



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE  
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI UDINE  
Facoltà di Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea Interateneo

in

Tecniche della Prevenzione Nell'Ambiente e Nei Luoghi di Lavoro

Tesi di Laurea  
VALUTAZIONE DEL PROCESSO DI SANIFICAZIONE IN UNA REALTÀ  
ARTIGIANALE (GELATERIA)

Laureando  
GARBINO Giorgio

Relatore  
Dott. MISSANA Giovanni

Correlatori  
Dott.ssa MAIFRENI Michela  
Dott. RIZZO Marco

Anno Accademico 2020 - 2021

## Indice

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>3</b>
1.1. IL GELATO ARTIGIANALE.....	4
1.1.1 Gli stabilimenti.....	4
1.1.2. Il processo produttivo.....	4
1.2. ASPETTI CRITICI PER LA SALUTE.....	5
1.2.1. Tipicità igieniche del gelato artigianale.....	5
1.2.2. Il biofilm.....	6
1.3. LA SANIFICAZIONE DELLA GELATERIA.....	7
1.3.1. Aspetti generali, specifici e prassi riconosciute.....	7
1.3.2. Le macchine e i detergenti idonei.....	8
1.3.3. I disinfettanti per le attrezzature.....	9
1.3.4. L'igiene delle mani e i guanti.....	10
1.4. IL CONTROLLO E IL MONITORAGGIO.....	11
1.4.1. Obiettivi del monitoraggio e metodi.....	11
1.4.2. Le piastre a contatto.....	12
1.4.3. Il bioluminometro.....	12
<b>2. OBIETTIVI DELLO STUDIO</b> .....	<b>14</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>15</b>
3.1. PERIODO E LUOGO DELLA SPERIMENTAZIONE.....	15
3.2. LE MACCHINE.....	15
3.2.1. Il pastorizzatore.....	15
3.2.2. Il mantecatore.....	16
3.3. DETERGENTI, DISINFETTANTI, ALTRI SUPPORTI.....	16
3.3.1. I detergenti usati.....	16
3.3.2. I disinfettanti usati.....	17

3.3.3. L'acido solforico.....	17
3.3.4. L'acqua.....	17
3.3.5. I guanti .....	18
3.4. IL BIOLUMINOMETRO E I TAMPONI.....	18
3.5. LE PIASTRE A CONTATTO.....	18
3.6. LE PROCEDURE ADOTTATE.....	19
<b>4. RISULTATI.....</b>	<b>20</b>
<b>5. DISCUSSIONE.....</b>	<b>34</b>
<b>6. CONCLUSIONI.....</b>	<b>35</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>36</b>

## 1. INTRODUZIONE

La produzione del gelato artigianale comporta un elevato rischio di contaminazione del prodotto. L'esigenza di attenzione all'igiene di questo alimento è nota da tempo (Anderson, 1934; Davis, 1948), per questo gli aspetti tecnologici devono essere attentamente controllati. Gli ingredienti del gelato rappresentano un ottimo terreno di crescita per i microrganismi. *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica*, essendo in grado di moltiplicarsi a 4 °C, risultano tra i pericoli biologici per il consumatore. È importante il rispetto della qualità microbiologica, delle materie prime degli ingredienti, delle temperature di processo, dell'igiene degli ambienti, delle attrezzature e degli operatori. A valle del pastorizzatore il gelato non subisce infatti successivi trattamenti di decontaminazione (Maifreni et al., 1993). La fase del congelamento danneggia i microrganismi più sensibili (*ivi*), ma non può considerarsi risolutiva (Marriot & Gravani, 2008). Una corretta sanificazione delle macchine che operano post pastorizzazione è pertanto fondamentale, come previsto dal c.d. "pacchetto igiene" (EC Reg. No. 852/04, 853/04, 854/04, 882/04) (FIPE, 2013; Marcotrigiano et al., 2019). È altresì necessario accertarsi delle corrette condizioni igieniche tramite un efficace monitoraggio. La verifica visiva non è sufficiente (Cunningham et al., 2011). È necessario effettuare misure (Little & Sagoo, 2009; Marriot & Gravani, 2008). Uno dei sistemi consolidati è la conta batterica con piastre a contatto o tamponi (Giovinazzo et al., 2017; Ismail et al., 2013; Little & Sagoo, 2009; Marriot & Gravani, 2008; Silva et al., 2016), ma è lenta e costosa. Questo studio propone l'uso del bioluminometro come metodo alternativo per accertare un soddisfacente livello di pulizia, a favore di operatori di settore e consulenti sulla sicurezza delle produzioni alimentari.

## 1.1. IL GELATO ARTIGIANALE

### 1.1.1 Gli stabilimenti

Le gelaterie artigiane presentano laboratori di produzione di dimensioni spesso estremamente ridotte, ricavati all'interno di spazi commerciali complessivi talvolta inferiori ai 40 metri quadrati. Questo tipo di attività produttive vendono direttamente al consumatore il prodotto, pertanto la collocazione del locale produttivo non gode degli ampi spazi tipici delle zone industriali o artigianali, bensì delle ben più ristrette strutture tipiche dei centri storici o delle stazioni balneari, dei passaggi pedonali più trafficati o degli stabili collocati a ridosso delle arterie di traffico cittadino più intenso. Gli stabili sono quasi sempre fabbricati civili adibiti ad artigianato, con caratteristiche igieniche non ottimali, come nel caso degli edifici urbani più vecchi. Inoltre, le gelaterie artigiane, per favorire la visibilità dei prodotti e un ingresso facilitato del consumatore, sono caratterizzate da ampie superfici finestrate o porte a soffietto ad apertura totale. Nelle località di mare, in prossimità delle spiagge in particolare, tali ampie aperture favoriscono l'ingresso di polvere, sabbia e altri contaminanti trasportati dal vento. È difficile proteggere i laboratori in misura soddisfacente, dato che sono a stretto contatto con i locali di vendita.

### 1.1.2. Il processo produttivo

I gelati si possono produrre con diverse modalità, a seconda delle scelte dell'artigiano. Tipicamente si suddividono in gelati alle creme e gelati alla frutta. La lavorazione dei primi parte dalla pastorizzazione: si inseriscono nel pastorizzatore latte fresco intero, crema di latte, diversi tipi di zucchero, come il saccarosio e il destrosio, latte in polvere, stabilizzanti ed emulsionanti. Si provvede poi alla pastorizzazione (FIPE, 2013; Maifreni et al., 1993). Questa può essere "alta" o "bassa". Con la prima si porta la miscela a raggiungere gli 85 °C e si procede con l'abbattimento rapido a 3/5 °C. Con la seconda si raggiungono e si mantengono per 30 minuti 65 °C e poi si raffredda velocemente a 3/5 °C. La miscela base ottenuta viene poi estratta e addizionata manualmente di materie prime e semilavorati. Le lavorazioni degli ingredienti dei gelati alle creme sono diverse, con una variabilità dipendente dalla ricetta, similmente a

quanto accade nella cucina di un ristorante. Alcuni esempi sono la semplice aggiunta, la miscelazione, la triturazione, il riscaldamento, la cottura. I gelati alla frutta sono invece prodotti a partire da miscele di zuccheri preventivamente conservati oppure preparati sul momento, addizionati di frutta fresca, surgelata, liofilizzata o mantecata, acqua, latte, stabilizzanti. Nel caso della frutta fresca si provvede ad un preventivo lavaggio. I preparati così ottenuti, sia dei gelati alle creme che di quelli alla frutta, vengono poi versati nella bocca di caricamento del mantecatore, per ottenere tramite congelamento e incorporamento di aria il gelato vero e proprio. La produzione dei diversi gusti di gelato avviene con una successione che consente di operare con il minor numero di lavaggi nell'arco della giornata. Si procede partendo dai gusti neutri o più tenui, come il fiordilatte, per poi passare via via a quelli con sapori più intensi e con colori più marcati, ad esempio la nocciola, il pistacchio o il cioccolato. In alcuni casi per passare da una produzione all'altra è opportuno un semplice risciacquo, per diminuire la rimanenza della lavorazione precedente; in altri serve una deterzione più o meno marcata, come tra il cioccolato e il pistacchio; in altri ancora bisogna provvedere ad una pulizia profonda, come avviene se si deve produrre un gelato che sia privo di allergeni presenti nella produzione precedente, ad esempio nel caso del sorbetto al melone, privo di latte, seguendo la produzione dello yogurt. A fine turno di lavoro, con cadenza tipicamente giornaliera, si procede al lavaggio approfondito, con smontaggio dei diversi componenti del mantecatore, e alla disinfezione.

## 1.2. ASPETTI CRITICI PER LA SALUTE

### 1.2.1. Tipicità igieniche del gelato artigianale

Il gelato viene conservato per la vendita nelle vetrine orizzontali refrigerate e conservato a fine giornata negli armadi frigoriferi verticali da -15 °C a -18°C. Queste temperature esercitano un effetto batteriostatico che consente al prodotto di non degradarsi microbiologicamente. I microrganismi psicrofili non si sviluppano alle basse temperature di conservazione dei gelati (Maifreni et al., 1993). Il problema della *shelf life* dal punto di vista microbico quindi non si pone, anche considerato che la consumazione avviene solitamente in giornata o entro tempi inferiori al mese (Holah, 1995). L'effetto batteriostatico delle temperature di congelamento non si può applicare come metodo per la riduzione dei batteri, ma solo come fattore inibitore da associare

ad altri metodi di controllo dello sviluppo microbico (Marriot & Gravani, 2008). I locali e le attrezzature delle aree di produzione, oltre agli avanzi, al vapore e all'umidità, possono essere sedi di sviluppo di patogeni, indipendentemente dalle temperature mantenute (Maifreni et al., 1993). Il gelato rappresenta un substrato che per caratteristiche chimico-fisiche, pH, attività dell'acqua, contenuto di nutrienti, consente la crescita microbica persino a basse temperature di conservazione con caratteristiche batteriostatiche (Marcotrigiano et al., 2019). I gelati contengono varie sostanze che offrono ai microorganismi un perfetto terreno per lo sviluppo (Ciapetti, 2016; Maifreni et al., 1993). Questi microorganismi sono in particolare *Stafilococcus*, *Salmonellae*, *Escherichia Coli*, e con meno frequenza specie quali *Shigellae*, *Brucellae* e *Yersinia enterocolitica*. Ingredienti aggiunti al gelato in una fase successiva alla pastorizzazione possono costituire una fonte di contaminazione. La frutta fresca, che viene solamente lavata e tagliata a pezzi, può ad esempio contenere percentuali elevate di microrganismi di origine ambientale, tra cui anche batteri sporigeni. La principale fonte di contaminazione può essere considerata l'essere umano, tramite mani sporche, liquidi escreti e povera igiene personale (*ivi*). L'incremento della concentrazione batterica, con riferimento particolare ai coliformi, nelle fasi di produzione del gelato, implica difetti tecnologici e di scarsa pulizia tra le fasi di produzione. Se l'area di produzione non viene decontaminata perfettamente può avvenire la selezione e successivo sviluppo di ceppi batterici in grado di crescere alle basse temperature e di contaminare il prodotto rendendolo inidoneo al consumo (*ivi*).

