

# **Valutazione del rischio igienico-sanitario associato alla presenza di specie di *Bacillus* in salumi industriali ed artigianali**

## **Risk assessment of the presence of *Bacillus* spp. strains in artisanal and industrial cured sausages**

F. Baruzzi\*, A. Matarante\*, P.S. Cocconcelli\*\*, M. Morea\*

\* – Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, CNR, Via G. Amendola 122/O, 70126 – Bari

\*\* – Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Via E. Parmense 84, 29100 Piacenza

### **INTRODUZIONE**

*Bacillus cereus* è la più importante specie di *Bacillus* associata ad intossicazioni alimentari ed è solitamente presente in riso e pasta (*B. cereus* forma emetica) o latte, carne e derivati (*B. cereus* forma diarroica), per quanto anche altri bacilli, come *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, e *B. thuringiensis*, siano stati associati ad episodi di intossicazione alimentare (3). *B. cereus* è stato raramente isolato dalle carni (8, 11), nonostante i *Bacillus* siano frequentemente presenti nella carne e nei prodotti carnei (4, 9).

Sebbene siano stati riportati pochi episodi di intossicazione alimentare associati al consumo di carni fermentate causati da *Bacillus* (2, 12), la presenza di quantità variabili di bacilli e la produzione di tossine di *B. cereus* da parte di specie differenti da *B. cereus* (5) ci ha portato a valutare il rischio associato alla presenza di questo genere batterico nei salumi.

### **MATERIALI E METODI**

Campionamento ed analisi microbiologica: otto salumi, quattro prodotti mediante lavorazione industriale e quattro realizzati in aziende artigianali, sono stati analizzati. La conta dei bacilli totali è stata effettuata su Tryptic Soy Agar (TSA, Oxoid S.p.A., Garbagnate, Milano), previo trattamento termico per 10 min ad 80°C, mentre per l'isolamento selettivo di *B. cereus* è stato utilizzato il substrato mannitol-egg yolk-polymyxin (MYP, Merck S.p.A, Milano) dopo

crescita aerobia per 48 ore a 30°C. Da ciascun campione sono state isolate da 10 a 15 colonie che sono state analizzate per colorazione di Gram, morfologia cellulare, presenza di endospore e produzione di catalasi. Sessantaquattro isolati di bacilli Gram positivi, catalasi positivi, produttori endospore sono stati crio-conservati a -80°C.

Caratterizzazione genetica ed identificazione dei ceppi: sono stati analizzati il profilo RAPD degli isolati, seguendo il protocollo di Baruzzi e coll. (2000), ed il profilo AFLP come descritto da Vos e coll. (1995). La matrice binaria ottenuta da entrambe le analisi è stata sottoposta a “cluster analysis” usando il software NTSYS ver. 2.1. Previo calcolo del coefficiente di similarità di Dice è stato disegnato un dendrogramma basato sul metodo UPGMA. In entrambe le analisi RAPD ed AFLP alcuni ceppi sono stati saggiati in duplicato allo scopo di stabilire il valore di similarità oltre il quale gli isolati non possono essere distinti. Tutti i ceppi sono stati identificati tramite l’amplificazione e sequenziamento parziale dell’rDNA 16S, come precedentemente descritto (6).

Valutazione del potenziale tossigeno: la valutazione del potenziale tossigeno dei ceppi di *Bacillus* è stata effettuata mediante analisi PCR, saggi immunologici e determinazione delle attività emolitica e lecitinasica. I geni ricercati mediante PCR sono stati quelli relativi alle enterotossine HBL, NHE, T e FM di *B. cereus* e quelli relativi agli enzimi sfingomielinasi e fosfolipasi fosfatidilcolino-specifica. I primer e le condizioni d’amplificazione sono stati precedentemente riportati (7). La produzione delle enterotossine di *B. cereus* HBL ed NHE da parte dei ceppi isolati è stata valutata utilizzando il kit “*Bacillus* diarrheal enterotoxin visual immunoassay BDE” (TECRA International Pty. Ltd., Frenchs Forest, New South Wales, Australia) per NHE ed il kit “*B. cereus* enterotoxin reversed passive latex agglutination” (Oxoid) per l’HBL. Le attività emolitica e lecitinasica sono state rispettivamente saggate depositando una goccia di sospensione cellulare su una piastra di “Blood agar plates” (Merck) contenente 5% di sangue di montone o su una piastra di Nutrient agar arricchito (8%) di egg yolk emulsion (Oxoid). Entrambe le attività sono state determinate verificando la presenza di alone dopo 24 ore di crescita a 30°C.

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

La popolazione di *Bacillus* spp., presente in sette su otto campioni di salumi analizzati, variava da  $0,50 \times 10^2$  a  $1,20 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup>. Nessuna colonia ha mostrato le caratteristiche morfologiche tipiche di *B. cereus* su piastre di MYP. L’analisi RAPD-PCR sui 64 isolati ha permesso di distinguere 56 diversi biotipi che sono stati ulteriormente analizzati mediante fAFLP. Tale analisi ha confermato la biodiversità genetica presente tra i ceppi di *Bacillus* ed ha permesso di distinguere 47 diversi biotipi. L’analisi di sequenza dell’rDNA

16S ha mostrato che i ceppi isolati appartenevano prevalentemente alle specie *Bacillus subtilis* e *B. pumilus*. E' stato isolato un solo ceppo di *B. amyloliquefaciens* da un salame artigianale.

