

MONITORAGGIO MICROBIOLOGICO DEL LATTE ALLA STALLA NELLA ZONA DI PRODUZIONE DEL TRENTINGRANA

Franciosi E.¹, Pecile A.², Mazzucchi M.², Cavazza A.¹

¹ IASMA Research and Innovation Centre - Fondazione Edmund Mach - Food Quality and Nutrition Area. Italy

² IASMA Technology transfer and Consulting Centre - Fondazione Edmund Mach - Area Consulenza e Servizi per le Imprese. Italy

Riassunto

E' stato condotto uno studio atto a monitorare le condizioni igieniche e le relazioni tra i diversi gruppi microbiologici del latte crudo bovino in 20 stalle conferenti ai caseifici per la produzione di Grana Trentino. In 10 stalle il latte viene raccolto in bidoni senza refrigerazione, e in altre 10 viene refrigerato in una cisterna a 18°C immediatamente dopo la munta. Sono stati raccolti circa 120 campioni di latte nell'arco di un anno di tempo (2008-2009), il latte di ognuna delle 20 stalle è stato campionato ogni due mesi ed analizzato per la carica batterica totale (CBT) e per la presenza di coliformi, enterococchi, flore psicrotrofe, microflora acidificanti, proteolitiche e clostridi. Nella maggior parte dei campioni i coliformi e gli enterococchi erano sotto i 2 Log ufc/ml, segno che pratiche di buona igiene erano comunemente diffuse sia nelle stalle che facevano uso o meno di un sistema di refrigerazione. Non sono state registrate differenze significative per le cariche totali tra le stalle praticanti o meno la refrigerazione del latte a 18°C.

Abstract

Analysis of bacterial communities in the raw milk of the farms located in the region of Trentingrana production - A study was conducted to monitor raw milk hygiene, and to understand the relationship between different bacterial groups found in raw milk collected from stables in the Trentingrana area. 20 stables in Trento province were sampled. Each farmer provided one milk sample every 2 months for one year. The milk samples were examined for total bacterial count, coliforms, enterococci, psychrotrophic, acidificant and proteolytic microflora and clostridia. The bacterial counts of four milk samples for each stable, examined over an 8-months period were averaged and expressed as mean bacterial count per milliliter. In most samples, coliforms and enterococci were below 2 Log cfu / ml; this suggests that herds and milking hygiene were well controlled by all farmers. The milk refrigeration practice seems to have no influence on the growth of its microflora.

Introduzione

Il Grana Trentino è un formaggio a pasta dura simile al Grana Padano (del cui consorzio fa parte) e al Parmigiano Reggiano, prodotto con latte proveniente dall'arco alpino nella zona della provincia di Trento.

La qualità del latte dipende molto dai microrganismi che lo popolano e dal loro sviluppo. Durante la munta, il latte crudo è soggetto a contaminazioni, che avvengono durante le operazioni di trasporto e di travaso nelle cisterne di raccolta (Murphy e Boor, 2000).

La refrigerazione alla stalla è la principale tecnica applicata per prevenire il deterioramento del latte crudo. La combinazione tempo-temperatura di stoc-

caggio del latte crudo dovrebbe essere tale da impedire la crescita e l'acidificazione da parte dei batteri mesofili e anche lo sviluppo concomitante di popolazioni microbiche non desiderate.

Lo scopo di questo lavoro è stato paragonare due sistemi di raccolta del latte: quello tradizionale senza refrigerazione e la refrigerazione del latte a 18°C prima del trasporto al caseificio. Inoltre si è studiata la presenza di eventuali relazioni tra lo sviluppo di differenti gruppi microbici e le pratiche di munta alla stalla.

