



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



uniss
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA
CORSO DI DOTTORATO IN SCIENZE VETERINARIE
INDIRIZZO: PRODUZIONE, QUALITÀ E SICUREZZA ALIMENTARE
CICLO: XXXIV
Coordinatore del Corso Prof.ssa Fiammetta Berlinguer

Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino

Tutor:

Prof. Enrico Pietro Luigi De Santis

Dottorando:

Dott.ssa Maria Pina Meloni

Correlatore:

Dott. Gavino Nieddu

Anno Accademico 2021/2022

Indice

PREMESSA	1
CAPITOLO I: INTRODUZIONE	6
1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	6
1.2. Caratterizzazione filogenetica di <i>Listeria monocytogenes</i>	8
1.3. Fisiologia e patogenesi di <i>Listeria monocytogenes</i>	12
1.4. La listeriosi umana	16
1.4.1. Generalità e sintomatologia	16
1.4.2. Terapie	17
1.4.3. Incubazione.....	18
1.5. Alimenti a rischio e quadro normativo	19
1.6. Valutazione della capacità degli alimenti di supportare la crescita di <i>L. monocytogenes</i>	25
1.7. Nuovi metodi per il controllo di <i>L. monocytogenes</i> negli alimenti.....	26
1.7.1. Applicazioni delle batteriocine agli alimenti.....	27
1.7.2. Colture bioprotettive applicate alla sicurezza alimentare.....	28
1.8. I batteri lattici (LAB)	31
1.8.1. I batteri lattici e la loro applicazione nelle produzioni lattiero-casearie	33
1.8.2. Batteri lattici come conservanti	35

1.8.3. I LAB come microrganismi probiotici	35
1.8.4. Batteri lattici con attività antimicrobica	37
1.8.5. Meccanismo d'azione delle batteriocine	41
1.9. I formaggi e la sicurezza alimentare: stato dell'arte e prospettive	43
 CAPITOLO II: MATERIALI E METODI.....	47
 2.1. Valutazione della prevalenza di <i>L. monocytogenes</i> presso il caseificio	47
2.1.1. Identificazione molecolare di specie mediante PCR multiplex.....	49
2.1.2. Differenziazione dei sierogruppi di <i>L. monocytogenes</i> mediante Multiplex PCR.....	51
2.2. Valutazione <i>in vitro</i> dell'attività antimicrobica di batteri lattici nei confronti di <i>L. monocytogenes</i>	53
2.2.1 Isolamento di LAB autoctoni	53
2.2.2. Analisi biochimiche e morfologiche: test della Catalasi, prova dell'Ossidasi e colorazione di Gram.....	55
2.3. Screening sull'attività inibente nei confronti di <i>L. monocytogenes</i>	56
2.3.1. Agar Well Diffusion Assay: Fase 1	59
2.3.2. Agar Well Diffusion Assay: Fase 2	60
2.4. Attività antimicrobica in differenti medium di crescita.....	61
2.5. Enumerazione dei potenziali LAB e della CP previa crescita in terreni convenzionali e in <i>scotta</i>	62

2.6. Identificazione molecolare dei ceppi microbici	62
2.7. Effetto della proteinasi K sull'attività battericida della coltura protettiva commerciale.....	63
2.9. Caseificazione sperimentale su scala pilota	65
2.9.1. Preparazione della coltura madre	66
2.9.2. Prelievo dei campioni e analisi microbiologiche.....	66
2.9.3. Adattabilità di CP e di <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. sunkii</i> al latte.....	67
2.10. Challenge test	68
2.10.1. Disegno sperimentale	68
2.10.2. Diagramma di flusso della produzione del Pecorino Sardo Dolce DOP	69
2.10.3. Preparazione della scotta-innesto	71
2.10.4. Preparazione della sospensione microbica di <i>L. monocytogenes</i> per la contaminazione sperimentale.....	72
2.10.5. Contaminazione sperimentale degli spicchi di Pecorino Sardo Dolce DOP	73
2.10.6. Campionamenti, test microbiologici e analisi dei parametri chimico-fisici	74
CAPITOLO III: RISULTATI.....	78
3.1. Valutazione della prevalenza di <i>L. monocytogenes</i> presso il caseificio	78
3.1.1. Identificazione di specie di <i>Listeria</i> isolate mediante Multiplex PCR	79

3.1.2. Differenziazione dei sierogruppi più comuni di <i>L. monocytogenes</i> mediante Multiplex PCR.....	80
3.2. Isolamento ed identificazione di ceppi batterici con attività antimicrobica nei confronti di <i>L. monocytogenes</i>	80
3.2.1. Analisi biochimiche e morfologiche: test della Catalasi, prova dell'Ossidasi e colorazione di Gram.....	81
3.5. Identificazione molecolare dei ceppi microbici.....	84
3.6. Effetto della proteinasi K sull'attività battericida della coltura protettiva commerciale.....	85
3.7. Cinetica della crescita e acidificazione di CP e LAB in <i>scotta</i>	85
3.8. Caseificazione sperimentale su scala pilota.....	93
3.9. Adattabilità di CP e di <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. sunkii</i> al latte	98
3.10. Challenge test	101
3.10.1. Profilo microbico e parametri chimico-fisici.....	101
CAPITOLO IV: DISCUSSIONE	107
CAPITOLO V: CONCLUSIONI.....	114
BIBLIOGRAFIA	116
RINGRAZIAMENTI	150

PREMESSA

Il settore economico ovi-caprino, pur rappresentando circa l'1 % della produzione agricola totale italiana, assume rilevanza economica in regioni quali Sardegna, Toscana e Lazio che generano quasi il 60% del valore complessivo del settore latte (ISMEA, 2021). Con circa 75.000 mila tonnellate prodotte, l'Italia è leader nell'Unione Europea per la produzione di formaggi ovini (ISMEA, 2020). Appare quindi evidente che il comparto ovino sia particolarmente rilevante in merito all'andamento economico di alcune regioni come la Sardegna, dove la raccolta del latte ovino rappresenta il 68,92% della produzione italiana (Istat, 2018). La Sardegna produce circa il 10% del latte di pecora europeo e una produzione di formaggio ovino stimata in 60.000 tonnellate, di cui circa 30.000 destinati alla produzione di formaggi a “Denominazione di Origine Protetta” (DOP) che la pone al livello di nazioni come la Spagna e le fa precedere altre come Francia e Portogallo (Agenzia Laore Sardegna, 2020).

L'origine del formaggio è particolarmente antica; si fa risalire a 8000 anni fa quando questo alimento fermentato veniva prodotto in Medio Oriente. L'Italia è caratterizzata da una lunga storia di produzione di formaggi (Gaglio *et al.*, 2021) ed è riconosciuta come un paese europeo che dispone di normative atte a proteggere le ricette tradizionali e salvaguardare le pratiche di produzione dei prodotti caseari (Vazzoler, 2009). Molte delle produzioni casearie italiane godono della certificazione DOP (CE n. 509/2006 e CE n. 510/2006), riconoscimento di qualità conferito dalla Comunità Europea a tutela di alcuni prodotti agricoli e alimentari prodotti in una determinata zona secondo i relativi disciplinari di produzione (Regulation (EC) No 1151/2012).

L'Unione Europea ha assegnato il marchio DOP a oltre 180 formaggi e di questi, 50 sono prodotti italiani (Lora *et al.*, 2020). Ciò dimostra che l'Italia è il Paese Europeo con il maggior numero di formaggi DOP registrati (DOOR, 2018).

La più ampia tradizione di trasformazione del latte di pecora è concentrata nelle regioni meridionali. Il formaggio ovino infatti è prodotto quasi in tutta Italia, con denominazioni che ne indicano rigorosamente la provenienza geografica come

Pecorino Romano, Pecorino Siciliano, Pecorino Sardo e Pecorino Toscano tra i prodotti più conosciuti. Tutti questi formaggi sono considerati prodotti tipici in quanto trasformati a seguito dell'applicazione di processi produttivi tradizionali in determinate aree geografiche (Gaglio *et al.*, 2021).

Tre formaggi italiani DOP “Pecorino Romano”, “Fiore Sardo” e “Pecorino Sardo”, sono prodotti in Sardegna (Vagnoni *et al.*, 2017). Il Pecorino Romano è un formaggio a pasta dura che può essere prodotto con latte di pecora crudo o termizzato, generalmente inoculato con un tradizionale fermentato naturale, la “scotta-innesto” (Chessa *et al.*, 2021). Il Fiore Sardo è il più antico e tradizionale formaggio a pasta dura prodotto con latte crudo di pecora intero prodotto in Sardegna (Urgeghe *et al.*, 2012). Il Pecorino Sardo è un formaggio a pasta semicotta prodotto con latte di pecora (se necessario, termizzato o pastorizzato a discrezione del casaro). A seconda del tempo di maturazione, si distinguono due tipologie di Pecorino Sardo: “Dolce” e “Maturo” (Madrau *et al.*, 2006). Il primo, rientra nella categoria dei formaggi a pasta molle, con un periodo di stagionatura da 20 a 60 giorni; il “Maturo”, invece, necessita di una stagionatura di almeno 60 giorni (2-4 mesi) (Pirisi *et al.*, 2014).

L'Italia detiene il primato nelle esportazioni di formaggi ovini, con il 36% della quota di mercato, seguita dalla Francia (20%). Il 21,8% delle pecore da latte del territorio si trova in Sardegna (Pulina *et al.*, 2018), ed è chiaro quindi che il settore lattiero-caseario ovino abbia un'importante rilevanza economica per l'isola. Per andare incontro alle esigenze di mercato, le aziende del settore alimentare hanno dovuto sviluppare sistemi innovativi al fine di garantire la sicurezza alimentare di prodotti con tempi di conservazione sempre più lunghi. Le aziende casearie nel mercato competitivo della “Grande Distribuzione Organizzata” (GDO) e dell'export sempre più spesso adattano la produzione in funzione delle esigenze del consumatore e della distribuzione, con il crescente coinvolgimento di aziende leader nel fornire servizi, come ad esempio il porzionamento. Il livello di rischio per la sicurezza dei prodotti alimentari cresce con l'incremento della produttività,

Maria Pina Meloni – “Adozione di culture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

nonostante la corretta applicazione delle procedure igieniche (GHP) e di lavorazione (GMP). Contaminazioni di prodotti alimentari da parte di microorganismi patogeni o agenti di spoilage durante le fasi di porzionamento, confezionamento o distribuzione (contaminazioni post processo) hanno causato importanti focolai di tossinfezione alimentare. Alcuni alimenti tra cui latte crudo, formaggi a pasta molle, carni pronte e pesce affumicato, sono considerati ad alto rischio di contaminazione da *Listeria monocytogenes*. Particolare attenzione è rivolta agli alimenti ready-to-eat (RTE) in grado di supportare la crescita di *L. monocytogenes* che può raggiungere livelli di contaminazione più elevati, anche a temperature di refrigerazione, e comportare un rischio per il consumatore (Fox *et al.*, 2011). *L. monocytogenes* è uno dei principali agenti patogeni a trasmissione alimentare al mondo e perciò attira gran parte dell'attenzione nella ricerca e nella sorveglianza da parte delle agenzie governative e dell'industria alimentare (Matle *et al.*, 2020).

L. monocytogenes è un batterio psicrotrofo e Gram positivo ed è l'agente eziologico della listeriosi umana, con un tasso di mortalità che può arrivare al 30%. La gastroenterite, la meningite e la setticemia sono state riportate come le principali manifestazioni cliniche della listeriosi. Il monitoraggio dei casi di malattia associati a *L. monocytogenes* e la sua dimostrata capacità di sopravvivenza in condizioni difficili come la refrigerazione e la conservazione in atmosfera modificata e persistenza negli ambienti di trasformazione degli alimenti, indica una potenziale continua esposizione degli alimenti a questo microorganismo durante la lavorazione e nelle fasi post-lavorazione (Bahrami *et al.*, 2020).

Le tecnologie di produzione dei formaggi e l'adozione di corrette prassi igieniche offrono ostacoli che minimizzano il rischio microbiologico fino a livelli bassi, mentre le fasi post-processo possono essere causa di una nuova contaminazione. Come accennato, le industrie, su richiesta dei mercati e della grande distribuzione (GDO), hanno integrato il ciclo della produzione con il porzionamento e hanno evidenza della frequente contaminazione ambientale negli stabilimenti da parte di

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

L. monocytogenes, con potenziale trasferimento del microorganismo da parte di superfici a contatto. Le aziende casearie possono incorrere in azioni di ritiro/ricambio da parte dell'Autorità Competente in caso di riscontro di *L. monocytogenes* in prodotti immessi sul mercato. Ciò determina gravi ripercussioni economiche per le aziende alimentari sia in termini economici che di immagine.

I consumatori si aspettano che gli alimenti disponibili sul mercato siano sicuri, ma allo stesso tempo sono consapevoli dei potenziali effetti nocivi degli additivi chimici (Castro *et al.*, 2011). Appare quindi fondamentale adottare sistemi di innovazione che, pur mantenendo la tradizione, garantiscano la sicurezza alimentare. Negli ultimi anni, i microrganismi probiotici sono stati proposti come antimicrobici alternativi contro i patogeni per migliorare la sicurezza alimentare (Hossain *et al.*, 2017). L'uso di batteri lattici (LAB) produttori di sostanze antimicrobiche come le batteriocine, il perossido di idrogeno, l'etanolo e altri acidi organici per il controllo dei patogeni di origine alimentare, è una strategia sempre più diffusa nelle industrie alimentari (Morandi *et al.*, 2019). I LAB che consentono l'inibizione di microrganismi indesiderati (patogeni e alteranti) sono definiti "Colture Protettive" (Settanni e Moschetti, 2010).

Le colture protettive disponibili in commercio, composte da batteri lattici selezionati, sono sicure e facili da usare negli alimenti, ma presentano alcune limitazioni. Le normative su cui si basano i disciplinari DOP, infatti, non consentono l'aggiunta di sostanze o microrganismi che non appartengono al prodotto stesso (Martín *et al.*, 2022). Sulla base di queste considerazioni l'obiettivo del presente lavoro è stato quello di selezionare e identificare batteri lattici termofili autoctoni isolati da latte crudo ovino prodotto in Sardegna al fine del loro utilizzo come colture protettive contro la crescita di *L. monocytogenes* nel Pecorino Sardo DOP. Lo studio ha incluso la valutazione dell'attività antimicrobica *in vitro* di una coltura protettiva commerciale e di microrganismi lattici termofili autoctoni nei confronti di *L. monocytogenes*, e la loro adattabilità al processo di produzione di formaggio.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

È stato condotto un challenge test per valutare il potenziale di crescita di *L. monocytogenes* nei formaggi contaminati artificialmente e inoculati con le colture protettive con lo scopo di studiarne l'efficacia nel ridurre o eliminare il patogeno.

CAPITOLO I: INTRODUZIONE

1.1. *Listeria monocytogenes*

Il genere *Listeria* appartiene al phylum *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordine *Bacillales* (Matle *et al.*, 2020). *Listeria* è stata classificata nella famiglia delle *Corynebacteriaceae* secondo la 7a edizione del Manuale di batteriologia sistematica di Bergey (Goodfellow *et al.*, 2012), ma è stata inserita in una nuova famiglia, denominata *Listeriaceae*, nel 2004 (Shamloo *et al.*, 2019). Sono batteri Gram-positivi a forma bastoncellare, asporigeni, anaerobi facoltativi, catalasi positivi e ossidasi negativi, con dimensioni 0,5–4 µm di diametro e 0,5–2 µm di lunghezza (Jamshidi & Zeinali, 2019).

Il genere *Listeria* è costituito da 20 specie a basso contenuto di guanina (G) + citosina (C) (38%), che comprende *L. monocytogenes*, *L. marthii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. costaricensis*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii*, *L. newyorkensis*, *L. weihenstephanensis*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. thailandensis*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. booriae*, *L. Goensis* e *L. Grandensis*. Tra le specie del genere *Listeria*, *L. monocytogenes* e *Listeria ivanovii*, sono patogene (Matereke *et al.*, 2020).

Le specie di *Listeria* sono generalmente mobili, per mezzo di flagelli, a temperature comprese tra 24 °C e 28 °C ma non mobili al di sopra dei 30°C. Queste specie sono catalasi positive e ossidasi, urea e indolo negative e idrolizzano l'esculina. Hanno anche la capacità di tollerare concentrazioni di NaCl fino al 20% (peso/volume [p/v]) e crescono in un intervallo di pH compreso tra 4,4 e 9,6. La loro temperatura di crescita varia da -2 °C a +45 °C, con un optimum a +37 °C e possono sopravvivere con valori di attività dell'acqua relativamente bassi ($a_w < 0,90$) (Tabella). Queste condizioni di crescita contribuiscono alla loro versatilità e ne consentono la sopravvivenza in condizioni ambientali estreme come quelle presenti negli impianti di produzione e trasformazione degli alimenti, rappresentando pertanto un serio problema per l'industria alimentare (Matle *et al.*, 2020).

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

Tabella: *Caratteristiche di crescita/sopravvivenza di L. monocytogenes (ceppo specifico) in brodo di crescita* (EURL Lm Technical Guidance Document; European Union Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes*, 2014)

	MIN. (limite minimo di crescita)	OPTIMUM DI CRESCITA (crescita più rapida)	MAX. (limite massimo di crescita)	SOPRAVVIVENZA (ma non crescita)
Temperatura (°C)	-2	30 - 37	45	-18
pH	4,0 – 4,3	7,0	9,6	3,3 – 4,2
aw	0.92 (0,90 con glicerolo)	0,99	/	<0,90
NaCl			12	≥20
Atmosfera / Gas	Anaerobio facoltativo e microaerofilo, capace di crescere in presenza/assenza di O ₂ . (es. sotto vuoto o atmosfera di gas modificato)			

L. monocytogenes è stata descritta per la prima volta da Hülphers nel 1910 a seguito dell'isolamento da un fegato necrotico di un coniglio in Svezia e denominata *Bacillus hepatis* (Hülphers, 1911). Murray isolò un batterio simile nel 1926 come agente eziologico di malattia in conigli e porcellini d'India e lo chiamò *Bacterium monocytogenes* (Murray et al., 1926). Nell'uomo *L. monocytogenes* fu isolata per la prima volta da Nyfeldt nel 1929 e nello stesso anno Gill descrisse anche la malattia negli ovini, denominata “malattia del circolo” (Nyfeldt 1929; Gill et al. 1937; Matle et al., 2020). La listeriosi è stata quindi definita come zoonosi e negli anni '80, dopo diversi focolai, è stato identificato come patogeno di origine alimentare (Schlech et al., 1983).

L. monocytogenes è la principale causa di listeriosi di origine alimentare nell'uomo. Raramente, infezioni di origine alimentare sono state segnalate da altre specie di *Listeria*. I vari ceppi di *L. monocytogenes* hanno potenziale patogeno diverso, poiché alcuni sono molto virulenti, mentre altri sono considerati agenti non infettivi.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari

La determinazione del potenziale patogeno di *L. monocytogenes* è importante dal punto di vista della sicurezza alimentare e della salute pubblica. L'identificazione di ceppi virulenti può essere ottenuta tracciando alcuni geni direttamente correlati alla patogenicità (Jamshidi & Zeinali, 2019).

1.2. Caratterizzazione filogenetica di *Listeria monocytogenes*

I ceppi di *L. monocytogenes* sono geneticamente eterogenei e possono essere raggruppati in:

- quattro lineage filogenetici I-IV;
- tredici sierotipi;
- cinque sierogruppi molecolari;
- 63 complessi clonali (CC) mediante Multi Locus Sequence Typing (MLST) (Schiavano *et al.*, 2021).

Sulla base di antigeni somatici (Antigene O) e flagellari (Antigene H), *L. monocytogenes* può essere raggruppata nei seguenti 13 sierotipi: 1/2 a, 1/2 b, 1/2 c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7 (Datta & Burall, 2018; Orsi *et al.*, 2011).

A causa della complessità delle tecniche di sierotipizzazione classica mediante la reazione antigene-anticorpo, sono stati sviluppati diversi metodi basati sul DNA che dipendono dalla presenza/assenza di sequenze geniche. Utilizzando un metodo basato sulla PCR, Doumith (Doumith *et al.*, 2004) ha riportato per primo un approccio che ha portato alla formazione di cinque sierogruppi: I.1 (1/2a-3a), I.2 (1/2c-3c), II.1 (4b-4d-4e), II. 2 (1/2b-3b-7) e III (4a-4c). I metodi di raggruppamento dei sierotipi mediante PCR sono basati sull'identificazione dei geni bersaglio lmo0737, lmo1118, ORF2819 e ORF2110 (Leclercq *et al.*, 2011)

Sebbene tutti i ceppi di *L. monocytogenes* siano considerati patogeni, non è chiaro il motivo per cui alcuni sierotipi siano maggiormente rappresentati tra gli isolati clinici e altri tra gli isolati alimentari e ambientali (Datta *et al.*, 2018). Nello specifico, i ceppi appartenenti ai lineage I e II sono i più rappresentativi in termini

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

di numero di ceppi isolati nel mondo e impatto sulla malattia (Aguilar-Bultet *et al.*, 2018). Tuttavia, solo tre sierotipi (1/2a, appartenente al lineage II; 1/2b e 4b, appartenenti al lineage I) sono stati associati al 98% di tutti i casi di listeriosi umana. Il lineage I è stato associato a casi di listeriosi epidemica ed è collegato alle infezioni del sistema nervoso centrale (Aguilar-Bultet *et al.*, 2018) mentre il lineage II è stato associato a isolati provenienti da alimenti. È evidente che la variazione genetica tra i due lineage si traduce nella capacità del lineage I di infettare gli esseri umani in modo più efficiente e nella capacità del lineage II di colonizzare i substrati alimentari. Inoltre, gli isolati del lineage II hanno una virulenza ridotta rispetto al lineage I. Questa riduzione della virulenza può, in parte, essere dovuta all'osservazione che oltre il 30% degli isolati di lineage II contengono un codone di stop prematuro nel gene che codifica per l'internalina A (*inlA*), un fattore chiave di virulenza richiesto per l'invasione delle cellule epiteliali (Bechtel *et al.*, 2021). È interessante notare che gli isolati appartenenti al lineage II sembrano albergare un numero maggiore di plasmidi rispetto a quelli appartenenti al lineage I e tali plasmidi spesso conferiscono resistenza ai metalli tossici e presumibilmente ad altri composti che possono essere riscontrati nell'ambiente. Inoltre, gli isolati del lineage II sembrano essere più resistenti alle batteriocine rispetto agli isolati del lineage I, il che probabilmente conferisce un vantaggio in ambienti in cui gli organismi produttori di batteriocine sono numerosi. L'evidenza complessiva suggerisce che i quattro lineage di *L. monocytogenes* finora identificati presentino caratteristiche ecologiche, genetiche e fenotipiche distinte che sembrano influenzare la loro capacità di trasmissione attraverso gli alimenti e di causare malattie nell'uomo (Orsi *et al.*, 2011).

Ceppi di *L. monocytogenes* diversi, isolati da siti anche molto distanti tra loro possono essere geneticamente simili e addirittura appartenere allo stesso complesso clonale (CC), ovvero gruppi di isolati geneticamente correlati che si presume discendano da un antenato comune recente (Ragon *et al.*, 2008; Cardenas-Alvarez *et al.*, 2019). L'identificazione di questi gruppi clonali distribuiti a livello globale è

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

stata determinante per valutare la biodiversità di *L. monocytogenes* e comprendere il potenziale patogeno e l'epidemiologia relativi a diverse sottopopolazioni di *L. monocytogenes*. (Chen *et al.*, 2016). Un CC è definito da uno schema di Multi Locus Sequence Type (MLST) a 7 loci come un gruppo di ceppi i cui profili allelici (Sequence Type - ST) differiscono per non più di un allele da almeno un altro ST nel gruppo. Un ST che differisce da tutti gli altri ST esistenti nell'intera specie per almeno due alleli definisce un CC (Chen *et al.*, 2020). Secondo questo principio, ogni CC comprende ceppi con un alto livello di analogia genetica e dunque, isolati di differenti complessi clonali, sono meno correlati rispetto ad altri che fanno parte del medesimo complesso clonale (Sammarco *et al.*, 2014). Particolare attenzione è stata posta sul complesso clonale 1 (CC1). Questo è un gruppo clonale cosmopolita isolato per la prima volta da un soldato italiano affetto da meningite durante la prima guerra mondiale. In particolare, CC1 è il complesso clonale clinico più diffuso in diversi paesi e corrisponde al 20% di tutti gli isolati clinici di *L. monocytogenes* depositati presso il National Center for Biotechnology Information (NCBI). Il CC1 è stato riportato in diverse matrici alimentari, compresi i prodotti lattiero-caseari, che possono essere fortemente contaminati e costituiscono una delle principali fonti di listeriosi umana (Moura *et al.*, 2020).

Uno studio condotto da Chenal-Francisque *et al.*, sulla distribuzione mondiale dei principali cloni di *L. monocytogenes* ha dimostrato chiaramente l'elevata prevalenza di pochi cloni frequenti in diverse regioni del mondo. CC1 e CC2 (entrambi appartenenti al Lineage I) erano predominanti in tutte le regioni del mondo ad eccezione dell'Africa settentrionale per CC1. CC3 (Lineage I) si è classificato tra i 4 cloni più comuni in tutte le regioni, mentre CC9 (Lineage II) si è classificato terzo in Europa e nell'emisfero occidentale. Complessivamente, questi 4 cloni rappresentano il 50% degli isolati alimentari e il 68% degli isolati clinici (Chenal-Francisque, *et al.*, 2011).

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

Tabella. Sintesi dei lineage filogenetici di *L. monocytogenes*. (Orsi *et al.*, 2011).

Lineage	Identificazione iniziale	Sierotipi	Caratteristiche genetiche	Distribuzione
I	Descritto per la prima volta in uno studio MLEE ¹ di Piffaretti <i>et al.</i> , 1989	1/2b, 3b, 3c, 4b	La diversità più bassa tra i lineage; livelli più bassi di ricombinazione tra i lineage	Comunemente isolato da varie fonti; molto frequente tra gli isolati umani
II	Descritto per la prima volta in uno studio MLEE ¹ di Piffaretti <i>et al.</i> , 1989.	1/2a, 1/2c, 3a	Livelli di ricombinazione più diversi e più alti	Comunemente isolato da varie fonti; molto frequente negli alimenti e nei loro ambienti di produzione, nonché gli ambienti naturali
III	Descritto per la prima volta utilizzando analisi di dati di sequenza parziale da Rasmussen <i>et al.</i> , 1995.	4a, 4b, 4c	Molto vario; livelli di ricombinazione tra quelli del lineage I e del lineage II	La maggior parte degli isolati ottenuti da ruminanti
IV	Descritto per la prima volta utilizzando analisi di dati di sequenza parziale da Roberts <i>et al.</i> , 2006.	4a, 4b, 4c	Pochi isolati analizzati fino ad oggi.	La maggior parte degli isolati ottenuti da ruminanti

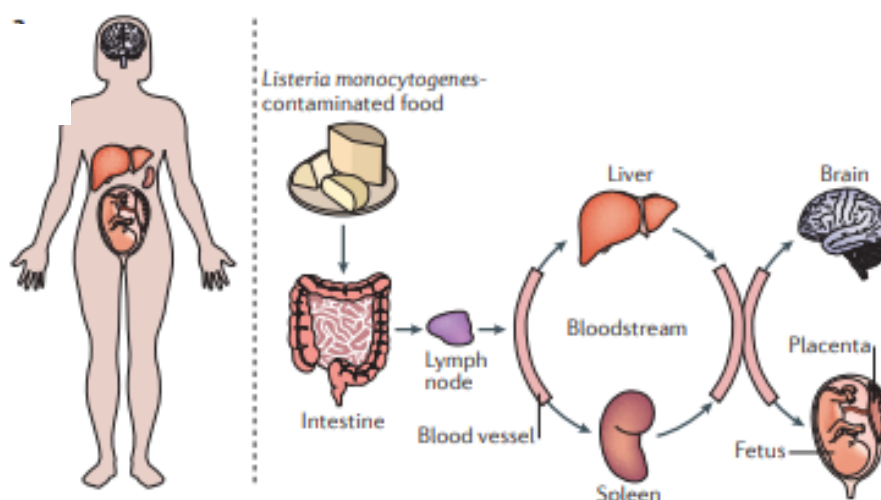
¹ MLEE: studio di tipizzazione mediante Multilocus Enzyme Electrophoresis

1.3. Fisiologia e patogenesi di *Listeria monocytogenes*

Diverse caratteristiche fisiologiche di *L. monocytogenes* rendono questo microorganismo particolarmente interessante nel campo delle malattie infettive, della microbiologia e della biologia cellulare. Questo patogeno intracellulare può infettare cellule ospiti umane e animali, sopravvivere e crescere in condizioni molto diverse tra loro, e superare barriere fisiopatologiche, come l'epitelio intestinale, la barriera ematoencefalica e la placenta. *L. monocytogenes* sovverte i recettori delle cellule ospiti, gli organelli e il citoscheletro in diverse fasi dell'infezione, manipolando molte funzioni cellulari che includono il trasporto di ioni, le modifiche post-traduzionali, le risposte immunitarie innate, nonché l'espressione genica e la stabilità del DNA (Pizarro-Cerda & Cossart, 2018).

Si ritiene che il 99% delle infezioni causate da *L. monocytogenes* sia di origine alimentare (Orsi *et al.*, 2011). Dopo l'ingestione di alimenti contaminati, *L. monocytogenes* si moltiplica nel lume intestinale, attraversa la barriera intestinale e, dopo aver raggiunto i linfonodi mesenterici, entra nel flusso sanguigno e raggiunge il fegato e la milza, dove prolifera. Il rilascio di batteri nel flusso sanguigno può dar luogo a setticemia. In alcuni casi, *L. monocytogenes* può attraversare la barriera ematoencefalica negli individui immunocompromessi o la barriera placentare nelle donne in gravidanza come mostrato nella *Figura* che segue (Radoshevich *et al.*, 2018).

Schema dell'infezione da *L. monocytogenes* di un ospite umano.



- Il ciclo infettivo intracellulare si compone di fasi distinte (Luque-Sastre *et al.*, 2018): invasione della cellula ospite eucariota;
- fuga dal vacuolo intracellulare,
- proliferazione intercellulare;
- diffusione intercellulare basata sui filamenti di actina;
- disseminazione nella cellula adiacente.

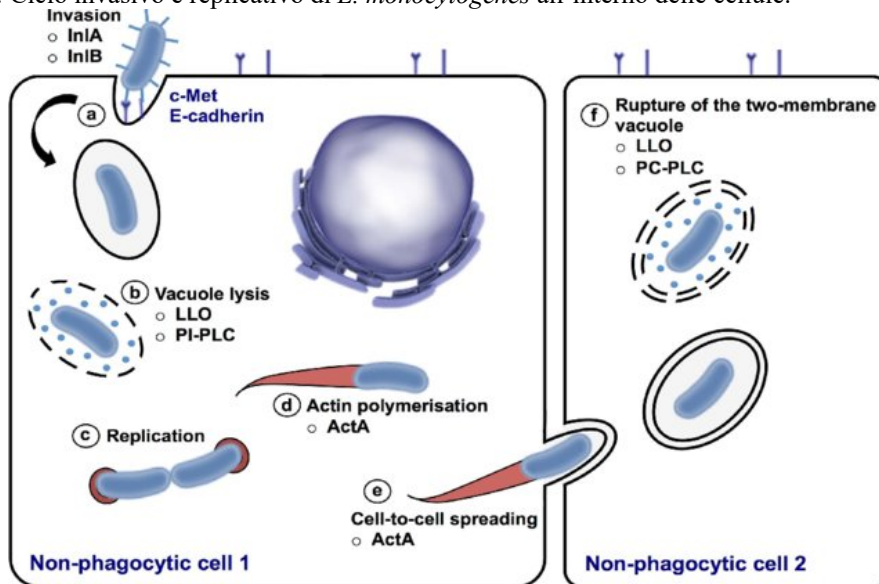
Prove *in vitro* hanno dimostrato che *L. monocytogenes* entra in quasi tutte le cellule aderenti, ma l'efficienza dell'assorbimento può variare di oltre 10.000 volte. I macrofagi e le linee cellulari simili ai macrofagi possono interiorizzare fino a 20 batteri per cellula, mentre le linee cellulari di fibroblasti interiorizzano meno di un batterio per cellula (Portnoy *et al.*, 2002). Dopo l'ingresso in cellule non fagocitiche o l'assorbimento da parte delle cellule fagocitiche, *L. monocytogenes* viene interiorizzata nel vacuolo. Questo primo passaggio porta al riarrangiamento del citoscheletro. Nella maggior parte dei casi, il batterio fuoriesce dal vacuolo distruggendo fisicamente la membrana vacuolare attraverso l'attività di potenti fattori di virulenza. *L. monocytogenes* può sopravvivere e dividersi nel citosol delle

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari

cellule ospiti e quindi ne altera una serie di organelli e di processi biologici (Radoshevich *et al.*, 2018).

Il ciclo di vita intracellulare di *L. monocytogenes* è illustrato nella *Figura* che segue (Luque-Sastre *et al.*, 2018).

Figura: Ciclo invasivo e replicativo di *L. monocytogenes* all'interno delle cellule.



- a) Invasione: *Listeria* entra nelle cellule ospiti tramite un meccanismo a cerniera, che richiede l'interazione delle internaline di superficie *InlA* e *InlB* con i rispettivi recettori di superficie cellulare *E-caderina* e *Met*.
- b) Lisi del vacuolo: il vacuolo endocitico viene rotto tramite l'azione degli effettori secreti ovvero la tossina che forma i pori listeriolysin O (*LLO*) e la fosfatidilinositide fosfolipasi C (*PI-PLC*).
- c) Replicazione: I batteri possono replicarsi nel citosol, utilizzando le risorse citosoliche a proprio vantaggio.
- d) Polimerizzazione dell'actina: la proteina di superficie batterica *ActA* stimola la polimerizzazione dell'actina cellulare attraverso il reclutamento del complesso Arp2/3. Ciò consente la motilità intracellulare e la diffusione da cellula a cellula dei batteri.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

- e) Rottura del vacuolo: la rottura del vacuolo in due membrane è principalmente mediata dall'azione di *LLO* e della fosfolipasi C specifica della fosfatidilcolina (*PC-PLC*) (Cossart & Lebreton, 2014).

Il patogeno può sfuggire al sistema immunitario dell'ospite grazie alla capacità di sopravvivere e proliferare all'interno dei macrofagi.

La maggior parte dei fattori di virulenza, che svolgono un ruolo essenziale nella via di infezione di *L. monocytogenes*, sono regolati dal regolatore trascrizionale *PrfA*. Un certo numero di proteine di superficie comprese le internaline, come l'internalina A (*InlA*) e l'internalina B (*inlB*), sono cruciali per l'invasione della cellula ospite (Bierne *et al.*, 2007). Altre internaline, *InlC* e *InlJ*, partecipano alle fasi post-intestinali dell'infezione da *L. monocytogenes* (Jamshidi, & Zeinali, 2019). I geni che codificano per i fattori di virulenza di *L. monocytogenes* sono sparsi nel genoma (per esempio il locus *inlA-inlB*, *bsh*, *inlC*, *lap*, e altri) o raggruppati nelle isole di patogenicità LIPI-1, LIPI-3 e LIPI-4. Il locus *inlA - inlB* codifica per le proteine di superficie *InlA* e *InlB*, e, insieme a LIPI-1, è necessario per le fasi chiave del parassitismo intracellulare (adesione, interiorizzazione, sopravvivenza e disseminazione intracellulare). È importante sottolineare che il locus *inlA - inlB* e LIPI-1 sono conservati in quasi tutti gli isolati di *L. monocytogenes*, evidenziando il loro ruolo cruciale per la patogenicità. È importante sottolineare che oltre il 30% degli isolati di lineage II (sovrarappresentati negli alimenti) ospitano codoni di stop prematuri nel gene *inlA*, portando all'attenuazione della virulenza. La genomica comparativa tra cloni ipo e ipervirulenti ha portato alla scoperta di nuovi fattori di virulenza come LIPI-3 e LIPI-4. LIPI-4 è presente nel CC4 di *L. monocytogenes* (complesso clonale significativamente associato a listeriosi materno-fetale e malattia neurologica), nei ceppi di *L. monocytogenes* lineages III e IV e, recentemente, in *L. innocua* (Quereda *et al.*, 2021). Altri importanti geni di virulenza di *L. monocytogenes* come *bsh* o *inlC* non sono raggruppati in isole di patogenicità ma sono sparsi nel genoma e sono controllati positivamente

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

dall'attivatore trascrizionale *PrfA* (Quereda *et al.*, 2021; Gouin *et al.*, 2010). Come descritto, un altro elemento caratterizzante il meccanismo patogenetico di *L. monocytogenes* è la capacità di trasportare una tossina chiamata listeriolysin O (*LLO*), proteina di 58 KDa codificata dal gene *hlyA*, che è fondamentale per la virulenza del batterio in quanto consente la comparsa di pori (Jamshidi, & Zeinali, 2019).

La dose infettiva di *L. monocytogenes* non è stata determinata con sicurezza, ma si ritiene che possa variare in base al ceppo, alla suscettibilità dell'ospite, e alla matrice alimentare coinvolta che può influenzare la relazione dose-risposta. Per esempio, nei casi di malattia associati al latte crudo o non adeguatamente pastorizzato, è probabile che meno di 1.000 cellule possano causare malattie in individui sensibili (FDA, 2012).

