

### 10.5.8.1 Solidi

### 10.5.8.2 Liquidi

Terreni liquidi o brodi di coltura

## 10.6 SISTEMA NBB-B-TUBES



### 10.6.1 Cos'è

Il sistema NBB-Tubes è un sistema facile, veloce ed intuitivo che permette di impostare un piccolo autocontrollo senza strumentazioni da laboratorio. Si basa sull'utilizzo di NBB-B-tubes ovvero un terreno di coltura liquido in provette per la rapida determinazione di tracce di batteri dannosi alla birra nel lievito e nella birra non filtrata. Coniuga un'analisi microbiologica ad una semplicità d'esecuzione incredibile

#### 10.6.1.1 NBB-B-TUBES

#### 10.6.1.2 NBB-B-AM-TUBES

**NBB®-B-Am** è un terreno di coltura in brodo, nel caso della versione *tubes*, lo si trova in fiale da 10ml, per la rapida e qualitativa determinazione di microrganismi indicatori produttori di biofilm, specialmente lattici e acetici, ma non essendo selettivo permette lo sviluppo anche di lieviti ed altri microrganismi generici come bacilli, clostridi, enterobatteriacee, micrococchi e Klebsiella. Con questo terreno è possibile determinare la presenza significativa di questi microrganismi indicatori semplicemente osservando la torbidità ed il colore della provetta che in presenza di contaminati diverrà gialla e torbida. **NBB®-B-Am** rappresenta dunque un metodo eccellente di controllo dell'igiene ambientale e generico. Grazie a degli opportuni tamponi è possibile valutare la presenza di m.o. indicatori in tutti i punti del processo essendo così sicuri di un ottimale livello igienico.

### Benefici



### 10.6.2 Come si utilizza

Protocollo di impiego ( piccola sezione)

### 10.6.3 Spettro d'azione

Nome del terreno		uso	m.o. targhet
NBB-B-Am	m.o.indicatori	Acqua, mosto	<i>Enterobacter, Rhodotorula, Gluconobacter, Acetobacter</i> , lieviti, batteri lattici, <i>Pectinatus, Megasphaera, E.coli, coliformi</i>
NBB-B	m.o. contaminanti della birra	Birra in tutte le fasi di processo dal momento dell'inoculo del lievito a birra finita	<i>Pectinatus, Megasphaera, Lattobacillus, Pediococcus</i>

### 10.6.4 Limitazioni

#### 10.6.4.1 Precisione

#### 10.6.4.2 Affidabilità

#### 10.6.4.3 Falsi positivi

Il sistema NBB-B-tubes a causa della sua estrema semplicità, spesso fornisce risultati visivi NON attendibili, con una grande frequenza di falsi positivi, ovvero di campioni che risultano contaminati anche se non lo sono, specialmente nel caso del lievito.

Questo è dovuto soprattutto al fatto che il lievito presente nel campione riesce a utilizzare il nutrimento fornito dall’NBB fermentando e abbassando il pH, causando così un viraggio di colore dell’indicatore rosso di clorofenolo.

#### 10.6.4.4 *Correzione (aggiuntina)*

Non si trovano dati certi sulla reale composizione dell’attuale mezzo NBB-B, ma la tabella a fianco mostra la composizione generica del mezzo NBB secondo *Blackwell 2001*. Come abbiamo visto in precedenza il sistema è coinvolto in numerosi falsi positivi, perciò per rendere più efficace il sistema bisogna impedire al lievito di utilizzare il substrato. Scegliamo l’utilizzo della cicloesimide un ottimo antifungino che inibisce completamente l’azione dei lieviti con eccezione della specie *Dekkera*. Questa pratica consiste nell’aggiunta di una goccia di cicloesimide (0,1% for microbiology) sterile all’interno della provetta, tale quantità sarà più che sufficiente per inibire il metabolismo del lievito.

In teoria in questo modo imiteremo l’azione metabolica del lievito, affinché l’alterazione di pH e il

conseguente cambio di colore siano dovuti solamente a contaminazioni batteriche.

