

# RILIEVI MICROBIOLOGICI E CHIMICI IN GASTEROPODI TERRESTRI COMMERCIALIZZATI NELLA REGIONE SARDEGNA

## **MICROBIOLOGICAL AND CHEMICAL TESTING OF FOOD SNAILS MARKETEDS IN SARDINIA**

Tedde T. <sup>1</sup>, Virgilio S. <sup>1</sup>, Chessa G. <sup>1</sup>, Fiori G. <sup>1</sup>, Terrosu G. <sup>1</sup>, Rosa M.N. <sup>1</sup>, Pinna C. <sup>2</sup>, Piras G. <sup>2</sup>

(<sup>1</sup>) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari

(<sup>2</sup>) Azienda Sanitaria Locale - Servizio Veterinario Igiene Alimenti O.A., Sassari

### **SUMMARY**

A total of 29 samples of snails belonging to the species *Helix aspersa*, *Helix aperta* and *Helix vermiculata* were analysed for the presence of *Salmonella* spp. and *Clostridium perfringens*; Cadmium and Lead concentrations were determined by ICP-MS. One sample contained *Salmonella* sp.; *Clostridium perfringens* were not detected. The means of toxic metals (expressed as mg/Kg wet weight) were the following: Cd 0,995, Pb 0,274.

### **Key words**

Food snails, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, toxic metals.

### **INTRODUZIONE**

I gasteropodi terrestri, comunemente denominati "chioccioline", costituiscono un prodotto alimentare di nicchia tradizionalmente apprezzato da alcune fasce di consumatori del nord Sardegna (1). Le specie di chioccioline maggiormente consumate sono *Helix aspersa*, *Helix aperta* e *Helix vermiculata*; la loro presenza sul mercato varia nel corso dell'anno, con una diminuzione nella stagione invernale e un aumento in quella estiva, nella quale le chioccioline, in fase di opercolarmento, si preservano maggiormente. La raccolta in natura ai fini del consumo domestico, ancora ben radicata in diversi territori dell'Isola, si stima in costante diminuzione, mentre nel circuito commerciale è possibile reperire una sempre maggiore quantità di chioccioline vive già spurgate e pronte alla cottura, provenienti in prevalenza dal mercato extracomunitario. Tali prodotti sono per

la maggior parte importati da Paesi del nord Africa (in particolare Tunisia e Algeria), nei quali si effettua di norma la raccolta in natura. Relativamente alle quantità importate nel mercato regionale della Sardegna, si è verificato nell'ultimo decennio un incremento medio annuale costante superiore al 7%, con oltre 14.000 quintali nel 2007 (2).

Dal punto di vista normativo, la produzione delle chioccioline rientra nel campo di applicazione del Reg. CE n. 852/04 (3), mentre l'eventuale trasformazione viene disciplinata dal Reg. CE n. 853/04 (4); non esiste tuttavia una normativa di settore che definisca requisiti specifici di natura microbiologica e/o chimica per tali prodotti.

In considerazione del rischio derivante dalla possibile presenza di microrganismi potenzialmente patogeni nelle preparazioni gastronomiche che non prevedono la cottura prima del consumo (5) e stante la necessità di acquisire dati aggiornati sulla even-

tuale contaminazione da metalli pesanti, si è ritenuto utile acquisire informazioni di natura microbiologica e chimica su un numero significativo di campioni di chioccioline commercializzate nella Regione Sardegna.

