



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE BIOMEDICHE**

*Indirizzo in Scienze Biomediche dell'Età Evolutiva*

CICLO XXVI

COORDINATORE Prof. Persio Dello Sbarba

***Batteriocine ad attività listericida prodotte da  
Enterococcus spp.***

Settore Scientifico Disciplinare MED/42

**Dottorando**

Dott. Calonico Carmela

**Tutore**

Dott. Lo Nostro Antonella

**Coordinatore**

Prof. Dello Sbarba Persio

Anni 2011/2013

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Batteriocine</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Batteriocine dei batteri Gram-negativi</b>	<b>5</b>
1.2.1 Le Colicine	6
<b>1.3 Batteriocine dei batteri Gram-positivi</b>	<b>10</b>
1.3.1 Classificazione delle batteriocine dei batteri Gram-positivi	12
1.3.2 I Lantibiotici	13
1.3.3 Batteriocine di classe II	17
1.3.4 Batteriocine di classe III	22
1.3.5 Batteriocine di classe IV	23
<b>1.4 Regolazione della produzione di batteriocine</b>	<b>23</b>
1.4.1 <i>Quorum sensing</i> della nisina	25
<b>1.5 Applicazioni delle batteriocine in campo clinico e alimentare</b>	<b>26</b>
<b>1.6 Resistenza nei confronti delle batteriocine</b>	<b>30</b>
<b>1.7 Dinamiche di comunità contenenti batteriocine</b>	<b>31</b>
1.7.1 Dinamiche di comunità formate da due ceppi	31
1.7.2 Dinamiche di comunità formate da tre ceppi	33
<b>1.8 <i>Enterococcus</i> spp.</b>	<b>34</b>
1.8.1 Ecologia di <i>Enterococcus</i> spp.	38
1.8.2 Enterococchi negli alimenti	38
1.8.3 Enterococchi come probiotici	43
1.8.4 Patogenicità	45
1.8.5 Antibiotico-resistenza	46
1.8.6 Meccanismi di trasferimento genico	49
1.8.7 Fattori di virulenza	51
<b>1.9 <i>Listeria monocytogenes</i></b>	<b>53</b>
1.9.1 Caratteristiche microbiologiche	53
1.9.2 Ecologia	54
1.9.3 <i>Listeria</i> e alimenti	55
1.9.4 Fattori di virulenza e patogenesi	56
1.9.5 Listeriosi	59
1.9.6 Epidemiologia delle <i>foodborne disease</i>	60
1.9.7 Epidemiologia della listeriosi	61
1.9.8 Trattamento e prevenzione di <i>Listeria monocytogenes</i>	64

<b>2. SCOPO DELLA RICERCA</b>	<b>66</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>68</b>
<b>3.1 Ceppi microbici utilizzati</b>	<b>68</b>
<b>3.2 Isolamento e identificazione dei ceppi provenienti da matrici alimentari</b>	<b>68</b>
3.2.1 Isolamento e identificazione di <i>Enterococcus</i> spp.	68
3.2.2 Isolamento e identificazione di <i>Listeria monocytogenes</i>	70
<b>3.3 <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC</b>	<b>71</b>
<b>3.4 Agar Spot Test</b>	<b>72</b>
<b>3.5 Agar Well Diffusion</b>	<b>73</b>
3.5.1 Preparazione dei surnatanti	73
3.5.2 Agar well diffusion	73
<b>3.6 Test supplementari</b>	<b>74</b>
3.6.1 Valutazione dell'attività antimicrobica a differenti temperature	74
3.6.2 Valutazione dell'attività antimicrobica a differenti valori di pH	74
3.6.3 Valutazione dello spettro di attività	75
<b>3.7 Antibiotico-resistenza</b>	<b>75</b>
<b>3.8 Influenza del mezzo di crescita sulla produzione delle batteriocine</b>	<b>77</b>
<b>4. RISULTATI</b>	<b>78</b>
<b>4.1 Analisi microbiologiche</b>	<b>78</b>
<b>4.2 Agar Spot Test e Agar Well Diffusion</b>	<b>83</b>
<b>4.3 Attività antimicrobica a differenti temperature</b>	<b>87</b>
<b>4.4 Attività antimicrobica a differenti valori di pH</b>	<b>90</b>
<b>4.5 Spettro di attività</b>	<b>92</b>
<b>4.6 Antibiotico-resistenza</b>	<b>95</b>
<b>4.7 Influenza del mezzo di crescita sulla produzione di batteriocine</b>	<b>97</b>
<b>5. CONCLUSIONI</b>	<b>103</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>109</b>

# 1. Introduzione

La presenza di interazioni antagonistiche tra batteri è nota sin dal XIX secolo, quando Louis Pasteur e Robert Koch svilupparono il concetto di contagio animato, ponendo le basi della microbiologia. La successiva scoperta della penicillina ad opera di Alexander Fleming, nel 1928, aprì le porte all'uso degli antibiotici in campo medico e veterinario, con lo scopo di esercitare un'azione letale nei confronti di microrganismi patogeni.

In campo alimentare, le patologie che si possono verificare a seguito dell'ingestione di alimenti contaminati da microrganismi, o da loro tossine, rappresentano un grande problema di Sanità Pubblica, non solo per i costi elevati legati all'ospedalizzazione e alla perdita di produttività, ma anche per le gravi complicanze che possono manifestarsi. Per questo motivo una moderna sfida, che viene costantemente perseguita per il raggiungimento della sicurezza alimentare, è l'individuazione di additivi ad azione antagonistica, che abbiano sia proprietà conservative che antimicrobiche.

L'impiego di additivi in tecniche come la salatura di carne e pesce, la solfitazione di mosti e vini o l'aggiunta di aceto nelle conserve vegetali, risale già all'epoca pre-industriale. Con lo sviluppo dell'industria chimica, ed in particolare con l'applicazione della chimica alla filiera alimentare, ma anche con il mutare delle abitudini alimentari che hanno enormemente influenzato il ciclo produttivo e distributivo degli alimenti, l'uso degli *additivi alimentari* si è esteso notevolmente. Queste sostanze sono definite dalla Direttiva del Consiglio 89/107/CEE come «qualsiasi sostanza normalmente non consumata come alimento in quanto tale e non utilizzata come ingrediente tipico degli alimenti, indipendentemente dal fatto di avere o meno un valore nutritivo, che aggiunta intenzionalmente ai prodotti alimentari per un fine tecnologico nelle fasi di produzione, trasformazione, preparazione, trattamento, imballaggio, trasporto o immagazzinamento degli alimenti, si possa ragionevolmente presumere che diventi, essa stessa o i suoi derivati, un componente di tali alimenti, direttamente o indirettamente». Prima di essere autorizzati per l'uso alimentare, gli additivi alimentari subiscono un processo di valutazione della sicurezza a livello europeo dall'Agenzia per la Sicurezza Alimentare (EFSA) e a livello internazionale dal Comitato congiunto di esperti sugli additivi alimentari (JECFA-Joint Expert Committee on Food Additives) dell'Organizzazione per l'Alimentazione e per l'Agricoltura (FAO) e dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS). Malgrado ciò, gli additivi di sintesi possono causare, a determinate

concentrazioni e condizioni, reazioni di tipo allergico o intolleranze e essere nocivi per l'uomo: ricerche in campo oncologico e studi approfonditi sulle conseguenze dell'assunzione cronica di alcuni additivi hanno infatti dimostrato che alcuni di essi possono essere ritenuti la causa diretta di stati patologici e malattie oncologiche. Basti pensare a nitriti e nitrati, che vengono convertiti dall'organismo che li consuma in nitrosammine, spesso implicate in processi di cancerogenesi, o al difenile, impiegato nel trattamento della buccia per la conservazione di alcuni frutti freschi, che può diffondere nella polpa risultando tossico a concentrazioni elevate.

A questo scenario si aggiunge la consapevolezza che, nonostante l'introduzione di moderne tecnologie e l'obbligo da parte delle aziende di attuare lungo tutta la filiera produttiva misure preventive di autocontrollo, basate sul sistema Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP), l'incidenza delle malattie trasmesse dagli alimenti mostra un trend in continuo aumento. Recenti epidemie di patogeni emergenti, come *Listeria monocytogenes*, hanno portato l'industria alimentare a porsi delle domande sull'efficacia dei correnti metodi di conservazione degli alimenti. Inoltre, l'aumentata richiesta da parte del consumatore di alimenti ad alta qualità, privi di conservanti chimici e con elevata shelf-life (tempo di conservazione), ma anche la restrizione dell'uso di alcuni conservanti chimici da parte delle autorità legislative, ha generato un rinnovato interesse verso agenti antimicrobici di nuova generazione, idonei ad essere utilizzati nella conservazione degli alimenti, non alterandone le caratteristiche. Si ipotizza che questi agenti potrebbero essere usati in combinazione a trattamenti fisici, procedure di imballaggio e di congelamento, in modo da attuare un sinergismo tale da creare un ambiente ostile per la sopravvivenza microbica.

Nella ricerca di nuove tecnologie utilizzabili per la conservazione degli alimenti, assumono un posto di grande rilievo i bioconservanti, sostanze prodotte dai microrganismi con effetto batteriostatico, tra le quali meritano particolare attenzione le batteriocine. Un esempio di bioconservante alimentare utilizzato in oltre 60 paesi e considerato sicuro dall'OMS è la Nisina A, la quale ha mostrato effetti inibitori sulla crescita di *Listeria monocytogenes*, trovando ampio utilizzo nei prodotti di origine lattiero-casearia, nelle carni, nei vegetali, nei prodotti di panetteria e pescheria.

Sebbene il ruolo antimicrobico delle batteriocine sia stato ampiamente riconosciuto, e sebbene negli ultimi 15 anni ci sia stato un incremento di attenzione e studio verso queste molecole a spiccata attività antimicrobica, esse sono attualmente poco utilizzate in campo tecnologico/alimentare e clinico a causa di una insufficiente conoscenza delle

loro caratteristiche peculiari, ma anche degli alti costi dovuti alle difficoltà di produzione e purificazione.

## 1.1 Batteriocine

I batteri, per loro stessa natura, sono in grado di attivare una straordinaria varietà di meccanismi di difesa. Tra questi sistemi rientrano i classici antibiotici, diversi prodotti secondari del metabolismo (come l'acido lattico prodotto dai lattobacilli), gli agenti litici, le esotossine e le batteriocine. Questo "arsenale biologico" è impressionante non solo per la sua diversità, ma anche per la sua naturale abbondanza.

Il termine batteriocina fu utilizzato per la prima volta negli anni '50 da Francois Jacob (Jacob et al., 1953) per indicare composti proteici di origine batterica, prodotti indifferentemente da batteri Gram-positivi e Gram-negativi, dotati di attività inibitoria nei confronti di ceppi batterici differenti dal ceppo produttore, ma ad esso strettamente correlati.

Caratteristica comune di questa eterogenea famiglia di sostanze è di essere proteine, generalmente non ad ampio spettro battericida, estremamente stabili e resistenti. La prima batteriocina fu descritta nel 1925 da Gratia, che osservò la capacità di *E. coli* di inibire la crescita di altri microrganismi tassonomicamente simili (Gratia, 1925). Di fatto, quindi, le batteriocine furono scoperte prima della penicillina, ma inizialmente furono poco studiate a causa della straordinaria attività antimicrobica mostrata dagli antibiotici, che spinse la comunità scientifica a focalizzare l'attenzione su tali molecole e a sottostimare il problema dell'insorgenza delle resistenze a tali sostanze, oggi di primaria importanza per la comunità scientifica.

Sebbene in letteratura siano state spesso confuse con i classici antibiotici, le batteriocine mostrano specifiche caratteristiche (Drider and Rebuffat, 2011):

- sono sintetizzate a livello ribosomiale, mentre gli antibiotici sono sintetizzati da sistemi multi-enzimatici la cui biosintesi non è bloccata da inibitori della sintesi proteica, al contrario delle batteriocine;
- hanno uno spettro d'azione limitato e generalmente hanno attività battericida solo nei confronti di quei batteri strettamente correlati al ceppo che le produce, mentre gli antibiotici hanno uno spettro d'azione più ampio;
- hanno la capacità di uccidere i batteri a concentrazioni nanomolari, mentre gli antibiotici sono efficaci a concentrazioni maggiori.

<b>Caratteristiche</b>	<b>Batteriocine</b>	<b>Antibiotici</b>
<i>Applicazione</i>	Alimentare	Clinica
<i>Sintesi</i>	Ribosomiale	Metabolismo secondario
<i>Attività</i>	Spettro limitato	Ampio spettro
<i>Presenza di cellule immuni nell'ospite</i>	Presenti	Assenti
<i>Modalità d'azione</i>	Generalmente formazione di canali nella membrana	Bersaglio specifico
<i>Tossicità nelle cellule eucariotiche</i>	Assente	Presente

Tab. 1.1. Caratteristiche delle batteriocine e degli antibiotici convenzionali (Cleveland et al., 2001)

Negli ultimi anni, l'aumentata incidenza di resistenza mostrata dai batteri nei confronti della maggior parte degli antibiotici tradizionali, ha reso necessario comprendere il potenziale ruolo che le batteriocine potrebbero avere come validi sostituti. Si pensa, infatti, che le batteriocine siano una prima linea di difesa ideale nei confronti dei patogeni, in quanto vengono prodotte 100 volte più velocemente degli antibiotici e diffondono molto più rapidamente delle grandi molecole (Boman 1995, 1996).

Il concetto di operare una specifica modulazione della microflora orale tramite l'introduzione di produttori di batteriocine, per esempio, ha trovato applicazione nel controllo di una varietà di malattie e infezioni del cavo orale, come faringiti da streptococco, carie dentali, alitosi (Tagg e Dierksen, 2003). Altre ricerche hanno focalizzato l'attenzione sull'uso delle batteriocine come conservanti alimentari (Gillor et al., 2004; Cotter et al., 2005), in particolare per quelle prodotte da batteri lattici (LAB) a causa del loro utilizzo nelle fermentazioni alimentari, ma anche perché considerati Generally Recognized As Safe (GRAS) dalla Food and Drug Administration (FDA). Da segnalare anche il sempre più crescente interesse nell'uso dei batteri come agenti attivi nelle formulazioni dei probiotici (Raffi and Ossiprandi, 2006).

Prima di poter sfruttare le vaste potenzialità di queste sostanze, sono necessarie ulteriori ricerche per comprenderne a fondo la natura, i vantaggi che potrebbe dare la produzione multipla, ma anche alcuni aspetti legati alla frequenza e alla diversità di produzione, che variano enormemente tra le popolazioni batteriche. Le batteriocine sono state definite l'arma microbica d'elezione grazie alla loro abbondanza e diversità. Si ritiene, infatti, che tutti i membri dei batteri e degli *Archaea*, quando isolati dai loro naturali habitat, siano dotati della capacità di produrre almeno una batteriocina e che la ragione per cui non sempre è possibile identificarle a partire da un determinato isolato batterico è da ricondursi alla presenza di condizioni non appropriate (Klaenhammer, 1993). Dato che molte batteriocine sono complesse a livello strutturale, e di conseguenza la loro

produzione comporta alla cellula produttrice costi considerevoli, si ritiene che abbiano un ruolo indispensabile per la sopravvivenza del ceppo produttore nell'habitat naturale, ma non in laboratorio, dove i batteri vengono cresciuti in monocultura, senza competitori e in presenza di adeguati nutrienti. Quindi deve esistere un compromesso tra i costi metabolici legati alla produzione di batteriocine e i benefici in termini di sopravvivenza ottenuti dall'espressione delle batteriocine e/o il mantenimento della capacità genetica di produrre batteriocine quando il bisogno lo richiede (Riley, 2007).

## 1.2 Batteriocine dei batteri Gram-negativi

I batteri Gram-negativi producono una ampia varietà di batteriocine, che generalmente vengono denominate a partire dal genere o dalla specie del batterio che le produce (per es. klebicina di *Klebsiella pneumoniae*).

Il ricercatore André Gratia nel 1925 osservò la capacità di un ceppo di *Escherichia coli*, virulento in infezioni sperimentali, di produrre una sostanza stabile alle oscillazioni di temperatura e di possedere attività inibitoria nei confronti di altri ceppi di *E. coli*. Dal momento che la sostanza era in grado di uccidere *E. coli*, venne denominata "colicina" (Gratia, 1925). Successivamente, Fredericq dimostrò che le colicine erano proteine e che avevano un limitato spettro d'azione a causa della presenza o assenza di specifici recettori sulla membrana delle cellule sensibili (Fredericq and Levin, 1947). A partire da quel momento, Gratia e Fredericq generarono un vasto scenario di letteratura in materia, fornendo le prime dettagliate informazioni sulle diverse famiglie di colicine. Anche grazie a questo impulso, le colicine sono diventate un modello per molti studi di biochimica, genetica, ecologia e evoluzione delle batteriocine, fornendo informazioni sia in merito alle loro origini e alle loro funzioni, sia sulle batteriocine prodotte da membri delle *Enterobacteriaceae* e delle *Pseudomonadaceae* (Riley, 2007).

I geni che codificano per le batteriocine prodotte dai batteri Gram-negativi sono generalmente localizzati a livello plasmidico. Una volta prodotte, le batteriocine aderiscono alle cellule bersaglio grazie alla presenza di specifici recettori presenti a livello della membrana delle cellule sensibili, agiscono mediante formazione di canali ionici nella membrana citoplasmatica e, una volta penetrate nella cellula sensibile, mostrano una spiccata attività nucleasica.

Le batteriocine prodotte dai batteri Gram-negativi sono raggruppate in tre classi, a seconda delle loro dimensioni:



1. Large colicin-like (25-80 kDa)
2. Microcine (<10 kDa)
3. Phage tail-like (>80 kDa)

Il primo gruppo comprende proteine ad alto peso molecolare, la cui espressione viene indotta dal sistema SOS di riparazione del DNA (Braun et al., 1994), come le colicine e molte batteriocine prodotte dalle *Enterobacteriaceae*, che infatti sono simili alle colicine per struttura, funzione e caratteristiche molecolari, evolutive e ecologiche.

Il secondo gruppo comprende peptidi a basso peso molecolare, non indotti dal sistema SOS, simili alle batteriocine prodotte dai batteri Gram-positivi (Baquero et al., 1978; Moreno et al., 2002).

Il terzo gruppo comprende proteine multimeriche, resistenti a proteasi e nucleasi, con struttura simile alle code dei batteriofagi. Uccidono le cellule sensibili tramite depolarizzazione della membrana cellulare e si pensa possano essere fagi incompleti o aver avuto origine da fagi che poi si sono evoluti in batteriocine. Ad avvalorare questa tesi il fatto che la piocina R2 (una batteriocina prodotta da *Pseudomonas* spp.) presenta una struttura simile a un residuo del fago P2, mentre la piocina F2 è simile al fago lambda (Nakayama et al., 2000). Le piocine sono state ampiamente studiate e ne sono state descritte tre tipologie: F, R e S. I tipi R e F sono prodotti da più del 90% e il tipo S da più del 70% dei ceppi di *P. aeruginosa* esaminati (Michel-Briand and Baysse, 2002). Le piocine del tipo F e R appartengono al terzo gruppo di batteriocine e sono resistenti a proteasi e nucleasi. Il tipo S invece è sensibile alle proteasi e appartiene al gruppo delle batteriocine colicino-simili. I geni per la piocina sono cromosomici e sono ubiquitari in *Pseudomonas* spp.

### **1.2.1 Le Colicine**

La colicina è la batteriocina più studiata fra quelle dei batteri Gram-negativi. Ha un peso molecolare di circa 20 kDa e ad oggi sono state identificate più di 30 batteriocine prodotte da *E. coli*.

#### **Organizzazione genica delle colicine**

Le colicine sono codificate in un operone, situato sul plasmide batterico, formato da tre geni strettamente legati tra loro: un gene che codifica la colicina, un gene immunitario e un gene di lisi (figura 1.1).

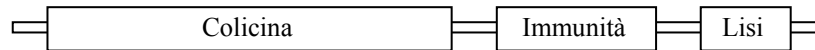


Fig. 1.1. Struttura dell'operone delle colicine.

Il gene *colicina* codifica la batteriocina, che funziona da killer nei confronti della cellula bersaglio. Il gene *immunità* codifica la sintesi della proteina che conferisce alla cellula produttrice una immunità specifica nei confronti della colicina stessa (Fredericq, 1957), legandosi nella zona adiacente al sito attivo della colicina e inibendo la sua attività tramite ingombro sterico e repulsione elettrostatica. Il gene *lisi* codifica una proteina litica che permette il rilascio della colicina all'esterno, mediante la lisi della cellula produttrice. Il gene *lisi* può essere assente, in particolar modo quando più di un operone *colicina* coesiste nella stessa cellula. Alcuni studi hanno evidenziato l'esistenza di operoni con geni addizionali per l'immunità, come l'operone della *colicina E3*, che contiene anche un gene immunitario nei confronti della *colicina E8* (Toba et al., 1988).

I geni per la colicina e la proteina litica condividono lo stesso promotore, mentre il gene per l'immunità è indotto da un promotore costitutivo che mantiene sempre un certo livello basale di proteine immunitarie.

La produzione della colicina è regolata dal sistema SOS, e quindi è principalmente prodotta in condizioni di stress: quando la risposta SOS viene innescata, i geni per la colicina sono rapidamente indotti a esprimere alti livelli di proteina, che risulta essere letale per la cellula produttrice e per le cellule nelle strette vicinanze da essa riconosciute.

Sebbene le colicine siano rappresentative delle batteriocine prodotte dai batteri Gram-negativi, sono state trovate varie differenze entro questo sottogruppo di batteriocine. Per esempio, *E.coli* codifica la sua colicina esclusivamente tramite geni su plasmidi, mentre i geni che codificano per la piocina prodotta da *Pseudomonas aeruginosa*, che mostra similarità di sequenza con la colicina, si trovano esclusivamente sul cromosoma. In altri casi i geni sono situati sia su plasmidi che su cromosomi.

### **Organizzazione proteica delle colicine**

A livello strutturale, la colicina e molte batteriocine colicino-simili sono organizzate in tre domini. Il dominio N-terminale e quello centrale determinano la specificità dell'azione battericida: l'interazione della colicina con la cellula bersaglio comincia con il legame del dominio centrale con uno specifico recettore sulla membrana cellulare, la colicina è poi portata all'interno della cellula tramite il dominio N-terminale fino a

raggiungere la membrana interna (nel caso di batteriocina che agisce formando pori) o il citoplasma (nel caso di batteriocina con attività nucleasica nei confronti di DNA, rRNA, e tRNA). Infine, il dominio C-terminale è responsabile dell'attività della colicina, che uccide le cellule tramite i meccanismi precedentemente descritti (Ohno-Iwashita e Imahori, 1982).

Le colicine che formano pori variano in dimensione da 449 a 629 aminoacidi, mentre le colicine con attività nucleasica hanno un più ampio range di dimensioni, da 178 a 777 aminoacidi.

### **Produzione delle colicine**

Le colicine sono state oggetto di diversi studi di ecologia microbica, dai quali è risultato che un terzo dei ceppi di *E. coli* produce batteriocine (Riley and Gordon, 1996). In realtà, la prevalenza di ceppi colicinogenici può variare dal 10 al 70% tra differenti popolazioni di *E. coli* a causa delle interazioni dinamiche che si stabiliscono tra batteri che producono la colicina, batteri resistenti e batteri sensibili (Gordon et al., 1998; Riley and Gordon, 1999). Infatti, sia considerazioni teoriche che osservazioni sperimentali hanno mostrato che l'ambiente in cui vivono le cellule può influenzare la frequenza dei ceppi colicinogenici. Per esempio, la frequenza di *E. coli* produttori di colicina è più bassa nei ceppi isolati dall'ambiente rispetto ai ceppi isolati dai campioni fecali in Australia. La frequenza dipende anche dal tipo di ospite da cui le cellule sono isolate: nei carnivori la frequenza di ceppi produttori è del 20%, mentre negli erbivori e onnivori è circa il doppio (Hume, 1999) indicando che probabilmente i ceppi che producono colicine sono svantaggiati in ospiti con rapido turnover del tratto gastro-intestinale.

Altri dati, ottenuti da studi sulla frequenza di differenti colicine provenienti da isolati diversi (umano, animale, ambientale), hanno dimostrato che in una determinata popolazione di *E. coli* è generalmente dominante un solo tipo di colicina (Riley and Gordon, 1996). In una popolazione microbica naturale di *E. coli* vi sono numerose cellule resistenti ad una o più colicine, con una media del 70% resistente ad alcune colicine e del 30% resistente a tutte le colicine prodotte all'interno della popolazione (Gordon e Riley, 1999). Quando la frequenza dei batteri resistenti alla colicina dominante aumenta, diminuisce la frequenza dei batteri che producono la colicina dominante, dando la possibilità a un nuovo ceppo produttore, al quale le cellule che erano resistenti alla prima colicina dominante sono suscettibili, di invadere la

popolazione. Questo porterebbe a una continua variazione della frequenza relativa di colicine diverse in una popolazione di *E. coli*.

La maggior parte degli studi effettuati fino ad oggi si sono interessati di popolazioni batteriche in cui viene prodotto un solo tipo di batteriocina. Alcuni studi teorici (Czaran et al., 2002) hanno analizzato la dinamica di una comunità cellulare, in cui vengono prodotte più batteriocine, composta da cellule con differenti sensibilità e resistenze alle batteriocine prodotte. Simulazioni numeriche del modello hanno individuato l'esistenza di due stadi di quasi-equilibrio, che sono stati chiamati "frozen" e "hyper-immunity". Nello stato "frozen", la maggior parte delle cellule produce una singola batteriocina alla quale è immune. Nello stato "hyper-immunity", la maggior parte delle cellule non produce batteriocina, molte producono una singola batteriocina, alcune più batteriocine. In quest'ultimo stadio, praticamente tutte le cellule sono resistenti alla maggior parte delle batteriocine presenti nella popolazione. L'instaurarsi dell'uno o dell'altro stadio dipende da vari fattori, come le condizioni iniziali, il tasso di ricombinazione e i costi metabolici associati alla produzione delle batteriocine.

L'espressione delle colicine porta alla lisi della cellula produttrice. È evidente che questo meccanismo suicida è costoso per la cellula, e di conseguenza più ricercatori si sono posti delle domande sulla effettiva necessità delle cellule batteriche di mantenere i geni che codificano per le batteriocine. Una ipotesi è che le colicine siano usate dai plasmidi per il loro stesso mantenimento, come fossero dei parassiti nella cellula batterica. Quelle cellule che non presentano il plasmide perdono anche il gene per l'immunità, e di conseguenza sono uccise dalle colicine prodotte dagli altri batteri della stessa specie. Inoltre, le colicine sono implicate come meccanismo di difesa nella competizione per le risorse e lo spazio nell'ambiente. In alcuni casi l'induzione delle colicine e la co-induzione del gene di lisi avviene solo in cellule danneggiate, e quindi può essere assimilato al meccanismo dell'apoptosi nelle cellule eucariotiche, infatti dati sperimentali hanno evidenziato che l'espressione delle colicine è indotta solo in una piccola frazione della popolazione (Mulec et al., 2003). Queste cellule muoiono, ma producono abbastanza colicina da uccidere cellule competitive che vivono nello stesso habitat, mostrando un comportamento altruistico per il beneficio dei batteri appartenenti alla loro stessa specie.

### **1.3 Batteriocine dei batteri Gram-positivi**

Lo studio delle batteriocine prodotte dai batteri Gram-positivi ha avuto un inizio incerto, anche a causa dei vari tentativi di applicare regole di classificazione simili a quelle utilizzate per i batteri Gram-negativi.

Il 1947 segna un momento importante: Mattick e Hirsch caratterizzano una molecola proteica responsabile dell'attività inibitoria dei lactococchi, a quei tempi classificati come *Streptococcus* appartenenti al sierogruppo N, nei confronti di altri batteri lattici (Mattick e Hirsch, 1947). Si tratta della nisina, il cui primo prodotto commerciale viene creato nel 1953 e riconosciuto nel 1969 come conservante alimentare per il controllo batterico dalla FAO/WHO (FAO/WHO, 1969).

Nel 1976 la prima review sulle batteriocine dei batteri Gram-positivi (Tagg et al., 1976) ha segnato l'inizio di una ondata di ricerche di molecole nisino-simili, portando gli studi sulle batteriocine prodotte da Gram-positivi, e in particolar modo dai batteri lattici, a dominare la letteratura relativa alle batteriocine. D'altro canto, gli insuccessi nel trovare utilizzi pratici per le batteriocine prodotte dai batteri Gram-negativi ha portato a trascurare sempre di più il loro studio, sia da parte di ricercatori che da associazioni finanziatrici.

La maggior parte delle batteriocine fino ad oggi descritte sono prodotte da microrganismi appartenenti ai generi *Lactobacillus*, seguite da *Enterococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc* spp., tutti appartenenti al gruppo dei batteri lattici (LAB). Le batteriocine prodotte dai LAB hanno suscitato molto interesse per vari motivi: sono ingredienti naturali trovati praticamente in tutti gli alimenti fermentati e nei prodotti caseari, quindi sono stati consumati inconsapevolmente dagli uomini per migliaia di anni e inoltre, essendo in grado di inibire l'accrescimento di batteri degradativi e patogeni nelle derrate alimentari, possono essere utilizzate nell'industria alimentare come conservanti naturali. Il crescente interesse nell'uso dei batteri lattici come conservanti naturali è dato anche dalla loro capacità di produrre metaboliti con attività antimicrobica come acidi organici (lattico e acetico), perossido d'idrogeno, CO<sub>2</sub>, diacetile (2,3-butandione) e enzimi antimicrobici.

#### **Caratteristiche generali**

Le batteriocine prodotte dai Gram-positivi sono generalmente peptidi cationici, con proprietà anfotera e quindi capaci di penetrare nella membrana citoplasmatica. Alcune presentano un ponte di solfuro nella loro struttura e la maggior parte di esse sono

piccole molecole (inferiori ai 6 kDa) con meno di 50 aminoacidi. Queste molecole sono generalmente stabili al calore, a bassi valori di pH, alla refrigerazione, al congelamento, a diversi solventi organici deboli, a sali ed enzimi. Sono invece sensibili all'azione degli enzimi proteolitici (Ray, 1996), specialmente delle proteasi del tratto gastrointestinale dei mammiferi, caratteristica che li rende sicuri per il consumo umano.

I geni che codificano per le batteriocine prodotte dai batteri Gram-positivi possono essere localizzate sia a livello plasmidico che cromosomico, e in particolare si trovano in strutture multi gene simili agli operoni; il corredo genetico deputato alla produzione delle batteriocine ad opera dei Gram-positivi risulta anche estremamente più ampio rispetto a quello dei Gram-negativi.

La produzione di batteriocine da parte dei batteri Gram positivi, a differenza di quello che succede nei Gram-negativi, non necessariamente porta a un evento letale, dipende dal meccanismo di trasporto utilizzato dai Gram-positivi per rilasciare la batteriocina: alcuni hanno implementato un sistema di trasporto specifico, altri utilizzano un sistema sec-dipendente. La batteriocina viene trasportata attraverso la membrana sotto forma di pre-peptide inattivo e, in seguito al taglio proteolitico del peptide leader N-terminale, si trasforma nella molecola biologicamente attiva e viene riversata nell'ambiente esterno alla cellula.

Per quanto riguarda la modalità d'azione, le batteriocine operano direttamente a livello della membrana plasmatica (Bruno and Montville, 1993), non mostrano alcun adsorbimento specifico e hanno uno spettro d'inibizione più ampio di quello dei Gram-negativi, infatti si dimostrano attive non solo verso altri batteri Gram-positivi ma anche verso microrganismi Gram-negativi. La nisina e la pediocina AcH, per esempio, esercitano la loro attività inibitoria sulla crescita di batteri quali *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Listeria monocytogenes* e *Micrococcus luteus* (Ray, 1996).

Inoltre, è interessante notare che l'attività di queste proteine può incrementare al variare del pH, così come in presenza di particolari sostanze chimiche che, alterando l'integrità della parete batterica delle cellule bersaglio, aumentano la suscettibilità all'azione delle batteriocine (Raffi and Ossiprandi, 2006).

Come succede per i Gram-negativi, i microrganismi batteriocina-produttori non subiscono l'azione della batteriocina da loro stessi prodotta grazie allo sviluppo di una immunità specifica mediata da una proteina con attività protettiva (Hancock and Chapple, 1999).

### 1.3.1 Classificazione delle batteriocine dei batteri Gram-positivi

La designazione di un agente ad attività inibitoria come specifica batteriocina può avvenire solo dopo l'isolamento, la purificazione e il sequenziamento del peptide e del corrispondente gene, ma anche dopo la conferma dell'unicità di questa molecola attiva con riferimento ai database contenenti le sequenze genetiche delle batteriocine isolate fino ad oggi.

Nel corso degli anni, la nomenclatura delle batteriocine prodotte dai batteri Gram-positivi non è stata sempre chiara, basandosi talvolta sulla specie, talvolta sul genere del ceppo produttore. Inoltre, le batteriocine sono state classificate sulla base di differenti caratteristiche, come l'attività (Drider et al., 2006; Klaenhammer, 1993), la modalità di azione (Diep et al., 2002), la modalità di escrezione (Jack et al., 1995), la struttura amminoacidica (Cotter et al., 2005), portando a una mancanza di compattezza. Nel corso degli anni molti ricercatori hanno cercato di formulare una classificazione adeguata e coerente, sebbene non sia semplice individuare una classificazione che comprenda tutte le batteriocine esistenti (Zouhir et al., 2010).

Per primo Klaenhammer, nel 1993, ha provato a riorganizzare la classificazione delle batteriocine prodotte dai Gram-positivi, proponendo 4 classi principali (Klaenhammer, 1993):

- Batteriocine di classe I o lantibiotici: peptidi a basso peso molecolare, termostabili, sottoposti a modificazioni post-traduzionali;
- Batteriocine di classe II: peptidi di piccole dimensioni (<10 kDa) stabili al calore e attivi sulla membrana, suddivisi a loro volta in tre sottogruppi (IIa, IIb e IIc);
- Batteriocine di classe III: proteine termolabili ad alto peso molecolare (>30 kDa);
- Batteriocine di classe IV: molecole dalla struttura complessa contenente componenti di natura lipidica e/o glucidica.

Questo schema è stato adottato da molti ricercatori, sebbene nel tempo siano state proposte ulteriori suddivisioni (Chatterjee et al., 2005; Cotter et al., 2005; Drider et al., 2006; Nes et al., 2007), grazie anche alle nuove conoscenze ottenute da studi sempre più dettagliati.

Di seguito viene descritta la classificazione delle batteriocine nelle quattro classi precedentemente riportate, dando particolare rilievo alla nisina, per la sua importanza a livello commerciale, e alle batteriocine prodotte dal genere *Enterococcus* (enterocine), in quanto oggetto dell'attività di ricerca.

### 1.3.2 I Lantibiotici

Le batteriocine appartenenti alla classe I vengono anche chiamate lantibiotici per la presenza di caratteristici aminoacidi policiclici, la lantionina e la  $\beta$ -metillantionina, che vengono introdotti a seguito di modificazioni post-trascrizionali; fanno parte della struttura anche residui deidratati, come l'aminoacido insaturo deidroalanina (DHA) e deidrobutilirina (DHB) (Bierbaum and Sahl, 2009). La loro presenza determina la formazione di strutture cicliche, che sembrano coinvolte nella resistenza dei lantibiotici all'azione delle proteasi (Chen and Hoover, 2003).

Nel 1991, Jung ha proposto un'ulteriore suddivisione di questa classe, basandosi sulla struttura della molecola:

Lantibiotici di tipo A: molecole di forma elicoidale allungata e flessibile, anfipatiche, che agiscono depolarizzando la membrana e favorendo la formazione di pori nelle cellule bersaglio. Appartengono a questa classe la nisina A, nisina Z, pediocina, subtilina ed epidermina (Zacharof and Lovitt, 2012). Nel 1992, l'identificazione di un nuovo lantibiotico ha apportato un'ulteriore modifica a questo sottogruppo: tipo A-I, che comprende i lunghi peptidi, e tipo A-II, che include quei lantibiotici aventi un lungo e lineare dominio amino-terminale ed una porzione carbossi-terminale con conformazione globulare, come la lacticina (Bierbaum and Sahl, 2009). Hanno un peso molecolare tra i 2 e i 5 kDa

Lantibiotici di tipo B: peptidi con conformazione globulare, di dimensioni di 2 kDa. Agiscono interferendo con le reazioni enzimatiche essenziali per la crescita e la sopravvivenza della cellula bersaglio, ad esempio impedendo la sintesi della parete cellulare (Sahl et al., 1995). Possono avere carica netta negativa o neutra e appartengono a questa classe la lactocina B, mersacidina, actagardina e mutacina II (Abee, 1995; Cotter et al., 2005).

Nel corso degli anni sono stati isolati lantibiotici con caratteristiche particolari, come la lacticina 481, che è formata da una estremità N-terminale lineare e da una estremità C-terminale globulare. La continua scoperta di lantibiotici che non appartengono a nessuno dei due sottogruppi sopra descritti fa sì che la classificazione sia in continuo aggiornamento. Twomey et al. (2002), per esempio, hanno diviso i lantibiotici in sei sottogruppi.

L'azione dei lantibiotici risulta evidente soprattutto verso batteri Gram-positivi. I Gram-negativi, come le *Enterobacteriaceae*, risultano insensibili alla loro azione



probabilmente a causa della presenza della membrana esterna, che rende difficile ai lantibiotici raggiungere la membrana citoplasmatica ed attuare il danno.

### **La Nisina**

La nisina è la batteriocina più conosciuta della classe dei lantibiotici. È stata isolata per la prima volta nel 1947 e il suo nome deriva da “group N inhibitory substance”, con il suffisso “-in” a indicare le sue proprietà antibiotiche (Mattick and Hirsch, 1947).

È l'unica batteriocina ad oggi commercialmente ammessa come antimicrobico naturale nell'industria alimentare, con la sigla E234, in più di 40 Paesi, inclusi gli Stati Uniti, Australia, Sud Africa, Russia e India. La nisina è considerata sicura dall'OMS e nel 2001 ha ricevuto la denominazione di Generally Recognized as Safe (GRAS) dal Food and Drug Administration per l'uso in carni cotte e prodotti derivati del pollame (FDA, 2001).

Prodotta da *Lactococcus lactis* subspecie *lactis*, può essere addizionata agli alimenti in quantità variabili da 10 a 750 mg/kg di prodotto commerciale, che equivalgono a 0,25-18,7 µg nisina/g (Ruhr and Sahl, 1985). In Europa il suo utilizzo è consentito dalla Direttiva 95/2/CE in formaggi stagionati e fusi in concentrazione massima di 12,5 mg/kg, mentre la sua dose letale (LD50) è stata quantificata in 6950 mg/kg quando assunta per via orale. Il suo utilizzo è permesso anche in cibi in scatola, derivati del latte, preparazioni liquide a base di uovo, preparazione della fermentazione della birra e succhi di frutta.

La nisina commerciale è ottenuta dalla fermentazione controllata di *Lactococcus lactis* subspecie *lactis* in un mezzo a base di latte a pH 6-7. La sintesi della nisina ha inizio nella prima fase esponenziale di crescita, raggiunge il *maximum* alla fine di questa fase e cessa quando il batterio entra in fase stazionaria. La nisina prodotta è poi concentrata, separata e seccata a spruzzo prima della macinazione nelle particelle fini e infine standardizzata tramite l'aggiunta del cloruro di sodio (EFSA, 2006).

Esistono due varianti naturali, la nisina A e la nisina Z, entrambe composte da 34 aminoacidi e caratterizzate da una struttura pentaciclica, ma che differiscono per l'aminoacido in posizione 27: asparagina per la nisina Z e istidina per la nisina A (figura 1.2) (Kuipers et al., 1993; Mulders et al., 1991).

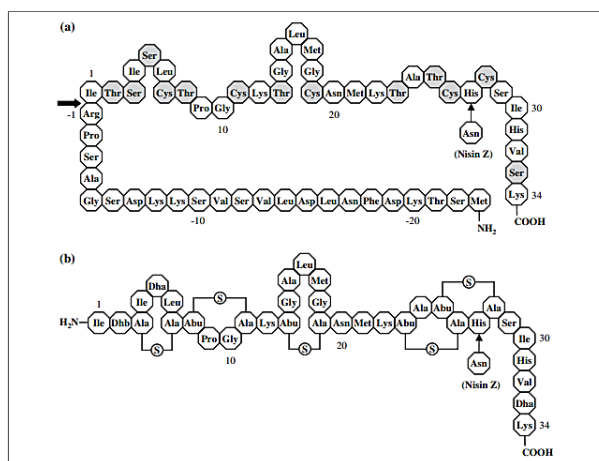


Fig. 1.2. Struttura del pre-peptide inattivo della nisina (a) e della nisina matura (b). I residui che vengono modificati sono indicati in grigio. La molecola mostrata è la nisina A, ma è indicata la sostituzione di His27 con Asn27 a formare la nisina Z (Cheigh and Pyun, 2005).

La nisina ha una doppia modalità d’azione antimicrobica: può legarsi ai lipidi II presenti nella membrana cellulare, che sono i principali trasportatori dei peptidoglicani dal citoplasma alla parete cellulare, oppure può inserirsi a livello della membrana e formare pori che alterano l’equilibrio osmotico e il potenziale di membrana della cellula, con conseguente arresto della funzionalità cellulare (figura 1.3). Tale inserzione avviene in regioni non specifiche (Bierbaum and Sahl, 2009).

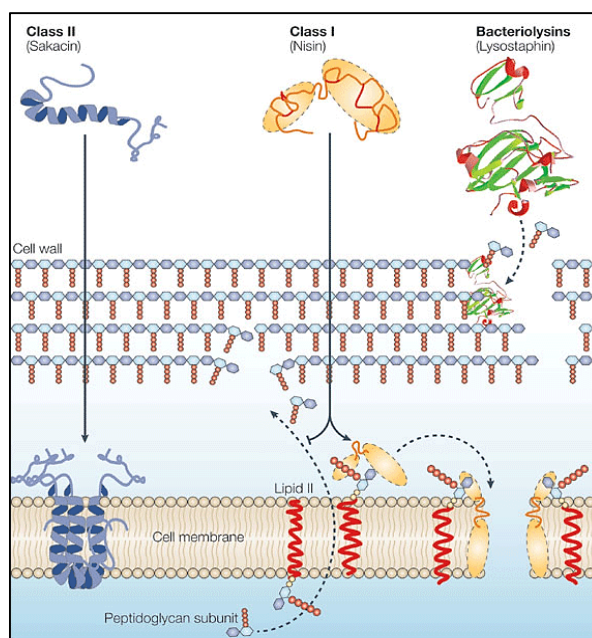


Fig. 1.3. Modalità d’azione di tre differenti batteriocine. La nisina, classe I, presenta una doppia modalità d’azione, potendosi legarsi al lipide II o formare pori nella membrana. Batteriocine di classe II come la sakacina, con struttura a elica, si inseriscono nella membrana portando a depolarizzazione e morte cellulare. Le batteriolisine di classe III possono agire direttamente sulla parete, portando a lisi e morte cellulare (Cotter et al., 2005).

