

# Identificazione e caratterizzazione di batteri alofili isolati da pasta di acciughe

SSICA - Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari,  
Via Nazionale 121/123 - 84012 Angri (SA)

Liliana La Pietra, Alessandra Belfiore, Francesco De Sio, Andrea Lo Voi, Giuseppe Pirone

## RIASSUNTO

La flora dominante in confezioni di pasta di acciughe mantenute a 25°C e in analoghi campioni prelevati dal commercio, gonfi e no, è costituita da cocchi formanti tetradi, catalasi negativi. Sono isolati e caratterizzati 216 ceppi che, per la capacità di accrescersi a concentrazioni di NaCl superiori al 10% e per la sensibilità ai pH acidi, sono identificabili come ceppi alofili del genere *Tetragenococcus*.

Tutti i ceppi sono mesofili e sono divisi, rispetto alle tolleranze al sale, in tre alo-tipi di cui il tipo 2 è il più alofilo, in quanto presenta un optimum compreso fra 5 e 15% ed è in grado di accrescersi fino al 20% di NaCl. L'alo-tipo 2 rappresenta la maggior parte dei ceppi isolati da tubetti gonfi e presenta il 18% dei ceppi istidina-decarbossilasi positivi. Non si riscontrano differenze nella distribuzione dei ceppi isolati da campioni del commercio rispetto a campioni termostatati.

In prove di *shelf-life* condotte a 25°C, alla fine della fase stazionaria, si osserva rigonfiamento dei contenitori per sviluppo di anidride carbonica; il gonfiaggio è dovuto alla decarbossilazione dell'istidina presente nel muscolo per azione di alcuni ceppi dell'alo-tipo 2. La conseguente produzione d'istamina si evidenzia quando la carica microbica supera 10<sup>5</sup> ufc/g.

Analoghi fenomeni biochimici si riscontrano nei campioni prelevati dal commercio.

## INTRODUZIONE

Le acciughe salate sono tipiche semiconserve ittiche mediterranee preparate, mediante processi di decapitazione/eviscerazione, salagione e maturazione, da pesci appartenenti alla famiglia delle *Engraulidae* (1).

Al termine della maturazione, le acciughe vengono desalate e, dopo opportuna preparazione, commercializzate o intere/sfilettate e confezionate in olio o sottoforma di preparazioni come la pasta di acciughe senza applicazione di alcun trattamento termico.

La produzione della pasta prevede una prima fase di triturazione e, dopo aggiunta di olio, una successiva fase di omogeneizzazione cui segue il confezionamento, generalmente, in tubetti di alluminio verniciati internamente (1).

Secondo la FAO, ai fini della prevenzione di rischi sanitari in semiconserve a base di acciughe salate, le caratteristiche chimico-fisiche da raggiungere a fine maturazione sono: pH compresi fra 5,3 e 5,7, umidità inferiore al 50%, valori di  $a_w \leq 0,76$  e concentrazioni di sale NaCl superiori al 15% (2).

Alcuni autori (1) propongono, per prevenire alterazioni putrefattive di questi prodotti, valori di  $a_w$  leggermente inferiori ( $\leq 0,74$ ) e concentrazioni saline superiori ( $\geq 18\%$ ).

La specie batterica predominante nel processo di salagione e maturazione delle acciughe è rappresentata dal *Pediococcus halophilus* (2-4), un microrganismo riclassificato, a seguito di studi genetici (analisi RNA), in un nuovo genere denominato *Tetragenococcus* (5).

I ceppi appartenenti alla specie *Tetragenococcus halophilus* sono descritti come batteri di forma sferica, occasionalmente ovoidi, con tendenza a formare tetradi.

Crescono a concentrazioni di sale NaCl comprese fra 4 e 18%, con un optimum del 5-10% e possono tollerare concentrazioni del 20-26%. Presentano un optimum di temperatura di 30-35°C, con il minimo a 15°C e il massimo a 40°C. Prediligono valori di pH compresi fra 7,0 e 8,0 e riescono a svilupparsi nell'intervallo di pH 5,0-9,6.

Sono anaerobi facoltativi, catalasi negativi e fermentano il glucosio, senza sviluppo di gas, producendo come prodotto finale acido L-(+) lattico con tracce di acido D-(-) lattico variabili fra il 3 e il 25% (6).

Tuttavia le condizioni di crescita possono condizionare il tipo di metabolismo promuovendo l'avvio di vie ca-

taboliche diverse che consentono di migliorare il bilancio energetico.

Fermentazioni acido miste con produzione di vari metaboliti quali acetato, etanolo e formiato possono instaurarsi in casi di ridotte velocità di crescita, limitate concentrazioni di glucosio (6) e anaerobiosi (7).

Holzappel et al. (7) propongono una semplice chiave dicotomica per distinguere fenotipicamente ceppi di *Tetragenococcus* spp. dai pediococchi: essa è fondata sull'alofilia (capacità di accrescersi a concentrazioni comprese fra 10 e 18% NaCl) e sulla sensibilità agli acidi (crescita a pH 9,0 e non a 5,0) esibite dai tetragenococchi.

Una seconda specie con caratteristiche morfologiche e fisiologiche del genere *Tetragenococcus* è stata isolata da salsa a base di fegato di calamaro; differendo, in studi fenotipici, genotipici e filologici, da *T. halophilus*, per essa è proposto il nome *T. muriaticus* (8).

*T. muriaticus* è accomunato con *T. halophilus* dalla mesofilia, presentando un optimum di temperatura compreso fra 25 e 30°C e dalla predilezione per pH alcalini, avendo un optimum fra 7,5 e 8,0 (6, 8).

Ceppo alofilo in grado di accrescersi fino a concentrazioni del 25% di sale, *T. muriaticus* si differenzia da *T. halophilus* per l'incapacità di crescere in assenza di sale (6, 8, 9).

In test di fermentazione degli zuccheri, i ceppi identificati come *T. muriaticus* si distinguono da *T. halophilus* per la capacità di fermentare D-mannitolo, ma non L-arabinosio e saccarosio (8, 9).

L'isolamento da varie matrici di ceppi con profili differenti indica, peraltro, come i *Tetragenococcus* rappresentino una popolazione piuttosto eterogenea riguardo alla fermentazione degli zuccheri e rende inaffidabile tali test ai fini identificativi (9 -13).

Ceppi provenienti da vari alimenti con elevate concentrazioni di sale, pur presentando fenotipi diversi, risultano omogenei all'analisi del DNA facendo ipotizzare che solo un numero limitato di specie possa adattarsi all'ambiente salino (12); le diverse abilità nell'utilizzare i substrati potrebbero essere collegate all'adattamento dei ceppi alla crescita in matrici differenti.

L'identificazione genetico-molecolare è utile per la classificazione delle specie (11).

I tetragenococchi sono considerati microrganismi moderatamente alofili (secondo definizione di Kushner) in quanto presentanti un optimum di concentrazione salina compreso fra 0,5 e 2,5 M (14).

Nei microrganismi alofili, la capacità di tollerare elevate concentrazioni di sale è data dalla possibilità di mantenere l'equilibrio osmotico intracellulare accumulando all'interno sali e/o molecole organiche osmolite quali ectoine, idrossiectoine, betaina di glicina, prolina, ecc. (14).

A differenza di altri alofili moderati, *T. halophilus* non produce osmoprotettori di nuova sintesi; esso regola l'osmosi mediante il trasporto attivo di sostanze esogene quali betaina di glicina e carnitina, se disponibili nell'ambiente o mediante conversione di colina in glicina betaina (15).

L'alotolleranza delle due specie di tetragenococchi giustifica la loro larga diffusione e predominio in habitat ad alta concentrazione salina.

*T. halophilus* e *T. muriaticus* sono microrganismi tipici di prodotti ricchi in sale e proteine.

Il *T. halophilus* è frequentemente ritrovato in diversi prodotti fermentati tipici dell'est e sud-est asiatico, come derivati ittici (9, 16-18), prodotti a base di soya (10-12, 19), vegetali fermentati (20).

Esso è stato isolato da salumi insaccati stagionati (21), ma anche in prodotti intermedi della lavorazione della barbabietola da zucchero come responsabile di alterazione (22).

*T. muriaticus* è diffuso insieme a *T. halophilus* in derivati ittici fermentati (9, 17).

*T. halophilus*, grazie alla sua attività proteolitica, gioca un ruolo importante nella formazione dell'aroma in salse di pesce durante il processo di maturazione.

Esso possiede attività amino-peptidasica in grado di esprimersi anche a concentrazioni saline del 25% con produzione di oligo-peptidi/amminoacidi, precursori di sostanze volatili (18, 23).

In sistemi *in vitro* (brodo di acciughe inoculato) sono riscontrate sostanze desiderabili e caratterizzanti il flavor e l'aroma e fra queste, come composti volatili predominanti, alcol quali 1-propanolo, 1-butanolo e aldeidi quali 3-metil-butanale, 2-metil-propanale, benzaldeide (18, 23); nello stesso sistema (rispetto al controllo) sono, di contro, ridotte le concentrazioni di sostanze indesiderate come il di-metil disolfuro (23).

La capacità di promuovere sostanze desiderabili e di eliminare odori indesiderabili rende utile il loro uso come starter.

Durante i processi di maturazione, amine biogene possono essere prodotte per azione di attività decarbossiliche su aminoacidi.

La produzione di amine biogene sembra, peraltro, favorita da bassi pH ed è adottata da molti microrganismi come meccanismo di sopravvivenza in condizioni di acid stress (pH omeostasi) (24).

Karnop (4) evidenzia che il 53% dei pediococchi alofili isolati da conserve di acciughe prelevate dal commercio è in grado di produrre istamina; in prove di conservazione a 20°C, inoltre, la formazione dell'amina è legata, in particolare, ad aumenti della concentrazione batterica a valori superiori a 10<sup>5</sup> ufc/g.

La produzione di amina, secondo lo stesso autore, può verificarsi anche a concentrazioni saline superiori al 20%, in caso di mantenimento dei prodotti a 20°C e a 5°C, durante stoccaggi a lungo termine (4).

In salse giapponesi a base di pesce, è stato isolato un ceppo, identificato come *T. halophilus*, in grado di produrre istamina fino al 15% di NaCl, alla temperatura di 20-37°C; la produzione d'istamina è promossa da un pH di 6,0 ed è ritardata da un pH di 8,0 (25).

Da salse di pesce thailandesi sono stati isolati ceppi di *T. halophilus* in grado di produrre, in brodo colturale all'isti-

dina, istamina anche a concentrazioni saline del 25% (18).

