

EFFICACIA DELLA DEPURAZIONE SULLA SICUREZZA DI MITILI (*Mytilus galloprovincialis*) ALLEVATI NEL GOLFO DI OLBIA

EFFICACY OF DEPURATION ON SAFETY OF MEDITERRANEAN MUSSELS (*Mytilus galloprovincialis*) REARED IN THE OLBIA GULF

Meloni D.¹, Mureddu A.¹, Pisanu M.², Serra S.³, Piras A.³, Virgilio S.², Mazzette R.¹

¹ DBA - Sez. Ispezione Alimenti di O.A., Sassari; ² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari; ³ ASL n°2, Olbia

SUMMARY

The aim of the present study was to investigate the effect of depuration on the safety of Mediterranean mussels harvested in the Olbia gulf and to evaluate the efficacy of *E.coli* and *Salmonella spp.* as indicators of the presence of naturally occurring *Vibrios* and other pathogens (viruses causing hepatitis, *L.monocytogenes* and *S.aureus*). Samples of mussels belonging to 5 batches of products, from 2 Depuration Centers, were collected before depuration (T0), after 4h (T4) and at the end of depuration (T8). Results showed an overall efficacy of the depuration in respect to *E.coli* moderate counts. A depuration for ~8 hours led to a rapid decline in the concentration, complying to the Food Safety Criteria of the Reg. (EC) 2073/2005. The decline in numbers of *E.coli*, does not correlate with the presence of naturally occurring *Vibrios*, which decline at an even slower rate. The adoption of shorter treatments times for mussels with high initial counts of *Vibrios* could lead to a reduction unfitted to guarantee the safety of consumers.

Key words

Mussels, depuration, Food Safety Criteria, Vibrio spp.

INTRODUZIONE

La sicurezza dei molluschi bivalvi viene valutata in relazione al rispetto dei criteri microbiologici e biotossicologici previsti dal Reg.(CE) n.2073/2005 e dal Reg.(CE) n. 853/2004, All. II, Sez. VII, Cap. V. Secondo i dati del Centre of Disease Control (Usa) le tossinfezioni connesse al consumo di molluschi sono causate principalmente (20%) da patogeni abitualmente presenti nell'ambiente marino, come *Vibrio spp.*, mentre ai batteri di origine fecale (*Salmonella spp.* ed *E.coli*), contaminanti accidentali delle acque, viene attribuito un ruolo inferiore (4%)(12). Le malattie alimentari associate ai vibrioni patogeni sono caratterizzate da un elevato tasso di mortalità (0,59%), 10 volte superiore(10) a quello attribuito a *Salmonella spp.* (0,041%) e *E.coli* patogeni (0,045%). Anche i virus enterici, tra cui quello dell'Epatite A (HAV) e i Norovirus (NV), assumono un ruolo sem-

pre più rilevante nella determinazione di infezioni connesse al consumo di mitili, la cui incidenza nel nostro paese è stata valutata in 2 casi/100.000 abitanti(3). Le più comuni tecnologie di depurazione dei molluschi bivalvi si dimostrano meno efficaci nei confronti di *Vibrio spp.* e dei virus enterici rispetto ad *E.coli*, la cui contaminazione può essere ridotta o eliminata in poche ore(5). La ricerca di *Salmonella spp.* ed *E.coli* viene ritenuta scarsamente predittiva nei confronti dei vibrioni patogeni, salvo che per *V.cholerae O1*(1), e dei virus enterici(7). Il presente lavoro è stato programmato al fine di acquisire dati utili alla valutazione dell'efficacia dei sistemi di depurazione in mitili (*Mytilus galloprovincialis*) allevati nel golfo di Olbia, area tradizionalmente vocata a tali produzioni. In particolare è stato valutato l'impatto del trattamento sui parametri di sicurezza previsti dalla normativa comunitaria e su altri patogeni, per i quali ai fini della definizione di criteri

specifici sono ritenuti necessari ulteriori approfondimenti.

