

Biofilm formation and blue pigment production by *Pseudomonas*: the impact on the dairy industry

Formação de biofilme e produção de pigmento azul por *Pseudomonas*: o impacto na indústria de laticínios

Article Info:

Article history: Received 2022-10-06 / Accepted 2022-11-01 / Available online 2022-11-03

doi: 10.18540/jcecv18iss8pp14898-01e

Nayara Aparecida da Silva Costa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1690-9828>

Universidade Federal de Viçosa, Brasil

E-mail: nayaraascosta@gmail.com

Rafaela da Silva Rodrigues

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5152-8313>

Universidade Federal de Viçosa, Brasil

E-mail: rafaelasilva_mts@hotmail.com

Antônio Fernandes de Carvalho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3238-936X>

Universidade Federal de Viçosa, Brasil

E-mail: antoniofernandes@ufv.br

Solimar Gonçalves Machado

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2836-6026>

Universidade Federal de Viçosa, Brasil

E-mail: solimar.machado@ufv.br

Resumo

Pseudomonas spp. são constantemente associadas à deterioração de produtos lácteos. Espécies desse gênero são amplamente conhecidas por sua adaptabilidade e versatilidade, além de conseguirem se multiplicar em temperaturas de refrigeração. *Pseudomonas* spp. são problemáticas na indústria alimentícia pois, além de produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas, são capazes de formar biofilme e produzir pigmentos. Os biofilmes são estruturas mais resistentes a sanitizantes e podem resultar na contaminação dos alimentos alterando textura, cor, sabor e outros parâmetros sensoriais. A produção de pigmentos por *Pseudomonas* tem causado problemas em queijos frescos principalmente devido à formação de manchas azuis. A deterioração por produção de pigmento azul, descrita como descoloração azul, tem ganhado destaque devido aos números de casos crescentes em todo o mundo. O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de uma revisão de literatura, os desafios encontrados pela indústria de laticínios frente à formação de biofilme e produção de pigmento azul pelo gênero *Pseudomonas*.

Palavras-chave: Psicotróficos. Deterioração. Laticínios.

Abstract

Pseudomonas spp. are constantly associated with spoilage of dairy products. Species of this genus are widely known for their adaptability and versatility, in addition to being able to multiply at cold temperatures. *Pseudomonas* spp. are an issue in the food industry because, in addition to producing proteolytic and lipolytic enzymes, they are capable of forming biofilms and producing pigments. Biofilms are structures that are more resistant to sanitizers and can result in food contamination by altering texture, color, flavor and other sensory parameters. Pigment production by *Pseudomonas* has caused problems in fresh cheeses mainly due to the formation of blue discoloration. Deterioration by blue pigment production has gained prominence due to increasing case numbers

worldwide. The objective of this work was to evaluate, through a literature review, the challenges faced by the dairy industry in the face of biofilm formation and blue pigment production by the genus *Pseudomonas*.

Keywords: Psychrotrophics. Spoilage. Dairy.

1. Introdução

O gênero *Pseudomonas* compreende diversos microrganismos em formato de bastonetes, gram-negativos, aeróbios, mesófilos e psicrotróficos, caracterizados por exigências nutricionais simples (Anzai et al., 2000; Frapolli et al., 2007). Bactérias pertencentes a esse gênero são comumente associadas a deterioração de laticínios (Machado et al., 2015; Capodifoglio et al., 2016). *P. fluorescens* é uma das espécies mais comumente isoladas de leite e produtos lácteos (Martin et al., 2011; Scatamburlo et al., 2015). Isso se deve a sua extrema adaptabilidade e versatilidade, além da capacidade de multiplicação em temperaturas de refrigeração (Decimo et al., 2014).

Ademais, superfícies, utensílios e equipamentos de processamento de alimentos fornecem um nicho favorável para a multiplicação de *Pseudomonas* spp. e formação de biofilmes, que são especialmente problemáticos, pois as células que compõem essas comunidades multicelulares associadas à superfície são mais resistentes aos desinfetantes comumente usados e podem se tornar uma importante fonte de contaminação de alimentos (Bridier et al., 2015; Meliani & Bensoltane, 2015).

