



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA
Scienze Agrarie



Curriculum “Biotecnologie Microbiche Agroalimentari”

Ciclo XXIX

Studio delle proprietà tecnologiche e funzionali di *Lactobacillus* spp.
e stafilococchi coagulasi-negativi isolati da salsiccia di pecora

Dott. Michele Cottu

Coordinatore del Corso
Referente di Curriculum
Docente Guida
Tutor

Prof. Antonello Cannas
Prof. Severino Zara
Dott.ssa Nicoletta Pasqualina Mangia
Dott.ssa Barbara Scherm



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA
Scienze Agrarie



Curriculum “Biotecnologie Microbiche Agroalimentari”

Ciclo XXIX

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Scienze Agrarie dell'Università degli Studi di Sassari, a.a. 2015/2016 - XXIX ciclo, con il sostegno di una borsa di studio cofinanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività 1.3.1 “Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell'ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell'energia e dello sviluppo sostenibile, dell'agroalimentare e dei materiali tradizionali”.

La tesi è stata prodotta, altresì, grazie al contributo della Fondazione di Sardegna.

Michele Cottu presents its sincere thanks to the Sardinian Regional Government for the financial support of her PhD scholarship (P.O.R. Sardegna F.S.E. Operational Programme of the Autonomous Region of Sardinia, European Social Fund 2007-2013 - Axis IV Human Resources, Objective 1.3, Line of Activity 1.3.1.).

Sincere thanks also to the Fondazione di Sardegna for the financial contribution.

Abstract

Lactic acid bacteria (LAB) and coagulase negative staphylococci (CNS) are the main groups involved in sausage fermentation and ripening. LAB are important for safety guarantee of products, while CNS are important for their proteolytic and lipolytic properties. In this study, we identified and analyzed the technological and safety-related properties in LAB and CNS isolated from Sardinian sheep sausage. We found the following dominant bacteria species: *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *Staphylococcus xylosum*, *S. equorum* and *S. pasteurii*. Concerning to the technological properties, *Lactobacillus plantarum* showed an important growth capacity, high acidification activity and good lipolytic activity. The proteolytic properties of most CNS, were notable against sarcoplasmic protein, and *S. pasteurii* showed the highest lipolytic activity. About safety aspects, *L. plantarum* showed antimicrobial properties against important food borne pathogen. In relation to antibiotic resistance, we found mostly intrinsic resistance in tested strains. About biogenic amine production, strains confirm their safety feature: only *L. brevis* strains and one *S. pasteurii* produced tyramine. Some *L. plantarum* and *S. xylosum* strains have been shown to possess desirable technological and safety characteristics, therefore are good candidates as starter cultures in the sausage manufacturing.

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 I batteri lattici	2
<i>1.1.1 Caratteristiche tecnologiche</i>	4
1.2 Gli stafilococchi	5
<i>1.2.1 Caratteristiche tecnologiche</i>	7
1.3 Caratteristiche funzionali dei batteri starter	7
<i>1.3.1 Attività antimicrobica dei lattobacilli</i>	8
<i>1.3.2 Attività antimicrobica degli stafilococchi</i>	9
<i>1.3.3 Attività antifungina dei batteri lattici</i>	9
<i>1.3.4 Attività amino-decarbossilasica dei batteri lattici</i>	10
<i>1.3.5 Attività amino-decarbossilasica degli stafilococchi</i>	11
<i>1.3.6 Resistenza agli antibiotici nei batteri lattici</i>	12
<i>1.3.7 Resistenza agli antibiotici negli stafilococchi</i>	15
1.4 I salami	15
<i>1.4.1 La salsiccia sarda</i>	18
2. SCOPO DEL LAVORO	22
3. MATERIALI E METODI	24
3.1 Microrganismi e condizioni colturali	25
3.2 Identificazione e genotipizzazione degli isolati batterici	25
3.3 Attività acidificante e di crescita dei batteri lattici	27
3.4 Attività proteolitica	27
3.5 Attività lipolitica	29

3.6 Attività antibatterica	30
3.7 Attività anti-fungina	31
3.8 Produzione di ammine biogene	32
3.9 Resistenza/sensibilità agli antibiotici	33
3.10 Analisi statistica	34
4. RISULTATI	35
4.1 Identificazione e genotipizzazione degli isolati batterici	36
4.2 Capacità acidificante e di crescita dei lattobacilli	40
4.3 Attività proteolitica dei batteri lattici e degli stafilococchi CN	45
4.4 Attività lipolitica dei batteri lattici e degli stafilococchi CN	48
4.5 Attività antibatterica dei lattobacilli e degli stafilococchi	51
4.6 Attività anti-fungina	53
4.7 Produzione di ammine biogene	57
4.8 Resistenza/sensibilità agli antibiotici	60
5. DISCUSSIONE	64
6. CONCLUSIONI	75

Ringraziamenti

Bibliografia

1. INTRODUZIONE

1.1 I batteri lattici

I batteri lattici sono microrganismi procarioti, eterotrofi e chemoorganotrofi. Sono principalmente anaerobi microaerofili, in grado quindi di tollerare piccole concentrazioni di ossigeno, Gram positivi (Gram+), non sporigeni, privi di catalasi, di citocromo ossidasi e sono in grado di produrre grandi quantità di acido lattico dalla metabolizzazione dei carboidrati (Bottazzi, 1993).

Sulla base delle recenti acquisizioni tassonomiche, si possono suddividere nei seguenti generi: *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Holzapfel et al., 2001). In base alla loro temperatura ottimale di crescita, vengono suddivisi in mesofili e termofili. I primi hanno un optimum di sviluppo a 30°C, mentre per i secondi la temperatura ottimale di crescita è superiore ai 40°C. Appartengono al gruppo dei batteri lattici mesofili principalmente le specie ascritte al genere *Lactococcus* e *Leuconostoc*. Rientrano invece nel gruppo dei termofili, le specie appartenenti al genere *Streptococcus*. I batteri lattici sono i principali agenti della fermentazione lattica, le differenze fra le specie comportano un diverso corredo enzimatico che caratterizza due distinte vie metaboliche: metabolismo del lattosio dei batteri omofermentanti e metabolismo dei batteri eterofermentanti. Nei batteri lattici omofermentanti il lattosio viene scisso dall'enzima β -galattosidasi in glucosio e galattosio; dalla degradazione del glucosio si producono due molecole di lattato attraverso la via metabolica Embden-Mayerhof-Parnas (EMP). Il lattosio può essere fosforilato a lattosio-6P a livello della parete cellulare dalla fosfoenolpiruvato fosfotransferasi (PEP-PTS) ed essere presente a livello citoplasmatico nella sua forma fosforilata, oppure può essere assunto dalla cellula batterica come molecola tale quale per la presenza di proteine di membrana dette permeasi. I batteri lattici eterofermentanti (*Oenococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus brevis*) producono acido lattico, acido acetico dalla fermentazione dei pentosi (xilosio, ribosio) e lattato, CO₂ e etanolo dagli esosi (glucosio, fruttosio) attraverso la via metabolica della fosfochetolasi (Caplice e Fitzgerald, 1999; Jay, 2000; Kuipers et al., 2000).

I batteri lattici sono microrganismi eterotrofi per eccellenza e per il loro sviluppo richiedono substrati complessi contenenti carbonio, azoto, composti fosforati e solforati, ma anche molto ricchi di basi puriniche e pirimidiniche, vitamine e oligoelementi che rappresentano importanti fattori di crescita. I batteri lattici sono molto esigenti in fattori nutritivi azotati che devono trovare disponibili nel substrato di crescita, in modo da poter sfruttare appieno tutte le loro potenzialità metaboliche. In generale, gli aminoacidi non sono sintetizzati da questi batteri, per cui per potersi sviluppare, devono ricorrere a una sorgente esogena (acido glutamico, valina, metionina, ecc.); questi batteri

presentano comunque buone capacità nel trasporto degli aminoacidi e di corti peptidi attraverso la parete cellulare e la membrana citoplasmatica, garantendosi così il metabolismo azotato (Kandler, 1983). I batteri lattici sono largamente distribuiti in natura ritrovandosi in differenti habitat: nella cavità orale, nel tratto intestinale umano ed animale, nei vegetali, negli insilati, nel suolo, nell'acqua, nelle feci, nel letame, nei cereali e negli alimenti fermentati (latte, carne e vegetali). I batteri lattici fanno parte inoltre del microbiota autoctono di diversi alimenti fermentati quali salami, latti fermentati e formaggi, paste acide e bevande alcoliche nella maggior parte dei quali rivestono il ruolo di microrganismi tecnologici.

Genere *Lactobacillus*

Il genere *Lactobacillus*, secondo la classificazione più aggiornata, riportata nell'introduzione dell'ultima edizione del Bergey's Manual (Garrity et al., 2005) appartiene alla famiglia delle *Lactobacillaceae*, Ordine *Lactobacillales*, Classe *Bacilli* del Phylum *Firmicutes*.

Il genere *Lactobacillus* comprende ben 222 specie e 29 sottospecie descritte nella "LPSN" (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature) (Marzo 2016, www.bacterio.net).

Le cellule sono di forma regolare, allungate, corte e ricurve, talvolta formanti lunghe catene. Sono microrganismi eterofermentanti e omofermentanti, microaerofili in base alla presenza o all'assenza degli enzimi fruttosio-1,6-difosfato aldolasi, e la fosfochetolasi, responsabili del metabolismo omo o etero-fermentante rispettivamente. I lattobacilli sono divisi in 3 gruppi di seguito descritti.

-Gruppo I: Lattobacilli omofermentanti: a questo gruppo appartengono le specie che fermentano gli esosi quasi esclusivamente in acido lattico attraverso la via glicolitica di Embden-Meyerhof e che sono incapaci di fermentare i pentosi e il gluconato;

-Gruppo II: Lattobacilli eterofermentanti facoltativi: le specie del gruppo II, fermentano gli esosi attraverso la via di Embden-Meyerhof o glicolisi, e producono quasi esclusivamente acido lattico. Tuttavia in presenza limitata di glucosio, producono lattato, acetato, etanolo o acido formico; sono in grado di fermentare i pentosi a lattato ed acetato per mezzo di una fosfochetolasi inducibile dalla presenza di pentosi;

-Gruppo III: Lattobacilli eterofermentanti obbligati: I lattobacilli appartenenti a questo gruppo fermentano gli esosi a lattato, acetato (o etanolo) e CO₂ attraverso la via metabolica del fosfogluconato, mentre i pentosi sono fermentati, sempre mediante l'intervento dell'enzima fosfochetolasi in lattato e acetato.

I lattobacilli presentano un ampio *range* di condizioni colturali: temperatura compresa tra 5 e 53°C con valori ottimali di 30-40°C; elevate concentrazioni di sale (6.5%); pH ottimale di crescita di 5.5-5.8, ma si sviluppano anche a pH<5.

1.1.1 Caratteristiche tecnologiche

I batteri lattici e i lattobacilli in particolare costituiscono i microrganismi dominanti nei prodotti carnei fermentati. Essi sono gli agenti della fermentazione lattica degli zuccheri, e la conseguente diminuzione del pH (al di sotto di 5.0) è dovuta alla produzione di acido lattico. L'acidificazione è un prerequisito fondamentale per l'ottenimento di alimenti fermentati di qualità poiché impedisce la crescita di microrganismi patogeni e alteranti, garantendo la sicurezza e la conservabilità (Samelis et al., 1994).

Da un punto di vista strettamente tecnologico, l'attività acidificante che i batteri lattici svolgono nell'impasto carneo, favorisce la coagulazione delle proteine, la formazione del colore e il miglioramento della stabilità del prodotto (Bücke Nhüske, 1993). Inoltre, la diminuzione della capacità di legare l'acqua da parte delle proteine della carne, a causa dell'acidificazione, accelera l'essiccazione e riduce quindi il tempo di lavorazione (Jessen, 1995). Per contro, una rapida acidificazione, non è sempre considerata un pregio, poiché in alcune produzioni può portare ad una alterazione della compattezza e del colore del prodotto, rivelando al taglio un aspetto non gradevole. Durante il processo di maturazione dei prodotti carnei fermentati, i batteri lattici possono agire sulle proteine, sia nel corso del loro sviluppo, ma soprattutto dopo la morte e la lisi delle loro cellule, in questo modo le proteasi intracellulari vengono riversate all'esterno e agiscono sulle proteine dell'impasto provocandone l'idrolisi. Tuttavia, un'intensa attività proteolitica, viene svolta dalle catepsine provenienti dalle cellule sarcoplasmatiche della carne e da altri enzimi proteolitici (Zambonelli et al., 1992).

Nelle carni fermentate i batteri lattici sono in parte responsabili anche dei processi di lipolisi, ovvero della parziale degradazione della frazione lipidica, essenziale nello sviluppo degli aromi nei salami. Il processo della lipolisi, avviene ad opera delle lipasi provenienti dai tessuti muscolari e dalle lipasi di natura microbica. I batteri lattici possono idrolizzare i trigliceridi e possono agire sui mono e digliceridi, contribuendo così all'idrolisi dei grassi e alla formazione di acidi grassi liberi. Mono e digliceridi inoltre, sono in grado di legare la frazione proteica idrosolubile con quella grassa liposolubile favorendo la consistenza, la stabilità e la compattezza del prodotto.

I batteri lattici trovano un'ampia applicazione a livello industriale come colture starter, come probiotici e come agenti bio-conservanti, non a caso per molte specie è stato riconosciuto lo status di GRAS (Generally Recognized as Safe) e lo status di QPS (Qualified Presumption of Safety) (Bernadeau et al., 2008; Giraffa, 2012).

Lo status di GRAS è stato introdotto negli Stati Uniti dalla Food and Drug Administration (FDA, 2010), e viene riconosciuto alle sostanze o ai microrganismi, per i quali è stata accertata la sicurezza alimentare. Lo status di QPS è stato introdotto in Europa nel 2007 dall'European Food Safety Authority (EFSA) e rappresenta uno schema di valutazione della sicurezza di un determinato microrganismo proposto dall'EFSA; si basa sulle conoscenze acquisite su un determinato ceppo batterico, sulle indagini che consentono di escludere ogni eventuale caso d'infezione e sull'assenza di geni di resistenza agli antibiotici e di geni di virulenza; è inoltre utile per la valutazione della sicurezza d'uso dei microrganismi nella filiera alimentare.

1.2 Gli stafilococchi

Gli stafilococchi sono microrganismi Gram+, immobili, asporigeni, aerobi facoltativi, fermentanti il glucosio e produttori di catalasi. Appartengono al genere *Staphylococcus*, alla famiglia delle *Staphylococcaceae*, all'ordine dei *Bacillales*, alla classe dei *Bacilli* e al phylum dei *Firmicutes*. Sono ampiamente distribuiti in natura e a oggi il genere *Staphylococcus* comprende 52 specie e 28 sottospecie (www.bacterio.net). In base agli studi del gene 16S rRNA, al genere *Staphylococcus* appartengono batteri Gram+ con un basso contenuto di G+C. Sono infatti, strettamente correlati a ad altri batteri Gram+ come enterococchi, streptococchi, lattobacilli e listeria (Irlinger, 2008).

Le cellule degli stafilococchi possono disporsi singolarmente, a formare delle coppie o delle tetradi, oppure disporsi in ammassi irregolari che ricordano dei grappoli d'uva (da cui deriva il termine *Staphylococcus*); possiedono una parete cellulare spessa e rigida costituita principalmente da peptidoglicano, da acidi teicoici, polimeri specie-specifici, da acidi lipoteicoici e polisaccaridi complessi, chiamati polisaccaridi C. Una caratteristica importante del peptidoglicano degli stafilococchi è la presenza di ponti interspecifici ricchi di glicina. Circa la metà delle specie presentano ponti penta ed esa-glicinici, con legami tra l'aminogruppo della L-lisina e il gruppo carbossilico della D alanina adiacente (peptidoglicano di tipo Lys-Gly₅₋₆). Nelle altre specie, una porzione dei residui di glicina è sostituita da L-serina (peptidoglicano di tipo Lys-Gly₄, Ser), mentre alcune specie (*S. sciuri*, *S. lentus*, *S. fleuretti* e *S. vitulus*) possono avere un residuo di L-alanina, invece di uno di glicina, legato alla lisina della subunità peptidoglicanica (peptidoglicano di tipo

Lys-Ala-Gly₄). Gli acidi teicoici della parete cellulare degli stafilococchi, sono polimeri idrosolubili che contengono gruppi fosfodiesterici legati covalentemente al peptidoglicano e si presume abbiano una funzione antigenica. Gli acidi lipoteicoici invece hanno la funzione di ancorare la parete cellulare alla membrana citoplasmatica sottostante. In alcune specie/ceppi di stafilococchi la parete cellulare è rivestita da una capsula polisaccaridica, costituita da esopolisaccaridi. Questa struttura conferisce al microrganismo una notevole resistenza a diversi fattori di stress: condizioni ambientali sfavorevoli e antibiotici (Dehò et al., 2012). Crescono in un range di temperatura che va da 10 a 45 °C, con un optimum di temperatura dai 30 ai 37 °C e in un range di pH tra 4 e 9, con un optimum tra 7 e 7.5. Dal punto di vista metabolico gli stafilococchi utilizzano il sistema completo dei citocromi quando crescono in presenza di ossigeno, mentre in ambiente anaerobio presentano un metabolismo energetico fermentativo. La crescita degli stafilococchi è più rapida e abbondante in condizioni di aerobiosi, con l'eccezione di *S. saccharolyticus* e *S. aureus* subsp. *anaerobius*, che sono anche catalasi-negativi. La maggior parte delle specie contengono citocromi di tipo a e b, le specie *S. lentus*, *S. sciuri* e *S. vitulus* contengono anche citocromi di tipo c (Götz, 2006). Pur non essendo sporigeni, gli stafilococchi mostrano una notevole resistenza a condizioni ambientali sfavorevoli. La loro notevole alofilia, li rende capaci di svilupparsi anche in presenza di concentrazioni elevate di NaCl (7,5%), tali da inibire lo sviluppo della maggior parte degli altri batteri (La Placa, 2008). Una prima distinzione operata all'interno del genere *Staphylococcus* considera due raggruppamenti: stafilococchi coagulasi-positivi (SCP) e coagulasi-negativi (SCN). Il gruppo degli stafilococchi coagulasi-positivi comprende le specie produttrici di tossine responsabili di tossinfezioni alimentari e patogene per l'uomo. La specie *Staphylococcus aureus* rappresenta il patogeno più importante per l'uomo, in quanto agente causale di malattie nosocomiali come setticemie, endocarditi, polmoniti, osteomieliti, artriti e malattie della pelle (Wertheim et al., 2005; Dayan et al., 2016).

Gli stafilococchi coagulasi negativi (stafilococchi CN) invece, sono un gruppo eterogeneo di microrganismi in cui si possono distinguere ceppi saprofiti e d'interesse tecnologico, importanti nello sviluppo degli aromi nei prodotti fermentati. Gli stafilococchi CN fanno parte del microbiota naturale dei prodotti carnei fermentati (Garcia et al., 1988, 1990; Casaburi et al., 2013). Sono microrganismi commensali della pelle e delle membrane mucose degli animali a sangue caldo, ma sono riscontrabili anche in un'ampia gamma di prodotti alimentari come carne, latte e loro derivati, e in substrati ambientali come suolo, sabbia, aria e acqua (Kloos e Schleifer, 1986; Ruaro et al., 2013). Da sempre gli stafilococchi CN sono stati considerati non patogeni. Di recente invece, la

sicurezza degli stafilococchi CN è stata argomento di discussione per l'European Food Safety Authority (EFSA, 2004), in ragione del fatto che oggi sono considerati tra i maggiori patogeni nosocomiali, in particolare le specie *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* (Beker et al., 2014).

Tuttavia, gli stafilococchi CN associati ai prodotti alimentari e quelli commensali della pelle e delle mucose dell'uomo e degli animali, hanno una minore incidenza nelle manifestazioni cliniche.

Le specie *S. xylosus* e *S. carnosus* sono inoltre utilizzate come colture starter nella fermentazione della carne (Talon et al., 2002; Rantsiou e Cocolin; 2006)..

1.2.1 Caratteristiche tecnologiche

Gli stafilococchi sono microrganismi commensali delle carni fermentate, e in relazione al numero elevato, anche nei salami, dove raggiungono popolazioni intorno alla 10^5 - 10^8 ufc/g, soprattutto dopo i 14-20 giorni di maturazione. Attraverso la loro capacità di ridurre i nitrati in nitriti e in ossido nitrico, contribuiscono alla formazione della nitroso mioglobina, pigmento che attribuisce il colore rosso caratteristico della carne stagionata.

La presenza dell'enzima catalasi in questo gruppo di microrganismi, contribuisce alla riduzione dei perossidi, i quali potrebbero alterare il prodotto e favorirne l'irrancidimento.

Gli stafilococchi CN contribuiscono ai processi di proteolisi dei prodotti carnei fermentati (Montel et al., 1992; Hammes et al., 1995). Le proteine della carne, principalmente sarcoplasmatiche e miofibrillari, sono idrolizzate per opera delle esopeptidasi e proteasi microbiche (per autolisi) e degli enzimi endogeni del muscolo (catepsine).

Rivestono inoltre particolare importanza anche nei processi lipolitici (Samelis et al., 1993); Stanke et al. (1994) riporta dell'importanza di questa specie nel rilascio di acidi grassi liberi nel prodotto in seguito all'azione lipolitica. Altri autori riportano in particolare, delle proprietà lipolitiche della specie *S. xylosus* (Comi et al., 1992; Sorensen et al., 1993; Fiorentini et al., 2010).

1.3 Caratteristiche funzionali dei batteri starter

La selezione dei lattobacilli e degli stafilococchi coagulasi negativi, oltre a contemplare le attività di ordine tecnologico certamente indispensabili per la validazione del processo produttivo, considera anche le attività "funzionali" ossia la capacità di fornire dei benefici al consumatore attraverso la produzione di sostanze antibatteriche/antifungine, attività amino-decarbossilasica e resistenza agli antibiotici.

1.3.1 Attività antimicrobica dei lattobacilli

L'attività antagonista dei lattobacilli nei confronti di diversi microrganismi alteranti e/o patogeni come *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Clostridium difficile* è spesso dovuta all'abbassamento del pH, alla produzione di acidi organici, e alla produzione di metaboliti antimicrobici come il perossido di idrogeno e le batteriocine (Trenevev, 2001; Dalié et al., 2010).

L'acido lattico e l'acido acetico, rappresentano i prodotti principali derivanti dalla fermentazione lattica dei carboidrati. L'acido lattico in particolare oltre ad esercitare la propria attività attraverso l'abbassamento del pH, nella sua forma indissociata, agisce come “permeabilizzatore” della membrana esterna dei batteri Gram-negativi, favorendo l'ingresso di altri composti ad azione battericida. Inoltre, gli acidi organici in base alle loro proprietà chelanti possono catturare elementi essenziali per la crescita, quali ferro, non rendendolo quindi disponibile ad altri microrganismi. Makras et al. (2006) Hyperlink e Makras (2006) hanno dimostrato che l'attività antimicrobica di *L. casei* Shirota e *L. rhamnosus* GG è dovuta esclusivamente alla produzione di acido lattico mentre Tejero-Sarinena et al. (2012) hanno riportato che l'attività antimicrobica di *L. plantarum* e *L. casei* nei confronti di *E. coli* e *S. aureus* è dovuta a diversi fattori.

I lattobacilli sono inoltre in grado di produrre sostanze di natura proteica, chiamate batteriocine. Si tratta di molecole proteiche di produzione batterica dotate di attività inibitoria nei confronti di ceppi batterici diversi dal ceppo produttore, ma a questo strettamente correlati. Le batteriocine prodotte dai batteri Gram+, sono generalmente peptidi cationici di piccole dimensioni e termostabili, inizialmente sintetizzati come pre-peptidi e che, in seguito a fenomeni di scissione, si trasformano in molecole biologicamente attive. Generalmente sono stabili al calore, a bassi valori di pH, al congelamento e sensibili agli enzimi proteolitici. In base alla loro natura proteica e allo spettro d'azione, le batteriocine vengono classificate in quattro classi: Classe I (*Lantibiotici*) di dimensioni < 5kD, termostabili, contenenti amminoacidi tioeteri come la lantionina e la β -metil lantionina e amminoacidi insaturi come la deidroalanina e l'acido DL-2-aminobutirrico; la nisina rappresenta il classico esempio di batteriocina appartenente a questa classe; Classe II, di dimensioni < 10 kDa, idrofobiche e relativamente stabili al calore, non contengono amminoacidi modificati; appartiene a questa classe la batteriocina PA-1; Classe III, di dimensioni > 30 kDa e termolabili e infine Classe IV, molecole complesse nella cui struttura si riconoscono componenti sia di natura lipidica che glucidica che sono indispensabili per la loro attività.

1.3.2 Attività antimicrobica degli stafilococchi

Tra i batteri Gram+, anche gli stafilococchi hanno la capacità di produrre sostanze antimicrobiche, in particolare batteriocine.

Schnell et al. (1989) riportano la produzione di un antibiotico, la gallidermina, da parte della specie *Staphylococcus gallinarum*; Sahl e Bierbaum (1998) riferiscono invece della produzione dell'epidermina da parte di *S. epidermidis*. Altri autori riportano la produzione dell'aureocina da parte di *S. aureus* (Netz et al., 2002;). *Staphylococcus equorum* WS 2733 è invece produttore della macrocina P1 (Cundliffe e Thompson, 1981; Otaka et al., 1974).

1.3.3 Attività antifungina dei batteri lattici

I batteri lattici possono svolgere attività antagonista anche nei confronti dei funghi/muffe. I funghi associati alla catena alimentare appartengono principalmente ai generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*; i primi due sono contaminanti di un'ampia gamma di prodotti alimentari e mangimi, alcune specie di *Fusarium* sono patogene dei cereali in campo (Mauch et al., 2010). Il problema maggiore che incombe in seguito alla contaminazione fungina, è dovuto alla produzione di micotossine, prodotti naturali derivanti dal metabolismo secondario di molte specie fungine, appartenenti soprattutto ai generi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* e *Claviceps* (Marin et al., 2013). Gli effetti dovuti all'ingestione, all'inalazione o al contatto possono causare seri problemi di salute nell'uomo e negli animali. Possono avere caratteristiche di genotossicità, cancerogenicità, immunotossicità, mutagenicità, nefrotossicità e teratogenicità (Zöllner e Mayer-Helm, 2006).

Nella filiera alimentare, una delle malattie principali che colpisce il frumento in campo è la "fusariosi della spiga", patologia diffusa in tutto il mondo, la cui scoperta risale alla fine del 19° o 18° secolo in Inghilterra (Smith, 1884). In Italia la malattia è stata segnalata fin dai primi anni del 1900, tuttavia solo verso la fine del secolo scorso è apparsa in forma epidemica in alcune aree italiane (Balmas et al., 1998; Corazza et al., 2002; Pancaldi et al., 2010). In Sardegna compare raramente e con gravità di attacco non elevata tranne che in particolari annate come quella del 2010 e del 2013 (Pruneddu et al., 2010; Pruneddu et al., 2013).

I funghi responsabili della fusariosi della spiga fanno parte del genere *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. triticum*) e del genere *Microdochium* (*M. nivale* var. *nivale* e *M. nivale* var. *majus*).

F. graminearum Schwabe (telomorfo=*Gibberella zeae*) è la specie predominante negli areali di coltivazione del frumento in tutto il mondo, classificandosi al 4° posto tra i patogeni fungini in base all'importanza scientifica ed economica (Dean et al., 2012). Le fasi fenologiche tra la spigatura-fioritura e la maturazione latteo-cerosa sono quelle in cui la pianta è molto sensibile (Schroeder e Christensen, 1963). Balmas et al. (1998) riporta come il proliferarsi della malattia sia inoltre influenzato dalle condizioni climatiche, vale a dire caldo umido e pioggia e dalle pratiche colturali come la gestione dei residui in campo, precessione colturale, varietà utilizzata, eccesso di azoto, oltre che dalla microflora e dalla microfauna presente nel terreno. I sintomi principali di questa malattia sono dei disseccamenti totali o parziali della spiga, con conseguente formazione di cariossidi striminzite. La comparsa di piccole masse arancioni tra le spighette (sporodocchi, fruttificazioni agamiche del fungo), è sintomo di un'infezione avvenuta in periodi umidi e piovosi (Champeil et al., 2004).

Tra le micotossine prodotte dal microrganismo responsabile della fusariosi della spiga (*Fusarium* spp.) vi sono i tricoteceni. I tricoteceni chimicamente sono sesquiterpeni epossidici, divisi in quattro gruppi, A, B, C e D (Marin et al., 2013), la cui tossicità è dovuta al gruppo epossidico (Organizzazione mondiale della sanità, WHO 1990).

I tricoteceni prodotti dal *Fusarium graminearum* appartengono al gruppo B, che comprende il deossinivalenolo (DON), il nivalenolo (NIV) e i loro derivati, in particolare 3-acetil e 15-acetil deossinivalenolo (3ADON e 15ADON) e il 4-acetil deossinivalenolo (4ANIV), e sono quelli maggiormente prodotti (Dweba et al., 2017).

1.3.4 Attività amino-decarbossilasica dei batteri lattici

Le ammine biogene (AB) sono riconosciute da tempo come responsabili di problemi fisiologici per l'uomo. Esse si trovano nei prodotti alimentari fermentati quali vino, formaggi, insaccati, pesce e carni non ben conservati. Le AB sono basi organiche a basso peso molecolare la cui struttura può essere alifatica (putrescina, cadaverina, spermina e spermidina), aromatica (tiramina e fenilettilamina) o eterociclica (istamina e triptamina). Derivano principalmente dalla decarbossilazione degli amminoacidi precursori, dai quali viene rimosso il gruppo carbossilico con conseguente formazione dell'ammina corrispondente e di CO₂ (Gardini et al., 2016). La reazione è catalizzata da un gruppo di enzimi di origine microbica noti come amminoacido decarbossilasi che utilizzano il piridossal fosfato come coenzima. I prodotti di questa reazione sono ammine spesso di notevole importanza biochimica o dotate di intense attività fisiologiche e pertanto indicate come

ammine biogene. Per contro, elevate concentrazioni di AB negli alimenti, possono avere implicazioni sulla salute dell'uomo che si manifestano in termini di crisi ipertensive, mal di testa, nausea; tiramina e istamina in particolare possono indurre anche reazioni allergiche (Roseiro et al., 2006; Latorre-Moratalla et al., 2012). Inoltre, nei prodotti carnei fermentati, alcune AB come la putrescina e la cadaverina, in presenza dei nitriti possono dare origine a composti cancerogeni come le nitrosammine (Huis in't Veld et al., 1990; Hotchkiss et al., 1977).

