

# Caratterizzazione di alterazioni microbiologiche in derivati del pomodoro (III): flat-sour

## Microbial spoilage characterization in tomato products (III): flat-sour

SSICA Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari,  
Via Nazionale, 121/123 - 84012 Anagni (SA) Italia  
\* SSICA Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari,  
V.le Tanara, 31/A - 43100 Parma (PR) Italia

Liliana La Pietra, Giuseppe  
Pirone, Maria Longo, Mario  
Impembo, Elisabetta  
Manganelli\*

### RIASSUNTO

Sono stati studiati tre ceppi di batteri sporigeni isolati da casi di flat sour.

I tre ceppi, di cui uno catalasi negativo, presentano caratteristiche fenotipiche differenti. Essi sono stati identificati, mediante PCR Real-Time, come *Bacillus coagulans*.

Sono state valutate la cinetica di sviluppo e d'inattivazione e le caratteristiche metaboliche in passato di pomodoro a pH pari a 4,5, inoculato con  $10^2$ - $10^3$  spore/mL, confezionato sia in aerobiosi sia sottovuoto e incubato a 37°C.

I parametri di crescita della popolazione microbica, fase lag, tempo di generazione, densità massima, inizio fase stazionaria, variano fra i ceppi e, all'interno degli stessi, fra le condizioni aerobiosi e sotto vuoto. Le velocità massime di sviluppo sono simili, ad eccezione del ceppo 360-3c in aerobiosi. Per tutti i ceppi, la fase di declino è di tipo esponenziale.

Tutti i ceppi crescono, determinando abbassamento del valore del pH. In entrambe le condizioni di confezionamento è prodotta anidride carbonica in quantità tali da non deformare il contenitore e da ridurre il vuoto nelle confezioni così prodotte. L'alterazione diviene conclamata in un tempo massimo di 14 giorni.

Tutti i ceppi utilizzano acido malico e producono, dal metabolismo del glucosio, esclusivamente acido L-lattico indipendentemente dal tipo di confezionamento adottato.

### ABSTRACT

Three strains of spore-forming bacteria isolated from cases of flat sour were studied. The three strains, of which one was catalase negative, show different phenotypic characteristics. They were identified by Real-Time PCR as *Bacillus coagulans*.

The growth and inactivation Kinetics were assessed along with the metabolic characteristics in tomato puree at pH of 4.5, inoculated with  $10^2$ - $10^3$  spores / mL, packaged either under aerobic conditions or under vacuum and incubated at 37°C.

The growth parameters of microbial population, lag phase, generation time, maximum density, beginning of stationary phase, vary among the strains and, within each strain, between aerobic and vacuum conditions. Maximum growth rates are similar, except for strain 360-3c under aerobic conditions.

For all strains, the death phase is exponential.

All strains grow, resulting in lowering of the pH value. In both packaging conditions carbon dioxide is also produced in such quantities as to reduce vacuum in the packs, but not to deform the containers.

Spoilage becomes evident within a maximum of 14 days. All strains use malic acid and produce, from glucose metabolism, only L-lactic acid regardless of the type of package used.

### INTRODUZIONE

Il flat-sour è un'alterazione delle conserve di pomodoro caratterizzata da abbassamento spinto del valore del pH del prodotto senza deformazioni (evidenti) del contenitore e dalla comparsa di odori anomali definiti come "medicinale", "fenolico" o "fruttato" (1).

Il microrganismo ritenuto responsabile dell'alterazione è il *Bacillus coagulans*, batterio di origine tellurica frequentemente isolato in prodotti lattiero-caseari e in derivati del pomodoro, in particolare in succo (1).

Nel pomodoro, esso risulta contaminare la materia prima, in quantità proporzionale all'entità di terriccio a essa adeso, impianti e acqua di lavaggio, in cui, peraltro, ne è stata riscontrata la capacità di sviluppo; spore sono state isolate anche da scatole vuote, linee di lavorazione e nastri di trasporto (1, 2).

Il *Bacillus coagulans* è un batterio termofilo facoltativo in grado di accrescersi in mezzi artificiali da 20°C a 55°C e, per alcuni ceppi, anche a 60°C (2); non si sviluppa in derivati del pomodoro a 55°C (1, 3) e la temperatura ottimale per la produzione di off-flavor appare essere 37°C (1).

Esso fermenta il glucosio producendo prevalentemente acido L-lattico e piccole quantità di 2,3 butandiolo, acetoino,

acido acetico ed etanolo (4). Il metabolismo del glucosio pare essere condizionato, comunque, dalla presenza di ossigeno, in quanto la fermentazione da omolattica, in condizione di parziale anaerobiosi, diventa eterolattica, in condizione aerobiotica (5).

*B. coagulans* assume particolare importanza nella stabilizzazione termica dei derivati non concentrati del pomodoro poiché è uno dei pochi batteri sporigeni capaci di svilupparsi in prodotti a pH < 4,5.

La capacità di germinazione, di accrescimento e di alterazione è legata alla concentrazione sporale inquinante e al pH del prodotto; minore è la concentrazione di spore presenti, più è elevato il valore minimo di pH necessario allo sviluppo (5).

In derivati del pomodoro con diverse condizioni di pH, residuo ottico e concentrazione di spore, è stata riscontrata alterazione in 7-14 giorni in un intervallo di temperatura 30-42°C, a una concentrazione di 8-18°Brix, a un minimo di pH di 4,2 e con un livello minimo di 10-10<sup>2</sup> spore per mL (3, 6, 7); a R.O. pari a 28% non è stato osservato sviluppo con il titolo massimo considerato di 10<sup>4</sup> spore/g, a pH 4,5, a 37°C per un periodo di 70 giorni (7).

In pomodoro sono stati accertati inquinamenti variabili da 0 a 4,0 x 10<sup>3</sup> spore/g (8, 9, 10); il livello massimo più rappresentativo in materia prima nostrana è stato determinato in 550 spore/g (p = 0,95) (10).

I valori di termoresistenza riscontrati sono molto variabili: sono riportati valori di D<sub>110</sub> talvolta elevati, sebbene non tutti in derivati del pomodoro. Tre ceppi isolati nei laboratori SSICA da campioni alterati mostrano valori di D<sub>100</sub> compresi fra 2,5 e 3,6 in passato di pomodoro con pH variabili da 4,2 a 4,5 (11, 12).

Sebbene *Bacillus coagulans* sia ritenuto tipicamente agente di *flat-sour*, in letteratura sono riportati casi di accrescimento in succo di pomodoro con aumento del pH; in sistemi *in vitro*, è stata dimostrata la capacità dei ceppi in esame di portare il pH a valori superiori a 4,6 e, quindi, tali da consentire lo sviluppo di *Clostridium botulinum* (13, 14).

In relazione all'incidenza di *B. coagulans* nell'alterazione di conserve alimentari, in un'indagine sulle cause di alterazione microbiologica dei derivati del pomodoro negli anni 1969-1985, tale batterio non era mai stato riscontrato (15).

In una successiva indagine riguardante gli anni 1991-2001 (16), *B. coagulans* era stato riscontrato come agente alterante in quattro campioni di passato di pomodoro su un totale di 241 confezioni alterate di derivati del pomodoro.

Nonostante la bassa incidenza riscontrata come causa di alterazione, *B. coagulans* assume importanza per il tipo di alterazione di cui è responsabile; il mancato bombaggio delle confezioni rende impossibile identificarle ed escluderle dalla distribuzione prima dell'apertura per il consumo.