MATERIALI E METODI

L'indagine è stata condotta su campioni di mitili prelevati presso 2 Centri di Depurazione (CDM) e Spedizione (CSM), annessi agli allevamenti. I CDM (A e B) differivano per la struttura dell'impianto di depurazione, basato sull'impiego di 2 sistemi di filtrazione (meccanico e biologico), di ozonizzazione (CDM B), sull'azione di lampade a raggi UV (l 254 nm): in A veniva applicato un sistema a "ciclo chiuso", basato sul ricircolo di acqua potabile con aggiunta di sale marino; in B il sistema di depurazione a "ciclo aperto" prevedeva l'utilizzo dell'acqua marina. Per ciascun CDM sono stati analizzati campioni di mitili appartenenti a 5 lotti (L10L5) di produzione. Nel corso di ciascun campionamento sono stati monitorati la temperatura, la salinità e il pH dell'acqua utilizzata per la depurazione. Per ciascun lotto venivano prelevati campioni di mitili (circa 2 kg) nelle seguenti fasi: a) al momento dell'ingresso nello stabilimento di depurazione (T0); b) in una fase intermedia, dopo circa 4 ore (T4); c) al termine del processo, dopo circa 8 ore, immediatamente prima del confezionamento (T8). La preparazione del campione da sottoporre ad analisi è stata effettuata secondo quanto indicato nelle norme di riferimento (EN/ISO 6887-3:2004; EN/ISO 7218:2007). Su ciascun campione sono stati determinati i seguenti parametri: a) *pH* (metodo potenziometrico, pH-metro Crison GLP22); b) *E.coli* (ISO/TS 16649-3:2005); c) *Salmonella spp.* (EN/ISO 6579:2002); d) *Vibrio spp.*: mediante semina diretta e previo arricchimento (Alkaline Peptone Water + 1% di NaCl, Lab M limited, UK) in Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS *Cholera medium*, Lab M limited, UK), a 20°C per 72h(13) e a 30°C per 24 h(11). N.40 ceppi, scelti tra quelli isolati nelle tre fasi e rappresentativi dei due stabilimenti, sono stati sottoposti alle prove di identificazione di genere(11) e di specie, mediante sistema API 20E (bioMerieux, France) modificato(6); e) *L.monocytogenes* (EN/ISO 11290-1:1996 e EN/ISO 11290-2:1998); f) *S.aureus* (APHA, 2001); g) *Virus dell'Epatite A* (HAV): mediante protocollo di RT-PCR(2). I risultati sono stati sottoposti ad analisi della varianza mediante procedura GLM (Statgraphics Plus 5.1).

RISULTATI

I valori medi della temperatura dell'acqua sono risultati compresi tra +12 e +13°C, il pH (media±d.s.) era 7,64±0,03 e 8,24±0,18, mentre la salinità era 24,2±2,2 e 37,0±1,0 ‰, rispettivamente nei CDM A e B. I risultati relativi alla determinazione del pH e dei parametri di sicurezza nei mitili sono riportati nelle tabelle 1 e 2. a) *pH* - i valori medi sono risultati omogenei tra i due stabilimenti, in relazione al lotto, e irregolarmente inferiori nei prodotti al termine del processo: 6,35±0,06 (T0), 6,26±0,01 (T4) e 6,25±0,04 (T8). b) *E.coli* - la presenza è risultata variabile (p<.05) in relazione al lotto di produzione e, in tutti i campioni, contenuta entro i limiti previsti dal Reg. (CE) 2073/2005 per i prodotti immessi sul mercato. La prevalenza era pari al 100% dei campioni prelevati al T0, al 100 e al 60% al T4, al 60 e al 20 % al T8, rispettivamente in A e B. I campioni appartenenti al L5 presentavano livelli più elevati. Il valore massimo, pari a 230MPN/100g, è stato riscontrato solo in tre campioni appartenenti ai lotti L3 e L5, prelevati al T0. Nel corso del processo si è assistito ad una progressiva riduzione della contaminazione. c) *Salmonella spp.* - non è mai stata rilevata. d) *Vibrio spp.*: la prevalenza è risultata elevata (dal 40 al 100%), indipendentemente dal CDM di provenienza, dal lotto e dalla fase di campionamento. I livelli di contaminazione, valutati mediante semina diretta, sono risultati superiori di circa 1 unità logaritmica nei campioni esaminati dopo incubazione a 30°C rispetto a quelli a 20°C. Inoltre, come atteso, i valori ottenuti previo arricchimento sono risultati superiori, ma non sono state riscontrate differenze significative in relazione alle temperature di sviluppo. Nel corso del trattamento di depurazione è stata evidenziata una limitata e disomogenea riduzione delle prevalenze e del livello di contaminazione di *Vibrio spp.*, generalmente contenuta entro 1 unità logaritmica. N. 25 dei 40 ceppi sottoposti ad identificazione provenivano dal CDM A, i restanti 15 dal CDM B. Le specie prevalenti sono risultate *V.alginolyticus* (52,5%), *V.fluvialis* (30%), *V.cholerae* (10%), *V.parahaemolyticus* (5%) e *V.vulnificus* (2,5%). La distribuzione delle specie è risultata omogenea tra i due CDM e in relazione alle fasi di prelievo. La prevalenza di *V.alginolyticus* è risultata pari al 48% nel CDM A e al 60% nel CDM B. I risultati delle identificazioni, seppure preliminari, confermano quanto riportato in bibliografia, relativamente alla prevalenza di *V.alginolyticus* (4, 11). e) *L.monocytogenes*: non è stata riscontrata in nessuno dei campioni. *Listeria spp.* è stata isolata in campioni prelevati al T0, T4 e T8 ap-

