

# COMPORAMENTO DI *Aeromonas hydrophila* IN CAMPIONI DI PESCE SPADA SALATO

## **BEHAVIOUR OF *Aeromonas hydrophila* IN SALTED SWORDFISH SAMPLES**

Giuffrida A., Giarratana F., Gervasi E., Bucca M., Ruolo A., Ziino G.  
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria– Università di Messina

### **SUMMARY**

A challenge test for *Aeromonas hydrophila* in salted swordfish samples was carried out. Particularly, 24 samples (250g) were experimentally contaminated, salted and stored at two different temperature regimes (fluctuating – F group - and non fluctuating – NF group – regime). The count of *A. hydrophila*, *Enterobacteria* and Lactic acid bacteria (LAB) as well as the determination of pH and aw were performed at 0, 19 43, 163, 187, 230, 320 and 368 hours whereas the temperature was monitored continuously by using 6 data-loggers. In both group, the mean concentrations of *A. hydrophila* did not exceed Log 3 cfu/g and decreased below the mean value of Log 1 cfu/g after 368 hours. However in the F group the *A. hydrophila* growth was slower and the decrease appeared slightly higher than NF group and this suggests the temperature fluctuations induces a more pronounced behaviour variability of *A. hydrophila* under stressing conditions.

### **Key words**

Salted swordfish; *Aeromonas hydrophila*; fluctuating temperature; food safety.

### **INTRODUZIONE**

Nonostante i prodotti della pesca non possano considerarsi tra quelli maggiormente responsabili di malattie alimentari umane, il loro contributo in tale senso non appare affatto trascurabile (2, 4). Classicamente, le cause predominanti sono di natura chimico-tossicologica, mentre gli episodi ascrivibili a cause microbiche rimangono prevalentemente limitati al consumo di determinati prodotti consumati crudi o poco cotti (2, 4). Relativamente a tali alimenti, oltre ai ben noti Molluschi Eduli Lamellibranchi, l'attenzione degli igienisti si è spostata, in quest'ultimo decennio, sui numerosi prodotti ittici pronti al consumo, spesso caratterizzati da tecnologie di produzione particolarmente blande e finalizzate al mantenimento di parametri organolettici simili a quelli delle materie prime non trasformate. In questo contesto si inserisce, notoria-

mente, il problema *Listeria monocytogenes* nei prodotti ittici affumicati, considerata la discreta distribuzione del microrganismo negli ambienti acquatici, la sua elevata resistenza a numerosi stressori tecnologici e la sua psicrotrofia. Considerazioni simili potrebbero essere fatte, tuttavia, anche per altri microrganismi maggiormente presenti negli ecosistemi dulciacquicoli e marini e parimenti psicrotrofi. Tra questi va, senz'altro, ricordato *Aeromonas hydrophila*, la cui presenza negli organismi acquatici è ampiamente documentata (3). Peraltro, tale microrganismo, oltre ad essere un noto patogeno opportunista degli anfibi e dei pesci d'acqua dolce, comincia ad essere sempre più frequentemente isolato anche nei pesci marini, sia in casi di patologie condizionate che, se pur in concentrazioni piuttosto basse, quale normale costituente della microflora cutanea, branchiale ed intestinale (5). Recentemente, peraltro, è stata documentata (5) la sua capacità di

moltiplicazione sulle superfici di Orate allevate, naturalmente contaminate, in corso di stoccaggio a refrigerazione.

La presenza di *A. hydrophila* nei prodotti ittici affumicati non è frequentemente segnalata, probabilmente a fronte della sua scarsa resistenza all'affumicamento (6), anche allorquando questo venga effettuato, come nella maggior parte dei casi, a freddo. Non sembrano, invece, sussistere sufficienti certezze al riguardo per quanto attiene ai numerosi prodotti ittici innovativi la cui tecnologia si basa su blandi trattamenti di salagione ed essiccamento che, sempre più spesso, vedono l'impiego di tranci di grossi pelagici quali il Tonno, il Marlin e il Pesce spada.

Sulla base di tali presupposti, lo scopo del presente lavoro è stato quello di effettuare un challenge test per *Aeromonas hydrophila* in campioni di pesce spada salato valutando, nel contempo, altri parametri igienici e fisico-chimici potenzialmente influenti sul comportamento del microrganismo.