La mancanza di sporificazione successiva all'accrescimento e la limitata sopravvivenza cellulare (6, 7) fanno ritenere che la percentuale di conserve alterate da questo microrganismo sia superiore a quanto riportato e che la scarsità di reperti analitici positivi faccia sottovalutare tale problema.

Fra i batteri sporigeni, la capacità di produrre elevate quantità di acido lattico è sembrata, per molti anni, tipica del *Bacillus coagulans*; peraltro l'isolamento da varie fonti di numerosi ceppi presentanti caratteristiche morfologiche, biochimiche e fisiologiche differenti ha fatto ipotizzare che tale caratteristica fosse diffusa anche fra altre specie di *Bacillus*.

Kitahara e Suzuki (17) isolarono, in mangime per pollo, alcuni ceppi con caratteristiche intermedie fra lattobacilli e *Bacillus* in quanto, come i primi, erano catalasi negativi, microaerofili, omofermentanti e, come i secondi, sporigeni e proposero la loro classificazione in un nuovo sottogenere *Sporolactobacillus*.

Nakayama e Yanoshi (18) isolarono dalla rizosfera di varie piante e descrissero *Bacillus* spp. omofermentanti in grado di fermentare glucosio, che però, a differenza del *B. coagulans* (produttore di L-lattico) formavano dal metabolismo dello zucchero, alcuni, acido D-lattico e, altri, DL-lattico; gli autori, in base a tale isomeria, proposero per i ceppi isolati, rispettivamente, le nuove specie *Bacillus laevolacticus* e *Bacillus racemilacticus*.

Andersch *et al.* (19), esaminando le caratteristiche genetiche di ceppi di *Bacillus* spp. produttori di acido lattico, catalasi positivi (contenuto % G+C, valori d'ibridazione DNA-DNA) rilevarono che i membri del gruppo *B. levolacticus* erano altresì omogenei genotipicamente e chiaramente distinguibili da *Sporolactobacillus* e da altre specie di *Bacillus*. Nakamura *et al.* (20), mediante esame del DNA (contenuto % G+C, stima dell'omologia) in ceppi previamente identificati come *B. coagulans*, individuarono un gruppo di ceppi geneticamente e fenotipicamente distinti per i quali fu proposto l'assegnazione di specie nuova con il nome *Bacillus smithii*.

Secondo studi sulle sequenze geniche di rRNA 16S di ceppi sporigeni produttori di acido lattico, Suzuki e Yamasato (21) riscontrarono che la maggior parte dei ceppi in esame (*Sporolactobacillus* spp., *Bacillus* spp.), anche se non omogenei nella produzione di catalasi e del tipo d'isomero di acido lattico, erano ascrivibili al genere *Sporolactobacillus*.

*B. coagulans*, per gli scarsi livelli di correlazione emersi, risultava non correlabile a tali ceppi e, pertanto, lontano filogeneticamente. I batteri lattosporigeni non sono, pertanto, monofiletici, e, quindi, la capacità di fermentare il glucosio per via omolattica è una caratteristica evolutasi fra i vari ceppi indipendentemente; emerge, altresì, che test chemio-sistematici, quali la catalasi e l'isomeria dell'acido lattico prodotto non sono determinanti per l'assegnazione del genere (21).

Scopo di questo lavoro è l'identificazione di tre ceppi di batteri sporigeni mesofili, isolati da conserve di pomodoro alterate per *flat-sour*, al fine di verificare se tale capacità alterante sia ascrivibile anche a specie diverse da *B. coagulans*. È stata caratterizzata, inoltre, l'alterazione causata dai ceppi in esame mediante la determinazione delle cinetiche di sviluppo, l'utilizzo di sostanze costituenti e la produzione di metaboliti in passato di pomodoro, a pH pari a 4,45 e residuo rifrattometrico di 7,7°Brix, confezionato in vasetti di vetro in presenza di aria o con un determinato grado di vuoto.

### **Microrganismi (ceppi)**

Sono stati studiati tre ceppi di batteri isolati da confezioni di passato di pomodoro, alterate, con la produzione di *off-flavor*, presentanti inacidimento senza rigonfiamento dei contenitori e denominati 360-2a, 360-3c e 402.

### **Isolamento dei microrganismi**

Da piastre di Thermoacidurans agar (Difco) sono state prelevate colonie risultate costituite da cellule bastoncellari in grado di inacidire succo di pomodoro a pH 4,5 con la produzione di odori anomali e poi isolate per strisciamento su piastre di terreno Tryptone soy agar (Oxoid); dopo incubazione a 37°C per 48 ore, le colonie isolate sono state strisciate su slant di TSA, incubate a 37°C per 48 ore e, dopo accrescimento, mantenute a temperatura ambiente.

### **Identificazione dei microrganismi**

I tre ceppi, sono stati sottoposti a identificazione primaria adottando i test del sistema API 20E e API 50 CHB (BioMérieux).

Il test della catalasi è stato eseguito mediante perossido d'idrogeno soluzione 3,5% m/v (Carlo Erba).

Il test per la produzione di acidi da glucosio è stato eseguito sul terreno descritto dal *Bergey's manual* (22) e la stereospecificità dell'acido lattico prodotto è stata determinata con analisi enzimatica mediante kit Boehringer Biochemia Robin.

Le temperature di sviluppo minime e massime sono state individuate in terreno Brain heart infusion (OXOID) nelle condizioni d'incubazione descritte nel manuale *Bergey's* (22).

La reattività in latte è stata valutata in latte scremato sterile; dopo incubazione a 37°C e a 44°C, per massimo 7 giorni, sono stati verificati cambi di stato della matrice e variazioni di pH.

### **PCR REAL TIME**

#### **Ceppi microbici ed estrazione del DNA da coltura batterica**

Oltre ai ceppi 360-2a, 360-3c e 402, sono stati utilizzati i seguenti ceppi come controlli negativi dei primers: *Bacillus subtilis* ATCC6630, *Bacillus polymyxa* ATCC 8523, *Bacillus licheniformis* ATCC 14580

Il ceppo di *Bacillus coagulans* ATCC 7050 è stato utilizzato come controllo positivo.

I microrganismi sono stati fatti crescere in terreno culturale Plate count agar (PCA Oxoid) incubato a 30°C per 48 h, poi si è proceduto all'estrazione del DNA (23).

#### **Primer**

I primer utilizzati sono stati sintetizzati da Invitrogen e sono (23):

Spo3: 5' TCT TGC GGC TCA ACC GCA AGC GG 3' e Spo4: 5' TGC AGG CGG GTT GCA GCC TGC 3'.

#### **PCR Real-Time SYBR Green**

Le reazioni d'amplificazione della PCR Real-Time sono state eseguite con termocicizzatore (Bio-Rad) associato a sistema ottico e software iCycler (Bio-Rad), con le seguenti condizioni d'amplificazione: 1° ciclo, a 95°C per 5 min; 2° ciclo (amplificazione), ripetuto 30 volte, a 95°C per 1 min (denaturazione) a 65°C per 1 min (*annealing*) e 72°C per 1 min (estensione); 3° ciclo a 72°C per 10 min (estensione finale); 4° ciclo (*melting*) ripetuto 80 volte da 55°C con un incremento di 0,5°C ogni 15 s.

La miscela di reazione era così composta: 25 µL di iQ™ SYBR Green Supermix di Bio-Rad, 0,05 nmoli di ogni primer, 5 µL di estratto di DNA usato come template e acqua distillata per ottenere un volume finale di 50 µL.