Materiali e metodi

Sono state selezionate 20 stalle (tabella 1: stalle numerate da 1 a 20) tra quelle che insistono nel territorio trentino e conferiscono latte per la produzione di Grana Trentino. In dieci di queste è adottato un approccio "tradizionale" (tabella 1: stalle numerate da 1 a 10): le vacche vengono nutrite due volte al giorno, il latte non viene refrigerato dopo la munta e viene trasportato al caseificio in cisterna oppure in bidoni d'acciaio da 50L. Nelle altre dieci (tabella 1: stalle numerate da 11 a 20) è stato adottato un approccio più "moderno": le vacche sono nutrite solo una volta al giorno (pratica del piatto unico o *unifeed*); il latte viene raccolto in grosse cisterne di acciaio da 500L e refrigerato a 18°C immediatamente dopo la munta prima del trasporto al caseificio. In ogni stalla, il latte è stato campionato sei volte nell'arco temporale di un anno (luglio 2008–giugno 2009). I campioni di latte venivano prelevati previa agitazione della cisterna o del bidone di raccolta se la conduzione della stalla era "tradizionale" e poi venivano subito congelati in azoto liquido fino all'arrivo in laboratorio dove venivano mantenuti a -80°C fino all'analisi microbiologica. Prima del piastramento, i campioni di latte sono stati diluiti tre volte in acqua peptonata (1 g/l mycological peptone pH 7.0) e 0.2ml di ogni diluizione è stata spatolata su diversi terreni di crescita. Per la ricerca dei coliformi è stato usato il Violet Red Bile lactose Agar (VRBA, Oxoid, UK) incubato per 24h a 37°C. Gli enterococchi sono stati contati dopo 24h a 37°C su Kanamycin Aesculine Agar (KAA, Oxoid); i batteri psicrotrofi su Plate Count Agar (PCA, Oxoid) contenente 1 g/l di polvere di latte magro e incubato a 7°C per 7 giorni. I batteri acidificanti e quelli capaci di secernere proteasi contro la caseina sono stati contati, dopo incubazione per 48h a 30°C, su PCA addizionato con 1% di polvere di latte magro (Harper et al., 1978) e 0,17 g/l di bromocresol porpora: la presenza attorno alle colonie di un alone chiaro era indice di avvenuta proteolisi della caseina, la presenza di un alone giallo era indice di acidificazione del terreno. La Carica Batterica Totale (CBT) è stata determinata su PCA addizionato di 1 g/l di polvere di latte magro e incubato a 30°C per 48h. Le spore dei clostridi sono state numerate tramite MPN in terreno RCM (Oxoid) e la loro identificazione è stata fatta tramite sequenziamento delle colonie isolate dalle provette positive.

L'analisi della varianza (ANOVA) è stata condotta con il software Statistica 9 sulle conte dei diversi gruppi microbici dopo una preliminare trasformazione dei dati in logaritmi in modo da garantirne una distribuzione normale e indipenden-

te. Le cariche dei diversi gruppi microbici sono state considerate come variabili dipendenti.

Risultati e discussione

I risultati delle conte batteriche dei campioni di latte refrigerati e non refrigerati sono riportati in tabella 1.

Tabella 1 - Microflora presente nei campioni di latte refrigerato o no immediatamente dopo la munta. Le conte (Log UFC / ml) sono espresse come media (M) \pm deviazione standard (d.s.) di sei campioni di latte prelevati nell'arco dell'anno di analisi. Le stalle sono numerate da 1 a 20. Nelle due linee chiamate TOT sono segnati la media e d.s. del totale delle conte dei campioni di latte non refrigerati e refrigerati a 18°C rispettivamente. In grigio sono evidenziate le stalle che consegnano il latte in bidoni al caseificio.