Lo spettro di azione della nisina non è ampio e risulta efficace soprattutto nei confronti di cellule vegetative e spore di batteri Gram-positivi, infatti in assenza di altri metodi di conservazione il peptide generalmente non inibisce i batteri Gram-negativi, i lieviti e le muffe (Rayman et al., 1981; Stevens et al., 1991; Ganzle et al., 1999; Bauer e Dicks, 2005). Per questo motivo negli ultimi anni è stata valutata l'efficienza della nisina nella cosiddetta tecnologia ad ostacoli, ovvero in combinazione con metodi di conservazione tradizionali o innovativi, al fine di incrementarne l'attività antimicrobica (Bierbaum and Sahl, 2009).

Data la sua capacità di inibire la sopravvivenza e riproduzione di microrganismi come *L. monocytogenes* e *C. botulinum*, viene impiegata come conservante soprattutto in prodotti caseari e a base di carne, in cui la contaminazione da parte di questi patogeni può risultare più probabile (Dodd et al., 1990). Inoltre, la nisina è risultata efficace contro *Clostridium difficile*, così da poter costituire una possibile valida alternativa alla terapia antibiotica potendo, anche, rappresentare un rimedio contro l'ulcera peptica, data la sua stabilità a pH acidi (Bierbaum and Sahl, 2009).

Importanti considerazioni per l'uso della nisina sono la sua stabilità e solubilità, infatti è maggiormente stabile in ambiente acido ed è solubile in ambiente acquoso. È stata riportata una solubilità del 12% a pH 2,5, che diminuisce al 4% a pH 5, e diventa molto bassa a pH neutro. A una temperatura di 115.6°C è stabile quando il pH è 2.0, ma perde il 40% di attività a pH 5.0 e più del 90% a pH 6.8 (Liu and Hansen, 1990).

### **1.3.2.1. Altri Lantibiotici**

Le batteriocine prodotte da *Streptococcus salivarius* K12, salivaricina B e salivaricina A2, hanno mostrato un'azione inibitoria verso *Streptococcus pyogenes* e per questo vengono utilizzate come probiotici in alcuni dentrifici in Nuova Zelanda. Alcuni esperimenti hanno messo in evidenza la capacità di alcuni lantibiotici di contrastare la sopravvivenza dei ceppi meticillina-resistenti di *S. aureus* (Bierbaum and Sahl, 2009), incoraggiando la loro possibile applicazione in campo medico, come sostituti degli antibiotici.

La **citolisina** prodotta da *E. faecalis* è la sola enterocina tipo-lantibiotico attualmente conosciuta. È costituita da due peptidi lineari, ed è quindi strutturalmente differente dalla Nisina A e Z, che sono costituite da un singolo peptide lineare. Viene ugualmente inserita nel gruppo dei lantibiotici in quanto contiene residui di lantionina. È emolitica ed è attiva sia verso batteri Gram-positivi che verso cellule eucariotiche (Garneau et al.,

2002). La capacità degli enterococchi di produrre questa batteriocina rappresenta un fattore di virulenza e pertanto non può essere utilizzata come bioconservante (Nes et al., 2007).

### **1.3.3 Batteriocine di classe II**

Le batteriocine appartenenti alla classe II sono piccoli peptidi con peso molecolare inferiore ai 10 kDa e costituiti da un numero variabile da 37 a 48 aminoacidi; sono cationici, idrofobici e relativamente stabili al calore. Tali peptidi non subiscono modifiche post-traduzionali, fatta eccezione per la formazione di ponti disolfuro e il distacco del peptide leader, sul quale è situato un sito di maturazione Gly-Gly (Cocolin et al., 2010). Esempi di tale proteine sono la lactacina F, pediocina, lattococcina A, B, M, leucocina A, sakacina A, P e curvacina (Jay et al., 1996). Questa classe viene suddivisa in tre sottogruppi (IIa, IIb, IIc).

#### **1.3.3.1 Batteriocine di classe IIa o batteriocine anti-Listeria**

Le batteriocine della classe IIa sono anche chiamate “pediocina-simili”, dal nome della prima batteriocina caratterizzata appartenente a questa classe. Raccoglie tutte le batteriocine con attività anti-Listeria che presentano in posizione N-terminale una sequenza idrofilica fortemente conservata (YGNGV) e che contengono due residui di cisteina uniti da un ponte di solfuro, che stabilizza la struttura a  $\beta$  sheet. La funzione della sequenza conservata non è stata ancora del tutto chiarita, ma si pensa possa essere coinvolta nella stabilizzazione del peptide durante la traduzione, nel mantenimento del pre-peptide in forma inattiva all'interno del citoplasma e nella sua traslocazione attraverso la membrana (Jack et al., 1995). Attraverso la costruzione di batteriocine ibride si è invece capito che la regione carbossi-terminale è importante nel determinare la specificità verso l'organismo bersaglio (Chikindas et al., 1995; Fimland et al., 1996). Per la produzione e la secrezione delle batteriocine di classe IIa sono indispensabili tre geni: il gene che codifica per la batteriocina, il gene per il trasportatore ABC (che permette la secrezione del peptide) ed il gene che conferisce l'immunità al microorganismo produttore. Talvolta può intervenire anche un quarto gene per la sintesi di proteine accessorie.

Le batteriocine di questa classe presentano una porzione N-terminale più lunga, il cui taglio proteolitico segna l'attivazione della batteriocina. Il ruolo di questa piccola sequenza peptidica è quello di proteggere la cellula dall'azione della batteriocina

quando si trova all'interno del citoplasma, e di renderla riconoscibile al trasportatore per la secrezione.

I batteri produttori di batteriocine sono immuni alle loro stesse batteriocine anche grazie alla presenza di particolari proteine protettive, ad oggi ancora poco conosciute. Attualmente, sono state identificate circa venti proteine con possibile attività protettiva, che sono localizzate nel citosol, talvolta associate al versante interno della membrana citoplasmatica. Studi sulle proteine immunitarie carnobacteriocina B2 immunity protein (ImB2) e enterocina A immunity protein (EntA-im) hanno mostrato come siano attive contro la batteriocina correlata e, in misura minore, verso altre batteriocine della classe IIa, simili da un punto di vista strutturale, come nel caso di sakacina P, sintetizzata da *Lactobacillus sakei* LTH673 e pediocina PA-1/AcH. Ancora non è stato ben chiarito come queste proteine agiscano nel proteggere il microrganismo produttore di batteriocine dall'azione delle stesse (Jack et al., 1995).

L'interesse per le batteriocine di classe IIa è aumentato negli ultimi anni grazie a numerosi studi che ne hanno evidenziato il potenziale utilizzo in numerosi settori: in campo medico, come valida alternativa all'utilizzo di antibiotici e antivirali; nel settore alimentare, come conservanti e come agenti di protezione nei confronti di patogeni responsabili di intossicazioni alimentari. È stata infatti dimostrata l'attività antimicrobica di queste piccole proteine nei confronti di *L. monocytogenes*, da cui il nome della classe, *B. cereus*, *C. perfringens* e *S. aureus* (Jack et al., 1995).

### **Modalità d'azione delle batteriocine di classe IIa**

La pediocina PA-1 (AcH) provoca a livello cellulare la fuoriuscita di ioni  $K^+$ , aminoacidi e altre molecole a basso peso molecolare con conseguente alterazione del potenziale di membrana, della forza proton-motrice e deplezione dell'ATP intracellulare (Jack et al., 1995).

Uno studio di Waite et al. del 1998 ha evidenziato come l'alterazione della forza proton-motrice, indotta dalla leuconosina S, dalla nisina e dalla pediocina JD, influenzi negativamente i trasportatori del glucosio in *L. monocytogenes*.

L'effetto di permeabilizzazione di membrana è stata osservato anche per altre batteriocine, quali, ad esempio, enterocina P, bavaricina MN, mesentericina Y105 e mundticina (Jack et al., 1995).

L'affinità di legame delle batteriocine con la membrana della cellula target è fortemente influenzata dal pH, ad esempio la diminuzione del pH da 7.5 a 6 aumenta l'affinità di legame alla membrana e la capacità d'incrementarne la permeabilità della pediocina

PA-I (Ennahar et al., 1999). Il pH dell'ambiente risulta molto importante poiché le batteriocine presentano cariche positive in condizioni fisiologiche che favoriscono interazioni elettrostatiche con i fosfolipidi di membrana, che invece hanno carica negativa (Ennahar et al., 1999).

Altri generi di batteri Gram-positivi sensibili all'azione delle batteriocine di classe IIa sono: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Bacillus* e *Brochothrix*.

### **Enterocine appartenenti alla classe IIa**

Alla classe IIa appartengono la quasi totalità delle enterocine prodotte. Le più comuni sono enterocina A, enterocina P e mundticina.

L'**enterocina A** è stata studiata per lungo tempo. Viene prodotta da diversi ceppi di *E. faecium*, quali *E. faecium* DPC1146 (O'keeffe et al., 1999), *E. faecium* CTC492 isolato da salsicce spagnole (Aymerich et al., 1996) ed *E. faecium* EK13 (Strompfova et al., 2006). È un piccolo peptide di 47 aminoacidi, che presenta la sequenza consenso tipica della classe IIa e quattro residui di cisteina che si pensa formino due ponti di solfuro. Nello studio di Aymerich e coll. del 1996, l'analisi della sequenza amminoacidica ha evidenziato un'omologia del 54,6% con la pediocina PA-1. L'informazione genetica è portata a livello cromosomico, assieme al gene indispensabile per l'immunità del microorganismo produttore, *entI* (O'keeffe et al., 1999). L'enterocina A è risultata attiva contro i generi *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* e soprattutto contro *Listeria* spp.

L' **enterocina P** viene prodotta dagli stipiti di *E. faecium* P13, AA13, G16 e L50 isolati da insaccati fermentati di produzione spagnola (Cintas et al., 1997, 2000; Herranz et al., 2001). Possiede attività anti-*Listeria*, ma anche verso altri patogeni Gram-positivi, quali *E. faecalis*, *S. carnosus*, *S. aureus*, *C. sporogenes*, *C. tyrobutyricum*, *C. perfringens*, *C. botulinum*. L'attività antimicrobica viene meno a seguito del trattamento con proteasi, mentre resta invariato dopo trattamento termico a 100°C per 1 ora, 121°C per 15 minuti, e al variare del valore di pH tra 2 e 11. L'attività permane anche in seguito a congelamento e a liofilizzazione (Cintas et al., 1997).

La **mundticina** è una batteriocina prodotta da *E. munditii* ATO6, isolato da vegetali processati. La sua azione antimicrobica rimane invariata a seguito del trattamento termico a 100°C per 15 minuti, mentre si riduce del 50% se permane a 100°C per 1 ora. È costituita da 43 aminoacidi, contiene il motivo consenso YGNGVXC e un singolo

ponte di solfuro nella porzione N-terminale. È risultata attiva nell'inibizione di molti batteri Gram-positivi, tra cui *L. monocytogenes*, *L. salivarius*, *L. sakei*, *E. faecalis*, *E. hirae*, e *L. innocua*; è nota, inoltre, l'efficacia nell'inibire la sporulazione di *C. botulinum* (Bennik et al., 1998).

### **1.3.3.2 Batteriocine di classe IIb a due peptidi**

Sono batteriocine non pediocino-simili costituite da due differenti peptidi cationici, entrambi di 25-40 residui. L'attività antibatterica richiede la presenza di entrambi i peptidi e in particolare l'*optimum* si ottiene quando sono presenti approssimativamente in quantità equivalenti. Generalmente sono sintetizzate come pre-peptidi e l'attivazione avviene tramite un taglio proteolitico della sequenza leader, a livello dell'N-terminale, durante il trasporto fuori dalla cellula (Garneau et al., 2002) che avviene tramite un sistema sec-dipendente.

I geni necessari per la loro sintesi sono quattro: il gene strutturale per il pre-peptide, il gene per l'immunità, il gene per il trasportatore di membrana specifico ed il gene per le proteine accessorie, utili per la secrezione della batteriocina.

La batteriocina matura presenta generalmente carica negativa, è anfipatica e può presentare residui di cisteina. Agisce formando pori nella membrana plasmatica, con conseguente alterazione del potenziale di membrana. L'interazione tra i fosfolipidi di membrana e le cariche positive della batteriocina facilita l'inserzione delle regioni idrofobiche del peptide, permettendo a più batteriocine di associarsi formando dei pori transienti nella membrana (Garneau et al., 2002).

### **Enterocine appartenenti alla classe IIb**

Le più comuni enterocine appartenenti alla classe IIb sono enterocina 1070, enterococcina L50, enterocina Q e enterocina EJ97.

L'**enterocina 1071** è sintetizzata da *E. faecalis* BFE 1071, isolato nelle feci di cavie (Balla et al., 2000), e da *E. faecalis* FAIR-E 309 (Franz et al., 2002), isolato da un formaggio argentino. L'enterocina 1071 è costituita da due peptidi, enterocina 1071A e enterocina 1071B, rispettivamente di 39 e 32 aminoacidi. Le singole subunità mostrano un elevato grado di omologia con altre batteriocine della stessa classe: la subunità A presenta il 64% di omologia con la lactococcina G $\alpha$ , mentre la subunità B presenta il 61% di omologia con la lattococcina G $\beta$  (Garneau et al., 2002).

Espliega la sua attività su batteri Gram-positivi quali *C. tyrobutyricum*, *E. durans*, *E. faecalis*, *L. salivarius*, *L. innocua*, *Micrococcus* spp. e *S. agalactiae*. Non mostra attività emolitica e viene inattivata da trattamenti proteolitici con enzimi come  $\alpha$ -chimotripsina, pepsina, pronasi, proteinasi K e tripsina. È invece resistente ai trattamenti termici, mostrando un dimezzamento dell'attività a seguito dell'esposizione a 121°C per 15 minuti, e ha bassa sensibilità alle variazioni di pH in un range compreso tra 3 e 12 (Balla et al., 2000).

L'**enterococcina L50** è stata isolata da *E. faecium* L50 e 6T1a (Cintas et al., 2000; Floriano et al, 1998). Non mostra attività emolitica ed è costituita da due peptidi, A e B, che mostrano tra loro un'omologia del 72%. I due peptidi sono prodotti diretti della traduzione, pertanto non presentano alcuna sequenza segnale, e entrambi hanno attività antimicrobica, in particolare L50A, che appare dalle 4 alle 12 volte più attiva della subunità L50B. Tuttavia, l'azione congiunta delle due subunità può essere fino a cento volte maggiore di quella dei singoli peptidi. Un'altra particolarità legata a questa batteriocina è la mancanza di geni relativi all'immunità. È dimostrata l'efficacia contro patogeni alimentari, quali *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, *C. perfringens*, *C. botulinum*, e contro patogeni umani (Garneau et al., 2002).

L'**EnterocinaQ** è prodotta dal ceppo *E. faecium* L50, al pari delle enterocine L50 e P. È un peptide di 34 aminoacidi, simile alla EntL50, e non è prodotta come pre-peptide. Codificata dal gene *entQ*, localizzato sul plasmide pCIZ2, non presenta la sequenza leader all'N-terminale e pertanto può sfruttare un qualsiasi trasportatore per l'esternalizzazione (Cintas et al., 2000).

L'**Enterocina EJ97** è costituita da 44 aminoacidi ed è prodotta da *E. faecalis* EJ97, isolato da acque pubbliche di scarico. La sua attività inibitoria è mantenuta invariata anche in seguito a incubazione di 1 ora a valori di pH compresi tra 2 e 9,5, mentre il trattamento termico a 100°C per 30 minuti determina una riduzione dell'attività del 30%. L'azione della pronasi decrementa del 100% l'attività di questa batteriocina ed è attiva verso un ampio spettro di batteri Gram-positivi, come *L. monocytogenes*, *Bacillus* spp., ceppi di *S.aureus* ed anche *Enterococcus* spp. (Galvez et al., 1998).

### 1.3.3.3 Batteriocine di classe IIc

La sottoclasse IIc è costituita da peptidi tiolo-attivi, termolabili, che necessitano della riduzione di residui cisteinici per esplicare la loro azione.



### **Enterocine appartenenti alla classe IIc**

Le enterocine di questa classe assumono una struttura ciclica tramite la formazione di legami tra le estremità carbossiliche e quelle N-terminali; le più comuni sono enterocina B, lactococcina 972, circularina A ed enterocina AS-48.

L'**enterocina B** è prodotta dai ceppi *E. faecium* T136 e CTC 492, isolati da salsicce fermentate spagnole, e da *E. faecium* BFE 900, isolato da olive nere. Spesso viene prodotta assieme all'enterocina A e la sua sintesi può essere regolata o costitutiva. È formata da 53 aminoacidi e presenta 2 residui di cisteina, che possono dar luogo ad un ponte disolfuro. Presenta similarità di sequenza solo con la carnobatteriocina A, con la quale condivide anche un'altra caratteristica: i loro geni dell'immunità sono localizzati nel filamento di DNA opposto e non subito dopo il gene strutturale, come avviene per la maggior parte delle batteriocine di classe II. È nota l'attività contro *Enterococcus* e *Lactobacillus* spp. e contro patogeni di origine alimentare come *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *C. perfringens* (Franz et al., 1996).

La **batteriocina 32** è stata identificata nel ceppo *E. faecium* VRE200 vancomicina resistente. Il locus genetico della batteriocina 32 consiste in un gene per la batteriocina e in un gene per l'immunità. Presenta attività verso *E. faecium*, *E. hirae*, and *E. durans*, ma non mostra attività contro *L. monocytogenes*. Studi epidemiologici, hanno evidenziato come la produzione di questa batteriocina sia comune nei ceppi di *Enterococcus* vancomicina resistenti (Inoue et al., 2006).

### **1.3.4 Batteriocine di classe III**

Chiamate anche batteriolisine, sono proteine termolabili ad alto peso molecolare (superiore ai 30 kDa), con struttura ciclica. Il loro meccanismo d'azione si distingue da quello di altre batteriocine in quanto provocano la lisi della parete delle cellule patogene. In esse, sia la porzione C-terminale che N-terminale partecipano al fenomeno di rottura: la prima è infatti implicata nel riconoscimento della cellula bersaglio e la seconda, essendo analoga ad una endopeptidasi, promuove l'idrolisi dei legami peptidici, componenti indispensabili per l'integrità della parete.

Un esponente di questa classe è l'**enterocina AS-48**, sintetizzata da *E. faecalis* (Martinez-Bueno et al., 1994) e prima batteriocina dal genere *Enterococcus* ad essere isolata. Altre batteriocine appartenenti a questa classe sono l'elvetica J, millericia B, lacticine A-B (Raffi and Ossiprandi, 2006; Foulquié Moreno et al., 2006; Zacharof and Lovitt, 2012; Jay et al., 1996; Almeida et al., 2011; Cocolin et al., 2007).

### 1.3.5 Batteriocine di classe IV

Le batteriocine appartenenti alla classe IV sono proteine complesse, caratterizzate dalla presenza nella loro struttura di componenti non proteiche indispensabili per la loro attività, come lipidi o glucidi. Appartengono a questa classe l'enterolisina A, plantaricina S, leucocina S, lactacina 27 e pediocina SJ-1.

L'**enterolisina A** prodotta dai ceppi di *E. faecalis* LMG 2333 e DPC5280 (Hickey et al., 2003; Nilsen et al., 2003) è una batteriocina di grandi dimensioni, sensibile al calore, che mostra attività verso i generi *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Listeria* e *Staphylococcus* spp. La regione C-terminale mostra similarità con diverse proteine batteriofagiche ad azione mureina litica e infatti possiede la capacità di idrolizzare la parete cellulare.

## 1.4 Regolazione della produzione di batteriocine

Nel mondo procariotico esistono alcuni sistemi di controllo che consentono ad un microrganismo di rispondere in modo estremamente efficace ai segnali provenienti dall'ambiente. La comunicazione batterica intercellulare implica l'esistenza di sofisticati sistemi di rilevamento di molecole segnale e meccanismi di trasduzione del segnale, che vengono integrati con altre informazioni al fine di effettuare determinate decisioni sulla regolazione genica.

Svariate specie batteriche possiedono un sistema regolatore definito *quorum sensing*, termine introdotto per la prima volta da Fuqua et al. (1994), che si basa sulla percezione della densità batterica delle cellule appartenenti alla stessa specie. Questa forma di controllo rappresenta un sistema di fondamentale importanza per i batteri, costantemente impegnati in una gara in cui competono per risorse e spazi limitati, poiché regola la ricerca di nutrienti o di nicchie ambientali, attiva i batteri a difendersi contro competitori e ottimizza l'abilità delle cellule a differenziarsi in forme morfologiche maggiormente adatte a sopravvivere in un ambiente ostile. I batteri usano il *quorum sensing* anche per regolare diverse caratteristiche fisiologiche, inclusa la capacità di incorporare DNA estraneo, di tollerare l'ambiente acido, di regolare la virulenza e inoltre sembra essere coinvolto in tutte le fasi di formazione del biofilm (Riley, 2007; Skandamis and Nychas, 2012).

Questo meccanismo di regolazione genica viene attuato per mezzo della sintesi di piccole molecole segnale solubili, chiamate autoinduttori, che permettono la

comunicazione intercellulare in quanto diffusibili attraverso le membrane. Sia nei batteri Gram-positivi che nei Gram-negativi sono state identificate molte classi di molecole segnale. Recentemente anche le batteriocine sono state identificate come molecole segnale intercellulari, infatti in aggiunta al loro ruolo come tossine antibatteriche, è stato dimostrato che agiscono come agenti di coordinamento necessari per invadere, instaurarsi e competere nell'ambiente naturale. La nisina, per esempio, può servire da molecola segnale per l'espressione dei geni per la biosintesi e l'immunità nelle cellule che producono la nisina stessa (Riley, 2007).

Nei batteri Gram-negativi, la molecola segnale è spesso l'omoserina lattone acilato (AHL), ma sembrano essere anche coinvolti lipidi, oligopeptidi e aminoacidi (Fuqua et al., 2001; Whitehead et al., 2001). I batteri Gram-negativi che possiedono questo sistema di controllo sono dotati di un enzima che sintetizza l'AHL, che in condizioni normali viene diffuso all'esterno della cellula e, nel momento in cui numerose cellule produttrici della stessa molecola si localizzano nelle vicinanze, viene concentrata al suo interno in modo specifico.

Nei batteri Gram-positivi le molecole segnale sono spesso peptidi e il *quorum sensing* consiste generalmente di tre componenti: un peptide feromone, che agisce come peptide di segnale, una proteina transmembrana (recettore istidina chinasi) e un regolatore di risposta intracellulare. Il feromone lega l'istidina chinasi, che dà luogo a un'autofosforilazione, con successivo trasferimento del gruppo fosfato a un regolatore, che si lega ai promotori della risposta e li attiva (Riley, 2007). I feromoni sono sintetizzati a livello ribosomiale e sono secreti costantemente a bassa concentrazione, ma la loro concentrazione intracellulare aumenta all'aumentare della densità di popolazione.

Questi fattori solubili spesso determinano la formazione di biofilm microbici, ovvero densi aggregati di microrganismi aderenti a superfici, inseriti in una matrice formata da polisaccaridi, proteine e DNA secreti dalle cellule (Scheie e Petersen, 2004). Possono essere formati da una o da più specie microbiche e si trovano sia su superfici biotiche (ad esempio orale e intestinale) che abiotiche (Shapiro, 1998). La formazione del biofilm è vantaggiosa per i batteri poiché li rende più resistenti agli agenti antimicrobici, rendendo difficile la loro eradicazione dalle strumentazioni, come le superfici di acciaio inossidabile coinvolte nei processi di produzione alimentare.

Lo studio dei batteri che risiedono nei biofilm come comunità interattiva ha recentemente suscitato molti interessi (Watnick and Kolter, 2000) dato che il biofilm è

quasi sempre formato da culture microbiche miste, che subiscono un ampio range di adattamenti fisiologici e morfologici in risposta a cambiamenti ambientali. Differenti gradienti chimici, di nutrienti e di ossigeno creano un microambiente a livello del biofilm al quale i batteri devono adattarsi per sopravvivere (Watnick and Kolter, 2000) e, costretti a competere con altre specie per gli stessi nutrienti o gli stessi spazi, la maggior parte di loro produce batteriocine.

### 1.4.1 *Quorum sensing* della nisina

Recenti studi sulla biosintesi e regolazione della nisina hanno mostrato che questa batteriocina è prodotta in maniera dipendente alla densità cellulare e la sua biosintesi è sotto il controllo di un sistema a due componenti: una istidina chinasi e un regolatore della risposta. I geni che codificano per entrambi questi componenti sono stati individuati nel cluster genico della nisina (*nisR* e *nisK*, Engelke et al., 1994).

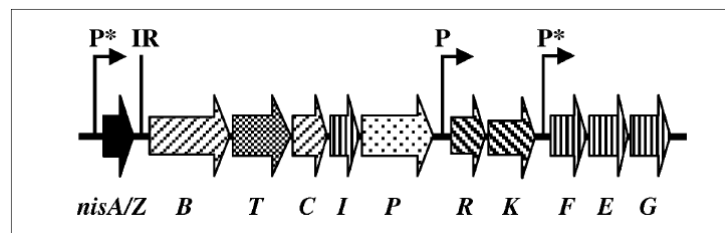


Fig. 1.4. Cluster genico della nisina. La funzione dei prodotti genici è la seguente: *nisA/Z*, peptide precursore della nisina; *nisB* e *nisC*, modifiche post-traduzionale; *nisT*, traslocazione; *nisP*, proteasi; *nisR* e *nisK*, regolazione della biosintesi della nisina; *nisI* e *nisFEG*, immunità. I promotori regolati sono indicati da P\* e i promotori costitutivi da P. IR indica una sequenza ripetuta invertita (Cheigh e Pyun, 2005).

Come mostrato in figura 1.5, in risposta al segnale esterno portato dalla nisina matura, che funge da peptide feromone autoinduttore, la chinasi NisK autofosforila un residuo di istidina nel dominio C-terminale della proteina. Il gruppo fosfato viene poi trasferito su un residuo di acido aspartico del corrispondente NisR intracellulare, che generalmente è un attivatore trascrizionale, che si lega e attiva i promotori *NisA* e *NisF* all'interno del cluster genico della nisina.

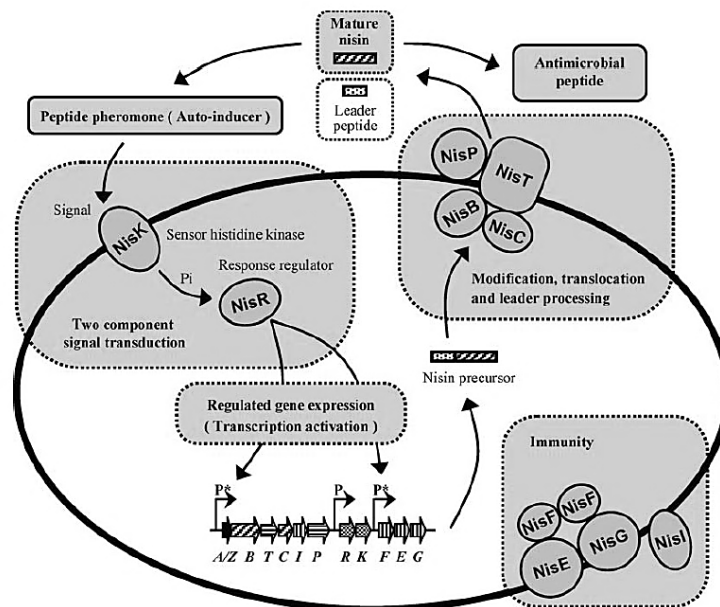


Fig. 1.5. Rappresentazione schematica della biosintesi e regolazione della nisina in *Lactococcus lactis*. Il precursore della nisina (codificato da *nisA/Z*) è sintetizzato a livello ribosomiale, modificato (NisB e NisC) e traslocato (NisT), fino a formare la molecola matura. La nisina matura extracellulare agisce sia come peptide antimicrobico, sia da feromone attivando la sua stessa biosintesi tramite un sistema a due componenti composto da NisK e NisR. La cellula produttrice è protetta dall'attività della nisina grazie all'immunità conferita da NisI e NisFEG (Cheigh e Pyun, 2005).

## 1.5 Applicazioni delle batteriocine in campo clinico e alimentare

Negli ultimi anni abbiamo assistito a una crescita della consapevolezza da parte dei consumatori dei possibili rischi associati al consumo di cibi trattati con additivi chimici. Questo atteggiamento ha spinto i produttori ad abbandonare, dove possibile, gli agenti chimici, e a incentivare l'uso di conservanti naturali, da utilizzare in alternativa o in combinazione a tradizionali tecniche di prevenzione per il biocontrollo di batteri alteranti e patogeni nelle matrici alimentari.

A tal fine, le batteriocine potrebbero essere impiegate in diversi modi, per esempio inoculando un ceppo produttore di batteriocine all'interno dell'alimento all'inizio del processo produttivo o sul prodotto finito, in modo che queste molecole bioattive vengano sintetizzate direttamente sul prodotto al consumo. La produzione *in situ* delle batteriocine offre vantaggi sia dal punto di vista economico che legale, e molti studi ne hanno mostrato l'efficacia nella bioconservazione, come mostrato in tabella 1.2 (Balciunas et al., 2013).

Batteriocine	Batteri produttori	Microrganismi bersaglio	Alimenti	Riduzione (log CFU g <sup>-1</sup> )	Riferimenti
Nisina	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Maiale	3,5	Nattress, Yost & Baker, 2001
Nisina	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Latte pastorizzato	6,0	Benkerroum et al., 2002
AcH Pediocina	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Formaggio	1,0-2,0	Loessner et al., 2003
Enterocina	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Listeria monocytogens</i>	Latte	2,0	Elotmani, Revol-Junelles, Assobhei, Milliére, 2002
Enterocina	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Salsicce	5,3	Ananou, Maqueda, Martínez-Bueno, Gálvez, Valdivia, 2005
Nisina Z	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Formaggio	2,0	Rilla et al., 2004

Tab. 1.2. Applicazione delle batteriocine nel settore alimentare (Balciunas et al., 2013)

Gli alimenti potrebbero anche essere addizionati con batteriocine prodotte *ex situ* sotto forma di preparati parzialmente o totalmente purificati. La purificazione può avvenire con diverse modalità a seconda delle enterocine trattate: per curvacina A, sakacina P, lactosina S e bavaricina A si può effettuare una precipitazione con solfito di ammonio, cromatografia a scambio ionico o interazione idrofobica in HPLC in fase inversa. L'impiego di sali di ammonio per la purificazione è utilizzata anche per helveticina J e lactacina F, in alternativa alla cromatografia a permeazione di gel (GPC), che viene utilizzata per lactacina B. Per quest'ultima viene impiegata anche la cromatografia a scambio ionico e l'ultrafiltrazione. Lo svantaggio dato da queste tecniche di purificazione è l'elevato costo economico, che rischia di compromettere l'impiego di tali bioconservanti in campo alimentare (Balciunas et al., 2013). Inoltre, è stato dimostrato che l'utilizzo di batteriocine pure non garantisce completamente la sicurezza e l'innocuità degli alimenti, in particolar modo quando si verifica una contaminazione da batteri Gram-negativi, verso i quali l'azione battericida di queste sostanze proteiche non è ancora del tutto chiara; è necessario quindi combinare la presenza di batteriocine con ulteriori tecniche, come il campo elettrico pulsato (PEF) o il trattamento ad alta pressione, che incrementano la shelf-life dei prodotti alimentari alterando la membrana citoplasmatica dei batteri contaminanti gli alimenti, senza alterarne le qualità sensoriali e nutrizionali. In queste condizioni le batteriocine, da sole o insieme ad altri composti antimicrobici quali il sodio lattato o il sodio acetato, possono avere una maggiore attività battericida nei confronti dei microrganismi contaminanti (Zacharof and Lovitt, 2012).

Accanto alla capacità prettamente fermentativa dei batteri lattici, bisogna evidenziare l'utilità di utilizzare batteri lattici capaci di produrre batteriocine attive contro microrganismi patogeni, come *Listeria monocytogenes*, ma anche alteranti, come *Clostridium butyricum*, come starter microbici, che porterebbe a un aumento sia della qualità igienico-sanitaria che della conservabilità (Cocolin et al., 2010).

Va inoltre ricordato l'utilizzo di colture batteriche produttrici di batteriocine in qualità di probiotici alimentari, ovvero di preparazioni batteriche, in particolare di batteri lattici, che migliorano le proprietà della microflora autoctona dell'organismo ricevente. L'incorporazione dei microrganismi probiotici può essere estesa ai prodotti lattiero-caseari, alle formulazioni per l'infanzia, ai succhi di frutta, ai prodotti a base di cereali ed a taluni prodotti farmaceutici (Raffi and Ossiprandi, 2006).

È stata anche evidenziata la capacità di alcune specie batteriche, nello specifico *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, di inibire la crescita di *Helicobacter pylori*, uno dei principali agenti eziologici responsabili di ulcere gastro-duodenali, grazie alla liberazione di molecole proteiche riconducibili a specifiche batteriocine. La somministrazione in forma probiotica di queste specie batteriche in soggetti geneticamente predisposti previene la formazione di ulcere a livello gastroenterico e, inoltre, stabilizza la barriera gastrica e riduce l'infiammazione mucosale. Dati sperimentali hanno rivelato che l'utilizzo di probiotici non porta all'eradicazione definitiva e completa di *H. pylori*, ma è in grado di contenere il livello gastrico del patogeno, inibendo in tal modo la sintomatologia clinica (Gotteland et al., 2006).

Recentemente, l'ambito della bioconservazione si è esteso all'utilizzo delle batteriocine per la funzionalizzazione di materiali plastici utilizzati per il confezionamento degli alimenti. Questa applicazione è di particolare rilevanza per quelle batteriocine prodotte da microorganismi che non possono essere inoculati come agenti di fermentazioni, in quanto incompatibili. Le batteriocine, prodotte *ex situ*, sono applicate e immobilizzate su materiali di imballaggio ("tecnica dell'imballaggio bioattivo"), che fungono da riserva di batteriocine concentrate, da cui vengono diffuse al cibo garantendo un rifornimento continuo di batteriocina. Questo metodo protegge gli alimenti da una possibile contaminazione che può provenire dall'esterno e previene la moltiplicazione dei microrganismi sulla superficie di questi prodotti, che è la porzione dove inizialmente vi è una maggiore carica microbica. Gli imballaggi antimicrobici possono essere preparati inserendo direttamente nel rivestimento plastico le batteriocine, che vengono così immobilizzate, oppure aggiungendo nella confezione una bustina contenente le

sostanze proteiche, che vengono rilasciate in modo graduale e si disperdono sui prodotti alimentari durante il periodo della conservazione (Ross et al., 2002). Da non sottovalutare il fatto che l'applicazione delle batteriocine sulla sola superficie dell'alimento trattato richiede una minore quantità di molecole, con conseguente riduzione dei costi.

In campo clinico, le batteriocine potrebbero trovare applicazione come valide alternative delle terapie antibiotiche, infatti avendo uno spettro d'azione limitato potrebbero essere utilizzate contro specifici patogeni. In questo modo, il ricorso all'antibiotico sarebbe limitato, con conseguente riduzione del rischio di sviluppo di antibiotico-resistenze, e ridotta alterazione della flora commensale intestinale del soggetto trattato. Ad esempio, la latticina 3147, batteriocina prodotta da *Lactococcus lactis*, ha mostrato una spiccata attività nei confronti dei principali agenti mastitogeni Gram-positivi. Appare quindi evidente come la latticina 3147 presenti interessanti potenzialità di utilizzo, sia in fase di trattamento terapeutico che in fase di prevenzione e controllo della mastite bovina (Raffi and Ossiprandi, 2006).

I lantibiotici vengono utilizzati nel trattamento di allergie, infiammazioni, herpes, carie dentali, infezioni della pelle, mastiti e ulcera peptica. La colicina è impiegata nella cura dell'infezione uro-genitale, della colite emorragica e della sindrome uremico emolitica. Le microcine agiscono come agente antimicrobico soprattutto nelle infezioni causate da batteri Gram-negativi, come la salmonellosi (Balciunas et al., 2013; Gillor et al., 2005). Al fine di sfruttare tutte i vantaggi forniti da tali molecole antimicrobiche, molti ricercatori stanno cercando di applicare metodi di ingegneria genetica o chimica al campo delle batteriocine, al fine di ottenere ceppi in grado di produrre quantità maggiori di peptidi. Una strategia prevede l'introduzione di più plasmidi in un singolo ceppo, in modo da renderlo capace di uccidere le cellule bersaglio in maniera più efficace del ceppo wild type. È possibile raggiungere lo stesso risultato tramite l'amplificazione e il clonaggio di geni che codificano per batteriocine all'interno di ceppi differenti. In campo chimico, invece, è possibile modificare la struttura proteica delle batteriocine, alterando o introducendo determinate modifiche post-traduzionali, tramite l'attività di specifici enzimi (Balciunas et al., 2013).



## 1.6 Resistenza nei confronti delle batteriocine

Il fenomeno della batteriocino-resistenza è un problema attuale e di notevole importanza, data l'applicazione di alcune di queste sostanze come conservanti all'interno degli alimenti.

Ceppi mutanti resistenti alle batteriocine sviluppano delle modifiche a livello della membrana citoplasmatica o della parete cellulare, che portano a un'alterazione del potenziale elettrochimico, della fluidità della membrana e dello spessore della parete. Questi cambiamenti probabilmente si verificano in seguito all'esposizione di questi batteri ad una bassa concentrazione di batteriocine oppure possono essere il risultato di una risposta adattativa a condizioni di stress ( Balciunas et al., 2013).

I microrganismi che mostrano resistenza alla nisina possono inattivare il peptide anche per via enzimatica, infatti *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarium*, e alcune specie di *Bacillus* che producono l'enzima nisinasi, sono in grado di neutralizzare l'attività antimicrobica del peptide (Hurst and Hoover, 1993).

Nel 1995 Abee ha dimostrato che la resistenza di *Listeria monocytogenes* alla nisina è data da alcuni cambiamenti della composizione della membrana citoplasmatica, tra cui la riduzione della concentrazione dei fosfolipidi, che ostacola la formazione dei pori da parte della batteriocina. Crandall and Montville nel 1998 hanno dimostrato che l'alterazione della composizione fosfolipidica nei ceppi di *L. monocytogenes* resistenti alla nisina crea una riduzione della carica netta negativa, che ostacola il legame di componenti cationiche come la nisina. La membrana di questi ceppi mostra un aumento di acidi grassi a catena lunga e una riduzione del rapporto tra gli acidi grassi C15/C17, creando una riduzione della fluidità e stabilità.

In uno studio di Cotter et al. (2002), un ceppo di *L. monocytogenes* con aumentata resistenza alla nisina ha mostrato un'aumentata sensibilità alle cefalosporine, dimostrando che ceppi che acquistano resistenza alla nisina non sono anche resistenti ad altri antibiotici, escludendo quindi fenomeni di cross-resistenza.

Non è mai stato rilevato il trasferimento della resistenza di nisina da un ceppo a un altro e inoltre, nonostante il prolungato uso di nisina nell'industria alimentare, non abbiamo assistito a un incremento della resistenza nei suoi confronti. Probabilmente questo fenomeno è dato dalla capacità della nisina di agire tramite una doppia modalità di azione (paragrafo 1.3.2.1) (EFSA, 2006).

## **1.7 Dinamiche di comunità contenenti batteriocine**

La morte di un microrganismo a causa di composti chimici tossici prodotti da un altro microrganismo è un fenomeno comune nelle comunità microbiche e porta a un'alterazione della natura chimica dell'ambiente, creando cambiamenti che influiscono sia sull'ecologia che sull'evoluzione di tutti i membri della comunità. Molte delle attuali conoscenze sulle comunità batteriche contenenti batteriocine derivano dall'uso combinato di modelli di microrganismi, modelli di comunità creati in laboratorio e modelli matematico-teorici. Gli studi di base sulle dinamiche di comunità contenenti batteriocine sono stati effettuati con *Escherichia coli* organizzato in microcosmi sperimentali, e successivamente con comunità create in laboratorio sia in vitro che in vivo (Riley, 2007).

Sia gli approcci sperimentali che quelli teorici hanno mostrato che la struttura fisica di una popolazione può essere fondamentale per l'iniziale invasione di un ceppo che produce batteriocina, mentre la struttura spaziale può giocare un ruolo centrale nella coesistenza di ceppi che producono batteriocina e ceppi che non la producono.

### **1.7.1 Dinamiche di comunità formate da due ceppi**

La più semplice comunità che produce batteriocine è costituita da due componenti: un ceppo produttore e un ceppo sensibile. Per le specie batteriche come *E. coli*, la produzione di batteriocine è un evento costoso poiché le cellule muoiono nel processo che porta a rilasciare la molecola nell'ambiente. Questi costi sono stati documentati in laboratorio, dove il ceppo produttore ha un tasso di crescita più basso o un tasso di mortalità più alto rispetto al ceppo sensibile (Chao and Levin, 1981). Infatti, nel caso in cui il ceppo sensibile e il ceppo produttore vengono fatti crescere separatamente in due fiasche contenenti terreno di coltura, il ceppo sensibile mostra un vantaggio rispetto a quello produttore. Se invece i ceppi vengono mescolati nella stessa fiasca, l'effetto della batteriocina sulla comunità di cellule sensibili è proporzionale al numero di produttori: se nella comunità sono presenti pochi produttori, l'impatto delle batteriocine sulle cellule sensibili è minimo e di conseguenza si verifica un vantaggio nella crescita del ceppo sensibile, tanto da poter sostituire il produttore; al contrario, se le cellule produttrici sono molte, l'impatto sulle cellule sensibili può essere notevole.

Prima tramite modelli matematici, e poi in laboratorio, è stato dimostrato che in condizioni ben miscelate e alla stessa densità iniziale, un produttore è in grado di

sostituire il suo competitore sensibile solo se al di sopra di una certa frequenza, a causa dei costi dovuti alla produzione delle batteriocine (Riley, 2007). Chao e Levin (1981) hanno provato a far competere un ceppo produttore e uno sensibile di *E. coli* in due habitat differenti: una fiasca con terreno di coltura liquido inoculato e ben miscelato e una piastra Petri con terreno agarizzato. Mentre nel primo caso il produttore era in grado di eliminare il ceppo sensibile solo in base alle condizioni iniziali, nel secondo caso il ceppo produttore era sempre in grado di eliminare il ceppo sensibile, anche quando era in basse concentrazioni. In un ambiente strutturato come quello che si crea nella piastra Petri, la batteriocina rilasciata dal ceppo produttore non è distribuita equamente su tutta la superficie e il tasso di mortalità delle cellule sensibili che si trovano a stretto contatto o nelle vicinanze del ceppo produttore è più alto della media. Quindi, la struttura spaziale inclina la bilancia a favore del ceppo produttore.