Gli stessi ceppi inoculati in salse di pesce non inducono aumenti significativi d'istamina rispetto al controllo non inoculato, ma, al contrario, in qualche caso, procurano riduzione del contenuto facendo ipotizzare dall'autore la capacità dei ceppi di degradare l'amina (23).

Da pesce fermentato con crusca di riso, sono stati isolati ceppi di *T. halophilus* fra i quali alcuni produttori d'istamina e altri no (26).

In sardine fermentate e inoculate, un ceppo non produttore d'istamina è in grado di sopprimere la produzione dell'amina da parte dei ceppi produttori indicando che l'uso come starter di tali microrganismi non produttori può aumentare la sicurezza di tali prodotti (26).

L'analisi genetica evidenzia che i geni codificanti l'attività decarbossilasica sono localizzati su plasmidi (25).

Anche la specie *T. muriaticus* è produttrice d'istamina (8); l'isolamento di ceppi negativi per l'amina fa ipotizzare che tale capacità non sia tipica della specie ma ceppo specifica (9).

In studi *in vitro* sui parametri influenzanti la produzione d'istamina, emerge che essa viene prodotta durante la fase stazionaria e favorita in condizioni limitanti di O<sub>2</sub>, con concentrazione di glucosio >1% e a pH di 5,8 rispetto a pH 7,6 (27).

Gli stessi studi rilevano che la produzione è ottimale a una concentrazione salina del 5-7% e nell'intervallo di temperatura di 20-30°C; essa è ridotta, ma non totalmente inibita, a concentrazioni saline del 20% e a 10-15°C rendendo, pertanto, queste concentrazioni e queste temperature non efficaci nel prevenire la formazione dell'amina in prodotti contaminati dal *T. muriaticus* (27).

L'ubiquità di ceppi appartenenti alle due specie di tetragenococchi alofili in grado di decarbossilare l'istidina fa ritenere che entrambe le specie giochino un ruolo importante nella formazione d'istamina in conserve ittiche sottosale.

Le acciughe sono molto suscettibili alla formazione d'istamina per l'alto contenuto d'istidina libera nel muscolo; esse sono comprese nell'elenco dei prodotti della pesca ad alto tenore d'istidina (*Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae*, *Scombrosidae*) e, per i quali, il Regolamento CE (28) prevede un limite al contenuto d'istamina.

Peraltro, casi d'intossicazioni da istamina associati al consumo di acciughe in scatola sono stati registrati in Inghilterra (29) e in Nuovo Galles del Sud (30).

Nel rapporto EFSA (31), in un'indagine sul rischio da amine biogene in alimenti fermentati, emerge che, fra questi, le acciughe essiccate rappresentano la categoria con le concentrazioni d'istamina più elevate nei valori di media (348 mg/Kg) e del 95-percentile (1440 mg/kg).

In letteratura non è riportata la presenza d'istamina in alici fresche (32, 33); istamina è stata riscontrata in acciughe confezionate (2, 4, 32-35) e in pasta d'acciughe (36).

La FDA, nelle sue linee guida, evidenzia, come, nei prodotti ittici, la sintesi dell'amina sia favorita dall'aumentare delle possibilità di contatto fra muscolo e microrganismi istamina produttori, condizioni queste che occorrono durante la trasformazione dei pesci nelle fasi di macellazione, sfilettatura, triturazione, miscelazione (37).

In studi sulle variazioni nel contenuto di amine biogene durante la produzione e stoccaggio di semiconserve di acciughe, si nota una leggera produzione di amine durante le prime fasi della maturazione (33). Nelle stesse prove, durante lo stoccaggio, si osserva aumento d'istamina nei campioni conservati a temperatura ambiente rispetto a quelli refrigerati; la produzione d'istamina è più spinta nelle acciughe confezionate in olio rispetto a quelle in salamoia.

Secondo la FAO (2), le caratteristiche chimico-fisiche acquisite dal prodotto a fine maturazione quali  $a_w \leq 0,76$  e concentrazione salina >15% non consentono, da sole, una completa inibizione della flora batterica. Se le semiconserve vengono tenute a temperature favorevoli (20-25°C), durante lo stoccaggio possono selezionarsi microrganismi alofili quali *T. halophilus* il cui sviluppo può procurare proteolisi del prodotto e accumulo lento e progressivo d'istamina; con la conservazione a temperature di refrigerazione, questi processi di alterazione sono inibiti data la natura mesofila della flora coinvolta. Pertanto, la FAO raccomanda di mantenere le semi-conserve di acciughe salate a temperature inferiori o uguali a 10-15°C per una durata massima di un anno.

Anche Karnop (4) pone l'accento su come, nelle acciughe, la produzione dell'istamina sia secondaria e, cioè, non legata alla flora iniziale del prodotto, ma a microrganismi selezionati in tale matrice per la loro alofilia.

La formazione d'istamina è accompagnata da produzione di gas con rigonfiamento dei contenitori (2, 36); tale fenomeno potrebbe essere dovuto all'accumulo di anidride carbonica derivante dalla decarbossilazione dell'istidina.

Ripetute segnalazioni di confezioni di pasta di acciughe gonfie, hanno indotto il Dipartimento Microbiologia di questo istituto a indagare su tale alterazione e a isolare e caratterizzare i ceppi batterici presenti nel prodotto alterato e no.

## MATERIALI E METODI

### Campioni

48 tubetti di pasta di acciughe, appena prodotti, sono stati mantenuti a 25°C (a simulazione della tempera-

tura ambiente) e prelevati ed esaminati a diversi intervalli di tempo fino a 600 giorni per verificarne la *shelf-life*; 2 campioni di controllo sono stati tenuti in frigorifero a  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$  e analizzati a fine sperimentazione.

Sono stati studiati, in parallelo, 40 campioni di pasta di acciughe in tubetti, provenienti dal commercio, di cui 20 gonfi e 20 di aspetto regolare.

#### *Analisi microbiologica*

In fase preliminare, al fine di individuare i microrganismi di alterazione, sui campioni gonfi sono state eseguite le ricerche qualitative di stafilococchi e micrococchi in terreno Mannitol Salt agar (Oxoid), batteri alofili in terreno Halophilic agar (38) modificato al 15% in NaCl, batteri lattici alofili in APT agar (Biolife) al 7% in NaCl, miceti xerofili in DG18 (Oxoid), batteri anaerobi alofili in SPS (Biolife) con NaCl al 5%.

Su tutti i campioni sono stati eseguiti conteggi di cocchi alofili catalasi negativi mediante terreno APT agar-NaCl 7% agar incubato in anaerobiosi a  $30^{\circ}\text{C}$  per 7 giorni.

#### *Isolamento dei microrganismi*

Da piastre di terreno impiegato per i conteggi, sono state prelevate colonie risultate costituite da cocchi in tetradi, catalasi negativi.

Le colonie sono state re-isolate in terreno APTa-NaCl 5%.

I ceppi sono stati mantenuti in "slant" dello stesso terreno.

#### *Inoculi*

Tutti i test sono stati eseguiti mediante inoculo di 0,1 ml di brodo coltura ottenuta in APT brodo (Biolife) al 5% di NaCl dopo incubazione a  $30^{\circ}\text{C}$  per 7 giorni.

#### *Test fisiologici*

Sui ceppi isolati sono stati eseguiti test fisiologici quali la tolleranza al sale in terreno APT brodo addizionato con concentrazioni crescenti di NaCl da 0 a 20%, la capacità di accrescimento a diverse temperature in brodo APT-NaCl 5% incubato a temperature da 5 a  $55^{\circ}\text{C}$ , la capacità di accrescimento a diversi pH in brodo APT-NaCl 5% con pH variabili da un minimo di 5,0 a un massimo di 9,2.

In tutti i test, ad eccezione delle tolleranze alle temperature, le incubazioni sono state eseguite a  $30^{\circ}\text{C}$  per un massimo di 7 giorni e la capacità di accrescimento è stata valutata mediante misura delle variazioni del pH indotte.

#### *Test sierologici*

Sono stati eseguiti test di agglutinazione al lattice per verificare l'appartenenza al gruppo D di Lancefield (Oxoid).

#### *Test biochimici*

Sono stati eseguiti test di fermentazione degli zuccheri (1%) glucosio, L-arabinosio, maltosio, D-mannitolo, maltotrioso, D-melezitosio, D-ribosio, saccarosio, D-xilosio in brodo estratto di lievito-peptone, al bromocresol porpora, al 5% di NaCl (39).

Nelle brodocolture al glucosio, inoltre, sono state valutate la produzione di gas, mediante campanella di Durham, il pH finale e la stereo-specificità dell'acido lattico prodotto dalla fermentazione mediante analisi enzimatica con kit enzimatici Boehringer Mannheim - Roche.

L'idrolisi dell'arginina è stata effettuata come descritto da Roling *et al.* (10).

In 100 ceppi selezionati con criterio di rappresentatività, è stata ricercata la produzione d'istamina per decarbossilazione dell'istidina, dopo incubazione a  $30^{\circ}\text{C}$  per 7 giorni, in brodo colturale ottenuto modificando il terreno MDA (40) mediante omissione di agar, bromo-cresolporpora, carbonato di calcio e addizione di glucosio all'1% e NaCl al 5%.

La determinazione dell'istamina è stata eseguita mediante test immuno-enzimatico ELISA (TECNA). Per la preparazione del campione, 1 ml di brodo di coltura, è stato diluito a 10 ml con acqua bidistillata e agitato al Vortex per 30 secondi. È stato prelevato 1 ml, posto in vial Eppendorf per centrifuga, e centrifugato per 10 minuti a 2000 GPM. 20  $\mu\text{l}$  di surnatante sono stati portati a 10 ml con acqua bi distillata e 100  $\mu\text{l}$  di questa soluzione sono stati utilizzati per l'esecuzione del test, secondo le modalità prescritte dall'azienda produttrice.

#### *Analisi chimica e chimico-fisica del prodotto*

Sul prodotto da sottoporre a *shelf-life* sono state eseguite previamente la misurazione di  $a_w$ , con misuratore Aqualab modello 3TE e la determinazione della concentrazione % di NaCl, mediante metodo Volhard.

Sui campioni prelevati a vari tempi d'incubazione, sono stati determinati la composizione in aminoacidi liberi e le concentrazioni di acido acetico, acido D-L lattico e istamina.

Sul campione di controllo è stata determinata la concentrazione d'istamina.

Gli aminoacidi liberi sono stati determinati come descritto da Strydom *et al.* (41) e De Sio *et al.* (42).

Il contenuto in istamina è stato determinato diluendo, 1:10, 5 g di prodotto con acqua bidistillata e, dopo agi-

tazione per 30 minuti e filtrazione su carta, procedendo con le stesse modalità adottate per i brodi colturali.

L'acido D-L lattico e l'acido acetico sono stati determinati con analisi enzimatica mediante kit enzimatici Boehringer Mannheim - Roche.

