

# Alterazioni di formaggi freschi: focus su difetti da *Pseudomonas*

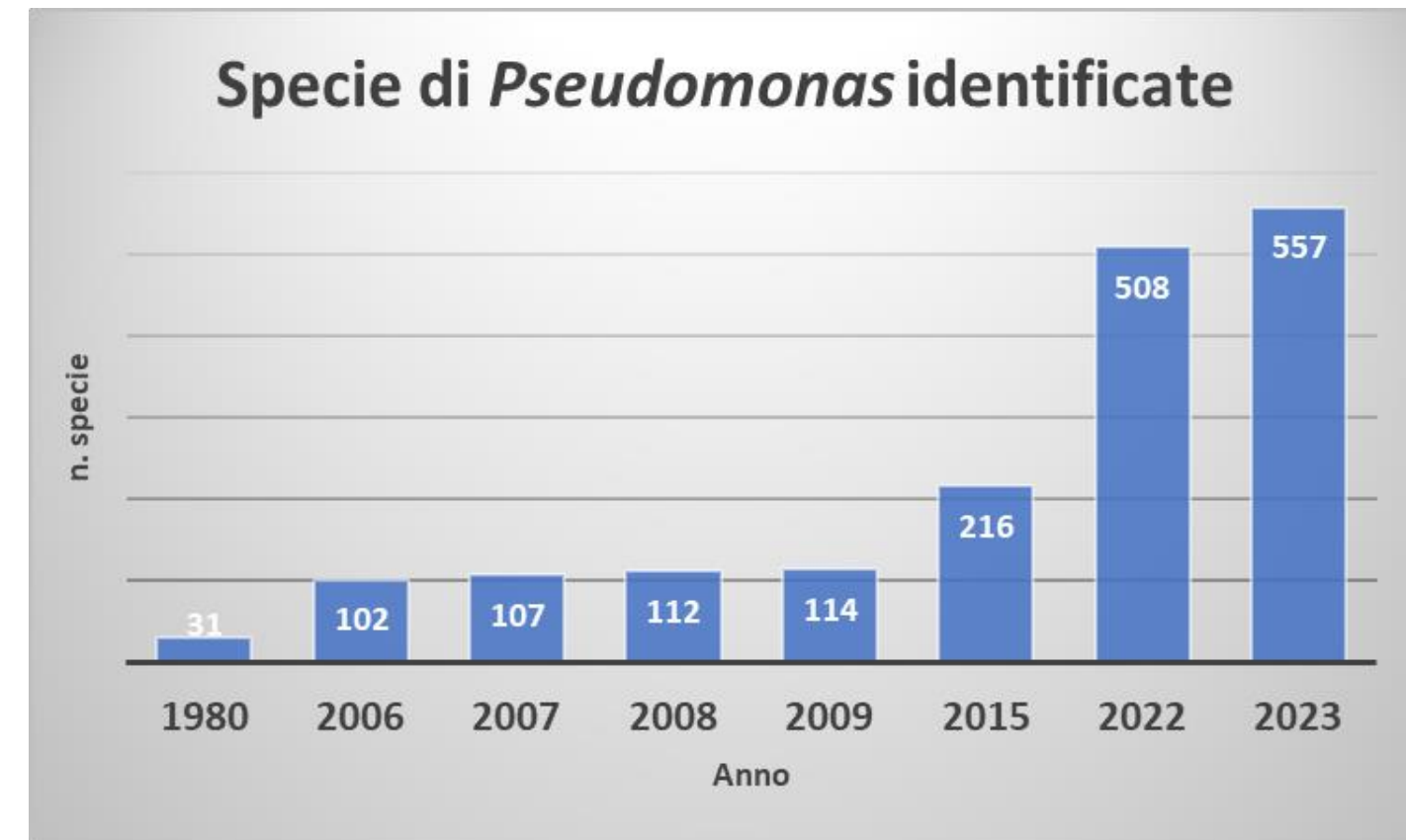
FLAVIO TIDONA

SCIENZA E TECNICA  
LATTIERO - CASEARIA

## Inquadramento tassonomico

Il genere *Pseudomonas* è fra i più complessi tra i gram-negativi e con il maggior numero di specie identificate.

Per classificare il genere *Pseudomonas* il sequenziamento del gene 16S rRNA non è risultato in grado di discriminare tutte le varie specie.