#### 10.6.5 Interpretazione dei risultati

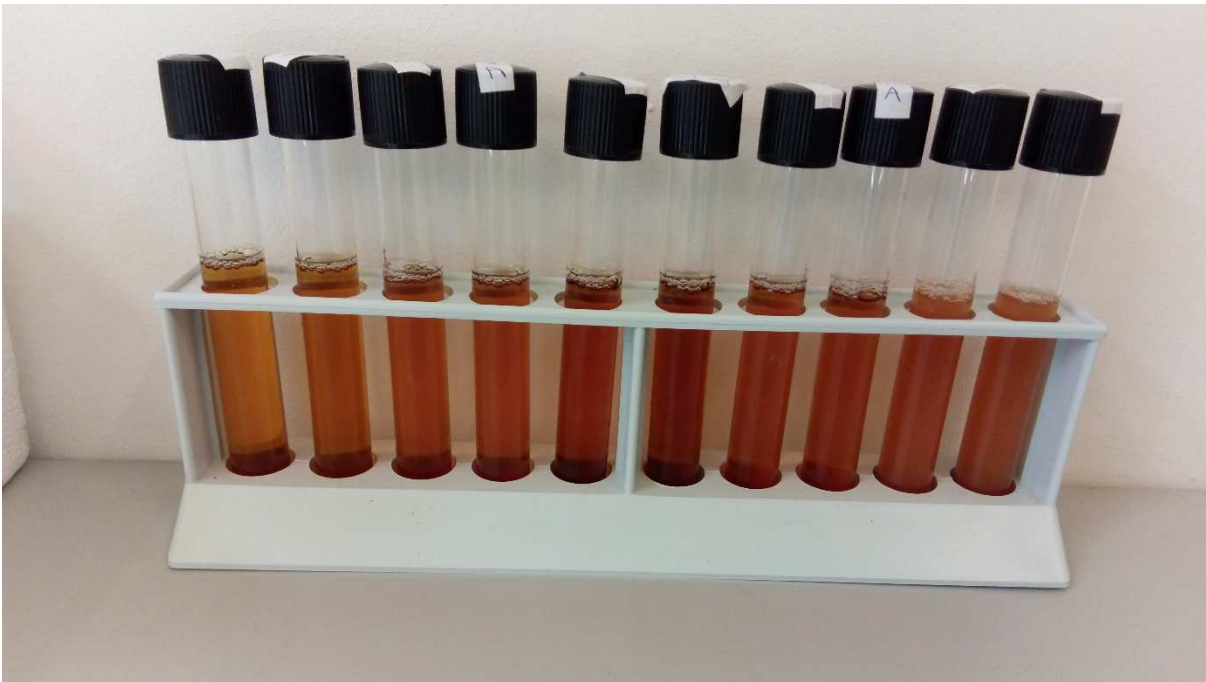
##### 10.6.5.1 *Inoculo campioni*

Campione	ciclohex	descrizione	inoculo 1/09/2017			
			data inoculo NBB	colore NBB	torbidità NBB	pH campione
1	no	birra finita	01/09/2017		Limpido	3,95
2	no	birra finita (marcia)	01/09/2017		Limpido	4,43
3	no	birra scura finita	01/09/2017		Limpido	4,32
4	no	bitter in fermentazione	01/09/2017		Limpido	4,24
5	no	lievito bitter	01/09/2017		torbido	4,38
1a	si	birra finita	01/09/2017		Limpido	3,95
2a	si	birra finita (marcia)	01/09/2017		Limpido	4,43
3a	si	birra scura finita	01/09/2017		Limpido	4,32
4a	si	bitter in fermentazione	01/09/2017		Limpido	4,24
5a	si	lievito bitter	01/09/2017		torbido	4,38

**Table 8.20** Composition of modified NBB medium.

Component	
Casein peptone	5 g
Yeast extract	5 g
Meat extract	2 g
Tween 80	0.5 ml
Potassium acetate	6 g
Sodium phosphate, dibasic	2 g
L-cysteine monohydrochloride	0.2 g
Chlorophenol red	70 mg
Glucose	15 g
Maltose	15 g
L-malic acid	0.5 g
Agar	15 g
Final pH	5.8
Beer/distilled water (1:1) to	1000 ml

