

IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA DI SPECIE FUNGINE ISOLATE DALL'ARIA PRESENTE NELLE CELLE FRIGORIFERE SITE NEI REPARTI DIPENDENTI DALLA BRIGATA MECCANIZZATA "AOSTA" DELLA SICILIA ORIENTALE

BIOCHEMICAL IDENTIFICATION OF FUNGAL SPECIES FROM AIR INSIDE REFRIGERATION CELLS IN "AOSTA" MECHANIZED BRIGADE'S REGIMENTS LOCATED IN ORIENTAL SICILY

Marino A.M.F.¹, Puglisi M.L.¹, Muratore A.¹, Giunta R.¹, Longo A.², Salvaggio A.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

²Esercito Italiano- Comando Brigata Meccanizzata "Aosta"- Messina

SUMMARY

In our study, we have identified and typed mycotic colonies after isolation from air sampled in refrigeration cells of the "Aosta" Mechanized Brigade's Regiments, in Eastern Sicily, through an active air sampling system. Typing has been carried out through macro and microscopic examinations and biochemical identification system machine called "Biolog". All isolated mycotic species belonged to *Aspergillus* and *Penicillium* genus, which have both direct and indirect pathogenic concern for human beings.

KEYWORDS

Barrack, refrigeration cells, air, fungi, typing.

INTRODUZIONE

Il monitoraggio del livello di contaminazione fungina dell'aria presente all'interno di una cella frigorifera adibita allo stoccaggio di matrici alimentari è uno strumento utile alla valutazione del livello igienico ivi presente. Infatti i frammenti miceliari e le spore fungine hanno caratteristiche adatte al trasporto aereo, sono resistenti agli stress ambientali e la loro presenza è favorita dall'elevata umidità¹. La valutazione della carica fungina è però incompleta se non è supportata da una tipizzazione delle specie fungine isolate, che consenta di stabilirne il grado di patogenicità diretta o indiretta. Le matrici alimentari infatti rappresentano un substrato ideale per lo sviluppo di funghi filamentosi quali quelli appartenenti ai generi *Aspergillus* e *Penicillium* su alcune matrici sono normali, ma nella maggior parte dei casi sono indici di scarsa

igiene ambientale e possibili produttori di tossine che sono in grado di produrre per inalazione allergie, asma e polmoniti, per ingestione gravi effetti tossigeni e per contatto diretto micosi. La stima di tali parametri è ancora più importante quando è riferita alle celle frigorifere annesse a cucine e mense che servono comunità, come nel caso in oggetto riferito alle caserme.

MATERIALI E METODI

Dopo il monitoraggio attivo dell'aria presente nelle celle frigorifere delle tre Caserme sedi di reggimenti appartenenti alla Brigata Mecc. "Aosta" nella Sicilia Orientale, "Ainis" e "Crisafull-Zuccarello" (Messina) e "Sommaruga" (Catania), mediante l'impiego del SAMPL'AIR LITE dell'AES, campionatore attivo ad impatto ortogonale, si è proceduto all'indagine diretta mediante l'osservazione microscopica e macroscopica delle colonie fungine cresciute

sulle piastre di Malt agar precedentemente incubate in un termostato a 25°C per 3-5 gg⁴. Per l'esame microscopico a fresco è stato prelevato del materiale dalle colonie in coltura e mescolato con blu di lattofenolo in rapporto 1:1, in tale colorazione l'acido lattico svolge un'azione chiarificante, l'acido fenico agisce come antisettico, il glicerolo impedisce l'essiccamento e il blu metile colora le strutture fungine. Contemporaneamente è molto importante svolgere l'analisi macroscopica della colonia per valutare aspetto, colore, dimensioni e produzione di pigmenti. Dopo aver determinato il genere di appartenenza dei funghi in coltura si è proceduto con l'analisi biochimica mediante il sistema di Identificazione Biolog. Questo sistema rileva il metabolismo delle cellule fungine mediante reazioni biochimiche che utilizzano le diverse fonti di C contenute in una microplate composta da 96 pozzetti. Si procede innanzitutto inoculando delle piastre di Malt Agar al 2% poggiando delicatamente sull'agar l'ansa