Algumas cepas de *Pseudomonas* são descritas como capazes de produzir pigmentos como piocianina, pioverdina, piorrubina, pioquelina e piomelanina que podem causar deterioração devido à formação de descoloração e/ou desenvolvimento de manchas em alimentos lácteos, especialmente queijos (Andreani et al., 2014; Capodifoglio et al., 2016; del Olmo et al., 2018; Rossi et al., 2018; Zhang et al., 2020). Recentemente, esse assunto ganhou destaque na literatura devido aos casos de pigmentação azul em queijos frescos relatados em diversos países (Rasff, 2010).

Dentro desta perspectiva, esse trabalho de revisão propõe discutir os impactos causados por *Pseudomonas* spp. na indústria de laticínios com a formação de biofilme e a produção de pigmentos.

2. Biofilme

Biofilmes bacterianos são formados por bactérias que aderem à superfícies e formam comunidades espacialmente organizadas dentro de uma matriz composta por substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (Flemming & Wingender, 2010). Essas estruturas impactam a indústria alimentícia, uma vez que possibilitam a adesão de bactérias em materiais como plástico, polipropileno, aço inoxidável, vidro, borracha e em alimentos (Hall-Stoodley et al., 2004). *Pseudomonas* spp. são descritos como bons formadores de biofilmes, inclusive em associação com outras espécies microbianas (Yuan et al., 2018). Os biofilmes são identificados ainda como responsáveis por danos em equipamentos, aumento dos custos de energia, deterioração de alimentos e transmissão de doenças (Alvarez-Ordoñez et al., 2019). Mesmo com procedimentos de limpeza e sanitização, os microrganismos podem permanecer nas superfícies dos equipamentos e sobreviver por longos períodos (Cloete et al., 2009).

Os biofilmes são regulados por um complexo sistema de comunicação célula-célula, conhecido como *quorum sensing* (QS). Recentemente, moléculas sinalizadoras e reguladoras envolvidas no QS, como as homoserina lactonas, foram detectadas em produtos lácteos deteriorados sugerindo um papel importante da comunicação microbiana na deterioração de laticínios (Quintieri et al., 2021). Em várias cepas de *P. fluorescens*, importante deteriorante em lácteos, foram identificados sistemas QS baseados em moléculas sinalizadoras (Galloway et al., 2011).

Assim como outras características relacionadas ao potencial deteriorador de *Pseudomonas*, a capacidade de formação de biofilme é uma característica cepa-específica. Rossi et al. (2018) investigaram a capacidade de formação de biofilme de 72 cepas de *Pseudomonas* spp. Isoladas de leite e laticínios. A maioria dos isolados foi capaz de formar biofilme, embora com algumas diferenças relacionadas às cepas e às temperaturas de incubação. Um resultado notável foi observado em relação *P. koreensis* pf97 que persistiu no ambiente da planta de processamento durante um período de 8 meses (Endersen et al., 2014). Isso demonstra a necessidade de estudar e implementar novas estratégias para controle de biofilme.

3. Produção de pigmento

Uma preocupação atual na indústria de laticínios é um pigmento azul produzido por algumas cepas de *Pseudomonas* e descrito como uma descoloração azul (Martin et al., 2011; Nogarol et al., 2013). Essa deterioração específica geralmente ocorre em queijos frescos com alto teor de umidade, pH alto (5,3 - 6,0) e produzidos sem culturas iniciadoras, e o pigmento azul é desenvolvido mesmo durante o armazenamento em baixas temperaturas (Remenant et al., 2015; Carrascosa et al., 2015; Sechi et al., 2011).

O defeito de descoloração azul em diferentes tipos de queijos frescos está aumentando em todo o mundo durante a presente década. Em junho de 2010, as autoridades nacionais de saúde italianas notificaram o Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações (RASFF) sobre características sensoriais alteradas (cor azul) e números elevados ($5,1 \times 10^6$ UFC/g) de *Pseudomonas fluorescens* em queijo Mozzarella importado da Alemanha (Rasff, 2010).

O primeiro caso de descoloração azul no Brasil foi constatado por Rodrigues et al. (2021). Os pesquisadores investigaram a deterioração anômala em queijos Minas Frescal. Os 31 isolados obtidos foram identificados como pertencentes a *Pseudomonas* spp. Esses isolados foram ainda capazes de produzir o pigmento azul difusível *in vitro* nas temperaturas de 5, 14 e 25 °C.

Andreani et al. (2015) realizaram um estudo induzindo a descoloração azul em queijo Mozzarella a fim de extrair o pigmento de duas cepas de *P. fluorescens*. No entanto, a sua estrutura molecular não pôde ser totalmente elucidada, mas acredita-se que seja um derivado do indol.