*Composizione dell’ NBB medium secondo Blackwell 2001*



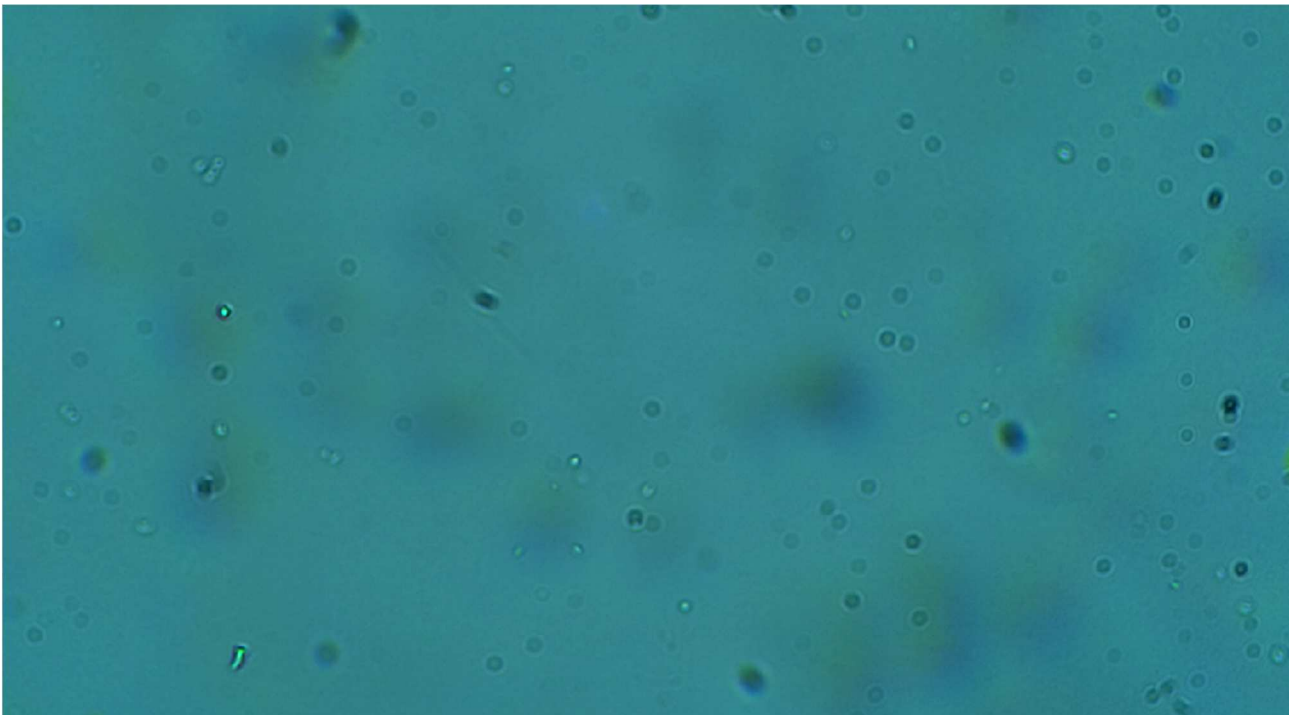
*Inoculo dei campioni*



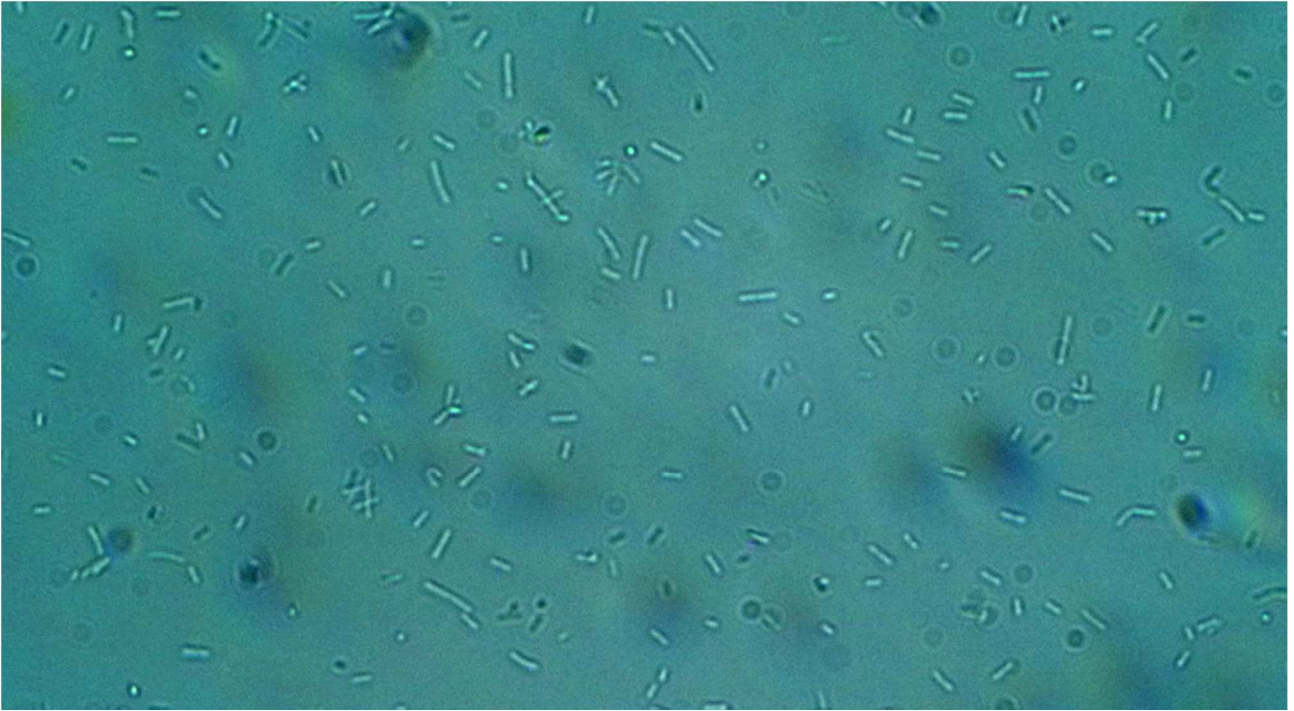
*Inoculo dei campioni*



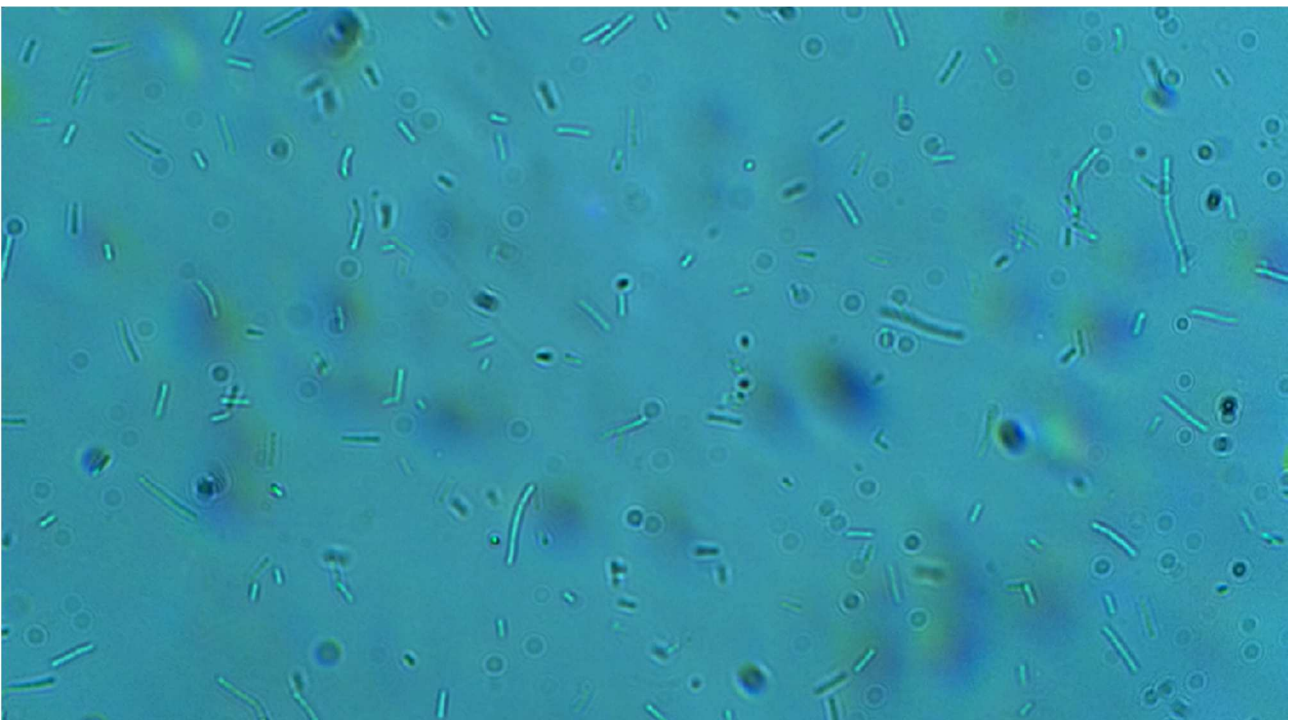
*Osservazione dei risultati dopo giorni di incubazione a 27°C ±1*