impregnata di colonia fungina, in corrispondenza dei tre angoli di un immaginario triangolo equilatero. Dopo avere identificato macro e microscopicamente il genere d'appartenenza del microrganismo, si procede con l'allestimento delle microplate: a tale scopo si prepara una sospensione di coltura fungina in un apposito fluido di inoculazione: l'FF-IF (Filamentous Fungi Inoculation Fluid). Una volta raggiunto il valore di torbidità previsto dalla procedura, si provvede ad inoculare con 100µl della sospensione, ciascun pozzetto della microplate FF, specifica per i funghi filamentosi, che viene poi incubata a 25-26° C per 24, 48, 72, 96 ore, sottoponendola a letture quotidiane delle reazioni che sviluppa².

RISULTATI

I risultati elaborati sono riassunti nella Tab.1) dalla quale si evince che le specie fungine rinvenute sono appartenenti ai generi *Aspergillus* e *Penicillium*³.

Tabella 1. Raccolta risultati tipizzazione agenti micotici

N	Caserma	Cella	°C Cella	S	Calcolo colonie Malt pre-S	E.M.	Risultato tipizzazione Biolog	Calcolo colonie Malt Post-S	E.M.	Risultato tipizzazione Biolog (dopo sanificazione)
1	Caserma Ainis Messina	Salumi e Formaggi	5°C	A	145 CFU/m3	Aspergillus Penicillium	29% <i>Aspergillus niger</i> var. <i>awamori</i> 35% <i>Penicillium commune</i> 30% <i>Penicillium solitum</i>	90 CFU/m3	Penicillium Aspergillus	23% <i>Penicillium commune</i> 6% <i>Aspergillus niger</i> var. <i>awamori</i> 30% <i>Penicillium solitum</i> 41% <i>Penicillium glabrum</i>
2				B	105 CFU/m3	Penicillium	25% <i>Penicillium commune</i> 25% <i>Penicillium solitum</i> 50% <i>Penicillium decubens</i>	75 CFU/m3	Penicillium Aspergillus	23% <i>Aspergillus niger</i> var. <i>awamori</i> 73% <i>Penicillium glabrum</i> 13% <i>penicillium commune</i>
3				C	45 CFU/m3	Penicillium	66% <i>Penicillium commune</i> 34% <i>Penicillium solitum</i>	90 CFU/m3	Penicillium	42% <i>Penicillium solitum</i> 58% <i>Penicillium commune</i>
4				D	115 CFU/m3	Penicillium	100% <i>Penicillium commune</i>	55 CFU/m3	Penicillium	45% <i>Penicillium glabrum</i> 45% <i>penicillium solitum</i> 10% <i>Penicillium commune</i>
5	Caserma Ainis Messina	Frutta e Verdura	8°C	A	190 CFU/m3	Penicillium	48% <i>Penicillium solitum</i> 52% <i>Penicillium glabrum</i>	530 CFU/m3	Penicillium	3% <i>Penicillium commune</i> 52% <i>Penicillium solitum</i> 46% <i>Penicillium glabrum</i>
6				B	390 CFU/m3	Penicillium	59% <i>Penicillium solitum</i> 41% <i>Penicillium commune</i>	500 CFU/m3	Penicillium	3% <i>Penicillium commune</i> 42% <i>Penicillium solitum</i> 46% <i>Penicillium glabrum</i>