Após o alerta da RASFF (2010), cerca de 70 mil unidades de Mozzarella foram retiradas do mercado (Cenci-Goga et al., 2014), representando o grande impacto econômico causado pela descoloração azul no setor de laticínios.

4. Conclusão

Pseudomonas spp. constituem um problema na indústria laticinista devido à capacidade de formação de biofilme e deterioração por descoloração azul. Considerando a ineficiência dos métodos utilizados no controle de biofilme, urge a necessidade de novos estudos para o desenvolvimento de novas metodologias. Em relação à produção de pigmento azul, os estudos devem ser feitos a fim de elucidar as condições que afetam o surgimento do defeito visual, além de suas características.

Referências

- Alvarez-Ordóñez, A., Coughlan, L. M., Briandet, R., & Cotter, P. D. (2019). Biofilms in Food Processing Environments: Challenges and Opportunities. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10, 173–195. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121805>
- Andreani, N. A., Carraro, L., Martino, M. E., Fondi, M., Fasolato, L., Miotto, G., Magro, M., Vianello, F., & Cardazzo, B. (2015). A genomic and transcriptomic approach to investigate the blue pigment phenotype in *Pseudomonas fluorescens*. *International Journal of Food Microbiology*, 213, 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.024>
- Andreani, N. A., Martino, M. E., Fasolato, L., Carraro, L., Montemurro, F., Mioni, R., Bordin, P., & Cardazzo, B. (2014). Tracking the blue: a MLST approach to characterise the *Pseudomonas fluorescens* group. *Food Microbiology*, 39, 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.11.012>
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J. Y., Wakabayashi, H., & Oyaizu, H. (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 Pt 4, 1563–1589. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-4-1563>
- Bridier, A., Sanchez-Vizueté, P., Guilbaud, M., Piard, J. C., Naïtali, M., & Briandet, R. (2015). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiology*, 45(Pt B), 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.015>
- Capodifoglio, E., Vidal, A., Lima, J., Bortoletto, F., D'Abreu, L. F., Gonçalves, A., Vaz, A., Balieiro, J., & Netto, A. S. (2016). Lipolytic and proteolytic activity of *Pseudomonas* spp. isolated during milking and storage of refrigerated raw milk. *Journal of Dairy Science*, 99(7), 5214–5223. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10453>
- Carrascosa, C., Millán, R., Jaber, J. R., Lupiola, P., Rosario-Quintana, C. d., Mauricio, C., & Sanjuán, E. (2015). Blue pigment in fresh cheese produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Food Control*, 54, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.039>
- Cenci-Goga, B., Karama, M., Sechi, P., Iulietto, M., Novelli, S., & Mattei, S. (2014). Evolution under different storage conditions of anomalous blue coloration of mozzarella cheese intentionally contaminated with a pigment-producing strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Dairy Science*, 97, 6708–6718. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8611>
- Cloete, T. E., Thantsha, M. S., Maluleke, M. R., & Kirkpatrick, R. (2009). The antimicrobial mechanism of electrochemically activated water against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* as determined by SDS-PAGE analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 107(2), 379–384. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04233.x>
- Decimo, M., Morandi, S., Silvetti, T., & Brasca, M. (2014). Characterization of Gram-negative psychrotrophic bacteria isolated from Italian bulk tank milk. *Journal of Food Science*, 79(10), M2081–M2090. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12645>
- del Olmo, A., Calzada, J., & Nuñez, M. (2018). The blue discoloration of fresh cheeses: A worldwide defect associated to specific contamination by *Pseudomonas fluorescens*. *Food Control*, 86, 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.12.001>
- Endersen, L., O'Mahony, J., Hill, C., Ross, R. P., McAuliffe, O., & Coffey, A. (2014). Phage therapy in the food industry. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5, 327–349. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092415>
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Frapolli, M., Défago, G., & Moënne-Loccoz, Y. (2007). Multilocus sequence analysis of biocontrol fluorescent *Pseudomonas* spp. producing the antifungal compound 2,4-diacetylphloroglucinol. *Environmental Microbiology*, 9(8), 1939–1955. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01310.x>