#### **Interpretazione dei risultati di PCR Real-Time con SYBR Green**

All'inizio del processo di amplificazione, la miscela di reazione contiene DNA denaturato, primers e la molecola fluorescente SYBR Green. Dopo la fase di *annealing* dei primers si legano le molecole fluorescenti di SYBR Green alla doppia elica. Durante l'estensione si verifica un aumento di fluorescenza che corrisponde all'aumento del numero di copie dell'amplicone, il modulo ottico dello strumento ne misura la fluorescenza alla lunghezza d'onda di 497 e 520 nm coincidenti con il filtro FAM dello strumento iQ-Cycler e contemporaneamente il software associato traccia l'intensità della fluorescenza che si visualizza sul monitor del computer. I risultati sono osservati analizzando il valore di *Ct* (numero del ciclo al quale la curva d'amplificazione attraversa il ciclo soglia) di ogni campione.

Il parametro *Ct* indica il numero del ciclo durante il quale si è avuto un aumento di fluorescenza significativo ed è in relazione con il numero di unità genomiche presenti nel template di partenza. I valori di *Ct* sono inversamente proporzionali al numero di coppie di DNA target presenti nel campione analizzato; pertanto, più è alto il numero di unità genomiche del gene target nel campione analizzato, più basso è il valore di *Ct*. Il saggio con SYBR Green è una metodica non specifica dovuta al fatto che la molecola fluorescente si lega a random a tutte le doppie eliche, includendo i dimeri di primers; è necessario, pertanto,

dopo l'amplificazione effettuare una curva di dissociazione o melting, dove i campioni vengono riscaldati e la variazione dell'energia di fluorescenza viene monitorata per generare una curva di dissociazione, consentendo così d'identificare i prodotti di amplificazione specifici rispetto a prodotti aspecifici.

---

### **Sporificazione**

La capacità di sporificazione è stata saggiata a 37°C e a 44°C utilizzando, a confronto, i terreni Thermoacidurans agar (Difco), TSA, TSA addizionato di Mn<sup>++</sup> (1 ppm) e Tryptone Glucose Yeast Extract (5) agar dopo tre subculture in Brian Infusion broth (Oxoid) a 44°C per 24 h ciascuna.

La capacità di sporificazione è stata valutata mediante osservazione microscopica giornaliera fino a 7 giorni.

Dal terreno a maggior sporificazione, dopo 7 giorni, le spore sono state raccolte con acqua distillata sterile, lavate e centrifugate tre volte per 20 minuti a 4000 giri/min e, dopo pastorizzazione a 80°C per 20 min, conservate a 2-4°C.

---

### **Preparazione del substrato**

È stato utilizzato passato di pomodoro distribuito in vasetti di vetro con capsule, pre-sterilizzati a 121°C per 15 min, nella quantità di g 80 per vasetto. I contenitori così confezionati sono stati trattati in autoclave a vapore a 100°C per 15 min al fine di inattivare eventuali cellule batteriche inquinanti il prodotto e i vasetti durante il confezionamento.

Dopo il trattamento termico, il pH del prodotto risultava pari a  $4,47 \pm 0,02$  e il residuo rifrattometrico pari a  $7,70 \pm 0,02^\circ\text{Brix}$ .

---

### **Preparazione delle sospensioni, inoculazione in pomodoro e incubazione**

Dopo attivazione mediante shock termico a 80°C per 10 min in soluzione fisiologica peptonata, aliquote di sospensione di spore sono state inoculate in flaconi in modo da ottenere un titolo pari a circa  $10^2\text{-}10^3/\text{mL}$ ; le diluizioni sono state effettuate in soluzione fisiologica peptonata (SOLP) fino a raggiungere le concentrazioni previste.

Dopo agitazione e prelievo di due unità per verificare il titolo iniziale, una metà dei flaconi è stata incubata direttamente a 37°C e l'altra metà alla stessa temperatura, ma dopo chiusura mediante capsulatrice sotto-vuoto in modo da raggiungere un grado di vuoto pari a 60 cm Hg. A tempi prestabiliti, i contenitori (due per volta per ogni tipo di confezionamento) sono stati analizzati per la composizione dei gas dello spazio di testa, il conteggio delle cellule e delle spore batteriche, alcuni indicatori chimici di alterazione e, per i soli confezionati sotto vuoto, il vuoto.

---

### **Conteggi microbiologici**

Le concentrazioni cellulari sono state valutate mediante conteggi in TSA inoculato per inclusione e incubato a 37°C per 72 h. Il conteggio delle spore è stato fatto nelle stesse condizioni, ma dopo pastorizzazione del substrato a 80°C per 10 min.

---

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

Il pomodoro utilizzato per preparare i vasetti e quello alterato ai vari tempi considerati nel piano sperimentale, sono stati analizzati al fine di determinare i seguenti metaboliti: glucosio, fruttosio, acido acetico, acido citrico, acido formico, acido L-malico, acido D-L lattico, acido succinico, etanolo, 2,3 butandiolo, acetoino. I parametri, ad eccezione dell'acido lattico e malico, sono stati ricercati mediante cromatografia per HPLC.

*Sistema cromatografico.* Per la determinazione è stato impiegato un sistema della Waters composto di una pompa mod. 600E, di un autocampionatore mod. 717, di un rivelatore spettrofotometrico mod. 484 e di un rivelatore IR 410. I dati cromatografici erano acquisiti ed elaborati mediante software Millennium 32, versione 3.05.01 della Waters Corporation.

*Preparazione del campione.* I campioni sono stati centrifugati a 18000 r.p.m. Per la determinazione dell'acido citrico, 5 mL del surnatante sono stati caricati su colonna 1 x 30 cm, riempita per 25 cm con resina Bio-Rad, tipo AG 2-X8 Cl-, 100-200 mesh, eluita con acido formico. Per gli altri composti organici, il surnatante è stato filtrato su filtri da 0,45 µm e iniettato nel sistema cromatografico.

*Preparazione degli standard.* Per costruire le rette di calibrazione sono state impiegate soluzioni standard contenenti da 25 a 500 mg/100 g, in funzione della quantità contenuta nel prodotto.

*Condizioni cromatografiche.* Sono state adottate le seguenti condizioni:

- Per il rivelatore 484, lunghezza d'onda di rivelazione: 210 nm;
- AUFS (attenuazione del sistema di rivelazione): 0,01;
- fase mobile: soluzione acquosa di acido solforico 5 mM;
- per il rivelatore IR-410, sensibilità: 256 nm;
- velocità di flusso: 0,6 mL/min;
- volume di iniezione: 10 µL;
- colonna: Aminex HPX-87H Bio-Rad;
- temperatura di lavoro: 30°C.

L'acido D-L lattico e l'acido L-malico sono stati determinati con analisi enzimatica mediante kit Boehringer Biochemia Robin. Sono stati, inoltre, determinati i valori del pH e del residuo ottico ai vari tempi considerati.

Le misure di pH sono state effettuate con pHmetro CRISON modello MicroPH 2002.  
Le misure del residuo ottico sono state eseguite con rifrattometro BS modello RFM81.

---

### **Misura del vuoto**

Il vuoto è stato determinato mediante doppia lettura con vuotometro BUDENBERG modello 269 BFMIRA avente una scala 0-30 In. Hg; per il calcolo del valore di vuoto vero con conversione a cm Hg è stata utilizzata la formula  $(A \times B) / (2B - A) \times 2,54$  con A prima lettura e B come seconda.

