

RIPRODUZIONE SPERIMENTALE DELLA COLORAZIONE BLU DA *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* BIOVAR IV IN UN FORMAGGIO A PASTA FILATA

ANOMALOUS BLUE COLOURING OF MOZZARELLA CHEESE INTENTIONALLY CONTAMINATED WITH PIGMENT PRODUCING STRAINS OF PSEUDOMONAS FLUORESCENS

Sechi P.¹, Vizzani A.², Scuota S.³, Zicavo A.³, Parmegiani S.¹, Cenci Goga. B.¹

¹Master in Sanità Pubblica Veterinaria e Igiene degli Alimenti, Università degli Studi di Perugia

²Scuola di Specializzazione in Ispezione degli Alimenti di Origine Animale

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche, Perugia

SUMMARY

In summer 2010 a large outbreak of anomalous blue coloration of mozzarella cheese was recorded in Italy and some northern European countries. Official laboratory analysis and health authorities linked the outbreak to the contamination of processing water with strains of *Pseudomonas fluorescens*, although several expert raised the question of how to unequivocally link the blue coloring to the presence of the micro-organism. In an attempt to set-up a method to determine whether a given *Pseudomonas* spp. strain is responsible of the defect, an in vitro system for the evaluation of blue colouring of mozzarella cheese intentionally contaminated with strains of *Pseudomonas fluorescens* was developed. The system is aimed to ascertain whether *P. fluorescens* strains, isolated from mozzarella cheese with anomalous blue coloration, are able to reproduce the blue coloration under controlled experimental condition. 96 trials of experimental inoculation of mozzarella cheese in different preservation liquids, were conducted using various suspension of *Pseudomonas* spp. (*P. fluorescens* ATCC 13525, *P. fluorescens* CFBP 3150, one *P. fluorescens* field strain isolated from blue-colored mozzarella cheese and *P. aeruginosa* ATCC 10145 as positive control) at different concentrations and incubated at different temperatures. Growth curve of all *Pseudomonas* spp. strains tested demonstrated that after three days of incubation the concentration was generally higher than 10⁶ CFU/g of mozzarella cheese incubated in Tryptic Soy Broth (TSB), and higher than 10⁵ CFU/g of mozzarella cheese incubated in preservation liquid. All mozzarella cheeses inoculated with the field strain of *Pseudomonas fluorescens* showed the characteristic anomalous blue coloration, which is often associated with *Pseudomonas fluorescens* contamination of water used during mozzarella cheesemaking. With the proposed system, which enabled a considerable amount of samples to be analysed under controlled experimental conditions and a large number of data to be generated in a short time, we demonstrated that the presence of *Pseudomonas fluorescens* in blue coloured mozzarella cheese is a necessary and sufficient condition.

KEYWORDS

mozzarella, cheese, *Pseudomonas*, *fluorescens*, blue

INTRODUZIONE

Diversi microrganismi sono in grado di produrre pigmenti negli alimenti. Nella carne conservata a temperature di refrigerazione possono

sviluppare batteri psicrotrofi, come *Acinetobacter* spp., *Moraxella* spp., *Pseudomonas* spp. che degradano i grassi, provocando odori anomali e colorazione grigio-bruna. *Pseudomonas phosphorescens* provoca la formazione di aree lumi-

nescenti sulle carni bovine e suine, osservabili anche al buio. Nei prodotti lattiero caseari vanno citati *Pseudomonas synxantha*, che dà al latte un colore giallo, *Pseudomonas syncyanea*, che rende il latte blu e *Serratia marcescens*, che conferisce colore rosso (3-9). Nell'estate del 2010 sono stati segnalati diversi incidenti collegati alla colorazione anomala di mozzarelle prodotte in Europa (http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm).

