

IDENTIFICAZIONE DI LATTOBACILLI AUTOCTONI E STUDIO PRELIMINARE DELLA LORO ATTIVITA'ANTI-LISTERIA IN RITAGLI DI SALMONE AFFUMICATO

IDENTIFICATION OF AUTOCHTHONOUS LACTOBACILLI AND PRELIMINAR STUDY OF ANTI-LISTERIAL ACTIVITY IN COLD-SMOKED SALMON SCRAPS

Ripamonti B., Stella S., Bernardi C., Tirloni E., Bersani C., Cattaneo P.
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare – Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Milano – Via Celoria 10, 20133 Milano.

SUMMARY

The current work highlights the properties of Lactobacilli, isolated and identified from cold-smoked salmon scraps, as protective cultures against *Listeria monocytogenes* strains isolated and identified from the same product.

KEYWORDS

Lactobacilli, *Listeria monocytogenes*, anti-listerial activity, ribotyping

INTRODUZIONE

I ritagli di salmone affumicato confezionato sottovuoto presentano notevoli criticità dal punto di vista microbiologico: il prodotto subisce un'elevata manipolazione e la tecnologia di produzione non prevede fasi battericide. Inoltre in Italia la shelf-life assegnata è particolarmente lunga (fino a 60 giorni): in questo periodo di conservazione i batteri psicrotrofi alteranti e patogeni possono moltiplicarsi oltre i limiti accettabili. I batteri lattici, dopo i primi dieci giorni di conservazione rappresentano la flora microbica maggioritaria. Tra i microrganismi patogeni, *L. monocytogenes* risulta essere quello più adattato alle condizioni di confezionamento ed alle temperature di conservazione del prodotto (1). Una delle tecnologie più promettenti allo scopo di minimizzare il rischio di replicazione di *L. monocytogenes* in questa tipologia alimentare è rappresentata dall'utilizzo di colture bioprotettrici, ovvero colture batteriche antagoniste aggiunte per inibire i microrganismi patogeni o alteranti e/o prolungare così la vita commerciale dei prodotti mantenendo le proprietà organolettiche il più a

lungo possibile. In particolare, i batteri lattici, oltre a competere per i nutrienti, producono numerosi metaboliti ad attività anti-microbica quali acidi organici, perossido di idrogeno, diacetile e batteriocine. Allo scopo di selezionare i lattobacilli autoctoni con attività anti-*Listeria*, si è proceduto alla mappatura della flora microbica lattica presente nei ritagli di salmone affumicato oggetto di studio e all'isolamento ed identificazione dei ceppi di *L. monocytogenes* presenti.

MATERIALI E METODI

Sono stati sottoposti a sperimentazione 4 diversi lotti di ritagli di salmone affumicato da 500 g. confezionati sottovuoto. La ricerca di *L. monocytogenes* è stata effettuata a 16, 30, 44, 60 e 66 giorni dal confezionamento (AFNOR BRD 07/4-09/98), mentre i lattobacilli sono stati isolati a metà shelf-life (ISO 15214:1998).

I ceppi di *L. monocytogenes* sono stati isolati dalle piastre di terreno Rapid L'mono e seminati in Tryptic Soy Broth (TSB). Dopo incubazione a 37°C per 48 h, i ceppi sono stati seminati su Brain Heart Infusion agar (BHI) e sottoposti ad identificazione clonale mediante ribotipizzazione (Riboprinter Microbial

Characterization System) (2). I ceppi di lattobacilli sono stati isolati dalle piastre di DeMan, Rogosa, Sharpe (MRS) agar e seminati in MRS broth, incubato a 30°C per 48 h in condizioni di anaerobiosi. Al termine dell'incubazione, i ceppi sono stati seminati su piastre di MRS agar e sottoposti a classificazione ed identificazione mediante RAPD-PCR (3) e sequenziamento rRNA 16S.