---

### **Analisi dei gas dello spazio di testa**

La composizione della miscela di gas prodotti dal metabolismo batterico nei vasi in vetro è stata determinata mediante gas cromatografo (Dani, mod. 3200) operante a 40°C con elio come gas di trasporto, equipaggiato con un sensore di temperatura, colonna a setacci molecolari e colonna Poropack T.

---

### **Elaborazione dei dati**

I dati concernenti la cinetica di sviluppo dei due ceppi inoculati in diverse condizioni colturali sono stati elaborati mediante modello matematico (24) utilizzando il programma "Table Curve 2D, versione 4" (SPSS Inc., Chicago, U.S.A.); la funzione adottata è l'equazione modificata di Gompertz a quattro parametri:  $Nt = A + C \exp\{-\exp[-B(t-M)]\}$  dove:

$Nt$  = numero di batteri al tempo  $t$  [Log (ufc/mL)];

$A$  = numero iniziale di batteri [Log (ufc/mL)];

$C$  = numero di cicli logaritmici di crescita [Log (ufc/mL)];

$M$  = tempo a cui la velocità di crescita è massima ( $h$  = ore);

$B$  = velocità di crescita relativa al tempo  $M$   $\{[\text{Log (ufc/mL)}]/h\}$ .

La fase lag,  $\lambda$  ( $h$ ) è così calcolata =  $M - (1/B)$ ;

Il tempo di generazione cellulare,  $tg$  ( $h$ ) è così calcolato:  $e \cdot \text{Log}(2) / B \cdot C$ ;

La massima densità di crescita raggiunta, ( $N_{MAX}$ ) è così calcolata:  $A + C$ ;

La velocità di crescita in fase logaritmica,  $\mu$  ( $N/h$ ) è così calcolata:  $BC/e$ .

L'inizio della fase stazionaria ( $h$ ) è stato stimato, dopo traslazione dell'origine degli assi in  $0'$  ( $\lambda; A$ ), mediante l'intersezione tra la retta rappresentante la fase di crescita logaritmica ( $y = \mu t$ ) e la retta rappresentante l'asintoto superiore ( $y = C$ ); la formula semplificata adottata è stata  $C / \mu + \lambda$ .

I dati sperimentali in fase di declino sono stati elaborati verificando il miglior adattamento mediante il programma "Table Curve 2D, versione 4".

Le variazioni di pH, del vuoto e dei metaboliti sono state elaborate secondo lo stesso modello di Gompertz, sostituendo a  $Nt$  il valore del parametro in esame.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Le caratteristiche biochimiche dei microrganismi in esame sono riportate nella Tabella 1.

TAB. 1 - Tabella identificativa dei tre ceppi responsabili di flat-sour

Test		Ceppi			
		360-2a	360-3c	402	
	Catalasi	+	-	+	
	Acido lattico prodotto da glucosio	L(+)	L(+)	L(+)	
API 20 E	ONPG	-	-	+	
	idrolisi arginina	-	-	-	
	decarbossilazione lisina	-	-	-	
	decarbossilazione ornitina	-	-	-	
	utilizzo citrato	-	-	-	
	produzione H <sub>2</sub> S,	-	-	-	
	ureasi	-	-	-	
	triptofano deaminasi	-	-	-	
	produzione indolo	-	-	-	
	produzione acetoino	+	+	-	
	gelatinasi	-	-	-	
	riduzione nitrati	-	-	-	
	API 50 CHB fermentazione	glicerolo	+	+	+
		eritritolo	-	-	-
D-arabinosio		-	-	-	
L-arabinosio		-	+	+	
D-ribosio		+	+	+	
D-xilosio		-	-	+	
L-xilosio		-	-	-	
D-adonitolo		-	-	-	
Metil-β-D-xilopiranoside		-	-	-	
D-galattosio		+	+	+	
D-glucosio		+	+	+	
D-fruttosio		+	+	+	
D-mannosio		+	+	+	
L-sorbosio		-	-	-	
L-ramnosio		-	-	+	
dulcitolio		-	-	-	
inositolio		-	-	+	
D-mannitolo		-	+	+	
D-sorbitolo		-	-	-	
Metil-α-D-mannopiranoside		-	-	-	
Metil-α-D-glucopiranoside		+	-	-	
N-acetil glucosammina		+	+	+	
amigdalina		-	-	+	
arbutina		-	-	+	
esculina		-	-	+	
salicina		-	-	+	
D-cellobiosio		+	-	+	
D-maltosio		-	+	+	
D-lattosio		-	-	-	
D-melibiosio		+	+	+	
D-Saccarosio		+	+	+	
D-trealosio		+	+	+	
inulina		-	-	-	
D-melezitosio		-	-	-	
D-raffiniosio		-	-	-	
amido		-	+	+	
glicogeno		-	-	-	
xilitolo		-	-	-	
gentobiosio		-	-	+	
D-turanosio		-	+	-	
D-lixosio		-	-	-	
D-tagatosio		-	-	-	
D-fucosio		-	-	-	
L-fucosio		-	-	-	
D-arabitolio		-	-	-	
L-arabitolio		-	-	-	
gluconato		+	+	+	
2-chetogluconato		-	-	-	
5-chetogluconato		-	+	-	
Temperatura minima di sviluppo		15°C	20°C	15°C	
Temperatura massima di sviluppo	60°C	60°C	60°C		

I ceppi denominati 360-2a e 402 sono risultati positivi al test della catalasi; non è stata riscontrata tale attività per il ceppo 360-3c. Tutti gli stipiti producono acido L-lattico dal metabolismo del glucosio.

Tutti i ceppi presentano la temperatura massima di sviluppo a 60°C.

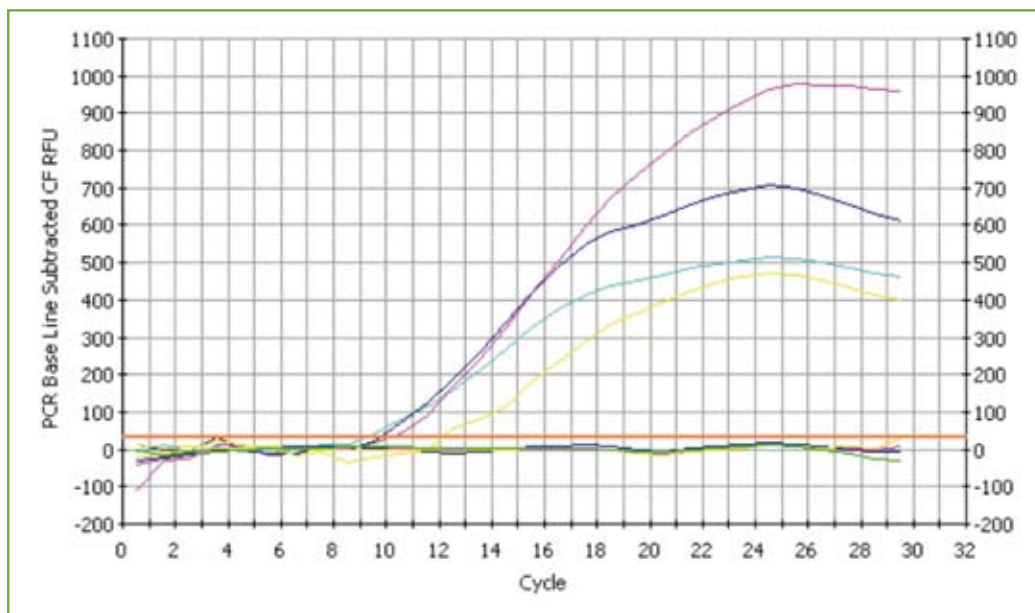
La temperatura minima per l'accrescimento è pari a 15°C, per i ceppi 360-2a e 402 e pari a 20°C, per il ceppo 360-3c.