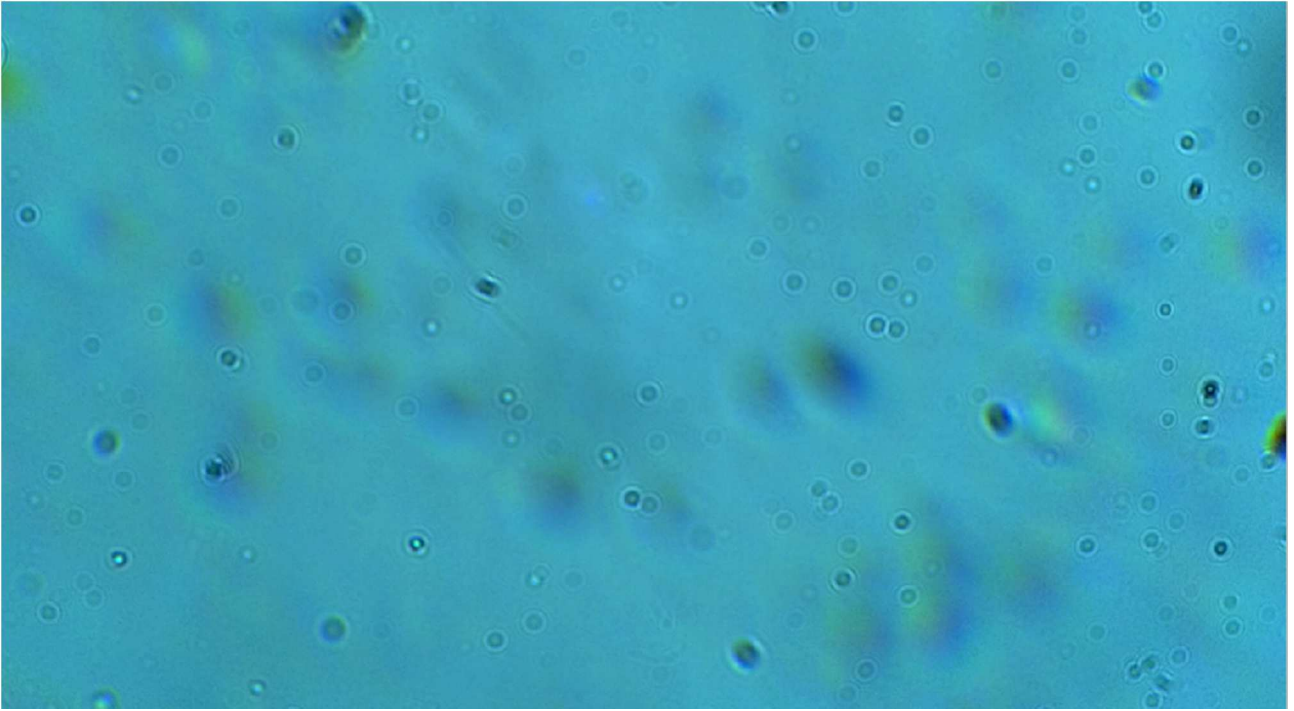
*Campione 1(visione al microscopio 400x) – Non si nota la presenza di batteri, ma di sole cellule di lievito*



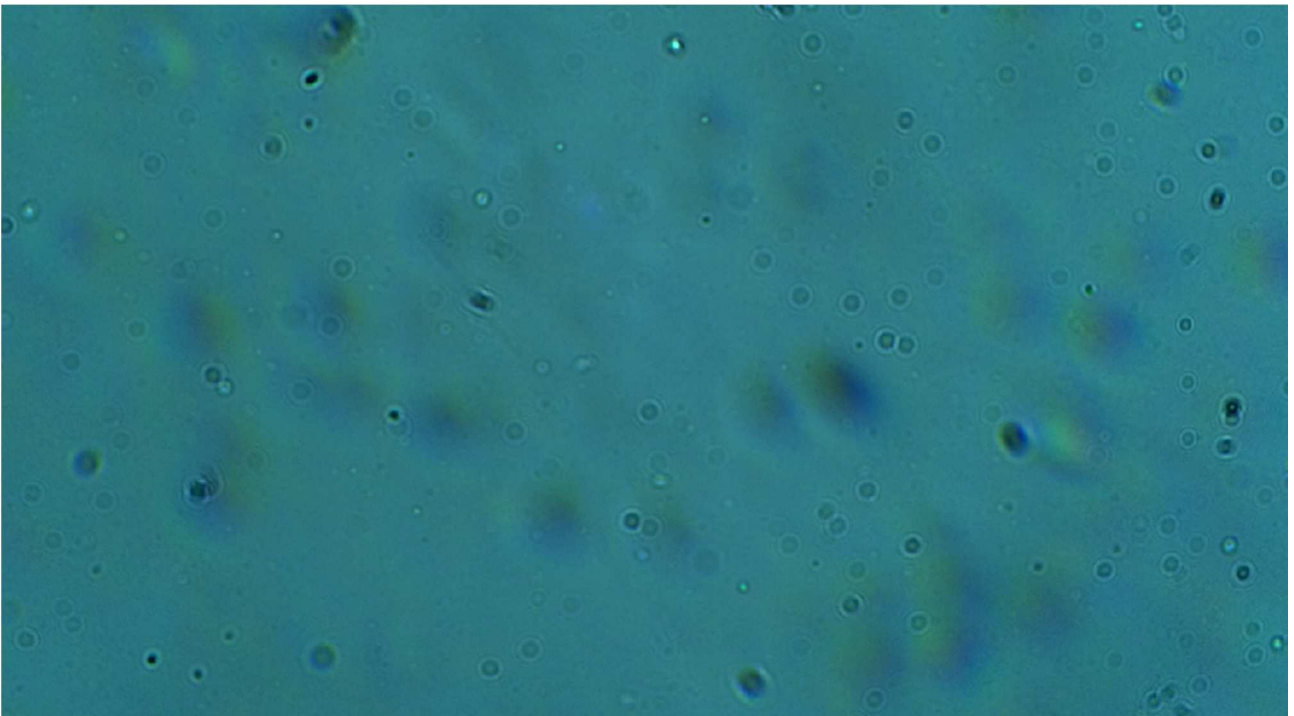
*Campione 2 (visione al microscopio 400x) – Si nota la grande presenza di batteri bacilli*