Analisi di altri geni housekeeping, ad esempio mediante un approccio MLST (Multilocus Sequence-type)

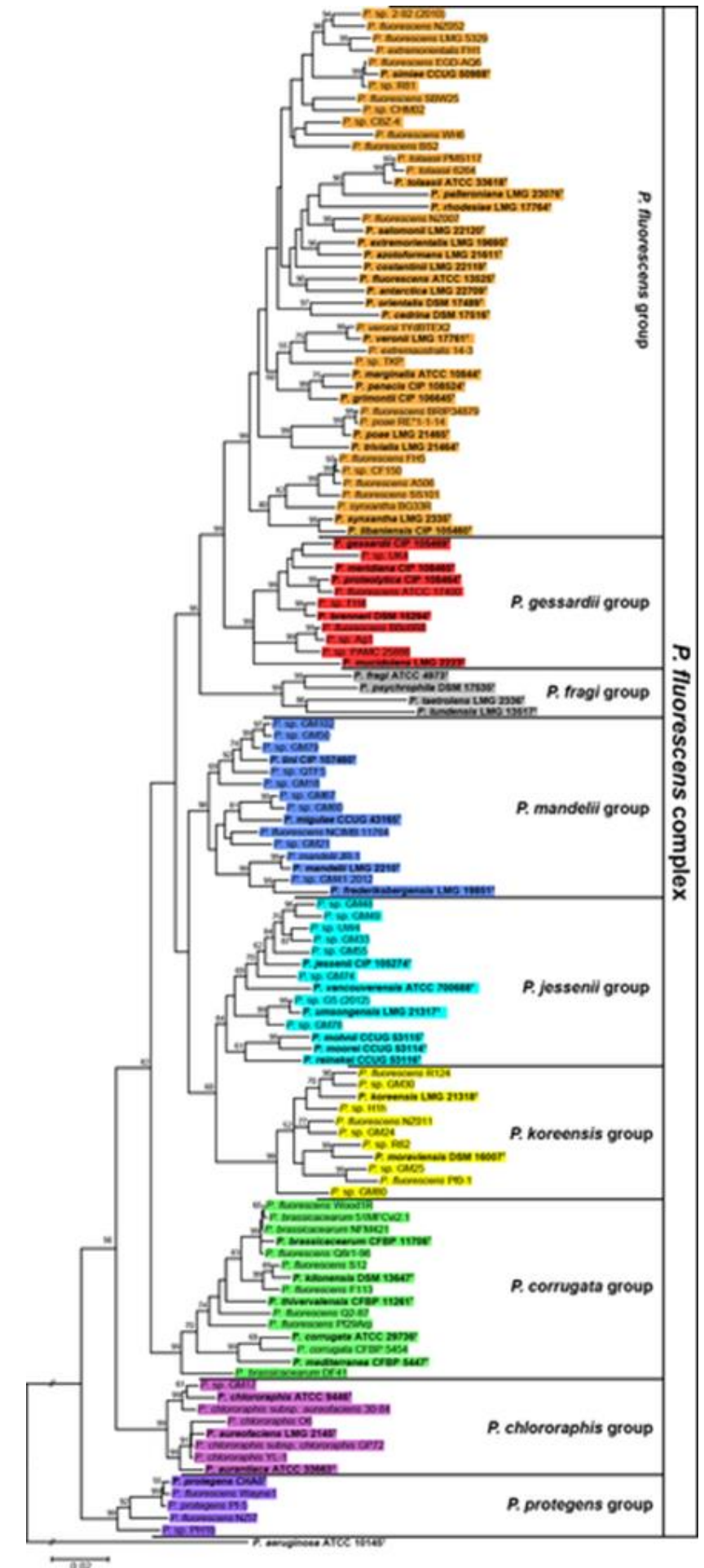


Analisi dell'intero genoma

## Inquadramento tassonomico

Per semplificare, possiamo dire che all'interno del genere *Pseudomonas* si possono individuare due gruppi:

- specie che non producono metaboliti fluorescenti (*P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes* e *P. pseudoalcaligenes*)
- specie produttori di pigmenti fluorescenti (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens* e *P. putida*)



## Caratteristiche fisiologiche

- Le specie appartenenti al genere *Pseudomonas*, gram-negativi, non producono spore.
- Sono bacilli dritti o leggermente curvi e misurano 0.5 - 1.0µm x 1.5 - 5.0µm.
- La maggior parte delle specie sono ossidasi positive.
- Sono aerobi obbligati (in alcuni casi, il nitrato è stato usato come alternativa per consentire la crescita in anaerobiosi).
- Sono mobili per presenza di uno o più flagelli polari. →
- Crescono in prodotti con  $A_w > 0.97$
- Non crescono a  $pH < 5.0$  e rallentano già a  $pH < 5.8$
- Non sopravvivono a temperature che superano i 65 °C



## Caratteristiche fisiologiche

- Peculiarità metaboliche:
  - sono in grado di sintetizzare tutti i fattori di crescita loro necessari.
  - sono psicrotrofi e riescono a moltiplicare (se pure lentamente) fino a 3 °C.
  - sintetizzano molti enzimi e possono metabolizzare sia composti a basso peso molecolare (amminoacidi, mono- e disaccaridi) sia molecole di grandi dimensioni, come proteine e acidi grassi.
  - molte specie sintetizzano pigmenti idrosolubili che possono diffondere negli alimenti
  - Possono formare biofilm

## *Pseudomonas* e salute umana

Molte specie presentano potere patogeno per i vegetali; altre sono patogene od occasionalmente patogene per i pesci e rettili (*P. reptilivora*, *P. ichtyodermis*, *P. piscicida*).

