

Specie fungine produttrici di Ocratossina A nei salami lombardi prodotti negli anni 2011-2014

C. Merla¹, G. Andreoli¹, N. Vicari¹, C. Dalla Valle², C. Cavanna², M.L. Guglielminetti³, A. Biancardi⁴, M.Fabbi¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna 'B. Ubertini' ~ Sezione Diagnostica di Pavia

²Fondazione I.R.C.C.S. Policlinico San Matteo, Struttura complessa di Microbiologia Virologia ~ Pavia

³Università degli Studi ~ Pavia

⁴Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna 'B. Ubertini'~Laboratorio Micotossine e Tossicologia ~ Brescia

Le muffe appartenenti ai generi *Aspergillus* e *Penicillium* spesso presenti sulla superficie dei salami, regolano il pH e il grado di umidità per la corretta stagionatura del prodotto.

Sebbene la legge italiana consenta l'utilizzo di colture starter di *Penicillium chrysogenum* e di *P.nalgiovense* nella produzione degli insaccati crudi (D.M. 28/12/1994 G.U. n. 89), i produttori di salame tradizionale non ne fanno utilizzo permettendo la crescita dei funghi naturalmente presenti nell'aria degli ambienti di stagionatura.

Alcuni ceppi di *Aspergillus* (soprattutto *A.ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* e *A. niger*) e di *Penicillium* (*P. verrucosum* e *P. nordicum*) possono produrre e rilasciare nel salame ocratossina A (OTA).

Lo scopo di questo lavoro è il monitoraggio della flora fungina colonizzante i salami tradizionali prodotti in Lombardia negli anni 2011-2014 con valutazione delle tecniche per la rilevazione di ceppi ocratossinogeni.

La flora fungina di 123 salami con stagionatura variabile (1 settimana - 7 mesi) è stata ricercata secondo il metodo ISO 21527:2008 per la numerazione di lieviti e muffe.

Sono stati isolati 235 ceppi di cui 155 appartenenti al genere *Penicillium* e 15 appartenenti al genere *Aspergillus*. L'identificazione delle specie è stata condotta sfruttando le caratteristiche colturali e morfologiche come previsto dalle chiavi di identificazione di Samson (2010).

L'identificazione dei 37 ceppi più rappresentati è stata confermata sequenziando il frammento comprendente le regioni ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1) e ITS2 del rDNA e per 15 di questi, 14 *Penicillium* e 1 *Aspergillus*, è stata inoltre sequenziata una porzione del gene della β tubulina come ulteriore conferma. Le sequenze ottenute da ciascun campione sono state confrontate in banca dati NCBI mediante il programma BLAST.

Per 4 salami (2 provenienti dalla provincia di Pavia, uno da Milano e uno da Monza e Brianza) in cui sono stati isolate specie potenzialmente ocratossinogene (3 *A. westerdijkiae* e 1 *P. nordicum*) la ricerca dell'ocratossina A è stata condotta attraverso cromatografia liquida accoppiata in tandem alla spettrometria di massa.

L'identificazione a livello morfologico delle specie fungine a causa dell'esistenza di specie morfologicamente affini tra loro, ha fornito solamente un'indicazione a livello di gruppo e perciò ha reso necessaria una conferma molecolare.

L'identificazione delle specie ottenuta mediante il sequenziamento del frammento ITS ha confermato l'identificazione a livello di gruppo. Il sequenziamento della porzione del gene della β tubulina ha permesso l'identificazione fino al livello di specie per tutti i ceppi.

Per verificare l'attendibilità delle tipizzazioni e in particolare modo quelle riguardanti i ceppi potenzialmente micotossinogeni si è ricercata l'OTA nei 4 salami colonizzati. In 2 salami la quantità di OTA è risultata ben superiore alla quantità massima suggerita per legge per carni suine e prodotti derivati (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Circ. Min. San. n. 10 09/06/1999 G.U. n.135). In uno di questi si è riscontrato un livello di OTA 600 volte superiore al limite, mentre nell'altro di 7 volte. Nei rimanenti due salami la quantità di micotossina superava di poco i limiti previsti.

In un salame colonizzato da *A. westerdijkiae* e positivo ad OTA (1,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$), ricreando le condizioni ideali per la micotossinogenesi ($a_w < 0,79$ e $T=20-30$ °C) si è ottenuta una massiccia sintesi di tossina nell'arco di 10 giorni (3,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Attualmente stiamo procedendo con la messa a punto di una metodica di PCR Real Time mirata a riscontrare la presenza di funghi ocratossinogeni amplificando geni coinvolti nella biosintesi della tossina.