Alcune AB, come cadaverina e putrescina, rivestono un certo rilievo come "indicatori d'igiene" delle materie prime o del processo di trasformazione (Vidal-Carou et al., 2007), poiché la loro formazione dipende dall'attività di microrganismi contaminanti come le enterobatteriace e altri batteri fortemente proteolitici.

Negli alimenti fermentati caratterizzati da un'eccessiva proteolisi e conseguentemente da una elevata concentrazione di aminoacidi, le AB possono raggiungere livelli importanti, la cui formazione è dovuta all'attività di specie o meglio di ceppi batterici diversi. È stato infatti riportato che la produzione di ammine biogene sia ceppo specifica e non specie specifica (Marcobal et al., 2006; Garai et al., 2007).

Tra i microrganismi d'interesse alimentare, i batteri lattici anche se considerati non patogeni o non tossinogeni, possono tuttavia produrre ammine biogene in seguito alla loro attività decarbossilasica. Il genere maggiormente coinvolto è *Enterococcus*, descritto come produttore di tiramina e triptamina nei formaggi e di ammine biogene in genere nel latte (Garg e Mital, 1991). In particolare le specie *Enterococcus faecium* e *E. faecalis* producono tiramina e fenilettilamina nei salumi fermentati (Talon e Leroy, 2011).

Diverse specie di lattobacilli isolate da salami fermentati, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. farciminis*, e *L. sakei*, sono state riportate come produttrici di ammine biogene, tiramina in particolare (Suzzi e Gardini, 2003).

1.3.5 Attività amino-decarbossilasica degli stafilococchi

La produzione di ammine biogene da parte degli stafilococchi è minore se comparata a quella dei batteri lattici. A oggi non è stata documentata la produzione di ammine biogene nei formaggi, mentre i salami fermentati possono contenere ammine biogene derivanti da specie appartenenti a questo gruppo di microrganismi (Talon e Leroy, 2011). Le specie *S. carnosus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. warneri* e *S. piscifermentas* sono produttrici di ammine biogene (Talon e Leroy, 2011). In particolare la specie *S. xylosus* è produttrice di istamina (Silla Santos, 1996). Anche.

tiramina e putrescina possono essere prodotte dagli stafilococchi, mentre è rara la produzione di istamina (de las Rivas et al., 2008)

1.3.6 Resistenza agli antibiotici nei batteri lattici

La scoperta degli antibiotici nel ventesimo secolo ha cambiato l'approccio nel trattamento delle malattie infettive negli esseri umani e negli animali. L'uso clinico degli antibiotici ha permesso di ridurre drasticamente il tasso di mortalità associato alle malattie infettive, e inoltre ha avuto un profondo impatto sulla chirurgia e sulla terapia dei tumori. Il loro utilizzo si è quindi espanso sia in ambito veterinario, dove vengono impiegati come agenti terapeutici, per la profilassi e come promotori di crescita, sia in agricoltura, dove vengono impiegati per il trattamento delle patologie vegetali (Wegener, 2003; Levy e Marshall, 2004). L'uso eccessivo degli antibiotici, ha però portato ad un drammatico incremento della frequenza delle resistenze tra i microrganismi patogeni e di conseguenza a una riduzione delle opzioni terapeutiche (Andersson e Hughes, 2010). Recentemente, l'Organizzazione Mondiale per la Sanità (OMS, 2014) ha evidenziato il problema degli agenti infettivi antibiotico resistenti, ponendolo tra i principali problemi da affrontare per la salvaguardia della salute pubblica.

La resistenza agli antibiotici è una caratteristica dei biomi batterici e può essere vista come il risultato dell'adattamento che si verifica facilmente sotto l'effetto delle pressioni dell'ambiente circostante (Rodriguez-Rojas et al., 2013). Le resistenze possono essere di due tipi: intrinseche (o naturali) o acquisite. Sono resistenze intrinseche quelle che si manifestano per la presenza naturale del gene nel cromosoma dell'ospite, quelle acquisite invece sono dovute all'acquisizione di un gene attraverso trasferimento genico orizzontale: coniugazione (attraverso plasmidi o trasposoni coniugativi), trasformazione (incorporamento nel cromosoma di DNA cromosomico, plasmidi o altro DNA da un organismo estraneo) e trasduzione (attraverso batteriofagi), oltreché alla mutazione di un gene indigeno (Levy e Marshall, 2004; Ammor e Mayo, 2007). Il trasferimento di materiale genetico tra microrganismi appartenenti allo stesso genere è comune, ma è stato osservato anche tra microrganismi appartenenti a generi completamente diversi, anche molto distanti come tra Gram+ e Gram- (Courvalin, 1994)

Le resistenze intrinseche presentano un minimo potenziale di trasferimento orizzontale tra diverse specie, com'è stato dimostrato per esempio per il determinante genico della resistenza alla vancomicina presente in *L. rhamnosus* GG (Devirgiliis et al., 2013). In maniera molto simile le resistenze acquisite dovute ad una mutazione cromosomica presentano un basso rischio di

trasferimento, invece, le resistenze acquisite presenti in elementi genetici mobili presentano un elevato rischio di trasferimento (Devirgiliis et al., 2013).

La resistenza agli antibiotici da parte dei microrganismi è legata a una serie di meccanismi, e quindi alla presenza di particolari locus genici, i principali dei quali sono: inattivazione diretta della molecola attiva; perdita della suscettibilità all'antibiotico per modificazione del target di azione dell'antibiotico; riduzione della concentrazione dell'antibiotico che raggiunge il target senza modificazione del componente stesso. Quest'ultimo meccanismo, chiamato *efflux pump*, permette alla cellula di espellere l'antibiotico. Rappresenta il meccanismo maggiormente coinvolto nelle resistenze intrinseche, acquisite e fenotipiche nei confronti degli antibiotici utilizzati attualmente nel trattamento delle infezioni (Hernando-Amado et al., 2016). I meccanismi intrinseci di difesa sono legati soprattutto alla bassa permeabilità della cellula e all'estrusione della molecola stessa dalla cellula, per effetto appunto dell'*efflux pump* (Fajardo et al., 2008)

Una caratteristica che suscita maggiore preoccupazione per la salvaguardia della salute dell'uomo sono i microrganismi che presentano resistenze multiple, ovvero quelli capaci di resistere a più di una classe di antibiotici. Le resistenze multiple sono state trovate per la prima volta in batteri enterici come *Escherichia coli*, *Shigella* e *Salmonella*, già dal 1950-1960. L'utilizzo sempre maggiore di antibiotici ha intensificato la frequenza delle resistenze, soprattutto nei paesi industrializzati. I microrganismi multi-resistenti costituiscono un rischio maggiore, considerando che per il trattamento spesso necessitano dell'uso di più antibiotici, inoltre rappresentano un costo maggiore in quanto raddoppiano i periodi di ricovero in ospedale, e raddoppia il tasso di mortalità e di morbilità in comparazione con un'infezione dovuta a un agente sensibile (Levy e Marshall, 2004). Molti individui possono soccombere alle resistenze multiple per l'inefficacia degli antibiotici, soprattutto nei paesi in via di sviluppo, dove per le malattie enteriche dovute ad agenti come *Salmonella enteridis*, *Shigella flexneri* e *Vibrio cholerae* sono state attuate misure di sanità pubblica (Levy e Marshall, 2004).

L'antibiotico resistenza nei batteri d'interesse alimentare suscita scalpore per il potenziale rischio di trasferimenti di geni di resistenza. Valutare la presenza di resistenze trasmissibili nella selezione dei ceppi è quindi un criterio di sicurezza molto importante (Talon e Leroy, 2011).

I cibi fermentati rappresentano per i microrganismi un veicolo verso il corpo umano e possono rappresentare un *reservoir* di geni di antibiotico resistenza facilmente trasferibili, sia a batteri patogeni che a batteri commensali (Talon e Leroy., 2011).

Tra i batteri lattici il genere *Enterococcus* è sicuramente quello maggiormente studiato, soprattutto in ambito clinico e medico. Da diversi anni è conosciuto come l'agente causale più comune dell'endocardite, malattia fatale senza una terapia antibiotica efficace. Rappresentano inoltre la causa più comune d'infezioni nosocomiali, causando batteriemie, infezioni del tratto urinario e altro (Franz et al., 2011). Ceppi di *E. faecium* provenienti da ambito clinico, presentano resistenze intrinseche alla penicillina e hanno acquisito determinanti genetici per la resistenza ai glicopeptidi (vancomicina e teicoplanina) e all'azione sinergica dei β -lattamici e aminoglicosidi (Ogier e Serror, 2008). Tuttavia, nonostante la loro potenziale patogenicità, negli enterococchi isolati da prodotti alimentari, solo in alcuni casi si sono verificate resistenze nei confronti di antibiotici importanti di uso medico come ampicillina, gentamicina, penicillina e vancomicina (Talon e Leroy, 2011). L'insorgenza di patologie legate ai lattobacilli è molto rara. Il tasso d'infezione di *Lactobacillus* nella popolazione sana è molto basso, si stima 1 caso ogni 10.000.000 di individui in un periodo che copre più di un secolo (Bernardeau et al., 2006), non a caso sono riconosciuti come microrganismi GRAS e QPS. Tuttavia, in soggetti immuno-compromessi e in soggetti anziani, la sicurezza dei lattobacilli dovrebbe essere presa in considerazione. Alcuni ceppi opportunistici, possono occasionalmente causare infezioni (Harty et al., 1994; Cannon et al., 2005;), ed altri possiedono resistenze agli antibiotici che potrebbero essere trasferibili. Attraverso l'ingestione di alimenti fermentati i lattobacilli possono raggiungere il tratto gastrointestinale in numero maggiore di 10^8 ufc/mL (Ali et al., 2009), dove possono interagire con il microbiota residente ed effettuare dei trasferimenti di materiale genetico. A causa dell'elevato numero di cellule batteriche presenti a livello gastrointestinale, si creano le condizioni in cui le cellule sono in stretto rapporto spaziale tra di loro, creando così un ambiente idoneo per il trasferimento di materiale genetico. La possibilità di trasferimento di resistenze agli antibiotici mette in risalto l'importanza della qualità microbiologica dei prodotti fermentati, in particolare quelli tradizionali. Negli ultimi anni, i lattobacilli come potenziali serbatoi di antibiotico resistenza, sono oggetto di studio da parte della società scientifica ma anche del consumatore, anche se considerati come sicuri (QPS). Fino al 1999 gli studi sulla presenza di antibiotico resistenza nei lattobacilli erano pochi, da allora diverse ricerche hanno riportato la presenza di geni di resistenza nei lattobacilli. Molti autori hanno dimostrato sia la presenza di resistenze intrinseche sia la presenza di geni che codificano per resistenze trasferibili (Casado et al., 2014; Hummel et al., 2007; Kastner et al., 2006, Klare et al., 2007, Klein et al., 2011; Liu et al., 2009; Zonenschain et al., 2009; Ammor et al., 2008; Devirgiliis et al., 2009). Danielsen e Wind (2003) riportano che il genere *Lactobacillus* ha un numero elevato di resistenze naturali alla

bacitracina, cefoxitina, ciprofloxacina, acido fisidico, kanamicina, gentamicina, metronizadolo, nitrofurantoina, norfloxacin, streptomycin, sulfadiazina, teicoplanina, trimetropin/sulfametossazolo e vancomycin.

Le proprietà chimico fisiche degli alimenti fermentati e la presenza di fattori di stress come il sale, il basso pH e la presenza di additivi possono innescare un aumento delle resistenze, con un incremento dell'espressione di questi geni e facilitando la disseminazione tra ceppi che coesistono nello stesso luogo e periodo (Al-Nabusi et al., 2011; Ganjian et al., 2012, Poole 2012).

1.3.7 Resistenza agli antibiotici negli stafilococchi

Le resistenze agli antibiotici interessano anche gli stafilococchi. Le infezioni da stafilococchi, causate generalmente da specie coagulasi positive, sono documentate in tutte le parti del mondo (Ateba et al., 2010). La specie *Staphylococcus aureus* è la specie maggiormente studiata, ma anche quella che rende più complicate le cure mediche, soprattutto se si tratta di ceppi con resistenze multiple. L'elevata virulenza di *S. aureus* è stata documentata per la prima volta in uno studio pubblicato nel 1941, che riporta di un tasso di mortalità dell'82% associato a pazienti con batteriemie dovute a questo microrganismo in un ospedale della città di Boston (Skinner e Keefer, 1941). La resistenza alla meticillina in *S. aureus* (meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA) è quella maggiormente riscontrata. In ambito ospedaliero l'MRSA rappresenta un problema già dal 1960; il 20% delle infezioni ematiche sono causate da *S. aureus* (Wisplinghoff et al., 2010). Nel 2003 negli Stati Uniti, in un'unità di terapia intensiva, la percentuale d'infezioni da MRSA, ha raggiunto il 64.4%; rappresentano inoltre la causa di maggiori costi sanitari, periodi di ricovero più lunghi e a essi si associa il maggiore tasso di mortalità (Klevens et al., 2007).

Anche specie di stafilococchi CN isolate da colture starter, alimenti probiotici e carni fermentate, hanno geni codificanti per la resistenza alla tetraciclina, eritromicina e ai β -lattamici. Anche in questo caso sono stati definiti come *reservoir* di resistenze trasferibili a ceppi di *S. aureus*, rendendoli resistenti ad agenti multipli (Fijałkowski et al., 2016). Le resistenze maggiormente riscontrate negli stafilococchi CN isolati da prodotti alimentari sono quelle all'ampicillina, eritromicina, penicillina, lincomicina e tetraciclina (Talon e Leroy., 2011)

1.4 I salami

I salami sono alimenti derivanti dalla fermentazione di carni ottenute dalla muscolatura striata appartenente alla carcassa di suino, con aggiunta di sale ed eventualmente di carni di altre specie

animali, macinate e miscelate con grasso suino in proporzioni variabili, e insaccate in budelli naturali o sintetici (D.M. del 21/09/2005).

La denominazione "salame", pare abbia preso origine da un'antica città greca, Salamis, distrutta poi nel 450 a.c. (Pederson, 1979). Tale tipologia di prodotto pare fosse molto apprezzata già da allora, e pare sia stata precursore di altre varietà europee (Smith,1987). I salami erano inoltre conosciuti dall'Impero Romano, che utilizzano sia carne di manzo, che carne suina, tagliata a pezzetti, aggiunta di sale e spezie, e confezionata all'interno di pelli animali, e posta a stagionare in appositi locali (Zeuthen, 2007).

Tutti i paesi che si affacciano nel Mediterraneo hanno un'antica tradizione nella produzione di salami, con una varietà di prodotti che spesso sono riconosciuti solo a livello regionale e/o locale. Questi prodotti presentano caratteristiche diverse nella tecnologia di produzione, che ne modifica le caratteristiche organolettiche.

Lo studio dell'ecologia microbica dei salami è di primaria importanza per comprendere i cambiamenti fisici e chimici che avvengono durante la fermentazione e la maturazione (Lucke, 1985; Comi et al., 2005;). Un ruolo fondamentale nella prima selezione della popolazione microbica è operato dal cloruro di sodio che, riducendo l'attività dell'acqua a valori < 0.97 , impedisce lo sviluppo di gran parte dei batteri Gram-negativi contaminanti. Solo i microorganismi alotolleranti sono in grado di svilupparsi nell'impasto, alcuni utili, come i batteri lattici appartenenti al genere *Lactobacillus* (*L. sakei*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. alimentarius*), *Staphylococcus* (*S. carnosus*, *S. simulans*, *S. xylosus*) e *Kocuria* (*K. Varians*, *K. Kristinae*) altri come *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria* spp., *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli* e *Salmonella*, sono patogeni per l'uomo.

Il controllo e la selezione dei microorganismi presenti nell'impasto, oltre che all'attività fermentativa, è svolta dall'eventuale impiego di spezie, sale, nitrati e nitriti che hanno azione specifica nei confronti di sporigeni anaerobi.

Anche le tecnologie di produzione applicate ai salami (come le operazioni d'insaccatura e la temperatura adottata durante il processo di fermentazione) hanno un carattere selettivo nei confronti dei diversi microorganismi. Dopo alcune ore dall'insacco, i primi che si sviluppano sono i micrococchi aerobi obbligati (*Kocuria* spp.), che svolgono diverse funzioni, tra cui il rapido consumo dell'ossigeno presente nell'impasto, favorendo la creazione di un ambiente anaerobico; riducono i nitrati a nitriti e sono coinvolti nell'attività lipolitica e nella liberazione di acidi grassi (Cantoni et al., 1966) che vengono idrolizzati in chetoni, aldeidi ed acidi grassi volatili, composti

Michele Cottu – Studio delle proprietà tecnologiche e funzionali di *Lactobacillus* spp. e stafilococchi coagulasi-negativi isolati da salsiccia di pecora – Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – Curriculum "Biotecnologie Microbiche Agroalimentari" – Ciclo XXIX
Università degli Studi di Sassari

che caratterizzano l'aroma del prodotto. Essendo aerobi stretti, una volta consumato l'ossigeno, la loro crescita si arresta. Durante questa fase, prendono sopravvento gli stafilococchi CN, aerobi o anaerobi facoltativi che, in assenza di ossigeno conducono una fermentazione lattica. Questi giocano un ruolo cruciale nella maturazione del prodotto perché responsabili dell'attività nitrato reductasica, prevengono anch'essi l'irrancidimento del prodotto in seguito alla degradazione dei perossidi, e sono importanti nello sviluppo degli aromi in seguito alle loro spiccate proprietà lipolitiche e proteolitiche (Casaburi et al., 2005). La specie maggiormente presente è lo *Staphylococcus xylosum* (Mangia et al., 2013). I batteri lattici invece metabolizzano la quasi totalità degli zuccheri presenti nell'impasto con produzione di acidi organici, soprattutto acido lattico. Tale azione acidificante determina una riduzione del pH da valori iniziali di 5,8-6, a valori finali di 5-5,3 garantendo una maggiore sicurezza del prodotto e ostacolando lo sviluppo dei microrganismi patogeni e alteratori che potrebbero essere responsabili di effetti negativi sulle caratteristiche sensoriali e igienico-sanitarie (Fontana, Coconcelli, & Vignolo, 2005). L'ambiente acido che si crea all'interno dell'insaccato contribuisce inoltre alla fissazione del colore rosso dei salami (Aymerich et al., 2003). I batteri lattici infine partecipano alla definizione delle caratteristiche sensoriali del prodotto attraverso la loro azione proteolitica e lipolitica. I batteri lattici sono molto importanti nel processo di fermentazione della salsiccia. La specie predominante nell'impasto e nei primi giorni di maturazione della salsiccia è il *Lactobacillus curvatus* seguito dal *Lactobacillus plantarum*, che è il batterio lattico più rappresentato nei salumi in cui la fermentazione è affidata ai microrganismi naturali (Zambonelli et al., 1992; Mangia et al., 2006). È possibile riscontrare anche altre specie appartenenti al genere *Lactobacillus*, ma sono presenti anche specie appartenenti ai generi *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* e *Enterococcus* (Talon e Leroy, 2011). I batteri lattici e gli stafilococchi CN sono importanti nei processi biochimici che si verificano in fase di maturazione. La degradazione delle proteine produce piccoli peptidi e amminoacidi liberi che sono i precursori dei composti volatili in grado di definire le caratteristiche aromatiche del prodotto. Per lungo tempo si pensava che l'idrolisi delle proteine, fosse provocata soltanto dall'azione dei soli enzimi endogeni della carne, in particolare dalle proteinasi (catepsine-calpaine), di recente invece si è visto che oltre a tali enzimi della carne, operano anche le proteasi batteriche, in particolare alcuni ceppi riconducibili ai lattobacilli eterofermentanti facoltativi, dotati di attività proteolitica intra ed extra cellulare. Anche nei fenomeni lipolitici, pare vi sia l'intervento oltre che delle lipasi endogene della carne, anche di quelle di natura microbica. Sono state isolate infatti da ceppi di micrococchi e stafilococchi derivanti da insaccati fermentati, lipasi sia extracellulari che intracellulari, le prime

esplicano un'azione notevole nei confronti dei monogliceridi, digliceridi e trigliceridi, le seconde si limitano soltanto ai trigliceridi.

Sebbene sia risaputo che i principali gruppi microbici dei prodotti carnei fermentati siano i batteri lattici e gli stafilococchi CN, diversi studi riportano il ruolo dei lieviti nella maturazione dei salami, nella formazione di aromi e del colore. (Flores et al., 2004; Mendoca et al., 2013). I lieviti più frequentemente isolati sono ascrivibili ai generi *Candida*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Torulaspora*, *Yarrowia*, *Trichosporon* (Comi e Cantoni, 1980b; Nielsen et al., 2008; Mendoza et al. 2014).

Le muffe invece si sviluppano principalmente all'esterno del budello e svolgono un'importante azione disacidificante in quanto utilizzano, come fonte energetica, l'acido lattico precedentemente prodotto dai batteri lattici (Grazia et al., 1986), hanno inoltre un'azione regolatrice dell'umidità, influenzano il colore e la struttura e favoriscono la formazione dei caratteri organolettici e sensoriali. Per contro, alcune specie appartenenti ai generi *Penicillium* e *Aspergillus* producono composti dotati di elevato grado di tossicità, le micotossine (Ciegler et al., 1972); non è però certo che queste muffe siano in grado di formare effettivamente tossine durante la maturazione dei salumi. Le muffe del genere *Aspergillus* sono presenti occasionalmente al pari di altri generi quali *Mucor*, *Fusarium*, *Cladosporium*.

Oltre ai microrganismi tecnologici, nel processo di trasformazione della salsiccia, si possono sviluppare anche microrganismi alteranti e/o patogeni. La *Listeria monocytogenes* e la *Salmonella* enterica sono stati riscontrati con concentrazioni spesso eccedenti i limiti legali rappresentando un pericolo per il consumatore (Mataragas et al., 2015). Anche la specie *Escherichia coli* è stata la causa d'infezioni alimentari in seguito al consumo di salumi fermentati (Tilden et al., 1996). Atassanova et al. (2001), riportano la presenza della specie *Staphylococcus aureus* (SCP) nella carne di maiale sia cruda che fermentata, la cui patogenicità è dovuta alla capacità di produrre enterotossine.

1.4.1 La salsiccia sarda

Tra i salumi prodotti in Italia, la salsiccia sarda riveste un ruolo importante nel settore dei prodotti carnei trasformati. È un prodotto tradizionale (MiPAAF, Decreto Ministeriale 18/07/2000) ovvero un prodotto la cui lavorazione, conservazione e stagionatura si è affermata nel tempo in un determinato territorio, e per un periodo non inferiore a 25 anni. È un salame stagionato ottenuto principalmente da carni suine, provenienti da animali con 10/12 mesi di età e un peso tra i 120 e i

Michele Cottu – Studio delle proprietà tecnologiche e funzionali di *Lactobacillus* spp. e stafilococchi coagulasi-negativi isolati da salsiccia di pecora – Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – Curriculum “Biotecnologie Microbiche Agroalimentari” – Ciclo XXIX
Università degli Studi di Sassari

180 kg; la carne viene tritata, addizionata di grasso suino, sale e spezie, e il tutto viene miscelato e insaccato in budelli naturali o sintetici (Mangia et al., 2013). La preparazione della salsiccia sarda prevede principalmente l'impiego di carni suine e l'eventuale utilizzo di colture starter soprattutto nelle produzioni industriali (Mangia et al., 2013). Il processo di trasformazione prevede le seguenti fasi:

-selezione della carne: la tradizione prevedeva l'impiego di tutti i tagli, oggi si utilizzano perlopiù la spalla e la pancetta magra che sono i tagli che richiedono una lavorazione minore e inoltre sono i meno costosi.

-rifilatura e mondata della carne: utile a eliminare tendini, nervi e grasso che deprezzerebbero il prodotto.

-Preparazione dell'impasto: la carne viene tritata (macinata o tagliata a piccoli cubetti) a seconda della tipologia di salame da produrre. Alla triturazione segue l'aggiunta di grasso (quando la produzione lo richiede), anche questo tagliato a cubetti, e del sale. Le spezie (pepe, aglio, semi di finocchio o anice) vengono impiegate in percentuale variabile e non in tutte le produzioni. Nella produzione tradizionale viene spesso aggiunto vino e/o aceto, mentre nelle produzioni industriali vengono inoltre aggiunti gli additivi specifici, gli zuccheri e lo starter microbico.

Cloruro di sodio: viene aggiunto direttamente all'impasto in quantità variabile tra 2,5-4% in funzione del tipo di prodotto. La salagione è uno dei metodi più antichi di conservazione, il sale disidrata i tessuti cellulari con i quali viene a contatto, creando un ambiente poco adatto alla proliferazione di batteri patogeni e consentendo lo sviluppo solo dei microrganismi alofili.

Additivi: sono rappresentati da nitrati e nitriti di sodio e di potassio la cui dose massima consentita è di 250 ppm e 150 ppm rispettivamente; acido ascorbico come agente antiossidante 0.05%.

Concia: l'aggiunta delle spezie ha la funzione di conferire al prodotto gusti e aromi particolari, migliorandone la conservabilità. Composizione e dose della concia, variano in funzione della zona di produzione e del tipo di prodotto. Talvolta possono dare origine a spiacevoli contaminazioni sia chimiche che microbiche (residui di fitofarmaci, metalli pesanti). Il pepe è la spezia comune a tutte le produzioni, altre invece vengono impiegate solo in certe zone della Sardegna, come i semi di finocchio selvatico e/o l'aglio.

Zuccheri: si utilizzano glucosio, saccarosio o lattosio in quantità variabile, per migliorare l'attività fermentativa dei batteri lattici. Il lattosio può essere aggiunto come latte o siero di latte in polvere.

Aggiunta dello starter microbico: la fermentazione nella produzione tradizionale è realizzata da microrganismi presenti naturalmente, oppure in base alla zona di produzione, si utilizza del vino

bianco con fermentazione malolattica in atto, così da conferire una carica di batteri lattici. Nelle produzioni industriali è previsto l'impiego di colture starter, che comprendono sia specie batteriche (batteri lattici, stafilococchi) che fungine.

-Insaccamento: l'impasto può essere insaccato in budelli naturali o artificiali. Il budello naturale è costituito da una parte dell'intestino tenue di suino, bovino o equino che viene sottoposto a una serie di lavaggi con acqua, sale e aceto. I budelli artificiali invece possono derivare da fibre animali o vegetali e hanno alcuni vantaggi fra i quali la costanza del diametro, l'assenza di grassi, di odori e di microflora patogena. Un altro vantaggio dei budelli artificiali è dato dal fatto che il prodotto finale è facilmente pelabile.

-Stagionatura: ha una durata di circa 15 giorni. La stufatura è la prima fase della stagionatura, seguono affumicatura ed essiccamento. Durante queste fasi, per opera della microflora starter o naturale, iniziano i processi fermentativi con conseguente produzione di metaboliti utili alle caratteristiche organolettiche, nutrizionali e di sicurezza del prodotto. In seguito alla stagionatura, per un periodo che dura dai 15 ai 90 giorni, si hanno importanti trasformazioni che portano i salumi ad assumere le loro caratteristiche definitive. L'umidità diminuisce considerevolmente, passando da valori iniziali di 50-70% a valori del 27-45% e di conseguenza diminuisce anche l' a_w ; si ha un aumento della concentrazione del cloruro di sodio e quindi anche un aumento dell'azione selettiva e inibitrice nei confronti della microflora e la denaturazione irreversibile delle proteine che perdono la capacità di assorbire e legarsi con l'acqua.

Le notizie riguardanti la microbiologia della salsiccia sarda sono poche. Greco et al. (2005) riportano dell'elevata variabilità dei batteri lattici, riscontrando le specie *Lactobacillus sakei*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. casei*, *L. farciminis*, *L. sharpae*, *L. delbrueckii* e *L. amilophylus*. Mangia et al. (2013) riportano invece di una minore variabilità nei batteri lattici isolati da salsiccia prodotta in modo tradizionale, classificando come dominante la specie *L. curvatus*, soprattutto nei primi giorni di maturazione e, insieme a *L. plantarum*, il maggiore responsabile del processo fermentativo. La minore variabilità è dovuta probabilmente a specifiche tecnologie impiegate nella produzione artigianale come l'affumicatura naturale, il taglio della carne a cubetti e l'impiego di basse temperature (10-13 °C) durante la stagionatura. La specie *S. xylosum* domina invece tra gli stafilococchi coagulasi negativi (Daga et al., 2007; Mangia et al., 2013), mentre la specie *Debaryomyces hansenii*, rappresenta il lievito maggiormente riscontrato (Mangia et al., 2007).

Mangia et al. (2007), riporta della valutazione igienico-sanitaria della salsiccia sarda, riscontrando una conta totale di $7 \cdot 10^9$ ufc/g, valori tuttavia normali negli insaccati fermentati. Riportano inoltre

Michele Cottu – Studio delle proprietà tecnologiche e funzionali di *Lactobacillus* spp. e stafilococchi coagulasi-negativi isolati da salsiccia di pecora – Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – Curriculum “Biotecnologie Microbiche Agroalimentari” – Ciclo XXIX
Università degli Studi di Sassari

della presenza di *E. coli*, sinonimo di una scarsa igiene nella materia prima, e di stafilococchi coagulasi positivi, probabilmente dovuti alla continua manualità e a temperature favorevoli al loro sviluppo. Non riportano invece della presenza di *Salmonella* e di *L. monocytogenes*.