## MATERIALI E METODI

Nel periodo compreso tra i mesi di luglio del 2008 e gennaio del 2009 sono stati sottoposti ad accertamenti di laboratorio n. 29 campioni di chioccioline selezionati da altrettante partite presenti nel circuito commerciale, sia all'ingrosso che al dettaglio, e provenienti dal mercato regionale (2 campioni), nazionale (2 campioni) e da quello extracomunitario (Algeria, Tunisia, Ecuador, 25 campioni). I campioni di chioccioline, appartenenti alle specie *Helix aspersa*, *Helix aperta* e *Helix vermiculata* sono stati prelevati dal Servizio Veterinario di Igiene degli Alimenti di O.A. della A.S.L. territorialmente competente. Sui campioni è stata effettuata la ricerca di microrganismi del genere *Salmonella spp.* e di *Clostridium perfringens* e la determinazione dei metalli tossici Cadmio e Piombo. Da ciascuna partita sono state prelevate 5 aliquote del peso di circa 300 g ciascuna e con un numero medio di esemplari pari a 50. Per la ricerca di *Salmonella spp.* è stata utilizzata la metodica indicata nella norma ISO 65790:2002 che prevede, in sintesi, una fase di prearricchimento della quantità di saggio (25 g) in acqua peptonata tamponata, una fase di arricchimento selettivo in brodo e una fase di isolamento su terreni selettivi, con successive prove biochimiche e sierologiche di conferma. La ricerca di *Clostridium perfringens* è stata effettuata con la metodica descritta nella norma ISO 7937:2004., che prevede la semina su specifico terreno selettivo e incubazione in anaerobiosi, con successive prove biochimiche e sierologiche di conferma. Le determinazioni del Cadmio e del Piombo sono state eseguite sottoponendo i campioni ad accurato lavaggio, separazione dal guscio e preparazione di un omogenato; 1 g di campione così ottenuto è stato addizionato a 2 ml di HNO<sub>3</sub> e mineralizzato in forno a microonde. La soluzione del mineralizzato è stata trasferita in contenitori di polipropilene e diluita con H<sub>2</sub>O MilliQ al volume di 50 ml. La Tale soluzione così ottenuta è stata ulteriormente diluita nel rapporto di 1: 5 ml con H<sub>2</sub>O MilliQ prima della lettura strumentale; quest'ultima è stata eseguita mediante tecnica ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer*). Le concentrazioni di Cadmio e Piombo così ottenute sono state utilizzate nella stima della valu-

tazione del rischio da esposizione associato al consumo dell'alimento chiocciola (tab. 5). Tale stima è stata valutata ipotizzando un consumo medio di chioccioline di circa 50 g per settimana (6). Il dato di assunzione settimanale (*eEstimated Wweekly Intake*, EWI), calcolato per adulto (p.c. pari a 70 kg) è stato quindi comparato con i valori della dose settimanale tollerabile provvisoria (*Provisional Tolerable Weekly Intake*, PTWI) stabiliti dal Comitato congiunto di esperti FAO/OMS sugli additivi alimentari (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JEFCA) (7).

## RISULTATI

Tutti i campioni analizzati per la ricerca di *cClostridium perfringens* sono risultati con cariche < 10 UFC<sub>cfu</sub>UFC/g, mentre *sSalmonella spp* è stata isolata in n. 1 campione di chioccioline appartenente alla specie *hHelix aspersa* (tab. 1) di provenienza extracomunitaria. Relativamente alle determinazioni chimico - tossicologiche, i campioni di chioccioline esaminati hanno presentato una concentrazione media di cadmio pari a 0,995 mg/kg, con una deviazione standard di 0,567. mg/kg. In particolare, il valore di cadmio rilevato nelle diverse specie ha evidenziato una maggiore concentrazione del metallo nella specie *hH. vVvermiculata* (tab. 2). La concentrazione media di pPiombo, nella totalità dei campioni esaminati, è risultata pari a 0,274 mg/Kg, con una deviazione standard di 0,190 ed una maggiore contaminazione dei campioni di chioccioline appartenenti alla specie *hH. aAperta* (tab. 3). I RISULTATI OTTENUTI SONO STATI UTILIZZATI NELLA STIMA DELLA VALUTAZIONE DEL RISCHIO DA ESPOSIZIONE ASSOCIATO AL CONSUMO DELL'ALIMENTO CHIOCCIOLA (TAB. 5). TALE STIMA È STATA VALUTATA IPOTIZZANDO UN CONSUMO MEDIO DI CHIOCCIOLINE DI CIRCA 50 G PER SETTIMANA (6). IL DATO DI ASSUNZIONE SETTIMANALE (*ESTIMATED WEEKLY INTAKE*, EWI), CALCOLATO PER ADULTO (P.C. PARI A 70 KG) È STATO QUINDI COMPARATO CON I VALORI DELLA DOSE SETTIMANALE TOLLERABILE PROVVISORIA (*PROVISIONAL TOLERABLE WEEKLY INTAKE*, PTWI) STABILITI DAL COMITATO CONGIUNTO DI ESPERTI FAO/OMS SUGLI ADDITIVI ALIMENTARI (*JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES* (JEFCA) (7). In tabella 5 sono riportate le concentrazioni medie di cCadmio e pPiombo rilevate nei campioni esaminati, la stima dell'introduzione settimanale (EWIewi) mediante il