Secondo il sistema di lettura Api, il ceppo 402 risulta ben identificato come *Bacillus coagulans* mentre i profili relativi ai ceppi 360 non ne consentono l'identificazione biochimica.

Come si può evidenziare dalla Figura 1, con i ceppi 360-2a, 360-3c, 402 e il ceppo di *Bacillus coagulans* ATCC7050 si rilevano le curve d'amplificazione; i tre ceppi utilizzati come controllo negativo, *Bacillus subtilis* ATCC6630, *Bacillus polymyxa* ATCC 8523, *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 e il campione senza template non hanno prodotto nessuna curva d'amplificazione.

Fig. 1 - Curva d'amplificazione Real-time Pcr

Legenda: — *B. coagulans* ATCC 7050, —: ceppo 360-2a, —: ceppo 360-3c, —: ceppo 402. Le curve sotto la linea di base d'amplificazione rappresentano i ceppi *B. subtilis* ATCC 6630, *B. polymyxa* ATCC 8523, *B. licheniformis* ATCC 14580 e un controllo negativo senza template, non amplificati.

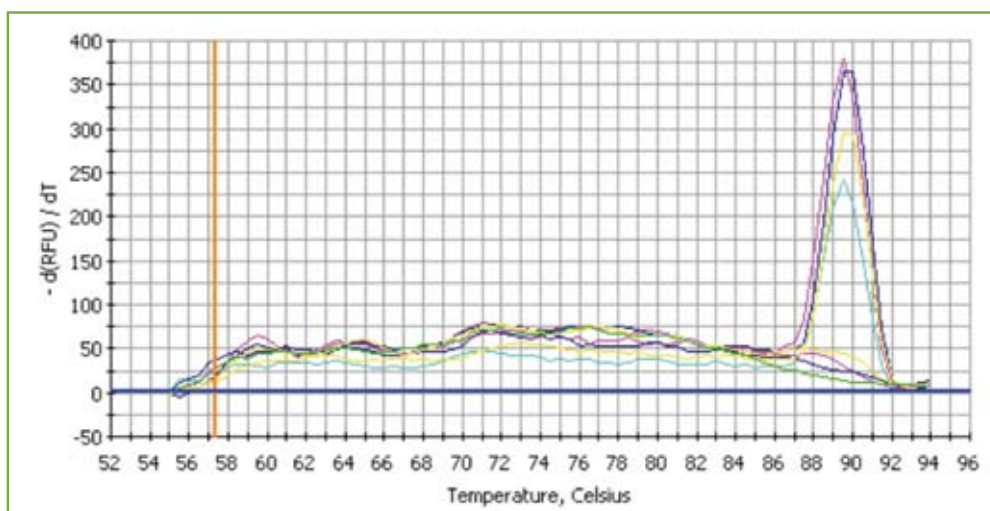


Dall'analisi della curva di *melting* (Figura 2) si evince che le curve hanno lo stesso punto di fusione (89,5°C) e quindi non si identificano con prodotti d'amplificazione aspecifici.

Fig. 2 - Curva di Melting.

Legenda: — *B. coagulans* ATCC 7050, —: ceppo 360-2a, —: ceppo 360-3c, —: ceppo 402.

Le curve sotto la linea di base d'amplificazione rappresentano i ceppi *B. subtilis* ATCC 6630, *B. polymyxa* ATCC 8523, *B. licheniformis* ATCC 14580 e un controllo negativo senza template, non amplificati.



I risultati ottenuti consentono, pertanto, di affermare che i tre ceppi in esame appartengono alla specie *Bacillus coagulans*. Il ceppo 402 mostra una reattività al latte tipica con coagulazione acida a entrambe le temperature saggiate (37°C e 44°C); per i ceppi 360, si riscontra, invece, a 44°C, una gelificazione del mezzo con un leggero aumento di pH (+0,3).

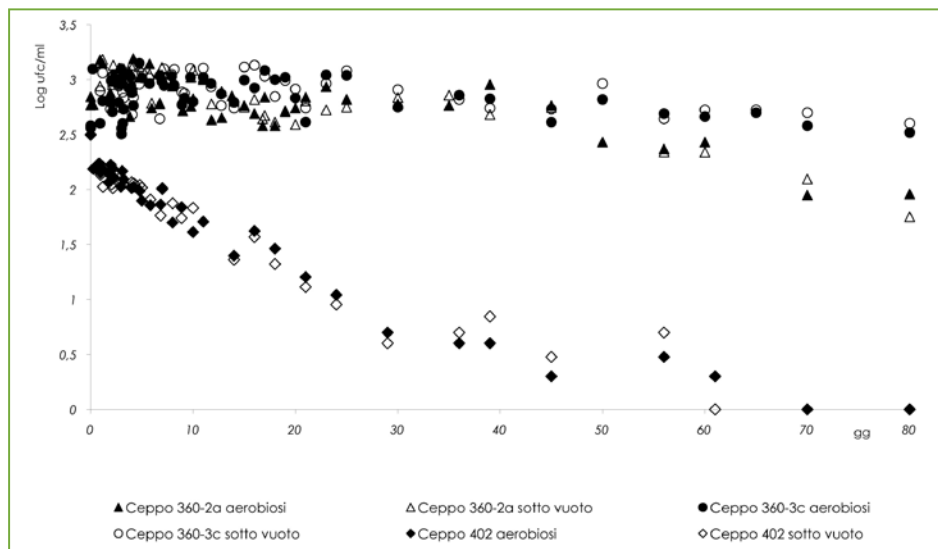
La capacità di sporificare nei diversi substrati, alle temperature 37°C e 44°C, sono specificate nella Tabella 2; per tutti i ceppi, le condizioni migliori si sono verificate nel terreno TGYE incubato a 44°C per un periodo prossimo a 7 giorni.

TAB. 2 - Capacità di sporificazione in diversi terreni colturali a diverse temperature

Media		Ceppi											
		360-2a				360-3c				402			
		37°C		44°C		37°C		44°C		37°C		44°C	
		4 gg	7gg	4 gg	7gg	4 gg	7gg	4 gg	7gg	4 gg	7gg	4 gg	7gg
Thermoacidurans agar	%	<0,1	<0,1	<0,1	0,1	<0,1	0,1	<0,1	0,1	<0,1	1	<0,1	1
Tryptone soya agar		<0,1	0,1	30	30	0,1	10	30	40	10	15	50	50
Tryptone soya agar + MnSO4		<0,1	<0,1	20	30	0,1	1	30	20	10	30	80	90
TGYE agar		<0,1	10	90	99	50	50	90	99	90	100	100	100

Le variazioni nel tempo della concentrazione sporale del prodotto sono rappresentate nella Figura 3.