Nella produzione della salsiccia sarda, come già detto, la carne suina è quella maggiormente utilizzata. Ultimamente si sta diffondendo sempre di più la salsiccia prodotta con carne di pecora (Mangia et al., 2006). Il processo produttivo della salsiccia di pecora non differisce molto da quello della salsiccia suina, è però essenziale l'eliminazione del tessuto connettivo e del grasso ovino perché sgradevoli al gusto. La parte grassa viene quindi integrata con del grasso suino, utile a rendere più morbido il gusto della carne ovina. Da una prima indagine microbiologica sempre sulla salsiccia ovina, il *Lactobacillus plantarum* e lo *Staphylococcus xylosus*, sono risultate le specie batteriche predominanti durante la fase fermentativa e di maturazione (Mangia et al., 2008). Lo studio del profilo chimico-fisico ha invece evidenziato un prodotto con buone caratteristiche organolettiche e nutrizionali (Mazzette et al; 1996).

2. SCOPO DEL LAVORO

Le caratteristiche organolettiche e sensoriali di un salame, dipendono dalla materia prima impiegata e dai processi tecnologici di fermentazione e maturazione.

I batteri lattici e gli stafilococchi CN, rappresentano i batteri “tecnologici” principali del processo di trasformazione dei salami. I batteri lattici sono responsabili della fermentazione; in seguito alla produzione di acido lattico derivante dal loro metabolismo, abbassano il pH del prodotto garantendone la sicurezza; gli stafilococchi CN, in seguito ai processi di lipolisi e di proteolisi, sono responsabili della maturazione del prodotto.

In considerazione del fatto che a oggi non risultano altri lavori sperimentali su microrganismi isolati da salsiccia sarda di pecora, lo scopo del presente lavoro è stato quello di identificare e caratterizzare da un punto di vista tecnologico e funzionale, i batteri lattici e gli stafilococchi CN isolati da salsiccia sarda di pecora.

Il lavoro è stato articolato principalmente in tre parti:

- ✓ Identificazione degli isolati
- ✓ Caratterizzazione tecnologica dei ceppi identificati
- ✓ Valutazione delle proprietà funzionali

3. MATERIALI E METODI

3.1 Microrganismi e condizioni colturali

In questo lavoro, sono stati impiegati 40 *Lactobacillus* spp. e 70 stafilococchi coagulasi negativi isolati da salsiccia di pecora prodotta in modo tradizionale senza l'impiego di colture starter (Mangia et al., 2008). Tutte le colture, conservate a -80°C, sono state rinfrescate inizialmente su terreno di coltura agarizzato confermandone in questo modo la purezza, successivamente in terreno liquido. Per i lattobacilli è stato impiegato il terreno MRS (Oxoid, Milano, Italia), e relativa incubazione a 30°C per 24 ore in condizioni di anaerobiosi; per gli stafilococchi è stato impiegato il terreno di coltura BHI (Oxoid) e condizioni di incubazione di 37°C per 24 ore in aerobiosi. Le colture *overnight* di entrambi i gruppi batterici sono state impiegate nelle analisi di seguito riportate.

3.2 Identificazione e genotipizzazione degli isolati batterici

-Estrazione del DNA dai ceppi di batteri lattici e stafilococchi CN

Dalle colture *overnight* dei lattobacilli e stafilococchi è stato estratto il DNA genomico utilizzando il kit ArchivePure DNA Yeast & Gram+/- della 5 PRIME seguendo le istruzioni del produttore. La qualità e la concentrazione del DNA estratto (rapporto 260/280 nm) è stata controllata con LVIPlate del sistema SPECTRONano (BMGTech, Germania) mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1%. Il DNA estratto è stato utilizzato per l'identificazione e per la ricerca dei geni responsabili della produzione di ammine biogene.

-Analisi RAPD-PCR e REP-PCR

La RAPD PCR è stata eseguita utilizzando il primer M13 (Rossetti et al.; 2005). La reazione di PCR è stata realizzata in un volume finale di 50 µl, contenente 5 mM di MgCl₂, 200 µM di DNTPs, 5 µl di PCR Buffer 10X (Invitrogen), 2 µM di primer, 100 ng di DNA genomico ed 1,25 U di TAQ polimerasi (Invitrogen). Le condizioni di amplificazione hanno previsto uno step iniziale di denaturazione a 94°C per 120 s, seguito da 40 cicli di 94°C per 60 s, 45°C per 40 s e 72°C per 120 s e uno step finale di elongazione di 10 min a 72 °C.

La rep-PCR è stata eseguita utilizzando il primer GTG5 (Bautista-Gallero et al., 2014). La reazione di PCR è stata realizzata in un volume finale di 50 µl, contenente 3 mM di MgCl₂, 200 µM di DNTPs, 5 µl di PCR Buffer 10X (Invitrogen), 1 µM di primer, 100 ng di DNA genomico e 2 U di TAQ polimerasi (Invitrogen). Le condizioni di amplificazione hanno previsto uno step iniziale di

denaturazione a 94°C per 5 minuti, seguito da 30 cicli di 94°C per 90 s, 40°C per 60 s e 72°C per 120 s e uno step finale di elongazione di 15 min a 72 °C.

La riproducibilità delle analisi è stata testata su 3 ceppi di lattobacilli e 3 ceppi di stafilococchi, dai quali il DNA è stato estratto 3 volte, le reazioni di PCR e le corse elettroforetiche sono state eseguite su ciascun ceppo 3 volte.

I prodotti di PCR sono stati separati mediante corsa elettroforetica di 3 ore a 90 volt (V) in gel di agarosio all'1,5% contenente 15 µl di SYBR safe (Invitrogen). In ciascun gel è stato utilizzato il marker da 1 Kb (Euroclone, Sharp Mass1) per consentire la standardizzazione durante l'analisi delle immagini. L'immagine è stata acquisita tramite il trans-illuminatore BIORAD CHEMIDOC XRS. L'immagine digitale in formato TIFF è stata analizzata utilizzando il software INFOQUEST BIORAD. La similarità tra i profili elettroforetici è stata basata sul coefficiente di correlazione di Pearson. Il dendrogramma è stato dedotto dalla matrice di similarità utilizzando la tecnica UPGMA. Il coefficiente di similarità impiegato come soglia per la definizione dei cluster è stato dell'85%.

In base ai risultati dell'analisi RAPD e rep-PCR ottenuti, i ceppi di batteri lattici appartenenti allo stesso *cluster* sono stati identificati mediante sequenziamento parziale del gene 16s rDNA e tramite una Multiplex PCR specie-specifica *recA* per le specie *Lactobacillus plantarum*, *L. paraplantarum* e *L. pentosus* (Torriani et al., 2001). Gli stafilococchi CN sono stati identificati mediante sequenziamento parziale del gene 16s rDNA.

-Amplificazione e sequenziamento parziale del 16s rDNA

L'amplificazione parziale del 16S rDNA è stata eseguita utilizzando i primer W001 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTC-3') e W002 (5'-GNTACCTTG TTACGACTT-3'). La reazione di PCR è stata realizzata in un volume finale di 50 µl, contenente 2,5 mM di MgCl₂, 200 µM di DNTPs, 4 µl di PCR Buffer 10 X (Invitrogen), 1,2 µM di primer, 1 µl di DNA genomico ed 1,25 U di TAQ polimerasi (Invitrogen). Il programma di ciclizzazione è stato il seguente: 1 ciclo a 96°C per 4min (denaturazione iniziale), 35 cicli a 96°C per 40 s (denaturazione), 50°C per 30 s (annealing), 72°C per 1min (extension), 1 ciclo a 72°C per 10min (final extension). I prodotti di PCR sono stati analizzati in un gel di agarosio al 1,5 % contenente 1,5 µl di SYBRsafe (Invitrogen). L'immagine è stata acquisita tramite il trans-illuminatore BIORAD CHEMIDOC XRS. Il sequenziamento è stato condotto dalla Macrogen Europe (Amsterdam, Olanda).

-Multiplex PCR specie specifica

Michele Cottu – Studio delle proprietà tecnologiche e funzionali di *Lactobacillus* spp. e stafilococchi coagulasi-negativi isolati da salsiccia di pecora – Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – Curriculum “Biotecnologie Microbiche Agroalimentari” – Ciclo XXIX
Università degli Studi di Sassari

Per la multiplex PCR specie specifica per le specie *L. plantarum*, *L. paraplantarum* e *L. pentosus* sono stati utilizzati i seguenti primers: pREV (5'-TCGGGATTACCAAACATCAC-3'), PlanF(5'-CCGTTTATGCGGAACACCTA-3'), ParaF (5'-GTCACAGGCATTACGAAAAC-3), ePentF (5'-CAGTGGCGCGGTTGATAT-3'). La reazione di PCR è stata realizzata in un volume finale 50 µl, contenente 1.5 mM di MgCl₂, 100 µM di DNTPs, 5 µl di PCR Buffer 10 X (Invitrogen), 0.25 µM di primer ParaF, PentF e Prev e 0.12 µM di primer PlantF, 1 µl di DNA genomico ed 1 U di TAQ polimerasi (Invitrogen). Il programma di ciclizzazione è stato il seguente: 1 ciclo a 94°C per 3min (denaturazione iniziale), 30 cicli a 94°C per 30sec (denaturazione), 56°C 10 sec (annealing), 72°C per 30 sec (extension), 1 ciclo 72°C per 5 min (final extension). Il prodotto di PCR è stato analizzato in un gel di agarosio al 1.5% contenente 1,5 µl di SYBRsafe (Invitrogen), è stato utilizzato un marker da 100 bp (SharpMass™ 100 pb). L'immagine è stata acquisita tramite il trans-illuminatore BIORAD CHEMIDOC XRS.

3.3 Attività acidificante e di crescita dei batteri lattici

Per lo studio dell'attività acidificante e di crescita dei lattobacilli è stato impiegato il terreno di coltura SB così composto: 10% estratto di carne, 2% glucosio, 2.5% NaCl, 1% peptone batteriologico, pH 6.5 (Essid et al.; 2009), in assenza e in presenza di 150 mg/l di nitrato di potassio (KNO₃). Da una coltura overnight di ogni ceppo è stato prelevato un volume definito e usato per inoculare 50 ml di terreno colturale SB, tale da avere una OD₆₀₀ iniziale di 0.05. Il pH e la conta vitale dei batteri (ufc/ml) sono stati determinati alle 0, 3, 6, 9, 24, 48 ore.

3.4 Attività proteolitica

L'attività proteolitica delle colture di lattobacilli e stafilococchi è stata condotta utilizzando come substrato le proteine sarcoplasmatiche e miofibrillari estratte da carne di suino e da carne di pecora.

-Estrazione delle proteine sarcoplasmatiche e miofibrillari.

L'estrazione delle proteine sarcoplasmatiche e miofibrillari, è stata condotta in accordo con Fadda et al. (1999). Le carni (ovina e suina) magre preventivamente sminuzzate, sono state poi diluite (rapporto 1:10) in 20 m mol l⁻¹ di buffer fosfato pH 6.5, omogeneizzate (Stomacher 400 blender) per 3 minuti e centrifugate a 13000g per 20 min a 4°C. Il surnatante (frazione sarcoplasmatica) è stato infine filtrato con filtri aventi diametro di 0.22 µm e considerato pronto per le successive analisi.

Il pellet (frazione miofibrillare) è stato risospeso in 200 ml di 0.03 mol l⁻¹ di buffer fosfato pH 7.4 contenente 0.1 % (v/v) di Triton X- 100 e poi omogeneizzato per 2 minuti. In seguito è stato centrifugato a 13000g per 20 min a 4°C e risciacquato per 3 volte utilizzando lo stesso buffer. Il pellet è stato poi pesato e risospeso in nove volumi di 0.1 mol l⁻¹ di buffer fosfato a pH 6.5 contenente 0.7 mol l⁻¹ di KI. Dopo il trattamento di omogeneizzazione per 8 minuti è stato centrifugato a 13000g per 20 min a 4 °C e diluito per 10 volte con acqua per eliminare l'eventuale effetto inibente del KI sull'attività delle proteasi batteriche (Fadda et al.; 1999)

La concentrazione delle proteine sarcoplasmatiche e miofibrillari è stata misurata con Bio-rad protein assay e come indicatore è stata utilizzata la *Bovine Serum Albumine* (BSA, Sigma-Aldrich).

-Attività proteolitica in piastra

Le proteine sarcoplasmatiche e miofibrillari sono state addizionate (0.5 mg/ml) al Proteolytic Assessment (PA) terreno colturale così composto: triptone 5g/l, estratto di lievito 2.5g/l, glucosio 1g/l, agar 15g/l, pH 6.9 (Drosinos et al., 2007); sulle piastre contenenti il terreno di coltura sopra descritto, sono stati eseguiti dei fori aventi diametro pari a 6 mm i quali sono stati riempiti con 50 µl di una coltura overnight nel caso dei lattobacilli e una coltura di 24 ore nel caso degli stafilococchi. Dopo un periodo d'incubazione di 48 ore a 30 °C, sulle piastre è stata versata una soluzione colorante contenente per litro: 1g di Coomassie Brilliant Blue R 250, 400ml di metanolo e 100 ml di acido acetico. Dopo una sosta di un'ora, dalle piastre è stata tolta la soluzione colorante e sono stati eseguiti una serie di lavaggi con una soluzione decolorante contenente per litro: 400 ml di metanolo e 100 ml di acido acetico. La presenza di un alone chiaro attorno al pozzetto ha evidenziato l'attività proteolitica delle colture batteriche testate.

-Attività proteolitica SDS-PAGE

L'attività proteolitica delle colture batteriche risultate positive al test in piastra, è stata monitorata con l'analisi SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate gel (SDS)-polyacrylamide electrophoresis (PAGE)).

Una coltura overnight è stata centrifugata a 5000g per 15 minuti e il pellet è stato lavato tre volte utilizzando il buffer PBS, avente la seguente composizione per litro: 40.5 ml Na₂HPO₄·12H₂O 0.2 M, 9.5 ml NaHPO₄·H₂O 0.2 M, 8 g di NaCl. Il pellet lavato e risospeso nello stesso buffer è stato utilizzato per inoculare (10 ml) il terreno di coltura PA senza agar, e messo a incubare a 37°C per i seguenti intervalli di tempo: 0, 9, 18, e 27giorni.

Trascorso il periodo d'incubazione, la biomassa batterica è stata separata mediante centrifugazione (5000g per 5 min), e considerando un volume totale di 36 µl (la capienza del pozzetto del gel di acrilamide), 7.2 µl (0.2 %) di surnatante sono stati miscelati con 28.8 µl (0.8 %) di buffer di trattamento, avente la seguente composizione per litro: 125 ml di Tris-HCl 0.5 M a pH 6.8, 125 ml; 200 ml di glicerolo, 50 ml di β-mercaptoetanololo, 200 ml di SDS al 10%, 50 ml di blu bromofenolo. I campioni sono stati messi a bollire per 10 minuti. Il gel di acrilamide al 12 %, sono stati preparati secondo quanto riportato da Drosinos et al. (2007).

I peso molecolari dei polipeptidi risultanti dal profilo proteico sono stati comparati con lo standard proteico (Biolabs), avente un *range* 10-230 kDa.

3.5 Attività lipolitica

Per la valutazione dell'attività lipolitica dei ceppi di lattobacilli e stafilococchi è stato impiegato il metodo in piastra e il metodo per titolazione.

-Metodo in piastra.

In particolare, nelle colture batteriche è stata testata l'attività lipolitica con il *Tween method* in accordo con quanto descritto da Essid et al. (2009). Da una coltura overnight preventivamente centrifugata e poi risospesa in buffer fosfato a pH 7, sono stati prelevati 10 µl e depositi sulla superficie delle piastre (spot) contenenti MRS agar (per i lattobacilli) e NA (per gli stafilococchi) aggiunti di Tween 80 (1% v/v).

L'attività lipolitica sul substrato tributirina è stata valutata in accordo con Mangia et al. (2013). In entrambe le analisi, la presenza di un alone opaco, indice di attività lipolitica, è stata valutata dopo 48 ore.

-Metodo per titolazione

L'attività lipolitica per titolazione è stata condotta come descritto da Mauriello et al. (2004). Un ml di una coltura overnight è stato inoculato in 10 ml di terreno liquido YTF contenente 1% di triptone, 0.5 % di estratto di lievito, 3 % di NaCl, pH 7 e addizionato con 4% (w/v) di grasso di maiale. Dopo 7 giorni a 30 C°, si è proceduto con l'estrazione dei lipidi: la brodocoltura è stata addizionata di 10 ml di etere di petrolio e posta ad agitare per 2 minuti. Dopo una breve sosta, la fase superficiale è stata prelevata e titolata con NaOH 0.1 N in etanolo usando come indicatore la fenolftaleina all'1%. L'attività lipolitica è stata espressa come percentuale di acido oleico seguendo

la seguente espressione: attività lipolitica = $(a \times N \times 28.2) / g$ dove a sono gli ml di NaOH usati per la titolazione; N è la normalità; 28.2 è la % del peso equivalente dell'acido oleico; g è la quantità di grasso di maiale nel campione.

3.6 Attività antibatterica

L'attività antibatterica è stata valutata sia sui batteri lattici che sugli stafilococchi CN impiegando come microrganismi indicatori *Listeria monocytogenes* E, *Listeria monocytogenes* DSMZ 20.600, *Salmonella enterica* DSMZ 13772, *Staphylococcus aureus* DSMZ 20231, e *Escherichia coli* DSMZ 30083. Il test iniziale è stato realizzato con la tecnica dell'“Agar Spot Test” che consiste nella semina della sospensione del microrganismo indicatore, in concentrazione del 3%, nel terreno BHI (*Listeria monocytogenes*) e NB per *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* contenenti lo 0,75% (w/v) di agar (Bacteriological agar N°3, Oxoid). Sul terreno agarizzato solidificato sono stati depositi 10 µl di sospensione cellulare dei ceppi produttori (lattobacilli e stafilococchi) e posti a incubare in aerobiosi a 30 °C per 24 ore. L'attività antimicrobica è stata valutata misurando l'alone di inibizione rilevato intorno. Gli aloni di inibizione intorno alle colonie con diametro > 1 sono stati considerati positivi.

La ricerca di eventuali composti inibitori secreti nel mezzo liquido di crescita da parte dei ceppi positivi allo spot test e quindi considerati produttori, è stata condotta attraverso il metodo dell'agar well diffusion (Herreros et al.; 2005); i surnatanti liberi da cellule (CFS, cell free supernatant) sono stati preparati partendo da colture microbiche lasciate sviluppare sotto le migliori condizioni per la produzione delle batteriocine. I lattobacilli sono stati fatti crescere in terreno liquido MRS per 24 h a 30° C, mentre gli stafilococchi in nutrient agar (NA, Oxoid) sempre per 24 h a 30° C. I surnatanti sono stati ottenuti: (a) dal CFS filtrato con l'ausilio di filtri aventi diametro di 0.22 µm (Millipore); (b) dal CFS filtrato e portato a pH a 6.5 con l'ausilio di NaOH 1 M, per escludere l'attività degli acidi organici; (c) rappresentato dal CFS (b) trattato con catalase (1mg ml⁻¹) utile a eliminare l'effetto del perossido di idrogeno (H₂O₂). I CFS così ottenuti, sono stati immediatamente utilizzati. Nelle piastre di MRS e NB agar soft, inoculate preventivamente con il microrganismo indicatore in concentrazione del 3% sono stati praticati i pozzetti di 6 mm di diametro nei quali sono stati versati 35 µL di CFS precedentemente preparati. Dopo 24 ore a 37°C d'incubazione, sulle piastre sono stati analizzati i diametri di inibizione. Tali trattamenti sono utili per capire se l'inibizione è dovuta alla produzione di acidi organici, al perossido di idrogeno o alla produzione di batteriocine da parte dei microrganismi testati. La presenza di inibizione nel terzo trattamento esclude che l'attività sia

dovuta ad acidi organici o al perossido di idrogeno e rappresenta un indice di produzione di batteriocine da parte del microrganismo testato. Dopo aver consentito l'assorbimento della sospensione deposta nei pozzetti, le piastre sono state incubate alla temperatura di crescita ottimale dei microrganismi indicatori per 24-48 ore.

3.7 Attività anti- fungina

-Test *in vitro*

L'attività antifungina è stata saggiata nei confronti del fungo *F. graminearum* utilizzando l'Overlay method in accordo con Muhialdin e Hassan (2011). I batteri lattici sono stati inoculati su piastre di MRS agar mediante due strisce di colonie lunghe circa 2 cm e distanti tra loro 1 cm, dopodiché sono stati messi a incubare per 48 h a 30°C in condizioni di anaerobiosi. Trascorso il periodo d'incubazione, le piastre sono state ricoperte con 10 mL di Malt Extract agar soft (0.7%) inoculato con circa 1×10^4 conidi/mL di *F. graminearum*. Dopo un periodo d'incubazione di 24 h a 30°C, è stato misurato il diametro di inibizione. La scala utilizzata è stata la seguente: (-) nessuna inibizione; (+) 0.1-30%; (++) 3-8%; e (+++) > 8 % della superficie della piastra. Il test *in vitro* è servito esclusivamente come screening per scegliere i tre ceppi migliori che sono stati poi utilizzati nei test in serra e in campo.

-Prova in serra

Per la prova in serra sono stati utilizzati i due ceppi, L7 e L12, appartenenti alla specie *Lactobacillus plantarum*. Sono stati utilizzati due trattamenti: una sospensione contenente le cellule vive (C) e il surnatante (SUR) ricavato dalle colture overnight. Per il trattamento C (10^8 ufc/mL) le cellule sono state ottenute centrifugando 50 mL di coltura batterica overnight per 20 minuti (min) a 4600 rpm. Il pellet ottenuto è stato risciacquato per 2 volte con soluzione fisiologica e poi risospeso nella stessa. Il surnatante ricavato dal trattamento C è stato utilizzato per il trattamento SUR dopo essere stato filtrato con l'ausilio dei filtri aventi \varnothing 45 μ m. Le spighe di frumento duro sono state trattate per aspersione con 2 mL dei rispettivi trattamenti (C; SUR) e dopo 24 h sono state infettate con 10 μ L di una sospensione (1×10^4 conidi/mL) di *F. graminearum* utilizzando la tecnica "point inoculation", che consiste nell' inoculare la sospensione conidica tra le glume della quinta spighetta basale. Per ogni trattamento sono state eseguite tre repliche e per ogni replica sono state utilizzate 5 spighe. La gravità della malattia è stata valutata dopo 21 giorni e analizzata con l'indice di

McKinney (McKinney,1923) suddividendo l'intensità del sintomo in sette classi da 0 a 6, con 0= spighe senza alcun sintomo; 6= spiga completamente disseccata. Sono stati inoltre rilevati il peso delle cariossidi prodotte e la quantità di micotossine. La prova è stata condotta su frumento duro, varietà Svevo.

-Prova in campo

Per la prova in campo oltre ai ceppi L7 (*L. plantarum*), L12 (*L. plantarum*) è stato utilizzato anche il ceppo L26 (*L. brevis*). Per ciascun ceppo sono stati impiegati tre trattamenti: cellule vive (CV), surnatante filtrato (SF) e surnatante filtrato e neutralizzato (SN). Il trattamento CV è stato ottenuto centrifugando 50 mL di coltura overnight per 20 min. a 4600 rpm. Il pellet ottenuto è stato risciacquato per 2 volte con soluzione fisiologica e poi risospeso nella stessa. Il trattamento SF è stato ottenuto centrifugando 50 mL di coltura overnight per 20 min. a 4600 rpm. Il surnatante è stato quindi prelevato e filtrato con l'ausilio di filtri aventi \varnothing 0.45 μ m. Il trattamento SN è stato ottenuto come il trattamento SF, dopodiché è stato portato a pH 6.5 con NaOH 1N, al fine di escludere un'attività dovuta agli acidi prodotti. Per la prova sono stati utilizzati due controlli positivi, T+ e T2+, e due controlli negativi, T- e T2-. Il T+, costituito da spighe trattate per aspersione con acqua e infettate con un mix di *Fusarium*, T2+ da spighe trattate per aspersione con terreno MRS e infettate con un mix di *Fusarium*, il T- da spighe trattate con acqua, e infine T2- costituito da spighe trattate con terreno colturale MRS. I controlli T+ e T- (con acqua) sono stati utilizzati per l'analisi dei dati ottenuti nei trattamenti C, mentre i controlli T2+ e T2- (con MRS) per l'analisi dei dati ottenuti nei trattamenti con i surnatanti, sia filtrato che neutralizzato, in modo da escludere un qualsiasi ruolo del MRS nei risultati.

Di seguito sono riportati nomi dei trattamenti: CV7, CV12, CV26, SF7, SF12, SF26, SN7, SN12, SN26.

3.8 Produzione di ammine biogene

L'attività decarbossilasica è stata valutata sui batteri lattici e sugli stafilococchi CN mediante lo screening dei geni responsabili della decarbossilazione degli amminoacidi istidina, lisina, ornitina e tirosina, precursori rispettivamente delle ammine biogene: istamina, cadaverina, putrescina e tiramina.

Screening genetico. Lo screening genetico per la ricerca dei geni *hdc*, *ldc*, *odc* e *tdc* responsabili della decarbossilazione rispettivamente di istidina, lisina, ornitina e tirosina, è stato condotto in

accordo con quanto descritto da Yüceer and Özden Tuncer (2015) e Landeta et al. (2007). Il programma di ciclizzazione è stato il seguente: 1 ciclo a 95°C per 10 min (denaturazione iniziale), 30 cicli a 95°C per 30sec (denaturazione), 53°C 30 sec (annealing), 72°C per 2 min (extension), 1 ciclo 72°C per 20 min. (final extension). Il prodotto di PCR è stato analizzato in un gel di agarosio al 1.5 % contenente 1,5 µl di SYBRsafe (Invitrogen) e come ceppo positivo è stato utilizzato l'*Enterococcus faecium* 65C1 presente nella sezione di Microbiologia Agraria dell'Università di Sassari. Nella Tabella 1 sono illustrati i primer utilizzati.

Tabella 1. Primer utilizzati per la ricerca dei geni responsabili della decarbossilazione degli amminoacidi

Gene	Primer	Sequenze	bp
<i>hdc</i>	HIS1-F	GGNATNGTNWSNTAYGAYMGNGCNGA	372
	HIS1-R	ATNGCDATNGCNSWCCANACNCCRTA	
<i>ldc</i>	CAD2-F	GGDATNCCNGGNGGRTA	1185
	CAD2-R	CAYRTNCCNGGNCAYAA	
<i>odc</i>	PUT1-F	TWYMAYGCNGAYAARACNTAYTTYGT	1440
	PUT1-R	ACRCANAGNACNCCNGGNGGRTANGG	
<i>tdc</i>	TDC-F	TGGYTNGTNCCNCARACNAARCAUYTA	825
	TDC-R	ACRTARTCNACCATRTRTRAARTCNGG	

3.9 Resistenza/sensibilità agli antibiotici

La resistenza/sensibilità agli antibiotici nelle colture di lattobacilli e stafilococchi CN è stata saggiata applicando il metodo Disc Diffusion Method (Landeta et al., 2013a; Landeta et al., 2013b) e sono stati utilizzati dieci tra i più comuni antibiotici utilizzati nella terapia umana e animale: cloramfenicolo (30 µg), clindamicina (2 µg), penicillina G (10 U), amoxicillina (2 µg), eritromicina (15 µg), tetraciclina (30 µg), ampicillina (10 µg), kanamicina (30 µg), gentamicina (10 µg) e vancomicina (30 µg) (Oxoid, Milano Italia). 350 µL di una coltura overnight (10⁶ cell /mL) sono stati distribuiti in capsule Petri contenenti MRS agar soft; sulla stessa capsula, con l'ausilio di una bacchetta sterile sono stati depositi i dischetti contenenti gli antibiotici. Le piastre sono state quindi poste ad incubare in anaerobiosi alla temperatura ottimale per lo sviluppo del microrganismo indicatore (30 °C), le zone d'inibizione sono state valutate dopo 24 ore. I risultati ottenuti sono stati confrontati con gli standards del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014).

3.10 Analisi statistica

I risultati delle prove di crescita (conta su piastra) e acidificazione (variazione di pH) e dell'attività antifungina in serra e in campo (indice di MyKinney) sono stati analizzati utilizzando l'ANOVA a una via. Nelle prime prove è stato verificato l'effetto del KNO₃ addizionato al substrato di crescita, nella seconda è stato valutato l'effetto dei trattamenti C, SUR in serra e CV, SN e SF in campo. Quando l'effetto dei diversi trattamenti rispetto al controllo risultava statisticamente significativo, le medie sono state confrontate con il test Tukey ($p < 0,05$).

4. RISULTATI

4.1 Identificazione e genotipizzazione degli isolati batterici

Per la genotipizzazione degli isolati sono state impiegate le tecniche “Repetitive element sequence-based PCR” (rep-PCR) e la “Randomly amplified polymorphic DNA” (RAPD-PCR), ampiamente utilizzate per eseguire il fingerprint genetico di batteri appartenenti a diverse specie (Rossi et al., 2001; Iacumin et al., 2006a; Svec et al., 2010; Fonseca et al., 2013). Per ottenere una maggiore discriminazione tra i diversi ceppi analizzati, i risultati di entrambe le analisi sono stati combinati. L’identificazione degli isolati invece è stata condotta attraverso il sequenziamento parziale del gene 16S rDNA che rappresenta il metodo più utilizzato per i microrganismi isolati da prodotti fermentati (Kesmen et al., 2012; Fonseca et al., 2013) e attraverso PCR specie-specifica solo per le specie *Lactobacillus plantarum*, *L. paraplantarum* e *L. pentosus*.

Complessivamente, sono stati identificati 40 lattobacilli 70 stafilococchi. I profili RAPD-PCR e rep-PCR sono riportati nelle figure 1 e 2. In base all’indice di similarità dell’85% (soglia scelta in base alla ripetibilità dell’analisi) i ceppi di lattobacilli sono stati suddivisi in 17 cluster, di cui 5 *singletone*, ovvero composti da un singolo ceppo, mentre i 70 ceppi di stafilococchi testati hanno mostrato una maggiore diversità genetica: 44 cluster diversi, di cui 12 che raggruppavano più di una specie e 32 *singleton*. L’analisi cluster ha permesso un raggruppamento in termini di similarità genetica, utile anche alla riduzione dei ceppi sui quali eseguire il sequenziamento parziale del gene 16s rDNA. La Multiplex PCR *recA*, su un totale di 40 lattobacilli, ha permesso l’identificazione di 31 *Lactobacillus plantarum* (77.5%). I restanti 9 ceppi (22.5%), appartenenti alla specie *L. brevis*, sono stati identificati mediante sequenziamento parziale del gene 16S rDNA.