Alcuni ricercatori si sono poi chiesti se esistono circostanze in cui i due ceppi possono coesistere. Frank (1994) ha dimostrato che se esiste una eterogeneità spaziale nella concentrazione delle risorse, entrambi i ceppi possono coesistere stabilmente. In questo modello, le cellule che producono la batteriocina occupano le aree ricche di nutrienti, dove la competizione è ridotta, mentre le cellule sensibili dominano le aree povere di nutrienti, dove la competizione è intensa.

Anche se in natura la presenza di una eterogeneità spaziale è molto probabile, altri ricercatori si sono chiesti se fosse possibile mantenere la diversità in un sistema spaziale omogeneo. Czárán e Hoekstra (2003) hanno dimostrato che è possibile. Nel loro modello la comunità microbica è distribuita in molti siti, ciascuno con le stesse caratteristiche, a formare una “metapopolazione”. Se un sito è contemporaneamente colonizzato da cellule sensibili e cellule produttrici, allora le cellule produttrici hanno la meglio sulle sensibili. La rapida crescita delle cellule sensibili, però, porta a un’alta densità delle stesse, che quindi possono migrare facilmente verso un sito diverso e colonizzarlo. Il ceppo sensibile riesce quindi a sopravvivere adottando uno stile di vita nomade. Questo modello può essere utile nello spiegare la diversità di produzione di batteriocine a livello enterico, dove ospiti multipli come *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* formano una sorta di metapopolazione.

### **1.7.2 Dinamiche di comunità formate da tre ceppi**

Più complesso risulta essere lo studio delle dinamiche di comunità composte da tre soggetti (cellule produttrici, sensibili e resistenti). Bisogna tener presente che in natura gli elementi in gioco sono molteplici, per esempio all'interno di una popolazione batterica possono essere presenti vari tipi di batteriocine e ciascun produttore può essere sensibile alla batteriocina prodotta da un produttore differente, come è comune che si generino delle resistenze (Riley, 2007).

Pagie e Hogeweg (1999) hanno costruito un modello contenente più produttori, ciascuno dei quali capace di produrre più batteriocine, utilizzando un sistema in lattice. Dai loro studi hanno dedotto che in un sistema spazialmente strutturato possono coesistere stabilmente produttori multipli. Il tipo di coesistenza dipende dai costi che i microrganismi sostengono per rendersi immuni nei confronti della batteriocina: se questi costi sono bassi, allora la comunità entra in uno stato di iper-immunità, dove la maggior parte delle cellule sono resistenti a più tipi di batteriocine, mentre poche cellule producono più batteriocine; se invece i costi sono alti, la comunità mostra uno stato di multi-tossicità, dove le cellule sono resistenti a un numero inferiore di batteriocine e tendono a produrre individualmente più batteriocine.

Lo studio di comunità con produttori multipli suscita particolare interesse soprattutto alla luce del fatto che le batteriocine secrete da un produttore possono agire come induttori di batteriocine in altri produttori, ovvero essere implicate nel fenomeno del *quorum sensing* (Riley, 2007).

## 1.8 *Enterococcus* spp.

Il termine “*entèrocoque*”, dal greco “*enteron*”, intestino, e “*kokkos*”, grano, venne utilizzato per la prima volta nel 1899 dal ricercatore francese Thiercelin (Thiercelin, 1899), che volle così sottolineare l’origine intestinale di alcuni diplococchi Gram-positivi da lui isolati. Nel 1906, Andrews utilizzò il nome *Streptococcus faecalis* per descrivere un microrganismo, comune nella flora intestinale, isolato in un paziente affetto da endocardite (Andrewes and Horder, 1906) e nel 1937, Sherman (Sherman, 1937b) suddivise gli Streptococchi in quattro gruppi, basandosi su caratteristiche morfologiche, fisiologiche e chimiche:

- Streptococchi piogeni, microrganismi emolitici, incapaci di crescere a temperature inferiori a 10°C e superiori a 45°C, non tolleranti a sali, alcali e blu di metilene;
- Streptococchi viridans, microrganismi incapaci di attuare la  $\beta$ -emolisi e di produrre ammoniaca da peptone, capaci di crescere a temperature superiori o uguali a 45°C;
- Streptococchi lattici, microrganismi capaci di crescere alla temperatura di 10°C, ma non a 45°C, intolleranti a concentrazioni di NaCl al 6.5% e non in grado di crescere a pH superiore a 9.6;
- Streptococchi fecali o enterococchi, microrganismi resistenti alle alte temperature, tolleranti alla bile, capaci di fermentare il mannitolo, dotati o meno di attività emolitica e tolleranti a concentrazioni di NaCl al 6.5%.

Da un punto di vista tassonomico, il genere *Enterococcus* è stato rivisitato diverse volte. Le loro caratteristiche morfologiche e strutturali ne hanno reso difficile la distinzione da altri patogeni, tanto che fino agli anni ‘80 gli Enterococchi vennero anche indicati come Streptococchi del gruppo D in base al sistema di classificazione sierologica di Lancefield (Lancefield, 1933): lo studio, basato sull’analisi di 106 ceppi di *S. haemolyticus* provenienti da una grande varietà di fonti, differenziava i microrganismi in cinque gruppi, indicati con le lettere A, B, C, D ed E, sulla base di test sierologici che identificavano le varie tipologie di antigene polisaccaridico C della parete batterica. Con l’aiuto delle moderne tecnologie, il numero dei gruppi sierologici è costantemente aumentato fino a 18, raggiungendo la lettera W. Al gruppo D, appartengono anche *Streptococcus bovis*, *Streptococcus alactolyticus* e *Streptococcus equinus*.

Nel 1984, per mezzo di nuove tecniche genetiche, quali la tecnica del DNA-DNA hybridization e DNA-rRNA hybridization, Schleifer e Kilpper-Bälz proposero il trasferimento delle specie *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium* nel genere

*Enterococcus* (Schleifer and Kilpper-Bälz, 1984) e suddivisero il genere *Streptococcus* in *Streptococcus in sensu stricto*, *Lactococcus* e *Enterococcus* (Stiles and Holzapfel, 1997).

La tassonomia odierna raccoglie 45 specie nel genere *Enterococcus*, appartenente alla famiglia delle *Enterococcaceae*, ordine *Lactobacillales*, classe *Bacilli*, phylum *Firmicutes*.

Nel 1998, a seguito del sequenziamento della subunità 16S dell'rRNA, Monstein ha proposto di suddividere le specie di *Enterococcus* in gruppi omogenei, in base alle analogie riscontrate nella sequenza nucleica (Monstein et al., 1998):

- Il gruppo *E. avium*, che comprende: *E. avium*, *E. devriesei*, *E. gilvus*, *E. hermannienseis*, *E. malodoratus*, *E. pallens*, *E. pseudoavium* e *E. raffinosus*;
- Il gruppo *E. cecorum*: *E. cecorum* e *E. columbae* ;
- Il gruppo *E. dispar*: *E. asini*, *E. canintestini* e *E. dispar*;
- Il gruppo *E. faecalis*: *E. caccae*, *E. faecalis*, *E. haemoperoxidus*, *E. moravienseis*, *E. silesiacus* e *E. termitis*;
- Il gruppo *E. faecium*: *E. canis*, *E. durans*, *E. faecium*, *E. hiraes*, *E. mundtii*, *E. phoeniculicola*, *E. ratti*, *E. thailandicus* e *E. villorum*;
- Il gruppo *E. gallinarum*: *E. casseliflavus* e *E. galinarum*;
- Il gruppo *E. saccharolyticus*: *E. aquimarinus*, *E. camelliae*, *E. italicus*, *E. saccharolyticus* e *E. sulfureus*.

Alcune specie del genere *Enterococcus* sono state riclassificate: *E. porcinius* è stato rinominato *E. villorum* (De Graef e Devriese, 2003), mentre *E. saccharominimus* è stato classificato come *E. italicus* (Naser et al., 2005).

Di tutte le specie conosciute, 10 sono state isolate dall'uomo: *E. avium*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*, *E. hiraes*, *E. mundtii* ed *E. raffinosus*. Di queste le maggiori per importanza sono *E. faecalis* ed *E. faecium* (Almeida et al., 2011; Aguilar-Galvez et al., 2012).

In seguito a colorazione di Gram, gli enterococchi appaiono al microscopio come batteri Gram-positivi di forma coccoide, con diametro di circa 1 µm, disposti singolarmente, a coppie o in corte catenelle. La parete cellulare risulta costituita da acidi grassi saturi o monoinsaturi a lunga catena, sono acapsulati, non formano endospore e sono aerobi-anaerobi facoltativi e generalmente sono immobili (Murray, 1990).

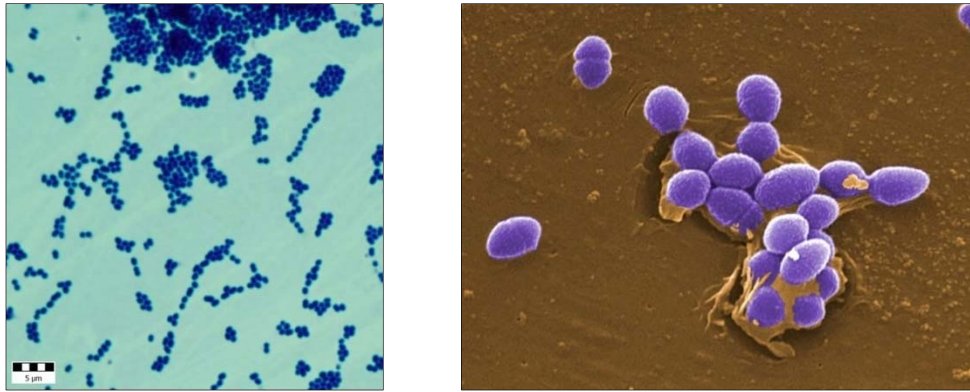


Fig. 1.6. *Enterococcus faecalis*: colorazione di Gram e immagine al microscopio elettronico (SEM) (<http://www.bacteriainphotos.com>).

Gli enterococchi crescono in un range di temperatura compreso tra 10°C e 45°C, con un *optimum* di 35°C, ma mostrano resistenza alla temperatura di 60°C per 30 minuti, caratteristica utile per la loro identificazione (Sherman, 1937a). Probabilmente la resistenza alle alte temperature è legata sia alla composizione in acidi grassi della membrana cellulare, sia alla fase di crescita: durante la fase stazionaria le cellule risultano essere molto più resistenti al calore, come dimostrato nello studio effettuato da Martínez e coll. nel 2003, in cui è stata analizzata la correlazione tra la resistenza alle alte temperature e la crescita di *E. faecium*, ai fini della pastorizzazione (Martínez et al., 2003).

I valori di pH a cui un enterococco è capace di crescere e riprodursi vanno tra un minimo di 4,6 ed un massimo di 9,9, con un *optimum* di 7,5 (Rosso et al., 1995; Van den Berghe et al., 2006). La resistenza alle condizioni basiche è data dalla capacità della membrana di essere impermeabile agli acidi ed agli alcali, probabilmente grazie all'azione dell' $H^+$ ATPasi (Fisher and Phillips, 2009; Nakajo et al., 2005).

Gli enterococchi risultano essere resistenti ad elevate concentrazioni di sale, infatti la capacità di crescere in terreni che presentano una concentrazione di NaCl del 6.5%, a 10°C ed a pH 9,6 può essere utilizzata per distinguere gli enterococchi all'interno del gruppo D degli Streptococchi (Schleifer and Kilpper-Bälz, 1984). Bisogna comunque tenere presente che le specie appartenenti ai gruppi *E. cecorum* e *E. avium* spesso non crescono o si sviluppano poco e lentamente in soluzioni al 6.5% di cloruro di sodio (Devriese, 1993).

Data la loro origine enterica, gli enterococchi sono tolleranti ai sali biliari, fino a concentrazioni del 40% (Sherman, 1937b; Manero and Blanch, 1999).

Dal punto di vista biochimico, *Enterococcus* è ossidasi negativo e catalasi negativo, non contenendo citocromi, anche se specie come *Enterococcus haemoperoxidus* presentano delle pseudocatalasi (Schleifer e Kilpper-Bälz, 1984; Bascomb and Mammad, 1998). Inoltre, sono organismi chemoorganotrofi con metabolismo di tipo omofermentativo: producono acido lattico in forma L (Bascomb and Mammad, 1998) come principale metabolita della fermentazione del glucosio, e in quantità minore acetato ed etanolo. I prodotti del loro metabolismo possono comunque variare in base alle condizioni ambientali in cui si trovano: in presenza di ossigeno vengono sintetizzati acetato e anidride carbonica, mentre in condizioni di anaerobiosi viene prodotto acido lattico (Aguilar-Galvez et al., 2012).

Generalmente sono  $\alpha$  o  $\gamma$  emolitici. La caratteristica di produrre emolisina, da sola, non può essere utilizzata per identificare la specie in quanto è legata al plasmide pAD1 e pertanto può essere trasferita per coniugazione (Ike et al., 1987). La  $\beta$  emolisi può essere osservata su Agar sangue umano o di cavallo ed è prodotta dall'azione delle citolisine (Schleifer and Kilpper-Bälz, 1984 ; Fisher and Phillips, 2009; Bascomb and Mammad, 1998), per questo motivo per consentire la rilevazione di reazioni emolitiche viene fatto ricorso all'agar contenente sangue di montone (Mundy et al., 2000).

Alcuni test hanno messo in evidenza la capacità di diversi ceppi di idrolizzare l'esculina in presenza del 40% di sali biliari; questo è reso possibile grazie alla presenza dell'enzima beta-D-glucosidasi, che scinde l'esculina in esculetina e destrosio (Sherman, 1937b; Manero and Blanch, 1999). Un'altra importante caratteristica che può essere sfruttata per l'identificazione di specie è data dalla capacità di idrolizzare pirrolidonil- $\beta$ -naftilamide (PYR) e leucina- $\beta$ -naftilamide (LAP) (Manero and Blanch, 1999). La produzione di acetone a seguito della fermentazione del ribosio è una caratteristica discriminante tra *Enterococcus* e *Streptococcus*, e prende il nome di test di Voges-Proskauer (Aguilar-Galvez et al., 2012).

Gli enterococchi sono quindi dei microrganismi molto esigenti, che per la crescita in vitro necessitano di specifici terreni di coltura contenenti vitamine e aminoacidi (Domig et al., 2003). Su terreni di coltura come Trypticase/Tryptone soy agar, le colonie appaiono di piccole dimensioni, tonde e bianche, anche se talvolta presentano una pigmentazione gialla, come nel caso di *E. casseliflavus*, *E. flavescens*, *E. mundtii* e *E. sulfureus* (Bascomb and Mammad, 1998; Aguilar-Galvez et al., 2012).



### **1.8.1 Ecologia di *Enterococcus* spp.**

Gli enterococchi sono largamente diffusi nell'ambiente: il loro habitat naturale è rappresentato dal tratto gastrointestinale di uomini e animali ma, grazie alla loro capacità di crescere e sopravvivere in condizioni sfavorevoli, possono essere isolati a partire da diverse matrici ambientali quali acque superficiali, suolo, piante e da tutti quegli ambienti a possibile contaminazione fecale (Stiles and Holzapfel, 1997; Klein, 2003). Alcuni studi hanno messo in evidenza come possa essere variabile la distribuzione delle varie specie di *Enterococcus* in organismi diversi (Klein, 2003). Nell'intestino umano, per esempio, *E. faecium* ed *E. faecalis* sono considerati i più rappresentati: dalle analisi di feci umane, *E. faecalis* è stato riscontrato in concentrazione di  $10^5$ - $10^7$  CFU/g, mentre *E. faecium* in concentrazioni di  $10^4$ - $10^5$  CFU/g (Noble, 1978); nelle feci dei neonati è stato isolato *E. faecalis*, ma non *E. faecium* (Noble, 1978). *E. faecium* è presente prevalentemente nell'apparato digerente di avicoli, ovini e suini, seguito da *E. faecalis* e *E. cecorum* e, con frequenza minore, *E. gallinarum*, *E. durans/hirae* e *E. avium*. Nei vegetali è più frequente l'isolamento di *E. mundtii*, *E. casseliflavus* ed *E. sulfureus* (Klein, 2003).

La capacità degli enterococchi di sopravvivere nell'ambiente in condizioni variabili di temperature e pH li rende ottimi bioindicatori di contaminazione fecale di alimenti e acque. Per molto tempo, l'elevata concentrazione di enterococchi in prodotti alimentari è stata correlata al mancato impiego di norme igienico-sanitarie da parte dei produttori durante le diverse fasi di lavorazione e trasformazione, ma in realtà bisogna tenere presente che alcuni alimenti contengono gli enterococchi come naturale microflora (Franz et al., 1999a). La loro presenza negli alimenti può essere inoltre causata da numerosi tipi di contaminazione, come quella ambientale, che può avvenire attraverso liquami contaminati e deiezioni di animali (conosciuti come serbatoi naturali del genere *Enterococcus*).

### **1.8.2 Enterococchi negli alimenti**

I microrganismi appartenenti al gruppo dei LAB sono numerosi e di generi diversi, ma hanno in comune le caratteristiche morfologiche e la capacità di resistere ad alcuni specifici trattamenti, quali la pastorizzazione e il congelamento (Barile et al., 2013). L'imponente carattere adattativo ambientale degli enterococchi ha permesso loro di essere utilizzati per la conservazione di alimenti crudi, come carne o latte, e di prodotti sottoposti a trattamenti termici. Non solo questa caratteristica ha portato a un

incremento del loro impiego nell'industria agro-alimentare, ma anche la loro tendenza a mantenere le normali proprietà nutritive e chimico-fisiche di alimenti in fase di produzione e la loro potenzialità di minimizzare le contaminazioni durante i processi produttivi e manipolativi che portano alla realizzazione del prodotto finito. In conseguenza di ciò, gli enterococchi sono diventati parte integrante della microflora di alimenti fermentati come formaggi (Giraffa, 2003), salsicce (Hugas et al., 2003) e olive (Franz et al., 1999a) e inoltre sono stati impiegati come probiotici, ovvero coadiuvanti al mantenimento o al ripristino della normale flora intestinale.

Negli ultimi anni sono aumentati gli studi relativi all'utilizzo di enterococchi come colture starter per processi fermentativi e maturativi di formaggi *in primis*, ma anche di carni e vegetali, e ciò non è risultato sempre semplice a causa dell'ampio rischio che tali batteri possono rappresentare per la salute umana (Sousa et al., 2001; Foulquié Moreno et al., 2006). L'azione che gli enterococchi svolgono su tali alimenti è quella di conferire aromi e sapori tipici, che non fanno altro che esaltare le proprietà organolettiche dello stesso, tramite processi di lipolisi, proteolisi e degradazione del citrato (Foulquie Moreno et al., 2006).

### **La lipolisi**

La lipolisi è un processo metabolico che determina la degradazione dei trigliceridi, consentendo la formazione e la liberazione di acidi grassi, i quali, specie se a catena corta, possono essere trasformati in composti aromatici come lattoni e metilchetoni. Inoltre, l'ossidazione a cui sono sottoposti gli acidi grassi determina la produzione di alcune aldeidi insature. Tutti questi composti contribuiscono a dare consistenza e aroma ad alcuni alimenti, in particolar modo ai formaggi.

Nonostante i LAB siano ritenuti batteri con debole attività lipolitica, molti di essi sono utilizzati nella produzione di latticini in funzione di starter, come per esempio *Lactococcus* e *Lactobacillus*, mentre altri ceppi, come *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* e *Micrococcus*, sono capaci di resistere a trattamenti termici come la pastorizzazione e sono co-responsabili dell'idrolisi dei grassi (Foulquie Moreno et al., 2006; Sarantinopoulos et al., 2001).

### **Metabolismo del citrato**

Una delle funzioni del citrato è quella di fungere da additivo per molte materie prime usate per la produzione di alimenti fermentati, ma anche per mantenere l'integrità organolettica di frutta, vegetali e prodotti lattiero-caseari. La degradazione del citrato

genera anidride carbonica e crea dei composti tra cui acetaldeide, acetoino, 2,3-butandiolo e diacetile, i quali influiscono sulla qualità degli alimenti fermentati (Foulquie Moreno et al., 2006).

### **Proteolisi**

Lo specifico aroma e la consistenza caratteristiche di ciascuna qualità di formaggio derivano dalla degradazione della caseina, a cui si aggiunge l'azione proteolitica di peptidi associati alla parete cellulare di batteri lattici quali *Lactococcus* e *Lactobacillus* (Sousa et al., 2001). L'attività proteolitica è ceppo e tempo dipendente, infatti aumenta vistosamente con l'aumentare del periodo di incubazione (Pritchard and Coolbear, 1993; Arizcun et al., 1997).

Oltre che come colture starter, i LAB possono essere utilizzati in campo alimentare come bioconservanti, in quanto sono capaci di protrarre la shelf-life dei cibi, riducendo la crescita e la sopravvivenza di microrganismi patogeni. Svolgono azioni antimicrobiche contro numerosi patogeni di origine alimentare, fra cui *Bacillus subtilis*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (Yanagida et al., 2005) e le loro capacità conservative sono dovute in gran parte all'attitudine di produrre acido lattico, perossido di idrogeno, diacetile, batteriocine e altri metaboliti, ciascuno dei quali, con un proprio specifico meccanismo, inibisce o riduce l'insorgenza di patogeni. L'acido acetico e l'acido lattico, prodotti dalle fermentazioni del glucosio, hanno una forte attività antimicrobica poiché causano un abbassamento del pH, contrastando l'insorgenza e la moltiplicazione batterica, mentre il perossido di idrogeno, essendo un composto instabile termodinamicamente, va a danneggiare e poi distruggere l'attività enzimatica batterica, compromettendo l'attività della cellula patogena (Çadirci and Çitak, 2005). L'attività battericida è da ricondursi all'azione dei radicali liberi, che sono responsabili della perossidazione lipidica e della conseguente alterazione della membrana cellulare.

#### **1.8.2.1 Enterococchi in prodotti carnei**

I processi di macellazione delle carni possono portare con grande facilità a fenomeni di contaminazione da parte degli enterococchi, sia per contatto diretto delle stesse con il materiale fecale presente nell'intestino, sia per contaminazione indiretta tramite gli strumenti di macellazione che sono venuti a contatto con il materiale intestinale. Nelle

analisi su carne cruda di maiale e manzo è stata evidenziata la predominanza di *E. faecalis* (Franz et al., 1999a). Gli enterococchi vengono riscontrati anche sulla carne processata, non solo a causa di eventuali contaminazioni crociate, ma anche perché essendo maggiormente termotolleranti di altre specie batteriche asporigene, riescono a sopravvivere e colonizzare tagli di carne sottoposti a processi termici durante le fasi di produzione (Franz et al., 1999a; Foulquié Moreno et al., 2006). I blandi trattamenti di calore a cui sono sottoposti i prodotti carnei durante la lavorazione spesso costituiscono un metodo di selezione batterica, in quanto determinano la sopravvivenza dei ceppi batterici più resistenti e tra questi gli enterococchi sono i maggiori rappresentanti.

Ovviamente, la resistenza alle temperature dipende sia dalla fibra della carne che dalla composizione del prodotto stesso, ad esempio gli enterococchi accrescono la loro termoresistenza sfruttando sali e nitriti che vengono comunemente impiegati nelle industrie alimentari (Franz et al., 1999a).

Relativamente alle possibili applicazioni degli enterococchi nelle carni, è da sottolineare la loro capacità di ridurre la metamioglobina, con conseguente prolungamento della colorazione rossa della carne fresca. Questa caratteristica potrebbe essere sfruttata per sostituire l'uso dei nitrati (Hugas et al., 2003), che si è dimostrato essere potenzialmente cancerogeno.

### **1.8.2.2 Enterococchi nei latticini**

Gli enterococchi possono contaminare il latte sia direttamente, attraverso le feci animali, che indirettamente, attraverso fonti d'acqua contaminate e strumenti per la mungitura o lo stoccaggio. Nella produzione industriale di formaggi freschi, realizzati con latte pastorizzato e starter selezionati, la presenza di alti livelli di contaminazione da enterococchi è da considerarsi come risultato della non osservanza di norme igieniche. Per contro, studi condotti su formaggi tradizionali di Italia, Spagna, Grecia e Portogallo (Franz et al., 1999a; Giraffa, 2003), prodotti con latte crudo o pastorizzato di capra, pecora, bufala e mucca, hanno dimostrato che gli enterococchi, assieme ad altri batteri lattici, svolgono un importante ruolo per il processo produttivo degli stessi. Inoltre, alcuni ricercatori hanno evidenziato che ceppi appartenenti alla stessa specie, isolati dal latte, risultano diversi da quelli presenti nelle feci, mettendo quindi in dubbio la fonte di contaminazione fecale (Gelsomino et al., 2002). Quindi, se si esclude che la fonte di contaminazione siano le feci degli animali stessi, l'origine degli *Enterococcus* nel latte crudo non è certa, anche se recentemente alcuni ricercatori (Kagkli et al., 2007) hanno

indicato l'ambiente di mungitura, le attrezzature ed il personale come principale fonte di contaminazione. Le attività legate alla mungitura del latte costituiscono la principale fonte di contaminazione del latte di capra crudo (Foschino et al., 2002) e del latte di vacca crudo (Michel et al., 2001; Polentarutti et al., 2001; Bonfoh et al., 2003; Delbès et al., 2007).

Le colture starter per la produzione dei formaggi vengono selezionate mediante pastorizzazione di latte crudo, il quale viene incubato a 42-44°C per un tempo di 12-15h al fine di selezionare microrganismi termofili come *Streptococcus thermophilus* ed *Enterococcus* spp. (De Vuyst et al., 2003). Questi microrganismi possono essere riscontrati nei formaggi prodotti con latte sia crudo che pastorizzato e la loro concentrazione dipende dalla presenza di latte ancora contaminato dopo la pastorizzazione, dal tipo di formaggio, dalla coltura starter impiegata, dalle tecniche utilizzate e dal tipo di stagionatura; la resistenza alla stagionatura scaturisce dalla tolleranza degli enterococchi nei confronti di elevate temperature, pH acidi e concentrazioni saline. La concentrazione di enterococchi riscontrata nel latte cagliato di diversi formaggi varia tra  $10^4$  e  $10^6$  CFU/g, mentre al termine della stagionatura la concentrazione varia tra  $10^5$  e  $10^7$  CFU/g, con prevalenza di *E. faecalis* e *E. faecium* (Manolopoulou et al., 2003; Franz et al., 1999a; Giraffa, 2003).

### **1.8.2.3 Enterococchi nei prodotti vegetali**

Così come nei prodotti carnei e lattiero-caseari, la presenza di enterococchi è rilevante anche su prodotti vegetali e olive (Aguilar-Galvez et al., 2012; Franz et al., 1999a). L'origine della presenza degli enterococchi sui vegetali può essere endogena o può derivare da una contaminazione ambientale, ma ad oggi la documentazione sull'isolamento e la caratterizzazione di enterococchi da questa categoria di alimenti è limitata. Studi recenti hanno evidenziato la presenza di *E. faecium* in olive prodotte in Spagna e ne hanno mostrato la resistenza a valori di pH pari a 9 ed alle concentrazioni di sale utilizzate per la loro preparazione (Omar et al., 2004). In uno studio italiano, di Randazzo e collaboratori, sono stati isolati un numero totale di 52 LAB da olive verdi fermentate, provenienti da diverse aree della Sicilia; anche se la maggior parte di questi microrganismi è stata ascritta al genere *Lactobacillus*, quattro sono stati identificati come appartenenti al genere *Enterococcus*, sulla base di indagini biochimiche e fenotipiche, e nello specifico appartenevano alle specie *E. faecium*, *E. casseliflavus* e *E. hirae* (Randazzo et al., 2004).

In Paesi come la Cina o l’Africa, *E. faecium* e *E. faecalis* sono coinvolti nei processi di fermentazione del sorgo e della soia (Aguilar-Galvez et al., 2012). Al giorno d’oggi il consumo di alimenti sottoposti a minimi trattamenti chimici e fisici, provenienti anche da Paesi con bassi livelli di sorveglianza sanitaria, sta aumentando, con un conseguente rischio per la salute in caso di assunzione di cibi contaminati (Foulquié Moreno et al., 2006). L’utilizzo di LAB produttori di batteriocine o batteriocine purificate, potrebbe divenire un valido aiuto per migliorare la sicurezza di tali generi di consumo e garantire loro la conservazione delle qualità organolettiche specifiche.

### **1.8.3 Enterococchi come probiotici**

La normale flora intestinale è costituita da un elevato numero di specie batteriche, aerobie e non, che rappresentano una barriera di resistenza nei confronti di numerosi patogeni e contribuiscono alla salute dell’individuo. I probiotici, secondo definizione riportata da FAO e OMS, sono “organismi vivi che, somministrati in quantità adeguata, apportano un beneficio alla salute dell’ospite” (FAO/WHO, 2001). Un probiotico deve rispettare e garantire alcune peculiarità, fra cui fissarsi alle cellule ed impedire l’adesione di quelle nocive, non essere tossico né patogeno, essere capace di replicarsi e persistere nel tempo anche in ambienti a pH acido, essere sicuro e garantire il bilanciamento della flora microbica. I principali ceppi utilizzati come probiotici per l’uomo hanno origine gastro-intestinale ed appartengono al genere *Lactobacillus* (*Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* e *Lb. reuteri*) e *Bifidobacterium* (*B. lactis*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis* e *B. animalis*). Altri microrganismi utilizzati in qualità di probiotici sono: *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. thermophilus*, *L. lactis subsp. lactis*, *Leuconostoc mesenteriodes*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Pediococcus acidilactici*, *Sporolactobacillus inulinus*, *E. coli*, *Bacillus cereus* ed il lievito *Saccharomyces cerevisiae* (Aguilar-Galvez et al., 2012; Franz et al., 1999a). *E. faecalis* trova inoltre applicazione come integratore alimentare nei mangimi degli animali da allevamento (Franz et al., 1999a). L’impiego di enterococchi come probiotici è potenzialmente possibile in quanto appartengono al gruppo dei batteri lattici e sono parte integrante della flora intestinale dell’uomo e degli animali a sangue caldo.

La somministrazione dei probiotici, siano essi provenienti da colture di microrganismi di una singola specie o miscele di specie diverse, viene effettuata in tre modi: tramite latticini fermentati, come lo yogurt, e prodotti non fermentati, tramite preparazioni farmaceutiche e tramite alimenti per l’infanzia (Aguilar-Galvez et al., 2012; Franz et al.,

1999a). La resistenza all'ambiente gastrico e agli acidi biliari consente loro di raggiungere integri e vitali l'intestino, in cui si stabiliscono, apportando all'ospite diversi vantaggi:

- miglioramento della sintomatologia correlata all'intolleranza al lattosio;
- rafforzamento delle difese immunitarie;
- bilanciamento della flora microbica;
- riduzione degli enzimi correlati con la carcinogenesi;
- trattamento dei disturbi gastroenterici correlati a trattamenti antibiotici o a viaggi (Foulquié Moreno et al., 2006);
- trattamento di coliti indotte da *Clostridium difficile* e da rotavirus e di ulcere gastriche provocate da *Helicobacter pylori*;
- riduzione del colesterolo nel sangue, anche se vi sono dati discordanti (Aguilar-Galvez et al., 2012);
- antagonismo nei confronti dei patogeni di origine alimentare.

In particolare, per quanto concerne il genere *Enterococcus*, uno studio in vitro ha dimostrato che il ceppo *E. faecium* 18C23 inibisce, nei suini, l'adesione alla mucosa intestinale da parte di *E. coli* enterotossigenico K88 in maniera dose dipendente, esercitando un antagonismo non competitivo sui recettori glicoproteici mucosali (Jin et al., 2000).

Diversi studi hanno riguardato il ceppo *E. faecium* SF68. In Svizzera, è risultato essere efficace nella prevenzione della diarrea associata alla terapia antibiotica in pazienti pediatrici e adulti (Franz et al., 1999b; Aguilar-Galvez et al., 2012) e ha mostrato in vitro un'attività inibente la crescita di *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Enterobacter* spp. (Franz et al., 1999b). In Belgio, è stato testato come alternativa al trattamento antibiotico di enteriti, in adulti e bambini, mostrando una riduzione del tempo necessario alla risoluzione. In Danimarca, è stato commercializzato per diverso tempo associato ad un latte fermentato con effetto ipocolesterolizzante, anche se a lungo termine questa azione non è stata dimostrata. Nel 2000, questo stesso prodotto fermentato è stato testato in associazione al trattamento con vancomicina e da questa analisi è stato concluso che non si verifica l'acquisizione di resistenza all'antibiotico in questione da parte di *E. faecium* SF68 (Renye et al., 2009).

Il ceppo *E. faecium* CRL 183 ha mostrato in vitro, in associazione con *Lactobacillus jugurti*, un'attività ipocolesterolizzante ed è stato utilizzato per la produzione di un probiotico a base di latte di soia (Pingitore et al., 2012).

Il ceppo *E. faecium* PR88 ha mostrato effetti positivi nel trattamento della sintomatologia della sindrome del colon irritabile (Gardiner et al., 1999). Nel 1999, Gardiner e collaboratori hanno testato gli effetti di questo stesso ceppo di *Enterococcus faecium* come starter nella produzione del formaggio cheddar, concludendo che il microrganismo contribuisce alle proprietà organolettiche, riduce i tempi di produzione e potrebbe essere assunto in qualità di probiotico proprio attraverso il formaggio (Deibel and Silliker, 1963).

I probiotici svolgono inoltre il ruolo di adiuvanti nei confronti di vaccini e sembrano poter contribuire al controllo della pressione sanguigna grazie all'azione di due tripeptidi nei confronti dell'angiotensina, che viene inibita determinando una diminuzione pressoria (Heikens et al., 2011). Infine viene loro attribuita una azione inibente nei confronti di quei batteri responsabili di alitosi e della formazione di carie dentale.

Infine, ha suscitato particolare attenzione l'impiego di preparazioni probiotiche in aggiunta ai mangimi degli animali, per prevenire e curare le enteriti, o come promotori della crescita, in quanto potrebbe costituire una valida alternativa agli antibiotici al fine di prevenire il fenomeno delle antibiotico-resistenze (Franz et al., 1999a).

#### **1.8.4 Patogenicità**

A partire dagli anni '20 molti casi di tossinfezione alimentare sono stati correlati alla presenza di enterococchi negli alimenti. La sintomatologia però è sempre risultata molto vaga e la riproducibilità della patologia in volontari e animali non sempre attendibile. Sulla base di queste osservazioni, e alla luce della presa di coscienza che gli enterococchi sono microrganismi normalmente presenti in alcune tipologie di alimenti, nel 1962 Deibel e Silliker hanno condotto studi sperimentali su volontari al fine di stabilire una correlazione diretta tra gli enterococchi e le tossinfezioni, giungendo alla conclusione che non è possibile dimostrare una correlazione diretta (Ogier and Serror, 2008) e che l'insorgenza della malattia è invece molto spesso legata ad una condizione patologica pre-esistente di immunodeficienza (Sabia et al., 2007).

Gli enterococchi sono commensali intestinali dell'uomo e vivono in equilibrio con la flora microbica dell'ospite, tuttavia, in particolari casi dipendenti dalle condizioni



dell'ospite o dalle caratteristiche del microrganismo, questa stabilità può andare incontro ad alterazioni, causando nell'uomo infezioni opportunistiche di varia gravità.

I casi in cui si riscontra un'aumentata suscettibilità dell'ospite sono da ricondurre a scenari ospedalieri: questo fa del genere *Enterococcus* un importante patogeno nosocomiale e la sua diffusione in questo ambito non è legata tanto ai fattori di virulenza del microrganismo, quanto alla sua spiccata abilità nell'acquisire e sviluppare nuovi determinanti di resistenza agli antibiotici (Cambiotti et al., 2012). Infatti, al fenomeno dell'antibiotico-resistenza (ARE) è legato il grande incremento di casi di sepsi enterococciche nosocomiali degli ultimi 20 anni e di molti casi di morte seguite ad esse (Heikens et al., 2011). I soggetti a rischio sono rappresentati da donne in gravidanza, anziani, trapiantati, neonati, grandi ustionati, politraumatizzati ed in generale da tutti quegli individui affetti da un deficit del sistema immunitario (Sabia et al., 2007). In questi individui l'infezione da enterococco può essere facilitata da pratiche invasive, quali interventi chirurgici, inserimento di cateteri vascolari o urinari e le infezioni nosocomiali causate possono essere rappresentate da sepsi, batteremie spesso associate a endocarditi (5-10% dei casi di endocardite sono causate dal genere *Enterococcus*), infezioni del tratto urinario, ascessi addominali, peritoniti ed infezioni del sistema nervoso centrale (Franz et al., 1999a; Sabia et al., 2007). Sono stati osservati anche casi di infezioni nei neonati contratte durante il passaggio nel canale del parto, dato che il 25% delle donne sane presenta il genere *Enterococcus* nella microflora vaginale (Franz et al., 1999a).

Le specie più coinvolte sono *E. faecalis*, responsabile dell'80-90% dei casi, ed *E. faecium* che, sebbene figura nel 5-10%, è più difficile da curare a causa della maggiore capacità di acquisire antibiotico-resistenza. In rare circostanze sono stati isolati anche *E. durans*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus*, *E. hirae* e *E. mundtii* (Aguilar-Galvez et al., 2012).

### **1.8.5 Antibiotico-resistenza**

Per antibiotico-resistenza si intende la capacità di alcune specie batteriche di sopravvivere e moltiplicarsi in presenza di concentrazioni di antibiotico tali da inibire o uccidere microrganismi appartenenti alla stessa specie (Zacharof et al., 2012). Questo fenomeno è proprio di molti microrganismi e sta aumentando progressivamente in tutte le specie batteriche, enterococchi inclusi, tanto da rendere le infezioni enterococciche il terzo tipo di patologie nosocomiali per importanza.

Le resistenze degli enterococchi agli antibiotici possono essere di due tipi:

- *intrinseca*, quindi interna al genoma, come per la vancomicina, le cefalosporine, i  $\beta$ -lattamici, la sulfonammide, la clindamicina e gli aminoglicosidi;
- *acquisita*, la cui informazione è codificata all'interno di trasposoni e pertanto risulta essere trasferibile. Ne sono esempio la resistenza all'ampicillina (specialmente in *E. faecium*), alle tetraciline, ai macrolidi, ad alti livelli di amminoglicosidi, al cloramfenicolo, ai chinoloni e ai glicopeptidi come la vancomicina (Franz et al., 1999b).

Un problema crescente è costituito dall'aumento della diffusione di enterococchi vancomicina-resistenti (VRE, vancomycin-resistant enterococci). Questa molecola è stata isolata nella metà del secolo scorso da *Streptomyces orientalis* ed è stata somministrata inizialmente come antibiotico di prima scelta nelle infezioni da batteri Gram-positivi, e in particolar modo in quelle da enterococchi resistenti ad altri antibiotici. È un antibiotico appartenente alla classe dei glicopeptidi ad alto peso molecolare e agisce legandosi al dipeptide Ala-Ala, localizzato nella parte terminale del peptidoglicano, e provocando una variazione conformazionale che determina la compromissione di meccanismi enzimatici e la conseguente distruzione della parete dei batteri Gram-positivi. Non esplica invece alcun effetto sui batteri Gram-negativi, in quanto le grosse dimensioni non permettono l'attraversamento della membrana esterna (Cetinkaya et al., 2000).

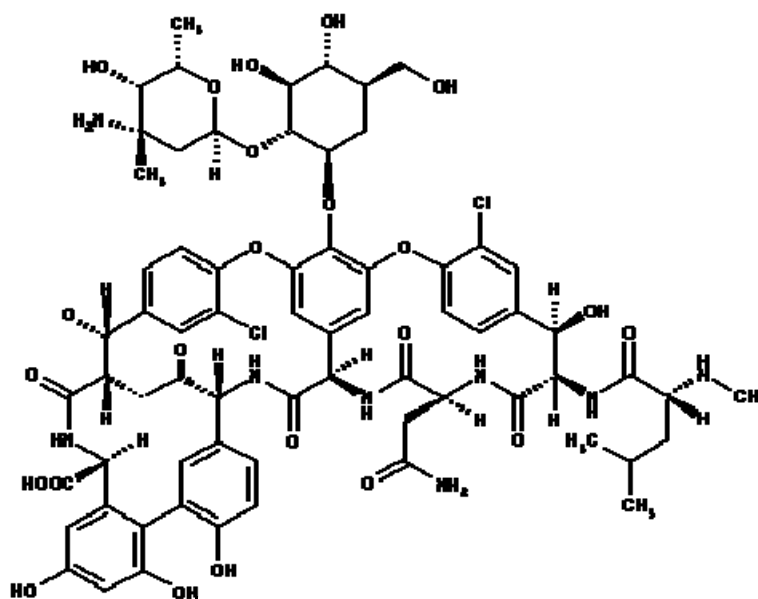


Fig.1.7. Struttura chimica della molecola vancomicina.

I cluster genici coinvolti vengono indicati mediante le sigle: *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* e *vanG*. *VanA* e *VanB* presentano una maggiore rilevanza clinica e sono stati riscontrati frequentemente in *E. faecalis* e *E. faecium*. L'operone *VanA* induce resistenza sia ad alti livelli di vancomicina che di teicoplanina, è locato all'interno del trasposone Tn1546 e dunque può essere trasferito tramite coniugazione (Fisher and Phillips, 2009; Rathnayake et al., 2012). *VanB* è responsabile della resistenza a varie concentrazioni di vancomicina e può essere trasferito mediante i trasposoni Tn1547 o Tn5382. *VanC* genera una resistenza costitutiva a bassi livelli di vancomicina ed è frequentemente riscontrabile in *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. flavescens*. *VanD* è situato sul cromosoma e dunque non è trasferibile. *VanE* e *VanG* generano bassi livelli di resistenza alla vancomicina ed evidenziano elevata sensibilità alla teicoplanina (Fisher and Phillips, 2009; Cetinkaya et al., 2000).