1.4. La listeriosi umana

1.4.1. Generalità e sintomatologia

La listeriosi è un'infezione causata dal consumo di alimenti contaminati dal batterio *Listeria monocytogenes*. Infezioni invasive possono determinare sintomi gravi come setticemia, encefalite e meningite in gruppi ad alto rischio definiti “YOPI” (young, old, pregnant and immunocompromised) (Habann, 2013), e/o affetti da altre condizioni gravi (come diabete, insufficienza renale, malattie del fegato e HIV) (FDA- CDER, 2019). Le persone che non presentano questi fattori di rischio sono raramente interessate. L'infezione provoca uno spettro di malattie, che vanno dalla gastroenterite febbrile alla malattia invasiva, tra cui batteriemia, sepsi e meningoencefalite (Hernandez-Milian & Payeras-Cifre, 2014).

Quasi tutti coloro a cui viene diagnosticata la listeriosi presentano un'infezione invasiva e, sebbene le persone a volte possano sviluppare la listeriosi fino a due mesi dopo aver ingerito alimenti contaminati, i sintomi di solito iniziano entro diversi giorni. I sintomi variano a seconda che siano coinvolte persone ad alto

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

rischio o individui sani. Nel primo caso, i sintomi possono includere febbre, dolori muscolari, mal di testa, torcicollo, confusione, perdita di equilibrio e convulsioni. La listeriosi materno-fetale non porta mai alla mortalità materna e non è praticamente mai associata alla forma neurologica materna. In questi casi i sintomi nella madre includono febbre, brividi e mal di testa, e più dell'80% delle madri infette presenta gravi complicazioni fetali: natimortalità, parto prematuro o infezione pericolosa per la vita del neonato. Le persone sane raramente sviluppano una listeriosi invasiva. Tuttavia, le persone esposte a una concentrazione molto elevata del patogeno possono sviluppare una forma non invasiva ma accompagnata da diarrea e febbre (FDA- CDER, 2018; FDA- CDER, 2019).

Negli ultimi tre decenni si è registrato un forte calo del numero di casi materno-neonatali, in concomitanza con la maggiore sorveglianza in ambito alimentare e delle campagne informative sulle misure preventive per evitare la listeriosi. A differenza della listeriosi materno-fetale, batteriemia e forma neurologica sono quasi costantemente associate a comorbidità immunosoppressive, tra cui cirrosi, diabete mellito, malattia renale allo stadio terminale, cancro d'organo solido, neoplasie ematologiche, trapianto di cellule staminali emopoietiche o di organi solidi, asplenia, neutropenia, linfopenia, infezione da HIV, malattie infiammatorie intestinali, malattie reumatiche infiammatorie e altre malattie autoimmuni, immunodeficienza congenita, prescrizione di corticosteroidi o altre terapie immunosoppressive negli ultimi 5 anni ed età superiore a 70 anni (Lecuit, 2020).

1.4.2. Terapie

Il trattamento della listeriosi avviene mediante la somministrazione di antibiotici. La terapia standard per le infezioni gravi è a base di amoxicillina o ampicillina, spesso in associazione con la gentamicina; occasionalmente può essere usata la vancomicina nelle infezioni non meningee, mentre l'eritromicina è usata durante la gravidanza (Baquero et al., 2020). È rilevante sottolineare che negli ultimi decenni sono stati sempre più comunemente riscontrati fenomeni di resistenza di *L.*

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

monocytogenes a molti agenti antimicrobici. Nell'uomo, gli isolati di *L. monocytogenes* hanno mostrato resistenza alla tetraciclina e alla ciprofloxacina; negli alimenti, è stata descritta un'elevata prevalenza di resistenza ad ampicillina, penicillina G e tetraciclina in ceppi isolati da filiere di carne, pesce e latticini (Rugna et al., 2021). Mentre le terapie antiretrovirali attive e la profilassi antimicrobica mediante cotrimossazolo mitigano entrambi il rischio di listeriosi associata all'infezione da HIV, un recente focolaio in Sud Africa ha drammaticamente sottolineato che l'infezione da HIV incontrollata costituisce un importante fattore di rischio per la listeriosi (Thomas, et al., 2020).

1.4.3. Incubazione

Nelle malattie di origine alimentare il periodo di incubazione è il periodo che intercorre tra il consumo di un prodotto contaminato e l'insorgenza dei primi sintomi della malattia. A differenza delle comuni malattie di origine alimentare come la salmonellosi, il periodo di incubazione della listeriosi può essere lungo. Molteplici aspetti della listeriosi rendono difficile la determinazione di un preciso periodo di incubazione. In primo luogo, *L. monocytogenes* può contaminare una grande varietà di alimenti, il che ostacola l'identificazione di una fonte di alimento infetta. In secondo luogo, poiché si ritiene che il periodo di incubazione sia variabile e lungo, possono essere sospettati alimenti consumati durante un lungo periodo (di solito 30 giorni). Infine, molti alimenti contaminati da *L. monocytogenes* presentano una lunga shelf-life (diversi giorni o settimane) e possono quindi essere consumati dal paziente in più occasioni. Pertanto i dati sul periodo di incubazione riferiti alle singole esposizioni sono scarsi.

Dati sul periodo di incubazione più breve sono stati osservati nel caso della gastroenterite associata a *L. monocytogenes* (un giorno). Il periodo di incubazione è breve anche per i casi di batteriemia, con una media di 2 giorni, mentre è più lungo per i casi di malattia neurologica, con una media di 9 giorni. Nelle forme associate alla gravidanza, il periodo di incubazione è in genere molto più lungo. Una

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

probabile spiegazione è che vi sia un ritardo tra batteriemia e infezione del feto dovuto al tempo necessario a *L. monocytogenes* per colonizzare la placenta e per indurre una infiammazione, che è all'origine dell'infezione fetale. Una volta colonizzata, la placenta funge da serbatoio di infezione per la madre.

Le situazioni in cui il periodo di incubazione della listeriosi può essere determinato con precisione sono eccezionali. È possibile ottenere indicazioni del legame tra un alimento contaminato e una malattia in situazioni di focolaio, ma tali prove sono raramente disponibili per i casi sporadici. La situazione più adatta alla documentazione di un preciso periodo di incubazione è un focolaio legato ad un unico pasto, poiché il momento del consumo del prodotto incriminato coincide con il momento della contaminazione. Quando l'epidemia è dovuta a un prodotto consumato per un periodo di tempo più lungo o su base regolare, è estremamente difficile identificare la data esatta dell'infezione (de Valk *et al.*, 2013).

La durata dei sintomi dipende generalmente dallo stato di salute della persona infetta. I sintomi possono durare da giorni a diverse settimane (FDA, 2012b).

1.5. Alimenti a rischio e quadro normativo

L. monocytogenes è diffusa in natura poiché facente parte della flora fecale di molti mammiferi ed è spesso causa di tossinfezioni alimentari. (EpiCentro, ISS, 2016). Inoltre, in una percentuale di popolazione compresa tra l'1% e il 10% viene riscontrata la presenza di *L. monocytogenes* nelle feci (Hernandez-Milian & Payeras-Cifre, 2014).

Sebbene esistano altre modalità di trasmissione, gli alimenti sono stati chiaramente identificati come la più importante fonte di infezione (*Figura di seguito*).

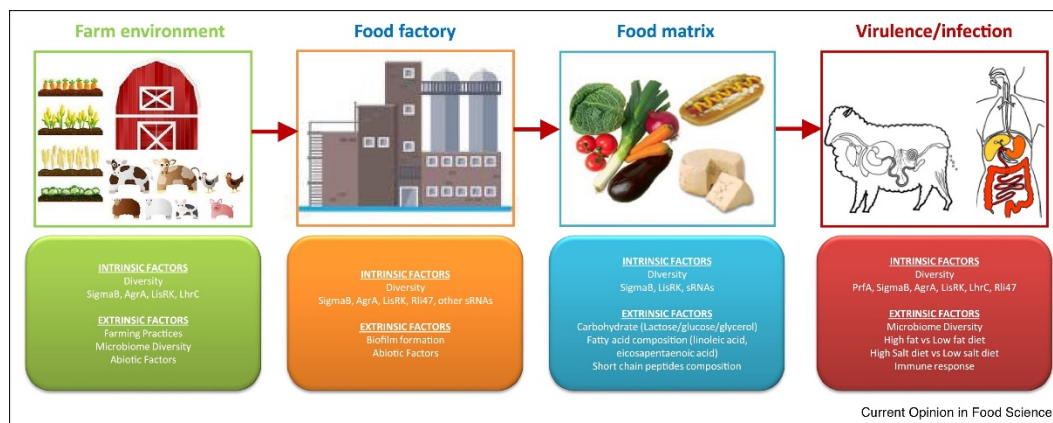


Figura: Schema delle vie di trasmissione di *L. monocytogenes* dagli ambienti esterni all'ambiente dell'industria alimentare, alimentare e umana. La figura include una selezione di fattori intrinseci ed estrinseci noti per modulare l'idoneità di *L. monocytogenes* in base all'habitat. (Kallipolitis *et al.*, 2020).

L'elevata prevalenza di *L. monocytogenes* negli alimenti, in combinazione con un alto tasso di mortalità per listeriosi, rende *L. monocytogenes* un problema decisamente rilevante e complesso nella valutazione del rischio microbiologico e nella gestione dello stesso (Nørrung *et al.*, 1999). L'alto tasso di mortalità dei casi di listeriosi ha portato i governi e le agenzie per la sicurezza alimentare di tutto il mondo a intraprendere misure per ridurre la presenza di *L. monocytogenes* nelle filiere di produzione degli alimenti (Orsi *et al.*, 2011).

L. monocytogenes è un microrganismo ubiquitario in natura e può contaminare gli ambienti di lavorazione, rappresentando una minaccia per le industrie del settore alimentare. Ciò riguarda in modo particolare gli alimenti ready-to-eat (RTE) poiché non subiscono alcun trattamento termico o altra fase antimicrobica tra la produzione e il consumo. Pertanto, sistemi di controllo nei confronti di *L. monocytogenes* risultano essere importanti per i settori produttivi e soprattutto per la salute pubblica (Jordan & McAuliffe, 2018). Le categorie di alimenti RTE tipicamente associate alla listeriosi umana, ovvero "carne e prodotti a base di carne", "pesce e prodotti ittici" e "latte e prodotti derivati dal latte", continuano ad essere importanti dal punto di vista della sicurezza alimentare. Inoltre, anche gli alimenti di origine vegetale e

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

gli alimenti congelati sono stati coinvolti in focolai (ad es. melone, mele caramellate, gelato), a dimostrazione del fatto che quasi tutti gli alimenti RTE, in determinate condizioni, possono favorire la crescita di *L. monocytogenes* e/o che se consumati da persone altamente suscettibili, hanno il potenziale per contribuire al carico della malattia (EFSA, 2018).

Esistono numerose vie di contaminazione che consentono a *L. monocytogenes* di entrare nella catena alimentare RTE. Il suolo e l'acqua sono considerati le fonti primarie di *L. monocytogenes* per la trasmissione ai vegetali, ai mangimi, agli animali e alla catena alimentare. La materia prima che dalla produzione primaria entra nel processo produttivo è considerata di grande importanza per la presenza del patogeno nel prodotto finito. Infatti, maggiore è la concentrazione di agenti patogeni nella materia prima, più efficaci devono essere le misure applicate per ridurre le concentrazioni a livelli accettabili. Inoltre, la concentrazione di *L. monocytogenes* nelle materie prime all'ingresso negli stabilimenti di trasformazione, è direttamente proporzionale alla possibilità di contaminazione dell'ambiente di lavorazione. La trasformazione degli alimenti RTE può comportare varie fasi di manipolazione, come: triturazione, aggiunta di aromi, leganti, diluenti ed emulsionanti, conservanti, decontaminazione, trattamenti termici (pastorizzazione, cottura, bollitura, ecc.), stagionatura, affumicatura, fermentazione ed essiccazione. La maggior parte di questi passaggi ha il potenziale per ridurre i livelli dei microorganismi patogeni negli alimenti RTE, ma l'efficacia delle misure di controllo deve essere conformata al tipo di alimento e alla progettazione del processo. Un altro punto critico è la possibilità per gli alimenti RTE di essere ricontaminati durante l'ulteriore lavorazione e manipolazione attraverso superfici a contatto con gli alimenti, macchinari di lavorazione, operatori (EFSA, 2018).

La contaminazione degli alimenti da *L. monocytogenes* che avviene dopo il trattamento termico, durante le manipolazioni post-processo è principalmente dovuto alla capacità del microorganismo di formare biofilm. I microorganismi organizzati all'interno di un biofilm, possono risultare più resistenti ai disinfettanti

e agli agenti antimicrobici e pertanto persistere negli ambienti di lavorazione e in superfici con cui l'alimento potrebbe venire a contatto. Pertanto, la corretta applicazione delle procedure di pulizia e disinfezione e la progettazione igienica delle apparecchiature sono fondamentali per la sorveglianza su *L. monocytogenes* (Jordan et al. 2018).

È stato ampiamente dimostrato che la contaminazione dei prodotti alimentari si verifica solitamente negli impianti di trasformazione o nel corso della vendita al dettaglio e meno spesso per trasmissione diretta dagli animali. Appare evidente quanto il fattore umano sia cruciale, con particolare riferimento agli operatori che, in caso di mancato rispetto delle norme igieniche, possono essere vettori di *L. monocytogenes* lungo la catena (Kurpas et al., 2018).

Per definire regole riguardanti la prevalenza di *L. monocytogenes* negli alimenti, l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO) e l'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) hanno stabilito standard internazionali chiamati *Codex Alimentarius* (FAO/WHO, 2003; CAC, 2007). In questo contesto, appare rilevante citare il documento legislativo internazionale UNI EN ISO 22000:2005, pubblicato al fine di armonizzare a livello globale, gli standard per la gestione della sicurezza alimentare e HACCP che trova applicazione nei Sistemi di Gestione della Sicurezza Alimentare (FSMS) basati su Good Hygiene Practices and Production (GHMP) e su Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) (Kurpas et al., 2018).

Nell'Unione Europea i criteri sulla presenza di *L. monocytogenes* negli alimenti RTE sono gli stessi del *Codex* e sono stati applicati dal 2006 in poi (Regolamento (EC) No. 2073/2005). Il regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici per i prodotti alimentari, stabilisce le regole in merito ai criteri microbiologici alle quali l'operatore del settore alimentare (OSA) deve sottostare. In tale documento viene fatto particolare riferimento ai lattanti e agli alimenti destinati a fini medici speciali: gli alimenti pronti destinati a queste categorie devono soddisfare il criterio “assenza in 25 gr su 10 unità campionarie”.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

Gli alimenti RTE con una durata di conservazione prolungata in refrigerazione, sono suddivisi in quelli che sono in grado di supportare la crescita di *L. monocytogenes* e quelli che non lo sono. A quest'ultima categoria appartengono i prodotti alimentari con $\text{pH} \leq 4,4$ o con $a_w \leq 0,92$ e i prodotti alimentari con $\text{pH} < 5,0$ e $a_w \leq 0,94$ (Wemmenhove *et al.*, 2021). In questo caso l'OSA deve dimostrare il rispetto del limite di 100 CFU/g per tutta la durata di conservazione. Per alimenti RTE che sono in grado di supportare la crescita di *L. monocytogenes*, il criterio è “assenza in 25 gr su 5 unità campionarie” al momento dell'immissione sul mercato, tranne se il produttore è in grado di dimostrare con soddisfazione dell'Autorità Competente (AC) che il prodotto non supererà il limite di 100 UFC/g durante il periodo di conservabilità. Se la capacità di un alimento di sostenere la crescita non è stata determinata, si presume che si verificherà la crescita e si applica il criterio dell'assenza. L'OSA, sotto il controllo dell'AC, dovrà valutare il rischio e individuare le misure da adottare. Se i livelli di *L. monocytogenes* non superano le 100 UFC/gr non è previsto l'obbligo del richiamo e dell'attivazione del sistema di allerta rapido RASFF (Regulation (EC) No. 2073/2005; Polese *et al.*, 2014) istituito dal Regolamento (CE) 178/2002.

Al fine di tutelare la salute pubblica, la presenza di *L. monocytogenes* negli alimenti comporta il richiamo/ritiro dal mercato degli alimenti contaminati. Con “richiamo” si intende: “*Se il prodotto può essere arrivato al consumatore, l'operatore informa i consumatori in maniera efficace e accurata del motivo del ritiro e, se necessario, richiama i prodotti già forniti al consumatore, quando altre misure non siano sufficienti a conseguire un livello elevato di tutela della salute*”, la procedura obbligatoria è a carico dell'OSA. Nel caso in cui si evidenzia la sussistenza di un rischio alto, l'OSA dovrà effettuare il ritiro del prodotto dal mercato. Il “ritiro” è qualsiasi misura volta a impedire la distribuzione e l'esposizione di un prodotto pericoloso, nonché la sua offerta al consumatore. Si procede quindi al ritiro del prodotto quando l'OSA ritiene che vi sia un pericolo o non si ha certezza

dell'assenza di controindicazioni (Regolamento (CE) 178/2002. Nota ministeriale del 15 dicembre 2016 e Nota ministeriale del 31 maggio 2016).

La contaminazione da *L. monocytogenes* può essere molto bassa e non uniformemente distribuita nell'alimento, perciò è importante testare l'alimento. Se viene rilevata una contaminazione prima o dopo il rilascio del prodotto, può essere avviato un richiamo/ritiro del prodotto, volontario o obbligatorio. Tale richiamo/ritiro può comportare gravi conseguenze per le aziende alimentari, soprattutto quando un prodotto di un'azienda viene utilizzato come ingrediente da altre aziende. Le procedure per il richiamo, da parte degli operatori del settore alimentare, di prodotti non conformi vengono eseguite ai sensi del Regolamento (CE) 178/2001. In caso di ritiro, l'OSA sarà tenuto a decidere la destinazione del prodotto.

Nei paesi a reddito medio-basso, in cui la produzione alimentare ha iniziato a essere industrializzata senza una rigorosa sorveglianza microbiologica degli impianti di produzione alimentare, e dove la prevalenza di individui immunosoppressi è elevata nel contesto della pandemia di HIV, *L. monocytogenes* sta ora emergendo come uno dei principali patogeni, come recentemente evidenziato dal più grande focolaio segnalato al mondo verificatosi in Sud Africa, attraverso la contaminazione di un grande impianto di trasformazione di carne. Ciò sottolinea la necessità di adeguati programmi di sorveglianza microbiologica ed epidemiologica, che possono essere altamente efficaci nel prevenire grandi focolai e l'importanza di diagnosticare la listeriosi con metodi di coltura batterica, che non viene eseguita di routine in molti paesi che dispongono di scarse risorse di microbiologia clinica. Ciò probabilmente porta a una sottovalutazione dell'effettivo onere medico ed economico associato a *L. monocytogenes* in tutto il mondo. L'incidenza della listeriosi è bassa nella popolazione generale (cioè circa da 1 a 9 casi ogni 1.000.000 di persone all'anno) e rappresenta solo lo 0,02% circa di tutte le malattie di origine alimentare, ma nel contempo rappresenta circa il 28% dei decessi dovuti a malattie di origine alimentare (Tompkin, 2002). Attualmente, negli Stati Uniti e in Europa, dove sono

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

stati implementati programmi di sorveglianza alimentare ed epidemiologica, l'incidenza della listeriosi varia tra due e cinque casi all'anno per milione di abitanti (Lecuit, 2020). Nel 2021 l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) e il Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC), hanno pubblicato il rapporto “*One-Health*” sulle zoonosi in UE. Nel 2020 sono stati identificati 1876 casi di listeriosi. La riduzione dei casi di listeriosi osservata nel 2020 rispetto al 2019 è stata più lieve rispetto alla tendenza delle altre zoonosi alimentari nell'Unione Europea (- 27,2%) (EFSA & ECDC, 2021).

1.6. Valutazione della capacità degli alimenti di supportare la crescita di *L. monocytogenes*

Come accennato, il regolamento (CE) 2073/2005 suddivide gli alimenti pronti in due categorie: quelli che costituiscono e quelli che non costituiscono un terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes*. Le caratteristiche che debbono avere questi ultimi sono le seguenti:

- Alimenti con un periodo di conservabilità inferiore a 5 gg;
- Alimenti con $\text{pH} \leq 4,4$;
- Alimenti con $a_w \leq 0,92$;
- Alimenti con $\text{pH} \leq 5,0$ e $a_w \leq 0,94$.

Nel caso in cui l'alimento RTE non rientri nelle categorie sopra elencate sarà definito come “favorevole alla crescita di *L. monocytogenes*” e dovrà rispettare i criteri discussi nel paragrafo 1.5 previsti dal regolamento (CE) 2073/2005. Secondo l'allegato II del regolamento (CE) 2073/2005 esistono una serie di strumenti per valutare la shelf-life degli alimenti RTE per quanto riguarda *L. monocytogenes*, tra cui il Challenge Test. Il “European Union Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes*” nel luglio 2021 ha pubblicato la quarta versione del “Documento di orientamento tecnico sul challenge test e sugli studi di durata di conservazione

degli alimenti RTE relativi a *Listeria monocytogenes*”. Il documento pone particolare attenzione alla progettazione di challenge test per determinare il potenziale di crescita di *L. monocytogenes* negli alimenti. Vengono fornite informazioni in particolare sulla definizione di challenge test e quando è consigliabile la sua effettuazione. Sono inoltre descritti i fattori da considerare e la metodologia di laboratorio da applicare quando si esegue un challenge test per determinare il potenziale di crescita di *L. monocytogenes* in una matrice alimentare definita (Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2015).

1.7. Nuovi metodi per il controllo di *L. monocytogenes* negli alimenti

La corretta applicazione di processi igienici è fondamentale per migliorare la sorveglianza nei confronti di *L. monocytogenes* negli ambienti di produzione e di trasformazione degli alimenti (Terentjeva *et al.*, 2021). Parallelamente nuovi metodi come l'utilizzo delle batteriocine sono considerati innovativi per il controllo dei problemi di salute pubblica (Jordan *et al.* 2018). Molti batteri lattici (LAB), microrganismi riconosciuti come GRAS' (generally recognized as safe), sono abili produttori di una serie di sostanze antimicrobiche come acidi organici, diacetile, acetoina, perossido di idrogeno, reuterina, reutericiiclina e batteriocine, capaci di inibire patogeni Gram-positivi e microrganismi deterioranti di origine alimentare (Rathod *et al.*, 2021). I LAB hanno un grande potenziale bioprotettivo perché sono sicuri per il consumo e sono presenti naturalmente nel microbiota di molti alimenti (Melero *et al.*, 2013), per questo sono approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) e dall'EFSA con lo stato di *Qualified Presumption of Safety* (QPS) (Nikodinoska, *et al.*, 2019; EFSA, 2018; FDA, 2018).

L'efficacia delle batteriocine e dei loro microrganismi produttori nell'inibire diversi agenti patogeni batterici è stata dimostrata in diverse matrici alimentari tra cui formaggio, carne e verdure. Le colture protettive e le batteriocine consentono di garantire la qualità e la sicurezza di cibi pronti, freschi o a lunga conservazione,

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

senza l'ausilio di conservanti chimici (Hammami et al., 2019). La strategia di bioprotezione consiste nell'inoculazione di microrganismi viventi o nell'aggiunta dei loro metaboliti, in forma purificata, durante o successivamente alla produzione dell'alimento. Oltre ad avere effetti antimicrobici, l'aggiunta di colture protettive durante le prime fasi dei processi produttivi potrebbe anche migliorare le caratteristiche qualitative degli alimenti fermentati (Di Gianvito et al., 2022).

1.7.1. Applicazioni delle batteriocine agli alimenti

La maggior parte delle applicazioni alimentari che coinvolgono le batteriocine possono essere suddivise in tre categorie:

1. Batteriocine parzialmente purificate;
2. Prodotti lattiero-caseari e altri prodotti fermentati per uso alimentare contenenti batteriocine sotto forma di fermentato grezzo;
3. Colture protettive che producono batteriocine.

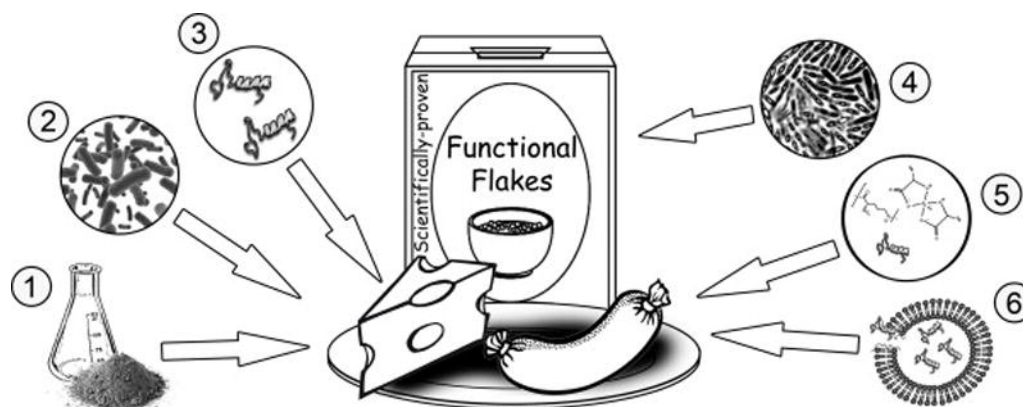
Il controllo dei patogeni di origine alimentare da parte delle batteriocine in diversi prodotti alimentari è stato studiato nel corso di decenni e finora la nisina è l'unica batteriocina alimentare prodotta in commercio utilizzata come conservante (Chikindas *et al.*, 2018).

Diversi ricercatori stanno lavorando al miglioramento delle prestazioni delle batteriocine negli alimenti; ci sono studi incoraggianti, come quello di Millis *et al.*, sul controllo dei patogeni alimentari attraverso l'utilizzo di microorganismi produttori di multi-batteriocine, dove la nisina viene utilizzata in combinazione con altre batteriocine (Mills *et al.*, 2017). Le attività di ricerca includono tecniche di ingegneria genetica per garantire una maggiore resistenza agli enzimi proteolitici, una migliore attività e un maggiore spettro di inibizione.

È probabile che un ruolo potenzialmente nuovo ed emergente per le batteriocine sia mirato agli "alimenti funzionali" (*Figura sotto*) in cui i microrganismi produttori di batteriocine saranno consumati con il cibo o come formulazione da banco con

l'obiettivo di modulare positivamente il microbiota gastrointestinale (Murphy *et al.*, 2013).

Figura. Gli alimenti funzionali e le batteriocine: dal semplice utilizzo alle sofisticate applicazioni mirate.



1 – latte o altro fermentato alimentare contenente batteriocine; 2 – coltura microbica protettiva che produce batteriocine; 3 – batteriocine alimentari parzialmente purificate; 4 – coltura probiotica attiva produttrice di batteriocine; 5 – batteriocine con antimicrobici di derivazione naturale ad azione sinergica; 6 – implementazione di sistemi di rilascio controllato per una migliore stabilità ed efficacia delle batteriocine (Chikindas *et al.*, 2018).

Le batteriocine possono essere utilizzate anche per migliorare la qualità degli alimenti e le proprietà sensoriali, aumentando il tasso di proteolisi o per prevenire il “gonfiore tardivo” nel formaggio. Un'altra interessante applicazione riguarda il confezionamento bioattivo, un processo in grado di proteggere l'alimento da contaminazioni esterne, migliorando la sicurezza alimentare e la durata di conservazione (Negash & Tsehai, 2020).

1.7.2. Colture bioprotettive applicate alla sicurezza alimentare

I conservanti sono composti che controllano il deterioramento degli alimenti dovuto all'attività dei microrganismi e aiutano a prolungarne la durata diminuendo o limitando il tasso di deterioramento. Sia i prodotti chimici che i bioconservanti sono

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

usati negli alimenti (Amiri et al., 2021). Secondo il *Codex Alimentarius* per conservanti chimici si intendono le sostanze chimiche che, se aggiunte in piccolo volume (fino allo 0,2%), apportano modifiche minime o nulle alle proprietà organolettiche e fisico/chimiche degli alimenti (To et al., 2022). I composti chimici sono stati utilizzati per molto tempo come additivi alimentari, al fine di prolungare la durata di conservazione, migliorare l'aspetto e mantenere la qualità del prodotto. Diversi composti, come il benzoato di sodio, l'acido benzoico, i nitriti, i solfiti, il sorbato di sodio e il sorbato di potassio, sono noti comunemente come conservanti alimentari (Davidson et al., 2005). Tuttavia, l'integrazione di conservanti dannosi per la salute umana negli alimenti è frequentemente segnalata. Questi possono essere causa di numerosi effetti collaterali negativi sulla salute umana e sull'ambiente. Ad esempio, nitriti e nitrati vengono aggiunti alla carne per ostacolare la crescita di *Clostridium botulinum*, ma un'elevata concentrazione di nitrati, il cui utilizzo è infatti regolamentato (Reg. n. 1333/2008), porta al malfunzionamento dei globuli rossi. Pertanto, l'attuale tendenza è rivolta all'utilizzo di additivi naturali che non causano danni a operatori e consumatori e che incidono positivamente sulla loro salute e benessere, anche per la maggior attenzione alla salute da parte dei consumatori.

I conservanti alimentari naturali sono considerati sicuri in quanto non associati a effetti dannosi. Possono essere classificati in prodotti di origine vegetale (erbe e spezie), con proprietà antimicrobiche (Martínez-Graciá et al., 2015), e microrganismi probiotici e i loro metaboliti. L'uso di erbe e spezie negli alimenti è stato registrato in modo intensivo. Questi non solo migliorano le proprietà organolettiche ma preservano anche gli alimenti grazie alle loro attività antimicrobiche e antiossidanti (Batiha et al., 2021).

D'altra parte, la bioconservazione, ovvero l'uso di microrganismi sicuri e/o dei loro peptidi per migliorare la sicurezza microbiologica e prolungare la shelf-life degli alimenti, ha ottenuto grande attenzione. La fermentazione è la forma più comune e

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

più antica di bioconservazione degli alimenti e consiste nella conversione dello zucchero in acidi, gas o alcol.

I microrganismi vivi vengono anche usati come bioconservanti sotto forma di colture protettive. Come accennato, molti composti bioattivi sintetizzati dai batteri, che esercitano un effetto antagonista contro agenti patogeni e microrganismi deterioranti, possono essere purificati e aggiunti alla matrice alimentare come conservanti naturali per prolungarne la durata di conservazione (To *et al.*, 2022).

Si definiscono colture protettive i microrganismi con attività antagonista aggiunti agli alimenti per inibire gli agenti patogeni e/o prolungare la durata di conservazione modificando il meno possibile le proprietà sensoriali (Lücke, 2000).

I LAB hanno un grande potenziale di utilizzo nella bioconservazione perché sono sicuri per il consumo e, durante la conservazione, dominano naturalmente il microbiota di molti alimenti. I LAB possono esercitare un effetto bioprotettivo o inibitorio nei confronti di altri microrganismi, oltre che per la produzione di batteriocine e composti organici, anche per i fenomeni di competizione per i nutrienti tipici delle comunità batteriche (Menberuet *et al.*, 2021).

Le aziende di trasformazione alimentare devono affrontare una sfida importante nei confronti dei consumatori, che chiedono alimenti sicuri con una lunga durata di conservazione, ma esprimono anche la loro preferenza per i prodotti minimamente trasformati, meno gravemente danneggiati dal calore e dal congelamento e che non contengano conservanti chimici. In quest'ottica, le colture protettive appaiono come un'opzione interessante per fornire almeno una parte della soluzione (Castellano *et al.*, 2008).

L'uso di colture batteriche protettive è un potenziale intervento. La loro aggiunta al formaggio non richiede un'etichettatura aggiuntiva e quindi si allinea alla domanda dei consumatori di alimenti "*clean label*" (Aljasir *et al.*, 2020).

Le colture protettive associate alle produzioni alimentari sono generalmente specie di LAB (es. *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Enterococcus* e *Streptococcus*) e *Bifidobacterium*. Molte di

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

queste colture protettive hanno dimostrato di essere altamente efficaci contro batteri patogeni come *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *L. monocytogenes* (Xu *et al.*, 2021). Esistono alcune colture batteriche protettive disponibili in commercio per il controllo dei microrganismi indesiderati negli alimenti, compresa *L. monocytogenes*. Sono generalmente riconosciuti come sicuri per il consumo e molti sono in grado di produrre batteriocine ma attualmente non sono disponibili dati sufficienti in letteratura sul loro potenziale d'azione come probiotici.

1.8. I batteri lattici (LAB)

I batteri lattici (LAB) sono ubiquitari in natura: sono infatti presenti in nicchie di origine lattiero-casearia, nella carne, nei vegetali, nei tratti gastrointestinale e urogenitale dell'uomo e degli animali, nel suolo e nell'acqua. Questi microrganismi sono ben noti per la loro capacità di produrre acido lattico come principale prodotto finale del loro metabolismo anaerobico e per sintetizzare un'ampia gamma di metaboliti che influiscono beneficamente sulle proprietà nutrizionali, sensoriali e tecnologiche dei prodotti alimentari fermentati. Per questi motivi, i LAB sono stati ampiamente utilizzati come colture starter, come probiotici e nella produzione di composti nutraceutici, per il loro versatile metabolismo (Ruiz Rodríguez *et al.*, 2019).

L'attuale classificazione tassonomica include il gruppo LAB nel phylum *Firmicutes*, classe *Bacilli* e ordine *Lactobacillales*. Essi sono un gruppo di cocci o bacilli Gram-positivi, non sporulanti, anaerobi o anaerobi facoltativi, che producono acido lattico come uno dei principali prodotti del metabolismo fermentativo dei carboidrati. Il suolo e le piante sono ipoteticamente considerati la prima nicchia ancestrale dei LAB e, successivamente, l'intestino degli animali erbivori. L'intestino dei mammiferi è colonizzato da 100 trilioni di microrganismi, chiamati “microbiota”, essenziali per la salute. Il microbiota gastrointestinale fornisce una barriera microbica contro i patogeni. *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

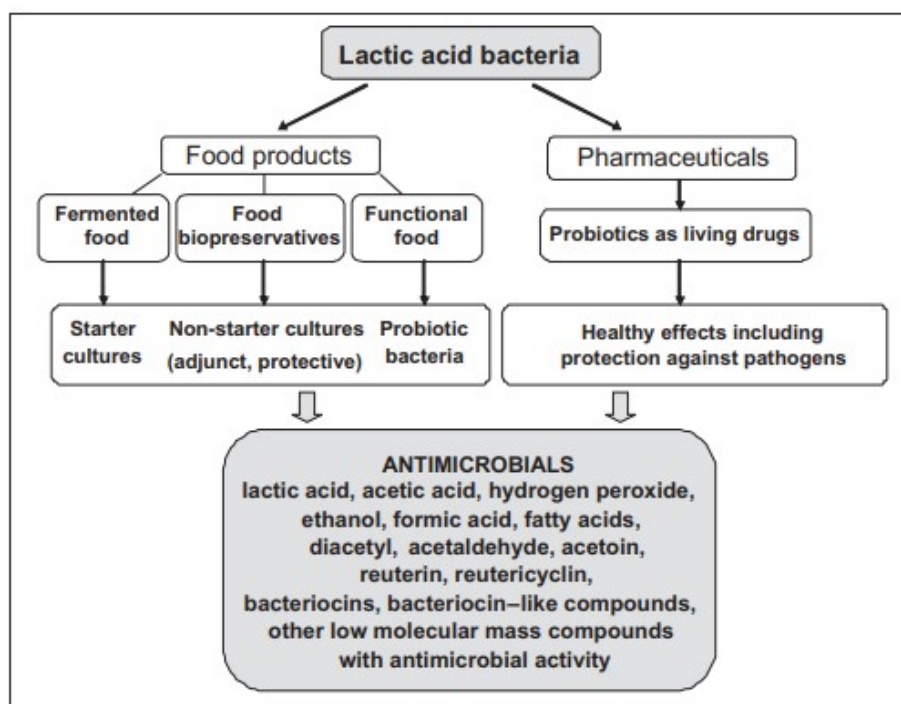
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

spp. di origine intestinale umana producono sostanze antimicrobiche attive *in vitro* e *in vivo* contro i microrganismi enteropatogeni; entrambi i generi hanno la capacità di bloccare o interferire o nel processo patogenetico dei batterici enterici. I ceppi di *Lactobacillus acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* interferiscono con un'ampia gamma di agenti patogeni, come *Escherichia coli enteropatogeno*, *E. coli enteroemorragico*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica serovar Typhimurium* e *S. flexneri* (Quinto et al., 2014).

Come illustrato nella *Figura* che segue, i batteri lattici hanno una lunga storia di applicazioni nell'industria alimentare per la fermentazione e la conservazione, rivestono inoltre un ruolo importante nelle preparazioni farmaceutiche. Ciò è dovuto alla loro capacità di produrre metaboliti che possono migliorare le caratteristiche nutrizionali e sensoriali degli alimenti, nonché ai loro composti antimicrobici che contribuiscono a prolungare la durata di conservazione dei prodotti alimentari e che sono implicati nella produzione di probiotici da parte dell'industria farmaceutica (Peng et al., 2020).