Stalla	Coliformi	Enterococchi	CBT	Psicrotrofi	Acidificanti	Proteolitici	
	M \pm d.s.	M \pm d.s.	M \pm d.s.	M \pm d.s.	M \pm d.s.	M \pm d.s.	
Latte NON refrigerato	1	0.72 \pm 0.55	1.58 \pm 0.92	3.59 \pm 0.38	1.46 \pm 1.18	2.42 \pm 0.48	1.29 \pm 1.02
	2*	1.30 \pm 0.62	2.45 \pm 0.62	5.21 \pm 0.40	4.74 \pm 0.41	3.81 \pm 0.91	3.69 \pm 0.57
	3	1.47 \pm 0.41	2.40 \pm 0.53	3.86 \pm 0.67	2.73 \pm 1.54	2.10 \pm 1.41	2.38 \pm 1.30
	4	1.11 \pm 0.29	0.78 \pm 1.33	3.65 \pm 0.17	3.36 \pm 0.16	2.78 \pm 0.34	2.88 \pm 0.36
	5	0.46 \pm 0.53	1.36 \pm 1.43	3.85 \pm 0.46	2.84 \pm 0.65	2.36 \pm 1.41	1.65 \pm 1.42
	6	1.49 \pm 0.81	0.11 \pm 0.25	3.53 \pm 0.28	2.90 \pm 0.30	1.90 \pm 1.52	1.46 \pm 0.78
	7	1.64 \pm 0.41	1.74 \pm 0.72	5.17 \pm 0.69	4.27 \pm 1.07	4.3 \pm 1.36	3.20 \pm 0.45
	8*	2.28 \pm 0.52	2.90 \pm 0.34	4.91 \pm 0.37	4.50 \pm 0.35	4.15 \pm 0.48	2.81 \pm 0.85
	9	1.74 \pm 0.48	2.03 \pm 1.47	4.16 \pm 0.53	3.63 \pm 0.66	3.42 \pm 0.75	2.41 \pm 0.56
	10*	1.86 \pm 1.08	1.98 \pm 0.53	4.68 \pm 0.83	4.18 \pm 0.86	3.64 \pm 0.76	2.53 \pm 0.99
TOT	1.41 \pm 0.75	1.82 \pm 1.13	4.24 \pm 0.83	3.40 \pm 1.26	3.03 \pm 1.31	2.40 \pm 1.12	
Latte refrigerato a 18°C	11	0.71 \pm 0.51	2.83 \pm 0.76	4.12 \pm 0.70	3.89 \pm 1.22	2.37 \pm 1.42	2.07 \pm 1.63
	12	1.48 \pm 0.61	1.72 \pm 1.00	3.61 \pm 0.56	1.72 \pm 0.87	2.43 \pm 0.59	1.14 \pm 1.26
	13*	1.78 \pm 0.43	2.05 \pm 0.59	4.66 \pm 0.90	3.93 \pm 0.67	3.46 \pm 2.27	3.21 \pm 1.19
	14	1.67 \pm 0.85	2.07 \pm 0.10	4.07 \pm 0.79	3.75 \pm 1.35	2.68 \pm 0.50	3.31 \pm 0.95
	15	0.80 \pm 0.71	1.61 \pm 1.40	3.34 \pm 0.27	2.67 \pm 0.38	0.57 \pm 0.98	2.52 \pm 0.15
	16*	2.35 \pm 0.43	1.02 \pm 1.42	4.53 \pm 0.67	4.47 \pm 0.68	2.90 \pm 1.68	3.39 \pm 0.67
	17*	0.00 \pm 0.00	1.36 \pm 0.76	3.84 \pm 0.40	3.27 \pm 0.59	1.77 \pm 1.11	1.52 \pm 1.74
	18*	1.43 \pm 0.13	1.90 \pm 1.09	4.08 \pm 0.57	3.55 \pm 0.91	2.42 \pm 0.46	2.33 \pm 1.73
	19	1.44 \pm 0.68	2.22 \pm 1.24	3.76 \pm 0.29	3.38 \pm 0.21	2.53 \pm 0.37	2.41 \pm 0.48
	20	2.20 \pm 0.64	2.12 \pm 0.10	4.24 \pm 1.05	4.36 \pm 1.25	1.67 \pm 1.53	3.74 \pm 1.04
TOT	1.42 \pm 0.87	1.97 \pm 1.09	4.04 \pm 0.68	3.29 \pm 1.23	2.41 \pm 1.28	2.43 \pm 1.31	

*Le stalle segnate con l'asterisco non hanno una sala adibita a mungitura

La media della CBT variava in un intervallo tra 3,3 e 5,2 Log ufc/ml. La CBT più elevata è stata osservata nel latte prelevato da stalle che non praticavano la refrigerazione, ma tale differenza non era significativa se paragonata con la media delle CBT in latte di stalle che refrigeravano a 18°C.

Delle 20 stalle esaminate, solo in tre il latte aveva una media della CBT maggiore di 4,7 Log ufc/ml e in tutti e tre i casi si trattava di latte non refrigerato e trasportato con bidoni.

La media della carica degli enterococchi era solitamente più alta di quella dei coliformi e non si sono osservate differenze tra i diversi campioni: la media delle cariche di enterococchi era compresa tra 0,2 e 3,1 Log ufc/ml mentre quella dei coliformi tra 0 e 2,4 Log ufc/ml. Ad eccezione delle stalle n° 8, 16 e 20, tutte le altre producevano un latte con la carica media dei coliformi inferiore a 2 Log ufc/ml. Questi dati indicano che il latte prodotto era caratterizzato da una buona qualità microbiologica poiché nella maggior parte dei campioni il tenore di coliformi e enterococchi era basso e paragonabile a quanto riportato in letteratura (Rea et al., 1992; Desmases et al., 1997). Ciò suggerisce che l'igiene durante la mungitura era ben controllata in tutte le stalle, indipendentemente dall'approccio utilizzato (tradizionale o moderno).