Per quanto riguarda gli stafilococchi CN, *Staphylococcus xylosus* (n=27) *Staphylococcus equorum* (n=21) sono risultate le specie identificate con la maggior frequenza, 38.6% e 32.8% rispettivamente. In ordine di frequenza sono state identificate le specie *Staphylococcus pasteurii* (8.5%), *Staphylococcus succinus* (2.8%) e *Staphylococcus haemolyticus* (2.8%). Non è stato possibile risalire alla specie di 12 ceppi appartenenti al genere *Staphylococcus* (17.1%).

Le figure 3 e 4 mostrano la frequenza delle specie di batteri lattici e stafilococchi CN riscontrate nel presente lavoro.

Composite fingerprint (40 entries)

M13+GTGS
COMPOSITE FINGERPRI

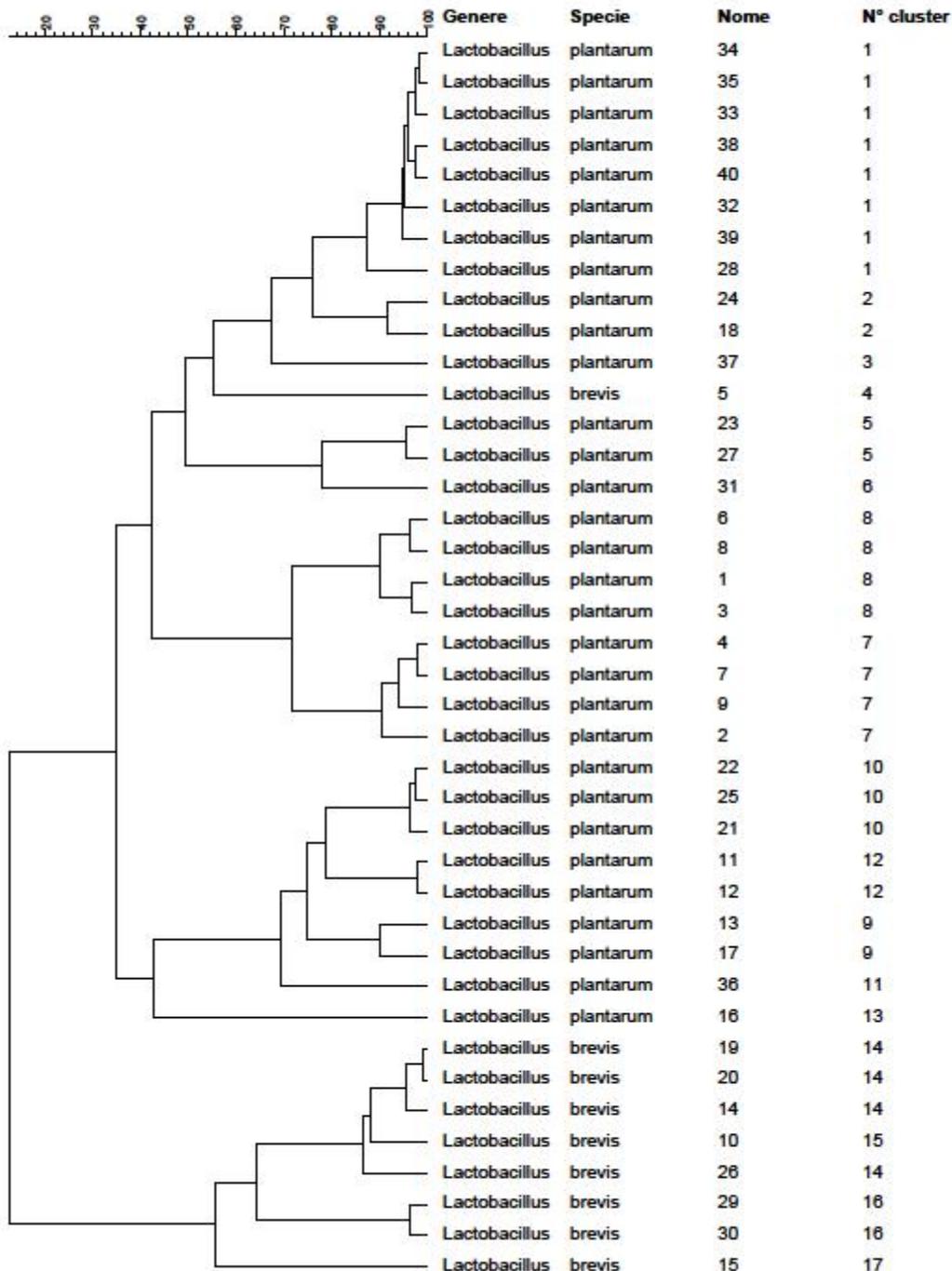


Figura 1. Analisi cluster del fingerprinting genetico dei 40 batteri lattici

composite fingerprint (70 entries)

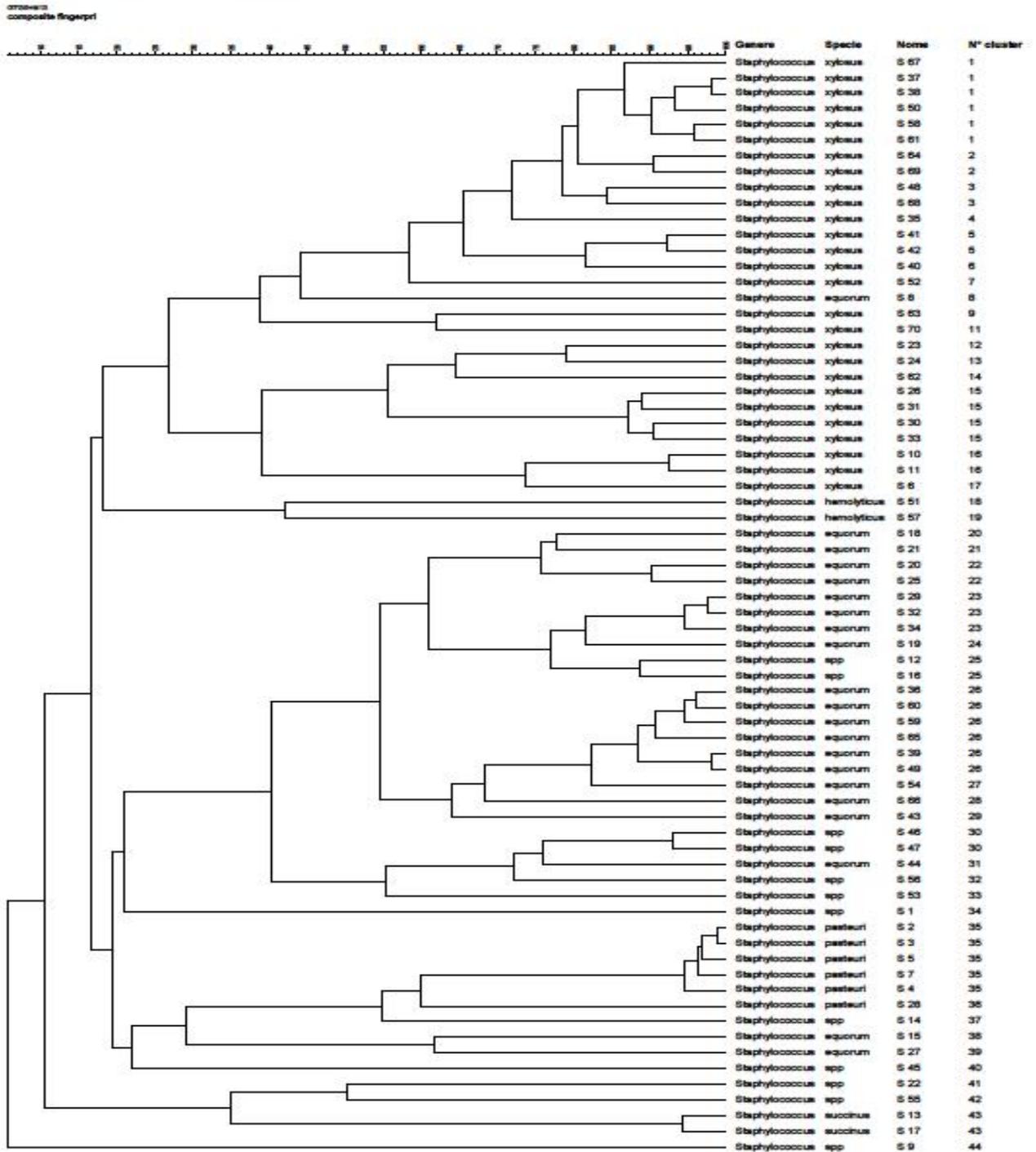


Figura 2. Analisi cluster del fingerprinting genetico dei 70 stafilococchi

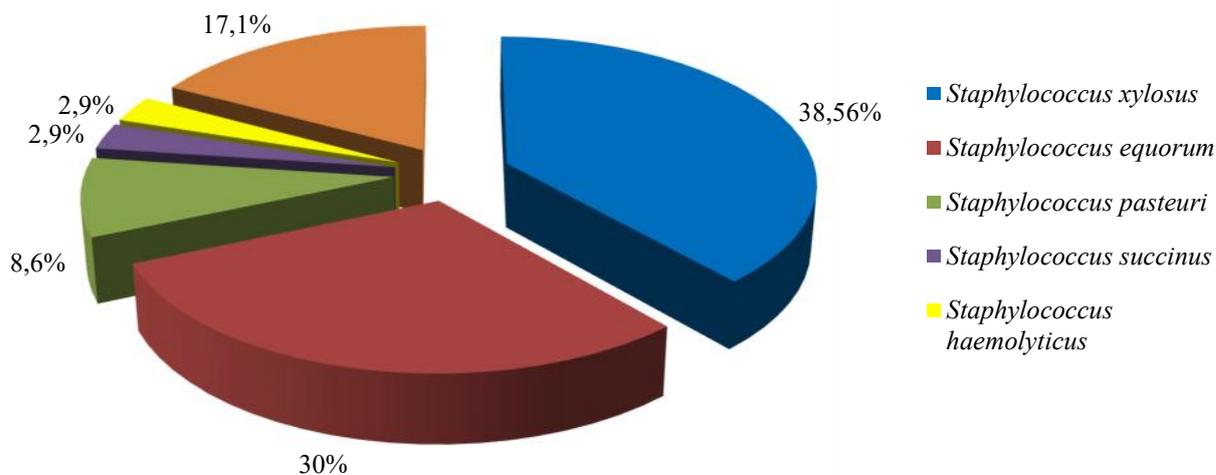


Figura 3. Frequenza delle specie di SCN

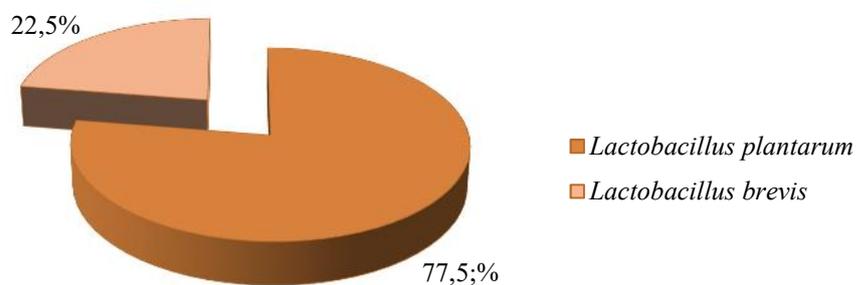


Figura 4. Frequenza delle specie di batteri lattici

4.2 Capacità acidificante e di crescita dei lattobacilli

L'attività acidificante, è stata testata su 14 ceppi di *L. plantarum* rappresentativi dei cluster ottenuti in base all'analisi genetica. La Tabella 2 riporta i valori di pH registrati nelle colture allestite con i substrati S1 e S2 (aggiunto di KNO₃) ai diversi intervalli di tempo di incubazione.ⁱ

Nel substrato S1 (senza KNO₃), già alle 3 ore di incubazione, i ceppi L7, L13, L21 e L27, hanno registrato valori di pH inferiori a 5.8, con differenza significativa ($p < 0.05$), rispetto a quanto mostrato nel substrato contenente KNO₃ (S2). Il ceppo più interessante è risultato L27, con valori di pH pari a 5.38. Contrariamente, i ceppi L2, L13, L24, L31, L36, L37, hanno registrato valori di pH inferiori nel terreno S2 ($p < 0.05$), in particolare il ceppo L24 con pH 5.41.

Dopo 6 ore di incubazione invece, i valori di pH registrati in S1 dei ceppi L2, L7 e L28, risultavano inferiori a 5.6, e hanno mostrato differenze significative ($p < 0.05$) rispetto a S2. Tra questi, L7 è stato quello che ha mostrato una migliore capacità acidificante, con un pH di 4.99. Hanno presentato invece pH inferiori ($p < 0.05$) in S2, i ceppi L2, L24, L31, L36, L37 e L39, in particolare il ceppo L24, con valori di pH di 5.41.

Alle 9 ore di incubazione invece, i ceppi L2, L7, L13 e L37, sono risultati quelli maggiormente acidificanti nel substrato S1 ($p < 0.05$). Il ceppo L7 è stato quello che ha avuto il comportamento migliore, con valori di pH di 4.54. I ceppi L27, L31, L36 e L39 hanno evidenziato una capacità acidificante superiore ($p < 0.05$) in S2, e in particolare il ceppo L36, con pH 4.47.

A 24 ore di incubazione, tutti i ceppi saggiati in S1 avevano determinato l'abbassamento del pH sotto la soglia di 4.3, con il ceppo L27 che ha registrato valori di pH pari a 3.78, ($p < 0.05$). Diversamente, i ceppi L7 e L39 hanno avuto un comportamento significativo ($p < 0.05$) in S2, con pH rispettivamente di 3.94 e 3.82.

Infine alle 48 ore, i ceppi L7 e L27, hanno registrato in S1 valori di pH rispettivamente di 3.69 e 3.93, significativamente più alti rispetto a quelli registrati in S2. I ceppi L2, L12 e L39 invece, con valori di pH rispettivamente di 3.43, 3.83 e 3.79, hanno avuto un comportamento migliore in S2.

I risultati delle conte microbiche a tempi diversi di incubazione sono illustrati nella Tabella 3.

Dai risultati riportati, si può mettere in evidenza sia la velocità di crescita che la capacità dei ceppi saggiati ad adattarsi ai substrati S1 e S2. Dopo 3 ore di incubazione, il 71% dei ceppi ha raggiunto una popolazione superiore ($p < 0.05$) nel substrato S1, in particolare il ceppo L36, ha raggiunto un numero di cellule di 5.83 log/ufc ml, rispetto ai 4.91 log/ufc ml della conta iniziale. I ceppi L1, L24, L28 e L31, contrariamente hanno avuto uno sviluppo maggiore ($p < 0.05$) in S2, in particolare L24 con valori pari a 6.18 log/ufc ml, rispetto ai 4.52 log/ufc ml iniziali.

Michele Cottu – Studio delle proprietà tecnologiche e funzionali di *Lactobacillus* spp. e stafilococchi coagulasi-negativi isolati da salsiccia di pecora – Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – Curriculum “Biotecnologie Microbiche Agroalimentari” – Ciclo XXIX
Università degli Studi di Sassari

Dopo sei ore di incubazione, *Lactobacillus plantarum* L1, L12, L16, L36 e L39 sono cresciuti maggiormente in S1 ($p < 0.05$), tra questi, il ceppo L12, ha raggiunto un numero pari a 7.63 log/ufc ml. Invece, i ceppi L2, L13, L21, L27 e L28 sono cresciuti maggiormente ($p < 0.05$) nel substrato S2, con il ceppo L28 che ha raggiunto una conta pari a 8.31 log/ufc ml. I ceppi L7, L24, L31 e L37, non hanno mostrato nessuna differenza significativa nella conta cellulare dei due terreni di coltura.

A nove ore, i ceppi L12, L13, L16 e L21 ($p < 0.05$), hanno raggiunto i valori di crescita maggiori in S1, con valori rispettivamente di 9.48, 10.04, 10.02, 9.68 log/ufc ml. I ceppi L27, L28 e L39, sempre nel terreno colturale S1, anche se con numeri inferiori rispetto ai precedenti, presentavano una differenza significativa ($p < 0.05$) rispetto ai valori ottenuti in S2. I ceppi L1, L24 e L37 invece, registravano conte maggiori in S2 ($p < 0.05$). Gli altri ceppi non hanno mostrato differenze significative.

Alle 24 ore i ceppi L2, L12, L21, L24, L27 e L39 hanno riscontrato una conta maggiore e significativa in S1; in particolare L12 e L27 raggiungevano una popolazione rispettivamente di 10.03 e 10.08 log/ufc ml. In S2 invece, i ceppi che hanno mostrato la maggiore capacità di crescita sono risultati L31 e L36, con valori rispettivamente di 10.39 e 10.75 log/ufc ml.

Infine dopo 48 ore di incubazione, 8 ceppi su 14 testati, hanno presentato una popolazione microbica maggiore sul substrato S1, e in particolare L7 e L13 presentavano una conta pari a 10.06 e 10.04 log/ufc ml. In S2, invece, i ceppi L1, L24 e L37, hanno mostrato una crescita maggiore ($p < 0.05$) rispetto al terreno colturale S1 e in particolare il ceppo L24, con una popolazione di 10.04 log/ufc ml.

La variazione della popolazione microbica alle 48 ore di incubazione evidenzia la diversità di comportamento dei ceppi di *L. plantarum*, probabilmente dovuta sia dalla residua disponibilità di nutrienti e soprattutto dalla presenza di KNO_3 . È comunque opportuno sottolineare, che i ceppi di lattobacilli impiegati nella sperimentazione non subiscono particolare influenza, particolarmente nei primi tempi di incubazione, dalla presenza del nitrato.

Tabella 2. Cinetica di acidificazione di *L. plantarum* a tempi diversi di incubazione.

<i>L. plantarum</i>	0 ore		3 ore		6 ore		9 ore		24 ore		48 ore	
	S1	S2										
L1	5.86±0,01 ^a	5.88±0,01 ^a	5.83±0,01 ^a	5.62±0,02 ^a	5.67±0,02 ^a	5.54±0,01 ^b	5.49±0,02 ^a	4.87±0,02 ^a	4.23±0,02 ^a	4.27±0,03 ^a	4.00±0,01 ^a	3.99±0,01 ^a
L2	5.83±0,46 ^a	5.87±0,01 ^a	5.77±0,01 ^a	5.63±0,04 ^b	5.52±0,01 ^a	5.57±0,01 ^b	4.85±0,01 ^a	5.47±0,03 ^b	4.48±0,02 ^a	4.28±0,01 ^b	3.61±0,01 ^a	3.43±0,02 ^b
L7	5.81±0,01 ^a	5.84±0,05 ^a	5.72±0,01 ^a	5.79±0,03 ^b	4.99±0,01 ^a	5.16±0,04 ^b	4.54 ^a	5.04±0,06 ^b	4.18±0,01 ^a	3.94±0,04 ^b	3.69±0,04 ^a	4.10±0,02 ^b
L12	5.88±0,03 ^a	5.81±0,03 ^a	5.51±0,02 ^a	5.71±0,01 ^a	5.46±0,03 ^a	5.49±0,02 ^a	4.86±0,02 ^a	5.12±0,06 ^b	4.24±0,05 ^a	4.32±0,03 ^a	3.92±0,02 ^a	3.83±0,01 ^b
L13	5.84±0,03 ^a	5.83±0,03 ^a	5.72±0,01 ^a	5.80 ^b	5.52±0,02 ^a	5.30±0,02 ^b	4.9±0,02 ^a	5.14±0,01 ^b	4.28±0,02 ^a	4.25±0,01 ^a	4.00±0,01 ^a	4.00±0,03 ^a
L16	5.84±0,47 ^a	5.86±0,02 ^a	5.61±0,01 ^a	5.63±0,01 ^a	5.60±0,02 ^a	5.09±0,01 ^a	5.0±0,03 ^a	5.08±0,04 ^a	4.28±0,01 ^a	4.31±0,04 ^a	3.93±0,02 ^a	4.14±0,06 ^b
L21	5.8±0,02 ^a	5.74 ^a	5.59±0,01 ^a	5.71±0,04 ^b	5.53±0,02 ^a	5.40±0,01 ^b	5.05±0,04 ^a	5.09±0,03 ^a	4.32±0,08 ^a	4.27±0,04 ^a	4.14±0,05 ^a	4.16±0,03 ^a
L24	5.8±0,02 ^a	5.8±0,03 ^a	5.57±0,02 ^a	5.41±0,05 ^b	5.28±0,05 ^a	5.20±0,04 ^a	5.17±0,03 ^a	5.18±0,03 ^a	4.29±0,02 ^a	4.25±0,03 ^a	3.94±0,01 ^a	4.11±0,03 ^b
L27	5.84±0,06 ^a	5.86±0,01 ^a	5.38±0,05 ^a	5.63±0,02 ^b	5.30±0,11 ^a	5.44±0,04 ^a	4.90±0,05 ^a	4.67±0,06 ^b	3.78±0,06 ^a	4.05±0,04 ^b	3.76±0,04 ^a	3.98±0,03 ^b
L28	5.82±0,03 ^a	5.87±0,03 ^a	5.68±0,03 ^a	5.22±0,02 ^a	5.19±0,03 ^a	5.29±0,01 ^b	4.88±0,09 ^a	4.85±0,06 ^a	4.06±0,02 ^a	4.14±0,02 ^b	4.03±0,02 ^a	4.02±0,02 ^a
L31	5.83±0,01 ^a	5.81±0,02 ^a	5.63±0,02 ^a	5.47±0,02 ^b	5.58±0,03 ^a	5.41±0,03 ^b	5.08±0,02 ^a	4.91±0,01 ^b	4.21±0,05 ^a	4.12±0,02 ^a	4.12±0,02 ^a	4.08±0,03 ^a
L36	5.79±0,03 ^a	5.86±0,03 ^a	5.63±0,02 ^a	5.47±0,03 ^b	5.39±0,03 ^a	5.31±0,05 ^a	4.68±0,06 ^a	4.47±0,03 ^b	4.10±0,05 ^a	4.09±0,02 ^a	4.06±0,03 ^a	4.04±0,03 ^a
L37	5.86±0,04 ^a	5.85±0,05 ^a	5.72±0,03 ^a	5.51±0,01 ^b	5.44±0,06 ^a	5.42±0,08 ^a	4.76±0,05 ^a	4.87±0,04 ^b	3.97±0,02 ^a	4.05±0,06 ^a	3.93±0,03 ^a	4.00±0,06 ^a
L39	5.78±0,01 ^a	5.81±0,06 ^a	5.59±0,07 ^a	5.49±0,05 ^a	5.59±0,04 ^a	5.43±0,07 ^b	4.95±0,03 ^a	4.69±0,08 ^b	4.01±0,06 ^a	3.82±0,05 ^b	3.99±0,01 ^a	3.79±0,07 ^b

I valori riportati rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti e la relativa deviazione standard.

Tabella 3. Conte microbiche di *L. plantarum* a tempi diversi di incubazione.

<i>L. plantarum</i>	0 ore		3 ore		6 ore		9 ore		24 ore		48 ore	
	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2
L1	4.71±0,01 ^a	4.75±0,01 ^a	5.53±0,01 ^a	5.63±0,02 ^b	6.34±0,01 ^a	6.27±0,01 ^b	7.88±0,02 ^a	7.99±0,02 ^b	7.70±0,02 ^a	7.80±0,05 ^b	9.71 ^a	9.78 ^b
L2	4.81 ^a	4.75±0,01 ^a	5.38±0,03 ^a	5.34±0,02 ^a	6.10±0,01 ^a	6.21 ^b	7.81±0,01 ^a	7.85±0,05 ^a	8.36±0,02 ^a	8.23±0,01 ^b	9.82±0,01 ^a	7.62±0,01 ^b
L7	4.89±0,01 ^a	4.80±0,02 ^a	5.54±0,01 ^a	5.46±0,02 ^b	6.35±0,02 ^a	6.33±0,03 ^a	7.78 ^a	7.75±0,06 ^a	7.61±0,01 ^a	7.92±0,05 ^b	10.06±0,04 ^a	9.93±0,03 ^b
L12	4.94±0,04 ^a	4.95±0,02 ^a	5.53±0,01 ^a	5.46±0,01 ^b	7.63±0,06 ^a	7.33±0,01 ^b	9.48±0,01 ^a	8.72±0,01 ^b	10.3±0,05 ^a	9.85±0,02 ^b	9.43±0,01 ^a	9.10±0,01 ^b
L13	4.89±0,04 ^a	4.82±0,01 ^a	5.38 ^a	5.32±0,01 ^b	7.09±0,01 ^a	7.67±0,03 ^b	10.04±0,02 ^a	8.84±0,01 ^b	10.4±0,01 ^a	10.7±0,01 ^b	10.04±0,01 ^a	8.92±0,04 ^b
L16	4.91±0,01 ^a	4.93±0,03 ^a	5.64 ^a	5.30±0,01 ^b	7.42±0,02 ^a	7.29 ^b	10.02±0,03 ^a	9.58±0,05 ^b	10.5±0,01 ^a	10.09±0,02 ^b	8.94±0,03 ^a	9.09±0,02 ^b
L21	4.72±0,03 ^a	4.79 ^a	5.44±0,01 ^a	5.36±0,01 ^b	7.53 ^a	8.31±0,02 ^b	9.68±0,02 ^a	9.44±0,03 ^b	10.6±0,04 ^a	9.82±0,03 ^b	9.59±0,03 ^a	9.12±0,02 ^b
L24	4.62±0,01 ^a	4.55±0,02 ^a	5.20±0,01 ^a	5.20±0,02 ^a	6.55±0,04 ^a	6.45±0,05 ^a	6.95±0,04 ^a	7.67±0,02 ^b	9.53±0,02 ^a	9.33±0,01 ^b	9.76 ^a	10.09±0,03 ^b
L27	4.47±0,03 ^a	4.52±0,01 ^a	5.17±0,04 ^a	4.99±0,03 ^b	5.94±0,05 ^a	6.09±0,04 ^b	6.90±0,04 ^a	6.64±0,08 ^b	10.08±0,03 ^a	9.24±0,01 ^b	9.05±0,03 ^a	9.09±0,03 ^a
L28	4.51±0,01 ^a	4.52±0,06 ^a	5.36±0,03 ^a	6.18±0,08 ^b	6.14±0,05 ^a	6.59±0,08 ^b	6.94±0,08 ^a	6.53±0,05 ^b	9.66±0,01 ^a	9.87±0,03 ^b	8.94±0,09 ^a	9.10±0,04 ^a
L31	4.42±0,01 ^a	4.43±0,01 ^a	5.30±0,03 ^a	5.26±0,04 ^a	6.46±0,10 ^a	6.61±0,07 ^a	7.36±0,06 ^a	7.29±0,04 ^a	9.64±0,06 ^a	10.39±0,04 ^b	8.72±0,03 ^a	8.10±0,05 ^b
L36	4.91±0,02 ^a	4.87±0,03 ^a	5.83±0,07 ^a	5.62±0,03 ^b	7.00±0,04 ^a	6.90±0,04 ^b	7.98±0,07 ^a	7.86±0,05 ^a	9.70±0,08 ^a	10.75±0,04 ^b	8.22±0,14 ^a	8.24±0,13 ^a
L37	4.50±0,04 ^a	4.50±0,03 ^a	5.32±0,01 ^a	5.10±0,02 ^b	6.15±0,06 ^a	6.04±0,10 ^a	6.97±0,05 ^a	7.07±0,03 ^b	9.64±0,11 ^a	9.64±0,10 ^a	8.94±0,06 ^a	9.39±0,03 ^b
L39	4.54±0,01 ^a	4.45±0,05 ^a	5.27±0,02 ^a	5.12±0,02 ^b	6.18±0,03 ^a	5.95±0,03 ^b	6.94±0,02 ^a	6.67±0,04 ^b	8.95±0,01 ^a	7.86±0,03 ^b	9.43±0,01 ^a	9.23±0,03 ^b

I valori riportati rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti e la relativa deviazione standard.

4.3 Attività proteolitica dei batteri lattici e degli stafilococchi CN

Nessuno dei batteri lattici testati ha evidenziato, nel test su piastra, attività proteolitica nei confronti delle proteine sarcoplasmatiche e miofibrillari di suino e di pecora (dati non mostrati). Per questo motivo si è ritenuto opportuno non proseguire il test con i gel di SDS-PAGE.

Fra le specie di stafilococchi CN impiegati nella prova, 12 ceppi (17.1%) hanno mostrato una buona attività proteolitica nei confronti delle proteine sarcoplasmatiche di pecora e suino ($\varnothing \geq 1$ cm) (Tabella 4) mentre non hanno mostrato attività nei confronti delle proteine miofibrillari. L'attività proteolitica dei 12 stafilococchi positivi al test in piastra è stata valutata con il metodo SDS-PAGE. I profili dei peptidi nelle proteine sarcoplasmatiche di suino hanno mostrato una grandezza di 80, 53, 50, 48, 47, 42, 40, 38, 32, 29, 25, 20 e 15 kDa, mentre quelli di pecora di 80, 70, 53, 50, 48, 47, 42, 40, 38, 32, 29, 26, 25, 23, 20 e 15 kDa. Complessivamente, il primo risultato che emerge dai profili elettroforetici è la maggiore idrolisi delle proteine estratte da carne suina rispetto a quelle estratte da carne di pecora. In particolare, dopo 9 giorni di incubazione i ceppi *S. pasteurii* S4, S5 e S7, *S. haemolyticus* S57 e S59, *S. equorum* S14, S45 e *S. xylosum* S63, hanno mostrato un'attività proteolitica molto simile nei confronti delle proteine sarcoplasmatiche di suino (dati non mostrati). A titolo di esempio, nella Figura 5 viene riportata l'attività proteolitica del ceppo *S. xylosum* S63, dove si possono notare la scomparsa delle bande a 80, 42, 32 e 25 kDa ai 9 giorni. A 18 e 27 giorni, si attenua l'intensità della banda a 48 kDa, il resto del profilo rimane costante. Tra tutti i ceppi, il ceppo *S. pasteurii* S3, ha mostrato i risultati migliori nel substrato suino (Figura 6); dal profilo elettroforetico, si evidenzia la scomparsa anche delle bande a circa 32, 38, 48 kDa ai nove giorni, e la comparsa di un nuovo peptide intorno ai 35kDa; ai 18 giorni si ripresenta lo stesso profilo dei nove giorni, e al 27 giorno si ha la scomparsa di tutte le bande.