partenenti al L3 del CDM A e in 2 campioni relativi al T0 e al T4 del L3 del CDM B. *L.innocua* è risultata la specie prevalente (60%), inoltre sono state isolate *L.seeligeri* e *L.grayi*. *f) S.aureus*: è risultato assente in tutti i campioni. Il livello medio di contaminazione di *Staphylococcus spp.* nei campioni prelevati al momento dell'ingresso nello stabilimento (T0) è risultato pari a $2,95 \pm 0,9$ (CDM A) e $2,32 \pm 0,3$ Log10 ufc/g (CDM B). L'efficacia della depurazione su questo parametro è risultata variabile: i valori riscontrati nei campioni prelevati al T8 sono stati pari a

$2,65 \pm 0,9$ (CDM A) e $2,39 \pm 0,3$ (CDM B). *S.warneri* è risultata la specie prevalente (78%). *g) Virus dell'Epatite A*: tutti i campioni sono risultati negativi.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

I risultati, seppure preliminari e riferiti ad un numero non elevato di campioni, evidenziano l'efficacia dei sistemi di depurazione nei confronti di parametri microbiologici previsti dalla normativa, la

Tabella 1- Parametri di sicurezza (media \pm d.s.) in mitili sottoposti a depurazione. Viene riportata la % dei campioni positivi, se diversa dal 100%.

Parametro	CDM	Fase della depurazione		
		T0	T4	T8
pH	A	$6,31 \pm 0,02$	$6,27 \pm 0,04$	$6,28 \pm 0,03$
	B	$6,39 \pm 0,10$	$6,25 \pm 0,12$	$6,22 \pm 0,02$
<i>E.coli</i> *	A	$100,2 \pm 3,2$	$47,4 \pm 2,4$	$44 \pm 2,6$ (60)
	B	$137,2 \pm 93,5$	$38 \pm 34,6$ (60)	$20 \pm 0,0$ (20)
<i>Salmonella spp</i>	A	-**	-	-
	B	-	-	-
<i>Virus epatite A</i>	A	-**	-	-
	B	-	-	-

Legenda:*= MPN/100g; **= inferiore al limite di sensibilità della metodica

Tabella 2- Risultati della ricerca di *Vibrio spp* (media \pm d.s. \log_{10} u.f.c. /g), mediante semina diretta e previo arricchimento, in mitili sottoposti a depurazione. Viene riportata la % dei campioni positivi, se diversa dal 100%.

<i>Vibrio spp</i>	T°*	CDM	Fase della depurazione		
			T0	T4	T8
Semina diretta	20°C	A	$3,15 \pm 0,751$	$2,43 \pm 0,26$	$2,60 \pm 0,56$
		B	$2,88 \pm 0,83$ (80)	$2 \pm 0,0$ (40)	$2,67 \pm 0,95$ (40)
	30°C	A	$3,76 \pm 0,94$	$3,32 \pm 0,12$ (80)	$3,11 \pm 0,50$
		B	$3,13 \pm 0,56$	$3,37 \pm 0,23$ (80)	$3,24 \pm 0,55$ (80)
Dopo arricchimento	20°C	A	$8,10 \pm 0,57$	$7,06 \pm 0,64$	$7,86 \pm 1,00$
		B	$8,13 \pm 0,65$	$7,81 \pm 0,60$	$7,69 \pm 0,62$
	30°C	A	$8,04 \pm 0,67$	$7,59 \pm 0,58$	$8,04 \pm 0,63$
		B	$8,16 \pm 0,75$	$7,83 \pm 0,45$	$7,61 \pm 0,53$

Legenda:*= Temperatura di incubazione delle piastre di TCBS *Cholera medium*.