Su campioni provenienti dal commercio (10 gonfi e 10 corrispondenti di aspetto regolare), sono state determinate la concentrazione % NaCl, l' $a_w$  e la composizione in aminoacidi e l'istamina.

Su tutti i campioni sono stati, inoltre, determinati i valori del pH mediante pHmetro CRISON modello GLP21.

#### Analisi dei gas dello spazio di testa

La composizione della miscela dei gas idrogeno, ossigeno, azoto e anidride carbonica presenti nei tubetti è stata determinata mediante gas cromatografo (Dani, mod. Master GC) operante a 50°C con elio come gas di trasporto, equipaggiato con un sensore di temperatura, colonna a setacci molecolari e colonna impaccata CHROM 1447 (Altec).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

L'analisi microbiologica qualitativa eseguita sui campioni gonfi ha evidenziato, nei terreni Mannitol salt agar, Halophilic agar e APT agar al 7% NaCl, sviluppo di colonie costituite da batteri di forma coccica, formanti tetraedi, catalasi negativi; gli stessi microorganismi sono riscontrati in campioni di aspetto regolare.

Non sono stati rilevati accrescimenti in terreni per miceti xerofili e batteri anaerobi alofili.

Dai conteggi eseguiti su terreno APTa-7% NaCl, emerge come la concentrazione di tetragenococchi catalasi negativi sia mediamente di 4,9 Log ufc/g, nei campioni gonfi e di 3,2 Log ufc/g, nei campioni non alterati.

La percentuale di campioni con cariche superiori a  $10^5$  ufc/g è del 10%, in campioni non gonfi e del 55%, in campioni gonfi.

Le distribuzioni di frequenza delle concentrazioni cellulari riscontrate nei vari campioni prelevati dal commercio, gonfi e no, sono rappresentate in Figura 1.

La variazione della stessa carica in campioni termostatati a 25°C è rappresentata in Figura 2.

Dall'esame della curva, si evince, dopo una fase lag di circa 30 giorni, l'aumento della popolazione microbica da una concentrazione iniziale di  $10^3$  ufc/g a una concentrazione finale prossima a  $10^6$  ufc/g.

La fase stazionaria inizia verso i 90 giorni e si protrae fino a circa 150 giorni; il declino della popolazione microbica è alquanto lento e la carica microbica residua si porta, alla fine del periodo considerato (600 giorni), a livelli di circa  $10^2$  ufc/g.

Nei campioni di controllo mantenuti per l'intera durata della termostatazione a temperatura di  $4\pm 2^\circ\text{C}$ , la carica media è risultata pari a 20 ufc/g.

Dalle varie tipologie di campioni, 216 ceppi sono stati isolati e sottoposti a test fisiologici.

In considerazione dell'elevato tenore salino della matrice d'origine, i ceppi in esame sono stati inizialmente caratterizzati rispetto all'alo-tolleranza e, quindi, suddivisi in tre gruppi distinti le cui affinità al sale sono rappresentate graficamente nella Figura 3.

Il tipo 1 comprende ceppi incapaci di crescere in assenza di sale, e alla massima concentrazione utilizzata (20%), con un optimum compreso fra 2 e 10% di NaCl.

Il tipo 2 è il più "alofilo" in quanto in grado di crescere anche al 20%, richiede, per la maggior parte dei ceppi, almeno il 2% di sale e presenta un optimum del 5-15%.

I ceppi del gruppo 3, meno alofili e con un optimum fra 0,5 e 5%, crescono in assenza di sale e con un massimo al 15%.

La distribuzione dei diversi alo-tipi, nei campioni gonfi e no, è schematizzata nella Tabella 1.

In campioni gonfi si riscontrano ceppi appartenenti agli alo-tipi 2 e 3.

Non si rilevano differenze sostanziali nelle distribuzioni degli alo-tipi fra campioni del commercio e campioni termostatati in laboratorio.

La Tabella 2 descrive le caratteristiche fisiologiche riscontrate per i tre tipi di alofili a varie concentrazioni di sale, a diverse temperature testate e in vari ambiti di pH.

Per quanto riguarda le temperature, tutti gli stipiti crescono fra 25 e 35°C, intervallo di temperatura tipico di *Tetragenococcus* spp.

Diversi ceppi del tipo 1 crescono fino a 10 e 45°C, mentre non si osserva sviluppo di alcun ceppo dei tipi 2 e 3 a 10°C; alcuni ceppi del tipo 3 riescono ad accrescersi fino a temperature pari a 50°C.

Per quanto riguarda il pH, i tipi 1 e 2 presentano un optimum compreso fra 6,0 e 8,0, un massimo di 9,0 e, per la maggior parte, un minimo a 6,0.

Il tipo 3 si presenta più tollerante verso i pH acidi, riuscendo a crescere anche a 5,5 e con un optimum a 5,7-7,0.

Tutti i ceppi, per la capacità di accrescersi a concentrazioni di NaCl superiori al 10% e per la sensibilità ai pH acidi, sono identificabili secondo Holzapfel (7) come *Tetragenococcus* spp.; la tolleranza a pH 9,0 è, inoltre, distribuita in alta proporzione negli alo-tipi 1 e 2.

Fra gli alo-tipi 1 e 2 sono stati riscontrati ceppi presentanti antigeni di tipo D in percentuale del 33% e 39%,

rispettivamente.

Le caratteristiche biochimiche dei ceppi sono descritte in Tabella 3.

L'esame dei profili di zuccheri evidenzia come la maggior parte dei ceppi tipo 1 e tipo 2 siano assimilabili a *T. halophilus* per la capacità di fermentare meleztosio, maltotriosio e xilosio (7), saccarosio (7, 8) arabinosio (8); anomala la positività al test del mannitolo (6, 8).

Appare più eterogeneo il profilo degli zuccheri per i ceppi di tipo 3.

Tutti i ceppi producono, dal metabolismo del glucosio, acido L-lattico senza sviluppo di gas; per quanto riguarda l'acido D-Lattico, esso è prodotto in tracce dal tipo 1 e in quantità superiori fino a raggiungere un rapporto dei due isomeri D:L pari a 12:88 dal tipo 3.

Il pH finale è più basso per alo-tipo 1 (4,56) più alto per gli alo-tipo 2 (4,88) e 3 (4,85).

Per quanto riguarda il test dell'arginina, tutti i ceppi del tipo 1 e la maggior parte dei ceppi di tipo 2 e 3 sono in grado di idrolizzare l'aminoacido come riportato da alcuni autori (3,10, 16) e diversamente da quanto descritto dal Bergey's (6) e da Kobayashi et al. (17).

La capacità di decarbossilare l'istidina è presente solo nel tipo 2 con il 18% dei ceppi positivi; la maggior parte di questi isolati, inoltre, è in grado di accrescersi fino al 20% di sale.

Rispetto alla matrice di origine, i ceppi decarbossilasi positivi sono stati isolati in campioni del commercio gonfi e no e, per quelli analizzati durante la *shelf-life*, solo in quelli gonfi.

I parametri chimico-fisici riscontrati previamente nelle confezioni da sottoporre a termostatazione sono tipici del prodotto giunto a maturazione; la concentrazione in NaCl è risultata pari a 15,4%, il valore di  $a_w$  è 0,74 e il pH è 5,42 (Tabella 4).

Durante l'incubazione a 25°C, sono state osservate deformazioni dei contenitori a circa 160 giorni d'incubazione.

Non sono stati costatati rigonfiamenti nei tubetti di controllo refrigerati.

La composizione % dei gas dello spazio di testa evidenzia nei tubetti bombati sviluppo di anidride carbonica.

Nella Tabella 4 sono illustrate le caratteristiche chimiche e chimico-fisiche riscontrate nei campioni di pasta di acciuga a diversi tempi d'incubazione a 25°C.

Le variazioni nel tempo del contenuto di acido lattico e acido acetico e dei valori di pH sono rappresentate graficamente nella Figura 4.

Dopo circa 120 giorni d'incubazione si osserva aumento di acido L-lattico e di acido acetico; non si osservano variazioni nella concentrazione di acido D-lattico per tutto il periodo esaminato.

Per quanto riguarda la composizione in aminoacidi, sono da sottolineare variazioni significative durante la termostatazione degli aminoacidi istidina e arginina.

Le variazioni nel tempo delle concentrazioni d'istidina, istamina e del pH sono messi a confronto graficamente in Figura 5.

Dall'osservazione dell'andamento si evidenziano aumenti della concentrazione d'istamina accompagnati dalla riduzione della concentrazione d'istidina; il contemporaneo abbassamento, in questa fase, dei valori di pH, suggerisce un probabile ruolo di quest'ultimo nella dinamica della reazione di decarbossilazione.

La produzione dell'amina è riscontrabile con concentrazioni batteriche superiori a  $10^5$  ufc/g ed è massima a circa 160 giorni, in corrispondenza del rigonfiamento del contenitore, avvalorando l'ipotesi della produzione di gas dalla decarbossilazione dell'istidina.

Le variazioni successive del pH potrebbero essere collegate, nella fase di aumento, alla produzione dell'amina e, nella successiva fase di diminuzione, con l'esaurirsi dell'istidina, alla produzione di acidi organici per vie metaboliche da valutare.

Nei campioni di controllo (mantenuti a temperatura di refrigerazione) il pH è risultato 5,34 e il contenuto d'istamina è al di sotto del limite di rilevazione (<0,25 mg/100g).

Anche nei campioni gonfi prelevati dal commercio, si osserva produzione di anidride carbonica rispetto ai campioni non gonfi.

Per quanto riguarda i parametri chimici e chimico-fisici, sono stati confrontati, mediante test t di Student, i risultati riscontrati in confezioni di aspetto regolare rispetto a quelli emersi dalle confezioni gonfie.

Dall'analisi dei dati, si evidenziano sensibili differenze per quanto riguarda la concentrazione % del sale NaCl e del parametro  $a_w$  in quanto, nei campioni gonfi, rispetto ai regolari, si notano una concentrazione salina leggermente ridotta e un'attività dell'acqua di poco più alta.

Tali differenze non dovrebbero influenzare l'alterazione, visto che gli alofili *Tetragenococcus* spp., sono in grado di decarbossilare l'istidina anche a concentrazioni saline prossime al 20% (4, 18, 27).

Per quanto riguarda la composizione in aminoacidi liberi, escluse arginina e istidina, non si osservano variazioni significative fra confezioni gonfie e no.

Molto diverse, inoltre, appaiono le concentrazioni riscontrate d'istamina.

In Tabella 5 sono sintetizzati i valori relativi ai parametri pH e  $a_w$  e alle concentrazioni di sale NaCl, arginina, istidina e istamina evidenziate nei campioni prelevati dal commercio.