Figura. Applicazioni industriali dei batteri lattici (Šušković, *et al.*, 2010)



1.8.1. I batteri lattici e la loro applicazione nelle produzioni lattiero-casearie

I batteri lattici sono largamente utilizzati nella fermentazione di un'ampia varietà di prodotti alimentari e sono noti per i loro effetti conservanti e terapeutici (Gourama & Bullerman 1995). Il sistema proteolitico dei LAB, infatti, è essenziale per la crescita dei microrganismi, è coinvolto nell'utilizzo della caseina all'interno delle cellule, e contribuisce allo sviluppo delle proprietà organolettiche dei prodotti a base di latte fermentato (Gemechu, 2015). I generi più comunemente selezionati per le applicazioni industriali appartengono a *Lactococcus* (latte), *Lactobacillus* (latte, carne, verdure, cereali), *Leuconostoc* (verdure, latte), *Pediococcus* (verdure, carne), *Oenococcus* (vino) e *Streptococcus* (latte) (Settanni & Moschetti 2010). I batteri lattici possono essere suddivisi in due gruppi in relazione alle loro condizioni di crescita ottimale durante i processi di fermentazione dei latticini:

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

- LAB mesofili: con range di crescita ottimale da 20 a 30 ° C;
- LAB termofili, con range di crescita ottimale 30- 45 ° C (Rakhmanova *et al.*, 2018).

Il processo di fermentazione del latte è affidato all'attività dei LAB, che svolgono un ruolo cruciale nella conversione di questa matrice alimentare come materia prima in prodotti lattiero-caseari fermentati, come i formaggi. In questo caso, il microbiota coinvolto nel processo di produzione e maturazione del formaggio può essere generalmente suddiviso in due categorie: batteri lattici starter (SLAB) e non starter LAB (NSLAB). Gli SLAB sono i principali responsabili dell'acidificazione durante la produzione del formaggio e contribuiscono al processo di maturazione iniziale (Blaya *et al.*, 2018). Subito dopo la produzione, la coltura starter supera frequentemente le 10^9 unità formanti colonia per grammo (UFC/g) di formaggio. L'ambiente di maturazione del formaggio, che risulta essere ostile per tali microrganismi (nessun residuo di lattosio, pH 5,0–5,3, 4–6% di sale, 5–13°C), determina un graduale declino della vitalità degli starter. Alcuni SLAB morenti subiscono il processo di autolisi, con il rilascio di enzimi intracellulari e componenti cellulari nel prodotto. Allo stesso tempo, le popolazioni NSLAB (la cui concentrazione iniziale è $<10^2$ ufc/g) iniziano ad aumentare e a stabilizzarsi fino a concentrazioni di $10^7 - 10^8$ ufc/g dopo 3–9 mesi di stagionatura (Steele, *et al.*, 2013). I NSLAB sono infatti coinvolti nella maturazione del formaggio e sono i principali responsabili della generazione di composti aromatici (Guarrasi *et al.*, 2017).

Nell'industria della fermentazione del latte, vari ceppi industriali di LAB vengono utilizzati come colture starter. Gli starters sono ottenuti mediante processi di isolamento, selezione e sequenziamento. Poiché ogni singolo ceppo di LAB selezionato ha particolari caratteristiche, sono state stabiliti e utilizzati diversi protocolli per la produzione industriale di prodotti a base di latte fermentato (Gemechu, 2015).

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

1.8.2. Batteri lattici come conservanti

È noto che il latte è un prodotto deperibile mentre alcuni prodotti a base di latte fermentato possono essere conservati per lunghi periodi (Rakhmanova et al., 2018). Il latte e i prodotti a base di latte fermentato sono substrati favorevoli alla crescita di microrganismi che possono portare a condizioni di deterioramento. La caratteristica più nota dei LAB in relazione alle proprietà conservanti è la loro capacità di produrre acidi, che a loro volta mostrano attività antimicrobica. Il processo di acidificazione protegge il latte dai microrganismi deterioranti e dalla proliferazione di agenti patogeni. Ciò è spesso supportato dalla capacità dei LAB di rilasciare batteriocine (Widyastuti & Febrisiantosa, 2014). Acidi e batteriocine hanno un grande potenziale in merito alla conservazione degli alimenti, che sono considerati “*Green preservatives*” ovvero conservanti naturali sicuri (Pawlowska et al., 2012).

1.8.3. I LAB come microrganismi probiotici

Oltre a contribuire alla qualità e alla sicurezza degli alimenti, i LAB hanno suscitato un notevole interesse per le loro potenziali proprietà funzionali e come integratori (Pasolli et al., 2020). Il termine "probiotico" originariamente si riferiva a un fenomeno osservato quando due organismi venivano coltivati insieme, in cui sostanze prodotte da uno stimolavano la crescita dell'altro organismo (Tannock, 1997). Attualmente viene definito probiotico un integratore alimentare microbico vivo che ha un effetto benefico sull'ospite migliorando il suo equilibrio microbico intestinale (Fuller, 1989).

I batteri lattici, come gli appartenenti ai generi *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ed *Enterococcus*, sono i probiotici più comunemente impiegati. Da molto tempo, i probiotici sono ben noti per i loro benefici per la salute e per l'associazione con esseri umani e animali. Recenti analisi su larga scala dell'intero genoma, condotte nel 2020 da Pasolli et al., hanno evidenziato la stretta correlazione tra i LAB

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

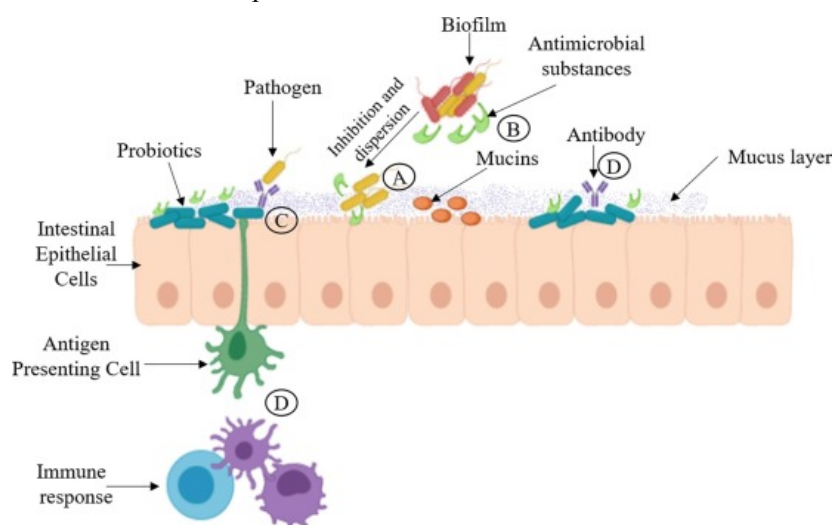
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

presenti nell'intestino con i ceppi di LAB isolati dagli alimenti, indicando che gli alimenti fermentati sono possibili fonti di LAB per il microbiota intestinale. Gli alimenti con probiotici sono molto richiesti dai consumatori, date le loro proprietà salutari che li rendono popolari (Lillo-Pérez *et al.*, 2021). Oggi le persone si concentrano in maniera rilevante su uno stile di vita sano e ciò si ripercuote sulle abitudini alimentari. I consumatori associano alimenti sani a una quantità inferiore di additivi e sostanze chimiche e; questa consapevolezza sottolinea l'importanza di studiare l'applicazione di sostanze naturali per garantire la sicurezza alimentare e soddisfare la domanda di alimenti più sani e “naturali” (Moradi *et al.*, 2021). È stato dimostrato che mediante la produzione di composti antimicrobici, acidi linoleici coniugati, sfingolipidi, peptidi bioattivi ed esopolisaccaridi (Ahire, *et al.*, 2021), i probiotici contribuiscono a regolare il microbiota intestinale, migliorare il sistema immunitario e la biodisponibilità dei nutrienti, ridurre i sintomi dell'intolleranza al lattosio e prevenire e/o curare le infezioni gastrointestinali (*Figura*) (Marinova *et al.*, 2019).

Figura: Meccanismi d'azione dei probiotici.



A) Esclusione competitiva di microrganismi patogeni. (B) Produzione di sostanze antimicrobiche. (C) Aumento dell'adesione alla mucosa intestinale e miglioramento della barriera epiteliale. (D) Stimolazione del sistema immunitario (Silva *et al.*, 2020).

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

Altre indicazioni sulla salute degne di nota includono la prevenzione del cancro mammario, la riduzione del danno polmonare associato a virus e la diminuzione del livello di colesterolo che riduce il rischio di malattie cardiovascolari (Zheng 2017).

1.8.4. Batteri lattici con attività antimicrobica

È nota la capacità di alcuni batteri lattici di inibire i microrganismi dannosi producendo molecole antimicrobiche in prossimità di essi. Le sostanze antimicrobiche principalmente prodotte dai LAB possono essere classificate in composti a bassa e alta massa molecolare (cioè con massa molecolare < 1000 Da e > 1000 Da, rispettivamente); quelle non appartenenti alla classe delle batteriocine hanno una massa molecolare bassa (Šušković, et al., 2010). A questa categoria appartengono: acido lattico, acetico, fenillattico, 4-idrossifenillattico, benzoico, perossido di idrogeno, diacetile, acetaldeide, acetoina e anidride carbonica (Arena *et al.*, 2018).

- Nella forma non scissa, gli acidi organici possono diffondersi attraverso la membrana cellulare sfruttando il gradiente chimico causato dal diverso pH tra il citosol (alcalino) e l'ambiente esterno (acido). Una volta all'interno della cellula batterica, possono interferire con le funzioni metaboliche e dissipare il potenziale di membrana (Arena *et al.*, 2018).
- Il perossido di idrogeno (H_2O_2) è prodotto dai LAB in presenza di ossigeno. Il suo effetto antimicrobico può derivare dall'ossidazione dei gruppi solfidrilici che causano la denaturazione di un certo numero di enzimi, e dalla perossidazione dei lipidi di membrana quindi l'aumentata permeabilità della membrana ed essere anche come precursore per la produzione di radicali liberi come il superossido (O^{2-}) e radicali idrossilici ($OH\cdot$) che possono danneggiare il DNA (Şanlıbaba & Güçer 2015). È stato dimostrato che alcuni batteri lattici, come *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, hanno la capacità

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

di inibire la crescita di microrganismi psicotrofi e patogeni correlati al deterioramento dell'alimento (anche durante la refrigerazione) poiché producono quantità maggiori di H₂O₂ a basse temperature (Zalán *et al.*, 2005).

- Il diacetile, l'acetaldeide e l'acetoina, prodotti attraverso il metabolismo eterofermentativo, sembrano essere buoni candidati per la loro attività antimicrobica selettiva e per l'assenza di tossicità nei confronti dell'uomo e degli animali (Lanciotti *et al.*, 2003; Yüksekdağ *et al.*, 2004).
- L'azione inibitoria dell'anidride carbonica (CO₂) è sfruttata da tempo per migliorare l'igiene degli alimenti, sia liquidi che solidi, proteggendoli dal deterioramento batterico. Il meccanismo preciso della sua azione antimicrobica è ancora sconosciuto. Tuttavia, è noto che la CO₂ possa svolgere un ruolo nella creazione di un ambiente anaerobio che inibisce le decarbossilazioni enzimatiche; inoltre l'accumulo di CO₂ nel doppio strato lipidico della membrana può causare una disfunzione nella permeabilità (Amenu, 2013).

Il secondo gruppo di composti antimicrobici prodotti dai LAB, cioè le sostanze ad alta massa molecolare, comprende le già citate molecole proteiche denominate batteriocine (Arena *et al.*, 2018). Le batteriocine sono biomolecole di natura proteica con diversa attività battericida e batteriostatica. La maggior parte delle batteriocine prodotte dai batteri lattici viene utilizzata contro batteri filogeneticamente correlati contro alcuni agenti patogeni come *Bacillus*, *Clostridium* e *Listeria*. Sebbene lo spettro d'azione riportato delle batteriocine sia principalmente contro i batteri Gram-positivi, studi recenti hanno mostrato evidenza della loro capacità di agire anche contro i batteri Gram-negativi. Si propone che le batteriocine siano utilizzate come conservanti alimentari naturali e che i batteri produttori di batteriocine siano inclusi come ceppi competitivi in comunità eterogenee (Kareb & Aïder, 2020).

Esse sono spesso paragonate agli antibiotici per le loro proprietà antibatteriche. Tuttavia, a differenza degli antibiotici terapeutici, la loro

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

applicazione di norma non implica la possibilità di reazioni allergiche indesiderate che si verificano negli esseri umani (Vesković Moračanin *et al.*, 2014).

La loro classificazione è complessa, considerando che possono differire per struttura amminoacidica, proprietà biochimiche, attività antimicrobica e modalità d'azione (Barcenilla *et al.*, 2021). La prima classificazione utilizzata a livello globale è stata definita da Klaenhammer (Klaenhammer, 1993), sebbene abbia subito diverse modifiche con la scoperta di nuove batteriocine. Sono state proposte nuove classificazioni che includono quattro classi di batteriocine.

Le batteriocine di classe I (<5kDa), sono chiamate lantibiotici e sono caratterizzate in base alla loro modificazione post-traduzionale. Queste trasformazioni sono alla base della formazione di aminoacidi insoliti: lantionina e metillantionina (Mokoena, 2017). Il principale rappresentante di questa classe è la nisina, ampiamente utilizzata nell'industria alimentare come agente antibotulinico in formaggi, uova, salse e cibi in scatola. Esibisce un'azione antimicrobica ad ampio spettro contro *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, altri agenti patogeni e specie di LAB. Questa attività è mediata da un meccanismo a doppia azione che comprende l'interferenza con la sintesi della parete cellulare e promozione della formazione di pori nella membrana cellulare. La nisina è l'unica batteriocina approvata per le applicazioni alimentari considerata sicura dalla FAO (Food and Agriculture Organization) ed OMS (World Health Organization) dal 1969 (Balciunas, *et al.*, 2013).

La nisina è attualmente un additivo alimentare (numero E234) autorizzato nell'Unione Europea ai sensi dell'allegato II del regolamento (CE) 1333/2008 per l'uso in diverse categorie alimentari. La sicurezza della nisina (E 234) come additivo alimentare è stata valutata nel 2006 dal gruppo di esperti scientifici dell'EFSA sugli additivi alimentari, gli aromi, i coadiuvanti tecnologici e i materiali a contatto con gli alimenti. È stata confermata un'assunzione giornaliera accettabile di nisina di 0,13 mg/kg di peso corporeo. L'autorizzazione all'uso di questa batteriocina ha molti motivi: non sono stati osservati effetti avversi in uno studio di tossicità orale.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

Per questo studio è stato identificato un livello senza effetti avversi osservati di 225 mg di nisina A/kg di peso corporeo al giorno, la dose più alta testata. In relazione a questo, è stata calcolata una assunzione giornaliera accettabile di 1 mg di nisina A/kg di peso corporeo per la nisina (E 234). A seguito di tali indagini, è stata proposta l'estensione della nisina come additivo alimentare (E 234) nel formaggio non stagionato (a un livello massimo di 12 mg/kg) e nei prodotti a base di carne trattati termicamente (a un livello massimo di 25 mg/kg) (EFSA, 2017).

L'uso della nisina è attualmente limitato poiché alcuni ceppi di *Listeria* hanno già iniziato ad essere resistenti. Diverse batteriocine prodotte da LAB e *Bacillus* sono state studiate e classificate in base al loro peso/dimensione molecolare, modalità d'azione e struttura, ma devono ancora essere approvate per l'applicazione nei sistemi alimentari commerciali. Pertanto, sono necessarie ulteriori ricerche per trovare composti sicuri e attivi con un'ampia proprietà antibatterica per ottenere l'approvazione ufficiale come conservante alimentare (To, 2022).

Le batteriocine di classe II sono piccoli peptidi termostabili (<10 kDa) suddivisi in tre sottoclassi:

- IIa (pediocina ed enterocina). La sottoclasse IIa è composta da batteriocine che mostrano un'elevata specificità contro *L. monocytogenes*. Le batteriocine di questa classe provocano la formazione di pori nella membrana plasmatica della cellula bersaglio con conseguente dissipazione della forza motrice protonica. Nel tentativo di mantenere o ripristinare la forza motrice protonica, si ha un'accelerazione nel consumo di ATP alla quale consegue la morte cellulare (Balciunas *et al.*, 2013).
- IIb (lattocina G). Questa sottoclasse comprende le batteriocine eterodimeriche, cioè le batteriocine che richiedono l'attività combinata di due peptidi. Normalmente i geni coinvolti sono localizzati nello stesso operone ed espressi simultaneamente, perciò i due peptidi agiscono in combinazione spesso mostrando un'importante azione sinergica. Il loro meccanismo d'azione comporta anche la dissipazione del potenziale di membrana e una

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

diminuzione della concentrazione intracellulare di ATP. Questi peptidi hanno un'attività molto bassa quando impiegati individualmente (Balciunas *et al.*, 2013).

- IIc (lattocina B). Le batteriocine appartenenti a questa sottoclasse hanno un legame covalente tra i terminali C e N, risultando in una struttura ciclica (Balciunas *et al.*, 2013).

Le batteriocine di classe III sono il gruppo meno caratterizzato e sono costituite da proteine termolabili che sono generalmente >30 kDa. Il gruppo comprende elveticina J prodotto da *Lactobacillus helveticus* ed enterolisina prodotta da *Enterococcus faecium* (Ross *et al.*, 2002).

Infine, le batteriocine afferenti alla classe IV sono peptidi di grandi dimensioni la cui attività richiede l'associazione con porzioni di carboidrati o lipidi (Abee *et al.*, 1995). A seguito di una riclassificazione delle batteriocine, i peptidi membri di quest'ultima classe sono stati ridenominati come batteriolisine, cioè polipeptidi idrolitici; lasciando solo tre classi di batteriocine, in base alle caratteristiche genetiche e biochimiche dei loro membri (Mokoena, 2017).

1.8.5. Meccanismo d'azione delle batteriocine

Le batteriocine prodotte dai LAB possono essere raggruppate oltre che in relazione alla struttura, anche in base alla modalità d'azione.

Alcuni membri della classe I (lantibiotici), come la *nisina*, hanno dimostrato di avere una doppia modalità d'azione:

1. Possono legarsi al “*lipid II*”, il principale trasportatore delle subunità del peptidoglicano dal citoplasma alla parete cellulare, e quindi impedire la corretta sintesi della parete cellulare, portando alla morte cellulare.
2. Possono utilizzare il *lipid II* come molecola di attracco per avviare un processo di inserimento nella membrana e la formazione di pori che determinano una rapida morte cellulare.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

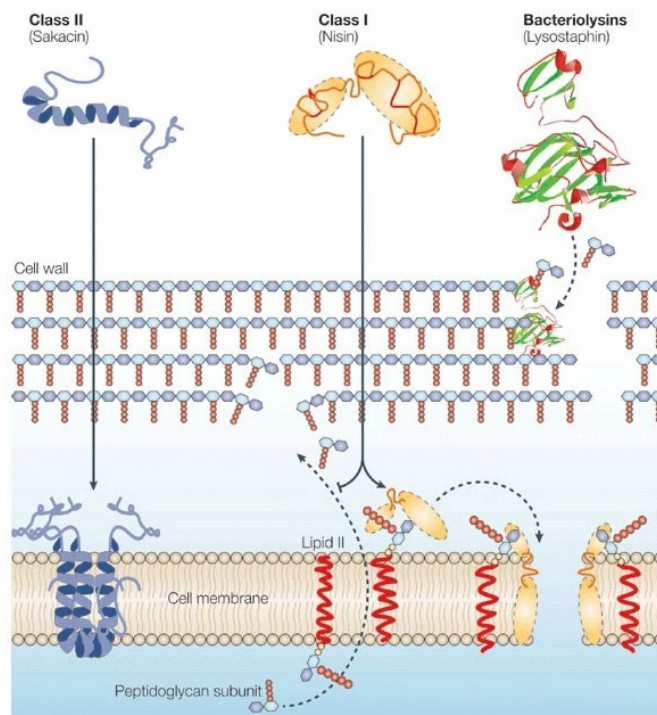
Università degli Studi di Sassari

Un lantibiotico a due peptidi, come la *latticina 3147*, può avere queste doppie attività distribuite su due peptidi, mentre la *mersacidina* ha solo l'attività di legame del *lipid II*, ma non forma pori.

In generale, le batteriocine di classe II hanno una struttura elicoidale anfipatica, che consente loro di inserirsi nella membrana della cellula bersaglio, portando alla depolarizzazione e alla morte.

Grandi proteine batteriolitiche, le batteriolisine, come la lisostafina, possono agire direttamente sulla parete cellulare dei bersagli Gram-positivi, portando alla morte e alla lisi della cellula bersaglio (*Figura* mostrata di seguito). (Negash, & Tsehai, 2020).

Figura: Modalità d'azione delle diverse classi di batteriocine prodotte dai batteri lattici (Cotter, *et al.*, 2005).



Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

1.9. I formaggi e la sicurezza alimentare: stato dell'arte e prospettive

Il formaggio è un alimento popolare in molti paesi grazie alle sue caratteristiche sensoriali alle quali si associano molteplici benefici per la salute. I benefici per la salute includono proprietà probiotiche e antitumorali naturali. Inoltre, il formaggio è una ricca fonte di calcio alimentare, fosforo e proteine e ha dimostrato di ridurre l'incidenza del diabete di tipo II. Sebbene il formaggio sia generalmente considerato un alimento sicuro per via delle sue proprietà chimico-fisiche e grazie al fenomeno di antagonismo dei batteri lattici, di tutti i focolai epidemici di origine alimentare riscontrati nel 2006 nell'Unione Europea, lo 0,4% è stato associato al consumo di formaggi contaminati (Choi *et al.*, 2016).

Le epidemie di listeriosi legate al consumo di formaggi hanno avuto un tasso di mortalità relativamente alto (dal 15% al 30%) (FDA, 2012b). Per tali motivi *L. monocytogenes* continua a rappresentare un rischio per la sicurezza alimentare negli alimenti pronti, compresi i formaggi. Nonostante *L. monocytogenes* venga rilevata regolarmente lungo il processo produttivo dei formaggi, variazioni nelle caratteristiche del prodotto e fattori intrinseci ed estrinseci durante il processo di produzione (pH, attività dell'acqua e temperatura), influenzano il potenziale di sopravvivenza e la crescita del patogeno (Falardeau *et al.*, 2021).

Nel 2012 un focolaio di listeriosi negli Stati Uniti è stato collegato a ricotta salata importata dall'Italia e prodotta con latte di pecora pastorizzato. Il formaggio implicato nel focolaio è stato prodotto in uno stabilimento in Puglia che lavorava semilavorati forniti da cinque stabilimenti situati in Sardegna. Dalle analisi effettuate su campioni di alimento e ambientali prelevati a seguito di tali avvenimenti, emerse che 179/758 (23,6%) prodotti finiti erano positivi a *L. monocytogenes*, con livelli di contaminazione da <10 ufc/g a $1,1 \times 10^6$ ufc/g. I campioni ambientali positivi provenivano da due dei quattro impianti di lavorazione. La tipizzazione molecolare mediante Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) mostrò una somiglianza del 100% tra i ceppi clinici statunitensi e gli isolati di ricotta salata, confermando l'origine italiana dell'epidemia. I campionamenti

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

dimostrarono la persistenza dei ceppi in nicchie ambientali degli impianti di lavorazione che probabilmente rappresentavano la fonte di contaminazione del prodotto. Inoltre, due profili PFGE di ceppi ottenuti da isolati clinici di listeriosi in Italia nel 2011, presentavano omologia del 100% con un isolato clinico statunitense associato al consumo di ricotta salata oggetto dell'indagine. Tuttavia, avevano una somiglianza dell'87% con l'unico profilo PFGE riscontrato sia nel caso clinico statunitense, che in 14 campioni di ricotta raccolti durante il campionamento che seguì il focolaio statunitense. La condivisione dei dati molecolari e la disponibilità di protocolli di caratterizzazione comuni sono stati gli elementi chiave per collegare la rilevazione dell'epidemia negli Stati Uniti con la fonte alimentare in Italia (Acciari *et al.*, 2016).

Con il 17,2% del totale, l'Italia continua ad essere il primo Paese Membro per numero di segnalazioni inviate attraverso il sistema “Rapid Alert System for Food and Feed” (RASFF). Le segnalazioni per contaminazioni microbiologiche sono state il 16,6% del totale. I principali pericoli microbiologici notificati nel 2015 relativi ad alimenti circolanti in Italia, sono stati (ISS, 2015):

- 26 segnalazioni per *L. monocytogenes*,
- 25 segnalazioni per *Salmonella*,
- 17 segnalazioni per *Escherichia coli*,
- 7 segnalazioni per *norovirus*.

L'ampia attività di vigilanza su tutto il territorio italiano ha contribuito ad aumentare il numero di notifiche ricevute nell'ambito del sistema RASFF relative ai prodotti nazionali. I prodotti nazionali sono stati interessati da 35 notifiche per contaminazione microbiologica, delle quali 5 effettuate dalle autorità competenti italiane. I prodotti della pesca e quelli del settore lattiero-caseario sono i maggiormente interessati da tali notifiche. (ISS, 2015).

La politica alimentare dell'Unione Europea si basa su elevati standard di sicurezza alimentare che possono essere utilizzati per salvaguardare la salute dei consumatori. La sicurezza alimentare è organizzata in modo coordinato e integrato,

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

tenendo in considerazione tutti gli aspetti, dalla produzione primaria al consumatore (Doménech, *et al.*, 2011).

Secondo le raccomandazioni del *Codex Alimentarius* sulla sicurezza alimentare e le normative europee, le opzioni di gestione applicate a livello di processo di produzione dovrebbero basarsi su buone pratiche igieniche, sul sistema HACCP e su sistemi di gestione del rischio per la sicurezza alimentare.

L'HACCP (Hazard analysis and critical control points) è un sistema che consente di applicare l'autocontrollo in maniera razionale e organizzata. Questo è uno strumento per valutare i pericoli e stabilire regimi di controllo incentrati sulla prevenzione, piuttosto che basarsi principalmente sui test finali. Secondo il *Codex Alimentarius* un punto critico di controllo (CCP) è una fase, o una procedura in cui è possibile ed indispensabile attuare un controllo al fine di prevenire o eliminare un pericolo per la sicurezza alimentare o ridurlo a un limite accettabile (FAO/WHO, 2003).

1. I principi su cui si basa l'elaborazione di un piano HACCP sono sette (EC Reg. no 853/2004): Effettuare un'analisi dei pericoli da prevenire, eliminare o ridurre.
2. Determinare i CCP.
3. Stabilire il/i limite/i critico/i che differenziano l'accettabilità dalla inaccettabilità.
4. Stabilire e applicare procedure di sorveglianza efficaci nei punti critici di controllo.
5. Stabilire le misure correttive da adottare nel caso che il monitoraggio indichi che un particolare CCP non rientra nei limiti critici stabiliti.
6. Stabilire procedure di verifica per confermare che il sistema HACCP funzioni in modo efficace.
7. Predisporre la documentazione relativa a tutte le procedure e registrazioni adeguate a tali principi e alla loro applicazione.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

Il miglioramento delle procedure di gestione dell'igiene è una misura fondamentale per ridurre il livello di contaminazione dei prodotti lattiero-caseari. Tuttavia, considerato che i formaggi appartengono alla categoria di alimenti RTE, potrebbero essere necessarie strategie aggiuntive per controllare la crescita e la sopravvivenza di patogeni come *L. monocytogenes*. Diversi trattamenti fisici a base di alta pressione, getto d'acqua pressurizzato, ozono e infrarossi sono stati studiati per controllare patogeni come *L. monocytogenes*. Tutte queste strategie hanno portato ad un'efficace riduzione del microrganismo (fino a 2–3 Log) ma nel frattempo hanno evidenziato anche alcune limitazioni nella loro applicazione, come il calo dell'efficacia del trattamento su superfici irregolari e ruvide, cambiamenti visibili nell'aspetto esterno e necessità di elevati investimenti di capitale. Una strategia promettente per proteggere i formaggi dalle contaminazioni superficiale è l'utilizzo di batteri lattici produttori di antimicrobici come batteriocine, perossido di idrogeno, etanolo e altri acidi organici. I LAB antimicrobici sono sicuri ed evitano l'uso di conservanti chimici nei prodotti lattiero-caseari. Un gran numero di LAB possiede attività antimicrobica (Morandi *et al.*, 2019). L'uso di bioconservanti, come le colture bioprotettive, da soli o in combinazione con altri trattamenti, sono attualmente proposti per competere con i microrganismi patogeni contaminanti per garantire il mantenimento della qualità e della sicurezza dei prodotti lattiero-caseari (Spanu *et al.*, 2017).

CAPITOLO II: MATERIALI E METODI

Il presente lavoro è stato svolto in collaborazione con un'azienda del settore lattiero-caseario ubicata in Sardegna che ha messo a disposizione il proprio expertise tecnologico relativo ad applicazione della tecnologia di produzione del Pecorino Sardo Dolce DOP. Inoltre, ha fornito i prodotti lattiero-caseari utilizzati nelle varie fasi sperimentali e ha reso possibile l'effettuazione presso le loro strutture delle produzioni sperimentali previste per il Challenge Test.

2.1. Valutazione della prevalenza di *L. monocytogenes* presso il caseificio

Con lo scopo di valutare il livello di contaminazione ambientale e individuare eventuali nicchie ecologiche di *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*, presso l'azienda sono stati effettuati dei campionamenti ambientali. Sono stati prelevati campioni dalle seguenti aree:

- Ricevimento latte;
- Sala lavorazione;
- Camera di stufatura del Pecorino Sardo DOP;
- Salatura formaggi e ricotte;
- Lavaggio formaggi;
- Cella frigo;
- Cella di stagionatura formaggi;
- Porzionamento e Confezionamento.

Il campionamento includeva superfici a contatto e superfici non a contatto con alimenti lungo le aree di produzione, stagionatura, porzionatura, confezionamento e stoccaggio del formaggio. Le superfici a contatto comprendevano: filtro del latte, stampi per i formaggi, carrelli e scaffali di drenaggio, tavoli, ripiani, nastri per la salagione, taglia formaggi a lama, taglia formaggi a filo, griglie di acciaio, macchina lava formaggi. Le superfici non a contatto con alimenti includevano:

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

pavimenti e canalette di tutte le aree, canaletta dell'area di lavaggio del Pecorino Sardo, macchina lava stivali.

I campioni ambientali sono stati prelevati utilizzando un delimitatore sterile 10 x 10 cm² e un kit commerciale per campionamento di superfici (3M™ Hydra Sponges Spugne Idratate, St. Paul, Minnesota, USA) contenente ciascuno un sacchetto ermetico con spugna inumidita con 10 ml di tampone neutralizzante e 2 guanti sterili. Il kit è stato adoperato inoltre per il prelievo di campioni dalla superficie del Pecorino Sardo DOP. Sono stati effettuati prelievi da tre lotti di produzione differenti. Per ogni lotto di produzione, una spugna è stata utilizzata per strofinare la superficie di 5 formaggi (area di campionamento: 250 cm², calcolata sulla superficie totale del formaggio). Dopo il campionamento, ciascuna spugna è stata inserita nell'apposito sacchetto sterile e conservata in ambiente refrigerato fino all'analisi.

Complessivamente sono stati raccolti n.28 campioni, di cui:

- n.15 prelevati da superfici non a contatto con alimenti,
- n.10 prelevati da superfici a contatto con alimenti,
- n.3 ottenuti dalla superficie di Pecorino Sardo DOP.

Su tutti i campioni è stata determinata la presenza di *L. monocytogenes* e *Listeria spp.* utilizzando metodi di coltura qualitativa convenzionali con doppio arricchimento secondo le norme ISO 11290-1:1996 Amd 2017.

Il campione è stato arricchito in half-Fraser broth (Biolife, Milano, Italy), con un rapporto 1:10 ed incubato a 30°C per 25 ± 1 ore. Successivamente, 0,1 ml della coltura del primo arricchimento sono stati inoculati su una piastra di terreno Agar *Listeria* acc. to Ottaviani & Agosti (ALOA, Biolife, Milano, Italy). In una provetta contenente 10 ml di Fraser broth (Biolife, Milano, Italy) è stata realizzata una subcoltura di 0,1 ml dal brodo half-Fraser broth (Biolife, Milano, Italy) e incubata a 37°C per 24 ± 2 ore.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

Dal secondo arricchimento, 0,1 ml sono stati seminati su una piastra di terreno ALOA (Biolife, Milano, Italy). Dopo incubazione a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 24 ± 2 ore, è stata valutata la presenza di colonie tipiche di *L. monocytogenes*.

Su tutti i campioni è stata inoltre effettuata l'analisi quantitativa mediante metodo per il conteggio di *L. monocytogenes* e *Listeria* spp secondo la norma ISO 11290-2:1998 Amd 2017 mediante inoculo di 0,1 ml dalla sospensione del campione in half-Fraser broth su una piastra da 90 mm di terreno ALOA (Biolife, Milano, Italy). Dopo incubazione a 37°C per 24 ± 2 ore è stato effettuato il conteggio delle colonie di *L. monocytogenes* e *Listeria* spp.

Da ciascun campione positivo sono state isolate fino a 5 colonie con aspetto tipico (colore verde-blu circondate da un alone opaco). Su tutti gli isolati sono stati effettuati i seguenti test preliminari: colorazione di Gram, test della catalasi e dell'ossidasi. Tutti i ceppi sono stati conservati a -80°C in brodo BHI (Brain Heart Infusion, Biolife, Milano, Italy) con glicerolo (15% v/v) per le successive analisi.

2.1.1. Identificazione molecolare di specie mediante PCR multiplex

Il DNA genomico dei ceppi batterici è stato estratto utilizzando il kit di purificazione genomica Wizard (Promega Corp., Madison, WI, USA) secondo le istruzioni del produttore.

L'identificazione molecolare di specie delle colonie tipiche è avvenuta mediante Multiplex PCR con l'obiettivo di identificare sei specie di: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri* utilizzando il protocollo PCR descritto da Ryu et al. (2013) parzialmente modificato.

La Multiplex PCR per l'identificazione di specie è stata eseguita utilizzando i seguenti ceppi di referenza:

- *L. monocytogenes* ATCC 19115;
- *Listeria innocua* ATCC 33090;
- *Listeria ivanovii* ATCC 19119;
- *Listeria grayi* ATCC 19120;

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

- *Listeria seeligeri* ATCC 35967;
- *Listeria welshimeri* ATCC 35897.

Le sequenze e le concentrazioni dei primer impiegate per la reazione sono riportate nella *Tabella 1*.

Tabella 1. Sequenze nucleotidiche e concentrazioni dei primers utilizzati per l'identificazione di specie

Specie	Gene	Primer	Sequenze (5'-3')	Dimensioni prodotto (bp)	Concentrazione primer (μM)
genere <i>Listeria</i>	<i>prs</i>	<i>prsF</i>	GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG	370	0,4
		<i>prsR</i>	CAAAGAAACCTTGGATTGCGG		
<i>L. grayi</i>	<i>Ossidore</i>	<i>JOgrayi-F</i>	GCGGATAAAAGGTGTTCTGGGTCAA	201	0,24
	<i>duttasi</i>	<i>JOgrayi-R</i>	ATTGTCTATCGTCCGAGGCTAGG		
<i>L. innocua</i>	<i>lin0464</i>	<i>lin0464-F</i>	CGCATTTATCGCCAAAACCTC	749	2,25
		<i>lin0464-R</i>	TCGTGACATAGACGCGATTG		
<i>L. ivanovii</i>	<i>namA</i>	<i>liv22-228-F</i>	CGAATTCCTTATCACTTGAGC	463	0,52
		<i>liv22-228-R</i>	GGTGCTGCGAACTTAACTCA		
<i>L. monocytogenes</i>	<i>lmo1030</i>	<i>lmo1030-F</i>	GCTTGTATTCACTTGGATTGTCTGG	509	0,56
		<i>lmo1030-R</i>	ACCATCCGCATATCTCCAGCCAAC		
<i>L. seeligeri</i>	<i>lmo0333</i>	<i>lseelin-F</i>	GTACCTGCTGGGAGTACATA	673	1.36
		<i>lseelin-R</i>	CTGTCTCCATATCCGACAG		
<i>L. welshimeri</i>	<i>scrA</i>	<i>lwe1801-F</i>	CGTGGCACAATAGCAATCTG	281	2,5
		<i>lwe1801-R</i>	GACATGCCTGCTGAACTAGA		

Tutte le reazioni di amplificazione sono state eseguite in un volume finale di 25 μL contenente: 1 μL di DNA, 5 μL di buffer PCR 1X (Flexi Buffer Green GoTaq, Promega), 4 mM di MgCl₂, 0,1 mM di dNTPs e 2 U di Taq polimerasi (GOTAQ Hot start 5U/μl, Promega).

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
 Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
 Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
 Università degli Studi di Sassari

Tutte le reazioni di amplificazione sono state eseguite in un termociclatore (Geneamp Pcr Sistema 9700 Thermocycler) programmato come segue: denaturazione a 94°C per 5 minuti, annealing a 58°C per 30 secondi e allungamento a 72° C per 30 secondi, seguito da un periodo di estensione finale a 72°C per 5 minuti.

I frammenti amplificati sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 3% in 1X Tris-acetato EDTA (TAE; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e colorati con bromuro di etidio (0,5 µg/ml) per 20 minuti. I gel sono stati osservati e le immagini acquisite dal transilluminator UV Gel-Doc (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

2.1.2. Differenziazione dei sierogruppi di *L. monocytogenes* mediante Multiplex PCR

Dopo il primo screening per l'identificazione di specie, è stata eseguita una Multiplex PCR per differenziare i sierotipi principali di *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b) in quattro sierogruppi, secondo il protocollo proposto da Doumith et al. (2004). Nella *Tabella 2* sono elencate e descritte le sequenze dei primer utilizzate, i rispettivi geni bersaglio e le loro specificità del sierotipo.

Tabella 2. Geni target e rispettivi primers utilizzati nella Multiplex PCR per la distinzione genica dei sierotipi.