Lo studio di Rathnayake e collaboratori (2012) ha messo in evidenza la distribuzione delle resistenze tra ambiente nosocomiale e ambiente acquatico naturale, evidenziando che gli enterococchi isolati dall'acqua non sono resistenti a vancomicina, ciprofloxacina e ampicillina, ma sono resistenti alla tetraciclina (14,5%) e alla gentamicina (49,1%). Al contrario, i ceppi di *E. faecium* isolati in ospedale mostrano resistenza a gentamicina (77,9%), tetraciclina (72,9%), ciprofloxacina (25,4%), ampicillina (5,1%) e vancomicina (3,4%). In ambiente nosocomiale risulta essere più frequente anche la multiresistenza, come accade per il 71,2% di *E. faecalis* ed il 70,3% di *E. faecium*, in contrapposizione ai ceppi di origine naturale (5,7% degli isolati di *E. faecium*).

Per sopperire all'incremento del fenomeno di antibiotico-resistenza, si ricorre sempre più frequentemente all'impiego di combinazioni antibiotiche: aminoglicosidi e  $\beta$ -lattamici ne sono un esempio, ed il loro sinergismo è giustificato dal fatto che i primi agiscono determinando la formazione di pori nella parete, che facilitano quindi l'ingresso e l'azione del secondo tipo di farmaci.

I primi casi di VRE risalgono alla fine degli anni '80 e da allora il crescente sviluppo di antibiotico-resistenza negli enterococchi ha alzato l'attenzione e la preoccupazione per questo fenomeno, rendendo chiara la necessità di individuare nuove sostanze battericide. Batteri antibiotico-resistenti sono stati isolati non solo dall'uomo, ma anche da animali e in particolar modo da quelli di allevamento, a causa del fatto che fino a qualche anno fa l'impiego di antibiotici era consentito nell'industrie zootecniche non solo a scopo terapeutico ma anche come promotori per la crescita. Non a caso l'aumento

del numero di VRE viene ricondotto proprio all'uso massivo di vancomicina in ambito zootecnico a partire dagli anni '80.

Nel 1997, in Europa è stato vietato l'utilizzo di un glicopeptide prodotto da *Streptomyces candidus*, l'avoparcina, che veniva addizionato ai mangimi come promotore della crescita, e ha contribuito alla selezione dei VRE a causa della stretta somiglianza strutturale esistente con la vancomicina (Klein, 2003; Cetinkaya et al., 2000). La selezione di VRE in animali destinati all'alimentazione umana costituisce un importante problema per la salute, poiché una volta raggiunto l'intestino dell'ospite potrebbero trasferire questa peculiarità alla flora intestinale ed ai patogeni eventualmente presenti (Klein, 2003).

Vista la gravità delle conseguenze portate dagli enterococchi antibiotico-resistenti, la Scientific Committee on Animal Nutrition (SCAN) of the European Commission (European Commission, 2005) ha imposto l'esecuzione di test da sottoporre agli enterococchi destinati all'impiego come probiotici o colture starter, al fine di valutare la trasmissibilità di eventuali resistenze (Klein, 2003).

Da non sottovalutare il fatto che, sebbene in Europa l'impiego di promotori per la crescita sia stato bandito, in paesi extracomunitari il loro impiego è ancora consentito e di conseguenza è possibile che con la carne vengano importati anche i fattori di resistenza, che a loro volta potrebbero essere trasferiti all'uomo mediante la catena alimentare (Cambiotti et al., 2012).

Il Centers for Disease Control and Prevention's National Nosocomial Infections Surveillance System ha riportato un incremento dell'incidenza dei VRE dallo 0,3 al 7,9% in ambito nosocomiale negli anni dal 1989 al 1993 (Klein et al., 1998). In molti casi, i VRE sono risultati essere anche resistenti alle normali terapie per le infezioni da enterococchi, come ad esempio la combinazione di penicillina e aminoglicosidi, contribuendo all'incremento della mortalità e morbosità delle infezioni nosocomiali.

Per la loro caratteristica di patogeni opportunisti non risulta possibile annoverarli, assieme agli altri batteri lattici, nella categoria definita Generally Recognized As Safe (GRAS).

### **1.8.6 Meccanismi di trasferimento genico**

Il fenomeno della resistenza agli antibiotici è strettamente correlato alla capacità degli enterococchi di trasferire materiale genetico, tra cui i geni che codificano per i fattori di virulenza e per l'antibiotico resistenza. I processi di trasferimento coinvolgono plasmidi

e trasposoni, ovvero piccole porzioni di DNA capaci, nel primo caso, di replicarsi autonomamente, nel secondo, di trasferirsi in punti diversi del genoma dello stesso microrganismo.

Negli enterococchi esistono due tipi di plasmidi coniugativi. Il primo tipo, con grandezza di circa 30 kb, è solitamente in grado di replicare in un numero ampio di specie batteriche e può essere trasferito anche a batteri appartenenti a un genere diverso. Per quanto riguarda i plasmidi del secondo tipo, sono feromone-dipendente, ovvero la capacità di essere trasferiti dalla cellula donatrice a quella ricevente viene conferita da un piccolo feromone secreto dalla cellula ricevente; si trovano essenzialmente in *E. faecalis*, sono caratterizzati da un'elevata trasmissibilità a batteri della stessa specie e da una dimensione di circa 45 kb (Clewell, 1990).

I plasmidi feromone-dipendenti più studiati sono il plasmide pAD1, che codifica per la citolisina, il plasmide pCF10, che codifica per la resistenza alla tetraciclina, e il plasmide pPD1, che codifica per la batteriocina 21. Benché i meccanismi molecolari alla base del processo di coniugazione non siano completamente noti, pPD1, pAD1 e pCF10, appaiono regolati da un medesimo meccanismo di trasferimento. La coniugazione ha inizio in risposta alla secrezione di un feromone (cPD1 per pPD1, cAD1 per pAD1 e cF10 per pCF10) altamente specifico da parte di una cellula ricevente priva di plasmidio. Il feromone induce nella cellula donatrice la trascrizione dei geni che codificano per le proteine coinvolte nel processo coniugativo, tra cui la sostanza aggregante, che una volta espressa sulla superficie della cellula donatrice, permette il legame alla cellula ricevente inducendo la formazione di un “canale coniugativo”, che consente il trasferimento del plasmide dalla cellula donatrice a quella ricevente. Dopo il trasferimento, la produzione della sostanza aggregante cessa, portando alla scomparsa di aggregazione cellulare. Il feromone viene internalizzato dalla cellula donatrice per mezzo di una “surface binding protein” e riconosciuto da un recettore intracellulare, che in assenza di feromone svolge il ruolo di regolatore negativo del processo di coniugazione (Nakayama and Suzuki, 1997; Ike and Clewell, 1984; Hedberg et al., 1996).

L'autoinduzione della coniugazione dovuta alla produzione di feromone endogeno da parte delle cellule donatrici è prevenuta grazie a due specifici meccanismi: la produzione di un inibitore codificato a livello plasmidico, e la sintesi di una proteina plasmide-specifica. Grazie a questi meccanismi la coniugazione si verifica solo in presenza di feromone esogeno (Chandler and Dunny, 2004).

È stato infine mostrato che un ceppo di *E. faecalis* che possiede un tipo di plasmide feromone-dipendente rimane sensibile all'acquisizione di altri tipi di plasmidi feromone-dipendenti; questa caratteristica può portare frequentemente alla coesistenza di diversi tipi di plasmidi feromone-dipendenti all'interno di una stessa cellula (Wirth, 1994).

### **1.8.7 Fattori di virulenza**

Per poter mettere in atto un'infezione batterica, un agente eziologico deve essere capace di aderire ai tessuti dell'ospite, penetrarvi e moltiplicarsi, e per fare questo deve possedere particolari caratteristiche, chiamate fattori di virulenza, che determinano l'espressione della sua patogenicità. Fanno parte di questa categoria non solo i prodotti che causano un danno diretto all'incolumità dell'ospite, come le tossine, ma anche i geni di trascrizione che li regolano e tutti i meccanismi atti a garantire la presenza e lo sviluppo del patogeno. La virulenza di un organismo è regolata da specifici geni, presenti nel genoma in specifici loci, a loro volta chiamati "pathogenicity islands (PAI)" (Giridhara et al., 2009).

Nel genere *Enterococcus* sono stati individuati diversi fattori di virulenza, tra i quali si ritiene che i più importanti siano la citolisina, la sostanza aggregante, la gelatinasi e la proteina extracellulare di superficie.

Alcune specie di enterococchi sono in grado di produrre le **citolisine**, o  $\beta$ -emolisine. Si tratta di piccoli peptidi ad attività emolitica, capaci di ledere i tessuti e di avere attività battericida generando pori sulla membrana di altri batteri Gram-positivi. L'analisi della sequenza amminoacidica di una citolisina purificata da *E. faecalis* ha rivelato che appartiene alla classe dei lantibiotici, ossia batteriocine di classe I (Sabia et al., 2007; Poeta et al., 2008). Per la produzione di citolisina è necessario un cluster genico contenente 6 geni, localizzato sul plasmide feromone-dipendente ad alta trasmissibilità pAD1 (Ike et al., 1990). I geni *cyl<sub>L</sub>* e *cyl<sub>LS</sub>* codificano per due subunità, rispettivamente di 68 e 63 amminoacidi, ed è stato dimostrato che solo i ceppi che esprimono e secernono entrambe le subunità risultano emolitici (Booth et al., 1996). La presenza della citolisina è stata riscontrata nel 60% dei ceppi di *E. faecalis* ricavati da campioni clinici e ne è stata ampiamente confermata l'attività battericida e tossica, infatti nell'uomo partecipa all'insorgenza di patologie e complicanze settiche che risultano maggiormente pericolose rispetto a quelle provocate dai medesimi ceppi batterici non provvisti di attività citolitica. In particolare il rischio di morte in caso di batteriemie

causate da ceppi citolitici risulta essere 5 volte superiore rispetto ad una stessa infezione causata da ceppi non citolitici (Huycke et al., 1991).

La **sostanza aggregante (AS)** è una proteina di superficie di natura glicoproteica, codificata da un plasmide feromone-dipendente che, oltre a promuovere la formazione di aggregati durante la coniugazione batterica, è di fondamentale importanza per l'adesione di *Enterococcus* agli epitelii intestinale, urinario, ai macrofagi e ai neutrofili. Sembra essere coinvolta anche nell'internalizzazione di *E. faecalis* negli enterociti (Franz et al., 1999b) e studi riguardanti le endocarditi hanno mostrato sinergia tra citolisina e AS. Fino ad ora l'AS è stata rinvenuta solo in ceppi di *E. faecalis*, tuttavia la sua incidenza nei ceppi provenienti da campioni alimentari sembra essere elevata (Eaton and Gasson, 2001).

Un ulteriore fattore di virulenza osservato in modelli animali (Poeta et al., 2008) è costituito dalla **Gelatinasi**, una zinco-metalloendopeptidasi capace di idrolizzare il collagene, l'emoglobina, la gelatina e altri peptidi bioattivi e che interviene nella produzione del biofilm, importante per la sopravvivenza del microrganismo e la colonizzazione dell'ospite (Franz et al., 1999b). Il gene coinvolto nella sintesi è *gelE*, la cui trascrizione è posta sotto il controllo del sistema di *quorum sensing* (Fisher e Phillips, 2009). Essendo la gelatinasi un fattore di virulenza, la sua presenza viene generalmente riscontrata in campioni clinici, fecali e nosocomiali associati ad *E. faecalis*, mentre non è stata riscontrata alcuna associazione con ceppi di *E. faecium*. In particolare, è stato dimostrato che la gelatinasi prodotta da particolari ceppi di *E. faecalis* contribuisce alla comparsa di endocarditi in modelli animali (Giridhara et al., 2009).

Altra proteina coinvolta nell'adesione ai tessuti è la **proteina extracellulare di superficie** (Enterococcal Surface Protein, Esp), codificata dal gene *esp* e riscontrata più frequentemente in *E. faecalis* che in *E. faecium* (Sabia et al., 2007). La frequenza di espressione del gene *esp* è maggiore in isolati clinici rispetto a isolati commensali e si pensa che questa proteina possa essere coinvolta nell'elusione del sistema immunitario e nella formazione dei biofilm (Jett et al., 1994).

In *E. faecalis* sono state caratterizzate anche altre proteine di superficie chiamate **Ace**, acronimo di "adhesion of collagen from *E. faecalis*"; si tratta di proteine capaci di riconoscere le molecole della matrice ed è stato osservato il loro coinvolgimento nella patogenesi di endocarditi (Fisher e Phillips, 2009).

Infine, la **ialuronidasi** è un enzima che idrolizza l'acido ialuronico, importante costituente della matrice extracellulare delle cellule animali, evocando danni tissutali. Venendo codificata dal gene *hyl*, localizzato sul cromosoma, non risulta trasferibile. Si ritiene che il ruolo di queste proteasi sia quello di fornire nutrienti agli enterococchi per mezzo della degradazione dei tessuti dell'ospite e di contribuire alla formazione di biofilm (Fisher e Phillips, 2009).

## **1.9 *Listeria monocytogenes***

Le batteriocine prodotte dagli enterococchi sono in grado di contrastare lo sviluppo di diversi microrganismi patogeni, e in particolar modo di *Listeria monocytogenes*, tanto che le batteriocine che costituiscono la classe IIa sono state anche denominate batteriocine anti-*Listeria*. La preoccupazione che desta tale patogeno alimentare a livello di Sanità Pubblica, associato al crescente interesse da parte dei consumatori di cibi naturali o poco trattati, ha risvegliato nell'industria alimentare molto interesse nell'utilizzo delle batteriocine come conservanti naturali.

### **1.9.1 Caratteristiche microbiologiche**

Il genere *Listeria* appartiene alla famiglia delle *Listeriaceae*, ordine delle *Bacillales*, e comprende sei specie: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovi*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri*. Di queste, solo *Listeria monocytogenes* e *L. ivanovii* sono considerate patogene per gli animali, mentre per l'uomo è considerata patogena solo la specie *monocytogenes*, assunta solitamente per via alimentare (Jadhav et al., 2012).

*L. monocytogenes* è un bastoncello con dimensioni di 0,4-0,5×0,5-2 µm, Gram-positivo talvolta associato a formare coppie o piccole catene, aerobio o microaerofilo, asporigeno, catalasi positivo. Benché sia non capsulato, risulta essere molto resistente alle condizioni ambientali avverse infatti, mentre in fase attiva di duplicazione è molto sensibile, in fase di crescita stazionaria assume caratteristiche che le rendono in grado di resistere a pH e temperature sfavorevoli. Ha spiccate caratteristiche di termo resistenza, tali da rendere necessari almeno 15 secondi a 72°C per la sua inattivazione, presenta una temperatura ottimale di crescita tra 1°C e 45°C (caratteristica che gli permette di moltiplicarsi in alimenti conservati a temperatura di refrigerazione), con un *optimum* di sviluppo a 30-37°C, cresce a valori di pH compresi tra 4,3 e 9,4 ed è provvisto di flagelli polari che gli conferiscono mobilità. I batteri sono mobili a temperatura



ambiente, ma non a 37°C, e mostrano un caratteristico movimento a capriola, caratteristica differenziale utile per la loro identificazione preliminare. Presenta attività  $\beta$ -emolitica legata ad una tossina citolitica, chiamata listeriolisina O, responsabile della formazione di pori sulle membrane cellulari (Ripio et al., 1996).

Grazie alla capacità di moltiplicarsi in condizioni ambientali sfavorevoli e di assumere caratteristiche sempre maggiori di antibiotico-resistenza, *Listeria monocytogenes* viene inserita tra i patogeni emergenti.

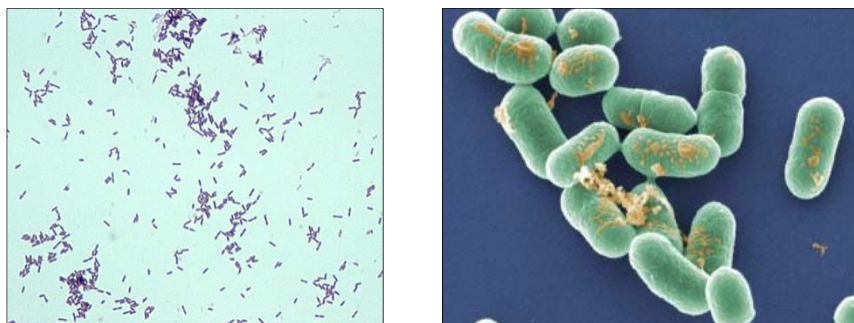


Fig. 1.8. *Listeria monocytogenes*: colorazione di Gram (<http://bacterioweb.univ-fcomte.fr>) e immagine al microscopio elettronicoSEM (<http://www.visualphotos.com>).

## 1.9.2 Ecologia

*Listeria monocytogenes* è un microrganismo ubiquitario: è presente a livello intestinale in animali domestici e selvatici, che ne costituiscono così il serbatoio e veicolo di infezione, e a partire da queste fonti viene dispersa nell'ambiente per mezzo delle feci contaminate, con conseguente contaminazione del suolo e delle acque superficiali che, in maniera diretta o indiretta, possono portare il microrganismo su alimenti ed acque destinati al consumo umano (U.S. Food & Drug Administration 2012).

L'uomo stesso rappresenta un veicolo attivo nella diffusione del batterio, tramite abiti e scarpe contaminate a causa di scarse pratiche igieniche, che permettono al microrganismo di raggiungere con facilità utensili e strumenti di lavoro e da qui diffondersi ulteriormente. Si stima che nel contenuto intestinale di una quota di popolazione umana sana compresa tra il 2 ed il 10% sia presente in maniera asintomatica *Listeria monocytogenes*. La presenza di questo microrganismo può diventare sintomatica ed evolvere in listeriosi nel momento in cui nel portatore si assista ad un calo delle difese immunitarie.

*Listeria monocytogenes* risulta di difficile eradicazione anche a causa della sua capacità di aderire alle superfici formando biofilm.

### 1.9.3 Listeria e alimenti

Gli animali possono infettarsi con *Listeria monocytogenes* nutrendosi di vegetali o acque contaminate e diventare o portatori cronici a livello intestinale o sviluppare l'infezione. Se *Listeria* è presente solo nell'intestino dell'animale, si può verificare una contaminazione secondaria delle carni durante la macellazione; se invece invade l'epitelio gastrointestinale e arriva al torrente ematico, si può avere una contaminazione primaria del latte e della carne. Le matrici alimentari dalle quali può essere isolata listeria sono, quindi, numerose: formaggi a pasta molle o a crosta fiorita, latte non pastorizzato, gelati, patè di carne, hot dog, pollo crudo e carne cruda in genere, verdure, frutta e prodotti ittici (Galdiero et al., 1997; Schlech, 2000; Rocourta et al., 2000).

Le sue caratteristiche di resistenza alle basse temperature, a bassi valori di pH e a concentrazioni di NaCl del 5% la rendono capace di sopravvivere e moltiplicarsi in numerosi alimenti (Galdiero et al., 1997). In particolar modo, sono maggiormente coinvolti gli alimenti definiti "ready to eat", ovvero che non prevedono un ricondizionamento termico prima dell'assunzione (Schlech, 2000), e gli alimenti con elevata shelf-life, dove riesce a moltiplicarsi anche a temperature di refrigerazione raggiungendo concentrazioni tali da provocare l'infezione. Inoltre, la sua presenza non è osservabile in quanto non altera le proprietà organolettiche degli alimenti.

La contaminazione secondaria può coinvolgere tutti gli alimenti: *Listeria monocytogenes* è sensibile ai trattamenti termici e quindi la sua presenza su cibi cotti è da ricondurre all'inosservanza delle Good Manufacturing Practices, e inoltre è capace di aderire ai substrati che incontra durante la filiera produttiva e formare dei biofilm, un valido riparo dall'azione di agenti di pulizia e sanificazione (Cruz and Fletcher, 2012; Trémoulet et al., 2002). Da queste strutture possono staccarsi alcune cellule e andare a contaminare ulteriori superfici, aumentando quindi la possibilità di contaminazione secondaria degli alimenti (Cruz and Fletcher, 2012). Da qui l'importanza di effettuare un'efficace pulizia, seguita da sanificazione efficiente delle superfici.

La dose infettante di listeria è piuttosto bassa, sono sufficienti infatti 100 UFC/g di alimento a causare un'infezione, anche se ormai è dimostrato che possa tendere a valori più bassi in relazione all'immunocompetenza del soggetto infettato oppure alla virulenza del ceppo considerato. Inoltre, tanto più elevata è la concentrazione del microrganismo al momento dell'assunzione, tanto maggiore è la probabilità di contrarre la listeriosi.

Data la sua capacità di sopravvivere e moltiplicarsi in un'ampia gamma di alimenti, e viste anche le sue ripercussioni sulla salute del consumatore, è stato imposto un regime di tolleranza zero in tutti gli alimenti pronti (Jadhav et al., 2012).

#### **1.9.4 Fattori di virulenza e patogenesi**

*L. monocytogenes* è un patogeno facoltativo intracellulare che può crescere in macrofagi, cellule epiteliali e colture di fibroblasti. Il passaggio da semplice infezione a malattia conclamata si ha quando il batterio riesce ad attraversare la barriera intestinale e diffondere, tramite la via ematica e linfatica, nel fegato e negli altri organi bersaglio. Alla base dell'elevata virulenza di *Listeria monocytogenes* c'è la sua capacità di sintetizzare proteine che le consentono di invadere le cellule dell'ospite e causare in esse lesioni. Tali proteine sono: internalina A e B (InlA e InlB), un'emolisina chiamata listeriolisina O (LLO), due fosfolipasi, PlcA e PlcB, coi rispettivi geni di virulenza, *plcA* e *plcB*. I geni relativi a questi fattori di virulenza sono raccolti in quello che viene definito "cluster di geni di virulenza", la cui trascrizione è regolata dal prodotto proteico del gene autoregolato *prfA*, attivato in risposta a stimoli esterni (Ripio et al., 1996).

*L. monocytogenes* penetra all'interno delle cellule eucariote mediante un processo per fasi successive. Il primo evento è rappresentato dalla sintesi di una proteina, che esposta sulla superficie batterica permette al patogeno di prendere contatto con la cellula ospite. Successivamente intervengono Internalina A ed internalina B, le più importanti proteine di superficie coinvolte nel meccanismo di penetrazione cellulare, che legandosi a specifici recettori di membrana inducono un accomodamento del citoscheletro cellulare innescando un processo di fagocitosi, che porta all'internalizzazione del batterio da parte della cellula eucariota. Internalina A si lega al recettore E-caderina delle cellule umane e ne attiva la fagocitosi, mentre internalina B è coinvolta nell'invasione di un cospicuo numero di cellule fra cui epatociti e fibroblasti (Cossart et al., 2008). La resistenza del batterio all'interno del fagosoma non è molto elevata, ed infatti dopo circa 30 minuti si mobilita per sottrarsi all'azione battericida della cellula ospite sintetizzando alcune proteine che agiscono probabilmente in sinergia: la listeriolisina O, un'esotossina emolitica che a pH acido è capace di alterare le membrane lipidiche, e due fosfatidilinositol fosfolipasi (PlcA e PlcB) (Berche, 1995; Cossart et al., 2008). La listeriolisina O appartiene alla classe delle proteine tiolo-attivate, si lega alla membrana del fagosoma e induce in essa la formazione di pori che determinano instabilità ionica e disgregazione: questo processo si conclude con la liberazione di *Listeria monocytogenes*

nel citoplasma. Ruolo fondamentale hanno anche le due fosfolipasi PlcA e PlcB: la prima è responsabile della lisi della membrana del fagolisosoma primario e la seconda della rottura del vacuolo a doppia membrana che si forma durante il passaggio della cellula patogena dalla cellula ospite ad una cellula adiacente, risultando quindi implicata nel processo d'infezione delle cellule adiacenti.

Libera nel citoplasma della cellula infettata, *L. monocytogenes* può moltiplicarsi e sintetizzare nuovi fattori di virulenza, fra cui la proteina ActA, la quale attiva un particolare complesso proteico che promuove la polimerizzazione di monomeri di actina (Berche, 1995). I monomeri formano quindi una sorta di reticolo filamentoso, che si colloca ad un polo della cellula batterica e ne indirizza lo spostamento verso la membrana della cellula ospite, che a causa della pressione esercitata dai filamenti di actina protende verso l'esterno, con conseguente invaginamento della membrana plasmatica e successiva fagocitosi del patogeno all'interno di una nuova cellula ospite adiacente (figura 1.9). Il processo di lisi del fagolisosoma, la replicazione batterica ed il movimento direzionale si ripetono, permettendo così a *Listeria monocytogenes* di infettare una cellula dopo l'altra, bypassando le tipiche forme di difesa dell'organismo, anticorpi compresi (Cossart et al., 2008).

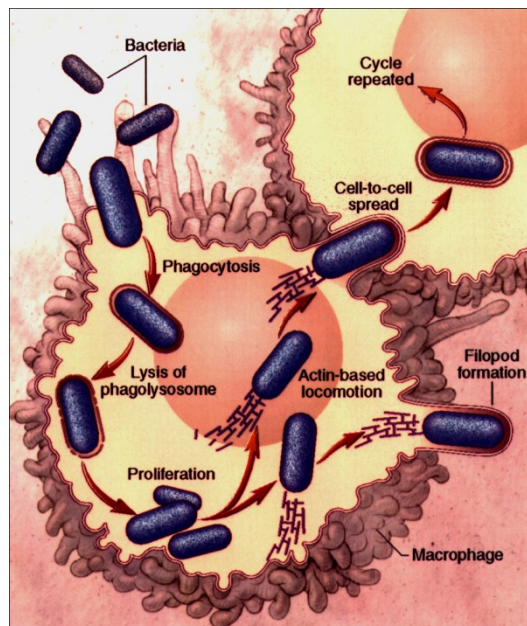


Fig. 1.9. Meccanismi dell'infezione cellulare di *Listeria monocytogenes* (Janakiraman, 2008).

*L. monocytogenes*, assunta solitamente per via alimentare, penetra nell'organismo dall'epitelio gastroenterico, si riproduce all'interno degli enterociti e da qui invade la lamina propria, dove trova monociti e macrofagi pronti a fagocitarla. L'efficienza dei monociti nel distruggere *L. monocytogenes* è molto elevata, ma una piccola percentuale di batteri può sopravvivere e riprodursi all'interno di queste cellule immunitarie, che trasportano poi i batteri a fegato e milza, con conseguente infiammazione e disseminazione nell'ospite.

Recentemente, si sono scoperti altri meccanismi grazie ai quali *Listeria monocytogenes* può superare la barriera gastrica e sopravvivere nell'intestino umano, che sono essenziali per la sopravvivenza del batterio e sono la causa della condizione di portatore asintomatico nell'uomo, in quanto la capacità di penetrazione all'interno delle cellule è fortemente influenzata dalla presenza di fattori di stress, come l'allontanamento dai valori ottimali di pH e temperatura (Galdiero et al., 1997).

In condizioni in cui i livelli di pH sono nettamente acidi, *Listeria monocytogenes* riesce a mutare il proprio comportamento ai fini dell'adattamento: modifica gli scambi ionici transmembrana, eliminando esternamente l'eccesso di protoni, e può sviluppare il GAD (glutammato-decarbossilasi), un sistema enzimatico che, utilizzando un protone interno alla cellula, converte una molecola di acido glutammico in una di Acido Gamma Amino Butirrico (GABA), che successivamente viene scambiato con una nuova molecola di acido glutammico all'esterno della cellula. Tramite questo meccanismo, *Listeria monocytogenes* riesce a diminuire la concentrazione di protoni intracellulari alcalinizzando contemporaneamente l'ambiente extracellulare. La valutazione dei livelli di attività del sistema GAD nei vari ceppi di *L. monocytogenes* può essere, quindi, un sistema per valutare indirettamente la capacità del singolo ceppo di adattarsi in misura più o meno accentuata a un'acidificazione del substrato.

Esiste un secondo sistema enzimatico, denominato BSH (Bile Salt Hydrolase), grazie al quale *Listeria monocytogenes* è in grado di idrolizzare il legame amidico dei sali biliari coniugati, liberando acidi biliari che hanno un potere emulsionante molto inferiore a quello dei precedenti e che, di conseguenza, hanno effetto batteriostatico e battericida molto più basso. L'esistenza di questo secondo sistema enzimatico nelle cellule di *L. monocytogenes* giustifica la capacità del microrganismo di sopravvivere anche nel contenuto intestinale e persino all'interno della vescichetta biliare (Dussurget et al., 2004; Gahan e Hill, 2005).

### 1.9.5 Listeriosi

La listeriosi è un'infezione alimentare che si presenta con sintomi e gravità diverse a seconda del soggetto colpito e della concentrazione di microrganismo ingerita. La sua emergenza e diffusione è strettamente correlata alle variazioni occorse negli ultimi anni nelle tipologie di alimenti consumati, con un aumento di richiesta di prodotti ready to eat e/o con una lunga shelf-life (Schlech, 2000).

La maggior parte delle infezioni in adulti sani è asintomatica, mentre nei soggetti compresi nelle categorie a rischio *Listeria monocytogenes* può diffondere nel sangue e raggiungere tutti i distretti corporei.

La listeriosi si può presentare sotto due forme principali, la forma non invasiva o diarroica e la forma invasiva o sistemica. La forma non invasiva o diarroica è tipica delle tossinfezioni alimentari, si presenta dopo poche ore dall'ingestione (12-24 ore), con sintomi che possono essere confusi con normali forme influenzali: febbre, dolori muscolari, diarrea, crampi addominali, spossatezza e nausea. La forma invasiva o sistemica ha un periodo d'incubazione dalle 2 alle 3 settimane, che occasionalmente può protrarsi fino a 3 mesi. Il passaggio del microrganismo dall'intestino al circolo sanguigno può portare a sintomi molto gravi quali meningiti, encefaliti e sepsi (Vasquez-Boland et al., 2001) e arrivare fino alla morte in soggetti quali donne in gravidanza, neonati, pazienti affetti da AIDS o da cirrosi epatica, trapiantati, immunocompromessi, pazienti sotto chemioterapia, diabetici e anziani.

I danni più gravi possono verificarsi in caso vengano infettati la placenta o il SNC (Berche, 1995). Nel primo caso, infatti, *Listeria monocytogenes* per la capacità di superare la barriera placentare può provocare gravi danni al feto. Nel caso in cui l'infezione avvenga nei primi mesi di gravidanza, la listeriosi può portare ad un aborto spontaneo del feto; nell'ultimo trimestre di gravidanza, invece, può essere causa di morte in utero o di parto prematuro, a cui spesso segue la morte del neonato per insufficienza multi organo (Schlech, 2000; Berche, 1995). La listeriosi può essere contratta anche durante il parto in seguito a contatto con *Listeria monocytogenes* presente nella zona perianale della madre infetta. Questa tipologia di contaminazione, a due o tre settimane dal parto, può indurre nei neonati lo sviluppo di una meningite batterica (Schlech, 2000). Qualora l'esito della malattia non sia fatale, nel neonato aumenta comunque il rischio di subire danni neurologici a lungo termine e ritardi nello sviluppo. In caso vi sia il sospetto di una contaminazione da *Listeria monocytogenes* durante il parto, è fondamentale una diagnosi precoce, che può essere effettuata tramite

analisi del sangue e/o del liquor cefalo-rachidiano del neonato. Nella gestante, invece, il decorso della malattia si svolge come una banale febbre.

Quando *Listeria monocytogenes* raggiunge il SNC, può causare un'encefalite, caratterizzata da numerosi ascessi, soprattutto a livello del tronco encefalico, i quali evolvono rapidamente verso la necrosi tissutale. L'interessamento di questa particolare porzione del SNC è probabilmente da ricondurre all'intensa vascolarizzazione, che facilita la disseminazione del microrganismo (Rocourta et al., 2000; Berche, 1995). I meccanismi che permettono a *Listeria monocytogenes* di attraversare la barriera ematoencefalica non sono ancora ben conosciuti, si stima che la meningoencefalite si manifesti in circa due terzi dei pazienti infettati da *Listeria monocytogenes*, con il rischio di sequele neurologiche e incremento di mortalità del 30% rispetto alle altre forme di listeriosi. *Listeria monocytogenes* è causa anche del 1% delle meningiti batteriche ed è la terza causa di morte per meningite neonatale (Berche, 1995).

### **1.9.6 Epidemiologia delle *foodborne disease***

Nonostante l'incidenza globale delle tossinfezioni alimentari sia molto difficile da stimare, secondo l'OMS, nel 2005, la principale causa di morte per diarrea (circa 1,8 milioni di decessi in tutto il mondo) è da ricondursi all'ingestione di acqua e cibi contaminati. Nei soli Paesi industrializzati, oltre il 30% della popolazione ogni anno è soggetto a una tossinfezione alimentare. Molto più complesso è stimare l'incidenza di queste infezioni nei Paesi in via di sviluppo, in cui l'elevata incidenza dei fenomeni diarroici suggerisce la presenza di un grave problema nella sicurezza alimentare. L'incidenza di queste patologie è andata globalmente aumentando nel corso degli anni e la loro epidemiologia ha subito notevoli cambiamenti, dovuti in parte al miglioramento delle condizioni igienico sanitarie, in parte al profondo modificarsi delle abitudini alimentari, ma anche all'aumento dei pazienti con fattori di rischio per patologie infettive, quali gli anziani, gli immunodepressi e i pazienti neoplastici.

Dal 1996, il FoodNet (Foodborne Diseases Active Surveillance Network), sistema di sorveglianza statunitense per le tossinfezioni alimentari del Centers for Disease Control and Prevention (CDC), permette di registrare e valutare i trend delle infezioni trasmesse attraverso gli alimenti da patogeni come *Campylobacter*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella*, *Vibrio* e *Yersinia*, al fine di valutare l'efficacia della prevenzione e dei piani di sicurezza alimentare (Silk et al., 2012).

Negli Stati Uniti si verifica un'incidenza annua di 9.4 milioni di casi di patologie a trasmissione alimentare, su una popolazione di circa 299 milioni di persone. Di questi casi, il 58% sono causati da virus, il 39% da batteri e il 2% da parassiti; i patogeni più coinvolti sono i *Norovirus* (58%), le Salmonelle non tifoidee (11%), *Clostridium perfringens* (10%), *Campylobacter* spp. (9%) e *Staphylococcus aureus* (3%). Patogeni come *Salmonella*, *Shigella* e *Campylobacter* colpiscono prevalentemente bambini di età inferiore a 5 anni, mentre l'incidenza di listeriosi e le infezioni da *Vibrio* spp. riguardano soprattutto la fascia d'età superiore ai 60 anni (CDC, 2011). Le infezioni acquisite durante i viaggi, in particolar modo nei paesi in cui le condizioni igienico-sanitarie sono scarse, rappresentano una minoranza nella valutazione globale dell'epidemiologia delle *foodborne disease*, e infatti si stima che oltre il 90% delle patologie a trasmissione alimentare negli USA abbia origine domestica (Scallan et al., 2011).

Nell'Unione Europea, l'ultimo rapporto Efsa (Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare) relativo all'anno 2011 ha segnalato 5648 focolai di tossinfezioni alimentari responsabili di 69553 casi nell'uomo, 7125 ricoveri e 93 decessi. I batteri maggiormente coinvolti sono risultati *Salmonella*, *Campylobacter*, *E.coli*, *Shigella*, e non mancano casi di patologie causate dall'ingestione di tossine batteriche, come quelle prodotte da *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* e *Bacillus cereus*. Nel 2011 è stato registrato un ulteriore decremento dei casi di infezioni alimentari dovute a *Salmonella* (95548 casi confermati, con una riduzione del 5,4% rispetto al 2010 e del 37,9% rispetto al 2007), un incremento dei casi confermati di campilobatteriosi (quasi 220209), che mantiene il primato di più comune zoonosi alimentare di origine batterica, e un leggero decremento di listeriosi umana (1476 contro i 1601 del 2010). Gli alimenti maggiormente coinvolti nelle epidemie sono risultati essere prodotti a base di uova, seguiti da preparazioni con ingredienti misti e prodotti a base di pesce (EFSA and ECDC, 2011).

### **1.9.7 Epidemiologia della listeriosi**

L'epidemiologia dell'infezione da *Listeria monocytogenes* è cambiata radicalmente nel decennio 2001-2012 rispetto ai dieci anni precedenti, sia per quanto riguarda l'incidenza, sia per quanto riguarda i soggetti colpiti, riguardando sempre di più individui ultrasessantenni (Mook et al., 2011). Questi cambiamenti non sembrano essere artefatti correlati a modificazione dei sistemi di sorveglianza o delle caratteristiche nella



popolazione relative a età, sesso ed etnia, ma sembrano invece essere legati all'aumento della popolazione con condizioni di immunodeficienza e alla maggiore diffusione di comportamenti a rischio.

La listeriosi è definita dall'OMS come malattia a bassa incidenza (5 casi per milione di abitanti), ma nonostante ciò preoccupante a causa dell'elevato tasso di mortalità (20% per le forme invasive) e di ospedalizzazione (90,5%) che la caratterizza. A causa di questi fattori, l'impatto economico e sociale di questa patologia è considerato tra i più alti tra le malattie trasmesse dagli alimenti.

Negli Stati Uniti, negli anni compresi tra il 2004 ed il 2009, sono stati riportati da FoodNet 762 casi sporadici di listeriosi invasiva, di cui il 17% erano donne in stato di gravidanza e il 53% pazienti con età superiore ai 65 anni. In questo arco di tempo l'incidenza annuale della listeriosi è passata da 0,25 a 0,32 casi su 100000 abitanti, non mostrando un cambiamento significativo (Silk et al., 2012).

*L. monocytogenes* è stata isolata dal feto nel 54% delle donne in gestazione con listeriosi e nei neonati la diagnosi precoce è stata effettuata nel 41% dei casi dopo 1 giorno dalla nascita, nel 51% dopo 1 settimana e nel 78% dopo 2 settimane; nel 44% dei casi, il neonato ha contratto la meningite (Silk et al., 2012). I pazienti over-65 hanno mostrato un'incidenza di batteriemia (68%) e di meningite (41%) maggiore rispetto alle altre fasce d'età (Silk et al., 2012).

Numerosi casi di listeriosi sono stati associati all'assunzione di alimenti contaminati, in particolar modo di hot dogs, yogurt e latte intero non pastorizzato (Silk et al., 2012).

Nel 2000, il CDC di Atlanta ha evidenziato come *L. monocytogenes* rappresenti il patogeno alimentare con più alto tasso di ospedalizzazione (90,5% dei casi) e sia al secondo posto per l'elevato tasso di mortalità tra i pazienti ospedalizzati (20-30%). Tuttavia, come spesso accade per le malattie trasmesse dagli alimenti, nonostante la notifica sia obbligatoria, assistiamo ad una sottostima dei casi di listeriosi poiché vengono infatti notificati solo i casi più gravi, che necessitano di ricovero.

Negli anni dal 1989 al 1993, negli Stati Uniti si è verificata una diminuzione dell'incidenza della listeriosi (da 7,9 a 4,4 casi per milione di abitanti), grazie alla messa in atto di pratiche preventive associate a campagne informative. Un'ulteriore riduzione del 40% dei casi è stata osservata dal 1996 al 2002, a seguito della creazione del sistema di sorveglianza FoodNet.

Secondo l'OMS, un trend di riduzione analogo si è osservato anche in Europa, in Gran Bretagna e in Australia. In Francia, le misure preventive avrebbero ridotto del 68% la

presenza di *Listeria* nel decennio 1987-97 e, al fine di ridurre ulteriormente il trend di incidenza, nel 2003 il CNR francese ha avviato, in collaborazione con 27 laboratori europei, uno studio per la sorveglianza microbiologica delle infezioni da *Listeria* in Europa, che ha istituito un database elettronico condiviso sui profili genetici dei ceppi identificati nei diversi Paesi e sui diversi cibi, denominato progetto PulseNet Europa.

Per quanto riguarda i dati ufficiali relativi all'epidemiologia della listeriosi in Europa, il bollettino annuale delle patologie trasmissibili steso nel 2012 dall'ECDC (ECDC, 2012) ha rilevato 1624 casi nel 2010, con un'incidenza di 0.33 casi per 100000 abitanti. I paesi con la maggior incidenza di notifiche sono risultati la Finlandia (1.33/100000), la Danimarca (1.12/100000) e la Svezia (0,67/100000), a causa del maggior consumo di pesce affumicato, mentre solo il Portogallo non ha riportato dati. I tassi d'incidenza sono risultati più alti nella fascia d'età degli over-65 anni, seguita da quella dei bambini sotto i 5 anni. Fra gli anziani sono più colpiti gli uomini, mentre nelle fasce d'età più giovani la patologia colpisce di più le donne, a causa della maggior attenzione posta alla listeriosi quando si tratta di donne in età fertile e in gravidanza, in particolare tra i 25 e i 44 anni. Per quanto riguarda la stagionalità, è stato riscontrato un trend stagionale con un aumento di casi tra giugno e ottobre (ECDC, 2012).

In Europa gli episodi epidemici sembrano essere correlati principalmente dall'assunzione di prodotti caseari: negli anni 1983 e 1987 gli alimenti maggiormente coinvolti nelle epidemie in Svizzera sono stati i formaggi molli non pastorizzati; analogamente, nel 1986, in Austria si è verificata un'epidemia a causa del consumo di latte non pastorizzato, mentre, nel 1995 in Francia l'alimento coinvolto è stato un tipo di Brie a base di latte non pastorizzato. In Finlandia, nel 1998, è stato registrato un caso di listeriosi legato al consumo di burro contaminato successivamente alla produzione: su 18 pazienti, 16 hanno sviluppato gravi forme di setticemia, in 1 caso è stato coinvolto il Sistema Nervoso Centrale e in 4 casi l'exitus è stato fatale.

La direttiva europea 92/59/EEC ha stabilito la realizzazione del Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), un sistema rapido di allerta che ha lo scopo di notificare agli Stati membri della Comunità Europea, in tempo reale, i rischi diretti o indiretti per la salute dei consumatori associati ad un prodotto alimentare. Si tratta quindi di uno strumento attraverso il quale gli enti sanitari territoriali possono avere informazioni su notifiche, fonti di contaminazione, prodotti e Paesi coinvolti in epidemie legate al consumo di alimenti.

L'Annual Report del RASFF relativo all'anno 2011, ha riportato 107 notifiche relative a *Listeria monocytogenes*, in particolare legate al consumo di pesce (61 casi). I formaggi, di diverso tipo e provenienza, sono stati coinvolti in 23 casi di notifica, con un maggiore coinvolgimento di quelli prodotti in Francia e Italia.

In Italia, la notifica della listeriosi rientra tra quelle con obbligo di notifica, come previsto per le tossinfezioni alimentari dal Decreto Ministeriale del 15 dicembre 1990.