Nei campioni gonfi, l'alterazione è caratterizzata da valori ridotti nel contenuto medio d'istidina ( $M_{10} = 32,18$  mg/100g), rispetto ai campioni di aspetto regolare ( $M_{10} = 497,98$  mg/100g).

Di contro, il contenuto medio d'istamina risulta di 32,40 mg/100g, nei campioni di aspetto regolare e di 233,65 mg/100g, nei campioni gonfi.

Nei campioni regolari, è stata evidenziata istamina solo in 2 unità fra le 10 considerate; il contenuto riscontrato era pari a 276,0 e 48,0 mg/100 g e, quindi, superiore al limite previsto dal Regolamento CE (28) per i prodotti della pesca sottoposti a trattamento di maturazione in salamoia (per 9 unità campionarie, *m* pari a 200 mg/Kg, *M* pari a 400 mg/Kg e *c* pari a 2).

È da precisare che, in entrambi i campioni, la carica era superiore a  $10^5$  ufc/g, concentrazione considerata significativa per la produzione d'istamina da altri autori (4).

Le alterazioni ritrovate nel prodotto durante la *shelf-life* condotta a 25°C riproducono, pertanto, quanto osservato nei campioni provenienti dal commercio.

## CONCLUSIONI

La flora dominante in campioni di pasta di acciuga gonfi è rappresentata da cocchi formanti tetradi, catalasi negativi; gli stessi micro-organismi, sebbene con concentrazioni leggermente minori, sono riscontrati in campioni di aspetto regolare.

Lo studio dell'evoluzione della popolazione microbica, in prove di *shelf-life* a 25°C, evidenzia lo sviluppo dei tetragenocchi che, dopo una fase *lag* di 30 giorni, raggiungono, nella fase stazionaria (a circa 90 giorni), una concentrazione massima di  $10^6$  ufc/g.

Tutti i ceppi isolati dai campioni del commercio e in *shelf-life*, gonfi e no, sono identificabili come ceppi alofili del genere *Tetragenococcus* per la capacità di accrescersi a concentrazioni di NaCl superiori al 10% e per la sensibilità ai pH acidi; i profili biochimici non consentono l'identificazione della specie. L'occorrenza di tetragenocchi alofili è, peraltro, tipica nei prodotti fermentati ad alto contenuto salino.

I ceppi, mesofili, presentano affinità al sale riconducibile a 3 alo-tipi distinti e, fra questi, si distingue il tipo 2 per la capacità di accrescersi fino al 20% di NaCl e non a 10°C.

I ceppi appartenenti all'alo-tipo 2 sono i più diffusi e rappresentano la flora dominante in tubetti gonfi; il 18% di essi sono istidina-decarbossilasi positivi.

Non si riscontrano differenze nella distribuzione dei diversi alo-tipi fra gli isolati da campioni del commercio rispetto agli isolati da campioni termostatati in laboratorio.

Durante la *shelf-life* condotta a 25°C, alla fine della fase stazionaria si osserva rigonfiamento dei contenitori per sviluppo di anidride carbonica. L'esame chimico del prodotto rileva le riduzioni di arginina e istidina e l'aumento d'istamina.

I fenomeni biochimici osservati riproducono quanto riscontrato nei campioni gonfi e no prelevati dal commercio.

Il gonfiaggio potrebbe essere dovuto alla decarbossilazione dell'istidina presente nel muscolo per azione di alcuni ceppi dell'alo-tipo 2; la produzione d'istamina si evidenzia quando la carica microbica supera  $10^5$  ufc/g.

I microrganismi coinvolti sono in grado di produrre istamina anche a concentrazioni >15% NaCl e a temperatura di 25°C, ma non a 4°C; il controllo della produzione d'istamina da parte di questi batteri mesofili potrebbe essere ottenuto con l'applicazione di temperature di refrigerazione durante le fasi di stoccaggio e distribuzione del prodotto.

Tali microrganismi, peraltro, pur essendo produttori d'istamina, giocano un ruolo importante, grazie alle attività metaboliche, nella formazione di sostanze aromatiche desiderabili per la caratterizzazione del prodotto durante il processo di maturazione.

Per prevenire la produzione d'istamina è ipotizzabile, pertanto, l'utilizzo di starter autoctoni, istamina negativi, la cui applicazione contribuirebbe anche a standardizzare la maturazione e a preservare la tipicità delle caratteristiche organolettiche.

Nuovi studi si rendono necessari per meglio comprendere le attività biochimiche dei tetragenocchi alofili in pasta di acciuga, in particolare, riguardo al consumo di arginina e alla produzione di acido acetico e di altri eventuali metaboliti quali formato ed etanolo.

### Ringraziamenti

Si ringraziano i colleghi Alessandro De Giorgi e Giuseppe Squitieri per la collaborazione prestata.

TAB. 1 - Distribuzione dei diversi tipi di ceppi in campioni, alterati e no, del commercio o termostatati a 25°C (shelf-life)  
 Table 1 - Distribution of different strains in samples, altered and not, from trade or thermostated at 25°C (shelf-life)

			Ceppi Strains			
			Totali Total	Tipo 1 Type 1	Tipo 2 Type 2	Tipo 3 Type 3
			n°	%		
Campioni Samples	Commercio Trade	Tubetti gonfi Swollen tubes	60	0,0	88,3	11,7
		Tubetti regolari Regular tubes	60	23,3	75,0	1,7
	Shelf-life	Tubetti regolari Regular tubes	44	34,1	61,4	4,5
		Tubetti gonfi Swollen tubes	52	0,0	88,5	11,5

TAB. 2 - Caratteristiche fisiologiche dei ceppi alofili isolati in pasta di acciughe (% isolati positivi)  
 Table 2 - Physiological characteristics of halophilic strains from anchovy paste (% positive isolates)

			Tipo 1 Type 1	Tipo 2 Type 2	Tipo 3 Type 3
Sviluppo Growth	NaCl %	0	-	-	+
		0,5	+	6	+
		2	+	84	+
		5	+	+	+
		10	+	+	+
		12	+	+	90
		15	+	99	80
		18	54	82	-
		20	-	27	-
		Optimum	2-10	5-15	0,5-5
	Temperatura Temperature °C	5	-	-	-
		10	33	-	-
		15	96	20	60
		20	+	93	90
		25	+	+	+
		30	+	+	+
		35	+	+	+
		40	+	66	+
		45	46	-	+
		50	4	-	10
	55	-	-	-	
	Optimum	25-35	25-30	30-40	
	pH	5	-	-	-
		5,5	-	-	50
		5,7	-	6	+
		6	+	+	+
		6,5	+	+	+
		7	+	+	+
		7,5	+	+	+
		8	+	+	+
		8,5	+	96	+
		9	70	69	8
	9,2	-	-	-	
Optimum	6,0-8,0	6,0-8,0	5,7-7,0		

Simboli: "+" =100% positivi; "-"=100% negativi  
 Symbols: "+" =100% positive; "-"=100% negative



TAB. 3 - Caratteristiche biochimiche dei ceppi alofili isolati in pasta di acciughe (% isolati positivi)  
 Table 3 - Biochemical characteristics of halophilic strains from anchovy paste (% positive isolates)

		Tipo 1 Type 1	Tipo 2 Type 2	Tipo 3 Type 3
Catalasi Catalase		-	-	-
Fermentazione Fermentation	Glucosio Glucose	+	+	+
	L-arabinosio L-arabinose	+	92	44
	Maltosio Maltose	+	96	+
	Maltotriosio Maltotriose	+	+	+
	D-mannitolo D-mannitol	+	99	56
	D-melezitosio D-melezitose	+	88	89
	D-ribosio D-ribose	+	92	67
	Saccarosio Sucrose	+	86	+
	D-xilosio D-xylose	+	91	56
Produzione da glucosio <i>Production from glu- cose</i>	Acido lattico D:L Lactic acid D:L	3:97	0:100	12:88
	Gas	-	-	-
Idrolisi Hydrolysis	Arginina Arginine	+	62	71
Decarbossilazione Decarboxylation	Istidina Histidine	-	18	-
pH finale medio Final pH average  in condizioni ottimali di NaCl % e temperatura <i>in optimal condition of NaCl % and temperature</i>		4,56	4,88	4,85

Simboli: "+" =100% positivi; "-"=100% negativi  
 Symbols: "+" =100% positive; "-"=100% negative

TAB. 4 - Variazione delle caratteristiche chimiche e chimico-fisiche in campioni di pasta di acciughe termostatati a 25°C  
 Table 4 - Change in chemical and chemical-physical characteristics in samples of anchovy paste incubated at 25°C

		Tempo Time									
		gg									
		0	8	60	120	160	210	250	300	350	500
pH		5,42	5,40	5,39	5,35	5,34	5,31	5,48	5,57	5,49	5,27
a <sub>w</sub>		0,743	0,741	0,740	0,739	0,741	0,738	0,738	0,744	0,743	0,741
NaCl	%	15,39	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acido D-lattico D- lactic acid		0,080	0,064	0,048	0,078	0,077	0,080	0,093	0,079	0,083	0,086
Acido L-lattico L- lactic acid		2,620	2,592	2,757	2,982	4,475	4,788	4,152	3,994	4,689	5,217
Acido acetico Acetic acid		0,075	0,088	0,065	0,112	0,196	0,319	0,744	0,950	0,826	0,861
Aminoacidi Amino acid	Acido aspartico Aspartic acid	476,9	338,3	331,2	406,1	411,9	423,3	417,3	422,2	421,5	470,1
	Acido glutammico Glutamic acid	209,1	287,0	254,9	295,4	292,7	306,5	294,7	289,1	290,5	316,3
	Serina Serine	202,9	297,0	252,9	331,8	273,3	265,1	275,3	264,4	235,3	234,8
	Asparagina Asparagine	46,1	19,1	62,5	52,6	41,5	66,1	43,1	39,2	41,6	<0,1
	Glicina Glycine	96,5	129,6	133,6	175,7	161,9	178,9	181,7	184,3	176,5	199,9
	Glutammina Glutamine	83,2	312,3	123,7	319,5	215,3	148,3	231,6	236,0	197,2	102,4
	Istidina Histidine	210,2	279,5	238,3	293,1	79,7	14,8	3,2	1,8	23,7	13,5
	Treonina Threonine	187,8	273,8	261,4	341,5	301,4	356,5	304,9	303,1	292,6	282,7
	Arginina Arginine	144,1	208,5	194,9	255,5	163,6	108,8	33,0	2,9	<0,1	5,2
	Alanina Alanine	222,8	306,5	280,6	336,9	315,8	340,7	340,1	330,4	322,3	362,9
	Prolina Proline	100,1	129,5	123,4	166,2	126,9	122,2	166,9	178,2	163,4	158,7
	Tirosina Tyrosine	92,3	127,9	127,5	190,0	173,7	162,8	190,2	221,1	239,1	212,1
	Valina Valine	245,1	341,0	317,8	404,5	368,5	388,2	399,3	408,3	396,8	415,4
	Metionina Methionine	130,4	175,6	161,6	147,5	178,4	189,3	209,3	157,6	140,7	214,9
	Isoleucina Isoleucine	245,1	326,9	303,4	368,2	305,6	432,5	173,7	200,1	366,8	315,9
	Leucina Leucine	383,7	516,9	462,2	576,2	528,1	529,2	501,5	577,3	666,2	539,6
	Lisina Lysine	347,7	418,5	449,5	447,9	452,2	546,9	465,0	413,2	477,5	505,1
Fenilalanina Phenil-alanine	130,7	195,8	164,8	229,7	201,3	191,9	219,7	229,6	234,9	214,6	
Istamina Histamine		<0,25	<0,25	<0,25	77,4	128,8	180,2	164,3	174,3	150,8	170,4