Fig. 3 - Evoluzione della concentrazione sporale



Dall'esame si evince che nelle condizioni di attivazione adottate (shock termico di 10 min a 80°C in soluzione fisiologica peptonata) solo una frazione di spore è germinata. È nota l'influenza sulla germinazione di vari fattori colturali quali la temperatura, il tempo e la composizione del mezzo impiegati per l'attivazione, nonché delle condizioni utilizzate per la produzione delle spore (25). La concentrazione di cellule rimaste allo stato di spore diminuisce regolarmente nel tempo, per quanto riguarda il ceppo 402, fino ad azzerarsi quasi del tutto in 2 mesi; per gli altri due ceppi, le variazioni sono molto contenute e risultano, per il periodo esaminato, di 1 log, per il ceppo 360-2a e di 0,5 log, per il ceppo 360-3c.

Le curve che descrivono l'evoluzione della popolazione microbica in fase di accrescimento (calcolate mediante il modello di Gompertz) e in fase di declino (calcolate mediante modello esponenziale) e i dati sperimentali sono riportati nella Figura 4 per il ceppo 360-2a, nella Figura 5 per il ceppo 360-3c e nella Figura 6 per il ceppo 402.

Fig. 4 - Evoluzione della popolazione microbica relativa al ceppo 360-2a

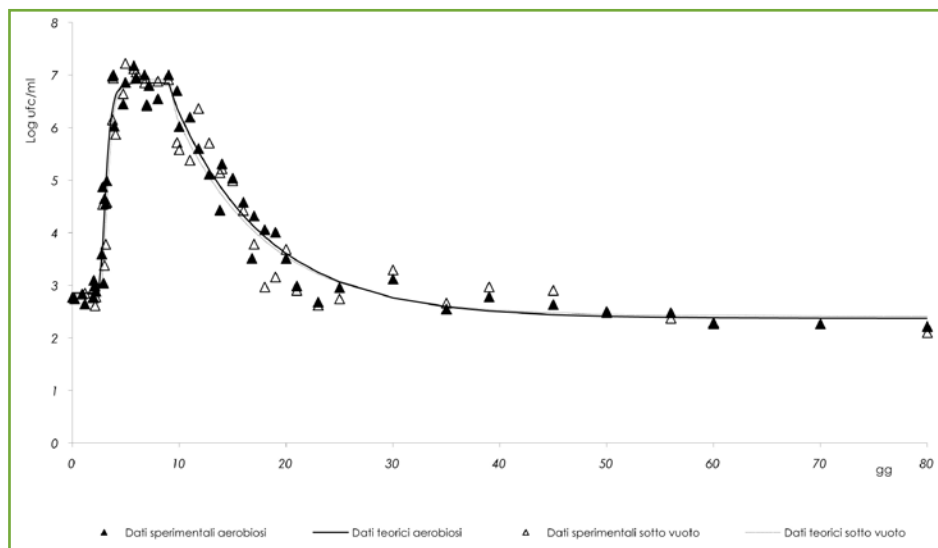




Fig. 5 - Evoluzione della popolazione microbica relativa al ceppo 360-3c

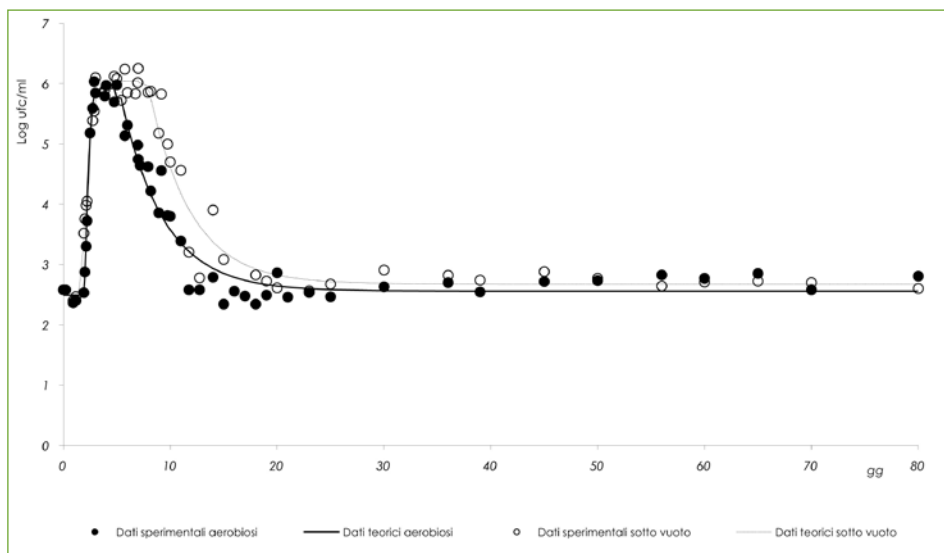
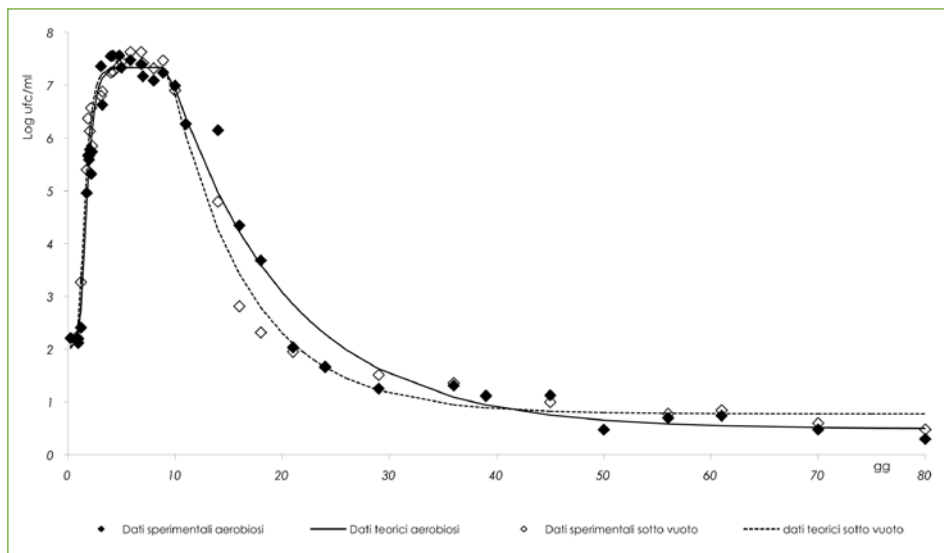


Fig. 6 - Evoluzione della popolazione microbica relativa al ceppo 402



I parametri di crescita elaborati con l'equazione di Gompertz sono riportati nella Tabella 3.

TAB. 3 - Parametri di accrescimento alla temperatura di 37°C elaborati con l'equazione di Gompertz

Ceppi		360-2a		360-3c		402	
		aerobiosi	sotto vuoto	aerobiosi	sotto vuoto	aerobiosi	sotto vuoto
Numero iniziale di batteri, $N_0$	Log/ml	2,85	2,83	2,49	2,51	2,06	2,02
Fase lag, $\lambda$	h	62,1	66,0	47,7	39,2	25,4	21,5
Tempo generazione, $t_g$	min	114,0	118,1	73,2	139,9	112,6	107,1
Velocità massima di crescita, $\mu$	Log/h	0,16	0,15	0,25	0,13	0,16	0,17
Densità massima di crescita, $N_{MAX}$	Log/ml	6,85	6,91	5,92	6,04	7,33	7,34
Inizio fase stazionaria	h	87,3	92,8	61,6	66,5	58,2	53,0

Dall'elaborazione analitica dei dati secondo il modello di calcolo adottato, la fase di latenza (*fase lag*) varia fra i tre ceppi e, all'interno degli stessi, fra le condizioni aerobiosi e sotto vuoto; in particolare è minima per il ceppo 402 sotto vuoto (21,5 h) e massima per il ceppo 360-2a sotto vuoto (66,0 h).