Nell'uomo la specie più comune è *P. aeruginosa*, che talvolta provoca infezione in tessuti esposti all'ambiente esterno, in pazienti ospedalizzati debilitati o immunocompromessi.

Tale microrganismo è spesso un contaminante di lesioni popolate da microrganismi più virulenti.

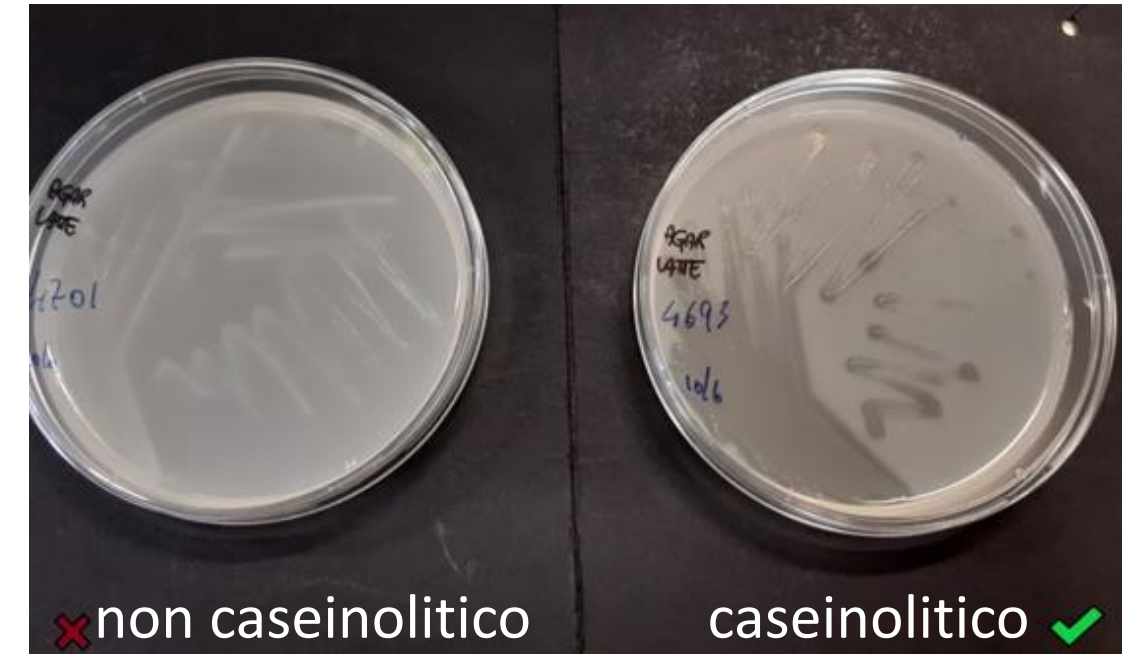
L'eventuale proliferazione di *Pseudomonas* in un alimento (compresa *P. aeruginosa*) è ben poco probabile che possa comportare problemi di salute umana.

**«Non sono descritti, nell'uomo, casi di malattia in seguito all'ingestione di alimenti contaminati da *Pseudomonas*»**

## Le alterazioni più comuni da *Pseudomonas*

**Proteolisi:** capacità di sintetizzare proteasi termoresistenti in grado di degradare le caseine, nell'ordine  $k \rightarrow \beta \rightarrow \alpha-S1$

- Possono provocare difetti nel latte UHT e sterilizzato quali gelificazione, sedimento.
- Gusto amaro come pure diminuzione della resa nella produzione del formaggio.



**Lipolisi:** le lipasi di *Pseudomonas* sono termostabili ma a livello notevolmente inferiore alle proteasi (inattivazione dal 15 al 56 % a 63°C x 30').

- Portano all'idrolisi dei trigliceridi in glicerolo ed acidi grassi, causando fenomeni di irrancidimento
- Lecitinasi: enzimi che disgregano i globuli dei grassi
- Provocano cambiamenti di aroma e off-flavours

**Difetti di struttura:** Rammollimento della struttura delle mozzarelle



## Le alterazioni più comuni da *Pseudomonas*

Alterazioni cromatiche: alcuni ceppi sono in grado di sintetizzare pigmenti (aventi più di 40 strutture chimiche differenti) tra i quali:

**fluoresceina** (giallo dorato)

**piorubina** (rosso-marrone)

**piomelanina** (nero)

**pioverdina** (verde)

**piocianina** (blu-viola)

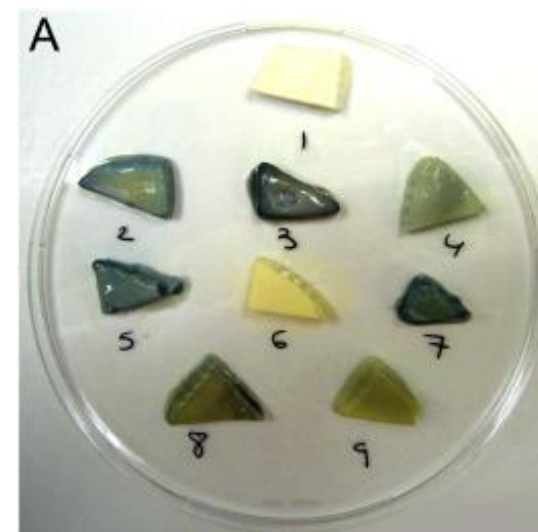
**indigoidina** (blu)