### 1.2.2. Il biofilm

I biofilm contengono cellule batteriche protette da una matrice da essi prodotta. Grazie a questa protezione i batteri sono molto più difficili da rimuovere, rispetto alle cellule planctoniche (Mazaheri et al., 2021). I biofilm offrono protezione contro sostanze chimiche idrosolubili, come gli agenti caustici, ossidanti, iodofori, fenoli e disinfettanti a base di ammonio quaternario, impedendo la distruzione dei batteri (Marriot & Gravani, 2008). Tutti i microrganismi possono aderire alle superfici e formare biofilm. Livelli relativamente alti di batteri saprofiti sulle superfici possono essere tollerati, ma non i patogeni. (p.e. *Salmonella* spp. e *Listeria* spp.). I microrganismi possono attaccarsi e crescere sulla maggior parte delle superfici usate nella produzione di cibo, come acciaio,

alluminio, nylon ad alta densità, polipropilene, policarbonato e PVC (Holah, 1995). *Listeria monocytogenes* forma biofilm su acciaio inox, poiché presenta crepe e fessure, e su materiali plastici e gommosi. *Salmonellae* aderisce bene su teflon, acciaio, vetro, e poliuretano. *Staphylococcus aureus* è incline ad aderire a superfici idrofile e idrofobe (Ciapetti, 2016). Il tempo necessario alla formazione del biofilm dipende dalla frequenza della pulizia (Gibson et al., 1999). Sulle superfici ambientali, rispetto alle superfici delle attrezzature, il tempo a disposizione dei batteri per formare biofilm è superiore, a causa degli intervalli tra un ciclo di pulizia e l'altro, con il rischio di contaminazione del prodotto per contatto diretto, con il trasferimento dagli operatori, oppure con l'aria come mezzo di trasporto. L'igiene delle superfici, oltre che delle attrezzature, è pertanto determinante (*ivi*).

### 1.3. LA SANIFICAZIONE DELLA GELATERIA

#### 1.3.1. Aspetti generali, specifici e prassi riconosciute

Al fine di ottenere sicurezza dal punto di vista microbiologico è necessario sanificare gli stabilimenti che producono cibo (Holah, 1995). Per assicurare risultati soddisfacenti si deve procedere a valutare il processo di sanificazione. Essa viene applicata per rimuovere lo sporco grossolano, come residui di cibo, corpi estranei, microrganismi e sostanze chimiche dalle superfici. Ciò deve avvenire in modo economico e ad un livello al quale i residui rimanenti costituiscano un rischio minimo per la qualità o la sicurezza del prodotto (Holah, 1995). Tali componenti indesiderati possono derivare dalla normale produzione, sversamenti, accumuli, manutenzione delle attrezzature, confezionamento o contaminazione ambientale costituita da polvere e sporco generico. Le fasi della sanificazione sono ben conosciute: rimozione dello sporco grossolano, detersione, disinfezione, risciacquo. La disinfezione è inefficace se non preceduta da pulizia approfondita (detersione) (Gibson et al., 1999; Holah, 1995). L'operatore artigiano della gelateria ha esigenze specifiche in relazione agli spazi e alle attrezzature di cui è dotato il laboratorio e deve essere competente. Agisce per lo più manualmente e deve essere in grado di smontare agevolmente le attrezzature laddove previsto per la pulizia e la disinfezione. La complessità di alcune macchine e la difficoltà di smontaggio ostacolano la sanificazione (Park et al., 2020). Il design delle attrezzature è pertanto determinante. L'assenza di interstizi e spazi morti è opportuna (Gibson et al., 1999).

Esistono manuali di corretta prassi igienica approvati dal Ministero Italiano della Sanità e inviati alla Commissione europea, che agevolano il compito degli operatori di settore (Manuale per la Disinfezione, 1978).

### 1.3.2. Le macchine e i detergenti idonei

Le principali macchine usate nelle gelaterie sono il pastorizzatore e il mantecatore. Entrambe sono costruite in acciaio inox come materiale principale, unitamente a parti plastiche e in particolare di teflon per quanto riguarda l'agitatore del mantecatore. Le modalità costruttive differiscono da modello a modello, ma i principi di progettazione sono comuni alla maggior parte delle macchine in commercio. Il pastorizzatore consiste in una vasca in acciaio inox di forma cilindrica o di parallelepipedo, con un agitatore all'interno, che consente di riscaldare e raffreddare alle temperature preimpostate o personalizzate la miscela base, per poi raffreddarla rapidamente. Il mantecatore consiste in un cilindro orizzontale raffreddato al cui interno ruota un agitatore a due o più pale, che hanno la funzione di raschiare il gelato formatosi per congelamento sulle pareti e di impastare la miscela incorporando aria mentre acquisisce durezza e il prodotto giunge alla temperatura di circa -10 °C. Il pastorizzatore, oltre alla materia grassa residua di ogni lavorazione, rimovibile con sgrassanti o tensioattivi, presenta come sporco tipico la cosiddetta pietra del latte, una patina dura giallognola prodotta dal riscaldamento del latte (Davis, 1948). Le proteine denaturate dal calore si combinano con i sali minerali e grasso e aderiscono alle superfici. I solfati di calcio derivanti dal latte diventano meno solubili alle alte temperature e sono presenti in grandi quantità (Marriot & Gravani, 2008). Questo strato duro è difficile da rimuovere meccanicamente e tende ad accumularsi nel tempo. Per la rimozione si usano prevalentemente soluzioni acide e in particolare l'acido solforico. L'acido cloridrico non è indicato poiché il cloro aggredisce l'acciaio, provocando fenomeni di corrosione. Alcuni consigliano l'alternanza dell'uso di acido e basi forti (*ivi*). Il mantecatore come sporco tipico presenta invece i residui grassi e zuccherini delle lavorazioni del gelato. Questi sono rimovibili tramite tensioattivi e acqua calda ottenendo una pulizia grossolana, mentre necessitano di detergenti alcalini per rimuovere la patina giallastra grassa che si accumula nel tempo aderendo all'acciaio e al teflon, che alcuni autori definiscono *yellow slime* (Davis, 1948). Tali prodotti vanno usati con cautela e necessitano di protezione per l'operatore, poiché

a differenza dei tensioattivi per uso domestico a pH neutro, sono irritanti per occhi e cute. Sono inoltre particolarmente aggressivi su alcuni metalli, come l'alluminio, provocandone la corrosione. Nella scelta e soprattutto nella diluizione dei detergenti è importante conoscere la durezza dell'acqua. Maggiore è la presenza di calcio e magnesio e meno efficace è la detersione. Per ovviare a questo inconveniente le formulazioni dei detergenti spesso contemplano la presenza di agenti sequestranti. La programmazione degli intervalli di pulizia tramite i detergenti di diversa natura deve assicurare la rimozione dei substrati di materiale indesiderato dalle superfici, in conformità alle esigenze di abbattimento dei contaminanti come da piano di autocontrollo. La frequenza della pulizia approfondita del pastorizzatore e del mantecatore è solitamente quotidiana (FIPE, 2013). Intervalli più lunghi per la pulizia approfondita paiono non determinare pericolosità eccessive, se gli effetti vengono verificati con un opportuno monitoraggio, ma non sono consigliati (Holm et al., 2002).

### 1.3.3. I disinfettanti per le attrezzature

I prodotti usati per la fase della disinfezione disponibili sono diversi. Acido peracetico, soluzioni alcoliche, ipoclorito di sodio o altri composti a base di cloro, sali di ammonio quaternario sono una parte consistente dei prodotti utilizzati. Per le attrezzature della gelateria è importante non avere residui che possano costituire fonte di profumi o gusti indesiderati del prodotto finale, oltre che non presentare tossicità residua nell'alimento (Holah, 1995). I disinfettanti devono inoltre essere specifici per le applicazioni di cui si necessita (Ciapetti, 2016; Gibson et al., 1999). Bisogna considerare vantaggi e svantaggi di ogni disinfettante (Gibson et al., 1999; Holah, 1995). Cloro e alcool possono avere effetto irritante sugli operatori anche se sono efficaci. I sali di ammonio quaternario sono indicati per la disinfezione delle attrezzature (FIPE, 2013; Marriot & Gravani, 2008), ma non devono contenere sostanze odorizzanti che rimarrebbero come residuo dopo la fase del risciacquo. Non devono inoltre essere usati insieme a tensioattivi anionici, pena l'inefficacia della loro azione. Bisogna inoltre considerare la durezza dell'acqua (Marriot & Gravani, 2008), poiché i sali di ammonio quaternario sono incompatibili con i sali di calcio e magnesio e non dovrebbero mai essere utilizzati con acqua contenente concentrazioni superiori a 200 parti per milione di calcio (*ivi*). I sali di ammonio quaternario, spesso indicati come QAC, (*quaternary*

*ammonium compound*), hanno buona capacità penetrante e sono indicati per le superfici porose. Sono agenti bagnanti che presentano buone capacità di detersione e sono tensioattivi. Possono essere applicati anche mediante schiuma. Gli agenti più usati sono i tensioattivi cationici. Hanno scarse capacità detergenti ma ottime doti germicide, ad esempio contro *Lysteria monocytogenes*. Riducono inoltre le muffe. Sono stabili e hanno lunga *shelf life* (*ivi*). Tra i composti dell'ammonio quaternario troviamo l'alchilidimetilbenzilammonio cloruro e l'alchilidimetilettilbenzilammonio cloruro. Sono entrambi efficaci in acqua che presenta valori di durezza tra 500 e 1000 ppm di CaCO<sub>3</sub> senza l'aggiunta di agenti sequestranti. Altri QAC sono il diisobutilfenossietossietildimetilbenzilammonio cloruro e il metildodecilbenziltrimetilammonio cloruro, composti che richiedono l'abbassamento della durezza dell'acqua al di sotto di 500 ppm tramite tripolifosfato di sodio. La concentrazione di questi composti disinfettanti è facile da dosare. Hanno bassa tossicità e i residui, pur non pericolosi, sono facilmente eliminabili con detergenti anionici e risciacquo (*ivi*). Per ottenere l'effetto biocida desiderato è necessario osservare il tempo di contatto previsto dal produttore (Manuale per la Disinfezione, 1978).