Le velocità di crescita per i ceppi 402 e 360-2a sono alquanto simili in entrambe le condizioni e i rispettivi tempi di generazione si differenziano solo per pochi minuti; per il ceppo 360-3c si osserva, invece, una velocità di crescita all'incirca doppia in aerobiosi rispetto al sotto vuoto.

I diversi ceppi si differenziano, inoltre, per la densità massima di crescita; il ceppo 402 supera in entrambe le condizioni una concentrazione di  $10^7$  ufc/mL, mentre il ceppo 360-3c raggiunge livelli prossimi a  $10^6$  ufc/mL.

Anche per quanto riguarda l'inizio e la durata della fase stazionaria si osservano variazioni fra i tre ceppi e, all'interno degli stessi, fra le condizioni aerobiosi e sotto vuoto; in particolare risulta singolare il comportamento del ceppo 360-3c che, in aerobiosi, presenta la fase stazionaria più breve (circa 3 giorni).

In tutti e tre i ceppi, la fase di declino è di tipo esponenziale.

L'inattivazione è massima per il ceppo 402 il cui titolo scende a una concentrazione inferiore a 1 log ufc/mL in circa 45 giorni; per i ceppi 360-2a e 360-3c, dopo 80 giorni d'incubazione, la concentrazione raggiunge, rispettivamente, livelli prossimi a 2,4 e 2,6 log ufc/mL.

La longevità della popolazione batterica potrebbe essere legata, specialmente per il ceppo 360-3c, alla persistenza di una cospicua proporzione delle cellule in forma di spore.

Le variazioni di vuoto osservate nei flaconi così confezionati sono descritte nella Tabella 4.

TAB. 4 - Variazioni del vuoto

Ceppi		360-2a	360-3c	402
Vuoto iniziale medio	cm Hg	61,40	61,04	61,01
Vuoto finale medio	cm Hg	54,56	55,46	55,43
Delta	cm Hg	6,84	5,58	5,58
Inizio variazione	gg	4,1	3,6	4,3
Inizio fase costante	gg	9,5	9,5	10,5

In tutti i ceppi, la riduzione del vuoto comincia a evidenziarsi intorno al quarto giorno e tende a stabilizzarsi verso il decimo giorno; mediamente si osserva una riduzione dello stesso di 6,84 cm Hg per il ceppo 360-2a e di 5,58 cm Hg per i ceppi 360-3c e 402. Variazioni analoghe sono state riscontrate in altre sperimentazioni utilizzando ceppi di *Bacillus coagulans* isolati da derivati del pomodoro alterati per flat sour (6).

L'analisi della composizione dei gas dello spazio di testa rileva che tutti i ceppi sviluppano anidride carbonica sia in aerobiosi sia nelle confezioni sotto vuoto (Tabella 5).

TAB. 5 - Concentrazione % CO<sub>2</sub> in spazio di testa nelle diverse prove dopo 80 gg a 37°C

Prova		Prodotto inoculato	Controllo non inoculato
360-2a	aerobiosi	16,9	5,8
	sotto vuoto	44,9	25,9
360-3c	aerobiosi	15,8	7,8
	sotto vuoto	41,6	32,5
402	aerobiosi	19,6	7,3
	sotto vuoto	53,8	30,2

La produzione dell'anidride carbonica è responsabile della riduzione di vuoto nei vasetti così confezionati.

Le differenze di concentrazione emerse fra le due condizioni sono presumibilmente dovute alle diverse modalità di confezionamento che influenzano la composizione e il volume dello spazio di testa iniziale; in controlli non inoculati, la concentrazione di CO<sub>2</sub> nello spazio di testa, al termine della prova, risultava, peraltro, mediamente, pari a 7,0% e a 29,5%, per vasetti confezionati, rispettivamente, in aerobiosi e sotto vuoto.

La produzione di anidride carbonica era stata altresì evidenziata da altri autori in sistemi in vitro, sebbene, in tali casi, la produzione di gas fosse maggiore in aerobiosi che in anaerobiosi (26, 27).

Le variazioni di pH sono descritte nella Tabella 6.

TAB. 6 - Variazioni di pH

Ceppi		360-2a		360-3c		402	
pH iniziale medio	unità pH	4,476	4,473	4,485	4,481	4,464	4,457
pH finale medio	unità pH	4,245	4,235	4,257	4,264	4,040	4,018
Delta	unità pH	0,231	0,238	0,228	0,217	0,424	0,439
Inizio variazione	gg	3,3	3,6	2,2	2,0	2,4	2,9
Inizio fase costante	gg	13,0	10,1	6,0	7,8	7,7	9,3

Per i ceppi 360 le variazioni sono molto simili; esse, per entrambi, sono prossime a -0,23, in aerobiosi mentre, in condizioni di sottovuoto, sono vicine a -0,22, per il ceppo 360-3c e vicine a -0,24, per il ceppo 360-2a.

Più spinte le variazioni per il ceppo 402 che raggiunge delta di -0,42 e -0,44 per le condizioni aerobiosi e sotto vuoto.

Le variazioni del ceppo 402 sono sovrapponibili a quelle riscontrate in esperienze con altri ceppi di *B. coagulans* (6).

La minore produzione di acidi rilevata per i ceppi 360 potrebbe spiegare il minore grado d'inattivazione microbica in essi riscontrata.

Le riduzioni di pH cominciano a essere apprezzabili verso il secondo giorno per il ceppo 360-3c in entrambe le condizioni di aerobiosi e sotto vuoto.

La riduzione appare più veloce in aerobiosi rispetto al sotto vuoto, per gli altri ceppi; il più precoce è il 402 in aerobiosi con 2,4 giorni e il più tardivo il ceppo 360-2a con 3,6 giorni in condizioni di vuoto.

La stabilizzazione della variazione appare eterogenea fra ceppi e condizioni variando da un minimo di 6,0 giorni per il ceppo 360-3c a un massimo di 13 giorni, per il ceppo 360-2a.

La comparsa di odori anomali, per il ceppo 402, è stata riscontrata al terzo giorno mentre, per i ceppi 360, è risultata apprezzabile a partire dal quarto giorno.

Per tutti i ceppi, gli indici di alterazione (produzione di gas, riduzione del pH) cominciano a essere evidenziabili verso la fine della fase logaritmica della popolazione microbica; le variazioni si esauriscono poi alla fine della fase stazionaria, confermando le ridotte attività metaboliche dei microrganismi presenti in questa fase.

Le variazioni indotte dal metabolismo microbico sono riportate nella Tabella 7.

TAB. 7 - Concentrazioni finali medie di metaboliti

	Ceppi		360-2a		360-3c		402	
			aerobiosi	sotto vuoto	aerobiosi	sotto vuoto	aerobiosi	sotto vuoto
Produzione	Acido L-lattico		1,78	1,85	1,40	1,35	4,56	4,62
Consumo	Glucosio		0,81	0,80	0,65	0,62	1,10	1,14
	Fruttosio		-	-	-	-	1,45	1,60
	Acido malico		0,13	0,13	0,11	0,09	0,11	0,11
Riduzione residuo ottico		°Bx	0,10	0,10	0,07	0,07	0,14	0,15

Tutti i ceppi producono, anche se in quantità differenti, esclusivamente acido L-lattico; non sembrano significative, per tutti i ceppi, le differenze fra le condizioni di confezionamento.