N	Caserma	Cella	°C Cella	S	Calcolo colonie Malt pre-S	E.M.	Risultato tipizzazione Biolog	Calcolo colonie Malt Post-S	E.M.	Risultato tipizzazione Biolog (dopo sanificazione)
7				C	370 CFU/m3	Penicillium	35% Penicillium solitum 42% Penicillium commune	455 CFU/m3	Penicillium	26% Penicillium commune 32% Penicillium solitum 42% Penicillium glabrum
8	Caserma Ainis Messina	Carni Bianche e Rosse	5°C	A	50 CFU/m3	Penicillium	50% Penicillium solitum 50% Penicillium commune	145 CFU/m3	Aspergillus Penicillium	4% Aspergillus niger var. awamori 26% Penicillium solitum 11% Penicillium commune 26% Penicillium glabrum
9				B	30 CFU/m3	Penicillium	66% Penicillium glabrum 33% Penicillium solitum	155 CFU/m3	Penicillium	21% Penicillium solitum 41% Penicillium commune 38% Penicillium glabrum
10				C	50 CFU/m3	Penicillium	50% Penicillium solitum 50% Penicillium decubens	135 CFU/m3	Penicillium	56% Penicillium solitum 42% Penicillium glabrum
11				D	60 CFU/m3	Penicillium	50% Penicillium decubens 33% Penicillium commune 17% Penicillium solitum	295 CFU/m3	Penicillium	28% Penicillium glabrum 10% Penicillium commune 57% Penicillium solitum
12				E	100 CFU/m3	Penicillium Aspergillus	89% Penicillium solitum 11% Aspergillus niger var. awamori	210 CFU/m3	Penicillium	40% Penicillium solitum 38% Penicillium glabrum 23% Penicillium commune
13				F	155 CFU/m3	Penicillium	90% Penicillium glabrum 10% Penicillium commune	170 CFU/m3	Penicillium	47% Penicillium glabrum 31% Penicillium commune 34% Penicillium solitum
14	Caserma Ainis Messina	Surgelati	-18°C	A	20 CFU/m3	Penicillium	75% Penicillium decumbens 25% Penicillium commune	10 CFU/m3	Penicillium	100% Penicillium solitum
15	Caserma Crisafulli-Zuccarello	Salumi e Formaggi	+4°C	A	1280 CFU/m3	Penicillium	100% Penicillium solitum	330 CFU/m3	Penicillium	100% Penicillium decubens
16				B	1720 CFU/m3	Aspergillus Penicillium	3% Aspergillus niger var. awamori 49% Penicillium solitum 48% Penicillium glabrum	330 CFU/m3	Penicillium	100% Penicillium decubens
17				C	1415 CFU/m3	Penicillium	100% Penicillium solitum	245 CFU/m3	Penicillium	100% Penicillium decubens
18				D	1125 CFU/m3	Penicillium	100% Penicillium solitum	430 CFU/m3	Penicillium	82% Penicillium decubens 18% Penicillium solitum

N	Caserma	Cella	°C Cella	S	Calcolo colonie Malt pre-S	E.M.	Risultato tipizzazione Biolog	Calcolo colonie Malt Post-S	E.M.	Risultato tipizzazione Biolog (dopo sanificazione)
19	Caserma Crisafulli-Zuccarello	Frutta e Verdura	+6°C	A	725 CFU/m3	Aspergillus Penicillium	1% Aspergillus niger var. awamori 45% Penicillium solitum 54% Penicillium glabrum	1390 CFU/m3	Penicillium	29% Penicillium decumbens 56% Penicillium solitum 15% Penicillium glabrum
20				B	1375 CFU/m3	Aspergillus Penicillium	1% Aspergillus niger var. awamori 60% Penicillium solitum 39% Penicillium glabrum	415 CFU/m3	Penicillium	35% Penicillium decumbens 60% Penicillium solitum 5% Penicillium glabrum
21				C	1000 CFU/m3	Aspergillus Penicillium	2% Aspergillus niger var. wamori 50% Penicillium glabrum 47% Penicillium solitum	255 CFU/m3	Penicillium	39% Penicillium decumbens 50% Penicillium solitum 11% Penicillium glabrum
22				D	1135 CFU/m3	Aspergillus Penicillium	2% Aspergillus awamori 49% Penicillium glabrum 49% Penicillium solitum	100 CFU/m3	Penicillium	48% Penicillium decumbens 8% Penicillium solitum 40% Penicillium glabrum
23				E	885 CFU/m3	Aspergillus Penicillium	2% Aspergillus niger var. awamori 52% Penicillium solitum 46% Penicillium glabrum	120 CFU/m3	Penicillium	28% Penicillium decumbens 50% Penicillium solitum 22% Penicillium glabrum
24				F	955 CFU/m3	Aspergillus Penicillium	1% Aspergillus niger var. awamori 49% Penicillium solitum 50% Penicillium glabrum	1110 CFU/m3	Penicillium	10% Penicillium decumbens 10% Penicillium solitum 80% Penicillium glabrum
25	Caserma Crisafulli-Zuccarello	Carni Bianche e Rosse	+4°C	A	725 CFU/m3	Aspergillus Penicillium	2% Aspergillus niger var. awamori 54% Penicillium solitum 44% Penicillium glabrum	125 CFU/m3	Penicillium	50% Penicillium solitum 50% Penicillium glabrum
26				B	805 CFU/m3	Aspergillus Penicillium	2% Aspergillus niger var. awamori 50% Penicillium glabrum 48% Penicillium solitum	190 CFU/m3	Penicillium	57% Penicillium solitum 43% Penicillium glabrum
27				C	700 CFU/m3	Aspergillus Penicillium	2% Aspergillus niger var. awamori 55% Penicillium glabrum 43% Penicillium solitum	105 CFU/m3	Penicillium	60% Penicillium solitum 40% Penicillium glabrum