TAB. 5 - Valori medi (M) e deviazione standard (s) di pH,  $a_w$ , concentrazioni di NaCl%, arginina, istidina e istamina in campioni di pasta di acciughe prelevati dal commercio

Table 5 - Mean values (M) and standard deviation (s) of pH,  $a_w$ , NaCl%, arginine, histidine and histamine concentrations in samples of anchovy paste taken from trade

		Tubetti gonfi Swollen tubes		Tubetti regolari Regular tubes	
		n=10		n=10	
		M	s	M	s
pH		5,295	0,187	5,248	0,100
$a_w$		0,748	0,009	0,726	0,011
NaCl	%	14,72	0,78	16,52	1,41
Arginina Arginine	mg/100g	183,73	173,93	522,70	316,05
Istidina Histidine		32,18	40,56	497,98	329,51
Istamina Histamine		233,65	136,75	32,40	86,91

Fig. 1 - Distribuzione carica tetragenococchi alofilo in campioni di pasta d'acciuga, alterati e no, del commercio  
Distribution of halophilic tetragenococci counts in samples of anchovy paste, spoiled or not, from trade

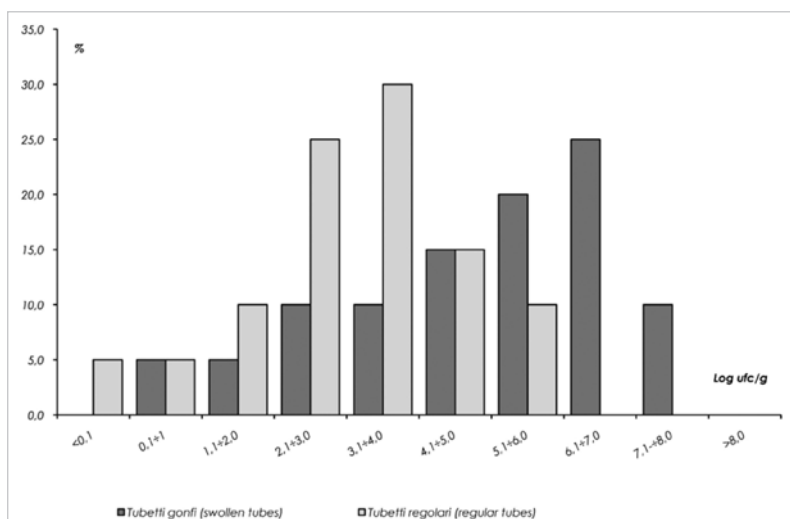


Fig. 2 - Variazione carica tetragenococchi alofilo in campioni di pasta d'acciuga termostata a 25°C  
Changes of halophilic tetragenococci counts in samples of anchovy paste thermostated at 25°C

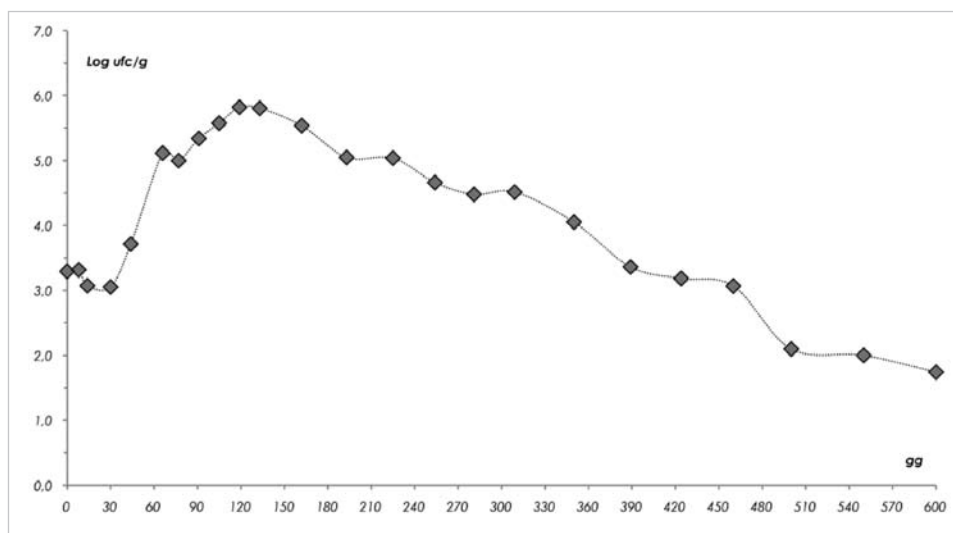


Fig. 3 - Valori ottimali e valori limite delle concentrazioni % di sale NaCl per lo di sviluppo nei tre gruppi di alofilia  
*Optimal values and limit values of the % NaCl salt concentrations for the growth in the three halophilic groups*

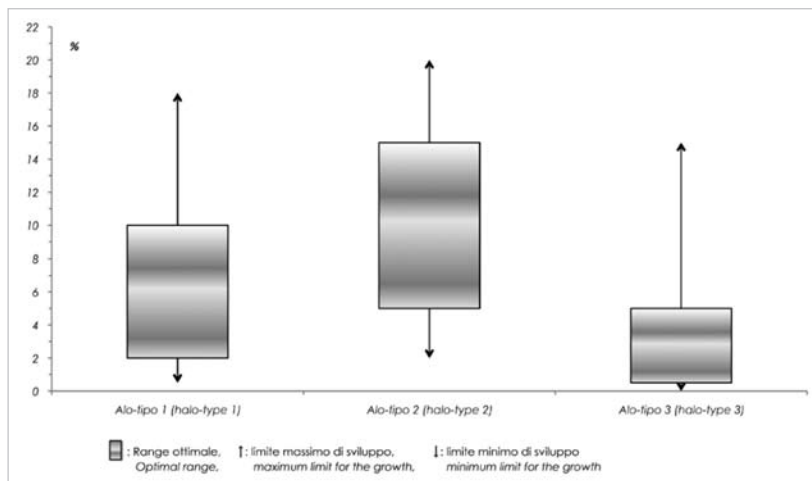


Fig. 4 -Variazioni delle concentrazioni di acidi organici e del pH in campioni di pasta d'acciuga termostatati a 25°C  
*Variations of the concentrations of organic acids and of pH in samples of anchovy paste thermostated at 25°C*

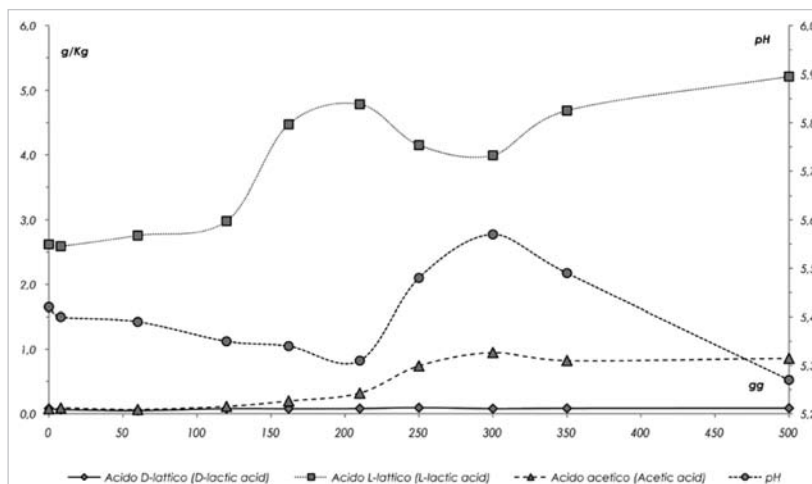
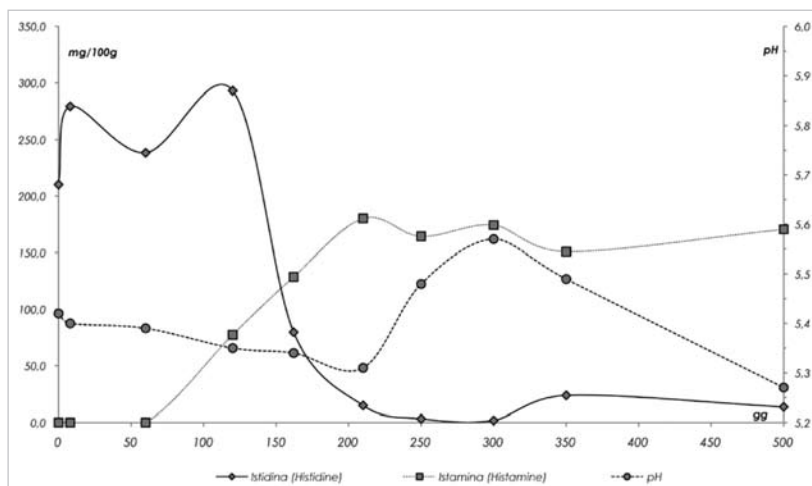


Fig. 5 - Variazione delle concentrazioni di istidina e istamina e del pH in campioni di pasta d'acciuga termostatati a 25°C  
*Variations of concentrations of histidine and histamine and of pH in sample of anchovy paste thermostated at 25°C*