Non si riscontrano altri metaboliti quali 2,3 butandiolo, acetoino, acido acetico, acido formico, acido succinico, etanolo.

Il ceppo 402 si distingue per la più elevata concentrazione dell'acido lattico prodotto (mediamente 4,6 mmoli/100 g) mentre il ceppo 360-3c è il meno produttivo (mediamente 1,4 mmoli/100 g).

La maggiore formazione di acido è confermata, per il ceppo 402, dal maggior consumo di glucosio (mediamente 1,1 mmoli/100 g) che, invece, presenta il minimo con 360-3c (mediamente 0,6 mmoli/100 g).

In linea con il consumo di glucosio sono le riduzioni del residuo rifrattometrico; esse sono più spinte con il 402 (-0,15%) e più contenute con il ceppo 360-3c (-0,07%).

Il ceppo 402, a differenza dei ceppi 360, è in grado di metabolizzare il fruttosio.

Tutti i ceppi in esame utilizzano l'acido malico; non si osserva per essi la capacità di catabolizzare l'acido citrico.

Il confronto fra le concentrazioni di zuccheri metabolizzati e di acido lattico prodotto conferma che questi è l'unico prodotto dei processi metabolici in entrambe le condizioni di confezionamento.

A risultati diversi erano pervenuti altri autori che, di contro, avevano constatato, in sistemi *in vitro*, come la fermentazione omolattica divenisse, eterolattica nel passaggio da condizioni anaerobiche ad aerobiche (5).

## CONCLUSIONI

I tre ceppi di batteri sporigeni isolati da casi di *flat-sour*, dopo identificazione mediante test PCR Real-Time, risultano appartenere alla specie *Bacillus coagulans*.

I tre ceppi mostrano caratteristiche fenotipiche differenti.

Il ceppo 402 presenta un profilo biochimico e una reattività al latte (coagulazione acida) tipica della specie.

I ceppi 360 non risultano identificabili per via biochimica e non esibiscono attività coagulativa acida. Il ceppo 360-3c, inoltre, non presenta l'enzima catalasi ponendo, così, dubbi sull'utilità di tale test ai fini chemio-sistematici.

Per tutti i ceppi, nelle condizioni di attivazione adottate, solo una percentuale di spore germina; tutti i ceppi comunque crescono nel prodotto alterandolo per *flat sour*.

L'alterazione, peraltro, appare evidente in un tempo massimo di 14 giorni a 37°C.

Per il 402, le spore non germinate tendono a inattivarsi nel tempo più velocemente rispetto ai ceppi 360.

I parametri di crescita della popolazione microbica (*fase lag*, tempo di generazione, densità massima, inizio fase stazionaria), elaborati mediante equazione di Gompertz, variano fra i ceppi e, all'interno degli stessi, fra le condizioni di aerobiosi e sotto vuoto.

Alquanto simili, ad eccezione di quanto riscontrato in aerobiosi per il ceppo 360-3c, sono le velocità massime di sviluppo.

In tutti i ceppi, la fase di declino è di tipo esponenziale.

Tutti i ceppi producono anidride carbonica sia in vasi chiusi in aerobiosi sia sotto vuoto con conseguente riduzione del grado di vuoto nei flaconi così confezionati.

Dal metabolismo del glucosio viene prodotto esclusivamente acido L-lattico in entrambe le condizioni di confezionamento.

I ceppi metabolizzano l'acido malico.

La possibilità che l'utilizzo di tale acido possa essere responsabile di elevazione del pH in conserve di pomodoro dovrebbe essere valutata con ulteriori studi.

Nelle condizioni sperimentali adottate, il ceppo 402, rispetto ai ceppi 360, ha capacità alteranti più incisive e l'alterazione conseguente al suo sviluppo presenta le caratteristiche tipiche, in termini di pH e variazioni del grado di vuoto, già riscontrate per altri ceppi di *B. coagulans*.

Una più approfondita caratterizzazione dei ceppi 360, rispetto al 402, in termini di comportamento delle spore e di capacità di alterazione in diverse condizioni sperimentali sarà oggetto di successivi studi.

Angri, 1 febbraio 2010

1. "Compendium of methods for the microbiological examination of foods", 3a Ed., Eds. C. Vanderzant, D.F. Splittstoesser, American Public Health Association, Washington DC (1992).
2. P. J. Tomson, *J. Food Protect.*, 44, 154 (1981).
3. E. Vicini, M. P. Previdi, G. Pirone, *Microb. Al. Nutrition*, 10, 105 (1992).
4. "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", Eds. R. E. Buchanan, N. E. Gibbons, 8° ed., The William and Wilkins co., Baltimora (1974).
5. A. C. Rice, C. S. Pederson, *Food Res.*, 19, 115 (1953).
6. E. Vicini, S. Mannino, G. Pirone, *Ind. Conserve*, 64, 13 (1989).
7. E. Vicini, G. Pirone, S. Mannino, M. P. Previdi, *Ind. Conserve*, 65, 20 (1990).
8. C. B. Denny, C. W. Bohrer, National Canner Association Research report N. 2-64 (1963).
9. K. G. York, J. R. Heil, G. L. Marsh, A. Ansar, R. L. Merson, T. Wolcott, S. Leonard, *J. Food Sci.*, 40, 764 (1975).
10. G. Pirone, L. La Pietra, *Ind. Conserve*, 68, 126 (1993).
11. G. Pirone, S. Mannino, E. Vicini, *Ind. Conserve*, 64, 18 (1989).
12. G. Pirone, L. La Pietra, M. Longo, *Ind. Conserve*, 68, 420 (1993).
13. M. L. Fields, A. F. Zamora, M. Bradsher, *J. Food Sci.*, 42, 931 (1977).
14. R. E. Anderson, *J. Food Sci.*, 49, 647 (1984).
15. E. Vicini, *Ind. Conserve*, 61, 338 (1986).
16. G. Pirone, L. La Pietra, *Ind. Conserve*, 78, 41 (2003).
17. K. Kitahara, J. Suzuki, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 9, 59 (1963).
18. O. Nakayama, M. Yanoshi, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 13, 139 (1967).
19. I. Andersch, S. Pianka, D. Fritze, D. Claus, *Intern. J. Sist. Bacteriol.*, 44, 659 (1994).
20. L. K. Nakamura, I. Blumenstock, D. Claus, *Intern. J. Sist. Bacteriol.*, 38, 63 (1988).
21. T. Suzuki, K. Yamasato, *FEMS Microbiol. Lett.*, 115, 13 (1994).
22. "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Editor P. H. Sneath, 9° Ed., The William and Wilkins co., Baltimora (1986).
23. P. Aureli, A. Fiore, C. Scalfaro, G. Franciosa, *Metodi microbiologici tradizionali e metodi molecolari per l'analisi degli integratori alimentari a base di o con probiotici per uso umano*. Roma, Istituto Superiore di Sanità, 2008 (Rapporti ISTISAN 08/36).
24. R. C. Whiting, R. L. Buchanan, *Food Technol.*, 48, 113 (1994).
25. H. R. Curran, F. R. Evans, *J. Bacteriol.*, 49, 335 (1945).
26. M. E. Becker, C. S. Pederson, *J. Bacteriol.*, 59, 717 (1950).
27. G. C. Knock, M. S. J. Lambrechts, R. C. Hunter, F. R. Riley, *J. Sci. Food Agric.*, 10, 337 (1959).

#### RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Dott. Aldo Pezzani per la collaborazione prestata.