori di *F*<sub>100</sub> corrispondenti sono riportati nelle tabelle 3 e 5.

Per la determinazione degli effetti letali in base ai valori di *D* dei singoli ceppi sono stati impiegati termocoppie rame-costantina e un registratore ELLAB CMC 821.

I vasetti sono stati quindi incubati a 37°C per 7-14-21-28 giorni e sottoposti (tre per volta) settimanalmente a determinazioni della concentrazione sporale e/o cellulare (tramite conteggio in piastra), del pH e del grado di vuoto e ad esame sensoriale (odore).

Sulla base di questi dati sono stati calcolati i tempi di riduzione decimale a 100°C per i due ceppi ai due pH di lavoro (tab. 2). Essi risultano di poco inferiori ai valori già riscontrati per il ceppo 1881: *D*<sub>100</sub> = 2,88 min a pH 4,3 e 3,01 a pH 4,4 (3).

TAB. 2 - Valori del tempo di riduzione decimale calcolati a 100°C per i due ceppi a pH 4,3 e 4,45.

Ceppo	pH	<i>D</i> <sub>100</sub>
114	4,30	2,5
	4,45	2,6
1046	4,30	3,5
	4,45	3,6

*Capacità di accrescimento in funzione del pH*

Per tutti e tre i ceppi sono stati osservati accrescimento sporale e alterazione del prodotto a pH 4,45 anche con l'inoculo di minore entità (10<sup>1</sup> spore/ml), mentre a pH 4,3 e con inoculo di 10<sup>1</sup> spore/ml si sono sviluppati solo i ceppi 114 e 1046. È stata comunque accertata la capacità di accrescimento del ceppo 1881 con un inoculo di 10<sup>2</sup> spore/ml (1).

### Trattamenti termici subletali

Nelle esperienze condotte a pH 4,3 non è stato osservato accrescimento dei batteri inoculati in alcuna delle combinazioni trattamento termico/entità dell'inoculo (tab. 3).

Nelle prove a pH 4,45 è stata rilevata alterazione solamente con i prodotti inoculati con  $10^4$  spore/g di uno qualsiasi dei tre ceppi e sottoposti a trattamento termico equivalente a una riduzione decimale (tab. 4).

TAB. 3 - Sopravvivenza e capacità di alterazione di *B. coagulans* in pomodoro a pH 4,3 in funzione del livello di contaminazione sporale e del trattamento termico impartito.

Ceppo	Spore inoculate (n./ml)*	Valori di $F_{100}$ (min)	N. di riduzioni decimali impartite	Spore residue (n./ml)*	Vasetti trattati	Vasetti alterati
1881	$1,3 \times 10^4$	8,6	3	$1,1 \times 10$	12	0
	$1,6 \times 10^4$	5,8	2	$1,4 \times 10^2$	12	0
	$1,0 \times 10^4$	2,9	1	$9,2 \times 10^2$	12	0
	$1,1 \times 10^3$	5,8	2	8	12	0
	$1,1 \times 10^3$	2,9	1	$9,5 \times 10$	12	0
	$1,3 \times 10^2$	2,9	1	6	12	0
1046	$1,1 \times 10^4$	10,5	3	5	12	0
	$1,6 \times 10^4$	7,0	2	$1,1 \times 10^2$	12	0
	$2,2 \times 10^4$	3,5	1	$9,9 \times 10^2$	12	0
	$2,2 \times 10^3$	7,0	2	$1,8 \times 10$	12	0
	$1,9 \times 10^3$	3,5	1	$2,0 \times 10^2$	12	0
	$1,8 \times 10^2$	3,5	1	9	12	0
114	$9,8 \times 10^3$	7,5	3	$1,3 \times 10$	12	0
	$9,6 \times 10^3$	5,0	2	$2,2 \times 10^2$	12	0
	$1,1 \times 10^4$	2,5	1	$1,7 \times 10^3$	12	0
	$1,0 \times 10^3$	5,0	2	$1,4 \times 10$	12	0
	$1,1 \times 10^3$	2,5	1	$1,8 \times 10^2$	12	0
	$1,0 \times 10^2$	2,5	1	$1,9 \times 10$	12	0

\* Valore medio su tre vasetti.

Tra l'altro, dai conteggi delle spore presenti nel prodotto, eseguiti sia subito dopo il trattamento termico sia a distanza di sette giorni e ripetuti settimanalmente fino al 28° giorno risulta una progressiva inattivazione delle spore sopravvivenenti. Ciò è accaduto anche quando il livello sporale era più elevato, come nel caso della combinazione  $10^4/1D$ , in cui erano presenti nel prodotto circa  $10^3$  spore/g.