Dal 2002 al 2003 è stato attivato un sistema di sorveglianza attiva che coinvolge 40 laboratori localizzati in 10 regioni, affiancato al sistema delle notifiche obbligatorie. Questo studio ha raccolto 192 casi, con un'incidenza dell'1,3/1000000 abitanti/anno, che contrasta con il dato presentato dal Ministero della Sanità relativo alle notifiche obbligatorie, che nello stesso intervallo di tempo ha stimato un'incidenza di 0,8/1000000 abitanti/anno (Gianfranceschi et al., 2007).

### **1.9.8 Trattamento e prevenzione di *Listeria monocytogenes***

La diagnosi di listeriosi passa attraverso l'isolamento del batterio dai materiali biologici fisiologicamente sterili, quali il sangue e il liquor e, nei casi materno infantili, il liquido amniotico, gli annessi fetali e i tamponi alla nascita (Janakirman, 2008).

Il trattamento di listeriosi viene affidato all'azione di alcuni antibiotici a cui il batterio ha dimostrato particolare sensibilità, come  $\beta$ -lattamici, ampicillina e gentamicina, mentre non vengono impiegati antibiotici appartenenti alla famiglia delle cefalosporine, in quanto risultano non essere efficaci nel trattamento della patologia. Particolare interesse ha suscitato il trimetoprim-sulfametoxazolo, che ha mostrato un ampio spettro protettivo contro listeriosi in pazienti immunocompromessi che lo assumono come normale terapia nei confronti di altri microrganismi patogeni (Schlech, 2000).

Essendo la listeriosi una patologia a trasmissione prevalentemente alimentare, per prevenire l'insorgere dell'infezione è necessario attuare degli interventi nelle aree produttive, ma anche sviluppare sistemi di sorveglianza e incentivare l'educazione di coloro che lavorano nel campo alimentare, sia a livello della produzione che della distribuzione (Lionau and Sofos, 2007).

Per ridurre l'incidenza di listeriosi è necessario il controllo della contaminazione in ogni stadio del processo produttivo degli alimenti, iniziando dagli allevamenti e dalle coltivazioni, dove per esempio la listeriosi animale può essere ridotta eliminando fattori di rischio come il sovraffollamento eccessivo e monitorando la qualità degli insilati (CFSAN-FDA-HHS/FSIS-USDA, 2011). Gli ambienti di trasformazione-preparazione

degli alimenti sono stati riconosciuti come i punti a maggiore rischio di contaminazione: in questi luoghi è possibile intervenire con miglioramenti nella organizzazione del lavoro, con procedure operative di sanificazione standardizzata e con un attento uso dell'HACCP, sebbene a volte risulta difficile giungere alla eradicazione di *Listeria monocytogenes* all'interno degli ambienti di manipolazione e confezionamento degli alimenti a causa della sua capacità di formare biofilm, che favoriscono l'adesione delle cellule batteriche alle superfici di lavoro e l'acquisizione di resistenza nei confronti di disinfettanti, creando per le industrie alimentari grosse complicanze.

Il tasso di incidenza della listeriosi può inoltre essere ridotto grazie a programmi di educazione alimentare, indirizzati in particolar modo alle categorie ad alto rischio, che dovrebbero evitare di mangiare cibi crudi o poco cotti di origine animale, formaggi freschi e verdure crude non lavate.

## 2. Scopo della ricerca

Negli ultimi anni abbiamo assistito a un crescente interesse dei consumatori nei confronti di prodotti alimentari naturali, privi di conservanti e non sottoposti a trattamenti tecnologici “spinti”. In questo scenario, sta assumendo un ruolo sempre più importante l’applicazione delle batteriocine, ovvero molecole di natura proteica, prodotte sia da batteri Gram-positivi che Gram-negativi, dotate di attività inibitoria nei confronti di ceppi batterici che condividono lo stesso habitat. Queste molecole a spiccata attività antimicrobica hanno suscitato un notevole interesse sia in campo alimentare, per la loro potenziale applicazione nella bioconservazione, sia in campo clinico, per la loro capacità di regolare la microflora autoctona e come soluzione alternativa agli antibiotici.

Nonostante l’introduzione di moderne tecnologie e l’obbligo da parte delle aziende di attuare misure preventive di autocontrollo basate sul sistema HACCP, l’incidenza delle malattie trasmesse dagli alimenti mostra un trend in continuo aumento, specialmente a carico di microrganismi emergenti quali *Listeria monocytogenes*. Questo patogeno causa la listeriosi, un’infezione a grande impatto economico e sociale, che vede coinvolti principalmente prodotti a base di carne, latticini, cibi freschi e prodotti trasformati pronti al consumo, per cui l’utilizzo di tecniche di prevenzione e di conservazione risulta essere necessario e fondamentale per ridurre o addirittura impedire la moltiplicazione di *L. monocytogenes*.

Nella moderna sfida per il raggiungimento della sicurezza alimentare, una valida alternativa ai conservanti chimici potrebbe essere l’impiego di microrganismi, produttori di batteriocine, che vengono normalmente isolati dagli alimenti: questa soluzione permetterebbe da un lato di non alterare la flora microbica autoctona dell’alimento, dall’altro di utilizzare conservanti naturali.

A tale scopo, ha suscitato in noi grande interesse la possibile applicazione di batteriocine prodotte da enterococchi (enterocine) ad attività listericida, in particolar modo in seguito all’osservazione che solo una bassa percentuale di campioni alimentari, analizzati presso il nostro laboratorio, ha mostrato contemporanea contaminazione del genere *Enterococcus* e della specie *L. monocytogenes*, sebbene questi batteri vengano normalmente riscontrati nelle stesse tipologie di matrici alimentari.

Il presente lavoro si propone di valutare la capacità di ceppi di enterococchi, isolati da campioni di carne cruda di manzo e avicoli, di produrre enterocine con attività inibitoria nei confronti di *L. monocytogenes* ATCC, ma anche nei confronti di ceppi di *Listeria monocytogenes* di origine alimentare e clinica. Si propone inoltre di indagare la stabilità delle enterocine isolate a diverse temperature e a variazioni di pH tipicamente riscontrabili negli alimenti. Questo studio permetterebbe così di valutare l'efficacia delle batteriocine isolate nel contrastare la flora patogena, in funzione di un loro ipotetico utilizzo come conservanti alimentari naturali.

## **3. Materiali e metodi**

### **3.1 Ceppi microbici utilizzati**

Nel presente studio sono stati utilizzati i seguenti microrganismi:

- 194 ceppi appartenenti al genere *Enterococcus*, isolati da carne cruda di manzo e avicoli
- 14 ceppi di *Listeria monocytogenes*, isolati da carne cruda di manzo e avicoli
- 14 Ceppi di *Listeria monocytogenes* di origine clinica
- il ceppo *Listeria monocytogenes* ATCC 7644

I ceppi di *Listeria monocytogenes* di origine clinica sono stati isolati da campioni di sangue presso il laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale Misericordia e Dolce di Prato, negli anni 2011 e 2012.

### **3.2 Isolamento e identificazione dei ceppi provenienti da matrici alimentari**

I ceppi di *Enterococcus* spp. e *Listeria monocytogenes* di origine alimentare utilizzati in questo studio sono stati isolati, nel periodo compreso tra gennaio 2002 e dicembre 2012, presso il laboratorio di Microbiologia Applicata del Dipartimento di Scienze della Salute dell'Università di Firenze. I campioni alimentari sono stati prelevati da personale esperto e trasportati all'interno di contenitori idonei e a una temperatura di circa 4°C in laboratorio, dove sono stati analizzati secondo metodiche standard e manipolati in condizioni di asetticità. Le colonie isolate e identificate sono state conservate a -80°C in terreno contenente triptone e glicerolo al 15%.

#### **3.2.1 Isolamento e identificazione di *Enterococcus* spp.**

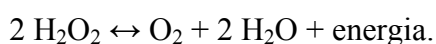
Mediante l'uso di bilancia analitica di precisione, è stata prelevata un'aliquota di 25 g di alimento, inserita in un apposito sacchetto sterile con membrana a filtro Stofilter (pbi International) e diluita 1:10 tramite l'aggiunta di 225 ml di Acqua Peptonata Tamponata sterile (Buffered Peptone Water, Oxoid), un brodo di pre-arricchimento idoneo per rivitalizzare le cellule microbiche. La busta è stata inserita in omogeneizzatore

peristaltico a pale verticali per 60 secondi, al fine di omogeneizzare la sospensione e disperdere i batteri presenti nella matrice alimentare. Successivamente, 0,5 ml della diluizione 1:10 sono stati seminati per spatolamento sul terreno di coltura Slanetz and Bartley medium (Oxoid), un terreno idoneo per l'isolamento degli enterococchi, che risulta essere selettivo per la presenza di azide sodica, che inibisce lo sviluppo di microrganismi Gram-negativi e stafilococchi, e differenziale per la presenza di cloruro di tetrazolio, che, una volta ridotto dagli enterococchi a formazano, conferisce alle colonie una colorazione rosso-marrone (Slanetz and Bartley, 1957; Burkwall and Hartman, 1964). Le piastre sono state poste a incubare a 44°C per 48 ore in condizioni di aerobiosi. Al termine del periodo di incubazione, è stata verificata la presenza di microrganismi appartenenti al genere *Enterococcus* esaminando la morfologia delle colonie. Sono state considerate come tipiche le colonie aventi una colorazione dal rosa al rosso scuro e marrone.

Per confermare la presenza di *Enterococcus* spp., sono stati eseguiti dei test preliminari e di identificazione volti ad evidenziare caratteristiche metaboliche discriminanti.

#### **Test della catalasi**

L'enzima catalasi, di cui gli enterococchi non sono provvisti, appartiene alla famiglia delle ossido-riduttasi e catalizza la reazione di scissione del perossido di idrogeno in acqua e ossigeno molecolare, neutralizzandone l'azione ossidante:



La presenza dell'enzima è stata valutata ponendo una colonia batterica o un frammento di essa in contatto con una goccia di Perossido di Idrogeno al 3% (10 Volumi). La liberazione di ossigeno nascente segnala la presenza dell'enzima.

#### **Valutazione della capacità emolitica**

Le colonie risultate negative al test della catalasi, sono state seminate su piastre contenenti agar sangue di montone e incubate a 37°C per 24 ore, al fine di valutarne la capacità emolitica.

#### **Test di identificazione biochimica**

Sulle colonie con capacità di produrre  $\alpha$  o  $\gamma$  emolisi, è stato effettuato il test di identificazione di specie RapID STR System (Oxoid), un sistema biochimico miniaturizzato per l'identificazione degli streptococchi dei gruppi A, B, C, D e G.



### 3.2.2 Isolamento e identificazione di *Listeria monocytogenes*

Mediante l'uso di bilancia analitica di precisione, è stata prelevata un'aliquota di 10 g di alimento, inserita in un apposito sacchetto sterile con membrana a filtro Stofilter e diluita 1:10 tramite l'aggiunta di 90 ml di Half Fraser Broth (Oxoid), un brodo di arricchimento primario per *Listeria* spp. Il sacchetto, dopo essere stato posto all'interno dell'omogeneizzatore a pale, è stato posto ad incubare a 28°C per 24 ore. Dall'arricchimento primario sono stati prelevati 100 µl di sospensione e inseriti in una provetta contenente 10 ml di Fraser Broth (Oxoid), un brodo di arricchimento secondario, che è stata posta a incubare a 37°C per 24 ore.

I terreni Half Fraser e Fraser Broth sono raccomandati dalla norma UNI EN ISO 11290 relativa alla ricerca di *Listeria monocytogenes* nei prodotti alimentari. Entrambi contengono citrato ferrico di ammonio, che grazie agli ioni ferrici favorisce la crescita di *L. monocytogenes*, esculina, che viene idrolizzata a esculetina da *Listeria* spp. con conseguente legame agli ioni ferrici e annerimento del brodo, e litio cloruro, che inibisce la crescita degli enterococchi che, come *Listeria*, idrolizzano l'esculina. Le due formulazioni differiscono per il fatto che il brodo Half Fraser contiene una quantità dimezzata di acido nalidixico e acriflavina, al fine di facilitare la rivitalizzazione delle cellule danneggiate (Fraser and Sperber, 1988; McClain and Lee, 1988; Cowart and Foster, 1985).

Al termine del periodo d'incubazione, 10 µl di sospensione batterica di arricchimento secondario sono stati seminati su terreno selettivo differenziale *Listeria* Palcam Agar (Oxoid). Questo terreno deve la sua alta selettività alla presenza di litio cloruro nel terreno di base e di ceftazidime, polimixina B e acriflavina cloridrato nel supplemento selettivo (Palcam Selective Supplement, Oxoid). Palcam Agar permette una più facile differenziazione di *Listeria monocytogenes* poiché utilizza un doppio sistema indicatore: l'idrolisi dell'esculina e la fermentazione del mannitolo. *Listeria monocytogenes* idrolizza l'esculina e produce colonie circondate da un alone nero, ma non fermenta il mannitolo, permettendo così una facile differenziazione da contaminanti come enterococchi e stafilococchi, che invece fermentano il mannitolo e causano il viraggio dal rosso al giallo dell'indicatore di pH rosso fenolo (Van Netten et al., 1989). La piastra seminata è stata incubata per 48 ore a 37°C in condizioni di microaerofilia per inibire la crescita dei batteri strettamente aerobi, come *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp. Al termine del periodo di incubazione, l'aspetto tipico delle colonie di *Listeria*

*monocytogenes* è il seguente: colonie di circa 2 mm di diametro, di colore grigio verdastro con centro nero, infossate e circondate da un alone nero.

Le colonie cresciute su Listeria Palcam Agar sono state sottoposte a test preliminari e di identificazione volti ad evidenziare caratteristiche metaboliche discriminanti.

#### **Test della catalasi**

*L. monocytogenes* possiede l'enzima catalasi. Il test è stato svolto con le stesse modalità descritte nel paragrafo 3.2.1.

#### **Valutazione della capacità emolitica**

*Listeria monocytogenes* è in grado di produrre la listeriolisina O, una esotossina batterica capace di creare pori nelle membrane e responsabile della lisi dei globuli rossi. Tale proprietà può essere individuata tramite la semina su Agar Sangue di cavallo (Oxoid), terreno di coltura contenente il 5% di sangue sterile defibrinato. Il batterio dà una caratteristica  $\beta$ -emolisi stretta e piccola.

#### **Test di identificazione biochimica**

Sulle colonie  $\beta$ -emolitiche è stata eseguita l'identificazione della specie utilizzando il test biochimico miniaturizzato Microbact 12L.

### **3.3 *Listeria monocytogenes* ATCC**

L'ansa di inoculazione (Culti-Loop, Oxoid) contenente il ceppo *Listeria monocytogenes* 7644 ATCC (American Type Culture Collection) è stata immersa in una provetta con terreno Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid) e incubata a 37°C per il tempo necessario a garantire il completo scioglimento e distacco del microrganismo. La sospensione è stata inoculata su piastra contenente Tryptone Soya Agar (TSA, Oxoid) e incubata a 37°C per 24 ore. Al termine di questo periodo, alcune colonie di *Listeria monocytogenes* sono state stemperate in 50 ml di BHI broth (Brain Heart Infusion broth-Oxoid) contenenti glicerolo al 15% e incubate a 37°C per 22-24 ore, in modo da ottenere il microrganismo in fase di crescita esponenziale e poter quindi conservare le cellule sincronizzate in fiale per crioconservazione alla temperatura di -80°C. In occasione di ogni esperimento, il ceppo *Listeria monocytogenes* ATCC è stato rivitalizzato a partire da una di queste fiale.

I terreni BHI broth e BHI agar sono terreni di coltura generici, contenenti estratto di cuore e cervello, indicati per la crescita di un'ampia varietà di batteri, compresi i patogeni esigenti (Rosenow, 1919; Seth, 1970).

### 3.4 Agar Spot Test

Per determinare l'attività antimicrobica dei ceppi di *Enterococcus* spp. in esame, è stato effettuato un test preliminare, denominato Agar Spot Test, che ha permesso di valutare in terreno solido la capacità di produrre sostanze ad azione battericida nei confronti di *L. monocytogenes* ATCC.

Gli enterococchi, conservati a -80°C in apposito terreno di congelamento, sono stati seminati su piastra Petri contenente TSA e incubati a 37°C per 24 ore. Le colonie cresciute su TSA sono state propagate per due volte per 18-24 ore a 30°C in MRS broth (De Man et al., 1960), un brodo di arricchimento non selettivo per la crescita dei batteri acido lattici. Trascorso il periodo di incubazione, sono stati effettuati dei fori mediante ago metallico sterile su una piastra Petri contenente terreno BHI agar, all'interno dei fori sono stati inoculati 2-3 µl della sospensione batterica e le piastre sono state incubate a 37°C per 24 ore in modo da ottenere una crescita evidente. Il giorno seguente, circa 10<sup>6</sup> cellule di *L. monocytogenes* ATCC sono state inoculate in 8 ml di BHI soft agar (0,7% agar), che è stato poi versato sulla piastra Petri a ricoprire gli enterococchi seminati il giorno precedente e cresciuti a spot (Harris et al., 1989). Una volta solidificato il terreno, la piastra è stata incubata a 37°C per 24 ore e, al termine di questo periodo, è stata valutata la formazione di aloni d'inibizione nello strato di BHI contenente il ceppo di *L. monocytogenes* ATCC. Sono stati considerati positivi i ceppi che hanno prodotto una zona d'inibizione attorno allo spot superiore a 0,5 mm (Schillinger and Lucke, 1989).

Sono stati effettuati due controlli sperimentali: aggiunta di 1 mg/ml di proteasi (tipo XIV da *Streptomyces griseus*, Sigma-Aldrich) al BHI agar per eliminare l'attività inibitoria delle batteriocine e utilizzo di un ceppo di *Enterococcus* spp. non produttore di batteriocine per escludere inibizioni dovute alla produzione di acido lattico.

Inoltre, è stato utilizzato BHI agar con 0,2% di glucosio e pH iniziale a 7,4 per eliminare l'inibizione dovuta all'acidificazione del mezzo (Harris et al, 1989).

## 3.5 Agar Well Diffusion

La valutazione della presenza di composti inibitori secreti nel mezzo di crescita da parte dei ceppi positivi all'agar spot test, è stato condotto tramite la tecnica di diffusione in agar mediante pozzetto o Agar Well Diffusion (Dal Bello et al, 2010), metodo descritto per la prima volta da Tagg e Mc Given nel 1971 (Tagg and McGiven, 1971) e modificata negli anni in numerosi studi.

### 3.5.1 Preparazione dei surnatanti

I ceppi di enterococchi positivi all'agar spot test, e quindi selezionati come potenziali produttori di batteriocine, sono stati seminati in 10 ml di MRS broth e incubati a 30°C per 24 ore. La sospensione *batterica* è stata centrifugata a 12000 giri/min per 10 minuti, a 4°C. Il surnatante così ottenuto è stato portato a pH 6.5 con l'aggiunta di NaOH 1M, al fine di neutralizzare l'azione inibitoria data dagli acidi organici prodotti durante la fase di crescita del microrganismo, ed è stato filtrato mediante l'uso di filtri con pori da 0,2 µm (Filtropur S 0.2, Sarstedt). I surnatanti sono stati poi sottoposti a un trattamento termico di 80°C per 10 minuti, al fine di disattivare le eventuali proteasi presenti, e sono stati immediatamente utilizzati o conservati a -20°C (Schillinger and Lucke, 1989; Harris et al, 1989).

### 3.5.2 Agar well diffusion

In piastre Petri sono stati distribuiti 20 ml di BHI soft agar allo 0,7%, inoculati con circa 10<sup>6</sup> cellule di *L. monocytogenes* ATCC; una volta solidificato l'agar, nel terreno sono stati praticati dei pozzetti del diametro di circa 5 mm, mediante foratappi di metallo sterile, all'interno dei quali sono poi stati aggiunti 40 µl dei surnatanti di *Enterococcus* da testare e lasciati diffondere a 20°C per circa 2 ore (Harris et al, 1989). A seguito dell'incubazione a 37°C per 24 ore, è stata valutata la presenza di aloni di inibizione.

Al fine di confermare la natura proteica del composto inibente la crescita di *L. monocytogenes* ATCC, sono stati effettuati dei controlli negativi trattando i surnatanti, prima di essere inoculati all'interno dei pozzetti, con pronasi alla concentrazione di 1 mg/ml (Harris et al, 1989) per 1 ora a 37°C. Un ulteriore controllo è stato effettuato trattando i surnatanti con catalasi ricavata da fegato di bovino (Sigma-Aldrich) alla concentrazione di 5 mg/ml, per escludere una eventuale inibizione dovuta alla presenza

di perossido d'idrogeno (Schillinger and Lucke, 1989), prodotto dal metabolismo dei LAB. Sono stati considerati come positivi per la presenza di batteriocine quei surnatanti in cui l'attività inibitoria sulla crescita del microrganismo indicatore veniva meno a seguito del trattamento con pronasi e rimaneva invariata quando trattata con catalasi.

### **3.6. Test supplementari**

Sui campioni con evidente attività antimicrobica, sono stati effettuati i seguenti test supplementari:

- Valutazione dell'attività antimicrobica a differenti temperature
- Valutazione dell'attività antimicrobica a differenti valori di pH
- Valutazione dello spettro di attività

#### **3.6.1 Valutazione dell'attività antimicrobica a differenti temperature**

I surnatanti positivi all'agar well diffusion sono stati testati per la stabilità alle seguenti temperature:

- 70°C per 10, 20 e 30 minuti
- 80°C per 10, 20 e 30 minuti
- 90°C per 10, 20 e 30 minuti
- 100°C per 10, 20 e 30 minuti
- 121°C per 15 minuti

L'attività è stata valutata tramite la tecnica dell'agar well diffusion: dopo il trattamento termico, 40 µl di surnatante sono stati inseriti nei pozzetti creati in piastre contenenti BHI soft agar allo 0,7%, precedentemente inoculato con circa 10<sup>6</sup> cellule di *Listeria monocytogenes* ATCC. Dopo 24 ore a 37°C, sono stati misurati i diametri degli aloni d'inibizione. Il surnatante non trattato è stato utilizzato come controllo.

#### **3.6.2 Valutazione dell'attività antimicrobica a differenti valori di pH**

I surnatanti positivi all'agar well diffusion sono stati portati a valori di pH di 4, 5, 6, 6.5 e 7 tramite l'aggiunta di quantità opportune di HCl 5M e NaOH 5M, al fine di valutarne l'attività antimicrobica a differenti valori di pH. I surnatanti così modificati sono stati filtrati mediante filtri da 0,22 µm, sottoposti a trattamento termico di 80°C per 10 minuti

e infine 40 µl inoculati in pozzetti praticati in piastre di BHI soft agar allo 0,7%, contenenti circa  $10^6$  cellule di *L. monocytogenes* ATCC. Dopo incubazione a 37°C per 24 ore, è stato misurato l'alone d'inibizione presente attorno ai pozzetti. Il surnatante non trattato è stato utilizzato come controllo.

### **3.6.3 Valutazione dello spettro di attività**

L'attività inibitoria dei surnatanti è stata valutata su 28 ceppi di *L. monocytogenes*, provenienti sia da campioni alimentari che clinici e appartenenti a differenti gruppi sierologici.

I ceppi di *L. monocytogenes* di nostro interesse sono stati seminati su terreno TSA e incubati per 24 ore a 37°C. Al termine dell'incubazione,  $10^6$  cellule di ciascuno dei 28 ceppi di *L. monocytogenes* sono state inoculate in BHI soft agar allo 0,7% e, una volta solidificato il terreno, creati i pozzetti in cui sono stati inseriti 40 µl di surnatante. Dopo 24 ore a 37°C sono stati misurati i diametri degli aloni d'inibizione.

## **3.7 Antibiotico-resistenza**

I ceppi di *Enterococcus* spp. e *Listeria monocytogenes* utilizzati nel presente studio sono stati sottoposti al saggio di sensibilità agli antibiotici (antibiogramma) tramite la tecnica di agar-diffusione, nota anche come tecnica di Kirby-Bauer (Bauer et al., 1966). Come da direttiva EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), è stata preparata una sospensione dei ceppi da saggiare pari ad una torbidità 0,5 McFarland e seminata in maniera uniforme e confluyente tramite un tampone sterile su piastre contenenti Müller-Hinton agar (Oxoid), nel caso degli enterococchi, e su piastre contenenti Mueller-Hinton agar addizionato con il 5% di sangue defibrinato di cavallo e 20 mg/L di β-NAD, per quanto riguarda i ceppi di *L. monocytogenes*. I dischetti di carta bibula, impregnati degli antibiotici in concentrazioni standard (Oxoid), sono stati quindi adagiati sulla superficie con l'ausilio di pinzette sterili, e infine le piastre incubate a 37°C per 24 ore in condizioni di aerobiosi per gli enterococchi, e in presenza del 5% di CO<sub>2</sub> nel caso di *L. monocytogenes*. In seguito all'incubazione, è stato misurato il diametro dell'alone di inibizione attorno a ogni dischetto di antibiotico. Le misurazioni ottenute sono state confrontate con i valori soglia indicati nella direttiva EUCAST versione 3.1, valida dall'11 febbraio 2013. Per gli antibiotici non presenti nella direttiva EUCAST, sono stati utilizzati i limiti forniti nella linea guida m100-s22

del gennaio 2012 redatta dal Clinical and Laboratory Standards Institute statunitense (CLSI, ex NCCLS) (tabelle 3.1 e 3.2).

Antibiotico		Concentrazione (µg)	Valori limite (mm)		Direttiva
			S	R	
PENICILLINE	Penicillina G	10 U	≥ 15	≤ 14	CLSI m100-s22
	Ampicillina	2	≥ 10	< 8	EUCAST 3.1
GLICOPEPTIDI	Vancomicina	5	≥ 12	<12	EUCAST 3.1
	Teicoplanina	30	≥ 16	< 16	EUCAST 3.1
AMINOGLICOSIDI	Gentamicina	30	≥ 8	< 8	EUCAST 3.1
TETRACICLINE	Tetraciclina	30	≥ 19	≤ 14	CLSI m100-s22
FLUOROCHINOLONI	Ciprofloxacina	5	≥ 21	≤ 15	CLSI m100-s22
FENICOLI	Cloramfenicolo	30	≥ 18	≤ 12	CLSI m100-s22
OXAZOLIDINONI	Linezolid	10	≥ 19	< 19	EUCAST 3.1
MACROLIDI	Eritromicina	15	≥ 23	≤13	CLSI m100-s22

Tabella 3.1. Agar diffusione dei ceppi di *Enterococcus*: valori limite utilizzati per definire la sensibilità agli antibiotici. Per gli antibiotici non presenti nella direttiva EUCAST 3.1 sono stati utilizzati i valori limite forniti da CLSI m100-s22 per *Enterococcus* spp.

Antibiotico		Concentrazione (µg)	Valori limite (mm)		Direttiva
			S	R	
PENICILLINE	Ampicillina	2	≥ 16	< 16	EUCAST 3.1
	Penicillina G	10 U	≥ 13	< 13	EUCAST 3.1
	Oxacillina	1	≥ 13	≤ 10	CLSI m100-s22
CEFALOSPORINE	Cefalotina	30	≥ 18	≤ 14	CLSI m100-s22
CARBAPENEMI	Meropenem	10	≥ 26	< 26	EUCAST 3.1
GLICOPEPTIDI	Teicoplanina	30	≥ 14	≤ 10	CLSI m100-s22
AMINOGLICOSIDI	Gentamicina	10	≥ 15	≤ 12	CLSI m100-s22
	Kanamicina	30	≥ 18	≤ 13	CLSI m100-s22
MACROLIDI	Eritromicina	15	≥ 25	< 25	EUCAST 3.1
TETRACICLINE	Tetraciclina	30	≥ 19	≤ 14	CLSI m100-s22
FLUOROCHINOLONI	Ciprofloxacina	5	≥ 21	≤ 15	CLSI m100-s22
FENICOLI	Cloramfenicolo	30	≥ 18	≤ 12	CLSI m100-s22
LINCOSAMIDI	Clindamicina	2	≥ 21	≤ 14	CLSI m100-s22
INIBITORI METABOLISMO DEI FOLATI	Sulfametossazolo-Trimetoprim	1,25-23,75	≥ 29	< 29	EUCAST 3.1

Tabella 3.2. Agar diffusione dei ceppi di *Listeria monocytogenes*: valori limite utilizzati per definire la sensibilità agli antibiotici. I valori limite forniti da CLSI m100-s22 sono quelli relativi a *Staphylococcus aureus*, non essendo presenti indicazioni per *L. monocytogenes*.

### 3.8 Influenza del mezzo di crescita sulla produzione delle batteriocine

Tutti i ceppi di *Enterococcus* spp. isolati da carne di manzo risultati negativi in prima analisi all'agar spot test, ma anche quelli risultati prima positivi all'agar spot test e poi negativi all'agar well diffusion, sono stati sottoposti a dei test di stimolazione al fine di valutare l'influenza del mezzo di crescita sulla produzione di batteriocine.

Sono stati allestiti due esperimenti, condotti in parallelo: in uno, il ceppo di *Enterococcus* da testare è stato fatto crescere in presenza di *Listeria monocytogenes* e, nell'altro, in presenza del suo stesso surnatante.

Nel primo caso, sono state preparate provette contenenti 10 ml di BHI broth, a cui sono state aggiunte  $10^2$  cellule di *Listeria monocytogenes* e  $10^2$  cellule di *Enterococcus*, mentre nel secondo caso sono state preparate provette contenenti 7,5 ml di BHI broth,  $10^2$  cellule di *Enterococcus* e 2,5 ml del suo surnatante, ottenuto precedentemente. Per far ciò, sono state preparate sospensioni di *Listeria monocytogenes* e di *Enterococcus* spp. alla concentrazione di 0,5 McFarland, che in seguito ad opportune diluizioni sono state seminate per spatolamento su TSA per poter risalire alla effettiva concentrazione dell'inoculo. Entrambe le provette sono state incubate a 37°C per 24 ore, in agitazione.

Al termine del periodo di incubazione, dalle provette sono stati prelevati 7 ml di sospensione e centrifugati a 12.000 giri per 10 minuti a 4°C, in modo tale da ottenere il surnatante, che in parte è stato utilizzato per preparare due nuove provette e in parte per testarne l'attività inibitoria nei confronti di *L. monocytogenes* ATCC tramite il test dell'Agar Well Diffusion. Per ogni esperimento è stata quindi preparata una nuova provetta, ognuna contenente 7,5 ml di BHI broth, 2,5 ml di surnatante (ottenuto per centrifugazione della sospensione batterica a 24 ore) e circa  $10^4$  cellule ottenute diluendo opportunamente la sospensione batterica, che durante l'incubazione di 24 ore ha raggiunto una concentrazione pari a circa  $10^8$  UFC/ml.

Al fine di ottenere informazioni dettagliate relative alla curva di crescita dei ceppi utilizzati negli esperimenti, la sospensione batterica contenente *Listeria monocytogenes* ed *Enterococcus* è stata seminata per spatolamento, sia per intero che diluita, sui terreni agarizzati Palcam, Slanetz e TSA, mentre la sospensione batterica contenente *Enterococcus* e il suo surnatante è stata diluita e seminata per spatolamento sul terreno TSA. Le piastre sono state incubate a 37°C per 24 ore.

Gli esperimenti sono stati condotti ai tempi 24 ore, 48 ore e 96 ore.



## 4. Risultati

### 4.1 Analisi microbiologiche

Nel periodo compreso tra gennaio 2002 e dicembre 2012 sono stati analizzati 277 campioni di carne cruda di manzo e 267 campioni di carne cruda di avicoli.

Dall'analisi condotta sui campioni di manzo, è emerso quanto segue: 95 campioni (34,3%) sono risultati contaminati dal genere *Enterococcus* spp., 11 (3,97%) dalla specie *Listeria monocytogenes*, tra questi in 5 casi (1,81%) è stata riscontrata la presenza concomitante di *Listeria monocytogenes* e di una specie del genere *Enterococcus* (figura 4.1), con la seguente frequenza:

- *E. faecalis* e *L. monocytogenes* nel 40% dei casi;
- *E. avium* e *L. monocytogenes* nel 40% dei casi;
- *E. faecium* e *L. monocytogenes* nel 20% dei casi.

Per quanto riguarda l'analisi effettuata sulla carne di origine avicola, 94 campioni (35,21%) sono risultati contaminati da *Enterococcus* spp., 21 (7,87%) da *Listeria monocytogenes*, tra questi in 9 casi (3,37%) è stata riscontrata la presenza concomitante di *Listeria monocytogenes* e del genere *Enterococcus* (figura 4.1), con la seguente frequenza:

- *E. faecium* e *L. monocytogenes* nel 44,5% dei casi;
- *E. faecalis* e *L. monocytogenes* nel 33,3% dei casi;
- *E. gallinarum* e *L. monocytogenes* nell'11,1% dei casi;
- *E. durans*, *E. faecium* e *L. monocytogenes* nell'11,1% dei casi.

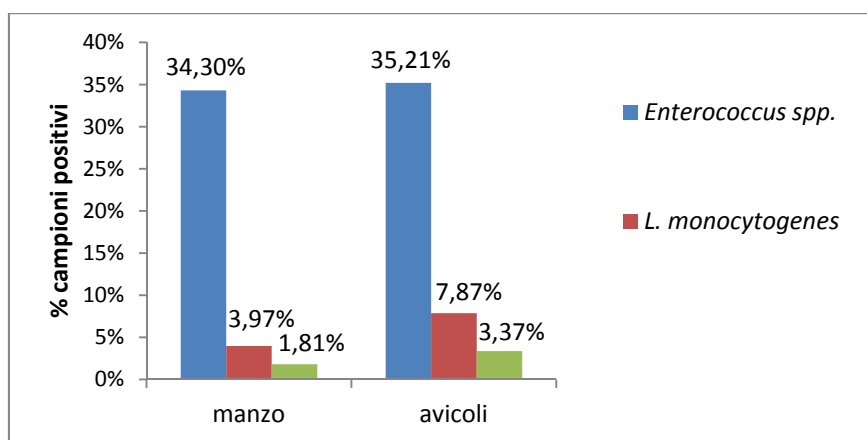


Fig. 4.1. Distribuzione della contaminazione da *Enterococcus* spp. e *L. monocytogenes* nei campioni di carne cruda di manzo e avicoli.

In due casi sono stati isolati dal medesimo campione di manzo sia *E. faecium* che *E. faecalis*, con un totale di isolati pari a 97, mentre, per quanto riguarda la carne avicola, in tre casi dallo stesso campione sono state isolate due diverse specie di *Enterococcus* (*E. faecium* e *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. durans*, *E. faecalis* e *E. durans*), con un totale di isolati pari a 97.

In tabella 4.1 è riportata la frequenza di isolamento dei ceppi di *Enterococcus* spp. e *L. monocytogenes* in entrambe le matrici alimentari considerate, suddivise per anno.

matrice al.	anno	<i>Enterococcus</i> spp.			<i>Listeria monocytogenes</i>		
		N	n	% positivi	N	n	% positivi
manzo	2002	27	8	29,6%	27	4	14,8%
	2003	25	13	52,0%	25	1	4,0%
	2004	40	15	37,5%	40	3	7,5%
	2005	31	12	38,7%	31	1	3,2%
	2006	41	12	29,3%	41	0	0,0%
	2007	28	8	28,6%	28	0	0,0%
	2008	33	14	42,4%	33	1	3,0%
	2009	10	3	30,0%	10	1	10,0%
	2010	14	4	28,6%	14	0	0,0%
	2011	17	5	29,4%	17	0	0,0%
	2012	11	3	27,3%	11	0	0,0%
<b>Totale</b>	<b>277</b>	<b>97</b>	<b>35,0%</b>	<b>277</b>	<b>11</b>	<b>4,0%</b>	
avicoli	2002	14	1	7,1%	14	0	0,0%
	2003	13	4	30,8%	13	1	7,7%
	2004	20	9	45,0%	20	1	5,0%
	2005	26	21	80,8%	26	1	3,8%
	2006	46	8	17,4%	46	1	2,2%
	2007	62	7	11,3%	62	4	6,5%
	2008	18	11	61,1%	18	3	16,7%
	2009	12	7	58,3%	12	1	8,3%
	2010	14	5	35,7%	14	1	7,1%
	2011	30	13	43,3%	30	6	20,0%
	2012	12	11	91,7%	12	2	16,7%
<b>Totale</b>	<b>267</b>	<b>97</b>	<b>36,3%</b>	<b>267</b>	<b>21</b>	<b>7,9%</b>	

N: n. di campioni analizzati n: n. di ceppi isolati % positivi: n/N

Tab. 4.1. Ceppi di *Enterococcus* spp. e *Listeria monocytogenes* isolati in campioni di carne cruda di manzo e avicoli, 2002-2012.

La prevalenza del patogeno *L. monocytogenes* è pressoché costante in entrambe le matrici alimentari fino al biennio 2009-2010, oltre il quale si nota un andamento opposto: in aumento nelle carni avicole e in diminuzione in quelle bovine (figura 4.2). Tuttavia, la differenza tra le medie osservate non è significativa (t di student,  $p=0.19$ ).

Il numero di isolati di *Enterococcus* spp. nel corso degli anni 2002-2012 risulta essere pressoché costante per i campioni di manzo, con oscillazioni della prevalenza tra il 27,3% e il 52%; il numero di isolati di avicoli, invece, presenta variazioni tra il 7,1% e

l'80,8% (figura 4.2). Anche in questo caso, la differenza tra le medie osservate non è significativa ( $p=1$ ).

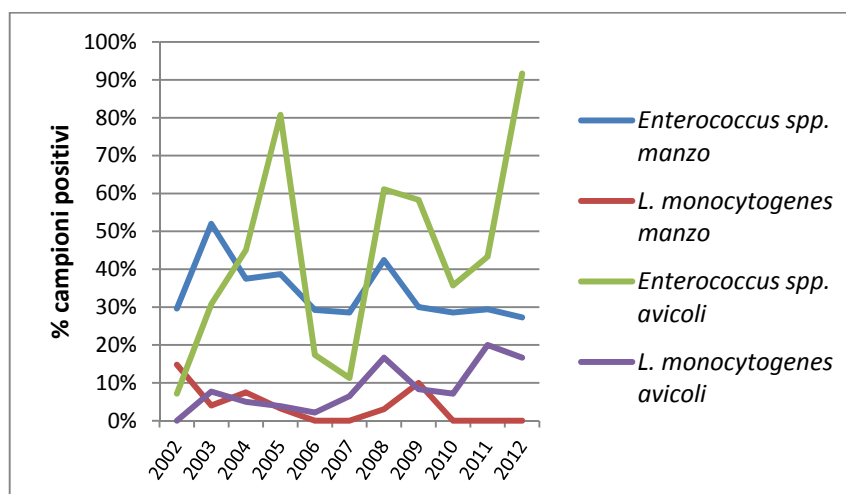


Fig. 4.2. Andamento della prevalenza di *Enterococcus* spp. e *Listeria monocytogenes* isolati in campioni di carne cruda di manzo e avicoli, 2002-2012.

La specie maggiormente isolata nei campioni di manzo è rappresentata da *E. faecalis* (50,5%), seguita da *E. faecium* (35,1%), *E. durans* (11,3%) ed *E. avium* (3,1%).

Questo andamento viene riscontrato anche per i campioni avicoli, dove la specie maggiormente isolata è *E. faecalis* (43,3%), seguita da *E. faecium* (36,1%), *E. durans* (11,3%) e *E. avium* (6,2%), a cui si aggiungono, rispetto alla carne di manzo, *E. gallinarum* (2,1%) ed *E. casseliflavus* (1%) (figura 4.3).

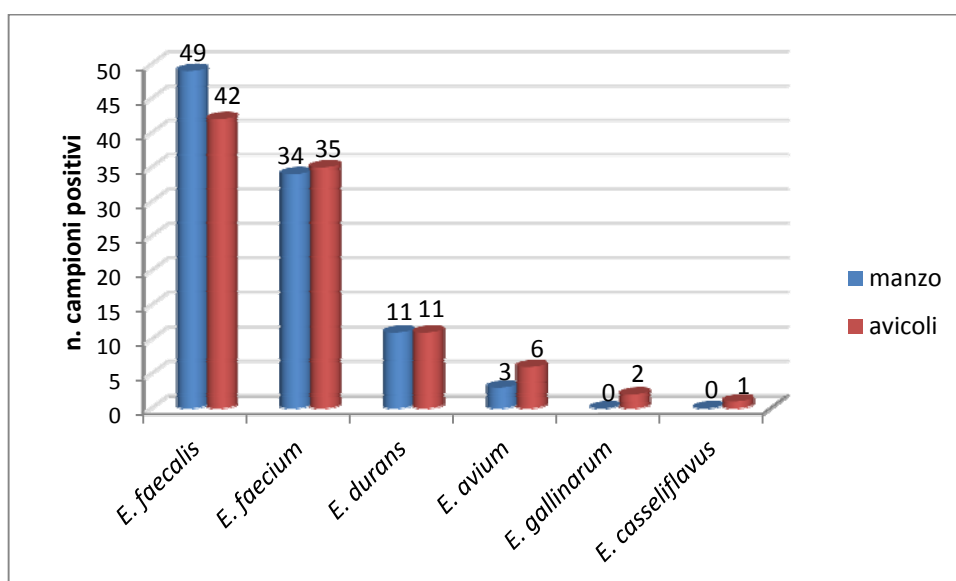


Fig. 4.3. Distribuzione delle specie di *Enterococcus* isolate da carne di manzo e avicoli.

Il numero di ceppi di enterococchi isolati per anno è maggiore nei campioni di manzo rispetto a quelli di carne avicola fino all'anno 2008, fatta eccezione per l'anno 2005; dal 2009 in poi si riscontra invece una tendenza contraria, con un maggiore numero di isolati nei campioni di carne avicola (tabella 4.2).

Se si considera la distribuzione totale delle specie di *Enterococcus* isolate (figura 4.3), si nota che in entrambe le matrici alimentari la specie *E. faecalis* ha una prevalenza maggiore rispetto alla specie *E. faecium*. Se si effettua un'analisi della distribuzione suddivisa per singolo anno (tabella 4.2), non si notano differenze statistiche significative in entrambe le matrici considerate ( $p=0.175$  per il manzo e  $p=0.497$  per gli avicoli), infatti in alcuni anni si verifica una inversione di tendenza, con un maggior numero di isolati della specie *E. faecium* rispetto a *E. faecalis* (2006 e 2011 per la carne di manzo, 2008 e 2011 per gli avicoli), e in altri anni si riscontra una pari percentuale di isolamento di *E. faecium* ed *E. faecalis* (2007 e 2008 per il manzo, 2007 per gli avicoli).

