

PSEUDOMONAS FLUORESCENS IN PRODOTTI LATTIERO-CASEARI: UN NUOVO CASO *MOZZARELLE BLU* IN SARDEGNA

Pseudomonas fluorescens in dairy products: a new case of blue mozzarella in Sardinia region

Nogarol Chiara^{1*}, Bianchi Daniela Manila¹, Cogoni Maria Paola², Brignardello Stefania², Zuccon Fabio¹, Monfardini Sara¹, Decastelli Lucia¹

*Corresponding author. Tel: (+39) 11 2686233; Fax: (+39) 11 22473450. E-mail: chiara.nogarol@libero.it

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino, Italia.

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Dipartimento Territoriale di Cagliari, Italia.

ABSTRACT

Following a case of *blue mozzarella* occurred in Sardinia region, 14 isolates of *Pseudomonas fluorescens* have been isolated. Data analysis of pulsed-field-gel-electrophoresis profiles allowed to divide the isolates in two different clades, genetically unrelated. The presence of these two strains, deriving from nearby productions, confirmed the high diffusion of this microorganism. Multiples contamination sources (raw materials, processing surfaces and water supply) made this specie one of the most relevant of the dairy productions chain.

Keywords: Mozzarella cheese, PFGE, *Pseudomonas fluorescens*.

INTRODUZIONE

Specie batteriche classificate come psicotolleranti sono considerate tra i principali contaminanti riscontrabili negli stabilimenti di trasformazione lattiero-casearia. Inoltre, la distribuzione e la conservazione di tali prodotti a temperature di refrigerazione, permette la crescita e la moltiplicazione di tali specie (Dogon e Boor, 2003). Il latte, nelle prime fasi della filiera produttiva, può essere contaminato con diverse specie appartenenti al genere *Pseudomonas* attraverso il contatto con acqua contaminata, con il terreno o con biofilm presenti sulla superficie dei tank di refrigerazione (Cousin, 1982). Durante il processo produttivo, le acque impiegate nello stabilimento e le superfici di lavoro a contatto con gli alimenti completano il quadro delle principali fonti di contaminazione da *Pseudomonas* spp. Alcuni ceppi appartenenti alle specie *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens* e ad alcuni fitopatogeni quali le *P. syringae*, sono in grado di produrre pigmenti giallo-verdi, fluorescenti e idrosolubili (Palleroni *et al.*, 1972). Tale capacità risulta correlata alla presenza, nel genoma batterico, di sequenze geniche codificanti pigmenti colorati, sintetizzati al verificarsi di determinate condizioni ambientali (Meyer e Abdallah, 1978).

A seguito dell'evento *mozzarella blu*, scatenatosi a partire dal giugno 2010, si è registrato un incremento della soglia di attenzione sia da parte dei consumatori che da parte dell'autorità competente nelle sue attività di controllo. Tale evento ha portato, oltre che alla indagine analitica per la verifica della diffusione dei ceppi di *Pseudomonas* negli impianti lattiero caseari, anche alla messa a punto di tecniche di secondo livello per la caratterizzazione molecolare dei ceppi (Nogarol *et al.*, 2010). I metodi culturali tradizionali consentono di isolare le specie microbiche responsabili delle suddette alterazioni, mentre i metodi di caratterizzazione molecolare permettono di approfondire la loro correlazione genetica. In particolare, l'elettroforesi in campo pulsato (PFGE) possiede un elevato potere discriminatorio per identificare il grado di correlazione tra microrganismi appartenenti alla stessa specie. Il presente studio riporta l'indagine, effettuata con entrambe le metodiche, per la valutazione del grado di contaminazione da parte di *P. fluorescens* in uno stabilimento lattiero-caseario in provincia di Cagliari.

MATERIALI E METODI

Nel mese di febbraio 2012, dopo segnalazione di un cittadino di una mozzarella con colorazione ano-

mala, i servizi veterinari dell'ASL insieme ai N.A.S. hanno prelevato 24 campioni di mozzarella dallo stabilimento produttore. I campioni, appartenenti a 2 lotti che differiscono tra loro per quattro giorni nella data di scadenza, sono stati sottoposti ad esame ispettivo e ad indagine microbiologica per la ricerca di *Pseudomonas* spp. presso il laboratorio di Microbiologia degli Alimenti, Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) della Sardegna, Dipartimento Territoriale di Cagliari. La numerazione di *Pseudomonas* spp. è stata eseguita secondo il metodo ISO/TS 11059:2009 *Milk and milk products – Method for the enumeration of Pseudomonas spp.* (ISO/TS 11059:2009).