*Campione 3 (visione al microscopio 400x) – si nota la presenza di batteri bacilli lunghi*



*Campione 4 (visione al microscopio 400x) – Non si nota la presenza di batteri, ma di sole cellule di lievito*



*Campione 5 (visione al microscopio 400x) - Non si nota la presenza di batteri, ma di sole cellule di lievito*

### 10.6.5.2 Risultati

Campione	ciclohex	descrizione	inoculo 1/09/2017				lettura 04/09/2017					Risultato
			data inoculo NBB	colore NBB	torbidità NBB	pH campione	data lettura	colore NBB	torbidità NBB	pH NBB	microscopio	
1	no	birra finita	01/09/2017		Limpido	3,95	04/09/2017	neg	limpido	5,39	no	il campione non presenta contaminazioni
2	no	birra finita (marcia)	01/09/2017		Limpido	4,43	04/09/2017	pos	torbido	4,23	lattici	il campione presenta elevata contaminazione
3	no	birra scura finita	01/09/2017		Limpido	4,32	04/09/2017	neg	torbido	4,72	lattici	il campione presenta elevata contaminazione
4	no	bitter in ferm	01/09/2017		Limpido	4,24	04/09/2017	neg	limpido	5,22	no	il campione non presenta contaminazioni
5	no	lievito bitter	01/09/2017		torbido	4,38	04/09/2017	pos	velato	5,16	no	il campione non presenta contaminazioni
1a	si	birra finita	01/09/2017		Limpido	3,95	04/09/2017	neg	limpido	5,32	no	il campione non presenta contaminazioni
2a	si	birra finita (marcia)	01/09/2017		Limpido	4,43	04/09/2017	pos	torbido	4,24	lattici	il campione presenta elevata contaminazione
3a	si	birra scura finita	01/09/2017		Limpido	4,32	04/09/2017	neg	torbido	4,78	lattici	il campione presenta elevata contaminazione
4a	si	bitter in ferm	01/09/2017		Limpido	4,24	04/09/2017	neg	limpido	5,36	no	il campione non presenta contaminazioni
5a	si	lievito bitter	01/09/2017		torbido	4,38	04/09/2017	pos	velato	5,21	no	il campione non presenta contaminazioni

N.B. In questo test l'aggiunta di cicloesimide risulta completamente superflua poiché lo stesso campione inoculato in NBB-B-tubes con e senza cicloesimide ha portato lo stesso risultato.

## 10.7 IL RIVOLUZIONARIO SISTEMA PETRIFILM 3M

Le piastre 3M Petrifilm rappresentano una tecnologia unica per effettuare le analisi microbiologiche in ambito alimentare. A differenza di analisi microbiologiche di coltura su piastra tradizionali, le piastre petrifilm rappresentano il futuro delle analisi, specialmente in settori quali l'alimentare dove sono necessarie analisi: rapide, affidabili e facili da effettuare.

### 10.7.1 Cos'è

Le piastre 3M <sup>TM</sup>Petrifilm<sup>TM</sup> sono piastre molto sottili, preformate, contenenti il terreno di coltura in forma di gel. Vengono utilizzate per le rapide ricerche quantitative di microrganismi, molto comuni negli ambienti alimentari (Nero et al., 2008).

### 10.7.2 Vantaggi

In pratica, di diverso dalla normale tecnica classica, hanno solamente lo spessore molto limitato, che occupa meno spazio in incubatore

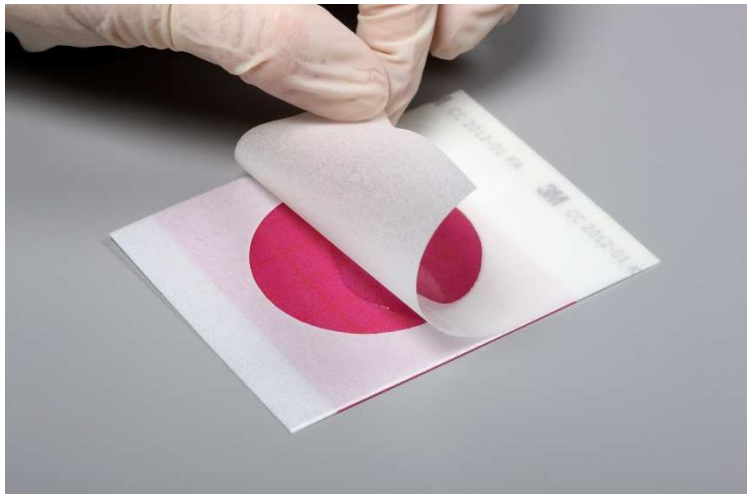
### 10.7.3 Come funziona

### 10.7.4 Come si utilizza

Le piastre petrifilm sono semplicissime da utilizzare

### 10.7.5 Limitazioni

Terreni disponibili





### 10.7.5.1 Precisione

1UFC/ml

### 10.7.5.2 Affidabilità

Le piastre 3M™ Petrifilm™ sono riconosciute da AOAC™ INTERNATIONAL come metodo ufficiale di analisi