#### 1.3.4. L'igiene delle mani e i guanti

L'igiene delle mani è un fattore noto per la sicurezza alimentare, costituendo la prima linea di difesa contro le malattie, visto che circa il 38% delle contaminazioni alimentari è attribuibile al lavaggio delle mani (Marriot & Gravani, 2008). I lavoratori che vengono formati sulla sicurezza delle produzioni alimentari presentano frequenze di lavaggio superiori rispetto a chi non è stato istruito. Anche la presenza di lavandini in misura sufficiente promuove l'igiene delle mani (Green et al., 2007). L'uso dei guanti, maggiore nel settore delle catene di ristoranti che li distribuiscono nelle aree di preparazione dei cibi (*ivi*), non è sempre praticato e neppure uniformemente consigliato in alcune attività specifiche, presentando vantaggi e svantaggi. Da una parte favorisce l'isolamento della cute e dalle estremità delle dita dal prodotto, dall'altra non consente di percepire la presenza di sporco sulle mani (Marriot & Gravani, 2008). Studi sulla contaminazione crociata parrebbero suggerire che con l'uso delle mani nude la contaminazione sia superiore. I migliori risultati si ottengono con l'uso congiunto dei guanti cambiati spesso e del lavaggio delle mani (Yap et al., 2019). L'uso prolungato dello

stesso paio di guanti e soprattutto l'asciugatura delle mani con panni è invece un fattore che contribuisce alla contaminazione. Un accurato lavaggio delle mani, l'asciugatura adeguata, con asciugamani monouso o aria, e la pratica di cambiare i guanti sono necessari per ridurre la contaminazione per trasferimento di microbi (FIPE, 2013; Yap et al., 2019). IVI. Un altro metodo efficace di prevenzione è il lavaggio e la disinfezione con alcool con cadenza di un'ora (Marriot & Gravani, 2008). I guanti devono comunque essere indossati dopo aver lavato e asciugato le mani. Deve essere posta attenzione nell'uso dei guanti per evitare che si possano forare nel corso delle operazioni di lavorazione; inoltre bisogna selezionare un materiale che non provochi reazioni allergiche agli operatori, come può accadere con il lattice. Bisogna anche considerare che all'interno del guanto si promuove la crescita batterica per mezzo dell'ambiente umido e caldo, che favorisce una rapida moltiplicazione, se non viene usato un antisettico (*ivi*). Nelle prassi consolidate dei reparti produttivi si raccomanda elevata frequenza di lavaggio delle mani in particolare prima di iniziare ogni lavorazione, dopo aver usato i servizi igienici, al cambio delle lavorazioni, dopo essersi soffiati il naso o dopo aver tossito e dopo aver toccato i rifiuti o i contenitori della spazzatura. Bisogna inoltre tenere le unghie corte e pulite, non laccate, non indossare anelli e bracciali, proteggere le ferite e le abrasioni con cerotti resistenti all'acqua e guanti monouso (FIPE, 2013).

#### 1.4. IL CONTROLLO E IL MONITORAGGIO

##### 1.4.1. Obiettivi del monitoraggio e metodi

L'obiettivo del monitoraggio consiste nel verificare periodicamente che siano rispettate le condizioni di igienicità necessarie alla salubrità del prodotto finale. Il monitoraggio va programmato per ciascun elemento delle procedure prerequisito (PRP), ove possibile. Si deve procedere a specificare quali test vanno eseguiti e quali misure utilizzare per verificare se si raggiungono gli obiettivi stabiliti. Vanno indicati anche la frequenza, il metodo e le modalità di registrazione (FIPE, 2013). L'analisi microbiologica del prodotto consente di tutelare le categorie più deboli, come donne in gravidanza, bambini e anziani, poiché nel gelato i microrganismi patogeni o potenzialmente patogeni possono essere estremamente pericolosi per questi soggetti, pur non sviluppandosi (Maifreni et al., 1993).

#### 1.4.2. Le piastre a contatto

Le tecniche per monitorare lo sporco delle superfici sono diverse. Una delle più usate consiste nell'uso delle piastre a contatto. Si procede aprendo una piastra chiusa o una piastra Petri reidratata e si preme il terreno di cultura agarizzato contro la superficie da monitorare. Si procede poi a consentire un periodo di incubazione variabile da 2 a 20 giorni a seconda del microrganismo oggetto di rilevazione e di 2 o 3 giorni per una conta microbica delle superfici. Questa tecnica è semplice da utilizzare ma obbliga a un'attesa non sempre compatibile con le esigenze di controllo della produzione. Bisogna poi considerare che presenta costi elevati per le microimprese del settore delle gelaterie artigiane. Le superfici oggetto di rilevazione devono essere piane (per campionamenti su superfici irregolari si usano i tamponi, per poi procedere alla cultura in piastra). La crescita microbica, contata con CFU, offre l'indicazione sul grado di contaminazione (Marriot & Gravani, 2008). Un livello di conta microbica totale di CFU/cm<sup>2</sup> inferiore a 50 può essere considerato soddisfacente; da 50 a 10<sup>4</sup> CFU/cm<sup>2</sup> può essere stimato come abbastanza soddisfacente, oltre 10<sup>4</sup> CFU/cm<sup>2</sup> il valore viene ritenuto insoddisfacente (Legnani et al., 2004).

#### 1.4.3. Il bioluminometro

Un metodo alternativo è l'uso del metodo biochimico del bioluminometro. Questo sistema misura la presenza di ATP mediante la reazione con il complesso luciferina-luciferasi. L'ATP viene sviluppato non solo dalle cellule batteriche, ma anche dalle cellule vegetali e animali (Marriot & Gravani, 2008). La reazione di bioluminescenza richiede ATP, luciferina e luciferasi. Quest'ultimo è un enzima che produce luce nella coda della lucciola. Durante la reazione la luciferina viene ossidata, emettendo luce. Il bioluminometro rileva e quantifica in RLU (*relative light units*) l'emissione di luce, proporzionale alla quantità di ATP campionato. Il tempo di esecuzione del test è di pochi secondi, circa 30 per un singolo test su superficie, e avviene direttamente in loco. Possono essere rilevati livelli molto bassi di microrganismi (*ivi*). La misurazione dell'ATP è stata storicamente usata con successo come importante marcatore per rilevare e quantificare la sporcizia e il carico biologico contaminante nei luoghi di produzione di cibo (Shaughnessy et al., 2013). L'uso del bioluminometro è più economico,

complessivamente, rispetto ai metodi tradizionali con piastre o tamponi, di circa il 40 per cento. L'efficacia del bioluminometro per rilevare la contaminazione microbica è dibattuta. In alcuni ambiti di studio è stata rilevata una correlazione lineare significativa con le tecniche classiche di conta batterica, specialmente dove non sono presenti substrati di tipo alimentare o materiale biologico in genere (Van Arkel et al., 2021), come nell'ambiente sanitario (Amodio et al., 2014; Levrini et al., 2016; Marriot & Gravani, 2008), o nella rilevazione dello sporco nelle scuole (Shaughnessy et al., 2013), ma anche nelle mense universitarie (Osimani et al., 2014). In altri studi è ritenuta povera (Nante et al., 2017). In altri è valutata come inesistente (Ciccarelli, 2005). Alcuni autori sottolineano come ci siano spesso risultati opposti tra la conta batterica e i risultati del bioluminometro, oltre ad aspetti critici come il confondimento dovuto a residui di detergenti e disinfettanti (Shama & Malik; 2013). Diversi autori sembrano concordi sul fatto che unire la misurazione dell'ATP alla conta batterica sia un efficace sistema di valutazione dell'igiene (Cunningham et al.; Osimani et al., 2014; Sogin et al., 2021). La bioluminescenza non è una tecnologia standardizzata, dal momento che ogni strumento ha diversi valori di riferimento, non sempre chiaramente definiti. Al momento la tecnologia pare comunque poter garantire di valutare in tempo reale le superfici dove è richiesto un livello di disinfezione e pulizia, ma non la sterilità (Nante et al., 2017). Sarebbe utile individuare soglie di ATP per attestare il grado di pulizia di una superficie, anche tramite una standardizzazione delle misure ottenuta con la collaborazione dell'industria produttiva degli strumenti di rilevazione (Giovinazzo et al., 2017; Shama & Malik, 2013; Shaughnessy et al., 2013).