Per quanto riguarda i ceppi 114 e 1046 la riduzione della concentrazione sporale era sensibile già dopo sette giorni, mentre per il ceppo 1881 dopo lo stesso intervallo di tempo erano presenti ancora circa  $3 \times 10^2$  spore/g, che al 28° giorno erano ridotte a poche unità (fig. 1).

È probabile che questo processo d'inattivazione sporale sia dovuto al sinergismo tra effetto del calore e pH del passato di pomodoro, analogamente a quanto osservato da altri autori nel caso del succo di pomodoro (10, 11).

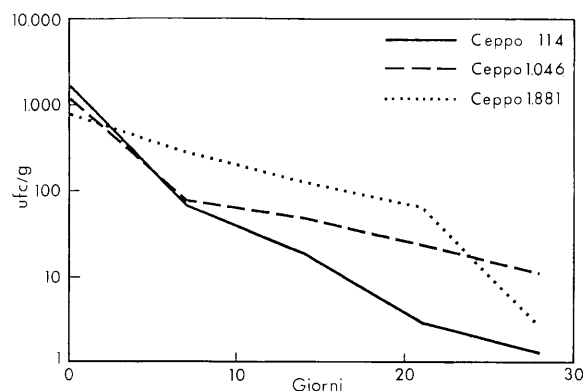


FIG. 1 - Andamento dell'inattivazione sporale successiva a trattamento termico subletale a pH 4,30.

I ceppi 114 e 1046 alteravano il prodotto in sette giorni con sviluppo di odore caratteristico.

I valori di pH a questo stadio dei controlli analitici non erano sensibilmente inferiori a

TAB. 4 - Capacità di alterazione di *B. coagulans* a pH 4,45 con inoculo pari a  $10^4$  spore e trattamento termico equivalente a una riduzione decimale.

Ceppo	Tempo 0			7° giorno			14° giorno			21° giorno			28° giorno		
	Spore (n./ml)	pH	Vuoto (mm Hg)	Vasetti alterati (n.)	$\Delta$ pH	$\Delta$ Vuoto (mm Hg)	Vasetti alterati (n.)	$\Delta$ pH	$\Delta$ Vuoto (mm Hg)	Vasetti alterati (n.)	$\Delta$ pH	$\Delta$ Vuoto (mm Hg)	Vasetti alterati (n.)	$\Delta$ pH	$\Delta$ Vuoto (mm Hg)
1881	$9,1 \times 10^2$	4,45	483	0	—	—	0	—	—	1	-0,40	-77	1	-0,45	-102
1046	$1,1 \times 10^3$	4,45	470	2	-0,06	—	3	-0,26	-38	2	-0,35	-38	2	-0,39	-43
114	$9,6 \times 10^2$	4,43	470	2	-0,07	—	2	-0,28	-20	3	-0,40	-38	3	-0,37	-34

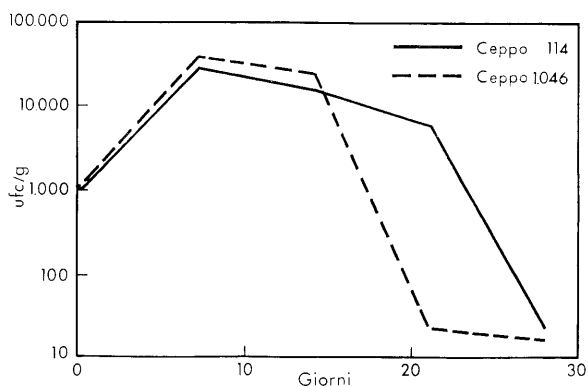


FIG. 2 - Variazione della concentrazione cellulare in vasetti alterati contenenti prodotto con pH iniziale 4,45.

TAB. 5 - Sopravvivenza e capacità di alterazione di *B. coagulans* in pomodoro a pH 4,45 in funzione del livello di contaminazione sporale e del trattamento termico impartito.