Le analisi ufficiali hanno ricondotto le cause alla presenza di stipiti di *Pseudomonas fluorescens* nell'acqua di lavorazione, ma alcuni esperti hanno sollevato la questione di come collegare inequivocabilmente il difetto alla presenza del microrganismo. Nel tentativo di definire un metodo per valutare se un determinato isolato di *Pseudomonas* spp. possa essere responsabile del difetto, abbiamo sviluppato un procedura in vitro per la valutazione della produzione di pigmento blu in mozzarelle prodotte in scala di laboratorio e contaminate con diversi stipiti di *P. fluorescens*.

Il sistema può così essere utilizzato per determinare se stipiti di *P. fluorescens*, isolati da mozzarelle con colorazione anomala sono in grado di riprodurre il difetto in condizioni sperimentali controllate. Scopo del lavoro è stato di simulare:

- a) la contaminazione del liquido di governo con diversi stipiti di *Pseudomonas* spp.,
- b) le condizioni di conservazione delle mozzarelle dopo il confezionamento (abuso termico o refrigerazione),
- c) le condizioni a cui le mozzarelle possono essere mantenute dal consumatore dopo l'apertura della confezione (abuso termico o refrigerazione).

MATERIALI E METODI

Nel corso della ricerca, sono state calcolate le curve di crescita di quattro stipiti di *Pseudomonas* spp. in brodo e in liquido di governo, a diverse temperature (10 e 25°C), analizzando mozzarelle e liquido su tre trial, per un totale di 96 ripetizioni.

Produzione di mozzarella

Le mozzarelle, delle dimensioni di 2 cm di diametro, sono state prodotte in caseificio con acidificazione del latte e cagliata per addizione di siero innesto naturale. La coagulazione, è stata ottenuta per aggiunta di caglio naturale di vitello. Al termine della maturazione, la cagliata, dopo miscelazione con acqua bollente, è stata filata e poi mozzata nelle forme previste, poste quindi in acqua potabile fino a rassodamento. La salatura è stata eseguita in salamoia. Il pro-

dotto confezionato è stato mantenuto nel suo liquido di governo fino all'inizio dell'esperimento.

Contaminazione delle mozzarelle

Le mozzarelle sono state poste in liquido di governo (LG) (acqua di filatura con 0,2% NaCl e 0,05% acido lattico, pH 4) e in brodo di coltura (TSB) (TSB, Oxoid, Basingstoke, UK) contaminato con *P. fluorescens* ATCC 13525 (PSF ATCC), *P. fluorescens* CFBP 3150 (PSF CFBP), *P. fluorescens* isolato nell'estate 2010 da mozzarella con colorazione blu (Fotografia 1) (PSF 349) e *P. aeruginosa* ATCC 10145 (PSA) per ottenere le seguenti concentrazioni finali: 0 (controllo), 10 UFC/ml di LG o TSB (1) 10³ UFC/ml di LG o TSB (3).

Evoluzione di Pseudomonas spp

Sono stati effettuati prelievi al tempo 1 giorno (1), 3 giorni (3) e 5 giorni (5) seminando sia il liquido di governo e il brodo che prelievi di mozzarella, sui seguenti terreni di coltura: King A, King B, *Pseudomonas* agar base con *pseudomonas* CN selective supplement (Oxoid), *Pseudomonas* agar base con *pseudomonas* CFC selective supplement (Oxoid) e LPGA, incubati a 10°C e a 25°C, per 24-72h.

Valutazione della colorazione blu

La valutazione della colorazione blu è stata effettuata su mozzarelle prelevate al tempo 0, 1 ora, 6 ore, 12 ore, 24 ore, 48 ore, 72 ore, poste a 10°C e a 25°C e ciascuna osservata al tempo 1 ora, 6 ore, 12 ore, 24 ore, 3 giorni (72 ore) e 8 giorni (192 ore).