## **2. OBIETTIVI DELLO STUDIO**

L'obiettivo principale della ricerca consiste nel verificare se il bioluminometro si possa usare efficacemente per valutare se il processo di sanificazione viene effettuato in misura soddisfacente negli ambienti artigianali di produzione alimentare, con riferimento specifico alla gelateria con produzione diretta. Ci si pone il fine di capire se ci sia una relazione importante tra questo tipo di analisi e le tecniche di rilevazione microbiologica di riferimento, come le piastre a contatto, e quale possa essere lo strumento più idoneo per verificare l'igiene delle superfici. Si intende anche cogliere l'occasione per testare l'uso di alcuni detergenti e disinfettanti da usare nella sanificazione delle attrezzature, sperimentando l'esito della loro applicazione sul mantecatore del gelato.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1. PERIODO E LUOGO DELLA SPERIMENTAZIONE

La sperimentazione si è svolta nei mesi di aprile e di maggio 2022 in due distinte giornate. La sede delle operazioni è stata un laboratorio di gelateria artigianale, sito in una zona centrale della località turistica balneare di Grado, in provincia di Gorizia, in Friuli-Venezia Giulia, a poche decine di metri dalla spiaggia. Coordinate geografiche: 45.675909529717245, 13.388277620255883. L'attività ospitante ha una superficie complessiva di circa 40 metri quadrati, con il laboratorio di circa 12 metri quadrati, nel quale opera solitamente un solo addetto. I soffitti sono alti m 3,20. Durante la stagione estiva sono impegnati nell'attività lavorativa dalle 3 alle 4 persone, di cui uno o due in fase produttiva e gli altri nella parte destinata alla vendita. Nel laboratorio sono presenti due mantecatori, un pastorizzatore, un tino di maturazione, armadi refrigerati positivi e negativi. L'attività consiste nella produzione e vendita diretta al pubblico di gelati in coni e coppette da asporto.

#### 3.2. LE MACCHINE

##### 3.2.1. Il pastorizzatore

Il pastorizzatore è il modello "Mixtronic 60" prodotto dalla ditta Technogel, con circa 15 anni di servizio stagionale estivo di anzianità. Consiste in una vasca di acciaio inox della capienza utile di 60 litri. Presenta all'interno, in posizione centrale, un albero agitatore ed emulsionatore. L'emulsione è ottenuta tramite alette montate alla base dell'albero, che spingono la miscela per gelato contro un cilindro dotato di fori calibrati. Il riscaldamento della base per gelato avviene per mezzo di un sistema di resistenze immerse in un fluido che circonda la vasca. I programmi di pastorizzazione, "alta" e "bassa", sono preimpostati. La vasca è dotata di coperchio rimovibile in plexiglas.

### 3.2.2. Il mantecatore

Il mantecatore è il modello Labotronic 40/60 prodotto dalla ditta Carpigiani, con circa 20 anni di anzianità di servizio stagionale. Consiste in un cilindro orizzontale refrigerato in acciaio inox, al cui interno gira un miscelatore a tre pale con struttura in acciaio rivestito in teflon, dotate di placche raschianti autoregolanti in teflon, smontabili e sostituibili una volta consumate. Le placche sono spinte contro le pareti del cilindro tramite molle. La miscela si congela a contatto con il cilindro e viene staccata dalla parete durante la produzione. La pala agitatrice allo stesso tempo consente l'incorporazione di aria nel gelato. Le pale e i raschianti sono strutturati e disegnati in modo da schiacciare il gelato e da impastarlo, ottenendo una struttura fine non granulosa del prodotto, analogamente a come opera un cucchiaino spingendo contro una terrina nella preparazione di un impasto per una torta. Consente di produrre con una singola lavorazione dai 4 ai 6 chilogrammi di gelato, in un tempo variabile dai 10 ai 15 minuti. La gestione del processo di mantecazione è attuata tramite una centralina elettronica, in grado di regolare l'accensione del compressore di raffreddamento a seconda delle condizioni di utilizzo, segnalando acusticamente e visivamente all'operatore quando il prodotto ha raggiunto la consistenza preimpostata.

### 3.3. DETERGENTI, DISINFETTANTI, ALTRI SUPPORTI

#### 3.3.1. I detergenti usati

Il detergente usato per le stoviglie, per i lavaggi più frequenti di utensili e mani e per i cicli di lavaggio non approfondito tra una produzione e l'altra, è il tensioattivo anionico "Svelto Lemon – 100", prodotto da Unilever. È una miscela, classificata come non pericolosa in base alla Direttiva 1999/45/CE e suoi emendamenti. L'etichetta riporta la seguente composizione: "Magnesium Laureth dal 5% al 10%, Sulfate, Sodium Laureth Sulfate 1/5%, Cocamidopropyl Betaine, 1/5%". Il suo pH è 5,5. Viene usato puro con erogazione diretta su spugna o diluito per consentire il lavaggio per immersione. Per i lavaggi approfonditi di attrezzature, utensili e superfici che necessitano uno sgrassaggio intenso, è stato usato il prodotto "Sgrassante Forte NF" prodotto dalla ditta Icefor spa. È un detergente alcalino, miscela di idrossido di sodio, idrossido di potassio, *tetrasodium* EDTA. Il pH è 13/14. Si usa diluito per essere usato con erogatore manuale a spruzzo

oppure versato in recipiente contenente acqua, per consentire lavaggi con immersione. Il prodotto è classificato come pericoloso ai sensi delle disposizioni di cui al Reg. (CE) 1272/2008 (CLP). Comporta pertanto cautele per l'operatore, come la protezione degli occhi, della cute e delle vie respiratorie.

### 3.3.2. I disinfettanti usati

Per la disinfezione delle superfici delle attrezzature è stato usato il prodotto "Aroquat", della ditta Firma S.r.l. È stato scelto per l'assenza di sostanze odorizzanti, che si trovano nella maggior parte dei disinfettanti a base di sali di ammonio quaternario dedicati alle superfici non a contatto con gli alimenti, come pareti o pavimenti. Viene presentato come disinfettante incolore e inodore di sali di ammonio quaternario. È stato usato diluito in acqua in soluzione 0,8/1,2%, come da istruzioni. Il tempo di contatto previsto per l'uso è di 15 minuti. Il prodotto è classificato pericoloso ai sensi delle disposizioni di cui al Regolamento (CE) 1272/2008 (CLP) (e successive modifiche e adeguamenti). Provoca ustioni a cute e occhi; va pertanto usato proteggendo opportunamente l'operatore.

### 3.3.3. L'acido solforico

Per rimuovere la pietra del latte dal pastorizzatore è stato usato acido solforico al 24,5% in soluzione acquosa, pH 0,5 a 20 °C., usato puro su spugna dotata di parte raschiante in gomma rigida; l'acido è denominato commercialmente "pH-", prodotto dalla ditta Bionova S.r.l. e venduto come fertilizzante. La scelta dell'acido solforico, anziché del cloridrico, è dovuta al fatto che quest'ultimo non viene indicato per la pulizia dell'acciaio dalla maggior parte dei produttori di detersivi, poiché il cloro su questo metallo esercita un effetto corrosivo. L'uso di tale sostanza presenta problematicità dal punto di vista della sicurezza sul lavoro, con esigenza di protezione di occhi, cute e vie respiratorie per l'operatore, e di scrupolose cautele operative specifiche per gli acidi forti.

### 3.3.4. L'acqua

L'acqua usata per le operazioni di pulizia è quella dell'acquedotto, distribuita dall'ente Irisacqua. La temperatura dell'acqua fredda al rubinetto è di circa 15 °C.

L'acqua calda, riscaldata per mezzo di boiler elettrico, è a 56 °C. La durezza totale è di 16,5 °F. Il pH a 20 °C è 7,8.

### 3.3.5. I guanti

Per le operazioni sono stati usati guanti in nitrile, prodotti dalla "Inco Medical Products Co Ltd", modello "Synguard", etichettati come "non sterili".

### 3.4. IL BIOLUMINOMETRO E I TAMPONI

Il bioluminometro usato è il modello "Ensure Touch" prodotto dalla ditta Hygiena. Consente il monitoraggio multiplo usato per analisi dell'igiene ambientale, con dieci secondi di attesa. È dotato di display touch-screen, tecnologia wireless e software Sure Trend di salvataggio dati. Utilizza tamponi per controllo di superfici con reagenti predosati. Le caratteristiche sono le seguenti: rilevazione fino a <0,1 femtomole di ATP; sensore di luce: fotodiode; batteria della durata di 8-10 ore; dimensioni (cm) 17,8x7,6x2,5; campi personalizzabili in base alle esigenze di misurazione. I tamponi utilizzati per l'esperimento sono il modello "SuperSnap" della stessa casa produttrice. Consentono la rilevazione di residui di prodotto a partire da 1ppm a seconda della matrice. Il sistema bioluminometro/tamponi deve essere usato su superfici pulite. Se usato su superfici visibilmente sporche la reazione di bioluminescenza produce risultati inaccurati. I tamponi si usano secondo lo schema indicato nelle istruzioni, su una superficie di 100 cm<sup>2</sup>.

### 3.5. LE PIASTRE A CONTATTO

Le piastre a contatto usate per le attrezzature sono state preparate con il prodotto "CM0325 Plate Count Agar", prodotto da Oxoid. Le istruzioni d'uso prescrivono l'aggiunta di 15,5 g ad un litro di acqua distillata, da dissolvere portando ad ebollizione con frequente mescolamento, miscelazione e distribuzione nei contenitori finali, con sterilizzazione in autoclave a 121 °C. L'incubazione prevista è di 48 ore alla temperatura di 32 °C. Le piastre usate misurano 25 cm<sup>2</sup> di superficie e vengono tenute premute contro una superficie piana per 10 secondi. Le piastre a contatto per l'analisi dei guanti sono state preparate con il prodotto "CM0545 OGYE AGAR" della stessa casa produttrice. Le istruzioni d'uso indicano che si devono sospendere 18,5 g di prodotto in

500 ml di acqua distillata e portare gentilmente il composto fino a dissolverlo completamente. Si procede poi alla sterilizzazione in autoclave a 115 °C per 10 minuti. Si consente al mezzo di raffreddarsi a 50 °C e si deve aggiungere in ambiente asettico il contenuto di una fiala di Oxytetracycline GYE Supplemento Selettivo (SR0073) ricostituito come previsto. Si procede a mescolare a fondo e versare in piastre Petri.