Ceppo	Spore inoculate (n./ml)*	Valori di $F_{100}$ (min)	N. di riduzioni decimali impartite	Spore residue (n./ml)*	Vasetti trattati	Vasetti alterati
1881	$9,3 \times 10^3$	9,0	3	$1,2 \times 10$	12	0
	$1,4 \times 10^4$	6,0	2	$1,6 \times 10^2$	12	0
	$1,0 \times 10^4$	3,0	1	$9,1 \times 10^2$	12	2
	$1,1 \times 10^3$	6,0	2	$1,2 \times 10$	12	0
	$1,3 \times 10^3$	3,0	1	$1,6 \times 10^2$	12	0
	$2,1 \times 10^2$	3,0	1	$2,7 \times 10$	12	0
1046	$1,4 \times 10^4$	10,9	3	$1,2 \times 10$	12	0
	$1,1 \times 10^4$	7,3	2	$1,3 \times 10^2$	12	0
	$1,2 \times 10^4$	3,6	1	$1,1 \times 10^3$	12	9
	$9,8 \times 10^2$	7,3	2	$1,1 \times 10$	12	0
	$8,4 \times 10^2$	3,6	1	$7,2 \times 10$	12	0
	$1,4 \times 10^2$	3,6	1	$1,3 \times 10$	12	0
114	$9,5 \times 10^3$	7,8	3	9	12	0
	$1,1 \times 10^4$	5,2	2	$1,2 \times 10^2$	12	0
	$9,8 \times 10^3$	2,6	1	$9,6 \times 10^2$	12	10
	$1,1 \times 10^3$	5,2	2	$1,3 \times 10$	12	0
	$1,1 \times 10^3$	2,6	1	$9,2 \times 10$	12	0
	$1,2 \times 10^2$	2,6	1	$1,1 \times 10$	12	0

\* Valore medio su tre vasetti.

quelli di partenza; essi tendevano ad abbassarsi in misura maggiore già al 14° giorno. La concentrazione cellulare dopo i primi sette giorni era superiore a  $1 \times 10^4$  e alle analisi successive risultava generalmente minore (fig. 2).

Tale evenienza può essere considerata un riscontro sperimentale all'ipotesi di una rapida inattivazione (autosterilizzazione) delle cellule di *B. coagulans* in alimenti acidi (1).

Il ceppo 1881, peraltro, alterava i campioni dopo 21 giorni; il prodotto presentava ridotta concentrazione cellulare, come nei casi precedenti.

In tutti i campioni alterati sono stati trovati un grado di vuoto e un valore di pH inferiori a quelli dei campioni normali.

Alle altre combinazioni entità dell'inoculo/trattamento termico, le confezioni non hanno mai presentato alterazioni (tab. 5).

Il prodotto non inoculato, trattato termicamente, non si è mai alterato.

#### CONCLUSIONI

I valori di termoresistenza dei ceppi 114 e 1046 non sono particolarmente elevati e risultano paragonabili a quelli del ceppo 1881 (3).

Trattamenti termici subletali, non finalizzati, cioè, a inattivare tutte le spore di *B. coagulans* presenti nel prodotto, hanno stabilizzato microbiologicamente il passato di pomodoro a pH 4,3 anche quando la concentrazione sporale sopravviveva di  $10^3/g$ .

A pH 4,45, invece, nelle stesse condizioni sperimentali è stato rilevato accrescimento delle

spore con conseguente alterazione del passato; di contro, con concentrazioni sporali di minor entità non è stato osservato sviluppo batterico.

La possibilità che trattamenti termici subletali stabilizzino derivati non concentrati del pomodoro rispetto a spore di *B. coagulans* dev'essere comunque valutata eseguendo test su un numero considerevolmente più elevato di campioni (pack-test).

*Stazione sperimentale per l'industria delle conserve alimentari, sede di Anghi (SA) 12 novembre 1993*

#### BIBLIOGRAFIA

- 1 - E. Vicini, S. Mannino e G. Pirone, *Ind. Conserve*, 64, 13 (1989).
- 2 - E. Vicini, G. Pirone, S. Mannino e M. Paola Previdi, *Ind. Conserve*, 65, 20 (1990).
- 3 - G. Pirone, S. Mannino e E. Vicini, *Ind. Conserve*, 64, 18 (1989).
- 4 - G. Pirone e Liliana La Pietra, *Ind. Conserve*, 68, 126 (1993).
- 5 - E. Vicini, *Ind. Conserve*, 61, 338 (1986).
- 6 - A. Casolari e L. Giannone, *Ind. Conserve*, 41, 95 (1966).
- 7 - G. Pirone, S. Mannino e Mirella Campanini, *Ind. Conserve*, 62, 135 (1987).
- 8 - G. Pirone e Liliana La Pietra, *Ind. Conserve*, 63, 37 (1988).
- 9 - B. C. J. G. Knight e H. Proom, *J. Gen. Microbiol.*, 4, 508 (1950).
- 10 - C. S. Pederson e M. E. Becker, *N Y. State Agr. Exp. Sta., Techn. Bull* 287 (1949).
- 11 - G. K. York, J. R. Heil, G. L. Marsh, A. Ansar, R. L. Merson, T. Wolcott e S. Leonard, *J. Food Sci.*, 40, 764 (1975).