Totale isolati per anno	Specie	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
	<i>E. faecalis</i>	6	10	11	14	9	7	9	6	6	5	8
	<i>E. faecium</i>	1	4	8	10	10	7	13	2	2	10	2
	<i>E. durans</i>	0	2	2	7	1	0	2	2	1	2	3
	<i>E. avium</i>	2	1	2	2	0	1	1	0	0	0	0
	<i>E. gallinarum</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
	<i>E. casseliflavus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	<b>Totale (A)</b>	<b>9</b>	<b>17</b>	<b>24</b>	<b>33</b>	<b>20</b>	<b>15</b>	<b>25</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	<b>18</b>	<b>14</b>
matrice al.	Specie	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %
manzo	<i>E. faecalis</i>	5 62,5%	8 61,5%	7 46,7%	6 50,0%	4 33,3%	4 50,0%	6 42,9%	3 100,0%	2 50,0%	1 20,0%	3 100,0%
	<i>E. faecium</i>	1 12,5%	3 23,1%	5 33,3%	3 25,0%	7 58,3%	4 50,0%	6 42,9%	- -	1 25,0%	4 80,0%	- -
	<i>E. durans</i>	- -	2 15,4%	2 13,3%	3 25,0%	1 8,4%	- -	2 14,2%	- -	1 25,0%	- -	- -
	<i>E. avium</i>	2 25,0%	- -	1 6,7%	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
	<i>E. gallinarum</i>	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
	<i>E. casseliflavus</i>	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
	<b>Totale (N)</b>	<b>8 88,9%</b>	<b>13 76,5%</b>	<b>15 62,5%</b>	<b>12 36,4%</b>	<b>12 60,0%</b>	<b>8 53,3%</b>	<b>14 56,0%</b>	<b>3 30,0%</b>	<b>4 44,4%</b>	<b>5 27,8%</b>	<b>3 21,4%</b>
avicoli	<i>E. faecalis</i>	1 100,0%	2 50,0%	4 44,5%	8 38,1%	5 62,5%	3 42,9%	3 27,3%	3 42,8%	4 80,0%	4 30,8%	5 45,5%
	<i>E. faecium</i>	- -	1 25,0%	3 33,3%	7 33,3%	3 37,5%	3 42,9%	7 63,6%	2 28,6%	1 20,0%	6 46,1%	2 18,2%
	<i>E. durans</i>	- -	- -	- -	4 19,1%	- -	- -	- -	2 28,6%	- -	2 15,4%	3 27,3%
	<i>E. avium</i>	- -	1 25,0%	1 11,1%	2 9,5%	- -	1 14,2%	1 9,1%	- -	- -	- -	- -
	<i>E. gallinarum</i>	- -	- -	1 11,1%	- -	- -	- -	- -	- -	- -	1 7,7%	- -
	<i>E. casseliflavus</i>	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	1 9,1%
	<b>Totale (N)</b>	<b>1 11,1%</b>	<b>4 23,5%</b>	<b>9 37,5%</b>	<b>21 63,6%</b>	<b>8 40,0%</b>	<b>7 46,7%</b>	<b>11 44,0%</b>	<b>7 70,0%</b>	<b>5 55,6%</b>	<b>13 72,2%</b>	<b>11 78,6%</b>

n% = n/N = numero di isolati per specie per anno/numero totale di isolati per matrice per anno

N% = N/A = numero totale di isolati per matrice per anno/numero totale di isolati in quell'anno

Tab. 4.2 Specie di *Enterococcus* spp. isolati, suddivisi per anno e matrice alimentare.

## 4.2 Agar Spot Test e Agar Well Diffusion

La capacità di produrre batteriocine è stata valutata, tramite la tecnica dell'Agar Spot test e dell'Agar Well Diffusion, su tutti i ceppi di enterococchi isolati da carne cruda di manzo e avicoli in cui non è stata riscontrata la contemporaneamente contaminazione del genere *Listeria*. Il primo screening effettuato è stato l'agar spot test, che ha consentito di individuare i ceppi con attività antimicrobica nei confronti del microrganismo indicatore *L. monocytogenes* ATCC 7644 (figura 4.4). I ceppi positivi all'agar spot test sono stati poi sottoposti al metodo dell'agar well diffusion, al fine di individuare eventuali composti inibitori secreti nel mezzo liquido di crescita.



Fig. 4.4. Agar spot test con evidenti aloni di inibizione dei ceppi 374 e 2658 nei confronti di *L. monocytogenes* ATCC 7644.

L'agar spot test è stato eseguito su 71 ceppi di *Enterococcus* spp. isolati da carne bovina e su 66 ceppi isolati da carne avicola. Dall'analisi effettuata, la presenza di composti inibitori secreti dagli enterococchi isolati da manzo è risultata essere circa il doppio rispetto alla carne avicola, con rispettivamente 30 ceppi (42,3%) e 13 ceppi (19,7%) che hanno dato esito positivo al test (figura 4.5).

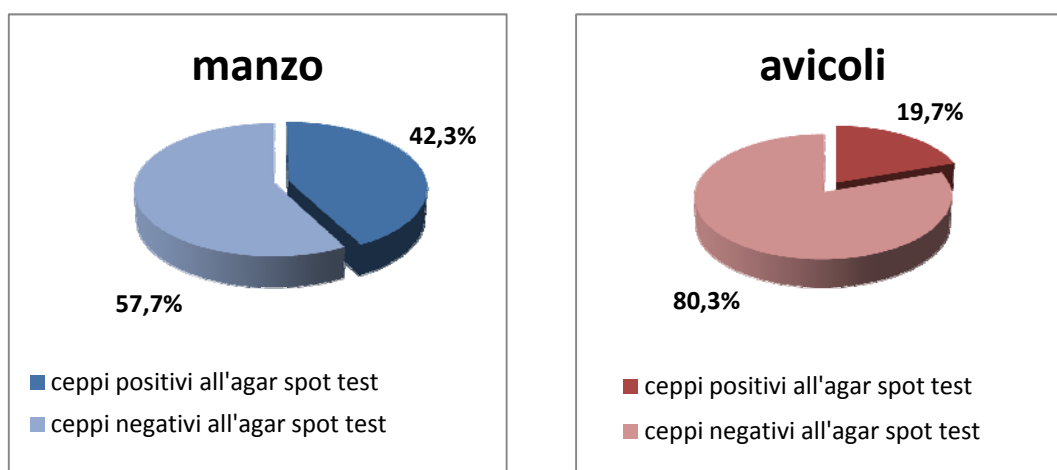


Fig. 4.5. Percentuale dei ceppi risultati positivi e negativi all'agar spot test.

Dei 30 ceppi isolati da manzo risultati positivi al test, 13 appartengono alla specie *E. faecalis*, 13 a *E. faecium*, 3 a *E. durans* e 1 a *E. avium*. Dei 13 ceppi isolati da avicoli risultati positivi al test, 7 appartengono alla specie *E. faecalis*, 2 a *E. faecium*, 2 a *E. avium*, 1 a *E. durans* e 1 a *E. casseliflavus* (figura 4.6).

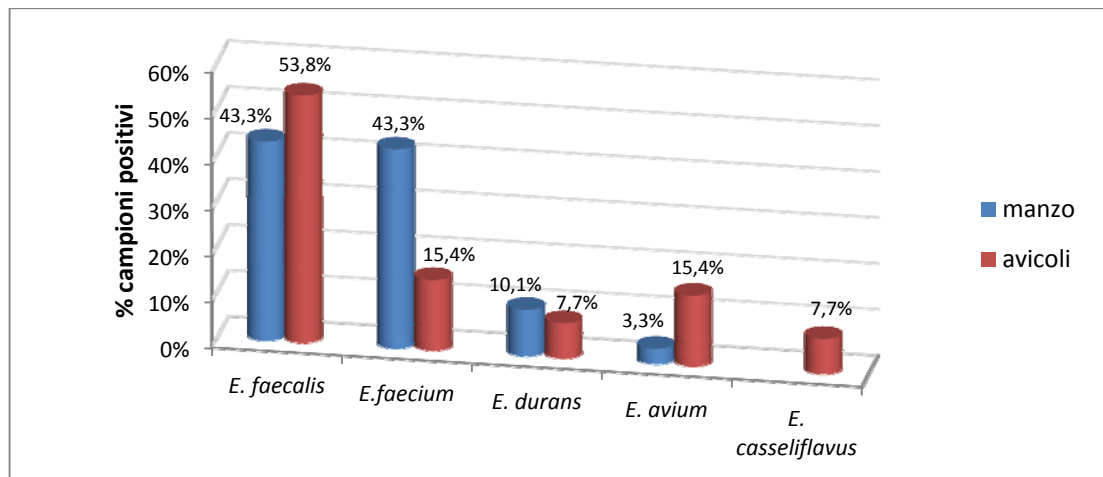


Fig. 4.6. Distribuzione delle specie di *Enterococcus* positive all'agar spot test, per matrice alimentare.

I surnatanti dei ceppi che hanno dato esito positivo all'agar spot test sono stati testati con la tecnica dell'agar well diffusion (figura 4.7) e successivamente trattati con proteasi, per accertare l'effettiva natura proteica dell'agente inibente la crescita di *Listeria monocytogenes* ATCC, e con catalasi, al fine di escludere l'attività inibitoria prodotta dal perossido d'idrogeno sulla crescita di *L. monocytogenes* ATCC.



Fig. 4.7. Aloni di inibizione prodotti dai surnatanti dei ceppi di *Enterococcus* 945 e 1470 con la tecnica dell'agar well diffusion.

Dei 30 ceppi di *Enterococcus* spp. isolati da carne bovina e dei 13 ceppi di *Enterococcus* spp. isolati da carne avicola, rispettivamente 9 e 3 hanno dato esito positivo all'agar well diffusion. In seguito a trattamento con proteasi, è stato possibile escludere la natura proteica di uno dei 3 surnatanti provenienti dai ceppi isolati da carne avicola, deducendone quindi che l'attività inibitoria non era dovuta alla presenza di batteriocina (figura 4.8).

Come per l'agar spot test, anche in questo caso si può affermare che, tra i surnatanti degli enterococchi risultati positivi all'agar spot test, quelli isolati da manzo hanno dato esito positivo all'agar well diffusion per circa il doppio (30%) rispetto a quelli isolati da carne avicola (15,4%).

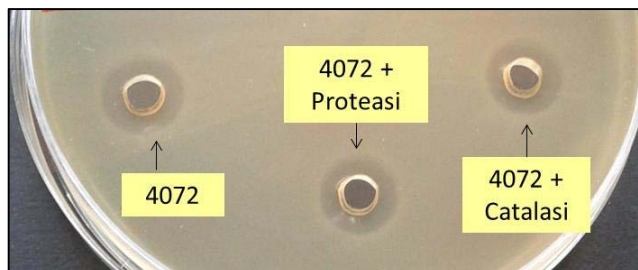


Fig. 4.8. In seguito a trattamento con proteasi, il surnatante del ceppo 4072 produce l'alone di inibizione.

Per quanto riguarda i surnatanti dei ceppi provenienti da manzo, sono risultati positivi 2 ceppi di *E. faecalis*, il 6,1% dei 33 enterococchi appartenenti a questa specie presi in esame, e 7 ceppi di *E. faecium*, il 25% dei 28 appartenenti al campione iniziale (figura 4.9). Degli enterococchi di origine bovina testati, quindi, la specie *E. faecium* è risultata maggiormente produttrice di batteriocine rispetto a *E. faecalis*.

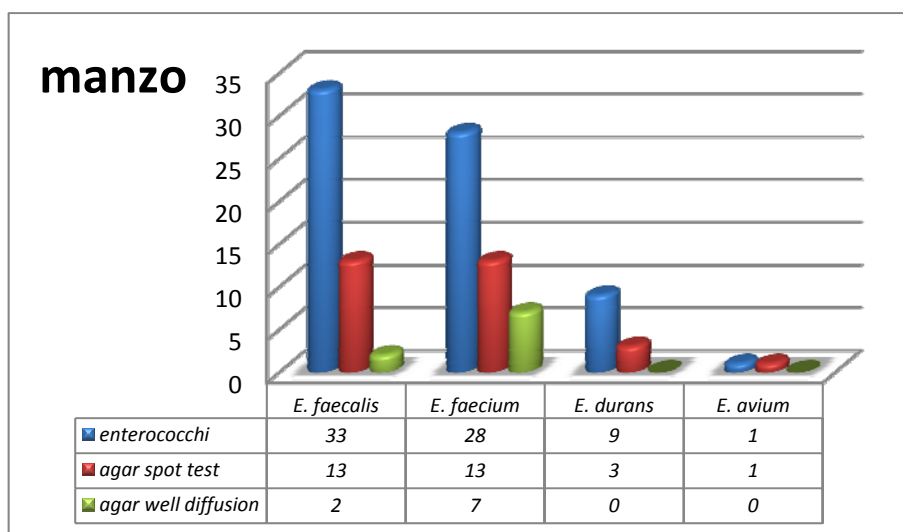


Fig. 4.9. Risultati dell'agar spot test e dell'agar well diffusion sui surnatanti dei ceppi di *Enterococcus* spp. isolati in campioni di manzo.

Per quanto riguarda i surnatanti dei ceppi provenienti da avicoli, sono risultati positivi 1 ceppo di *E. faecalis*, il 3,5% dei 29 enterococchi appartenenti a questa specie presi in esame, e 1 ceppo di *E. avium*, il 33,3% dei 3 appartenenti al campione iniziale (figura 4.10).



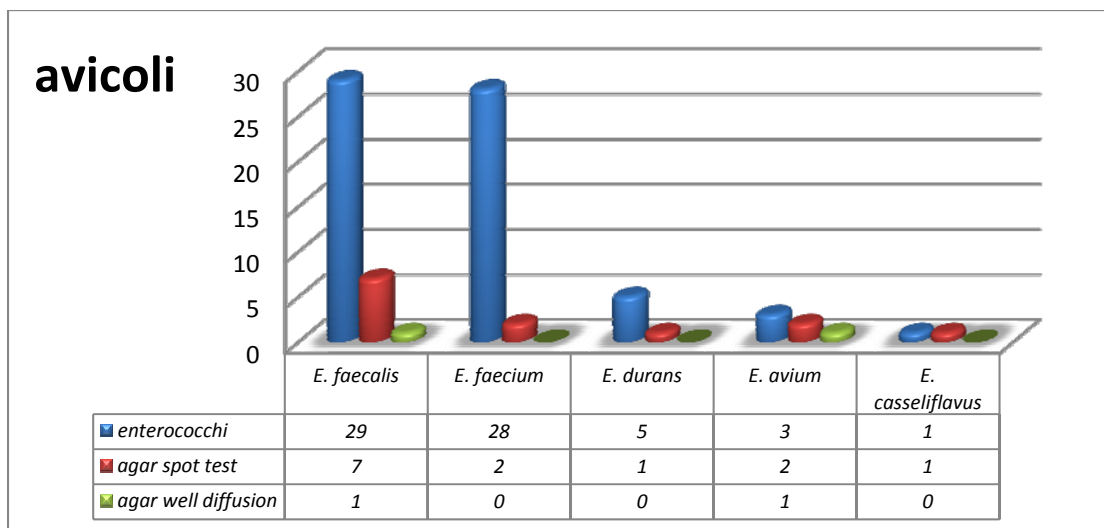


Fig. 4.10. Risultati dell'agar spot test e dell'agar well diffusion sui surnatanti dei ceppi di *Enterococcus* spp. isolati in campioni di avicoli.

In conclusione, hanno dimostrato di essere produttori di batteriocina 9 ceppi di *Enterococcus* spp. su 71 (12,7%) provenienti da carne di manzo, e 2 ceppi su 66 (3%) provenienti da carne di avicoli. Per convenienza, i ceppi produttori sono stati indicati con le seguenti sigle:

- FMm1, FMm2, FMm3, FMm4, FMm5, FMm6 e FMm7 i ceppi di *E. faecium* e FLm1 e FLm2 i ceppi di *E. faecalis* provenienti da carne di manzo;
- FLa1 il ceppo di *E. faecalis* e Aa1 il ceppo di *E. avium* provenienti da carne avicola.

Da segnalare, infine, la presenza in 6 surnatanti testati (tabella 4.3) di due aloni di inibizione: un alone prossimale, caratterizzato da margini meno netti, in cui è completamente assente la crescita di *L. monocytogenes* ATCC, ed un alone distale, caratterizzato da margini decisi, in cui è visibile una riduzione della crescita del microrganismo indicatore. Tale fenomeno è stato riscontrato, oltre che nel test di agar well diffusion, anche in tutti i test supplementati eseguiti successivamente (valutazione dell'attività antimicrobica a differenti temperature, a differenti pH e nei confronti di differenti ceppi di *Listeria monocytogenes*) e può essere imputabile alla produzione di due batteriocine da parte del microrganismo testato, con una batteriocina più efficace rispetto all'altra e con effetti diversi sui vari ceppi di *Listeria monocytogenes* analizzati.

ceppo	FMm 1		FMm 2		FMm 3		FMm 4		FMm 5		FMm 6		FMm 7		FLm 1		FLm 2		Fla 1		Aa 1	
alone in mm	int	ext	int	ext	int	ext	int	ext	int	ext	int	ext	int	ext	int	ext	int	ext	int	ext	int	ext
		19	—	13	19	11	17	11	17	11	17	13	19	11	17	13	—	11	—	11	—	11

Tab. 4.3. Valori dei diametri degli aloni di inibizione prossimale e distale ottenuti tramite la metodica dell'agar well diffusion.

### 4.3 Attività antimicrobica a differenti temperature

Tutti i surnatanti contenenti batteriocina sono stati sottoposti a trattamento termico, per tempi e temperature differenti:

- 70°C per 10 min, 20 min, 30 min
- 80°C per 10 min, 20 min, 30 min
- 90°C per 10 min, 20 min, 30 min
- 100°C per 10 min, 20 min, 30 min
- 121°C per 15 min

Sui surnatanti trattati è stato successivamente effettuato il test dell'agar well diffusion, al fine di valutare la permanenza o meno dell'attività antimicrobica nei confronti del ceppo indicatore *L. monocytogenes* ATCC.

Come mostrato in tabella 4.4, si nota un mantenimento dell'attività inibitoria delle batteriocine contenute nei surnatanti trattati, sebbene, in generale, all'aumentare delle temperature si riscontri una diminuzione del diametro di inibizione, fino in taluni casi ad arrivare alla completa scomparsa dello stesso alla temperatura di 121°C×15 minuti.

	FMm1	FMm2	FMm3	FMm4	FMm5	FMm6	FMm7	FLm1	FLm2	Fla1	Aa1
<b>controllo</b>	19	13	11	11	11	13	11	13	11	11	11
<b>70x10</b>	19	11	11	11	9	11	11	13	11	11	11
<b>70x20</b>	19	11	11	11	9	11	11	13	11	11	11
<b>70x30</b>	19	9	11	11	9	11	11	13	11	11	11
<b>80x10</b>	19	9	11	11	9	11	11	13	11	11	11
<b>80x20</b>	19	9	11	9	9	11	11	13	11	11	11
<b>80x30</b>	17	9	11	9	9	11	11	13	11	11	11
<b>90x10</b>	17	9	11	9	9	11	9	11	11	11	11
<b>90x20</b>	17	9	11	9	9	11	9	11	11	11	11
<b>90x30</b>	15	8	9	9	9	10	9	11	11	11	11
<b>100x10</b>	15	8	9	8	9	10	9	11	11	11	11
<b>100x20</b>	15	8	9	8	9	10	9	11	11	11	11
<b>100x30</b>	15	8	9	8	9	10	9	11	11	11	11
<b>121x15</b>	5	5	5	5	5	5	5	9	5	11	11

Tab. 4.4. Valori in mm dei diametri degli aloni di inibizione ottenuti per ciascun ceppo, in seguito a trattamento termico a diversi tempi e temperature. Il valore 5 mm corrisponde al diametro del pozzetto, ovvero ad assenza di inibizione.

Tutti i surnatanti prodotti dai ceppi di *E. faecium*, sebbene con andamenti diversi (figura 4.11), subiscono una riduzione del diametro di inibizione fino alla temperatura di 100°C×30 minuti, per poi perdere completamente l'attività antimicrobica alla temperatura di 121°C×15 minuti.

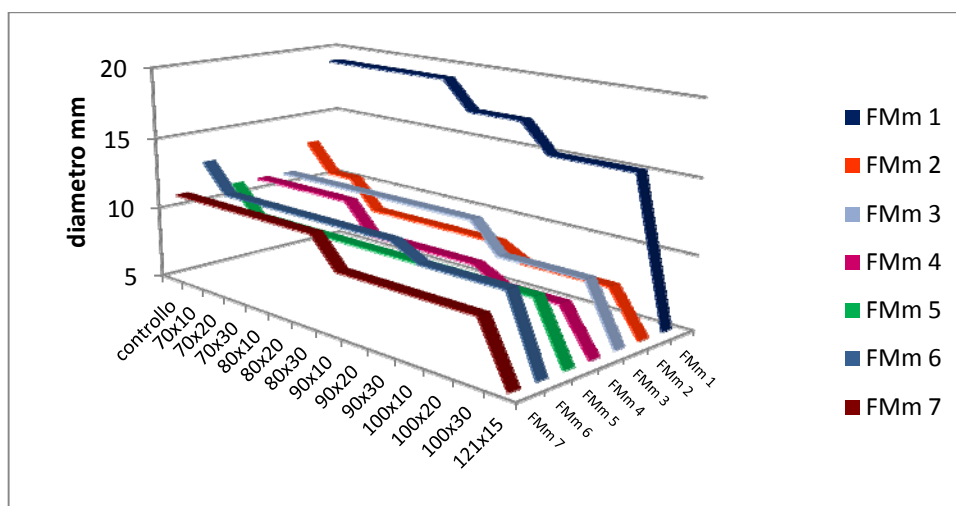


Fig. 4.11. Decremento dell'alone d'inibizione in seguito ai trattamenti termici sui ceppi di *E. faecium*.

I ceppi di *E. faecalis* testati provengono sia da carne bovina che avicola (figura 4.12). I diametri di inibizione di FLm2 sono costanti fino al trattamento termico di 100°C×30 minuti, per poi scomparire in seguito al trattamento di 121°C×15 minuti, mentre per i ceppi FLm1 e FLa1 l'attività inibitoria si mantiene anche alla temperatura di sterilizzazione. In particolare, il diametro di FLm1, in seguito all'esposizione di 121°C×15 minuti, si riduce di 4 mm rispetto all'alone osservato nel controllo, mentre il diametro di FLa1 non subisce alcuna modifica rispetto ai trattamenti termici. Il ceppo *E. avium* Aa1 mostra un andamento identico a quello del ceppo *E. faecalis* FLa1, con i valori dei diametri di inibizione che rimangono invariati in tutti i trattamenti.

Dai risultati ottenuti, si può dedurre che le batteriocine isolate dai ceppi FLm1, FLa1 e Aa1 siano termostabili. In particolare, FLa1 e Aa1 non hanno mostrato alcuna modificazione del diametro di inibizione rispetto al valore ottenuto con il surnatante di controllo, che è stato esclusivamente sottoposto a un trattamento di 80°C per 10 minuti, al fine di disattivare le eventuali proteasi presenti.

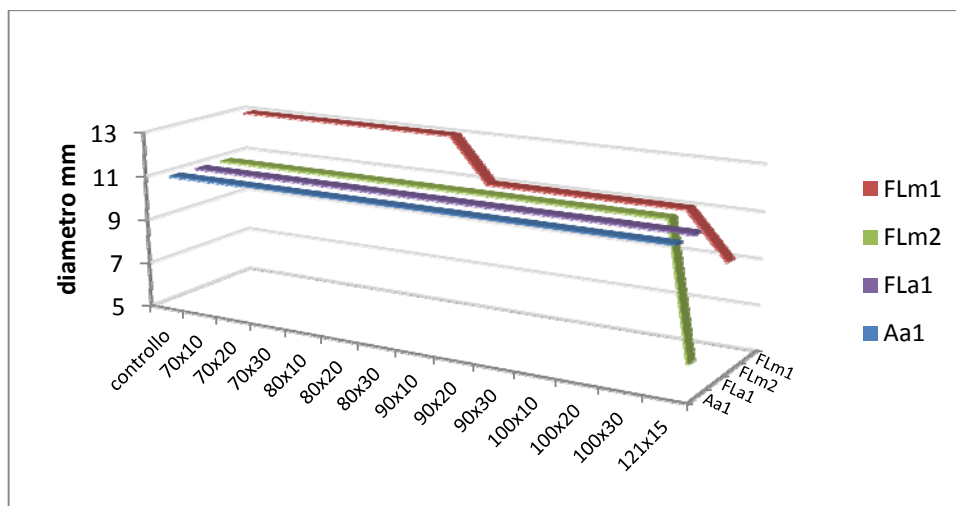


Fig. 4.12. Decremento dell'alone d'inibizione in seguito ai trattamenti termici sui ceppi di *E. faecalis* e *E. avium*.

In figura 4.13 sono messi a confronto gli andamenti degli aloni interni ed esterni dei 6 surnatanti che hanno formato due aloni di inibizione. Come si nota, il trend di diminuzione dei diametri degli aloni esterni è simile a quello degli aloni interni, addirittura in 4 ceppi su 6 (FMm3, FMm5, FMm6 e FMm7) risulta essere parallelo, per arrivare in tutti i casi all'annullamento dell'attività inibitoria a 121°C×15 minuti.

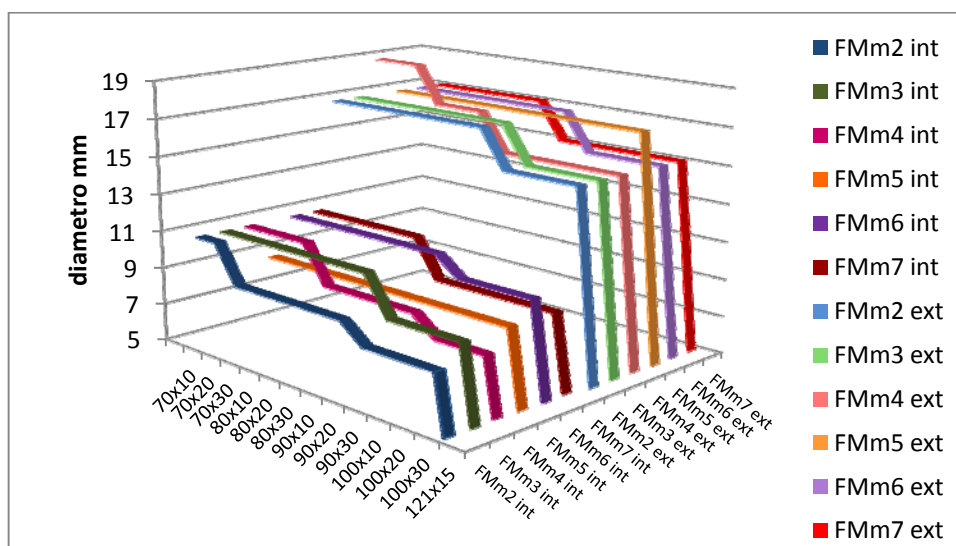


Fig. 4.13. Decremento degli aloni prossimale (int) e distale (ext) in seguito ai trattamenti termici dei surnatanti di *E. faecium* FMm2, FMm3, FMm4, FMm5, FMm6 e FMm7.

## 4.4 Attività antimicrobica a differenti valori di pH

Tramite l'impiego di NaOH e HCl 5M, il pH dei surnatanti contenenti enterocina sono stati variati ai valori 4, 5, 6, 6.5 e 7 e testati, tramite il test dell'agar well diffusion, al fine di valutare la loro attività antimicrobica nei confronti del ceppo indicatore *L. monocytogenes* ATCC (figura 4.14). Il range dei pH testati comprende valori di pH che si riscontrano in numerosi alimenti, e in particolare nelle carni crude.

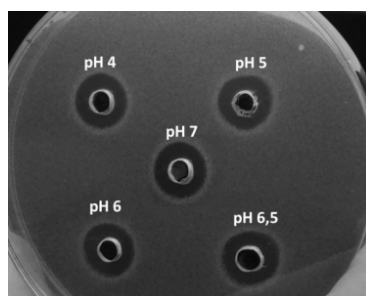


Fig. 4.14. Agar Well Diffusion del surnatante del ceppo FMm2 a differenti valori di pH.

In tutti i ceppi, e per tutti i valori di pH testati, non si sono verificate rilevanti modifiche nel diametro degli aloni d'inibizione (tabella 4.5). In particolare, i surnatanti dei ceppi FMm2, FMm7, FLm2 e FLa1 hanno mostrato dei diametri costanti per tutti i trattamenti. È quindi possibile dedurre che le enterocine testate siano stabili a valori di pH compresi tra 4 e 7.

	FMm1	FMm2	FMm3	FMm4	FMm5	FMm6	FMm7	FLm 1	FLm 2	FLa 1	Aa 1
pH 4	17	13	13	9	11	13	11	11	11	11	10
pH 5	17	13	13	11	11	13	11	11	11	11	11
pH 6	17	13	13	11	11	13	11	13	11	11	11
pH 6.5	19	13	11	11	11	13	11	13	11	11	11
pH 7	17	13	11	11	13	15	11	11	11	11	11

Tab. 4.5. Misura in mm dei diametri degli aloni di inibizione ai differenti valori di pH testati.

In figura 4.15 vengono messi a confronto gli andamenti degli aloni interni e esterni dei ceppi FMm2, FMm3, FMm4, FMm5, FMm6 e FMm7 che, come accaduto in precedenza, hanno generato un doppio alone di inibizione attorno al pozzetto. L'andamento dei diametri di inibizione relativi agli aloni esterni è simile a quello degli aloni interni e in 3 ceppi (FMm2, FMm3, FMm5) risulta essere parallelo.

Nel ceppo FMm2 il diametro degli aloni prossimale e distale è costante (13 e 19 mm) per tutti i valori di pH testati. Nel ceppo FMm3 entrambi gli aloni presentano un

diametro costante a pH 4, 5 e 6 (13 e 19 mm), per poi aumentare e in entrambi i casi rimanere invariato a pH 6.5 e 7 (11 e 17 mm). In FMm4 il diametro risulta essere al minimo in entrambi gli aloni a pH 4 (9 e 13 mm), per poi raggiungere i massimi valori a pH 6.5 e 7 (11 e 17 mm). In FMm5 entrambi gli aloni presentano un diametro costante da pH 4 a 6.5 (11 e 17 mm), per poi aumentare in entrambi i casi a pH 7 (13 e 19 mm). In FMm6 l'alone interno è costante da pH 4 a 6.5 (13 mm) e aumenta a pH 7 (15 mm), mentre l'alone esterno rimane costante a 19 mm per tutti i valori di pH. Infine, in FMm7 l'alone interno è costante e pari a 11 mm, mentre l'alone esterno ha un diametro di 19 mm a pH 4, per poi stabilizzarsi a 17 mm per i restanti valori di pH.

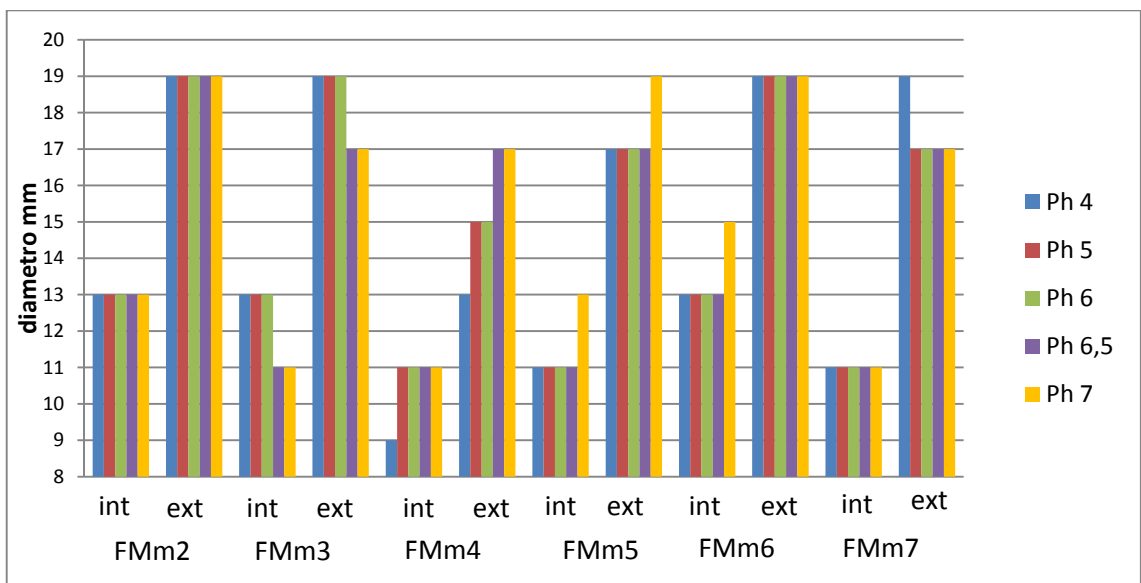


Fig. 4.15. Andamento degli aloni prossimale (int) e distale (ext) in seguito a variazione di pH dei surnatanti di *E. faecium* FMm2, FMm3, FMm4, FMm5, FMm6 e FMm7.

## 4.5 Spettro di attività

L'attività dei surnatanti contenenti batteriocina è stata testata su un totale di 28 ceppi di *L. monocytogenes*, appartenenti a differenti gruppi sierologici e provenienti sia da campioni alimentari che clinici (tabella 4.6).

<i>L. monoc</i>	Sierogr	origine	Surnatanti										
			FMm 1	FMm 2	FMm 3	FMm 4	FMm 5	FMm 6	FMm 7	FLm 1	FLm 2	Fla 1	Aa 1
7644	1/2c	ATCC	19	13	11	11	11	13	11	13	11	11	11
179	1/2c	manzo	19	11	9	11	11	11	9	7	7	5	5
221	4b	manzo	23	15	13	15	13	15	13	15	9	7	7
473	1/2c	manzo	17	11	11	11	11	9	9	9	7	5	5
474	1/2c	manzo	19	13	11	11	13	15	11	9	9	7	7
917	1/2c	manzo	19	13	13	11	11	13	11	11	7	9	9
2675	4b	manzo	17	11	11	11	11	11	11	11	7	5	5
2920	4b	manzo	23	13	13	13	15	13	13	13	7	9	9
3722	1/2a	avicoli	17	11	11	9	11	11	9	9	9	5	5
3759	1/2c	avicoli	17	11	11	11	11	13	11	11	9	7	5
3763	1/2a	avicoli	17	11	11	13	13	11	11	9	9	5	5
3764	1/2a	avicoli	17	11	11	11	11	11	9	9	9	5	5
3765	1/2a	avicoli	19	13	13	11	13	13	11	11	11	5	5
4023	1/2c	avicoli	19	13	11	11	13	11	11	11	11	5	5
4037	1/2c	avicoli	19	11	11	11	13	11	11	11	11	7	5
3747	1/2b	uomo	21	13	13	13	13	13	13	13	7	9	5
3748	4b	uomo	23	13	13	13	15	13	11	15	13	9	5
3749	4b	uomo	21	13	13	13	13	13	13	13	7	7	5
3750	1/2a	uomo	19	12	13	13	13	13	11	9	7	5	5
3751	1/2a	uomo	17	11	11	11	11	11	11	9	7	5	5
3752	1/2b	uomo	23	15	13	15	15	15	13	17	15	9	5
3753	4b	uomo	21	13	13	13	13	13	11	13	7	7	5
3755	4b	uomo	21	11	13	11	13	11	11	15	9	9	5
3756	1/2a	uomo	19	11	11	11	11	13	11	9	9	5	5
3757	1/2b	uomo	21	13	13	15	15	13	13	15	13	9	5
3758	1/2a	uomo	19	11	11	11	13	13	11	11	11	7	5
3948	1/2a	uomo	19	11	11	12	11	11	11	9	7	5	5
4002	1/2b	uomo	23	15	15	15	15	17	15	15	11	11	5
4003	1/2a	uomo	19	12	11	11	13	11	11	11	9	7	5

Tab. 4.6. Diametro, in mm, degli aloni di inibizione prodotti dai surnatanti contenenti batteriocina nei confronti di 7 ceppi di *Listeria monocytogenes* isolate da manzo, 7 isolate da avicoli e 14 isolate da uomo. Il valore 5 mm corrisponde al diametro del pozzetto, ovvero ad assenza di inibizione.

In generale, i surnatanti testati si sono dimostrati attivi nei confronti dei 28 ceppi di *L. monocytogenes* utilizzati. Solo in due casi è stato possibile notare una notevole diminuzione di attività, se confrontata con quella ottenuta verso *L. monocytogenes* ATCC, dei surnatanti dei ceppi FLa1 e Aa1 in cui sono stati prodotti aloni del diametro di 11 mm nei confronti del ceppo ATCC, mentre verso i 28 ceppi testati FLa1 ha mostrato un valore medio dei diametri pari a 6,8 mm e Aa1 ha presentato un valore medio pari a 6,7 mm nei confronti delle listerie isolate da manzo, per poi perdere qualsiasi attività nei confronti delle listerie isolate dai campioni avicoli e di origine umana.

Per quanto riguarda il confronto tra le medie dei diametri ottenuti nei confronti dei ceppi di *L. monocytogenes* provenienti da manzo rispetto a quelli di origine avicola, non si notano differenze significative ( $p > 0.05$ ) ad eccezione che per i ceppi FLm2 e Aa1: FLm2 presenta un valore medio di diametro di 7,6 mm per le listerie isolate da manzo e di 9,8 mm per le listerie da avicoli ( $p = 0.001$ ), mentre Aa1 presenta un valore medio di diametro di 6,7 mm per le listerie isolate da manzo e di 5 mm per le listerie da avicoli ( $p = 0.03$ ).

Se si considerano invece le medie dei diametri di inibizione ottenute nei confronti delle listerie di origine alimentare rispetto a quelle di origine umana, esiste differenza significativa in sei ceppi: FMm1 ( $p = 0.03$ ), FMm3 ( $p = 0.03$ ), FMm4 ( $p = 0.04$ ), FMm7 ( $p = 0.03$ ), FLm1 ( $p = 0.04$ ) e Aa1 ( $p = 0.04$ ). In tutti i casi il valore medio dei diametri è maggiore per le listerie umane, ad eccezione di Aa1, dove è maggiore per le listerie di origine alimentare.

In figura 4.16 sono messi a confronto gli aloni prossimale e distale prodotti dai surnatanti dei ceppi FMm2, FMm3, FMm4, FMm5, FMm6 e FMm7. Gli aloni distali seguono un andamento simile a quello prodotto dagli aloni prossimali, infatti presentano differenza significativa solo quando si confrontano le medie dei diametri ottenuti nei confronti delle listerie alimentari e umane, per i ceppi FMm3 ( $p = 0.03$ ), FMm4 ( $p = 0.04$ ) e FMm7 ( $p = 0.02$ ).



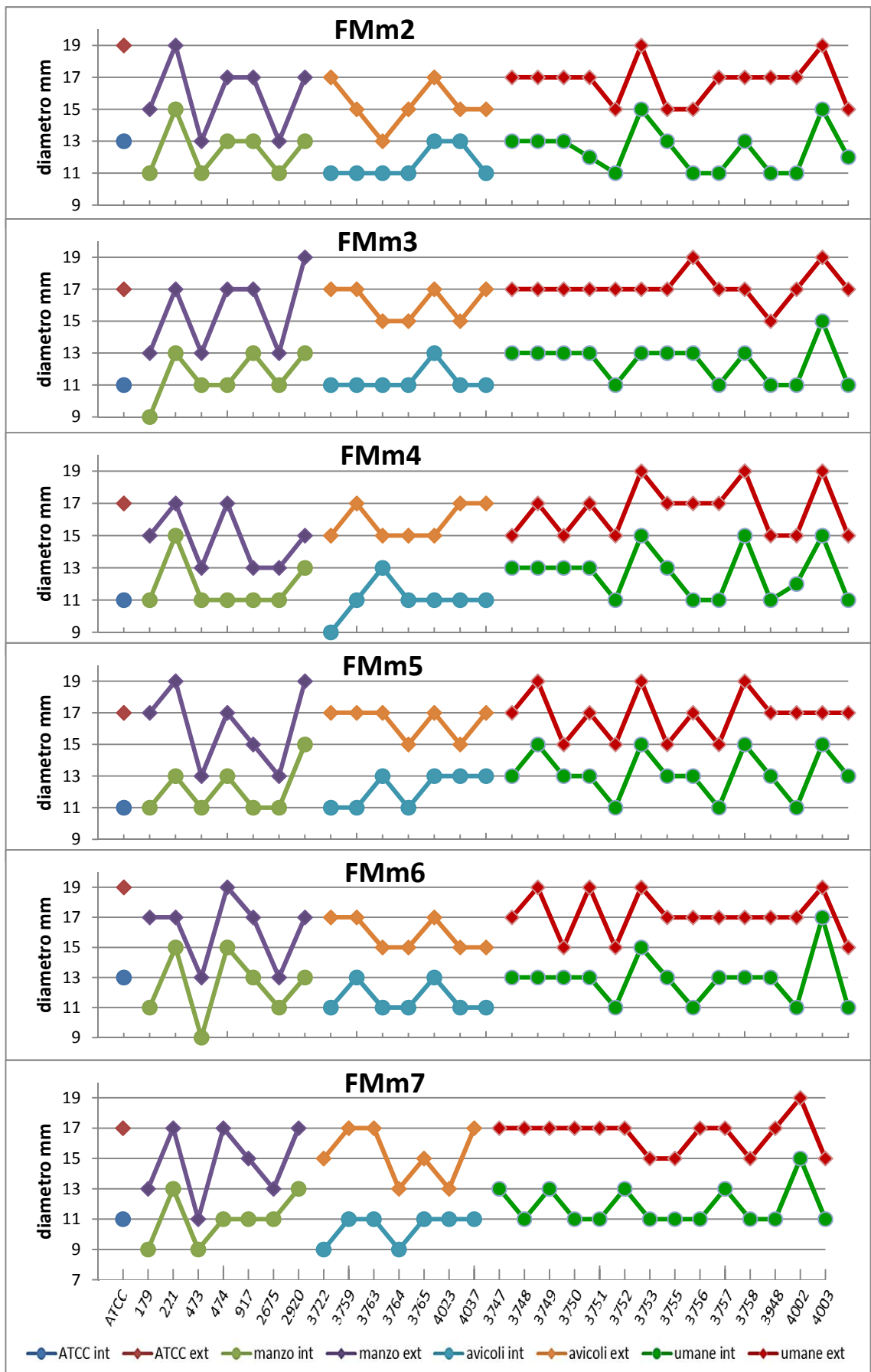


Fig. 4.16. Diametro, in mm, degli aloni interno ed esterno prodotti dai surnatanti FMm2, FMm3, FMm4, FMm5, FMm6 e FMm7 verso i 28 ceppi di *L. monocytogenes* provenienti da manzo, avicoli e uomo.