N	Caserma	Cella	°C Cella	S	Calcolo colonie Malt pre-S	E.M.	Risultato tipizzazione Biolog	Calcolo colonie Malt Post-S	E.M.	Risultato tipizzazione Biolog (dopo sanificazione)
28				D	650 CFU/m3	Aspergillus Penicillium	1% Aspergillus niger var. awamori 49% Penicillium solitum 50% Penicillium glabrum	115 CFU/m3	Penicillium	30% Penicillium solitum 70% Penicillium glabrum
29	Caserma Crisafulli-Zuccarello	Surgelati	-18°C	A	10 CFU/m3	Penicillium	100% Penicillium solitum	5 CFU/m3	Penicillium	100% Penicillium solitum
30	Caserma Sommaruga	Salumi e Formaggi	5°C	A	295 CFU/m3	Penicillium	56% Penicillium brevicompactum 44% Penicillium polonicum	165 CFU/m3	Aspergillus Penicillium	71% Penicillium polonicum 23% Penicillium commune 6% Aspergillus niger var. awamori
31				B	260 CFU/m3	Penicillium	63% Penicillium brevicompactum 37% Penicillium polonicum	65 CFU/m3	Penicillium	54% Penicillium polonicum 46% Penicillium glabrum
32				C	245 CFU/m3	Aspergillus Penicillium	23% Penicillium brevicompactum 72% Penicillium polonicum 5% Aspergillus niger var. awamori	105 CFU/m3	Penicillium	85% Penicillium polonicum 15% Penicillium glabrum
33				D	305 CFU/m3	Penicillium	37% Penicillium brevicompactum 33% Penicillium glabrum 30% Penicillium expansum	60, CFU/m3	Penicillium	83% Penicillium polonicum 17% Penicillium commune
34				E	290 CFU/m3	Penicillium	20% Penicillium brevicompactum 40% Penicillium glabrum 40% Penicillium polonicum	50 CFU/m3	Penicillium	70% Penicillium expansum 30% Penicillium commune
35	Caserma Sommaruga	Frutta e Verdura	+6°C	A	195 CFU/m3	Penicillium	72% Penicillium brevicompactum 28% Penicillium glabrum	60 CFU/m3	Penicillium	50% Penicillium commune 50% Penicillium glabrum
36				B	200 CFU/m3	Penicillium	30% Penicillium brevicompactum 70% Penicillium glabrum	50 CFU/m3	Penicillium	75% Penicillium commune 25% Penicillium glabrum
37				C	225 CFU/m3	Penicillium	22% Penicillium brevicompactum 88% Penicillium glabrum	445 CFU/m3	Penicillium	98% Penicillium commune 2% Penicillium glabrum
38				D	340 CFU/m3	Penicillium	45% Penicillium brevicompactum 55% Penicillium glabrum	105 CFU/m3	Penicillium	90% Penicillium commune 10% Penicillium glabrum