L'attività antimicrobica dei lattobacilli isolati è stata testata secondo la metodica di seguito riportata. Si è inizialmente proceduto alla rivitalizzazione delle colonie di *L. monocytogenes* e lattobacilli mediante semina su brodo di arricchimento secondo il metodo precedentemente illustrato per la fase di isolamento. Il passaggio è stato eseguito due volte per ottenere brodocolture di microrganismi nella medesima fase di crescita. Si è poi proceduto alla titolazione dei brodi mediante metodica delle diluizioni seriali, seminando *L. monocytogenes* su Tryptic Soy Agar (TSA) e i lattobacilli su MRS agar. Le piastre sono state incubate rispettivamente a 37°C per 24 h e a 30°C per 48 h in anaerobiosi. I ceppi, una volta titolati, sono stati congelati a -25°C dopo aggiunta di glicerolo (15% v/v). Una concentrazione pari a 10⁶ UFC/mL di *L. monocytogenes* è stata seminata per striscio mediante tampone su TSB; successivamente sulla piastra sono stati disposti 3 dischetti del diametro di 6 mm precedentemente imbibiti con 10 µL di MRS broth contenente i lattobacilli da testare. Dischetti di Ampicillina (AMP10) sono stati utilizzati come controllo positivo. Le piastre così preparate sono state incubate in microaerofilia a 30°C per 24 e 48 h. Alla fine del periodo di incubazione è stato misurato l'alone

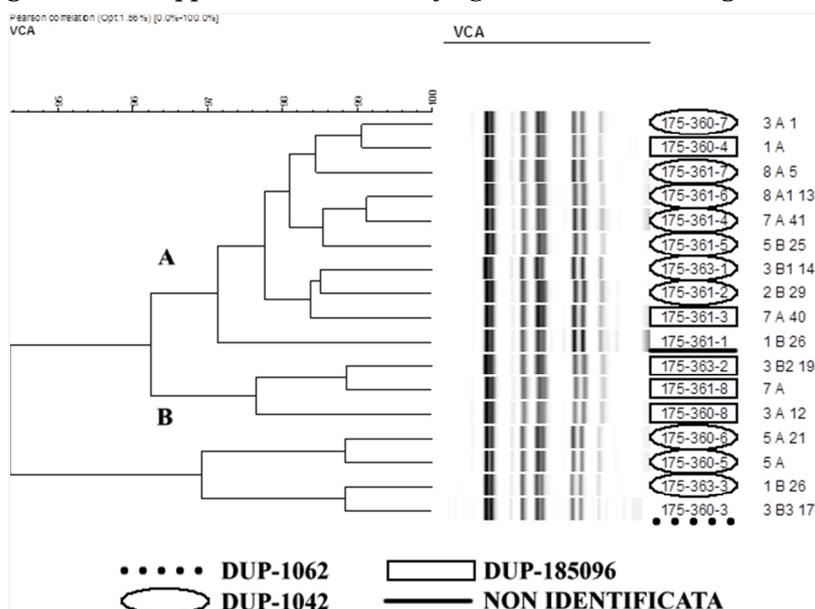
di inibizione, considerando efficaci quei microrganismi in grado di produrre aloni ≥ 8 mm (4). Sui lattobacilli selezionati, al termine delle prove anti-*Listeria*, è stata effettuata la valutazione della produzione di gas, seminando i microrganismi in MRS broth con campanella di Durham, e la valutazione della resistenza antibiotica mediante *disk diffusion test* secondo il metodo Kirby-Bauer. Gli antibiotici testati sono stati i seguenti: Ampicillina (AMP10), Tetraciclina (TE30), Gentamicina (GM10), Kanamicina (K30) e Apramicina (APR15). Per testare la resistenza antibiotica è stato seminato 1 mL di soluzione batterica per spatolamento sul terreno di coltura; il titolo microbico è stato controllato mediante standard 0,5 di McFarland, corrispondente ad una concentrazione di 1.5 x 10⁶ UFC/g. Non avendo a disposizione dati relativi ai microrganismi in questione si è utilizzata una specie appartenente comunque alla famiglia dei batteri lattici: "*Streptococcus* spp. other than *S. pneumoniae*".

RISULTATI

Identificazione clonale di *Listeria monocytogenes*

Sono stati sottoposti a ribotipizzazione 17 ceppi di *L. monocytogenes* isolati dai 4 lotti testati. 10 sono stati identificati come DUP-1042, 5 come DUP-18596 e 1 come DUP-1062 (figura 1). Tutti ceppi isolati presentavano una elevata similarità; se si considera come valore limite 0,95 si possono evidenziare due gruppi distinti (A e B): il primo, composto in prevalenza dal DUP-1042 e il secondo dal DUP-18596.

Figura 1: Dendrogramma di ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati dai ritagli di salmone affumicato.