Geni bersaglio	Sequenza di primer (5'-3')	Dimensioni del prodotto (bp)	Sierogruppi di <i>L. monocytogenes</i>
<i>lmo0737F</i>	AGGGCTTCAAGGACTTACCC	691	1/2a, 1/2c, 3a e 3c
<i>lmo0737R</i>	ACGATTCTGCTTGCCCATTC		
<i>lmo1118 F</i>	AGGGGTCTTAAATCCTGGAA	906	1/2c e 3c
<i>lmo1118 R</i>	CGGCTTGTCGGCATACTTA		
ORF2819 F	AGCAAAATGCCAAACTCGT	471	<i>Sierotipi di L. monocytogenes</i> 1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e
ORF2819 R	CATCACTAAAGCCTCCCATTG		
ORF2110 F	AGTGGACAATTGATTGGTGAA	597	4b, 4d e 4e
ORF2110 R	CATCCATCCCCTTACTTTGGAC		
<i>prsF</i> ¹	GCTGAGAGATTGCGAAAGAAG	370	Tutte le specie di <i>Listeria</i>
<i>prsR</i>	CAAAGAAACCTTGATTGCGG		

¹ Il gene *prs* è specifico per i ceppi del genere *Listeria*, ed è stato inserito come controllo interno.

Le reazioni di amplificazione, in un volume finale di 50 µl, contenevano:

- 5 µl di DNA purificato,
- 2 U di Taq polimerasi (GOTAQ Hot start 5U/µl, Promega),
- 0,2 mM di dNTPs (10 mM, Sigma),
- 2 mM di MgCl₂ (50 mM, Invitrogen),
- buffer PCR 5X (Flexi Buffer Green GoTaq, Promega),
- 1 µM per *lmo0737*, ORF2819 e ORF2110;
- 1,5 µM per *lmo1118*;
- 0,2 µM per *prs*.

La PCR è stata eseguita con una fase iniziale di denaturazione a 94 °C per 3 minuti; 35 cicli di 94 °C per 40 secondi, 53 °C per 1,15 minuti e 72 °C per 1,15 minuti; e un ciclo finale di 72 °C per 7 minuti in un termociclatore (Geneamp Pcr Sistema 9700 Thermocycler).

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari

Gli amplificati sono stati quindi sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio 3% in tris-acetato-EDTA (TAE) 1X (Invitrogen, USA) e visualizzati mediante l'impiego del sistema Gel-Doc UV trans illuminator (Bio-Rad, USA) (Doumith *et al.*, 2004). La Multiplex PCR è stata sviluppata utilizzando ceppi di riferimento di *L. monocytogenes* rappresentanti i quattro sierotipi più comuni:

- *L. monocytogenes* ATCC 19111, sierotipo 1/2 a;
- *L. monocytogenes* NTCC 10887, sierotipo 1/2 b;
- *L. monocytogenes* ATCC 7644, sierotipo 1/2 c;
- *L. monocytogenes* ATCC 19115, sierotipo 4 b.
-

2.2. Valutazione *in vitro* dell'attività antimicrobica di batteri lattici nei confronti di *L. monocytogenes*

2.2.1 Isolamento di LAB autoctoni

Complessivamente sono stati analizzati n. 4 campioni in pool di latte ovino crudo, forniti da un caseificio situato sul territorio regionale. I 4 pool sono stati ottenuti mediante prelievo di campioni direttamente dalle cisterne per la raccolta del latte dopo il conferimento da parte di allevamenti sardi.

Aliquote (10 ml) di ciascun campione di latte, sono state omogeneizzate, con l'ausilio di uno Stomacher (BagMixer® 400, Interscience, Saint Nom la Bretèche, France) con 90 ml di soluzione salina sterile (0,85% NaCl) per 1 minuto e diluite in serie da 10^{-1} a 10^{-4} (diluizione 1:10). Successivamente, sono state allestite semine su piastra per la ricerca di:

- Lattobacilli termofili: terreno MRS (Man Rogosa and Sharpe, Biolife, Milano, Italy) agar, acidificato a pH 5.5 con HCl 0.5 N (MRS 5.5);
- Lattococchi termofili: terreno M17 (Microbiol, Cagliari, Italy) agar addizionato con lattosio (Codex, Farmacopea) alla concentrazione 0.5% (L-M17);

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

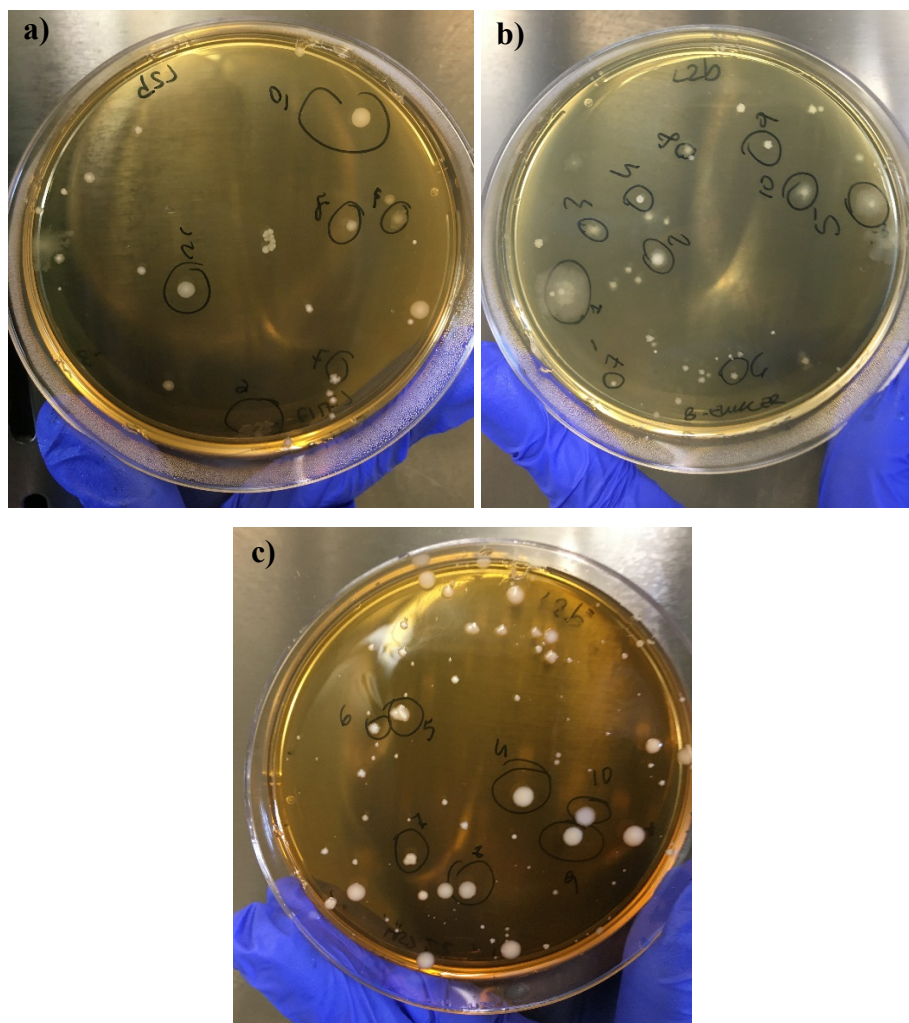
- *Streptococcus therophilus*: terreno Elliker (Sigma-Aldrich) agar con l'aggiunta di Beef extract (Biolife, Milano, Italy) alla concentrazione di 0.5% (B-Elliker).

È stato seminato 0.1 ml di ciascuna diluizione per ogni terreno. Le piastre sono state incubate a 45 °C per 48-72 h in aerobiosi ed in anaerobiosi. L'atmosfera anaerobica è stata ottenuta mediante l'incubazione delle piastre in giare con l'aggiunta di un kit per l'anaerobiosi (Thermo Scientific, Oxoid AnaeroGen, UK).

L'enumerazione dei microrganismi è stata effettuata in piastre Petri contenenti da 30 a 300 CFU/ml ed è stata eseguita analisi statistica della varianza (ANOVA, ANalysis Of VAriance) dei dati prodotti.

Colonie singole morfologicamente distinte sono state casualmente selezionate e sub-coltivate singolarmente (*Figura 1*).

Figura 1. Piastre Petri con colonie batteriche cresciute dalla semina di latte ovino sardo in terreno di coltura rispettivamente: a) L-M17; b) B-elliker; c) MRS 5.5.



2.2.2. Analisi biochimiche e morfologiche: test della Catalasi, prova dell'Ossidasi e colorazione di Gram

Da ogni campione positivo, n. 220 isolati sono stati sottoposti a prove preliminari mediante effettuazione del test della catalasi mediante perossido di idrogeno (H_2O_2 ,

Maria Pina Meloni – “Adozione di culture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

Titolchimica, Pontecchio Polesine, Italy), della prova dell'ossidasi mediante dischetti (Microbiol, Cagliari, Italy) e della colorazione di Gram.

2.3. Screening sull'attività inibente nei confronti di *L. monocytogenes*

I batteri selezionati come potenziali LAB autoctoni e una coltura protettiva commerciale (CP), sono stati testati *in vitro* per la loro attività antimicrobica nei confronti di *L. monocytogenes*.

Mediante metodica Agar Well Diffusion Assay (AWDA) secondo il protocollo sviluppato da Moraes *et al.* (2010), con alcune modifiche, sono stati testati:

- 74 ceppi batterici identificati come potenziali LAB termofili, isolati da latte ovino non trattato termicamente;
- una coltura protettiva commerciale liofilizzata, Lyofast LPAL, prodotta da Sacco System, costituita da un ceppo selezionato di *Lactobacillus plantarum* (batterio lattico mesofilo) produttore di batteriocine.

Per il test AWDA sono state utilizzate piastre contenenti 20 ml di BHI semisolido BHI (Brain Heart Infusion, Biolife, Milano, Italy) (0,8g/100ml di agar batteriologico) precedentemente inoculate con 10^5 UFC/ml di *L. monocytogenes*. Con l'ausilio di puntali sterili per pipette da 1000 µl, sulle piastre sono stati creati dei pozzetti del diametro di 7,7 mm, nei quali sono stati inoculati 80µl delle colture batteriche da testare per l'attività inibitoria nei confronti di *L. monocytogenes*.

Il AWDA è stato condotto utilizzando 51 ceppi di *L. monocytogenes*, 47 dei quali isolati da aziende del settore lattiero-caseario situate sul territorio regionale. Il criterio di scelta si è basato sulla matrice di isolamento (superficie a contatto o non a contatto con l'alimento) e sul sierotipo. I ceppi di campo, elencati nella *Tabella 3* appartenevano alla ceppo-teca interna alla Sezione Ispezione degli Alimenti di Origine Animale del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università degli

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

Studi di Sassari. Quattro ceppi di *L. monocytogenes* ATCC19111, NCTC1088, ATCC764, ATCC19115 sono stati utilizzati come referenza.

Tabella 3. Ceppi di *L. monocytogenes* utilizzati come indicatori per testare l'attività antimicrobica di CP e dei potenziali LAB *in vitro* mediante AWDA. Nella tabella la matrice di isolamento e il sierotipo per ognuno dei ceppi utilizzati.

CEPPI DI <i>L.monocytogenes</i>	SITO DI ISOLAMENTO	A contatto/non a contatto con alimenti	Sierogruppi
LM023	Macchine di lavaggio Formaggi/Ricotta	a contatto	4b
LM024	Canalette di scolo a pavimento	non-a contatto	1/2c
LM025	Canalette di scolo a pavimento	non-a contatto	4b
LM031	Ricotta salata	alimento	4b
LM035	Pecorino Romano	alimento	1/2a
LM041	Tavoli di drenaggio	a contatto	1/2a
LM054	Macchine di lavaggio Formaggi/Ricotta	a contatto	1/2a
LM062	Ricotta salata	alimento	1/2a
LM071	Canalette di scolo a pavimento	non-a contatto	1/2b
LM078	Stampi	a contatto	1/2a
LM081	Filtri del latte	a contatto	1/2a
LM082	Canalette di scolo a pavimento	non-a contatto	4b
LM088	Canalette di scolo a pavimento	non-a contatto	1/2b
LM089	Canalette di scolo a pavimento	non-a contatto	1/2a
LM096	Macchine di lavaggio Formaggi/Ricotta	a contatto	1/2b
LM104	Stampi	a contatto	1/2a
LM107	Filtri del latte	a contatto	1/2a
LM109	Canalette di scolo a pavimento	non-a contatto	1/2a
LM123	Tavoli/Nastri trasportatori	a contatto	4b
LM132	Tavoli/Nastri trasportatori	a contatto	4b
LM133	Tavoli/Nastri trasportatori	a contatto	4b
LM135	Pecorino Romano	alimento	4b

**Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la
conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari**

LM174	Canalette di scolo a pavimento	non-a contatto	4b
LM178	Canalette di scolo a pavimento	non-a contatto	1/2a
LM378	Canalette di scolo a pavimento	non-a contatto	1/2c
LM386	Tavoli/Ripiani	a contatto	4b
LM389	Canalette di scolo a pavimento	non-a contatto	1/2b
LM390	Canalette di scolo a pavimento	non-a contatto	4b
LM391	Canalette di scolo a pavimento	non-a contatto	4b
LM393	Canalette di scolo a pavimento	non-a contatto	4b
LM394	Tavoli/Ripiani	a contatto	1/2b
LM406	Canalette di scolo a pavimento	non-a contatto	1/2c
LM537	Pecorino Romano	alimento	1/2b
LM565	Ricotta zuccherata	alimento	1/2a
LM582	Macchine di lavaggio Formaggi/Ricotta	a contatto	1/2b
LM687	Macchine di lavaggio Formaggi/Ricotta	a contatto	1/2b
LM701	Pavimento	non-a contatto	1/2b
LM717	Pavimento	non-a contatto	1/2b
LM721	Macchine di lavaggio Formaggi/Ricotta	a contatto	1/2b
LM734	Formaggi	alimento	1/2b
LM741	Ricotta salata	alimento	1/2c
LM783	Canalette di scolo a pavimento	non-a contatto	1/2a
LM788	Ricotta salata	alimento	1/2a
LM820	Pavimento	non-a contatto	4b
LM822	Pavimento	non-a contatto	4b
LM837	Canalette di scolo a pavimento	non-a contatto	1/2b
LM843	Ricotta salata	alimento	1/2c
ATCC19111	Ceppi di Referenza		1/2a
NCTC10887			1/2b
ATCC7644			1/2c
ATCC19115			4b

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari

Il protocollo di tale fase sperimentale è stato articolato in due fasi:

Fase 1: Agar Well Diffusion Assay utilizzando i 74 potenziali LAB e la CP tal quali. In breve, i ceppi, previa crescita negli specifici brodi di coltura e alle idonee condizioni di crescita, sono stati testati per le loro capacità antimicrobiche nei confronti di *L. monocytogenes in vitro*.

Fase 2: per valutare la capacità dei potenziali LAB e della CP di produrre sostanze di natura proteica ad azione batteriostatica/battericida, è stato condotto un Agar Well Diffusion Assay utilizzando il loro surnatante privo di cellule (CFS).

2.3.1. Agar Well Diffusion Assay: Fase 1

Una colonia in purezza per ognuno dei 74 potenziali LAB (*Tabella 4*) è stata sub-coltivata in 10 ml del loro specifico brodo di coltura ed incubata a 45°C per 17 h in bagnetto termostato ad agitazione (GFL Shaking Water Baths Orbital Motion 1092).

Per rispettare le indicazioni fornite dal produttore, 1,5 mg di CP sono stati inoculati in 10 ml brodo MRS ed incubati a 30 °C per 17 h in bagnetto termostato ad agitazione.

Tabella 4. Ceppi potenziali LAB utilizzati per la Fase 1 del AWDA, con indicazioni sulle caratteristiche morfologiche, forma, colorazione di Gram e proprietà biochimiche (catalasi e ossidasi). Le sezioni a), b) e c) suddividono i ceppi in relazione ai terreni di coltura idonei per la loro crescita *in vitro*, rispettivamente: MRS pH 5.5, L-M17 e B-Elliker.

Ceppi potenziali LAB testati mediante Agar Well Diffusion Assay																	
Terreno di coltura		Caratteristiche morfologiche e biochimiche				Terreno di coltura		Caratteristiche morfologiche e biochimiche				Terreno di coltura		Caratteristiche morfologiche e biochimiche			
	Nome	Forma	Gram	Cat	Ox		Nome	Forma	Gram	Cat	Ox		Nome	Forma	Gram	Cat	Ox
MRS pH 5,5	L1 MRS 7a	Bacilli	+	-	-	L-M17	L1 M17 10b	Cocchi	+	-	-	B-Elliker	L1 B-E 7a	Cocchi	+	-	-
	L1 MRS 10a	Bacilli	+	-	-		L1 M17 13a	Cocchi	+	-	-		L1 B-E 13a	Cocchi	+	-	-
	L2 MRS 2a	Bacilli	+	-	-		L1 M17 19a	Cocchi	+	-	-		L2 B-E 10a	Cocchi	+	-	-
	L2 MRS 4a	Bacilli	+	-	-		L1 M17 2b	Cocchi	+	-	-		L3 B-E 7a	Cocchi	+	-	-
	L2 MRS 7a	Bacilli	+	-	-		L1 M17 3b	Cocchi	+	-	-		L1 B-E 2b	Bacilli	+	-	-
	L3 MRS 3a	Cocchi	+	-	-		L1 M17 5b	Cocchi	+	-	-		L1 B-E 5b	Cocchi	+	-	-
	L3 MRS 7a	Cocchi	+	-	-		L1 M17 6b	Bacilli	+	-	-		L1 B-E 10b	Cocchi	+	-	-
	L4 MRS 1a	Bacilli	+	-	-		L1 M17 8b	Cocchi	+	-	-		L2 B-E 2b	Bacilli	+	-	+
	L4 MRS 2a	Bacilli	+	-	-		L2 M17 10a	Cocchi	+	-	-		L2 B-E 4b	Bacilli	+	-	-
	L4 MRS 8a	Bacilli	+	-	-		L2 M17 10b	Cocchi	+	-	+		L2 B-E 9b	Bacilli	+	-	-
	L1 MRS 1b	Bacilli	+	-	-		L2 M17 1b	Cocchi	+	-	-		L3 B-E 9b	Cocchi	+	-	-
	L1 MRS 2b	Cocchi	+	-	-		L2 M17 2a	Bacilli	+	-	+		L4 B-E 8b	Cocchi	+	-	-
	L1 MRS 3b	Bacilli	+	-	-		L2 M17 4a	Bacilli	+	-	-		L4 B-E 10b	Cocchi	+	-	-
	L1 MRS 4b	Bacilli	+	-	-		L2 M17 4b	Cocchi	+	-	-						
	L1 MRS 5b	Bacilli	+	-	-		L2 M17 9b	Cocchi	+	-	-						
	L2 MRS 2b	Cocchi	+	-	-		L3 M17 2b	Cocchi	+	-	-						
	L2 MRS 4b	Bacilli	+	-	-		L3 M17 3b	Cocchi	+	-	-						
	L2 MRS 7b	Bacilli	+	-	-		L3 M17 5a	Cocchi	+	-	-						
	L2 MRS 8b	Bacilli	+	-	-		L3 M17 8a	Cocchi	+	-	-						
	L2 MRS 9b	Bacilli	+	-	-		L3 M17 8b	Cocchi	+	-	+						
	L3 MRS 1b	Bacilli	+	-	-		L4 M17 10b	Bacilli	+	-	-						
L3 MRS 2b	Bacilli	+	-	-	L4 M17 2a	Bacilli	+	-	-								
L3 MRS 3b	Bacilli	+	-	-	L4 M17 2b	Cocchi	+	-	-								
L3 MRS 4b	Bacilli	+	-	-	L4 M17 3b	Cocchi	+	-	-								
L3 MRS 5b	Bacilli	+	-	-	L4 M17 4a	Cocchi	+	-	-								
L3 MRS 7b	Bacilli	+	-	-	L4 M17 6b	Cocchi	+	-	-								
L4 MRS 1b	Bacilli	+	-	-	L4 M17 7b	Cocchi	+	-	-								
L4 MRS 2b	Bacilli	+	-	-													
L4 MRS 4b	Bacilli	+	-	-													
L4 MRS 5b	Bacilli	+	-	-													
L4 MRS 7b	Bacilli	+	-	-													
L4 MRS 8b	Bacilli	+	-	-													
L4 MRS 10b	Cocchi	+	-	-													
a)						b)						c)					

80 µl di ciascuna sospensione batterica sono stati dispensati nei pozzetti ottenuti nelle piastre contenenti BHI precedentemente inoculato con *L. monocytogenes* secondo il protocollo descritto nel paragrafo 2.3.

2.3.2. Agar Well Diffusion Assay: Fase 2

La seconda fase sperimentale del AWDA ha riguardato la ricerca di eventuali sostanze inibenti prodotte da parte della CP e dei potenziali LAB positivi all'AWDA di fase 1.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

Sono stati preparati surnatanti privi di cellule (CFS) partendo da colture microbiche ottenute in idonee condizioni di crescita, come descritto nel punto 2.3.1. La sospensione batterica è stata quindi centrifugata a $10.000 \times g$ per 10 minuti. Il surnatante così ottenuto è stato alcalinizzato correggendo il pH a 6,0 con NaOH 1M ed è stato infine sterilizzato per filtrazione con apposito filtro con pori di $0.22 \mu m$ (Millex SLGP033RS, Millipore, Bedford, MA, U.S.A.). 80 μl di ciascuna sospensione sono stati depositati nei pozzetti ricavati nelle piastre BHI inoculati con *L. monocytogenes* secondo il protocollo descritto nel paragrafo 2.3.

In tutte le prove, un pozzetto è stato inoculato con 80 μl di NaCl 0,85% come controllo negativo.

Le piastre dell'AWDA sono state incubate a 37°C per 24 ore ed esaminate per la presenza di un alone di inibizione. Per determinare la capacità batterica di inibire *L. monocytogenes*, è stato misurato il diametro dell'alone di inibizione (cm), quando prodotto.

2.4. Attività antimicrobica in differenti medium di crescita

Sono state eseguite indagini sull'adattabilità della coltura protettiva commerciale e dei LAB ai prodotti lattiero-caseari.

La CP e i potenziali LAB risultati positivi ai test AWDA sono stati testati per la loro attività antimicrobica nei confronti di *L. monocytogenes in vitro* previa crescita in scotta. 1,5 mg di CP sono stati inoculati in 10 ml di scotta ed incubati a 30 °C; una colonia per ciascun potenziale LAB è stata inoculata in 10 ml di scotta ed incubata a 45°C. Tutti i ceppi testati sono stati incubati per 17 ore in bagnetto termostato in agitazione.

Sono state allestite piastre per AWDA come descritto nel paragrafo 2.3, e nei pozzetti sono stati dispensati 80 μl delle sospensioni batteriche ottenute previa crescita in scotta.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

Le piastre sono state incubate a 37°C per 24 ore ed è stata valutata la presenza dell'alone di inibizione.

2.5. Enumerazione dei potenziali LAB e della CP previa crescita in terreni convenzionali e in scotta

Per comprendere se l'azione inibente da parte dei microrganismi testati nei confronti di *L. monocytogenes* fosse correlata alla loro concentrazione e/o al medium di crescita utilizzato, è stata effettuata e comparata l'enumerazione dei batteri vitali previa crescita in terreni di coltura convenzionali e in scotta:

- 1,5 mg di CP sono stati inoculati in 10 ml di MRS broth e in 10 ml di scotta ed incubati per 17 ore a 30 °C;
- Una colonia per ciascun presunto LAB è stata sub-coltivata in 10 ml dei rispettivi brodi di coltura idonei (MRS pH 5,5; L-M17; B-Elliker) e in 10 ml di scotta ed incubati per 17 ore a 45°C.

È stato prelevato 1 ml da ciascuna coltura batterica e sono state effettuate diluizioni seriali (1:10) utilizzando NaCl 0,85% come diluente. Ciascuna delle diluizioni è stata inoculata nel terreno specifico per ognuno dei microorganismi. Le piastre sono state incubate per 48-72 ore a 30°C per CP e a 45°C per i potenziali LAB termofili.

Successivamente si è proceduto all'enumerazione dei microrganismi in piastre Petri contenenti da 30 a 300 CFU/ml.

2.6. Identificazione molecolare dei ceppi microbici

Sette potenziali LAB termofili autoctoni risultati efficaci nei confronti di *L. monocytogenes* mediante il test AWDA, sono stati inviati a BMR Genomics (Padova, Italia) per il sequenziamento del gene rRNA 16S per l'identificazione a livello di specie secondo metodica Sanger. Una ricerca per l'omologia delle

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

sequenze è stata effettuata utilizzando l'algoritmo BLAST disponibile sul server NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.7. Effetto della proteinasi K sull'attività battericida della coltura protettiva commerciale

Per confermare che l'attività antibatterica della CP fosse mediata da peptidi o proteine, come le batteriocine, il CFS è stato sottoposto a trattamento con l'enzima proteinasi K. La proteinasi K è una proteasi ad alta attività, stabile ad un ampio range di pH e capace di resistere alle alte temperature. Per rilevare la suscettibilità delle batteriocine prodotte dalla CP (*L. plantarum*) alla proteolisi, sono stati prelevati campioni di CFS e trattati a 37 °C per 2 ore con proteinasi K ad una concentrazione finale di 1 mg/ml. Dopo la regolazione del pH a 6,5, i campioni sono stati filtrati attraverso un filtro sterile da 0,22 µm (Millipore) e l'attività antimicrobica è stata determinata mediante il metodo AWDA come descritto nel paragrafo 2.3. (Lin e Pan, 2019).

2.8. Potenziale di crescita e di acidificazione di CP e LAB in *scotta*

Per valutare la capacità di crescita e l'attività acidificante dei microrganismi con attività bioprotettiva, sono state prodotte curve di crescita e di acidificazione della coltura protettiva commerciale e dei quattro LAB autoctoni che avevano mostrato i migliori risultati *in vitro*: *L4 MI7 2a*; *L3 MRS 5b*; *L2 MRS 7b* e *L4 MRS 4b*.

In modo da ottenere i risultati in triplicato, sono state preparate 3 beute sterili contenenti ciascuno 1 litro di *scotta*. In ognuna sono stati inoculati 15 mg della coltura protettiva commerciale liofilizzata Sacco - Lyofast LPAL. Secondo le indicazioni fornite dal produttore, con tale quantitativo si apporta una carica stimata

di 10^6 UFC/ml. Tutti i barattoli sono stati incubati per 24 ore a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in bagnetto termostato.

Con l'obiettivo di rendere comparabili i dati ricavati dalla sperimentazione, anche i LAB sono stati testati ad una concentrazione di 10^6 UFC/ml. Una colonia di ciascun LAB è stata inoculata in 100 ml di scotta, incubati per 14 ore a 45°C fino a raggiungere la concentrazione di 10^7 UFC/ml. La sospensione batterica ottenuta è stata inoculata in 3 beute sterili contenenti 900 ml di scotta in modo da ottenere una diluizione 1:10 e una carica stimata di 10^6 UFC/ml. La *scotta* così inocolata è stata incubata per 24 ore a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 2).

Figura 2. L'immagine ritrae le beute contenenti la *scotta* inocolata con i potenziali LAB per lo studio della cinetica di crescita e di acidificazione.



Campioni di *scotta* sono stati analizzati prima dell'inoculo (T_0 -pre inoculo) e subito dopo l'inoculo (T_0 -post inoculo) dei microrganismi, dopo i seguenti tempi di incubazione: 4 ore (T_4), 8 ore (T_8), 9 ore (T_9), 10 ore (T_{10}), 11 ore (T_{11}), 12 ore (T_{12}) e 24 ore (T_{24}).

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

Sono state effettuate diluizioni seriali (1:10) utilizzando NaCl 0,85% di ciascun campione prelevato e sono stati seminati su piastre Petri contenenti:

- MRS agar per i campioni inoculati con CP ed incubati a 30°C per 48-72 ore;
- L-M17 agar per i campioni inoculati con il LAB “*L4 M17 2a*” ed incubati a 45°C per 48-72 ore;
- MRS pH 5,5 agar per i campioni inoculati con i LAB *L3 MRS 5b*, *L2 MRS 7b* e *L4 MRS 4b* ed incubati a 45°C per 48-72 ore.

Le curve di crescita sono stata costruite con il tempo sull'asse x e la concentrazione dei microrganismi espressa in Log UFC/ml sull'asse y (*Figura 8*).

Parallelamente, tutti i campioni prelevati sono stati utilizzati per valutare la capacità inibente di ciascun microrganismo nei confronti di *L. monocytogenes* previa crescita in *scotta* mediante Agar Well Diffusion Assay.

Temperatura e pH sono stati valutati ogni 15 minuti nel corso delle 24 ore della sperimentazione utilizzando il WTW™ misuratore portatile per pH 3110 ProfiLine™. I dati ottenuti hanno prodotto una curva di acidificazione con il tempo sull'asse x e la scala del pH sull'asse y (*Figura 10*).

I dati raccolti da questa fase sperimentali sono stati impiegati per l'analisi statistica (ANOVA, ANalysis Of VAriance).

2.9. Caseificazione sperimentale su scala pilota

Dopo aver identificato i LAB termofili autoctoni mediante sequenziamento del gene rRNA 16S ed elaborato i risultati ottenuti dalle prove di laboratorio, sono state eseguite tre prove di caseificazione sperimentale su scala pilota seguendo la tecnologia di produzione del Pecorino Sardo Dolce DOP. Questa fase sperimentale è avvenuta usufruendo dei locali e delle attrezzature del mini-caseificio del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Sassari. Per ognuna delle tre produzioni sperimentali (EP1, EP2, EP3) sono stati utilizzati 10

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

litri di latte ovino sardo trattato termicamente a cui è stata aggiunta una coltura madre contenente:

1. *Lactobacillus delbrueckii subsp. sunkii* (EP1);
2. *Lactobacillus delbrueckii subsp. indicus* (EP2);
3. *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* strain KCTC 3035 (EP3).

2.9.1. Preparazione della coltura madre

Per ciascuna caseificazione è stato prodotto 1 litro di coltura madre. Ognuno dei ceppi batterici impiegati è stato inoculato in 1 litro di scotta e incubato a 45°C per 17 ore. La coltura madre così prodotta, è stata addizionata dopo l'aggiunta degli starter tradizionalmente usati per la produzione del Pecorino Sardo DOP, prima della coagulazione del latte.

2.9.2. Prelievo dei campioni e analisi microbiologiche

Campioni dei formaggi sperimentali sono stati raccolti nel corso della caseificazione a 0 ore (T₀, cagliata dopo rottura del coagulo), 4 ore (T₄), 8 ore (T₈), 10 ore (T₁₀) e 24 ore (T₂₄). su tutti i campioni è stata effettuata l'enumerazione di batteri lattici termofili e mesofili (UFC/g) mediante semina su piastra Petri in MRS pH 5,5 ed incubazione rispettivamente a 45°C e 30°C per 48-72 ore in condizioni anaerobiche.

Dai dati ottenuti, per ogni caseificazione sperimentale, è stata costruita una curva di crescita con il tempo sull'asse x e la concentrazione dei microrganismi espressa in Log UFC/ml sull'asse y.

Per tutti i campioni prelevati, è stata applicata la metodica Agar Well Diffusion Assay per la valutazione dell'efficacia dei LAB nei confronti di *L. monocytogenes* dopo il loro utilizzo in un processo di caseificazione sovrapponibile a quello utilizzato per la produzione del Pecorino Sardo Dolce DOP.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

È stato misurato il pH nel corso delle 24 ore di analisi, ed è stata quindi ottenuta una curva di acidificazione con il tempo sull'asse x e la scala del pH e sull'asse y. I risultati ottenuti sono stati decisivi e preliminari alla pianificazione del Challenge Test.

2.9.3. Adattabilità di CP e di *Lactobacillus delbrueckii subsp. sunkii* al latte

Preliminarmente all'avvio del Challenge test, si è allestita una prova di laboratorio per testare il comportamento dei microrganismi ad attività bioprotettiva nel latte di pecora. Il latte ovino trattato termicamente (*LOT*) è stato fornito da un caseificio situato in Sardegna. La CP e *L. sunkii* ad una concentrazione di 10^6 UFC/ml sono stati inoculati separatamente in 3 beute sterili contenenti *LOT*. Il latte così inoculato è stato mantenuto alle idonee temperature di crescita di CP (37°C) e di *L. sunkii* (45°C) per 24 ore. Sono stati prelevati campioni prima dell'inoculo (T_0 -pre inoculo) e subito dopo l'inoculo (T_0 -post inoculo) dei microrganismi, dopo i seguenti tempi di incubazione: 4 ore (T_4), 8 ore (T_8), 9 ore (T_9), 10 ore (T_{10}), 11 ore (T_{11}), 12 ore (T_{12}) e 24 ore (T_{24}). Tutti i campioni sono stati analizzati per:

- enumerazione dei batteri lattici;
- capacità inibente di CP e *L. sunkii* nei confronti di *L. monocytogenes* (AWDA);
- proprietà acidificante nel latte.

Tutte le analisi sono state eseguite come descritto nella sezione 2.8.

È stata prodotta una curva di crescita di comparazione tra CP e *L. sunkii* con il tempo sull'asse x e la concentrazione dei microrganismi, espressa in Log UFC/ml, sull'asse y (*Figura 12*). Allo stesso modo è stata costruita una curva di acidificazione avente il tempo espresso sull'asse delle ascisse e la scala del pH sull'asse delle ordinate (*Figura 14*).

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

2.10. Challenge test

Per valutare la dinamica di crescita di *L. monocytogenes* nel Pecorino Sardo Dolce DOP è stato allestito un challenge test su tre lotti di formaggi inoculati con una coltura protettiva commerciale liofilizzata, (Sacco - Lyofast LPAL) composta da un ceppo selezionato di *Lactobacillus plantarum* (CP) e un ceppo di *Lactobacillus delbrueckii subsp. sunkii* isolato da latte ovino proveniente da allevamenti regionali. Per la progettazione del Challenge test si è fatto riferimento al documento “*EURL Lm Guidance Document to evaluate the competence of laboratories implementing challenge tests and durability studies related to L. monocytogenes in ready-to-eat foods*”.

2.10.1. Disegno sperimentale

Il *challenge test* è stato condotto su tre lotti di formaggio prodotti in tre giornate di lavorazione distinte, al fine di garantire la riproducibilità dei risultati.

Per ogni lotto sono state impiegate tre polivalenti da 3500 litri ciascuna dedite rispettivamente alla produzione di:

1. Pecorino Sardo Dolce con l'inoculo di una scotta-innesto contenente la Lyofast LPAL, prodotta da Sacco System, composta da un ceppo selezionato di *Lactobacillus plantarum* produttore di batteriocine (PSA);
2. Pecorino Sardo Dolce con l'inoculo di una scotta-innesto contenente *Lactobacillus delbrueckii subsp. sunkii* (PSB);
3. Pecorino Sardo Dolce senza scotta-innesto, prodotto seguendo la tecnologia di produzione tradizionale. Questa produzione ha rappresentato il controllo (CTRL).

Per tutte le produzioni sperimentali è stata rispettata la tecnologia di produzione del Pecorino Sardo Dolce DOP, le uniche modifiche apportate riguardavano l'aggiunta della scotta-innesto per PSA e PSB.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

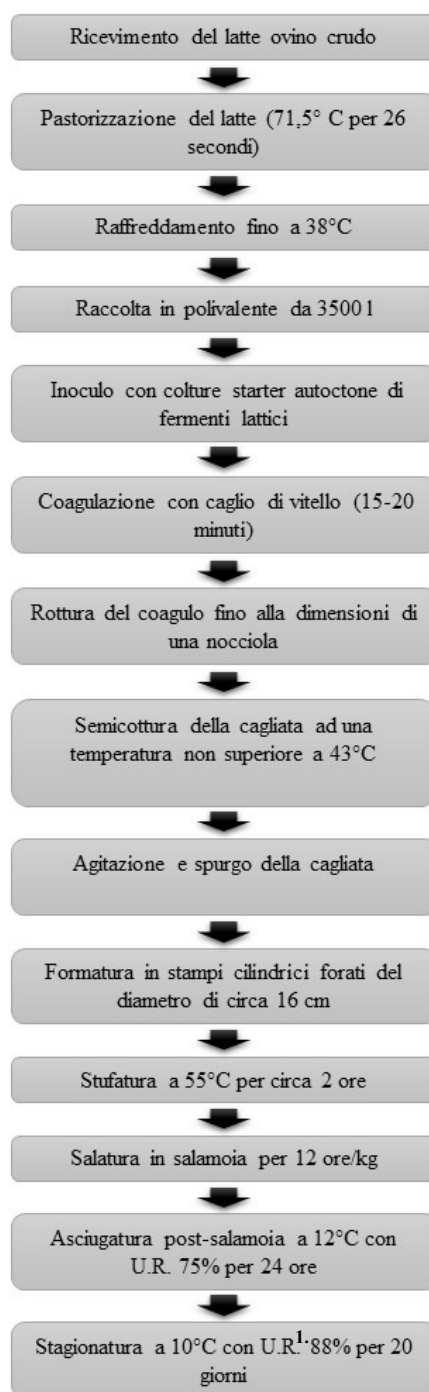
Università degli Studi di Sassari

Al termine della stagionatura, le forme delle tre tipologie di prodotto sono state porzionate in sei spicchi ciascuna e contaminate sperimentalmente con *L. monocytogenes*. Sono quindi state condotte attività di campionamento per valutare i parametri microbiologici e chimico-fisici del prodotto durante tutta la shelf-life.