**indolo-derivato** (blu)



- Possono avere funzioni antimicrobiche (*Erwinia amylovora*, causa di malattia di piante da frutto)
- Siderofori: molecole in grado di legare il ferro
- Contrastare lo stress ossidativo

- derivato il metabolismo del triptofano





## «I casi delle mozzarelle blu»

Nel corso del 2010, con grande risalto mediatico, sono stati portati all'attenzione dell'opinione pubblica alcuni casi delle cosiddette «mozzarelle blu», con evidenti alterazioni cromatiche. Il fenomeno ha creato preoccupazione tra i cittadini, sollecitando gli interventi delle ASL.

Ciò ha permesso di affrontare alcuni punti:

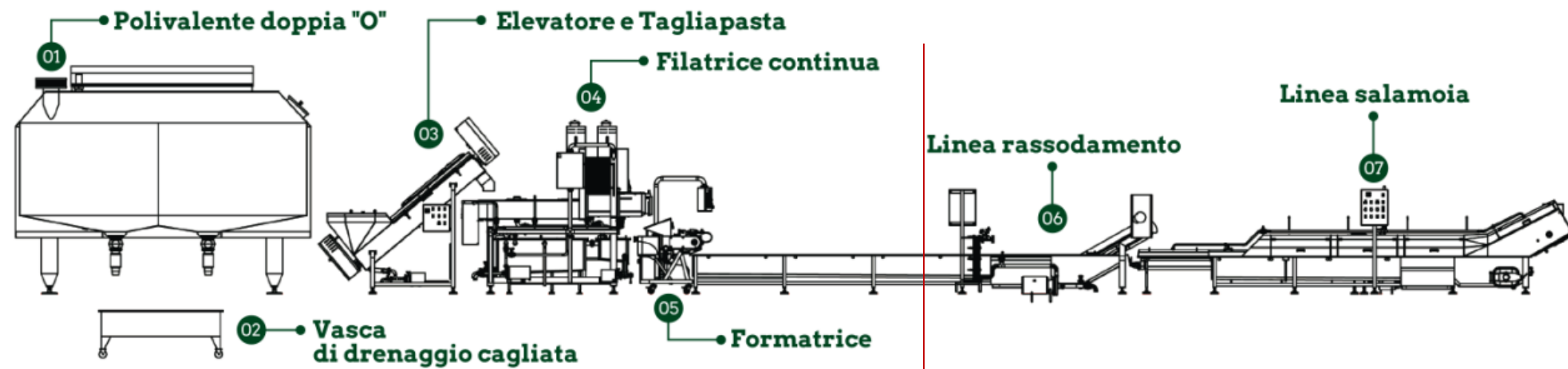
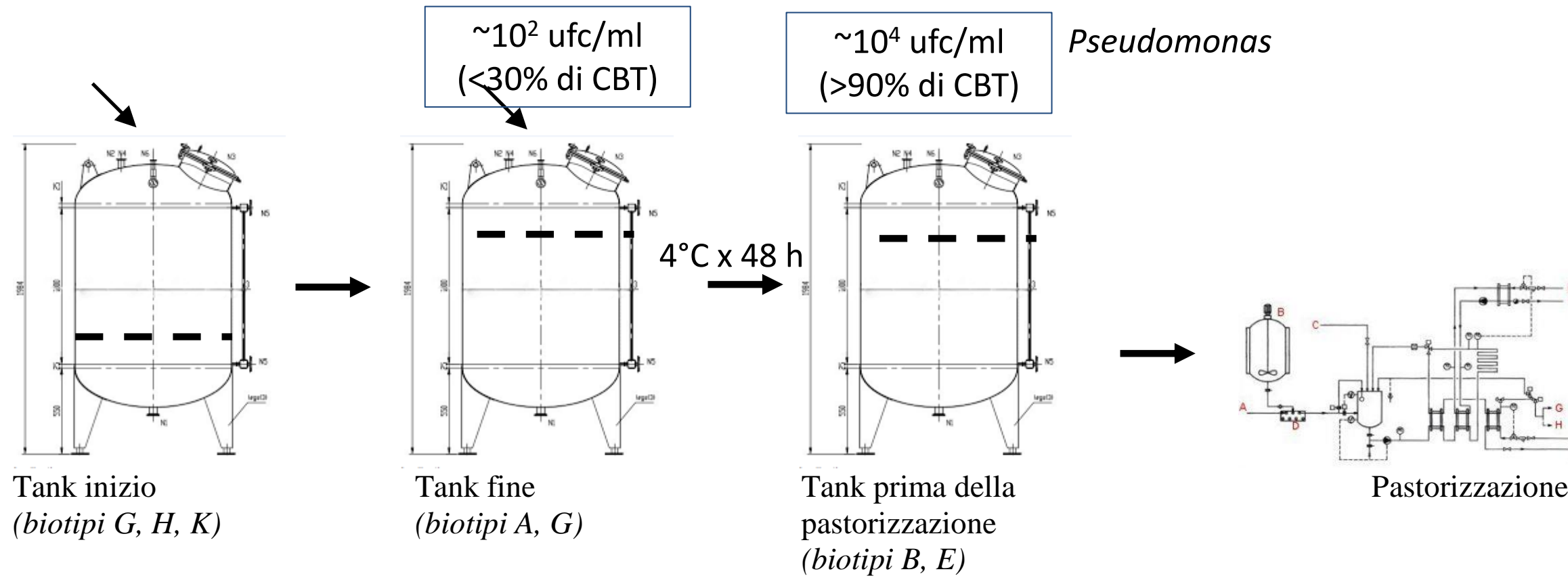
- Individuare l'agente batterico contaminante
- Assenza di limiti previsti dalla normativa
- Approfondire la fase critica di contaminazione