cui presenza è risultata non rilevabile o contenuta, anche precedentemente al trattamento. È stata confermata(5) la capacità dei mitili di rilasciare in tempi relativamente brevi *E.coli*, in maniera più efficace nel CDM B rispetto al CDM A. Tale evenienza, in presenza di una limitata contaminazione iniziale, permette ai produttori di ridurre efficacemente i tempi di depurazione (~8 ore). La capacità dei molluschi di rilasciare *Vibrio spp.* è risultata invece notevolmente inferiore. Ciò conferma quanto descritto da altri autori, secondo i quali i mitili trattengono più a lungo tutte le specie microbiche ad habitat acquatico(8). L'inefficacia dei sistemi di depurazione, in presenza di inadeguate misure di condizionamento dei mitili nelle fasi successive alla depurazione, può incrementare il rischio connesso alla presenza di vibrioni potenzialmente patogeni, che possono raggiungere livelli critici per la salute del consumatore(5). La presente indagine costituisce un contributo pratico all'acquisizione di dati di campo a supporto dei criteri per la classificazione degli stabilimenti di depurazione dei mitili in classi di rischio, recentemente predisposta dalla Regione Autonoma della Sardegna(9), e fornisce inoltre utili indicazioni agli OSA relativamente al rispetto dei criteri di sicurezza dei prodotti.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Cavallo R.A., Stabili L. (2002) "Presence of vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* from the Mar Piccolo of Taranto" *Water Res.*, 36, 15, 3719-3726
- 2) Chironna M., Sallustio A., Barbuti S., Quarto M. (2005) "Tipizzazione molecolare di ceppi di HAV in molluschi bivalvi analizzati mediante Real Time PCR" *Atti del V Workshop Nazionale Enter-net Italia*, 28.
- 3) Corrain C., Arcangeli G., Fasolato L., Manfrin A., Rossetti E., Piazza E., Mioni R., Pavoni E., Losio N., Sanavio G., Suffredini E., Croci L. "Influenze climatico-ambientali sulla presenza di virus enterici in molluschi bivalvi" (2007), *Ind. Alim.-XLVI* 277-283.
- 4) Croci L., Serratore P., Cozzi L., Stacchini A., Milandri S., Suffredini E., Toti L. (2001) "Detection of *Vibrionaceae* in mussels and in their seawater growing area" *L. in Appl. Microbiol.*, 32, 57-61
- 5) Croci L., Suffredini E., Cozzi L., Toti L. (2002) "Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio parahaemolyticus*" *J. of Appl. Microbiol.* 92, 460-465.
- 6) Croci L., Suffredini E., Cozzi L., Toti L., Ottaviani D., Pruzzo C., Serratore P., Fischetti R., Goffredo E., Loffredo G., Mioni R., (2006) "Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*" *J. of Appl. Microbiol.* 102, 229-237.
- 7) Franco E., Toti L., Gabrieli R., Croci L., De Medici D., Panà A. (1990) "Depuration of *Mytilus galloprovincialis* experimentally contaminated with hepatitis A virus", *Int.J.of Food Microbiol.*, 11, 321-328.
- 8) Jackson K.L., Ogburn D.M. (1999) "Review of depuration and its role in shellfish quality assurance" *FRDC Project No.96/355. NSW Fisheries Final Report Series No.13 ISSN 1440-3544.*
- 9) <http://www.regione.sardegna.it> "Piano regionale per la vigilanza ed il controllo sanitario della produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi e per la sorveglianza periodica delle zone di produzione e stabulazione dei molluschi bivalvi vivi"-Anno 2008".
- 10) Lipp E.K., Rose J.B. (1997) "The role of seafood in food borne diseases in the U.S.A." *Rev. Scient. et Techn.* 16, 620-640.
- 11) Masini L., Bacchiocchi S., Marangoni V., Santarelli S., Ottaviani D. (2006) "Indagine sulla prevalenza di vibrioni patogeni nei prodotti della pesca e dell'acquacoltura" *Ind.Alim.-XLV* (2006), aprile, 410-413.
- 12) Serracca L., Gallo F., Magone L., Preparo M., Ercolini C., Orlandi M. (2007) "Caratterizzazione biochimica e tossicologica di *Vibrio* patogeni in prodotti ittici" *Ind. Alim.*, XLVI, 881-886.
- 13) Serratore P., Rosmini R., Bignami G. (2007) "Miglioramento della qualità e della shelf-life di molluschi bivalvi vivi. Messa a punto di sistemi innovativi di vendita al dettaglio" *Atti XVII Convegno Nazionale AIVI*, 411-415.