

# Impiego dei Batteri Lattici Autoctoni per la Bioconservazione dei Prodotti Vegetali della Quarta Gamma.

## **RISULTATI**

### **Attività svolta presso l'Università S.Cuore di Piacenza.**

Per incrementare l'effetto antagonista di colture lattiche selezionate verso il microbiota patogeno e di "alterazione", è stato ampliato il suo spettro d'azione utilizzando colture protettive composte da diversi ceppi di LAB, appartenenti o meno alla stessa specie, dotate di differenti specificità di inibizione. In questa fase sono stati selezionati ceppi di LAB mesofili isolati dal microbiota autoctono di prodotti di IV gamma: a) dell'Azienda produttrice; b) già disponibili nella collezione dell'Istituto di Microbiologia dell'UCSC.

La prima selezione degli isolati dotati di attività inibenti è stata effettuata mediante il cosiddetto *deferred method (metodo differito)* che prevede l'inclusione in piastra, in sequenza differenziale, prima dei ceppi indicatori e poi di colonie del ceppo inibitore.

Complessivamente, gli isolati dotati di attività inibitoria sono stati 11. Dai dati si può concludere che l'azione verso la *Listeria* è meno evidente rispetto agli altri patogeni. Fra i ceppi di LAB disponibili nella collezione dell'Istituto di Microbiologia dell'UCSC il *Lactobacillus casei* tov 34 ha mostrato un ampio spettro d'azione.

I ceppi *Lactobacillus casei* tov 34 e *Lactobacillus plantarum* 4, in combinazione, possano esercitare una azione complementare contro tutti i patogeni testati.

### ***Inibizione dei patogeni su porzioni di foglia***

Si è osservato che l'inibizione è efficace su tutti i patogeni: l'effetto più spiccato è espresso nei confronti di *A. hydrophila* e *E. coli*, mentre per quanto riguarda *L. monocytogenes* si può concludere che la coltura protettiva produce un effetto battericida, ma con una dinamica meno veloce rispetto alle due specie precedenti. Infatti, mentre i LAB sembrano garantire una riduzione di circa 6 Log ufc/g per *A. hydrophila* e *E. coli*, rispetto al riferimento, nell'arco dei 6 giorni di conservazione alla temperatura di abuso di 8°C, nei confronti di *L. monocytogenes* la riduzione è di poco meno di 3 Log ufc/g.

Infine l'efficacia verso *S. typhimurium* è risultata di circa 4.8 Log ufc/g nell'arco di tempo di conservazione considerato.

La apparente lentezza con cui la coltura protettiva riesce ad azzerare la presenza dei patogeni considerati, non deve essere considerata in modo negativo: infatti, va tenuto ben presente che la bioprotezione non è da considerarsi un metodo di disinfezione, ma piuttosto un sistema preventivo di protezione dalla riproduzione incontrollata delle specie patogene.

Sulla base dei risultati conseguiti in questa fase si può concludere che:

- le prove di inibizione in vitro verso i patogeni delle 4 specie considerate, hanno permesso di selezionare alcuni isolati di batteri lattici dotati di differenti spettri di inibizione;
- la classificazione tassonomica su base biochimica e molecolare ha permesso di escludere alcuni isolati del genere *Enterococcus*;
- gli esperimenti challenge su porzioni di foglia, simulanti le condizioni reali di contaminazione e di conservazione, hanno portato alla scelta di una associazione di due ceppi da usare (50:50) come coltura antagonista, ad ampio spettro, nella sperimentazione in azienda:
  - 1) *Lactobacillus casei* tov 34, dotato di ampio spettro di inibizione
  - 2) *Lactocillus plantarum* 4 più specifico nei confronti di *Listeria monocytogenes*;
- gli studi di ecologia microbica hanno permesso di interpretare gli effetti di inibizione osservati e difficilmente riscontrabili in altre matrici alimentari: la localizzazione prevalente della coltura protettiva nelle micro-nicchie della fillosfera, occupate dai patogeni, permette una inibizione fortemente localizzata e quindi altamente efficace;
- Infine, va sottolineata l'importanza dell'entità di inoculo: la somministrazione della coltura inibente, finemente nebulizzata, a livelli di popolazione di 6/7 log UFC stimola l'espressione dell'effetto inibente attraverso l'attivazione dei meccanismi di segnalazione cellula-cellula

che stanno alla base del cosiddetto *quorum sensing*. Per ottenere questo scopo la coltura aggiunta non necessita di uno sviluppo intenso, spiegando così la limitata variazione di pH (0.1-0.2 unità) nei campioni sperimentalmente trattati.