Anche il ceppo *S. equorum* S60 (Figura 7) ha avuto un comportamento differente nelle proteine sarcoplasmatiche di suino, dovuto alla scomparsa anche delle bande da 50, 48, 29 e 25 kDa ai 18 giorni, e ai 27 giorni si ha una minore intensità a 38 kDa e 35 kDa.

Nel profilo riguardante le proteine sarcoplasmatiche delle proteine di pecora, non si sono evidenziate differenze tra i ceppi: ai 9 giorni, risulta la scomparsa delle bande a 32 e 80 kDa, e una diminuzione dell'intensità a 38 e 40 kDa. Tale profilo rimane costante anche a 18 e a 27 giorni di incubazione.

Tabella 4. Attività proteolitica di *Staphylococcus* spp. nei confronti delle proteine di pecora e suino

Specie	Ceppo	Proteine				Specie	Ceppo	Proteine				
		Sarcoplasmatiche		Miofibrillari				Sarcoplasmatiche		Miofibrillari		
		Suino	Pecora	Suino	Pecora			Suino	Pecora	Suino	Pecora	
<i>S. xylosus</i>	S6	-	-	-	-	<i>S. equorum</i>	S29	-	-	-	-	
	S10	-	-	-	-		S32	-	-	-	-	
	S11	-	-	-	-		S34	-	-	-	-	
	S23	-	-	-	-		S36	-	-	-	-	
	S24	-	-	-	-		S39	-	-	-	-	
	S26	-	-	-	-		S43	-	-	-	-	
	S30	-	-	-	-		S44	-	-	-	-	
	S31	-	-	-	-		S49	-	-	-	-	
	S33	-	-	-	-		S54	-	-	-	-	
	S35	-	-	-	-		S59	1,1	1,1	-	-	
	S37	-	-	-	-		S60	1,2	1	-	-	
	S38	-	-	-	-		S65	1,1	1,1	-	-	
	S40	-	-	-	-		S66	-	-	-	-	
	S41	-	-	-	-		<i>S. pasteurii</i>	S2	-	-	-	-
	S42	-	-	-	-			S3	1	1	-	-
	S48	-	-	-	-			S4	1	1	-	-
	S50	-	-	-	-	S5		1	1	-	-	
	S52	-	-	-	-	S7		0,9	0,85	-	-	
	S58	-	-	-	-	S28		1,1	1,1	-	-	
	S61	-	-	-	-	<i>S. succinus</i>	S13	-	-	-	-	
S62	-	-	-	-	S17		-	-	-	-		
S63	1,2	1,05	-	-	<i>S. haemolyticus</i>	S51	-	-	-	-		
S64	-	-	-	-		S57	1,5	1	-	-		
<i>S. equorum</i>	S67	-	-	-	-	<i>Staphylococcus</i> spp.	S1	-	-	-	-	
	S68	-	-	-	-		S9	-	-	-	-	
	S69	-	-	-	-		S12	-	-	-	-	
	S70	-	-	-	-		S14	1,2	1,2	-	-	
	S8	-	-	-	-		S16	-	-	-	-	
	S15	-	-	-	-		S22	-	-	-	-	
	S18	-	-	-	-		S45	1	1,3	-	-	
	S19	-	-	-	-		S46	-	-	-	-	
	S20	-	-	-	-		S47	-	-	-	-	
	S21	-	-	-	-		S53	-	-	-	-	
	S25	-	-	-	-		S55	-	-	-	-	
	S27	-	-	-	-		S56	-	-	-	-	

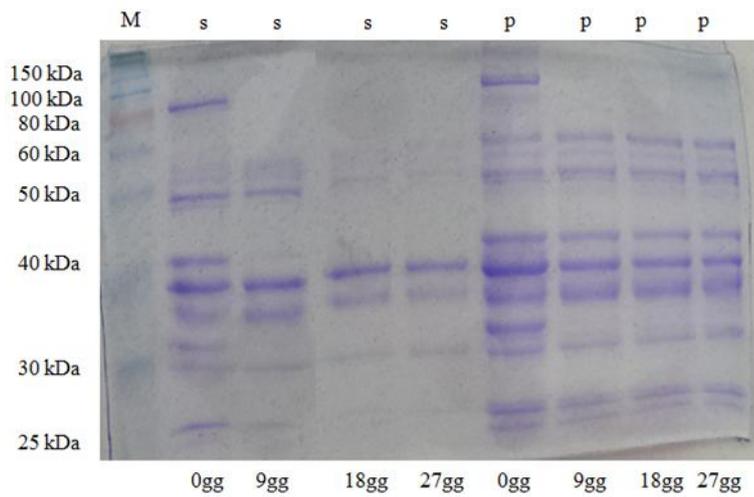


Figura 5. SDS-PAGE delle proteine sarcoplasmatiche, idrolizzate dal ceppo *S. xylosoyus* S63, ai 0, 9, 18 e 27 giorni di incubazione. M: marker; s: suino; p: pecora.

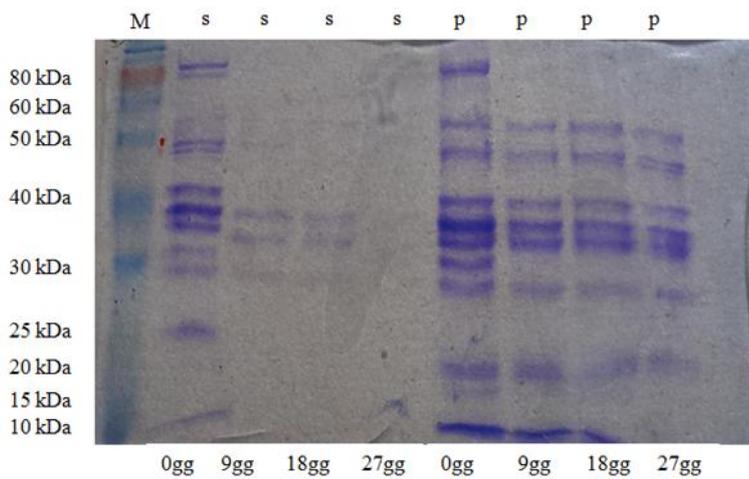


Figura 6. SDS-PAGE delle proteine sarcoplasmatiche, idrolizzate dal ceppo *S. pasteyri* S3, ai 0, 9, 18 e 27 giorni di incubazione. M: marker; s: suino; p: pecora.

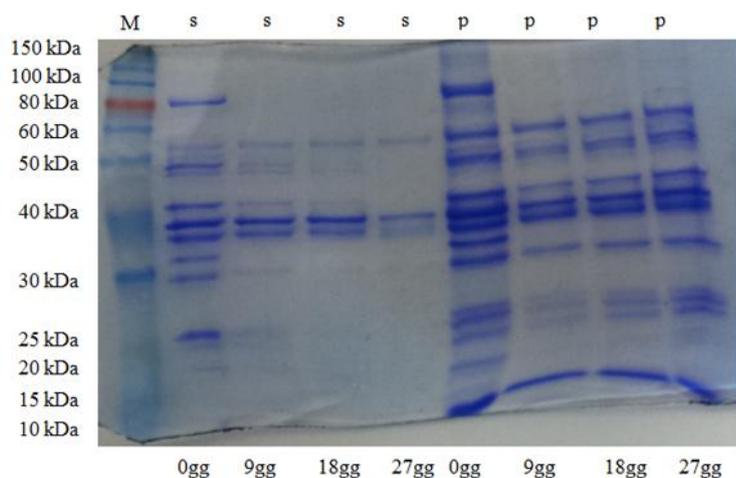


Figura 7. SDS-PAGE delle proteine sarcoplasmatiche, idrolizzate dal ceppo *S. equorum* S60, ai 0, 9, 18 e 27 giorni di incubazione M: marker; s: suino; p: pecora.

4.4 Attività lipolitica dei batteri lattici e degli stafilococchi CN

Tutti i ceppi di *L. plantarum* (n=31) e *L. brevis* (n=9) non sono stati in grado di idrolizzare il substrato contenente *Tween* 80 e la tributirina (metodo in piastra) mentre sono stati ottenuti risultati diversi con il metodo per titolazione, poiché tutti i ceppi hanno prodotto acidi grassi liberi espressi in percentuale di acido oleico (Figura 8). In particolare, 10 ceppi di *L. plantarum* su 31 (25%) hanno prodotto acido oleico in quantità maggiore del 1.40%, con la migliore *performance* dei ceppi *L. plantarum* L6 e L12 che hanno prodotto il 2.51 e 4.49% di acido oleico rispettivamente.

Tutti gli stafilococchi testati (n=70) non hanno idrolizzato il *Tween* 80 nel substrato contenente la tributirina invece 12 ceppi sono risultati attivi (Tabella 5). I ceppi positivi al test in piastra sono stati poi analizzati mediante il metodo per titolazione, i cui risultati sono mostrati nella figura Figura 9. Il più interessante è risultato il ceppo *S. pasteurii*, l'S3, con valori di acido oleico prodotto del 5.02 %, seguono i ceppi *S. pasteurii* S4 e S5 con valori di acido oleico del 4.51 e 4.31% rispettivamente. Anche i ceppi *S. xylosum* S41, S48 e S63, sono stati in grado d'idrolizzare il grasso suino con percentuali di acido oleico prodotto del 3.91, 3.83 e 1.91 rispettivamente, comunque inferiori rispetto ai ceppi di *S. pasteurii*.

Tabella 5. Attività lipolitica espressa dagli stafilococchi CN.

Specie	Ceppo	Substrato		Specie	Ceppo	Substrato		
		BPA+tributirrina ^a	% acido oleico ^b			BPA+tributirrina ^a	% acido oleico ^b	
<i>S. xylosus</i>	S6	-	-	<i>S. equorum</i>	S29	1,3	2,9±0,24	
	S10	-	-		S32	-	-	
	S11	-	-		S34	-	-	
	S23	-	-		S36	-	-	
	S24	-	-		S39	-	-	
	S26	-	-		S43	-	-	
	S30	-	-		S44	-	-	
	S31	-	-		S49	-	-	
	S33	-	-		S54	-	-	
	S35	-	-		S59	-	-	
	S37	-	-		S60	1,63±0,18	1,69±0,04	
	S38	-	-		S65	-	-	
	S40	-	-		S66	-	-	
	S41	1,4±0,1	3,91±0,85		<i>S. pasteurii</i>	S2	1,55±0,05	3,93±0,7
	S42	-	-			S3	1,4	5,02±0,18
	S48	1,25±0,05	3,83			S4	1,45	4,51±0,32
	S50	-	-			S5	1,37±0,5	4,31±0,16
	S52	-	-			S7	1,58±0,03	3,12±0,1
	S58	-	-	S28		-	-	
	S61	-	-	<i>S. succinus</i>	S13	-	-	
S62	-	-	S17		-	-		
S63	1,95	1,91±0,06	<i>S. haemolyticus</i>	S51	1,6	2,09±0,2		
S64	-	-		S57	-	-		
S67	-	-	<i>Staphylococcus</i> spp.	S1	-	-		
S68	-	-		S9	-	-		
S69	-	-		S12	-	-		
S70	-	-		S14	-	-		
<i>S. equorum</i>	S8	1,29±0,07		3,22	S16	-	-	
	S15	-		-	S22	-	-	
	S18	-		-	S45	-	-	
	S19	-		-	S46	-	-	
	S20	-		-	S47	-	-	
	S21	-		-	S53	-	-	
	S25	-	-	S55	-	-		
S27	-	-	S56	-	-			

^ametodo in piastra: i valori (cm) indicano il diametro dell'alone opaco intorno al pozzetto;

^bmetodo per titolazione: i valori indicano la l'attività lipolitica espressa in % di acido oleico. BPA=Baird Parker Agar;

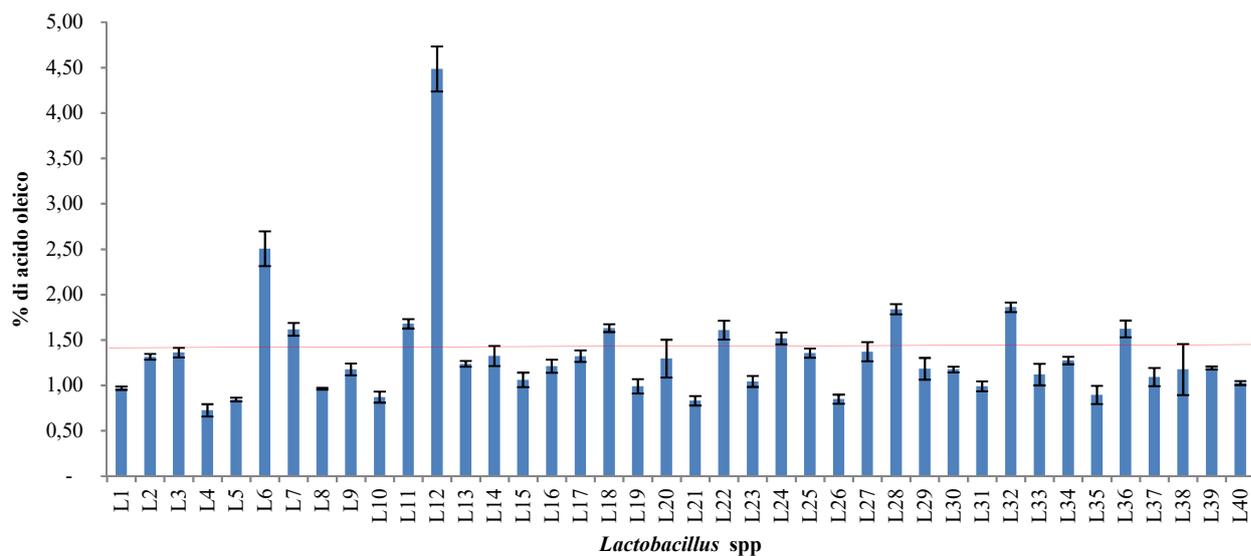


Figura 8. Lipolisi dei batteri lattici.

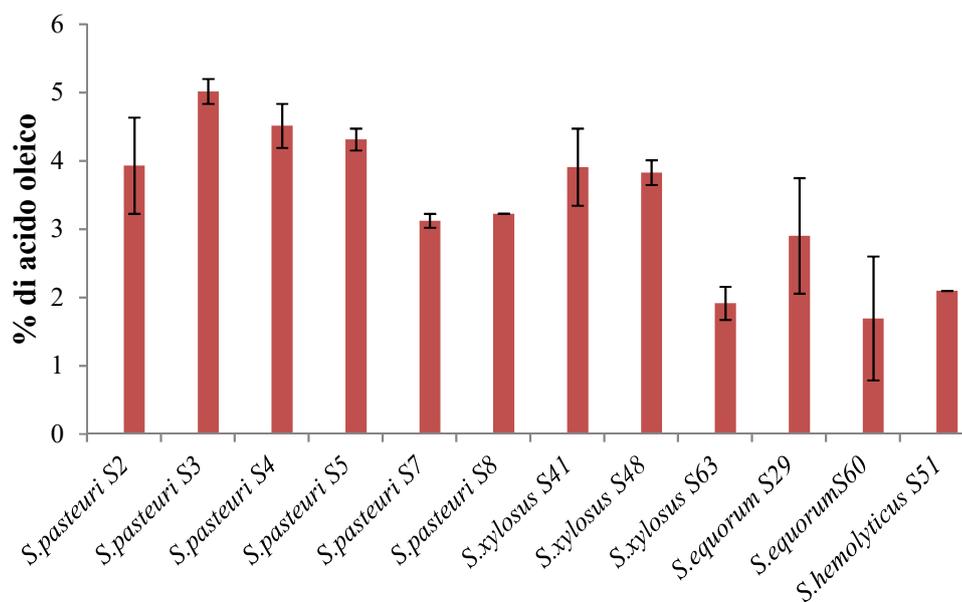


Figura 9. Lipolisi degli stafilococchi CN.

4.5 Attività antibatterica dei lattobacilli e degli stafilococchi CN.

L'attività antibatterica dei ceppi di lattobacilli e stafilococchi CN è stata effettuata utilizzando come microrganismi target 2 ceppi di *Listeria monocytogenes*, e *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

In questo lavoro il 35% dei lattobacilli testati (n=14) tutti appartenenti alla specie *Lactobacillus plantarum*, hanno mostrato attività antagonista ($\varnothing > 1\text{cm}$) nei confronti di almeno un microrganismo indicatore (Tabella 6). In particolare, i *L. plantarum* L12, L13, L28, L31, L36 e L39 sono risultati attivi contro tutti i microrganismi testati. Tutti i *L. plantarum*, sono stati capaci di inibire lo *Staphylococcus aureus*, con diametri d'inibizione $>$ di 1.1 cm.

I risultati dell'attività antagonista dei ceppi di stafilococchi CN hanno evidenziato che solo 4 ceppi su 70 sono risultati attivi nei confronti della *Listeria* E e della *Listeria* DSMZ (Figura 10). I ceppi *S. xylosus* S41, S48 e S69 e *S. hemolyticus* S51 hanno mostrato un diametro di inibizione maggiore di 1.3 cm. Il ceppo *Staphylococcus haemolyticus* S51, è stato quello maggiormente attivo nei confronti della *Listeria* DSMZ, con un diametro di inibizione di 1.58cm. L'attività antagonista quando analizzata con il metodo *agar well diffusion* non è stata confermata da nessuna coltura batterica testata.

Tabella 6. Attività antimicrobica dei batteri lattici (Spot test).

Ceppi	<i>Listeria E</i>	<i>Listeria ATCC</i>	<i>Salmonella</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
L1	0.6±0.05	0.81±0,04	1.09±0.02	1.15±0.02	0.87±0.02
L3	0.68±0.05	0.65±0.02	1.05±0.02	1.14±0.03	1.00
L7	0.69±0,04	0.90±0.02	0.98±0.01	1.19±0.02	0.94±0.02
L12	1.31±0.03	1.38±0.03	1.13±0.01	1.34±0.05	1.02±0.01
L13	1.19±0.05	1.45±0.02	1.07±0.02	1.38±0.04	1.04±0.02
L16	1,14±0.06	1.45±0.02	0.94±0.01	1.28±0.04	0.98±0.01
L21	1,26±0.05	1.50±0.05	0.99	1.41±0.05	1.17±0.03
L24	0.83±0.02	1.23±0.02	0.93±0.02	1.22±0.02	1.11±0.03
L27	0.88±0.01	1.09±0.02	1.12±0.02	1.40±0.06	0.96±0.02
L28	1.02±0.01	1.20±0.03	1.06±0.02	1.35±0.02	1.03±0.01
L31	1.02±0.01	1.31±0.5	1.32±0.04	1.23±0.02	1.05±0.02
L36	1.06±0.01	1.29±0.06	1.32±0.03	1.54±0.03	1.29±0.03
L37	0.99	1.28±0.06	1.24±0.02	1.28±0.02	1.17±0.02
L39	1.06±0.01	1.19±0.01	1.21±0.02	1.33±0.03	1.12±0.03

I valori riportati rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti e la relativa deviazione standard.

I ceppi con un diametro di inibizione > 1 cm sono stati considerati positivi.

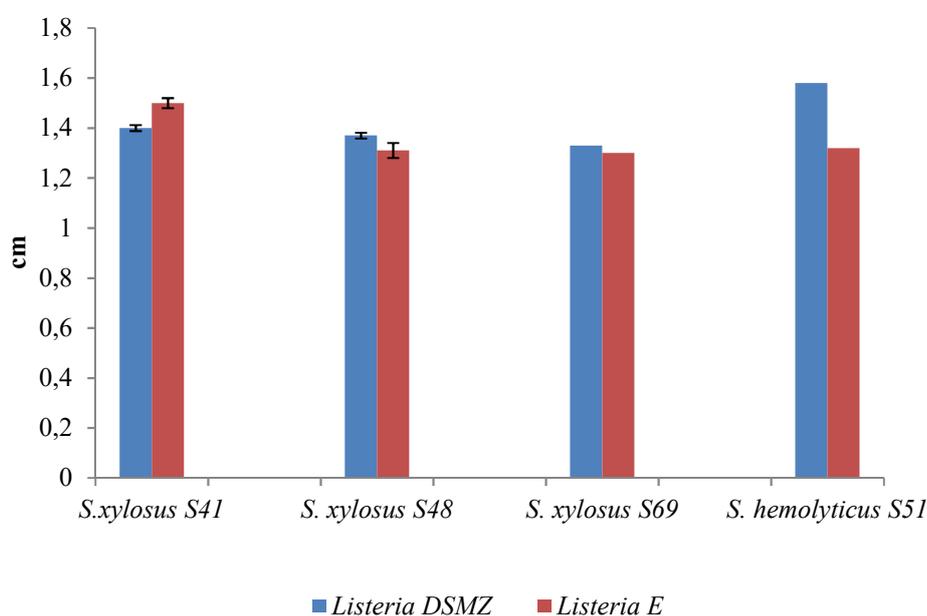


Figura 10. Diametri di inibizione (cm) dei 4 stafilococchi nei confronti della *Listeria DSMZ* e della *Listeria E*.

4.6 Attività anti-fungina

Il test *in vitro*, condotto su tutti i batteri lattici, è stato utilizzato come screening per la selezione dei ceppi da utilizzare nelle prove in serra e in campo. In base all'analisi visiva delle piastre, quelle che presentavano una minore crescita fungina dovuta all'azione dei batteri lattici, sono stati selezionati l'L7 e l'L12 appartenenti alla specie *L. plantarum*, e il ceppo L26 appartenente alla specie *L. brevis*. Per le prove in serra i risultati ottenuti con i ceppi L7 e il L12, sono in riportati in Tabella 7, mentre la Figura 11 mostra la relazione tra la gravità della malattia e la quantità di micotossine prodotta.

Tabella 7. Risultati della prova in serra.

TESI	McKinney (%)	N° semi	Peso (g)	Micotossine(ppb)
Test -	2,23 ±3,8	249±30	15±1	0
Test+	79,96±5,77	214±24	10±1	5484±1090
C7	81,1±1,9	208±17	9±1	5340±1521
SUR7	36,67±6,65	211±5	12±1	1587±500
C12	74,43±9,64	222±21	11±2	3319±3192
SUR12	77,8±8,40	273±18	12±2	2742±661

I valori riportati rappresentano la media e la relativa deviazione standard.

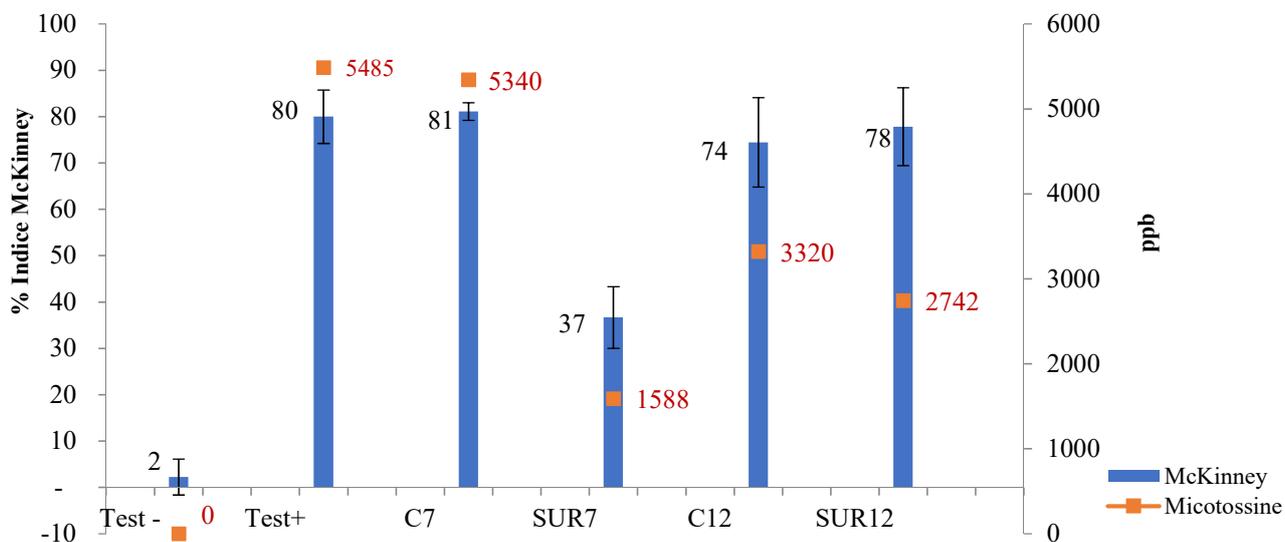


Figura 11. Gravità della malattia e quantità di micotossine prodotte.

Nel trattamento SUR7, statisticamente significativo ($p < 0.05$), è stato registrato un indice di McKinney del 37%, il più basso tra tutti i trattamenti e inferiore del 43% rispetto al controllo positivo (che ha registrato un valore pari all'80%). La quantità di micotossine registrata in questo trattamento era pari a 1588 ppb ($P < 0.05$), mentre il peso dei semi, 12.48 g, è stato il più elevato, confermando una bassa incidenza della malattia. L'indice di McKinney nel trattamento C7, è stato addirittura $> 1\%$ rispetto al T+ e il contenuto di micotossine molto alto (5340 ppb nel C7 e 5485 nel Test+). Il trattamento SUR12 ha registrato un indice di McKinney elevato (78%). Tuttavia, la quantità di micotossine pari a 2742 ppb, minore del 40% rispetto al T+, era statisticamente significativa ($P < 0.05$) rispetto alla quantità di micotossine prodotta dal T+.

Nella Figura 12 invece viene raffigurato il grafico che mette in relazione il peso dei semi e la quantità di micotossine prodotta. I risultati evidenziano che le spighe che avevano un più basso contenuto in micotossine, avevano un peso maggiore dei semi.

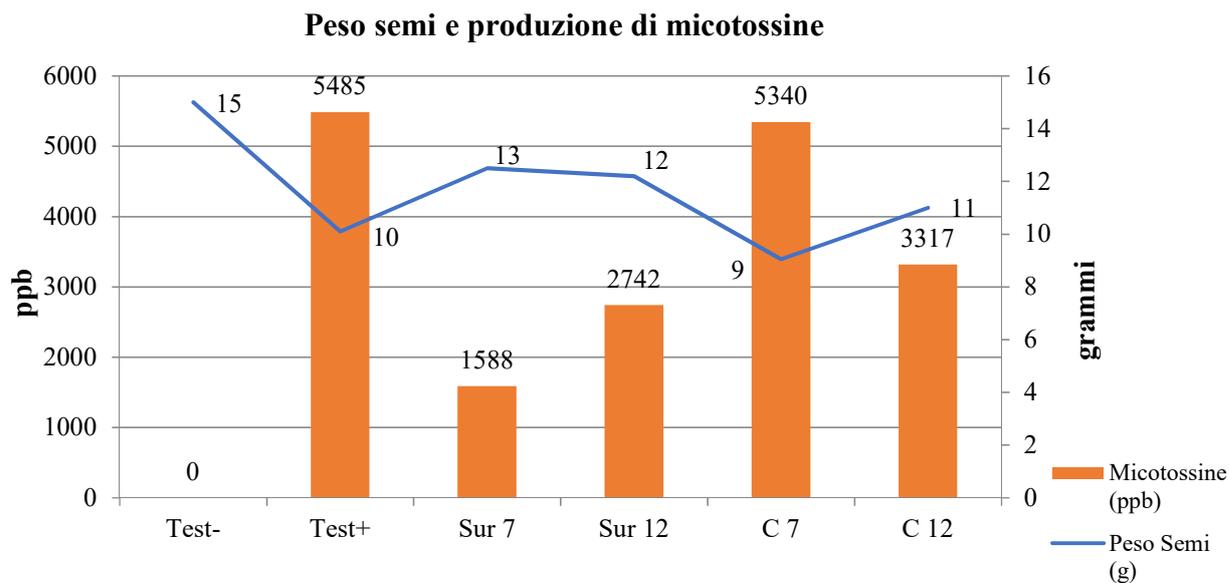


Figura 12. Peso semi e quantità di micotossine prodotta nella prova in serra.

Per quanto riguarda le prove in campo con gli stessi ceppi utilizzati nella prova in serra più il ceppo L26 (*L. brevis*), nessuno dei trattamenti si è rivelato significativo. Le figure di seguito riportano la gravità di attacco ottenuta in base all'indice di McKinney: la Figura 13 riporta i risultati dei trattamenti CV e i rispettivi controlli T+ e T-, mentre la Figura 14 riporta i risultati dei trattamenti SN e SF e rispettivi controlli T2- e T2+.

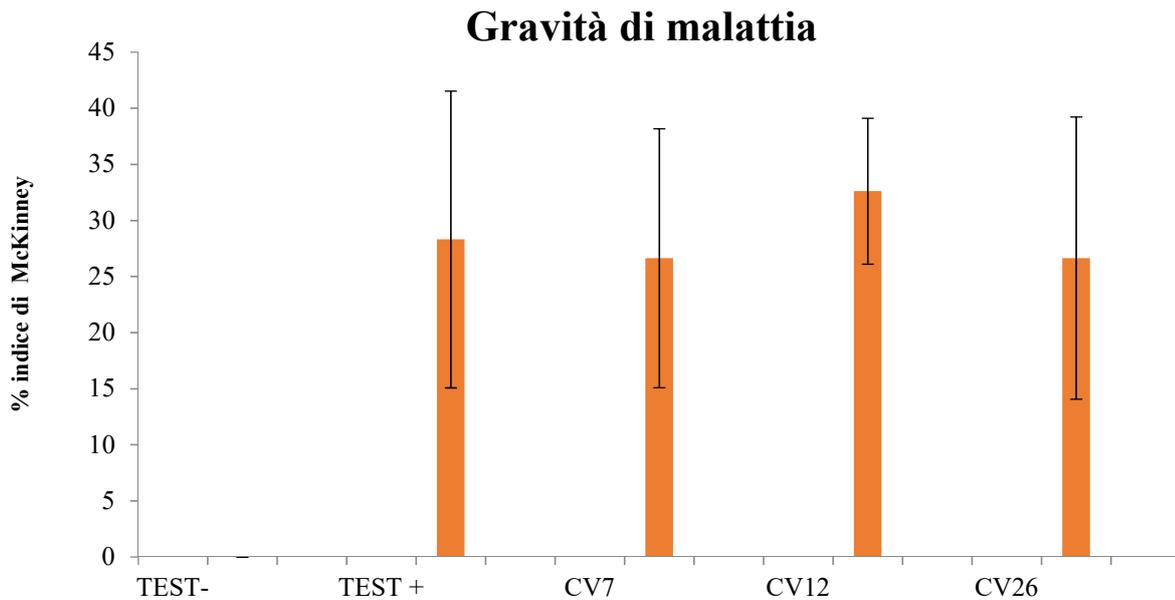


Figura 13. Controlli T- eT+ e trattamenti CV nella prova in campo.