### 10.7.6 Tipologie di Petrifilm™ disponibili

Nome del terreno	m.o. Targhet	Selettività
Aerobic count plate	Microflora totale	NO
Enterobacteriaceae count plate	Enterobacteriaceae	SI
Coliform count plate	Coliformi	SI
E.coli/Coliform count plate	E.coli / coliformi	Differenziale
High sensitivity coliform count plate	Coliformi in piccole quantità	SI
E.coli count plate	E.coli	Estrema per E.coli

## 11 ANALISI

---

### 11.1 COME E COSA ANALIZZARE

Molto spesso il birraio si affida ad un laboratorio esterno per il controllo microbiologico delle birre. In questo non vi è nulla di sbagliato anzi affidarsi a degli enti esterni che forniscono analisi è un ottimo sistema, facile ed affidabile. Tuttavia tale sistema risulta costoso se pensiamo di far analizzare ogni singolo lotto di birra, ancor più se capiamo quanto importante non sia l'analisi di purezza della birra, ma quella dell'impianto con cui è prodotta. ***“Da un processo sporco non potranno nascere birre pulite”***

#### 11.1.1 LIMITI

Un criterio microbiologico è un limite specifico legato ad un alimento, nel nostro caso alla birra finita, ma anche ad altre matrici come acqua, mosto e birra in fase di lavorazione. Definisce l'accettabilità di un prodotto sulla base delle condizioni microbiologiche in esso, generalmente questo schema di controllo si attribuisce ad un'analisi dei batteri patogeni, ma nel nostro caso è molto comodo traslare questa esperienza a specifici batteri alteranti.

I criteri microbiologici sono strettamente connessi al piano di campionamento. Infatti, quando si esamina un alimento per la presenza di un microrganismo, i limiti che esso deve rispettare fanno riferimento ad un campione rappresentativo del lotto produttivo (o unità campionaria). Dunque, i criteri microbiologici che definiscono l'accettabilità di un determinato prodotto alimentare, dettano il piano di campionamento da adottare, con particolare riferimento al numero di campioni da sottoporre ad analisi.

Campione	Sensibilità	UFC max accettabili	Terreno	Periodicità analisi
Mosto areato	1 UFC/ml	0 UFC/ml	Generico conta mesofili	Ogni cotta

			NBB-AM petrifilm AC 3M TTC standard	
Lievito	1 UFC/ml	0 UFC/ml	NBB-B-tubes	Ogni recupero
Mosto in fermentazione	1 UFC/ml	0 UFC/ml	NBB-B-tubes	A seconda del piano
Birra in fermentazione	1 UFC/ml	0 UFC/ml	NBB-B-tubes	A seconda del piano
Birra non filtrata	1 UFC/10ml	0 UFC/ml	NBB-B-tubes PETRIFILM LATTICI	Tutti i lotti
Birra filtrata/centrifugata non pastorizzata	1-10 UFC/100ml	< 10 UFC/100ml	MRS AGAR LISYNE PETRIFILM LATTICI	Tutti i lotti
Acqua di risciacquo (CIP)	1UFC/100ml	< 10 UFC/100ml	Generico conta mesofili PCA TTC standard	A seconda del piano

**Table 2**  
Sensitivity required for detection of specific spoilage organisms in brewery samples

Samples	Sensitivity
Cold aerated wort	1 organism per 25 ml
Pitching yeast	1 bacterium per ml and 1 wild yeast per 10 <sup>6</sup> culture yeast
Fermenting wort	1 organism per ml
Tank bottoms	1 organism per ml
Beer in storage	1 organism per ml
Filtered beer	1 beer spoilage organism per 100 ml or 10 <sup>-10</sup> non-beer spoilage organisms per 100 ml
Packaged beer (non-pasteurized or flash pasteurized)	10 <sup>-10</sup> non-beer spoilage organisms per 100 ml
Rinse water (end of cleaning in place)	1 organism per 100 ml

## 11.2 PRELIEVO

Per effettuare una corretta analisi è indispensabile effettuare un buon prelievo, altrimenti i risultati potrebbero essere non rappresentativi del campione, in questo specifico caso parliamo di una contaminazione dovuta al prelievo.

### 11.2.1 Sterilizzazione prelievo

Per quanto riguarda il prelievo dei campioni in ambito birrario fortunatamente ci troviamo sempre di fronte a liquidi facilmente gestibili.

#### Materiale occorrente

- Guanti monouso
- Vasetto sterile: i contenitori per le urine sono i più facilmente reperibili e dal costo minore
- Alcool denaturato o meglio detergente a base di alcool etilico e alcool isopropilico ad azione rapida
- Bunsen portatile (perfetti i bunsen da campeggio con bomboletta usa e getta)

## Procedura

- 1) Spruzzare la soluzione disinfettante sulla valvola preleva campioni
- 2) Aspettare qualche istante che la soluzione agisca
- 3) Ponendo attenzione flambare velocemente la superficie incendiando l'alcool spruzzato, in questo modo andremo a potenziare col calore l'effetto dell'alcool rimuovendone anche gran parte dei residui che altrimenti potrebbero falsare l'analisi
- 4) Far scorrere un'opportuna quantità di campione dal rubinetto senza effettuare il prelievo in modo che il campione risulti più uniforme e che tutti i residui di calore/detergente vengano portati via
- 5) Aprire il contenitore sterile (monouso) e farvi entrare una quantità di campione almeno sufficiente per l'analisi. [consigliabile in questa fase lavorare "sotto fiamma" come descritto in 10.3.1 modo da non contaminare il campione con l'ambiente esterno]
- 6) Risciacquare il rubinetto preleva campioni con abbondante acqua e sanificante in modo che non rimangano residui, in tal modo ci si prepara al meglio per il prossimo prelievo.