1. G. Arcangeli, G. Baldrati, P. Pirazzoli, "La trasformazione dei prodotti della pesca: tecnologia, controllo e igiene di lavorazione", Ed. SSICA (2003)
2. FAO Document 525, *Élaboration des semi-conserves d'anchois: aspects économiques, techniques et hygiéniques* (2009)
3. M. Villar, A. P. de Ruiz Holgado, J. J. Sanchez, R. E. Trucco, G. Oliver, *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 664 (1985)
4. G. Karnop, *Archiv. Fuer Lebensmittelhygiene*, **39**, 57 (1988)
5. M. D. Collins, A. M. Williams, S. Wallbanks, *FEMS Microbiol. Letters*, **70**, 255 (1990)
6. "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Vol. 3 "The Firmicutes", 2° ed., Springer Dordrecht Heidelberg, London New York (2009)
7. "The Prokaryotes", Cap. 1.2.8, Vol. 4, Ed. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, E. Stackebrandt, Springer, New York (2006)
8. M. Satomi, B. Kimura, M. Mizoi, T. Sato, T. Fujii, *Int. J. System. Bacteriol.*, **47**, 832 (1997)
9. T. Kobayashi, B. Kimura, T. Fujii, *Int. J. Food Microbiol.*, **56**, 211 (2000)
10. W. F. M. Röling, H. W. van Verseveld, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1203 (1996)
11. S. Tanasupawat, J. Thongsanit, S. Okada, K. Komagata, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **48**, 201 (2002)
12. H. Hanagata, O. Shida, H. Takagi, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **49**, 95 (2003)
13. K. Uchida, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **28**, 215 (1982)
14. A. Ventosa, J. J. Nieto, A. Oren, *Microbiol. Molecular Biol. Rev.*, **62**, 504 (1998)
15. H. Robert, C. Le Marrec, C. Blanco, M. Jebbar, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 509 (2000)
16. S. Tanasupawat, W. Daengsubha, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **29**, 487 (1983)
17. T. Kobayashi, M. Kaijwara, M. Wahyuni, T. Kitakado, N. Hamada-Sato, C. Imada, E. Watanabe, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **49**, 279 (2003)
18. N. Udomsil, S. Rodtong, S. Tanasupawat, J. Yongsawatdigul, *Int. J. Food Microbiol.*, **141**, 186 (2010)
19. W. F. M. Röling, A. B. Prasetyo, A. H. Stouthamer, H. V. van Verseveld, *J. Appl. Microbiol.*, **86**, 348 (1999)
20. Y.-S. Chen, F. Yanagida, J.-S. Hsu, *J. Appl. Microbiol.*, **101**, 125 (2006)
21. L. La Pietra, G. Pirone, M. Longo, *Ind. Conserve*, **74**, 41 (1999)
22. A. Justé, B. Lievens, M. Klingeberg, C. W. Michiels, T. L. Marsh, K. A. Willems, *Food Microbiol.*, **25**, 413 (2008)
23. N. Udomsil, S. Rodtong, Y. J. Choi, Y. Hua, J. Yongsawatdigul, *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 8401 (2011)
24. S. Bearson, B. Bearson, J. W. Foster, *FEMS Microbiol. Letters*, **147**, 173 (1997)
25. M. Satomi, M. Furushita, H. Oikawa, M. Yoshikawa-Takahashi, Y. Yano, *Int. J. Food Microbiol.*, **126**, 202 (2008)
26. T. Kuda, Y. Izawa, S. Ishii, H. Takahashi, Y. Torido, B. Kimura, *Food Chem.*, **130**, 569 (2012)
27. B. Kimura, Y. Konagaya, T. Fujii, *Int. J. Food Microbiol.*, **70**, 71 (2001)
28. Regolamento CE 2073/2005, Modificato da Reg. CE 1441/2007- All. I Cap.1 – Criteri di sicurezza alimentare
29. C. K. Murray, G. Hobbs, R. J. Gilbert, *J. Hyg. Camb.*, **88**, 215 (1982)
30. NSW Food Authority, Presence of histamine in anchovies, NSW/FA/FI079/1007 (2010)
31. EFSA - European Food Safety Authority, Scientific opinion on risk based control of biogenetic amine formation in fermented foods, *Efsa Journal*, **2393** (2011)
32. S.-H. Kim, J.-B. Eun, T.-Y. Chen, C.-I. Wei, R. A. Clemens, H. An, *J. Food Sci.*, **69**, 157 (2004)
33. M. T. Veciana-Nogués, S. Albala-Hurtado, A. Marine-Font, M. C. Vidal-Carou, *J. Food Protect.*, **59**, 1218 (1996)
34. H. Lee, S.-H. Kim, C.-I. Wei, S. H. Jun, J.-B. Eun, H. An, *J. Food Sci.*, **70**, 145 (2005)
35. M. T. Veciana-Nogués, A. Marine-Font, M. C. Vidal-Carou, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1385 (1997)
36. P. Pirazzoli, I. Incerti, S. Gola, N. Scaramuzza, *Ind. Conserve*, **81**, 281 (2006)
37. USFDA - U.S. Food and Drug Administration, Fish and fishery product hazard and controls guide - Cap.7: Scombrotossin (histamine) formation (2011)
38. "Compendium of methods for the microbiological examination of foods", Cap. 13, 3° Ed., C. Vanderzant, D.F. Splittstoesser, American Public Health Association, Washington DC (1992)
39. H. L. Günther, H. R. White, *J. Gen. Microbiol.*, **26**, 185 (1961)
40. R. L. Maijala, *Letf. Appl. Microbiol.*, **17**, 40 (1993)
41. D. J. Strydom, S. A. Cohen, *Anal. Biochem.*, **222**, 19 (1994)
42. F. De Sio, G. Fasanaro, G. Villari, R. Louidice, D. Castaldo, *Ind. Conserve*, **70**, 423 (1995)



# Identification and characterization of halophilic bacteria from anchovy paste

SSICA - Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari,  
Via Nazionale 121/123 - 84012 Angri (SA)

Liliana La Pietra, Alessandra  
Belfiore, Francesco De Sio,  
Andrea Lo Voi, Giuseppe Pirone

## ABSTRACT

The dominant flora in anchovy paste packages stored at 25°C and in similar swollen and non-swollen samples from the market, consists of catalase-negative, tetrad-forming cocci. We isolated and characterized 216 strains which, based on their ability to grow at NaCl concentrations above 10% and their sensitivity to acid pH values, can be identified as halophilic strains of the genus *Tetragenococcus*.

All the strains are mesophilic and are subdivided, based on salt tolerance, into three halotypes of which type 2 is the most halophilic, with an optimum between 5 and 15% and ability to grow at up to 20% NaCl. Halotype 2 represents the majority of the strains isolated from swollen tubes and accounts for 18% of histidine-decarboxylase positive strains. No differences have been observed in the distribution of strains isolated from market samples compared to thermostated samples.

In shelf-life tests conducted at 25°C, at the end of the stationary phase, swelling of the containers from development of carbon dioxide is observed; the swelling is due to decarboxylation of the histidine present in the muscle through the action of some halotype 2 strains. Consequent production of histamine occurs when microbial count exceeds 10<sup>5</sup> cfu/g.

Similar biochemical phenomena are observed in the samples collected from the market.

## INTRODUCTION

Salted anchovies are a typical Mediterranean semi-preserved fish product prepared by beheading/eviscerating, salting and maturing fish of the *Engraulidae* family (1).

Once matured, the anchovies are desalted, prepared and sold either whole/filleted in oil or in products such as anchovy paste without applying any heat treatment.

The production of paste starts with an initial mincing phase and, after oil is added, it continues with a homogenization phase followed by packaging, generally in internally lacquered aluminium tubes (1).

According to FAO, the chemical-physical characteristics required at end of maturation in order to prevent sanitary risks in salted anchovies are: pH range between 5.3 and 5.7, moisture under 50%, *a<sub>w</sub>* values ≤0.76 and NaCl concentrations above 15% (2).

To prevent putrefactive alterations of these products, some authors (1) propose slightly lower *a<sub>w</sub>* values (≤0.74) and higher salt concentrations (≥18%).

In the anchovy salting and maturation process, the predominant bacteria species is the *Pediococcus halophilus* (2-4), a microorganism that, following genetic studies (RNA analysis), has been reclassified into a new genus named *Tetragenococcus* (5).

The strains belonging to the *Tetragenococcus halophilus* species are described as spherical, occasionally ovoid, bacteria with a tendency to form tetrads.

They grow at NaCl concentrations ranging between 4 and 18%, with 5-10% optimum and can tolerate 20-26% concentrations. The temperature optimum is 30-35°C, with minimum at 15 °C and maximum at 40°C. They prefer pH values between 7.0 and 8.0 and are able to develop in the 5.0-9.6 pH interval.

They are catalase-negative facultative anaerobes, and ferment glucose, without development of gas, producing as final product L-(+) lactic acid with traces of D-(-) lactic acid ranging between 3 and 25% (6).

However growth conditions can affect the type of metabolism and promote different catabolic pathways that lead to improved energy balance.

Mixed acid fermentations with production of various metabolites such as acetate, ethanol and formate

can take place in case of reduced growth rate, limited glucose concentration (6) and anaerobiosis (7).

Holzappel et al. (7) propose a simple dichotomic key to phenotypically distinguish strains of *Tetragenococcus* spp from pediococci: it is based on halophilia (ability to grow at NaCl concentrations between 10 and 18%) and on the acid sensitivity displayed by the tetragenococci (growth at pH 9.0 and not at 5.0).

A second species with morphological and physiological characteristics of the genus *Tetragenococcus* was isolated from a sauce containing squid liver; phenotypic, genotypic and philological studies have shown that it differs from *T. halophilus*, so the name *T. muriaticus* was proposed for it (8).

*T. muriaticus* and *T. halophilus* share the same mesophilic characteristics, showing a temperature optimum in the 25 to 30°C range and a preference for alkaline pH, with optimum value between 7.5 and 8.0 (6, 8).

A halophilic strain able to grow at salt concentrations up to 25%, *T. muriaticus* differs from *T. halophilus* for its inability to grow in the absence of salt (6, 8, 9).

In sugar fermentation tests, the strains identified as *T. muriaticus* differ from *T. halophilus* in their ability to ferment D-mannitol, but not L-arabinose and saccharose (8, 9).

Moreover the isolation of strains with different profiles from various matrices shows that the *Tetragenococcus* population is rather heterogeneous in terms of sugar fermentation and makes these tests unfit for identification purposes (9 -13).

Although strains from various foods with high salt concentrations present different phenotypes, they prove homogeneous at the DNA analysis which makes it reasonable to assume that only a limited number of species can adapt to a saline environment (12); their different ability in substrate use could be connected to the adaptation of the strains to growth in different matrices.

Genetic-molecular identification is useful for species classification (11).

Tetragenococci are considered moderately halophilic microorganisms (according to Kushner's definition) as their salt concentration optimum ranges between 0.5 and 2.5 M (14).

In halophilic microorganisms, the ability to tolerate high salt concentrations is given by the possibility of maintaining intracellular osmotic balance through internal accumulation of salts and/or osmolite organic molecules such as ectoine, hydroxyectoine, glycine betaine, proline, etc. (14).