D.Lgs. n. 31 del 2001:

conta di *Pseudomonas aeruginosa* in acqua imbottigliata

# Analisi della contaminazione durante il processo (es. Mozzarella)



Linea di lavorazione e prodotto  
(assenza *Pseudomonas*)

Assenza *Pseudomonas*

Linea rassodamento

- acqua nastro 1: assenza *Pseudomonas*
- acqua nastro 2 (inizio): biotipi I, L, M
- acqua nastro 2 (fine): biotipi C, D, F, J

*P. cedrinae* ('fluorescens' subgroup)  
*P. taiwanensis*  
*P. lurida*

*P. mucidolens* (gessardi' subgroup)  
*P. panacis* ('fluorescens' subgroup)  
*P. migulae* ('mandelii' subgroup)  
*P. aeruginosa* ('aeruginosa' group)

## Considerazioni

- Nel latte troviamo sempre ceppi di *Pseudomonas*, spesso diversi dai ceppi ritrovati nel prodotto finito.
- Non si rilevano *Pseudomonas* in latte pastorizzato.
- L'acqua di rassodamento sembra aver contaminato prodotto e liquido di governo prima del confezionamento.
- Possibile formazione di biofilm nella zona degli scambiatori o acqua di processo.



Investigation on the presence of blue pigment-producing *Pseudomonas* strains along a production line of fresh mozzarella cheese

Domenico Carminati\*, Barbara Bonvini, Lia Rossetti, Miriam Zago, Flavio Tidona, Giorgio Giraffa