### 11.3 CAMPIONAMENTO

Il **campione** è una frazione del lotto rappresentativa dello stesso che viene prelevata per scopi analitici.

Quando si preleva un campione è stabilito un numero minimo di U.C. (unità campionarie) ovvero delle frazioni uguali tra loro e rappresentative del campione che vanno a costituire l'aliquota. Questo serve per avere un'analisi dei dati su più U.C. con risultati più corretti. In genere un'aliquota si compone di 5-9 U.C.

La scelta del campione deve basarsi, quando ciò sia ragionevole, su metodi statisticomatematici volti a definire quantitativamente il numero di unità campionarie necessario e sufficiente per ottenere dall'analisi di queste dei risultati rappresentativi estendibili all'intero lotto da esaminare.

Il campione deve essere rappresentativo, per quanto possibile, della totalità

Il campionamento ai nostri scopi di autocontrollo si basa generalmente su di una sola U.C. per ogni aliquota poiché analizzare più campioni sarebbe più oneroso ed in più rispetto ad altre matrici alimentari, non abbiamo grossi problemi di non uniformità tra i campioni.

#### 11.3.1 Piano di campionamento

Il piano di campionamento è una delle cose più importanti da istituire quando si parla di controllo qualità poiché risulta fondamentale creare uno schema operativo con cui affrontare il controllo in modo da limitare il più possibile il protrarsi di eventuali problematiche nel tempo. Il piano di campionamento o piano d'analisi permette oltre ad avere un corretto modo operativo di campionamento di avere uno storico dei dati.

##### 11.3.1.1 Piano a 2 classi

In questo piano il campione può ricadere in una di due classi: accettato o rifiutato. Dunque questi piani vengono usati per decisioni presenza/assenza.

Gli attributi ideali per questi piani sono:

**n**: numero di unità da campionare e da sottoporre ad analisi; per unità campionaria (u.c.) deve intendersi una porzione singola o confezione di prodotto alimentare scelta a caso su cui si eseguiranno le analisi;

**m**: numero limite di batteri che determina l'inaccettabilità del lotto;

**c**: numero massimo di unità campionarie che possono superare il valore di  $m$  accettate per esprimere l'idoneità del lotto.

Di seguito viene riportato un esempio per illustrare come si interpretano i risultati di un piano a 2 classi.

Es.

$n=5$     $c=2$     $m=0$

***Il lotto è fuori dai criteri se più di 2 u.c. presentano il microrganismo.***

In genere in questi piani  $c=0$ , per cui il campione è accettato solo se tutte le u.c. non superano il limite  $m$ .

#### ***11.3.1.2 Piano a 3 classi***

Le tre classi qualitative per le  $n$  unità campionarie sono identificabili con le seguenti lettere:

**m**: valore limite del numero di batteri; il risultato è considerato soddisfacente se il numero di batteri in tutte le unità campionarie analizzate è inferiore ad  $m$ ;

**M**: valore massimo del numero di batteri tollerato; il risultato è considerato insoddisfacente se il numero di batteri in una o più delle unità campionarie analizzate è superiore ad  $M$ ;

**c**: numero delle unità campionarie il cui valore può essere compreso tra  $m$  ed  $M$ ; il campione viene considerato ancora accettabile se il numero di batteri delle altre unità campionarie è pari o inferiore ad  $m$ .

***Il piano di campionamento a tre classi consente una maggiore flessibilità nell'interpretazione di risultati positivi, ammettendo la possibilità che una piccola proporzione dei campioni analizzati (c) possa superare, entro un certo limite, il valore massimo consentito (m).***

Si considerino i seguenti esempi:

#### **Esempio 1.**

Supponiamo che per le acque di risciacquo siano fissati i seguenti criteri microbiologici:

$n=5$  (scambiatore, fermentatore, maturatore, 2x linea imbott)

$c=1$

$m < 10\text{UFC}/100\text{ml}$

$M=1\text{UFC}/\text{ml}$

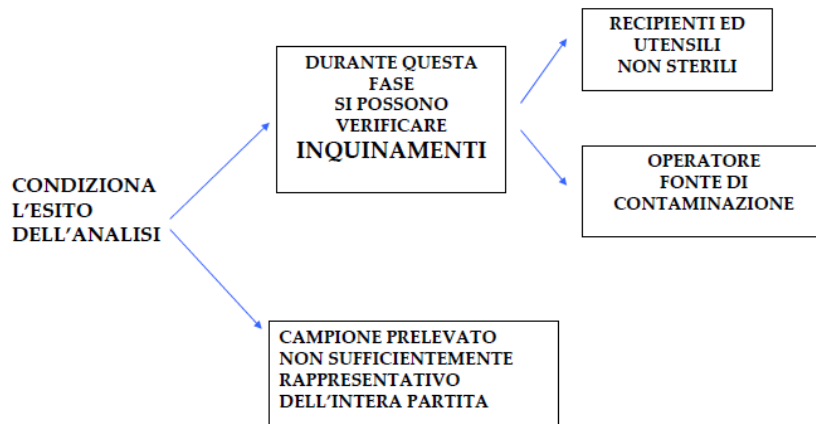
L'analisi microbiologica su ciascuna delle cinque unità campionarie analizzate fornisce i seguenti risultati:

$\text{UFC}/\text{g} = (1); (2); (3); (4); (5)$ .

Giudizio di accettabilità dell'alimento: l'alimento non è accettabile in quanto una delle u.c. (la n° 5) supera il valore massimo del numero di batteri tollerato ( $M=2 \times 10^4$ ).