Isolamento ed identificazione dei lattobacilli

Sono stati identificati 80 ceppi di lattobacilli: 73 mediante metodica RAPD-PCR e 7 mediante sequenziamento rRNA 16S (4 *Carnobacterium maltaromaticum* e 3 *Carnobacterium divergens*).

Il microrganismo maggiormente presente è risultato essere *L. curvatus*, seguito da *L. sakei*;

C. divergens, *C. maltaromaticus* e *L. fuchuensis* rappresentavano solo una parte minoritaria della flora lattica (tabella 1). In particolare, tra i 32 ceppi di *L. curvatus* sono stati identificati 5 profili clonali (similarità $\geq 0,85\%$); tra i 31 ceppi di *L. sakei* sono stati identificati 8 profili clonali diversi, mentre i 7 ceppi di *C. divergens*, appartengono ad un solo profilo clonale.

Figura 2: Dendrogramma relativo ai lattobacilli isolati da ritagli di salmone affumicato identificati mediante metodica RAPD-PCR (73). Le lettere indicano i diversi raggruppamenti clonali identificati considerando un valore soglia di 0,85.

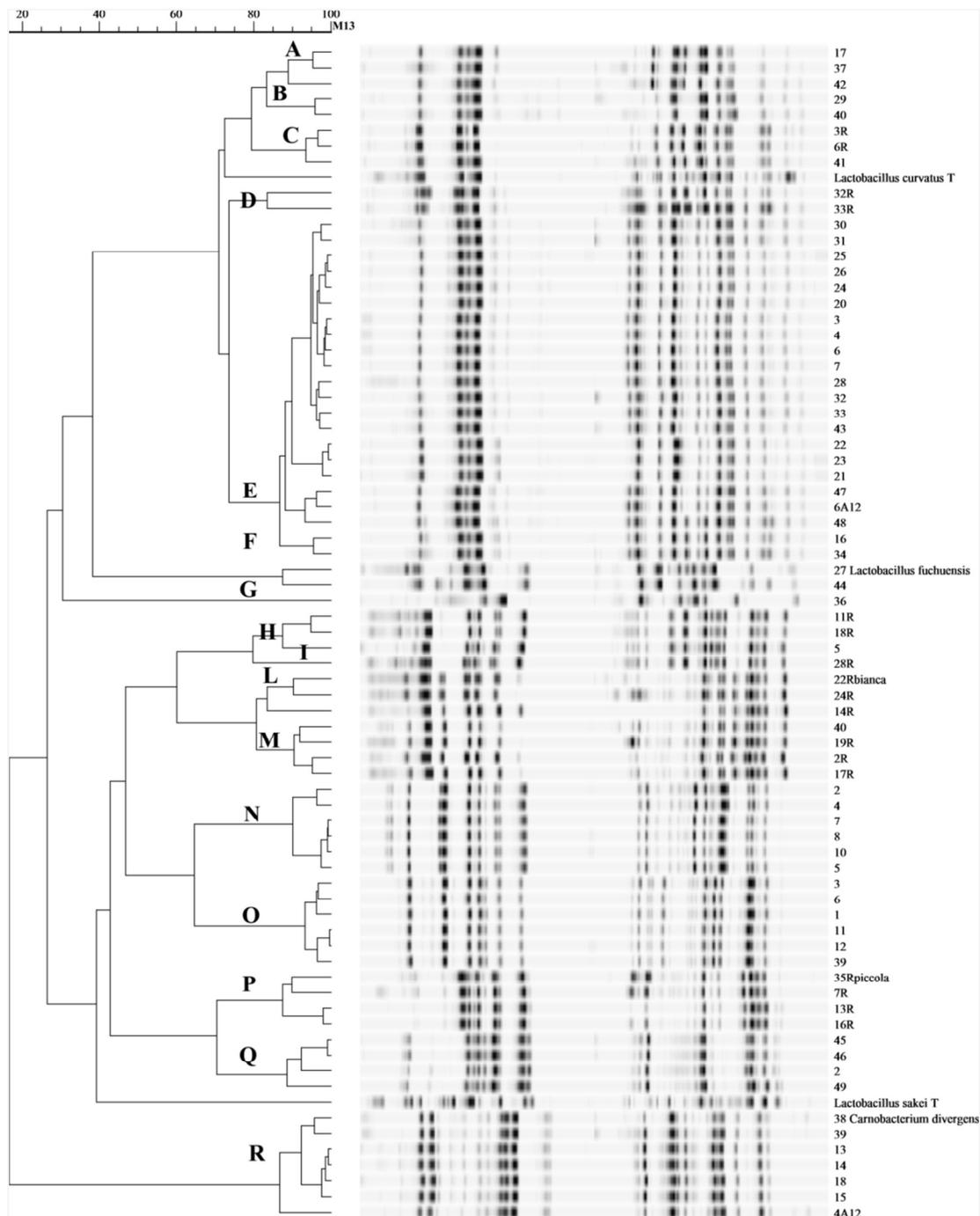


Tabella 1. Specie di batteri lattici identificate dai campioni di salmone affumicato.

Generi	<i>L. curvatus</i>	<i>L. sakei</i>	<i>Carnobacterium divergens</i>	<i>Carnobacterium maltaromaticus</i>	<i>L. fuchuisensis</i>
n.	32	31	10	4	2
%	40,0	39,0	12,5	5,0	2,5

Tabella 2. Risultati prove anti-listeria; - : < 8 mm ; + : ≥ 8 mm

Numero campione	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	<i>L. monocytogenes</i> DUP-1042	<i>L. monocytogenes</i> DUP-18596
3	-	+	-
6	-	+	-
11	+	+	+

Valutazione dell'attività anti-Listeria

Le colonie di lattobacilli identificate (80) sono state sottoposte alla valutazione delle loro proprietà inibenti nei confronti di *L. monocytogenes* ATCC 19115, *L. monocytogenes* DUP-1042 e DUP-18596 (queste ultime 2 isolate dal prodotto preso in esame). Nella tabella 2 sono riportati i risultati ottenuti. La capacità inibente dei lattobacilli è stata valutata basandosi sulla formazione degli aloni di inibizione. Degli 80 ceppi testati solo 3 sono risultati positivi alla prova.

I batteri che hanno dato esito positivo sono stati identificati come *L. sakei* profilo O (figura 2). Tutti i campioni selezionati hanno mostrato azione inibente nei confronti del clone *L. monocytogenes* DUP-1042, quello con una percentuale di isolamento più elevata. Il campione 11 ha mostrato attività anti-Listeria nei confronti di tutti i cloni di *L. monocytogenes* testati.