I 14 ceppi di *Pseudomonas fluorescens* isolati sono stati inviati al Laboratorio Controllo Alimenti, IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (Torino) per la caratterizzazione molecolare mediante PFGE (Nogarol *et al.*, 2010). In seguito a restrizione enzimatica dell'intero genoma batterico mediante l'enzima *SpeI* (Promega), i frammenti generati sono stati separati su gel di agarosio attraverso corsa elettroforetica in campo pulsato (CHEF Mapper® XA, BioRad, Segrate, Italia). L'analisi del pattern elettroforetico è stata eseguita grazie al software di analisi di immagine BioNumerics®, versione 6.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgio).

RISULTATI

Dall'esame ispettivo, quattro campioni sono risultati non conformi poiché, nonostante avessero consistenza normale, presentavano un'evidente colorazione bluastra su parte della superficie: tale alterazione non coinvolgeva la sezione di taglio. Ai restanti campioni (n=20) è stato assegnato esito conforme poiché, durante l'esame ispettivo in prima istanza non presentavano colorazione anomala. Per un totale di 10 campioni si è resa necessaria l'analisi di seconda istanza, con apertura dell'aliquota dedicata (primo lotto dopo 6 giorni; secondo lotto dopo 9 giorni): in questa fase, 5 campioni hanno manifestato un'alterazione cromatica. Le analisi microbiologiche per la ricerca di *Pseudomonas* spp. sono state condotte in accordo con quanto previsto dalla ISO/TS 11059:2009: sono state selezionate 5 colonie tipiche per ciascun campione e ciascuna di esse è stata sottoposta a verifica biochimica (prova dell'ossidasi, fermentazione del glucosio e identificazione mediante API 20NE Biomérieux). Sono stati così isolati 14 microrganismi identificati biochimicamente come *Pseudomonas fluorescens* (Tabella 1): di questi 10 derivanti da mozzarelle conformi all'esame ispettivo e 4 da mozzarelle con pigmentazione blu. Come mostrato in Tabella 1, da 6 campioni (conformi all'esame ispettivo) è stato possibile isolare microrganismi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, diversi dal genere *Pseudomonas*.

L'analisi molecolare condotta sui 14 ceppi di *P. fluorescens* ha consentito di identificare due *clade* (Figura 1, *clade A* e *clade B*), tra loro scarsamente correlati dal punto di vista genetico (grado di correlazione 59.7%). Nel *clade A* sono compresi 5 isolati, derivanti dal primo lotto di produzione. Nel *clade B* sono compresi isolati batterici derivanti dal secondo lotto produttivo, che comprende mozzarelle cromaticamente alterate e non. Essi presentano un'omologia del 100%, ad eccezione di un ceppo (cerchiato in Figura 1) che presenta omologia del 97.9% con gli altri isolati.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti evidenziano la presenza di due diversi pulsotipi di *P. fluorescens* nei campioni di mozzarella prodotti nell'arco di 4 giorni nello stesso stabilimento. È stato infatti possibile suddividere i 14 ceppi isolati in due *cluster* (Figura 1), presentanti un grado di correlazione pari al 59.7%, che indica una scarsa correlazione genetica.

Nonostante il numero relativamente basso di ceppi compresi nello studio, il breve intervallo di tempo durante il quale essi sono stati isolati dimostra la presenza di ceppi diversi all'interno dello stabilimento produttivo, confermando le molteplici fonti di contaminazione. Altre indagini di caratterizzazione molecolare (Nogarol *et al.*, 2013) ma eseguiti su un elevato numero di ceppi di *P. fluorescens* evidenziano come nelle aziende il numero di pulsotipi rilevanti aumenti con l'aumentare del numero di campioni analizzati. Questo consente di ipotizzare che sia possibile identificare più pulsotipi all'interno di uno stesso lotto, soprattutto in seguito ad analisi di un elevato numero di isolati da esso derivanti.

L'evento *mozzarelle blu* ha portato a un'aumentata sensibilità dei consumatori, grazie anche all'attenzione che i mass media hanno dedicato a questo e ad altri temi di sicurezza alimentare.