N	Caserma	Cella	°C Cella	S	Calcolo colonie Malt pre-S	E.M.	Risultato tipizzazione Biolog	Calcolo colonie Malt Post-S	E.M.	Risultato tipizzazione Biolog (dopo sanificazione)
39	Caserma Sommaruga	Carni Bianche e Rosse	+4°C	A	1495 CFU/m ³	Penicillium	80% <i>Penicillium brevicompactum</i> 20% <i>Penicillium polonicum</i>	30 CFU/m ³	Penicillium	66% <i>Penicillium polonicum</i> 17% <i>Penicillium commune</i> 17% <i>Penicillium glabrum</i>
40				B	855 CFU/m ³	Penicillium	45% <i>Penicillium brevicompactum</i> 55% <i>Penicillium polonicum</i>	50 CFU/m ³	Penicillium	60% <i>Penicillium polonicum</i> 40% <i>Penicillium glabrum</i>
41				C	965 CFU/m ³	<i>Aspergillus Penicillium</i>	30% <i>Penicillium brevicompactum</i> 65% <i>Penicillium polonicum</i> 5% <i>Aspergillus niger</i> var. <i>awamori</i>	65 CFU/m ³	Penicillium	77% <i>Penicillium commune</i> 23% <i>Penicillium polonicum</i>
42	Caserma Sommaruga	Surgelati	-18°C	A	40 CFU/m ³	Penicillium	100% <i>Penicillium brevicompactum</i>	10 CFU/m ³	Penicillium	100% <i>Penicillium expansum</i>

Legenda: S = scaffali, E.M. = Esame Microscopico, pre-S = pre sanificazione, post-S = post sanificazione

In particolare in tutte le celle frigorifere monitorate è stata riscontrata la presenza di *Aspergillus niger* var. *awamori*. Abbiamo documentato il risultato di un'attività sperimentale, non riteniamo l'*A. niger* var. *awamori* un'emergenza, ma come indicatore ha sicuramente un suo significato, considerato che da diversi autori viene descritto come agente contaminante di cereali (Magnoli et al. 2006), mangimi (Dalcero et al. 2002), uva (Su-lin Lynette Leong 2005; Magnoli et al. 2004), nonché produttore di livelli significativi di tossina. Questo fungo è un produttore di importanti metaboliti tossici come l'ocratossina A e il naphtho-gamma-pirone ed è inoltre un comune contaminante di alimenti ed ambienti indoor. Tra i *Penicilli*, il micete riscontrato nel controllo di tutte le caserme è il *Penicillium glabrum*, questo fungo filamentoso è frequentemente coinvolto nella contaminazione del cibo, portando molto spesso l'alimento al deterioramento tramite la crescita, la produzione di conidi, la sintesi di metaboliti secondari, come la citromicetina ecc. Può essere isolato dalla frutta, torte congelate, succhi di frutta, cereali. Il *Penicillium decumbens* e il *P. solitum* sono stati isolati nelle Caserme "Ainis" e "Crisafulli-Zuccarello" di Messina. Per il *P. solitum* il principale habitat è rappresentato dal cibo, in particolare formaggio, paté di fegato e altri prodotti derivati dalla carne e comunemente dal pesce sottovuoto, inoltre si può trovare nella frutta e nei cereali. Questa