2.10.2. Diagramma di flusso della produzione del Pecorino Sardo Dolce DOP

La *Figura 3*. riassume la tecnologia di produzione del Pecorino Sardo Dolce DOP, oggetto del presente lavoro.

Figura 3. Diagramma di flusso della produzione del Pecorino Sardo Dolce DOP.



¹ U.R. : umidità relativa

2.10.3. Preparazione della scotta-innesto

In ogni polivalente di PSA e PSB sono stati versati 30 litri di scotta-innesto (*Figura 4*).

Figura 4. Inoculo della scotta-innesto in polivalente.



Per la preparazione della scotta-innesto per PSA sono stati inoculati 4,5 g di coltura protettiva liofilizzata, nel rispetto delle indicazioni fornite dal produttore, in 30 litri di scotta ed incubata a 37°C per 17 ore prima del suo utilizzo.

Per PSB, la scotta-innesto è stata preparata aggiungendo ai 30 litri di scotta, 1 litro di coltura madre preparata come descritto nel paragrafo 2.9.1., e mantenuta a 45°C per 17 ore prima del suo utilizzo.

Per le produzioni PSA e PSB, la scotta-innesto è stata aggiunta subito dopo l'inoculo degli starters, prima della fase di coagulazione.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

Per la produzione CTRL è stata rispettata la tecnologia descritta nella *Figura 3*, senza aggiunta di scotta-innesto.

2.10.4. Preparazione della sospensione microbica di *L. monocytogenes* per la contaminazione sperimentale

L'inoculo sperimentale era costituito da un pool di 5 ceppi distinti di *L. monocytogenes*, dei quali tre di referenza e due di campo isolati dal caseificio partern del presente progetto, di modo che fossero rappresentativi dei ceppi residenti:

1. *L. monocytogenes* ATCC19111, sierotipo 1/2a (ceppo di referenza)
2. *L. monocytogenes* NCTC10887, sierotipo 1/2b (ceppo di referenza)
3. *L. monocytogenes* ATCC19115, sierotipo 4b (ceppo di referenza)
4. *L. monocytogenes* LM837, sierotipo 1/2b (isolato da una canaletta di scolo a pavimento presso lo stabilimento partner)
5. *L. monocytogenes* LM843, sierotipo 1/2c (isolato da una ricotta salata prodotta presso il caseificio partner).

La scelta dei ceppi per la contaminazione sperimentale è ricaduta sui microrganismi sopra elencati in quanto rappresentativi dei più comuni sierotipi di *L. monocytogenes*. Inoltre, in merito ai due ceppi di campo, LM837 era stato isolato da superfici non a contatto con gli alimenti mentre LM843 proveniva da un alimento (ricotta salata).

Ciascun ceppo di *L. monocytogenes*, conservato in brodo BHI e glicerolo ad una temperatura di -80°C , è stato scongelato, seminato in terreno BHA (Brain Heart Infusion agar, Biolife, Milano, Italy) ed incubato alla temperatura di 37°C per 24 ore. Una colonia di ogni ceppo è stata sub-coltivata in 10 ml di brodo BHI (Brain Heart Infusion, Biolife, Milano, Italy) ed incubata a 37°C per 18 ore per garantire il raggiungimento dell'inizio della fase stazionaria. Per pre-adattare le cellule alle

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

condizioni ambientali previste dal challenge test, le sospensioni batteriche sono state stoccate a +4°C per 7 giorni. Una volta accertato che la concentrazione microbica fosse pari a 10^9 UFC/ml, le 5 colture di *L. monocytogenes* sono state miscelate insieme in volumi uguali. Il pool ottenuto è stato diluito 1:10 con NaCl 0,85% per raggiungere la concentrazione di circa 10^2 UFC/ml stabilita per la contaminazione sperimentale.

2.10.5. Contaminazione sperimentale degli spicchi di Pecorino Sardo Dolce DOP

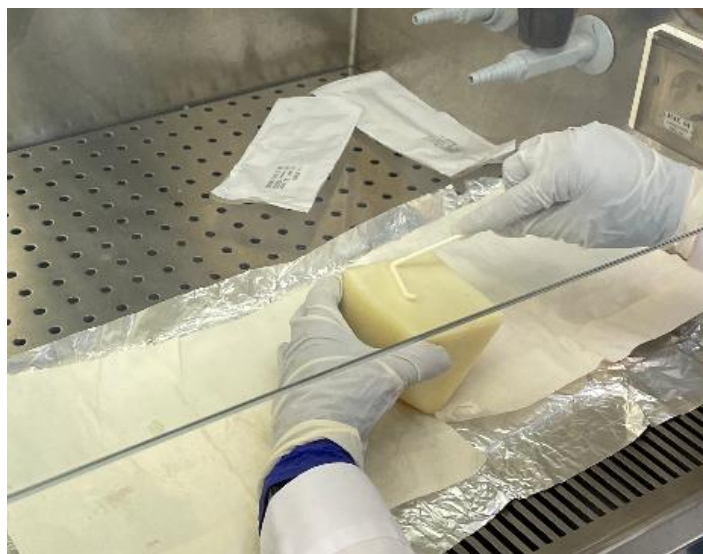
Trascorso il periodo di stagionatura di 20 giorni, 10 forme di PSA, 10 forme di PSB e 10 forme di CTRL sono state porzionate per ottenere 6 spicchi di circa 300 grammi ciascuno per forma. La contaminazione sperimentale degli spicchi di formaggio è stata condotta utilizzando una cappa sterile a flusso laminare, presso i laboratori della Sezione Ispezione degli Alimenti di Origine Animale del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Sassari.

Per simulare la contaminazione derivata dai processi di porzionatura dell'alimento, si è eseguita una contaminazione superficiale degli spicchi. La contaminazione è avvenuta con l'ausilio di una spatola sterile mediante trascinamento lungo le due facce degli spicchi come mostrato nella *Figura 5* Per ognuna delle tipologie di formaggio (PSA, PSB e CTRL), 6 spicchi per ogni lotto non sono stati contaminati sperimentalmente con *L. monocytogenes* e sono stati utilizzati come “bianco” (controllo negativo).

Tutti i campioni, contaminati e bianchi, sono stati confezionati sottovuoto e stoccati a due differenti temperature:

- + 4°C, per simulare condizioni di conservazione corrette;
- + 10°C, per simulare un abuso termico.

Figura 5. Procedura di contaminazione superficiale degli spicchi con *L. monocytogenes*. L'ansa sterile consente la simulazione di una contaminazione da taglio provocata da una lama o da apparecchi taglia formaggio.



2.10.6. Campionamenti, test microbiologici e analisi dei parametri chimico-fisici

Per ognuno dei tre lotti prodotti sono state predisposte quattro attività di campionamento. Sono stati prelevanti campioni di PSA, PSB e CTRL:

- Durante la caseificazione (T_0). Questa fase di analisi aveva l'obiettivo di verificare l'assenza di *L. monocytogenes* negli spicchi di formaggio. A T_0 sono stati eseguiti prelievi di:
 - cagliata dopo rottura del coagulo (T_0 CR);
 - cagliata dopo la fase di stufatura (T_0 CS);
- il giorno successivo alla contaminazione con *L. monocytogenes* (T_{21});
- dopo 90 giorni dalla produzione (T_{90}) che corrisponde alla shelf-life del prodotto;

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

Per il campionamento a T_0 sono stati prelevati:

- 10 ml di scotta-innesto PSA;
- 10 ml di scotta-innesto PSB.

- tre aliquote da 10 grammi ciascuna di cagliata dopo rottura del coagulo di PSA (CAGL.ROT.PSA);
- tre aliquote da 10 grammi ciascuna di cagliata dopo rottura del coagulo di PSB (CAGL.ROT.PSB);
- tre aliquote da 10 grammi ciascuna di cagliata dopo rottura del coagulo di CTRL (CAGL.ROT.CTRL).

- tre aliquote da 10 grammi ciascuna di cagliata dopo la fase di stufatura di PSA (CAGL.STUF.PSA);
- tre aliquote da 10 grammi ciascuna di cagliata dopo la fase di stufatura di PSB (CAGL.ROT.PSB);
- tre aliquote da 10 grammi ciascuna di cagliata dopo la fase di stufatura di CTRL (CAGL.ROT.CTRL).

Per le successive fasi del challenge test (T_{21} , T_{90} , T_{120}), dagli spicchi contaminati e dai bianchi, sono state ottenute aliquote da 10 grammi ciascuna raschiando la superficie di taglio della pasta con l'ausilio di una lama da bisturi sterile (*Figura 6*).

Figura 6. Prelievo delle aliquote di campione dalla superficie degli spicchi dei formaggi impiegati per il Challenge test.



I campioni prelevati durante T_0 , T_{21} , T_{90} e T_{120} sono stati utilizzati per la determinazione dei batteri lattici mesofili e termofili (ISO 15214:1998) e per determinazione qualitativa e quantitativa di *L. monocytogenes* (ISO 11290-1: 2017 e ISO 11290-2: 2017).

Per l'enumerazione dei batteri mesofili e termofili, 10 g di ciascun campione sono stati omogeneizzati, con l'ausilio di uno Stomacher, con 90 ml di NaCl 0,85% per 1 minuto, diluiti in serie (1:10) e 1 ml di ciascuna diluizione è stato seminato su MRS pH 5,5. Per la conta dei batteri mesofili e termofili, le piastre Petri sono state incubate rispettivamente a 30°C e a 45°C in anaerobiosi per 48-72 ore.

Per la determinazione e il conteggio di *L. monocytogenes*, 10 g di ciascun campione sono stati prelevati e analizzati secondo quanto precedentemente descritto. Su tutti i campioni analizzati si è proceduto alla valutazione del pH utilizzando il WTWTM misuratore per pH 3110 ProfiLineTM (Willis Towers Watson, Londra, Regno Unito) e dell' a_w mediante l'apparecchio AQUALAB 4TE (METER Group, Inc. USA).

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari

Tutte le prove sono state eseguite in triplicato: per ogni tempo di analisi sono stati campionati tre spicchi di PSA, tre spicchi di PSB e tre spicchi di CTRL.

L'analisi dei dati ottenuti è stata oggetto di indagine statistica della varianza (ANOVA, ANalysis Of VAriance).

CAPITOLO III: RISULTATI

3.1. Valutazione della prevalenza di *L. monocytogenes* presso il caseificio

A seguito del campionamento ambientale presso il caseificio, *L. monocytogenes* è stata rilevata in 9/28 campioni con una prevalenza del 32,1%. Il patogeno è risultato assente in tutti i campioni prelevati da alimenti e in tutte le superfici a contatto con gli stessi. Due delle positività sono state riscontrate in campioni prelevati da superfici non a contatto con l'alimento (pavimento e canaletta di scolo) dall'area di porzionamento e confezionamento (2/9; 22,2%). Dall'analisi quantitativa solo un campione è risultato positivo con un livello di contaminazione pari a 1,78 Log₁₀ UFC/cm².

La tabella sottostante (Tabella 5) riporta i dati relativi all'isolamento di *L. monocytogenes* nei campioni prelevati da diverse aree dello stabilimento.

Tabella 5. Sintesi dei dati sulla prevalenza e l'enumerazione di *L. monocytogenes*

AREA PRELIEVO CAMPIONE	<i>L.monocytogenes</i> metodica quantitativa (Log ₁₀ UFC/cm ²)	<i>Lmonocytogenes</i> metodica qualitativa
RICEVIMENTO LATTE	Filtro latte	- ²
CASEIFICAZIONE/ SALA LAVORAZIONE	Pavimento	-
	Canaletta	-
	Stampi (pool)	-
	Carrelli/scaffali drenaggio (pool)	-
	Lavastivali	+ ³
SALATURA FORMAGGI E/O RICOTTE	Pavimento	+
	Canaletta	-
	Tavoli/Scaffali/Nastri salagione	-
LAVAGGIO FORMAGGI	Pavimento	1,78
	Canaletta	+
	Canaletta lavaggio PS ¹	+

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

	Macchina lavaprodotti (interno)	-	-
	Griglie PS	-	-
CELLA FRIGO	Pavimento	-	-
	Canaletta	-	+
	Tavoli/Scaffali/Ripiani	-	-
PECORINO SARDO	Lotto n. 192756	-	-
STAGIONATURA FORMAGGI CELLA (N 6)	Pavimento	-	+
	Tavoli/Scaffali/Ripiani	-	-
PECORINO SARDO		-	-
PORZIONAMENTO E CONFEZIONAMENTO	Tagliaformaggi a lama	-	-
	Tagliaformaggi a filo	-	-
	Pavimento	-	+
	Canaletta	-	+
	Tavoli Scaffali Ripiani	-	-
GLIGLIE ACCIAIO		-	-
PECORINO SARDO		-	-

¹ PS: Pecorino Sardo

² - : risultato negativo, assenza di *L. monocytogenes*

³ + : risultato positivo, presenza di *L. monocytogenes*

3.1.1. Identificazione di specie di *Listeria* isolate mediante Multiplex PCR

Dall'isolamento di 3-5 colonie dai campioni positivi con morfologia ascrivibile al genere *Listeria*, un totale di 31 isolati è stato sottoposto a Multiplex PCR per l'identificazione molecolare di specie. Solo 1/31 (4,3%) degli isolati è stato identificato come *L. innocua*, i restanti 30/31 (96,7%) sono stati identificati come *L. monocytogenes*.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

3.1.2. Differenziazione dei sierogruppi più comuni di *L. monocytogenes* mediante Multiplex PCR

Tra i 30 ceppi di *L. monocytogenes* sottoposti a Multiplex PCR sono stati identificati due sierotipi: 1/2a e 4b, il 93% (28/30) dei ceppi testati sono stati identificati come sierotipo 1/2a, mentre due isolati sono risultati appartenere al sierotipo 4b.

3.2. Isolamento ed identificazione di ceppi batterici con attività antimicrobica nei confronti di *L. monocytogenes*

I risultati relativi ai livelli dei microorganismi lattici isolati dai diversi terreni selettivi incubati in aerobiosi e anaerobiosi, sono mostrati nella *Tabella 6*.

I livelli medi dei LAB ($\log_{10}$ CFU/ml) rilevati mediante semina in MRS 5,5 sono risultati significativamente inferiori ($p < 0,01$) rispetto a quelli riscontrati mediante semina in L-M17 e B-Elliker.

Tabella 6.a Livelli medi ($\log_{10}$ CFU/ml media $\pm$ deviazione standard) dei LAB termofili isolati da latte crudo mediante semina in MRS pH 5,5, L-M17 e B-Elliker in condizioni aerobiche.

CRESCITA IN AEROBIOSI

Campioni di latte crudo	Terreni di coltura		
	MRS pH 5.5	L - M17	B - Elliker
L1 ^b	2,1 ^a $\pm$ 0,3 ^c	3,6 $\pm$ 0,0	3,5 $\pm$ 0,0
L2	3,0 $\pm$ 0,7	3,5 $\pm$ 0,1	3,7 $\pm$ 0,2
L3	1,4 $\pm$ 0,8	3,6 $\pm$ 0,2	3,8 $\pm$ 0,2
L4	2,7 $\pm$ 0,1	3,2 $\pm$ 0,6	3,7 $\pm$ 0,3

^a $\log_{10}$ CFU/ml ^b Pool di latte crudo ^c media $\log_{10}$ CFU/ml $\pm$ deviazione standard

Tabella 6.b Livelli medi ($\log_{10}$ CFU/ml media $\pm$ deviazione standard) dei LAB termofili isolati da latte crudo mediante semina in MRS pH 5,5, L-M17 e B-Elliker in condizioni anaerobiche.

CRESCITA IN ANEROBIOSI

Campioni di latte crudo	Terreni di coltura		
	MRS pH 5.5	L - M17	B - Elliker
L1 ^b	2,2 ^a $\pm$ 0,1 ^c	4,6 $\pm$ 0,3	4,3 $\pm$ 0,2
L2	2,8 $\pm$ 0,4	4,5 $\pm$ 0,2	4,6 $\pm$ 0,2
L3	2,3 $\pm$ 0,1	3,9 $\pm$ 0,3	4,3 $\pm$ 0,3
L4	3,0 $\pm$ 0,2	4,8 $\pm$ 0,2	4,5 $\pm$ 0,2

^a $\log_{10}$ CFU/ml ^b Pool di latte crudo ^c media $\log_{10}$ CFU/ml $\pm$ deviazione standard

3.2.1. Analisi biochimiche e morfologiche: test della Catalasi, prova dell'Ossidasi e colorazione di Gram

Dai quattro pool di latte ovino *crudo* sono stati isolati 220 ceppi batterici, tra questi sono stati selezionati quelli aventi caratteristiche riconducibili ai batteri lattici: cocchi/bacilli Gram positivi e catalasi negativi. I risultati dei test biochimici e morfologici hanno consentito di individuare 74/220 ceppi Gram positivi e catalasi negativi (33,6%), dei quali 37 bacilli e 37 cocchi.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

3.3. Screening sull'attività inibente nei confronti di *L. monocytogenes*

I risultati dell'AWDA (fase 1 e fase 2) hanno evidenziato che la coltura protettiva commerciale ha mostrato un'attività antimicrobica *in vitro* contro tutti i 51 ceppi di *L. monocytogenes* testati. Di 73 presunti LAB autoctoni, 13 sono risultati efficaci nei confronti di *L. monocytogenes*. Utilizzando il surnatante privo di cellule (CFS), la coltura protettiva (CP) ha prodotto un alone di inibizione, mentre lo stesso esperimento ha dato esito negativo per tutti i LAB. Questo risultato conferma che l'attività listericida della CP (*L. plantarum*) è correlata alla produzione di batteriocine come dichiarato dal produttore. La CP ha prodotto, nel corso di entrambe le prove, un alone di inibizione con un diametro > 2,1 cm. Su 74 totali, 13 LAB (17,6 %) sono invece risultati positivi al test di fase 1, 7 su 13 hanno prodotto un alone di inibizione di dimensione 1,1–2,0 cm, i restanti 6 LAB hanno mostrato un alone di inibizione tra 0,1 e 1 cm di diametro. I 7 LAB che avevano mostrato la maggior efficacia nei confronti di *L. monocytogenes* sono stati utilizzati nella fase successiva.

3.4. Attività antimicrobica e valutazione della crescita dei potenziali LAB e della CP in differenti substrati

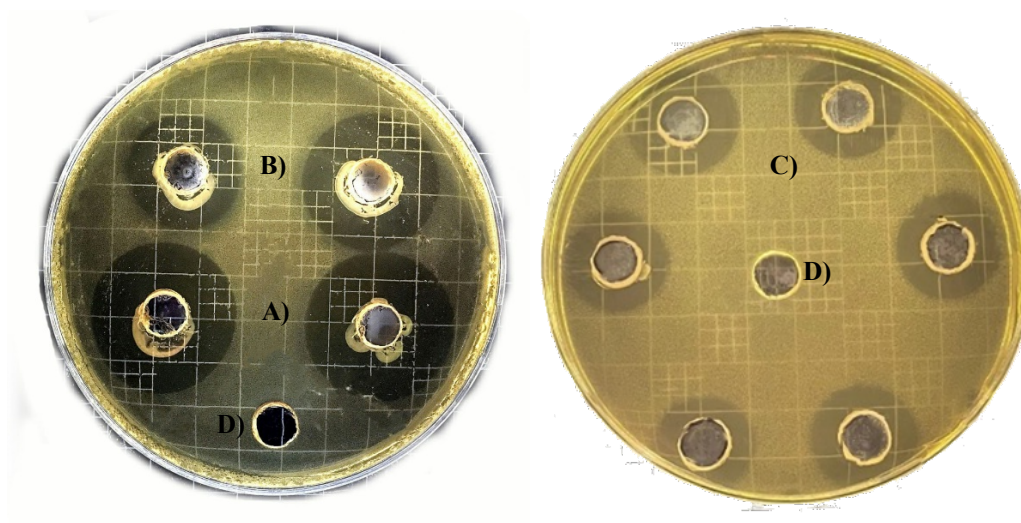
La *Tabella 7* descrive i risultati relativi ai livelli medi ($\log_{10}$ CFU/ml) ottenuti per la CP e per i sette LAB risultati più efficaci nel contrastare la crescita di *L. monocytogenes* a seguito dell'inoculo in *scotta*. La *Figura 7* confronta i risultati dell'AWDA previa crescita dei microrganismi in MRS e in *scotta*.

Tabella 7. Nella prima colonna sono elencati i substrati analizzati. La seconda colonna mostra i livelli medi ($\log_{10}$ CFU/ml media $\pm$ deviazione standard) dei microorganismi lattici dopo inoculo in *scotta* per 17 ore. Infine, la terza colonna mostra i risultati del AWDA mettendo a confronto l'attività anti-*Listeria in vitro* di PC e LAB previa crescita nei terreni di coltura tradizionali e in *scotta*.

		DIAMETRO ALONE DI INIBIZIONE (AWDA)	
Substrati	Conta delle colonie	Prevvia crescita in terreni di coltura tradizionali (cm)	Prevvia crescita in <i>scotta</i> (cm)
Scotta	$0^a \pm 0,0^a$	-	-
Scotta inoculata con	CP	$8,81 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,3$ $1,9 \pm 0,3$
	L4 M17 2a	$7,60 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,1$ $1,7 \pm 0,2$
	L1 MRS 1b	$8,02 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,1$ $1,1 \pm 0,0$
	L2 MRS 7b	$7,66 \pm 1,0$	$1,4 \pm 0,2$ $1,4 \pm 0,2$
	L2 MRS 8b	$7,54 \pm 0,6$	$1,4 \pm 0,3$ $1,6 \pm 0,4$
	L2 MRS 9b	$7,92 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,2$ $1,2 \pm 0,1$
	L3 MRS 5b	$7,61 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,2$ $1,5 \pm 0,3$
	L4 MRS 4b	$7,74 \pm 0,6$	$1,5 \pm 0,2$ $1,3 \pm 0,2$

^a I valori indicano la media derivata dai risultati degli esperimenti condotti in triplicato espressi in $\log_{10}$ CFU/ml $\pm$ deviazione standard.

Figura 7. Due piastre prodotte secondo metodica Agar Well Diffusion Assay (AWDA). Inibizione di *L. monocytogenes* da parte di CP a seguito di crescita A) in terreno di coltura tradizionale (MRS) e B) in *scotta*. L'immagine C) mostra gli aloni di inibizione prodotti dai LAB cresciuti in *scotta*. D) Controllo negativo.



3.5. Identificazione molecolare dei ceppi microbici

I risultati ottenuti dal sequenziamento del gene rRNA 16S hanno confermato che i sette isolati batterici utilizzati nelle fasi sperimentali precedentemente descritte precedentemente erano batteri lattici. Nello specifico, sono stati identificati come: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *sunkii*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *indicus*, *Lactobacillus helveticus* and *Enterococcus faecalis*; la Tabella 8, li mostra nel dettaglio.

Tabella 8. Identificazione molecolare ottenuta dal sequenziamento rRNA 16S.

ISOLATI	SPECIE	NCBI ACCESSION NO.
L4 M17 2a	<i>Enterococcus faecalis</i> strain 133170041-3	CP046108
L1 MRS 1b	<i>Lactobacillus helveticus</i> strain LH5	CP019581
L2 MRS 7b	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>indicus</i>	LC483566

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

L2 MRS 8b	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>sunkii</i> strain JCM 17838	CP018217
L2 MRS 9b	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> strain KCTC 3035	CP018156
L3 MRS 5b	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>sunkii</i> strain JCM 17838	CP018217
L4 MRS 4b	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> strain KCTC 3035	CP018156

Lactobacillus delbrueckii subsp. *sunkii* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* erano le specie più frequentemente isolate, entrambi con prevalenza 28,6 %. Inoltre, un isolato è stato identificato come membro del genere *Enterococcus*.

3.6. Effetto della proteinasi K sull'attività battericida della coltura protettiva commerciale

Dai risultati ottenuti mediante AWDA previo trattamento del CFS con proteinasi K, non è risultata rilevabile alcuna attività inibitoria.

3.7. Cinetica della crescita e acidificazione di CP e LAB in *scotta*

CP e *L4 M17 2a* (*Enterococcus faecalis*); *L2 MRS 7b* (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *indicus*) *L3 MRS 5b* (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *sunkii*) e *L4 MRS 4b* (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*), sono stati selezionati per l'inoculo in *scotta*.

Le figure che seguono mostrano le curve di crescita della CP e dei diversi LAB ottenute dopo inoculo in *scotta*.

Figura 8.a. Curva di crescita di *Lactobacillus plantarum* (CP)

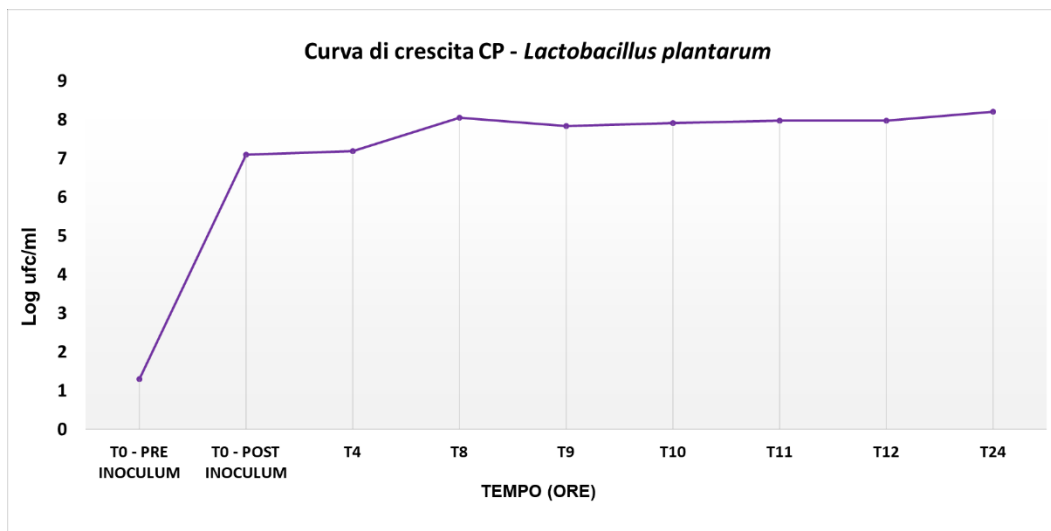
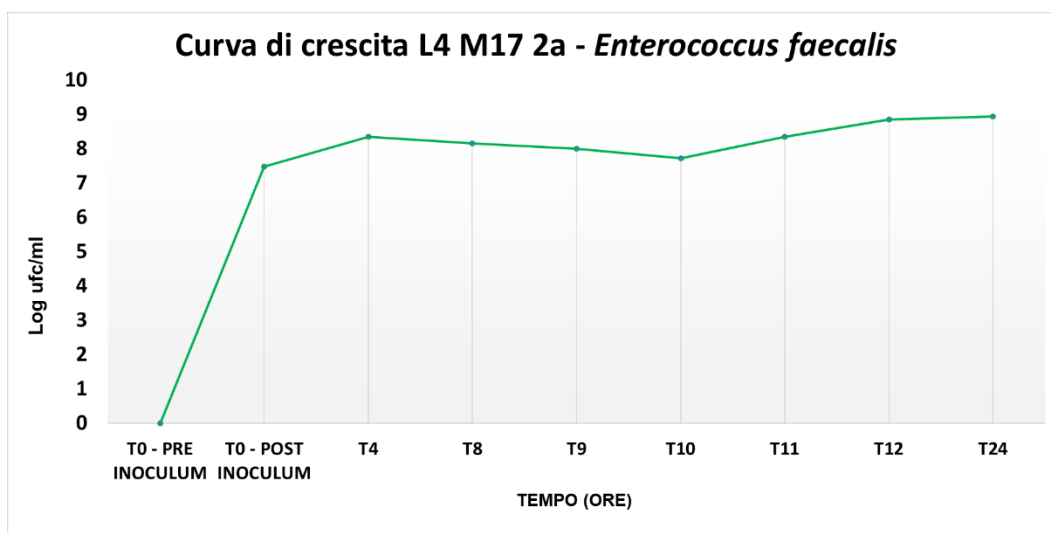


Figura 8.b. Curva di crescita di *Enterococcus faecalis*



Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
 Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
 Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
 Università degli Studi di Sassari

Figura 8.c. Curva di crescita di *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *indicus*

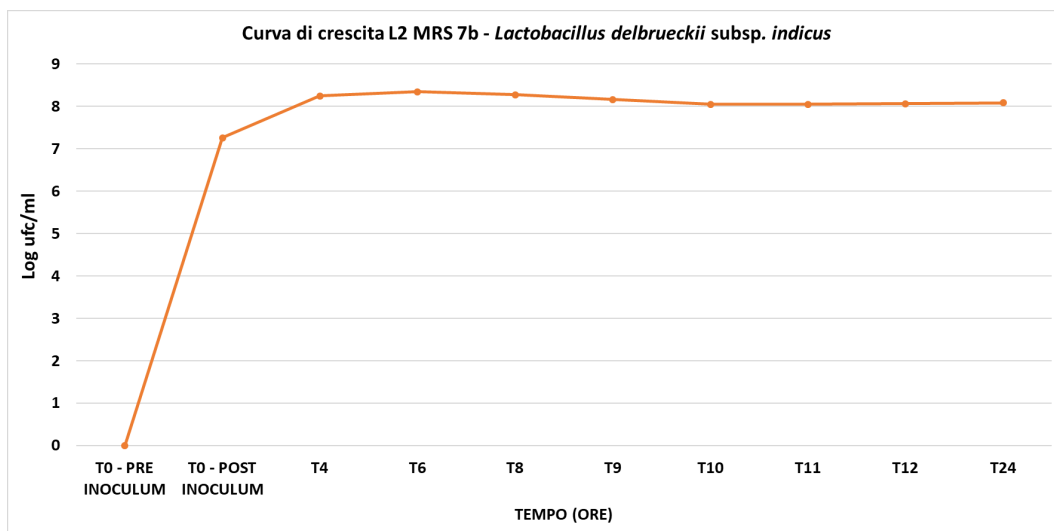


Figura 8.d. Curva di crescita di *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *sunkii*

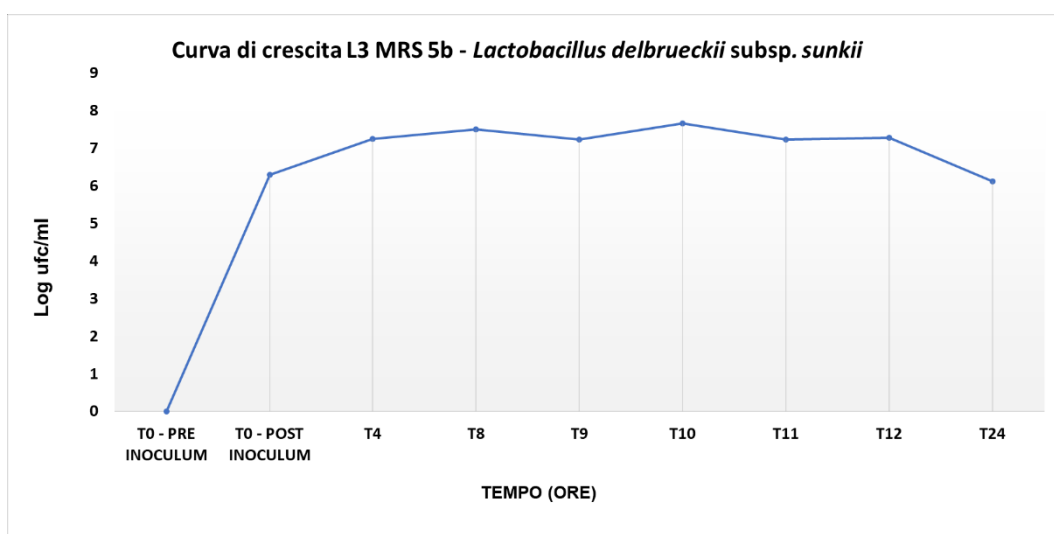
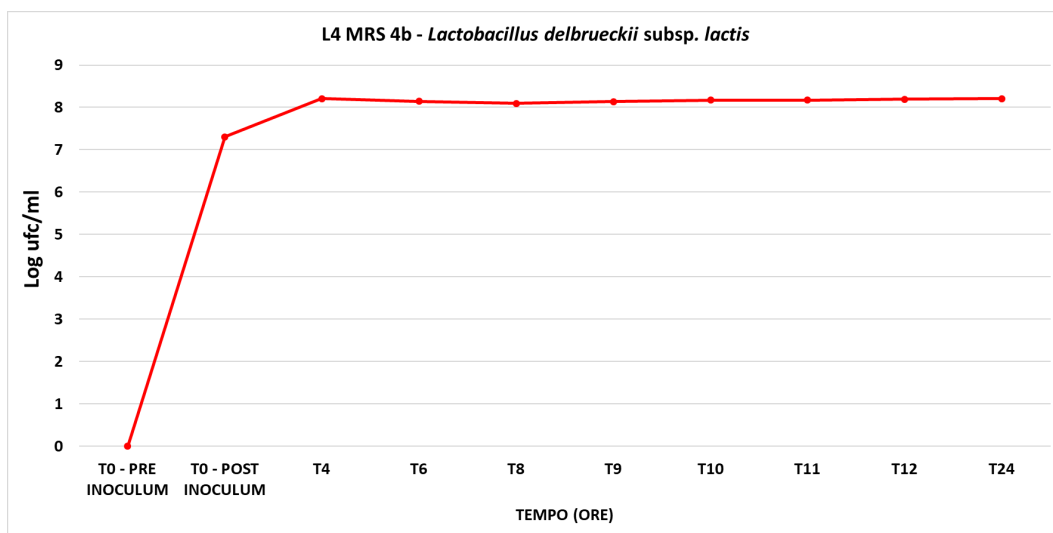


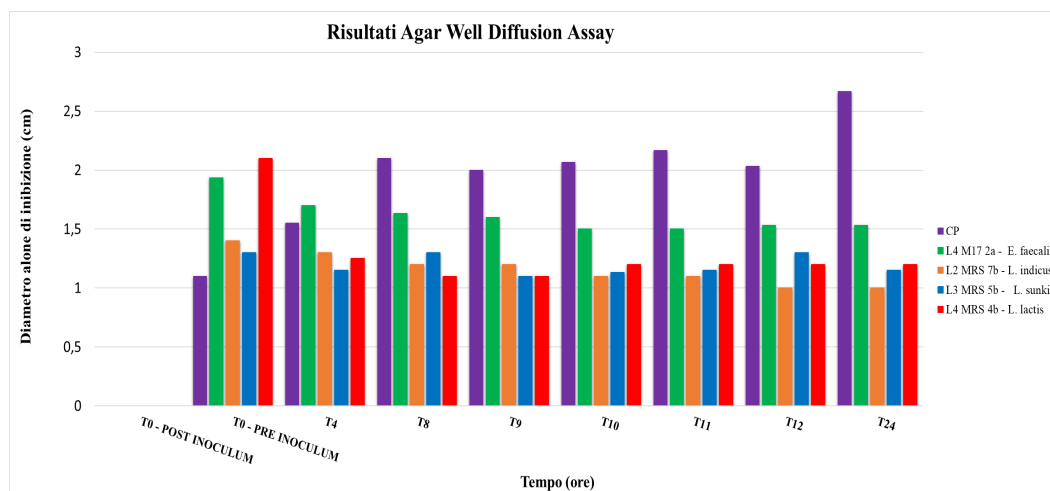
Figura 8.e. Curva di crescita di *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*



I livelli medi dei diversi batteri lattici in scotta non hanno mostrato differenze significative ($p > 0,05$) per tutte le 24 ore di analisi.

I risultati relativi all'attività antimicrobica nei confronti di *L. monocytogenes* valutata mediante AWDA nel corso delle 24 ore dopo inoculo in scotta sono mostrati nella Figura 9. La CP ha mostrato la migliore attività listericida, con un diametro di aloni di inibizione di 2,7 cm a T₂₄. *Enterococcus faecalis* ha mostrato una buona attività nei confronti di *L. monocytogenes in vitro* ma con efficacia decrescente da T₀ (2 cm) a T₂₄ (1,5 cm). I restanti tre microrganismi testati avevano attività antimicrobica nei confronti di *L. monocytogenes* con aloni di inibizione di diametro compreso tra 1 cm e 2,1 cm.

Figura 9. Comparazione dei risultati del AWDA eseguita per lo studio dell'attività antimicrobica di CP e LAB, previa crescita in *scotta*, nei confronti di *L. monocytogenes*. Nell'asse x sono indicati i tempi di prelievo dei campioni e nell'asse y il diametro dell'alone di inibizione (cm) prodotto dai singoli ceppi per tutti i tempi di analisi.



Gli aloni di inibizione prodotti dai LAB e da CP presentavano differenze significative ($p < 0,05$), CP ha prodotto alone di inibizione di diametro superiore rispetto ai LAB, tra questi *E. faecalis* e *L. lactis* hanno mostrato i migliori risultati e non presentavano differenze significative con CP ($p > 0,05$).

Contemporaneamente allo studio della concentrazione microbica e alla valutazione dell'attività anti-*Listeria in vitro*, è stata effettuata la misurazione del pH della *scotta* inoculata con i microorganismi in esame. I risultati relativi all'andamento del pH valutato sulla *scotta* nel corso delle 24 ore post-inoculo della CP e dei LAB sono mostrati nelle figure che seguono.