I batteri psicrotrofi sono stati rilevati in tutti i campioni e costituivano il secondo gruppo dominante tra quelli studiati nei campioni di latte esaminati. La carica di batteri psicrotrofi era maggiore nel latte da stalle che non praticavano la refrigerazione (3.40 Log ufc /ml) ma tale differenza non era significativa, se paragonata con la media calcolata sui campioni di latte da stalle che refrigeravano a 18°C (3.29 Log ufc /ml). La media della conta degli psicrotrofi variava in un intervallo molto ampio: tra 1.5 e 4.7 Log ufc/ml rispetto agli altri gruppi microbici, e pure le deviazioni standard (d.s.) mostravano un'ampia variazione tra le diverse stalle. Come per la CBT anche per la carica degli psicrotrofi non è stata osservata una correlazione significativa tra le conte e la pratica della refrigerazione, probabilmente perché la temperatura di 18°C non è così bassa da essere selettiva per gli psicrotrofi, e perché il tempo di sosta prima del trasporto al caseificio (max. 2h) non era tale da permettere una selezione di questo gruppo microbico sugli altri.

Anche i batteri acidificanti e proteolitici erano presenti in tutti i campioni in quantità estremamente variabile tra le stalle. I batteri acidificanti variavano in un intervallo tra 0,6 e 4,2 Log ufc/ml mentre i proteolitici in un intervallo più ristretto (tra 1.1 e 3.7 Log ufc/ml). Il gruppo degli acidificanti era presente in quantità significativamente maggiore se il latte non veniva refrigerato, probabilmente a causa di uno sviluppo dei mesofili, la cui crescita è probabilmente rallentata nel caso di refrigerazione a 18°C.

Spore di clostridi sono state trovate solamente nel latte di quattro stalle, e comunque mai in numero maggiore di 2,5 spore per ml di latte. In seguito a DGGE e sequenziamento, le spore sono state identificate come appartenenti a *Clostridium soprogenes*, *Clostridium perfringens* o *Clostridium difficile*.

Nel modello di elaborazione statistica sono stati considerati diversi fattori di possibile correlazione: la pratica della refrigerazione a 18°C dopo la mungitura; il trasporto al caseificio in bidoni o in cisterna (in tabella 1 sono segnate in grigio le stalle che trasportano con bidoni); il mese (estivo o invernale) e il periodo della munta (mattina o sera); il tipo di mungitura (in tabella 1 sono segnate con un asterisco* le stalle che non sono fornite di una sala per la mungitura); il numero di cellule somatiche e di clostridi; la pratica o meno dell'*unifeed* e la stabulazione delle vacche (fissa o libera).

Grazie all'analisi statistica si è visto che la refrigerazione del latte, il trasporto e la mungitura in sala sono, tra tutti i fattori analizzati, quelli ad avere un impatto

significativo su alcuni dei gruppi microbici analizzati. La refrigerazione del latte a 18°C permette di mantenere significativamente più bassi il numero di batteri acidificanti mesofili presenti nel latte. La pratica del trasporto del latte in cisterna contribuisce a mantenere significativamente inferiori non solo gli acidificanti ma anche la carica totale. La presenza alla stalla di una sala adibita alla mungitura permette di avere un latte con cariche batteriche totali di mesofili e psicrotrofi significativamente più basse.

Conclusioni

In questo studio è stata caratterizzata la flora microbica del latte destinato a produzione di Grana Trentino. La raccolta dei campioni è avvenuta in stalla, e i dati sono stati messi in relazione con le pratiche di mungitura, refrigerazione e trasporto del latte. Dalle basse conte dei coliformi (le medie sono sempre inferiori a 2.5 log ufc/ml) e della CBT (solo in due stalle la media era maggiore di 5 log ufc/ml) si è potuto notare che la qualità microbiologica del latte è buona.

Si è notata una correlazione significativa tra le pratiche di mungitura e di trasporto del latte e la carica batterica totale, in particolare la refrigerazione del latte a 18°C, il trasporto non in bidoni ma in cisterna e la mungitura in un locale idoneo sono fattori che contribuiscono a diminuire significativamente la CBT e i batteri acidificanti nel latte.

Ringraziamenti

La ricerca è stata finanziata dalla provincia autonoma di Trento sul progetto "Qualità Filiera Grana Trentino".

Bibliografia

- Desmaures N., Bazin F., Gueguen M., 1997. *Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy*. Journal of Applied Microbiology. 83, 53–58;
- Harper Jr. C., Dizikes J.L., Packard V.S., 1978. *Microbiological methods for butter, margarine and related products*. In: Marth, E.H., Steele (Eds.), Standard Methods for the Examination of Dairy Products. APHA, Washington, DC, pp. 157–159.
- Murphy S.C., Boor K.J., 2000. *Trouble-shooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk*. Dairy, Food Environmental Sanitation. 20, 606–611.
- Rea M.C., Cogan, T.M., Tobin, S. 1992. *Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland*. Journal of Applied Bacteriology. 73, 331–336.