### 3.6. LE PROCEDURE ADOTTATE

Gli operatori incaricati del campionamento sono stati equipaggiati con guanti in nitrile, camice, raccoglitore per capelli, facciale filtrante. L'addetto alla produzione ha proceduto alle lavorazioni con la stessa dotazione. Il gelato al latte è stato prodotto a partire da base pastorizzata, i cui ingredienti sono stati: latte fresco intero, crema di latte, saccarosio, destrosio, latte in polvere magro scremato, stabilizzanti. Il gelato alla banana è stato invece ottenuto da una miscela realizzata pochi minuti prima dell'introduzione nel mantecatore, senza pastorizzazione. Gli ingredienti usati sono stati: acqua, latte fresco intero, banana (frutta fresca), saccarosio, destrosio, glucosio, succo di limone, stabilizzanti. Le banane usate sono state lavate in acqua di rubinetto, sbucciate e tagliate a pezzi, senza disinfezione della buccia. Sono stati effettuati campioni, tramite tampone per bioluminometro, delle superfici interne del mantecatore in diverse fasi della produzione. 8 campioni sono stati prelevati dopo la produzione, a mantecatore visibilmente sporco. 10 misurazioni sono state eseguite a mantecatore deterso con i prodotti Svelto e Icefor. 38 misurazioni sono state effettuate a mantecatore disinfettato. Sono state inoltre effettuate 27 rilevazioni appaiate nello stesso momento e nella medesima posizione, con bioluminometro e piastre a contatto, sulle pareti del mantecatore in diverse fasi della sanificazione, successive al risciacquo. Il valore dei risultati ottenuti con le piastre è stato moltiplicato per 4, per offrire una misura su 100 cm<sup>2</sup>, analogamente alla superficie campionata tramite tamponi per bioluminometro. La contaminazione sui guanti è stata rilevata con il bioluminometro e con le piastre a contatto, prima e dopo il lavaggio con i detergenti "Svelto" e "Sgrassante Forte NF".

#### 4. RISULTATI

I valori rilevati sulle superfici del mantecatore dopo la lavorazione del gelato alla banana hanno presentato un massimo di 7023 RLU e un minimo di 176 RLU, con una media di 2124,23 RLU (*Tabella 1 e 2*). Dopo la detersione il massimo è stato pari a 7501 RLU e il minimo pari a 0,00 RLU, con una media di 1036,80. A disinfezione effettuata il valore massimo è stato di 117,00 RLU, il minimo di 0,00 RLU e la media di 32,16 RLU. La distribuzione dei dati ottenuti con il campione esaminato, in base al test di Shapiro-Wilk, è risultata non normale (*Tabella 3*). Nel gruppo di dati relativo al campionamento seguente alla detersione si è presentato un dato *outlier* di 7501 RLU. Il test di Mann-Whitney (*Tabella 4*) ha dimostrato una differenza statisticamente significativa tra i valori successivi alla detersione e i valori dopo la disinfezione ( $\alpha=0,01$ ). Le superfici a seguito della lavorazione del gelato al fiordilatte (*Tabella 5 e 6*) hanno mostrato una misura massima di 137,00 RLU, un minimo di 57,00 RLU e una media di 98,25 RLU. Il test di Shapiro-Wilk ha mostrato che la distribuzione dei valori rilevati nel mantecatore sporco di gelato alla banana è risultata non normale, diversamente dai valori rilevati dopo la produzione del gelato al fiordilatte (*Tabella 7*). Non si sono presentati *outliers*. I guanti dopo la lavorazione del gelato alla banana hanno fatto registrare 4781 RLU. Dopo il lavaggio dei guanti, indossati, il valore è sceso a 87 RLU (*Tabella 8*). I valori di ATP rilevati sulle pareti del mantecatore nelle diverse fasi, in momenti successivi a risciacquo, detersione e disinfezione, appaiati alle misure ottenute con campionamento negli stessi momenti tramite conta totale dei microrganismi con piastre a contatto, hanno mostrato un coefficiente di Spearman di -0,03652 (*Tabella 10*), ma in assenza di normalità delle serie di dati, verificati con il test di Shapiro-Wilk (*Tabella 11*).

Tabella 1. Valori RLU superfici mantecatore campionate.

SUPERFICI SPORCHE MANTECATORE BANANA RLU	MANTECATORE SOLO DETERSIONE RLU	SUPERFICIE INTERNA MANTECATORE DISINFETTATO CON AROQUAT 0,8-1,2% RLU
2707	849	0
7023	7501	15
307	294	60
983	212	26
592	973	117
4663	203	8
176	19	105
542	243	43
	0	55
	74	36
		25
		42
		12
		6
		10
		31
		52
		14
		28
		52
		24
		92
		83
		57
		41
		32
		2
		22
		8
		9
		0
		5
		54
		7
		21
		9
		12
		7

Tabella 2. I valori statistici RLU mantecatore nelle diverse fasi.

	G1 Superfici sporche mantecatore dopo banana	G2 Mantecatore dopo detersione	G3 Mantecatore disinfettato con QAC	Outlier Multiplier 2,2	G1	G2	G3
Mean	2124,13	1036,80	32,16	Min	176,00	0,00	0,00
St. err.	886,75	725,87	4,80	Q1-Min	307,25	106,25	9,00
Median	787,50	227,50	24,50	Med-Q1	304,25	121,25	15,50
St. Dev.	2508,11	2295,42	29,59	Q3-Med	2408,50	482,75	25,25
Sample Variance	6290633,27	5268940,40	875,43	Max-Q3	3827,00	262,75	67,25
Kurtosis	0,79	9,42	1,23	Mean	2124,13	1036,80	32,16
Skewness	1,35	3,04	1,28				
Range	6847,00	7501,00	117,00	Min	176,00	0,00	0,00
Maximum	7023,00	7501,00	117,00	Q1	483,25	106,25	9,00
Minimum	176,00	0,00	0,00	Median	787,50	227,50	24,50
Count	8,00	10,00	38,00	Q3	3196,00	710,25	49,75
				Max	7023,00	973,00	117,00
				Mean	2124,13	1036,80	32,16
				Outliers	None	7501	None

Tabella 3. Test di Shapiro-Wilk relativo a tabella 2.

	Group 1	Group 2	Group 3
W-stat	0,796388	0,48501804	0,866255
p-value	0,026184	2,4281E-06	0,000324
alpha	0,05	0,05	0,05
normal	no	no	no

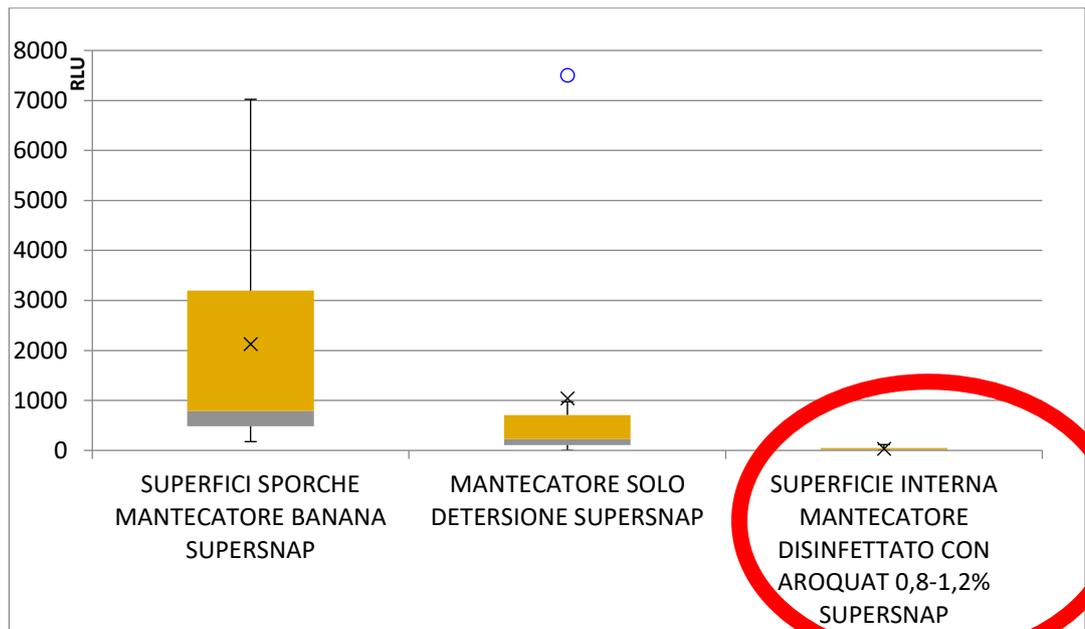


Fig. 1. Grafico con box plot RLU mantecatore nelle tre fasi relativo a tabella 1.

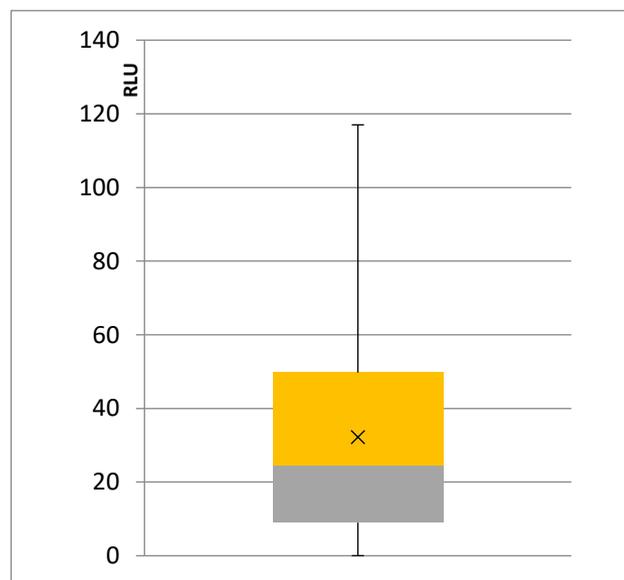


Fig. 2. Box plot figura 1 ingrandito.

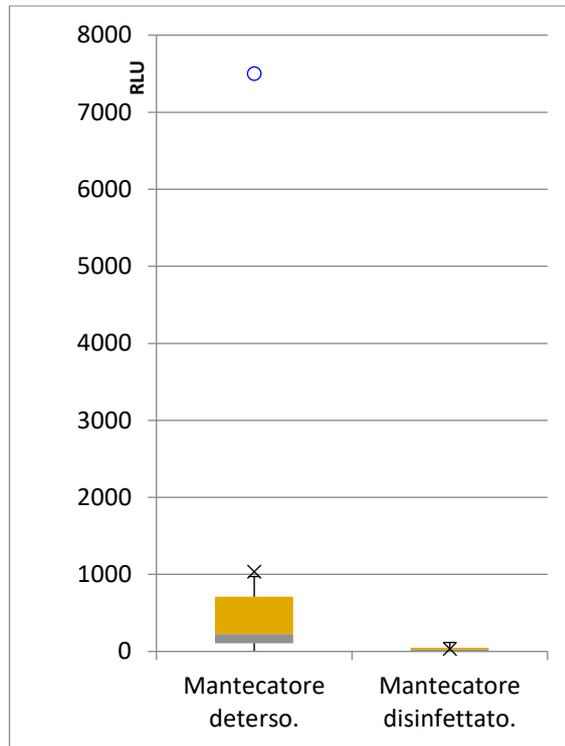


Fig. 3. Grafico con box plot che evidenzia la differenza di RIU dopo la deterzione e dopo la disinfezione.