specie è strettamente correlata al *P. commune* anch'esso riscontrato nelle celle frigorifere della Caserma "Ainis". Queste due specie difficilmente possono essere differenziate sulla base della morfologia delle strutture conidiogeniche, è consigliabile quindi l'uso di una identificazione biochimica. Il *P. commune* produce importanti metaboliti tossici come l'acido cyclopiazonic e la rugulovasina A e B, l'habitat è rappresentato dal cibo ed è spesso presente negli ambienti indoor, in particolare rappresenta il più comune contaminante di formaggio molle e stagionato, ma è anche comune nei prodotti a base di carne. Infine sono stati isolati unicamente dalle celle frigorifere della caserma Sommaruga, il *P. expansum*, il *P. polonicum* e il *P. brevicompactum*. Queste specie producono importanti metaboliti tossici, come glicopeptidi nefrotossici, roquefortine C, patulina, brevianamide A. Si riscontrano principalmente nel cibo e negli ambienti indoor, in particolare nei cereali, nei prodotti a base di carne, nelle arachidi, nella frutta, nel mais e nel suolo.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Il comune monitoraggio dell'aria permette di valutare la carica fungina ambientale ma è ulteriormente importante conoscere le specie fungine caratterizzanti tali cariche. Infatti la tipizzazione delle specie isolate permette di

prendere coscienza della eventuale potenziale patogenicità di alcune di esse, in grado di liberare nell'aria spore e composti organici volatili che possono provocare gravi problemi per la salute umana. Esistono studi sul tale pericolo poiché le micosi contratte in ambienti alimentari non risultano assai frequenti. Questa conoscenza motiva ulteriormente a rispettare i corretti interventi di sanificazione con prodotti e modalità specifici per gli ambienti refrigerati ed umidi, quali le celle frigorifere. Concordiamo nel fatto che le specie fungine siano essenzialmente rilevatori di non igienicità, ma considerata la potenziale pericolosità dei loro metaboliti ci è sembrato opportuno sottolineare questo aspetto e proseguire pertanto i nostri studi in tal senso, anche per rafforzare i dati presentati in questo primo studio e per ampliare la casistica disponibile, sottolineando ancora una volta la scarsa disponibilità di dati presenti in letteratura.

BIBLIOGRAFIA

1. A.M.F. Marino, A. Salvaggio, A. Aparo, M.L. Puglisi, A. Scalia, T. Alfonzetti, R. Giunta "Identificazione biochimica di specie fungine isolate dall'aria interna a frigoriferi domestici mediante campionamento attivo". Atti IX Congresso Nazionale FIMUA – CT 27-29 Nov. 2008.
2. MUT (Mycotheca Universitatis Taurinensis) "Introduzione ai funghi dell'aria e degli alimenti: i generi *Aspergillus* e *Penicillium*: Applicazione del Biolog- Dipartimento Biologia Vegetale Università di Torino.
3. Stefano Andreoni, Claudio Farina e Gianluigi Lombardi-Atlante di Micologia Medica- Systems
4. AES Sampl'air Lite User's Manual.
5. "Linee guida per la tutela e la promozione della salute negli ambienti confinati, Ministero della Salute, 2001.
6. Mansi A., Rilevamento, valutazione e controllo della contaminazione microbica in ambienti indoor, ISPESL, 2006.
7. Magnoli C., Astoreca A., Ponsone L., Combina M., Palacio G., Rosa C.A., Dalcerro A.M. Departamento de Microbiologia e Immunologia, Facultad de Ciencias Exactas, Fisico, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Rio Cuarto, Cordoba, Argentina. " Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets. Lett Appl Microbiol. 2004; 39(4):326-31
8. Dalcerro A., Magnoli C., Hallak C., Departamento de Microbiologia e Immunologia Facultad de Ciencias Exactas Fisico Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Rio Cuarto, Argentina. "Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus section Nigri* in Argentina. Food Addit Contam.2002 Nov.; 19(11): 1065-72
9. Magnoli C., Hallak C., Astoreca A., Ponsone L., Chiacchiera S., Dalcerro A.M. ., Departamento de Microbiologia e Immunologia Facultad de Ciencias Exactas Fisico Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Rio Cuarto, Argentina. " Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in commercial corn kernels in Argentina. Mycopathologia 2006 Jan 161 (1): 53-8
10. Su-Lin Lynette Leong " Black *Aspergillus* species: implications for ochratoxin A in Australia grapes and wine"- Discipline of Plant and Pest Science School of Agriculture and Wine University of Adelaide- Mycology and Mycotoxins Food Microbiology CSIRO Food Science Australia July,2005