consumo di chiocchie e la percentuale sulla *pProvisional tTolerable wWeekly iIntake*. Tale valutazione risulta di grande utilità in quanto consente di stabilire in quale misura il consumo del prodotto in esame possa incidere sulla dose - soglia di sicurezza, la quale deve tener conto del contributo di ogni singolo alimento costituente il pasto completo.

Per quanto riguarda il calcolo della dose-soglia di sicurezza dei metalli, i dati ottenuti mostrano una elevata diversità a seconda del metallo considerato. Il livello di assunzione stimato per il Piombo è pari a 0,8% della soglia d'esposizione; tale valore si somma alle quantità di metallo introdotte con gli

altri alimenti che compongono la dieta. Significativamente più elevata risulta invece la percentuale di esposizione al cadmio; il consumo settimanale stimato di chiocchie comporterebbe, infatti, un livello di assunzione del metallo pari al 10 % del valore soglia di sicurezza.

## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

I gasteropodi terrestri rappresentano alimenti particolarmente apprezzati da alcune fasce di consumatori e, in alcune Regioni, rientrano a pieno ti-

Tab. 1 Prevalenza di *Salmonella spp* in relazione alle specie di chiocchie esaminate

Specie	Campioni esaminati	
	Totale n.	Positivi
<i>Helix aperta</i>	8	0
<i>Helix aspersa</i>	10	1
<i>Helix vermiculata</i>	11	0

Tab. 2 Concentrazione di Cadmio (mg/kg) in relazione alle specie di chiocchie esaminate

Specie	media	dev. st.	min.	Max
<i>Helix aperta</i>	0,924	0,510	0,147	1,480
<i>Helix aspersa</i>	0,851	0,549	0,317	2,150
<i>Helix vermiculata</i>	1,202	0,625	0,580	2,500

Tab. 3 Concentrazione di Piombo (mg/kg) in relazione alle specie di chiocchie esaminate

Specie	media	dev. st.	min.	Max
<i>Helix aperta</i>	0,435	0,258	0,100	0,759
<i>Helix aspersa</i>	0,318	0,140	0,098	0,562
<i>Helix vermiculata</i>	0,124	0,039	0,057	0,168

Tab. 5 Stima dell'introduzione settimanale (EWI) di Pb e Cd mediante consumo di chiocchie e % sul PTWI

	Piombo	Cadmio
Concentrazione media ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	274	995
Consumo settimanale	50g	50g
PTWI ( $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{week}$ )	25	7
EWI** ( $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{week}$ )	0.20	0.7
% PTWI	0.8	10

\*\* la stima del livello d'assunzione settimanale EWI (*Evaluation Weekly Intake*) riportata in tabella 5 è stata calcolata moltiplicando il valore di concentrazione media per la quantità in peso della porzione settimanale diviso il peso standard di un adulto convenzionalmente fissato in 70.01 kg.

tolo nella cucina tradizionale. Nella Regione Sardegna, il consumo di chiocchie rientra a pieno titolo nella tradizione gastronomica locale e, come testimoniato dal progressivo aumento delle quantità importate, incontra un sempre maggiore favore.