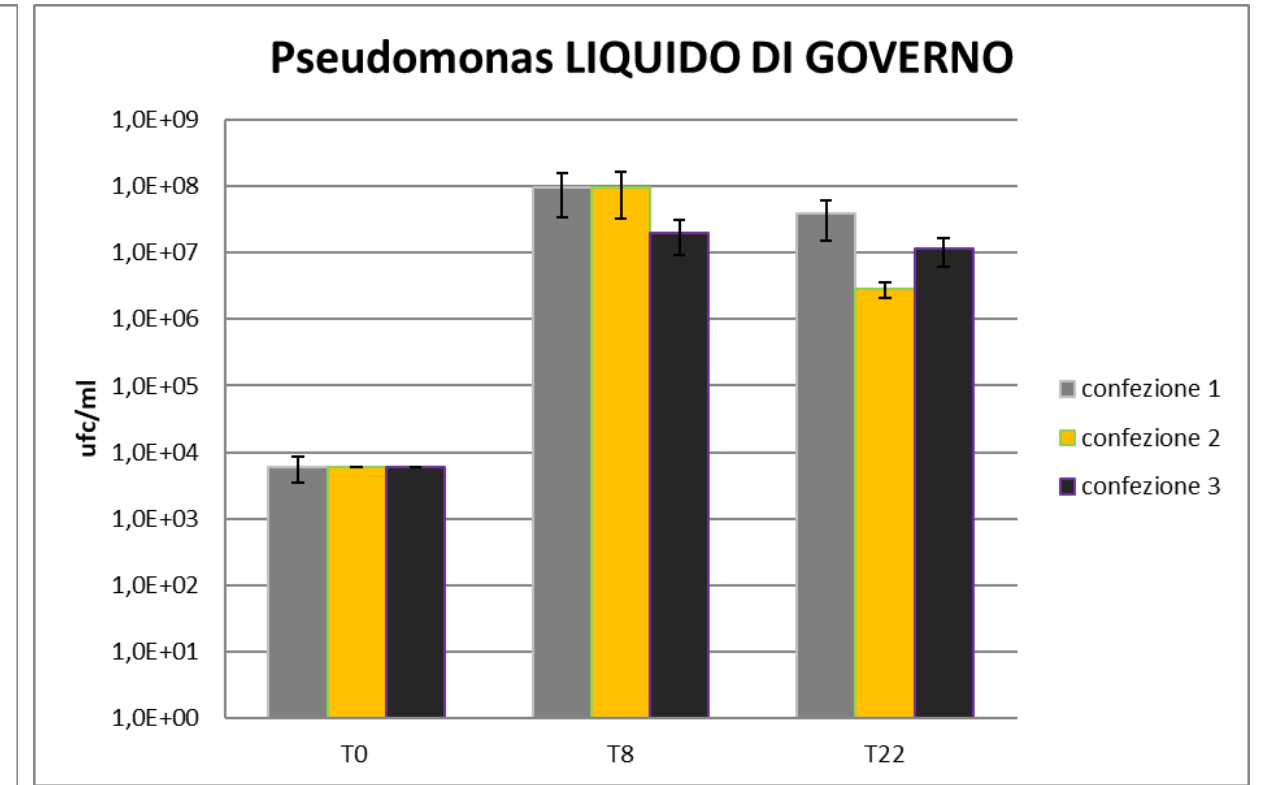
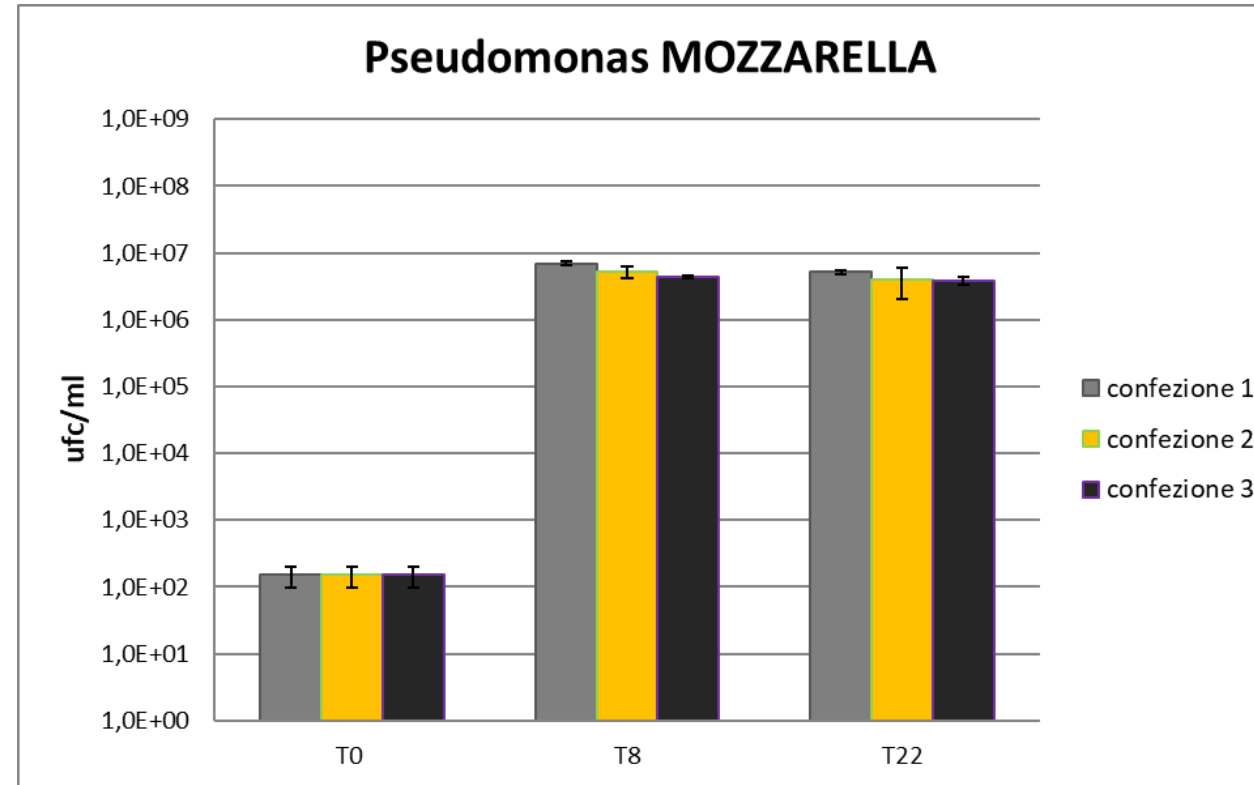
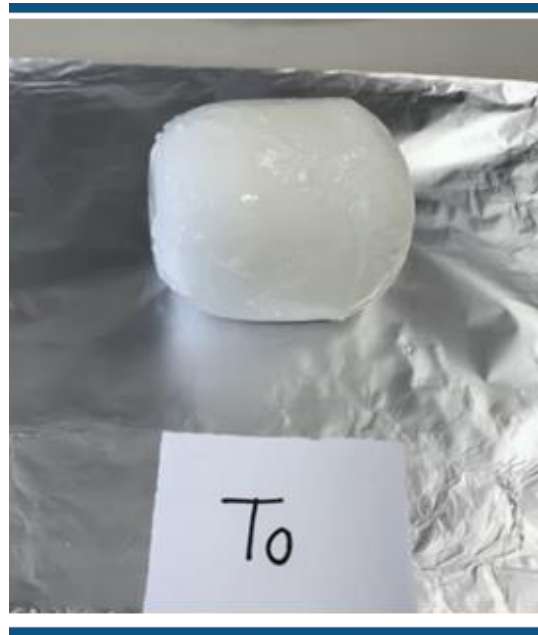
Council for Agricultural Research and Economics, Research Centre for Animal Production and Aquaculture (CREA-ZA), Via A. Lombardo 11, 26900, Lodi, Italy