Unlike other moderate halophiles, *T. halophilus* does not produce newly synthesized osmoprotectants; it regulates osmosis through active transport of exogenous substances such as glycine betaine and carnitine, if available in the environment, or by converting choline in glycine betaine (15).

The halotolerance of the two *Tetragenococcus* species determines their large diffusion and predominance in habitats with high salt concentration.

*T. halophilus* and *T. muriaticus* are typical microorganisms in products that are rich in salt and protein.

*T. halophilus* is frequently found in various fermented products typical of East and South-East Asia, such as fish-based products (9, 16-18), soy-based products (10-12, 19), fermented vegetables (20).

It has been isolated from cured sausage products (21), but also in intermediate products of sugar beet processing as responsible for degradation (22).

*T. muriaticus* is frequently found together with *T. halophilus* in fermented fish-based products (9, 17).

Thanks to its proteolytic activity, *T. halophilus* plays an important role in the formation of aroma in fish sauces during the maturation process.

It has aminopeptidase activity which can be expressed even at 25% salt concentrations with production of oligopeptides/amino acids, precursors of volatile substances (18, 23).

Desirable flavour and aroma characterizing substances have been found in *in vitro* systems (inoculated anchovy broth), among these, as predominant volatile compounds, alcohols such as 1-propanol, 1-butanol and aldehydes such as 3-methyl-butanal, 2-methyl-propanal, benzaldehyde (18, 23); on the other hand, in the same system the concentration of undesired substances such as dimethyl disulfide are reduced (compared to the control) (23).

The ability to promote desirable substances and eliminate undesirable odours makes them useful as starters.

During maturation processes, biogenic amines can be produced as a result of decarboxylase activity on amino acids.

Moreover, the production of biogenic amines seems favoured by low pH values and is adopted by many microorganisms as a survival mechanism in conditions of acid stress (pH homeostasis) (24).

Karnop (4) points out that 53% of the halophilic pediococci isolated from anchovies taken from the market are able to produce histamine; moreover, in storage tests at 20°C, the formation of amine is linked in particular to increases in bacteria concentration to values above 10<sup>5</sup> cfu/g.

The production of amine, according to the same author, can occur even with salt concentrations above 20%, when products are kept at 20°C and at 5°C, during long term storage (4).

In Japanese fish-based sauces, a strain was isolated, identified as *T. halophilus*, which is able to produce histamine up to 15% NaCl, at 20-37°C; the production of histamine is promoted by pH 6.0 and delayed by pH 8.0 (25).

*T. halophilus* strains able to produce histamine in a histidine broth even at 25% salt concentration were isolated from Thai fish-based soups (18).



The same strains inoculated in fish sauces do not induce significant histamine increases compared to the non-inoculated control; on the contrary, in some cases they cause a reduction of the content leading the author to suggest an ability of the strains to degrade amine (23).

*T. halophilus* strains were isolated from fish fermented with rice bran; some of the strains were producers of histamine and some were not (26).

In fermented and inoculated sardines, a non histamine-producing strain is able to suppress the production of histamine by producer strains indicating that the use of these non-producer microorganisms as starters can increase the safety of those products (26).

Genetic testing shows that the genes encoding the decarboxylase activity are located on plasmids. (25).

The *T. muriaticus* species is also a histamine producer (8); the isolation of amine negative strains leads to the hypothesis that this ability is not typical of the species but rather strain-specific (9).

*In vitro* studies on the parameters affecting histamine production show that it is produced during the stationary phase and is favoured by O<sub>2</sub> limiting conditions, with glucose concentration >1% and pH 5.8 rather than pH 7.6 (27).

The same studies reveal that production is optimal at 5-7% salt concentration and in the temperature range 20-30°C; it is reduced, but not totally inhibited, at 20% salt concentration and at 10-15°C thus making these concentrations and temperatures not effective for preventing amine formation in products contaminated by *T. muriaticus* (27).

The ubiquity of strains belonging to the two halophilic tetragenococci species able to decarboxylate histidine suggests that both species play an important role in the formation of histamine in salt-preserved fish.

Anchovies are very susceptible to the formation of histamine due to the high content of free histidine in the muscle; they are included in the list of fishery products with high amounts of histidine (*Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae*, *Scombrosidae*) for which EC regulations (28) set a limit on histamine content.

Moreover cases of histamine intoxication associated with the consumption of canned anchovies have been reported in England (29) and New South Wales (30).

The EFSA report (31) investigating risk from biogenic amines in fermented foods reveals that, among these, dried anchovies are the category with the highest histamine concentrations in average values (348 mg/Kg) and 95-percentile (1440 mg/kg).

The literature does not report presence of histamine in fresh anchovies (32, 33); histamine was found in packaged anchovies (2, 4, 32-35) and anchovy paste (36).

FDA guidelines point out how amine synthesis in fish products is favoured by increased likelihood of contact between muscle and histamine-producing microorganisms, conditions that occur during fish processing in the phases of slaughtering, filleting, mincing, mixing (37).

Studies on the variations in biogenic amines content during production and storage of semi-preserved anchovy products show slight amine production during the first maturation phases (33). The same tests, carried out during storage, reveal an increase of histamine in samples stored at room temperature compared to refrigerated ones; the production of histamine is greater in anchovies preserved in oil than in those preserved in brine.

According to FAO (2), the chemical-physical characteristics acquired by the product at the end of maturation, such as  $a_w \leq 0.76$  and salt concentration >15%, do not, on their own, enable complete inhibition of bacterial flora. The storage of semi-preserved products at favourable temperatures (20-25°C) can lead to selection of halophilic microorganisms such as *T. halophilus*, whose development can cause product proteolysis and slow, progressive histamine accumulation; if the products are refrigerated, these alteration processes are inhibited due to the mesophilic nature of the flora involved. Therefore FAO recommends storing semi-preserved salted anchovies at temperatures not above 10-15°C for a maximum period of one year.

Karnop (4) also stresses that histamine production in anchovies is secondary, i.e. not linked to the initial flora in the product, but to microorganisms selected in this matrix due to their halophilic character.

Histamine formation is accompanied by gas production with swelling of the containers (2, 36); this phenomenon could be due to the accumulation of carbon dioxide deriving from histidine decarboxylation.

Repeated reports regarding swollen anchovy paste packages have induced the Microbiology Department of this institute to investigate this spoilage and to isolate and characterize the bacterial strains present in spoiled and unspoiled products.

## MATERIALS AND METHODS

### Samples

48 anchovy paste tubes, fresh from production, were kept at 25°C (simulating room temperature) and then examined after different time intervals up to 600 days to test their shelf-life; 2 control samples were refrigerated at 4±2°C and analyzed at the end of the experiment.

A parallel study was conducted on 40 samples of anchovy paste in tubes, from the market, of which 20 were swollen and 20 with regular appearance.

#### *Microbiological analysis*

In the preliminary phase, in order to identify the spoilage microorganisms, swollen samples were subjected to qualitative research for staphylococci and micrococci in Mannitol Salt agar medium (Oxoid), halophilic bacteria in Halophilic agar (38) modified with 15% NaCl, halophilic lactic bacteria in APT agar (Biolife) at 7% in NaCl, xerophilic fungi in DG18 (Oxoid), halophilic anaerobic bacteria in SPS (Biolife) with 5% NaCl.

All the samples were submitted to catalase negative halophilic cocci count on APT agar-NaCl 7% agar, incubated in anaerobiosis at 30°C for 7 days.

#### *Isolation of microorganisms*

Colonies consisting of catalase-negative tetrad-forming cocci were picked from the medium plates used for counting.

The colonies were re-isolated in a APTa-NaCl 5% medium.

The strains were maintained in slants with the same medium.

#### *Inocula*

All the tests were performed by inoculating 0.1 ml culture broth in APT broth (Biolife) with 5% NaCl after incubation at 30°C for 7 days.

#### *Physiological tests*

Physiological tests were performed on the isolated strains, such as tolerance to salt in APT broth with increasing concentrations of NaCl from 0 to 20%, growth capacity at different temperatures in APT-NaCl 5% broth incubated at temperatures from 5 to 55°C, growth capacity at different pH values in APT-NaCl 5% broth with pH ranging from a minimum of 5.0 to a maximum of 9.2.

In all of the tests, except for temperature tolerance, incubations were performed at 30°C for a maximum of 7 days and growth capacity was tested by measuring induced pH variations.

#### *Serological tests*

Latex agglutination tests were carried out to verify inclusion in Lancefield's D group (Oxoid).

#### *Biochemical tests*

Fermentation tests were performed with sugar (1%) glucose, L-arabinose, maltose, D-mannitol, maltotriose, D-melezitose, D-ribose, saccharose, D-xylose, in bromocresol purple peptone-yeast extract broth, with 5% NaCl (39).

In glucose culture broths we also measured gas production using a Durham tube, final pH and stereospecificity of the lactic acid produced by fermentation through enzymatic testing with Boehringer Mannheim-Roche enzyme kits.

Arginine hydrolysis was carried out according to Roling et al. (10).

Histamine production from histidine decarboxylation was studied in 100 strains selected according to a representativeness criterion, after incubation at 30°C for 7 days, in a culture broth obtained by modifying the MDA medium (40) with the omission of agar, bromocresol purple, calcium carbonate and addition of 1% glucose and 5% NaCl.

Histamine was determined by the ELISA (TECNA) immune-enzyme test. For the preparation of the sample, 1 ml of culture broth was diluted to 10 ml with bidistilled water and vortexed for 30 seconds. 1 ml was transferred into a centrifuge Eppendorf vial then centrifuged for 10 minutes at 2000 GPM. 20 µl of the supernatant were brought to 10 ml with bidistilled water and 100 µl of this solution were used to perform the test, according to the procedure indicated by the manufacturer.

#### *Chemical and chemical-physical analysis of the product*

Before subjecting the product to shelf-life testing,  $a_w$  was measured using the Aqualab 3TE meter and NaCl % was determined by means of the Volhard method.

On the samples taken after various incubation periods we determined composition in free amino acids and concentrations of acetic acid, D-L lactic acid and histamine.

Histamine concentration was measured on the control sample.

Free amino acids were measured according to Strydom et al. (41) and De Sio et al. (42).

Histamine content was measured using the same method adopted for culture broths after diluting 5 g of product 1:10 with bidistilled water, shaking for 30 minutes and filtering through paper.

D-L lactic acid and acetic acid were measured by enzyme testing using Boehringer Mannheim – Roche enzyme kits.

On the samples taken from the trade (10 swollen and 10 equivalent samples with regular appearance), we measured NaCl concentration %,  $a_w$ , amino acid composition and histamine.

pH value was measured on all of the samples using a CRISON GLP21 pH meter.