Figura 10.a. Curva di acidificazione di *Lactobacillus plantarum* (CP)

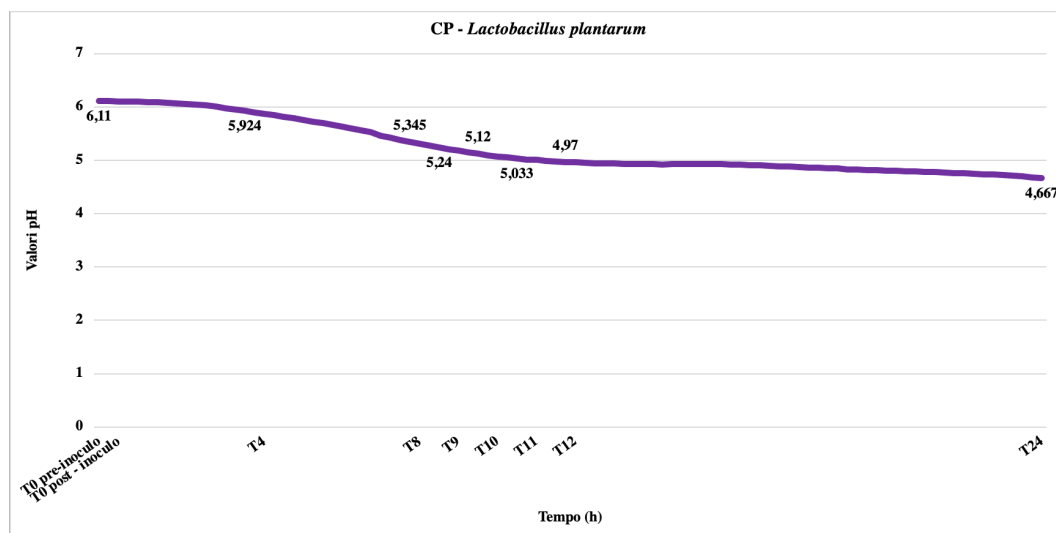
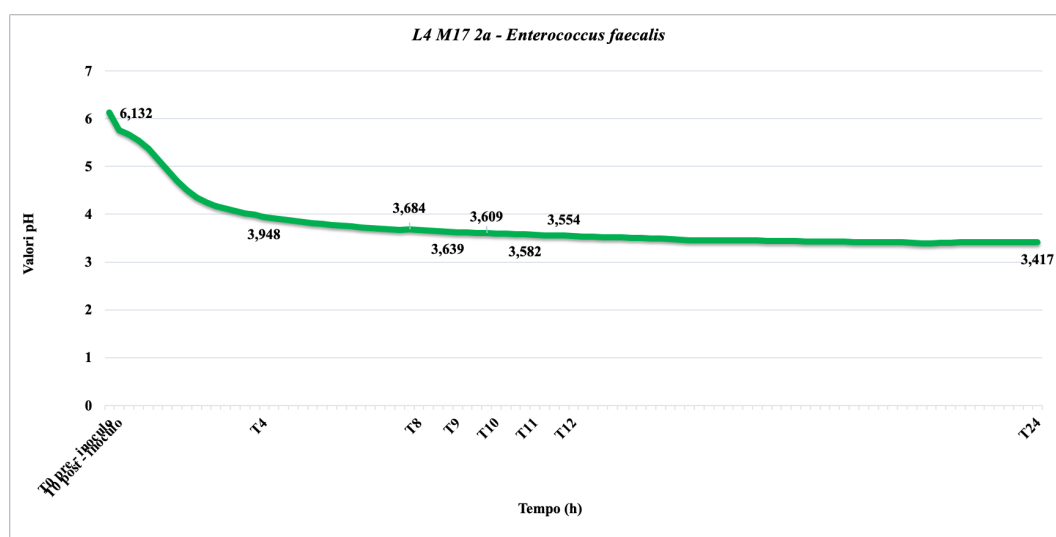


Figura 10.b. Curva di acidificazione di *Enterococcus faecalis*



Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
 Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
 Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
 Università degli Studi di Sassari

Figura 10.c. Curva di acidificazione di *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *indicus*

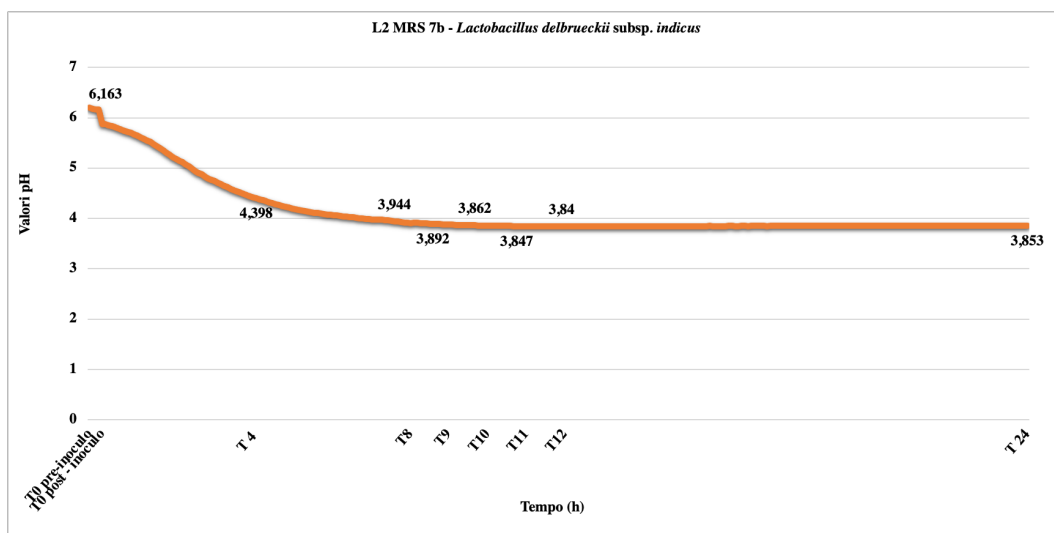
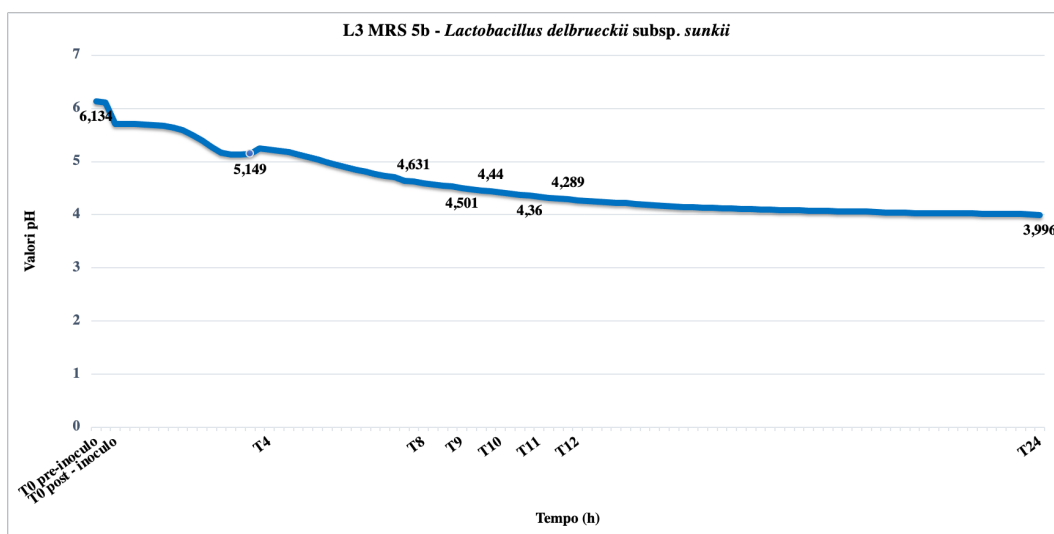
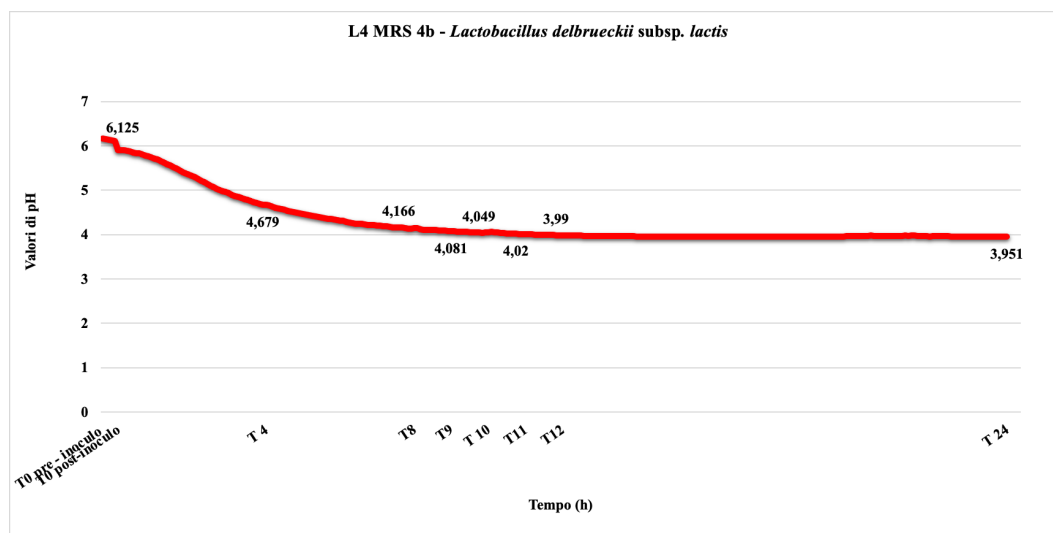


Figura 10.d. Curva di acidificazione di *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *sunkii*



Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
 Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
 Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
 Università degli Studi di Sassari

Figura 10.e. Curva di acidificazione di *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*



I valori di pH iniziali (T₀ pre-inoculo: prima dell'inoculo della CP e dei LAB) per tutti i campioni di *scotta* erano compresi nel range 6,12 – 6,16.

Enterococcus faecalis ha mostrato il maggior potere acidificante. Il valore di pH della *scotta* ha mostrato un rapido decremento durante le prime 4 ore di inoculo, passando da 6,1 a 4,9, per poi raggiungere un pH pari a 3,9 a T₂₄.

Le curve di acidificazione di tutti i microorganismi testati hanno mostrato un rapido decremento della capacità acidificante degli stessi entro le prime 8 ore dopo l'inoculo. Nello specifico, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *indicus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* hanno evidenziato un rapido decremento del pH entro 4 ore dall'inoculo. Il comportamento di acidificazione di tutti i microorganismi testati appare coerente con quello dei batteri lattici.

I valori finali a T₂₄ erano:

- Coltura Protettiva commerciale (*L. plantarum*): 4,66;
- L4 M17 2a (*Enterococcus faecalis*): 3,41;
- L2 MRS 7b (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *indicus*): 3,85;
- L3 MRS 5b (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *sunkii*): 3,99;
- L4 MRS 4b (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*): 3,95.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

3.8. Caseificazione sperimentale su scala pilota

La *Tabella 9* mostra la concentrazione dei microrganismi presenti nelle tre colture madri preparate per ognuna delle caseificazioni realizzate su scala pilota (EP1, EP2, EP3).

Tabella 9. Livelli medi dei batteri lattici nelle colture madri impiegate per le caseificazioni su scala pilota EP1, EP2, EP3.

<i>Coltura madre</i>	<i>Log₁₀ UFC/ml</i> ¹ (media±deviazione standard)
<i>EP1</i> ²	6,7±0,1
<i>EP2</i> ³	8,4±0,2
<i>EP3</i> ⁴	8,4±0,03

¹ Sono espressi in Log₁₀UFC/ml i valori medi delle conte microbiche su piastra ottenuti da prove effettuate in triplicato.

² (EP1): caseificazione su scala pilota con inoculo di *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *sunkii*

³ (EP2): caseificazione su scala pilota con inoculo di *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *indicus*

⁴ (EP3): caseificazione su scala pilota con inoculo di *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* strain KCTC 3035

Sono state osservate differenze per quanto riguarda i livelli medi dei microorganismi lattici nelle tre colture madri. Dopo incubazione a 45°C per 17 ore, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *indicus* (coltura madre EP2) e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (coltura madre EP3) hanno mostrato livelli medi simili, mentre *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *sunkii* (coltura madre EP1) ha evidenziato livelli medi inferiori di circa 2 Log₁₀UFC/ml di.

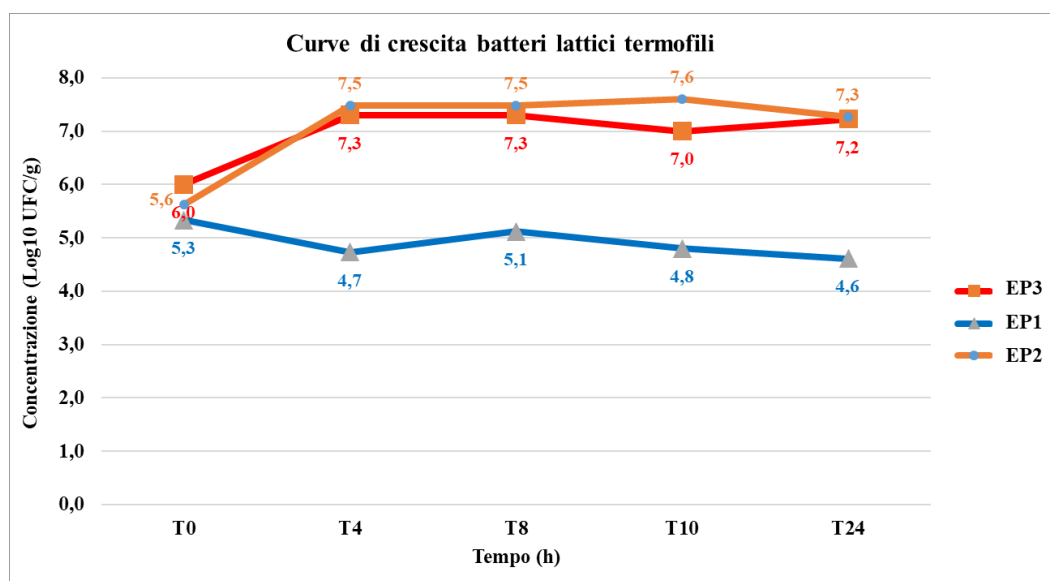
Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

La Figura 11.a mostra le curve di crescita dei microorganismi lattici termofili nelle 3 colture madri nel corso delle prime 24 ore della caseificazione (T₀: cagliata dopo la rottura del coagulo).



Le colture EP2 e EP3 hanno mostrato il raggiungimento del plateau dopo 4 ore con una concentrazione di LAB pari a 7,3 Log₁₀UFC/g e 7,5 Log₁₀UFC/g, rispettivamente.

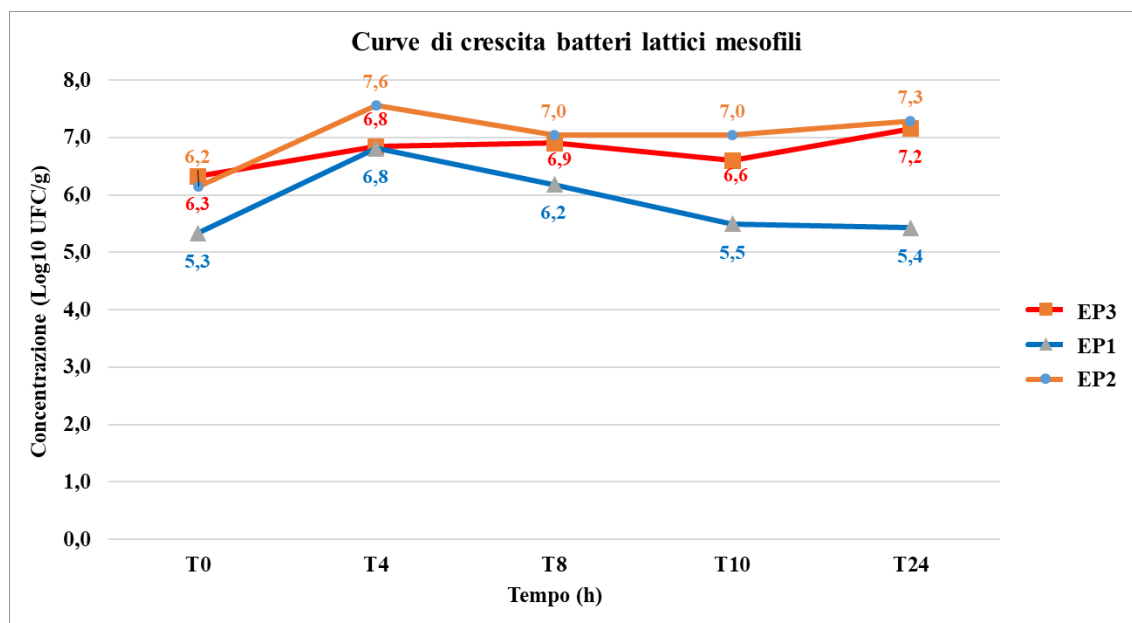
Più moderata è risultata la crescita dei lattici termofili in EP1, dove solo in corrispondenza di T₀ e T₈ sono stati raggiunti livelli pari a 5 Log₁₀UFC/g.

Dopo 24 ore i livelli dei LAB termofili erano i seguenti:

- EP1: 4,6 Log₁₀UFC/g;
- EP2: 7,3 Log₁₀UFC/g;
- EP3: 7,2 Log₁₀UFC/g.

La Figura 11.b. mostra le curve di crescita dei microorganismi lattici mesofili nelle 3 colture madri nel corso delle prime 24 ore della caseificazione (T_0 : cagliata dopo la rottura del coagulo).

Figura 11.b. Curve di crescita batteri lattici mesofili per EP1, EP2 e EP3.

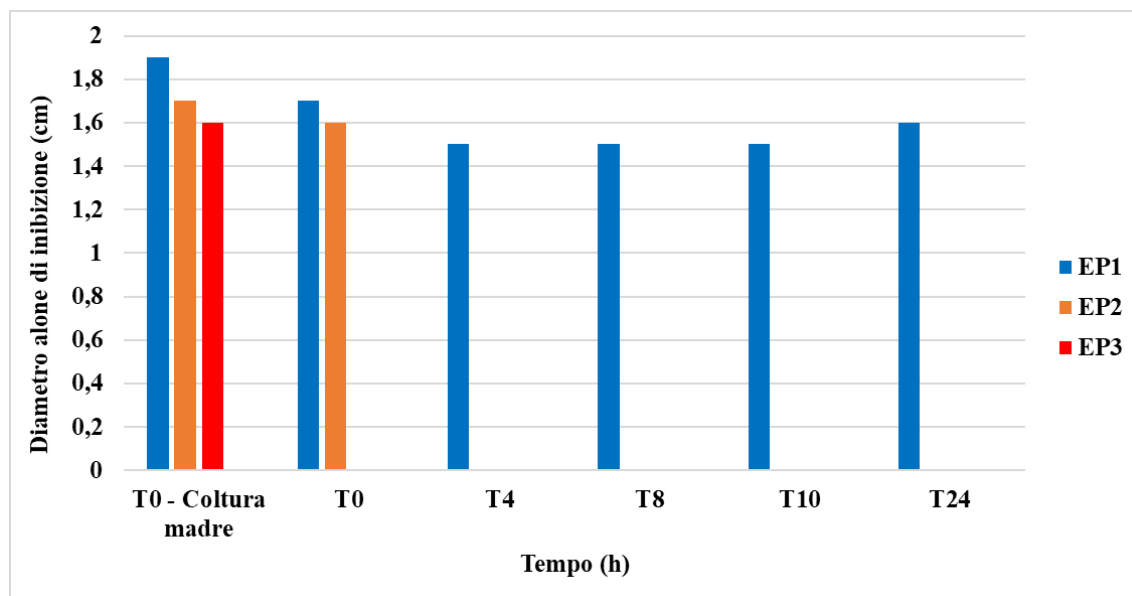


Nella coltura EP1, i batteri lattici mesofili hanno mostrato livelli medi superiori rispetto ai termofili. in corrispondenza di T_4 e T_8 la concentrazione dei LAB mesofili era $> 6 \text{ Log}_{10}\text{UFC/g}$, rispettivamente 6,8 e 6,2 $\text{Log}_{10}\text{UFC/g}$. In seguito, i livelli medi sono andati incontro ad un progressivo decremento fino a T_{24} (5,4 $\text{Log}_{10}\text{UFC/g}$).

Nelle colture EP2 e EP3 i livelli medi del LAB mesofili erano sovrapponibili a quelli osservati per i LAB termofili. A T_{24} i livelli medi dei LAB mesofili erano pari a 7,3 $\text{Log}_{10}\text{UFC/g}$ per EP2 e 7,2 $\text{Log}_{10}\text{UFC/g}$ per EP3.

La *Figura 12* mostra i risultati ottenuti mediante la AWDA sui campioni prelevati nel corso delle prime 24 h della caseificazione.

Figura 12. Risultati ottenuti da Agar Well Diffusion Assay



Nell'asse x sono indicati i tempi di prelievo dei campioni e sull'asse y il diametro dell'alone di inibizione espresso in cm. I dati sono riassunti nella *Tabella 10*.

Tabella 10. Risultati AWDA

TEMPO DI ANALISI	DIMENSIONE ALONE DI INIBIZIONE (cm)		
	EP1 ¹	EP2 ²	EP3 ³
T ₀ - coltura madre	1,9	1,7	1,6
T ₀	1,7	1,6	0
T ₄	1,5	0	0
T ₈	1,5	0	0
T ₁₀	1,5	0	0
T ₂₄	1,6	0	0

¹ (EP1): caseificazione su scala pilota con inoculo di *Lactobacillus delbrueckii subsp. sunkii*

² (EP2): caseificazione su scala pilota con inoculo di *Lactobacillus delbrueckii subsp. indicus*

³ (EP3): caseificazione su scala pilota con inoculo di *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* strain KCTC 3035

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

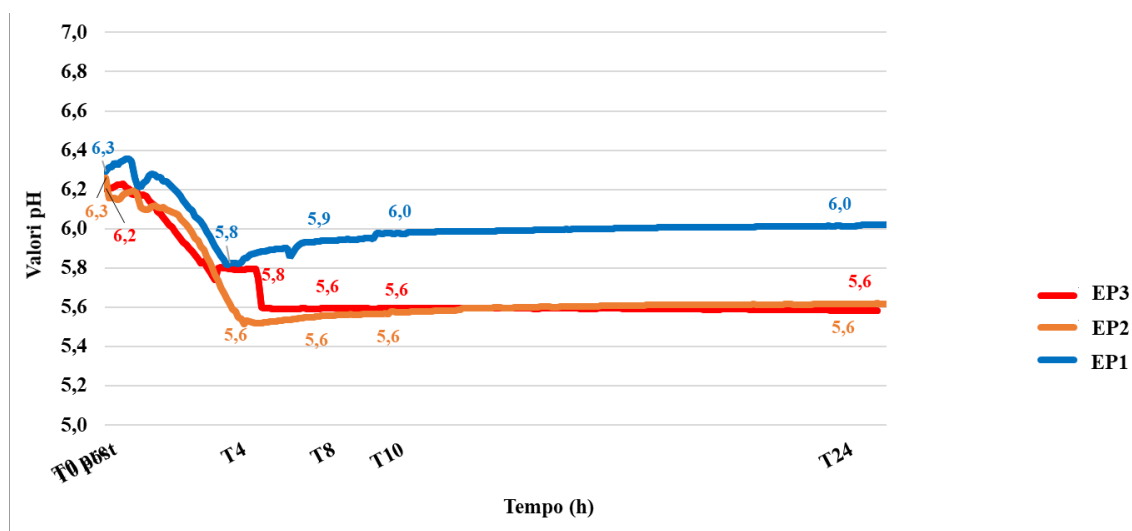
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

I campioni prelevati nel corso della caseificazione sperimentale EP1 sono gli unici ad aver mostrato attività nei confronti di *L. monocytogenes in vitro* nel corso di tutte le 24 ore di analisi, mostrando un alone di inibizione di diametro compreso tra un valore massimo di 1,9 cm e un valore minimo di 1,5 cm. I campioni prelevati da EP2 hanno mostrato attività anti-*Listeria* solo a T₀; mentre una totale assenza di attività anti-*Listeria* è stata riscontrata per i campioni prelevati da EP3. La *Figura 13* mostra l'andamento del pH nel corso delle prime 24 ore di caseificazione per ognuna delle produzioni sperimentali.

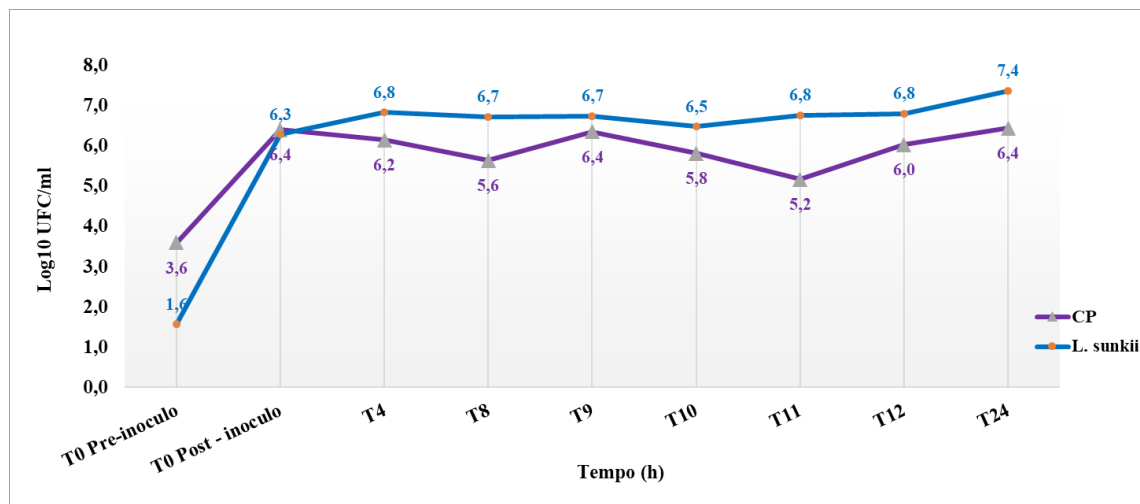
Figura 13. Curve di acidificazione delle caseificazioni sperimentali su scala pilota.



È stato riscontrato un rapido decremento dei valori di pH entro le prime 4 ore per tutte e tre le produzioni sperimentali. I ceppi batterici inoculati in EP2 ed EP3 hanno mostrato un maggior potere acidificante rispetto ai batteri inoculati in EP1. I risultati ottenuti da tutte le fasi sperimentali, hanno pertanto identificato *Lactobacillus delbrueckii subsp. sunkii* come il microrganismo più idoneo da utilizzare come coltura bioprotettiva per il Pecorino Sardo Dolce DOP.

3.9. Adattabilità di CP e di *Lactobacillus delbrueckii subsp. sunkii* al latte

Figura 14. Confronto delle curve di crescita di CP e *L. sunkii* in latte ovino trattato termicamente.



La curva di crescita di *L. sunkii* ha mostrato un aumento dei livelli medi ($\text{Log}_{10}\text{UFC/ml} \pm \text{deviazione standard}$) di circa 6 Log_{10} nel corso di 24 ore. La concentrazione di microrganismi riscontrata nel latte prima dell'inoculo di *L. sunkii* era pari a $1,6 \pm 0,4$, mentre dopo l'inoculo del lattobacillo, al termine delle 24 ore di analisi, era $7,4 \pm 0,2$.

La curva di crescita relativa all'inoculo di CP nel latte ha mostrato un incremento dei livelli medi di circa 3 $\text{Log}_{10}\text{UFC/ml}$ dei microorganismi lattici nel corso di 24 ore. I microorganismi lattici sono passati da livelli medi ($\text{Log}_{10}\text{UFC/ml} \pm \text{deviazione standard}$) pari a $3,6 \pm 0,1$ a T_0 , a $6,4 \pm 0,4$ al termine delle 24 ore di analisi.

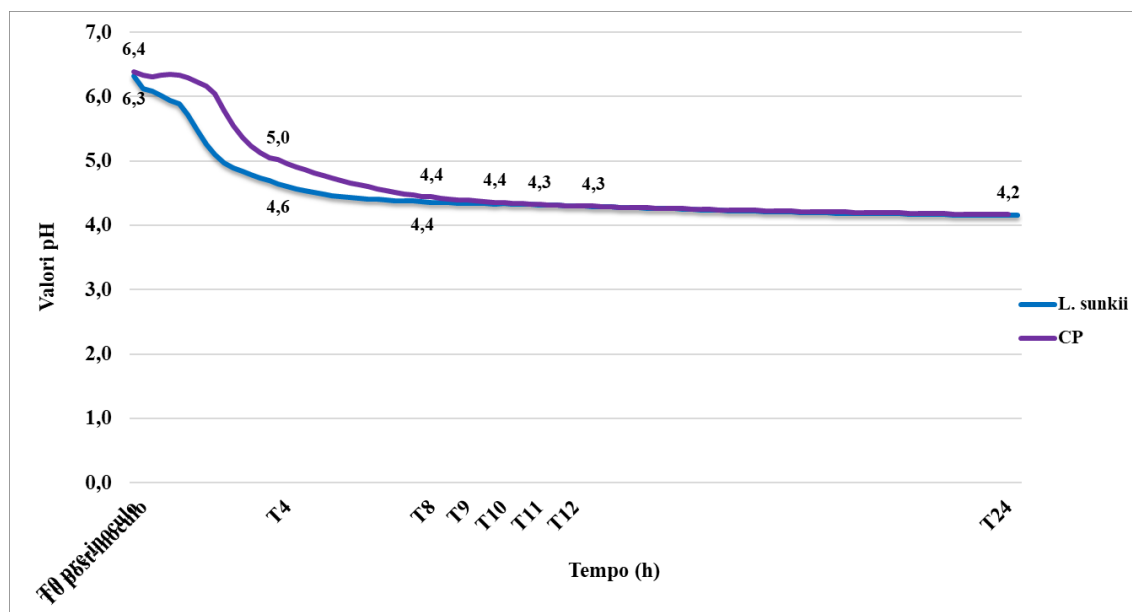
Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

Figura 15. Curva di acidificazione di CP e *L. sunkii* inoculati in LOT.



Il potere acidificante dei due batteri testati nel latte è risultato sovrapponibile. Il valore di pH del *LOT* prima dell'inoculo dei microrganismi era compreso tra 6,3 e 6,4, mentre dopo 24 ore dall'inoculo i valori di pH rilevati erano 4,3 in tutte le prove.

Tabella 11. Sono mostrati i risultati dell'AWDA dei campioni di LOT inoculato con CP e *L. sunkii*.

<i>Tempo di prelievo del campione</i>	<i>Diametro dell'alone di inibizione</i> (media cm±deviazione standard)	
	CP ¹	<i>L. sunkii</i> ²
T₀ pre-inoculo	0,0	0,0
T₀ post-inoculo	1,1 ³ ± 0,0	1,0 ± 0,0
T₄	1,4 ± 0,2	0,3 ± 0,6
T₈	1,8 ± 0,4	1,2 ± 0,1
T₉	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,1
T₁₀	1,8 ± 0,1	1,1 ± 0,1
T₁₁	1,7 ± 0,1	1,2 ± 0,1
T₁₂	1,5 ± 0,1	1,2 ± 0,1
T₂₄	2,4 ± 0,0	1,4 ± 0,0

¹ CP: *L. plantarum* produttore di batteriocine (coltura protettiva commerciale, Lyofast LPAL, Sacco System)

² *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *sunkii* (LAB autoctono termofilo isolato da latte crudo)

³ I valori sono stati ottenuti dalla media delle prove eseguite in triplicato con la relativa deviazione standard tra parentesi

3.10. Challenge test

La tabella di seguito mostra i risultati relativi ai livelli medi ($\log_{10}$ CFU/ml $\pm$ deviazione standard) dei LAB nei campioni di scotta-innesto inoculati con Lyofast LPAL, prodotta da Sacco System, composta da un ceppo selezionato di *Lactobacillus plantarum* produttore di batteriocine (PSA) e *Lactobacillus delbrueckii subsp. sunkii* (PSB) e analizzati 17 ore dopo l'inoculo.

Tabella 12. Livelli medi ($\log_{10}$ CFU/g $\pm$ deviazione standard) dei batteri lattici presenti nella scotta-innesto.

<i>Campioni</i>	<i>LAB</i>		
	Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3
<i>Scotta-innesto PSA</i> ¹	7,7 $\pm$ 0,1 ³	6,2 $\pm$ 0,1	7,6 $\pm$ 0,2
<i>Scotta-innesto PSB</i> ²	7,7 $\pm$ 0,3	6,6 $\pm$ 0,0	6,8 $\pm$ 0,1

¹ Scotta-innesto prodotta inoculando *Lactobacillus plantarum* (Lyofast LPAL, Sacco System)

² Scotta-innesto prodotta inoculando *Lactobacillus delbrueckii subsp. sunkii*.

³ Risultati della media delle conte su piastra eseguite in triplicato $\pm$ deviazione standard.

3.10.1. Profilo microbico e parametri chimico-fisici

Le tabelle che seguono mostrano i risultati della valutazione del pH e dell' a_w (Tabella 13), della determinazione dei livelli medi dei batteri lattici mesofili e termofili, e dell'analisi qualitativa e quantitativa di *L. monocytogenes* (Tabella 14) relativi ai tre lotti di produzione nel corso del challenge test.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

Tabella 13. Challenge test: Risultati dello studio dei parametri chimico-fisici. I dati relativi a pH e a_w rappresentano la media delle misurazioni ottenute dai tre lotti analizzati.

T stoc¹	ID Campione e Tempo di analisi		pH	Aw
	PSA³	<i>T0 - CR</i>	6,5 ± 0,1	0,995 ± 0,0
		<i>T0 - CS</i>	5,4 ± 0,2	0,992 ± 0,0
	PSB⁴	<i>T0 - CR</i>	6,5 ± 0,0	0,997 ± 0,0
		<i>T0 - CS</i>	5,4 ± 0,1	0,994 ± 0,0
	CTRL⁵	<i>T0 - CR</i>	6,5 ± 0,1	0,996 ± 0,0
		<i>T0 - CS</i>	5,5 ± 0,3	0,993 ± 0,0
4°C	PSA-bianco²	<i>T21</i>	4,9 ± 0,1	0,982 ± 0,0
	PSA	<i>T21</i>	5,0 ± 0,1	0,988 ± 0,0
	PSB-bianco	<i>T21</i>	4,9 ± 0,0	0,983 ± 0,0
	PSB	<i>T21</i>	5,0 ± 0,1	0,988 ± 0,0
	CTRL-bianco	<i>T21</i>	4,9 ± 0,1	0,980 ± 0,0
	CTRL	<i>T21</i>	4,9 ± 0,1	0,988 ± 0,0
	PSA-bianco	<i>T90</i>	4,9 ± 0,1	0,971 ± 0,0
	PSA	<i>T90</i>	4,9 ± 0,1	0,973 ± 0,0
	PSB-bianco	<i>T90</i>	4,9 ± 0,1	0,970 ± 0,0
	PSB	<i>T90</i>	4,9 ± 0,0	0,966 ± 0,0
	CTRL-bianco	<i>T90</i>	4,8 ± 0,1	0,968 ± 0,0
	CTRL	<i>T90</i>	4,8 ± 0,1	0,969 ± 0,0
10°C	PSA-bianco	<i>T21</i>	4,9 ± 0,1	0,975 ± 0,0
	PSA	<i>T21</i>	5,0 ± 0,1	0,982 ± 0,0
	PSB-bianco	<i>T21</i>	5,0 ± 0,0	0,983 ± 0,0
	PSB	<i>T21</i>	5,0 ± 0,1	0,989 ± 0,0
	CTRL-bianco	<i>T21</i>	5,0 ± 0,0	0,984 ± 0,0

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

CTRL	<i>T21</i>	4,9 ± 0,0	0,987 ± 0,0
PSA-bianco	<i>T90</i>	4,9 ± 0,0	0,962 ± 0,0
PSA	<i>T90</i>	4,9 ± 0,1	0,967 ± 0,0
PSB-bianco	<i>T90</i>	4,9 ± 0,1	0,966 ± 0,0
PSB	<i>T90</i>	4,9 ± 0,0	0,973 ± 0,0
CTRL-bianco	<i>T90</i>	4,8 ± 0,1	0,964 ± 0,0
CTRL	<i>T90</i>	4,8 ± 0,1	0,976 ± 0,0

¹ T stoc: temperatura di stoccaggio degli spicchi per tutta la durata del challenge test. (4°C, per simulare condizioni di conservazione corrette; 10°C, per simulare un abuso termico).

² bianco: I campioni contrassegnati con questa dicitura sono spicchi non contaminati sperimentalmente con *L. monocytogenes*. Rappresentano un controllo sperimentale.

³ PSA: formaggio con inoculo di *L. plantarum* produttore di batteriocine (coltura protettiva commerciale, Lyofast LPAL, Sacco System)

⁴ PSB: formaggio con inoculo di *Lactobacillus delbrueckii subsp. sunkii* (LAB autoctono termofilo isolato da latte crudo)

⁵ CTR: produzione controllo senza inoculo di colture bioprotettive

Dal confronto dei dati ottenuti per le diverse tipologie di prodotto, è emerso che non ci sono differenze significative ($p > 0,05$) relativamente all'attività dell'acqua in prodotti inoculati (PSA e PSB) e non inoculati (CTRL) con colture bioprotettive per tutta la shelf-life. PSA e PSB invece, presentavano valori significativamente più elevati di pH rispetto a CTRL a T_{90} ($p < 0,01$). L'andamento del pH ha mostrato un calo significativo ($p < 0,01$) tra T_0 ($6,0 \pm 0,6$ e T_{21}). Un'ulteriore diminuzione, seppure non significativa del pH è stata riscontrata tra T_{21} e T_{90} ($4,9 \pm 0,1$). Anche l' a_w è andata incontro ad un significativo calo ($p < 0,01$) dei valori medi sia tra T_0 ($0,995 \pm 0,0$) e T_{21} ($0,985 \pm 0,0$) che tra T_{21} e T_{90} ($0,966 \pm 0,0$).