## 4.6 Antibiotico-resistenza

L'analisi delle antibiotico-resistenze dei 7 ceppi di *E. faecium* produttori di enterocine ha evidenziato un'elevata percentuale di resistenza (42,9%) nei confronti della penicillina G. Il 28,6% dei ceppi è risultato resistente alla eritromicina, mentre nei confronti di tetraciclina e ciprofloxacina la percentuale dei ceppi resistenti è risultata in entrambi i casi del 14,3% (figura 4.17). Per quanto riguarda i 5 ceppi di *E. faecalis* produttori di batteriocina, la distribuzione delle antibiotico-resistenze ha evidenziato una percentuale notevole di ceppi resistenti alla tetraciclina (60%), seguita dal 40% di resistenza nei confronti dell'eritromicina e dal 20% al cloramfenicolo (figura 4.17).

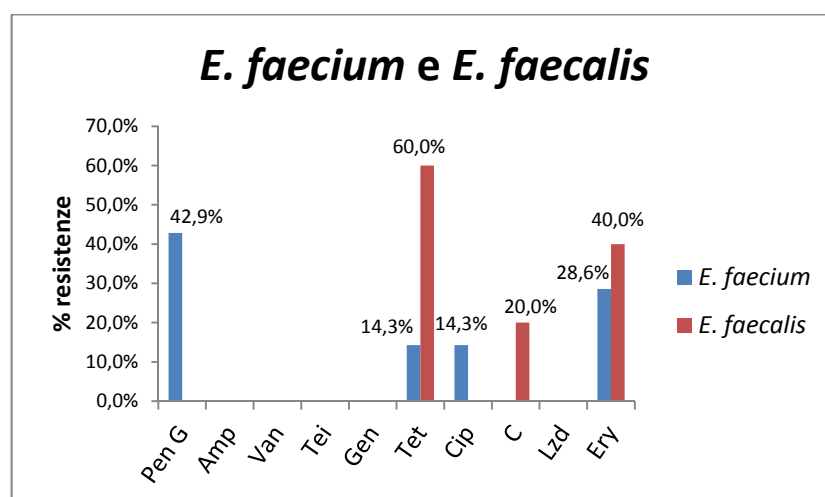


Fig. 4.17. Profilo di antibiotico-resistenza dei ceppi *E. faecium* FMm1, FMm2, FMm3, FMm4, FMm5, FMm6, FMm7 e dei ceppi *E. faecalis* FLm1, FLm2, FLm3, FLm4 e FLa1. Pen G = penicillina G; Amp = ampicillina; Van = vancomicina; Tei = teicoplanina; Gen = gentamicina; Tet = tetraciclina; Cip = ciprofloxacina; C = cloramfenicolo; Lzd = linezolid; Ery = eritromicina.

Il solo ceppo appartenente alla specie *E. avium* (Aa1) produttore di batteriocine è risultato resistente a teicoplanina, tetraciclina, linezolid e eritromicina.

Dei 13 enterococchi identificati come produttori di batteriocina, Aa1 è l'unico ad aver mostrato resistenza nei confronti di più di tre antibiotici, e può quindi essere definito multiresistente. Negli altri casi, 3 ceppi non hanno mostrato alcuna resistenza verso tutti gli antibiotici testati, 5 ceppi hanno mostrato resistenza verso 1 antibiotico e 4 ceppi verso due antibiotici.

È stata effettuata l'analisi delle antibiotico-resistenze anche sui 28 ceppi di *L. monocytogenes* utilizzati come indicatori negli esperimenti sullo spettro di attività (figura 4.18). Sia le listerie di origine alimentare che di provenienza umana hanno mostrato resistenza nei confronti di oxacillina, clindamicina e sulfametossazolo-

trimetoprim, sebbene con percentuali differenti: la totalità dei ceppi umani e un'elevata percentuale (78,6%) di quelli alimentari ha mostrato resistenza nei confronti della oxacillina; la percentuale di resistenza delle listerie di isolamento umano nei confronti della clindamicina (78,6%) è risultata molto più alta rispetto a quelle di isolamento alimentare (28,6%); nei confronti del sulfametossazolo-trimetoprim le listerie alimentari hanno presentato un tasso di resistenza più elevato rispetto alle umane, ma con percentuali più basse rispetto agli altri due antibiotici (14,3% e 7,1%). Infine, è stato riscontrato il 7,1% di resistenza alla kanamicina solo nei ceppi di isolamento umano e il 21,4% all'eritromicina solo nei ceppi di provenienza alimentare.

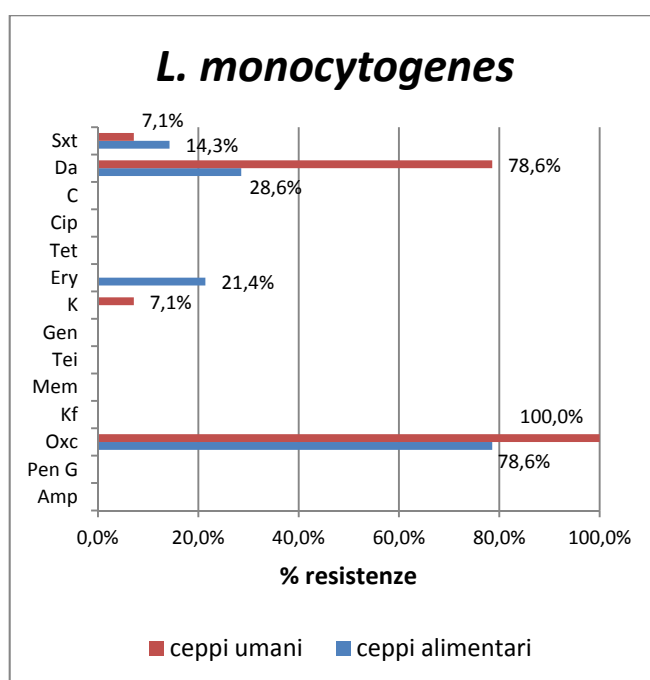


Fig. 4.18. Antibiotico-resistenza dei 28 ceppi di *L. monocytogenes* di provenienza alimentare e umana. Amp = ampicillina; Pen G = penicillina G; Oxc = oxacillina; Kf = cefalotina; Mem = meropenem; Tei = teicoplanina; Gen = gentamicina; K = kanamicina; Ery = eritromicina; Tet = tetraciclina; Cip = ciprofloxacina; C = cloramfenicolo; Da = clindamicina; Sxt = sulfametossazolo-trimetoprim.

## 4.7 Influenza del mezzo di crescita sulla produzione di batteriocine

Un totale di 62 ceppi di enterococchi isolati da carne cruda di manzo, precisamente i 41 risultati negativi in prima analisi all'agar spot test, e i 21 risultati prima positivi all'agar spot test e poi negativi all'agar well diffusion (paragrafo 4.2), sono stati sottoposti a due diversi tipi di stimolazione al fine di valutare l'influenza del mezzo di crescita sulla produzione delle batteriocine.

Dei 62 ceppi di enterococchi presi in esame, la specie più numerosa è risultata essere *E. faecalis* (50%), seguita da *E. faecium* (33,9%), *E. durans* (14,5%) e *E. avium* (1,6%) (figura 4.19).

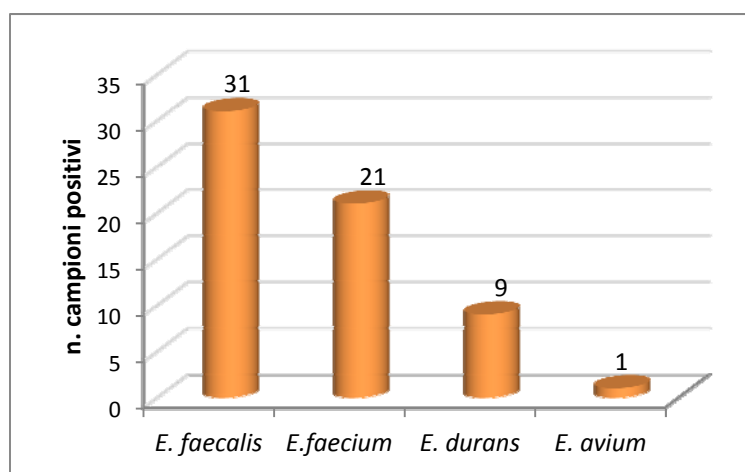


Fig. 4.19. Distribuzione di specie dei ceppi di *Enterococcus* spp. risultati negativi all'agar spot test e all'agar well diffusion.

Sono stati allestiti due esperimenti, condotti in parallelo: in uno, il ceppo di *Enterococcus* da testare è stato fatto crescere in presenza di *Listeria monocytogenes* e, nell'altro, in presenza del suo stesso surnatante.

Al termine dei periodi di incubazione (24, 48 e 96 ore), è stata valutata la presenza di attività inibitoria nei confronti di *L. monocytogenes* ATCC tramite il test dell'agar well diffusion: dei 62 ceppi di *Enterococcus* spp. testati, 2 (3,2%) hanno prodotto batteriocina in seguito all'esposizione a entrambi i due tipi di stimolazione. Un ceppo ha dato esito positivo esclusivamente al test di stimolazione eseguito con il suo surnatante, ma in seguito a trattamento con proteasi è stata esclusa la natura proteica della sostanza ad attività inibitoria, e pertanto anche la presenza di batteriocina.

I 2 ceppi risultati positivi al test appartengono alla specie *E. faecalis*, e sono stati indicati per convenienza con le sigle FLm3 e FLm4. Entrambi hanno prodotto aloni di inibizione dal diametro di 15 mm, sia quando stimolati con *Listeria monocytogenes*, che quando stimolati con il loro stesso surnatante (figure 4.20 e 4.21).

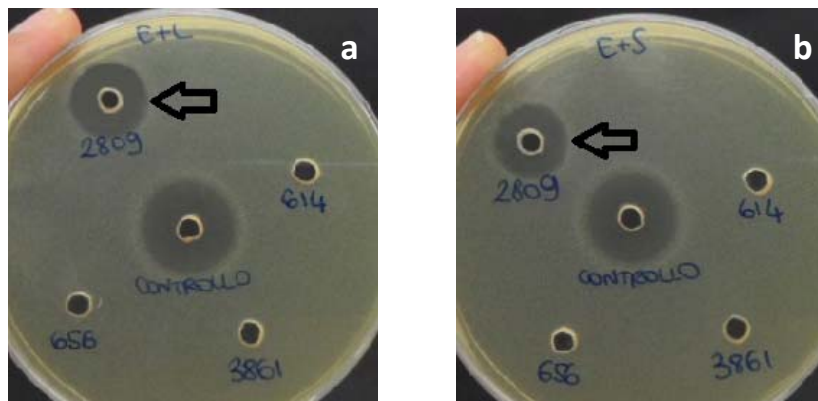


Fig. 4.20. Agar well diffusion dei surnatanti di 4 diversi ceppi di *Enterococcus* stimolati dalla presenza di *Listeria monocytogenes* (a) e del loro stesso surnatante (b). Solo il ceppo 2809 (FLm3) mostra l'alone di inibizione. Il controllo positivo è costituito da surnatante contenente batteriocine.

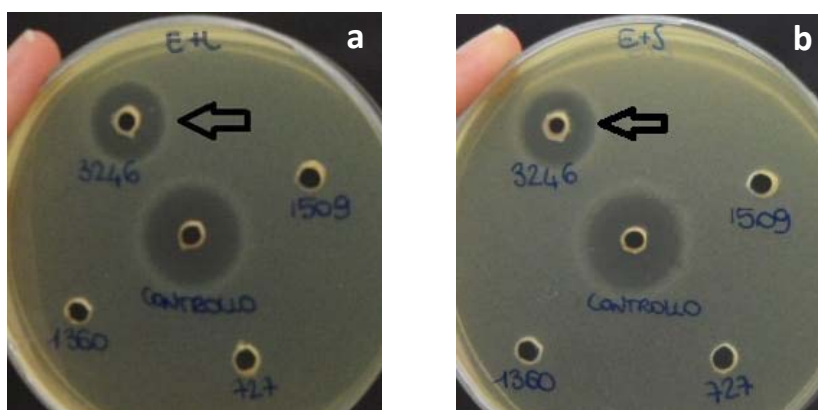


Fig. 4.21. Agar well diffusion dei surnatanti di 4 diversi ceppi di *Enterococcus* stimolati dalla presenza di *Listeria monocytogenes* (a) e del loro stesso surnatante (b). Solo il ceppo 3246 (FLm4) mostra l'alone di inibizione. Il controllo positivo è costituito da surnatante contenente batteriocine.

Al fine di ottenere informazioni dettagliate relative alla curva di crescita dei ceppi testati, e per avere un'ulteriore conferma dell'azione battericida dei surnatanti contenenti batteriocina, ai tempi 24, 48 e 96 ore, la sospensione batterica contenente *Listeria monocytogenes* ed *Enterococcus* è stata seminata sui terreni agarizzati Palcam, Slanetz e TSA, mentre la sospensione batterica contenente *Enterococcus* e il suo surnatante, sul terreno TSA.

Nelle figure 4.22 e 4.23 sono riportate le medie dei valori di densità cellulare (UFC/ml) ottenute per i ceppi di enterococchi risultati non produttori di batteriocina, rispettivamente quando stimolati con *Listeria monocytogenes* e con il loro surnatante. In entrambi gli esperimenti, gli enterococchi presi in esame hanno mostrato una crescita esponenziale nelle prime 24 ore, seguita da una fase stazionaria caratterizzata da una densità cellulare di circa  $10^9$  UFC/ml. La moltiplicazione di *Listeria monocytogenes* non è stata inibita dalla presenza degli enterococchi, e entrambe le specie batteriche hanno mostrato un tempo di generazione di circa un'ora e mezza.

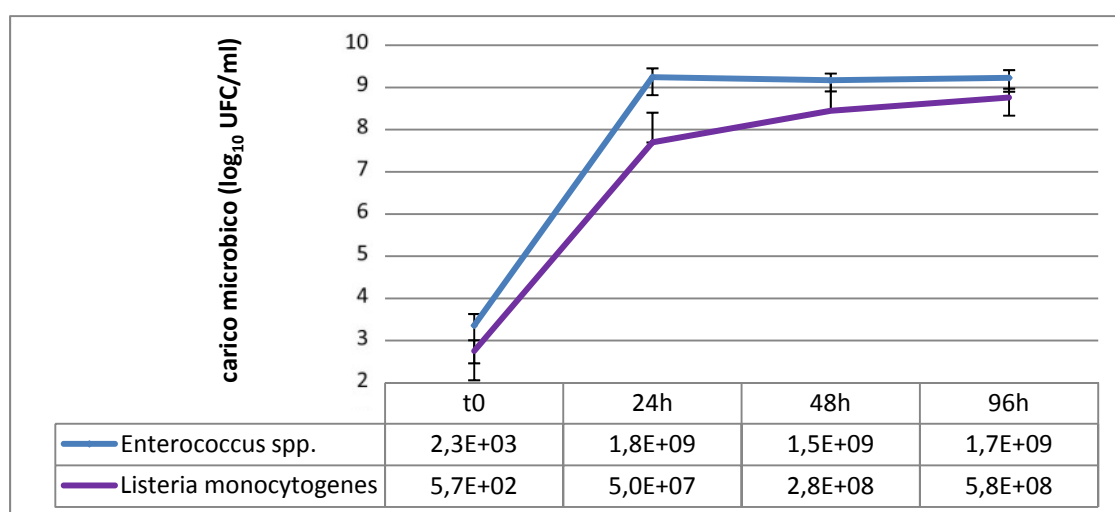


Fig. 4.22. Andamento di crescita microbica di *Enterococcus* spp. non produttori di batteriocina in presenza di *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, a diversi intervalli di tempo.

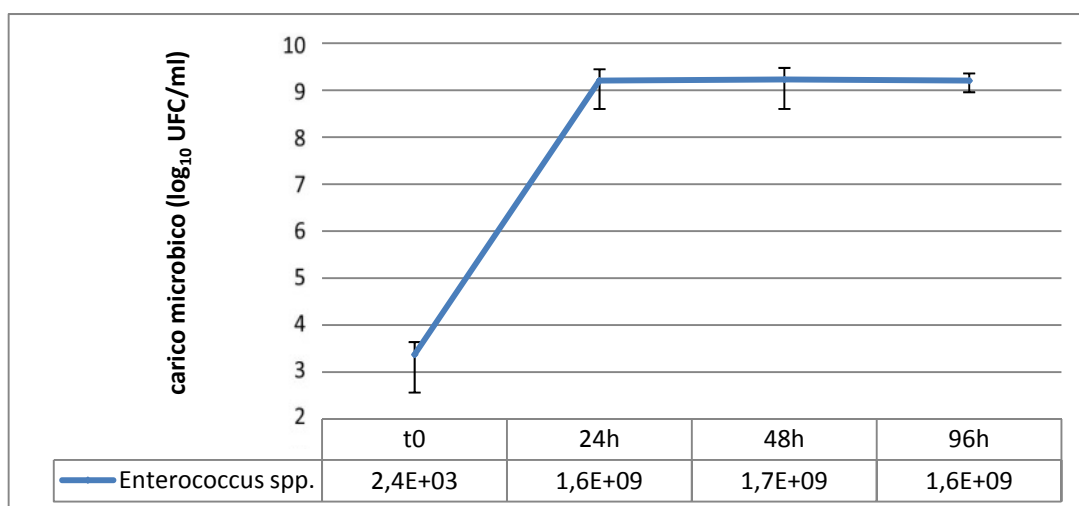


Fig. 4.23. Andamento di crescita microbica di *Enterococcus* spp. non produttori di batteriocina in presenza del loro stesso surnatante, a diversi intervalli di tempo.

Nell'esperimento di stimolazione con *L. monocytogenes* ATCC, i ceppi FLm3 e FLm4 hanno generato una curva di crescita simile a quella riscontrata per gli enterococchi risultati negativi al test: la densità cellulare dei due ceppi cresce in maniera esponenziale e dopo 24 ore di incubazione si stabilizza su valori di circa  $10^9$  UFC/ml. *L. monocytogenes* ATCC, invece, mostra un rapido declino nelle prime 24 ore di incubazione, seguito da una completa inibizione nei tempi successivi, a confermare la produzione, nel mezzo di crescita, di una sostanza ad attività antibatterica da parte del ceppo di enterococco stimolato (figura 4.24).

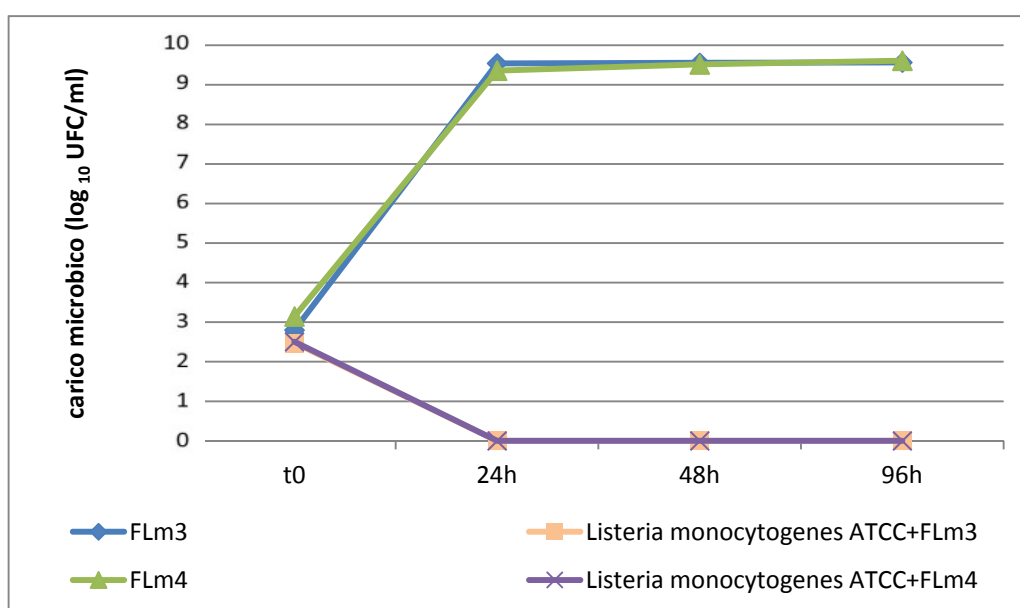


Fig. 4.24. Inibizione della crescita di *Listeria monocytogenes* ATCC causata dalle batteriocine prodotte dai ceppi FLm3 e FLm4 in seguito a stimolazione con *L. monocytogenes* ATCC.

Sui surnatanti prodotti dai ceppi FLm3 e FLm4 in seguito a stimolazione, sono stati effettuati i test supplementati di valutazione dell'attività antimicrobica a differenti temperature, a differenti pH e nei confronti di differenti ceppi di *L. monocytogenes*.

Dai risultati ottenuti (figura 4.25) è possibile dedurre la termostabilità delle batteriocine testate: tutti i surnatanti subiscono una riduzione del diametro di inibizione all'aumentare dei tempi e della temperatura di esposizione, ma per entrambi i ceppi l'attività antimicrobica è mantenuta anche alla temperatura di  $121^{\circ}\text{C} \times 15$  minuti. Sia per FLm3 che per FLm4, l'andamento dei diametri di inibizione è identico quando stimolati con *L. monocytogenes* e con il loro surnatante e in entrambi i casi, in seguito a esposizione alla temperatura di sterilizzazione, il diametro si riduce di 6 mm rispetto all'alone osservato nel controllo.

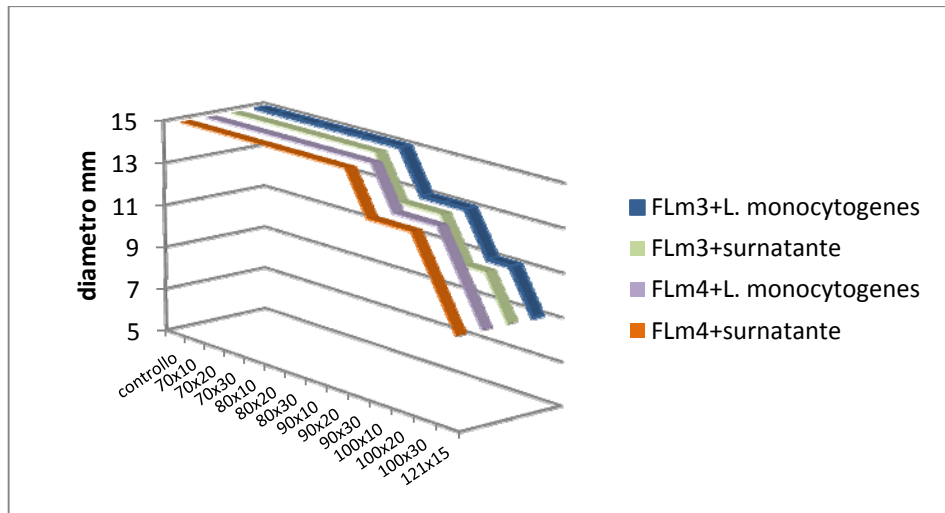


Fig. 4.25. Decremento, in seguito ai trattamenti termici, degli aloni d'inibizione prodotti dai surnatanti dei ceppi FLM3 e FLM4 ottenuti in seguito a stimolazione con *L. monocytogenes* ATCC e con il proprio surnatante.

Le enterocine prodotte da FLM3 e FLM4 si sono dimostrate stabili a valori di pH compresi tra 4 e 7, infatti in entrambi i ceppi non si sono verificate rilevanti modifiche nel diametro degli aloni d'inibizione per tutti i valori di pH testati (figura 4.26). In particolare, FLM4 ha prodotto dei diametri costanti per tutti i trattamenti, sia nel caso di stimolazione con *L. monocytogenes* che con il suo surnatante, mentre FLM3 ha mostrato valori più alti di attività, in entrambe le stimolazioni, per pH pari a 7.

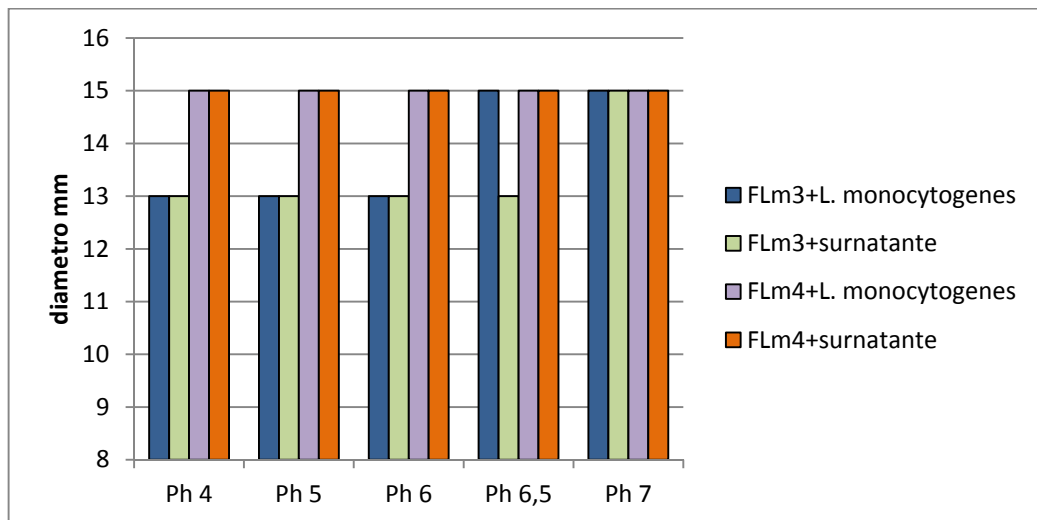


Fig. 4.26. Variazione dell'attività listericida dei surnatanti testati ai valori di pH 4, 5, 6, 6.5 e 7.

Infine, nei confronti dei 28 ceppi di *L. monocytogenes* di provenienza alimentare e clinica, i surnatanti di FLM3 e FLM4 non hanno mai mostrato una completa inibizione, ma solo, in alcuni casi, una riduzione della crescita del microrganismo indicatore



(tabella 4.7). In particolare, tra le listerie di origine alimentare, solo una isolata da carne avicola ha subito una riduzione della crescita a causa della presenza dei surnatanti di FLm3 e FLm4, mentre, tra le listerie di origine umana, la parziale inibizione è stata visibile nei confronti di un numero maggiore di ceppi. Questo atteggiamento può essere imputabile al fatto che, probabilmente, le batteriocine prodotte in seguito a stimolazione presentano una specificità di azione nei confronti di determinati antigeni presenti nel mezzo di crescita in cui sono state prodotte e, viceversa, perdono la loro capacità inibitoria nei confronti di ceppi batterici con i quali non hanno condiviso lo stesso habitat, che quindi non hanno stimolato la produzione delle batteriocine stesse.

<i>L. monocytogenes</i>	Sierogr	origine	Surnatanti			
			FLm3 + <i>L. monocytogenes</i>	FLm3 + surnatante	FLm4 + <i>L. monocytogenes</i>	FLm4 + surnatante
179	1/2c	manzo	-	-	-	-
221	4b	manzo	-	-	-	-
473	1/2c	manzo	-	-	-	-
474	1/2c	manzo	-	-	-	-
917	1/2c	manzo	-	-	-	-
2675	4b	manzo	-	-	-	-
2920	4b	manzo	-	-	-	-
3722	1/2a	avicoli	-	-	-	-
3759	1/2c	avicoli	+	+	+	+
3763	1/2a	avicoli	-	-	-	-
3764	1/2a	avicoli	-	-	-	-
3765	1/2a	avicoli	-	-	-	-
4023	1/2c	avicoli	-	-	-	-
4037	1/2c	avicoli	-	-	-	-
3747	1/2b	uomo	-	-	-	-
3748	4b	uomo	+	+	+	+
3749	4b	uomo	+	+	+	+
3750	1/2a	uomo	+	+	+	+
3751	1/2a	uomo	+	+	+	+
3752	1/2b	uomo	+	+	+	+
3753	4b	uomo	-	-	-	-
3755	4b	uomo	+	+	+	+
3756	1/2a	uomo	+	+	+	+
3757	1/2b	uomo	+	+	-	-
3758	1/2a	uomo	+	+	+	+
3948	1/2a	uomo	-	-	-	-
4002	1/2b	uomo	+	+	+	+
4003	1/2a	uomo	-	-	-	-

Tab. 4.7. Inibizione (+) e non inibizione (-) prodotta dai surnatanti dei ceppi FLm3 e FLm4, ottenuti in seguito a stimolazione con *L. monocytogenes* ATCC e con il proprio surnatante, nei confronti di 7 ceppi di *Listeria monocytogenes* isolate da manzo, 7 isolate da avicoli e 14 isolate da uomo.

## 5. Conclusioni

Gli enterococchi sono microrganismi ampiamente diffusi nell'ambiente, si possono trovare nel suolo, negli alimenti e nelle acque superficiali, ma il loro habitat principale è costituito dal tratto gastrointestinale di uomini e animali. Grazie alle loro caratteristiche adattative, possono crescere e sopravvivere in condizioni ambientali sfavorevoli ed essere isolati sia da alimenti prodotti con materie prime crude, sia da prodotti alimentari sottoposti a trattamenti termici. Non solo questa caratteristica ha portato a un incremento del loro impiego nell'industria agro-alimentare, specialmente come parte integrante della microflora di alimenti fermentati, ma anche la loro capacità di contribuire alla formazione di sapori ed aromi tipici e la loro potenzialità di minimizzare le contaminazioni durante i processi produttivi e manipolativi. In particolare, la loro capacità di produrre batteriocine (enterocine) ad attività antimicrobica nei confronti di batteri alteranti e patogeni degli alimenti, rappresenta una importante caratteristica per lo sviluppo di moderni e più salubri metodi conservativi, da utilizzare in alternativa agli additivi chimici classicamente usati dall'industria alimentare.

In ambito di sicurezza alimentare, l'adozione di tecniche di prevenzione e conservazione, che rallentino o prevengano la crescita microbica, è di notevole importanza soprattutto alla luce del fatto che l'incidenza delle malattie trasmesse dagli alimenti mostra un trend in continuo aumento, specialmente a carico di microrganismi emergenti quali *Listeria monocytogenes* (Silk et al., 2012). Questo patogeno, frequentemente isolato negli alimenti, può causare listeriosi, un'infezione di grande impatto per la salute pubblica in quanto colpisce principalmente categorie a rischio manifestandosi con quadri clinici complessi, spesso ad exitus infausto.

L'osservazione che il genere *Enterococcus* venga riscontrato su gran parte degli alimenti comunemente contaminati anche da *L. monocytogenes*, ha portato a riporre grande interesse nelle enterocine ad attività listericida, argomento del presente lavoro, poiché l'uso di queste sostanze consentirebbe da un lato di impiegare composti naturali nella produzione e nella conservazione di prodotti alimentari, dall'altro di non alterare la flora microbica autoctona dell'alimento.

Nel presente studio, sono stati analizzati 277 campioni di carne cruda di manzo e 267 campioni di carne cruda di avicoli. Dall'analisi condotta sui campioni di manzo, è emersa una contaminazione del genere *Enterococcus* nel 34,3% dei casi e della specie

*L. monocytogenes* nel 3,97%, mentre, per quanto riguarda la carne di origine avicola, il 35,21% dei campioni sono risultati contaminati da *Enterococcus* spp. e il 7,87% da *L. monocytogenes*. I dati ottenuti nelle due matrici alimentari considerate sono risultati simili tra loro, infatti non è stata individuata una differenza statistica significativa nella prevalenza dei microrganismi ricercati. Fra il totale di campioni analizzati, l'1,81% di manzo e il 3,37% di avicoli ha mostrato la presenza concomitante della specie *L. monocytogenes* e di almeno una specie del genere *Enterococcus*.

In entrambe le matrici alimentari esaminate, la specie *E. faecalis* ha mostrato una prevalenza maggiore rispetto alla specie *E. faecium*, seppur senza differenze statistiche significative. Generalmente *E. faecium* ed *E. faecalis* sono le due specie, appartenenti al genere *Enterococcus*, maggiormente isolate in prodotti a base di carne (Foulquié Moreno et al., 2006; Hayes et al., 2003), come confermato dai dati riportati dalla FDA relativi alla prevalenza di *Enterococcus* spp. in 11 Stati Americani negli anni 2002-2011 (FDA and CDC, 2011).

Su 71 ceppi di *Enterococcus* spp. isolati da carne bovina e 66 ceppi isolati da carne avicola, rispettivamente 9 (12,7%) e 2 (3%) hanno dato esito positivo all'agar well diffusion, test che ha permesso di individuare la presenza di composti di natura proteica ad attività listericida, ovvero batteriocine, liberati nel mezzo liquido di crescita. La specie maggiormente rappresentata, tra gli 11 ceppi produttori di enterocine, è stata *E. faecium* (63,6%), seguita da *E. faecalis* (27,3%) ed *E. avium* (9,1%). Risultati simili sono stati ottenuti da Dal Bello et al. (2010) su ceppi di enterococchi isolati da carni e formaggi prodotti in Piemonte, dove, fra gli enterococchi isolati, è risultata produrre batteriocine una quota più alta di *E. faecium* (74,4%) rispetto a *E. faecalis* (18,6%).

Per caratterizzare la natura chimica delle sostanze inibitorie isolate, è stato effettuato uno studio della stabilità dei surnatanti attivi sia al variare della temperatura che del pH, che ne ha rilevato interessanti proprietà correlate alla prevenzione alimentare.

Data la natura proteica delle sostanze ad attività inibitoria, si è ipotizzata una perdita progressiva di funzionalità all'aumentare della temperatura d'esposizione, che è stata dimostrata all'aumentare dei tempi e delle temperature dei trattamenti a cui sono stati sottoposti i surnatanti. In particolare, 8 delle batteriocine testate, ovvero quelle prodotte da tutti i ceppi *E. faecium* e da un ceppo *E. faecalis* (FMm1, FMm2, FMm3, FMm4, FMm5, FMm6, FMm7 e FLm2), hanno perso la loro efficacia listericida in seguito all'esposizione a 121°C×15 minuti, pur avendo mostrato caratteristiche peculiari di termoresistenza anche dopo trattamento a temperature elevate come 100°C×30 minuti.

Le batteriocine prodotte da FLm1, FLa1 e Aa1 si sono dimostrate le più termostabili, in quanto hanno esplicato la loro azione antimicrobica anche in seguito a trattamento di 121°C×15 minuti.

L'attività listericida delle sostanze inibenti da noi estratte è stata testata per valori di pH compresi tra 4 e 7, al fine di valutare il mantenimento delle proprietà antimicrobiche in un range di pH caratteristico di numerosi alimenti, e in particolare delle carni crude. L'attività inibitoria è risultata stabile per tutte le batteriocine testate in tutto l'intervallo di valori considerato, mostrando la massima attività per pH pari a 6.5/7. Questa caratteristica può essere vantaggiosa in vista di un possibile utilizzo del ceppo produttore *in situ*, in modo che la sintesi delle molecole bioattive avvenga direttamente sul prodotto di consumo, oppure nel caso in cui venga utilizzato in qualità di probiotico alimentare e debba resistere ai valori di pH tipici del tratto gastro-intestinale.

La termoresistenza e la stabilità ad ampi intervalli di pH delle batteriocine prodotte dal genere *Enterococcus* è stata dimostrata anche in altri studi, quali quelli effettuati da Balla et al. (2000), Cintas et al. (1997), Sparo et al. (2006).

In generale, le batteriocine da noi isolate si sono dimostrate attive nei confronti di 28 ceppi di *Listeria monocytogenes* di origine umana e alimentare. Ad esclusione dei surnatanti di FLa1 e Aa1, che hanno mostrato talvolta assenza o comunque una notevole ridotta attività, se confrontata con quella ottenuta verso *L. monocytogenes* ATCC, l'efficacia di tutti gli altri surnatanti si è esplicita in maniera netta sia nei confronti dei ceppi alimentari che verso i ceppi di origine umana, da considerarsi più virulenti in quanto già causa di stati clinici.

L'attività listericida è una caratteristica comune alle enterocine (Giraffa, 1995) e in particolare l'inibizione mostrata dalle batteriocine da noi isolate, ad eccezione di FLa1 e Aa1, suggerisce che potrebbero appartenere alla classe IIa, delle cosiddette batteriocine anti-listeria, caratterizzate dalla presenza in posizione N-terminale della sequenza idrofilica fortemente conservata "YGNGV" (Jack et al., 1995).

La listeriosi viene comunemente trattata tramite la somministrazione di un β-lattamico, solitamente ampicillina, da solo o in combinazione con un aminoglicoside, generalmente gentamicina. In caso di allergia ai β-lattamici, vengono utilizzati sulfametossazolo-trimetoprim, che ha mostrato un ampio spettro protettivo, eritromicina, vancomicina e i fluorochinoloni (Temple e Nahata, 2000). I ceppi di *L. monocytogenes* di origine alimentare e umana testati in questo studio non hanno evidenziato resistenze nei confronti di ampicillina e gentamicina, che sono gli antibiotici

d'elezione nella cura della listeriosi. Hanno invece mostrato resistenza nei confronti di sulfametossazolo-trimetoprim sia le listerie alimentari (14,3%) che quelle umane (7,1%), e nei confronti di eritromicina il 21,4% dei ceppi di provenienza alimentare.

La capacità delle enterocine esaminate di interferire con la sopravvivenza di questo patogeno, potrebbe rappresentare una valida alternativa nella prevenzione delle listeriosi causate da ceppi che in futuro potrebbero essere più virulenti ed aver acquisito resistenza alle terapie in uso.

Visto il crescente problema delle antibiotico-resistenze, nella selezione di ceppi appartenenti al genere *Enterococcus*, da poter utilizzare nell'industria alimentare, è di fondamentale importanza l'assenza di fattori di virulenza o di geni di resistenza agli antibiotici, anche alla luce del fatto che gli enterococchi non sono riconosciuti come GRAS ed inoltre sono stati associati a infezioni nosocomiali. Per quanto riguarda gli 11 ceppi di enterococchi da noi identificati come produttori di batteriocina, solo uno (Aa1) è risultato essere multiresistente, in quanto ha mostrato resistenza nei confronti di più di tre antibiotici. I ceppi FMm2, FMm5 e FLm1 non hanno invece mostrato resistenza nei confronti di nessun antibiotico testato.

Al fine di valutare l'influenza del mezzo di crescita sulla produzione delle batteriocine, i ceppi di enterococchi isolati da carne cruda di manzo risultati non produttori, sono stati sottoposti a due diversi tipi di stimolazione: nel primo caso è stata creata una co-coltura, formata dal ceppo di enterococco da testare e un ceppo ad esso strettamente correlato (*Listeria monocytogenes* ATCC 7644), mentre nel secondo caso il ceppo di enterococco è stato posto in contatto con il suo stesso surnatante, precedentemente preparato.

Su un totale di 62 ceppi di enterococchi, solo 2 (3,2%) in seguito all'esposizione a entrambi i tipi di stimolazione hanno prodotto batteriocine in grado di uccidere tutte le cellule di *Listeria monocytogenes* ATCC presenti nel mezzo. L'attività antimicrobica dei surnatanti è stata mantenuta anche in seguito a tutti i trattamenti termici effettuati, anche a quello di 121°C×15 minuti, e a valori di pH compresi tra 4 e 7.

Nella regolazione della produzione di batteriocine è nota l'importanza di fattori come il pH, la temperatura o altre condizioni di crescita, mentre l'effetto dato della presenza di microrganismi competitori non è ancora ben conosciuto (Rojo-Bezares et al., 2007). Per esempio, è stato dimostrato che la produzione delle batteriocine lactacina B e divercina da parte di *Lactobacillus acidophilus* N2 e *Carnobacterium divergens* AS7, viene aumentata, rispettivamente, dalla presenza dei ceppi indicatori *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 4797 (Barefoot et al., 1994a, b) e *Carnobacterium piscicola* NCDO 2765 (Sip et

al., 1998). Nel nostro studio, i ceppi FLm3 e FLm4 sono stati capaci di produrre batteriocina solo in seguito a stimolazione, dimostrando che la produzione di batteriocine in questo caso è strettamente correlata a stimoli che provengono dall'ambiente, e nello specifico dalla presenza di microrganismi competitori o da molecole segnale da lui stesso prodotte e potenzialmente capaci di indirizzare la regolazione genica verso la produzione di batteriocine. Nel caso di stimolazione con *L. monocytogenes*, lo stimolo nel produrre batteriocine potrebbe provenire da sostanze secrete nel surnatante da parte del ceppo induttore oppure da strutture molecolari adese alla membrana cellulare del ceppo induttore. Nel caso di stimolazione con il surnatante, potrebbe instaurarsi un meccanismo di autoinduzione, per cui il ceppo in determinate condizioni di crescita secerne metaboliti che fungono da autoinduttori, portando alla morte alcune delle cellule in modo che la specie possa proliferare per più tempo, senza terminare anzitempo il nutrimento presente nel mezzo. Questo sembra dovuto ad un meccanismo di tipo *quorum sensing*, riscontrato nella produzione di molte batteriocine appartenenti alla classe II, come per esempio le enterocine A e B prodotte da *E. faecium* CTC 492 (Nilsen et al., 1998), il cui sistema regolatore è mediato da peptidi feromoni o peptidi autoinduttori.

Anche il ceppo *Lactobacillus plantarum* NC8 non è in grado di produrre la batteriocina PLNC8 se cresciuto da solo in terreno di coltura, ma solo in seguito a co-coltura con alcuni batteri Gram-positivi. In aggiunta alla produzione della batteriocina, lo stimolo creato dai ceppi induttori attiva la produzione di una molecola autoinduttrice in *L. plantarum* NC8, che indica l'esistenza di un meccanismo regolatore *quorum sensing* (Maldonado et al., 2004).

Da segnalare, infine, l'assenza di inibizione da parte dei surnatanti di FLm3 e FLm4 nei confronti dei ceppi di *L. monocytogenes* di provenienza alimentare e clinica, ma solo la presenza, in alcuni casi, di una riduzione della crescita del microrganismo indicatore. Questo atteggiamento potrebbe essere correlato alla produzione di una bassa concentrazione di batteriocina, che così non risulta essere in grado di inibire tutte le cellule presenti, in considerazione anche del fatto che la biosintesi delle batteriocine porta a un intenso consumo di energia, per cui è possibile che solo una frazione della popolazione induca l'espressione delle batteriocine mostrando un comportamento altruistico per il beneficio dei batteri appartenenti alla sua stessa specie (Mulec et al., 2003). L'inibizione parziale può essere anche imputabile al fatto che, probabilmente, le batteriocine prodotte in seguito a stimolazione presentano una specificità di azione nei

confronti di determinati antigeni presenti nel mezzo di crescita che ha stimolato la produzione delle batteriocine stesse.