Tabella 4. Superfici sporche dopo banana e dopo fiordilatte. Differenza significativa all'1%.

Test di Mann-Whitney per due campioni indipendenti		
	Mantecatore deterso	Mantecatore disinfettato
count	10	38
median	227,5	24,5
rank sum	371,5	804,5
U	63,5	316,5
U crit. con $\alpha = 0,01$	90	
	one tail	two tail
U	63,5	
mean	190	
std dev	39,38479	ties
z-score	3,199205	yates
effect r	0,461765	
p-norm	0,000689	0,001378072
p-exact	0,000374	0,000747099

Tabella 5. Superfici sporche dopo banana e dopo fiordilatte.

SUPERFICI SPORCHE MANTECATORE BANANA RLU	SUPERFICI SPORCHE BASE BIANCA RLU
2707	137
7023	117
307	81
983	67
592	89
4663	134
176	57
542	104

Tabella 6. Statistica descrittiva e test Shapiro-Wilk relativo a tabella 5.

Statistica descrittiva			Outlier Multiplier 2,2		
	Superfici sporche mantecatore banana	Superfici sporche mantecatore base bianca		Superfici sporche mantecatore banana	Superfici sporche mantecatore base bianca
Mean	2124,13	98,25	Min	176,00	57,00
Standard Error	886,75	10,54	Q1-Min	307,25	20,50
Median	787,50	96,50	Med-Q1	304,25	19,00
Standard Deviation	2508,11	29,82	Q3-Med	2408,50	24,75
Sample Variance	6290633,27	889,36	Max-Q3	3827,00	15,75
Kurtosis	0,79	-1,45	Mean	2124,13	98,25
Skewness	1,35	0,03			
Range	6847,00	80,00	Min	176,00	57,00
Maximum	7023,00	137,00	Q1	483,25	77,50
Minimum	176,00	57,00	Median	787,50	96,50
Count	8,00	8,00	Q3	3196,00	121,25
			Max	7023,00	137,00
			Mean	2124,13	98,25
			Grand Min	0,00	
			Outliers	None	None
				<i>Group 1</i>	<i>Group 2</i>
			Min	176,00	57,00

Tabella 7. Test di Shapiro-Wilk relativo a tabella 5.

Shapiro-Wilk Test		
	Superfici sporche mantecatore banana	Superfici sporche mantecatore base bianca
W-stat	0,80	0,95
p-value	0,03	0,67
alpha	0,05	0,05
normal	no	yes

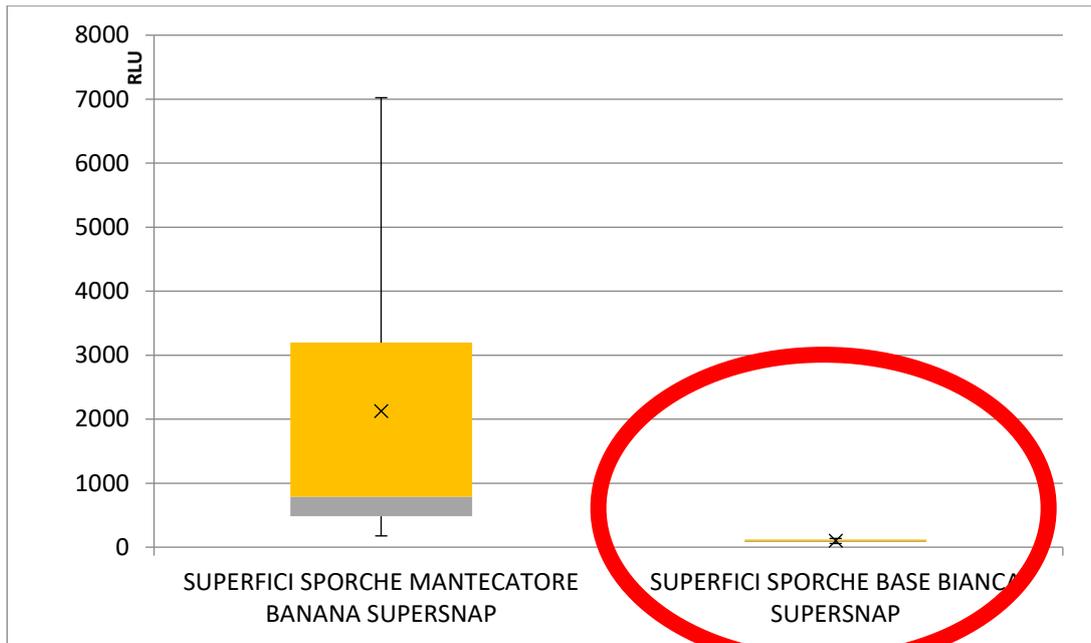


Fig. 4. Box plot RLU superfici sporche dopo banana e dopo base bianca

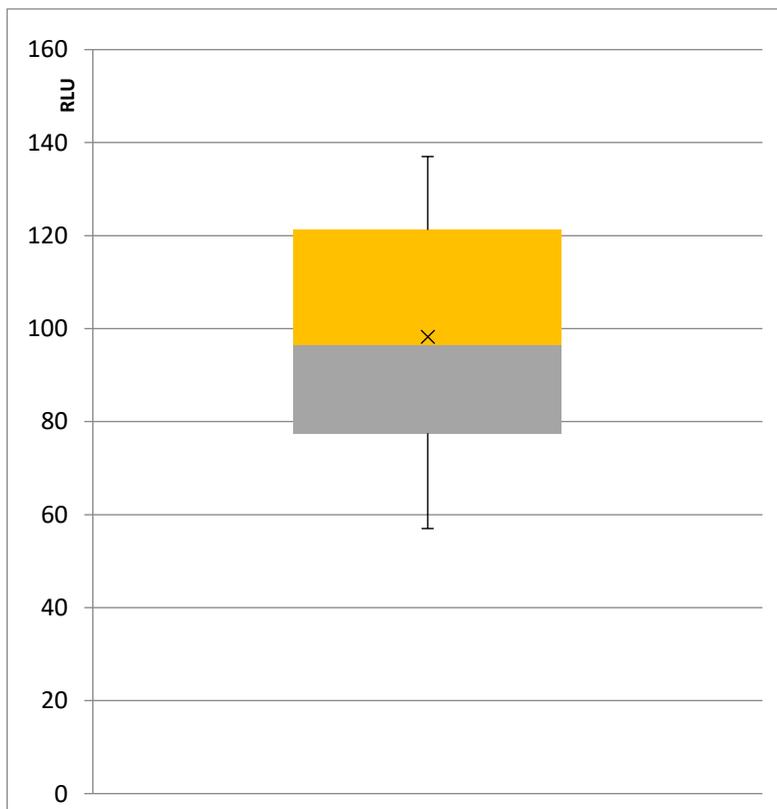


Fig. 5. Box plot ingrandito figura 4.

Tabella 8. Valori RLU relativi ai guanti.