Non sono state osservate differenze significative ($p > 0,05$), per i valori di pH e a_w , in relazione alla conservazione dei prodotti a temperatura di refrigerazione corretta (4°C) e in condizioni di abuso termico (10°C). La temperatura di stoccaggio non ha influenzato le variazioni dei parametri intrinseci.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

Tabella 14. Challenge test: studio dei parametri microbiologici. I valori espressi in tabella sono il risultato della media dei dati dei tre lotti analizzati.

Analisi microbiologica Challenge test						
T stoc ¹	ID Campione e Tempo di analisi		LAB 45°C ²	LAB 30°C ³	Lm QL ⁴	Lm QT ⁵
	PSA ⁷	T0 - CR	6,2 ± 0,3	7,8 ± 0,4	0 ± 0,0	-
		T0 - CS	6,7 ± 0,1	6,8 ± 0,1	0 ± 0,0	-
	PSB ⁸	T0 - CR	6,5 ± 0,1	7,5 ± 0,4	0 ± 0,0	-
		T0 - CS	6,7 ± 0,5	6,8 ± 0,3	0 ± 0,0	-
	CTRL ⁹	T0 - CR	5,8 ± 0,3	7,5 ± 0,8	0 ± 0,0	-
		T0 - CS	6,3 ± 0,7	6,7 ± 0,4	0 ± 0,0	-
4°C	PSA-bianco ⁶	T21	8,0 ± 0,2	7,8 ± 0,3	0 ± 0,0	-
	PSA	T21	8,2 ± 0,4	7,9 ± 0,4	1,2 ± 1,0	4/6
	PSB-bianco	T21	7,8 ± 0,1	8,1 ± 0,1	0 ± 0,0	-
	PSB	T21	8,0 ± 0,1	8,1 ± 0,2	1,6 ± 0,2	5/6
	CTRL-bianco	T21	7,8 ± 0,5	7,9 ± 0,3	0 ± 0,0	-
	CTRL	T21	7,6 ± 0,3	7,9 ± 0,2	0,9 ± 0,8	5/6
	PSA-bianco	T90	7,7 ± 0,4	7,9 ± 0,4	0 ± 0,0	-
	PSA	T90	7,7 ± 0,3	7,8 ± 0,2	0 ± 0,0	3/6
	PSB-bianco	T90	7,6 ± 0,3	6,7 ± 1,3	0 ± 0,0	-
	PSB	T90	7,5 ± 0,4	7,0 ± 0,8	0 ± 0,0	-
	CTRL-bianco	T90	7,5 ± 0,3	6,9 ± 0,7	0 ± 0,0	-
	CTRL	T90	7,6 ± 0,1	7,2 ± 0,6	0 ± 0,0	4/6
10°C	PSA-bianco	T21	8,1 ± 0,4	7,8 ± 0,7	0 ± 0,0	-
	PSA	T21	8,0 ± 0,2	8,0 ± 0,5	1,6 ± 0,2	5/6
	PSB-bianco	T21	7,5 ± 0,3	7,9 ± 0,2	0 ± 0,0	-
	PSB	T21	8,0 ± 0,1	8,1 ± 0,1	0,6 ± 0,9	5/6
	CTRL-bianco	T21	7,9 ± 0,4	7,9 ± 0,2	0 ± 0,0	-
	CTRL	T21	7,8 ± 0,1	7,8 ± 0,2	1,4 ± 0,3	5/6
	PSA-bianco	T90	8,0 ± 0,3	8,0 ± 0,3	0 ± 0,0	-
	PSA	T90	7,8 ± 0,1	8,0 ± 0,2	0 ± 0,0	2/6
	PSB-bianco	T90	7,3 ± 0,4	7,3 ± 0,5	0 ± 0,0	-
	PSB	T90	7,6 ± 0,4	7,4 ± 0,6	0 ± 0,0	2/6
	CTRL-bianco	T90	7,4 ± 0,1	7,1 ± 0,7	0 ± 0,0	-
	CTRL	T90	7,4 ± 0,2	6,5 ± 0,7	0 ± 0,0	3/6

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

- ¹ T stoc: temperatura di stoccaggio degli spicchi per tutta la durata del challenge test. (4°C, per simulare condizioni di conservazione corrette; 10°C, per simulare un abuso termico).
- ² Conta lattici (45°C): risultati dell'enumerazione dei batteri lattici termofili. I dati sono espressi in Log₁₀UFC/g della media di tutti i valori con tra parentesi la deviazione standard.
- ³ Conta lattici (30°C): risultati dell'enumerazione dei batteri lattici mesofili (ISO 15214:1998). I dati sono espressi in Log₁₀UFC/g della media di tutti i valori con tra parentesi la deviazione standard.
- ⁴ Lm QT: determinazione quantitativa di *L. monocytogenes* (ISO 11290-2: 2017). È indicata la media del Log₁₀UFC/g di tutti i dati ottenuti la deviazione standard in parentesi.
- ⁵ Lm QL: determinazione qualitativa di *L. monocytogenes* (ISO 11290-1: 2017)
- ⁶ bianco: I campioni contrassegnati con questa dicitura sono spicchi non contaminati sperimentalmente con *L. monocytogenes*. Rappresentano un controllo sperimentale.
- ⁷ PSA: formaggio con inoculo di *L. plantarum* produttore di batteriocine (coltura protettiva commerciale, Lyofast LPAL, Sacco System)
- ⁸ PSB: formaggio con inoculo di *Lactobacillus delbrueckii subsp. sunkii* (LAB autoctono termofilo isolato da latte crudo)
- ⁹ CTR: produzione controllo senza inoculo di colture bioprotettive

I livelli medi (Log₁₀UFC/g $\pm$ deviazione standard) dei microorganismi lattici termofili nel corso della conservazione erano pari a 6,4 $\pm$ 0,3 a T₀, 7,9 $\pm$ 0,2 a T₂₁ e 7,6 $\pm$ 0,2 a T₉₀ con un incremento significativo tra T₀ e T₂₁ (p<0,01) e un calo (p<0,05) di 0,3 Log a fine shelf-life T₉₀. Anche i livelli medi dei microorganismi lattici mesofili hanno mostrato differenze significative con un aumento (p<0,01) da T₀ (7,2 $\pm$ 0,5) a 7,9 $\pm$ 0,1 a T₂₁ per poi subire un nuovo calo (p<0,01) e tornare a valori sovrapponibili a quelli di T₀ a fine shelf-life (7,3 $\pm$ 0,5). La comparazione dei livelli medi delle due tipologie di lattici (mesofili e termofili), in relazione ai tempi di analisi, non ha evidenziato significative differenze (p>0,05). La stessa evidenza (p>0,05) è stata riscontrata relativamente ai livelli medi delle due tipologie di batteri lattici in relazione alle temperature di stoccaggio impiegate durante la sperimentazione (conservazione a temperatura corretta 4°C e abuso termico 10°C);

mostrando che la temperatura di conservazione non influenza la capacità di crescita dei batteri lattici.

È stata analizzata statisticamente la variazione della presenza dei LAB termofili e mesofili in relazione alle diverse tipologie di campioni, inoculati (PSA e PSB) e non inoculati (CTRL) con colture bioprotettive (tabella)

Non sono state riscontrate differenze significative per tutte le tipologie di campioni a T_{21} ($p>0,05$) sia nel caso dei LAB termofili che dei LAB mesofili. La stessa evidenza è emersa nel caso di PSB e CTRL a T_{90} ($p>0,05$). Al contrario, la concentrazione dei LAB termofili di PSA a T_{90} risultava significativamente maggiore ($p<0,05$) rispetto a quella riscontrata in PSB e CTRL. Anche in relazione ai LAB mesofili, come da previsioni, la concentrazione in PSA era significativamente superiore ($p<0,01$) rispetto a PSB e CTRL.

Come atteso, *L. monocytogenes* è risultata assente a T_0 sia con la metodica qualitativa che con la quantitativa (ISO 11290-1: 2017; ISO 11290-2: 2017). Mediante la metodica quantitativa sono stati riscontrati livelli pari compresi tra 0,3 e 1,8 $\text{Log}_{10}\text{UFC/g}$ a T_{21} e assenza (a T_{90}); non sono state rilevate differenze significative ($p>0,05$) in riferimento ai dati ottenuti dai campioni stoccati alle due differenti temperature (4°C e 10°C). Mediante metodica qualitativa è stato possibile isolare *L. monocytogenes* dal 43,9 % (54/123) dei campioni CTRL, dal 26,8 % (33/123) da campioni PSB e dal 29,3 % (36/123) da campioni PSA. Come rilevato per l'analisi quantitativa, anche in questo caso non sono emerse differenze significative ($p>0,05$) sulla presenza di *L. monocytogenes* in merito alle differenti temperature di stoccaggio dei campioni (4°C e 10°C). La temperatura non influiva sulla capacità del patogeno di svilupparsi. Nel complesso, le due colture bioprotettive si sono dimostrate pertanto efficaci nei confronti *L. monocytogenes*.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

CAPITOLO IV: DISCUSSIONE

L'obiettivo del presente lavoro era lo studio di sistemi innovativi per migliorare la sicurezza alimentare del Pecorino Sardo Dolce DOP che, per composizione e caratteristiche intrinseche (pH, a_w), può risultare permissivo per lo sviluppo di *L. monocytogenes*.

L'attività di ricerca ha riguardato:

- l'individuazione di siti di contaminazione ambientale da *L. monocytogenes* presso uno caseificio di produzione del Pecorino Sardo Dolce DOP situato sul territorio regionale;
- l'individuazione e l'adozione di colture bioprotettive finalizzata a contrastare la crescita di *L. monocytogenes*;
- la conduzione di un challenge test per valutare l'efficacia delle colture bioprotettive nei confronti di *L. monocytogenes* in Pecorino Sardo Dolce DOP artificialmente inoculato.

I campionamenti ambientali presso l'azienda di produzione del Pecorino Sardo Dolce DOP hanno rilevato la presenza di *L. monocytogenes* nel 32,1% (9/28) dei campioni, tutti prelevati da superfici non a contatto con alimenti.

Mediante la metodica quantitativa, *L. monocytogenes* è stata isolata solo in un campione prelevato dal pavimento dell'area lavaggio formaggi (1,78 Log₁₀ UFC/ml), sito spesso interessato dalla presenza di *L. monocytogenes* e altri microorganismi patogeni (Dzieciol *et al.*, 2016). L'indagine molecolare eseguita su 30 isolati di *L. monocytogenes* ha consentito di identificare il sierogruppo 1/2a in 28/30 ceppi (93%) e il sierogruppo 4b in 2/30 (6,7%). Il riscontro di ceppi di *L. monocytogenes* 1/2a e 4b è coerente con quanto descritto in precedenti studi eseguiti presso caseifici ovini presenti sul territorio regionale (Ibba *et al.*, 2013, Spanu *et al.*, 2015); in particolare, anche nel presente studio, gli isolati 1/2a risultavano i più frequenti tra i sierogruppi identificati (Coroneo, *et al.*, 2016; Acciari *et al.*, 2016).

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

È noto che *L. monocytogenes* abbia la capacità di formare biofilm e quindi persistere negli ambienti di lavorazione degli alimenti (Colagiorgi *et al.*, 2017). La formazione di biofilm varia in base al sierotipo, al lineage, all'origine dell'isolamento e a fattori intrinseci ed estrinseci. Nonostante la controversa correlazione tra sierotipo/lineage e la capacità di formazione di biofilm, in taluni casi, ceppi di lineage I hanno mostrato una maggior attitudine alla produzione di biofilm rispetto ai ceppi di lineage II, mentre in altri casi i ceppi 1/2a e/o 1/2c (lineage II) mostravano una maggior produzione di biofilm rispetto ai ceppi 4b (lineage I) (Kadam *et al.*, 2013)

I sierotipi di *L. monocytogenes* 1/2a, 1/2b e 4b rappresentano oltre il 95% degli isolati da casi di malattia nell'uomo (Pan *et al.*, 2009; Mashak *et al.*, 2021; Bouymajane *et al.*, 2021). La corretta applicazione delle pratiche igieniche e di lavorazione e delle procedure di pulizia e sanificazione, è fondamentale per evitare la contaminazione con *L. monocytogenes* negli stabilimenti di produzione di alimenti (Kurpaset *et al.*, 2018). Il controllo di questo agente patogeno negli impianti di lavorazione è una delle sfide più difficili per la sicurezza alimentare perché *L. monocytogenes* si adatta facilmente a condizioni ambientali caratteristiche di queste strutture (Almeida *et al.*, 2013). Poiché il sierotipo 4b di *L. monocytogenes* (identificato nel presente studio) è il più frequente tra gli isolati in casi di malattia nell'uomo e considerando che i ceppi appartenenti al sierotipo 1/2a (rilevati nel presente studio) sono solitamente isolati dagli alimenti (Borucki *et al.*, 2003), appare di primaria importanza implementare le misure che ostacolano lo sviluppo e la persistenza del patogeno.

Già da diversi anni sono in corso numerose indagini che valutano l'utilizzo di alcune specie di batteri lattici come colture bioprotettive al fine di ostacolare la crescita di *L. monocytogenes* negli alimenti RTE (Stiles, 1996; Camargo *et al.*, 2018; Yap *et al.*, 2021; Martín *et al.*, 2022). Nel presente studio è stata testata l'attività anti-*Listeria* di una coltura protettiva commerciale costituita da un ceppo di *Lactobacillus plantarum* produttore di batteriocine. Parallelamente, per rispettare

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

quanto indicato nel disciplinare del Pecorino Sardo DOP, sono stati isolati ceppi di batteri lattici autoctoni da *latte crudo* ovino proveniente dal territorio regionale. Sono stati selezionati unicamente batteri termofili al fine di consentirne l'inoculo durante la tecnologia di produzione del formaggio, e sono stati testati per le loro capacità di inibire la crescita di *L. monocytogenes in vitro*. I livelli medi dei microrganismi lattici mediante l'utilizzo dei tre diversi terreni di coltura sono risultati significativamente inferiori ($p < 0,01$) in MRS 5,5 rispetto a quelli ottenuti in L-M17 e B-Elliker. Tuttavia, solo un ceppo isolato da L-M17 ha mostrato attività anti-*Listeria in vitro*. I restanti ceppi risultati positivi al test AWDA erano stati isolati da terreno MRS 5,5. In accordo con precedenti studi, il terreno di coltura MRS è considerato il più idoneo per l'isolamento e la crescita di batteri lattici ad azione bioprotettiva (Daba *et al.*, 1993; Todorov & Dicks, 2006).

I test di screening eseguiti mediante AWDA hanno mostrato che solo la CP aveva attività listericida *in vitro* utilizzando il surnatante privo di cellule (CFS): l'esistenza di ceppi di *L. plantarum* produttori di batteriocine è ampiamente documentata in letteratura (Ennahar *et al.*, 1998; Loessner *et al.*, 2003; Sip *et al.*, 2012; da Silva Sabo *et al.*, 2014). Per ciò che concerne l'attività inibente dei LAB nei confronti di *L. monocytogenes*, dai risultati ottenuti è deducibile che questa non sia dovuta a sostanze di natura proteica (batteriocine). L'efficacia anti-*Listeria* di alcuni LAB al test AWDA può essere attribuita alla produzione di metaboliti antimicrobici come acidi organici (acido lattico e acetico), acqua ossigenata, anidride carbonica, etanolo, diacetile, che sono stati documentati come antagonisti di molti batteri patogeni (Soomro *et al.*, 2002; Srivastava *et al.*, 2017).

Preliminarmente alla scelta del potenziale LAB più idoneo all'impiego come coltura bioprotettiva nella produzione del Pecorino Sardo Dolce DOP, sono stati eseguiti test utilizzando la *scotta* come substrato di coltura. La *scotta*, residuo della lavorazione della ricotta, è abitualmente utilizzata nell'industria lattiero-casearia per la produzione della *scotta-innesto* (Chessa *et al.*, 2019), e presenta una carica microbica pari a 0 UFC/ml. Queste caratteristiche hanno consentito di individuarla

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

come substrato di crescita ideale per l'inoculo dei potenziali LAB e di CP durante il processo di produzione del Pecorino Sardo Dolce DOP. Dal confronto dei risultati ottenuti mediante test AWDA previa crescita dei microrganismi nei terreni di coltura convenzionali e in *scotta*, non sono emerse differenze significative ($p > 0,05$) relativamente alle dimensioni degli aloni di inibizione rilevati nelle varie prove.

La caratterizzazione a livello molecolare mediante sequenziamento rRNA 16S dei LAB ha contribuito ad individuare la coltura bioprotettiva più idonea per il Pecorino Sardo Dolce DOP. Il ceppo identificato come *Enterococcus faecalis* è stato scartato in quanto non utilizzabile per l'inoculo in alimenti a causa della sua patogenicità (Anderson *et al.*, 2016); gli altri sei batteri sono stati identificati come lattobacilli. Per indagare in maniera più dettagliata l'adattabilità dei LAB e di CP alle matrici lattiero-casearie, è stata valutata la cinetica di crescita e di acidificazione dei microrganismi inoculati in *scotta* ed è stata valutata la loro capacità di inibire *L. monocytogenes in vitro* per 24 ore. Dai dati rinvenuti in bibliografia è possibile confrontare la concentrazione dei LAB in *scotta* con quella dei batteri lattici tradizionalmente impiegati per la produzione della *scotta-innesto*, substrato ampiamente utilizzato durante la caseificazione. A T₂₄, le concentrazioni dei LAB raggiungevano 10⁷-10⁸ UFC/ml, dati sovrapponibili a quelli ottenuti dall'enumerazione dei microrganismi starters costituenti la *scotta-innesto* (Mannu *et al.*, 2002), questo conferma che la *scotta* è un ottimo medium di coltura per i LAB. Anche la valutazione dell'attività anti-*Listeria in vitro* dei ceppi inoculati in *scotta*, ha dato risultati positivi: tutti i microrganismi hanno mostrato inibizione nei confronti di *L. monocytogenes* per 24 ore. Studi sulla biodiversità della *scotta-innesto*, hanno rilevato la presenza di batteri lattici ad attività listericida (Chessa *et al.*, 2021). Infatti, come riscontrato nel presente studio, la *scotta* non altera le capacità antimicrobiche dei microrganismi e può rappresentare la matrice d'inoculo ideale delle colture protettive durante la tecnologia di produzione dei formaggi.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

Preliminarmente al challenge test, sono state eseguite tre caseificazioni sperimentali su scala pilota con l'obiettivo di individuare il lattobacillo autoctono bioprotettivo più idoneo all'inoculo durante la tecnologia di produzione del Pecorino Sardo DOP. Relativamente ai LAB testati in questa fase, i livelli medi di *L. indicus* e di *L. lactis* (10^7 - 10^8 UFC/g) dopo 24 ore, sono risultati sovrapponibili a quelli ottenuti in precedenti studi per lattobacilli bioprotettivi (Leyva Salas *et al.*, 2018; Garnier *et al.*, 2019). I livelli medi di *L. sunkii* (10^4 - 10^5 UFC/g) erano invece significativamente ($p < 0,05$) inferiori rispetto agli altri batteri lattici. Tuttavia, solo nei campioni derivati dal formaggio sperimentale inoculato con *L. sunkii* (EP1) è stato possibile rilevare un'attività antimicrobica nei confronti di *L. monocytogenes* per 24 ore. Tale risultato dimostra che l'attività anti-*Listeria* non sia strettamente correlata alla concentrazione dei LAB e che *L. sunkii* sia efficace contro *L. monocytogenes* nonostante presente in concentrazione inferiore rispetto agli altri LAB. Sulla base di queste considerazioni, *Lactobacillus delbrueckii subsp. sunkii* e *Lactobacillus plantarum* produttore di batteriocine presente nella coltura protettiva commerciale, sono stati scelti per la conduzione del challenge test.

I prodotti lattiero-caseari, hanno rilevanza economica a livello nazionale e nello specifico, la Sardegna è una regione leader per le esportazioni di formaggi pecorini, con un valore aggiunto lordo di ca. 320 milioni di euro all'anno, nonché la prima regione dell'Unione Europea per la produzione di latte ovino (13% del totale) (Atzori, *et al.*, 2022). Il Pecorino Sardo Dolce DOP appartiene alla categoria degli alimenti ready-to-eat e quindi non viene sottoposto a ulteriori trattamenti termici prima del consumo. Se un alimento non rispetta i criteri microbiologici sulla presenza di *L. monocytogenes* secondo il regolamento (CE) n. 2073/2005, l'operatore del settore alimentare (OSA) applica misure di ritiro/riciamo del prodotto. È evidente che, per un'azienda, tali provvedimenti siano lesivi sia dal punto di vista economico che di immagine. Secondo il regolamento (CE) n. 2073/2005 gli OSA devono condurre studi sulla shelf-life per gli alimenti RTE al fine di garantire che siano rispettati i limiti previsti per i criteri di sicurezza

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

alimentare per tutta la durata di conservazione. Tra questi studi, si può ricorrere a challenge test microbiologici, che mediante contaminazione artificiale di un alimento con un patogeno, può simularne il comportamento durante la shelf-life (Spanu *et al.*, 2014).

Partendo da tali considerazioni è emersa la necessità di condurre un challenge test su due tipologie Pecorino Sardo Dolce DOP (PSA e PSB) prodotte utilizzando una *scotta-innesto* inoculata rispettivamente con *L. plantarum* (CP) e *Lactobacillus delbrueckii subsp. sunkii*. Un'ulteriore produzione di Pecorino Sardo Dolce DOP, rispettando la tecnologia di produzione tradizionale (senza *scotta-innesto*), è stata utilizzata come controllo sperimentale (CTRL).

Dai risultati del challenge test condotto su PSA, PSB e CTRL si evince che *L. monocytogenes* è in grado di sopravvivere sia in condizioni di refrigerazione (+4°C) che in condizioni di abuso termico (+10°C). I livelli medi di *L. monocytogenes* raggiunti partendo dalla stessa concentrazione iniziale (10^2 UFC/g) non hanno mostrato differenze significative in relazione alle temperature di stoccaggio ($p > 0,05$).

Mediante applicazione della metodica quantitativa per la determinazione di *L. monocytogenes* sono stati rilevati livelli medi del patogeno di 0,3-1,8 Log₁₀UFC/g a T₂₁ (giorno seguente alla contaminazione sperimentale) e mentre il patogeno è risultato assente a T₉₀ (fine della shelf-life). I livelli medi di *L. monocytogenes* erano significativamente maggiori ($p < 0,05$) a T₂₁ rispetto alla fine della shelf-life (T₉₀). Questi risultati sono sovrapponibili con quanto riscontrato in indagini simili: due recenti studi sull'efficacia dei LAB nei confronti di *L. monocytogenes* in formaggi (Scatassa *et al.*, 2017; Morandi *et al.*, 2020), hanno mostrato che l'utilizzo di batteri lattici ad attività anti-*Listeria* determinava diminuzione del patogeno da 2 a 3 Log₁₀UFC/g dopo i primi 15 - 20 giorni dall'inoculo. In controtendenza col presente lavoro è risultata una recente indagine sull'utilizzo di LAB produttori di batteriocine sulla superficie di formaggi *Gorgonzola* (Morandi *et al.*, 2020): dopo 50 giorni dalla contaminazione, la concentrazione del patogeno mostrava un

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

incremento. Di contro, i risultati ottenuti dalla determinazione quantitativa di *L. monocytogenes* in questo studio, hanno rilevato assenza del patogeno a T₉₀, ovvero dopo 70 giorni dalla contaminazione sperimentale. La determinazione qualitativa è stata l'unica a rilevare positività al patogeno a T₉₀ e i dati ottenuti rivelano che poco meno della metà degli isolati di *L. monocytogenes* (43,9 %) proveniva dai campioni CTRL (senza utilizzo di coltura bioprotettiva). Si può quindi affermare che entrambe le colture testate abbiano mostrato attività inibente nei confronti di *L. monocytogenes*, con una efficacia leggermente superiore per *L. sunkii* (autoctono) rispetto a *L. plantarum* (commerciale).

Non sono presenti studi in letteratura riguardanti l'utilizzo di *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *sunkii* come coltura bioprotettiva, i dati ottenuti risultano perciò innovativi e comparabili solo con lavori riguardanti l'utilizzo di altri lattobacilli per la conduzione di challenge test. I livelli medi dei lattici termofili per tutte le tipologie di prodotto (PSA, PSB e CTRL) erano pari a 10⁶-10⁷ UFC/g a T₀, 10⁷-10⁸ a T₂₁ e a T₉₀; la concentrazione dei batteri lattici mesofili era 10⁶-10⁸ UFC/g a T₀ 10⁶-10⁸ UFC/g a T₂₁ e a T₉₀. Per le due categorie di lattici, per i tre lotti analizzati, nelle tre tipologie di formaggio sperimentale, non sono emerse differenze significative (p>0,05). Questi risultati sono sovrapponibili con quelli ottenuti in altri challenge test descritti in letteratura (Østergaard *et al.*, 2014; Smatassa *et al.*, 2017; Aymerich *et al.*, 2019; Morandi *et al.*, 2020). Relativamente al pH, non ci sono state variazioni sostanziali per tutte le tipologie di campioni per i tre lotti analizzati. Durante tutto il periodo di conservazione i valori di pH non sono mai scesi al di sotto di 4,7. Questa caratteristica, unitamente ai parametri di a_w rilevati, rende il prodotto permissivo alla crescita di *L. monocytogenes* fino a fine shelf-life.

La strategia di utilizzo di microrganismi ad azione bioprotettiva presentata in questo studio si è dimostrata applicabile alla tecnologia di produzione del Pecorino Sardo Dolce DOP ed efficace nel controllo di *L. monocytogenes*.

CAPITOLO V: CONCLUSIONI

I parametri intrinseci rilevati sul Pecorino Sardo Dolce DOP lo collocano nella categoria degli alimenti RTE in grado di supportare la crescita di *L. monocytogenes* (regolamento (CE) n. 2073/2005). Considerate queste premesse, in questo studio è stato costruito un modello per l'inoculo di microrganismi bioprotettivi durante la tecnologia di produzione del formaggio per contrastare la crescita di *L. monocytogenes*. L'identificazione di batteri lattici autoctoni inibenti tale patogeno ha dimostrato che il latte ovino sardo rappresenta un'ottima fonte di batteri lattici utilizzabili nell'industria alimentare. I batteri lattici autoctoni impiegati nel presente lavoro, hanno mostrato eccellente adattabilità alle matrici lattiero-casearie utilizzate (latte, scotta, formaggi). Il loro *optimum* di crescita (45°C) li rende particolarmente adatti all'inoculo durante i processi di caseificazione, che prevedono l'applicazione di temperature elevate (45-47°C) durante le fasi di stufatura. Un'altra importante considerazione riguarda gli aspetti normativi che tutelano i prodotti a marchio DOP. Il disciplinare di Produzione della DOP "Pecorino Sardo" prevede che *"il latte intero di pecora venga inoculato con colture provenienti dalla zona di origine"*. L'impiego di microrganismi autoctoni ad azione inibente nei confronti di *L. monocytogenes* consente di migliorare la sicurezza dell'alimento nel rispetto di quanto indicato nel disciplinare.

In conclusione, il challenge test ha avvalorato i dati ottenuti mediante le prove *in vitro*. Le potenzialità delle colture bioprotettive, nel ridurre il rischio microbiologico da *L. monocytogenes* sono state ampiamente confermate dalla riduzione del livello di contaminazione dei livelli medi del patogeno alla fine della shelf-life, nonostante l'alimento sia permissivo per *L. monocytogenes*.

I risultati ottenuti con questo studio possono avere importanti ricadute sulle attività del settore alimentare in quanto l'impiego delle colture bioprotettive consente di migliorare la sicurezza di prodotti RTE come il Pecorino Sardo DOP. L'impiego dei batteri lattici è di facile applicazione tecnologica e consente il rispetto del

Maria Pina Meloni – "Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

disciplinare DOP. L'utilizzo delle colture bioprotettive, in associazione ad una rigorosa applicazione delle procedure igieniche e di lavorazione, può essere una strategia vincente nel contrastare la presenza di *L. monocytogenes* negli alimenti. L'innovazione tecnologica proposta, ha riscontrato notevole interesse da parte dell'azienda partner del presente lavoro, leader nel settore lattiero-caseario ovino sardo. L'azienda potrà usufruire di tale strategia per dare ulteriore evidenza sulla sicurezza del prodotto fornendo, inoltre, garanzie sul rispetto della legislazione internazionale nell'ottica dell'esportazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Ahire, J. J., Jakkamsetty, C., Kashikar, M. S., Lakshmi, S. G., & Madempudi, R. S. (2021). In vitro evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* UBLP40 isolated from traditional indigenous fermented food. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 13(5), 1413-1424.
2. Abee, T., Krockel, L., & Hill, C. (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International journal of food microbiology*, 28(2), 169-185.
3. Acciari, V. A., Iannetti, L., Gattuso, A., Sonnessa, M., Scavia, G., Montagna, C., ... & Gianfranceschi, M. V. (2016). Tracing sources of *Listeria* contamination in traditional Italian cheese associated with a US outbreak: investigations in Italy. *Epidemiology & Infection*, 144(13), 2719-2727.
4. Acciari, V. A., Iannetti, L., Gattuso, A., Sonnessa, M., Scavia, G., Montagna, C., ... & Gianfranceschi, M. V. (2016). Tracing sources of *Listeria* contamination in traditional Italian cheese associated with a US outbreak: investigations in Italy. *Epidemiology & Infection*, 144(13), 2719-2727.
5. Agenzia Laore Sardegna. (2020). Dati sull'allevamento ovino, caprino e bovino da latte in Sardegna – 2019. Official website: <http://www.sardegnaagricoltura.it/index.php?xsl=443&s=413001&v=2&c=94525&vd=1>

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV

Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare

Università degli Studi di Sassari

6. Aguilar-Bultet, L., Nicholson, P., Rychener, L., Dreyer, M., Gözel, B., Origgi, F. C., ... & Falquet, L. (2018). Genetic separation of *Listeria monocytogenes* causing central nervous system infections in animals. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 20.
7. Aljasir, S. F., Gensler, C., Sun, L., & D'Amico, D. J. (2020). The efficacy of individual and combined commercial protective cultures against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, O157 and non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in growth medium and raw milk. *Food Control*, 109, 106924.
8. Almeida, G., Magalhães, R., Carneiro, L., Santos, I., Silva, J., Ferreira, V., ... & Teixeira, P. (2013). Foci of contamination of *Listeria monocytogenes* in different cheese processing plants. *International Journal of Food Microbiology*, 167(3), 303-309.
9. Álvarez-Ordóñez, A., Leong, D., Hickey, B., Beaufort, A., & Jordan, K. (2015). The challenge of challenge testing to monitor *Listeria monocytogenes* growth on ready-to-eat foods in Europe by following the European Commission (2014) Technical Guidance document. *Food Research International*, 75, 233-243.
10. Amenu, D. (2013). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from “Ergo”, Ethiopian traditional fermented milk. *Curr. Res. Microbiol. Biotechnol*, 1(6), 278-284.
11. Amiri, S., Moghanjoughi, Z. M., Bari, M. R., & Khaneghah, A. M. (2021). Natural protective agents and their applications as bio-preservatives in the

food industry: An overview of current and future applications. *Italian Journal of Food Science*, 33(SP1), 55-68.

12. Anderson, A. C., Jonas, D., Huber, I., Karygianni, L., Wölber, J., Hellwig, E., ... & Al-Ahmad, A. (2016). *Enterococcus faecalis* from food, clinical specimens, and oral sites: prevalence of virulence factors in association with biofilm formation. *Frontiers in microbiology*, 6, 1534..
13. Atzori, A. S., Bayer, L., Molle, G., Arca, P., Franca, A., Vannini, M., ... & Vagnoni, E. (2022). Sustainability in the Sardinian sheep sector: A systems perspective, from good practices to policy. *Integrated Environmental Assessment and Management*.
14. Aymerich, T., Rodríguez, M., Garriga, M., & Bover-Cid, S. (2019). Assessment of the bioprotective potential of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 8° C. *Food microbiology*, 83, 64-70.
15. Bahrami, A., Baboli, Z. M., Schimmel, K., Jafari, S. M., & Williams, L. (2020). Efficiency of novel processing technologies for the control of *Listeria monocytogenes* in food products. *Trends in Food Science & Technology*, 96, 61-78.
16. Balciunas, E. M., Martinez, F. A. C., Todorov, S. D., de Melo Franco, B. D. G., Converti, A., & de Souza Oliveira, R. P. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control*, 32(1), 134-142.

17. Balciunas, E. M., Martinez, F. A. C., Todorov, S. D., de Melo Franco, B. D. G., Converti, A., & de Souza Oliveira, R. P. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control*, 32(1), 134-142.
18. Baquero, F., F. Lanza, V., Duval, M., & Coque, T. M. (2020). Ecogenetics of antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, 113(3), 570-579.
19. Barcenilla, C., Ducic, M., López, M., Prieto, M., & Álvarez-Ordóñez, A. (2022). Application of lactic acid bacteria for the biopreservation of meat products: A systematic review. *Meat Science*, 183, 108661.
20. Batiha, G. E. S., Hussein, D. E., Algammal, A. M., George, T. T., Jeandet, P., Al-Snafi, A. E., ... & Cruz-Martins, N. (2021). Application of natural antimicrobials in food preservation: Recent views. *Food Control*, 126, 108066.
21. Beaufort, A., Bergis, H., Lardeux, A. L., Polet, M., Botteldoorn, N., Papageorgiou, G., ... & Prencipe, V. Technical Guidance Document for Conducting Shelf-Life Studies on *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods; EURL Lm Technical Guidance Document; European Union Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes*. 2014.
22. Bechtel, T.D, Gibbons, J.G. (2021). Population Genomic Analysis of *Listeria monocytogenes* From Food Reveals Substrate-Specific Genome Variation. *Front. Microbiol.*, 12.
23. Bierne, H., Sabet, C., Personnic, N., & Cossart, P. (2007). Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. *Microbes and Infection*, 9(10), 1156-1166.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari

24. Blanco-Montenegro, I., De Ritis, R., & Chiappini, M. (2007). Imaging and modelling the subsurface structure of volcanic calderas with high-resolution aeromagnetic data at Vulcano (Aeolian Islands, Italy). *Bulletin of Volcanology*, 69(6), 643-659.
25. Blaya, J., Barzideh, Z., & LaPointe, G. (2018). Symposium review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. *Journal of Dairy Science*, 101(4), 3611-3629.
26. Borucki, M. K., Peppin, J. D., White, D., Loge, F., & Call, D. R. (2003). Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and environmental microbiology*, 69(12), 7336-7342.
27. Bouymajane, A., Filali, F. R., Oulghazi, S., Lafkih, N., Ed-Dra, A., Aboukacem, A., ... & Moumni, M. (2021). Occurrence, antimicrobial resistance, serotyping and virulence genes of *Listeria monocytogenes* isolated from foods. *Heliyon*, 7(2), e06169.
28. Buchanan, R. L., Gorris, L. G., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food control*, 75, 1-13.
29. C. Spanu, C. Scarano, F. Piras, V. Spanu, C. Pala, D. Casti, S. Lamon, F. Cossu, M. Ibba, G. Nieddu, E.P.L. De Santis. (2017). Testing commercial biopreservative against spoilage microorganisms in MAP packed Ricotta Frescal cheese. *Food Microbiol.*, 66, pp. 72-76.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari

30. Camargo, A. C., Todorov, S. D., Chihib, N. E., Drider, D., & Nero, L. A. (2018). Lactic acid bacteria (LAB) and their bacteriocins as alternative biotechnological tools to control *Listeria monocytogenes* biofilms in food processing facilities. *Molecular biotechnology*, 60(9), 712-726.
31. Cardenas-Alvarez, M.X., Townsend Ramsett, M.K., Malekmohammadi, S., Bergholz, T.M. (2019). Evidence of Hypervirulence in *Listeria Monocytogenes* Clonal Complex 14. *J. Med. Microbiol.*, 68, 1677–1685.
32. Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., & Vignolo, G. (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, 79(3), 483-499.
33. Castro, M. P., Palavecino, N. Z., Herman, C., Garro, O. A., & Campos, C. A. (2011). Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Sci.*, 87, 321–329.
34. Chen, Y., Chen, Y., Pouillot, R., Dennis, S., Xian, Z., Luchansky, J. B., ... & Brown, E. W. (2020). Genetic diversity and profiles of genes associated with virulence and stress resistance among isolates from the 2010-2013 interagency *Listeria monocytogenes* market basket survey. *PLoS One*, 15(4), e0231393.
35. Chen, Y., Gonzalez-Escalona, N., Hammack, T. S., Allard, M. W., Strain, E. A., & Brown, E. W. (2016). Core genome multilocus sequence typing for identification of globally distributed clonal groups and differentiation of outbreak strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and environmental microbiology*, 82(20), 6258-6272.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari

36. Chenal-Francisque, V., Lopez, J., Cantinelli, T., Caro, V., Tran, C., Leclercq, A., ... & Brisse, S. (2011). Worldwide distribution of major clones of *Listeria monocytogenes*. *Emerging infectious diseases*, 17(6), 1110.