## MATERIALI E METODI

L'indagine è stata condotta a partire da kg 6 di muscolatura di *Xiphias gladius* congelato (3 tranci di circa 2 kg ciascuno) che venivano scongelati nell'arco di 48 ore, mediante mantenimento in cella frigorifera a 4°C. I tranci, dopo suddivisione in pezzi da 500 g ciascuno e dello spessore di 4 cm circa, venivano avviati alla salagione previa contaminazione con una sospensione di *A. hydrophila*. In particolare, tale operazione veniva effettuata allestendo una sospensione di 10 L di acqua con concentrazione del batterio pari a circa Log 5 ufc/ml, nella quale i campioni di muscolatura venivano fatti sottostare per 30 minuti. Dopo altri 30 minuti di asciugatura in cella frigo a 3°C, i campioni venivano salati per 1 ora in salamoia al 20%. Alla fine del processo di salagione, i campioni venivano ulteriormente suddivisi in pezzature da 250g e sottoposti ad un periodo di asciugatura di 48 ore, a temperatura di 6 / 8 °C. Al termine di tale fase, tutti i campioni venivano confezionati sottovuoto, previa apposizione, sulla superficie e nella profondità di alcuni di essi, di 6 datalogger per il controllo continuo della temperatura (sonda FT8000, Econorma). I campioni venivano, dunque, suddivisi in due sottogruppi e sottoposti a due diversi regimi di stoccaggio: il primo prevedeva un mantenimento a temperatura costante di 6°C (gruppo NF) mentre il secondo (gruppo F) veniva stoccato operando, manualmente, incrementi e decrementi della T del frigorifero, che da 6°C determinavano un innalzamento fino a 10°C

(temperatura mantenuta per 1 ora) e un successivo decremento fino a 2°C (temperatura mantenuta per 30 minuti).

Le determinazioni analitiche venivano effettuate subito dopo la contaminazione (ora 0) e dopo 19, 43, 163, 187, 230, 320 e 368 ore. Queste, effettuate in triplice per ogni campione analizzato (da 2 a 4 campioni per ogni intervallo di tempo), riguardavano:

- la valutazione del pH, con pHmetro WTW pH330i (Hana Instruments);
- la valutazione dell'aw, con misuratore AquaLab Serie 3TE (Steroglass);
- la determinazione degli Enterobatteri (VRBA agar x 24 a 37°C)
- la conta dei batterici lattici (LAB) (MRS agar x 48h a 37°C, in condizioni di anaerobiosi)
- la conta di *Aeromonas* mediante semina in GSP (Merk) (24 / 48h a 35°C).

Il controllo della T interna ed esterna dei campioni effettuato mediante datalogger FT-800 (Econorma, Treviso), si realizzava impostando le rilevazioni ogni 14 minuti. I dati venivano, successivamente trasferiti in formato elettronico ed elaborati per la valutazione della curva termica media.

## RISULTATI

I risultati degli andamenti di *A. hydrophila*, degli Enterobatteri e dei LAB sono riportati, rispettivamente, nelle figure 1, 2 e 3. Relativamente ad *A. hydrophila*, appare evidente come a fronte di una crescita massima attestata tra la 163<sup>ma</sup> (Gruppo NF) e la 230<sup>ma</sup> (Gruppo F) ora, si è osservato, successivamente, un lieve e progressivo decremento fino a valori medi inferiori a Log 1 cfu/g. A ciò si aggiunge che i suddetti dati medi sono caratterizzati da un'elevatissima deviazione standard, considerata l'alta percentuale di campioni negativi (concentrazione < Log 1 ufc/g - Figg. 4 e 5). In relazione, ancora, ai due gruppi di campioni considerati, la disamina della fig. 3 indicherebbe un effetto lievemente inibente delle fluttuazioni termiche sulla crescita di *A. hydrophila*, specie a partire dalla 187<sup>ma</sup> ora. Tale effetto sembrerebbe essersi manifestato anche sull'andamento degli Enterobatteri (fig. 2) specie tra la 157<sup>ma</sup> e alla 230<sup>ma</sup>. Al riguardo, è interessante notare che tale periodo corrisponde a quello in cui le fluttuazioni termiche sono state più intense in termini di frequenza (fig. 6). La crescita dei LAB (fig. 3), invece, non è risultata influenzata da tale aspetto, ed ha avuto un andamento sovrapponibile tra i due gruppi, raggiungendo una concentrazione massima di Log 8 ufc/g già alla 320<sup>ma</sup> ora.