GUANTI DOPO LAVORAZIONE BANANA	4781
GUANTI DOPO LAVAGGIO MANI CON GUANTI	87

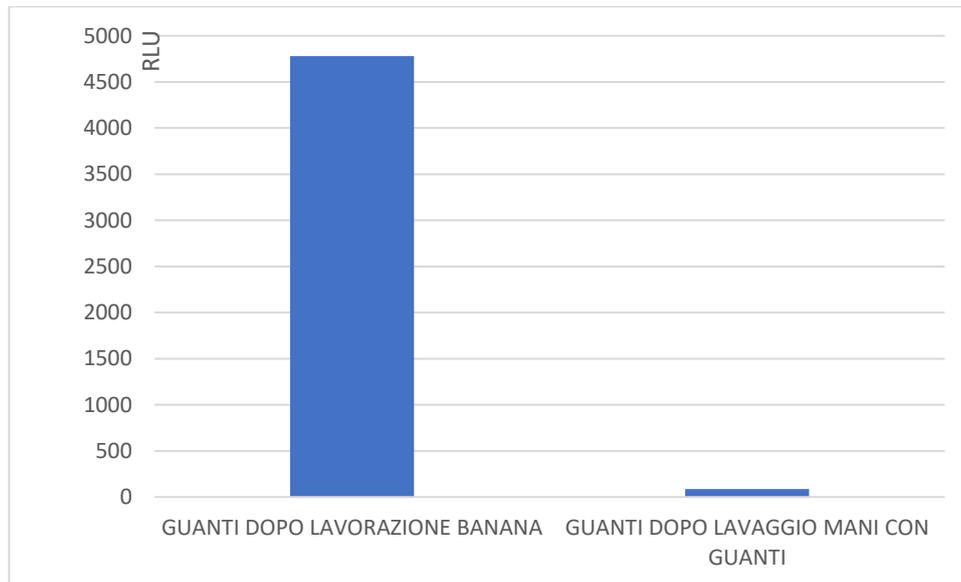


Fig. 6. Guanti dopo lavorazione banana e dopo lavaggio con guanti, misura in RLU

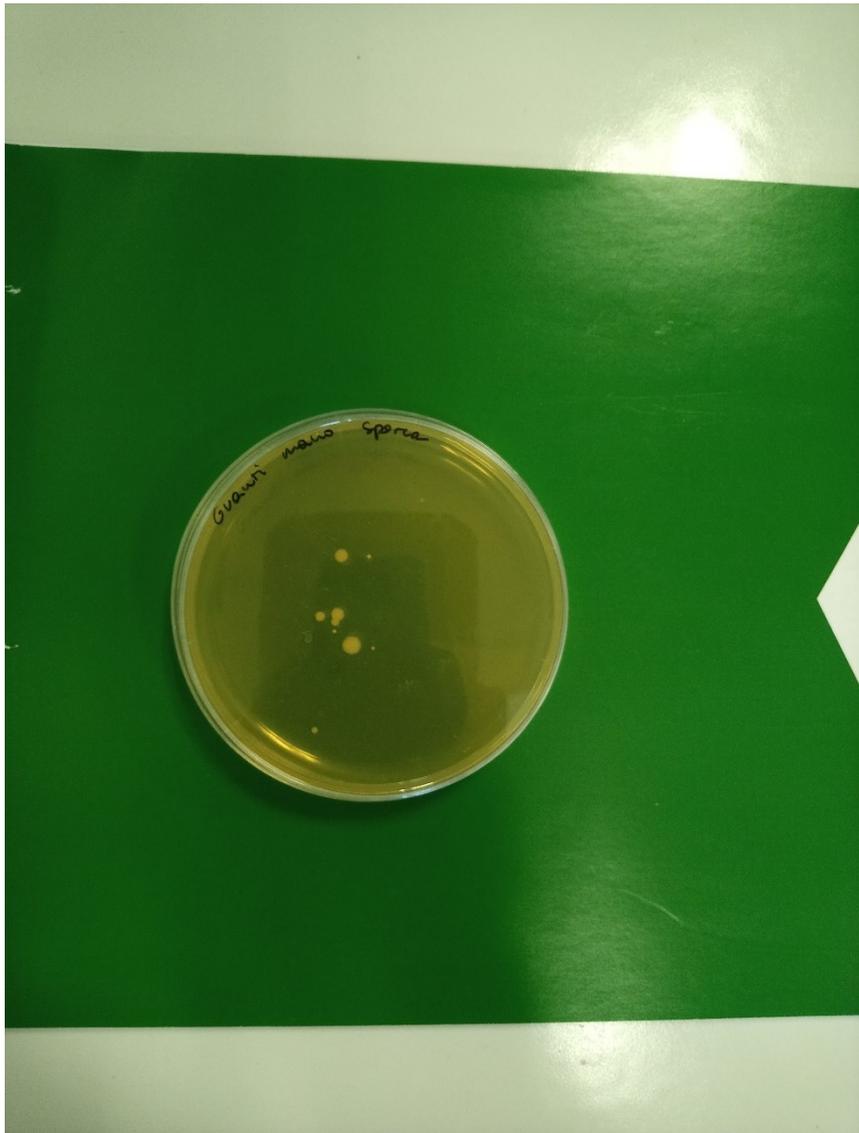


Fig. 7. Guanti sporchi dopo la lavorazione.

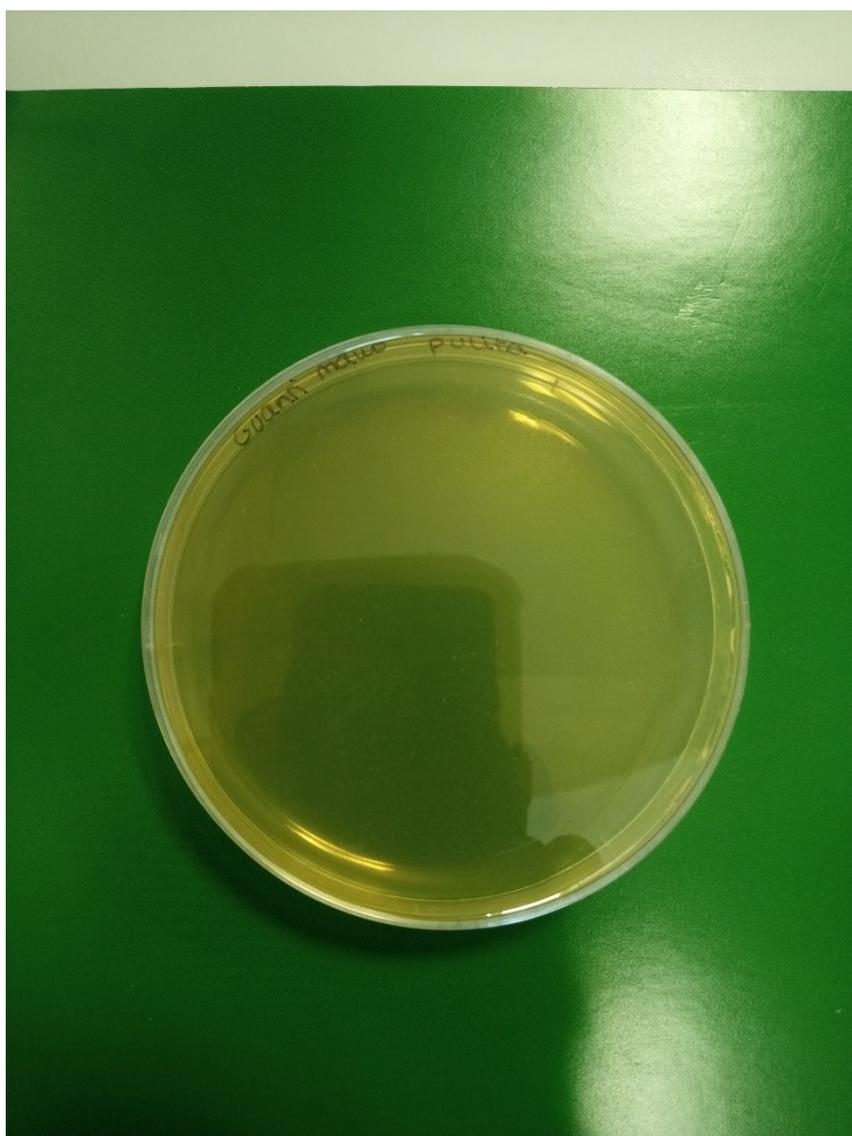


Fig. 8. Guanti puliti dopo il lavaggio.

Tabella 9. Misure appaiate di ATP in RLU e conta microbica totale con piastre a contatto.

Nr progressivo campionamento	RLU	UFC/100 cm <sup>2</sup>
1	4175	2
2	33	12
3	217	2
4	7,5	116
5	38	8
6	127	28
7	111,5	208
8	486,6	68
9	2627,5	48
10	253	308
11	131	72
12	60	2
13	92	4
14	193,5	2
15	1201	4
16	71,5	2
17	145,5	2
18	49	4
19	12	28
20	74	40
21	80,5	2
22	645	20
23	359	112
24	588	136
25	37	2
26	23	262
27	17	72



Tabella 10. Coefficienti di correlazione ATP-CFU, relativi a tabella 8.

Coefficienti di correlazione			
Pearson	-0,1271		
Spearman	-0,03652		
Kendall	-0,05388		
Pearson's coeff (t test)		Pearson's coeff (Fisher)	
Alpha	0,05	Rho	0
Tails	2	Alpha	0,05
		Tails	2
corr	-0,1271		
std err	0,198378	corr	-0,1271
t	-0,64071	std err	0,196116
p-value	0,527541	z	-0,62606
lower	-0,53567	p-value	0,531276
upper	0,281464	lower	-0,48375
		upper	0,265747

Tabella 11. Test Shapiro Wilk relativo a tabella 9.

Shapiro Wilk - Test		
	RLU	UFC/100 cm <sup>2</sup>
W-stat	0,497126	0,717231
p-value	1,57E-08	6,8E-06
alpha	0,05	0,05
normal	no	no

## 5. DISCUSSIONE

I dati relativi alle misurazioni con bioluminometro delle superfici del mantecatore (*Tabella 2*) mostrano che la mediana dopo la disinfezione è inferiore di circa 10 volte rispetto al valore post-detersione. La differenza tra i valori delle misurazioni effettuate dopo la sola detersione del mantecatore e dopo la disinfezione, statisticamente significativa all'1% con il test di Mann-Whitney, dimostra quanto si abbatta la contaminazione con l'ultima fase; attesta inoltre che il bioluminometro è in grado di rilevare efficacemente tale variazione (*Tabella 4*). Il grafico box-plot (*Figura 3*) mostra che al terminare dei valori inferiori a seguito della detersione cominciano i valori superiori post-disinfezione, a testimonianza dell'abbattimento del valore di ATP. I valori RLU rilevati dopo la lavorazione del gelato alla banana sono sensibilmente più alti rispetto a quelli successivi alla produzione del fiordilatte. Ciò può essere addebitato alla mancata pastorizzazione della miscela del preparato per il gelato alla banana. La misurazione del mantecatore sporco non è indicata come opportuna dalle istruzioni del produttore del bioluminometro, ma ha consentito in questo studio di valutare la scala delle misurazioni. Più significativa è invece la lettura dopo la pulizia del mantecatore, cioè dopo la detersione e dopo la disinfezione, poiché la funzione del bioluminometro è testare l'avvenuta sanificazione. La misurazione dell'ATP sui guanti mostra una riduzione del valore di contaminazione, dovuta al lavaggio, di oltre 50 volte. La rilevazione con le piastre a contatto non mostra invece valori CFU molto dissimili tra i guanti prima e dopo il lavaggio (*Figure 7 e 8*). Ciò può essere dovuto ai frequenti lavaggi tra le lavorazioni, anche se rapidi, o al non aver toccato superfici molto contaminate. I valori appaiati delle misure di ATP e di conta batterica totale mostrano una mancanza di correlazione (*Figura 9*). Questo studio non si proponeva come obiettivo principale di verificarne l'esistenza e la numerosità del campione non è stata forse sufficientemente ampia, ma l'informazione appare suggerire che sia difficile in questo tipo di sanificazione poter desumere valori di conta batterica a partire dai dati del bioluminometro.

## 6. CONCLUSIONI

I risultati della sperimentazione paiono suggerire che il bioluminometro possa essere usato in modo efficace come sistema per verificare se la sanificazione è stata svolta in misura soddisfacente nell'ambiente delle produzioni alimentari e specificamente nelle gelaterie artigiane. Non pare che sia utile al fine di determinare se ci sia contaminazione batterica sulle superfici alla fine del processo di sanificazione attuato. La rapidità di operazioni e di ottenimento dei risultati consentite dal bioluminometro offrono un consistente vantaggio in termini di tempo di risposta rispetto alle piastre a contatto. Potremmo suggerire l'uso di questo strumento per il monitoraggio del piano di pulizie previsto dal sistema HACCP, in alternanza a periodici controlli microbiologici da eseguire con le tecniche classiche di conta batterica totale e specifica. In questo modo viene anche scongiurato il pericolo dell'inefficacia dei disinfettanti usati nell'ambiente di lavoro nel corso del tempo dovuta allo sviluppo di resistenza da parte dei microrganismi.