37. Chessa, L., Paba, A., Daga, E., & Comunian, R. (2019). Effect of growth media on natural starter culture composition and performance evaluated with a polyphasic approach. *International Journal of Dairy Technology*, 72(1), 152-158 ,

38. Chessa, L., Paba, A., Daga, E., Caredda, M., & Comunian, R. (2020). Optimization of scotta as growth medium to preserve biodiversity and maximise bacterial cells concentration of natural starter cultures for Pecorino Romano PDO cheese. *FEMS Microbiology Letters*, 367(14), fnaa110.

39. Chessa, L., Paba, A., Daga, E., Dupré, I., & Comunian, R. (2021). Biodiversity and Safety Assessment of Half-Century Preserved Natural Starter Cultures for Pecorino Romano PDO Cheese. *Microorganisms*, 9(7), 1363.

40. Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., & Dicks, L. M. (2018). Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current opinion in biotechnology*, 49, 23-28.

41. Choi, K. H., Lee, H., Lee, S., Kim, S., & Yoon, Y. (2016). Cheese microbial risk assessments—A review. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 29(3), 307.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari

42. Codex Alimentarius Commission. (1991). Draft principles and application of the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) system. Codex Alimentarius Commission Document Alinorm, 93, 13.
43. Codex Alimentarius Commission. (2007). Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control *Listeria monocytogenes* in foods. CAC/GL 61.
44. Colagiorgi, A., Bruini, I., Di Ciccio, P. A., Zanardi, E., Ghidini, S., & Ianieri, A. (2017). *Listeria monocytogenes* biofilms in the wonderland of food industry. *Pathogens*, 6(3), 41.
45. Coroneo, V., Carraro, V., Aissani, N., Sanna, A., Ruggeri, A., Succa, S., ... & Sanna, C. (2016). Detection of virulence genes and growth potential in *Listeria monocytogenes* strains isolated from ricotta salata cheese. *Journal of Food Science*, 81(1), M114-M120..
46. Cossart, P., & Lebreton, A. (2014). A trip in the “New Microbiology” with the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*. *FEBS letters*, 588(15), 2437-2445.
47. Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777-788.
48. da Silva Sabo, S., Vitolo, M., González, J. M. D., & de Souza Oliveira, R. P. (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64, 527-536.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari

49. Daba, H., Lacroix, C., Huang, J., & Simard, R. E. (1993). Influence of growth conditions on production and activity of mesentericin 5 by a strain of *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39(2), 166-173.
50. Datta, A., & Burall, L. (2018). Current trends in foodborne human listeriosis. *Food Safety*, 6(1), 1-6.
51. Davidson, P. M., Sofos, J. N., & Branen, A. L. (2005). *Antimicrobials in food*. CRC press.
52. de Valk, H., Vaillant, V., King, L. A., & Goulet, V. (2013). What is the incubation period for listeriosis?.
53. Di Gianvito, P., Englezos, V., Rantsiou, K., & Cocolin, L. (2022). Bioprotection strategies in winemaking. *International Journal of Food Microbiology*, 109532.
54. Doménech, E., Amorós, J. A., Pérez-Gonzalvo, M., & Escriche, I. (2011). Implementation and effectiveness of the HACCP and pre-requisites in food establishments. *Food Control*, 22(8), 1419-1423.
55. DOOR. Database of PDO, PGI and TSG. European Union (2018). <http://ec.europa.eu/agriculture/quality/door/list.html?locale=en>
56. Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., & Martin, P. (2004). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, 42(8), 3819-3822.

57. Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., & Martin, P. (2004). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, 42(8), 3819-3822.
58. Dzieciol, M., Schornsteiner, E., Muhterem-Uyar, M., Stessl, B., Wagner, M., & Schmitz-Esser, S. (2016). Bacterial diversity of floor drain biofilms and drain waters in a *Listeria monocytogenes* contaminated food processing environment. *International journal of food microbiology*, 223, 33-40.
59. E.C. - European Commission. European Commission Regulation (E.C.) No 2073/2005 of 15 November 2005 on Microbiological Criteria for Foodstuffs. O.J.E.U. 2005, L 338/1. *Food Control*, 32 (2013), pp. 461-471
60. E.C. - European Commission. European Commission Regulation (EC) No 1263/96 of 1 July 1996 supplementing the Annex to Regulation (EC) No 1107/96 on the registration of geographical indications and designations of origin under the procedure laid down in Article 17 of Regulation (EEC) No 2081/92.
61. E.C. - European Commission. European Commission Regulation (EC) No 509/2006. *Official Journal of the European Union*. L 93/1, 31 March 2006.
62. E.C. - European Commission. European Commission Regulation EC. No 510/2006. *Official Journal of the European Union*. L 93/12, 31 March 2006.
63. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., ... & Lindqvist, R. (2018). *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA journal*, 16(1), e05134.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari

64. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 8:Suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2018. EFSA Journal, 2018, 16(7):5315.
65. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), Younes, M., Aggett, P., Aguilar, F., Crebelli, R., Dusemund, B., ... & Gott, D. (2017). Safety of nisin (E 234) as a food additive in the light of new toxicological data and the proposed extension of use. EFSA Journal, 15(12), e05063.
66. Ennahar, S., Assobhei, O., & Hasselmann, C. (1998). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear-surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin AcH producer. Journal of food protection, 61(2), 186-191.
67. EpiCentro - L'epidemiologia per la sanità pubblica - Istituto Superiore di Sanità, 2016. <https://www.epicentro.iss.it/listeria>
68. EURL. 2018. Lm Guidance document to evaluate the competence of laboratories implementing challenge tests and durability studies related to *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Version 2–7 May 2018. Available online: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_mc_guidancecomp-labs.pdf

69. European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control. (2021). The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. EFSA Journal, 19(12), e06971.
70. European Parliament and the Council of the European Union. (2008). Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives. Off J Eur Union, 354, 16-33.
71. European Parliament and the Council of the European Union. (2008). Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives. Off J Eur Union, 354, 16-33.
72. European Union. (2012). Regulation (EU) No. 1151/2012 of the European Parliament and of the Council of 21 November 2012 on quality schemes for agricultural products and foodstuffs. Official Journal of the European Union, 343, 1-29.
73. Falardeau, J., Trmčić, A., & Wang, S. (2021). The occurrence, growth, and biocontrol of *Listeria monocytogenes* in fresh and surface-ripened soft and semisoft cheeses. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 20(4), 4019-4048.
74. FDA, U. (2018). Microorganisms & microbial-derived ingredients used in food (partial list). Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN).

75. Food and Drug Administration. (2012). Bad bug book: handbook of foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins. Center for Food Safety and Applied Nutrition.
76. Food and Drug Administration's (FDA) Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2019.
77. Food and Drug Administration's (FDA) Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2018.
78. Fox, E., Hunt, K., O'Brien, M., & Jordan, K. (2011). *Listeria monocytogenes* in Irish farmhouse cheese processing environments. *International journal of food microbiology*, 145, S39-S45.
79. Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *The Journal of applied bacteriology*, 66(5), 365-378.
80. Gaglio, R., Todaro, M., & Settanni, L. (2021). Improvement of raw milk cheese hygiene through the selection of starter and non-starter lactic acid bacteria: The successful case of PDO Pecorino Siciliano cheese. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(4), 1834.
81. Garnier, L., Mounier, J., Lê, S., Pawtowski, A., Pinon, N., Camier, B., ... & Valence, F. (2019). Development of antifungal ingredients for dairy products: From in vitro screening to pilot scale application. *Food microbiology*, 81, 97-107.

82. Gemechu, T. (2015). Review on lactic acid bacteria function in milk fermentation and preservation. *African Journal of Food Science*, 9(4), 170-175.
83. Gianfranceschi, M., Gattuso, A., Tartaro, S., & Aureli, P. (2003). Incidence of *Listeria monocytogenes* in food and environmental samples in Italy between 1990 and 1999: serotype distribution in food, environmental and clinical samples. *European journal of epidemiology*, 18(10), 1001-1006.
84. Gill, D. A. (1937). Ovine bacterial encephalitis (circling disease) and the bacterial genus *Listerella*. *Australian Veterinary Journal*, 13(2), 46-56.
85. Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H. J., Trujillo, M. E., Suzuki, K. I., Ludwig, W., & Whitman, W. B. (Eds.). (2012). *Bergey's manual® of systematic bacteriology: Volume five the actinobacteria, part a* (pp. 171-206). Springer New York.
86. Gouin, E., Adib-Conquy, M., Balestrino, D., Nahori, M. A., Villiers, V., Colland, F., ... & Cossart, P. (2010). The *Listeria monocytogenes* InlC protein interferes with innate immune responses by targeting the I κ B kinase subunit IKK α . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(40), 17333-17338.
87. Gourama, H., & Bullerman, L. B. (1995). Antimycotic and antiaflatoxigenic effect of lactic acid bacteria: a review. *Journal of Food Protection*, 58(11), 1275-1280.
88. Gram, C. (1884). Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschritte der Medicin*, 2, 185-189.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari

89. Guarrasi, V., Sannino, C., Moschetti, M., Bonanno, A., Di Grigoli, A., & Settanni, L. (2017). The individual contribution of starter and non-starter lactic acid bacteria to the volatile organic compound composition of Caciocavallo Palermitano cheese. *International journal of food microbiology*, 259, 35-42.
90. Habann, M. F. (2013). Characterization of bacteriophage baseplate proteins and their role in *Listeria* recognition, adsorption and infection (Doctoral dissertation, ETH Zurich).
91. Hammami, R., Fliss, I., & Corsetti, A. (2019). Application of protective cultures and bacteriocins for food biopreservation. *Frontiers in microbiology*, 10, 1561.
92. Hernandez-Milian, A., & Payaras-Cifre, A. (2014). What is new in Listeriosis? *BioMed Research International*.
93. Hossain, M. I., Sadekuzzaman, M., & Ha, S.-D. (2017). Probiotics as potential alternative biocontrol agents in the agriculture and food industries: A review. *Food Res. Int.*, 100, 63–73.
94. Hülphers, G. (1911). Liver necrosis in rabbits caused by a hitherto undescribed bacterium. *Swedish Veterinary Journal* 16.1911: 265-273.
95. Ibba, M., Cossu, F., Spanu, V., Viridis, S., Spanu, C., Scarano, C., & De Santis, E. P. (2013). *Listeria monocytogenes* contamination in dairy plants: evaluation of *Listeria monocytogenes* environmental contamination in two cheese-making plants using sheeps milk. *Italian Journal of Food Safety*, 2(2), e31-e31.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari

96. ISMEA Mercati (2020). Tendenze Latte ovino.
97. ISMEA Mercati (2021). Tendenze Latte ovino.
98. ISS - Istituto Superiore di Sanità. Analisi critica dei dati in funzione della sicurezza degli alimenti. Allegato al Capitolo 5 della Relazione annuale al PNI – 2015.
https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_dettaglioPNI_1113_allegati_allegati_itemName_0_allegato.pdf
99. Jamshidi, A., & Zeinali, T. (2019). Significance and Characteristics of *Listeria monocytogenes* in Poultry Products. International journal of food science, 2019, 7835253. <https://doi.org/10.1155/2019/7835253>
100. Jamshidi, A., & Zeinali, T. (2019). Significance and characteristics of *Listeria monocytogenes* in poultry products. International journal of food science, 2019.
101. Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, & World Health Organization. (2003). Codex Alimentarius: Food hygiene, basic texts. Food & Agriculture Org..
102. Jordan, K., & McAuliffe, O. (2018). *Listeria monocytogenes* in foods. Advances in food and nutrition research, 86, 181-213.
103. Jordan, K., Hunt, K., Lourenco, A., & Pennone, V. (2018). *Listeria monocytogenes* in the food processing environment. Current Clinical Microbiology Reports, 5(2), 106-119.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari

104. Kallipolitis, B., Gahan, C. G., & Piveteau, P. (2020). Factors contributing to *Listeria monocytogenes* transmission and impact on food safety. *Current Opinion in Food Science*, 36, 9-17.
105. Kadam, S. R., den Besten, H. M., van der Veen, S., Zwietering, M. H., Moezelaar, R., & Abee, T. (2013). Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: impact of growth condition, serotype and strain origin. *International Journal of Food Microbiology*, 165(3), 259-264.
106. Kareb, O., & Aider, M. (2020). Quorum sensing circuits in the communicating mechanisms of bacteria and its implication in the biosynthesis of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(1), 5-17.
107. Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 12(1-3), 39-85.
108. Kurpas, M., Wieczorek, K., & Osek, J. (2018). Ready-to-eat meat products as a source of *Listeria monocytogenes*. *Journal of veterinary research*, 62(1), 49.
109. Lanciotti, R., Patrignani, F., Bagnolini, F., Guerzoni, M. E., & Gardini, F. (2003). Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiology*, 20(5), 537-543.
110. Latorre, L., Parisi, A., Fraccalvieri, R., Normanno, G., Nardella La Porta, M. C., Goffredo, E., ... & Santagada, G. (2007). Low prevalence of *Listeria*

- monocytogenes in foods from Italy. Journal of food protection, 70(6), 1507-1512.
111. Leclercq, A., Chenal-Francisque, V., Dieye, H., Cantinelli, T., Drali, R., Brisse, S., & Lecuit, M. (2011). Characterization of the novel *Listeria monocytogenes* PCR serogrouping profile IVb-v1. International journal of food microbiology, 147(1), 74-77.
 112. Lecuit, M. (2020). *Listeria monocytogenes*, a model in infection biology. Cellular Microbiology, 22(4), e13186.
 113. Leyva Salas, M., Thierry, A., Lemaitre, M., Garric, G., Harel-Oger, M., Chatel, M., ... & Coton, E. (2018). Antifungal activity of lactic acid bacteria combinations in dairy mimicking models and their potential as bioprotective cultures in pilot scale applications. Frontiers in Microbiology, 9, 1787.
 114. Lillo-Pérez, S., Guerra-Valle, M., Orellana-Palma, P., & Petzold, G. (2021). Probiotics in fruit and vegetable matrices: Opportunities for nondairy consumers. LWT, 151, 112106.
 115. Lin, T. H., & Pan, T. M. (2019). Characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus plantarum* NTU 102. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 52(3), 409-417.
 116. Loessner, M., Guenther, S., Steffan, S., & Scherer, S. (2003). A pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *Listeria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium. Applied and Environmental Microbiology, 69(3), 1854-1857.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari

117. Lora I., Zidi A., Magrin L., Prevedello P., Cozzi G. (2020). An insight into the dairy chain of a Protected Designation of Origin cheese: The case study of Asiago cheese. *Journal of Dairy Science*, 103 , pp. 9116-9123
118. Lücke, F. K. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat science*, 56(2), 105-115.
119. Lungu, B., Ricke, S. C., & Johnson, M. G. (2009). Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions: a review. *Anaerobe*, 15(1-2), 7-17.
120. Luque-Sastre, L., Arroyo, C., Fox, E. M., McMahon, B. J., Bai, L. I., Li, F., & Fanning, S. (2018). Antimicrobial resistance in *Listeria* species. *Microbiology spectrum*, 6(4), 6-4.
121. Madrau, M. A., Mangia, N. P., Murgia, M. A., Sanna, M. G., Garau, G., Leccis, L., ... & Deiana, P. (2006). Employment of autochthonous microflora in Pecorino Sardo cheese manufacturing and evolution of physicochemical parameters during ripening. *International dairy journal*, 16(8), 876-885.
122. Mannu, L., Riu, G., Comunian, R., Fozzi, M. C., & Scintu, M. F. (2002). A preliminary study of lactic acid bacteria in whey starter culture and industrial Pecorino Sardo ewes' milk cheese: PCR-identification and evolution during ripening. *International Dairy Journal*, 12(1), 17-26.
123. Marinova, V. Y., Rasheva, I. K., Kizheva, Y. K., Dermenzhieva, Y. D., & Hristova, P. K. (2019). Microbiological quality of probiotic dietary

Maria Pina Meloni – “Adozione di culture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari

supplements. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 834-841.

124. Martín, I., Rodríguez, A., Alía, A., Martínez-Blanco, M., Lozano-Ojalvo, D., & Córdoba, J. J. (2022). Control of *Listeria monocytogenes* growth and virulence in a traditional soft cheese model system based on lactic acid bacteria and a whey protein hydrolysate with antimicrobial activity. *International Journal of Food Microbiology*, 361, 109444.
125. Martín, I., Rodríguez, A., Delgado, J., & Córdoba, J. J. (2022). Strategies for biocontrol of *Listeria monocytogenes* using lactic acid bacteria and their metabolites in ready-to-eat meat-and dairy-ripened products. *Foods*, 11(4), 542.
126. Martínez-Graciá C, González-Bermúdez Ca, Cabellero-Valcárcel Am, Santaella-Pascual M & Frontela-Saseta C. 2015. Use of herbs and spices for food preservation: Advantages and limitations. *Curr Opin Food Sci* 6: 38-43.
127. Mashak, Z., Banisharif, F., Banisharif, G., Reza Pourian, M., Eskandari, S., Seif, A., ... & Alavi, I. (2021). Prevalence of listeria species and serotyping of *Listeria monocytogenes* bacteria isolated from seafood samples. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences*, 52(1), 1-9.
128. Matereke, L. T., & Okoh, A. I. (2020). *Listeria monocytogenes* virulence, antimicrobial resistance and environmental persistence: A review. *Pathogens*, 9(7), 528.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari

129. Matle, I., Mbatha, K. R., & Madoroba, E. (2020). A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 87(1), 1-20.
130. Melero, B., Vinuesa, R., Diez, A. M., Jaime, I., & Rovira, J. (2013). Application of protective cultures against *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter jejuni* in chicken products packaged under modified atmosphere. *Poultry Science*, 92(4), 1108-1116.
131. Melo, J., Andrew, P. W., & Faleiro, M. L. (2015). *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. *Food Research International*, 67, 75-90.
132. Menberu, M. A., Liu, S., Cooksley, C., Hayes, A. J., Psaltis, A. J., Wormald, P. J., & Vreugde, S. (2021). *Corynebacterium accolens* has antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* pathogens isolated from the sinonasal niche of chronic rhinosinusitis patients. *Pathogens*, 10(2), 207.
133. Miller, W. R., Munita, J. M., & Arias, C. A. (2014). Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert review of anti-infective therapy*, 12(10), 1221-1236.
134. Mills, S., Griffin, C., O'Connor, P. M., Serrano, L. M., Meijer, W. C., Hill, C., & Ross, R. P. (2017). A multibacteriocin cheese starter system, comprising nisin and lacticin 3147 in *Lactococcus lactis*, in combination with plantaricin from *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(14), e00799-17.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari

135. Mokoena, M. P. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*, 22(8), 1255.
136. Moradi, M., Molaei, R., & Guimarães, J. T. (2021). A review on preparation and chemical analysis of postbiotics from lactic acid bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 143, 109722.
137. Moraes, P. M., Perin, L. M., Ortolani, M. B. T., Yamazi, A. K., Viçosa, G. N., & Nero, L. A. (2010). Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *LWT-Food Science and Technology*, 43(9), 1320-1324.
138. Morandi, S., Silvetti, T., Battelli, G., & Brasca, M. (2019). Can lactic acid bacteria be an efficient tool for controlling *Listeria monocytogenes* contamination on cheese surface? The case of Gorgonzola cheese. *Food Control*, 96, 499-507.
139. Morandi, S., Silvetti, T., Vezzini, V., Morozzo, E., & Brasca, M. (2020). How we can improve the antimicrobial performances of lactic acid bacteria? A new strategy to control *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola cheese. *Food Microbiology*, 90, 103488.
140. Moura, A., Lefrancq, N., Wirth, T., Leclercq, A., Borges, V., Gilpin, B., ... & *Listeria* CC1 Study Group. (2021). Emergence and global spread of *Listeria monocytogenes* main clinical clonal complex. *Science advances*, 7(49), eabj9805.

141. Murphy, E. F., Clarke, S. F., Marques, T. M., Hill, C., Stanton, C., Ross, R. P., ... & Cotter, P. D. (2013). Antimicrobials: strategies for targeting obesity and metabolic health?. *Gut microbes*, 4(1), 48-53.
142. Murray, E. G. D., Webb, R. A., & Swann, M. B. R. (1926). A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 29(4), 407-439.
143. Negash, A. W., & Tsehai, B. A. (2020). Current applications of bacteriocin. *International Journal of Microbiology*, 2020.
144. Nikodinoska, I., Baffoni, L., Di Gioia, D., Manso, B., García-Sánchez, L., Melero, B., & Rovira, J. (2019). Protective cultures against foodborne pathogens in a nitrite reduced fermented meat product. *Lwt*, 101, 293-299.
145. Nørnung, B., Andersen, J. K., & Schlundt, J. (1999). Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. *International Journal of Food Microbiology*, 53(2-3), 195-203.
146. Nyfeldt, A. (1929). Etiologie de la mononucleose infectieuse. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie*, 101, 590-591.
147. Orsi, R. H., den Bakker, H. C., & Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(2), 79-96.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari

148. Østergaard, N. B., Eklöv, A., & Dalgaard, P. (2014). Modelling the effect of lactic acid bacteria from starter-and aroma culture on growth of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 15-25.

149. Pan, Y., Breidt Jr, F., & Kathariou, S. (2009). Competition of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains in mixed-culture biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 75(18), 5846-5852.

150. Pasolli, E., De Filippis, F., Mauriello, I. E., Cumbo, F., Walsh, A. M., Leech, J., ... & Ercolini, D. (2020). Large-scale genome-wide analysis links lactic acid bacteria from food with the gut microbiome. *Nature communications*, 11(1), 1-12.

151. Pawlowska, A. M., Zannini, E., Coffey, A., & Arendt, E. K. (2012). “Green preservatives”: combating fungi in the food and feed industry by applying antifungal lactic acid bacteria. *Advances in food and nutrition research*, 66, 217-238.

152. Peng, K., Koubaa, M., Bals, O., & Vorobiev, E. (2020). Recent insights in the impact of emerging technologies on lactic acid bacteria: A review. *Food research international*, 137, 109544.

153. Piffaretti, J. C., Kressebuch, H., Aeschbacher, M., Bille, J., Bannerman, E., Musser, J. M., ... & Rocourt, J. (1989). Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(10), 3818-3822.

154. Pirisi, A., Addis, M., & Comunian, R. (2014). Formaggi da latte di pecora: aspetti microbiologici, fisico-chimici e tecnologici. *Formaggi da latte di pecora: aspetti microbiologici, fisico-chimici e tecnologici*, 89-113.
155. Polese, P., Del Torre, M., Venir, E., & Stecchini, M. L. (2014). A simplified modelling approach established to determine the *Listeria monocytogenes* behaviour during processing and storage of a traditional (Italian) ready-to-eat food in accordance with the European Commission Regulation N° 2073/2005. *Food control*, 36(1), 166-173.
156. Portnoy, D. A., Auerbuch, V., & Glomski, I. J. (2002). The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. *The Journal of cell biology*, 158(3), 409-414.
157. Pulina, G., Milán, M. J., Lavín, M. P., Theodoridis, A., Morin, E., Capote, J., ... & Caja, G. (2018). Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. *Journal of dairy science*, 101(8), 6715-6729.
158. Quereda, J. J., Morón-García, A., Palacios-Gorba, C., Dessaux, C., García-del Portillo, F., Pucciarelli, M. G., & Ortega, A. D. (2021). Pathogenicity and virulence of *Listeria monocytogenes*: A trip from environmental to medical microbiology. *Virulence*, 12(1), 2509-2545.
159. Quinto, E. J., Jiménez, P., Caro, I., Tejero, J., Mateo, J., & Girbés, T. (2014). Probiotic lactic acid bacteria: a review. *Food and Nutrition Sciences*, 5(18), 1765.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari

160. Radoshevich, L., & Cossart, P. (2018). *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 16(1), 32-46.
161. Ragon, M., Wirth, T., Hollandt, F., Lavenir, R., Lecuit, M., Le Monnier, A., & Brisse, S. (2008). A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathogens*, 4(9), e1000146.
162. Rakhmanova, A., Khan, Z. A., & Shah, K. (2018). A mini review fermentation and preservation: Role of Lactic Acid Bacteria. *MOJ Food Process Technol*, 6(5), 414-417.
163. Rakhmanova, A., Khan, Z. A., & Shah, K., (2018). A mini review fermentation and preservation: Role of Lactic Acid Bacteria. *MOJ Food Process Technol*, 6(5), 414-417.
164. Rasmussen O.F., Skouboe P., Dons L., Rossen L., Olsen J.E. (1995). *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes. *Microbiology*, 141, pp. 2053-2061
165. Rathod, N. B., Phadke, G. G., Tabanelli, G., Mane, A., Ranveer, R. C., Pagarkar, A., & Ozogul, F. (2021). Recent advances in bio-preservatives impacts of lactic acid bacteria and their metabolites on aquatic food products. *Food Bioscience*, 44, 101440.
166. Regulation (EC) No 178/2002. Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 Laying Down the General Principles and Requirements of Food Law, Establishing the

European Food Safety Authority and Laying Down Procedures in Matters of Food Safety.

167. Regulation (EC) No 852/2004. (2004). Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on the Hygiene of Foodstuffs. Off. J. Eur. Union, 139, 1-54.
168. Reiner, K. (2010). Catalase test protocol. American society for microbiology, 1-6.
169. Roberts A., Nightingale K., Jeffers G., Fortes E., Kongo J.M., Wiedmann M. (2006). Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III. Microbiology, 152, pp. 685-693
170. Ross, R. P., Morgan, S., & Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. International journal of food microbiology, 79(1-2), 3-16.
171. Rugna, G., Carra, E., Bergamini, F., Franzini, G., Faccini, S., Gattuso, A., ... & Giacometti, F. (2021). Distribution, virulence, genotypic characteristics and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* isolated over one-year monitoring from two pig slaughterhouses and processing plants and their fresh hams. International Journal of Food Microbiology, 336, 108912.
172. Ruiz Rodríguez, L. G., Mohamed, F., Bleckwedel, J., Medina, R., De Vuyst, L., Hebert, E. M., & Mozzi, F. (2019). Diversity and functional properties of lactic acid bacteria isolated from wild fruits and flowers present in Northern Argentina. Frontiers in microbiology, 10, 1091.

**Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari**

173. Ryu, J., Park, S. H., Yeom, Y. S., Shrivastav, A., Lee, S. H., Kim, Y. R., & Kim, H. Y. (2013). Simultaneous detection of *Listeria* species isolated from meat processed foods using multiplex PCR. *Food Control*, 32(2), 659-664.
174. Sammarco, M. L., Ripabelli, G., & Tamburro, M. (2014). Epidemiologia molecolare delle malattie infettive: metodi di analisi ed interpretazione dei risultati. *Ann Ig*, 26(1), 10-45.
175. Şanlıbaba, P., & Güçer, Y. (2015). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria. *J. Int. Sci. Publ*, 3, 451-457.
176. Scatassa, M. L., Gaglio, R., Cardamone, C., Macaluso, G., Arcuri, L., Todaro, M., & Mancuso, I. (2017). Anti-*Listeria* activity of lactic acid bacteria in two traditional Sicilian cheeses. *Italian Journal of Food Safety*, 6(1).
177. Schiavano, G. F., Ateba, C. N., Petruzzelli, A., Mele, V., Amagliani, G., Guidi, F., ... & Brandi, G. (2021). Whole-Genome Sequencing Characterization of Virulence Profiles of *Listeria monocytogenes* Food and Human Isolates and In Vitro Adhesion/Invasion Assessment. *Microorganisms*, 10(1), 62.
178. Schlech III, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., ... & Broome, C. V. (1983). Epidemic listeriosis—evidence for transmission by food. *New england journal of medicine*, 308(4), 203-206.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari

179. Settanni, L., & Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food microbiology*, 27(6), 691-697.
180. Shamloo, E., Hosseini, H., Abdi Moghadam, Z., Halberg Larsen, M., Haslberger, A., & Alebouyeh, M. (2019). Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: a review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance. *Iranian journal of veterinary research*, 20(4), 241–254.
181. Shields, P., & Cathcart, L. (2010). Oxidase test protocol. *American Society for Microbiology*, 1-9.
182. Silva, D. R., Sardi, J. D. C. O., de Souza Pitangui, N., Roque, S. M., da Silva, A. C. B., & Rosalen, P. L. (2020). Probiotics as an alternative antimicrobial therapy: Current reality and future directions. *Journal of Functional Foods*, 73, 104080.
183. Sip, A., Więckowicz, M., Olejnik-Schmidt, A., & Grajek, W. (2012). Anti-*Listeria* activity of lactic acid bacteria isolated from golka, a regional cheese produced in Poland. *Food control*, 26(1), 117-124.
184. Soomro, A. H., Masud, T., & Anwaar, K. (2002). Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health-a review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 1(1), 20-24.
185. Spanu, C., Scarano, C., Ibba, M., Pala, C., Spanu, V., & De Santis, E. P. L. (2014). Microbiological challenge testing for *Listeria monocytogenes*

in ready-to-eat food: a practical approach. Italian journal of food safety, 3(4).

186. Spanu, C., Scarano, C., Ibba, M., Spanu, V., & De Santis, E. P. L. (2015). Occurrence and traceability of *Listeria monocytogenes* strains isolated from sheep's milk cheese-making plants environment. Food Control, 47, 318-325.
187. Spanu, C., Scarano, C., Piras, F., Spanu, V., Pala, C., Casti, D., ... & De Santis, E. P. L. (2017). Testing commercial biopreservative against spoilage microorganisms in MAP packed Ricotta fresca cheese. Food microbiology, 66, 72-76.
188. Srivastava, S., Srivastava, A., Chandra, N., & Kumar, S. (2017). Antimicrobial metabolites of probiotic bacteria: its properties and diversity. Research Article.
189. Steele, J., Broadbent, J., & Kok, J. (2013). Perspectives on the contribution of lactic acid bacteria to cheese flavor development. Current opinion in biotechnology, 24(2), 135-141.
190. Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie van leeuwenhoek, 70(2), 331-345.
191. Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K., & Matošić, S. (2010). Antimicrobial activity—the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. Food Technology and Biotechnology, 48(3), 296-307.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari

192. Tannock, G. W. (1997). Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. *Trends in biotechnology*, 15(7), 270-274.
193. Terentjeva, M., Šteingolde, Ž., Meistere, I., Elferts, D., Avsejenko, J., Streikiša, M., ... & Bērziņš, A. (2021). Prevalence, genetic diversity and factors associated with distribution of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in cattle farms in Latvia. *Pathogens*, 10(7), 851.
194. Thomas, J., Govender, N., McCarthy, K. M., Erasmus, L. K., Doyle, T. J., Allam, M., ... & Blumberg, L. H., 2020. Outbreak of listeriosis in South Africa associated with processed meat. *New England Journal of Medicine*, 382(7), 632-643.
195. Thomas, J., Govender, N., McCarthy, K. M., Erasmus, L. K., Doyle, T. J., Allam, M., ... & Blumberg, L. H. (2020). Outbreak of listeriosis in South Africa associated with processed meat. *New England Journal of Medicine*, 382(7), 632-643.
196. To, H. T. A., Chhetri, V., Settachaimongkon, S., & Prakitchaiwattana, C. (2022). Stress tolerance-Bacillus with a wide spectrum bacteriocin as an alternative approach for food bio-protective culture production. *Food Control*, 133, 108598.
197. Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2006). Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. *Microbiological Research*, 161(2), 102-108.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari

198. Tompkin, R. B. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *Journal of food protection*, 65(4), 709-725.
199. Urgeghe, P. P., Piga, C., Addis, M., Di Salvo, R., Piredda, G., Scintu, M. F., ... & Sanna, G. (2012). SPME/GC-MS characterization of the volatile fraction of an Italian PDO sheep cheese to prevalent lypolitic ripening: the case of Fiore Sardo. *Food Analytical Methods*, 5(4), 723-730.
200. Vagnoni E., Franca A., Porqueddu C., Duce P. (2017). Environmental profile of Sardinian sheep milk cheese supply chain: a comparison between two contrasting dairy systems. *J. Clean. Prod.*, 165 , pp. 1078-1089.
201. Vandermaesen, J., Horemans, B., Bers, K., Vandermeeren, P., Herrmann, S., Sekhar, A., ... & Springael, D. (2016). Application of biodegradation in mitigating and remediating pesticide contamination of freshwater resources: state of the art and challenges for optimization. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(17), 7361-7376.
202. Vazzoler, S. (2009). Cheese Making in the Veneto Region of Italy–Relevance and Implications to Australia.
203. Vesković-Moračanin, S. M., Đukić, D. A., & Memiši, N. R. (2014). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria: A review. *Acta periodica technologica*, (45), 271-283.
204. Wemmenhove, E., Wells-Bennik, M. H. J., & Zwietering, M. H. (2021). A model to predict the fate of *Listeria monocytogenes* in different cheese types–A major role for undissociated lactic acid in addition to pH, water

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari

- activity, and temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 357, 109350.
205. Widyastuti, Y., & Febrisiantosa, A. (2014). The role of lactic acid bacteria in milk fermentation. *Food and Nutrition Sciences*, 2014.
 206. Wilks, S. A., Michels, H. T., & Keevil, C. W. (2006). Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on metal surfaces: implications for cross-contamination. *International journal of food microbiology*, 111(2), 93-98.
 207. Xu, M. M., Kaur, M., Pillidge, C. J., & Torley, P. J. (2021). Evaluation of the potential of protective cultures to extend the microbial shelf-life of chilled lamb meat. *Meat Science*, 181, 108613.
 208. Yap, P. C., MatRahim, N. A., AbuBakar, S., & Lee, H. Y. (2021). Antilisterial Potential of Lactic Acid Bacteria in Eliminating *Listeria monocytogenes* in Host and Ready-to-Eat Food Application. *Microbiology Research*, 12(1), 234-257.
 209. Yüksekdağ, Z. N., Beyatli, Y., & Aslim, B. E. L. M. A. (2004). Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. *LWT-Food Science and Technology*, 37(6), 663-667.
 210. Zalán, Z., Németh, E., Baráth, Á., & Halász, A. (2005). Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. *Food technology and Biotechnology*, 43(3), 219-225.

Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari

211. Zheng, M., Zhang, R., Tian, X., Zhou, X., Pan, X., & Wong, A. (2017). Assessing the risk of probiotic dietary supplements in the context of antibiotic resistance. *Frontiers in microbiology*, 8, 908.

RINGRAZIAMENTI

Il percorso di Dottorato è stato uno dei più impegnativi, entusiasmanti e formativi. Ho potuto comprendere quanto tre anni possano essere produttivi ed espressione di crescita professionale ed umana. Reputo la mia esperienza un privilegio che ha coinvolto molteplici ambiti della mia vita, persone, luoghi. Ma soprattutto, mi ha messo in discussione e ciò ha rappresentato lo stimolo per confrontarmi, imparare, migliorare. I punti di domanda sono fondamentali perché danno seguito a risposte e la scienza, in fondo, è un po' questo: mettere in discussione, interrogarsi per comprendere il Mondo.

Tanti punti di riferimento ho avuto in questo percorso, ognuno di loro mi ha dedicato tempo di qualità e trasmesso passione per la Ricerca. È per me essenziale ringraziarli per aver condiviso con me questi anni e per l'impagabile collaborazione a questo progetto di ricerca.

Un sincero ringraziamento va innanzitutto al mio tutor, il Professor Enrico De Santis che, con pazienza e dedizione, ha saputo indirizzare il mio lavoro, promuovere nuove idee e trasmettermi fondamentali conoscenze. A lui devo tanto della mia crescita professionale e personale. Un sentito Grazie per avermi dato fiducia.

Al prof. Christian Scarano, alla dott.ssa Francesca Piras ed al dott. Vincenzo Spanu esprimo la mia gratitudine per l'immane supporto, il sostegno ed i preziosi consigli. Grazie per avermi coinvolta in svariate attività di ricerca, sono state per me ineguagliabile fonte di crescita.

Ringrazio il dott. Gavino Nieddu, il dott. Giangavino Buttu, e tutto il personale dell'Azienda CAO Formaggi che, con la loro professionalità, sono stati prestigiosi collaboratori per lo svolgimento di questo lavoro di ricerca.

Devo altresì ringraziare la dott.ssa Olivia McAuliffe e tutto lo staff di Teagasc che, nonostante la breve esperienza, ha condiviso con me conoscenze e competenze.

**Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari**

Un affettuoso ringraziamento alle mie colleghe Dottorande, agli Specializzandi, ai Borsisti. Ognuno è stato prezioso durante questo percorso. Grazie per il costante sostegno, per i consigli, il continuo confronto e l'immenso aiuto. Sono stati anni di condivisione di tempo e di idee che mi hanno fatto sentire fortunata professionalmente ed umanamente ad avervi incontrato.

Alla dott.ssa Daniela Ladu un caro ringraziamento per essere stata un riferimento sempre presente durante questi anni.

Un ringraziamento a tutti i Ricercatori, Docenti e Tecnici del Settore Ispezione degli Alimenti di Origine Animale per la disponibilità ed il supporto.

Ringrazio la prof.ssa Fiammetta Berlinguer, coordinatrice della Scuola di Dottorato in Scienze Veterinarie dell'Università degli Studi di Sassari, per il sostegno fornito e per incoraggiare la ricerca nei giovani.

La borsa di dottorato è stata cofinanziata con risorse del
Programma Operativo Nazionale Ricerca e Innovazione 2014-2020 (CCI 2014IT16M2OP005),
Fondo Sociale Europeo, Azione I.1 "Dottorati Innovativi con caratterizzazione Industriale"



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



**Maria Pina Meloni – “Adozione di colture bioprotettive per migliorare la sicurezza e la
conservabilità dei formaggi a base di latte ovino”
Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie - Ciclo XXXIV
Indirizzo: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare
Università degli Studi di Sassari**