P. fluorescens non rientra tra i patogeni trasmissibili per via alimentare e la sua ricerca non è compresa tra i criteri di igiene di processo previsti dal Reg. CE 2073/2005 e seguenti modifiche e/o integrazioni [Regolamento (CE) 2073/2005]. Tuttavia, le alterazioni cromatiche che tali specie possono generare potrebbero rendere gli alimenti contaminati inadatti al consumo umano e quindi, passibili di ritiro dal mercato [Regolamento (CE) 178/2002].

Considerate le molteplici vie di contaminazione da *Pseudomonas fluorescens* durante il processo produttivo di prodotti lattiero-caseari, pre- e post-pastorizzazione (Eneroth *et al.*, 1998; Gruetmacher e Bradley, 1999), si ritiene che tale problematica debba essere gestita dalle aziende grazie all'attuazione di un corretto piano di autocontrollo, in grado di individuare i punti critici di controllo e adatte azioni correttive in caso di contaminazione.

BIBLIOGRAFIA

- Cousin M.A. 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. *J. Food Protect.* 45:172-207.
- Dogan B., Boor K.J. 2003. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Appl. Environ. Microb.* 69:130-138.
- Eneroth A., Christiansson A., Brendehaug J., Molin G. 1998. Critical contamination sites in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. *Int. Dairy J.* 8:829-834.
- Gruetmacher T.J., Bradley R.L. Jr. 1999. Identification and control of processing variables that affect the quality and safety of fluid milk. *J. Food Protect.* 62:625-631.
- ISO/TS 11059:2009. Milk and milk products. Method for the enumeration of *Pseudomonas* spp. International Organization for Standardization ed., Ginevra, Svizzera.
- Meyer J.M., Abdallah M.A. 1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens* biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.* 107:319-328.
- Nogarol C., Acutis P.L., Bianchi D.M., Maurella C., Peletto S., Gallina S., Adriano D., Zuccon F., Borrello S., Caramelli M., Decastelli L. 2013. Molecular characterization of *P. fluorescens* isolates involved in the Italian "blue mozzarella" event. *J. Food Protect.* 76:500-504.
- Nogarol C., Bianchi D.M., Vencia W., Losio M.N., Zuccon F., Decastelli L. 2010. Caratterizzazione molecolare di isolati di *Pseudomonas fluorescens* da prodotti lattiero-caseari: ottimizzazione di un protocollo PFGE. Atti del XII Congresso Nazionale Società Italiana di Diagnostica di Laboratorio Veterinaria, Genova 27-29 Ottobre 2010.
- Palleroni N.J., Ballard R.W., Ralston E., Dondoroff M. 1972. Deoxyribonucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* 23:333-339.
- Regolamento (CE) 178/2002, della commissione del 28 gennaio 2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, L 31 del 1.2.2002.*
- Regolamento (CE) n. 2073/2005, della commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, L 338 del 22.12.2005.*

Tabella 1. Risultato del conteggio di *Pseudomonas* spp. secondo ISO/TS 11059:2009 (ISO/TS 11059:2009).

ID campioni	UFC/gr	Conferma biochimica
9665-1	1.300	<i>Enterobacter cloacae</i>
9665-2	<20	NEG
9665-3	320.000	<i>Enterobacter amnigenus</i>
9665-4	1.600	<i>Enterobacter amnigenus</i>
9665-5	2.500	<i>Enterobacter amnigenus</i>
9677-1	31.000.000	<i>Pseudom. fluorescens</i>
9677-2	20.000.000	<i>Pseudom. fluorescens</i>
9677-3	12.000.000	<i>Pseudom. fluorescens</i>
9677-4	100.000.000	<i>Pseudom. fluorescens</i>
9677-5	22.000.000	<i>Pseudom. fluorescens</i>
9913-1	<100	NEG
9913-2	9.000.000	<i>Enterobacter cloacae</i>
9913-3	38.000	<i>Enterobacter cloacae</i>
9913-4	<100	NEG
9913-5	<100	NEG
9949	17.000.000.000	<i>Pseudom. fluorescens</i>
10267-1	46.000.000	<i>Pseudom. fluorescens</i>
10267-2	18.000.000	<i>Pseudom. fluorescens</i>
10267-3	3.400.000	<i>Pseudom. fluorescens</i>
11065-1	15.000.000	<i>Pseudom. fluorescens</i>
11065-2	3.900.000	<i>Pseudom. fluorescens</i>
11065-3	8.100.000	<i>Pseudom. fluorescens</i>
11065-4	27.000.000	<i>Pseudom. fluorescens</i>
11065-5	8.600.000	<i>Pseudom. fluorescens</i>

ID, codice identificativo; UFC, unità di formazione di colonie; NEG, negativo.