RISULTATI

L'evoluzione di *Pseudomonas* spp. sia in LG che in TSB è mostrata nelle figure 1 e 2 in cui sono riportati i dati dello stipite bluogeno *Ps. fluorescens* PSF 349. La comparsa della colorazione anomala è mostrata nella figura 3 e nella fotografia 2. La curva di crescita per tutti gli stipiti ha raggiunto concentrazioni maggiori di 10⁶ UFC/g in mozzarelle incubate in Tryptic Soy Broth (TSB) e maggiori di 10⁵ UFC/g in mozzarelle incubate in liquido di governo. L'osservazione delle mozzarelle ha permesso di evidenziare la comparsa della colorazione blu già dopo appena 6 ore di permanenza in liquido di governo contaminato con lo stipite bluogeno di *Ps. fluorescens* e 6 ore in frigorifero.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Con questa serie di esperimenti è stato possibile confermare che la causa della colorazione anomala di mozzarelle, verificatasi nell'estate 2010,

è riconducibile con certezza alla presenza di *Ps. fluorescens*, avendo riprodotto l'anomalia attraverso la contaminazione di liquido di governo con un isolato proveniente da mozzarelle con colorazione blu. È interessante rilevare come l'anomalia sia riscontrabile sia in mozzarelle conservate in condizioni di abuso termico, sia in mozzarelle conservate a temperature di refrigerazione.

Il modello sperimentale descritto è peraltro utilizzabile in luogo dell'inoculo su quei terreni di coltura che potenziano la produzione di pigmento (1; 2). Nei confronti di queste formulazioni il modello da noi proposto presenta il vantaggio della ripetibilità, della facilità di esecuzione e della esatta riproduzione delle condizioni di conservazione.

BIBLIOGRAFIA

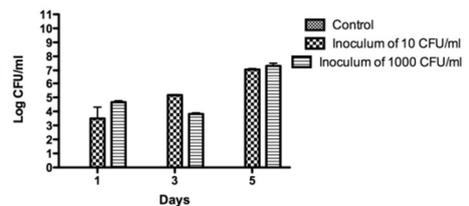
- Cantoni, C., Marchisio, E., & Galli, M. (2000). Causa della colorazione blu-verde delle mozzarelle. *Industrie alimentari*, 39, 586-588.
- Cantoni, C., Stella, S., Ripamonti, B., & Marchese, R. (2001). *Pseudomonas fluorescens* e alterazione di colore delle mozzarelle. *Industrie alimentari*, 40, 33-35.
- Cenci Goga, B., Clementi, F., & Di Antonio, E. (1995). Behaviour of lactic and non lactic microflora during production and ripening of on-farm manufactured Pecorino cheese. *Annals of microbiology*, 45, 219-235.
- Cenci Goga, B. T., Bystricky, P., Clementi, F., & Di Antonio, E. (1993). Technology of a typical ewe cheese: evaluation of lactic and non-lactic microflora in Brindza production. *FEMS Microbiology Reviews*, 12 (1-3), 167.
- Diez, A. M., Björkroth, J., Jaime, I., & Rovira, J. (2009). Microbial, sensory and volatile changes during the anaerobic cold storage of morcilla de Burgos previously inoculated with *Weissella viridescens* and *Leuconostoc mesenteroides*. *International Journal of Food Microbiology*, 131(2-3), 168-177.
- Jeppesen, C. (1995). Media for *Aeromonas* spp., *Plesiomonas shigelloides* and *Pseudomonas* spp. from food and environment. *International Journal of Food Microbiology*, 26(1), 25-41.
- Kobayashi, H., Nogi, Y., & Horikoshi, K. (2007). New violet 3,3-bipyridyl pigment purified from deep-sea microorganism *Shewanella violacea* DSS12. *Extremophiles*, 11(2), 245-250.
- Loh, W., Farnbacher, M., Bohne, L., Emmerich, B., & Kersten, H. (1974). Metabolism of ribosomes during thiamine starvation and restoration in *Lactobacillus viridescens*. *BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis*, 353(2), 238-247.
- Su, W.-T., Tsou, T.-Y., & Liu, H.-L. (2011). Response surface optimization of microbial prodigiosin production from *Serratia marcescens*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42(2), 217-222.