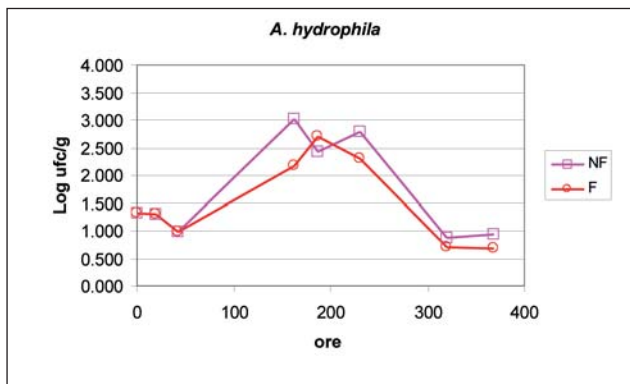


Fig. 1. Andamento medio di *A. hydrophila*

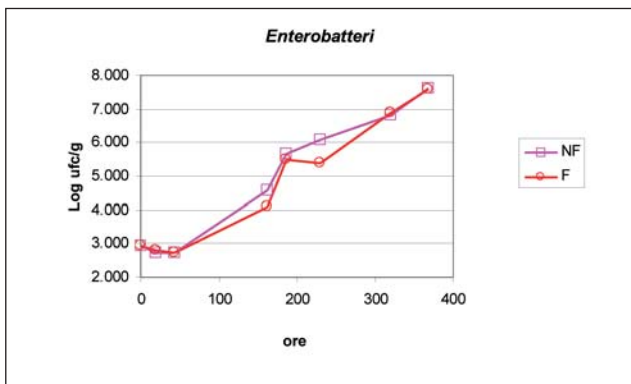


Fig. 2. Andamento medio degli *Enterobatteri*

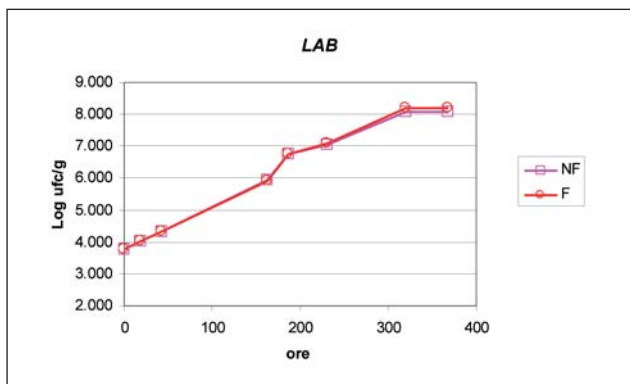


Fig. 3. Andamento medio dei *LAB*

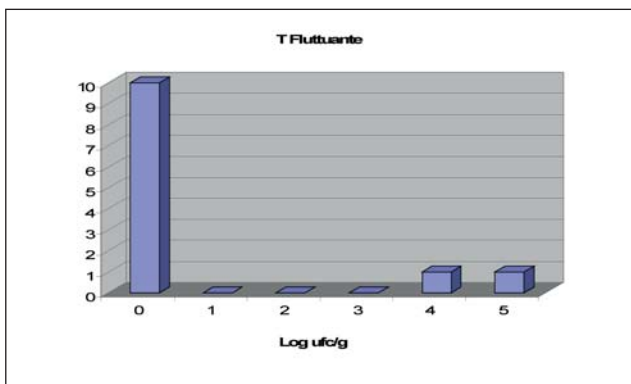


Fig. 4. Distribuzione della frequenza dei campioni rispetto alla concentrazione di *A. hydrophila* a 368 ore, per il gruppo F

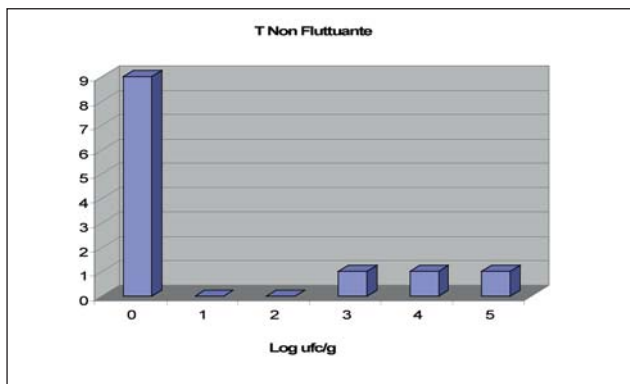


Fig. 5. Distribuzione della frequenza dei campioni rispetto alla concentrazione di *A. hydrophila* a 368 ore, per il gruppo NF

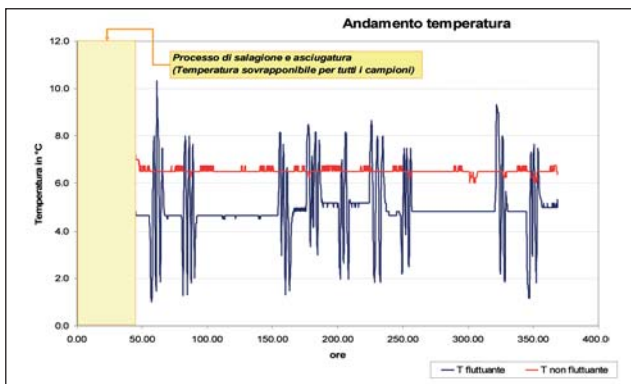


Fig. 6. Andamento della Temperatura nei due gruppi considerati (Blu: F; Rosso: NF)