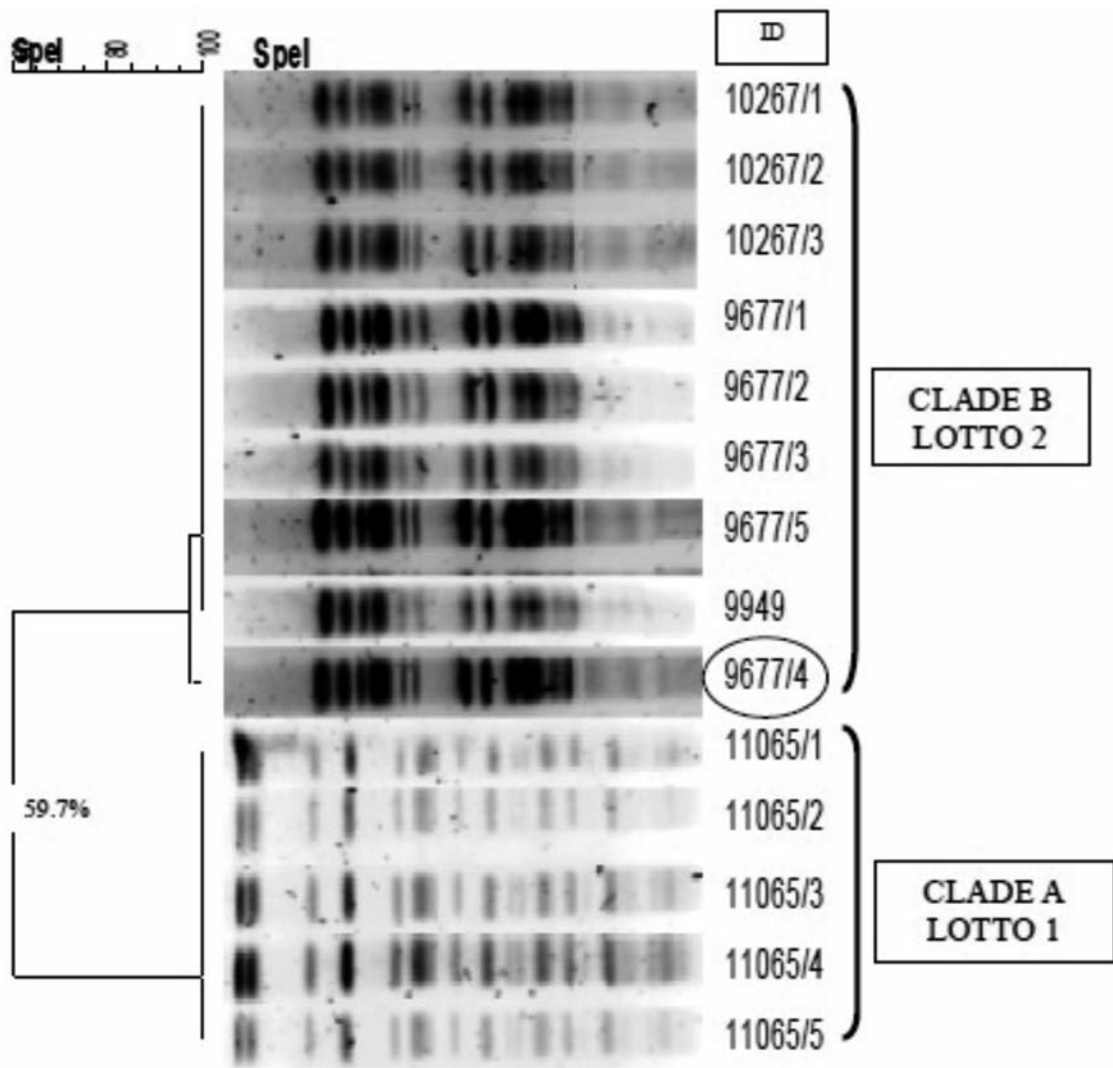


Figura 1. Cluster analysis degli isolati di *P. fluorescens* (BioNumerics®, ottimizzazione 0.5, tolleranza 2%) (Applied Maths).