Valutazione della produzione di gas e test di resistenza antibiotica

L. sakei è un eterofermentante facoltativo; si è reso quindi necessario effettuare prove di produzione di gas: i test sono risultati negativi per tutti i ceppi testati. Le prove di resistenza antibiotica eseguite sui lattobacilli selezionati hanno mostrato esclusivamente sensibilità alla tetraciclina.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

L. monocytogenes è un microrganismo potenzialmente patogeno largamente diffuso nel salmone affumicato, la cui replicazione nel corso

della conservazione non può essere bloccata dalle condizioni del prodotto (elevata concentrazione salina, presenza di fenoli, confezionamento sottovuoto) (5). I prodotti ittici, pur essendo frequentemente contaminati da questo microrganismo, non sono però generalmente associati a casi di listeriosi umana (6); questo fenomeno è dovuto alla presenza di differenti gruppi clonali che presentano un diverso potenziale di patogenicità (7). Nel presente lavoro i microrganismi sono stati identificati confrontando i pattern ottenuti con quelli presenti nella libreria del Riboprinter: delle 17 colonie di *L. monocytogenes*, isolate dai campioni di ritagli di salmone affumicato, la ribotipizzazione ha permesso di assegnare 3 diversi ribotipi. Di questi, il DUP 1042 è stato precedentemente isolato anche in casi di listeriosi umana, (8) rivelando quindi un elevato grado di patogenicità nei confronti dell'uomo. Per mantenere il più possibile sotto controllo la crescita di *L. monocytogenes* nel salmone affumicato sono state testate diverse sostanze, in particolare il nitrato di sodio ed il lattato di sodio. Tuttavia l'applicazione di questi additivi o interferisce con le caratteristiche sensoriali o non è ben accettata dal consumatore o, come per il nitrato, non è ammessa in UE. Una valida alternativa può essere pertanto rappresentata dalla biopreservazione del prodotto mediante l'utilizzo di colture di batteri lattici i quali rappresentano la flora dominante già dopo 3 settimane di conservazione sottovuoto a regime refrigerato. I lattobacilli isolati con maggiore frequenza nei ritagli di salmone affumicato sono risultati appartenere alle specie *L. curvatus* e *L. sakei*: questi microrganismi da soli rappresentavano infatti il 79% del totale. Tali