La presente indagine ha permesso di acquisire informazioni aggiornate sull'entità della contaminazione microbiologica e chimica di chiocchie di prevalente provenienza extracomunitaria utilizzate a scopo alimentare nel nord Sardegna. Relativamente alla contaminazione da *Salmonella sp.*, il microrganismo è stato isolato in n. 1 campione della specie *Helix aspersa*. La presenza di microrganismi del genere *Salmonella* nell'alimento, pur rappresentando un fattore di rischio, deve essere correlata fondamentalmente alla tipologia di trattamento a cui l'alimento viene sottoposto prima del consumo, risultando evidente come una adeguata cottura possa determinare l'eliminazione del pericolo. Il rischio sanitario per il consumatore aumenta ovviamente nei casi in cui le preparazioni gastronomiche non prevedano trattamenti di bonifica. Non deve tuttavia essere trascurata la possibilità che, durante la eventuale manipolazione delle chiocchie negli stabilimenti e nelle cucine, possa verificarsi la contaminazione crociata di altri alimenti che non prevedano un successivo trattamento termico prima del consumo e/o già cotti ed in fase di raffreddamento (8).

Per quanto riguarda la presenza dei metalli tossici, a livello nazionale e comunitario non esistono attualmente norme che disciplinano i livelli massimi di concentrazione consentiti nei gasteropodi terrestri destinati al consumo umano. In base al Reg. CE n.1881/2006 (9), i tenori massimi di metalli pesanti presenti nella parte edule di molluschi bivalvi, che per le loro caratteristiche biologiche possono in parte essere accomunati ai gasteropodi terrestri, sono stabiliti sui seguenti valori: Cadmio 1,0 mg/kg sul fresco, Piombo 1,5 mg/kg sul fresco (10).

Valutando la conformità ai limiti sopracitati, si osserva che, per le concentrazioni di Cadmio su 29 campioni esaminati, 8 (27%) superano la concentrazione di 1,0 mg/kg, mentre per il Piombo si registra, nella totalità della popolazione esaminata, un livello inferiore ad 1,5 mg/kg.

Le concentrazioni medie di Cadmio e Piombo rilevate nei campioni esaminati, la stima dell'introduzione settimanale (ewi) mediante il consumo di chiocchie e la percentuale sulla *Provisional Tolerable Weekly Intake* sono riportate in tabella 5. Tale valutazione risulta di grande utilità in quanto consente di stabilire in quale misura il consumo del prodotto in esame possa incidere sulla dose - soglia di

sicurezza, la quale deve tener conto del contributo di ogni singolo alimento costituente il pasto completo.

Valutando la conformità ai limiti sopracitati, si osserva che, per le concentrazioni di Cadmio su 29 campioni esaminati, 8 (27%) superano la concentrazione di 1,0 mg/kg, mentre per il Piombo si registra, nella totalità della popolazione esaminata, un livello inferiore ad 1,5 mg/kg.

In tabella 5 sono riportati le concentrazioni medie di Cadmio e Piombo rilevate nei campioni esaminati, la stima dell'introduzione settimanale (EWI) mediante il consumo di chiocchie e la percentuale sulla *Provisional Tolerable Weekly Intake*. Tale valutazione risulta di grande utilità in quanto consente di stabilire in quale misura il consumo del prodotto in esame possa incidere sulla dose - soglia di sicurezza, la quale deve tener conto del contributo di ogni singolo alimento costituente il pasto completo.