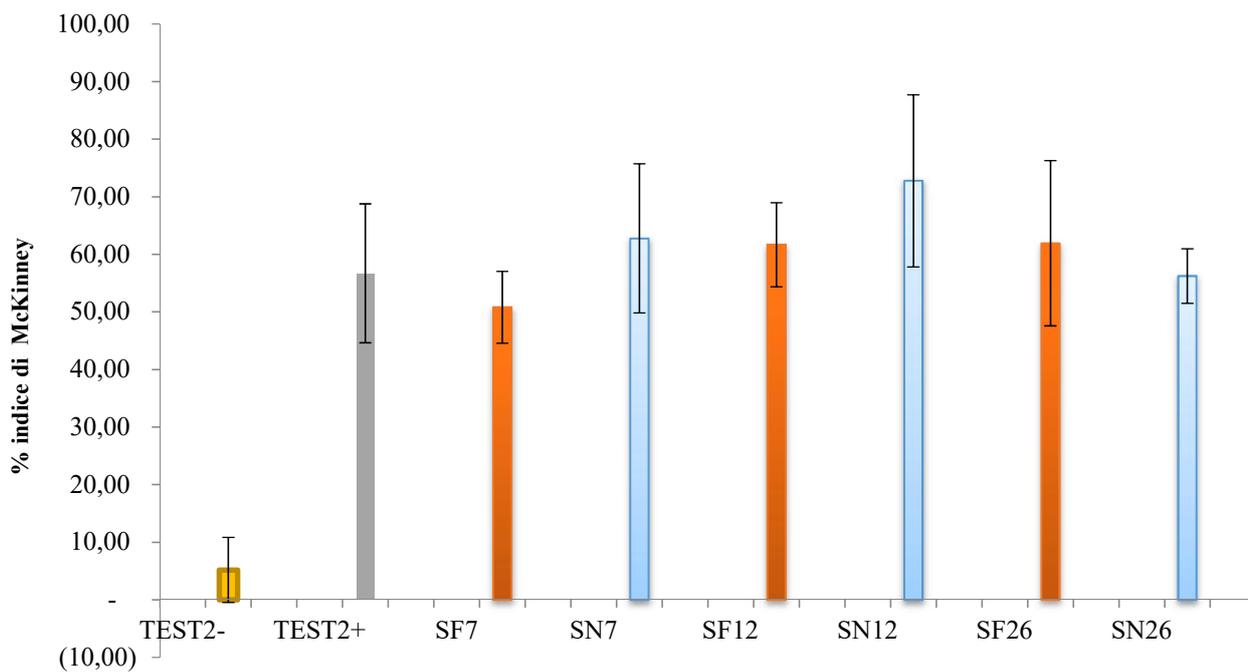


Figura 14. Controlli T2- eT2+ e trattamenti SF e SF nella prova in campo.

Alcuni trattamenti hanno mostrato un indice di gravità di malattia minore ai rispettivi controlli positivi come il trattamento SF7, con valori pari a 50.8%, rispetto al controllo T2+ (che ha registrato valori pari a 56.7%) con una differenza positiva pari a 5.9%. Tutti gli altri trattamenti SN e SF, hanno registrato valori pari al testimone T2+ o addirittura superiori. Per quanto riguarda i trattamenti con le cellule vive (CV), dove è stato utilizzato come controllo positivo il T+ (acqua + mix *Fusarium*), il CV7 e il CV26, hanno raggiunto entrambi un indice di McKinney di 26.6 %, molto simili al controllo positivo T+ che ha dato valori di gravità pari a 28.3%; CV12 ha addirittura mostrato un indice superiore al controllo positivo, con valori di 32.6%.

La gravità di attacco riscontrata nel controllo positivo T2+ (MRS+*Fusarium*), è stata molto più elevata rispetto al controllo positivo T+ (H₂O+*Fusarium*), con valori rispettivamente di 56.7% e 28.3%. Nel T2+ i conidi di *F. graminearum* sono stati sospesi in terreno MRS, ed evidentemente tale substrato conteneva delle sostanze utili per lo sviluppo del fungo. Anche nel controllo negativo T2- (trattato con solo terreno colturale MRS) è stato registrato un leggero sviluppo della malattia, con un indice pari a 5.2%, a differenza del T- (trattato con sola acqua) con indice pari allo 0%. Molto probabilmente, alcuni conidi di *F. graminearum* provenienti dalle spighe infettate, in seguito a leggere correnti d'aria si sono spostati anche nelle spighe dei controlli negativi, e nel T2-, trovato i nutrienti necessari per un leggero sviluppo. Non avendo ottenuto risultati soddisfacenti nella prova in campo, si è ritenuto opportuno non proseguire con le altre analisi.

4.7 Produzione di ammine biogene

L'analisi molecolare per la ricerca dei geni *tdc* (tirosina decarbossilasi) *hdc* (istidina decarbossilasi), *ldc* (lisina decarbossilasi), e *odc* (ornitina decarbossilasi), è stata condotta sui 40 batteri lattici e sui 70 stafilococchi CN.

Dai risultati ottenuti, riportati nella Tabella 8, è stata riscontrata la presenza del gene *tdc*, responsabile della produzione di tiramina, nei nove ceppi appartenenti alla specie *Lactobacillus brevis*. In nessuno dei ceppi appartenenti alla specie *Lactobacillus plantarum*, è stata riscontrata la presenza di nessuno dei geni presi in considerazione.

Per quanto riguarda gli stafilococchi CN, come riportato nella Tabella 9, esclusivamente nel ceppo S5, appartenente alla specie *S. pasteurii*, è stata riscontrata la presenza del gene *tdc* (tirosina

decarbossilasi). In tutti gli altri stafilococchi CN, non è stato riscontrato alcun gene responsabile della decarbossilazione degli amminoacidi.

Tabella 8. Presenza dei geni *hdc*, *ldc*, *odc* e *tdc* nei batteri lattici.

Specie	Ceppo	Geni				Specie	Ceppo	Geni				
		<i>hdc</i>	<i>ldc</i>	<i>odc</i>	<i>tdc</i>			<i>hdc</i>	<i>ldc</i>	<i>odc</i>	<i>tdc</i>	
<i>L. plantarum</i>	L1	-	-	-	-	<i>L. plantarum</i>	L28	-	-	-	-	
	L2	-	-	-	-		L31	-	-	-	-	
	L3	-	-	-	-		L32	-	-	-	-	
	L4	-	-	-	-		L33	-	-	-	-	
	L6	-	-	-	-		L34	-	-	-	-	
	L7	-	-	-	-		L35	-	-	-	-	
	L8	-	-	-	-		L36	-	-	-	-	
	L9	-	-	-	-		L37	-	-	-	-	
	L11	-	-	-	-		L38	-	-	-	-	
	L12	-	-	-	-		L39	-	-	-	-	
	L13	-	-	-	-		L40	-	-	-	-	
	L16	-	-	-	-		<i>L. brevis</i>	L5	-	-	-	+
	L17	-	-	-	-			L10	-	-	-	+
	L18	-	-	-	-			L14	-	-	-	+
	L21	-	-	-	-			L15	-	-	-	+
	L22	-	-	-	-			L19	-	-	-	+
	L23	-	-	-	-			L20	-	-	-	+
L24	-	-	-	-	L26	-		-	-	+		
L25	-	-	-	-	L29	-	-	-	+			
L27	-	-	-	-	L30	-	-	-	+			

hdc: istidina decarbossilasi; *ldc*: lisina decarbossilasi; *odc*: ornitina decarbossilasi; *tdc*: tirosina decarbossilasi.

Tabella 9. Presenza dei geni *hdc*, *ldc*, *odc* e *tdc* negli stafilococchi CN.

Specie	Ceppo	Geni				Specie	Ceppo	Geni				
		<i>hdc</i>	<i>ldc</i>	<i>odc</i>	<i>tdc</i>			<i>hdc</i>	<i>ldc</i>	<i>odc</i>	<i>tdc</i>	
<i>S. xylosus</i>	S6	-	-	-	-	<i>S. equorum</i>	S29	-	-	-	-	
	S10	-	-	-	-		S32	-	-	-	-	
	S11	-	-	-	-		S34	-	-	-	-	
	S23	-	-	-	-		S36	-	-	-	-	
	S24	-	-	-	-		S39	-	-	-	-	
	S26	-	-	-	-		S43	-	-	-	-	
	S30	-	-	-	-		S44	-	-	-	-	
	S31	-	-	-	-		S49	-	-	-	-	
	S33	-	-	-	-		S54	-	-	-	-	
	S35	-	-	-	-		S59	-	-	-	-	
	S37	-	-	-	-		S60	-	-	-	-	
	S38	-	-	-	-		S65	-	-	-	-	
	S40	-	-	-	-		S66	-	-	-	-	
	S41	-	-	-	-		<i>S. pasteurii</i>	S2	-	-	-	-
	S42	-	-	-	-			S3	-	-	-	-
	S48	-	-	-	-			S4	-	-	-	-
	S50	-	-	-	-			S5	-	-	-	+
	S52	-	-	-	-			S7	-	-	-	-
	S58	-	-	-	-			S28	-	-	-	-
	S61	-	-	-	-	<i>S. succinus</i>	S13	-	-	-	-	
S62	-	-	-	-	S17		-	-	-	-		
S63	-	-	-	-	<i>S. haemolyticus</i>	S51	-	-	-	-		
S64	-	-	-	-		S57	-	-	-	-		
S67	-	-	-	-	<i>Staphylococcus spp.</i>	S1	-	-	-	-		
S68	-	-	-	-		S9	-	-	-	-		
S69	-	-	-	-		S12	-	-	-	-		
S70	-	-	-	-		S14	-	-	-	-		
<i>S. equorum</i>	S8	-	-	-		-	S16	-	-	-	-	
	S15	-	-	-		-	S22	-	-	-	-	
	S18	-	-	-		-	S45	-	-	-	-	
	S19	-	-	-		-	S46	-	-	-	-	
	S20	-	-	-		-	S47	-	-	-	-	
	S21	-	-	-		-	S53	-	-	-	-	
	S25	-	-	-	-	S55	-	-	-	-		
S27	-	-	-	-	S56	-	-	-	-			

hdc: istidina decarbossilasi; *ldc*: lisina decarbossilasi; *odc*: ornitina decarbossilasi; *tdc*: tirosina decarbossilasi.

4.8 Resistenza/sensibilità agli antibiotici

La resistenza/sensibilità agli antibiotici è stata saggiata sui ceppi di *L. plantarum* e stafilococchi CN applicando il metodo Disc Diffusion Method e utilizzando dieci tra i più comuni antibiotici utilizzati nella terapia umana e animale: cloramfenicolo (30 µg), clindamicina (2 µg), penicillina G (10 U), amoxicillina (2 µg), eritromicina (15 µg), tetraciclina (30 µg), ampicillina (10 µg), kanamicina (30 µg), gentamicina (10 µg) e vancomicina (30 µg).

In accordo con quanto riportato dagli standard dettati dal CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute, 2012, 2014) e da Sharma et al. (2016), le colture batteriche con alone d'inibizione > di 20 mm sono stati considerati suscettibili (S), ≤ 14mm sono stati considerati resistenti (R); le colture con alone d'inibizione compreso tra 15 e 19 mm sono stati considerati intermedi.

I risultati, riportati nella Tabella 10, hanno evidenziato un basso numero di resistenze agli antibiotici.

Tutti i ceppi di *L. plantarum* testati (n=31) hanno mostrato resistenza alla vancomicina (100%) e alla kanamicina (100%); 6 ceppi (19%) sono resistenti alla clindamicina e due (6%) alla penicillina. I ceppi L11 e L12, sono stati quelli che hanno mostrato il maggior numero di resistenze (resistenti a vancomicina, kanamicina, clindamicina e penicillina), seguono i ceppi L16, L17, L22 e L36 (resistenti a vancomicina kanamicina clindamicina). La totalità dei ceppi è invece sensibile a tetraciclina, cloramfenicolo ed eritromicina. Nei confronti di amoxicillina, ampicillina, penicillina e gentamicina non sono state registrate resistenze, tuttavia diversi sono risultati *intermedi*.

Riguardo gli stafilococchi, il test degli antibiotici è stato eseguito solo sui ceppi rappresentanti le specie identificate (n=21) di cui 5 *S. pasteurii*, 5 *S. equorum*, 4 *S. xylosum*, 2 *S. haemolyticus* e 5 *Staphylococcus* spp. I risultati sono mostrati nella tabella 11. Tutti i ceppi sono risultati resistenti alla kanamicina, mentre un'elevata percentuale (85%) ha mostrato resistenza nei confronti dall'amoxicillina; di questi, solo 3 ceppi classificati come *Staphylococcus* spp erano sensibili. Sei ceppi (28.6%) risultavano resistenti alla tetraciclina, di cui 4 *S. pasteurii*, uno *S. haemolyticus* e uno *Staphylococcus* spp. Per quanto riguarda l'ampicillina, solo i 5 ceppi appartenenti alla specie *S. pasteurii*, sono risultati resistenti (24 % dei ceppi testati). Nei confronti della penicillina è stata riscontrata resistenza in tutti i ceppi di *S. pasteurii* e di *S. xylosum*, rappresentando il 42.8% sul totale dei ceppi. Per quanto riguarda la resistenza alla vancomicina, sempre in base agli standard dettati dal CLSI (2014), il Disk Diffusion Method non è in grado di distinguere i ceppi di stafilococchi

resistenti o sensibili. I risultati hanno comunque evidenziato un comportamento simile all'interno della specie di appartenenza, nel caso delle specie *S. pasteurii*, *S. xylosum* e *S. equorum*. I 5 ceppi di *S. pasteurii* testati, sono tutti risultati resistenti a kanamicina, tetraciclina, ampicillina, amoxicillina e penicillina; 5 *S. equorum* resistenti a kanamicina e amoxicillina; 4 *S. xylosum* resistenti a kanamicina, ampicillina e penicillina.

I ceppi *S. haemolyticus* S51 e S57, sono risultati resistenti a kanamicina e amoxicillina, *S. haemolyticus* S57 anche a tetraciclina ed eritromicina, presentando quindi multi-resistenze. Tra gli appartenenti al genere *Staphylococcus* spp., il ceppo S22 è risultato resistente ad amoxicillina, kanamicina e penicillina, mentre il ceppo S28 ad amoxicillina, kanamicina e tetraciclina; i ceppi S14, S45 ed S46, sono quelli che in assoluto hanno mostrato il numero minore di resistenze (esclusivamente alla kanamicina). La totalità dei ceppi invece è sensibile alla gentamicina, al cloramfenicolo, all'eritromicina e alla clindamicina

Tabella 10. Sensibilità agli antibiotici in *Lactobacillus plantarum*

Antibiotici	<i>Lactobacillus plantarum</i>																														% R	% I	% S		
	L1	L2	L3	L4	L6	L7	L8	L9	L11	L12	L13	L16	L17	L18	L21	L22	L23	L24	L25	L27	L28	L31	L32	L33	L34	L35	L36	L37	L38	L39				L40	
DA	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S	I	R	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	S	S	19	10	71	
K	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	100		
TE	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S			100	
C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S			100	
AMP	I	I	S	S	I	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	I	S	I	S	I	I	S	I	I	I	S		45	55	
VA	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	100		
E	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S			100	
AML	S	I	I	I	I	I	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	I	S	S	S	S	S		32	68	
P	I	I	I	I	S	S	S	S	R	R	S	I	I	I	I	S	S	S	I	I	I	I	I	S	S	I	S	S	I	S	S	6	49	45	
CN	I	S	S	S	S	S	I	I	I	I	S	S	S	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I		74	26	

S: sensibile; I: intermedio; R: resistente

Tabella 11. Sensibilità agli antibiotici negli stafilococchi coagulasi negativi

specie	ceppo	Antibiotici									
		DA	K	TE	C	AMP	VA	E	AML	P	CN
<i>S. pasteurii</i>	S2	S	R	R	S	R	ND	S	R	R	S
	S3	S	R	R	S	R	ND	S	R	R	S
	S4	S	R	R	S	R	ND	S	R	R	S
	S5	S	R	R	S	R	ND	S	R	R	S
	S7	S	R	I	S	R	ND	S	R	R	S
<i>S. equorum</i>	S8	S	R	S	S	S	ND	S	R	S	S
	S29	S	R	S	S	S	ND	S	R	S	S
	S59	S	R	S	S	S	ND	S	R	S	S
	S60	S	R	S	S	S	ND	S	R	S	S
	S65	S	R	S	S	S	ND	S	R	S	S
<i>Staphylococcus spp</i>	S14	S	R	S	S	S	ND	S	S	S	S
	S22	S	R	S	S	S	ND	S	R	S	S
	S28	S	R	R	S	S	ND	S	R	S	S
	S45	S	R	S	S	S	ND	S	S	S	S
	S46	S	R	S	S	S	ND	S	S	S	S
<i>S. xylosus</i>	S41	S	R	S	S	S	ND	S	R	R	S
	S48	S	R	S	S	S	ND	S	R	R	S
	S63	S	R	S	S	S	ND	S	R	R	S
	S69	S	R	S	S	S	ND	S	R	R	S
<i>S. haemolyticus</i>	S51	S	R	S	S	S	ND	S	R	S	S
	S57	S	R	R	S	S	ND	R	R	S	S
% R			100	29		24		5	85	43	
% I				5							
% S		100		66	100	76		95	15	57	100

R: resistente; I: intermedio; S: sensibile.

DISCUSSIONE

Durante la produzione dei salami si verificano diverse modifiche biochimiche e chimico-fisiche quali la fermentazione dei carboidrati, la lipolisi e la proteolisi.

Tali modifiche, che sono responsabili delle caratteristiche organolettiche dei prodotti finali, sono dovute principalmente ai batteri lattici e alle *Staphylococcaceae* che si sviluppano negli insaccati durante la fase di fermentazione e di maturazione. Inoltre, la presenza dei batteri lattici garantisce la sicurezza del prodotto attraverso la produzione di composti antimicrobici di natura diversa che inibiscono la crescita di microrganismi indesiderati.

Nel genere *Lactobacillus* la specie *L. plantarum* è stata ampiamente ritrovata in molti salami di diversa origine. Drosinos et al. (2005) e Kozačinski et al. (2008), riportano come la specie *L. plantarum* sia dominante nei salumi della Grecia così come nei salumi tipici della Spagna, come il Botillo, Androlla, Fuet, Salchichón e Chorizo (Benito et al., 2007; García-Fontán et al., 2007a, b; Aymerich et al., 2003). Rebecchi et al. (1998) e Cocolin et al. (2001b) riportano della presenza importante della specie *L. plantarum* in alcuni salami italiani, altri autori invece riportano della maggiore frequenza delle specie *L. sakei* e *L. curvatus* (Coppola et al., 1998; Coppola et al., 2000; Comi et al., 2005; Coppola et al., 1995) probabilmente per un loro maggior adattamento alle basse temperature di stagionatura che caratterizzano questi prodotti (Silvestri et al., 2007). In altri salami italiani invece, come il “Salame di Senise”, la specie *L. plantarum* non è stata isolata (Baruzzi et al., 2006). Nella salsiccia sarda prodotta con carne suina *L. plantarum*, *L. sakei* e *L. curvatus* sono le specie lattiche maggiormente isolate (Greco et al., 2005; Mangia et al., 2007) mentre i nostri risultati sulla salsiccia di pecora indicano la netta dominanza della specie *L. plantarum* seppur anche la specie *L. brevis* sia stata identificata. La presenza della specie *L. brevis* invece, trova riscontro anche nel lavoro di Kozačinski et al. (2008) che, su campioni di salami di diversi paesi d'Europa, riporta come sia stata riscontrata anche in Grecia, Serbia, Bosnia, Croazia, Italia e Serbia.

La specie *L. brevis*, essendo un microrganismo etero fermentante obbligato può produrre sacche d'aria all'interno del salame, e conferire caratteristiche non gradite nel prodotto finale come il sapore pungente dovuto all'eccesso di acido acetico prodotto (Amor et al., 2007). La bassa variabilità delle specie lattiche isolate dalla salsiccia di pecora può essere dovuta ad alcune specifiche tecnologie impiegate nella produzione artigianale quali l'affumicatura naturale, il taglio della carne a cubetti e l'impiego di basse temperature (10-13°C) durante la stagionatura.

Tra le *Staphylococcaceae*, la specie *Staphylococcus xylosus*, è risultata la specie predominante nella salsiccia sarda prodotta con carne di pecora, e rappresenta una specie ubiquitaria dei salami

fermentati italiani prodotti con carne suina (Torriani et al., 1994; Coppola et al., 2000; Cocolin et al., 2001a; Mauriello et al., 2004; Mangia et al., 2007). La specie *S. xylosus* riveste inoltre una particolare importanza anche nella preparazione industriale di insaccati fermentati, per via delle proprietà tecnologiche e di sicurezza alimentare. Il D.M. del 28 dicembre 1994 autorizza infatti l'impiego di questa specie come "coltura starter" nella produzione dei salami.

Staphylococcus equorum si è rivelata una specie importante nel substrato salsiccia di pecora, come anche in altri salami italiani (Mauriello et al., 2004; Iacumin et al., 2006; Blaiotta et al., 2004; Rantsiou et al., 2005, Villani et al., 2007; Baruzzi et al., 2007) e nei salami francesi e (Leroy et al., 2010; Corbière Morot-Bizot et al., 2006; Landeta et al., 2013; Fonseca et al., 2013)

La presenza della specie *S. pasteurii*, è stata ritrovata anche nella salsiccia di suino prodotta in Sardegna (Daga et al., 2007), così come nei salami prodotti nel nord est dell'Italia e nei salami della Basilicata (Polka et al., 2015; Rebecchi et al., 2015; Iacumin et al., 2006; Rantsiou et al., 2005b; Blaiotta et al., 2004); altrettanto importante risulta la presenza della specie *S. succinus* nei prodotti carnei fermentati italiani (Rantsiou et al., 2005; Villani et al., 2007; Baruzzi et al., 2006; Blaiotta et al., 2004; Greppi et al., 2015) e nei salami francesi e spagnoli (Coton et al., 2010a; García-Fontán et al., 2007a,b). La specie *S. haemolyticus*, invece, non è mai stata identificata nelle salsicce prodotte in Sardegna e poco in altri prodotti carnei fermentati. Tuttavia, Mauriello et al. (2004) su 78 ceppi isolati da "Soppressata di Ricigliano", hanno trovato un solo ceppo appartenente a questa specie. Rebecchi et al. (2015), invece, in un lavoro condotto su campioni d'intestino di maiale, vacca e pecora utilizzati per insaccare i salami, riportano che la specie *S. haemolyticus* è presente in tutti i campioni. Ciò può dare una spiegazione sulla presenza di questa specie nel presente lavoro, quindi che possa derivare dal budello utilizzato più che dalla materia prima stessa.

La capacità acidificante e la velocità di sviluppo dei batteri lattici sono requisiti tecnologici fondamentali per essere poi impiegati come colture starter. I risultati ottenuti in queste sperimentazioni, evidenziano un'ottima capacità acidificante di *L. plantarum* nel substrato carne anche in presenza di KNO_3 , ampiamente utilizzato come conservante nella filiera dei prodotti carnei. I risultati ottenuti sono simili a quelli riportati da altri autori (Essid et al., 2009; Boulares et al., 2012). La capacità di sviluppo nelle prime ore, è un requisito tecnologico fondamentale nella selezione di uno starter, utile a creare una competizione dei nutrienti e quindi evitare lo sviluppo di microrganismi alteranti e/o patogeni. In generale si può affermare che i lattobacilli impiegati nella sperimentazione hanno mostrato ottime capacità di acidificazione e di sviluppo e che la presenza di

KNO_3 , non ha influenzato lo sviluppo del *L. plantarum*, soprattutto nelle prime ore di incubazione. Pochi autori mettono come presupposto l'influenza di nitrati e nitriti sulle capacità tecnologiche dei batteri lattici. Bonomo et al. (2008) riportano come la presenza di KNO_2 , influenza negativamente la capacità acidificante della specie *L. plantarum*.

Il processo di proteolisi che si manifesta durante la fermentazione delle carni determina la formazione di composti a basso peso molecolare come peptidi, amminoacidi, aldeidi, acidi organici e ammine, essenziali nello sviluppo del sapore e degli aromi. In questo processo, gli enzimi dei tessuti muscolari rivestono un ruolo di primo piano (Lucke et al., 2002) rispetto agli enzimi di natura microbica. Le proteine miofibrillari in particolare, vengono degradate maggiormente dagli enzimi muscolari, principalmente dalle catepsine B, D e L (Matsakura et al., 1981; Zeece et al., 1989).

Per quanto i batteri lattici non siano riconosciuti come microrganismi proteolitici, alcuni autori ne riportano un loro possibile contributo soprattutto nelle ultime fasi della stagionatura (Casaburi et al., 2008). Inoltre, i batteri lattici attraverso la capacità di acidificare il substrato migliorano le attività degli enzimi dei tessuti, poiché alcuni di essi (es. catepsina D) presentano un optimum di attività nel range di pH compreso tra 3 e 5. Comunque, i nostri risultati evidenziano una scarsa attività proteolitica dei batteri lattici nei confronti delle proteine sarcoplasmatiche e miofibrillari estratte da suino e da pecora. Alcuni autori (Fadda et al.; 1992) invece, riportano una certa attività proteolitica del ceppo *L. plantarum* CRL681 nei confronti sia delle proteine sarcoplasmatiche che miofibrillari.

Per quanto riguarda gli stafilococchi, è emersa una notevole capacità proteolitica nei confronti delle proteine sarcoplasmatiche di suino e di pecora, ma non di quelle miofibrillari. I risultati sono in accordo con quanto riportato da Casaburi et al. (2005). Mauriello et al. (2002; 2004) e Drosinos et al. (2007) riferiscono della capacità proteolitica su entrambe le tipologie di proteine testate, e maggiore nei confronti delle miofibrillari, mentre Calchaldora et al. (2013) e Bonomo et al. (2009) riportano di un'attività maggiore degli stafilococchi nei confronti delle sarcoplasmatiche rispetto alle miofibrillari. Per quanto riguarda i risultati dei profili elettroforetici, la scomparsa delle proteine aventi peso molecolare intorno a 50 kDa, evidenziata nei ceppi attivi nel substrato contenente le proteine sarcoplasmatiche di suino, anche altri autori riportano risultati simili (Mauriello et al., 2002; Calchaldora et al., 2013).

Complessivamente, tutti i ceppi di stafilococchi testati hanno mostrato buone capacità proteolitiche soprattutto nel substrato contenente le proteine sarcoplasmatiche di suino.

Questi risultati evidenziano come i substrati carne di suino e carne di pecora abbiano influenzato l'attività degli enzimi proteolitici dei batteri testati. È ipotizzabile che la differenza di alcune caratteristiche dei due substrati (presenza di grasso nel reticolo sarcoplasmatico, valori di pH) siano le ragioni dei nostri risultati.

Durante la maturazione dei salami, la formazione dell'aroma e del flavour è dovuto all'attività lipolitica dei microrganismi, principalmente stafilococchi CN (Casaburi et al., 2005). In questo lavoro tutti i ceppi appartenenti alla specie *S. pasteurii* sono risultati lipolitici. La capacità lipolitica di questa specie è riportata anche da altri autori (Kanmani et al., 2015; Cachaldora et al., 2013). Solo pochi ceppi di *S. xylosum* saggiati hanno mostrato attività lipolitica, al contrario rispetto a quanto riportato da altri autori (Zeng et al., 2017; Villani et al., 2007). Mangia et al. (2013), in alcuni ceppi di *S. xylosum* isolati da salsiccia di suino, riscontrano valori di acido oleico superiori anche a quelli riscontrati in questo lavoro dai ceppi di *S. pasteurii*. Per quanto riguarda la specie *S. haemolyticus*, in base alle nostre conoscenze, in letteratura non sono stati trovati dati da poter raffrontare. Tuttavia, altri autori (Mauriello et al., 2004) riportano valori decisamente superiori, mentre altri (Drosinos et al., 2007; Bonomo et al., 2009; Zuber et al., 2007) non hanno riscontrato ceppi positivi.

Dalle prove condotte in questo lavoro mediante il metodo della titolazione, i risultati hanno messo in risalto la capacità lipolitica dei *L. plantarum* isolati da salsiccia di pecora. L'attività lipolitica nei batteri lattici pare che apporti ottimi benefici. Molti batteri lattici probiotici infatti possono agire sui trigliceridi, rilasciando acidi grassi a media catena, i quali stanno diventando importanti nei trattamenti dei pazienti con problemi metabolici, problemi di colesterolo e nel trattamento della malnutrizione infantile (Medina et al., 2004). Drosinos et al. (2007), utilizzando lo stesso metodo, riportano dell'assenza di attività lipolitica dei batteri lattici nei confronti del grasso suino; come anche Benito et al. (2007) con l'utilizzo di test in piastra.

Negli ultimi anni i consumatori tendono ad acquistare prodotti aventi conservanti naturali, piuttosto che quelli trattati con additivi chimici. Un'importante caratteristica tecnologica dei batteri lattici, è data dalla capacità di inibire lo sviluppo di microrganismi alteranti e/o patogeni che si possono sviluppare nei prodotti fermentati. Questa capacità è spesso dovuta alla produzione di acidi organici derivanti dal loro metabolismo, alla produzione di perossido d'idrogeno e alla produzione di sostanze di natura proteica come le batteriocine. I ceppi testati in questo lavoro, tutti appartenenti alla specie *L. plantarum*, hanno mostrato capacità d'inibizione nei confronti di patogeni Gram+ e Gram-. Altri lavori riportano la capacità dei ceppi di *L. plantarum* di inibire lo sviluppo di *E. coli* e

S. enterica (Klinberg et al., 2005), di *L. monocytogenes* e *S. aureus* (Nieto-Lozano et al., 2002; Papamanoli et al., 2003).