### **Attività svolta presso l'az. Coop Bettolino di Reggiolo (RE)**

Sono state realizzate prove per verificare il metodo migliore di somministrazione della coltura batterica. Il sistema di somministrazione risultato più idoneo è stato quello spray; infatti la fine nebulizzazione della coltura, unitamente ad un sistema di copertura delle sezioni nella quale viene effettuata la spruzzatura, hanno richiesto quantitativi di biomassa equivalenti a  $10^{12}$ - $10^{13}$  ufc per trattare 10 Kg di prodotto; in tali condizioni la concentrazione finale dei LAB sull'insalata risulta di  $10^6$ - $10^7$  ufc/g.

Per ottenere gli stessi carichi con il sistema dell'immersione, è necessaria una biomassa 10x superiore, rendendo il processo economicamente inapplicabile.

Sulla base dei risultati ottenuti sono state effettuate prove di inibizione, condotte su campioni prodotti all'interno dell'azienda.

In tutte le prove non sono state rilevate differenze di entità del processo di imbrunimento enzimatico, inclusi i campioni alterati

Gli andamenti delle popolazioni microbiche dei Coliformi totali e di *E. coli*, riferiti alle stesse serie di sperimentazioni, confermano i risultati osservati nelle prove di *challenge* effettuate su porzioni di foglia, per quest'ultima specie: infatti la sua presenza non è più riscontrabile già al secondo giorno di conservazione sia a 4 che a 18°C. In particolare la differenza tra il campione con l'aggiunta della coltura protettiva presenta una differenza di circa 1.5 Log ufc/g, rispetto al testimone, al 2° giorno a 18 °C.

Infine, le prove di contaminazione artificiosa dei campioni, effettuate con i gruppi patogeni di cui alle suddette prove *challenge*, hanno fornito risultati sostanzialmente gli stessi risultati di queste ultime.

L'efficacia dell'azione dei due tipi di agente inibitore (Cloro e colture batteriche) è stato evidente in entrambi i casi. Tuttavia va sottolineata una sostanziale differenza tra gli effetti, che deriva dal diverso meccanismo dell'inibizione: la cinetica di azione dell'additivo è immediata, producendo una riduzione di circa 1 ciclo logaritmico nella popolazione PCA entro le prime 24 ore, mentre i campioni trattati con la coltura protettiva risentono del suo effetto progressivamente nel periodo di conservazione fino a superare l'effetto corrispondente a quello dell'additivo. Al contrario, nel caso di temperature di abuso, la stima dei gruppi "coliformi totali ed *E. coli*, dimostra una loro ripresa già entro le 24 ore; da ciò si differenziano in modo evidente i campioni dei trattamenti con i LAB.

Al riguardo deve essere richiamata l'attenzione sulla possibilità che le cellule sopravvissute all'azione dell'additivo possano, durante la conservazione, riprendere la crescita vanificando il processo di sanificazione; al contrario, la coltura protettiva mantiene attivo il suo effetto durante l'intero periodo di stoccaggio ed inoltre in modo proporzionale alla temperatura d'abuso: infatti, mentre l'additivo è caratterizzato da una durata tanto più breve (a seconda della sua natura) quanto più rapido è il suo effetto, la base del concetto di bioconservazione si fonda sulla capacità della coltura vitale di esprimere l'inibizione in funzione delle condizioni ambientali (temperatura).

Sulla base dei risultati conseguiti in questa fase si può concludere che:

- le prove di somministrazione hanno dimostrato l'efficacia del sistema per sprayzzazione; l'efficacia può essere ulteriormente migliorata adottando appropriati ugelli di nebulizzazione;
- la coltura protettiva, è efficace anche alle temperature di abuso riducendo sia il rischio microbiologico che la deperibilità del prodotto; data l'importanza di questi aspetti, ulteriori approfondimenti possono ottimizzare il livello di somministrazione garantendo sicurezza microbiologica e minimo effetto alterante;
- la bioconservazione con colture lattiche miste si propone come valida alternativa ai lavaggi con acqua contenente sanitizzanti ( $Cl_2$  attivo) in virtù del suo effetto prolungato. Non va

comunque tralasciato un efficiente processo di lavaggio che permetta alla coltura protettiva di esercitare al meglio la sua funzione su un prodotto di accettabile contaminazione.