### 11.3.2 Problematiche relative al campionamento

#### PRIMA FASE ESAME ANALITICO

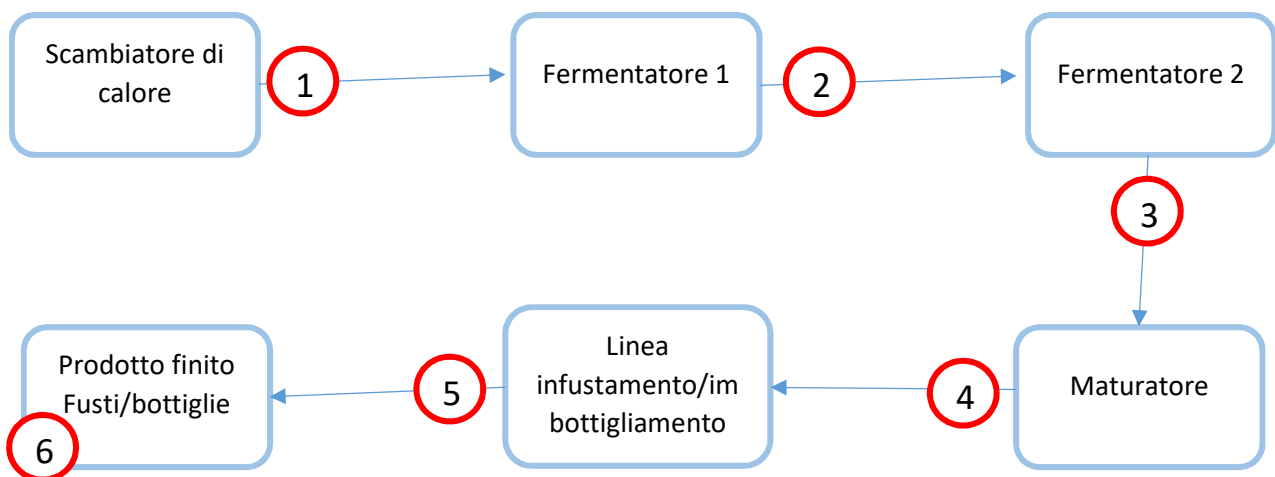


<http://wpage.unina.it/villani/eLAB2.html>

### 11.4 PUNTI DOVE EFFETTUARE L'ANALISI

Lo schema sottostante descrive i punti critici in cui è necessario controllare la qualità microbiologica del prodotto sia esso: birra, acqua o mosto.

Nei punti 1,2,3,4,5 possiamo analizzare la condizione di pulizia dell'attrezzatura mediante l'analisi delle acque di risciacquo con terreno di coltura generico ( PCA o NBB-AM ) preferibilmente in 100ml di campione.



**Tabella Punti di analisi**

CP	Posizione	Matrice	M.O.	Terreno consigliato
1	Uscita dello scambiatore di calore	Mosto/ acqua di risciacquo	Batteri/lieviti generici mesofili. INDICI DI ERRATA PULIZIA	<ul style="list-style-type: none"> <li>NBB-B-AM</li> <li>PCA (10ml)</li> </ul>
2	In fermentazione	Birra verde	Batteri contaminanti nella birra	<ul style="list-style-type: none"> <li>NBB-B-tubes</li> </ul>

				<ul style="list-style-type: none"> <li>• Terreno selettivo con antifungino</li> </ul>
	Dopo lavaggio	Acqua di risciacquo	Batteri/lieviti generici mesofili. INDICI DI ERRATA PULIZIA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PCA (100ml)</li> </ul>
3	In fermentazione	Birra verde	Batteri contaminanti nella birra	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NBB-B-tubes</li> <li>• Terreno selettivo con antifungino</li> </ul>
	Dopo lavaggio	Acqua di risciacquo	Batteri/lieviti generici mesofili. INDICI DI ERRATA PULIZIA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PCA (100ml)</li> </ul>
4	In fermentazione	Birra verde	Batteri contaminanti nella birra	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NBB-B-tubes</li> <li>• Terreno selettivo con antifungino</li> </ul>
	Dopo lavaggio	Acqua di risciacquo	Batteri/lieviti generici mesofili. INDICI DI ERRATA PULIZIA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PCA (100ml)</li> </ul>
5	In fermentazione	Birra verde	Batteri contaminanti nella birra	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NBB-B-tubes</li> <li>• Terreno selettivo con antifungino</li> </ul>
	Dopo lavaggio	Acqua di risciacquo	Batteri/lieviti generici mesofili. INDICI DI ERRATA PULIZIA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PCA (100ml)</li> </ul>
6	Prodotto finito	Birra finita	Batteri e lieviti contaminanti nella birra	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PCA, WLD, LISYNE, MRS, con aggiunta di selettivo antifungino</li> </ul>

## VEDI MANUALE DEL BIRRAIO PRATICO

### 11.4.1 Frequenza di campionamento

Per stabilire una frequenza di campionamento è necessario stabilire un **“piano di campionamento”** con lo scopo di rendere costanti e quindi affidabili i controllo qualitativi eseguiti in birrificio. Proprio per questo motivo non sono un grande fan delle analisi “a Spot” (non continuative) in genere effettuate conto terzi da granparte dei microbirrifici. Questo tipo di analisi non permette la rilevazione anticipata del rischio con spesso un risultato non utile.

### 11.4.2 ANALISI A CASCATA

Più che una metodica analitica, l’analisi a cascata rappresenta un sistema logico per non far analisi inutili. Ipotizziamo ad esempio di avere una birra che risulta “acida e poco gradevole” di sicuro la prima cosa che ci viene in mente è di fare un analisi sulla birra stessa il che non è assolutamente sbagliato tuttavia questo in genere non farà che confermare le nostre precedenti convinzioni.

Ritengo invece un analisi molto più utile quella delle varie fasi critiche di produzione, quelle dove un successivo lotto di birra potrebbe ulteriormente contaminarsi, come il precedente, causa probabile di un punto cieco che non si riesce a lavare correttamente.