Per concludere, in questo studio è stato confermato l'importante ruolo che gli enterococchi produttori di batteriocine o le stesse enterocine purificate potrebbero avere nella conservazione alimentare, in sostituzione di alcuni additivi di sintesi che a determinate concentrazione e condizioni risultano nocivi per l'uomo. È auspicabile un sempre maggiore impiego delle batteriocine come conservanti alimentari, da soli o in combinazione con tradizionali e innovative tecniche di prevenzione, avendo dimostrato inoltre la loro azione listericida, che consentirebbe di controllare la moltiplicazione e la sopravvivenza di *Listeria monocytogenes* in particolar modo in quegli alimenti destinati alle popolazioni a rischio. Tuttavia, bisogna sottolineare la necessità di effettuare studi accurati che chiariscano le caratteristiche delle singole batteriocine e che, prima del loro uso come bioconservanti, garantiscano l'assenza di virulenza del ceppo in esame e delle batteriocine da esso prodotte.

## 6. Bibliografía

Abee T., 1995. *Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and selfprotection mechanisms of producer organism*. FEMS Microbiology Letters. 129: 1-9.

Abee T., Krockel L., Hill C., 1995. *Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning*. Int J Food Microbiol. 28: 169-185.

Aguilar-Galvez A., Dubois-Dauphin R., Destain J., Campos D., Thonart P., 2012. *Les entérocoques: avantages et inconvenient en biotechnologie (synthèse bibliographique)*. Biotechnol Agron Soc Environ. 16: 67-76.

Almeida T., Brandão A., Muñoz-Atienza E., Gonçalves A., Torres C., Igrejas G., Hernández P.E., Herranz C., Cintas L.M., Poeta P., 2011. *Identification of Bacteriocin Genes in Enterococci Isolated from Game Animals and Saltwater Fish*. Journal of Food Protection. 74 (8): 1252-1260.

Andrewes F.W., Horder T.J., 1906. *A study of the streptococci pathogenic for man*. The Lancet, 168: 708-713.

Arizcun C., Barcina Y. & Torre P., 1997. *Identification and characterization of proteolytic activity of Enterococcus spp. isolated from milk and Roncal and Idiazabal cheese*. International Journal of Food Microbiology. 38: 17-24.

Aymerich T., Holo H., Havarstein L.S., Hugas M., Garriga M., Nes I.F., 1996. *Biochemical and Genetic Characterization of Enterocin A from Enterococcus faecium, a New Antilisterial Bacteriocin in the Pediocin Family of Bacteriocins*. Applied and Environmental Microbiology. 62 (5): 1676-1682.

Balciunas E.M., Castillo Martinez F.A., Todorov S.D., Gombossy De Melo Franco B. D., Converti A., de Sousa Oliveira R.P., 2013. *Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review*. Food Control. 32: 134-142.

Balla E., Dicks L.M.T., Du Toit M., Van der Merwe M.J., Holzapfel, W.H., 2000. *Characterization and cloning of the genes encoding Enterocin 1071A and Enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by Enterococcus faecalis BFE 1071*. Appl Environ Microbiol. 66: 1298-1304.

Baquero F., Bouanchaud D., Martinez-Perez M.C., Fernandez C., 1978. *Microcin plasmids: a group of extrachromosomal elements coding for low-molecular-weight antibiotics in Escherichia coli*. J Bacteriol. 135: 342-347.

Barefoot S.F., Chen Y.R., Hughes T.A., Bodine A.B., Shearer M.Y., Hughes M.D., 1994a. *Identification and purification of protein that induces production of the Lactobacillus acidophilus bacteriocin lactacin B*. Appl. Envir. Microb. 60: 3522-3528.

Barefoot S.F., Nettles C.G., Chen Y.R., 1994b. *Lactacin B, a bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus*. In: de Vuyst, L., Vandamme, E.J. (Eds.), *Bacteriocins of*



*Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and applications*. Blackie Academic and Professional, London, United Kingdom, pp. 353-376.

Barile M., Mormile A., Mercogliano R., Murru N., 2013. *Antilisterial activity of Lactic Acid Bacteria isolated from gilthead breams and sea basses fillets packaged map against primitive strains of Listeria monocytogenes*. Italian J of Food Safety. Vol.1 n.1.

Bascomb S., Mammad M., 1998. *Use of enzyme test in characterization and identification of aerobic and facultatively anaerobic Gram-positive cocci*. Clinical Microbiology Reviews. vol 11, 2: 318-340.

Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C. and Turck M., 1966. *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method*. Am J Clin Pathol. 45:493-496.

Bauer R. and Dicks L.M.T., 2005. *Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics*. International Journal of Food Microbiology. 101, 201-216.

Bennik M.H., Vanloo B., Brasseur R., Gorris L.G., Smid E.J., 1998. *A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated E. mundtii: full characterization and interaction with target organisms*. Biochim Biophys Acta. 1373: 47-58.

Berche R., 1995. *Physiopathologie des infections à Listeria monocytogenes*. Méd Mal Infect. 25: 197-209.

Bierbaum G., Sahl H.G., 2009. *Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering*. Current Pharmaceutical Biotechnology. 10: 2-18.

Boman H.G., 1995. *Peptide antibiotics and their role in innate immunity*. Annual Review of Immunology. 13: 61-92.

Boman H.G., 1996. *Peptide antibiotics: holy or heretic grail of innate immunity?* Scand J Immunol. 43: 475-82.

Bonfoh B., Wasem A., Traore A.N., Fane A., Spillmann H., 2003. *Microbiological quality of cow's milk taken at different intervals from the udder to the selling point in Bamako (Mali)*. Food Control. 14: 495-500.

Booth M. C., Bogie C. P., Sahl H. G., Siezen R. J., Hatter K. L. & Gilmore M. S., 1996. *Structural analysis and proteolytic activation of Enterococcus faecalis cytolysin, a novel lantibiotic*. Mol Microbiol. 21: 1175-84.

Braun V., Pilsl H., Gross P., 1994. *Colicins: structures, modes of action, transfer through membranes, and evolution*. Arch Microbiol. 161: 199-206.

Bruno M.E.C. and Montville T.J., 1993. *Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria*. Appl Environ Microbiol. 59: 3003-3010.

Burkwall M.K., Hartman P.A., 1964. *Comparison of direct plating media for the isolation and enumeration of enterococci in certain frozen foods*. Appl Microb. 2:18-23.

Çadirci B.H. and Çitak S., 2005. *A Comparison of Two Methods Used for Measuring Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria*. Pakistan J of Nutrition 4 (4): 237-241.

Cambiotti V., Garofalo D., Cenci Goga B.T., 2012. *Comparison between tetracycline resistant enterococci isolated from sheep and typical cheese in the geographical area of "Parco Nazionale dei Monti Sibillini"*. Italian J of Food Safety. 1(4): 43-45.

CDC Estimates of foodborne illness in the United State in 2011  
<http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>

Cetinkaya Y., Falk P., Mayhall C.G., 2000. *Vancomycin-Resistant Enterococci*. Clinical Microbiology Reviews. 13(4): 686-707.

CFSAN-FDA-HHS/FSIS-USDA. *Draft assessment of relative risk to public health from foodborne Listeria monocytogenes among selected categories of ready-to-eat foods*. RASFF The rapid alert system for food and feed, 2011 Annual Report

Chandler J. R. & Dunny G. M., 2004. *Enterococcal peptide sex pheromones: synthesis and control of biological activity*. Peptides. 25: 1377-88.

Chao L., Levin B.R., 1981. *Structured habitats and the evolution of anticompetitor toxins in bacteria*. Proc Natl Acad Sci USA. 78: 6324-6328.

Chatterjee C., Paul M., Xie L., Van Der Donk W.A., 2005. *Biosynthesis and mode of action of lantibiotics*. Chem Rev. 105: 633-684.

Cheigh C.I. and Pyun Y.R., 2005. *Nisin biosynthesis and its properties*. Biotechnology Letters. 27: 1641-1648.

Chen H. and D. G. Hoover, 2003. *Bacteriocins and their food applications*. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2: 83-100.

Chikindas M.L., Venema K., Ledebøer A.M., Venema G. and Kok J., 1995. *Expression of lactococcin-A and pediocin Pa-1 in heterologous hosts*. Letters in applied microbiology. 21(3): 183-189.

Cintas L.M., Casaus P., Havarstein L.S., Hernandez P.E., Nes I.F., 1997. *Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from Enterococcus faecium P13 with a broad antimicrobial spectrum*. Appl Environ Microbiol. 63: 4321-4330.

Cintas L.M., Casaus P., Herranz P.E., Håvarstein L.S., Holo H., Hernández P.E. and Nes I.F., 2000. *Biochemical and genetic evidence that Enterococcus faecium L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-Dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-Terminal extension termed enterocin Q*. J Bacteriol. 182: 6806-6814.

Cleveland J., Montville T.J., Nes I.F., Chikindas M.L., 2001. *Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation*, International J of Food Microbiology. 71: 1-20.

Clewell D. B., 1990. *Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 9: 90-102.

Cocolin L., Foschino R., Comi G., Fortina M. G., 2007. *Description of bacteriocins produced by two strains of Enterococcus faecium isolated from Italian goat milk*. Food Microbiology. 24: 725-758.

Cocolin L., Dal Bello B., Alessandria V., Dolci P., Rantsiou K., 2010. *Microbiota autoctoni per il controllo dei microrganismi alteranti e patogeni negli alimenti: il ruolo della bioprotezione*. Ital J Agron/Riv Agron. 4: 73-81.

Cossart P., Toledo-Arana A., 2008. *Listeria monocytogenes, a unique model in infection biology: an overview*. Microbes and Infection. 10: 1041-50.

Cotter P.D., Guinane, C.M. & Hill C., 2002. *The LisRK signal transduction system determines the sensitivity of Listeria monocytogenes to nisin and cephalosporins*. Antimicrob Agents Chemother. 46: 2784-2790.

Cotter P.D., Hill C., Ross R.P., 2005. *Bacteriocins: developing innate immunity for food*. Nature Rev Microbiol. 3: 777-788.

Cowart R.E., Foster B.G., 1985. *Differential effects of iron on the growth of Listeria monocytogenes: minimum requirements and mechanism of acquisition*. J Infect Dis. 151(4): 721-730.

Crandall A.D. and Montville T.J., 1998. *Nisin resistance in Listeria monocytogenes ATCC 700302 is complex phenotype*. Appl Environ Microbiol. 64: 231-7.

Cruz C.D., Fletcher G.C., 2012. *Assessing manufacturers' recommended concentrations of commercial sanitizers on inactivation of Listeria monocytogenes*. Food Control. 26: 194-199.

Czaran T.L., Hoekstra R.F., Pagie L., 2002. *Chemical warfare between microbes promotes biodiversity*. Proc Natl Acad Sci USA. 99: 786-790.

Czárán T.L., Hoekstra R.F., 2003. *Killer-sensitive coexistence in metapopulations of microorganisms*. Proc R Soc Lond Series B-Biol Sci. 270: 1373-1378.

Dal Bello B., Rantsiou K., Zeppa G., Ambrosoli R., Cocolin L., 2010. *Microbial ecology of artisanal products from the Piedmont region (North West Italy) and antimicrobial activity of the autochthonous populations*. LWT Food Science and Technology. 43: 1151-1159.

De Graef E.M., Devriese L.A., 2003. *Description of Enterococcus canis sp. Nov. from dogs and reclassification of Enterococcus porcinus Teixeira et al. 2001 as a junior synonym of Enterococcus villorum Vancanneyt et al. 2001*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 53: 1069-1074.

De Man J. C., Rogosa M. and Sharpe M. E., 1960. *A medium for the cultivation of lactobacilli*. J Appl Bacteriol. 23:130-135.

- De Vuyst L., Foulquie Moreno M. R. and Revets H., 2003. *Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins*. Int J Food Microbiol. 84: 299-318.
- Deibel R.H., Silliker J.H., 1963. *Food-poisoning potential of the enterococci*. J Bacteriol. 85(4): 827-832.
- Delbès C., Ali-Mandjee L. and Montel M.C., 2007. *Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and -independent 16S rRNA gene-based analyses*. Appl Environ Microbiol. 73:1882-1891.
- Devriese L.A., Pot B., Collins M.D., 1993. *Phenotypic identification of the genus Enterococcus and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups*. Journal of Applied Bacteriology. 75: 399-408.
- Diep D.B., Nes I.F., 2002. *Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria*. Current Drug Targets 3:107-122.
- Dodd H.M., Horn N., Gason M.J., 1990. *Analysis of the genetic determinant for production of the peptide antibiotic nisin*. J of General Microbiology. 136: 555-566.
- Domig K.J., Mayer H.K., Kneifel W., 2003. *Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of Enterococcus spp. 2. Phenol- and genotypic criteria*. International Journal of Food Microbiology. 88, 165-188.
- Drider D., Fimland G., He'chard Y., McMullen L.M., Pre'vost H., 2006. *The continuing story of class IIa bacteriocins*. Microbiol Mol Biol Rev. 70(2): 564-582.
- Drider D., Rebuffat S., 2011. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*, Springer, 451 p.
- Dussurget O., Pizzarro-Cerda J., Cossart P., 2004. *Molecular Determinants of Listeria monocytogenes virulence*, Annual Review of Microbiology. 58: 587-610.
- Eaton T. J. & Gasson M. J., 2001. *Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates*. Appl Environ Microbiol. 67, 1628-35.
- ECDC, 2012. *Reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data*. Annual Epidemiological Report.
- EFSA, 2006. *The use of nisin (E 234) as a food additive*. The EFSA Journal. 314: 1-16.
- EFSA and ECDC, *The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Foodborne Outbreaks in 2011*, 2013. EFSA Journal. 11(4): 3129.
- Engelke G., Gutowski-Eckel Z., Kiesau P., Siegers K., Hammelmann M., Entian K.D., 1994. *Regulation of nisin biosynthesis and immunity in Lactococcus lactis 6F3*. Appl Environ Microbiol. 60: 814-825.

Ennahar S., Sonomoto K., Ishizaki A., 1999. *Class IIa Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Antibacterial Activity and Food Preservation*. Journal of Bioscience and Bioengineering 87(6): 705-716.

European Commission, 2005. *Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the Criteria for Assessing the Safety of Micro-Organisms Resistant to Antibiotics of Human Clinical and Veterinary Importance*. European Commission, Brussels.

FAO/WHO, 1969. *Specifications for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation: some antibiotics, twelfth report*. No. 430

FAO/WHO, October 2001. *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*

FDA 2001, U. S. Department of Health and Human Services. Agency Response Letter GRAS Notice n°. GRN 000065. April 20, 2001

FDA and CDC, 2011. *NARMS Retail Meat Annual Report 2011, National antimicrobial resistance monitoring system*.

Fimland G., Blingsmo O., Sletten K., Jung G., Nes I.F., Nissen-Meyer J., 1996. *New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins: the C-terminal region is important for determining specificity*. Appl Environ Microbiol. 62(9): 3313-8.

Fisher K., Phillips C., 2009. *The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus*. Microbiology 155, 1749-57.

Floriano B., Ruiz-Barba J.L. and Jimenez-Diaz R., 1998. *Purification and genetic characterization of enterocin I from Enterococcus faecium 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins*. Appl Environ Microbiol. 64, 4883-4890.

Foschino R., Invernizzi A., Barucco R. and Stradiotto K., 2002. *Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year*. J Dairy Res. 69: 213-225.

Foulquié Moreno M. R., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L., 2006. *The role and application of enterococci in food and health*. Int J Food Microbiol. 106: 1-24.

Frank S.A., 1994. *Spatial polymorphism of bacteriocins and other allelopathic traits*. Evolutionary Ecology. 8: 369-386.

Franz C.M., Schillinger U., Holzapfel W.H., 1996. *Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by Enterococcus faecium BFE 900 from black olives*. International Journal of Food microbiology 29: 255-270.

Franz C.M., Holzapfel W.H., Stiles M.E., 1999a. *Enterococci at the crossroads of food safety?* International Journal of Food Microbiology. 47: 1-24.

Franz C.M., Worobo R.W., Quadri L.E., Schillinger U., Holzapfel W.H., Vederas J.C., Stiles M.E., 1999b. *Atypical Genetic Locus Associated with Constitutive Production of Enterocin B by Enterococcus faecium BFE 900*. Applied and Environmental Microbiology 65(5): 2170-2178.

Franz C.M., Grube A., Herrmann A., Abriouel H., Stärke J., Lombardi A., Tauscher B., Holzapfel W.H., 2002. *Biochemical and genetic characterization of the two-peptide bacteriocin enterocin 1071 produced by Enterococcus faecalis FAIR-E 309*. Appl Environ Microbiol. 68(5): 2550-2554.

Fraser J.A., and Sperber W.H., (1988) *Rapid detection of Listeria spp in food and environmental samples by esculin hydrolysis*. J Food Protection. 51(10): 762-765.

Fredericq P., 1957. *Colicins*. Annu Rev Microbiol. 11: 7-22.

Fredericq P., Levine M., 1947. *Antibiotic Interrelationships among the Enteric Group of Bacteria*. J Bacteriol. 54(6): 785-792.

Fredericq P., 1957. *Colicins*. Annu Rev Microbiol. 11:7-22.

Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P., 1994. *Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators*. J Bacteriol. 176: 269-275.

Fuqua C., Parsek M.R., Greenberg E.P., 2001. *Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing*. Annu Rev Genet. 35: 439-468.

Gahan C.G., Hill C., 2005. *Gastrointestinal phase of Listeria monocytogenes infection, A Review*, Journal of Applied Microbiology. 98: 1345-1353.

Galdiero E., D'Isanto M., Aliberti F., 1997. *Effect of saline concentration, pH and growth temperature on the invasive capacity of Listeria monocytogenes*. Res Microbiol. 148: 305-313.

Gálvez A., Valdivia E., Abriouel H., Camafeita E., Mendez E., Martinez-Bueno M., Maqueda M., 1998. *Isolation and characterization of enterocin EJ97, a bacteriocin produced by Enterococcus faecalis EJ97*. Arch Microbiol. 171: 59-65.

Ganzle M.G., Hertel C. and Hammes W.P., 1999. *Resistance of Escherichia coli and Salmonella against nisin and curvacin A*. Int Journal of Food Microbiology 48: 37-50.

Gardiner G.E., Ross R.P., Wallace J.M., Scanlan F.P., Jägers P.P., Fitzgerald G.F., Collins J.K., Stanton C., 1999. *Influence of a Probiotic Adjunct Culture of Enterococcus faecium on the Quality of Cheddar Cheese*. J. Agric. Food Chem. 47: 4907-4916.

Garneau S., Martin N.I., Vederas J.C., 2002. *Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria*. Biochimie. 84: 577-592.

Gelsomino R., Vancanneyt M., Cogan T.M., Condon S., Swings J., 2002. *Source of enterococci in a farmhouse raw-milk cheese*. Appl Environ Microbiol. 68: 3560-5.

Gianfranceschi M.V., Gattuso A., Dottavio M.C., Fokas S., Aureli P., 2007. *Results of a 12-months enhanced surveillance of listeriosis in Italy*, *Eurosurveillance*, Volume 12, Issue 11.

Gillor O., Kirkup B.C., Riley M.A., 2004. *Colicins and microcins: the next generation antimicrobials*. *Adv Appl Microbiol.* 54: 129-146.

Gillor O., Nigro L.M., Riley M.A., 2005. *Genetically Engineered Bacteriocins and their Potential as the Next Generation of Antimicrobials*. *Curr Pharm Des.* 11(8): 1067-75.

Giraffa G., 1995. *Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-Listeria factors in dairy technology*. *Food Microbiol.* 12: 291-299.

Giraffa G., 2003. *Functionality of enterococci in dairy products*. *International Journal of Food Microbiology.* 88: 215-222.

Giridhara U.P.M., Ravikumar K.L., Umopathy B.L., 2009. *Review of virulence factors of Enterococcus: an emerging nosocomial pathogen*. *Indian Journal of Medical Microbiology.* 27(4): 301-305.

Gordon D.M., Riley M.A., Pinou T., 1998. *Temporal changes in the frequency of colicinogeny in E. coli from house mice*. *Microbiology.* 144: 2233-2240.

Gordon D.M., Riley M.A., 1999. *A theoretical and empirical investigation of the invasion dynamics of colicinogeny*. *Microbiology.* 145: 655-661.

Gotteland M., Brunser O., Cruchet S., 2006. *Are probiotics useful in controlling gastric colonization by Helicobacter pylori?* *Aliment Pharmacol Ther.* 23(8): 1077-1086.

Gratia A., 1925. *Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille*. *C. R. Soc. Biol.* 93: 1040-1042.

Hancock R.E. and Chapple D.S., 1999. *Peptides antibiotics antimicrobial. Agents in Chemotherapy.* 43: 1317-1323.

Harris L. J., Daeschel M. A., Klaenhammer T. R., 1989. *Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection, Belo Horizonte.* 52(4): 384-387.

Hayes J. R., English L.L., Carter P.J., Proescholdt T., Lee K.Y., Wagner D.D., White D.G., 2003. *Prevalence and antimicrobial resistance of Enterococcus species isolated from retail meats*. *Appl Environ Microbiol.* 69: 7153-7160.

Hedberg P.J., Leonard B.A.B., Ruhfel R.E. & Dunny G. M., 1996. *Identification and Characterization of the Genes of Enterococcus faecalis Plasmid pCF10 Involved in Replication and in Negative Control of Pheromone-Inducible Conjugation*. *Plasmid.* 35: 46-57.

Heikens E., Singh K.V., Jacques-Palaz K.D., van Luit-Asbroek M., Oostdijk E.A., Bonten M.J., Murray B.E., Willems R.J., 2011. *Contribution of the enterococcal surface*

*protein Esp to pathogenesis of Enterococcus faecium endocarditis*. *Microbes Infect.* 13(14-15): 1185-90.

Herranz C., Martínez J.M., Rodríguez J.M., Hernández P.E., Cintas L.M., 2001. *Optimization of enterocin P production by batch fermentation of Enterococcus faecium P13 at constant pH*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56: 378-83.

Hickey R.M., Twomey D.P., Ross R.P., Hill C., 2003. *Production of enterolysin A by a raw milk enterococcal isolate exhibiting multiple virulence factors*. *Microbiology Reading.* 149(3): 655-664.

Hugas M., Garriga M., Aymerich M.T., 2003. *Functionality of enterococci in meat products*. *International Journal of Food Microbiology.* 88: 223-233.

Hume I.D., 1999. *Marsupial nutrition*. Cambridge University Press, 434 pp.

Hurst A. and Hoover D.G., 1993. *Nisin*, p369-394. In P.M. Davidson and A.L. Branan (ed) *Antimicrobials in foods*. Marcel Dekker, Inc., New York.

Huycke M.M., Spiegel C.A. & Gilmore M.S., 1991. *Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 35: 1626-34.

Ike Y. and Clewell D.B., 1984. *Genetic analysis of the pAD1 pheromone response in Streptococcus faecalis, using transposon Tn917 as an insertional mutagen*. *J Bacteriol.* 158: 777-83.

Ike Y., Hashimoto H. and Clewell D.B., 1987. *High incidence of hemolysin production by Enterococcus (Streptococcus) faecalis strains associated with human parenteral infections*. *Journal of Clinical Microbiology.* 25(8): 1524-1528.

Ike Y., Clewell D.B., Segarra R.A. & Gilmore M.S., 1990. *Genetic analysis of the pAD1 hemolysin/bacteriocin determinant in Enterococcus faecalis: Tn917 insertional mutagenesis and cloning*. *J Bacteriol.* 172: 155-63.

Inoue T., Tomita H., Ike Y., 2006. *Bac 32, a novel bacteriocin widely disseminated among clinical isolates of Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 50(4): 1202-1212.

Jack R.W., Tagg J.R., Ray B., 1995. *Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria*. *Microbiological Reviews.* 59(2): 171-200.

Jacob F., Lwoff A., Siminonich A. and Wallman E., 1953. *Definition de quelques termes relatifs à la lysogenie*. *Annales de Institut Pasteur.* 84: 222-224.

Jadhav S., Bhave M., Palombo E.A., 2012. *Methods used for the detection and subtyping of Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods.* 88: 327-341.

Janakirman V., 2008. *Listeriosis in pregnancy: diagnosis, treatment and prevention*. *Reviews in obstetrics and gynecology.* 1(4): 179-185.



- Jay J. M., Loessner M.J., Golden D.A., 1996. *Microbiologia degli alimenti*, Springer 848 p.
- Jett B.D., Huycke M.M., Gilmore M.S., 1994. *Virulence of enterococci*. Clin Microbiol. 7 (4): 462-478.
- Jin L.Z., Marquardt R.R., ZHAO X., 2000. *A strain of Enterococcus faecium (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic E. coli K88 to porcine small intestine mucus*. Applied and Environmental Microbiology. 66(10): 4200-4204.
- Jung G. and Sahl H.-G., 1991. *Lantibiotics: a survey*. In: Jung G., Sahl H.-G. (ed.), *Nisin and novel lantibiotics*. Escom, Leiden, pp 1-34.
- Kagkli D.M., Vancanneyt M., Hill C., Vandamme P., Cogan T.M., 2007. *Enterococcus and Lactobacillus contamination of raw milk in a farm dairy environment*. International Journal of food Microbiology. 114(2): 243-251.
- Klaenhammer T.R., 1993. *Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria*. FEMS Microbiol Rev. 12: 39-85.
- Klein G., Pack A., Reuter G., 1998. *Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany*. Applied and Environmental Microbiology. 64 (5): 1825-1830.
- Klein G., 2003. *Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract*. Intern Journal of Food Microbiology. 88: 123-131.
- Kuipers O.P., Beerthuyzen M.M., Siezen R.J., de Vos W.M., 1993. *Characterization of the nisin gene cluster nisABTCIPR of Lactococcus lactis. Requirement of expression of the nisA and nisI genes for development of immunity*. Eur J Biochem. 216: 281-291.
- Lancefield R.C., 1933. *A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci*. J Exp Med. 57: 571-595.
- Lionau A., Sofos J.N., 2007. *A review of the incidence and transmission of listeria monocytogenes in Ready-to-eat products in retail and food service environments*. Journal of Food Protection. 70(9): 2172-2198.
- Liu W. and Hansen J., 1990. *Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by Lactococcus lactis*. Applied and Environmental Microbiology. 56: 2551-2558.
- Maldonado A., Ruiz-Barba J.L., Jimenez-Diaz R., 2004. *Production of plantaricin NC8 by Lactobacillus plantarum NC8 is induced in the presence of different types of gram-positive bacteria*. Arch. Microbiol. 181: 8-16.
- Manero A., Blanch A.R., 1999. *Identification of Enterococcus spp. with a Biochemical Key*. Applied and Environmental Microbiology. 65(10): 4425-4430.

- Manolopoulou E., Sarantinopoulos P., Zoidou E., Aktypis A., Moschopoulou E., Kandarakis I. G. & Anifantakis E. M., 2003. *Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening*. *Int J Food Microbiol.* 82: 153-61.
- Martínez S., Lopez M., Bernardo A., 2003. *Thermal inactivation of Enterococcus faecium: effect of growth temperature and physiological state of microbial cells*. *Letters in Applied Microbiology.* 37: 475-481.
- Martínez-Bueno M., Maqueda M., Gálvez A., Samyn B., Van Beeumen J., Coyette J., Valdivia E., 1994. *Determination of the gene sequence and the molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48*. *J Bacteriol.* 176(20): 6334-6339.
- Mattick A.T.R., Hirsch A., 1947. *Further observations on an inhibitory substance (nisin) produced by group N streptococci*. *Lancet* 2: 5-7.
- McClain D, Lee WH., 1988. *Development of USDA-FSIS method for isolation of Listeria monocytogenes from raw meat and poultry*. *J Assoc Off Anal Chem.* May-Jun;71(3):660-664.
- Michel V., Hauwuy A., Chamba J.F., 2001. *Raw cow milk microflora: Diversity and influence of conditions of production*. *Lait.* 81: 575-592.
- Michel-Briand Y., Baysse C., 2002. *The pyocins of Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie.* 84: 499-510.
- Monstein H.J., Quednau M., Samuelsson A., Ahrné S., Isaksson B., Jonasson J., 1998. *Division of the genus Enterococcus into species groups using PCR-based molecular typing methods*. *Microbiology.* 144: 1171-1179.
- Mook P., O'Bryen S.Y., Gillespie I.A., 2011. *Concurrent conditions and human listeriosis, England, 1999-2009*. *Emerg Infect Dis.* 17(1): 38-43.
- Moreno F., Gonzalez-Pastor J.E., Baquero M.R., Bravo D., 2002. *The regulation of microcin B, C and J operons*. *Biochimie.* 84: 521-529.
- Mulders J.W.M., Boerrigter I.J., Rollema H.S., Siezen R.J., de Vos W.M., 1991. *Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant*. *Eur J Biochem.* 201: 581-584.
- Mulec J., Podlesek Z., Mrak P., Kopitar A., Ihan A., Zgur-Bertok D., 2003. *A cka-gfp transcriptional fusion reveals that the colicin K activity gene is induced in only 3 percent of the population*. *J Bacteriol.* 185: 654-659.
- Mundy L.M., Sahm D.F., Gilmore M., 2000. *Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance*. *Clinical Microbiology Rev.* 13(4): 513-522.
- Murray B.E., 1990. *The Life and Times of the Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*, p. 46-65.

Nakajo K., Komori R., Ishikawa S., Ueno T., Suzuki Y., Iwami Y., Takahashi N., 2005. *The resistance to acid and alkaline environments of endodontic pathogen Enterococcus faecalis*. International Congress Series. 1284: 191-192.

Nakayama J. & Suzuki A., 1997. *Genetic analysis of plasmid-specific pheromone signaling encoded by pPDI in Enterococcus faecalis*. Biosci Biotechnol Biochem. 61: 1796-9.

Nakayama K., Takashima K., Ishihara H., Shinomiya T., Kageyama M., Kanaya S., Ohnishi M., Murata T., Mori H., Hayashi T., 2000. *The R-type pyocin of Pseudomonas aeruginosa is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage*. Mol Microbiol. 38: 213-231.

Naser S., Thompson F.L., Hoste B., Gevers D., Vandemeulebroecke K., Cleenwerck I., Thompson C.C., Vancanneyt M., Swings J., 2005. *Phylogeny and identification of Enterococci by atpA gene sequence analysis*. Journal of Clinical Microbiology. 43(5): 2224-30.

Nes I.F., Yoon S-S, Diep D.B., 2007. *Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review*. Food Sci Biotechnol. 16:675-690.

Nilsen T., Nes I.F., Holo H., 1998. *An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in Enterococcus faecium CTC492*. J. Bacteriol. 180, 1848-1854.

Nilsen T., Nes I.F., Holo H., 2003. *Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from Enterococcus faecalis LMG 2333*. Appl Environ Microbiol. 69(5): 2975-2984.

Noble C.J., 1978. *Carriage of group D streptococci in the human bowel*. Journal of Clinical Pathology. 31: 1182-1186.

O'keeffe T., Hill C., Ross R.P., 1999. *Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocine A production, immunity, and regulation in Enterococcus faecium DPC1146*. Applied and Environmental Microbiology. 65(4): 1506-1515.

Ogier J.C., Serror P., 2008. *Safety assessment of dairy microorganisms: the Enterococcus genus*. International Journal of Food Microbiology. 126: 291-301.

Ohno-Iwashita Y., Imahori K., 1982. *Assignment of the functional loci in the colicin E1 molecule by characterization of its proteolytic fragments*. J Biol Chem. 257: 6446-6451.

Omar B.N., Castro A., Lucas R., Abriouel H., Yousif N.M.K., Franz C.A.M.P., Holzapfel W.H., Perez-Pulido R., Martinez-Canamero M., Galvez A., 2004. *Functional and safety aspects of Enterococci isolated from different Spanish foods*. Syst Appl Microbiol. 27(1):118-30.

Pagie L., Hogeweg P., 1999. *Colicin diversity: a result of eco-evolutionary dynamics*. J Theor Biol. 196: 251-261.

Pingitore E.V., Todorov S.D., Sesma F., Franco B.D., 2012. *Application of bacteriocinogenic Enterococcus mundtii CRL35 and Enterococcus faecium ST88Ch in*

*the control of Listeria monocytogenes in fresh Minas cheese*. Food Microbiology. 32: 38-47.

Poeta P., Igrejas G., Costa D., Sargo R., Rodrigues J., Torres C., 2008. *Virulence factors and bacteriocins in faecal enterococci of wild boars*. Journal of Basic Microbiology. 48: 385-392.

Polentarutti M., Piasenzotto L., Comi G., Conte L. and Surmely A., 2001. *Influence of season on raw milk and on Montasio cheese aroma*. Industrie Alimentari. 40(409): 1331-1342.

Pritchard G.G., Coolbear T., 1993. *The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria*. FEMS Microbiol Rev. 12: 179-206.

Raffi V., Ossiprandi M.C., 2006. *Batteriocine: evoluzione ecologica ed applicazioni pratiche*. Ann Fac Madic Vet di Parma. 26: 235-246.

Randazzo C.L., Restuccia C., Romano A.D., Caggia C., 2004. *Lactobacillus casei, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives*. International Journal of Food Microbiology. 90: 9-14.

Rathnayake I.U., Hargreaves M., Huygens F., 2012. *Antibiotic resistance and virulence traits in clinical and environmental Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium isolates*. Systematic and Applied Microbiology. 35: 326-333.

Ray B., 1996. *Fundamental food microbiology*. Washington: CRC Press

Rayman M.K., Aris B., Hurst A., 1981. *Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats*. Appl. Environ. Microbiol. 41: 375-80.

Renye J.A, Somkuti G.A., Paul M., Van Hekken D.L., 2009. *Characterization of antilisterial bacteriocins produced by Enterococcus faecium and Enterococcus durans isolates from Hispanic-style cheeses*. J Ind Microbiol Biotechnol. 36: 261-8.

Riley M.A., Gordon D.M., 1996. *The ecology and evolution of bacteriocins*. J Indust Microbiol. 17: 151-158.

Riley M.A., Gordon D.M., 1999. *A model of intraspecific microbial warfare*. Trends Microbiol. 7: 129-133.

Riley M.A., Chavan M.A., 2007. *Bacteriocins: ecology and evolution*, Springer.

Ripio M.T., Domínguez-Bernal G., Suárez M., Brehm K., Berche P., Vázquez-Boland J.A., 1996. *Transcriptional activation of virulence genes in wild-type strains of Listeria monocytogenes in response to a change in the extracellular medium composition*. Res. Microbiol. 147: 371-384.

Rocourta J., Jacqueta C.H., Reilly A., 2000. *Epidemiology of human listeriosis and seafoods*. International Journal of Food Microbiology. 62: 197-209.

- Rojo-Bezares B.; Saenz Y., Navarro L., Zarazaga M., Ruiz-Larrea F., Torres C., 2007. *Coculture-inducible bacteriocin activity of Lactobacillus plantarum strain J23 isolated from grape must*. Food Microbiology. 24(5): 482-491.
- Rosenow E.C., 1919. *Studies on elective localization. Focal infection with special reference to oral sepsis*. J Dental Res. 1: 205-249.
- Ross R.P., Morgan S., Hill C., 2002. *Preservation and fermentation: past, present and future*. Int J Food Microbiol. 79(1-2): 3-16.
- Rosso L., Lobry J.R., Bajard S., Flandrois J.P., 1995. *Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth*. Applied and Environmental Microbiology. 610-616.
- Ruhr E., Sahl H. G., 1985. *Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 27: 841-845.
- Sabia C., de Niederhäusern S., Guerrieri E., Messi P., Anacarso I., Manicardi G., Bondi M., 2007. *Detention of bacteriocin production and virulence traits in vancomycin-resistant enterococci of different sources*. Journal of Applied Microbiology. 104: 970-9.
- Sahl H.G., Jack R.W., Bierbaum G., 1995. *Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications*. Eur J Biochem. 230: 827-853.
- Sarantinopoulos P., Andrighetto G., Georgalaki M.D., Rea M.C., Lombardi A., Cogan T.M., Kalantzopoulos G., Tsakalidou E., 2001. *Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance*. Int Dairy J. 11: 621-647.
- Scallan E., Hoekstra R.M., Augulo F.J., Tauxe R., Widdowson M.A., Roy S.L., Jones J.L., Griffin P.M., 2011. *Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens*, 17(1).
- Scheie A.A., Petersen F.C., 2004. *The biofilm concept: Consequences for future prophylaxis of oral diseases?* Crit Rev Oral Biol Med. 15:4-12.
- Schillinger U., Lücke F.K., 1989. *Antibacterial activity of Lactobacillus sake isolated from meat*. Appl Environ Microbiol. 55(8): 1901-6.
- Schlech W.F. III, 2000. *Foodborne Listeriosis*. Clinical Infectious Diseases. 31: 770-5.
- Schleifer K.H., Kilpper-Bälz R., 1984. *Transfer of Streptococcus faecalis and Streptococcus faecium to the genus Enterococcus nom. rev. as Enterococcus faecalis comb. nov. and Enterococcus faecium comb. nov.* Int. J. Syst. Bacteriol. 34: 31-34.
- Seth A., 1970. *Use of trimethoprim to prevent overgrowth by Proteus in the cultivation of N. gonorrhoeae*. Br J Vener Dis. 46(3): 201-202.
- Shapiro J.A., 1998. *Thinking about bacterial populations as multicellular organisms*. Annu Rev Microbiol. 52:81-104.

- Sherman J.M., Mauer J.C., Stark P., 1937a. *Streptococcus faecalis*. Journal of Bacteriology. 33(3): 275-282.
- Sherman J.M., 1937b. *The streptococci*. Bacteriol. Rev. 1: 3-97.
- Silk B.J. et al., 2012. *Invasive listeriosis in the Foodborne Diseases active surveillance network (FoodNet), 2004–2009: further targeted prevention needed for higher-risk groups*. Clinical Infectious Diseases. 54(5): 396-404.
- Sip A., Grajek W., Boyaval P., 1998. *Enhancement of bacteriocin production by Carnobacterium divergens AS7 in the presence of a bacteriocin-sensitive strain Carnobacterium piscicola*. Int. J. Food Microbiol. 42: 63-69.
- Skandamis P.N., Nychas G.J., 2012. *Quorum sensing in the context of food microbiology*. Appl Environ Microbiol. 78: 5473-5482.
- Slanetz L.W., Bartley C.H., 1957. *Numbers of enterococci in water, sewage, and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium*. J Bacteriol. 74(5): 591-595.
- Sousa M.J., Ardo Y., McSweeney P.L.H., 2001. *Advances in the study of proteolysis during cheese ripening*. International Dairy Journal. 11: 327-345.
- Sparo M.D., Castro M.S., Andino P.J., Lavigne M.V., Ceriani C., Gutierrez G.L., Fernandez M.M., Marzi M.C., Malchiodi E.L., Manghi M.A., 2006. *Partial characterization of enterocin MR99 from corn silage isolate of Enterococcus faecalis*. J Appl Microbiol. 100: 23-34.
- Stevens K.A., Sheldon B.W., Klapes N.A. and Klaenhammer T.R., 1991. *Nisin treatment for inactivation of Salmonella species and other Gram-negative bacteria*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3613-5.
- Stiles M.E., Holzappel W.H., 1997. *Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy*. International Journal of Food Microbiology. 36: 1-29.
- Strompfová V., Marcináková M., Simonová M., Gancarcíková S., Jonecová Z., Sciranková L., Koscová J., Buleca V., Cobanová K., Lauková A., 2006. *Enterococcus faecium EK13-an enterocin A-producing strain with probiotic character and its effect in piglets*. Anaerobe. 12: 242-248.
- Tagg J.R., McGiven A.R., 1971. *Assay System for Bacteriocins*. Appl Micr. 21(5): 943.
- Tagg J.R., Dajani A.S., Wannamaker L.W., 1976. *Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria*. Bacteriological Reviews. 40(3): 722-756.
- Tagg J.R., Dierksen K.P., 2003. *Bacterial replacement therapy: adapting 'germ warfare' to infection prevention*. Trends Biotechnol. 21: 217-223.
- Temple M.E., Nahata M.C., 2000. *Treatment of listeriosis*. Annals of Pharmacotherapy. 34(5): 656-661.

Thiercelin M.E., 1899. *Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogène*. C.R. Séances Soc Biol. 5: 269-271.

Toba M., Masaki H., Ohta T., 1988. *Colicin E8, a DNase which indicates an evolutionary relationship between colicins E2 and E3*. J Bacteriol. 170: 3237-3242.

Trémoulet F., Duché O., Namane A., Martinie B., The European Listeria Genome Consortium, Labadie J.C., 2002. *Comparison of protein patterns of Listeria monocytogenes grown in biofilm or in planktonic mode by proteomic analysis*. FEMS Microbiology Letters. 210: 25-31.

Twomey D., Ross R.P., Ryan M., Meaney B., Hill C., 2002. *Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications*. Antonie Van Leeuwenhoek. 82:165-185.

U.S. Food & Drug Administration. *Bad bug book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*. Second edition. 2012

Van den Berghe E., De Winter T., De Vuyst L., 2006. *Enterocin A production by Enterococcus faecium FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion*. International Journal of Food Microbiology. 107: 159-170.

Van Netten P., Perales J., Van De Moosdijk A., Curtis G.D.W., Mossel D.A.A. 1989. *Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes*. Int. Food Microbiol. 8: 299-316.

Vasquez-Boland J.A., Khun M., Berche P., Chrakraborty T., Dominguez-Bernal G., Goebel W., Gonzalez-Zorn B., Wehland J. and Kreft J. 2001. *Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants*. Clinical Microbiology Review. 14(3): 584-640.

Waite B.L., Siragusa G.R., Hutkins R.W., 1998. *Bacteriocin inhibition of two glucose transport systems in Listeria monocytogenes*. J of Applied Microbiology. 84: 715-721.

Watnick P., Kolter R., 2000. *Biofilm, city of microbes*. J Bacteriol. 182: 2675-2679.

Whitehead N.A., Barnard A.M., Slater H., Simpson N.J., Salmond G.P., 2001. *Quorum-sensing in Gram-negative bacteria*. FEMS Microbiol Rev. 25: 365-404.

Wirth R., 1994. *The sex pheromone system of Enterococcus faecalis. More than just a plasmid-collection mechanism?* Eur J Biochem. 222: 235-46.

Yanagida F., Chen Y., Onda T., Shinohara T., 2005. *Durancin L28-1A, a new bacteriocin from Enterococcus durans L28-1, isolated from soil*. Lett Appl Microbiol. 40: 430-435.

Zacharof M.P., Lovitt R.W., 2012. *Bacteriocins produced by lactic acid bacteria*. SciVerse ScienceDirect. 2: 50-56.

Zouhir A., Hammami R., Fliss I., Hamida J.B., 2010. *A New Structure-based Classification of Gram-positive Bacteriocins*. Protein J. 29: 432-439.