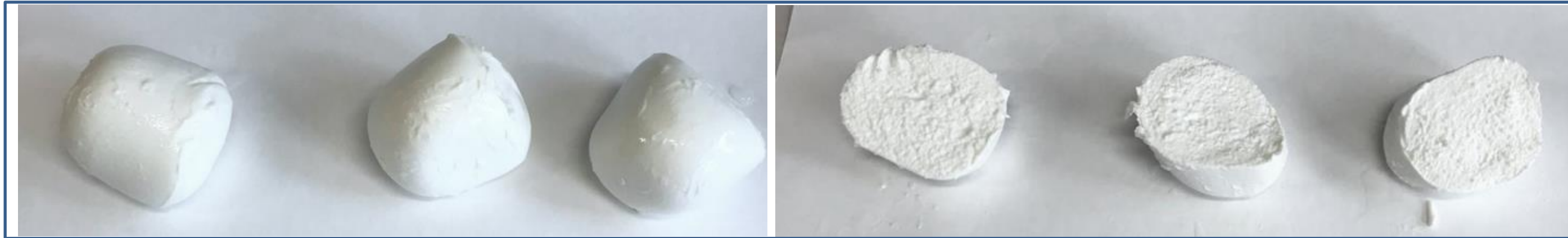
## Ricerca di *Pseudomonas* in mozzarelle

Durante una sperimentazione è stata valutata la presenza di *Pseudomonas* in mozzarelle commerciali all'arrivo (T0) e monitorate dopo 8 e 22 giorni di shelf-life (T8, T22).

T0



T8



T22



Nessun difetto riscontrato fino al termine della shelf-life

E' stata condotta una sperimentazione in cui abbiamo artificialmente contaminato le mozzarelle con ceppi di *Pseudomonas fluorescens* aventi capacità di sintetizzare pigmenti, simulando una contaminazione durante l'ultima fase produttiva (confezionamento in liquido di governo).



Le mozzarelle sono state conservate a 6°C per 15 giorni



Tutte le mozzarelle inoculate hanno manifestato difetti di alterazioni cromatiche confermando la criticità legata a ceppi di *Pseudomonas fluorescens* pigmentanti.

La comparsa del difetto dipende in particolare da:

- Inoculo iniziale
- durata shelf-life
- temperatura di stoccaggio

### Gestione ambientale

Attuazione di adeguati programmi di pulizia e disinfezione

### Gestione del prodotto

#### **Metodi fisici:**

- Trattamento termico: SI (no per proteasi termostabili)
- Refrigerazione: NO
- Atmosfera modificata: SI

#### **Metodi chimici:**

- Acidificazione del prodotto/liquido di governo: SI (ma  $\text{pH} < 5,0$ )
- Conservanti o molecole ad attività antimicrobica: SI (ma obbligo di additivo in etichetta)