risultati sono in accordo con quanto riscontrato da altri autori; resta comunque da segnalare l'elevata variabilità evidenziata nelle diverse sperimentazioni condotte (9). La valutazione della capacità biopreservante è da verificare sul singolo ceppo microbico, dato che è legata al clone; è quindi necessario effettuare prima una identificazione dei lattobacilli isolati ed un loro raggruppamento nei diversi profili. I lattobacilli isolati ed identificati sono stati sottoposti alla valutazione delle proprietà anti-*Listeria* e solo 3, appartenenti alla specie *L. sakei* profilo clonale O, sono risultati efficaci (il 9,68% dei *L. sakei* presenti nei ritagli di salmone). Questi ceppi sono inoltre risultati negativi alla produzione di gas, sensibili alla tetraciclina e resistenti a tutti gli altri antibiotici testati. La resistenza antibiotica è un fattore particolarmente importante da considerare quando si selezionano colture batteriche. I lattobacilli sono solitamente sensibili alla famiglia delle penicilline e ad antibiotici che inibiscono la sintesi proteica come ad esempio la tetraciclina, la kanamicina e la gentamicina (10). In bibliografia però sono comunque riportate numerose segnalazioni di antibiotico-resistenza da parte di batteri lattici (11). Nel nostro studio l'unico antibiotico efficace è risultato essere la tetraciclina. Negli Stati Uniti la FDA ha classificato i batteri lattici come Generally Recognized as safe (GRAS), ma il punto di vista europeo è più severo, infatti lo Scientific Committee of Animal Nutrition (SCAN) suggerisce un'ulteriore verifica mediante criteri specifici.

In conclusione, i dati ottenuti *in vitro* si sono dimostrati promettenti: i ceppi selezionati verranno quindi utilizzati in un successivo studio per confermare l'azione inibente nei confronti di *L. monocytogenes* su campioni di salmone affumicato.

BIBLIOGRAFIA

1. Leroi F. (2002). La microbiologie du saumon fumé à froid: aspects hygiéniques et qualité. *Revue générale du froid* 1028, 354-363.
2. Bruce J. (1996). Automated system rapidly identifies and characterizes microorganisms in food. *Food Technology* 50, 77-81.
3. Andrighetto C., Borney F., Barmaz A., Stefanon B., Lombardi A. (2002). Genetic diversity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Italian traditional cheeses. *International Dairy Journal* 12, 141-144.
4. Tomè E., Pereira V.L., Lopes C.I., Gibbs P.A., Teixeira P.C. (2008). *In vitro* tests of suitability of bacteriocin-producing lactic acid bacteria, as potential biopreservation cultures in vacuum-packaged cold-smoked salmon. *Food Control* 19, 535-543.
5. Beaufort A., Rudelle S., Gnanou-Besse N., Toquin M.T., Kerouanton A., Bergis H., Salvat G. (2006). Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated cold-smoked salmon. *Letters in Applied Microbiology* 44, 406-411.
6. Norton D.M., Scarlett J.M., Horton K., Sue D., Thimothe J., Boor K.J., Wiedmann M. (2001). Characterisation and Pathogenic Potential of *Listeria monocytogenes* isolated from the smoked fish industry. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 646-653.
7. Wiedmann M., Bruce J.K., Keating C., Johnson A., McDonough P.L., Bat C.A. (1997). Ribotypes and virulence gene polymorphism suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences pathogenic potential. *Infection and Immunity* 65, 2707-2716.
8. Gendel S.M., Ulaszek J. (2000). Ribotype Analysis of Strain Distribution in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 63, 179-185.
9. Truelstrop-Hansen H., Huss H.H. (1998). Comparison of the microflora isolated from spoiled cold-smoked salmon from three smokehouses. *Food Research International* 31, 703-711.
10. Ammor M.S., Flòrez A.B., Mayo B. (2006). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology* 24, 559-570.
11. Mathur S., Singh R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. *International Journal of Food Microbiology* 105, 281-295.

Lavoro finanziato dal Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (MIUR), PRIN 2007, prot. 2007M9ABNA-001.