## 7. BIBLIOGRAFIA

AMODIO, E., CANNOVA, L., VILAFRATE, M. R., MERENDINO, A. M., APREA, L., & CALAMUSA, G. (2014). *Analytical Performance Issues: Comparison of ATP Bioluminescence and Aerobic Bacterial Count for Evaluating Surface Cleanliness in an Italian Hospital*. *Journal of occupational and environmental hygiene*, 11(2), D23–D27. <https://doi.org/10.1080/15459624.2013.852281>

ANDERSON, E.B. (1934). *Hygiene of Ice-Cream Production and Conservation: The Bacteriological Aspect of Plant Cleaning*, by E. B. ANDERSON, M.Sc., F.I.C., Chief Chemist, United Dairies, Ltd. *The Journal of the Royal Society for the Promotion of Health*, 55, 285 - 295.

CIAPETTI, S. (2016). *Problematiche igieniche legate alla presenza di biofilm microbici nell'industria degli alimenti di origine animale*. [Tesi laurea magistrale, Università di Pisa].

CICCARELLI, E. (2005). *Determinazione dell'ATP in bioluminescenza*. Arpa Umbria. [https://www.arpa.umbria.it/resources/docs/PSAS%20-%20Ciccarelli\\_APAT99\\_15%20sett.pdf](https://www.arpa.umbria.it/resources/docs/PSAS%20-%20Ciccarelli_APAT99_15%20sett.pdf)

CUNNINGHAM, A. E., RAJAGOPAL, R., LAUER, J., & ALLWOOD, P. (2011). *Assessment of hygienic quality of surfaces in retail food service establishments based on microbial counts and real-time detection of ATP*. *Journal of food protection*, 74(4), 686–690. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-395>

DAVIS, J. G., D. SC, PH. D., F.R.I.C. (MEMBER), DIRECTOR (TECHNICAL). (1948) *The Cleansing and Sterilizing of Dairy and Ice-cream Plant. the Express Dairy Co., Ltd'. Journal of the Royal Sanitary Institute*, 68(5), pp. 547–556. DOI: 10.1177/146642404806800526.

FEDERAZIONE ITALIANA PUBBLICI ESERCIZI - CONFCOMMERCIO. *Manuale di corretta prassi operativa. Ristorazione, gastronomia, gelateria, pasticceria*. (2013). Fuoricasa.

GAZZETTA UFFICIALE n. 284 del 04 -12-1998 Elenco dei manuali di corretta prassi igienica previsti dal decreto legislativo 26 maggio 1997, n. 155, e dalla circolare n. 1 del 26 gennaio 1998.

GIBSON, H., TAYLOR, J. H., HALL, K. E., & HOLAH, J. T. (1999). *Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. Journal of applied microbiology*, 87(1), 41–48. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00790.x>

GIOVINAZZO, R., BARCA, S., CARADONNA, L., GIAQUINTA, G., GUERRERA, E., MAMELI, M., MANSI, A., MARENA, G., MASTROMARTINO, T., SARTO, D., TOMAO, P., CARDUCCI, A., VERANI, M., MOLINARI, A., MASALA, E. (2017) *La contaminazione microbiologica delle superfici negli ambienti lavorativi*. Inail

GREEN, L. R., RADKE, V., MASON, R., BUSHNELL, L., REIMANN, D. W., MACK, J. C., MOTSINGER, M. D., STIGGER, T., & SELMAN, C. A. (2007). *Factors related to food worker hand hygiene practices. Journal of food protection*, 70(3), 661–666. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-70.3.661>

HOLAH J. T. (1995). *Disinfection of food production areas. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 14(2), 343–363. <https://doi.org/10.20506/rst.14.2.850>

HOLAH J. T. (1995). *Special needs for disinfectants in food-handling establishments*. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 14(1), 95–104. <https://doi.org/10.20506/rst.14.1.825>

HOLM, S., TOMA, R. B., REIBOLDT, W., NEWCOMER, C., & CALICCHIA, M. (2002). *Cleaning frequency and the microbial load in ice-cream*. *International journal of food sciences and nutrition*, 53(4), 337–342. <https://doi.org/10.1080/09637480220138133>

ISMAÏL, R., AVIAT, F., MICHEL, V., LE BAYON, I., GAY-PERRET, P., KUTNIK, M., & FÉDÉRIGHI, M. (2013). *Methods for recovering microorganisms from solid surfaces used in the food industry: a review of the literature*. *International journal of environmental research and public health*, 10(11), 6169–6183. <https://doi.org/10.3390/ijerph10116169>

P. LEGNANI, E. LEONI, M. BERVEGLIERI, G. MIROLO, N. ALVARO, *Hygienic control of mass catering establishments, microbiological monitoring of food and equipment*, *Food Control*, Volume 15, Issue 3, 2004, Pages 205-211, ISSN 0956-7135, [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S0956-7135\(03\)00048-3](HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S0956-7135(03)00048-3).

LEVRINI, L., MANGANO A., MARGHERINI, S., TENCONI, C., VIGETTI D., MUOLLO R., ABBATE G. M. (2016). *ATP Bioluminometers Analysis on the Surfaces of Removable Orthodontic Aligners after the Use of Different Cleaning Methods*. *International Journal of Dentistry*. Article ID 5926941, 6 pages, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5926941>

LITTLE, C., & SAGOO, S. (2009). *Evaluation of the hygiene of ready-to-eat food preparation areas and practices in mobile food vendors in the UK*. *International journal of environmental health research*, 19(6), 431–443. <https://doi.org/10.1080/09603120903079364>

MAIFRENI, M., CIVILINI, M., DOMENIS, C., MANZANO, M., DI PRIMA, R., & COMI, G. (1993). *Microbiological quality of artisanal ice cream*. *Zentralblatt fur Hygiene und Umweltmedizin = International journal of hygiene and environmental medicine*, 194(5-6), 553–570.

*Manuale per la disinfezione.* (1978). Ciba-Geigy, Linea ospedaliera.

MARCOTRIGIANO, V., MAGARELLI, P., SORRENTI, G. T., BERTAMINO, E., DI NINNO, F., DE GIGLIO, O., CAGGIANO, G., MONTAGNA, M. T., ORSI, G. B., & NAPOLI, C. (2019). *Official controls regarding artisanal ice cream shops: public health policies and consumer protection in the Italian and European legislative frameworks.* *Annali di igiene: medicina preventiva e di comunita*, 31(1), 76–85. <https://doi.org/10.7416/ai.2019.2261>

MARRIOT, N. G., GRAVANI, R. B. (2008). *Principles of Food Sanitation.* (A. Tedesco, Trad.; 5 ed). Springer. (Originariamente pubblicato nel 2006).

MAZAHERI, T., CERVANTES-HUAMÁN, B., BERMÚDEZ-CAPDEVILA, M., RIPOLLES-AVILA, C., & RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. (2021). *Listeria monocytogenes* Biofilms in the Food Industry: Is the Current Hygiene Program Sufficient to Combat the Persistence of the Pathogen? *Microorganisms*, 9(1), 181. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010181>

NANTE, N., CERIALE, E., MESSINA, G., LENZI, D., & MANZI, P. (2017). *Effectiveness of ATP bioluminescence to assess hospital cleaning: a review.* *Journal of preventive medicine and hygiene*, 58(2), E177–E183.

OSIMANI, A., GAROFALO, C., CLEMENTI, F., TAVOLETTI, S., & AQUILANTI, L. (2014). *Bioluminescence ATP monitoring for the routine assessment of food contact surface cleanliness in a university canteen.* *International journal of environmental research and public health*, 11(10), 10824–10837. <https://doi.org/10.3390/ijerph111010824>

PARK, J. M., KIM, J. M., HONG, J. W., & YOU, Y. H. (2020). *Microbial control measures for soft ice cream in franchise brands: A comparative analysis of microbial analysis and manufacturing practices.* *Food science & nutrition*, 8(3), 1583–1595. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1446>

SHAUGHNESSY, R. J., COLE, E. C., MOSCHANDREAS, D., HAVERINEN-SHAUGHNESSY, U. (2013) *ATP as a Marker for Surface Contamination of Biological Origin in Schools and as a Potential Approach to the Measurement of Cleaning Effectiveness*. Journal of Occupational and Environmental Hygiene, 10:6, 336-346, DOI: 10.1080/15459624.2013.784633

SHAMA, G., & MALIK, D. J. (2013). *The uses and abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays*. International journal of hygiene and environmental health, 216(2), 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2012.03.009>

SILVA, D. A., DIAS, M. R., COSSI, M. V., CASTILHO, N. P., CAMARGO, A. C., & NERO, L. A. (2016). *Hygiene and Safety in the Meat Processing Environment from Butcher Shops: Microbiological Contamination and Listeria monocytogenes*. Journal of food protection, 79(4), 628–634. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-482>

SOGIN JH, LOPEZ-VELASCO G, YORDEM B, LINGLE CK, DAVID JM, ÇOBO M, WOROBO RW. (2021). *Implementation of ATP and microbial indicator testing for hygiene monitoring in a tofu production facility improves product quality and hygienic conditions of food contact surfaces: a case study*. Appl Environ Microbiol 87:e02278-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.02278-20>.

VAN ARKEL, A., WILLEMSEN, I., & KLUYTMANS, J. (2021). *The correlation between ATP measurement and microbial contamination of inanimate surfaces*. Antimicrobial resistance and infection control, 10(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s13756-021-00981-0>

YAP, M., CHAU, M. L., HARTANTYO, S., OH, J. Q., AUNG, K. T., GUTIÉRREZ, R. A., & NG, L. C. (2019). *Microbial Quality and Safety of Sushi Prepared with Gloved or Bare Hands: Food Handlers' Impact on Retail Food Hygiene and Safety*. Journal of food protection, 82(4), 615–622. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-349>