I valori dell'andamento della Temperatura, per entrambi i gruppi, è mostrato nella fig. 6 dalla quale si evince come, se pur a fronte di imponenti fluttuazioni termiche, il valore medio prevalente del gruppo "F" si sia attestato intorno ai 4.7°C rispetto ai 6.4°C del gruppo NF. Infine, il pH ha mostrato un decre-

mento da valori di 6.4 a 5.9 nel gruppo NF mentre nel gruppo F il decremento è stato meno intenso. Ancora, relativamente all'aw, i suoi valori medi dopo un brusco decremento fino a valori di 0.947, in conseguenza della salagione, si sono mantenuti, per entrambi i gruppi, tra 0.978 e 0.985.

## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI BIBLIOGRAFIA

La valutazione dei risultati medi ottenuti dimostrerebbe come *A. hydrophila* possa trovare discrete possibilità di replicazione nei prodotti ittici debolmente salati e refrigerati specie laddove, come da noi simulato, le temperature di conservazione siano anche di poco superiori a quelle normalmente consigliate dai produttori (+4°C). Nel corso della conservazione, tuttavia, le condizioni fisico-chimiche di tali prodotti, unitamente all'attività delle flore competitive, hanno determinato un comportamento di *A. hydrophila* piuttosto variabile, caratterizzato, prevalentemente, da una riduzione della concentrazione media, se pur con un'elevata deviazione standard. Ciò, come ben noto, può dipendere dalla differente risposta di ogni singola cellula alle condizioni ambientali ed alla competizione batterica, cosa che, in accordo con Besse et al. (2006), si manifesta maggiormente e con più spiccata tendenza alla decrescita, quando le concentrazioni iniziali sono inferiori ai Log 2 ufc/g.

Altro elemento a cui ascrivere, potenzialmente, la variabilità osservata è la fluttuazione termica che ha determinato un aumento della deviazione standard della concentrazione di *A. hydrophila* specie negli intervalli di campionamento prossimi alle maggiori fluttuazioni della temperatura. Ciò porta, dunque, a dare maggiore enfasi all'approccio probabilistico nel contesto della microbiologia alimentare, anche in accordo con i dati ottenuti circa la ritardata crescita e la riduzione, se pur modesta, delle concentrazioni di *A. hydrophila* in corrispondenza di maggiori fluttuazioni termiche. Infatti, in questi casi, potrebbe essere ipotizzabile che l'escursione termica possa aver influenzato (negativamente) il tasso di crescita di una parte della popolazione batterica considerata, portando in negativo il "bilancio" tra tempo di replicazione e tempo di morte cellulare. Tale ipotesi induce, dunque, ad ulteriori ricerche volte alla modellazione stocastica del comportamento microbico, al fine di una maggiore coerenza tra la microbiologia degli alimenti e la Valutazione del Rischio. Questo concetto, peraltro, è in linea con quanto riportato dal Reg. 178/02 e dovrebbe rappresentare un principio guida per le scelte di Risk Management, nel contesto della nuova politica comunitaria in materia di sicurezza alimentare.

- 1) Besse N.G., Audinet N., Barre L., Cauquil A., Cornu M., Colin P. (2006). Int. J. Food Microbiol. 110, 43-51
- 2) Cook D. W. (1991). Microbiology of Bivalve Molluscan Shellfish. In Ward D. R., Hackney C. R.. Microbiology of marine food products. Ed. AVI Book, 1991, New York.
- 3) Daskalov H. (2006). The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. *Food Control* 17, 474-483
- 4) Huss H.H., Ababouch L., Gram L. (2004). Assessment and Management of Seafood Safety and Quality. *FAO Fisheries Technical* 444.
- 5) Giuffrida A., Ziino G., Valenti D., Donato G., Panebianco A. (2007). Application of an interspecific competition model to predict the growth of *Aeromonas hydrophila* on fish surfaces during refrigerated storage. *Archiv fur Lebensmittelhygiene* 56: 136-141.
- 6) Sunen E., Aristimuno C., Fernandez-Galian B. (2003). Activity of smoke wood condensates against *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged, cold-smoked rainbow trout stored at 4 °C. *Food Research International* 36, 111-116.