L'attività antagonista mostrata dalle colture batteriche testate in questo lavoro è probabilmente dovuta alla produzione di acidi organici. L'accumulo di acidi organici all'interno del citoplasma, provoca l'abbassamento del pH e di conseguenza l'arresto dello sviluppo cellulare dell'organismo target (Russell e Diez-Gonzalez, 1998). Altri autori riportano dell'attività antagonista nei confronti della *Listeria*, *S. aureus* e *E. coli*, dovuta alla produzione di acidi organici (Belicova et al., 2013).

Riguardo all'attività anti-*Listeria* della specie *S. xylosum*, anche altri autori riportano risultati in accordo con quelli di questo lavoro. Papamanoli et al. (2002) su 10 *S. xylosum* testati, riportano che la totalità dei ceppi ha attività anti-*Listeria*. Altri autori tuttavia riportano risultati discordanti. Braem et al. (2014) su 9 ceppi di *S. xylosum*, non trovano nessun ceppo con attività anti-*Listeria*. Nessuno dei ceppi ha mostrato attività antagonista nei confronti degli altri microrganismi patogeni impiegati nel test. Altri autori invece, riportano la capacità antimicrobica degli stafilococchi coagulasi negativi anche nei confronti di *S. aureus*, *Salmonella*, *E. coli* (Essid et al., 2007). Brito et al. (2011a) in accordo con il presente lavoro, riportano che 3 ceppi di stafilococchi CN su 17 testati, sono risultati attivi nei confronti della *Listeria*; mentre non in linea con i nostri risultati, sono risultati attivi anche nei confronti di *Staphylococcus aureus*.

I ceppi appartenenti alle specie *S. equorum* non hanno mostrato nessuna attività antagonista nei confronti dei microrganismi testati. Carnio et al. (2000) riportano l'attività anti-*Listeria* del ceppo *S. equorum* WS2733 isolato dal Raclette, tipico formaggio della Francia, dovuta alla produzione di batteriocine (microcina P1).

Negli ultimi anni è stata messa in discussione la sicurezza dei conservanti chimici (acido benzoico, acido propionico e acido sorbico) utilizzati nella lotta alle contaminazioni fungine negli alimenti. Vista la tendenza da parte dei consumatori all'acquisto di prodotti non trattati con sostanze chimiche, la ricerca di possibili alternative naturali è sempre più importante e di attualità. Nguyen et al. (2017), riportano dell'utilizzo di specie appartenenti ai generi *Streptomyces* e *Trichoderma*, nel bio-controllo dei più importanti patogeni delle colture, tra cui il genere *Fusarium*. Altri autori riportano dell'impiego nel settore del bio-controllo, di alcune specie appartenenti al genere *Bacillus*, utilizzate nel trattamento delle patologie vegetali in campo (Pérez-García et al., 2011). Nelle ultime decadi, anche i batteri lattici, in particolare il genere *Lactobacillus*, sono oggetto di studi volti a capire la loro capacità d'inibizione nei confronti di funghi responsabili delle principali patologie del

frumento, in particolare proprio degli agenti causali della fusariosi della spiga (Hassan, Zhou e Bullerman, 2015). I meccanismi con cui i batteri lattici inibiscono l'attività fungina sono vari, dalla competizione per i nutrienti, alla produzione di acidi e metaboliti secondari, all'abbassamento del pH o anche dalla combinazione di tutti e tre i meccanismi insieme (Magnusson et al., 2003).

Confrontando le prove in vivo (serra e campo), nonostante ci siano differenze soprattutto per quanto riguarda l'inoculo del fungo (in serra "point inoculation" e in campo "aspersione") il trattamento SUR7 è stato soddisfacente in serra, nonostante non ci fosse un controllo positivo con terreno MRS, che avrebbe dovuto mostrare un indice di gravità della malattia più alto del T+. Tuttavia, anche in campo il trattamento SF7 (in alias SUR7) è stato quello che ha mostrato il più basso indice di McKinney rispetto a tutti gli altri, però senza significatività statistica. L'efficacia del SUR7 in serra, molto probabilmente era dovuta alla produzione di acidi organici derivanti dal metabolismo batterico, considerando che lo stesso surnatante nel trattamento neutralizzato, non era efficace. Ciò dovrebbe escludere anche l'eventuale produzione di sostanze di natura proteica come le batteriocine. A oggi non ci sono dati utili per un effettivo confronto dei risultati ottenuti nella prova in serra, e ancora meno in campo. Solo Baffoni et al. 2015, in una prova condotta *in vitro* e in campo (in quest'ultima utilizzando una sospensione di cellule batteriche) riportano dell'efficacia del ceppo *L. plantarum* SLG17 nel contrastare lo sviluppo di *F. graminearum* e *F. culmorum*.

Tuttavia, in accordo con i nostri risultati, altri autori invece riportano dell'efficacia *in vitro* dei batteri lattici nei confronti di *F. graminearum* (Hassan e Bullerman, 2008). Franco et al. (2011), riportano dell'efficacia nel contenimento della crescita e della produzione di DON da parte dei batteri lattici, in particolare la specie *L. plantarum*. Gerez et al. (2009) invece riportano dell'attività antifungina anche di alcuni ceppi appartenenti alla specie *L. brevis*.

I test condotti *in vivo* nel presente lavoro rappresentano un primo passo, sarebbe opportuno isolare i prodotti rilasciati nel surnatante dal ceppo L7, in modo da eliminare i nutrienti presenti nel terreno colturale e condurre una prova in campo utilizzando esclusivamente i metaboliti. Tuttavia, le prove condotte *in vitro* e in serra in ambiente controllato spesso possono dare dei risultati diversi da quelli del campo in quanto, in pieno campo vi è la presenza di molti altri fattori che possono interagire (luce, umidità, temperatura, presenza di altri microrganismi, presenza di inquinanti ambientali, aerosol marini, etc.) vanificando in parte gli studi effettuati in laboratorio.

La produzione di ammine biogene nei prodotti carnei fermentati è il risultato di un complesso equilibrio tra fattori abiotici dell'ambiente e l'attività enzimatica della popolazione microbica. I

prodotti carnei fermentati rappresentano substrati ricchi di proteine, dove la produzione di ammine biogene da parte dei microrganismi può rappresentare un rischio considerevole per la salute dell'uomo. L'accumulo di ammine biogene nella salsiccia, è dovuto soprattutto a specie contaminanti come *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* principalmente nelle prime fasi di fermentazione, quando la conservazione della carne si protrae per un tempo eccessivo o raggiunge temperature elevate, oppure in seguito a una scarsa igiene durante il processo di preparazione (Vidal-Carou et al., 2007).

Tuttavia, oltre alle specie contaminanti, anche batteri lattici e stafilococchi CN, possono produrre ammine biogene nella salsiccia.

I risultati di questo lavoro hanno evidenziato una scarsa attività amino-decarbossilasica da parte dei batteri lattici e degli Stafilococchi CN. Solo i ceppi appartenenti alla specie *L. brevis* e esclusivamente un ceppo di *S. pasteurii*, sono risultati possessori del gene *tdc* (tirosina-decarbossilasi) responsabile della produzione di tiramina, l'ammina biogena più frequente nei cibi fermentati (Kim e Kim, 2014). La produzione di tiramina in *L. brevis* è ampiamente documentata in letteratura (Elsanhoty et al., 2016; Ladero et al., 2015; Kim et al., 2014; Lorencová et al., 2012). Questi risultati fanno ipotizzare che la decarbossilazione della tiramina, sia una caratteristica intrinseca della specie, nonostante altri autori riportano come la produzione di tiramina non sia specie-specifica, ma ceppo specifica (Kim & Kim, 2014). Anche Komprda et al. (2010), in accordo con questo lavoro, riportano che la totalità dei ceppi appartenenti alla specie *L. brevis* provenienti da salami, sono produttori di tiramina, andando a rafforzare l'ipotesi che possa essere una caratteristica della specie.

I ceppi appartenenti alla specie *L. plantarum* e i restanti ceppi di stafilococchi CN non hanno mostrato la presenza dei geni presi in considerazione, in accordo con altri autori (Landeta et al., 2013 a e b; Yüceer e Özden Tuncer, 2015; Marty et al., 2012; Coton et al., 2010b; Martín et al., 2006; Talon e Leroy, 2011; Simonová et al., 2006). Komprda et al. (2010), in disaccordo, riportano la presenza di ceppi di *Lactobacillus* spp. produttori di ammine biogene tra cui anche la specie *L. plantarum* (istidina e tirosina decarbossilasi). In riferimento agli stafilococchi CN invece, altri autori riportano la presenza rilevante di geni responsabili della decarbossilazione degli amminoacidi negli stafilococchi CN; alcuni ceppi di stafilococchi CN isolati da salami spagnoli sono risultati positivi ai geni istidina, tirosina e lisina decarbossilasi (Cachaldora et al., 2013).

Nel complesso, i risultati di questo lavoro evidenziano una scarsa capacità di produrre ammine biogene dei ceppi testati. Ciò nonostante, il rischio di un accumulo di ammine biogene nella salsiccia può derivare, come già detto, anche da altri gruppi microbici opportunisti contaminanti; è buona prassi quindi rispettare le norme igieniche durante la lavorazione, al fine di ridurre al massimo il rischio di un eccessivo accumulo nel prodotto finale.

La catena alimentare è considerata una delle vie più importanti per la trasmissione dei geni responsabili dell'antibiotico resistenza (Singer et al., 2003). Studiare le possibili resistenze dei microrganismi d'interesse alimentare, come i batteri lattici, è di fondamentale importanza. In considerazione del fatto che alcuni ceppi di *Lactobacillus* sono stati causa d'infezioni occasionali e presentano geni di antibiotico resistenza trasmissibili, si desume che la loro sicurezza è da prendere in considerazione. La stessa attribuzione dello status di QPS (Qualified Presumption of Safety), viene assegnata ai microrganismi in seguito a determinate caratteristiche di sicurezza, una delle quali prevede l'assenza di geni di antibiotico resistenza trasmissibili.

Una recente indagine condotta dal Center for Disease Dynamics, Economics and Policy (CDDEP) ha rivelato che il consumo di antibiotici nel mondo è salito dal 2000 al 2010 del 30% e contestualmente si è verificato anche un aumento consistente delle resistenze agli antibiotici (Reardon 2014; <http://www.nature.com/news/dramatic-rise-seen-in-antibiotic-use-1.18383#/related-links>; <http://www.nature.com/news/antibiotic-resistance-sweeping-developing-world-1.15171>, World Health Organization, <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>).

Secondo l'European Centre for Disease Prevention and Control invece, l'Italia rappresenta uno dei paesi con il maggior numero di batteri resistenti per la maggior parte degli antibiotici.

I risultati di questo lavoro mettono in risalto la scarsa presenza di antibiotico resistenza nei *L. plantarum* testati. La resistenza alla vancomicina nella totalità dei ceppi, trova conferma in letteratura (Lapsiriet al., 2011; Adimpong et al., 2012; Landeta et al., 2013b; Bousmaha-Marroki e Marroki., 2014), allo stesso modo anche la resistenza alla kanamicina (amminoglicoside) (Adimpong et al., 2012; Mejri e Hassouna, 2016; Jiang et al., 2016), considerate entrambe resistenze intrinseche dei lattobacilli. La resistenza alla vancomicina, è principalmente dovuta alla presenza nella membrana della D-alanina-D-lattato, piuttosto che il dipeptide D-ala/D-ala (Abriouel et al., 2015) che impedisce al peptidoglicano di reticolare. La vancomicina è un glicopeptide attivo nei confronti di batteri Gram +, considerato un antibiotico cruciale nel trattamento di batteri patogeni aventi resistenze multiple; tuttavia, in accordo con il presente lavoro, anche altri autori

riportano la resistenza dei batteri lattici nei confronti dei glicopeptidi in genere (Bernardeau et al., 2008). La kanamicina invece appartiene alla classe degli aminoglicosidi, antibiotici inibitori della sintesi proteica. L'eventuale presenza di resistenze a questa classe di antibiotici, può essere dovuta all'assenza del trasporto degli elettroni mediante il citocromo, che permetterebbe l'assorbimento degli antibiotici, oppure per cambiamenti nella permeabilità cellulare (Charteris et al., 2001).

Nessuno dei ceppi di *L. plantarum* ha invece mostrato resistenze agli antibiotici tetraciclina, cloramfenicolo ed eritromicina, in accordo con quanto riportato da altri autori (Aymerich et al., 2006; Hummel, Hertel, Holzapfel, e Franz, 2007; Adimpong et al., 2008; Landeta et al., 2013b; Ammor et al., 2007) in riferimento ai batteri lattici in genere. Sui ceppi di *L. plantarum* invece, che hanno evidenziato resistenze intermedie alla gentamicina, alla clindamicina e alla penicillina, sarebbe opportuno eseguire ulteriori analisi per confermarne il dato.

Anche gli stafilococchi CN nel presente lavoro hanno evidenziato una scarsa presenza di resistenze agli antibiotici. Solo alla kanamicina la totalità degli stafilococchi CN testati è risultata resistente, in accordo anche con Rebecchi et al. (2015), anche se tuttavia si trovano in letteratura pareri discordanti (Landeta et al., 2013). Per quanto riguarda l'elevata percentuale di ceppi resistenti all'amoxicillina, i risultati confermano quanto riportato da altri autori (Mauriello et al., 2000).

I risultati di questo lavoro invece evidenziano la presenza di resistenze multiple nella specie *S. pasteurii*, come confermano anche altri autori (Regecovà et al., 2014). La resistenza alla tetraciclina invece, sempre in *S. pasteurii*, è in accordo con altri autori (Simeoni et al., 2008), come anche quella alla kanamicina (Rebecchi et al., 2015). Al contrario, Rebecchi et al. (2015) riscontrano resistenze nei confronti dell'eritromicina. La resistenza all'ampicillina, amoxicillina e penicillina riscontrata nella specie *S. pasteurii* è in accordo con quanto riportato da Regecovà et al. (2014) e Faria et al. (2009).

La resistenza alla penicillina in *S. xylosus* isolati da salami, ma anche da altre matrici alimentari, è stata ampiamente riportata (Marty et al., 2012; Martin et al., 2006; Resch et al., 2008). Gli stessi autori riportano invece un'incidenza inferiore di resistenze all'amoxicillina, rispetto a quella riscontrata nel presente lavoro, mentre per quanto riguarda la resistenza alla kanamicina in *S. xylosus*, i risultati sono in disaccordo con quanto riportano Rebecchi et al. (2015) e Perreten et al. (1998). Comunque, considerando che l'assenza di antibiotico resistenza nei microrganismi tecnologici come i batteri lattici e gli stafilococchi CN, rappresenta un prerequisito importante nella

selezione di microrganismi per un loro possibile impiego come “colture starter”, sarebbe opportuno eseguire approfondimenti sulla trasferibilità delle resistenze.

CONCLUSIONI

Il lavoro svolto ha definito per la prima volta la composizione della popolazione batterica “tecnologica” della salsiccia sarda di pecora, apportando un importante contributo alla conoscenza delle caratteristiche metaboliche e tecnologiche di lattobacilli e stafilococchi CN.

Lactobacillus plantarum, insieme a *Staphylococcus xylosus* e *S. equorum*, sono le specie dominanti nella salsiccia sarda di pecora, seguono *L. brevis*, *S. succinus*, *S. pasteurii*.

Dall’analisi delle proprietà tecnologiche, sono state evidenziate importanti caratteristiche utili ai processi di fermentazione e di maturazione dei salami. La specie *L. plantarum*, ha dimostrato di avere ottime capacità acidificanti e di crescita, mostrando inoltre spiccate capacità lipolitiche. Gli stafilococchi CN hanno invece evidenziato una buona capacità proteolitica, e la specie *S. pasteurii* è quella che ha mostrato maggiori proprietà lipolitiche.

Entrambi i gruppi microbici hanno mostrato inoltre alcune caratteristiche funzionali importanti: la capacità antimicrobica, la scarsa presenza di resistenze agli antibiotici e la bassa incidenza di geni responsabili della produzione di ammine biogene.

Lo studio sulla salsiccia di pecora, ha evidenziato come questo prodotto rappresenta un’ottima fonte di lattobacilli e stafilococchi tecnologici e funzionali, che possono essere impiegati come colture starter nella produzione dei prodotti carnei fermentati di qualità.

Ringraziamenti

Alla fine di questi tre anni di dottorato, vorrei esprimere i miei più sinceri ringraziamenti alle persone che mi hanno sostenuto in questo percorso.

Un prezioso ringraziamento alla Dott.ssa Nicoletta Mangia, per la sua pazienza, la sua disponibilità, e per essere stata la mia guida durante l'intero percorso.

Ringrazio particolarmente la Dott.ssa Barbara Scherm, per il supporto fornitomi nelle prove in campo, insieme al Dott. Virgilio Balmas.

Ringrazio infine tutti i professori e i ricercatori, particolarmente prof. Pietrino Deiana e il Dott. Francesco Fancello, il personale, i tesisti e i dottorandi con i quali ho condiviso gli anni di questo bellissimo percorso.

Bibliografia

- Abriouel, H., Muñoz, M. D. C. C., Lerma, L. L., Montoro, B. P., Bockelmann, W., Pichner, R., Kabisch J., Cho, G., Franz, C.M.A.P., Gálveza, A., & Benomar, N. (2015). New insights in antibiotic resistance of *Lactobacillus* species from fermented foods. *Food Research International*. 78: 465-481.
- Adimpong, D. B., Nielsen, D. S., Sørensen, K. I., Derkx, P. M., Jespersen, L. (2012a). Genotypic characterization and safety assessment of lactic acid bacteria from indigenous African fermented food products. *BMC microbiology*. 12(1): 1.
- Adimpong, D. B., Nielsen, D. S., Sørensen, K. I., Derkx, P. M., Jespersen, L. (2012b). Genotypic characterization and safety assessment of lactic acid bacteria from indigenous African fermented food products. *BMC microbiology*. 12(1): 75.
- Ammor, M. S., Flórez, A. B., Mayo, B. (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*. 24(6): 559-570.
- Ammor, M. S., Florez, A.B., Van Hoek, A. H., De Los Reyes-Gavilan C. G., Aarts H. J., Margolles A. (2008). Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 14: 6–15.
- Ammor, M. S., Mayo, B. (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: an update. *Meat Science*. 76: 138–146.
- Andersson, D. I., Hughes, D. (2010). Antibiotic resistance and its cost: is possible to reverse resistance?. *Nature Reviews Microbiology*. 8: 260-271.
- Aspria, M., Bozoudia, D., Tsaltasa, D., Hillb, C., Papademasa, P. (2017). Raw donkey milk as a source of *Enterococcus* diversity: Assessment of their technological properties and safety characteristics. *Food Control*. 73: 81-90.
- Atanassova, V., Meindl, A., Ring, C., (2001). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham—a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 68: 105–113.
- Ateba, C. N., Mbeve, M., Moneoang, M. S., Bezuidenhout, C. C. (2010). Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from milk in the Mafikeng Area, North West province, South Africa. *South African Journal of Science*. 106(11-12): 1-6.
- Aymerich T., Martín B., Garriga M. and Hugas M. (2003). Microbial quality and direct PCR identification of Lactic Acid Bacteria and Non-pathogenic Staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4583.

- Aymerich, T., Martín, B., Garriga, M., Vidal-Carou, M. C., Bover-Cid, S., Hugas, M.(2006). Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*. 100(1): 40–49.
- Balmas, V., Santori, A., Corazza, L. (1998). Fusariosi della spiga di frumento duro. *L'Informatore Agrario*. 36: 53–55
- Baruzzi, F., Matarante, A., Caputo, L., Morea, M. (2006). Molecular and physiological characterization of natural microbial communities isolated from a traditional Southern Italian processed sausage. *Meat Science*. 72(2): 261-269.
- Bautista-Gallego, J., Alessandria, V., Fontana, M., Bisotti, S., Taricco, S., Dolci, P., Cocolin, L., Rantsiou, K. (2014). Diversity and functional characterization of *Lactobacillus* spp. isolated throughout the ripening of a hard cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 181: 60-66.
- Belicová, A., Mikulášová, M., Dušinský, R. (2013). Probiotic potential and safety properties of *Lactobacillus plantarum* from Slovak Bryndza cheese. *BioMed research international*.
- Becker, K., Heilmann, C., & Peters, G. (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clinical microbiology reviews*, 27(4), 870-926.
- Benito, M. J., Martín, A., Aranda, A., Pérez-Nevaldo, F., Ruiz-Moyano, S., Córdoba, M.G. (2007). Characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional Iberian dry-fermented salchichón and chorizo sausages. *Journal of Food Science*. 72(6): 193-201.
- Bernardeau, M., Guguen, M., Vernoux, J. P. (2006). Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiol. Review*. 30: 487–513.
- Bernardeau, M., Vernoux, J.P., Henri-Dubernet, S., Guegen, M.(2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International journal of food microbiology*. 126: 278–285.
- Blaiotta, G., Pennacchia, C., Villani, F., Ricciardi, A., Tofalo, R., Parente, E. (2004). Diversity and dynamics of communities of coagulase–negative staphylococci in traditional fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*. 97(2): 271-284.
- Bonomo, M. G., Ricciardi, A., Zotta, T., Parente, E., Salzano, G. (2008). Molecular and technological characterization of lactic acid bacteria from traditional fermented sausages of Basilicata region (Southern Italy). *Meat Science*. 80(4): 1238-1248.
- Bonomo, M. G., Ricciardi, A., Zotta, T., Sico, M. A., Salzano, G. (2009). Technological and safety characterization of coagulase-negative staphylococci from traditionally fermented sausages of Basilicata region (Southern Italy). *Meat science*. 83(1): 15-23.
- Bottazzi, V.(1993). Microbiologia e biotecnologia lattiero-casearia. *Edagricole*.

- Boulares, M., Aouadhi, C., Mankai, M., MOUSSA, O. B., Essid, I., Hassouna, M. (2012). Characterisation, identification and technological properties of psychotrophic lactic acid bacteria originating from Tunisian fresh fish. *Journal of Food Safety*. 32(3): 333-344.
- Bousmaha-Marroki, L., Marroki, A. (2014). Antibiotic susceptibility and heterogeneity in technological traits of lactobacilli isolated from Algerian goat's milk. *Journal of Food Science and Technology*. 52 (8): 4708–4723.
- Braem, G., Stijlemans, B., Van Haken, W., De Vlieghe, S., De Vuyst, L., Leroy, F. (2014). Antibacterial activities of coagulase-negative staphylococci from bovine teat apex skin and their inhibitory effect on mastitis-related pathogens. *Journal of Applied Microbiology*. 116: 1084-93.
- Brito, M. A. V. P., Somkuti, G. A., Renye, J. A. (2011). Production of antilisterial bacteriocins by staphylococci isolated from bovine milk. *Journal of dairy science*. 94(3): 1194-1200.
- Cachaldora, A., Fonseca, S., Da Franco, I., Carballo, J. (2013). Technological and safety characteristics of Staphylococcaceae isolated from Spanish traditional dry-cured sausages. *Food Microbiology*. 33: 61-68.
- Cannon J. P., Lee T. A., Bolanos J. T., Danziger L. H. (2005). Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: A retrospective review of over 200 cases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 24: 31–40.
- Cantoni, C., Molnar, M. R., Renon, P., Giolitti G. (1966) Investigation on the lipids of dry sausage. Proc 12th Eur. Meeting Meat Res. Workers, man N. 4.
- Caplice, E., Fitzgerald, G.F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50:131-149. DOI: Doi 10.1016/S0168-1605(99)00082-3.
- Carnio, M.C., Holtzel, A., Rudolf, M., Henle, T., Jung, G., Scherer, S. (2000) The macrocyclic peptide antibiotic micrococcinP(1) is secreted by the food-borne bacterium *Staphylococcus equorum* WS 2733 and inhibits *Listeria monocytogenes* on soft cheese. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:2378–2384.
- Casaburi, A., Blaiotta, G., Mauriello, G., Pepe, O., Villani, F. (2005). Technological activities of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* strains isolated from fermented sausages. *Meat Science*. 71(4): 643-650.
- Casaburi, A., Di Monaco, R., Cavella, S., Toldrà, F., Ercolini, D., Villani, F. (2008). Proteolytic and lipolytic starter cultures and their effect on traditional fermented sausages ripening and sensory traits. *Food Microbiology*. 25(2):335-347.
- Casado Muñoz M. C., Benomar N., Lavilla Lerma, L., Gálvez A., Abriouel H. (2014). Antibiotic resistance of *Lactobacillus pentosus* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolated from naturally-fermented Aloreña table olives throughout fermentation process. *International Journal of Food Microbiology*. 172: 110–118.

- Champeil, A., Dorè, T., Fourbet, J. F. (2004). *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Science*. 166: 1389–1415
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., Collins, J. K. (2001). Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli. *Journal of Food Protection*. 64: 2007–2014.
- Cocolin, L., Manzano, M., Aggio, D., Cantoni, C., Comi, G. (2001a). A novel polymerase chain reaction (PCR)—denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for the identification of *Micrococcaceae* strains involved in meat fermentations. Its application to naturally fermented Italian sausages. *Meat Science*, 58(1): 59-64.
- Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G. (2001b). Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(11): 5113-5121.
- Collins, M. D., Samelis, J., Metaxopoulos, J., Wallbanks, S. (1993). Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *Journal of Applied Microbiology*. 75: 595–603.
- Comi, G., Cantoni, C. 1983. Presenza di lieviti nei prosciutti crudi stagionati. *Industria Alimentari*. February 102.
- Comi, G., Urso, R., Iacumin, L., Rantsiou, K., Cattaneo, P., Cantoni, C., Cocolin, L. (2005). Characterisation of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. *Meat Science*. 69(3): 381-392.
- Coppola, R., Giagnacovo, B., Iorizzo, M., Grazia, L. (1998). Characterization of lactobacilli involved in the ripening of soppressata molisana, a typical southern Italy fermented sausage. *Food Microbiology*. 15(3): 347-353.
- Coppola, R., Marconi, E., Rossi, F., Dell'Aglio, F. (1995). Artisanal production of Naples-type salami: chemical and microbiological aspects. *Italian Journal of Food Science*. 7: 57-62.
- Coppola, S., Mauriello, G., Aponte, M., Moschetti, G., Villani, F. (2000). Microbial succession during ripening of Naples-type salami, a southern Italian fermented sausage. *Meat Science*. 56(4): 321-329.
- Corazza, L., Balmas, V., Santori, A., Vitale, S., Luongo, M., Maccaroni, M. (2002). Head blight and foot rot of wheat in Italy. *Petria*. 12: 25-36.
- Corbière Morot-Bizot, S., Leroy, S., Talon, R. (2006). Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 108(2): 210–217.
- Coton, E., Desmonts, M. H., Leroy, S., Coton, M., Jamet, E., Christeans, S., Talon, R. (2010a). Biodiversity of coagulase-negative staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples. *International journal of food microbiology*. 137(2): 221-229.

- Coton, E., Mulder, N., Coton, M., Pochet, S., Trip, H., Lolkema, J.S.(2010b). Origin of the putrescine-producing ability of the coagulase-negative bacterium *Staphylococcus epidermidis* 2015B. *Applied and Environmental Microbiology*. 76: 5570–5576.
- Courvalin, P. (1994). Transfer of antibiotic resistance between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 38: 1447-1451.
- Cundliffe, E., J. Thompson. (1981). Concerning the mode of action of micrococcin upon bacterial protein synthesis. *Eur. J. Biochem*. 118: 47–52.
- Daga, E., Mannu, L., Porcu, S., Comunian, R., Paba, A., Scintu, M. F. (2007) Home-made dri sausage produced in Sardinia: an investigation on the microflora. *Italian Journal of Food Science*. 19: 297-308
- Dalié, D. K. D., Deschamps, A. M., Richard-Forget, F. (2010). Lactic acid bacteria–Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food control*. 21(4): 370-380.
- Danielsen, M., Wind, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*. 82: 1-11.
- Dayan, G. H., Mohamed, N., Scully, I. L., Cooper, D., Begier, E., Eiden, J., ... & Anderson, A. S. (2016). *Staphylococcus aureus*: the current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention. *Expert review of vaccines*, 15(11), 1373-1392.
- De las Rivas, B., Rodriguez, H., Carrascosa, A.V., Muñoz, R. (2008). Molecular cloning and functional characterization of a histidine decarboxylase from *Staphylococcus capitis*. *Journal of Applied Microbiology*. 104: 194–203.
- Dean, R., Van Kan, J.A., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J.(2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol*. 13: 414e430.
- Devirgiliis C., Coppola D., Barile S., Colonna B., Perozzi G. (2009). Characterization of the Tn916 conjugative transposon in a food-borne strain of *Lactobacillus paracasei*. *Applied and Environmental Microbiology*. 75 : 3866–3871.
- Devirgiliis, C., Zinno, P., Perozzi, G.(2013). Update on antibiotic resistance in foodborne *Lactobacillus* and *Lactococcus* species. *Frontiers in Microbiology*. 4: 301.
- Drosinos, E. H., Mataragas, M., Xiraphi, N., Moschonas, G., Gaitis, F., Metaxopoulos, J. (2005). Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Science*. 69(2): 307-317.
- Drosinos, E. H., Paramithiotis, S., Kolovos, G., Tsikouras, I. (2007). Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and *staphylococci* isolated from traditionally fermented sausages in Southern

- Drosinos, E. H., Paramithiotis, S., Kolovos, G., Tsikouras, I. (2007). Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. *Food Microbiology*. 24: 260–270.
- Dweba, C. C., Figlan, S., Shimelis, H. A., Motaung, T. E., Sydenham, S., Mwadzingeni, L., Tsilo, T. J. (2017). Fusarium head blight of wheat: Pathogenesis and control strategies. *Crop Protection*. 91: 114-122.
- European Food Safety Authority, 2004. EFSA Scientific Colloquium Summary Report. QPS: qualified presumption of safety of microorganisms in food and feed. European Food Safety Authority, Brussels, Belgium.
- El Soda, M., M Korayem, N. Ezzat. (1986). The esterolytic and lipolytic activities of lactobacilli. III: Detection and characterisation of the lipase system. *Milchwissenschaft*. 41: 353 – 355.
- Elsanhoty, R. M., Ramadan, M. F. (2016). Genetic screening of biogenic amines production capacity from some lactic acid bacteria strains. *Food Control*. 68: 220-228.
- Essid, I., Ben Ismail, H., BelHadj Ahmed, S., Ghedamsi, R., Hassouna, M. (2007). Characterization and technological properties of *Staphylococcus xylosus* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. *Meat Science*. 77: 204–212.
- Essid, I., Medini M., Hassouna, M. (2009). Technological and safety properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. *Meat Science*. 81: 203–208.
- Even, S., Leroy, S., Charlier, C., Zakour, N. B., Chacornac, J. P., Lebert, I., ...Donnio, P. Y. (2010). Low occurrence of safety hazards in coagulase negative staphylococci isolated from fermented foodstuffs. *International journal of food microbiology*. 139(1): 87-95.
- Fadda, S., Sanz, Y., Vignolo, G., M. - C. Aristoy, Oliver, G., Toldra, F. (1999a). Characterization of muscle sarcoplasmic and myofibrillar protein hydrolysis caused by *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65 : 3540 – 3546.
- Fadda, S., Sanz, Y., Vignolo, G., Aristoy, M. - C., Oliver, G., Toldra, F. (1999b). Hydrolysis of pork muscle sarcoplasmic proteins by *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sake*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 578 - 584.
- Fajardo, A., Martinez J. L. (2008), Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Curr. Opin. Microbiol*. 11: 161–167.
- Faria, C., Vaz-Moreira, I., Serapicos, E., Nunes, O. C., & Manaia, C. M. (2009). Antibiotic resistance in coagulase negative staphylococci isolated from wastewater and drinking water. *Science of the Total Environment*. 407(12):3876-3882.