### Headspace gas analysis

The composition of the mixture of hydrogen gas, oxygen, nitrogen and carbon dioxide present in the tubes was measured using a gas chromatograph (Dani, mod. Master GC) operating at 50°C with helium as carrier gas, equipped with a temperature sensor, MS column and packed column CHROM 1447 (Altec).

## RESULTS AND DISCUSSION

The qualitative microbiological analysis performed on the swollen samples revealed, on Mannitol salt agar, Halophilic agar and APT agar with 7% NaCl media, development of colonies of catalase-negative, tetrad-forming cocci-shaped bacteria; the same microorganisms were found in the samples with regular appearance.

No growth was observed in the media for xerophilic fungi and halophilic anaerobic bacteria.

Counts performed on APTa-7% NaCl medium show how the average concentration of catalase-negative tetragenococci is 4.9 Log cfu/g in swollen samples and 3.2 Log cfu/g in unspoiled samples.

The percentage of samples with count above  $10^5$  cfu/g is 10% in non-swollen samples and 55% in swollen samples.

The frequency distributions of cellular concentrations in the various swollen and non swollen samples taken from the trade are shown in Figure 1.

The variation of the same count in samples thermostated at 25°C is shown in Figure 2.

When we examine the curve we see that after a lag phase lasting approximately 30 days, the microbial population increases from an initial concentration of  $10^3$  cfu/g to a final concentration close to  $10^6$  cfu/g.

The stationary phase starts around day 90 and lasts up to approximately day 150; the decrease in microbial population is very slow and, at the end of the period considered (600 days), the microbial count reaches a level of about  $10^2$  cfu/g.

In the control samples maintained for the entire thermostating period at a temperature of  $4 \pm 2$  °C, the average count is equal to 20 cfu/g.

From the various sample types, 216 strains were isolated and subjected to physiological tests.

In view of the high salt content of the original matrix, the strains examined were initially characterized according to halotolerance and then subdivided into three separate groups whose affinity to salt are represented graphically in Figure 3.

Type 1 includes strains that can grow in the absence of salt, and at the maximum concentration used (20%), with optimum between 2 and 10% NaCl.

Type 2 is the most "halophilic" as it can grow even at 20%, it requires, for most of the strains, at least 2% salt and optimum is around 5-15%.

The strains in group 3, less halophilic and showing optimum between 0.5 and 5%, grow in the absence of salt and with maximum at 15%.

The distribution of the various halotypes, in swollen and non swollen samples, is shown in Table 1.

In swollen samples we find strains belonging to halotypes 2 and 3.

There are no substantial differences in the distribution of halotypes between market samples and laboratory thermostated samples.

Table 2 describes the physiological characteristics observed for the three types of halophilic bacteria at various salt concentrations, at different test temperatures and various pH values.

As regards temperatures, all of the strains grow between 25 and 35°C, typical temperature interval for *Tetragenococcus* spp.

Several type 1 strains grow up to 10 and 45°C, while no type 2 and 3 strains develop at 10°C; some type 3 strains can grow up to a temperature of 50°C.

As regards pH values, type 1 and 2 have their optimum in the 6.0 to 8.0 range, maximum 9.0 and, for most, minimum at 6.0.

Type 3 proves more tolerant towards acid pH, can grow even at 5.5 and its optimum is at 5.7-7.0.

Because of their ability to grow at NaCl concentrations above 10% and their sensitivity to acid pH, all of the strains can be identified according to Holzapfel (7) as *Tetragenococcus* spp.; tolerance to pH 9.0 is distributed in high proportion in halotypes 1 and 2.

Among halotypes 1 and 2 we found strains with D-antigens in a proportion of 33% and 39% respectively.

The biochemical characteristics of the strains are described in Table 3.

An analysis of the sugar profiles shows how most of the type 1 and type 2 strains can be assimilated to *T. halophilus* due to their ability to ferment melezitose, maltotriose and D-xylose (7), saccharose (7, 8) arabinose (8); irregular positivity to mannitol test (6, 8).

The sugar profile of type 3 strains looks more heterogeneous.

All of the strains produce, from glucose metabolism, L-lactic acid without gas development; as regards D-lactic acid, traces of it are produced by type 1 and greater quantities up to a 12:88 D:L isomer ratio by type 3.

Final pH is lower for halotype 1 (4.56) and higher for halotype 2 (4.88) and 3 (4.85).

Regarding the arginine test, all of the type 1 strains and most of type 2 and 3 strains are able to hydrolyze the amino acid as reported by some authors (3,10, 16) and unlike what is described by Bergey's (6) and by Kobayashi et al. (17).

The ability to decarboxylate histidine is present only in type 2 with 18% positive strains; moreover, most of these isolates can grow with up to 20% salt concentration.

As regards the original matrix, decarboxylase-positive strains have been isolated in swollen and non swollen market samples and, for those analyzed during shelf-life, only in swollen ones.

The chemical-physical parameters previously found in the packages to be thermostated are typical of the product at maturation; NaCl concentration was found to be equal to 15.4%,  $a_w$  value is 0.74 and pH is 5.42 (Table 4).

During incubation at 25°C, container deformation was observed after approximately 160 days.

No swelling was observed in the refrigerated control tubes.

Headspace gas % composition reveals development of carbon dioxide in the swollen tubes.

Table 4 illustrates the chemical and chemical-physical characteristics of the anchovy paste samples after different periods of incubation at 25°C.

Variation of lactic acid content, acetic acid content and pH values over time are represented graphically in Figure 4.

After approximately 120 days of incubation we observe an increase in L-lactic acid and acetic acid; there are no variations in the concentration of D-lactic acid during the period examined.

As regards amino acid composition, we see significant variations of the amino acids histidine and arginine during thermostating.

Time variations in the concentrations of histidine, histamine and pH are compared graphically in Figure 5.

The trend reveals increase in histamine concentration accompanied by a reduction of histidine concentration; the simultaneous reduction of pH values in this phase suggests a probable role of pH in the dynamics of decarboxylation reaction.

Amine production is observed with bacterial concentration above  $10^5$  cfu/g and is maximum after approximately 160 days, when the container swells, confirming the hypothesis of gas production from histidine decarboxylation.

Subsequent pH variations could be connected, in the increasing phase, to the production of amine and, in the subsequent decreasing phase, with the depletion of histidine, to the production of organic acids by metabolic pathways to be evaluated.

In control samples (stored at refrigeration temperature) pH value is 5.34 and histamine content below the detection limit (<0.25 mg/100g).

In swollen samples from the market we also observe production of carbon dioxide compared to non swollen samples.

As regards chemical and chemical-physical parameters, the results obtained for packages of regular appearance were compared with those for swollen packages using Student's *t* test.

An analysis of the data shows substantial differences with respect to NaCl salt concentration % and  $a_w$  parameter: in swollen samples, compared to regular ones, the salt concentration is slightly lower and water activity is slightly higher.

These differences should not affect alteration, as *Tetragenococcus* spp halophiles are able to decarboxylate histidine even at salt concentrations close to 20% (4, 18, 27).

As regards the composition of free amino acids, excluding arginine and histidine, there are no significant variations between swollen and non swollen packages.

Large differences are also observed in histamine concentrations.

Table 5 summarizes the values for pH and  $a_w$  parameters as well as for concentrations of NaCl salt, arginine, histidine and histamine shown by the samples taken from the market.

In swollen samples, spoilage is characterized by low values for average histidine content ( $M_{10}$  = 32.18 mg/100g), compared to samples of regular appearance ( $M_{10}$  = 497.98 mg/100g).

Conversely, average histamine content is 32.40 mg/100g, in samples of regular appearance and 233.65 mg/100g, in swollen samples.

In regular samples, histamine was found only in 2 of the 10 units considered; its content was equal to 276.0 and 48.0 mg/100 g, therefore higher than the limit set by EC regulations (28) for fishery products subjected to maturation treatment in brine (for 9 sample units, *m* equal to 200 mg/Kg, *M* equal to 400 mg/Kg and *c* equal to 2).

It must be pointed out that, in both samples, the count was above  $10^5$  cfu/g, a concentration that other authors consider significant for histamine production (4).

Therefore, the alterations shown by the product during its shelf-life at 25°C produce the same findings observed in the market samples.

The dominant flora in swollen anchovy paste samples is represented by catalase-negative tetrad-forming cocci; the same microorganisms, although with slightly lower concentrations, are found in samples of regular appearance.

The study of microbial population evolution in shelf-life tests at 25°C, reveals development of tetrigenococci which, after a 30 day lag phase, reach a maximum concentration of 10<sup>6</sup> cfu/g in the stationary phase (at approx. 90 days).

All the strains isolated from market samples and shelf-life samples, swollen and non-swollen, can be identified as halophilic strains of the genus *Tetrigenococcus* due to their ability to grow at NaCl concentrations above 10% and their sensitivity to acid pH; the biochemical profiles do not enable species identification.

The occurrence of halophilic tetrigenococci is typical in fermented products with high salt content.

The salt affinity shown by the mesophilic strains can be linked to 3 different halotypes and, among these, type 2 is selected for its ability to grow at up to 20% NaCl and not at 10°C.

The strains belonging to halotype 2 are the most widespread and are the dominant flora in swollen tubes; 18 % of them are histidine-decarboxylase positive.

No differences have been observed in the distribution of different halotypes among the isolates from market samples compared to laboratory thermostated samples.

During the shelf-life period at 25°C, at the end of the stationary phase, container swelling was observed due to development of carbon dioxide. A chemical analysis of the product reveals a decrease in arginine and histidine and increase in histamine.

The biochemical reactions reproduced those observed in swollen and non swollen samples from the market.

The swelling could be due to decarboxylation of the histidine present in the muscle through the action of some halotype 2 strains; histamine production occurs when microbial count exceeds 10<sup>5</sup> cfu/g.

The microorganisms involved are able to produce histamine even at NaCl concentrations >15% and at a temperature of 25°C, but not at 4°C; control of histamine production by these mesophilic bacteria could be achieved by applying refrigeration temperatures during the phases of product storage and distribution.

Although they are histamine producers, these microorganisms play an important role, thanks to their metabolic activity, in the formation of aromatic substances that are desirable for product characterization during the maturation process.

Therefore to prevent histamine production a feasible solution is to use histamine-negative autochthonous starters, whose application would also contribute to standardizing maturation and preserving the typical organoleptic characteristics.

New studies will be necessary to better understand the biochemical activity of halophilic tetrigenococci in anchovy paste particularly with respect to arginine consumption and to the production of acetic acid and other metabolites such as formate and ethanol.

### *Acknowledgements*

*We wish to thank our colleagues Alessandro De Giorgi and Giuseppe Squitieri for their collaboration.*