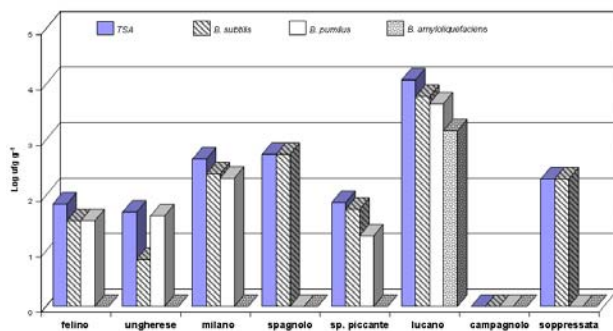


Fig. 1 – Presenza all'interno della popolazione totale di *Bacillus* delle diverse specie.

La distribuzione tra le varie specie di *Bacillus* rispetto alla loro conta totale in ogni campione è mostrata in figura 1. Nella figura 2 è riportato il dendrogramma che mostra la similarità dei ceppi in base al loro profilo fAFLP.

L'analisi molecolare dei 56 ceppi di *Bacillus*, ottenuti dalla RAPD-PCR, effettuata con i primer

relativi ai geni di quattro tossine e due enzimi della virulenza di *B. cereus* non ha prodotto alcun frammento indicando che tali geni sono presumibilmente assenti nei ceppi isolati dai salumi.

Tutti i ceppi isolati saggati con test immunologici per le tossine HBL ed NHE sono risultati negativi per entrambe le tossine HBL ed NHE. Attività emolitica è stata prodotta da due ceppi di *B. subtilis* e da 15 su 16 ceppi di *B. pumilus*. In confronto agli aloni larghi e chiari prodotti da *B. cereus*, quelli ottenuti dai *Bacillus* isolati dai salumi erano piccoli e verdeggianti suggerendo quindi un'alfa emolisi. Analizzando i brodi di coltura privi di cellule solo due *B. subtilis* hanno prodotto ancora gli aloni descritti. Attività lecitinasica è stata riscontrata in un solo ceppo di *B. pumilus* e nel 67% dei ceppi di *B. subtilis*.

## CONCLUSIONI

La mancanza di qualunque risultato positivo dall'analisi PCR ed immunologica dei fattori di virulenza di *B. cereus* indica che i ceppi di *B. subtilis*, *B. pumilus*, e *B. amyloliquefaciens* isolati dai salumi analizzati non possiedono geni codificanti per le tossine di *B. cereus*. Un'attività emolitica certa, sebbene diversa da quella di *B. cereus*, è stata riscontrata solo in due ceppi di *B. subtilis* mentre molti isolati di *B. pumilus* hanno sviluppato attività lecitinasica pur in assenza di frammenti PCR relativi ai geni di fosfolipasi specifiche per fosfatidilinositolo e fosfatidilcolina (gene *pipIC*). Dal momento che è stato dimostrato (10) che alcune attività emolitiche di *B. subtilis* sono dovute alle loro attività proteolitiche, in mancanza di altri risultati, le attività emolitica e lecitinasica riscontrate potrebbero ritenersi normali in cellule isolate da matrici alimentari. Poichè la

conta ed isolamento dei *Bacillus* dai salumi è stata effettuata previo trattamento termico, ovvero contando le spore presenti in quel momento, la quantità totale delle cellule di *Bacillus* rimane sconosciuta e quindi il rischio potenziale associato alla loro presenza potrebbe essere sottostimato. In assenza di dati epidemiologici, i risultati del presente lavoro confermano il limitato rischio associato al consumo di salumi tradizionali e industriali contenenti differenti ceppi di *Bacillus* spp.

## RIASSUNTO

Salumi di provenienza artigianale ed industriale sono stati valutati per la presenza di ceppi di *Bacillus*. Sessantaquattro isolati, previa caratterizzazione ed identificazione molecolare, sono stati valutati per il loro potenziale tossigeno. I ceppi

isolati, appartenenti alle specie *B. subtilis*, *B. pumilus* e *B. amyloliquefaciens*, sono stati saggiati per la presenza dei geni di virulenza appartenenti a *B. cereus*. Inoltre, è stata valutata la produzione delle tossine NHE ed HBL utilizzando kit commerciali. Non sono stati ritrovati geni della virulenza di *B. cereus* né sono state prodotte tossine nei ceppi isolati dai salumi analizzati. Questi risultati preliminari rassicurano sul rischio potenziale associato alla presenza di ceppi di *Bacillus* in salumi ottenuti sia mediante lavorazione industriale sia mediante lavorazione artigianale.