- Galloway, W. R., Hodgkinson, J. T., Bowden, S. D., Welch, M., & Spring, D. R. (2011). *Quorum sensing* in Gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 *quorum sensing* pathways. *Chemical Reviews*, 111(1), 28–67. <https://doi.org/10.1021/cr100109t>
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews. Microbiology*, 2(2), 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Machado, S. G., da Silva, F. L., Bazzolli, D. M., Heyndrickx, M., Costa, P. M., & Vanetti, M. C. (2015). *Pseudomonas* spp. and *Serratia liquefaciens* as Predominant Spoilers in Cold Raw Milk. *Journal of Food Science*, 80(8), M1842–M1849. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12957>
- Martin, N. H., Murphy, S. C., Ralyea, R. D., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2011). When cheese gets the blues: *Pseudomonas fluorescens* as the causative agent of cheese spoilage. *Journal of Dairy Science*, 94(6), 3176–3183. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4312>
- Meliani, A., & Bensoltane, A. (2015). Review of *Pseudomonas* Attachment and Biofilm Formation in Food Industry. *Poultry, Fisheries & Wildlife Sciences*, 3(1), 1-7. <https://doi.org/10.4172/2375-446X.1000126>
- Nogarol, C., Acutis, P. L., Bianchi, D. M., Maurella, C., Peletto, S., Gallina, S., Adriano, D., Zuccon, F., Borrello, S., Caramelli, M., & Decastelli, L. (2013). Molecular characterization of *Pseudomonas fluorescens* isolates involved in the Italian "blue mozzarella" event. *Journal of Food Protection*, 76(3), 500–504. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-312>
- Quintieri, L., Caputo, L., Brasca, M., & Fanelli, F. (2021). Recent Advances in the Mechanisms and Regulation of QS in Dairy Spoilage by *Pseudomonas* spp. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(12), 3088. <https://doi.org/10.3390/foods10123088>
- RASFF, Notification details - 2010.0807 altered organoleptic characteristics (blue) of and *Pseudomonas fluorescens* (5100000 CFU/g) in mozzarella cheese from Germany (2010) <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchResultList>, Accessed 24th Oct 2022
- Remenant, B., Jaffrès, E., Dousset, X., Pilet, M. F., & Zagorec, M. (2015). Bacterial spoilers of food: behavior, fitness and functional properties. *Food Microbiology*, 45(Pt A), 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.009>
- Rodrigues, R. S., Machado, S. G., Carvalho, A. F., & Nero, L. A. (2021). *Pseudomonas* sp, as the causative agent of anomalous blue discoloration in Brazilian fresh soft cheese. *International Dairy Journal*, 117. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105020>
- Rossi, C., Serio, A., Chaves-López, C., Anniballi, F., Auricchio, B., Goffredo, E., Cenci-Goga, B. T., Lista, F., Fillo, S., & Paparella, A. (2018). Biofilm formation, pigment production and motility in *Pseudomonas* spp. isolated from the dairy industry. *Food Control*, 86, 241-248. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.018>
- Scatamburlo, T. M., Yamazi, A. K., Cavicchioli, V. Q., Pieri, F. A., & Nero, L. A. (2015). Spoilage potential of *Pseudomonas* species isolated from goat milk. *Journal of Dairy Science*, 98(2), 759–764. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8747>
- Sechi, P., Vizzani, A., Scuota, S., Zicavo, A., Parmegiani, S., & Cenci-Goga, B. (2011). Anomalous blue colouring of mozzarella cheese intentionally contaminated with pigment producing strains of *Pseudomonas fluorescens*. *Italian Journal of Food Safety*, 1, 81-84. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2011.757>
- Yuan, L., Burmølle, M., Sadiq, F. A., Wang, N., & He, G. (2018). Interspecies variation in biofilm-forming capacity of psychrotrophic bacterial isolates from Chinese raw milk. *Food Control*, 91, 47-57. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.03.026>
- Zhang, C., Bijl, E., Muis, K. E., & Hettinga, K. (2020). Stability of fat globules in UHT milk during proteolysis by the AprX protease from *Pseudomonas fluorescens* and by plasmin. *Journal of Dairy Science*, 103(1), 179–190. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17150>
- Zupančič, J., Raghupathi, P. K., Houf, K., Burmølle, M., Sørensen, S. J., & Gunde-Cimerman, N. (2018). Synergistic Interactions in Microbial Biofilms Facilitate the Establishment of

Opportunistic Pathogenic Fungi in Household Dishwashers. *Frontiers in Microbiology*, 9, 21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00021>