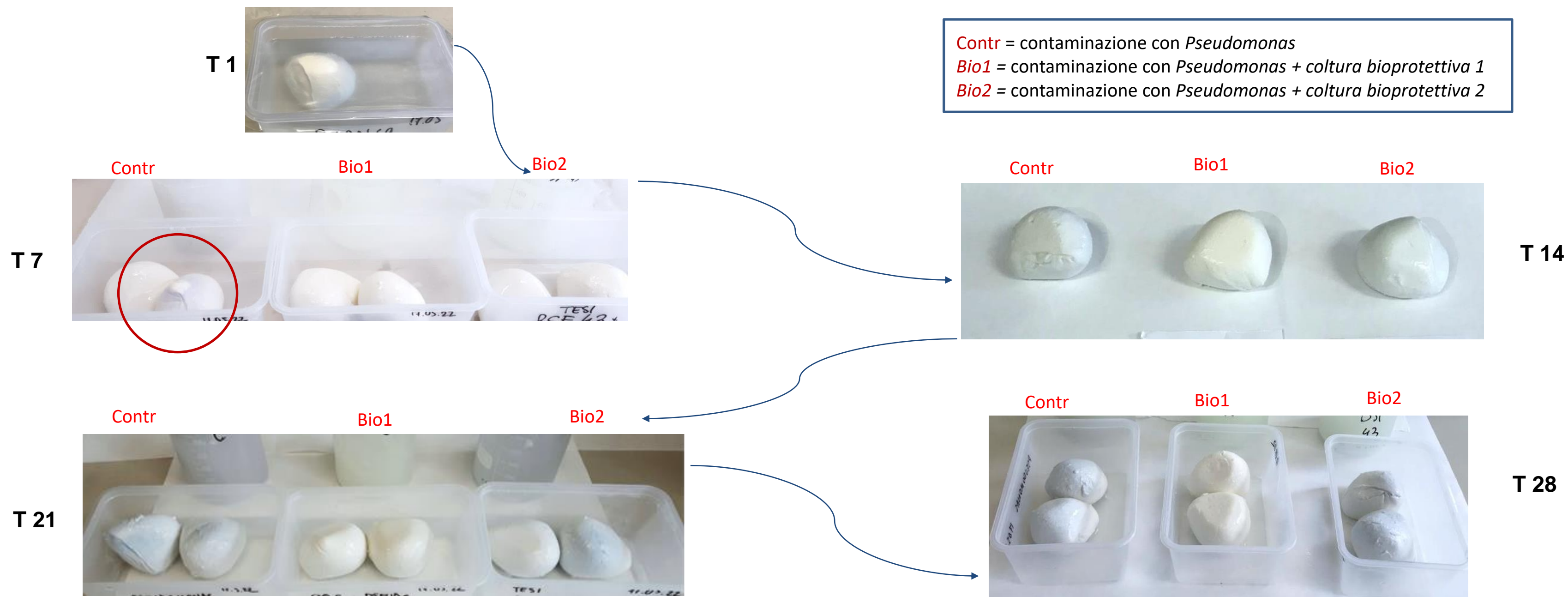
#### **Metodi biologici:**

- Utilizzo di colture bio-protettive (ingredienti)

## Come contrastare le alterazioni da *Pseudomonas*?

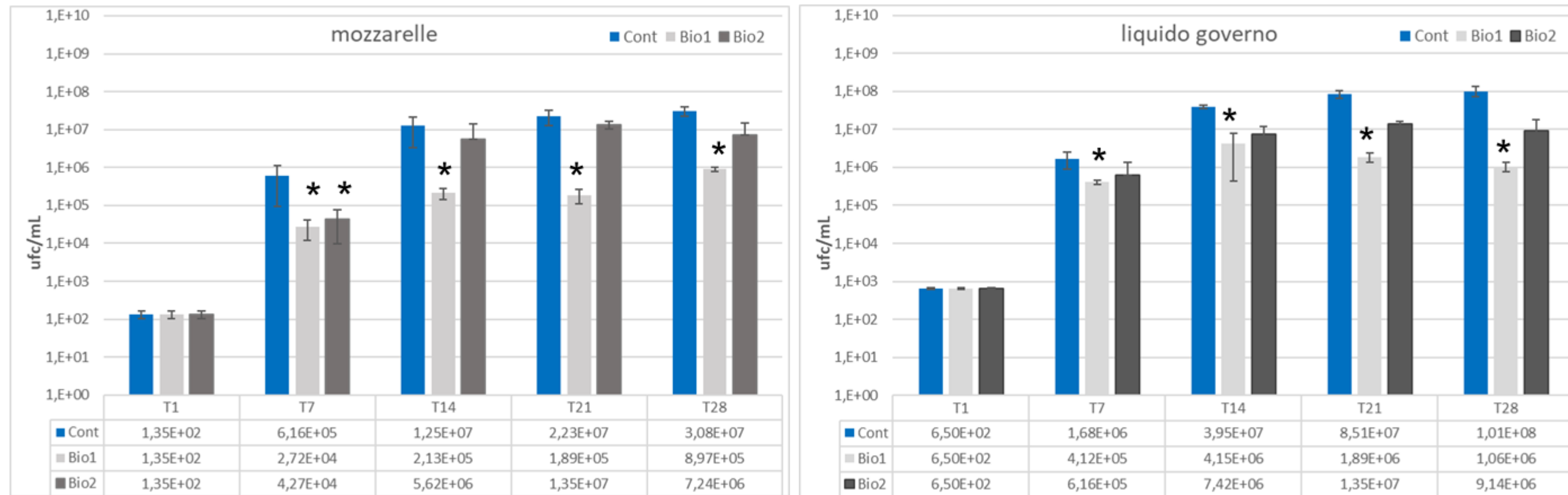
Applicazione di due colture con potenzialità bio-protettive in liquido di governo di mozzarelle da fermentazione biologica.

**Challenge test:** il liquido di governo è stato contaminato da *P. fluorescens* pigmentanti prima del confezionamento e su due campioni sono state aggiunte le colture protettive (Bio1 e Bio2). Le mozzarelle sono state conservate a 6°C fino a 28 giorni di shelf life.



## Come contrastare le alterazioni da *Pseudomonas*?

Applicazione di due colture con potenzialità bio-protettive in liquido di governo di mozzarelle da fermentazione biologica.



T 7

T 14

T 21

T 28





# GRAZIE

**FLAVIO TIDONA**

**Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi  
dell'economia agraria (CREA)**

**[flavio.tidona@crea.gov.it](mailto:flavio.tidona@crea.gov.it)**

**SCIENZA E TECNICA  
LATTIERO - CASEARIA**