RINGRAZIAMENTI

Ricerca condotta con finanziamento Fondazione Cassa di Risparmio di Perugia, Progetto: 2006.0258.020 – Sviluppo locale.

Figura 1. Contaminazione di mozzarella con *Ps. fluorescens* PSF 349. Analisi del liquido di governo.

Contamination of mozzarella with *Pseudomonas fluorescens* biovar IV in preservation liquid at 10°C



Contamination of mozzarella with *Pseudomonas fluorescens* biovar IV in preservation liquid at 25°C

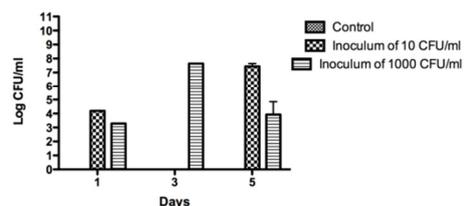


Figura 2. Contaminazione di mozzarella con *Ps. fluorescens* PSF 349. Analisi delle mozzarelle.

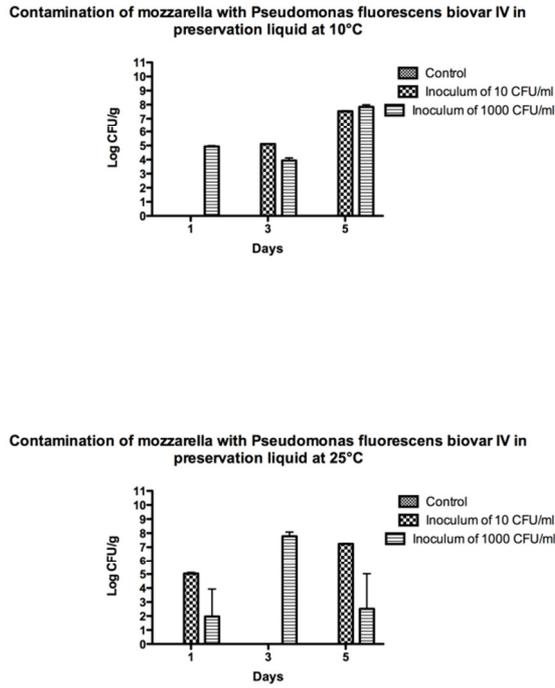
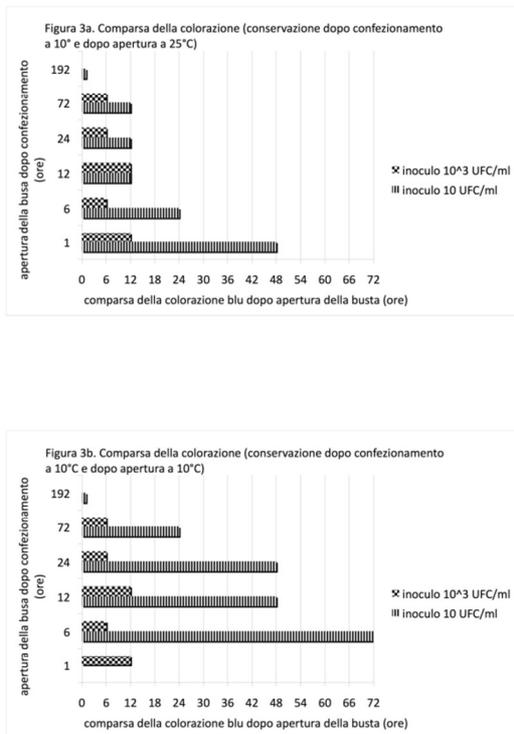


Figura 3. Comparsa della colorazione blu a differenti condizioni di conservazione (ore).



Fotografia 1. Mozzarella con colorazione blu da cui è stato isolato lo stipite di *Ps. fluorescens* PS 349.



Fotografia 2. Riproduzione sperimentale della colorazione blu in mozzarelle prodotte in scala di laboratorio