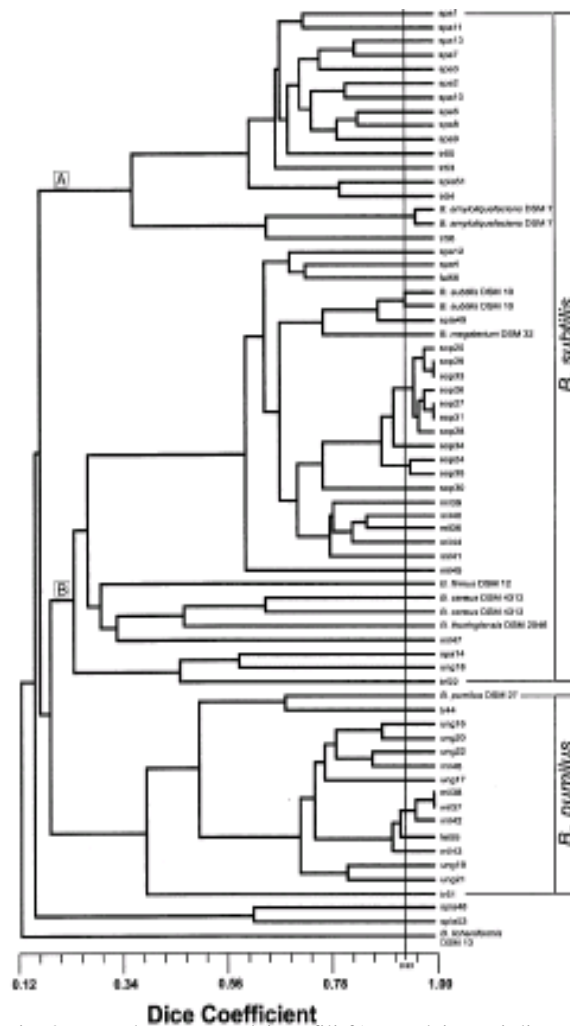


Fig. 2 – Dendrogramma dei profili fAFLP dei ceppi di *Bacillus*.

## SUMMARY

Artisanal and industrial sausages were analyzed for their *Bacillus* microflora. Sixty-four isolates, after molecular characterization and identification, were evaluated for their toxigenic potential. The isolates, belonging to *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, and *Bacillus amyloliquefaciens* species, were analyzed for the presence of *B. cereus* virulence genes. In addition, the production of NHE and HBL enterotoxins was also evaluated by using commercial kits. Neither *B. cereus* virulence genes nor enterotoxins were found in the isolated *Bacillus* strains. The absence of toxigenic potential in *Bacillus* strains from the sausages analyzed indicates that these products can be considered safe under the processing conditions they were produced.

## BIBLIOGRAFIA

1. F. Baruzzi, M. Morea, A. Matarante, and P. S. Cocconcelli. "Changes in the *Lactobacillus* community during Ricotta forte cheese natural fermentation". *J. Appl. Microbiol.* 89, 807–814 (2000).
2. Centers for Disease Control and Prevention. 2000. "Human ingestion of *Bacillus anthracis*-contaminated meat". *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 49, 813–816 (2000).
3. F.A. Drobniewski. "*Bacillus cereus* and related species". *Clin. Microbiol. Rev.* 6:324–338 (1993).
4. J.P. Encinas, J. Sanz-Gomez, M. L. García-Lo'pez, M. R. García-Armesto, and A. Otero. "Evaluation of different systems for the identification of *Bacillus* strains isolated from Spanish fermented sausages. *Meat Sci.* 42, 127–131 (1996).
5. M.W. Griffiths. "Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp. present in milk". *J. Food Prot.* 53, 790–792 (1990).
6. N. Klijn, A. H. Weerkamp, and W. M. de Vos. "Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* spp. in natural ecosystems". *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 788–792 (1995).
7. A. Matarante, F. Baruzzi, P.S. Cocconcelli and M. Morea. "Genotyping and Toxigenic Potential of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* Strains Occurring in Industrial and Artisanal Cured Sausages". *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5168–5176 (2004).
8. G.L. Nortje, S. M. Vorster, R. P. Greebe, and P. L. Steyn. "Occurrence of *Bacillus cereus* and *Yersinia enterocolitica* in South African retail meats". *Food Microbiol.* 16, 213–217 (1999).
9. S.A. Palumbo, A. I. Rivenburgh, J. L. Smith, and J. C. Kissinger. "Identification of *Bacillus subtilis* from sausage products and spices". *J. Appl. Bacteriol.* 38, 99–105 (1975).
10. P.B. Pedersen, M. E. Bjørnqvad, M. D. Rasmussen, and J. N. Petersen. "Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus* sp.". *Regul. Toxicol. Pharm.* 36, 155–161 (2002).
11. M. C. Te Giffel, R. R. Beumer, S. Leijendekkers, and F. M. Rombouts. "Incidence of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in foods in The Netherlands". *Food Microbiol.* 13, 53–58 (1996)
12. N. M. Trinchese, L. Carraciulo, E. Giffoni, and M. G. Panico. "An outbreak of food poisoning caused by *Bacillus cereus* in the province of Naples: epidemiological investigation and case-control study". *Ig. Mod.* 113: 335–346 (2000)
13. P. Vos, R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijjans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. "AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23, 4407–4414 (1995).