- Fijałkowski, K., Peitler, D., Karakulska, J.(2016). Staphylococci isolated from ready-to-eat meat – Identification, antibiotic resistance and toxin gene profile. *International Journal of Food Microbiology*. 238: 113-120.
- Flores M., Durá, M. A., Marco A. Toldrá F. (2004). Effect of *Debaryomyces* spp. on aroma formation and sensory quality of dry-fermented sausages. *Meat Science*. 68: 439.
- Fonseca, S., Cachaldora, A., Gómez, M., Franco, I., Carballo, J. (2013a). Effect of different autochthonous starter cultures on the volatile compounds profile and sensory properties of Galician chorizo, a traditional Spanish dry fermented sausage. *Food Control*. 33: 6–14.
- Fonseca, S., Cachaldora, A., Gómez, M., Franco, I., Carballo, J.(2013b). Monitoring the bacterial population dynamics during the ripening of Galician chorizo, a traditional dry fermented Spanish sausage. *Food Microbiology*. 33 (1): 77–84.
- Fontana C., Cocconcelli P.S., Vignolo G. 2005 Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisan Argentinean sausages. *International Journal of Food Microbiology*.
- Franz, C. M. A. P., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., Gálvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 151: 125-140.
- Ganjian H., Nikokar I., Tieshayar A., Mostafaei A., Amirmozafari N., Kiani S. (2012). Effects of salt stress on the antimicrobial drug resistance and protein profile of *Staphylococcus aureus*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 5 : 328–331
- Garai, G., Duenas, M. T., Irastorza, A., Moreno-Arribas, M. V. (2007). Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider. *Letters in Applied Microbiology*. 45: 473-8.
- Garcia, M. C., Otero, A., Garcia, M. L., Garcia, M. R., Moreno, B., (1988). Species identification of Staphylococci and micrococci isolated from ewe's milk cheeses. *Journal of Dairy Research*. 55: 269-275.
- García-Fontán, M.C., Lorenzo, J.M., Martínez, S., Franco, I., Carballo, J.(2007b). Microbiological characteristics of Botillo, a Spanish traditional pork sausage. *LWT-Food Science and Technology*. 40: 1610-1622.
- García-Fontán, M.C., Lorenzo, J.M., Parada, A., Franco, I., Carballo, J.(2007). Microbiological characteristics of "androlla", a Spanish traditional pork sausage. *Food Microbiology*. 24: 52e58.
- García-Varona, M., Santos, E. M., Jaime, I., Rovira, J. (2000). Characterisation of Micrococcaceae isolated from different varieties of chorizo. *International Journal of Food Microbiology*. 54(3): 189-195.
- Gardini, F., Ozogul, Y., Suzzi, G., Tabanelli, G., Ozogul, F. (2016). Technological factors affecting biogenic amine content in foods: a review. *Frontiers in Microbiology*. 7:1218. doi:10.3389/fmicb.2016.01218.
- Garg, S. K., and Mital, B. K. (1991). Enterococci in milk and milk products. *Crit.Rev. Microbiol*. 18: 15–45.

Garrity G.M., “Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2 (Parts A, B & C; Three-Volume Set)”, published by Williams & Wilkins, (2005).

Giraffa, G. (2012). Selection and design of lactic acid bacteria probiotic cultures. *Engineering In Life Sciences. 4*: 391-398.

Grazia, L., Romano, P., Bagni, A., Roggiani, D., Guglielmi, G.(1986). “The role of moulds in the ripening process of salami”. *Food Microbiology. 9*: 19-25.

Greco, M., et al (2005) Evolution and identification of lactic acid bacteria isolated during the ripening of Sardinian sausages. *Meat Science. 69(4)*:733–739

Greppi, A., Ferrocino, I., La Storia, A., Rantsiou, K., Ercolini, D., Cocolin, L. (2015). Monitoring of the microbiota of fermented sausages by culture independent rRNA-based approaches. *International Journal of Food Microbiology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.16>.

Götz, F., Bannermann, T., Schleifer, K. H. (1981). The genera *Staphylococcus* and *Macrococcus*, 5-75, In *The Prokaryotes*. Ed. Springer, (2006)

Hammes, W. P., Bosch, I., Wolf, G. (1995). Contribution of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus piscifermentans* to the fermentation of protein foods. *Journal of Applied Bacteriology- Symposium Supplement*. 79: 76S.

Harty D.W.S., Oakey H.J., Patrikakis M., Hume E.B., Knox K.W. (1994). Pathogenic potential of lactobacilli. *International Journal of Food Microbiology. 24*: 179–189.

Hernando-Amado, S., Blanco, P., Alcalde-Rico, M., Corona, F., Reales-Calderón, J. A., Sánchez, M. B., Martínez, J. L. (2016). Multidrug efflux pumps as main players in intrinsic and acquired resistance to antimicrobials. *Drug Resistance Updates. 28*: 13-27.

Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition. 73*:365s-373s.

Hotchkiss, J. H., Scanlan, R. A., Libbey, L. M. (1977). Formation of bis(hydroxyalkyl)-n-nitrosamines as products of nitrosation of spermidine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry. 25*: 1183-1189

Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M. T. (2003). Functionality of enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology. 88(2–3)*: 223–233.

Huisin't Veld, J. H. J., Hose, H., Schaafsma, G. J., Silla, H., Smith, J. E. (1990). Health aspects of food biotechnology. In Zeuthen, P., Cheftel, J. C., Ericksson, C., Gormley, T. R., Linke, P., Paulus K. (Eds.). *Processing and quality of foods. Food biotechnology: Avenues to healthy and nutritious products. 2*: 2.73–2.97).

Michele Cottu – Studio delle proprietà tecnologiche e funzionali di *Lactobacillus* spp. e stafilococchi coagulasi-negativi isolati da salsiccia di pecora – Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – Curriculum “Biotecnologie Microbiche Agroalimentari” – Ciclo XXIX
Università degli Studi di Sassari

Hummel, A. S., Hertel, C., Holzapfel, W. H., & Franz, C. M. A. P. (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(3): 730–739.

Iacumin, L., Comi, G., Cantoni, C., Cocolin, L. (2006a). Molecular and technological characterization of *Staphylococcus xylosum* isolated from Italian naturally fermented sausages by RAPD, Rep-PCR and Sau-PCR analysis. *Meat Science*. 74:281–288.

Iacumin, L., Comi, G., Cantoni, C., Cocolin, L. (2006b). Ecology and dynamics of coagulase-negative cocci isolated from naturally fermented Italian sausages. *Systematic and applied microbiology*. 29(6):480–486.

Irlinger, F. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative staphylococci. *International journal of food microbiology*, 126(3), 302–310.

Jessen, B. (1995) Starter cultures for meat fermentations G. Campbell-Platt, P.E. Cook (Eds.), Fermented meats, Chapman & Hall, London, UK. 130–159.

Jiang, M., Zhang, F., Wan, C., Xiong, Y., Shah, N. P., Wei, H., Tao, X. (2016). Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* WLPL04 isolated from human breast milk. *Journal of dairy science*. 99(3): 1736–1746.

Kandler, O. (1983) Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antoine van Leeuwenhoek*. 49: 209–224.

Kanmani, P., Kumaresan, K., Aravind, J. (2015). Utilization of coconut oil mill waste as a substrate for optimized lipase production, oil biodegradation and enzyme purification studies in *Staphylococcus pasteurii*. *Electronic Journal of Biotechnology*. 18: 20–28

Kastner, S., Perreten, V., Bleuler, H., Hugenschmidt, G., Lacroix, C., Meile, L. (2006). Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. *Systematic and Applied Microbiology*. 29(2): 145–155.

Kesmen, Z., Yetiman, A. E., Gulluce, A., Kacmaz, N., Sagdic, O., Cetin, B., ... Yetim, H. (2012). Combination of culture-dependent and culture-independent molecular methods for the determination of lactic microbiota in sucuk. *International journal of food microbiology*. 153(3): 428–435.

Kim, M. J., Kim, K. S. (2014). Tyramine production among lactic acid bacteria and other species isolated from kimchi. *LWT-Food Science and Technology*. 56(2): 406–413.

Klare I., Konstabel C., Werner G., Huys G., Vankerckhoven V., et al. (2007). Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J. Antimicrob. Chemother.* 59: 900–912.

Klevens, R. M., Morrison, M. A., Nadle, J., Petit, S., Gershman, K., Ray, S., Craig, A. S. (2007). Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *Jama*. 298(15): 1763–1771.

Michele Cottu – Studio delle proprietà tecnologiche e funzionali di *Lactobacillus* spp. e stafilococchi coagulasi-negativi isolati da salsiccia di pecora – Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – Curriculum “Biotecnologie Microbiche Agroalimentari” – Ciclo XXIX
Università degli Studi di Sassari

- Klingberg, T. D., Axelsson, L., Naterstad, K., Elsser, D., Budde, B. B. (2005). Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. *International journal of food microbiology*. 105(3):419-431.
- Kloos, W.E., Schleifer, K. H. (1986). Genus IV. *Staphylococcus*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore, 1013–1035.
- Komprda, T., Sládková, P., Petirová, E., Dohnal, V., Burdychová, R. (2010). Tyrosine- and histidine-decarboxylase positive lactic acid bacteria and enterococci in dry fermented sausages. *Meat science*. 86(3):870-877.
- Kozačinski, L., Drosinos, E., Čaklovica, F., Cocolin, L., Gasparik-Reichardt, J., Veskovi, S. (2008). Investigation of microbial association of traditionally fermented sausages. *Food Technology and Biotechnology*. 46(1): 93-106.
- La Placa, M. (1971). Stafilococchi; I farmaci antibatterici in Principi di microbiologia medica. Società editrice Esculapio s.r.l., Bologna, 2008 .208-216.
- Ladero, V., Martín, M. C., Redruello, B., Mayo, B., Flórez, A. B., Fernández, M., Alvarez, M. A. (2015). Genetic and functional analysis of biogenic amine production capacity among starter and non-starter lactic acid bacteria isolated from artisanal cheeses. *European Food Research and Technology*. 241(3): 377-383.
- Landeta, G., Curiel J.A., Carrascosa A.V., Muñoz, R., De Las Rivas, B. (2013b). Characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from Spanish dry cured meat products. *Meat Science*. 93(3): 387-396.
- Landeta, G., Curiel J.A., Carrascosa A.V., Muñoz, R., De Las Rivas, B. (2013a). Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry-cured sausages. *Meat Science*. 95(2): 272–280.
- Landeta, G., De las Rivas, B., Carrascosa, A. V., Muñoz, R. (2007). Screening of biogenic amine production by coagulase-negative *staphylococci* isolated during industrial Spanish dry-cured ham processes. *Meat Science*. 77(4): 556-561
- Lapsiri, W., Nitisinprasert, S., Wanchaitanawong, P. (2011). *Lactobacillus plantarum* strains from fermented vegetables as potential probiotics. *Kasetsart Journal. (Natural Sciences)*. 45: 1071-1082.
- Latorre-Moratalla, M. L., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M. T., Vidal-Carou, M. C. (2015). Control of biogenic amines in fermented sausages: role of starter cultures. *Biogenic Amines in Fermented Foods*. 3(169): 28.
- Leroy, S., Giammarinaro, P., Chacornac, J. P., Lebert, I., Talon, R. (2010). Biodiversity of indigenous staphylococci of naturally fermented dry sausages and manufacturing environments of small-scale processing units. *Food Microbiology*. 27(2): 294-301.
- Levy S. B., Bonnie Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* 10: 122 - S129. DOI:10.1038/nm1145.

- Lindgren, S. E., Dobrogosz, W. J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS microbiology reviews*. 7(1-2): 149-163.
- Liu C., Zhang Z., Dong K., Yuan J., GuopX.. (2009). Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. *Biomed. Environ. Sci.* 22: 401–412.
- Lorencová, E., Buňková, L., Matoulková, D., Dráb, V., Pleva, P., Kubáň, V., Buňka, F. (2012). Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. *International Journal of Food Science & Technology*.47(10): 2086-2091.
- Lucke, F. K. (1985) Fermented sausages. In *Microbiology of Fermented Foods*, 2, ed. Wood, B.J. pp. 41±83. Amsterdam: Elsevier.
- Makras, L., Triantafyllou, V., Fayol-Messaoudi, D., Adriany, T., Zoumpoulou, G., Tsakalidou, E., ... De Vuyst, L. (2006). Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella entericaserovarTyphimurium* reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Research in Microbiology*. 157(3): 241-247.
- Mangia, N. P., Murgia, M. A., Garau, G., Merella, R., Deiana, P.(2008). Sardinian fermented sheep sausage: microbial biodiversity resource for quality improvement. In: Olaizola, Ana Mara, Boutonnet, Jean Pierre, Bernus, Alberto. *Options méditerranéennes*. 78: 273-277.
- Mangia, N. P., Trani, A., Di Luccia, A., Faccia, M., Gambacorta, G., Fancello, F., Deiana, P. (2013). Effect of the use of autochthonous *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* and *Staphylococcus xilosus* strains on microbiological and biochemical properties of the Sardinian fermented sausage. *European Food Research and Technology*. 236: 557-566.
- Mangia, N.P. et al (2007) Microbiologia e valutazione igienicosanitaria della salsiccia sarda. *Industrie Alimentari*. 46(469): 533–536
- Marcobal, Á., Martín-Álvarez, P. J., Polo, M. C., Muñoz, R., Moreno-Arribas, M. V. (2006). Formation of biogenic amines throughout the industrial manufacture of red wine. *Journal of Food Protection*®. 69(2): 397-404.
- Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., & Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*. 60: 218-237.
- Martín, B., Garriga, M., Hugas, M., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M. T., Aymerich, T. (2006). Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages. *International journal of food microbiology*.107(2): 148-158.

- Marty, E., Bodenmann, C., Buchs J., Hadorn R., Eugster-Meier, E., Lacroix, L., Meile, L. (2012). Prevalence of antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci from spontaneously fermented meat products and safety assessment for new starters. *International Journal of Food Microbiology*. 159: 74–83.
- Mataragas, M., Bellio, A., Rovetto F., Asregiano, F., Greci, C., Hertel, C., Decastelli L., Coccolin, L., (2015). Quantification of persistence of the food-borne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* during manufacture of Italian fermented sausages. *Food Control*. 47: 552-559.
- Matsukura, U., Okitani, A., Nishimura, T., Katoh, H. (1981). Mode of degradation of myofibrillar proteins by an endogenous protease, cathepsin L. *Biochimica et Biophysica Acta*. 662: 41–47.
- Mauch, A., Dal Bello, F., Coffey, A., Arendt, E. K. (2010). The use of *Lactobacillus brevis* PS1 to in vitro inhibit the outgrowth of *Fusarium culmorum* and other common *Fusarium* species found on barley. *Int J Food. Microbiol* 141: 116–121.
- Mauriello, G., Casaburi, A., Blaiotta, G., Villani, F. (2004). Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. *Meat Science*. 67(1):149-158.
- Mauriello, G., Casaburi, A., Villani, F. (2002). Proteolytic activity of *Staphylococcus xylosus* strains on pork myofibrillar and sarcoplasmic proteins and use of selected strains in the production of Naples type salami. *Journal of Applied Microbiology*. 92: 482-490.
- Mazzette, R., De Santis, E. L.P., Coppa, G., Serra, P. G., Bean, V., Cosseddu, A. M. (1996). Valorizzazione delle carni ovine: utilizzazione per la produzione dei prodotti di salumeria. . Atti A.I.V.I. 4, 181.
- McMeekin, T. A., Chandler, R. E., Doe, P. E., Garland, C. D., Olley, J., Putro, S., Ratkowsky, D. A. (1987). Model for combined effect of temperature and salt concentration/water activity on the growth rate of *Staphylococcus xylosus*. *Journal of Applied Bacteriology*. 62(6): 543-550.
- Medina, R.B., Katz, M.B., González, S., Oliver, G. (2004). Determination of esterolytic and lipolytic activities of lactic acid bacteria. *Methods in Molecular Biology*. 268: 465-470.
- Mejri, L., Hassouna, M. (2016). Characterization and selection of *Lactobacillus plantarum* species isolated from dry fermented sausage reformulated with camel meat and hump fat. *Applied Biological Chemistry*. 59 (4): 533–542.
- Mendoza, L. M., Padilla, B., Belloch, C., & Vignolo, G. (2014). Diversity and enzymatic profile of yeasts isolated from traditional llama meat sausages from north-western Andean region of Argentina. *Food Research International*. 62: 572-579.
- Montel, M. C., Talon, R., Cantonnet, M., Cayrol, J. (1992a). Peptidasic activities of starter cultures, in Proc. 38th International Congress of Meat Science and Technology, Clermont-Ferrand, 811.

- Muhaladin, B. J., Hassan, Z. (2011). Screening of Lactic Acid Bacteria for Antifungal Activity against *Aspergillusoryzae*. *American Journal of Applied Sciences*. 5: 447-451.
- Netz, D. J. A., Pohl, R., Beck-Sickinger, A. G., Selmer, T., Pierik, A. J., Bastos, M. C. F. and Sahl, H.-G. (2002) Biochemical characterisation and genetic analysis of aureocin A53, a new, atypical bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. *J Mol Biol*. 319: 745–756.
- Nieto-Lozano, J. C., Reguera-Useros, J. I., Peláez-Martínez, M. C., De la Torre, A. H. (2002). Bacteriocinogenic activity from starter cultures used in Spanish meat industry. *Meat Science*. 62(2): 237-243.
- Ogier, J. C., Serror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*. 126(3): 291–301.
- Otaka, T., A. Kaji. 1974. Micrococcin: acceptor-site specific inhibitor of protein synthesis. *Eur. J. Biochem*. 50:101–106.
- Pancaldi, D., Tonti, S., Prodi, A., Salomoni, D., Dal Prà, M., Nipoti, P., Alberti, I. and Pisi, A. (2010) Survey of the main causal agents of fusarium head blight of durum wheat around Bologna, northern Italy. *Phytopathol. Mediterr*. 49, 258-266.
- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetakis, E., Kotzekidou, P. (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*. 65(2): 859-867.
- Papamanoli, E., Kotzekidou, P., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. (2002). Characterization of *Micrococccaceae* isolated from dry fermented sausage. *Food Microbiology*. 19(5): 441-449.
- Pederson; C.S. 1979. *Microbiology of food fermentation*. 2^o ed. Westport, The AVI Publishing Company Inc, p 212.
- Perin, L. M., Belvisio, S., Bello, B. D., Nero, L. A., Cocolin, L. (2016). Technological Properties and Biogenic Amines Production by Bacteriocinogenic Lactococci and Enterococci Strains Isolated from Raw Goat's Milk. *Journal of Food Protection*. 80(1): 151-157.
- Perreten, V., Giampà, N., Schuler-Schmid, U., Teuber, M. (1998). Antibiotic resistance genes in coagulase-negative staphylococci isolated from food. *Systematic and Applied Microbiology*. 21(1): 113-120.
- Polka, J., Rebecchi, A., Pisacane, V., Morelli, L. (2015). Bacterial diversity in typical Italian salami at different ripening stages as revealed by high-throughput sequencing of 16s rRNA amplicons. *Food Microbiology*. 46: 342-356.
- Poole, K. (2012). Efflux mediated antimicrobial resistance. T.J. Dougherty, M.J. Pucci (Eds.), *Antibiotic Discovery and Development*, Springer, New York, USA . 349–395.

- Pruneddu, G., Motzo, R., Giunta, F., Dettori, M., Mameli, L., Balmas, V. (2010). Supplemento cereali-grano duro Sardegna. *L'Informatore Agrario*. 33: 33–34
- Rantsiou, K., Cocolin, L. (2006). New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 255–267.
- Rantsiou, K., Drosinos, E. H., Gialitaki, M., Urso, R., Krommer, J., Gasparik-Reichard, J., Tòth, S., Metaxopoulos, I., Comi, G., Cocolin, L. (2005a). Molecular characterization of *Lactobacillus* species isolated from naturally fermented sausages produced in Greece, Hungary and Italy. *Food Microbiology*. 22(1): 19-28.
- Rantsiou, K., Urso, R., Iacumin, L., Cantoni, C., Cattaneo, P., Comi, G., Cocolin, L. (2005b). Culture-dependent and-independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(4): 1977-1986.
- Reardon, S. Antibiotic resistance sweeping developing world. *Nature*. (2014) May8;509(7499):141-2. doi: 10.1038/509141a.
- Rebecchi, A., Crivori, S., Sarra, P. G., Cocconcelli, P. S. (1998). Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation. *Journal of Applied Microbiology*. 84(6):1043-1049.
- Rebecchi, A., Pisacane, V., Callegari, M. L., Pugliesi, E., Morelli, L. (2015). Ecology of antibiotic resistant coagulase-negative staphylococci isolated from the production chain of a typical Italian salami. *Food Control*. 53: 14-22.
- Regecová, I., Pipová, M., Jevinová, P., Marušková, K., Kmeť, V., Popelka, P. (2014). Species Identification and Antimicrobial Resistance of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from the Meat of Sea Fish. *Journal of food science*. 79(5): M898-M902.
- Resch, M., Nagel, V., & Hertel, C. (2008). Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci associated with food and used in starter cultures. *International journal of food microbiology*. 127(1): 99-104.
- Rodríguez-Rojas, A., Rodríguez-Beltrán, J., Couce, A., Blázquez, J. (2013). Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. *International Journal of Medical Microbiology*. 303: 293-297.
- Roseiro, C., Santos, C., Sol, M., Silva, L., Fernandes, I. (2006). Prevalence of biogenic amines during ripening of a traditional dry fermented pork sausage and its relation to the amount of sodium chloride added. *Meat Science*. 74: 557-563.
- Rossetti, L., Giraffa, G., (2005). Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13 generated, RAPD-PCR fingerprint database. *Journal of Microbiological Methods*. 63: 135-144.
- Rossi, F., Tofalo, R., Torriani, S., Suzzi, G. (2001). Identification by 16S–23S rDNA intergenic region amplification, genotypic and phenotypic clustering of *Staphylococcus xylosum* strains from dry sausages. *Journal Applied Microbiology*. 90:365–71.

Ruaro, A., Andrighetto, C., Torriani, S., Lombardi, A. (2013). Biodiversity and characterization of indigenous coagulase-negative *staphylococci* isolated from raw milk and cheese of North Italy. *Food Microbiology*. 34: 106-111

Russell, J. B., Diez-Gonzalez, F. (1998). The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Advances in Microbial Physiology*. 39: 205-234.

Sahl, H. G., and G. Bierbaum. (1998). Lantibiotics: Biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 52: 41-79.

Samelis, J., Maurogenakis, F., Metaxopoulos, J. (1994). Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *International Journal of Food Microbiology*. 23(2): 179-196.

Schnell, N., Entian, K.D., Götz, F., Horner, T., Kellner, R. and Jung, G. (1989). Structural gene isolation and prepeptide sequence of gallidermin, a new lanthionine containing antibiotic. *FEMS Microbiol.* 58: 263-268.

Schroeder H.W. Christensen J. J. (1963). Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberellazeae*. *Phytopathology*. 53: 831-838

Silla Santos, M. H. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal Food Microbiology*. 29: 213-231

Silvestri, G., Santarelli, S., Aquilanti, L., Beccaceci, A., Osimani, A., Tonucci, F., Clementi, F. (2007). Investigation of the microbial ecology of Ciauscolo, a traditional Italian salami, by culture-dependent techniques and PCR-DGGE. *Meat Science*. 77(3): 413-423.

Simeoni, D., Rizzotti, L., Cocconcelli, P., Gazzola, S., Dellaglio, F., Torriani, S. (2008). Antibiotic resistance genes and identification of staphylococci collected from the production chain of swine meat commodities. *Food microbiology*. 25(1): 196-201.

Simonová, M., Stropfiová, V., Marciňáková, M., Lauková, A., Vesterlund, S., Moratalla, M. L., ...Vidal-Carou, C. (2006). Characterization of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products. *Meat science*. 73(4): 559-564.

Singer, R., Finch, H.C., Wegener, R., Bywater, J., Walters, M., Lipsitch (2003). Antibiotic resistance—the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *The Lancet Infectious Diseases*. 3: 47-51

Skinner, D., Keefer, C. S. (1941). Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*: a study of one hundred and twenty-two cases and a review of the literature concerned with experimental infection in animals. *Archives of Internal Medicine*. 68: 851-875.

Smith W.G. (1884). Diseases of field and garden crops. In: *Macmillan and Co*, pp. 208-213. London

Smith, D.R. (1987). Sausage- A food of myth, mystery and marvel. *CSIRO Food Research Quarterly*. 47: 1-8.

Michele Cottu – Studio delle proprietà tecnologiche e funzionali di *Lactobacillus* spp. e stafilococchi coagulasi-negativi isolati da salsiccia di pecora – Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – Curriculum “Biotecnologie Microbiche Agroalimentari” – Ciclo XXIX
Università degli Studi di Sassari

- Suzzi, G., Gardini, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International journal of food microbiology*. 88(1): 41-54.
- Švec, P., Pantůček, R., Petráš, P., Sedláček, I., Nováková, D. (2010). Identification of *Staphylococcus* spp. using (GTG) 5-PCR fingerprinting. *Systematic and applied microbiology*. 33(8): 451-456.
- Talon, R., Leroy-Sétrin, S., Fadda, S., 2002. Bacterial starters involved in the quality of fermented meat products. In: Toldra, F. (Ed.), *Research Advances in Quality of Meat and Meat Products*, pp. 175–191.
- Talon, R., Leroy, S. 2011. Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations. *Meat Science*. 89: 303-309.
- Tejero-Sariñena, S., Barlow, J., Costabile, A., Gibson, G. R., Rowland, I. (2012). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*. 18(5): 530-538.
- Tilden Jr, J., Young, W., McNamara, A. M., Custer, C., Boesel, B., Lambert-Fair, M. A., ... Morris Jr, J. G. (1996). A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *American journal of public health*. 86(8_Pt_1): 1142-1145.
- Torriani, S., Di Bucchianico, R., Pattarini, F., Zabeo, G., Dellaglio, F. (1994). Presenza e caratterizzazione biotecnologica di batteri lattici e *Micrococcaceae* negli insaccati abruzzesi. *Ind. Conserv.* 69: 3–9.
- Vidal-Carou, M. C., Latorre-Moratalla, M. L., Veciana-Nogués, M. T., Bover-Cid, S. (2007). Biogenic amines: risks and control. *Handbook of fermented meat and poultry*, 455-468.
- Villani, F., Casaburi, A., Pennacchia, C., Filosa, L., Russo, F., Ercolini, D. (2007). Microbial ecology of the *Soppressata* of Vallo di Diano, a traditional dry fermented sausage from Southern Italy, and *in vitro* and *in situ* selection of autochthonous starter cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(17): 5453-5463.
- Wegener, H. C. (2003). Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Current Opinion in Microbiology*. 6: 439-445.
- Wertheim, H.F., Melles, D.C., Vos, M.C., van, L.W., van, B.A., Verbrugh, H.A., Nouwen, J.L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* 5, 751 – 762.
- Yüceer, Ö., & Özden Tuncer, B. (2015). Determination of Antibiotic Resistance and Biogenic Amine Production of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Turkish Sausage (Sujuk). *Journal of Food Safety*. 35(2): 276-285.
- Zambonelli, C., Papa, F., Romano, P., Suzzi, G., Grazia, L., (1992). *Microbiologia dei Salumi-Edagricole-Edizioni Agricole*.

- Zeece, M. G., Katoh, K. (1989) . Cathepsin D and its effects on myofibrillar proteins: a review. *Journal of Food Biochemistry*. 13:157–161.
- Zeng, X., He, L., Guo, X., Deng, L., Yang, W., Zhu, Q., Duan, Z. (2017). Predominant processing adaptability of *Staphylococcus xylosus* strains isolated from Chinese traditional low-salt fermented whole fish. *International Journal of Food Microbiology*. 242: 141-151.
- Zeuthen, P. (2007). A Historical Perspective of Meat Fermentation. In: F. Toldrá (Ed.) *Handbook of Fermented Meat and Poultry*: 3-8.
- Zöllner P., Mayer-Helm B. (2006). Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1136: 123–169
- Zonenschain D., Rebecchi A., Morelli L. (2009). Erythromycin and tetracycline-resistant lactobacilli in Italian fermented dry sausages. *Journal of Applied Microbiology*. 107: 1559–1568.
- Zuber, A. D., Horvat, M. (2007). Influence of starter cultures on the free fatty acids during ripening in Tea sausages. *European Food Research and Technology*. 224: 511-517.
-