Per quanto riguarda il calcolo della dose-soglia di sicurezza dei metalli, i dati ottenuti mostrano una elevata diversità a seconda del metallo considerato. Il livello di assunzione stimato per il Piombo è pari a 0,8% della soglia d'esposizione; tale valore si somma alle quantità di metallo introdotte con gli altri alimenti che compongono la dieta. Significativamente più elevata risulta invece la percentuale di esposizione al cadmio; il consumo settimanale stimato di chiocchie comporterebbe, infatti, un livello di assunzione del metallo pari al 10 % del valore soglia di sicurezza. Le chiocchie non rappresentano certamente un alimento preponderante della dieta quotidiana: il loro consumo è sicuramente saltuario e legato quasi esclusivamente a particolari abitudini alimentari locali. Il livello di contaminazione riscontrato risulta tuttavia non trascurabile. Tale aspetto desta ancor più preoccupazione in considerazione del fatto che i prodotti alimentari rappresentano la principale fonte di assunzione di Cadmio per l'uomo. A tale proposito è importante richiamare quanto segnalato dal *Scientific Committee on Food* che, a seguito del risultato di indagini effettuate per la valutazione dell'esposizione alimentare, raccomanda agli Stati membri di intensificare gli sforzi per ridurre l'esposizione alimentare al Cadmio e invita ad adottare misure volte a ridurre quanto più possibile la presenza di questo elemento negli alimenti. Il gruppo di esperti scientifici EFSA sui contaminanti nella catena alimentare dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare ha ridotto la dose settimanale ammissibile PTWI per il cadmio a 2,5 microgrammi per chilogrammo di peso corporeo, basandosi sull'analisi di nuovi dati (11).

Nel presente lavoro sono stati eseguiti accertamenti microbiologici e chimici su un numero di campioni limitato e altamente diversificato per luogo di produzione, specie e taglia. Tali parametri intervengono significativamente sul livello di accumulo dei metalli e andrebbero pertanto maggiormente investigati (12), (13). Uno studio più accurato, riguardante anche gli aspetti riportati, e finalizzato alla definizione dei livelli di contaminazione da metalli pesanti sul prodotto commercializzato nel nostro Paese sarebbe pertanto auspicabile.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Arru E., Marceddu L. (1976). Atti Convegno sulla Chiocciola, Approvvigionamento e consumo dei molluschi terrestri in Sardegna, 5 dicembre 1976, 61, 1976
- 2) Istituto Internazionale di Elicicoltura di Cherasco (2008). Il mercato delle chioccioline Helix, [www.lumache-elici.com](http://www.lumache-elici.com), Cherasco, 30/03/2009
- 3) Regolamento (CE) n. 852/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 sull' Igiene dei prodotti alimentari
- 4) Regolamento (CE) N. 853/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale
- 5) Marongiu E., Virgilio S., Sias S., Santoru F. (1993). Aspetti igienico-sanitari di chioccioline utilizzate a scopo alimentare in Sardegna. Atti XLVII Congresso. Nazionale. Società. Italiana. Scienze Veterinarie, Riccione, 29 settembre- 2 ottobre 1993
- 6) Consumi in aumento in Italia, le chioccioline sempre più forti nel paniere alimentare (2007). Rivista di Elicicoltura, n. 1, aprile, pag. 3
- 7) <http://www.codexalimentarius.net/web/jecfa.jsp>, 30/03/2009
- 8) Wallace H. Andrews, Clyde R. Wilson, Aida Romero, and Paul L. Poelma (1975). The Moroccan Food Snail, *Helix aspersa*, as a source of Salmonella. Applied Microbiology, 29 (3), 328-330
- 9) Regolamento CE n. 1881/2006 Tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari, modif. da Reg. CE n. 1126/2007 e Reg. CE n. 629/2008
- 10) Scaffardi E., Ru G., Giordana G. (2007). "Il Chirone" edizione n° 1, anno 2007. Accumulo di metalli pesanti in chioccioline della specie *Helix pomatia* L. (Pulmonata, Helicidae) destinate al consumo umano, Brescia, 8-11
- 11) Cadmium in food - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain (2009). The EFSA Journal 980, 1-139
- 12) W. B. Rabitsch (1996). Metal Accumulation in Terrestrial Pulmonates at a Lead/Zinc Smelter Site in Arnoldstein, Austria. Bull. etin of Environmental Contamination. Toxicology., 56:734-741
- 13) Dallinger, R., Wieser, W. (1984). Patterns of accumulation, distribution and liberation of Zn, Cu, Cd and Pb in different organs of the land snail *Helix pomatia* L. Comparative Biochemistry and Physiology C 79 (1), 117 - 124